

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ŽIVILSTVO

Nataša VEHAR

**FERMENTACIJA KONCENTRIRANE SIROTKE Z IZBRANIMI
LAKTOBACILI, OSAMLJENIMI IZ ČREVESNE SLUZNICE
PRAŠIČEV**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**FERMENTATION OF CONCENTRATED WHEY WITH SELECTED
LACTOBACILI, ISOLATED FROM PIGS' INTESTINAL MUCOSA**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Opravljeno je bilo na Katedri za mlekarstvo Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za živilstvo je za mentorico diplomskega dela imenovala doc. dr. Andrejo Čanžek Majhenič, za somentorico dr. Metodo Zorič Peternel in za recenzentko prof. dr. Sonjo Smole Možina.

Mentorica: Andreja Čanžek Majhenič

Somentorica: Metoda Zorič Peternel

Recenzentka: Sonja Smole Možina

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Nataša Vehar

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 637.344:579.6:636.087.6 (043)=163.6
KG	sirotka/laktobacili/probiotiki/črevesna mikroflora/prehrana živali/krma/prehranski dodatki
AV	VEHAR, Nataša
SA	ČANŽEK MAJHENIČ, Andreja (mentorica)/ZORIČ PETERNEL, Metoda (somentorica)/SMOLE MOŽINA, Sonja (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI	2010
IN	FERMENTACIJA KONCENTRIRANE SIROTKE Z IZBRANIMI LAKTOBACILI, OSAMLJENIMI IZ ČREVESNE SLUZNICE PRAŠIČEV
TD	Diplomsko delo
OP	IX, 41 str., 7 pregl., 22 sl., 8 pril., 49 vir.
IJ	sl
JJ	sl/en
AI	Sirotka kot stranski produkt pri izdelavi sira predstavlja po eni strani najkakovostnejši del mleka, po drugi strani pa zaradi ogromnih, dnevno proizvedenih količin velik strošek z ekološkega vidika odstranjevanja oz. izkoriščenosti. Zato smo v nalogi želeli ugotoviti možnost fermentacije koncentrirane sirotke s prašičjimi izolati in pripraviti obstojen probiotičen prehranski dodatek za živali (prašiče) z visoko vsebnostjo izbranih živih probiotičnih bakterij. Tri seve laktobacilov, osamljenih iz črevesne sluznice prašičev, smo nagojili v tekočem gojišču in pripravili vcepek za fermentacijo sirotke. Najprej smo v predposkusu preverili uspešnost rasti prašičjih izolatov na gojišču MRS z dodanima antibiotikoma klindamicinom in ciprofloksacinom, ki zavirata rast ostalih prisotnih laktobacilov v sirotki. Nato smo izvedli tri poskuse s štirimi fermentacijami. V prvem in tretjem poskusu smo vcepili vsak sev posamezno, fermentacija pa je potekla pri 37 °C oz. 39 °C. Drugi poskus pa je temeljil na različni kombinaciji sevov pri 37 °C. V vsakem poskusu je bila četrta fermentacija kontrola, koncentrirana sirotka brez dodanih prašičjih izolatov. Ker smo želeli tudi ugotoviti, kakšna je obstojnost fermentirane sirotke, smo po fermentaciji vzorce fermentirane sirotke hranili pri sobni temperaturi 7 dni oz. pri temperaturi hladilnika (4 °C) 7, 14 ali 21 dni. Pred in po fermentaciji ter pri analizi obstojnosti fermentirane sirotke smo spremljali gibanje populacij posameznih skupin mikroorganizmov, merili vrednost pH in preverjali morfološke lastnosti mikroorganizmov. Ugotovili smo, da z izbranimi prašičjimi izolati, posamezno ali v kombinaciji, ob uporabljenih temperaturno časovnih režimih nismo dobili zelenega proizvoda. Čeprav poskus ni dal pričakovanih rezultatov, pa dobljeni rezultati jasno nakazujejo smernice nadaljnjih poskusov optimizacije pogojev fermentacije sirotke z izbranimi prašičjimi izolati za izdelavo primerne prehranskega dodatka za živali.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 637.344:579.6:636.087.6 (043) =163.6
CX whey/lactobacilli/probiotic/intestinal mucosa/animal nutrition /feed /food supplement
AU VEHAR, Nataša
AA ČANŽEK MAJHENIČ, Andreja (supervisor) /ZORIČ PETERNEL, Metoda (co-advisor) SMOLE MOŽINA, Sonja (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
PY 2010
TI FERMENTATION OF CONCENTRATED WHEY WITH SELECTED LACTOBACILI, ISOLATED FROM PIGS' INTESTINAL MUCOSA
DT Graduation thesis (university studies)
NO IX, 41 p., 7 tab., 22 fig., 8 ann., 49 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Whey a by product of cheese making, is a highly nutritious part of milk while on the other hand, given the enormous quantities produced per day, it represents a high cost of disposal. Therefore, the possibility of fermentation of concentrated whey with pig isolates and production of stable probiotic food supplement for animals (pigs) with the high content of selected live probiotic bacteria was investigated. Three strains of lactobacilli, isolated from porcine intestinal mucosa were cultivated in liquid medium and prepared for whey inoculation. The growth of pig isolates was tested on MRS medium supported with antibiotics klindamycin and ciprofloxacin in preliminary tests, for successful distinguishing of pig isolates from naturally present lactobacilli in whey. Three experiments including four different fermentations were performed. First and third experiment were identical in inoculation protocol, where each strain was inoculated extra, but they differ in fermentation temperatures which were 37 °C or 39 °C, respectively. In second experiment (fermentations at 37 °C) different combinations of selected lactobacilli were used. In each experiment the fourth fermentation served as control. After fermentations, the stability of fermented whey samples was tested at different time-temperature regimes. Stability was tested after keeping whey for 7 days at room temperature and after 7, 14 or 21 at the fridge temperature (4 °C). Before and after fermentation as well as during stability testing, whey quality was monitored through pH measuring, counting the microbial population of different groups of microorganisms and examining the morphological characteristics of microorganisms. We have concluded that selected pig isolates used, individually or in combination, at different temperature regimes, did not give expected results. Nevertheless, the results of our study strongly suggest guidelines for further optimization of whey fermentation conditions with selected pig isolates to produce suitable animal feed supplement.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI).....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VII
KAZALO SLIK.....	VIII
KAZALO PRILOG	IX
1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA	1
1.2 NAMEN NALOGE	2
1.3 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 SESTAVA SIROTKE	3
2.1.1 Sirotkine beljakovine.....	4
2.1.2 Laktoza	5
2.1.3 Mlečna maščoba in hlapne maščobne kisline.....	5
2.1.4 Vitamini	6
2.2 UPORABA SIROTKE	6
2.2.1 SIROTKA V PREHRANI ŽIVALI	8
2.3 MLEČNOKISLINSKE BAKTERIJE	9
2.3.1 Mlečnokislinska fermentacija.....	9
2.4 MLEČNOKISLINSKE BAKTERIJE KOT PROBIOTIKI	10
2.4.1 Rod Lactobacillus	12
2.5 PREBAVNI TRAKT	12
2.5.1 Razvoj mikroflore pri prašiču	14
2.6 ZAKONODAJA NA PODROČJU PREHRANSKIH DODATKOV	15
3 MATERIAL IN METODE	16
3.1 NAČRT POSKUSA.....	16
3.2 MATERIAL	18
3.2.1 Koncentrirana sirotka.....	18
3.2.2 Bakterijski sevi in pogoji gojenja	18
3.2.3 Gojišča	18
3.3 LABORATORIJSKA OPREMA	19
3.4 METODE	20
3.4.1 Namnoževanje prašičjih izolatov za fermentacijo.....	20

3.4.2	Fermentacija	20
3.4.3	Ugotavljanje števila mikroorganizmov.....	20
3.4.4	Merjenje vrednosti pH.....	22
3.4.5	Morfološki pregled celic.....	22
3.4.6	Analiza obstojnosti	22
4	REZULTATI.....	24
4.1	UGOTAVLJANJE ŠTEVILA POSAMEZNIH SKUPIN MIKROORGANIZMOV 24	
4.1.1	Rast čistih kultur prašičjih izolatov	24
4.1.2	Primerjava poskusov 1 in 3 (različni temperaturi fermentacije).....	24
4.1.3	Primerjava poskusov 1 in 2 (različne kombinacije izolatov).....	25
4.2	SPREMLJANJE VREDNOSTI pH.....	26
4.3	UGOTAVLJANJE OPTIMALNIH POGOJEV FERMENTACIJE	30
4.4	MORFOLOŠKE LASTNOSTI PRAŠIČJIH IZOLATOV	31
4.5	MORFOLOŠKE LASTNOSTI OSTALIH SKUPIN MIKROORGANIZMOV	33
4.6	OBSTOJNOST FERMENTIRANE SIROTKE.....	35
4.6.1	Shranjevanje fermentirane sirotke pri sobni temperaturi	35
4.6.2	Shranjevanje fermentirane sirotke pri temperaturi hladilnika	36
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	38
5.1	RAZPRAVA.....	38
5.2	SKLEPI.....	39
6	POVZETEK.....	41
7	VIRI	42

ZAHVALA
PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

PREGLEDNICA 1: KEMIJSKA SESTAVA SLADKE IN KISLE SIROTKE (POMERANZ, 1992)	3
PREGLEDNICA 2: DELEŽ PROTEINOV V SIROTKI (TRATNIK, 1998).....	4
PREGLEDNICA 3: VRSTE LAKTOBACILOV IN BIFIDOBAKTERIJ, KATERIH PREDSTAVNIKE NAJPOGOSTEJE NAJDEMO MED PROBIOTIKI (HOLZAPFEL IN SOD., 1998)	11
PREGLEDNICA 4: POGOJI FERMENTACIJE KONCENTRIRANE SIROTKE Z RAZLIČNO KOMBINACIJO PRAŠIČJIH IZOLATOV	16
PREGLEDNICA 5: POGOJI GOJENJA LAKTOBACILOV, PRAŠIČJIH IZOLATOV, LAKTOKOKOV, SKUPNEGA ŠTEVILA MIKROORGANIZMOV IN KOLIFORMNIH MIKROORGANIZMOV	21
PREGLEDNICA 6: MIKROBIOLOŠKE ANALIZE VZORCEV ČISTIH KULTUR PRAŠIČJIH IZOLATOV, VZORCEV SIROTKE PRED IN PO FERMENTACIJI TER PO SKLADIŠČENJU, TER ANALIZE KONTROLNE IN IZHODIŠČNE SIROTKE.....	21
PREGLEDNICA 7: POSTOPEK BARVANJA PO GRAMU	22

KAZALO SLIK

SLIKA 1: DIAGRAM POTEKA IZKORIŠČANJA SIROTKE IN PRIDOBIVANJE RAZLIČNIH PRODUKTOV (DURHAM IN HOURIGAN, 2007).	7
SLIKA 2: SIROTKA (CORTESE, 2008).....	8
SLIKA 3: POSELITEV RAZLIČNIH DELOV PRAŠIČJEGA ČREVEVA Z MIKROORGANIZMI (GEDEK, 1991).....	13
SLIKA 4: PRAŠIČ (KMETIJSTVO, 2008).....	14
SLIKA 5: POTEK POSKUSA.....	17
SLIKA 6: PRIMERJAVA RASTI NARAVNO PRISOTNIH LAKTOBACILOV IN DODANIH PRAŠIČJIH IZOLATOV PO 18-URNI FERMENTACIJI V POSKUSU 1 IN 3.	25
SLIKA 7: PRIMERJAVA RASTI NARAVNO PRISOTNIH LAKTOBACILOV IN DODANIH PRAŠIČJIH IZOLATOV PO 18-URNI FERMENTACIJI V POSKUSU 1 IN 2.	26
SLIKA 8: VREDNOSTI pH FERMENTIRANIH VZORCEV IN IZHODIŠČNE SIROTKE HRANJENIH PRI SOBNI TEMPERATURI V POSKUSU 1.....	27
SLIKA 9: SPREMLJANJE VREDNOSTI pH FERMENTIRANIH VZORCEV IN IZHODIŠČNE SIROTKE HRANJENIH PRI TEMPERATURI HLADILNIKA V POSKUSU 1.	27
SLIKA 10: VREDNOSTI pH FERMENTIRANIH VZORCEV IN IZHODIŠČNE SIROTKE HRANJENIH PRI SOBNI TEMPERATURI V POSKUSU 2.....	28
SLIKA 11: SPREMLJANJE VREDNOSTI pH FERMENTIRANIH VZORCEV IN IZHODIŠČNE SIROTKE HRANJENIH PRI TEMPERATURI HLADILNIKA V POSKUSU 2.	28
SLIKA 12: VREDNOSTI pH FERMENTIRANIH VZORCEV IN IZHODIŠČNE SIROTKE HRANJENIH PRI SOBNI TEMPERATURI V POSKUSU 3.....	29
SLIKA 13: SPREMLJANJE VREDNOSTI pH FERMENTIRANIH VZORCEV IN IZHODIŠČNE SIROTKE HRANJENIH PRI TEMPERATURI HLADILNIKA V POSKUSU 3.	30
SLIKA 14: UGOTAVLJANJE USPEŠNOSTI RASTI PRAŠIČJIH IZOLATOV V POSKUSU 1, 2 IN 3.	31
SLIKA 15: MIKROSKOPSKI PREPARAT SEVA 2/25	32
SLIKA 16: MIKROSKOPSKI PREPARAT SEVA 14/26	32
SLIKA 17: MIKROSKOPSKI PREPARAT SEVA 4/26	33
SLIKA 18: KOLIFORMNE BAKTERIJE (GOJIŠČE VRB)	34
SLIKA 19: SKUPNO ŠTEVILO MIKROORGANIZMOV (GOJIŠČE PCA + 0,1 % MLEKA V PRAHU)	34
SLIKA 20: OBSTOJNOST PRAŠIČJIH IZOLATOV IN SIROTKINIH LAKTOBACILOV PRI SOBNI TEMPERATURI PO 7 DNEH V POSKUSIH 1, 2 IN 3.....	35
SLIKA 21: OBSTOJNOST PRAŠIČJIH IZOLATOV IN SIROTKINIH LAKTOBACILOV PRI 4 °C PO 21 DNEH V POSKUSIH 1, 2 IN 3.	36
SLIKA 22: REZULTATI OBSTOJNOSTI PRAŠIČJIH IZOLATOV PRI TEMPERATURI HLADILNIKA V POSKUSIH 1, 2 IN 3.	37

KAZALO PRILOG

PRILOGA A: RAST ČISTIH PRAŠIČJIH IZOLATOV NA GOJIŠČU MRS Z DODATKOM ANTIBIOTIKOV (MRS/CL/CIP) V PREDPOSKUSU

PRILOGA B: REZULTATI VREDNOSTI PH ANALIZIRANIH VZORCEV, SPREMLJANIH PRI VSEH POSKUSIH

PRILOGA C1: VELIKOSTI MIKROBNE POPULACIJE SKUPNIH LAKTOBACILOV, PRAŠIČJIH IZOLATOV IN NARAVNO PRISOTNIH LAKTOBACILOV PRED IN PO FERMENTACIJI, TER HRANJENJU PRI SOBNI TEMPERATURI (POSKUS 1)

PRILOGE C2: VELIKOSTI MIKROBNE POPULACIJE LAKTOKOKOV, KOLIFORMNIH MO IN SKUPNEGA ŠTEVILA MO PRED IN PO FERMENTACIJI, TER HRANJENJU PRI SOBNI TEMPERATURI (POSKUS 1)

PRILOGA D1: VELIKOSTI MIKROBNE POPULACIJE SKUPNIH LAKTOBACILOV, PRAŠIČJIH IZOLATOV IN NARAVNO PRISOTNIH LAKTOBACILOV PRED IN PO FERMENTACIJI, TER HRANJENJU PRI SOBNI TEMPERATURI (POSKUS 2)

PRILOGE D2: VELIKOSTI MIKROBNE POPULACIJE LAKTOKOKOV, KOLIFORMNIH MO IN SKUPNEGA ŠTEVILA MO PRED IN PO FERMENTACIJI, TER HRANJENJU PRI SOBNI TEMPERATURI (POSKUS 2)

PRILOGA E1: VELIKOSTI MIKROBNE POPULACIJE SKUPNIH LAKTOBACILOV, PRAŠIČJIH IZOLATOV IN NARAVNO PRISOTNIH LAKTOBACILOV PRED IN PO FERMENTACIJI, TER HRANJENJU PRI SOBNI TEMPERATURI (POSKUS 3)

PRILOGE E2: VELIKOSTI MIKROBNE POPULACIJE LAKTOKOKOV, KOLIFORMNIH MO IN SKUPNEGA ŠTEVILA MO PRED IN PO FERMENTACIJI, TER HRANJENJU PRI SOBNI TEMPERATURI (POSKUS 3)

PRILOGA F1: VELIKOSTI MIKROBNE POPULACIJE SKUPNIH LAKTOBACILOV, PRAŠIČJIH IZOLATOV IN NARAVNO PRISOTNIH LAKTOBACILOV PRI HRANJENJU PRI TEMPERATURI HLADILNIKA (POSKUS 1)

PRILOGE F2: VELIKOSTI MIKROBNE POPULACIJE LAKTOKOKOV, KOLIFORMNIH MO IN SKUPNEGA ŠTEVILA MO PRI HRANJENJU PRI TEMPERATURI HLADILNIKA (POSKUS 1)

PRILOGA G1: VELIKOSTI MIKROBNE POPULACIJE SKUPNIH LAKTOBACILOV, PRAŠIČJIH IZOLATOV IN NARAVNO PRISOTNIH LAKTOBACILOV PRI HRANJENJU PRI TEMPERATURI HLADILNIKA (POSKUS 2)

PRILOGE G2: VELIKOSTI MIKROBNE POPULACIJE LAKTOKOKOV, KOLIFORMNIH MO IN SKUPNEGA ŠTEVILA MO PRI HRANJENJU PRI TEMPERATURI HLADILNIKA (POSKUS 2)

PRILOGA H1: VELIKOSTI MIKROBNE POPULACIJE SKUPNIH LAKTOBACILOV, PRAŠIČJIH IZOLATOV IN NARAVNO PRISOTNIH LAKTOBACILOV PRI HRANJENJU PRI TEMPERATURI HLADILNIKA (POSKUS 3)

PRILOGE H2: VELIKOSTI MIKROBNE POPULACIJE LAKTOKOKOV, KOLIFORMNIH MO IN SKUPNEGA ŠTEVILA MO PRI HRANJENJU PRI TEMPERATURI HLADILNIKA (POSKUS 3)

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

<i>B.</i>	<i>Bacillus</i>
<i>Bif.</i>	<i>Bifidobacterium</i>
<i>Cl.</i>	<i>Clostridium</i>
CIP	Ciprofloksacin
CL	Klindamicin
DNA	Deoksiribonukleinska kislina
g/l	gramov na liter
KE	Kolonijske enote
KE/ml	kolonijskih enot na mililiter
<i>Lb.</i>	<i>Lactobacillus</i>
M17	Gojišče za laktokoce
MO	Mikroorganizmi
MKB	Mlečnokislinske bakterije
MRS	Gojišče de Man – Rogosa – Sharp za laktobacile
MRS/CL/CIP	gojišče MRS z antibiotikoma klindamicinom (CL) in ciprofloksacinom (CIP) za selekcijo seva K7
PCA	Gojišče Plate Count Agar za skupno število mikroorganizmov
SŠMO	Skupno število mikroorganizmov
<i>Sta.</i>	<i>Staphylococcus</i>
<i>Str.</i>	<i>Streptococcus</i>
SCCA	Short Chain Carboxylic Acids (kratkoverižne karboksilne kisline)
VRB	Gojišče Violet Red Bile Agar za koliformne mikroorganizme
Error! Bookmark not defined.	

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Na slovenskem trgu je vedno več živil, prehranskih dopolnil, dodatkov živalski krmi in zdravil brez recepta, ki vsebujejo probiotične bakterije. Ker pa trditve o njihovih zdravju pozitivnih učinkih in sestavi niso preverjane na enak način in z enako strogostjo kot je to uveljavljeno za zdravila, mikrobiološke analize velikokrat pokažejo neujemanje med dejanskim številom in vrsto prisotnih organizmov v izdelku ter podatki na deklaraciji (Bogovič-Matijašič in Rogelj, 2006).

Sirotka je prehransko najkakovostnejši del mleka. Dobimo jo kot preostanek, ko med postopkom sirjenja iz mleka izstopita beljakovina kazein in večina mlečne maščobe. Po sirjenju v sirotki ostane približno polovica mineralov, ves mlečni sladkor in sirotkine beljakovine (albumini in globulini), ki po sestavi in izkoristku sodijo med najkakovostnejše beljakovine nasploh. Albumine in globuline iz sirotke izločimo z nadaljnjim postopkom predelave, kjer izstopijo v obliki sirarske ali albuminske skute. Tako nastane skoraj povsem brezbeljakovinska ali sekundarna sirotka, medtem ko je njena predhodnica, ki vsebuje albumine in globuline, znana kot primarna sirotka.

Sirotka nas preskrbi z najkakovostnejšimi in najlažje prebavljivimi beljakovinami, kar jih poznamo. Vsebuje še minerale, nekatere vitamine ter druge snovi, ki dvigujejo telesno odpornost in poživljajo presnovo. Sirotka dobrodejno vpliva na prebavila. Zaradi laktoze spodbuja razvoj zdravju koristne mikroflore v debelem črevesju in s tem posledično vpliva na splošno izboljšanje počutja ter povečuje telesno odpornost.

Danes sirotka žal še vedno ni izkoriščena v taki meri kot bi lahko bila. V prehrani ljudi se na trgu največkrat pojavlja sirotka v prahu, ki jo dodajajo raznim mlečnim izdelkom. Večji delež se je še vedno uporabi v prehrani živali, predvsem prašičev. Žal pa jo je tudi za prašiče preveč. Tako kot drugod po svetu, predstavlja sirotka velik problem tudi v Sloveniji, zato jo velike količine izvozijo na Madžarsko, kar pa predstavlja visok finančni strošek. S fermentacijo koncentrirane sirotke z izbranimi laktobacili, osamljenimi iz črevesne sluznice prašičev, bi lahko izboljšali njeno prehransko vrednost in podaljšali obstojnost ter na ta način pridobili odličen prehranski dodatek za živali.

Takšen pristop je priporočljiv z ekonomskega in tudi z ekološkega stališča. V zahodni Evropi mora imeti vsaka mlekarna rešen problem neškodljivega odstranjevanja sirotke. V okolje je ne smejo izpuščati, ker se zavedajo negativnih posledic za okolje, predvsem pa zaradi stroge zakonodaje. V Sloveniji ta problem še ni ustrezno rešen. Na državni ravni je treba doseči skupen dogovor o načinu reševanju tega problema, kar bi omogočilo koristno porabo in predelavo sirotke vseh slovenskih mlekarn in pomenilo veliko razbremenitev okolja (Mavrin in Oštir, 2002).

Metoda štetja kolonij na hranljivi podlogi je ena najpogosteje uporabljenih metod za ugotavljanje velikosti mikrobnih populacij v najrazličnejših vzorcih. Omenjena metoda je

primerna za mikrobiološke analize tako tekočih kot tudi trdnih vzorcev, seveda ob predpostavki, da trdne vzorce predhodno primerno pripravimo, na primer homogeniziramo v ustrezni razredčevalni raztopini. Glede na izhodni vzorec, rezultat izražamo kot število kolonijskih enot (KE) v mililitru ali v gramu vzorca, pri čemer se je potrebno zavedati, da lahko kolonije izrastejo iz več kot ene mikrobne celice (Kaiser, 2005).

1.2 NAMEN NALOGE

- Ugotoviti sposobnost rasti izbranih izolatov laktobacilov v koncentrirani sirotki pri različnih pogojih fermentacije (čas, temperatura, kombinacija izolatov) in optimizirati pogoje fermentacije.
- Ugotoviti mikrobiološko sliko izhodiščne in fermentirane sirotke.
- Ugotoviti vpliv dodanih laktobacilov na izhodiščno mikrofloro sirotke.
- Spremljati obstojnost fermentirane sirotke med shranjevanjem pri različnih časovno-temperaturnih režimih (7, 14 ali 21 dni; sobna temperatura ali temperatura hladilnika), z merjenjem vrednosti pH in ugotavljanjem števila mikroorganizmov (skupno število, število laktobacilov, laktokokov, koliformnih MO).
- Pripraviti obstojen probiotičen prehranski dodatek za živali (prašiče), z visoko vsebnostjo izbranih živih probiotičnih bakterij.

1.3 DELOVNE HIPOTEZE

- Dodani prašičji izolati laktobacilov, predhodno osamljeni iz črevesne sluznice prašičev, se bodo v fermentirani koncentrirani sirotki namnožili do najmanj 10^9 KE/ml in prerasli izhodiščno mikrofloro sirotke.
- Ne glede na režim shranjevanja fermentirane sirotke (en teden pri sobni T oziroma tri tedne pri 4 °C), populacija dodanega laktobacila ne bo padla pod 10^7 KE/ml.
- Med shranjevanjem fermentirane sirotke pri sobni temperaturi bo skupno število MO naraslo, pri 4 °C pa ostalo približno enako.
- Obstojnost fermentirane sirotke (sprememba vrednosti pH in sprememba skupnega števila oziroma števila posameznih skupin MO) bo boljša pri 4 °C kot pri sobni temperaturi.
- Obstojnost sirotke, fermentirane z izbranimi laktobacili, bo boljša od obstojnosti kontrolne sirotke (fermentirana izhodiščna sirotka, brez dodanih laktobacilov).

2 PREGLED OBJAV

2.1 SESTAVA SIROTKE

Sirotka je stranski proizvod v tehnološkem procesu proizvodnje sira ali kazeina (Tratnik, 1998). Predstavlja bogato in raznoliko raztopino, ki vsebuje beljakovine značilnih kemijskih, fizikalnih in funkcionalnih lastnosti. Povprečno dobimo pri vsakem kilogramu izdelanega sira okoli devet litrov sirotke, ki vsebuje približno polovico vseh hranilnih snovi mleka (Zadow, 2003).

Izločanje kazeina iz mleka poteka med procesom acidifikacije v območju vrednosti pH med 4,5 in 4,8 ali pa zaradi dodatka encimskega pripravka (himozina), ki povzroči koagulacijo kazeina (Zadow, 2003).

Po kislosti sirotko razdelimo v tri skupine (Zadow, 1993, cit. po Tratnik, 1998):

- Sladka sirotka: vrednost pH od 5,8 do 6,6
- Srednje kislja sirotka: vrednost pH od 5,0 do 5,8
- Kislja sirotka: vrednost pH manj kot 5,0

Kemijska sestava sirotke je odvisna od načina pridobivanja sira. V povprečju sirotka vsebuje 93 % vode in 7 % suhe snovi (Preglednica 1). Lahko rečemo, da je sirotka 5 % raztopina laktoze. Poleg laktoze, sirotka vsebuje majhne količine beljakovin, soli in maščobe. Vitamini, topni v vodi, se v sirotki nahajajo v približno enaki količini kot v mleku (Pomeranz, 1992).

Preglednica 1: Kemijska sestava sladke in kisle sirotke (Pomeranz, 1992)

Vsebnost (g/l)	Sladka sirotka (pH 5,9-6,4)	Kislja sirotka (pH 4,6-4,8)
Skupna suha snov	63,0 - 70,0	
Beljakovine	6,0 - 8,0	6,0 - 7,0
Laktoza	46,0 - 52,0	44,0 - 46,0
Maščoba	0,2 - 1,0	0,1 - 0,5
Kalcij	0,4 - 0,6	1,2 - 1,6
Magnezij	0,08	0,11
Fosfat	1,0 - 3,0	2,0 - 4,5
Citrat	1,2 - 1,7	0,2 - 1,0
Laktat	2	6,4
Natrij	0,4 - 0,5	
Kalij	1,4 - 1,6	
Klorid	1,0 - 1,2	

2.1.1 Sirotkine beljakovine

Najpomembnejši del sirotke zagotovo predstavljajo sirotkine beljakovine s svojimi edinstvenimi, hranljivimi in biološkimi lastnostmi (Doulton in sod., 2004).

Sirotkine beljakovine so beljakovine, ki se pojavijo v supernatantu po obarjanju kazeinov pri vrednosti pH 4,6. Encimska koagulacija se bistveno razlikuje od kislinske, saj himozin cepi κ -kazein (kapakazein), ki je sestavljen iz dveh delov: hidrofilnega in hidrofobnega. Hidrofilni del privlači molekule vode, hidrofobni del nase veže kalcijeve ione. Ko v mleko dodamo sirišče, se razrahlja vez med tema dvema deloma κ -kazeina, tako da se hidrofilni del izloči v sirotko, hidrofobni del pa ostane v miceli. κ -kazeinu, ki je ostal brez hidrofilnega dela, pravimo parakapakazein, spremenjenim kazeinskim micelam pa parakazeinske micle. Vrednost pH encimske koagulacije se giblje med 5,1 – 5,3 (Mavrin in Oštir, 2002).

Sirotkine beljakovine so globularne beljakovine in obstajajo kot samostojne molekule z različnim številom disulfidnih povezav. V primerjavi s kazeini imajo večjo topnost v vodi in so bolj občutljive na povišano temperaturo. Glavne beljakovinske komponente, zastopane v sirotki vključujejo α -laktalbumin, β -laktoglobulin in manjše količine imunoglobulinov, serum albumina in proteaza peptonov (Gramc, 1997).

Proteini sirotke (Preglednica 2) so neobčutljivi na kislinsko in encimsko razgradnjo, zato med koagulacijo mleka ostanejo nespremenjeni, po ločevanju kazeina pa v celoti preidejo v sirotko. Zaradi tega je količina proteinov v sladki in v kisli sirotki zelo podobna, medtem ko delež prostih aminokislin precej variira, v odvisnosti od stopnje hidrolize kazeina (Tratnik, 1998).

Preglednica 2: Delež proteinov v sirotki (Tratnik, 1998)

Proteini v sirotki	(%) od vseh
β -laktoglobulin	50
α -laktalbumin	22
Imunoglobulini	12
Protezoza - peptoni	10
Albumin krvnega seruma	5
Ostalo	1

Najpomembnejša sirotkina beljakovina kravjega mleka je β -laktoglobulin. Pri temperaturah nad 60 °C začne denaturirati in se s pomočjo žveplovih mostičkov povezovati s κ -kazeinom in α -laktalbuminom. Pri visokih temperaturah sprošča žveplove spojine, predvsem sulfhidrilne, ki vežejo nase težke kovine in imajo zaradi tega antioksidativne lastnosti. Mleku dajejo okus po kuhanju (Mavrin in Oštir, 2002).

α -laktalbumin je tudi značilna beljakovina in ga je v mleku bistveno manj kot β -laktoglobulina. Najdemo ga v mleku vseh sesalcev in ima pomembno vlogo pri sintezi laktoze v vimenu (Mavrin in Oštir, 2002).

Na funkcionalnost sirotkinih beljakovin, še posebno na proces želiranja, izredno dobro vpliva kalcij. V eni izmed študij so ugotovili, da dodatek kalcija poveča čvrstost gela in združevanje beljakovinskih molekul, kar povečuje prožnost in elastičnost sirotkinih gelov (Beaulieu in sod., 2001).

2.1.2 Laktoza

Laktoza je disaharid ($C_{12}H_{22}O_{11}$), sestavljen iz molekul α -D-glukoze in β -D-galaktoze. Laktoza se v mleku pojavlja v dveh oblikah, α - in β - obliki, ki sta strukturno izomerični in se razlikujeta po položaju H in OH skupin na prvem C atomu glukozidnega dela. Na razmerje med α - in β - obliko laktoze v mleku pa vpliva tudi temperatura mleka, saj je β - oblika laktoze bolj topna od α - oblike. Pri sobni temperaturi mleka predstavlja α -laktoza 37,3 % in β -laktoza 62,7 % od skupne količine laktoze v mleku. S spremembo temperature se spreminja tudi njun delež, kar pomeni, da ena oblika laktoze prehaja v drugo. Temu pojavu pravimo mutarotacija. Mutarotacija ima pomembno vlogo v komercialnih procesih kristalizacije laktoze. V praksi je pomembna kristalizacija α -laktoze, ker kristalizira hitreje kot β -laktoza (Tratnik, 1998).

Laktoza je značilen sladkor mleka, spada med ogljikove hidrate in zato jo imenujemo mlečni sladkor. Količina laktoze se v mleku giblje od 4,5 do 5 % in predstavlja največji delež suhe snovi mleka. Najnižjo vrednost doseže v kolostralnem mleku in mleku pozne laktacijske dobe v primeru obolenj mlečne žleze. Laktoza je tipičen proizvod mlečne žleze. Nekateri mikroorganizmi, predvsem mlečnokislinske bakterije, lahko razgradijo oz. fermentirajo laktozo v mlečno kislino in nekatere druge spojine, kar je pomembno za celotno mlekarstvo. Ta pretvorba laktoze omogoča predelavo mleka v različne mlečne izdelke, tj. kontrolirano fermentacijo, ki je zaželena, lahko pa povzroči hitro kvarjenje mleka, tj. naključno fermentacijo, ki ni zaželena (Mavrin in Oštir, 2002).

Čisti mlečni sladkor je kristalna snov bele barve brez posebnega vonja. Čeprav je petkrat manj sladek kot saharoza, daje mleku značilen sladkast okus. V mleku se nahaja v obliki prave raztopine, kar vpliva na:

- ozmotski tlak,
- zmrziščno točko,
- točko vrelišča,
- refrakcijo mleka (Mavrin in Oštir, 2002).

2.1.3 Mlečna maščoba in hlapne maščobne kisline

Mlečna maščoba se v veliki meri zadrži v siru, vendar manjši del maščobe vedno preide tudi v sirotko. Manj maščobe vsebuje kislina sirotka, saj kisle sveže sire navadno izdelujejo iz posnetega mleka. V primerjavi z mlečno maščobo v mleku je mlečna maščoba v sirotki bolj razpršena in vsebuje večji odstotek manjših maščobnih kroglic (Tratnik, 1998).

Količina mlečne kisline v sirotki je zelo spremenljiva in je odvisna od postopka pridelave sira, načina hranjenja sirotke ter od mikrobne združbe v sirotki. V sladki sirotki jo je povprečno 0,76 %, medtem ko jo je v kisli sirotki okoli 1,08 % (Tratnik, 1998).

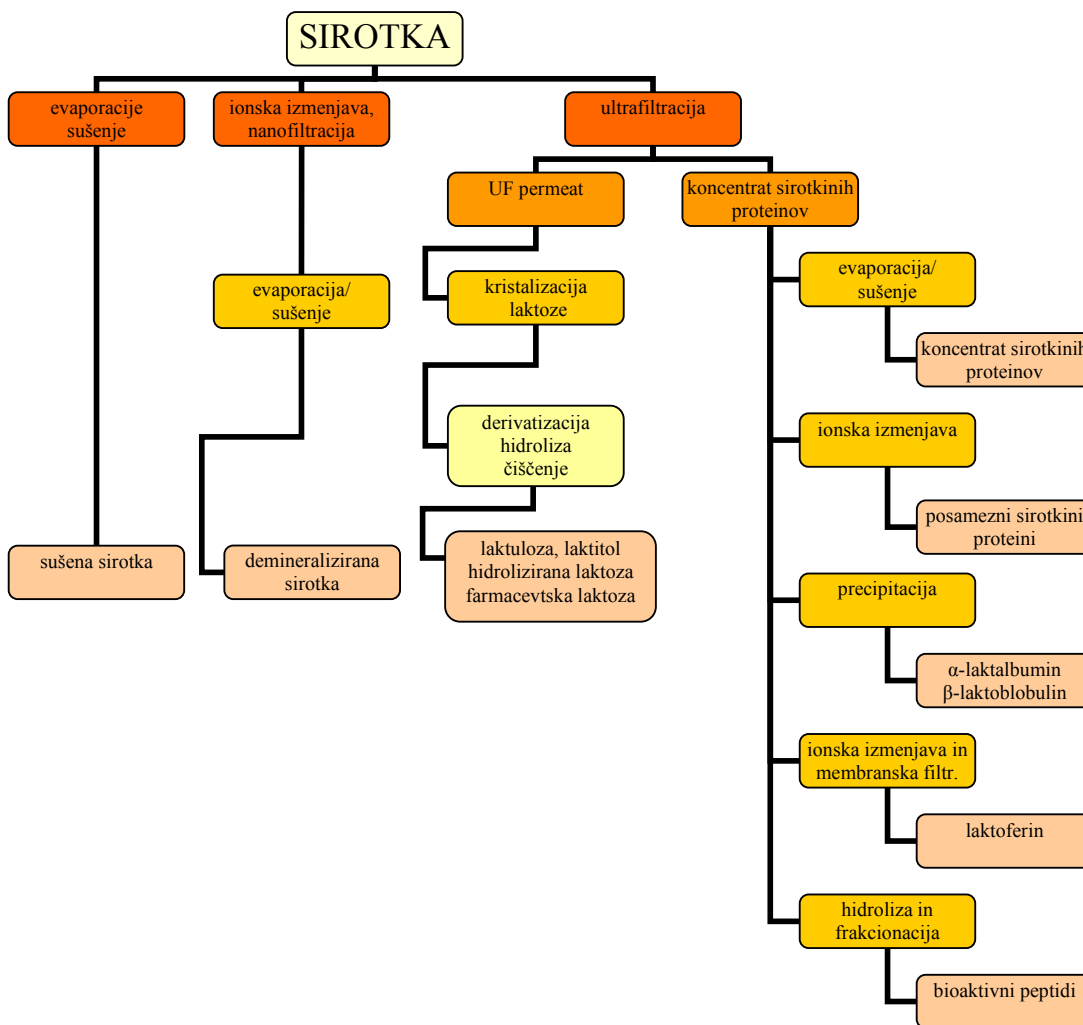
V surovi sirotki zasledimo še tri hlapne maščobne kisline in sicer očetno (9,2 mg/l), propionsko (8,5mg/l) in n-masleno kislino (200 mg/l) (Ghaly, 1996).

2.1.4 Vitamini

Iz mleka prehajajo v sirotko tudi vodotopni vitamini, vitamini topni v maščobah pa le delno, odvisno od količine maščobe, ki ostane po proizvodnji sira v sirotki. Delež vitaminov je spremenljiv in odvisen predvsem od načina shranjevanja sirotke. V splošnem velja, da lahko en liter sirotke zadovolji dnevne potrebe odraslega človeka po vitaminih B-skupine (Tratnik, 1998).

2.2 UPORABA SIROTKE

Najpreprostejša izraba sirotke je za krmo živalim (Poglavje 2.2.1) ali kot gnojilo, medtem ko so možnosti predelave sirotke prikazane na Sliki 1.



Slika 1: Diagram poteka izkoriščanja sirotke in pridobivanje različnih produktov (Durham in Hourigan, 2007).

Izboljšanje separacijskih tehnik ločevanja sirotkinih sestavin, kot so mikrofiltracija, ultrafiltracija, reverzna osmoza, elektroforeza in kromatografija, je omogočilo, da se možnosti za uporabo sirotke nenehno širijo (Pomeranz, 1992).

Živilska industrija uporablja sirotko in njene izdelke (sirotkin beljakovinski koncentrat in izolat, sirotka v prahu) kot dodatke v mlekarški industriji, za obogatitev nekaterih vrst sirov in ostalih fermentiranih mlečnih izdelkov, za pripravo adaptiranega mleka (nadomestek za materino mleko), v proizvodnji pijač, otroške hrane, slaščičarstvu, mesni industriji in ostalih izdelkov s področja predpripravljenih živil, kot so juhe, omake, zamrznjena živila in podobno (Pomeranz, 1992; Zadow, 2003).

2.2.1 SIROTKA V PREHRANI ŽIVALI

Sirotko največ uporabljamo za prehrano svinj v tekočem, koncentriranem stanju ali v obliki prahu. Uporablja se tudi v prehrani telet in perutnine, vendar le kot dodatek obrokom (Miletič, 1994).

Zaradi ločevalnega učinka pri encimski koagulaciji mleka je sirotka osiromašena energije (1,1 MJ/kg), v maščobi topnih vitaminov ter kalcija in fosforja. Kvantitativno je revnejši vir proteinov kot mleko, vendar največji delež proteinov predstavljajo β -laktoglobulini, ki so zelo dobre kvalitete. Ponavadi s tekočo sirotko krmimo prašiče »ad libitum« (neomejeno, po želji). Sušeno posneto mleko in sirotka sta uporabna kot sestavina v mlečnih nadomestkih pri krmljenju telet. Nasprotno od tistih v posnetem mleku, se sirotkini proteini ne zasirijo v siriščniku, zato lahko povzročijo prebavne motnje, če je količina, vključena v obrok prevelika (McDonald in sod., 1995).



Slika 2: Sirotka (Cortese, 2008)

2.3 MLEČNOKISLINSKE BAKTERIJE

Mlečnokislinske bakterije (MKB) so raznovrstna skupina mikroorganizmov, katerih prednosti človek s pridom izkorišča že stoletja. Ker naseljujejo raznolike ekološke niše jih najdemo tako v fermentiranih živilih kot tudi v prebavnem traktu ljudi in živali, kjer predstavljajo del naravne mikroflore (Rogelj, 2001).

Za MKB velja, da so po Gramu pozitivni koki ali palčke, ki proizvajajo mlečno kislino kot glavni končni produkt fermentacije ogljikovih hidratov. So tudi katalaza negativne, mikroaerofilne in acidotolerantne bakterije brez citohromov (Axelsson, 1998; Somkuti, 2000). Med MKB prištevamo predstavnike rodov *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* in *Weissella* (Wessels in sod., 2004).

Med najpomembnejše lastnosti MKB lahko zapišemo,

- da so sestavni del naravne mikroflore mleka,
- da proizvajajo raznolike produkte kot so mlečna in očetna kislina, aromatične snovi, ogljikov dioksid in polisaharide,
- da zaradi sposobnosti rasti pri različnih temperaturnih območjih MKB sodelujejo pri proizvodnji širokega spektra fermentiranih izdelkov,
- da s probiotičnimi aktivnostmi, ki jih izražajo določeni sevi MKB, pozitivno prispevajo k zdravju ljudi,
- da so sestavni del avtohtone mikroflore humanega in živalskega prebavnega trakta, kjer uravnavajo črevesno mikrofloro in preprečujejo razmnoževanje patogenih bakterij
- ter da so zaradi sposobnosti fermentacije in terapevtsko prehranskih učinkov industrijsko pomembni organizmi (Wessels in sod., 2004).

2.3.1 Mlečnokislinska fermentacija

Pretvorba laktoze v mlečno kislino in druge snovi, kot so organske kisline (očetna), ogljikov dioksid, vodikov peroksid, diacetil, acetaldehid in D-izomere aminokislin, je glavni proces, ki se odvija med proizvodnjo fermentiranih mlečnih izdelkov. Mikroorganizmi, ki jih uporabljamo v proizvodnji fermentiranih živil, so najpogosteje vrste iz rodov *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* in *Carnobacterium*. Mlečna kislina, ki nastaja med procesom fermentacije, znižuje vrednost pH in s tem podaljšuje obstojnost izdelkov (Rogelj, 1997).

V preteklosti se je mlečnokislinska fermentacija zgodila kot spontan proces, a sčasoma je človek spoznal, da lahko s spreminjanjem pogojev fermentacije in usmerjenim izborom mikroorganizmov fermentacijo nadzira do končnega fermentiranega izdelka standardnih lastnosti in visoke kakovosti. Tako danes izbrane MKB uporabljajo kot starterske kulture v skrbno nadzorovanih procesih proizvodnje fermentiranih živil in krme (Čanžek Majhenič in sod., 2009).

Pomembna lastnost, po kateri lahko delimo vrste MKB, je način fermentacije glukoze v standardnih pogojih – ob zadostni koncentraciji glukoze in rastnih faktorjev (aminokislina,

vitamini, prekursorji nukleinskih kislin) ter ob omejeni koncentraciji kisika. Pod takimi pogoji rasti delimo MKB v dve skupini: na homofermentativne, ki pretvarjajo glukozo večinoma samo v mlečno kislino in na heterofermentativne, ki glukozo fermentirajo do mlečne kisline, etanola ali očetne kisline in CO₂ (Axelsson, 1998).

MKB delimo tudi glede na temperaturo, pri kateri poteka fermentacija. Pri tem ločimo mezofilne in termofilne mlečnokislinske starterske kulture (Zupan, 1996). Mezofilna mlečnokislinska fermentacija poteka pod vplivom bakterij, ki imajo optimalno temperaturo rasti v območju med 20 in 30 °C. Termofilne mlečnokislinske bakterije imajo optimalno temperaturo med 40 in 50 °C. Terapevtske mlečnokislinske bakterije (probiotične mlečnokislinske bakterije), kot je *Lb. acidophilus*, pa pri 37 °C (Mavrin in Oštir, 2002).

2.3.1.1 Termofilna mlečnokislinska fermentacija

Proces spremembe mleka v jogurt imenujemo termofilna fermentacija. Optimalna temperatura za rast bakterije *Str. thermophilus* je okoli 37 °C, za *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* pa 45 °C. Vendar obe uspešno rasteta pri 42 °C, kar je temperaturni kompromis med optimalnima temperaturama rasti *Str. thermophilus* in *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus*. Danes je to standardna temperatura komercialne izdelave klasičnega jogurta. Obe bakteriji sta homofermentativni, kar pomeni, da je glavni produkt fermentacije laktoze mlečna kislina (Rogelj in Perko, 2003). Potek termofilne fermentacije je v veliki meri odvisen od velikosti mikrobne populacije, razmerja bakterij v starterski kulturi in od časovnega poteka samega procesa. Končna vrednost pH izdelkov se giblje med 3,8 in 4,2, vsebnost mlečne kisline pa med 0,90 in 0,97 % (Zupan, 1996).

Izdelki, pridobljeni s termofilno fermentacijo, so jogurt in probiotični mlečni izdelki.

2.4 MLEČNOKISLINSKE BAKTERIJE KOT PROBIOTIKI

Izraz »probiotik« se je pojavil šele v 70-ih, ko ga je Parker (1974) uporabil za opis dodatkov živalski krmi, ki pospešujejo rast. Leta 1989 pa je Fuller (1989) definiral probiotik kot »živ mikrobni dodatek krmi, ki ugodno vpliva na žival gostiteljico z izboljšanjem njenega mikrobnega ravnovesja« in s tem poudaril pomembnost živih mikroorganizmov.

Primarne bakterijske vrste, katerih predstavnike so omenjali kot probiotike so bile *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* in *Bifidobacterium* ssp. (Preglednica 3). Kasnejše študije pa so pokazale, da se pod imenoma *Lb. acidophilus* in *Lb. casei* skrivajo različne bakterijske vrste. Na podlagi taksonomskih študij danes skupina *Lb. acidophilus* združuje 6 vrst, medtem ko najdemo znotraj skupine *Lb. casei* 3 vrste. Drugi dve vrsti laktobacilov, med katerimi pa najdemo mnoge komercialne probiotične seve sta *Lactobacillus reuteri* in *Lactobacillus plantarum*. Bifidobakterije, ki jih srečamo kot probiotike, pripadajo vrstam *Bif. lactis*, *Bif. adolescentis*, *Bif. bifidum*, *Bif. longum*, *Bif. breve* in *Bif. infantis* (Holzapfel in sod., 1998). Med najbolj zaželene pozitivne učinke MKB na zdravje človeka prištevamo antagonistično delovanje proti patogenim

mikroorganizmom, stimulacijo imunskega sistema, izboljšanje metabolizma laktoze, zniževanje koncentracije holesterola v serumu in protikancerogeno delovanje (Sanders in Huis in't Veld, 1999).

Preglednica 3: Vrste laktobacilov in bifidobakterij, katerih predstavnike najpogosteje najdemo med probiotiki (Holzapfel in sod., 1998)

Skupina: <i>Lactobacillus acidophilus</i>	Druge vrste laktobacilov
<i>Lb. acidophilus</i> <i>Lb. amylovorus</i> <i>Lb. crispatus</i> <i>Lb. gallinarum</i> <i>Lb. gasseri</i> <i>Lb. johnsonii</i>	<i>Lb. reuteri</i> <i>Lb. plantarum</i>
Skupina: <i>Lactobacillus casei</i>	Vrste rodu <i>Bifidobacterium</i>
<i>Lb. casei</i> <i>Lb. paracasei</i> <i>Lb. rhammosus</i>	<i>Bif. lactis</i> <i>Bif. longum</i> <i>Bif. adolescentis</i> <i>Bif. animals</i> <i>Bif. bifidum</i> <i>Bif. breve</i> <i>Bif. infantis</i>

Da pa lahko probiotični sevi izrazijo svojo aktivnost, je pomembno, da imajo sposobnost vezave na črevesno sluznico in vsaj začasne kolonizacije v prebavnem traktu gostitelja. Mehanizmi adhezije niso popolnoma raziskani, znano je le, da gre za specifične in nespecifične interakcije (Lee, 2004).

Značilna odlika probiotikov, ki proizvajajo mlečno kislino, je tudi njihova sposobnost naselitve in zaščite črevesne sluznice, ter metabolna aktivnost v črevesu, ki vključuje tudi tvorbo protimikrobnih snovi. S poskusi *in vitro* ter *in vivo* so uspeli pojasniti nekatere mehanizme delovanja mlečnokislinskih bakterij (Servin, 2004):

- produkcija protimikrobnih snovi, kot so kratkoveržne karboksilne kisline (SCCA),
- izključevanje vezave potencialno patogenih mikroorganizmov na črevesno sluznico,
- stimulacija lokalnega črevesnega imunskega sistema,
- zaviranje produkcije toksinov,
- učinek na črevesni epitel,
- vpliv na fizikalno-kemijske pogoje v črevesu in s tem omejitev rastnih pogojev za neželene mikrobe,
- vpliv na metabolizem žolčnih kislin in posledično pospeševanje absorpcije maščob.

2.4.1 Rod *Lactobacillus*

Za rod *Lactobacillus* velja, da je daleč najštevilčnejši rod med MKB, saj združuje največ vrst. Je tudi zelo heterogen, saj posedujejo vrste raznolike fenotipske, biokemijske in fiziološke lastnosti. Heterogenost pa se odraža tudi v območju vsebnosti C+G (v mol %) v DNA vrst, ki pripadajo temu rodu (Axelsson, 1998), saj to območje znaša od 32-53 %, kar je približno dvakrat več kot je za posamezen rod običajno.

Laktobacili so tudi najpogosteje zastopana skupina industrijsko uporabljenih bakterij v živilstvu. So po Gramu pozitivne, dolge ali kokoidne, negibljive in nesporogene palčke. Energijo pridobivajo izključno s fermentacijo sladkorjev. Glede odnosa do kisika so aerotolerantni anaerobi. Poleg fermentabilnih sladkorjev potrebujejo še druge rastne dejavnike, kot so aminokisliline, vitamini in organske baze (Adamič in sod., 2003).

Razmnožujejo se v širokem temperaturnem območju, pri temperaturi od 2 °C pa do 45 °C, optimum je med 30 °C in 40 °C (Adamič in sod., 2003).

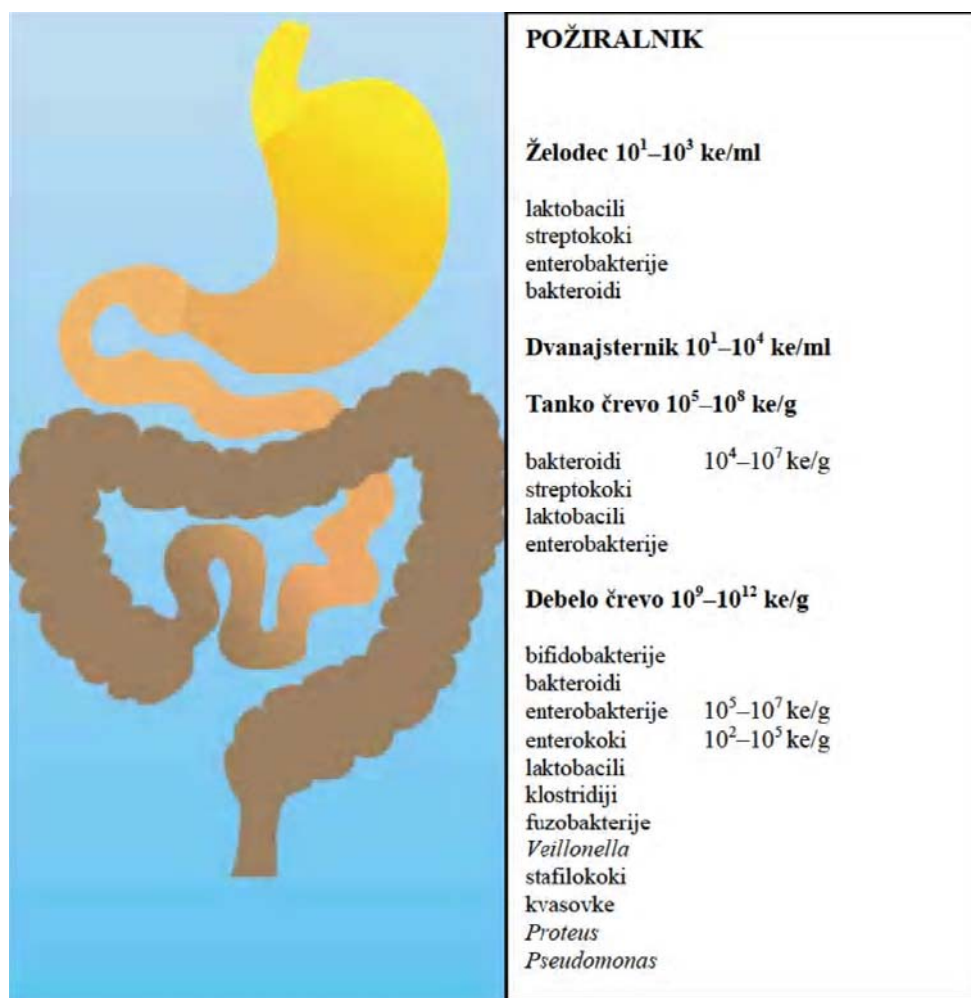
Bakterije rodu *Lactobacillus* so naravni prebivalci tako humanega kot živalskega prebavnega trakta (Walter, 2005). Njihova naloga je zaščita pred infekcijami, spodbujanje imunskega sistema in zmanjšanje pojava diareje (Ouwehand in sod., 2002; Koninkx in Malago, 2008).

Nekatere seve skupine *Lactobacillus acidophilus* odlikujejo probiotične lastnosti. Take seve najdemo znotraj vrst *Lb. acidophilus*, *Lb. amylovorus*, *Lb. crispatus*, *Lb. gallinarum*, *Lb. johnsonii* in *Lb. gasseri*. Med seboj jih razlikujemo z molekularnimi tehnikami DNA. Skupina je obligatno homofermentativna in fermentira sladkorje v mlečno kislino. Uspešno rastejo tudi pri nizkih vrednostih pH (pod 5,0), njihova optimalna temperatura razmnoževanje je do 37 °C (Naidu in Clemens, 2000).

Lactobacillus reuteri je obligatno heterofermentativna bakterija. Naseljuje prebavni trakt ljudi in živali (prašiči, govedo, perutnina, ovce) (Axelsson and Lindgren, 1987). Nekateri sevi vrste *Lb. reuteri* lahko proizvajajo bakteriocin reuterin, kadar rastejo anaerobno ob prisotnosti glicerola. Reuterin ima zelo širok spekter delovanja, saj zavira rast po Gramu pozitivnih in po Gramu negativnih bakterij, kvasovk, plesni, protozojev in virusov. Na reuterin so občutljive tudi MKB, vključno z *Lb. reuteri* (Ouwehand, 1998).

2.5 PREBAVNI TRAKT

Prebavni trakt je bogato okolje za razvoj in vzdrževanje goste in raznovrstne mikrobne flore (Slika 3). V debelem črevesu človeka in monogastričnih živali (prašičev, perutnine,...) se nahaja od 10^{10} do 10^{11} , predvsem anaerobnih bakterij na gram vsebine (Fonty in sod., 1995).



Slika 3: Poselitev različnih delov prašičjega črevesa z mikroorganizmi (Gedek, 1991)

Kompleksnost prebavnega trakta se razlikuje med vrstami živali in znotraj posameznih prebavil. Odvisna je tudi od zdravstvenega stanja posameznih živali. Ključno pri prebavi je učinkovita absorpcija hranil skozi steno prebavil. Fermentacija in hidroliza sta pri tem najpomembnejša mehanizma, ki pretvorita hrano v obliko primerno za absorpcijo (Ewing in Cole, 1994).

Mikrofloro prebavnega trakta bi lahko označili kot postnatalno pridobljen organ, sestavljen iz raznolikih bakterij, ki opravljajo pomembno funkcijo za gostitelja. Sestava mikroflore se lahko spreminja pod vplivi okolja. Med najpomembnejšimi dejavniki je prehrana (Blum in Schiffrin, 2002).

V prebavilih najdemo stalno in prehodno mikrofloro. Pomembnejše učinke imajo predvsem stalni mikroorganizmi, medtem ko prehodni le izjemoma, če so prisotni v velikem številu ali če izločajo bioaktivne snovi kot so toksini, metaboliti, inhibitorji (Fonty in sod., 1995).

2.5.1 Razvoj mikroflore pri prašiču

Pri prašiču ima bakterijska flora značilno vlogo pri prebavi že v tankem črevesu. Glavni del prebave pri prašiču poteka v debelem črevesu, pri tem pa sodelujejo mikroorganizmi. Večina vrst črevesnih bakterij pri prašiču razgrajuje monosaharide (glukozo, galaktozo in fruktozo) in disaharide (laktozo, maltozo, saharozo), lastno amilazo pa vsebujejo samo nekatere vrste. Največ jo ima *Bifidobacterium bifidum*, *Streptococcus bovis*, *Str. equinus*, *Clostridium perfringens* in *Cl. butyricum* (Černe, 1996).

Debelo črevo je najgosteje poseljen mikrobni ekosistem. Gram vsebine vsebuje do 10^{12} organizmov iz nabora doslej ugotovljenih 400 mikrobnih vrst, ki so predvsem striktni anaerobi. Količinsko sta pri človeku in živalih najpomembnejši skupini *Bacteroides* in bifidobakterije. Številčno prevladujejo po Gramu negativne vrste rodu *Bacteroides* (npr. *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides ovatus*, *Bacteroides thetaiotaomicron*). V tem rodu so proteolitične in saharolitične vrste (MacFarlane in Gibson, 1994).

Specifičnim predstavnikom prebavne mikroflore, med katerimi so najbolj proučeni laktobacili in bifidobakterije, pripisujejo številne ugodne vplive na gostitelja. Ugodni vplivi se odražajo v spodbujanju razvoja prebavil, imunski modulaciji in antagonizmu s patogenimi mikrobi. Mikroflora ima pomembno vlogo tudi pri ohranjanju črevesne imunske homeostaze ter pri preprečevanju vnetij. Prva obramba proti patogenim bakterijam in mikrobnim antigenom poteka na nivoju črevesnih epitelnih celic. Raznolika in kompleksna mikrobna združba je v prebavilih v tesni povezavi s sluznico gostitelja (Blum in Schiffrin, 2002; Leser in sod., 2002).



Slika 4: Prašič (Kmetijstvo, 2008)

2.6 ZAKONODAJA NA PODROČJU PREHRANSKIH DODATKOV

Evropska zakonodaja, ki ureja področje prehrane in prehranskih dodatkov za živali, temelji na dveh glavnih uredbah (Uredba št. 1831/2003/ES in Uredba št. 429/2008/ES), ki natančno predpisujeta postopke uporabe, označevanje in nadzora krmnih dodatkov, podajata smernice za oceno le teh in registracijo novih (Uredba Evropskega ..., 2003).

Področje uporabe probiotikov kot krmnih dodatkov za živalsko prehrano je veliko bolje urejeno kot področje uporabe probiotikov za humano uporabo. Uredba EU 1831/2003 uvršča probiotične mikroorganizme v kategorijo krmnih dodatkov, znotraj te pa v funkcionalno skupino stabilizatorjev črevesne flore. Predpisano je označevanje, ki vključuje rok trajanja, način uporabe, identifikacijsko številko seva in število kolonijskih enot v gramu (KE/g). V EU je na seznamu krmnih dodatkov trenutno registriranih 29 mikroorganizmov kot probiotikov za krmila (Zakon o krmi, 2006).

Z januarjem leta 2006 je pričela v EU veljati prepoved uporabe vseh antibiotikov, ki so se v prehrano živali dodajali kot preventiva in kot pospeševalci rasti. Posledica te prepovedi je bilo pospešeno iskanje prehranskih alternativ, ki bi, podobno kot antibiotiki, uspeli izboljšati oziroma racionalizirati živalsko proizvodnjo. Hkrati z novimi dodatki, ki so se pojavili na trgu, je zakonodaja izvedla nekaj pomembnih sprememb, ki so in bodo pripomogle k večji varnosti uporabe krmnih dodatkov (Zakon o krmi, 2006).

Večina današnje zakonodaje s področja krme in krmnih dodatkov, vključno z mikroorganizmi, temelji na mnenjih in usmeritvah dveh strokovnih organov pod okriljem Evropske komisije in sicer Scientific committee of animal nutrition (SCAN) in European food safety authority (EFSA). Leta 2001 je SCAN izdal dopolnjeno mnenje o uporabi krmnih dodatkov, s posebnim poglavjem, ki zajema encime in mikroorganizme. Vse ugotovitve tega dokumenta zdaj zajema Uredba 429/2008/ES (Uredba komisije ..., 2008).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 NAČRT POSKUSA

V sklopu eksperimentalnega dela smo primerjali mikrobiološko sliko sirotke, fermentirane z dodatkom izbranih prašičjih izolatov in izhodiščne sirotke, fermentirane brez dodatka prašičjih izolatov (kontrola). Izhodiščna sirotka je bila sveža, petkrat koncentrirana sirotka, ki smo jo dobili iz Pomurskih mlekarn. Za fermentacijo smo, na podlagi rezultatov predhodno opravljene raziskave (Hacin in sod., 2008), med laktobacili, osamljenimi iz črevesne sluznice prašičev, najprej izbrali tri izolate: 2/25, 4/26 in 14/26. Omenjeni prašičji izolati izkazujejo dobro protimikrobno delovanje.

Potek eksperimentalnega dela smo razdelili v dva dela.

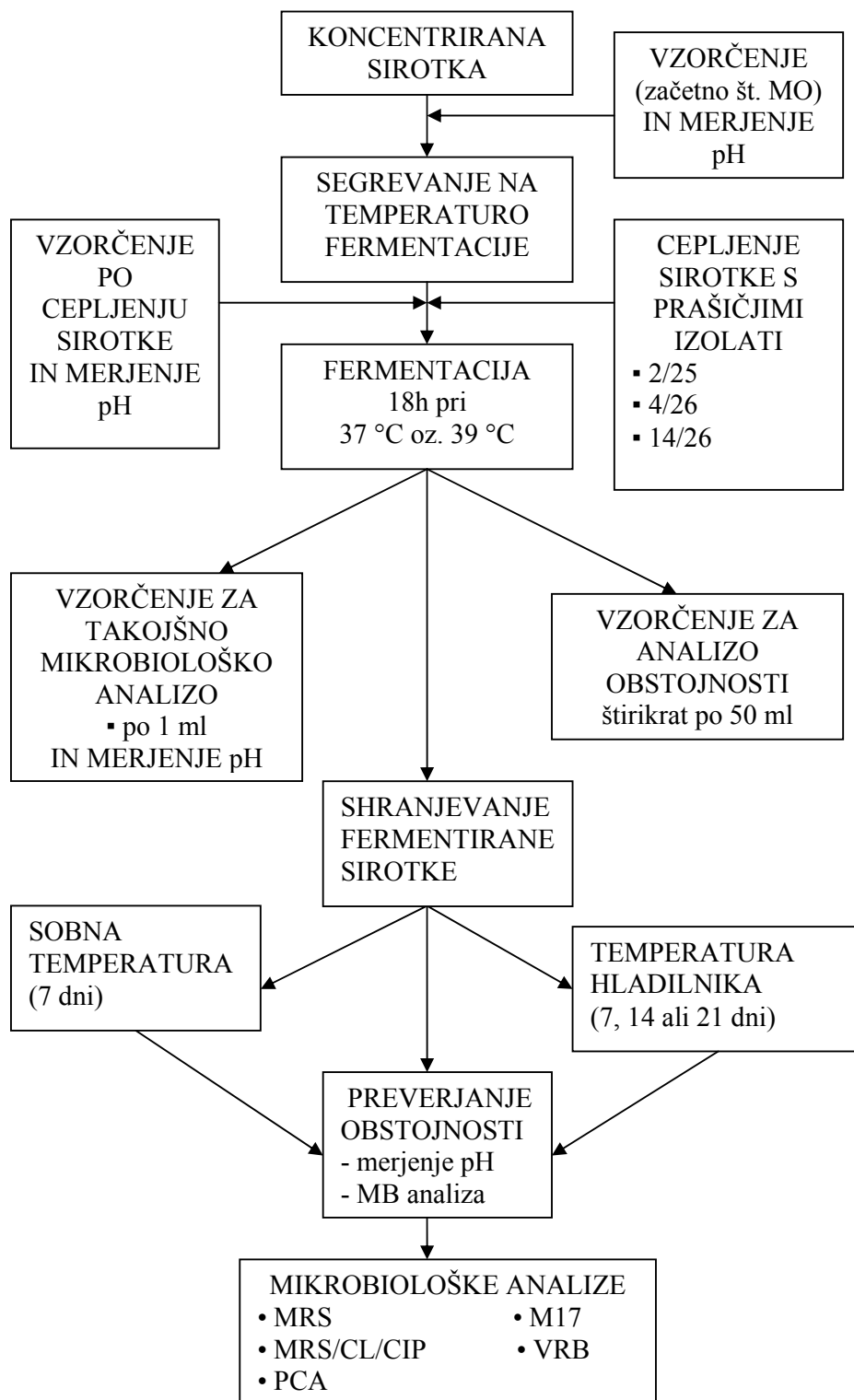
V prvem delu smo v predposkusu s tehniko vmešavanja najprej preverili uspešnost rasti prašičjih izolatov na gojišču MRS z dodatkom antibiotikov (Priloga 1). V petrijeve plošče smo cepili po 1 ml zaporednih, 10-kratnih razreditev čistih kultur prašičjih izolatov. V raztopljeno trdno gojišče MRS, ohlajeno na 45 °C, smo pred razlivanjem dodali antibiotika klindamicin (CL) in ciprofloksacin (CIP). Nacepljene petrijeve plošče smo inkubirali 2 dni pri 37 °C. Nato pa smo v treh poskusih izvedli po štiri fermentacije (Preglednica 4) pri različnih temperaturnih režimih in z uporabo različnih kombinacij prašičjih izolatov. Zanimali sta nas optimalna temperatura fermentacije in optimalna kombinacija prašičjih izolatov.

Preglednica 4: Pogoji fermentacije koncentrirane sirotke z različno kombinacijo prašičjih izolatov

Vzorec	Poskus 1 T= 37 °C/18 h	Oznaka vzorca	Poskus 2 T= 37 °C/18 h	Oznaka vzorca	Poskus 3 T= 39 °C/18 h	Oznaka vzorca
1	2/25	1/1	2/25 + 14/26 + 4/26	2/1	2/25	3/1
2	4/26	1/2	2/25 + 14/26	2/2	4/26	3/2
3	14/26	1/3	4/26 + 14/26	2/3	14/26	3/3
4	kontrola	1/4	kontrola	2/4	kontrola	3/4
5	izhodiščna sirotka	1/5	izhodiščna sirotka	2/5	izhodiščna sirotka	3/5

Vzorec številka 5 je bila nefermentirana izhodiščna sirotka. Hranili smo jo v hladilniku in jo uporabljali za primerjavo rezultatov, dobljenih s fermentiranimi vzorci.

V drugem delu našega eksperimentalnega dela pa smo spremljali obstojnost fermentirane sirotke (spremembe v mikrobiološki sliki fermentirane sirotke in vrednosti pH). Obstojnost smo spremljali pri sobni temperaturi (po sedmih dneh) in temperaturi hladilnika (po sedmih, štirinajstih in enaindvajsetih dneh). Slika 5 prikazuje potek celotnega poskusa.



Slika 5: Potek poskusa

3.2 MATERIAL

3.2.1 Koncentrirana sirotka

Osnovna surovina za naše poskuse je bila petkrat koncentrirana sirotko z 32 % suhe snovi in vrednostjo pH 5,8, ki smo jo dobili iz Pomurskih mlekarn. Do poskusa smo jo hranili pri -20 °C, med poskusi pa v hladilniku.

3.2.2 Bakterijski sevi in pogoji gojenja

V poskusih fermentacije smo uporabili bakterijske seve 2/25, 4/26 in 14/26. Omenjeni sevi so bili osamljeni iz črevesne sluznice prašičev, z ugotavljanjem nukleotidnega zaporedja odseka V1-V2 16S rDNA pa sta bila seva 2/25 in 4/26 prepoznana kot pripadnika vrst *Lb. crispatus*/*Lb. amylovorus*, medtem ko je sev 14/26 pripadnik vrste *Lb. reuteri* (Hacin in sod., 2008). Sevi so shranjeni v mikrobnih zbirki IML Katedre za mlekarstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani in sicer pod oznakami 2/25=IM 299, 4/26=IM 276 in 14/26=IM 279. Seve smo oživili iz zamrznjenih kultur tako, da smo jih vcepili v tekoče gojišče MRS, jih aerobno inkubirali 2 – 3 dni pri 37 °C ter jih zaporedno dvakrat precepili v sveže tekoče gojišče MRS.

3.2.3 Gojišča

Za posamezne skupine in skupno število mikroorganizmov smo uporabljali standardna komercialna gojišča. Vsa komercialna gojišča smo pripravili in avtoklavirali po navodilih proizvajalcev.

3.2.3.1 Gojišče za ugotavljanje skupnega števila laktobacilov (MRS)

Za ugotavljanje skupnega števila laktobacilov smo uporabljali gojišče MRS (po de Man Rogosa Sharpe; Merck, Darmstadt, Nemčija). Tekoče gojišče MRS smo uporabljali za gojenje čistih kultur izbranih prašičjih izolatov laktobacilov. Trdno gojišče MRS pa smo uporabljali za ugotavljanje skupnega števila laktobacilov v izhodiščni ali fermentirani sirotki. Gojišče MRS smo pripravili po navodilih proizvajalca in ga avtoklavirali 15 minut pri 118 °C.

3.2.3.2 Gojišče za prašičje izolate (skupina *Lb. acidophilus*) (MRS/CL/CIP)

Gojišče MRS z dodanima antibiotikoma smo uporabili za selektivno štetje izbranih prašičjih izolatov, s katerimi smo fermentirali sirotko. Pred razlivanjem na plošče (45 °C) smo gojišču dodali antibiotika klindamicin (Sigma, Nemčija) in ciprofloksacin (Sigma), ki zavirata rast ostalih laktobacilov. Založni raztopini antibiotikov (s koncentracijama 0,2 mg/ml za klindamicin in 2 mg/ml za ciprofloksacin) smo pripravili po navodilih

proizvajalcev in ju shranjevali pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Delovna (končna) koncentracija klindamicina v gojišču je bila $0,1\text{ }\mu\text{g/ml}$, ciprofloksacina pa $10\text{ }\mu\text{g/ml}$.

3.2.3.3 Gojišče za laktokoke (M 17)

Gojišče M 17 (po Terzaghi; Merck,) smo uporabili v mikrobioloških analizah za ugotavljanje števila laktokokov.

3.2.3.4 Gojišče za koliformne bakterije (VRB)

Gojišče VRB smo pripravili po navodilih proizvajalca (Merck). Tega gojišča ne avtoklaviramo, temveč ga pred uporabo raztopimo s segrevanjem v mikrovalovni pečici. Uporabljamo ga v mikrobioloških analizah za ugotavljanje števila koliformnih MO.

3.2.3.5 Gojišče za ugotavljanje skupnega števila bakterij (PCA)

Gojišče PCA smo pripravili po navodilih proizvajalca (Merck), mu dodali $0,1\text{ }\%$ posnetega mleka v prahu (Meck), ter ga avtoklavirali 15 minut pri temperaturi $110\text{ }^{\circ}\text{C}$. Gojišče smo uporabili pri mikrobioloških analizah za ugotavljanje skupnega števila MO.

3.2.3.6 Raztopina za razredčevanje vzorcev

Za razredčevanje vzorcev pri mikrobioloških analizah (metoda po Kochu) smo uporabljali $\frac{1}{4}$ Ringerjeve raztopine. Pripravili smo jo po navodilih proizvajalca (Merck). Po 9 ml Ringerjeve raztopine smo prenesli v epruvete in avoklavirali 15 min pri $121\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.3 LABORATORIJSKA OPREMA

- Avtoklav (A – 21 CA, Kambič, Slovenija)
- Centrifuga (mikro 22R, Hettich Zentrifugen, Nemčija; Sigma 3K18, Nemčija)
- Digestorij (Modelle 80, Waldner, Nemčija)
- Elektronski števec (EŠKO 7L, LABO Ljubljana)
- Inkubatorji (BT150, Marijan Krokter, Slovenija; Labo, Slovenija; BTE – S Termomedicinski aparati, Hrvaška)
- Laboratorijska oprema: petrijeve plošče, steklovina, stojala, nastavki, pipete, pincete, mikrocentrifugirke, gorilnik
- Mikrovalovna pečica (32 L, Bosch, Nemčija)
- pH meter: Mettler Toledo MP120, Mettler, Nemčija
- Tehtnice (AT 400 FACT, Mettler Toledo, Nemčija; Exacta 300EB, Tehtnica, Slovenija)
- Viskubator (DARBY elektronika, Bojan Rupnik, Slovenija)

- Vodna kopel (0925095 MK, Marijan Krokter, Slovenija)
- Vrtinčni mešalnik (Vibromix 104 EV, tehtnica Železniki, Slovenija)

3.4 METODE

Pri eksperimentalnem delu smo uporabljali standardne mikrobiološke tehnike dela.

3.4.1 Namnoževanje prašičjih izolatov za fermentacijo

Dan pred analizo smo čiste kulture prašičjih izolatov precepili v tekoče gojišče MRS ter jih 18 h inkubirali pri 37 °C. Po 40 ml 18-urnih kultur smo centrifugirali 10 minut pri 6000 obratih. Supernatant smo odlili, usedlini bakterijskih celic dodali 40 ml sirotke in na vrtičnem mešalniku dobro premešali. Tako dobljena suspenzija je predstavljala 2 % vcepek, ki smo ga uporabili v poskusu fermentacije (poglavje 3.4.2). Da bi dobili začetno število (KE/ml) dodanega prašičjega izolata, smo 1 ml suspenzije vcepka ustrezno razredčili in nacepili na trdno gojišče MRS z dodanima antibiotikoma CL+CIP ter plošče aerobno inkubirali 48 h pri 37 °C.

3.4.2 Fermentacija

V vsakem od treh poskusov smo hkrati izpeljali štiri fermentacije, ki so potekale v viskubator s štirimi posodami. Vsakič je ena od štirih fermentacij predstavljala kontrolo (izhodiščna koncentrirana sirotka brez dodanih prašičjih izolatov). Volumen fermentacijske mešanice je bil 2 l. Pred začetkom fermentacije smo izhodiščni sirotki izmerili vrednost pH. V izhodiščno sirotko, segreto na temperaturo fermentacije, smo dodali predhodno pripravljen 2 % vcepek, dobro premešali in odvzeli po 1 ml vzorca za določanje začetnega števila MO pred fermentacijo (ob času t_0). Po končani 18-urni fermentaciji smo ponovno odvzeli po 1 ml fermentirane sirotke (končni vzorec, ob času t_k) za mikrobiološko analizo ugotavljanja števila posameznih skupin in skupnega števila MO ter izmerili končno vrednost pH. Ob času t_k pa smo od vsakega vzorca fermentirane sirotke odvzeli še po 4 vzorce s po 50 ml fermentirane sirotke, za kasnejše analize ugotavljanja obstojnosti fermentirane sirotke.

3.4.3 Ugotavljanje števila mikroorganizmov

Vzorce čistih kultur izolatov, izhodiščne sirotke, nacepljene sirotke in fermentirane sirotke smo najprej ustrezno razredčili z $\frac{1}{4}$ Ringerjeve raztopine (metoda po Kochu). Pripravili smo si ustrezna gojišča in petrijeve plošče. Po 1 ml ustrezno razredčenega vzorca smo aseptično prenesli na petrijevo ploščo in ga prelili z ustreznim gojiščem (po potrebi smo dodali antibiotike). Petrijeve plošče smo inkubirali pri pogojih, navedenih v Preglednici 5.

Preglednica 5: Pogoji gojenja laktobacilov, prašičjih izolatov, laktokokov, skupnega števila mikroorganizmov in koliformnih mikroorganizmov

Gojišče	Skupina MO	Temperatura inkubacije [°C]	Pogoji inkubacije	Čas inkubacije [h]
MRS	laktobacili	37	Aerobno	48
MRS/CL/CIP	prašičji izolati	37	Aerobno	48
M17	laktokoki	30	Aerobno	48
PCA	skupno število MO	30	Aerobno	72
VRB	koliformni MO	30	Aerobno	24

Preglednica 6: Mikrobiološke analize vzorcev čistih kultur prašičjih izolatov, vzorcev sirotke pred in po fermentaciji ter po skladiščenju, ter analize kontrolne in izhodiščne sirotke

ANALIZIRANI VZORCI	GOJIŠČE				
	MRS	MRS/CL/CIP	M17	VRB	PCA
2/25	•	/	/	/	/
4/26	•	/	/	/	/
14/26	•	/	/	/	/
PRED FERMENTACIJO 1/1, 1/2, 1/3	•	•	/	/	/
PRED FERMENTACIJO 2/1, 2/2, 2/3	•	•	/	/	/
PRED FERMENTACIJO 3/1, 3/2, 3/3	•	•	/	/	/
PRED FERM. KONTROLA 1/4, 2/4, 3/4	•	/	•	•	•
PO FERMENTACIJI 1/1, 1/2, 1/3	•	•	•	•	•
PO FERMENTACIJI 2/1, 2/2, 2/3	•	•	•	•	•
PO FERMENTACIJI 3/1, 3/2, 3/3	•	•	•	•	•
PO FERM. KONTROLA 1/4, 2/4, 3/4	•	/	•	•	•
IZHODIŠČNA SIROTKA	•	/	•	•	•
OBSTOJNOST PRI SOBNI TEMP. PO 7 DNEH 1/1, 1/2, 1/3, 2/1, 2/2, 2/3, 3/1, 3/2, 3/3	•	•	•	•	•
OBSTOJNOST PRI SOBNI TEMP. PO 7 DNEH 1/4, 2/4, 3/4 IN 1/5, 2/5, 3/5	•	/	•	•	•
OBSTOJNOST PRI TEMP. HLADILNIKA PO 7, 14 IN 21 DNEH 1/1, 1/2, 1/3, 2/1, 2/2, 2/3, 3/1, 3/2, 3/3,	•	•	•	•	•
OBSTOJNOST PRI TEMP. HLADILNIKA PO 7, 14 IN 21 DNEH 1/4, 2/4, 3/4 IN 1/5, 2/5, 3/5	•	/	•	•	•

Legenda: • opravljena analiza na gojišču / analiza ni bila opravljena

Po končani inkubaciji smo prešteli zrasle kolonije s pomočjo elektronskega števca (EŠKO 7L, LABO Ljubljana). Število kolonijskih enot (KE) bakterij v mililitru vzorca smo izračunali po naslednji formuli (IDF standard, 100B):

$$KE = \sum n / (fa*1 + fb*0,1)*d$$

...1

Legenda:

$\sum n$... vsota kolonij izraslih na ploščah

fa...število plošč, uporabljenih v prvi razredčitvi

fb...število plošč, uporabljenih v drugi razredčitvi

d...recipročni razredčitveni faktor najnižje razredčitve

3.4.4 Merjenje vrednosti pH

Vrednost pH smo določali izhodiščni sirotki, fermentirani sirotki z dodanimi prašičjimi izolati in kontroli. Določali smo jo pred fermentacijo, po fermentaciji in med analizo obstojnosti.

3.4.5 Morfološki pregled celic

Po inkubaciji smo pregledali zrasle kolonije na gojiščih. Z vsake petrijeve plošče smo naključno izbrali po tri kolonije, jih pobarvali po Gramu in mikroskopirali.

Potek fiksacije preparata:

- Ob gorilniku smo na objektno steklo kanili kapljico fiziološke raztopine, nato pa smo v njej s cepilno zanko razmazali kolonijo, ki smo jo aseptično pobrali z gojišča.
- Razmaz smo posušili na zraku ob gorilniku, ter ga nato fiksirali tako, da smo ga trikrat potegnili čez plamen gorilnika.
- Sledilo je barvanje po Gramu. Za barvanje po Gramu smo uporabili komplet Color Gram 2 (Color Gram 2-F, bioMérieux, Francija). Postopek je opisan v Preglednici 7.

Preglednica 7: Postopek barvanja po Gramu

	Čas nanosa
Nanos barvila kristal violet G+	5 min
Spiranje z vodo	
Nanos barvila lugol	1 min
Spiranje z vodo	
Nanos raztopine aceton-etanol	1 min
Spiranje z vodo	
Nanos barvila safranin G-	1 min
Spiranje z vodo	
Sušenje, utrjevanje vzorca	

Predstavnike posameznih skupin MO smo pregledali pod svetlobnim mikroskopom.

3.4.6 Analiza obstojnosti

Analiza obstojnosti vzorcev sirotke je vključevala mikrobiološko analizo (Preglednica 6) in merjenje vrednosti pH.

Po 18-urni fermentaciji smo vzorčili po 50 ml fermentirane sirotke za analizo obstojnosti. Hkrati smo spremljali obstojnost tudi izhodiščni, nefermentirani sirotki. Obstojnost smo spremljali pri sobni temperaturi in temperaturi hladilnika (4 °C). Pri sobni temperaturi smo obstojnost preverili samo po sedmih dneh. Pri vzorcih, hranjenih v hladilniku, smo obstojnost spremljali po sedmih, štirinajstih in enaindvajsetih dneh.

4 REZULTATI

4.1 UGOTAVLJANJE ŠTEVILA POSAMEZNIH SKUPIN MIKROORGANIZMOV

Ugotavljali smo število skupnih laktobacilov, dodanih prašičjih izolatov, laktokokov, koliformnih bakterij in skupno število mikroorganizmov.

4.1.1 Rast čistih kultur prašičjih izolatov

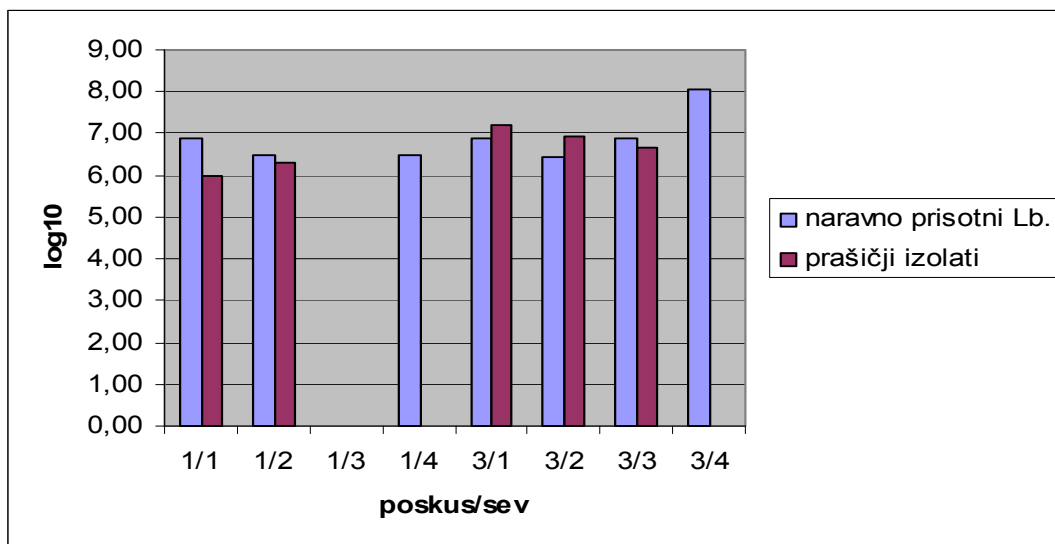
Za uspešno ločevanje prašičjih izolatov od ostalih laktobacilov smo v predposkusu ugotavljali uspešnost rasti prašičjih izolatov na trdnem gojišču MRS z dodatkom antibiotikov CL+CIP. Ugotovili smo, da sta seva 2/25 in 14/26 uspešno rasla na tako pripravljenem gojišču, medtem ko sev 4/26 ni rasel (Priloga 1). Zato smo v nadaljnjem delu za mikrobiološke analize sirotk 1/2, 2/1, 2/3, 3/2, kjer je bil v fermentaciji uporabljen sev 4/26, uporabili petkrat nižjo koncentracijo klindamicina in ciprofloksacina v gojišču. Preverili smo tudi morebitno rast naravne mikroflore sirotke pri uporabljeni nižji koncentraciji antibiotikov in ugotovili, da mikroflora sirotke ne zraste.

4.1.2 Primerjava poskusov 1 in 3 (različni temperaturi fermentacije)

Ko smo primerjali rezultate poskusov 1 in 3 (Preglednica 4, različna temperatura fermentacije, Slika 6) smo ugotovili, da je ustrežnejša temperatura fermentacije 39 °C.

Iz Slike 6 ugotovimo, da v poskusu 1 prašičji izolati niso prerasli naravno prisotnih laktobacilov sirotke. Za sev 14/26 (1/3) smo zgrešili razredčitev in zato nismo dobili rezultata. Sev 4/26, za katerega smo uporabili nižjo koncentracijo antibiotikov, je rasel zelo dobro.

Pri poskusu 3 pa je bila rast sevov 2/25 in 4/26 intenzivnejša od naravno prisotnih laktobacilov sirotke. Manj intenzivna, glede na naravno prisotne laktobacile sirotke, je bila rast seva 14/26. Najintenzivnejšo rast pri poskusu 3 je dosegel sev 2/25 (Slika 6).



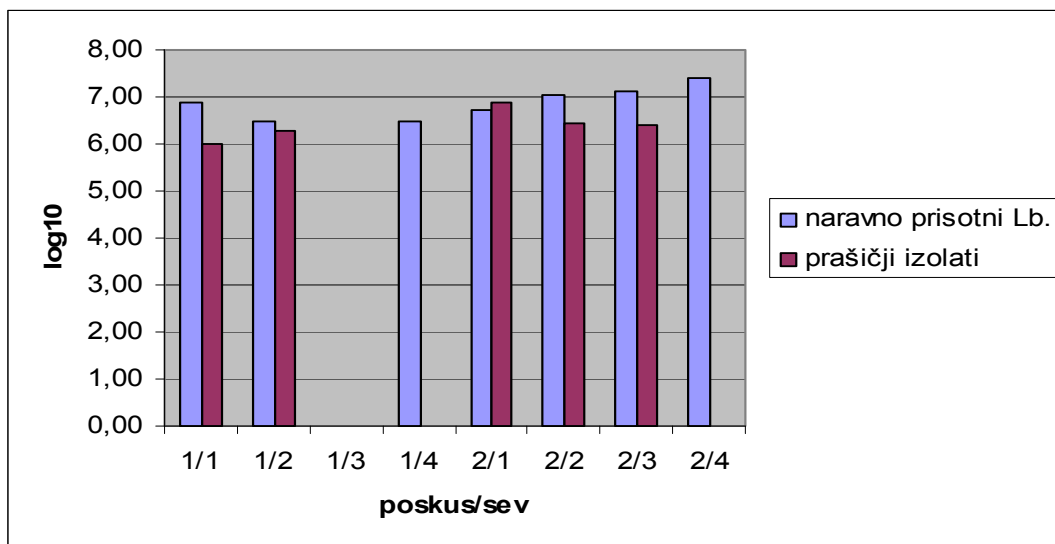
Slika 6: Primerjava rasti naravno prisotnih laktobacilov in dodanih prašičjih izolatov po 18-urni fermentaciji v poskusu 1 in 3.

4.1.3 Primerjava poskusov 1 in 2 (različne kombinacije izolatov)

Pri primerjavi rezultatov poskusa 1 in 2, kjer gre za enako temperaturo fermentacije a različne kombinacije prašičjih izolatov, smo ugotovili, da je bila rast le teh boljša v kombinaciji kot posamično. Iz slike 7 je razvidno, da je bila najboljša rast pri kombinaciji vseh treh prašičjih izolatov (2/1). Slabšo rast je izkazala kombinacija sevov 2/25 in 14/26 (2/2) ter še za odtenek slabšo rast kombinacija sevov 4/26 in 14/26 (2/3).

Iz rezultatov velikosti populacije smo ugotovili, da je bila rast prašičjih izolatov v obeh poskusih, razen v poskusu 2/1, premalo intenzivna, saj so jih prerasli naravno prisotni laktobacili sirotke.

Če primerjamo rast naravno prisotnih laktobacilov sirotke v poskusu 1 s poskusom 2 ugotovimo, da so naravno prisotni laktobacili intenzivneje rasli v poskusu 2.

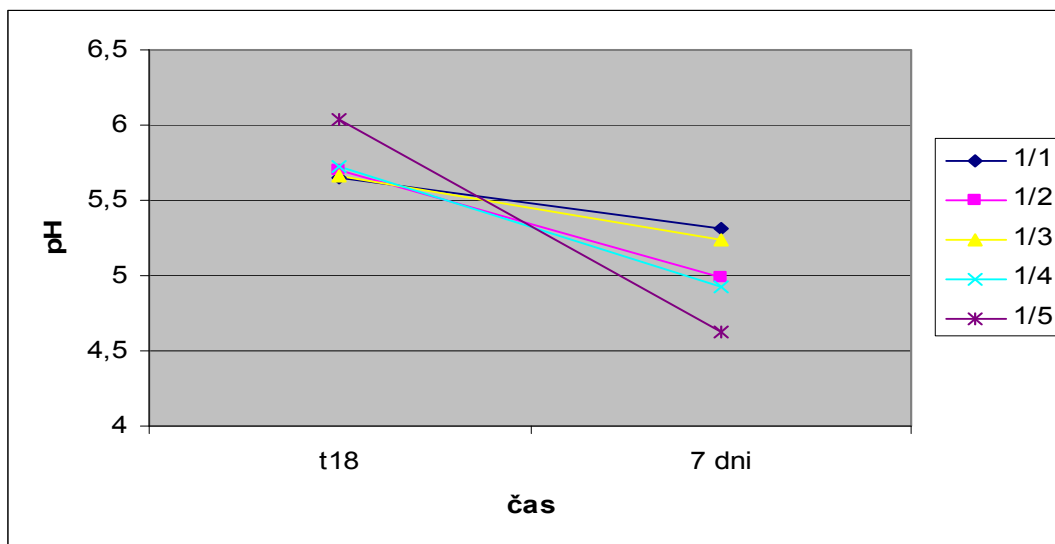


Slika 7: Primerjava rasti naravno prisotnih laktobacilov in dodanih prašičjih izolatov po 18-urni fermentaciji v poskusu 1 in 2.

4.2 SPREMLJANJE VREDNOSTI pH

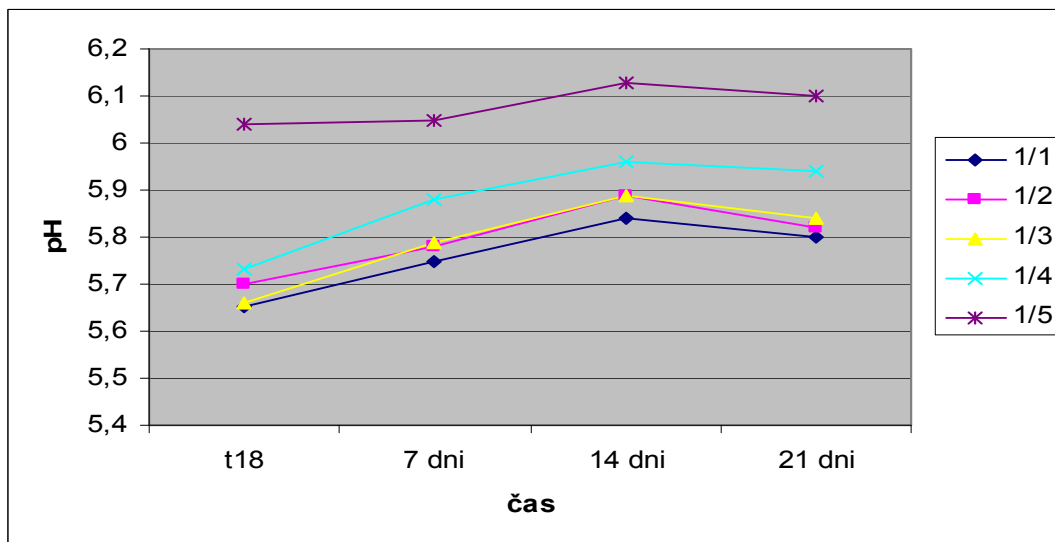
Vrednost pH smo določali izhodiščni sirotki, fermentirani sirotki z dodanimi prašičjimi izolati in kontroli. Določali smo jo pred fermentacijo, po fermentaciji ter med shranjevanjem pri različnih časovno-temperaturnih režimih (Priloga 2).

Iz Priloge 2 je razvidno, da vrednost pH pri vzorcih fermentirane sirotke in kontrole, hranjenih pri sobni temperaturi, pri vseh treh poskusih pade. Prav tako pade tudi vrednost pH izhodiščne sirotke, hranjene pri sobni temperaturi. Fermentacija se je pri sobni temperaturi še počasi nadaljevala, kar je vidno iz padca vrednosti pH, ki kaže na tvorbo kisline. Po drugi strani pa se vzorcem, hranjenim pri temperaturi hladilnika, vrednost pH počasi umiri. Čeprav pri teh vzorcih med 3-tedenskim skladiščenjem pri temperaturi hladilnika opazimo neznatno nihanje vrednosti pH, je to nihanje najverjetneje posledica dejstva, da smo za spremljanje obstojnosti in vrednosti pH iz vsakega fermentiranega vzorca pripravili po 4 paralelke. Ko smo po predvidenem času izmerili vrednost pH in odvzeli vzorec za mikrobiološko analizo, smo tako paralelko zavrgli. Z analizo posameznih paralelk istega vzorca smo se namreč želeli ogniti morebitnim nepravilnostim (okužba,..), do katerih bi lahko prišlo pri manipulaciji enega samega vzorca. Kot pa kaže, so se tudi mikrobiološki sistemi v pripravljenih paralelkah med seboj rahlo razlikovali, kar je imelo za posledico rahla nihanja vrednosti pH. Vsekakor pa lahko zaključimo, da se je fermentacija pri temperaturi hladilnika upočasnila oz. umirila.



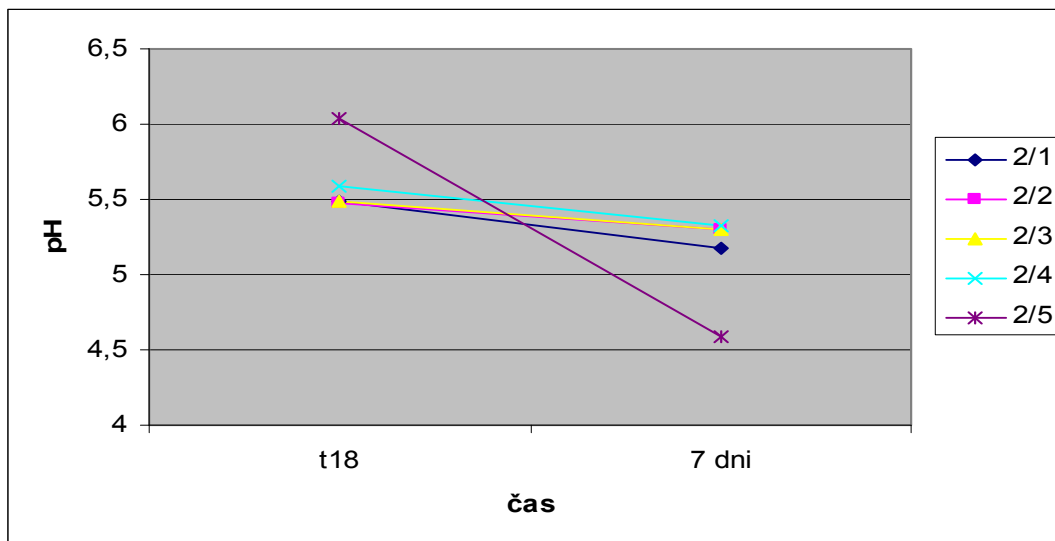
Slika 8: Vrednosti pH fermentiranih vzorcev in izhodiščne sirotke hranjenih pri sobni temperaturi v poskusu 1.

Pri poskusu 1 smo ugotovili, da je vzorcem, hranjenim en teden pri sobni temperaturi, vrednost pH opazno padla. Največji padec vrednosti pH je dosegel vzorec 1/5 (izhodiščna sirotka). Od prašičjih izolatov je največji padec vrednosti pH dosegel vzorec sirotke, ki je bila fermentirana z izolatom 4/26 (1/2) (Slika 8).



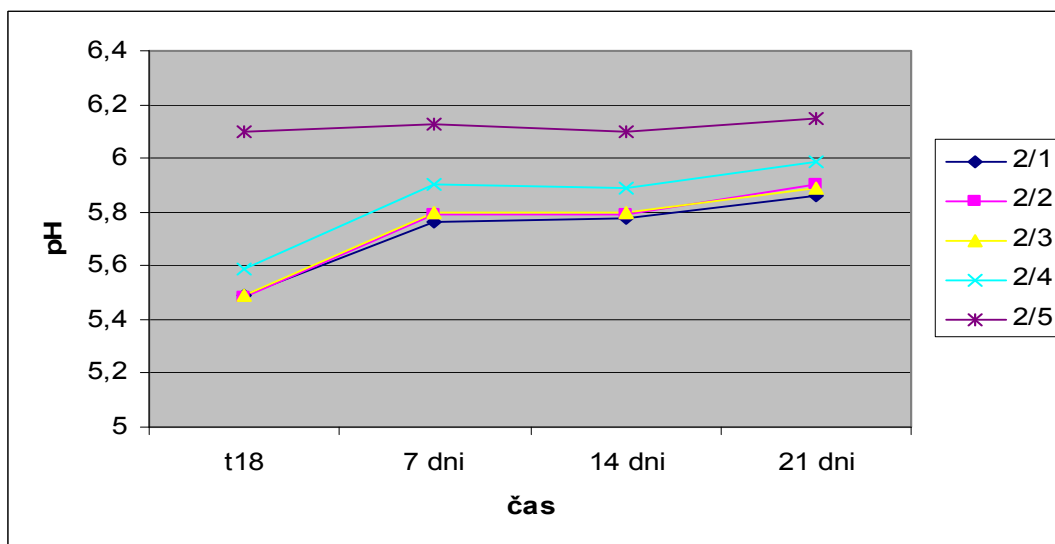
Slika 9: Spremljanje vrednosti pH fermentiranih vzorcev in izhodiščne sirotke hranjenih pri temperaturi hladilnika v poskusu 1.

Pri vzorcih, hranjenih pri temperaturi hladilnika, pa smo v poskusu 1 ugotovili, da se med 3-tedenskih hranjenjem v hladilniku, vrednost pH ne spreminja in je tudi po 21-dneih še vedno praktično enaka vrednosti, izmerjeni po koncu 18-urne fermentacije. (Slika 9). Podobno velja tudi za izhodiščno sirotko (vzorec 1/5).1/1).



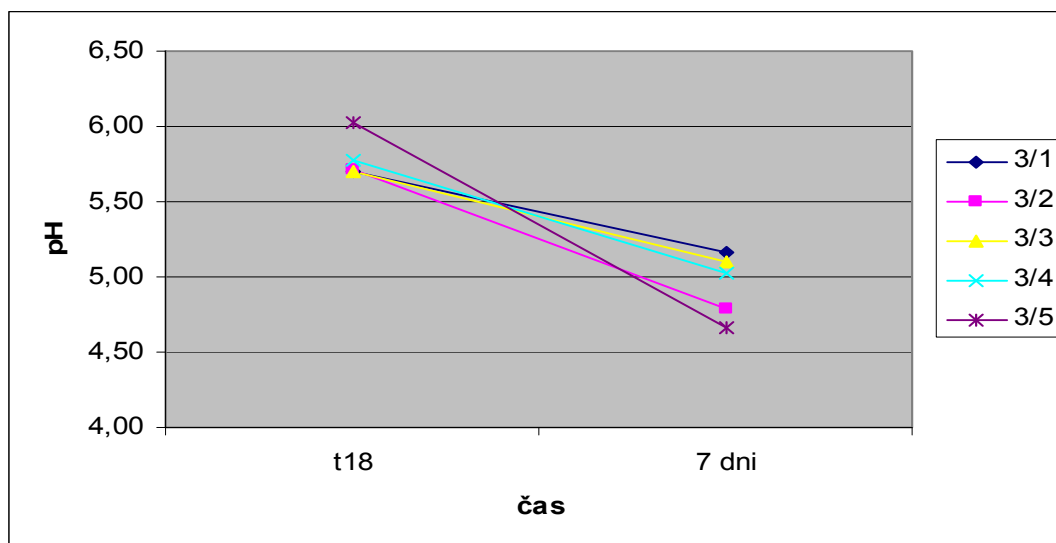
Slika 10: Vrednosti pH fermentiranih vzorcev in izhodiščne sirotke hranjenih pri sobni temperaturi v poskusu 2.

Pri poskusu 2 smo ugotovili, da je vzorcem 2/1, 2/2, 2/3 in 2/4, hranjenih pri sobni temperaturi, po enem tednu vrednost pH približno enako padla. Največji padec vrednosti pH, pod 5, smo zabeležili pri vzorcu 2/5 (izhodiščna sirotka) (Slika 10).



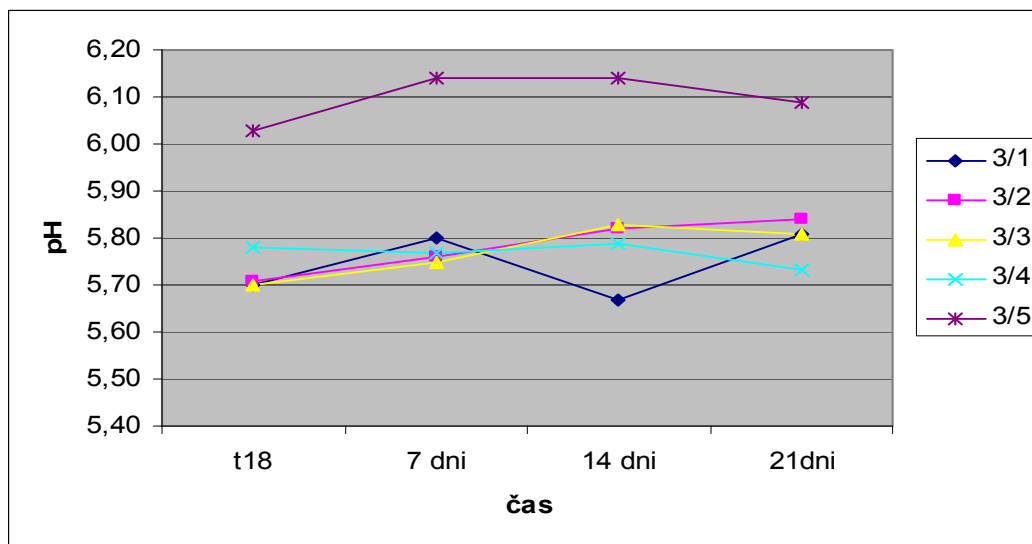
Slika 11: Spremljanje vrednosti pH fermentiranih vzorcev in izhodiščne sirotke hranjenih pri temperaturi hladilnika v poskusu 2.

Tudi pri vzorcih iz poskusa 2, ki smo jih hranili pri temperaturi hladilnika, smo ugotovili, da so bile spremembe vrednosti pH med 3-tedenskim skladiščenjem pri vseh vzorcih minimalne in se niso bistveno spremenile glede na vrednost pH, doseženo po 18-urni fermentaciji (Slika 11)



Slika 12: Vrednosti pH fermentiranih vzorcev in izhodiščne sirotke hranjenih pri sobni temperaturi v poskusu 3.

Podobno kot že pri poskusih 1 in 2, smo tudi pri poskusu 3 ugotovili, da je vsem vzorcem, hranjenih en teden pri sobni temperaturi, vrednost pH znatno padla. Največji padec vrednosti pH smo zaznali pri vzorcu 3/5 (izhodiščna sirotka). Od prašičjih izolatov smo največji padec vrednosti pH zaznali pri sevu 4/26 (3/2) (Slika 12).



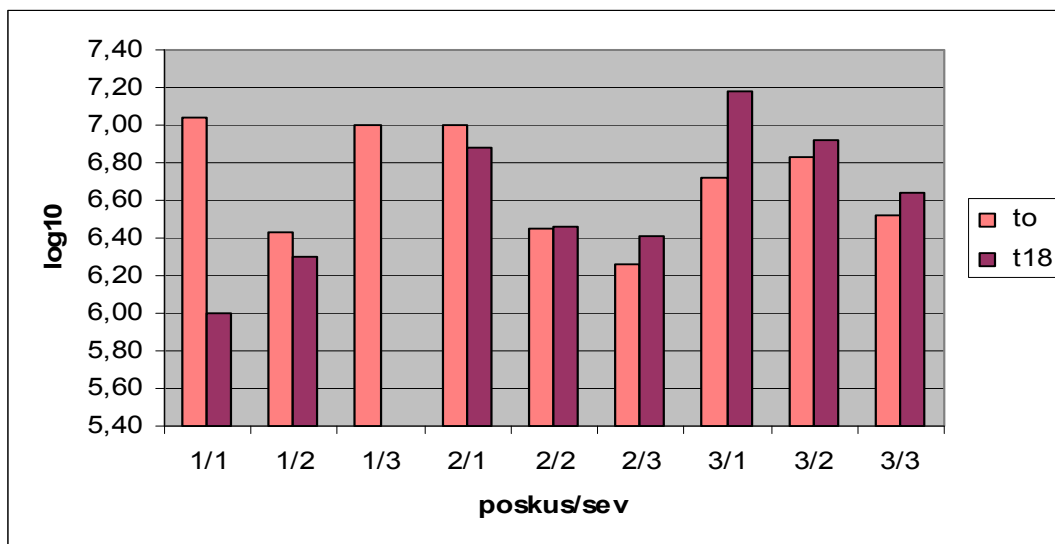
Slika 13: Spremljanje vrednosti pH fermentiranih vzorcev in izhodiščne sirotke hranjenih pri temperaturi hladilnika v poskusu 3.

Tudi v poskusu 3 so vrednosti pH vseh vzorcev med 3-tedenskim skladiščenjem pri temperaturi hladilnika, razen že opaženega rahlega nihanja, ostale praktično enake vrednostim pH, doseženim po koncu fermentacije (Slika 13).

4.3 UGOTAVLJANJE OPTIMALNIH POGOJEV FERMENTACIJE

Da bi ugotovili optimalno kombinacijo prašičjih izolatov, s katerimi smo fermentirali koncentrirano sirotko, ter optimalno temperaturo fermentacije, smo izvedli dvanajst fermentacij (trije poskusi po štiri fermentacije). Izbirali smo med tremi prašičji izolati s potencialno probiotičnimi lastnostmi: 2/25, 4/26 in 14/26 ter dvema temperaturama fermentacije: 37 °C in 39 °C. Vcepek je bil vselej 2 % (Priloge 3 - 8).

V probiotičnem prehranskem dodatku za živali naj bi bila vsebnost dodanih prašičjih izolatov vsaj 10^9 KE/ml. Iz slike 14 je razvidno, da se pri danih pogojih noben od dodanih izolatov ni namnožil do več kot 10^7 KE/ml. Najboljšo rast je dosegel sev 2/25 (3/1), njegova velikost mikrobne populacije je bila $1,5 \cdot 10^7$ KE/ml.



Slika 14: Ugotavljanje uspešnosti rasti prašičjih izolatov v poskusu 1, 2 in 3.

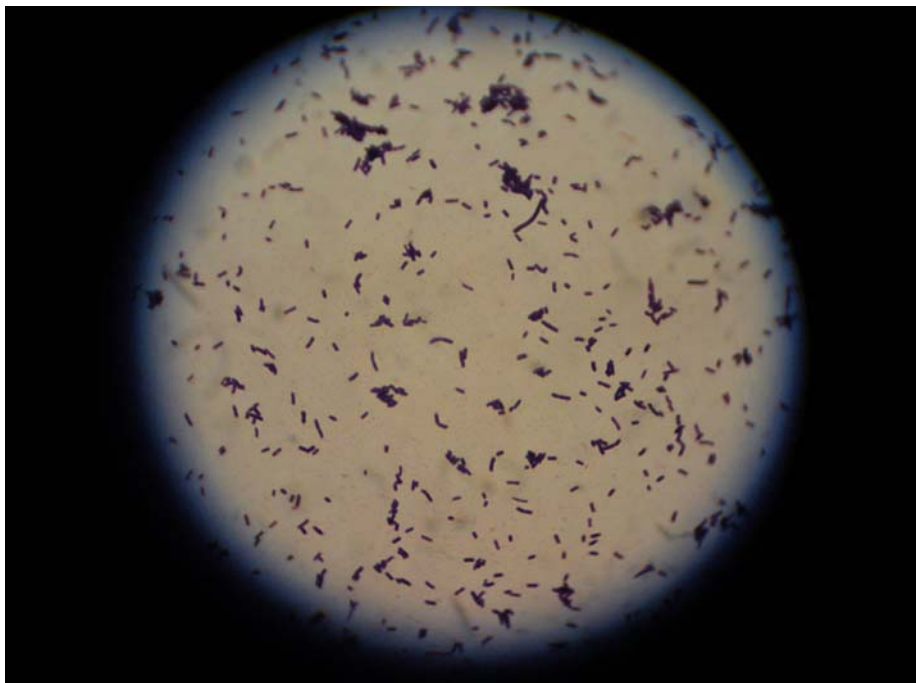
Rast prašičjih izolatov v prvem poskusu je bila zelo slaba, verjetno je bila temperatura 37 °C prenizka. Za sev 14/26 (1/3) nimamo točnega podatka o številu po 18h, ker smo nacepili vzorce previsokih razredčitev. Število namnoženega izolata 14/26 je bilo $< 10^6$ KE/ml. Pri analizah sirotk 1/2, 2/1, 2/3 in 3/2, kjer je bil prisoten sev 4/26, smo uporabili nižji koncentraciji antibiotikov clindamicina in ciprofloksacina v gojišču MRS. Velikost populacije se je gibala med $2 \cdot 10^6$ KE/ml in $8,3 \cdot 10^6$ KE/ml.

Iz predstavljenih rezultatov smo zaključili, da so za izbrane seve prašičjih izolatov najugodnejši pogoji fermentacije v poskusu 3, pri temperaturi 39 °C.

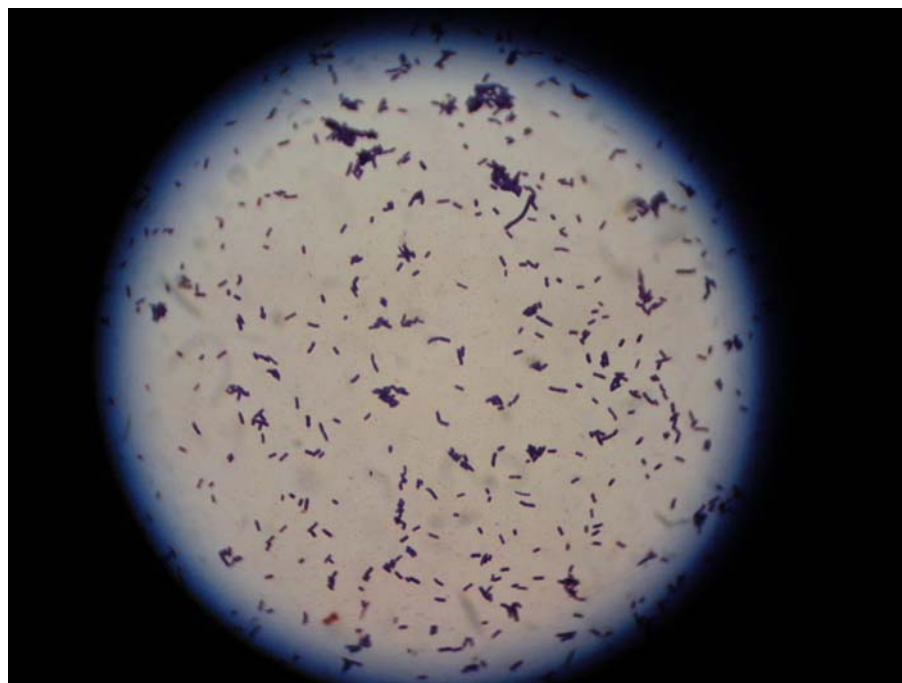
4.4 MORFOLOŠKE LASTNOSTI PRAŠIČJIH IZOLATOV

Kadar smo nacepili čiste kulture izbranih prašičjih izolatov, so bile izrasle kolonije nebleščeče, sivo do belkaste barve, z bolj ali manj nepravilnimi robovi. Kolonije vseh treh prašičjih izolatov so bile na videz zelo podobne. Da bi preverili čistost kulture posameznega izolata, smo pri vsakem poskusu izbrali po tri izrasle kolonije, jih pobarvali po Gramu in pregledali pod svetlobnim mikroskopom.

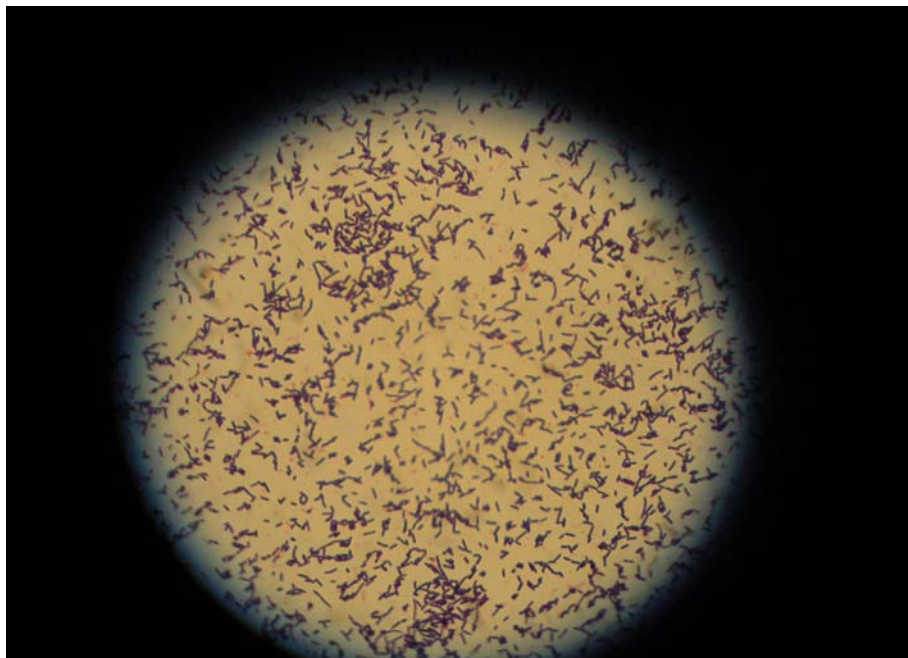
- Izolata 2/25 in 4/26: kratke, tanke, modro vijolične palčke (Gram pozitivne), posamezne ali v krajših verižicah (sliki 15 in 17).
- Izolat 14/26: srednje dolge zakrivljene modro vijolične palčke (Gram pozitivne), posamezne ali v verižicah (slika 16).



Slika 15: Mikroskopski preparat seva 2/25



Slika 16: Mikroskopski preparat seva 14/26



Slika 17: Mikroskopski preparat seva 4/26

4.5 MORFOLOŠKE LASTNOSTI OSTALIH SKUPIN MIKROORGANIZMOV

Pregledali smo kolonije, ki so zrasle na gojiščih MRS, M17, VRB in PCA. Iz istega gojišča (plošče) smo izbrali po tri kolonije, ki so bile različne po velikosti oziroma barvi. Pobarvali smo jih po Gramu ter pogledali pod svetlobnim mikroskopom.

Ugotovili smo, da so na M17 poleg laktokokov zrasle tudi kolonije laktobacilov. Na gojišču MRS pa so poleg laktobacilov rasli tudi laktokoki. Gojišči MRS in M17 nista dovolj selektivni, ker poleg zelene skupine MO na njih zrastejo tudi predstavniki drugih skupin. Zato je lahko končno ugotovljeno število laktokokov ali laktobacilov nekoliko precenjeno.

Na gojišču VRB so zrasle tipične, rdeče obarvane kolonije koliformnih bakterij, obdanih z rdečkasto cono precipitacije (slika 18), kar smo potrdili tudi z barvanjem po Gramu. Pod mikroskopom smo videli posamezne rdeče kratke palčke, kar je značilno za po Gramu negativne bakterije.



Slika 18: Koliformne bakterije (gojišče VRB)



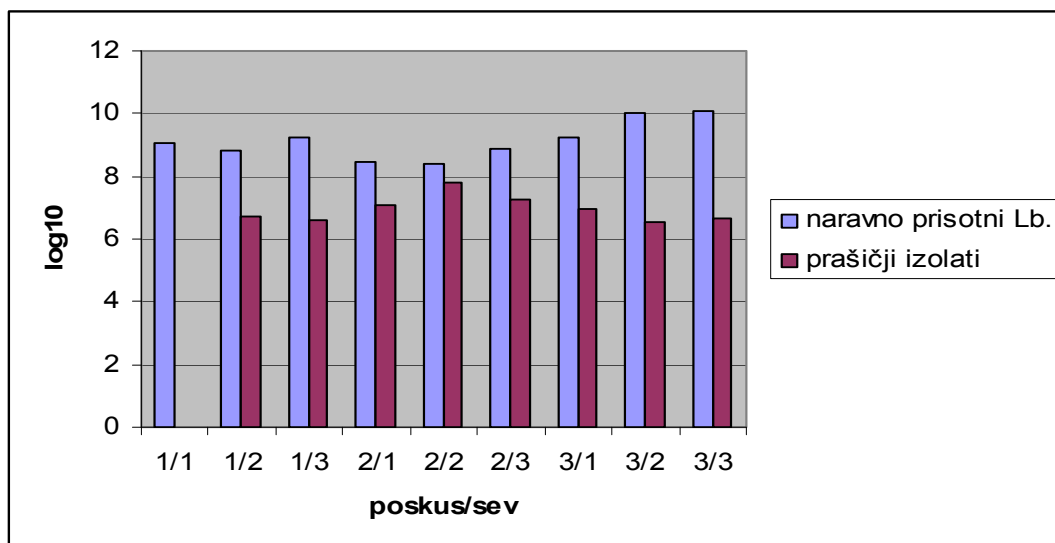
Slika 19: Skupno število mikroorganizmov (gojišče PCA + 0,1 % mleka v prahu)

4.6 OBSTOJNOST FERMENTIRANE SIROTKE

Želeli smo pripraviti obstojen probiotičen prehranski dodatek za živali (prašiče), z visoko vsebnostjo izbranih živih probiotičnih bakterij. Zato smo analizirali obstojnost sirotke in s tem spremljali vsebnost živih mikroorganizmov in vrednost pH. Obstojnost smo spremljali med shranjevanjem pri sobni temperaturi (po sedmih dneh) in pri temperaturi hladilnika (po sedmih, štirinajstih in enaindvajsetih dneh).

4.6.1 Shranjevanje fermentirane sirotke pri sobni temperaturi

V sterilne stekleničke smo vzorčili izhodiščno nefermentirano sirotko, fermentirano sirotko z dodanimi prašičjimi izolati in kontrolo in jih hranili pri sobni temperaturi sedem dni. Po sedmih dneh smo izmerili vrednosti pH in ugotavljali mikrobiološko sliko tako hranjenih vzorcev (Priloge 3, 4, 5). Ugotovili smo, da so se v izhodiščni sirotki (nefermentirana sirotka) naravno prisotni laktobacili namnožili do 10^9 KE/ml in sicer v vseh treh poskusih. Skupni laktobacili, to so naravno prisotni sirotkini laktobacili in posamezni dodani prašičji izolati, so se pri poskusu 1 namnožili do 10^9 KE/ml, pri poskusu 2 do 10^8 KE/ml in pri poskusu 3 do 10^{10} KE/ml. Prašičji izolati pa so se namnožili pri poskusu 1 in 3 do 10^6 KE/ml in pri poskusu 2 do 10^7 KE/ml. Laktokoki so se namnožili do 10^8 KE/ml v vseh treh poskusih kot tudi v izhodiščni sirotki. Ko smo po sedmih dneh shranjevanja fermentirane sirotke pri sobni T merili vrednosti pH, smo opazili tvorbo plina in zaznali močan neprijeten vonj.

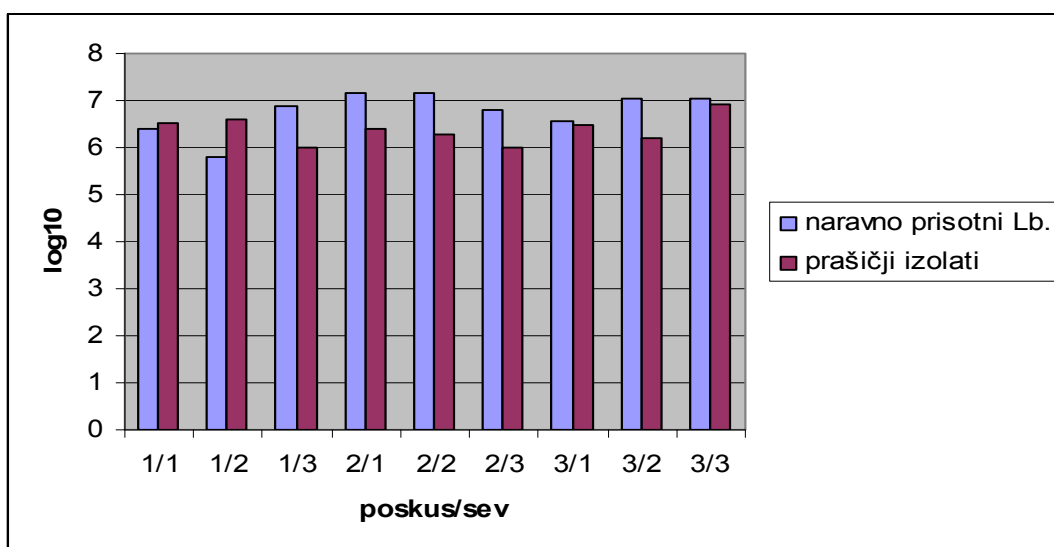


Slika 20: Obstojnost prašičjih izolatov in sirotkinih laktobacilov pri sobni temperaturi po 7 dneh v poskusih 1, 2 in 3.

Pri sobni temperaturi je bila obstojnost naravno prisotnih laktobacilov v sirotki boljša od dodanih prašičjih izolatov. Njihovo število je bilo v povprečju za 2 log višje od števila prašičjih izolatov (Slika 20).

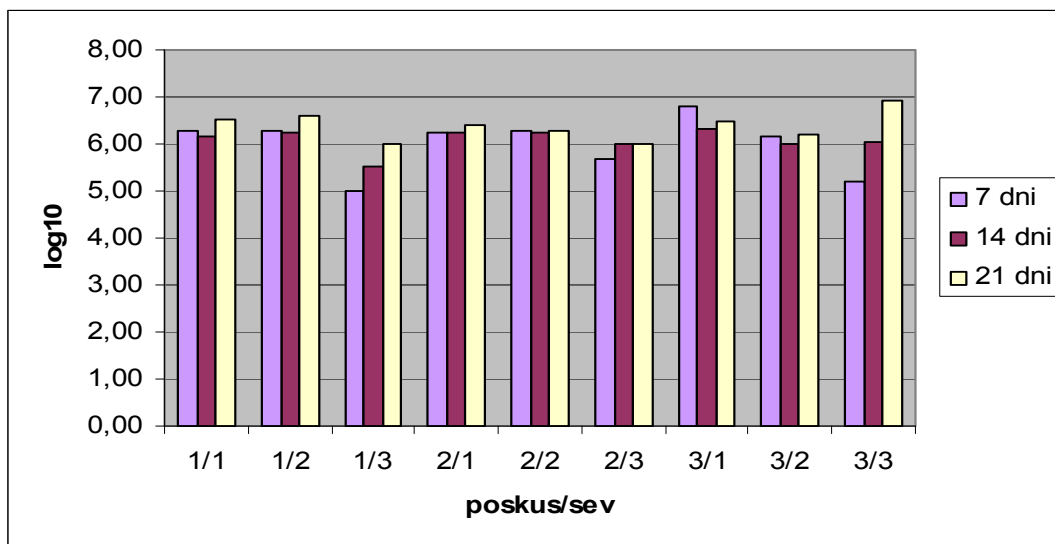
4.6.2 Shranjevanje fermentirane sirotke pri temperaturi hladilnika

V sterilne stekleničke smo vzorčili izhodiščno nefermentirano sirotko, fermentirano sirotko z dodanimi prašičjimi izolati in kontrolo ter jih hranili pri temperaturi hladilnika. Vsak vzorec smo vzorčili v štirih paralelkah. Po sedmih, štirinajstih in enaindvajsetih dneh smo merili vrednosti pH in ugotavljali mikrobiološko sliko tako hranjenih vzorcev (Priloge 6, 7, 8). Ugotovili smo, da vsebnost naravno prisotnih laktobacilov v izhodiščni sirotki s časom shranjevanja pada in je po enaindvajsetih dneh 10^3 KE/ml, medtem ko se vsebnost prašičjih izolatov v fermentirani sirotki ne spreminja. Po sedmih, štirinajstih in enaindvajsetih dneh je 10^6 KE/ml prašičjih izolatov. Najboljšo obstojnost po enaindvajsetih dneh je imel sev 14/26 ($8,5 \cdot 10^6$ KE/ml) pri poskusu tri (3/3). Sledita mu 4/26 ($3,9 \cdot 10^6$ KE/ml) in 2/25 ($3,3 \cdot 10^6$) pri poskusu 1 (1/2 in 1/1).



Slika 21: Obstojnost prašičjih izolatov in sirotkinih laktobacilov pri 4 °C po 21 dneh v poskusih 1, 2 in 3.

Na sliki 21 je predstavljena primerjava obstojnosti med dodanimi prašičjimi izolati in naravno prisotnimi sirotkinimi laktobacili med vsemi tremi poskusi. Število naravno prisotnih sirotkinih laktobacilov je bilo po 21 dneh pri shranjevanju pri 4 °C v večini primerov večje od števila prašičjih izolatov.



Slika 22: Rezultati obstojnosti prašičjih izolatov pri temperaturi hladilnika v poskusih 1, 2 in 3.

Pri poskusu 1 sta seva 2/25 (1/1) in 4/26 (1/2) ohranjala konstantno število s časom shranjevanja pri temperaturi hladilnika, medtem ko smo pri sevu 14/26 (1/3) med shranjevanjem pri temperaturi hladilnika zabeležili celo rahel porast (Slika 22).

Podobno kot za poskus 1 smo ugotovili tudi za poskus 2: kombinacije prašičjih izolatov so ohranjale konstantno število s časom shranjevanja pri temperaturi hladilnika (Slika 22).

Tudi pri poskusu 3 smo opazili podobne rezultate kot pri poskusih 1 in 2. Razen seva 14/26 (3/3), pri katerem smo s časom shranjevanja pri temperaturi hladilnika opazili celo počasno naraščanje števila, sta seva 2/25 in 4/26 ohranjala konstantno število med shranjevanjem (Slika 22).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Vodilni stranski produkt pri predelavi mleka v sir je prav gotovo sirotka, saj pri izdelavi 1 kg sira v povprečju dobimo 9 kg sirotke (Durham in Hourigan, 2007). Po napovedih naj bi v prihodnje proizvodnja sirov še naraščala, kar pomeni temu primerno več sirotke, zato ostaja iskanje novih oz. boljših možnosti izkoriščanja sirotke še naprej prioriteta naloga mlekarne industrije. Visoka vrednost BPK₅ sirotke (40000 mg/L) je glavni onesnaževalec okolja.

Eno od možnosti izkoriščanja sirotke smo predstavili v naši nalogi, kjer smo želeli proučiti možnost priprave probiotičnega prehranskega dodatka za živali. Ker bi bil ta prehranski dodatek namenjen prašičem, smo preskusili možnost uporabe prašičjih izolatov kot potencialnih probiotičnih bakterij pri fermentaciji koncentrirane sirotke. Uporabili smo seve 2/25, 4/26 in 14/26.

Za izbrane seve smo se odločili na podlagi rezultatov, ki so jih objavili Hacin in sod. (2008). Izbrani izolati so bili izolirani iz črevesne sluznice 3-5 tednov starih prašičev, v predhodnih študijah pa so izkazali dobro protimikrobno aktivnost proti predstavnikom patogenih mikroorganizmov, ki so prisotni v prašičjem prebavnem traktu: *E. coli*, *Sta. aureus*, *B. cereus* in *Cl. perfringens*. Sev 4/26 je edini inhibiral *Sta. aureus*. Seva 4/26 in 2/25 sta bila učinkovita proti *Lb. sakei* in *Lb. gasseri*.

Za uspešno ločevanje prašičjih izolatov od ostalih laktobacilov smo uporabili selektivno gojišče MRS z dodanima antibiotikoma klindamicinom in ciprofloksacinom, ki sta zavirala rast ostalih laktobacilov in tako omogočila selektivno rast prašičjih izolatov. Za omenjena antibiotika smo se odločili na podlagi rezultatov Hacin in sod (2008).

V prid temu rezultatu govori tudi primerjava vrednosti pH fermentiranih sirotk. Iz poskusov 1 in 3, merjenih po 7-dnevnem shranjevanju sirotk pri sobni temperaturi (Preglednica 2). Ker je bila temperatura v poskusu 3 (39 °C) primernejša za rast prašičjih izolatov med 18-urno fermentacijo kot v poskusu 1 (37 °C), so se sevi uspešneje namnožili. Čeprav so vrednosti pH po fermentaciji poskusa 1 in 3 zelo primerljive, pa so po 7-dneh pri sobni temperaturi opazno nižje pri poskusu 3.

Mnogo avtorjev navaja, da je rezultat mlečnokislinske fermentacije kopičenje organskih kislin, v glavnem mlečne kisline, ki je glavni končni produkt metabolizma ogljikovih hidratov (Naidu in Clemens, 2000). S kopičenjem mlečne kisline se sočasno znižuje vrednost pH okolja, kar deluje inhibitorno na po Gramu pozitivne kot tudi po Gramu negativne bakterije. Poskus spremljanja obstojnosti fermentirane sirotke (vrednost pH in mikrobiološka obstojnost) pri različnem temperaturnem časovnem režimu shranjevanja smo spremljali tako, da smo iz vsakega vzorca fermentirane sirotke pripravili po 4 paralelke za kasnejše analize. Iz rezultatov spremljanja vrednosti pH pri shranjevanju vzorcev pri temperaturi hladilnika smo opazili rahla nihanja, kar najverjetneje pomeni, da

paralelke niso bile povsem enake. Kljub temu pa rezultati shranjevanja v hladilniku jasno kažejo, da vzorci sirotke ohranijo vrednost pH, ki jo dosežejo po fermentaciji.

Pri časovno-temperaturnih režimih, ki smo jih uporabili v naši raziskovalni nalogi, smo ugotovili, da se dodani prašičji izolati oz. kombinacije izolatov v sirotki ne namnožijo do zelenih koncentracij, ki naj bi ugodno vplivale na zdravje živali. Sklepamo lahko, da so imeli uporabljeni izolati na voljo premalo hrane, oz. da izbrani pogoji fermentacije za njihovo rast niso bili optimalni. Prašičji izolati se pri danih pogojih v mediju kot je sirotka najverjetneje niso uspeli dovolj prilagoditi, zato je bila njihova rast manj intenzivna. V prid temu dejstvu govori tudi rezultat, da so prašičji izolati pod istimi pogoji precej bolje rasli v komercialnem gojišču MRS, ki je komercialno gojišče, katerega sestava je optimalno prilagojena za rast laktobacilov, torej tudi naših prašičjih izolatov. Med drugimi tudi Bogovič Matijašič (1997) navaja, da je za rast laktobacilov primerno gojišče MRS, ki vsebuje rastne faktorje za laktobacile. Laktobacili so relativno zahtevni za hranila, zato menimo, da bi dodatek rastnih faktorjev (aminokislina, vitamini, prekursorji nukleinskih kislin) v sirotko izboljšal njihovo rast. Predvidevamo, da je bil izbran čas fermentacije (18 h) najverjetneje prekratek. Zato bi bila ena od možnosti, da bi podaljšali čas fermentacije. Menimo tudi, da bi bilo smiselno izpeljati fermentacijo s kombinacijo izolatov pri 39 °C in sočasno ponoviti fermentacijo s posameznimi izolati, ravno tako pri 39 °C. Ena od možnosti za zvišanje končnega števila dodanih izolatov v izdelku (fermentirani sirotki) bi bila povečanje inokuluma. Čeprav opisane možnosti za izboljšanje pogojev fermentacije in s tem končnega proizvoda pomenijo dodatni strošek, pa bi morda ob racionalni kombinaciji le-teh vseeno lahko pridobili prehransko učinkovit in finančno primeren izdelek.

Na osnovi naših rezultatov zaenkrat lahko zaključimo, da bi bil probiotičen pripravek, pripravljen po protokolu, opisanem v nalogi, za živali najverjetneje premalo učinkovit, saj je namen uporabe probiotikov tudi ta, da s pozitivnimi učinki na gostitelja, ki jih mikroorganizmi lahko izkazujejo le če jih zaužijemo v zadostni količini, posredno vplivajo na zmanjšanje stroškov v živinoreji.

Naš poskus je bil torej preliminaren korak na poti do potencialnega novega probiotičnega izdelka za živali na slovenskem trgu. Z nadaljnjimi poskusi bi ob upoštevanju zgoraj omenjenih možnosti lahko pripravili zelen izdelek.

5.2 SKLEPI

- Dodani prašičji izolati laktobacilov, predhodno osamljeni iz črevesne sluznice prašičev, so se v koncentrirani sirotki pri danih pogojih fermentacije namnožili le do 10^6 KE/ml.
- Populacija dodanega prašičjega laktobacila je padla pod 10^7 KE /ml, ne glede na režim shranjevanja fermentirane sirotke (en teden pri sobni T oziroma tri tedne pri 4 °C).
- Prašičji izolati so bolje rasli pri temperaturi fermentacije 39 °C.

- Obstočnost fermentirane sirotke (sprememba vrednosti pH in sprememba skupnega števila oziroma števila posameznih skupin MO) je bila boljša pri 4 °C kot pri sobni temperaturi.
- Mikrobiološka obstočnost sirotke, fermentirane z izbranimi laktobacili, ni bila boljša od mikrobiološke obstočnosti kontrole (fermentirana izhodiščna sirotka, brez dodanih laktobacilov).

6 POVZETEK

V raziskavi smo ugotavljali uspešnost rasti oz. preživelost prašičjih izolatov med fermentacijo in skladiščenjem fermentirane sirotke. Izhodno surovino, koncentrirano sirotko z 32 % suhe snovi, smo dobili iz Pomurskih mlekarn. Prašičji izolati, ki so bili predhodno osamljeni iz črevesne sluznice prašičev, so potencialni probiotiki in z njihovo uporabo v sirotki bi lahko pripravili funkcionalen prehranski dodatek za živali.

Za analizo velikosti populacije smo med tehnološkim postopkom izdelave in skladiščenja izdelka izbrali časovne intervale, v katerih smo jemali vzorce za ugotavljanje števila živih prašičjih izolatov z metodo štetja kolonij na hranljivih selektivnih gojiščih.

Pri primerjavi števila živih prašičjih izolatov med poskusoma 1 in 3 smo ugotovili, da jim bolj odgovarja višja temperatura, to je 39 °C. Če primerjamo poskus 1 in 2, pridemo do ugotovitve, da so uspešnejši v kombinaciji kot posamezno.

Ugotovili smo tudi, da med fermentacijo v povprečju najslabše prirašča mikrobna populacija seva 14/26, medtem ko sevu 4/26 pogoji fermentacije nekoliko bolj ustrezajo. Najboljšo rast med procesom fermentacije smo ugotovili pri sevu 2/25.

Med skladiščenjem izdelkov pri sobni temperaturi smo pri vseh treh prašičjih sevih opazili močno povečanje njihovega števila mikroorganizmov. Pri skladiščenju izdelka pri temperaturi hladilnika je število prašičjih izolatov približno enako, oz. se v nekaterih primerih celo rahlo poveča, kar kaže na razmnoževanje laktobacilov tudi pri temperaturi hladilnika. Njihovo območje rasti je od 2 °C do 35 °C, optimum od 30 °C do 40 °C. Sev 14/26, se je med fermentacijo slabše razmnoževal kot seva 2/25 in 4/26. Med skladiščenjem pri sobni T pa smo zanj po 21 dneh opazili boljšo obstojnost.

Pri spremljanju vrednosti pH ugotovimo, da se pri shranjevanju pri sobni temperaturi fermentacija počasi nadaljuje, kar se vidi v padanju vrednosti pH (tvorba kisline). Pri shranjevanju pri temperaturi hladilnika pa se fermentacija ustavi oziroma je bistveno počasnejša, kar se vidi tudi iz vrednosti pH, ki ostanejo v območju, doseženem po koncu fermentacije.

7 VIRI

Adamič J., Smole Možina S., Jeršek B. 2003. Vloga in pomen mikroorganizmov v živilih in taksonomija. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 1- 45

Axelsson L. 1998. Lactic acid bacteria: Classification and physiology. V: Lactic acid bacteria: Microbiology and functional aspects. Salaminnen S., Von Wright A. (eds.). New York, Marcel Dekker, Inc.: 1-22

Axelsson L.T., Lindgren S. E. 1987. Characterization and DNA homology of *Lactobacillus reuteri* strains isolated from pig intestine. *Journal of Applied Microbiology*, 62: 513 – 520

Beaulieu M., Turgeon S.L., Doublier J.L. 2001. Rheology, texture and microstructure of whey proteins/low methoxyl pectins mixed gels with added calcium. *International Dairy Journal*, 11: 961 – 967

Blum S., Schiffrin E.J. 2002. Intestinal microflora and homeostasis of the mucosal immune response: Implications for probiotic bacteria? V: Probiotics and prebiotics: Where are we going? Tannock G. W. (ed.). Norfolk, Caister: 311-329

Bogovič-Matijašič B., Rogelj I. 2006. Demonstration of suitability of probiotic product: an emphasis on survey of commercial products obtained on Slovenian market. *Agro Food Industry Hi-Tech*, 17: 38-40

Bogovič-Matijašič B. 1997. Bakteriocini seva *Lactobacillus acidophilus* LF221: proučevanje tvorbe, protibakterijske aktivnosti, biokemijskih lastnosti in sestave. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 103 str.

Cortese D. 2008. Frika in druge mlečne prikazni. Ljubljana, Mercator d.d.: 1 str
http://www.mercator.si/uzivajmozdravo/zdravje_in_sport/clanki/zdravje/clanek (9.6.2010)

Čanžek Majhenič A., Bogovič Matijašič B., Zorič Peternel M., Rogelj I. 2009. Lastnosti in delovanje bakteriocinov mlečnokislinskih bakterij v različnih okoljih. V: Protimikrobne snovi. Posvetovanje Pomen biotehnologije in mikrobiologije za prihodnost, 29. in 30. januar 2009, Ljubljana. Raspor P., Petković H. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 120 - 121

Černe M. 1996. Morfološke, morfometrijske in histokemične raziskave tankega črevesa pri malabsorpcijskem sindromu prašičev odstavljenecv. Doktorska disertacija. Ljubljana, Veterinarska fakulteta: 168 str.

Doultani S., Turhan K.N., Etzel M.R. 2004. Fractionation of proteins from whey using cation exchange chromatography. *Process Biochemistry*, 39: 1737 – 1743

Durham R. J., Hourigan J.A. 2007. Waste management and co-product recovery in dairy processing. V: Handbook of waste management and co-product recovery in food processing. 1st ed. Waldron K. (ed.). Cambridge, Woodhead Publishing Limited: 1 - 25

Ewing W.N., Cole D.J.A. 1994. The living gut: An introduction to microorganisms in nutrition. Dungannon, Context: 220 str.

Fonty G., Jounany J.P., Forano E., Gouet P. 1995. L'écosystème microbien du reticulo-rumen. V: Nutrition des ruminants domestiques. Jarrige R., Ruckebusch Y., Demarquilly C., Farce M.H., Journet M. (eds.). Paris, INRA Editions: 299-347

Fuller R. 1989. Probiotics in man and animals. Journal of Applied Bacteriology, 66: 365 - 378

Gedek B.R. 1991. Regulation of the intestinal flora by food. Zentralblatt für Hygiene Umweltmedizin, 191: 277-301

Ghaly A.E. 1996. A comparative study of anaerobic digestion of acid cheese whey and dairy manure in a two-stage reactor. Bioresource Technology, 58: 61-72

Gramc A. 1997. Encimsko modificirane beljakovine sirotke. Magistrsko delo. Ljubljana, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 62 str.

Hacin B., Rogelj I., Bogovič Matijašić B., 2008. *Lactobacillus* isolates from weaned piglets' mucosa with inhibitory activity against common porcine pathogens. Folia Microbiologica, 53, 6: 569 – 576

Holzappel W.H., Haberer P., Snel J., Schillinger U., Huis in't Veld J.H.J. 1998. Overview of gut flora & probiotics. International Journal of Food Microbiology, 41: 85-101

Kmetijstvo. 2008. Javni razpis za posodabljanje kmetijskih gospodarstev za prestrukturiranje prašičev in perutnine. Ljubljana, spletni portal Kmetija.si: 1 str.
www.kmetija.si/new/content/view/486/33/ (9.6.2010)

Kaiser G.E. 2005. Enumeration of microorganisms. Baltimore, Catonsville Campus, The Community College of Baltimore Country: 1 str.
<http://www.cat.cc.md.us/courses/bio141/labmanua/lab4/lab4.html> (9.6.2010)

Koninkx J.F.J.G., Malago J.J. 2008. The protective potency of probiotic bacteria and their microbial product against enteric infections – review. Folia Microbiologica, 53: 189 - 194

Lee Y.K. 2004. Mathematical modelling of intestinal bacteria – host interactions. V: Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects. 3rd ed. Salminen S., von Wright A., Ouwehand A. (eds.). New York, Marcel Dekker: 351-363

Leser T.D., Amenuvor J.Z., Jensen T.K., Lindecrona R.H., Boye M., Møller K. 2002. Culture-independent analysis of gut bacteria: The pig gastrointestinal tract microbiota revisited. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 673-690

MacFarlane G.T., Gibson G.R. 1994. Metabolic activities of the normal colonic flora. V: *Human health: The contribution of microorganisms*. Gibson S.A.W. (ed.). London, Springer Verlag: 17-52

Mavrin D., Oštir Š. 2002. Tehnologija mleka in mlečnih izdelkov. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 218 str.

McDonald P., Edwards R.A., Greenhalgh J.F.D., Morgan C.A. 1995. *Animal nutrition*. 5th ed. New York, Longman Scientific & Technical: 607 str.

Miletič S. 1994. Mlijeko i mliječni proizvodi. Zagreb, Hrvatsko mljekarsko društvo: 273 str.

IDF Standard 100B. Milk and milk products: Enumeration of microorganisms colony count technique at 30 °C. 1991: 3 str.

Naidu A.S., Clemens R.A. 2000. Probiotics. V: *Natural food antimicrobial systems*. Naidu A.S. (ed.). Boca Raton, CRC Press: 431-461

Ouwehand A.C. 1998. Antimicrobial components from lactic acid bacteria. V: *Lactic acid bacteria: Microbiology and functional aspects*. Salaminnen S., Von Wright A. (eds.). New York, Marcel Dekker, Inc.: 139 – 155

Ouwehand A., Salminen A.C., Isolauri E. 2002. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82: 279 - 289

Parker R.B. 1974. Probiotics, the other half of the antibiotics story. *Animal Nutrition and Health*, 29: 4 – 8

Pomeranz Y. 1992. Whey: Composition, properties, processing and uses. V: *Encyclopedia of food science and technology*. Vol. 4. Hui H.Y. (ed.). New York, J. Wiley & Sons: 2835 – 2845

Rogelj I. 1997. Fermentirani mlečni izdelki-probiotična hrana? V: *Tehnologija, hrana, zdravje*. 1. slovenski kongres o hrani in prehrani z mednarodno udeležbo, 21-25 april, 1996, Bled. Raspor P., Pitako D., Hočevar I. (ur.). Ljubljana, Društvo živilskih in prehranskih strokovnih delavcev Slovenije: 31-38

Rogelj I. 2001. Simbiotični mlečni izdelki-učni primer funkcionalne hrane. V: *Funkcionalna hrana*. 21. Bitenčevi živilski dnevi. Portorož, 8-9 nov. 2001. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 219 – 229

Rogelj I., Perko B. 2003. Mlečni izdelki. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole-Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 541 - 578

Sanders M.E., Huis in't Veld J.H.J. 1999. Bringing a probiotic-containing functional food to the market: Microbiological, product, regulatory and labelling issues. V: Proceedings of the 6th Symposium on lactic acid bacteria: Genetics, metabolism and applications. Amsterdam, Kluwer Academic Publishers: 293-316

Servin A.L. 2004. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. FEMS Microbiology Reviews, 28, 4: 405-440

Somkuti G.A. 2000. Lactic acid bacteria. V: Encyclopedia of microbiology. Vol. 3. 2nd ed. Lederberg J. (ed.). New York, The Rockefeller University: 1-8

Tratnik L. 1998. Mlijeko: tehnologija, biokemija i mikrobiologija. Zagreb, Hrvatska mljekarska zadruga: 391 str.

Uredba Evropskega parlamenta in Sveta (ES) z dne 22.9.2003. Št. 1831/2003 o dodatkih za uporabo v prehrani živali. 2003. Uradni list Evropske unije, 46, L268: 29 str.

Uredba komisije (ES) št. 429/2008 z dne 25.4.2008 o podrobnih pravilih za izvajanje Uredbe Evropskega parlamenta in Sveta (ES) št. 1831/2003 v zvezi s pripravo in predvložitvijo vlog ter oceno krmnih dodatkov in izdajo dovoljenj zanje. 2008. Uradni list Evropske komisije, 51, L133: 1 - 65

Walter J. 2005. The microecology of lactobacilli in the gastrointestinal tract. V: Probiotics & prebiotics: Scientific aspects. Tannock G.W. (ed.) Wymondham, Caister Academic Press: 51 - 82

Wessels S., Axelsson L., Hansen E.B., De Vuyst L., Laulund S., Lähteenmäki L., Lindgren S., Mollet B., Salminen S., von Wright A. 2004. The lactic acid bacteria, the food chain, and their regulation. Trends in Food Science and Technology, 15: 498 -505

Zadow J.G. 2003. Whey and whey powders. V: Encyclopedia of food sciences and nutrition. Vol. 4. 2nd ed. Caballero B., Tringo L.C., Finglas P.M. (eds.). Amsterdam, Academic Press: 6147 - 6170

Zakon o krmi. 2006. Uradni list Republike Slovenije, 16, 127: 13924 - 13929

Zupan I. 1996. Preživetje vrst *Lactobacillus acidophilus* in *Bifidobacterium* ssp. med skladiščenjem fermentiranega mleka. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 59 str.

ZAHVALA

Najprej gre zahvala mentorici doc. dr. Andreji Čanžek Majhenič za njeno strokovno pomoč in vzpodbudo.

Hvala somentorici Metodi za vso pomoč in vložen trud.

Hvala recenzentki prof. dr. Sonji Smole Možina.

Hvala gđc. Lini Burkan za pomoč pri urejanju literature.

Mami in ati, hvala za spodbudo in potrpežljivost, ki sta mi jo nudila skozi študij. Hvala bratu Mitju za vso pomoč in podporo.

Peter hvala za vso ljubezen in podporo.

Uroš hvala ti za tvoj čas, trud in potrpežljivost pri oblikovanju diplome.

Karmen hvala za pomoč in prijateljstvo v študentskih letih.

PRILOGE

Priloga A: Rast čistih prašičjih izolatov na gojišču MRS z dodatkom antibiotikov (MRS/CL/CIP) v predposkusu

sev	KE/ml
2/25	$2,5 \cdot 10^8$
4/26	$1,3 \cdot 10^7$!
14/26	$1,0 \cdot 10^8$

! uporabljena nižja koncentracija antibiotika

Priloga B: Rezultati vrednosti pH analiziranih vzorcev, spremljanih pri vseh poskusih

POSKUS 1					
	to	po18h	po 7 dneh	po 14 dneh	po 21 dneh
sobna T					
1/1	/	5,65	5,31	/	/
1/2	/	5,70	4,99	/	/
1/3	/	5,66	5,24	/	/
1/4	/	5,73	4,93	/	/
1/5	6,04	6,04	4,62	/	/
T hladiln.					
1/1	/	5,65	5,75	5,84	5,80
1/2	/	5,70	5,78	5,89	5,82
1/3	/	5,66	5,79	5,89	5,84
1/4	/	5,73	5,88	5,96	5,94
1/5	6,04	6,04	6,05	6,13	6,10
POSKUS 2					
	to	po 18h	po 7 dneh	po 14 dneh	po 21 dneh
sobna T					
2/1	/	5,49	5,18	/	/
2/2	/	5,48	5,30	/	/
2/3	/	5,49	5,30	/	/
2/4	/	5,59	5,33	/	/
2/5	6,10	6,10	4,59	/	/
T hladiln.					
2/1	/	5,49	5,76	5,78	5,86
2/2	/	5,48	5,79	5,79	5,90
2/3	/	5,49	5,80	5,80	5,89
2/4	/	5,49	5,90	5,89	5,99
2/5	6,10	6,10	6,13	6,10	6,15
POSKUS 3					
	to	po 18h	po 7 dneh	po 14 dneh	po 21 dneh
sobna T					
3/1	/	5,70	5,16	/	/
3/2	/	5,71	4,79	/	/
3/3	/	5,70	5,10	/	/
3/4	/	5,78	5,02	/	/
3/5	6,03	6,03	4,66	/	/
T hladiln.					
3/1	/	5,70	5,80	5,67	5,81
3/2	/	5,71	5,76	5,82	5,84
3/3	/	5,70	5,75	5,83	5,81
3/4	/	5,78	5,77	5,79	5,73
3/5	6,03	6,03	6,14	6,14	6,09

Priloga C1: Velikosti mikrobne populacije skupnih laktobacilov, prašičjih izolatov in naravno prisotnih laktobacilov pred in po fermentaciji, ter hranjenju pri sobni temperaturi (poskus 1)

vzorec	skupni laktobacili			prašičji izolati			naravno prisotni laktob.		
	t_0	t_{18}	7 dni	t_0	t_{18}	7 dni	t_0	t_{18}	7 dni
1/1	$1,4 \cdot 10^7$	$9 \cdot 10^6$	$1,1 \cdot 10^9$	$1,1 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^6$	Nešt.	$3 \cdot 10^6$	$8 \cdot 10^6$	
1/2	$3,8 \cdot 10^6$	$5 \cdot 10^6$	$7,1 \cdot 10^8$	$2,7 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^6$	$5,2 \cdot 10^6$	$1,1 \cdot 10^6$	$3 \cdot 10^6$	$7,0 \cdot 10^8$
1/3	$1,5 \cdot 10^7$	$1,3 \cdot 10^7$	$1,8 \cdot 10^9$	$1,0 \cdot 10^6$	$> 10^6$	$4,0 \cdot 10^6$	$1,4 \cdot 10^7$		$1,8 \cdot 10^9$
1/4	0	$3 \cdot 10^6$	$1,1 \cdot 10^9$	/	/	/	/	/	/
1/5	/	Nešt.	Nešt.	/	/	/	/	/	/

Legenda: / analiza ni bila opravljena

Priloge C2: Velikosti mikrobne populacije laktokokov, koliformnih MO in skupnega števila MO pred in po fermentaciji, ter hranjenju pri sobni temperaturi (poskus 1)

vzorec	laktokoki			koliformni MO			skupno število MO		
	t_0	t_{18}	7 dni	t_0	t_{18}	7 dni	t_0	t_{18}	7 dni
1/1	/	$2 \cdot 10^6$	$1,4 \cdot 10^7$	/	$2,0 \cdot 10^3$	$4,4 \cdot 10^6$	/	Nešt.	$1,3 \cdot 10^8$
1/2	/	Nešt.	Nešt.	/	$4,9 \cdot 10^3$	Nešt.	/	$1 \cdot 10^7$	$7,6 \cdot 10^8$
1/3	/	Nešt.	$3,4 \cdot 10^8$	/	$1,110^3$	Nešt.	/	$1 \cdot 10^7$	Nešt.
1/4	$1,9 \cdot 10^2$	$2,7 \cdot 10^7$	$9,4 \cdot 10^8$	0	$4,0 \cdot 10^7$	$4,2 \cdot 10^7$	$1,4 \cdot 10^4$	$3,9 \cdot 10^7$	$9,5 \cdot 10^8$
1/5	/	/	Nešt.	/	/	$1,6 \cdot 10^7$	/	/	$1,2 \cdot 10^9$

Priloga D1: Velikosti mikrobne populacije skupnih laktobacilov, prašičjih izolatov in naravno prisotnih laktobacilov pred in po fermentaciji, ter hranjenju pri sobni temperaturi (poskus 2)

vzorec	skupni laktobacili			prašičji izolati			naravno prisotni laktob.		
	t_0	t_{18}	7 dni	t_0	t_{18}	7 dni	t_0	t_{18}	7 dni
2/1	$1,9 \cdot 10^7$	$1,3 \cdot 10^7$	$3,3 \cdot 10^8$	$1,0 \cdot 10^7$	$7,5 \cdot 10^6$	$1,2 \cdot 10^7$	$9,0 \cdot 10^6$	$5,5 \cdot 10^6$	$3,1 \cdot 10^8$
2/2	$1,1 \cdot 10^7$	$1,4 \cdot 10^7$	$3,4 \cdot 10^8$	$2,8 \cdot 10^6$	$2,9 \cdot 10^6$	$6,7 \cdot 10^7$	$8,2 \cdot 10^6$	$1,1 \cdot 10^7$	$2,7 \cdot 10^8$
2/3	$1,5 \cdot 10^7$	$1,6 \cdot 10^7$	$8,1 \cdot 10^8$	$1,8 \cdot 10^6$	$2,6 \cdot 10^6$	$1,9 \cdot 10^7$	$1,3 \cdot 10^7$	$1,3 \cdot 10^7$	$7,9 \cdot 10^8$
2/4	$1,7 \cdot 10^4$	$2,5 \cdot 10^7$	$5,9 \cdot 10^8$	/	/	/	/	/	/
2/5	/	/	Nešt.	/	/	/	/	/	/

Priloge D2: Velikosti mikrobne populacije laktokokov, koliformnih MO in skupnega števila MO pred in po fermentaciji, ter hranjenju pri sobni temperaturi (poskus 2)

vzorec	laktokoki			koliformni MO			skupno število MO		
	t_0	t_{18}	7 dni	t_0	t_{18}	7 dni	t_0	t_{18}	7 dni
2/1	/	$1,6 \cdot 10^6$	Nešt.	/	$8,2 \cdot 10^2$	$1,5 \cdot 10^7$	/	$1,7 \cdot 10^6$	$7,6 \cdot 10^8$
2/2	/	$6,3 \cdot 10^4$	Nešt.	/	$1,2 \cdot 10^2$	$6,5 \cdot 10^6$	/	$7,6 \cdot 10^4$	$4,1 \cdot 10^8$
2/3	/	$1,1 \cdot 10^6$	Nešt.	/	$2,2 \cdot 10^2$	$1,2 \cdot 10^7$	/	$8,7 \cdot 10^4$	$9,1 \cdot 10^8$
2/4	$1,1 \cdot 10^2$	$7,5 \cdot 10^7$	$8,6 \cdot 10^8$	0	$1,0 \cdot 10^6$	$2,1 \cdot 10^7$	$1,7 \cdot 10^2$	$9,2 \cdot 10^7$	$7,3 \cdot 10^8$
2/5	/	/	Nešt.	/	/	$7,1 \cdot 10^6$	/	/	$1,1 \cdot 10^9$

Priloga E1: Velikosti mikrobne populacije skupnih laktobacilov, prašičjih izolatov in naravno prisotnih laktobacilov pred in po fermentaciji, ter hranjenju pri sobni temperaturi (poskus 3)

vzorec	skupni laktobacili			prašičji izolati			naravno prisotni laktob.		
	t_0	t_{18}	7 dni	t_0	t_{18}	7 dni	t_0	t_{18}	7 dni
3/1	$3,9 \cdot 10^6$	$2,3 \cdot 10^7$	$1,7 \cdot 10^9$	$5,3 \cdot 10^6$	$1,5 \cdot 10^7$	$9,4 \cdot 10^6$		$8 \cdot 10^6$	$1,7 \cdot 10^9$
3/2	$1,0 \cdot 10^7$	$1,1 \cdot 10^7$	$1,2 \cdot 10^{10}$	$6,7 \cdot 10^6$	$8,3 \cdot 10^6$	$3,3 \cdot 10^6$	$3,3 \cdot 10^6$	$2,7 \cdot 10^6$	$1,1 \cdot 10^{10}$
3/3	$1,1 \cdot 10^7$	$1,2 \cdot 10^7$	$1,3 \cdot 10^{10}$	$3,3 \cdot 10^6$	$4,4 \cdot 10^6$	$4,8 \cdot 10^6$	$7,7 \cdot 10^6$	$7,6 \cdot 10^6$	$1,2 \cdot 10^{10}$
3/4	$6,8 \cdot 10^1$	$1,1 \cdot 10^8$	$4,8 \cdot 10^8$	/	/	/	/	/	/
3/5	/	/	$1,9 \cdot 10^9$	/	/	/	/	/	/

Priloge E2: Velikosti mikrobne populacije laktokokov, koliformnih MO in skupnega števila MO pred in po fermentaciji, ter hranjenju pri sobni temperaturi (poskus 3)

vzorec	laktokoki			koliformni MO			skupno število MO		
	t_0	t_{18}	7 dni	t_0	t_{18}	7 dni	t_0	t_{18}	7 dni
3/1	/	$1,9 \cdot 10^6$	$1,8 \cdot 10^9$	/	$3,0 \cdot 10^3$	$1,3 \cdot 10^7$	/	$2,3 \cdot 10^6$	$1,4 \cdot 10^9$
3/2	/	$4,3 \cdot 10^5$	$3,9 \cdot 10^8$	/	$1,8 \cdot 10^3$	$2,8 \cdot 10^6$	/	$4,6 \cdot 10^5$	Nešt.
3/3	/	$7,7 \cdot 10^5$	Nešt.	/	$2,9 \cdot 10^2$	$3,5 \cdot 10^5$	/	$7,3 \cdot 10^5$	Nešt.
3/4	$2,1 \cdot 10^2$	$1,7 \cdot 10^8$	$5,8 \cdot 10^8$	0	$4,0 \cdot 10^6$	$1,0 \cdot 10^7$	$1,3 \cdot 10^3$	$1,4 \cdot 10^8$	$6,5 \cdot 10^8$
3/5	/	/	$2,0 \cdot 10^9$	/	/	$1,8 \cdot 10^8$	/	/	Nešt.

Priloga F1: Velikosti mikrobne populacije skupnih laktobacilov, prašičjih izolatov in naravno prisotnih laktobacilov pri hranjenju pri temperaturi hladilnika (poskus 1)

vzorec	skupni laktobacili			prašičji izolati			naravno prisotni laktob.		
	7	14	21	7	14	21	7	14	21
1/1	$4,5 \cdot 10^6$	$5,4 \cdot 10^6$	$5,9 \cdot 10^6$	$1,9 \cdot 10^6$	$1,5 \cdot 10^6$	$3,3 \cdot 10^6$	$2,6 \cdot 10^6$	$3,9 \cdot 10^6$	$2,6 \cdot 10^6$
1/2	$5,3 \cdot 10^6$	$3,9 \cdot 10^6$	$6,3 \cdot 10^6$	$1,9 \cdot 10^6$	$1,7 \cdot 10^6$	$3,9 \cdot 10^6$	$3,4 \cdot 10^6$	$2,2 \cdot 10^6$	$2,4 \cdot 10^6$
1/3	$8,3 \cdot 10^6$	$2,7 \cdot 10^6$	$9,0 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^5$	$3,2 \cdot 10^5$	$9,9 \cdot 10^5$	$8,2 \cdot 10^6$	$2,3 \cdot 10^6$	$8,0 \cdot 10^6$
1/4	Nešt.	Nešt.	$2,2 \cdot 10^7$	/	/	/	/	/	/
1/5	$9,3 \cdot 10^3$	Nešt.	$4 \cdot 10^3$	/	/	/	/	/	/

Priloge F2: Velikosti mikrobne populacije laktokokov, koliformnih MO in skupnega števila MO pri hranjenju pri temperaturi hladilnika (poskus 1)

vzorec	laktokoki			koliformni MO			skupno število MO		
	7	14	21	7	14	21	7	14	21
1/1	$3 \cdot 10^5$	$5,6 \cdot 10^5$	$1,4 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^2$	0	0	$3 \cdot 10^5$	$6,7 \cdot 10^5$	$1,2 \cdot 10^6$
1/2	$1,2 \cdot 10^5$	$1,8 \cdot 10^5$	$4,3 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^2$	0	0	$3,1 \cdot 10^6$	$2,2 \cdot 10^5$	$3,5 \cdot 10^5$
1/3	$2,2 \cdot 10^5$	$2,3 \cdot 10^5$	$1,1 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^2$	0	0	$9,7 \cdot 10^6$	$3,8 \cdot 10^5$	$9,5 \cdot 10^5$
1/4	Nešt.	Nešt.	$2,9 \cdot 10^7$	Nešt.	$1,4 \cdot 10^5$	$7,4 \cdot 10^4$	Nešt.	$1 \cdot 10^8$	$4,9 \cdot 10^7$
1/5	$6,3 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^4$	Nešt.	$2 \cdot 10^1$	0	0	Nešt.	$1,5 \cdot 10^6$	$8,9 \cdot 10^6$

Priloga G1: Velikosti mikrobne populacije skupnih laktobacilov, prašičjih izolatov in naravno prisotnih laktobacilov pri hranjenju pri temperaturi hladilnika (poskus 2)

vzorec	skupni laktobacili			prašičji izolati			naravno prisotni laktob.		
	7	14	21	7	14	21	7	14	21
2/1	$1,5 \cdot 10^7$	$1,4 \cdot 10^7$	$1,7 \cdot 10^7$	$1,8 \cdot 10^6$	$1,8 \cdot 10^6$	$2,5 \cdot 10^6$	$1,3 \cdot 10^7$	$1,2 \cdot 10^7$	$1,4 \cdot 10^7$
2/2	$1,5 \cdot 10^7$	$1,2 \cdot 10^7$	$1,7 \cdot 10^7$	$2,0 \cdot 10^6$	$1,8 \cdot 10^6$	$1,9 \cdot 10^6$	$1,3 \cdot 10^7$	$1,0 \cdot 10^7$	$1,5 \cdot 10^7$
2/3	$5,3 \cdot 10^6$	$1,3 \cdot 10^7$	$7,1 \cdot 10^6$	$5 \cdot 10^5$	$9,9 \cdot 10^5$	$1,0 \cdot 10^6$	$4,8 \cdot 10^6$	$1,2 \cdot 10^7$	$6,1 \cdot 10^6$
2/4	$9,1 \cdot 10^7$	$7,1 \cdot 10^7$	$4,6 \cdot 10^7$	/	/	/	/	/	/
2/5	$4,0 \cdot 10^2$	$4 \cdot 10^3$	Nešt.	/	/	/	/	/	/

Priloge G2: Velikosti mikrobne populacije laktokokov, koliformnih MO in skupnega števila MO pri hranjenju pri temperaturi hladilnika (poskus 2)

vzorec	laktokoki			koliformni MO			skupno število MO		
	7	14	21	7	14	21	7	14	21
2/1	$2,0 \cdot 10^7$	Nešt.	$3,7 \cdot 10^6$	$5,6 \cdot 10^1$	$3,8 \cdot 10^1$	0	$7,8 \cdot 10^6$	$4,3 \cdot 10^6$	$5,8 \cdot 10^6$
2/2	$1,5 \cdot 10^5$	$1,9 \cdot 10^5$	$1,9 \cdot 10^5$	0	$4,7 \cdot 10^3$	0	$7,2 \cdot 10^7$	$3,0 \cdot 10^5$	$1,8 \cdot 10^5$
2/3	$2,9 \cdot 10^6$	$2,5 \cdot 10^6$	$2,4 \cdot 10^6$	0	Nešt.	0	$6,8 \cdot 10^6$	$3,7 \cdot 10^6$	$2,2 \cdot 10^6$
2/4	$2,2 \cdot 10^8$	$1,0 \cdot 10^8$	$6,4 \cdot 10^7$	$4,8 \cdot 10^5$	$3,0 \cdot 10^5$	$2,2 \cdot 10^5$	$1,6 \cdot 10^8$	Nešt.	$7,5 \cdot 10^7$
2/5	$2,0 \cdot 10^3$	$1,1 \cdot 10^3$	Nešt.	0	Nešt.	0	$1,7 \cdot 10^3$	$5,1 \cdot 10^6$	$1,4 \cdot 10^5$

Priloga H1: Velikosti mikrobne populacije skupnih laktobacilov, prašičjih izolatov in naravno prisotnih laktobacilov pri hranjenju pri temperaturi hladilnika (poskus 3)

vzorec	skupni laktobacili			prašičji izolati			naravno prisotni laktob.		
	7	14	21	7	14	21	7	14	21
3/1	$2,7 \cdot 10^7$	$7,2 \cdot 10^6$	$8,7 \cdot 10^6$	$6,4 \cdot 10^6$	$2,2 \cdot 10^6$	$3,0 \cdot 10^6$	$2,0 \cdot 10^7$	$5,0 \cdot 10^6$	$3,7 \cdot 10^6$
3/2	$1,4 \cdot 10^7$	$9,0 \cdot 10^6$	$1,2 \cdot 10^7$	$1,5 \cdot 10^6$	$1,0 \cdot 10^6$	$1,6 \cdot 10^6$	$1,2 \cdot 10^7$	$8,0 \cdot 10^6$	$1,1 \cdot 10^7$
3/3	$7,6 \cdot 10^6$	$1,1 \cdot 10^7$	$1,2 \cdot 10^7$	$1,6 \cdot 10^5$	$1,1 \cdot 10^6$	$8,5 \cdot 10^6$	$7,4 \cdot 10^6$	$9,9 \cdot 10^6$	$3,5 \cdot 10^6$
3/4	$2,3 \cdot 10^8$	$9,3 \cdot 10^7$	$3,8 \cdot 10^8$	/	/	/	/	/	/
3/5	Nešt.	$1,3 \cdot 10^1$	$4,7 \cdot 10^1$	/	/	/	/	/	/

Priloge H2: Velikosti mikrobne populacije laktokokov, koliformnih MO in skupnega števila MO pri hranjenju pri temperaturi hladilnika (poskus 3)

vzorec	laktokoki			koliformni MO			skupno število MO		
	7	14	21	7	14	21	7	14	21
3/1	$3,1 \cdot 10^6$	$2,2 \cdot 10^6$	$3,7 \cdot 10^6$	$1,2 \cdot 10^3$	$1,4 \cdot 10^2$	$6,1 \cdot 10^1$	Nešt.	$3,3 \cdot 10^6$	$5,0 \cdot 10^6$
3/2	$1,2 \cdot 10^6$	$3,2 \cdot 10^6$	$1,1 \cdot 10^7$	$1,1 \cdot 10^3$	$1,9 \cdot 10^2$	$7,8 \cdot 10^1$	$8,9 \cdot 10^6$	$2,8 \cdot 10^6$	$9,0 \cdot 10^6$
3/3	$1,1 \cdot 10^6$	$4,1 \cdot 10^6$	$1,1 \cdot 10^7$	$1,5 \cdot 10^2$	$3,2 \cdot 10^1$	0	Nešt.	$3,7 \cdot 10^6$	$1,1 \cdot 10^7$
3/4	$2,5 \cdot 10^8$	$1,6 \cdot 10^8$	$4,1 \cdot 10^8$	$1 \cdot 10^6$	$4,2 \cdot 10^5$	$1,5 \cdot 10^6$	Nešt.	$1,7 \cdot 10^8$	$5,3 \cdot 10^8$
3/5	$4 \cdot 10^2$	$9,1 \cdot 10^1$	$1,3 \cdot 10^3$	0	$1,3 \cdot 10^1$	$8,5 \cdot 10^2$	Nešt.	$3,9 \cdot 10^4$	$2,5 \cdot 10^6$

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Nataša Vehar

**FERMENTACIJA KONCENTRIRANE SIROTKE Z
IZBRANIMI LAKTOBACILI, OSAMLJENIMI IZ
ČREVESNE SLUZNICE PRAŠIČEV**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2010