In vitro utjecaj kofeina na kolonijalni rast odabranih sojeva probiotskih bakterija

Frano Lovrić, 2. razred

EDukOS – privatna srednja škola s pravom javnosti, Osijek
Mentor: *Dragičević Anokić Gabrijela*

SAŽETAK

Cilj istraživanja bio je ispitati antimikrobnu aktivnost kofeina protiv bakterija izoliranih iz starter-kulture jogurta. Metodologija je uključivala pripremu starter kulture fermentacijom mlijeka uz dodatak bifidum startera, izradu MRS agara te inokulaciju bakterijskih kultura. Bakterije *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus* i *Bifidobacterium* spp. iz starter-kulture su inokulirane na MRS agar sterilnom ezom te su ostavljene na inkubaciji 24 sata na 37 °C. Vodene otopine kofeina izrađene su u slijedećim koncentracijama 1 g/L, 2 g/L, 4 g/L, 6 g/L, 8 g/L, 10 g/L, 15 g/L i 20 g/L. Bakterijska kultura prenesena je na MRS agar, a različite koncentracije otopina dodane su metodom disk-difuzije. Također, dodana je destilirana voda (negativna kontrola) te diskovi streptomicina, ciprofloksacina i amoksiklava (pozitivna kontrola) kako bi se pokazala vjerodostojnost inhibitornog učinka kofeina. Promjer zona inhibicije rasta mikroorganizama mjerio se u milimetrima nakon ponovna 24 sata inkubacije na 37 °C. Rezultati su pokazali inhibiciju rasta bakterija pri višim koncentracijama kofeina. Zaključeno je da kofein posjeduje slab do umjeren inhibitorni učinak u *in vitro* uvjetima. Antmikrobni učinak se povećava s povećanjem koncentracije kofeina.

Ključne riječi: *agar; zona inhibicije; inokulacija bakterija; kofein*

UVOD

Bakterije mliječne kiseline (LAB) gram-pozitivni su mikroorganizmi prirodno prisutni na supstratima bogatim hranjivim tvarima, kao što su mlijeko, meso, razgradivi biljni materijali te ljudski gastrointestinalni sustav. Obuhvaćaju oko 20 rodova, među kojima se ističu *Lactobacillus, Streptococcus* i *Bifidobacterium*. Zbog svojih povoljnih svojstava iznimno su važni mikroorganizmi u industriji, gdje se koriste kao starter kulture za proizvodnju različitih fermentiranih proizvoda. Kada se primjenjuju kao jedna ili više kultura živih mikroorganizama, djeluju kao probiotici, odnosno korisno utječu na domaćina poboljšavajući svojstva autohtone mikroflore probavnog sustava. Pozitivni učinci na zdravlje uključuju poboljšanje metabolizma laktoze, stimulaciju imunološkog sustava, suzbijanje urogenitalnih i crijevnih infekcija te modifikaciju crijevne mikroflore (Pandžić, 2017).

Fermentaciju se općenito definira kao proces stvaranja biokemijskih promjena organskih sastojaka djelovanjem enzima mikroorganizama, uglavnom bez kisika, uz oslobađanje energije (Ljubičić, 2016). Najčešće se koristi u prehrambenoj industriji kako bi se namirnicama povećala kvaliteta i iskoristivost. Nadalje, fermentirana hrana obuhvaća hranu i napitke koji su dobiveni kontroliranim rastom mikroorganizama i konverzijom određenih komponenti enzimskim reakcijama (Dimidi i sur., 2019).

Među različitim fermentacijskim procesima posebnu ulogu ima mliječno-kisela fermentacija. Prema Toplek (2025) fermentacija laktoze u mliječnu kiselinu odvija se postupnom razgradnjom te stvaranjem mnogih međuprodukata i energije. Produkti metabolizma bakterija mliječne kiseline mogu biti različite vrste organskih kiselina, diacetil, amonijak, ugljikov dioksid, vodikov peroksid i mnogi drugi. S obzirom na količinu i vrstu produkata metabolizma mogu se podijeliti na homofermentativne i heterofermentativne bakterije (Makarova i sur., 2006).

Homofermentativnim bakterijama mliječne kiseline pripadaju *Lactobacillus acidophilus* i *Streptococcus thermophilus*. One nisu u mogućnosti koristiti laktozu izravno, već koriste enzim laktoza-permeazu

Autori zadržavaju autorska prava te časopisu daju pravo prvog objavljivanja rada u skladu s licencijom CC BY 4.0, koja dopušta drugima dijeljenje rada uz navođenje autorstva i izvornog mjesta objavljivanja rada u časopisu.

kojim ju unose u stanicu. Unutar se stanice laktoza razgrađuje na glukozu i galaktozu uz pomoć enzima β−galaktozidaze, odnosno laktaze. Zatim prevode heksoze pomoću Embden-Meyerhof-Parnas puta do mliječne kiseline koja je najzastupljeniji produkt metabolizma, odnosno tijekom glikolize specifični enzimi LAB provode fermentaciju glukoze preko raznih međuprodukata do pirogrožđane kiseline (piruvata). Redukcijom piruvata uz pomoć enzima laktatdehidrogenaze nastaje mliječna kiselina, tj. laktat (Makarova i sur., 2006; Toplek, 2025).

Osim mliječne kiseline, heterofermentativne bakterije prevode heksoze preko pentoza-fosfatnog puta do više vrsta produkata, kao što su ugljikov dioksid, octena kiselina i etanol (Makarova i sur., 2006).

Posebno mjesto zauzimaju fermentirani mliječni napitci proizvedeni uz pomoć selekcioniranih sojeva *Lactobacillus acidophilus* i *Bifidobacterium bifidum*, čiji se odabrani sojevi odlikuju termofilnim svojstvima, osjetljivošću na kiselu sredinu, slabom proteolitičkom aktivnošću te sposobnošću sinteze sluzavih tvari koje doprinose povećanju viskoznosti proizvoda, kao i proizvodnjom inhibitornih spojeva s bakteriostatskim i baktericidnim djelovanjem (Pandžić, 2017).

Kako bi se fermentacijski procesi odvijali učinkovito, kontrolirano i s predvidivim ishodom, u praksi se primjenjuju starter-kulture koje imaju ključnu ulogu u usmjeravanju i stabilizaciji fermentacije (Petrovicky, 2016). Starter kulture se definiraju kao mikrobiološki pripravci koji sadrže barem jednu vrstu mikroorganizama, a koje dodatkom u sirovinu, ubrzavaju i upravljaju procesom fermentacije s ciljem proizvodnje fermentirane hrane (Živković, 2016). Njihovo djelovanje temelji se na fiziološkoj i metaboličkoj aktivnosti mikroorganizama, kojom se potiče fermentacija supstrata te stvaranje poželjnih metabolita zaslužnih za poboljšanje teksture, okusa i mirisa proizvoda (Petrovicky, 2016). Vrlo bitna uloga starter kultura je inaktivacija patogena i mikroorganizama kvarenja uslijed proizvodnje kiselina i bakteriocina (Živković, 2016). U odnosu na autohtonu mikrofloru, starter-kulture djeluju brže i dominantnije, što omogućuje predvidljivost i lakšu kontrolu procesa te skraćivanje vremena proizvodnje. Mogu se primjenjivati kao monokulture ili kao mješovite kulture, koje se najčešće koriste u fermentaciji hrane pri čemu je nužan sinergistički odnos među uključenim mikroorganizmima (Petrovicky, 2016).

U nastavku rada se kofein opisuje kao bioaktivni spoj s naglaskom na njegova fizikalno-kemijska svojstva i utjecaj na crijevnu mikrobiotu. Prema Bardić (2020) i Majić (2021), kofein je alkaloid biljnog podrijetla iz skupine metilksantina koji se prema IUPAC-ovoj nomenklaturi naziva 1,3,7-trimetilpurin-2,6-dion. Umjereno je topljiv u vodi pri sobnoj temperaturi (2 g/100 mL), dok se u kipućoj vodi njegova topljivost značajno povećava (66 g/100 mL). Istraživanje koje su proveli Chen i sur. (2023) na miševima, primjenom sekvenciranja rRNA gena, pokazalo je da kofein smanjuje relativnu zastupljenost rodova *Lactobacillus* i *Lactococcus*, dok povećava relativnu brojnost rodova *Dubosiella* i *Bifidobacterium*. Nadalje, Jang i sur. (2019) ispitivali su utjecaj kofeina na antimikrobnu aktivnost bakterije *Lactobacillus casei* protiv *Escherichia coli*. Rezultati su pokazali da koncentracija kofeina od 0,3 mg/mL povećava antimikrobnu aktivnost *L. casei*, što upućuje na mogućnost da kofein modulira sposobnost korisnih bakterija u suzbijanju patogenih mikroorganizama.

Razlog odabira ove teme leži u sve većoj konzumaciji kofeina među mladom populacijom, posebno putem energetskih napitaka i kave. Energetska pića predstavljaju skupinu proizvoda u tekućem obliku koja u pravilu sadrže kofein, uz mogućnost prisutnosti i drugih dodanih prehrambenih sastojaka (Alsunni 2015). Kako navodi Danjek (2024), energetska su pića sve popularnija bezalkoholna pića među studentskom populacijom. Prema Balordi (2020), kava, zahvaljujući bioaktivnim sastojcima (fenolni spojevi, vlakna i minerali), povoljno utječe na crijevnu mikrobiotu povećavajući korisne bakterije i

smanjujući potencijalno štetne, pri čemu se učinak povezuje s povećanjem motiliteta crijeva. Ali, Ćićerić (2024) navodi kako studija na bakteriji *Escherichia coli* pokazuje da kofein značajno inhibira rast bakterije, što upućuje na njegov potencijal kao antimikrobnog sredstva. S obzirom na navedene stavke i važnu ulogu crijevne mikrobiote u očuvanju zdravlja, zanimljivo je istražiti kako bioaktivne tvari iz prehrane, poput kofeina, mogu utjecati na rast korisnih bakterija. Također, tijekom posljednjeg desetljeća zabilježen je značajan porast interesa potrošača i zdravstvenih stručnjaka za hranu obogaćenu probiotičkim mikroorganizmima, što je rezultiralo ubrzanim razvojem tržišta probiotičkih proizvoda, pri čemu dominantan udio čine mliječni proizvodi, funkcionalni napitci te formule za dojenčad (Socool i sur., 2014.).

U ovom radu ispituje se *in vitro* utjecaj kofeina na kolonijalni rast odabranih sojeva probiotskih bakterija (*Lactobacillus acidophilus, Bifidobacterium* spp. i *Streptococcus thermophilus*), koje se široko primjenjuju u starter kulturama za proizvodnju fermentiranih mliječnih proizvoda i probiotskih pripravaka. Iako svi ispitivani sojevi nisu trajni članovi crijevne mikrobiote, njihova konzumacija može privremeno utjecati na sastav i ravnotežu crijevne mikrobiote. S obzirom na sve prethodno napisano, ciljevi su istraživanja: (1) ispitati inhibicijski utjecaj kofeina na rast odabranih probiotskih bakterija *in vitro*; (2) utvrditi koncentracije kofeina pri kojima se javlja najveći inhibicijski učinak.

Glavna je hipoteza da će inhibicijski učinak kofeina na odabrane probiotske bakterije (*Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* spp. i *Streptococcus thermophilus*) biti proporcionalan njegovoj koncentraciji, odnosno da veće koncentracije kofeina izazivaju snažniji inhibitorni efekt na njihov rast.

METODE RADA

U ovom istraživanju primijenjene su standardne mikrobiološke metode za pripremu starter-kulture, hranjivih podloga, inokulaciju bakterija te ispitivanje antimikrobnog učinka kofeina. Starter-kultura dobivena je fermentacijom mlijeka uz dodatak Bifidum startera. Nakon fermentacije kultura je nanesena na BIOLIFE MRS Agar with Tween 80 koji je inkubiran na 37 °C tijekom 24 sata. Vodene otopine kofeina pripremljene su u osam različitih koncentracija. Utjecaj otopina kofeina ispitivan je disk-difuzija odnosno Kirby-Bauer metodom, koja je standardizirani mikrobiološki postupak za određivanje osjetljivosti bakterija (Hudzicki, 2009). Nakon inkubacije bakterijske kulture, uzgojene bakterije prenesene su na nove MRS agare. U jednu Petrijevu zdjelicu dodan je disk na koji je impregnirana destilirana voda (negativna kontrola istraživanja), a u drugu su dodani diskovi antibiotika (pozitivna kontrola istraživanja). U preostalih je osam Petrijevih zdjelica dodan po jedan disk impregniran vodenom otopinom kofeina. Ploče su ponovno inkubirane 24 sata pri 37 °C. Inhibicijsko djelovanje procijenjeno je mjerenjem promjera zona inhibicije u milimetrima.

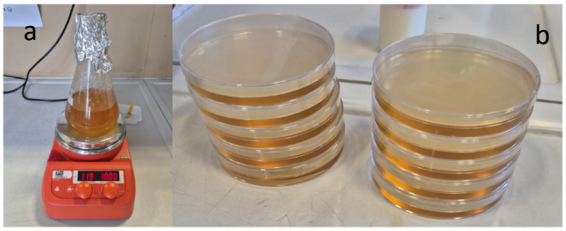
Istraživanje je djelomično provedeno na Odjelu za kemiju u Osijeku zbog dostupnosti potrebne laboratorijske opreme, kemikalija i odgovarajućih uvjeta za izvođenje eksperimentalnog dijela rada.

Priprema starter-kulture

Za pripremu starter-kulture se jedna litra mlijeka (pasterizirano kravlje s 3,2 % mliječne masti) najprije prokuha, a potom ohladi na 37 °C. Kada mlijeko postigne željenu temperaturu, dodaje se vrećica starter kulture (10 g Bifidum startera) i smjesa se temeljito promiješa mikserom. Tako se pripremljena smjesa ostavlja u termo posudi na temperaturi od 37 °C tijekom deset sati kako bi se provela fermentacija. Nakon završetka postupka, nastali se jogurt pohranjuje u hladnjak na temperaturi od 3 °C.

Postupak pripreme agara

Za pripremu BIOLIFE MRS Agar with Tween 80 (De Man, Rogosa i Sharpe, MRS) agara 70,2 g praškaste podloge suspendirano je u 1000 mL hladne destilirane vode te zagrijavano do vrenja uz stalno miješanje radi potpunog otapanja sastojaka pomoću magnetne miješalice s grijačem (slika 1a). Pripremljena otopina sterilizirana je autoklaviranjem 15 minuta pri 121 °C. Nakon sterilizacije medij je ohlađen na približno 48 °C, razliven u sterilne Petrijeve zdjelice i ostavljen da se stvrdne pri sobnoj temperaturi (slika 1b).



Slika 1 a) Miješanje i zagrijavanje agara do vrenja; b) očvrsnuti MRS agar u Petrijevim zdjelicama

Autor: Lovrić F., 2026

Nanošenje starter kulture na agar ploče

Nakon što je jogurt fermentiran, jednokratnim sterilnim plastičnim ezama nanesen je na MRS agar koji omogućuje bujan rast bakterija mliječne kiseline. Starter-kultura na agar ploče nanesena je tehnikom razmazivanja (engl. streak technique) tako da na svim dijelovima ploče bude jednaka zastupljenost bakterija. Nakon toga su agari stavljeni u inkubator na 37 °C tijekom 24 sata.

Priprema otopina različitih koncentracija kofeina

Određene su otopine slijedećih koncentracija kofeina ekstrakata: 1 g/L, 2 g/L, 4 g/L, 6 g/L, 8 g/L, 10 g/L, 15 g/L i 20 g/L.

Masene su koncentracije su izračunate pomoću sljedeće formule:

$$\delta(kofein, otopina) = \frac{m(kofein)[mg]}{V(otopina)[L]}$$

Epruvete su označene brojevima 1 – 8. U svaku epruvetu dodani su odgovarajući omjeri kofeina i destilirane vode (slika 2):

1. epruveta: 100 mg kofeina / 100 mL otopine
2. epruveta: 200 mg kofeina / 100 mL otopine
3. epruveta: 400 mg kofeina / 100 mL otopine
4. epruveta: 600 mg kofeina / 100 mL otopine
5. epruveta: 800 mg kofeina / 100 mL otopine
6. epruveta: 1000 mg kofeina / 100 mL otopine
7. epruveta: 1500 mg kofeina / 100 mL otopine
8. epruveta: 2000 mg kofeina / 100 mL otopine

Otopine su zatim dobro promućkane kako bi se homogenizirale.



Slika 1 Pripremljene koncentracije vodenih otopina kofeina

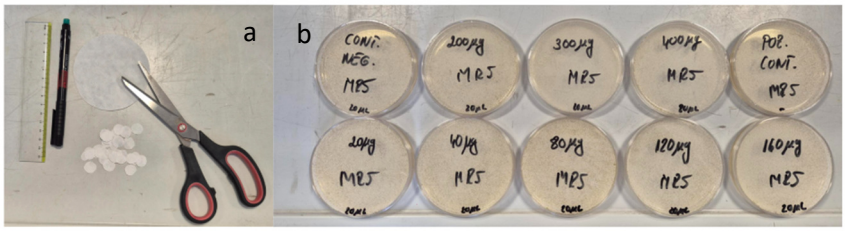
Autor: Lovrić F., 2026

Subkultivacija bakterija i primjena otopina kofeina

Nakon inkubiranja bakterija na MRS agaru na 37 °C tijekom 24 sata bakterije su presađene u nove Petrijeve zdjelice s MRS agarom na koje je vodootpornim flomasterom naznačen sadržaj koji će se u njih staviti (slika 3b). Bakterije su presađivane sterilnim plastičnim ezama tehnikom razmazivanja (engl. streak technique). Diskovi na kojima se ispitivao utjecaj otopina kofeina dobiveni su izrezivanjem krugova promjera jedan centimetar od sterilnog filter papira (slika 3a). Na agare s presađenim bakterijama dodani su diskovi s različitim koncentracijama kofeina (20 µL otopine po disku). Otopine kofeina su na diskove dodavani mikropipetom. Kao negativna kontrola dodana je destilirana voda (20 µL destilirane vode). S druge strane kao pozitivna kontrola dodani su industrijski napravljeni diskovi streptomicina (10 mcg), ciprofloksacina (5 mcg) i amoksiklav (30 mcg) tvrtke HiMedia. Pri tome su primijenjene različite mase antibiotika po disku, budući da cilj nije bio ispitati ovisnost veličine zone inhibicije o koncentraciji antibiotika, već isključivo usporediti može li kofein ostvariti antimikrobni učinak približan onome koji postižu standardizirani, industrijski proizvedeni antibiotski diskovi. Razlog korištenja pozitivne i negativne kontrole standardizacija je inhibitornog učinak kofeina i mogućnost uspoređivanja s antibioticima za koje se zna da inhibiraju rast bakterija te destilirane vode za koju je poznato da nema nikakav učinak za inhibiciju odabranih bakterija. Petrijeve posude s gore navedenim komponentama stavljene su na inkubaciju na 37 °C tijekom 24 sata, te je zatim mjerena zona inhibicije.

Mjerenje zona inhibicije

Po završetku inkubacije osjetljivost bakterija procijenjena je određivanjem radijusa zone inhibicije rasta na svim Petrijevim zdjelicama. Kod pravilno je oblikovanih zona mjerena ravnalom udaljenost od ruba filtarskog diska do granice vidljivog rasta bakterija. Ako je zona inhibicije bila nepravilnog oblika, radijus je izračunan kao aritmetička sredina najveće i najmanje izmjerene vrijednosti. No, u slučaju da zona inhibicije nije bila prisutna, što je upućivalo na rezistenciju mikroorganizama prema ispitivanoj vodenoj otopini kofeina, rezultat je zabilježen vrijednošću 0.



Slika 3 a) Pribor za pripremu diskova koji će biti natopljeni otopinama kofeina različitih koncentracija; b) označene Petrijeve zdjelice inokulirane bakterijskom kulturom

Autor: Lovrić F., 2026

Veličina uzorka i statistička analiza podataka

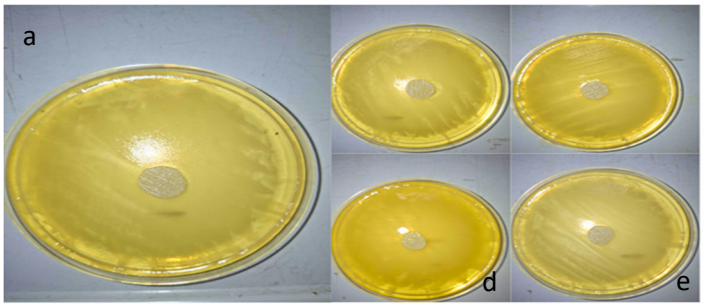
Kako bi se ispitala statistička značajnost u ovom istraživanju pokus je ponovljen tri puta. Ispitivanje razlike različitih koncentracija ispitana je one-way ANOVA testom u programu Excel, uz razinu značajnosti (statistička vjerojatnost) $p < 0,05$. Nakon što je ANOVA test pokazao statistički značajnu razliku, korišten je Scheffé post hoc test kako bi se utvrdila statistička značajna razlika ($p < 0,05$) između svakog pojedinog uzorka.

REZULTATI

Dobiveni rezultati antimikrobne aktivnosti vodenih otopina kofeina prikazani su tablično, grafovima i fotografijama Petrijevih zdjelica s vidljivim zonama inhibicije.

Zona inhibicije nije zabilježena u Petrijevim zdjelicama s negativnom kontrolom i vodenim otopinama kofeina koncentracija od 1 g/L, 2 g/L, 4 g/L, 6 g/L (slika 4).

b c

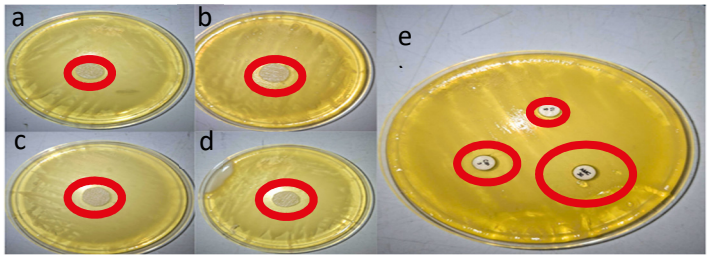


Slika 4 Petrijeve zdjelice s kolonijama probiotskih bakterija bez vidljivih zona inhibicije: a) negativna kontrola (destilirana voda); otopine kofeina: b) 1g/L; c) 2 g/L; d) 4 g/L; e) 6 g/L

Autor: Lovrić F., 2026

Međutim, pri koncentracijama kofeina od 8 g/L, 10 g/L, 15 g/L i 20 g/L te pozitivnom kontrolom došlo je do povećanja zone inhibicije (slika 5).

Učinjena je One-way ANOVA (jednosmjerna analiza varijanci). Pronađena je razlika u veličini zone inhibicije među podskupinama. Ukupno, vrijednost testa iznosila je $F = 1475,71$; statistička vjerojatnost $p < 0,001$. Scheffé testom za post hoc analizu utvrđena je razlika među uzorcima što je prikazano u tablici 1. Pokraj ispitivanih uzoraka različitih koncentracija kofeina i kontrola naveden je broj uzorka (od 1–12) te je u tablici 1 prikazano koje skupine pokazuju statistički značajnu razliku ($p < 0,05$).



Slika 5 Petrijeve zdjelice s kolonijama probiotskihj bakterija sa vidljivom zonom inhibicija: a) 8 g/L; b) 10 g/L; c) 15 g/L; d) 20 g/L; e) pozitivna kontrola

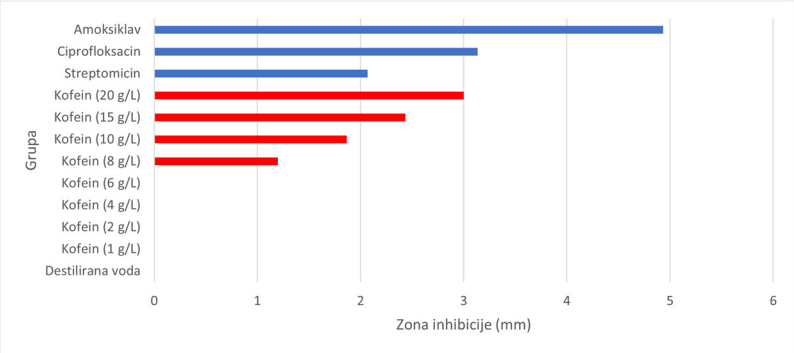
Autor: Lovrić F., 2026

Niže koncentracije kofeina (1–6 g/L) ne pokazuju statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu niti međusobno ($p < 0,05$). Nasuprot tome, više koncentracije (≥ 8 g/L) pokazuju statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu, niže koncentracije kofeina te većinu ispitivanih antibiotika. Općenito, s porastom koncentracije kofeina uočava se izraženiji statistički značajan učinak (tablica 1).

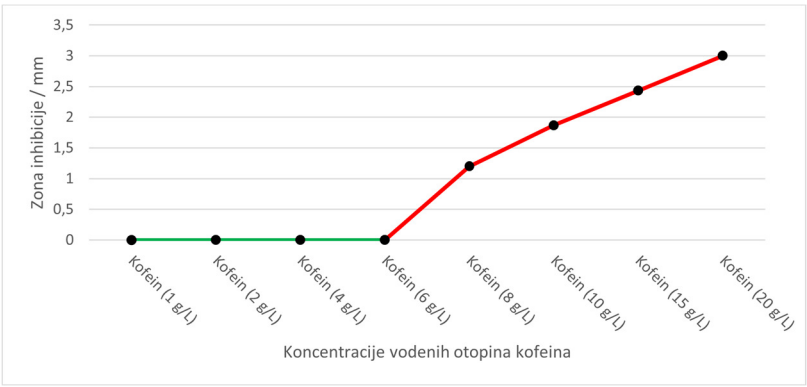
Tablica 1 Uzorci su označeni brojevima od 1-12 i primijenjen je Scheffé-ov test za post hoc analizu te je prikazana statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između svake skupine međusobno, ukoliko je dokazana testom.

Uzorci	Statistički značajno ($p < 0,05$) u odnosu na:
Destilirana voda (Negativna kontrola) (1)	6; 7; 8; 9; 10; 11; 12
Kofein (1 g/L) (2)	6; 7; 8; 9; 10; 11; 12
Kofein (2 g/L) (3)	6; 7; 8; 9; 10; 11; 12
Kofein (4 g/L) (4)	6; 7; 8; 9; 10; 11; 12
Kofein (6 g/L) (5)	6; 7; 8; 9; 10; 11; 12
Kofein (8 g/L) (6)	1; 2; 3; 4; 5; 7; 8; 9; 10; 11; 12
Kofein (10 g/L) (7)	1; 2; 3; 4; 5; 6; 8; 9; 11; 12
Kofein (15 g/L) (8)	1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 9; 10; 11; 12
Kofein (20 g/L) (9)	1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 10; 12
Streptomicin (10)	1; 2; 3; 4; 5; 6; 8; 9; 11; 12
Ciprofloksacin (11)	1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 10; 12
Amoksiklav (12)	1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 11

Grafičkim prikazom je prikazana prosječna vrijednost izmjerene zone inhibicije za pojedine uzorke i pozitivnu i negativnu kontrolu (slika 6). Istaknut je porast antimikrobnog učinka otopina kofeina potkrepljen brojčanim vrijednostima (slika 7).



Slika 6 Srednje vrijednosti zona inhibicije su: 0 mm (destilirana voda, 1 g/L – 6 g/L), 1 mm (8 g/L), 2 mm (10 g/L), 2,5 mm (15 g/L), 3 mm (20 g/L), 2 mm (streptomicin), 3 mm (ciprofloksacin), 5 mm (amoksiklav)



Slika 7 Prikaz ovisnosti veličine zone inhibicije o koncentraciji kofeina: srednje vrijednosti iznose 0 mm (1–6 g/L), 1 mm (8 g/L), 2 mm (10 g/L), 2,5 mm (15 g/L) i 3 mm (20 g/L), uz vidljiv porast zone inhibicije s porastom koncentracije

RASPRAVA

Dobiveni rezultati ispitivanih uzoraka bakterija *Lactobacillus acidophilus, Streptococcus thermophilus i Bifidobacterium* spp. potvrđuju hipotezu da će veće koncentracije vodenih otopina kofeina imati inhibicijski učinak na njihov rast. Rezultati su također i opovrgnuli hipotezu te pokazali da niže koncentracije vodenih otopina kofeina ne utječu na rast bakterija *Lactobacillus acidophilus, Streptococcus thermophilus i Bifidobacterium* spp.

U mnogim istraživanjima dokazivan je utjecaj kave na crijevni mikrobiom gdje se konzumacija kave povezuje sa značajnim smanjenjem različitih znanstvenih rizika. Pvi se učinci pripisuju prisutnosti endogenih bioaktivnih komponenti kave, poput kofeina, klorogenskih kiselina i trigonelina (Ludwig i sur., 2014).

Stoga, u nastavku su prikazani radovi slične problematike. Chen i sur. (2023) su istraživanjem provedenim *in vivo* na miševima, primjenom sekvenciranja 16S rRNA gena, pokazali da kofein smanjuje relativnu brojnost rodova *Lactobacillus* i *Lactococcus*, dok povećava relativnu brojnost rodova *Dubosiella* i *Bifidobacterium*. Za razliku od navedenog istraživanja, koje je provedeno na životinjskom modelu, u ovom su radu prikazani rezultati vlastitog pokusa provedenog *in vitro*. U oba slučaja uočeno je da konzumacija, odnosno prisutnost kofeina, dovodi do smanjenja broja probiotičkih bakterija. Međutim, metodološki pristup razlikuje se u pogledu identifikacije bakterija. U istraživanju Chen i sur. (2023) sastav mikrobiote određen je sekvenciranjem, dok u ovom istraživanju nije provedena dodatna identifikacija pojedinih vrsta bakterija zbog ograničenog pristupa naprednim molekularnim metodama,

već se na temelju sastava korištene starter-kulture znalo da su bakterije *Lactobacillus acidophilus, Streptococcus thermophilus* i *Bifidobacterium* spp. prisutne.

Prema McConnell i Bakermans (2023), laboratorijsko istraživanje pokazalo je da kofein usporava rast bakterije *Escherichia coli* u aerobnim i anaerobnim uvjetima, pri čemu više koncentracije kofeina uzrokuju izraženiju inhibiciju rasta, što upućuje na njegov mogući antimikrobni učinak. Oba istraživanja provedena su *in vitro*, međutim ispitivane bakterije pripadaju različitim funkcionalnim skupinama. *E. coli* se često smatra oportunističkim patogenom, dok su *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus* i *Bifidobacterium* spp. probiotičke bakterije s povoljnim učinkom na domaćina (DenamurI sur. 2021; Le Morvan de Sequeira i sur. 2022). U istraživanju McConnell i Bakermans (2023) nije precizno navedena hranjiva podloga na kojoj je uzgajana *E. coli*, dok je u ovom istraživanju korišten MRS agar, selektivna podloga pogodna za rast bakterija roda *Lactobacillus* i drugih bakterija mliječne kiseline. Unatoč razlikama u ispitivanim mikroorganizmima i primijenjenoj metodologiji, oba istraživanja potvrđuju hipotezu da kofein ima inhibitorno djelovanje na rast bakterija. Rezultati dobiveni u ovom istraživanju mogu se usporediti s rezultatima koje su naveli Sales i sur.(2020), koji su zaključili da kofein nije imao značajan učinak na rast bakterija roda *Bifidobacterium* sp., ali je smanjivao rast bakterija roda *Lactobacillus* sp. Autori su zaključili da konzumacija kave može selektivno poticati rast određenih probiotskih bakterija, čime se postiže potencijalni prebiotički učinak, dok proces dekofeinizacije može utjecati na navedena svojstva kave. Također je utvrđeno da različiti bakterijski sojevi koriste različite komponente kave kao izvor hranjivih tvari za rast. Važno je istaknuti da su u oba istraživanja korišteni jednaki *in vitro* uvjeti, isti bakterijski sojevi te jednak tip agara, što omogućuje pouzdaniju usporedbu rezultata i smanjuje utjecaj metodoloških razlika na dobivene ishode.

Ovo istraživanje dalo je doprinos poznavanju djelovanja koncentracija kofeina na aktivnost i rast određenih sojeva probiotskih bakterija, no ipak postoji potreba za daljnjim istraživanjem. Runti i sur. (2015) pokazali su antimikrobni učinak običnog i dekofeiniziranog ekstrakta *Coffea arabica* na rast *Staphylococcus aureus* (MIC = 2 mg/mL; 0,2 % w v^{-1}), dok je za kofein utvrđen MIC (Minimalna inhibitorna koncentracija) ≤ 25 mg/mL, što upućuje na izostanak njegova antimikrobnog djelovanja. Razna istraživanja potvrđuju antimikrobna svojstva kave (Almeida i sur., 2006., Daglia i sur., 2007.), no odgovorne komponente i mehanizmi djelovanja još nisu u potpunosti razjašnjeni. Antimikrobni potencijal povezan je s postupkom i stupnjem prženja, pri čemu se produkti Maillardove reakcije, osobito melanoidini, smatraju ključnim nositeljima aktivnosti (Daglia i sur., 1994). Međutim, zbog njihove izrazito varijabilne kemijske strukture, nastale interakcijama ugljikohidrata, proteina, aminokiselina i fenolnih spojeva tijekom prženja, točan mehanizam antimikrobnog djelovanja ostaje nedovoljno razjašnjen (Bekedam i sur., 2008).

Primjenom većeg broja različitih koncentracija vodenih otopina kofeina te smanjenjem razlika između ispitivanih koncentracija omogućio bi se precizniji uvid u odgovor bakterija korištenih u ovom istraživanju na antimikrobno djelovanje kofeina. Dodatno, istraživanje bi se moglo unaprijediti preciznijim određivanjem minimalne inhibitorne koncentracije (MIC). Kao smjer budućih istraživanja predlaže se ispitivanje kumulativnog učinka kofeina na odabrane bakterijske sojeve, uz svakodnevno mjerenje zona inhibicije te njihovu usporedbu kroz vrijeme. Također, preporučuje se usporedna analiza djelovanja kofeina na rast probiotičkih bakterija i kvasca *Saccharomyces boulardii*. Nadalje, Sales i sur. (2020.) pokazali su da ekstrakti vrsta *Coffea arabica* i *Coffea canephora* u koncentracijskom rasponu od 0,5 do 1,5 % značajno stimuliraju rast probiotičkih sojeva *Lactobacillus rhamnosus* i *Lactobacillus acidophilus*, uz istodobnu inhibiciju rasta bakterije *Escherichia coli*, što ukazuje na potencijalni prebiotički učinak kofeina i srodnih bioaktivnih spojeva na odabrane probiotičke mikroorganizme te

predstavlja relevantnu osnovu za daljnja istraživanja u području funkcionalnih sastojaka hrane i povećanja ili inhibicije rasta probiotskih bakterija.

ZAKLJUČCI

U današnje vrijeme konzumacije sve veće količine kofeina, potreba za podizanjem svijesti o njegovim učincima na crijevni mikrobiom postala je ključna. Ovaj rad istražuje djelovanje različitih koncentracija kofeina na rast bakterije crijevne mikrobiote.

Tijekom istraživanja utvrđeni su sljedeći zaključci te se može reći kako je hipoteza djelomično potvrđena:

- Niže koncentracije vodenih otopina kofeina (1 g/L, 2 g/L, 4 g/L, 6 g/L) nisu imale nikakav utjecaj na rast probiotskih bakterija iz starter kulture za proizvodnju jogurta.
- Više koncentracije vodenih otopina kofeina pokazuju inhibitorna svojstva gdje su prosječne zone inhibicije 1 mm (8 g/L), 2 mm (10 g/L), 2,5 mm (15 g/L), 3 mm (20 g/L).
- Usporedbom kofeina sa standardnim antibioticima (streptomicin, ciprofloksacin i amoksiklav) pokazano je da više koncentracije vodenih otopina kofeina (≥ 10 g/L) u volumenu od 20 µL imaju inhibicijska svojstva.
- Kofein ima slab do umjeren antimikrobni učinak, ovisno o koncentraciji.

LITERATURA

Almeida A. A., Farah A., Silva D. A., Nunan E. A., Glória M. B. 2006. Antibacterial activity of coffee extracts and selected coffee chemical compounds against enterobacteria. Journal of Agricultural and Food Chemistry 54: 8738–8743.

Alsunni A. A. 2015. Energy drink consumption: beneficial and adverse health effects. The International Journal of Health Sciences 9 (4): 468–474.

Bardić L. 2020. Toksikološki i forenzični značaj kofeina – određivanje koncentracije kofeina u raznim napitcima. Fakultet za forenzičke znanosti bez pravne osobnosti, Split, diplomski rad, https://zir.nsk.hr/object/forenzikast:89, pristupljeno 1.1.2026.

Chen L., Wang X.-j., Chen J.-x., Yang J.-c., Lin L., Cai X.-B., Chen Y.-s. 2022. Caffeine ameliorates the metabolic syndrome in diet-induced obese mice through regulating the gut microbiota and serum metabolism. Diabetology & Metabolic Syndrome 15: 37.

Daglia M., Papetti A., Grisoli .P, Aceti C., Spini V., Dacarro C., Gazzani G. I2007. Isolation, identification and quantification of roasted coffee antibacterial compounds. Journal of Agricultural and Food Chemistry 55: 10208–10213.

Denamur E. i sur. 2021. The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*. Nat. Rev. Microbiol. 19(1):37-54.

Dimidi E., Cox S. R., Rossi M., Whelan K. 2019. Fermented foods: definitions and characteristics, impact on the gut microbiota and effects on gastrointestinal health and disease. Nutrients 11: 1806.

Hudzicki J. 2009. Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test protocol. American Society for Microbiology, https://asm.org/getattachment/2594ce26-bd44-47f6-8287-0657aa9185ad/kirby-bauer-disk-diffusion-, pristupljeno 8.4.2026.

Jang E., Park J. A., Kim Y. H., Kim H. 2019. Effect of caffeine on the antibacterial activity of *Lactobacillus casei*: caffeine and antibacterial activity of L. casei. Korean Journal of Agricultural Science, 46, 981–989.

Le Morvan de Sequeira C., Hengstberger C., Enck P., Mack I. 2022. Effect of probiotics on psychiatric symptoms and central nervous system functions in human health and disease: a systematic review and meta-analysis. Nutrients 14(3): 621.

Ludwig I. A., Clifford M. N., Lean M. E., Ashihara H., Crozier A. 2014. Cofee: biochemistry and potential impact on health. Food and Function 5(8): 1695–1717.

Ljubičić A. 2016. Mikroorganizmi koji sudjeluju u fermentaciji mlijeka. Poljoprivredni fakultet Osijek, završni rad, https://repozitorij.fazos.hr/object/pfos:867, pristupljeno 30.12.2025.

Majić A. 2021. Kofein-prirodni izvori, metabolizam i zdravstveni učinci. Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, završni rad, https://repozitorij.pbf.unizg.hr/en/object/pbf:3944, pristupljeno 1.1.2026.

Makarova K., Slesarev A., Wolf Y., Sorokin A., Mirkin B., Koonin E., Pavlov A., Pavlova N., Karamychev V., Polouchine N., Shakhova V., Grigoriev I., Lou Y., Rohksar D., Lucas S., Huang K., Goodstein D. M., Hawkins T., Plengvidhya V., Welker D., Hughes J., Goh Y., Benson A., Baldwin K., Lee J. H., Díaz-Muñiz I., Dosti B., Smeianov V., Wechter W., Barabote R., Lorca G., Altermann E., Barrangou R., Ganesan B., Xie Y., Rawsthorne H., Tamir D., Parker C., Breidt F., Broadbent J., Hutkins R., O'Sullivan D., Steele J., Unlu G., Saier M., Klaenhammer T., Richardson P., Kozyavkin S., Weimer B., Mills D. 2006. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. Proceedings of the National Academy of Sciences 103(42): 15611–15616.

McConnell M. N., Bakermans C. 2023. Nutrients mediate caffeine inhibition of *Escherichia coli*. Environmental Microbiology Reports 15(5): 422–425.

Pandžić I. 2017. Korištenje bakterija mliječne kiseline u poljoprivrednoj proizvodnji. Poljoprivredni fakultet Osijek, diplomski rad, https://repozitorij.fazos.hr/object/pfos:1036, pristupljeno 30.12.2025.

Petrovicky B. 2016. Primjena starter kultura u prehrambenoj industriji. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, završni rad, https://repozitorij.unios.hr/object/ptfos:1107, pristupljeno 30.12.2025.

Runti G., Pacor S., Colomban S., Gennaro R., Navarini L., Scocchi M. 2015. Arabica cofee extraxt shows antibacterial activity against *Staphylococcus epidermidis* and *Enterococcus faecalis* and low toxicity towarsd a human cell line. LWT - Food Science and Technology 62(1): 108–114.

Soccol C. R., Machado Prado M. R., Blandon Garcia L. M., Rodrigues C., Pedroni Medeiros A. B., Socco V. T. 2014. Current development in probiotics. Journal of Microbial and Biochemical Technology 7: 11–20.

Sales A. L. i sur. 2020. Effects of regular and decaffeinated roasted coffee (Coffea arabica and Coffea canephora) extracts and bioactive compounds on in vitro probiotic bacterial growth. Food and Function. 11(2), 1410-1424.

Toplek M. 2025. Utjecaj fermentiranih mliječnih proizvoda s probioticima na zdravlje ljudi. Odjel prehrambene tehnologije, Sveučilište Sjever, Koprivnica, završni rad, https://repozitorij.unin.hr/object/unin:8247, pristupljeno 30.12.2025.

Živković M. 2017. Određivanje optimalne temperature i pH vrijednosti bakterija mliječne kiseline izoliranih iz proizvoda akvakulture. Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet., završni rad; https://repozitorij.pbf.unizg.hr/object/pbf:1701/FILE0 , pristupljeno 16.2.