

# Simulacija humanog gastrointestinalnog trakta pomoću "in vitro" kemostatskih i "in vitro" kontinuiranih modela

---

Jukić, Stjepan

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

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:159:508497>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom](#).

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-14**



Repository / Repozitorij:

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



**Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski studij Biotehnologija**

**Stjepan Jukić**  
6772/BT

**SIMULACIJA HUMANOG GASTROINTESTINALNOG  
TRAKTA POMOĆU „IN VITRO“ KEMOSTATSKIH I  
„IN VITRO“ KONTINUIRANIH MODELA**

**ZAVRŠNI RAD**

**Modul: Biotehnologija 4**  
**Mentor: Prof. dr. sc. Jagoda Šušković**

**Zagreb, 2016.**

## DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski studij Biotehnologija  
Zavod za biokemijsko inženjerstvo  
Laboratorij za tehnologiju antibiotika,  
enzima, probiotika i starter kultura

### SIMULACIJA HUMANOG GASTROINTESTINALNOG TRAKTA POMOĆU „IN VITRO“ KEMOSTATSKIH I „IN VITRO“ KONTINUIRANIH MODELA

*Stjepan Jukić 6772/BT*

**Sažetak:** Razvoj mikrobiologije, biokemije, biotehnologije te molekularnih i genetičkih metoda, doveo je do povećanog istraživanja utjecaja mikroorganizama na razne procese. Od proizvodnje hrane i pića, proizvodnje bioloških goriva, razgradnje polimera, pa sve do proizvodnje antibiotika. Jedno od interesnih područja je postalo i ljudsko tijelo, odnosno kako mikroorganizmi koji se nalaze u ljudskom probavnom sustavu, utječu na procese koji se tamo odvijaju, te kakvu interakciju imaju sa domaćinom. Budući da nije etički prihvatljivo provoditi takva istraživanja na ljudima, i da je taj proces tehnički zahtjevan, razvijeni su „in vitro“ modeli probavnog sustava. Različiti modeli imaju različite funkcije samim time su pogodniji za istraživanje procesa, u različitim regijama gastrointestinalnog trakta.

Cilj ovog rada je predstaviti te pet modela od kojih su tri kemostatskog tipa (Enteromix<sup>®</sup>, Reading i SHIME), dok su tri nekemostatski kontinuirani modeli (TIM 1 i TIM 2). Objasniti ćemo na koji način pojedini model funkcionira, te ih na kraju usporediti.

**Ključne riječi:** Reading, SHIME, Enteromix, Kemostat

**Rad sadrži:** 22 stranica, 8 slika, 1 tablica, 21 literaturnih navoda.

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** Prof. dr. sc. Jagoda Šušković

**Rad predan:** svibanj, 2016.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Final work

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
Undergraduate studies Biotechnology  
Department of Biochemical Engineering  
Laboratory for Antibiotics, Enzymes, Probiotics and Starter Cultures Technology

### SIMULATION OF HUMAN GASTROINTESTINAL TRACT BY „IN VITRO“ CHEMOSTATIC AND „IN VITRO“ CONTINUOUS MODELS

*Stjepan Jukić 6772/BT*

**Abstract:** The development of microbiology, biochemistry, biotechnology and molecular and genetic methods, has led to increased research of the influence of microorganisms on various processes, from food and beverages production, production of bio-fuels, polymer degradation, to the production of antibiotics. One of the areas of interest is also the human body. Particularly how microorganisms in the human digestive system affect the processes that take place there, and how they interact with the host. Since it is not ethically acceptable to conduct such studies in humans, and because the process is technically demanding, "in vitro" models of the digestive system have been developed. Different models have specific functions and thus are more suitable for the study of processes, in certain part of gastrointestinal tract. The aim of this paper is to present five models of which three are chemostat type (Enteromix®, Reading and SHIME), while the other two have non-chemostat continuous model (TIM 1 and TIM 2). We will explain how a particular model works, and then compare them.

**Keywords:** Reading, SHIME, Enteromix, Chemostat

**Thesis contains:** 22 pages, 8 figures, 1 tables, 21 references.

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** *PhD Jagoda Šušković, Full Professor*

**Thesis delivered:** May, 2016

## **SADRŽAJ**

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>TEORIJSKI DIO.....</b>	<b>1</b>
<b>2.HUMANI INTESTINALNI TRAKT .....</b>	<b>2</b>
2.1 DIJELOVI PROBAVNOG SUSTAVA .....	3
2.2 ULOGA PROBAVNOG SUSTAVA.....	7
<b>3. FERMENTACIJA I FERMENTORI.....</b>	<b>7</b>
3.1 FERMENTACIJA .....	7
3.2 KEMOSTAT .....	8
<b>4. HUMANI INTESTINALNI TRAKT KAO KONTINUIRANI BIOREAKTOR.....</b>	<b>9</b>
<b>5.TIPOVI „IN VITRO“ GASTROINTESTINALNIH MODELA.....</b>	<b>11</b>
<b>6. „IN VITRO“ KEMOSTATSKI MODELI LJUDSKOG GASTROINTESTINALNOG TRAKTA.....</b>	<b>12</b>
6.1. READING MODEL .....	13
6.2. SHIME MODEL .....	14
6.3. ENTEROMIX® MODEL.....	15
6.4. OSTALI SIMULATORI .....	16
<b>7. „IN VITRO“ KONTINUIRANI MODELI GASTROINTESTINALNOG TRAKTA</b>	<b>17</b>
7.1. SUSTAV TIM 1 .....	17
7.2 SUSTAV TIM 2 .....	19
<b>8.ZAKLJUČAK.....</b>	<b>20</b>
<b>LITERATURA .....</b>	<b>21</b>

## **1. UVOD**

Crijevna mikrobiota u čovjeka nikada nije bila tako intenzivno proučavana kao danas. Tijekom prošlog desetljeća, korištenje molekularnih metoda, osobito onih koje se temelje na 16S ribosomalnoj RNA, donijelo je puno novih spoznaja o sastavu crijevne mikrobiote u ljudi, ali i u životinja. Lako dostupan fekalni uzorak je glavni izvor crijevne mikrobiote korištene za razne analize. Nije sigurno koliko pouzdano fekalni uzorci prikazuju sastav mikrobiote u proksimalnom debelom crijevu, ali je sigurno puno drugačiji od sastava u tankom crijevu. Kako bi proučili mikrobnu aktivnost i njezin sastav u ovim dijelovima probavnog sustava, potrebni su „in vivo“ uzorci iz velikog broja zdravih pojedinaca. Budući da je etički neprihvatljivo takvo invazivno uzimanje uzoraka od ljudi, mogu se koristiti životinjski uzorci, ali oni zbog drukčije fiziologije imaju i drukčiji sastav crijevne mikrobiote. Stoga „in vitro“ metode upotpunjuju životinjske studije i pružaju sredstva za testiranje specifičnih hipoteza u kontroliranim uvjetima, koji se mogu i replicirati, bez da se koriste životinjske studije ili kliničko uzorkovanje. „In vitro“ modelima moguće je simulirati uvjete u ljudskoj oralnoj šupljini, želucu, dvanaesniku, jejunumu, ileumu i uzlaznom, transverzalnom i izlaznom debelom crijevu.

Kako bi se bolje razumjeli sami modeli koji se koriste za simulaciju ljudskog gastrointestinalnog trakta, potrebno je upoznati pojedine dijelove probavnog trakta. Također će se definirati fermentacija i fermentori pri čemu će se poseban fokus biti na kemostatskim i kontinuiranim bioreaktorima, jer su modeli, koje će se obraditi u ovom radu, upravo tog tipa. Definirati će se pet modela, od kojih su Reading, SHIME i EnteroMix<sup>®</sup> kemostatski modeli, a TIM1 i TIM 2 kontinuirani modeli. Objasniti će se princip rada svakog od tih modela, napraviti kratku usporedbu te napisati neke prednosti i nedostatke „in vitro“ načina proučavanja djelovanja mikrobiote u ljudskom probavnom sustavu.

**TEORIJSKI DIO**

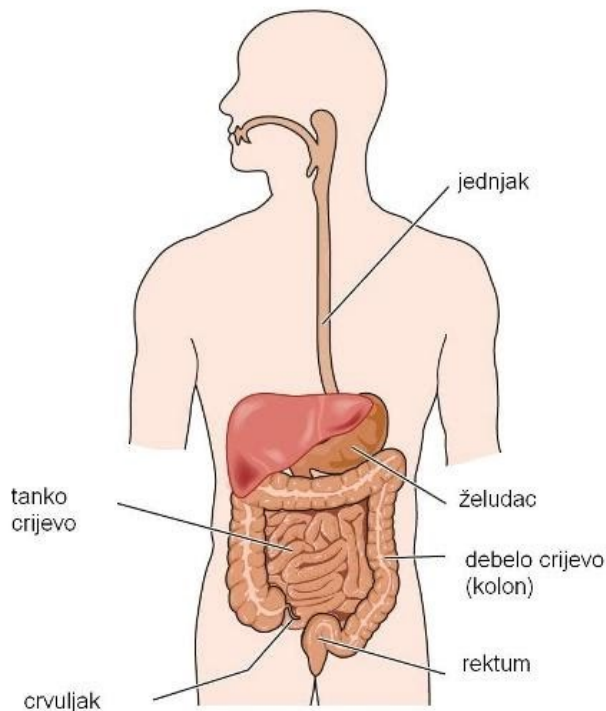


## 2.HUMANI INTESTINALNI TRAKT

Probava je proces koji se događa u probavnom sustavu, a uloga probavnog sustava je mehanička i kemijska razgradnja hrane, apsorpcija hranjivih sastojaka u krvni i limfni optok te defekacija. Kroz probavu, ljudski organizam dobiva energiju koja se oslobađa razgradnjom nutrijenata. Nutrijenti i energija iz hrane su potrebni za normalno funkcioniranje organizma i njegovu izgradnju.

Probava počinje u ustima, gdje se hrana unosi, žvače i usitnjava. Pri žvakanju se oslobađa slina koja vlaži hranu i svojim enzimima započinje razgradnju ugljikohidrata. Hrana gutanjem odlazi u jednjak koji povezuje usta i želudac. U želucu se događa najveća razgradnja, uz pomoć želučanih sokova (*želučane kiseline*) koji razgrađuju bjelančevine. Razgrađena, hrana poprima tekuću formu i odlazi u tanko crijevo gdje se obavlja završna enzimska razgradnja i apsorpcija nutrijenata. Probavni enzimi iz jetre (*žuč*) i gušterače se izlučuju u tanko crijevo i pomažu u razgradnji masti (*jetra*), ugljikohidrata i bjelančevina (*gušterača*). Osim dugih probavnih crijeva i probavnih organa, u procesu probave sudjeluju i veće probavne žlijezde koje izlučuju svoje sekrete. Na tanko crijevo se nadovezuje debelo crijevo. U njemu se reapsorbiraju mineralne tvari i voda, a bakterijska fermentacija oblikuje stolicu. Vrijeme potrebno za prolaz hrane kroz „probavnu cijev“ je oko 24 do 48 sati. Stolica se izbacuje iz probavnog trakta kroz analni otvor i time završava proces probave. Potrebne tvari resorbirane iz crijeva putuju krvotokom po cijelom tijelu, dolaze do stanica, gdje se iskorištavaju za energiju i druge procese. (Krpmotić - Nemanić i Marušić, 2011)

## 2.1 DIJELOVI PROBAVNOG SUSTAVA



**Slika 1: Dijelovi probavnog sustava čovjeka (Juričić, 2012)**

Ljudski probavni sustav se sastoji od probavne cijevi, pratećih probavnih organa i probavnih žlijezda. Probavnu cijev čine: usna šupljina, ždrijelo, jednjak, želudac, tanko crijevo, debelo crijevo i crijevni otvor, anus. Pomoćni probavni organi su zubi, jezik, a probavne žlijezde gušterača, jetra, koje svoje probavne sokove luče u dvanaesnik i žlijezde slinovnice. Na spoju tankog i debeloga crijeva nalazi se slijepo crijevo s nastavkom crvuljkom. Hrana se u probavnom sustavu mijenja mehanički i kemijski. Dijelove probavnog sustava štite i podmazuju serozne opne.

- **Usta**

Ljudska probava započinje u ustima primanjem hrane. U ustima se stvara zalogaj uz pomoć djelovanja zubiju, jezika i sline. Zubi imaju ulogu žvakanja i najčvršće su kosti u tijelu. Odraslo zubalo ima 32 zuba - 16 na svakoj vilici. Oni su podijeljeni u 4 skupine: 8 sjekutića, 4 očnjaka, 8 pretkutnjaka i 12 kutnjaka. Prednji zubi, sjekutići i očnjaci, služe za kidanje i pridržavanje hrane, pa su zbog toga oštiri i šiljastiji od stražnjih zuba. Stražnji zubi, pretkutnjaci i kutnjaci stišću i melju hranu kako bi se ona raspala u manje komade. Nakon što

zubi prožvaču i usitne hranu, jezik je prevrće, te se aktiviraju žlijezde slinovnice koje imaju ulogu proizvodnje sline. Tri su para žlijezda slinovnica - podvilične, podušne i podjezične žlijezde. Izlučuju enzim ptijalin, koji u ustima razgrađuje škrob na maltozu i glukozu. U ustima se slinom razgradi do 70% škroba. Slina ovlažuje hranu kako bi se mogla lakše progutati te zbog nje jezik može osjetiti njen okus. Lučenje sline se ne može kontrolirati zato što je refleksivna reakcija, a dnevno se izluči približno 1 i 1,5 litre sline. Jezikom se zalogaj nakon žvakanja potisne u ždrijelo i dolazi do refleksne pojave gutanja. (Krmptić - Nemanić i Marušić, 2011)

- **Ždrijelo**

Hrana pri gutanju prolazi kroz ždrijelo do jednjaka. Tijekom prolaska hrane elastični poklopac, epiglotis, spriječava odlazak hrane u dušnik, a disanje je zbog toga onemogućeno. Hrana do jednjaka prolazi naizmjeničnim stezanjem i otpuštanjem mišićne stijenke ždrijela.

- **Jednjak**

Jednjak je cijev duga oko 25 cm koja povezuje probavni sustav od ždrijela do želuca. Hrana putuje pomoću stezanja mišića valovito kako bi prošla kroz cijelu probavnu cijev. Proces peristaltike u probavnoj cijevi ponavlja se više puta. Na kraju jednjaka se nalazi sfinkter, prstenasti mišić koji spriječava povratak hrane iz želuca u jednjak. Prilikom prolaska hrane kroz jednjak se opušta kako bi zalogaj ušao u želudac, a nakon toga se steže i time spriječava regurgitaciju.

- **Želudac**

Želudac priprema hranu za daljnju preradu u tankom crijevu. Nalik je vrećici te se u njemu može pohraniti velika količina hrane te na neki način služi kao spremnik hrane (tj. energije). Obujam praznog želuca odrasle osobe je oko pola litre, dok je punog oko 1,5 litara. U stijenci želuca se nalazi sloj glatkih mišića koji stežu i time melju hranu, pretvarajući ju u himus (smjesa slična kaši). U stijenci se nalaze i brojne žlijezde koje izlučuju probavne sokove i sluz. Obložne žlijezde luče kloridnu kiselinu, na što ih potiče hormon gastrin. Kloridna kiselina i enzim pepsin razgrađuju hranu u želucu. Unutarnja stijenka želuca se zaštićuje lučenjem zaštitnog sloja sluzi (luče ga vrčaste žlijezde), debljine do jednog milimetra, kako ju

želučana kiselina nebi oštetila. Enzim pepsin služi za degradaciju bjelančevina u peptide, klorovodična kiselina razgrađuje masti, a želučana sluz ju razrijeđuje kako ne bi oštetila stijenku želuca. Relativna pH vrijednost želučane kiseline iznosi manje od 2.

Uz enzime za razgranju bjelančevina, u želucu se izlučuje i lipaze (*enzimi za razgradnju masti*), ali u manjoj mjeri. Lipaze nema velikog ustjecana ja razgradnju masti, jer se ona razgrađuje u tankom crijevu. Hrana u želucu mora biti tekuća, a krute tvari biti usitnjene na veličinu do 2 milimetra. Nakon probave u želucu, himus putuje u dvanaesnik (*početni dio tankog crijeva*). Na njegovom ulazu se nalazi prstenasti mišić (*piloritični sfinkter*) koji sprječava prolazak hrane prije nego što se probavi u želucu.

Prilikom prelaska himusa iz želuca u tanko crijevo, potrebno je neutralizirati kiselinu iz želuca kako nebi oštetila stijenke tankog crijeva. Uz neutraliziranje, potrebna je razgradnja makromolekula (*bjelančevina, masti i ugljikohidrata*) u manje molekule kako bi mogle ući u krvotok. U ovom procesu je važna gušterača, koja u svojim sokovima sadrži bikarbonatne ione. Oni neutraliziraju kiseli himus. Enzimi proteaze, koje gušterača izlučuje u neaktivnoj formi, razgrađuju bjelančevine. Proteaze postaju aktivne tek kada uđu u tanko crijevo. Gušterača izlučuje i ostale enzime kao pankreasnu lipazu, ribonukleazu, deoksiribonukleazu, želatinazu i elastazu koji pomažu u razgradnji triglicerida u glicerol i masne kiseline, škrob i glikogen do disaharida itd. Probavni sokovi gušterače se spajaju kanalima žučovoda i zajedno s poluprobavljenom hranom iz želuca se ulijevaju u dvanaesnik kroz tanki otvor *papilu vateri*. (Krmpotić - Nemanić i Marušić, 2011)

- **Tanko crijevo**

Tanko crijevo je najdulji dio probavnog sustava. Sadržaj kroz njega prolazi oko pet sati, a ovisi o hrani koju smo pojeli. Kroz tanko crijevo hrana ponovno putuje valovitim stezanjem mišića - peristaltikom. U njemu se odvijaju završne faze probave. Površina za apsorpciju iznosi oko 300 m<sup>2</sup>, a dobije se zbog crijevnih resica. Kada bi se tanko crijevo promatralo kao obična cijev, njegova površina bi iznosila 19 m<sup>2</sup>. Početni dio cijevi je prekriven sluzi, slično kao u želucu. U ostatku crijeva su također smještene žlijezde koje luče sluz, ali je njena količina manja od one u želucu. U debelom crijevu se probavljena hrana pretvara u tekućinu i odlazi u krv. Jednostavnije tvari se apsorbiraju u crijevnim resicama i odmah ulaze u krv (npr. glukoza i aminokiseline), dok one složenije (masne kiseline i glicerol) prvo prelaze u limfu i onda naknadno limfotokom u krvotok. Iz tankog se crijeva probava nastavlja na debelo crijevo.

Tanko crijevo se sastoji od tri dijela:

1. dvanaesnika (duodenuma), duljine do 25 cm, u koga se ulijevaju probavni sokovi jetre i gušterače
2. jejunuma, duljine 2-8 m, u kojemu se dovršava razgradnja hrane
3. ileuma, duljine oko 4 m, u kojemu se razgrađeni sastojci hrane upijaju u krv

- **Debelo crijevo**

U debelom crijevu se odvija zadnja faza probave. Po obujmu je veće od tankog, ali je trostruko kraće. Dijeli se na slijepo crijevo, obodno (uzlazno, poprečno i silazno), ravno te anus. Otpadne tvari iz debelog crijeva prelaze u njegov završni dio, a to je anus (*crijevni otvor*) kroz koji se redovito izbacuju izmetine (lat. *feces*). U debelom crijevu se vrši uglavnom resorpcija vode (*do 1,5 l/danu*) i minerala, a mikrobi razgrađuju, za čovjeka, neprobavljivu hranu. Uloga debelog crijeva je formiranje, pohrana i otpuštanje stolice. Te tvari se u njemu zadržavaju 12 do 24 sata. U stijenci debelog crijeva se nalaze snažni mišići koji omogućavaju jače kontrakcije crijeva, kako bi njezin zadržaj kontrolirano izašao kroz anus.

U izmetu se nalazi oko 75% vode i 25 % krutih tvari (*većinom bakterije, vlakna i neprobavljive tvari*). Izmet ima karakterističan miris zbog plinova koji su rezultat bakterijskog metabolizma.

- **Gušterača i jetra**

Gušterača je i probavna žlijezda s unutarnjim i vanjskim lučenjem. Sok joj je lužnat i neutralizira kiselinu nastalu u želucu. Enzimi gušterače sudjeluju u kemijskoj razgradnji hrane do molekula koje se mogu upiti u krv.

U jetri se odvijaju stotine kemijskih reakcija i pohranjuju životno važni kemijski spojevi poput vitamina i glikogena. Ona je najveća žlijezda u čovječjem organizmu te oslobađa i uskladištava hranjive tvari, a neutralizira štetne. Kako bi iz crijeva hranjive tvari dospjele u krv moraju se prilagoditi u jetri. Jetra također proizvodi žuč koja se pohranjuje u žučnom mjehuru i potpomaže probavu masti.

## 2.2 ULOGA PROBAVNOG SUSTAVA

Osnovna uloga probavnog sustava je priprema hrane za staničnu upotrebu. Sustav razgrađuje velike molekule iz unesene hrane, koje zbog svoje veličine ne bi mogle ući u krvotok. Manje i jednostavnije molekule nastale nakon razgradnje mogu proći kroz stijenku probavne cijevi i ući u krvotok uz pomoć kojeg dopijevaju do svake stanice u tijelu. Probavni sustav nas štiti od štetnih i nepotrebnih tvari koje unesemo u usta, izbacujući te tvari kroz rektum. U tijelu se probavni sustav proteže kroz cijeli trup, nadovezujući probavne organe jedan na drugi, od usta i vrata do prsne i trbušne šupljine i na kraju do analnog otvora. (Krmptić - Nemanić i Marušić, 2011)

## 3. FERMENTACIJA I FERMENTORI

### 3.1 FERMENTACIJA

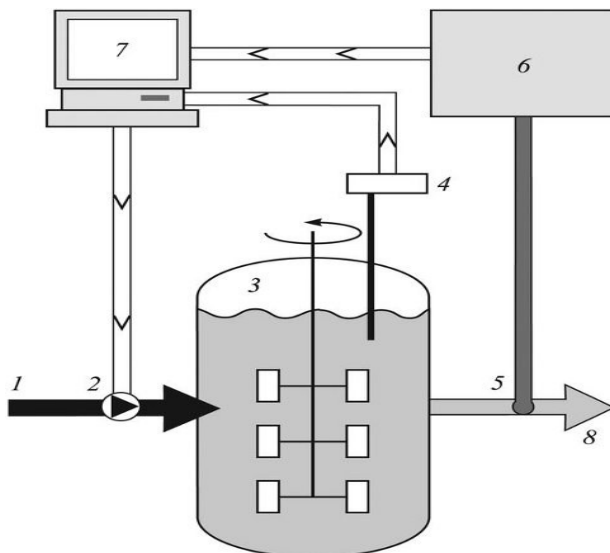
Fermentacija (lat. *fermentum*) je proces u kojem dolazi do pretvaranja određenih organskih spojeva putem djelovanja enzima. U biotehnologiji se fermentacija koristi u kontroliranim uvjetima. To se postiže, bilo dodavanjem neophodnih enzima ili dodavanjem bakterija, gljivica i drugih bioloških staničnih kultura, čijim djelovanjem dolazi do fermentacije u okvirima njihove enzimski potaknute razmjene materija, metabolizma. Jednim dijelom, ovi mikroorganizmi su prirodno potaknuti na djelovanje, što se naziva spontana fermentacija. U industriji se, za tu svrhu, koriste umjetno uzgojene čiste kulture mikroorganizama, da bi se lakše kontrolirao proces fermentacije i da bi se izbjegli neželjeni sporedni proizvodi. Prvobitno su se pod pojmom fermentacija podrazumijevale anaerobne biološke reakcije.

Danas fermentacija obuhvaća određene tehničke bioreakcije. Tako se naprimjer uz pomoć mikroorganizama sintetiziraju medicinski proizvodi poput inzulina, hijaluronske kiseline, streptokinaze i brojnih antibiotika, poput penicilina, u velikim količinama, unutar bioreaktora. Za niz biotehnoloških procesa, koji se odvijaju u aerobnim uvjetima (kao što je npr. gore navedena proizvodnja antibiotika), koristi se naziv „Biosinteza“, a za reaktore u kojima se ti procesi odvijaju „Bioreaktori“ (Šušćković, 2014). Mikroorganizmi su sposobni sintetizirati određene spojeve koji se na uobičajeni način, putem kemijskih reakcija, vrlo teško dobivaju. (Marić i Šantek, 2009)

Fermentacija se može odvijati u šaržnom, šaržnom procesu s pritokom supstrata, polukontinuiranom i kontinuiranom procesu. U šaržnim procesima se niz operacija odvija u

nekom vremenskom periodu na odvojenom, pojedinom predmetu ili grupi materijala. Nakon što u bioreaktor dodamo određeni volumen hranjive podloge i nacjepimo ga radnim mikroorganizmom, bioreaktor se zatvara i proces traje dok mikroorganizmi ne potroše sve hranjive sastojke iz hranjive podloge. Mikroorganizmi prolaze i lag i eksponencijalnu i stacionarnu fazu rasta. U kontinuiranim procesima se u dobro miješanu mikrobnu kulturu, kontinuirano dovodi hranjiva podloga, uz istovremeno odvođenje jednakog dijela iskorištene podloge, koja sadrži mikrobne stanice i proizvode metabolizma. Ovakav način rasta mikroorganizama, može se vidjeti u prirodnim vodotocima, kao i u probavnom traktu ljudi i životinja. U kontinuiranom uzgoju, mikroorganizmi se stalno održavaju u eksponencionalnoj fazi rasta. Reaktor za kontinuirani uzgoj, naziva se kemostat.

### 3.2 KEMOSTAT

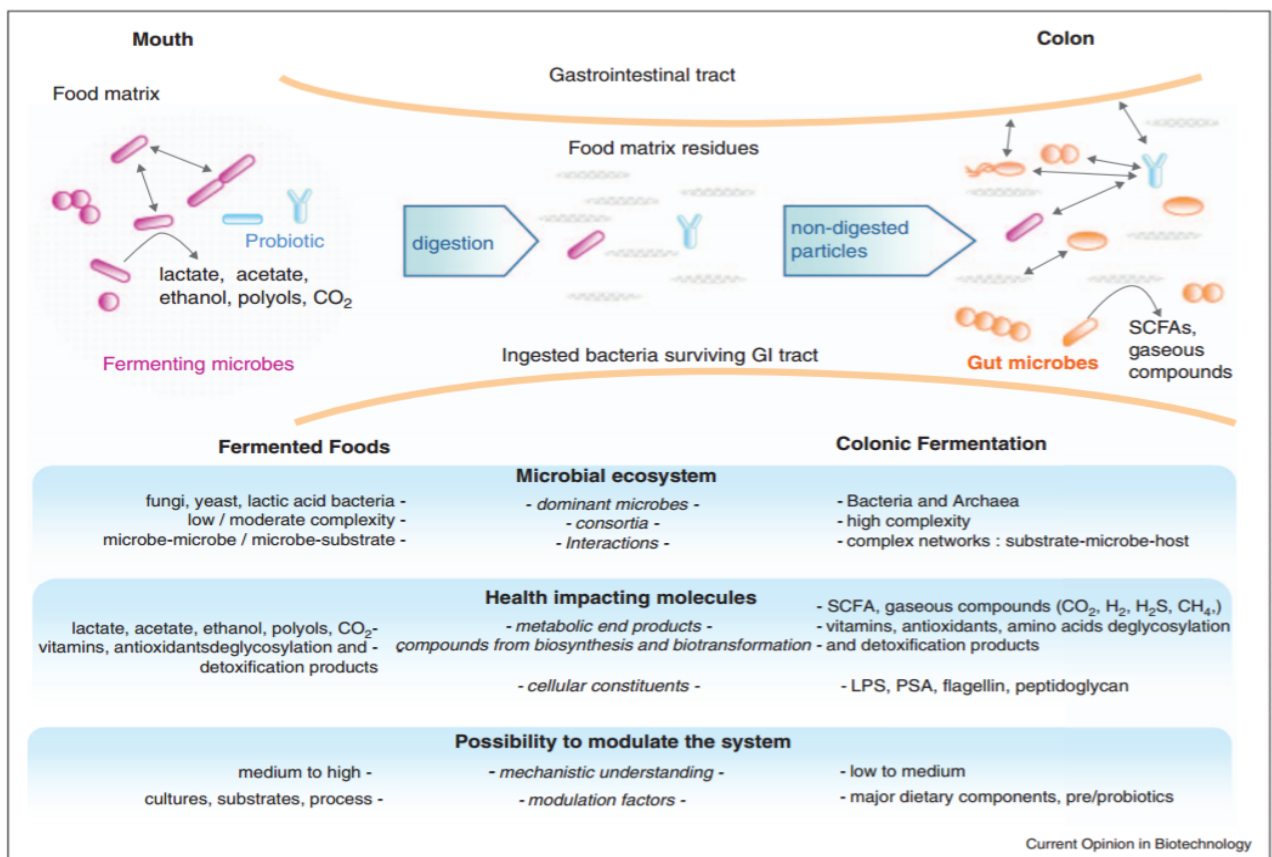


**Slika 2: KEMOSTAT** - 1. ulaz supstrata, 2. pumpe i ventili, 3. bioreaktor, 4. osjetnik, 5. uzimanje uzorka, 6. izravna kontinuirana analiza, 7. računalo, 8. Proizvod (<http://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=31175>, 22. Svibanj 2016).

Kemostat je bioreaktor za kontinuirani uzgoj mikroorganizama ili organizamskih stanica u kontinuiranom, idealno miješanom bioreaktoru u kojem se stabilno ustaljeno stanje samoupravljivo ostvaruje ograničavanjem rasta stanica, odnosno stanične biomase, s pomoću hranjive podloge koja sadrži granični supstrat. Granični je supstrat ona hranjiva tvar u hranjivoj podlozi koja ograničuje rast (jer su sve druge hranjive tvari dodane u podlogu u suvišku), a to može biti bilo koji kemijski spoj ili element bitan za rast radnog mikroorganizma. Zbog toga se brzina rasta u kemostatu regulira brzinom dotoka hranjive

podloge u bioreaktor. Brzinom razrjeđenja, tj. omjerom brzine dotoka hranjive podloge i volumena kulture u bioreaktoru, unaprijed se odabiru uvjeti rasta organizma, odnosno njegova specifična brzina rasta. Do kritične brzine razrjeđivanja, koja je teorijski jednaka maksimalnoj specifičnoj brzini rasta, moguća je uspostava niza ustaljenih stanja, a svako je karakterizirano odgovarajućim koncentracijama stanične biomase (stanica), supstrata i produkta, pri čemu je specifična brzina rasta jednaka brzini razrjeđivanja. Kada brzina razrjeđivanja prijeđe kritičnu vrijednost, koncentracija biomase (stanica) opada i kultura se iz reakcijskoga sustava ispire. Konstantni kemijski uvjeti odlučujući su čimbenik za uspješan rad kemostata.

#### 4. HUMANI INTESTINALNI TRAKT KAO KONTINUIRANI BIOREAKTOR



**Slika 3: Fermentacija u ljudskom intestinalnom traktu** (Johan ET van Hylckama i sur., 2011)

Ljudski probavni sustav je gusto naseljen s neizmerno raznolikom mikrobnom zajednicom. Crijevna mikrobiota djeluje na domaćina kroz široku lepezu molekularnih interakcija i utječe na probavu, imunitet i metabolizam tijekom životnog vijeka (Jia i sur., 2008). Sa otprilike 1,5 kg bakterija u debelom crijevu, koncentracije  $10^{12}$  stanica po gramu crijevnog sadržaja, crijevna mikrobiota je priznata kao važan metabolički organ, usporediv s jetrom (Martin i sur., 2009), te se može se smatrati kontinuiranim sustavom uzgoja, gdje neprobavljeni dijelovi



hrane služe kao supstrat za održavanje visoke koncentracije i raznolikosti crijevne mikrobiote. Glavna razlika u odnosu na konvencionalne kemostatske bioreaktore je, da je sam reaktor, ljudsko tijelo. Ono kao takvo ekstrahira i konkurira za, hranjive tvari s crijevnom mikroflorom, dok je istodobno opskrbljuje sa sluzi kao dodatnom sirovinom (Rabiu i Gibson, 2002). Sastav i aktivnost crijevne mikrobiote kontrolira se prehranom kao i kroz modulaciju od strane domaćina uglavnom preko imunološkog sustava sluznice. Poremećaj tog ekosustava okolišnim čimbenicima poput prehrane, patogena ili antibiotičke terapije u kombinaciji s genetičkim predispozicijama u domaćinu, može dovesti do razvoja nezdrave mikrobiote i oslabljene aktivnosti koja može imati negativan utjecaj na zdravlje.

Od svih prehrambenih sastojaka koji se unesu, oni koji nisu probavljivi za enzime domaćina, kao što su prehrambena vlakna, ili onih koji izbjegnu gornju probavu i apsorpciju, kao što je višak proteina, mogu se metabolizirati crijevnom mikroflorom. Dokazano da prehrana igra dominantnu ulogu u oblikovanju crijevne mikrobiote, važniju i od genetike domaćina. Procjenjuje se da se oko 60% ukupnih promjena crijevne mikrobiote može objasniti promjenom prehrane, a samo oko 10% može se pripisati genetičkim varijacijama domaćina. Velike promjene u prehrani izravno utječu na sastav mikrobiote i specifične filogenetičke skupine se mogu razviti unutar nekoliko dana, kao odgovor na promjene u unosu ugljikohidrata i proteina (Walker i sur.,2010).

Genetičko sekvenciranje crijevne mikrobiote (kolektivni Genom crijevne mikrobiote) ima veliki genetički potencijal s ogromnim brojem različitih gena za razgradnju i transformacije različitih prehrambenih sastojaka. Prehrambeni ugljikohidrati (prebiotici) su glavni izvori energije za i čovjeka. Stoga ne čudi da je crijevna mikrobiota posebno bogata genima uključenim u katabolizam ugljikohidrata. Posebno, složeni ugljikohidrati kao polisaharidna stanična stjenka u biljaka (uključujući celulozu, pektin i hemicelulozu) i rezistentni škrob mogu izbjeći probavu i doći u debelo crijevo da služe kao supstrati za fermentaciju bakterijama koje žive u crijevima (Walker i sur., 2010).

## 5. TIPOVI „IN VITRO“ GASTROINTESTINALNIH MODELA

„In vitro“ modeli se dijele na:

- šaržne,
- kemostatske, koji uključuju i polukontinuirane i kontinuirane sustave,
- ne kemostatske simulatore.

Svi modeli gastrointestinalnog trakta (GIT) imaju strogo anaerobne uvjete, kako bi održavali rast mikroorganizama uzetih iz GIT ljudi i drugih sisavaca. „In vitro“ modeli mogu se koristiti sekvencionirano tako da se u simulatorima želuca i tankog crijeva hrana probavlja korištenjem uvjeta i enzima, koji odgovaraju fiziološkim uvjetima u gornjem dijelu GIT. Simulatori slijepog crijeva nastavljaju, simulirajući mikrobnog metabolizam neprobavljivog ostatka. Različiti kemostatski i ne kemostatski modeli imaju velike strukturalne razlike, a šaržni fermentori su generalno slično strukturirani reaktori, u malim posudama (Šušković, 2015).

### *Šaržni simulatori:*

Najjednostavnija i najčešće upotrebljavana „in vitro“ metoda u mikrobiološkim studijama je šaržna fermentacija crijevnog tekućine ili fekalne sluzi kako bi se proučavali efekti različitih dodanih sastojaka. Ovi reaktori su obično anaerobno zatvorene boce sa fekalnim sadržajem debelog crijeva čovjeka materijalom (Rumney i Rowland, 1992). Ovi modeli simuliraju samo određeni dio životinjskog GIT. Vrijeme transporta tekućine u ovim dijelovima GIT-a je relativno kratko, pa je tako i vrijeme zadržavanja u ovim modelima kratko, od 2 do 24 sata. Nakupljanje proizvoda fermentacije može dovesti do promjene uvjeta u šaržnoj fermentaciji, od mikrobiološki stabilnog početka, do puno kompetitivnijeg okruženja za crijevnu mikrobiotu, te tako utječe na sličnost sa „in vivo“ procesima u dužim simulacijama. Kompleksniji modeli sa nekoliko posuda između kojih se tekućina transportira ili kontinuirano ili polukontinuirano, izbjegavaju nakupljanje proizvoda fermentacije (Edwards i Eastwood, 1992).

## 6. „IN VITRO“ KEMOSTATSKI MODELI LJUDSKOG GASTROINTESTINALNOG TRAKTA

„In vitro“ simulatori debelog crijeva, prvi puta su se pojavili 1981. i svi modeli koji se upotrebljavaju danas imaju puno sličnosti sa tim prvim modelom. Tri najzastupljenija modela danas su:

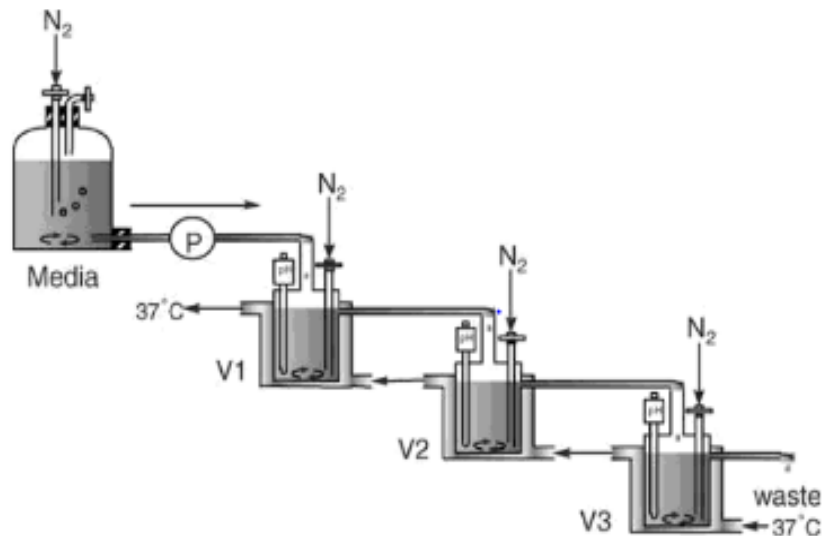
1. Reading model
2. SHIME model
3. EnteroMix<sup>®</sup>

Sva tri modela su strukturno kemostati sa 3-6 serijski spojenih fermentacijskih posuda sa kompjuterski kontroliranim prijenosom tekućine. Reading i EnteroMix<sup>®</sup> model simuliraju samo ljudsko debelo crijevo, a kao tekućinu, koja oponaša tekućinu koja iz tankog crijeva ulazi u debelo, koriste medij koji je opisao Macfarlane i suradnici (Macfarlane i sur., 1998) SHIME model simulira cijeli ljudski GIT od želuca do debelog crijeva i koristi umjetni SHIME medij, koji ima puno sličnosti sa medijem kojeg su opisali Macfarlane i suradnici. Sva tri modela imaju različiti dizajn što se tiče prijenosa tekućine. Tekućina se pumpa polukontinuirano u sljedeću posudu u trosatnim intervalima (EnteroMix model) ili se kontinuirano prepumpava između posuda (Reading model) ili se mogu kombinirati ova dva načina (SHIME) model.

**Tablica 1 Usporedba "in vitro" modela GIT-a (Mäkivuokko I Nurminen, 2006)**

	Reading	SHIME	EnteroMix	TIM 1	TIM 2
Dio koji se simulira	Debelo crijevo	Od želuca do debelog crijeva	Debelo crijevo	Od želuca do ileuma	Debelo crijevo
Volumen posuda	220-330 ml	300-1600 ml	6-15 ml	200 ml	200 ml
pH	5.8-6.8	5.0-7.0	5.5-7.0	1.8-6.5	5.8
Vrijeme zadržavanja	14 dana do stacionarne faze	30 dana po ciklusu	2 dana	1 dan	3 dana

## 6.1. READING MODEL

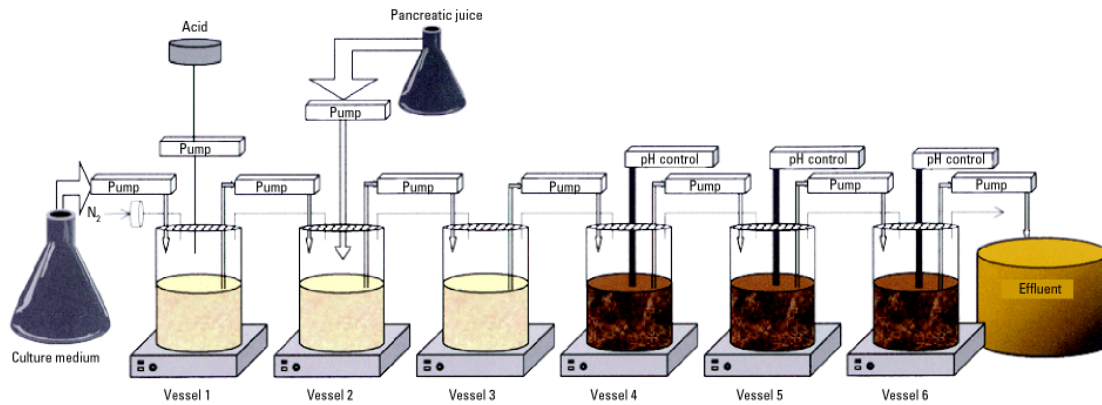


**Slika 4: Reading model** (Mäkivuokko I Nurminen, 2006)

Reading simulator, simulira debelo crijevo koristeći trofaznu kontinuiranu kulturu u tri posude: V1 - 220ml, V2 - 320 ml i V3 – 320 ml. Svaka posuda ima drugačiji pH, po redu V1 - 5.8, V2 - 6.2 i V3 - 6.8, oponašajući tako proksimalni (V1), transverzalni (V2) i distalni (V3) dio debelog crijeva (Šušković, 2015).

Na početku simulacije, svaka posuda se inokulira sa 100ml 20% (wt/vol) ljudskih fekalija. Sustav se inkubira šaržno, preko noći, nakon čega započinje kontinuirano pumpanje svježije simulacijske tekućine u prvu posudu (V1). U isto vrijeme započinje kontinuirano pretakanje iz jedne posude u drugu ( V1 u V2, V2 u V3). To se odvija najmanje 14 dana, kako bi se postiglo ustaljeno stanje u svim posudama. Višak tekućine iz treće posude se skuplja u posudu sa sakupljanje otpada. Vrijeme zadržavanja u sustavu varira od 27 do 67 sati . Održivost mikrobiote se testira uzimanjem uzoraka iz posuda u određenim vremenskim intervalima. Nakon perioda inkubacije u sustav se dodaje testna supstancija, pomiješana u simulacijsku tekućinu. Sustav se tada opet mora dovesti u ustaljeno stanje, što traje oko 22 dana. Zadnja faza je ispiranje, koje traje oko 50 dana. Ispiranje se vrši originalnom simulacijskom tekućinom kako bi se odredilo, koliko će dugo, promjene koje su uvedene testnom substancijom, biti vidljive u sustavu, bez prisutnosti supstrata (Gibson i sur.,1988).

## 6.2. SHIME MODEL



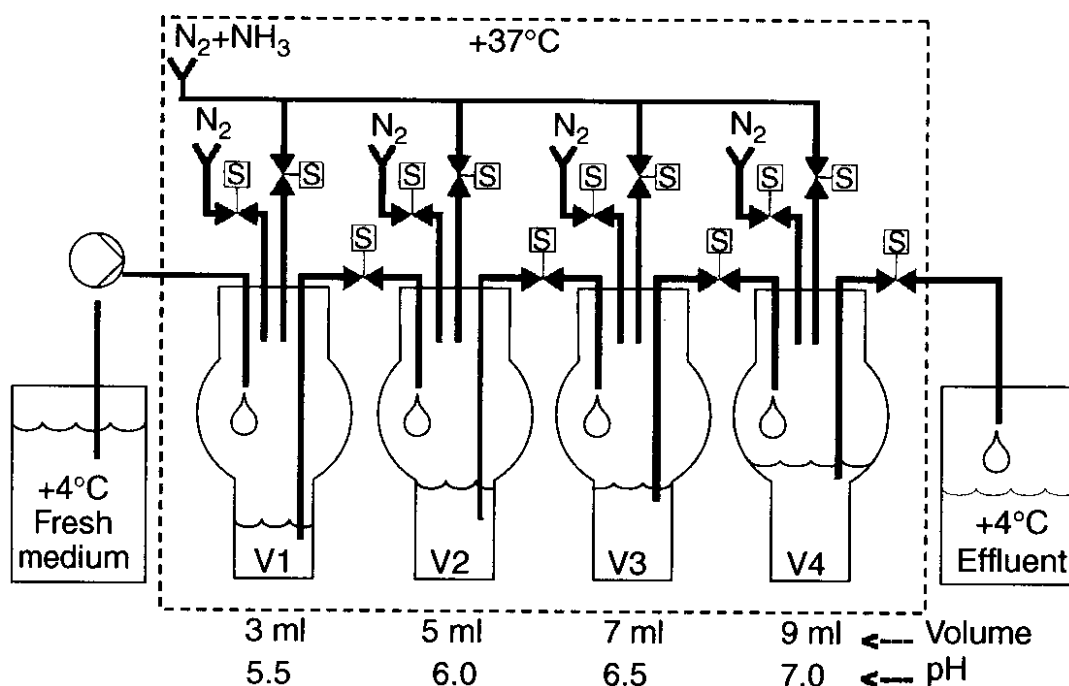
**Slika 5: Simulator for Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME) model** (Mäkivuokko I Nurminen, 2006)

SHIME model je sustav koji se sastoji od 6 posuda, u kojem prve tri posude simuliraju želudac i tanko crijevo, a ostale tri posude simuliraju debelo crijevo. Radni volumeni ovih posuda su 300 ml za želudac i tanko crijevo, 1000 ml za početak debelog crijeva i uzlazno debelo crijevo, 1600 ml za transverzalno i 1200 ml za silazno debelo crijevo. pH se kontrolira u posudama 2,3,4,5 i 6 u rasponu od 5.0 – 6.5, 6.5 – 7.0, 5.5 – 6.0, 6.0 – 6.5 i 6.5 – 7.0.

Sustav se inokulira sa 10 ml supernatanta suspenzije (koja odgovara zapadnjačkoj prehrani). Ta se suspenzija dodaje u prve tri posude, svaki dan, osam dana za redom. Preostale tri posude (4-6), koje simuliraju debelo crijevo, inokuliraju se s 50 ml faekalne suspenzije, svaki dan tijekom 10 dana. Sadržaj ove tri posude, kontinuirano se prepumpava iz jedne posude u drugu, te na kraju u posudu koja skuplja višak. Sustav radi kontinuirano 84 sata. Na početku simulacije 200 ml svježeg SHIME medija se dodaje u prvu posudu, koja predstavlja želudac, tri puta dnevno. Svaka 2 – 3 sata kiseli (pH 2.0) sadržaj prve posude se pumpa u drugu posudu, koja predstavlja dvanaesnik i jejunum, zajedno sa 100 ml gušteračinog soka s dodatkom žuči, kako bi se neutralizirala kiselina želučanog efluenta. Nakon četiri sata sadržaj druge posude se pumpa u treću posudu, koja predstavlja ileum.

Nakon što se osam dana koristi samo SHIME medij, u sustav se dodaje testni supstrat, pomiješan sa SHIME medijem. Supstrat se dodaje dvanaest dana, a nakon toga se opet osam do deset dana dodaje samo SHIME medij. Ovakav ciklus od tri faze, se ponavlja za sve ispitivane supstrate, a uzorci se uzimaju nakon svake faze (Molly i sur.,1993).

### 6.3. ENTEROMIX® MODEL



**Slika 6: EnteroMix® model** (Mäkivuokko I Nurminen, 2006)

EnteroMix® model predstavlja debelo crijevo čovjeka (V1- caecum + uzlazno debelo crijevo, V2- transverzalno debelo crijevo V3 – silazno debelo crijevo i V4 - distalni dio).

EnteroMix® model ima četiri paralelne jedinice, od kojih svaka sadrži četiri staklene posude, tako dozvoljavajući da se četiri simulacije odvijaju istovremeno, sa istim fekalnim inokulumom. Posude EnteroMix® modela imaju najmanje radne volumene u odnosu na tri modela koja smo spominjali do sada. V1= 6 ml, V2=8 ml, V3=10 ml i V4=12 ml. pH vrijednosti su slične kao i kod ostalih modela V1=5.5, V2=6.0, V3=6.5 i V4=7.0. Zbog malog volumena posuda, 40 ml inokuluma 25% (w/vol) ljudskih fekalija i samo 4 g testnog supstrata je dovoljno za četiri paralelne 48 satne simulacije.

Simulacija počinje punjenjem posuda u sve četiri jedinice sa 0.9 mM anaerobnom NaCl, 3 ml u V1, 5 ml u V2, 7 ml u V3 i 9 ml u V4. Zatim se prva posuda inokulira sa 10 ml fekalnog inokuluma. Inokulum se u prvoj posudi pomiješa sa NaCl-om i zatim se 10 ml te mješavine, prebacuje u drugu posudu. Postupak se ponavlja za sve posude, a na kraju se višak inokuluma, iz četvrte posude, pumpa u spremnik za otpad. Nakon tri sata inkubacije 3 ml simulacijskog medija, sa ili bez testne supstancije, se pumpa u prvu posudu. Medij se u prvoj posudi fermentira tri sata, nakon čega se 3 ml fermentiranog medija, prebacuje u drugu posudu, a 3 ml svježeg medija se ponovno pumpa u prvu posudu. Postupak prijenosa tekućine se nastavlja

kroz sve posude, tako da na kraju, nakon petnaest sati, kada se 3 ml fermentirane tekućine iz četvrte posude izbacilo u spremnik za otpad, po prvi puta, u posudama imamo:  $V_1=6$  ml,  $V_2=8$  ml,  $V_3=10$  ml i  $V_4=12$  ml fermentirajuće tekućine. Fermentacija i trosatni prijenosi tekućine među posudama, se nastavljaju 48 sati, nakon čega se sustav zaustavlja i uzimaju se uzorci iz svake posude (Mäkivuokko i Nurminen, 2006).

#### **6.4. OSTALI SIMULATORI**

Korištenje kemostatskih modela u simulaciji gastrointestinalnog sustava je proširilo njihovu primjenu za simulaciju mikrobne aktivnosti u usnoj šupljini kao drugom najaktivnijem mikrobnom ekosustavu u ljudskom organizmu. Koriste se za istraživanje nastajanja zubnog plaka, odnosno biofilma. Koriste se također za simulaciju mokraćnog mjehura kako bi se istražila osjetljivost patogena, koji uzrokuju upale mokraćnih puteva, na antibiotike. Ovi se simulatori obično sastoje od jednog kemostata (Takahashi i sur., 1998).

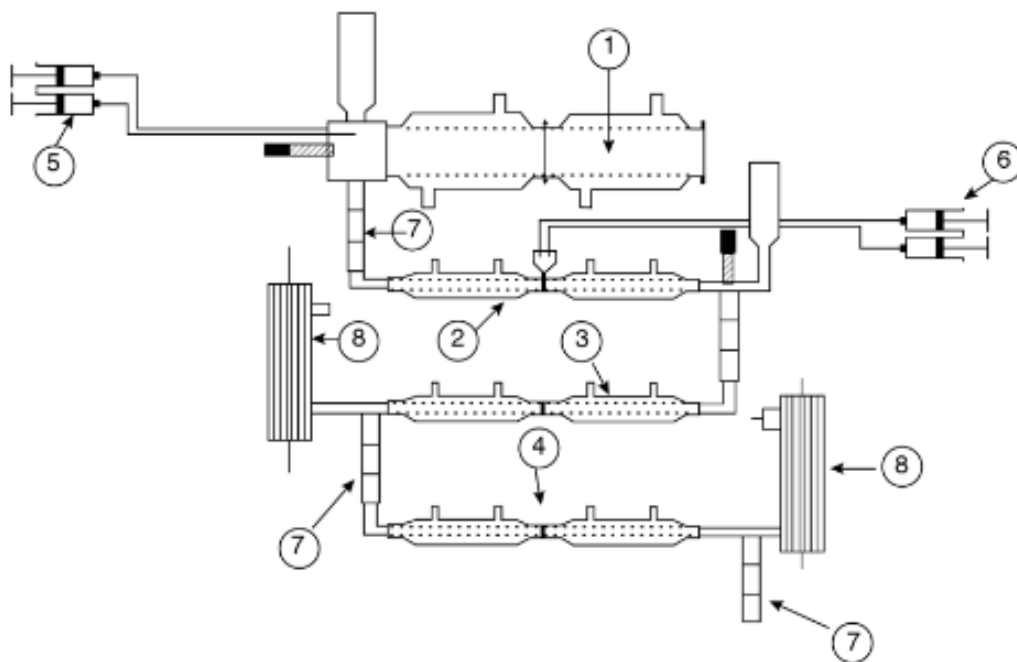
## 7. „IN VITRO“ KONTINUIRANI MODELI GASTROINTESTINALNOG TRAKTA

Ovaj tip modela je sastavljen od dva komplementarna dijela, TIM (TNO Intestinal Model) sustavi 1 i 2 (Minekus i sur., 1995). Ovi dinamički modeli, razlikuju se od prethodna tri u dva glavna aspekta.

- transport tekućine iz jedne u drugu posudu se postiže peristaltičkim pumpama
- kontinuirano se provodi apsorpcija vode i proizvoda fermentacije dijalizom kroz membrane.

U oba sustava, peristaltičko kretanje gastrointestinalne tekućine, se postiže mijenjanjem tlaka vode koja cirkulira između stjenki staklenih modula i fleksibilnih dijalizacijskih membrana. Tlak se mijenja pomoću, kompjuterski kontroliranih ventila, kako bi se simuliralo pražnjenje želuca.

### 7.1. SUSTAV TIM 1



**Slika 7: Sustav TIM 1** (Mäkivuokko I Nurminen, 2006)

Simulacijski TIM 1 sustav:

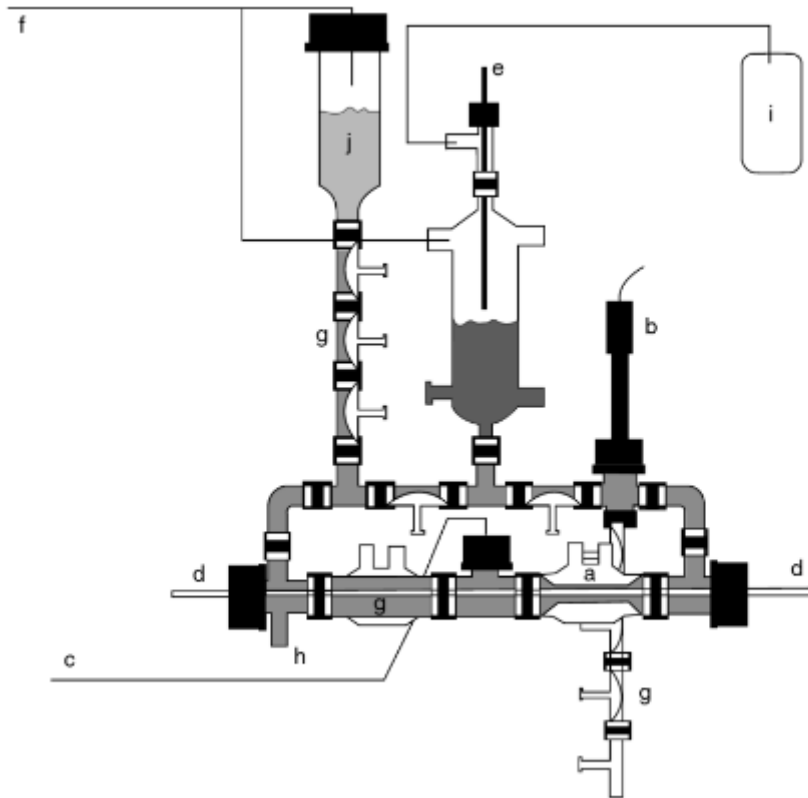
1 – želuca; 2 – duodenum; 3 – jejunum; 4 – ileum; 5 – sekret želuca; 6 – intestinalni sekret;  
7- peristaltička pumpa; 8 – uređaji za dijalizu.



Sustav TIM 1 sastavljen je od osam serijski povezanih staklenih modula, a simulira želudac i tanko crijevo. Za simulaciju probavne apsorpcije TIM 1 ima ugrađene dvije fleksibilne dijalizacijske membrane (vrećica, 5kDa). Te membrane omogućuju apsorpciju metabolita i vode, koja bi bila apsorbirana u jejunumu i ileumu, u realnom vremenu.

U TIM 1 simulaciji kao inokulat služe sekret želuca, intestinalni sekret i homogenizirani obrok i dodaju se u želučani odjeljak, prema prethodno određenim vremenima. Iz želuca, tekućina se pumpa u sljedećih šest odjeljaka. Tijekom simulacije, izlučivanje enzima, žući i gušteračinog soka, kontrola gradijenta želučanog pH ( od 5.0 do 1.8 u 80 minuta) kao i pH dvanaesnika ( konstantan pH=6.5), se kontrolira kompjuterom (Minekus i sur., 1995).

## 7.2 SUSTAV TIM 2



**Slika 8: Sustav TIM 2** (Mäkivuokko I Nurminen, 2006)

**a** – fleksibilne stijenke sustava koji simulira peristaltiku; **b** – pH elektroda; **c** – alkalna pumpa; **d** – sustav za dijalizu (membrana sa šupljim vlaknima); **e** - senzor za kontrolu razine tekućine; **f** – dovod dušika; **g** – peristaltička pumpa; **h** – uzorkovanje tekućine; **i** - uzorkovanje plina; **j** – tekući sadržaj ileuma

TIM 2 sustav se sastoji od četiri staklena modula, u petlji, koji simuliraju proksimalno debelo crijevo . Za simulaciju probavne absorpcije TIM 2 ima ugrađenu jednu membranu. Membranu poroznih vlakana (50 kDa). U toj membrani kruži tekućina za dijalizu i omogućava absorpciju vode i masnih kiselina.

U TIM 2 simulaciji model se prvo inokulira sa 200 ml fekalnog inokuluma, mikrobiota se adaptira 16 sati, nakon čega započinje prava simulacija, dodatkom tekućeg sadržaja ileuma, sa ili bez testiranog supstrata . pH se održava konstantnim (5.8) jer je toliki pH u proksimalnom debelom crijevu (Krul i sur.,2002).

## **8.ZAKLJUČAK**

Simulacijski modeli koje smo spominjali u ovom radu, međusobno se strukturno i funkcionalno razlikuju, ali otopine koje se koriste kako bi se replicirali uvjeti, koji utječu na cjelokupnu mikrobiotu debelog crijeva, su slične u svim modelima.

1. Mikrobiota debelog crijeva se, u svakom modelu, simulira fekalnim uzorkom od pojedinačnog donora ili uzorcima od više donora koji su spojeni u jedan fekalni uzorak, jer su realističniji uzorci iz ileuma ili cekuma ljudi i teško pribavljivi iz tehničkih, ali i etičkih razloga.

2. Svi simulatori debelog crijeva koriste sličan medij za rast. Taj medij oponaša tekućinu iz ileuma.

3. Svi simulatori debelog crijeva imaju strogo anaerobne uvijete, slične pH vrijednosti, koje predstavljaju „in vivo“ situaciju u debelom crijevu zdravog čovjeka i sve funkcije ovih sustava su kontrolirane kompjuterski.

Reading i SHIME model rade dok se ne postigne ustaljeno stanje sustava i stacionarna faza u rastu mikroorganizama, dok TIM 2 i EnteroMix<sup>®</sup> modeli rade neki prethodno određeni vremenski period ( 2 do 5 dana). SHIME sustav, je jedini od navedenih, koji ima kontinuiranu liniju od želuca do distalnog debelog crijeva i tako omogućava simulaciju cijelog GIT-a u jednom pokretanju. Simulacijska tekućina iz TIM 1 se, indirektno, može koristiti kao medij za rast u TIM 2 simulatoru. EnteroMix<sup>®</sup> model ima najmanje radne volumene od svih modela, pa omogućava testiranje malih koncentracija testnog supstrata. S druge strane, mali radni volumeni ne omogućavaju uzimanje uzoraka tijekom trajanja simulacije, što je moguće u ostalim simulatorima. EnteroMix<sup>®</sup> model je jedini koji ima paralelne kanale u istom simulatoru, što omogućava provođenje četiri paralelne simulacije s istim fekalnim uzorkom, u isto vrijeme.

Usprkos naprednim tehnologijama korištenim u ovim simulatorima, simulatori su i dalje nepotpuni modeli gastrointestinalnog trakta.

4. Nedostaci „in vitro“ modela su npr. interakcija između mikroorganizama i domaćina, također interakcija mikroorganizama sa sluzi i imunološkim sustavom. Neki od ovih nedostataka se mogu nadomjestiti korištenjem staničnih linija iz probavnog trakta u simulatoru. Iako bi ovo rješenje i dalje bilo samo približno slično „in vivo“ procesu, svejedno nam može pružiti bolji uvid u dinamiku i aktivnost gastrointestinalne mikrobiote.

**LITERATURA**

1. Edwards, C.A., Eastwood, M.A. (1992) Comparison of the effect of ispaghula and wheat bran on rat caecal and colonic fermentation. *Gut*. **33**, 299 – 331.
2. Gibson, G.R., Cummings, J.H., Macfarlane, G.T. (1988) Use of three – stage continuous culture system to study the effect of mucin on dissimilatory sulfate reduction and methanogenesis by mixed populations of human gut bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 2750 – 2577.
3. Jia, W., Li, H., Nicholson, J.K. (2008) Gut microbiota: a potential new theory for drug targeting. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **7**, 123 – 129.
4. Juričić, M. (2012) Dijelovi probavnog sustava. *O.Š. Slavka kolara Hercegovac*. < [http://os-skolara-hercegovac.skole.hr/zanimljiva\\_nastava/biologija?news\\_id=3435](http://os-skolara-hercegovac.skole.hr/zanimljiva_nastava/biologija?news_id=3435)>, Pristupljeno 11. Svibanj 2016
5. Johan ET van Hylckama Vlieg, Veiga, P., Zhang, C., Derrien, M., Zhao, L. (2011) Impact of microbial transformation of food on health — from fermented foods to fermentation in the gastro-intestinal tract. *Current Opinion in Biotechnology.* **22**, 211–219.
6. Krmpotić - Nemanić, J., Marušić, A. (2011) Anatomija čovjeka, Medicinska naklada, Zagreb
7. Krul, C., Humbolt, C., Philippe, C., i sur. (2002) Metabolism of sinigrin (2 – propenyl glucosinolate) by thr human colonic microflora in a dynamic in vitro large – intestinal model. *Carcinogenesis.* **23**, 1011.
8. Leksikografski Zavod Miroslav Krleža (2000) Kemostat, <<http://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=31175>>, Pristupljeno 22. Svibanj 2016
9. Macfarlane, G.T., Macfarlane, S., Gibson, G.R. (1998) Validation of three – stage compound continuous culture system for investigating the effect of retention time on ecology and metabolism of bacteria in human colon. *Microb. Ecol.* **35**, 180 – 187.
10. Mäkivuokko, H., Nurminen, P. (2006) In Vitro Methods to Model the Gastrointestinal tract. U: *Gastrointestinal Microbiology* (Ouwehand, C. A., Vaughan E. E., ured.) Taylor & Frances group, London, str. 237-250
11. Marić, V., Šantek, B. (2009) Biokemijsko inženjerstvo, Golden marketing – Tehnička knjiga, Zagreb
12. Minekus, M., Marteau, P., Havenaar, R., Huis in't Veld, H.J. (1995) A multicompartamental dynamic computer-controlled model simulating the stomach and small intestine. *ATLA.* **23**, 197-209.

13. Martin, F.P., Sprenger, N., Yap, I.H., Wang, Y., Babiloni, R., Rochat, F., Rezzi, S., Cherbut, C., Kochhar, S., Lindon, J.C. i sur. (2009) Panorganismal gut microbe – host metabolic crosstalk. *J. Proteome Res.* **8**, 2090 – 2015.
14. Molly, K., Vande, W.M., Verstraete, W. (1993) Development of a 5 – step multi – chamber reactor as a simulation of human intestinal microbial ecosystem. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **39**, 254 – 258.
15. Rabić, B.A., Gibson, G.R. (2002) Carbohydrates: a limit on bacterial diversity within the colon. *Biol.Rev.* **77**, 443 – 453.
16. Rumney, C.J., Rowland, I.R. (1992) In vivo models of the human colonic flora. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* **31**, 299 – 331.
17. Šušćković, J. (2014) Biotehnologija 4. *Merlin*, <<http://moodle.srce.hr/>>. Pristupljeno 13. Svibanj 2016
18. Šušćković, J. (2015) Crijevna mikroflora, prehana i zdravlje. *Merlin*, <<http://moodle.srce.hr/>>. Pristupljeno 14. Svibanj 2016
19. Takahashi, S., Sano, M., Nishimura, M., i sur. (1998) Bactericidal effect of levofloxacin on strains with equal susceptibility in an in vitro urinary bladder model. *Chemotherapy.* **44**, 337 – 342.
20. Vrsalović – Presećki, A. (2013) Bioreakcijska tehnika 2, *Interna skripta*, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb
21. Walker, A.W., Ince, J., Duncan, S.H., Webster, L.M., Holtrop, G., Ze, X., Brown, D., Stares, M.D., Scott, P., Bergerat, A., i sur. (2010) Dominant and diet – responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota. *ISME J.* doi: 10.1038/ismej.2010.118.