

# Optimizacija hranjive podloge za održavanje bakterija roda *Bacteroides* u in vitro uvjetima

---

Galić, Sanja

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:088128>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-06**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2020.

Sanja Galić  
1040/N

**Optimizacija hranjive podloge za  
održavanje  
bakterija roda *Bacteroides* u *in vitro*  
uvjetima**

Rad je izrađen u Laboratoriju za bioinformatiku na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom dr. sc. Jurice Žučka, izv. prof. Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i stručnog suradnika dr. sc. Damira Orosa, doc. Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć doc. dr. sc. Ivane Rumore Samarin.

## **ZAHVALA**

*Puno hvala momu mentoru, izv. prof. dr. sc. Jurici Žučku, koji mi je uvijek izlazio ususret sa svojim stručnim znanjem i nesebično pomagao.*

*Želim zahvaliti i svojoj prijateljici Luciji, koja je uvijek bila tu za mene kad mi je trebao savjet ili pomoć s jezičnim nedoumicama.*

*Od srca zahvaljujem svim važnim osobama u mom životu na velikoj podršci koju su mi pružili pri pisanju diplomskog rada.*

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za biokemijsko inženjerstvo  
Laboratorij za bioinformatiku

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Nutricionizam

**OPTIMIZACIJA HRANJIVE PODLOGE ZA ODRŽAVANJE  
BAKTERIJA RODA *BACTEROIDES* U *IN VITRO* UVJETIMA**

*Sanja Galić, 1040/N*

**Sažetak:** Zbog važnosti utjecaja na zdravlje čovjeka crijevna mikrobiota postala je često područje istraživanja. Budući da je provođenje istraživanja na ljudima iznimno kompleksno, sve se više razvijaju *in vitro* modeli za simulaciju uvjeta u ljudskome probavnom sustavu. Svrha ovog rada bila je u već razvijenom *in vitro* sustavu testirati utjecaj SIEM (eng. *Simulated Ileal Efflux Medium*) hranjive podloge na održavanje sastava inokulirane crijevne mikrobiote. Uzgoj crijevne mikrobiote u *in vitro* sustavu korištenjem SIEM hranjive podloge rezultirao je drastičnim padom udjela pripadnika koljena *Bacteroidetes*, te je predložena optimizacija hranjive podloge na osnovi podloga koje se koriste za uzgoj bakterija koje pripadaju rodu *Bacteroides* – najzastupljenijem rodu koljena *Bacteroidetes* u crijevnoj mikrobioti čovjeka.

**Ključne riječi:** crijevna mikrobiota, SIEM, *Bacteroidetes*, optimizacija, *Bacteroides*

**Rad sadržava:** 48 stranica, 15 slika, 6 tablica, 58 literaturnih navoda, 4 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (PDF format) obliku pohranjen u:** Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** izv. prof. dr. sc. Jurica Žučko

**Pomoć pri izradi:** dr. sc. Damir Oros

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. Doc. dr. sc. Janko Diminić
2. Izv. prof. dr. sc. Jurica Žučko
3. Doc. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc
4. Doc. dr. sc. Anamarija Štafa (zamjena)

**Datum obrane:** 15. srpnja 2020.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
Department of Biochemical Engineering  
Bioinformatics Lab

Scientific area: Biotechnical Sciences  
Scientific field: Nutrition

### OPTIMIZATION OF GROWTH MEDIUM FOR MAINTAINING BACTERIA OF GENUS *BACTEROIDES IN VITRO*

*Sanja Galić, 1040/N*

**Abstract:** Due to its importance for human health the intestinal microbiota has become popular topic of research. Since conducting research on humans is demanding and complex new *in vitro* models are increasingly being developed to simulate conditions in the human gastrointestinal tract. The aim of this thesis was to test the influence of SIEM (*Simulated Ileal Efflux Medium*) growth medium on the viability of the inoculated microbiota composition in previously developed *in vitro* system simulating lower gastrointestinal tract. Cultivation of intestinal microbiota *in vitro* using the SIEM medium had resulted in drastic decline of members of the *Bacteroidetes* phylum. Optimization of SIEM growth media was proposed based on growth media used for cultivating bacteria of genus *Bacteroides* - most abundant genus of *Bacteroidetes* phylum in human gut microbiota.

**Keywords:** gut microbiota, SIEM, *Bacteroidetes*, optimization, *Bacteroides*

**Thesis contains:** 48 pages, 15 figures, 6 tables, 58 references, 4 supplements

**Original in:** Croatian

**Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

**Mentor:** PhD, Jurica Žučko, Associate professor

**Technical support and assistance:** PhD, Damir Oros

#### Reviewers:

1. PhD. Janko Diminić, Assistant professor
2. PhD. Jurica Žučko, Associate professor
3. PhD. Andreja Leboš Pavunc, Assistant professor
4. PhD. Anamarija Štafa, Assistant professor (substitute)

**Thesis defended:** 15 July 2020

## Sadržaj:

1. UVOD .....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	3
2.1. PROBAVNI SUSTAV: GRAĐA I FIZIOLOGIJA .....	3
2.2. CRIJEVNA MIKROBIOTA .....	4
2.2.1. Uloga mikrobiote .....	5
2.2.2. Bioraznolikost crijevne mikrobiote .....	6
2.2.3. Utjecaj načina života na mikrobiotu .....	7
2.3. MAKRONUTRIJENTI I MIKROBIOTA .....	9
2.3.1. Ugljikohidrati .....	9
2.3.1.1. Probava ugljikohidrata .....	10
2.3.1.2. Ugljikohidrati i mikrobiota .....	11
2.3.2. Proteini .....	12
2.3.2.1. Probava proteina .....	13
2.3.2.2. Proteini i mikrobiota .....	15
2.3.3. Lipidi .....	16
2.3.3.1. Probava lipida .....	16
2.3.3.2. Lipidi i mikrobiota .....	19
2.4. MODELI I HRANJIVE PODLOGE ZA UZGOJ CRIJEVNE MIKROBIOTE U <i>IN VITRO</i> UVJETIMA .....	19
2.4.1. Optimalne podloge za uzgoj bakterija iz roda <i>Bacteroides</i> .....	21
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	23
3.1. MATERIJALI .....	23
3.1.1. Sastav hranjive podloge za uzgoj mikrobiote u <i>in vitro</i> uvjetima .....	23
3.1.1.1. SIEM hranjiva podloga .....	23
3.1.1.2. SIEM s dodatkom prebiotika .....	25
3.1.1.3. SIEM hranjiva podloga s dodatkom probiotika i prebiotika .....	25
3.1.2. Mikrobna kultura za inokulaciju .....	25
3.1.3.1. Pribor .....	26
3.1.3.2. Bioreaktor s miješalom (Fermentor) .....	26
3.1.3.3. Uređaj za automatiziranu izolaciju i pročišćavanje DNA .....	27
3.1.3.4. Ostali laboratorijski uređaji .....	27
3.1.3.5. Kemikalije za pripremu hranjive podloge .....	27
3.1.3.6. Plin pod tlakom .....	28
3.1.3.7. Ostale kemikalije .....	28
3.1.3.8. Računalni programi za analizu podataka .....	29
3.2. METODE .....	29
3.2.1. Priprema hranjivih podloga .....	29



3.2.2. Sterilizacija podloge, pribora i aparature.....	29
3.2.3. Sastavljanje aparature i postavljanje parametara procesa.....	30
3.2.4. Faza prilagodbe mikrobiote u bioreктору.....	30
3.2.5. Vođenje anaerobnoga mikrobnog procesa u bioreктору .....	30
3.2.6. Automatizirana izolacija DNA .....	31
3.3. OPTIMIZACIJA SIEM HRANJIVE PODLOGE ZA ODRŽAVANJE UDJELA RODA <i>BACTEROIDES</i> U <i>IN VITRO</i> UVJETIMA .....	31
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	34
5. ZAKLJUČCI.....	42
6. LITERATURA.....	43
7. PRILOZI .....	49

## 1. UVOD

Ljudska mikrobiota definirana je kao zajednica mikroorganizama, koja uključuje bakterije, arheje, viruse i neke jednostanične eukariote koji žive u specifičnom okruženju. Nastanjuju je do 1000 bakterijskih vrsta koje kodiraju oko 5 milijuna gena i obavljaju mnoge funkcije potrebne za fiziologiju domaćina i preživljavanje. Primjereno tomu, ljudska mikrobiota poznata je i kao „zaboravljeni organ“ (D’Argenio i Salvatore, 2015). Više od 99 % crijevne mikrobiote sastavljeno je od vrsta unutar 4 bakterijskih koljena: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* i *Actinobacteria*, a preostalih 1 % crijevne mikrobiote čine vrste unutar koljena *Fusobacteria*, *Verrucomicrobia* i *Cyanobacteria* (Eckburg i sur., 2005).

Pri provođenju *in vivo* istraživanja probavnog sustava kod ljudi teško je prikupiti uzorke iz raznih područja gastrointestinalnog sustava te se znanstvenici susreću s brojnim ograničenjima poglavito vezanima za razne etičke norme koje su uključene kod provođenja istraživanja na ljudima. Zbog toga se razvijaju drugi sustavi koji bi omogućili simulaciju uvjeta u probavnom sustavu, poput *in vitro* modela. *In vitro* modeli probavnog sustava omogućuju brzo, jednostavno i jeftino proučavanje crijevnog mikrobioma, u jednom ili više odjeljenja crijeva ili duž cijelog probavnog sustava (Williams i sur., 2015). Nadalje, *in vitro* modeli održavaju broj i omjer različitih mikroorganizama koji su po sastavu slični onima u ljudskome debelom crijevu (Rehman i sur., 2012). Također omogućuju proučavanje utjecaja specifičnih prebiotika, probiotika i lijekova na mikrobioti te raznih kemikalija i bioaktivnih spojeva (Boureau i sur., 2000).

Mnoge hranjive podloge i njihove varijacije koriste se za uzgoj crijevne mikrobiote u *in vitro* uvjetima, a od kojih su najčešće korištene SIEM (eng. *Simulated Ileal Efflux Medium*), SCEM (eng. *Simulated Colonic Environment Medium*) i GMM (eng. *Gut Microbiota Medium*) hranjive podloge. SIEM hranjiva podloga svojim sastavom simulira neprobavljene komponente hrane koje iz terminalnog ileuma dopiju u debelo crijevo, gdje se mogu fermentirati. Sastav ugljikohidrata u ovoj podlozi odražava tipične komponente tzv. zapadnjačke prehrane. Također sadržava neprobavljene proteine, zaostalu žuč te neke minerale i vitamine. Najčešća je primjena ove podloge u *in vitro* uzgoju mikrobiote debelog crijeva (Sáyago-Ayerdi i sur., 2019; Venema, 2015; Maathuis i sur., 2012).

U ovom diplomskom radu koristili smo se upravo SIEM podlogom da bismo ispitali je li ovaj medij pogodan za održavanje postojanog sastava inokulirane mikrobiote. Međutim,

nakon uzgoja crijevne mikrobiote iz fecesa uočili smo drastičan pad zastupljenosti bakterijskog koljena *Bacteroidetes*. Budući da je teško optimizirati podlogu za cijelo koljeno, zbog različitih prehrambenih preferencija među bakterijskim vrstama, odabran je najzastupljeniji rod tog koljena-*Bacteroides* te je na osnovi podloga koje se koriste za njegov uzgoj rađena optimizacija SIEM hranjive podloge da bi zadržali njihov udio u mikrobioti.

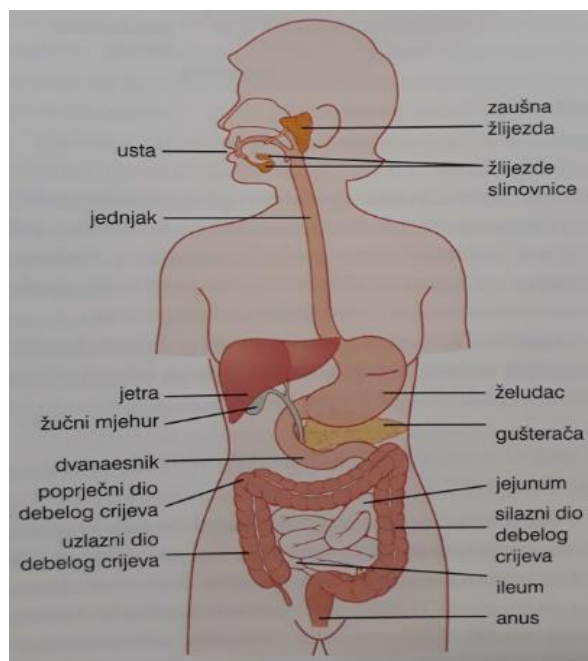
## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. PROBAVNI SUSTAV: GRAĐA I FIZIOLOGIJA

Probavni sustav možemo promatrati kao dugu, nepravilnu cijev koja prima i probavlja hranu, resorbira hranjive tvari te odstranjuje nepotrebne tvari. U probavni sustav ubrajamo i organe koji nastaju iz probavne cijevi ili uz nju: zubi, žlijezde slinovnice, jetra, žučna vrećica i gušterača. Probavna cijev započinje ustima i završava čmarom. Sastoji se od ovih dijelova: 1. usna šupljina, *cavitas oris*; 2. ždrijelo, *pharynx*; 3. jednjak, *oesophagus*; 4. želudac, *gaster*; 5. tanko crijevo, *intestinum tenue* i 6. debelo crijevo; *intestinum crassum* (Krpmotić-Nemanić i Marušić, 2007).

Probavni sustav neprekidno opskrbljuje organizam vodom, elektrolitima, vitaminima i hranjivim tvarima, što zahtijeva: 1) gibanje hrane kroz probavni sustav, 2) lučenje probavnih sokova i probavu hrane, 3) apsorpciju vode, različitih elektrolita, vitamina i produkata probave, 4) protok krvi kroz probavne organe kako bi se probavni proizvodi prenijeli dalje u organizam i 5) nadzor svih tih funkcija lokalnim, živčanim i hormonskim sustavima.

Na slici 1 prikazan je cijeli probavni sustav. Svaki njegov dio prilagođen je specifičnim funkcijama koje obavlja: jednostavnom prolasku hrane (poput jednjaka), zatim njezinoj privremenoj pohrani (poput želuca) ili pak probavi i apsorpciji (poput tankoga crijeva) (Guyton i Hall, 2012).



Slika 1. Probavni sustav (Guyton i Hall, 2012)

## 2.2. CRIJEVNA MIKROBIOTA

Gastrointestinalni sustav (GIS) odraslog čovjeka dom je golemom broju mikroorganizama, a od usta do anusa tvori 9 metara dugu cijev s procijenjenom površinom između 250 i 400 m<sup>2</sup>, što odgovara površini teniskog terena. Također je dom najvećoj zajednici imunoloških stanica te sadržava isti broj neurona kao i leđna moždina (Lutgendorff i sur., 2008; Savage, 1977). Broj mikroorganizama, koji doseže do 100 trilijuna (10<sup>14</sup>), isti je kao i broj ljudskih stanica te čini masu od 0,2 kg. Stoga ne čudi što se crijevna mikrobiota naziva i zaboravljenim organom, jer ne samo da doprinosi probavi, već je i bitna za zdravlje domaćina (Sender i sur., 2016; Fera-Gervasio, 2014; Savage, 1977).

Iako većinu mikroorganizama čine bakterije, GIS mogu nastaniti kvasci, virusi, jednostanični eukarioti i mali parazitski crvi. Samim time GIS nastanjuju sve 3 domene: bakterije, arheje i eukariote. Broj, vrsta i uloga mikroorganizama razlikuje se uzduž GIS; većina obitava u debelom crijevu gdje pridonosi fermentaciji neprobavljenih sastojaka hrane, naročito ugljikohidrata/vlakana i formiranju fekalne mase. Neki od najzastupljenijih rodova crijevnih bakterija kod odraslih jesu: *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Streptococcus* i *Ruminococcus* (Backhed i sur., 2005). Prema rezultatima projekta „The human microbiome project“ (HMP) preko 90 % svih bakterijskih filogenetskih tipova (filotipova) pripada samo dvama od 70 poznatih koljena u domeni Bakterija: *Bacteroidetes* i *Firmicutes*. Razlike u sastavu mikroorganizama koje nastanjuju debelo crijevo veće su među pojedincima nego li između različitih mjesta uzorkovanja unutar debelog crijeva (Turnbaugh i sur., 2007).

Sve je više dokaza da neravnoteža u crijevnoj populaciji mikroorganizama može biti povezana s razvojem nekih bolesti, uključujući upalnu bolest crijeva (eng. *IBD- Inflammatory bowel disease*). Navedena saznanja doprinijela su povećanju svijesti o ulozi mikrobiote u održavanju zdravlja te je posljedično zabilježen porast broja važnih istraživanja i komercijalnih ulaganja u ovom području. Mikroorganizmi u crijevima proizvode veliki broj bioaktivnih spojeva koji mogu utjecati na zdravlje; neki poput vitamina djeluju korisno, a neki su od proizvoda toksični. Cijelom dužinom crijeva imunološka obrana domaćina, uključujući i mukoznu barijeru, pomaže spriječiti potencijalno štetne bakterije da uzrokuju oštećenja tkiva. Održavanje raznolike i rastuće populacije korisnih bakterija u crijevima pomaže zadržati štetne bakterije pod kontrolom, natječući se s njima za hranjive tvari i mjesta kolonizacije (Conlon i Bird, 2015).

### 2.2.1. Uloga mikrobiote

– Metabolička uloga: Mikrobiota je jedan od činitelja koji sudjeluju u regulaciji metabolizma ugljikohidrata, lipida i proteina, a djelovanje mikrobiote u ovoj sferi zasniva se na lučenju vlastitih enzima, utjecaju na domaćinove enzime i na fermentaciji. Sinteza kratkolančanih masnih kiselina (eng. *SCFA-short chain fatty acid*) također je produkt djelovanja mikrobiote. Osim toga, mikrobiota sudjeluje u sintezi vitamina K i nekih vitamina B skupine, u metabolizmu žučnih kiselina i polifenola iz hrane. Također ima utjecaja na metabolizam ksenobiotika i lijekova (Antal i sur., 2019).

– Antimikrobna zaštitna uloga: Crijevni komenzali bore se izravno protiv mikroba zauzimajući životni prostor i natječući se za hranjive tvari te na taj način sprječavaju njihovu kolonizaciju i prevladavanje. Osim toga, doprinose obrani od mikroba i neizravno, među ostalim stimuliranjem lokalnoga imunosnog odgovora i sintezom raznih spojeva koji imaju antimikrobni učinak. Na primjer, mliječna kiselina, koja je produkt metabolizma vrsta roda *Lactobacillus*, sudjeluje u razaranju bakterijske stanične stijenke, dok sastav žučnih kiselina, u kojem se odražava ukupni metabolizam mikrobiote, znatno utječe na germinaciju spora vrste *Clostridioides difficile* (Antal i sur., 2019).

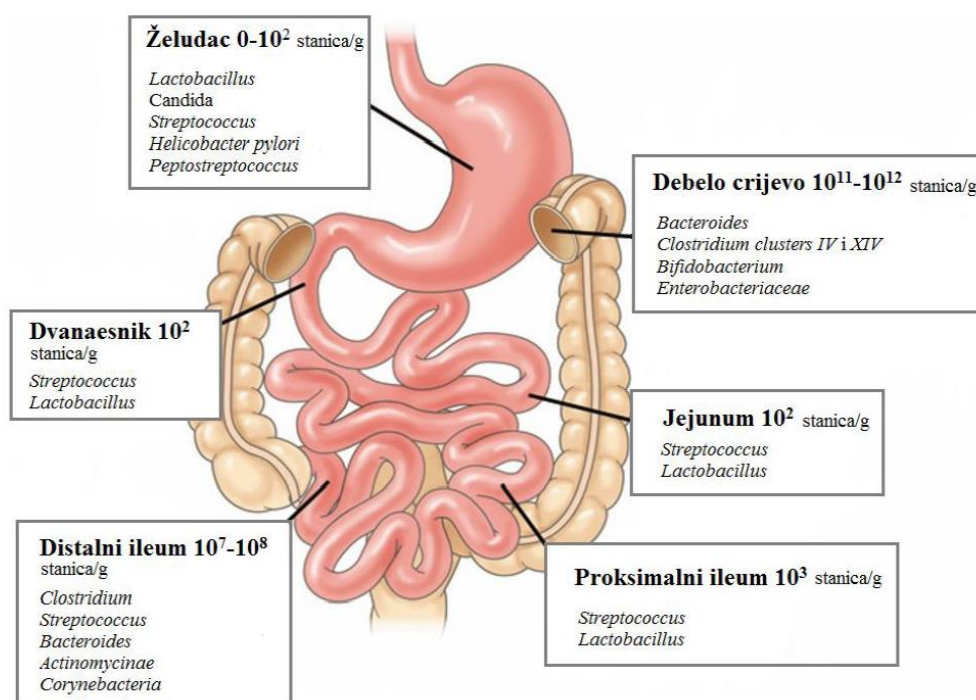
– Utjecaj na imunološki sustav: Crijevna mikrobiota pridonosi modulaciji imunosnog sustava tako što utječe na oblikovanje crijevima pridružena limfoidnog tkiva (eng. *GALT-gut associated lymphoid tissues*), sudjelujući u razvoju i djelovanju regulacijskih limfocita T (eng. *Treg-T regulatory cells*) te regulirajući prirodene limfoidne stanice (eng. *ILCs- innate lymphoid cells*). Razvoj mikrobiote u ranoj životnoj dobi djeteta ima važnu ulogu u sazrijevanju imunološkog sustava i razvoju alergijskih bolesti (Antal i sur., 2019).

– Očuvanje gastrointestinalnog sustava: Dokazano je da crijevna mikrobiota pozitivno utječe na održavanje strukturne barijere gastrointestinalnog sustava (npr. djelovanjem na međustanične veze – eng. *tight junctions*, održavanje dezmosoma). Uz to i djeluje na transkripcijski faktor angiogenin-3 koji ima ulogu u razvoju krvnih žila u crijevima (Antal i sur., 2019).

### 2.2.2. Bioraznolikost crijevne mikrobiote

Više od 99 % crijevne mikrobiote sastavljeno je od vrsta unutar 4 bakterijskih koljena: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* i *Actinobacteria*. Prevladava koljeno *Firmicutes* koje čini 64 % crijevne mikrobiote i sastoji se ponajprije od grupa *Clostridium XIV i IV* te uz to i rodova *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Enterococcus* i *Ruminococcus*. Koljeno *Bacteroidetes* čini 24 % mikrobiote i sastoji se većinom od rodova *Bacteroides* i *Prevotella*. Iz koljena *Proteobacteria* (8 % svih bakterija) mali udio čine *Enterobacteriaceae*, poput vrste *Escherichia coli*. Koljeno *Actinobacteria* prisutno je u malom broju (3 %) i uglavnom je sastavljeno od roda *Bifidobacterium* (Rinninella i sur., 2019; Sartor, 2008). Preostalih 1 % crijevne mikrobiote čine vrste unutar koljena *Fusobacteria*, *Verrucomicrobia* i *Cianobacteria* (Eckburg i sur., 2005).

Od jednjaka do rektuma uočava se značajna razlika u raznolikosti i brojnosti bakterija, u rasponu od  $10^1$  po gramu sadržaja u jednjaku i želudcu pa do  $10^{12}$  po gramu sadržaja u debelom crijevu i njegovom distalnom dijelu. Slika 2 prikazuje raznolikost mikrobiote od jednjaka distalno prema debelom crijevu (Jandhyala i sur., 2015).



Slika 2. Sastav i koncentracije dominantnih mikrobnih vrsta u pojedinim dijelovima gastrointestinalnog trakta (Sartor, 2008)

*Streptococcus* je dominantan rod u distalnom jednjaku, dvanaesniku i jejunumu, a *Helicobacter* u želudcu. Sve dok vrsta *Helicobacter pylori* nastanjuje želudac kao komenzal, postoji mikrobna raznolikost gdje je dominantni rod *Streptococcus*, te su uz njega još prisutni rodovi *Prevotella*, *Veillonella* i *Rothia*. Raznolikost se smanjuje kada *Helicobacter pylori* stekne patogeni fenotip (Jandhyala i sur., 2015).

Najbogatiji dio gastrointestinalnog sustava mikrobiotom debelo je crijevo, koje sadržava preko 70 % mikrobiote čovjeka. Naseljavaju ga pretežito bakterije koljena *Firmicutes* i *Bacteroidetes*, a upravo njihov omjer ukazuje na predispoziciju za razvoj bolesti. Primarni patogeni kao *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterica*, *Vibrio cholera*, *Escherichia coli* i *Bacteroides fragilis* također nastanjuju debelo crijevo, ali u jako malom broju (0,1 % ili manje crijevnog mikrobioma) (Jandhyala i sur., 2015).

Konzorcij MetaHIT (eng. *Metagenomics Of The Human Intestinal Tract*) predložio je novi način klasifikacije crijevne mikroflore, koji se temelji na specifičnom sastavu mikrobiote. U ovoj klasifikaciji ne uzima se u obzir dob, spol, geografsko podrijetlo ili tjelesna masa pri svrstavanju ljudi u određene grupe, tj. enterotipove. Enterotipovi se međusobno razlikuju po sastavu i dominantnoj ulozi pojedinih bakterijskih rodova. Postoje uglavnom tri enterotipa: Enterotip 1, sadržava većinom bakterije iz roda *Bacteroides* te je povezan s prehranom bogatom proteinima i zasićenim lipidima (tzv. zapadnjačka prehrana); Enterotip 2, koji sadržava većinom bakterije iz roda *Prevotella*, povezan je s prehranom bogatom ugljikohidratima i jednostavnim šećerima i Enterotip 3, koji sadržava veliki broj bakterija iz roda *Ruminococcus*, povezan je s prehranom bogatom prehranbenim vlaknima i otpornim škrobom, što odražava prehrambene izbore u ruralnim i poljoprivrednim zajednicama (Arumugam i sur., 2011; Wu i sur., 2011). Premda se hipoteza o enterotipovima čini prilično zanimljivom, a varijacije mikrobne zajednice zasigurno će biti važne za dijagnosticiranje i predviđanje mnogih bolesti povezanih s mikrobiomom, još je u fazi istraživanja (Knights i sur., 2014).

### **2.2.3. Utjecaj načina života na mikrobiotu**

Utjecaj neprehrambenih životnih faktora na mikrobiotu u velikoj se mjeri zanemaruje (Conlon i Bird, 2015). Kod pojedinaca s visokim ITM (indeksom tjelesne mase), dijabetesom, kod onih koji unose velike količine crvenog i procesuiranog mesa te pušača dokazan je povećan rizik za razvoj raka debelog crijeva (Huxley i sur., 2009).



Kod bolesnika s Crohnovom bolesti mikrobiota ima važnu ulogu u obnavljanju i zaštiti od gastrointestinalne upale. Pušenje je rizični faktor za oboljele od Crohnove bolesti, naime, utječe na povijest bolesti. Pacijenti s aktivnom Crohnovom bolesti imaju povećan broj *Bacteroides-Prevotella* u odnosu na nepušače. Veća je vjerojatnost da će pušači razviti Crohnovu bolest, imati češće relapse, veće stope recidiva i, u konačnici, češće će im biti potreban operativni zahvat. Jedno potencijalno objašnjenje za štetne učinke pušenja upravo je povišenje broja bakterija koje potiču upalne procese (Benjamin i sur., 2012).

Stres je još jedan faktor koji treba uzeti u obzir. Utječe na motoričku aktivnost debelog crijeva preko osi crijeva-mozak (eng. *GBA- gut-brain axis*) što može dovesti do promjene sastava crijevne mikrobiote. Ta promjena uključuje smanjenje koncentracije potencijalno korisnih laktobacila i bifidobaterija te poticanje rasta anaerobnih i gram negativnih bakterija u tankom crijevu (Conlon i Bird, 2015; Lutgendorff i sur., 2008). Stres ima utjecaj i na pokretljivost crijeva. Eksperimentalne studije pokazale su da kod ljudi i životinja akutni stresori mogu odgoditi pražnjenje želuca i povećati pokretljivost crijeva. Kod kritično bolesnih pacijenata dokazana je povezanost stresa i razvitka čira na želudcu, kao i peptičke ulkusne bolesti (Lutgendorff, Akkermans, Soderholm, 2008).

Malo pozornosti pridodano je vezi između tjelovježbe i mikrobiote te sjedilačkog načina života i njegova utjecaja na mikrobiotu i pojavu pretilosti. Nedavno istraživanje pokazalo je porast crijevne mikrobne populacije kod profesionalnih rugby igrača kao rezultat redovite tjelovježbe i pravilne prehrane (u GIS prisutna 22 različita koljena mikroorganizama što je povezano s unosom proteina i kreatin kinazom) (Clarke i sur., 2014).

Na sastav crijevne mikrobiote značajno utječe i mjesto stanovanja. U studiji De Filippo i sur. (2010) ispitala se raznolikost crijevne mikrobiote kod seoske djece iz Burkiné Faso, čija prehrana obiluje vlaknima, i djece iz razvijenih dijelova Europe, koja se hrane zapadnjačkim stilom prehrane. Kod djece iz Burkiné Faso veća je zastupljenost bakterija iz koljena *Bacteroidetes* i smanjen broj iz koljena *Firmicutes* te njihova mikrobiota obiluje bakterijama iz roda *Prevotella* i *Xylanibacter*, za koje se zna da sadržavaju gene koji kodiraju enzime za hidrolizu celuloze i ksilana, koji potpuno nedostaju djeci iz Europe. Kod djece iz Burkiné Faso također je prisutno više kratkolančanih masnih kiselina i značajno je smanjen broj bakterija iz porodice *Enterobacteriaceae* (rodovi *Shigella* i *Escherichia*). Prema tome, možemo pretpostaviti da se crijevna mikrobiota razvila u skladu s prehranom baziranom na

polisaharidima kod djece iz Burkine Faso, omogućujući im maksimalan unos energije te istodobno zaštitu od upalnih i neinfektivnih bolesti debelog crijeva (De Filippo i sur., 2010).

Jednako tako i ostali okolišni činitelji mogu utjecati na zdravlje preko crijevnih mikroba. Putovanja, posebice u prekomorske destinacije, povećavaju rizik od zaraze i širenja zaraznih bolesti, uključujući one koje uzrokuju proljev. Neke infekcije mogu proći nedijagnosticirane, ali rezultirati dugoročnim GI problemima, uključujući sindrom iritabilnog crijeva (eng. *IBS- irritable bowel syndrome*). Širenje zaraznih uzročnika mogu olakšati loši sanitarni uvjeti u zemljama u razvoju i loša osobna higijena (Conlon i Bird, 2015). Rezultati studije ukazuju da cirkadijalna disritmija (npr. kod smjenskog rada, putovanja kroz vremenske zone) također može utjecati na sastav crijevne mikrobiote, što u konačnici može imati posljedice na razvitak upalnih bolesti (Voigt i sur., 2014).

### **2.3. MAKRONUTRIJENTI I MIKROBIOTA**

Proteini, lipidi i ugljikohidrati glavna su sastavnica ljudske prehrane. Otkriveno je da vrsta i količina proteina, lipida i ugljikohidrata prisutnih u prehrani utječu na sastav crijevne mikrobiote domaćina. To je povezano s mnoštvom mikrobnih metabolita koji nastaju u procesu probave i mogu djelovati i lokalno i sistemski (nakon što se apsorbiraju u krvotok). Mikrobnim metabolizmom ujedno mogu nastati potencijalno korisni, ali i potencijalno toksični metaboliti. Utjecaj tih biokemijskih spojeva na ljudsko zdravlje složen je, a u nekim slučajevima ovisi o koncentraciji metabolita ili položaju organa (Oliphant i Allen-Vercoe, 2019; Riaz Rajoka i sur., 2017).

#### **2.3.1. Ugljikohidrati**

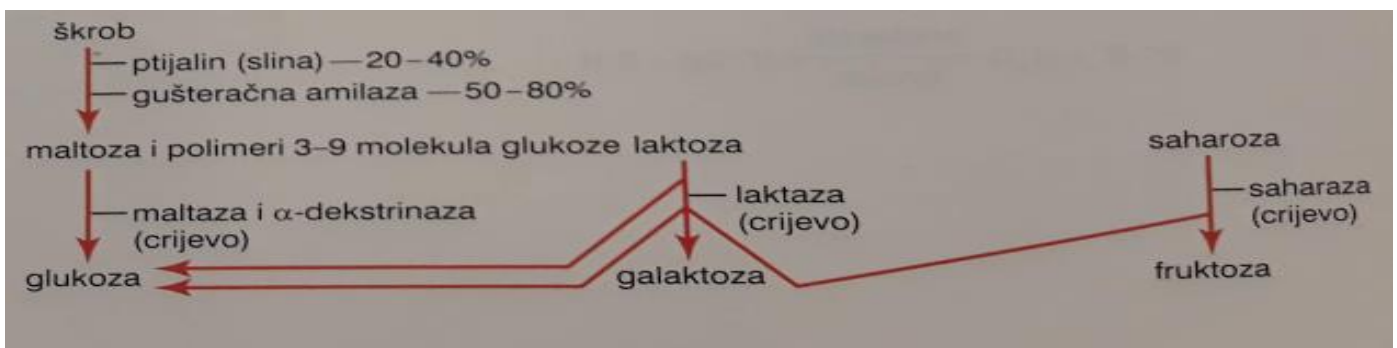
Ugljikohidrati su aldehidi ili ketoni s većim brojem hidroksilnih skupina. Zbog svoje važne uloge u svim oblicima života, čine većinu organske tvari na Zemlji. Služe kao pričuvena energija, gorivo i metabolički međuprodukti. Nadalje, šećeri riboza i deoksiriboza čine dio strukturne okosnice molekula DNA i RNA. Polisaharidi, od kojih je celuloza jedan od najzastupljenijih organskih spojeva u biosferi, grade stanične stijenke bakterija i biljaka. Ugljikohidrati su vezani na mnoge proteine i lipide i takvi imaju ključnu ulogu u komunikaciji između stanica i drugih elemenata u staničnom okruženju. Građeni su od monosaharida, malih molekula sastavljenih uglavnom od 3 do 9 ugljikovih atoma.

Monosaharidi se mogu međusobno povezati u niz različitih oligosaharidnih struktura, a upravo to oligosaharide čini molekulama bogatim informacijama (Berg i sur., 2013).

### 2.3.1.1. Probava ugljikohidrata

U normalnoj ljudskoj hrani postoje samo tri važnija izvora ugljikohidrata. To su saharoza, disaharid popularno nazvan obični šećer, zatim laktoza, disaharid iz mlijeka te različite vrste škroba, odnosno veliki polisaharidi koji se nalaze gotovo u svim vrstama biljne hrane, posebice u krumpiru i žitaricama. Druge vrste ugljikohidrata koje se uzimaju u manjoj mjeri jesu: amiloza, glikogen, alkohol, mliječna kiselina, pirogroždana kiselina, pektini, dekstrini i male količine ugljikohidratnih derivata u mesu. Hrana sadržava i velike količine ugljikohidrata celuloze, ali u ljudskome probavnom sustavu nema enzima koji bi je mogao hidrolizirati. Stoga celulozu ne možemo smatrati ljudskom hranom.

Pri žvakanju se hrana miješa sa slinom, a slina sadržava enzim ptijalin (jedna  $\alpha$ -amilaza), koji većinom luče zaušne žlijezde. Taj enzim hidrolizira škrob na disaharid maltozu i druge male glukozne polimere koji sadržavaju 3 do 9 molekula glukoze, kao što je prikazano na slici 3. Ipak, hrana u ustima ostaje samo kratko vrijeme pa se do trenutka gutanja hrane vjerojatno ne hidrolizira više od 5 % ukupno pojedenog škroba. Probava škroba nastavlja se u tijelu i fundusu želudca, gdje katkad traje otprilike jedan sat, dok se hrana ne pomiješa sa želučanim sokovima. Aktivnost amilaze iz sline tada se zakoči kiselinom u želučanim lučevinama zato što njezina enzimska aktivnost prestaje kad je pH manji od 4,0. Ipak, prosječno se 30 – 40 % škroba hidrolizira uglavnom u maltozu prije nego što se hrana i slina potpuno pomiješaju sa želučanim sokom.



Slika 3. Probava ugljikohidrata (Guyton i Hall, 2012)

Sok gušterače, kao i slina, sadržava veliku količinu  $\alpha$ -amilaze koja je funkcionalno gotovo sasvim jednaka onoj iz sline, ali je nekoliko puta djelotvornija. Zato se sav škrob probavi već 15 do 30 minuta nakon što himus prijeđe iz želudca u dvanaesnik i pomiješa se sa sokom gušterače. Općenito, prije nego što napuste dvanaesnik ili gornji dio jejunuma, sve se vrste škroba gotovo potpuno pretvore u maltozu i druge male glukozne polimere.

Enterociti koji oblažu resice tankog crijeva sadržavaju četiri enzima (laktazu, saharazu, maltazu i  $\alpha$ -dekstrinazu), koji mogu razlagati disaharide laktozu, saharozu i maltozu te druge male glukozne polimere na monosaharide od kojih su građeni. Ti se enzimi nalaze na četkastoj prevlaci enterocita koji oblažu crijevne mikroresice pa se disaharidi probavljaju kada dođu u dodir s tim enterocitima. Laktoza se razlaže na molekulu galaktoze i molekulu glukoze, saharoza se pak razlaže na molekulu fruktoze i molekulu glukoze, a maltoza i drugi mali glukozni polimeri na molekule glukoze. Prema tome, svi konačni proizvodi probave ugljikohidrata jesu monosaharidi koji su topljivi u vodi te se odmah apsorbiraju u portalnu krv. U svagdanjoj prehrani, koja sadržava mnogo više škroba nego svih drugih ugljikohidrata zajedno, glukoza čini više od 80 % konačnih proizvoda probave ugljikohidrata, a galaktoza i fruktoza svaka pojedinačno malokad više od 10 % (Guyton i Hall, 2012).

### 2.3.1.2. Ugljikohidrati i mikrobiota

Ugljikohidrati su glavni izvor ugljika za crijevnu mikrobiotu. Crijevni mikrobiom obogaćen je genima uključenim u metabolizam škroba, saharoze, glukoze, galaktoze, fruktoze, arabinoze, manoze i ksiloze te je zastupljena najmanje 81 različita obitelj glikozid hidrolaza (Conlon i Bird, 2015; Gill i sur., 2006).

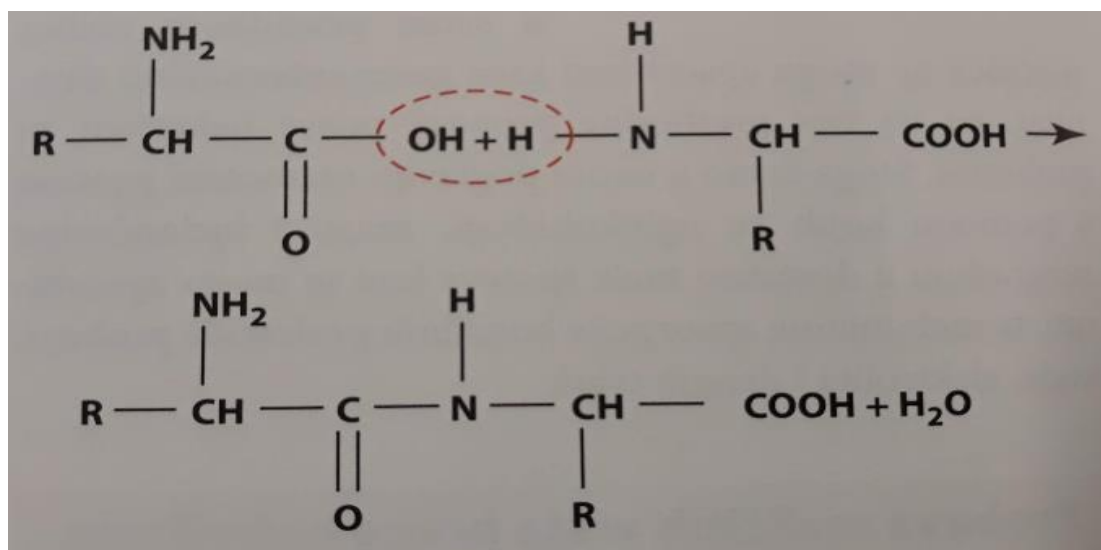
Vlakna, više nego bilo koja druga komponenta iz hrane, utječu na rad debelog crijeva kod ljudi, uzrokujući povećanje stolice, razrjeđivanje sadržaja unutar debelog crijeva, njegov brži prolazak kroz crijeva i promjene u metabolizmu minerala, dušika i žučnih kiselina. Ove promjene nastaju prolaskom neprobavljenih vlakana kroz crijeva, koja zadržavaju vodu unutar svoje stanične strukture (Stephen i Cummings, 1980). Mnoge zdravstvene koristi koje se pripisuju vlaknima posljedica su njihove fermentacije od mikrobiote u debelom crijevu i metabolitima koji nastaju (Conlon i Bird, 2015). Glavni produkti mikrobnog metabolizma vlakana jesu kratkolančane masne kiseline (eng. *SCFA- short-chain fatty acid*), ponajprije acetat, propionat i butirat (Cuervo i sur., 2013).

SCFA se brzo apsorbiraju iz debelog crijeva i uglavnom se smatraju korisnima za domaćina. Butirat je najvažniji izvor energije za kolonocite i ima glavnu ulogu u proliferaciji i diferencijaciji epitelih stanica debelog crijeva. Dodatne funkcije uključuju inhibiciju karcinogeneze i upale debelog crijeva, smanjenje oksidativnog stresa i jačanje obrambene barijere u debelom crijevu (Windey i sur., 2012). Acetat je najzastupljeniji od svih SCFA i nedavno je otkriveno da proizvodnja acetata poboljšava imunološku obrambenu funkciju stanica crijevnog epitela. Propionat također ima tumor-supresivnu ulogu i potiče efekt sličan butiratu, samo su potrebne veće koncentracije (Fung i sur., 2012).

### **2.3.2. Proteini**

Proteini su najsvestranije molekule u živim sustavima i obavljaju bitne funkcije u svim biološkim procesima. Djeluju kao katalizatori, prenose i pohranjuju ostale molekule, npr. kisik, provode gibanje, prenose živčane impulse, osiguravaju mehaničku potporu i imunosnu zaštitu te kontroliraju rast i diferencijaciju. Obavljanje svih ovih funkcija proteinima omogućuju neka njihova ključna svojstva: 1. linearni su polimeri izgrađeni od monomernih jedinica nazvanih aminokiseline, koje su vezane jedna za drugu; 2. sadržavaju vrlo različite funkcionalne skupine (alkohole, tiole, tioetere, karboksilne kiseline, karboksamide i razne bazne skupine); 3. mogu djelovati međusobno ili s drugim biomolekulama tvoreći složene nakupine; 4. neki su proteini prilično kruti, dok su drugi prilično fleksibilni. Aminokiseline su gradivni blokovi proteina. Svaka  $\alpha$ -aminokiselina sastoji se od središnjeg ugljikova atoma ( $\alpha$ -ugljikov atom) na koji su vezani amino-skupina, karboksilna skupina, vodikov atom i specifična skupina R, često nazivana i bočnim ogrankom. Svojstva pojedinog proteina ovise o vrsti i o slijedu aminokiselina u proteinskoj molekuli. Prehrambeni proteini građeni su od dugačkih lanaca aminokiselina povezanih peptidnim vezama (Berg i sur., 2013; Guyton i Hall, 2012).

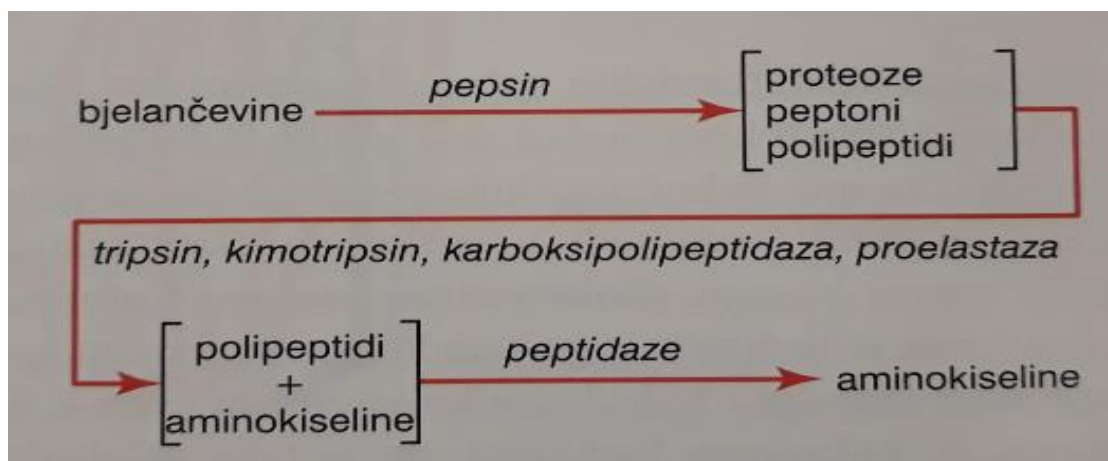
Tipična peptidna veza izgleda ovako (slika 4):



Slika 4. Tvorba peptidne veze (Guyton i Hall, 2012)

#### 2.3.2.1. Probava proteina

Pepsin, važan želučani enzim u razgradnji proteina, najaktivniji je pri pH od 2,0 do 3,0, a sasvim je neaktivan kad je pH veći od otprilike 5,0. Stoga, da bi taj enzim probavio proteine, želučani sok mora biti kiseo. Parijetalne (kiselinske) stanice luče solnu kiselinu pri pH od otprilike 0,8. No kad se ona pomiješa sa želučanim sadržajem i lučevinama drugih želučanih žlijezda, pH postane oko 2,0 do 3,0, što je vrlo prikladna kiselost za djelovanje pepsina. Jedno je od vrlo važnih svojstava pepsina njegova sposobnost probavljanja proteina kolagena, albuminoidne vrste proteina na koju drugi probavni enzimi slabo djeluju. Kolagen je glavni sastojak međustaničnoga vezivnog tkiva u mesu, a da bi probavni enzimi mogli prodrijeti u meso i probaviti druge mesne proteine, moraju se probaviti kolagenska vlakna. Zbog toga u osoba u čijem želučanom soku nedostaje pepsin, drugi probavni enzimi slabo prodiru u meso pa ga slabo probavljaju. Pepsin samo započne proces razgradnje proteina, dovršavajući obično samo 10 – 20 % njihove ukupne probave u proteoze, peptone i nešto u polipeptide (slika 5). Razgradnja proteina zbiva se procesom hidrolize, koja zahvaća peptidne veze između aminokiselina.



Slika 5. Probava proteina (Guyton i Hall, 2012)

Glavnina probave proteina zbiva se u gornjem dijelu tankog crijeva, u dvanaesniku i jejunumu, djelovanjem proteolitičkih enzima koje luči gušterača. Odmah nakon što iz želudca uđu u tanko crijevo, proizvode djelomične razgradnje proteina napadnu glavni gušteračni proteolitički enzimi: tripsin, kimotripsin, karboksipolipeptidaza i elastaza (slika 5). I tripsin i kimotripsin razlažu proteinske molekule na male polipeptide. Zatim karboksipolipeptidaza odcjepljuje pojedinačne aminokiseline s karboksilnoga kraja polipeptida. Proelastaza se pretvara u elastazu, koja probavlja elastinska vlakna koja meso djelomice drže na okupu. Sokovi gušterače razgrade samo mali dio proteina do razine sastavnih aminokiselina, a većina ih ostane u obliku dipeptida i tripeptida.

Za posljednji stadij crijevne probave proteina odgovorni su enterociti koji oblažu resice tankog crijeva, pretežno u dvanaesniku i jejunumu. Te stanice imaju četkastu prevlaku koja se sastoji od stotina mikroresica što se pružaju sa stanične površine. U membrani svake od tih mikroresica nalaze se brojne peptidaze koje kroz membranu strše u okolinu, gdje dolaze u dodir s crijevnim sokovima. Posebno su važne dvije vrste peptidaza, aminopolipetidaza i nekoliko dipeptidaza. One razlažu preostale veće polipeptide na tripeptide i dipeptide, a neke i sve do aminokiselina. Aminokiseline, dipeptidi i tripeptidi lako se prenose u enterocite kroz membrane mikroresica. Konačno, u citosolu enterocita nalaze se i brojne peptidaze koje su specifične za preostale vrste veza između aminokiselina. Za nekoliko se minuta praktično svi dipeptidi i tripeptidi probave do kraja, to jest do aminokiselina koje tada kroz suprotnu stranu enterocita prelaze u krv. Više od 99 % apsorbiranih konačnih proizvoda probave proteina čine pojedinačne aminokiseline. Apsorpcija je peptida rijetka, a apsorpcija cijelih proteina vrlo rijetka. No čak i te malobrojne

proteinske molekule katkad izazivaju ozbiljne alergijske ili druge imunološke poremećaje (Guyton i Hall, 2012).

#### 2.3.2.2. Proteini i mikrobiota

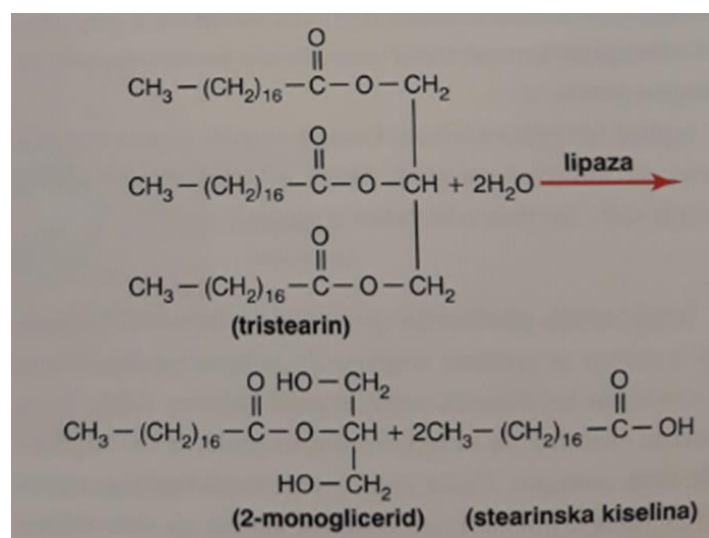
Probavom proteina nastaje veliki broj produkata: SCFA, amini, fenoli, indoli, tioli, NH<sub>3</sub>, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> i H<sub>2</sub>S, od kojih mnogi imaju toksična svojstva. Kod ljudi koji se hrane zapadnjačkim stilom prehrane, konzumiranje mesa može biti povezano s rizikom od raka debelog crijeva. Razlog je tomu prisutnost velikih količina organskih dušičnih spojeva potencijalno dostupnih bakterijama za fermentaciju u debelom crijevu. Upravo su produkti fermentacije poput amonijaka, fenola, amina i N-nitrozo spojeva karcinogeni (Oostindjer i sur., 2014; Macfarlane i Macfarlane, 2012; Silvester i Cummings, 1995). Trenutačno dostupni epidemiološki dokazi nisu dovoljni da potvrde pozitivnu korelaciju između konzumiranja crvenog mesa i kolorektalnog karcinoma jer uz konzumiranje crvenog mesa postoje brojni faktori koji bi mogli utjecati na razvoj karcinoma (npr. visok unos rafiniranih šećera, nizak unos voća, povrća, pušenje, visok indeks tjelesne mase, niska fizička aktivnost) (Alexander i Cushing, 2011).

Bakterijske vrste, poput većine putrefakcijskih: *Clostridium*, *Peptostreptococcus* i *Fusobacterium*, mogu se koristiti pojedinim aminokiselinama kao izvorom dušika i energije. Brojne su bakterije koje mogu rasti na mješavini produkata razgradnje proteina, no još nisu opisane i klasificirane. Smith i Macfarlane dokazali su da se crijevne bakterije mogu koristiti i Sticklandovim reakcijama, koje uključuju oksidoredukciju parova aminokiselina u organske kiseline. Također je dokazano da fermentacija proteina od crijevne mikrobiote u nedostatku šećera, dovodi ne samo do stvaranja opasnih metaboličkih produkata, već i do mogućeg širenja štetnih bakterija (Richardson i sur., 2013).



### 2.3.3. Lipidi

Lipidi su heterogena skupina tvari koje imaju svojstvo da su slabo topljivi u vodi, ali topivi su u organskim otapalima. Životinjski lipidi sadržavaju masne kiseline, monokarboksilne organske kiseline sastavljene od linearnog ugljikova lanca koji sadržava od 4 do 26 atoma ugljika. Te kiseline mogu biti zasićene ili nezasićene i mono- ili polietilenske. Lipidi su klasificirani kao jednostavni lipidi, koji uključuju acilglicerole (trigliceride) i voskove; i složeni lipidi, koji sadržavaju fosfolipide, glikolipide i lipoproteine. Najčešći lipidi u hrani neutralne su masti, poznate i kao trigliceridi. Njihove su molekule esteri sastavljeni od glicerolske jezgre i triju postraničnih lanaca masnih kiselina (slika 6.) Ovisno o broju esterificiranih alkoholnih skupina, acilgliceroli mogu biti monoacilgliceroli, diacilgliceroli ili triacilgliceroli. Zagrijavanjem neutralne masti s jakom bazom stvara se sapun i slobodni glicerol (saponifikacija). Hidrogenacijom tekućih acilglicerola (ulja) nastaju čvrste masti (margarini). Lipidi su važni u prehrani zbog visoke kalorijske vrijednosti (9,3 kcal / g ili 33,9 J / g) (Blanco i Blanco, 2017; Guyton i Hall, 2012).



Slika 6. Hidroliza neutralne masti katalizirana lipazom (Guyton i Hall, 2012)

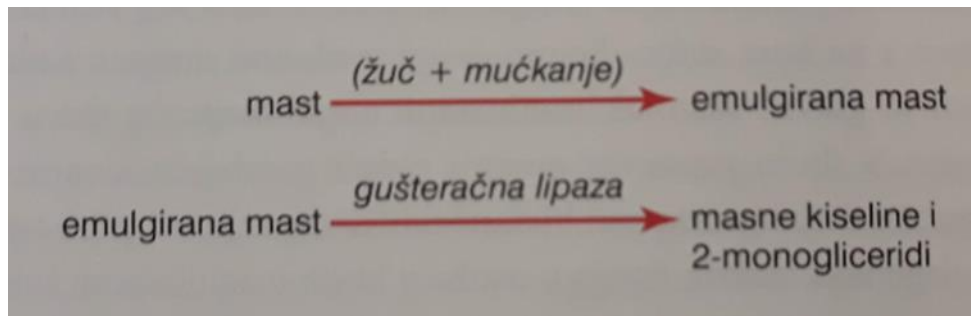
#### 2.3.3.1. Probava lipida

Neutralna mast glavni je sastojak hrane životinjskog podrijetla, a mnogo je manje zastupljena u hrani biljnog podrijetla. U svakidašnjoj prehrani prisutne su također male količine fosfolipida, kolesterola i kolesterolskih estera. Fosfolipidi i kolesterolski esteri sadržavaju masne kiseline, pa i njih možemo smatrati lipidima. Kolesterol je sterolni spoj koji

nema masnih kiselina, ali posjeduje neka fizikalna i kemijska svojstva lipida. Nastaje od lipida i njegov je metabolizam sličan metabolizmu lipida i stoga se sa stajališta prehrane i kolesterol smatra lipidom.

Manju količinu triglicerida u želudcu razgrađuje lingvalna lipaza koju luče jezične žlijezde u ustima, a guta se sa slinom. Budući da se to odnosi na manje od 10 % probave triglicerida, možemo reći da je zanemarivo. Zapravo, sva se probava lipida zbiva u tankom crijevu. Prvi korak u probavi lipida jest fizičko razbijanje masnih kapljica na male čestice, tako da probavni enzimi topljivi u vodi mogu djelovati na velikoj površini. Taj se proces zove emulgiranje lipida, a počinje pokretima želudca kojima se lipidi miješaju s proizvodima probave u želudcu. Većina se emulgiranja zbiva u dvanaesniku djelovanjem žuči, lučevine jetara koja nema probavnih enzima. No žuč sadržava velike količine žučnih soli i fosfolipida lecitina. Te su tvari, a posebno lecitin, iznimno važne za emulgiranje lipida. Polarni dijelovi (mjesto na kojima se zbiva ionizacija u vodi) molekula žučnih soli i lecitina izrazito su dobro topljivi u vodi, dok se većina ostalih dijelova njihovih molekula dobro otapa u lipidima. Tako se dijelovi topljivi u lipidima otope u površinskom sloju masne kapljice, a polarni dijelovi koji strše prema van otope se u okolnoj vodenastoj tekućini. Time se znatno smanjuje površinska napetost lipida pa samim tim ona postaje topljivom. Glavna zadaća žučnih soli i lecitina, jest da kapljice lipida učine takvima da se mogu lako raspršiti mućkanjem vode u tankom crijevu. To je jednako djelovanju mnogih deterdženata koji se u sredstvima za uklanjanje masnoća naveliko rabe u kućanstvu. Svaki put kad se mućkanjem u tankom crijevu promjer masnih kapljica znatno smanji, ukupna se površina višestruko povećava. Budući da je prosječni promjer emulgiranih masnih čestica u crijevu manji od 1  $\mu\text{m}$ , proces emulgiranja lipida znači tisućstruko povećanje njezine ukupne površine. Lipaze su topljive u vodi i mogu napasti masne kapljice samo na njihovoj površini, stoga je deterdžentski učinak žučnih soli i lecitina vrlo važan u probavi lipida.

Najvažniji enzim za probavu triglicerida jest gušteračna lipaza koja se u obilnim količinama nalazi u soku gušterače. Te su količine dostatne da za jednu minutu probave sve trigliceride koje dosegnu. Enterociti tankog crijeva sadržavaju lipazu, poznatu kao crijevna lipaza, ali ona obično nije nužna. Gušteračna lipaza razgradi većinu triglicerida iz hrane do slobodnih masnih kiselina i 2-monoglicerida (slika 7).



Slika 7. Probava lipida (Guyton i Hall, 2012)

Hidroliza triglicerida izrazito je reverzibilan proces, stoga nakupljanje monoglicerida i slobodnih masnih kiselina u blizini masnih kapljica koje se probavljaju vrlo brzo zakoči dalju probavu. Žučne soli važne su i za uklanjanje monoglicerida i slobodnih masnih kiselina iz blizine masnih kapljica, gotovo odmah po stvaranju tih završnih proizvoda probave. Taj se proces zbiva na sljedeći način: žučne su soli pri velikoj koncentraciji u vodi sklone stvaranju micela, malih kuglastih ili cilindričnih tvorbi promjera 3 do 6 nm, sastavljenih od 20 do 40 molekula žučnih soli. Micele se stvore zato što svaka molekula žučne soli ima sterolnu jezgru vrlo topljivu u lipidima i polarnu skupinu vrlo topljivu u vodi. Sterolne jezgre sadržavaju razgradne proizvode lipida pa u sredini micelle nastaje lipidna kapljica s polarnim skupinama žučnih soli koje strše prema van, prekrivajući površinu micelle. Budući da su te polarne skupine negativno nabijene, one omogućuju da se cijela micela otopi u vodi probavnih sokova te da otopina ostane stabilnom sve dok se lipid ne apsorbira u krv. Micele žučnih soli djeluju i kao prijenosno sredstvo za dopremu razmjerno slabo topljivih monoglicerida i slobodnih masnih kiselina do četkaste prevlake crijevnih epitelnih stanica. Ondje se monogliceridi i slobodne masne kiseline apsorbiraju, a žučne se soli ponovno otpuštaju u himus, gdje opet nastavljaju s prijenosnim postupkom.

Glavnina kolesterola u hrani nalazi se u obliku kolesterolskih estera, koji su spoj slobodnoga kolesterola i jedne molekule masne kiseline. Fosfolipidi u svojoj molekuli također sadržavaju masne kiseline. Kolesterolske estere i fosfolipide hidroliziraju dvije lipaze iz soka gušterače. Enzim kolesterol-ester-hidrolaza hidrolizira kolesterolski ester, a fosfolipaza A<sub>2</sub> hidrolizira fosfolipid pa se tako oslobađaju masne kiseline. Micele žučnih soli imaju jednaku ulogu u prenošenju slobodnoga kolesterola i probavljenih fosfolipidnih molekula kao i pri prijenosu monoglicerida i slobodnih masnih kiselina. Bez djelovanja micela, kolesterol se praktično uopće ne apsorbira (Guyton i Hall, 2012).

### 2.3.3.2. Lipidi i mikrobiota

Lipopolisaharidi (eng. *LPS- lipopolysaccharides*) jedan su od glavnih sastojaka vanjske stanične stijenke Gram-negativnih bakterija. Stoga je crijevna mikrobiota golem rezervoar ovog endotoksina. U normalnim uvjetima prisutnost LPS u crijevnom lumenu ne izaziva negativne zdravstvene učinke, no neki činitelji mogu pogodovati prijenosu LPS-a u krvožilni sustav. Vrsta prehrane, posebno prehrana s visokim udjelom lipida, može pridonijeti endotoksemiji uzrokovanoj povišenom razinom LPS u krvnoj plazmi (Boroni Moreira i sur., 2012). Također je dokazano da veći unos lipida povećava crijevnu propusnost. Prehrana s visokim udjelom lipida (49.5 % lipida) izaziva promjene u sastavu crijevne mikrobiote, uključujući smanjenje broja *Bifidobacterium spp.* i *Eubacterium rectale – Clostridium coccoides* (Gram-pozitivne bakterije) kao i *Bacteroides* (Gram-negativne bakterije). Uočena je negativna korelacija između *Bifidobacterium spp.* i razine LPS-a u plazmi, kao i povećanje bifidobakterija uzrokovano unosom prebiotika koji smanjuju endotoksemiju. Prehrana s visokim udjelom lipida potiče crijevnu mikrobiotu na stvaranje toksičnih metabolita i blokira im sintezu kratkolančanih masnih kiselina, bitnih za zdravlje probavnog sustava time što omogućuju energiju enterocitima (Ou i sur., 2012).

Utjecaj prehrambenih lipida na crijevnu mikrobiotu indirektno može biti posredovan žučnim kiselinama. Unosom lipida povećava se proizvodnja žučnih kiselina u jetrima i njihovo oslobađanje iz žučnog mjehura u tanko crijevo, kao i količina žučnih kiselina koje izbjegnu enterohepatičko recikliranje i uđu u debelo crijevo. Sekundarne žučne kiseline, koje crijevna mikrobiota proizvodi 7  $\alpha$ -dehidroksilacijom primarnih žučnih kiselina, potencijalno su kancerogene i mogu uzrokovati karcinom debelog crijeva, žučne kamence te ostale gastrointestinalne bolesti (Ridlon i sur., 2006).

## 2.4. MODELI I HRANJIVE PODLOGE ZA UZGOJ CRIJEVNE MIKROBIOTE U *IN VITRO* UVJETIMA

*In vitro* modeli probavnog sustava omogućuju brzo, jednostavno i ekonomično proučavanje crijevnog mikrobioma, u jednom ili više odjeljenja crijeva ili duž cijelog gastrointestinalnog trakta (Williams i sur., 2015). Predstavljaju jedinstven alat za proučavanje stabilnosti, otpuštanja, otapanja, apsorpcije i biokonverzije hranjivih tvari, kemikalija, bioaktivnih spojeva i lijekova u probavnom sustavu. Simuliraju se i sljedeći standardizirani parametri *in vivo* sustava: tjelesna temperatura, pH u

lumenu, prijenos probavljenog supstrata iz ileuma, miješanje i transport crijevnog sadržaja, prisutnost složene, bogate, metabolički aktivne, anaerobne mikrobiote ljudskog podrijetla te apsorpciju vode i metaboličkih produkata preko polupropusne membrane unutar modela debelog crijeva. U *in vitro* modelima uspješno je održan broj i omjer različitih mikroorganizama koji su po sastavu i metaboličkoj aktivnosti slični onima u ljudskome debelom crijevu (Rehman i sur., 2012). Nadalje, *in vitro* modeli omogućuju istraživačima da prouče utjecaj specifičnih prebiotika, probiotika i lijekova na mikrobioti (Boureau i sur., 2000).

Prema načinu vođenja kultivacije mikrobiote, *in vitro* modeli mogu se podijeliti na šaržne, kontinuirane, višestupnjevito kontinuirane i kontinuirane s imobiliziranom mikrobiotom. Danas najčešće korišteni *in vitro* modeli jesu SHIME i TIM-2 (Prilog 1 i 2). Dok se uz njih, u manjoj mjeri, koriste i modeli: Enteromix, PolyFermS, SHIME, M-SHIME, TwinSHIME, TIM-1, TIM-2, HMI i *Gut-on-a-chip* (Williams i sur., 2015).

Mnoge hranjive podloge i njihove varijacije koriste se za uzgoj crijevne mikrobiote u *in vitro* uvjetima, a od kojih su najčešće korištene SIEM, SCEM i GMM hranjive podloge. SIEM (eng. *Simulated Ileal Efflux Medium*) hranjiva podloga svojim sastavom simulira neprobavljene komponente hrane koje iz terminalnog ileuma dopiru u debelo crijevo kroz ileo-cekalni zalistak, gdje se mogu fermentirati. Sastav ugljikohidrata (pektin, ksilan, arabinogalaktan, amilopektin i škrob) u ovoj podlozi odražava tipične komponente tzv. zapadnjačke prehrane. Također sadržava proteine koje se nisu razgradili u tankom crijevu, zaostalu žuč te neke minerale i vitamine. Najčešća je primjena ove podloge u *in vitro* uzgoju mikrobiote debelog crijeva (Sáyago-Ayerdi i sur., 2019; Venema, 2015; Maathuis i sur., 2012). SCEM (eng. *Simulated Colonic Environment Medium*) hranjiva je podloga koja simulira uvjete okoline u ileumu i debelom crijevu. Sastav SCEM podloge izvorno su opisali Beumer i sur. (1992) te je modificiran prema Musken i sur. (2008) (Prilog 3). Glavne razlike između SCEM i SIEM podloge jesu ionska snaga i prisutnost probavnih enzima u SIEM podlozi (Polzin i sur., 2013). GMM (eng. *Gut Microbiota Medium*) neselektivna je podloga nastala modifikacijom suplementirane TYG<sub>S</sub> podloge (eng. *Supplemented tryptoneyeast-glucose medium*) i sadržava samo komercijalno dostupne sastojke. Kako bi se spriječio prekomjerni rast kolonija, smanjuje se koncentracija glukoze, triptona i ekstrakta kvasca peterostruko u usporedbi s TYG<sub>S</sub>-om. Kompletan sastav GMM podloge nalazi se u Prilogu 4 (Goodman i sur., 2011).

#### 2.4.1. Optimalne podloge za uzgoj bakterija iz roda *Bacteroides*

Vrste roda *Bacteroides* anaerobne su, na žuč otporne, ne sporogene, gram-negativne štapićaste bakterije. Značajni su klinički patogeni te održavaju složen i općenito koristan odnos s domaćinom kada se nalaze u crijevima, ali kad napuste crijevnu mikrobiotu mogu uzrokovati značajne patologije, uključujući bakterijemiju i stvaranje apscesa na više mjesta u tijelu. Vrste roda *Bacteroides* rastu relativno brzo u usporedbi s većinom drugih anaeroba, a njihov rast na selektivnom mediju (npr. bakterijskom eskulinskom agaru) prilično je karakterističan (Wexler, 2007).

Prema istraživanju Hoa i sur. (2017) rast vrsta roda *Bacteroides* bio je poboljšan u podlozi BHI (eng. *Brain Heart Infusion*) obogaćenju ekstraktom kvasca, cistein hidrokloridom, žučnim solima, vitaminom K, heminom, glukozom, eskulinom, željezovim amonijevim citratom, brom timol plavim, gentamicinom, kanamicinom i novobiocinom. Također, prema Bacic i Smith često korištena podloga za svakidašnji uzgoj roda *Bacteroides* kompleksna je podloga TYG (eng. *Tryptone yeast extract glucose medium*), u koju se može dodati bilo koji ugljikohidrat (Bacic i Smith, 2008). Njemački Leibniz institut DSMZ za uzgoj roda *Bacteroides* koristi se nekima od podloga: Columbia Blood Medium, Chopped Meat Medium, Fastidious Anaerobe Broth, Dehydrated Culture Media upravo zbog toga što unutar roda *Bacteroides* postoje različite prehrambene preferencije: npr. za razliku od ostalih vrsta bakterija roda *Bacteroides*, *B. vulgatus* za svoj rast ne koristi sve vrste polisaharida. Jedino amiloza i amilopektin osiguravaju brzi rast i visoke prinose kod svih vrsta roda *Bacteroides* (McCarthy i sur., 1988). Na osnovi toga teško je definirati hranjivu podlogu koja će održavati rast svih vrsta roda *Bacteroides* (Eley i sur., 1985).

Iako bakterije roda *Bacteroides* imaju relativno jednostavne zahtjeve za rast, potrebno je ispuniti nekoliko parametara kako bi im se omogućio obilan rast. Prvo, to su saharolitički organizmi i zahtijevaju izvor fermentabilnih ugljikohidrata. Jednostavni se šećeri lako asimiliraju, ali ovi organizmi također imaju sofisticirane enzimske sustave za korištenjem složenim polisaharidima poput škroba, pektina i hemiceluloze. Smatra se da je ovaj kapacitet prilagodbe širokom rasponu ugljikohidrata ključan za njihovo preživljavanje u crijevima. Drugi zahtjev za rastom jest izvor hemina. Iako je moguće bakterijske vrste ovog roda uzgajati duže vrijeme bez hemina, tipično generacijsko vrijeme iznosi približno samo 1/10 normalnog rasta. Vrste roda *Bacteroides* u osnovi su hem auksotrofi te im se u podlozi za rast mora osigurati izvor hemina, protoporfirina IX ili krvi. Između ostalog, hemin je potreban za sintezu b-tipa citokroma, važnog za proizvodnju sukcinata i anaerobni transport elektrona.

Također rod *Bacteroides* zahtijeva izvor vitamina B<sub>12</sub>. Kobalamin (B<sub>12</sub>) važan je kofaktor mnogim enzimima, ali sposobnost L-metionina da bude zamijenjen s B<sub>12</sub> sugerira da je ključni enzim u sintezi metionina najkritičniji nedostatak u odsustvu B<sub>12</sub> (Bacic i Smith, 2008).

### **3.EKSPERIMENTALNI DIO**

Ovaj rad nastavlja se na pokuse u kojima je praćena dinamika promjene zastupljenosti bakterijskih vrsta crijevne mikrobiote u *in vitro* uvjetima. Provedene su tri serije pokusa kako bi se odredio utjecaj SIEM podloge na dinamiku mikrobiote, podloge s dodanim prebiotikom i podloga s dodatkom probiotika i prebiotika. Kao osnova korištena je SIEM hranjiva podloga koja simulira sastav neprobavljene hrane na ulasku iz ileusa u debelo crijevo. Sastav podloge u svim je pokusima bio identičan (prema van Nuenen i sur., 2003). Kod pokusa s dodatkom prebiotika korišten je rezistentni pšenični dekstrin NUTRIOSE © u koncentraciji od 9,4 g L<sup>-1</sup> u prvom uzgoju i 15 g L<sup>-1</sup> u drugom uzgoju. Kod pokusa s dodatkom probiotika i prebiotika korišten je *Lactobacillus plantarum* D13 u koncentraciji 1\*10<sup>8</sup> CFU mL<sup>-1</sup>, dok je kao prebiotik korišten rezistentni pšenični dekstrin NUTRIOSE © u koncentraciji 21 g L<sup>-1</sup>. Cilj je dijela eksperimentalnog rada odrediti nedostatke korištene podloge koji su doveli do gubitka ravnotežnog omjera bakterijskih koljena za vrijeme uzgoja crijevne mikrobiote u *in vitro* uvjetima te ih poslije upotrijebiti kako bi se optimizacijom SIEM podloge u *in vitro* uvjetima uspjeli očuvati ravnotežni omjeri bakterijskih koljena.

#### **3.1. MATERIJALI**

##### **3.1.1. Sastav hranjive podloge za uzgoj mikrobiote u *in vitro* uvjetima**

U eksperimentalnom dijelu rada korištena je SIEM kompleksna hranjiva podloga, čiji je potpun sastav naveden u tablicama 1 – 3.

###### **3.1.1.1. SIEM hranjiva podloga**

SIEM hranjiva podloga simulira komponente iz hrane koje dopijuju do debelog crijeva i u ovom radu se koristi kao hranjiva podloga za bakterije crijevne mikrobiote. U ovom radu SIEM hranjiva podloga pripremana je od triju dijelova, a dio podloge koji se odnosi na ugljikohidrate naveden je u tablici 1.



Tablica 1. Sastav hranjive podloge

SASTOJAK	KOLIČINA (g L <sup>-1</sup> )
Škrob	39,2
Baktopepton	23,5
Kazein	23,5
Tween 80	17,0
Amilopektin	4,7
Arabinogalaktan	4,7
Ksilan	4,7
Pektin	4,7
Žučne soli	0,3

Sastav otopine soli – dijalizata, prikazan je u tablici 2. Pripremljena otopina soli autoklavira se odvojeno te se miješa s ostalim komponentama podloge nakon sterilizacije.

Tablica 2. Sastav otopine soli

SASTOJAK	KOLIČINA (g L <sup>-1</sup> )
NaCl	3,500
K <sub>2</sub> PO <sub>3</sub> × 3H <sub>2</sub> O	2,500
MgO <sub>3</sub> × 7H <sub>2</sub> O	0,500
CaCl <sub>2</sub> × 2H <sub>2</sub> O	0,350
Cistein hidroklorid	0,300
Žučne soli	0,050
FeSO <sub>3</sub> × 7H <sub>2</sub> O	0,005

Sastav otopine vitamina prikazan je u tablici 3. Pripremljena se otopina ne sterilizira u autoklavu zbog termolabilnosti pojedinih vitamina, već se filtrira kroz membranu veličine pora od 0,45 μm. Pripremljena otopina čuva se u hladnjaku (6 °C) te se dodaje u podlogu neposredno prije prihrane.

Tablica 3. Sastav vitaminske otopine

SASTOJAK	KOLIČINA (g L <sup>-1</sup> )
Pantotenat	0,100
Nikotinamid	0,050
p-aminobenzen	0,050
Tiamin	0,030
D-biotin	0,020
Menandion	0,010
Vitamin B <sub>12</sub>	0,005
Destilirana voda	do 10 mL

### 3.1.1.2. SIEM s dodatkom prebiotika

Za testiranje utjecaja prebiotika na dinamiku sastav crijevne mikrobiote pri uzgoju u *in vitro* uvjetima korišten je pšenični dekstrin komercijalnog naziva Nutriose. Prebiotik je dodan SIEM hranjivoj podlozi u koncentraciji 9,4 g L<sup>-1</sup> pri prvom uzgoju i 15 g L<sup>-1</sup> pri drugom uzgoju. Ostali sastojci SIEM hranjive podloge ostali su nepromijenjeni.

### 3.1.1.3. SIEM hranjiva podloga s dodatkom probiotika i prebiotika

U pokusima u kojima se testirala dinamika ravnoteže bakterijskih vrsta crijevne mikrobiote u SIEM podlozi s dodatkom probiotika i prebiotika korišteni su probiotik *Lactobacillus plantarum* D13, iz mikrobiološke zbirke Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u koncentraciji 1\*10<sup>8</sup> CFU mL<sup>-1</sup> i prebiotik pšenični dekstrin Nutriose FB06 u koncentraciji 21 g L<sup>-1</sup>.

## 3.1.2. Mikrobna kultura za inokulaciju

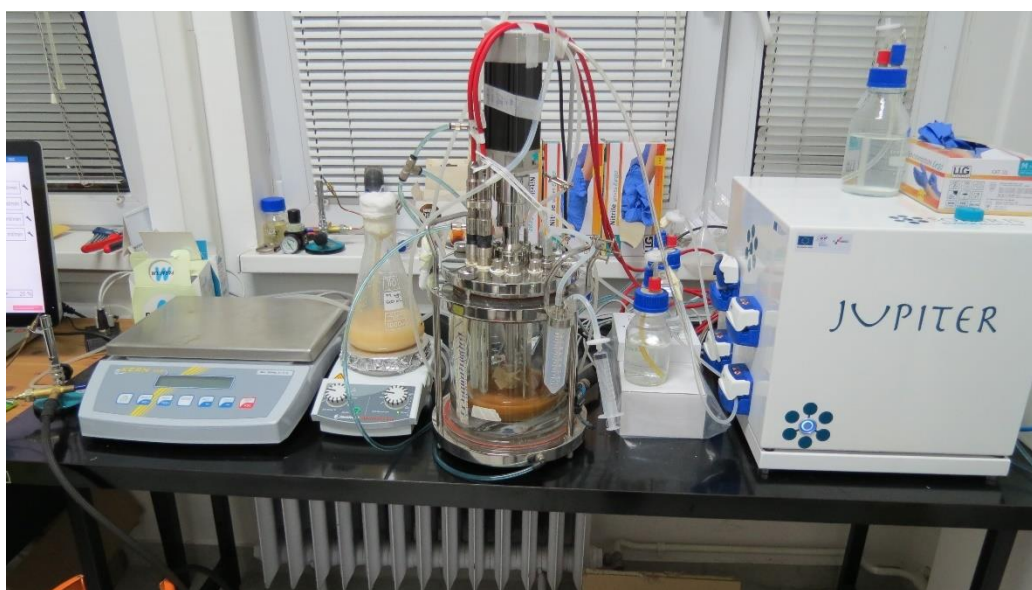
Kao izvor mikrobne kulture za inokulaciju hranjive podloge u ovome diplomskom radu korišteno je 6 uzoraka stolice od 2 donora. Oba donora imali su indeks tjelesne mase (ITM) veći od 30 i u posljednja tri mjeseca prije davanja uzoraka stolice nisu konzumirali lijekove ili supstancije za koje je poznato da značajno utječu na sastav crijevne mikrobiote.

### 3.1.3.1. Pribor

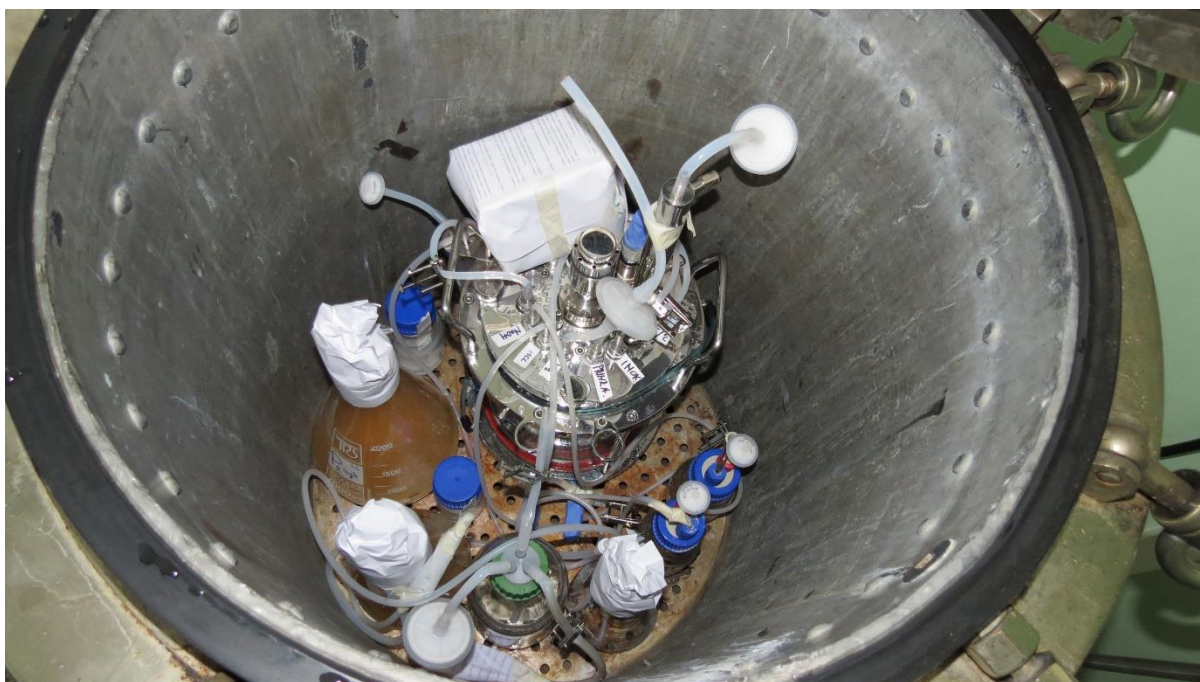
- Automatske pipete
- Erlenmeyerove tikvice od 500 mL, 1 L i 2 L
- Falcon kivete od 15 i 50 mL
- Kleme
- Silikonske cijevi različitih promjera
- Spojnice
- Staklene boce od 250 i 500 mL

### 3.1.3.2. Bioreaktor s miješalom (Fermentor)

Za simulacije procesa koji se odvijaju u debelom crijevu korišten je laboratorijski bioreaktor Jupiter 2.0 (Solaris Biotechnology, Porto Mantovano, Italija) ukupnog volumena od 2 L (slika 8). Bioreaktor je opremljen pH elektrodom, ORP elektrodom (oksidacijsko reduksijski potencijal), senzorom razine tekućine, termometrom, dvama turbinskim mješalima, elektromotorom, integriranim peristaltičkim pumpama i upravljačkom jedinicom. Svi ulazi nalaze se na poklopcu bioreaktora- otvori za uzimanje uzorka, inokulaciju, pritok hranjive podloge te dodavanje kiseline i lužine (slika 9). Elektromotor snage 266 W pokreće dva turbinska i jedno propelersko miješalo. Za vođenje i upravljanje procesom uzgoja upotrebljava se programski paket Leonardo.



Slika 8. Bioreaktor Jupiter 2.0 (Solaris Biotechnology, Porto Mantovano, Italija)



Slika 9. Sterilizacija bioreaktora i svih materijala potrebnih za jedan uzgoj

#### 3.1.3.3. Uređaj za automatiziranu izolaciju i pročišćavanje DNA

- Maxwell® 16 Instrument, Promega, Sjedinjene Američke Države

#### 3.1.3.4. Ostali laboratorijski uređaji

- Analitička vaga model Eclipse EBL 313i, Adam, Ujedinjeno Kraljevstvo
- Autoklav „Sutjeska“, Jugoslavija
- Centrifuga Universal 320 R, Hettich, Njemačka
- Hladnjak, Beko, Turska
- Magnetska mješalica, Heildoph, Njemačka
- Tehnička vaga, KERN fkb, Njemačka
- Zamrzivač Forma 900 (-86 °C), Thermo scientific, Njemačka

#### 3.1.3.5. Kemikalije za pripravu hranjive podloge

- Arabinogalaktan, Sigma, Sjedinjene Američke Države
- Baktopepton, Sigma-Aldrich, Španjolska
- Cijanokobalamin, Fluka, Sjedinjene Američke Države
- D-biotin, Fischer-BioReagens, Kina

- Kalcijev klorid, bezvodni, *Gram mol*, Hrvatska
- Kalijev hidrogenfosfat (99 %), bezvodni, *Acros*, Španjolska
- Kazein, *Sigma*, Sjedinjene Američke Države
- Ksilan, *Carl Roth GmbH*, Njemačka
- Kukuruzni škrob, *Sigma-Aldrich*, Sjedinjene Američke Države
- L-cistein, *Sigma*, Sjedinjene Američke Države
- Magnezijev sulfat heptahidrat (99,5 %), *Acros*, Španjolska
- Menadion, *Sigma*, Njemačka
- Natrijev klorid, *Carlo Erba Reagens*, Italija
- Nikotinamid, *Acros*, Sjedinjene Američke Države
- p-aminobenzen, *Sigma*, Kina
- Pantotenat (99 %), *Sigma*, Kina
- Pektin (izoliran iz jabuke), *Sigma*, Švicarska
- Tiamin hidroklorid, *Fischer-BioReagens*, Njemačka
- Tween 80, *Sigma*, Ujedinjeno Kraljevstvo
- Željezov (II) sulfat (99,5 %), *Acros*, Španjolska
- Žučne soli, *Fluka*, Novi Zeland

#### 3.1.3.6. Plin pod tlakom

- N<sub>2</sub> >99,996 %, tehnički komprimirani plin, *Messer*, Hrvatska

#### 3.1.3.7. Ostale kemikalije

- Etanol (70 %), *Gram mol*, Hrvatska
- Glicerol, *Gram mol*, Hrvatska
- Klorovodična kiselina, *Carlo Erba Reagens*, Italija
- Maxwell 16 Cell DNA Purification Kit, *Promega*, Sjedinjene Američke Države
- Maxwell 16 Tissue DNA Purification Kit, *Promega*, Sjedinjene Američke Države
- Meliseptol, *Braun*, Njemačka
- Mukasol, *Schulke*, Njemačka
- Natrijev hidroksid, *Carlo Erba Reagens*, Italija
- Octena kiselina, *Baker*, Njemačka
- PlivaSept Tinktura, *Pliva*, Hrvatska
- Pufer pH 3, *Reagecon*, Irska

- Pufer pH 7, Reagecon, Irska
- Pufer pH 10, Reagecon, Irska

#### 3.1.3.8. Računalni programi za analizu podataka

- Microsoft Office 2010, Microsoft, Sjedinjene Američke Države
- Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME 1.9.1)

## **3.2. METODE**

### **3.2.1. Priprema hranjivih podloga**

Kompleksna hranjiva podloga korištena u ovom radu, SIEM, pripremljena je prema podacima iz literature (van Nuenen i sur., 2003). SIEM hranjiva podloga dobivena je miješanjem komponenata iz tablica 1, 2 i 3. Hranjive podloge pripremljene su otapanjem izvaganih sastojaka u demineraliziranoj vodi u trima različitim Erlenmeyerovim tikvicama. U eksperimentu s prebiotikom NUTRIOSE® FB06 dodan je u definiranoj količini u gotovu podlogu.

### **3.2.2. Sterilizacija podloge, pribora i aparature**

Prije same sterilizacije potrebno je bioreaktor pripremiti za autoklav zajedno s bocama za kiselinu i lužinu, jednom praznom Erlenmeyerovom tikvicom predviđenom za inokulum, te drugom za SIEM hranjivu podlogu. Također, prije sterilizacije potrebno je baždariti pH i ORP elektrode i zatvoriti sve otvore koji se ne koriste. Laboratorijski bioreaktor, zajedno s pomoćnim dijelovima, sterilizira se u autoklavu na temperaturi od 121 °C u ukupnom trajanju od 15 minuta. Autoklavirane tikvice za SIEM podlogu potrebno je odmah nakon sterilizacije pomiješati u pripremljenoj Erlenmeyerovoj tikvici kako bi se smanjila mogućnost kontaminacije podloge.

### **3.2.3. Sastavljanje aparature i postavljanje parametara procesa**

Nakon sterilizacije i prije početka procesa potrebno je spojiti kompletan sustav. Na pH i ORP elektrodu priključuju se kablovi za spajanje sa sučeljem koje upravlja cijelim sustavom. S kontrolnom jedinicom spajaju se grijači vode koji se nalaze u plaštu bioreaktora te temperaturna sonda na gornjoj ploči bioreaktora. Elektromotor koji pokreće miješalo u bioreaktoru postavlja se na za to predviđeno mjesto. U sustav se uvodi dušik u količini 0,2 NI min<sup>-1</sup> kako bi se osigurali anaerobni uvjeti. Prije pokretanja procesa, potrebno je postaviti željene parametre. Temperaturu na 37 °C, a pH na 5,8, 6,2 te 6,8, ovisno o vremenskoj točki procesa. Svi parametri podešavaju se preko korisničkog sučelja upravljačke jedinice na kojem je instaliran upravljački programski paket. Da bi se spriječilo taloženje neotopljenih sastojaka u podlozi, miješanje je prije inokulacije podešeno na 50 o min<sup>-1</sup> (okretaja po minuti). Radni je volumen bioreaktora 600 ml.

### **3.2.4. Faza prilagodbe mikrobiote u bioreaktoru**

Eksperiment započinje homogeniziranjem svježeg uzorka fecesa mase 30 g. Feces se homogenizira u otopini soli volumena 300 mL u Erlenmeyerovoj tikvici od 1 L iz koje se potom prebacuje u bioreaktor pomoću peristaltičkih pumpi. Faza prilagodbe mikrobiote u trajanju od 4 sata provedena je u bioreaktoru u uvjetima koji simuliraju uzlazni dio debelog crijeva (37 °C i pH 5,8). Prilagodba je vođena u anaerobnim uvjetima uvođenjem dušika u bioreaktor uz ciklički profil promjene brzine rotacije miješala gdje je minimalna brzina bila 30 o min<sup>-1</sup>, a maksimalna 150 o min<sup>-1</sup> (10 minuta pri 30 o min<sup>-1</sup> uz stupnjevitu promjenu na 150 o min<sup>-1</sup> kroz 2 minute).

### **3.2.5. Vođenje anaerobnoga mikrobnog procesa u bioreaktoru**

Nakon faze prilagodbe, slijedi faza uspostave stabilne ravnotežne mikrobiote. Radi se o šaržnom postupku koji traje 24 sata i započinje miješanjem bazne hranjive podloge volumena 300 ml sa suspenzijom mikrobiote u otopini soli istog volumena. Nakon 24 sata izmijenjena je podloga tako da je 300 mL fermentirane podloge (mješovita mikrobna kultura i podloga u bioreaktoru) izdvojeno iz procesa te je prihranjeno s 300 mL nove hranjive podloge s pomoću peristaltičkih pumpi. Prije početka ubacivanja nove hranjive podloge, pH u sustavu podešen je na 6,2 jer se u ovoj fazi eksperimenta simuliraju uvjeti poprečnog dijela debelog crijeva. I druga faza uzgoja traje 24 sata.

Na identičan način provedena je i treća, posljednja faza, u kojoj se simuliraju uvjeti silaznog dijela debelog crijeva. Nakon izmjene podloge i prihrane s preostalih 300 mL hranjive podloge, podešen je pH na 6,8 što odgovara silaznom dijelu debelog crijeva. Ukupno trajanje procesa bilo je 76 sati – 4 sata za prilagodbu inokuluma u otopini soli i 72 sata polukontinuiranog uzgoja gdje se svaka 24 sata vršila izmjena dijela podloge sa svježom hranjivom podlogom. Homogenost medija u bioreaktoru tijekom procesa održavana je definiranim profilom miješanja (10 minuta pri 30 o min<sup>-1</sup> uz stupnjevitu promjenu na 150 o min<sup>-1</sup> kroz 2 minute). Tijekom bioprocesa, definirane pH vrijednosti održavane su otopinama NaOH ili HCl, dok je anaerobnost osigurana kontinuiranim strujanjem dušika (0,2 Nl min<sup>-1</sup>). Za praćenje biodinamike mikrobiote svakih 12 sati uzimani su uzorci medija s pomoću sustava za sterilno izuzimanje i uzorci su odmah po izuzimanju pospremljeni u ledenicu na – 80 °C.

### **3.2.6. Automatizirana izolacija DNA**

Za izolaciju DNA korišteni su uzorci čuvani na -80 °C, koje je prije upotrebe potrebno odlediti. Alikvot odmrznutih uzoraka centrifugira se na 1000 x g pri 10 °C, a dobiveni supernatant otpipetira se direktno u prostor kazete kita za izolaciju DNA Maxwell 16 DNA Purification Kit. Za izolaciju DNA fecesa korišten je Maxwell 16 Tissue DNA Purification Kit dok je za izolaciju DNA uzoraka iz bioreaktora korišten Maxwell 16 Cell DNA Purification Kit. Za sve uzorke izolacija DNA provedena je u skladu s uputom proizvođača. Kod uzoraka fecesa korišteno je 0,5 g fecesa dok je kod uzoraka iz bioreaktora korišteno 400 µL suspenzije stanica kao materijal iz kojeg će se izolirati DNA: Postupak izolacije provodi se paralelno za 16 uzoraka koje uređaj može primiti, u skladu s uputom proizvođača. Nakon završetka izolacije DNA za svaki se uzorak određuje koncentracija izolirane DNA korištenjem Nano-drop spektrofotometra te se dobivena DNA pohranjuje na -20 °C do slanja na sekvenciranje.

### **3.3. OPTIMIZACIJA SIEM HRANJIVE PODLOGE ZA ODRŽAVANJE UDJELA RODA *BACTEROIDES* U *IN VITRO* UVJETIMA**

Kao što je već spomenuto u teorijskom dijelu, postoje razne podloge za uzgoj bakterijskih vrsta roda *Bacteroides* upravo zato što različite vrste roda *Bacteroides* imaju različite prehrambene preferencije (ekstrakt kvasca, žučne soli, vitamin K, hemin, vitamin B12 itd...). Prema navedenom u ovome diplomskom radu odabrali smo obogaćenu hranjivu



podlogu BHI (eng. *Brain Heart Infusion*), kompleksnu podlogu TYG (eng. *Tryptone yeast extract glucose medium*) i Columbia Blood Medium na temelju čijih sastava optimizirat ćemo SIEM podlogu, čijim je korištenjem u *in vitro* uvjetima primijećen znatan pad zastupljenosti bakterijskih vrsta koljena *Bacteroidetes* u odnosu na njihov udio u svježem fecesu. Naveden je sastav odabranih hranjivih podloga (tablice 4 – 6).

Tablica 4. Sastav obogaćene hranjive podloge BHI (prema Hou i sur., 2017)

SASTOJAK	KOLIČINA (g L <sup>-1</sup> )
Bakteriološki agar (Oxoid agar no.1)	15,0
Brain Heart Infusion (Oxoid)	37,0
Ekstrakt kvasca	5,0
Cistein hidroklorid	0,5
Žučne soli	10,0
Vitamin K	0,05
Hemin	0,5
Glukoza	1,0
Eskulin	1,0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>5</sub> [Fe(C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> O <sub>7</sub> ) <sub>2</sub> ]	0,5
Bromtimol plavo	0,24
Gentamicin	0,004
Kanamycin	0,1
Novobiocin	0,03

Tablica 5. Sastav TYG hranjive podloge (prema Bacic i Smith, 2008)

SASTOJAK	KOLIČINA (g L <sup>-1</sup> )
Tripton	20,0
Ekstrakt kvasca	10,0
Glukoza	5,0
Cistein	1,0
Hemin	10 mL
Resazurin (0,1 % otopina)	1,0 mL
Agar	15,0
NaHCO <sub>3</sub> (10 % otopina)	20 mL
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,26 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,48
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,0
NaCl	2,0

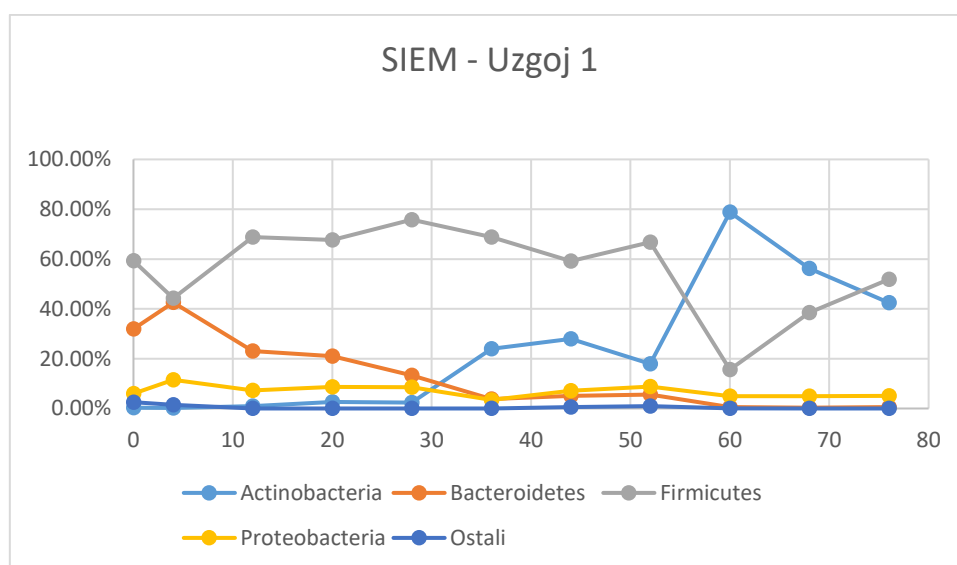
Tablica 6. Sastav Columbia Blood Medium (prema DSMZ)

SASTOJAK	KOLIČINA (g L <sup>-1</sup> )
Pepton	23,0
Škrob	1,0
NaCl	5,0
Agar	10,0

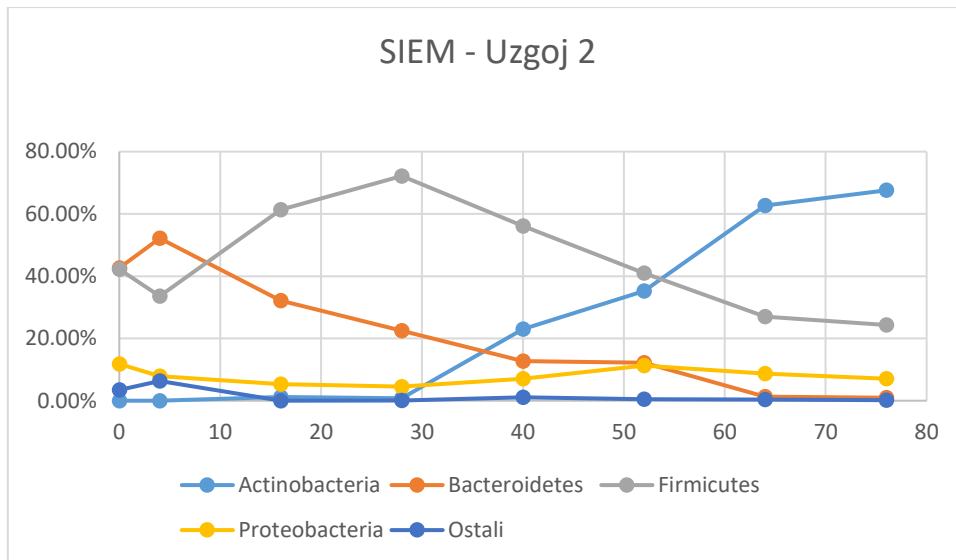
## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Analizom uzoraka svježeg fecesa te *in vitro* uzgojenih uzoraka crijevne mikrobiote u SIEM podlozi, SIEM podlozi s dodatkom prebiotika i SIEM podlozi s dodatkom probiotika i prebiotika uočavamo smanjen udjel koljena *Bacteroidetes*, što možemo vidjeti iz priloženih grafova (slike 10 – 15). U svim slučajevima udio koljena *Bacteroidetes*, od dominantnog je pao do jedva vidljive zastupljenosti nakon 72 sata *in vitro* uzgoja. Primjetno je da udio bakterija koje pripadaju koljenu *Bacteroidetes* najsporije pada u pokusu gdje je SIEM hranjivoj podlozi dodan prebiotik NUTRIOSE® FB06 u koncentraciji 15 g L<sup>-1</sup>. To odgovara prijašnjim spoznajama o njihovoj sklonosti kompleksnim ugljikohidratima kao izvoru ugljika (Bacic i Smith, 2008).

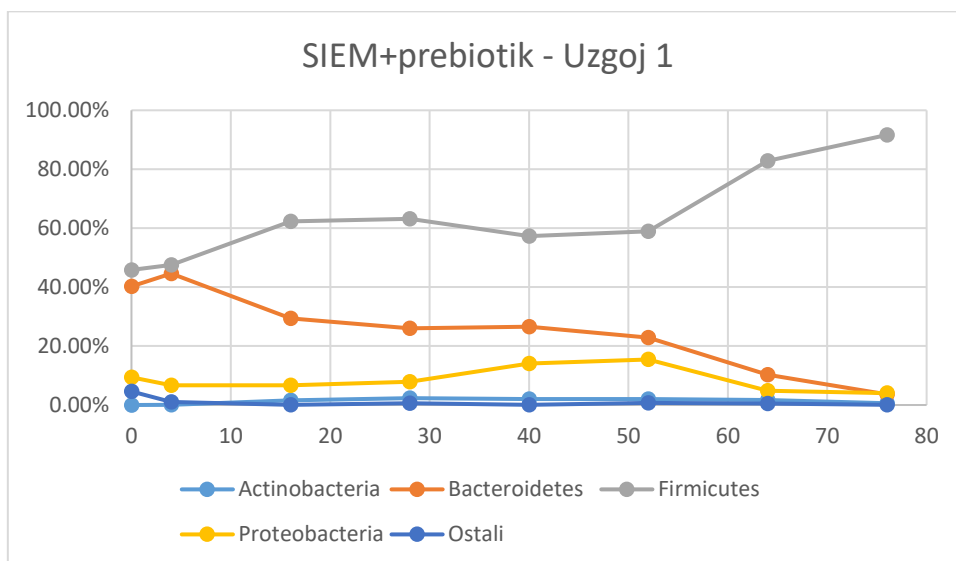
Ostali pokusi, neovisno o tome je li korištena samo SIEM hranjiva podloga ili SIEM podloga s dodatkom prebiotika ili prebiotika i probiotika, prate sličnu krivulju promjene dinamike udjela koljena *Bacteroidetes* u ukupnoj *in vitro* crijevnoj mikrobioti gdje nakon faze prilagodbe dolazi do naglog pada njihove zastupljenosti u ukupnom sastavu. Korištenjem takve podloge za uzgoj crijevne mikrobiote ne mogu se dobiti rezultati sastava humane crijevne mikrobiote u *in vitro* uvjetima koji bi odgovarali stvarnom sastavu crijevne mikrobiote *in vivo*, te se sustav s testiranim postavkama ne može koristiti za simulaciju dinamike humane crijevne mikrobiote.



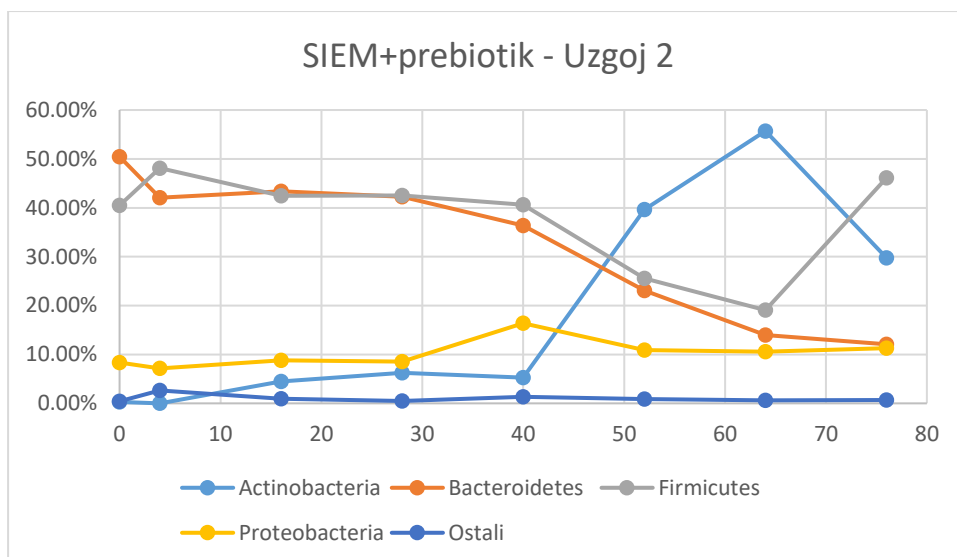
Slika 10. Zastupljenost bakterijskih koljena tijekom uzgoja korištenjem SIEM podloge



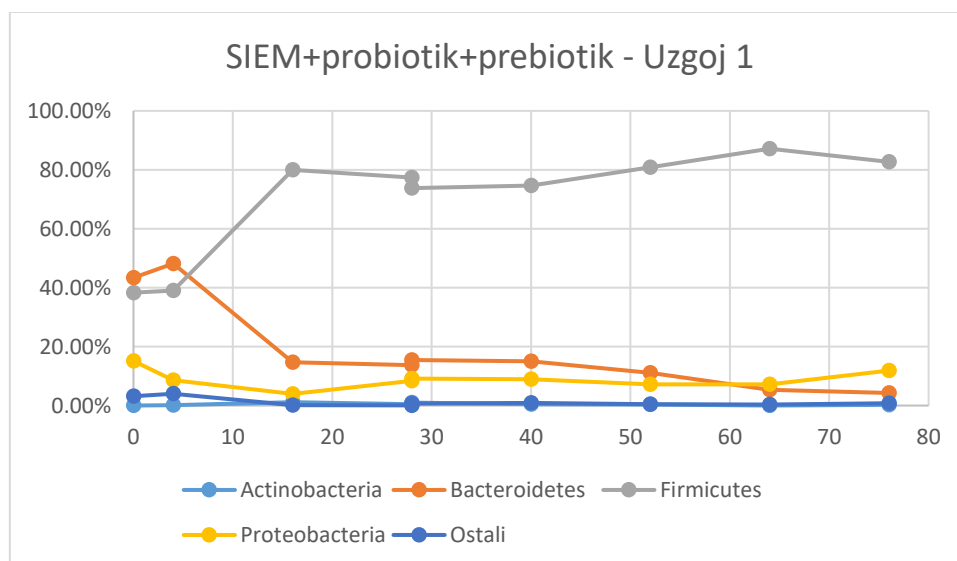
Slika 11. Zastupljenost bakterijskih koljena tijekom *in vitro* uzgoja korištenjem SIEM podloge



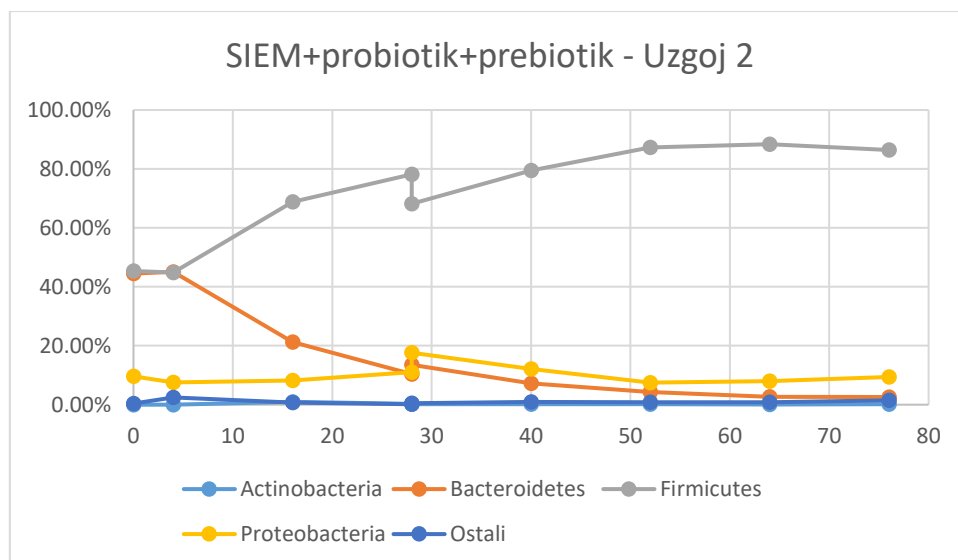
Slika 12. Zastupljenost bakterijskih koljena tijekom *in vitro* uzgoja korištenjem SIEM podloge s dodanim prebiotikom NUTRIOSE® FB06 u koncentraciji 9,4 g L<sup>-1</sup>



Slika 13. Zastupljenost bakterijskih koljena tijekom *in vitro* uzgoja korištenjem SIEM podloge s dodanim prebiotikom NUTRIOSE® FB06 u koncentraciji 15 g L<sup>-1</sup>



Slika 14. Zastupljenost bakterijskih koljena tijekom *in vitro* uzgoja korištenjem SIEM podloge s dodanim prebiotikom i probiotikom



Slika 15. Zastupljenost bakterijskih koljena tijekom *in vitro* uzgoja korištenjem SIEM podloge s dodanim prebiotikom i probiotikom

Dobiveni rezultati pokazuju da je potrebno optimizirati SIEM podlogu za održavanje rasta bakterija roda *Bacteroides*, dominantnog roda koljena *Bacteroidetes*, što je i bio cilj ovoga diplomskog rada. Na temelju sastava podloga za uzgoj bakterijskih vrsta roda *Bacteroides* navedenih u Poglavlju 3.3. predložene su 3 optimizirane SIEM podloge.

Budući da je udio vrsta roda *Bacteroides* u početnim uzorcima fecesa 40 – 45 %, predložene su optimizacije SIEM podloge na sljedeći način:

1. Kako bi se održala zastupljenost koljena *Bacteroidetes*, odnosno najzastupljenijeg roda tog koljena *Bacteroides* SIEM hranjiva podloga suplementirat će se sastojcima obogaćene Blood Heart Infusion (BHI) podloge (prema Ho i sur., 2017) koja se koristi kao podloga za uzgoj bakterija roda *Bacteroides*, koji nisu prisutni u SIEM podlozi i to u udjelu koji odgovara prosječnom udjelu koljena *Bacteroidetes* u crijevnoj mikrobioti – 45 %. Tako će se korištenoj SIEM podlozi, definiranoj u sekciji 3.1.1. dodati sastojci obogaćene BHI hranjive podloge, te bi koncentracije sastojaka optimizirane podloge bile:

SASTOJAK	KOLIČINA (g L <sup>-1</sup> )
Bakteriološki agar (Oxoid agar no.1)	6,75
Brain Heart Infusion (Oxoid)	16,65
Ekstrakt kvasca	2,25
Vitamin K	0,0225
Hemin	0,225
(NH <sub>4</sub> ) <sub>5</sub> [Fe(C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> O <sub>7</sub> ) <sub>2</sub> ]	0,225
Škrob	39,2
Baktopepton	23,5
Kazein	23,5
Tween 80	17,0
Amilopektin	4,7
Arabinogalaktan	4,7
Ksilan	4,7
Pektin	4,7
Žučne soli	0,35
NaCl	3,5
K <sub>2</sub> PO <sub>3</sub> × 3H <sub>2</sub> O	2,5
MgO <sub>3</sub> × 7H <sub>2</sub> O	0,5
CaCl <sub>2</sub> × 2H <sub>2</sub> O	0,35
Cistein hidroklorid	0,3
FeSO <sub>3</sub> × 7H <sub>2</sub> O	0,005
Pantotenat	0,1
Nikotinamid	0,05
p-aminobenzen	0,05
Tiamin	0,03
D-biotin	0,02
Menandion	0,01

Vitamin B <sub>12</sub>	0,005
-------------------------	-------

2. Drugi prijedlog za optimizaciju SIEM hranjive podloge za održavanje udjela bakterijskog koljena *Bacteroidetes* baziran je na još jednoj hranjivoj podlozi koja se koristi za uzgoj bakterija roda *Bacteroides*, Tripton kvašćev ekstrakt medij s glukozom – TYG (eng. *Tryptone yeast extract glucose medium*) (prema Bacic i Smith, 2008). Optimizirana hranjiva podloga sastojala bi se od sljedećih komponenti:

SASTOJAK	KOLIČINA (g L <sup>-1</sup> )
Tripton	9,0
Ekstrakt kvasca	4,5
Cistein	0,45
Hemin	2,25
Škrob	39,2
Baktopepton	23,5
Kazein	23,5
Tween 80	17,0
Amilopektin	4,7
Arabinogalaktan	4,7
Ksilan	4,7
Pektin	4,7
Žučne soli	0,35
NaCl	3,5
K <sub>2</sub> PO <sub>3</sub> × 3H <sub>2</sub> O	2,5
MgO <sub>3</sub> × 7H <sub>2</sub> O	0,5
CaCl <sub>2</sub> × 2H <sub>2</sub> O	0,35
Cistein hidroklorid	0,3
FeSO <sub>3</sub> × 7H <sub>2</sub> O	0,005



Pantotenat	0,1
Nikotinamid	0,05
p-aminobenzen	0,05
Tiamin	0,03
D-biotin	0,02
Menandion	0,01
Vitamin B <sub>12</sub>	0,005

3. Posljednja podloga koja se koristi za uzgoj roda *Bacteroides* i čiji će se sastojci koristiti za optimizaciju SIEM podloge kako bi održala zastupljenost koljena Bacteroidetes u *in vitro* uvjetima jest Columbia krvna hranjiva podloga (eng. *Columbia Blood Medium*) (prema DSMZ). Sastojci optimizirane podloge jesu:

SASTOJAK	KOLIČINA (g L <sup>-1</sup> )
Pepton	10,35
Škrob	61,2
NaCl	7,675
Agar	4,5
Baktopepton	23,5
Kazein	23,5
Tween 80	17,0
Amilopektin	4,7
Arabinogalaktan	4,7
Ksilan	4,7
Pektin	4,7
Žučne soli	0,35
K <sub>2</sub> PO <sub>3</sub> × 3H <sub>2</sub> O	2,5
MgO <sub>3</sub> × 7H <sub>2</sub> O	0,5
CaCl <sub>2</sub> × 2H <sub>2</sub> O	0,35
Cistein hidroklorid	0,3
FeSO <sub>3</sub> × 7H <sub>2</sub> O	0,005
Pantotenat	0,1

Nikotinamid	0,05
p-aminobenzen	0,05
Tiamin	0,03
D-biotin	0,02
Menandion	0,01
Vitamin B <sub>12</sub>	0,005

Da bi se odredila uspješnost optimizacija, sve optimizirane podloge potrebno je provjeriti prema metodama opisanim u ovom radu, te odrediti sastav mikrobiote uzgojene u *in vitro* uvjetima tijekom 72 sata uzgoja u optimiziranim hranjivim podlogama. Dodatno je potrebno provjeriti utjecaj prebiotika NUTRIOSE® FB06 na očuvanje zastupljenosti bakterijskog koljena *Bacteroidetes*. Nadalje, potrebno je odrediti koncentraciju prebiotika koja održava zastupljenost koljena *Bacteroidetes*, kao i vrijeme uzgoja unutar kojeg neće doći do porasta zastupljenosti koljena *Actinobacteria*, točnije roda *Bifidobacterium*. Ako bi testiranje optimiziranih podloga pokazalo da ne poboljšavaju rast vrsta roda *Bacteroides*, preporučuje se optimizacija SIEM podloge dodatkom spojeva koji su u dosadašnjim istraživanjima pokazali pozitivan utjecaj na rast vrsta roda *Bacteroides* – ekstrakt kvasca, žučne soli, hemin, vitamin B<sub>12</sub>.

## 5. ZAKLJUČCI

1. SIEM hranjiva podloga ne održava omjere bakterijskih koljena koji bi odgovarali njihovu početnom omjeru u crijevnoj mikrobioti.
2. Dodatak prebiotika NUTRIOSE® FB06 u koncentraciji od 15 g L<sup>-1</sup> usporava gubitak koljena *Bacteroidetes* iz humane crijevne mikrobiote tijekom *in vitro* uzgoja.
3. Predložene su optimizirane hranjive podloge na osnovi nutritivnih preferencija roda *Bacteroides* koje bi trebale poboljšati nutritivne preferencije koljena *Bacteroidetes*.
4. Optimizirane podloge potrebno je testirati kako bi se pokazala uspješnost održavanja početnog omjera bakterijskih koljena crijevne mikrobiote.

## 6. LITERATURA

1. Alexander, D. D., Cushing, C. A. (2011) Red meat and colorectal cancer: a critical summary of prospective epidemiologic studies. *Obes. Rev.* **12**, 472–493.
2. Antal, I., Jelić, M., Sila, S., Kolaček, S., Tambić Andrašević, A. (2019) Ljudska mikrobiota i mikrobiom. *Acta. Med. Croatica.* **73**, 3–11.
3. Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D. R., Fernandes, G. R., Tap, J., Bruls, T., Batto, J. M., Bertalan, M., Borruel, N., Casellas, F., Fernandez, L., Gautier, L., Hansen, T., Hattori, M., Hayashi, T., Kleerebezem, M., Kurokawa, K., Leclerc, M., Levenez, F., Manichanh, C., Nielsen, H. B., Nielsen, T., Pons, N., Poulain, J., Qin, J., Sicheritz-Ponten, T., Tims, S., Torrents, D., Ugarte, E., Zoetendal, E. G., Wang, J., Guarner, F., Pedersen, O., de Vos, W. M., Brunak, S., Doré, J., MetaHIT Consortium, Weissenbach, J., Ehrlich, S. D., Bork, P. (2011) Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature.* **473**, 174–180.
4. Bacic, M. K., Smith, C. J. (2008) Laboratory Maintenance and Cultivation of *Bacteroides* Species. *Curr. Protoc. Microbiol.* **9**, 13C.1.1–13C.1.21.
5. Backhed, F., Ley R. E., Sonnenburg, J. L., Peterson, D. A., Gordon, J. I. (2005) Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science.* **307**, 1915–1920.
6. Benjamin, J. L., Hedin, C. R. H., Koutsoumpas, A., Ng, S. C., McCarthy, N. E., Prescott, N. J., Pessoa-Lopes, P., Mathew, C. G., Sanderson, J., Hart, A. L., i sur. (2012) Smokers with active Crohn's disease have a clinically relevant dysbiosis of the gastrointestinal microbiota. *Inflamm. Bowel Dis.* **18**, 1092–1100.
7. Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L. (2013) Biokemija, 6.izd. (preveli Đurašević, I. W., Jernej, B. i Kućan, Ž.) Školska knjiga, Zagreb, str. 25–65, 303–326.
8. Beumer, R. R., de Vries, J., Rombouts, F. M. (1992) *Campylobacter jejuni* non-culturable coccoid cells. *Int. J. Food Microbiol.* **15** (1 – 2), 153–163.
9. Blanco, A., Blanco, G. (2017) Lipids. U: Medical Biochemistry, Academic Press (Versteeg-Buschman, L., ured.), London/San Diego/Cambridge/Oxford, str. 99–115.
10. Boroni Moreira, A. P., Fiche Salles Texeira, T., Barbosa Ferreira, A., do Carmo Gouveia Peluzio, M., de Cássia Gonçalves Alfenas, R.(2012) Influence of a high-fat diet on gut microbiota, intestinal permeability and metabolic endotoxaemia. *Br. J. Nutr.* **108**, 801–809.

11. Boureau, H., Hartmann, L., Karjalainen, T., Rowland, I., Wilkinson, M. H. F. (2000) Models to study colonisation and colonisation resistance. *Microb. Ecol. Health D.* **12** (2), 247–258.
12. Clarke, S. F., Murphy, E. F., O’Sullivan, O., Lucy, A. J., Humphreys, M., Hogan, A., Hayes, P., O’Reilly, M., Jeffery, I. B., Wood-Martin, R. i sur. (2014) Exercise and associated dietary extremes impact on gut microbial diversity. *Gut.* **63**, 1913–1920.
13. Conlon, M. A., Bird, A. R. (2014) The Impact of Diet and Lifestyle on Gut Microbiota and Human Health. *Nutrients.* **7**, 17–44.
14. Cuervo, A., Salazar, N., Ruas-Madiedo, P., Gueimonde, M., González, S. (2013) Fiber from a regular diet is directly associated with fecal short-chain fatty acid concentrations in the elderly. *Nutr. Res.* **33**, 811–816.
15. D’Argenio, V., Salvatore, F. (2015) The role of the gut microbiome in the healthy adult status. *Clin. Chim. Acta.* **451**, 97–102.
16. De Filippo, C., Cavalieri, D., Di Paola, M., Ramazzotti, M., Poulle, J. B., Massart, S., Collini, S., Pieraccini, G., Lionetti, P. (2010) Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Pnas.* **107**, 14691–14696.
17. Eckburg, P. B, Bik, E. M, Bernstein, C. N, Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S. R., Nelson, K. E., Relman, D. (2005) Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science.* **308**, 1635–1638.
18. Eley, A., Greenwood, D., O’Grady, F. (1985) Comparative Growth of *Bacteroides* Species in Various Anaerobic Culture Media. *J. Med. Microbiol.* **19** (2), 195–201.
19. Feria-Gervasio, D., Tottey, W., Gaci, N., Alric, M., Cardot, J. M., Peyret, P., Martin, J. F., Pujos, E., Sébédio, J. L., Brugère, J. F. (2014) Three-stage continuous culture system with a self-generated anaerobia to study the regionalized metabolism of the human gut microbiota. *J. Microbiol. Methods.* **96**, 111–118.
20. Fung, K. Y. C., Cosgrove, L., Lockett, T., Head, R., Topping, D. L. (2012) A review of the potential mechanisms for the lowering of colorectal oncogenesis by butyrate. *Br. J. Nutr.* **108**, 820–831.
21. Gill, S. R., Pop, M., DeBoy, R. T., Eckburg, P. B., Turnbaugh, P. J., Samuel, B. S., Gordon, J. I., Relman, D. A., Fraser-Liggett, C. M., Nelson, K. E. (2006)

- Metagenomic Analysis of the Human Distal Gut Microbiome. *Science*. **312** (5778), 1355–1359.
22. Goodman, A. L., Kallstrom, G., Faith, J. J., Reyes, A., Moore, A., Dantas, G., Gordon, J. I. (2011) Extensive personal human gut microbiota culture collections characterized and manipulated in gnotobiotic mice. *PNAS*. **108** (15), 6252–6257.
23. Guyton., A. C., Hall, J. E. (2012) *Medicinska fiziologija*, 12. izd. (preveli Kukolja Taradi, S. i Andres, I.) Medicinska naklada, Zagreb, str. 797–798, 807–816, 833–837.
24. Ho, P. L., Ho, L. Y., Yau, C. Y., Tong, M. K., Chow, K. H. (2017) A Novel Selective Medium for Isolation of *Bacteroides fragilis* from Clinical Specimens. *J. Clin. Microbiol.* **55** (2), 384–390.
25. Huxley, R. R., Ansary-Moghaddam, A., Clifton, P., Czernichow, S., Parr, C. L., Woodward, M. (2009) The impact of dietary and lifestyle risk factors on risk of colorectal cancer: A quantitative overview of the epidemiological evidence. *Int. J. Cancer*. **125**, 171–180.
26. Jandhyala, S. M., Talukdar, R., Subramanyam, C., Vuyyuru, H., Sasikala, M., Reddy, D. N. (2015) Role of the normal gut microbiota. *World J. Gastroenterol.* **21** (29), 8787–8803.
27. Knights, D., Ward, T. L., McKinlay, C. E., Miller, H., Gonzalez, A., McDonald, D., Knight, R. (2014) Rethinking “Enterotypes”. *Cell Host Microbe*. **16**, 433–437.
28. Krmpotić-Nemanić, J., Marušić, A. (2007) *Anatomija čovjeka*, 2.izd., Medicinska naklada, Zagreb, str. 297–349.
29. Lutgendorff, F., Akkermans, L. M. A., Soderholm, J. D. (2008) The role of microbiota and probiotics in stress-induced gastrointestinal damage. *Curr. Mol. Med.* **8**, 282–298.
30. Maathuis, A. J. H., van den Heuvel, E. G., Schoterman, M. H. C., Venema, K. (2012) Galacto-Oligosaccharides Have Prebiotic Activity in a Dynamic In Vitro Colon Model Using a <sup>13</sup>C-Labeling Technique. *J. Nutr.* **142** (7), 1205–1212.
31. Macfarlane, G. T., Macfarlane, S. (2012) Bacteria, Colonic Fermentation, and Gastrointestinal Health. *J. AOAC Int.* **95**, 50–60.
32. McCarthy, R. E., Pajeau, M., Salyers, A. A. (1988) Role of Starch as a Substrate for *Bacteroides Vulgatus* Growing in the Human Colon. *Appl. Environ. Microbiol.* **54** (8), 1911–1916.

33. Minekus, M., Smeets-Peeters, M., Bernalier, A., Marol-Bonnin, S., Havenaar, R., Marteau, P., Alric, M., Fonty, G., Huis in't Veld, J. H. J. (1999) A computer-controlled system to simulate conditions of the large intestine with peristaltic mixing, water absorption and absorption of fermentation products. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **53**, 108–114.
34. Molly, K., Woestyne, M. V., Verstraete, W. (1993) Development of a S-step multi-chamber reactor as a simulation of the human intestinal microbial ecosystem. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **39** (2), 254–258.
35. Musken, A., Bielaszewska, M., Greune, L., Schweppe, C. H., Muthing, J., Schmidt, H., Schmidt, M. A., Karch, H., Zhang, W. (2008) Anaerobic conditions promote expression of Sfp fimbriae and adherence of sorbitol-fermenting enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:NM to human intestinal epithelial cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **74** (4), 1087–1093.
36. Oliphant, K., Allen-Vercoe, E. (2019) Macronutrient metabolism by the human gut microbiome: major fermentation byproducts and their impact on host health. *Microbiome.* **7**, 1–15.
37. Oostindjer, M., Alexander, J., Amdam, G. V., Andersen, G., Bryan, N. S., Chen, D., Corpet, D. E., Smet, S., Dragsted, L. O., Haug, A., Karlsson, A. H., Kleter, G., de Kok, T. M., Kulseng, B., Milkowski, A. L., Martin, R. J., Pajari, A. M., Paulsen, J. E., Pickova, J., Rudi, K., Sødring, M., Weed, D. L., Egelanddal, B. (2014) The role of red and processed meat in colorectal cancer development: a perspective. *Meat Science.* **97** (4), 583–596.
38. Ou, J., DeLany, J. P., Zhang, M., Sharma, S., O’Keefe, S. J. D. (2012): Association Between Low Colonic Short-Chain Fatty Acids and High Bile Acids in High Colon Cancer Risk Populations. *Nutr. Cancer.* **64** (1), 34–40.
39. Polzin, S., Huber, C., Eylert, E., Elsenhans, I., Eisenreich, W., Schmidt, H. (2013) Growth Media Simulating Ileal and Colonic Environments Affect the Intracellular Proteome and Carbon Fluxes of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Strain EDL933. *Appl. Environ. Microbiol.* **79** (12), 3703–3715.
40. Rehman, A., Heinsen, F. A., Koenen, M. E., Venema, K., Knecht, H., Hellmig, S., Schreiber, S., Ott, S. J. (2012) Effects of probiotics and antibiotics on the intestinal homeostasis in a computer controlled model of the large intestine. *BMC Microbiol.* **12**, 47–57.

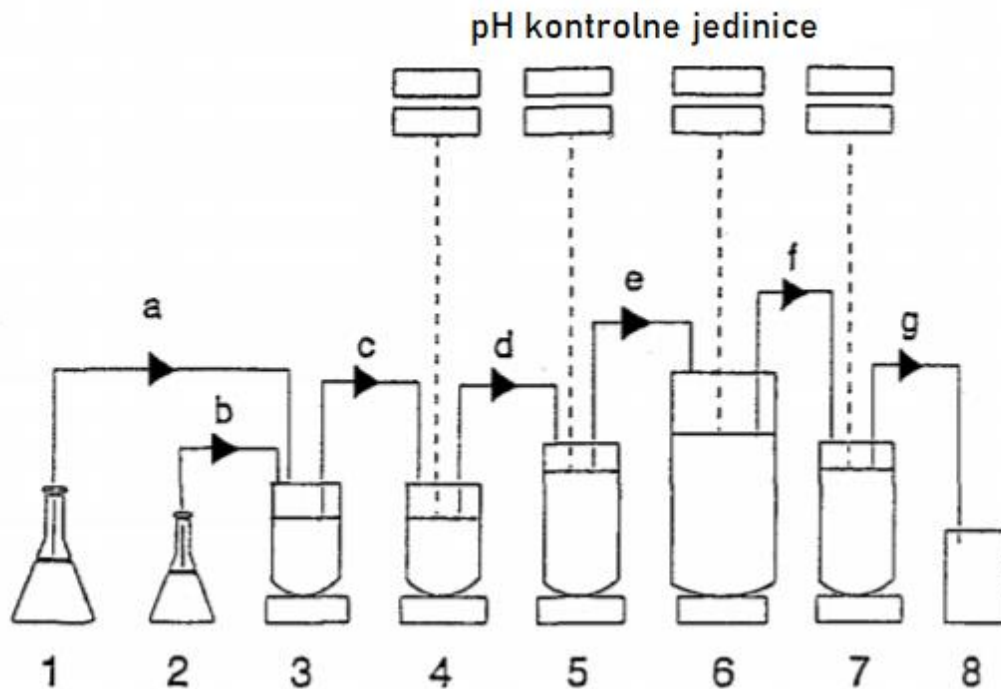
41. Riaz Rajoka M. S., Shi, J., Mehwish, H. M., Zhu, J., Li, Q., Shao, D., Huang, Q., Yang, H. (2017) Interaction between diet composition and gut microbiota and its impact on gastrointestinal tract health. *Food Sci. Hum. Well.* **6**, 121–130.
42. Richardson, A. J., McKain, N., Wallace, R. J. (2013) Ammonia production by human faecal bacteria, and the enumeration, isolation and characterization of bacteria capable of growth on peptides and amino acids. *BMC Microbiol.* **13**, 1–8.
43. Ridlon, J. M., Kang, D. J., Hylemon, P. B. (2006) Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *J. Lipid Res.* **47**, 241–259.
44. Rinninella, E., Raoul, P., Cintoni, M., Franceschi, F., Miggiano, G. A. D., Gasbarrini, A., Mele, M. C. (2019) What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms.* **7** (1): 14, 1–22.
45. Sartor, R. B. (2008) Microbial Influences in Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology.* **134**, 577–594.
46. Savage, D. C. (1977) Microbial Ecology of the Gastrointestinal Tract. *Annu. Rev. Microbiol.* **31**, 107–133.
47. Sáyago-Ayerdi, S. G., Zamora-Gasga, V. M., Venema, K. (2019) Prebiotic effect of predigested mango peel on gut microbiota assessed in a dynamic in vitro model of the human colon (TIM-2). *Food Res. Int.* **118**, 89–95.
48. Sender, R., Fuchs, S., Milo, R. (2016) Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol.* **14** (8), 1–14.
49. Silvester, K. R., Cummings, J. H. (1995) Does digestibility of meat protein help explain large bowel cancer risk? *Nutr Cancer.* **24**(3), 279–288.
50. Stephen, A. M., Cummings, J. H. (1980) Mechanism of Action of Dietary Fibre in the Human Colon. *Nature.* **284** (5753), 283–284.
51. Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Hamady, M., Fraser-Liggett, C. M., Knight, R. i sur. (2007) The human microbiome project. *Nature.* **449**, 804–810.
52. van Nuenen, M., Meyer, P. D., Venema, K. (2003) The effect of various inulins and *Clostridium difficile* on the metabolic activity of the human colonic microbiota in vitro. *Microb. Ecol. Health Dis.* **15**, 137–144.
53. Venema, K. (2015) The TNO In Vitro Model of the Colon (TIM-2). U: The Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models, Springer ( Verhoeckx, K.,



- Cotter, P., López-Expósito, I., Kleiveland, C., Lea, T., Mackie, A., Requena, T., Swiatecka, D., Wichers, H., ured.), Cham/Heidelberg/New York/Dordrecht/ London, str. 293–304.
54. Voigt, R. M., Forsyth, C. B., Green, S. J., Mutlu, E., Engen, P., i sur. (2014) Circadian Disorganization Alters Intestinal Microbiota. *PLoS ONE*. **9** (5), 1–17.
55. Wexler, H. M. (2007) *Bacteroides*: the Good, the Bad, and the Nitty-Gritty. *Clin. Microbiol Rev.* **20** (4), 593–621.
56. Williams, C. F., Walton, G. E., Jiang, L., Plummer, S., Garaiova, I., Gibson, G. R. (2015) Comparative analysis of intestinal tract models. *Annu. Rev. Food. Sci. Technol.* **6**, 329–350.
57. Windey, K., De Preter, V., Verbeke, K. (2012) Relevance of protein fermentation to gut health. *Mol. Nutr. Food Res.* **56**, 184–196.
58. Wu, G. D., Chen, J., Hoffmann, C., Bittinger, K., Chen, Y. Y., Keilbaugh, S. A., Bewtra, M., Knights, D., Walters, W. A., Knight, R., Sinha, R., Gilroy, E., Gupta, K., Baldassano, R., Nessel, L., Li, H., Bushman, F. D., Lewis, J. D. (2011). Linking Long-Term Dietary Patterns with Gut Microbial Enterotypes. *Science*. **334**, 105–108.

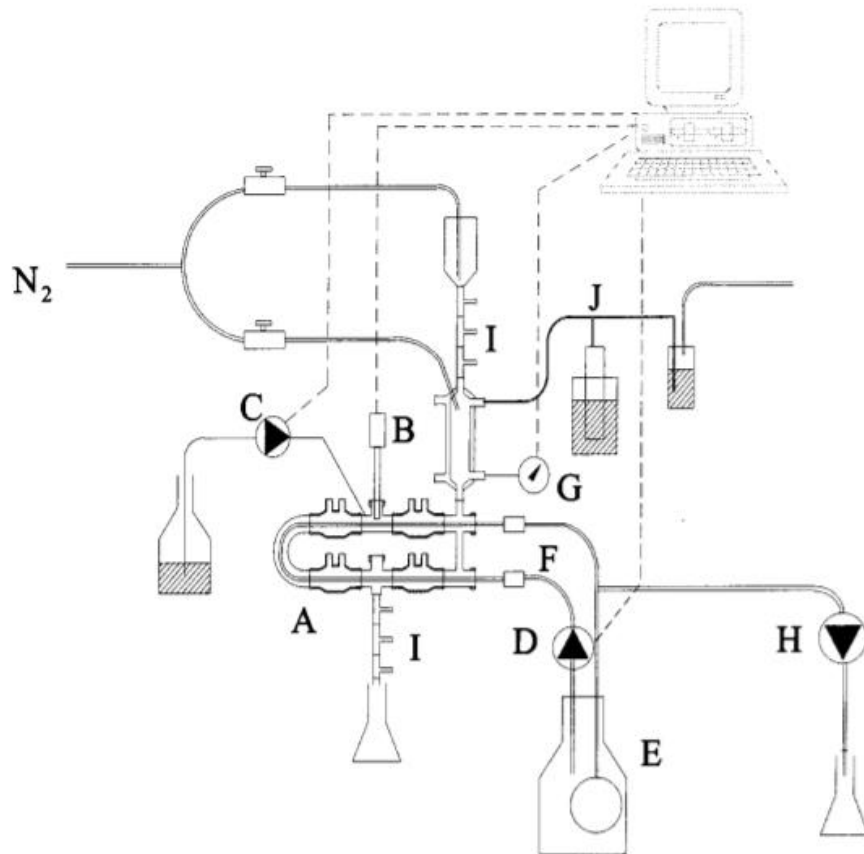
## 7. PRILOZI

**Prilog 1.** SHIME reaktor- *Simulated human intestinal microbial ecosystem*, kojeg su konstruirali Molly i sur., 1993. godine (Molly i sur., 1993)



1. prehrana, 2. gušteračin aceton u prahu, 3. reaktor 1 (duodenum i jejunum), 4. reaktor 2 (ileum), 5. reaktor 3 (slijepo crijevo i uzlazno debelo crijevo), 6. reaktor 4 (poprečno debelo crijevo), 7. reaktor 5 (silazno debelo crijevo), 8. otpadni produkti, pumpe a-d radile su polukontinuirano, pumpe e-g radile su kontinuirano

**Prilog 2.** TIM-2 in vitro model- *The TNO Gastro-Intestinal Model* (Minekus i sur., 1999)



A- jedinice za miješanje, B- pH elektroda, C- alkalna pumpa, D- dijalizna pumpa, E- dijalizno svjetlo, F- dijalizni krug sa šupljim vlaknima, G- senzor razine, H- pumpa za apsorpciju vode, I- peristaltička pumpa s ventilom, J- izlaz za plin s bravom za vodu

**Prilog 3.** Sastav SCEM hranjive podloge prema Musken i sur. (2008)

SASTOJAK	KOLIČINA (g L <sup>-1</sup> )
Baktotripton	6,25
D-glukoza	2,6
NaCl	0,88
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,43
NaHCO <sub>3</sub>	1,7
Žučne soli	4,0
KHCO <sub>3</sub>	2,7

**Prilog 4.** Sastav GMM podloge za *in vitro* uzgoj

SASTOJAK	KOLIČINA/L	KONCENTRACIJA
Tripton Pepton	2 g	0,2 %
Ekstrakt kvasca	1 g	0,1 %
D-glukoza	0,4 g	2,2 mM
L-cistein	0,5 g	3,2 mM
Celobioza	1 g	2,9 mM
Maltoza	1 g	2,8 mM
Fruktoza	1 g	2,2 mM
Mesni ekstrakt	5 g	0,5 %
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	100 mL	100 mM
MgSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	0,002 g	0,008 mM
NaHCO <sub>3</sub>	0,4 g	4,8 mM
NaCl <sub>2</sub>	0,08 g	1,37 mM
CaCl <sub>2</sub>	1 mL	0,80 %
Vitamin K (menadion)	1 mL	5,8 mM
FeSO <sub>4</sub>	1 mL	1,44 mM
Histidin Hematin otopina	1 mL	0,1 %
Tween 80	2 mL	0,05 %
ATCC Vitamin Mix	10 mL	1 %
ATCC Mix Minerali u tragovima	10 mL	1 %
Octena kiselina	1,7 mL	30 mM
Izovalerijanska kiselina	0,1 mL	1 mM
Propionska kiselina	2 mL	8 mM
Butirična kiselina	2 mL	4 mM
Resazurin	4 mL	4 mM
Noble Agar	12 g	1,2 %

## IZJAVA O IZVORNOSTI

Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onima koji su u njemu navedeni.

---

Sanja Galić