

Mehanizam probiotičkog djelovanja bakterija mliječne kiseline*

Jagoda Šušković, Blaženka Brkić i Srećko Matošić

Revijalni prikaz - Review's account

UDK: 637.146.3

Sažetak

Probiotik se može definirati kao pojedinačna ili mješovita kultura živih mikroorganizama koji, primijenjeni u ljudi ili životinja blagotvorno djeluju na domaćina poboljšavajući mu svojstva autohtone mikroflore. Znanstveni temelj za izučavanje i razvoj probiotika proistječe iz spoznaje da je crijevna flora uključena u zaštitu domaćina (čovjeka ili životinje) od naseljavanja intestinalnog trakta neautohtonim mikroorganizmima. Probiotičko djelovanje bakterija mliječne kiseline može se iskazati različitim mehanizmima djelovanja prema patogenim mikroorganizmima u intestinalnom traktu: 1. smanjivanjem broja živih bakterija: a) proizvodnjom antibakterijskih supstancija (bakteriocina), b) natjecanjem za hranjiva, c) natjecanjem za mjesta vezanja na crijevnoj epitelnoj površini; 2. izmjenom metabolizma mikroorganizama: a) povećanjem ili b) smanjenjem enzimne aktivnosti i 3. stimuliranjem imunološkog sustava povećanjem: a) razine antitijela i b) makrofagne aktivnosti.

Ključne riječi: bakterije mliječne kiseline, probiotička aktivnost

a) Uvod

Izraz "bakterije mliječne kiseline" obuhvaća velik broj bakterijskih vrsta koje proizvode mliječnu kiselinu previranjem različitih ugljikohidrata. Podrijetlo tog trivijalnog imena potječe još iz 1884. godine, kada je H u e p p e prvi upotrijebio izraz "Milchsauerbacillus" da opiše dio flore mikroorganizama odgovornih za kiseljenje mlijeka i mliječnih proizvoda (S t a m e r, 1979.). Spoznaja da bakterije izazivaju kiseljenje mlijeka nešto je starija jer je P a s t e u r 1857. godine otkrio da je kiseljenje mlijeka uzrokovano mikroorganizmima (Š u š k o v i ć, 1989.).

Prema najnovijoj sistematici (S n e a t h i sur., 1986.; W o o d, 1992.), bakterije mliječne kiseline obuhvaćaju velik broj vrsta koje pripadaju rodovima:

* Rad je izložen na znanstveno-stručnom simpoziju "Fermentirani mliječni proizvodi u prehrani i dijetetici", Zagreb, 1996.

Lactobacillus, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Bifidobacterium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus* i *Sporolactobacillus*. Tradicionalno se primjenjuju u pripravi fermentirane hrane i napitaka, silaže i probiotičkih pripravaka (Brkić, 1995.; Šušković, 1996.).

Bakterije mliječne kiseline dio su populacije mikroorganizama probavnog trakta zdravih ljudi i životinja i uključene su u njihov metabolizam. Koristan učinak bakterija mliječne kiseline, unesenih fermentiranim mliječnim proizvodima, na regulaciju mikroflore crijevnog trakta uočio je Metchnikoff početkom ovog stoljeća (Metchnikoff, 1907.). Elie Metchnikoff (1845.-1916.), zaposlen u Pasteurovu institutu u Parizu, dugo je smatrao da mikroflora debelog crijeva štetno djeluje na zdravlje odrasla čovjeka. Bio je u to toliko uvjeren da je podržavao kirurško odstranjenje debelog crijeva. Ipak, kada je otkrio da bugarski seljaci, koji se hrane velikim količinama kiselog mlijeka, dožive vrlo duboku starost, promijenio je mišljenje. Treba naglasiti da se Metchnikoff (1907.) bavio više kiselim mlijekom, a ne onim što danas nazivamo jogurtom, i kako se postupno dolazilo do čistih kultura, zastupao je uporabu nazvanim "bugarski bacillus". Taj soj je gotovo istovjetan s mikroorganizmom koji je kasnije nazvan *Bacillus bulgaricus*, a potom *Lactobacillus bulgaricus*. Laktobacil koji fermentira mlijeko u jogurt naziva se danas *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* i djeluje zajedno sa *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, proizvođači jogurt kakvog danas poznajemo (Fuller, 1992.). Međutim, tek se tijekom posljednjih tridesetak godina javlja interes za razvijanje Metchnikoffljeve ideje radi pronalaženja prirodnog načina poboljšanja zdravlja ljudi i životinja korištenjem fermentiranih proizvoda i čistih kultura bakterija mliječne kiseline u terapijske svrhe.

Široka primjena kemijskih dodataka i antibiotika u prehrani uzrok je kroničnom poremećaju crijevne mikroflore i terapijskoj nedjelotvornosti kemoterapeutika u slučaju različitih infektivnih bolesti. Jedan od najuvjerljivijih pokazatelja uloge crijevne mikroflore u otpornosti prema bolesti dali su 1978. godine Collins i Carter. Dokazali su da se pokusni kunić uzgojen "bez klica" (germfree) može ubiti s 10 stanica *Salmonella enteritidis*, ali da je potrebno 10^9 stanica *S. enteritidis* da bi se usmratio kunić s normalnom crijevnom mikroflorom. Nema sumnje da životinje u svom probavnom traktu imaju populaciju mikroorganizama koja ih štiti od bolesti. Ako je tome tako, zašto su nam potrebni probiotici? Pri normalnim uvjetima ne bismo trebali probiotike, u divljini mlade životinje brzo stječu zaštitnu

mikrofloru primivši je od majke i okoline. Ipak, moderne metode perinatalne skrbi ograničavaju dodir s majkom i pribavljaju neprirodnu hranu i neprirodne uvjete okoline. Rezultat toga je da u crijevnoj mikroflori manjkaju normalni sastojci odgovorni za otpornost prema bolesti. Čak i mikroflora odrasle osobe može biti poremećena prehranom, antibakterijskim lijekovima i stresom (T a n n o c k, 1983. Stoga je poželjno primijeniti bakterije mliječne kiseline u prehrani i terapeutici kao probiotike, zbog njihova širokog raspona korisnog djelovanja.

b) Definicija probiotika

Riječ probiotik potječe od grčke riječi *pro bios* (za život) i tijekom godina poprimala je različita značenja. Prvi put su je upotrijebili Lilly i Stillwell 1965. godine i njome opisali tvar koju je izlučivao jedan mikroorganizam da bi se poticao rast drugog mikroorganizma. Tim se značenjem može potpuno opravdati dijametralno suprotno značenje riječi antibiotik i s etimološkog gledišta. Ipak, riječ probiotik se u gornjem značenju nije održala i S p e r t i (1971.) je počinje postupno primjenjivati za ekstrakte tkiva koji su poticali rast mikroorganizama.

Godine 1974. P a r k e r ju je počeo rabiti u kontekstu u kojem se i danas rabi. Probiotike je definirao kao "organizme i tvari koji korisno djeluju na ravnotežu crijevne mikroflore". Ta definicija povezuje probiotike s crijevnom mikroflorom, ali joj dodatak u "tvar" daje široko značenje koje uključuje i antibiotike. U nastojanju da poboljša definiciju Fuller je (1989.) ponovo definirao probiotike kao "živo mikrobno hranjivo koje korisno djeluje na životinjski organizam poboljšavajući ravnotežu njegove crijevne mikroflore". H a v e n a a r i H u i s i n ' t V e l d (1992.) proširuju Fullerovu definiciju, predlažući novu, koja glasi: "Probiotik je jedna ili više kultura živih stanica mikroorganizama koje, primijenjene u životinja ili ljudi djeluju korisno na domaćina, poboljšavajući svojstva autohtone kulture".

Dakle, izraz probiotik se odnosi na proizvode koji:

1. sadrže žive mikroorganizme, npr. kao liofilizirane stanice ili u fermentiranim proizvodima,
2. poboljšavaju zdravstveno stanje ljudi i životinja (koje može uključivati poticanje rasta životinja) i
3. mogu djelovati u ustima ili probavnom traktu u hrani ili u obliku kapsula), u gornjem respiratornom traktu (aerosol) ili u urogenitalnom traktu (lokalna primjena).

c) Način djelovanja probiotika

I. Inhibicija rasta nepoželjnih mikroorganizama

1. Antimikrobno djelovanje

Bakterije mliječne kiseline koje se primjenjuju kao probiotici mogu djelovati antagonistički zbog:

a) sniženja pH uslijed nakupljanja organskih kiselina

b) proizvedenog H_2O_2 (u aerobnim uvjetima)

c) proizvedenog diacetila

d) proizvedenih specifičnih inhibicijskih supstancija, primjerice bakteriocina.

Tijekom rasta i fermentacije bakterije mliječne kiseline proizvode značajne količine organskih kiselina. Organske kiseline djeluju inhibicijski na rast i razmnožavanje mikroorganizama (Blažeka i sur., 1991.; Brkić i sur., 1995.). Lipofilne kiseline kao što su mliječna i octena u nedisociranom obliku, mogu prodrijeti u stanicu mikroorganizma i interferirati s osnovnim metabolizmom, te sniziti intracelularni pH (Baird-Parker, 1980.; Kaskhet, 1987.). Octena kiselina ima jače inhibicijsko djelovanje nego mliječna kiselina, posebice prema kvascima i plijesnima (Baird-Parker, 1980.). To se može objasniti time što je količina disocirane octene kiseline 2-4 puta veća od nedisocirane u usporedbi s mliječnom kiselinom. Neki autori navode da octena i mliječna kiselina sinergistički djeluju u inhibiciji rasta *Salmonella* (Rubin, 1987.; Adams i Hall, 1988.) i kvasaca (Moon, 1983.).

Bakterije mliječne kiseline mogu proizvesti vodik-peroksid (H_2O_2) u prisutnosti kisika djelovanjem flavoprotein oksidaza ili NADH peroksidaza (Dahya i Speck, 1968.). Koncentracija H_2O_2 može rasti do koncentracije koja djeluje antimikrobiotski zbog nedostatka katalazne aktivnosti bakterija mliječne kiseline (Price i Lee, 1970.). H_2O_2 što ga proizvode bakterije mliječne kiseline pokazuje inhibicijsko djelovanje prema *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas* sp. Baktericidni učinak H_2O_2 može se pripisati snažnom oksidacijskom djelovanju na stanicu mikroorganizma i stanične proteine. Naime, H_2O_2 uzrokuje oksidaciju SH-grupa u vitalnim enzimima metabolizma: heksokinazi, aldolazi i gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazi (Bjorck, 1985.).

Diacetil (2,3-butandion) je metabolit koji proizvode svi rodovi bakterija mliječne kiseline (J a y, 1982.). Nastajanje diacetila je reprimirano za vrijeme katabolizma i heksoza. Znatne količine diacetila mogu, međutim, nastati u prisutnosti organskih kiselina, npr. limunske, koja se preko piruvata konvertira u diacetil. Inhibicijsko djelovanje diacetila očituje se i prema velikom broju gramnegativnih bakterija (J a y i sur., 1983.).

Proizvodnja specifičnih inhibicijskih supstancija, kao što su bakteriocini, također je osobina bakterija mliječne kiseline. Odatle i njihovo dodatno antimikrobiološko djelovanje. Po definiciji, bakteriocini su ekstracelularne supstancije proteinske prirode, djelotvorne prema sojevima iste ili srodne vrste (K o n i n s k y, 1982.). Bakteriocini gram-pozitivnih mikroorganizama (bakterija mliječne kiseline) obično imaju nešto širi spektar inhibicije tako da djeluju i na druge gram-pozitivne vrste (T a g g i sur., 1976.; B r k i ć, 1995.). Najpoznatiji bakteriocin iz bakterija mliječne kiseline je nizin, što ga proizvodi *Lactococcus lactis* supsp. *lactis* (H u r s t, 1983.). Tijekom desetljeća publiciran je velik broj radova koji se odnose na proizvodnju bakteriocina iz bakterija mliječne kiseline. U tablici 1 navedene su bakterije mliječne kiseline i bakteriocini koje proizvode.

Mehanizam djelovanja bakteriocina svodi se na njihovu interakciju sa specifičnim receptorima na površini osjetljive stanice. Prema H o l l a n d u (1967.) postoje dvije hipoteze o djelovanju bakteriocina. Prema prvoj, nakon specifičnog vezivanja bakteriocina na staničnu stijenku bakterije dolazi do penetracije bakteriocina na mjesto djelovanja u stanici. Druga, manje vjerojatna mogućnost jest da bakteriocin, nakon povezivanja s receptorom, inducira svoje djelovanje s ekstracelularne pozicije. Pri intracelularnom djelovanju bakteriocini uzrokuju specifičnu inhibiciju sinteze DNA i proteina te oštećuju osmotsku barijeru, tj. staničnu stijenku. To je u suprotnosti s djelovanjem antibiotika koji stehiometrijski inhibiraju određenu reakciju metabolizma najčešće djelovanje nekog enzima. Molekula bakteriocina može, stupiti u interakciju s regulatornim sustavom bakterijske stanice i na taj način utjecati na mnoge stanične funkcije. Ti regulacijski centri vjerojatno su dio citoplazmatske membrane osjetljive stanice ili su za nju vezani te su zbog toga pristupačni za interakciju s bakteriocinima koji se specifično vežu na površinu stanice (D a e s c h e l i sur., 1990.). Mogućnost proizvodnje bakteriocina koji djeluju i na druge bakterije mliječne kiseline još je jedna važna osobina probiotičkih sojeva jer oni na taj način imaju veću mogućnost naseljavanja i održavanja u gastrointestinalnom traktu.

Tablica 1.: Bakterije mliječne kiseline - proizvođači bakteriocina (Havenaar i sur., 1992.)

Table 1: Lactic acid bacteria producers of bacteriocin (Havenaar and al., 1992.)

VRSTA BAKTERIJE	BACTERIOCIN
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	laktostrepcin 5
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	nizin, lakticin 481
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>diacetylactis</i>	laktokokin A, laktokokin B
<i>S. salvarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>	protein
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	acidolin, acidofilin, protein, antibiotska supstancija, laktocidin, acidocin A, acidocin B, laktacin B, acidofilucin A
<i>Lactobacillus brevis</i>	laktobacilin, brevicin 37
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	bulgaricin
<i>Lactobacillus fermenti</i>	fermenticin
<i>Lactobacillus helveticus</i>	laktocin 27, helveticin J
<i>Lactobacillus plantarum</i>	laktolin, plantaricin A, plantaricin SIK-83, plantaricin SA6
<i>Lactobacillus reuteri</i>	rojterin
<i>Lactobacillus sake</i>	sakacin A, laktocin S
<i>Lactobacillus casei</i>	kazeicin 80
<i>Leuconostoc</i> soj VAL 187	inhibicijska supstancija
<i>Pediococcus acidilactici</i> H	pediocin AcH
<i>Enterococcus faecium</i>	antibakterijska supstancija, bakteriocin, enterocin 1146, enterocin 01

2. Natjecanje za hranjive komponente

Brojne aktivnosti intestinalne flore smatraju se odgovornim za sprečavanje rasta neautohtonih mikroorganizama. Budući da se intestinalni trakt ponaša kao kontinuiran reaktor, populacijski kontrolni mehanizmi, koji sprečavaju rast neautohtone kulture, u skladu su s teorijom kemostata (Fredrickson, 1977.). Osnovni je koncept teorije kemostata da se bakterije u mješovitoj, kontinuiranoj kulturi natječu za nužne hranjive tvari. U svojim istraživanjima Fretter i sur. (1983.a) pokazali da je razmnožavanje *E. coli*, *Fusobacterium* sp. i *Eubacterium* sp. jako inhibirano kad se one inokuliraju u fekalni filtrat mišje intestinalne flore. To znači da mišja intestinalna flora kontrolira ekosustav autohtone kulture. Glavni je razlog ograničavanju razmnožavanja tih mikroorganizama nedostatak izvora iskoristivih ugljikohidrata. Proučavajući sličan kontinuirani sustav, Wilson

(1986.) je došao do zaključka da zbog preniske koncentracije ugljikohidrata u mišjem fekalnom filtratu ne može rasti *Clostridium difficile*. Iz toga proizlazi da je natjecanje za iskoristljive ugljikohidrate temeljno važno za regulaciju bakterijske populacije u intestinalnom traktu.

3. Natjecanje za mjesta vezanja

Jedan od mehanizama suzbijanja rasta patogeno je natjecanje za mjesta vezanja na epitelnoj površini crijeva. Poznato je da se bakterije mliječne kiseline mogu vezati na crijevni epitel, što je vrlo poželjna osobina probiotičkih sojeva (Fuller i Turvey, 1971; Jin i sur., 1996.). Jedna je posljedica inhibicijskih aktivnosti crijevne mikroflore da vrijeme udvostručenja patogena u intraluminalnom sadržaju često prekoračuje brzinu razrjeđivanja. Stoga, u tim uvjetima patogeni bivaju teorijski "isprani" iz intestinalnog trakta. Da bi osigurali preživljavanje u tom ekosustavu, patogeni bi se morali vezati za crijevu sluznicu. Fretter i sur. (1983.b) su razvili matematički model koji predviđa da dva ili više bakterijskih sojeva koji se u probavnom traktu natječu za istu hranjivu tvar mogu koegzistirati ako metabolički manje učinkoviti sojevi imaju dostupna specifična mjesta vezanja. Mogućnost vezanja za crijevu sluznicu zbog toga je važna odrednica za uspješno naseljavanje crijevnog trakta patogenima. Mnogi su eksperimentalni podaci pokazali da se sudionici mikroflore natječu s patogenima za mjesto vezanja na sluznici crijeva. Mikroflora koja je stalno vezana za sluznicu sprečava naseljavanje patogenih mikroorganizama (Snoueyenbos, 1979.). Kennedy i Volz (1985. a, 1985.b) su in vivo u hrčaka istraživali utjecaj antibiotske terapije na vezanje patogena na crijevu sluznicu. Ustanovili su da je stupanj vezanja *Candida albicans* na površinu crijeva mnogo veći u životinja tretiranih antibiotikom nego u netretiranih. Ti su autori proveli in vitro pokuse s isjeckanim crijevnim materijalom hrčaka podvrgnutih i nepodvrgnutih djelovanju penicilina, te nacijepljenih s kvascem *Candida albicans*. Rezultati su bili istovjetni s rezultatima iz pokusa in vivo, tj. mnogo veći broj stanica *Candida albicans* vezao se na crijevni epitel materijala obrađivanog penicilinom, nego na onaj koji nije bio podvrgnut djelovanju penicilina.

4. Toksični metaboliti i nepovoljni uvjeti okoline

Toksični metaboliti koji uključuju vodik-sulfid, slobodne žučne kiseline i kratkolančane masne kiseline inhibicijski djeluju na intestinalne bakterije.

Vodik-sulfid sudjeluje u suzbijanju rasta patogene bakterije *E. coli* u kontinuiranom sustavu (F r e t e r i sur., 1983.c), dok o inhibicijskoj aktivnosti slobodnih žučnih kiselina postoje vrlo oskudni podaci. Međutim, brojna istraživanja su napravljena o utjecaju kratkolančanih hlapljivih masnih kiselina na patogene u intestinalnom traktu.

Primarne žučne kiseline (kolna i ksenodeoksikolna) sintetiziraju se u jetri i potom konjugiraju s taurinom ili glicinom. Ljudska žuč također sadrži konjugate sekundarne žučne deoksikolne kiseline koja nastaje dehidroksilacijom kolne kiseline. U crijevima se konjugati hidroliziraju pomoću različitih anaerobnih bakterija i oslobađaju slobodne žučne kiseline (D r a s a r i H i l l, 1974.). Samo su slobodne žučne kiseline prisutne u fecesu. Crijevne bakterije također konvertiraju neke primarne žučne kiseline u sekundarne, deoksikolnu i litokolnu. F l o c k i sur. (1972.) navode da su i gram-pozitivne i gram-negativne intestinalne bakterije inhibirane slobodnim žučnim kiselinama, ali ne humanom žuči ili konjugiranim žučnim kiselinama. Sekundarne žučne kiseline, deoksikolna i litokolna toksičnije su za bakterije nego primarne (Š u š k o v i ć i sur., 1996.).

Očito je da toksični metaboliti interferiraju sa sposobnošću patogena da se vežu s intestinalnom crijevnom površinom. U svojim in vitro studijama K e n n e d y i V o l z (1983., 1985.a) i K e n n e d y i sur. (1987.) su pokazali da stanice *Can. albicans* prijanjaju u velikom broju na izrezano intestinalno tkivo dobiveno iz životinja tretiranih antibioticima. Međutim, broj se stanica *Candida albicans* smanji kada se to crijevno tkivo suspendira zajedno s crijevnim sadržajem koji ima živu mikrofloru. Ti rezultati pokazuju da crijevena flora proizvodi supstancije koje inhibiraju prijanjanje stanica *Candida albicans* na sluznicu crijeva. Da bi se te supstancije identificirale, provedena su istraživanja tijekom kojih se otkrio utjecaj kratkolančanih hlapljivih masnih kiselina i slobodnih žučnih kiselina na mukozno prijanjanje. Obje otkrivene supstancije su inhibirale vezanje stanica *Candida albicans* na sluznicu crijeva, vjerojatno modificiranjem mukoznih receptora.

Poznato je da su kratkolančane hlapljive masne kiseline toksične za gramnegativne bakterije. Vjerojatno je, dakle, da su te kiseline uključene u eliminaciju patogena iz intestinalnog trakta. Istraživanja su također pokazala da je in vitro razmnožavanje *Sal. enteritidis* inhibirano suspendiranim crijevnim sadržajem pokusne životinje (H e n t g e s, 1992.). Analizom sadržaja hlapljivih kiselina ustanovljene su koncentracije koje inhibiraju rast *Sal. enteritidis*. Oralnom primjenom antibiotika eliminiraju se važni sudionici

crijevne mikroflore koji proizvode kratkolančane hlapljive masne kiseline i slobodne žučne kiseline. Posljedica toga je smanjenje koncentracije tih kiselina u intestinalnom sadržaju, što je popraćeno povećanjem oksidoredukcijskog potencijala i pH, stvarajući tako povoljne uvjete za razmnožavanje *Sal. enteritidis*. Može se zaključiti da je zaštita od *Sal. enteritidis* posljedica nastajanja kratkolančanih masnih kiselina koju prati sniženje oksido-redukcijskog potencijala i pH vrijednosti u crijevnom sadržaju. Slični rezultati su dobiveni u pokusima sa *Sh. dysenteriae*, gdje su visoke koncentracije kratkolančanih masnih kiselina, niski pH i oksido-redukcijski potencijal glavni limitirajući čimbenici razmnožavanja *Shigella* vrsta *in vivo* (Arnold, 1974.).

II. Promjene metabolizma mikroorganizama u probavnom traktu

Jedan od najvažnijih načina korisnog djelovanja probiotičkih organizama na "domaćina" je modifikacija procesa metabolizma, napose onih koji se odvijaju u probavnom traktu. Takav koristan učinak može se objasniti teorijom različitih mehanizama (Rowland, 1992.), a to su:

1. zaustavljanje reakcija čiji rezultat je proizvodnja toksičnih ili kancerogenih metabolita.
2. stimulacija enzimskih reakcija uključenih u detoksifikaciju potencijalnih toksičnih supstancija
3. stimulacija enzima sisavaca, uključenih u razgradnju kompleksnih hranjivih sastojaka, ili takvih enzima koji su odsutni (nasljedno ili zbog bolesti), osiguravajući bakterijski izvor tih enzima
4. sintetiziranje enzima i drugih esencijalnih hranjivih sastojaka koji prehranom nisu osigurani u dovoljnim količinama.

Unošenjem probiotičkog mikroorganizma u organizam sisavaca dolazi do modifikacije enzimskih reakcija, odnosno do interakcije s ekosustavom crijevne mikroflore. Tako reakcije metabolizma koje se odvijaju u probavnom traktu mogu lokalno djelovati na sluznicu crijeva ili mogu djelovati na cijeli organizam. U crijevnom metabolizmu sisavaca sudjeluju različiti enzimi. U prvom redu to su probavni enzimi uključeni u razgradnju glavnih makromolekularnih sastojaka hrane. Postoje slučajevi enzimske deficijencije koja može biti prirođena ili uzrokovana nekom bolešću. Najpoznatija klinička manifestacija enzimske deficijencije je nepodnošljivost prema laktози. Ta je nepodnošljivost posljedica niske crijevne koncentracije laktaze koja nije dovoljna za hidrolizu fiziološke razine koncentracije laktoze u crijevu.

Primjenom probiotičkih organizama, u obliku jogurta i drugih fermentiranih mliječnih proizvoda, uveliko se smanjuje ta nepodnošljivost zbog smanjene koncentracije laktoze u tim proizvodima ili zbog prisutnosti β -galaktozidaze, koju proizvode probiotički mikroorganizmi. Dodatne digestivne enzime, uključene u probavu makromolekularnih sastojaka hrane, sadrži sluznica crijeva. To su oksidativni enzimi, sposobni da oksidiraju hranjive komponente, uključujući i lijekove i druge strane tvari dospjele u probavni trakt. Enzimi uključeni u te procese sadrže citokrom P450 vezan s funkcijom oksidaza (npr. arilhidrokarbon hidroksilaza, dimetilnitrozamin N-dimetilaza) i konjugacijske enzime, kao što su glutation-S-transferaza i UDP-glukuroniltransferaza. Oksidacijske reakcije mogu voditi do konverzije različitih stranih spojeva, uključujući benzopirene, dimetilhidrazine i nitrozamine u aktivne genotoksine i kancerogene. Prema tome, probiotički metaboliti mogli bi modulirati aktivnost oksidativnih enzima sluznice crijeva i tako spriječiti njihovu aktivnost u indukciji kancerogenih procesa.

Mnogi ksenobiotici i endogeno proizvedeni spojevi, primjerice steroidi, metaboliziraju se u jetri i konjugacijom prelaze u glukuronsku kiselinu (glukuronide). Nastajanje glukuronida u jetri vrlo je važan detoksifikacijski mehanizam u ljudi, ali nastali glukuronidi se sa žuči izlučuju u crijeva gdje, pomoću β -glukuronidaze određenih crijevnih bakterija mogu biti hidrolizirani oslobađajući potencijalne kancerogene (Goldin i Gorbach, 1984.).

Velik broj boja upotrijebljenih u hrani, kozmetici, tekstilnoj i kožnoj industriji temelji se na azo spojevima. Pomoću azoreduktoze crijevnih bakterija ti se spojevi reduciraju do različitih stupnjeva dajući amine koji su toksični i izazivaju miopatiju mišića srca i kostura (Grasso i Goldberg, 1968.). Radnicima izloženima bojama u kožnoj i tekstilnoj industriji prijete opasnost da obole od raka krvi jer redukcijom tih boja pomoću crijevnih bakterija nastaje benzidin, poznati humani krvni kancerogen (Cerniglia i sur. 1982.).

Nitrat je široko rasprostranjen kontaminant okoliša, često prisutan u hrani i piću za ljude. Iako je vrlo malo toksičan, lako se pomoću bakterijske crijevne populacije probavnog trakta sisavaca reducira s nitrat-reduktazom u reaktivniji i toksičniji proizvod - nitrit. Nitrit reagira s oksihemoglobinom u krvi, dajući methemoglobin. Reakcija je medicinski važna jer methemoglobin ne može transportirati kisik do tkiva (de Bruin, 1976.). Aktivnost bakterijske nitrat reduktaze pokazala se vrlo važnom u određivanju stupnja methemoglobinemije nakon izlaganja nitratima (Wise i sur., 1982.). Mnogo važnija

posljedica redukcije nitrata je reakcija nitrita s dušičnim spojevima u tijelu tvoreći pritom N-nitrozo spojeve, većina kojih je kancerogena (Rowland, 1988.). Sandine (1979.), zatim Goldin i Gorbach (1984.) istraživali su na koji način bakterije mliječne kiseline mogu utjecati na metabolizam mikroorganizama u probavnom traktu. Istraživanja su napravili na ljudima hraneći ih s *L. acidophilus* i pratili koncentraciju β -glukuronidaze, azoreduktaze i nitratreduktaze u fecesu. Ustanovili su da je primjena *L. acidophilus* smanjila koncentraciju tih enzima. Fuller (1989.) i Rowland (1992.) iznose da probiotički sojevi povoljno utječu na smanjenje aktivnosti štetnih enzima i na povećanje aktivnosti nekih korisnih enzima, primjerice β -galaktozidaze u osoba s nemogućnošću metaboliziranja laktoze.

III. Stimulacija imuno sustava

Gastrointestinalni trakt je važan organ u tijelu domaćina u obrani protiv patogenih mikroorganizama i neživih tvari, uključujući i kancerogene. To znači da se imunokompetentne stanice aktiviraju u crijevima i zatim prenose na druga mjesta koja su prekrivena sluznicom, a to su respiratorni i urogenitalni trakt. Limfna tkiva vezana za crijeva imaju važnu ulogu u imuno odgovoru gastrointestinalnog trakta (Naukkarinene i Surjanen, 1986.).

Crijevna sluznica posjeduje humoralni (krv, limfa) i celulami imuno sustav koji može utjecati na sastav mikroflore (Van der Waaij, 1984.). Ti imuno sustavi mogu pak biti aktivirani autohtonim mikroorganizmima i mikrobnim lipopolisaharidima (Havenaar i Spanhaak, 1994.).

Crijevna mikroflora znakovito utječe na imuno status domaćina. Živi autohtoni mikroorganizmi ili njihovi antigeni mogu prodrijeti kroz epitelnu barijeru crijeva i tako stimulirati imunokompetentne stanice koje se prenose do npr. respiratornog i urogenitalnog trakta. Bakterije iz roda *Lactobacillus* se premještaju intravenski, preživljavaju i ograničeno se razmnožavaju u jetri, slezeni, plućima i drugim organima, stimulirajući fagocitnu aktivnost i proizvodnju interferona (Ma i sur., 1990.).

Berg (1983.) uvodi izraz "translokacija" za prolaz živih bakterija iz gastrointestinalnog trakta u limfne čvorove crijevne opne i druge organe. Na taj način i potencijalno patogeni mikroorganizmi mogu izbjeći intracelularno "ubijanje" i uzrokovati bolest. Postavlja se pitanje kako djeluju probiotici? Naime, pokazalo se da translokacija patogenih mikroorganizama može biti

mijenjana s agensima koji usklađuju imuno funkcije i fagocitozom. Moglo bi se reći da probiotici djeluju i na taj način.

Takahashi i sur. (1993.) su opisali dugotrajno hranjenje miša s opranim i toplinski obrađenim (80°C) kulturama *Bifidobacterium longum* i *Lactobacillus acidophilus* (upotrijebljena doza bila je 8×10^{10} neživih stanica po danu). Visoka razina antitijela prema *B. longum*, odnosno prema *L. acidophilus* dobivena je nakon 10, odnosno 6 tjedana. U slučaju *B. longum* imuno odgovor je dobiven od citoplazme, a ne od stanične stijenke, dok je imuno odgovor za *L. acidophilus* dobiven i od citoplazme i od stanične stijenke. Taj imuno odgovor se sastojao od imunoglobulina G i imunoglobulina A.

Imunomodulatorni učinci laktobacila promatrani su također s obzirom na intestinalne infekcije. Za vrijeme infekcije miševa sa *Salmonella typhimurium* oralno davanje *L. casei* inducira je visoku razinu sekretornog antitijela u intestinalnoj tekućini (Perdigon i sur., 1993.). Pri primjeni liofiliziranog pripravka laktobacila (3×10^{12} stanica), tijekom 24 sata, u periodu od 28 dana, zapaža se porast prirodnih "stanica ubojica" i y-interferona u krvi dragovoljnih ispitanika (Simone i sur., 1989.). Perdigon i sur. (1990.) na osnovi svojih istraživanja zaključuju da *L. casei* aktivira imunokompetentne stanice limfnih tkiva, vezanih za crijeva, dajući značajno povećanje antisalmonela aglutinacijskog titra (imunoglobulin A) u intestinalnoj tekućini. Autori predlažu oralno uzimanje *L. casei* u zaštiti od crijevnih infekcija. Do sada još nije poznato koja stanična komponenta može biti odgovorna za aktiviranje imuno sustava. Imuno odgovor, kao rezultat probiotičkog djelovanja, mogao bi se objasniti na sljedeći način: bakterije mliječne kiseline ili proizvodi njihova metabolizma uzrokuju promjene u crijevnoj mikrobnj populaciji, što posljedično izaziva promjene u imuno odgovoru. To nalaže zaključak da probiotici nemaju samo potencijal da djeluju na regulaciju crijevne mikroflore nego mogu i posredno djelovati na pojavu bolesti (infekcije i tumori) u tkivima udaljenim od gastrointestinalnog trakta (Havenaar i Huis in't Veld, 1992.).

Sposobnost laktobacila da djeluju na imuno sustav ljudi i životinja potiče istraživanja u primjeni tih mikroorganizama, kao vektora za oralna cjepiva (Havenaar i Spanhaak, 1994.; Wells i sur. 1996.). U tablici 2. prikazani su probiotički sojevi bakterija mliječne kiseline koji se klinički uspješno primjenjuju.

Tablica 2. Uspješno primjenjene probiotičke bakterije i njihovo djelovanje (Salmi n e n i sur., 1996.)

Table 2: Successfully used probiotic bacteria and their activity (Salmi n e n et al., 1996.)

VRSTA BAKTERIJE	PROBIOTIČKO DJELOVANJE KAO REZULTAT KLINIČKIH ISTRAŽIVANJA
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA 1	Stimulira imuno sustav, veže se na crijevne stanice, regulira sastav crijevne mikroflore
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFB 1748	Smanjuje aktivnost fekalnih enzima, primjenjuje se u terapiji dijareje uzrokovane radioterapijom u terapiji konstipacije
<i>Lactobacillus</i> GG (ATCC 53013)	Primjenjuje se u terapiji dijareje uzrokovane antibiotskom terapijom, rotavirusom i bakterijom <i>Clostridium difficile</i> ; za prevenciju Crohnove bolesti i kao nadomjestak cjepiva
<i>Lactobacillus casei</i> Shirota	Primjenjuje se u prevenciji crijevnih poremećaja, u terapiji dijareje uzrokovane rotavirusom; stimulira imuno sustav u ranoj fazi raka krvi i raka crijeva; regulira sastav crijevne mikroflore, smanjuje aktivnost fekalnih enzima
<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> ; <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subs. <i>bulgaricus</i>	Ne djeluju na rotavirus dijareje i ne utječu na aktivnost fekalnih enzima
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Regulira sastav crijevne mikroflore i primjenjuje se u terapiji dijareje uzrokovane rotavirusom i drugim virusima
<i>Lactobacillus gasseri</i> (ADH)	Smanjuje aktivnost fekalnih enzima, preživljava u intestinalnom traktu
<i>Lactobacillus reuteri</i>	Kolonizira intestinalni trakt (istraživanja provedena na životinjama); postoji mogućnost da postane humani probiotik

PROBIOTIC ACTIVITY MECHANISM OF LACTIC ACID BACTERIA

Summary

Probiotics can be defined as viable mono- or mixed culture of microorganisms which, applied to animal or man, beneficially affects the host by improving the properties of the indigenous microflora. The scientific basis for the development of probiotics stems from the knowledge that the gut flora is involved in protecting the host (man or animals) against colonisation of the intestinal tract by nonindigenous microorganisms. The probiotic effect of Lactic acid bacteria may be expressed by different modes of action towards pathogenic microorganisms in intestinal tract: 1. Suppression of viable count by; a) production of antibacterial compounds (bacteriocins), b) competition for nutrients, c) competition for adhesion sites on the gut epithelial surface; 2. Alteration of microbial metabolism: a) increased enzyme activity, b) decreased enzyme activity and 3. Stimulation of immunity by increased: a) antibody levels, b) macrophage activity.

Key words: lactic acid bacteria, probiotic activity

Literatura

- Adams, M. R. i C. J. Hall (1988): Growth inhibition of food-borne pathogens by lactic and acetic acid and their mixtures. Int. J. Food Sci. Technol., 23, 287-292.*
- Arnold, W. J. (1974): Inhibition of Shigella species by environmental factors in the mouse intestine. M. S. Thesis, University of Missouri School of Medicine, Columbia.*
- Baird-Parker A. C. (1980.): Organic acids. U: "Microbial Ecology of Foods". (Silliker, J. H. ed.) Academic Press, New York, 126-135.*
- Berg, R. D. (1983): Translocation of indigenous bacteria from the intestinal tract. U: "Human Intestinal Microflora in Health and Disease" (Heutges, D. J., ed.) Academic Press, New York, USA, 335-352.*
- Bjorck, L. (1985): The lactoperoxidase system. U: "Natural antimicrobial systems". IDF Square Vergote 1040 Brussels, 18-30.*
- Blažeka, B., J. Šušković, i S. Matošić (1991.): Antimicrobial activity of lactobacilli and streptococci. World J. Microbiol. Biotechnol., 7, 533-536.*
- Brkić, B. (1995.): Fiziološke značajke i antibakterijska aktivnost odabranih bakterija mliječne kiseline. Magistarski rad, Prehrambeno-tehnol. biotechnol. rev 33 (4), 145-150.*
- Cerniglia, C. E., J. P. Freeman, W. Franklin i L. D. Pack (1982): Metabolism of benzidine and benzidine-congener based dyes by human, monkey and rat intestinal bacteria. Biochem. Biophys. Res. Commun., 107, 1224-1229.*
- Collins, F. M. i P. B. Carter (1978.): Growth of Salmonellae in orally infected germfree mice. Infect. Immun., 21, 41-47.*

- Daeschel, M. A. M. C. McKenney i L. C. McDonald (1990.): Bacteriocidal activity of *Lactobacillus plantarum* C-11. *Food Microbiol.*, 7, 91-98.
- Dahya, R. S. i M. L. Speck (1968.): Hydrogen peroxide formation by *Lactobacilli* and its effects on *Staphylococcus aureus* J. *Dairy Sci.*, 51, 1568-1572.
- De Bruin, A. (1976.): *Biochemical Toxicology of Environmental Agents*, Elsevier, Amsterdam.
- Drasar, B. S. i M. J. Hill (1974.): *Human Intestinal Flora*. Academic Press, London, USA, 36-43.
- Flock, M. H., J. J. Binder, B. Filburn i W. Gershengoren (1972.): The effect of bile acids on intestinal microflora. *Amer J. Clin. Nutr.* 25, 1418-1426.
- Freter, R., E. Stauffer i D. Cleven (1983a): Continous flow cultures as in vitro models of the ecology of large intestinal flora. *Infect. Immun.*, 39, 666-675.
- Freter, R., H. Brickner i J. Fekete (1983b): Survival and implantation of *Escherichia coli* in the intestinal tract. *Infect. Immun.*, 39, 686-703.
- Freter, R., H. Brickner i M. Botney (1983c): Mechanisms that control bacterial populations in continuous-flow culture models of mouse large intestinal flora. *Infect. Immun.*, 39, 676-685.
- Fredrickson, A. G. (1977): Behaviour of mixed cultures of organisms. *Ann. Rev. Med. Microbiol.*, 31, 63-87.
- Fuller, R. i A. Turvey (1971): Bacteria associated with the intestinal wall of the fowl (*Gallus domesticus*). *J. Appl. Bacteriol.*, 34, 617-622.
- Fuller, R. (1989): Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.*, 66, 365-378.
- Fuller, R. (1992): Problems and prospects. U: "Probiotics - The scientific basis" (R. Fuller., ed.) Chapman and Hall, London, 377-396.
- Goldin, B. R. i S. L. Gorbach (1984): The effect of milk and *Lactobacillus* feeding on human intestinal bacterial enzyme activity. *American Journal of Clinical Nutrition*, 39, 756-761.
- Grasso, P. i L. Golberg (1968): Problems confronted and lessons learnt in safety evaluation of Brown FK. *Food Cosmet Toxicol.*, 8, 539.
- Havenaar, R. i J. H. J. Huis in't Veld (1992): Probiotics: A General View. U: "The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease" vol. 1. (B.J.W. Wood, ed.) Elsevier Applied Science, London, 151-170.
- Havenaar, R., B. T. Brink i J.H.J. Huis in't Veld (1992): Selection of strains for probiotic use. U: "Probiotics - The Scientific basis". (Fuller, R. ed.) Chapman and Hall, London, 209-221.
- Havenaar, R. i S. Spanhaak (1994): Probiotics from an immunological point of view. *Curr. Opinion in Biotechnol.*, t, 320-325.
- Hentges, D. J. (1992): Gut flora and disease resistance. U: "Probiotics - The Scientific basis" (Fuller, R. ed.) Chapman and Hall, London, 87-110.
- Holland, J. B. (1967): Bacteriocins. U: "Antibiotics I: Mechanism of Action", Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 684-688.
- Hurst, A. (1983): Nisin and other inhibitory substances from lactic acid bacteria. U: "Antimicrobial in Foods" (Branen, A. L. i P. M. Davidson, eds), Marcel Dekker Inc, New York, 327.
- Jay, J. M. (1982): Antimicrobial properties of diacetyl. *Appl. Environ. Microbiol.*, 44, 525-532.

- Jay, J. M., G. M. Rivers i W. E. Boisvert (1983): Antimicrobial properties of alpha-dicarbonyl and related compounds. *J. Food Prot.*, 46, 325-329.
- Jin, L. Z., Z. W. Ho, M. A. Ali, N. Abdullah, K. B. Ong i S. Jalaludin (1996): Adhesion of lactobacillus isolates to intestinal epithelial cells of chicken. *Letters in Appl. Microbiol.* 22, 229-232.
- Kashket, E. R. (1987): Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance. *FEMS Microbiol. Rev.*, 46, 233-244.
- Kennedy, M. J. i P. A. Volz (1985a): Effect of various antibiotics on gastrointestinal colonisation and dissemination by *Candida albicans*. *Sabourandia*, 23, 265-273.
- Kennedy, M. J. i P. A. Volz (1985b): Ecology of *Candida albicans* gut colonization: inhibition of *Candida* adhesion, colonization, and dissemination from gastrointestinal tract by bacterial antagonism. *Infect. Immun.*, 49, 654-663.
- Kennedy, M. J., P. A. Volz, C. A. Edwards i R. J. Yancey (1987): Mechanisms of association of *Candida albicans* with intestinal mucosa. *J. Med. Microbiol.*, 24, 333-341.
- Koninsky, J. (1982): Colicins and other bacteriocins with an established mode of action. *Ann. Rev. Microbiol.*, 36, 125-144.
- Lilly, D. M. i R. H. Stillwell (1965): Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. *Science*, 147, 747-748.
- Ma, L., E. Deitch, E. Specian, E. Steffen i R. Berg (1990): Translocation of *Lactobacillus murinus* from the gastrointestinal tract. *Current Microbiology*, 20, 177-184.
- Metchnikoff, E. (1907): *The Prolongation of Life*. Optimic Studies, Heinemann, London.
- Moon, N. J. (1983): Inhibition of the growth of acid tolerant yeasts by acetate, lactate and propionate and their synergistic mixtures. *J. App. Bacteriol.*, 43, 215-230.
- Naukkarinene, A. i K. J. Surjenen (1986): Immuno-response in the gastrointestinal tract. U: "Gastrointestinal Toxicology" (Rozman, K. i O. Henninen, eds.), Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 213-245.
- Parker, J. B. (1974): Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Anim. Nutr. Health*, 29, 4-8.
- Perdigon, G., De Macias Men, S. Alvarez, G. Oliver i A. A. Pesce de Ruiz Holgado (1990): Prevention of Gastrointestinal Infection using Immunobiological Methods with Milk Fermented with *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*. *J. Dairy Res.*, 57, 255-264.
- Perdigon, G., S. Alvarez, M. Medici i A. A. Pesce de Ruiz Holgado (1993): Influence of the use of *Lactobacillus casei* as an oral adjuvant on the levels of secretory immunoglobulin A during an infection with *Salmonella typhimurium*. *Food Agric. Immunol.*, 5, 27-37.
- Price, R. J. i J. Lee (1970): Inhibition of *Pseudomonas* sp. by hydrogen peroxide producing lactobacilli. *J. Milk Food Technol.*, 33, 13-18.
- Rowland, J. R. (1988): The toxicology of N-nitrosocompounds. U: "Nitrosamines Toxicology and Microbiology", (Hill, M. J., ed.) Ellis Horwood, Chichester, 117-141.
- Rowland, J. R. (1992): Metabolic interactions in the gut. U: "Probiotics - The Scientific basis". (Fuller, R. ed.) Chapman and Hall, London, 29-53.
- Rubin, H. E. (1987): Toxicological model for a two-acid system. *App. Environ. Microbiol.*, 36, 623-624.
- Salminen, S., E. Isolauri i E. Salminen (1996): Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. *Antoine van Leeuwenhoek*, 70, 347-358.

- Sandine, W. E.* (1979): Roles of *Lactobacillus* in the intestinal tract. *J. Food Prot.*, 42, 259-262.
- Simone, C., B. B. Salvadori, S. Di Fabio, S. Tzantzoglou, F. Bitonti i V. Trinchieri* (1989): Yoghurt and lactobacilli in the regulation of immunity. U: "Proceedings in the NIZO Institute. Fermented Milks and Health". Ede, The Netherlands: NIZO Institute, 125-130.
- Sneath, P. H. A., N. S. Mair i M. E. Sharpe* (1986): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2 (Sneath, P. H. A., N. S. Mair i M. E. Sharpe, eds), Williams and Wilkins, Baltimore.
- Snoeyenbos, G. H.* (1979): Role of native intestinal microflora in protection against pathogens. *Proc. Ann. Meeting U.S. Animal Health Assoc.*, 83, 388-393.
- Sperti, G. S.* (1971): Probiotics, Avi Publishing Co., West Point, Connecticut.
- Stamer, J. R.* (1979): The lactic acid bacteria: microbes of diversity. *Food technol.* 33, 60-65.
- Šušković, J.* (1989): Utjecaj sastava hranjive podloge na kinetiku nastajanja mliječne kiseline za prehrambene svrhe. Magistarski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
- Šušković, J.* (1996): Probiotic properties of *Lactobacillus acidophilus* M92 i *Lactobacillus plantarum* LA, 5th Symposium on lactic Acid Bacteria, 8-12, September, Veldhoven, The Netherlands, Abstracts book J20.
- Tagg, J. R., A. S. Dajani i L. W. Wannaker* (1976): Bacteriocins of Gram-positive species. *Bacteriol. Rev.*, 40, 722-756.
- Takahashi, T., T. Oka, H. Iwana, T. Kywata i Y. Yamamoto* (1993): Immune response of Mice to Orally Administered lactic acid bacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 57, 1557-1560.
- Tannock, G. W.* (1983): Effect of dietary and environmental stress on the gastrointestinal microbiota. U: "Human Intestinal Microflora in Health and Disease (D. J. Hentges, ed.) Academic Press, New York, 517-539.
- Van der Whaaij, D.* (1984): The Immunoregulation of the Intestinal Flora: Experimental Investigations on the Development and the Composition of the Microflora in Normal and Thymusless Mice. *Microecol. Therapy*, 14, 63-74.
- Wells, J. M., Robinson, L. M. Chamberlain, K. M. Schofield, R. W. F. Le Page* (1996): Lactic acid bacteria as vaccine delivery vehicles. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70, 221-234.
- Wilson, K. H., J. N. Sheagren i R. Freter* (1986): Gnotobiotic models for study of *Clostridium difficile* and *E. coli*. *J. Infect. Dis.*, 153, 547-551.
- Wise, A., A. K. Mallett i J. R. Rowland* (1982): Dietary fibre, bacterial metabolism and toxicity of nitrate in the rat. *Xenobiotica*, 12, 111-118.
- Wood, B. J. B.* (1992): *The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease*. Elsevier Science Publishers LTD, England.

Adrese autora - Author's addresses:

Dr. sc. Šušković Jagoda

Mr. sc. Brkić Blaženka

Prof. dr. sc. Matošić Srećko

Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb

Primljeno - Received:

1. 2. 1997.