

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO – TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

PREDDIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENE TEHNOLOGIJE

Lorna Nikolić

Uloga mikroorganizama pri izolaciji biološki aktivnih tvari

završni rad

Osijek, 2016.

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

PREDDIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENE TEHNOLOGIJE

Završni rad

Uloga mikroorganizama pri izolaciji biološki aktivnih tvari

Nastavni predmet

Opća mikrobiologija

Predmetni nastavnik: doc. dr. sc. Lidija Lenart

Student/ica: Lorna Nikolić

(MB: 3635/12)

Mentor: doc. dr. sc. Lidija Lenart

Predano (datum):

Pregledano (datum):

Ocjena:

Potpis mentora:

Uloga mikroorganizama pri izolaciji biološki aktivnih tvari

Sažetak

Biološki aktivne tvari su prirodne ili sintetičke tvari koje imaju pozitivan učinak u životu živih bića. Važno svojstvo bioaktivnih mikrobnih metabolita je njihovo pozitivno djelovanje na okolinu, zatim raznolika biološka aktivnost, te jedinstvena kemijska struktura. Biološki aktivne tvari moguće je dobiti djelovanjem mikroorganizama, izolacijom iz biljnog tkiva i višestaničnih algi te pomoću genetičkog i metaboličkog inženjeringa. Tvari izolirane iz mikroorganizama najčešće se dodaju u hranu ili se koriste kao dodatci prehrani u svrhu pozitivnog učinka na ljudski organizam.

Veliki broj biološki aktivnih tvari, kao što su primjerice neke aminokiseline, organske kiseline i vitamini, nastaju prilikom sekundarnog metabolizma pa su poznati i pod pojmom sekundarni metaboliti. Pomoću mikroorganizama može se provoditi i transformacija jednih vrsta steroida u druge. Antibiotici također pripadaju u biološki aktivne tvari koje proizvode mikroorganizmi. Poznato je kako antibiotici djeluju pogubno na rast nekih mikroorganizama, stoga je važna i njihova primjena u medicini, stočarstvu i poljoprivredi. Radom mikroorganizama mogu se dobiti i probiotici koji također imaju pozitivan učinak na ljudsko zdravlje.

Ključne riječi: biološki aktivne tvari, mikroorganizmi, sekundarni metaboliti, antibiotici

Summary:**Title: Role of microorganisms in isolation of biologically active compounds**

Biologically active compounds are natural or synthetic substances which have positive influence on life of every living being. Positive environmental influence, various biological activity and unique chemical structure are the most important properties of bioactive microbial metabolites. Biologically active compounds can be obtained with microorganism activity, isolation from plant tissue and multicellular algae and with genetical and metabolic engineering. Compounds isolated from microorganisms are mostly added in food or are used as food additives for the purpose of aiding human health.

Large number of biologically active compounds, like aminoacids, organic acids and vitamins, arise during secondary metabolism, therefore they are known as secondary metabolites. With microbial utilization it's also possible to transform one type of steroids to another. Another biologically active compounds gained by utilizing microbes are antibiotics and probiotics. Negative effect of antibiotics on microbial growth is very well known, thus their usage in medicine, livestock farming and agriculture is very important and probiotics are compounds which also hold great positive influence on human health.

Key words: biologically active compounds, microorganisms, secondary metabolites, antibiotics

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	3
2.1. Biološki aktivne tvari.....	3
2.1.1. Izvori prirodnih biološki aktivnih tvari.....	3
2.1.1.1. Mikrobiološki izvori biološki aktivnih spojeva.....	3
2.1.1.2. Biljno tkivo.....	4
2.1.1.3. Alge i mikroalge.....	4
2.1.1.4. Metaboličko inženjstvo (biotransformacija/biokonverzija).....	5
2.1.2. Podjela biološki aktivnih sastojaka hrane.....	5
2.1.3. Sekundarni metaboliti kao biološki aktivni spojevi.....	7
2.1.4. Kolekcije bakterija kao izvor novih bioaktivnih spojeva.....	8
3. MIKROORGANIZMI U INDUSTRIJI I BIOTEHNOLOGIJI.....	9
3.1. Organske kiseline, aminokiseline i vitamini.....	9
3.1.1. Proizvodnja vitamina.....	13
3.1.1.1. Izolacija vitamina skupine B i provitamina D2 (ergosterola) iz pekarskog kvasca (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>).....	13
3.1.1.2. Izolacija vitamina B12 iz biomase.....	14
3.1.2. Transformacija steroida.....	15
3.2. Antibiotici.....	16
3.3. Probiotici i prebiotici.....	18
4. ZAKLJUČAK.....	21
5. LITERATURA.....	22

1. UVOD

Biološki aktivne tvari se dijele na nutritivne (vitamini, minerali, aminokiseline, masne kiseline, ugljikohidrati) i nenutritivne tvari, no sam naziv „biološki aktivna tvar“ se najčešće odnosi na spojeve koji nemaju nutritivnu vrijednost, ali imaju određen utjecaj na zdravlje. Možemo definirati biološki aktivne tvari kao prirodne nenutritivne fiziološki aktivne sastojke hrane koji imaju određena funkcionalna svojstva u organizmu, djeluju kao pomoćna sredstva u sprječavanju i liječenju bolesti te poboljšavanju stanja organizma općenito. Potječu iz biljnih, životinjskih i mikrobioloških izvora, a međusobno se razlikuju po kemijskoj strukturi i funkciji u organizmu. Skupina biološki aktivnih tvari je vrlo velika i raznolika, a neki primjeri skupina biološki aktivnih tvari su: polifenoli, flavonoidi, klorofil, izotiocijanati, alkaloidi, steroli, karotenoidi i drugi. Najpoznatije nenutritivne biološki aktivne tvari su: indol i karabinol u brokuli, likopen u rajčici i lubenici, β -karoten u mrkvi, marelici, i breskvama, lutein u kukuruzu, alicin u češnjaku, kvercetin u luku, elaginska kiselina u jabukama, genistein u soji, kapsaicini i karotenoidi u ljutim paprikama te katehini u zelenom čaju. Sve navedene tvari, ako su unesene u organizam u adekvatnim količinama, mogu povoljno utjecati na zdravlje, odnosno na različite sustave našeg organizma, kao što su gastrointestinalni, kardiovaskularni, endokrini, živčani, imunološki i drugi.

Biološki aktivne tvari dobivene radom mikroorganizama najčešće se dodaju u hranu zbog svog pozitivnog učinka na ljudsko zdravlje, služe za razvoj novih lijekova i kemikalija te poboljšavaju poljoprivrednu proizvodnju. U hrani se nalaze u malim količinama, ali je njihova učinkovitost velika. Kakvoća ovih tvari ne mjeri se njihovom količinskom zastupljenošću, nego sposobnošću da tijekom svoje biološke aktivnosti mogu neutralizirati utjecaje štetnih tvari u ljudskom organizmu (Jašić, 2010.).

Kontinuirani društveni rast kao i povećana očekivanja pojedinaca stavljaju stalne i nove izazove pred industriju, poljoprivredu i modernu medicinu. Pritisak da se uvedu nove tehnologije koje će osigurati dovoljne količine energije i hrane, kao i da se proizvedu nove tvari koji će unaprijediti ljudsko zdravlje ogroman je, sveprisutan i potaknut realnim potrebama svjetskog tržišta (Stanković, 2012.).

Novi procesi koje nude farmaceutska i kemijska industrija sve češće se zasnivaju na biološki zasnovanim katalizama (Centi i Perathoner, 2009.). Najveći generator aktivnih tvari jesu živi organizmi čiji se prirodni proizvodi nalaze već tisućama godina u ljudskoj upotrebi. I pored razvoja kemije, tehnologije i informatike koji daju nemjerljiv doprinos u kreiranju novih, za čovjeka važnih bioaktivnih spojeva, prirodni proizvodi, usavršavani milijunima godina evolucije, izvor su koji je daleko od iscrpljenog (Baltz, 2008.).

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Biološki aktivne tvari

Spoj ili tvar ima biološku aktivnost ukoliko ima direktan učinak na živi organizam. Taj učinak može biti pozitivan ili negativan ovisno o tvari, količini ili bioraspoloživosti.

U medicinskom riječniku, biološki aktivan spoj definiran je kao spoj koji ima učinak, uzrokuje reakciju ili pobuđuje odgovor živog tkiva (Guaadaoui i sur., 2014.).

Biološki aktivne tvari se dijele na nutritivne (vitamini, minerali, aminokiseline, masne kiseline, ugljikohidrati) i nenutritivne tvari. Sam naziv „biološki aktivna tvar“ se najčešće odnosi na spojeve koji nemaju nutritivnu vrijednost, ali imaju određen utjecaj na zdravlje. Biološki aktivne tvari mogu se definirati kao prirodne nenutritivne fiziološki aktivni sastojci koji imaju određena funkcionalna svojstva u organizmu, djeluju kao pomoćna sredstva u sprječavanju i liječenju bolesti te poboljšavaju stanje organizma općenito.

Skupina biološki aktivnih tvari je vrlo velika i raznolika, a međusobno se razlikuju po kemijskoj strukturi i funkciji u organizmu (<http://www.definicijahrane.hr>, 2016.).

2.1.1. Izvori prirodnih biološki aktivnih tvari

2.1.1.1. Mikrobiološki izvori biološki aktivnih spojeva

Mikroorganizmi su važni iz mnogo razloga, posebno jer koriste biološke sustave za proizvodnju važnih molekula (Demain, 2000.). Identificirano je oko 23000 prirodnih biološki aktivnih spojeva mikrobnog porijekla, i većina tih spojeva izolirana je iz samo nekoliko grupa mikroorganizama (Olano i sur., 2008.).

Gljivice nastanjuju svaki dio Zemlje, uključujući područja naslaga dubokih stijena i pustinja kao i vodena područja. Kao biljke i prokarioti, gljive sintetiziraju bioaktivne spojeve zato što imaju ekološku funkciju. Različiti spojevi imaju različite funkcije, od zaštitnog djelovanja protiv letalne fotooksidacije do zaštitnog djelovanja protiv okolišnog stresa, a također mogu djelovati kao kofaktori u enzimskim reakcijama (Mapari i sur., 2005.). Postoji velika raznolikost gljiva koje se koriste u proizvodnji takvih spojeva uključujući *Penicillium* i *Aspergillus*, koji se koriste za proizvodnju bioaktivnih molekula kao što su antibiotici, enzimi i organske kiseline (Silveira i sur., 2008.).

Aktivne tvari proizvedene s pomoću mikroorganizama mogu imati različite uloge, primjerice kao dodaci prehrani, poboljšivači okusa, teksture, konzervansi, emulgatori, sredstva za zakiseljavanje i zgušnjavanje te površinski aktivne tvari.

Važni metaboliti izolirani iz bakterija su, između ostalog, izoprenoidi kao karotenoidi (β -karoten i likopen) i fenilpropanoidi kao derivati stilbena (Chang i Keasling, 2006.). Samo oko 1% mikroorganizama se uzgaja „in vitro“, što govori da postoji velika bioraznolikost i velik broj prirodnih spojeva u mikroorganizmima koji ostaju neiskorišteni. Glavni razlog za korištenje mikroorganizama za proizvodnju spojeva iz biljaka i životinja je jednostavnost dobivanja visokog iskorištenja, i mogućnost genetske i okolišne manipulacije (Demain, 2000.).

2.1.1.2. Biljno tkivo

Prirodni biljni spojevi mogu se podijeliti na primarne i sekundarne metabolite. Primarni metaboliti su šećeri, aminokiseline, masne kiseline i nukleinske kiseline, kao i svi spojevi koji su potrebni biljkama za rast i razvoj. Sekundarni metabolizam ima podjeljene funkcije tijekom životnog ciklusa biljke (Balandrin i sur., 1985).

S obzirom na velik raspon funkcija koje sekundarni metaboliti biljaka imaju u biljnim stanicama, ovi spojevi od velikog su interesa za istraživače koji proučavaju njihovu bioaktivnost za korisne primjene.

Prema njihovom biosintetskom porijeklu, sekundarni metaboliti biljaka mogu se podijeliti u pet skupina: poliketide, izoprenoide, alkaloidne, fenilpropanoide i flavonoide (Oksman-Caldentey i Inzé, 2004.). Ovi spojevi sintetiziraju se u specijaliziranim tipovima stanica i samo tijekom određenih faza rasta ili pod određenim uvjetima što otežava njihovu ekstrakciju i pročišćavanje (Verpoorte i sur., 2002).

2.1.1.3. Alge i mikroalge

Važnost algi i mikroalgi kao izvor novih spojeva ubrzano raste, a znanstvenici su pokazali da ovi spojevi pokazuju različite biološke aktivnosti. Mnogi od ovih spojeva posjeduju antioksidativno, antimikrobno i antivirusno djelovanje (Gil-Chavez, 2013.).

Alge žive u staništima izloženim ekstremnim uvjetima kojima se moraju brzo i učinkovito prilagoditi, a kao posljedica toga, proizvode veliki broj biološki aktivnih sekundarnih metabolita koji sudjeluju u prirodnim obrambenim mehanizmima (Rodríguez-Meizoso i sur., 2010. godine). Mikroalge luče raznolike spojeve koji se koriste kao funkcionalni sastojci, uključujući karotenoide, polifenole, flavonoide, kisele derivate i dipeptide (Lam, 2007.).

2.1.1.4. Metaboličko inženjerstvo (biotransformacija/biokonverzija)

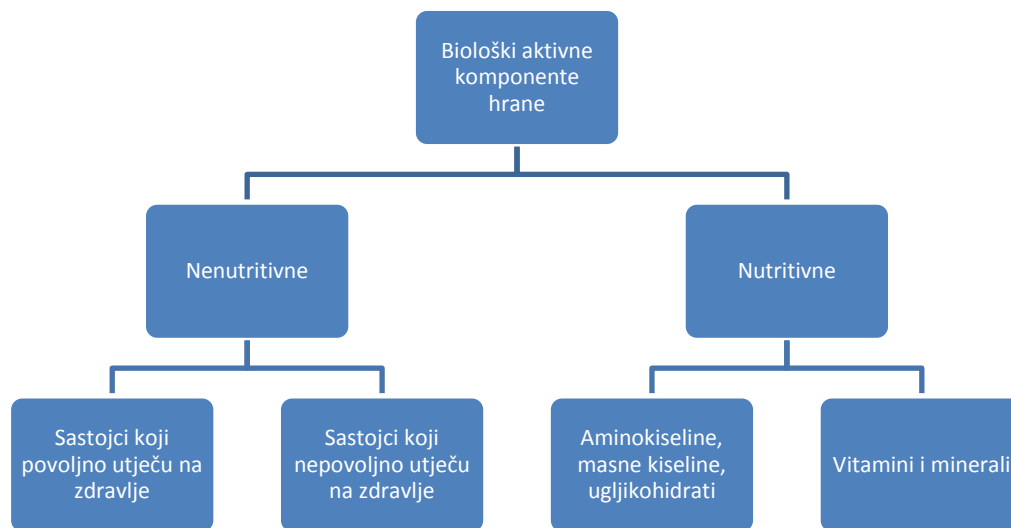
Metaboličko inženjerstvo je usmjereno poboljšanje stvaranja produkta ili staničnih svojstava modifikacijama određenih biokemijskih reakcija ili uvođenjem novih s uporabom tehnologije rekombinantne DNA (Demain i Adrio, 2008.). Uz prepoznavanje vrlo važne uloge genetske kontrole u proizvodnji prirodnih biološki aktivnih spojeva, primjena metaboličkog inženjerstva postala je intenzivno područje istraživanja u biotehnologiji (Wenzel i Müller, 2005.). Sve veće razumijevanje biosinteze prirodnih biološki aktivnih spojeva uzrokuje značajan napredak u molekularnoj genetici (Wilkinson i Micklefield, 2007.).

2.1.2. Podjela biološki aktivnih sastojaka hrane

Biološki aktivne komponente hrane mogu se podijeliti prema više kriterija:

- prema kemijskom sastavu,
- prema porijeklu,
- prema funkciji djelovanja na određene organe i tkiva u organizmu ,
- prema formi ili prema farmaceutskom obliku ako se konzumiraju kao dodaci prehrani.

Biološki aktivne tvari hrane mogu biti nutritivnog i nenutritivnog karaktera. Nutritive tvari su: aminokiseline, masne kiseline, neki ugljikohidrati (β -D-glukani, inozit, sorbitol), vitamini i minerali. Tvari koje nemaju nutritivni karakter su: polifenoli, flavonoidi, klorofil, izotiocijanati, fitoestrogeni, glikozidi, alkaloidi, steroli, karoteonoidi itd. Vlaknasta struktura, odnosno sirova biljna vlakna su po dogovoru iz 1993. godine priznata kao hranjiva tvar (nutrijent).



Slika 1. Podjela biološki aktivnih sastojaka hrane (Jašić, 2010.)

Neke biološki aktivne komponente hrane djeluju na probavni sustav. To su primjerice dijetalna vlakna i enzimi (bromelain, papain, amilaze). Druge pak djeluju na krvožilni (omega tri masne kiseline, vitamin K, ginko biloba), endokrini (alfalipoična kiselina) ili živčani sustav (derivati ksantina) itd. (Jašić, 2010.).

Prema podrijetlu biološki aktivne tvari mogu biti: biljnog (karotenoidi, polifenoli, flavonoidi, betalaini, glikozidi, alkaloidi, saponini), animalnog (kolostrum, probiotici, proteini sirutke), mineralnog (Ca, Mg,) i mikrobiološkog podrijetla (funkcionalne mikrobne kulture). Što je hrana više industrijski procesirana, to je manji udio fitokemikalija. Kada se hrana rafinira do kraja, tada u njoj ne ostaje ništa fitokemikalija. Takav je slučaj kod proizvodnje bijelog šećera, alkoholnog octa ili žestokih alkoholnih pića. Najbolji način da se osigura zdrava prehrana je svakodnevni unos voća i povrća u organizam. Tek tada fitokemikalije kao što su vitamini, minerali, vlakna i esencijalne masnoće mogu imati najefikasnije djelovanje.

Biološki aktivne tvari u prirodnom obliku kao što su kolostrum, probiotici, proteini sirutke i sl. mogu biti u krutom, želatinoznom i tekućem stanju. Ako nisu u prirodnom obliku mogu biti prerađene kao farmaceutski proizvodi u formi tableta, kapsula, praškova, sirupa itd (Jašić, 2010.).

2.1.3. Sekundarni metaboliti kao biološki aktivni spojevi

Prirodni bioaktivni spojevi jesu proizvodi biljaka, životinja i mikroorganizama. Mogu biti produkti primarnog ili sekundarnog metabolizma.

Produkti primarnog metabolizma su primjerice lipidi (steroidi, prostaglandini, hormoni, neki vitamini), aminokiseline i peptidi (tirozin, proteinski fragmenti, poliamini) nukleozidi, porfirini (Butler, 2008.). Produkti sekundarnog metabolizma su alkaloidi, terpenoidi, fenazini, poliketidi, neribozomalni peptidi itd. (Keller i sur., 2005.). Prvi sekundarni metaboliti u humanoj upotrebi bili su oni biljnog podrijetla zbog svoje dostupnosti za izolaciju i uporabu. Sekundarni metaboliti mikrobnog podrijetla morali su čekati razvoj moderne kemije, farmacije i medicine (Stanković, 2012.).

Sekundarni metaboliti su odličje samo određenih vrsta. Na sekundarni utječu različiti ekološki faktori primjerice odnosi u biocenozama (simbioza, kompeticija, komenzalizam, mutualizam, itd.)(Stanković, 2012.).

Kemijske strukture sekundarnih metabolita su raznolike i često kao polaznu osnovu uzimaju metabolite primarnog metabolizma ili "posuđuju" prekursore puteva primarnog metabolizma. Ti spojevi su najčešće iz skupina:

- alkaloida;
- terpenoida i steroida;
- fenilpropanoida;
- poliketida i masnih kiselina;
- aminokiselina i peptida;
- i nekih ugljikohidrata (Hanson, 2003.).

Proučavanje sekundarnih metabolita dovelo je do otkrića bioaktivnih molekula koje su našle svoju primjenu u medicini i poljoprivredi, te se oni mogu klasificirati kao:

- antibiotici (penicilin, streptomycin, vankomicin),
- antitumorne tvari (taksol, bleomicin),
- otrove (muskarin, lisergična kiselina)
- tvari za kontrolu bola (morfin),
- insekticide (piretrin),

- pesticide (makulozin),
- antiinflamatorne tvari (salicilna kiselina),
- imunosupresive (ciklosporin A).

Ovi metaboliti imaju veliki učinak u medicini i u temeljnim biološkim istraživanjima (Nisbet i Moore, 1997.).

2.1.4. Kolekcije bakterija kao izvor novih bioaktivnih spojeva

Kolekcije izolata dugo su bile jedini način izolacije novih prirodnih bioaktivnih spojeva. Traganje za biološki aktivnim prirodnim proizvodima tradicionalno je podrazumijevalo analizu ekstrakata mikroorganizama ili biljaka u odgovarajućem biološkom testu. Potpuno drugačiji pristup, uveden kasnije, zasnivao se na fizikalno-kemijskim pretragama u kojima se obično vrši uspoređivanje nepoznatih sa poznatim tvarima iz banke podataka dobivenih spojeva (tzv. kemijske biblioteke) (Gordon i sur., 1994.).

Više bakterije (aktinomicete) iz roda *Streptomyces*, prednjače po broju identificiranih bioaktivnih molekula u odnosu na sve ostale rodove bakterija. One su rasprostranjene u površinskim slojevima tla te je stvaranje kolekcija izolata relativno lako. Takve kolekcije farmaceutska industrija koristi više od 70 godina, još od otkrića antibiotika streptomicina kao izolata iz aktinomicete vrste *Streptomyces griseus* u Waksmanovom laboratoriju 1943. godine. Postojeće kolekcije predstavljaju samo mali uzorak , u odnosu na neistražena slabo dostupna područja u kojima vladaju ekstremni klimatski uvjeti. Pretpostavka je da takva nedostupna područja predstavljaju potencijalni izvor možebitno novih bioaktivnih molekula (Saintpierre-Bonaccio i sur., 2005.).

3. MIKROORGANIZMI U INDUSTRIJI I BIOTEHNOLOGIJI

U nizu društvenih običaja i tradicija pridaje se osobita važnost proizvodnji velikog broja namirnica uz pomoć mikroorganizama. Mikrobní procesi koji se primjenjuju u proizvodnji hrane, utemeljeni na brojnim osobinama mikroorganizama, tradicionalno upotrebljavaju njihove enzimске aktivnosti za pretvaranje jedne namirnice u drugu.

Određene vrste mikroorganizama vrlo su prikladne za industrijske procese. Mikroorganizmi ne posjeduju samo veliku količinu enzima za provođenje mogućih kemijskih pretvorbi, nego također izvode velike metabolizamske aktivnosti koje dopuštaju brze pretvorbe. Oni, osim toga, imaju veliku površinu zbog brze apsorpcije nutrijenata i izlučivanja konačnih produkata. Osim toga u pravilu se vrlo brzo razmnožavaju, kao npr. *Escherichia coli*, kod koje je generacijsko vrijeme 20 minuta u optimalnim uvjetima (Duraković, 1996.).

U industrijskim procesima mikroorganizmi djeluju poput kemijskih tvornica. Oni sintetiziraju goleme količine jednostavnih produkata koji se mogu djelotvorno izolirati i dobiti u čistom obliku. Mikroorganizmima se jednostavno rukuje i uzgaja ih se, a genetički su, uz rijetke mutacije, stabilni. Njihova se vrijednost povećava ako rastu na jeftinim supstratima koje mogu brzo metabolizirati (primjerice na sporednim produktima industrijskih procesa). Na primjer, velike se količine sirutke dobivaju tijekom proizvodnje sira, pa se u sirutku dodaju mikroorganizmi koji je pretvaraju u mliječnu kiselinu i lako doprinose dobiti u sirnoj industriji (Duraković, 1996.).

3.1. Organske kiseline, aminokiseline i vitamini

Golem se broj organskih kiselina, aminokiselina i vitamina komercijalno proizvodi pomoću mikroorganizama. Tipični kemijski spojevi svake od tih skupina, zajedno s mikroorganizmom odgovornim za njihovu proizvodnju dani su u tablici 1:

Tablica 1 Odabrane organske kiseline, aminokiseline i vitamini koje proizvode mikroorganizmi (Duraković, 1996.)

PRODUKT	MIKROORGANIZAM	PRIMJENA
ORGANSKE KISELINE		
Octena kiselina	<i>Acetobacter sp.</i>	Začin, zaštita namirnica
Limunska kiselina	<i>Aspregillus niger</i> <i>Aspregillus wentii</i>	Antikoagulans, začin, za proizvodnju tinte i bojila
Eikozapentaeonička kiselina	Morske alge kremenjašice (alge)	Snižavanje kolesterola u krvi
Mliječna kiselina	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Kalcij-laktat i željezo-laktat u stanjima pothranjenosti
AMINOKISELINE		
Glutaminska kiselina	<i>Micrococcus glutamicus</i> <i>Arthrobacter sp.</i> <i>Brevibacterium sp.</i>	Medicinski preparat, dodatak hrani
lizin	<i>Escherichia coli i</i> <i>Enterobacter aerogenes</i>	Dodatak hrani
valin	<i>Escherichia coli</i>	
VITAMINI		
Cijanokolabamin (B ₁₂)	<i>Streptomyces olivaceus</i> <i>Propionibacterium freundenreichii</i>	Dodatak hrani, liječenje perniciozne anemije (pomanjkanje vitamina B ₁₂)
Beta-karoten	<i>Dunaliella salina (alga)</i>	Bojanje hrane, prekursor vitamina A, u obradi karcinoma
Riboflavin (B ₂)	<i>Ashbya gossypii (alga)</i>	Dodatak hrani

Octena kiselina (Ocat)

Vinski se ocat tradicionalno dobiva spontanom kiseljenjem vina. Kvasci fermentiraju voćni sok u etanol do koncentracije od 10 do 20%. Sok se potom mehanički raspršuje u spremniku, gdje se nalaze bakterije *Acetobacter aceti* koje rastu na drvenim strugotinama ili na nekom

drugom supstratu. Tijekom prelaska etanola preko površine, bakterijski ga enzimi prevode u acetaldehid, a potom u octenu kiselinu. Prije sakupljanja na dnu spremnika, ocat recirkulira nekoliko puta. Zaostali etanol isparava, a produkt u pravilu sadrži 3 do 5% octene kiseline. Okus je octa određen uljima, šećerima i ostalim spojevima koji su proizvod bakterijskog metabolizma a zajedno s rezidualnim organskim spojevima u vinu, ako je ocat načinjen od vina (Duraković, 1996.).

Mnogi koji se bave liječenjem ljekovitim biljem smatraju da je jabučni ocat uspješno sredstvo u borbi protiv artritisa, da stimulira stvaranje žuči, da može zaustaviti proljev, suzbiti gastrointestinalne infekcije i da liječi sindrom kronične premorenosti. (<http://www.plivazdravlje.hr>, 2016.).

Mliječna kiselina

Mliječna se kiselina dobiva procesom fermentacije u kojem sudjeluje bakterija *Lactobacillus delbrueckii* ili *L. bulgaricus*. Te bakterije rastu na hidrolizatu kukuruza, ili krumpirovu škrobu, melasi ili na sirutki nakon proizvodnje sira. U tome se procesu mliječna kiselina u pravilu neutralizira vapnom (CaO) radi dobivanja kalcij-laktata. Taj se spoj koristi kao dodatak hrani ili se može prevesti ponovno u mliječnu kiselinu za ostale primjene (Duraković 1996.).

Eikozapentaenična kiselina (EPK)

Ova organska kiselina, poznata i kao omega-3 masna kiselina, nalazi se u velikim količinama u ribama slanih voda, osobitou mesu lososa i tuna. Sniženje koncentracije kolesterola u krvi ljudi pripisuje se uživanju mesa spomenutih riba u kojemu se nalaze omega-3 masne kiseline u malim količinama. Ribe međutim ne proizvode te masne kiseline, one ih dobivaju iz algi (diatomeja) koje pojedu. Neke velike kompanije pokušavaju uzgajati dijatomeje radi dobivanja EPK izravni i upotrijebiti ih kao dodatak hrani za obradu bolesnika u kojih je visoka razina kolesterola (Duraković, 1996.).

Limunska kiselina

Limunska kiselina proizvodi se kao suvišak, međuproizvod u ciklusu trikarbonskih kiselina (ciklus limunske kiseline). Plijesni *Aspergillus niger* i *A. wentii*, odgovorne za sintezu, nacjepljuju se na kukuruzni škrob, kukuruzno brašno, sećernu repu, melasu, sok od šećerne trske i sirovi šećer. Proces je aeroban i provodi se u velikim spremnicima, uz snažno aeriranje. Tijekom rasta plijesni *Aspergillus* u hranjivoj podlozi enzimatski razgrađuju glukozu

do konačne tvorbe citronske kiseline. Proces ne ide dalje od tog spoja, budući da plijesan nema enzime za kasnije reakcije u ciklusu. Citronska se kiselina nagomilava, prikladnim se postupcima izdvaja i upotrebljava za različite komercijalne proizvode (Duraković, 1996.).

Aminokiseline

Aminokiseline su postale golem dio industrijske produkcije pomoću mikroorganizama. Primjerice svake se godine proizvede više od 165 000 tona glutaminske kiseline koja se u obliku natrij-glutamata upotrebljava za poboljšanje okusa namirnica.

U postupku dobivanja glutaminske kiseline, bakterije kao što su *Micrococcus glutamicus*, ili *Arthrobacter*, ili *Brevibacterium* vrste, mogu adirati amonijak na alfa-ketoglutarnu kiselinu, jednog od intermedijera u ciklusu limunske kiseline. U tome se procesu proizvodi glutaminske kiseline više od količine što je bakteriji nužna. Supstrati u procesu dobivanja glutaminske kiseline su melasa, riblje brašno, sojino brašno i amonijevi spojevi.

Postupak proizvodnje lizina zahtijeva dvije različite vrste bakterija, za svaki korak različitu. *Escherichia coli* inokulira se u glicerol, kukuruzni ekstrakt i amonijeve spojeve radi produkcije diaminopomelinske kiseline. Taj se kemijski spoj zatim modificira pomoću *Enterobacter aerogenes* radi proizvodnje lizina (Duraković, 1996.).

3.1.1. Proizvodnja vitamina

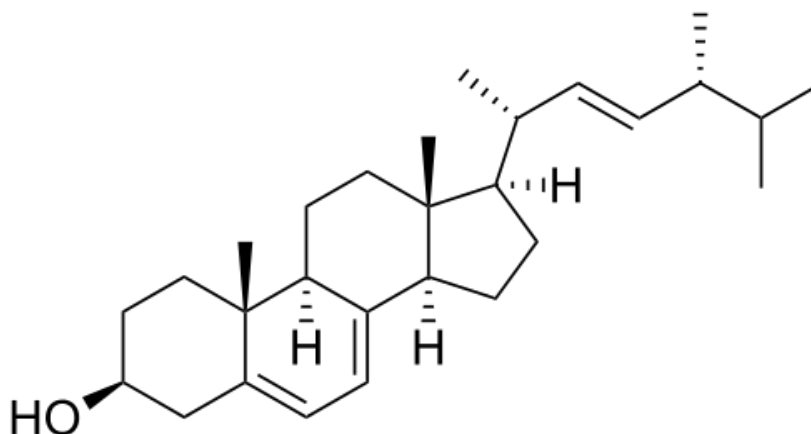
Vitamini se komercijalno mogu proizvesti kemijskom sintezom. Međutim proizvodnja je nekih vitamina vrlo složena i skupa, pa je ekonomičniji postupak njihova dobivanja mikrobnom fermentacijom. Dva su produkta takvog mikrobnog djelovanja: vitamin B₂ (riboflavin) i vitamin B₁₂ (cijanokolabamin). Za proizvodnju riboflavina uzgaja se plijesan *Ashhya gossypii* na kukuruznom ekstraktu. U postupku dobivanja cijanokolabamina upotrebljava se ili *Streptomyces olivaceus* ili *Propionibacterium freundenreichii* koje se uzgajaju na slanom ekstraktu i kukuruznome ekstraktu uz dodatak kobalta, kao esencijalnog dijela strukture vitamina B₁₂.

Beta-karoten, prekursor vitamina A, proizvodi se u vrlo velikim količinama pomoću halotolerantne (podnosi visoku koncentraciju NaCl-a) alge *Dunaliella salina*. Taj organizam proizvodi više od 20% beta-karotena u staničnoj masi, a raste u okolišu što sadrži koncentraciju NaCl-a kakva je u Mrtvom moru. Otkako se beta-karoten počeo dobivati u velikim količinama i dodavati u namirnice kao bojilo, a i kao prekursor vitamina A, za koji se drži da ima antikarcinogeno djelovanje, njegovo je značenje umnogostručeno (Duraković 1996.).

3.1.1.1. Izolacija vitamina skupine B i provitamina D2 (ergosterola) iz pekarskog kvasca (*Saccharomyces cerevisiae*)

Sastav pekarskog kvasca vrlo je kompleksan i različit s obzirom na sadržaj vitamina. Kvasac sadrži 14 raznih vitamina, od kojih je većina topljiva u vodi, dok je samo provitamin D₂ (ergosterol) topljiv u mastima. Kvasac je jedan od najbogatijih izvora vitamina skupine B (B1, B2, B6, B12, folna kiselina, nikotinska kiselina, inozitol, pantotenska kiselina, biotin i p-aminobenzojeva kiselina) i jeftina je sirovina za dobivanje visokovrijednog vitaminskog koncentrata. Osim toga kvasac sadrži u svom sastavu 48-58% bjelančevina (na suhu tvar) koje se po aminokiselinskom sastavu približavaju životinjskim bjelančevinama i radi toga imaju veliku hranjivu vrijednost.

Da bi se izolirali navedeni vitamini, pekarski se kvasac podvrgne autolizi pri temperaturi 50-55°C, a zatim se obrađuje etanolom da bi se izdvojili u vodi topljivi vitamini B skupine i osigurala filtracijska moć kvasne mase. Osušeno kvasno brašno ponovno se obrađuje alkoholom, a dobiveni masni koncentrat saponificira lužinom da bi se dobio kristalični provitamin D₂ (ergosterol) (Kniewald i sur., 2000.).



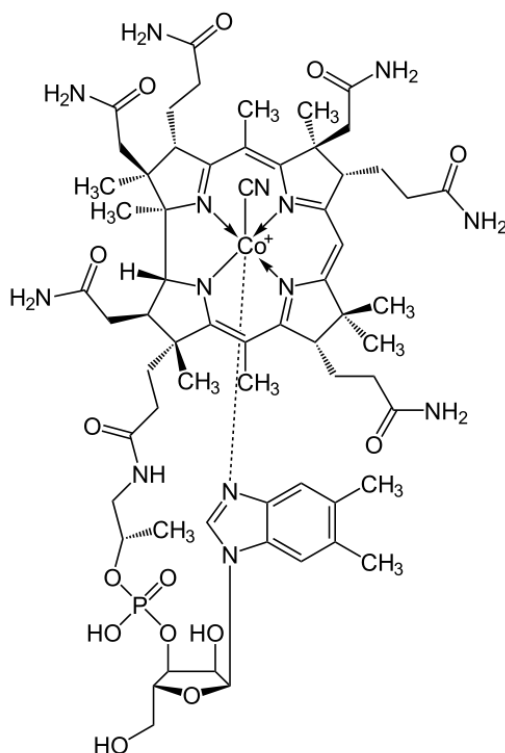
Slika 2 Provitamin D₂ (<https://en.wikipedia.org>)

3.1.1.2. Izolacija vitamina B₁₂ iz biomase

Cijanokolabamin ili vitamin B₁₂ najvažniji je predstavnik korinoida. Ima izvanredno značajnu ulogu u metaboličkim procesima prokariotskih i eukariotskih stanica, gdje se uvijek javlja u obliku kobalamin-koenzima i sudjeluje u više tipova biokemijskih reakcija kao što su, izomerizacija dikarboksilnih kiselina, transmetilacija i transformacija dihidroksi-spojeva u deoksi spojeve. Nedostatak vitamina B₁₂ u organizmu čovjeka i životinja uzrokuje pernicioznu anemiju (Kniewald i sur., 2000.).

Izolacija vitamina vrši se na način da se biomasa suspendira u zagrijanoj vodi, a zatim se dobivenoj homogenoj masi dodaje dijatomejska zemlja te se provodi postupak filtracije. Dobiveni filtrat se zatim cijanizira pri čemu se oboji u crveno. Filtratu se potom dodaje aktivni ugljen koji se kasnije uklanja filtracijom. Na aktivnom ugljenu adsorbiran je vitamin B₁₂ s kojega se eluira smjesom otapala aceton/voda. Aceton se zatim otpari destilacijom, a vodena faza koja sadrži vitamin B₁₂ ekstrahira se smjesom otapala fenol/tetraklor ugljik.

Nakon završetka ekstrakcije organskom sloju doda se Al_2O_3 na koji se veže vitamin B_{12} koji se zatim eluira sa Al_2O_3 u kromatografskoj koloni.



Slika 3 Cijanokolabamin (<https://sh.wikipedia.org>)

3.1.2. Transformacija steroida

Steroidi su hormoni iznimno važni u kontracepciji i u obradi različitih bolesti, uključujući artritis i šok. Kortikosteron, hormon kore nadbubrežne žlijezde, uspoješno se upotrebljava u obradi stanja šoka. Taj se spoj dobiva iz goveda, ali u vrlo malim količinama, pa je jako važno postalo otkriće da mikroorganizmi mogu transformirati neke druge steroide u kortikosteron. Istraživanja pokazuju da se kombinacija kemijskih i mikrobnih reakcija može uspješno koristiti za proizvodnju kortizona koji se uvelike primjenjuje u liječenju artritisa (upala zglobova) i u suzbijanju ostalih tipova upalnih procesa. Transformacija steroida uključuje jedan specifični enzim koji mijenja posebnu kemijsku komponentu na molekuli steroida i tako stvara novi spoj. Takav jedan enzim može biti proizvod samo jedne mikrobne vrste. Steroidi se upotrebljavaju za ispravljanje i uklanjanje defekata hormonalnih i ostalih poremećaja (Duraković, 1996.).

3.2. Antibiotici

Najveći broj kemoterapijskih agenasa nastaje na jedan od dva načina:

- 1) kao prirodni produkti mikroorganizama,
- 2) kao antimikrobne tvari ili agensi sintetizirani u laboratoriju.

Izvorni pojam antibiotik odnosi se samo na kemijske tvari mikrobnog podrijetla koje u malim koncentracijama ubijaju mikroorganizme. Danas se taj pojam primjenjuje za velik broj antimikrobnih kemijskih spojeva, uključujući one koji su potpuno sintetizirani u laboratoriju i kao i kemijski modificirane (polusintetičke) oblike prirodnih antibiotika (Duraković, 1996.).

Godine 1889. francuski znanstvenik Paul Vuillemini upotrijebio je pojam „antibiotik“ za označavanje tvari što je bila izolirana nekoliko godina ranije iz bakterije *Pseudomonas aeruginosa*. Ta tvar, nazvana piocijanin, inhibirala je u epruvetama za testiranje rasta, rast ostalih bakterija. Taj se Vuilleminijev pojam zadržao do današnjih dana.

Nakon što je sir Alexander Fleming otkrio da mikroorganizmi proizvode kemijske tvari koje inhibiraju rast ili ubijaju mikroorganizme, nastala je potraga za novim antibioticima. Otkriće penicilina i kasniji razvoj tog spoja u ranim 1940-im godinama, koje su ostvarili Ernst Boris Chain i Howard Walter Florey, bilo je osnova za današnju industriju antibiotika. Antibiotici se u pravilu proizvode tijekom rasta specifičnih bakterijskih ili fungalnih vrsta u submerznim kulturama u velikim snažno aeriranim fermentorima.

Primjerice, u proizvodnji penicilina je prikladan medij (koji u pravilu sadrži i sporedne produkte destilacije) sterilno inokuliran s plijesni *Penicillium chrysogenum* ili *P. notatum*. Nakon 7-14 dana uspostavljaju se uvjeti koji ometaju proizvodnju penicilina. Plijesan se uklanja centrifugiranjem, katkada filtriranjem, a antibiotik se ekstrahira i pročišćava.

Tvorba antibiotika, koja je prirodan način kontrole (sprječavanja) u natjecanju mikrobnih populacija, ima veliku primjenu i u ljudskoj populaciji tijekom liječenja infekcija uzrokovanih mikroorganizmima. Pozornost se pridaje i primjeni antibiotika u stočarstvu i poljoprivredi kao dodatcima za zaštitu bilja i stoke protiv infekcijskih bolesti, a i za pospješene njihova rasta (Duraković, 1996.).

Značaj i učestalost ovih glavnih vrsta mikroba kao proizvođača bioaktivnih metabolita je značajno varirala tijekom posljednjih desetljeća. U početku ere antibiotika gljivične (penicilin, grizeofulvin) i bakterijske (gramicidin) vrste bile su u prvom planu interesa, ali nakon otkrića streptomicina i kasnije kloramfenikola, tetraciklina i makrolida, pozornost su privukle vrste *Streptomyces* (Bérđy, 2004.)

Sekundarne metabolite, antibiotike i slične prirodne produkte mogu proizvesti gotovo svi živi organizmi ali su ti metaboliti vrlo različiti (Bérđy, 2004.).

U bakterijskoj populaciji najčešći proizvođači korisnih sekundarnih metabolita su bakterije vrsta *Bacillus* i *Pseudomonas*. Posljednjih godina pridružile su im se i cijanobakterije.

Ukupan broj poznatih bioaktivnih spojeva u ovoj grupi je oko 3800, od toga 17% su mikrobnji metaboliti. (Bérđy, 2004.). Prema glavnim tipovima mikrobnjih proizvođača, prosječan broj mikrobnjih metabolita prikazan je u tablici 2:

Tablica 2 Prosječan broj bioaktivnih mikrobnjih produkata (2002.) prema njihovim proizvođačima (Bérđy, 2004.)

Izvor	Antibiotici	Ostali bioaktivni metaboliti	Ukupni bioaktivni metaboliti	U praktičnoj uporabi (ljudskoj)	Inaktivni metaboliti
Bakterije	2900	900	3800	10-12 (8-10)	3000 do 5000
<i>Actinomycetales</i>	8700	1400	10100	100-120 (70-75)	5000 do 10000
Gljive	4900	3700	8600	30-35 (13-15)	2000 do 15000
Ukupno	16500	6000	22500	140-160 (100)	20000 do 25000

U tablici 4 broj svih antibiotika (bez drugih djelatnosti), broj antibiotika koji pokazuju dodatne "druge" bioaktivnosti i ostali bioaktivni metaboliti, kao i ukupan broj sažeti su prema glavnim tipovima proizvođača i nekoliko određenih vrsta proizvođača.

Izvor	Bioaktivni sekundarni mikrobiološki metaboliti				
	Antibiotici		Bioaktivni metaboliti		Ukupni bioaktivni metaboliti
	Ukupno	Sa drugom aktivnošću	Bez antibiotičke aktivnosti	Antibiotici+bioaktivni	
Bakterija	2900	(780)	900	(1680)	3800
Eubacteriales	2170	(570)	580	(1150)	2750
<i>Bacillus</i> sp.	795	(235)	65	(300)	860
<i>Pseudomonas</i> sp.	610	(185)	185	(370)	795
Miksobakter	400	(130)	10	(140)	410
Cijanobakter	300	(80)	340	(420)	640
Aktinomicete	8700	(2400)	1400	(3800)	10100
<i>Streptomyces</i> sp.	6550	(1920)	1080	(3000)	7630
Rijetke aktinoze	2250	(580)	220	(800)	2470
Gljive	4900	(2300)	3700	(6000)	8600
Mikroskopične gljive	3770	(2070)	2680	(4750)	6450
<i>Penicillium Aspergillus</i>	1000	(450)	950	(1400)	1950
Basidiomicete	1050	(200)	950	(1150)	2000
Kvasci	105	(35)	35	(70)	140
Sluzava plijesan	30	(5)	20	(25)	60
Ukupno	16500	(5500)	6000	(11500)	22500
Protozoa	35	(10)	5	(45)	50

Tablica 4 Prosječan broj bioaktivnih mikrobnih metabolita prema njihovim proizvođačima i bioaktivnostima (Bérdy, 2004.)

3.3. Probiotici i prebiotici

Prije stotinu godina, Elie Metchnikoff (ruski znanstvenik, dobitnik Nobelove nagrade, i profesor na Institutu Pasteur u Parizu) pretpostavio je da bakterije mliječne kiseline (BMK) nude zdravstvene prednosti koje mogu promicati dug život. Smatrao je da se "crijevna autointoksikacija" i rezultirajuće starenje može potisnuti modifikacijom crijevne mikroflore i zamjenom proteolitičkih mikroorganizma poput klostridija-koje stvaraju toksične tvari uključujući fenole, indole i amonijak iz probave proteina-s korisnim mikrobima. On je razvio prehranu s mlijekom bakterijom koju je nazvao "bugarski bacillus" (WGO, 2011.)

Godine 1917., prije nego je Sir Alexander Fleming otkrio penicilin, njemački profesor Alfred Nissle izolirao je nepatogeni soj bakterije *Escherichia coli* iz fecesa vojnika koji nije razvio enterokolitis tokom teške epidemije šigeloze. Poremećaji u probavnom traktu često su bili tretirani sa održivim nepatogenim bakterijama koje su koristile za promjenu ili zamjenu crijevne mikroflore. Soj *Escherichie coli* Nissle 1917 je jedan od rijetkih primjera nelaboratorijskih probiotika.

Bifidobacterium je prvi put izolirao Henry Tissier iz crijeva dojenčeta te je nazvao bakteriju *Bacillus bifidus communis*. Tissier je tvrdio da bi bifidobakterije zamijenile proteolitičke bakterije koje uzrokuju proljev i preporučio davanje bifidobakterija dojenčadi koja pati od ovih simptoma.

Pojam "probiotici" prvi put su predstavili Lilly i Stillwell 1965. Za razliku od antibiotika, probiotici su definirani kao mikrobnno izvedeni faktori koji stimuliraju rast drugih organizama (WGO, 2011.).

Probiotici

Probiotici su živi mikroorganizmi koji mogu biti formulirani u više različitih vrsta proizvoda, uključujući hranu, lijekove i dodatke prehrani. Vrste *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* se najčešće koriste kao probiotici, ali također kao probiotici mogu se koristiti kvasac *Saccharomyces cerevisiae*, neke *E. coli* i *Bacillus* vrste. Bakterije mliječne kiseline, uključujući i *Lactobacillus* vrste, koje su se tisućama godina koristile za zaštitu hrane fermentacijom, mogle imati dvostruku funkciju: kao sredstva za prehrambenu fermentaciju i kao izvor zdravstvenog blagostanja (WGO, 2011.).

Prebiotici i sinbiotici

Prebiotici su prehrambene tvari (uglavnom sastavljene od neškrobnih polisaharida i oligosaharida slabo probavljivih pomoću ljudskih enzima) koje pospješuju rast odabranih crijevnih mikroorganizama. Prebiotici stimuliraju rast korisnih mikroorganizama, a nepoželjnima štete. Većina prebiotika se već nalazi u hrani kao uobičajen sastojak, primjerice u pecivima, žitaricama, čokoladama, namazima i mliječnim proizvodima.

Općepoznati prebiotici:

- oligofruktoze,
- inulin,
- galakto-oligosaharidi,
- laktuloze,
- oligosaharidi iz majčina mlijeka .

Laktuloza je sintetski disaharid koji se koristi kao lijek za liječenje opstipacije i encefalopatije. Prebiotik oligofruktoza se prirodno nalazi u mnogim namirnicama, kao što su pšenica, luk, banana, med, češnjak i poriluk. Fermentacija oligofruktoze u debelom crijevu rezultira velikim brojem fizioloških učinaka, uključujući:

- povećanje broja bifidobakterija u debelom crijevu,
- povećanje apsorpcije kalcija,

- povećanje fekalne težine,
- skraćivanje vremena gastrointestinalnog prijenosa,
- potencijalno, snižavanje razina lipida u krvi.

Pretpostavlja se da povećanje broja crijevnih bifidobakterija koristi ljudskom zdravlju proizvodnjom spojeva koji inhibiraju potencijalne patogene, smanjenjem razine amonijaka u krvi i proizvodnjom vitamina i probavnih enzima. Sinbiotici su odgovarajuće kombinacije prebiotika i probiotika. Sinbiotički proizvod pojačava prebiotički i probiotički učinak (WGO, 2011.).

4. ZAKLJUČAK

Tijekom proteklih 50 godina došlo je do značajnih otkrića i spoznaja o mogućnostima primjene mikroorganizama glede unaprijeđenja medicinske tehnologije, zdravlja ljudi i životinja, obrade hrane, sigurnosti i kvalitete hrane, genetičkog inženjeringa, zaštite okoliša, poljoprivredne biotehnologije i učinkovitijeg zbrinjavanja poljoprivrednog i komunalnog otpada. Analogno tomu unaprijeđena je i izolacija bioaktivnih tvari iz bioloških materijala.

Bioaktivni spojevi predstavljaju sve veći interes, te su vrlo obećavajuće područje u punom razvoju. To je dovelo do sve većeg istraživanja bioaktivnih spojeva iz različitih izvora.

Mikroorganizmi imaju značajnu funkciju u izolaciji mnogih bioaktivnih spojeva kao što su vitamini, organske kiseline, aminokiseline, steroidi, antibiotici itd. jer koriste biološke sustave za proizvodnju tih vrlo vrijednih molekula.

Primjenom u industriji mikroorganizmi su u stanju sintetizirati znatne količine jednostavnih produkata koji se mogu djelotvorno izolirati i dobiti u čistom obliku. Mikroorganizmi su idealne male tvornice zbog njihova jednostavnog i brzog namnožavanja, uzgoja i relativno lake manipulacije njima, a i genetički su vrlo stabilni. Vrijednost dobivenih biološki aktivnih tvari je veća ako se mikroorganizmi uzgajaju na jeftinim supstratima koje mogu brzo metabolizirati (primjerice na sporednim produktima industrijskih procesa).

Prirodni biološki aktivni spojevi proizvedeni s pomoću mikroorganizma mogu se inkorporirati u hranu kao dodaci prehrani, poboljšivači okusa, teksture, konzervansi, emulgatori, sredstva za zakiseljavanje i zgušnjavanje te površinski aktivne tvari.

5. LITERATURA

1. Balandrin M, Klocke J, Wurtele E, Bollinger W: Natural plant chemicals: sources of industrial and medicinal materials. *Science*, 228(4704):1154–9., 1985.
2. Baltz RH: Renaissance in antibacterial discovery from actinomycetes. *Current Opinion in Pharmacology* 8: 557-563., 2008.
3. Bérdy J: Bioactive Microbial Metabolites. *The Journal of Antibiotics*, 58(1): 1–26, 2005
4. Butler MS: Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials. *Natural Product Reports*, 25: 475-516, 2008.
5. Centi G, Perathoner S: From green to sustainable industrial chemistry. *Sustainable Industrial Processes*, Weinheim, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA., 2009.
6. Chang M, Keasling J: Production of isoprenoid pharmaceuticals by engineered microbes., *Nature Chemical Biology* 2(12):674–81, 2006.
7. Demain A: Microbial biotechnology. *Trends Biotechnology* 18(1):26–31, 2000.
8. Demain AL, Adrio JL: Contributions of microorganisms to industrial biology. *Mol Biotechnol* 38(1):41–55, 2008.
9. Duraković S: Primjenjena mikrobiologija, Zagreb, 1996.
10. Gil-Chavez GJ, Villa JA, Ayala-Zavala JF, Heredia JB, Sepulveda D, Yahia EM, Gonzalez-Aguilar GA: Technologies for Extraction and Production of Bioactive Compounds to be Used as Nutraceuticals and Food Ingredients: An Overview, 2013.
11. Gordon EM, Barrett RW, Dower WJ, Fodor SP, Gallop MA: Applications of combinatorial technologies to drug discovery. 2. Combinatorial organic synthesis, library screening strategies, and future directions. *Journal of Medicinal Chemistry* 37: 1385-1401, 1994.
12. Guaadaoui A, Benaicha S, Elmajdoub N, Bellaoui M, Hamal A: What is a bioactive compound? A combined definition for a preliminary consensus. *International Journal of Nutrition and Food Sciences*, 3(3): 174-179, 2014.

13. Hanson JR, Natural Products: The Secondary Metabolites. Cambridge, UK The Royal Society of Chemistry, 2003.
14. Jašić M: Uvod u biološki aktivne komponente hrane, modul prvi, Biološki aktivni sastojci hrane, dodaci prehrani, funkcionalna hrana i fortifikacija hrane, Tuzla, 2010.
15. Keller N -P, Turner G, Bennett JW: Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics. *Nature Reviews Microbiology* 3: 937-947, 2005.
16. Kniewald Z: Priručnik za pripremu biološki djelatnih supstancija, Zagreb, 2000.
17. Lam K: New aspects of natural products in drug discovery. *Trends Microbiol* 15(6):279–89, 2007.
18. Mapari S, Nielsen K, Larsen T, Frisvad J, Meyer A, Thrane U: Exploring fungal biodiversity for the production of water-soluble pigments as potential natural food colorants. *Current Opinion Biotechnology* 16(2):231–8, 2005.
19. Nisbet J, Moore L, Moore M: Will natural products remain an important source of drug research for the future? *Current Opinion in Biotechnology* 8: 708-712, 1997.
20. Oksman-Caldentey K, Inze D: Plant cell factories in the post-genomic ´ era: new ways to produce designer secondary metabolites. *Trends in Plant Science* 9(9):433–40 , 2004.
21. Olano C, Lombo F, M ´endez C, Salas J: Improving production of ´ bioactive secondary metabolites in actinomycetes by metabolic engineering. *Metabolic Engineering* 10(5):281–92, 2008.
22. Saintpierre-Bonaccio D, Amir H, Pineau R, Tan GY, Goodfellow M: *Amycolatopsis plumensis* sp. nov., a novel bioactive actinomycete isolated from a New-Caledonian brown hypermagnesian ultramafic soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55: 2057-2061, 2005.
23. Silveira S, Daroit D, Brandelli A: Pigment production by *Monascus purpureus* in grape waste using factorial design. *LWT-Food Science Technology* 41(1):170–4, 2008.
24. Stanković N: Izolacija i karakterizacija bioaktivnih sekundarnih metabolita iz odabranih sojeva roda *Streptomyces*, Doktorska disertacija, Beograd, 2012.

25. Verpoorte R, Memelink J: Engineering secondary metabolite production in plants. *Current Opinion Biotechnology* 13(2):181–7., 2002.
26. Wilkinson B, Micklefield J: Mining and engineering natural-product biosynthetic pathways. *Nature Chemical Biology* (7):379–86, 2007.
27. World Gastroenterology Organisation Global Guidelines, Probiotics and prebiotics, October 2011
28. <http://www.plivazdravlje.hr/centar/prehrana/11/namirnica/61/Ocat.html>, 15.9.2016.
29. <https://en.wikipedia.org/wiki/Ergosterol>, 18.9.2016.
30. <https://sh.wikipedia.org/wiki/Cijanokobalamin>, 18.9.2016.