

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Ana KRALJ

**PROTIMIKROBNE LASTNOSTI IN β -
GALAKTOZIDAZNA AKTIVNOST
STREPTOKOKOV IN LAKTOBACILOV,
OSAMLJENIH IZ TRADICIONALNIH JOGURTOV**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2009

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Ana KRALJ

**PROTIMIKROBNE LASTNOSTI IN β -GALAKTOZIDAZNA
AKTIVNOST STREPTOKOKOV IN LAKTOBACILOV,
OSAMLJENIH IZ TRADICIONALNIH JOGURTOV**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**ANTIMICROBIAL PROPERTIES AND β -GALACTOSIDASE
ACTIVITY OF STREPTOCOCCI AND LACTOBACILLI ISOLATED
FROM TRADITIONAL YOGHURTS**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2009

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 recenzentko pa prof. dr. Ireno Rogelj.

Mentorica: doc. dr. Andreja Čanžek Majhenič

Recenzentka: prof. dr. Irena Rogelj

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Diplomsko delo 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.

Ana Kralj

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 579.22/.24+579.26:637.146.34(043)=163.6
KG	mlečnokislinske bakterije/jogurt/ <i>Streptococcus thermophilus</i> / <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> /morfološke lastnosti/PCR identifikacija mikroorganizmov/protimikrobne lastnosti/medsebojno protimikrobno delovanje/ β -galaktozidazna aktivnost/mlečna kislina
AV	KRALJ, Ana
SA	ČANŽEK MAJHENIČ, Andreja (mentorica) / ROGELJ, Irena (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI	2009
IN	PROTIMIKROBNE LASTNOSTI IN β -GALAKTOZIDAZNA AKTIVNOST STREPTOKOKOV IN LAKTOBACILOV, OSAMLJENIH IZ TRADICIONALNIH JOGURTOV
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	IX, 55 str., 13 pregl., 10 sl., 41 vir.
IJ	sl
JJ	sl/en
AI	Proučevali smo bakterijske seve izolirane iz tradicionalnega bolgarskega jogurta. Izolate smo najprej opisali z morfološkim pregledom pod mikroskopom in jih identificirali. Protimikrobni potencial izolatov med seboj kakor tudi proti naboru sorodnih bakterij, bakterij kvarljivk in potencialno patogenih bakterij smo ugotavljali z metodo lise na trdnem gojišču. Proučevali smo stopnjo β -galaktozidazne aktivnosti in tvorbo mlečne kisline. Izkazalo se je, da so vsi izolati po Gramu pozitivne bakterije. Z analizo PCR smo izolata S4 in S7 identificirali kot seva vrste <i>Str. thermophilus</i> , izolate L1, L2, L3, L4, L5, L6 in Biofank pa za pripadnike vrste <i>Lb. delbrueckii</i> oziroma podvrste <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> . Streptokoka S4 in S7 sta delovala proti sevu <i>Cl. Tyrobutyricum</i> DSM 2637, laktobacili pa proti <i>Lb. johnsonii</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Staph. aureus</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>L. innocua</i> , <i>Cl. perfringens</i> . β -galaktozidazna aktivnost je bila višja pri laktobacilih. Najbolj učinkovit laktobacil je pokazal 1211 ME aktivnosti, najbolj učinkovit streptokok pa 180 ME. Sevi laktobacilov so v rekonstituiranem posnetem mleku tvorili od 4,2 g/l do 9,9 g/l D(-) mlečne kisline, seva streptokokov pa od 0,74 g/l do 6,04 g/l L(+) mlečne kisline. V bujonu so sevi laktobacilov tvorili od 4,5 g/l do 10,9 g/l D(-) mlečne kisline, seva S4 in S7 pa 0,68 g/l in 1,4 g/l L(+) mlečne kisline. Iz dobljenih rezultatov smo ocenili, da predstavljajo preiskovani sevi obetaven potencial za pripravo fermentiranega izdelka.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 579.22/.24+579.26:637.146.34(043)=163.6
lactic acid bacteria/yoghurt /*Streptococcus thermophilus*/*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*/morphological properties/PCR
CX identification/antimicrobial properties/antagonistic activity/ β -galactosidase activity/lactic acid
AU KRALJ, Ana
AA ČANŽEK MAJHENIČ, Andreja (supervisor)/ROGELJ, Irena (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
PY 2009
TI ANTIMICROBIAL PROPERTIES AND β -GALACTOSIDASE ACTIVITY OF STREPTOCOCCI AND LACTOBACILLI ISOLATED FROM TRADITIONAL YOGHURTS
DT Graduation Thesis (University studies)
NO IX, 55 p., 13 tab., 10 fig., 41 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Bacterial strains isolated from traditional Bulgarian yoghurts were analysed. Test strains were morphologically examined under the microscope and identified. To determine antimicrobial potential, strains were tested with agar spot method directed against each other as well as against some closely related bacteria, spoilage and pathogen bacteria. β -galactosidase activity and lactic acid production were examined as well. Results revealed that all isolates were Gram positive. By the use of PCR technique it was found out that isolates S4 in S7 belong to *Str. thermophilus* species, while isolates L1, L2, L3, L4, L5, L6 and Biofank belong to *Lb. delbrueckii* species and further to *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* subspecies. Streptococci showed antibacterial activity against strain *Cl. tyrobutyricum* DSM 2637 and lactobacilli were effective against strains of *Lb. johnsonii*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*, *Staph. aureus*, *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *Cl. perfringens*. Lactobacilli exhibited higher β -galactosidase activity than streptococci. The most effective lactobacilli exhibited 1211 ME and the most effective streptococci exhibited 180 ME of β -galactosidase activity. When lactobacilli and streptococci were cultivated in reconstituted skimmed milk they produced from 4,2 g/l to 9,9 g/l D(-) lactic acid and 0,74 g/l to 6,04 g/l L(+) lactic acid, respectively. In broth lactobacilli produced from 4,5 g/l to 10,9 g/l D(-) lactic acid and streptococci from 0,68 g/l to 1,4 g/l L(+) lactic acid, respectively. From results obtained we concluded, that all our test strains are suitable for production of fermented products.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO PREGLEDNIC.....	VII
KAZALO SLIK.....	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	IX
1 UVOD	1
1.1 DELOVNA HIPOTEZA	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 MLEČNOKISLINSKE BAKTERIJE	3
2.2 BAKTERIJSKA VRSTA <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	4
2.3 BAKTERIJSKA VRSTA <i>Streptococcus thermophilus</i>	5
2.4 PROTIMIKROBNO DELOVANJE BAKTERIJ <i>Lactobacillus delbrueckii</i> IN <i>Streptococcus thermophilus</i>	7
2.5 PROBIOTIČNE LASTNOSTI BAKTERIJ <i>Streptococcus thermophilus</i> IN <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	8
2.6 β - GALAKTOZIDAZNA AKTIVNOST	10
2.7 TVORBA MLEČNE KISLINE.....	11
3 MATERIAL IN METODE	13
3.1 MATERIAL	13
3.1.1 Bakterijski sevi.....	13
3.1.1.1 Testne bakterije.....	13
3.1.1.2 Indikatorske bakterije	14
3.1.1.3 Bakterije, uporabljene kot kontrole v reakcijah PCR.....	15
3.1.2 Gojišča	15
3.1.2.1 Tekoča gojišča	15
3.1.2.2 Trdna gojišča	16
3.1.2.3 Poltrdna gojišča	16
3.1.3 Reagenti za barvanje po Gramu	17
3.1.4 Reagenti za pripravo bakterijske DNA	17
3.1.5 Reagenti za verižno reakcijo s polimerazo (PCR).....	17
3.1.6 Reagenti za analizo pomnožkov v agaroznem gelu	17
3.1.7 Reagenti za ugotavljanje aktivnosti β-gal.....	18
3.1.8 Reagenti za določanje količine in vrste nastale mlečne kisline.....	18
3.2 METODE	19
3.2.1 Morfološka analiza z barvanjem po Gramu	19
3.2.2 Priprava DNA za izvedbo PCR.....	20
3.2.3 Priprava reakcijske mešanice za PCR.....	21
3.2.4 Potek reakcije PCR	22
3.2.5 Gelska elektroforeza.....	24

3.2.6	Ugotavljanje protimikrobnega potenciala testnih laktobacilov in streptokokov z metodo lise na trdnem gojišču.....	25
3.2.6.1	Medsebojno protimikrobno delovanje testnih sevov.....	25
3.2.6.2	Protimikrobno delovanje testnih sevov proti naboru indikatorskih bakterij ...	26
3.2.7	Ugotavljanje β-galaktozidazne aktivnosti testnih sevov	27
3.2.8	Določanje količine in vrste nastale mlečne kisline.....	28
4	REZULTATI.....	31
4.1	MORFOLOŠKA ANALIZA MLEČNOKISLINSKIH BAKTERIJ IN INDIKATORSKIH ORGANIZMOV	31
4.2	REZULTATI ANALIZE PCR	33
4.3	REZULTATI ANALIZ PROTIMIKROBNEGA DELOVANJA Z METODO LISE NA TRDNEM GOJIŠČU	35
4.4	REZULTATI ANALIZE β -GALAKTOZIDAZNE AKTIVNOSTI.....	38
4.5	REZULTATI DOLOČANJA KOLIČINE IN VRSTE NASTALE MLEČNE KISLINE	39
4.5.1	Gojitev kultur v tekočih gojiščih	39
4.5.2	Gojitev kultur v rekonstituiranem posnetem mleku	40
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	41
5.1	RAZPRAVA.....	41
5.1.1	Morfološke značilnosti preiskovanih sevov	41
5.1.2	Identifikacija preiskovanih sevov	42
5.1.3	Protimikrobno delovanje testnih mikroorganizmov	42
5.1.4	β-galaktozidazna aktivnost	44
5.1.5	Tvorba mlečne kisline	45
5.2	SKLEPI.....	48
6	POVZETEK.....	49
7	VIRI	51

ZAHVALA

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Testni sevi in pogoji kultivacije.....	13
Preglednica 2: Nabor izbranih indikatorskih bakterij in pogoji kultivacije.....	14
Preglednica 3: Nabor izbranih sevov, ki smo jih uporabili kot pozitivne kontrole v reakcijah PCR in pogoji kultivacije.....	15
Preglednica 4: Uporabljeni začetni oligonukleotidi pri reakciji PCR in velikost specifičnih pomnožkov.....	22
Preglednica 5: Potek reakcije PCR za določanje vrste <i>Lb. delbrueckii</i> (Tilsala – Timisjärvi in Alatossava, 1997).	23
Preglednica 6: Potek reakcije PCR za določanje podvrst <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> in <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> (Torriani in sod., 1999).	23
Preglednica 7: Potek reakcije PCR za določanje vrste <i>Str. thermophilus</i> (Tilsala – Timisjärvi in Alatossava, 1997).	24
Preglednica 8: Rezultati morfološke analize	32
Preglednica 9: Rezultati analize medsebojnega protimikrobnega delovanja preiskovanih sevov.	35
Preglednica 10: Rezultati analize preiskovanih sevov proti izbranim indikatorskim bakterijam.	37
Preglednica 11: Rezultati merjenja absorbance pri 560 nm in 420 nm in vrednosti β -galaktozidazne aktivnosti v Millerjevih enotah.	38
Preglednica 12: Rezultati merjenja absorbance pri 340 nm, rezultati izračuna spremembe absorbanc in koncentracije nastale mlečne kisline (gojitev kultur v tekočih gojiščih).	39
Preglednica 13: Vrednosti pH koaguluma, rezultati merjenja absorbance pri 340 nm, rezultati izračuna spremembe absorbanc in koncentracije nastale mlečne kisline (gojitev kultur v rekonstituiranem mleku).	40

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Shematski prikaz barvanja po Gramu.....	20
Slika 2: Primer velikostne lestvice DNA 1Kb.	25
Slika 3: Označbe plošč pri ugotavljanju protimikrobnega potenciala.	26
Slika 4: Mikroskopski preparat bakterij iz rodu <i>Lactobacillus</i>	31
Slika 5: Mikroskopski preparat bakterij iz rodu <i>Streptococcus</i>	31
Slika 6: Rezultati reakcije PCR z začetnimi oligonukleotidi ThI/ThII za vrsto <i>Str. thermophilus</i>	33
Slika 7: Rezultati PCR za potrditev vrste <i>Lactobacillus delbrueckii</i> (A) in za potrditev podvrst <i>lactis</i> , <i>bulgaricus</i> in <i>delbrueckii</i> (B).....	34
Slika 8: Rezultati PCR za potrditev podvrst <i>lactis</i> , <i>bulgaricus</i> in <i>delbrueckii</i>	35
Slika 9: Ugotavljanje protimikrobne aktivnosti testnih mikroorganizmov L1, L2, L3 in L4 proti indikatorskemu organizmu <i>Lb. sakei</i> (ni inhibicije)	36
Slika 10: Ugotavljanje protimikrobne aktivnosti testnih mikroorganizmmov K7, S4 in S7 proti indikatorskemu organizmu <i>L. sakei</i> (inhibicija samo s K7).	36

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Okrajšava ali simbol:	Pomen:
β -gal	encim β -galaktozidaza
<i>B. cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
BHI	gojišče za bakterije <i>B. cereus</i> , <i>E. coli</i> , <i>L. innocua</i> in <i>L. monocytogenes</i> (Brain heart broth)
bp	bazni par
<i>Cl.</i>	<i>Clostridium</i>
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	mešanica nukleotidov
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
<i>Ec.</i>	<i>Enterococcus</i>
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid (etilendiamintetraocetna kislina)
Elliker-lac	gojišče za streptokoke s poznano koncentracijo laktoze, ki je edini prisotni sladkor
GRAS	generally recognised as safe (splošno priznane kot varne)
K7	<i>Lactobacillus gasseri</i> K7
<i>Lb.</i>	<i>Lactobacillus</i>
<i>L.</i>	<i>Listeria</i>
M	molarnost (mol/L)
ME	Millerjeve enote
MKB	mlečnokislinske bakterije
MRS	gojišče za laktobacile po De Man, Rogosa, Sharpe
MRS-lac	gojišče za laktobacile s poznano koncentracijo laktoze, ki je edini prisotni sladkor
M17	gojišče za streptokoke
OPNG	o-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid
PCR	polymerase chain reaction (verižna reakcija s polimerazo)
RCM	gojišče za <i>Cl. perfringens</i> in <i>Cl. tyrobutyricum</i> (Reinforced Clostridium medium)
RPM	rekonstituirano posneto mleko
TAE	TRIS acetni pufer
<i>Str.</i>	<i>Streptococcus</i>
<i>Staph.</i>	<i>Staphylococcus</i>
subsp.	subspecies (podvrsta)
UV	ultravijoličen (-a svetloba)

1 UVOD

Jogurt je fermentiran mlečni proizvod. Največkrat je narejen iz kravjega mleka, medtem ko ga v deželah Mediterana, srednjega vzhoda, na jugu Rusije in v južni Aziji izdelujejo tudi iz drugih vrst mleka kot je kozje, ovčje, kobilje ali bivoličje. Za klasični jogurt sta značilni bakteriji *Streptococcus thermophilus* in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Kadar govorimo o organoleptičnih lastnostih jogurta, opisujemo njegovo aromo, okus, konsistenco, viskoznost, vonj in teksturo. Jogurt ima tipično svežo aromo, ki je večinoma posledica prisotnosti acetaldehida. Rahlo kiselkast in svež okus je posledica prisotnosti mlečne kisline. Organoleptične lastnosti jogurta so odvisne od uporabljenih proizvodnih kultur, predhodne obdelave mleka, pogojev inkubacije ter od ohlajanja in skladiščenja izdelka (Mareschi in Cueff, 1989).

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 bakteriji zelo 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).

S fermentacijo mleka v jogurt se spremeni tudi sestava izdelka. Bakteriji *Str. thermophilus* in *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* med fermentacijo znižata vsebnost laktoze za 20 do 30 %, saj je laktoza njun vir energije. Proizvajata pa mlečno kislino, galaktozo in glukozo. Tako povečujeta prebavljivost mlečnih izdelkov pri ljudeh z laktozno intoleranco. Posledica fermentacije je tudi povečana vsebnost peptidov in aminokislin v jogurtu kar tudi izboljšuje prebavljivost jogurta. Vsebnost maščob v jogurtu je določena z vsebnostjo maščob v uporabljenem mleku in se med fermentacijo bistveno ne spremeni (Mareschi in Cueff, 1989).

Bakteriji *Str. thermophilus* in *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* nista avtohtoni bakteriji prebavnega trakta, zato zaradi delovanja črevesnih encimov, žolčnih soli in želodčne kisline prehoda skozi prebavni trakt navadno ne preživita. Vendar pa s svojimi metabolnimi produkti prispevata k izboljšanju prebave, preprečujeta namnoževanje patogenih bakterij in tvorita produkte s protimikrobnim delovanjem kot so bulgaricin, acidofilin in laktobacilin (Mareschi in Cueff, 1989).

1.1 DELOVNA HIPOTEZA

Simbiotična rast streptokokov in laktobacilov v mleku že stoletja zagotavlja proizvodnjo tradicionalnega jogurta. Laktobacili so navadno boljši proteoliti in z razgradnjo kazeina do aminokislin stimulirajo rast streptokokov, medtem ko streptokoki s tvorbo formata in CO₂ stimulirajo rast laktobacilov. Mleko med fermentacijo koagulira zaradi znižanja vrednosti pH, ki je posledica nastanka mlečne kisline. Da pa mlečna kislina lahko nastane, streptokoki in laktobacili s pomočjo encima β -galaktozidaze razgradijo laktozo na glukozo in galaktozo, kjer glukozo nadalje pretvorijo v L(+) oz. D(-) mlečno kislino. Začetni padec vrednosti pH do 5,0 gre na račun aktivnosti streptokokov, medtem ko so laktobacili odgovorni za nadaljnje zniževanje vrednosti pH do 4,0. Zato pričakujemo, da bodo preiskovani laktobacili izkazali višjo β -galaktozidazno aktivnost kot streptokoki ter tvorili D(-) mlečno kislino, medtem ko bo pri streptokokih β -galaktozidazna aktivnost slabše izražena in bodo tvorili L(+) mlečno kislino. Predvidevamo, da bodo laktobacili protimikrobno bolj učinkoviti kot streptokoki. Naši rezultati bodo koristna informacija o morebitnem izboru potencialnih sevov, osamljenih iz tradicionalnih jogurtov, za pripravo starterske kulture za izdelavo klasičnega jogurta.

2 PREGLED OBJAV

2.1 MLEČNOKISLINSKE BAKTERIJE

Mlečnokislinske bakterije (MKB) imajo pomembno vlogo med starterskimi kulturami. Njihova uporaba je že zelo dolga, sodijo pa tudi med mikroorganizme, katerih uporaba je splošno znana kot varna oz. GRAS (Generally Recognised as Safe). Okolja, ki jih naselijo MKB, postanejo hitro kislila, saj MKB proizvajajo organske kisline, najpogosteje mlečno kislino. Produkti njihovega metabolizma so tudi očetna kislina, etanol, aromatične spojine, bakteriocini, eksopolisaharidi in razni encimi (Leroy in De Vuyst, 2004).

Med mlečnokislinske bakterije mlekarskih starterskih kultur sodijo bakterije iz rodov *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* in *Lactobacillus* (Rogelj in Perko, 2003). Leroy in De Vuyst (2004) pa omenjata še naslednje rodove MKB: *Bifidobacterium*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus* in *Weissella*.

MKB pripisujejo mnoge koristne lastnosti. Z izločanjem protimikrobnih snovi kot so organske kisline, ogljikov dioksid, vodikov peroksid, etanol, različni bakteriocini, ki delujejo kot biokonzervansi, prispevajo MKB k obstojnosti in mikrobiološki stabilnosti fermentiranega izdelka. Med mlečnokislinsko fermentacijo se lahko tvorijo acetaldehid, acetoin in diacetil, ki oblikujejo tipično aromo izdelka. S tvorbo eksopolisaharidov pa lahko nekatere MKB vplivajo na teksturo izdelka. Poleg tega pa ima uživanje fermentiranih mlečnih izdelkov, zaradi produktov fermentacije, tudi ugoden učinek na zdravje ljudi (Leroy in De Vuyst, 2004).

MKB pa so tudi sestavni del avtohtone mikroflore humanega in živalskega prebavnega in urogenitalnega trakta, kjer uravnavajo črevesno mikrofloro in preprečujejo razmnoževanje patogenih bakterij (Rogelj in Perko, 2003).

2.2 BAKTERIJSKA VRSTA *Lactobacillus delbrueckii*

Bakterijska vrsta *Lb. delbrueckii* vsebuje tri podvrste: *Lb. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* in *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. So palčke, ki se lahko pojavljajo posamič ali v kratkih verižicah. Pri temperaturah pod 10 °C je njihova rast zelo šibka, optimalna temperatura rasti v mleku je med 40 in 45 °C, rast pa se pojavi tudi še pri temperaturah med 50 in 55 °C. Za gojenje te vrste uporabljamo neselektivno gojišče de Man, Rogosa in Sharpe - MRS (de Man in sod., 1960), inkubiramo pa jih v anaerobnih pogojih, pri 37 °C. Ker pa pri teh pogojih lahko zrastejo tudi bakterije vrste *Str. thermophilus*, uporabljamo gojišče MRS z vrednostjo pH 5,4. Takšna vrednost pH zavre rast bakterij vrste *Str. thermophilus*, ne pa tudi drugih laktobacilov (Curry in Crow, 2002).

Bakterije podvrste *Lb. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* lahko izoliramo iz fermentiranega rastlinskega materiala. Ne fermentirajo laktoze, zato niso pomembne v mlekarški industriji. Fermentirajo pa glukozo, fruktozo, manozo in saharozo. Bakterije podvrste *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* lahko izoliramo iz mnogih mlečnih izdelkov. V primerjavi z ostalimi je ta podvrsta sposobna fermentirati največ različnih ogljikovih hidratov. Fermentirajo fruktozo, glukozo, laktozo, maltozo, manozo, saharozo, trehalozo,... Bakterije podvrste *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* lahko izoliramo iz sira in fermentiranih mlečnih izdelkov. Fermentirajo pa samo glukozo, laktozo in fruktozo (Curry in Crow, 2002).

Bakterije vrste *Lb. delbrueckii* so homofermentativni laktobacili. Glavni produkt fermentacije je D(-) mlečna kislina. *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* cepita laktozo z encimom β -galaktozidaza, redkeje z encimom fosfo- β -galaktozidaza. Ko gojimo bakterije v mleku, začne s pomočjo antiport sistema v celice vstopati laktoza in izstopati galaktoza. V celici namreč poteče cepitev laktoze z encimom β -galaktozidaza, pri čemer se samo glukosa pretvori v D(-) laktat. Ta proces poteče po Embden-Meyerhofovi poti (Curry in Crow, 2002).

Lb. delbrueckii subsp. *bulgaricus*, bakterijo z eno najdaljših tradicij starterske kulture v mlekarški industriji, uporabljamo pri proizvodnji različnih vrst fermentiranih mlečnih izdelkov. Kot startersko kulturo jo običajno uporabljamo skupaj z bakterijami vrste *Str.*

thermophilus. Le s pravilno kombinacijo in razmerjem bakterijskih vrst v starterski kulturi lahko zagotovimo dobro vzajemno rast starterske kulture v mleku in s tem optimalen potek fermentacije. Tako je kombinacija *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in *Str. thermophilus*, navadno v razmerju 1:1, optimalna za izdelavo klasičnega jogurta, saj bakteriji s svojim delovanjem v mleku stimulatивно vplivata druga na drugo. *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* je boljši proteolit kot *Str. thermophilus*. Posledica proteolitičnega delovanja so kratkoveržni peptidi in nekaj malega proste aminokisliline, ki stimulirajo rast bakterije *Str. thermophilus*. *Str. thermophilus* pa s peptidazami cepi kratkoveržne peptide do prostih aminokislilin, ki stimulirajo rast bakterije *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, dodatno pa *Str. thermophilus* stimulira rast *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* s tvorbo mravljinčne kisline in manjših količin CO₂, ki nastane pri razgradnji sečnine (Robinson, 2002).

Pri vrsti *Lb. delbrueckii* je poznanih malo bakteriocinov. Mednje sodita ozkospektralna lakticina A in B podvrste *lactis*, ki sta uspešna le proti sevom podvrste *bulgaricus*. Nasprotno pa lahko pri podvrsti *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* najdemo bakteriocin bulgarikan s širokim spektrom delovanja tako proti po Gramu pozitivnim kot tudi po Gramu negativnim bakterijam (Curry in Crow, 2002).

2.3 BAKTERIJSKA VRSTA *Streptococcus thermophilus*

Bakterije *Str. thermophilus* spadajo med termofilne mlečnokislinske bakterije. So po Gramu pozitivni koki, premera od 0,7 do 0,9 µm. Pojavljajo se lahko v parih ali verižicah (Pearce in Flint, 2002). Podatki o optimalni temperaturi rasti se v literaturi rahlo razlikujejo. Tako Pearce in Flint (2002) navajata optimalno temperaturo rasti med 40 in 45 °C, Rogljeva in Perko (2003) ter Robinson (2002) pa navajajo kot optimalno temperaturo rasti 37 °C. Minimalna temperatura, ki še omogoča rast je 20 – 25 °C, maksimalna temperatura pa 47 do 50 °C. Fermentirajo laktozo, fruktozo, saharozo in glukozo. Bakterije vrste *Str. thermophilus* so precej občutljive za antibiotike in dezinfekcijska sredstva. So slabi proteoliti (Pearce in Flint, 2002).

Vrsta *Str. thermophilus* je dobro prilagojena na razmere v mleku in mlečnih izdelkih, zato je praktično ne najdemo v drugih ekoloških nišah. Za svojo rast potrebujejo proste

aminokislina: glutaminsko kislino, histidin, metionin, cistein, valin, levcin, izolevcin, triptofan, arginin in tirozin. Ker je vsebnost razpoložljivega dušika v surovem mleku običajno nezadostna za dobro rast, si pomagamo tako, da mleko za proizvodnjo jogurta segrevamo na ustrezno temperaturo, da povzročimo precipitacijo sirotkinih beljakovin ali pa dodamo kulturo bakterij, ki so dobri proteoliti. Med slednje sodijo že omenjeni laktobacili (Pearce in Flint, 2002).

Bakterije vrste *Str. thermophilus* so homofermentativne. Laktozo fermentirajo po Embden – Meyerhofovi poti, pri čemer nastane L(+) laktat. S pomočjo sistema antiport v celice vstopa laktoza, kjer pride do njene cepitve, in izstopa galaktoza, glukoza pa se pretvarja v L(+) laktat (Pearce in Flint, 2002).

Bakterije *Str. thermophilus* lahko proizvajajo bakteriocine, ki so navadno ozkospektralni in delujejo le proti sorodnim bakterijskim vrstam. Znanih pa je tudi nekaj širokospektralnih bakteriocinov, ki so učinkoviti ne samo proti sorodnim bakterijskim vrstam ampak celo proti nekaterim kvarljivcem in patogencem (Pearce in Flint, 2002).

Čeprav klasičnemu jogurtu in mnogim laktobacilom pripisujejo nekatere probiotične učinke, pa vrsta *Str. thermophilus* praktično ne kaže nobenih probiotičnih lastnosti. Predvsem občutljivost streptokokov za žolč onemogoča njihovo preživetje skozi prebavni trakt. Še najpomembnejša sposobnost streptokokov je cepitev laktoze. Od začetnih 4-5 % normalno prisotne laktoze v mleku ostane v jogurtu običajno 3-4 % laktoze, kar je tista količina, ki jo ljudje z zmanjšano količino encima β -galaktozidaze v tankem črevesu oziroma t.i. laktozno intoleranco, lažje prebavijo (Pearce in Flint, 2002).

2.4 PROTIMIKROBNO DELOVANJE BAKTERIJ *Lactobacillus delbrueckii* IN *Streptococcus thermophilus*

MKB proizvajajo različne protimikrobne snovi. Mednje sodijo organske kisline (mlečna, očetna, mravljinčna,...), vodikov peroksid, ogljikov dioksid, diacetil, etanol in protimikrobne proteinske snovi z nizko molekulsko maso – bakteriocini (Leroy in De Vuyst, 2004).

Nedisociirane organske kisline delujejo protimikrobno, saj so sposobne preiti preko citoplazemske membrane. Ker je v citoplazmi vrednost pH višja, organske kisline disociirajo in pri tem sprostijo protone. Organske kisline, ki imajo višjo vrednost pKa delujejo bolj inhibitorno. Zato očetna kislina s pKa vrednostjo 4,8 deluje bolj inhibitorno kot mlečna kislina, katere vrednost pKa je 3,9. pH vrednost se posledično zniža in oslabi membrano. Zniža se aktivnost celičnih encimov, ki so občutljivi na spremembo vrednosti pH. Celica večino razpoložljive energije porabi za deacidifikacijo citoplazemske membrane in zato je njena rast upočasnjena (Charlier in sod., 2009).

Podatki o protimikrobnem delovanju vodikovega peroksida in o MKB, ki ga proizvajajo v živilih, so precej skopi. Charlier in sod., (2009) navajajo, da lahko nekateri sevi laktobacilov s tvorbo vodikovega peroksida v koncentraciji 0,18 mmol/l inhibirajo rast bakterije *Staph. aureus* in tako delujejo bakteriostatično. Bakteriocidno pa delujejo na *Staph. aureus* takrat, ko proizvedejo od 0,6 mmol/l do 1,0 mmol/l vodikovega peroksida.

Čeprav so bakteriocini zelo zanimiva skupina protimikrobnih snovi MKB, pa za bakterijski vrsti *Lb. delbrueckii* in *Str. thermophilus* velja, da jih le redko proizvajata (Hebert in sod., 2000; Mathot in sod., 2003).

Miteva in sod. (1998) so opisali bakteriocin, ki ga proizvaja sev 1043 vrste *Lb. delbrueckii*, podvrste pa z izbranimi metodami niso mogli določiti. Izolirani bakteriocin je deloval protimikrobno na bakterije, ki povzročajo zastrupitve s hrano. To so *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica* in *Y. pseudotuberculosis*. Znotraj podvrste *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* pa literatura navaja bakteriocine laktobacilin

EG4 (Giraffa in sod., 1989) ter lakticina A in B (Toba in sod., 1991). Hyun - Jin in sod. (2004) pa so v svoji raziskavi ugotovili, da bakteriocin, ki ga proizvaja bakterija *Lb. bulgaricus*, uspešno zavira seve iz rodov *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Acetobacter*, *Pseudomonas*, ter celo seve vrst *Staph. aureus* in *Strep. agalactiae*, ki so običajni povzročitelji mastitisa. Zanimalo jih je namreč, če so MKB sposobne tvoriti bakteriocin(e), ki bi pri zdravljenju mastitisa lahko zamenjali antibiotike.

Tudi bakteriocinov vrste *Str. thermophilus* je do danes opisanih le nekaj. Mednje spadajo termofilin T (Aktypis in sod., 1998), bakteriocin seva *Str. thermophilus* 580 (Mathot in sod., 2003), termofilin 110 (Gilbreth in Somkuti, 2005), bakteriocin seva *Str. thermophilus* 81 (Ivanova in sod., 1998) in termofilin 13 (Marciset in sod., 1997). Zanimivo je, da imajo omenjeni bakteriocini širok spekter protimikrobnega delovanja in poleg sorodnih bakterijskih vrst, zavirajo tudi seve vrst *Pediococcus acidilacti*, *Clostridium tyrobutyricum*, *Cl. sporogenes*, *Cl. botulinum*, *Bacillus cereus* in *Listeria monocytogenes*. Iz praktičnih razlogov moramo zato vedno preveriti medsebojno protimikrobno učinkovanje bakteriocinogenih in nebakteriocinogenih sevov, preden jih kot mešanico uporabimo v starterski kulturi. Kakršenkoli zaviralni učinek lahko močno spremeni potek fermentacije (Delorme, 2008).

2.5 PROBIOTIČNE LASTNOSTI BAKTERIJ *Streptococcus thermophilus* IN *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

Probiotiki so živi mikroorganizmi, ki jih dodamo živilom zato, da pri gostitelju ugodno učinkujejo na zdravje. Vendar se je izkazalo, da za izboljšanje prebavljivosti laktoze in za zniževanje krvnega tlaka niso potrebne žive celice. Zadostujejo celične komponente, encimski sistemi ali pa produkti fermentacije. Zato nekateri avtorji zagovarjajo koncept probiotično aktivnih substanc (Vinderola in Reinheimer, 2003).

Večina probiotičnih bakterij sodi v rodova *Lactobacillus* in *Bifidobacterium*, probiotične seve pa najdemo tudi znotraj rodov *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Propionibacterium* in kvasovk *Saccharomyces*. Upoštevajoč koncept probiotično aktivnih substanc pa vedno več avtorjev med probiotike prišteva tudi mlečnokislinski bakteriji *Str. thermophilus* in *Lb.*

delbrueckii subsp. *bulgaricus*. Preverjanje probiotičnih lastnosti teh dveh mlečnokislinskih bakterij je pomembno zato, ker sta bakteriji starterskih kultur pri proizvodnji jogurta. Zanimivo bi bilo namreč vedeti, ali imata poleg tega, da pretvorita mleko v jogurt, tudi pozitivni učinek na človekovo zdravje. Vinderola in Reinheimer (2003) sta ugotavljala probiotične lastnosti pri izbranih bakterijah tako, da sta v *in vitro* pogojih ugotavljala toleranco za želodčni sok, odpornost proti žolčnim solem, sposobnost dekonjugacije žolčnih soli, hidrofobnost in β -galaktozidazno aktivnost. Ugotovila sta, da *Str. thermophilus* in *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* preživita v želodčnem soku veliko slabše kot ostale probiotične bakterije tako pri vrednosti pH 2 kot tudi pri vrednosti pH 3. Obe bakteriji sta tudi mnogo bolj občutljivi za žolčne soli kot ostale probiotične bakterije. Rast bakterije *Str. thermophilus* inhibira že 0,5 % koncentracija prisotnih žolčnih soli, rast *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* pa 1 % koncentracija žolčnih soli. Bakteriji tudi nista sposobni dekonjugirati žolčnih soli. Natrijev glikodeoksiholat popolnoma zavre rast obeh bakterij, ostale žolčne soli (natrijev tauroholat, natrijev taurodeoksiholat in natrijev glikoholat) pa so nekoliko manj zaviralne, saj se pojavi šibka rast obeh bakterij. Postavila se je celo hipoteza, da naj bi bila občutljivost za žolčne soli tudi prednost. Ker je encim β -galaktozidaza intracelularni encim, se mora za uspešno hidrolizo laktoze v črevesju iz celic sprostiti. Tako celice bakterij, ki so občutljive za žolčne soli, lizirajo in sprostijo encim v črevesje, kjer nato poteče hidroliza laktoze. Hidrofobnost so simulirali z merjenjem sposobnosti vezave bakterij na ogljikovodike, saj se nanje vežejo enako kot na epiteljske celice gostitelja. Obe bakteriji se slabše vežeta na ogljikovodike kot večina probiotičnih bakterij, pa vendarle bolje kot *Lb. casei* in *Lb. rhamnosus*. β -galaktozidazne aktivnosti niso zaznali pri laktokokih, *Str. thermophilus* je pokazal le šibko β -galaktozidazno aktivnost. Tudi sevi probiotičnih bakterij *Lb. casei* in *Lb. rhamnosus* niso pokazali β -galaktozidazne aktivnosti ali pa je bila zelo nizka. Pri sevih *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* so izmerili od 0 do 2053 Millerjevih enot β -galaktozidazne aktivnosti, pri bifidobakterijah od 147 do 860 Millerjevih enot in za seve *Lb. acidophilus* od 675 do 1301 Millerjevih enot (Vinderola in Reinheimer, 2003).

Ker definicija probiotikov poudarja žive mikroorganizme, običajnim mlečnokislinskim starterskim kulturam, zaradi slabe preživelost pri prehodu skozi prebavni trakt, nikoli ni bil priznan status probiotičnih bakterij. Danes naj bi veljalo, da za nekatere probiotične učinke

niso ključne žive celice, ampak lahko k pozitivnim učinkom za zdravje prispevajo tudi mrtve celice ali deli celic, encimi s svojim delovanjem ali produkti fermentacije. Zaradi sposobnosti tvorbe raznolikih snovi, na primer encimov kot je β -galaktozidaza, ki pozitivno vplivajo na izboljšano prebavo hranil v črevesju in sodelujejo pri uravnavanju imunskega sistema, sta se na seznamu probiotičnih bakterij znašla tudi *Str. thermophilus* in *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Vinderola in Reinheimer, 2003).

2.6 β - GALAKTOZIDAZNA AKTIVNOST

β -galaktozidaza (β -gal) je encim, ki ga proizvajata obe bakteriji, pomembni pri izdelavi klasičnega jogurta. Tako sta bakteriji *Str. thermophilus* in *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* med glavnimi viri laktaz za komercialne raziskave (Tamime in Robinson, 1999).

β -gal (β -D-galaktozid galaktohidrolaza), katere trivialno ime je laktaza, katalizira hidrolizo laktoze v monosaharida glukozo in galaktozo. Ta reakcija ima mnogo prednosti, ki so zanimive tako s stališča živilske industrije kot prehrane. Nastali produkti hidrolize so slajši, bolj topni, kar zmanjšuje možnost kristalizacije v mlečnih izdelkih, hitreje fermentirajo in se direktno absorbirajo iz črevesja (Mahoney, 1985).

β -gal, ki jo izloča *Str. thermophilus*, je optimalno aktivna pri nevtralni vrednosti pH in temperaturi 55 °C, bakterijski encim je toplotno bolj stabilen kot encim dobljen iz kvasovk, Mg^{2+} ion stimulira aktivnost encima, medtem ko ga EDTA inhibira, aktivnost pa poveča tudi prisotnost žolča (0,15 ml/100 ml). Za β -gal, ki jo izloča bakterija *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* pa je značilno, da prisotnost Mg^{2+} zelo stimulira njeno aktivnost in da je optimalno območje delovanja med pH 6,5 in 7, čeprav je encim stabilen tudi pri vrednosti pH 5,8. Encim β -gal, dobljen iz *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, je sestavljen iz dveh, enako velikih podenot, molekulske mase 235 kDa (Tamime in Robinson, 1999).

Reakcija hidrolize laktoze z β -gal poteka v treh stopnjah. Pri tem nastanejo naslednji kompleksi (Mahoney, 2002):

- encim + laktoza \rightarrow encim - laktozni kompleks
- encim - laktozni kompleks \rightarrow galaktozil - encimski kompleks + glukoza
- galaktozil - encim + H₂O \rightarrow galaktoza + encim

ali

- galaktozil - encim + sladkorna komponenta \rightarrow oligosaharid + encim

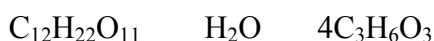
Iz sheme je razvidno, da encim prenese molekulo galaktoze na akceptorje, ki vsebujejo hidroksilno skupino. V primeru, da je akceptor voda, nastane prosta molekula galaktoze, v primeru, da je akceptor kateri od sladkorjev, pa so produkt hidrolize di-, tri- ali kateri višji saharidi. Vse pa s skupnim imenom imenujemo oligosaharidi.

Hidrolizo laktoze lahko izvedemo tudi s kemijskimi katalizatorji, pri čemer se v reakciji sproščajo komponente, ki negativno vplivajo na okus in barvo, njihovo odstranjevanje pa močno podraži postopek. Pri encimski hidrolizi teh težav ni, edina pomanjkljivost encimske hidrolize je lahko nastanek različnih oligosaharidov. Vendar pa so raziskave zadnjih let pokazale, da naj bi imeli nekateri galakto - oligosaharidi koristne učinke na prebavni trakt, saj vzpodbujajo rast bifidobakterij (Mahoney, 2002).

2.7 TVORBA MLEČNE KISLINE

Pri razgradnji laktoze z bakterijami *Str. thermophilus* in *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* nastaja kot glavni produkt mlečna kislina. Proces razgradnje poteka postopno po različnih biokemijskih reakcijah, vendar ga lahko poenostavljeno predstavimo z naslednjo reakcijo (Tamime in Robinson, 1999):

laktoza + voda \rightarrow mlečna kislina



Mlečna kislina ima več pomembnih vlog v proizvodnji jogurta:

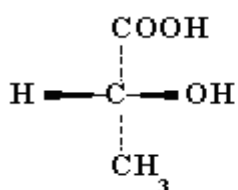
- povzroča kislinsko koagulacijo.

Mlečna kislina destabilizira kazeinske micelle s postopnim pretvarjanjem koloidnega Ca/P kompleksa (v kazeinski miceli) v topni kalcijev fosfat. Tako micela počasi izgublja kalcij in, ko je puferna kapaciteta presežena, pride do združevanja micel. Koagulacija kazeina poteče pri vrednosti pH 4,6 - 4,7. Pri tem se tvori topni kalcijev laktat, iz koloidne raztopine pa nastane stuktura gela. Reakcija destabilizacije je sledeča (Tamime in Robinson, 1999):

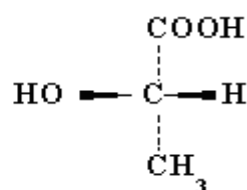


- vpliva na značilen okus in aromo jogurta.

Ker imajo mlečnokislinske bakterije encim laktat dehidrogenazo, ki se nahaja v celični citoplazmi, lahko iz piruvata proizvajajo laktat. Pri tem nastanejo različne oblike mlečne kisline, ki se razlikujejo v konfiguraciji na drugem ogljikovem atomu. *Str. thermophilus* tvori večinoma L(+) mlečno kislino, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* pa D(-) mlečno kislino. V jogurtu je običajno 45-60 % L(+) mlečne kisline in 40-55 % D(-) mlečne kisline (Tamime in Robinson, 1999).



D(-) mlečna kislina



L(+) mlečna kislina

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Bakterijski sevi

3.1.1.1 Testne bakterije

V preglednici 1 so prikazani pogoji kultivacije testnih sevov, osamljenih iz tradicionalnih bolgarskih jogurtov in seva K7, ki smo jih uporabili v poskusu. Vse seve razen seva K7 smo inkubirali v aerobnih pogojih. Sev K7 smo inkubirali v anaerobnih pogojih.

Preglednica 1: Testni sevi in pogoji kultivacije.

Testne bakterije	Oznaka seva	Gojišče	T inkubacije (°C)
<u>Laktobacili:</u>			
LDSB SELUR 1 (IM 374)	L1	MRS	42
LDSB SELUR 2 (IM 379)	L2	MRS	42
LDSB SELUR 3 (IM 380)	L3	MRS	42
LDSB SELUR 4 (IM 377)	L4	MRS	42
LDSB SELUR 5 (IM 375)	L5	MRS	42
LDSB SELUR 6 (IM 382)	L6	MRS	42
LDSB Biofank (IM 376)	Biofank	MRS	42
<i>Lb. gasseri</i> K7 (IM105)	K7	MRS, M17	37
<u>Streptokoki:</u>			
ST SELUR 4 (IM 377)	S4	M17	37
ST SELUR 7 (IM 378)	S7	M17	37

Legenda: IM – mikrobna zbirka Katedre za mlekarstvo, Domžale, Slovenija

LDSB: *Lb. delbruecii* subsp. *bulgaricus*

ST: *Str. thermophilus*

3.1.1.2 Indikatorske bakterije

Izbrane indikatorske bakterije in pogoji kultivacije so prikazani v preglednici 2.

Preglednica 2: Nabor izbranih indikatorskih bakterij in pogoji kultivacije.

Indikatorske bakterije	Gojišče	T inkubacije (°C)	Odnos do kisika
<i>Cl. perfringens</i> 1b 1106 IM 73	RCM	37	anaeroben
<i>Cl. tyrobutyricum</i> DSM 2637	RCM	37	anaeroben
<i>Lb. sakei</i> NCDO 2714	MRS	30	aeroben
<i>Lb. delbrueckii</i> (LDSB) LMG 6412 ¹	MRS	42	aeroben
<i>Lb. johnsonii</i> Lj. 1, NCC 533	MRS	42	aeroben
<i>Lb. bulgaricus</i> (LDSB) LMG 6901 ¹	MRS	42	aeroben
<i>Lb. paracasei</i> DSM 5622	MRS	37	aeroben
<i>Lb. plantarum</i> IM 212	MRS	37	aeroben
<i>Lb. fermentum</i> IM 351	MRS	37	aeroben
<i>Lb. delbrueckii</i> (LDSL) IM 350	MRS	42	aeroben
<i>Lb. helveticus</i> IM 30	MRS	42	aeroben
<i>Lb. rhamnosus</i> IM 239	MRS	37	aeroben
<i>B. cereus</i> IM 250	BHI	30	aeroben
<i>E. coli</i> IM 120	BHI	37	aeroben
<i>Ec. faecalis</i> LMG 7937	M17	37	aeroben
<i>Ec. faecalis</i> CCM 4647	M17	37	aeroben
<i>Ec. durans</i> CCM 5612	M17	37	aeroben
<i>Ec. faecium</i> IM 273	M17	37	aeroben
<i>L. monocytogenes</i> IM 372	BHI	37	aeroben
<i>L. innocua</i> IM 373	BHI	37	aeroben
<i>Staph. aureus</i> IM 388	BHI	37	aeroben
<i>Staph. aureus</i> IM 389	BHI	37	aeroben
<i>Staph. aureus</i> IM 390	BHI	37	aeroben

Legenda: LMG – LMG Culture Collection, Universiteit Gent, Gent, Belgium; IM – mikrobná zbirka Katedre za mlekarstvo, Domžale, Slovenija; DSM – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Germany; NCC – Nestlé Culture Collection, Lausanne, Switzerland

3.1.1.3 Bakterije, uporabljene kot kontrole v reakcijah PCR

V preglednici 3 so prikazani pogoji kultivacije sevov, katerih DNA smo uporabili kot pozitivne kontrole v analizah reakcije PCR:

Preglednica 3: Nabor izbranih sevov, ki smo jih uporabili kot pozitivne kontrole v reakcijah PCR in pogoji kultivacije.

Bakterija	Gojišče	T inkubacije (°C)	Kontrola za:
<i>Str. thermophilus</i> S20 (IM 191)	M 17	37	vrsto: <i>Str. thermophilus</i>
<i>Lb. delbrueckii</i> . subsp. <i>delbrueckii</i> LMG 6412 ^T	MRS	42	podvrsto: <i>delbrueckii</i>
<i>Lb. delbrueckii</i> . subsp. <i>bulgaricus</i> LMG 6901 ^T	MRS	42	podvrsto: <i>bulgaricus</i>
<i>Lb. delbrueckii</i> . subsp. <i>lactis</i> LMG 6401	MRS	42	podvrsto: <i>lactis</i>

3.1.2 Gojišča

3.1.2.1 Tekoča gojišča

MRS: tekoče gojišče MRS smo pripravili po navodilu proizvajalca (Merck, Darmstadt, Nemčija). Avtoklavirali smo ga 15 minut pri 121 °C.

M17: tekoče gojišče M17 smo pripravili po navodilu proizvajalca (Merck, Darmstadt, Nemčija). Avtoklavirali smo ga 15 minut pri 121 °C.

BHI (Brain heart broth): tekoče gojišče BHI smo pripravili po navodilu proizvajalca (Merck, Darmstadt, Nemčija). Avtoklavirali smo ga 15 minut pri 121 °C.

RCM (Reinforced Clostridium medium): tekoče gojišče RCM smo pripravili po navodilu proizvajalca (Merck, Darmstadt, Nemčija). Avtoklavirali smo ga 15 minut pri 121 °C.

Modificirani Elliker-lac in MRS-lac gojišči: tekoči gojišči smo pripravili po priporočilih avtorjev Vinderola in Reinheimer (2003) tako, da smo zamešali vse sestavine za gojišče MRS oz. Elliker, razen sladkorjev. Gojišči smo avtoklavirali 15 minut pri 121 °C. Pripravili smo si tudi 10 % (w/v) raztopino laktoze, pri čemer smo v 100 ml deionizirane

vode raztopili 10 g laktoze. Raztopino smo sterilizirali s filtracijo preko filtra s porami premera 0,45 µm (Minisart, Sartorius, Nemčija). Pred uporabo smo založno raztopino laktoze sterilno dodali v pripravljene avtoklavirane gojišče (končna koncentracija 1 %).

RPM (rekonstituirano posneto mleko): po navodilih proizvajalca (Merck, Darmstadt, Nemčija) smo pripravili 10 % (w/v) RPM ter ga avtoklavirali 15 min pri 110 °C.

3.1.2.2 Trdna gojišča

MRS: trdno gojišče MRS smo pripravili po navodilu proizvajalca (Merck, Darmstadt, Nemčija). Avtoklavirali smo ga 15 minut pri 121 °C.

M17: trdno gojišče M17 smo pripravili po navodilu proizvajalca (Merck, Darmstadt, Nemčija). Avtoklavirali smo ga 15 minut pri 121 °C.

3.1.2.3 Poltrdna gojišča

MRS: poltrdno gojišče MRS smo pripravili tako, da smo v 1000 ml tekočega gojišča MRS (Merck, Darmstadt, Nemčija) dodali 7,5 g agar-agarja (Merck, Darmstadt, Nemčija) in ga avtoklavirali 15 minut pri 121 °C.

M17: poltrdno gojišče M17 smo pripravili tako, da smo v 1000 ml tekočega gojišča M17 (Merck, Darmstadt, Nemčija) dodali 7,5 g agar-agarja (Merck, Darmstadt, Nemčija) in ga avtoklavirali 15 minut pri 121 °C.

BHI (Brain heart broth): poltrdno gojišče BHI smo pripravili tako, da smo v 1000 ml tekočega gojišča BHI (Merck, Darmstadt, Nemčija) dodali 7,5 g agar-agarja (Merck, Darmstadt, Nemčija) in ga avtoklavirali 15 minut pri 121 °C.

RCM (Reinforced Clostridium medium): poltrdno gojišče RCM smo pripravili tako, da smo v 1000 ml tekočega gojišča RCM (Merck, Darmstadt, Nemčija) dodali 7,5 g agar-agarja (Merck, Darmstadt, Nemčija) in ga avtoklavirali 15 minut pri 121 °C.

3.1.3 Reagenti za barvanje po Gramu

Reagenti za barvanje po Gramu Color Gram 2 (bioMerieux sa, Lyon, Francija):

- barvilo kristal vijolično,
- barvilo lugol,
- mešanica etanola in acetona (1:1),
- barvilo safranin.

3.1.4 Reagenti za pripravo bakterijske DNA

- Komplet za izolacijo genomske DNA: Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, ZDA),
- Izopropanol,
- 70 % etanol,
- 50 mM EDTA, pH = 8,0; (Sigma, Nemčija),
- Založna raztopina encima lizocima 10 mg/ml (Sigma, Nemčija).

3.1.5 Reagenti za verižno reakcijo s polimerazo (PCR)

- Mešanica dNTP-jev, vsak v koncentraciji 10 mM (Fermentas, Nemčija),
- Komplet za analizo PCR: GoTaq[®] DNA Polymerase (Promega, Madison, ZDA),
- Začetni oligonukleotidi koncentracije 100 µM: DelI/DelII, LB1/LLB1, ThI/ThII (Invitrogen),
- Deionizirana, mikrofiltrirana in sterilizirana voda (mQ).

3.1.6 Reagenti za analizo pomnožkov v agaroznem gelu

- 0,5x pufer TAE, pH = 0,8 (Sambrook in Russell, 2001),
- Agaroz (SeaKem LE),
- DNA barvilo: SYBR[®] Safe (Invitrogen),

- Velikostna lestvica DNA: 100 bp DNA ladder in 1 Kb DNA ladder (Fermentas, Nemčija).

3.1.7 Reagenti za ugotavljanje aktivnosti β -gal

- Fosfatni pufer: 60 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 40 mM NaH_2PO_4 , pH=7,
- Modificirani tekoči gojišči MRS-lac in Elliker-lac,
- Založna raztopina laktoze 10 % (w/v),
- Mešanica toluen/acetone 1:9 (v/v),
- 1 M Na_2CO_3 , ki smo ga avtoklavirali 15 minut pri 121 °C,
- OPNG (o-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid): 4 mg/ml (Sigma, Nemčija).

3.1.8 Reagenti za določanje količine in vrste nastale mlečne kisline

- Encimski komplet za določanje D in L mlečne kisline: D-Lactic acid/L-Lactic acid UV – method for the determination of D- and L-lactic acid in foodstuffs and other materials (R-BIOPHARM AG, Darmstadt, Nemčija),
- Tekoči gojišči MRS in M17,
- Rekonstituirano posneto mleko (10 %, w/v).

3.2 METODE

3.2.1 Morfološka analiza z barvanjem po Gramu

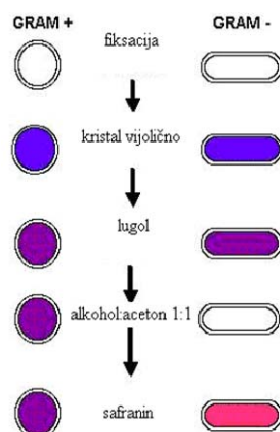
Mikromorfološke lastnosti (oblika, velikost, formacija in obarvanje po Gramu) izbranih mlečnokislinskih bakterij in indikatorskih organizmov smo opazovali pri 1000-kratni povečavi.

Po Gramu pozitivne bakterije imajo relativno enostavno sestavljeno celično steno, ki jo sestavljajo citoplazmatska membrana in do 25 plasti peptidoglikana. Po Gramu negativne bakterije pa imajo večplastno kompleksno celično steno, ki jo sestavljajo citoplazmatska membrana, periplazma s tanko plastjo peptidoglikana in plast lipopolisaharidov in proteinov. Pri po Gramu pozitivnih bakterijah je celična stena tanka in alkohol povzroči dehidracijo. Pore peptidoglikana se zmanjšajo in barvni kompleks kristal violet – lugol ostane v celični steni. Pri po Gramu negativnih bakterijah gre alkohol skozi peptidno plast in tanko plast peptidoglikana in raztopi barvni kompleks kristal violet - lugol (Jeršek, 2004).

Potek fiksacije in barvanje po Gramu:

- Ob gorilniku smo na objektno stekelce s cepilno zanko nanesti kapljico 18-urne kulture iz dobro premešanega tekočega gojišča.
- Razmaz smo posušili na zraku ob gorilniku.
- Preparat smo še fiksirali tako, da smo objektno stekelce trikrat hitro potegnili skozi plamen na gorilniku.
- Barvanje po Gramu smo izvedli po navodilih proizvajalca bioMerieux sa, (Lyon, Francija):
 - Na fiksiran preparat smo nanesti barvilo kristal vijolično, ki smo ga po 1 minuti pazljivo sprali pod tekočo vodo.
 - Na preparat smo nato nanesti lugol, ki smo ga prav tako sprali po 1 minuti.
 - Preparat smo razbarvali z mešanico alkohola in acetona (1:1).
 - Preparat smo sprali pod tekočo vodo.

- Na preparat smo nanесли še safranin, ki smo ga po 1 minuti sprali pod tekočo vodo.
- Preparat smo pazljivo osušili s papirnato brisačko.
- Na preparat smo pred mikroskopiranjem nanесли kapljico imerzijskega olja.



Slika 1: Shematski prikaz barvanja po Gramu (Loyola University Chicago, 2009)

3.2.2 Priprava DNA za izvedbo PCR

- Preiskovane in kontrolne seve smo precepili v ustrezna tekoča gojišča. Po inkubaciji preko noči smo 1 ml tako pripravljenih kultur odpipetirali v 1,5 ml mikroeprovete.
- Kulture smo centrifugirali pri 16 000 g 2 minuti. Previdno smo odlili supernatant.
- Celice, ki so se zbrale na dnu mikroeprovete, smo resuspendirali v 480 μ l 50 mM EDTA. Dodali smo 120 μ l založne raztopine encima lizocima, s katero smo oslabili celično steno in omogočili njen boljši razkroj. Mešanico smo nežno premešali s pomočjo pipete.
- To mešanico smo inkubirali 30 min pri 37 °C.
- Sledilo je centrifugiranje pri 16 000 g 2 minuti. Previdno smo odlili supernatant.
- Sedimentu smo dodali 600 μ l raztopine za liziranje celic (Nuclei Lysis Solution). Previdno smo premešali s pomočjo pipete.
- Inkubirali smo 5 min pri 80 °C, da je potekla liza celic.
- Vsebinsko smo ohladili na sobno temperaturo.

- K celičnemu lizatu smo dodali 3 µl RN-aze in mikroepruveto 5x obrnili, da se je vsebina premešala.
- Po 15 min inkubaciji pri 37 °C smo mešanico ohladili na sobno temperaturo.
- Dodali smo 200 µl raztopine za precipitacijo proteinov in z uporabo vrtičnika mešanico mešali 20 s.
- Sledila je 5-minutna inkubacija na ledu.
- Precipitirane proteine smo odstranili s centrifugiranjem 3 minute pri 16 000 g.
- Supernatant, ki vsebuje DNA, smo prelili v drugo mikroepruveto, v kateri je bilo 600 µl izopropanola, sobne temperature, za precipitacijo DNA. Mikroepruveto smo nekajkrat previdno obrnili in tako premešali vsebino.
- Precipitirano DNA smo zbrali na dnu mikroepruvete s centrifugiranjem 2 minuti pri 16 000 g.
- Previdno smo odlili supernatant in zbrano DNA sprali z dodatkom 600 µl 70 % etanola. Mikroepruveto smo previdno obračali in tako premešali vsebino.
- Vsebino smo centrifugirali 2 minuti pri 16 000 g. in supernatant previdno odlili.
- DNA na dnu mikroepruvete smo previdno osušili v inkubatorju pri 45 °C, da je izhlapel etanol.
- Sedimentu smo dodali 100 µl raztopine za rehidracijo DNA (DNA Rehydration Solution).
- Rehidracija je potekla preko noči pri 4 °C.
- Tako pripravljen vzorec DNA je bil pripravljen za PCR. Do uporabe smo DNA hranili pri -20°C.

3.2.3 Priprava reakcijske mešanice za PCR

Reakcijsko mešanico za PCR smo pripravili v posebnem prostoru. Pri delu smo uporabljali rokavice za enkratno uporabo. Po končanem delu smo prostor razkužili in osvetlili z UV svetlobo za dve uri. Vse kemikalije, ki smo jih uporabili za pripravo mešanice PCR, smo imeli ves čas na ledu. Glede na število vzorcev smo si izračunali volumno posameznih sestavin, potrebnih za mešanico (Jeršek, 2003).

Mešanico za en vzorec PCR, v skupnem volumnu 20 μ l, sestavlja:

- 4 μ l 5x zeleni GoTag[®] pufer z dodanim MgCl₂ (7,5 mM),
- 0,2 μ l dNTP,
- 0,2 μ l začetni oligonukleotid 1,
- 0,2 μ l začetni oligonukleotid 2,
- 0,1 μ l GoTaq[®] DNA polimeraza,
- 14,8 μ l H₂O.

Tej mešanici smo dodali 0,5 μ l predhodno pripravljene DNA.

Za potrjevanje vrste *Lb. delbrueckii* smo uporabili začetna oligonukleotida Del I in Del II (Tilsala – Timisjärvi in Alatossava, 1997). Za določanje podvrst *Lb. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* smo uporabili začetna oligonukleotida LB1 in LLB1. Velikost specifičnih pomnožkov za *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* znaša 1065 bp, za *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* pa 1600 bp. Če uporabimo začetna oligonukleotida LB1 in LLB1 za identifikacijo *Lb. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* pa je rezultat negativen – ni pomnožka (Torriani in sod., 1999).

Za določanje vrste *Str. thermophilus* smo uporabili začetna oligonukleotida Th I in Th II (Tilsala – Timisjärvi in Alatossava, 1997).

Preglednica 4: Uporabljeni začetni oligonukleotidi pri reakciji PCR in velikost specifičnih pomnožkov.

Določanje vrste in podvrste	Začetni oligonukleotidi	Velikost specifičnih pomnožkov
vrsta <i>Lb. delbrueckii</i>	Del I, Del II	100 bp
podvrsta <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	LB1, LLB1	ni pomnožka
podvrsta <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>		1065 bp
podvrsta <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>		1600 bp
vrsta <i>Str. thermophilus</i>	Th I, Th II	259 bp

3.2.4 Potek reakcije PCR

Verižna reakcija s polimerazo sodi med molekularne metode, ki se uporabljajo za določanje in ugotavljanje mikroorganizmov v živilih in tudi v različnih drugih vzorcih. Princip same reakcije PCR je *in vitro* pomnožitev dela tarčne DNA z encimom DNA-

polimerazo v cikličnem termostatu. Termostat zagotavlja zvezno spreminjanje temperature v ciklu, ki zajema tri faze. V prvi fazi poteče denaturacija oziroma razdvajanje dvoverižne DNA. V drugi fazi poteče prileganje oligonukleotidnih začetnikov, v tretji fazi pa poteče podaljševanje. V vsakem ciklu se število tarčnih kopij podvoji. Izbira oligonukleotidnih začetnikov je odvisna od vrste PCR in vrste preiskovanih mikroorganizmov. Zaporedja baz adenin, timin, gvanin in citozin v oligonukleotidnih začetnikih so komplementarna delu tarčne DNA. Pomnožimo del tarčne DNA med izbranimi oligonukleotidnima začetnikoma. Število pomnožkov se podvoji v vsakem ciklu. Pomnožke PCR najenostavneje ugotovimo z agarozno gelsko elektroforezo. Pri tem primerjamo velikost pomnožkov z velikostno lestvico z znanimi velikostmi fragmentov (Jeršek, 2003).

Mikroeprovete z 20 µl reakcijske mešanice smo prenesli v aparaturo za PCR (Eppendorf Mastercycler gradient). V aparaturo smo vnesli protokole kot so prikazani v preglednicah 5, 6 in 7.

Preglednica 5: Potek reakcije PCR za določanje vrste *Lb. delbrueckii* (Tilsala – Timisjärvi in Alatossava, 1997).

Št. ciklov	Faza	Temperatura	Čas
1	začetna denaturacija DNA	92 °C	2 min
30	denaturacija DNA	95 °C	30 s
	prileganje začetnih oligonukleotidov	62 °C	30 s
	podaljševanje verige DNA	72 °C	30 s
1	zaključno podaljševanje verige DNA	72 °C	5 min
	ohladitev	4 °C	∞

Preglednica 6: Potek reakcije PCR za določanje podvrst *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in *Lb. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* (Torriani in sod., 1999).

Št. ciklov	Faza	Temperatura	Čas
1	začetna denaturacija DNA	94 °C	2 min
35	denaturacija DNA	94 °C	45 s
	prileganje začetnih oligonukleotidov	58 °C	30 s
	podaljševanje verige DNA	72 °C	30 s
1	zaključno podaljševanje verige DNA	72 °C	10 min
	ohladitev	4 °C	∞

Preglednica 7: Potek reakcije PCR za določanje vrste *Str. thermophilus* (Tilsala – Timisjärvi in Alatossava, 1997).

Št. ciklov	Faza	Temperatura	Čas
1	začetna denaturacija DNA	92 °C	2 min
30	denaturacija DNA	95 °C	30 s
	prileganje začetnih oligonukleotidov	55 °C	30 s
	podaljševanje verige DNA	72 °C	30 s
1	zaključno podaljševanje verige DNA	72 °C	5 min
	ohladitev	4 °C	∞

3.2.5 Gelska elektroforeza

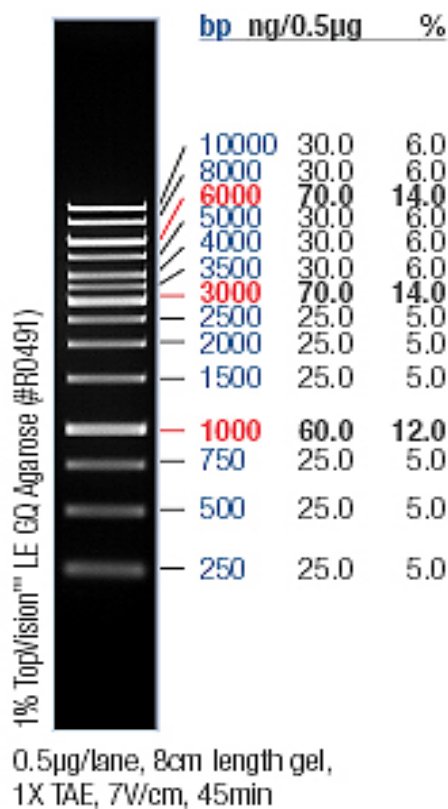
Vse pomnožke, ki smo jih dobili v reakcijah PCR z različnimi začetnimi oligonukleotidi in pri različnih pogojih, smo analizirali s pomočjo gelske elektroforeze. V analizi smo vedno uporabili po 10 µl pomnožkov PCR.

Agarozni gel (1 %; w/v) smo pripravili iz agaroze in 0,5x pufra TAE. V mikrovalovni pečici smo raztopino segrevali do vrenja. Pri tem je nastala bistra raztopina. Nato smo gel ohladili na 60 °C. V model za gel smo dali elektroforezni glavnik, potem pa smo v model vlili gel. Počakali smo, da se je gel strdil in polimeriziral. Nato smo previdno odstranili glavnik, gel pa prenesli v elektroforezno banjico s pufrom TAE 0,5x.

Ko smo izvajali elektroforezo, kjer smo analizirali pomnožke PCR za vrsto *Str. thermophilus*, smo v prvi prostorček nanesli velikostno lestvico DNA – 100 bp, v drugi in tretji prostor smo nanesli naša vzorca, v četrti prostor smo nanesli kontrolo in v peti prostor ponovno velikostno lestvico DNA – 100 bp. Za kontrolo smo uporabili sev *Str. thermophilus* S20.

Na elektroforeznem gelu, kjer smo analizirali pomnožke PCR za določanje vrste *Lb. delbrueckii*, smo v prvi prostor nanesli velikostno lestvico DNA – 100 bp, potem smo po vrsti nanesli naših 7 vzorcev, sledile so tri kontrole in še enkrat velikostna lestvica DNA – 100 bp. Na istem elektroforeznem gelu smo analizirali še pomnožke PCR za podvrste *lactis*, *bulgaricus* in *delbrueckii*, zato smo ponovno nanesli naših 7 vzorcev, sledile so tri

kontrolne in še velikostna lestvica DNA – 1 Kb. Kot kontrole smo uporabili seve *Lb. delbrueckii* subsp *lactis* LMG 6401, *Lb. delbrueckii* subsp *bulgaricus* LMG 6901^T in *Lb. delbrueckii* subsp *delbrueckii* LMG 6412^T.



Slika 2: Primer velikostne lestvice DNA 1Kb.

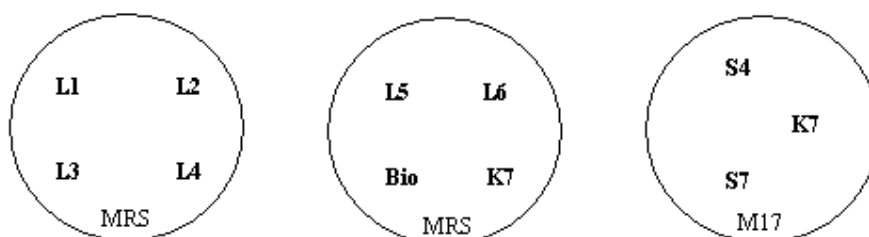
Elektroforeza je za oba gela potekala pri 100 V 1 h. Po končani elektroforezi smo gela pobarvali z DNA barvilom SYBR[®] Safe. Po 30 minutah barvanja smo gel pregledali pod UV svetlobo. Gel smo tudi računalniško dokumentirali.

3.2.6 Ugotavljanje protimikrobnega potenciala testnih laktobacilov in streptokokov z metodo lise na trdnem gojišču

3.2.6.1 Medsebojno protimikrobno delovanje testnih sevov

Najprej smo ugotavljali medsebojno protimikrobno delovanje testnih sevov. Predhodno pripravljene trdni gojišči MRS in M17 smo sterilno nalili v petrijevke, jih označili, ohladili

in posušili v laminarju. Testne kulture smo dan pred izvedbo poskusa precepili v tekoča gojišča in jih preko noči inkubirali na primernih temperaturah. Na vsaki plošči smo si označili točke, kamor smo nato nanесли po 5 μ l prekonočnih kultur testnih sevov in seva *Lactobacillus gasser* K7. K7 smo uporabili kot pozitivno kontrolo, saj je bilo v preteklih študijah dokazano, da ta mikroorganizem tvori bakteriocine (Bogovič Matijašič in Rogelj, 1999). Plošče smo pustili pri sobni temperaturi 2 uri, da se je nanos posušil ter jih nato inkubirali 24 ur pri ustrezni temperaturi (Preglednica 1). Po inkubaciji smo plošče prelili s poltrdnim gojiščem, cepljenim s testnimi sevi. Vsako gojišče smo prelili z vsakim testnim sevom: 4 ml ustreznega poltrdnega gojišča MRS ali M17 smo cepili s 50 μ l 18-urne kulture testne bakterije, gojišče s kulturo dobro premešali in ga previdno prelili po ploščah. Po 24-urni inkubaciji na primernih temperaturah smo odčitali rezultat. Opazovali smo, če je nastala cona inhibicije okoli lise testnega seva, kakšen rob je imela (zabrisan ali ostro izražen) ter kako je velika (izraženo v milimetrih, merjeno od roba lise testnega izolata do roba cone inhibicije). Celoten poskus smo izvedli v aseptičnih pogojih.



Slika 3: Označbe plošč pri ugotavljanju protimikrobnega potenciala.

3.2.6.2 Protimikrobno delovanje testnih sevov proti naboru indikatorskih bakterij

V nadaljevanju smo ugotavljali tudi protimikrobno delovanje testnih sevov proti naboru indikatorskih bakterij, med katerimi so bile sorodne bakterijske vrste, bakterije kvarljivke in potencialno patogene bakterije. Postopek ugotavljanja je bil enak kot v prvem delu poskusa, le da smo po tri plošče (Slika 3) prelili z izbranimi indikatorji. Plošče smo inkubirali 24 ur pri pogojih, ki ustrezajo indikatorjem (Preglednica 2).

3.2.7 Ugotavljanje β -galaktozidazne aktivnosti testnih sevov

Za ugotavljanje β -galaktozidazne aktivnosti smo uporabili prirejeno metodo po Millerju (Vinderola in Reinheimer, 2003). Metoda temelji na encimski razgradnji brezbarvnega sintetičnega substrata o-nitrofenil- β -D-galaktopiranozida (OPNG) do galaktoze in o-nitrofenola, ki je rumene barve. β -galaktozidazno aktivnost sevov ugotavljamo z merjenjem absorbance nastale rumene barve, pri 420 nm.

Preiskovane kulture smo precepili v ustrezna tekoča gojišča. Laktobacile smo preko noči inkubirali pri 42 °C in streptokoke pri 37 °C. Kulture smo centrifugirali 5 minut pri 12000 g pri 5 °C. Supernatant smo odlili in celice dvakrat sprali s fosfatnim pufrom. Sprane celice smo vcepili (1 %, v/v) v tekoči gojišči MRS-lac (gojišče za laktobacile) in Elliker-lac (gojišče za streptokoke), kamor smo dodali laktozo v koncentraciji 1 %. Sledila je inkubacija preko noči pri ustreznih temperaturah (Preglednica 1).

Potem smo ponovno izvedli dvakratno spiranje s fosfatnim pufrom. Uporabili smo enake pogoje pri centrifugiranju kot predhodni dan. Iz spranih celic smo s fosfatnim pufrom pripravili suspenzijo celic tako, da je bila vrednost njene absorbance (A_{560}), izmerjene pri 560 nm, približno 1. Celično suspenzijo (1 ml) smo permeabilizirali z dodatkom 50 μ l mešanice toluen/acetona in intenzivnim, 7-minutnim mešanjem s pomočjo vrtičnika, čemur je sledilo takojšnje ugotavljanje β -galaktozidazne aktivnosti. Zato smo v mikroeprovete odpipetirali 100 μ l permeabilizirane celične suspenzije, dodali 900 μ l fosfatnega pufrja in 200 μ l ONPG ter mešanice inkubirali v vodni kopeli s temperaturo 37 °C. Po 15 minutah smo reakcijo ustavili z dodatkom 0,5 ml 1M Na_2CO_3 . Vsakemu vzorcu smo izmerili absorbanco pri 420 nm in 560 nm (Vinderola in Reinheimer, 2003).

β -galaktozidazno aktivnost smo izračunali po formuli (Vinderola in Reinheimer, 2003):

$$ME = 1000 \times [(A_{420} - 1,75 \times A_{560}) / (t \times V \times A_{560})] \quad \dots(1)$$

A_{560} = optična gostota celične suspenzije, izmerjena pred reakcijo

$1,75 \times A_{560}$ = korekcija absorbance zaradi celičnega ozadja pri 420 nm, izmerjena po reakciji

A_{420} = skupna absorbanca rumenega o-nitrofenola in celičnega ozadja, izmerjena po reakciji

t = čas (min), ko je bil ONPG izpostavljen delovanju encima β -galaktozidaze (15 min)

V = volumen (ml) permeabiliziranih celic, uporabljenih v reakciji (0,1 ml)

3.2.8 Določanje količine in vrste nastale mlečne kisline

Za določanje količine in vrste nastale mlečne kisline smo uporabili komercialno pripravljen encimski komplet D-Lactic acid/L-Lactic acid UV – method for the determination of D- and L-lactic acid in foodstuffs and other materials (R-BIOPHARM AG, Darmstadt, Nemčija).

Nastalo mlečno kislino smo ugotavljali v rekonstituiranem posnetem mleku (RPM; 10 %) in tekočem gojišču, zato smo kulture L1, L2, L3, L4, L5, L6, Biofank nacepili v tekoče gojišče MRS, S4 in S7 pa v tekoče gojišče M17. Po 24 urah smo kulture precepili (1 % vcepek) v pripravljeno RPM in v ustrezno tekoče gojišče MRS ali M17. Po 24-urni inkubaciji na ustrezni temperaturi smo izvedli analizo.

Najprej smo si po navodilih proizvajalca pripravili vzorce.

Za ugotavljanje mlečne kisline v jogurtu/mleku (v našem primeru v RPM), smo 2 ml kulture iz RPM dodali 98 ml destilirane vode. Vzorce smo z uporabo vrtičnika dobro premešali in jih z uporabo filtrov s porami premera 0,45 μm (Minisart, Sartorius, Nemčija) prefiltrirali. 0,1 ml tako pripravljenega filtrata smo uporabili za nadaljnjo analizo.

Za ugotavljanje mlečne kisline v gojiščih (v našem primeru v tekočih gojiščih MRS oz. M17) smo vzorce najprej inkubirali v vodni kopeli (80 °C) 15 minut, da smo ustavili encimske reakcije. Sledilo je centrifugiranje, supernatant pa smo uporabili za nadaljnjo analizo. Vzorce supernatantov smo, glede na pričakovano količino nastale mlečne kisline, po navodilih proizvajalca tudi primerno razredčili: supernatante laktobacilov smo

razredčili 1000 krat, supernatante streptokokov pa 100 krat, saj slednji po pričakovanjih tvorijo manj mlečne kisline.

Potek analize:

Reagent:	Slepi vzorec:	Vzorec:
RAZTOPINA 1	1,0 ml	1,0 ml
RAZTOPINA 2	0,2 ml	0,2 ml
SUSPENZIJA 3	0,020 ml	0,020 ml
Predhodno pripravljen vzorec	/	0,1 ml
DESTILIRANA VODA	1,0 ml	1,0 ml

S pomočjo plastične paličice smo vzorce dobro premešali, ponovno premešali po 5 minutah in izmerili absorbanco (A1) pri 340 nm. Nato smo reakcijo sprožili z dodatkom:

RAZTOPINA 4	0,02 ml	0,02 ml
-------------	---------	---------

S pomočjo plastične paličice smo vzorce dobro premešali. Ko je reakcija potekla (po približno 30 minutah) smo vzorce ponovno premešali in tako pri slepem vzorcu kot pri vzorcih izmerili absorbanco (A2) pri 340 nm. Potem smo dodali:

RAZTOPINA 5	0,02 ml	0,02 ml
-------------	---------	---------

S pomočjo plastične paličice smo vzorce dobro premešali. Ko je reakcija potekla (po približno 30 minutah) smo vzorce ponovno premešali in tako pri slepem vzorcu kot pri vzorcih izmerili absorbanco (A3) pri 340 nm.

Tako smo izmerili absorbance A1, A2 in A3 za slepi vzorec in kulture nacepljene v RPM. Izmerili smo tudi absorbance A1, A2 in A3 za slepi vzorec in kulture nacepljene v tekoča gojišča.

Določili smo razliko absorbanc:

$$\bullet \Delta A_{D\text{-mlečna kislina}} = \Delta (A2-A1)_{\text{vzorec}} - \Delta (A2-A1)_{\text{slepi vzorec}} \quad \dots(2)$$

$$\bullet \Delta A_{L\text{-mlečna kislina}} = \Delta (A3-A2)_{\text{vzorec}} - \Delta (A3-A2)_{\text{slepi vzorec}} \quad \dots(3)$$

Formula za izračun koncentracije nastale mlečne kisline:

- $c = (V \times M) / (\epsilon \times d \times v \times 1000) \times \Delta A, [g/l]$... (4)

V – končni volumen [ml]

v – volumen vzorca [ml]

M – molska masa mlečne kisline [g/mol]

d – pot žarka [cm]

ϵ – ekstinkcijski koeficient NADH pri 340nm = 6,3, [l x mmol⁻¹ x cm⁻¹]

- $c_{D\text{-mlečna kislina}} = (2,240 \times 90,1) / (\epsilon \times 1,00 \times 0,100 \times 1000) \times \Delta A$... (5)

- $c_{D\text{-mlečna kislina}} = (2,018/\epsilon) \times \Delta A$... (6)

- $c_{L\text{-mlečna kislina}} = (2,260 \times 90,1) / (\epsilon \times 1,00 \times 0,100 \times 1000) \times \Delta A$... (7)

- $c_{L\text{-mlečna kislina}} = (2,036/\epsilon) \times \Delta A$... (8)

Ker smo vzorce razredčili, smo morali upoštevati razredčitveni faktor F:

- $F_{\text{laktobacili}} = 1000$

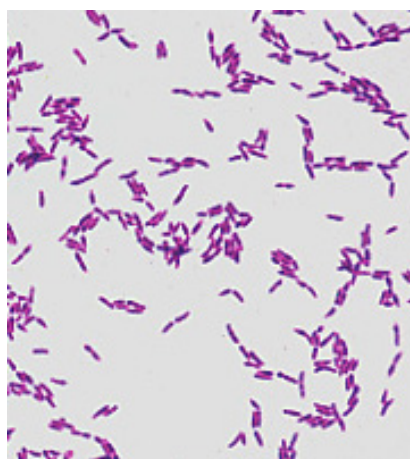
- $F_{\text{streptokoki}} = 100$

4 REZULTATI

4.1 MORFOLOŠKA ANALIZA MLEČNOKISLINSKIH BAKTERIJ IN INDIKATORSKIH ORGANIZMOV

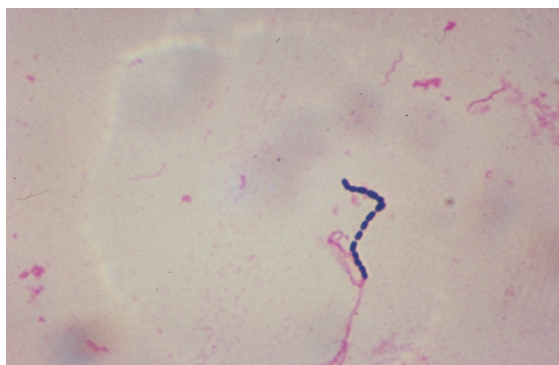
Po Gramu pobarvane preparate smo si ogledali pri 1000 kratni povečavi. Edini po Gramu negativen indikatorski organizem je *E. coli*. Vsi ostali preiskovani mikroorganizmi pa so po Gramu pozitivni bacili ali koki.

Bakterije rodu *Lactobacillus* so po Gramu pozitivne dolge ali kokoidne, negibljive in nesporogene paličice.



Slika 4: Mikroskopski preparat bakterij iz rodu *Lactobacillus* (Todar K., 2006)

Bakterije rodu *Streptococcus* so okrogli, po Gramu pozitivni, fakultativno do obvezno anaerobni koki. Pojavljajo se v parih, krajših ali daljših verižicah.



Slika 5: Mikroskopski preparat bakterij iz rodu *Streptococcus* (Simonson L. G., 2007)

Preglednica 8: Rezultati morfološke analize mikroorganizmov

Analizirani mikroorganizmi:	Morfološki opis:
L1	Po Gramu pozitivne tanke paličice, ki se pojavljajo posamezno pa tudi v krajših verižicah
L2	Po Gramu pozitivne tanke paličice, ki se pojavljajo posamezno pa tudi v krajših verižicah
L3	Po Gramu pozitivne tanke paličice, ki se pojavljajo posamezno pa tudi v krajših verižicah
L4	Po Gramu pozitivne tanke paličice, ki se pojavljajo posamezno pa tudi v krajših verižicah
L5	Po Gramu pozitivne tanke paličice, ki se pojavljajo posamezno pa tudi v krajših verižicah
L6	Po Gramu pozitivne tanke paličice, ki se pojavljajo posamezno pa tudi v krajših verižicah
Biofank	Po Gramu pozitivne paličice, ki se pojavljajo posamezno in v kratkih verižicah
S4	Po Gramu pozitivni koki, ki se pojavljajo v daljših verižicah
S7	Po Gramu pozitivni koki, ki se pojavljajo v daljših verižicah
<i>Cl. perfringens</i> 1b 1106	Po Gramu pozitivne paličice
<i>Cl. tyrobutyricum</i> DSM 2637	Po Gramu pozitivne paličice
<i>Lb. sakei</i> NCDO 2714	Po Gramu pozitivne paličice
<i>Lb. delbrueckii</i> (LDSB) IM 349	Po Gramu pozitivne paličice
<i>Lb. johnsonii</i> Lj. 1	Po Gramu pozitivne, dolge paličice
<i>Lb. bulgaricus</i> (LDSB) IM 348	Po Gramu pozitivne paličice
<i>Lb. paracasei</i> DSM 5622	Po Gramu pozitivne paličice
<i>Lb. plantarum</i> IM 212	Po Gramu pozitivne kratke paličice
<i>Lb. fermentum</i> IM 351	Po Gramu pozitivne paličice
<i>B. cereus</i> IM 250	Po Gramu pozitivne paličice
<i>E. coli</i> IM 120	Po Gramu negativne, kratke paličice
<i>Ec. faecalis</i> LMG 7937	Po Gramu pozitivni koki
<i>Ec. faecalis</i> CCM 4647	Po Gramu pozitivni koki
<i>Ec. durans</i> CCM 5612	Po Gramu pozitivni koki
<i>L. monocytogenes</i> IM 372	Po Gramu pozitivne, kokoidne paličice
<i>L. innocua</i> IM 373	Po Gramu pozitivne, kokoidne paličice
<i>E. faecium</i> IM 273	Po Gramu pozitivni koki

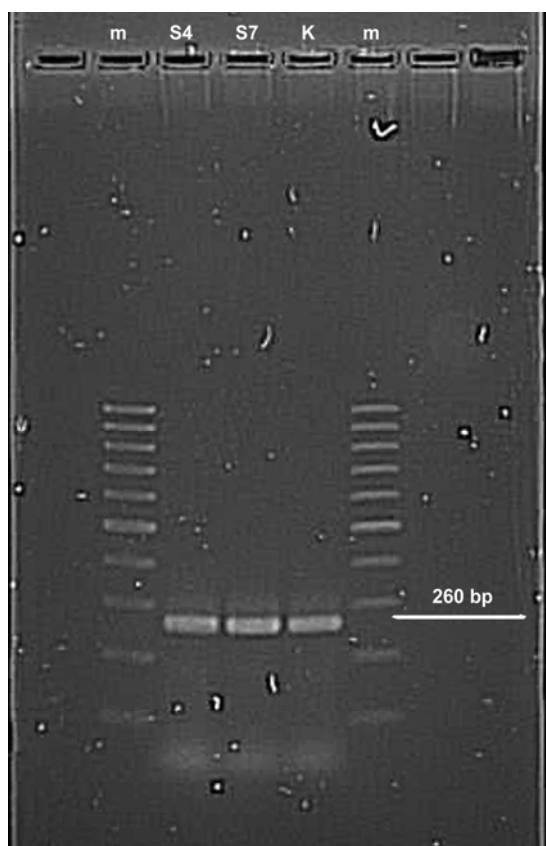
Se nadaljuje.

Nadaljevanje preglednice 8: Rezultati morfološke analize mikroorganizmov

Analizirani mikroorganizmi:	Morfološki opis:
<i>Lb. delbrueckii</i> (LDSL) IM 350	Po Gramu pozitivne, dolge paličice
<i>Lb. helveticus</i> IM 30	Po Gramu pozitivne, kratke paličice
<i>Lb. rhamnosus</i> IM 239	Po Gramu pozitivne, kratke paličice
<i>Staph. aureus</i> IM 388	Po Gramu pozitivni koki
<i>Staph. aureus</i> IM 389	Po Gramu pozitivni koki
<i>Staph. aureus</i> IM 390	Po Gramu pozitivni koki

4.2 REZULTATI ANALIZE PCR

Z analizo PCR smo potrdili, da sta vzorca S4 in S7 pripadnika vrste *Str. thermophilus*. Z uporabljenimi začetnimi oligonukleotidi ThI/ThII smo dobili pričakovano velike pomnožke PCR (259 bp), kar prikazuje slika 6.



Legenda:

m – velikostna lestvica DNA 100 bp

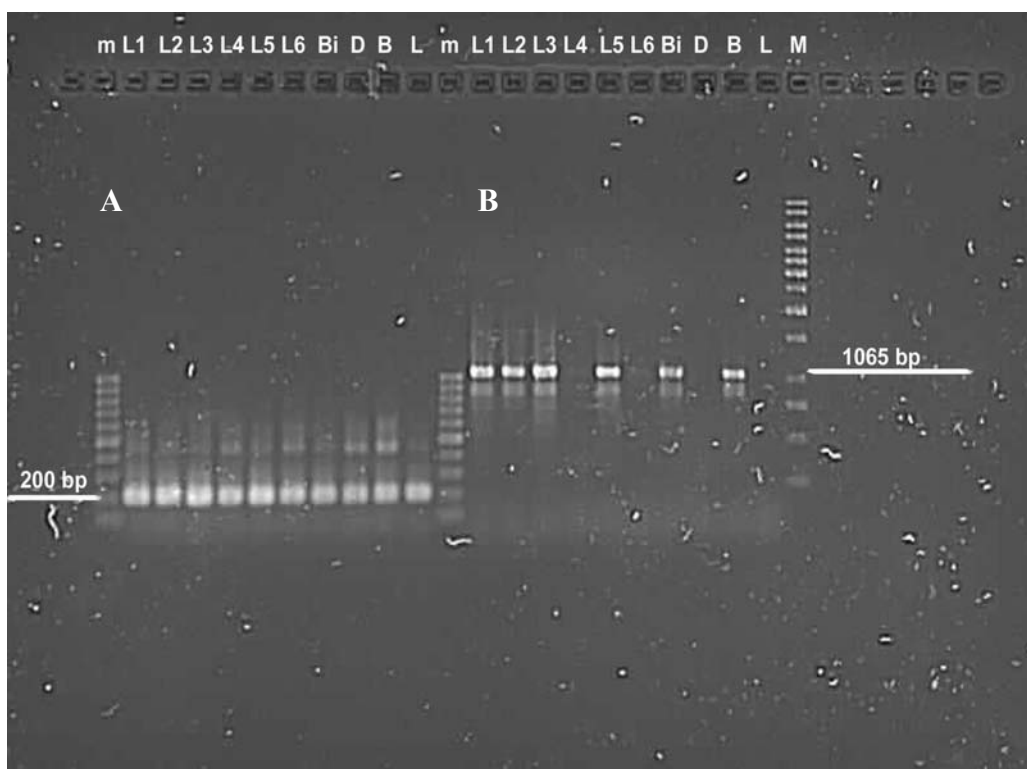
S4 – preiskovani izolat

S7 – preiskovani izolat

K – pozitivna kontrola S20

Slika 6: Rezultati reakcije PCR z začetnimi oligonukleotidi ThI/ThII za vrsto *Str. thermophilus*.

V nadaljevanju smo z reakcijo PCR analizirali preiskovane izolate L1, L2, L3, L4, L5, L6 in Biofank. Z izbranimi začetnimi oligonukleotidi DeI I/DeI II oziroma LB1/LLB1 smo ugotovili, da so vsi izolati predstavniki vrste *Lb. delbrueckii* (Slika 7A) in podvrste *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Slika 7B in Slika 8).



Slika 7: Rezultati PCR za potrditev vrste *Lb. delbrueckii* (A) in za potrditev podvrst *lactis*, *bulgaricus* in *delbrueckii* (B)

Legenda:

m – velikostna lestvica DNA 100 bp

L1, L2, L3, L4, L5, L6, Bi – preiskovani izolati

D – pozitivna kontrola - *Lb. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* IM 349

B - pozitivna kontrola - *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* IM 348

L - pozitivna kontrola - *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* IM 350

M – velikostna lestvica DNA 1 Kb



Legenda:

B - pozitivna kontrola - *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* IM 348

L4, L6 – preiskovani izolati

D – pozitivna kontrola - *Lb. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* IM 349

L - pozitivna kontrola - *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* IM 350

M – velikostna lestvica DNA 1 Kb

Slika 8: Rezultati PCR za potrditev podvrst *lactis*, *bulgaricus* in *delbrueckii*.

4.3 REZULTATI ANALIZ PROTIMIKROBNEGA DELOVANJA Z METODO LISE NA TRDNEM GOJIŠČU

Rezultati analize medsebojnega protimikrobnega delovanja preiskovanih sevov so podani v preglednici 9.

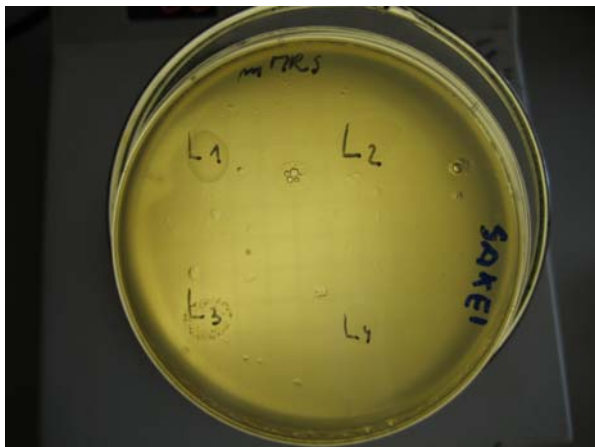
Preglednica 9: Rezultati analize medsebojnega protimikrobnega delovanja preiskovanih sevov.

Indikator / Testni m.o.	L1	L2	L3	L4	L5	L6	Biofank	S4	S7	<i>Lb. sakei</i>
L1	/	/	/	K	K	/	/	/	/	/
L2	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
L3	/	/	/	/	K	K	K	/	/	/
L4	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
L5	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
L6	/	/	/	K	/	K	/	/	/	/
Biofank	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
K7 (MRS)*	o/6	o/6	o/6	o/5	o/6	o/4	o/6	/	K	o/5
S4	/	/	/	/	/	/	/	o/2	/	/
S7	/	/	/	/	/	/	/	o/2	/	/
K7 (M17)*	o/5	o/4	o/4	/	o/4	o/3	/	/	/	o/3

Legenda: /: cona ni nastala, K: komaj opazna cona, <1mm, o/2-6: cone z ostrimi robovi, premera 2 do 6mm

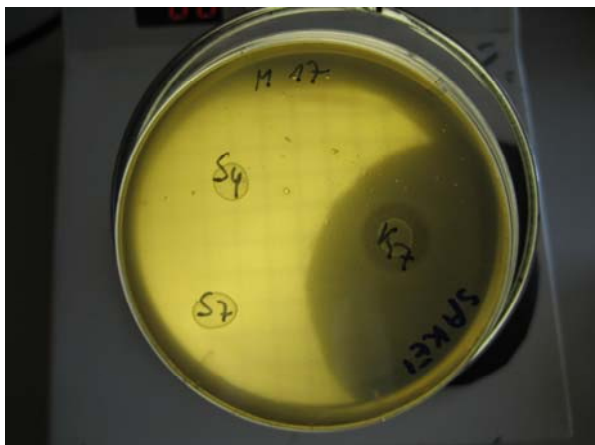
*: K7 nanešen kot testni mikroorganizem na trdno gojišče MRS oziroma M17 (glej tudi Sliko 3).

Na sliki 9 lahko vidimo, da testni mikroorganizmi L1, L2, L3 in L4 niso pokazali nobenega protimikrobnega delovanja proti indikatorskemu mikroorganizmu *Lb. sakei*.



Slika 9: Ugotavljanje protimikrobne aktivnosti testnih mikroorganizmov L1, L2, L3 in L4 proti indikatorskemu organizmu *Lb. sakei* (ni inhibicije).

Na sliki 10 vidimo, kako je mikroorganizem K7 inhibiral indikatorski mikroorganizem *L. sakei*, testna mikroorganizma S4 in S7 pa nista delovala protimikrobno.



Slika 10: Ugotavljanje protimikrobne aktivnosti testnih mikroorganizmmov K7, S4 in S7 proti indikatorskemu organizmu *Lb. sakei* (inhibicija samo s K7).

Rezultati analize preiskovanih sevov proti izbranim indikatorskim mikroorganizmom so podani v preglednici 10.

Preglednica 10: Rezultati analize preiskovanih sevov proti izbranim indikatorskim bakterijam.

Testni m.o. Indikatorski m.o..	L1	L2	L3	L4	L5	L6	Biofank	K7*	S4	S7	K7**
<i>Cl. perfringens</i> Ib 1106 IM 73	o/1	/	o/1	/	K	/	o/3	/	/	/	/
<i>Cl. tyrobutyricum</i> DSM 2637	/	/	K	/	K	K	K	/	o/2	o/2	/
<i>Lb. sakei</i> NCDO 2714	/	/	/	/	/	K	/	o/7	/	/	o/4
<i>Lb. delbrueckii</i> (LDSB) IM 349	/	/	/	/	/	K	K	o/7	/	/	o/5
<i>Lb. johnsonii</i> Lj. 1	o/2	o/2	/	/	/	o/2	o/2	/	/	K	K
<i>Lb. bulgaricus</i> (LDSB) IM 348	o/2	K	o/5	/	o/2	/	o/7	/	/	/	/
<i>Lb. paracasei</i> DSM 5622	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>Lb. plantarum</i> IM 212	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>Lb. fermentum</i> IM 351	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	o/2
<i>B. cereus</i> IM 250	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>E. coli</i> IM 120	/	/	/	/	/	/	/	K	/	/	/
<i>Ec. faecalis</i> LMG 7937	/	/	/	/	/	/	/	o/4	/	/	o/3
<i>Ec. faecalis</i> CCM 4647	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>Ec. durans</i> CCM 5612	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>L. monocytogenes</i> IM 372	o/5	o/2	o/6	o/4	o/2	/	o/5	/	/	/	/
<i>L. innocua</i> IM 373	o/6	/	o/7	o/4	o/3	/	o/6	/	/	/	/
<i>Ec. faecium</i> IM 273	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>Lb. delbrueckii</i> (LDSL) IM 350	K	/	K	/	/	o/1	K	o/8	/	/	o/2
<i>Lb. helveticus</i> IM 30	K	/	K	/	K	K	K	o/4	/	/	o/2
<i>Lb. rhamnosus</i> IM 239	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>Staph. aureus</i> IM 388	o/4	o/1	K	K	o/4	/	o/6	/	/	/	/
<i>Staph. aureus</i> IM 389	/	/	/	/	K	/	/	K	/	/	/
<i>Staph. aureus</i> IM 390	o/4	/	o/3	o/1	o/2	/	o/4	/	/	/	/

Legenda: /: cona ni nastala, K: komaj opazna cona, <1mm, o/2-7: cone z ostrimi robovi, premera 2 do 7 mm,

K7*: gojen na trdnem gojišču MRS, K7**: gojen na trdnem gojišču M17

4.4 REZULTATI ANALIZE β -GALAKTOZIDAZNE AKTIVNOSTI

Preglednica 11: Rezultati merjenja absorbance pri 560 nm in 420 nm in vrednost β -galaktozidazne aktivnosti v Millerjevih enotah.

Testni mikroorganizem	A_{a560nm}	A_{b560nm}	A_{420nm}	β -galaktozidazna aktivnost (ME*)
L1	0,9554	0,0403	1,807	1211,7
L2	1,132	0,0489	1,943	1093,9
L3	1,010	0,0457	2,921	1875,2
L4	1,012	0,0420	2,523	1613,7
L5	0,9819	0,0389	0,6393	387,8
L6	0,9437	0,0340	0,9869	655,1
BIOFANK	1,070	0,0423	2,076	1247,3
S4	1,0574	0,043	0,7356	416,3
S7	1,0876	0,0349	0,3548	180,0

*ME - Millerjeva enota

Iz rezultatov vidimo, da so laktobacili izkazali mnogo višjo β -galaktozidazno aktivnost kot streptokoki. Med laktobacili sta bila najmanj aktivna seva L5 in L6, najbolj aktiven pa je bil sev L3.

4.5 REZULTATI DOLOČANJA KOLIČINE IN VRSTE NASTALE MLEČNE KISLINE

4.5.1 Gojitev kultur v tekočih gojiščih

Rast testnih organizmov preko noči v ustreznih tekočih gojiščih je bila dobra, saj so tekoča gojišča postala motna, na dnu epruvete pa je bila vidna usedlina. Pred nadaljnjim postopkom analize smo vsebino epruvete dobro premešali z uporabo vrtičnika. Pri končnem izračunu količine nastale mlečne kisline smo upoštevali razredčitvene faktorje:

$$F_{\text{laktobacili}} = 1000$$

$$F_{\text{streptokoki}} = 100$$

Preglednica 12: Rezultati merjenja absorbance pri 340 nm, rezultati izračuna spremembe absorbanc in koncentracije nastale mlečne kisline (gojitev kultur v tekočih gojiščih).

Testni mikroorganizem	A1	A2	A3	Δ_{AD} -mlečna kislina	Δ_{AL} -mlečna kislina	$c_{\text{mlečne kisline}}$ [g/l]
L1	0,352	0,418	0,458	0,034	-0,011	$c_D = 10,9$
L2	0,349	0,406	0,447	0,025	-0,010	$c_D = 8,0$
L3	0,355	0,418	0,458	0,031	-0,011	$c_D = 9,9$
L4	0,352	0,401	0,443	0,017	-0,009	$c_D = 5,4$
L5	0,348	0,403	0,444	0,023	-0,010	$c_D = 7,4$
L6	0,354	0,400	0,445	0,014	-0,006	$c_D = 4,5$
Biofank	0,352	0,409	0,455	0,025	-0,005	$c_D = 8,0$
S4	0,352	0,383	0,455	-0,001	0,021	$c_L = 0,68$
S7	0,361	0,397	0,492	0,004	0,044	$c_L = 1,4$
Slepi vzorec	0,362	0,394	0,445	/	/	/

4.5.2 Gojitev kultur v rekonstituiranem posnetem mleku

Rast kultur v rekonstituiranem posnetem mleku v prahu je bila dobra. V vseh primerih je prišlo do nastanka koaguluma.

Preglednica 13: Vrednosti pH koaguluma, rezultati merjenja absorbance pri 340 nm, rezultati izračuna spremembe absorbanc in koncentracije nastale mlečne kisline (gojitev kultur v rekonstituiranem mleku).

Testni mikroorganizem	vrednost pH koaguluma	A1	A2	A3	Δ_{AD} -mlečna kislina	Δ_{AL} -mlečna kislina	$c_{mlečne\ kisline}$ [g/l]
L1	3,81	0,360	0,412	0,456	0,02	-0,007	$c_D = 6,4$
L2	3,78	0,357	0,402	0,447	0,013	-0,006	$c_D = 4,2$
L3	3,55	0,345	0,408	0,453	0,031	-0,006	$c_D = 9,9$
L4	3,84	0,353	0,404	0,454	0,019	-0,001	$c_D = 6,1$
L5	3,72	0,353	0,405	0,460	0,02	0,004	$c_D = 6,4$
L6	3,53	0,355	0,406	0,456	0,019	-0,001	$c_D = 6,1$
Biofank	3,77	0,352	0,405	0,457	0,021	0,001	$c_D = 6,7$
S4	5,82	0,356	0,379	0,456	-0,009	0,026	$c_L = 0,74$
S7	4,19	0,353	0,377	0,615	-0,008	0,187	$c_L = 6,04$

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Morfološke značilnosti preiskovanih sevov

Preiskovane seve smo najprej želeli morfološko opisati. Uporabili smo barvanje po Gramu, ki sodi med najpomembnejša sestavljena diferencialna barvanja v bakteriologiji, saj na osnovi tega barvanja razdelimo bakterije v dve veliki skupini: po Gramu pozitivne in po Gramu negativne bakterije. Postopek barvanja je leta 1884 opisal Gram (Smole Možina, 2000).

Bakterije rodu *Lactobacillus* so po Gramu pozitivne dolge ali kokoidne, negibljive in nesporogene paličice. V okolju z nizko vrednostjo pH postanejo po Gramu negativne. Glede odnosa do kisika so aerotolerantni anaerobi. Bakterije rodu *Streptococcus* pa so okrogli, po Gramu pozitivni, fakultativno do obvezno anaerobni koki. Pojavljajo se v parih, krajših ali daljših verižicah (Adamič in sod., 2003).

Barvanje po Gramu smo izvedli tako na preiskovanih sevih kot tudi na indikatorskih mikroorganizmih. Izkazalo se je, da so presikovani vzorci L1, L2, L3, L4, L5, L6 in Biofank dolge, ozke paličice, ki se pojavljajo posamično pa tudi v krajših verižicah. Obarvali so se vijolično. Torej sodijo med po Gramu pozitivne mikroorganizme. Vzorca S4 in S7 sta se prav tako obarvala vijolično, le da sta bila v obliki kokov. Koki so bili nanizani v daljših verižicah. Tudi ta dva vorca sodita med po Gram pozitivne mikroorganizme. Med indikatorskimi mikroorganizmi se je le vzorec *E. coli* obarval rdeče, saj sodi med po Gramu negativne mikroorganizme. Prav vsi indikatorski mikroorganizmi so po naši morfološki analizi ustrezali taksonomskim podatkom.

5.1.2 Identifikacija preiskovanih sevov

Za določanje vrste *Lb. delbrueckii* Tilsala – Timisjarvi in Alatossava (1997) navajata uporabo začetnih oligonukleotidov Del I in Del II, za določanje vrste *Str. thermophilus* pa začetnih oligonukleotidov Th I in Th II. Torriani in sod. (1999) so ugotovili, da je mogoče z uporabo samo ene vrste začetnih oligonukleotidov razlikovati med podvrstami *lactis*, *bulgaricus* in *delbrueckii*. Ta začetna oligonukleotida sta LB1 in LLB1.

Z molekularno analizo smo želeli ugotoviti vrste preiskovanih sevov, pri laktobacilih pa smo želeli določiti še podvrsto. Kot osnovo smo uporabili raziskavi avtorjev Tilsala – Timisjarvi in Alatossava (1997) in Torriani in sod. (1999). Izkazalo se je, da je bila izbrana metoda primerna, saj smo uspeli preiskovan seve identificirati do vrste, pri laktobacilih pa smo določili tudi podvrsto. To, da lahko identificiramo mikroorganizme tudi na nivoju podvrste je zelo pomembno tudi v živilski industriji. Ni namreč vseeno kateri mikroorganizem se nahaja v starterski kulturi, saj je od izbire delovnega mikroorganizma odvisen končni izdelek. S tem, ko vemo kateri mikroorganizem imamo, vemo tudi, katere so optimalne razmere za gojitev in kakšen produkt bo nastal.

5.1.3 Protimikrobno delovanje testnih mikroorganizmov

Protimikrobno delovanje mikroorganizmov, ki jih uporabljamo v mešanicah kot starterske kulture, je zaželena lastnost, saj so protimikrobne snovi dodatna pomoč pri zaviranju delovanja neželenih mikroorganizmov. Seveda pa moramo pred uporabo protimikrobni potencial takih bakterij natančno preveriti, predvsem z vidika vrste in spektra delovanja. Bakteriji klasične jogurtove kulture, *Str. thermophilus* in *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* proizvajata različne protimikrobne snovi, kot so bakteriocini, vodikov peroksid in benzojska kislina (Loones, 1989). Med bakteriocini bakterij *Str. thermophilus* in *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* najdemo bulgaricin, acidofilin in laktobacilin (Mareschi in Cuff, 1989). Nekateri med njimi naj bi celo učinkovali na po Gramu pozitivne kot tudi na po Gramu negativne bakterije (Curry in Crow, 2002).

Da bi preverili kakršenkoli protimikrobni potencial testnih sevov, smo protimikrobno delovanje najprej ugotavljali z učinkovanjem testnih mikroorganizmov med seboj. Rezultati analize medsebojnega učinkovanja preiskovanih sevov niso pokazali pomembnejšega protimikrobnega delovanja. Ponekod so se pojavile nejasne, komaj opazne, majhne cone, ki so najverjetneje posledica tvorbe in delovanja kislin. Tudi majhni coni v primeru testnih mikroorganizmov S4 in S7 proti indikatorskemu mikroorganizmu S4 sta najverjetneje nastali na račun tvorbe kisline. Ker preiskovani sevi, osamljeni iz tradicionalnih bolgarskih jogurtov, drug proti drugemu ne delujejo zaviralno, predstavljajo zanimiv vir možnih kombinacij za mešane starterske kulture.

V nadaljevanju smo ugotavljali protimikrobno delovanje testnih mikroorganizmov proti naboru različnih indikatorskih bakterij. Kot navaja literatura, bakterije vrste *Str. termophilus* redko proizvajajo bakteriocine (Mathot in sod., 2003), a tistih nekaj opisanih navadno uspešno deluje ne samo proti sorodnim bakterijskim vrstam kot so streptokoki, laktokoki, laktobacili, enterokoki, ampak tudi proti vrstam iz rodov *Bacillus*, *Clostridium*, *Listeria*, *Salmonella*, *Escherichia* in *Yersinia* (Ivanova in sod., 1998; Marciset in sod., 1997). Tudi vrsta *Lb. delbrueckii* redko proizvaja bakteriocine. Miteva in sod. (1998) so opisali bakteriocin seva 1043, ki poleg sorodnih bakterijskih vrst zavira tudi patogene in kvarljivce kot so *L. monocytogenes*, *Staph. aureus*, *Ec. faecalis*, *E. coli*, *Y. enterocolitica* in *Y. pseudotuberculosis*. Hyun-Jin in sod. (2004) so podoben protimikroben učinek opisali za bakteriocin podvrste *Lb. bulgaricus*, ki pa je še posebej zanimiv zaradi svoje učinkovitosti proti *Staph. aureus* in *Strep. agalactiae*, glavnima povzročiteljema mastitisa. Po drugi strani pa so Hebert in sod. (2000) zapisali, da pri nobenem od preiskovanih sevov vrste *Lb. delbrueckii* niso ugotovili tvorbe bakteriocinov.

Tudi naša analiza je pripeljala do rezultatov, primerljivih z že objavljenimi. Medtem ko testna mikroorganizma S4 in S7 iz rodu *Streptococcus*, razen proti *Cl. tyrobutyricum* DSM 2637, nista delovala protimikrobno proti nobenemu izbranemu indikatorju, pa so laktobacili izkazali precej širši spekter protimikrobnega delovanja. Od sorodnih bakterijskih vrst so testni laktobacili protimikrobno delovali proti termofilnim laktobacilom, vključujoč *Lb. johnsonii* Lj. 1, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* IM 348 ter *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* IM350, medtem ko so med nesorodnimi bakterijami uspešno

zavrli predstavnike vrst *Cl. perfringens* 1b 1106 IM 73, *Staph. aureus* IM 388 in IM 390 ter *L. monocytogenes* IM 372 in *L. innocua* IM 373.

Pri tem je treba poudariti, da so tako testni laktobacili kot streptokoka proti omenjenim indikatorskim bakterijam delovali z oblikovanjem jasne cone z ostrim robom, kar je zelo pogost pokazatelj prisotnosti protimikrobne snovi proteinske narave, torej bakteriocinov. Seveda bi bilo potrebno za potrditev naših predvidevanj opraviti dodatne analize, na primer preveriti občutljivost protimikrobne snovi za proteolitične encime. Protimikroben učinek proti klostridijem kot povzročiteljem poznega napihovanja sirov (Bogovič Matjašić in sod. 2007), listerijam kot patogenim bakterijam in povzročiteljicam listerioze (Miteva in sod. 1998) ter stafilokokom kot povzročiteljem mastitisa (Hyun-Jin in sod., 2004), uvršča preiskovane seve laktobacilov in streptokokov med obetavne mikrobe z možnostjo uporabe kot starterskih kultur z zaščitnim delovanjem.

Proti ostalim indikatorskim mikroorganizmom so bili laktobacili in streptokoki protimikrobno manj oziroma neuspešni, saj je le pri nekaterih indikatorskih mikroorganizmih prišlo do tvorbe komaj opazne cone inhibicije z nejasnim robom, najverjetneje kot posledica delovanja kisline.

5.1.4 β -galaktozidazna aktivnost

Encim β -galaktozidaza, ki razgrajuje mlečni sladkor laktozo na glukozo in galaktozo, ima v mlekarški industriji še neizkoriščen potencial. Encim, ki ga proizvajajo mlečno kislinske bakterije, je pomemben zato, ker z razgradnjo laktoze na monosaharida poveča prebavljivost mlečnih izdelkov, ki so zato primerni tudi za ljudi z laktozno intoleranco. Po podatkih, ki jih navaja literatura, ljudje z laktozno intoleranco predstavljajo okoli 50 % svetovne populacije. To tržišče je še dokaj neizkoriščeno in zato predstavlja uporaba tega encima v prihodnje velik potencial (Tari in sod., 2009)

Encim β -galaktozidazo najdemo v različnih bioloških sistemih, vendar pa so glavni vir kvasovke, plesni in bakterije. Pri tem imajo pomembno vlogo prav mlečno kislinske

bakterije, saj imajo status GRAS in s tem zagotovilo, da so »varni« mikroorganizmi (Vasiljevic in Jelen, 2001)

Vinderola in Reinheimer (2003) navajata, da so pri sevih *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* izmerili od 0 do 2053 Millerjevih enot β -galaktozidazne aktivnosti. V tem okviru se gibljejo tudi naši rezultati. Pri testnem mikroorganizmu L3 smo izmerili največjo β -galaktozidazno aktivnost 1875,2 ME. Najmanjšo aktivnost med testnimi laktobacili pa je pokazal testni organizem L5, ki je dosegel le 387,8 ME. Vsi ostali testni laktobacili pa so v tem razponu.

Streptokoka S4 in S7 sta pokazala slabšo β -galaktozidazno aktivnost. Bolj učinkovit je bil testni sev S4, ki je dosegel 416,3 ME, sev S7 pa je dosegel le 180 ME. V literaturi so podatki o β -galaktozidazni aktivnosti streptokokov še mnogo nižji od rezultatov, ki smo jih ugotovili v naši raziskavi. Vinderola in Reinheimer (2003) opisujeta, da se gibljejo vrednosti β -galaktizidazne aktivnosti za bakterijo *Str. thermophilus* med 2,9 do 6,7 ME.

Isik Ustok in sodelavci (2007) pa opisujejo, da na aktivnost encima β -galaktozidaze pomembno vpliva tudi simbioza med mikroorganizmoma *Str. thermophilus* in *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Str. thermophilus* 95/2 in *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 77 sta v natančno definiranim gojišču pri določenih pogojih v razmerju 3:2,6 (Lb77:St95/2) pokazala za 60 % večjo β -galaktozidazno aktivnost, kot jo je pokazal Lb 77 uporabljen samostojno in za 10 % večjo β -galaktozidazno aktivnost od aktivnosti organizma St95/2, ko je bil uporabljen samostojno.

5.1.5 Tvorba mlečne kisline

Mlečna kislina sodi med snovi s širokim spektrom uporabe. Pomembna je za živilsko industrijo, kjer se uporablja kot zakisevalec živil, uporablja se lahko kot aroma in konzervans. Mlečna kislina je pomembna surovina v farmacevtski industriji, pri predelavi usnja, v tekstilni industriji, pri proizvodnji organskih kislin in pri proizvodnji biorazgradljive plastike (Tango in Ghaly, 1999). Ker pa igra cena surovine, ki jo uporabimo kot gojišče, zelo veliko vlogo, se mnogo raziskovalcev ukvarja prav s tem, da

bi poiskali kar najcenejše gojišče, ki bo ustrezalo proizvodnemu mikroorganizmu (Lee, 2005).

Lee (2005) je proučeval tudi, kako na proizvodnjo kisline vplivajo sinergistični odnosi med različnimi mlečnokislinskimi bakterijami. Ugotovil je, da je proizvodnja mlečne kisline večja, kadar je uporabil več različnih bakterij kot pa pri uporabi ene same vrste bakterije. Isik Ustok in sodelavci (2007) poročajo, da testna mikroorganizma *Str. thermophilus* 95/2 in *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 77 v razmerju 3:2,6 (Lb77:St95/2) proizvajata za 72 % več mlečne kisline kot Lb77 uporabljen samostojno in 74 % več mlečne kisline kot St95/2 uporabljen kot samostojna kultura.

Jogurt običajno vsebuje 45 – 60 % L(+) mlečne kisline in 40 – 55 % D(-) mlečne kisline. Ker *Str. thermophilus* raste hitreje kot *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, pri proizvodnji jogurta najprej nastane L(+) mlečna kislina in šele nato D(-) mlečna kislina. Iz odstotka določenega izomera prisotnega v jogurtu lahko sklepamo na določene lastnosti. Če vsebuje jogurt več kot 70 % L(+) mlečne kisline, lahko sklepamo, da je bila v mleko vcepljena predvsem kultura bakterije *Str. thermophilus* ali pa je fermentacija potekala pri temperaturi nižji od 40 °C. Če pa jogurt vsebuje več D(-) mlečne kisline kot L(+) mlečne kisline je fermentacija najverjetneje potekala pri temperaturi višji od 45 °C, izdelek je bil predolgo skladiščen ali pa je bilo v mleko vcepljenih več laktobacilov kot streptokokov (Tamime in Robinson, 1999).

Naš poskus je bil zastavljen tako, da smo preverili količino in vrsto nastale mlečne kisline tako v gojišču, ki ni naravno okolje starterskih kultur *Str. thermophilus* in *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* kot tudi v njihovem naravnem okolju, mleku.

Ugotovili smo, da *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* tvori D(-) mlečno kislino, *Str. thermophilus* pa L(+) mlečno kislino. V šestih primerih od devetih so testni mikroorganizmi povzročili nastanek večje količine mlečne kisline v tekočih gojiščih M17 in MRS kot pa v rekonstituiranem mleku. Največ kisline je tvoril sev L1 v tekočem gojišču MRS. Koncentracija D(-) mlečne kisline je bila 10,9 g/l. Ostali testni mikroorganizmi so tvorili od 4,5 do 9,9 g/l mlečne kisline v tekočem gojišču MRS. Vsi ti sevi pripadajo vrsti

Lb. delbrueckii subsp. *bulgaricus*. Testna mikroorganizma S4 in S7, ki pripadata vrsti *Str. thermophilus* in smo ju gojili v tekočem gojišču M17, pa sta tvorila bistveno manjše koncentracije mlečne kisline. S7 je tvoril 1,4 g/l L(+) mlečne kisline, S4 pa le 0,68 g/l L(+) mlečne kisline.

V delovni hipotezi smo predpostavili, da so za začetni padec pH vrednosti v jogurtu odgovorni streptokoki, za nadaljnje znižanje pa laktobacili. Poskus je pokazal, da sta *Str. thermophilus* seva S4 in S7 znižala vrednost pH na 5,82 in 4,19. Precej nižjo vrednost pH so dosegli laktobacili. Najbolj učinkovit je bil s končno vrednostjo pH 3,53 *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* sev L6. Prav vsi testni laktobacili so znižali vrednost pH do 3,84 oziroma celo do 3,53.

Testni laktobacili, ki smo jih kultivirali v rekonstituiranem mleku, so tvorili od 4,2 g/l do 9,9 g/l D(-) mlečne kisline. Najbolj učinkovit je bil sev L3, najmanj pa je bil učinkovit med laktobacili sev L2. *Str. thermophilus* sev S7 je tvoril bistveno več mlečne kisline v mleku kot pa v tekočem gojišču M17. Koncentracija L(+) mlečne kisline v RPM je znašala 6,04 g/l, v tekočem gojišču M17 pa le 1,4 g/l. *Str. thermophilus* sev S4 je tvoril le nekaj več mlečne kisline v RPM kot pa v tekočem gojišču M17. V prvem primeru je koncentracija znašala 0,74 g/l, v drugem pa 0,68 g/l L(+) mlečne kisline.

5.2 SKLEPI

- Preiskovani sevi vrst *Str. thermophilus* in *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* se medsebojno ne inhibirajo.
- Razen proti *Cl. tyrobutyricum* DSM 2637, streptokokna seva S4 in S7 nimata protimikrobnega potenciala proti izbranim indikatorskim mikroorganizmom.
- Sevi laktobacilov so bili protimikrobno učinkovitejši, saj so delovali proti sorodnim (*Lb. johnsonii*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*) in nesorodnim bakterijskim vrstam (*Staph. aureus*, *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *Cl. perfringens*).
- Glede na izgled cone inhibicije (bistra, ostra cona) predvidevamo, da so med protimikrobnimi snovmi zelo verjetno prisotni tudi bakteriocini.
- Sevi laktobacilov imajo višjo β -galaktozidazno aktivnost kot sevi streptokokov.
- Sevi laktobacilov, ki smo jih gojili v tekočem gojišču MRS, so tvorili od 4,5 g/l do 10,9 g/l mlečne kisline, sevi streptokokov, gojeni v tekočem gojišču M17 pa so tvorili od 0,68 g/l do 1,4 g/l mlečne kisline.
- Sevi laktobacilov, ki smo jih gojili v rekonstituiranem posnetem mleku, so tvorili od 4,2 g/l do 9,9 g/l D(-) mlečne kisline, sevi streptokokov pa od 0,74 g/l do 6,04 g/l L(+) mlečne kisline.
- Pri fermentaciji rekonstituiranega mleka je bil najbolj učinkovit *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* sev L6, ki je znižal vrednost pH do 3,53, najmanj učinkovit pa *Str. thermophilus* sev S4, ki je znižal vrednost pH samo do 5,82.

6 POVZETEK

Proučevali smo seve mlečnokislinskih bakterij, izoliranih iz tradicionalnega bolgarskega jogurta. Najprej smo izolate barvali po Gramu in jih pregledali pod mikroskopom. Ugotovili smo, da vsi izolati spadajo med po Gramu pozitivne bakterije.

Sledila je identifikacija izolatov z uporabo specifičnih začetnih oligonukleotidov. Z analizo PCR smo izolata S4 in S7 identificirali kot seva vrste *Str. thermophilus*, izolate L1, L2, L3, L4, L5, L6 in Biofank pa za pripadnike vrste *Lb. delbrueckii* oziroma podvrste *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

V nadaljevanju smo ugotavljali medsebojni protimikrobni potencial izolatov in protimikrobni potencial izolatov proti izbranim indikatorskim bakterijam, vključujoč sorodne bakterijske vrste, bakterije kvarljivke in patogene bakterije. Ugotovili smo, da preiskovani izolati niso pokazali protimikrobnega delovanja med seboj, vendar so bili sevi laktobacilov protimikrobno aktivni proti drugim sorodnim (*Lb. johnsonii*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*) in nesorodnim bakterijskim vrstam (*Staph. aureus*, *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *Cl. perfringens*). Seva S4 in S7 nista pokazala protimikrobnega potenciala proti nobenemu izbranemu indikatorskemu mikroorganizmu razen proti *Cl. tyrobutyricum* DSM 2637.

Encim β -galaktozidaza, ki katalizira hidrolizo laktoze v monosaharida glukozo in galaktozo, ima pomembno vlogo pri proizvodnji jogurta. Nastali monosaharidi vplivajo na senzorične lastnosti jogurta, hkrati pa je ravno ta encim odgovoren za to, da lahko tudi ljudje z laktozno intoleranco uživajo jogurt. Z analizo smo ugotovili, da je β -galaktozidazna aktivnost višja pri testnih laktobacilih, saj je znašala med 387,8 ME in 1875,2 ME, pri preiskovanih streptokokih pa je bila aktivnost med 180 ME in 416,3 ME.

Tvorba mlečne kisline je nujna za nastanek jogurta. Mlečna kislina prispeva k značilnemu okusu, omogoča destabilizacijo kazeinskih micel in deluje kot naravni konzervans jogurta. Ugotovili smo, da sevi *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* tvorijo D(-) mlečno kislino, seva *Str. thermophilus* pa L(+) mlečno kislino. Laktobacili, ki smo jih kultivirali v

rekonstituiranem posnetem mleku, so tvorili od 4,2 g/l do 9,9 g/l D(-) mlečne kisline, seva S4 in S7 pa 0,74 g/l in 6,04 g/l L(+) mlečne kisline. Pri tem je padla vrednost pH v rekonstituiranem posnetem mleku, fermentiranem z najučinkovitejšim sevom laktobacilov (L6) do vrednosti 3,53, z najučinkovitejšim sevom streptokokov (S7) pa do vrednosti 4,19.

Iz rezultatov lahko sklepamo, da so proučevani sevi vrst *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in *Str. thermophilus* primerni za pripravo fermentiranega izdelka. Pred uporabo testiranih sevov za sestavljanje starterskih kultur pa bi bilo potrebno izvesti še dodatne raziskave s katerimi bi ugotovili, katera kombinacija bi bila najbolj primerna za izdelavo jogurta. Končna izbira bo odvisna od hitrosti fermentacije pa tudi od senzoričnih lastnosti izdelkov (aroma, okus, konsistenca, viskoznost in tekstura), narejenih z različnimi kombinacijami testiranih sevov.

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, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 1 - 47
- Aktypis A., Kalantzopoulos G., Huis in't Veld J. H., ten Brink B. 1998. Purification and characterization of thermophilin T, a novel bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0040. *Journal of Applied Microbiology*, 84: 568 – 576
- Bogovič Matijašič B., Rogelj I. 1999. Bacteriocinogenic activity of lactobacilli isolated from cheese and baby faeces. *Food Technology and Biotechnology*, 37, 2: 93 - 100
- Bogovič Matijašič B., Koman Rajšp M., Perko B., Rogelj I. Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in cheese by *Lactobacillus gasseri*. *International Dairy Journal*, 17, 2: 157 - 166
- Charlier C., Cretenet M., Even S., Le Loir Y. 2009. Interactions between *Staphylococcus aureus* and lactic acid bacteria: An old story with new perspectives. *International Journal of Food Microbiology*, 131: 30 – 39
- Curry B., Crow V. 2003. *Lactobacillus* spp.: General characteristics. V: Encyclopedia of dairy sciences. Vol. 3. Roginski H., Fuquay J.W., Fox P.F. (eds.). London, Academic Press: 1479 – 1511
- Delorme C. 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: *Streptococcus thermophilus*. *International Journal of Food Microbiology*, 126: 274 - 277
- De Man J.C., Rogosa M., Sharpe M.E. 1960. A medium for the cultivation of Lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, 23: 130 - 135

- Gilbreth S. E., Somkuti G. A. 2005. Thermophilin 110: a bacteriocin of *Streptococcus thermophilus* ST110. *Current Microbiology*, 51: 175 – 182
- Giraffa G., Bossi M. G., Fornasari E. 1989. Bacteriocin production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* strains. *Microbiologie, Aliments, Nutrition*, 7: 139 - 143
- Hebert E. M., Raya R.R., Tailliez P., De Giori G. S. 2000. Characterization of natural isolates of *Lactobacillus* strains to be used as starter cultures in dairy fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 59: 19 - 27
- Hyun-Jin K., Ji-Hyun K., Jeong Hwys., Hyo-Jin S., So-Jin P., Nam-Soo P., Sung-Koo K. 2004. Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14: 503 – 508
- Isik Ustok F., Tari C., Harsa S. 2007. Effect of symbiotic relationship of *Lactobacillus bulgaricus* 77 and *Streptococcus thermophilus* 95/2 on beta-galactosidase and lactic acid production. *Journal of Biotechnology*, 131: 224 - 241
- Ivanova I., Miteva V., Stefanova T., Pantev A., Budakov I., Danova S., Moncheva P., Kotova N., Dousset X., Boyaval P. 1998. Characterization of a bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* 81. *International Journal Food Microbiology*, 42: 147 - 158
- Jeršek B. 2003. Higiena živil: laboratorijske vaje za predmet higiena živil. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 21 - 28
- Jeršek B. 2004. Osnovni principi identifikacije bakterij in kvasovk v živilih. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 14 - 14
- Lee K. 2005. Comparison of fermentative capacities of lactobacilli in single and mixed culture in industrial media. *Process Biochemistry*, 40: 1559 - 1564

- Leroy F., De Vuyst L. 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, 15: 67 - 78
- Loones A. 1989. Transformation of milk components during yogurt fermentation. V: *Yogurt: Nutritional and health properties*. Chandan R.C. (ed.). Virginia, National Yogurt Association: 95 – 114
- Loyola University Chicago. 2009. Gram staining technique. Chicago, Loyola University Chicago Stritch School of Medicine
<http://www.meddean.luc.edu/lumen/DeptWebs/microbio/med/gram/tech.htm>
(september 2009): 1 - 1
- Mahoney R. R. 1985. Modification of lactose and lactose-containing dairy products with β -galactosidase. V: *Developments in dairy chemistry*. 3: Lactose and minor constituents. Fox P.F. (ed.). London, Elsevier: 69 - 107
- Mahoney R. R. 2003. Beta – D – Galactosidase. V: *Encyclopedia of dairy sciences*. Vol. 2. Roginski H., Fuquay J.W., Fox P.F. (eds.) London, San Diego. Academic Press: 907 – 913
- Marciset O., Jeronimus – Stratingh M. C., Mollet B., Poolman B. 1997. Thermophilin 13, a nontypical antilisterial poration complex bacteriocin, that functions without a receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 272: 14277 – 14284
- Mareschi J. P., Cuff A. 1989. Essential characteristics of yogurt and its regulation Around the world. V: *Yogurt: Nutritional and health properties*. Chandan R. C. (ed.). Virginia, National Yogurt Association: 11 - 28
- Mathot A. G., Beliard E., Thuault D. 2003. *Streptococcus thermophilus* 580 produces a bacteriocin potentially suitable for inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in hard cheese. *Journal of Dairy Science*, 86: 3068 – 3074

- Miteva V., Ivanova I., Budakov I., Pantev A., Stefanova T., Danova S., Moncheva P., Mitev V., Dousset X., Boyaval P. 1998. Detection and characterization of a novel antibacterial substance produced by a *Lactobacillus delbrueckii* strain 1043. *Journal of Applied Microbiology*, 85: 603 - 614
- Pearce L., Flint S. 2003. *Streptococcus thermophilus*. V: Encyclopedia of dairy sciences. Vol. 4. Roginski H., Fuquay J.W., Fox P.F. 2003 (ed.) London, Academic Press: 2577 – 2582
- Robinson R. K. 2002. Dairy microbiology handbook. 3rd ed. New York, Wiley Interscience: 765 str.
- 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
- Sambrook J., Russell, D. W. 2001. Molecular cloning : a laboratory manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor laboratory Press: A1.17 – A1.17
- Simonson L. G. 2007. *Streptococcus thermophilus*. Ohio, Kenyon College http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Streptococcus_thermophilus (september 2009): 1 - 1
- Smole Možina S. 2000. Eksperimentalne vaje iz živilske mikrobiologije. Splošna mikrobiološka tehnika: skripta in delovni zvezek za študente I. letnika živilstva. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 9 - 10
- Tamime A. Y., Robinson R. K. 1999. Yoghurt: Science and technology. 2nd ed. Cambridge, Woodhead Publishing: 432 - 439
- Tango M. S. A., Ghaly A. E. 1999. Amelioration of lactic acid production from cheese whey using micro-aeration. *Biomass and Bioenergy*, 17: 221 - 238

- Tari C., Isik Ustok F., Harsa S. 2009. Optimization of the associative growth of novel yoghurt cultures in the production of biomass, β -galactosidase and lactic acid using response surface methodology. *International Dairy Journal*, 19: 236 - 243
- Tilsala – Timisjärvi A., Alatossava T. 1997. Development of oligonucleotide primers from the 16S-23S rRNA intergenic sequences for identifying different dairy and probiotic lactic acid bacteria by PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 35: 49 - 56
- Toba T., Yoshioka E., Iton T. 1991. Lacticin, a bacteriocin produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*. *Letters in Applied Microbiology*, 12: 43 – 45
- Todar K. 2006. The normal flora of humans. Madison, University of Wisconsin
<http://bioinfo.bact.wisc.edu/themicrobialworld/NormalFlora.html>
(september 2009): 1 - 1
- Torriani S., Zapparoli G., Dellaglio F. 1999. Use of PCR-Based methods for rapid differentiation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *L. delbrueckii* subsp. *lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 4351 - 4356
- Vasiljevic T., Jelen P. 2001. Production of β -galactosidase for lactose hydrolysis in milk and dairy products using thermophilic lactic acid bacteria. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2: 75 - 85
- Vinderola C. G., Reinheimer J. A. 2003. Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative »in vitro« study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Research International*, 36: 895 - 904

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici doc. dr. Andreji Čanžek Majhenič za pomoč pri načrtovanju te diplomske naloge, za vse nasvete pri izvedbi laboratorijskega dela kot tudi za pomoč pri končnem oblikovanju te naloge. Hvaležna sem za ves njej trud, potrpljenje in čas, ki sem ga bila deležna.

Zahvaljujem se recenzentki prof. dr. Ireni Rogelj za strokovno recenzijo diplomskega dela.

Zahvaljujem se še staršem, ki so mi omogočili študij in prijateljem, ki so mi polepšali moja študentska leta.

Iskrena hvala vsem!