

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO- MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

MIKROFLORA I ZDRAVLJE

MICROFLORA AND HEALTH

SEMINARSKI RAD

Leona Radmanić

Preddiplomski studij biologije

(Undergraduate Study of Biology)

Mentor: prof.dr.sc. Nada Oršolić

ZAGREB,2014.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	3
2. LITERATURNI PODACI.....	4
1.1. Promjena metabolizma crijevne mikroflore.....	4
1.2. Deaktivacija kancerogenih spojeva.....	5
1.3. Natjecanje trulih i malih mikrobiota.....	5
1.4. Inhibicija signalnim putovima pomoću tirozin kinaze.....	6
1.5. Bakterije mliječne kiseline u fermentiranim prehrambenim produktima biljnog podrijetla.....	7
2. Utjecaj fenola na rast i vijabilnost bakterija mliječne kiseline	
2.1. <i>L. plantarum</i>	10
3. Ostale vrste bakterijske mliječne kiseline.....	11
4. Probiotičke bakterije u prevenciji i terapiji dijareje.....	12
4.1. Značenje liječenja dijareje u svijetu.....	12
4.2. Različiti oblici dijareje.....	13
5. Probiotički koncept probiotika kao dodataka hrani i kao bioterapeutika.....	14
5.1. Funkcionalna svojstva probiotičkih bakterija.....	14
5.2. Proizvodnja probiotika kao živih lijekova.....	15
3. LITERATURA.....	17
4. SAŽETAK.....	21
5. SUMMARY.....	21

1.UVOD

Gastrointestinalni sustav predstavlja složeni ekosustav u kojem se uspostavlja ravnoteža između domaćina i crijevne mikroflore koju čine fakultativni i obvezatni anaerobi. Otprilike 95% crijevne bakterijske populacije kod ljudi čine obvezatni anaerobi poput *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus* i *Bacteroides*, dok 1-10% crijevne populacije čine fakultativni anaerobi poput *Lactobacillus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* i *Bacillus*. Crijevna mikroflora je važna za sazrijevanje imunološkog sustava, razvoj normalne crijevne morfologije, održavanje kroničnog i imunološki posredovanog upalnog odgovora, održavanje funkcije crijevne sluznice, obranu od alergena te pomaže u prevenciji od pričvršćivanja patogenih mikroorganizama. Probiotici su živi mikroorganizmi koji, kada se daju u odgovarajućim količinama, mogu dati zdravu korist na domaćinu i najčešće pripadaju mliječno-kiselim bakterijama (LAB), a brojni znanstvenici su istraživali njihovo zaštitno djelovanje protiv tumora. Molekularne analize pokazale su ohrabrujuće rezultate koji podržavaju ulogu probiotika u prevenciji raka debelog crijeva. Rak debelog crijeva jedan je od glavnih problema u svijetu te predstavlja najčešći malignitet gastrointestinalnog sustava. Rak debelog crijeva je četiri puta učestaliji u razvijenijim zemljama nego u zemljama u razvoju, a to je zbog razlike u prehranbenim navikama i stilu života. Epidemiološka istraživanja pokazala su da je konzumacija crvenog mesa i životinjske masti povezana s povećanim rizikom za razvoj raka debelog crijeva, dok prehrana bogata povrćem i voćem čini zaštitu protiv nastanka raka debelog crijeva. Veza između prehrane i raka debelog crijeva može biti zbog neravnoteže crijevne mikroflore. Normalna dobra mikroflora sastoji se od bakterijskih vrsta s morfološkim, fiziološkim i genetskim osobinama koje će pustiti da se koloniziraju i množe pod posebnim uvjetima na određenim mjestima, koje će koegzistirati s drugim kolonizacijskim mikroorganizmima i konkurentno inhibirati rast patogenih bakterija. Ipak, neki okolišni čimbenici kao što su prehrana i droge mogu mijenjati sastav mikroflore s posljedicama negativnim za zdravlje pojedinca. Mehanizam kojim probiotik može spriječiti rak debelog crijeva uključuje par koraka: promjena intestinalne mikroflore, inaktivacija kancerogenih spojeva, natjecanje s patogenim mikrobiotima, poboljšanje imunskog odgovora domaćina, anti- proliferativni učinak putem regulacije apoptoze i diferencijacije stanica, fermentacija neprobavljene hrane, inhibicija tirozin kinaze signalnim putovima.

Također, u posljednjih nekoliko godina, znanstvenici i proizvođači hrane postali su sve više zainteresirani za fenolne spojeve. Fenolni spojevi su važni sastojci prehranbenih proizvoda biljnog podrijetla. Razlog za taj interes su njihova antioksidativna svojstva,

njihovo veliko obilje u našoj prehrani te njihova vjerovatna uloga u prevenciji raznih bolesti povezanih sa oksidativnim stresom, kao što je rak, te bolesti krvožilnog sustava i degenerativne bolesti (Manach i sur.,2004). Fenoli su skupina spojeva koji se sastoji od hidroksilne skupine (-OH) vezane izravno na ugljikovodik. Jače su kiseline od alkohola jer se aromatski prsten uže veže s kisikom te je veza između vodikovog i kisikovog atoma relativno slaba. Kiselost hidroksilne skupine kod fenola na ljestvici je negdje između alifatskih spojeva i karboksilnih kiselina. Fenolni spojevi su razmatrani kao nutritivno nepoželjni jer talože proteine, inhibiraju probavne enzime i utječu na korištenje vitamina i minerala te na smanjenje prehrambene vrijednosti namirnica. Međutim, nedavno istraživanje pokazalo je da su fenolni spojevi korisni za zdravlje zbog svojih kemoprevencijskih aktivnosti protiv karcinogeneze i mutageneze. Osim što imaju prehrambena i antioksidativna svojstva, fenolni spojevi utječu na svojstva hrane kao što su okus, trpkost i boje. Fenoli mogu doprinijeti mirisu i okusu brojnih prehrambenih proizvoda biljnog podrijetla. Voće, povrće i pića, kao što je čaj, glavni su izvori fenolnih spojeva u ljudskoj prehrani (Kapur i Kapoor, 2001; Dimitrios, 2006). Mediteranska prehrana uključuje fermentirano povrće u hrani, kao što su masline, za koje su fenolni spojevi odgovorni za prehrambena svojstva. Bakterije mliječne kiseline (LAB) su autohtoni mikrobiota sirovog povrća. *Lactobacillus plantarum* je komercijalni starter koji se najčešće koristi u fermentaciji prehrambenih proizvoda biljnog podrijetla. LAB su široko dostupni npr. u jogurtu, siru, fermentiranom i filtriranom mlijeku, sokovima, žitaricama. Brojna istraživanja u životinjskim modelima i u ljudskoj populaciji su pokazala da je konzumacija probiotika u raznim medicinskim stanjima kao što su netolerancija na laktozu, antibioticima uzrokovani proljev, gastroenteritis, zatvor i infekcija genitourinarnog sustava.

LITERATURNI PODACI

1.1. Promjena metabolizma crijevne mikroflore

Glukuronidna konjugacija jedna je od glavnih metaboličkih funkcija u jetri te je izuzetno važna za metabolizam hormona, kao i za inaktivaciju toksina i kancerogenih spojeva endogenog i egzogenog podrijetla što rezultira polarnim metabolitima da se učinkovito eliminiraju u žuči. Dekonjugacija tih glukuronida u crijevu pomoću bakterijske β -glukuronidaze, dovodi do otpuštanja aglikona koji su potencijalno kancerogene tvari. Fekalni bakterijski enzimi- azoreduktaze i nitroreduktaze, kataliziraju oslobađanje prokancerogenih tvari u crijevima. Jedan od mogućih mehanizama smanjenja rizika za početak raka debelog crijeva je promjenom crijevnog metabolizma, tj. modulacijom djelovanja tih bakterijskih enzima. U istraživanjima je pokazano da hranjenje jogurtom može smanjiti razinu β -glukuronidaze i nitroreduktaze sadržane u debelom crijevu miševa koji imaju rak debelog crijeva. Nadalje, Goldin i Gordbach (1984) su pokazali da se smanjuje fekalna aktivnost enzima nakon hranjenja *Lactobacillus acidophilus* u životinjskim modelima. Nakon što je prestalo bakterijsko hranjenje, fekalna razina enzima

se vratila u normalu nakon četiri tjedna što je pokazalo da kontinuirano uzimanje ovih organizama je potrebno enzimima koji će se održavati u mikroflori. Na primjer, Marteau i suradnici (1990) su pokazali smanjenje nitroreduktazne aktivnosti nakon tri tjedna konzumiranja fermentiranih mliječnih proizvoda koji sadrže *L. acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum* te mezofilne kulture (*Streptococcus lactis* i *Streptococcus cremoris*), dok β -glukuronidaza i azoreduktaza se ne mjenjaju. Ti rezultati su pokazali da je sposobnost modulacije fekalnih enzima bakterijske aktivnosti karakterističan i specifičan soj probiotika.

1.2. Deaktivacija kancerogenih spojeva

Analize 15 istraživanja su pokazale da je relevantni rizik za razvoj raka debelog crijeva kod ispitanika koji jedu crvenom meso u većoj mjeri u uspoređi s ljudima koji jedu crveno meso u manjim količinama. Za objašnjenje tog odnosa napravljeno je nekoliko hipoteza.

Heterociklički aromatski amini (HCA) su formirani kao rezultat mesa na visokim temperaturama. Crijevna mikroflora može aktivirati HCA svojim aktivnim derivatima kao što su npr. mutageni pirolizni 3-amino-1,4-dimetil-5H-pirido-(4,3-b) indol 2 (Trp-P-1), 3-amino-1-metil-5H-pirido-(4,3-b) indol (Trp-P-2) te brojni drugi. Takve snažne mutagene tvari mogu djelovati na sluznicu debelog crijeva što uzrokuje tumorigenetske mutacije. Mliječno-kisele bakterije i druge bakterije su pronađene da metaboliziraju nekoliko kancerogena, uključujući HCA i N-nitrozne spojeve. Jedan od glavnih mehanizama uklanjanja karcinogena iz ljudskog tijela bi moglo biti vezivanje ili razgradnja HCA pomoću probiotika. Orrhage i sur. (1994) su istraživali *in vitro* kapacitet neke bakterije mliječne kiseline te vezali mutagenu HCA koja je formirana tijekom kuhanja bjelančevinaste hrane. Pomoću HPLC su analizirali vezanje mutagena Trp-P-2, PhIP, IQ i MeIOx u bakterijskim sojevima. Trp-P-2 je bio gotovo potpuno i nepovratno vezan uz PhIP, te je to glavni mutagen u zapadnoj prehrani koji je dosegao oko 50%. Sreekumar i Hosono (1998) su pokazali da su različiti sojevi *Lactobacillus* i *Bifidobacterium gasserii longum* čvrsto vezani za Trp-P-1 i Trp-P-2. U novijim istraživanjima Nowak i Libudzisz (2009) su pokazali da *Lactobacillus casei DN 114001* raste i preživi u prisutnosti IQ, MeIQx i PhIP te smanji njihovu koncentraciju. Probiotska sposobnost da se veže ili metabolizira toksične spojeve ovisi o pH i drugim fizičkim uvjetima. Svi ti rezultati pokazuju da se detoksifikacija mutagenih spojeva hrane obično nalazi u zapadnoj prehrani bogatoj mesom, što može biti jedan od glavnih mehanizama koji antagoniziraju bakterije mliječne kiseline za početak nastanka raka debelog crijeva.

1.3. Natjecanje trulih i patogenih mikrobiota

Gastrointestinalni sustav, posebice u debelom crijevu, naseljen je brojnim bakterijama. Iako je većina crijevnih bakterija benigna, neke su vrste akutne pa mogu biti uključene u početke akutnih i kroničnih poremećaja, uključujući rak debelog crijeva. Utvrđeno je da prehrana bogata životinjskim mastima stimulira rast sekundarne žučne soli za proizvodnju bakterija, pa su daljnja istraživanja pokazala da su sekundarne žučne soli

citotoksične i kancerogene. Prehrana bogata crvenom mesom također olakšava rast sulfat-reducirajućih bakterija koje proizvode hidrogen sulfid za koji je eksperimentalno poznato da je genotoksičan. Rafter i sur. (2007) su otkrili sinbiotičku kombinaciju specifičnih oligofruktosaharida obogaćenih inulinom s probioticima koji povećavaju broj nekih skupina mliječno-kiselih bakterija, dok je broj *Clostridium pefringens* znatno smanjen što pozitivno utječe na rak debelog crijeva pacijenta. Potrošnja probiotika pokazala je učinkovitost na promjene u gastrointestinalnoj mikroflori sa značajnim smanjenjem koliformnih bakterija te povećanje bakterija mliječne kiseline. Dakle, probiotici mogu spriječiti razvoj raka debelog crijeva kroz mehanizam tržišnog natjecanja s patogenim crijevnim mikrobiotima. Poboljšanje imunološkog odgovora domaćina igra važnu ulogu u kontroli promocije i kod rasta tumora. Yokokura i sur. (1981) su pokazali djelovanje anti-tumorskih učinaka, a osobito visok potencijal je pokazao *Lactobacillus casei Shirota* (LcS). Taj soj nije izravno citotoksičan za stanice tumora *in vitro*. Oralna primjena LcS je izazvala blagotvoran utjecaj na ljude i životinje kao i anti-tumorsku aktivnost protiv stanica raka mokraćnog mjehura u ljudi u kliničkim istraživanjima. LcS je pokazao da posjeduje snažan anti-tumorski i anti-metastatski učinak na stanice tumora i kemijski inducirani proces karcinogeneze u glodavaca. Protu-tumorski učinak LcS temelji se na regulaciji imunogenog odgovora te inhibiciji 3-metilkolantrenom-inducirane karcinogeneze u miša. Taj model je prisutan kod poticanja brojnih oblika tumora, uključujući rak debelog crijeva. Mogući mehanizam prevencije karcinogeneze je proliferacija i aktivacija NK stanica (engl. natural killer, NK). NK stanice su veliki zrnati limfociti nastali u koštanoj srži i imaju kritičnu ulogu u imunogenom nadzoru protiv razvoja tumora. Dendritičke stanice (engl. dendritic cells, DCs) su druge moguće izvršne stanice koje potaknute LcS i probioticima te predstavljaju ključne stanice u predočavanju antigena i u proizvodnji citokina. Oralno davanje LcS stimulira pomoćničke stanice T(Th1), aktivira stanični imunogeni sustav i inhibira pojavnost tumora kao i proizvodnju IgE u miševa. LcS zasigurno suprimira tumorogenezu u miša. Ostali probiotički sojevi također pokazuju značajna imuno-zaštitna svojstva kroz povećanje specifičnih i nespecifičnih mehanizama koji imaju anti-tumorske učinke.

1.4. Inhibicija tirozin kinaze signalnim putovima

Signalni putovi su zastupljeni u nizu biokemijskih reakcija gdje stanice komuniciraju s izvanstaničnim okolišom. Signalni putovi su aktivirani receptorima i citoplazmatskim proteinima tirozin kinazne aktivnosti i imaju važnu ulogu u karcinogenezi. *Saccharomyces boulardii* (SB) je sigurnosni probiotički pripravak koji se koristi za sprečavanje ili liječenje raznih humanih poremećaja probavnog sustava. *Saccharomyces boulardii* regulira upalni odgovor crijevne sluznice kroz modulaciju signalnih putova domaćina. SB regulira MA-PK signalne putove koji se nalaze nizvodno od mnogih rastućih receptornih faktora, uključujući epidermalni faktor rasta- receptor (EGFR). EGF receptor se sastoji od četiri člana: ErbB1/ EGFR/HER1, ErbB2/HER2/Neu, erbB3/HER-3 i ErbB4/HER-4 koji su važni za razvoj raka. SB sprječava formiranje kolonija stanica raka, smanjuje EGF staničnu proliferaciju i povećava apoptozu. Probiotici mogu spriječiti

EGFR i signalizaciju drugih tirozin kinaznih puteva i time mogu poslužiti kao novi terapijski pripravci ili imati profilaktičku ulogu u intestinalnim malignomima.

1.5. Bakterije mliječne kiseline u fermentiranim prehrambenim proizvodima biljnog podrijetla

Povrće je preporučljivo u ljudskoj prehrani jer je bogato antioksidansima, vitaminima, prehrambenim vlaknima i mineralima. Najveći dio povrća koji se konzumira u ljudskoj prehrani je svjež, minimalno obrađeno, pasterizirano ili kuhano. Svjež i minimalno obrađeno povrće ima kratak životni vijek jer je pod utjecajem brzog mikrobiološkog kvarenja i razni kuhinjski procesi bi mogli dovesti do nepoželjnih promjena u fizikalnim i kemijskim svojstvima. Fermentacija pomoću bakterija mliječne kiseline se može smatrati jednostavnom biotehnologijom za održavanje i poboljšanje sigurnosti te roka trajanja svojstva povrća i ima industrijski značaj za krastavce, kupus i masline. Važni čimbenici koji utječu na vrenje i kvalitetu proizvoda su sastav mikrobiota i njihov razvoj. LAB čine mali dio hranidbenih mikrobiota sirovog povrća. Spontane fermentacije koje se događaju proizlaze iz konkurentskih aktivnosti raznih autohtona i kontaminirajućih mikroorganizama. Mikroorganizmi koji su najbolje prilagođeni uvjetima fermentacije na kraju će dominirati. Iniciranje spontanog procesa traje relativno dugo s visokim rizikom za neuspjeh. Neuspjeh fermentacije može dovesti do kvarenja i opstanka patogena, čime se stvaraju neočekivani rizici u prehrambenim proizvodima. Korištenje starter kultura se preporuča zbog higijene i sigurnosti jer će dovesti do brzog zakiseljavanja produkta, a time i do inhibiranja rasta kvarenja i patogenih bakterija. Samo nekoliko kultura se koristi biljnom fermentacijom. *Lactobacillus plantarum* je komercijalni starter koji se najčešće koristi u fermentaciji krastavaca, kupusa i maslina (Ruiz-Barba sur., 1994; Vega Leal- anchez i sur., 2003). *L. plantarum* i *Lactobacillus pentosus* se smatraju glavnim vrstama LAB koje igraju važnu ulogu u fermentaciji maslina te se koriste kao starteri, iako su izolirane i druge vrste LAB poput *Leukonostok mesenterius*, *Leukonostok pseudomesenterius* ili *Pediococcus pentosaceus* (Ruiz i Barba Jimenez-Diaz, 1994; Ruiz-Barba i sur., 1994; Nychas i sur., 2002; Panagou i sur., 2003; Vega Leal-Sanchez i sur., 2003; Ercolini i sur., 2006; Chamkha i sur., 2008; Hurtado i sur., 2008). Četiri vrste LAB su otkrivene kao organizmi koji su prisutni u fermentaciji kiselog kupusa: *L. mesenterius*, *Lactobacillus brevis*, *P. pentosaceus* i *L. plantarum*, iako su novija istraživanja pokazala da je više vrsta LAB prisutno u fermentaciji kao što je *Leukonostok citreum* i *Lactobacillus paraplantarum* (Plengvidhya i sur., 2007).

TABLICA 1. Glavne vrste LAB izolirane iz fermentiranog povrća

Izvor povrća	LAB vrste	References
masline	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Ruiz- Barba and Jimenez-Diaz, 1994;Ruiz- Barba i sur.,1994
	<i>Lactobacillus pentosus</i>	Nychas i sur., 2002
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Panagou i sur., 2003
	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	Vega Leal- Sanchez i sur., 2003
	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Ercolini i sur., 2006 Chamkha i sur.,2008 Hurtado i sur., 2008
kupus	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Lactobacillus brevis</i> <i>Pediococcus pentosaceus</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Leuconostoc citreum</i> <i>Lactobacillus paraplantarum</i>	Plengvidhya i sur.,2007
krastavci	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus brevis</i> <i>Lactobacillus pentosus</i> <i>Leuconostoc sp.</i> <i>Pediococcus sp.</i>	Tamminen i sur.,2004

patlidžan	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus fermentum</i> <i>Lactobacillus pentosus</i> <i>Lactobacillus brevis</i>	Sanchez i sur.,2004 Sesena i sur., 2005 Sesena I Palop,2007
bobičasto voće	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus paraplantarum</i> <i>Lactobacillus pentosus</i> <i>Lactobacillus brevis</i> <i>Lactobacillus fermentum</i>	Perez- Pulido i sur., 2007
Mošt od grožđa	<i>Oenococcus oeni</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus brevis</i>	Moreno- Arribas i sur.,2003 Rodas i sur., 2005

Preuzeto iz: Héctor Rodríguez, José Antonio Curiel , José María Landete, Blanca de las Rivas, Félix López de Felipe,Carmen Gómez-Cordovés, José Miguel Mancheño, Rosario Muñoz: Food phenolics and lactic acid bacteria, International Journal of Food Microbiology 132 (2009) 79–90

Slične vrste LAB koje se pojavljuju u fermentaciji krastavaca su *L. brevis*, *L. pentosus* i *Leukonostok spp.* (Tamminen i sur., 2004). Sojevi *L. mesenteroides*, *L. plantarum*, *Enterococcus faecalis*, *P. pentosaceus* i *L. fermentum* su otkriveni u sirovoj mrkvi, mahuni i šećercu (Di Cagno i sur., 2008). *L. plantarum* i *L. brevis* su starter kulture koje se najčešće koriste za fermentaciju sokova i povrća, na primjer autohtoni *L. plantarum* soj se koristi za povećanje zdravih i senzorskih svojstava soka od rajčice (Di Cagno i sur., 2009). U moštu i vinu najvažnija vrsta LAB i koja se primjenjuje kao starter kultura je *Oenococcus oeni*. S obzirom da su LAB mikrobi nađeni u biljnim fermentacijama, čini se da je samo nekoliko LAB vrsta dobro prilagođeno rastu u sirovom biljnom materijalu gdje ima fenolnih spojeva u izobilju.

2. Utjecaj fenola na rast i vijabilnost bakterija mliječne kiseline

2.1. *L. plantarum*

L. plantarum je komercijalni starter koji se najčešće koristi u fermentaciji biljnih prehrambenih proizvoda. Ograničen broj istraživanja je napravljen za proučavanje utjecaja fenolnih spojeva na rast i vijabilnost sojeva *L. plantarum*. Salih i sur. (2000) su pručavali kako djeluju hidroksicinaminska kiselina, njezini esteri i kininska kiselina na rast *L. plantarum* te ustanovili da je na rast bakterija utjecala hidroksicinaminska kiselina. Marsilio i Lanza (1998) su opisali da je rast *L. plantarum* značajno smanjen u prisutnosti od 1g/L p-kumarinske kiseline i povećana inhibitorna aktivnost u prisutnosti NaCl. Koncentracije niže od 0,5 g/L ne pokazuju inhibicijsku aktivnost protiv *L. plantarum*. Nekoliko autora je pručavalo učinke oleuropeina i njegovih proizvoda hidrolize na preživljavanje bakterija. Dobiveni rezultati su se razlikovali zbog korištenja različitih antibakterijskih metoda. Marsilio i Lanza (1998) su pokazali sposobnost *L. plantarum* da raste u prisutnosti oleuropeina, hidroksitirosola i p-kumarinske kiseline u kombinaciji s različitim koncentracijama NaCl. *L. plantarum* je dobro rasla u NaCl koncentracije do 60g/L, odgođen rast je bio od razine 80 g/L, a rast je bio potisnut od 100g/L NaCl. U svim uvjetima pod kojima je testirano, oleuropein u kombinaciji s NaCl značajno povećava rast bakterija i zato nema baktericidne učinke. Slični rezultati su dobiveni i u prisutnosti hidroksitirosola. U prisutnosti oleuropeina, gustoća stanica je veća nego s hidroksitirosolom jer glukoza iz hidrolizirane glukoze lako metabolizira *L. plantarum*. Landete i sur. (2008) su mjerili aktivnost inhibicije rasta devet maslinovih fenolnih spojeva protiv *L. plantarum* sojeva izoliranih iz različitih izvora. Niti jedan od ispitivanih spojeva (oleuropein, hidroksitirosol, tirosol, vanilijska, p-hidroksibenzojeva, sinapska, siringijska, protokatekuična i cimetna kiselina) nije inhibirao rast *L. plantarum* u proizvodnji maslina. Mehanizam inhibicije rasta nije potpuno jasan pa su predloženi različiti prijedlozi. Neki autori predlažu da oleuropein i njegovi proizvodi hidrolize izazivaju curenje glutamata i anorganskog fosfata od bakterijske staince. Oleuropein nije imalo utjecaja na stupanj glikolize kada se u stanice u mirovanju doda *L. plantarum*, ali izaziva smanjenje sadržaja ATP stanica (Juven i sur., 1972) te je to opisano kao baktericidno djelovanje fenolnih spojeva koji se odnose na promjene stanične stijenke i citoplazmatskih membrana (Ruiz. Barba i sur.,1990). Skeniranje elektrona mikrografski pokazalo je da nakon 24 sata inkubacije u fenolnim spojevima bakterijska površina *L. plantarum* postaje nepravilna i gruba te stanične stijenke postaju nepravilne također koje se pojavljuju na površini bakterije. Nakon 11 dana od inkubacije u fenolu stanična stijenka je gotovo nestala, a baktericidno djelovanje oleuropeina je popraćeno promjenama u tipičnoj bacilnoj strukturi *L. plantarum*. Autori sugeriraju da bi to moglo značiti da oleuropein potiče poremećaj peptidoglikana što bi moglo dovesti do stanične smrti uništenja stanične ovojnice.

3. Ostale vrste bakterija mliječne kiseline

Mali broj istraživanja je napravljen u vezi utjecaja fenolnih spojeva na rast i vijabilnost drugih vrsta u laboratoriju. Ta istraživanja su uglavnom usredotočena na vino i LAB vrste poput *O. oeni*, *L. brevis* i *L. hilgardii*. *O. oeni* je glavna vrsta LAB koja je uključena u malolaktičke fermentacije tijekom proizvodnje vina. Fenolni spojevi su važni sastojci crnog vina i potencijalno utječu na malolaktičku fermentaciju. Vivas i sur. (2000) su pokazali da groždani tanini, procijanidi, tanini hrastove šume i elagitanin neće imati isti učinak na *O. oeni*. Oligomerni procijanidi su snažni inhibitori koji utječu na bakterijsku održivost u uvjetima koji nisu povoljni za rast bakterija i malolaktičke djelatnosti. Naprotiv, čisti elagitanin se pokazao da je pogodan za održivost *O. oeni*. Ti autori su pokazali da elagitanin, kad oksidira ima jak inhibirajući učinak, za razliku od procijanida koji će izgubiti svu snagu kad oksidira. Salih i sur. (2000) su istraživali učinke sljedećih hidroksicinaminskih kiselina: ferulične, p-kumarinske, kafeinska, p-kumarol kininska, 5'-kavene, kininske nefenolne kiseline i kininske kiseline na rast *O. oeni*. Kininska kiselina nije bila aktivna i rast *O. oeni* je bio zbog koncentracije hidroksicinaminske kiseline. Slični rezultati su dobiveni u istraživanjima drugih autora. Reguant i sur. (2000) je utvrdio da na rast *O. oeni* utječu fenolni spojevi na različite načine, ovisno o vrsti i koncentraciji. Generalno nemaju učinak u niskim koncentracijama, no hidroksicinaminska kiselina je inhibicijska u visokim koncentracijama. Rozès i sur. (2003) su otkrili da 50 mg/L ili više fenolnih spojeva stimuliraju rast *O. oeni* u uvjetima vina. Theobald i sur. (2007) su utvrdili da zeleni čaj može uzrokovati stimulaciju rasta *O. oeni* kao rezultat fenolnih spojevi koji su prisutni u zelenom čaju, a posebno epigalokatehin galata. Međutim, ovisno o koncentraciji, taj spoj može također spriječiti rast *O. oeni*. Figueiredo i sur. (2008) su također ispitali učinke fenolnih aldehida i flavonoida na rast i inaktivaciju *O. oeni*. Fenolni aldehidi koji su testirani su inapaldehid, koniferaldehid, p-hidroksibenzaldehid, 3, 4-dihidrobenzaldehyd, i 3, 4, 5-trihidroksibenzaldehid koji su značajno inhibirali rast *O. oeni*, dok vanilin i sirigaldehid nisu imali utjecaj na koncentraciju testiranih. Među flavonoidima, kvercetin i kaempferol vrše inhibitorni utjecaj na *O. oeni*. Miricetin, katekin i epikatekin nisu bitno utjecali na rast *O. oeni*. Zgusnuti tanini snažno utječu na održivost *O. oeni*. Rast *L. hilgardii* se smatra uzrokom kvarenja vina (Rodríguez i sur., 2007a). Učinke različitih koncentracija galusne kiseline i katekvina na rast *L. hilgardii* su proučavali Alberto i sur. (2001). Ovi fenolni spojevi, u normalnim koncentracijama prisutnosti u vinu, nisu samo stimulirali rast, nego su također rezultirali veće gustoće stanica za vrijeme stacionarne faze rasta. Alberto i sur. (2002) su nastavili proučavati učinak vina fenolnih spojeva na održivost *L. hilgardii*. Opisao je da je u dekoloriziranom vinu, koje rezultiraju gubitke tanina, žive stanice će se povećati. Utjecaj pojedinih fenolnih kiselina na rast i inaktivaciju *L. hilgardii* je također istraživao Campos i sur. (2003). P-kumarinska kiselina je pokazala najjači inhibitorni učinak na rast i preživljavanje, i prikazuje da kavena i ferulska kiselina povoljno utječu na rast *L. hilgardii*. Nedavno, učinak fenolnih spojeva na *L. hilgardii* u proizvodnji vina proučavali su Alberto i sur. (2007). Otkrili su da je rast bakterija stimuliran

fenolnim spojevima, osim galne kiseline i kvercitina. Kondenzirani tanini snažno utječu na preživljavanje stanice. Učinak tanina, taninske kiseline na *L. hilgardii* je analiziran proteomskim testom (Bossi i sur., 2007). Iako mehanizmi vladajućih međureakcija između taninske kiseline i *L. hilgardii* stanica nisu bili razjašnjeni, proteomski pristup sugerira uplitanja tanina na ekspresiju proteina stanice. Uključenost važnih metaboličkih enzima, ribosomalnih i funkcionalnih membranskih proteina bi mogli objasniti inhibiciju rasta stanica u prisutnosti tanina.

4. Probiotičke bakterije u prevenciji i terapiji dijareje

Probiotičke bakterije pozitivno djeluju u prevenciji i terapiji različitih bolesti. Najveći preventivni i terapijski učinak probiotičkih bakterija utvrđen je za akutnu dijareju u djece uzrokovanu rotavirusima. Značajan, ali nešto manji učinak probiotičkih bakterija dokazan je kod dijareje kao posljedice uzimanja antibiotika. Preventivni i terapijski učinak na dijareju neovisan je o načinu uzimanja probiotičkih bakterija, fermentiranim mlijekom, kapsulom ili oralnom rehidrationskom otopinom (Szajewska i Mrukowicz, 2005, Sazawal i sur., 2006).

4.1. Značenje liječenja dijareje u svijetu

Zbog velikog onečišćenja okoliša, upotrebe raznih kemijskih dodataka hrani, čestih putovanja te načina liječenja antibioticima i zračenjem, može doći do poremećaja u ravnoteži crijevne populacije. Najčešća posljedica tih poremećaja je dijareja od koje u svijetu boluje oko 4 milijarde ljudi na godinu. Od posljedica zabilježenih slučajeva dijareje u svijetu godišnje umre oko 4% ljudi (Szajewska i Mrukowicz, 2005, Sazawal i sur., 2006). U zemljama u razvoju, dijareje uzrokovane patogenim sojevima *Shigella*, *Vibrio cholera*, *Salmonella*, *Campylobacter* spp., *Escherichia coli* i rotavirusima vodeći su uzrok smrtnosti dojenčadi i djece. U razvijenim zemljama, na primjer u SAD-u, dijareja se u populaciji djece od 16,5 milijuna, evidentira u 21 do 37 % slučajeva godišnje (Nomoto, 2005). Putnička se dijareja godišnje zabilježi u otprilike 12 milijuna slučajeva, a ovisno o odredištu od nje pati između 5 i 50 % putnika (Cheng i Thielman, 2002; McFarland, 2007). Dijareja je česta u tijeku ili nakon liječenja bolesnika antibioticima (5 - 25 %) ili zračenjem bolesnika koji boluju od tumorskih bolesti (Bergogne-Berezin, 2000). Pošto više od polovice svjetske odrasle populacije ima nedovoljnu razinu enzima laktaze, dijareja može biti posljedica konzumacije hrane u kojoj je udjel laktoze približno 50 g. Bakterije mliječne kiseline i bifidobakterije imaju tvorbu različitih organskih spojeva i kiselina, vodikovog peroksida, diacetila, CO₂, te bakteriocina koje izlučuju u okolinu u kojoj rastu (Tamime i sur., 2006). Neovisno o tome radi li se o hrani ili probavnom sustavu, ti spojevi prvenstveno inhibitorno djeluju na rast za čovjeka nepoželjne mikrobne populacije (Rogelj i Bogović-Matijašić, 1994; Šušković i sur., 1998; Samaržija i sur., 2001, 2001.a). Brojna su istraživanja provedena na tome da osim prehrambene, fermentirana mlijeka imaju i direktnu i/ili indirektnu zdravstvenu vrijednost (Lukač Havranek i Samaržija, 1996). U prevenciji ili kao dopuna u liječenju mnogih vrsta bolesti (gastrointestinalnih, urogenitalnih infekcija, tumorskih bolesti i sl.)

fermentirana mlijeka, ili pripravci bakterija mliječne kiseline i bifidobakterija u obliku kapsula, pokazali su dobra svojstva (Blom i Mortvedt, 1991; Strnad i Babuš, 1996; Ouwehand i sur., 1999; Betica- Radić, 2000; Sleator i Hill, 2007). U prevenciji i terapiji dijareje uzrokovane poremećajem ravnoteže unutar crijevne mikrobne populacije, korištenje probiotičkih bakterija mliječne kiseline i bifidobakterija u određenim slučajevima također se pokazalo dobrim izborom.

4.2. Različiti oblici dijareje

U najvećem broju slučajeva akutna dijareja kod djece posljedica je infekcije rotavirusima. Istraživanje koje je obuhvatilo djecu u dobi od mjesec do 36 mjeseci je pokazalo da svakodnevno korištenje probiotičkih bakterija mliječne kiseline i/ili bifidobakterija neovisno o tome jesu li one bile u sastavu fermentiranih mlijeka, kapsule ili oralne rehidracijske otopine, smanjuje trajanje dijareje 30 - 40 % (Saavedra, 2000). U skupini djece koja su uzimala probiotike dijareja je trajala od 1,4 do 2,3, a u placebo skupini od 2,4 do 3,2 dana (Isolauri i sur., 1991; Boudra i sur., 1996; Shornikova, 1998; Guandalini i sur., 2000, Weizman i sur., 2005). Na pojavnost akutne dijareje kod djece probiotički sojevi bakterija *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus delbruecki* subsp. *bulgaricus*, *Bifidobacterium lactis* i *Streptococcus thermophilus*, osim terapijski djeluju i preventivno. Međutim, zbog kontradiktornih rezultata se još sa sigurnošću ne može tvrditi kolika je stvarna učinkovitost upotrebe probiotičkih bakterija u profilaksi putničke dijareje. Istraživanja koja su provedena 90-ih godina, utvrđeno je da probiotički sojevi *Lactobacillus acidophilus* sami ili u kombinaciji s *Lactobacillus fermentum* i *Lactobacillus delbruecki* subsp. *bulgaricus* nemaju značajan utjecaj na prevenciju i/ili smanjenje težine dijareje (Kollaritsch i sur., 1989, Katelaris i sur., 1995) Rezultate tih istraživanja potvrdio je i Briand (2006) koji je pokazao da *Lactobacillus acidophilus* (1010 CFU/g) uziman dvaput dnevno prije i tijekom putovanja ne utječe na prevenciju dijareje. Meta analiza 6 istraživanja koju s proveli Sazawal i sur. (2006) pokazala je da probiotički sojevi bakterija *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbruecki* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus rhamnosus* GG i *Lactobacillus fermentum* smanjuju rizik od razvoja dijareje tijekom putovanja 8%. Nadalje, dijareja je česta posljedica uzrokovana liječenjem antibioticima, na primjer klindamicina, cefalosporina i penicilina. Terapijom antibioticima narušava se prirodna ravnoteža crijevne mikrobne populacije, što omogućava ubrzani rast bakterije *Clostridium difficile*, a posljedica je dijareja. Bakterija *Clostridium difficile* u crijevima zdravih ljudi prirodno je prisutna u malom broju (Nomoto, 2005). Zbog povećanog broja te bakterijske vrste i njezine sposobnosti tvorbe enterotoksina - toksin A i/ili citotoksina - toksin B dolazi do pojavnosti dijareje (Marcos i DuPont, 2007). Meta analize kliničkih istraživanja pokazuju da je kod osoba koje tijekom terapije antibioticima uzimaju i probiotičke sojeve bakterija *Saccharomyces boulardii*, *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus acidophilus* i *Lactobacillus delbruecki* subsp. *bulgaricus* pojava dijareje smanjena čak 52% u odnosu na kontrolnu skupinu. Također, dijareja može biti uzrokovana zračenjem. Zračenje je vrlo česta metoda koja se koristi u liječenju brojnih tumora. Negativna strana zračenja je činjenica da približno 80% pacijenata ima akutne simptome, od kojih je dijareja najučestalija. Uzimanjem liofilizirane mješovite probiotičke kulture sastavljene od četiri soja laktobacila, tri soja bifidobakterija i jednog soja *Streptococcus delbrueckii* subsp. *thermophilus* tijekom terapije, dijareja se može značajno smanjiti (Delia i sur., 2007). Suprotno, Giralt i sur. (2008) u kliničkom istraživanju utvrdili su da *Lactobacillus casei* DN-114 001 u koncentraciji od 108 CFU/g,

koje su pacijenti uzimali jogurtom, nema statistički značajan utjecaj na smanjenje učestalosti dijareje uzrokovane zračenjem. Istraživanje je provedeno na pacijentima kod kojih je dijagnosticiran i operiran zloćudni tumor endometrija (sluznice maternice). Zbog nedostatka enzima β -galaktozidaze (laktaze) u probavnom sustavu određenog broja ljudi, laktoza sadržana u mlijeku ne može se razgraditi. Nerazgrađena laktoza uzrokuje bolest organizma koja se manifestira grčevima, nadimanjem, dijarejom i mučninom. U tim proizvodima koji nastaju fermentacijom, koncentracija laktoze znatno je smanjena, a probiotičke varijante fermentiranih mlijeka dodatno sadržavaju i mikrobnu β -galaktozidazu (Fooks i sur., 1999). U 80% laktoza netolerantnih osoba nakon unosa 18 g laktoze mlijekom javlja se dijareja i/ili nadimanje. Međutim, simptomi bolesti izostaju kada se ista količina laktoze u organizam unese jogurtom. Aktivnost β -galaktozidaze sadržane u jogurtu dovoljna je za probavu 50 - 100% unesene laktoze u količini od 20 g (Miller i sur., 2007).

5. Probiotički koncept probiotika kao dodatka hrani i kao bioterapeutika

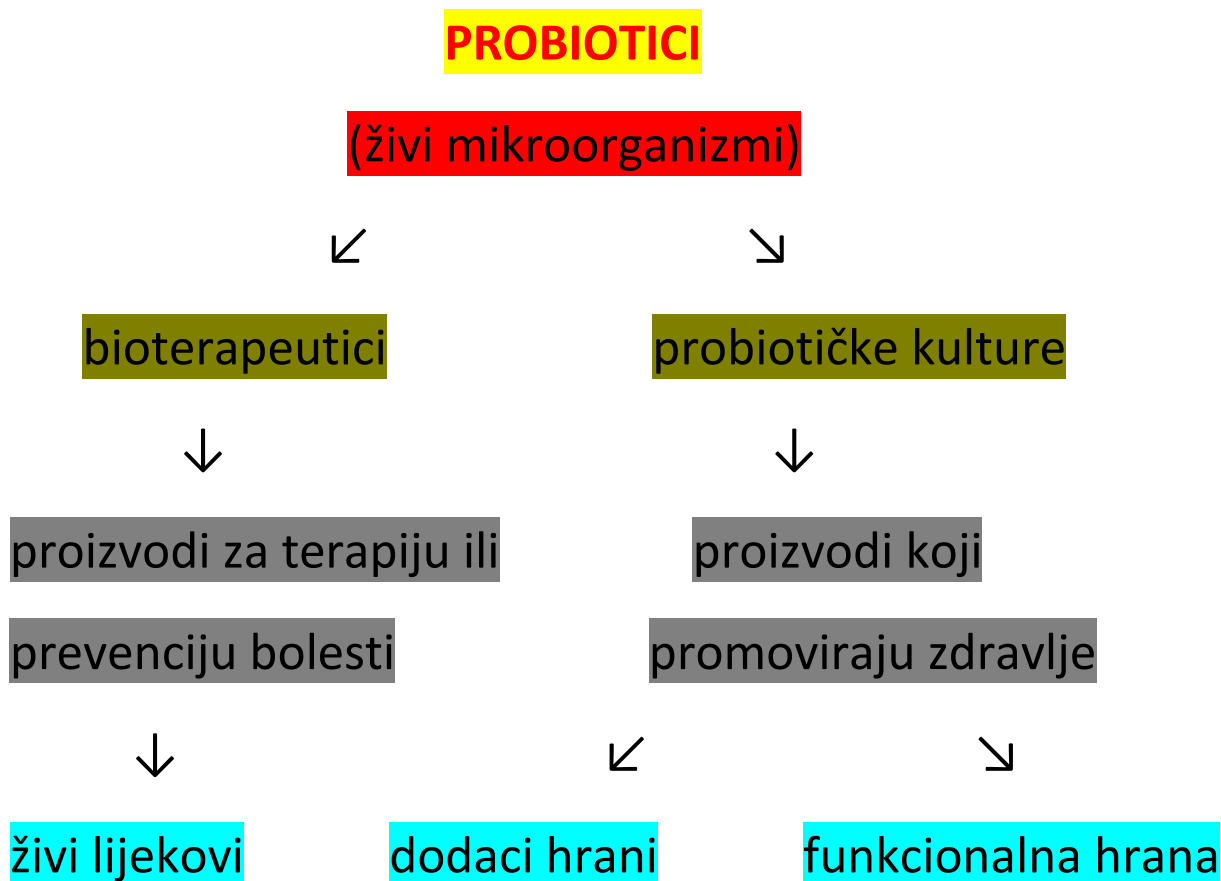
Svjetska zdravstvena kriza, posebno u liječenju infektivnih bolesti zbog alarmantnog stanja s antibiotskom rezistencijom te nizom kroničnih bolesti koje ugrožavaju ljudsko zdravlje, uspostavila je koncept funkcionalne hrane još 1980. godine, u Japanu. Znači, hrana je funkcionalna ako sadrži sastojke koji pozitivno djeluju na jednu ili više ciljanih funkcija u tijelu. Ciljno mjesto djelovanja probiotika, prebiotika, odnosno sinbiotika, kao funkcionalnih dodataka hrani je gastrointestinalni sustav. Ravnoteža ovog mikrobnog sustava je dinamična i može se poremetiti pod utjecajem starenja, liječenja, stresa, prehrane i drugih čimbenika iz okoliša. Probiotički, prebiotički, odnosno sinbiotički koncept podrazumijeva ponovno uspostavljanje ravnoteže crijevne mikroflore i usmjeravanje njenog metabolizma u proizvodnju metabolita korisnih za zdravlje. Obećavajući rezultati s prvom generacijom probiotika nude novu generaciju probiotika (živih lijekova) gdje će se kombinacijom različitih probiotičkih sojeva s komplementarnim djelovanjem koristiti u liječenju različitih gastrointestinalnih i urogenitalnih bolesti ili će se koristiti kao vektori za vakcine, imunoglobuline i druge terapijske proteine. Stoga je sve više potrošača zainteresirano za potencijalna svojstva funkcionalne hrane radi poboljšanja zdravlja, što bi smanjilo rizik od nastajanja bolesti, a s time i upotrebu antibiotika, što bi dovelo do smanjenja antibiotske rezistencije. Rezistencija bakterija na antibiotike je postala važan problem u današnjoj medicini pa je potrebno odgovorno korištenje ovih važnih lijekova kako bi se njihova djelotvornost sačuvala i za buduće generacije. Stoga, postoji probiotički i prebiotički koncept s ciljnim mjestom djelovanja (gastrointestinalni sustav), odnosno na crijevnu mikrofloru. Probiotički koncept podrazumijeva oralno uzimanje živih, korisnih mikroorganizama, nazvanih probioticima, dok prebiotički koncept uvodi selektivne izvore ugljika i energije korisnim, autohtono prisutnim i unesenim, alohtonim probiotičkim bakterijama u intestinalnom sustavu.

5.1. Funkcionalna svojstva probiotičkih bakterija

Antimikrobno djelovanje probiotičkih bakterija, posebno prema patogenim mikroorganizmima, važno je funkcionalno svojstvo probiotičkih bakterija koje im osigurava kompetitivnu prednost u natjecanju za mjesta vezanja i hranjive tvari u intestinalnom sustavu. Promjena mikrobnog metabolizma u intestinalnom sustavu, kao važno funkcionalno svojstvo probiotičkih bakterija, posljedica je inhibicije rasta nekih sudionika crijevne mikroflore koji proizvode enzime (β -glukuronidazu, nitroreduktazu, azoreduktazu i steroid-7 α -dehidroksilazu) odgovorne za kancerogene procese. S druge strane, probiotičke bakterije doprinose poboljšanju metabolizma laktoze kod laktoza-netolerantnih osoba povećanjem aktivnosti enzima β -galaktozidaze u intestinalnom sustavu, što dalje omogućava razgradnju laktoze pri fiziološkoj deficijenciji tog enzima. Važna funkcionalna svojstva probiotičkih sojeva su adhezija na crijevni epitel i poticanje imunološkog odgovora domaćina. Adhezija i kolonizacija intestinalnog sustava pokusnih Swiss albino miševa bila je bolja kad su se umjesto probiotičkih koristili sinbiotički pripravci, a ustanovljeni su i nepoželjni sudionici crijevne mikroflore, enterobakterije i sulfitoreducirajuće klostridije, nakon obrade Swiss albino miševa s probiotičkim i sinbiotičkim pripravcima triju selekcioniranih probiotičkih sojeva (Frece i sur. 2009). Proteomičkom analizom staničnih proteina bakterije *Lactobacillus helveticus* M92 (Beganović i sur., 2010), koja je prethodno primjenjena na bakteriji *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* kao modelnom mikroorganizmu za proučavanje bakterija mliječne kiseline, otkriveni su proteini prisutni u netopljivoj frakciji, zatim proteini stanične ovojnice, koji su potencijalni adhezini, imunomodulatori i potencijalni prenositelji oralnih vakcina koje potiču mukozalni odgovor. Najsuvremenijim proteomičkim pristupom, primjenom LC-MS/MS (tekućinske kromatografije je vezane na tandemsku spektrometriju masa), otkriveno je 399 različitih proteina koji čine netopljivi proteom bakterije *L. helveticus* M92, od kojih je 30 eksprimirano u stresnim uvjetima, tijekom prolaska probiotičkog soja kroz gastrointestinalni sustav «germ-free» miša (Beganović, 2008; Beganović sur., 2010). SDS-PAGE ukupnih i površinskih staničnih proteinabakterije *L. helveticus* M92 pokazala je karakterističnu proteinsku vrpcu SlpA proteina, tzv. površinskog parakristalnog S-sloja, koja je potvrđena i analizom pomoću LC-MS/MS (Beganović, 2008). Površinski, parakristalni S-sloj bakterije *L. helveticus* M92 je odgovoran za komparativnu prednost pred drugim sudionicima autohtone crijevne mikroflore, za preživljavanje *L. helveticus* M92 u nepovoljnim uvjetima gastrointestinalnog trakta, a sudjeluje i u procesu adhezije ispitivanog probiotičkog soja na crijevne epitelne stanice pokusnih Swiss albino miševa i svinja pasmine Landras (Kos, 2001; Kos i sur. 2003; Frece i sur. 2005a). Zbog svih dosadašnjih spoznaja postoji veliki interes za SlpA proteine i mogućnostima njegove primjene kao nositelja oralnih vakcina te u terapiji do sada neizlječivih autoimunih bolesti kao što je multipla skleroza (Šušković i sur., 2010).

5.2. Proizvodnja probiotika kao živih lijekova

Probiotici se prema načinu primjene mogu podijeliti na bioterapeutike i funkcionalne dodatke hrani.



SLIKA 1. Podjela probiotika prema načinu primjene

Preuzeto iz: J. ŠUŠKOVIĆ i sur.: *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* 4 (3-4), 77-84 (2009)

Bioterapeutici su probiotički sojevi namijenjeni za terapiju ili prevenciju bolesti što ih svrstava u kategoriju živih lijekova, dok probiotici kao funkcionalni dodaci hrani promoviraju zdravlje tj. pozitivno utječu na ravnotežu crijevne mikroflore (Periti i Tonelli, 2002; Šušković, 2009). Dodatkom krioprotektora i lioprotektora, te mikroinkapsuliranjem probiotičkih sojeva tijekom zamrzavanja, sušenja ili čuvanja, može se bitno povećati broj živih stanica po gramu probiotičkog pripravka (Kailasapathy, 2002; Kos i sur., 2008). Mikroinkapsulacija je tehnološki postupak imobilizacije probiotičkih bakterija unutar ograničenog prostora s ciljem njihove zaštite tijekom biotehnološkog postupka proizvodnje i primjene kao bioterapeutika (Champagne i Fustier, 2007). Mikroinkapsulirane probiotičke stanice bolje preživljavaju u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog sustava od stanica koje nisu bile mikroinkapsulirane. Mikroinkapsulacija probiotičkih sojeva u alginatu pokazala se kao obećavajuća metoda koja doprinosi boljem preživljavanju u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog sustava, stoga bi mogla imati primjenu u biotehnološkoj proizvodnji probiotika kao živih lijekova (Keohane i sur., 2009). Na temelju znanstvenih i kliničkih istraživanja, probiotici mogu biti vrlo učinkoviti u sprječavanju različitih vrsta crijevnih i urogenitalnih infekcija, te posebice za uspostavljanje normalne crijevne mikroflore nakon antibiotske terapije. Današnja istraživanja upozoravaju na sve veći učinak

probiotičkih mikroorganizama u suzbijanju različitih bolesti, a posebno u suzbijanju kancerogenih procesa u probavnom sustavu. Obećavajući rezultati s prvom generacijom probiotika nude novu generaciju probiotika (živih lijekova) gdje će se kombinacija različitih sojeva s komplementarnim djelovanjem koristiti u liječenju različitih gastrointestinalnih i urogenitalnih bolesti ili će se koristiti kao vektori za vakcine, imunoglobuline i druge terapijske proteine (Ljungh i Wadström, 2009).

3. LITERATURA

- Alberto, M.R., Arena, M.E., Manca de Nadra, M.C.(2007): Putrescine production from agmatine by *Lactobacillus hilgardii*: effect of phenolic compounds. *Food Control* 18, 898–903.
- Alberto, M.R., Farias, M.E., Manca de Nadra, M.C.(2001): Effect of gallic acid and catechin on *Lactobacillus hilgardii* 5w growth and metabolism of organic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 4359–4363.
- Alberto, M.R., Farías, M.E., Manca de Nadra, M.C.(2002): Effect of wine phenolic compounds on *Lactobacillus hilgardii* 5w viability. *Journal of Food Protection* 65, 211–213.
- Beganović, J. (2008): Primjena proteomike i drugih molekularnih metoda u definiranju funkcionalnih svojstava probiotičkih bakterija, *Disertacija*, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
- Betica-Radić, L.J. (2000): Antibiotici i probavni trakt, *Medicus* 9 (2), 185-191.
- Campos, F.M., Couto, J.A., Hogg, T.A., 2003. Influence of phenolic acids on growth and inactivation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii*. *Journal of Applied Microbiology* 94, 167–174.
- Chamkha, M., Sayadi, S., Bru, V., Godon, J.J.(2008): Microbial diversity in Tunisian olive fermentation brine as evaluated by small subunit rRNA — single strand conformation polymorphism analysis. *International Journal of Food Microbiology* 122, 211–215.
- Champagne, C.P. i Fustier, P. (2007): Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Curr. Opin. Biotechnol.* 18, 184-190.
- Cheng, A.C., Thielman, N.M. (2002): Update on traveler's diarrhea, *Current infectious disease reports* 4, 70-77.
- Delia, P., Sansotta, G., Donato, V., Frosina, P., Messina, G., De Renzis, C., Famularo, G. (2007): Use of probiotics for prevention of radiation-induced diarrhea, *World Journal of Gastroenterology* 13 (6), 912-915.
- Di Cagno, R., Surico, R.F., Paradiso, A., De Angelis, M., Salmon, J.-C., Buchin, S., De Gara, L., Gobbetti, M.(2009): Effect of autochthonous lactic acid bacteria starters on healthpromoting and sensory properties of tomato juices. *International Journal of Food Microbiology* 128, 473–483.
- Dimitrios, B.(2006): Sources of natural phenolic antioxidants. *Trends in Food Science and Technology* 17, 505–512.
- Ercolini, D., Villani, F., Aponte, M., Mauriello, G.(2006): Fluorescence in situ hybridization of *Lactobacillus plantarum* group on olives to be used in natural fermentations. *International Journal of Food Microbiology* 112, 291–296.
- Figueiredo, A.R., Campos, F., de Freitas, V., Hogg, T., Couto, A. (2008): Effect of phenolic aldehydes and flavonoids on growth and inactivation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii*. *Food Microbiology* 25, 105–112.

- Fooks, L.J., Fuller, R., Gibson, G.R. (1999): Prebiotics, probiotics and human gut microbiology, *International Dairy Journal* 9 (1), 53-61.
- Frece, J., Kos, B., Svetec, I. K., Zgaga, Z., Beganović, J., Leboš, A., Šušković, J. (2009): Synbiotic effect of *Lactobacillus helveticus* M92 and prebiotics on the intestinal microflora and immune system of mice, *J. Dairy Res.* 76, 98-104.
- Goldin BR, Gorbach SL(1984): Alterations of the intestinal microflora by diet, oral antibiotics, and Lactobacillus: decreased production of free amines from aromatic nitro compounds, azodyes, and glucuronides. *J Natl Cancer Inst*, 73:689-695.
- Hurtado, A., Reguant, C., Esteve-Zarzoso, B., Bordons, A., Rozès, N.(2008): Microbial population dynamics during the processing of Arbequina table olives. *Food Research International* 41, 738–744.
- Isolauri, E., Jununen, M., Rautanen, T. (1991): A human lactobacillus strain *Lactobacillus casei* sp strain GG promotes recovery from acute diarrhea in children, *Pediatrics* 88 (1), 90-97.
- Juven, B., Henis, Y., Jacoby, B.(1972): Studies on the mechanism of the antimicrobial action of oleuropein. *Journal of Applied Bacteriology* 35, 559–567.
- Kailasapathy, K. (2002): Microencapsulation of Probiotic Bacteria: Technology and Potential Applications. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* 3, 39-48.
- Kapur, C., Kapoor, H.C. (2001): Antioxidants in fruits and vegetables — the millennium's health. *International Journal of Food Science and Technology* 36, 703–725.
- Katelaris, P.H., Salam, I., Farthing, M.J. (1995): *Lactobacilli* to prevent traveler's diarrhea?, *The New England Journal of Medicine* 333 (20), 1360-1361.
- Keohane, J., Ryan, K., Shanahan, F. (2009) :*Lactobacillus* in the Gastrointestinal Tract. U: *Lactobacillus* Molecular Biology: From Genomics to Probiotics, Ljungh, Å., Wadström, T. (ured.), Caister Academic Press, Norfolk, str. 169-181.
- Kollaritsch, H., Kremsner, P., Wiedermann, G., Scheiner, O. (1989): Prevention of traveller's diarrhea: comparison of different non-antibiotic preparations, *Travel Medicine International*, 9-17.
- Kos, B. (2001): Probiotički koncept: *in vitro* istraživanja sodabranim bakterijama mliječne kiseline. *Disertacija*, Prehrambeno- biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
- Kos, B., Šušković, J., Beganović, J., Gjuračić, K., Frece, J., Iannaccone, C., Canganella, F. (2008): Characterization of the three selected probiotic strains for the application in food industry, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24, 699-707.
- Kos, B., Šušković, J., Vuković, S., Šimpraga, M., Frece, J., Matošić, S. (2003): Adhesion and Aggregation Ability of Probiotic Strain *Lactobacillus acidophilus* M92, *J. Appl. Microbiol.* 94, 981-987.
- Landete, J.M., Curiel, J.A., Rodríguez, H., de las Rivas, B., Muñoz, R.(2008a): Study of the inhibitory activity of phenolic compounds found in olive products and their degradation by *Lactobacillus plantarum* strains. *Food Chemistry* 107, 320–326.
- Ljungh Å., Wadström T. (2009): From probiotics, prebiotics and synbiotics to «living drugs». U: *Lactobacillus* Molecular Biology: From Genomics to Probiotics, Ljungh, Å., Wadström, T. (ured.), Caister Academic Press, Norfolk, str. 197-202.
- Lukač Havranek, J., Samaržija, D. (1996): Prehrambene, zdravstvene i tehnološke značajke fermentiranih proizvoda, *Mljekarstvo* 46 (4), 265-273.

- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémés, C., Jiménez, L.(2004):Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition* 79, 727–747.
- Marcos, L.A., Dupont, H.L. (2007): Advances in defining etiology and new therapeutic approaches in acute diarrhea, *Journal of Infection* 55 (5), 385-393.
- Marteau P, Pochart P, Flourié B, Pellier P, Santos L, Desjeux JF, Rambaud JC:
- McFarland, L.V. (2007): Meta-analysis of probiotics for the prevention of traveler's diarrhea, *Travel Medicine and Infectious Disease* 5 (2), 97-105.
- Miller, G.D., Jarvis, J.K., Mcbean, L.D. (2007): Handbook of dairy foods and nutrition, 3. izd., Taylor & Francis group, New York.
- Nomoto, K. (2005): Prevention of infections by probiotics, *Journal of Bioscience and Bioengineering* 100 (6), 583-592.
- Nowak A, Libudzisz Z(2009): Ability of probiotic *Lactobacillus casei* DN 114001 to bind or/and metabolise heterocyclic aromatic amines in vitro. *Eur J Nutr*, 48:419-427.
- Nychas, G.-J.E., Panagou, E., Parker, M., Waldron, K., Tassou, C.C.(2002): Microbial colonization of naturally black olives during fermentation and associated activities in the cover brine. *Letters in Applied Microbiology* 34, 173–177.
- Orrhage K, Sillerström E, Gustafsson JA, Nord CE, Rafter J(1994): Binding of mutagenic heterocyclic amines by intestinal and lactic acid bacteria. *Mutat Res*, 311:239-248.
- Ouwehand, A.C., Kirjavainen, P.K., Shortt, C., Salminen, S. (1999): Probiotics. Mechanisms and established effects, *International Dairy Journal* 9 (1), 43-52.
- Panagou, E.Z., Tassou, C.C., Katsaboxakis, K.Z.(2000): Induced lactic acid fermentation of intreated green olives of the *Conservolea* cultivar by *Lactobacillus pentosus*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83, 667–674.
- Periti, P., Tonelli, F. (2002): Biotherapeutics and biotherapy of surgical enteropathies, *Digest. Liver Dis.* 34, S87-S97. Reid, G. (2006) Safe and effi cacious probiotics: what are they?*TRENDS in Microbiology* 14(8), 348-352.
- Plengvidhya, V., Breidt, F., Lu, Z., Fleming, H.P.(2007): DNA fingerprinting of lactic acid bacteria in sauerkraut fermentations. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 7697–7702.
- Rafter J, Bennett M, Caderni G, Clune Y, Hughes R, Karlsson PC, Klinder A, O’Riordan M, O’Sullivan GC, Pool-Zobel B, Rechkemmer G, Roller M, Rowland I, Salvadori M, Thijs H, Van Loo J, Watzl B, Collins JK (2007): Dietary synbiotics reduce cancer risk factors in polypectomized and colon cancer patients. *Am J Clin Nutr*, 85:488-496.
- Reguant, C., Bordons, A., Arola, L., Rozès, N., (2000): Influence of phenolic compounds on the physiology of *Oenococcus oeni* from wine. *Journal of Applied Microbiology* 88, 1065–1071.
- Rodríguez, H., de las Rivas, B., Muñoz, R., (2007a): Efficacy of recA sequence analysis in the identification and discrimination of *Lactobacillus hilgardii* strains isolated from stuck wine fermentations. *International Journal of Food Microbiology* 115, 70–78.
- Rogelj, I., Bogović-Matijašić, B. (1994): Bacteriocins of lactic acid bacteria-properties, range of inhibitory activity and methods of detection, *Prehrambeno-tehnološka i biotehnološka revija, spec. izd.* 32, 171-175.

- Rozès, N., Arola, L., Bordons, A., (2003): Effect of phenolic compounds on the co-metabolism of citric acid and sugars by *Oenococcus oeni* from wine. *Letters in Applied Microbiology* 36, 337–341.
- Ruíz-Barba, J.L., Cathcart, D.P., Warner, P.J., Jiménez-Díaz, (1994): Use of *Lactobacillus plantarum* LPC010, a bacteriocin producer, as a starter culture in Spanish-style green olive fermentations. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 2059–2064.
- Saavedra, J. (2000): Probiotics and infectious diarrhea, *The American Journal of Gastroenterology* 95 (1), 16-18.
- Salih, A.G., Le Quéré, J.-M., Drilleau, J.-F. (2000): Action des acides hydroxycinnamiques libres et esterifiés sur la croissance des bactéries lactiques. *Science des Aliments* 20, 537–560.
- Samaržija, D., Lukač Havranek, J., Antunac, N., Sikora, S. (2001): Characteristics and role of mesophilic lactic culture, *Agriculturae conspectus scientificus* 66 (2), 113- 120
- Sazawal, S., Hiremath, G., Dhingra, U., Malik, P., Deb, S., Black, R.E. (2006): Efficacy of probiotics in prevention of acute diarrhoea: a meta analysis of masked, randomised, placebo-controlled trials, *Lancet Infectious Disease* 6 (6), 374-382.
- Shornikova, A.V., Casas, I.A., Isolauri, E., Mykkanen, H., Vesikari, T. (1997): *Lactobacillus reuteri* as a therapeutic agent in acute diarrhea in young children, *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 24, 399-404.
- Sleator, R.D., Hill, C. (2007): New frontier in probiotic research, *Letters in Applied Microbiology* 46 (2), 143-147.
- Sreekumar O, Hosono A(1998): The heterocyclic amine binding receptors of *Lactobacillus gasseri* cells. *Mutat Res*, 421:65-72.
- Strnad, M., Babuš, V. (1996): Antitumorsko djelovanje fermentiranih mliječnih proizvoda. U: Fermentirani mliječni proizvodi u prehrani i dijetetici, Hrvatska akademija medicinskih znanosti, Zagreb, 85-91.
- Šušković, J., Kos, B., Beganović, J., Leboš Pavunc, A., Habjanič, K.: (2010): Antimicrobial Activity – the Most Important Property of Probiotic and Starter Lactic Acid Bacteria, *Food Technol. Biotechnol.* 48, (2010) u tisku.
- Šušković, J., Kos, B., Matošić, S. (1998): Probiotici: Znanstvena činjenica ili pomodni trend?, *Mljekarstvo* 48 (3), 165-176.
- Tamminen, M., Joutsjoki, T., Sjöblom, M., Joutsen, M., Palva, A., Ryhänen, E.-L.(2004): Screening of lactic acid bacteria from fermented vegetables by carbohydrate profiling and PCR-ELISA. *Letters in Applied Microbiology* 39, 439–444.
- Theobald, S., Pfeiffer, P., Zuber, U., König, H.(2007):Influence of epigallocatechin gallate and phenolic compounds from green tea on the growth of *Oenococcus oeni*. *Journal of Applied Microbiology* 104, 566–572.
- Vega Leal-Sánchez, M., Ruíz-Barba, J.L., Sánchez, A.H., Rejano, L., Jiménez-Díaz, R., Garrido, A.(2003):Fermentation profile and optimization of green olive fermentation using *Lactobacillus plantarum* LPC010 as a starter culture. *Food Microbiology* 20, 421–430.
- Vivas, N., Augustin, M., Lonvaud-Funel, A.(2000): Influence of oak wood and grape tannins on the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni* (*Leuconostoc oenos* 8413). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80, 1675–1678.

- Weizman, Z., Asli, G., Alsheikh, A. (2005): Effect of a probiotic infant formula on infections in child care centers: comparison of two probiotic agents, *Pediatrics* 115 (1),174-177.
- Yokokura T, Kato I, Mutai M(1981): Antitumor effect of Lactobacillus casei (LC 9018). In Intestinal flora and carcinogenesis. Gakkai-Syuppan Center Tokyo, Japan;Mitsuoka T:72-88.

<http://www.plivazdravlje.hr/aktualno/clanak/10929/sto-su-probiotici.html>

http://medlib.mef.hr/857/1/Hojsak_I_disertacija_rep_857.pdf

https://www.google.hr/search?q=crijevana+mikroflora%2C+prehrana+i+zdravlje+doktorat&aq=crijevna+mikroflora&aq=chrome.0.69i59l3.3806j0j4&sourceid=chrome&espv=2&es_sm=122&ie=UTF-8#q=crijevana+mikroflora%2C+prehrana+i+zdravlje+sandy+lovkov%C4%87&safe=off

4. SAŽETAK

Neke bakterije mliječne kiseline su prilagođene za rast u biljnim hranidbenim podlogama gdje su fenolni spojevi u izobilju. Većina proučavanih fenolnih spojeva ima inhibitorni učinak na rast bakterija mliječne kiseline. Rasvjetljavanje metaboličkih puteva bi dovelo do dobivanja biotehnoški korisnih sojeva i bjelančevina. Ti sojevi ili proteini će biti adekvatni u postupcima razrade za dobivanje hrane s poboljšanim senzorskim i prehrambenim svojstvima. Iako su brojna istraživanja dovela do rezultata u posljednjih nekoliko godina još uvijek nije moguće dobiti uvjerljive kliničke dokaze uloge probiotika u nastanku raka debelog crijeva. Rak debelog crijeva je nepraktičan u smislu broja subjekata, troškova, trajanja istraživanja i etičkih načela. Nekoliko mehanizama bi moglo objasniti preventivno djelovanje probiotika protiv početka nastanka raka debelog crijeva. Najvjerojatnije različiti sojevi probiotika rade sa specifičnim mehanizmima. Također, korištenje probiotičkih bakterija dokazuje pozitivno djelovanje u prevenciji i terapiji akutnih dijareja u dojenčadi i djece, kao i kod dijareja uzrokovanih uzimanjem antibiotika, a to ima prvenstveno značenje u smanjenju troškova liječenja. Daljnja istraživanja jako su potrebna kako bi se utvrdio utjecaj svakog mehanizma i stvarna korist od probiotika u liječenju brojnih bolesti.

5. SUMMARY

Some lactic acid bacteria are adapted to growth in plant nutritional substrates where are phenolic compounds in abundance. Most of the studied phenolic compounds is carried the inhibitory effect on the growth of lactic acid bacteria. The elucidation of metabolic pathways would lead to getting biotechnology useful strains and proteins. These strains or proteins will be adequate in the elaboration of procedures for obtaining food with

improved organoleptic and nutritional properties. Although numerous studies have led to the results in the last few years, it is still not possible to obtain conclusive clinical evidence of the role of probiotics in the development of colon cancer. Colorectal cancer is impractical in terms of the number of the subject, cost, duration of studies and ethical principles. Several mechanisms could explain the preventive effect of probiotics against the beginning of developing colorectal cancer. Most likely different strains of probiotics work with specific mechanisms. Also, the use of probiotic bacteria proven positive effect in the prevention and treatment of acute diarrhea in infants and children, as well as diarrhea caused by taking antibiotics, and it has meaning primarily in reducing the cost of treatment. Further studies are strongly required to determine the impact of each mechanism and the actual benefit of probiotics in the treatment of many diseases.