

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Simona GRM

**VPLIV KOSTANJEVEGA TANINA NA RAST IN ENCIMSKE  
AKTIVNOSTI VAMPNIH BAKTERIJ *Streptococcus bovis* IN  
*Selenomonas ruminantium***

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**INFLUENCE OF CHESTNUT TANNINS ON GROWTH AND  
ENZYME ACTIVITIES OF RUMEN BACTERIA *Streptococcus bovis*  
AND *Selenomonas ruminantium***

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2006

Diplomsko delo predstavlja zaključek Univerzitetnega dodiplomskega študija zootehniko.  
Opravljeno je bilo na Katedri za mikrobiologijo in mikrobiološko biotehnologijo Oddelka za  
zootehniko Biotehniške fakultete v Domžalah.

Komisija za dodiplomski študije Oddelka za zootehniko je za mentorico imenovala prof.  
dr. Romano Marinšek Logar.

Recenzent: doc. dr. Andrej Lavrenčič

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Jurij POHAR  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Članica: prof. dr. Romana MARINŠEK LOGAR  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: doc. dr. Andrej LAVRENČIČ  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Simona Grm

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 579(043.2)=863
KG	mikrobiologija/ <i>Streptococcus bovis</i> / <i>Selenomonas ruminantium</i> /bakterije/rast/kostanjevi tanini/encimi/encimska aktivnost/vamp
KK	AGRIS L50
AV	GRM, Simona
SA	MARINŠEK LOGAR, Romana (mentorica)
KZ	SI-1230 Domžale, Groblje 3
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
LI	2006
IN	VPLIV KOSTANJEVEGA TANINA NA RAST IN ENCIMSKE AKTIVNOSTI VAMPNIH BAKTERIJ <i>Streptococcus bovis</i> IN <i>Selenomonas ruminantium</i>
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XIV, 62 str., 6 pregl., 21 sl., 24 pril., 89 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Tanini so naravni sekundarni presnovki rastlin, ki spadajo v skupino polifenolov. Pogosto so prisotni v krmi rastlinojedih živali. Njihova najpomembnejša skupna lastnost je, da tvorijo komplekse z vitaminimi, rudninskimi snovmi, ogljikovimi hidrati, prebavnimi encimi, mikroorganizmi in beljakovinami. S tem vplivajo tudi na prebavne procese pri prežvekovalcih. Tvorba kompleksov v predželodcih vpliva na razgradljivost hranljivih snovi in delovanje mikroorganizmov. Predvsem v velikih koncentracijah, tanini negativno vplivajo na vampne mikroorganizme in tudi na zdravje živali. V manjših koncentracijah imajo pozitiven vpliv. Z vezavo na beljakovine krme te ščitijo pred nezaželeno razgradnjo v predželodcih. Tako se poveča oskrba živali z beljakovinami in izboljša prireja. V tem diplomskem delu smo preverili vpliv kostanjevih taninov na dve pomembnejši vampni bakteriji <i>Selenomonas ruminantium</i> in <i>Streptococcus bovis</i> . Uporabili smo tri različne koncentracije tanina (0,05 g/l, 0,25 g/l in 1,00 g/l) in sedem inkubacijskih časov (5, 10, 13, 16, 20, 32 in 48 ur). Rast bakterij smo spremljali z merjenjem koncentracije beljakovin. Spremljali smo encimske aktivnosti ksilanaz, karboksimetilcelulaz (CMC-az), amilaz in proteaz v supernatantu kultur in v celicah. Tanin je imel vpliv na rast <i>S. bovis</i> pri obeh večjih koncentracijah tanina. Bolj očiten je vpliv na rast <i>S. ruminantium</i> , ki jo povečuje. Pri bakteriji <i>S. ruminantium</i> tanini zmanjšajo encimske aktivnosti celičnih ksilanaz, CMC-a ter amilaz. Inhibicija je očitna tudi pri ksilanazah, CMC-azah in izvenceličnih amilazah bakterije <i>S. bovis</i> . Proteaze obeh bakterij, izvencelične amilaze, ksilanaze in CMC-aze <i>S. ruminantium</i> ter celične amilaze <i>S. bovis</i> so bile bolj aktivne pri večjih koncentracijah tanina (0,25 g/l in 1,00 g/l). Z naraščanjem koncentracije taninov se veča vpliv tanina, vendar ne sorazmerno. Obe bakteriji kažeta določeno odpornost do taninov. Obseg vpliva taninov na proučevani bakteriji je odvisen od lastnosti posameznih bakterij ter od koncentracije taninov.

#### KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn  
DC UDC 579(043.2)=863  
CX microbiology/*Streptococcus bovis/Selenomonas ruminantium/bacteria/growth/* chestnut tannins/enzymes/enzyme activity/rumen  
CC AGRIS L50  
AU GRM, Simona  
AA MARINŠEK LOGAR, Romana (supervisor)  
PP SI-1230 Domžale, Groblje 3  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Zootechnical Department  
PY 2006  
TI INFLUENCE OF CHESTNUT TANNINS ON GROWTH AND ENZYME ACTIVITIES OF RUMEN BACTERIA *Streptococcus bovis* AND *Selenomonas ruminantium*  
DT Graduation Thesis (University studies)  
NO XIV, 62 p., 6 tab., 21 fig., 24 ann., 89 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB Tannins are natural, secondary plant metabolites. They belong to group of polyphenolic compounds, often present in the diets of herbivores. They form complexes with vitamins, minerals, carbohydrates, digestive enzymes, microorganisms and proteins. In this way they interfere in digestion of ruminants. Formation of complexes in the rumen has influence on nutrient degradation and microbial activity. Supplied at high concentration tannins may have adverse effects on rumen microbial population and on animal health. On the other hand, low doses exhibit some potential to improve rumen fermentation. By forming complexes with diet proteins, they decrease ruminal protein degradation and therefore enhance nitrogen supply to the animal. In graduation thesis we tested the influence of chestnut tannins on two important rumen bacteria *Selenomonas ruminantium* and *Streptococcus bovis*. Three different tannin concentrations (0.05 g/l, 0.25 g/l and 1.00 g/l) were used at seven incubation times (5, 10, 13, 16, 20, 32 and 48 hours). Cell growth (proteins) and enzyme activities of xylanase, carboxymethylcellulase (CMC-ase), amylase and protease were followed in supernatants and cell extracts. Growth of *S. bovis* has been influenced at both higher tannin concentrations. Growth of *S. ruminantium* has been improved by tannins. *S. ruminantium* cellular xylanase, amylase and CMC-ase activities were reduced. Xylanase, CMC-ase and extracellular amylase activities in *S. bovis* were inhibited too. Proteolytic enzymes of both bacteria, extracellular amylase, xylanase and CMC-ase activities in *S. ruminantium* and cellular amylase activities in *S. bovis* were more active at higher tannin concentrations (0.25 g/l and 1.00 g/l). The influence of tannin increased with higher concentration but not proportionally. Both bacteria showed some resistance to tannins. The degree of tannins influence on bacteria depends on concentration of tannins and on specific bacterial properties.

## KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key words documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VIII
Kazalo slik	IX
Kazalo prilog	XII
Okrajšave in simboli	XIV
<b>1 UVOD</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN DELA	2
<b>2 PREGLED OBJAV</b>	<b>3</b>
2.1 VAMP IN VAMPNI MIKROORGANIZMI	3
<b>2.1.1 <i>Streptococcus bovis</i></b>	<b>3</b>
<b>2.1.2 <i>Selenomonas ruminantium</i></b>	<b>4</b>
2.2 GLAVNE SESTAVINE KRME PREŽVEKOVALCEV	5
<b>2.2.1 Ogljikovi hidrati</b>	<b>5</b>
2.2.1.1 Škrob	5
2.2.1.1.1 Zakisanje vampa ali vampna acidoza	6
2.2.1.2 Celuloza, ksilan	6
<b>2.2.2 Beljakovine</b>	<b>7</b>
2.3 TANINI	7
<b>2.3.1 Vrste taninov</b>	<b>8</b>
2.3.1.1 Kondenzirani tanini	8
2.3.1.2 Hidrolizirajoči tanini	9
<b>2.3.2 Prisotnost taninov v naravi</b>	<b>10</b>
<b>2.3.3 Delovanje in vpliv taninov</b>	<b>11</b>
2.3.3.1 Povezovanje z makromolekulami	12
2.3.3.1.1 Kompleksi z beljakovinami	12
2.3.3.1.2 Kompleksi z ogljikovimi hidrati	14

	str.
2.3.3.1.3 Kompleksi z vitaminimi in rudninskimi snovmi	14
2.3.3.1.4 Kompleksi z mikrobi in prebavnimi encimi	14
2.3.3.2 Vpliv taninov na presnovo beljakovin	15
2.3.3.3 Vpliv taninov na presnovo ogljikovih hidratov	16
<b>2.3.4 Prilagoditev živali in mikroorganizmov na prisotnost taninov</b>	17
<b>2.3.5 Farmatan</b>	18
<b>3 MATERIALI IN METODE</b>	19
3.1 GOJENJE IN SPREMLJANJE RASTI BAKTERIJ	19
3.1.1 Gojišča za bakterijske kulture	19
3.1.2 Tehnike gojenja in shranjevanje bakterij	20
3.1.3 Priprava raztopin s taninom in vzorcev bakterijskih kultur za določanje encimske aktivnosti	20
3.1.4 Merjenje koncentracije celičnih beljakovin – spremeljanje rasti bakterijskih kultur	21
3.2 ENCIMSKI TESTI	22
3.2.1 Kvantitativno merjenje ksilanazne encimske aktivnosti (razgradnja ksilana)	22
3.2.2 Kvantitativno merjenje CMC-azne encimske aktivnosti (razgradnja celuloze)	23
3.2.3 Kvantitativno merjenje amilolitične encimske aktivnosti (razgradnja škroba)	23
3.2.4 Kvantitativno merjenje proteolitične encimske aktivnosti (razgradnja beljakovin)	24
3.3 STATISTIČNA ANALIZA REZULTATOV	25
<b>4 REZULTATI</b>	27
4.1 RAST IN ENCIMSKA AKTIVNOST BAKTERIJE <i>S. ruminanatum</i>	27
4.2 RAST IN ENCIMSKA AKTIVNOST BAKTERIJE <i>S. bovis</i>	35
<b>5 RAZPRAVA IN SKLEPI</b>	42

	str.
5.1 <b>VPLIV KOSTANJEVEGA TANINA NA RAST BAKTERIJ</b>	
<i>S. ruminantium</i> IN <i>S. bovis</i>	43
5.2 <b>VPLIV KOSTANJEVEGA TANINA NA KSILANAZNO</b>	
ENCIMSKO AKTIVNOST BAKTERIJ <i>S. ruminantium</i> IN <i>S. bovis</i>	44
5.3 <b>VPLIV KOSTANJEVEGA TANINA NA CMC-azno</b>	
ENCIMSKO AKTIVNOST BAKTERIJ <i>S. ruminantium</i> IN <i>S. bovis</i>	45
5.4 <b>VPLIV KOSTANJEVEGA TANINA NA AMILAZNO</b>	
ENCIMSKO AKTIVNOST BAKTERIJ <i>S. ruminantium</i> IN <i>S. bovis</i>	46
5.5 <b>VPLIV KOSTANJEVEGA TANINA NA PROTEAZNO</b>	
ENCIMSKO AKTIVNOST BAKTERIJ <i>S. ruminantium</i> IN <i>S. bovis</i>	47
5.6 <b>SKLEPI</b>	50
<b>6          POVZETEK</b>	52
<b>7          VIRI</b>	54

**ZAHVALA**

**PRILOGE**

## KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Pregl. 1: Sestava gojišča M2 z dodatkom ksilana	19
Pregl. 2: Mineralna raztopina I	19
Pregl. 3: Mineralna raztopina II	20
Pregl. 4: Reagenčna mešanica Lowry A : Lowry B = 50 : 1	21
Pregl. 5: Reagenčna mešanica PAHBAH	22
Pregl. 6: Reagenčna mešanica DNS	24

## KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Struktura flavan-3-ola in proantocianidina (Mangan, 1988: 210)	8
Slika 2: Struktura galne in elagne kisline (Mangan, 1988: 210)	9
Slika 3: Potek dela pri ugotavljanju vpliva kostanjevega tanina na rast in encimske aktivnosti bakterije <i>S. bovis</i> in <i>S. ruminantium</i>	26
Slika 4: Rast bakterijske kulture <i>S. ruminantium</i> pri treh različnih koncentracijah kostanjevega tanina (0,05 g/l; 0,25 g/l; 1,00 g/l) in kontrolni kulturi brez dodanega tanina	27
Slika 5: Specifična celična ksilanolitična encimska aktivnost bakterijske kulture <i>S. ruminantium</i> pri treh različnih koncentracijah kostanjevega tanina (0,05 g/l; 0,25 g/l; 1,00 g/l) in kontrolni kulturi brez dodanega tanina	28
Slika 6: Specifična izvencelična ksilanolitična encimska aktivnost bakterijske kulture <i>S. ruminantium</i> pri treh različnih koncentracijah kostanjevega tanina (0,05 g/l; 0,25 g/l; 1,00 g/l) in kontrolni kulturi brez dodanega tanina	29
Slika 7: Specifična celična CMC-azna encimska aktivnost bakterijske kulture <i>S. ruminantium</i> pri treh različnih koncentracijah kostanjevega tanina (0,05 g/l; 0,25 g/l; 1,00 g/l) in kontrolni kulturi brez dodanega tanina	30
Slika 8: Specifična izvencelična CMC-azna encimska aktivnost bakterijske kulture <i>S. ruminantium</i> pri treh različnih koncentracijah kostanjevega tanina (0,05 g/l; 0,25 g/l; 1,00 g/l) in kontrolni kulturi brez dodanega tanina	30
Slika 9: Specifična celična amilolitična encimska aktivnost bakterijske kulture <i>S. ruminantium</i> pri treh različnih koncentracijah kostanjevega tanina (0,05 g/l; 0,25 g/l; 1,00 g/l) in kontrolni kulturi brez dodanega tanina	31

str.

- Slika 10: Specifična izvencelična amilolitična encimska aktivnost bakterijske kulture *S. ruminantium* pri treh različnih koncentracijah kostanjevega tanina (0,05 g/l; 0,25 g/l; 1,00 g/l) in kontrolni kulturi brez dodanega tanina 32
- Slika 11: Specifična celična proteolitična encimska aktivnost bakterijske kulture *S. ruminantium* pri treh različnih koncentracijah kostanjevega tanina (0,05 g/l; 0,25 g/l; 1,00 g/l) in kontrolni kulturi brez dodanega tanina 33
- Slika 12: Specifična izvencelična proteolitična encimska aktivnost bakterijske kulture *S. ruminantium* pri treh različnih koncentracijah kostanjevega tanina (0,05 g/l; 0,25 g/l; 1,00 g/l) in kontrolni kulturi brez dodanega tanina 33
- Slika 13: Rast bakterijske kulture *S. bovis* pri treh različnih koncentracijah kostanjevega tanina (0,05 g/l; 0,25 g/l; 1,00 g/l) in kontrolni kulturi brez dodanega tanina 35
- Slika 14: Specifična celična ksilanolitična encimska aktivnost bakterijske kulture *S. bovis* pri treh različnih koncentracijah kostanjevega tanina (0,05 g/l; 0,25 g/l; 1,00 g/l) in kontrolni kulturi brez dodanega tanina 36
- Slika 15: Specifična izvencelična ksilanolitična encimska aktivnost bakterijske kulture *S. bovis* pri treh različnih koncentracijah kostanjevega tanina (0,05 g/l; 0,25 g/l; 1,00 g/l) in kontrolni kulturi brez dodanega tanina 37
- Slika 16: Specifična celična CMC-azna encimska aktivnost bakterijske kulture *S. bovis*, pri treh različnih koncentracijah kostanjevega tanina (0,05 g/l; 0,25 g/l; 1,00 g/l) in kontrolni kulturi brez dodanega tanina 38

str.

- Slika 17: Specifična izvencelična CMC-azna encimska aktivnost bakterijske kulture *S. bovis* pri treh različnih koncentracijah kostanjevega tanina (0,05 g/l; 0,25 g/l; 1,00 g/l) in kontrolni kulturi brez dodanega tanina 38
- Slika 18: Specifična celična amilolitična encimska aktivnost bakterijske kulture *S. bovis* pri treh različnih koncentracijah kostanjevega tanina (0,05 g/l; 0,25 g/l; 1,00 g/l) in kontrolni kulturi brez dodanega tanina 39
- Slika 19: Specifična izvencelična amilolitična encimska aktivnost bakterijske kulture *S. bovis* pri treh različnih koncentracijah kostanjevega tanina (0,05 g/l; 0,25 g/l; 1,00 g/l) in kontrolni kulturi brez dodanega tanina 40
- Slika 20: Specifična celična proteolitična encimska aktivnost bakterijske kulture *S. bovis* pri treh različnih koncentracijah kostanjevega tanina (0,05 g/l; 0,25 g/l; 1,00 g/l) in kontrolni kulturi brez dodanega tanina 41
- Slika 21: Specifična izvencelična proteolitična encimska aktivnost bakterijske kulture *S. bovis* pri treh različnih koncentracijah kostanjevega tanina (0,05 g/l; 0,25 g/l; 1,00 g/l) in kontrolni kulturi brez dodanega tanina 41

## KAZALO PRILOG

- Priloga A: Vir variabilnosti in statistična značilnost vplivov pri spremeljanju rasti in encimskih aktivnosti bakterije *S. ruminantium*
- Priloga B1: Vpliv kostanjevih taninov na rast bakterije *S. ruminantium*
- Priloga B2: Vpliv kostanjevih taninov na koncentracijo beljakovin v supernatantu bakterijske kulture *S. ruminantium*
- Priloga B3: Koncentracija beljakovin v supernatantu bakterijske kulture *S. ruminantium* pri treh različnih koncentracijah kostanjevega tanina (0,05 g/l, 0,25 g/l in 1,00 g/l) in kontrolni kulturi brez dodanega tanina
- Priloga C: Vpliv kostanjevih taninov na celično ksilanolitično aktivnost bakterije kulture *S. ruminantium*
- Priloga D: Vpliv kostanjevih taninov na izvencelično ksilanolitično aktivnost bakterije kulture *S. ruminantium*
- Priloga E: Vpliv kostanjevih taninov na celično CMC-azno aktivnost bakterije kulture *S. ruminantium*
- Priloga F: Vpliv kostanjevih taninov na izvencelično CMC-azno aktivnost bakterije kulture *S. ruminantium*
- Priloga G: Vpliv kostanjevih taninov na celično amilolitično aktivnost bakterije kulture *S. ruminantium*
- Priloga H: Vpliv kostanjevih taninov na izvencelično amilolitično aktivnost bakterije kulture *S. ruminantium*
- Priloga I: Vpliv kostanjevih taninov na celično proteolitično aktivnost bakterije kulture *S. ruminantium*
- Priloga J: Vpliv kostanjevih taninov na izvencelično proteolitično aktivnost bakterije kulture *S. ruminantium*
- Priloga K: Vir variabilnosti in statistična značilnost vplivov pri spremeljanju rasti in encimskih aktivnosti bakterije *S. bovis*
- Priloga L1: Vpliv kostanjevih taninov na rast bakterije *S. bovis*

- Priloga L2: Vpliv kostanjevih taninov na koncentracijo beljakovin v supernatantu bakterijske kulture *S. bovis*
- Priloga L3: Koncentracija beljakovin v supernatantu bakterijske kulture *S. bovis* pri treh različnih koncentracijah kostanjevega tanina (0,05 g/l, 0,25 g/l in 1,00 g/l) in kontrolni kulturi brez dodanega tanina
- Priloga M: Vpliv kostanjevih taninov na celično ksilanolitično aktivnost bakterije kulture *S. bovis*
- Priloga N: Vpliv kostanjevih taninov na izvencelično ksilanolitično aktivnost bakterije kulture *S. bovis*
- Priloga O: Vpliv kostanjevih taninov na celično CMC-azno aktivnost bakterije kulture *S. bovis*
- Priloga P: Vpliv kostanjevih taninov na izvencelično CMC-azno aktivnost bakterije kulture *S. bovis*
- Priloga R: Vpliv kostanjevih taninov na celično amilolitično aktivnost bakterije kulture *S. bovis*
- Priloga S: Vpliv kostanjevih taninov na izvencelično amilolitično aktivnost bakterije kulture *S. bovis*
- Priloga T: Vpliv kostanjevih taninov na celično proteolitično aktivnost bakterije kulture *S. bovis*
- Priloga U: Vpliv kostanjevih taninov na izvencelično proteolitično aktivnost bakterije kulture *S. bovis*

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ΔA	koncentracija razgrajenega azokazeina, ki je posledica delovanja encimov v vzorcih (razlika koncentracije v vzorcu in negativne kontrole)
BSA	ang.: bovine serum albumin, goveji serumski albumin
CMC	karboksimetil celuloza
CMC-aza	karboksimetil celulaza
Da	dalton, enota za molekulsko maso beljakovin
DSMZ	nem.; Deutsche sammlung von mikroorganismen und zellkulturen, Nemska zbirka mikroorganizmov in celičnih kultur
DTT	ditiotreitol
h	ura
kat	katal, enota za količino encima, ki sprosti 1 mol produktov v sekundi
PAHBAH	hidrazid parahidroksibenzojske kisline
PEG	polietilenglikol
PROT	koncentracija beljakovin
<i>S. ruminantium</i>	<i>Selenomonas ruminantium</i>
<i>S. bovis</i>	<i>Streptococcus bovis</i>
RS	reducirajoči sladkorji
ΔRS	količina sproščenih reducirajočih sladkorjev zaradi delovanja encimov v vzorcih (razlika koncentracij vzorca in negativne kontrole)
SA	specifična encimska aktivnost
SED	standardna napaka ocene srednje vrednosti
SEM	standardna napaka ocene razlike
TCA	triklorocetna kislina
U	ang.: unit, enota – količina encimov, ki razgradi 1 µg azokazeina v uri

## 1 UVOD

Kljub vse bolj dorečenemu znanju in ustreznim postopkom pri pridelovanju in konzerviranju krme ter krmljenju ne dosegamo želenih rezultatov v procesu reje živali, zato mora kmetijska stroka poiskati nove načine za izboljšanje prieje, predvsem v povezavi s prehrano živali. Ravno od tega je v največji meri odvisna gospodarnost prieje. Pri tem pa postaja vse bolj pomembno dejstvo, da vsebnost hranljivih snovi, predvsem beljakovin, v obroku pogojuje stopnjo rasti in prieje živali. Beljakovin je pogosto premalo ali pa so živali z njimi preslabo oskrbljene.

Predželodce prežvekovalcev naseljujejo mikroorganizmi, ki omogočajo izkoriščanje hranljivih snovi krme, ki jih gostitelj drugače ne bi mogel izkoriščati. Encimi mikroorganizmov razgradijo sestavine krme, razgradne produkte pa nato delno sami porabijo za rast, razmnoževanje in tvorbo mikrobnih beljakovin. Neprebavljene sestavine krme, mikroorganizme in mikrobne beljakovine preidejo iz predželodcev v pravi želodec (siriščnik) in tanko črevo, kjer jih encimi živali gostiteljice prebavijo, prebavni produkti pa se absorbirajo v krvni obtok. V osnovi so živali s tem preskrbljene s hranili, ki jih potrebujejo. Pri intezivni prieji selekcioniranih živali pa ta način ne zadošča za pokritje vseh potreb po hranljivih snoveh, predvsem po beljakovinah. Spričo tega je potrebno obrok dopolniti z beljakovinami, oz. preprečiti njihovo prekomerno razgradnjo v predželodcih, tako da se bodo prebavile šele v siriščniku in tankem črevesu. Eden izmed možnih načinov zaščite beljakovin je uporaba rastlinskih polimerov, taninov.

Tanini so naravni sekundarni presnovki rastlin, ki spadajo v skupino polifenolov. Kemijsko še niso povsem definirani. Med rastlinskimi vrstami se razlikujejo po molekulski strukturi, stopnji pojavljanja in razširjenosti. Predvidevamo, da rastlinam služijo kot kemična obramba pred škodljivci in rastlinojedimi živalmi. Najpomembnejša skupna lastnost taninov je, da v predželodcih tvorijo komplekse z vitaminimi, rudninske snovi, ogljikovimi hidrati, prebavnimi encimi in beljakovinami v krmi.

Tanini imajo sloves nezaželenih sestavin krme. Ta sloves vse bolj popravljajo raziskave o uporabi taninov v prehrani prežvekovalcev, predvsem o majhnih koncentracijah taninov v obroku, ki praviloma pozitivno delujejo na prebavni proces in tudi na presnovo v

organizmu. To pomeni zagotavljanje bolj uravnovešenega stanja v prebavnem traktu, pri tem pa se izboljšujejo še rejski rezultati.

Tanini zmanjšujejo hranljivo vrednost rastlinam, zato v *in vitro* raziskavah raziskujejmo predvsem vplive taninskih izvlečkov. Raziskave so pri nas usmerjene v proučevanje izvlečka tanina iz pravega kostanca (*Castanea sativa* Mill.), v katerem so prisotni predvsem hidrolizirajoči tanini.

### 1.1 NAMEN DELA

Namen raziskave je bil preveriti vpliv treh različnih koncentracij kostanjevega tanina na rast in encimske aktivnosti (ksilanazna, amilazna, proteazna, karboksimetilcelulazna) dveh pomembnejših vampnih bakterij: *Selenomonas ruminantium* in *Streptococcus bovis*. Rezultati nam bodo bolj pojasnili delovanje tanina na določeni bakteriji in tako delno pomagali razumeti delovanje taninov na mikrofloro v vampu govedi.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 VAMP IN VAMPNI MIKROORGANIZMI

Pri prebavi hranljivih snovi pri neprežvekovalcih imajo ključno vlogo encimi, ki jih tvorijo neprežvekovalci sami, ne proizvajajo pa encimov, s katerimi bi lahko razgradili strukturne ogljikove hidrate (celuloza, hemiceluloza, pektin) (Hobson, 1997). Prebavni sistem prežvekovalcev je temu prilagojen in je odvisen predvsem od mikrobne populacije, ki se je specializirala za razgradnjo rastlinskih ogljikovih hidratov (Wolin in sod., 1997).

Mikrobnna združba, ki razgrajuje hranljive snovi, se nahaja v predželodcih in sestoji iz bakterij, gliv in praživali. Najbolj številčne ( $10^{10}$  na ml) in pomembne so bakterije. Končni produkti mikrobne razgradnje (aminokisline, peptidi, hlapne maščobne kisline) se delno absorbirajo v krvni obtok že skozi steno vampa. Večina preide skupaj z nerazgrajenimi sestavinami krme in mikrobnimi beljakovinami v siriščnik in tanko črevo. Tu se s pomočjo encimov gostitelja prebavijo in absorbirajo. Žival se tako oskrbi z energijo in hranili, ki jih potrebuje za ohranjanje osnovnih telesnih funkcij, rast in prirejo mleka, mesa ter volne (Hobson, 1997; Lavrenčič, 2001).

#### 2.1.1 *Streptococcus bovis*

So gram pozitivne, negibljive bakterije, ki imajo obliko kokov. Lahko se pojavljajo samostojno ali v manjših verigah. Celice so velike od 0,70 do 0,80  $\mu\text{m}$ . V osnovi gre za anaerobne bakterije, vendar določeni sevi prenesejo manjše koncentracije kisika (Nelson in sod., 1998).

Večina sevov ima optimalno temperaturo za rast pri  $37^\circ\text{C}$ , nekateri pa so aktivni še pri 20 oz.  $40^\circ\text{C}$ . Optimalen pH je med 5,6 in 6,5 (Satoh in sod., 1993).

*S. bovis* je ena izmed najbolj aktivnih amilolitičnih vampnih bakterij – torej zelo aktivna pri razgradnji škroba (Cotta, 1988). Pri razgradnji surovega škroba sodelujejo izvencelične amilaze, pri razgradnji topnega škroba pa celične amilaze (Satoh in sod., 1997). Narita in sod. (2004) navajajo, da sev 148 proizvaja mlečno kislino neposredno iz surovega škroba pri pH 6 in temperaturi  $37^\circ\text{C}$ . Pri tem iz 20 g/l surovega škorba proizvede 14,7 g mlečne kisline. Bakterije slabše rastejo v glukoznem mediju (Cotta, 1988). Russel in Dombrowski

(1980) ugotavljata, da ima *S. bovis* visoko aktivnost še pri dokaj nizkem izvenceličnem pH. Wallace in Brammall (1985) navajata, da imajo bakterije visoko leucin aminopeptidazno aktivnost. Nelson in sod. (1998) navajajo, da določeni sevi nemoteno rastejo tudi v prisotnosti taninov.

### 2.1.2 *Selenomonas ruminantium*

Glede na velikost in širino celic se med sevi pojavljajo precejšne razlike. Večinoma so velike, ukrivljene palčke, dolge od 2 do 2,5 µm in široke od 0,8 do 1 µm. Pojavljajo se kot samostojne celice, včasih pa tudi v parih ali kratkih verigah. Opazili so tudi precej podaljšane predstavnike do 20 µm. Celice so gram negativne in gibljive. Na sredino oz. ukrivljen del celice je pritrjenih 12 ali več bičkov. So striktni anaerobi (Bryant, 1956), ki predstavljajo od 20 do 51 % populacije vampnih bakterij (Caldwell in Bryant, 1966).

Večina sevov ima optimalno temperaturo za rast med 30 in 37°C. Ne rastejo pri temperaturi pod 22°C ali nad 45°C. V primerjavi z drugimi bakterijami prenesejo bolj kislo okolje vampa (Bryant, 1956).

*Selenomonas ruminantium* razgrajuje različne ogljikove hidrate vkjučno z glukozo, ksilanom, arabinozo in maltozo (Strobel, 1993; Bryant 1956; Cotta, 1992). Prioritetno razgrajuje heksoze pred pentozami (Strobel, 1993). Končni poducti razgradnje so laktat, propionat in acetat, količine in deleži produktov pa so odvisni od rastnih razmer. Če je glukoza glavni vir ogljika, se najprej tvorita D-laktat in L-laktat, ki se nato v primeru, da je sev sposoben razgraditi laktat, pretvorijo v propionat in acetat (Scheifinger in sod., 1975). Če bakterije laktata ne razgradijo, se ta kopiči v predzelodcih. S produkcijo in razgradnjo laktata te bakterije vplivajo na vampni pH in potek vampne acidoze (Russell in Dombrowski, 1980; Strobel, 1993). Cotta (1990) je prepoznał tri seve, ki izkoriščajo kot vir energije RNA, ne pa DNA. Izoliran je bil tudi sev, ki ima prisotno tanazno aktivnost in lahko kot vir energije izrablja tanin (Skene in Brooker, 1995). Williams in Martin (1990) navajata, da prisotnost monomernih fenolnih enot zmanjšuje razgradnjo ksiloze pri *Selenomonas ruminantium* do 40 %.

## 2.2 GLAVNE SESTAVINE KRME PREŽVEKOVALCEV

### 2.2.1 Ogljikovi hidrati

Rastlinski ogljikovi hidrati (celuloza, ksilan, pektin, škrob, fruktani) pripadajo strukturnim ali rezervnim ogljikovim hidratom rastlin in predstavljajo poglavitni vir ogljika in energije za prežvekovalce (Dehority, 1991).

#### 2.2.1.1 Škrob

Škrob je najpomembnejši rastlinski rezervni ogljikov hidrat, ki je prisoten predvsem v semenih, koreninah in gomoljih. Sestavljen je iz dveh različnih polisaharidov: amiloze in amilopektina. Tako amiloza kot amilopektin se nahajata v rastlinah v obliki zrnc. V večini primerov je v škorbu bolj zastopan amilopektin, ki predstavlja 70 do 80 % suhe snovi (Žgajnar, 1990).

Amiloza je preprostejši polisaharid, sestavljen iz linearne verige, kjer so glukozni ostanki povezani z  $\alpha(1-4)$  vezjo. Pojavljajo se redke stranske verige, ki so na osnovno verigo vezane z  $\alpha(1-6)$  vezjo. Amilopektin je ravno tako sestavljen iz  $\alpha(1-4)$  povezanih glukoznih ostankov, vendar je to večja molekula z bolj razvejeno strukturo (Chesson in Forsberg, 1997). Pri preverjanju sestave škroba uporabljajo jodov test. Amiloza daje z jodom temno modro barvo, amilopektin pa vijolično-modro do škrlatno (Žgajnar, 1990).

Razgradnja škroba v vampu je bolj odvisna od materiala, ki obdaja zrno, kot od lastnosti samega škroba. Delež škroba, ki se izogne vampni razgradnji, je od 3 do 50 %, odvisno od predhodne obdelave krme ali vira škroba (Chesson in Forsberg, 1997). Ko se škrob sprosti iz zrnc, se v njegovo razgradnjo vključijo vampni mikrobi. Veliko vampnih bakterij je sposobnih uporabiti škrob kot substrat in so zato pomembni pri njegovi razgradnji. To so bakterijske vrste *Prevotella ruminicola* in *P. bryantii*, *Ruminobacter amylophilus*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Bacteroides ruminicola*, *Selenomonas ruminantium* in *Streptococcus bovis* (Cotta, 1988, 1993).

#### 2.2.1.1.1 Zakisanje vampa ali vampna acidoza

V primeru, da žival zaužije preveliko količino škroba, se namnožijo mlečno-kislinske bakterije, ki sintetizirajo mlečno kislino (Narita in sod., 2004). Ta se zaradi premajhnega števila bakterij, ki jo izrabljajo, kopiči v predželodcih, zato se zniža pH vampa. Ko pade pod vrednost 5,0, govorimo o bolezenskem stanju, ki ga imenujemo acidoza ali zakisanje vampa. Zakisanje vampa povezujejo predvsem z namnožitvijo bakterij vrste *Streptococcus bovis* (Nock, 1997). Posledice so zmanjšana prireja živali, v hujših primerih pa zastrupitev in pogin (Jazbec in Skušek, 1990).

#### 2.2.1.2 Celuloza, ksilan

Celuloza in hemiceluloza sta najbolj zastopana struktorna ogljikova hidrata rastlinskih celičnih sten (Cotta, 1993). Delež hemiceluloze v rastlinski celični steni zajema 20 do 40 %. Prevladujoči polimer je ksilan (50 % ali več), ki sestoji iz ksiloze in arabinose (Dehority, 1973, cit. po Hespell in sod., 1987). Mlade rastline ponavadi vsebujejo manj celuloze in ksilana (Žgajnar, 1990), s staranjem pa se njun delež povečuje. Nahajata se predvsem v sekundarnih celičnih stenah rastlin. Glukozne ostanke imata povezane z  $\beta(1\text{-}4)$  glikozidno vezjo. Verige se z vodikovimi vezmi povezujejo v mikrofibrile, te pa kasneje z ligninom (Chesson in Forsberg, 1997).

V predželodcih celulozo in ksilan razgrajujejo cellulaze in ksilanaze, encimi, ki jih proizvajajo vampni mikrobi. Obseg razgradljivosti celuloze in hemiceluloze (ksilana) v predželodcih s staranjem rastline pada, kar je posledca vezave z ligninom, ki je mikrobom slabše dostopen. V mladih rastlinah mikroorganizmi razgadjijo do 90 % struktturnih ogljikovih hidratov (Žgajnar, 1990), v starejših pa le 40 do 60% (Hespell in sod., 1987). Glavni končni produkti so ocetna, maslena in propionska kislina. V manjši meri se sproščata še ogljikov dioksid in metan (Žgajnar, 1990). Pomembne vampne bakterije pri razgradnji celuloze so *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* in *Eubacterium cellulosolvens* (Butter in sod., 1999; Chesson in Forsberg, 1997).

## 2.2.2 Beljakovine

Za zadovoljivo prirejo živali je potrebna predvsem zadostna oskrba z beljakovinami. Tako premajhna kot prevelika oskrba z njimi vodita do poslabšane rasti in prireje. Rastline vsebujejo dušik v obliki beljakovin, ki predstavljajo poglaviti vir dušika za prežvekovalec (Wallace in sod., 1997). Mikroorganizmi v predželodcih omogočajo, da se zaužite beljakovine razgradijo do nebeljakovinskih dušikovih spojin (amoniak, peptidi, aminokisline), ki se kasneje, ob primerni oskrbi z energijo, vgradijo v mikrobne beljakovine. Te kasneje skupaj z nerazgrajenimi beljakovinami krme preidejo v siriščnik in tanko črevo, kjer se prebavijo in absorbirajo v krvni obtok, da jih žival porabi za lastno rast (McDonald in sod., 1995). Če je v vampu razgradnja beljakovin hitrejša od razgradnje ogljikovih hidratov, se kopiči amoniak, ki se izloči s sečem, to pa zmanjuje biološko vrednost beljakovin (Lavrenčič, 2001). Po Manganu (1988) je najpogostejša rastlinska beljakovina F1-beljakovina oz. ribuloza-1,5-difosfat karboksilaza (*Rubisco*).

Pri živalih z veliko prirejo je oskrba z beljakovinami problematična in je potrebno ponavadi obrok dopolniti z drugimi nebeljakovinskimi viri dušika (npr. sečnina) ali pa zavarovati beljakovine krme pred razgradnjo v predželodcih (Wallace in sod., 1997).

Proteolitične bakterije, ki s svojimi proteazami in peptidazami sodelujejo pri razgradnji beljakovin v vampu so *Bacteroides ruminicola* in *B. amylophilus*, *Butyrivibrio fibrisolvens* in *B. alactacidigenes*, *Streptococcus bovis* in *Selenomonas ruminantium* (Wallace in Brammall, 1985).

## 2.3 TANINI

Sekundarni presnovki rastlin se med seboj močno razlikujejo glede na molekulsko maso in stopnjo razširjenosti ter pojavljanja med rastlinami. To velja tudi za tanine, ki so druga najbolj zastopana skupina rastlinskih fenolov, takoj za ligninom (Lowry in sod., 1996). Tanini kemično niso povsem definirani, tako da jih med seboj povezujejo bolj ali manj sorodne lastnosti (Jansman, 1993), med katerimi je najbolj pomembna tvorba stabilnih kompleksov z beljakovinami, ogljikovimi hidrati (pektin, celuloza, hemiceluloza), rudninskimi snovmi in vitaminji (Mangan, 1988; Jansman, 1993; Kumar in Vaithianathan,

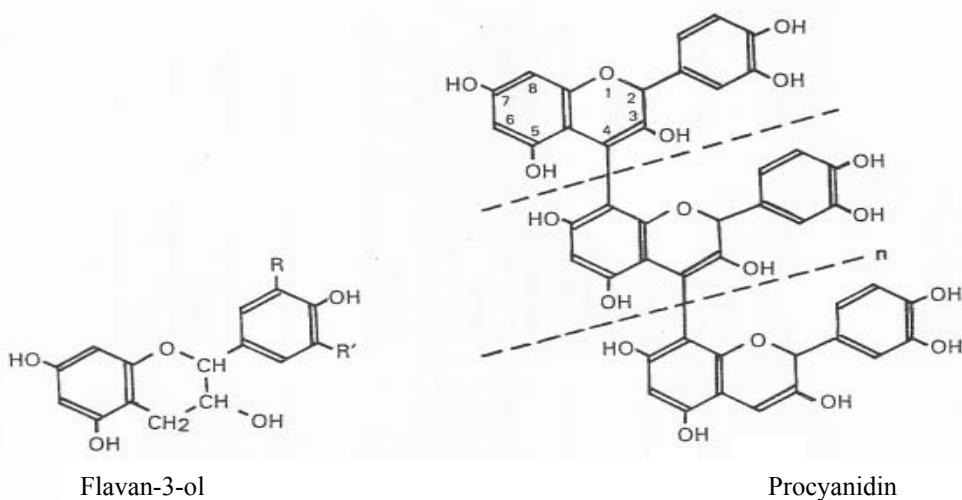
1990). So topni v vodi, njihova topnost pa se zmanjšuje s povečevanjem molekulske mase (Lavrenčič, 2001), ki se v povprečju giblje med 500 in 3000 Da (Mangan, 1988).

### 2.3.1 Vrste taninov

Tanine delimo na hidrolizirajoče in kondenzirane. Med seboj se razlikujejo po kemijski zgradbi molekul, reaktivnosti z drugimi molekulami, odpornosti na hidrolizo, prehranskih učinkih in toksičnosti (Kumar in Vaithianathan, 1990; Caygill, 1999).

#### 2.3.1.1 Kondenzirani tanini

So najbolj razširjeni rastlinski tanini, ki tvorijo polimere in oligomere iz flavonskih enot (flavan-3-ol, flavan-3-4-diol). Kondenzirani tanini, v katerih prevladujejo flavan-3-oli so tako imenovani katehini, v galokatehinih pa prevladujejo flavan-3-4-dioli (Mangan, 1988). Ker se pri segrevanju v prisotnosti kisline obarvajo in tvorijo antocianide, jih imenujemo tudi proantocianidi. Leukodelfinidin, leukocianidin in leukopelargonidin spadajo med proantocianide, flavan-3-4-diole (Jansman, 1993). Obstajajo kondenzirani tanini, katerih molekulska masa presega 20 000 Da (Hagerman in Butler, 1981).



Slika 1: Strukturna flavan-3-ola in proantocianidina (Mangan, 1988: 210)

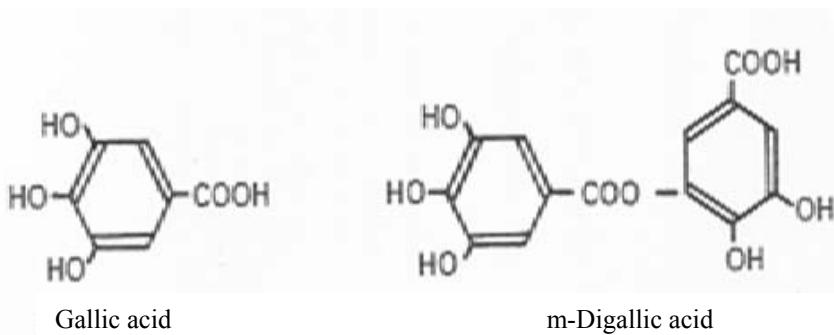
V nasprotju s hidrolizirajočimi tanini kondenzirani tanini nimajo ogljikohidratnega jedra (Mangan, 1988) in se ne depolimerizirajo prek cepljenja ogljikovih vezi (McSweeney in sod., 2001). Zato tudi razgradnja v anaerobnih pogojih vampa verjetno ne poteka (Lowry

in sod., 1996). Kondenzirani tanini so v manjših koncentracijah v obroku prežvekovalcev celo koristni (Perez-Maldonado in Norton, 1996).

Po raziskavah, ki so jih opravili Grundhofer in sod. (2001), se kondenzirani tanini ne nahajajo v celičnih vakuolah, ampak v celičnih stenah, kjer poteka tudi njihova sinteza. Drevesne vrste *Acacia mollisiima* in *A. mearnsii*, *Schinopsis lorentii* in *S. balansae* služijo kot glavni viri izvlečkov kondenziranih taninov (Bhat in sod., 1988; Mangan, 1998).

### 2.3.1.2 Hidrolizirajoči tanini

Hidrolizirajoči tanini imajo ogljikohidratno jedro (največkrat glukoza), na katerem sta dve ali več hidroksilnih skupin zaestrenih z galno ali elagno kislino (galotanini) oz. heksahidroksidifensko kislino (elagitanini) (Lowry in sod., 1996). Tanini se hitro hidrolizirajo v prisotnosti kislin, baz ali določenih encimov (Kumar in Vaithianathan, 1990). Pri hidrolizi heksahidroksidifenske kisline se tvori elagna kislina (Bhat in sod., 1998), pri hidrolizi galotaninov pa galna kislina in glukoza (Reed, 1995). Tipičen hidrolizirajoči tanin je taninska kislina, ki jo uvrščamo med galotanine (Singh in sod., 2001). Po Manganu (1988) naj bi taninska kislina vsebovala na mol glukoze 8 do 10 molov galne kisline.



Slika 2: Struktura galne in elagne kisline (Mangan, 1988: 210)

Njihova hidroliza poteka tudi v vampu, v prisotnosti encimov esteraz oz. tanin acilhidrolaz (Goel in sod., 2005; McSweeney in sod., 2001). Ti pri taninski kislini cepijo estrske vezi, pri tem pa se sprošča galna kislina (Skene in Brooker, 1995). Galna kislina se v vampu naprej dekarboksilira do resorcinola in floroglucinola, ki se izločita s sečem živali (Murdiati in sod., 1992; McSweeney in sod., 2001). Tudi Singh in sod. (2001) poročajo o

nastanku galne kisline, pirogalola in resorcinola pri *in vitro* razgradnji taninske kisline z vampnim sokom govedi.

Hidrolizirajoči tanini so slabo zastopani v listju in travah. Nahajajo se v celičnih vakuolah, iz katerih se sprostijo ob poškodbni celic (Waghorn in McNabb, 2003). Najbolj pogoste drevesne vrste, iz katerih pridelujejo komercialne izvlečke hidrolizirajočih taninov, so hrast (*Quercus infectoria*, *Q. ilex*, *Q. aegilops* in *Q. robur* I), kostanj (*Castanea sp.*), ruj (*Rhus coriaria* I., *Rhus semialata*) in evkaliptus (*Eucalyptus sp.*) (Bhat in sod., 1998; Jansman, 1993; Waghorn in McNabb, 2003; Mangan, 1988).

### **2.3.2 Prisotnost taninov v naravi**

Lowry in sod. (1996) navajajo, da vsebujejo trave zmernega pasu 20 g taninov na kg SS z izjemo nekaterih stročnic, ki vsebujejo do 50 g kondenziranih taninov na kg SS. V tropskih rastlinah je lahko do 200 g taninov na kg SS. Skupno je lahko v določenih rastlinah več kot 500 g fenolov na kg SS. Prisotnost taninov je ugotovljena pri 80 % drevesnih vrst in 15 % enoletnih in trajnih dvokaličnicah (Mueller-Harvey, 1999).

Nekatere pomembne rastlinske vrste, ki se pojavljajo v prehrani ljudi in živali, vsebujejo precejšne količine taninov v semenih, npr. proso (*Panicum miliaceum*), ogrščica (*Brassica napus*), ječmen (*Hordeum vulgare*), lucerna (*Medicago sativa*), medena detelja (*Melilotus officinale*), turška detelja (*Onobrychis viciifolia*), plazeča detelja (*Trifolium repens*) in črna detelja (*Trifolium pratense*) (Jansman, 1993). Tanini so prisotni tudi v pivu, moštu in vinu, kamor so prišli iz hmelja, jabolk in grozdja (Mueller-Harvey, 1999).

Vrsta, vsebnost in mesto nahajanja taninov v rastlinah se med posameznimi vrstami rastlin močno razlikuje. Pomembni v prehrani živali so predvsem tisti, ki se kopičijo v celičnih stenah in vakuolah listov ter stebel (Waghorn in McNabb, 2003; Grundhofer in sod. 2001). Posamezne rastlinske vrste ne proizvajajo le ene vrste tanina, ampak kompleksno mešanico, kjer ena vrsta prevladuje (Mueller-Harvey, 1999).

Na vsebnost taninov vpliva zrelost rastlin, stresni dejavniki in okolje, predvsem pomembni so rastni dejavniki (temperatura, količina padavin, založenost tal s hranili) (Jansman, 1993; Mueller-Harvey, 1999). Različni kultivarji lotusa (*Lotus pedunculatus*, *Lotus corniculatus*)

vsebujejo različne deleže taninov. Več jih vsebujejo tisti, ki rastejo na bolj revnih tleh (Barry in Manley, 1984). Obstaja celo povezava med vsebnostjo kondenziranih taninov v *Lotus pedunculatus* in ligninom. Pri manjši vsebnosti tanina je bila manjša tudi vsebnost lignina (46 g na kg SS oz. 132 g na kg SS), pri večji vsebnosti tanina, pa je bila večja tudi vsebnost lignina (106 g na kg SS oz. 152 g na kg SS) (Barry in Manley, 1984).

### 2.3.3 Delovanje in vplivi taninov

Tanini so prisotni v številnih rastlinskih vrstah, kjer služijo kot kemična obramba pred boleznimi in škodljivci (Caygill, 1999). Različni viri navajajo na podlagi *in vitro* in *in vivo* raziskav, da krma, bogata s tanini, vpliva na konzumacijo krme pri živalih, njihovo pritejo, dnevni prirast ter prebavljenost in izkoristljivost hranljivih snovi krme (Barry in Duncan, 1984; Barry in Manley, 1984; Waghorn in sod., 1994; Chiquette in sod., 1988). To je posledica tvorbe kompleksov z beljakovinami in ostalimi makromolekulami krme (ogljikovi hidrati, rudninske snovi, vitamini, mikrobi prebavnega trakta, prebavni encimi) (Chung in sod, 1998c; McLead, 1974; Jansman, 1993; Reed, 1995; Mangan, 1988).

Tanini delujejo astringentno. To pomeni, da tvorijo na površini sluznic tanek sloj netopnih denaturiranih beljakovin. S tem sluznica postane manj občutljiva na škodljive vplive. Tanini tako delujejo tudi na celično membrano mikrobov (Štruklec, 2002). Posledica astringentnega delovanja je trpek okus in povečana izsušenost sluznice in s tem zmanjšana konzumacija krme pri živalih (Jansman, 1993; Longstaff in McNab, 1991). Štruklec (2002) navaja, da govedo in ovce odklanjajo krmo, ko ta vsebuje več kot 60 g taninov na kg SS.

Po Lowryju in sod. (1996) naj bi bile spremembe v prebavnem traktu večinoma posledica nastanka taninsko-beljakovinskih kompleksov. Pri prežvekovalcih, ki zauživajo z beljakovinami bogato krmo, tanini preprečijo napenjanje (Butter in sod., 1999). V veterinarski praksi se tanini priporočajo kot preventiven ukrep pri preprečevanju in zdravljenju drisk, saj izboljšujejo kakovost sluznice z delovanjem na glikoproteine (Vincenzi, 2001). Zaradi vezave na mikroorganizme imajo bakteriostatičen učinek. Pri drobnici je bilo ugotovljeno, da prisotnost kondenziranih taninov v krmi povečuje odpornost na črevesno-parazitne infekcije (Niezen in sod., 1995). Nastanek taninsko-beljakovinskega kompleksa izboljšuje tudi izkoriščanje dušika krme, kar posledično

zmanjšuje onesnaženost okolja (Butter in sod., 1999; Mueller-Harvey, 1999). Pozitivni učinki taninov, naj bi se kazali tudi pri prieji živali. Avtorji (Orešnik, 1996; Wang in sod., 1996a, 1996b; Barry in sod., 1986a) poročajo o izboljšani prieji mleka, izboljšani absorbciji predvsem esencialnih aminokislin, večjem deležu mlečnih beljakovin, zmanjšani prieji mlečnih maščob in boljši rasti volne pri živalih.

Tanini pa nimajo samo pozitivnih učikov na živali. Krmljenje s krmo, ki vsebuje večje koncentracije kondenziranih taninov (100 do 180 g na kg SS) ima negativne učinke na prežvekovalce, saj zmanjšuje konzumacijo krme, prebavljivost ogljikovih hidratov in oskrbo z energijo (Chiquette in sod., 1998; Barry in Duncan, 1984; Barry in sod., 1986b). Velike koncentracije taninov v krmi delujejo toksično (Kumar in Vaithianathan, 1990). Bolj toksični so hidrolizirajoči kot kondenzirani tanini. Slednji se ne absorbirajo v krvni obtok, medtem ko se razgradni produkti hidrolizirajočih taninov absorbirajo v kri. S tem lahko pri prekomernih koncentracijah povzročijo odmiranje ali odpoved notranjih organov (Jansman, 1993). Zhu in Filippich (1992) poročata, da je povečano zauživanje taninske kisline pri ovcah vplivalo na nastanek presnovne acidoze.

S tanini se srečujemo tudi v prehrani ljudi. Najdemo jih v živilih kot so sok, vino in čaj. Mnoge raziskave poročajo o antikarcinogenosti taninov, ker zmanjšujejo nastajanje prostih radikalov (Chung in sod., 1998c).

### 2.3.3.1 Povezovanje z makromolekulami

#### 2.3.3.1.1 Kompleksi z beljakovinami

Tanini se zaradi svoje sposobnosti tvorbe kompleksov z beljakovinami že od nekdaj uporabljali v usnjarski industriji, kjer so zamenjali toksični kromov sulfat. Ob stiku z beljakovinami kože (kolageni) pretvorijo kožo v usnje in ga tako trajno zaščitijo pred napadi mikroorganizmov (Mueller-Harvey, 1999; Mangan, 1988). Veliko avtorjev poroča o nastanku taninsko-beljakovinskega kompleksa z beljakovinami sline, beljakovinami krme in prebavnimi encimi (Lowry in sod., 1996; Kumar in Vaithianathan, 1990; Bhat in sod., 1998). Z vezavo se zmanjša delovanje prebavnih encimov in razgradnja beljakovin (McLead, 1974).

Že med procesom žvečenja v ustih prežvekovalcev tanini reagirajo z beljakovinami krme in sline s tem da tvorijo z njimi reverzibilne vodikove vezi (McLead, 1974). Tvorba kompleksov se nadaljuje v vampu. Na to vpliva več dejavnikov, od izoelektrične točke beljakovin, pH in temperature okolja do prisotnosti anorganskih ionov, strukture beljakovin, molekulske mase in števila prostih fenolnih spojih (Hagerman in Butler, 1981; Barry in McNabb, 1999; Lowry in sod., 1996; Perez-Maldonado in sod., 1995).

Večje globularne beljakovine imajo manjšo privlačnost do tanina. Molekule tanina pa morajo biti dovolj majhne, da lahko vdrejo v molekulo beljakovine in imeti morajo dovolj reaktivnih skupin, da lahko tvorijo vodikove vezi (Hagarman in Butler, 1981; Jansman, 1993). Mueller-Harvey (1999) navaja, da je najmanjša molekulska masa tanina, pri kateri še lahko obori beljakovino, 500 g na mol.

Perez Maldonado in sod. (1995) poročajo, da se je *in vitro* največ kompleksov med beljakovinami in tanini tvorilo v območju izoelektrične točke beljakovin, v odsotnosti drugih faktorjev.

Stabilnost taninsko beljakovinskega kompleksa je močno pogojena s pH (Jones in Mangan, 1977). Kompleks je stabilen v pH območju 3,5 do 7,0, razpade in sprosti beljakovino pri pH pod 3,5 in nad 8,5. Prisotnost taninov v krmi naj bi tako teoretično zmanjšala razgradnjo beljakovin v vampu (pH 5,8 do 6,8) in omogočila razpad kompleksa, prebavo beljakovin ter absorbcijo produktov prebave v siriščniku (pH 2,5 do 3,5) in tankem črevesu (7,5 do 8,5). Perez-Maldonado in sod. (1995) ugotavlja, da pH sam ni odločilen za tvorbo kompleksov. V *in vitro* raziskavi so ugotovili, da se netopni kompleksi ne tvorijo med govejimi serumskimi albumini in rastlinskimi beljakovinami samo v pričakovanem pH območju vampa, če so prisotni različni anorganski ioni (Ca, Mg, K, Na). Kompleksi med tanini in listnimi beljakovinami se tvorijo v pH območju med 3,5 in 5,5, pri govejem serumskem albuminu pa v pH območju 4,5 do 5,5.

Tanini imajo tudi različno afiniteti do beljakovin. Najraje se vežejo z beljakovinami sline, ki so bogate s prolinom (Jansman, 1993) in manj na goveje serumske albumine. Na tvorbo kompleksov med beljakovinami sline in tanini vpliva tudi temperatura. Beljakovine sline ne tvorijo kompleksov s kondenziranimi tanini, ki so izpostavljeni temperaturi 38°C,

tvorijo pa netopne komplekse z njimi, ko so ti izpostavljeni 12 ur temperaturi 5°C (Perez-Maldonado in sod., 1995).

Vez med tanini in beljakovinami je reverzibilna in razpade ob določenem pH. Ob izpostavitvi kompleksov visoki temperaturi se tvorijo ireverzibilne kovalentne vezi (Lowry in sod., 1996). Za preprečevanje nastanka taninsko-beljakovinskega kompleksa se uporablajo sintetični polimeri (polietilenglikol, polivinil pirolidon) (Makkar in sod., 1995) in formaldehid (Barry, 1976), ki se specifično vežejo s tanini v širokem pH območju. S tem tudi zavarujejo vampne mikrobe pred škodljivimi vplivi tanina.

#### 2.3.3.1.2 Kompleksi z ogljikovimi hidrati

Tanini tvorijo komplekse tudi z ogljikovimi hidrati, a je afiniteta do njih precej manjša kot do beljakovin. Komplekse tvorijo z celulozo, hemicelulozo, pektinom in škrobom (Jansman, 1993) prek reverzibilnih hidrofobnih vezi (Reed, 1995), s čimer se zmanjšuje obseg njihove razgradnje.

#### 2.3.3.1.3 Kompleksi z vitaminimi in rudninskimi snovmi

Pri vezavi tanina na vitamine in rudninske snovi se zmanjšuje njihova absorbacija. Za živali, ki zauživajo s taninom bogate liste dreves, postaneta žveplo in železo manj dostopna (Kumar in Vaithianathan, 1990). Chung in sod. (1998a) predvidevajo, da taninska kislina, ki ima močno afiniteto do železa, z vezavo nanj omeji njegov dostop črevesnim bakterijam, s tem pa negativno vpliva na njihovo rast. Tanini deluje negativno na absorbenco vitamina A in zmanjšujejo izkoristljivost vitamina B<sub>12</sub> (Chung in sod., 1998b).

#### 2.3.3.1.4 Kompleksi z mikrobi in prebavnimi encimi

Tanini imajo sposobnost, da se vežejo na mikrobne encime in mikrobne celične stene (McSweeney in sod., 2001; McLead, 1974). S tem predvsem negativno vplivajo na transport hrani skozi celično steno, rast in aktivnost mikrobov ter delovanje encimov. Jones in sod. (1994) poročajo o zmanjšani proteazni aktivnosti in rasti številnih bakterij v prisotnosti kondenziranih taninov. V *in vitro* poskusu s kondenziranimi tanini *Lotus corniculatus* so Min in sod. (2005) ugotovili, da se pri več kot 200 µg/ml taninov zmanjša

rast in aktivnost proteolitičnih in fibrolitičnih bakterij. Tanin zmanjšuje delovanje pektinaz, celulaz (Butter in sod., 1999), lipaz in amilaz (Longstaff in McNab, 1991). Makkar in sod. (1988) navajajo, da hidrolizirajoči tanini zavirajo delovanje karboksimetilcelulaz. Reakcije med tanini in mikrobi potekajo v manjšem obsegu, saj se pri ugodnem pH ti raje povezujejo z drugimi makromolekulami (Jansman, 1993).

V prisotnosti taninov prihaja do morfoloških sprememb celic določenih mikroorganizmov. Goel in sod. (2005) poročajo o povezovanju 40 do 50 celic pri sevu rodu *Streptococcus* spp. v verige pri povečanju koncentracije taninske kisline. O tvorbi podaljšanih verig iz celic bakterij v prisotnosti taninov poročajo tudi Jones in sod. (1994) ter O'Donovan in Brooker (2001).

#### 2.3.3.2 Vpliv taninov na presnovo beljakovin

Predvsem pri prežvekovalcih z visoko pirejo je problematična oskrba z beljakovinami. Presnova dušika z vampnimi mikroorganizmi običajno ni dovolj učinkovita. Beljakovine krme se razgradijo prehitro glede na hitrost razgradnje ogljikovih hidratov, ki so vir energije. Posledica je velika produkcija amoniaka (Wallace in sod., 1997). Do 30 % beljakovin krme lahko postane nedostopnih za žival zaradi njihove pretvorbe v amoniak v vampu in posledičnega izločanja (Barry in sod., 1986b; Barry in Manley, 1984).

Prekomerni razgradnji rastlinskih beljakovin v predželodcih se je možno izogniti z vključevanjem taninskih izvlečkov ali rastlin, ki vsebujejo tanin, v krmni obrok živali. V prebavnem traktu tanini reagirajo z beljakovinami krme in s tem preprečijo neželeno mikrobno razgradnjo v predželodcih (Kumar in Vaithianathan, 1990; Reed, 1995).

Izkoristljivost beljakovin je odvisna predvsem od vsebnosti tanina v obroku. Krma, ki vsebuje do 50 g kondenziranih taninov na kg SS, poveča absorbcojo neamoniakalnega dušika v tankem črevesu brez ogrožanja prebavljljivosti ali konzumacije (Barry in Manley, 1984). Barry in McNabb (1999) poročata, da se je pri vrednosti kondenziranih taninov med 30 in 40 g na kg SS iz *Lotus corniculatus*, v krmi za drobnico povečala absorbacija esencialnih aminokislin iz tankega črevesa. McNabb in sod. (1993) poročajo o zmanjšani razgradnji beljakovin krme ter povečani absorbcoji in izkoriščanju cisteina (rast volne) če je bila vsebnost med 50 in 55 g kondenziranih taninov na kg SS. Barry in Manley (1984) sta

ugotovila, da pride pri krmljenju s krmo, ki vsebuje kondenzirane tanine le v sledovih, do dvanajsternika le 75 % neamoniakalnega dušika glede na skupno količino zaužitega dušika, kar pomeni zmanjšano resorbcijo amoniaka v vampu. Pri povečani vsebnosti kondenziranih taninov v obroku na 40 g na kg SS je bil delež neamoniakalnega dušika, ki je prišel v dvanajsternik, enak skupni količini zaužitega dušika. Dokazano je, da povečna absorbcija aminokislin izboljšuje oskrbo živali z beljakovinami (Orešnik, 1996). Ob dodatku 2,5 % kostanjevega tanina na kg krmne mešanice se je povečala vsebnost beljakovin v mleku do 0,15 % v primerjavi s kravami kontrolne skupine.

Zaradi zmanjšane razgradnje beljakovin se v predželodcih tvori manj amoniaka, manjša je resorbcija duška iz predželodcev in izguba sečnine s sečem. Poveča se pretok neamoniakalnega dušika v siriščnik in dvanajsternik, to posledično omogoča zmanjšanje onesnaženosti okolja (Butter in sod., 1999). Śliwiński in sod. (2002) navajajo podatke, da je vsebnost amoniaka v predželodcih za 21 % manjša, če je v obrok vključenih 2,5 g hidrolizirajočih taninov na kg krme (*in vivo*).

### 3.3.3.3 Vpliv taninov na presnovo ogljikovih hidratov

Visoka koncentracija kondenziranih taninov v obroku poveča pretok neamoniakalnega dušika v siriščnik in tanko črevo, vendar pa zmanjša razgradnjo ogljikovih hidratov (Barry in sod., 1986b; Barry in Duncan, 1984).

Afiniteta taninov do ogljikovih hidratov je manjša kot do beljakovin. Tvorba kompleksov med tanini in ogljikovimi hidrati zmanjšuje njihovo razgradljivost. Barry in Manley (1984) poročata o zmanjšani razgradnji topnih ogljikovih hidratov in hemiceluloze, ne pa tudi celuloze v prisotnosti taninov iz *Lotus pedunculatus*. Obenem navajata tudi, da se je povečala razgradnja hemiceluloze v tankem črevesu. Ulyatt in Egan (1979) sta preverjala prebavljljivost ogljikovih hidratov petih različnih vrst rastlin. Ugotovila sta, da se slabše prebavljaogljkovi hidrati rastlin, ki imajo večjo koncentracijo kondenziranih taninov. Waghorn in sod. (1987) poročajo o nespremenjeni prebavi ogljikovih hidratov v prisotnosti kondenziranih taninov v obroku iz *Lotus corniculatus* (22 g na kg SS).

Makkar in sod. (1988) navajajo, da tanini zavirajo delovanje encimov številnih bakterij, ki sodelujejo v razgradnji ogljikovih hidratov, vključno s karboksimetilcelulazami.

Kondenzirani tanini iz *Lotus corniculatus* so zmanjšali razgradnjo celuloze s *Fibrobacter succiogenes* za 45 % pri inkubaciji s 300 µg taninov/ml. Pri koncentraciji, večji od 400 µg taninov/ml ni bilo zaznati več nobene aktivnosti (Bae in sod., 1993). Kumarna in ferulna kislina sta tudi zmanjšali delovanje karboksimetilcelulaz in ksilanaz (Martin in Akin, 1988).

Manjša razgradnja vlaknine pa zmanjša oskrbo mikroorganizmov z ATP, s tem pa vpliva na njihovo rast, sintezo mikrobnih beljakovin in v končni fazi na oskrbo živali gostiteljice s hranljivimi snovmi. V prisotnosti tanina se spremeni razmerje v produkciji hlapnih maščobnih kislin. Zmanjša se delež ocetne na račun propionske kisline (Butter in sod., 1999).

### **2.3.4 Prilagoditev živali in mikroorganizmov na prisotnost taninov**

Živali, ki se prehranjujejo s krmo, ki vsebuje tanine, so razvile mehanizme, s katerimi so se prilagodile na njihovo prisotnost in obšle ali vsaj omilile njihove negativne učinke. Eden izmed mehanizmov je produkcija slino bogate s prolinom, ki ima veliko afiniteto do taninov (Makkar in Becker, 1998). S tem se prepreči vezava tanina na beljakovine krme.

Številni avtorji (O'Donovan in Brooker, 2001; Krause in sod., 2005; Nelson in sod., 1998; Brooker in sod., 1994) poročajo o vampnih mikroorganizmih, predvsem pri divjih živalih, ki so sposobni razgraditi komplekse taninov z beljakovinami. Goel in sod. (2005) so dokazali, da lahko govedo, ki predtem ni bilo krmljeno s krmo, ki bi vsebovala tanin, vsebuje mikroorganizme, ki so sposobni razgraditi taninsko-beljakovinski kompleks.

Določene na tanin odporne bakterije proizvajajo v prisotnosti tanina kot obrambo izvencelični plašč iz polisaharidov (Jones in sod., 1994; Krause in sod., 2005; O'Donovan in Brooker, 2001). S tem naj bi preprečile vezavo tanina na celično steno bakterij oz. razgradile tanin na neškodljive produkte s kislinskimi hidrolazami in galat dekarboksilazami, ki bi se lahko nahajale v zaščitnem sloju polisaharidov.

Študije so se osredotočile na možnost, da anaerobni mikroorganizmi živali, ki so bile krmljene s tanini bogato krmo, lahko razgradijo taninsko-beljakovinski kompleks. Brooker in sod. (1994) so izolirali *Streptococcus caprinus* iz vampa divje koze, ki se je

prehranjevala z rastlinami rodu *Acacia*, ki vsebujejo veliko taninov. Ugotovili so, da *Streptococcus caprinus* tolerira do 3 % hidrolizirajočih ali kondenziranih taninov, ne more pa jih izkoriščati kot vir energije. Iz vampa divje koze, ki se je prehranjevala z *Desmodium ovalifolium*, ki vsebuje do 17 % kondenziranih taninov, so izolirali mikroorganizme, ki lahko razgradijo hidrolizirajoče tanine, ne pa tudi kondenziranih (Nelson in sod., 1995). Skene in Brooker (1994) sta izolirala prvo anaerobno vampno bakterijo *Selenomonas ruminantium var. ruminantium* iz vampa divje koze, ki ni sposobna samo razgraditi taninsko-beljakovinskega kompleksa, ampak lahko tanin izrablja kot vir energije. To je posledica prisotnosti encimov tanin acilhidrolaze.

### 2.3.5 Farmatan

V Sloveniji ekstrahirane tanine proizvaja Tanin Sevnica d.d, pripravek se imenuje Farmatan. Les pravega kostanja (*Castanea sativa* Mill.) vsebuje veliko taninov. Naravni izvleček lesa pravega kostanja je proizvod, pridobljen s pomočjo vodne ekstrakcije izbranih delov kostanjevega lesa (Farmatan, neobjavljen). Izvleček vsebuje 75 % taninov (Naravni izvleček..., neobjavljen), kjer hidrolizirajoči tanini prevladujejo. Na pogled je to prašek rjave barve, trpkega okusa in kiselkastega vonja (Farmatan, neobjavljen).

Uporablja se kot silirni dodatek, za pripravo premiksov in mineralno-vitaminskih mešanic, kot dodatek dopolnilnim ali popolnim krmnim mešanicam, kot dodatek obrokom iz sveže krme in za predhodno obdelavo beljakovinskih krmil (Naravni izvleček..., neobjavljen). Uporabja se v prehrani prašičev, perutnine, krav, telet, kuncev in psov. Dodaja se v obliki praška, kapsul ali gela. Pri hidrolizi se farmatan povsem razgradi do glukoze in galne kisline (izloči se z urinom), zato je meso in mleko živali, ki so ga zaužile, za prehrano ljudi primerno brez omejitve (Farmatan, neobjavljen).

### 3 MATERIALI IN METODE

Preučevali smo vpliv različnih koncentracij kostanjevega tanina (pripravek *Farmatan*<sup>®</sup>) na rast in encimsko aktivnost bakterij *Streptococcus bovis* in *Selenomonas ruminantium*. Uporabili smo tri različne koncentracije tanina (0,05, 0,25 in 1,00 g/l) ob negativni kontroli, kjer tanina nismo dodali. Poskus je bil opravljen v treh ponovitvah. Rast bakterijske kulture smo spremljali z merjenjem koncentracije beljakovin pri sedmih različnih časih inkubacije: 0, 5, 10, 13, 16, 20, 32 in 48 ur. Pri istih časih inkubacije smo spremljali tudi proteolitično, amilolitično, ksilanolitično in karboksimetil-celulazno (CMC-azno) aktivnost, preračunano na celične beljakovine bakterijske kulture.

#### 3.1 GOJENJE IN SPREMLJANJE RASTI BAKTERIJ

##### 3.1.1 Gojišča za bakterijske kulture

Za namnožitev in shranjevanje bakterij smo uporabljali gojišče M2 (modificirano tekoče gojišče po Hobsonu, 1969) z dodatkom ksilana ovsenih plev.

Preglednica 1: Sestava gojišča M2 z dodatkom ksilana

Sestavina	Koncentracija
Tripton	10,0 g/l
Kvasni ekstrakt	2,5 g/l
Glukoza	2,0 g/l
Celobioza	2,0 g/l
Topni škrob	2,0 g/l
NaHCO <sub>3</sub>	4,0 g/l
L-cistein HCl	1,0 g/l
Resazurin	0,01 g/l
Ksilan	2,0 g/l
Mineralna raztopina I	15 (vol %)
Mineralna raztopina II	15 (vol %)
Vampni sok	30 (vol %)
Destilirana voda	40 (vol %)

Peglednica 2: Mineralna raztopina I

Sestavina	Koncentracija
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,0 g/l
Destilirana voda	1000 ml

Preglednica 3: Mineralna raztopina II

Sestavina	Koncentracija
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	3,00 g/l
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	6,00 g/l
NaCl	6,00 g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,65 g/l
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,60 g/l
Destilirana voda	1000 ml

Sestavine smo stehtali in odmerili, kuhali do vrelišča (ob mešanju), nato dodali L-cistein HCl in ponovno zavreli. Sledilo je ohlajanje gojišča in njegovo prepihovanje s  $\text{CO}_2$ , vse dokler ni izgubilo rožnate barve. Pod zaščitnim plinom smo gojišče razlili v Hungate epruvete (8 ml/epruveto), neprodušno zaprli in avtoklavirali 15 minut pri 121°C.

### 3.1.2 Tehnika gojenja in shranjevanja bakterij

Seva bakterij, na katerih smo proučevali vpliv kostanjevega tanina, smo prejeli iz nemškega raziskovalnega centra DSMZ, kjer hranijo zbirke mikroorganizmo in celičnih kultur. Pred samo uporabo sta bile bakterijske kulture shranjene v poltrdem agarskem gojišču pri -70°C.

Bakterijske kulture smo gojili v anaerobnih pogojih po Bryantovi modifikaciji Hungatove tehnike (Bryant, 1972). Kulture, pred tem shranjene v vbodnikih, smo pri -20°C, ( $M_2 + 0,75$  ut. % agarja), precepili pod zaščitnim plinom ( $\text{CO}_2$ ), speljanim prek kolone z reduciranimi bakrovimi opilki, segretimi na 350°C.

### 3.1.3 Priprava raztopin s taninom in vzorcev bakterijske kulture za določanje encimskih aktivnosti

Bakterijsko kulturo smo v anaerobnih pogojih nacepili v Hungate epruvete z gojiščem  $M_2 +$  ksilan. Ker je tanin občutljiv na visoko temperaturo, gojišča pa smo pred nacepitvijo bakterij avtoklavirali, smo tanin dodajali v gojišča v času nacepitve. Dodajali smo ga v obliki raztopin (200 µl).

Priprava raztopin: 25,5 mg, 127,5 mg in 510 mg tanina smo raztoplili v 10 ml 0,1 M Na-fosfatnem pufru (pH 6,5). Pri tem smo dobili tri raztopine s tremi različnimi

koncentracijami tanina. Ob dodatku 200 µl ustrezne raztopine v epruvete z gojiščem (8 ml), smo dobili v njih želene koncentracije kostanjevega tanina: 0,05 g/l, 0,25 g/l in 1,00 g/l.

Nacepljena gojišča smo inkubirali pri 37°C. Rast bakterij in njihovo encimsko aktivnost smo spremljali pri inkubacijskih časih: 5, 10, 13, 16, 20, 32 in 48 ur. Po izteku posameznega inkubacijskega časa smo bakterijske kulture centrifugirali 15 minut pri 3000 obr./min. Odvzeli smo 1,5 ml supernatanta in ga shranili v epruvetah Eppendorf pri -20°C. Celice smo dvakrat sprali v 50 mM Na-fosfatnem pufru (pH 6,5) in jih nato resuspendirali v 1,3 ml miliQ. Vzorce smo shranili pri -18°C.

### **3.1.4 Merjenje koncentracije celičnih beljakovin – spremjanje rasti bakterijskih kultur**

Koncentracijo beljakovin smo merili v paralelkah po Lowryjevi metodi (Lowry in sod., 1951). Umeritveno krivuljo smo pripravili s standardnimi koncentracijami BSA (govejega serumskega albumina): 0,00 mg/ml; 0,08 mg/ml; 0,16 mg/ml; 0,24 mg/ml; 0,32 mg/ml; 0,40 mg/ml. V epruvete Eppendorf smo odpipetirali po 125 µl 1M NaOH, premešali in inkubirali 5 minut pri 100°C. Po alkalni hidrolizi smo ohlajenim vzorcem dodali 625 µl mešanice OD (reagent Lowry A : reagent Lowry B = 50 : 1) in 125 µl Folin Ciocalteujevega reagenta (pred uporabo mešamo z miliQ v razmerju 1 : 1), premešali in pustili 30 minut, da se je razvila barva. Vzorcem smo nato s spektrofotometrom izmerili absorbanco (Shimadzu, UV-160A) pri valovni dolžini 700 nm. Koncentracijo beljakovin v vzorcih smo izračunali na podlagi umeritvene krivulje.

Peglednica 4: Reagenčna mešanica Lowry A : reagent Lowry B = 50 : 1

Ime reagenta	Sestavine	Delež
Lowry A	Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	5 %
Lowry B	Na-K tartrat CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O, pH = 7	1 % 0,5 %

### 3.2 ENCIMSKI TESTI

#### 3.2.1 Kvantitativno merjenje ksilanazne encimske aktivnosti (razgradnja ksilana)

Ksilanazno encimsko aktivnost smo določali z metodo reducirajočih sladkorjev (Lever, 1977). Test smo opravili v paralelkah. K 230 µl substrata (1 % (m/v)) ksilana v 50 mM Na-fosfatnem pufru (pH 6,5) v epruvetah Eppendorf smo dodali 20 µl ustreznega redčenega vzorca, premešali in inkubirali 150 minut pri 37°C. Reakcijo smo ustavili z dodatkom 30 µl 10 % (m/v) triklorocetne kisline (TCA). Vzporedno smo pripravili tudi kontrolne vzorce, v katerih smo inkubirali samo substrat, 20 µl encimskega vzorca pa smo dodali po inkubaciji, hkrati z 10 % triklorocetno kislino. Količino sproščenih reducirajočih sladkorjev smo izmerili spektrofotometrično. Reagenčno mešanico PAHBAH smo zaradi slabe obstojnosti pripravili tik pred uporabo. V epruvetah HACH smo k 5 ml reagenčne mešanice PAHBAH dodali 100 µl inkubiranega vzorca, za izdelavo umeritvene krivulje pa po 100 µl standardnih raztopin ksiloze v vodi: 0 mM; 1 mM; 2 mM; 4 mM in 6 mM. Epruvete smo zaprli, premešali vsebino in inkubirali za 10 minut pri 100°C, jih ohladili in centrifugirali pri 3000 obr/min. Intenziteta barve, ki se je razvila, je bila sorazmerna s količino sproščenih reducirajočih sladkorjev. Določili smo jo spektrofotometrično pri valovni dolžini 420 nm, v kvarčnih kivetah. Od dodeljenih koncentracij reducirajočih sladkorjev v vzorcih, smo odšteli vrednosti dobljene v kontrolnih vzorcih in dobili količino sproščenih reducirajočih sladkorjev, ki je posledica delovanja encimov v vzrocu ( $\Delta RS$ ).

Peglednica 5: Reagenčna mešanica PAHBAH

Sestavina	Delež
1 M Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	5 % (v/v)
0,5 M Na-citrat	5 % (v/v)
5 M NaOH	5 % (v/v)
destilirana voda	80 % (v/v)
0,2 M CaCl <sub>2</sub>	5 % (v/v) po kapljicah

Specifično encimsko aktivnost smo izračunali po enačbi (1),

$$SA(\text{nakat/mg PROT}) = \Delta RS \cdot 280 / (\text{PROT} \cdot 0,02 \cdot 9000) \quad (1)$$

kjer so:

SA – specifična encimska aktivnost

PROT – označuje koncentracijo beljakovin v posameznem vzorcu (mg/ml)

Faktor 280 – količina testne mešanice (280 µl)

0,02 – količna vzorca v mešanici (20 µl)

9000 – čas inkubacije (9000 sekund)

Enota katal je definirana kot količina encima, ki sprosti 1 mol produktov v sekundi.

### **3.2.2 Kvantitativno merjenje CMC-azne encimske aktivnosti (razgradnja celuloze)**

Celulazno encimsko aktivnost smo prav tako merili z metodo reducirajočih sladkorjev, pri čemer smo kot encimski substrat uporabili CMC (karboksimetil celuloza – oblika topne celuloze). Test smo opravili enako kot pri ksilanolitični encimski aktivnosti, le da smo tu pri pripravi substrata uporabili 1 % CMC, za umeritveno krivuljo pa smo uporabili standardno raztopino glukoze: 0 mM; 0,5 mM; 1 mM; 2 mM in 3,8 mM.

### **3.2.3 Kvantitativno merjenje amilazne encimske aktivnosti (razgradnja škroba)**

Amilazno encimsko aktivnost smo merili z metodo reducirajočih reducirajočih z DNS reagentom (Petterson in Porath, 1966). Test smo izvedli v paralelkah. K 200 µl substrata (1 % krompirjev škrob, v 0,1 M PIPES pufri, pH 6,8) smo dodali 200 µl ustrezeno redčenega vzorca, premešali in inkubirali 10 minut pri 39°C. Reakcijo smo ustavili z dodatkom 600 µl DNS reagenta. Reakcijske mešanice z DNS smo segrevali 15 minut pri 100°C, ohladili in izmerili absorbanco pri valovni dolžini 540 nm. Koncentracijo sladkorjev smo izračunali s pomočjo umeritvene krivulje. 400 µl standardnih raztopin glukoze smo dodali 600 µl DNS reagenta in ravno tako inkubirali 15 minut pri 100°C, ohladili in izmerili absorbanco pri 540 nm. Hkrati smo merili absorbanco tudi kontrolnim vzorcem, ki smo jih predhodno inkubirali 10 minut pri 39°C, dodali 600 µl DNS reagenta in inkubirali 15 minut pri 100°. Od dobljenih koncentracij reducirajočih sladkorjev v

vzorcih smo odsteli vrednosti dobljene v kontrolnih vzorcih in dobili količino sproščenih reducirajočih sladkorjev, kar je posledica delovanja encimov v vzrocih ( $\Delta RS$ ).

Peglednica 6: Reagenčna mešanica DNS

Sestavina	Delež
NaOH	2 ut %
Na-K tartrat	20 ut %
destilirana voda	
DNS	1 ut %

Specifično encimsko aktivnost smo izračunali po enačbi (2),

$$SA \text{ (nkat/mg PROT)} = \Delta RS \cdot 1000 / (PROT \cdot 0,2 \cdot 600) \quad (2)$$

kjer so:

SA – specifična encimska aktivnost

PROT – označuje koncentracijo beljakovin v posameznem vzorcu (mg/ml)

1000 – količina testne mešanice (1000 µl)

0,2 – količna vzorca v mešanici (200 µl)

600 – čas inkubacije (600 sekund)

Enota kat je definirana kot količina encima, ki sprosti 1 mol produktov v sekundi.

### 3.2.4 Kvantitativno merjenje proteazne encimske aktivnosti (razgradnja beljakovin)

Proteazno aktivnost smo merili z metodo, pri kateri kot substrat uporabljamo azokazein (Kopečny in Wallace, 1982). Testirali smo v paralelkah. V epruvetah Eppendorf smo pripravili reakcijsko mešanico 300 µl 0,1 M Na-fosfatnega pufra (pH 6,5), 100 µl 50 mM DTT in 200 µl 0,5 % azokazeina. Dodali smo 200 µl encimskega vzorca, premešali in inkubirali 60 minut pri 40°C. Reakcijo smo ustavili z dodatkom 25 % TCA. Vzorce smo centrifugirali 10 minut pri 4000 × g in nato prenesli 0,5 supernatanta v drugo epruveto. Temu smo dodali 0,5 ml 0,5 M NaOH, premešali in izmerili absorbanco pri valovni dolžini 440 nm. Intenziteta barve je sorazmerna razgrajenemu azokazeinu v vzorcu, le-ta pa proteolitični aktivnosti vzorca. Vzporedno smo pripravili kontrolne vzorce tako, da smo po dodatku encimskega vzorca reakcijo takoj ustavili z dodatkom TCA. Umeritveno krivuljo

smo izdelali s standardnimi koncentracijami azokazeina v reakcijski mešanici brez encimskega vzorca: 0,00 mg/l; 1 mg/l; 2,5 mg/l; 4 mg/l; 5 mg/l. Od dobljenih koncentracij razgrajenega azokazeina v reakcijski mešanici smo odšteli vrednost kontrolnega vzorca in dobili koncentracijo razgrajenega azokazeina, ki je posledica delovanja encimov v vzorcih ( $\Delta A$ ).

Specifično encimsko aktivnost smo izračunali po enačbi (3),

$$SA \text{ (Enota/mg PROT)} = \Delta A \cdot 1000 / (PROT \cdot 0,2) \quad (3)$$

kjer so:

SA – specifična encimská aktivnosť

PROT – označuje koncentraciu beljakovin v posameznem vzorcu (mg/ml)

1000 – količina testne mešanice (1000 µl)

0,2 – količna vzorca v mešanici (200 µl)

Enota katal je definirana kot količina encima, ki razgradi 1 µg azokazeina v uri.

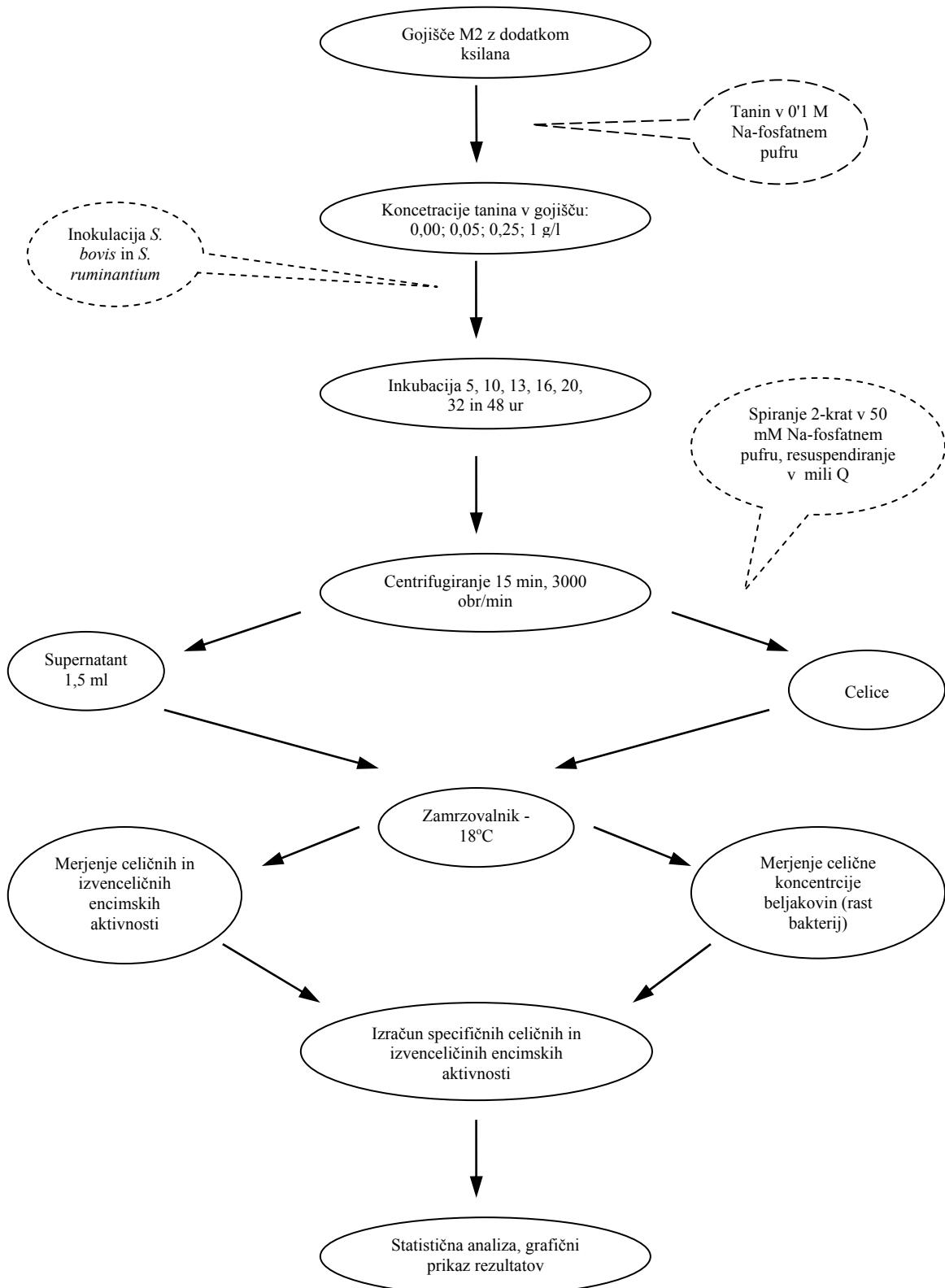
### 3.3 STATISTIČNA ANALIZA REZULTATOV

Pri statistični analizi rezultatov smo uporabili metodo najmanjših kvadratov v proceduri splošnih linearnih modelov (GLM) statističnega paketa SAS-STAT.

$$Y_{ijk} = \mu + U_i + T_j + UT_{ij} + e_{ijk} \quad (4)$$

Kot sistematski vplivi z nivoji so bili v model za vse lastnosti vključeni čas inkubacije ( $U_i$ ), koncentracija tanina ( $T_j$ ) ter interakcija med čas inkubacije in koncentracijo tanina ( $UT_{ij}$ ). Odvisno spremenljivko v modelu predstavlja  $Y_{ijk}$ , medtem ko je  $e_{ijk}$  ostanek.

Za primerjavo vpliva koncentracije tanina ob posameznih časih inkubacije smo uporabili multipli test sredin po Tukeyu.

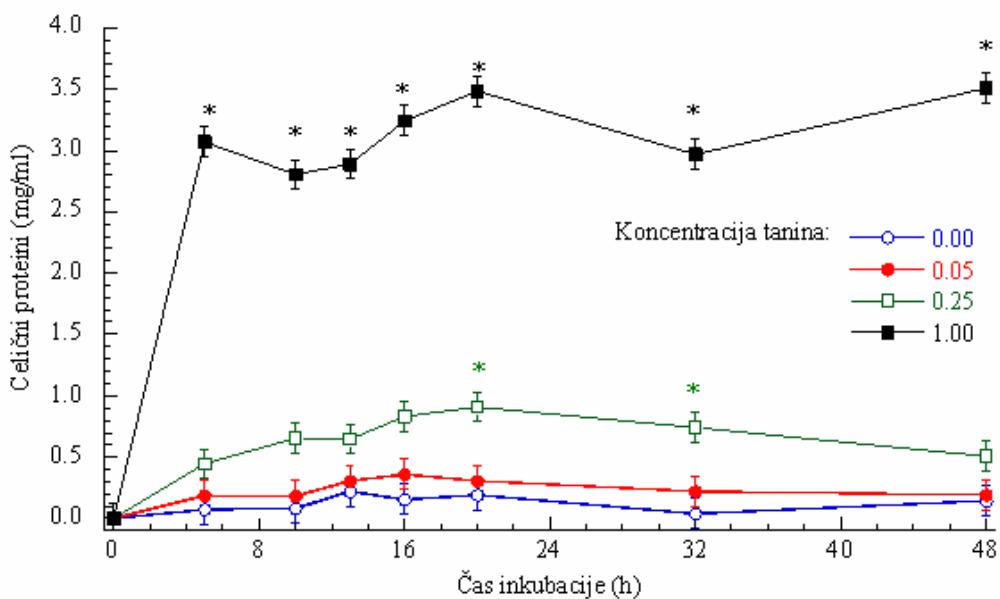


Slika 3: Potek dela pri ugotavljanju vpliva kostanjevega tanina na rast in encimsko aktivnost bakterij *S. bovis* in *S. ruminantium*

## 4 REZULTATI

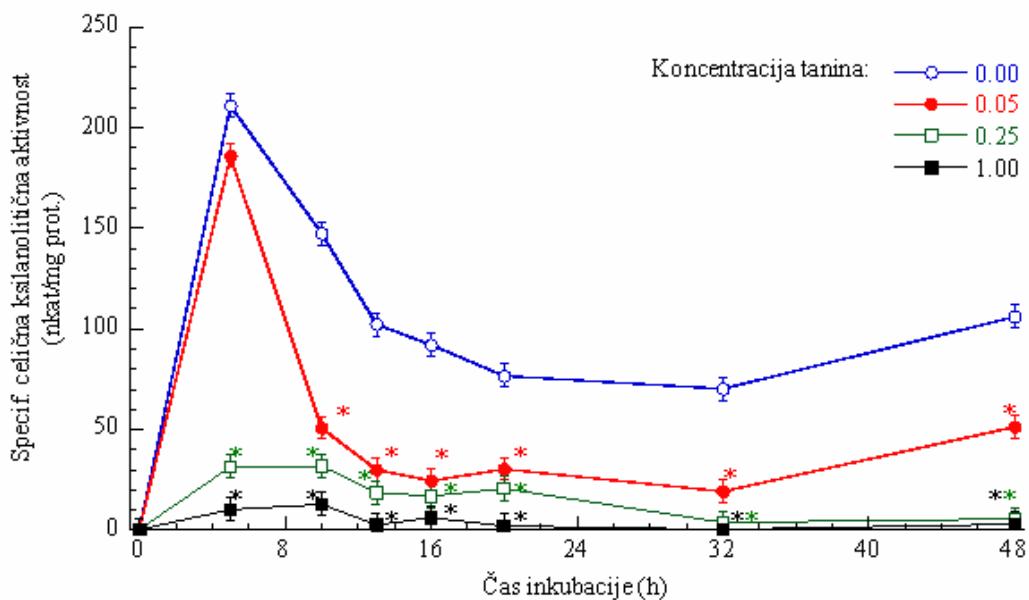
### 4.1 RAST IN ENCIMSKA AKTIVNOST BAKTERIJE *S. ruminantium*

Vpliv koncentracije tanina ob posameznih časih inkubacije na rast in encimske aktivnosti bakterije *Selenomonas ruminantium* smo preverjali takrat, ko je bila interakcija med uro inkubacije in koncentracijo tanina statistično značilna (Priloga A). Vpliv treh koncentracij kostanjevega tanina na rast bakterije *S. ruminantium* v primerjavi z negativno kontrolo brez dodanega tanina smo spremljali 48 ur z merjenjem koncentracije celičnih beljakovin. Rezultati so prikazani na sliki 4. Prisotnost kostanjevih taninov pozitivno vpliva na rast bakterije. Pri najmanjši koncentraciji tanina (0,05 g/l) nismo opazili statistično značilnega vpliva na rast. Nekoliko večji vpliv kostanjevih taninov smo opazili pri koncentraciji 0,25 g/l, s statistično značilnima razlikama v 20. in 32. uri inkubacije. Koncentracija tanina 1,00 g/l statistično značilno poveča rast *S. ruminantium*. Podrobnejši podatki, ki se navezujejo na sliko 4, so prikazani v prilogi B1.



Slika 4: Rast bakterijske kulture *S. ruminantium* pri treh različnih dodanih koncentracijah kostanjevega tanina (0,05 g/l, 0,25 g/l in 1,00 g/l) in kontrolni kulturi brez dodanega tanina (\* - statistično značilno odstopanje od negativne kontrole;  $p < 0,05$ ).

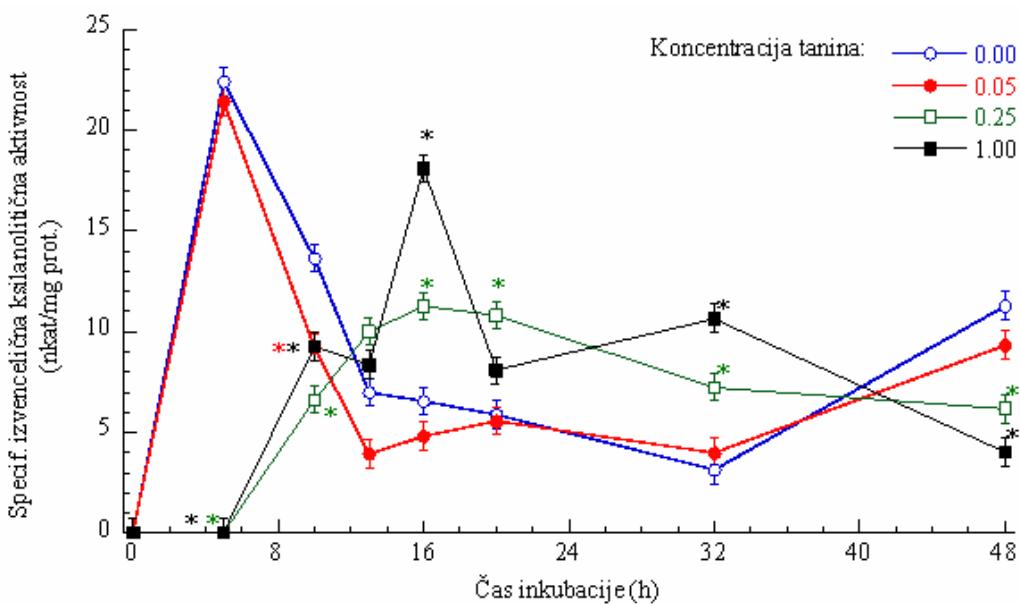
Spremljali smo tudi koncentracijo beljakovin v supernatantu (priloga B2, B3), ki smo jo uporabili pri izračunu specifičnih izvenceličnih encimskih aktivnosti. Koncentracije beljakovin so bile pri vseh treh koncentracijah tanina in negativni kontroli praktično enake. To ne odraža dejanske koncentracije izvenceličnih beljakovin (prisotne so npr. tudi beljakovine gojišča ...).



Slika 5: Specifična celična ksilanolitična aktivnost bakterijske kulture *S. ruminantium* pri treh različnih dodanih koncentracijah kostanjevega tanina (0,05 g/l, 0,25 g/l in 1,00 g/l) in kontrolni kulturi brez dodanega tanina (\* - statistično značilno odstopanje od negativne kontrole;  $p < 0,05$ ).

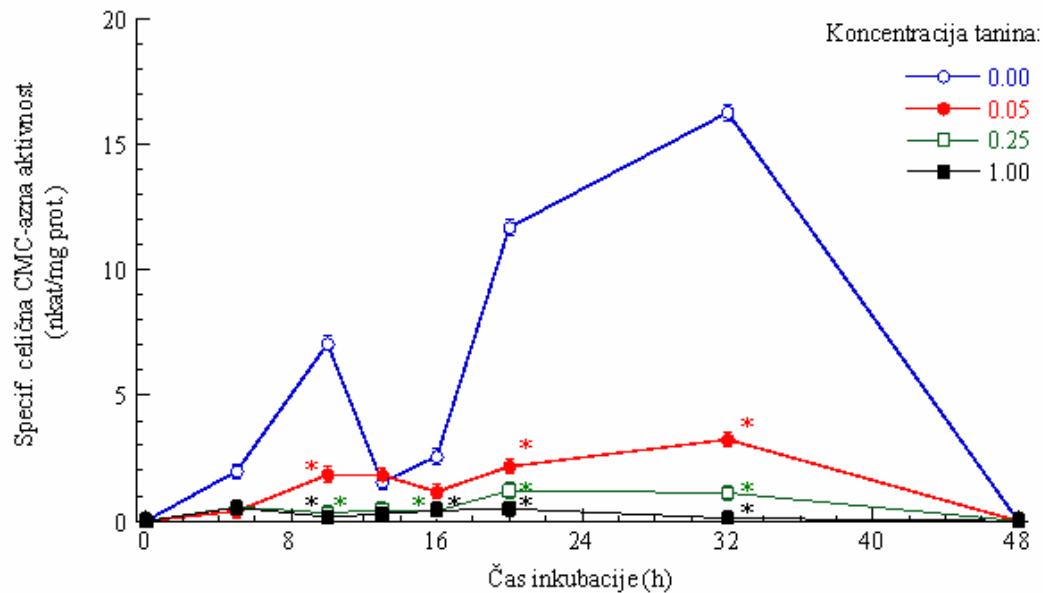
Slika 5 prikazuje statistično značilen inhibitorni vpliv kostanjevih taninov pri vseh treh koncentracijah tanina na celično ksilanolitično aktivnost. Izjema je le 5. uro inkubacije pri najmanjši koncentraciji tanina, kjer razlika ni statistično značilna, meritev pa se nahaja na nivoju negativne kontrole. Zadnjo uro inkubacije (48. ura) smo pri koncentraciji tanina 0,05 g/l zabeležili statistično značilno povečanje aktivnosti. Podrobnejši podatki, ki se navezujejo na sliko 5, so prikazani v prilogi C.

Vpliv taninov na izvencelično ksilanolitično aktivnost (slika 6) pri koncentraciji tanina 0,05 g/l ni izrazit. Statistično značilno zmanjšano aktivnost smo zabeležili le pri 10. urah inkubacije. Vpliv pri večjih dveh koncentracijah tanina je bolj izrazit, predvsem med 16. in 32. uro inkubacije, kjer smo zabeležili statistično značilno povečanje aktivnosti. Največji aktivnosti smo pri koncentraciji tanina 0,05 g/l in negativni kontroli zabeleženi 5. uro inkubacije, pri večjih dveh koncentracijah tanina (0,25 g/l in 1,00 g/l) pa 16. uro inkubacije. Podrobnejši podatki, ki se navezujejo na sliko 6, so prikazani v prilogi D.

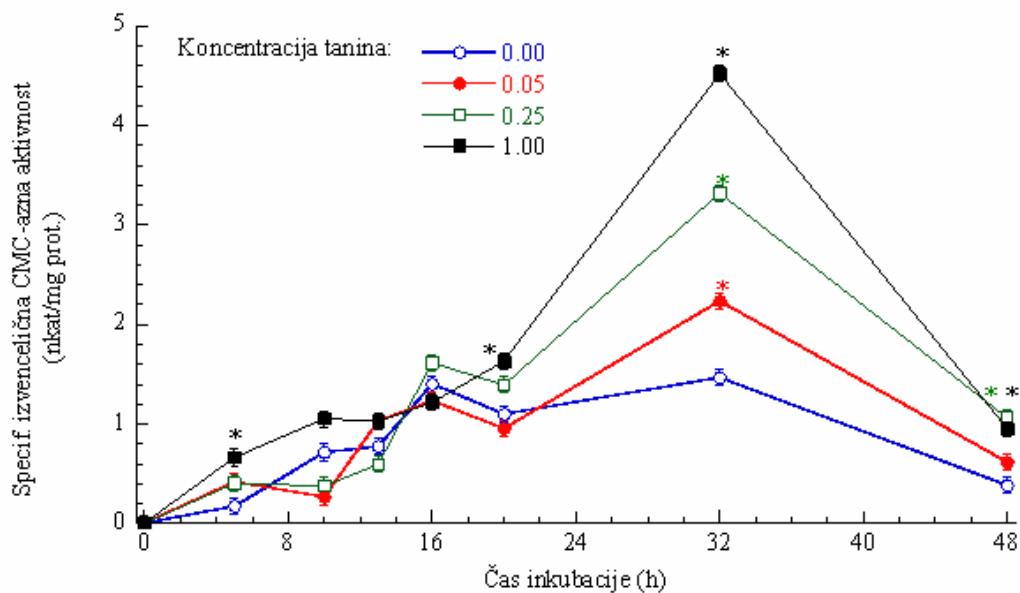


Slika 6: Specifična izcencelična ksilanolitična aktivnost bakterijske kulture *S. ruminantium* pri treh različnih dodanih koncentracijah kostanjevega tanina (0,05 g/l, 0,25 g/l in 1,00 g/l) in kontrolni kulturi brez dodanega tanina (\* - statistično značilno odstopanje od negativne kontrole;  $p < 0,05$ ).

Z večanjem koncentracije tanina se povečuje inhibitorni vpliv na celično CMC-azno aktivnost bakterije *S. ruminantium* (slika 7). Pri večjih dveh koncentracijah tanina (0,25 g/l, 1,00 g/l) je statistično značilna inhibicija (izjemni 13. uro) močno izražena skozi celoten čas inkubacije tako, da aktivnosti dejansko skoraj ni zaslediti. Pri najmanjši koncentraciji tanina je vpliv statistično značilen 10., 20. in 32. uro inkubacije. 48. uro inkubacije aktivnosti nismo nikjer več zaznali. Podrobnejši podatki, ki se navezujejo na sliko 7, so prikazani v prilogi E.



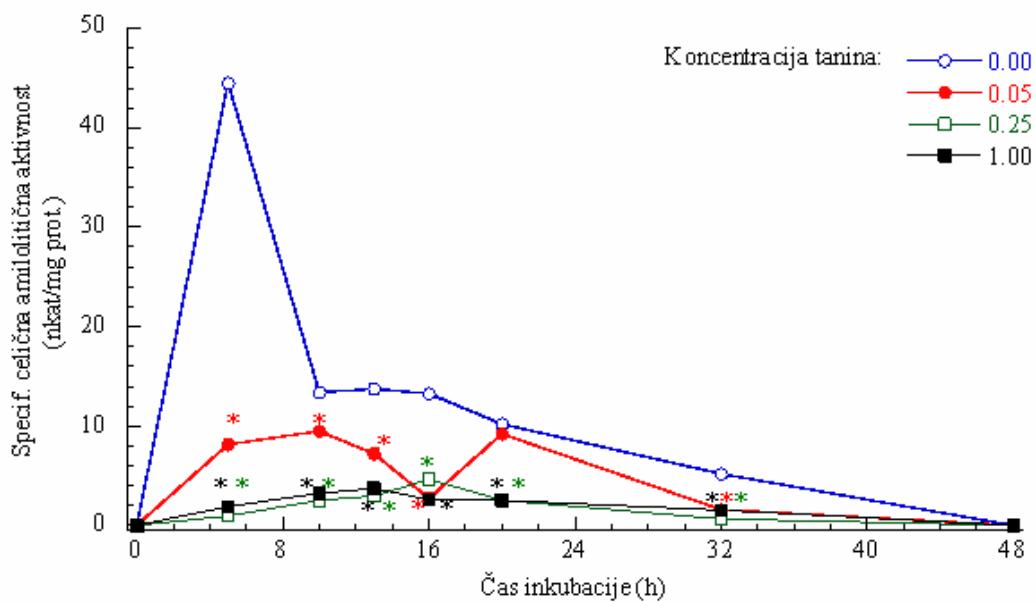
Slika 7: Specifična celična CMC-azna aktivnost bakterijske kulture *S. ruminantium* pri treh različnih dodanih koncentracijah kostanjevega tanina (0,05 g/l, 0,25 g/l in 1,00 g/l) in kontrolni kulturi brez dodanega tanina (\* - statistično značilno odstopanje od negativne kontrole;  $p < 0,05$ ).



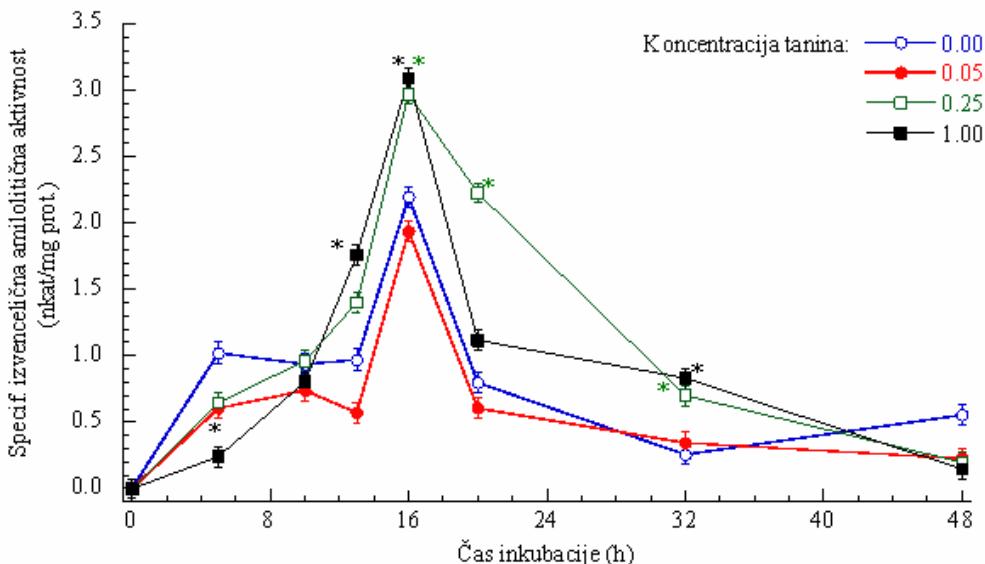
Slika 8: Specifična izvencelična CMC-azna aktivnost bakterijske kulture *S. ruminantium* pri treh različnih dodanih koncentracijah kostanjevega tanina (0,05 g/l, 0,25 g/l in 1,00 g/l) in kontrolni kulturi brez dodanega tanina (\* - statistično značilno odstopanje od negativne kontrole;  $p < 0,05$ ).

S slike 8 je razvidno, da predvsem zadnje ure inkubacije narašča izvencelična CMC-azna aktivnost z večanjem koncentracije tanina. Od 5. do 20. ure inkubacije so meritve manjših dveh koncentracij tanina na nivoju negativne kontrole, pri koncentraciji tanina 1,00 g/l pa je aktivnost že nekoliko povečana. Statistično značilni razliki sta le 5. in 10. uro inkubacije pri največji koncentraciji tanina. Po 20. uri se izvencelična CMC-azna aktivnost statistično značilno povečuje in to pri vseh treh koncentracijah dodanega tanina. 48. uro vrednosti padejo nazaj na nivo negativne kontrole. Podrobnejši podatki, ki se navezujejo na sliko 8, so prikazani v prilogi F.

S slike 9 je razvidno, da kostanjevi tanini inhibirajo delovanje celičnih amilaz. Aktivnosti so pri vseh treh koncentracijah statistično značilno (izjema 20. ura pri 0,05 g/l) manjše med 5. in 32. uro inkubacije, v primerjavi z aktivnostjo pri negativni kontroli. Inhibicija je izrazitejša pri večjih dveh koncentracijah tanina. 48. uro inkubacije aktivnosti nismo skoraj nikjer več zaznali. Podrobnejši podatki, ki se navezujejo na sliko 9, so prikazani v prilogi G.

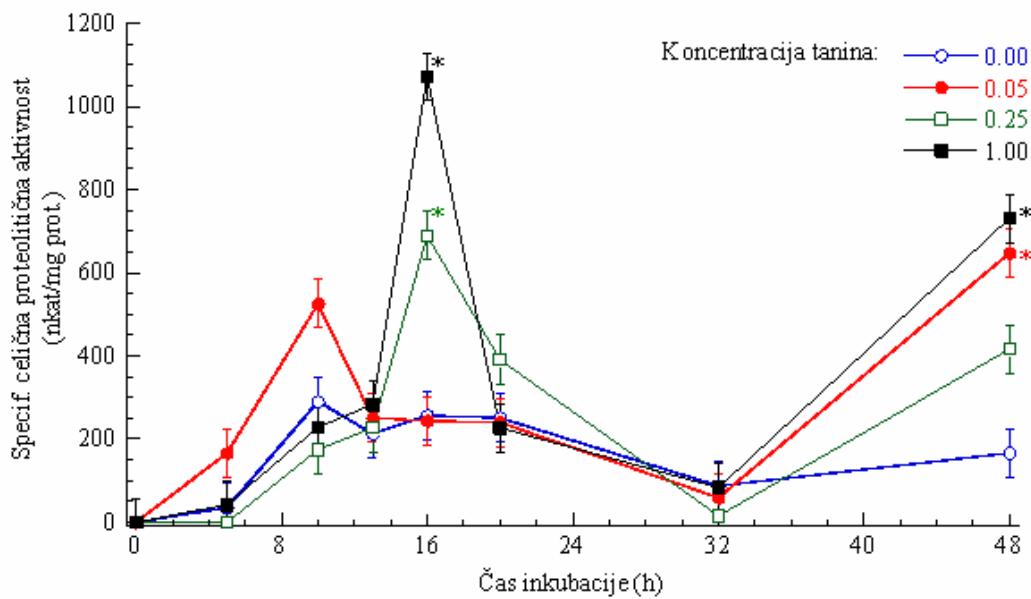


Slika 9: Specifična celična amilolitična aktivnost bakterijske kulture *S. ruminantium* pri treh različnih dodanih koncentracijah kostanjevega tanina (0,05 g/l, 0,25 g/l in 1,00 g/l) in kontrolni kulturi brez dodanega tanina (\* - statistično značilno odstopanje od negativne kontrole;  $p < 0,05$ ).

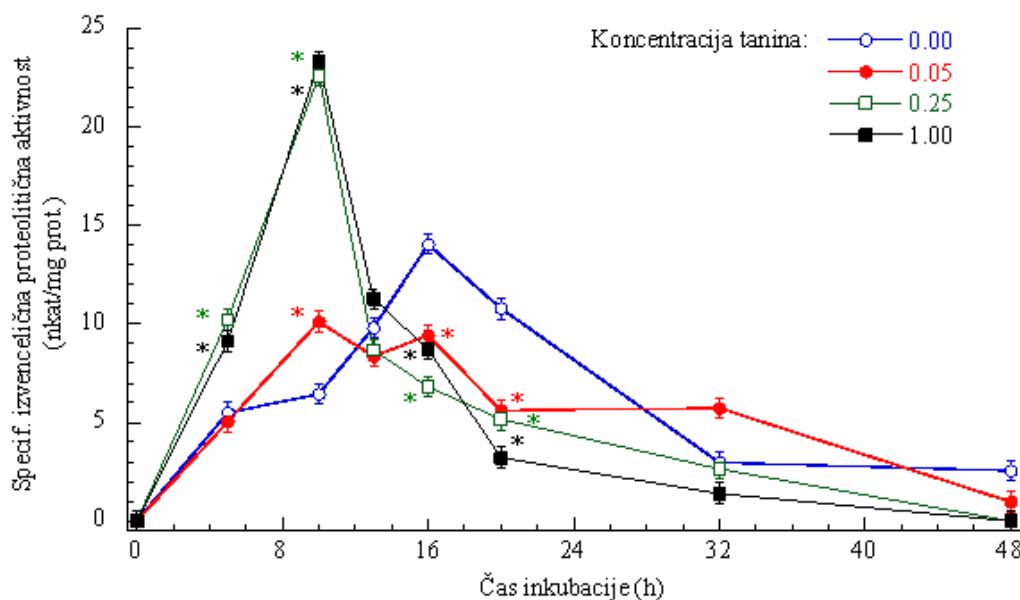


Slika 10: Specifična izvencelična amilolitična aktivnost bakterijske kulture *S. ruminantium* pri treh različnih dodanih koncentracijah kostanjevega tanina (0,05 g/l, 0,25 g/l in 1,00 g/l) in kontrolni kulturi brez dodanega tanina (\* - statistično značilno odstopanje od negativne kontrole;  $p < 0,05$ ).

Pri izvencelični amilolitični aktivnosti (slika 10) najmanjša koncentracija tanina nima statistično značilnega vpliva. Pri koncentraciji tanina 0,25 g/l in 1,00 g/l sprva ni opaziti izrazitega vpliva taninov na encimske aktivnosti. Med 13. in 32. uro inkubacije pa smo zabeležili statistično značilno povečanje izvencelične amilolitične aktivnosti. Aktivnost povsod raste do 16. ure inkubacije, bolj izrazito pri večjih dveh koncentracijah tanina. Podrobnejši podatki, ki se navezujejo na sliko 10, so prikazani v prilogi H.



Slika 11: Specifična celična proteolitična aktivnost bakterijske kulture *S. ruminantium* pri treh različnih dodanih koncentracijah kostanjevega tanina (0,05 g/l, 0,25 g/l in 1,00 g/l) in kontrolni kulturi brez dodanega tanina (\* - statistično značilno odstopanje od negativne kontrole; p < 0,05).



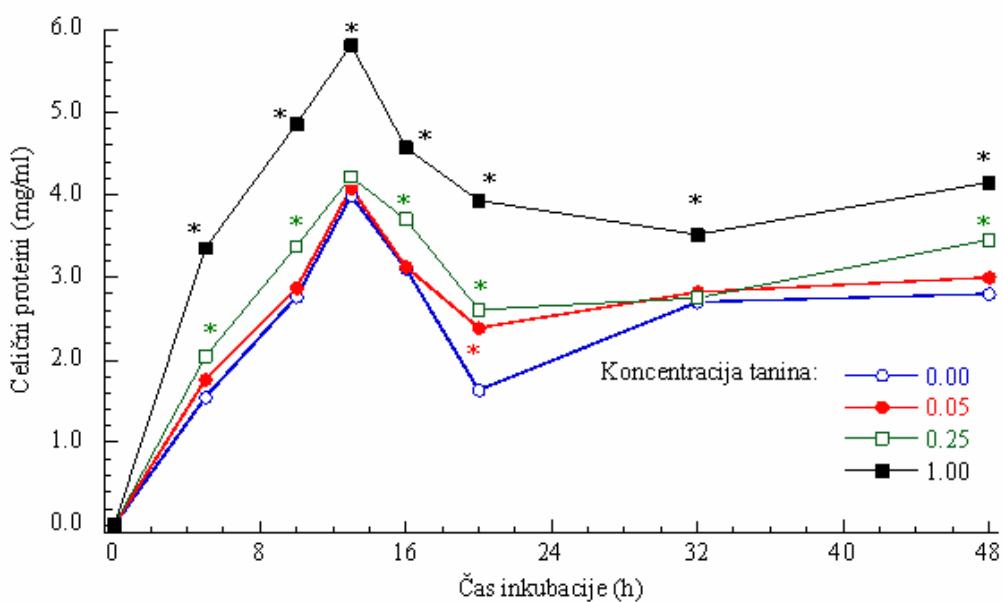
Slika 12: Specifična izvencelična proteolitična aktivnost bakterijske kulture *S. ruminantium* pri treh različnih dodanih koncentracijah kostanjevega tanina (0,05 g/l, 0,25 g/l in 1,00 g/l) in kontrolni kulturi brez dodanega tanina (\* - statistično značilno odstopanje od negativne kontrole; p < 0,05).

Slika 11 prikazuje vpliv kostanjevih taninov na celično proteolitično aktivnost bakterije *S. ruminantium*. Koncentracija tanina 0,05 g/l nima statistično značilnega vpliva, vse do zadnje ure inkubacije, ko smo zabeležili statistično značilno povečano aktivnost. Statistično značilno močno povečano aktivnost smo zabeležili tudi pri večjih dveh koncentracijah tanina 16. in 48. uro inkubacije. 16. uro sta doseženi največji encimski aktivnosti teh dveh koncentracij. Podrobnejši podatki, ki se navezujejo na sliko 11, so prikazani v prilogi I.

Vpliv kostanjevih taninov na izvencelično proteolitično aktivnost bakterije (slika 12) je dobro viden in statistično značilen v prvih dveh urah inkubacije. Kostanjevi tanini tu povsod povečujejo encimsko aktivnost. 10. uro inkubacije so dosežene največje aktivnosti vseh treh koncentracij tanina. V točkah, kjer razlike niso statistično značilne (13., 32. in 48. ura inkubacije), ni večjih odstopanj od negativne kontrole. Podrobnejši podatki, ki se navezujejo na sliko 12, so prikazani v prilogi J.

#### 4.2 RAST IN ENCIMSKA AKTIVNOST BAKTERIJE *S. bovis*

Vpliv koncentracije tanina ob posameznih časih inkubacije na rast in encimske aktivnosti bakterije *Streptococcus bovis* smo preverjali takrat, ko je bila interakcija med uro inkubacije in koncentracijo tanina statistično značilna (Priloga K). Vpliv treh koncentracij kostanjevega tanina na rast bakterije *S. bovis* v primerjavi z negativno kontrolo brez dodanega tanina smo spremljali 48. ur z merjenjem koncentracije celičnih beljakovin. Rezultati so prikazani na sliki 13. Manjši dve koncentraciji tanina (0,05 g/l in 0,25 g/l) nimata opaznejšega vpliva na rast. Pri koncentraciji tanina 1,00 g/l smo opazili pozitiven vpliv kostanjevih taninov na rast bakterij. Vse vrednosti so tu statistično značilno večje od negativne kontrole. Podrobnejši podatki, ki se navezujejo na sliko 13, so prikazani v prilogi L1.

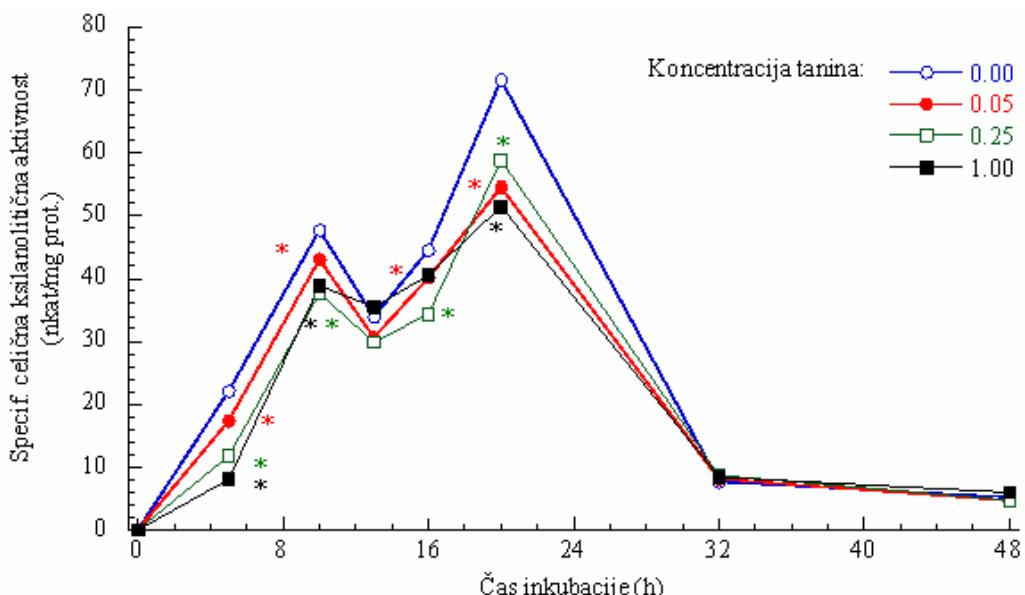


Slika 13: Rast bakterijske kulture *S. bovis* pri treh različnih dodanih koncentracijah kostanjevega tanina (0,05 g/l, 0,25 g/l in 1,00 g/l) in kontrolni kulturi brez dodanega tanina (\* - statistično značilno odstopanje od negativne kontrole;  $p < 0,05$ ).

Spremljali smo tudi koncentracijo beljakovin v supernatantu (priloga L2, L3), ki smo jo uporabili pri izračunu specifičnih izvenceličnih encimskih aktivnosti. Koncentracije beljakovin so bile tu pri vseh treh koncentracijah tanina in negativni kontroli praktično

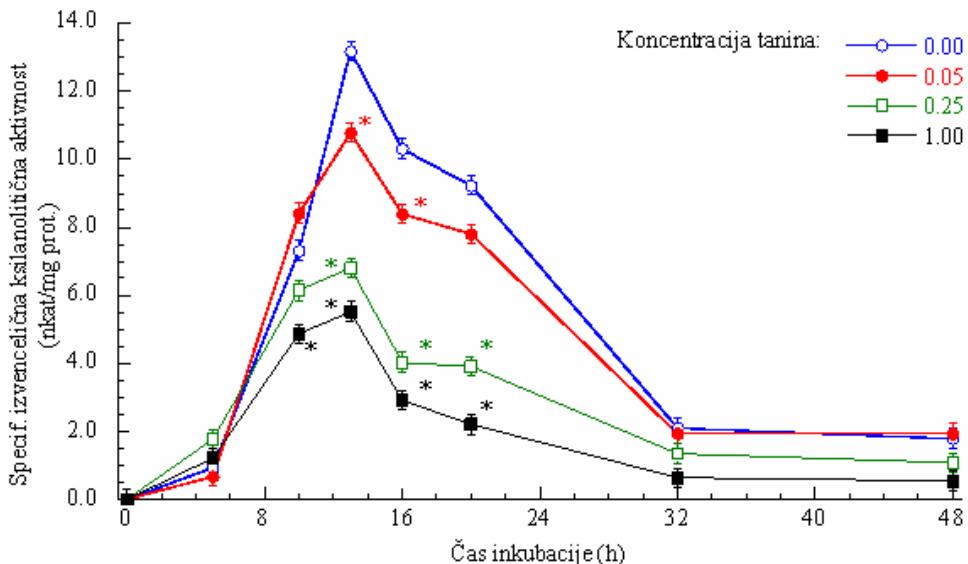
enake. To ne odraža dejanske koncentracije izvenceličnih beljakovin (prisotne so npr. tudi beljakovine gojišča...).

Slika 14 kaže, da se v prisotnosti kostanjevih taninov zmanjša celična ksilanolitična aktivnost bakterije *S. bovis*. Statistično značilno inhibicijo smo zasledili med 5. in 20. uro inkubacije. Odstopanja med vrednostmi pri koncentracijah taninov in vrednostmi negativne kontrole so sicer majhna. Encimska aktivnost je povsod največja 20. uro inkubacije. Zadnji dve uri inkubacije aktivnosti ni skoraj nikjer več zaznati. Podrobnejši podatki, ki se navezujejo na sliko 14, so prikazane v prilogi M.



Slika 14: Specifična celična ksilanolitična aktivnost bakterijske kulture *S. bovis* pri treh različnih dodanih koncentracijah kostanjevega tanina (0,05 g/l, 0,25 g/l in 1,00 g/l) in kontrolni kulturi brez dodanega tanina (\* - statistično značilno odstopanje od negativne kontrole;  $p < 0,05$ ).

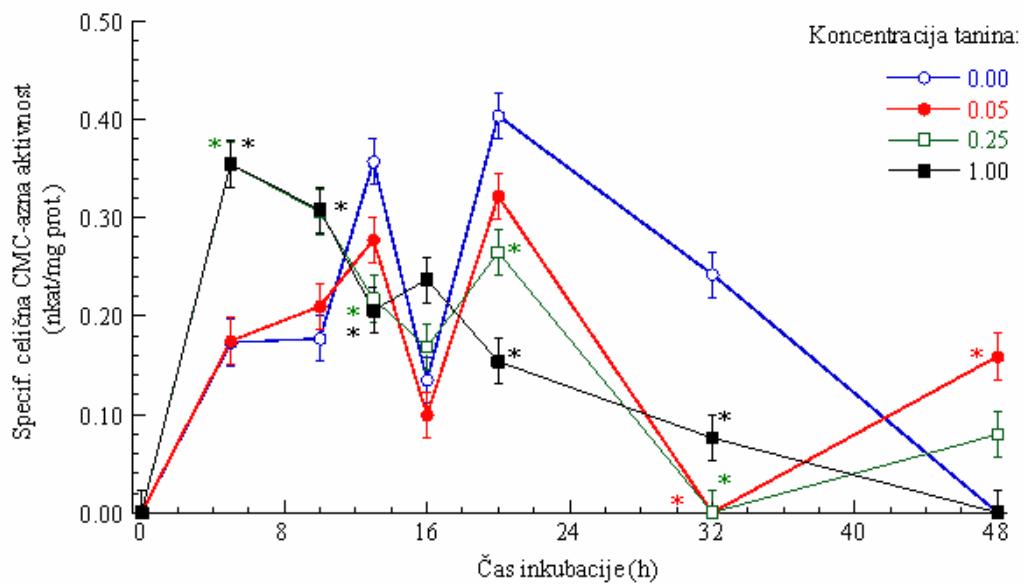
Pri koncentraciji tanina 0,05 g/l je inhibitorni vpliv kostanjevih taninov na izvencelično ksilanolitično aktivnost slabše viden in statistično značilen le pri 13. in 16. uri inkubacije (slika 15). Statistično značilno zmanjšanje aktivnosti je najbolj očitno vidno med 10. in 20. uro inkubacije(0,25 g/l in 1,00 g/l). Podrobnejši podatki, ki se navezujejo na sliko 15, so prikazane v prilogi N.



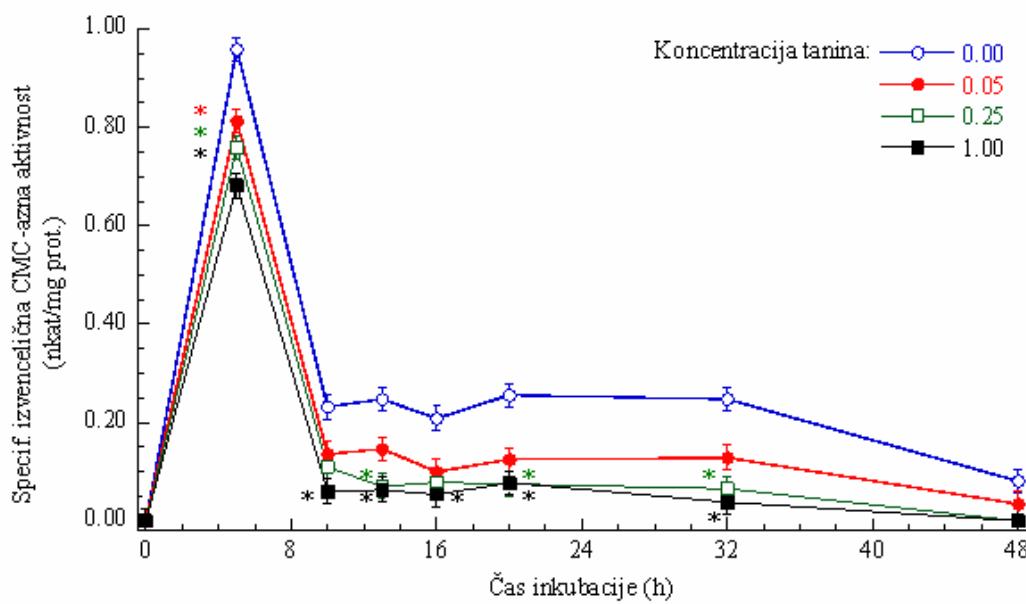
Slika 15: Specifična izvencelična ksilanolitična aktivnost bakterijske kulture *S. bovis* pri treh različnih dodanih koncentracijah kostanjevega tanina (0,05 g/l, 0,25 g/l in 1,00 g/l) in kontrolni kulturi brez dodanega tanina (\* - statistično značilno odstopanje od negativne kontrole;  $p < 0,05$ ).

Vpliv kostanjevih taninov na celično CMC-azno aktivnost je prikazan na sliki 16. Manjša koncentracija tanina (0,05 g/l) nima vpliva na celično CMC-azno aktivnost. V prvih dveh urah inkubacije smo, pri koncentraciji tanina 0,25 g/l in 1,00 g/l, opazili statistično značilno povečanje aktivnosti, z največjo aktivnostjo pri 5. uri inkubacije. Sledil je padec na nivo negativne kontrole. Od 20. ure dalje je viden statistično značilen inhibitoren vpliv kostanjevih taninov. Zaradi neznanega vzroka (možna napaka v postopku) pri 32. uri inkubacije ni več zaznati encimske aktivnosti pri manjših dveh koncentracijah tanina (0,05 g/l in 0,25 g/l), pri 48. uri inkubacije pa jo zopet zasledimo. Podrobnejši podatki, ki se navezujejo na sliko 16, so prikazane v prilogi O.

Vpliv kostanjevih taninov na izvencelično CMC-azno aktivnost prikazuje slika 17. Statistično značilno inhibicijo smo zabeležili pri vseh treh koncentracijah tanina (0,05 g/l, 0,25 g/l in 1,00 g/l). Poteki krivulj so podobni kot pri negativni kontroli. Največjo aktivnost smo, zabeležili 5. uro inkubacije. Podrobnejši podatki, ki se navezujejo na sliko 17, so prikazane v prilogi P.

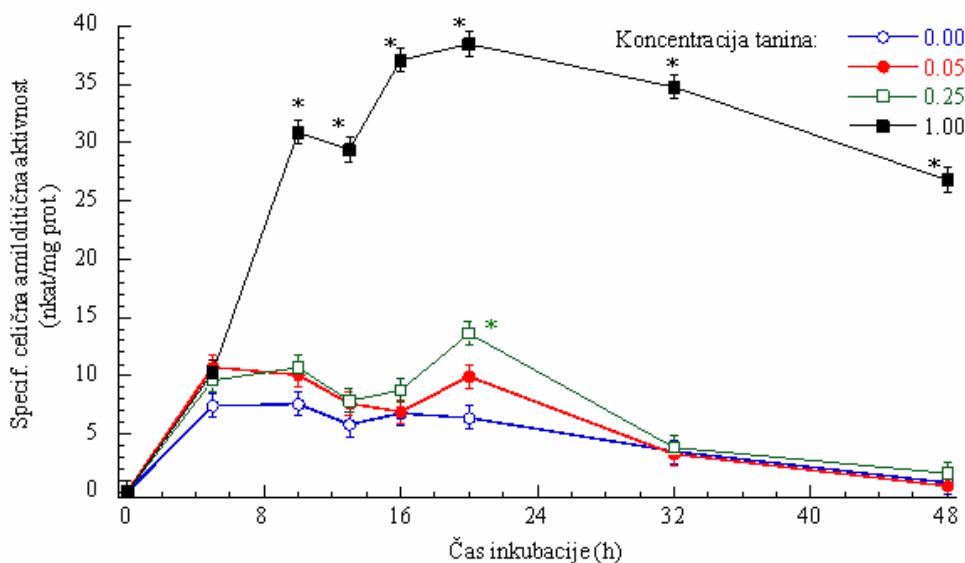


Slika 16: Specifična celična CMC-azna aktivnost bakterijske kulture *S. bovis* pri treh različnih dodanih koncentracijah kostanjevega tanina (0,05 g/l, 0,25 g/l in 1,00 g/l) in kontrolni kulturi brez dodanega tanina (\* - statistično značilno odstopanje od negativne kontrole;  $p < 0,05$ ).



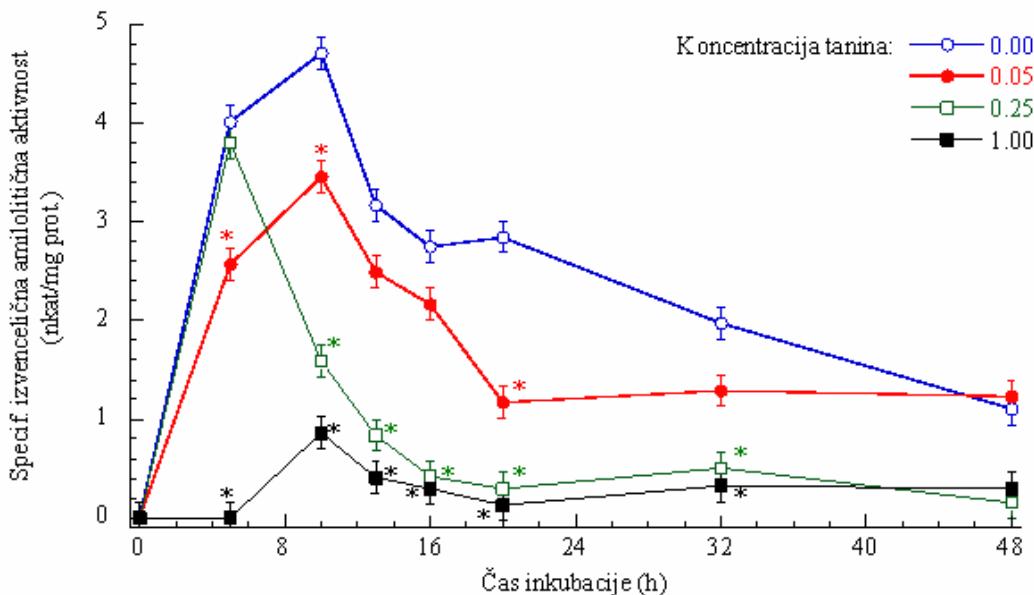
Slika 17: Specifična izvencelična CMC-azna aktivnost bakterijske kulture *S. bovis* pri treh različnih dodanih koncentracijah kostanjevega tanina (0,05 g/l, 0,25 g/l in 1,00 g/l) in kontrolni kulturi brez dodanega tanina (\* - statistično značilno odstopanje od negativne kontrole;  $p < 0,05$ ).

Vpliv kostanjevih taninov na celično amilolitično encimsko aktivnost (slika 18) je dobro viden pri koncentraciji tanina 1,00 g/l, kjer so vrednosti statistično značilno večje in se nahajajo visoko nad negativno kontrolo. Manjše koncentracije tanina nimajo statistično značilnega vpliva. Podrobnejši podatki, ki se navezujejo na sliko 18, so prikazane v prilogi R.



Slika 18: Specifična celična amilolitična aktivnost bakterijske kulture *S. bovis* pri treh različnih dodanih koncentracijah kostanjevega tanina (0,05 g/l, 0,25 g/l in 1,00 g/l) in kontrolni kulturi brez dodanega tanina (\* - statistično značilno odstopanje od negativne kontrole;  $p < 0,05$ ).

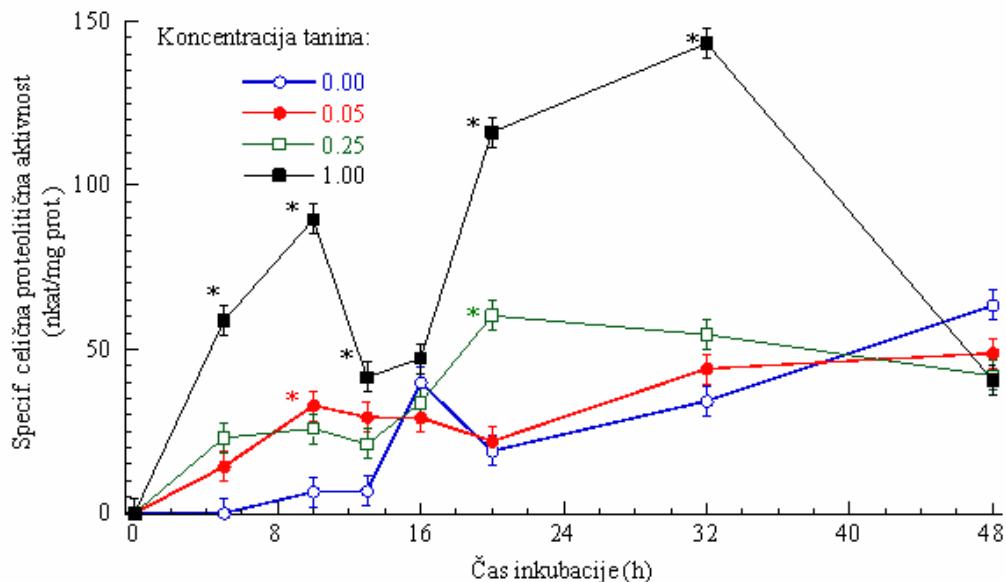
Kostanjevi tanini imajo inhibitorni vpliv na izvencelično amilolitično aktivnost (slika 19). Statistično značilno inhibicijo smo opazili med 10. in 32. uro inkubacije pri koncentraciji tanina 0,25 g/l oz. med 5. in 32. ure pri koncentraciji tanina 1,00 g/l. Pri najmanjši koncentraciji tanina smo statistično značilno inhibicijo opazili prve ure inkubacije, vendar ne v tolikšni meri kot pri večjih dveh koncentracijah. Podrobnejši podatki, ki se navezujejo na sliko 19, so prikazane v prilogi S.



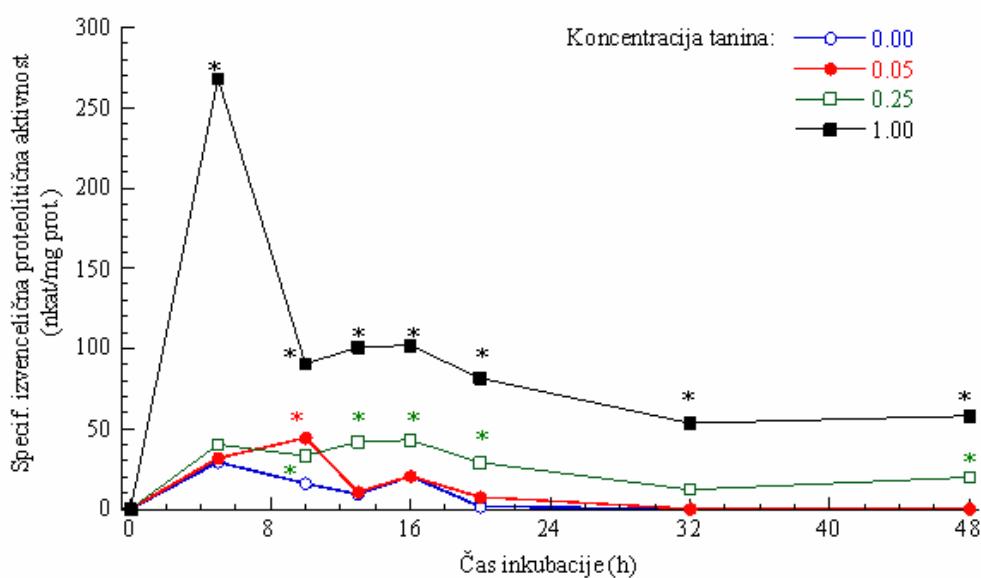
Slika 19: Specifična izvencelična amilolitična aktivnost bakterijske kulture *S. bovis* pri treh različnih dodanih koncentracijah kostanjevega tanina (0,05 g/l, 0,25 g/l in 1,00 g/l) in kontrolni kulturi brez dodanega tanina (\* - statistično značilno odstopanje od negativne kontrole;  $p < 0,05$ ).

Slika 20 kaže, da imajo kostanjevi tanini pozitiven vpliv na celično proteolitično aktivnost bakterije *S. bovis*. Pri koncentraciji tanina 1,00 g/l je ta vpliv izrazito viden. Pri manjših koncentracijah tanina večinoma nismo zaznali statistično značilnega vpliva na celično proteolitično aktivnost. Podrobnejši podatki, ki se navezujejo na sliko 20, so prikazane v prilogi T.

Vpliv na izvencelično proteolitično aktivnost je najbolj viden pri največji koncentraciji tanina (slika 21). Pri koncentraciji tanina 0,25 g/l smo vpliv na izvencelično encimsko aktivnost precej šibkeje zaznali. Koncentracija tanina 0,05 g/l nima več statistično značilnega vpliva. Podrobnejši podatki, ki se navezujejo na sliko 21, so prikazane v prilogi U.



Slika 20: Specifična celična proteolitična aktivnost bakterijske kulture *S. bovis* pri treh različnih dodanih koncentracijah kostanjevega tanina (0,05 g/l, 0,25 g/l in 1,00 g/l) in kontrolni kulturi brez dodanega tanina (\* - statistično značilno odstopanje od negativne kontrole; p < 0,05).



Slika 21: Specifična izvencelična proteolitična aktivnost bakterijske kulture *S. bovis* pri treh različnih dodanih koncentracijah kostanjevega tanina (0,05 g/l, 0,25 g/l in 1,00 g/l) in kontrolni kulturi brez dodanega tanina (\* - statistično značilno odstopanje od negativne kontrole; p < 0,05).

### 3 RAZPRAVA IN SKLEPI

Vampni bakteriji *S. ruminantium* in *S. bovis* imata pomembno vlogo v predželodcih. *S. bovis* sodeluje predvsem pri razgradnji beljakovin (Wallace in Brammall, 1985) in škroba (Cotta, 1988), zato je velikokrat odgovorna za nastanek bolezenskega stanja, zakisanja vampa (Nock, 1997). Pomembna pa je tudi prisotnost bakterije *S. ruminantium*, ki sodeljuje pri razgradnji ogljikovih hidratov (Bryant, 1956) in laktata (Scheifinger in sod., 1975). S svojo prisotnostjo lahko prepreči zakisanje vampa.

V intenzivni reji dodajamo krmi prežvekovalcev tanine z namenom zaščite beljakovin pred njihovo pretirano mikrobnim razgradnji v predželodcih. Namen diplomske naloge je bil preveriti vpliv tanina na rast in določene encimske aktivnosti bakterij *S. ruminantium* in *S. bovis*. Na podlagi rezultatov smo poskušali ugotoviti, ali bi dodatek tanina krmi dosegel želene učinke oz. kateri nezaželeni učinki bi se lahko ob tem pojavili.

Obe bakteriji sta del združbe vampnih mikroorganizmov, zato lahko rezultate, ki smo jih dobili na čistih kulturah, do določene mere razširimo na celotno združbo, ki je odvisna od posameznih članov v njej. Pri tem pa se moramo zavedati tudi omejitev takih posplošitev, ki so posledica načina izvedbe eksperimenta. Vpliv tanina bi bil lahko drugačen v *in vivo* pogojih, kjer je prisotna celotna združba in vpliv številnih drugih dejavnikov. Iz literature je razvidno, da je vpliv taninov v predželodcih tako pozitiven (manjša razgradnja beljakovin), kot tudi negativen (zaviranje delovanja celulaz, ksilanaz, amilaz), zato je potrebno z vrsto in koncentracijo tanina med njimi iskati optimum (Barry in sod., 1986a; Jones in sod., 1994). Glede na to, da je *S. bovis* pomembna bakterija pri razgradnji škroba in beljakovin (Cotta, 1988; Wallace in Brammall, 1985), *S. ruminantium* pa pri razgradnji večine rastlinskih ogljikovih hidratov in laktata (Bryant, 1956), lahko iz rezultatov sklepamo na obseg pozitivnih in negativnih učinkov kostanjevega tanina.

Koncentracije tanina, ki smo jih preverjali v tem eksperimentu, smo izbrali na podlagi priporočil proizvajalcev. Ob upoštevanju približnega volumna vampa in priporočenega dnevnega odmerka tanina v krmi je koncentracija tanina v gojišču, ki ustreza priporočeni dozi za prežvekovalce, 0,25 g/l. Poleg tega smo preverjali tudi koncentracijo, ki močno presega priporočeno (1,00 g/l) oz. je precej pod njo (0,05 g/l). Na podlagi predhodnih

meritev (rezultati niso prikazani) smo ugotovili, da je bil tanin, ki smo ga dodajali vzorcem pred inkubacijo, kasneje kljub spiranju v določeni manjši meri še vedno prisoten v vzorcih celic pri vseh analizah. Zaznali smo določen vpliv tanina na merjenje koncentracije beljakovin v celičnih vzorcih s spektrofotometrom. V supernatantih kulturah se zaradi centrifugiranja po koncu inkubacije prosti tanin usede na dno in zato ni prisoten v vzorcu – ne vpliva na meritev. Pri merjenju encimskih aktivnosti se ta vpliv zaradi upoštevanja negativnih kontrolnih vzorcev prav tako izniči. Tanin je tako pri koncentracijah 0,25 g/l in 1,00 g/l rahlo povečal dejanske vrednosti koncentracije beljakovin v celičnih vzorcih, pri najmanjši koncentraciji, 0,05 g/l, pa tega vpliva skoraj ni bilo zaznati. Zaradi nekoliko manjših dejanskih koncentracij beljakovin pri večjih dveh koncentracijah tanina so tudi specifične encimskie aktivnosti pri teh dveh koncentracijah tanina rahlo večje, kot smo jih dejansko izračunali iz dobljenih podatkov. Ta vpliv je dokaj velik v začetnih fazah rasti (5. ura in deloma 10. ura inkubacije), kjer je koncentracija celic še majhna. Glede na rezultate, ki smo jih dobili, je vpliv tanina na meritve najbolj viden pri merjenju koncentracije beljakovin, pri 5. urah inkubacije, kjer se vrednosti pri koncentraciji tanina 0,25 g/l in 1,00 g/l precej razlikujejo od negativne kontrole, kar je v nasprotju s pričakovanji. To smo upoštevali tudi pri interpretaciji rezultatov.

Pri izračunu specifičnih encimskih aktivnosti se ta vpliv ni pokazal, saj so v večini primerov dobljene vrednosti pri 5. urah inkubacije zelo nizke ali enake 0, drugje pa vrednosti niso razporejene tako, da bi vpliv tanina na merjenje koncentracije beljakovin zbrisal trende v gibanju specifičnih encimskih aktivnosti glede na čas inkubacije in koncentracijo tanina. Če so izmerjene vrednosti blizu skupaj in ni statistično značilnih razlik, se ta vpliv ne izrazi. Kjer pa so razlike statistično značilne, so le te dovolj velike, da jih omenjeni vpliv ne spremeni bistveno. Dodatno kontrolo specifičnih, encimskih aktivnosti nam omogočajo dejanske absolutne encimskie aktivnosti, kjer ni upoštevana koncentracija beljakovin v vzorcu.

### 5.1 VPLIV KOSTANJEVEGA TANINA NA RAST BAKTERIJ *S. ruminantium* IN *S. bovis*

Rast bakterij smo spremljali na podlagi merjenja koncentracije beljakovin. Kostanjevi tanini bolj izrazito vplivajo na rast bakterije *S. ruminantium* (slika 4) kot na rast bakterije

*S. bovis* (slika 13). Vse tri uporabljeni koncentracije tanina pospešujejo rast bakterije *S. ruminantium*. Razvidno je, da se z večanjem koncentracije tanina izboljšuje rast bakterije in kasneje dosega največja vrednost. Pri najmanjši uporabljeni koncentraciji tanina (0,05 g/l) pospešena bakterijska rast ni statistično značilna (priloga B1). Pri koncentraciji tanina 0,25 g/l gre za delno statistično značilno pospešeno rast, največja koncentracija tanina (1,00 g/l) ima največji vpliv na rast bakterije. Rast je najbolj intenzivna do 20. ure inkubacije, nato se upočasni in se bistveno ne spreminja več. Razlog za povečano bakterijsko rast je lahko v tanazni aktivnosti te bakterije, ki sta jo ugotovila Skene in Brooker (1995). Bakterija *S. ruminantium* je sposobna rasti v prisotnosti taninske kisline, kar je posledica cepitve esterskih vezi med galno kislino in glukozo s tanazami in kasnejše izrabe glukoze kot vira energije.

Tudi v primeru *S. bovis* ima kostanjev tanin podoben vpliv na rast bakterijske kulture kot pri *S. ruminantium* (slika 13). V primeru večjih dveh koncentracij tanina (0,25 in 1,00 g/l) gre za jasno statistično značilno pospešeno rast. Več avtorjev (Nelson in sod., 1998; Goel in sod., 2005) navaja v rezultatih svojih raziskav, da določeni sevi *Streptococcus bovis* kažejo tanazno aktivnost in so v določeni meri tolerantni do tanina. Sevi rodu *Streptococcus* tolerirajo do 50 g/l taninske kisline *in vivo* (Goel in sod., 2005). Navajajo tudi, da se s povečevanjem koncentracije tanina podaljšuje lag faza, kar v našem primeru ni bilo ugotovljeno. Slika 13 kaže, da bi lahko tudi naš sev bakterije *Streptococcus bovis* kazal toleranco do tanina, saj se v njegovi prisotnosti rast večino poveča. Razlog je lahko v tanazni aktivnosti bakterije. Pri manjših dveh koncentracijah tanina bi bil lahko razlog za manjša odstopanja od negativne kontrole ogljikohidratni izvencelični plašč, ki ščiti celico pred negativnimi vplivi tanina. O njem poroča več avtorjev (Krause in sod., 2005; O'Donovan in Brooker 2001). Izvencelični plašč sicer ni povečal odpornosti bakterije *S. bovis*, so pa znana poročila o tem, da je povečal odpornost bakterije *S. gallolyticus*.

## 5.2 VPLIV KOSTANJEVEGA TANINA NA KSILANAZNO AKTIVNOST BAKTERIJ *S. ruminantium* IN *S. bovis*

*S. ruminantium* je bolj ksilanolitično aktivna kot *S. bovis*. Ksilanolitična aktivnost je vezana predvsem na celično frakcijo in se manj izraža izvencelično (slika 5). Statistično značilen inhibitorni vpliv tanina je dobro viden predvsem pri večjih dveh koncentracijah

tanina (0,25 in 1,00 g/l). Tudi pri najmanjši koncentraciji tanina je inhibicija ksilanolitične aktivnosti statistično značilno izražena (priloga C). Pri izvencelični ksilanazni aktivnosti najmanjša koncentracija tanina nima vpliva. Pri večjih dveh koncentracijah tanina (0,25 g/l, 1,00 g/l) je opazno statistično značilno povečanje aktivnosti izvenceličnih ksilanaz (priloga D) med 16. in 32. ure inkubacije.

Inhibitoren vpliv kostanjevih taninov na ksilanazno aktivnost *S. bovis* je manj opazen. Tudi same razlike v ksilanolitični aktivnosti pri posameznih koncentracijah tanina so manj izrazite (sliki 14 in 15). Vpliv je statistično značilen prve ure inkubacije pri celični aktivnosti (priloga M) oz. med 10. in 20. ure inkubacije pri izvencelični ksilanolitični aktivnosti (priloga N).

O vplivu kondenziranih taninov na ksilanazno aktivnost pri združbi vampnih mikroorganizmov je poročalo že več avtorjev. Barry in Duncan (1984) sta pri krmljenju ovc s krmo, ki je vsebovala različne koncentracije taninov (46 in 106 g na kg SS) iz *L. pedunculatus*, ugotovila, da se z večanjem koncentracije taninov v obroku poslabšuje razgradnja hemiceluloze. V nasprotju s tem Waghorn in sod. (1987) poročajo, da pri ovcah, ki so se prehranjevale s krmo, ki je vsebovala 22 g na kg SS taninov iz *L. corniculatus*, tanini niso vplivali na razgradnjo hemiceluloze.

### 5.3 VPLIV KOSTANJEVEGA TANINA NA CMC-azno AKTIVNOST BAKTERIJ *S. ruminantium* IN *S. bovis*

Celična CMC-azna aktivnost bakterije *S. ruminantium* je pri večjih dveh koncentracijah tanina močno statistično značilno zmanjšana in se celoten čas inkubacije giblje blizu vrednosti 0 (slika 7, priloga E). Najmanjši, vendar še vedno statistično značilen vpliv kaže najmanjša koncentracija tanina, 0,05 g/l. V nasprotju s celično frakcijo je pri izvencelični CMC-azni aktivnosti, predvsem pri večjih dveh koncentracijah tanina in predvsem zadnje ure inkubacije, opazen porast encimske aktivnosti (slika 8, priloga F). Možna razloga za povečano specifično izvencelično CMC-azno aktivnost te bakterije je v tem, da imajo celične CMC-aze večjo afiniteto do tanina kot izvencelične – o različni afiniteti tanina do beljakovin, je poročal Jansman (1993).

Pri celično vezani CMC-azni aktivnosti bakterije *S. bovis* smo dokazali statistično značilno inhibicijo (slika 16, priloga O) pri večjih dveh koncentracijah tanina od 13. ure dalje. Prve ure inkubacije sicer encimske aktivnosti presegajo aktivnosti negativne kontrole. To je verjetno posledica vpliva tanina na merjenje koncentracije beljakovin s spektrofotometrom, ki nekoliko poveča dejanske vrednosti koncentracije beljakovin predvsem 5. in 10. uro inkubacije. V naslednjih urah se veže tanin na celično površino in prepreči izstop encimov v gojišče (McSweeney in sod., 2001), kar se v našem primeru kaže v zmanjšani CMC-azni aktivnosti. Pri najmanjši koncentraciji tanina, 0,05 g/l, nismo dokazali statistično značilnega vpliva na encimsko aktivnost. Inhibitoren vpliv kostanjevih taninov na izvencelično CMC-azo aktivnost je manj izrazit (slika 17). Same razlike v encimski aktivnosti, med posameznimi koncentracijami tanina niso močno izražene. Vpliv pri večjih dveh koncentracijah tanina (0,25 in 1,00 g/l) je statistično značilen (priloga P) večino časa inkubacije.

CMC-azna aktivnost je majhna pri obeh bakterijah, saj je znano, da bolj učinkovito razgrajujeta druge celične ogljikove hidrate (škrob, ksilan) in beljakovine (Cotta, 1988; Bryant; 1956). Do sedaj opravljene raziskave o vplivu tanina na aktivnost celulolitičnih vampnih bakterij, predvsem v združbi vampnih mikroorganizmov, ugotavljajo inhibicijo leteh. Makkar in sod. (1988) navajajo, da so hidrolizirajoči tanini hrasta (*Quercus incana*) *in vivo* zmanjšali delovanje karboksimetilcelulaz. Dodatek PEG, ki se specifično veže na tanine, v obrok bogat s kondenziranimi tanini je povečal razgradnjo celuloze v predželodcih ovc (Barry in Manley, 1984).

#### 5.4 VPLIV KOSTANJEVEGA TANINA NA AMILAZNO AKTIVNOST BAKTERIJ *S. ruminantium* IN *S. bovis*

Pri amilolitični (slika 9) in ksilanolitični aktivnosti (slika 5) celične frakcije *S. ruminantium* je opazna podobnost. V obeh primerih je močno zmanjšana aktivnost v prisotnosti tanina. Iz slike 9 je razvidno, da je inhibitorni vpliv tanina močno izražen in statistično značilen pri vseh treh koncentracijah. Posebno jasno je izražen inhibitorni vpliv pri koncentracijah tanina 1,00 g/l in 0,25 g/l, kjer so encimske aktivnosti že prve ure inkubacije blizu vrednosti 0 (priloga G). Verjetno je to posledica vezave tanina na encime celice, kar lahko poteka le do določene mere, nato se vpliv nič več ne povečuje. To

nakazuje potrebo po ugotavljanju koncentracije tanina, ki je primerna v praktični uporabi – optimizacija vampnih procesov in sama ekonomičnost (nad določeno koncentracijo se učinki ne večajo več sorazmerno z večanjem koncentracije tanina). V izvencelični frakciji koncentracija 0,05 g/l nima statistično značilnega vpliva (slika 10). Pri večjih dveh koncentracijah tanina smo zasledili med 13. in 32. uro inkubacije statistično značilno povečano aktivnost (priloga H).

*S. bovis* je v vampu aktivna pri razgradnji škroba (Cotta, 1988). Rezultati kažejo, da se izvencelična amilolitična aktivnost zmanjšana v prisotnosti tanina. Statistično značilna inhibicija je vidna med 5. in 20. ure inkubacije (priloga S), bolj pri večjih dveh koncentracijah tanina. V celični frakciji pri koncentraciji tanina 0,05 g/l in 0,25 g/l ni zaznati statistično značilnega vpliva. Izjema je 20. ura pri koncentraciji tanina 0,25 g/l, kjer smo zabeležili statistično značilno povečano aktivnost. Vrednosti pri koncentraciji tanina 1,00 g/l se od 10. ure dalje nahajajo visoko nad negativno kontrolo. Razlike so povsod statistično značilne (priloga R).

V strokovni literaturi poročajo o negativnem vplivu tanina na razgradnjo topnih ogljikovih hidratov. O zmanjšani razgradnji topnih ogljikovih hidratov *in vivo* v prisotnosti kondenziranih taninov iz *L. corniculatus* poročata Barry in Manley (1984). Longstaff in McNab (1991) poročata o zmanjšanem delovanju amilaz *in vivo* pri neprežvekovalcih, v prisotnosti različnih koncentracij kondenziranih taninov iz fižola (*Vicia faba*).

## 5.5 VPLIV KOSTANJEVEGA TANINA NA PROTEAZNO AKTIVNOST BAKTERIJ *S. ruminantium* IN *S. bovis*

*S. ruminantium* ima proteolitično aktivnost vezano predvsem na celično frakcijo in se manj izraža izvencelično (slika 12). Statistično značilen vpliv (priloga I) je dobro viden pri vseh treh koncentracijah tanina do 20. ure inkubacije (izjema 13. ura). Povečano aktivnost smo zabeležili 5. in 10. uro inkubacije, pri vseh treh koncentracijah tanina, bolj pri večjih dveh (0,25 in 1,00 g/l). Kasneje se aktivnost povsod zmanjša in pada pod nivo negativne kontrole. Pri celični proteolitični aktivnosti (slika 11, priloga J) smo zabeležili statistično značilen vpliv in obenem tudi povečano aktivnost 16. uro inkubacije (koncentracija tanina

0,25 in 1,00 g/l) in zadnjo uro inkubacije pri koncentraciji tanina 0,05 in 1,00 g/l. Drugje vplivi niso bili statistično značilni.

Koncentracija tanina 0,05 g/l nima statistično značilnega vpliva na celično in izvencelično proteolitično aktivnost bakterije *S. bovis* (slika 20 in 21). Pri koncentraciji tanina 0,25 g/l je vpliv že nekoliko bolj izražen. Najbolj močno vpliva na proteolitično aktivnost bakterije koncentracija tanina 1,00g/l. Tako izvencelična kot celična encimska aktivnost je pri tej koncentracij tanina močno statistično značilno povečana večino časa inkubacije (priloga T in U).

Večina avtorjev v strokovni literaturi navaja, da prisotnost taninov zmanjšuje proteolitično aktivnost bakterij, tudi bakterije *S. bovis*. Min in sod. (2005) so v *in vitro* raziskavi ugotovili, da prisotnost 1,5 g/ml kondenziranih taninov iz *L. corniculatus* zmanjša v večji ali manjši meri proteolitično aktivnost 11. različnih sevov bakterij. Raziskave drugih avtorjev (Skene in Brooker, 1995; Brooker in sod., 1994; Nelson in sod., 1995) pa so dokazale, da so določeni sevi iz rodu *Streptococcus* in *Selenomonas* sposobni razgraditi tanin-beljakovinski kompleks, kar je lahko razlog za povečano proteolitično aktivnost v našem primeru.

Glavni namen dodajanja taninov krmi je zmanjšati razgradnjo beljakovin v predželodcih, obenem pa ne bistveno prizadeti drugih procesov razgradnje strukturnih celičnih ogljikovih hidratov in s tem rasti bakterij. Vendar se razgradnja beljakovin ne sme zmanjšati v tolikšni meri, da bodo te postale povsem nedostopne za mikroorganizme, saj so te nujno potrebne za njihovo rast. Tako bi morali v vampu najprej ustrezno oskrbeti vampne mikroorganizme in hkrati ob delni zaščiti beljakovin krme s tanini, čim manj prizadeti njihovo delovanje.

Ob tem se zastavlja vprašanje primerljivosti našega poizkusa z dejanskim stanjem v vampu. Z vsaj treh vidikov ju ni mogoče primerjati:

- sestava gojišča je drugačna kot sestava vampnega soka – prisotne so druge vrste beljakovin, kar je bistvenega pomena pri njihovi zaščiti pred razgradnjo (Perez-Maldonado in sod., 1995);

- združba mikroorganizmov v vampu se lahko odziva na čisto drugačen način kot čista kultura in ima lahko npr. večjo toleranco na uporabljene koncentracije tanina (McSweeney in sod., 2001);
- vpliv živali in vpliv krme.

Poleg tega je vamp odprt, pretočni sistem s stalnim dohranjevanjem, v našem primeru pa je šlo za zaprt sistem inkubacije do 48 ur (v vampu je zadrževalni čas navadno od 10 do 12 ur). Zato so tudi mikroorganizmi v različnih fazah rasti, proti koncu inkubacije pa se znižuje tudi pH, kar lahko dodatno vpliva na stabilnost kompleksa tanina z beljakovinami (Perez-Maldonado in sod., 1995). Na podlagi tega bi lahko z vampon primerjali le del naših grafikonov, ki prikazujejo rast in specifične encimske aktivnosti. Kljub temu nam rezultati poskusa dajejo pomembno informacijo o splošnem vplivu oz. načinu delovanja taninov na hidrolitske predstavnike združbe vamnih mikroorganizmov. To nam lahko pomaga pri ovrednotenju izbrane vrste tanina ter ustrezne koncentracije za doseganje željenih učinkov in tudi pri načrtovanju poskusov *in vivo*.

Kostanjevi tanini so izboljševali rast bakterije *S. ruminantium*. Kljub boljši rasti v prisotnosti tanina pa je ta še vedno negativno vplival na nekatere njene specifične encimske aktivnosti. Pri primerjavi z vampon so verodostojnejši podatki o izvenceličnih encimskih aktivnostih, saj razgradnja kompleksnih ogljikovih hidratov v vampu poteka izven celic z encimi, na katere ima tanin neposreden vpliv. Glede na to lahko iz naših rezultatov zaključimo, da tanin zmanjšuje njeno celično ksilanazno, amilazno in CMC-azno aktivnost. Inhibicija se je odražala v kasnejšem in manjšem dosegu encimske aktivnosti ter stopnjevala z večanjem koncentracije tanina. Povečana aktivnost je zabeležena pri izvenceličnih CMC-azah ob koncu inkubacije pri vseh treh koncentracijah tanina, izvenceličnih ksilanazah 16 uro inkubacije pri večjih dveh koncentracijah tanina in pri izvenceličnih proteazah v prvih urah inkubacije. Pri ostalih encimskih aktivnostih je pri določenih časih inkubacije opažena povečana encimska aktivnost v prisotnosti tanina, tudi proteazna, pri kateri je bilo zaželeno doseči ravno obraten namen.

Tudi pri *S. bovis* kostanjevi tanini pri večjih dveh koncentracijah pospešujejo bakterijsko rast. Vpliv kostanjevih taninov na specifične encimske aktivnosti je različen. Ksilanaze so

bolj ali manj inhibirane. Pri celičnih CMC-azah je v prvih nekaj urah rasti tanin povečal specifično encimsko aktivnost. To je posledica kopiranja encimov v celicah, ker jim tanin preprečuje prehod. Aktivnost zato v naslednjih urah inkubacije hitro upade. Pri izvenceličnih CMC-azah in amilazah je pri večjih dveh koncentracijah tanina (0,25 in 1,00 g/l) opazna statistično značilna inhibicija. Medtem ko najmanjša koncentracija tanina ne vpliva na delovanje proteaz in celičnih amilaz, pa večji koncentraciji tanina večinoma statistično značilno povečujeta njihovo aktivnost. Glede na rezultate lahko ugotovimo, da ni viden tako želen negativen vpliv tanina na proteolizo. Njena glavna encimska aktivnost amiloliza je večja v prisotnosti tanina (celična frakcija). Ostale specifične encimske celične in izvencelične aktivnosti so bolj ali manj inhibirane.

Rast *S. bovis* je veliko boljša kot pri *S. ruminantium*, vpliv tanina na rast pa je bolj opazen pri *S. ruminantium*. Vzrok za različen vpliv kostanjevih taninov na obe bakteriji, bi bilo potrebno iskati v njunih značilnostih, posebno v sposobnosti izkoriščanja posameznih substratov (ksilan, škrob, beljakovine), v njunih encimskih značilnostih, na katere ima tanin vpliv in v splošni odpornosti bakterije na tanin oz. v sposobnosti razgradnje le-tega. Znano je, da med posameznimi bakterijami, kot tudi med sevi posamezne bakterije, obstajajo velike razlike.

## 5.6 SKLEPI

Obseg vpliva kostanjevih taninov na rast je odvisen od lastnosti posamezne bakterije in od koncentracije taninov v gojišču.

- Kostanjevi tanini izboljšujejo rast čistih kultur bakterije *S. bovis* in *S. ruminantium*. Rast je boljša v prisotnosti večjih koncentracij tanina.

Na encimske sisteme pri posamezni bakteriji kostanjevi tanini vplivajo različno. Na eni strani izboljšujejo specifične encimske aktivnosti, na drugi strani pa jih zavirajo.

- Kostanjevi tanini v določenih časih inkubacije izboljšujejo izvencelične encimske aktivnosti ksilanaz, CMC-az, amilaz ter encimske aktivnosti proteaz bakterije *S. ruminantium*. Aktivnost je izboljšana v prisotnosti večjih koncentracij tanina.

- ▶ Celična aktivnost ksilanaz, CMC-az in amilaz bakterije *S. ruminantium* se močno zmanjša v prisotnosti kostanjevih taninov. Inhibicija se stopnjuje z večanjem koncentracije tanina.
- ▶ Večje koncentracije kostanjevih taninov pri bakteriji *S. bovis* izboljšujejo delovanje proteaz in celičnih amilaz. Določeno obdobje inkubacije je bila povečana tudi aktivnost celičnih CMC-az.
- ▶ Encimska aktivnost izvenceličnih ksilanaz in amilaz je zmanjšana pri bakteriji *S. bovis* v prisotnosti večjih koncentracij kostanjevega tanina. Inhibicija pri celičnih ksilanazah in izvenceličnih CMC-azah pa je manjša in se bistveno ne povečuje z večanjem koncentracije tanina.

Vpliv tanina na encimske aktivnosti se je z naraščanjem koncentracije tanina povečeval, vendar nesorazmerno. Pri večjih koncentracijah tanina v gojišču se je inhibicija (oz. povečana aktivnost) stopnjevala le do določene mere, nato se ni več spreminja. S tega vidika bi bilo smiselno natančneje opredeliti optimalno koncentracijo taninov.

Izmed treh preverjenih koncentracij tanina v gojišču sta v večini primerov pokazali statistično značilne vplive koncentraciji 0,25 g/l in 1,00 g/l. Vplivi so si bili med seboj primerljivi, kadar je tanin deloval inhibitorno. Pri encimskih aktivnostih, kjer je tanin izboljševal le to, pa je bil vpliv pri koncentraciji 1,00 g/l večji. Najbolj ustrezena koncentracija je 0,25 g/l, leto pa priporoča tudi proizvajalec.

Glede na cilje, ki jih poskušamo doseči z dodajanjem taninov v krmi živali, bi bilo potrebno nadaljevati raziskave s čistimi kulturami pomembnejših vampnih bakterij ter opredeliti vpliv na posamezne pomembne encimske sisteme in na podlagi tega določiti optimalno koncentracijo. Le-to bi bilo potrebno preveriti tudi na združbi vampnih mikroorganizmov.

## 6           POVZETEK

Tanini so naravni sekundarni polifenolni presnovki rastlin. Rastlinam služijo kot kemična obramba pred škodljivci in rastlinojedimi živalmi. Predvsem v večjih koncentracijah delujejo negativno na zdravje in prirast živali, ki sta bistvena za uspešno in ekonomično revo živali. Ko jih prežvekovalci zaužijejo, se v vampu vežejo na vampne encime in mikrobe, zato večinoma negativno vplivajo na njihovo rast in aktivnosti, s čemer pa je oškodovan tudi gostitelj.

Niso pa vsi vplivi tanina negativni. V manjših količinah je lahko učinek pozitiven (npr. preprečevanje naglega napenjanja predželodca). Pomemben je predvsem v rejah, kjer je ključna dobra oskrba živali z beljakovinami. Tanin kot krmni dodatek je eden izmed načinov, kako beljakovine krme zaščititi pred pretirano razgradnjo v predželodcih in s tem oskrbeti žival z dodatnim virom aminokislin. Ključna pri tem je vrsta in koncentracija tanina, saj mora učinkovito zaščititi beljakovine krme, obenem pa ne prizadeti ostalih procesov v vampu.

Naš cilj je bil preveriti vpliv različnih koncentracij kostanjevega tanina (pripravek Farmatan®) na rast in encimske aktivnosti dveh vrst vampnih mikroorganizmov: *Selenomonas ruminantium* in *Streptococcus bovis*. Izračunane specifične encimske aktivnosti in koncentracije beljakovin smo statistično analizirali in grafično prikazali.

Ugotovili smo, da se bakteriji *S. ruminantium* izboljša rast v prisotnosti tanina. Pri večjih dveh koncentracijah tanina smo opazili močno zmanjšanje specifično celično aktivnost ksilanaz, CMC-az in amilaz, kar verjetno kaže na to, da se tanini vežjo na površino mikrobnih celic in ovirajo prehajanje encimov v gojišče oz. v vampno vsebino *in vivo*. Zmanjšana je tudi izvencelična ksilanazna aktivnost, ki se kaže v kasnejšem in manjšem dosegu največje aktivnosti. V času najbolj aktivne rasti (16. ura inkubacije) pri večjih dveh koncentracijah tanina je večja izvencelična amilazna in celična proteazna aktivnost. Povečana encimska aktivnost v prisotnosti tanina je zabeležena pri izvencelični CMC-azni (ob koncu inkubacije) in proteazni aktivnosti (prve ure inkubacije).

Pri bakteriji *S. bovis* smo ugotovili manjši vpliv tanina na rast. Pri koncentraciji tanina 0,05 g/l ni vidnega vpliva na rast, pri koncentraciji 0,25 in 1,00 g/l pa je rast v primerjavi s

kontrolo, nekoliko povečana. Specifična izvencelična aktivnost ksilanaz, CMC-az in amilaz je zmanjšana. Proteazna izvencelična aktivnost se s prisotnostjo tanina izboljšuje, predvsem pri koncentraciji tanina 1,00 g/l. Specifična celična proteazna in amilazna aktivnost je ravno tako povečana, predvsem v prisotnosti večjih koncentracije tanina. Pri CMC-azah se vrednosti pri večjih dveh koncentracijah tanina nahajajo (5. in 10. uro inkubacije) nad vrednostmi negativne kontrole in koncentracijo 0,05 g/l. V celični frakciji je očitno zmanjšana le aktivnost ksilanaz. Vsi ti rezultati kažejo na to, da se tanini na to bakterijo slabo vežejo oz. jih bakterija tolerira ali razgrajuje.

Vpliv tanina se stopnjuje z večanjem koncentracije tanina, vendar nesorazmerno, ampak le do neke meje. Pri obeh bakterijah tanin povečuje ali zmanjšuje določeno encimsko aktivnost. Sklepamo, da je vpliv tanina odvisen od posamezne bakterije in od njihovih specifičnih encimskih sistemov.

Rezultati večinoma kažejo na to, da je vpliv kostanjevega tanina opazen pri koncentraciji 0,25 g/l, ki je tudi priporočena za praktično uporabo v prehrani živali.

Iz dobljenih rezultatov ne moremo neposredno sklepati na dogajanje v vampu, kjer je prisotna kompleksna združba mikroorganizmov. Potrebno bi bilo nadaljevati raziskave pomembnejših vampnih mikroorganizmov, ki bi nam dale bolj celovito sliko o vplivu tanina na vamno mikrobno združbo.

7           **VIRI**

- Bae H.D., McAlister T.A., Yanke J., Cheng K.J., Muir A.D. 1993. Effects of condensed tannins on endoglucanase activity and filter paper digestion by *Fibrobacter succinogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 2132-2138
- Barry T.N. 1976. The effectiveness of formaldehyde treatment in protecting dietary protein from rumen microbial degradation. *Proceedings of the Nutrition Society*, 21: 221-229
- Barry T.N., Allsop T.F., Redekopp C. 1986a. The role of condensed tanins in the nutritional value of *Lotus pedunculatus* for sheep. *British Journal of Nutrition*, 56: 607-614
- Barry T.N., Duncan S.J. 1984. The role of condensed tannins in the nutritional value of *Lotus pedunculatus* for sheep. 3. Rates of body and wool growth. *British Journal of Nutrition*, 51: 485-491
- Barry T.N., Manley T.R. 1984. The role of condensed tannins in the nutritional value of *Lotus pedunculatus* for sheep. 2. Quantitative digestion of carbohydrates and proteins. *British Journal of Nutrition*, 51: 493-504
- Barry T.N., Manley T.R., Duncan S.J. 1986b. The role of condensed tannins in the nutritional value of *Lotus pedunculatus* for sheep. 4. Sites of carbohydrate and protein digestion as influenced by dietary reactive tannin concentrate. *British Journal of Nutrition*, 55: 123-137
- Barry T.N., McNabb W.C. 1999. The implication of the condensed tannins on the nutritive value of temperate forage fed to ruminants. *British Journal of Nutrition*, 81: 263-272
- Bhat T.K., Singh B., Sharma O.P. 1998. Microbial degradation of tannins – A current perspective. *Biodegradation*, 9: 343-357
- Brooker J.D., O'Donovan L.A., Skene I., Clarke K., Blackall L., Muslera P. 1994. *Streptococcus caprinus* sp.nov., a tannin-resistant ruminal bacterium from feral goats. *Letters in Applied Microbiology*, 18: 313-318
- Bryant M.P. 1956. The characteristics of strains of *Selenomonas* isolated from bovine rumen contents. *Journal of Bacteriology*, 2: 162-167

- Bryant M.P. 1972. Commentary on the Hungate technique for culture of anaerobic bacteria. American Journal of Clinical Nutrition, 25: 1324-1328
- Butter L., Dawson J.M., Buttery P.J. 1999. Effects of dietary tannins on ruminants. V: Secondary Plant Products. Caygill J.C., Mueller-Harvey I. (eds.). Nottingham, Nottingham University Press: 51-70
- Caldwell D.R., Bryant M.P. 1966. Medium without rumen fluid for nonselective enumeration and isolation of rumen bacteria. Applied Microbiology, 5: 794-801
- Caygill J.C. 1999. Background and introduction. V: Secondary Plant Products. Caygill J.C., Mueller-Harvey I. (eds.). Nottingham, Nottingham University Press: 1-7
- Chesson A., Forsberg C.W. 1997. Polysaccharide degradation by rumen microorganism. V: The rumen microbial ecosystem. Hobson P.N., Stewart C.S. (eds.). London, Thomson Science: 329-382
- Chiquette J., Cheng K.J., Costerton J.W., Milligan L.P. 1998. Effect of tannins on the digestibility of two isosynthetic strains of birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus L.*) using in vitro and in sacco techniques. Canadian Journal of Animal Science, 68: 751-760
- Chung K.T., Lu Z., Chou M.W. 1998a. Mechanism of inhibition of tannic acid and related compounds on the growth of intestinal bacteria. Food and Chemical Toxicology, 36: 1053-1060
- Chung K.T., Wei C., Johnson M.K. 1998b. Are tannins a double-edge sword in biology and health? Food Science and Technology, 9: 168-175
- Chung K.T., Wong T.Y., Wei C.I., Huang Y.W., Lin Y. 1998c. Tannins and human health: a review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 38, 6: 421-464
- Cotta M.A. 1988. Amylolytic activity of selected species of ruminal bacteria. Applied and Environmental Microbiology; 3: 772-726
- Cotta M.A. 1990. Utilization of nucleic acids by *Selenomonas ruminantium* and other ruminal bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 12: 3867-3870
- Cotta M.A. 1992. Interaction of ruminal bacteria in the production and utilization of maltooligosaccharides from starch. Applied and Environmental Microbiology, 1: 48-54

- Cotta M.A. 1993. Utilization of xylooligosaccharides by selected ruminal bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 3557-3563
- Dehority B.A. 1991. Effects of microbial synergism on fibre digeston in the rumen. *Proceedings of the Nutrition Society*, 50: 149-159
- Farmatan. Naraven izvleček pridobljen iz zdravega kostanjevega lesa. Sevnica, Tanin Sevnica (neobjavljen)
- Goel G., Kumar-Puniya A., Singh K. 2005. Tannic acid resistance in ruminal streptococcal isolates. *Journal of Basic Microbiology*, 45, 3: 243-245
- Grundhofer P., Niemetz R., Schilling G., Cross G.G. 2001. Biosynthesis and subcellular distribution of hydrolysable tannins. *Phytochemistry*, 57: 915-927
- Hagerman A.E., Butler L.G. 1981. The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. *The Journal of Biological Chemistry*, 256, 9: 4494-4497
- Hespell R.B., Wolf R., Bothast R.J. 1987. Fermentation of xylans by *Butyrivibrio fibrisolvens* and other ruminal bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 53: 2849-2853
- Hobson P.N. 1969. Rumen bacteria. V: Methods in microbiology. Vol 3B. Norris J.R., Ribbons D.W. (eds.). New York, Academic Press: 133-149
- Hobson P.N. 1997. Introduction. V: The rumen microbial ecosystem. Hobson P.N., Stewart C.S. (eds.). London, Thomson Science: 1-9
- Jansman A.J.M. 1993. Tannins in feedstuffs for simple-stomached animals. *Nutrition Research Reviews*, 6: 209-236
- Jazbec I., Skušek F. 1990. Bolezni goved. Bolezni prebavil. 1. izdaja, Ljubljana, ČZP Kmečki glas: 148 str.
- Jones W.T., Mangan J.L. 1997. Complexes of the condensed tannins of sainfoin with fraction 1 leaf protein and with submaxillary mucoprotein, and their reversal by polyethylene glycol and pH. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 28: 126-136

- Jones G.A., McAllister T.A., Muir A.D., Cheng K.J. 1994. Effects of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) condensed tannins on growth and proteolysis by four strains of ruminal bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 4: 1374-1378
- Kopečny J., Wallace R.J. 1982. Cellular location and some properties of proteolytic enzymes of rumen bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 43: 1026-1033
- Krause D.O., Smith W.J.M., Brooker J.D., McSweeney C.S. 2005. Tolerance mechanisms of streptococci to hydrolysable and condensed tannins. *Animal Feed Science and Technology*, 121: 59-75
- Kumar R., Vaithianathan S. 1990. Occurrence, nutritional significance and effect on animal productivity of tannins in tree leaves. *Animal Feed Science and Technology*, 30: 21-38
- Lavrenčič A. 2001. Razgradljivost beljakovin v predželodcih prežekovalcev. V: 9. tradicionalno posvetovanje "Uporaba kostanjevega tanina v prehrani živali", Podčetrtek, 22 marec. 2001. Sevnica, Tanin: 39-47
- Lever M. 1977. Carbohydrate determination with 4-hydroxybenzoic acid hydrazide (PAHBAH): effect of bismuth on the reaction. *Analytical Biochemistry*, 81: 21-27
- Longstaff M.A., McNab J.M. 1991. The effect of concentration of tannin-rich bean hulls (*Vicia faba* L.) on activities of lipase (EC 3.1.1.3) and  $\alpha$ -amylase (EC 3.2.1.1) in digesta and pancreas and on the digestion of lipid and starch by young chicks. *British Journal of Nutrition*, 66: 139-147
- Lowry J.B., McSweeney C.S., Palmer B. 1996. Changing perceptions of the effect of plant phenolics on nutrient supply in the ruminant. *Australian Journal of Agricultural Research*, 47: 829-842
- Lowry O.H., Rosembrough A.L., Farr N.H., Randall R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-275
- Makkar H.P.S., Becker K. 1998. Adaptation of cattle to tannins: role of proline-rich proteins in oak-fed cattle. *Animal Science*, 67: 277-281

- Makkar H.P.S., Blummel M., Becker K. 1995. Formation of complex between polyvinyl pyrrolidones or polyethylene glycols and tannins, and their implication in gas production and true digestibility in in vitro techniques. British Journal of Nutrition, 73: 879-913
- Makkar H.P.S., Singh B., Dawra R.K. 1988. Effect of tannin-rich leaves of oak (*Quercus incana*) on various microbial enzyme activities of the bovine rumen. British Journal of Nutrition, 60: 287-296
- Mangan J.L. 1988. Nutritional effects of tannins in animal feeds. Nutrition Research Reviews, 1: 209-231
- Martin A.S., Akin D.E. 1988. Effect of phenolic monomers on the growth and  $\beta$ -galukosidase activity of *Bacteroides ruminicola* and on the carboxymethylcellulase,  $\beta$ -glukosidase, and xylanase activities of *Bacteroides succinogenes*. Applied and Environmental Microbiology, 54, 12: 3019-3022
- McDonald P., Edwards R.A., Greenhalgh J.F.D., Morgan C.A. 1995. Animal nutrition. 5 th ed.. Singapore, Longman Singapore Publishers (Pte) Ltd.: 607 str.
- McLead M.N. 1974. Plant tannins – their role in forage quality. Nutrition Abstracts Reviews, 11: 803-815
- McNabb W.C., Waghorn G.C., Barry T.N., Shelton I.D. 1993. The effect of condensed tannins in *Lotus pedunculatus* on the digestion and metabolism of methionine, cystine and inorganic sulphur in sheep. British Journal of Nutrition, 70: 647-661
- McSweeney J.L., Palmer B., McNeill D.M., Krause D. 2001. Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. Animal Feed Science and Technology, 91: 83-93
- Min B.R., Attwood G.T., McNabb W.C., Molan A.L., Barry T.N. 2005. The effect of condensed tannins from *Lotus corniculatus* on the proteolytic activities and growth of rumen bacteria. Animal Feed Science and Technology, 121: 45-58
- Mueller-Harvey I. 1999. Tannins: their natural and biological significance. V: Secondary Plant Products. Caygill J.C., Mueller-Harvey I. (eds.). Nottingham, Nottingham University Press: 17-39

- Murdiati T.B., McSweeney C.S., Lowry J.B. 1992. Metabolism in sheep of gallic acid, tannic acid and hydrolysable tannin from *Terminalia oblongata*. Australian Journal of Agricultural Research, 43: 1307-1319
- Naravni izvleček lesa pravega kostanja (*Castanea Sativa Mill.*) v prehrani prežvekovalcev.  
Sevnica, Tanin Sevnica (neobjavljen)
- Narita J., Nakahara S., Fukuda H., Kondo A. 2004. Efficient production of L-(+)-lactic acid from row starch by *Streptococcus bovis* 148. Journal of Bioscience and Bioengineering, 6: 423-425
- Nelson K.E., Pell A.N., Schofield P., Zinder S. 1995. Isolation and characterization of an anaerobic ruminal bacterium capable of degrading hydrolyzable tannins. Applied and Environmental Microbiology, 61, 9: 3293-3298
- Nelson K.E., Thonney M.L., Woolston T.K., Zinder S.H., Pell A.N. 1998. Phenotypic and phylogenetic characterization of ruminal tannin-tolerant bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 10: 3824-3830
- Niezen J.H., Waghorn T.S., Charleston W.A.G., Waghorn G.C. 1995. Growth and gastrointestinal nematode parasitism in lambs grazing either lucerna or sulla which contains condensed tannins. Journal of Agricultural Science, Cambridge, 125: 281-289
- Nock J.E. 1997. Bovine acidosis: implication on laminitis. Journal of Dairy Science, 5: 1005-1028
- O'Donovan L., Brooker J.D. 2001. Effect of hydrolysable and condensed tannins on growth, morphology and metabolism of *Streptococcus gallolyticus* (*S. caprinus*) and *Streptococcus bovis*. Microbiology, 147: 1025-1033
- Orešnik A. 1996. The effect of chestnut tannins of milk protein content in dairy cattle. Krmiva, 38, 1: 21-24
- Perez- Maldonado R.A., Norton B.W. 1996. The effects of condensed tannins from *Desmodium intortum* and *Calliandra calothyrsus* on protein and carbohydrate digestion in sheep and goats. British Journal of Nutrition, 76: 515-533

- Perez- Maldonado R.A., Norton B.W., Kerven G.L. 1995. Factors affecting in vitro formation tannin-protein complexes. *Journal of the Scientific and Food Agriculture*, 69: 291-298
- Petterson G., Porath J. 1966. A cellulolytic enzyme from *Penicillium notatum*. *Methods in Enzymology*, 8: 603-607
- Reed J.D. 1995. Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. *Journal of Animal Science*, 73: 1516-1528
- Russell J.B., Dombrowski D.B. 1980. Effect of pH on the efficiency of growth by pure cultures of rumen bacteria in continuous culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 3: 604-610
- Satoh E., Nimura Y., Kudo T., Komagata K. 1997. Purification, characterization, and nucleotide sequence of an intracellular maltotriose-producing  $\alpha$ -amilase form *Streptococcus bovis* 148. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 4941-4944
- Satoh E., Nimura Y., Uchimura T., Koaki M., Komagata K. 1993. Molecular cloning and Expression of two  $\alpha$ -amylase genes from *Streptococcus bovis* 148 in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 3669-3673
- Scheifinger C.C., Latham M.J., Wolin M.J. 1975. Relationship of lactate dehydrogenase specificity and growth rate to lactate metabolism by *Selenomonas ruminantium*. *Applied Microbiology*, 6: 916-921
- Singh B., Bhat T.K., Sharman O.P. 2001. Biodegradation of tannic acid in an in vitro ruminal sistem. *Livestock Production Science*, 68: 259-262
- Skene I.K., Brooker J.D. 1995. Characterizaton of tannin acylhydrolase activity in the ruminal bacterium *Selenomonas ruminantium*. *Anaerobe*, 1: 321-327
- Śliwiński B.J., Soliva C.R., Machmüller A., Kreuzer M. 2002. Efficacy of plant extracts rich in secondary constituents to modify rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology*, 101: 101-114
- Strobel H.J. 1993. Evidence for catabolite inhibition in regulation of pentose utilization and transport in the ruminal bacterium *Selenomonas ruminantium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 40-46

- Štruklec M. 2002. Izkušnje uporabe farmatana v prehrani domačih živali. V: 10. tradicionalno posvetovanje "Uporaba kostanjevega tanina v prehrani živali", Podčetrtek, 21. marec. 2002. Sevnica, Tanin: 1-5
- Ulyatt M.J. in Egan A.R. 1979. Quantitative digestion of fresh herbage by sheep. 5. The digestion of four herbages and prediction of sites of digestion. Journal of Agricultural Science, Cambridge, 92: 605-616
- Vincenzi E. 2001. Poročilo o kliničnem testiranju farmatana. V: 9. tradicionalno posvetovanje "Uporaba kostanjevega tanina v prehrani živali", Podčetrtek, 22. marec. 2001. Sevnica, Tanin: 34-35
- Zhu J., Filippich L.J. 1992. Tannic acid intoxication in sheep and mice. Research in Veterinary Science, 53: 280-292
- Žgajnar J. 1990. Prehrana in krmljenje govedi. Osnovne sestavine krme in telesa govedi. 2. izdaja. Ljubljana, ČZP Kmečki glas: 564 str.
- Waghorn G.C., McNabb W.C. 2003. Consequences of plant phenolic compounds for productivity and health of ruminants. Proceedings of the Nutrition Society, 62: 383-392
- Waghorn G.C., Shelton I.D., McNabb W.C., McCutcheon S.H. 1994. Effects of condensed tannins in *Lotus pedunculatus* on its nutritive value for sheep. 2. Nitrogenous aspects. Journal of Agricultural Science, Cambridge, 123: 109-119
- Waghorn G.C., Ulyatt M.J., Johns A., Fisher M.T. 1987. The efect of condensed tannins on the site of digestion of aminoacids and other nutrients in sheep fed *Lotus corniculatus*. British Journal of Nutrition, 57: 115-126
- Wallace R.J., Brammall M.L. 1985. The role of different species of bacteria in the hydrolysis of protein in the rumen. Journal of General Microbiology, 131: 8521-832
- Wallace R.J., Onodera R., Cotta M.A. 1997. Metabolism of nitrogen-containing compounds. V: The rumen microbial ecosystem. Hobson P.N., Stewart C.S. (eds.). London, Thomson Science: 283-329
- Wang Y., Douglas G.B., Waghorn G.C. Barry T.N., Foote A.G. 1996a. Effect of condensed tannins in *Lotus corniculatus* upon lactation performance in ewes. Journal of Agricultural Science, Cambridge, 126: 353-362

- Wang Y., Douglas G.B., Waghorn G.C., Barry T.N., Foote A.G., Purchas R.W. 1996b.  
Effect of condensed tannins upon the performance of lambs grazing *Lotus corniculatus*  
and lucerne. Journal of Agricultural Science, Cambridge, 126: 87-98
- Williams D.K., Martin S.A. 1990. Xylose uptake by the ruminal bacterium *Selenomonas  
ruminantium*. Applied and Environmental Microbiology, 6: 1683-1688
- Wolin M.J., Miller T.L., Stewart C.S. 1997. Microbe-microbe interactions. V: The rumen  
microbial ecosystem. Hobson P.N., Stewart C.S. (eds.). London, Thomson Science:  
467-492

## ZAHVALA

Iskrena hvala mentorici Romani Marinšek Logar za vso pomoč, zaupanje, potrpežljivost in nasvete ter vedno nasmejan obraz in obilico spodbudnih besed.

Hvala tudi doc. dr. Andreju Lavrenčiču za strokovno recenzijo dela in dr. Špeli Malovrh za statistično analizo rezultatov.

Zahvaljujem se tudi vsem na Katedri za mikrobiologijo in mikrobnou biotehnologijo, ki so mi kakor koli olajšali delo v laboratoriju. Hvala tako za vašo strokovno pomoč, kot za spodbudne in prijazne besede, povabilo na kavico ali sladoled, kratek pogovor, kopico smeha in še mnogo več.

Hvala Urši Oražem za lektoriranje diplome.

Največja zahvala pa gre mojim staršem, Majdi in Dragu Grm. S svojo ljubeznijo in odrekanjem sta mi omogočila študij. Hvala za spodbudo, podporo in pomoč tako v dobrih kot slabih trenutkih študentskega življenja. Hvala tudi bratu Mateju za vse nasvete, finančne prilive in neomejeno uporabo računalnika.

Franci, tebi hvala za vso spodbudo, pomoč in neštete nasmehe, ki so mi olajšali delo in polepšali ta čas.

Na koncu zahvala vsem, ki so do tega trenutka postali del mojega življenja. Brez vas nebi postala in doseгла to kar sem.

## PRILOGE

### Priloga A:

Vir variabilnosti in statistična značilnost vplivov pri spremeljanju rasti in encimskih aktivnostih bakterije *Selenomonas ruminantium*

Lastnost	Verjetnost ( $P < 0,05$ )		
	Ura inkubacije	Koncentracija tanina	Interakcija
Proteini – celice	<b>&lt;.0001</b>	<b>&lt;.0001</b>	<b>&lt;.0001</b>
Proteini – supernanant	<b>&lt;.0001</b>	0.6435	<b>0.0019</b>
Spec. akt. ksilanaze – celice	<b>&lt;.0001</b>	<b>&lt;.0001</b>	<b>&lt;.0001</b>
Spec. akt. ksilanaze – supernatant	<b>&lt;.0001</b>	<b>&lt;.0001</b>	<b>&lt;.0001</b>
Spec. akt. CMC-aze – celice	<b>&lt;.0001</b>	<b>&lt;.0001</b>	<b>&lt;.0001</b>
Spec. akt. CMC-aze – supernatant	<b>&lt;.0001</b>	<b>&lt;.0001</b>	<b>&lt;.0001</b>
Spec. akt. amilaze – celice	<b>&lt;.0001</b>	<b>&lt;.0001</b>	<b>&lt;.0001</b>
Spec. akt. amilaze – supernatant	<b>&lt;.0001</b>	<b>&lt;.0001</b>	<b>&lt;.0001</b>
Spec. akt. proteaze – celice	<b>&lt;.0001</b>	<b>&lt;.0001</b>	<b>&lt;.0001</b>
Spec. akt. proteaze – supernatant	<b>&lt;.0001</b>	<b>&lt;.0001</b>	<b>&lt;.0001</b>

Statistično značilne interakcije so v poudarjenem tekstu ( $P < 0,05$ ).

Priloga B1:

Vpliv kostanjevih taninov na rast bakterije *S. ruminantium*

Čas inkubacije (h)	Konc. tanina (g/l)	Srednje vrednosti	Koncentracija tanina (g/l)			
			0.00	0.05	0.25	1.00
5	0.00	0.070		-0.118	-0.373	-3.001
	0.05	0.188	1.0000		-0.255	-2.883
	0.25	0.444	0.9428	0.9998		-2.628
	1.00	3.071	<.0001	<.0001	<.0001	
10	0.00	0.081		-0.103	-0.572	-2.727
	0.05	0.184	1.0000		-0.470	-2.624
	0.25	0.653	0.2487	0.6453		-2.155
	1.00	2.808	<.0001	<.0001	<.0001	
13	0.00	0.218		-0.091	-0.428	-2.671
	0.05	0.309	1.0000		-0.337	-0.103
	0.25	0.646	0.8061	0.9822		-2.243
	1.00	2.889	<.0001	<.0001	<.0001	
16	0.00	0.155		-0.204	-0.678	-3.089
	0.05	0.359	1.0000		-0.474	-2.885
	0.25	0.833	0.0559	0.6256		-2.411
	1.00	3.244	<.0001	<.0001	<.0001	
20	0.00	0.192		-0.116	-0.718	-3.293
	0.05	0.308	1.0000		-0.602	-3.177
	0.25	0.910	<b>0.0287</b>	0.1701		-2.575
	1.00	3.485	<.0001	<.0001	<.0001	
32	0.00	0.040		-0.178	-0.702	-2.928
	0.05	0.217	1.0000		-0.525	-2.751
	0.25	0.742	<b>0.0375</b>	0.4145		-2.226
	1.00	2.968	<.0001	<.0001	<.0001	
48	0.00	0.144		-0.046	-0.362	-3.368
	0.05	0.191	1.0000		-0.316	-3.321
	0.25	0.507	0.9585	0.9926		-3.005
	1.00	3.512	<.0001	<.0001	<.0001	

Statistično značilne razlike so v poudarjenem tekstu ( $P < 0,05$ ).

SEM = standardna napaka srednje vrednosti (= 0,122).

SED = standardna napaka razlike (= 0,345).

Verjetnosti → pod diagonalo, razlike med različnimi koncentracijami tanina → nad diagonalo.

Priloga B2:

Vpliv kostanjevih taninov na koncentracijo beljakovin v supernatantu bakterijske kulture *S. ruminantium*

Čas inkubacije (h)	Konc. tanina (g/l)	Srednje vrednosti	Koncentracija tanina (g/l)			
			0.00	0.05	0.25	1.00
5	0.00	7.593		0.012	0.285	0.054
	0.05	7.581	1.0000		0.273	0.042
	0.25	7.308	0.9198	0.9482		-0.231
	1.00	7.539	1.0000	1.0000	0.9935	
10	0.00	7.482		-0.227	-0.170	-0.245
	0.05	7.709	0.9950		0.057	-0.018
	0.25	7.652	1.0000	1.0000		-0.075
	1.00	7.727	0.9856	1.0000	1.0000	
13	0.00	7.780		-0.177	-0.145	-0.278
	0.05	7.957	0.9999		0.032	-0.227
	0.25	7.925	1.0000	1.0000		-0.133
	1.00	8.058	0.9374	1.0000	1.0000	
16	0.00	7.308		0.125	0.025	0.092
	0.05	7.183	1.0000		-0.100	-0.033
	0.25	7.283	1.0000	1.0000		0.067
	1.00	7.216	1.0000	1.0000	1.0000	
20	0.00	7.489		-0.128	0.330	-0.205
	0.05	7.617	1.0000		0.458	-0.077
	0.25	7.159	0.7369	0.1329		-0.535
	1.00	7.694	0.9990	1.0000	<b>0.0256</b>	
32	0.00	7.381		0.034	-0.347	0.056
	0.05	7.347	1.0000		-0.381	0.022
	0.25	7.728	0.6436	0.4489		0.403
	1.00	7.325	1.0000	1.0000	0.3344	
48	0.00	7.464		-0.019	-0.014	0.218
	0.05	7.483	1.0000		0.005	0.237
	0.25	7.478	1.0000	1.0000		0.232
	1.00	7.246	0.9973	0.9907	0.9931	

Statistično značilne razlike so v poudarjenem tekstu ( $P < 0,05$ ).

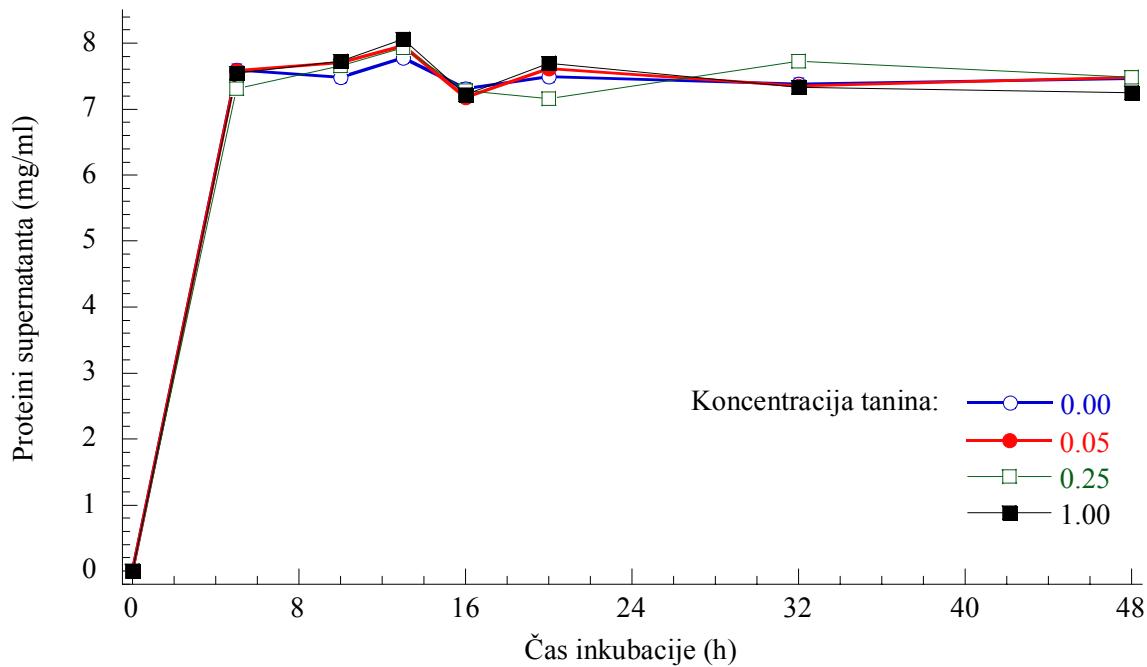
SEM = standardna napaka ocene srednje vrednosti ( $= 0,090$ ).

SED = standardna napaka ocene razlike ( $= 0,255$ ).

Verjetnosti → pod diagonalo, razlike med različnimi koncentracijami tanina → nad diagonalo.

Priloga B3:

Koncentracija beljakovin v supernatantu bakterijske kulture *S. ruminantium* pri treh različnih koncentracijah kostanjevega tanina (0,05 g/l, 0,25 g/l in 1,00 g/l) in kontrolni kulturi brez dodanega tanina



Priloga C:

Vpliv kostanjevih taninov na celično ksilanolitično aktivnost bakterije *S. ruminantium*

Čas inkubacije (h)	Konc. tanina (g/l)	Srednje vrednosti	Koncentracija tanina (g/l)			
			0.00	0.05	0.25	1.00
5	0.00	211.08		24.92	179.77	200.99
	0.05	186.16	0.3943		154.85	176.07
	0.25	31.31	<.0001	<.0001		21.22
	1.00	10.09	<.0001	<.0001	0.7206	
10	0.00	147.62		96.85	115.78	134.89
	0.05	50.77	<.0001		18.93	38.04
	0.25	31.84	<.0001	0.8823		19.11
	1.00	12.74	<.0001	0.0054	0.8724	
13	0.00	102.20		72.10	83.59	99.59
	0.05	30.10	<.0001		11.49	96.85
	0.25	18.61	<.0001	0.9999		16.00
	1.00	2.61	<.0001	0.2141	0.9803	
16	0.00	92.01		67.62	75.31	86.09
	0.05	24.39	<.0001		7.68	18.47
	0.25	16.70	<.0001	1.0000		10.79
	1.00	5.92	<.0001	0.9057	1.0000	
20	0.00	76.71		46.44	56.11	74.72
	0.05	30.27	0.0001		9.67	28.28
	0.25	20.60	<.0001	1.0000		18.61
	1.00	1.99	<.0001	0.1726	0.8991	
32	0.00	70.05		50.95	66.52	69.83
	0.05	19.10	<.0001		15.57	18.88
	0.25	3.53	<.0001	0.9861		3.31
	1.00	0.22	<.0001	0.8850	1.0000	
48	0.00	106.08		54.79	100.61	103.31
	0.05	51.29	<.0001		45.82	48.53
	0.25	5.47	<.0001	0.0002		2.71
	1.00	2.76	<.0001	<.0001	1.0000	

Statistično značilne razlike so v poudarjenem tekstu ( $P < 0,05$ ).

SEM = standardna napaka ocene srednje vrednosti (= 5,75).

SED = standardna napaka ocene razlike (= 16,22).

Verjetnosti → pod diagonalo, razlike med različnimi koncentracijami tanina → nad diagonalo.

Priloga D:

Vpliv kostanjevih taninov na izvencelično ksilanolitično aktivnost bakterije *S.*

*ruminantium*

Čas inkubacije (h)	Konc. tanina (g/l)	Srednje vrednosti	Koncentracija tanina (g/l)			
			0.00	0.05	0.25	1.00
5	0.00	22.43		0.99	22.43	22.43
	0.05	21.44	1.0000		21.44	21.44
	0.25	0.00	<.0001	<.0001		0.00
	1.00	0.00	<.0001	<.0001	1.0000	
10	0.00	13.66		4.46	7.04	4.38
	0.05	9.20	<b>0.0086</b>		2.58	-0.08
	0.25	6.62	<.0001	0.7089		-2.66
	1.00	9.28	<b>0.0111</b>	1.0000	0.6528	
13	0.00	6.99		3.05	-3.02	-1.38
	0.05	3.94	0.3668		-6.07	4.46
	0.25	10.00	0.3899	<.0001		1.64
	1.00	8.37	0.9999	<b>0.0095</b>	0.9981	
16	0.00	6.56		1.75	-4.71	-11.54
	0.05	4.80	0.9947		-6.46	-13.29
	0.25	11.27	<b>0.0036</b>	<.0001		-6.83
	1.00	18.10	<.0001	<.0001	<.0001	
20	0.00	5.87		0.30	-4.94	-2.22
	0.05	5.57	1.0000		-5.23	-2.51
	0.25	10.80	<b>0.0016</b>	<b>0.0006</b>		2.72
	1.00	8.09	0.9112	0.7554	0.6066	
32	0.00	3.13		-0.87	-4.11	-7.53
	0.05	4.00	1.0000		-3.24	-6.66
	0.25	7.24	<b>0.0262</b>	0.2552		-3.42
	1.00	10.66	<.0001	<.0001	0.1709	
48	0.00	11.29		1.96	5.12	7.28
	0.05	9.33	0.9765		3.17	5.32
	0.25	6.17	<b>0.0008</b>	0.2951		2.15
	1.00	4.02	<.0001	<b>0.0004</b>	0.9338	

Statistično značilne razlike so v poudarjenem tekstu ( $P < 0,05$ ).

SEM = standardna napaka ocene srednje vrednosti (= 0,69).

SED = standardna napaka ocene razlike (= 1,96).

Verjetnosti → pod diagonalo, razlike med različnimi koncentracijami tanina → nad diagonalo.

Priloga E:

Vpliv kostanjevih taninov na celično CMC-azno aktivnost bakterije *S. ruminantium*

Čas inkubacije (h)	Konc. tanina (g/l)	Srednje vrednosti	Koncentracija tanina (g/l)			
			0.00	0.05	0.25	1.00
5	0.00	1.98		1.58	1.44	1.45
	0.05	0.40	0.0920		-0.14	-0.12
	0.25	0.55	0.2059	1.0000		0.02
	1.00	0.53	0.1865	1.0000	1.0000	
10	0.00	7.07		5.22	6.73	6.90
	0.05	1.85	<.0001		1.51	1.68
	0.25	0.33	<.0001	0.1351		0.17
	1.00	0.16	<.0001	0.0469	1.0000	
13	0.00	1.54		-0.27	1.09	1.26
	0.05	1.81	1.0000		1.37	5.22
	0.25	0.45	0.7374	0.2904		0.17
	1.00	0.28	0.4551	0.1221	1.0000	
16	0.00	2.56		1.39	2.18	2.14
	0.05	1.17	0.2645		0.79	0.75
	0.25	0.38	0.0011	0.9899		-0.03
	1.00	0.42	0.0014	0.9946	1.0000	
20	0.00	11.70		9.53	10.49	11.21
	0.05	2.17	<.0001		0.96	1.68
	0.25	1.21	<.0001	0.9035		0.72
	1.00	0.49	<.0001	0.0467	0.9972	
32	0.00	16.27		13.02	15.16	16.14
	0.05	3.24	<.0001		2.13	3.12
	0.25	1.11	<.0001	0.0015		0.99
	1.00	0.12	<.0001	<.0001	0.8788	
48	0.00	0.00		0.00	0.00	0.00
	0.05	0.00	1.0000		0.00	0.00
	0.25	0.00	1.0000	1.0000		0.00
	1.00	0.00	1.0000	1.0000	1.0000	

Statistično značilne razlike so v poudarjenem tekstu ( $P < 0,05$ ).

SEM = standardna napaka ocene srednje vrednosti (= 0,30).

SED = standardna napaka ocene razlike (= 0,84).

Verjetnosti → pod diagonalo, razlike med različnimi koncentracijami tanina → nad diagonalo.

Priloga F:

Vpliv kostanjevih taninov na izvencelično CMC-azno aktivnost bakterije *S. ruminantium*

Čas inkubacije (h)	Konc. tanina (g/l)	Srednje vrednosti	Koncentracija tanina (g/l)			
			0.00	0.05	0.25	1.00
5	0.00	0.175		-0.243	-0.223	-0.490
	0.05	0.417	0.9515		0.020	-0.247
	0.25	0.397	0.9823	1.0000		-0.267
	1.00	0.665	<b>0.0188</b>	0.9408	0.8761	
10	0.00	0.714		0.450	0.339	-0.337
	0.05	0.264	0.0528		-0.111	-0.787
	0.25	0.375	0.4609	1.0000		-0.676
	1.00	1.052	0.4692	<b>&lt;.0001</b>	<b>&lt;.0001</b>	
13	0.00	0.772		-0.257	0.182	-0.249
	0.05	1.029	0.9127		0.439	0.450
	0.25	0.590	0.9991	0.0688		-0.431
	1.00	1.021	0.9367	1.0000	0.0834	
16	0.00	1.402		0.165	-0.209	0.187
	0.05	1.238	0.9998		-0.374	0.022
	0.25	1.612	0.9922	0.2661		0.396
	1.00	1.216	0.9986	1.0000	0.1747	
20	0.00	1.099		0.145	-0.293	-0.530
	0.05	0.954	1.0000		-0.438	-0.675
	0.25	1.393	0.7475	0.0697		-0.237
	1.00	1.629	<b>0.0061</b>	<.0001	0.9629	
32	0.00	1.469		-0.770	-1.855	-3.060
	0.05	2.238	<b>&lt;.0001</b>		-1.085	-2.290
	0.25	3.323	<b>&lt;.0001</b>	<b>&lt;.0001</b>		-1.205
	1.00	4.528	<b>&lt;.0001</b>	<b>&lt;.0001</b>	<b>&lt;.0001</b>	
48	0.00	0.382		-0.233	-0.680	-0.575
	0.05	0.615	0.9694		-0.447	-0.342
	0.25	1.062	<b>&lt;.0001</b>	0.0568		0.104
	1.00	0.957	<b>0.0016</b>	0.4380	1.0000	

Statistično značilne razlike so v poudarjenem tekstu ( $P < 0,05$ ).

SEM = standardna napaka ocene srednje vrednosti (= 0,081)

SED = standardna napaka ocene razlike (= 0,228).

Verjetnosti → pod diagonalo, razlike med različnimi koncentracijami tanina → nad diagonalo.

Priloga G:

Vpliv kostanjevih taninov na celično amilazno aktivnost bakterije *S. ruminantium*

Čas inkubacije (h)	Konc. tanina (g/l)	Srednje vrednosti	Koncentracija tanina (g/l)			
			0.00	0.05	0.25	1.00
5	0.00	44.53		36.37	43.59	42.61
	0.05	8.16	<.0001		7.22	6.25
	0.25	0.94	<.0001	<.0001		-0.98
	1.00	1.92	<.0001	<.0001	1.0000	
10	0.00	13.37		3.86	10.83	10.13
	0.05	9.52	0.0009		6.97	6.28
	0.25	2.54	<.0001	<.0001		-0.70
	1.00	3.24	<.0001	<.0001	1.0000	
13	0.00	13.76		6.56	10.79	10.05
	0.05	7.20	<.0001		4.23	3.86
	0.25	2.97	<.0001	0.0001		-0.74
	1.00	3.71	<.0001	0.0050	1.0000	
16	0.00	13.28		10.55	8.62	10.66
	0.05	2.73	<.0001		-1.93	0.11
	0.25	4.66	<.0001	0.7289		2.04
	1.00	2.62	<.0001	1.0000	0.6219	
20	0.00	10.20		1.00	7.62	7.65
	0.05	9.21	1.0000		6.62	6.65
	0.25	2.58	<.0001	<.0001		0.03
	1.00	2.55	<.0001	<.0001	1.0000	
32	0.00	5.19		3.59	4.53	3.64
	0.05	1.60	0.0032		0.94	0.05
	0.25	0.66	<.0001	1.0000		-0.88
	1.00	1.55	0.0025	1.0000	1.0000	
48	0.00	0.00		0.00	0.00	0.00
	0.05	0.00	1.0000		0.00	0.00
	0.25	0.00	1.0000	1.0000		0.00
	1.00	0.00	1.0000	1.0000	1.0000	

Statistično značilne razlike so v poudarjenem tekstu ( $P < 0,05$ ).

SEM = standardna napaka ocene srednje vrednosti (= 0,53)

SED = standardna napaka ocene razlike (= 1,48).

Verjetnosti → pod diagonalo, razlike med različnimi koncentracijami tanina → nad diagonalo.

Priloga H:

Vpliv kostanjevih taninov na izvencelično amilazno aktivnost bakterije *S. ruminantium*

Čas inkubacije (h)	Konc. tanina (g/l)	Srednje vrednosti	Koncentracija tanina (g/l)			
			0.00	0.05	0.25	1.00
5	0.00	1.022		0.416	0.377	0.783
	0.05	0.606	0.0707		-0.039	0.367
	0.25	0.646	0.1736	1.0000		0.406
	1.00	0.240	<.0001	0.2119	0.0896	
10	0.00	0.938		0.198	-0.024	0.133
	0.05	0.740	0.9926		-0.222	-0.065
	0.25	0.962	1.0000	0.9687		0.157
	1.00	0.805	1.0000	1.0000	0.9998	
13	0.00	0.972		0.401	-0.427	-0.788
	0.05	0.571	0.1006		-0.828	0.198
	0.25	1.399	0.0532	<.0001		-0.361
	1.00	1.760	<.0001	<.0001	0.2382	
16	0.00	2.196		0.260	-0.775	-0.895
	0.05	1.936	0.8474		-1.035	-1.155
	0.25	2.971	<.0001	<.0001		-0.120
	1.00	3.092	<.0001	<.0001	1.0000	
20	0.00	0.799		0.193	-1.427	-0.320
	0.05	0.606	0.9948		-1.620	-0.513
	0.25	2.226	<.0001	<.0001		1.107
	1.00	1.119	0.4697	0.0045	<.0001	
32	0.00	0.258		-0.089	-0.444	-0.573
	0.05	0.347	1.0000		-0.355	-0.484
	0.25	0.702	0.0337	0.2644		-0.128
	1.00	0.831	0.0007	0.0109	1.0000	
48	0.00	0.554		0.327	0.354	0.406
	0.05	0.227	0.4270		0.027	0.079
	0.25	0.199	0.2700	1.0000		0.052
	1.00	0.147	0.0888	1.0000	1.0000	

Statistično značilne razlike so v poudarjenem tekstu ( $P < 0,05$ ).

SEM = standardna napaka ocene srednje vrednosti (= 0,077).

SED = standardna napaka ocene razlike (= 0,216).

Verjetnosti → pod diagonalo, razlike med različnimi koncentracijami tanina → nad diagonalo.

Priloga I:

Vpliv kostanjevih taninov na celično proteolitično aktivnost bakterije *S. ruminantium*

Čas inkubacije (h)	Konc. tanina (g/l)	Srednje vrednosti	Koncentracija tanina (g/l)			
			0.00	0.05	0.25	1.00
5	0.00	35.56		-130.03	35.56	-6.68
	0.05	165.60	0.9992		165.60	123.35
	0.25	0.00	1.0000	0.9727		-42.25
	1.00	42.25	1.0000	0.9997	1.0000	
10	0.00	290.23		-234.31	114.79	62.36
	0.05	524.54	0.5404		349.10	296.67
	0.25	175.44	0.9999	<b>0.0208</b>		-52.43
	1.00	227.88	1.0000	0.1231	1.0000	
13	0.00	213.34		-37.25	-14.25	-69.80
	0.05	250.59	1.0000		23.01	-234.31
	0.25	227.59	1.0000	1.0000		-55.55
	1.00	283.14	1.0000	1.0000	1.0000	
16	0.00	257.05		13.01	-431.22	-813.79
	0.05	244.04	1.0000		-444.23	-826.80
	0.25	688.27	<b>0.0007</b>	<b>0.0004</b>		-382.57
	1.00	1070.84	<b>&lt;.0001</b>	<b>&lt;.0001</b>	<b>0.0056</b>	
20	0.00	250.95		11.34	-140.57	23.76
	0.05	239.61	1.0000		-151.90	12.42
	0.25	391.52	0.9971	0.9910		164.33
	1.00	227.19	1.0000	1.0000	0.9751	
32	0.00	87.60		29.02	72.45	4.37
	0.05	58.57	1.0000		43.43	-24.66
	0.25	15.15	1.0000	1.0000		-68.08
	1.00	83.23	1.0000	1.0000	1.0000	
48	0.00	166.57		-480.61	-249.16	-563.80
	0.05	647.18	<b>&lt;.0001</b>		231.45	-83.19
	0.25	415.73	0.4107	0.5662		-314.64
	1.00	730.37	<b>&lt;.0001</b>	1.0000	0.0700	

Statistično značilne razlike so v poudarjenem tekstu ( $P < 0,05$ ).

SEM = standardna napaka ocene srednje vrednosti (= 58,0).

SED = standardna napaka ocene razlike (= 163,5).

Verjetnosti → pod diagonalo, razlike med različnimi koncentracijami tanina → nad diagonalo.

Priloga J:

Vpliv kostanjevih taninov na izvencelično proteolitično aktivnost bakterije *S. ruminantium*

Čas inkubacije (h)	Konc. tanina (g/l)	Srednje vrednosti	Koncentracija tanina (g/l)			
			0.00	0.05	0.25	1.00
5	0.00	5.51		0.46	-4.71	-3.63
	0.05	5.06	1.0000		-5.17	-4.08
	0.25	10.23	<.0001	<.0001		1.09
	1.00	9.14	0.0024	0.0003	0.9998	
10	0.00	6.45		-3.68	-16.16	-16.89
	0.05	10.13	0.0018		-12.48	-13.21
	0.25	22.61	<.0001	<.0001		-0.73
	1.00	23.34	<.0001	<.0001	1.0000	
13	0.00	9.82		1.47	1.14	-1.45
	0.05	8.35	0.9758		-0.34	-3.68
	0.25	8.68	0.9995	1.0000		-2.59
	1.00	11.27	0.9801	0.0488	0.1584	
16	0.00	14.05		4.60	7.22	5.33
	0.05	9.45	<.0001		2.62	0.73
	0.25	6.82	<.0001	0.1421		-1.89
	1.00	8.72	<.0001	1.0000	0.7467	
20	0.00	10.80		5.16	5.63	7.58
	0.05	5.63	<.0001		0.46	2.42
	0.25	5.17	<.0001	1.0000		1.95
	1.00	3.22	<.0001	0.2642	0.6939	
32	0.00	2.98		-2.76	0.32	1.58
	0.05	5.74	0.0891		3.08	4.34
	0.25	2.66	1.0000	0.0265		1.26
	1.00	1.40	0.9475	<.0001	0.9972	
48	0.00	2.57		1.59	2.57	2.57
	0.05	0.98	0.9427		0.98	0.98
	0.25	0.00	0.1675	1.0000		0.00
	1.00	0.00	0.1675	1.0000	1.0000	

Statistično značilne razlike so v poudarjenem tekstu ( $P < 0,05$ ).

SEM = standardna napaka ocene srednje vrednosti (= 50,52).

SED = standardna napaka ocene razlike (= 1,47).

Verjetnosti → pod diagonalo, razlike med različnimi koncentracijami tanina → nad diagonalo.

Priloga K:

Vir variabilnosti in statistična značilnost vplivov pri spremeljanju rasti in encimskih aktivnostih bakterije *Streptococcus. bovis*

Lastnost	P-vrednost		
	Ura inkubacije	Koncentracija tanina	Interakcija
Proteini – celice	<.0001	<.0001	<.0001
Proteini – supernantan	<.0001	<.0001	<.0001
Spec. akt. ksilanaze – celice	<.0001	<.0001	<.0001
Spec. akt. ksilanaze – supernatant	<.0001	<.0001	<.0001
Spec. akt. CMC-aze – celice	<.0001	0.0724	<.0001
Spec. akt. CMC-aze – supernatant	<.0001	<.0001	0.0051
Spec. akt. amilaze – celice	<.0001	<.0001	<.0001
Spec. akt. amilaze – supernatant	<.0001	<.0001	<.0001
Spec. akt. proteaze – celice	<.0001	<.0001	<.0001
Spec. akt. proteaze – supernatant	<.0001	<.0001	<.0001

Statistično značilne interakcije so v poudarjenem tekstu ( $P < 0,05$ ).

Priloga L1:

Vpliv kostanjevih taninov na rast bakterije *S. bovis*

Čas inkubacije (h)	Konc. tanina (g/l)	Srednje vrednosti	Koncentracija tanina (g/l)			
			0.00	0.05	0.25	1.00
5	0.00	1.5487		-0.212	-0.493	-1.809
	0.05	1.7607	0.1604		-0.281	-1.597
	0.25	2.0417	<.0001	0.0059		-1.316
	1.00	3.3577	<.0001	<.0001	<.0001	
10	0.00	2.7693		-0.105	-0.608	-2.087
	0.05	2.8740	0.9966		-0.503	-1.983
	0.25	3.3773	<.0001	<.0001		-1.479
	1.00	4.8567	<.0001	<.0001	<.0001	
13	0.00	3.9933		-0.087	-0.227	-1.825
	0.05	4.0800	0.9999		-0.141	-0.105
	0.25	4.2207	0.0857	0.8821		-1.597
	1.00	5.8180	<.0001	<.0001	<.0001	
16	0.00	3.1060		-0.022	-0.599	-1.468
	0.05	3.1280	1.0000		-0.577	-1.446
	0.25	3.7053	<.0001	<.0001		-0.869
	1.00	4.5740	<.0001	<.0001	<.0001	
20	0.00	1.6367		-0.752	-0.972	-2.295
	0.05	2.3887	<.0001		-0.220	-1.543
	0.25	2.6087	<.0001	0.1167		-1.323
	1.00	3.9320	<.0001	<.0001	<.0001	
32	0.00	2.7033		-0.125	-0.046	-0.817
	0.05	2.8280	0.9651		0.079	-0.692
	0.25	2.7493	1.0000	1.0000		-0.771
	1.00	3.5200	<.0001	<.0001	<.0001	
48	0.00	2.8060		-0.197	-0.653	-1.347
	0.05	3.0027	0.2774		-0.456	-1.150
	0.25	3.4587	<.0001	<.0001		-0.694
	1.00	4.1530	<.0001	<.0001	<.0001	

Statistično značilne razlike so v poudarjenem tekstu ( $P < 0,05$ ).

SEM = standardna napaka ocene srednje vrednosti (= 0,043).

SED = standardna napaka ocene razlike (= 0,121).

Verjetnosti → pod diagonalo, razlike med različnimi koncentracijami tanina → nad diagonalo.

Priloga L2:

Vpliv kostanjevih taninov na koncentracijo beljakovin v supernatantu bakterijske kulture *S. bovis*

Čas inkubacije (h)	Konc. tanina (g/l)	Srednje vrednosti	Koncentracija tanina (g/l)			
			0.00	0.05	0.25	1.00
5	0.00	7.285		-0.241	0.045	-0.596
	0.05	7.526	0.9989		0.286	-0.355
	0.25	7.240	1.0000	0.9863		-0.641
	1.00	7.881	<b>0.0468</b>	0.8608	0.0192	
10	0.00	9.484		0.312	0.918	0.820
	0.05	9.172	0.9601		0.606	0.508
	0.25	8.566	<b>&lt;0.0001</b>	<b>0.0389</b>		-0.098
	1.00	8.664	<b>0.0003</b>	0.2076	1.0000	
13	0.00	8.186		-0.576	0.178	0.478
	0.05	8.762	0.0677		0.754	0.312
	0.25	8.008	1.0000	<b>0.0016</b>		0.300
	1.00	7.708	0.3111	<b>&lt;0.0001</b>	0.9750	
16	0.00	7.340		-0.106	-0.184	-0.534
	0.05	7.446	1.0000		-0.078	-0.428
	0.25	7.524	1.0000	1.0000		-0.350
	1.00	7.874	0.1388	0.5383	0.8767	
20	0.00	6.201		-0.181	-0.430	0.070
	0.05	6.382	1.0000		-0.249	0.251
	0.25	6.631	0.5284	0.9982		0.500
	1.00	6.131	1.0000	0.9979	0.2317	
32	0.00	6.843		0.055	0.585	0.365
	0.05	6.788	1.0000		0.530	0.310
	0.25	6.258	0.0574	0.1479		-0.220
	1.00	6.478	0.8259	0.9633	0.9998	
48	0.00	7.411		-0.081	0.132	-0.109
	0.05	7.492	1.0000		0.213	-0.028
	0.25	7.279	1.0000	0.9999		-0.241
	1.00	7.520	1.0000	1.0000	0.9989	

Statistično značilne razlike so v poudarjenem tekstu ( $P < 0,05$ ).

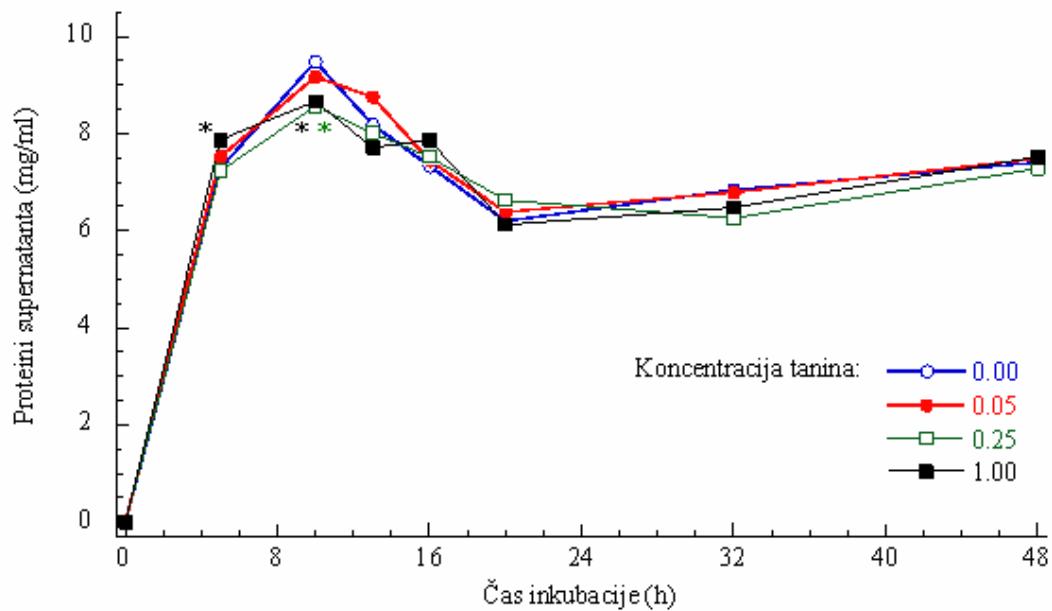
SEM = standardna napaka ocene srednje vrednosti (= 0,106).

SED = standardna napaka ocene razlike (= 0,298).

Verjetnosti → pod diagonalo, razlike med različnimi koncentracijami tanina → nad diagonalo.

Priloga L3:

Koncentracija beljakovin v supernatantu bakterijske kulture *S. bovis* pri treh različnih koncentracijah kostanjevega tanina (0,05 g/l, 0,25 g/l in 1,00 g/l) in kontrolni kulturi brez dodanega tanina



Priloga M:

Vpliv kostanjevih taninov na celično ksilanolitično aktivnost bakterije *S. bovis*

Čas inkubacije (h)	Konc. tanina (g/l)	Srednje vrednosti	Koncentracija tanina (g/l)			
			0.00	0.05	0.25	1.00
5	0.00	22.16		4.80	10.43	14.16
	0.05	17.36	<b>0.0096</b>		5.63	9.36
	0.25	11.73	<.0001	<b>0.0006</b>		3.73
	1.00	8.00	<.0001	<.0001	0.1614	
10	0.00	47.75		4.66	10.15	8.84
	0.05	43.09	<b>0.0146</b>		5.49	4.18
	0.25	37.60	<.0001	<b>0.0010</b>		-1.31
	1.00	38.91	<.0001	0.0549	1.0000	
13	0.00	33.89		3.25	4.02	-1.60
	0.05	30.64	0.4023		0.77	4.66
	0.25	29.87	0.0827	1.0000		-5.62
	1.00	35.49	0.9997	<b>0.0081</b>	<b>0.0007</b>	
16	0.00	44.54		4.41	10.13	3.98
	0.05	40.13	<b>0.0295</b>		5.72	-0.43
	0.25	34.41	<.0001	<b>0.0005</b>		-6.15
	1.00	40.56	<b>0.0908</b>	<b>1.0000</b>	<b>0.0001</b>	
20	0.00	71.66		17.05	12.78	20.19
	0.05	54.61	<.0001		-4.27	3.14
	0.25	58.88	<.0001	<b>0.0438</b>		7.41
	1.00	51.47	<.0001	0.4719	<.0001	
32	0.00	7.63		-0.49	-1.03	-0.72
	0.05	8.12	1.0000		-0.54	-0.24
	0.25	8.66	1.0000	1.0000		0.30
	1.00	8.35	1.0000	1.0000	1.0000	
48	0.00	5.24		0.56	0.47	-0.70
	0.05	4.67	1.0000		-0.09	-1.27
	0.25	4.77	1.0000	1.0000		-1.17
	1.00	5.94	1.0000	1.0000	1.0000	

Statistično značilne razlike so v poudarjenem tekstu ( $P < 0,05$ ).

SEM = standardna napaka ocene srednje vrednosti (= 0,75).

SED = standardna napaka ocene razlike (= 2,12).

Verjetnosti → pod diagonalo, razlike med različnimi koncentracijami tanina → nad diagonalo.

Priloga N:

Vpliv kostanjevih taninov na izvencelično ksilanolitično aktivnost bakterije *S. bovis*

Čas inkubacije (h)	Konc. tanina (g/l)	Srednje vrednosti	Koncentracija tanina (g/l)			
			0.00	0.05	0.25	1.00
5	0.00	0.94		0.26	-0.83	-0.27
	0.05	0.67	1.0000		-1.09	-0.53
	0.25	1.77	0.9714	0.6783		0.56
	1.00	1.21	1.0000	1.0000	0.9999	
10	0.00	7.31		-1.10	1.16	2.45
	0.05	8.41	0.6646		2.26	3.55
	0.25	6.15	0.5557	<b>0.0003</b>		1.29
	1.00	4.87	<b>&lt;.0001</b>	<b>&lt;.0001</b>	0.3385	
13	0.00	13.18		2.40	6.37	7.66
	0.05	10.78	<b>&lt;.0001</b>		3.97	-1.10
	0.25	6.80	<b>&lt;.0001</b>	<b>&lt;.0001</b>		1.28
	1.00	5.52	<b>&lt;.0001</b>	<b>&lt;.0001</b>	0.3450	
16	0.00	10.30		1.91	6.27	7.38
	0.05	8.40	<b>0.0057</b>		4.36	5.47
	0.25	4.03	<b>&lt;.0001</b>	<b>&lt;.0001</b>		1.11
	1.00	2.92	<b>&lt;.0001</b>	<b>&lt;.0001</b>	0.6463	
20	0.00	9.23		1.43	5.32	7.02
	0.05	7.80	0.1653		3.89	5.59
	0.25	3.91	<b>&lt;.0001</b>	<b>&lt;.0001</b>		1.70
	1.00	2.21	<b>&lt;.0001</b>	<b>&lt;.0001</b>	<b>0.0288</b>	
32	0.00	2.09		0.15	0.75	1.46
	0.05	1.94	1.0000		0.60	1.31
	0.25	1.34	0.9925	0.9998		0.71
	1.00	0.64	0.1407	0.3113	0.9965	
48	0.00	1.79		-0.15	0.71	1.25
	0.05	1.94	1.0000		0.86	1.40
	0.25	1.08	0.9962	0.9560		0.54
	1.00	0.54	0.3970	0.1955	1.0000	

Statistično značilne razlike so v poudarjenem tekstu ( $P < 0,05$ ).

SEM = standardna napaka ocene srednje vrednosti (= 0,29).

SED = standardna napaka ocene razlike (= 0,082).

Verjetnosti → pod diagonalo, razlike med različnimi koncentracijami tanina → nad diagonalo.

Priloga O:

Vpliv kostanjevih taninov na celično CMC-azno aktivnost bakterije *S. bovis*

Čas inkubacije (h)	Konc. tanina (g/l)	Srednje vrednosti	Koncentracija tanina (g/l)			
			0.00	0.05	0.25	1.00
5	0.00	0.1731		-0.0017	-0.1811	-0.1819
	0.05	0.1748	1.0000		-0.1794	-0.1802
	0.25	0.3542	<b>0.0003</b>	<b>0.0003</b>		-0.0008
	1.00	0.3550	<b>0.0003</b>	<b>0.0003</b>	1.0000	
10	0.00	0.1771		-0.0330	-0.1285	-0.1311
	0.05	0.2101	1.0000		-0.0955	-0.0981
	0.25	0.3056	0.0580	0.5069		-0.0026
	1.00	0.3082	<b>0.0465</b>	0.4500	1.0000	
13	0.00	0.3573		0.0797	0.1400	0.1513
	0.05	0.2776	0.8349		0.0603	-0.0330
	0.25	0.2173	<b>0.0210</b>	0.9923		0.0113
	1.00	0.2060	<b>0.0071</b>	0.9384	1.0000	
16	0.00	0.1353		0.0357	-0.0333	-0.1020
	0.05	0.0995	1.0000		-0.0690	-0.1377
	0.25	0.1686	1.0000	0.9578		-0.0687
	1.00	0.2373	0.3701	<b>0.0259</b>	0.9600	
20	0.00	0.4042		0.0820	0.1396	0.2501
	0.05	0.3221	0.7950		0.0575	0.1681
	0.25	0.2646	<b>0.0219</b>	0.9961		0.1106
	1.00	0.1540	<.0001	<b>0.0012</b>	0.2229	
32	0.00	0.2424		0.2424	0.2424	0.1665
	0.05	0.0000	<.0001		0.0000	-0.0759
	0.25	0.0000	<.0001	1.0000		-0.0759
	1.00	0.0759	<b>0.0014</b>	0.8910	0.8910	
48	0.00	0.0000		-0.1591	-0.0795	0.0000
	0.05	0.1591	0.0032		0.0796	0.1591
	0.25	0.0795	0.8387	0.8365		0.0795
	1.00	0.0000	1.0000	<b>0.0032</b>	0.8387	

Statistično značilne razlike so v poudarjenem tekstu ( $P < 0,05$ ).

SEM = standardna napaka ocene srednje vrednosti (= 0,0233).

SED = standardna napaka ocene razlike (= 0,0656).

Verjetnosti → pod diagonalo, razlike med različnimi koncentracijami tanina → nad diagonalo.

Priloga P:

Vpliv kostanjevih taninov na izvencelično CMC-azno aktivnost bakterije *S. bovis*

Čas inkubacije (h)	Konc. tanina (g/l)	Srednje vrednosti	Koncentracija tanina (g/l)			
			0.00	0.05	0.25	1.00
5	0.00	0.9587		0.1454	0.2002	0.2770
	0.05	0.8133	<b>0.0251</b>		0.0548	0.1316
	0.25	0.7585	<b>0.0001</b>	0.9992		0.0768
	1.00	0.6817	< <b>0.0001</b>	0.0776	0.9249	
10	0.00	0.2318		0.0955	0.1222	0.1716
	0.05	0.1363	0.6150		0.0267	0.0761
	0.25	0.1096	0.1535	1.0000		0.0494
	1.00	0.0602	<b>0.0021</b>	0.9318	0.9999	
13	0.00	0.2478		0.1018	0.1771	0.1840
	0.05	0.1460	0.4819		0.0753	0.0955
	0.25	0.0707	<b>0.0012</b>	0.9384		0.0069
	1.00	0.0638	<b>0.0006</b>	0.8608	1.0000	
16	0.00	0.2088		0.1083	0.1305	0.1551
	0.05	0.1006	0.3537		0.0222	0.0468
	0.25	0.0783	0.0844	1.0000		0.0246
	1.00	0.0537	<b>0.0104</b>	1.0000	1.0000	
20	0.00	0.2556		0.1313	0.1801	0.1774
	0.05	0.1243	0.0796		0.0488	0.0461
	0.25	0.0755	<b>0.0009</b>	0.9999		-0.0027
	1.00	0.0782	<b>0.0012</b>	1.0000	1.0000	
32	0.00	0.2472		0.1181	0.1812	0.2093
	0.05	0.1291	0.2000		0.0630	0.0911
	0.25	0.0660	<b>0.0008</b>	0.9930		0.0281
	1.00	0.0379	< <b>0.0001</b>	0.7055	1.0000	
48	0.00	0.0814		0.0464	0.0814	0.0814
	0.05	0.0350	1.0000		0.0350	0.0350
	0.25	0.0000	0.8718	1.0000		0.0000
	1.00	0.0000	0.8718	1.0000	1.0000	

Statistično značilne razlike so v poudarjenem tekstu ( $P < 0,05$ ).

SEM = standardna napaka ocene srednje vrednosti (= 0,0245).

SED = standardna napaka ocene razlike (= 0,0691).

Verjetnosti → pod diagonalo, razlike med različnimi koncentracijami tanina → nad diagonalo.

Priloga R:

Vpliv kostanjevih taninov na celično amilolitično aktivnost bakterije *S. bovis*

Čas inkubacije (h)	Konc. tanina (g/l)	Srednje vrednosti	Koncentracija tanina (g/l)			
			0.00	0.05	0.25	1.00
5	0.00	7.44		-3.32	-2.14	-2.85
	0.05	10.76	0.8976		1.17	0.47
	0.25	9.59	0.9998	1.0000		-0.71
	1.00	10.29	0.9801	1.0000	1.0000	
10	0.00	7.56		-2.53	-3.13	-23.33
	0.05	10.09	0.9960		-0.60	-20.80
	0.25	10.69	0.9418	1.0000		-20.20
	1.00	30.89	<.0001	<.0001	<.0001	
13	0.00	5.82		-1.78	-2.04	-23.58
	0.05	7.61	1.0000		-0.25	-2.53
	0.25	7.86	0.9999	1.0000		-21.54
	1.00	29.40	<.0001	<.0001	<.0001	
16	0.00	6.78		-0.13	-1.99	-30.35
	0.05	6.91	1.0000		-1.86	-30.23
	0.25	8.77	0.9999	1.0000		-28.36
	1.00	37.13	<.0001	<.0001	<.0001	
20	0.00	6.40		-3.53	-7.24	-32.09
	0.05	9.92	0.8272		-3.71	-28.56
	0.25	13.64	0.0018	0.7492		-24.84
	1.00	38.48	<.0001	<.0001	<.0001	
32	0.00	3.50		0.21	-0.35	-31.29
	0.05	3.29	1.0000		-0.55	-31.50
	0.25	3.84	1.0000	1.0000		-30.94
	1.00	34.79	<.0001	<.0001	<.0001	
48	0.00	0.81		0.31	-0.80	-26.00
	0.05	0.51	1.0000		-1.10	-26.30
	0.25	1.61	1.0000	1.0000		-25.20
	1.00	26.81	<.0001	<.0001	<.0001	

Statistično značilne razlike so v poudarjenem tekstu ( $P < 0,05$ ).

SEM = standardna napaka ocene srednje vrednosti (= 1,02).

SED = standardna napaka ocene razlike (= 2,89).

Verjetnosti → pod diagonalo, razlike med različnimi koncentracijami tanina → nad diagonalo.

Priloga S:

Vpliv kostanjevih taninov na izvencelično amiloliotično aktivnost bakterije *S. bovis*

Čas inkubacije (h)	Konc. tanina (g/l)	Srednje vrednosti	Koncentracija tanina (g/l)			
			0.00	0.05	0.25	1.00
5	0.00	4.019		1.449	0.217	4.019
	0.05	2.570	<.0001		-1.232	2.570
	0.25	3.802	1.0000	0.0004		3.802
	1.00	0.000	<.0001	<.0001	<.0001	
10	0.00	4.715		1.259	3.124	3.853
	0.05	3.456	0.0003		1.864	2.593
	0.25	1.591	<.0001	<.0001		0.729
	1.00	0.862	<.0001	<.0001	0.3029	
13	0.00	3.174		0.681	2.336	2.762
	0.05	2.493	0.4405		1.656	1.259
	0.25	0.837	<.0001	<.0001		0.425
	1.00	0.412	<.0001	<.0001	0.9896	
16	0.00	2.752		0.586	2.329	2.452
	0.05	2.166	0.7399		1.742	1.866
	0.25	0.423	<.0001	<.0001		0.123
	1.00	0.300	<.0001	<.0001	1.0000	
20	0.00	2.848		1.678	2.551	2.719
	0.05	1.170	<.0001		0.873	1.041
	0.25	0.297	<.0001	0.0694		0.168
	1.00	0.129	<.0001	0.0075	1.0000	
32	0.00	1.976		0.685	1.468	1.646
	0.05	1.291	0.4265		0.783	0.961
	0.25	0.508	<.0001	0.1854		0.178
	1.00	0.330	<.0001	0.0227	1.0000	
48	0.00	1.107		-0.123	0.953	0.811
	0.05	1.230	1.0000		1.075	0.934
	0.25	0.155	0.0254	0.0045		-0.141
	1.00	0.296	0.1382	0.0323	1.0000	

Statistično značilne razlike so v poudarjenem tekstu ( $P < 0,05$ ).

SEM = standardna napaka ocene srednje vrednosti (= 0,161).

SED = standardna napaka ocene razlike (= 0,453).

Verjetnosti → pod diagonalo, razlike med različnimi koncentracijami tanina → nad diagonalo.

Priloga T:

Vpliv kostanjevih taninov na celično proteolitično aktivnost bakterije *S. bovis*

Čas inkubacije (h)	Konc. tanina (g/l)	Srednje vrednosti	Koncentracija tanina (g/l)			
			0.00	0.05	0.25	1.00
5	0.00	0.00		-14.23	-22.90	-58.73
	0.05	14.23	0.9245		-8.67	-44.50
	0.25	22.90	0.1383	1.0000		-35.83
	1.00	58.73	<.0001	<.0001	0.0002	
10	0.00	6.55		-26.21	-19.25	-83.08
	0.05	32.76	0.0348		6.96	-56.87
	0.25	25.80	0.4367	1.0000		-63.83
	1.00	89.63	<.0001	<.0001	<.0001	
13	0.00	6.79		-22.61	-14.24	-34.70
	0.05	29.40	0.1541		8.37	-26.21
	0.25	21.03	0.9239	1.0000		-20.46
	1.00	41.49	0.0004	0.9886	0.3144	
16	0.00	39.87		10.67	6.11	-7.32
	0.05	29.20	0.9982		-4.56	-18.00
	0.25	33.76	1.0000	1.0000		-13.43
	1.00	47.19	1.0000	0.5790	0.9587	
20	0.00	19.04		-2.94	-41.23	-97.24
	0.05	21.98	1.0000		-38.29	-94.29
	0.25	60.27	<.0001	<.0001		-56.01
	1.00	116.28	<.0001	<.0001	<.0001	
32	0.00	34.32		-9.68	-20.19	-108.99
	0.05	44.00	0.9996		-10.50	-99.30
	0.25	54.50	0.3398	0.9986		-88.80
	1.00	143.30	<.0001	<.0001	<.0001	
48	0.00	63.37		14.56	21.42	22.72
	0.05	48.81	0.9058		6.86	8.16
	0.25	41.95	0.2328	1.0000		1.31
	1.00	40.65	0.1477	1.0000	1.0000	

Statistično značilne razlike so v poudarjenem tekstu ( $P < 0,05$ ).

SEM = standardna napaka ocene srednje vrednosti (= 5,54).

SED = standardna napaka ocene razlike (= 12,79).

Verjetnosti → pod diagonalo, razlike med različnimi koncentracijami tanina → nad diagonalo.

Priloga U:

Vpliv kostanjevih taninov na izvencelično proteolitično aktivnost bakterije *S. bovis*

Čas inkubacije (h)	Konc. tanina (g/l)	Srednje vrednosti	Koncentracija tanina (g/l)			
			0.00	0.05	0.25	1.00
5	0.00	29.28		-2.58	-10.70	-238.90
	0.05	31.86	1.0000		-8.12	-236.32
	0.25	39.98	0.2750	0.8070		-228.20
	1.00	268.18	<.0001	<.0001	<.0001	
10	0.00	15.89		-28.51	-17.32	-74.42
	0.05	44.40	<.0001		11.19	-45.91
	0.25	33.21	0.0007	0.2001		-57.10
	1.00	90.31	<.0001	<.0001	<.0001	
13	0.00	9.29		-1.25	-32.54	-91.39
	0.05	10.53	1.0000		-31.29	-28.51
	0.25	41.83	<.0001	<.0001		-58.85
	1.00	100.68	<.0001	<.0001	<.0001	
16	0.00	20.52		0.16	-22.59	-81.59
	0.05	20.35	1.0000		-22.76	-81.75
	0.25	43.11	<.0001	<.0001		-59.00
	1.00	102.10	<.0001	<.0001	<.0001	
20	0.00	1.64		-5.75	-27.27	-79.91
	0.05	7.39	0.9960		-21.52	-74.17
	0.25	28.91	<.0001	<.0001		-52.64
	1.00	81.55	<.0001	<.0001	<.0001	
32	0.00	0.00		0.00	-12.09	-53.55
	0.05	0.00	1.0000		-12.09	-53.55
	0.25	12.09	0.1049	0.1049		-41.46
	1.00	53.55	<.0001	<.0001	<.0001	
48	0.00	0.00		0.00	-19.69	-58.07
	0.05	0.00	1.0000		-19.69	-58.07
	0.25	19.69	<.0001	<.0001		-38.38
	1.00	58.07	<.0001	<.0001	<.0001	

Statistično značilne razlike so v poudarjenem tekstu ( $P < 0,05$ ).

SEM = standardna napaka ocene srednje vrednosti (= 2,31).

SED = standardna napaka ocene razlike (= 6,55).

Verjetnosti → pod diagonalo, razlike med različnimi koncentracijami tanina → nad diagonalo.

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Simona GRM

**VPLIV KOSTANJEVEGA TANINA NA RAST IN  
ENCIMSKE AKTIVNOSTI VAMPNIH BAKTERIJ  
*Streptococcus bovis* IN *Selenomonas ruminantium***

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2006