

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Nada KUK

**OPIS IN UGOTAVLJANJE USTREZNOSTI PROBIOTIČNIH
MLEČNIH IZDELKOV NA SLOVENSKEM TRGU**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**SURVEY AND SUITABILITY OF PROBIOTIC MILK PRODUCTS ON
PURCHASE ON SLOVENIAN MARKET**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2006

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Mikrobiološki del je bil opravljen v laboratoriju Katedre za mlekarstvo, Oddelka za zootehniko, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani.

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

Mentorica: prof. dr. Irena Rogelj

Somentorica: dr. Bojana Bogovič Matijašič

Recenzentka: prof. dr. Sonja Smole Možina

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Nada Kuk

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 579.67:615.372:614.31(043)=863
KG	probiotiki/probiotični mlečni izdelki/jogurt/prisotnost probiotičnih bakterij/izolacija DNA/konvencionalne metode/PCR/nadzor nad živili/ustreznost deklaracij
AV	KUK, Nada
SA	ROGELJ, Irena (mentorica)/BOGOVIČ MATIJAŠIČ, Bojana (somentorica)/SMOLE MOŽINA, Sonja (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI	2006
IN	OPIS IN UGOTAVLJANJE USTREZNOSTI PROBIOTIČNIH MLEČNIH IZDELKOV NA SLOVENSKEM TRGU
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XII, 61 str., 22 pregl., 11 sl., 58 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Analizirali smo enajst probiotičnih mlečnih izdelkov, ki so bili uvoženi ali proizvedeni v Sloveniji. Ugotavljali smo prisotnost deklariranih mikroorganizmov in njihovo število. Naš glavni cilj je bil ugotoviti, ali izdelki vsebujejo deklarirane bakterijske vrste ter katera gojišča so dovolj selektivna za posamezno bakterijsko vrsto. DNA smo izolirali neposredno iz izdelkov in iz kolonij z gojišč ter z vrstno specifično metodo PCR ugotavljali vrsto bakterij. Na enem izdelku je bilo navedeno napačno ime, pri njem pa smo z metodo PCR ugotovili dve vrsti mikroorganizmov, ki nista bili deklarirani. Gojišče MRS s klindamicinom je bilo dovolj selektivno za bakterije vrste <i>Lb. acidophilus</i> , v svežih izdelkih od $1,2 \cdot 10^5$ do $2,9 \cdot 10^7$ ke/ml in ob koncu roka uporabnosti od $3,3 \cdot 10^3$ do $3,1 \cdot 10^7$ ke/ml. Z metodo PCR smo potrdili prisotnost <i>Lb. casei</i> v vseh izdelkih kjer je bila deklarirana, število, ugotovljeno na gojišču MRS, pa je bilo vedno večje od 10^7 ke/ml. Gojišče LAMVAB je bilo primerno za <i>Lb. rhamnosus</i> , ki je bil deklariran v enem izdelku. Koncentracija <i>Lb. rhamnosus</i> ($2,4 \cdot 10^7$ ke/ml v svežem izdelku) se vse do konca roka uporabnosti ni zmanjšala. Metoda PCR na DNA iz kolonij je potrdila prisotnost <i>Bif. lactis</i> v štirih izdelkih, DNA vrste <i>Bif. bifidum</i> smo ugotovili pri enem izdelku, vrste <i>Bif. longum</i> pa nismo potrdili. Rod bifidobakterij smo potrdili v vseh izdelkih, kjer je bil deklariran. Število bifidobakterij je bilo ob nakupu izdelka od $2,0 \cdot 10^5$ do $2,5 \cdot 10^7$ in ob koncu roka uporabnosti $4,4 \cdot 10^4$ do $1,8 \cdot 10^7$ ke/ml. Selektivnost gojišč za bifidobakterije MRS z dichloxallinom ali z NPPL ni bila zadovoljiva, saj je poleg bifidobakterij rasel tudi <i>Lb. casei</i> , ki pa ga je bilo mogoče razlikovati od bifidobakterij po obliki kolonij. Zaradi pomanjkljive selektivnosti nekaterih gojišč predlagamo potrditev posameznih morfoloških tipov kolonij z vrstno specifično reakcijo PCR.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 579.67:615.372:614.31(043)=863
CX probiotics/probiotic milk products/yoghurt/presence of probiotic bacteria/DNA isolation/conventional methods/PCR/food control/suitability of declarations
AU KUK, Nada
AA ROGELJ, Irena (supervisor)/BOGOVIČ MATIJAŠIĆ, Bojana (co-advisor)/SMOLE MOŽINA, Sonja (reviewer)
PP SI-1000, Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
PY 2006
TI SURVEY AND SUITABILITY OF PROBIOTIC MILK PRODUCTS ON PURCHASE ON SLOVENIAN MARKET
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XII, 61 p., 22 tab., 11 fig., 58 ref.
LA SI
AL sl/en
AB A selection of eleven probiotic milk products, either produced in Slovenia or imported was analysed, with respect to the presence and viable counts of bacteria declared on the label. The main aim was to determine whether products contain declared bacterial species and which selective agar media is suitable enough for encountering of particular bacterial species. Species-specific PCR technique for bacterial species determination was applied on DNA isolated directly from the products and from the colonies grown on selective media. One product was incorrectly labeled with respect to the species and in the same product two microorganisms that were not listed on the label were detected with PCR technique. MRS agar with clyndamycin was suitable for enumeration of *Lb. acidophilus*. At the time of purchase the viable counts of *Lb. acidophilus* were from $1,2 \cdot 10^5$ to $2,9 \cdot 10^7$ cfu/ml and at the end of shelf life from $3,3 \cdot 10^3$ to $3,1 \cdot 10^7$ cfu/ml. The presence of *Lb. casei* was determined with PCR in all products where declared. Counts of *Lb. casei* always remained higher than 10^7 cfu/ml. Agar LAMVAB was suitable for enumerating *Lb. rhamnosus*, which was declared in one product. Viable counts of *Lb. rhamnosus* ($2,4 \cdot 10^7$ cfu/ml at the time of purchase) did not decrease until the end of shelf life. PCR analysis applied on the DNA taken from the colonies on media confirmed the presence of *Bif. lactis* in four products, *Bif. bifidum* was confirmed in one product, *Bif. longum* was not detected. Otherwise *Bifidobacterium* genus was detected in all products where declared. Viable counts of bifidobacteria was from $2,0 \cdot 10^5$ to $2,5 \cdot 10^7$ at the time of purchase and from $4,4 \cdot 10^4$ to $1,8 \cdot 10^7$ cfu/ml at the end of shelf life. The selectivity of MRS with dichloxallin or with NPNL for enumerating bifidobacteria was not satisfactory for two products where *Lb. casei* also grew in both media. However, the morphology of colonies was easily distinguished from those of bifidobacteria. Due to the inadequate selectivity of particular agar media, we recommend the confirmation of the particular morphology of colonies with the species-specific PCR.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
1.1 DELOVNA HIPOTEZA	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 KAJ SO PROBIOTIKI?	3
2.2 PRIPOROČENI ODMEREK ZA PROBIOTIČNI UČINEK	4
2.3 OZNAČEVANJE PROBIOTIČNIH IZDELKOV	5
2.4 UČINKI PROBIOTIKOV	6
2.4.1 Vloga probiotikov pri preprečevanju in zdravljenju bolezni prebavil	6
2.4.2 Teoretično neugodni/škodljivi učinki probiotikov	8
2.5 MLEČNOKISLINSKE BAKTERIJE	9
2.6 IZBIRA IN VARNOST PROBIOTIČNEGA SEVA	10
2.7 SODOBNE METODE UGOTAVLJANJA IN IDENTIFIKACIJE PROBIOTIČNIH BAKTERIJ	11
2.7.1 Pomnoževanje DNA z metodo PCR	11
3 MATERIAL IN METODE	14
3.1 NAČRT POSKUSA	14
3.2 MATERIAL.....	14
3.2.1 Probiotični mlečni izdelki	14

3.2.2 Gojišča	15
3.2.2.1 Tekoča gojišča in raztopine	15
3.2.2.2 Trdna gojišča	16
3.2.3 Reagenti in encimi za izolacijo DNA in reakcijo PCR	17
3.2.3.1 Reagenti za pripravo bakterijske DNA.....	17
3.2.3.2 Reagenti za pripravo mikroskopskega preparata.....	17
3.2.3.3 Reagenti za verižno reakcijo s polimerazo (PCR).....	17
3.2.3.4 Reagenti za ugotavljanje pomnožkov v agaroznem gelu	18
3.3 METODE.....	19
3.3.1 Ugotavljanje števila mikroorganizmov v probiotičnih mlečnih izdelkih	19
3.3.2 Ugotavljanje morfologije kolonij na gojiščih in mikroskopiranje.....	19
3.3.3 Priprava DNA za izvedbo PCR.....	20
3.3.3.1 Postopek izolacije DNA iz kolonij na gojišču z obdelavo s toploto in detergentom	20
3.3.3.2 Postopek izolacije DNA neposredno iz vzorca izdelka.....	20
3.3.4 Priprava reakcijske mešanice za PCR.....	21
3.3.5 Potek PCR	22
3.3.6 Dokazovanje pomnožkov z gelsko elektroforezo	23
4 REZULTATI.....	25
4.1 DEKLARACIJE PROBIOTIČNIH IZDELKOV	25
4.2 UGOTAVLJANJE ŠTEVILA DEKLARIRANIH PROBIOTIKOV V MLEČNIH IZDELKIH TER POTRJEVANJE KOLONIJ Z GOJIŠČ Z METODO PCR	26
4.2.1 Probiotični mlečni izdelek Ego	27
4.2.2 Probiotični mlečni izdelek Lca	28
4.2.3 Probiotični mlečni izdelek Kako si.....	29
4.2.4 Probiotični mlečni izdelek Bifidus	30
4.2.5 Probiotični mlečni izdelek LcaVita.....	31
4.2.6 Probiotični mlečni izdelek ProNutri	32
4.2.7 Probiotični mlečni izdelek AB kultura	33
4.2.8 Probiotični mlečni izdelek BioAktiv LGG	34
4.2.9 Probiotični mlečni izdelek Bio-Fit (hruška, jabolko)	35

4.2.10 Probiotični mlečni izdelek Actimel® - navadni	36
4.2.11 Probiotični mlečni izdelek Pinjenec - ananas.....	36
4.3 UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI DEKLARIRANIH MIKROORGANIZMOV NA SKUPNI DNA IZ IZDELKA Z METODO PCR	37
5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	45
5.1 RAZPRAVA.....	45
5.1.1 Deklaracije izdelkov	45
5.1.2 Kvantitativno ugotavljanje števila deklariranih probiotičnih bakterij.....	46
5.1.3 Kvalitativno ugotavljanje prisotnosti DNA deklariranih bakterij z metodo PCR na skupni DNA, izolirani iz izdelka	48
5.1.4 Stanje analiziranih probiotičnih mlečnih izdelkov na slovenskem trgu od oktobra do decembra 2005.....	50
5.2 SKLEPI.....	53
6 POVZETEK.....	54
7 VIRI	56
ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Dokazani funkcionalni oziroma zdravstveni učinki izbranih probiotičnih mikroorganizmov (Salminen in Gueimonde, 2004).....	7
Preglednica 2: Mikroorganizmi, ki jih uporabljamo kot probiotike (Gardiner in sod., 2002)	9
Preglednica 3: Pogoji reakcije PCR (Promega, 2005).....	12
Preglednica 4: Probiotični mlečni izdelki na slovenskem trgu od oktobra do decembra 2005	15
Preglednica 5: Selektivna gojišča in pogoji inkubacije za ugotavljanje števila mikroorganizmov	19
Preglednica 6: Uporabljeni oligonukleotidni začetniki v reakciji PCR ter velikost specifičnih produktov	22
Preglednica 7: Sestava 25 µl reakcijske mešanice za PCR.....	22
Preglednica 8: Oligonukleotidni začetniki in pogoji reakcije PCR za ugotavljanje bakterijske DNA in DNA tarčnih probiotičnih bakterij	23
Preglednica 9: Rezultati ugotavljanja prisotnosti in števila probiotičnih bakterij v mlečnem izdelku Ego	27
Preglednica 10: Rezultati ugotavljanja prisotnosti in števila probiotičnih bakterij v mlečnem izdelku Lca	28
Preglednica 11: Rezultati ugotavljanja prisotnosti in števila probiotičnih bakterij v mlečnem izdelku Kako si	29
Preglednica 12: Rezultati ugotavljanja prisotnosti in števila probiotičnih bakterij v mlečnem izdelku Bifidus.....	30
Preglednica 13: Rezultati ugotavljanja prisotnosti in števila probiotičnih bakterij v mlečnem izdelku LcaVita.....	31
Preglednica 14: Rezultati ugotavljanja prisotnosti in števila probiotičnih bakterij v mlečnem izdelku ProNutri	32
Preglednica 15: Rezultati ugotavljanja prisotnosti in števila probiotičnih bakterij v mlečnem izdelku AB kultura.....	33
Preglednica 16: Rezultati ugotavljanja prisotnosti in števila probiotičnih bakterij v mlečnem izdelku BioAktiv LGG	34

Preglednica 17: Rezultati ugotavljanja prisotnosti in števila probiotičnih bakterij v mlečnem izdelku Bio-Fit (hruška, jabolko).....	35
Preglednica 18: Rezultati ugotavljanja prisotnosti in števila probiotičnih bakterij v mlečnem izdelku Actimel [®] - navadni.....	36
Preglednica 19: Rezultati ugotavljanja prisotnosti in števila probiotičnih bakterij v mlečnem izdelku Pinjenec - ananas.....	36
Preglednica 20: Rezultati ugotavljanja prisotnosti DNA deklariranih vrst bakterij iz probiotičnih izdelkih in iz kolonij na gojiščih.....	38
Preglednica 21: Rezultati identifikacij bakterij iz probiotičnih mlečnih izdelkov.....	50
Preglednica 22: Prisotnost in število deklariranih bakterij v enajstih probiotičnih izdelkih, vzorčenih ob začetku in koncu roka uporabnosti	51

KAZALO SLIK

Slika 1: Glavni rodovi bakterij v človeškem prebavnem traktu (Ouwehand in Vesterlund, 2003).....	4
Slika 2: Slika molekularnega označevalca dolžin pomnožkov DNA po gelski elektroforezi na agarozni	18
Slika 3: Mikroskopski preparat tipičnih bifidobakterij.....	30
Slika 4: Rezultati specifične reakcije PCR za vrsto <i>Lb. casei</i> , na skupni DNA iz probiotičnega izdelka	39
Slika 5: Rezultati specifične reakcije PCR za vrsto <i>Lb. acidophilus</i> , na skupni DNA iz probiotičnega izdelka in iz kolonij na gojiščih.....	40
Slika 6: Rezultati specifične reakcije PCR za rod <i>Bifidobacterium</i> , na skupni DNA iz probiotičnega izdelka in iz kolonij na gojiščih.....	41
Slika 7: Rezultati specifične reakcije PCR za vrsto <i>Lb. rhamnosus</i> , na skupni DNA iz probiotičnega izdelka in iz kolonij na gojiščih.....	42
Slika 8: Število bakterij vrste <i>Lb. casei</i> v svežem izdelku in ob koncu roka uporabnosti...	42
Slika 9: Število bakterij vrste <i>Lb. acidophilus</i> v svežem izdelku in ob koncu roka uporabnosti	43
Slika 10: Število bakterij rodu <i>Bifidobacterium</i> v svežem izdelku in ob koncu roka uporabnosti	43
Slika 11: Število bakterij vrste <i>Lb. rhamnosus</i> v svežem izdelku in ob koncu roka uporabnosti	44

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Kratice - okrajšava	Pomen
AFC	Australian Food Council
ANZFA	Australia New Zealand Food Authority
<i>Bif.</i>	<i>Bifidobacterium</i>
bp	Bazni par
cfu	Colony Forming Unit
Chr. Hansen	Christian Hansen
<i>Cl.</i>	<i>Clostridium</i>
cly	Klindamicin
DGGE	Elektroforetsko ločevanje DNA na poliakrilamidnem gelu z gradientom denaturacijskega sredstva
DNA	Deoksiribonukleinska kislina
dNTP	Mešanica nukleotidov
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
<i>Ec.</i>	<i>Enterococcus</i>
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate
FAO	Food and Agriculture Organisation of the United Nations
FDA	Food and Drug Administration
FOSHU	Foods for Speciefic Health Use
FUFOSE	Functional Food Science in Europe
G	Gram
GoTaq [®] Flexi pufer za polimerazo	Polimeraza, izolirana iz mikroorganizma <i>Thermus Aquaticus</i> brez MgCl ₂
GoTaq [®] pufer za polimerazo	Polimeraza, izolirana iz mikroorganizma <i>Thermus Aquaticus</i> z MgCl ₂
GRAS	Generally Recognized As Safe (splošno priznano kot varno)
<i>H.</i>	<i>Helicobacter</i>
ILSI	International Life Science Institute
ke	Kolonijske enote

LAMVAB	Gojišče za laktobacile z vankomicinom
<i>Lb.</i>	<i>Lactobacillus</i>
MKB	Mlečnokislinske bakterije
MRS	Gojišče de Man - Rogosa - Sharp
MRS - IM	Modificirano gojišče de Man - Rogosa - Sharp
NPNL	Mešanica antibiotikov: Nalidixic acid, Paromomycin sulphate, Neomycin sulphate, LiCl
NYA	National Yoghurt Association
o. z.	Oligonukleotidni začetnik
PCR	Polymerase Chain Reaction (verižna reakcija s polimerazo)
PFGE	Gelska elektroforeza v pulzirajočem polju
RNA	Ribonukleinska kislina
rRNA	Ribosomska ribonukleinska kislina
rDNA	Gen za ribosomsko ribonukleinsko kislino
<i>S.</i>	<i>Staphylococcus</i>
<i>Sac.</i>	<i>Saccharomyces</i>
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
<i>Str.</i>	<i>Streptococcus</i>
TAE	Tris acetatni pufer
WHO	World Health Organization

1 UVOD

Na trgu se pojavlja vse več t. i. funkcionalne hrane, ki vsebuje dodatke, ki potrošniku zagotavljajo specifične, zdravju koristne učinke. Med temi izdelki prevladujejo takšni, ki vsebujejo probiotike, t. j. mlečnokislinske bakterije s posebnimi lastnostmi.

V prehranskih izdelkih so kot probiotične bakterije največkrat prisotne mlečnokislinske bakterije (MKB) in bifidobakterije. Med mlečnokislinske bakterije prištevamo vrste iz rodov *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* in *Weissella*. Rod *Bifidobacterium* pogosto uvrščajo med mlečnokislinske bakterije, vendar jim filogenetsko ni soroden in ima specifične poti fermentacije sladkorja (Axelsson, 2004). Predstavnike MKB in bifidobakterij lahko najdemo tako v gastrointestinalnem traktu ljudi in živali kot tudi v fermentirani hrani. Največ sevov, ki jih uporabljamo kot probiotike, pripada rodovom *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* in *Enterococcus*. Med najbolj zaželenimi lastnostmi probiotikov je antagonistično delovanje proti patogenim bakterijam (npr. *Helicobacter pylori*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Clostridium difficile*) ter izboljšanje imunskega odziva.

Najpogostejši način ugotavljanja števila živih mikroorganizmov v vzorcih je štetje kolonij na hranljivih gojiščih. Mlečnokislinske bakterije so tradicionalno uvrščali v taksonomske skupine glede na fenotipske lastnosti, kot so morfologija celic in kolonij, način fermentacije glukoze, temperaturno območje rasti, konfiguracija mlečne kisline in sposobnost fermentacije različnih ogljikovih hidratov. Hibridizacijski testi DNA-DNA in DNA-RNA ter primerjalne sekvenčne analize genov 16S rRNA in 23S rRNA so pokazale odstopanja klasično postavljenih taksonov od filogenetske sorodnosti, ki jo odraža nukleotidno zaporedje izbranih odsekov genoma, npr. ribosomskih genov. To je pripeljalo do velikih sprememb v taksonomiji številnih bakterijskih rodov. S stališča uporabnosti oz. identifikacije probiotičnih sevov je pomembno tudi dejstvo, da številnih sevov in celo vrst sploh ni mogoče razločevati na osnovi fenotipskih lastnosti. To velja za pomembne probiotične bakterije iz skupine *Lb. acidophilus*, *Lb. casei* in *Lb. paracasei* in nekatere vrste rodu *Bifidobacterium*. Vse to narekuje potrebo po uporabi molekularnih metod identifikacije in tipizacije probiotičnih sevov v selekcijskih postopkih in pri sledenju bodisi v funkcionalnih živilih med proizvodnjo ali skladiščenjem, bodisi v prebavnem traktu po zaužitju izdelka (Smole Možina in Jeršek, 2001).

Molekularne metode, ki temeljijo na analizi DNA, so vsekakor eno najbolj hitro razvijajočih se področij in se vse bolj uveljavljajo tudi v živilski mikrobiologiji. Eden od razlogov je, da kemijska narava nukleinskih kislin in molekularno-biološke metode omogočajo največjo specifičnost in največjo občutljivost med vsemi znanimi hitrimi metodami mikrobiološke analitike. Drugi razlog pa je, da analiza nukleinskih kislin na temeljnem nivoju, t. j. ugotavljanju nukleotidnega zaporedja DNA/RNA molekul, daje možnost razvoja testov, ki bodo omogočili direktno in hitro odkrivanje ter identifikacijo mikroorganizmov v vzorcih hrane brez predhodne izolacije in namnoževanja mikrobne biomase. Takšno perspektivo daje avtomatizirano ugotavljanje nukleotidnega zaporedja

odsekov DNA in pomnoževanje z verižno reakcijo s polimerazo (PCR, angl. polymerase chain reaction) (Smole Možina, 2003).

Osnovna definicija probiotikov pravi, da so to živi mikroorganizmi, ki ob zaužitju v zadostni količini pozitivno delujejo na zdravje človeka in živali tako, da izboljšajo lastnosti črevesne mikroflore, ki je lastna človeku ali živali. Pogoj za to je, da mora biti zagotovljeno zadostno število živih mikroorganizmov v izdelku vse do izteka roka uporabnosti.

1.1 DELOVNA HIPOTEZA

Ker so probiotični izdelki relativno nova kategorija, zakonsko še niso urejeni, zato proizvajalci niso dolžni navajati števila probiotičnih bakterij v izdelku. Poleg tega je tudi kontrola teh izdelkov pomanjkljiva, saj se kljub hitremu razvoju molekularno-genetskih metod te v kontrolnih laboratorijih še ne uporabljajo rutinsko. Glede na dejstvo, da se zakonodaja o probiotičnih izdelkih še oblikuje, in glede na številne objave o neustreznosti probiotičnih izdelkov deklariranih vrst in števila probiotičnih mikroorganizmov smo predvidevali, da so tudi na slovenskem trgu izdelki, ki ne ustrezajo deklaraciji.

Namen naše naloge je bil zato ugotoviti kakovost in ustreznost probiotičnih izdelkov na slovenskem trgu ter poiskati najustreznejšo kombinacijo metod, ki bi omogočile ustrezno kontrolo teh izdelkov.

2 PREGLED OBJAV

2.1 KAJ SO PROBIOTIKI?

Beseda probiotik je relativno nova beseda, ki izvira iz grškega izraza »pro bios«, kar pomeni za življenje in se uporablja za poimenovanje bakterij, ki imajo ugoden vpliv na ljudi in živali.

Razlika med fermentiranimi mlečnimi napitki, kot je konvencionalni jogurt, in probiotičnimi je, da pri izdelavi jogurta uporabljajo izključno termofilne mlečnokislinske bakterije vrst *Streptococcus thermophilus* in *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*, ki jih imenujemo starterske kulture za jogurt, probiotični jogurt pa vsebuje namesto ali poleg jogurtne kulture tudi probiotične bakterije, najpogosteje predstavnike rodov *Lactobacillus* in *Bifidobacterium*.

Koncept probiotikov se je pojavil na začetku 20. stoletja z opazovanjem pozitivnega učinka nekaterih bakterij s strani Mečnikova, ruskega Nobelovega nagrajenca, ki je delal na Pasteurjevem Inštitutu v Parizu. Menil je, da zaužita hrana vpliva na mikrofloro prebavil in da je mogoče škodljive mikroorganizme nadomestiti s koristnimi (Anonymous, 2001). Poročal je o bolgarskih kmetih, pri katerih je zasledil daljšo življenjsko dobo, kar je povezal z uživanjem velikih količin fermentiranega mleka. Ugotovil je, da se črevesna mikroflora spremeni z uživanjem kislega mleka ter da so za fermentacijo mleka pomembne po Gramu pozitivne paličaste bakterije, ki jih je poimenoval bolgarski bacili, kasneje pa so dobili ime *Bacillus bulgaricus*. Ta vrsta mikroorganizmov je kasneje postala znana kot *Lactobacillus bulgaricus*, sedaj pa se imenuje *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in je v kombinaciji s *Streptococcus thermophilus* odgovorna za tradicionalno fermentacijo mleka v jogurt (Fooks in sod., 1999). Francoski pediater Henry Tissier je v tem času ugotovil, da imajo otroci z diarejo v blatu manjše število bakterij razvejane oblike, podobne črki Y. Te »bifid« bakterije so pri zdravih otrocih prisotne v visokem številu, zato je predlagal, da ljudje, ki imajo težave z diarejo, uživajo te bakterije, da spet vzpostavijo zdravo črevesno floro (Anonymous, 2001).

Izraz »probiotik« se je pojavil šele leta 1974, ko ga je uporabil Parker za opis dodatkov živalski krmi, ki pospešujejo rast.

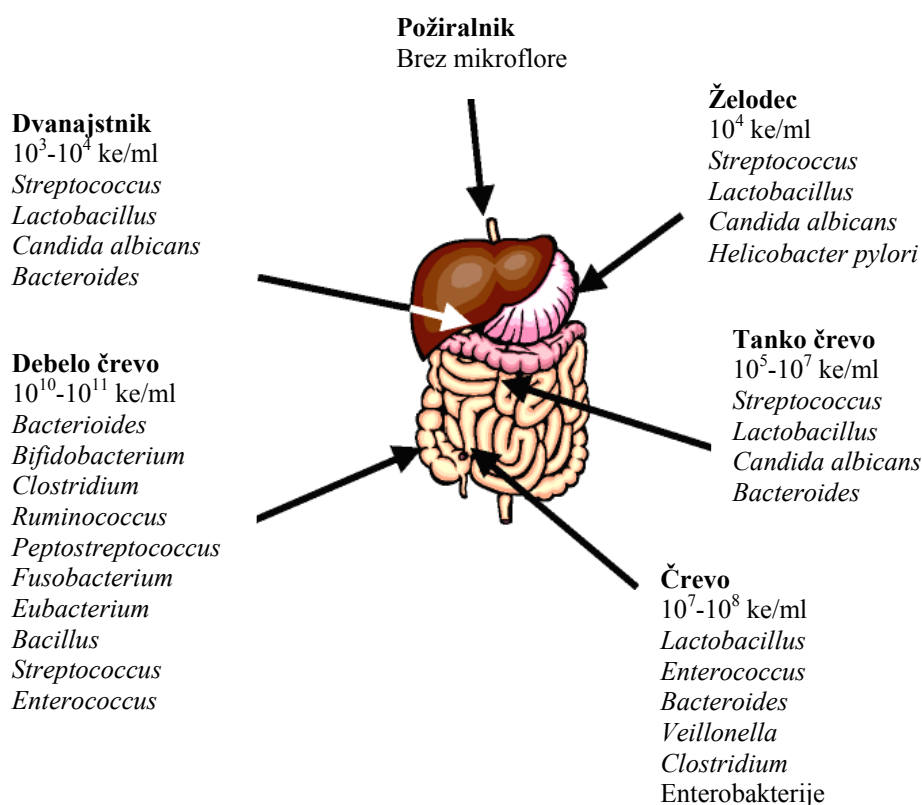
Definicija probiotikov je bila dolgo omejena samo na uporabo v živalski prehrani. Huis in't Veld in Havenaar (1991) sta predlagala, da se definicija razširi tudi na uporabo v prehrani ljudi. Predlagala sta naslednjo definicijo: »Probiotiki so mono ali mešane kulture živih mikroorganizmov, ki učinkujejo koristno na človeka ali žival z izboljšanjem lastnosti obstoječe indogene mikroflore«.

Ena izmed zadnjih definicij, ki sta jo povzeli tudi organizaciji WHO in FAO, pravi, da so probiotiki živi mikroorganizmi, ki dokazano pozitivno učinkujejo na zdravje, če jih zaužijemo v zadostni količini (Guarner in Schaafsma, 1998).

2.2 PRIPOROČENI ODMEREK ZA PROBIOTIČNI UČINEK

O številu bakterij v probiotičnem izdelku, potrebnem za to, da bo izdelek imel koristen učinek na zdravje, lahko najdemo zelo različne podatke. Avtorji (Kurmann in Rašić, 1991; Gueimonde in sod., 2004) navajajo, da bi moralo biti minimalno število probiotičnih bakterij za terapevtski učinek v probiotičnem jogurtu 10^5 – 10^6 ke/g izdelka. Za vzdrževanje zdravja Shortt (1999) priporoča v probiotičnih izdelkih koncentracijo 10^8 ke/ml ali več. Na Japonskem obstaja kriterij za število probiotikov v mlečnih izdelkih, ki naj bi bilo vsaj 10^7 ke/ml. Za funkcionalnost probiotikov Sanders in Huis in't Veld (1999) priporočata, da bi moralo do tankega črevesa priti vsaj 10^8 – 10^9 živih bakterij na dan. Če to drži, potem bi morala biti dnevna doza okrog 10^9 – 10^{10} probiotičnih bakterij. Vendar prehod skozi gastrointestinalni trakt preživi samo 10–40 % uporabljenih probiotičnih bakterij.

Na število probiotičnih bakterij v fermentiranih mlečnih izdelkih vpliva več dejavnikov, kot so: vrednost pH, kisline, prisotnost drugih mikroorganizmov, temperatura, vsebnost kisika in drugo (Shah, 2000; Lin in sod., 2006). Poleg tega morajo probiotične bakterije preživeti prehod skozi želodec in se v prebavilih čim dlje zadržati, če ne tudi naseliti. Na sliki 1 je prikazan prebavni trakt človeka s predstavniki rodov bakterij, ki naseljujejo naš prebavni sistem ter njihovo število v določenih predelih gastrointestinalnega trakta.



Slika 1: Glavni rodovi bakterij v človeškem prebavnem traktu (Ouweland in Vesterlund, 2003)

Največjo populacijo mikroorganizmov najdemo v debelem črevesu, in sicer od 10^{10} do 10^{11} ke/ml. Želodec, dvanajstnik in tanko črevo so malo manj naseljeni, vzrok pa je v nizkem pH (želodec), žolču (dvanajstnik, tanko črevo) in hitrem pretoku v tem predelu

prebavil. V črevesju se hitrost toka želodčne kaše upočasni in s tem se poveča število bakterij v debelem črevesu (Ouweland in Vesterlund, 2003).

2.3 OZNAČEVANJE PROBIOTIČNIH IZDELKOV

Poudariti je treba, da pri večini probiotičnih izdelkov na tržišču ne navajajo specifičnih funkcionalnih učinkov oziroma zdravilnih lastnosti, zato se lahko prodajajo v prosti prodaji. Za patentiranje posamezne aplikacije je potrebno opraviti obsežne študije in vložiti veliko sredstev, medtem ko za nov prehraben izdelek, sploh če gre za vsebnost naravno prisotnih mikroorganizmov, običajno ni potrebno več kot zadostiti osnovnim zahtevam za hrano glede kvalitete, zdravstvene neoporečnosti in trajnosti. Ker je večina proizvajalcev probiotičnih izdelkov iz živilske branže, pač nimajo pogojev za razvoj bolj specializiranih izdelkov, ker je ta povezan z velikimi stroški, zavarovanjem intelektualne lastnine in kliničnimi raziskavami (Bogovič Matijašič, 2001).

V Sloveniji še nimamo pravilnika, ki bi vseboval kriterije za deklariranje probiotičnih izdelkov.

Probiotični izdelki bi morali z vidika zdravja potrošnikov izpolnjevati naslednje pogoje:

- Imeti morajo pravilno deklarirane mikroorganizme glede na taksonomski status ter jasno in natančno označbo, tako da je uporabnik ob nakupu nedvoumno seznanjen z vsebino izdelka.
- V primeru, da gre za živilo, morajo biti izdelki varni, vsaj toliko kot konvencionalno živilo.
- Če so navedeni učinki na zdravje, morajo biti ti ustrezno dokazani (v kliničnih raziskavah na ljudeh).
- Število prisotnih mikroorganizmov mora biti zadostno do konca roka obstojnosti.
- Probiotični mikroorganizmi morajo biti zmožni doseči in preživeti v črevesni flori v zadostnem številu.

Probiotični izdelki morajo biti tudi genetsko stabilni in ne smejo poslabšati zdravja človeka in negativno vplivati na okolje (Saarela in sod., 2000; Reuter in sod., 2002; Hamilton - Miller in sod., 2003).

Zelo pomembno je, da na policah trgovin izberemo tiste proizvode, ki vsebujejo natančno deklarirano vrsto probiotika in imajo deklarirano tudi njihovo število. V ZDA je agencija FDA (Food and Drug Administration) izdala izsledke iz znanstvene literature za zdravstvene trditve (»health claims«), ki jih pripisujejo prehranskim dodatkom (Feord, 2002). Organizacija National Yoghurt Association (NYA) izdaja certifikat, ki vsebuje kriterije za živo jogurtno kulturo in je primer, da fermentirani izdelki lahko vsebujejo oznako »vsebuje žive in aktivne kulture«. Na Japonskem imajo od leta 1991 tako imenovani sistem FOSHU (Foods for Specific Health Use), ki zajema uradno priznane kriterije za funkcionalno hrano. Izdelki FOSHU vsebujejo informacije o cilju delovanja, prehranski vrednosti, priporočljivi dnevni dozi in opozorilu pred prekomernim uživanjem (Sanders in Huis in't Veld, 1999). Fermentirani mlečni izdelki morajo po japonskih kriterijih vsebovati najmanj 10^7 živih bakterij/ml (Shortt, 1999).

V Veliki Britaniji je združenje Joint Health Claims Initiative izdalo priporočila o zdravstvenih trditvah z naslovom »Innovative Health Claims«. Ta dokument zadeva tudi probiotične izdelke. Poudarjajo, da morajo biti zdravstvene trditve, deklarirane na izdelku, potrjene z znanstvenimi raziskavami. Te raziskave naj bi bile opravljene na različnih modelih, kot so celične linije in živali in tudi na ljudeh v kliničnih in epidemioloških študijah. Študije na ljudeh bi morale biti obvezne kot podpora zdravstvenim zahtevam (Feord, 2002). V Evropi je neprofitna organizacija ILSI (International Life Science Institute), financirana s strani Evropske komisije, izdala dokument FUFOSÉ (Functional Food Science in Europe). V njem je funkcionalna hrana opisana kot hrana, ki vsebuje dodatke, ki pozitivno učinkujejo na številne funkcije v telesu. Poudarjajo tudi, da tablet ali kapsul ne prištevamo k funkcionalni hrani (Sanders in Huis in't Veld, 1999).

V Avstraliji in Novi Zelandiji je prepovedano tako deklariranje zdravstvenih trditev na prehranskih izdelkih kot tudi uporaba le-teh v oglaševanju ali v javnosti. S pomočjo vladne organizacije ANZFA (Australia New Zealand Food Authority) in AFC (Australian Food Council) so pripravili pilotsko študijo o zdravstvenih trditvah. V omenjenih državah noben izdelek ne sme vsebovati zdravstvenih trditev, dokler ne izpolni določenih zahtev. Dovoljenje o deklariranju zdravstvenih učinkovitosti izdelka lahko izda samo ANZFA, in sicer pod pogojem, da izdelek izpolnjuje načela o varnosti probiotikov (Sanders in Huis in't Veld, 1999).

2.4 UČINKI PROBIOTIKOV

2.4.1 Vloga probiotikov pri preprečevanju in zdravljenju bolezni prebavil

V zadnjih letih je izšlo kar nekaj izčrpnih preglednih znanstvenih publikacij na področju probiotikov. Iz rezultatov kliničnih poskusov lahko za nekatere probiotične bakterije že rečemo, da so funkcionalni učinki ustrezno znanstveno dokazani. Varnost probiotikov preskušajo na živalskih modelih, kot so miši, podgane, morski prašički in prašiči ter na ljudeh. V Preglednici 1 so navedeni dokazani zdravstveni učinki za nekatere probiotične mikroorganizme.

Preglednica 1: Dokazani funkcionalni oziroma zdravstveni učinki izbranih probiotičnih mikroorganizmov (Salminen in Gueimonde, 2004)

Vrsta	Zdravstveni učinki	Ključne reference
<i>Lb. johnsonii</i> LA1	- veže se na črevesne celice - uravnateži črevesno mikrofloro - zviša imunsko odpornost - koristen pri zdravljenju okužb s <i>H. pylori</i>	McFarland, 2000; Salminen in sod., 1998
<i>Lb. acidophilus</i> NCFB 1748	- zmanjša aktivnost fekalnih bakterijskih encimov - zmanjšuje fekalno mutagenost - preventivno deluje pri driskah kot posledici z radioaktivnim žarčenja - izboljša konsistenco blata	Fonden in sod., 2000; Salminen in sod., 1998
<i>Lb. rhamnosus</i> GG (ATCC 53013)	- zdravi in prepreči rotavirusno drisko - prepreči drisko, povezano z uživanjem antibiotikov - zdravi drisko, ki jo povzroči <i>Cl. difficile</i>	McFarland, 2000; De Roos in Katan, 2000; Fonden in sod., 2000
<i>Lb. acidophilus</i> NFCM	- zmanjša fekalno encimsko aktivnost - ima visoko laktazno aktivnost - omili laktozno intoleranco - proizvaja bakteriocine	Fonden in sod., 2000
<i>Lb. casei</i> Shirota	- deluje preventivno pred črevesnimi motnjami - uravnateži črevesno mikrofloro - zmanjša fekalno encimsko aktivnost - pozitivno vpliva na zmanjšanje ponovljivosti površinskega tumorja na sečniku	Salminen in sod., 1998; McFarland, 2000; De Roos in Katan, 2000; Fonden in sod., 2000
<i>Str. thermophilus</i> ; <i>Lb. bulgaricus</i>	- na rotavirusno drisko nima učinka - na izboljšanje imunske odpornosti med rotavirusno drisko ni učinka - ni učinka na fekalne encime - izboljšanje laktozne intolerance je odvisno od specifične vrste bakterij	Fonden in sod., 2000
<i>Lb. acidophilus</i> La-5	- uravnateži črevesno mikrofloro - varuje pred »potovalno« drisko - poveča imunsko odpornost	Fonden in sod., 2000
<i>Bif. lactis</i>	- zdravi virusno in rotavirusno drisko - uravnateži črevesno mikrofloro	Fonden in sod., 2000; McFarland, 2000
<i>Lb. gasseri</i> (ADH)	- zmanjša fekalno encimsko aktivnost - preživi v črevesju	Fonden in sod., 2000
<i>Lb. reuteri</i>	- naseli črevesje - skrajša rotavirusno drisko	McFarland, 2000; De Roos in Katan, 2000; Fonden in sod., 2000
<i>Sac. boulardii</i>	- prepreči drisko pri zdravljenju z antibiotiki - zdravi kolitis, ki ga povzroči <i>Cl. difficile</i>	McFarland, 2000

V preteklih letih je bilo največ študij opravljenih na laktobacilih, predvsem na predstavnikih vrst *Lb. acidophilus* ali *Lb. casei*, sledijo pa raziskave na bifidobakterijah.

Na sevu *Lactobacillus* GG je bilo opravljenih največ poskusov, tako da je mogoče zaključiti, da ima terapevtski učinek pri zdravljenju drisk in nekaterih drugih motenj. (Anonymous, 2001).

Agarwal in sod. (2001) so z obsežnejšo klinično študijo v Indiji dokazali, da je z uživanjem izdelka Actimel® (Danone), ki vsebuje *Lb. casei*, mogoče skrajšati čas trajanja driske pri otrocih. V raziskavo je bilo vključenih 110 otrok z akutno drisko.

Pozitivni vpliv bakterije *Lb. casei* Shirota pri tretiranju kronične zaprtosti so potrdili v raziskavi, ki je bila opravljena na 70 osebah, starih med 18 in 70 let (Koebnick in sod., 2003). Med štiri tedenskim poskusom je polovica vključenih dobivala probiotični izdelek z $6,5 \cdot 10^8$ ke/ml *Lb. casei* Shirota, druga polovica pa placebo. Po koncu zdravljenja se je kronična zaprtost izboljšala pri 94 % vključenih, ki so dobivali izdelek z *Lb. casei* Shirota, v primerjavi s 57 % vključenih v kontrolno skupino. Avtorji še navajajo, da redno uživanje probiotika *Lb. casei* Shirota izboljša gastrointestinalne parametre, še posebej prebavo in konsistenco blata pri ljudeh, ki trpijo za kronično zaprtostjo. Terapija kronične zaprtosti bi morala poleg diete z veliko vlakninami, ki vključuje polnozrnat izdelke, sadje in zelenjavo, vključevati tudi probiotične prehranske izdelke.

V obsežni raziskavi, ki je potekala v več evropskih centrih, vanjo pa je bilo vključenih kar 287 otrok, so potrdili pozitiven vpliv seva *Lactobacillus* GG na skrajšanje časa driske in omiljenje jakosti driske (Guandalini in sod., 2000).

Uporaba probiotikov ima prihodnost bodisi kot alternativa oziroma dopnilo pri zdravljenju posameznih obolenj ali pa pri zdravih ljudeh z namenom ohranjanja zdravja in preventive pred obolenji. Dosedanji izsledki številnih študij o probiotikih kažejo, da številni sevi mlečnokislinskih bakterij delujejo na različne funkcije v prebavnem sistemu našega telesa. Vsak sev pa je potrebno posebej raziskovati, saj imajo različni sevi probiotičnih bakterij različne značilnosti in s tem tudi različne koristne učinke. Ouwehand in sod. (1999) navajajo, da je potrebno razvijati in spremljati klinične študije probiotikov, saj je poznanih le nekaj učinkov, ki so klinično potrjeni oz. dokazani z ustreznimi raziskavami. Potrebno je razjasniti dolgoročne učinke probiotikov in njihovo funkcijo v telesu. Vse interakcije bi morale biti natančno nadzorovane. Prav tako je potrebno postaviti zakonodajo za probiotike in funkcionalno hrano.

2.4.2 Teoretično neugodni/škodljivi učinki probiotikov

Probiotiki so živi mikroorganizmi. Teoretično bi lahko probiotiki izzvali štiri tipe stranskih učinkov: sistemske infekcije, škodljivo metabolično aktivnost, specifičen imunski odgovor ali prenos genov. Posebno mesto zavzema tveganje zaradi možnosti prenosa genov za rezistenco proti antibiotikom. Vankomicin je eden od zadnjih antibiotikov, ki je učinkovit proti stafilokokom. Že večkrat so ugotovili vpletenost proti vankomicinu odpornih enterokokov pri kliničnih infekcijah, poleg tega pa tudi dokazali *in vitro* in na miših, da je možen prenos genov za rezistenco proti vankomicinu iz enterokokov v druge po Gramu pozitivne bakterije. Proti vankomicinu odpornih enterokokov naj ne bi uporabljali za humane ali živalske probiotike (Salminen in sod., 1998; Anonymous, 2002).

Podatki, ki so trenutno na voljo za mlečnokislinske bakterije, ne kažejo pomembnih nevarnosti za zdravje. Infekcije, v katere so vpletene mlečnokislinske bakterije, so zelo redke. Izjema so posamezni predstavniki rodu *Enterococcus*, ki so lahko patogeni. Mlečnokislinske bakterije so oportunisti. Če že prodrejo v kri oziroma organe, potem je vzrok za to v oslabelosti organizma, oziroma odpovedi imunskega sistema, nikoli pa niso edini povzročitelji infekcije. Raziskave na področju varne uporabe je potrebno nadaljevati, še posebej za nove probiotične vrste in seve. Redke primere »bakterimij« so uspešno

ozdravili z antibiotiki (Reid, 2006). V večini primerov mlečnokislinske bakterije pozitivno vplivajo na zdravje in dobro počutje (Adams, 1999).

2.5 MLEČNOKISLINSKE BAKTERIJE

Mlečnokislinske bakterije imajo pomembno vlogo pri proizvodnji hrane in pri zdravem prehranjevanju. Uporabljajo se v mlečnih izdelkih, mesu in drugih fermentiranih proizvodih, kjer njihove lastnosti izkoristijo za proizvodnjo izdelkov, kot so sir, jogurt, drugi fermentirani mlečni izdelki, pijače, klobase in ostali mesni izdelki (Feord, 2002). Razen probiotičnih živil najdemo na tržišču probiotične izdelke v obliki praškov, tablet, kapsul, suspenzij ali sprejev. Lahko vsebujejo eno samo bakterijsko vrsto ali pa kombinacijo različnih vrst bakterij ali kvasovk (Fooks in sod., 1999).

Najbolj poznani probiotični mikroorganizmi so predstavniki rodov *Lactobacillus* in *Bifidobacterium* (Preglednica 2), kar je delno posledica njihove tradicionalne povezave z zdravjem, naravne prisotnosti v prebavnem traktu in fermentirani hrani, pa tudi tako imenovanega statusa GRAS (Generally Regarded as Safe), ki jim daje sloves »varnih« mikroorganizmov, saj jih ljudje v fermentirani hrani uživajo že tisočletja (Rogelj in Perko, 2003).

Preglednica 2: Mikroorganizmi, ki jih uporabljamo kot probiotike (Gardiner in sod., 2002)

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

Glede na končne produkte presnove delimo mlečnokislinske bakterije na:

- homofermentativne, pri katerih je končni produkt razgradnje glukoze mlečna kislina (*Lb. acidophilus*, *Lb. bulgaricus*, *Lb. helveticus*, *Ec. faecium* in *Str. thermophilus*) in
- heterofermentativne, ki iz glukoze tvorijo mlečno kislino, očetno kislino ter ostale produkte, med njimi pline, npr. ogljikov dioksid (*Bif. breve*, *Bif. infantis*, *Bif. longum*, *Bif. thermophilum*, *Lb. casei*, *Lb. fermentum*, *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus* in *Lb. salivarius*) (O'Toole in Lee, 2003).

Podrobno bomo opisali rodova *Lactobacillus* in *Bifidobacterium*, ki sta bila navzoča v pregledanih probiotičnih izdelkih.

Rod *Bifidobacterium* so obvezno anaerobne, negibljive, nesporogene gram-pozitivne paličaste bakterije, ki ogljikove hidrate fermentativno presnavljajo v mlečno in očetno kislino kot glavna produkta. V debelem črevesu dosežejo koncentracijo 10^8 – 10^9 celic na

gram vsebine, kar jih uvršča med najpomembnejše organizme črevesne flore. Naseljujejo tudi črevesje živali in druge ekološke niše, vendar se sevi razlikujejo, kar omogoča uporabo bifidobakterij pri odkrivanju vira fekalne kontaminacije. Bifidobakterije humanega izvora pa se uporabljajo tudi v proizvodnji probiotičnih mlečnih izdelkov (Adamič in sod., 2003).

Rod *Lactobacillus* spada med najpomembnejše mlečnokislinske bakterije, ki so istočasno najpomembnejša skupina industrijsko uporabnih bakterij v živilstvu. To so po Gramu pozitivne dolge ali kokoidne, negibljive in nesporogene paličice. Glede odnosa do kisika so aerotolerantni anaerobi. Prehransko so zahtevni, poleg fermentabilnih sladkorjev potrebujejo mnoge rastne dejavnike, kot so aminokisliline, vitamini in organske baze (Adamič in sod., 2003).

2.6 IZBIRA IN VARNOST PROBIOTIČNEGA SEVA

Sevi, ki jih uporabljamo kot probiotike, morajo biti natančno taksonomsko identificirani, poznane morajo biti njihove karakteristike. Zaželeno je, da so vrstno specifični, torej humani izolati za prehrano ljudi, nujne so potrditve, da so nepatogeni in netoksični. Najbolj so priljubljeni sevi, ki pripadajo vrstam mlečnokislinskih bakterij s statusom GRAS (Generally Regarded as Safe) (Rogelj in Bogovič Matijašič, 2004). Probiotični sev mora zadostiti osnovnim pogojem oz. kriterijem funkcionalnosti, kot so:

- odpornost proti kislini in žolču,
- sposobnost vezave na črevesne epitelne celice,
- imeti status GRAS,
- obstojnost med tehnološkimi procesi in skladiščenjem,
- učinkovitost proti patogenim bakterijam, kot so *Helicobacter pylori*, *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes* in *Clostridium difficile*,
- antimutageno in antikarcinogeno delovanje,
- humani izvor, če je sev namenjen humani uporabi ter
- klinično dokazani in dokumentirani zdravstveni učinki (Havennar in Huis in't Veld, 1992; Ouwehand in sod., 1999; Saarela in sod., 2000).

Rogelj (2001) pa še navaja, da sestavine hrane ne smejo vplivati na karakteristike probiotičnega seva, kakor tudi probiotik s svojo aktivnostjo ne sme negativno vplivati na organoleptične lastnosti izdelka. Nedavno so se kot zanimiva alternativa/dopolnilo probiotikom pojavili prebiotiki, ki naj bi imeli podobne učinke kot probiotiki, to je uravnavanje črevesnega mikrobnege ravnotežja. Pripadajo funkcionalni skupini prehranskih vlaknin oligo- in polisaharidne narave in so v glavnem rastlinskega izvora. Prebiotični ogljikovi hidrati lahko v živilu izboljšajo organoleptične lastnosti, poleg tega pa so tudi nizkokalorični. Pro- in prebiotiki so se začeli kombinirati v sinbiotike, ki naj bi imeli dvojni koristen učinek, kar pa bo potrebno še dokazati.

Lin in sod. (2006) so raziskovali različne lastnosti probiotičnih mlečnokislinskih bakterij iz petih probiotičnih izdelkov, od tega dveh probiotičnih mlečnih izdelkov in treh liofiliziranih probiotičnih izdelkov, med katerimi so bile odpornost proti kislini, žolču, učinkovitost proti patogenim bakterijam in sposobnost vezave na črevesne epitelne celice.

Pogoje, podobne tistim v prebavilih, so zagotovili tako, da so gojišču MRS dodali 0,3 % žolčno raztopino (Ox-gall). Primerjali so število ke/ml v gojišču MRS ter gojišču MRS z žolčem. Po 36 h je analiza pokazala, da se je število bakterij na gojišču MRS z žolčno kislino zmanjšalo z 0,31 na 4,24 log v primerjavi z gojiščem MRS, kjer je bilo število ke/ml od $2,5 \cdot 10^9$ do $2,05 \cdot 10^7$. Boljšo odpornost proti žolču so opazili v mlečnih izdelkih ter enem liofiliziranem izdelku, v ostalih dveh liofiliziranih izdelkih pa je bila odpornost proti žolču zelo slaba. Analizo odpornosti izdelkov proti želodčni kislini so opravili s štetjem ke/ml v gojišču MRS z nevtralnimi pH ter tistim z vrednostjo pH 2,0. V treh izdelkih (od tega v dveh probiotičnih mlečnih izdelkih) se je število na gojišču s pH 2,0 zmanjšalo za 2,23–3,45 log, v dveh liofiliziranih izdelkih pa za 1,10–1,52 log v primerjavi s kontrolnim gojiščem MRS s pH 7,0. Vendar pa je pH v gastrointestinalnem traktu odvisna od zaužite hrane in variira med vrednostma 1,5–4,5. To lahko vpliva na preživetje mlečnokislinskih bakterij. Zaužita hrana je torej tista, ki lahko zaščiti bakterije pred delovanjem pepsina in kisline v želodcu. Sposobnost vezave na epitelne celice so opazili samo v enem probiotičnem mlečnem izdelku, ostali niso pokazali te sposobnosti. Pri proučevanju učinkovitosti proti patogenim bakterijam (*S. aureus*, *E. coli* in *Salmonella typhimurium*) so zaviralne snovi proti patogencem ugotovili v treh izdelkih, v dveh pa samo proti *S. aureus*. Predvidevajo, da je zaviralni učinek teh mlečnokislinskih bakterij predvsem posledica delovanja mlečne kisline ali drugih organskih kislin, ki jih bakterije proizvajajo. Menijo tudi, da je v probiotičnih izdelkih malo mikroorganizmov, ki ustrezajo pogojem za probiotični sev.

2.7 SODOBNE METODE UGOTAVLJANJA IN IDENTIFIKACIJE PROBIOTIČNIH BAKTERIJ

Tradicionalne metode ugotavljanja mikroorganizmov so velikokrat dolgotrajne in zahtevajo veliko dela, zato se vedno bolj poslužujemo hitrih, specifičnih in občutljivih metod. Sodobne metode, ki temeljijo na analizi DNA, so nadomestile tradicionalne konvencionalne mikrobiološke metode. Nekatere izmed metod so vrstno specifična PCR metoda v kombinaciji z gelsko elektroforezo, elektroforetsko ločevanje DNA na poliakrilamidnem gelu (DGGE, angl. denaturing gradient gel electrophoresis), gelska elektroforeza v utripajočem električnem polju (PFGE, angl. pulsed field gel electrophoresis), sekveniranje DNA, kvantitativna real-time PCR (PCR v realnem času) in fluorescentne tehnike (Fasoli in sod., 2003; Coeuret in sod., 2004; Bogovič Matijašič in Rogelj, 2006).

2.7.1 Pomnoževanje DNA z metodo PCR

Verižna reakcija s polimerazo (PCR) je metoda sinteze nukleinskih kislin *in vitro*, s katero lahko v kratkem času pomnožimo določen odsek molekule DNA v velikem številu identičnih kopij. Reakcijo lahko uporabimo za odkrivanje, identifikacijo in/ali tipizacijo mikroorganizmov iz živil.

Stopnje, ki so vključene v preiskavo vzorca s PCR:

- priprava tarčne DNA,
- priprava in izvedba PCR in

- ugotavljanje pomnožkov (Smole Možina in sod., 2002).

Princip reakcije PCR je pomnožitev dela tarčne DNA *in vitro* z DNA-polimerazo v cikličnem termostatu. Termostabilna DNA-polimeraza je encim, ki so ga izolirali iz termofilnih bakterij *Thermus aquaticus*. Encim ima optimalno temperaturo 72 °C in ohranja svojo aktivnost, tudi če je krajši čas na višjih temperaturah, ki so potrebne za denaturacijo dvovertične DNA. Poseben termostat zagotavlja zvezno spreminjanje temperature, ki zajema več faz (Smole Možina in sod., 2002). Običajna reakcija PCR poteka pod pogoji, ki so opisani v preglednici 3.

Preglednica 3: Pogoji reakcije PCR (Promega, 2005)

Faze	T (°C)	t (min)	Št. ciklov
Začetna denaturacija	95	2	1
Denaturacija	95	0,5–1	25–35
Prileganje	42–65	0,5–1	
Podaljševanje	72	1	
Končno podaljševanje	72	5	1

V vsakem ciklu se število tarčnih kopij podvoji. S 25 do 35 ponovitvami cikla se koncentracija pomnoženega dela DNA eksponentno pomnoži tudi do 10^9 kopij.

Za pomnoževanje dela DNA je potrebna reakcijska mešanica, ki poleg tarčnih molekul DNA vsebuje termostabilno DNA-polimerazo, deoksinukleotid trifosfat (dNTP: dNTA, dNTT, dNTG, dNTC), ione Mg^{2+} , reakcijski pufer in oligonukleotidne začetnike.

Izbira oligonukleotidnih začetnikov je odvisna od vrste reakcije PCR in vrste preiskovanih mikroorganizmov. Zaporedja baz A, T, G, C v oligonukleotidnih začetnikih so komplementarna delu tarčne DNA in največkrat so pri reakciji PCR, ki je namenjena identifikaciji izolatov, izbrana iz znanih podatkov o nukleotidnih zaporedjih virulentnih genov. Pomnoži se del tarčne DNA med izbranimi oligonukleotidnima začetnikoma. Število pomnožkov, katerih velikost je določena z razdaljo med oligonukleotidnima začetnikoma, se podvoji v vsakem ciklu.

Pomnožke PCR najenostavneje ugotovimo z agarozno elektroforezo tako, da njihovo velikost primerjamo z molekularnim označevalcem z znanimi velikostmi odsekov DNA (Smole Možina in sod., 2002).

Čeprav je glavna prednost metod, ki vključujejo PCR, dobra specifičnost in občutljivost, pa je slednja pri praktični uporabi metode za preiskavo vzorcev hrane lahko problematična. Teoretično je za pomnoževanje DNA dovolj že ena sama tarčna molekula, v praksi pa je občutljivost metode lahko znatno nižja. Sestavine živila ali obogatitvenih gojišč lahko občutljivost zmanjšajo zaradi slabše ekstrakcije DNA iz mikrobnih celic, razgradnje DNA in/ali inhibicije encimske reakcije pomnoževanja DNA. Zato se metoda PCR v praksi uporablja v kombinaciji s klasično obogatitveno kultivacijo (Smole Možina, 2003).

Zaradi inhibicije encimske reakcije lahko pride do lažno negativnih rezultatov. Lahko so neustrezne razmere pomnoževanja ali pride do kontaminacije vzorca. Posebno pozornost je

treba posvetiti kontaminaciji s tujo DNA, saj le-ta lahko vodi do lažno pozitivnih rezultatov (Smole Možina in sod., 2002).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 NAČRT POSKUSA

V času raziskave (oktober - december 2005) smo v nekaterih bolj založenih slovenskih supermarketih popisali in vzorčili probiotične mlečne izdelke. Hranili smo jih po navodilih proizvajalca v hladilniku pri temperaturi pod 8 °C do analize ter jih analizirali na Katedri za mlekarstvo Biotehniške fakultete. Če je bilo mogoče, smo izbrali izdelek brez dodanega sadja, sicer pa s sadjem (v treh primerih).

Na deklaraciji smo ugotovili, ali je nomenklatura poimenovanja mikroorganizmov pravilna, kar smo preverili na seznamu veljavnih imen (List of prokaryotic names with standing in nomenclature), ki je dostopen na spletni strani in ga redno obnavljajo (Euzéby J.P., 1997).

Na deklaracijah izdelkov smo poiskali podatke o vrsti probiotičnih mikroorganizmov in izbrali različna selektivna gojišča za ugotavljanje števila posameznih mikroorganizmov. Število živih mikroorganizmov smo ugotavljali s konvencionalnimi metodami štetja kolonijskih enot na hranljivih gojiščih. Za potrditev identitete probiotičnih bakterij pa smo uporabili molekularno biološke metode, kjer smo DNA izolirali iz kolonij na selektivnih gojiščih in neposredno iz vzorca izdelkov ter s PCR in gelsko elektroforezo dokazovali prisotnost deklariranih mikroorganizmov.

3.2 MATERIAL

3.2.1 Probiotični mlečni izdelki

V bolj založenih slovenskih trgovinah smo kupili v paralelkah (z istim rokom uporabnosti) sedem izdelkov slovenskih proizvajalcev ter štiri izdelke iz drugih držav, ki so prikazani v preglednici 4. Vsak izdelek smo analizirali takoj po nakupu in ob koncu roka uporabnosti, saj nas je zanimalo, kako se spremeni število mikroorganizmov.

Preglednica 4: Probiotični mlečni izdelki na slovenskem trgu od oktobra do decembra 2005

Ime izdelka	Deklarirana vrsta rodu oz. komercialno ime kulture ¹	Proizvajalec	Datum analize	
			Nakup izdelka	Rok uporabe
EGO ; navadni probiotični izdelek	<i>Lactobacillus acidophilus</i> in Bifidobacteria	Ljubljanske mlekarne	14. 10. 2005	05. 11. 2005
LCA ; navadni probiotični jogurt	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium</i> in <i>Lactobacillus casei</i>	Mlekarna Celeia	14. 10. 2005	28. 10. 2005
KAKO SI ; navadni probiotični jogurt	Howaru™ Bifido	Ljubljanske mlekarne	18. 10. 2005	26. 10. 2005
BIFIDUS ; navadni probiotični jogurt	<i>Bifidobacterium bifidum</i> in <i>Lactobacillus acidophilus</i>	Mlekarna Vipava	18. 10. 2005	26. 10. 2005
PRONUTRI ; naravni probiotični jogurt	Nu-trish™; <i>Lactobacillus acidophilus</i> (LA-5™), <i>Bifidobacterium bifidum</i> (BB-12™)	Pomurske mlekarne	18. 10. 2005	29. 10. 2005
LCAVITA ; navadni probiotični izdelek	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Lactobacillus casei</i>	Mlekarna Celeia	18. 10. 2005	29. 10. 2005
AB KULTURA ; tekoči jogurt limeta in aloevera	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium longum</i>	Dukat, Hrvaška	24. 10. 2005	10. 11. 2005
BIOAKTIV LGG ; navadni jogurt drink	LGG (<i>Lactobacillus rhamnosus</i> Gorbach & Goldin ATCC 53103)	Nöm, Avstrija za Dukat	24. 10. 2005	30. 11. 2005
ACTIMEL® ; navadni jogurt drink	<i>L. casei</i> IMUNITASS	Danone, Avstrija	04. 11. 2005	21. 11. 2005
BIO-FIT ; probiotični sadni jogurt hruška in jabolko	<i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. bifidus</i>	Kärtnermilch za Spar, Avstrija	09. 11. 2005	22. 11. 2005
PINJENEC ; probiotični pinjenec ananas	Kulture nu-trish™	Pomurske mlekarne	06. 12. 2005	17. 12. 2005

3.2.2 Gojišča

3.2.2.1 Tekoča gojišča in raztopine

3.2.2.1.1 Peptonska voda

¼ Ringerjeve raztopine smo pripravili po navodilih proizvajalca (Merck, Darmstadt, Nemčija), kjer smo 1 Ringerjevo tableto in 1 g/l triptona (Merck, Darmstadt, Nemčija) raztopili v 1 l destilirane vode, razdelili po 9 ml v epruvete in avtoklavirali 15 minut pri 121 °C. Raztopino smo uporabili za razredčevanje po Kochu.

¹ Imena bakterij, kakor so navedena na deklaraciji izdelka

3.2.2.1.2 Pufer TAE

Pripravili smo založno 50-kратно raztopino iz 242 g Tris baze, 57,1 ml ledooacetne kisline in 100 ml 0,5 M EDTA. Pripravljeno raztopino smo pred uporabo razredčili z vodo v razmerju 1:50.

3.2.2.2 Trdna gojišča

3.2.2.2.1 Gojišče MRS

Trdno hranljivo gojišče MRS smo pripravili po navodilih proizvajalca (Merck, Darmstadt, Nemčija), razdelili v stekleničke (po 200 ml gojišča) in ga avtoklavirali 15 minut pri 115 °C. Uporabili smo ga za ugotavljanje števila kolonijskih enot *Lb. casei*.

3.2.2.2.2 Gojišče MRS z dodanim klindamicinom (MRS + cly)

Gojišče MRS smo pripravili po navodilih proizvajalca (Merck, Darmstadt, Nemčija). Založno raztopino antibiotika klindamicin smo sterilizirali s filtracijo skozi pore velikosti 0,2 µm ter ga pred razlivanjem na plošče (45 °C) dodali v koncentraciji 0,1 µg/ml (50 µl 0,02 % založne raztopine/100 ml gojišča). Uporabili smo ga za selektivno štetje laktobacilov vrste *Lb. acidophilus*.

3.2.2.2.3 Gojišče MRS z dodanim cisteinom (MRS + NPNL)

Gojišče MRS smo pripravili po navodilih proizvajalca (Merck, Darmstadt, Nemčija) ter pred razlivanjem v petrijevke dodali 0,05 % cistein hidroklorida (10 ml založne 5 % raztopine / 1 gojišča) ter mešanico antibiotikov NPNL (50 ml raztopine / 1 gojišča), ki smo jo pripravili po postopku, opisanem v IDF standardu 149 (1991). Raztopina NPNL vsebuje tri antibiotike: neomicin sulfat, paromomicin sulfat in nalidiksično kislino, ki zavirajo rast mlečnokislinskih bakterij, ne zavirajo pa bifidobakterij. Uporabili smo ga za štetje kolonij bifidobakterij.

3.2.2.2.4 Gojišče MRS - IM z dichloxallin-om (MRS - IM)

Gojišče MRS - IM smo pripravili po priporočilih proizvajalca Chr. Hansen (2001). Pred avtoklaviranjem (121 °C 15 minut) smo umerili vrednost pH na $6,9 \pm 0,1$. Pred uporabo smo v 1 l na 45 °C temperiranega gojišča dodali 100 ml 20 % raztopine glukoze, 10 ml 10 % založne raztopine LiCl, 5 ml 10 % založne raztopine cistein hidroklorida in 5 ml 0,01 % založne raztopine antibiotika dichloxalina. Uporabili smo ga za štetje kolonij bifidobakterij.

3.2.2.2.5 Gojišče LAMVAB

Gojišče MRS smo pripravili po navodilih proizvajalca (Merck, Darmstadt, Nemčija), mu dodali barvilo bromkrezol zeleno ter pred avtoklaviranjem (15 minut pri 121 °C) uravnali vrednost pH na $5,0 \pm 0,1$. Ohlajenemu steriliziranemu gojišču (45 °C) smo dodali cistein hidroklorid (0,5 g/l) ter antibiotik vankomicin (20 mg/l), ki inhibira rast po Gramu pozitivnih bakterij, ne pa večine laktobacilov (Hartemink in sod., 1997). LAMVAB smo uporabili za štetje kolonij laktobacilov.

3.2.3 Reagenti in encimi za izolacijo DNA in reakcijo PCR

3.2.3.1 Reagenti za pripravo bakterijske DNA

- Komercialni set za izolacijo genomske DNA (Promega, Madison, WI, ZDA)
- EDTA, pH = 8 (Sigma Chemical, St. Louis, ZDA)
- Lizocim (Sigma Chemical, St. Louis, ZDA)
- Izopropanol (Merck, Darmstadt, Nemčija)
- Etanol (Merck, Darmstadt, Nemčija)
- Triton X-100 (Sigma Chemical, St. Louis, ZDA)

3.2.3.2 Reagenti za pripravo mikroskopskega preparata

Komercialni set za barvanje po Gramu (Bio-Mérieux, Marcy L'Etoile, Francija) vsebuje:

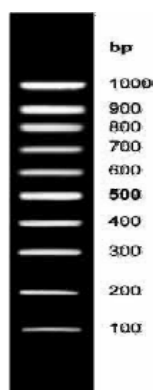
- kristal vijolično barvilo,
- barvilo lugol,
- 95 % mešanico etanola in etra (50 : 50),
- barvilo safranin in
- imerzijsko olje (Merck, Darmstadt, Nemčija).

3.2.3.3 Reagenti za verižno reakcijo s polimerazo (PCR)

- dNTP, 10 mM (Boehringer Mannheim, Nemčija),
- 5x zeleni GoTaq[®] pufer za polimerazo z 1,5 mM MgCl₂ (Promega, Madison, WI, ZDA),
- 5x zeleni GoTaq[®] Flexi pufer za polimerazo brez MgCl₂ (Promega, Madison, WI, ZDA),
- Magnezijev klorid - MgCl₂, 25 mM (Promega, Madison, WI, ZDA),
- GoTaq[®] DNA polimeraza (Promega, Madison, WI, ZDA),
- Oligonukleotidni začetniki (Invitrogen life technologies, Paisley, Velika Britanija),
- Deionizirana, mikrofiltrirana in sterilizirana voda (mQ).

3.2.3.4 Reagenti za ugotavljanje pomnožkov v agaroznem gelu

- 0,5 x TAE puffer,
- Agaroz (Sigma Chemical, St. Louis, ZDA),
- Rastopina etidijevga bromida (5 µg/ml) (Sigma Chemical, St. Louis, ZDA),
- Molekularni označevalec pomnožkov DNA - 100 bp (100 bp DNA Ladder, Fermentas, Litva).



Slika 2: Slika molekularnega označevalca dolžin pomnožkov DNA po gelski elektroforezi na agarozni

3.3 METODE

3.3.1 Ugotavljanje števila mikroorganizmov v probiotičnih mlečnih izdelkih

Vzorci probiotičnih mlečnih izdelkov smo dobro premešali ter jih odprli ob gorilniku. Po 1 ml vzorca smo odpipetirali v epruveto z 9 ml fiziološke raztopine. Uporabili smo metodo razredčevanja po Kochu, kjer vzorec razredčujemo v fiziološki raztopini, dokler po cepljenju na agarske plošče ne dobimo števnih plošč, od 30–300 kolonij na plošči (Smole Možina, 2000).

V petrijevke s trdim gojiščem smo odpipetirali 0,1 ml vzorca ter s stekleno palčko razmazali vzorec po površini. Stekleno palčko smo pred in po razmazu namočili v etanol, jo ožgali v plamenu in počakali, da se nekoliko ohladi. Gojišča smo inkubirali pri ustreznih pogojih, kot je prikazano v preglednici 5.

Anaerobne pogoje smo zagotovili z uporabo anaerobnih loncev in GENbox sistema (Bio-Mérieux, Marcy-L'Etoile, Francija).

Preglednica 5: Selektivna gojišča in pogoji inkubacije za ugotavljanje števila mikroorganizmov

Gojišče	Pogoji inkubacije	Tarčni mikroorganizem
MRS	31 °C, 48–72 h, aerobno	<i>Lb. casei</i>
MRS + cly	37 °C, 48–72 h, anaerobno	<i>Lb. acidophilus</i>
LAMVAB	37 °C, 24–48 h, anaerobno	Laktobacili
MRS - IM	42 °C, 72 h, anaerobno	Bifidobakterije
MRS + NPNL	42 °C, 72 h, anaerobno	Bifidobakterije

Po končani inkubaciji smo zrasle kolonije prešteli s pomočjo elektronskega števca (EŠKO 7L, LABO Ljubljana). Število kolonijskih enot (ke) bakterij v mililitru probiotičnega izdelka smo izračunali po naslednji formuli (IDF standard 100B, 1991):

$$N = \Sigma C / ((n_1 + 0,1 \cdot n_2) \cdot d) \quad \dots(1)$$

Legenda:

N: cfu/ml oz. cfu/g

ΣC : vsota kolonij na vseh ploščah

N_1 : število prešteti plošč 1. razredčitve

N_2 : število prešteti plošč 2. razredčitve

D: razredčitveni faktor

3.3.2 Ugotavljanje morfologije kolonij na gojiščih in mikroskopiranje

Po inkubaciji smo pregledali značilnosti kolonij (barva, izgled površine, rob). Iz značilnih kolonij smo naredili mikroskopski preparat z metodo barvanja po Gramu, ki je opisana

spodaj. Mikromorfološke lastnosti mikroorganizmov (oblika, velikost, formacije, obarvanje po Gramu itd.) smo opazovali pod mikroskopom pri 1000-kratni povečavi.

Za barvanje po Gramu smo uporabili komercialni set (Bio-Mérieux, Marcy L'Etoile, Francija):

- Kapljico fiziološke raztopine smo kanili na objektno steklo, nato pa smo v njej s cepilno zanko razmazali nekaj mikrobne biomase (s sterilno ezo se dotaknemo kolonije na gojišču). Uporabili smo aseptično tehniko dela.
- Razmaz smo posušili na zraku ter ga fiksirali tako, da smo ga trikrat potegnili čez plamen gorilnika.
- Barvanje po Gramu:
 - S kristal violet barvamo 1 minuto, spiramo z vodo.
 - Nanos barvila lugol in barvamo 1 minuto, spiramo z vodo.
 - Razbarvamo preparat s 95 % mešanico etanola in etra, spiramo z vodo.
 - Barvilo safranin pustimo 1 minuto in spiramo z vodo.
 - Preparat osušimo s papirnato brisačo in mikroskopiramo z imerzijo.

3.3.3 Priprava DNA za izvedbo PCR

DNA bakterij smo pripravili iz kolonij na gojiščih (MRS, MRS + cly, MRS - IM, MRS + NPNL in LAMVAB) in neposredno iz vzorca izdelka.

3.3.3.1 Postopek izolacije DNA iz kolonij na gojišču z obdelavo s toploto in detergentom

- S sterilno ezo smo kolonijo iz gojišča prenesli v mikroepreveto (1,5 ml) z 200 μ l deionizirane vode.
- Segrevali smo 5 minut pri 100 °C in na ledu ohladili.
- V novo mikroepreveto s 5 μ l 10 % tritona X-100 (Sigma Chemical, St. Louis, ZDA) smo dodali 45 μ l toplotno obdelanega, ohlajenega vzorca.
- Vzorce lizatov smo hranili v zamrzovalniku pri -20 °C.

3.3.3.2 Postopek izolacije DNA neposredno iz vzorca izdelka

Za izolacijo DNA neposredno iz probiotičnih jogurtov smo uporabili komercialni set za izolacijo genomske DNA (Promega, ZDA). Začetne korake smo prilagodili našim vzorcem.

- 100 μ l probiotičnega jogurta smo resuspendirali v 500 μ l EDTA, z dodanim encimom lizocimom, ki razgradi celično steno mikroorganizma ter vsebino previdno premešali.
- Pri 37 °C smo inkubirali 45 minut in s tem omogočili delovanje encima.
- Pri 14 000 g smo centrifugirali 2 minuti.

- Supernatant smo zavrgli, sedimentu pa previdno dodali 600 µl raztopine za liziranje celic (Nuclei Lysis Solution).
- Pri 80 °C smo inkubirali 5 minut in ohladili na sobno temperaturo.
- Dodali smo 3 µl raztopine RNA-ze ter 2-5x obrnili mikroepruveto, da se je vsebina premešala.
- Pri 37 °C smo inkubirali 15 minut in vzorec ohladili na sobno temperaturo.
- Dodali smo 200 µl raztopine za precipitacijo proteinov ter mešali 20 sekund (uporabimo mešalec Vortex).
- Vzorec smo 5 minut hladili na ledu.
- Pri 15 000 g smo centrifugirali 3 minute.
- Supernatant smo previdno odlili v novo mikroepruveto z 600 µl izopropanola ter nežno premešali.
- Pri 16 000 g smo centrifugirali 3 minute.
- Supernatant smo previdno odlili, sediment pa sprali s 70 % etanolom ter premešali.
- Pri 16 000 g smo centrifugirali 2 minuti.
- Supernatant smo previdno odlili.
- Mikroepruvete smo osušili v inkubatorju pri 45 °C za 10–15 minut, da je preostali etanol izhlapel.
- Sedimentu smo dodali 100 µl rehidracijske raztopine (DNA Rehydration Solution) in pustili na 4 °C preko noči.
- Naslednji dan smo lahko vzorce uporabili v reakciji PCR oz. smo jih hranili v zamrzovalniku pri -20 °C.

3.3.4 Priprava reakcijske mešanice za PCR

Reakcijsko mešanico za PCR smo sestavili v le za to namenjenem prostoru. Pri delu smo uporabili rokavice za enkratno uporabo. Kemikalije, ki smo jih uporabili, so morale biti ves čas na ledu (Jeršek, 2003). Pred in po delu smo delovni prostor razkužili ter osvetlili z UV lučjo za najmanj 2 uri.

Glede na število vzorcev (vključno z negativno in pozitivno kontrolo) smo izračunali volumen posameznih sestavin. Celoten volumen reakcijske mešanice z dodanimi lizati za en vzorec je znašal 25 µl. Najprej smo odpipetirali izračunan volumen vode, nato ustrezen volumen pufra za polimerazo z MgCl₂ (GoTaq[®]) ali pufra brez MgCl₂ (GoTaq[®] Flexi), mešanico nukleotidov dNTP, ustreznega oligonukleotidnega začetnika (o. z. 1, o. z. 2) ter na koncu GoTaq[®] DNA-polimerazo. Reakcijsko mešanico smo premešali in razdeljevali v 0,2 ml mikroepruvete za PCR po 21 µl.

V vsako reakcijo PCR smo vključili dve kontroli. Negativno kontrolo je predstavljala mešanica, ki smo ji namesto DNA dodali 4 µl deionizirane vode. Pozitivno kontrolo za preiskovane bakterije je predstavljala mešanica, ki smo ji dodali 4 µl lizata poznane čiste kulture preiskovanih bakterij. Mikroepruvete s 25 µl reakcijske mešanice (21 µl mešanice in 4 µl tarčne DNA) smo nato prenesli v aparaturo za PCR (Biorad, ZDA) in vnesli ustrezen protokol polimerazne verižne reakcije.

3.3.5 Potek PCR

Podatki o uporabljenih oligonukleotidnih začetnikih in velikosti specifičnih produktov so prikazani v preglednici 6, sestava reakcijske mešanice v 25 μ l pa v preglednici 7.

Preglednica 6: Uporabljeni oligonukleotidni začetniki v reakciji PCR ter velikost specifičnih produktov

Bakterijska vrsta	Oligonukleotidni začetnik 1	Oligonukleotidni začetnik 2	Končna konc. MgCl ₂	Velikost specifičnih produktov	Vir
Bakterijska DNA	27f	100r	1,5 mM	110 bp	Barakat in sod., 2000
rod <i>Bifidobacterium</i>	Bif 164-f	Bif 662-r	1,5 mM	520 bp	Satokari in sod., 2000
<i>Lb. casei</i>	Pr I	CasII	2 mM	200 bp	Walter in sod., 2000
<i>Lb. acidophilus</i>	Lac-1	Lac-2	1,5 mM	759 bp	
<i>Lb. rhamnosus</i>	PrI	RhaII	2 mM	186 bp	
<i>Bif. bifidum</i>	BiBIF-1	BiBIF-2	1,5 mM	278 bp	Matsuki in sod., 1999
<i>Bif. longum</i>	BiLON-1	BiLON-2	1,5 mM	831 bp	
<i>Bif. lactis</i>	Bf lact-2	Bf lact-5	1,5 mM	680 bp	

Preglednica 7: Sestava 25 μ l reakcijske mešanice za PCR

4 μ l tarčne DNA
2,5 μ l 5x zeleni GoTaq [®] Flexi ali GoTaq [®] pufer za polimerazo
od 1,5 do 3 μ l 25 mM MgCl ₂
0,25 μ l o. z. 1
0,25 μ l o. z. 2
0,5 μ l dNTP
0,25 μ l 5 U / μ l GoTaq [®] DNA polimeraze
od 11,9 do 15,8 μ l vode (glede na dodano količino MgCl ₂)

Reakcijo PCR za ugotavljanje prisotnosti bakterijske DNA in DNA tarčnih probiotičnih bakterij smo izvedli po protokolih, ki so prikazani v preglednici 8.

Preglednica 8: Oligonukleotidni začetniki in pogoji reakcije PCR za ugotavljanje bakterijske DNA in DNA tarčnih probiotičnih bakterij

Oligonukleotidni začetniki (tarčna bakterija)	Reakcija	Parametri	Št. ciklov
27 f in 100 r (bakterijska DNA)	Začetek	95 °C, 5 min	1
	Denaturacija DNA	94 °C, 30 s	35
	Prileganje	55 °C, 45 s	
	Podaljševanje	72 °C, 60 s	
	Zaključek	72 °C, 3 min	1
Bif 164-f in Bif 662-r (rod <i>Bifidobacterium</i>)	Začetek	94 °C, 5 min	1
	Denaturacija DNA	94 °C, 30 s	35
	Prileganje	62 °C, 20 s	
	Podaljševanje	68 °C, 40 s	
	Zaključek	62 °C, 20 s	1
		68 °C, 7 min	
PrI in CasII (<i>Lb. casei</i>)	Začetek	95 °C, 3 min	1
	Denaturacija DNA	95 °C, 30 s	30
	Prileganje	55 °C, 30 s	
	Podaljševanje	72 °C, 30 s	
	Zaključek	72 °C, 3 min	1
		72 °C, 2 min	
Lac-1 in Lac-2 (<i>Lb. acidophilus</i>)	Začetek	95 °C, 2 min	1
	Denaturacija DNA	95 °C, 30 s	30
	Prileganje	62 °C, 30 s	
	Podaljševanje	72 °C, 30 s	
	Zaključek	72 °C, 5 min	1
PrI in RhII (<i>Lb. rhamnosus</i>)	Začetek	95 °C, 2 min	1
	Denaturacija DNA	95 °C, 30 s	30
	Prileganje	58 °C, 30 s	
	Podaljševanje	72 °C, 30 s	
	Zaključek	72 °C, 5 min	1
BiBIF-1 in BiBIF-2 (<i>Bif. bifidum</i>)	Začetek	95 °C, 5 min	1
	Denaturacija DNA	95 °C, 20 s	35
	Prileganje	55 °C, 20 s	
	Podaljševanje	72 °C, 30 s	
	Zaključek	72 °C, 5 min	1
BiLON-1 in BiLON-2 (<i>Bif. longum</i>)	Začetek	95 °C, 5 min	1
	Denaturacija DNA	95 °C, 20 s	35
	Prileganje	55 °C, 20 s	
	Podaljševanje	72 °C, 30 s	
	Zaključek	72 °C, 5 min	1
Bflact-2 in Bflact-5 (<i>Bif. lactis</i>)	Začetek	95 °C, 5 min	1
	Denaturacija DNA	95 °C, 30 s	30
	Prileganje	58 °C, 1 min	
	Podaljševanje	72 °C, 4 min	
	Zaključek	72 °C, 7 min	1

3.3.6 Dokazovanje pomnožkov z gelsko elektroforezo

Agarozni gel smo pripravili iz agaroze in 0,5-kratnega pufra TAE (Tris acetatni puffer). V mikrovalovni pečici smo raztopino segrevali do vrenja tako dolgo, da je postala bistra. Po

ohladitvi na približno 60 °C smo raztopino gela vlili v ustrezen modelček z glavnikom. Ko se je gel dobro strdil, smo previdno odstranili glavnik in gel prenesli v aparat za elektroforezo s 0,5x pufrom TAE. Na gel smo nanegli po 10 µl mešanice PCR, nato pozitivno in negativno kontrolo ter v zadnji prostorček 2,5 µl raztopine molekularnega označevalca (100 bp DNA Ladder). Ker izdelek GoTaq® (Promega) že vsebuje barvilo, ga ni bilo potrebno dodajati. Na koncu smo v zadnje prostorčke odpipetirali negativno in pozitivno kontrolo. Elektroforeza je pri vseh gelih potekala pri 90 V od 30 do 40 minut.

Po končani elektroforezi smo gel obarvali z raztopino etidijevega bromida (0,5 µg/ml). Po 30 minutah barvanja smo gel pregledali pri UV svetlobi ($\lambda = 302$ nm) ter ga računalniško dokumentirali.

4 REZULTATI

4.1 DEKLARACIJE PROBIOTIČNIH IZDELKOV

Bistvenih pomanjkljivosti v poimenovanju izdelkov nismo ugotovili, niso pa bila vedno navedena imena vrst probiotičnih bakterij, ki so jih izdelki vsebovali. Navedba podatkov o bakterijskem sevu pa je bila sploh redka. Prav tako v večini primerov lahko le ugibamo, ali izdelek poleg probiotične vsebuje tudi jogurtovo kulturo (*Lb. bulgaricus* in *Str. thermophilus*) ali ne. Pravilnost imen mikroorganizmov, ki jih navajajo na deklaracijah, smo preverili na seznamu priznanih bakterijskih imen, ki je dostopen na spletni strani <http://www.bacterio.cict.fr/> (Euzéby, 1997). Rezultati preverjanja nomenklature so naslednji:

- Izdelek Bio-Fit ima deklarirano še staro ime *Lb. bifidus*, ki ne velja več.
- Izdelki Lca, Ego in LcaVita imajo naveden rod *Bifidobacterium*, ne pa vrste.
- Izdelek Actimel[®] ima poleg vrste in rodu deklarirano še ime IMUNITASS.
- Izdelek Kako si ima navedeno Howaru[™] Bifido brez pravega imena mikroorganizmov.
- Izdelek Pinjenec - ananas ima deklarirano kulturo nu-trish[™] brez pravega imena mikroorganizmov.
- Izdelek ProNutri ima poleg kulture nu-trish[™] deklarirane še bakterijske vrste.

Preverili smo tudi, ali deklaracije vsebujejo podatek o številu mikroorganizmov ter druge koristne informacije za potrošnika.

- Deklaracije enajstih analiziranih probiotičnih izdelkov ne vsebujejo podatka o številu mikroorganizmov.
- Izdelek Actimel[®] ima navedeno trditev, da pomaga krepiti naravno odpornost ter da je učinek Actimela[®] potrdilo avstrijsko Ministrstvo za zdravje.
- BioAktiv LGG ima v hrvaškem jeziku na ovitku napisane koristne zdravstvene informacije za potrošnika, niso pa prevedene v slovenski jezik. Deklaracija izdelka BioAktiv vsebuje naslednje informacije: »BioAktiv LGG je poseben prehransko pomemben mlečni proizvod namenjen tistim, ki živijo dinamično in stresno življenje in kljub temu aktivno skrbijo za svoje zdravje. LGG je koristna probiotična bakterija, ki blagodejno vpliva na zdravje, je znanstveno in klinično dokazana in najobsežnejše dokumentirana vrsta, kar je potrdilo hrvaško Ministrstvo za zdravje.

BioAktiv LGG:

- **pomaga pri normalni prebavi**; LGG ščiti prebavni sistem pred delovanjem škodljivih bakterij in olajša prebavne procese.
- **krepi imunski sistem**; LGG postane del naravne prebavne mikroflore in aktivno sodeluje pri nastajanju naravne imunosti
- **varuje zdravje**; LGG z blagodejnim delovanjem na prebavo in z aktivno krepitvijo imunskega sistema ter s številnimi drugimi pozitivnimi učinki prispeva k ohranjanju splošnega zdravja organizma.

Z rednim jemanjem izdelka BioAktiv se obnavlja naravni LGG. Dovoljen je en BioAktiv LGG vsak dan, s čimer zagotovite dnevno dozo LGG-ja«.

- Na slovenski deklaraciji izdelka Bio-Fit niso navedeni probiotični mikroorganizmi. V notranjosti ovitka je besedilo samo v nemškem jeziku kjer navajajo učinke za zdravje ter prisotne mikroorganizme.
- Izdelek AB kultura ima poleg ostalih zdravstvenih informacij navedeno, da AB kultura (*Lb. acidophilus* in *Bif. longum*) daje napitku poseben blag in osvežujoč okus in da ugodno vpliva tudi na prebavo. AB kultura je namenjena vsem tistim, ki nadzorujejo svojo vitkost in lepoto na zdrav način, želijo uravnoteženo, nizkokalorično prehrano brez odrekanja užitkom s polnim okusom sadja.
- Izdelka Pronutri in Pinjenec (Pomurske mlekarnе) imata navedeno, da kulture n-trishTM skrbijo za ravnovesje črevesne mikroflore, kar je dokazano tudi s kliničnimi testi.

4.2 UGOTAVLJANJE ŠTEVILA DEKLARIRANIH PROBIOTIKOV V MLEČNIH IZDELKIH TER POTRJEVANJE KOLONIJ Z GOJIŠČ Z METODO PCR

Število deklariranih mikroorganizmov v probiotičnih mlečnih izdelkih smo ugotavljali s štetjem kolonijskih enot na gojiščih. Kolonije z različno morfologijo, ki so zrasle na posameznih selektivnih gojiščih, smo šteli ločeno, jih opisali in pripravili mikroskopske preparate. Vrsto smo ugotavljali z metodo PCR.

Rezultati analiziranih probiotičnih mlečnih izdelkov so podani v preglednicah od 9 do 19.

4.2.1 Probiotični mlečni izdelek Ego

Preglednica 9: Rezultati ugotavljanja prisotnosti in števila probiotičnih bakterij v mlečnem izdelku Ego

Izdelek	Gojišče	Morfološki opis		N _Z (ke/ml)	N _K (ke/ml)	Rezultat PCR
		Kolonije	Bakterije (barvanje po Gramu)			Iz kolonij
Ego: <i>Lactobacillus acidophilus</i> in <i>Bifidobacterium</i>	MRS + cly za <i>Lb. acidophilus</i>	Ploščate, bele, prozorne kolonije z nazobčanim robom	G+ dolge, neenakomerno obarvane paličaste bakterije	$1,2 \cdot 10^5$	$3,3 \cdot 10^3$	+ <i>Lb. acidophilus</i>
	MRS - IM za bifidobakterije	Bele, vodene, okrogle kolonije z ravnim robom	G+ kratke razvejane paličaste bakterije v obliki črke Y	$2,6 \cdot 10^6$	*	+ <i>Bif. lactis</i>
	MRS + NPNL za bifidobakterije	Bele, okrogle kolonije z vrhom	G+ drobne paličaste bakterije z odebeljenimi konci	$7,0 \cdot 10^5$	$2,7 \cdot 10^5$	+ <i>Bif. lactis</i>

Legenda:

N_Z: št. ke bakterij ob dnevu nakupa (začetno)

N_K: št. ke bakterij na dan, ko je potekel rok uporabnosti (končno)

*: ni podatka

+: pozitiven rezultat

Pri vrsti *Lb. acidophilus* se je število ob poteku roka uporabnosti zmanjšalo za 1,6 log.

Na gojišču MRS - IM je zraslo večje število bifidobakterij kot na gojišču MRS + NPNL.

- Število bifidobakterij se med hranjenjem do konca roka uporabnosti ni bistveno spremenilo.
- Pri pregledu oblike bakterijskih celic smo opazili tipične ploščate kolonije z nazobčanim robom za *Lb. acidophilus* ter pri barvanju po Gramu pri rodu bifidobakterije paličaste bakterije v obliki črke Y, ki so na koncih odebeljene.
- Tako laktobacili kot bifidobakterije so se obarvale po Gramu pozitivno.
- Z metodo PCR smo iz kolonij na gojišču potrdili prisotnost obeh vrst mikroorganizmov.

4.2.2 Probiotični mlečni izdelek Lca

Preglednica 10: Rezultati ugotavljanja prisotnosti in števila probiotičnih bakterij v mlečnem izdelku Lca

Izdelek	Gojišče	Morfološki opis		N _Z (ke/ml)	N _K (ke/ml)	Rezultat PCR
		Kolonije	Bakterije (barvanje po Gramu)			Iz kolonij
Lca: <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium</i> in <i>Lactobacillus casei</i>	MRS za <i>Lb. casei</i>	Bele, ploščate, okrogle kolonije	G+ kratke posamezne paličaste bakterije	$2,1 \cdot 10^7$	$2,2 \cdot 10^7$	+ <i>Lb. casei</i>
	MRS + cly za <i>Lb. acidophilus</i>	Ploščate, bele, prozorne kolonije z nazobčanim robom	G+ dolge, neenakomerno obarvane paličaste bakterije	$2,9 \cdot 10^7$	$1,8 \cdot 10^7$	+ <i>Lb. acidophilus</i>
	LAMVAB za laktobacile	Majhne, bele, okrogle kolonije	G+ drobne paličaste bakterije	$1,9 \cdot 10^7$	$2,1 \cdot 10^7$	- rod <i>Lactobacillus</i>
	MRS - IM za bifidobakterije	Bele kolonije z vrhom	G+ kratke paličaste bakterije, na koncih odebeljene	$2,5 \cdot 10^7$	$2,4 \cdot 10^6$	+ rod <i>Bifidobacterium</i>
	MRS + NPNL za bifidobakterije	Večje, bele, prozorne, okrogle kolonije z vrhom	G+ paličaste bakterije odebeljene na koncih	$3,2 \cdot 10^6$	*	+ <i>Bif. lactis</i>
	MRS + NPNL za bifidobakterije	Majhne, bele, prozorne kolonije	G+ tanke dolge paličaste bakterije v verižicah ali posamezno	$1,3 \cdot 10^7$	*	+ <i>Lb. casei</i>

Legenda:

N_Z: št. ke bakterij ob dnevu nakupa (začetno)

N_K: št. ke bakterij na dan, ko je potekel rok uporabnosti (končno)

*: ni podatka

+: pozitiven rezultat

-: negativen rezultat

- Med hranjenjem do konca roka uporabnosti se število bakterij vrst *Lb. acidophilus* in *Lb. casei* ni bistveno spremenilo.
- Število bifidobakterij se je do konca roka uporabnosti zmanjšalo za 1 log.
- Na gojišču MRS + NPNL je zraslo manjše število bifidobakterij kot na gojišču MRS - IM.
- Z metodo PCR smo dokazali, da so manjše kolonije, ki so zrasle na gojišču MRS + NPNL, bakterije vrste *Lb. casei*, večje pa *Bif. lactis*.
- Na gojišču LAMVAB smo po morfologiji in barvanju po Gramu predvidevali, da so zrasle kolonije bakterije vrste *Lb. casei*, vendar jih z metodo PCR nismo potrdili.

- Z metodo PCR smo potrdili prisotnost bakterij vrst *Lb. casei*, *Lb. acidophilus*, rod *Bifidobacterium* ter tudi vrsto *Bif. lactis*, ki na deklaraciji ni navedena.
- Na gojišču MRS, ki sicer ni selektivno, niso zrasle druge bakterije kot *Lb. casei*, ker je bila temperatura inkubacije (31 °C) neustrezna za ostale vrste laktobacilov in bifidobakterije.
- Mešanica antibiotikov NPNL očitno delno zavira rast bifidobakterij, ki jih vsebuje izdelek Lca, in ne prepreči rasti bakterij *Lb. casei*. Gojišče MRS + NPNL ni dovolj selektivno za ugotavljanje števila bifidobakterij.
- Na gojišču LAMVAB, ki naj bi bilo selektivno za laktobacile, smo po morfologiji predvidevali, da so zrasle kolonije *Lb. casei*, vendar jih s PCR nismo potrdili. Predvidevali smo, da je zrasla jogurtna kultura *Lb. bulgaricus*, ki pa jo s PCR nismo ugotavljali. Mnogi probiotični jogurti vsebujejo jogurtni kulturi *Lb. bulgaricus* in *Str. thermophilus*, vendar to običajno ni deklarirano.

4.2.3 Probiotični mlečni izdelek Kako si

Preglednica 11: Rezultati ugotavljanja prisotnosti in števila probiotičnih bakterij v mlečnem izdelku Kako si

Izdelek	Gojišče	Morfološki opis		N _Z (ke/ml)	N _K (ke/ml)	Rezultat PCR
		Kolonije	Bakterije (barvanje po Gramu)			Iz kolonij
Kako si: Howaru™ Bifido	MRS - IM za bifidobakterije	Okrogle, bele kolonije	G+ kratke paličaste bakterije na koncih odebeljene, oblika črke Y	7,9 · 10 ⁶	*	+ <i>Bif. lactis</i>
	MRS + NPNL za bifidobakterije	Bele, prozorne, okrogle kolonije	G+ kratke paličaste bakterije na koncih odebeljene	1,4 · 10 ⁶	1,8 · 10 ⁵	+ <i>Bif. lactis</i>

Legenda:

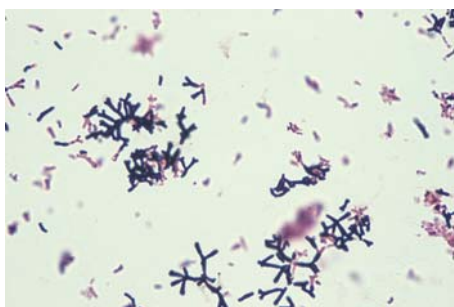
N_Z: št. ke bakterij ob dnevu nakupa (začetno)

N_K: št. ke bakterij na dan, ko je potekel rok uporabnosti (končno)

*: ni podatka

+: pozitiven rezultat

- Število bakterij je bilo ob poteku roka uporabnosti nekoliko manjše.
- Barvanje po Gramu in oblika celic je bila tipična za rod bifidobakterij, kar lahko vidimo na mikroskopskem preparatu na Sliki 3.
- Z metodo PCR smo iz kolonij na gojišču potrdili prisotnost bakterij vrste *Bif. lactis*. Na deklaraciji je navedeno samo komercialno ime Howaru™ Bifido, ki nakazuje na bakterijo rodu *Bifidobacterium*.



Slika 3: Mikroskopski preparat tipičnih bifidobakterij

4.2.4 Probiotični mlečni izdelek Bifidus

Preglednica 12: Rezultati ugotavljanja prisotnosti in števila probiotičnih bakterij v mlečnem izdelku Bifidus

Izdelek	Gojišče	Morfološki opis			Rezultat PCR	
		Kolonije	Bakterije (barvanje po Gramu)	N _Z (ke/ml)	N _K (ke/ml)	Iz kolonij
Bifidus: <i>Bifidobacterium bifidum</i> in <i>Lactobacillus acidophilus</i>	MRS + cly za <i>Lb. acidophilus</i>	Večje, bele kolonije z nazobčanim robom	G+ kratke tanke paličaste bakterije	$1,4 \cdot 10^7$	$2,5 \cdot 10^7$	+ <i>Lb. acidophilus</i>
	LAMVAB za laktobacile	Okrogle, bele kolonije z zelenim središčem	G+ kratke paličaste bakterije, ki tvorijo verige	$5,2 \cdot 10^6$	*	- rod <i>Lactobacillus</i>
	MRS - IM za bifidobakterije	Bele, okrogle kolonije	G+ kratke paličaste bakterije, na koncih odebeljene	$2,5 \cdot 10^7$	*	+ rod <i>Bifidobacterium</i>
	MRS + NPNL za bifidobakterije	Okrogle, bele kolonije	G+ kratke paličaste bakterije, na koncih odebeljene	$1,3 \cdot 10^6$	$8,3 \cdot 10^5$	+ rod <i>Bifidobacterium</i>

Legenda:

N_Z: št. ke bakterij ob dnevu nakupa (začetno)

N_K: št. ke bakterij na dan, ko je potekel rok uporabnosti (končno)

*: ni podatka

+: pozitiven rezultat

-: negativen rezultat

- Število bakterij vrste *Lb. acidophilus* se vse do konca roka uporabnosti ni zmanjšalo.
- Število bifidobakterij se je nekoliko zmanjšalo.
- Predvidevamo, da so na gojišču LAMVAB zrasle kolonije jogurtove kulture *Lb. bulgaricus*, saj *Lb. acidophilus* na tem gojišču ne raste.
- Z metodo PCR smo potrdili prisotnost *Lb. acidophilus* ter rod *Bifidobacterium*, vendar ne vrste *Bif. bifidum*, ki je navedena na deklaraciji.

4.2.5 Probiotični mlečni izdelek LcaVita

Preglednica 13: Rezultati ugotavljanja prisotnosti in števila probiotičnih bakterij v mlečnem izdelku LcaVita

Izdelek	Gojišče	Morfološki opis		N _Z (ke/ml)	N _K (ke/ml)	Rezultat PCR
		Kolonije	Bakterije (barvanje po Gramu)			Iz kolonij
LcaVita: <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium</i> in <i>Lactobacillus casei</i>	MRS za <i>Lb. casei</i>	Bele, okrogle kolonije	G+ kratke tanke paličaste bakterije	$2,4 \cdot 10^7$	$1,5 \cdot 10^7$	+ <i>Lb. casei</i>
	MRS + cly za <i>Lb. acidophilus</i>	Belkaste, prozorne kolonije z nazobčanim robom	G+ dolge tanke paličaste bakterije	$2,7 \cdot 10^7$	$3,1 \cdot 10^7$	+ <i>Lb. acidophilus</i>
	LAMVAB za laktobacile	Bele, okrogle kolonije z vrhom	G+ kratke tanke paličaste bakterije	$9,5 \cdot 10^6$	$1,5 \cdot 10^7$	+ <i>Lb. casei</i>
	MRS - IM za bifidobakterije	Večje, bele, okrogle kolonije	G+ zelo kratke paličaste bakterije	$2,7 \cdot 10^6$	$4,9 \cdot 10^5$	+ <i>Lb. casei</i>
	MRS - IM za bifidobakterije	Majhne, belkaste, prozorne kolonije	G+ kratke paličaste bakterije	$1,8 \cdot 10^7$	*	+ <i>Bif. lactis</i>
	MRS + NPNL za bifidobakterije	Večje, bele, okrogle kolonije	G+ paličaste bakterije, odebeljene na koncih	$3,9 \cdot 10^6$	*	+ <i>Bif. lactis</i>
	MRS + NPNL za bifidobakterije	Majhne, bele, okrogle kolonije	G+ kratke tanke paličaste bakterije	$9,1 \cdot 10^6$	*	+ <i>Lb. casei</i>

Legenda:

N_Z: št. ke bakterij ob dnevu nakupa (začetno)

N_K: št. ke bakterij na dan, ko je potekel rok uporabnosti (končno)

*: ni podatka

+: pozitiven rezultat

- Na gojišču MRS se število *Lb. casei* na dan analize in ob poteku roka uporabnosti ni bistveno spremenilo. Gojišče MRS sicer ni selektivno, vendar pri 31 °C na njem niso zrasle druge bakterije kot *Lb. casei*.
- Št. bakterij vrste *Lb. acidophilus* se vse do konca roka uporabnosti ni zmanjšalo.
- Na gojišču LAMVAB smo s PCR dokazali prisotnost bakterije *Lb. casei*. Število bakterij na gojiščih MRS in LAMVAB, kjer smo dokazali prisotnost bakterije vrste *Lb. casei*, je bilo dokaj izenačeno.
- Na gojišču MRS + NPNL je zraslo manjše število bakterij vrste *Bif. lactis* kot na gojišču MRS - IM.
- Na gojišču MRS - IM so zrasle kolonije dveh morfoloških tipov. Z metodo PCR smo večje kolonije potrdili kot *Lb. casei*, manjše pa kot *Bif. lactis*.

- Tudi na gojišču MRS + NPNL smo opazili dva tipa kolonij. Večje kolonije smo s PCR potrdili kot *Bif. lactis*, manjše pa kot *Lb. casei*.
- Z metodo PCR smo potrdili prisotnost bakterij vrst *Lb. acidophilus*, *Lb. casei* ter *Bif. lactis*. Deklariran je samo rod *Bifidobacterium*.

4.2.6 Probiotični mlečni izdelek ProNutri

Preglednica 14: Rezultati ugotavljanja prisotnosti in števila probiotičnih bakterij v mlečnem izdelku ProNutri

Izdelek	Gojišče	Morfološki opis		N _Z (ke/ml)	N _K (ke/ml)	Rezultat PCR
		Kolonije	Bakterije (barvanje po Gramu)			Iz kolonij
ProNutri: Nu-trish™, <i>Lactobacillus acidophilus</i> (LA-5™) in <i>Bifidobacterium bifidum</i> (BB-12™)	MRS + cly za <i>Lb. acidophilus</i>	Bele, prozorne kolonije z nazobčanim robom	G+ dolge tanke paličaste bakterije	$8,7 \cdot 10^6$	$7,9 \cdot 10^6$	+ <i>Lb. acidophilus</i>
	LAMVAB za laktobacile	Ni kolonij	/	/	/	/
	MRS - IM za bifidobakterije	Bele, ploščate, okrogle kolonije	G+ kratke paličaste bakterije, ki tvorijo mrežo	$5,3 \cdot 10^6$	$2,8 \cdot 10^6$	+ rod <i>Bifidobacterium</i>
	MRS + NPNL za bifidobakterije	Bele, okrogle kolonije	G+ kratke paličaste bakterije na koncih odebeljene	$3,5 \cdot 10^6$	*	+ rod <i>Bifidobacterium</i>

Legenda:

N_Z: št. ke bakterij ob dnevu nakupa (začetno)

N_K: št. ke bakterij na dan, ko je potekel rok uporabnosti (končno)

*, /: ni podatka

+: pozitiven rezultat

- Število bakterij vrste *Lb. acidophilus* in rodu *Bifidobacterium* je bilo približno enako ob nakupu izdelka in ob koncu roka uporabnosti.
- Primerljivo je bilo tudi število bifidobakterij iz gojišč MRS - IM in MRS + NPNL.
- Na gojišču LAMVAB ni bilo rasti, kar potrjuje dobro selektivnost tega gojišča, saj v izdelku ni bilo deklariranih drugih laktobacilov kot *Lb. acidophilus*, ki pa na tem gojišču ne raste.
- Z metodo PCR smo potrdili prisotnost vrste *Lb. acidophilus* ter rodu *Bifidobacterium*, ne pa vrste *Bif. bifidum*, kot je deklarirano.

4.2.7 Probiotični mlečni izdelek AB kultura

Preglednica 15: Rezultati ugotavljanja prisotnosti in števila probiotičnih bakterij v mlečnem izdelku AB kultura

Izdelek	Gojišče	Morfološki opis		N _Z (ke/ml)	N _K (ke/ml)	Rezultat PCR
		Kolonije	Bakterije (barvanje po Gramu)			Iz kolonij
AB kultura: <i>Lactobacillus acidophilus</i> in <i>Bifidobacterium longum</i>	MRS + cly za <i>Lb. acidophilus</i>	Bele kolonije z nazobčanim robom	G+ zelo tanke paličaste bakterije	$3,0 \cdot 10^6$	$4,8 \cdot 10^6$	+ <i>Lb. acidophilus</i>
	LAMVAB za laktobacile	Ni kolonij	*	*	*	*
	MRS - IM za bifidobakterije	Bele, okrogle kolonije, na sredini izbočene	G+ kratke paličaste bakterije, v obliki črke Y, na koncih odebeljene	$3,8 \cdot 10^4$	$9,8 \cdot 10^4$	+ rod <i>Bifidobacterium</i>

Legenda:

N_Z: št. ke bakterij ob dnevu nakupa (začetno)

N_K: št. ke bakterij na dan, ko je potekel rok uporabnosti (končno)

*: ni podatka

+: pozitiven rezultat

- Število bakterij se je med hranjenjem do konca roka uporabnosti malo povečalo.
- Na gojišču LAMVAB ni bilo rasti, kar pomeni, da izdelek ne vsebuje drugih laktobacilov, kot vrsto *Lb. acidophilus*.
- Z metodo PCR smo potrdili prisotnost vrste *Lb. acidophilus* ter rod *Bifidobacterium*, ne pa vrste *Bif. longum*, kot je deklarirano.

4.2.8 Probiotični mlečni izdelek BioAktiv LGG

Preglednica 16: Rezultati ugotavljanja prisotnosti in števila probiotičnih bakterij v mlečnem izdelku BioAktiv LGG

Izdelek	Gojišče	Morfološki opis		N _Z (ke/ml)	N _K (ke/ml)	Rezultat PCR
		Kolonije	Bakterije (barvanje po Gramu)			Iz kolonij
BioAktiv LGG: LGG (<i>Lactobacillus rhamnosus</i> Gorbach & Goldin ATCC 53103)	LAMVAB za laktobacile	Bele in zelene okrogle kolonije z vrhom	G+ kratke paličaste bakterije v verigah ali mreži	$2,4 \cdot 10^7$	$2,1 \cdot 10^7$	+ <i>Lb. rhamnosus</i>

Legenda:

N_Z: št. ke bakterij ob dnevu nakupa (začetno)

N_K: št. ke bakterij na dan, ko je potekel rok uporabnosti (končno)

+: pozitiven rezultat

- Št. bakterij na dan nakupa in ob koncu roka uporabnosti je bilo podobno.
- Rast na gojišču LAMVAB in morfologija belih in zelenih kolonij je kazala na možnost, da sta prisotna dva tipa kolonij. Z metodo PCR smo potrdili, da sta oba tipa kolonij pripadala vrsti *Lb. rhamnosus*.

4.2.9 Probiotični mlečni izdelek Bio-Fit (hruška, jabolko)

Preglednica 17: Rezultati ugotavljanja prisotnosti in števila probiotičnih bakterij v mlečnem izdelku Bio-Fit (hruška, jabolko)

Izdelek	Gojišče	Morfološki opis		N _Z (ke/ml)	N _K (ke/ml)	Rezultat PCR
		Kolonije	Bakterije (barvanje po Gramu)			Iz kolonij
Bio-Fit: <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i>	MRS + cly za <i>Lb. acidophilus</i>	Bele, prozorne kolonije z nazobčanim robom	G+ dolge tanke paličaste bakterije	*	$3,3 \cdot 10^3$	+ <i>Lb. acidophilus</i>
	MRS + cly za <i>Lb. acidophilus</i>	Manjše, bele, okrogle kolonije	G+ kratke paličaste bakterije	*	$3,6 \cdot 10^5$	+ <i>Lb. rhamnosus</i>
	LAMVAB za laktobacile	Bele, okrogle kolonije, zelenkaste	G+ zavite kratke paličaste bakterije	$3,2 \cdot 10^6$	$1,1 \cdot 10^6$	+ <i>Lb. casei</i>
	MRS - IM za bifidobakterije	Bele okrogle kolonije	G+ kratke paličaste bakterije, na koncih odebeljene, oblika črke Y	$2,0 \cdot 10^5$	$4,4 \cdot 10^4$	- rod <i>Bifidobacterium</i>

Legenda:

N_Z: št. ke bakterij ob dnevu nakupa (začetno)

N_K: št. ke bakterij na dan, ko je potekel rok uporabnosti (končno)

*: ni podatka

+: pozitiven rezultat

-: negativen rezultat

- Izdelek naj bi vseboval bakterijo vrste *Lb. bifidus*, vendar je to zastarelo oz. napačno ime. Predvidevali smo, da gre za vrsto *Bif. bifidum*, vendar kolonij rodu bifidobakterij na gojišču MRS - IM za bifidobakterije nismo potrdili.
- Na gojišču MRS + cly smo po morfologiji kolonij sklepali, da sta zrasli dve različni vrsti bakterij. Po morfologiji večjih kolonij z nazobčanim robom smo sklepali, da so bile to bakterije vrste *Lb. acidophilus* (naveden na deklaraciji), kar smo dokazali z metodo PCR. S to metodo smo dokazali tudi, da so manjše kolonije bakterije vrste *Lb. rhamnosus*, ki pa ni deklarirana.
- Na gojišču LAMVAB smo z metodo PCR ugotovili prisotnost *Lb. casei*, ki pa ni deklarirana na izdelku.
- Rod *Bifidobacterium* z metodo PCR iz kolonij na gojišču nismo ugotovili, čeprav je deklariran.

- Deklaracija izdelka Bio-Fit vsebuje napačno oz. zastarelo ime *Lb. bifidus*. To ime se ne uporablja že od leta 1969. Proizvajalec, ki podaja takšna imena na deklaraciji, ni seznanjen o pravilni nomenklaturi. Ime *Lb. bifidus* se je po mnenju Harteminka včasih uporabljalo za bakterije rodu *Bifidobacterium* (Hartemink, 2006).

4.2.10 Probiotični mlečni izdelek Actimel® - navadni

Preglednica 18: Rezultati ugotavljanja prisotnosti in števila probiotičnih bakterij v mlečnem izdelku Actimel® - navadni

Izdelek	Gojišče	Morfološki opis		N _Z (ke/ml)	N _K (ke/ml)	Rezultat PCR
		Kolonije	Bakterije (barvanje po Gramu)			Iz kolonij
Actimel®: <i>Lactobacillus casei</i> IMUNITASS	MRS za <i>Lb. casei</i>	Drobne, bele, prozorne kolonije	G+ kratke paličaste bakterije	$2,9 \cdot 10^8$	$3,6 \cdot 10^8$	+ <i>Lb. casei</i>

Legenda:

N_Z: št. ke bakterij ob dnevu nakupa (začetno)

N_K: št. ke bakterij na dan, ko je potekel rok uporabnosti (končno)

+: pozitiven rezultat

- Število bakterij vrste *Lb. casei* se ob koncu roka uporabnosti ni zmanjšalo.
- Z metodo PCR smo potrdili prisotnost *Lb. casei*, ki je deklariran na izdelku.

4.2.11 Probiotični mlečni izdelek Pinjenec - ananas

Preglednica 19: Rezultati ugotavljanja prisotnosti in števila probiotičnih bakterij v mlečnem izdelku Pinjenec - ananas

Izdelek	Gojišče	Morfološki opis		N _Z (ke/ml)	N _K (ke/ml)	Rezultat PCR
		Kolonije	Bakterije (barvanje po Gramu)			Iz kolonij
Pinjenec - ananas: kulture nu-trish™	MRS + cly za <i>Lb. acidophilus</i>	Belo prozorne kolonije z nazobčanim robom	*	$7,0 \cdot 10^6$	$4,7 \cdot 10^6$	*
	MRS - IM za bifidobakterije	Okrogle bele kolonije	*	$2,5 \cdot 10^6$	$2,9 \cdot 10^6$	*
	MRS + NPNL za bifidobakterije	Okrogle bele kolonije	*	$9,5 \cdot 10^5$	$3,2 \cdot 10^5$	*

Legenda:

N_Z: št. ke bakterij ob dnevu nakupa (začetno)

N_K: št. ke bakterij na dan, ko je potekel rok uporabnosti (končno)

*: ni podatka

- Število bakterij vrste *Lb. acidophilus* se je ob koncu roka uporabnosti nekoliko zmanjšalo. Z metodo PCR nismo ugotovili prisotnost vrste *Lb. acidophilus*. Po morfologiji kolonij na gojišču MRS + cly smo sklepali, da so bile to bakterije vrste *Lb. acidophilus*.
- Glede na morfologijo kolonij na gojiščih MRS - IM in MRS + NPNL smo sklepali, da je prisoten rod *Bifidobacterium*.
- Na gojišču MRS + NPNL je zraslo manjše število bakterij kot na gojišču MRS - IM.

4.3 UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI DEKLARIRANIH MIKROORGANIZMOV NA SKUPNI DNA IZ IZDELKA Z METODO PCR

Postopek PCR smo izvedli po protokolih, ki so opisani v poglavju 3.3.5. DNA smo izolirali iz izdelka s pomočjo seta kemikalij Wizard proizvajalca Promega, pri čemer smo postopek na začetku priredili našim vzorcem. Z reakcijo PCR smo želeli neposredno potrditi prisotnost deklariranih probiotičnih bakterij v izdelkih. Pri tem smo se morali prepričati, da je bila izolacija DNA neposredno iz izdelkov uspešna. To smo potrdili z reakcijo PCR z univerzalnimi bakterijskimi oligonukleotidnimi začetniki. Pri vseh vzorcih smo dobili pomnožke pričakovane velikosti. V preglednici 20 so prikazani rezultati ugotavljanja prisotnosti DNA neposredno iz vzorcev izdelkov in iz kolonij na gojiščih z reakcijo PCR.

Preglednica 20: Rezultati ugotavljanja prisotnosti DNA deklariranih vrst bakterij iz probiotičnih izdelkih in iz kolonij na gojiščih

Izdelek	Deklarirani mikroorganizmi ²	Mikroorganizmi, dokazani z metodo PCR na kolonijah iz gojišč	Mikroorganizmi, dokazani z metodo PCR na skupni DNA iz vzorca izdelka
EGO; Ljubljanske mlekarne	<i>Lb. acidophilus</i> , rod Bifidobacteria	<i>Lb. acidophilus</i> , <i>Bif. lactis</i>	<i>Lb. acidophilus</i> , rod Bifidobacterium
LCA; Mlekarna Celeia	<i>Lb. acidophilus</i> , rod Bifidobacterium, <i>Lb. casei</i>	<i>Lb. acidophilus</i> , <i>Bif. lactis</i> , rod Bifidobacterium, <i>Lb. casei</i>	<i>Lb. acidophilus</i> , <i>Bif. lactis</i> , <i>Lb. casei</i> , rod Bifidobacterium
KAKO SI; Ljubljanske mlekarne	Howaru TM Bifido	<i>Bif. lactis</i>	rod Bifidobacterium
BIFIDUS; Mlekarna Vipava	<i>Lb. acidophilus</i> , <i>Bif. bifidum</i>	<i>Lb. acidophilus</i> , rod Bifidobacterium	<i>Lb. acidophilus</i> , <i>Bif. bifidum</i> , rod Bifidobacterium
PRONUTRI; Pomurske mlekarne	Kulture nu-trish TM : <i>Lb. acidophilus</i> , <i>Bif. bifidum</i>	<i>Lb. acidophilus</i> , rod Bifidobacterium	<i>Lb. acidophilus</i> , rod Bifidobacterium
LCAVITA; Mlekarna Celeia	<i>Lb. acidophilus</i> , rod Bifidobacterium, <i>Lb. casei</i>	<i>Lb. acidophilus</i> , <i>Bif. lactis</i> , <i>Lb. casei</i>	<i>Lb. acidophilus</i> , <i>Bif. lactis</i> , rod Bifidobacterium
AB KULTURA, limeta in aloevera; Dukat, Hrvaška	<i>Lb. acidophilus</i> , <i>Bif. longum</i>	<i>Lb. acidophilus</i> , rod Bifidobacterium	<i>Lb. acidophilus</i> , rod Bifidobacterium
BIOAKTIV LGG; Nöm, Avstrija	<i>Lb. rhamnosus</i>	<i>Lb. rhamnosus</i>	*
ACTIMEL [®] ; Danone, Avstrija	<i>Lb. casei</i> IMUNITASS	<i>Lb. casei</i>	<i>Lb. casei</i>
BIO-FIT, hruška in jabolko; Kärntnermilch, Avstrija	<i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. bifidus</i>	<i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. rhamnosus</i> , <i>Lb. casei</i>	<i>Lb. acidophilus</i> , rod Bifidobacterium, <i>Lb. casei</i>
PINJENEC, ananas, Pomurske mlekarne	Kulture nu-trish TM	*	<i>Lb. acidophilus</i> , <i>Bif. lactis</i> , rod Bifidobacterium

Legenda:

Lb.: *Lactobacillus*

Bif.: *Bifidobacterium*

*: ni podatka

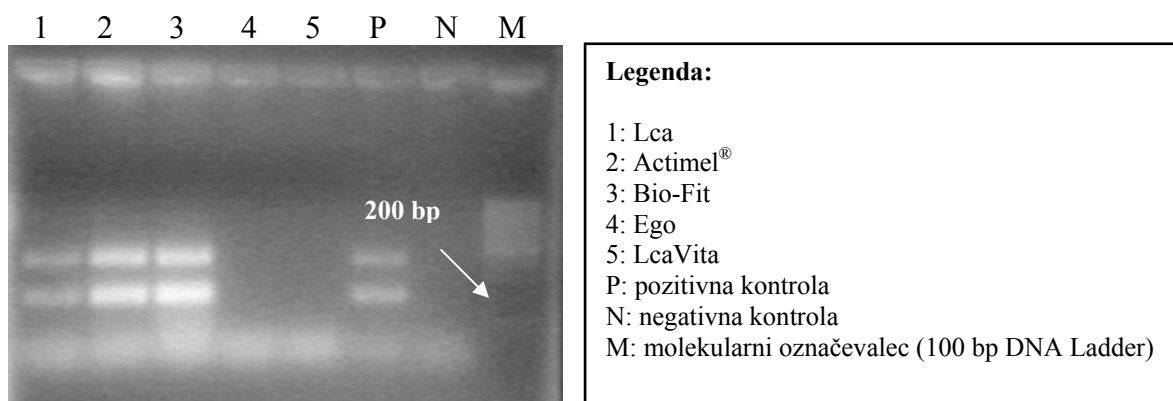
Praviloma smo z reakcijo PCR uspeli potrditi prisotnost deklariranih bakterijskih vrst tako na DNA, pridobljeni iz kolonij, zraslih na selektivnih gojiščih, kot tudi na skupni DNA, pridobljeni neposredno iz izdelkov. Izjemi sta bili *Lb. casei* v izdelku LcaVita ter *Lb. rhamnosus* v izdelku BioAktiv, ki smo ju uspeli dokazati na nivoju kolonij, ne pa v vzorcu skupne DNA, pridobljene iz izdelka. V primeru izdelka probiotični Pinjenec smo vrsti

² Imena bakterij, kakor so navedena na deklaraciji izdelka

Lactobacillus acidophilus in *Bifidobacterium lactis* dokazali neposredno iz izdelka, ne pa na kolonijah.

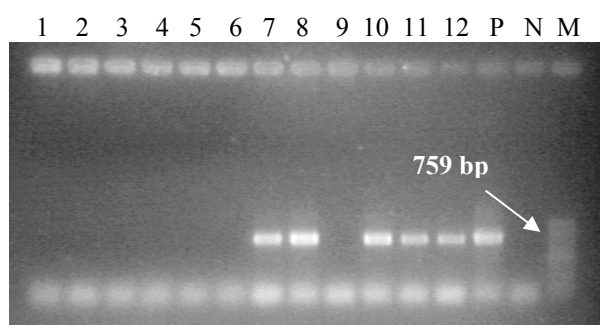
Rezultati ugotavljanja prisotnosti posameznih vrst probiotičnih bakterij z za vrsto specifično reakcijo PCR na skupni DNA iz probiotičnih izdelkov in na DNA iz kolonij, zraslih na selektivnih gojiščih so prikazani na slikah od 4 do 7.

Na sliki 4 so prikazani rezultati ugotavljanja in potrjevanja vrste *Lb. casei*. V izdelku 1 in 2 smo z metodo PCR potrdili prisotnost deklarirane vrste *Lb. casei*. V izdelku 5 te vrste nismo potrdili, kljub temu da je deklarirana, potrdili smo jo iz kolonij na gojišču MRS. Analize smo opravili tudi pri izdelkih, ki niso imeli navedene vrste *Lb. casei*, da smo se lahko prepričali o natančnosti deklaracij. V izdelku 3 smo potrdili prisotnost vrste *Lb. casei*, ki pa na deklaraciji ni navedena. Izdelek 4 vrste *Lb. casei* ni imel deklarirane, kar smo tudi potrdili.



Slika 4: Rezultati specifične reakcije PCR za vrsto *Lb. casei*, na skupni DNA iz probiotičnega izdelka

Na sliki 5 so prikazani rezultati ugotavljanja in potrjevanja vrste *Lb. acidophilus*. Analizirali smo izdelke, ki imajo deklarirano vrsto *Lb. acidophilus* in tudi tiste, ki te bakterije nimajo navedene. V izdelkih 7, 8, 10, 11 in 12 je bila vrsta *Lb. acidophilus* deklarirana, kar smo potrdili z metodo PCR. Izdelki 1, 2, 3 in 4 niso imeli deklarirane vrste *Lb. acidophilus*, kar smo potrdili. Za kolonije iz izdelkov 5, 6 in 9 smo ugotovili, da te niso *Lb. acidophilus*, vendar ima izdelek na deklaraciji navedeno vrsto *Lb. acidophilus*.

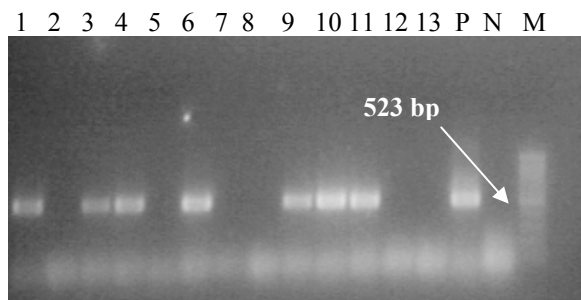


Slika 5: Rezultati specifične reakcije PCR za vrsto *Lb. acidophilus*, na skupni DNA iz probiotičnega izdelka in iz kolonij na gojiščih

Legenda:

- 1: BioAktiv LGG: neposredno iz jogurta
- 2: Actimel®: neposredno iz jogurta
- 3: Kako si: neposredno iz jogurta
- 4: BioAktiv LGG: kolonije iz gojišča LAMVAB
- 5: Bio-Fit: kolonije iz gojišča LAMVAB
- 6: Bio-Fit: manjše kolonije iz gojišča MRS + cly
- 7: Bio-Fit: večje kolonije iz gojišča MRS + cly
- 8: Lca: neposredno iz jogurta
- 9: LcaVita: kolonije iz gojišča LAMVAB
- 10: Bifidus: neposredno iz jogurta
- 11: LcaVita: neposredno iz jogurta
- 12: AB kultura: neposredno iz jogurta
- P: pozitivna kontrola
- N: negativna kontrola
- M: molekularni označevalec (100 bp DNA Ladder)

Na sliki 6 so prikazani rezultati ugotavljanja in potrjevanja prisotnosti rodu *Bifidobacterium*. V izdelkih 1, 3, 4, 6, 9, 10 in 11 smo potrdili prisotnost deklariranega rodu *Bifidobacterium*. Pri izdelkih 2, 5 in 8 smo na gojiščih opazili dve vrsti kolonij (večje in manjše). Potrdili smo, da kolonije iz teh izdelkov ne pripadajo rodu *Bifidobacterium*, ampak smo jih potrdili kot vrsto *Lb. casei*. V izdelku 12 in 13 rod *Bifidobacterium* ni bil deklariran, kar smo tudi potrdili. Iz kolonij iz izdelka 7 pa rodu *Bifidobacterium* nismo dokazali, čeprav je deklariran.

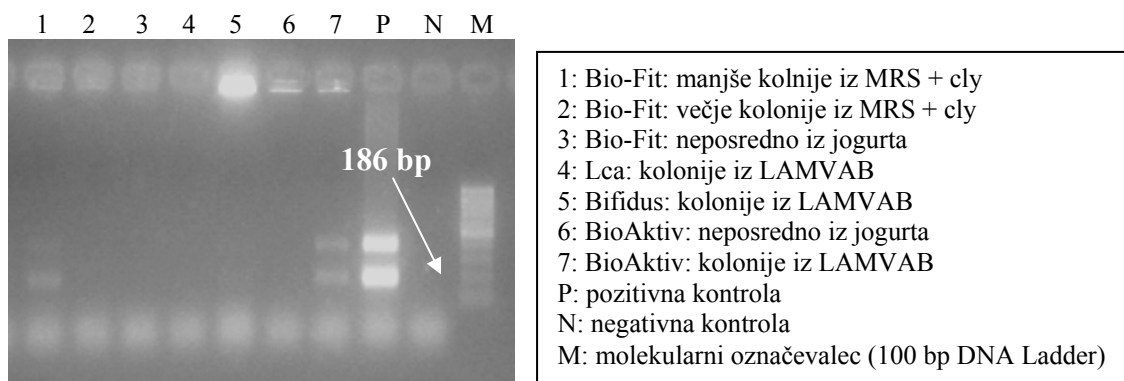


Slika 6: Rezultati specifične reakcije PCR za rod *Bifidobacterium*, na skupni DNA iz probiotičnega izdelka in iz kolonij na gojiščih

Legenda:

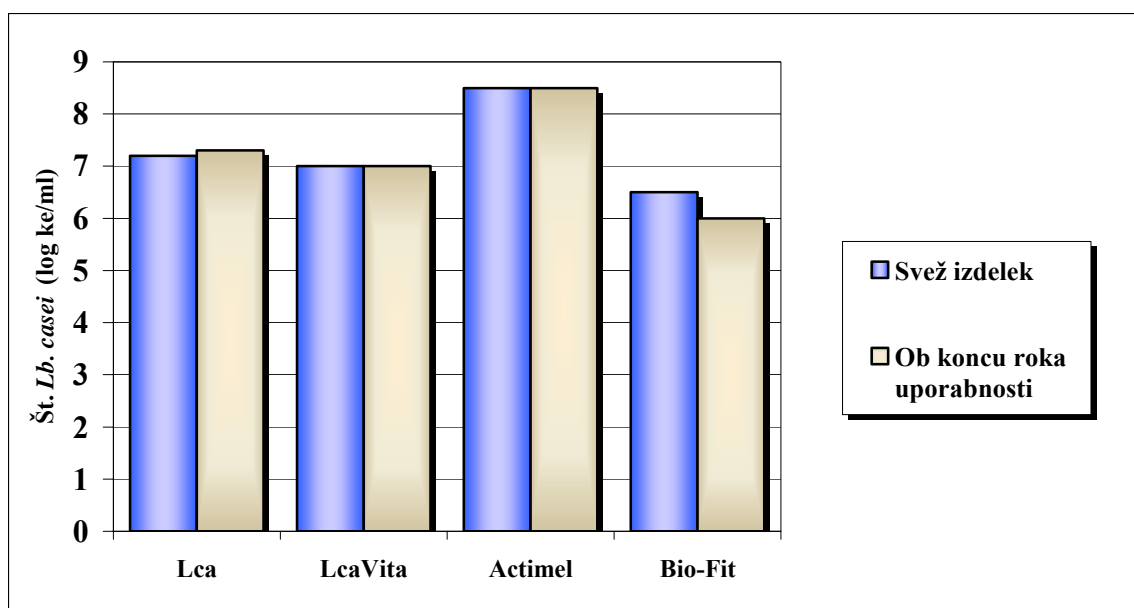
- 1: Lca: večje kolonije iz MRS + NPNL
- 2: Lca: manjše kolonije iz MRS + NPNL
- 3: Ego: kolonije iz MRS - IM
- 4: Kako si: kolonije iz MRS - IM
- 5: LcaVita: večje kolonije iz MRS - IM
- 6: LcaVita: manjše kolonije iz MRS - IM
- 7: Bio-Fit: kolonije iz MRS - IM
- 8: LcaVita: manjše kolonije iz MRS + NPNL
- 9: Pronutri: kolonije iz MRS - IM
- 10: AB kultura: kolonije iz MRS - IM
- 11: Bifidus: kolonije iz MRS - IM
- 12: BioAktiv: neposredno iz jogurta
- 13: Actimel®: neposredno iz jogurta
- P: pozitivna kontrola
- N: negativna kontrola
- M: molekularni označevalec (100 bp DNA Ladder)

Na sliki 7 so prikazani rezultati ugotavljanja in potrjevanja prisotnosti vrste *Lb. rhamnosus*. V izdelku 1 smo ugotovili prisotnost bakterije vrste *Lb. rhamnosus* iz gojišča MRS + cly, čeprav ta vrsta ni bila deklarirana. V izdelku 7 smo potrdili deklarirano vrsto *Lb. rhamnosus* iz kolonij na gojišču, ne pa neposredno iz vzorca jogurta - izdelek 6. Izdelek Bio-Fit vrste *Lb. rhamnosus* ni imel navedene na deklaraciji, a smo jo kljub temu ugotovili na mešanici kolonij na gojišču, ne pa iz izdelka. Analizirali smo tudi tiste izdelke, ki niso imeli deklarirane vrste *Lb. rhamnosus*. V izdelkih 2, 3, 4, 5 in 6 ta vrsta ni bila deklarirana, kar smo z metodo PCR potrdili.



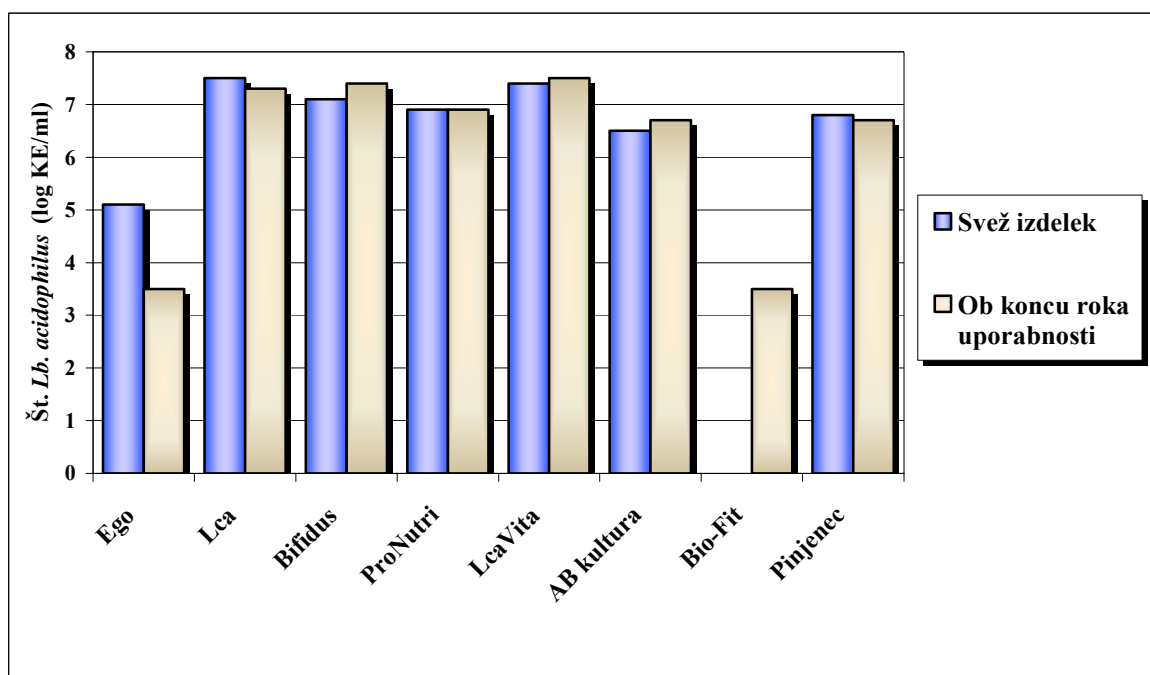
Slika 7: Rezultati specifične reakcije PCR za vrsto *Lb. rhamnosus*, na skupni DNA iz probiotičnega izdelka in iz kolonij na gojiščih

Na slikah od 8 do 11 je prikazano število probiotičnih bakterij v svežem izdelku in izdelku ob koncu roka uporabnosti. Upoštevali smo samo tisto število kolonij, za katere smo z reakcijo PCR potrdili specifične vrste.



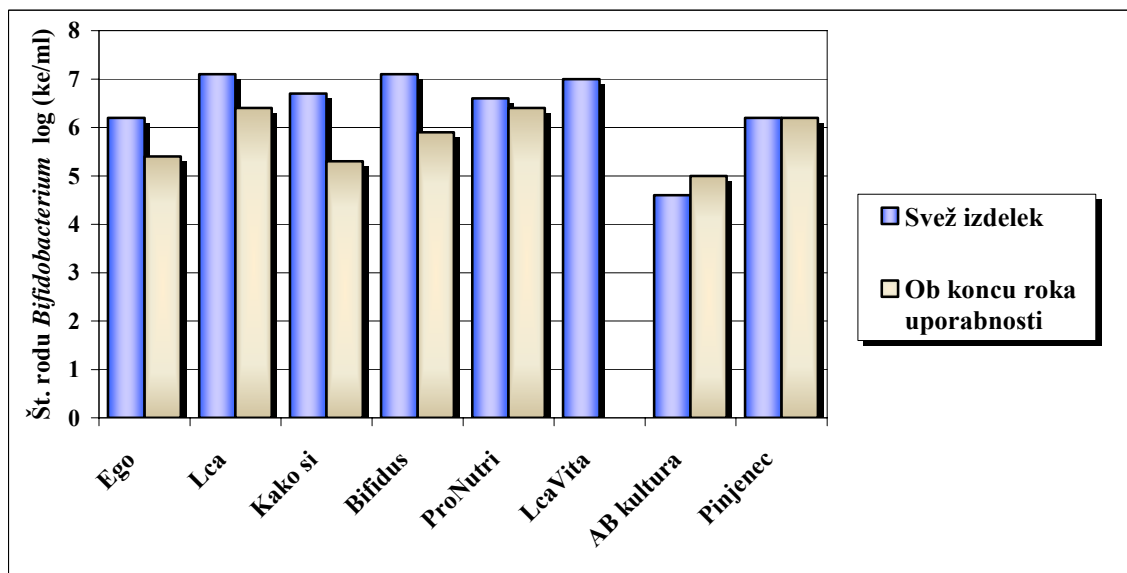
Slika 8: Število bakterij vrste *Lb. casei* v svežem izdelku in ob koncu roka uporabnosti

Iz slike 8 je razvidno, da so bakterije vrste *Lb. casei* zelo dobro preživele vse do konca roka uporabnosti. Med vsemi probiotičnimi bakterijami smo ugotovili, da je vrsta *Lb. casei* najmanj občutljiva na skladiščenje izdelka vse do konca roka uporabnosti.



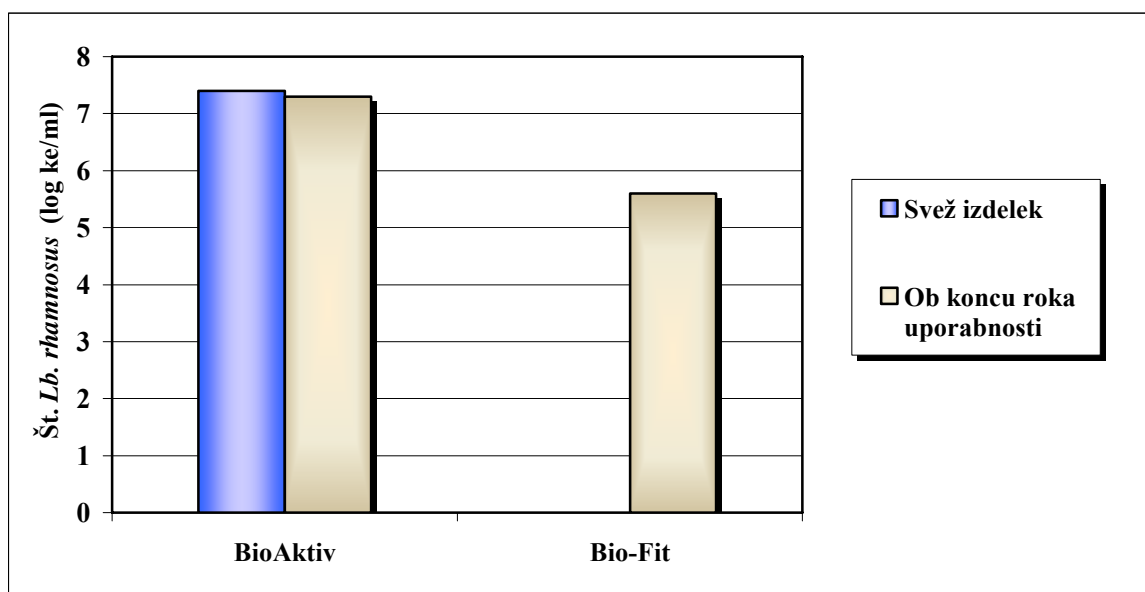
Slika 9: Število bakterij vrste *Lb. acidophilus* v svežem izdelku in ob koncu roka uporabnosti

Preživetje bakterij vrste *Lb. acidophilus* je bilo različno v različnih izdelkih. V dveh izdelkih se je med skladiščenjem do konca roka uporabnosti izraziteje zmanjšalo število probiotičnih bakterij (Slika 9).



Slika 10: Število bakterij rodu *Bifidobacterium* v svežem izdelku in ob koncu roka uporabnosti

Med hranjenjem do konca roka uporabnosti je bilo preživetje bifidobakterij različno v različnih izdelkih. V štirih izdelkih se je število bifidobakterij med skladiščenjem zmanjšalo za 0,5 do več kot 1 log enote (Slika 10).



Slika 11: Število bakterij vrste *Lb. rhamnosus* v svežem izdelku in ob koncu roka uporabnosti

Bakterije vrste *Lb. rhamnosus* so skladiščenje zelo dobro preživele vse do konca roka uporabnosti (Slika 11), saj se njihovo število skoraj ni spremenilo.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Deklaracije izdelkov

Zakon o hrani v EU (in ZDA) opisuje, da morajo biti vse sestavine na izdelku pravilno navedene. Po mnenju Harteminka (2006) za večino probiotičnih izdelkov to ne velja. O funkcionalni hrani ne moremo govoriti, če je deklaracija napačna oz. pomanjkljiva, saj sta v tem primeru vprašljivi tako varnost kot učinkovitost (Salminen in sod., 1998).

Delovna skupina, ki deluje v sklopu organizacije FAO, je leta 2002 izdala smernice za ovrednotenje probiotikov v hrani (Anonymous, 2002). Na deklaraciji naj bi bile navedene naslednje informacije:

- oznaka rodu, vrste in seva; oznaka seva naj ne bi zavajala potrošnika o funkcionalnosti tega mikroorganizma,
- minimalna koncentracija posameznega bakterijskega seva ob koncu roka uporabnosti,
- priporočena doza probiotikov, ki še zagotavlja učinkovitost,
- trditve o učinku na zdravje,
- pogoje skladiščenja ter
- ime proizvajalca in naslov za informacije potrošnika.

Bakterijske vrste morajo biti v celoti napisane ležeče (npr. *Lactobacillus acidophilus*) z oznako vrste (Reid, 2006).

Hamilton - Miller in sod. (2003) pa navajajo, da bi morala deklaracija vsebovati naslednje informacije:

- zaznamek, ali so prisotne žive bakterije,
- natančen opis bakterij,
- velikost populacije posamezne bakterije, zapisane v enotah, razumljivih porabniku in strokovno pravih ter
- minimalno količino bakterij za obdobje, ko je izdelek na tržišču, torej do konca roka uporabnosti, in ne samo podatka o številu bakterij v svežem izdelku.

Če izdelek ni pravilno deklariran, potem varnost in funkcionalnost izdelka nista zagotovljeni. Kljub temu, da se večina proizvajalcev zanaša na status GRAS (Generally recognised as safe) za laktobacile in bifidobakterije, premalo pozornosti posvečajo označevanju oz. ustreznemu opisu probiotičnih mlečnokislinskih bakterij, preverjanju rezistence proti antibiotikom ter ugotavljanju drugih lastnosti, ki so pomembne za varnost (Temmerman in sod., 2003).

Izdelki Lca, Kako si in LcaVita imajo deklariran samo rod *Bifidobacterium*, ne pa vrste. Za ostale probiotike v teh treh izdelkih je bila vrsta deklarirana, nismo pa zasledili podatkov o sevu.

Izdelek Bio-Fit ima napačno oz. zastarelo ime probiotika, ki se ne uporablja več; to je *Lb. bifidus* (pravilno *Bifidobacterium bifidum*). Temmerman in sod. (2003), ki so pregledali 25 probiotičnih mlečnih izdelkov, so navedeno ime našli na deklaracijah dveh izdelkov.

V enem od štirih probiotičnih mlečnih izdelkov, ki so jih analizirali Coeuret in sod. (2004), je deklaracija vsebovala napačno oz. zastarelo ime bakterije *Lb. rhamnosus*, namreč *Lb. casei* ssp. *rhamnosus*.

V naši raziskavi je samo izdelek Actimel® poleg rodu in vrste vseboval informacijo o sevu, to je *Lb. casei* IMUNITASS, vendar oznaka te vrste (IMUNITASS) ni zaželena, saj to ni pravo ime seva.

Podatkov o številu bakterij (ke/ml) nismo našli na nobenem od enajstih analiziranih izdelkov.

5.1.2 Kvantitativno ugotavljanje števila deklariranih probiotičnih bakterij

Probiotiki so živi mikroorganizmi, ki dokazano pozitivno učinkujejo na zdravje, če jih zaužijemo v zadostni količini. Mnenja o tem, kolikšna naj bi bila zadostna količina zaužitih probiotikov, so različna. Za terapevtski učinek naj bi bilo minimalno število zaužitih probiotikov 10^7 ke/ml (Shortt, 1999). Izbrali smo enajst probiotičnih mlečnih izdelkov, kupljenih v boljše založenih slovenskih trgovinah. Ugotovili smo, da je bilo v naši raziskavi pet izdelkov od enajstih takšnih, ki vsebujejo več kot 10^7 ke/ml glede na skupno število probiotikov ob dnevu nakupa in ob koncu roka uporabnosti.

Naši rezultati so pokazali, da je gojišče MRS + cly zelo primerno in dovolj selektivno za štetje bakterij *Lb. acidophilus*. Ta vrsta je bila deklarirana v sedmih izdelkih. Njeno prisotnost in število smo ugotovili na gojišču MRS + cly ter potrdili z metodo PCR na DNA iz kolonij na gojiščih. V enem izdelku so poleg tipičnih kolonij na gojišču MRS + cly za *Lb. acidophilus* rasle tudi netipične majhne kolonije. Razlika je bila zelo očitna, zato smo lahko obe vrsti kolonij ločeno šteli in pregledali. S PCR smo ugotovili, da so to bakterije vrste *Lb. rhamnosus*, ki pa na deklaraciji izdelka Bio-Fit ni bila navedena. Ob dnevu nakupa izdelkov se je število *Lb. acidophilus* gibalo od $1,2 \cdot 10^5$ do $2,9 \cdot 10^7$ ke/ml ter ob koncu roka uporabnosti od $3,3 \cdot 10^3$ do $3,1 \cdot 10^7$ ke/ml. Med vsemi probiotičnimi bakterijami je bila prav ta vrsta najbolj občutljiva za skladiščenje izdelkov.

Gojišče MRS je bilo ob inkubaciji pri 31 °C selektivno za štetje bakterij *Lb. casei*, saj pri tej temperaturi druge bakterije iz izdelkov niso zrasle. Deklariran je bil v treh izdelkih, kar smo z metodo PCR potrdili. Število na dan nakupa je bilo od $2,1 \cdot 10^7$ do $2,9 \cdot 10^8$ ter zadnji dan roka uporabnosti od $1,5 \cdot 10^7$ do $3,6 \cdot 10^8$ ke/ml. Število se do konca roka uporabnosti ni zmanjšalo.

V izdelku Bio-Fit *Lb. casei* ni bil deklariran, vendar smo ga iz kolonij na gojišču LAMVAB za laktobacile potrdili. Bakterije vrste *Lb. casei* smo potrdili tudi z izolacijo DNA neposredno iz izdelka s PCR specifično za vrsto. Na podlagi tega lahko zaključimo, da proizvajalec z nepopolno deklaracijo zavaja potrošnike.

Bakterija vrste *Lb. rhamnosus* je bila deklarirana samo v izdelku BioAktiv LGG. Iz kolonij na gojišču LAMVAB smo z metodo PCR potrdili prisotnost te bakterije. Število bakterij (ke/ml) na dan nakupa izdelka je bilo $2,4 \cdot 10^7$ in na dan roka uporabnosti $2,1 \cdot 10^7$ ke/ml, kar kaže na to, da se v izdelku BioAktiv LGG število probiotičnih bakterij skoraj ni spremenilo.

Rod *Bifidobacterium* je bil deklariran v treh izdelkih, vrsta *Bifidobacterium* pa v štirih izdelkih. Prisotnost *Bif. lactis* smo z metodo PCR na kolonijah iz gojišč potrdili v štirih izdelkih, prav tako tudi rod *Bifidobacterium* v štirih izdelkih. Selektivnost gojišč MRS - IM in MRS + NPNL je bila primerljiva in zadovoljiva za večino izdelkov, razen za dva, kjer smo s PCR metodo dokazali, da so zrasle tudi kolonije *Lb. casei*. Poleg tega smo opazili, da je na gojišču MRS + NPNL zraslo manj kolonij kot na gojišču MRS - IM. Predvidevamo, da v gojišču MRS + NPNL prisotni antibiotiki delno zavirajo tudi rast bifidobakterij. Število ke/ml je bilo na dan nakupa izdelka od $3,8 \cdot 10^4$ do $2,5 \cdot 10^7$ ter na dan roka uporabnosti od $4,4 \cdot 10^4$ do $2,8 \cdot 10^6$ ke/ml. Število bifidobakterij v izdelku je očitno bolj odvisno od začetne dodane doze in preživetja bifidobakterij med tehnološkim postopkom kot pa od preživetja med skladiščenjem.

Talwalkar in Kailasapathy (2004) sta ugotavljala vsebnost deklariranih probiotikov v devetih probiotičnih mlečnih izdelkih, kupljenih v Avstraliji. Na gojišču MRS + NPNL sta prav tako opazila dve vrsti kolonij in predvidevala, da so večje kolonije *Lb. casei*, vendar tega nista dokazala. Omenjena avtorja sta v avstralskih probiotičnih mlečnih izdelkih v času nakupa izdelkov ugotovila od $2,6 \cdot 10^3$ do $8,7 \cdot 10^6$ kolonij v gramu na gojišču MRS + NPNL. V avstralskih izdelkih so ugotovili manjše število bifidobakterij v primerjavi z našim izdelki.

Bakterije vrste *Lb. acidophilus* so rasle na gojišču MRS + NPNL in MRS - IM, bakterije rodu *Bifidobacterium* pa niso rasle na gojišču MRS + cly. Podobno so ugotovili Van de Castele in sod. (2005). Na gojišču MRS + NPNL in MRS - LP (MRS z dodatkom cisteina, LiCl_2 in natrijevega propionata) bakterije vrste *Lb. acidophilus* niso rasle, na gojišču MRS + cly pa nobena vrsta bifidobakterij ni tvorila kolonij.

Število bakterij v liofiliziranih izdelkih je nižje v primerjavi s probiotičnimi mlečnimi izdelki (Lin in sod., 2006; Temmerman in sod., 2003). Temmerman in sod. (2003) menijo, da je število nižje zato, ker morajo probiotične bakterije v liofiliziranih izdelkih preživeti dehidracijo. Navajajo pa tudi, da obstaja možnost, da so bili ti izdelki sterilizirani zaradi varnosti ali zaradi bližanja konca roka uporabnosti. Vendar avtorji navajajo, da so raziskave opravili pred rokom uporabnosti izdelka.

Bogovič Matijašič in Rogelj (2006) sta poročali o raziskavi, v kateri so pregledali sedem pripravkov z liofiliziranimi probiotiki, ki so na voljo v specializiranih trgovinah v Sloveniji. Probiotični dodatki so bili v obliki tablet, kapsul, pilul in praškov. Velika

nenatančnost je bila opažena pri deklariranju mikroorganizmov. Večina izdelkov ni vsebovala deklariranih mikroorganizmov, število bakterij je bilo precej nizko, poleg tega pa so bila na nekaterih izdelkih navedena napačna imena bakterij.

5.1.3 Kvalitativno ugotavljanje prisotnosti DNA deklariranih bakterij z metodo PCR na skupni DNA, izolirani iz izdelka

Z reakcijo PCR smo želeli potrditi prisotnost bakterij neposredno iz izdelkov. Najprej smo morali ugotoviti, ali je bila izolacija DNA neposredno iz vzorca izdelka uspešna. Z univerzalnimi bakterijskimi oligonukleotidnimi začetniki (27f in 100r) smo potrdili prisotnost bakterijske DNA z reakcijo PCR. S tem smo potrdili uspešnost izolacije DNA neposredno iz izdelkov.

Bakterije vrste *Lb. acidophilus* smo potrdili v osmih izdelkih, in sicer, v enem izdelku z navedenim komercialnim imenom kulture in v sedmih, kjer je bil deklariran. Bifidobakterije smo potrdili v vseh osmih izdelkih, kjer so bile deklarirane in v enem z navedenim komercialnim imenom kulture. Vrsto bifidobakterij pa smo uspeli potrditi le v štirih izdelkih in sicer v treh izdelkih *Bif. lactis* ter v enem *Bif. bifidum*. Bakterija vrste *Lb. casei* je bila deklarirana v treh izdelkih, potrdili smo jo v dveh. V izdelku Bio-Fit smo potrdili prisotnost *Lb. casei*, čeprav ni deklariran na izdelku. Vrsta *Lb. rhamnosus* je bila deklarirana v enem izdelku, ki pa ga z metodo PCR na DNA, izolirani iz probiotičnega izdelka, nismo potrdili.

Za identifikacijo probiotičnih bakterij se vse več uporabljajo različne sodobne molekularne metode. Temmerman in sod. (2003) so naredili raziskavo, ki je zajela kar 55 evropskih probiotičnih izdelkov, od tega 25 probiotičnih mlečnih izdelkov ter 30 izdelkov z liofiliziranimi bakterijami. Za identifikacijo bakterij so uporabili gojitvene tehnike na selektivnih gojiščih in analizo celokupnih celičnih proteinov z metodo SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis), pri čemer so dobljene vzorce proteinov primerjali s tistimi za referenčne seve različnih vrst, shranjene v računalniški bazi. Največkrat deklarirana vrsta v probiotičnih mlečnih izdelkih je bila *Lb. acidophilus* in tudi največkrat potrjena. Od skupno 55 probiotičnih izdelkov je samo šest izdelkov vsebovalo natanko tiste probiotične bakterije, ki so bile navedene. V 19 primerih so izolirali povsem druge bakterijske vrste od tistih, navedenih na deklaraciji. Temmerman in sod. (2003) so prišli do rezultata, da so vrsto *Lb. acidophilus* veliko pogosteje izolirali iz probiotičnih mlečnih izdelkov kot iz liofiliziranih. Predvidevajo, da zaradi:

- boljšega preživetja te vrste v mlečnih izdelkih kot v liofiliziranih,
- temperature okolja, pri kateri so različni izdelki vzdrževani,
- roka uporabnosti; za probiotične mlečne izdelke povprečno 30 dni, za liofilizirane izdelke pa 24 mesecev in
- zaradi razlik med posameznimi sevi v sposobnosti preživetja v stacionarni fazi pri določeni temperaturi.

Coeuret in sod. (2004) so pregledali deset komercialnih probiotičnih izdelkov, ki jih lahko kupimo v Evropi, med njimi dva izdelka z liofiliziranimi bakterijami, šest fermentiranih mlečnih izdelkov, en sir in eno prehransko dopolnilo. Izdelke so nacepili na trda gojišča in

iz kolonij izolirali DNA. Uporabili so metodo verižnega pomnoževanja DNA s polimerazo (PCR) in gelsko elektroforezo v pulzirajočem polju (PFGE - pulsed field gel electrophoresis), ki se je pokazala kot uspešna metoda za razlikovanje probiotičnih bakterij v mlečnih izdelkih. Od šestih analiziranih probiotičnih mlečnih izdelkov so imeli trije deklarirano število bakterij v gramu izdelka. V dveh izdelkih z liofiliziranimi bakterijami niso potrdili vseh deklariranih mikroorganizmov, prav tako tudi v siru in v prehranskem dopolnilu. V prehranskem dopolnilu je bilo število laktobacilov pod mejo detekcije. Pet izdelkov je bilo napačno deklariranih glede na število ke/g in trije glede na vrsto laktobacilov.

Gueimonde in sod. (2004) so analizirali štirinajst probiotičnih mlečnih izdelkov, kupljenih v trgovinah v Španiji. Uporabili so metodo identifikacije izolatov z ugotavljanjem sekvence dela 16S rDNA, razločevanje sevov pa s pomočjo elektroforeze v utripajočem polju (PFGE). Analize so opravili 2–4 dni po proizvodnji ter v 5-dnevnih intervalih do konca roka uporabnosti. Število laktobacilov v izdelkih je bilo ob koncu roka uporabnosti še vedno nad 10^5 ke/ml, medtem ko je bilo število bifidobakterij ob koncu roka uporabnosti nekoliko manjše. Potrjeni so bili vsi deklarirani mikroorganizmi, v dveh izdelkih pa so ugotovili tudi vrste mikroorganizmov, ki niso bili deklarirani. Na izdelkih, kjer je bil deklariran rod *Bifidobacterium*, so z analizo zaporedja nukleotidov dela 16S rDNA identificirali kot *Bif. animalis*/*Bif. lactis*.

Theunissen in sod. (2005) so pregledali dvajset komercialnih probiotičnih izdelkov, ki so uveljavljeni v Južni Afriki, med njimi enajst probiotičnih mlečnih izdelkov, osem izdelkov z liofiliziranimi bakterijami ter eno mlečno formulo za otroke. Uporabili so metodo PCR-DGGE. Štirje probiotični mlečni izdelki od enajstih so imeli deklarirano število ke/g. Prisotnost deklariranih mikroorganizmov so potrdili v 55 % probiotičnih mlečnih izdelkih, čeprav noben izdelek ni imel popolne deklaracije, torej poleg rodu še vrsto mikroorganizma, ter 33,3 % v liofiliziranih izdelkih. Na deklaracijah probiotičnih mlečnih izdelkov je bil naveden samo rod *Bifidobacterium*, ne pa vrsta. Bakterija vrste *Bif. bifidum* je bila največkrat potrjena vrsta rodu *Bifidobacterium*. Odkrili so tudi nekaj nepravilnosti glede poimenovanja mikroorganizmov, kar po južnoafriških zdravstvenih in živilskih predpisih (Regulations ... , 2002) ni dovoljeno, ker potem pozitivni učinek probiotikov ni zagamčen. Avtorji so menili, da proizvajalci liofiliziranih izdelkov niso obveščeni o predpisih o probiotikih ali preprosto ne ostajajo zvesti tem zahtevam. Strogo nadzorovanje izpolnjevanje predpisov in določitev kazni bi morda prepričala proizvajalce, da izboljšajo kvaliteto proizvodov. Izboljšanje vsebine deklaracij pa po mnenju omenjenih avtorjev ne bi smelo predstavljati prevelike težave.

Fasoli in sod. (2003) so uporabili metodo verižnega pomnoževanja DNA s polimerazo (PCR) in DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) za analizo štirinajstih komercialnih probiotičnih izdelkov, ki so jih ponujale italijanske trgovine. Pregledali so sedem probiotičnih mlečnih izdelkov in sedem probiotičnih liofiliziranih izdelkov. V vseh sedmih probiotičnih mlečnih izdelkih so z metodo PCR-DGGE potrdili prisotnost *Bif. lactis*. Niso pa potrdili *Lb. casei* in *Lb. acidophilus* v dveh izdelkih, kar pripisujejo številu kolonijskih enot, ki je bila pod mejo detekcije (10^3 ke/ml). Na precejšnja odstopanja so prišli pri liofiliziranih izdelkih, kjer so ugotovili nepravilno poimenovanje nekaterih

predstavnikov rodov *Bifidobacterium* in *Bacillus* ter prisotnost organizmov, ki niso bili navedeni. S to raziskavo so potrdili uporabnost metode DGGE.

5.1.4 Stanje analiziranih probiotičnih mlečnih izdelkov na slovenskem trgu od oktobra do decembra 2005

V preglednici 21 je podan pregled rezultatov identifikacije bakterij iz probiotičnih mlečnih izdelkov.

Preglednica 21: Rezultati identifikacij bakterij iz probiotičnih mlečnih izdelkov

Opis	Mlečni izdelki	% izdelkov
število izdelkov:	11	100
• ki so vsebovali vse deklarirane vrste / rodove	6	54,5
• ki so vsebovali druge vrste od deklariranih	1	9,1
• ki so imeli št. bakterij deklarirano	0	0
• ki so imeli deklarirano vrsto <i>Lb. acidophilus</i>	7	63,6
• pri katerih smo potrdili vrsto <i>Lb. acidophilus</i>	8	72,7
• ki imajo ob nakupu izdelka nad 10^7 ke/g	5	45,5

V naši raziskavi je šest izdelkov vsebovalo tiste probiotične bakterije, ki so bile deklarirane. En izdelek je imel deklarirano napačno ime bakterije. Vrsta *Lb. acidophilus* je bila najbolj pogosto deklarirana in tudi najbolj pogosto potrjena.

V preglednici 22 so predstavljeni skupni rezultati ugotavljanja števila probiotičnih bakterij v svežem izdelku in ob koncu roka uporabnosti ter rezultati prisotnosti deklariranih bakterij v izdelkih, ki smo jih potrdili z metodo PCR.

Preglednica 22: Prisotnost in število deklariranih bakterij v enajstih probiotičnih izdelkih, vzorčenih ob začetku in koncu roka uporabnosti

Izdelek	Deklarirani mikroorganizmi	ke/ml* v svežem izdelku	ke/ml* ob koncu roka uporabnosti	PCR (vrstno specifična) na mešanici kolonij s selektivnega gojišča	PCR na skupni DNA iz izdelka
EGO; Ljubljanske mlekarne	<i>Lb. acidophilus</i>	$1,2 \cdot 10^5$	$3,3 \cdot 10^3$	+	+
	<i>Bifidobacterium</i>	$1,7 \cdot 10^6$	$2,7 \cdot 10^5$	- rod <i>Bifidobacterium</i> + <i>Bif. lactis</i>	+ rod <i>Bifidobacterium</i> - <i>Bif. lactis</i>
LCA; Mlekarna Celeia	<i>Lb. acidophilus</i>	$2,9 \cdot 10^7$	$1,8 \cdot 10^7$	+	+
	<i>Bifidobacterium</i>	$1,4 \cdot 10^7$	$2,4 \cdot 10^6$	+ rod <i>Bifidobacterium</i> , + <i>Bif. lactis</i>	+ rod <i>Bifidobacterium</i> , + <i>Bif. lactis</i>
	<i>Lb. casei</i>	$1,7 \cdot 10^7$	$2,2 \cdot 10^7$	+	+
KAKO SI; Ljubljanske mlekarne	Howaru™ Bifido	$4,7 \cdot 10^6$	$1,8 \cdot 10^5$	- rod <i>Bifidobacterium</i> + <i>Bif. lactis</i>	+ rod <i>Bifidobacterium</i> - <i>Bif. lactis</i>
BIFIDUS; Mlekarna Vipava	<i>Lb. acidophilus</i>	$1,4 \cdot 10^7$	$2,5 \cdot 10^7$	+	+
	<i>Bif. bifidum</i>	$1,3 \cdot 10^7$	$8,3 \cdot 10^5$	+ rod <i>Bifidobacterium</i> - <i>Bif. bifidum</i>	+ rod <i>Bifidobacterium</i> + <i>Bif. bifidum</i>
PRONUTRI; Pomurske mlekarne	<i>Lb. acidophilus</i>	$8,7 \cdot 10^6$	$7,9 \cdot 10^6$	+	+
	<i>Bif. bifidum</i>	$4,4 \cdot 10^6$	$2,8 \cdot 10^6$	+ rod <i>Bifidobacterium</i> - <i>Bif. bifidum</i>	+ rod <i>Bifidobacterium</i> - <i>Bif. bifidum</i>
LCAVITA; Mlekarna Celeia	<i>Lb. acidophilus</i>	$2,7 \cdot 10^7$	$3,1 \cdot 10^7$	+	+
	<i>Bifidobacterium</i>	$1,1 \cdot 10^7$	/	- rod <i>Bifidobacterium</i> + <i>Bif. lactis</i>	+ rod <i>Bifidobacterium</i> + <i>Bif. lactis</i>
	<i>Lb. casei</i>	$1,1 \cdot 10^7$	$1,0 \cdot 10^7$	+	-
AB KULTURA, limeta in aloevera; Dukat, Hrvaška	<i>Lb. acidophilus</i>	$3,0 \cdot 10^6$	$4,8 \cdot 10^6$	+	+
	<i>Bif. longum</i>	$3,8 \cdot 10^4$	$9,8 \cdot 10^4$	+ rod <i>Bifidobacterium</i> , - <i>Bif. longum</i>	+ rod <i>Bifidobacterium</i> , - <i>Bif. longum</i>
BIOAKTIV LGG, Nöm, Avstrija	<i>Lb. rhamnosus</i>	$2,4 \cdot 10^7$	$2,1 \cdot 10^7$	+	-
ACTIMEL®; Danone, Avstrija	<i>Lb. casei</i> IMUNITASS	$2,9 \cdot 10^8$	$3,6 \cdot 10^8$	+	+
BIO-FIT, hruška in jabolko; Spar Naturpur, Kärtnermilch, Avstrija	<i>Lb. acidophilus</i>	/	$3,3 \cdot 10^3$	+	+
	<i>Lb. bifidus</i>	/	/	- rod <i>Bifidobacterium</i> - <i>Bif. bifidum</i>	+ rod <i>Bifidobacterium</i> , - <i>Bif. bifidum</i>
	/	$3,2 \cdot 10^6$	$1,1 \cdot 10^6$	+ <i>Lb. casei</i>	+ <i>Lb. casei</i>
	/	/	$3,6 \cdot 10^5$	+ <i>Lb. rhamnosus</i>	/
PINJENEC, ananas; Pomurske mlekarne	Kulture nu-trish™	$7,0 \cdot 10^6$	$4,7 \cdot 10^6$	/	+ <i>Lb. acidophilus</i>
		$1,7 \cdot 10^6$	$1,6 \cdot 10^6$	/	+ <i>Bif. lactis</i> , + rod <i>Bifidobacterium</i>

Legenda:

+: pozitiven rezultat s PCR specifično za vrsto

-: negativen rezultat s PCR specifično za vrsto

/: ni podatka

*: pri štetju na ploščah smo upoštevali samo kolonije s tipičnim izgledom, za katere smo s PCR potrdili, da pripadajo navedenemu rodu oziroma vrsti

5.2 SKLEPI

- V 1 ml svežih izdelkov smo ugotovili od 10^6 do 10^8 probiotičnih bakterij, ob koncu roka uporabnosti pa od 10^5 do 10^8 ke/ml.
- Na nobenem izdelku ni bilo deklariranega števila mikroorganizmov.
- Na enem od enajstih izdelkov je bilo deklarirano napačno oz. zastarelo ime mikroorganizma.
- Na treh probiotičnih izdelkih od enajstih je bil deklariran samo rod bakterij. Na dveh izdelkih je bilo navedeno komercialno ime kulture brez pravega imena mikroorganizmov.
- Na petih izdelkih, kjer je bil deklariran rod *Bifidobacterium* ali komercialno ime kulture, smo potrdili prisotnost vrste *Bifidobacterium lactis*.
- Izolacija DNA iz kolonij s pomočjo toplotne obdelave in tritona ter izolacija DNA neposredno iz izdelka s komercialnim setom za izolacijo genomske DNA sta se izkazali kot uspešni metodi, saj smo z metodo PCR, specifično za vrsto in gelsko elektroforezo, uspešno potrdili deklarirane mikroorganizme.
- Če na gojišču zrastejo kolonije z različno morfologijo, je potrebno z reakcijo PCR za vsak morfološki tip ugotoviti, za katere vrste gre. Pri štetju kolonijskih enot moramo upoštevati morfološko različnost kolonij.
- Koristno je opraviti analize tako na skupni DNA, pridobljeni iz izdelka, kot tisti, ki izvira iz posameznih kolonij. Lažno negativni rezultati na skupni DNA neposredno iz vzorca so lahko posledica nezadovoljivega postopka priprave skupne DNA ali prisotnosti inhibitorjev reakcije PCR v izdelku. Odsotnost kolonij določene vrste, ki smo jo dokazali s PCR na skupni DNA iz izdelka, je lahko posledica prisotnosti DNA bakterijskih celic, ki niso sposobne rasti na hranljivem gojišču.
- Gojišča MRS, MRS + cly in LAMVAB so pri ustreznih temperaturah inkubacije dovolj selektivna za štetje vrst *Lb. casei*, *Lb. acidophilus* in *Lb. rhamnosus* v probiotičnih izdelkih. Potrditveni testi so vsaj občasno priporočljivi.
- Za ugotavljanje števila bifidobakterij je primernejše gojišče MRS - IM kot gojišče MRS + NPNL.

6 POVZETEK

V obdobju od oktobra do decembra leta 2005 smo v raziskavi probiotikov zajeli enajst različnih probiotičnih mlečnih izdelkov v obliki napitkov oz. probiotičnih jogurtov, ki so na voljo v slovenskih trgovinah. Želeli smo ugotoviti pravilnost imen deklariranih mikroorganizmov ter ugotoviti število živih mikroorganizmov s konvencionalnimi metodami. Z molekularno metodo PCR na DNA, izolirani iz kolonij, ki so zrasle na selektivnih gojiščih, in DNA, izolirani iz izdelka ter gelsko elektroforezo, smo potrjevali prisotnost določenih probiotičnih bakterij.

Bistvenih pomanjkljivosti v poimenovanju nismo ugotovili, niso pa bila vedno navedena imena vrst probiotičnih bakterij, ki so jih izdelki vsebovali. Samo en izdelek od enajstih analiziranih je vseboval napačno oz. zastarelo ime bakterije, dva izdelka pa sta imela navedeno komercialno ime kulture (brez pravega imena mikroorganizmov). Navedba podatkov o bakterijskem sevu pa je bolj izjema kot pravilo.

Probiotiki so živi mikroorganizmi, ki dokazano pozitivno učinkujejo na zdravje, če jih zaužijemo v zadostni količini. Mnenja, kolikšna naj bi bila količina zaužitih probiotikov, ki zagotavlja probiotično delovanje, so različna. Najbolj razširjeno mnenje je, da naj bi bilo minimalno število zaužitih probiotikov 10^7 ke/ml. V naši raziskavi je pet izdelkov od enajstih vsebovalo več kot 10^7 ke/ml vse do konca roka uporabnosti.

Pri mikrobioloških analizah fermentiranih mlečnih izdelkov se vsi srečujejo s problemom nezadostne selektivnosti gojišč. Število kolonij bifidobakterij na gojišču MRS + NPNL je bilo v povprečju manjše kot na gojišču MRS - IM. Predvidevamo, da antibiotiki v gojišču MRS + NPNL delno zavirajo tudi rast bifidobakterij. Opazili smo, da so na gojišču MRS - NPNL, namenjenemu za selektivno štetje bifidobakterij, rasli tudi laktobacili vrste *Lb. casei*, vendar je bilo kolonije *Lb. casei* po morfologiji mogoče razlikovati od bifidobakterij. V primeru, ko na gojiščih zrastejo kolonije z različno morfologijo, je smiselno z reakcijo PCR ugotoviti vrsto za vsak morfološki tip ter rezultate PCR upoštevati pri štetju. Selektivnost gojišča MRS s klindamicinom (MRS + cly) je bila zadovoljiva za ugotavljanje števila *Lb. acidophilus*, prav tako pa so med inkubacijo pri 31 °C na gojišču MRS zrasli le predstavniki vrste *Lb. casei*. Preživetje bifidobakterij in *Lb. acidophilus* je bilo različno v različnih izdelkih, bakterije vrst *Lb. casei* in *Lb. rhamnosus* pa so zelo dobro preživele do konca roka uporabnosti.

Izolacija DNA iz kolonij na gojišču s toploto in tritonom ter izolacija DNA neposredno iz izdelkov z lastnim protokolom, ki je vključeval tudi uporabo komercialnega kompleta reagentov za izolacijo genomske DNA, sta se izkazali za zelo uspešni tehniki. Z reakcijo PCR smo uspeli potrditi prisotnost deklariranih bakterijskih vrst tako na DNA, pridobljeni iz kolonij, zraslih na selektivnih gojiščih, kakor tudi na skupni DNA, pridobljeni neposredno iz izdelkov. Izjemi sta bila *Lb. casei* v izdelku LcaVita ter *Lb. rhamnosus* v izdelku BioAktiv LGG, ki smo ju uspeli dokazati na nivoju kolonij, ne pa v vzorcu skupne DNA, pridobljene iz izdelka. Nasprotno se je zgodilo v primeru izdelka Pinjenec, ko smo *Lactobacillus acidophilus* in *Bifidobacterium lactis* dokazali na DNA, pridobljeni neposredno iz izdelka, ne pa na kolonijah. Omenjene pomanjkljivosti so nas vodile k

zaključku, da je zelo koristno opraviti analize tako na skupni DNA, kot tisti, ki izvira iz posameznih kolonij. Upoštevati je potrebno tudi, da je pozitiven rezultat, dobljen na skupni DNA neposredno iz vzorca, ne pa na kolonijah, lahko posledica prisotnosti DNA bakterijskih celic, ki niso več viabilne, t. j. sposobne zrasti na hranljivem gojišču. Na drugi strani izostanek pozitivnega rezultata na skupni DNA iz izdelka, čeprav smo dobili pozitivne rezultate na kolonijah, lahko pomeni nezadovoljiv postopek priprave skupne DNA ali prisotnost inhibitorjev reakcije PCR v izdelku.

Izbira selektivnih gojišč, postopek izolacije DNA s toploto in tritonom iz kolonij na gojišču ter izolacija DNA neposredno iz izdelka so se izkazale za zelo uspešne tehnike, saj smo z metodo PCR in gelsko elektroforezo potrdili deklarirane mikroorganizme.

Interes potrošnikov po poseganju po probiotičnih izdelkih je v Evropi in pri nas vse večji, zato bo potrebno področje probiotičnih izdelkov zakonsko urediti in zanj sestaviti primerne pravilnike.

7 VIRI

- Adamič J., Smole Možina S., Jeršek B. 2003. Vloga in pomen mikroorganizmov v živilih in taksonomija. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 1–45.
- Adams R.M. 1999. Safety of industrial lactic acid bacteria. *Journal of Biotechnology*, 68: 171–178.
- Agarwal K.N., Bhasin S.K., Faridi M.M.A., Mathur M., Gupta S. 2001. *Lactobacillus casei* in the control of acute diarrhea - a pilot study. *Indian Pediatrics*, 38: 905-910. <http://www.indianpediatrics.net/aug2001/aug-905-910.htm> (oktober 2006): 5 str.
- Anonymous. 2001. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria: Report of a joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live acid bacteria. Córdoba, Argentina, Food and Agriculture Organization of the United Nations. <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/meeting/009/y6398e.pdf> (oktober 2006): 34 str.
- Anonymous. 2002. Guidelines for the evaluation of probiotics in food: Report of joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canada, Food and Agriculture Organization of the United Nations. <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf> (oktober 2006): 11 str.
- Axelsson, L. 2004. Lactic acid bacteria: Classification and physiology. V: Lactic acid bacteria: Microbiology and functional aspects. 3rd ed. Salminen S., von Wright A., Ouwehand A. (eds.). New York, Marcel Dekker: 1–66.
- Barakat R.K., Griffiths M.W., Harris L.J. 2000. Isolation and characterization of *Carnobacterium*, *Lactococcus* and *Enterococcus* spp. from cooked, modified atmosphere packaged, refrigerated, poultry meat. *International Journal of Food Microbiology*, 62: 83–94.
- Bogovič Matijašič B. 2001. Ugotavljanje varnosti in učinkovitosti funkcionalne hrane. V: Funkcionalna hrana. 21. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 8. in 9. november 2001. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 153–165.
- Bogovič Matijašič B., Rogelj I. 2006. Demonstration of suitability of probiotic products; An emphasis on survey of commercial products obtained on Slovenian market. *AgroFOOD Industry Hi-tech*, 17, 3: 38–40.

- Chr. Hansen Company. 2001. *L. acidophilus*, *L. casei* and Bifidobacteria in fermented milk products - Guidelines. Method for counting probiotic bacteria. Hørsholm, Chr. Hansen: 4. str.
<http://www.chr-hansen.com> (november 2005)
- Coeuret V., Geuguen M., Vernoux P.J. 2004. Numbers and strains of lactobacilli in some probiotic products. *International Journal of Food Microbiology*, 97: 147–156.
- Euzéby J.P. 1997. List of bacterial names with standing in nomenclature. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47, 2: 590–592.
<http://www.bacterio.cict.fr/> (oktober 2005)
- Fasoli S., Marzotto M., Rizotti L., Rossi F., Dellaglio F., Torriani S. 2003. Bacterial composition of commercial probiotic products as evaluated by PCR-DGGE analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 82: 59–70.
- Feord J. 2002. Lactic acid bacteria in a changing legislative environment. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82: 353–360.
- Fooks J.L., Fuller R., Gibson R.G. 1999. Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. *International Dairy Journal*, 9: 53–61.
- Gardiner G., Ross R.P., Kelly P.M., Stanton C., Collins J.K., Fitzgerald G. 2002. Microbiology of therapeutic milks. V: Dairy microbiology handbook: the microbiology of milk and milk products. 3rd ed. Robinson R.K. (ed.). New York, John Wiley & Sons: 431–478.
- Guandalini S., Pensabene L., Abu Zikri M., Dias J.A., Casali L.G., Hoekstra H., Kolaček S., Massar K., Mičetić - Turk D., Papadopoulou A., de Sousa J.S., Sandhu B., Szajewska H., Weizman Z. 2000. *Lactobacillus* GG administered in oral rehydration solution to children with acute diarrhea: A multicenter European trial. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 30: 54–60.
- Guarner F., Schaafsma G.J. 1998. Probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 39: 237–238.
- Gueimonde M., Delgado S., Mayo B., Ruas - Madiedo P., Margolles A., de los Reyes-Gavilán C.G. 2004. Viability and diversity of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* populations included in commercial fermented milks. *Food Research International*, 37: 839–850.
- Hamilton - Miller J.M.T., Shah S., Winkler J.T. 2003. Public health issues arising from microbiological and labelling quality of foods and supplements containing probiotic microorganisms. *Public Health Nutrition*, 2: 223–229.

- Hartemink R., Domenech V.R., Rombouts F.M. 1997. LAMVAB - A new selective medium for the isolation of lactobacilli from faeces. *Journal of Microbiological Methods*, 29: 77–84.
- Hartemink R. 2006. Probiotics. Wageningen, Wageningen University.
<http://www.food-info.net/uk/ff/probiotics.htm> (oktober 2006): 5 str.
- Havennar R., Huis in't Veld J.H.J. 1992. Probiotics: general view. V: *Lactic acid bacteria in health disease*. Wood J.B.J. (ed.). London, Elsevier: 151–179.
- Huis in't Veld J., Havenaar R. 1991. Probiotics and health in man and animal. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 51: 562–567.
- IDF Standard 149. Annex A. 1991. Lactic acid starters. Section A.2-Enumeration of various microorganisms in lactic acid starters: 3 str.
- IDF Standard 100B. 1991. Milk and milk production - Enumeration of microorganisms – Colony count technique at 30 °C: 3 str.
- Jeršek B. 2003. Higiena živil. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 21–26.
- Koebnick C., Wagner I., Leitzmann P., Stern U., Zunft H.J.F. 2003. Probiotic beverage containing *Lactobacillus casei* Shirota improves gastrointestinal symptoms in patients with chronic constipation. *Canadian Journal of Gastroenterology*, 17: 655–659.
- Kurmann J.A., Rašić J.L. 1991. The health potential of products containing bifidobacteria. V: *Therapeutic properties of fermented milks*. Robinson R.K. (ed.). London, Elsevier Applied Food Science Series: 117–158.
- Lin W-H., Hwang C-F., Chen L-W., Tsen H-Y. 2006. Viable counts, characteristic evaluation for commercial lactic acid bacteria products. *Food Microbiology*, 23: 74–81.
- Matsuki T., Watanabe K., Tanaka R., Fukuda M., Oyaizu H. 1999. Distribution of Bifidobacterial species in human intestinal microflora examined with 16S rRNA-gene-target species-specific primers. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 4506–4512.
- O'Toole K.D., Lee K.Y. 2003. Fermented Foods. V: *Microbial biotechnology: Principles and applications*. Lee K.Y. (ed.). Singapore, World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.: 201–256.
- Ouwehand C.A., Kirjavainen V.P., Shortt C., Salminen S. 1999. Probiotics: mechanisms and established effects. *International Dairy Journal*, 9: 43–52.
- Ouwehand A., Vesterlund S. 2003. Health aspects of probiotics. *Idrugs*, 6: 573–580.

- Parker R.B. 1974. Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Animal Nutrition and Health*, 29: 4–8.
- Promega. 2005. Usage information. Madison, WI, Promega Corporation.
<http://www.promega.com> (november 2005): 2 str.
- Regulations relating to labelling and advertising of foodstuffs. 2002. Foodstuffs, Cosmetics and Disinfectants act No. 54 of 1972. No. R. 1055/2002.
<http://www.doh.gov.za/docs/regulations/2002/reg1055.html> (november 2006): 27 str.
- Reid G. 2006. Safe and efficacious probiotics: what are they? *Trends in Microbiology*, 14, 8: 348–352.
- Reuter G., Klein G., Goldberg M. 2002. Identification of probiotic cultures in food samples. *Food Research International*, 35: 117–124.
- Rogelj I. 2001. Probiotiki, prebiotiki in sinbiotiki. V: Probiotiki in možnosti njihove uporabe. Zbornik predavanj s posvetovanja. Pavčič M., Vitezić N. (ur.). Ljubljana, Zbornica nutricionistov in dietetikov: 6–16.
- Rogelj I., Bogovič Matijašič B. 2004. Probiotiki in varnost. V: Varnost živil. 22. Bitenčevi dnevi, Radenci, 18. in 19. marec 2004. Gašperlin L., Žlender B. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 181–189.
- Rogelj I., Perko B. 2003. Mlečni izdelki. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 541–577.
- Saarela M., Mogensen G., Fondén R., Mättö J., Mattila - Sandholm T. 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, 84: 197–215.
- Salminen S., Gueimonde M. 2004. Human studies on probiotics: What is scientifically proven. *Journal of Food Science*, 69, 5: 137–140.
- Salminen S., Von Wright A., Morelli L., Marteau P., Brassart D., De Vos W.M., Fondén R., Saxelin M., Collins K., Mogensen G., Birkeland S.E., Matilla - Sandholm T. 1998. Demonstration of safety of probiotics - a review. *International Journal of Food Microbiology*, 44: 93–106.
- Sanders M.E., Huis in't Veld J. 1999. Bringing a probiotic-containing functional food to the market: microbiological, product, regulatory and labelling issues. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76: 293–315.
- Satokari R.M., Vaughan E.E., Akkermans A.D.L., Saarela M., De Vos W.M. 2000. Bifidobacterial diversity in human feces detected by genus-specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 2: 504–513.

- Shah N.P. 2000. Probiotic bacteria: Enumeration and survival in dairy foods. *Journal of Dairy Science*, 83: 894-907.
- Shortt C. 1999. The probiotic century: historical and current perspectives. *Trends in Food Science & Technology*, 10: 411-417.
- Smole Možina S., Jeršek B., Zorman T., Žgur A., Avbelj J. 2002. Verižna reakcija s polimerazo (PCR) v živilski mikrobiologiji: delavnica za podiplomsko izobraževanje. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Katedra za živilsko mikrobiologijo: 13 str.
- Smole Možina S. 2003. Metode mikrobiološke preiskave živil. V: *Mikrobiologija živil živalskega izvora*. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 87-113.
- Smole Možina S. 2000. Eksperimentalne vaje iz živilske mikrobiologije. Splošna mikrobiološka tehnika: Skripta in delovni zvezek za študente 1. letnika živilstva. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Katedra za živilsko mikrobiologijo: 25 str.
- Smole Možina S., Jeršek B. 2001. Mikrobiološke in molekularne metode karakterizacije probiotičnih dodatkov funkcionalnim živilom. V: *Funkcionalna hrana*. 21. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 8. in 9. november 2001. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 207-218.
- Talwalkar A., Kailasapathy K. 2004. Comparison of selective and differential media for the accurate enumeration of strains of *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus casei* complex from commercial yoghurts. *International Dairy Journal*, 14: 143-149.
- Temmerman R., Pot B., Huys G., Swings J. 2003. Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *International Journal of Food Microbiology*, 81: 1-10.
- Theunissen J., Britz T.J., Torriani S., Witthuhn R.C. 2005. Identification of probiotic microorganisms in South African products using PCR-based DGGE analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 98: 11-21.
- Van de Castele S., Vanheuverzwijn T., Ruysen T., Van Assche P., Swings J., Huys G. 2005. Evaluation of culture media for selective enumeration of probiotic strains of lactobacilli and bifidobacteria in combination with yoghurt or cheese starters. *International Dairy Journal*, 16, 12: 1470-1476.

Walter J., Tannock G.W., Tilsala - Timisjärvi A., Rodtong S., Loach D.M., Munro K., Alatossava T. 2000. Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 297–303.

ZAHVALA

Za skrben in strokovni pregled diplomskega dela se zahvaljujem mentorici prof. dr. Ireni Rogelj in recenzentki prof. dr. Sonji Smole Možina.

Zahvaljujem se somentorici dr. Bojani Bogovič Matijašič, ki mi je pomagala pri delu v laboratoriju, strokovno pregledala diplomsko delo in pokazala veliko mero razumevanja in dobre volje.

Za pomoč pri zbiranju in urejanju literature gre zahvala Ivici Hočevar in Barbari Slemenik iz knjižnice Oddelka za živilstvo.

Hvala Bernardi Leva za jezikovni pregled dela.

Hvala očetu, mami, Ani, Majdi, Marti in prijateljem za podporo in pomoč v času študija.

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Nada KUK

**OPIS IN UGOTAVLJANJE USTREZNOSTI
PROBIOTIČNIH MLEČNIH IZDELKOV NA
SLOVENSKEM TRGU**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2006