

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Aleksandra ZAJC

**PREŽIVETJE PROBIOTIČNIH BAKTERIJ MED FERMENTACIJO
IN SKLADIŠČENJEM FERMENTIRANEGA MLEKA**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**SURVIVAL OF PROBIOTIC BACTERIA DURING FERMENTATION
AND STORAGE OF FERMENTED MILK**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2008

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Mikrobiološki del je bil opravljen v mikrobiološkem laboratoriju Mlekarne Celeia v Arji vasi in v laboratorijih Katedre za mlekarstvo, Oddelka za zootehniko, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za živilstvo je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Ireno Rogelj, za somentorico dr. Bojano Bogovič Matijašič in za recenzentko prof. dr. Sonjo Smole Možina.

Delovno mentorstvo je v Mlekarni Celeia prevzela mag. Tanja Veselko Vinko, dr. vet. med.

Mentorica: prof. dr. Irena Rogelj

Somentorica: dr. Bojana Bogovič Matijašič

Recenzentka: prof. dr. Sonja Smole Možina

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Aleksandra ZAJC

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK UDK 637.146.1+637.146.3:579.24:577.2.08(043)=163.6
- KG probiotične bakterije/probiotični fermentirani mlečni izdelki/*Lactobacillus acidophilus*/*Lactobacillus casei*/*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* /rast probiotičnih bakterij med fermentacijo/preživetje probiotičnih bakterij med skladiščenjem/ klasična kultivacijska tehnika/molekularne metode/PCR
- AV ZAJC, Aleksandra
- SA ROGELJ, Irena (mentorica)/BOGOVIČ MATIJAŠIČ, Bojana (somentorica)/SMOLE MOŽINA, Sonja (recenzentka)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
- LI 2008
- IN PREŽIVETJE PROBIOTIČNIH BAKTERIJ MED FERMENTACIJO IN SKLADIŠČENJEM FERMENTIRANEGA MLEKA
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP XI, 75 str., 10 pregl., 23 slik, 9 pril., 66 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Ugotavljali smo preživetje treh deklariranih vrst probiotičnih bakterij, *Lactobacillus (L.) casei*, *L. acidophilus* in *Bifidobacterium animalis subsp. lactis (Bif. lactis)*, v šestih probiotičnih fermentiranih mlečnih izdelkih Mlekarnice Celeia. Tekom tehnološkega postopka izdelave in skladiščenja izdelkov smo izbrali sedem ključnih točk, na katerih smo vzorčili ter ugotavljali število živih mikroorganizmov s konvencionalno metodo štetja kolonij na selektivnih gojiščih. Z uporabo molekularne metode PCR na DNA, osamljeni iz kolonij, ki so zrastle na selektivnih gojiščih, pa smo potrdili prisotnost treh vrst probiotičnih bakterij. Ugotovili smo, da so se med fermentacijo najmanj namnožile bifidobakterije, najbolj pa bakterije vrste *L. acidophilus*. Skladiščenje je najmanj vplivalo na velikost populacije vrste *L. acidophilus*, saj se je število v povprečju zmanjšalo za 55 %, najbolj pa se je zmanjšalo število *Bif. lactis* (v povprečju za 83 %). Zadnji dan roka trajanja izdelka je skupno število živih probiotičnih bakterij v vseh analiziranih izdelkih presegalo 10^7 ke/g, kar ustreza kriterijem za fermentirane probiotične izdelke.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 637.146.1+637.146.3:579.24:577.2.08(043)=163.6
CX probiotic bacteria/probiotic fermented dairy products/growth of probiotic bacteria during fermentation/*L. acidophilus*/*L. casei*/*Bifidobacterium*/survival of probiotic bacteria during storage/classical cultivation technique/molecular method/PCR
AU ZAJC, Aleksandra
AA ROGELJ, Irena (supervisor)/BOGOVIČ MATIJAŠIĆ, Bojana (co-advisor)/SMOLE MOŽINA, Sonja (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
PY 2008
TI SURVIVAL OF PROBIOTIC BACTERIA DURING FERMENTATION AND STORAGE OF FERMENTED MILK
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XI, 75 p., 10 tab., 23 fig., 9 ann., 66 ref.
LA sl
AL sl/en
AB We examined the survival of three labeled species of probiotic bacteria, *Lactobacillus (L.) casei*, *L. acidophilus* in *Bifidobacterium animalis subsp. lactis (Bif. lactis)*, in six probiotic fermented milk products of Mlekarna Celeia. We chose seven main points along the technological process and storage of products in which the samples were taken for determination of viable counts by conventional methods using selective agar media. The presence of three species of probiotic bacteria was confirmed by PCR molecular method using DNA isolated from the colonies grown on selective media. We found out that during fermentation, the number of bifidobacteria increased the least, and the number of *L. acidophilus* the most. Also during storage, *L. acidophilus* cells were the least negatively affected, average reduction during storage was 55 %, while the survival of bifidobacteria was the worst (average reduction was 83 %). At the expiry day, the total number of viable probiotic bacteria in all analysed products exceeded 10^7 cfu/g, which meet the criteria for fermented probiotic products.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	II
KEY WORDS DOCUMENTATION.....	III
KAZALO VSEBINE	IV
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PRILOG	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	X
1 UVOD	1
1.1 NAMEN NALOGE IN DELOVNA HIPOTEZA	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 DEFINICIJA PROBIOTIKOV	3
2.2 FERMENTACIJA	4
2.3 PROBIOTIČNE BAKTERIJE	5
2.3.1 Laktobacili.....	6
2.3.2 Bifidobakterije	7
2.4 UPORABA PROBIOTIKOV – VPLIV NA ČLOVEŠKI ORGANIZEM.....	8
2.4.1 Črevesna mikroflora	8
2.4.2 Sožitje črevesne flore z organizmom gostitelja	10
2.4.3 Uporaba probiotikov	10
2.5 VARNOST PROBIOTIČNIH SEVOV.....	12
2.5.1 Rezistenca proti antibiotikom in odkrivanje virulentnih dejavnikov	14
2.5.2 Proučevanje možnih negativnih učinkov probiotikov.....	14
2.6 NAJMANJŠA KONCENTRACIJA PROBIOTIČNIH BAKTERIJ, KI JE POTREBNA ZA UGODEN UČINEK NA ČLOVEŠKI ORGANIZEM	15
2.7 METODE UGOTAVLJANJA PROBIOTIČNIH BAKTERIJ	16
2.7.1 Konvencionalna kultivacijska mikrobiološka tehnika.....	16
2.7.1.1 Gojišča za osamitev probiotičnih bakterij	17
2.7.1.1.1 Osamitev bifidobakterij.....	17
2.7.1.1.2 Osamitev Lactobacillus acidophilus.....	18
2.7.1.1.3 Osamitev Lactobacillus casei	18
2.7.2 Molekularne tehnike identifikacije probiotičnih bakterij	18
2.7.2.1 Princip delovanja metode PCR.....	20
3 MATERIAL IN METODE	22
3.1 IZVEDBA RAZISKAVE	22
3.2 MATERIAL	22
3.2.1 Vzorci fermentiranega mleka s probiotičnimi kulturami.....	22

3.2.2 Gojišča, raztopine in kemikalije	25
3.2.2.1 Tekoča gojišča in raztopine	25
3.2.2.1.1 Ringerjeva raztopina	25
3.2.2.1.2 Raztopina dikalijevega hidrogenfosfata	25
3.2.2.1.3 Puffer TAE (Tris acetatni puffer).....	26
3.2.2.1.4 Tekoče gojišče MRS.....	26
3.2.2.2 Trdna gojišča	26
3.2.2.2.1 Gojišče MRS.....	26
3.2.2.2.2 Gojišče MRS z dodanim klindamicinom (MRS + cly).....	26
3.2.2.2.3 Gojišče MRS z dodanim cisteinom in mešanico NNLP (MRS + NNLP) ..	27
3.2.3 Reagenti in encimi za izolacijo DNA, reakcijo PCR in gelsko elektroforezo	27
3.2.3.1 Reagenti za izolacijo DNA iz bakterij	27
3.2.3.2 Reagenti za pripravo mikroskopskega preparata.....	27
3.2.3.3 Reagenti za verižno reakcijo s polimerazo (PCR).....	28
3.2.3.4 Reagenti za ugotavljanje pomnožkov v agaroznem gelu	28
3.3 METODE	28
3.3.1 Ugotavljanje števila probiotičnih bakterij v fermentiranih mlečnih izdelkih	28
3.3.1.1 Statistične metode.....	29
3.3.2 Ugotavljanje morfoloških značilnosti kolonij probiotičnih bakterij na selektivnih gojiščih in mikroskopski preparati	29
3.3.3 Priprava DNA za izvedbo PCR	30
3.3.3.1 Postopek izolacije DNA iz posameznih kolonij s toplotno obdelavo in detergentom	30
3.3.3.2 Postopek izolacije DNA iz posameznih kolonij z uporabo komercialnega seta za izolacijo genomske DNA.....	30
3.3.4 Priprava reakcijske mešanice za PCR	31
3.3.5 Reakcija PCR	32
3.3.6 Dokazovanje pomnožkov z gelsko elektroforezo	32
4 REZULTATI	34
4.1 UGOTAVLJANJE ŠTEVILA PROBIOTIČNIH BAKTERIJ V FERMENTIRANIH MLEČNIH IZDELKIH TER POTRDITEV VRST PRISOTNIH PROBIOTIČNIH BAKTERIJ	34
4.1.1 Število probiotičnih bakterij v posameznih fermentiranih izdelkih	34
4.1.1.1 Statistična obdelava podatkov	43
4.1.2 Morfološki opis kolonij in probiotičnih bakterij	49
4.1.2.1 Morfološki opis kolonij na selektivnih gojiščih	49

4.1.2.2 Morfološki opis bakterij – barvanje po Gramu	50
4.1.3 Potrditev prisotnosti probiotičnih bakterij v vzorcih z metodo PCR.....	51
4.1.3.1 Potrditev probiotičnih bakterij vrste <i>L. casei</i>	52
4.1.3.2 Potrditev probiotične bakterije <i>L. acidophilus</i>	54
4.1.3.3 Potrditev probiotične bakterijske vrste <i>Bifidobacterium lactis</i>	56
5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	59
5.1 RAZPRAVA.....	59
5.1.1 Ugotavljanje števila deklariranih probiotičnih bakterij.....	59
5.1.2 Kvalitativno ugotavljanje prisotnosti DNA deklariranih bakterij z metodo PCR.....	64
5.2 SKLEPI.....	66
6 POVZETEK.....	67
5 VIRI	69
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Mikroorganizmi, ki jih uporabljajo kot probiotike	6
Preglednica 2: Podatki o izdelkih, izbranih za analize	23
Preglednica 3: Potek odvzema vzorcev	25
Preglednica 4: Selektivna gojišča in pogoji inkubacije za ugotavljanje števila probiotičnih mikroorganizmov	29
Preglednica 5: Začetni oligonukleotidi, uporabljeni v reakciji PCR in velikost specifičnih produktov	32
Preglednica 6: Protokoli izvedbe PCR za posamezno probiotično bakterijo	32
Preglednica 7: Rezultati ugotavljanja prisotnosti DNA deklariranih vrst bakterij v probiotičnih izdelkih	51
Preglednica 8: Rezultati specifične reakcije PCR za <i>L. casei</i>	53
Preglednica 9: Rezultati specifične reakcije PCR za <i>L. acidophilus</i>	55
Preglednica 10: Rezultati specifične reakcije PCR za <i>Bifidobacterium lactis</i>	57

KAZALO SLIK

Slika 1: Aparat za PCR.....	22
Slika 2: Analizirani izdelki: LC navadni probiotični jogurt (blagovna znamka), LCA sadni probiotični jogurt in LCA Vita.....	24
Slika 3: Molekularni označevalec dolžin pomnožkov DNA po gelski elektroforezi na agarozni	33
Slika 4: Število bakterij vrste <i>L. casei</i> v navadnem in sadnem izdelku LCA.....	35
Slika 5: Število bakterij vrste <i>L. acidophilus</i> v navadnem in sadnem izdelku LCA.....	36
Slika 6: Število bakterij vrste <i>Bifidobacterium lactis</i> v navadnem in sadnem izdelku LCA	37
Slika 7: Število bakterij vrste <i>L. casei</i> v navadnem in sadnem izdelku LC	38
Slika 8: Število bakterij vrste <i>L. acidophilus</i> v navadnem in sadnem izdelku LC	39
Slika 9: Število bakterij vrste <i>Bifidobacterium lactis</i> v navadnem in sadnem izdelku LC .	40
Slika 10: Število bakterij vrste <i>L. acidophilus</i> v navadnem izdelku LCA ACI in sadnem izdelku LCA VITA.....	41
Slika 11: Število bakterij vrste <i>Bif. lactis</i> v navadnem izdelku LCA ACI in sadnem izdelku LCA VITA.....	42
Slika 12: Primer obdelave podatkov z uporabo programa STATGRAPHICS Centurion XV.II za <i>L. casei</i>	44
Slika 13: Primer obdelave podatkov z uporabo programa STATGRAPHICS Centurion XV.II za <i>L. acidophilus</i>	46
Slika 14: Primer obdelave podatkov z uporabo programa STATGRAPHICS Centurion XV.II za <i>Bif. lactis</i>	48
Slika 15: Kolonije <i>L. casei</i> na gojišču MRS.....	49
Slika 16: Kolonije <i>L. acidophilus</i> na gojišču MRS + cly	49
Slika 17: Kolonije <i>Bif. lactis</i> na gojišču MRS + NNLP	50
Slika 18: <i>L. casei</i> - mikroskopski preparat obarvan z metodo po Gramu	50
Slika 19: <i>L. acidophilus</i> - mikroskopski preparat obarvan z metodo po Gramu	50
Slika 20: <i>Bif. lactis</i> - mikroskopski preparat obarvan z metodo po Gramu.....	51
Slika 21: Rezultati specifične reakcije PCR za vrsto <i>L. casei</i>	54
Slika 22: Rezultati specifične reakcije PCR za vrsto <i>L. acidophilus</i>	56
Slika 23: Rezultati specifične reakcije PCR za vrsto <i>Bifidobacterium lactis</i>	58

KAZALO PRILOG

- Priloga A1: Rezultati ugotavljanja števila probiotičnih bakterij v vzorcih navadnega in sadnega izdelka LCA (1) (180 g), odvzetih v različnih fazah tehnološkega postopka in med skladiščenjem
- Priloga A2: Rezultati ugotavljanja števila probiotičnih bakterij v vzorcih navadnega in sadnega izdelka LCA (2) (180 g), odvzetih v različnih fazah tehnološkega postopka in med skladiščenjem
- Priloga A3: Rezultati ugotavljanja števila probiotičnih bakterij v vzorcih navadnega in sadnega izdelka LCA (3) (180 g), odvzetih v različnih fazah tehnološkega postopka in med skladiščenjem
- Priloga A4: Rezultati ugotavljanja števila probiotičnih bakterij v vzorcih navadnega in sadnega izdelka LC (1) (150 g), odvzetih v različnih fazah tehnološkega postopka in med skladiščenjem
- Priloga A5: Rezultati ugotavljanja števila probiotičnih bakterij v vzorcih navadnega in sadnega izdelka LC (2) (150 g), odvzetih v različnih fazah tehnološkega postopka in med skladiščenjem
- Priloga A6: Rezultati ugotavljanja števila probiotičnih bakterij v vzorcih navadnega in sadnega izdelka LC (3) (150 g), odvzetih v različnih fazah tehnološkega postopka in med skladiščenjem
- Priloga A7: Rezultati ugotavljanja števila probiotičnih bakterij v vzorcih navadnega (LCA ACI 1; 500 g) in sadnega izdelka (LCA VITA 1; 500g), odvzetih v različnih fazah tehnološkega postopka in med skladiščenjem
- Priloga A8: Rezultati ugotavljanja števila probiotičnih bakterij v vzorcih navadnega (LCA ACI 2; 500 g) in sadnega izdelka (LCA VITA 2; 500g), odvzetih v različnih fazah tehnološkega postopka in med skladiščenjem
- Priloga A9: Rezultati ugotavljanja števila probiotičnih bakterij v vzorcih navadnega (LCA ACI 3; 500 g) in sadnega izdelka (LCA VITA 3; 500g), odvzetih v različnih fazah tehnološkega postopka in med skladiščenjem

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Kratica – okrajšava

ABT

ADP

AFLP

ATP

Bif.

bp

c-PCR

cfu

Chr. Hansen

cly

DNA

dNTP

Ent.

E. coli

EDTA

FAO

FDA

GALT

GRAS

ke

L.

LSD

MKB

MRS

n

NAD⁺

NNLP

P1

P2

PCR

Pomen

Komercialno sestavljena kultura iz *L. acidophilus* (LA-5), *B. lactis* (BB-12) in *Streptococcus thermophilus*

Adenozin di fosfat

Analiza polimorfizma dolžin pomnožkov

Adenozin tri fosfat

Bifidobacterium

Bazni par

Kompetitivna reakcija PCR

Colony Forming Unit

Christian Hansen

Klindamicin

Deoksiribonukleinska kislina

Mešanica nukleotidov

Enterococcus

Escherichia coli

Ethylenediaminetetraacetic acid

Food and Agriculture Organisation of the United Nations

Food and Drug Administrations

Galt associated lymphoid tissue (črevesni lokalni imunski sistem)

Generally Regarded As Safe (splošno priznано kot varno)

Kolonijske enote

Lactobacillus

Least significant difference (test najmanjše značilne razlike)

Mlečnokislinske bakterije

Gojišče de Man - Rogosa - Sharp

število

Nikotinamid adenin dinukleotid

Mešanica antibiotikov: Nalidixic acid, Neomycin sulphate, LiCl, Paromomycin sulphate

Primer (začetni oligonukleotid) 1

Primer (začetni oligonukleotid) 2

Polymerase Chain Reaction (verižna reakcija s polimerazo)

PFGE	Gelska elektroforeza v pulzirajočem polju
RAPD	Verižna reakcija s polimerazo z naključno izbranimi začetnimi oligonukleotidi
Real-time PCR	Metoda PCR v realnem času
RFLP	Analiza polimorfizma dolžin restrikcijskih fragmentov
RNA	Ribonukleinska kislina
rRNA	Ribosomska ribonukleinska kislina
rDNA	Gen za ribosomsko ribonukleinsko kislino
<i>Str.</i>	<i>Streptococcus</i>
TAE	Tris acetatni puffer
WHO	World Health Organization (svetovna zdravstvena organizacija)
Wizard® Genomic DNA Purification Kit	Komercialni kit za izolacijo genomske DNA
z.o.	Začetni oligonukleotidi

1 UVOD

Probiotični izdelki imajo že od nekdaj sloves zdravih proizvodov in predstavljajo pomemben del prehrane ljudi. Znano je, da probiotične bakterije pozitivno učinkujejo na črevesno mikrofloro in na gostitelja. V zadnjih treh desetletjih se veliko raziskovalcev na področju prehrane in zdravja ukvarja z vprašanjem, kako izboljšati zdravje ljudi z uživanjem živih mikroorganizmov, ki so jih poimenovali probiotiki (Holzapfel in sod., 1998).

V prehranskih izdelkih so najobičajnejše probiotične kulture mlečnokislinske bakterije in bifidobakterije. Gre predvsem za predstavnike dveh rodov, in sicer *Lactobacillus* (*L.*) in *Bifidobacterium* (*Bif.*). Med probiotičnimi laktobacili izstopajo predstavniki skupine *L. acidophilus* (*L. acidophilus*, *L. johnsonii*, *L. gasseri*) ter vrst *L. casei*, *L. rhamnosus* in *L. reuteri*. Med vrstami *Bifidobacterium* pa najpogosteje srečamo *Bif. bifidum*, *Bif. animalis* subsp. *lactis*, *Bif. longum* in *Bif. infantis* (Heller, 2001).

Povpraševanje po različnih izdelkih, ki vsebujejo probiotične bakterije, je vse večje. Tako je v fermentiranih mlečnih izdelkih osnovni jogurtovi kulturi, ki jo sestavljata *Streptococcus thermophilus* in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, pogosto dodana probiotična kultura, ki ni potrebna za fermentacijo mleka, ampak je njen glavni namen pozitivno učinkovanje na zdravje človeka (Hutkins, 2006).

Uživanje izdelkov, ki vsebujejo probiotične kulture, lahko vpliva na gostitelja posredno, preko spreminjanja sestave črevesne mikroflore, ali pa neposredno. Med pozitivnimi učinki na zdravje omenjajo vzdrževanje ravnotežne mikroflore v črevesju, lajšanje simptomov laktozne intolerance in povečanje odpornosti proti črevesnim patogenim bakterijam. Probiotiki lahko tudi preprečijo ali omilijo diarejo preko delovanja na imunski sistem organizma (De Roos in Katan, 2000). Seveda se je potrebno zavedati, da morajo biti vsi ti, domnevno koristni učinki uživanja izdelkov z izbranimi živimi mikroorganizmi, tudi dokazani v temeljitih raziskavah *in vitro* ter kliničnih študijah.

Izdelke, ki vsebujejo probiotične bakterije, uvrščajo v skupino funkcionalne hrane. To je hrana, ki poleg tega, da oskrbuje organizem z osnovnimi hranili, preprečuje obolenja oziroma prispeva k boljšemu zdravstvenemu stanju (Orel in Rogelj, 2001). Da pa bi probiotični izdelki izpolnili pričakovanja, morajo vsebovati zadostno količino živih probiotičnih bakterij vse do konca roka uporabnosti. Število probiotičnih bakterij ni predpisano z zakonodajo niti v Sloveniji niti v drugih državah, obstajajo pa priporočila, ki

so rezultat številnih raziskav širom po svetu. Najpogosteje omenjajo koncentracijo najmanj 10^7 ke/g izdelka.

Razen zadostnega števila živih probiotičnih bakterij je potrebno zagotoviti, da so v izdelkih resnično tiste vrste bakterij, ki so navedene s strani proizvajalca. Po tradicionalnem taksonomskem sistemu mlečnokislinske bakterije razvrščamo glede na njihove fenotipske lastnosti, kot so morfologija, način fermentacije glukoze, konfiguracija mlečne kisline, temperaturno območje rasti in sposobnost fermentacije različnih ogljikovih hidratov. Hibridizacijski testi DNA-DNA in DNA-RNA in primerjalne sekvenčne analize genov za 16S rRNA in 23S rRNA pa so pokazale odstopanja klasično postavljenih taksonov od filogenetske sorodnosti, ki jo odraža nukleotidno zaporedje izbranih odsekov genoma, npr. ribosomskih genov. To novo spoznanje je pripeljalo do velikih sprememb v taksonomiji številnih bakterijskih rodov in vrst, kar je potrebno upoštevati tudi pri identifikaciji probiotičnih bakterij. Tudi za slednje velja dejstvo, da številnih sevov ali celo vrst, kot so bakterije iz skupine *L. acidophilus*, *L. casei* ali iz rodu *Bifidobacterium*, ni možno razlikovati zgolj na osnovi fenotipskih lastnosti. Zaradi tega je potrebno uporabiti za identifikacijo tudi molekularne metode, saj le z njihovo pomočjo lahko zanesljivo ugotovimo pripadnost posamezni vrsti (Smole Možina in Jeršek, 2001).

Poglavitna prednost metod, ki vključujejo analizo DNA, je tudi, da je ta manj odvisna od okoljskih dejavnikov kot ostale sestavine mikrobnih celice. Zelo uporabna je metoda verižnega pomnoževanja s polimerazo – PCR (angl. Polymerase chain reaction). Ta omogoča *in vitro* encimsko pomnožitev krajšega odseka matrične, t.j. mikrobnih DNA na nekaj milijonkratno število v nekaj urah. To daje povsem nove razsežnosti uporabe genotipizacijskih molekularnih metod na mnogih uporabnih področjih, tudi pri študiju probiotičnih bakterij v funkcionalnih živilih in prebavnem traktu človeka (Smole Možina in Jeršek, 2001).

1.1 NAMEN NALOGE IN DELOVNA HIPOTEZA

Na trgu se pojavlja vse več t.i. funkcionalnih mlečnih izdelkov, ki vsebujejo probiotične bakterije s specifičnimi, zdravju koristnimi učinki. Probiotiki so živi mikroorganizmi, ki dokazano ugodno vplivajo na zdravje ljudi, če se jih zaužije v zadostni količini. Mikroorganizmi morajo zato imeti poleg zdravju koristnih funkcionalnih učinkov tudi primerne tehnološke značilnosti, predvsem sposobnost preživetja in ohranjanja aktivnosti med tehnološkim postopkom in skladiščenjem izdelka, do konca roka uporabnosti.

Namen naloge je bil ugotoviti število živih probiotičnih bakterij treh vrst pred fermentacijo, takoj po njej in med skladiščenjem izdelka, do izteka roka obstojnosti. V ta namen smo morali izbrati ustrezna selektivna gojišča ter s pomočjo molekularnih metod, na posameznih kolonijah, preveriti njihovo selektivnost. Želeli smo tudi oceniti spremembe sestave mikrobne populacije, ki nastane med fermentacijo. Predvidevali smo, da bo velikost mikrobne populacije probiotičnih bakterij ob koncu fermentacije večja od minimalno zahtevane za probiotične izdelke 10^7 ke/ml ter, da med skladiščenjem njihovo število ne bo padlo pod to raven. Slabše preživetje, oziroma večja nihanja v številu, smo pričakovali pri bifidobakterijah, ki so najobčutljivejše za kisik. Predpostavljali smo, da bodo probiotične bakterije dobro prestale pogoje skladiščenja predvsem prva dva tedna, znatnejše odmiranje pa smo pričakovali v izdelkih, hranjenih več kot dva tedna.

2 PREGLED OBJAV

2.1 DEFINICIJA PROBIOTIKOV

Izraz probiotik sta prvič uporabila Lilly in Stillwell leta 1965 za opis substanc, ki jih proizvaja en mikroorganizem in stimulirajo rast drugih mikroorganizmov. Izraz izvira iz izraza »pro bios«, kar v prevodu pomeni za življenje. Kasneje so probiotike definirali na različne načine, odvisno od načina razumevanja mehanizmov njihovega delovanja na zdravje ljudi in koristi za človeka (Ouwehand in sod., 1999).

Parkerjeva definicija iz leta 1974 pravi, da so probiotiki organizmi in snovi, ki prispevajo k črevesnemu mikrobemu ravnotežju. To definicijo je preoblikoval Fuller leta 1989 v »živ mikrobní dodatek h krmi, ki ugodno vpliva na žival gostiteljico, z izboljšanjem njenega črevesnega ravnotežja«. Definicija probiotikov je bila dolgo omejena le na uporabo v živalski prehrani, in šele leta 1991 se je po predlogu Huis in't Velda in Havenaarja le ta razširila tudi na humano prehrano. Njuna definicija se je glasila, da je probiotik mono ali mešana kultura živih mikroorganizmov, ki učinkujejo koristno na človeka ali žival z izboljšanjem lastnosti obstoječe (lastne) mikroflore. Ta definicija je prispevala k razvoju koncepta probiotikov v različnih smereh, saj probiotično aktivnost ne omejuje samo na mikrofloro črevesa, temveč vključuje tudi aplikacijo na druge mikrobne združbe, npr. v respiratornem traktu, urogenitalnem traktu, na koži (Rogelj, 2001).

Probiotike zaradi njihovega vpliva na zdravje uvrščamo tudi v skupino funkcionalne hrane. Upošteevajoč slednje so leta 1998 spremenili definicijo probiotikov v »žive mikroorganizme, ki zaužiti v določenem številu učinkujejo ne samo na osnovno

prehrano/metabolizem, temveč imajo tudi zdravstvene učinke« (Guarner in Schaafsma, 1998).

V novi generaciji funkcionalnih izdelkov je postala pomembna hrana z dodanimi probiotičnimi bakterijami in prebiotiki, fermentirani mlečni izdelki pa prav gotovo eni izmed najbolj eminentnih predstavnikov te skupine (Rogelj, 2001).

2.2 FERMENTACIJA

Fermentacija, ki v biotehnologiji pogosto pomeni rast mikroorganizmov na določenem rastnem mediju ne glede na njihov metabolizem, je v ožjem pomenu besede metabolna (katabolna) pot, pri kateri pride do sproščanja energije brez zunanjega prejemnika elektronov, kot je denimo kisik pri aerobni respiraciji. Namesto tega se elektroni na koncu kaskade reakcij, med katerimi je nastajal ATP, prenesejo na enega od produktov prav te kaskade reakcij. Končni stranski produkti imajo še vedno veliko energije (neprimerno več kot denimo CO₂ in H₂O, ki nastaneta ob aerobni respiraciji), proizvedene energije je relativno malo in rast je počasna vendar pa takšen metabolizem omogoča neodvisnost od zunanjih prejemnikov elektronov. Mlečnokislinsko fermentacijo vodijo mlečnokislinske bakterije. Pri tem procesu je glavni prejemnik elektronov piruvat, iz katerega v seriji reakcij nastane mlečna kislina (Yim in Glover, 2003).

Mlečnokislinska fermentacija nastaja po reakciji: C₆H₁₂O₆ (glukoza) + 2NAD⁺ + 2ADP + 2Pi (fosfatna skupina) → 2C₃H₆O₃ (mlečna kislina) + 2NAD⁺ + 2ATP

Najobsežnejša skupina bakterij, ki so udeležene pri fermentaciji hrane, so brez dvoma mlečnokislinske bakterije, ki igrajo vodilno vlogo tudi pri fermentaciji mlečnih izdelkov. Skupino mlečnokislinskih bakterij sestavlja 13 rodov po Gramu pozitivnih bakterij: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Paralactobacillus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* in *Weissella* (Jay in sod., 2005).

Kluyver in Donker sta že leta 1924 razdelila mlečnokislinske bakterije v dve skupini, in sicer glede na končni produkt metabolizma glukoze. Tiste bakterije, ki proizvajajo pri fermentaciji glukoze kot glavni produkt mlečno kislino, sta poimenovala homofermentativne bakterije, druge, ki poleg mlečne kisline proizvajajo še ogljikov dioksid in etanol, pa heterofermentativne (Jay in sod., 2005).

2.3 PROBIOTIČNE BAKTERIJE

Da lahko posamezni bakterijski sev označimo za probiotičnega, mora zadostiti nekaterim zahtevam. Prvi pogoj za pozitivno delovanje seva v prebavnem traktu je, da le ta preživi prehod do črevesa in ga vsaj začasno naseli. Odpornost proti nizkim vrednostim pH (prehod skozi želodec) in žolču je zato zelo pomembna lastnost. Ker morajo probiotični sevi, ki prispejo do črevesa, v tem mikrobno zelo naseljenem okolju uspešno tekmovati za življenjski prostor, sta zaželeni tudi sposobnost vezave na črevesno sluznico ter proizvodnja protimikrobnih snovi. Ne glede na to, ali bomo probiotik uporabili kot prehranski dodatek ali zdravilo, mora njegova izbira sloneti na natančno določenih selekcijskih kriterijih, ki vključujejo razen že omenjenih lastnosti tudi ugotavljanje varnosti in kliničnih učinkov (Klaenhammer in Kullen, 1999; Saarela in sod., 2000).

Pri ugotavljanju varnosti seva je možnih več pristopov: proučevanje z varnostjo povezanih lastnosti seva in vitro, farmakokinetike in interakcij med probiotičnim sevom in gostiteljem. Poznavanje procesov preživetja v prebavnem traktu, translokacije in kolonizacijskih lastnosti ter narave in aktivnosti metabolitov, so pomembni pri ugotavljanju tako pozitivnih kot tudi možnih negativnih učinkov. Posebno pozornost je potrebno posvetiti tudi proučevanju možnega prenosa genskega materiala med bakterijami mikrobne združbe (transdukcija, konjugacija, transformacija). Plazmidi z geni za odpornost proti antibiotikom se pri laktobacilih in bifidobakterijah redko prenašajo, izjema pa so enterokoki, pri katerih se prenašajo pogosteje. Pomembno je torej ugotoviti odpornost probiotičnih bakterij proti antibiotikom in prenosljivost determinant za odpornost proti klinično pomembnim antibiotikom, če jih probiotiki imajo, na patogene bakterije (Rogelj in Perko, 2003).

Med pomembne selekcijske kriterije za probiotične bakterije spada tudi sposobnost le teh, da se vežejo na črevesno površino. To je pogoj za vsaj začasno kolonizacijo črevesa. Vezava je pomembna tudi pri stimulaciji imunskega sistema, saj omogoča probiotični bakteriji kontakt z limfoidnim tkivom debelega črevesa, ki je posrednik tako lokalnih kot tudi sistemskih imunskih odgovorov. Do nedavnega je veljalo, da samo adhezivne bakterije učinkovito inducirajo imunski odgovor in stabilizirajo črevesno zaščito, vendar nove raziskave komunikacij med bakterijami in črevesnim epitelom kažejo na to, da adhezija ni vedno nujno potrebna (Rogelj in Perko, 2003). Adhezija pa v vsakem primeru daje boljše možnosti za tekmovanje in selektivno izločanje patogenih bakterij s črevesne površine (Ouweland in sod., 1999; Saarela in sod., 2000).

Sev, ki ga želimo uporabiti v fermentiranih izdelkih in v prehranskih dodatkih, mora tudi preživeti tekom samega tehnološkega postopka, med skladiščenjem in distribucijo, do končnega potrošnika. To mu omogočajo nekatere pomembne tehnološke lastnosti, kot so primernost za gojenje, odpornost proti toploti, proti zamrzovanju ter podobno. Dodajanje probiotičnega seva ne sme negativno vplivati na senzorične lastnosti izdelka. Sev mora biti genetsko stabilen (Rogelj in Perko, 2003).

Probiotični mikroorganizmi, ki se najpogosteje pojavljajo v prehranskih izdelkih, pripadajo predvsem dvema rodovoma, in sicer *Lactobacillus* in *Bifidobacterium*. Delno je to posledica njihove tradicionalne povezave s fermentirano hrano in z zdravjem, naravne prisotnosti v prebavnem traktu in, tudi tako imenovanega statusa GRAS (Generally Regarded as Safe), ki jim daje sloves »varnih« mikroorganizmov, saj jih ljudje v fermentirani hrani uživajo že tisočletja (Rogelj in Perko, 2003). V spodnji preglednici so prikazane različne vrste bakterij, ki jih uporabljajo kot probiotike (Gardiner in sod., 2002).

Preglednica 1: Mikroorganizmi, ki jih uporabljajo kot probiotike (Gardiner in sod., 2002)

Laktobacili	bifidobakterije	enterokoki	ostali
<i>L. acidophilus</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. casei</i> <i>L. rhamnosus</i> <i>L. delbrueckii</i> spp. <i>bulgaricus</i> <i>L. fermentum</i> <i>L. johnsonii</i> <i>L. gasseri</i> <i>L. salivarius</i> <i>L. reuteri</i>	<i>Bif. bifidum</i> <i>Bif. infantis</i> <i>Bif. adolescentis</i> <i>Bif. longum</i> <i>Bif. breve</i> <i>Bif. lactis</i>	<i>Ent. faecium</i> <i>Ent. faecalis</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i> <i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>lactis</i> <i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>cremoris</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Propionbacterium freudenreichii</i> <i>Pediococcus acidilactici</i> <i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Escherichia coli</i>

2.3.1 Laktobacili

Laktobacili predstavljajo enega med najpomembnejšimi rodovi mlečnokislinskih bakterij, saj so tako razširjeni v naravi kakor tudi industrijsko uporabni v živilstvu. Gre za po Gramu pozitivne, dolge ali kokoidne, negibljive in nesporogene palčke. Imajo specifično lastnost, da lahko v okolju z nizko vrednostjo pH postanejo po Gramu negativne (Adamič in sod., 2003). Ne vsebujejo porfirinov in citokromov, nimajo transportne verige elektronov, energijo pa pridobivajo izključno s fermentacijo sladkorjev. Glede odnosa do kisika so aerotolerantni anaerobi. Prehransko spadajo med bolj zahtevne mikroorganizme, saj poleg fermentabilnih sladkorjev potrebujejo mnoge rastne dejavnike, kot so aminokisliline, vitamini in organske baze. Laktobacili se lahko razmnožujejo pri temperaturah od 2 °C do 35 °C (odvisno od vrste), optimum je med 30 °C in 40 °C. Rastejo

pri vrednostih pH od 3 do 7, minimalna vrednost a_w za rast je okoli 0,9. Glede na končne produkte presnove jih delimo v dve skupini:

- homofermentativne: pri teh je končni produkt razgradnje glukoze mlečna kislina in
- heterofermentativne: iz glukoze tvorijo mlečno in očetno kislino ter ostale produkte, npr. ogljikov dioksid.

Njihovo nahajališče je v okoljskih nišah, kjer so prisotna različna hranila, med drugim v surovinah rastlinskega in živalskega izvora. S stališča uporabnosti so pomembne predvsem naslednje vrste: *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, subsp. *bulgaricus* in subsp. *lactis*, *L. kefir* (oz. *kefiranofaciens*), *L. xylous*, *L. helveticus*, *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. casei* in *L. acidophilus*. *L. casei* in *L. acidophilus* sta vrsti, ki sta splošno znani kot probiotični (Adamič in sod., 2003).

L. acidophilus je vrsta, ki ima sposobnost tvorbe različnih protimikrobnih snovi, tudi bakteriocinov. Le ti povečajo imunsko odpornost proti glivam, kot je *Candida albicans* in škodljivim bakterijskim vrstam, kot so *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* in vrste rodu *Salmonella*. Probiotični sev *L. casei* YIT 0003 deluje zaščitno proti listerijam (Myers, 2006).

LA-5 je komercialno ime za bakterijski sev vrste *Lactobacillus acidophilus*. Ime je zaščiteno s strani proizvajalca Chr. Hansen. Gre za mikroaerofilno kulturo, ki počasi raste v mleku. Laktozo pretvarja v D-mlečno kislino. Optimalna temperatura rasti LA-5 je od 37 do 40 °C (Chr. Hansen Company, 2001). S strani proizvajalca je priporočeno, da se kultura cepi v koncentraciji, ki jo želimo v končnem proizvodu.

2.3.2 Bifidobakterije

Bifidobakterije običajno naseljujejo gastrointestinalni trakt človeka in živali. Med bifidobakterijami imajo najširši spekter uporabe vrste *Bif. longum*, *Bif. animalis* in *Bif. Bifidum* (Mullan, 2002). Kljub temu, da proizvajajo mlečno kislino, jih filogenetsko ne uvrščajo med mlečnokislinske bakterije. Rod *Bifidobacterium* uvrščajo v podskupino *Actinomyces*, med po Gram-pozitivne evbakterije (Mullan, 2002). Bifidobakterije so v glavnem po Gramu pozitivne in imajo specifičen videz, saj so pod mikroskopom vidne kot palčke, običajno v obliki »kija«. Lahko pa se pojavijo tudi številne druge razvejane oblike, izmed katerih je bolj prepoznavna oblika črke »Y«. Bifidobakterije spadajo med obvezno anaerobne bakterije, zato moramo med kultivacijo zagotoviti anaerobne pogoje. Njihova optimalna temperatura za rast se giblje od 37 do 41 °C in območje vrednosti pH med 6,5 do 7,0 (Mullan, 2002).

Bifidobakterije proizvajajo iz laktoze tako mlečno (L- izomero) kot tudi očetno kislino.

V človeškem debelem črevesu se nahajajo v koncentraciji $10^8 - 10^9$ celic na gram vsebine, kar jih tudi uvršča med najpomembnejše organizme črevesne flore. Nahajajo se tudi v črevesju živali in v drugih ekoloških nišah (Adamič in sod., 2003). Za vrsto *Bif. bifidum* je značilno, da zavira rast škodljivih bakterij iz rodov *Salmonella*, *Listeria*, *Shigella* in drugih. Bakterijski vrsti *E. coli* in *Clostridium perfringens* na primer inhibira tako, da porabi snovi, kot so npr. železovi ioni, ki so nujno potrebne za njihovo rast. Sevi vrste *Bif. bifidum* so sposobni sintetizirati nekatere vitamine in sodelujejo pri absorpciji mineralov, kot so kalcij, magnezij in cink (Myers, 2006).

Bb-12 je komercialno ime za bakterijski sev iz rodu *Bifidobacterium*, vrste *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*. Ime je zaščiteno s strani proizvajalca Chr. Hansen. Sev Bb-12 je anaeroben in zelo počasi raste v mleku. Pretvarja laktozo v L-mlečno kislino (Chr. Hansen Company, 2001). Bb-12 je zelo stabilen sev in ima visoko odpornost proti kislinam ter produktom fermentacije. Optimalna temperatura za rast Bb-12 je od 37 do 40 °C. Priporočeno je, da se kultura cepi v mleko v takšni koncentraciji, kot jo želimo v končnem izdelku. (Chr. Hansen Company, 2001).

2.4 UPORABA PROBIOTIKOV – VPLIV NA ČLOVEŠKI ORGANIZEM

2.4.1 Črevesna mikroflora

V prebavnem sistemu ljudi in živali so pogoji, ki predstavljajo ugodno življenjsko okolje za številne mikroorganizme. Preden so bile na voljo najsodobnejše molekularne metode, ki omogočajo tudi zaznavanje mikroorganizmov, ki jih ne moremo kultivirati, je veljalo, da črevesno floro tvori okoli 400 različnih vrst bakterij. Po novejših ocenah pa naj bi jih bilo čez 1000 (Egert in sod. 2006).

Glede odnosa do organizma gostitelja delimo mikroorganizme, ki sestavljajo t.i. črevesno mikrofloro, na nepatogene, oportunistične in patogene. Največ mikroorganizmov v prebavni cevi človeka je nepatogenih. Ti žive v mirnem in pogosto obojestransko koristnem sožitju. Črevesni imunski sistem je proti njim razvil stanje imunske tolerance, zato so s strani gostitelja zaščiteni. Oportunistične (potencialno patogene) mikroorganizme pri zdravem gostitelju nadzoruje črevesni imunski sistem, pri čemer mu pomagajo tudi drugi nespecifični zaščitni dejavniki. Zato jih lahko najdemo v črevesu zdravih oseb, ne da bi povzročali klinično sliko okužbe. Če pa pri posamezniku zaščitna vloga imunskega odziva s kakršnega koli vzroka oslabi, povzročijo oportunistične bakterije okužbo. Tretja

skupina, ki prav tako lahko naseljuje prebavni trakt, so patogene bakterije. Le te, v primeru navzočnosti v črevesu, povzročijo okužbo (vnetje) pri vsakem, tudi imunsko sposobnem posamezniku. V črevesu zdravih ljudi teh patogenih bakterij načeloma naj ne bi bilo. Obstaja tudi stanje prenašalstva, pri tem ima posameznik v črevesu prisotne patogene mikroorganizme, vendar ne zboli z znaki okužbe ali vnetja (Orel in Rogelj, 2001).

V želodčni vsebini je zaradi kislega okolja in posledično nizke vrednosti pH manj bakterij kot v ostalih delih. Salminen in sod. (1998) navajajo, da se število v gramu vsebine giblje pod 10^3 bakterij. Relativno majhno število bakterij je prisotnih v začetnih delih ozkega črevesa (10^4 bakterij/g). Bakterijsko razrast preprečujeta visoka koncentracija žolča in encimov trebušne slinavke ter hitro premikanje črevesne vsebine zaradi močne peristaltike. Veliko večja je gostota bakterij v vsebini ileuma ($10^6 - 10^7$ bakterij/g) in zlasti širokega črevesa ($10^{11} - 10^{12}$ bakterij/g).

Med bakterijami, ki prevladujejo v črevesu, so predvsem nesporogene anaerobne bakterije rodov *Bacteroides*, *Bifidobacterium* in *Eubacterium*. Manj je sporogenih rodov, med katerimi najdemo tudi potencialno patogene bakterije rodu *Clostridium*. Med anaerobnimi bakterijami so pomembni tudi rodovi kokoidnih bakterij – *Peptostreptococcus*, *Ruminococcus*, *Sarcina* in *Megasphaera*. Najdemo tudi predstavnike rodov *Streptococcus* in *Lactobacillus*, ki spadajo glede tolerance do kisika med fakultativne anaerobe. Pomembne so tudi po Gramu-negativne enterobakterije, kot so *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter* itd. (Orel in Rogelj, 2001).

V različnih življenjskih obdobjih je črevesna flora spremenjena in raznolika. Novorojenec ima sterilno črevo in normalna mikroflora, ki se ustvari v njem, pride od matere in okolja. Mikroflora ima tri poglavitne naloge: zmanjšuje možnost okužbe s patogenimi klicami, spodbuja zorenje črevesnega imunskega sistema in spodbuja razvoj imunske tolerance na ubikvitarne antigene, kot so antigeni nepatogenih črevesnih bakterij in antigeni iz hrane. Pri novorojencu črevo najprej kolonizirajo aerobne bakterije, kot so enterobakterije, streptokoki in stafilokoki, saj ima prvotno mikrookolje pozitiven redoks potencial, kar ustreza rasti in razmnoževanju le teh. Ko pa se aerobni mikroorganizmi v nekaj dneh do tednih namnožijo v dovoljšnji meri, da porabijo ves dostopen kisik, nastopi negativen redoksn potencial, ki ponuja ugodne pogoje za rast in razmnoževanje anaerobnih mikroorganizmov iz rodov bifidobakterij, bakteroidov in klostridijev. Slednji so v črevesu odraslih redko zastopani (Orel in Rogelj, 2001).

Prehrana je eden izmed ključnih dejavnikov za razvoj normalne mikroflore novorojenca. Na kasnejšo sestavo črevesne mikroflore pa vplivajo poleg prehrane še stres, uživanje

zdravil in drugi okoljski dejavniki. V določenih okoliščinah lahko pride po porušenja mikroflore in to vodi v začetek bolezni.

2.4.2 Sožitje črevesne flore z organizmom gostitelja

Mikroorganizmi, ki sestavljajo endogeno črevesno floro, presnavljajo ostanke hrane in snovi, ki jih v prebavni sistem izloča telo. Produkti njihove presnove so lahko za gostitelja koristni ali pa toksični. Glavni končni produkti bakterijske fermentacije so kratkoverižne maščobne kisline in številni plini, kot so metan in ogljikov dioksid, pa tudi potencialno toksične in karcinogene snovi, kot so fenoli, indoli, amini itd. (Orel in Rogelj, 2001).

Črevo je zelo odprt ekosistem in njegovi obrambni mehanizmi morajo biti sposobni razlikovati normalno simbiotsko črevesno mikrofloro od patogenih bakterij. Le tako lahko na učinkovit način vzdržujejo konstantno endogeno okolje s tem, da razvijejo do predstavnikov avtohtone črevesne flore imunsko toleranco, proti potencialno patogenim bakterijam pa spodbude imunski odziv. Avtohtone bakterijske skupnosti ščitijo svoj življenjski prostor pred zunanjimi vdori snovi, ki nanje delujejo toksično. Tako tudi črevesni imunski sistem (GALT) gostitelju pomaga pri ohranjanju stabilnosti mikroflore. Vse mehanizme, ki branijo novim bakterijam, da bi postale del endogene črevesne flore, imenujemo kolonizacijska odpornost (Orel in Rogelj, 2001).

2.4.3 Uporaba probiotikov

Ob pregledu strokovne literature je mnogo podatkov o uporabi probiotikov za varovanje zdravja in pri zdravljenju različnih vrst bolezni. Uporaba le teh sega že daleč v zgodovino, saj je že Plinij v prvem stoletju pred našim štetjem pisal o uporabi izdelkov iz fermentiranega mleka pri zdravljenju driske. Šele kasneje je razvoj mikrobiologije privedel do prvih znanstvenih raziskav o uporabi probiotikov. Metchnikoff je leta 1907 ugotovil, da laktobacili iz jogurta zmanjšajo število bakterij, ki izdelujejo toksine v črevesu. Tissier je leta 1906 priporočal bifidobakterije otrokom, ki so imeli drisko. Rettger in Cheplin sta leta 1921 svetovala uporabo črevesnih izolatov *Lactobacillus acidophilus*, ki naj bi imeli terapevtske učinke na prebavo (Orel in Rogelj, 2001).

Mattila-Sandholm in sod. (1999) navajajo med najbolj raziskanimi probiotičnimi bakterijskimi sevi naslednje: *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus casei* Shirota, *Lactobacillus johnsonii* LJ-1, *Lactobacillus acidophilus* La-5, *Lactobacillus reuteri* ATCC

55730, *Lactobacillus plantarum* DSM 9843, *Bifidobacterium lactis* Bb-12 in *Enterococcus (Ent.) faecium* SF68.

Več kontroliranih randomiziranih študij je dokazalo koristen učinek probiotikov in fermentiranih mlečnih izdelkov pri zdravljenju gastroenteritisa. Po navajanju Kaila in sod. iz leta 1995 uživanje določenih probiotikov dokazano zmanjšuje obolevnost za gastroenteritisom, vendar poudarjajo, da so določeni probiotiki učinkoviti le pri določenih vrstah črevesnih okužb. Tako je po navedbah Alander-ja in sod. iz leta 1999 *Lactobacillus rhamnosus* GG, za katerega je dokazano, da vsaj začasno naseli debelo črevo, za približno polovico skrajšal trajanje rotavirusne driske, skrajšal čas potrebne hospitalizacije in pospešil pridobivanje na teži, po prebolelem gastroenteritisu. *Bifidobacterium bifidum* in *Streptococcus thermophilus* sta se v dvojno slepi kontrolirani študiji s placebom izkazala za učinkovita pri preprečevanju širjenja rotavirusnih okužb med otroci v bolnišnici (Orel in Rogelj, 2001).

Veliko raziskav je bilo narejenih na uporabi probiotikov pri preprečevanju in zdravljenju drisk, ki so posledica zdravljenja z antibiotiki. Po poročanju Elmerja in sod. iz leta 1996 se driska pojavi kot stranski učinek pri 20 odstotkih bolnikov, ki se zdravijo z antibiotiki. Pojav driske pripisujejo uničenju normalne črevesne flore in s tem zmanjšanju naravne obrambe pred patogenimi klicami ter zmanjšani fermentacijski zmogljivosti flore v črevesu. Najhujše driske, zaradi vnetja debelega črevesa ob jemanju antibiotikov, povzročata okužbi s *Clostridium difficile* in *Klebsiella oxytoca*. Kot najuspešnejši probiotik pri zdravljenju okužb s *Clostridium difficile* se je izkazala gliva *Saccharomyces boulardii*, ki naj bi zmanjšala razrast klostridijev, koncentracijo klostridijskih toksinov in sekrecijo v črevesu (Elmer in sod., 1996). Rezultati šestih randomiziranih, kontroliranih poskusov, ki so vključevali populacijo 766 otrok pri ugotavljanju učinkovitosti probiotikov za preprečevanje drisk, ki so posledica antibiotikov in njihovega delovanja, so pokazali, da uporaba probiotikov, v primerjavi s placebom, zmanjša tveganje za drisko iz 28,5% na 11,9%. Najbolj pozitivne učinke pripisujejo vrstam *Bif. lactis*, *Streptococcus thermophilus* in *L. rhamnosus* GG (Saavedra, 2007).

Poskusi na živalih kažejo, da nekateri probiotiki pospešujejo celjenje želodčnih razjed. Učinek teh bakterij naj bi temeljil na spodbujanju imunskega sistema k izločanju rastnih faktorjev in citokinov, ki ščitijo sluznico in pospešujejo celjenje. Najmočnejši spodbujevalci naj bi bili polisaharidi bakterijske stene (Nagaoka in sod., 1994).

Nekaterim probiotičnim bakterijam pripisujejo aktivnosti pri preprečevanju tumorjev. Črevesna flora vpliva na nastanek črevesne karcinogeneze, ki je pospešena s strani

mikrobnih encimov kot so β -glukuronidaza, β -glukozidaza, nitroreduktaza in ureaza, ki pretvarjajo prokarcinogene spojine v karcinogene. Eksperimenti, narejeni na živalih, so pokazali, da ima nekaj sevov *L. acidophilus* in *Bifidobacterium* spp. sposobnost znižati koncentracijo teh encimov, ki lahko aktivirajo te prokarcinogene snovi in tako posredno zmanjšujejo možnost razvoja tumorjev (Gomes in Malcata, 1999).

Znano je, da večina ljudi z laktozno intoleranco dobro prenaša jogurt in sorodne fermentirane mlečne izdelke. Vzrokov za to je več. Bakterije v teh izdelkih vsebujejo encim β -galaktozidazo, ki s svojo aktivnostjo lahko nadomesti pomanjkanje tvorbe tega encima v črevesu. Najboljši učinek je tako možno doseči z živimi bakterijami, ki s svojo steno zaščitijo encim pred delovanjem želodčne kisline. Encim se sprosti v dvanajstniku pod vplivom delovanja žolčnih kislin in doseže največjo koncentracijo na mestu svojega fiziološkega delovanja, v tankem črevesu. Počasnejše praznjenje želodca in zmanjšana hitrost črevesne pasaže tudi omogočijo boljšo prebavo laktoze z β -galaktozidazo in zmanjšajo osmotsko obremenitev z neprebavljeno laktozo (Orel in Rogelj, 2001).

Probiotiki imajo dokazan učinek tudi pri alergijskih boleznih. Študije, v katerih so dojenčke z atopijskim dermatitisom hranili z otroško hrano, kateri je bila dodana probiotična bakterija *L. rhamnosus* GG, so pokazale izboljšano sliko bolezenskega stanja v primerjavi s tistimi dojenčki, ki probiotikov niso prejeli (Saavedra, 2007)

De Vrese in sod. (2001) navajajo, da dolgotrajno uživanje laktoze, mlečne kisline in bakterij, ki se nahajajo v fermentiranem mleku, spremeni vrednost pH in druge značilnosti črevesnega mikrookolja ter črevesno mikrofloro, s tem pa fermentacijo neprebavljene laktoze ter prag občutljivosti bolnika. Tako izboljša simptomatiko laktozne intolerance.

2.5 VARNOST PROBIOTIČNIH SEVOV

Pri ugotavljanju varnosti probiotičnega seva je potrebno upoštevati več vidikov: intrinzične karakteristike seva, farmakokinetiko in interakcije med probiotičnim sevom in gostiteljem (Rogelj in Bogovič, 2004).

V okviru raziskovanja varnosti probiotičnih sevov je pomembna točka ta, da se ugotovi vse pozitivne kot tudi možne negativne učinke sevov, zato je ključno poznati preživetje bakterij v prebavnem traktu, translokacijo, kolonizacijske lastnosti ter naravo in aktivnost njihovih metabolitov. Na osnovi literaturnih podatkov lahko ugotovimo, da so predstavniki posameznih vrst MKB včasih vpleteni v infekcije pri ljudeh, kot so endokarditis, bakteremije in infekcije sečil. Najpogosteje so bili od MKB iz kliničnih vzorcev izolirani

enterokoki, ki so po nekaterih podatkih odgovorni za 5-15 % endokarditisov (Adams, 1999), poleg tega pa tudi nekateri predstavniki laktobacilov, predvsem iz vrst *Lactobacillus rhamnosus*, *L. casei* ali *L. paracasei*. Iz večine raziskav je razvidno, da se z izjemo enterokokov pojavljajo MKB kot povzročiteljice infekcij zelo redko in pri zelo posebnih pogojih (imunska oslabelelost, kronične bolezni, kirurški posegi, slaba zobna higiena, želodčne ali črevesne lezije), poleg tega pa nikoli kot edini povzročitelj. Kljub temu pa dejstva, da so v posameznih primerih bile izolirane iz kliničnih vzorcev, ne moremo spregledati (Rogelj in Bogovič, 2004).

V okviru obsežnega evropskega raziskovalnega projekta z naslovom »Bio-safety evaluation of probiotic lactic acid bacteria used for human consumption«, ki je potekal v letih 2002-2006, so potekale obsežne raziskave o varni uporabi probiotičnih MKB za humano uživanje z namenom izdelati priporočila/predloge za oblikovanje kriterijev, standardov, zakonodaje ter postopkov in standardiziranih metodologij za testiranje varnosti probiotikov pred prehodom na tržišče in njegove biovarnosti na tržišču (Rogelj in Bogovič, 2004). Cilji raziskave so bili naslednji:

taksonomski opis probiotičnih in ostalih MKB,

odkrivanje rezistence in ugotavljanja horizontalnega prenosa genov za rezistenco proti antibiotikom pri MKB,

odkrivanje znanih in možnih virulentnih faktorjev pri MKB,

ugotavljanje možnih negativnih učinkov MKB na imunski sistem,

ugotavljanje preživetja, kolonizacije in genetske stabilnosti probiotičnih MKB v črevesu.

Raziskave, ki so potekale predvsem na varnosti probiotičnih sevov, so zajemale taksonomski opis probiotičnih in ostalih MKB, ki so dokazano varne za humano uporabo. Projektna skupina je pripravila kolekcijo varnih probiotikov in mlečnokislinskih bakterij humanega izvora, ki obsega kar 907 vrst teh, vključno z 320 prehranskimi izolati (večina od njih ima probiotične lastnosti) in 580 izolati iz »sterilnih« področij (n=339) in blata (n=241). Vrste, ki so jih raziskovali, so v večini pripadale rodovom *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Propionibacterium* in *Streptococcus*. Velja omeniti, da so bili donatorji teh vrst predvsem javne ustanove, ki proizvajajo probiotične kulture, podjetja, vključena v distribucijo in produkcijo probiotikov ter privatni zbiratelji. V okviru projekta so bile analizirane tudi vrste probiotičnih bakterij, ki se nahajajo v komercialno dostopnih izdelkih in v njih izstopata predvsem rodova *Lactobacillus* in *Bifidobacterium* (Vankerckhoven in sod., 2004).

2.5.1 Rezistenca proti antibiotikom in odkrivanje virulentnih dejavnikov

Za probiotične seve je zaželeno, da ne vsebujejo v svojih genih informacije za rezistenco proti nekaterim glikopeptidnim antibiotikom (vankomicin, teicoplanin), ki so zadnja rešitev v primeru odpovedi penicilinskih antibiotikov. V primeru, da je pri sevu ugotovljena rezistenca proti antibiotiku, pa mora biti dokazano, da ne more priti do prenosa s konjugacijo (Eaton in Gasson, 2001).

V povezavi z rezistenco proti antibiotikom in virulentnostjo je mnogo raziskav potekalo prav na rodu *Enterococcus*, kjer je bilo tudi potrjenih več primerov rezistence, ter tudi prenosa *in vitro*. Vendar so strokovnjaki kljub temu mnenja, da enterokokov nima smisla popolnoma izključiti iz aplikacije kot starterskih kultur ali probiotikov, saj so prisotni povsod. Posebno pozornost pa je vsekakor potrebno nameniti ugotavljanju prisotnosti virulentnih dejavnikov in rezistence proti antibiotikom, še posebno v smislu tveganja za prenos virulentnih faktorjev ali rezistence iz izolatov hrane v izolate, povezane s kliničnimi infekcijami. Če obstaja kakršnakoli možnost prenosa rezistence seva proti antibiotikom, ki ni intrinzična ali pridobljena z mutacijo, sev ni primeren za aplikacijo (European Commission, 2001).

2.5.2 Proučevanje možnih negativnih učinkov probiotikov

Večina vrst MKB, ki se uporabljajo v prehranski industriji, je nepatogenih, nevirulentnih in netoksikogenih. Veliko sevov laktobacilov in bifidobakterij je tradicionalno priznanih kot varnih. Bifidobakterije so že več kot 15 let sestavni del otroške hrane in v tem času še nikoli ni bilo dokumentirano, da bi prišlo pri uživanju do negativnih in škodljivih učinkov na konzumentih. Laktobacili, še posebej *L. rhamnosus GG*, so prav tako kot bifidobakterije v splošnem priznani kot varni in primerni za uporabo v otroških formulah (Saavedra, 2007).

Pri uživanju probiotičnih bakterij si je potrebno postaviti tudi vprašanje glede predozacije. Po poročanju Saavedra iz leta 2007 je ta skrb odvečna, kajti raziskave so pokazale, da je predozacija s probiotičnimi bakterijami težka, če ne že kar nemogoča. V okviru mednarodnega projekta »Probdemo« so po poročanju Crittenden-a in sod. (2002) v poskusih *in vivo* na zdravih ljudeh opravljali testiranja varnost uporabe probiotičnih sevov. Testiranja so opravljali s probiotikom *L. paracasei* subsp. *paracasei* F19, ki po 12-dnevnem zauživanju (dnevne doze 10^6 do 10^{10} živih celic/dan) v nobenem primeru ni presegel 1 % vse mikrobne populacije prebavil, kar so ocenili kot pozitivno, saj ni

zaželeno, da bi zaužiti probiotik porušil mikrobnno ravnotežje v prebavilih zdravega človeka.

Pri proučevanju negativnih učinkov probiotikov se posebna pozornost posveča raziskavam uporabe probiotikov pri zaščiti oseb s pomanjkljivo imunsko sposobnostjo (»immune deficient«). Med poznanimi mehanizmi delovanja probiotičnih bakterij je tudi stimulacija imunskega sistema. Pri osebah s temi težavami bi bila imunostimulacija zelo dobrodošla, seveda le v primeru, da bi probiotične bakterije aktivirale še funkcionalni obrambni sistem gostitelja, ki bi deloval proti patogenim bakterijam. Vendar pa je lahko aktivacija imunskega sistema pri osebah s pomanjkljivo imunsko sposobnostjo tudi škodljiva, predvsem v primeru, da pride do škodljivega vnetja ali avtoimunosti (Wagner in Balish, 1998).

Pomembno pri probiotikih je tudi ugotavljanje prisotnosti škodljivih encimov, ki lahko razgrajujejo glikopeptide črevesne sluzi ali hidrolizirajo žolčne soli. Potrebno je tudi testirati rezistenco proti antibiotikom (možnost prenosa plazmidov) ter druge lastnosti, za katere obstaja možnost, da bi lahko imele negativen vpliv na zdravje (npr. sposobnost agregacije krvne plazme, ki je povezana s specifičnimi proteini celične stene) (Adams, 1999; Saarela in sod., 2000).

2.6 NAJMANJŠA KONCENTRACIJA PROBIOTIČNIH BAKTERIJ, KI JE POTREBNA ZA UGODEN UČINEK NA ČLOVEŠKI ORGANIZEM

Še vedno je na voljo le malo podatkov o najmanjši koncentraciji probiotičnih organizmov v fermentiranih izdelkih, ki zagotavljajo koristen učinek na zdravje človeka. Nekatere pomembne raziskave na ljudeh še vedno niso dokončane. Pričakovati je, da bo zahtevano število posameznih probiotičnih bakterij nihalo glede na njihovo sposobnost kolonizacije in razmnoževanja v gastrointestinalnem traktu. Pričakovati je tudi, da bo doseganje terapevtskega učinka odvisno od posamezne vrste in seva probiotične bakterije. Zato je ugotavljanje najmanjše zahtevane koncentracije probiotičnih bakterij za ugoden učinek zahtevna naloga, kajti zavisi od mnogih dejavnikov, tako od samega gostitelja, kakor tudi od lastnosti probiotičnega seva in okoljskih dejavnikov. Kljub temu se pričakuje, da bodo sčasoma objavljene okvirne priporočene vrednosti. Združenje »The Fermented Milks and Lactic Acid Beverages Association«, katerega sedež je na Japonskem, je predstavilo standard za minimalno koncentracijo, ki je za sveže mlečne izdelke najmanj $1 \cdot 10^7$ ke živih probiotičnih bakterij v ml ali g izdelka (Mullan, 2002).

Shah (2000) pa za razliko od drugih, ki priporočajo minimalno koncentracijo živih celic $>10^6$ ke/ml ali ke/g, zagovarja višjo koncentracijo, to je 10^8 ke/g, ker upošteva tudi umiranje probiotičnih bakterij med prehodom skozi prebavni trakt.

V splošnem velja, da naj bi ob zaužitju probiotičen pripravek vseboval vsaj 10^6 ke/ml ali ke/g probiotičnih bakterij. Dnevno pa naj bi za pozitiven učinek na zdravlje človek zaužil skupaj 10^8 do 10^9 ke probiotičnih bakterij (Mullan, 2002).

2.7 METODE UGOTAVLJANJA PROBIOTIČNIH BAKTERIJ

Znanje o strukturi in delovanju črevesne mikroflore nekaterih živali in človeka je bilo zbrano pretežno s konvencionalno kultivacijsko mikrobiološko tehniko in deloma elektronsko mikroskopijo (Tannock, 2001). Gre za klasično mikrobiološko tehniko, ki pa je v določenih segmentih pomanjkljiva, kajti zahteva več časa in je lahko tudi manj natančna. Glavna prednost molekularnih metod je ta, da le te odpravljajo potrebo po kultivaciji mikroorganizmov in zato dajejo točnejšo sliko mikrobne raznolikosti kompleksnih ekosistemov. To se še posebej dobro pokaže v študiji anaerobnih življenjskih okolij, med katere spada tudi prebavni trakt človeka. Ocenjujejo, da klasične kultivacijske tehnike omogočajo zelo omejen vpogled v mikrobno združbo, saj je kultivabilnost bakterij iz humanega blata le okrog 20 % (Suau in sod., 1999).

2.7.1 Konvencionalna kultivacijska mikrobiološka tehnika

Pri konvencionalni kultivacijski mikrobiološki tehniki gre za ugotavljanje koncentracije mikroorganizmov v vzorcih na podlagi primerne razredčitve osnovnega vzorca in kultivaciji le tega na primernem selektivnem gojišču, ob predpisanih optimalnih pogojih. Sama selektivnost gojišča je zelo pomembna, saj je s predpisanimi dodatki v hranilno gojišče zagotovljena rast le želeni bakterijski vrsti oziroma skupini. Selektivni dodatki, ki se pogosto uporabljajo za zagotavljanje selektivnosti gojišč, so antibiotiki (gentamicin, nalidiksična kislina, neomicin...), različni viri ogljikovih hidratov, soli in žolč. Ob primernih pogojih inkubacije (prisotnost oziroma odsotnost kisika, temperaturi inkubacije) lahko na selektivnih gojiščih dobimo realne in zanesljive informacije (Mullan, 2002).

V probiotičnih fermentiranih izdelkih se najpogosteje srečamo s problemom selektivnega štetja bifidobakterij, *Str. thermophilus*, *L. casei*, *L. acidophilus* in *L. bulgaricus*. V splošnem so vrste rodu *Bifidobacterium* dokaj dobro odporne proti gentamicinu in

nalidiksični kislini, so pa slabše odporne proti neomicinu (vendar še vedno manj občutljive kot *Streptococcus thermophilus* in *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ter *L. casei*), medtem ko je vrsta *Streptococcus thermophilus* občutljiva za nalidiksično kislino in neomicin. Bakterije vrst *L. acidophilus* in *L. bulgaricus* so občutljive za vse tri zgoraj naštete antibiotike. V splošnem so laktokoki zelo občutljivi že za nizke koncentracije teh antibiotikov. *L. casei*, *L. acidophilus* in *L. bulgaricus*, laktokoki in *Streptococcus thermophilus* pa so občutljivi za mupirocin, medtem ko bifidobakterije niso (Mullan, 2002).

Gojišča, ki namesto glukoze vsebujejo maltozo, rafinozo, salicin, melibiozo ali katerega od ostalih ogljikovih hidratov, so proučevali v selekcijske namene za bifidobakterije in *L. acidophilus*. Gojišča, ki vsebujejo maltozo, omogočajo rast mnogim probiotičnim bakterijam, vendar zavirajo rast večine sevov *Streptococcus thermophilus* in *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Mullan, 2002).

Relativno nizke koncentracije natrijevega klorida in ostalih soli so lahko uporabne za preprečevanje rasti *Streptococcus thermophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ter *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. Prav tako dober selektivni dodatek je litijev klorid. Laktokoki, *Streptococcus thermophilus* in *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* so inhibirani ob dodatku žolčnih soli v gojišče. Uspšen selektivni faktor za ločevanje *L. casei* od ostalih probiotičnih bakterij je lahko kar temperatura inkubacije, saj je za razliko od ostalih sposoben rasti pri nižjih temperaturah od 15 °C. V več raziskavah pa so potrdili tudi, da ima *L. casei* dobro toleranco proti solem, zato so primerna selektivna gojišča za to vrsto tudi takšna z dodatkom soli (Mullan, 2002).

2.7.1.1 Gojišča za osamitev probiotičnih bakterij

Agar Rogosa (Rogosa, 1951) je najbolj uporaben za selektivno gojenje laktobacilov. Bifidobakterije, *Streptococcus thermophilus* in laktokoki ne rastejo na tem agarju. Večina sevov *L. acidophilus* dobro raste na agarju Rogosa, prav tako tudi sevov vrste *L. casei*. Z dodatkom soli je mogoče sestaviti dobro selektivno gojišče za *L. casei* (Mullan, 2002).

2.7.1.1.1 Osamitev bifidobakterij

Teraguchi in sod. (Mullan, 2002) so leta 1978 prvi predlagali uporabo selektivnih dodatkov kot so neomicin, nalidiksična kislina, litijev klorid in paromomicin sulfat (NNLP) za kvantitativno ugotavljanje bifidobakterij. L-cistein se dodaja bifidobakterijam zato, da

vzpostavi redukcijske pogoje. Gojišče na osnovi gojišča MRS (De Man in sod., 1960) z dodatkom mešanice NNLP se veliko uporablja. Podobno gojišče z mešanico NNLP, ki pa se ne dodaja agarju MRS, opisuje tudi standard IDF iz leta 1991 (IDF Standard 149, 1991). Selektivne dodatke je potrebno filtrirati in neposredno pred uporabo dodati avtoklaviranemu osnovnemu gojišču (Mullan, 2002).

Šele v zadnjem času se je razširila tudi uporaba mupirocina v gojiščih za bifidobakterije. Rada in Koc sta leta 2000 razvila Wilkins-Chalgren agar z dodanim mupirocinom za ugotavljanje bifidobakterij v mlečnih produktih, saj so bifidobakterije relativno dobro odporne proti mupirocinu. Pri uporabi tega antibiotika je potrebno upoštevati, da poleg bifidobakterij mupirocin dobro prenašajo tudi predstavnice *Actinomyces* in *Lactobacillus mucosae* (Mullan, 2002).

2.7.1.1.2 Osamitev *Lactobacillus acidophilus*

Selektivno gojišče za *L. acidophilus* je opisano v standardu ISO (IDF Standard 192, 2006). Osnova za selektivno gojišče je agar MRS (De Man in sod., 1960), kateremu sta dodana dva selektivna antibiotika, klindamicin in ciprofloksacin. Oba antibiotika zavirata rast najpogostejših mikroorganizmov iz fermentiranih izdelkov, kot so: *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis*, *Streptococcus thermophilus*, laktokoki, bifidobakterije, *L. casei*, *L. paracasei* subsp. *paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. reuteri* in vrste iz rodu *Leuconostoc*.

2.7.1.1.3 Osamitev *Lactobacillus casei*

Za *L. casei* ni na voljo standardnega selektivnega gojišča, pa tudi objav ni veliko. Najbolj uporaben selektivni dejavnik je za to vrsto temperatura inkubacije, saj pri 15 °C do 25 °C rase le malo drugih vrst mlečnokislinskih bakterij, sploh probiotičnih. Po priporočilu proizvajalca Christian Hansen (Danska) iz leta 2001 je uporaben osnovni agar MRS, ki ga inkubiramo pri 25 °C, ob prisotnosti kisika. V takih pogojih je rast bifidobakterij in *L. acidophilus* zavrta.

2.7.2 Molekularne tehnike identifikacije probiotičnih bakterij

Med molekularnimi metodami so najbolj v uporabi tiste, ki vključujejo analizo DNA, saj je ta manj odvisna od okoljskih dejavnikov kot ostale sestavine mikrobnih celic. DNA lahko za analizo v celoti osamimo iz mikrobnih celic, ali pa osamimo le del genoma, npr. samo kromosomsko ali plazmidno DNA. Osamitev slednje omogoča ugotavljanje plazmidnega

profila mlečnokislinskih bakterij. Gre za elektroforetsko analizo števila in velikosti prisotnih plazmidov. Metoda je primerna za razlikovanje sorodnih sevov iste vrste (Smole Možina in Jeršek, 2001).

Večjo, kromosomsko DNA oz. njene restrikcijske fragmente, ki jih dobimo z uporabo izbranih restrikcijskih endonukleaz z le nekaj restrikcijskimi mesti v bakterijskem kromosomu, lahko proučujemo s t.i. pulzno elektroforezo (PFGE, angl. Pulsed field gel electrophoresis). Na osnovi elektroforetskih vzorcev lahko razlikujemo zelo sorodne seve iste vrste in dosežemo odlično ponovljivost rezultatov. Metoda je zelo uporabna tudi za razlikovanje sevov laktobacilov, bifidobakterij in enterokokov (Holzapfel in sod., 2001).

Ena izmed metod, ki omogočajo mnogo večjo občutljivost pri odkrivanju prisotnosti mikroorganizmov v kompleksnih okoljih, je tudi PCR (angl. Polymerase chain reaction), verižna reakcija s polimerazo. Ta metoda omogoča *in vitro* encimsko pomnožitev krajšega odseka matrične t.j. mikrobne DNA na nekaj milijonkratno število v nekaj urah (Smole Možina in Jeršek, 2001).

V reakciji PCR lahko uporabimo zelo različne začetnike oligonukleotidov, ki določajo specifičnost reakcije. Reakcijo je mogoče izvesti tudi v kombinaciji z drugimi molekularnimi metodami, ki jih vključimo pred ali po pomnoževanju DNA s PCR. Primer je restrikcijska analiza, ki jo izvajamo pred reakcijo PCR, in se imenuje AFLP (angl. Amplified fragment length polymorphism), torej študij polimorfizma dolžin pomnožkov DNA (Vos in sod., 1995). Analizo polimorfizma dolžin restrikcijskih fragmentov po pomnoževanju DNA s PCR vključuje tudi analiza PCR-RFLP (angl. Restriction fragment length polymorphism). Podobno kot z AFLP je reakcijo PCR možno kombinirati tudi z drugimi tehnikami, npr. hibridizacijsko ali imunološko analizo, s čimer povečamo občutljivost in/ali specifičnost metode (Smole Možina in Jeršek, 2001).

Najpopolnejšo nadaljnjo analizo pomnožkov PCR predstavlja direktno sekvenciranje, t.j. ugotavljanje zaporedja pomnožkov nukleotidov DNA (Smole Možina in Jeršek, 2001). V molekularno ekoloških raziskavah mikrobne združbe prebavnega trakta, vključno s probiotičnimi bakterijami, so v zadnjem času največ uporabljali naslednji pristop. Skupne nukleinske kisline, osamljene iz vzorcev blata, služijo kot matrična DNA za pomnoževanje spremenljivih regij gena 16S rRNA. Univerzalni začetni oligonukleotidi reakcije PCR so izbrani na osnovi komplementarnih, dobro ohranjenih zaporedij gena 16S rRNA. Pomnožki izbranih regij rDNA so lahko osnova za kloniranje, posamezni kloni pa so nato uporabljeni za ponovno pomnoževanje in ugotavljanje zaporedja nukleotidov pomnoženih regij rDNA. Takšna analiza omogoča identifikacijo prisotnih mikrobnih vrst in s tem

odkrivanje kompleksnosti mikrobne združbe črevesa, vključno z možnimi učinki uživanja probiotičnih bakterij (Tannock, 2001).

Za ugotavljanje kompleksnosti mikrobne združbe črevesa na osnovi pomnožkov genov za rRNA in njihovih spremenljivih intergenskih regij je zelo uporabna tudi gelska elektroforeza v kombinaciji s temperaturnim in/ali kemijskim gradientom (TGGE oz. DGGE, angl. temperature oz. denaturing gradient gel electrophoresis) (Smole Možina in Jeršek, 2001).

Za kvantifikacijo probiotičnih sevov v črevesu oz. vzorcih blata je možno uporabiti tudi eno izmed posebnih izvedb PCR, t.i. kompetitivni PCR (c-PCR). Omogoča kvantifikacijo bakterij v preiskovanem vzorcu preko ugotavljanja koncentracije specifičnih tarčnih molekul DNA (Smole Možina in Jeršek, 2001). Zelo obetavna pa je tudi novejša metoda, imenovana PCR v realnem času (Real-time PCR).

Metode odkrivanja in identifikacije mikroorganizmov na osnovi PCR praviloma ne razlikujejo sevov iste vrste. Izjema je t.i. analiza RAPD (angl. Randomly amplified polymorphic DNA) oz. verižna reakcija s polimerazo z naključno izbranimi začetnimi oligonukleotidi (Williams in sod., 1990).

Poleg pomnoževanja mikrobne DNA s PCR obstaja še en temeljni molekularno-genetski pristop k analizi mikroorganizmov oz. mikrobnih združb, ki ga prav tako omogoča komplementarno vezanje nukleotidov – hibridizacija.

Analogno vezavi začetnih oligonukleotidov v reakciji PCR poteka v hibridizacijskih analizah vezava predhodno označenih oligonukleotidnih sond na komplementarna zaporedja tarčne, t.j. mikrobne DNA (Smole Možina in Jeršek, 2001).

2.7.2.1 Princip delovanja metode PCR

Verižna reakcija s polimerazo je metoda, s katero je mogoče v nekaj urah »in vitro« pomnožiti fragment DNA do 10^6 -krat in tako na enostaven način pridobiti dovolj veliko število enakih molekul DNA s prilagojenimi konci za subkloniranje v pravilnem bralnem okvirju določenega ekspresijskega vektorja, za sekvenčno analizo, za neposredno ugotavljanje mutacij itd. (Gasparič in Komel, 1996).

Potek PCR (Gasparič in Komel, 1996): PCR poteka v treh glavnih korakih, ki se ponovijo v 30 do 40 ciklih. To se opravlja v cikličnem termostatu za PCR,

imenovanem »PCR cycler«. Aparat ima zmožnost hitrega temperaturnega odziva, kar pomeni, da lahko hitro ohlaja in segreva majhne epruvetke, v katerih poteka verižna reakcija s polimerazo. Za polimerazo DNA uporabljamo termostabilno polimerazo DNA Taq, ki so jo izolirali iz termofilnih bakterij *Thermus aquaticus*, in ima dobro lastnost, da prenese temperature nad 90 °C, njen temperaturni optimum pa je 72 °C. V eni reagenčni epruveti z enkratnim dodatkom začetnih oligonukleotidov (izbira le teh je odvisna od vrste reakcije PCR in vrste preiskovanih mikroorganizmov), tarčne molekule DNA ter vseh štirih dNTP, z isto količino encima polimeraze Taq ponavljamo cikle:

1. korak: Denaturacija

Med postopkom denaturacije pri 94 °C ali 95 °C se dvojna vijačnica DNA razpre in nastane enojna veriga DNA.

2. korak: Komplementarno prileganje začetnih oligonukleotidov

Prileganje poteka pri nižji temperaturi (pri okrog 32 do 65 °C). V tem koraku prisotni začetni oligonukleotidi (z. o.), ki se nahajajo v reakcijski mešanici, najdejo mesta pripenjanja na matrični DNA. Tam, kjer se le ti pripnejo na prepoznavna mesta, lahko prične delovati polimeraza. Začetni oligonukleotidi se tako v pravilnem zaporedju nizajo na verigo.

3. korak: Sinteza komplementarnih sekundarnih verig DNA

Sinteza komplementarnih verig poteka pri 72 °C.

Omenjeni koraki se ponovijo v 30 do 40 ciklih.

Pri poteku PCR se podvajata obe enojni verigi, zato je nastajanje pomnožkov gena v eksponentni korelaciji. Tako zelo hitro pridemo do mnogokratne namnožitve genskega materiala (Gasparič in Komel, 1996).

Pomnožke PCR je najlažje detektirati z agarozno elektroforezo tako, da njihovo velikost primerjamo z molekularnim označevalcem z znanimi velikostmi odsekov DNA (Smole Možina in Jeršek, 2001).



Slika 1: Aparat za PCR

3 MATERIAL IN METODE

3.1 IZVEDBA RAZISKAVE

Raziskavo smo opravljali na dveh lokacijah. Prva je bila Mlekarna Celeia, kjer smo sledili izbranim probiotičnim izdelkom od začetka izdelave, torej od same fermentacije, preko hlajenja do skladiščenja. Na osnovi sheme tehnološkega postopka izdelave probiotičnih izdelkov smo sestavili potek vzorčenja. Za analizo smo izbrali tri različne fermentirane probiotične izdelke. Pri vsakem smo analizirali navadno in sadno linijo. Poskus je trajal od avgusta do oktobra 2007. Pri vsakem posameznem izdelku smo analizirali vzorce, odvzete v sedmih časovnih obdobjih. Analize smo opravljali v mikrobiološkem laboratoriju Mlekarnice Celeia. Analize z metodo PCR smo izvajali v prostorih Katedre za mlekarstvo na Biotehniški fakulteti v Domžalah.

3.2 MATERIAL

3.2.1 Vzorci fermentiranega mleka s probiotičnimi kulturami

Probiotične izdelke smo vzorčili iz redne proizvodnje. Analizirali smo tri različne izdelke v dveh okusih – brez dodanega sadja in s sadnim dodatkom (Preglednica 2), ki so bili pripravljani po tehnološkem postopku Mlekarnice Celeia. Za omenjene izdelke uporabljajo liofilizirana cepiva, proizvajalca Chr. Hansen (Danska). Cepiva vsebujejo sledeče kulture:

- ABT: *Lactobacillus acidophilus* (LA-5), *Bifidobacterium* (BB-12) in *Streptococcus thermophilus*.
- *Lactobacillus casei* 01

Bakterije, deklarirane kot *Bifidobacterium* (BB-12), pripadajo vrsti *Bif. animalis* subsp. *lactis* (v nadaljevanju *Bif. lactis*).

Da bi dobili čim boljši vpogled v proizvodnjo probiotičnih fermentiranih izdelkov in spreminjanje velikosti populacije probiotičnih bakterij, smo analize opravljali tudi medfazno. Tako smo vzorce jemali po cepljenju kulture v mleko, po končani fermentaciji, med hlajenjem izdelka in tekom skladiščenja. Za vsak izdelek smo odvzeli vzorce na sedmih področjih oziroma v sedmih časovnih intervalih, kakor je prikazano v preglednici 3.

Preglednica 2: Podatki o izdelkih, izbranih za analize

Ime izdelka	Izdelek, uporaben do	Deklarirana vrsta probiotičnih kultur	Količina vzorca	Lastnosti	Opomba
LCA navadni probiotični jogurt	24.09.2007	<i>L. acidophilus</i> <i>Bifidobacterium</i> <i>L. casei</i>	180 g	1,5 % mlečne maščobe	
LCA sadni probiotični jogurt (okus vinogradniška breskev)	24.09.2007	<i>L. acidophilus</i> <i>Bifidobacterium</i> <i>L. casei</i>	180 g	1,3 % mlečne maščobe	
LCA ACI navadni okus	18.09.2007	<i>L. acidophilus</i> <i>Bifidobacterium</i>	500 g	0,1 % mlečne maščobe	blagovna znamka
LCA VITA sadni (okus jagoda)	18.09.2007	<i>L. acidophilus</i> <i>Bifidobacterium</i>	500 g	0,1 % mlečne maščobe	
LC navadni probiotični jogurt	22.09.2007	<i>L. acidophilus</i> <i>Bifidobacterium</i> <i>L. casei</i>	150 g	1,5 % mlečne maščobe	blagovna znamka
LC sadni probiotični jogurt (okus jagoda)	22.09.2007	<i>L. acidophilus</i> <i>Bifidobacterium</i> <i>L. casei</i>	150 g	1,5 % mlečne maščobe	blagovna znamka
LCA navadni probiotični jogurt	01.10.2007	<i>L. acidophilus</i> <i>Bifidobacterium</i> <i>L. casei</i>	180 g	1,5 % mlečne maščobe	
LCA sadni probiotični jogurt (okus vinogradniška breskev)	01.10.2007	<i>L. acidophilus</i> <i>Bifidobacterium</i> <i>L. casei</i>	180 g	1,3 % mlečne maščobe	

nadaljevanje preglednice; Podatki o izdelkih, izbranih za analize

Ime izdelka	Izdelek, uporaben do	Deklarirana vrsta probiotičnih kultur	Količina vzorca	Lastnosti	Opomba
LCA ACI navadni okus	25.09.2007	<i>L. acidophilus</i> <i>Bifidobacterium</i>	500 g	0,1 % mlečne maščobe	blagovna znamka
LCA VITA sadni (okus breskev)	25.09.2007	<i>L. acidophilus</i> <i>Bifidobacterium</i>	500 g	0,1 % mlečne maščobe	
LC navadni probiotični jogurt	22.09.2007	<i>L. acidophilus</i> <i>Bifidobacterium</i> <i>L. casei</i>	150 g	1,5 % mlečne maščobe	blagovna znamka
LC sadni probiotični jogurt (okus jagoda)	22.09.2007	<i>L. acidophilus</i> <i>Bifidobacterium</i> <i>L. casei</i>	150 g	1,5 % mlečne maščobe	blagovna znamka
LCA navadni probiotični jogurt	08.10.2007	<i>L. acidophilus</i> <i>Bifidobacterium</i> <i>L. casei</i>	180 g	1,5 % mlečne maščobe	
LCA sadni probiotični jogurt (okus vinogradniška breskev)	08.10.2007	<i>L. acidophilus</i> <i>Bifidobacterium</i> <i>L. casei</i>	180 g	1,3 % mlečne maščobe	
LCA ACI navadni okus	02.10.2007	<i>L. acidophilus</i> <i>Bifidobacterium</i>	500 g	0,1 % mlečne maščobe	blagovna znamka
LCA VITA sadni (okus breskev)	02.10.2007	<i>L. acidophilus</i> <i>Bifidobacterium</i>	500 g	0,1 % mlečne maščobe	
LC navadni probiotični jogurt	06.10.2007	<i>L. acidophilus</i> <i>Bifidobacterium</i> <i>L. casei</i>	150 g	1,5 % mlečne maščobe	blagovna znamka
LC sadni probiotični jogurt (okus jagoda)	06.10.2007	<i>L. acidophilus</i> <i>Bifidobacterium</i> <i>L. casei</i>	150 g	1,5 % mlečne maščobe	blagovna znamka



Slika 2: Analizirani izdelki: LC navadni probiotični jogurt (blagovna znamka), LCA sadni probiotični jogurt in LCA Vita.

Preglednica 3: Potek vzorčenja probiotičnih izdelkov

Zap. št. vzorčenja	Vzorčenje (časovni interval)
1	~ 20 minut po cepljenju kulture
2	po fermentaciji
3	po ~ 18-ih urah hlajenja
4	po enem tednu skladiščenja (pri T=4 °C)
5	po dveh tednih skladiščenja (pri T=4 °C)
6	po treh tednih skladiščenja (pri T=4 °C)
7	zadnji dan roka trajanja izdelka

3.2.2 Gojišča, raztopine in kemikalije

3.2.2.1 Tekoča gojišča in raztopine

3.2.2.1.1 Ringerjeva raztopina

Ringerjevo raztopino (1/4 moči oziroma jakosti) smo pripravili po navodilih proizvajalca (Merck, Darmstadt, Nemčija). Raztopini smo dodali 1 ml/l 5 % sterilne raztopine cistein hidroklorida (Merck, Darmstadt, Nemčija) in uravnali vrednost pH na $7,0 \pm 0,2$ z dodatkom 1N NaOH. Tako pripravljeno razredčevalno raztopino smo razlili v epruvete po 9 ml, jih avtoklavirali pri 121 °C za 15 minut in uporabili za razredčevanje po Kochu.

3.2.2.1.2 Raztopina dikalijevega hidrogenfosfata

Raztopino smo pripravili po navodilu, ki ga navajajo Bajt in sod. (1998). Raztopini smo dodali 1 ml/l 5 % sterilne raztopine cistein hidroklorida in uravnali vrednost pH na $7,0 \pm 0,2$ z dodatkom 1N NaOH ter jo razlili v erlenmajerice po približno 800 ml. Nato smo raztopino avtoklavirali pri 121 °C za 15 minut. Tako pripravljeno raztopino smo uporabljali za osnovno (primarno) razredčitev vzorca.

3.2.2.1.3 Puffer TAE (Tris acetatni puffer)

Pripravili smo založno 50-kratno raztopino iz 242 g Tris baze (Sigma – Aldrich Chemie, Steinheim, Nemčija) 57,1 ml ledocetne kisline (Fluka, Buchs, Švica) in 100 ml 0,5M EDTA (Sigma – Aldrich Chemie, Steinheim, Nemčija).

Pripravljeno raztopino smo pred uporabo razredčili z vodo v razmerju 1:50.

Raztopino smo uporabili pri gelski elektroforezi - detekcija DNA.

3.2.2.1.4 Tekoče gojišče MRS

Tekoče gojišče MRS smo pripravili po navodilu proizvajalca (Merck, Darmstadt, Nemčija), ga razlili v stekleničke (po 200 ml) in avtoklavirali 15 minut 121 °C. Tekoče gojišče smo uporabljali za namnoževanje preiskovanih kultur.

3.2.2.2 Trdna gojišča

3.2.2.2.1 Gojišče MRS

Trdno hranljivo gojišče MRS smo pripravili po navodilih proizvajalca (Merck, Darmstadt, Nemčija), ga razdelili v stekleničke (po približno 250 ml) in avtoklavirali 15 minut pri 118 °C.

Tako pripravljeno gojišče smo uporabili za ugotavljanje števila kolonjskih enot probiotične kulture *L. casei*.

3.2.2.2.2 Gojišče MRS z dodanim klindamicinom (MRS + cly)

Gojišče smo pripravili iz MRS bujona po navodilih proizvajalca (Merck, Darmstadt, Nemčija), zvišali smo mu vrednost pH z dodatkom 1N NaOH tako, da je le ta po avtoklaviranju znašala $6,2 \pm 0,2$. Nato smo bujonu dodali 15 g/l agar agarja (Merck, Darmstadt, Nemčija), gojišče dobro raztopili s segrevanjem v vodni kopeli, razdelili v stekleničke po 200 ml in avtoklavirali 15 minut pri 118 °C.

Pred razlivanjem na plošče (45 °C) smo v gojišče dodali raztopino antibiotika klindamicina v koncentraciji 0,1 µg/ml (50µl 0,02 % založne raztopine/100 ml gojišča), ki smo jo pripravili po postopku, opisanem v ISO standardu 20128 (IDF192, 2006). Gojišče MRS z

dodanim klindamicinom smo uporabili za selektivno štetje laktobacilov vrste *L. acidophilus*.

3.2.2.2.3 Gojišče MRS z dodanim cisteinom in mešanico NNLP (MRS + NNLP)

Gojišče smo pripravili iz bujona MRS po navodilih proizvajalca (Merck, Darmstadt, Nemčija), zvišali smo mu pH vrednost z dodatkom 1N NaOH tako, da je le ta po avtoklaviranju znašala $7,2 \pm 0,2$. Nato smo bujonu dodali 15 g/l agar agarja (Merck, Darmstadt, Nemčija), gojišče dobro raztopili s segrevanjem v vodni kopeli, razdelili v stekleničke po 200 ml in avtoklavirali 15 minut pri 118 °C.

Pred razlivanjem na plošče (45 °C) smo v gojišče dodali 1ml/l 5 % raztopine cistein hidroklorida in mešanico antibiotikov NNLP (50 ml raztopine antibiotikov/l gojišča).

Cistein in mešanico antibiotikov smo pripravili po postopku, opisanem v IDF standardu 149 (1991). Raztopina antibiotikov je sestavljena iz treh antibiotikov: neomicin sulfata, paramomicin sulfata in nalidiksične kisline. V kombinaciji z dodanim litijevim kloridom je to mešanica, ki zavira rast MKB, na zavira pa rasti bifidobakterij.

Gojišče MRS z dodanim cistein hidrokloridom in mešanico antibiotikov smo uporabili za selektivno štetje bifidobakterij.

3.2.3 Reagenti in encimi za izolacijo DNA, reakcijo PCR in gelsko elektroforezo

3.2.3.1 Reagenti za izolacijo DNA iz bakterij

- ✓ Komercialni set (Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit) za izolacijo genske DNA (Promega, Madison, ZDA)
- ✓ Izopropanol (Merck, Darmstadt, Nemčija)
- ✓ Etanol (Merck, Darmstadt, Nemčija)
- ✓ EDTA, pH=8,0 (Sigma Chemical, St. Louis, ZDA)
- ✓ Lizocim (Sigma Chemical, St. Louis, ZDA)
- ✓ Triton X-100 (Sigma Chemical, St. Louis, ZDA)

3.2.3.2 Reagenti za pripravo mikroskopskega preparata

Reagenti za barvanje po Gramu (Merck, Darmstadt, Nemčija):

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

3.2.3.3 Reagenti za verižno reakcijo s polimerazo (PCR)

- ✓ dNTP, 10 mM (Boehringer Mannheim, Nemčija),
- ✓ 5x zeleni GoTaq[®] pufer za polimerazo z 1,5 mM $MgCl_2$ (Promega, Madison, ZDA),
- ✓ 5x GoTaq[®] Flexi pufer za polimerazo brez $MgCl_2$ (Promega, Madison, ZDA),
- ✓ Magnezijev klorid - $MgCl_2$, 25 mM (Promega, Madison, ZDA),
- ✓ GoTaq[®] DNA polimeraza (Promega, Madison, ZDA),
- ✓ Začetni oligonukleotidi (Invitrogen life technologies, Paisley, Velika Britanija),
- ✓ deionizirana, mikrofiltrirana in sterilna voda (mQ).

3.2.3.4 Reagenti za ugotavljanje pomnožkov v agaroznem gelu

- ✓ 0,5 x TAE pufer,
- ✓ Agaroz (Sigma Chemical, St. Louis, ZDA),
- ✓ Syber Safe barvilo (Sigma Chemical, St. Louis, ZDA),
- ✓ Molekularni označevalec pomnožkov DNA – 100 bp (100 bp DNA Ladder, Fermentas, Litva).

3.3 METODE

3.3.1 Ugotavljanje števila probiotičnih bakterij v fermentiranih mlečnih izdelkih

Odvzeti vzorec smo pred analizo dobro premešali, ga ob gorilniku odprli in v sterilno vrečko zatehtali 10 gramov. Nato smo vzorcu dodali raztopino dikalijevega hidrogen fosfata do skupne teže 100 gramov. Vsebina v sterilni vrečki je bila primarna (osnovna) razredčitev, ki smo jo uporabili za nadaljnje razredčitve. Te smo pripravljali z metodo razredčevanja po Kochu, tako da smo vzorec zaporedno redčili v $\frac{1}{4}$ Ringerjevi raztopini, dokler nismo dobili števnih plošč. Predhodno smo v petrijevke razlili na 45 °C ohlajena gojišča ter jih pustili ohladiti. Na površino smo odpipetirali 0,1 ml ustrezne razredčitve vzorca in ga s stekleno palčko razmazali po celotni površini. Cepljena gojišča smo inkubirali pri pogojih, ki so prikazani v preglednici 4.

Preglednica 4: Selektivna gojišča in pogoji inkubacije za ugotavljanje števila probiotičnih mikroorganizmov

Probiotični MO	Selektivno gojišče	Pogoji inkubacije
<i>L. casei</i>	MRS	25 °C, 96 ur, aerobno
<i>L. acidophilus</i>	MRS + klindamicin (cly)	37 °C, 72 ur, anaerobno
<i>Bifidobacterium</i>	MRS + NNLP	37 °C, 72 ur, anaerobno

Anaerobne pogoje smo zagotovili z uporabo anaerobnih vrečk (Genbag) (Biomérieux[®], Marcy I'Etoile, Francija).

Po končani inkubaciji smo zrasle kolonije prešteli s pomočjo elektronskega števca (EŠKO 7L, LABO Ljubljana).

Število kolonijskih enot (ke) bakterij v gramu vzorca smo izračunali po sledeči formuli (IDF standard 100B, 1991):

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0,1n_2)d}$$

Legenda:

N: ke/ml oz. ke/g (cfu/ml oz. cfu/g)

$\sum C$: vsota kolonij na vseh ploščah

n_1 : število prešteti plošč na prvi razredčitvi

n_2 : število prešteti plošč na drugi razredčitvi

d: razredčevalni faktor, upoštevajoč prvo razredčitev

3.3.1.1 Statistične metode

Za primerjavo razlik glede števila probiotičnih bakterij med posameznimi izdelki smo uporabili ANOVO – enosmerno analizo variance.

V primeru, da je le ta pokazala, da med izdelki obstajajo statistično značilne razlike, smo naredili še preizkus LSD, s katerim smo lahko ugotovili, kateri izdelki se med seboj značilno razlikujejo.

3.3.2 Ugotavljanje morfoloških značilnosti kolonij probiotičnih bakterij na selektivnih gojiščih in mikroskopski preparati

Na začetku raziskave smo na izbrana selektivna gojišča nacepili mešano kulturo, ki jo uporabljajo za izdelavo probiotičnih izdelkov, proučevanih v naši raziskavi. Po končani inkubaciji smo pregledali značilnosti kolonij (barva, rob, izgled površine) probiotičnih kultur na gojiščih. Izbrali smo posamezne kolonije in iz njih pripravili preparate, ki smo si jih ogledali s pomočjo fazno-kontrastnega mikroskopa. Preparate smo pred mikroskopiranjem barvali po Gramu. Mikromorfološke lastnosti probiotičnih bakterij

(oblika, velikost, formacija, obarvanje po Gramu itd.) smo opazovali pri 1000-kratni povečavi.

Potek fiksacije preparata in barvanja po Gramu:

- Ob gorilniku smo na objektno stekelce kanili kapljico raztopine dikalijevega hidrogen fosfata, nato pa smo v njej s cepilno zanko razmazali nekaj mikrobne biomase, pobrane z gojišča.
- Razmaz smo posušili na zraku ob gorilniku, nato smo izvedli fiksacijo tako, da smo ga trikrat potegnili čez plamen gorilnika.
- Barvanje po Gramu:
 - s kristal violet barvamo 5 minut, po preteku časa spiramo s tekočo vodo, vendar ne direktno pod curkom
 - naneseemo lugol in pustimo delovati 1 minuto, po preteku časa spiramo s tekočo vodo, vendar ne direktno pod curkom
 - preparat razbarvamo z mešanico etanola in acetona (1:1) in spiramo s tekočo vodo, vendar ne direktno pod curkom
 - naneseemo barvilo safranin in ga pustimo delovati 1 minuto, po preteku časa spiramo s tekočo vodo, vendar ne direktno pod curkom
 - preparat pazljivo popivnemo s papirnato brisačo in pred mikroskopiranjem pod imerzijskim objektivom naneseemo nanj kapljico imerzijskega olja.

3.3.3 Priprava DNA za izvedbo PCR

3.3.3.1 Postopek izolacije DNA iz posameznih kolonij s toplotno obdelavo in detergentom

DNA smo osamili iz kultur, zraslih iz posameznih kolonij. Najprej smo s cepilno zanko prenesli kolonijo s selektivnega gojišča (MRS, MRS+cly in MRS+NNLP) v 1 ml tekočega gojišča MRS z dodanim cistein hidrokloridom (0,05 % w/v) ter inkubirali pri 37 °C za 18 ur. Po centrifugiranju (3500 x g /3 minute) smo supernatant odlili, usedlini smo dodali 200 µl 1% Tritona X-100 (Sigma Chemical, St. Louis, ZDA). Nato smo mikroepreveto postavili v vrelo vodo za 5 minut, ohladili na ledu ter shranili v zamrzovalniku pri -20 °C.

3.3.3.2 Postopek izolacije DNA iz posameznih kolonij z uporabo komercialnega seta za izolacijo genomske DNA (Promega, ZDA)

Usedlino celic, ki smo jo pridobili iz kulture, zrasle iz posamezne kolonije, kakor je opisano zgoraj (3.3.3.1), smo resuspendirali v 50 mM EDTA, v kateri smo predhodno

raztopili 10 mg/ml lizocima. Suspenzijo smo inkubirali v vodni kopeli pri 37 °C za 45 minut, zatem pa sledili navodilom proizvajalca komercialnega seta za izolacijo genomske DNA (Promega, ZDA).

3.3.4 Priprava reakcijske mešanice za PCR

Priprava reakcijske mešanice je odvisna od preiskovane kulture in se zato razlikuje glede na mikroorganizem, ki ga identificiramo. Reakcijsko mešanico smo pripravljali v ločenem prostoru, ki smo ga pred delom in po njem razkužili in vsaj za 2 uri osvetljevali z UV lučjo. Obvezna je uporaba rokavic za enkratno uporabo.

Reakcijsko mešanico brez lizatov z DNA smo pripravili za vse vzorce naenkrat. Celoten volumen reakcijske mešanice z dodanimi lizati je za en vzorec znašal 20 µl.

Vse kemikalije, ki smo jih uporabili pri pripravi mešanice, so bile ves čas na ledu.

Najprej smo v epruvetko odpipetirali izračunan volumen vode (Milli Q), nato ustrezen volumen pufru za polimerazo z vključenim 1,5 mM $MgCl_2$ (GoTaq®) pri reakcijah za *L. acidophilus* in *Bif. lactis* oziroma pufru brez $MgCl_2$ (GoTaq® Flexi) pri reakcijah za *L. casei*. Sledilo je dodajanje mešanice nukleotidov dNTP, ustreznih začetnih oligonukleotidov (z.o. P1 in z.o P2) in na koncu še encima GoTaq® DNA-polimeraze. Reakcijsko mešanico smo dobro premešali in razdelili v mikroeprovete za PCR po 16 µl.

V vsako reakcijo smo vključili pozitivno in negativno kontrolo. Negativno kontrolo je predstavljala mešanica, ki smo ji namesto DNA dodali 4 µl vode (Milli Q, avtoklavirana). Pozitivno kontrolo za preiskovane bakterije je predstavljala mešanica, ki smo ji dodali 4 µl lizata poznane čiste kulture preiskovanih bakterij.

Mikroeprovete z vsebino 20 µl (16 µl reakcijske mešanice in 4 µl tarčne DNA) smo nato prenesli v aparaturo za PCR (Biorad, ZDA) in vnesli ustrezen protokol poteka PCR za določeno preiskovano kulturo.

Sestava 20 µl reakcijske mešanice za PCR:

- 4 µl tarčne DNA
- 4 µl Taq pufru z $MgCl_2$ (GoTaq®) ali 4 µl Go Taq Flexi pufru brez dodatka $MgCl_2$ (GoTaq® Flexi)
- 1,6 µl $MgCl_2$ (kjer smo uporabili GoTaq® Flexi pufer)
- 0,2 µl P1
- 0,2 µl P2
- 0,4 µl dNTP
- 0,1 µl DNA polimeraze
- 9,5 do 11,1 µl vode Milli Q (količina odvisna od količine $MgCl_2$)

Preglednica 5: Začetni oligonukleotidi, uporabljeni v reakciji PCR in velikost specifičnih produktov

Preiskovana probiotična bakterija	Začetni oligonukleotidi: P1	Začetni oligonukleotidi: P2	Velikost specifičnih produktov	Vir
<i>L. casei</i>	Pr I	CasII	200 bp	Walter in sod., 2000
<i>L. acidophilus</i>	Lac-1	Lac-2	759 bp	
<i>Bifidobacterium lactis</i>	BiBIF-1	BiBIF-2	278 bp	Matsuki in sod., 1999

3.3.5 Reakcija PCR

Reakcija PCR je potekala po protokolih, ki so prikazani v preglednici 6.

Preglednica 6: Protokoli izvedbe PCR za posamezno probiotično bakterijo

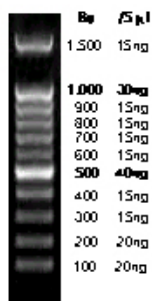
Probiotična bakterija	Uporabljeni začetni oligonukleotidi	Potek reakcije PCR	Pogoji reakcije (čas, temperatura)	Št. ciklov
<i>L. casei</i>	Pr I in CasII	Začetek	95 °C; 3 min	1
		Denaturacija DNA	95 °C; 30 s	30
		Prileganje	55 °C; 30 s	
		Podaljševanje	72 °C; 30 s	
		Zaključek	72 °C; 3 min	1
<i>L. acidophilus</i>	Lac I in Lac II	Začetek	95 °C; 2 min	1
		Denaturacija DNA	95 °C; 30 s	30
		Prileganje	62 °C; 30 s	
		Podaljševanje	72 °C; 30 s	
		Zaključek	72 °C; 5 min	1
<i>Bifidobacterium</i>	BiBIF-1 in BiBIF-2	Začetek	95 °C; 5 min	1
		Denaturacija DNA	95 °C; 20 s	35
		Prileganje	55 °C; 20 s	
		Podaljševanje	72 °C; 30 s	
		Zaključek	72 °C; 5 min	1

3.3.6 Dokazovanje pomnožkov z gelsko elektroforezo

Za gelsko elektroforezo smo najprej pripravili 2 % agarozni gel v 0,5-kratnem pufru TAE (Tris acetatni pufer). Raztopino smo segrevali v mikrovalovni pečici tako dolgo, da so se vsi delčki agaroze raztopili, ga ohladili na približno 60 °C in ga razlili v model (prostornine 45 ml ali 90 ml) z vstavljenim glavničkom. Ko se je gel ohladil in strdil, smo odstranili glavniček in gel prenesli v aparat za izvajanje elektroforeze, ki je vseboval 0,5-kratni pufer

TAE. V prvo luknjico v gelu smo nanесли 2,5 μ l molekularnega označevalca (100 bp, DNA Ladder), v naslednje pa po 10 μ l pomnožkov PCR, vključno s pozitivno ter negativno kontrolo. Barvil pri elektroforezi ni bilo potrebno dodajati, saj pufer GoTaq[®] (Promega) le ta že vsebuje. Elektroforeza je potekala 30 minut (za 45 ml gel) ali 60 minut (za 90 ml gel) pri 90 V. Po končani elektroforezi smo gel prenesli v banjico z barvilom Syber Safe in ga barvali 20 minut, nato pa smo ga presvetlili s transiluminatorjem (Syngene Chemigenius 2 sistem za dokumentacijo gelov s hlajeno 12-bitno CCD kamero) ter ga računalniško dokumentirali.

100bp DNA Ladder Marker



Slika 3: Molekularni označevalec dolžin pomnožkov DNA po gelski elektroforezi na agarozni

4 REZULTATI

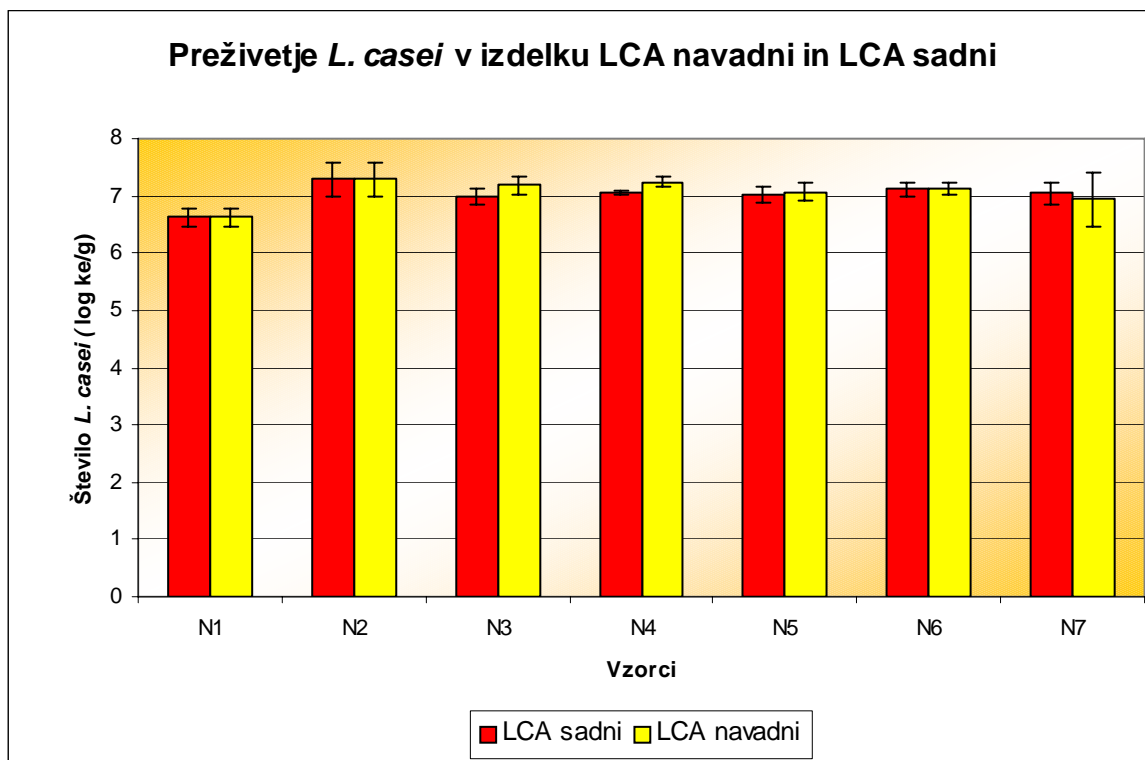
4.1 UGOTAVLJANJE ŠTEVILA PROBIOTIČNIH BAKTERIJ V FERMENTIRANIH MLEČNIH IZDELKIH TER POTRDITEV VRST PRISOTNIH PROBIOTIČNIH BAKTERIJ

Število kolonijskih enot probiotičnih bakterij v vzorcih smo ugotavljali s konvencionalno metodo štetja na ploščah. Hranljiva gojišča, ki smo si jih izbrali, so bila dovolj selektivna, da so na posameznem gojišču zrastle le morfološko enake kolonije. Iz posameznih kolonij smo pripravili mikroskopske preparate. Potrditveni test za vrsto pa smo opravili z metodo PCR.

4.1.1 Število probiotičnih bakterij v posameznih fermentiranih izdelkih

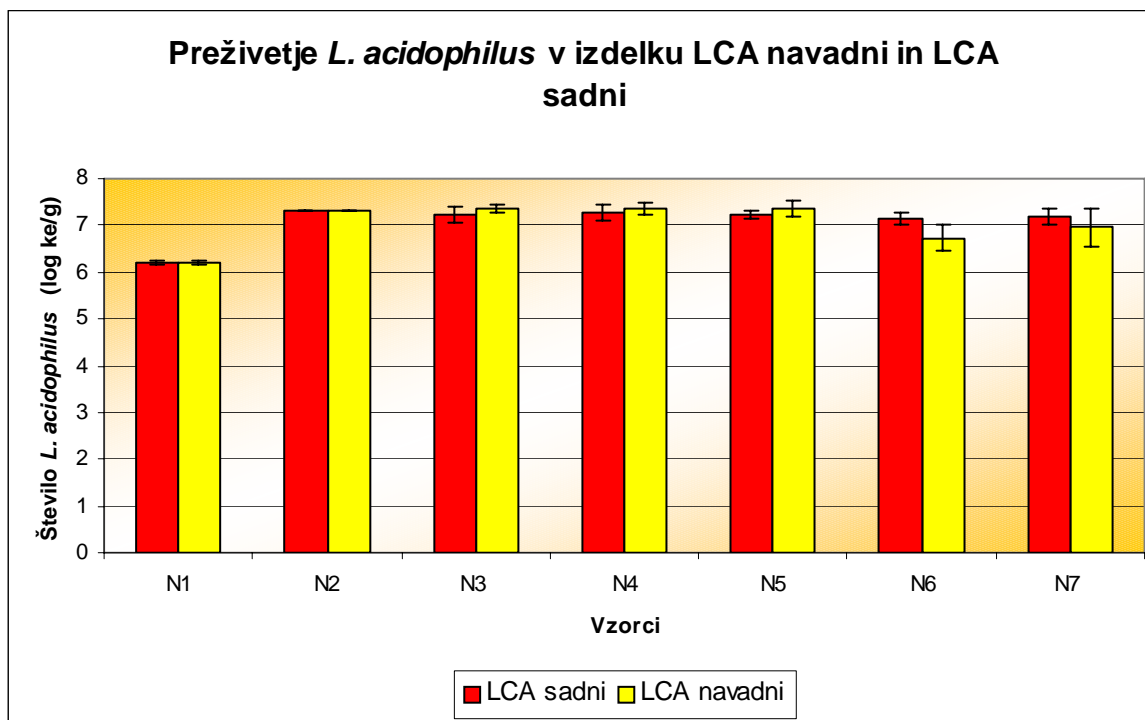
Rezultati ugotavljanja števila probiotičnih bakterij so podani v preglednicah od A1 do A9 v prilogi.

Na slikah od 4 do 11 je grafično prikazano število posameznih probiotičnih bakterij v vzorcih različnih fermentiranih izdelkov, odvzetih v različnih fazah tehnološkega postopka in med skladiščenjem. Posamezen izdelek je bil analiziran v treh šaržah, po dve paralelki v vsaki šarži. Grafično so prikazani rezultati povprečij.



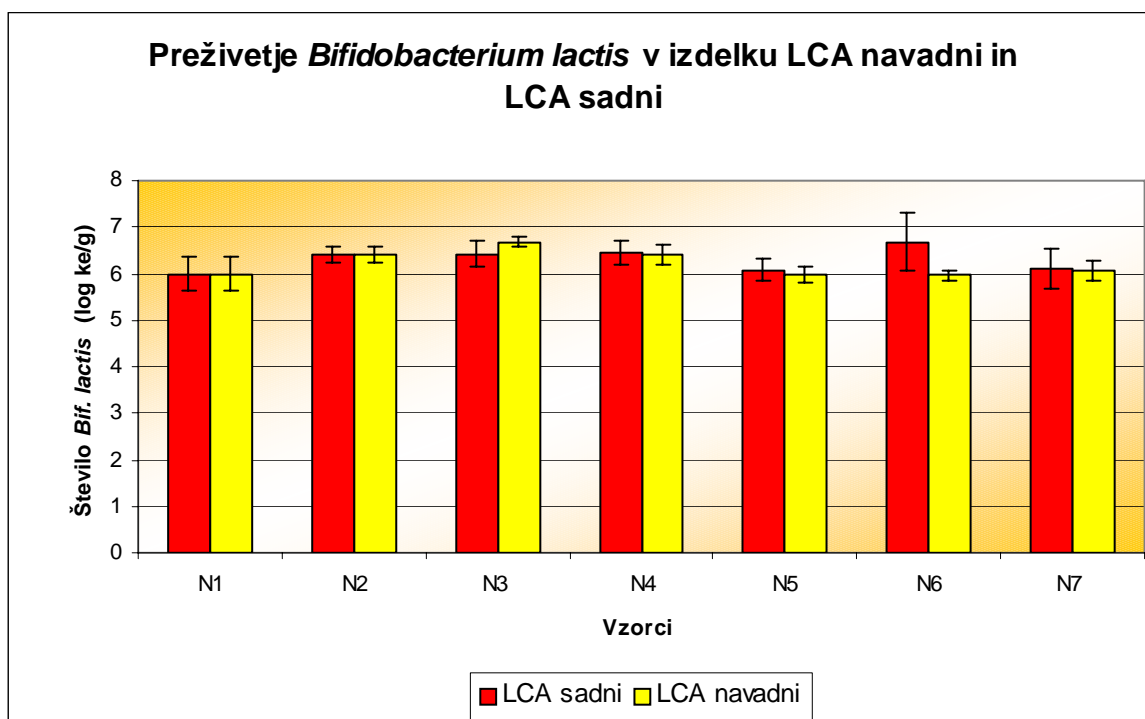
Slika 4: Število bakterij vrste *L. casei* v navadnem in sadnem izdelku LCA (N1 = vzorec ~20 minut po cepljenju kulture, N2 = vzorec po fermentaciji, N3 = vzorec po ~ 18. urah hlajenja, N4 = vzorec po 1. tednu skl., N5 = vzorec po 2. tednu skl., N6 = vzorec po 3. tednu skl., N7 = vzorec zadnji dan roka trajanja)

Slika 4 prikazuje preživetje bakterijske vrste *L. casei* v navadnem in sadnem izdelku LCA. Med fermentacijo število bakterij *L. casei* poraste za približno 0,5 log, med hlajenjem se nekoliko zniža, nato pa ostane velikost žive mikrobne populacije dokaj stabilna do konca skladiščenja. Glede na to, da je razlika med izdelkom z dodatkom sadja in brez majhna, lahko sklepamo, da dodatek sadja v izdelek nima negativnega vpliva na preživetje *L. casei*. Največjo variabilnost med vzorci znotraj skupine smo opazili pri navadnem LCA po 4-ih tednih skladiščenja (N7).



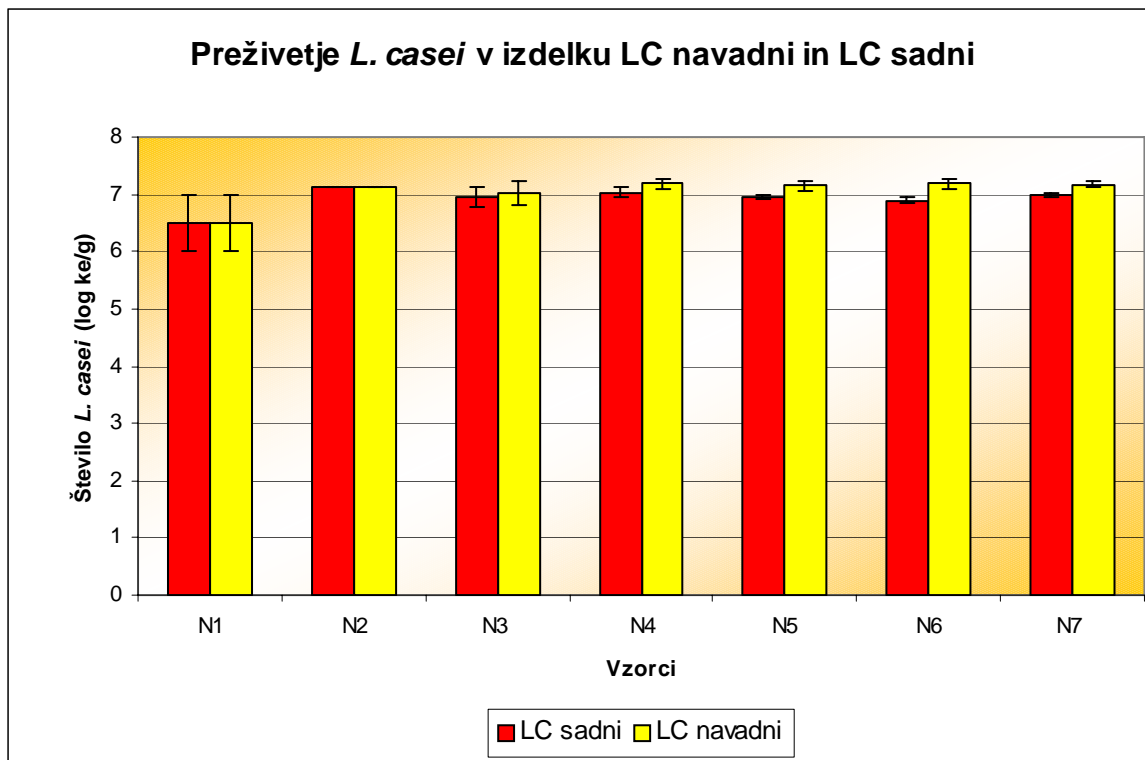
Slika 5: Število bakterij vrste *L. acidophilus* v navadnem in sadnem izdelku LCA (N1 = vzorec ~20 minut po cepljenju kulture, N2 = vzorec po fermentaciji, N3 = vzorec po ~ 18. urah hlajenja, N4 = vzorec po 1. tednu skl., N5 = vzorec po 2. tednu skl., N6 = vzorec po 3. tednu skl., N7 = vzorec zadnji dan roka trajanja)

Med fermentacijo se je število bakterij vrste *Lactobacillus acidophilus* povečalo približno za 10x. Njihovo število je od zaključene fermentacije pa do drugega tedna skladiščenja ostalo na približno enaki ravni, nato pa opazimo rahel trend padanja števila *L. acidophilus*, ki je izrazitejši pri navadnem LCA. Glede na to, da je razlika med izdelkom z dodatkom sadja in brez majhna, lahko sklepamo, da dodatek sadja v izdelek nima negativnega vpliva na preživetje *L. acidophilus*, temveč ga celo nekoliko zaščiti (Slika 5).



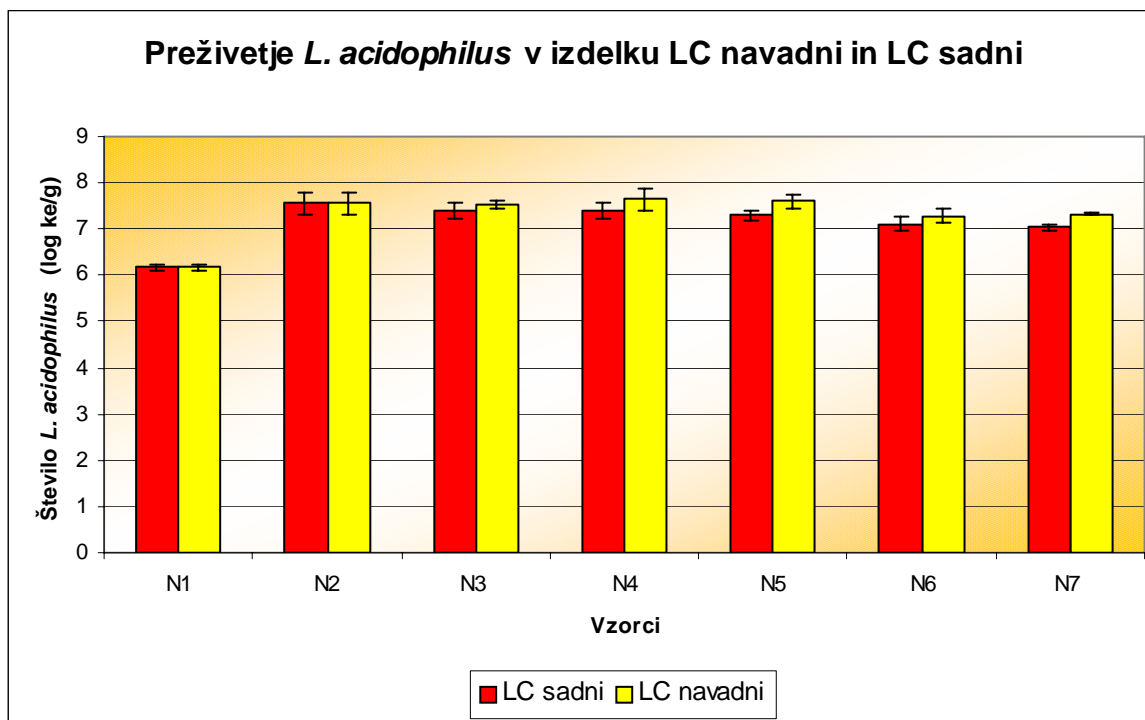
Slika 6: Število bakterij vrste *Bifidobacterium lactis* v navadnem in sadnem izdelku LCA (N1 = vzorec ~20 minut po cepljenju kulture, N2 = vzorec po fermentaciji, N3 = vzorec po ~ 18. urah hlajenja, N4 = vzorec po 1. tednu skl., N5 = vzorec po 2. tednu skl., N6 = vzorec po 3. tednu skl., N7 = vzorec zadnji dan roka trajanja)

Slika 6 prikazuje preživetje probiotičnih bakterij vrste *Bifidobacterium lactis* v izdelku LCA. Tudi bifidobakterije so se med procesom fermentacije namnožile, približno v enakem obsegu kot *L. casei* (za cca. 0,5 log), vendar pa je bilo preživetje bifidobakterij med skladiščenjem slabše. Tekom skladiščenja je njihovo število bolj nihalo kot število laktobacilov, velikost mikrobne populacije bifidobakterij pa se je zadnji dan roka trajanja izdelka (po 4-ih tednih skladiščenja) približala velikosti, ki smo jo ugotovili približno 20 minut po cepljenju kulture v mleko (N1). Glede na to, da je razlika med izdelkom z dodatkom sadja in brez majhna, lahko sklepamo, da dodatek sadja v izdelek nima negativnega vpliva na preživetje *Bif. lactis*.



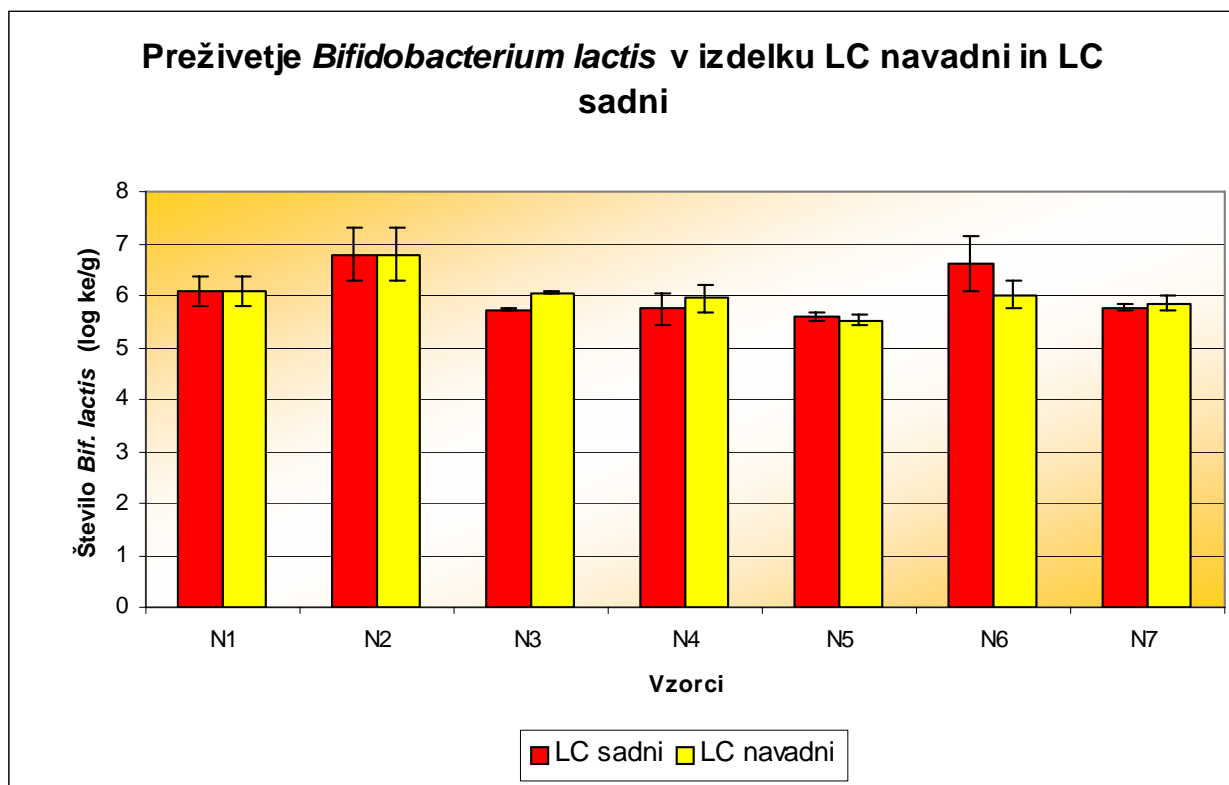
Slika 7: Število bakterij vrste *L. casei* v navadnem in sadnem izdelku LC (N1 = vzorec ~20 minut po cepljenju kulture, N2 = vzorec po fermentaciji, N3 = vzorec po ~ 18. urah hlajenja, N4 = vzorec po 1. tednu skl., N5 = vzorec po 2. tednu skl., N6 = vzorec po 3. tednu skl., N7 = vzorec zadnji dan roka trajanja)

Slika 7 prikazuje preživetje bakterijske vrste *L. casei* v navadnem in sadnem izdelku LC. Med fermentacijo število bakterij *L. casei* poraste za približno 0,6 log, nato ostane velikost žive mikrobne populacije dokaj stabilna do konca skladiščenja. Glede na to, da je razlika med izdelkom z dodatkom sadja in brez majhna, lahko sklepamo, da dodatek sadja v izdelek nima negativnega vpliva na preživetje *L. casei*. Največjo variabilnost med vzorci znotraj skupine smo opazili pri navadnem in sadnem izdelku LC ~20 minut po cepljenju kulture (N1).



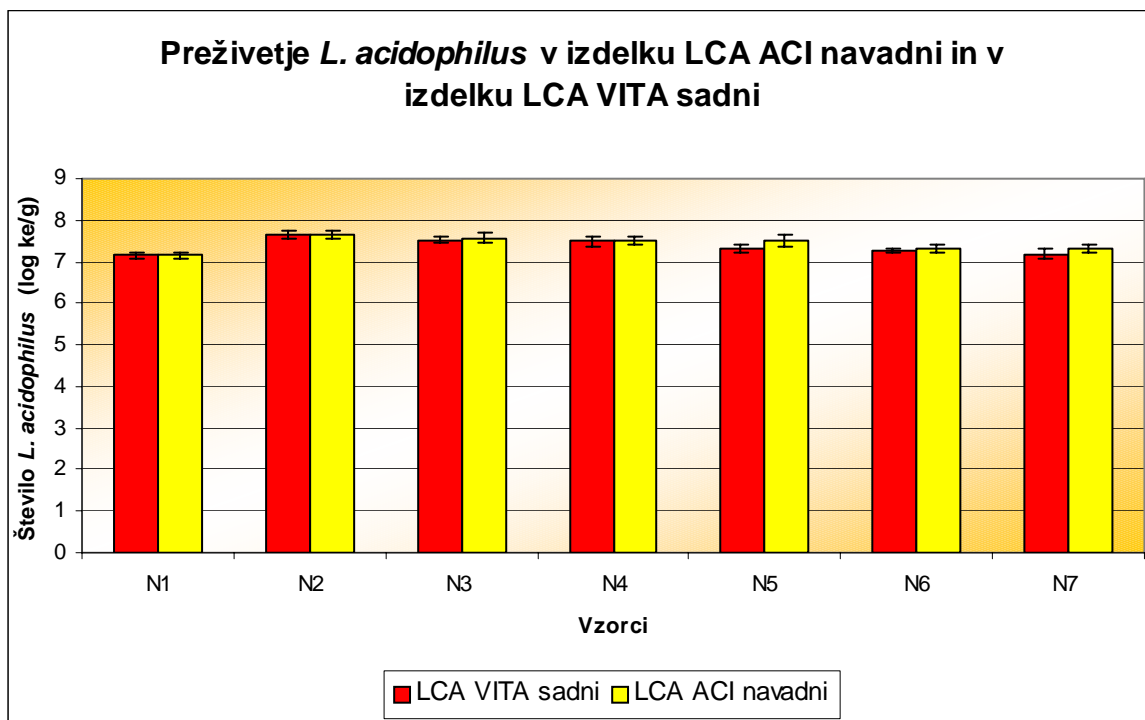
Slika 8: Število bakterij vrste *L. acidophilus* v navadnem in sadnem izdelku LC (N1 = vzorec ~20 minut po cepljenju kulture, N2 = vzorec po fermentaciji, N3 = vzorec po ~ 18. urah hlajenja, N4 = vzorec po 1. tednu skl., N5 = vzorec po 2. tednu skl., N6 = vzorec po 3. tednu skl., N7 = vzorec zadnji dan roka trajanja)

Med fermentacijo se je število bakterij vrste *Lactobacillus acidophilus* v izdelku LC povečalo kar za približno 13x. Nato je njihovo število, podobno kot v izdelku LCA, od zaključene fermentacije pa do drugega tedna skladiščenja ostalo na približno enaki ravni. Od te točke dalje pa je opazen rahel trend upada števila *L. acidophilus*. Kljub temu, da je ves čas skladiščenja povprečno število *L. acidophilus* v navadnem izdelku nekoliko višje kot v sadnem, je razlika majhna in s tehnološkega stališča sprejemljiva.



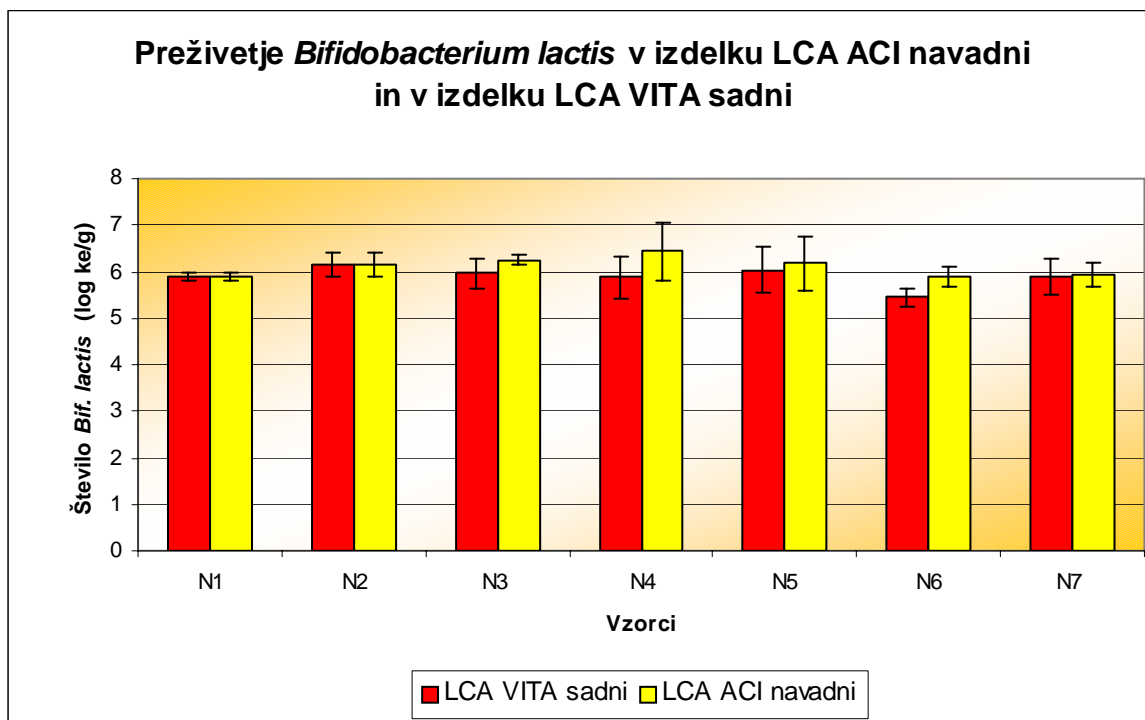
Slika 9: Število bakterij vrste *Bifidobacterium lactis* v navadnem in sadnem izdelku LC (N1 = vzorec ~20 minut po cepljenju kulture, N2 = vzorec po fermentaciji, N3 = vzorec po ~ 18. urah hlajenja, N4 = vzorec po 1. tednu skl., N5 = vzorec po 2. tednu skl., N6 = vzorec po 3. tednu skl., N7 = vzorec zadnji dan roka trajanja)

Slika 9 prikazuje preživetje probiotičnih bakterij vrste *Bifidobacterium lactis* v izdelku LC. Bifidobakterije so se med procesom fermentacije namnožile za cca. 0,8 log, vendar je bilo njihovo preživetje med skladiščenjem slabše, kar smo lahko opazili že pri izdelku LCA. Tekom skladiščenja je število bifidobakterij bolj nihalo kot število laktobacilov. Velikost mikrobne populacije bifidobakterij je zadnji dan roka trajanja izdelka (po 4-ih tednih skladiščenja) padla pod vrednost, ki smo jo ugotovili približno 20 minut po cepljenju kulture v mleko (N1). Razlika v številu *Bif. lactis* med izdelkom z dodatkom sadja in brez je bila tudi pri tem izdelku majhna.



Slika 10: Število bakterij vrste *L. acidophilus* v navadnem izdelku LCA ACI in sadnem izdelku LCA VITA (N1 = vzorec ~20 minut po cepljenju kulture, N2 = vzorec po fermentaciji, N3 = vzorec po ~ 18. urah hlajenja, N4 = vzorec po 1. tednu skl., N5 = vzorec po 2. tednu skl., N6 = vzorec po 3. tednu skl., N7 = vzorec zadnji dan roka trajanja)

V izdelku LCA ACI navadni in LCA VITA sadni se je število bakterij vrste *L. acidophilus*, v primerjavi z izdelkoma LCA in LC, najmanj povečalo med fermentacijo (za cca. 0,5 log). Njihovo število je od zaključene fermentacije pa do drugega tedna skladiščenja, ostalo na približno enaki ravni, nato pa je pričelo rahlo upadati. Glede na to, da je razlika med izdelkom z dodatkom sadja in brez majhna, lahko sklepamo, da dodatek sadja v izdelek nima negativnega vpliva na preživetje *L. acidophilus*.



Slika 11: Število bakterij vrste *Bif. lactis* v navadnem izdelku LCA ACI in sadnem izdelku LCA VITA (N1 = vzorec ~20 minut po cepljenju kulture, N2 = vzorec po fermentaciji, N3 = vzorec po ~ 18. urah hlajenja, N4 = vzorec po 1. tednu skl., N5 = vzorec po 2. tednu skl., N6 = vzorec po 3. tednu skl., N7 = vzorec zadnji dan roka trajanja)

Slika 11 prikazuje preživetje probiotičnih bakterij vrste *Bifidobacterium lactis* v izdelku LCA ACI navadni in LCA VITA sadni. Razmnoževanje bifidobakterij med procesom fermentacije je bilo v teh izdelkih zelo počasno (za cca. 0,3 log). Tudi njihovo preživetje med skladiščenjem je bilo slabše, kar smo lahko opazili že pri izdelkih LCA in LC. Tekom skladiščenja je število bifidobakterij bolj nihalo kot število laktobacilov. Velikost mikrobne populacije bifidobakterij se je zadnji dan roka trajanja izdelka (po 4-ih tednih skladiščenja) približala velikosti, ki smo jo ugotovili približno 20 minut po cepljenju kulture v mleko (N1). Največjo variabilnost med vzorci znotraj skupine smo opazili pri navadnem LCA ACI po 1. in 2. tednu skladiščenja. Dodatek sadja ni imel pomembnega vpliva na preživetje *Bif. lactis*.

4.1.1.1 Statistična obdelava podatkov

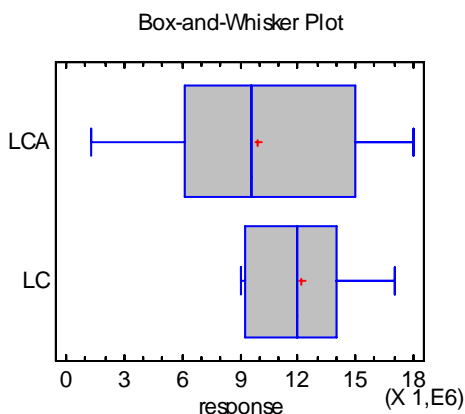
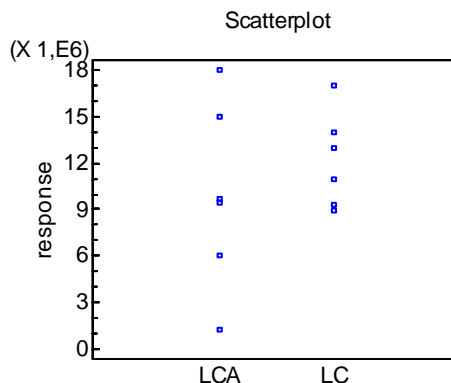
Dobljene podatke smo statistično obdelali z uporabo programa STATGRAPHICS Centurion XV.II.

Primerjali smo razlike v številu posameznih probiotičnih bakterij v fermentiranih izdelkih, vzorčenih med tehnološkim postopkom in skladiščenjem.

Najprej smo primerjali število *L. casei* v izdelkih LCA in LC. Statistična analiza je pokazala, da se izdelka LCA in LC po vsebnosti *L. casei* statistično značilno ne razlikujeta v nobeni fazi vzorčenja.

SnapStat: Multiple Sample Comparison

Sample	Count	Mean	Sigma
LCA	6	9,91667E6	6,00514E6
LC	6	1,22167E7	3,06621E6
	12	1,10667E7	4,7019E6

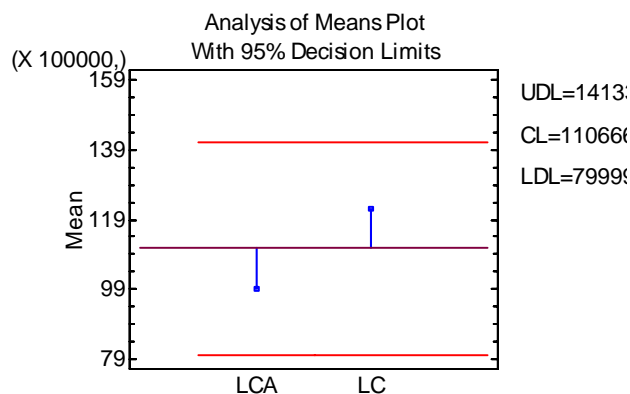
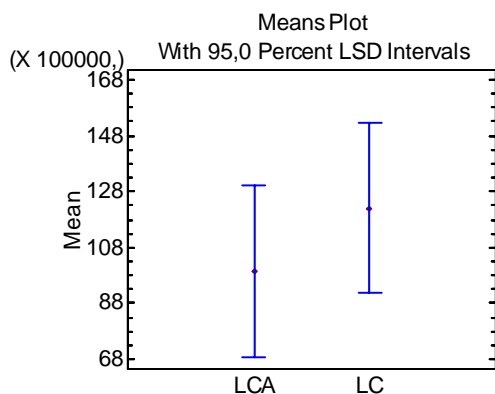


ANOVA Table

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio
Between	1,587E13	1	1,587E13	0,70
Within	2,27317E14	10	2,27317E13	
Total	2,43187E14	11		

P-Value = 0,4229

Variance Check
 Levene's: 1,29713
 P-Value = 0,2813

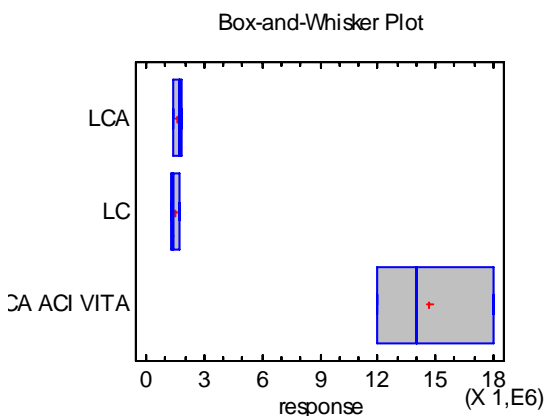
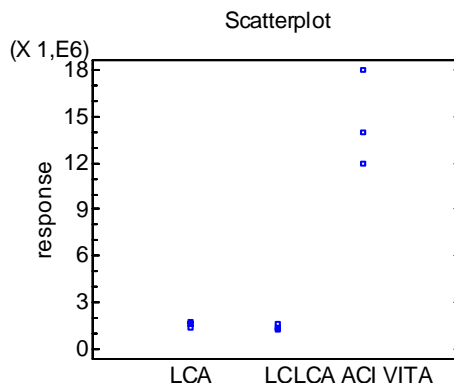


Slika 12: Primer obdelave podatkov z uporabo programa STATGRAPHICS Centurion XV.II za *L. casei* v izdelkih LCA in LC pri N7- zadnji dan roka trajanja

S statistično analizo smo primerjali tudi število bakterij *L. acidophilus* v treh izdelkih: LCA, LC in LCA ACI/VITA. Odstopanja smo s statistično analizo zabeležili pri primerjalni analizi vzorcev, odvzetih 20 minut po inokulaciji kulture (N1) in sicer pri izdelku LCA ACI/VITA. Velikost mikrobne populacije *L. acidophilus*, nacepljene v mleko, je bila statistično značilno ($P = 0,0001$) večja kot pri ostalih dveh izdelkih (slika 13). Naslednjo značilno odstopanje med izdelki smo ugotovili po 18 urah hlajenja (N3). Velikost mikrobne populacije *L. acidophilus* je bila v izdelku LCA statistično značilno ($P = 0,0203$) nižja kot pri ostalih dveh izdelkih. Statistično nižje vrednosti ($P = 0,0218$) pa smo ugotovili tudi v izdelku LCA po treh tednih skladiščenja (N6).

SnapStat: Multiple Sample Comparison

Sample	Count	Mean	Sigma
LCA	3	1,63333E6	208167
LC	3	1,46667E6	208167
LCA ACI VITA3	9	5,92222E6	6,73587E6

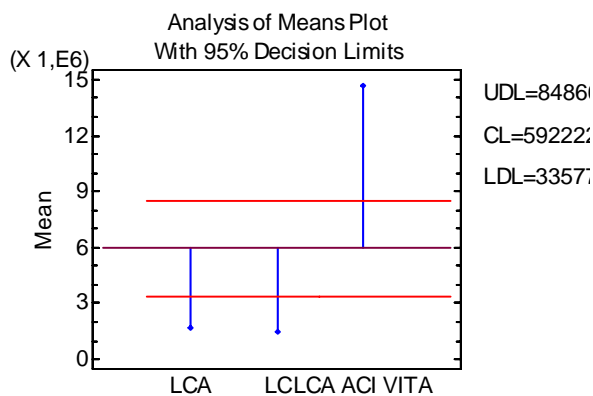
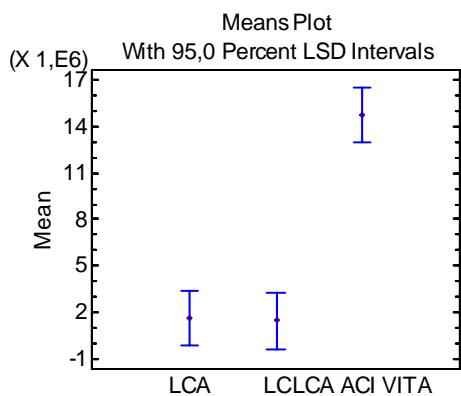


ANOVA Table

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio
Between	3,44136E14	2	1,72068E14	54,80
Within	1,884E13	6	3,14E12	
Total	3,62976E14	8		

P-Value = 0,0001

Variance Check
 Levene's: 2,5832
 P-Value = 0,1551

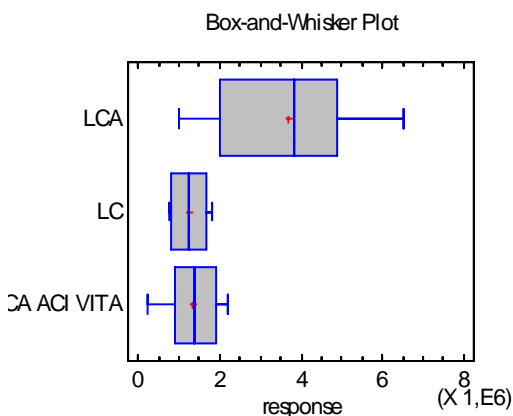
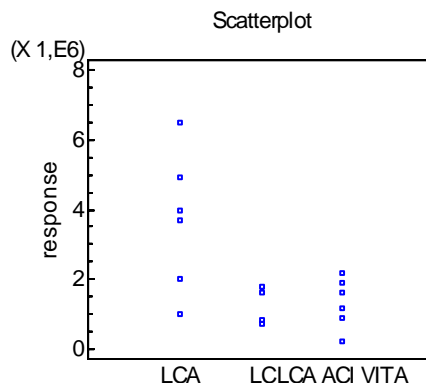


Slika 13: Primer obdelave podatkov z uporabo programa STATGRAPHICS Centurion XV.II za *L. acidophilus* v izdelkih LCA,LC in LCA ACI/VITA pri N1- 20 minut po inokulaciji kulture.

Pri probiotični bakterijski vrsti *Bif. lactis* smo s statističnim programom primerjali število v izdelkih LCA, LC in LCA ACI/VITA. Izdelki LCA, LC in LCA ACI/VITA se v številu ke *Bif. lactis*/ml niso razlikovali statistično značilno. Izstopal je izdelek LCA pri vzorčenju N3 - 18 ur po hlajenju izdelka. Ugotovili smo, da je bila velikost mikrobne populacije *Bif. lactis* v tem vzorcu LCA statistično značilno ($P = 0,0141$) večja kot pri ostalih dveh izdelkih (slika 14).

SnapStat: Multiple Sample Comparison

Sample	Count	Mean	Sigma
LCA	6	3,68333E6	1,97729E6
LC	4	1,25E6	527573
LCA ACI VITA	16	1,34167E6	710223
		2,19688E6	1,71537E6

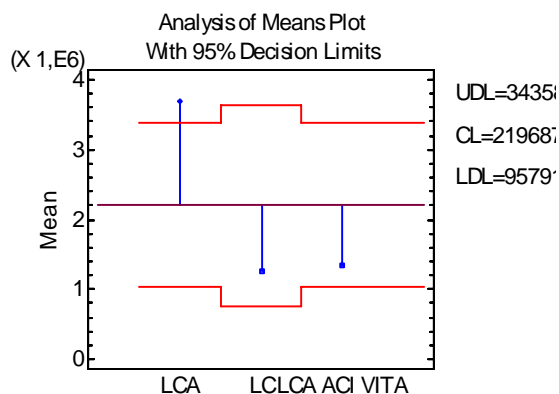
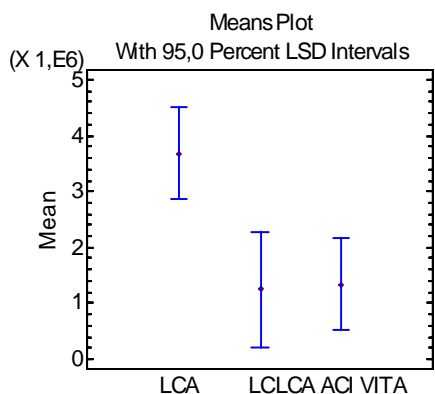


ANOVA Table

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio
Between	2,12319E13	2	1,0616E13	6,03
Within	2,29054E13	13	1,76196E12	
Total	4,41373E13	15		

P-Value = 0,0141

Variance Check
 Levene's 2,75557
 P-Value = 0,1005

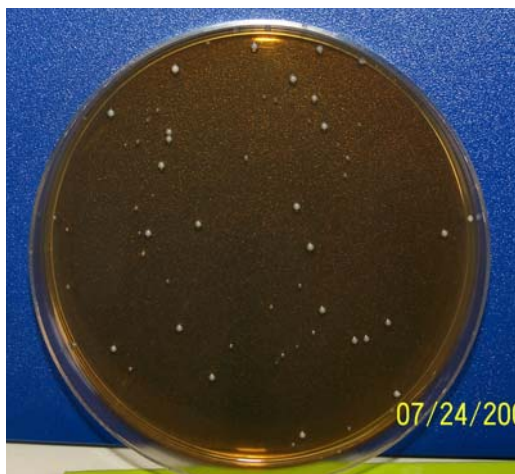


Slika 14: Primer obdelave podatkov z uporabo programa STATGRAPHICS Centurion XV.II za *Bif. lactis* v izdelkih LCA, LC in LCA ACI/VITA pri N3- približno 18 ur po hlajenju izdelka.

4.1.2 Morfološki opis kolonij in probiotičnih bakterij

4.1.2.1 Morfološki opis kolonij na selektivnih gojiščih

- ✓ *L. casei* na gojišču MRS



Slika 15: Kolonije *L. casei* na gojišču MRS

Kolonije so bele barve in pravilne, okrogle oblike.

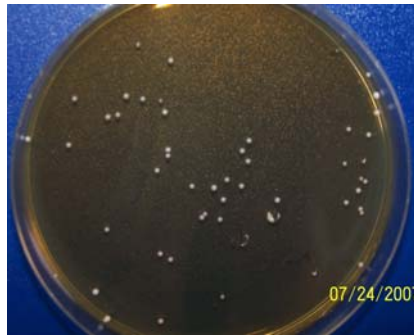
- ✓ *L. acidophilus* na gojišču MRS + cly



Slika 16: Kolonije *L. acidophilus* na gojišču MRS + cly

Kolonije so večje, bele barve do rahlo prozorne, imajo izrazito nazobčan rob in središče nekoliko gostejše.

- ✓ *Bif. lactis* na gojišču MRS + NNLP

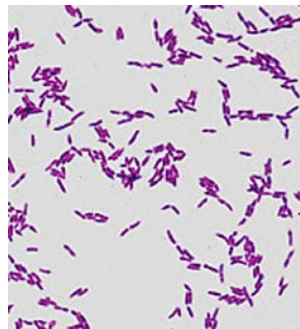


Slika 17: Kolonije *Bif. lactis* na gojišču MRS + NNLP

Kolonije so bele barve s sijajno površino in izbočenim središčem.

4.1.2.2 Morfološki opis bakterij – barvanje po Gramu

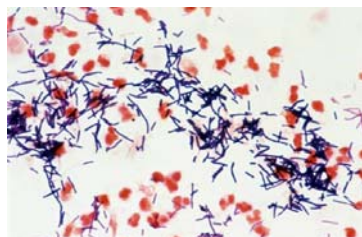
- ✓ *L. casei*, odvzet iz kolonij na gojišču MRS



Slika 18: *L. casei* - mikroskopski preparat, obarvan z metodo po Gramu

Bakterije spadajo v skupino po Gramu pozitivnih bakterij, po obliki so kratke, tanke paličaste bakterije.

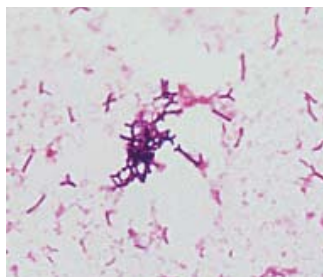
- ✓ *L. acidophilus*, odvzet iz kolonij na gojišču MRS + cly



Slika 19: *L. acidophilus* - mikroskopski preparat, obarvan z metodo po Gramu

Bakterije spadajo v skupino po Gramu pozitivnih bakterij, po obliki so dolge in tanke palčke.

- ✓ *Bif. lactis*, odvzet iz kolonij na gojišču MRS + NNLP



Slika 20: *Bif. lactis* - mikroskopski preparat, obarvan z metodo po Gramu

Bakterije spadajo v skupino po Gramu pozitivnih bakterij. Po obliki so na koncih odebeljene, paličaste bakterije, nekatere imajo obliko črke V ali Y.

4.1.3 Potrditev prisotnosti probiotičnih bakterij z metodo PCR

Metodo verižne reakcije s polimerazo smo izvedli po postopku, opisanem v poglavju 3.3.5. S to molekularno metodo smo potrdili prisotnost probiotičnih bakterijskih vrst v vzorcih. Rezultati so prikazani v preglednici 7.

Preglednica 7: Rezultati ugotavljanja prisotnosti DNA deklariranih vrst bakterij v probiotičnih izdelkih (DNA osamljena iz kolonij, izraslih na selektivnih gojiščih)

Deklarirani mikroorganizmi	Rezultat reakcije PCR za izolate iz različnih vzorcev								
	LCA1	LCA2	LCA3	LC1	LC2	LC3	LCA ACI + VITA1	LCA ACI + VITA2	LCA ACI + VITA3
<i>L. acidophilus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rod <i>Bifidobacterium</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>L. casei</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-

Legenda: +: pozitiven rezultat, pomnožek pričakovane velikosti

-: negativen rezultat, brez pomnožka ali pomnožek napačne velikosti

Vzorci za potrditev prisotnosti deklariranih probiotičnih bakterij smo odbirali naključno. Vsaka od deklariranih bakterij (*L. acidophilus*, *L. casei* in *Bifidobacterium*) je bila v vsaki vrsti izdelka (LCA, LC in LCA ACI oziroma LCA VITA) potrjena vsaj enkrat.

Rezultati reakcij PCR, z za vrsto specifičnimi začetniki, so prikazani na slikah 21 do 23.

4.1.3.1 Potrditev probiotičnih bakterij vrste *L. casei*

Potrditvene teste za bakterijo *L. casei* smo najprej izvedli po postopku, ki je opisan v poglavju 3.3.4, pri čemer smo za izolacijo DNA uporabili toplotni postopek (3.3.3.1.). Pri štirih vzorcih DNA (od skupno 7 vzorcev), pridobljenih iz kolonij, ki smo jih šteli kot *L. casei*, smo dobili negativen rezultat za *L. casei*, če smo v reakcijske epruvete vnašali po 4 μ l vzorca DNA. Pri treh vzorcih DNA (od skupno 9 vzorcev), pridobljenih iz kolonij, ki so zrastle na selektivnih gojiščih za bifidobakterije in enem vzorcu (od skupno 10 vzorcev), pridobljenem iz kolonij, zrastle na selektivnem gojišču za *L. acidophilus*, pa smo dobili pozitiven rezultat za *L. casei*. Sklepali smo, da bi lahko v omenjenih vzorcih bili sledovi DNA bakterij *L. casei*, ki zraste na selektivnih gojiščih za drugi dve vrsti, v obliki mikrokolonij, ki jih sicer nismo upoštevali pri štetju. Reakcijo PCR smo ponovili tako, da smo uporabili 3 različne koncentracije DNA v reakcijski mešanici: 1 μ l, 4 μ l oziroma 8 μ l. Rezultati, ki smo jih dobili pri ponovitvi, so prikazani v preglednici 8. Pri izdelkih LCA in LC smo na izolirani DNA, pridobljeni s toplotnim postopkom iz kolonij, izraslih na gojišču MRS za *L. casei*, dobili pozitiven rezultat pri uporabi 8 μ l in 4 μ l DNA v reakcijski mešanici. Kjer pa smo uporabili le 1 μ l DNA v reakcijski mešanici, so bili rezultati negativni. Sklepamo lahko, da je 1 μ l DNA v reakcijski mešanici premajhna količina, da bi potekla verižna reakcija s polimerazo.

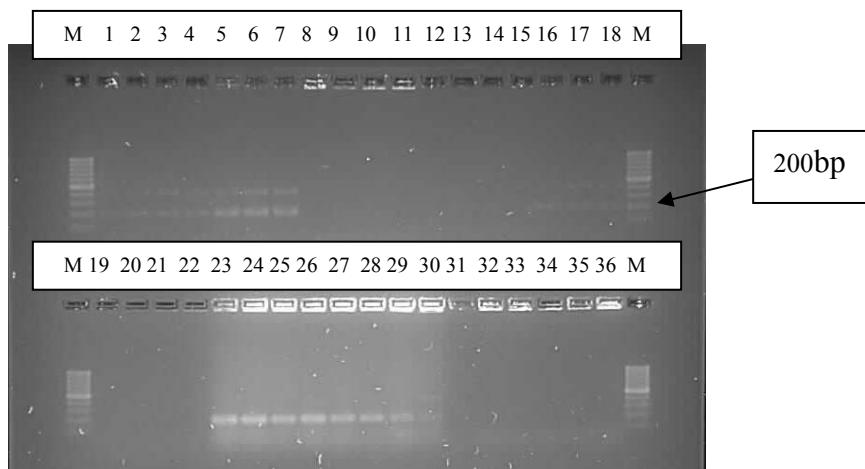
V vzorcih (LC2, LCA2, LC1 in LCA3), izoliranih iz kolonij z gojišč MRS + cly za *L. acidophilus* in MRS + NNLP za bifidobakterije, ki so dali v prvem poskusu pozitivno reakcijo PCR za *L. casei*, pa smo v ponovitvi dobili negativen rezultat pri dodatku 8 in 1 μ l DNA v reakcijski mešanici.

Preglednica 8: Rezultati specifične reakcije PCR za *L. casei*

Oznaka vzorca	Izdelek	Gojišče	Koncentracija DNA v reakcijski mešanici	Rezultat PCR
M	Molekularni označevalec (100bp DNA Ladder)			
1	LCA 0- testna serija (navadni)*	MRS	8 µl	+
2	LCA1 (sadni)	MRS	8 µl	+
3	LC1 (sadni)	MRS	8 µl	+
4	LCA2 (sadni)	MRS	8 µl	+
5	LC2 (navadni)	MRS	8 µl	+
6	LCA3 (sadni)	MRS	8 µl	+
7	LC3 (navadni)	MRS	8 µl	+
8	LC2 (navadni)	MRS + cly	8 µl	-
9	LCA2 (sadni)	MRS + NNLP	8 µl	-
10	LC1 (sadni)	MRS + NNLP	8 µl	-
11	LCA3 (navadni)	MRS + NNLP	8 µl	-
12	LCA 0- testna serija (navadni)*	MRS	1 µl	-
13	LCA1 (sadni)	MRS	1 µl	-
14	LC1 (sadni)	MRS	1 µl	-
15	LCA2 (sadni)	MRS	1 µl	-
16	LC2 (navadni)	MRS	1 µl	-
17	LCA3 (sadni)	MRS	1 µl	-
18	LC3 (navadni)	MRS	1 µl	-
19	LC2 (navadni)	MRS + cly	1 µl	-
20	LCA2 (sadni)	MRS + NNLP	1 µl	-
21	LC1 (sadni)	MRS + NNLP	1 µl	-
22	LCA3 (navadni)	MRS + NNLP	1 µl	-
23	LCA 0- testna serija (navadni)*	MRS	4 µl	+
24	LCA1 (sadni)	MRS	4 µl	+
25	LC1 (sadni)	MRS	4 µl	+
26	LCA2 (sadni)	MRS	4 µl	+
27	LC2 (navadni)	MRS	4 µl	+
28	LCA3 (sadni)	MRS	4 µl	+
29	LC3 (navadni)	MRS	4 µl	+
30	Pozitivna kontrola <i>L. casei</i>			+
31	Negativna kontrola			-

*LCA 0- testna serija (navadni): predposkus vzorčenja izdelkov iz serije LCA (navadni); ta serija ni vključena med podane rezultate o številu posameznih probiotičnih bakterij!

Rezultati reakcije PCR, s katero smo potrjevali vrsto *L. casei*, so prikazani na sliki 21.



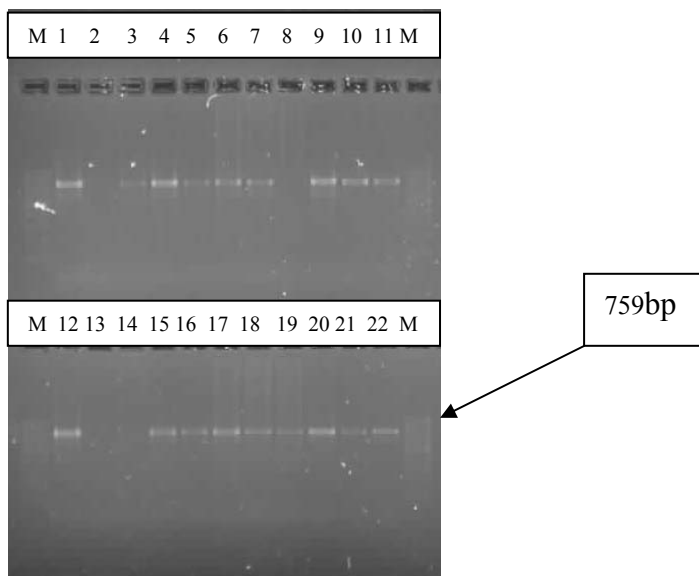
Slika 21: Rezultati specifične reakcije PCR za vrsto *L. casei* (DNA izolirana iz kolonij, izraslih na MRS)

4.1.3.2 Potrditev probiotične bakterije *L. acidophilus*

Potrditvene teste za bakterijo *L. acidophilus* smo izvedli najprej na DNA, izolirani s toplotnim postopkom (3.3.3.1) in postopkom, opisanem pod poglavjem 3.3.4. Ker nismo dobili nobenega pozitivnega rezultata (pomnožka) smo sklepali, da je bila koncentracija tarčne DNA v vzorcu, oziroma reakcijski mešanici za PCR, premajhna. Predvidevali smo, da je bila neuspešna izolacija DNA. Zato smo v nadaljevanju uporabili v reakciji PCR vzorce DNA, izolirane z uporabo komercialnega seta za izolacijo genomske DNA Wizard. Razen tega smo preskusili dve koncentraciji DNA v reakcijskih mešanicah: 2 μ l oziroma 4 μ l DNA/20 μ l mešanice. Rezultati so prikazani na sliki 22 in v preglednici 9. Pozitiven rezultat smo dobili pri vzorcih pod oznakami od 3 do 7 in od 9 do 11. Pri teh vzorcih je bilo v reakcijski mešanici dodano 4 μ l DNA. Pri vzorcu pod oznako 8 smo dobili negativen rezultat, vendar je bil ta isti vzorec nato pri uporabi polovične količine DNA v reakcijski mešanici, pozitiven (isti vzorec pod oznako 19). Pozitivne rezultate smo dobili tudi pri vzorcih pod oznako od 15 do 22, pri katerih je bilo v reakcijski mešanici 2 μ l DNA, medtem, ko je bil rezultat vzorca pod oznako 14 negativen. Spet je bil isti vzorec pri drugačni količini DNA (4 μ l) v reakcijski mešanici pozitiven.

Preglednica 9: Rezultati specifične reakcije PCR za *L. acidophilus*

Oznaka vzorca	Izdelek	Gojišče	Koncentracija DNA v reakcijski mešanici	Rezultat PCR
M	Molekularni označevalec (100bp DNA Ladder)			
1	Pozitivna kontrola <i>L. acidophilus</i>			+
2	Negativna kontrola			-
3	LC1 (navadni)	MRS + cly	4 µl	+
4	LCA1 (sadni)	MRS + cly	4 µl	+
5	LCA ACI 1 (navadni)	MRS + cly	4 µl	+
6	LC2 (navadni)	MRS + cly	4 µl	+
7	LCA2 (sadni)	MRS + cly	4 µl	+
8	LCA VITA 2 (sadni)	MRS + cly	4 µl	-
9	LCA3 (navadni)	MRS + cly	4 µl	+
10	LC3 (sadni)	MRS + cly	4 µl	+
11	LCA ACI 3 (navadni)	MRS + cly	4 µl	+
12	Pozitivna kontrola <i>L. acidophilus</i>			+
13	Negativna kontrola			-
14	LC1 (navadni)	MRS + cly	2 µl	-
15	LCA1 (sadni)	MRS + cly	2 µl	+
16	LCA ACI 1 (navadni)	MRS + cly	2 µl	+
17	LC2 (navadni)	MRS + cly	2 µl	+
18	LCA2 (sadni)	MRS + cly	2 µl	+
19	LCA VITA 2 (sadni)	MRS + cly	2 µl	+
20	LCA3 (navadni)	MRS + cly	2 µl	+
21	LC3 (sadni)	MRS + cly	2 µl	+
22	LCA ACI 3 (navadni)	MRS + cly	2 µl	+



Slika 22: Rezultati specifične reakcije PCR za vrsto *L. acidophilus* (DNA izolirana z uporabo komercialnega seta za izolacijo genomske DNA)

4.1.3.3 Potrditev probiotične bakterijske vrste *Bifidobacterium lactis*

Potrditvene teste za bakterijo *Bifidobacterium lactis* smo izvedli po postopku, opisanem v poglavju 3.3.4. V reakciji PCR smo uporabili kolonije s selektivnih gojišč, ki smo jih obdelali s toplotnim postopkom, kakor je opisano v poglavju 3.3.3.1.

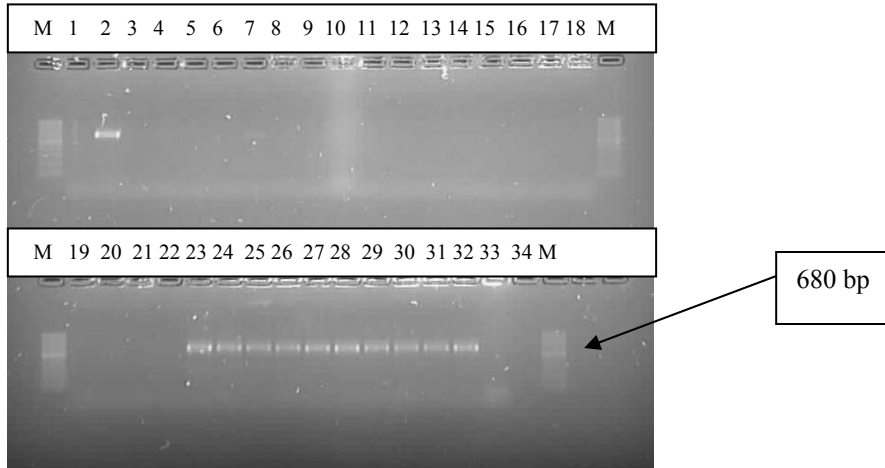
Rezultati so prikazani na sliki 23 in v preglednici 10. Rezultati PCR so bili pozitivni pri vzorcih pod oznako od 23 do 32, torej na DNA, izolirani iz kolonij izraslih na selektivnem gojišču za bifidobakterije. Tako smo potrdili vrsto *Bifidobacterium lactis* v izdelkih, ki naj bi to bakterijo vsebovali. V reakcijo PCR za potrditev bakterij vrste *Bifidobacterium lactis* smo na začetku vključili tudi DNA, ki smo jo s toplotnim postopkom izolirali iz razmaza čiste kulture ABT, ki se uporablja pri pripravi fermentiranih mlečnih izdelkov. Rezultat za vzorec pod oznako 3, ki smo ga dobili na potrditvenem testu PCR bi moral biti pozitiven, vendar ni. Glede na ostale pozitivne rezultate pri potrditvi vrste *Bif. lactis* lahko sklepamo, da smo naredili napako pri postopku izolacije DNA.

Preglednica 10: Rezultati specifične reakcije PCR za *Bifidobacterium lactis*

Oznaka vzorca	Izdelek	Gojišče	Koncentracija DNA v reakcijski mešanici	Rezultat PCR
M	Molekularni označevalec (100bp DNA Ladder)			
1	Negativna kontrola			-
2	Pozitivna kontrola <i>Bifidobacterium lactis</i>			+
3	Kultura ABT*	MRS + NNLP (45 °C)	4 µl	-
4	Kultura ABT*	MRS + cly (45 °C)	4 µl	-
5	Kultura ABT*	MRS + cly (37 °C)	4 µl	-
6	LCA 0- testna serija (sadni)**	MRS	4 µl	-
7	LCA1 (sadni)	MRS	4 µl	-
8	LC1 (sadni)	MRS	4 µl	-
9	LCA2 (sadni)	MRS	4 µl	-
10	LC2 (navadni)	MRS	4 µl	-
11	LCA3 (sadni)	MRS	4 µl	-
12	LC3 (navadni)	MRS	4 µl	-
13	LCA 0- testna serija (navadni)**	MRS + cly	4 µl	-
14	LC1 (navadni)	MRS + cly	4 µl	-
15	LCA1 (sadni)	MRS + cly	4 µl	-
16	LCA ACI 1 (navadni)	MRS + cly	4 µl	-
17	LC2 (navadni)	MRS + cly	4 µl	-
18	LCA2 (sadni)	MRS + cly	4 µl	-
19	LCA VITA 2 (sadni)	MRS + cly	4 µl	-
20	LCA3 (navadni)	MRS + cly	4 µl	-
21	LC3 (sadni)	MRS + cly	4 µl	-
22	LCA ACI 3 (navadni)	MRS + cly	4 µl	-
23	LC1 (sadni)	MRS + NNLP	4 µl	+
24	LCA1 (sadni)	MRS + NNLP	4 µl	+
25	LCA ACI 1 (sadni)	MRS + NNLP	4 µl	+
26	LC2 (navadni)	MRS + NNLP	4 µl	+
27	LCA2 (sadni)	MRS + NNLP	4 µl	+
28	LCA ACI 2 (navadni)	MRS + NNLP	4 µl	+
29	LCA3 (navadni)	MRS + NNLP	4 µl	+
30	LC3 (navadni)	MRS + NNLP	4 µl	+
31	LCA VITA 3 (sadni)	MRS + NNLP	4 µl	+
32	LC3 (navadni)	MRS + NNLP	4 µl	+
33	Negativna kontrola			-
34	Negativna kontrola			-

* Kultura ABT: razmaz ABT kulture na selektivna gojišča in inkubacija pri različnih temperaturah (37 °C in 45 °C).

**LCA 0- testna serija (brez sadja): predposkus vzorčenja izdelkov s serijo LCA (brez sadja); ta serija ni vključena med podane rezultate o številu posameznih probiotičnih bakterij!



Slika 23: Rezultati specifične reakcije PCR za vrsto *Bifidobacterium lactis*

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Ugotavljanje števila deklariranih probiotičnih bakterij

Strokovnjaki na področju probiotikov si niso povsem enotni glede minimalne predpisane količine probiotičnih bakterij, ki zagotavlja pričakovane funkcionalne učinke. Za probiotične prehranske izdelke, med katerimi prevladujejo fermentirani mlečni izdelki, je najbolj razširjeno priporočilo, da naj bi ob zaužitju probiotični izdelek vseboval vsaj 10^6 probiotičnih bakterij na ml ali gram. Dnevno pa naj bi po Mullan-u (2002) človek zaužil skupaj najmanj 10^8 do 10^9 probiotičnih bakterij. Na Japonskem zagovarjajo nekoliko višje odmerke, saj naj bi bilo probiotičnih bakterij najmanj 10^7 v gramu oz. ml izdelka (Mullan, 2002).

V predstavljeni nalogi smo si v delovni hipotezi zastavili, da naj bi bilo v preiskovanih izdelkih najmanj 10^7 živih probiotičnih bakterij v gramu oz. ml izdelka, kar ustreza strožjim priporočilom.

Selektivna gojišča, ki smo jih izbrali za kultivacijo posamezne vrste probiotičnih bakterij, so imela specifično sestavo in so omogočala dobro selektivnost med probiotičnimi bakterijami. Z metodo PCR smo deklarirane vrste probiotičnih bakterij brez težav dokazali na nivoju DNA, izolirane iz kolonij, izraslih na selektivnih gojiščih.

Analizirali smo izbrane probiotične izdelke tako brez (navadni) kot s sadnim dodatkom (sadni). V tehnološkem postopku priprave navadnih in sadnih izdelkov je razlika le v dodajanju sadne mase pri sadnih izdelkih, in sicer se tik pred polnjenjem izdelka, v ohlajeno fermentirano mleko doda približno 10 % sadne mase izbranega okusa. Tako je potrebno upoštevati, da do manjšega (okrog 10 %) upada v koncentraciji probiotičnih bakterij v sadnih izdelkih pride že zaradi sadnega dodatka. Rezultati so pokazali, da sadni dodatek ne vpliva negativno na preživetje probiotičnih bakterij. V povprečju je bilo število probiotičnih bakterij v sadnih izdelkih za 10 do 17 % nižje, v primerjavi z istimi navadnimi izdelki, a to samo takoj na začetku, po 18-tih urah hlajenja izdelka (N3). Med skladiščenjem te razlike nismo več opazili.

Iz naših rezultatov lahko sklepamo, da se velikost mikrobne populacije probiotične bakterije *L. casei* med fermentacijo poveča, nato pa populacija dobro preživi pogoje skladiščenja tako navadnih kot sadnih izdelkov LCA in LC vse do zadnjega dne roka trajanja. Izdelki so po 4-ih tednih skladiščenja ohranili minimalno koncentracijo živih

probiotičnih bakterij *L. casei*, ki je zahtevana za probiotične mlečne izdelke. Bakterijam vrste *L. casei* so pogoji fermentacije ustrezali, kljub dejstvu, da je fermentacija potekala pri temperaturi od 39 do 40 °C, optimalna temperatura za rast *L. casei* pa je od 30 do 35 °C (Sejong in sod., 1995). Tako se je število teh bakterij med fermentacijo povečalo v povprečju za štiri do petkrat. Skladiščenje izdelka je potekalo pri 4°C in do zadnjega dne roka uporabnosti drastičnega upada probiotičnih bakterij vrste *L. casei* ni bilo zaznati. Zadnji dan roka trajanja se je v izdelkih LCA in LC gibalo število probiotičnih bakterij *L. casei* v območju od $6,1 \cdot 10^6$ ke/g do $1,8 \cdot 10^7$ ke/g. Iz rezultatov naših analiz lahko zaključimo, da je tehnološko najbolj kritičen del za preživetje bakterij *L. casei* faza 18-urnega hlajenja po zaključeni fermentaciji, saj se je tako pri izdelku LCA kot pri izdelku LC število bakterij *L. casei* ravno takrat najbolj zmanjšalo.

V izdelkih LCA, LC in LCA ACI oziroma VITA je zelo dobro preživela mikrobnna populacija vrste *L. acidophilus*. Ob cepljenju kulture v mleko se je število bakterij vrste *L. acidophilus* v izdelkih LCA in LC gibalo v območju od $1,3 \cdot 10^6$ ke/g do $1,8 \cdot 10^6$ ke/g. V izdelku LCA ACI oziroma VITA pa je bil osnovni inokulum višji za kar 10-krat in se je gibal v območju od $1,2 \cdot 10^7$ ke/g do $1,8 \cdot 10^7$ ke/g. Visoko število bakterij vrste *L. acidophilus* takoj po cepljenju v mleko za izdelavo LCA ACI oz. VITA lahko najbrž pripišemo dejstvu, da kultura za ta izdelek ne vsebuje probiotične kulture *L. casei*, kot jo vsebujeta izdelka LCA in LC in se je proizvajalec odločil, da bo to razliko korigiral z višjo vsebnostjo kulture *L. acidophilus*.

Za probiotične bakterije vrste *L. acidophilus* so bili pogoji fermentacije več kot odlični, saj se je njihovo število v povprečju povečalo za približno 12-krat. Povprečje prirasta teh bakterij med fermentacijo znižuje izdelek LCA ACI oz. VITA, v katerem so se bakterije *L. acidophilus* namnožile v povprečju le za 3-krat. Dobro razmnoževanje vrste *L. acidophilus* med fermentacijo je bilo tudi pričakovati, kajti optimalna temperatura rasti teh bakterij je 37 °C in zato je bila temperatura fermentacije, ki se je gibala v območju od 39 do 40 °C (IDF Standard 192, 2006) za njihovo rast in razmnoževanje ugodna. Prav tako so tem bakterijam ustrezali tudi pogoji v fermentorju, saj so dopuščali ravno pravšnjo količino kisika za uspešno razmnoževanje, ki ga je spodbujala tudi prisotnost vrste *Streptococcus thermophilus*. Število bakterij vrste *L. acidophilus* se je zadnji dan roka trajanja v izdelkih LCA, LC in LCA ACI oz. VITA gibalo v območju od $2,0 \cdot 10^6$ ke/g do $2,5 \cdot 10^7$ ke/g, kar zadosti kriterijem glede priporočene koncentracije v tovrstnih izdelkih. Iz naših podatkov lahko sklepamo, da bakterije *L. acidophilus* dobro prenesejo pogoje skladiščenja. Pri izdelkih je v povprečju opaziti nekoliko večji upad števila na prehodu iz 2. v 3. teden skladiščenja.

Število bakterij vrste *Bif. lactis* je bilo v fermentiranih izdelkih, za razliko od ostalih dveh kultur, nekoliko manjše. Takšen rezultat smo pričakovali, saj so glede na literaturne podatke (Talwalkar in sod., 2001) bifidobakterije, najbolj občutljive za pogoje, ki so prisotni v fermentiranem mleku. Že število živih celic takoj po cepljenju kulture je bilo nižje in se je gibalo med $3,8 \cdot 10^5$ ke/g in $1,9 \cdot 10^6$ ke/g, pa tudi med fermentacijo se niso namnožile kot bi želeli, saj se je njihovo število v povprečju povečalo le za dva- do petkrat. Razlog gre iskati v pogojih, ki jih zahtevajo bifidobakterije za svojo rast. So namreč zelo občutljive za kisik, ki je zanje že v zelo majhnih količinah toksičen. V fermentorju je bil med fermentacijo ves čas prisoten kisik, ki se je zadrževal na vrhu posode. Po poteku fermentacije pa se v fermentacijski posodi vključi mešalo, kar pospeši aeriranje celotne zmesi, ki pa je za probiotično kulturo in njeno preživetje neugodno. Med skladiščenja je bilo število bifidobakterij najbolj nestanovitno, saj je nihalo iz tedna v teden, do konca roka uporabnosti. Variabilnost števila bifidobakterij v analiziranih vzorcih izdelkov lahko do neke mere pripišemo tudi različni koncentraciji kisika v izdelku, oziroma različnem času izpostavljenosti kisiku med samo mikrobiološko analizo. Za bolj zanesljivo razlago nihanja števila bifidobakterij med skladiščenjem bi bilo potrebno spremljati koncentracijo prisotnega kisika v lončkih. Menimo, da ni nezanemarljivo dejstvo, da skozi lončke, ki so sestavljeni iz standardnega polistirena, prihaja do migracij plinov in le ti lahko vplivajo na bifidobakterije, saj vemo, da je kisik zanje toksičen že v nizkih koncentracijah. Glede na manjše število bakterij že ob sami inokulaciji, je bilo preživetje bakterij vrste *Bif. lactis* tekom skladiščenja zadovoljivo. Zanimiv pa je tudi rezultat, da se je v izdelku LCA ACI oziroma LCA VITA zadnji dan roka trajanja nahajalo najmanjše število bakterij vrste *Bifidobacterium lactis*, v primerjavi z ostalimi izdelki. Ker je bilo število bifidobakterij najmanjše ravno v izdelku, ki ne vsebuje probiotične bakterije *L. casei*, lahko sklepamo, da pri tem igra veliko vlogo tudi sožitje bakterij, ki so prisotne v izdelku. Zadnji dan roka trajanja se je število bakterij vrste *Bif. lactis* v 1 g gibalo v območju od $1,5 \cdot 10^5$ ke do $2,3 \cdot 10^6$ ke, kar je nekoliko pod mejo 10^6 ke/g, ki velja za manj strog kriterij. Morda bi bilo smiselno razmisliti o povišani koncentraciji dodane kulture *Bif. lactis* v mleko.

Statistična obdelava podatkov o številu probiotičnih bakterij posameznih vrst v različnih fermentiranih izdelkih in različnih časovnih intervalih vzorčenja je pokazala, da med izdelki LCA, LC in LCA ACI oz. VITA v splošnem ni statistično signifikantnih razlik (pri 95 % intervalu zaupanja). V primeru vrste *L. acidophilus* so bila manjša odstopanja vzorcev izdelka LCA ACI/VITA, odvzetih po cepljenju kulture v mleko, saj je bilo število nacepljenih bakterij večje kot v drugih izdelkih. Razlika v številu teh bakterij je bila statistično značilna tudi po 18-urnem hlajenju izdelka po fermentaciji (N3), ko je bilo v izdelku LCA število *L. acidophilus* manjše kot v drugih izdelkih, v izdelku LCA

ACI/VITA pa večje. Prav tako je bilo manj bakterij vrste *L. acidophilus* v izdelku LCA, kot v drugih izdelkih, po 3 tednih skladiščenja (N6).

Shah je leta 2002 poročal o raziskavi, ki je bila izvedena na probiotičnih jogurtih, proizvedenih v Avstraliji in Evropi. V teh izdelkih so spremljali vrsto *L. acidophilus* in več vrst bifidobakterij. Ugotovili so prenizko vsebnost, še posebej pri bifidobakterijah, in začeli iskati vzroke za to. Ugotovili so, da na preživetje probiotičnih bakterij vplivajo protimikrobne snovi, kot je mlečna kislina, ki nastaja med fermentacijo in skladiščenjem izdelka. Jogurtova kultura in probiotična kultura tvorita različne organske kisline, med katerimi je najbolj zastopana očetna in ima zelo zaviralen vpliv na bifidobakterije. Shah (2002) še navaja, da število prisotnih probiotičnih bakterij v izdelku močno zavisi od vrste in tudi seva, ki se uporablja v proizvodnji fermentiranega izdelka, od interakcij z ostalimi bakterijami starterske kulture, od vitalnosti kulture, od zmožnosti tvorbe vodikovega peroksida preko metabolnih reakcij bakterij, od končne kislosti izdelka in vsebnosti mlečne ter očetne kisline v mediju.

Število probiotičnih bakterij je v fermentiranih izdelkih odvisno tudi od razpoložljivih hranilnih snovi, od prisotnosti rastnih faktorjev in raznih inhibitorjev v mediju, od koncentracije sladkorjev (ozmotski pritisk), od koncentracije raztopljenega kisika in prehoda le tega preko embalažnega materiala. Slednje je še posebej pomembno za bifidobakterije. Na število vplivajo tudi tehnološki pogoji, kot je velikost inokuluma, temperatura in čas fermentacije izdelka ter trajanje skladiščenja (Gomes in Malcata, 1999). Kot glavna dejavnika, ki vplivata na preživetje bifidobakterij, navaja Shah (2002) znižanje vrednosti pH in akumulacijo organskih kislin kot rezultat rasti in metabolizma bakterij samih. Joseph in sod. (1998) so v raziskavi ugotavljali antagonističen odnos med jogurtovo startersko kulturo in probiotičnimi bakterijami. Ugotovili so inhibicijo dveh izolatov bifidobakterij, ki so jih povzročili sevi *L. acidophilus*. Mehanizma delovanja niso opisali.

Dave in Shah (1997) sta prav tako raziskovala odnose med kulturami v jogurtu s probiotičnimi bakterijami. Prišla sta do ugotovitve, da posamezni sevi *Streptococcus thermophilus* proizvajajo stabilne bakteriocine, aktivne proti bifidobakterijam.

Bifidobakterije so probiotične kulture, ki zahtevajo posebne rastne pogoje. Mnogo raziskav je bilo narejenih na bifidobakterijah in na izboljšanju njihovega preživetja med fermentacijo in skladiščenjem mlečnih izdelkov. Talkwalker in sod. (2001) so proučevali vpliv kisika na probiotične bakterije vrste *L. acidophilus* in vrst *Bifidobacterium*. Prišli so do ugotovitve, da sevi vrste *L. acidophilus* bolje rastejo v anaerobnih pogojih. Podobno so to dokazali za večino sevov *Bifidobacterium*. Le sev *Bif. infantis* je pokazal boljšo rast v

aerobnih pogojih kot pa v anaerobnih, kar je bilo zelo presenetljivo glede na striktno anaeroben metabolizem.

Shah (2000) je v članku opisal raziskavo o rasti bifidobakterij v humanem mleku. Ugotovil je boljšo rast v humanem mleku kot v kravjem in iskal odgovor na to. Študija je pokazala, da se v humanem mleku nahaja t.i. »bifido faktor«, polisaharid, ki vsebuje N-acetil-D-glukozamin, ki pospešuje rast bifidobakterij. Tega sladkorja v kravjem mleku ni, zato je Shah razmišljal o možnih nadomestkih. Raziskava je pokazala, da tudi laktuloza deluje kot stimulator za rast *Bifidobacterium* spp.

Mnogo raziskav je bilo usmerjenih k boljši rasti bifidobakterij v kravjem mleku. Med njimi so Marshall in sod (1982) poskušali problem rešiti z obogatitvijo mleka s sirotkinimi proteini in treoninom, da bi bil medij bolj hranilen in imel manjši redoks potencial. Anand in sod. (1985) so v svoji raziskavi poročali o dobri rasti *Bif. bifidum* v sterilnem posnetem mleku z dodatkom 1 % dekstroze in 0,1 % kvasnega ekstrakta. Martinez-Villaluenga in sod. (2005) so proučevali vpliv dodatka oligosaharidov iz družine rafinoz na preživetje probiotičnih bakterij *Bif. lactis* in *L. acidophilus* v mlečnih izdelkih in prišli do zanimivih zaključkov, da dodatek le teh podaljša rok obstojnosti izdelka in poveča število živih bakterij. Takšen mlečni izdelek, ki vsebuje probiotike in prebiotike, ima dobre možnosti za sinergistično delovanje v organizmu v smislu zdravja.

Kot je bilo že omenjeno, so bifidobakterije občutljive za kisik. Cheng in Sandine (1989) sta problem prisotnosti kisika omilila tako, da sta gojišču na osnovi sirotke dodala L-cistein v koncentraciji 0,05% in kvasni ekstrakt v koncentraciji 0,3 %. Rezultat je bila zelo dobra in stabilna rast bifidobakterij v takih pogojih.

V mlekarski industriji se srečujemo z embalažnimi materiali, ki so različno propustni za snovi iz okolja in tako vplivajo na mikrookolje, ki se razvije v izdelku in tudi spreminja med skladiščenjem. Dave in Shah (1997) sta primerjala preživetje *L. acidophilus* in bifidobakterij v jogurtih, ki so bili embalirani v plastični embalaži ali v stekleni embalaži. Število kolonijskih enot *L. acidophilus* je bilo v izdelku, pakiranem v stekleno embalažo, večje. Še bolj pa je razlika prišla do izraza pri bifidobakterijah. Začetno število bifidobakterij je bilo kar za 1,6-krat večje v izdelkih, pakiranih v stekleni embalaži. Preživetje bifidobakterij in bakterij vrste *L. acidophilus* je bilo od 30 do 70 % večje v izdelkih, ki so bili fermentirani in skladiščeni v stekleni embalaži.

Donkor in sod. (2006) so izvedli raziskavo, v kateri so proučevali povezanost vrednosti pH medija z viabilnostjo probiotičnih bakterij. Število bakterij so ugotavljali s klasično

kultivacijsko tehniko na selektivnih gojiščih. Koncentracija bakterij *L. acidophilus* je bila prvi dan po fermentaciji med 7,35 in 7,54 log ke/g. Takšno število se je ohranjalo nekje do 21. dne skladiščenja, nato pa je število celic pričelo upadati, ter se zmanjšalo iz približno 7 na 6 log ke/g. Med 21. in 28. dnevom skladiščenja so opazili največje odmiranje celic, kar 83 %. Sprememba vrednosti pH je lahko kritičen faktor za preživetje *Bifidobakterij*, kakor so ugotovili na testnem sevu *Bif. lactis*. Podobne zaključke sta v svojih študijah objavila tudi Dave in Shah leta 1997. Donkor in sod. (2006) so raziskoval tudi preživetje *L. casei* med skladiščenjem in ugotovili, da je ta bakterijska vrsta najmanj občutljiva na okoljske dejavnike, kajti konstantno nižanje vrednosti pH medija med skladiščenjem ni imelo vpliva na preživetje *L. casei*. Slednje je v skladu z rezultati naše raziskave.

5.1.2 Kvalitativno ugotavljanje prisotnosti DNA deklariranih bakterij z metodo PCR

Z reakcijo PCR smo želeli potrditi prisotnost probiotičnih bakterij v analiziranih izdelkih. Vzorce fermentiranih izdelkov smo predhodno kultivirali na selektivnih gojiščih in iz izraslih kolonij izolirali DNA. V vseh analiziranih izdelkih LCA in LC smo potrdili deklarirane bakterije *L. acidophilus*, *Bifidobacterium* in *L. casei*. V izdelku LCA ACI /VITA pa smo potrdili samo *L. acidophilus* in *Bif. lactis*, saj izdelek *L. casei* ne vsebuje. Bakterije seva BB12 pripadajo vrsti *Bif. lactis*, vendar so na vseh preiskovanih izdelkih deklarirane le kot *Bifidobacterium*.

Tabasco in sod. (2007) so za identifikacijo probiotičnih bakterij prav tako uporabili metodo PCR z uporabo vrstno specifičnih začetnikov. To metodo so kombinirali z metodo PCR-DGGE in v zaključkih predlagali, da je kombinacija teh dveh metod najbolj učinkovita tehnika detekcije probiotičnih bakterij, saj lahko z njo zanesljivo ugotovimo vrsto probiotičnih bakterij v fermentiranih izdelkih, brez predhodne osamitve in kulture bakterij.

Couret in sod. (2004) so analizirali 10 komercialnih probiotičnih izdelkov, ki so na voljo na Evropskem tržišču. Izdelke so analizirali tako, da so najprej izvedli klasično kultivacijo na gojiščih in nato iz kolonij izolirali DNA. Za nadaljnjo detekcijo so uporabili metodo verižne reakcije s polimerazo (PCR) in za detekcijo pomnožkov uporabili gelsko elektroforezo v pulzirajočem polju (PFGE – pulsed field gel electrophoresis). Metoda se je pokazala kot zelo uspešna za analizo mlečnih izdelkov. Analizirali so šest fermentiranih mlek, en sir, eno prehransko dopolnilo in dva izdelka z dodanimi liofiliziranimi kulturami. Pri raziskavi z metodo PCR niso uspeli potrditi vseh deklariranih probiotičnih vrst, in sicer pri dveh izdelkih z liofilizirano probiotično kulturo, pri siru in pri prehranskem dopolnilu.

V prehranskem dopolnilu so dokazali, da je število prisotnih laktobacilov pod mejo detekcije.

5.2 SKLEPI

- Med fermentacijo so se od treh vrst probiotičnih bakterij najmanj namnožile bifidobakterije, in sicer le za 2 do 5-krat. Bakterije vrste *L. acidophilus* so se tekom procesa fermentacije namnožile od 3 do 24-krat, vrste *L. casei* pa od 4 do 5-krat.
- Takoj po zaključeni fermentaciji smo v 1g probiotičnih izdelkov ugotovili od $7,0 \cdot 10^6$ do $3,7 \cdot 10^7$ ke *L. casei*, od $1,6 \cdot 10^7$ do $6,3 \cdot 10^7$ ke *L. acidophilus* in od $5,2 \cdot 10^5$ do $1,5 \cdot 10^7$ ke *Bif. lactis*.
- Skladiščenje je najmanj vplivalo na probiotično bakterijo *L. acidophilus*, *L. casei* je dobro obstojen med skladiščenjem, najbolj občutljiv za celoten tehnološki postopek pa je *Bif. lactis*.
- Zadnji dan roka trajanja smo v 1 g probiotičnih izdelkov ugotovili od $6,1 \cdot 10^6$ do $1,8 \cdot 10^7$ ke *L. casei*, od $2,0 \cdot 10^6$ do $2,5 \cdot 10^7$ ke *L. acidophilus* in od $1,5 \cdot 10^5$ do $2,3 \cdot 10^6$ ke *Bif. lactis*. Medtem ko je število bakterij *L. acidophilus* in *L. casei* zadostilo tudi strožjemu kriteriju glede zahtevane vsebnosti ($10^7/g$), pa je bilo število bifidobakterij na spodnji meji priporočenih najnižjih vrednosti ($10^6/g$).
- Izbrana gojišča so za proučevane probiotične vrste dovolj selektivna in omogočajo dobro štetje, saj je morfologija kolonij dobro prepoznavna.
- Z metodo PCR smo uspešno identificirali posamezne probiotične bakterije, zato je metoda uspešna za potrjevanje probiotičnih bakterij v analiziranih izdelkih.
- Vse analizirane izdelke lahko upravičeno poimenujemo »probiotični izdelki«, saj do konca uporabnosti izdelka vsebujejo več kot 10^6 ke probiotičnih bakterij, torej nad priporočenim najmanjšim številom, ki naj bi še zagotavljalo pričakovane funkcionalne učinke.

6 POVZETEK

V raziskavi, v kateri smo ugotavljali preživelost probiotičnih bakterij med fermentacijo in skladiščenjem fermentiranih izdelkov, smo analizirali šest probiotičnih izdelkov Mlekarne Celeia. Od tega so bili trije izdelki predstavniki navadne linije in trije izdelki predstavniki sadne linije (izdelek s sadnim dodatkom). Analize smo izvajali v obdobju od avgusta do oktobra 2007.

Ugotavljali smo število probiotičnih bakterij, ki so bile deklarirane s strani proizvajalca starterskih kultur, in sicer dve predstavnici laktobacilov, *L. casei* in *L. acidophilus* ter eno predstavnico bifidobakterij, *Bif. lactis*. Slednje so bile sicer deklarirane le kot *Bifidobacterium*.

Za analizo preživelosti smo med tehnološkim postopkom izdelave in skladiščenja izdelka izbrali ključne časovne intervale, v katerih smo jemali vzorce za ugotavljanje števila živih probiotičnih bakterij s konvencionalno metodo štetja kolonij na hranljivih selektivnih podlogah. Z uporabo molekularne metode PCR na DNA, izolirani iz kolonij, ki so zrasle na selektivnih gojiščih in gelske elektroforeze, pa smo potrjevali prisotnost posameznih vrst probiotičnih bakterij.

Pri primerjavi števila posamezne vrste probiotičnih bakterij v različnih navadnih in sadnih izdelkih smo ugotovili, da dodatek sadne mase v izdelek ne vpliva negativno na rast mikrobne populacije probiotičnih bakterij.

Ugotovili smo tudi, da med fermentacijo v povprečju najslabše prirašča mikrobna populacija bifidobakterij, medtem ko bakterijam vrste *L. casei* pogoji fermentacije nekoliko bolj ustrezajo. Najboljšo rast mikrobne populacije med procesom fermentacije smo zaznali pri probiotični bakterijski vrsti *L. acidophilus*.

Med skladiščenjem izdelkov pri 4 °C smo najmanj sprememb v številu živih celic zaznali pri predstavnikih laktobacilov, medtem ko je imelo skladiščenje na *Bif. lactis* večji vpliv.

Z reakcijo PCR smo uspeli potrditi prisotnost deklariranih probiotičnih bakterijskih v vseh izdelkih, obravnavanih v raziskavi. DNA, ki smo jo uporabili v reakciji PCR, smo izolirali iz kolonij, zraslih na selektivnih gojiščih.

Bifidobakterije so na izdelkih deklarirane le kot rod *Bifidobacterium*, mi pa smo uspeli z molekularno metodo dokazati vrsto *Bif. lactis*.

Zadnji dan roka trajanja izdelka (25. dan od izdelave izdelka) je skupno število probiotičnih bakterij v vseh analiziranih izdelkih presegalo vrednost 10^7 ke/g, kar velja za strožji kriterij pri uvrstitvi izdelka med probiotike. V splošnem namreč velja, da naj bi ob zaužitju probiotičen izdelek vseboval vsaj 10^6 ke/ml ali ke/g probiotičnih bakterij, dnevno pa naj bi za pozitivni učinek na zdravje, človek zaužil skupaj 10^8 do 10^9 ke probiotičnih bakterij. Strožji kriterij, ki ga je zasnovalo združenje »The Fermented Milks and Lactic Acid Beverages Association«, navaja kot priporočeno minimalno koncentracijo za sveže mlečne izdelke vrednosti, ki naj ne bodo nižje od 10^7 ke živih probiotičnih bakterij v ml ali g izdelka.

Glede na vse večje zanimanje ljudi za probiotične izdelke in njihove pozitivne učinke na zdravje, bi bilo smiselno podati točne smernice, po katerih bi se probiotični pripravki ločili od navadnih fermentiranih izdelkov. Tako bi lahko na slovenskem tržišču izključili zavajanje potrošnika in zaslužen naziv probiotičnega izdelka podelili resnično tistim, ki bi ustrezali znanstvenim kriterijem.

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: 1-45
- Adams M.R. 1999. Safety of industrial lactic acid bacteria. *Journal of Biotechnology*, 68: 171-178
- Alander M., Satokari R., Korpela R., Saxelin M., Vilpponen-Salmela T., Mattila-Sandholm T., von Wright A. 1999. Persistence of colonisation of human colonic mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus rhamnosus GG* after oral consumption. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 1: 351-354
- Bajt N., Golc Teger S., Pirkmajer E. 1998. Tehnologija živil – vaje: 4. Zvezek – Mleko in mlečni izdelki. 1. natis. Ljubljana, Zavod Republike Slovenije za šolstvo: 179 str.
- Cheng R., Sandine W.E. 1989. Growth characteristics of bifidobacteria species in whey base medium. *Journal of Dairy Science*, 72, 1: 148
- Chr. Hansen Company. 2001. *L. acidophilus*, *L. casei* and bifidobacteria in fermented milk products – Guidelines. Method for counting probiotic bacteria. Horsholm, Chr. Hansen: 4 str.
<http://www.chr-hansen.com> (marec 2008): 1 str.
- Coeuret V., Gueguen M., Vernoux P.J. 2004. Numbers and strains of lactobacilli in some probiotic products. *International Journal of Food Microbiology*, 97: 147-156
- Crittenden R., Saarela M., Matto J., Ouwehand A.C., Salminen S., Pelto L., Vaughan E.E., de Vos W.M., von Wright A., Fonden R., Mattila – Sandholm T. 2002. *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* F19; Survival, ecology and safety in the human intestinal tract – a survey of feeding studies within the PROBDEMO project. *Microbial Ecology in Health Disease*, 3: 22-26
- Dave R.I., Shah N.P. 1997. Viability of yogurt and probiotic bacteria in yogurts made from commercial starter cultures. *International Dairy Journal*, 7: 31-41

- De Man J.C., Rogosa M., Sharpe M.E. 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, 23: 130-135
- De Roos N.M., Katan M.B. 2000. Effects of probiotic bacteria on diarrhoea, lipid metabolism, and carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998. *American Journal of Clinical Nutrition*, 71: 405-411
- De Vrese M., Stegelmann A., Richter B., Fenselau S., Laue C., Schrezenmeir J. 2001. Probiotics – compensation for lactase insufficiency. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73: 421-429
- Donkor O.N., Henriksson A., Vasiljevic T., Shah N.P. 2006. Effect of acidification on the activity of probiotics in yoghurt during cold storage. *International Dairy Journal*, 16, 10: 1181-1189
- Eaton T.J., Gasson M.J. 2001. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 1628-1635
- Egert M., De Graaf A.A., Smidt H., De Vos W.M. 2006. Beyond diversity - functional microbiomics for the human colon. *Trends in Microbiology*, 14, 2: 86-91
- Elmer G.W., Surawicz C.M., McFarland L.V. 1996. Biotherapeutic agents. A neglected modality for the treatment and prevention of selected intestinal and vaginal infections. *Journal of the American Medical Association*, 275, 11: 870-876
- European Commission. 2001. Opinion of the Scientific Committee on Animal Nutrition on the criteria for assessing the safety of micro-organisms resistant to antibiotics of human clinical and veterinary importance. Brussels, European Commission
http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scan/outcome_en.html (marec 2008): 3 str.
- Gardiner G.E., Bouchier P., O'Sullivan E., Kelly J., Collins J.K., Fitzgerald G., Ross R.P., Stanton C. 2002. A spray-dried culture for probiotic Cheddar cheese manufacture. *International Dairy Journal*, 12, 9: 749-756
- Gasparič A., Komel R. 1996. Metode izboljšanja delovnih mikroorganizmov. V: *Biotehnologija – osnovna znanja*. Raspor P. (ur.). Ljubljana, BIA, d.o.o.: 185-212

- Gomes A.M.P., Malcata F.X. 1999. *Bifidobacterium* spp and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in Food Science & Technology*, 10: 139-157
- Guarner F., Schaafsma G.J. 1998. Probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 39: 237-238
- Heller K.J. 2001. Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73: 374-379
- Holzapfel W.H., Haberer P., Geisen R., Björkroth J., Schillinger U. 2001. Taxonomy and important features of probiotics microorganisms in food and nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73: 365-373
- Holzapfel W.H., Haberer P., Snel J., Schillinger U., Huis in't Veld J.H.J. 1998. Overview of gut flora and probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 41, 2: 85-101
- Hutkins W. R. 2006. *Microbiology and technology of fermented foods*. 1st ed. Oxford, Blackwell Publishing Ltd: 75-89
- IDF Standard 100B. 1991. Milk and milk production – Enumeration of microorganisms – Colony count technique at 37 °C: 3 str.
- IDF Standard 149. Annex A. 1991. Lactic acid starters. Section A.2- Enumeration of various microorganisms in lactic acid starters: 3 str.
- IDF Standard 192. ISO 20128. 2006. Milk products – Enumeration of presumptive *Lactobacillus acidophilus* on a selective medium – Colony-count technique at 37 °C: 8 str.
- Jay M.J., Loessner J.M., Golden A.D., 2005. *Modern food microbiology*. 7th ed. New York, Springer Science+ Business Media: 151-155
- Joseph P.J., Dave R.I., Shah N.P. 1998. Antagonism between yogurt bacteria and probiotics bacteria isolated from commercial starter cultures, commercial yogurts, and a probiotic capsules. *Food Australia*, 50: 20-23

- Kaila M., Isolauri E., Saxelin M., Arvilommi H., Vesikari T. 1995. Viable versus inactivated lactobacillus strain GG in acute rotavirus diarrhoea. *Archives of Diseases in Childhood*, 72: 51-53
- Klaenhammer, T. R., Kullen M. J. 1999. Selection and design of probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 50: 45-58
- Marshall V.M., Cole W.M., Mabbitt L.A. 1982. Fermentation of specially formulated milk with single strains of bifidobacteria. *Journal of the Society of Dairy Technology*, 35: 143
- Martinez-Villaluenga C., Frias J., Gómez R., Vidal-Valverde C. 2005. Influence of addition of raffinose family oligosaccharides on probiotic survival in fermented milk during refrigerated storage. *International Dairy Journal*, 16, 7: 768-774
- Mattila-Sandholm T., Matto J., Saarela M. 1999. Lactic acid bacteria with health claims – interactions and interference with gastrointestinal flora. *International Dairy Journal*, 9: 25-35
- Matsuki T., Watanabe K., Tanaka R., Fukuda M., Oyaizu H. 1999. Distribution of Bifidobacterial species in human intestinal microflora examined with 16S rRNA-gene-target species-specific primers. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 10: 4506-4512
- Metchnikoff E. 1907. The prolongation of life. *Optimistic studies*, cit. po: Orel R. Rogelj I. 2001. Črevesna mikroflora in možnosti njenega spreminjanja s probiotiki. *Slovenska pediatrija* 8; 4: 83-87
- Myers S. 2006. The functionality of probiotics and prebiotics. Phoenix, Natural products insider. (oktober 2006)
<http://www.naturalproductsinsider.com/articles/472/6ah169412580088.html> (februar 2008): 1 str.
- Mullan W.M.A. 2002. Probiotics. Properties, benefits, mechanisms of action, safety and enumeration. Northern Ireland, Dairy Science and Food Technology. (februar 2008)
<http://www.dairyscience.info/probiotics.htm> (marec 2008): 14 str.
- Nagaoka M., Hashimoto S., Watanabe T., Yokokura T., Mori Y. 1994. Anti-ulcer effects of lactic acid bacteria and their cell wall polysaccharides. *Biological and Pharmaceutical*

Bulletin, 17, 8: 1012–1017

Orel R. Rogelj I. 2001. Črevesna mikroflora in možnosti njenega spreminjanja s probiotiki. Slovenska pediatrija 8; 4: 83-87

Ouwehand A.C., Kirjavainen P.V., Shortt C., Salminen S. 1999. Probiotics: mechanisms and established effects. International Dairy Journal, 9: 43-52

Rettger L.F., Cheplin H.A. 1921. The transformation of intestinal flora, with special reference to the implantation of *Bacillus acidophilus*, cit. po: Orel R. Rogelj I. 2001. Črevesna mikroflora in možnosti njenega spreminjanja s probiotiki. Slovenska pediatrija 8; 4: 83-87

Rogelj I. 2001. Probiotiki, prebiotiki in sinbiotiki. V: Probiotiki in možnosti njihove uporabe. Zbornik predavanj s posvetovanja, Ljubljana, 8. marec 2001. Pavčič M., Vitezić N. (ur.). Ljubljana, Zbornica nutricionistov in dietetikov: 6-16

Rogelj I., Bogovič Matijašič B. 2004. Probiotiki in varnost. V: Varnost živil. 22. Bitenčevi dnevi, Radenci, 18. in 19. marec 2004. Gašperlin L., Žlender B. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 181-189

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: 541-577

Rogosa M., Mitchel J.A., Wiseman R.F. 1951. A selective medium for the isolation of oral and fecal lactobacilli. Journal of Bacteriology, 62: 132-133

Saarela M., Mogensen G., Fonden R., Matto J., Mattila-Sandholm T. 2000. Probiotic bacteria: Safety, functional and technological properties. Journal of Biotechnology, 84: 197-215

Saavedra J.M. 2007. Use of probiotics in pediatrics: rationale, mechanisms of action, and practical aspects. Nutrition in Clinical Practice, 22, 3: 351-365

Salminen S., Von Wright A., Morelli L., Marteau P., Brassart D., De Vos W.M., Fonden R., Saxelin M., Collins K., Mogensen G., Birkeland S.E., Mattila - Sandholm T. 1998. Demonstration of safety of probiotics – a review. International Journal of Food

Microbiology, 44: 93-106

Shah N.P. 2000. Probiotic bacteria: Selective enumeration and survival in dairy foods.
Journal of Dairy Science, 83, 4: 894-907

Shah N.P. 2002. *Bifidobacterium spp.*: Applications in fermented milks. V: Encyclopedia of dairy science. Vol. 4. Roginski H., Fuquay J., Fox P. (eds.). London, Academic Press: 147-151

Sejong O., Sungsoe R., Jaehun S., Sangkyo K., Youngjin B. 1995. Optimizing conditions for the growth of *Lactobacillus casei* YIT 9018 in tryptone - yeast extract – glucose medium by using response surface methodology. Applied and Environmental Microbiology, 61, 11: 3809-3814

Smole Možina S., Jeršek B. 2001. Mikrobiološke in molekularne metode karakterizacije probiotičnih dodatkov funkcionalnim živilom. V: Funkcionalna hrana. 21. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 8. in 9. november 2001, Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 207-218

Statgraphics Centurion XV. Stat Point, Inc. Northern Virginia, 2005

Suau A., Bonnet R., Sutren M., Godon J.J., Gibson G.R., Collins M.D., Dore J. 1999. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. Applied and Environmental Microbiology, 65, 11: 4799-4807

Tabasco R., Paarup T., Pelaez C., Requena T. 2007. Selective enumeration and identification of mixed cultures of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. paracasei* subsp. *paracasei* and *Bifidobacterium lactis* in fermented milk. International Dairy Journal, 17: 1107-1114

Talwalkar A., Kailasapathy K., Peiris K., Arumugaswamy R. 2001. Application of RBGR – a simple way for screening of oxygen tolerance in probiotic bacteria. International Journal of Food Microbiology, 71: 245-248

Tannock G. W. 2001. Molecular assessment of intestinal microflora. American Journal of Clinical Nutrition, 73: 410-414

- Tissier H. 1906. Traitement des infections intestinales par la méthode de la flore bactérienne de l'intestin, cit. po: Orel R. Rogelj I. 2001. Črevesna mikroflora in možnosti njenega spreminjanja s probiotiki. Slovenska pediatrija 8; 4: 83-87
- Vankerckhoven, V. van Autgaerden T., Huys G., Vancanneyt M., Swings J., Goossens H. 2004. Establishment of the Prosafe collection of probiotic and human lactic acid bacteria. Microbial ecology in health and disease, 16: 131-136
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Friters A., Pot J., Paleman J., Kuiper M., Zabeau M. 1995. AFLP: a new technique for DNA Fingerprinting. Nucleic Acid Research, 21: 4407-4414
- Wagner R.D., Balish E. 1998. Probiotic bacteria for prophylaxis and therapy of candidiasis. Revista Iberoamericana de Micologia, 15, 4: 261-264
- Walter J., Tannock G.W., Tilsala – Timisjärvi A., Rodtong S., Loach D.M., Munro K., Alatosava K. 2000. Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. Applied and Environmental Microbiology, 66, 1: 297-303
- Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acid Research 18: 6531-6535
- Yim G., Glover C. 2003. Food Microbiology: The basics and the details of cheese production. Vancouver, The Science Creative Quarterly. (avgust 2003)
<http://www.scq.ubc.ca/food-microbiology-the-basics-and-the-details-of-cheese-production> (maj 2008): 1 str.

ZAHVALA

Zahvaljujem se kolektivu Mlekarne Celeia, ki mi je omogočil izvedbo laboratorijskega dela diplomske naloge v prostorih podjetja. Hvala delovni mentorici mag. Tanji Veselko Vinko za pomoč pri delu v laboratoriju, pri izdelavi naloge in veliko mero razumevanja.

Zahvaljujem se somentorici dr. Bojani Bogovič Matijašič za napotke in pomoč pri delu v laboratorijih Katedre za mlekarstvo, za skrben in strokoven pregled dela ter za prijaznost in dobro voljo.

Prav tako gre zahvala za strokoven in skrben pregled diplomskega dela mentorici prof. dr. Ireni Rogelj. Hvala tudi za ves čas in strokovna pojasnila.

Za natančen pregled dela se zahvaljujem recenzentki prof. dr. Sonji Smole Možina.

Za pomoč pri iskanju in urejanju literature gre zahvala ge. Ivici Hočevar in ge. Barbari Slemenik.

Hvala očetu in mami, ki sta mi omogočila študijsko pot in me na njej vseskozi spremljala.

Hvala vsem, ki ste kakor koli prispevali k nastanku tega dela!

PRILOGE

Priloga A1: Rezultati ugotavljanja števila probiotičnih bakterij v vzorcih navadnega in sadnega izdelka LCA
(1) (180 g), odvzetih v različnih fazah tehnološkega postopka in med skladiščenjem

Probiotični izdelek	Gojišče	Število mikroorganizmov (ke/g oziroma log ke/g)						
		N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7
LCA (1) navadni	MRS za <i>L. casei</i>	2,3·10 ⁶ (6,4)	7,0·10 ⁶ (6,8)	8,9·10 ⁶ (6,9)	1,4·10 ⁷ (7,1)	7,0·10 ⁶ (6,8)	1,0·10 ⁷ (7,0)	9,7·10 ⁶ (7,0)
	MRS + cly za <i>L. acidophilus</i>	1,7·10 ⁶ (6,2)	2,0·10 ⁷ (7,3)	2,2·10 ⁷ (7,3)	2,6·10 ⁷ (7,4)	1,7·10 ⁷ (7,2)	2,8·10 ⁶ (6,4)	2,0·10 ⁶ (6,3)
	MRS + NNLP za <i>Bifidobacterium</i>	8,2·10 ⁵ (5,9)	4,2·10 ⁶ (6,6)	4,0·10 ⁶ (6,6)	4,4·10 ⁶ (6,6)	5,8·10 ⁵ (5,8)	1,2·10 ⁶ (6,1)	2,1·10 ⁶ (6,3)
LCA (1) sadni	MRS za <i>L. casei</i>	2,3·10 ⁶ (6,4)	7,0·10 ⁶ (6,8)	6,5·10 ⁶ (6,8)	9,9·10 ⁶ (7,0)	7,8·10 ⁶ (6,9)	9,3·10 ⁶ (7,0)	9,4·10 ⁶ (7,0)
	MRS + cly za <i>L. acidophilus</i>	1,7·10 ⁶ (6,2)	2,0·10 ⁷ (7,3)	1,2·10 ⁷ (7,1)	2,0·10 ⁷ (7,3)	1,3·10 ⁷ (7,1)	1,3·10 ⁷ (7,1)	8,1·10 ⁶ (6,9)
	MRS + NNLP za <i>Bifidobacterium</i>	8,2·10 ⁵ (5,9)	4,2·10 ⁶ (6,6)	2,0·10 ⁶ (6,3)	5,2·10 ⁶ (6,7)	4,7·10 ⁵ (5,7)	1,3·10 ⁷ (7,1)	2,3·10 ⁶ (6,4)

Legenda: N1 = vzorec ~20 minut po cepljenju kulture, N2 = vzorec po fermentaciji, N3 = vzorec po ~ 18. urah hlajenja, N4 = vzorec po 1. tednu skl., N5 = vzorec po 2. tednu skl., N6 = vzorec po 3. tednu skl., N7 = vzorec zadnji dan roka trajanja

Priloga A2: Rezultati ugotavljanja števila probiotičnih bakterij v vzorcih navadnega in sadnega izdelka LCA
(2) (180 g), odvzetih v različnih fazah tehnološkega postopka in med skladiščenjem

Probiotični izdelek	Gojišče	Število mikroorganizmov (ke/g oziroma log ke/g)						
		N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7
LCA (2) navadni	MRS za <i>L. casei</i>	4,9·10 ⁶ (6,7)	1,5·10 ⁷ (7,2)	1,9·10 ⁷ (7,3)	1,6·10 ⁷ (7,2)	1,6·10 ⁷ (7,2)	1,2·10 ⁷ (7,1)	1,5·10 ⁷ (7,2)
	MRS + cly za <i>L. acidophilus</i>	1,8·10 ⁶ (6,3)	2,0·10 ⁷ (7,3)	2,9·10 ⁷ (7,5)	2,6·10 ⁷ (7,4)	3,6·10 ⁷ (7,6)	1,1·10 ⁷ (7,0)	7,1·10 ⁶ (6,9)
	MRS + NNLP za <i>Bifidobacterium</i>	1,9·10 ⁶ (6,3)	2,1·10 ⁶ (6,3)	6,5·10 ⁶ (6,8)	1,6·10 ⁶ (6,2)	8,5·10 ⁵ (5,9)	8,2·10 ⁵ (5,9)	8,1·10 ⁵ (5,9)

LCA (2) sadni	MRS za <i>L. casei</i>	$4,9 \cdot 10^6$ (6,7)	$1,5 \cdot 10^7$ (7,2)	$8,5 \cdot 10^6$ (6,9)	$1,3 \cdot 10^7$ (7,1)	$1,6 \cdot 10^7$ (7,2)	$1,2 \cdot 10^7$ (7,1)	$1,8 \cdot 10^7$ (7,2)
	MRS + cly za <i>L. acidophilus</i>	$1,8 \cdot 10^6$ (6,3)	$2,0 \cdot 10^7$ (7,3)	$2,7 \cdot 10^7$ (7,4)	$2,5 \cdot 10^7$ (7,4)	$2,2 \cdot 10^7$ (7,3)	$1,9 \cdot 10^7$ (7,3)	$2,3 \cdot 10^7$ (7,3)
	MRS + NNLP za <i>Bifidobacterium</i>	$1,9 \cdot 10^6$ (6,3)	$2,1 \cdot 10^6$ (6,3)	$4,9 \cdot 10^6$ (6,7)	$1,4 \cdot 10^6$ (6,1)	$1,7 \cdot 10^6$ (6,2)	$4,8 \cdot 10^5$ (5,7)	$1,3 \cdot 10^6$ (6,1)

Legenda: N1 = vzorec ~20 minut po cepljenju kulture, N2 = vzorec po fermentaciji, N3 = vzorec po ~ 18. urah hlajenja, N4 = vzorec po 1. tednu skl., N5 = vzorec po 2. tednu skl., N6 = vzorec po 3. tednu skl., N7 = vzorec zadnji dan roka trajanja

Priloga A3: Rezultati ugotavljanja števila probiotičnih bakterij v vzorcih navadnega in sadnega izdelka LCA (3) (180 g), odvzetih v različnih fazah tehnološkega postopka in med skladiščenjem

Probi otični izdele	Gojišče	Število mikroorganizmov (ke/g oziroma log ke/g)						
		N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7
LCA (3) navadni	MRS za <i>L. casei</i>	$5,5 \cdot 10^6$ (6,7)	$3,7 \cdot 10^7$ (7,6)	$1,8 \cdot 10^7$ (7,3)	$2,2 \cdot 10^7$ (7,3)	$1,2 \cdot 10^7$ (7,1)	$1,8 \cdot 10^7$ (7,2)	$1,3 \cdot 10^6$ (6,1)
	MRS + cly za <i>L. acidophilus</i>	$1,4 \cdot 10^6$ (6,1)	$2,0 \cdot 10^7$ (7,3)	$1,9 \cdot 10^7$ (7,3)	$1,4 \cdot 10^7$ (7,1)	$1,4 \cdot 10^7$ (7,1)	$2,5 \cdot 10^6$ (6,4)	$1,8 \cdot 10^7$ (7,2)
	MRS + NNLP za <i>Bifidobacterium</i>	$2,5 \cdot 10^5$ (5,4)	$1,6 \cdot 10^6$ (6,2)	$3,7 \cdot 10^6$ (6,6)	$1,7 \cdot 10^6$ (6,2)	$1,5 \cdot 10^6$ (6,2)	$7,3 \cdot 10^5$ (5,9)	$6,2 \cdot 10^5$ (5,8)
LCA (3) sadni	MRS za <i>L. casei</i>	$5,5 \cdot 10^6$ (6,7)	$3,7 \cdot 10^7$ (7,6)	$1,4 \cdot 10^7$ (7,1)	$1,1 \cdot 10^7$ (7,0)	$8,1 \cdot 10^6$ (6,9)	$1,8 \cdot 10^7$ (7,2)	$6,1 \cdot 10^6$ (6,8)
	MRS + cly za <i>L. acidophilus</i>	$1,4 \cdot 10^6$ (6,1)	$2,0 \cdot 10^7$ (7,3)	$1,1 \cdot 10^7$ (7,0)	$9,7 \cdot 10^6$ (7,0)	$1,5 \cdot 10^7$ (7,2)	$9,3 \cdot 10^6$ (7,0)	$1,5 \cdot 10^7$ (7,2)
	MRS + NNLP za <i>Bifidobacterium</i>	$2,5 \cdot 10^5$ (5,4)	$1,6 \cdot 10^6$ (6,2)	$1,0 \cdot 10^6$ (6,0)	$1,7 \cdot 10^6$ (6,2)	$1,4 \cdot 10^6$ (6,1)	$7,8 \cdot 10^5$ (5,9)	$2,3 \cdot 10^5$ (5,4)

Legenda: N1 = vzorec ~20 minut po cepljenju kulture, N2 = vzorec po fermentaciji, N3 = vzorec po ~ 18. urah hlajenja, N4 = vzorec po 1. tednu skl., N5 = vzorec po 2. tednu skl., N6 = vzorec po 3. tednu skl., N7 = vzorec zadnji dan roka trajanja

Priloga A4: Rezultati ugotavljanja števila probiotičnih bakterij v vzorcih navadnega in sadnega izdelka LC (1) (150 g), odvzetih v različnih fazah tehnološkega postopka in med skladiščenjem

Probio tični izdelek	Gojišče	Število mikroorganizmov (ke/g oziroma log ke/g)						
		N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7
LC (1) navadni	MRS za <i>L. casei</i>	$3,8 \cdot 10^6$ (6,6)	$1,3 \cdot 10^7$ (7,1)	$4,7 \cdot 10^6$ (6,7)	$1,4 \cdot 10^7$ (7,1)	$1,3 \cdot 10^7$ (7,1)	$1,1 \cdot 10^7$ (7,0)	$1,4 \cdot 10^7$ (7,1)
	MRS + cly za <i>L. acidophilus</i>	$1,4 \cdot 10^6$ (6,1)	$6,3 \cdot 10^7$ (7,8)	$3,1 \cdot 10^7$ (7,5)	$8,3 \cdot 10^7$ (7,9)	$4,0 \cdot 10^7$ (7,6)	$1,9 \cdot 10^7$ (7,3)	$2,0 \cdot 10^7$ (7,3)
	MRS + NNLP za <i>Bifidobacterium</i>	$1,7 \cdot 10^6$ (6,2)	$2,4 \cdot 10^6$ (6,4)	Ni podatka!	$1,7 \cdot 10^6$ (6,2)	$2,3 \cdot 10^5$ (5,4)	$3,7 \cdot 10^5$ (5,6)	$4,4 \cdot 10^5$ (5,6)
LC (1) sadni	MRS za <i>L. casei</i>	$3,8 \cdot 10^6$ (6,6)	$1,3 \cdot 10^7$ (7,1)	$4,7 \cdot 10^6$ (6,7)	$1,1 \cdot 10^7$ (7,0)	$8,7 \cdot 10^6$ (6,9)	$7,9 \cdot 10^6$ (6,9)	$9,0 \cdot 10^6$ (6,9)
	MRS + cly za <i>L. acidophilus</i>	$1,4 \cdot 10^6$ (6,1)	$6,3 \cdot 10^7$ (7,8)	$2,9 \cdot 10^7$ (7,5)	$3,8 \cdot 10^7$ (7,6)	$2,4 \cdot 10^7$ (7,4)	$2,0 \cdot 10^7$ (7,3)	$1,3 \cdot 10^7$ (7,1)
	MRS + NNLP za <i>Bifidobacterium</i>	$1,7 \cdot 10^6$ (6,2)	$2,4 \cdot 10^6$ (6,4)	Ni podatka!	$1,1 \cdot 10^6$ (6,0)	$3,9 \cdot 10^5$ (5,6)	$1,0 \cdot 10^7$ (7,0)	$5,3 \cdot 10^5$ (5,7)

Legenda: N1 = vzorec ~20 minut po cepljenju kulture, N2 = vzorec po fermentaciji, N3 = vzorec po ~ 18. urah hlajenja, N4 = vzorec po 1. tednu skl., N5 = vzorec po 2. tednu skl., N6 = vzorec po 3. tednu skl., N7 = vzorec zadnji dan roka trajanja

Priloga A5: Rezultati ugotavljanja števila probiotičnih bakterij v vzorcih navadnega in sadnega izdelka LC (2) (150 g), odvzetih v različnih fazah tehnološkega postopka in med skladiščenjem

Probi otični izdele	Gojišče	Število mikroorganizmov (ke/g oziroma log ke/g)						
		N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7
LC (2) navadni	MRS za <i>L. casei</i>	$4,2 \cdot 10^5$ (5,6)	$1,3 \cdot 10^7$ (7,1)	$1,3 \cdot 10^7$ (7,1)	$2,0 \cdot 10^7$ (7,3)	$1,8 \cdot 10^7$ (7,3)	$1,7 \cdot 10^7$ (7,2)	$1,7 \cdot 10^7$ (7,2)
	MRS + cly za <i>L. acidophilus</i>	$1,7 \cdot 10^6$ (6,2)	$3,0 \cdot 10^7$ (7,5)	$4,2 \cdot 10^7$ (7,6)	$2,4 \cdot 10^7$ (7,4)	$5,6 \cdot 10^7$ (7,7)	$1,2 \cdot 10^7$ (7,1)	$2,0 \cdot 10^7$ (7,3)
	MRS + NNLP za <i>Bifidobacterium</i>	$1,4 \cdot 10^6$ (6,1)	$1,5 \cdot 10^7$ (7,2)	$1,8 \cdot 10^6$ (6,3)	$3,8 \cdot 10^5$ (5,8)	$3,6 \cdot 10^5$ (5,6)	$1,4 \cdot 10^6$ (6,1)	$8,4 \cdot 10^5$ (5,9)
LC (2) sadni	MRS za <i>L. casei</i>	$4,2 \cdot 10^5$ (5,6)	$1,3 \cdot 10^7$ (7,1)	$1,1 \cdot 10^7$ (7,0)	$1,3 \cdot 10^7$ (7,1)	$9,8 \cdot 10^6$ (7,0)	$6,8 \cdot 10^6$ (6,8)	$1,1 \cdot 10^7$ (7,0)
	MRS + cly za <i>L. acidophilus</i>	$1,7 \cdot 10^6$ (6,2)	$3,0 \cdot 10^7$ (7,5)	$3,5 \cdot 10^7$ (7,5)	$1,6 \cdot 10^7$ (7,2)	$1,6 \cdot 10^7$ (7,2)	$8,8 \cdot 10^6$ (6,9)	$9,8 \cdot 10^6$ (7,0)
	MRS + NNLP za <i>Bifidobacterium</i>	$1,4 \cdot 10^6$ (6,1)	$1,5 \cdot 10^7$ (7,2)	$8,5 \cdot 10^5$ (5,9)	$3,4 \cdot 10^5$ (5,5)	$3,0 \cdot 10^5$ (5,5)	$1,4 \cdot 10^6$ (6,1)	$7,5 \cdot 10^5$ (5,9)

Legenda: N1 = vzorec ~20 minut po cepljenju kulture, N2 = vzorec po fermentaciji, N3 = vzorec po ~ 18. urah hlajenja, N4 = vzorec po 1. tednu skl., N5 = vzorec po 2. tednu skl., N6 = vzorec po 3. tednu skl., N7 = vzorec zadnji dan roka trajanja

Priloga A6: Rezultati ugotavljanja števila probiotičnih bakterij v vzorcih navadnega in sadnega izdelka LC (3) (150 g), odvzetih v različnih fazah tehnološkega postopka in med skladiščenjem

Probiotični izdelek	Gojišče	Število mikroorganizmov (ke/g oziroma log ke/g)						
		N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7
LC (3) navadni	MRS za <i>L. casei</i>	5,1·10 ⁶ (6,7)	1,4·10 ⁷ (7,1)	1,4·10 ⁷ (7,1)	1,2·10 ⁷ (7,1)	1,1·10 ⁷ (7,0)	1,8·10 ⁷ (7,2)	1,3·10 ⁷ (7,1)
	MRS + cly za <i>L. acidophilus</i>	1,3·10 ⁶ (6,1)	1,6·10 ⁷ (7,2)	2,7·10 ⁷ (7,4)	2,7·10 ⁷ (7,4)	2,2·10 ⁷ (7,3)	2,7·10 ⁷ (7,4)	2,2·10 ⁷ (7,3)
	MRS + NNLP za <i>Bifidobacterium</i>	3,8·10 ⁵ (5,6)	9,1·10 ⁵ (6,0)	1,6·10 ⁶ (6,2)	5,5·10 ⁵ (5,7)	4,0·10 ⁵ (5,6)	1,3·10 ⁶ (6,1)	8,5·10 ⁵ (5,9)
LC (3) sadni	MRS za <i>L. casei</i>	5,1·10 ⁶ (6,7)	1,4·10 ⁷ (7,1)	1,1·10 ⁷ (7,0)	7,9·10 ⁶ (6,9)	7,8·10 ⁶ (6,9)	9,0·10 ⁶ (7,0)	9,3·10 ⁶ (7,0)
	MRS + cly za <i>L. acidophilus</i>	1,3·10 ⁶ (6,1)	1,6·10 ⁷ (7,2)	1,4·10 ⁷ (7,1)	2,1·10 ⁷ (7,3)	1,4·10 ⁷ (7,1)	1,6·10 ⁷ (7,2)	1,0·10 ⁷ (7,0)
	MRS + NNLP za <i>Bifidobacterium</i>	3,8·10 ⁵ (5,6)	9,1·10 ⁵ (6,0)	7,5·10 ⁵ (5,9)	2,2·10 ⁵ (5,3)	4,8·10 ⁵ (5,7)	5,3·10 ⁵ (5,7)	5,0·10 ⁵ (5,7)

Legenda: N1 = vzorec ~20 minut po cepljenju kulture, N2 = vzorec po fermentaciji, N3 = vzorec po ~ 18. urah hlajenja, N4 = vzorec po 1. tednu skl., N5 = vzorec po 2. tednu skl., N6 = vzorec po 3. tednu skl., N7 = vzorec zadnji dan roka trajanja

Priloga A7: Rezultati ugotavljanja števila probiotičnih bakterij v vzorcih navadnega (LCA ACI 1; 500 g) in sadnega izdelka (LCA VITA 1; 500g), odvzetih v različnih fazah tehnološkega postopka in med skladiščenjem

Probiotični izdelek	Gojišče	Število mikroorganizmov (ke/g oziroma log ke/g)						
		N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7
LCA ACI 1 navadni	MRS za <i>L. casei</i>	/	/	/	/	/	/	/
	MRS + cly za <i>L. acidophilus</i>	1,4·10 ⁷ (7,1)	5,2·10 ⁷ (7,7)	5,0·10 ⁷ (7,7)	4,0·10 ⁷ (7,6)	3,4·10 ⁷ (7,5)	2,7·10 ⁷ (7,4)	2,5·10 ⁷ (7,4)
	MRS + NNLP za <i>Bifidobacterium</i>	8,4·10 ⁵ (5,9)	2,2·10 ⁶ (6,3)	1,9·10 ⁶ (6,3)	1,2·10 ⁶ (6,1)	1,7·10 ⁵ (5,2)	1,3·10 ⁶ (6,1)	8,1·10 ⁵ (5,9)

LCA VITA 1 sadni	MRS za <i>L. casei</i>	/	/	/	/	/	/	/
	MRS + cly za <i>L. acidophilus</i>	$1,4 \cdot 10^7$ (7,1)	$5,2 \cdot 10^7$ (7,7)	$3,8 \cdot 10^7$ (7,6)	$1,9 \cdot 10^7$ (7,3)	$1,7 \cdot 10^7$ (7,2)	$1,8 \cdot 10^7$ (6,3)	$1,1 \cdot 10^7$ (6,3)
	MRS + NNLP za <i>Bifidobacterium</i>	$8,4 \cdot 10^5$ (5,9)	$2,2 \cdot 10^6$ (6,3)	$2,5 \cdot 10^6$ (6,4)	Ni podatka!	$1,0 \cdot 10^6$ (6,0)	$1,4 \cdot 10^5$ (5,1)	$1,9 \cdot 10^5$ (5,3)

Legenda: N1= vzorec ~20 minut po cepljenju kulture, N2 = vzorec po fermentaciji, N3 = vzorec po ~ 18. urah hlajenja, N4 = vzorec po 1. tednu skl., N5 = vzorec po 2. tednu skl., N6 = vzorec po 3. tednu skl., N7 = vzorec zadnji dan roka trajanja

Priloga A8: Rezultati ugotavljanja števila probiotičnih bakterij v vzorcih navadnega (LCA ACI 2; 500 g) in sadnega izdelka (LCA VITA 2; 500g), odvzetih v različnih fazah tehnološkega postopka in med skladiščenjem

Probiotični izdelek	Gojišče	Število mikroorganizmov (ke/g oziroma log ke/g)						
		N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7
LCA ACI 2 navadni	MRS za <i>L. casei</i>	/	/	/	/	/	/	/
	MRS + cly za <i>L. acidophilus</i>	$1,2 \cdot 10^7$ (7,1)	$3,3 \cdot 10^7$ (7,5)	$2,8 \cdot 10^7$ (7,4)	$2,4 \cdot 10^7$ (7,4)	$4,1 \cdot 10^7$ (7,6)	$1,6 \cdot 10^7$ (7,2)	$1,5 \cdot 10^7$ (7,2)
	MRS + NNLP za <i>Bifidobacterium</i>	$5,8 \cdot 10^5$ (5,8)	$1,5 \cdot 10^6$ (6,2)	$2,2 \cdot 10^6$ (6,3)	$6,8 \cdot 10^6$ (6,8)	$4,0 \cdot 10^6$ (6,6)	$7,4 \cdot 10^5$ (5,9)	$1,4 \cdot 10^6$ (6,1)
LCA VITA 2 sadni	MRS za <i>L. casei</i>	/	/	/	/	/	/	/
	MRS + cly za <i>L. acidophilus</i>	$1,2 \cdot 10^7$ (7,1)	$3,3 \cdot 10^7$ (7,5)	$2,6 \cdot 10^7$ (7,4)	$3,4 \cdot 10^7$ (7,5)	$1,8 \cdot 10^7$ (7,3)	$1,6 \cdot 10^7$ (7,2)	$1,8 \cdot 10^7$ (7,2)
	MRS + NNLP za <i>Bifidobacterium</i>	$5,8 \cdot 10^5$ (5,8)	$1,5 \cdot 10^6$ (6,2)	$1,6 \cdot 10^6$ (6,2)	$2,0 \cdot 10^6$ (6,3)	$2,1 \cdot 10^6$ (6,3)	$4,3 \cdot 10^5$ (5,6)	$1,1 \cdot 10^6$ (6,0)

Legenda: N1= vzorec ~20 minut po cepljenju kulture, N2 = vzorec po fermentaciji, N3 = vzorec po ~ 18. urah hlajenja, N4 = vzorec po 1. tednu skl., N5 = vzorec po 2. tednu skl., N6 = vzorec po 3. tednu skl., N7 = vzorec zadnji dan roka trajanja

Priloga A9: Rezultati ugotavljanja števila probiotičnih bakterij v vzorcih navadnega (LCA ACI 3; 500 g) in sadnega izdelka (LCA VITA 3; 500g), odvzetih v različnih fazah tehnološkega postopka in med skladiščenjem

Probiotični izdelek	Gojišče	Število mikroorganizmov (ke/g oziroma log ke/g)						
		N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7
LCA ACI 3 navadni	MRS za <i>L. casei</i>	/	/	/	/	/	/	/
	MRS + cly za <i>L. acidophilus</i>	$1,8 \cdot 10^7$ (7,3)	$4,8 \cdot 10^7$ (7,7)	$3,5 \cdot 10^7$ (7,5)	$3,4 \cdot 10^7$ (7,5)	$1,9 \cdot 10^7$ (7,3)	$1,9 \cdot 10^7$ (7,3)	$2,1 \cdot 10^7$ (7,3)
	MRS + NNLP za <i>Bifidobacterium</i>	$9,0 \cdot 10^5$ (6,0)	$5,2 \cdot 10^5$ (5,7)	$1,2 \cdot 10^6$ (6,1)	$2,0 \cdot 10^5$ (5,3)	$4,1 \cdot 10^5$ (5,6)	$3,9 \cdot 10^5$ (5,6)	$3,2 \cdot 10^5$ (5,5)
LCA VITA 3 sadni	MRS za <i>L. casei</i>	/	/	/	/	/	/	/
	MRS + cly za <i>L. acidophilus</i>	$1,8 \cdot 10^7$ (7,3)	$4,8 \cdot 10^7$ (7,7)	$3,6 \cdot 10^7$ (7,6)	$3,9 \cdot 10^7$ (7,6)	$2,6 \cdot 10^7$ (7,4)	$2,2 \cdot 10^7$ (7,3)	$1,8 \cdot 10^7$ (7,3)
	MRS + NNLP za <i>Bifidobacterium</i>	$9,0 \cdot 10^5$ (6,0)	$5,2 \cdot 10^5$ (5,7)	$9,0 \cdot 10^5$ (6,0)	$2,5 \cdot 10^5$ (5,4)	$1,5 \cdot 10^5$ (5,2)	$2,8 \cdot 10^5$ (5,4)	$1,5 \cdot 10^5$ (5,2)

Legenda: N1 = vzorec ~20 minut po cepljenju kulture, N2 = vzorec po fermentaciji, N3 = vzorec po ~ 18. urah hlajenja, N4 = vzorec po 1. tednu skl., N5 = vzorec po 2. tednu skl., N6 = vzorec po 3. tednu skl., N7 = vzorec zadnji dan roka trajanja