

AUTORSKI PREGLED / AUTHOR'S REVIEW

Probiotički koncept – probiotici kao dodaci hrani i probiotici kao bioterapeutici

Probiotic Concept - Probiotics as Food Supplements and Probiotics as Biotherapeutics

Jagoda Šušković*¹, Blaženka Kos¹, Jadranka Frece², Jasna Beganović¹, Andreja Leboš Pavunc¹¹Laboratorij za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura,²Laboratorij za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica,

Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Sveučilišta u Zagrebu, Pierottijeva 6, Zagreb, Hrvatska

Sažetak

Svjetska zdravstvena kriza, posebice u liječenju infektivnih bolesti zbog alarmantnog stanja s antibiotskom rezistencijom te niz kroničnih bolesti koje ugrožavaju ljudsko zdravlje, proizvelo je situaciju za uspostavljanje koncepta funkcionalne hrane još 1980. godine, u Japanu. Dakle, hrana je funkcionalna ako sadrži sastojke koji pozitivno djeluju na jednu ili više ciljanih funkcija u tijelu. Ciljno mjesto djelovanja probiotika, prebiotika, odnosno sinbiotika, kao funkcionalnih dodataka hrani, je gastrointestinalni sustav. Taj sustav je najveći imuno organ u ljudskom organizmu s aktivnom površinom od oko 300 m², a sadrži vrlo kompleksnu mikrobnu populaciju (crijevnu mikrofloru) ukupne mase od 1,2 kg. Ova-ko golema mikrobna biomasa i njezina metabolizamska aktivnost nisu bez utjecaja, mogu imati pozitivne i negativne učinke na ljudsko zdravlje. Ravnoteža ovog mikrobnog sustava je dinamična i može se poremetiti pod utjecajem starenja, liječenja, stresa, prehrane i drugih čimbenika iz okoliša. Probiotički, prebiotički, odnosno sinbiotički koncept podrazumijeva ponovno uspostavljanje ravnoteže crijevne mikroflore i usmjerenje njenog metabolizma u proizvodnju metabolita korisnih za zdravlje. Obećavajući rezultati s prvom generacijom probiotika nude novu generaciju probiotika (živih lijekova) gdje će se kombinacija različitih probiotičkih sojeva s komplementarnim djelovanjem koristiti u liječenju različitih gastrointestinalnih i urogenitalnih bolesti ili će se koristiti kao vektori za vakcine, imunoglobuline i druge terapijske proteine. Rad se bazira na prikazu objavljenih rezultata znanstvenih istraživanja koja su provedena u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura na Prehrambeno-biotehnoškom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Gljučne riječi: probiotici, bioterapeutici, crijevna mikroflora

Abstract

World health crises, especially in a prevention of infective diseases and as result of the wide spread of antibiotic resistance and the number of chronic diseases that disturb human health, has lead, already in the 1980s, to the establishment of the functional food concept (FOSHU Food for specified health use) in Japan. Hence, the food is defined as functional "if it contains a food component (whether a nutrient or not) which affects one or a limited number of function(s) in the body in a targeted way so as to have positive effects". Target place of action of probiotics, prebiotics or synbiotics, as functional food supplements, is gastrointestinal tract. Gastrointestinal tract represents the largest immune organ in our body with an active space of approximately 300 m² and it contains a complex microbial ecosystem (gut microflora) with a total weight of 1.2 kg. Such a complex microbial biomass and its metabolic activity can have positive but also negative influence on human health. The balance of gut microflora is dynamic and could be disturbed by the influence of different factors like ageing processes, healing, stress, diet, and many other environmental factors. Probiotic, prebiotic and synbiotic concept imply the reestablishment of the disturbed gut microflora and direction of its metabolism to the production of bioactive metabolites beneficial for health. The promising results of a first generation of probiotics offer new generation of probiotics (biotherapeutics) that will often contain mixture of probiotic strains with complementary characteristics, tailor-made for different gastrointestinal and urogenital diseases, or as delivery systems for vaccines, immunoglobulins and other protein based therapies. In this paper the review of the published results of the investigations, performed in the Laboratory of Antibiotic, Enzyme, Probiotic and Starter Culture Technology at Faculty of Food Technology and Biotechnology University of Zagreb, are presented.

Key words: probiotics, biotherapeutics, gut microflora

1. Uvod

Hrana i znanost o prehrani danas imaju potpuno nove dimenzije i koncepte. U prošlosti je glavna uloga hrane bila preživljavanje, odnosno utomljavanje gladi i malo se pozornosti posvećivalo njenom negativnom, odnosno pozitivnom učinku na zdravlje. Detaljnije poznavanje biokemije, molekularne biologije, fiziologije, pa i patologije, podupire hipotezu da hrana (prehrana) kontrolira i usmjerava različite funkcije u tijelu te tako utječe na zdravstveno stanje organizma. Dakle, hrana je funkcionalna ako sadrži sastojke koji pozitivno djeluju

na jednu ili više ciljanih funkcija u tijelu. Stoga je sve više potrošača zainteresirano za potencijalna svojstva funkcionalne hrane radi poboljšanja zdravlja, što bi smanjilo rizik od nastajanja bolesti, a samim time i upotrebu antibiotika, što bi dovelo do smanjenja antibiotske rezistencije. Naime, Svjetska zdravstvena organizacija (WHO – World Health Organization) već niz godina upozorava na alarmantno stanje s antibiotskom rezistencijom. U cijeloj Europi 18. studenog se obilježava kao Europski dan svjesnosti o antibioticima. Rezistencija bakterija na antibiotike je postao važan problem u današnjoj medicini,

Corresponding author: jsusko@pbf.hr



u što su se uključile i relevantne institucije u Hrvatskoj želeći upozoriti na odgovorno korištenje ovih važnih lijekova kako bi se njihova djelotvornost sačuvala i za buduće generacije. Upravo iz tih i drugih zdravstvenih razloga, svjetska znanstvena zajednica je odavno prepoznala taj problem te se uključila u borbu protiv antibiotske rezistencije nudeći, između ostalih, i koncept funkcionalne hrane, odnosno probiotički i prebiotički koncept s ciljnim mjestom djelovanja (gastrointestinalni trakt), odnosno na crijevnu mikrofloru. Probiotički koncept podrazumijeva oralno uzimanje živih, korisnih mikroorganizama, nazvanih probioticima, dok prebiotički koncept uvodi selektivne izvore ugljika i energije korisnim, autohtono prisutnim i unesenim, alohtonim probiotičkim bakterijama u intestinalnom traktu. Sinbiotički koncept je kombinirana primjena probiotičkog i prebiotičkog koncepta radi postizanja pojačanog korisnog učinka na zdravlje.

2. Strategija izbora probiotičkih sojeva

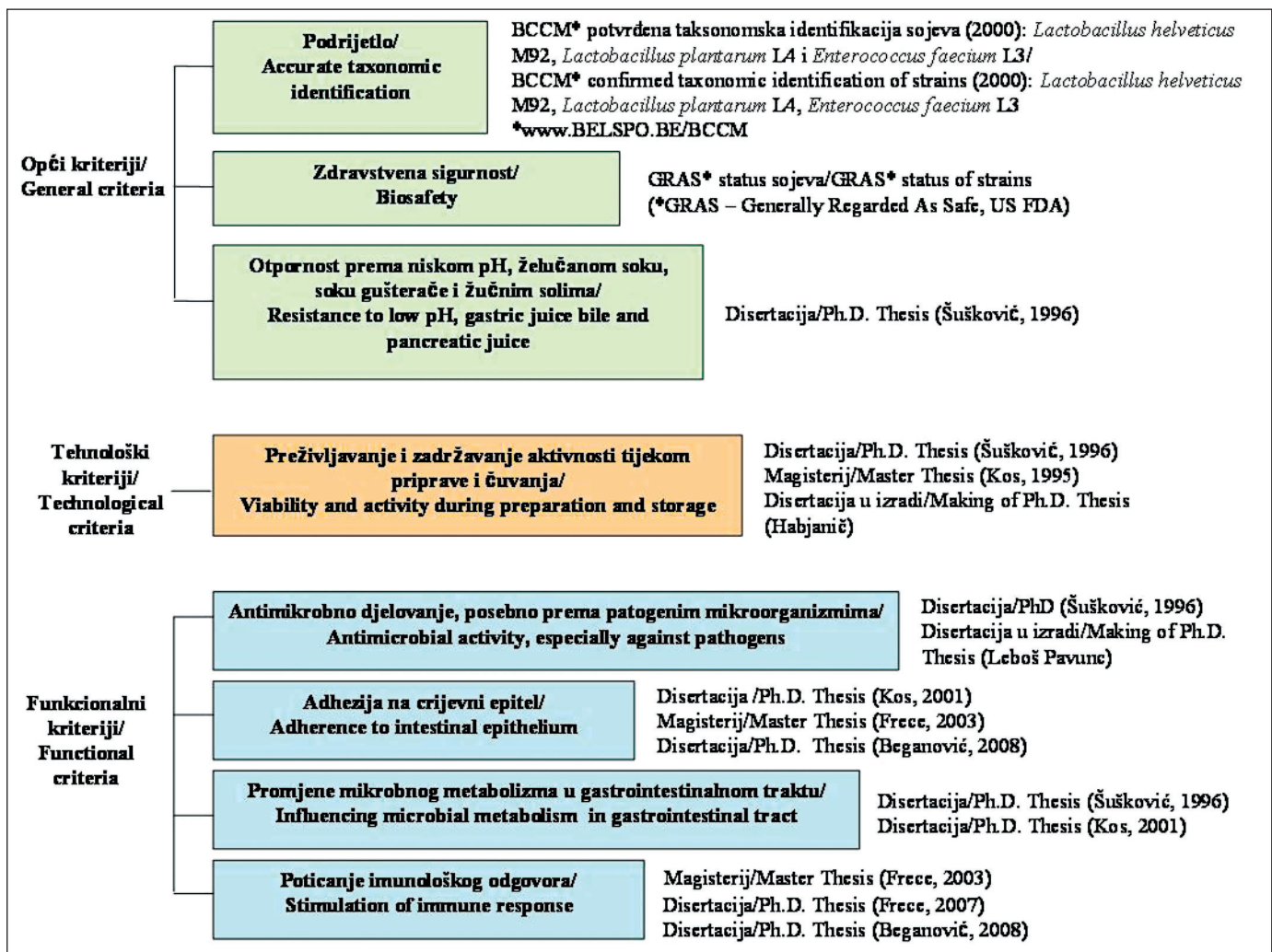
Istraživanja o probioticima, odnosno uspostavljanje probiotičkog koncepta traje već preko 20 godina. Znanstveni temelj za proučavanje probiotičkog koncepta je bila spoznaja da sastav crijevne mikroflora značajno utječe na zdravlje

organizma. Da bi se neki mikroorganizam mogao koristiti u probiotičke svrhe, mora zadovoljiti strogu izbornu probiotičku strategiju, a tri glavna aspekta su: opći, tehnološki i funkcionalni (Slika 1) (Šušković, 1996). Važno je naglasiti da bakterijski sojevi za probiotičku uporabu, prema ovoj, znanstveno priznatoj strategiji, trebaju zadovoljiti velik broj zahtjeva koji su navedeni u tablici 1 (Šušković i sur. 2001).

Na temelju provedenih istraživanja u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura na Prehrambeno-biotehnoškome fakultetu su prema navedenoj izbornoj probiotičkoj strategiji definirana tri probiotička soja: *Lactobacillus helveticus* M92 (formerly *Lacidophilus* M92), *Lactobacillus plantarum* L4 i *Enterococcus faecium* L3.

2.1. Opći kriteriji za izbor probiotičkih sojeva

Da bi se probiotički mikroorganizam mogao primjeniti, potrebna je točna taksonomska identifikacija i potpuna karakterizacija soja. Mnoge bakterijske kulture koje se nalaze u probiotičkim proizvodima različitih proizvođača nisu ispravno deklarirane. Tako se u nekim probiotičkim jogurtima umjesto deklarirane *Lactobacillus acidophilus* nalazi bakterija *L. johnsonii* ili *L. gasseri*; umjesto *L. casei* bakterija *L. paracasei*, a



Slika 1. Strategija izbora probiotičkih sojeva u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura na Prehrambeno-biotehnoškome fakultetu Sveučilišta u Zagrebu (Šušković, 1996)

Figure 1. Selection strategy for the probiotics in the Laboratory for Antibiotic, Enzyme, Probiotic and Starter culture Technology at the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb (Šušković, 1996)

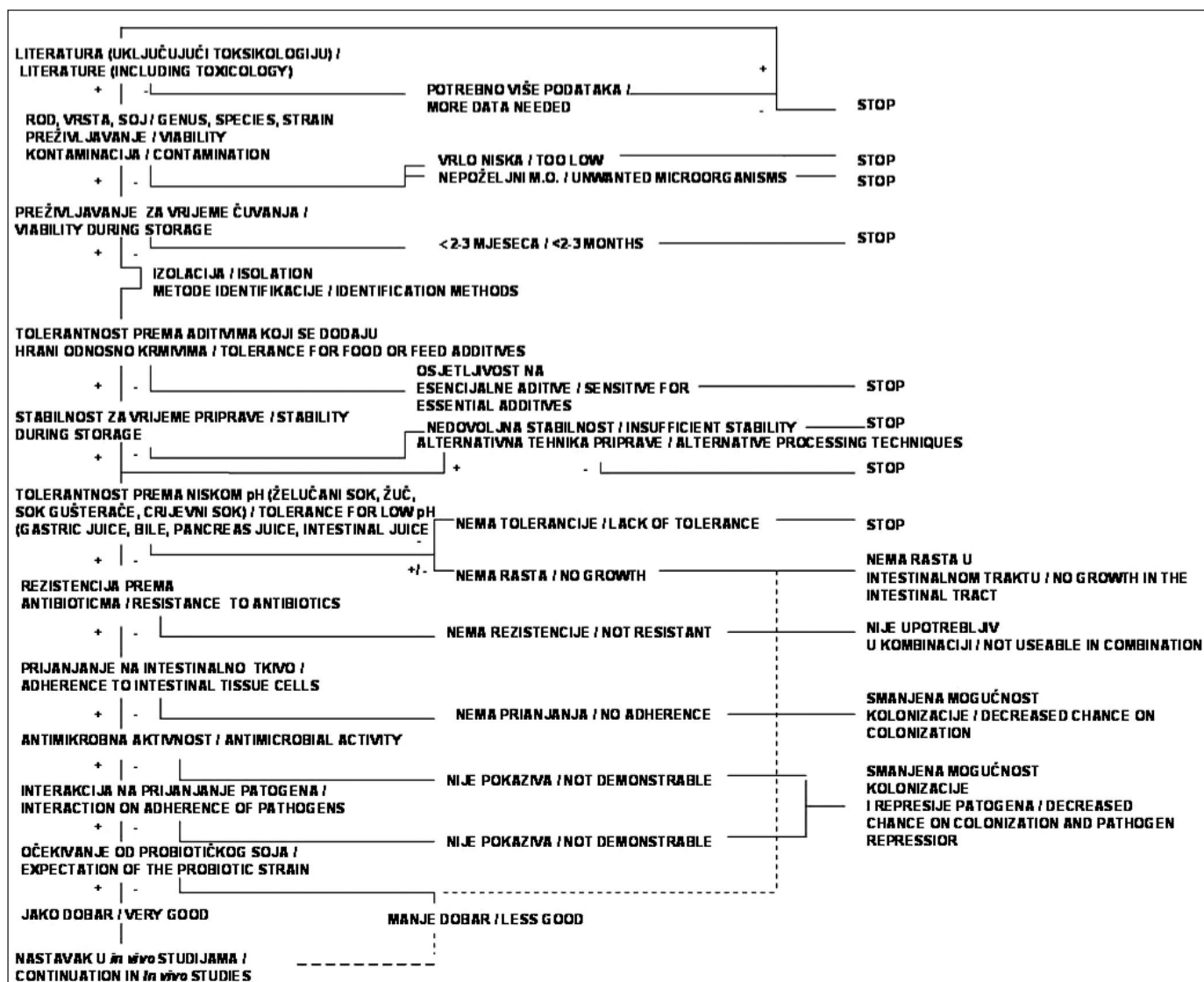
vrsta nazvana *Bifidobacterium longum* često je *B. animalis*. Molekularnim metodama identifikacije rješavaju se ti problemi i osigurava potrebna kakvoća probiotičkih proizvoda (Yeung i sur. 2004; Klaenhammer i sur. 2005; Zoetendal i Mackie, 2005; Norin i sur., 2009). Primjenjuju se metode za identifikaciju koje koriste početnice specifične za rod ili vrstu, kao što su npr. metode bazirane na PCR (Polymerase Chain Reaction), RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) i RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) (Dubernet i sur. 2002;

Christensen i sur. 2004; Rosetti i Giraffa, 2005). Taksonomska provjera triju probiotičkih sojeva bakterija mliječne kiseline (*Lactobacillus helveticus* M92, *Lactobacillus plantarum* L4 i *Enterococcus faecium* L3) izoliranih i definiranih u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, provedena je primjenom gel elektroforeze u pulsirajućem polju (PFGE - Puls Field Gel Electrophoresis) (Kos i sur. 2008). Dobivene rezultate potvrdila je i međunarodna institucija za identifikaciju

Tablica 1. Kriteriji za izbor probiotičkih sojeva (Šušković i sur. 2001)

Table 1. Selection criteria of probiotic strains (Šušković et al., 2001)

1.	točna taksonomska identifikacija / accurate taxonomic identification	Opći kriteriji / General criteria
2.	humano podrijetlo za humane probiotike / human origin for human probiotics	
3.	netoksičnost i nepatogenost / nontoxic and nonpathogenic	
4.	genetička stabilnost (nema prijenosa plazmida) / genetically stable (no plasmid transfer)	
5.	otpornost prema žučnim solima / resistant to bile salts	
6.	otpornost prema niskim pH vrijednostima / resistant to low pH values	
7.	stabilnost poželjnih karakteristika tijekom pripreme kulture, skladištenja i isporuke / stability of desired characteristics during culture preparation, storage and delivery	Tehnološki kriteriji / Technological criteria
8.	visoka razina broja živih bakterija u probiotičkom proizvodu (10^6 - 10^8 mL ⁻¹ ili g ⁻¹), npr. 100 g proizvoda osigurava 10^8 - 10^{10} živih stanica / viability at high populations preferred at 10^6 - 10^8 mL ⁻¹ or g ⁻¹ , which means that 100 g of probiotic product contains 10^8 - 10^{10} viable cells	
9.	brzo i lako razmnožavanje, izdvajanje, koncentriranje, smrzavanje i liofiliziranje tijekom procesa pripreme probiotičkih kultura, te visok stupanj preživljavanja za vrijeme čuvanja i distribucije / adequate growth, recovery, concentration, freezing and freeze-drying during the production of probiotic cultures and viability during storage and distribution	
10.	dobivanje željenih organoleptičkih svojstava kad su uključeni u fermentacijske procese / provision of desirable organoleptic qualities when included in fermentation processes	
11.	sposobnost preživljavanja, razmnožavanja i metabolizamske aktivnosti u "ciljanom" području primjene u organizmu / capable of survival, proliferation, and metabolic activity at the target site	Funkcionalni kriteriji / Functional criteria
12.	sposobnost adhezije i kolonizacije crijevnog epitela / adherence and colonization potential preferred	
13.	produkcija antimikrobnih supstancija, uključujući bakteriochine, vodikov peroksid i organske kiseline / production of antimicrobial substances, including bacteriocins, hydrogen peroxide, and organic acids	
14.	antagonistička aktivnost prema patogenim i kariogenim bakterijama / antagonistic activity toward pathogenic and cariogenic bacteria	
15.	mogućnost kompeticije sa sudionicima normalne mikroflore, uključujući iste ili srodne vrste, otpornost prema bakteriocinima, kiselinama ili drugim antimikrobnim supstancijama koje proizvodi autohtona mikroflora / able to compete with the normal microflora, including the same or closely related species, potentially resistant to bacteriocins, acid, and other antimicrobials produced by residing microflora	
16.	imunomodulacijski učinak / immunomodulatory effect	
17.	sposobnost iskazivanja jednog ili više klinički dokumentiranih korisnih učinaka na zdravlje / able to exert one or more clinically documented health benefits	



Slika 2. In vitro selekcija probiotičkih sojeva (Šušković, 1996)

Figure 2. In vitro selection of probiotic strains (Šušković, 1996)

mikroorganizama BCCM/LMG-BACTERIA COLLECTION, Gent, Belgija.

Duga tradicija uporabe bakterija mliječne kiseline bez štetnog utjecaja na zdravlje čovjeka pribavila im je GRAS (Generally Regarded As Safe) status prema US FDA, odnosno QPS (Qualified Presumption of Safety) status prema legislativi Europske Unije. Odabir potencijalnih probiotičkih sojeva temelji se na *in vitro* istraživanjima koja su dobar pokazatelj za utvrđivanje probiotičkih svojstava koja će bakterijski sojevi pokazati u *in vivo* uvjetima (Slika 2). Pri tome se koriste različiti statički i dinamički modeli koji simuliraju uvjete u gastrointestinalnom traktu (Šušković, 1996; De Boever i sur. 2000; Blanquet i sur. 2004). Glavnu prepreku preživljavanju potencijalnih probiotičkih sojeva u gastrointestinalnom traktu predstavljaju niski pH želuca, lizozim, žučne soli i probavni enzimi, kao što su pepsin i enzimi gušterače.

Probiotički sojevi selekcionirani u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta su pokazali visok stupanj preživljavanja u uvjetima niske pH vrijednosti hranjivog medija te u prisutnosti supstancija kao što su lizozim, fenol i

žučne soli, konjugirane i dekonjugirane (Šušković i sur., 1997a i 1997b). Slijedila su istraživanja preživljavanja ovih sojeva u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog sustava. Detaljno je istražen tranzit od želuca do krajnjeg dijela tankog crijeva (ileuma), tj. eksperimenti su provedeni u prisutnosti pepsina, mucina i pankreatina, uz dodatak protektora (kazeina, koncentriranih proteina sirutke i obranog mlijeka) uz odgovarajuće pH vrijednosti pojedinog dijela probavnog sustava kojeg probiotičke bakterije trebaju proći da bi kolonizirale prijelaz iz tankog u debelo crijevo gdje je poželjna njihova probiotička aktivnost (Šušković i sur. 2000). Pri tome su definirane kritične točke ključnih parametara pri kojima ispitivane bakterije mliječne kiseline mogu preživjeti (Kos i sur. 2000).

3. Funkcionalna svojstva probiotičkih bakterija

Antimikrobno djelovanje probiotičkih bakterija, posebno prema patogenim mikroorganizmima, važno je funkcionalno svojstvo probiotičkih bakterija koje im osigurava kompetitivnu prednost u natjecanju za mjesta vezanja i hranjive tvari u intestinalnom sustavu. Utvrđivanje antagonističkog djelovanja potencijalnih probiotičkih sojeva prema patogenim i drugim

mikroorganizmima provodi se različitim *in vitro* metodama na krutim i tekućim hranjivim podlogama kao i *in vivo* na pokusnim životinjama (Šušković, 1996; Kos, 2001; Frece, 2003). Posebna pozornost je posvećena bakteriocinskoj aktivnosti bakterija mliječne kiseline koja je također detaljno proučavana (Kos, 1995; Šušković, 1996; Šušković i sur., 1997a i 1997b).

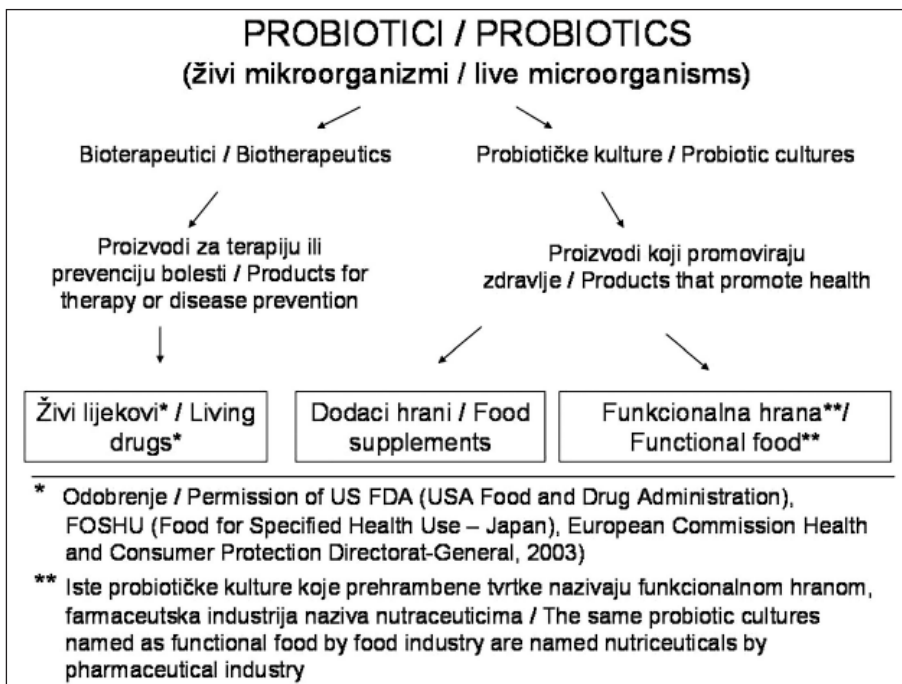
Promjena mikrobnog metabolizma u intestinalnom traktu, kao važno funkcionalno svojstvo probiotičkih bakterija, posljedica je inhibicije rasta nekih sudionika crijevne mikroflore koji proizvode enzime (β -glukuronidazu, nitroreduktazu, azoreduktazu i steroid-7 α -dehidrosilazu) odgovorne za kancerogene procese. S druge strane, probiotičke bakterije doprinose poboljšanju metabolizma laktoze kod laktoza-netolerantnih osoba povećanjem aktivnosti enzima β -galaktozidaze u intestinalnom traktu, što omogućava razgradnju laktoze pri fiziološkoj deficijenciji tog enzima. Povrh toga, *in vitro* i *in vivo* istraživanja su pokazala da dekonjugacijska (hidrolazna) aktivnost probiotičkih sojeva prema konjugiranim žučnim solima uzrokuje snižavanje koncentracije kolesterola jer se kolesterol taloži zajedno s istaloženim dekonjugiranim žučnim solima, što može biti još jedno, funkcionalno svojstvo probiotičkih bakterija s dokazanom dekonjugacijskom aktivnošću (Šušković i sur., 2000, Kos, 2001).

Važna funkcionalna svojstva probiotičkih sojeva su adhezija na crijevni epitel i poticanje imunološkog odgovora domaćina. Na temelju istraživanja provedenim u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta ustanovljena je *in vitro* adhezija probiotičkih sojeva *Lactobacillus helveticus* M92, *Lactobacillus plantarum* L4 i *Enterococcus faecium* L3 na epitelne stanice ileuma i želuca Swiss albino miševa i svinja pasmine Landras, što je potvrđeno i *in vivo* na pokusnim Swiss albino miševima te je dokazano imunomodulacijsko djelovanje sva tri probiotička soja kroz povećanje razine ukupnih IgA i IgG antitijela u serumima pokusnih miševa (Kos i sur. 2003; Frece, 2003; Frece i sur., 2005a i 2005b). Ispitane su i mogućnosti primjene ovih probiotičkih sojeva u kombinaciji s različitim prebiotičkim supstratima u svrhu postizanja pojačanog, sinbiotičkog učinka. Oralna imunizacija pokusnih miševa sa sinbiotičkim pripravcima uzrokovala je jači imunološki odgovor od pojedinačnih probiotičkih sojeva i samih prebiotičkih supstrata (Frece, 2007). Adhezija i kolonizacija intestinalnog trakta pokusnih Swiss albino miševa bila je bolja kad su se umjesto probiotičkih koristili sinbiotički pripravci, a ustanovljena je i kompetitivna ekskluzija nepoželjnih sudionika crijevne mikroflore, enterobakterija i sulfitoreducirajućih klostridija, nakon tretmana Swiss albino miševa s probiotičkim i sinbiotičkim pripravcima triju selekcioniranih probiotičkih sojeva (Frece i sur. 2009).

U svrhu istraživanja mehanizma adhezije probiotičkih sojeva na intestinalne epitelne stanice domaćina, što je bitan preduvjet njihovog probiotičkog djelovanja *in situ*, neophodna su istraživanja fizikalno-kemijskih karakteristika stanične površine bakterijskih sojeva za probiotičku primjenu. Bakterijska adhezija započinje nespecifičnim fizikalno-kemijskim interakcijama koje onda omogućavaju specifične interakcije adhezina s površine bakterijske stanice i komplementarnog receptora na epitelnim stanicama u intestinalnom sustavu.

Istraživanja u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta pokazala su da je autoagregacija česta značajka bakterijskih sojeva sa sposobnošću adhezije na crijevni epitel, kao i važnost površinskih proteina bakterijskih stanica u procesu adhezije (Kos i sur., 2003; Frece i sur., 2005a). Površinski proteini bakterija (engl. surface layer proteins – slp) su medijatori različitih staničnih procesa poput adhezije, transporta hranjivih tvari, a kod pojedinih probiotičkih sojeva iz roda *Lactobacillus* imaju i funkcionalnu ulogu u zaštiti bakterijske stanice i njenom imunomodulacijskom djelovanju na domaćina. Proteomičkom analizom staničnih proteina bakterije *Lactobacillus helveticus* M92 (Beganović i sur., 2010), utemeljenoj na metodologiji koja je prethodno razrađena i primjenjena na bakteriji *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* kao modelnom mikroorganizmu za proučavanje bakterija mliječne kiseline, identificirani su proteini prisutni u netopljivoj frakciji, s posebnim osvrtom na proteine stanične ovojnice, koji su potencijalni adhezini, imunomodulatori, pa čak i potencijalni prenositelji oralnih vakcina koje potiču mukozalni odgovor. Najsuvremenijim proteomičkim pristupom, primjenom LC-MS/MS (tekućinske kromatografije vezane na tandemsku spektrometriju masa), identificirano je čak 399 različitih proteina koji čine netopljivi proteom bakterije *L. helveticus* M92, od kojih je 30 eksprimirano u stresnim uvjetima, tijekom prolaska probiotičkog soja kroz gastrointestinalni trakt «germ-free» miša (Beganović, 2008; Beganović i sur., 2010). SDS-PAGE ukupnih i površinskih staničnih proteina bakterije *L. helveticus* M92 pokazala je karakterističnu proteinsku vrpcu SlpA proteina, tzv. površinskog parakristalnog S-sloja, koja je potvrđena i analizom pomoću LC-MS/MS (Beganović, 2008). Na temelju rezultata dobivenih pomoću spektrometra masa izrađen je dendrogram kojim su uspoređeni površinski Slp proteini iz različitih *Lactobacillus* sojeva radi usporedbe homologije SlpA iz *L. helveticus* M92 sa Slp proteinima drugih bakterijskih vrsta (Beganović, 2008). Provedeno je i sekvenciranje *slpA* gena iz *L. helveticus* M92. Usporedbom sekvencije gena *slpH* iz soja *L. helveticus* CNRZ 303 sa kompletnom sekvencijom *slpA* gena iz *L. helveticus* M92 vidi se da uspoređeni geni pokazuju veliki stupanj homologije, a nešto manji stupanj homologije sa sekvencama gena *slpA* iz sojeva *L. acidophilus* ATCC 4356 i *L. acidophilus* NCFM koje su dostupne u bazi podataka na web stranici NCBI (Beganović, 2008).

Površinski, parakristalni S-sloj bakterije *L. helveticus* M92 je prema rezultatima istraživanja provedenim u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta odgovoran za komparativnu prednost pred drugim sudionicima autohtone crijevne mikroflore, za preživljavanje *L. helveticus* M92 u nepovoljnim uvjetima gastrointestinalnog trakta, a sudjeluje i u procesu adhezije ispitivanog probiotičkog soja na crijevne epitelne stanice pokusnih Swiss albino miševa i svinja pasmine Landras (Kos, 2001; Kos i sur. 2003; Frece i sur. 2005a). *L. helveticus* M92 se pokazao kao učinkovit imunomodulator, a istraživanja na pokusnim Swiss albino miševima su pokazala imunomodulacijsko djelovanje samih, pročišćenih površinskih proteina S-sloja (Frece, 2007; Frece i sur. 2009). Zbog svih dosadašnjih spoznaja postoji veliki znanstveni interes za SlpA proteine i

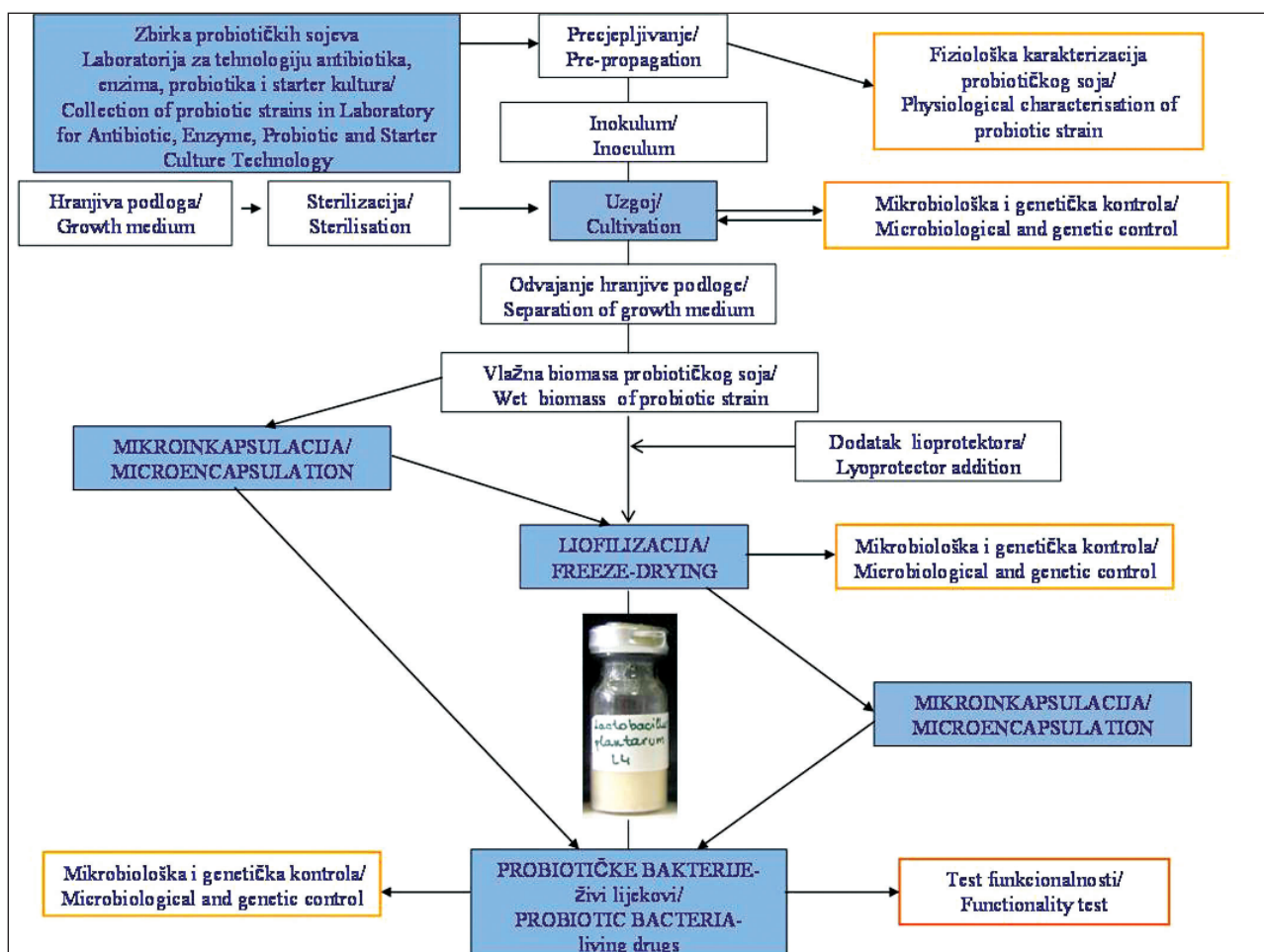


Slika 3. Klasifikacija probiotičkih proizvoda (Sleator i Hill, 2008; Šušković i sur., 2010)
Figure 3. Classification of probiotic products (Sleator and Hill, 2008; Šušković et al., 2010)

mogućnostima njegove primjene kao nositelja oralnih vakcina, te u terapiji do sada neizlječivih autoimunih bolesti kao što je multipla skleroza (Šušković i sur., 2010).

4. Proizvodnja probiotika kao živih lijekova

Probiotici se prema načinu primjene mogu podijeliti na bioterapeutike i funkcionalne dodatke hrani (Slika 3). Bioterapeutici su probiotički sojevi namijenjeni za terapiju ili prevenciju bolesti što ih svrstava u kategoriju živih lijekova, dok probiotici kao funkcionalni dodaci hrani promoviraju zdravlje tj. pozitivno utječu na ravnotežu crijevne mikroflore (Periti i Tonelli, 2002; Šušković, 2009). Često iste probiotičke kulture, koje prehrambene tvrtke nazivaju funkcionalnim dodacima hrani, farmaceutska industrija naziva nutraceuticima (Sleator i Hill, 2008).



Slika 4. Postupak pripreme praškastog oblika probiotika kao živih lijekova u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura na Prehrambeno-biotehnoškom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu (Šušković i sur., 2010)

Figure 4. Workflow for the preparation of powder form probiotic bacteria as living drugs in Laboratory for Antibiotic, Enzyme, Probiotic and Starter Culture Technology at the Faculty of Food Technology and Biotechnology University of Zagreb (Šušković et al., 2010)

S tehnološkog aspekta proizvodnje probiotika kao živih lijekova važno je osigurati i optimalne uvjete tijekom pripreme i čuvanja probiotika radi mikrobiološke stabilnosti proizvoda. Dodatkom krioprotektora i lioprotektora, te mikroinkapsuliranjem probiotičkih sojeva tijekom zamrzavanja, sušenja ili čuvanja, može se bitno povećati broj živih stanica po gramu probiotičkog pripravka (Kailasapathy, 2002; Kos i sur., 2008). Mnogi znanstveni radovi opisuju utjecaj različitih metoda mikroinkapsulacije na povećanje stabilnosti i preživljavanja probiotika tijekom njihove proizvodnje i primjene. Mikroinkapsulacija je tehnološki postupak imobilizacije probiotičkih bakterija unutar ograničenog prostora s ciljem njihove zaštite tijekom biotehnološkog postupka proizvodnje i primjene kao bioterapeutika (Champagne i Fustier, 2007). Postupak pripreme praškastog oblika probiotika kao živih lijekova u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu je prikazan na slici 4 (Šušković i sur., 2010; Beganović i sur., 2009). Probiotički sojevi *Lactobacillus helveticus* M92, *Lactobacillus plantarum* L4 i *Enterococcus faecium* L3 preživljavaju proces liofilizacije u visokom broju, a najveći postotak preživljavanja postignut je uz dodatak obranog mlijeka i glicerola kao lioprotektora. Učinkovitost mikroinkapsulacije, vlažne biomase probiotičkih bakterija, u odnosu na mikroinkapsulaciju liofiliziranih stanica ispitivanih probiotičkih sojeva pokazala se uspješnijom. Mikroinkapsulirane probiotičke stanice bolje preživljavaju u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta od stanica koje nisu bile mikroinkapsulirane. Mikroinkapsulacija probiotičkih sojeva u alginatu pokazala se kao obećavajuća metoda koja doprinosi boljem preživljavanju u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta, stoga bi mogla imati primjenu u biotehnološkoj proizvodnji probiotika kao živih lijekova (Keohane i sur., 2009).

Nekoliko preglednih znanstvenih radova detaljno opisuju fiziološku aktivnost i mehanizam djelovanja probiotika kao i rezultate provedenih kliničkih istraživanja koja potvrđuju korisne zdravstvene učinke probiotika (Šušković, 1996; Šušković i sur., 2001, Šušković i sur. 2010; Ouwehand i sur., 2002; Periti i Tonelli, 2002; Reid, 2006). Na temelju znanstvenih i kliničkih istraživanja može se reći da probiotici mogu biti vrlo učinkoviti u sprječavanju različitih vrsta crijevnih i urogenitalnih infekcija, te posebice za uspostavljanje normalne crijevne mikroflore nakon antibiotske terapije. Današnja istraživanja upozoravaju na sve veći učinak probiotičkih mikroorganizama u suzbijanju različitih bolesti, a posebice u suzbijanju kancerogenih procesa u probavnom sustavu. Obećavajući rezultati s prvom generacijom probiotika nude novu generaciju probiotika (živih lijekova) gdje će se kombinacija različitih sojeva s komplementarnim djelovanjem koristiti u liječenju različitih gastrointestinalnih i urogenitalnih bolesti ili će se koristiti kao vektori za vakcine, imunoglobuline i druge terapijske proteine (Ljungh i Wadström, 2009).

5. Literatura

Beganović, J. (2008): Primjena proteomike i drugih molekularnih metoda u definiranju funkcionalnih svojstava probiotičkih bakterija, *Disertacija*, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Beganović, J., Kos, B., Leboš Pavunc, A., Dukić, M., Radoš, I., Šušković, J. (2009): Influence of microencapsulation and freeze-drying on functionality of probiotic bacteria. U: *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 56, 2nd Central European Forum for Microbiology, Keszethly, Mađarska, 7-9 listopada, 2009.

Beganović, J., Guillot, A., van de Guchte, M., Jouan, A., Gitton, C., Loux, V., Roy, K., Huet, S., Monod, H., Monnet V. (2010): Characterisation of the insoluble proteome of *Lactococcus lactis* by SDS-PAGE-LC-MS-MS leads to the identification of new markers of adaptation of the bacteria to the mice digestive tract, *J. Proteome Res.* 9, 677-688.

Blanquet, S., E. Zeijdner, E. Beyssac, J.P. Meunier, S. Denis, R. Havenaar, M. Alric (2004): A dynamic artificial gastrointestinal system for studying the behavior of orally administered drug dosage forms under various physiological conditions, *Pharm. Res.* 21, 585-591.

Champagne, C.P. i Fustier, P. (2007): Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Curr. Opin. Biotechnol.* 18, 184-190.

Christensen J.E., C.E. Reynolds, S.K. Shukla, K.D. Reed (2004): Rapid molecular diagnosis of *Lactobacillus* bacteremia by terminal restriction fragment length polymorphism analysis of the 16S rRNA gene. *Clin. Med. Res.* 2, 37-45.

De Boever, P., B. Deplancke, W. Verstraete (2000): Fermentation by gut microbiota cultured in a simulator of the human intestinal microbial ecosystem is improved by supplementing a sojgerm powder, *J. Nutr.* 130, 2599-2606.

Dubernet S., N. Desmases, M. Gueguen (2002): A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level, *FEMS Microbiol. Lett.* 10, 271-275.

Frece, J. (2003): *In vitro* i *in vivo* istraživanja probiotičkog mehanizma djelovanja bakterija: *Lactobacillus acidophilus* M92, *Lactobacillus plantarum* L4 i *Enterococcus faecium* L3, *Magisterij*, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Frece, J. (2007): Sinbiotički učinak bakterija: *Lactobacillus acidophilus* M92, *Lactobacillus plantarum* L4 i *Enterococcus faecium* L3, *Disertacija*, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Frece, J., Kos, B., Svetec, I.K., Zgaga, Z., Mrša, V., Šušković, J. (2005a): Importance of S-layer proteins in probiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* M92, *J. Appl. Microbiol.* 98, 285-292.

Frece, J., Kos, B., Beganović, J., Vuković, S., Šušković, J. (2005b): *In vivo* testing of functional properties of three selected probiotic strain, *World J. Microbiol. & Biotechnol.* 21, 1401-1408.

Frece, J., Kos, B., Svetec, I. K., Zgaga, Z., Beganović, J., Leboš, A., Šušković, J. (2009): Synbiotic effect of *Lactobacillus helveticus* M92 and prebiotics on the intestinal microflora and immune system of mice, *J. Dairy Res.* 76, 98-104.

Kailasapathy, K. (2002): Microencapsulation of Probiotic Bacteria: Technology and Potential Applications. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* 3, 39-48.

Keohane, J., Ryan, K., Shanahan, F. (2009) *Lactobacillus* in the Gastrointestinal Tract. U: *Lactobacillus* Molecular Biology: From Genomics to Probiotics, Ljungh, Å., Wadström, T. (ured.), Caister Academic Press, Norfolk, str. 169-181.



- Klaenhammer, T.R., Barrangou, R., Buck, B.L., Azcarate-Peril, M.A. & Altermann, E. (2005): Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health, In W.M. de Vos, O.P. Kuipers & M. Kleerebezem (Eds.), *Proceedings of the 8th Symposium on Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications* (pp. 393-410). Elsevier Science B.V., Egmond Aan Zee, The Netherlands, *FEMS Microbiol. Rev.* 29, ISSN 0168-6445.
- Kos (Brkić), B. (1995): Fiziološke značajke i antibakterijska aktivnost odabranih bakterija mliječne kiseline, *Magisterij, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu*.
- Kos, B. (2001): Probiotički koncept: *in vitro* istraživanja s odabranim bakterijama mliječne kiseline. *Disertacija, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu*.
- Kos, B., Šušković, J., Goreta, J., Matošić, S. (2000): Effect of Protectors on the Viability of *Lactobacillus acidophilus* M92 in Simulated Gastrointestinal Conditions, *Food Technol. Biotechnol.* 38 (2) 121-127.
- Kos, B., Šušković, J., Beganović, J., Gjurčić, K., Frece, J., Iannaccone, C., Canganella, F. (2008): Characterization of the three selected probiotic strains for the application in food industry, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24, 699-707.
- Kos, B., Šušković, J., Vuković, S., Šimpraga, M., Frece, J., Matošić, S. (2003): Adhesion and Aggregation Ability of Probiotic Strain *Lactobacillus acidophilus* M92, *J. Appl. Microbiol.* 94, 981-987.
- Ljungh Å., Wadström T. (2009): From probiotics, prebiotics and synbiotics to «living drugs». U: *Lactobacillus Molecular Biology: From Genomics to Probiotics*, Ljungh, Å., Wadström, T. (ured.), Caister Academic Press, Norfolk, str. 197-202.
- Norin E., Jernberg, C., Nilsson, H. O., Engstrand, L. (2009): Studies of The Intestinal Microflora by Traditional, Functional and Molecular Techniques. U: *Lactobacillus Molecular Biology: From Genomics to Probiotics*, Ljungh, Å., Wadström, T. (ured.), Caister Academic Press, Norfolk, str. 83-94.
- Ouweland, A.C., S. Salminen, E. Isolauri (2002) Probiotics: an overview of beneficial effects U: *Proceedings of the 7th Symposium on Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications*, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, *Antonie van Leeuwenhoek*, 82, str. 279-289.
- Periti, P., Tonelli, F. (2002): Biotherapeutics and biotherapy of surgical enteropathies, *Digest. Liver Dis.* 34, S87-S97.
- Reid, G. (2006) Safe and efficacious probiotics: what are they? *TRENDS in Microbiology* 14(8), 348-352.
- Rosetti L., G. Giraffa (2005): Rapid identification of dairy lactic acid bacteria by M13-generated, RAPD-PCR fingerprint databases. *J. Microbiol. Methods*, 63, 135-144.
- Sleator, R. D., Hill, C. (2008): New frontiers in probiotic research. *Lett. Appl. Microbiol.* 46, 143-147.
- Šušković, J. (1996): Rast i probiotičko djelovanje odabranih bakterija mliječne kiseline, *Disertacija, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu*.
- Šušković, J., Brkić, B., Matošić, S., Marić, V. (1997a): *Lactobacillus acidophilus* M92 as potential probiotic strain, *Milchwissenschaft*, 52 (8) 430-435.
- Šušković, J., Kos, B., Beganović, J., Leboš Pavunc, A., Habjanič, K.: (2010): Antimicrobial Activity – the Most Important Property of Probiotic and Starter Lactic Acid Bacteria, *Food Technol. Biotechnol.* 48, (2010) u tisku.
- Šušković, J., Kos, B., Goreta, J., Matošić, S. (2001): Role of lactic acid bacteria and bifidobacteria in synbiotic effect, *Food Technol. Biotechnol.* 39, 227-235.
- Šušković, J., Kos, B., Matošić, S., Besendorfer, V. (2000): The effect of bile salts on survival and morphology of a potential probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 16 (7) 673-678.
- Šušković, J., Kos, B., Matošić, S., Marić, V. (1997b): Probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* L4, *Food Technol. Biotechnol.* 35 (2) 107-112.
- Yeung, P.S.M., Kits, C.L., Cano, R., Tong, P.S. & Sanders, M.E. (2004): Application of genotypic and phenotypic analyses to commercial probiotic strain identity and relatedness. *J. Appl. Microbiol.* 97, 1095-1104.
- Zoetendal, E.G. & Mackie, R.I. (2005): Molecular methods in microbial ecology. U: G.W. Tannock (Ed.), *Probiotics & Prebiotics: Scientific Aspects*. Caister Academic Press, Wymondham, U.K. str. 1-24, ISBN 1-904455-01-8.

Autori / Authors

Dr. sc. Jagoda Šušković, red. prof.
Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Pierottijeva 6

Dr. sc. Blaženka Kos, izv. prof.
Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Pierottijeva 6

Dr. sc. Jadranka Frece, doc.
Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Pierottijeva 6

Dr. sc. Jasna Beganović, doc.
Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Pierottijeva 6

Andreja Leboš Pavunc, dipl. ing.
Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Pierottijeva 6