

---

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Denis Martinšek

**VPLIV ZAŠČITNIH SNOVI NA PREŽIVETJE SEVA  
*Lactobacillus gasseri* K7 MED LIOFILIZACIJO IN  
SKLADIŠČENJEM**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2006

---

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Denis Martinšek

**VPLIV ZAŠČITNIH SNOVI NA PREŽIVETJE SEVA *Lactobacillus gasseri* K7 MED  
LIOFILIZACIJO IN SKLADIŠČENJEM**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**EFFECT OF PROTECTIVE AGENTS UPON SURVIVAL RATE OF STRAIN  
*Lactobacillus gasseri* K7 DURING LYOPHILIZATION AND STORAGE**

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2006

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

Študijska komisija Oddelka za živilstvo je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Ireno Rogelj, za somentorico dr. Andrejo Miklič, za recenzenta pa prof. dr. Petra Rasporja.

Mentorica: prof. dr. Irena Rogelj

Somentorica: dr. Andreja Miklič

Recenzent: prof. dr. Peter Raspor

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Denis Martinšek

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD	Dn
DK	UDK 579.24:615.3.002:547.96(043)=863
KG	mlečnokislinske bakterije/ <i>Lactobacillus gasseri</i> K7/fermentacija na sirotkinem gojišču/dodatek zaščitnih snovi za celice/liofilizacija brozge/skladiščenje liofilizata/preživetje <i>Lactobacillus gasseri</i> K7/bakteriocini/bakteriocinska aktivnost
AV	MARTINŠEK, Denis
SA	ROGELJ, Irena (mentorica)/MIKLIČ, Andreja(somentor)/RASPOR, Peter (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI	2006
IN	VPLIV ZAŠČITNIH SNOVI NA PREŽIVETJE SEVA <i>Lactobacillus gasseri</i> K7 MED LIOFILIZACIJO IN SKLADIŠČENJEM
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XI, 56 str., 5 pregl., 17 sl., 7 pril., 73 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	<p>Proučevali smo učinek dodatka zaščitnih snovi na preživetje seva <i>Lactobacillus gasseri</i> K7 med liofilizacijo, bakteriocinsko aktivnost liofiliziranega pripravka in ohranjanje viabilnosti celic ter bakteriocinske aktivnosti pripravka med 8-tedenskim skladiščenjem. Sev smo namnožili v sirotki z dodatkom kvasnega ekstrakta in tweena 80. Fermentacija je potekala v bioreaktorju pri temperaturi 37 °C, pH vrednosti 5,75 in podtlaku 0,5 bara. Za zaščito celic smo fermentacijski brozgi pred zamrzovanjem dodajali saharozo (5, 10, 15, 20 %), laktozo (5, 10 %), škrob (5, 10, 15, 20 %), glicerol (5 %), askorbinsko kislino (0,05 %) ali kombinacijo ene izmed naštetih zaščitnih snovi z askorbinsko kislino. Fermentacijska brozga je v 1 ml vsebovala <math>8,8 \times 10^8</math> živih celic <i>Lb. gasseri</i> K7, njena bakteriocinska aktivnost (BA) pa je bila 256.000 BA/ml. Postopek liofilizacije je preživel 1,2 x 10<sup>7</sup> celic/ml, kar je samo 1,4 % celic iz fermentacijske brozge. Najboljšo zaščito celic seva K7 med liofilizacijo je zagotovil 20-odstotni dodatek saharoze. Postopek je preživel 2,2 x 10<sup>8</sup> celic/ml (24,9 %), vendar je bila saharoza neučinkovita pri zaščiti celic med skladiščenjem liofiliziranih pripravkov. Skladiščenje je preživel manj kot 0,1 % celic. Najboljšo zaščito celic seva K7 je zagotovil 20-odstotni dodatek škroba, saj je 8-tedensko skladiščenje preživel 3 x 10<sup>7</sup> celic/ml (3,4 %). <u>Med liofilizacijo se je bakteriocinska aktivnost fermentacijske brozge razpolovila</u> (128.000 BA/ml) pri vseh vzorcih. Pripravki z dodatkom škroba so ohranili enako bakteriocinsko aktivnost še po 4-ih tednih skladiščenja, po 8-ih tednih pa smo opazili <u>ponovno zmanjšanje</u> na 64.000 BA/ml. Dodatek askorbinske kisline ni povečal zaščitnega učinka preskušanih zaščitnih snovi.</p>

Deleted: B

Deleted: se je med liofilizacijo

Deleted: e

Deleted: padec

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn  
 DC UDC 579.24:615.3.002:547.96(043)=863  
 CX lactic acid bacteria/*Lactobacillus gasseri* K7/fermentation on whey growth media/addition of protective agents for cells/lyophilization of fermentation mixture/storage of lyophilizate/survival of *Lactobacillus gasseri* K7/ bacteriocines/bacteriocin activity  
 AU MARTINŠEK, Denis  
 AA ROGELJ, Irena (supervisor)/MIKLIČ, Andreja(co-adviser)/RASPOR, Peter (reviewer)  
 PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology  
 PY 2006  
 TI EFFECT OF PROTECTIVE AGENTS UPON SURVIVAL RATE OF STRAIN *Lactobacillus gasseri* K7 DURING LYOPHILIZATION AND STORAGE  
 DT Graduation Thesis (University studies)  
 NO XI, 56 p., 5 tab., 17 fig., 7 ann., 73 ref.  
 LA sl  
 AL sl/en  
 AB We studied the addition of protective agents on the survival rate of the strain *Lb. gasseri* K7 during freeze-drying, bacteriocin activity of lyophilized samples and the preservation and survival of and bacteriocin activity during 8-weeks of storage. The strain was cultured in whey with an addition of yeast extract and Tween 80. Fermentation was performed in a bioreactor at 37 °C with a pH value of 5.75 and a vacuum of 0.5 bars. Prior to freeze-drying, sucrose (5, 10, 15, 20 %), lactose (5, 10 %), starch (5, 10, 15, 20 %), glycerol (5 %) and ascorbic acid (0.05 %), or a combination of one of the protective agents above with ascorbic acid was added into the fermentation mixture for the protection of cells. The fermentation mixture in 1 ml comprised  $8.8 \times 10^8$  viable cells *Lb. gasseri* K7, while bacteriocin activity (BA) was 256000 BA/ml. Only  $1.2 \times 10^7$  cells/ml survived the freeze-drying process; that is only 1.4 % cells from the fermentation mixture. The best protection for cells of the K7 strain during lyophilization was a 20 % addition of sucrose. In this case  $2.2 \times 10^8$  cells/ml (24.9 %) survived the process, but the sucrose was ineffectual in protecting cells during the storage of lyophilized samples. Less than 0.1 % cells survived storage. A 20 % addition of starch assured the best protections of *Lb. gasseri* K7 cells during an 8-week storage period with  $3 \times 10^7$  cells/ml (3.4 %) surviving. Bacteriocin activity of the fermentation mixture decreased by one half (128000 BA/ml) in all samples. Samples with an addition of starch maintained identical bacteriocin activity up to 4-weeks of storage, but at 8-weeks of storage, we observed a renewed decrease in activity to 64000 BA/ml. The addition of ascorbic acid did not increase the protective effects of the tested protective agents.

## KAZALO VSEBINE

Ključna dokumentacijska informacija (KID).....	II
Key words documentation (KWD).....	III
Kazalo vsebine.....	IV
<b>Kazalo preglednic.....</b>	<b>VII</b>
Kazalo slik.....	VIII
Kazalo prilog.....	X
Okrajšave in simboli.....	XI
<b>1 UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN DELA.....	3
<b>2 PREGLED OBJAV.....</b>	<b>4</b>
2.1 PROBIOTIKI.....	4
2.2 BAKTERIOCINI.....	5
2.3 ROD <i>Lactobacillus</i> .....	6
<b>2.3.1 <i>Lactobacillus gasseri</i> K7.....</b>	<b>7</b>
2.4 NAČIN PRIPRAVE BAKTERIJSKIH PRIPRAVKOV.....	8
<b>2.4.1 Liofilizacija.....</b>	<b>8</b>
2.4.1.1 Priprava medija pred liofilizacijo.....	8
2.4.1.2 Proces zamrzovanja.....	9
2.4.1.3 Sublimacija.....	9
<b>2.4.2 Sušenje z razprševanjem.....</b>	<b>10</b>
<b>2.4.3 Mikroinkapsulacija.....</b>	<b>10</b>
2.5 SPREMEMBE CELIC OB STRESU.....	11
<b>2.5.1 Spremembe fluidnosti membrane.....</b>	<b>11</b>
<b>2.5.2 Spremembe maščobnokislinske sestave membrane.....</b>	<b>11</b>
<b>2.5.3 Odziv celic na spremembe.....</b>	<b>12</b>
2.6 DEJAVNIKI, KI VPLIVAJO NA PREŽIVETJE BAKTERIJ V LIOFILIZIRANIH PRIPRAVKIH.....	12
<b>2.6.1 Lastnosti bakterij.....</b>	<b>12</b>

Deleted: o

2.6.1.1	Morfološke lastnosti.....	12
2.6.1.2	Maščobnokislinska sestava celične membrane.....	13
<b>2.6.2</b>	<b>Vpliv predhodnega stresa.....</b>	<b>13</b>
<b>2.6.3</b>	<b>Temperatura steklastega prehoda.....</b>	<b>13</b>
<b>2.6.4</b>	<b>Vpliv ravnega medija.....</b>	<b>15</b>
2.6.4.1	Kompatibilne snovi.....	15
2.6.4.2	Eksopolisaharidi.....	15
2.6.4.3	Sladkorji v ravnem mediju.....	16
2.7	VLOGA ZAŠČITNIH SNOVI, KI JIH DODAJAMO PRIPRAVKOM PRED LIOFILIZACIJO.....	16
<b>2.7.1</b>	<b>Dodatek sladkorjev.....</b>	<b>17</b>
2.7.1.1	Trehaloza.....	17
2.7.1.2	Saharoza.....	17
2.7.1.3	Sorbitol.....	18
2.7.1.4	Manitol.....	18
<b>2.7.2</b>	<b>Dodatek drugih snovi.....</b>	<b>18</b>
2.7.2.1	Natrijev glutamat.....	18
2.7.2.2	Mleko v prahu.....	18
2.7.2.3	Antioksidanti.....	19
2.7.2.4	Glicerol.....	19
2.7.2.5	Osmotsko aktivne snovi.....	19
2.7.2.6	Tween 80.....	19
2.8	SIROTKA.....	20
<b>2.8.1</b>	<b>Kemijska sestava sirotke.....</b>	<b>20</b>
<b>2.8.2</b>	<b>Uporaba sirotke.....</b>	<b>20</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL IN METODE.....</b>	<b>21</b>
3.1	NAČRT IN POTEK POSKUSA.....	21
3.2	MATERIAL.....	23
<b>3.2.1</b>	<b>Bakterijski sevi.....</b>	<b>23</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Gojišča in dodatki.....</b>	<b>23</b>
<b>3.2.3</b>	<b>Zaščitne snovi.....</b>	<b>23</b>
<b>3.2.4</b>	<b>Kemikalije.....</b>	<b>24</b>
3.3	METODE.....	24
<b>3.3.1</b>	<b>Priprava fermentacijskega medija.....</b>	<b>24</b>
<b>3.3.2</b>	<b>Priprava fermentorja.....</b>	<b>24</b>
<b>3.3.3</b>	<b>Fermentacija.....</b>	<b>24</b>
<b>3.3.4</b>	<b>Priprava vzorcev za liofilizacijo.....</b>	<b>24</b>
<b>3.3.5</b>	<b>Liofilizacija in skladiščenje.....</b>	<b>25</b>

3.3.6	Ugotavljanje števila živih bakterij seva <i>Lb. gasseri</i> K7.....	25
3.3.7	Ugotavljanje bakteriocinske aktivnosti pripravka.....	26
4	<b>REZULTATI.....</b>	<b>28</b>
4.1	PRIDOBIVANJE BAKTERIOCINSKO AKTIVNE BIOMASE <i>Lb. gasseri</i> K7 V BIOREAKTORJU.....	29
4.2	PREŽIVELOST SEVA <i>Lb. gasseri</i> K7 MED LIOFILIZACIJO IN SKLADIŠČENJEM TER BAKTERIOCINSKA AKTIVNOST PRIPRAVKA BREZ DODANIH ZAŠČITNIH SNOVI.....	30
4.3	VPLIV SAHAROZE NA PREŽIVETJE SEVA <i>Lb. gasseri</i> K7 MED LIOFILIZACIJO IN SKLADIŠČENJEM IN BAKTERIOCINSKO AKTIVNOST LIOFILIZIRANIH PRIPRAVKOV.....	32
4.4	VPLIV LAKTOZE NA PREŽIVETJE SEVA <i>Lb. gasseri</i> K7 MED LIOFILIZACIJO IN SKLADIŠČENJEM IN BAKTERIOCINSKO AKTIVNOST LIOFILIZIRANIH PRIPRAVKOV.....	34
4.5	VPLIV ŠKROBA NA PREŽIVETJE SEVA <i>Lb. gasseri</i> K7 MED LIOFILIZACIJO IN SKLADIŠČENJEM IN BAKTERIOCINSKO AKTIVNOST LIOFILIZIRANIH PRIPRAVKOV.....	36
4.6	VPLIV DODATKA GLICEROLA NA PREŽIVETJE SEVA <i>Lb. gasseri</i> K7 MED LIOFILIZACIJO IN SKLADIŠČENJEM IN BAKTERIOCINSKO AKTIVNOST LIOFILIZIRANIH PRIPRAVKOV.....	38
4.7	VPLIV DODATKA ASKORBINSKE KISLINE NA PREŽIVETJE SEVA <i>Lb. gasseri</i> K7 MED LIOFILIZACIJO IN SKLADIŠČENJEM IN BAKTERIOCINSKO AKTIVNOST LIOFILIZIRANIH PRIPRAVKOV.....	39
5	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI.....</b>	<b>43</b>
5.1	RAZPRAVA.....	43
5.2	SKLEPI.....	48
6	<b>POVZETEK.....</b>	<b>49</b>
7	<b>VIRI.....</b>	<b>50</b>

**ZAHVALA**

**PRILOGE**



## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1	<u>Temeljne</u> razlike med bakteriocini in antibiotiki (Claveland in sod., 2005)..5	Deleted: Osnovne
Preglednica 2	Klasifikacija bakteriocinov (Claveland in sod., 2001, cit. po Klaenhammer, 1993).....6	
Preglednica 3	Razdelitev rodu <i>Lactobacillus</i> (Axellson, 1998).....7	
Preglednica 4	Temperatura steklastega prehoda nekaterih sladkorjev (Patist in Zoerb, 2005).....14	
Preglednica 5	Preživelost seva <i>Lb. gasseri</i> K7 in bakteriocinska aktivnost liofiliziranega pripravka z dodatkom saharoze (5, 10, 15 in 20 %), laktoze (5, 10 %), škroba (5, 10, 15 in 20 %), glicerola (5 %) in dodatkom 0,05 % askorbinske kisline, po 4- in 8-tedenskem skladiščenju.....41	

## KAZALO SLIK

Slika 1	Zaščita celične membrane s trehalozo: celična membrana v laminarni fazi (A), prehod v fazo gel med sušenjem (B), membrana po rehidraciji (C); a) nezaščiten, b) membrana zaščiten s trehalozo (Patist in sod., 2005).....	15
Slika 2	Spremljanje rasti seva <i>Lb. gasseri</i> K7 v sirotki z dodatkom kvasnega ekstrakta in tweena 80 pri temperaturi 37 °C, podtlaku 0,5 bara in pH vrednosti 5,75.....	22
Slika 3	Hodogram poteka celotnega poskusa.....	26
Slika 4	Hodogram poteka določanja števila celic <i>Lb. gasseri</i> K7.....	27
Slika 5	Hodogram poteka določanja bakteriocinske aktivnosti pripravka z metodo kritične razredčitve na mikrotiterskih ploščah z indikatorskim sevom <i>Lb. sakei</i> NCDO 2174.....	27
Slika 6	Preživelost seva <i>Lb. gasseri</i> K7 v mediju brez dodanih zaščitnih snovi med zamrzovanjem (pred liofilizacijo), po liofilizaciji ter med 8-tedenskim skladiščenjem liofiliziranih pripravkov.....	30
Slika 7	Bakterijska aktivnost pripravka s sevom <i>Lb. gasseri</i> K7 v mediju, ki ni vseboval zaščitnih snov, po fermentaciji, pred <u>lioilizacijo in po njej</u> ter med 8- tedenskim skladiščenjem.....	31
Slika 8	Preživelost seva <i>Lb. gasseri</i> K7 v mediju s saharozo (5, 10, 15, 20 %) med zamrzovanjem, po liofilizaciji ter med 8-tedenskim skladiščenjem liofiliziranih pripravkov.....	32
Slika 9	Bakteriocinska aktivnost pripravka s sevom <i>Lb. gasseri</i> K7 v mediju s saharozo (5, 10, 15, 20 %), po fermentaciji, pred <u>lioilizacijo in po njej</u> ter med 8-tedenskim skladiščenjem.....	33
Slika 10	Preživelost seva <i>Lb. gasseri</i> K7 v mediju z laktozo (5, 10%), med zamrzovanjem, po liofilizaciji ter med 8-tedenskim skladiščenjem liofiliziranih pripravkov.....	34
Slika 11	Bakteriocinska aktivnost pripravka s sevom <i>Lb. gasseri</i> K7 v mediju z laktozo (5, 10 %) pred <u>lioilizacijo in po njej</u> ter med 8-tedenskim skladiščenjem.....	35
Slika 12	Preživelost seva <i>Lb. gasseri</i> K7 v mediju s škrobom (5, 10, 15, 20 %), med zamrzovanjem, po liofilizaciji ter med 8-tedenskim skladiščenjem liofiliziranih pripravkov.....	36
Slika 13	Bakteriocinska aktivnost pripravka s sevom <i>Lb. gasseri</i> K7 v mediju s škrobom (5, 10, 15, 20 %) pred <u>lioilizacijo in po njej</u> ter med 8-tedenskim skladiščenjem.....	37
Slika 14	Preživelost seva <i>Lb. gasseri</i> K7 v mediju z glicerolom (5 %), med zamrzovanjem, po liofilizaciji ter med 8-tedenskim skladiščenjem liofiliziranih pripravkov.....	38
Slika 15	Bakteriocinska aktivnost pripravkov s sevom <i>Lb. gasseri</i> K7 v mediju z glicerolom (5 %) pred <u>lioilizacijo in po njej</u> ter med 8-tedenskim skladiščenjem.....	39
Slika 16	Preživelost seva <i>Lb. gasseri</i> K7 v mediju z askorbinsko kislino med zamrzovanjem, po liofilizaciji ter med 8-tedenskim skladiščenjem liofiliziranega pripravka.....	40

Deleted: in po

Deleted: i

Deleted: ¶

Deleted: in po

Deleted: i

Deleted: in po

Deleted: i

Deleted: in po

Deleted: i

Deleted: in po

Deleted: i

Slika 17 Bakteriocinska aktivnost pripravka s sevom *Lb. gasseri* K7 v mediju z askorbinsko kislino (0,05 %) pred liofilizacijo in po njej, ter med 8-tedenskim skladiščenjem.....40

Deleted: po

Deleted: i

Deleted: ¶

## KAZALO PRILOG

Priloga A1	Spremljane rasti <i>Lb. gasseri</i> K7 v sirotki z dodatkom tweena 80 in kvasnega ekstrakta pri temperaturi 37 °C, pH vrednosti 5,75, z merjenjem OD pri 600 nm	Deleted: , Deleted: T Deleted: E Deleted: , Deleted: o Deleted: in po
Priloga A2	Preživelost seva <i>Lb. gasseri</i> K7 in bakteriocinska aktivnost pripravka v mediju brez dodatka zaščitnih snovi pred liofilizacijo in po njej ter med 8-tedenskim skladiščenjem	Deleted: in po Deleted:
Priloga A3	Preživelost seva <i>Lb. gasseri</i> K7 in bakteriocinska aktivnost pripravka v mediju z dodatkom saharoze (5, 10, 15, 20 %) pred liofilizacijo in po njej ter med 8-tedenskim skladiščenjem	Deleted: in po
Priloga A4	Preživelost seva <i>Lb. gasseri</i> K7 in bakteriocinska aktivnost pripravka z dodatkom laktoze (5, 10 %) pred liofilizacijo in po njej ter med 8-tedenskim skladiščenjem	Deleted: in po
Priloga A5	Preživelost seva <i>Lb. gasseri</i> K7 in bakteriocinska aktivnost pripravka z dodatkom škroba (5, 10, 15, 20%) pred liofilizacijo in po njej ter med 8-tedenskim skladiščenjem	Deleted: o Deleted: in po
Priloga A6	Preživelost seva <i>Lb. gasseri</i> K7 in bakteriocinska aktivnost pripravka z dodatkom glicerola (5 %) pred liofilizacijo in po njej ter med 8-tedenskim skladiščenjem	Deleted: in po
Priloga A7	Preživelost seva <i>Lb. gasseri</i> K7 in bakteriocinska aktivnost pripravka z dodatkom askorbinske kisline (0,05 %) pred liofilizacijo in po njej ter med 8-tedenskim skladiščenjem	Deleted: in po Deleted: i Deleted: ¶

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ATP	adenozin tri fosfat
BA	bakteriocinska aktivnost
C	citozin
DNA	deoksiribonukleinska kislina
G	gvanin
GRAS	generally recognized as safe (splošno spoznane kot varne)
ke/ml	število kolonijskih enot v mililitru
<i>Lb.</i>	<i>Lactobacillus</i>
MKB	mlečnokislinske bakterije
MRS	gojišče de Man Rogosa Sharpe

## 1 UVOD

Mlečnokislinske bakterije (MKB) so že stoletja v uporabi za proizvodnjo različnih vrst sira in jogurta. Zaradi lažjega skladiščenja in transporta so najpogosteje pripravljene v koncentrirani tekoči obliki ali posušene (s postopkom sušenja z razprševanjem ali liofilizacijo). Kadar so namenjene neposredni inokulaciji, je treba uporabiti takšno metodo priprave, ki zagotavlja največjo stopnjo preživelosti celic in ohranitev njihove visoke aktivnosti. Sušenje starterskih kultur je primerno predvsem zaradi možnosti skladiščenja takšnih pripravkov pri sobni temperaturi in enostavnega transporta (Carvalho in sod., 2004b).

Deleted:

Deleted: uporabljamo

Deleted: v

Deleted: i

Deleted: s

Deleted: direktni

Deleted: po

Deleted: no

Liofilizacijo uporabljajo v farmacevtski industriji, pri pripravi mikrobioloških preparatov in hrane. V primerjavi z nekaterimi drugimi postopki ima postopek manjše negativne učinke na bakterijske celice in omogoči optimalno fiziološko, kemijsko in biološko stabilnost celic med daljšim skladiščenjem, tudi pri sobni temperaturi. Ker je postopek povezan z velikimi stroški, se uporablja predvsem pri pripravi posebnih vrst hrane in biomaterialov (Fonseca in sod., 2004).

Deleted: . Postopek ima

Deleted: v

Deleted: ,

Na preživetje celic med liofilizacijo in skladiščenjem vplivajo različni dejavniki, kot so fiziološko stanje celic in njihova koncentracija, rastni pogoji, dodane zaščitne snovi ter pogoji skladiščenja (Carvalho in sod., 2004a). V procesu liofilizacije so MKB izpostavljene mnogim negativnim dejavnikom. Poveča se koncentracija snovi in poveča vrednost pH, zaradi nizkih temperatur nastajajo ledeni kristali, zaradi sušenja pa se zmanjša vodna aktivnost. Posledice tega so poškodbe celične membrane, razgradnja celičnih beljakovin in DNA (Bâati in sod., 2000). Zaradi naštetih sprememb, ki nastanejo med liofilizacijo, se zmanjša število živih celic. Da bi zmanjšali negativen vpliv omenjenih dejavnikov, moramo pravilno izvesti liofilizacijo in uporabiti ustrezne zaščitne snovi (Zhao in Zhang, 2005).

Deleted: zviša

Deleted: niža

Deleted: pade

Deleted: teh

Za zaščito lahko uporabimo več vrst snovi, ki jih delimo na snovi, ki hitro prehajajo v celico, na snovi, ki počasi prehajajo v celico, in na snovi, ki ne prehajajo v celico (Saarela in sod., 2005). Lahko uporabimo sladkorje (saharoza, fruktoza, laktoza), sladkorne alkohole (inozitol) ali druge snovi, kot so posneto mleko v prahu in antioksidanti, npr. askorbinska kislina (Carvalho in sod., 2004b).

Deleted: . D

Deleted: jih

Deleted: U

Deleted: lahko

Visoka stopnja preživelosti bakterijskih sevov in ohranitev njihove bakteriocinske aktivnosti sta še posebno pomembni zahtevi, kadar pripravljamo kulture probiotičnih bakterij. V predstavljeni diplomski nalogi smo spremljali stopnjo preživelosti probiotičnega seva *Lactobacillus gasseri* K7 med liofilizacijo in skladiščenjem v pripravkih na osnovi sirotke z dodatkom različnih vrst zaščitnih snovi. Ugotavljali smo tudi, ali se po liofilizaciji in skladiščenju spremeni bakteriocinska aktivnost pripravka.

Deleted: ej

MKB večinoma gojimo v mediju MRS. Naša ideja je bila, da bi probiotični sev *Lb. gasseri* K7, ki smo ga uporabili v naši raziskavi, namnožili v sirotki, ker vemo, da je sirotka bogat vir hranil, saj vsebuje laktozo, serum~~sk~~e proteine in krajše peptide, pa tudi nekatere rastne faktorje, na primer vitamine in aminokislino. Predvidevali smo, da bo proučevani sev dobro rasel tudi v sirotki. Sev *Lactobacillus gasseri* K7 spada v skupino *Lactobacillus acidophilus* in so ga izolirali iz blata ~~en~~ teden ~~starega~~ dojenčka. IZPOLNjuje nekatere ~~temeljne~~ zahteve za probiotike (Bogovič Matijašič in Rogelj, 2000). Iz predhodnih raziskav vemo, da sev *Lb. gasseri* K7 tvori bakteriocine, ki jih v eksponencialni fazi rasti izloča v rastni medij. Zato smo pričakovali, da bo liofilizirani pripravek fermentacijske brozge ohranil tudi bakteriocinsko aktivnost.

Deleted: dni

Deleted: osnovne

## 1.1 NAMEN DELA

V našem diplomskem delu smo želeli proučiti, kako dodatek različnih koncentracij zaščitnih snovi vpliva na preživetje seva *Lactobacillus gasseri* K7, med liofilizacijo in skladiščenjem. Zanimalo nas je tudi, ali liofilizirani pripravek ohrani bakteriocinsko aktivnost.

Postavili smo si naslednje hipoteze:

- Liofilizirani pripravek fermentacijske brozge, z namnoženim sevom *Lb. gasseri* K7, bo ohranil bakteriocinsko aktivnost, ki je nastala med fermentacijo.
- Liofilizacija in skladiščenje ne bosta vplivala na bakteriocinsko aktivnost pripravka.
- Primeren dodatek zaščitnih snovi v fermentacijsko brozgo pred liofilizacijo bo povečal stopnjo preživetja seva *Lb. gasseri* K7.

Deleted: e

Deleted: vpliv

Deleted: a

Deleted: ,

Deleted: ,

Deleted: pa

Deleted: i

Deleted: i

Deleted: ,

Deleted: ,

Deleted: zvišal



## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 PROBIOTIKI

Prisotnost mlečnokislinskih bakterij (MKB) v človeškem prebavnem traktu in njihova tradicionalna uporaba pri fermentaciji hrane, potrjuje njihovo varnost, dolgo znan pa je njihov pozitiven učinek na zdravje. Ker človek MKB s fermentirano hrano uživa že tisočletja, so le-te znane kot zdravju varne bakterije (GRAS- generally recognized as safe). Določene MKB, kot so laktobacili in bifidobakterije, so znane po številnih funkcionalnih učinkih, s katerimi vplivajo na zdravje ljudi in živali; imenujemo jih tudi probiotične MKB oz. krajše probiotiki (Mattila-Sandholm in sod., 2002).

Deleted: ,  
Deleted: po  
Deleted: preko  
Deleted: e  
Deleted: e  
Deleted: po  
Deleted: .  
Deleted: I

Kot probiotike označujemo tudi pripravke ali izdelke, ki vsebujejo žive probiotične mikroorganizme v zadostnem številu, da lahko vplivajo na mikrofloro prebavil in s tem zdravstveno stanje gostitelja (Rogelj, 2001).

Učinkovitost probiotičnih pripravkov je odvisna od števila živih bakterij in njihove aktivnosti, ki se ne sme zmanjševati med postopki priprave in skladiščenja. Pomembno je tudi, da jih čim več ostane aktivnih tudi v prebavnem traktu (Kailasapathy in Sureta 2004).

Deleted: pa  
Deleted: išje število

Izbrane vrste probiotičnih bakterij morajo zadostiti nekaterim določilom, kot so (Mattila-Sandholm in sod., 2002):

Deleted: kriterijem

- odpornost proti delovanju kisline in prebavnih sokov,
- odpornost proti žolčnim solem,
- sposobnost vezanja na epitelne celice črevesa in vsaj prehodna kolonizacija črevesa,
- stimulacija imunskega sistema,
- antagonistični učinek proti patogenim bakterijam, kot so *Helicobacter pylori*, *Salmonella* ssp., *Listeria monocytogenes* in *Clostridium difficile*,
- protikarcinogene in protimutagene lastnosti.

Picot in Lacroix (2004) sta podala več teorij, kako probiotiki delujejo v prebavnem traktu, in sicer:

Deleted: probiotiki

- zmanjšujejo vrednost pH v prebavilih, tako da tvorijo kratkoverižne maščobne kisline,
- tvorijo vodikov peroksid,
- patogenim bakterijam onemogočajo dostop do hranilnih snovi,
- s patogenimi bakterijami tekmujejo za adhezijske receptorje,
- tvorijo specifične zaviralne snovi, kot so bakteriocini.

Deleted: nižujejo

Deleted: ,

Deleted: onemogočajo

Deleted: tekmujejo

Probiotiki, ki jih dodajamo vsakodnevni prehrani, preprečujejo nastanek obolenj. Lahko se uporabijo celo kot nadomestek za antibiotike, predvsem pri gastrointestinalnih obolenjih (Bernardeau in sod., 2002).

## 2.2 BAKTERIOCINI

Bakteriocini so protimikrobni peptidi, ki jih proizvajajo številne bakterije. Bakteriocini se pogosto zamenjujejo z antibiotiki. Razlike med njimi so prikazane v preglednici 1 (Cleveland in sod., 2001).

Deleted: -

Preglednica 1: Osnovne razlike med bakteriocini in antibiotiki (Claveland in sod., 2001)

Lastnost	Bakteriocini	Antibiotiki
Aplikacija	prek hrane	klinični preparati
Sinteza	na ribosomih	so sekundarni metabolit
Aktivnost	ozek spekter	širok spekter
obrambni mehanizem tarčne celice oz. toleranca	ponavadi se spremeni sestava celične membrane	sprememba na genski ravni, odvisno od načina delovanja
način delovanja	tvorba por v membrani	vpliva na celično membrano ali intracelularne organe
toksičnost/stranski učinki	niso znani	znani

Deleted: o

Deleted: ets

Deleted: po

Deleted: po

Bakteriocini bakterijskega izvora so beljakovine s protimikrobnim delovanjem, velikosti 1-90 kDa. Bakteriocini služijo bakteriji kot obrambno sredstvo pred drugimi bakterijami. Bakterija, ki jih proizvaja, nanje ni občutljiva. Njihov spekter delovanja je pogosto zelo ozek, saj večina bakteriocinov deluje le na bakterije, ki so iste vrste ali sorodnih vrst kot bakterija proizvajalka. MKB proizvajajo več vrst bakteriocinov, ki jih delimo v razrede (preglednica 2). Bakteriocini so se pokazali kot učinkovito sredstvo proti kvarljivcem hrane in/ali patogenim bakterijam, kot je naprimer *Listeria monocytogenes*. Zato jih lahko uporabimo kot naravne konzervanse hrane in krme. Prvi komercialno uporabljen bakteriocin je nisin, ki ga uporabljajo že od leta 1950 (Rolf in Hoover; 2000, Eijsink in sod., 2002). Zaradi povečanja varnosti hrane lahko bakteriocine vključimo v hrano na tri načine: v hrano dodamo prečiščen bakteriocinski pripravek, dodamo sestavine, ki vključujejo seve, ki proizvajajo bakteriocine, ali pa starterske kulture nadomestimo s sevi, ki proizvajajo bakteriocine. V prehrabni industriji sta uporabna predvsem zadnja dva načina. Uporaba bakteriocinov je primerna predvsem v kombinaciji s postopki priprave, pri katerih ne uporabljamo toplote (uporaba metode konzerviranja s pulzirajočim električnim poljem) (Deegan in sod., 2006).

Deleted: ,

Deleted: b

Deleted: pa je

Deleted: e

Deleted: P

Deleted: ,

Deleted: z

Deleted: namenom

Deleted: .

Deleted: V

Deleted: ater

Deleted: nadomestimo

Deleted: e

Deleted: h

Preglednica 2: Klasifikacija bakteriocinov (Cleveland in sod. 2001, cit. po Klaenhammer, 1993)

Skupina	Lastnosti	Primer	
I	Ia	majhne molekule, <5 kDa, fleksibilne, pozitivno nabite beljakovine, tvorijo pore v membrano gostiteljske celice	nisin
	Ib	globularne beljakovine, imajo bolj rigidno strukturo, negativno nabite ali nevtralne beljakovine	mersacidin
II	Iia	majhne toplotno stabilne beljakovine	pediocin PA-1
	Iib	za tvorbo aktivnih kompleksov <u>sja</u> potrebni dve različni beljakovini	lactacin F
III	večje toplotno nestabilne beljakovine	lactacin Ain B	

Bakteriocini se vežejo na celično steno gostiteljske bakterije z elektrostatičnimi interakcijami. Interakcije nastanejo med pozitivno nabitimi beljakovinami in negativno nabitimi lipidi v membrani gram pozitivnih bakterij. Po pritrditvi v membrani gostiteljske celice tvorijo pore. S tvorbo por povzročijo, da začne celica izgubljati protone, ATP, hranilne snovi in metabolite, kar povzroči propad celice (Eijsink in sod., 2002).

Na nastajanje bakteriocinov vpliva več dejavnikov, in sicer rastnih in stresnih, na primer temperatura in prisotnost NaCl. Čeprav mehanizmi, ki uravnavajo nastajanje, še niso povsem znani, so raziskovalci prepričani, da na izražanje genov za tvorbo bakteriocinov vpliva okolje (Delgado, 2005).

V večini primerov je nastajanje bakteriocinov največje med eksponentno fazo rasti, nato pa se začne bakteriocinska aktivnost manjšati. Razlog za to še ni povsem znan. Zmanjševanje količine bakteriocinov verjetno nastane, ker se začnejo pritrjevati nazaj na celico, ki jih tvori (Bogovič Matijašič in Rogelj, 2000). Vzrok, da se zmanjša količina bakteriocinov, je lahko tudi prisotnost intracelularnih proteaz. Le-te preidejo v medij med lizo celic (Avonts in sod., 2004).

### 2.3 ROD *Lactobacillus*

V rod *Lactobacillus* uvrščamo gram pozitivne, nesporogene, mikroaerofilne ali fakultativno anaerobne bakterije paličaste oblike. Rod je daleč najboljšejnji med MKB

Deleted: :

Deleted: s

Deleted: l

Deleted: N

Deleted: o

Deleted: s pomočjo

Deleted: h

Deleted: produkcijo

Deleted: tako

Deleted: kot

Deleted: Kljub temu, da

Deleted: regulirajo produkcijo

Deleted: produkcija

Deleted: a

Deleted: padati

Deleted: Do z

Deleted: a

Deleted: pride

Deleted: pride do

Deleted: evanj

Deleted: e

Deleted: pa

(Narvhus, 2003). Je zelo heterogen, saj vsebuje vrste z zelo raznolikimi biokemijskimi in fiziološkimi lastnostmi. Heterogenost se kaže v različni vsebnosti G+C v DNA in znaša od 32 % do 53 %. V preglednici 3 so prikazane lastnosti, v katerih se razlikujejo tri skupine rodu *Lactobacillus*, dodane pa so nekatere najbolj znane vrste, ki pripadajo tem skupinam. Fiziološka podlaga za razdelitev je prisotnost ali odsotnost ključnih encimov homo- in heterofermentativnega metabolizma sladkorjev (fruktoza-1,6-difosfat aldolaza in fosfoketolaza) (Axellsson, 1998)

Deleted: po

Deleted: osnova

Preglednica 3: Razdelitev rodu *Lactobacillus* (Axellsson, 1998)

Lastnosti	Skupina I – obligativno homofermentativni	Skupina II – falkutativno heterofermentativni	Skupina III – obligativno heterofermentativni
Fermentacija pentoz	-	+	+
CO <sub>2</sub> iz glukoze	-	-	+
CO <sub>2</sub> iz glukonata	-	+ <sup>a</sup>	+ <sup>a</sup>
Prisotnost FDP aldolaze	+	+	-
Prisotnost fosfoketolaze	-	+ <sup>b</sup>	+
	<i>Lb. acidophilus</i> <i>Lb. delbruecki</i> <i>Lb. helveticus</i> <i>Lb. salivarius</i>	<i>Lb. casei</i> <i>Lb. curvatus</i> <i>Lb. plantarum</i> <i>Lb. sake</i>	<i>Lb. brevis</i> <i>Lb. buchneri</i> <i>Lb. fermentum</i> <i>Lb. reuteri</i>

Deleted: O

<sup>a</sup> – če ga bakterija fermentira; <sup>b</sup> – induciran s pentozo

Deleted: a

Nekatere vrste laktobacilov lahko kolonizirajo površino epitela v požiralniku in želodcu, drugi laktobacili pa kolonizirajo črevo in tam preprečijo razvoj patogenih bakterij (Tannock, 1997).

### 2.3.1 *Lactobacillus gasseri* K7

Sev *Lactobacillus gasseri* K7 so izolirali iz blata en teden starega dojenčka. Sev proizvaja bakteriocine s širokim spektrom protimikrobnega delovanja. Poleg tega, da je učinkovit proti določenim MKB, inhibira tudi nekatere kvarljivce in patogene bakterije, kot sta na primer *Cl. difficile* in *Cl. perfringens* (Bogovič Matijašič in Rogelj, 1999). Na kromosomu seva K7 je zapis za vsaj dva bakteriocina (Čanžek Majhenič in sod., 2003). Pomembni lastnosti tega seva sta odpornost proti nizkim vrednostim pH in žolčnim solem (Bogovič Matijašič in Rogelj, 2000).

Deleted: dni

Deleted: .

Deleted: pa

Sev K7, ki so ga dodali v startersko kulturo pri proizvodnji sira, je dobro preživel 6-tedensko skladiščenje sira, in se pokazal kot ustrezen probiotičen sev. Sir je na koncu skladiščenja vseboval  $10^8$  ke seva K7 v gramu (Perko in sod., 2002). V raziskavi so v blatu prašičev, ki so jim v hrano dodajali preparat s probiotičnimi bakterijami *Lb. gasseri* K7, našli več laktobacilov, kot pri tistih, ki jim niso dodajali preparata. Dodajanje preparata ni učinkovito na prehranjevanje in težo prašičev. Prašiči, ki so uživali probiotične bakterije, so bili zdravi; v primerjavi s prašiči, ki seva *Lb. gasseri* K7 niso prejeli, so imeli manj pogoste driske (Bogovič Matijašič in sod., 2004).

Deleted: ,

Deleted: ,

Deleted: preparata

Deleted: imelo

Deleted: pa

## 2.4 NAČINI PRIPRAVE BAKTERIJSKIH PRIPRAVKOV

V prehranski industriji so mlečnokislinske bakterije pomembne kot starterske kulture, v prehrani pa kot probiotične bakterije. Tak način njihove uporabe pa terja ustrezno tehnologijo priprave in koncentriranja celic. Priprava starterskih kultur in probiotičnih pripravkov mora zagotoviti obstojnost sevov med skladiščenjem. V ta namen največkrat uporabljamo metode, kot so; liofilizacija, sušenje s razprševanjem ali mikroinkapsulacija (Palmfeldt in Hähn-Hägerdal, 2000).

Deleted: Mlečnokislinske bakterije so

Deleted: in

Deleted: zahteva

Deleted: Največkrat uporabljamo

### 2.4.1 Liofilizacija

Liofilizacija je postopek, pri katerem s sublimacijo, pri znižanem tlaku, odstranimo vodo iz vzorca. Postopek je primeren za proizvodnjo starterskih kultur z dolgim rokom skladiščenja in se uporablja predvsem, ko želimo ohraniti veliko vegetativnih celic. Liofilizirane starterske kulture so primernejše za transport kot klasične, bodisi tekoče, ali zamrznjene. Skladiščenje pri nizkih temperaturah dodatno prispeva k boljši obstojnosti pripravkov (Ziadi in sod., 2005).

Deleted: ,

Deleted: ,

Deleted: Je primeren

Deleted: isoko število

Deleted: od

Deleted: ih

Deleted: t

Deleted: ih

Deleted: ih, primernejše za transport

Proces liofilizacije delimo na (Souzu, 2000):

- zgoščevanje medija in zamrzovanje,
- sušenje zamrznjenega preparata pri znižanem tlaku,
- skladiščenje.

#### 2.4.1.1 Priprava medija pred liofilizacijo

Priprava medija je pomembna, saj vpliva na celoten postopek liofilizacije. Pomembno je, da pripravimo pravilno koncentracijo celic v mediju. Če je koncentracija celic v mediju previsoka, le-to otežuje proces sublimacije, če pa je koncentracija prenizka, lahko to povzroči prevelike izgube med sublimacijo. Pomembno je tudi, da v medij dodamo snovi, ki zaščitijo celice med liofilizacijo (Souzu, 2000).

Deleted: rivede do

Deleted: ih

#### 2.4.1.2 Proces zamrzovanja

Hitrost zamrzovanja je odvisna od hitrosti zniževanja temperature. Med zamrzovanjem nastajajo ledeni kristali, ki se lahko tvorijo v notranjosti celice (intracelularni) ali pa zunaj nje (ekstracelularni) (Souzu, 2000).

Deleted: e

Deleted: celice

Med zamrzovanjem bo zaradi višje osmolarnosti v notranjosti celice ekstracelularna voda zamrznila hitreje kot intercelularna, v notranjosti celice pa ostane nekaj vode nezamrznjene. Nastane kemični gradient vode med ekstracelularno zamrznjeno vodo in notranjo nezamrznjeno. Tako termodinamično neravnovesje se lahko odpravi z odstranitvijo vode iz notranjosti ali pa voda zamrzne (Tanghe in sod., 2004).

Deleted: ta

Po teoriji Mazurija in sod. (1972, cit. po Schoug in sod., 2006) je počasno zamrzovanje škodljivo, ker se poveča osmotski tlak v celici, ki povzroči poškodbe celice. Hitro zamrzovanje pa povzroči tvorbo intracelularnih kristalov, ki so lahko vzrok za smrt celice. Raziskave so pokazale, da je hitrost zamrzovanja odvisna od vrste bakterij. Tako več bakterij *Lactobacillus acidophilus* in *Lactobacillus plantarum* preživi pri počasnem zamrzovanju, kjer je hitrost zamrzovanja okrog 2 °C/min, kot pri večji hitrosti zamrzovanja. Pri večji hitrosti (okrog 300 °C/min), preživi več celic *Lactobacillus bulgaricus* in *Streptococcus thermophilus* (Baati in sod., 2000, Fonseca in sod., 2004).

Deleted: so podali teorijo, da

Deleted: vpliv

Deleted: i

Deleted: e

Deleted: isji

Deleted: ,

#### 2.4.1.3 Sublimacija

Proces poteka pri znižanem tlaku, saj tako pospešimo sublimacijo ledu. Pri procesu sublimacije je pomembna razlika med tlakom v zamrznjenem pripravku, ki ga nameravamo liofilizirati, in tlakom v napravi. Pomembni sta tudi temperatura pripravka in temperatura naprave. Proces sublimacije delimo na primarni in sekundarni del. V primarnem delu sublimira večina vode, ki je v pripravku. V začetku sekundarne faze pa se začne temperatura hitro dvigati. S sublimacijo moramo med liofilizacijo odstraniti zadostno količino vode, ker prevelika količina vode pomeni večjo možnost za začetek oksidacije, ki povzroči poškodbe med skladiščenjem. Če pa odstranimo preveč vode, nastanejo poškodbe celic že med sušenjem (Souzu, 2000).

Deleted: ,

Deleted: prisotne vode

Deleted: saj

Deleted: redstavlja

Deleted: nastop

Deleted: opijo

Hiter in učinkovit potek liofilizacije zagotovimo z vzpostavitvijo primerne razlike med temperaturo pripravka in temperaturo v liofilizatorju, kar omogoči učinkovit prenos energije. To je pogoj za hitro tvorbo pare, kar prepreči večje poškodbe celic. Če prehod energije ni nadzorovan, se lahko poruši sistem v suspenziji bakterij, ki jo liofiliziramo. Nastalo paro moramo čim hitreje odstraniti iz vzorca, za kar je potreben gradient tlakov med notranjostjo in zunanostjo vzorca. Prehod pare lahko pospešimo tudi z dodatkom nekaterih kemičnih snovi, kot je na primer fosforjev pentaoksid (Perry, 1998).

Liofilizacija je učinkovita in jo preživi čim več celic, če poznamo fizikalne lastnosti zamrznjenega in liofiliziranega pripravka. Pri tem je pomemben parameter temperatura, pri kateri se poruši sistem v suspenziji bakterij. Pri MKB je med liofilizacijo struktura v suspenziji stabilna pri temperaturi  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Temperatura, pri kateri se poruši lokalna struktura ( $T_{lc}$ ) in nastanejo manjše poškodbe, je pri  $-29\text{ }^{\circ}\text{C}$ , ko pod mikroskopom opazimo spremembe v manjšem obsegu. Celoten sistem se poruši pri temperaturi  $-19\text{ }^{\circ}\text{C}$ , ki jo imenujemo  $T_c$ , pri tej se pojavijo večje poškodbe celic. Pri  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  pa se začne sistem taliti in točko imenujemo temperatura taljenja ( $T_m$ ). Kot merilo za določitev temperature, pri kateri se sistem poruši, lahko uporabimo temperaturo steklastega prehoda. Raziskovalci so ugotovili, da je pri tekočinah, katerim so dodane mlečnokislinske bakterije, ta temperatura približno za  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$  višja kot pri tekočinah brez dodanih bakterij. Te temperature lahko povečamo tako, da dodamo snovi, kot so saharoza, natrijev askorbat, maltodekstrini (Fonseca in sod., 2004).

- Deleted: Da je l
- Deleted: , da
- Deleted: išje število
- Deleted: moramo
- Deleted: ti
- Deleted: -
- Deleted: deformacije
- Deleted: pa
- Deleted:
- Deleted: ,
- Deleted: pride do
- Deleted: tve
- Deleted: pa
- Deleted: dvignemo
- Deleted: ;
- Deleted: s

#### 2.4.2 Sušenje z razprševanjem

Sušenje z razprševanjem je postopek sušenja, kjer po odstranitvi vode iz materiala dobimo majhne delce, velikosti  $1-200\text{ }\mu\text{m}$ , čas sušenja pa je  $1-20\text{ s}$ . Snov, ki jo sušimo, mora biti v tekočem stanju, da jo razpršimo v manjše kapljice, ki jih pomešamo z vročim zrakom (Brennan, 2003).

- Deleted: s
- Deleted: -
- Deleted: -
- Deleted: s

Tak postopek sušenja je ekonomsko sprejemljivejši, saj so stroški odstranjenega kilograma vode šestkrat manjši kot pri liofilizaciji (Gardiner in sod., 2000).

- Deleted: bolj
- Deleted: nižji

Liofilizacija je v primerjavi s sušenjem z razprševanjem za bakterije manj destruktiven postopek (Wang in Yu, 2004). Pri sušenju z razprševanjem nastajajo težave, predvsem zaradi visokih temperatur, katerim so med postopkom sušenja izpostavljene bakterije, ki negativno vplivajo na celice. To se odraža v majhnem odstotku preživelosti celic. Odstotek izgube celic med postopkom lahko zmanjšamo z uporabo nižjih izhodnih temperatur (Ananta in sod., 2005).

- Deleted: s
- Deleted: predstavljajo problem
- Deleted: e
- Deleted: e
- Deleted: nizkem

#### 2.4.3 Mikroinkapsulacija

Mikroinkapsulacija je metoda shranjevanja trdih, tekočih in plinastih materialov v kapsulo, iz katere se vsebina lahko izloči le pod posebnimi pogoji. Produkt, ki ga dobimo, lahko uporabljamo v obliki gel kroglic v emulziji ali pa ga posušimo s postopkom liofilizacije ali sušenja z razprševanjem (Doloyres in Lacroix, 2005).

- Deleted: s

Pri inkapsulaciji se uporabljajo materiali, ki lahko tvorijo matriks. To so predvsem škrob, kalcijev-alginat in želatina, ki se pogosteje uporablja na raziskovalnem nivoju. Največji potencial za širšo uporabo ima škrob (Picot in Lacroix, 2004).

- Deleted: bolj

Pri mikroinkapsulaciji uporabljajo predvsem encimsko obdelan škrob, ki ima porozno strukturo in je zaščita za bakterije (Mattila-Sandholm in sod., 2002). Če želimo zmanjšati volumen starterske kulture, pri kateri smo že opravili mikroinkapsulacijo, jo lahko liofiliziramo, da preživi čim več celic, dodamo še zaščitne snovi. Raziskovalci so razvili nov postopek, pri katerem kulturo najprej liofilizirajo in potem opravijo mikroinkapsulacijo. V dvostopenjskem procesu liofiliziran pripravek najprej obdajo z maščobo, nato pa kroglice zaščitijo še s topnimi sirotkinimi beljakovinami. Mikroinkapsulacija je preprost postopek priprave preparatov in ne pomeni večjih stroškov (Picot in Lacroix, 2004).

Deleted: predstavlja

Deleted: o

Deleted: izvedli

Deleted: ,

Deleted: pa

Deleted: kjer

Deleted: izvedejo

Deleted: te

Deleted: z

Deleted: redstavlja

## 2.5 SPREMEMBE CELIC OB STRESU

Med liofilizacijo in skladiščenjem so celice izpostavljene različnim stresom, ki povzročijo spremembe na celični steni in membrani. Najpogostejše so: sprememba fluidnosti membrane, spremenjena maščobnokislinska sestava in tvorba stresnih beljakovin (Båati in sod., 2000).

Deleted: Celice so

Deleted: . Ti

### 2.5.1 Spremembe fluidnosti membrane

Pomembna lastnost fosfolipidov, ki so temeljni gradniki bioloških membran, je zmožnost prehajanja iz kristaliničnega stanja gel v tekoče stanje sol (sprememba fluidnosti). To se zgodi pri temperaturi taljenja. Temperatura taljenja je odvisna od nasičenosti maščobnih kislin in dolžine njihovih verig. Na fluidnost fosfolipidov in s tem membrane vplivata tudi sušenje in povišan tlak. S spremembo lastnosti fosfolipidov se spremeni tudi prepustnost celične membrane. Sprememba fluidnosti je odvisna od kemičnih sprememb, ki so posledica sprememb znotraj celice in zunanjih vplivov. Spremembe znotraj celice vplivajo na spremembo molekul. Zunanji vplivi nastanejo kot posledica sprememb kemičnih lastnosti medija. Kemične lastnosti medija se spreminjajo zaradi aktivnosti celice ali fizikalnih sprememb. Sprememba fluidnosti membrane pa je mogoča samo do določene meje, ki je odvisna tudi od rastnega medija (Beney in Gervais, 2001).

Deleted: osnovni

Deleted: stanja

Deleted: stanje

Deleted: žna

### 2.5.2 Sprememba maščobnokislinske sestave membrane

V celici liofilizacija povzroči spremembe v razmerju nasičenih in nenasičenih maščobnih kislin. Zaradi spremenjene maščobnokislinske sestave je manjša aktivnost membransko vezanega encima ATP-aza in večja prepustnost membrane. Posledica povečane prepustnosti celične membrane je izguba sposobnosti celice, da vzdržuje normalno vrednost pH. Zato je zelo pomembno, da med liofilizacijo uporabimo snovi, ki zmanjšajo prepustnost membrane (Castro in sod., 1997).

Deleted: L

Deleted: v celici



Na spremembo razmerja med nasičenimi in nenasičenimi maščobnimi kislinami, ki se pojavi med skladiščenjem, vpliva tudi oksidacija. Vendar je njen vpliv opaznejši šele po daljšem skladiščenju. Peroksidacija biomolekul, ki nastane med skladiščenjem, vpliva na strukturo in funkcijo membrane. Lahko se pojavijo tudi poškodbe DNA molekul, kar lahko vodi v celično smrt (Teixeira in sod., 1995).

Deleted: opi

Deleted: P

Deleted: se lahko

### 2.5.3 Odziv celic na spremembe

Ko celico izpostavimo stresu iz okolja, se uveljavijo določeni obrambni geni. Le-ti v celici sprožijo spremembe, kot so: spremenjena delitev celice, spremenjen metabolizem DNA, spremembe v sestavi membrane in s tem spremenjen celični transport. Vse spremembe vodijo v izboljšanje celične tolerance (Ananta in Knorr, 2004).

Deleted: celico

Deleted: do žanja

Deleted: h

Deleted: h

Deleted: ov

Deleted: sprožijo

Deleted: te

Deleted: odzovejo hitro (v minutah),

Deleted: Identificirali

Deleted: se tvorijo

Deleted: e

Bakterije se hitro odzovejo (v minutah) na osmotski in toplotni šok, medtem ko se na hladni šok odzovejo počasi (v urah). Določili so nekatere heat-shock beljakovine (DnaK, DnaJ, GrpE, GroES, GroEL) in proteaze (Clp, HtxA, FtsH), ki nastanejo ob izpostavitvi šoku. Mehanizme njihovega delovanja proučujejo številni raziskovalci (Prasad in sod., 2003).

## 2.6 DEJAVNIKI, KI VPLIVAJO NA PREŽIVETJE BAKTERIJ V LIOFILIZIRANIH PRIPRAVKIH

Preživetje bakterij med liofilizacijo je odvisno od več dejavnikov. Tako na preživetje vplivajo lastnosti bakterij, predhodni stres in temperatura steklastega prehoda.

Deleted: ih

### 2.6.1 Lastnosti bakterij

Preživetje celic med liofilizacijo in skladiščenjem je odvisno od vrste ali celo bakterijskega seva. Med postopkom priprave se različne vrste bakterij različno odzivajo na spremembe. Njihov odziv je odvisen od morfoloških lastnosti in maščobnokislinske sestave celične membrane (Carvalho in sod., 2002).

Deleted: Različne vrste bakterij se

#### 2.6.1.1 Morfološke lastnosti

Preživetje bakterij je odvisno od nekaterih temeljnih lastnosti. Tako na preživetje vpliva velikost celic. Ekstracelularni kristali, ki nastanejo med zamrzovanjem, namreč povzročijo več poškodb na velikih celicah kot na manjših (Fonseca in sod., 2000). Tako so v liofiliziranih pripravkih enterokoki odpornejši kot na primer laktobacili. Vzrok za to je razmerje med površino in volumnom. Laktobacili imajo večjo površino in zato več možnosti, da nastanejo poškodbe, ki povzročijo smrt celice (Giraffa, 2002).

Deleted: osnovnih

Deleted: pride do

### 2.6.1.2 Maščobnokislinska sestava celične membrane

Pogoji, pri katerih celice rastejo, vplivajo na sestavo celične membrane. Pomembna je temperatura rasti, ker je od nje odvisna maščobnokislinska sestava celične membrane (Annous in sod., 1999). Pri nižjih temperaturah se tvori več dolgoverižnih maščobnih kislin, zato bakterije lažje preživijo zamrzovanje (Fernández Murga in sod., 2000).

Na maščobnokislinsko sestavo celične membrane vpliva tudi faza, v kateri prekinemo rast. V celicah, katerih rast smo prekinili v stacionarni fazi, je večja koncentracija nasičenih maščobnih kislin, predvsem nonadekanojske kisline (C19:O), ki ima pomembno vlogo pri zaščiti celic med liofilizacijo. Celice v stacionarni fazi tvorijo stresne beljakovine, ki ščitijo membransko vezane encime in vplivajo na fiziološke lastnosti celice (Bâati in sod., 2000). Stresne beljakovine naj bi bile odgovorne tudi za stabilizacijo membranskih beljakovin in lipidov (Beney in Gervais, 2001).

Deleted: .

Deleted: Ta

### 2.6.2 Vpliv predhodnega stresa

Če celice krajši čas izpostavimo stresu, ki nima letalnega učinka, jih več preživi liofilizacijo. Celice lahko izpostavimo hladnemu oz. toplotnemu stresu ali nižjim vrednostim pH. Celica, ki je bila predhodno izpostavljena stresu, lažje premosti stres med tehnološkim postopkom priprave in v prebavnem traktu (Stanton in sod., 2005).

Ziadi in sodelavci (2005) so ugotovili, da MKB, ki so izpostavljene toplotnemu stresu (46 °C, 45 minut), začnejo tvoriti heat-shock beljakovine. Bakterije, ki tvorijo večjo količino teh beljakovin, preživijo proces liofilizacije v večjem številu. Odpornejše bakterije lahko pridobimo s pomočjo temperature kot naravne selekcije. Kulturo večkrat zamrzujemo in odmrzujemo ter tako izločimo manj odporne celice (Monnet in sod., 2003).

Več bakterijskih celic preživi liofilizacijo tudi, če rastejo pri nekontrolirani vrednosti pH. To je posledica tvorbe večjih količin določenih beljakovin (Silva in sod., 2005).

Deleted: je število

### 2.6.3 Temperatura steklastega prehoda

Parameter je bolj znan z drugih področij, ki niso povezana s hrano. Ime izhaja iz vrednosti temperature, pri kateri steklo preide iz trdega v tekoče stanje. Določimo ga z merjenjem spreminjanja elastičnega modula v odvisnosti od temperature (Patist in Zoerb, 2005).

Deleted: i

Temperatura steklastega prehoda je odvisna od količine vode v sistemu (hrani, farmacevtskih proizvodih, bioloških materialih). Pri bioloških materialih (membranah, beljakovinah, liposomih) ta temperatura vpliva na njihovo stabilnost. Pri nižjih temperaturah je sistem stabilen, medtem ko pri višjih temperaturah razlika med

temperaturo steklastega prehoda in temperaturo skladiščenja vpliva na fizikalne, kemične in biološke spremembe v sistemu (Patist in Zoerb, 2005).

Če zmanjšamo količino vode v biološkem materialu, spremenimo viskoznost in sistem se podre zaradi poškodovane strukture (nastane povečana prepustnost celične membrane). To lahko preprečimo z dodajanjem trehaloze in drugih snovi, ki zvišajo temperaturo steklastega prehoda in tako ohranimo stabilnost sistema. Pomembna je tudi povezava, ki nastane med sladkorjem in biomolekulo. Tako, na primer, dekstrin, ki ima bistveno višjo temperaturo steklastega prehoda, slabše ščiti celico med zamrzovanjem, kot trehaloza, ki ima nižjo temperaturo steklastega prehoda (preglednica 4), vendar pa tvori vezi z biomolekulami (Patist in Zoerb, 2005). Na sliki 1 je shematsko prikazan način zaščite celične membrane s trehalozo.

Deleted: podre

Deleted: opi

Deleted: ,

Deleted: S

Preglednica 4: Temperature steklastega prehoda nekaterih sladkorjev (Patist in Zoerb, 2005)

Sladkor	Temperatura steklastega prehoda (°C)
trehaloza	115
maltoza	84
saharoza	60
glukoza	37
fruktoza	5
riboza	-22

Deleted: T

Deleted: M

Deleted: S

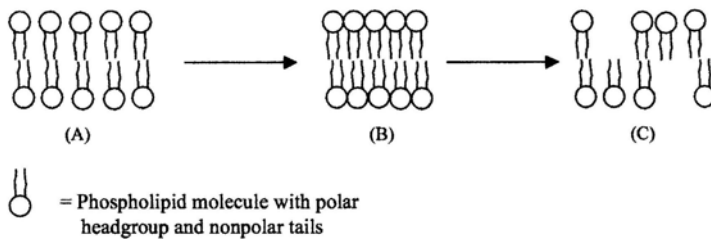
Deleted: G

Deleted: F

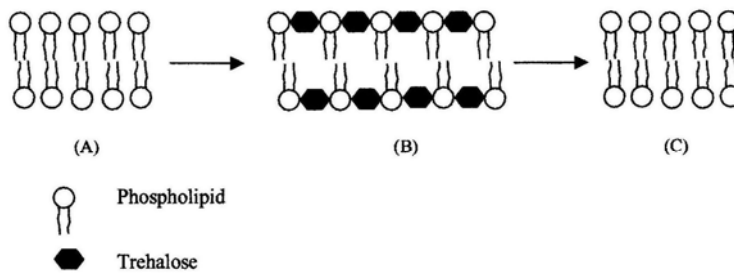
Deleted: R

Deleted: -

a)



b)



Slika 1: Zaščita celične membrane s trehalozo: celična membrana v laminarni fazi (A), prehod v fazo gel med sušenjem (B), membrana po rehidraciji (C); a) nezaščiten membrana, b) membrana zaščiten s trehalozo (Patist in sod., 2005)

Deleted: fazo

## 2.6.4 Vpliv ravnega medija

Raziskovalci raziskujejo predvsem, kako vplivajo snovi, dodane v medij pred liofilizacijo, na preživetje bakterij med liofilizacijo in skladiščenjem. Upoštevati je treba tudi vpliv snovi, ki so že v ravnem mediju ali nastanejo med fermentacijo. Izgube celic med liofilizacijo lahko zmanjšamo z dodatkom specifičnih snovi v ravnem mediju. Te snovi lahko povzročijo morfološke ali fiziološke spremembe v celici tako, da povečajo odpornost celic proti stresu iz okolja. Z izbiro ustreznega ravnega medija lahko vplivamo na kopičenje kompatibilnih snovi, nastanek eksopolisaharidov in spremembe v maščobnokislinski sestavi celične membrane (Carvalho in sod., 2004b).

Deleted: preiskujejo

Deleted: ih

Deleted: po

Deleted: no

Deleted: prisotne

Deleted: pa

Deleted: na

Deleted: produkcijo

### 2.6.4.1 Kompatibilne snovi

Kompatibilne snovi so majhne molekule, ki so dobro topne in lahko s pomočjo specifičnega transporta prehajajo skozi membrano v citoplazmo. V njej se akumulirajo in ohranjajo osmotsko ravnostanje v celici, zaščitijo pa tudi encime, ki bi denaturirali med zamrzovanjem in liofilizacijo. Za večjo koncentracijo kompatibilnih snovi v celici dodajajo v ravnem mediju različne količine nedefiniranih snovi, kot so peptoni, triptoni, kvasni in mesni ekstrakti. Še posebej primeren je dodatek ekstraktov, ker so vir karnitina in betaina, za katere glede na raziskave sklepajo, da vplivajo na preživetje MKB med skladiščenjem, ker spremenijo fiziološko stanje celic (Kets in sod., 1996). Vendar pa mehanizem delovanja kompatibilnih snovi še ni dobro znan (Carvalho in sod., 2004b).

Deleted: citoplazmi

Deleted: .

Deleted: Z

Deleted: denaturirali

Deleted: povečanje

Deleted: e

Deleted: ,

Deleted: Dodatek ekstraktov je

Deleted: ej

Deleted: na osnovi

Deleted: po

### 2.6.4.2 Eksopolisaharidi

Eksopolisaharidi so skupina metabolitov, ki jih proizvajajo bakterije, in jih delimo na dve glavni skupini. V prvo uvrščamo tiste, ki se lahko vežejo na celično steno in ustvarijo kapsulo, imenujemo jih kapsularni polisaharidi. Drugo skupino pa predstavljajo tisti, ki se ne vežejo. Količina eksopolisaharidov, ki nastane med fermentacijo, je odvisna od količine ogljikovih hidratov v ravnem mediju (Degeest in sod., 2001).

Deleted: .  
Deleted: D  
Deleted: jih  
Deleted: ,

Eksopolisaharidom pripisujejo podobno vlogo kot polimerom, ki tvorijo film na površini celice. Vendar pa niso potrdili, da bi produkcija eksopolisaharidov vplivala na večji odstotek preživelosti med zamrzovanjem, liofilizacijo in skladiščenjem (Carvalho in sod., 2003b).

#### 2.6.4.3 Sladkorji v ravnem mediju

Za zaščito MKB med liofilizacijo in skladiščenjem so potrebne tudi snovi, ki jih bakterije tvorijo med fermentacijo. Na nastanek le-teh vpliva predvsem vrsta sladkorja, ki je v ravnem mediju. Vrsta in količina metabolitov je odvisna od vrste fermentacije, ki je lahko homofermentativna ali heterofermentativna. Pri homofermentativni fermentaciji bakterije tvorijo samo mlečno kislino in poteka po Embden-Mayerhof-Parnasevi poti. Pri heterofermentativni fermentaciji pa bakterije tvorijo poleg mlečne kisline tudi ogljikov dioksid in etanol ali acetat, je odvisno od redoks potenciala. Fermentacija poteka po fosfoketolazni poti (Hofvendahl in Hahn-Hägerdal, 2000).

Deleted: bakterije  
Deleted: prisotna

Deleted: bakterije

Dodatek različnih vrst sladkorjev (glukoze, fruktoze, laktoze, manoze) osnovnemu gojišču MRS vpliva na morfološke in fiziološke spremembe celic. Te spremembe povzročijo različno stopnjo odpornosti proti stresnim dejavnikom iz okolja, vplivajo pa tudi na odstotek preživelosti bakterij med skladiščenjem pri sobni temperaturi, še zlasti med daljšim skladiščenjem (Carvalho in sod., 2004a).

Deleted: na  
Deleted: e  
Deleted: e  
Deleted: .  
Deleted: V

## 2.7 VLOGA ZAŠČITNIH SNOVI, KI JIH DODAJAMO PRIPRAVKOM PRED LIOFILIZACIJO

Število aktivnih celic se ne zmanjšuje samo med zamrzovanjem in liofilizacijo, ampak tudi med skladiščenjem. Carvalho in sodelavci (2003b) in Stanton in sodelavci (2005) ugotavljajo, da zaščitne snovi, ki jih dodamo pred liofilizacijo, celico ščitijo tudi med skladiščenjem. Zaščita celice je pomembna zaradi sprememb osmotskega tlaka in znižane temperature med liofilizacijo. Pri izbiri zaščitnega sredstva je pomembno, da omogoči dobro zaščito celic med liofilizacijo, poleg tega pa mora omogočiti hitro in enostavno rehidracijo (Costa in sod., 2000).

Deleted: i  
Deleted: celico

Delovanje snovi, ki jih dodajamo v medij pred liofilizacijo, je odvisno od sposobnosti, njihovega prehajanja skozi celično membrano. Glede na to lastnost snovi razdelimo v tri skupine (Carvalho in sod., 2004a):

Deleted: zmožnosti

- snovi, ki prehajajo skozi celično steno in celično membrano (glicerol),
- snovi, ki prehajajo skozi celično steno, ne pa skozi celično membrano (disaharidi, aminokisliline, nizkomolekularni polimeri),
- snovi, ki ne prehajajo niti skozi celično steno niti skozi celično membrano (polimeri z visoko molekulska maso, kot so beljakovine in polisaharidi).

### 2.7.1 Dodatek sladkorjev

Sladkorji, ki jih dodamo v medij pred liofilizacijo, po liofilizaciji nadomestijo molekule vode v membrani. Sladkorji se povežejo s polarnimi skupinami beljakovin in tako, preprečijo razgradnjo in agregacijo beljakovin (Costa in sod., 2000).

Deleted: s tem

Sladkorje in sladkorne derivate lahko razdelimo v tri skupine (Carvalho in sod., 2002, 2003c, 2004b):

- sladkorji (glukoza, fruktoza, laktoza, saharoza),
- sladkorni alkoholi (sorbitol in inozitol),
- nereducirajoči sladkorji (trehaloza).

Učinkovitost sladkorjev, kot zaščitnih snovi med liofilizacijo, je različna in odvisna od metabolizma bakterije. Tako, na primer, glukoza, fruktoza, laktoza in manoza učinkovito zaščitijo celice *Lactobacillus bulgaricus*, ki jih metabolizirajo, zato te sladkorje dodamo v rastni medij. Pri tem nastajajo eksopolisaharidi, ki vplivajo na preživetje med liofilizacijo in skladiščenjem (Carvalho in sod., 2002).

Deleted: se tvorijo

#### 2.7.1.1 Trehaloza

Pri proučevanju liofilizacije je najbolj razširjeno zaščitno sredstvo trehaloza, ki v kombinaciji s saharozo učinkovito ščiti strukturne in funkcionalne beljakovine. Trehaloza je še posebej učinkovita, ker lažje tvori vodikove vezi. Zaradi boljše fleksibilnosti vezi med monomerama glukoze tudi lažje tvori tetraedrično strukturo. Trehaloza ima v primerjavi z maltozo in saharozo tudi visoko temperaturo steklastega prehoda (preglednica 4) (Patist in Zoerb, 2005). S podaljševanjem skladiščenja se učinkovitost trehaloze manjša, če bi to primerjali z drugimi sladkorji. V komercialne namene se manj uporablja tudi zaradi visoke cene (Carvalho in sod., 2002).

Deleted: .

Deleted: v

Deleted: ej

Deleted: v

Deleted: v

Deleted: ostalimi

Deleted: , manjša

#### 2.7.1.2 Saharozna

Saharozna, ki jo dodamo v medij pred liofilizacijo, pozitivno vpliva na celično membrano.

Pomembno vlogo ima predvsem pri faznih prehodih, saj skupaj s posnetim mlekom niža temperaturo faznega prehoda. Saharoza kot majhna molekula, bolje ščiti beljakovine kot zaščitne snovi, ki imajo velike molekule (Oldenhof in sod., 2005).

Deleted: K

Deleted: ,

Deleted: saharoza

Deleted: ,

Deleted: S tem

Trehaloza in saharoza se vežeta na polarno skupino lipidov v celični membrani. Tako učvrstita strukturo celične membrane in jo stabilizirata (Beney in Gervais, 2001).

### 2.7.1.3 Sorbitol

Sorbitol je učinkovito zaščitno sredstvo predvsem med skladiščenjem liofiliziranih pripravkov (Carvalho in sod., 2003c). Sistem delovanja sorbitola, kot zaščitne snovi, še raziskujejo, obstaja pa nekaj hipotez:

- preprečuje poškodbe na membrani (Linders in sod., 1997),
- preprečuje poškodbe zaradi oksidacije (Linders in sod., 1997),
- stabilizira strukture beljakovin (Wisselink in sod., 2002).

Deleted: anje

Deleted: acija

### 2.7.1.4 Manitol

Manitol je pomemben kot antioksidant. V kombinaciji z askorbinsko kislino zmanjša škodo, ki nastane kot posledica oksidacije. Zmanjša tudi število prostih radikalov v pripravku med skladiščenjem in veže vodikov peroksid, ki nastane med oksidacijo, v kompleks (Andersen in sod., 1999)

Deleted: manitol

### 2.7.1.7 Škrob

Škrob, tako kot drugi polisaharidi, okrog celice ustvari zaščitni film. Ima visoko viskoznost in majhno mobilnost, zaradi česar se poveča stabilnost celice. Poleg tega tvori tudi vez s proteini in fosfolipidi, kar še dodatno prispeva k trdnosti strukture celice (Patist in Zoerb, 2005).

## 2.7.2 Dodatek drugih snovi

### 2.7.2.1 Natrijev glutamat

Natrijev glutamat je učinkovito zaščitno sredstvo, ker stabilizira strukturo celičnih beljakovin. Nastane namreč reakcija med amino skupino natrijevega glutamata in karboksilno skupino beljakovin celice (Carvalho in sod., 2003c).

Deleted: Pride

Deleted: do

Deleted: e

### 2.7.2.2 Mleko v prahu

Mleko ščiti celice tako, da prepreči poškodbe celične membrane, ki nastanejo med liofilizacijo in skladiščenjem (Castro in sod., 1997). Zayed in Ross (2004) sta ugotovila, da beljakovine iz mleka zaščitijo celične beljakovine, na preživetje pa pozitivno vpliva tudi prisotnost kalcija. Fosfati in citrati v posnetem mleku povečujejo puferno kapaciteto. Zaradi povečane puferske kapacitete več celic preživi liofilizacijo in skladiščenje, omogoča pa tudi ohranjanje konstantne vrednosti pH, ki se sicer spreminja zaradi povečane prepustnosti membrane. Abadias in sodelavci (2001) poročajo, da dodano mleko v prahu deluje kot zaščitno sredstvo, ker ustvari porozno strukturo liofiliziranega izdelka, s čimer olajša rehidracijo. Mlečne beljakovine ustvarijo zaščitno prevleko okoli celic.

Deleted: pozitivno pa

Deleted: Prisotnost f

Deleted: ov

Deleted: ov

Deleted: . Le-ta

Deleted: drugače

Deleted: pa

Deleted: in s tem

### 2.7.2.3 Antioksidanti

Kot antioksidanta se uporabljata propil-galat in askorbinska kislina.

Propil-galat inhibira oksidacijo lipidov in tako, poveča odstotek preživelosti bakterij med skladiščenjem (Carvalho in sod., 2002).

Deleted: s tem

Askorbinska kislina, ki jo dodajamo v rastni medij ali pripravek pred zamrzovanjem, med liofilizacijo in skladiščenjem vpliva različno: lahko je vir hranilnih snovi ali pa deluje kot antioksidant. Če so med liofilizacijo prisotne tudi določene aminokislino (triptofan, fenilalanin), se tvorijo prosti radikali, ki poškodujejo celične komponente. Ta proces dodatno pospeši prisotnost kovin (Andersen in sod., 1999).

Deleted: ima

Deleted: različne vplive

Deleted: L

Deleted: predstavlja

Deleted: pa

Deleted: pride do tvorbe

Deleted: h

Deleted: ov

### 2.7.2.4 Glicerol

Glicerol uporabljamo predvsem kot zaščitno sredstvo med zamrzovanjem, Vpliva na tvorbo manjših kristalov, ki povzročajo manjše poškodbe na celici, kot jih povročajo večji. Njegova učinkovitost se poveča, če dodamo še druge zaščitne snovi, na primer saharozo in laktozo (Fonseca in sod., 2003).

Deleted: .

Deleted: V

Deleted: kot sta

Deleted: a

Deleted: a

### 2.7.2.5 Osmotsko aktivne snovi

Pri nižani vrednosti  $a_w$  lahko zagotovimo večjo stabilnost bakterij z dodatkom osmotsko aktivnih snovi, kot sta na primer NaCl (elektrolit) ali saharoza (neelektrolit). Dodatek teh snovi vpliva na osmotsko stanje v celici. Če so bakterije pred liofilizacijo izpostavljene stradanju, dodatek negativno vpliva na stopnjo preživelosti (Carvalho in sod., 2003a).

Deleted: Večjo stabilnost bakterij p

Deleted: . To so

Deleted: pa

Deleted: -

Deleted: pa

### 2.7.2.6 Tween 80

Dodatek tweena 80 v rastni medij vpliva na spremembo maščobnokislinske sestave celične membrane in znižuje stopnjo oksidacije lipidov (Fernández Murga in sod., 2000). Poveča



se tudi odpornost bakterij proti žolču, ker deluje kot stabilizator membrane (Kimoto in sod., 2002).

## 2.8 SIROTKA

Kot rastni medij za MKB lahko uporabimo tudi sirotko, ki nastane kot stranski produkt pri izdelavi sira in industrijskega kazeina. Je bogat vir mnogih hranljivih snovi, največji pa je delež laktoze in beljakovin (Zadow, 2003).

Kazeini se izločajo v procesu acidifikacije kot posledica zmanjšanih vrednosti pH ali pa zaradi dodatka encimskega pripravka (himozina), ki povzroči njihovo koagulacijo. Pri proizvodnji sira se iz desetih litrov mleka izloči približno devet litrov sirotke (Pomeranz, 1992).

### 2.8.1 Kemijska sestava sirotke

V povprečju sirotka vsebuje 93 % vode in 7 % suhe snovi, njena kemijska sestava pa je odvisna od vrste mleka in tipa sira, ki smo ga izdelali. Sirotka poleg velike količine laktoze vsebuje tudi beljakovine, manjši delež soli in maščob. Od vitaminov so v njej predvsem vodotopni, katerih vsebnost je enaka vsebnosti v mleku (Pomeranz, 1992). V sirotki je delež laktoze lahko tudi 75 % suhe snovi, vendar je ta laktoza premalo sladka, da bi bila komercialno uporabna (Zadow, 2003). Najpomembnejši del sirotke so sirotkine beljakovine s svojimi hranljivimi in biološkimi lastnostmi (Doultoni in sod., 2004). Sirotkine beljakovine delimo na:  $\beta$ -laktoglobuline (50 %),  $\alpha$ -laktoalbumine (25 %) in druge beljakovine (25 %). Beljakovine imajo visoko prehransko vrednost in vsebujejo veliko esencialnih aminokislin (Zadow, 2003).

### 2.8.2 Uporaba sirotke

Živilska industrija uporablja sirotko in njene izdelke (sirotkin koncentrat oz. izolat sirotkinih beljakovin) kot dodatek za obogatitev nekaterih vrst sira in drugih fermentiranih mlečnih izdelkov, za pripravo adaptiranega mleka, v proizvodnji pijač in otroške hrane, slaščičarstvu, mesni industriji ter kot dodatek predpripravljenim živilom, kot so juhe, zamrznjena živila in podobno (Pomeranz, 1992; Zadow, 2003).

### 3 MATERIAL IN METODE

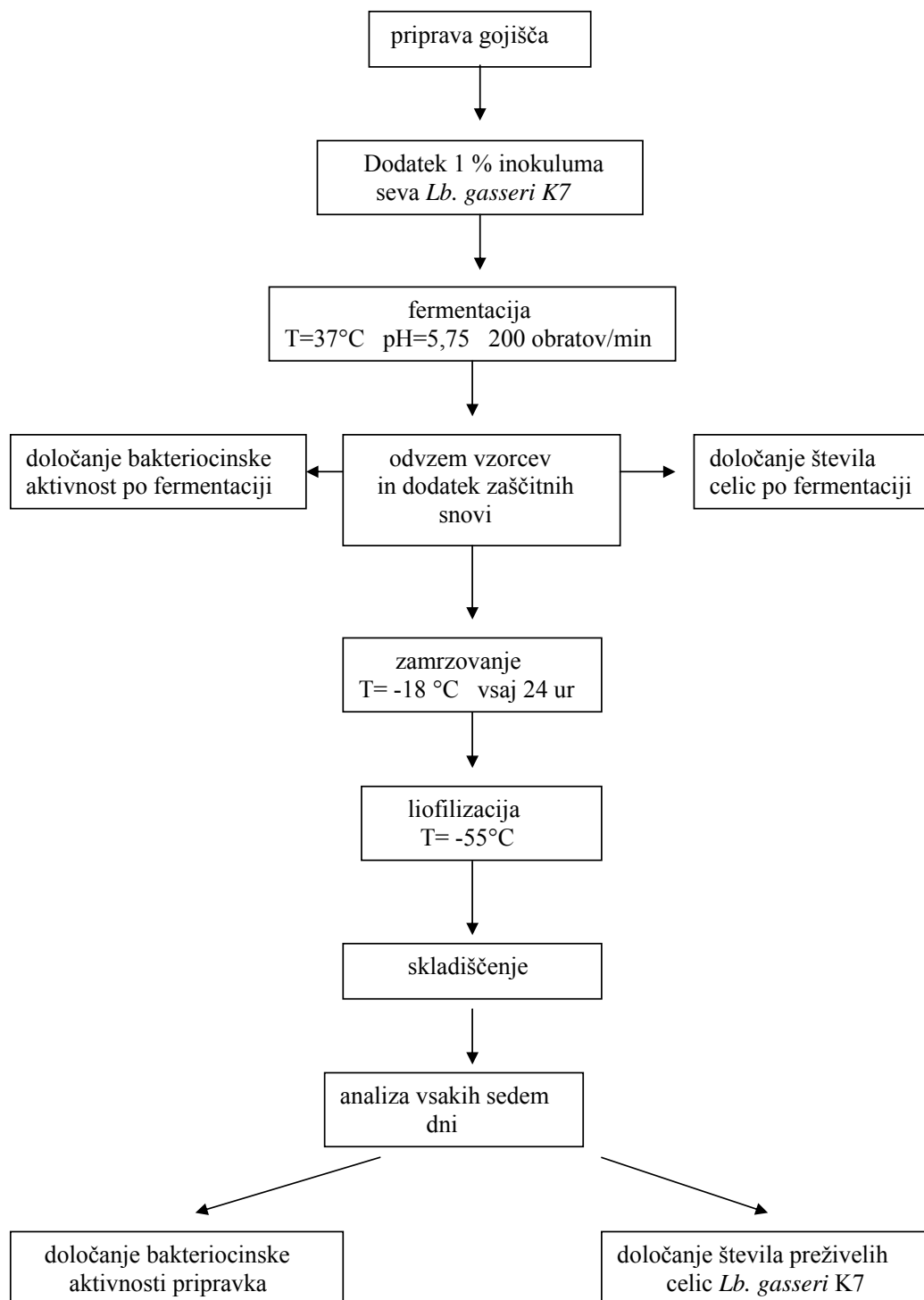
#### 3.1 NAČRT IN POTEK POSKUSA

V sklopu raziskovalnega dela smo želeli ugotoviti učinkovitost in primernost nekaterih zaščitnih snovi pri pripravi liofiliziranih pripravkov seva *Lb. gasseri* K7, namnoženega v posneti sirotki. Poleg preživelosti nas je zanimalo tudi, ali pripravek ohrani bakteriocinsko aktivnost.

Potek dela smo razdelili v tri dele.

V prvem delu poskusa smo v bioprocesu pripravili kulturo seva K7. V drugem delu poskusa smo dobljeni fermentacijski brozgi dodali eno od zaščitnih snovi; uporabili smo saharozo (5, 10, 15 in 20 %), laktozo (5 in 10 %), škrob (5, 10, 15, 20 %), glicerol (5 %), askorbinsko kislino (0,05 %). Vzorce smo zamrznili in nato liofilizirali. Po končani liofilizaciji smo pripravke skladiščili v temi pri sobni temperaturi.

V tretjem delu poskusa smo ugotavljali preživelost *Lb. gasseri* K7 in ohranitev bakteriocinske aktivnosti pripravka med 8-tedenskim skladiščenjem. Analize smo izvajali v razmiku sedmih dni. Po rehidraciji smo vzorce cepili na hranljivo gojišče za ugotavljanje laktobacilov. Bakteriocinsko aktivnost pa smo ugotavljali z metodo kritične razredčitve na mikrotiterskih ploščah z indikatorskim sevom *Lb. sake* NCDO 2174.



Slika 2: Hodogram poteka celotnega poskusa

## 3.2 MATERIAL

### 3.2.1 Bakterijski sevi

- *Lactobacillus gasseri* K7, bakteriocinogeni probiotični sev iz zbirke kultur Katedre za mlekarstvo
- *Lactobacillus sake* NCDO 2174, indikatorski sev za ugotavljanje bakteriocinske aktivnosti seva *Lb. gasseri* K7

### 3.2.2 Gojišča in dodatki

- posneta sirotka
- kvasni ekstrakt (Biolife, Italija)
- tween 80 (Biolife, Italija)
- trdo gojišče MRS za ugotavljanje števila živih celic *Lb. gasseri* K7

Gojišče MRS smo pripravili po navodilih proizvajalca (Merck, Nemčija) in ga 15 minut sterilizirali pri temperaturi 121 °C. Pred razlivanjem v petrijeve plošče smo gojišče v vodni kopeli ohladili na 45 °C.

- tekoče gojišče MRS za ugotavljanje bakteriocinske aktivnosti

Gojišče smo pripravili po navodilih proizvajalca (Merck, Nemčija), napolnili epruvete po 10 ml in 15 minut sterilizirali pri temperaturi 121 °C.

### 3.2.3 Zaščitne snovi

- saharoza (Kemika, Hrvaška)
- laktoza (Kemika, Hrvaška)
- škrob (Kemika, Hrvaška)
- glicerol (Kemika, Hrvaška)
- askorbinska kislina (Merck, Nemčija)

### 3.2.4 Kemikalije

- 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pripravili iz 98 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Merck, Nemčija)
- 4 M NaOH, pripravili iz NaOH v granulah (Merck, Nemčija)
- 10 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pripravili iz 33 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Kemika, Hrvaška)
- fiziološka raztopina
- Rignerjevo tabelo (Merck, Nemčija) smo raztopili v 500 ml destilirane vode, napolnili v epruvete po 9,3 ml in 15 minut sterilizirali pri temperaturi 121 °C.

## 3.3 METODE

### 3.3.1 Priprava fermentacijskega medija

Sirotko, ki smo ji dodali kvasni ekstrakt (4 g/l) in tween 80 (1 g/l), smo 15 minut sterilizirali v avtoklavu pri temperaturi 110 °C. Pred uporabo smo fermentacijski medij centrifugirali (SorvallRC5C, ZDA) 15 minut pri 10000 g, da smo odstranili beljakovine, ki so se izkosmičile med postopkom v avtoklavu.

### 3.3.2 Priprava fermentorja

Fermentor smo napolnili z vodo, priključili elektrodo za merjenje vrednosti pH in jo umerili. Vse skupaj smo 15 minut sterilizirali pri temperaturi 121 °C. Po sterilizaciji smo bioreaktor ohladili, ga izpraznili in napolnili s centrifugirano sterilno sirotko z dodatkom kvasnega ekstrakta in tweena 80 (fermentacijski medij). Priključili smo še cevke za dovod baze in kisline (sistem za uravnavanje vrednosti pH) ter sistem za merjenje motnosti.

### 3.3.3 Fermentacija

Sirotko (2000 ml) z dodatkom kvasnega ekstrakta in tweena 80 smo inokulirali z 1 % inokuluma 18-urne kulture seva *Lb. gasseri* K7 in izpeljali fermentacijo pri temperaturi 37 °C, vrednosti pH 5,75 in podtlaku 0,5 bara. Mešanje smo uravnali na 200 obratov/min. Za uravnavanje vrednosti pH smo uporabili 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in 4 M NaOH. Fermentacijo smo končali po koncu eksponentialne faze rasti (po približno 11 urah).

### 3.3.4 Priprava vzorcev za liofilizacijo

Fermentacijski brozgi (5 ml) smo dodali eno od zaščitnih snovi, in sicer:

- saharozo (5, 10, 15 in 20 %)
- laktozo (5 in 10 %)
- škrob (5, 10, 15 in 20 %)
- glicerol (5 %)
- askorbinsko kislino (0,05 %)
- saharozo (5, 10, 15 in 20 %) + askorbinsko kislino (0,05 %)
- laktozo (5 in 10 %) + askorbinsko kislino (0,05 %)
- škrob (5, 10, 15 in 20 %) + askorbinsko kislino (0,05 %)
- glicerol (5 %) + askorbinsko kislino (0,05 %)

Vzorci smo zamrznili na temperaturo  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  in jih na tej temperaturi hranili najmanj 24 ur.

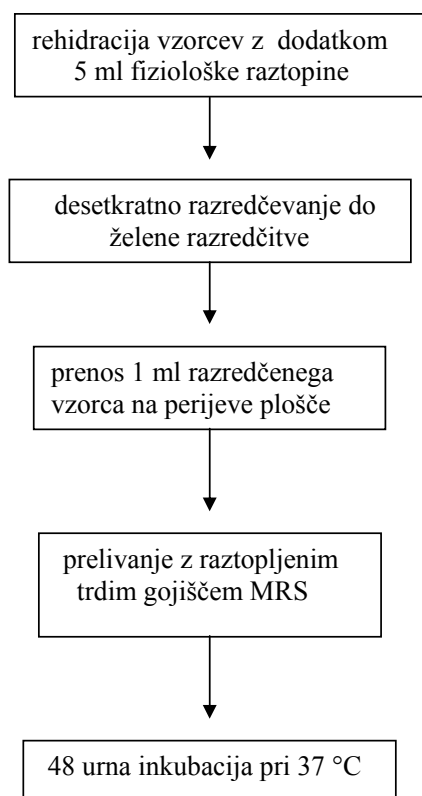
### 3.3.5 Liofilizacija in skladiščenje

Zamrznjene vzorce smo do suhega sušili v vakumskem sušilniku (Heto Lab Equipment A/S, Danska) pri tlaku, nižjem od 1 mm Hg, in temperaturi  $-55\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Liofilizirane vzorce smo hranili v zaprtih stekleničkah v temi pri sobni temperaturi ( $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

### 3.3.6 Ugotavljanje števila živih celic seva *Lb. gasseri* K7

Liofilizirane pripravke smo rehidrirali z dodatkom 5 ml fiziološke raztopine in pustili 20 minut, da so se celice adaptirale.

Rehidrirane vzorce smo dobro premešali in 1 ml vzorca prenesli v epruveto z 9 ml fiziološke raztopine. Tako smo dobili razredčitev  $R = 10^{-1}$ . Vsebinsko smo dobro premešali in nadaljevali desetkratno razredčevanje do želene razredčitve. Ponavadi smo razredčevali do  $R = 10^{-6}$ . Iz zadnjih treh razredčitev smo po 1 ml vzorca prenesli na petrijeve plošče, ki smo jih smo prelili s trdim gojiščem MRS in jih 48 ur inkubirali pri temperaturi  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ .



Slika 3: Hodogram poteka določanja števila celic *Lb. gasseri* K7

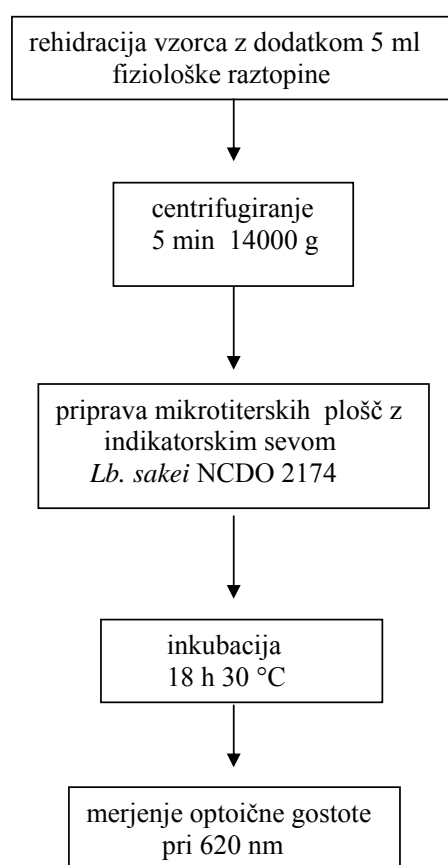
### 3.3.7 Ugotavljanje bakteriocinske aktivnosti pripravka

Bakteriocinsko aktivnost smo ugotavljali v supernatantu, ki smo ga dobili po centrifugiranju rehidriranega sirotkinega pripravka. Vzorce smo centrifugirali 5 minut pri 14 000 g (Hettich, Nemčija). Uporabili smo metode kritične razredčitve na mikrotiterskih ploščah z indikatorskim sevom *Lb. sakei* NCDO 2174, kot so že opisali Bogovič Matijašič in sodelavci (1998).

Postopek je bil naslednji: najprej smo indikatorski sev *Lb. sakei* NCDO 2174 inkubirali 18 ur pri temperaturi 30 °C. Po inkubaciji smo kulturo razredčili s svežim tekočim gojiščem MRS 10000-krat. V vsako luknjo (razen v prvo in zadnjo kolono) na mikrotiterski plošči smo prenesli 50 µl tekočega gojišča MRS, v luknje v drugi koloni pa še 50 µl tekočega gojišča MRS in 4 µl supernatanta centrifugiranega rehidriranega sirotkinega pripravka. Z

večkanalno pipeto smo prenesli 50 µl vzorca iz te kolone v naslednjo in tako naprej vse do predzadnje. Tako smo dobili 2-kratne razredčitve. Zadnjih 50 µl smo zavrgli. Na koncu smo v vsako luknjico dodali še 150 µl 10000-krat razredčene kulture *Lb. sakei* NCDO 2174. V prvo kolono smo dodali 200 µl tekočega gojišča MRS, v zadnjo pa 200 µl 10000-krat razredčene kulture *Lb. sakei* NCDO 2174. Plošče smo inkubirali 18 ur pri temperaturi 30 °C ter nato vsebino premešali in izmerili optično gostoto pri 620 nm. Prva kolona služi za umerjanje fotometra. Enota bakteriocinske aktivnosti, ki jo označimo kot BA/ml, označuje količino bakteriocinov, ki povzroči > 50 % inhibicijo seva *Lb. sakei* NCDO 2174 v primerjavi s kontrolo (zadnja kolona), ki je brez bakteriocinov.

$2^n \times (1/\mu\text{l bakteriocinskega pripravka oz. frakcije}) \times 1000 \mu\text{l}$



Slika 4: Hodogram poteka določanja bakteriocinske aktivnosti pripravka z metodo kritične razredčitve na mikrotiterskih ploščah z indikatorskim sevom *Lb. sakei* NCDO2174



#### 4 REZULTATI

Na podlagi delovne hipoteze, da bo dodatek zaščitnih snovi v fermentacijsko brozgo pred liofilizacijo vplival na stopnjo preživetja *Lb. gasseri* K7 in bakteriocinsko aktivnost pripravka, smo skušali dokazati, da se število celic seva *Lb. gasseri* K7 med 8-tedenskim skladiščenjem ne bo zmanjšalo, vrednost bakteriocinske aktivnosti pripravka pa bo ostala visoka.

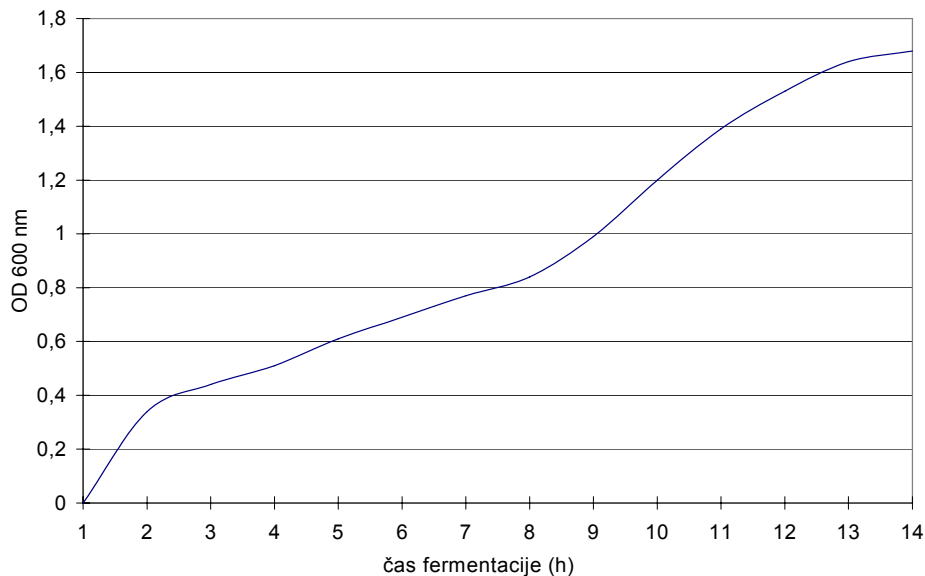
V prvem delu poskusa, ki je bil opravljen 1.6.2005 smo med fermentacijo z on-line merjenjem OD 600 nm spremljali rast seva *Lb. gasseri* K7 v pripravljenem fermentacijskem mediju, da smo določili eksponentialno fazo rasti, kjer je celic največ in vrednost bakteriocinske aktivnosti najvišja. Po končani fermentaciji smo določili število celic in bakteriocinsko aktivnost v fermentacijski brozgi.

V drugem in tretjem delu poskusa, ki je trajal od 2.6. 2005 do 23.8.2005 smo dobljeni fermentacijski brozgi dodali zaščitne snovi in jo liofilizirali ter skladiščili. Med 8-tedenskim skladiščenjem smo enkrat tedensko opravljali analize s katerimi smo ugotavljali preživelost seva *Lb. gasseri* K7 in bakteriocinsko aktivnost pripravka.

Eksperimentalni del naloge je bil opravljen v času od aprila 2005 do septembra 2005.

#### 4.1 PRIDOBIVANJE BAKTERIOCINSKO AKTIVNE BIOMASE *Lb. gasseri* K7 V BIOREAKTORJU

18-urno kulturo *Lactobacillus gasseri* K7 smo kot 1-odstotni inokulum nacepili v posneto sirotko z dodatkom kvasnega ekstrakta (4 g/l) in tweena 80 (1 g/l). Fermentacija je potekala v bioreaktorju pri temperaturi 37 °C in konstantni vrednosti pH 5,75. Bioproces smo prekinili po 11 urah oz. po eksponencialni fazi rasti mikrobne populacije. Rast mikrobne populacije smo spremljali z merjenjem OD pri 600 nm.



Slika 5: Spremljanje rasti seva *Lb. gasseri* K7 v sirotki z dodatkom kvasnega ekstrakta in tweena 80 pri temperaturi 37 °C, podtlaku 0,5 bara in pH vrednosti 5,75

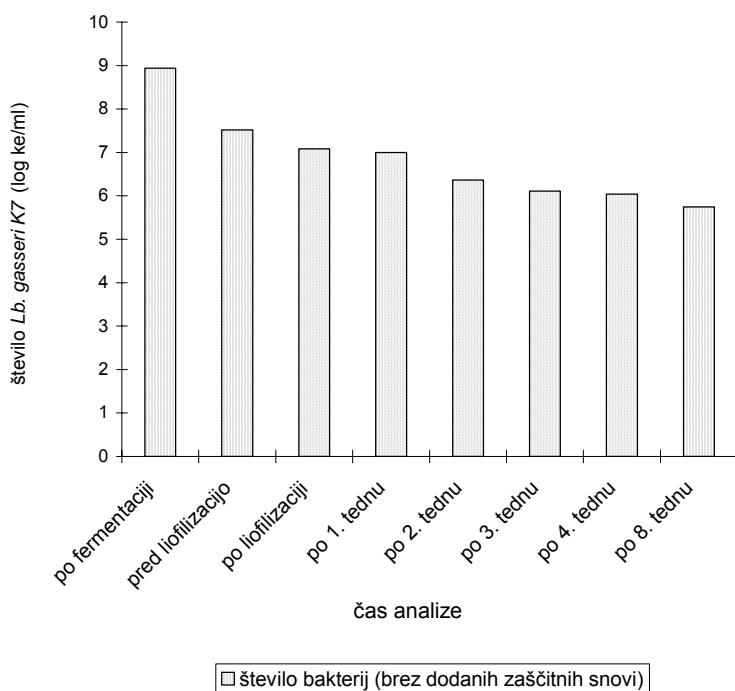
Vzorec fermentacijske brozge je po 11-tih urah v ml vseboval  $8,8 \cdot 10^8$  ke/ml probiotičnega seva *Lb. gasseri* K7 in imel bakteriocinsko aktivnost 256000 BA/ml.

#### 4.2 PREŽIVELOST SEVA *Lb. gasseri* K7 MED LIOFILIZACIJO IN SKLADIŠČENJEM TER BAKTERIOCINSKA AKTIVNOST SIROTKINEGA PRIPRAVKA BREZ DODANIH ZAŠČITNIH SNOVI

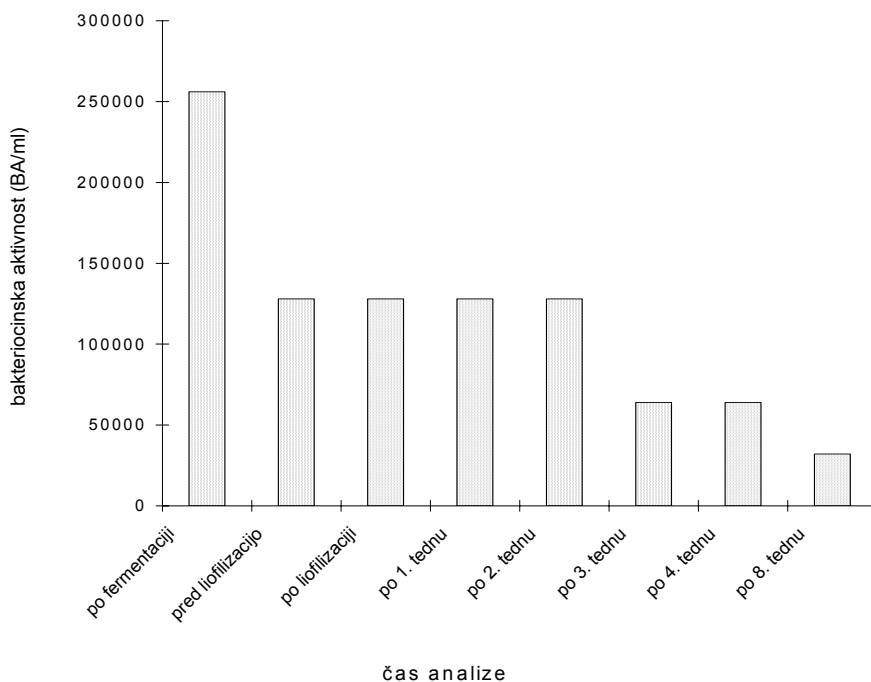
Po liofilizaciji fermentacijske brozge, ki ji nismo dodali zaščitnih snovi, smo dobili praškast pripravek.

Na sliki 6 je prikazano število preživelih celic *Lb. gasseri* K7 po zamrzovanju (pred liofilizacijo), po liofilizaciji ter zmanjševanje števila živih celic seva *Lb. gasseri* K7 med 8-tedenskim skladiščenjem. Na sliki 7 pa je prikazano zmanjševanje bakteriocinske aktivnosti pripravka med istimi postopki.

Rezultati poskusa so zbrani v Prilogi A2.



Slika 6: Preživelost seva *Lb. gasseri* K7 v mediju brez dodanih zaščitnih snovi med zamrzovanjem (pred liofilizacijo), po liofilizaciji ter med 8-tedenskim skladiščenjem liofiliziranega pripravka

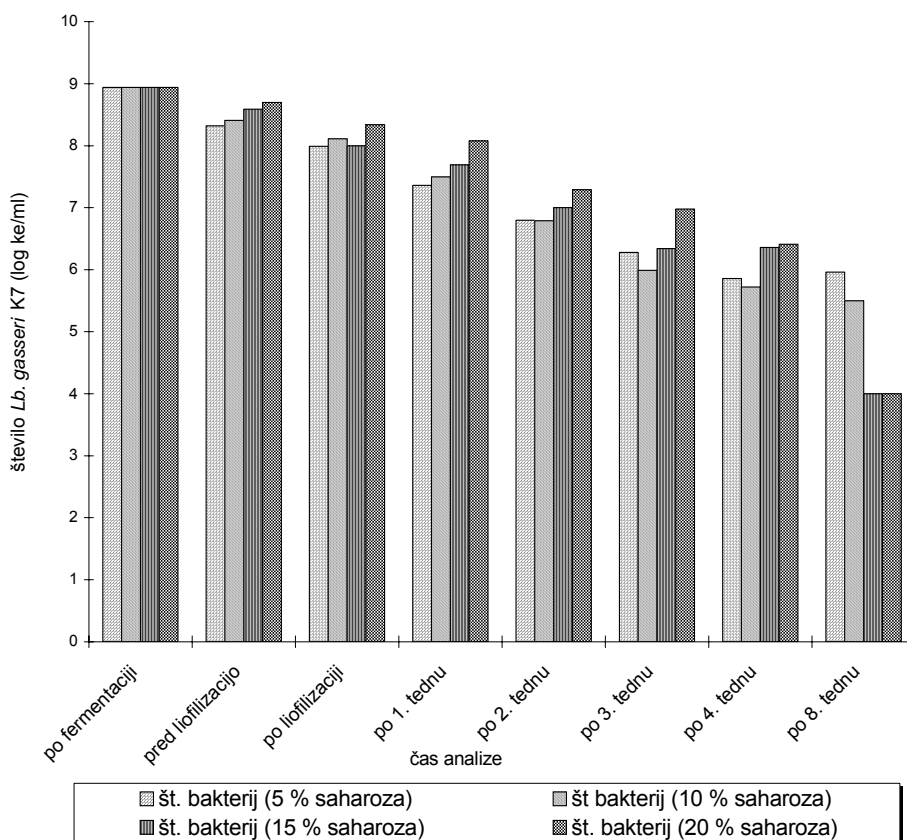


Slika 7: Bakteriocijska aktivnost pripravka s sevom *Lb. gasseri* K7 v mediju brez dodanih zaščitnih snovi, po fermentaciji, pred in po liofilizaciji ter med 8-tedenskim skladiščenjem

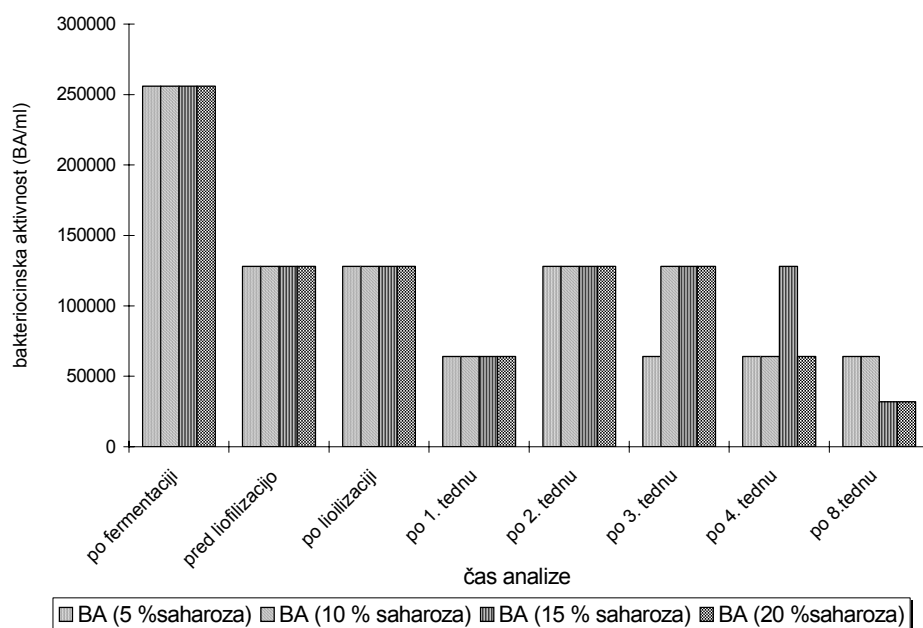
Kot je razvidno iz slike 6, se je število celic seva *Lb. gasseri* K7 med zamrzovanjem zmanjšalo za 1,42 log enot. Zamrzovanje je bolj vplivalo na bakteriocijsko aktivnost, ki se je zmanjšala od začetnih 256000 BA/ml na 128000 BA/ml (slika 7). Med postopkom vakumskega sušenja je odmrlo oz. bilo poškodovanih 0,44 log enot celic, bakteriocijska aktivnost pa je ostala nespremenjena. Po dveh tednih skladiščenja se je število živih celic zmanjšalo za manj kot 1 log enoto, bakteriocijska aktivnost pa je ostala nespremenjena. Po tretjem tednu skladiščenja smo zaznali zmanjšanje bakteriocijske aktivnosti na 64000 BA/ml in le rahlo zmanjšanje števila celic. Število celic je ostalo konstantno do osmega tedna. Osemtedensko skladiščenje je preživel  $5,5 \cdot 10^5$  celic, medtem ko se je bakteriocijska aktivnost zmanjšala na 32000 BA/ml.

#### 4.3 VPLIV SAHAROZE NA PREŽIVETJE SEVA *Lb. gasseri* K7 MED LIOFILIZACIJO IN SKLADIŠČENJEM TER BAKTERIOCINSKO AKTIVNOST LIOFILILIZIRANIH PRIPRAVKOV

Ko smo kot zaščitno sredstvo uporabili saharozo (5, 10, 15, 20 %), so se vzorci slabše posušili. Predvsem pri vzorcih z višjo koncentracijo saharoze (15 in 20 %) smo dobili visokoviskozno raztopino. Pri vzorcih z nižjo koncentracijo (5 in 10 %) pa smo dobili pastozno maso. Rezultati števila živih celic seva *Lb. gasseri* K7 v fermentacijski brozgi v pripravku pred liofilizacijo, po njej in med skladiščenjem ter bakteriocinska aktivnost liofiliziranih pripravkov so prikazani na slikah 8 in 9 ter v Prilogi A3.



Slika 8: Preživelost seva *Lb. gasseri* K7 v mediju s saharozo (5, 10, 15 in 20 %) med zamrzovanjem, po liofilizaciji ter med 8-tedenskim skladiščenjem liofiliziranih pripravkov

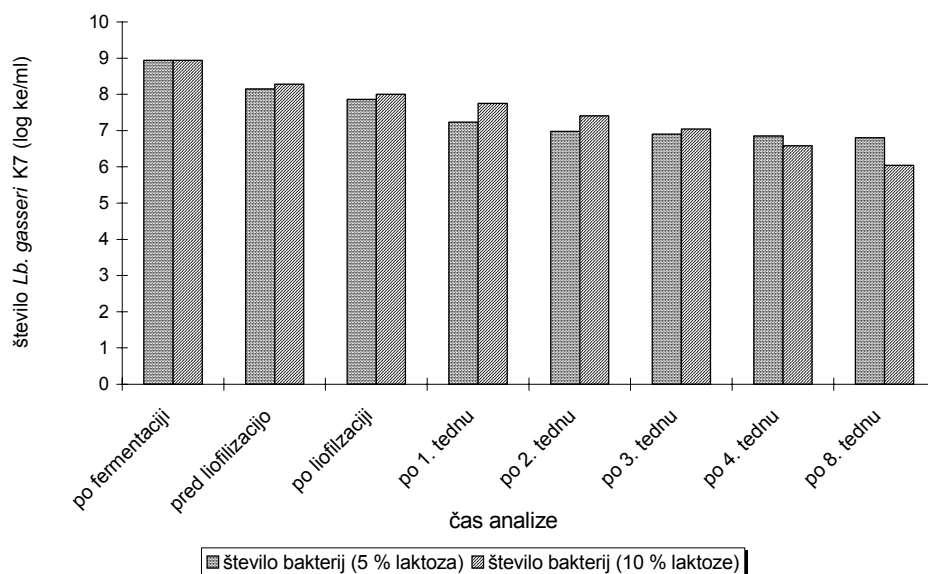


Slika 9: Bakteriociinska aktivnost pripravka s sevom *Lb. gasseri* K7 v mediju s saharozo (5, 10, 15, 20 %), po fermentaciji, pred liofilizacijo in po njej ter med 8-tedenskim skladiščenjem liofiliziranih pripravkov

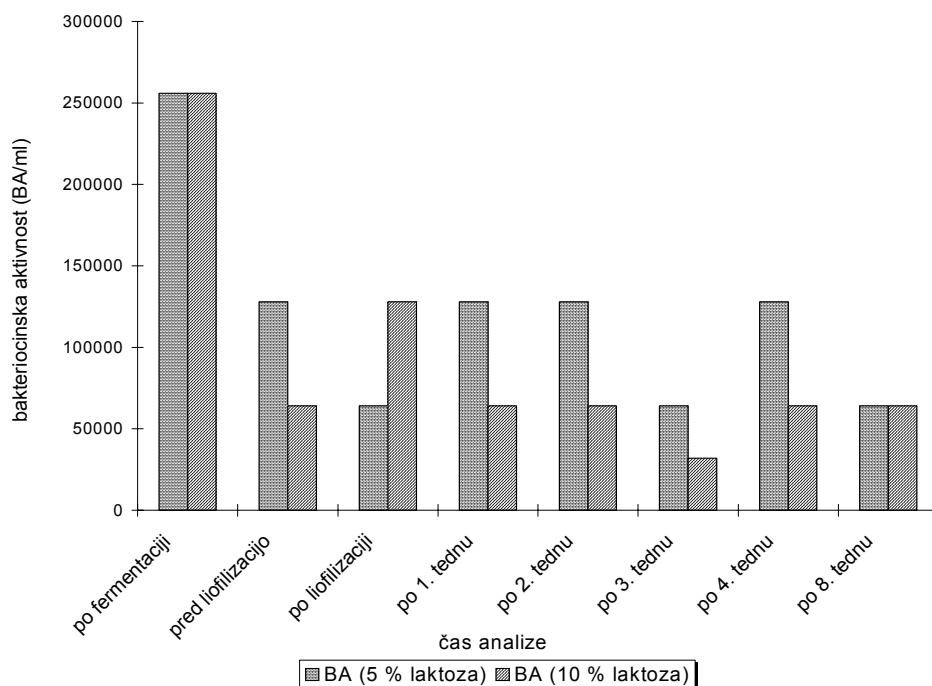
Na sliki 8 vidimo, da je dodatek saharoze izboljšal preživetje celic med zamrzovanjem, saj se število celic zmanjša samo za 0,24-0,62 log enot. Zaščita celic se je izboljševala s povečevanjem koncentracije saharoze. Pri vseh koncentracijah saharoze se je med zamrzovanjem zmanjšala bakteriociinska aktivnost pripravkov na 128000 BA/ml. Tako vrednost so pripravki zadržali tudi po liofilizaciji, nato pa smo med skladiščenjem opazili precejšnje nihanje bakteriociinske aktivnosti pripravkov. Med procesom liofilizacije je odmrlo oz. bilo poškodovanih 0,30-0,59 log enot celic. 20-odstoten dodatek saharoze je tudi med liofilizacijo najboljše zaščitno učinkoval na celico. Med skladiščenjem smo predvsem v prvih tednih zasledili večje preživetje celic ob dodatku višjih koncentracij saharoze (15 in 20 %), razlike pa so bile majhne. Po osmih tednih skladiščenja smo najmanj živih celic zasledili pri 15 % in 20 % koncentraciji saharoze (manj kot  $10^4$  ke/ml). Poleg majhnega števila celic je bila pri teh koncentracijah najnižja tudi vrednost bakteriociinske aktivnosti (32000 BA/ml).

#### 4.4 VPLIV LAKTOZE NA PREŽIVETJE SEVA *Lb. gasseri* K7 MED LIOFILIZACIJO IN SKLADIŠČENJEM TER BAKTERIOCINSKO AKTIVNOST LIOFILIZIRANIH SIROTKINIH PRIPRAVKOV

Odločili smo se za dodatek laktoze v koncentracijah 5 % in 10 %. Tudi pri liofilizaciji vzorcev z dodatkom laktoze nismo mogli posušiti vzorca v praškasto obliko. Laktoza pri višjih koncentracijah kristalizira, zato se pri rehidraciji ne raztopi povsem. Ker se je kristalizacija pojavila že pri 10 % koncentraciji, smo se odločili, da ne bomo uporabili višjih koncentracij saharoze (15 in 20 %). Število živih celic je prikazano na sliki 10, bakteriocinska aktivnost pripravka med skladiščenjem pa na sliki 11. Rezultati so zbrani tudi v Prilogi A4.



Slika 10: Preživelost seva *Lb. gasseri* K7 v mediju z laktozo (5 in 10 %) med zamrzovanjem, po liofilizaciji ter med 8-tedenskim skladiščenjem liofiliziranih pripravkov



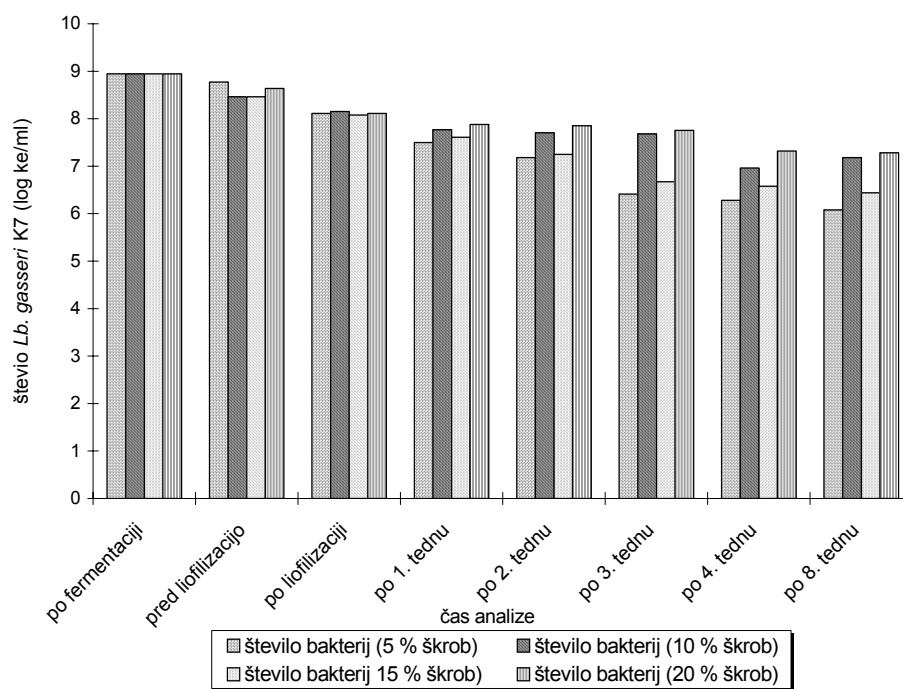
Slika 11: Bakteriocijska aktivnost pripravka s sevom *Lb. gasseri* K7 v mediju z laktozo (5 in 10 %), po fermentaciji, pred liofilizacijo in po njej ter med 8-tedenskim skladiščenjem

Pri obeh koncentracijah smo ugotovili, da se je med postopkoma ohranilo veliko celic, zmanjšala pa se je bakteriocijska aktivnost. Med zamrzovanjem se je število celic pri 5 % koncentraciji laktoze zmanjšalo za 0,79 log enot in 0,66 log enot pri 10 % koncentraciji, med liofilizacijo pa 0,29 log enot pri 5 % koncentraciji in 0,28 pri 10 % koncentraciji. Po četrtem tednu skladiščenja smo več živih celic ugotovili v pripravkih s 5 % koncentracijo laktoze ( $7,1 \cdot 10^7$  ke/ml). Pri tej koncentraciji smo izmerili tudi višjo bakteriocijsko aktivnost (128000 BA/ml). Podobno število živih celic smo ugotovili v pripravku s 5 % koncentracijo laktoze tudi na koncu skladiščenja. Bakteriocijska aktivnost je bila enaka pri obeh koncentracijah in je znašala 64000 BA/ml.

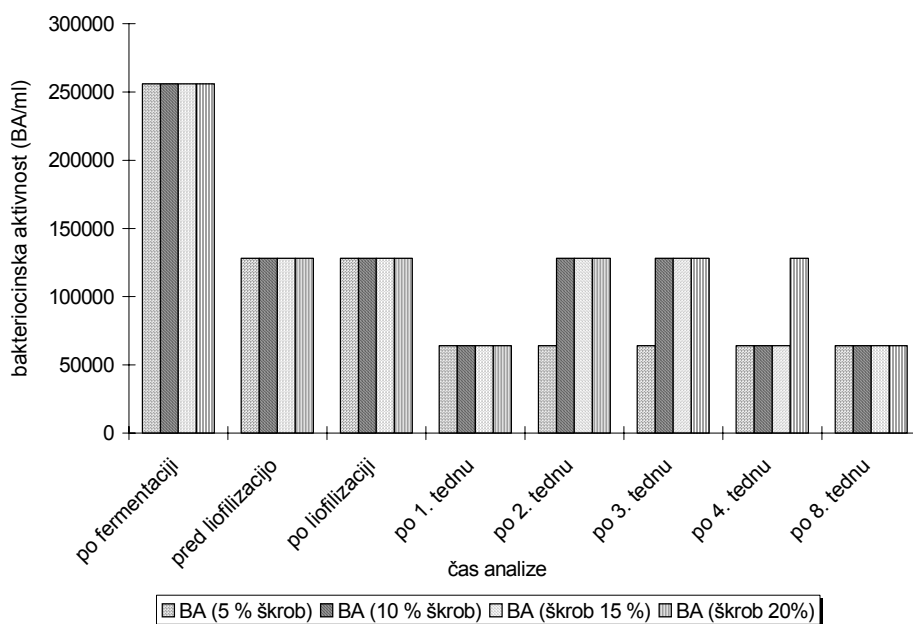


#### 4.5 VPLIV ŠKROBA NA PREŽIVETJE SEVA *Lb. gasseri* K7 MED LIOFILIZACIJO IN SKLADIŠČENJEM TER BAKTERIOCINSKO AKTIVNOST LIOFILIZIRANIH SIROTKINIH PRIPRAVKOV

Škrob smo dodali v koncentracijah 5, 10, 15 in 20 %. Vzorci, ki smo jim kot zaščitno sredstvo dodali škrob, so se med liofilizacijo dobro posušili in dobili smo popolnoma praškaste pripravke, ki so se tudi zelo dobro rehidrirali. Rezultati števila živih celic seva *Lb. gasseri* K7 in bakteriocinska aktivnost pripravkov v različnih fazah med liofilizacijo in skladiščenjem pripravkov so prikazani na slikah 12 in 13 ter v Prilogi A5.



Slika 12: Preživelost seva *Lb. gasseri* K7 v mediju s škrobom (5, 10, 15 in 20 %), med zamrzovanjem, po liofilizaciji ter med 8-tedenskim skladiščenjem

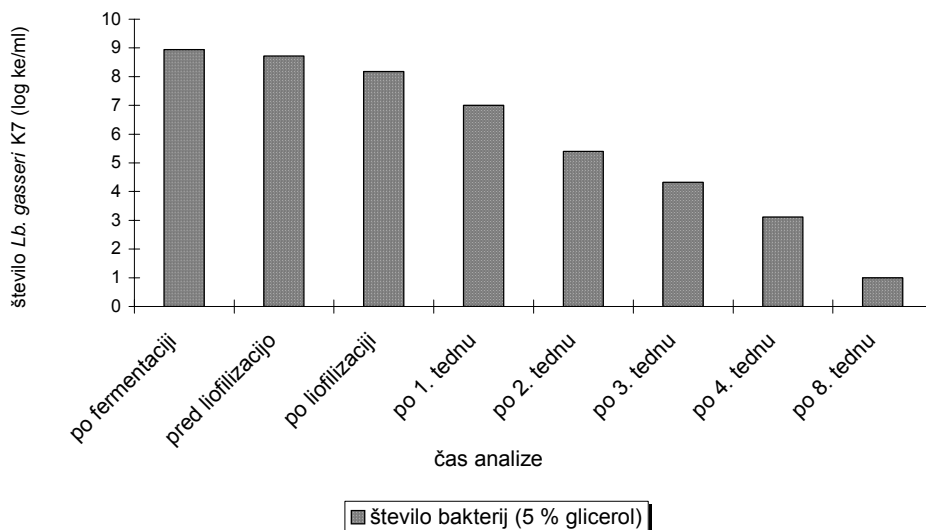


Slika 13: Bakteriocinska aktivnost pripravka s sevom K7 v mediju s škrobom (5, 10, 15 in 20 %) po fermentaciji, pred liofilizacijo in po njej ter med 8-tedenskim skladiščenjem

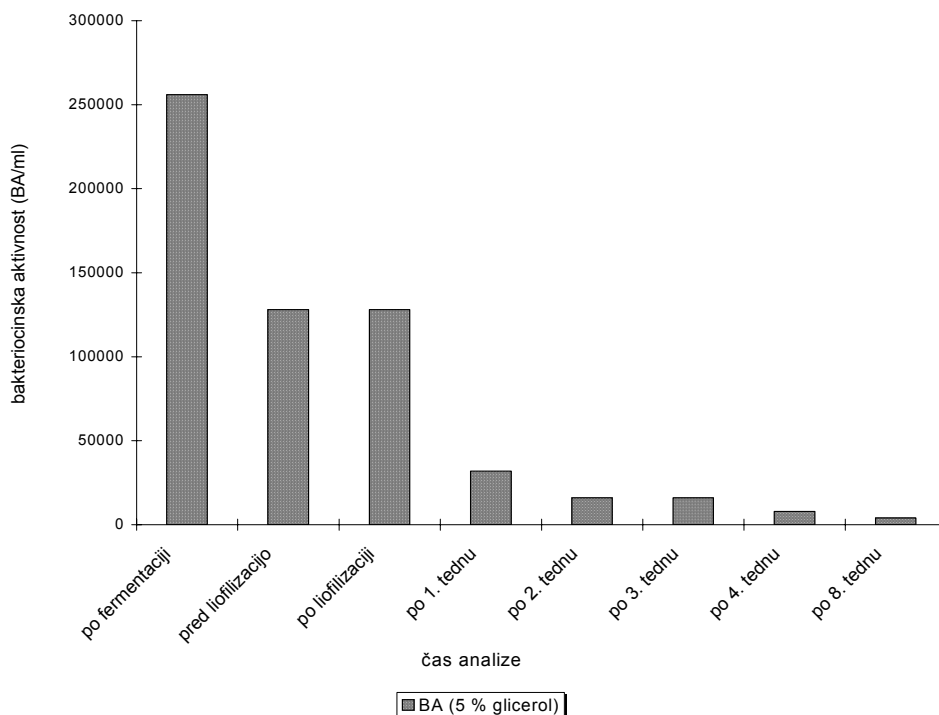
Kot vidimo na sliki 12, se med zamrzovanjem začetno število celic bistveno ne zmanjša. Poškodovanih ali odmrlih je bilo 2 % do 5 % celic. Začetna vrednost bakteriocinske aktivnosti (256000 BA/ml) se je zmanjšala na 128000 BA/ml. Po liofilizaciji se je število celic zmanjšalo za največ 0,66 log enot pri 5 % dodatku škroba, vrednost bakteriocinske aktivnosti pa se ni spremenila. Do tretjega tedna se število celic pri različnih koncentracijah ni bistveno razlikovalo. Po štirih tednih skladiščenja se je bakteriocinska aktivnost zmanjšala pri 10 % in 15 % koncentraciji (64000 BA/ml), najvišja je ostala v pripravku z 20 % dodanega škroba (128000 BA/ml). Med skladiščenjem so najmanj poškodb utrpele celice pri 20 % koncentraciji, saj se je število živih celic zmanjšalo samo za 0,68 log enot glede na število živih celic, prisotnih v vzorcih po liofilizaciji. Po osmih tednih skladiščenja smo najmanjše izgube celic opazili pri 20 % koncentraciji škroba; vzorec je vseboval še  $2,9 \cdot 10^7$  ke/ml celic. Vrednost bakteriocinske aktivnosti se je spremenila le pri 20 % koncentraciji, kjer se je zmanjšala na 64000 BA/ml, kolikor je znašala tudi pri preostalih.

#### 4.6 VPLIV DODATKA GLICEROLA NA PREŽIVETJE SEVA *Lb. gasseri* K7 MED LIOFILIZACIJO IN SKLADIŠČENJEM TER BAKTERIOCINSKO AKTIVNOST LIOFILIZIRANIH SIROTKINIH PRIPRAVKOV

Pri uporabi glicerola, kot zaščitnega sredstva, smo se odločili, da bomo uporabili le 5 % koncentracijo. Za uporabo višjih koncentracij (10, 15 in 20 %) se nismo odločili, ker nam med liofilizacijo tudi pri 5 % koncentraciji vzorca ni uspelo posušiti v praškast pripravek.



Slika 14: Preživelost seva *Lb. gasseri* K7 v mediju z glicerolom (5 %) med zamrzovanjem, po liofilizaciji ter med 8-tedenskim skladiščenjem liofiliziranih pripravkov



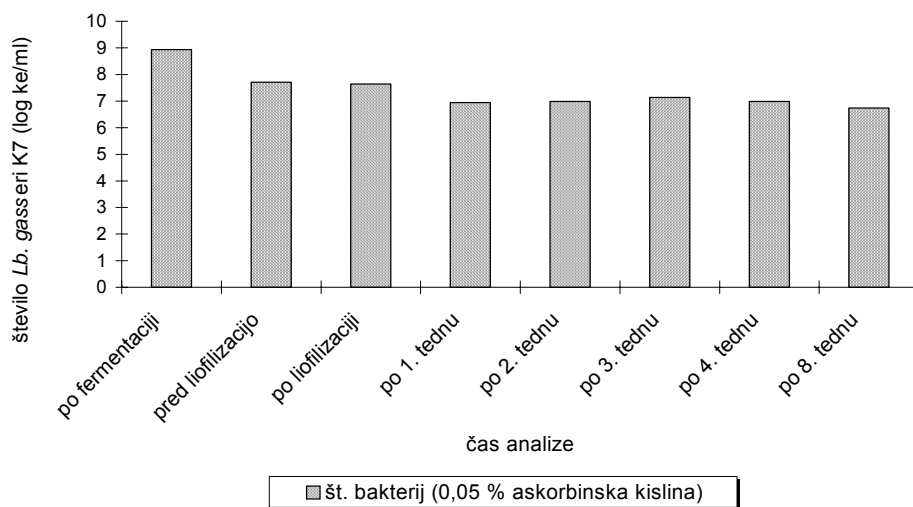
Slika 15: Bakteriocijska aktivnost pripravka s sevom *Lb. gasseri* K7 v mediju z glicerolom (5 %) po fermentaciji, pred liofilizacijo in po njej ter med 8-tedenskim skladiščenjem

Deleted: 1

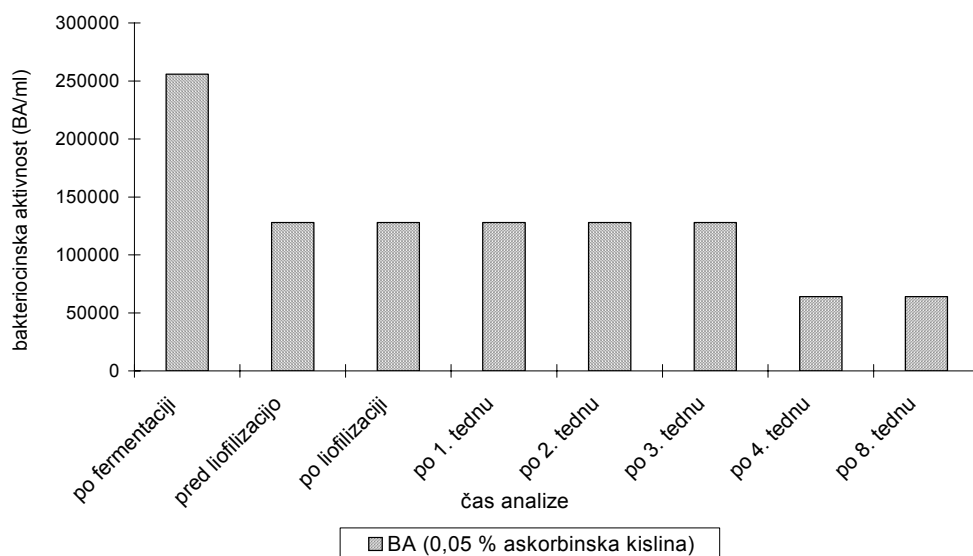
Na sliki 14 vidimo, da je postopek zamrzovanja pripravka preživela večina celic, prisotnih v fermentacijski brozgi (98 %). Med zamrzovanjem se je začetna vrednost bakteriocijske aktivnosti (256000 BA/ml) zmanjšala na 128000 BA/ml. Med procesom liofilizacije je bakteriocijska aktivnost ostala nespremenjena, odmrlo pa je 0,54 logaritmskih enot celic, ki so preživele zamrzovanje. Število živih celic v pripravku se je med skladiščenjem hitro zmanjšalo, zmanjšala pa se je tudi bakteriocijska aktivnost (slika 15). Po osmih tednih skladiščenja je bilo v pripravku manj kot 10 ke/ml celic, bakteriocijska aktivnost pripravka pa je bila najmanjša od vseh pripravkov, saj smo izmerili samo 4000 BA/ml.

#### 4.7 VPLIV DODATKA ASKORBINSKE KISLINE NA PREŽIVETJE SEVA *Lb. gasseri* K7 MED LIOFILIZACIJO IN SKLADIŠČENJEM TER BAKTERIOCIJSKO AKTIVNOST LIOFILIZIRANIH SIROTKINIH PRIPRAVKOV

Pri vzorcih, ki smo jim dodali askorbinsko kislino, smo po liofilizaciji dobili praškast preparat, ki se je dobro rehidriral. Rezultati analiz so prikazani na slikah 16 in 17 ter v Prilogi A7.



Slika 16: Preživelost seva *Lb. gasseri* K7 v mediju z askorbinsko kislino (0,05 %) med zamrzovanjem, pred liofilizacijo in po njej ter med 8-tedenskim skladiščenjem liofiliziranega pripravka



Slika 17: Bakteriocinska aktivnost pripravka s sevom *Lb. gasseri* K7 v mediju s askorbinsko kislino (0,05 %) po fermentaciji, pred liofilizacijo in po njej ter med 8-tedenskim skladiščenjem

Kot vidimo na sliki 16, je postopek zamrzovanja poškodoval največji delež celic, saj se je število živih celic zmanjšalo z začetnih  $8,8 \cdot 10^8$  v ml fermentacijske brozge na  $5,1 \cdot 10^7$ . Askorbinska kislina je dobro zaščitila celice med procesom liofilizacije pa tudi med skladiščenjem, saj smo v liofiliziranem pripravku še po 8. tednu skladiščenja ugotovili  $5,5 \cdot 10^6$  celic/ml. Bakteriocinska aktivnost pripravka se je najbolj zmanjšala med zamrzovanjem, naslednje zmanjšanje bakteriocinske aktivnosti pa smo opazili po 4. tednu skladiščenja pripravka. Po 8-ih tednih skladiščenja je bila bakteriocinska vrednost liofiliziranega pripravka še vedno 64000 BA/ml.

Zanimalo nas je tudi, kako na preživetje seva *Lb. gasseri* K7 in bakteriocinsko aktivnost pripravka vpliva dodatek askorbinske kisline (0,05 %) v kombinaciji s saharozo (5, 10, 15 in 20 %), laktozo (5 in 10 %), škrobom (5, 10, 15 in 20 %) in glicerolom (5 %). Število celic in bakteriocinsko aktivnost smo ugotavljali po štirih in osmih tednih skladiščenja.

Ko smo vzorcem z dodatkom askorbinske kisline dodali še različne zaščitne snovi, so bili vzorci po liofilizaciji podobni vzorcem, pri katerih smo uporabili samo zaščitne snovi. V preglednici 3 so navedeni rezultati števila živih celic seva *Lb. gasseri* K7 in bakteriocinske aktivnosti liofiliziranih pripravkov.

Preglednica 5: Preživelost seva *Lb. gasseri* K7 in bakteriocinska aktivnost liofiliziranega pripravka z dodatkom saharoze (5, 10, 15, 20 %), laktoze (5 in 10 %), škroba (5, 10, 15, 20 %), glicerola (5 %), in dodatka 0,05 % askorbinske kisline po 4- in 8-tedenskem skladiščenju

Zaščitna snov	Konc. zaščitne snovi (%)	Po liofilizaciji		Po 4. tednu		Po 8. tednu	
		Število celic (log ke/ml)	Bakteriocinska aktivnost (BA/ml)	Število celic (log ke/ml)	Bakteriocinska aktivnost (BA/ml)	Število celic (log ke/ml)	Bakteriocinska aktivnost (BA/ml)
Saharoz	5	7,99	128000	6,11	64000	5,34	64000
Saharoz	10	8,11	128000	6,98	64000	6,18	64000
Saharoz	15	8	128000	7,18	64000	<4	32000
Saharoz	20	8,34	128000	7,08	32000	<4	32000
Laktoza	5	7,86	128000	6,93	64000	6,56	64000
Laktoza	10	8,11	128000	6,89	64000	6,23	64000
Škrob	5	8,11	128000	7,11	128000	7,41	64000
Škrob	10	8,15	128000	7,11	128000	7,28	64000
Škrob	15	8,08	128000	6,92	128000	7,32	64000
Škrob	20	8,11	128000	7,74	128000	7,46	64000
Glicerol	5	8,18	64000	3,15	8000	<1	4000

Med skladiščenjem pripravkov, ki smo jim poleg osnovnega zaščitnega sredstva dodali tudi askorbinsko kislino, smo najmanjše zmanjšanje števila celic ugotovili pri kombinaciji škroba in askorbinske kisline. Po štirih tednih se je začetno število celic, ki so preživele liofilizacijo, zmanjšalo za 0,37 log enot, po osmih tednih pa za 0,65 log enot. Največje zmanjšanje števila smo zaznali pri kombinaciji glicerola in askorbinske kisline. Število celic se je po štirih tednih zmanjšalo za 5,03 log enot, po osmih tedni pa za več kot 7,18 log enot. Po štirih tednih skladiščenja smo najmanjšo vrednost bakteriocinske aktivnosti pripravka izmerili pri kombinaciji glicerola in askorbinske kisline, kjer je znašala 8000 BA/ml, največja pa se je ohranila pri vseh koncentracijah škroba (128000 BA/ml). Tudi po osmih tednih smo najmanjšo bakteriocinsko vrednost izmerili pri kombinaciji glicerola in askorbinske kisline (4000 BA/ml). Pri preostalih zaščitnih snoveh, razen pri kombinaciji saharoze (15, 20 %) in askorbinske kisline, je bakteriocinska aktivnost pripravka znašala 64000 BA/ml.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Iz rezultatov predhodnih raziskav vemo, da se število celic namnoženih na komercialnih gojiščih med liofilizacijo in skladiščenjem pri sobni temperaturi zmanjša, če ne uporabimo zaščitnih snovi. Z zmanjšanjem števila celic se zmanjša uporabna vrednost liofiliziranih pripravkov. Na zmanjšanje števila celic vpliva več faktorjev kot so; sestava gojišča, vrsta bakterij...

Z delom smo hoteli pokazati vpliv dodatka zaščitnih snovi na preživetje seva *Lb. gasseri* K7 in bakteriocinsko aktivnost pripravka med liofilizacijo in skladiščenjem. Zanimala nas je stopnja zmanjšanja števila celic *Lb. gasseri* K7 in bakteriocinske aktivnosti pripravka med 8-tedenskim skladiščenjem.

### 5.1 RAZPRAVA

Liofilizacija je postopek, s katerim lahko pripravimo dolgo obstojne bakterijske pripravke, primerne za skladiščenje, transport, preprosta pa je tudi njihova uporaba.

Liofilizirane pripravke lahko uporabimo za več namenov. Kadar je namen shranjevanje celičnih kultur, število celic ni odločilnega pomena, saj lahko z nekajkratnim precepljanjem takšnih celic obnovimo njihovo vitalnost, pa tudi njihove funkcionalne lastnosti. Če želimo liofilizirane celice uporabiti neposredno kot starterske kulture, kot dopolnilo prehrani ali kot dodatek krmi, pa mora pripravek vsebovati veliko živih celic, saj pri uporabi takšnih pripravkov pričakujemo hitro razmnoževanje celic in/ali njihovo aktivnost oziroma funkcionalnost.

V industriji uporabljamo mlečnokislinske bakterije kot starterske kulture, zato je pomembno, da so čim bolj koncentrirane, hkrati pa je odločilnega pomena njihovo preživetje med liofilizacijo in skladiščenjem. Ohranitev živih in aktivnih celic je pomembno s tehnološkega in ekonomskega stališča (Carvalho in sod., 2003c). Med postopkom liofilizacije so bakterije izpostavljene postopkom zamrzovanja in sušenja. Med zamrzovanjem v notranjosti celice nastajajo ledeni kristali, ki lahko poškodujejo celico. Poškodbe nastanejo tudi zaradi povišane koncentracije snovi v notranjosti in ekstremnih vrednosti pH. Zaradi liofilizacije nastanejo poškodbe na celični membrani, lahko pa liofilizacija povzroči tudi razgradnjo DNA in celičnih beljakovin (Zhao in Zhang 2005, Saarela in sod., 2005). Med skladiščenjem sta zmanjšanje vodne aktivnosti in oksidacija najpomembnejša stresna dejavnika, ki vplivata na preživetje (Bogovič Matijašič in sod., 2004).

Ponavadi raziskovalci uporabljajo za namnoževanje bakterij komercialna gojišča, npr. gojišče MRS za laktobacile, ki jih obogatijo z različnimi snovmi (saharoza, laktoza).



Pogosto v pripravek pred postopkom liofilizacije dodajajo tudi posneto mleko v prahu, ki je vir beljakovin in ščiti celične beljakovine. V naši raziskavi smo sev *Lactobacillus gasseri* K7 kutivirali v 2000 ml sirotke z dodatkom tweena 80 in kvasnega ekstrakta. Sirotka je primerno gojišče, ker vsebuje velik delež laktoze, serumske beljakovine in tudi krajše peptide. Iz tako pripravljene fermentacijske brozge smo želeli pripraviti liofilizirane pripravke, ki bi vsebovali čim več živih celic *Lb. gasseri* K7. Poleg tega naj bi med skladiščenjem ohranili visoko bakteriocinsko aktivnost liofiliziranega pripravka. Sev *Lb. gasseri* K7 namreč med logaritemsko fazo rasti izloča v medij bakteriocine s širokim spektrom protimikrobnega delovanja (Bogovič-Matijašič, Rogelj, 2000). Pred zamrzovanjem in liofilizacijo smo fermentacijski brozgi dodali različne koncentracije saharoze, laktoze, škroba, glicerola in askorbinske kisline ter ugotavljali, ali prispevajo k boljšemu preživetju celic in ohranitvi bakteriocinske aktivnosti pripravka.

Ali se bo vzorec posušil v praškasto obliko, je odvisno predvsem od dodane zaščitne snovi. Nekaterih snovi, ki smo jih uporabili za zaščito celic, zaradi njihovih fizikalno-kemijskih lastnosti ne moremo liofilizirati v praškasto obliko in dobimo pastozne vzorce. Tako smo pri dodatku škroba dobili popolnoma praškaste pripravke, pri dodatku glicerola pa so bili vzorci še zmeraj gosto tekoči, število živih celic *Lb. gasseri* K7 v liofiliziranih pripravkih pa se je med skladiščenjem hitro zmanjševalo (Slika 14). Po 8-tedenskem skladiščenju je ml pripravek vseboval manj kot 10 živih celic seva *Lb. gasseri* K7. Da povečana količina vode v pripravku vpliva na zmanjšanje števila celic, so ugotovili tudi Teixeira in sod. (1996).

Dodatek zaščitnih snovi pred zamrzovanjem vpliva na obseg poškodb med liofilizacijo. Carvalho in sodelavci (2002) poročajo o zmanjšanju števila celic *Lb. rhamnosus* in *Lb. plantarum* med liofilizacijo in 10-tedenskim skladiščenjem pri vzorcih brez dodanih zaščitnih snovi. V vzorcih z dodatkom zaščitnih snovi (fruktoze, sorbitola, natrijevega glutamata) v različnih koncentracijah pa se je število preživelih celic, glede na vzorce brez dodanih zaščitnih snovi, povečalo za 0,5–1,5 log enot. Zmanjšanje števila celic v vzorcih brez dodanih zaščitnih snovi med liofilizacijo so ugotovili tudi De Giulio in sodelavci (2005). V vzorcih z dodanimi zaščitnimi snovmi (trehaloza, maltoza, saharoza in glukoza) v koncentraciji 32 % je namreč preživelo do 20 % več celic.

Dodatek saharoze v fermentacijsko brozgo pred zamrzovanjem je pozitivno vplival na preživetje celic seva *Lb. gasseri* K7 med zamrzovanjem in liofilizacijo. V povprečju je ob dodatku saharoze preživelo 10 % več celic kot v pripravkih brez dodanih zaščitnih snovi. Zaščita je v povezavi s koncentracijo dodane saharoze, saj je največ celic preživelo v pripravkih z 20 % saharoze (začetno število celic se je po zamrzovanju zmanjšalo za 0,24 log enote in 0,6 po liofilizaciji) (Slika 8). Dodatek saharoze pa ni vplival na bakteriocinsko aktivnost pripravkov, saj so bile vrednosti vzorcev z dodano saharozo enake vrednostim vzorcev brez dodatka saharoze (Slika 8 in Slika 6). Ugotovili smo, da je saharoza pri

dotatku večjih koncentracij primernejša za krajše skladiščenje. V prvih tednih skladiščenja (1.–4.) je preživetje bakterij večje pri večjih koncentracijah saharoze (15 in 20 %). Pri teh vzorcih je bilo po četrtem tednu poškodovanih oz. odmrlih 1,66–1,93 log enot celic, ki so preživele liofilizacijo. Po osmih tednih skladiščenja pa je bilo v teh vzorcih za 4–4,34 log enot manj celic kot po koncu liofilizacije. Pri 5 in 10 % koncentraciji pa se je število celic zmanjšalo le za 2,03–2,61 log enot. V primerjavi z vzorci brez dodanih zaščitnih snovi je med liofilizacijo ob dodatku saharoze preživel sicer več celic, vendar pa so med skladiščenjem pripravkov odmirale hitreje. Po štirih in osmih tednih skladiščenja je več celic preživel v vzorcih brez dodatka zaščitnih snovi (Slika 6 in Slika 8). Ko smo uporabili večje koncentracije saharoze, smo izmerili tudi manjše vrednosti bakteriocinske aktivnosti kot pri vzorcih z nižjo koncentracijo in v vzorcih brez dodanih zaščitnih snovi (Slika 7 in Slika 9). Rezultati so nas nekoliko presenetili, saj drugi avtorji navajajo saharozo kot dobro zaščitno snov v postopkih liofilizacije. Da je saharoza učinkovito zaščitno sredstvo, so na primer ugotovili Oldenhof in sodelavci (2005), ki so jo uporabili pri pripravi pripravkov *Lb. bulgaricus* s postopkom sušenja z razprševanjem. Prav tako so njeno učinkovitost potrdili Saarela in sodelavci (2005), ki so jo uporabili kot zaščitno sredstvo (5 % koncentracijo) pri liofilizaciji in skladiščenju *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* E-012010.

Pri preskušanju laktoze kot zaščitne snovi smo naleteli na težavo, saj so že 5 in 10 % dodatki laktoze v fermentacijsko brozgo povzročili poslabšanje sušenja med liofilizacijo. Zato so bili pripravki pastozni ali gosto viskozni in ne praškasti. Pri večjih koncentracijah je bila otežena tudi rehidracija, ker se je pojavila kristalizacija laktoze. Ugotovili smo, da med liofilizacijo laktoza prav tako dobro ščiti celice kot saharoza pri enakih koncentracijah, med skladiščenjem pa je celicam zagotavljala boljšo zaščito, saj je 8-tedensko skladiščenje preživel več celic kot v pripravkih z dodano saharozo (Priloga A3 in Priloga A4). Pri 5 % dodatku laktoze je preživel več celic kot pri vzorcih brez dodatka zaščitnih snovi. Bakteriocinska aktivnost pripravka je bila po osmih tednih skladiščenja večja kot pri pripravkih brez dodatka zaščitnih snovi (Slika 7 in Slika 11). O učinkovitosti laktoze kot zaščitnega sredstva poročajo Carvalho in sodelavci (2004a). Ugotovili so, da je laktoza še posebno učinkovita kot zaščitno sredstvo, če jo dodamo v rastni medij (10 g/l v gojišče MRS). Podobno gojišče smo uporabljali tudi mi, saj je znano, da je v sirotki velik delež laktoze. Čeprav so bili pripravki z dodatkom laktoze stabilnejši, z rezultatom nismo bili preveč zadovoljni, saj je še vedno odmrlo preveč celic.

Najboljše preživetje celic seva *Lb. gasseri* K7 smo ugotovili v liofiliziranih pripravkih z dodatkom škroba. Vsi vzorci, tudi tisti z največjo koncentracijo škroba (15 in 20 %), so se popolnoma posušili in smo dobili praškast pripravek. V primerjavi z vzorci brez dodanih zaščitnih snovi je bilo število odmrlih celic med zamrzovanjem in liofilizacijo manjše, vrednost bakteriocinske aktivnosti pripravkov pa primerljiva (Priloga A2 in Priloga A5). Manjše izgube kot v pripravkih brez dodanih zaščitnih snovi smo med liofilizacijo opazili

predvsem pri večjih koncentracijah škroba (10, 15 in 20 %). V primerjavi s pripravki brez dodatka zaščitnih snovi so po koncu 8-tedenskega skladiščenja vsi pripravki s škrobom vsebovali več živih celic seva *Lb. gasseri* K7 (Slika 6 in Slika 12). Najboljšo zaščito celic smo ugotovili pri 20-odstotnem dodatku škroba. Najmanjše zmanjšanje bakteriocinske aktivnosti pripravka smo ugotovili pri 20 % koncentraciji škroba, kjer je po štirih tednih skladiščenja znašala 128000 BA/ml. Pri drugih koncentracijah dodanega škroba je znašala 64000 BA/ml in je bila večja kot pri vzorcih brez dodatka zaščitnih snovi. Po osmih tednih smo zaznali zmanjšanje bakteriocinske aktivnosti tudi pri 20 % koncentraciji (Slika 13). Med liofilizacijo in skladiščenjem je škrob boljše ščitil celice seva *Lb. gasseri* K7 kot saharoza in laktoza. V člankih raziskovalci ne omenjajo uporabe škroba kot zaščitne snovi pri liofilizaciji MKB. Abadias in sodelavci (2001) so ga uporabili pri liofilizaciji kulture *Candida sake*; rezultati so bili primerljivi z rezultati, ki so jih dobili pri vzorcih z dodatkom disaharidov kot zaščitnih snovi. Mattila-Sandholm in sodelavci (2002) poročajo o uporabi škroba pri inkapsulaciji, čemur sledi liofilizacija. Pri liofilizaciji je škrob kot zaščitna snov posebno zanimiv, ker se brez težav rehidrira in ga lahko uporabimo kot dodatek hrani ali živalski krmi.

Glicerol je primerno zaščitno sredstvo predvsem pri zamrzovanju bakterijskih preparatov in njihovem shranjevanju v zamrznjeni obliki. Ni pa primerno zaščitno sredstvo, ko liofilizirane preparate skladiščimo pri sobni temperaturi. Ko smo uporabili 5 % dodatek glicerola, je po liofilizaciji vzorec ostal gosto tekoč, zato se nismo odločili za uporabo večjih koncentracij (10, 15 in 20 %). Postopek zamrzovanja je poškodoval 0,22 log enot celic, postopek liofilizacije pa 0,76 log enot celic. Tako majhne so bile izgube pri drugih zaščitnih snoveh le pri najvišjih koncentracijah. Ugotovili smo, da so bile med skladiščenjem zelo velike izgube celic, predvsem pri daljšem skladiščenju. Po osmih tednih so liofilizirani pripravki vsebovali manj kot 10 živih celic seva *Lb. gasseri* K7 v ml (Slika 14). Zelo se je zmanjšala tudi bakteriocinska aktivnost pripravkov, saj je po štirih tednih znašala 8000 BA/ml, po osmih pa 4000 BA/ml (Slika 15). Če rezultate skladiščenja primerjamo z vzorci brez dodanih zaščitnih snovi, je preživetje pri vzorcih z dodanim glicerolom bistveno manjše, prav tako je manjša bakteriocinska aktivnost (Priloga A2 in Priloga A14). Fonseca in sodelavci (2003) ter Tršič - Milanović in sodelavci (2001) predlagajo uporabo glicerola v kombinaciji z laktozo in v manjših koncentracijah (1 % dodatek).

Askorbinska kislina, ki smo jo dodali pripravku, naj bi delovala kot antioksidant. Z dodatkom askorbinske kisline zmanjšamo negativne vplive kisika na celice med skladiščenjem, saj vzorcev nismo hranili v kontrolirani atmosferi. Pri uporabi askorbinske kisline smo ugotovili, da je po zamrzovanju ostalo nepoškodovanih 7,71 log enot celic od začetnih 8,94 log enot. Po liofilizaciji je ostalo število nepoškodovanih celic približno enako. Največ poškodb so celice utrpeli med prvim tednom skladiščenja (0,71 log enot). V nadaljevanju skladiščenja nismo opazili večjih sprememb; po osmih tednih so pripravki v

ml vsebovali  $5,5 \cdot 10^6$  živih celic seva *Lb. gasseri* K7 (Slika 16). V pripravkih brez dodanih zaščitnih snovi je bilo celic manj (Slika 6). Bakteriocinska aktivnost je bila nespremenjena (128000 BA/ml) do četrtega tedna skladiščenja, ko smo opazili zmanjšanje bakteriocinske aktivnosti na 64000 BA/ml. Ugotovili smo, da dodatek askorbinske kisline pozitivno vpliva na ohranitev bakteriocinske aktivnosti, saj je bila v vzorcih brez dodanih zaščitnih snovi bakteriocinska aktivnost manjša; po osmih tednih le 32000 BA/ml (Slika 7 in Slika 17). Zaščitno sposobnost askorbinske kisline lahko primerjamo z zaščitno sposobnostjo laktoze v koncentraciji 5 in 10 % ter zaščitno sposobnostjo 20-odstotnega dodatka škroba (Priloga A4 in Priloga A5). Bakteriocinska aktivnost pripravka je bila enaka bakteriocinski aktivnosti pripravkov z dodatkom drugih zaščitnih snovi. Manjšo bakteriocinsko aktivnost smo ugotovili le pri pripravkih z glicerolom (4000 BA/ml) (Slika 15).

Zanimalo nas je tudi, če dodatek askorbinske kisline v koncentraciji 0,05 % poleg osnovnega zaščitnega sredstva vpliva na preživetje seva *Lb. gasseri* K7 in bakteriocinsko aktivnost pripravka med skladiščenjem. Vzorce z dodatkom ene od zaščitnih snovi in askorbinske kisline smo analizirali po štirih in osmih tednih skladiščenja. Najmanj živih celic seva *Lb. gasseri* K7, po štiri tedenskem skladiščenju, smo ugotovili pri kombinaciji glicerola in askorbinske kisline, ko se je začetno število celic  $8,8 \cdot 10^8$  ke/ml zmanjšalo na  $1,4 \cdot 10^3$  ke/ml, po osmih tednih skladiščenja pa smo ugotovili manj kot 10 ke/ml. Največ celic je preživel v pripravkih, ki smo jim kot zaščitno sredstvo dodali kombinacijo 20 % škroba in 0,05 % askorbinske kisline. Po štirih tednih je preživel 7,74 log enot celic od začetnih 8,94 log enot, osemtedensko skladiščenje pa je preživel 7,46 log enot celic (Preglednica 5). Izgube so bile za 1,72 log enot manjše kot v pripravkih brez dodanih zaščitnih snovi in veliko manjše kot pri drugih zaščitnih snoveh. Ob primerjavi rezultatov, ko smo dodali samo osnovno zaščitno snov, s tistimi, ki smo jim dodali tudi askorbinsko kislino, lahko ugotovimo, da dodatek askorbinske kisline bistveno ne prispeva k boljši zaščiti celic med skladiščenjem pripravkov. Za 1,33 log enot in 0,88 log enot višje vrednosti števila živih celic seva *Lb. gasseri* K7 smo ugotovili le pri 5 % in 15 % dodanega škroba (Preglednica 5 in Priloga A5). Druge razlike so bile precej manjše. Kjer so bile izgube velike že prej, dodatek askorbinske kisline ni vplival na povečano preživetje. Tudi najmanjše vrednosti bakteriocinske aktivnosti pripravka smo izmerili pri kombinaciji glicerola in askorbinske kisline (4000 BA/ml). Lahko ugotovimo, da je ta vrednost veliko manjša od vrednosti, ki smo jo izmerili pri drugih zaščitnih snoveh (64000 BA/ml). Dodatek askorbinske kisline ni prispeval k ohranjanju bakteriocinske aktivnosti pripravkov.

## 5.2 SKLEPI

- Toplotno obdelana sirotka, z dodatkom kvasnega ekstrakta (4 g/l) in tweena 80 (1 g/l), je dober medij za kultivacijo seva *Lb. gasseri* K7.
- Ob koncu eksponentne faze rasti je fermentacijska brozga v ml vsebovala  $8,8 \times 10^8$  živih celic seva *Lb. gasseri* K7, njena bakteriocinska aktivnost pa je bila 256 000 BA/ml.
- Med zamrzovanjem se je število živih celic seva *Lb. gasseri* K7 zmanjšalo za 1,42 log enote, med liofilizacijo pa še za 0,44 log enote. Postopek je torej preživel  $1,2 \times 10^7$  celic/ml oziroma samo 1,4 % celic, prisotnih v fermentacijski brozgi.
- Med zamrzovanjem in liofilizacijo je najboljšo zaščito celic seva *Lb. gasseri* K7 zagotovil 20-odstotni dodatek saharoze. Postopek je preživel  $2,2 \times 10^8$  celic/ml ali 24,9 %, vendar pa je bil dodatek saharoze neučinkovit pri zaščiti celic med skladiščenjem liofiliziranih pripravkov, ki so po 8-ih tednih v ml vsebovali od  $9,1 \times 10^5$  živih celic do manj kot  $10^4$  živih celic, kar je manj kot 0,1 % celic iz fermentacijske brozge.
- Med skladiščenjem je najboljšo zaščito celic seva *Lb. gasseri* K7 zagotavljal 20-odstotni dodatek škroba, saj je 8-tedensko skladiščenje pripravkov preživel  $3 \times 10^7$  celic/ml ali 3,4 % celic iz fermentacijske brozge.
- Med postopkom liofilizacije se je bakteriocinska aktivnost fermentacijske brozge razpolovila (iz 256 000 BA/ml na 128 000 BA/ml) ne glede na dodano zaščitno snov.
- Liofilizirani pripravki z dodatkom škroba so ohranili enako bakteriocinsko aktivnost še po 4-ih tednih skladiščenja (128 000 BA/ml), ponovno zmanjšanje BA pa smo ugotovili po 8-ih tednih skladiščenja (64 000 BA/ml).
- Dodatek askorbinske kisline ni značilno povečal zaščitnega učinka preskušanih zaščitnih snovi niti pri zaščiti celic niti pri ohranjanju bakteriocinske aktivnosti liofiliziranih pripravkov.

## 6 POVZETEK

V raziskavi smo proučevali vpliv dodatka nekaterih zaščitnih snovi na preživetje seva *Lactobacillus gasseri* K7 in bakteriocinsko aktivnost pripravka med liofilizacijo in skladiščenjem. Uporabili smo 5, 10, 15 in 20 % dodatek saharoze, 5 in 10 % dodatek laktoze, 5, 10, 15 in 20 % dodatek škroba, 5 % dodatek glicerola in askorbinsko kislino (0,05 %). Preživetje in bakteriocinsko aktivnost pripravka smo ugotavljali po zamrzovanju (pred liofilizacijo), po liofilizaciji in enkrat na teden med osemtedenskim skladiščenjem. V pripravkih, ki smo jim poleg osnovnih zaščitnih snovi dodali še 0,05 % askorbinske kisline, smo preživetje in bakteriocinsko aktivnost ugotavljali po štirih in osmih tednih skladiščenja. Za ugotavljanje učinka dodanih zaščitnih snovi smo za primerjavo liofilizirali tudi vzorce brez dodanih zaščitnih snovi. Število bakterij ob koncu fermentacije in število preživelih bakterij smo ugotavljali s štetjem kolonij na ploščah. Bakteriocinsko aktivnost po fermentaciji in liofiliziranih pripravkov smo ugotavljali glede na stopnjo inhibicije seva *Lb. sakei* NCDO 2174, v primerjavi s kontrolo. Sev *Lb. gasseri* K7 smo namnožili v bioreaktorju pri konstantni vrednosti pH 5,75 in temperaturi 37 °C, v gojišču sirotke z dodatkom kvasnega ekstrakta in tweena 80. Fermentacijo smo zaključili po koncu eksponentne faze. Pri saharozi postopek liofilizacije ni močneje poškodoval celic, 0,95 log enot celic pri 15 % dodatku. Med skladiščenjem smo ugotovili, da so bile izgube do četrtega tedna manjše pri 15 in 20 % koncentraciji (1,64 do 1,93 log enot), po osmem tednu pa pri 5 in 10 % (2,03 do 2,61 log enot). Po osmih tednih je vrednost bakteriocinske aktivnosti znašala 64 000 BA/ml pri 5 in 10 % koncentraciji in 32 000 BA/ml pri 15 in 20 %. Med liofilizacijo vzorcev z dodatkom laktoze je odmrlo najmanj celic pri 10 % dodatku (0,94 log enot). Po štirih tednih se je število celic zmanjšalo za 1,01 log enot pri 5 % dodatku oz. 1,53 log enot pri 10 % dodatku, po osmih pa 1,06 log enot pri 5 % dodatku oz. 2,07 log enot pri 10 % dodatku laktoze. Po osmih tednih je pri obeh koncentracijah bakteriocinska aktivnost znašala 64 000 BA/ml. Pri dodatku škroba je celice med liofilizacijo in skladiščenjem najbolje zaščitil 20 % dodatek, saj je 8-tedensko skladiščenje pripravkov preživel 3·10<sup>7</sup> celic/ml ali 3,4 % celic iz fermentacijske brozge. Liofilizirani pripravki z dodatkom škroba so ohranili visoko bakteriocinsko aktivnost še po 4-ih tednih skladiščenja (128 000 BA/ml), po 8-ih tednih skladiščenja pa se je bakteriocinska aktivnost zmanjšala na 64 000 BA/ml. Dodatek glicerola je dobro zaščitil celice med postopkom liofilizacije, kot zelo slabo zaščitno sredstvo pa se je izkazal med skladiščenjem pripravkov. Pri vzorcih z dodatkom askorbinske kisline nismo opazili zmanjšanja števila celic v večjem obsegu (0,91 log enot po osmih tednih skladiščenja) in tudi bakteriocinska aktivnost se je ohranila na visoki ravni (64 000 BA/ml). Pri kombinaciji osnovnih zaščitnih snovi (saharaza, laktoza, škrob, glicerol) z askorbinsko kislino smo ugotovili najboljšo učinkovitost pri kombinaciji škroba (20 %) in askorbinske kisline. Preživel je 2,9·10<sup>7</sup> celic/ml, kar je zelo podobno kot pri samem dodatku škroba. Iz dobljenih rezultatov lahko zaključimo, da je bil od preskušanih zaščitnih snovi pri zaščiti celic seva *Lb. gasseri* K7 in ohranjanju bakteriocinske aktivnosti liofiliziranih pripravkov najučinkovitejši škrob .

## 7 VIRI

Abadias M., Benabarre A., Teixidó N., Usall J., Viñas I. 2001. Effect of freeze drying and protectants on viability of the biocontrol yeast *Candida sake*. *International Journal of Food Microbiology*, 65: 173–182

Ananta E., Knorr D. 2004. Evidence on the role of protein biosynthesis in the induction of heat tolerance of *Lactobacillus rhamnosus* GG by pressure pre-treatment. *International Journal of Food Microbiology*, 96: 307–313

Ananta E., Volkert M., Knorr D. 2005. Cellular injuries and storage stability of spray-dried *Lactobacillus rhamnosus* GG. *International Dairy Journal*, 15, 4: 399–409

Andersen A.B., Fog-Petersen M.S., Larsen H., Skibsted L.H. 1999. Storage stability of freeze-dried starter cultures (*Streptococcus thermophilus*) as related to physical state of freezing matrix. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 32: 540–547

Annous B.A., Kozempel M.F., Kurantz M.J. 1999. Changes in membrane fatty acid composition of *Pediococcus* sp. strain NRRL B-2354 in response to growth conditions and its effect on thermal resistance. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 7: 2857–2862

Avonts L., Van Uytven E., De Vuyst L. 2004. Cell growth and bacteriocin production of probiotic *Lactobacillus* strains in different media. *International Dairy Journal*, 14: 947–955

Axelsson L. 1998. Lactic acid bacteria: Classification and physiology. V: Lactic acid bacteria. Microbiology and functional aspects. Salminen S., von Wright A. (eds.). New York, Basel, Hong Kong, Marcel Dekker, Inc.:1–22

Bâati L., Fabre-Gea C., Auriol D., Blanc P.J. 2000. Study of the cryotolerance of *Lactobacillus acidophilus*: Effect of culture and freezing conditions on the viability and cellular protein levels. *International Journal of Food Microbiology*, 59: 241–247

Beney L., Gervais P. 2001. Influence of the fluidity of the membrane on the response of microorganisms to environmental stresses. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57: 34–42

Bernardeau M., Vernoux J.P., Gueguen M. 2002. Safety and efficacy of probiotic lactobacilli in promoting growth in post-weaning Swiss mice. *International Journal of Food Microbiology*, 77, 1–2: 19–27

Bogovič Matijašič B. 1998 Bacteriocines of *Lactobacillus* LF221. Zbornik Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, Kmetijstvo (Zootehnika), 72: 113–121

Bogovič Matijašič B., Rogelj I. 1999. Bacteriocinogenic activity of lactobacilli isolated from cheese and baby faeces. Food Technology and Biotechnology, 37, 2: 93–100

Bogovič Matijašič B., Rogelj I. 2000. *Lactobacillus* K7- A new candidate for a probiotic strain. Food Technology and Biotechnology, 38, 2: 113–119

Bogovič Matijašič B., Stojković S., Salobir J., Malovrh Š., Rogelj I. 2004. Evaluation of the *Lactobacillus gasseri* K7 and LF221 strains in weaned piglets for their possible probiotic use and their detection in the faeces. Animal Research, 53: 35–44

Brennan J.G. 2003. Spray drying. V: Encyclopedia of food sciences and nutrition. Vol 2. 2<sup>nd</sup> ed. Caballero B., Trugo L.C., Finglas P.M. (eds.). Amsterdam, Academic Press Elsevier Science: 1929–1340

Carvalho A.S., Silva J., Ho P., Teixeira P., Malcata F.X., Gibbs P. 2002. Survival of freeze-dried *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* during storage in the presence of protectants. Biotechnology Letters, 24: 1587–1591

Carvalho A.S., Silva J., Ho P., Teixeira P., Malcata F.X., Gibbs P. 2003a. Effects of addition of sucrose and salt, and of starvation upon thermotolerance and survival during storage of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. Journal of Food Science, 68, 8 :2538–2541

Carvalho A.S., Silva J., Ho P., Teixeira P., Malcata F.X., Gibbs P. 2003b. Effect of various growth media upon survival during storage of freeze-dried *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus durans*. Journal of Applied Microbiology, 94: 947–952

Carvalho A.S., Silva J., Ho P., Teixeira P., Malcata F.X., Gibbs P. 2003c. Protective effect of sorbitol and monosodium glutamate during storage of freeze-dried lactic acid bacteria. Lait, 83: 203–210

Carvalho A.S., Silva J., Ho P., Teixeira P., Malcata F.X., Gibbs P. 2004a. Effects of various sugars added to growth and drying media upon thermotolerance and survival throughout storage of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. Biotechnology Progress, 20: 248–254



Carvalho A.S., Silva J., Ho P., Teixeira P., Malcata F.X., Gibbs P. 2004b. Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 14: 835–847

Castro H.P., Teixeira P.M., Kirby R. 1997. Evidence of membrane damage in *Lactobacillus bulgaricus* following freeze drying. *Journal of Applied Microbiology*, 82: 87–94

Cleveland J., Montville T.J., Nes I.F., Chikindas M.L. 2001. Bacteriocins: natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 71: 1–20

Costa E., Usall J., Teixidó N., Garcia N., Viñas I. 2000. Effect of protective agents, rehydration media and initial cell concentration on viability of *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 subjected to freeze-drying. *Journal of Applied Microbiology*, 89: 793–800

Čanžek Majhenič A., Bogovič Matijašič B., Rogelj I. 2003. Chromosomal location of the genetic determinants for bacteriocins produced by *Lactobacillus gasseri* K7. *Journal of Dairy Research*, 70: 199–203

Deegan L.H., Cotter P.D., Hill C., Ross P., 2006. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *International Dairy Journal*, 16, 9: 1058–1071

Degeest B., Vaningelgem F., De Vuyst L. 2001 Microbial physiology, fermentation kinetics, and process engineering of heteropolysaccharide production by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 11: 747–757

Delgado A., Brito D., Peres C., Noé-Arroyo F., Garrido-Fernández A. 2005. Bacteriocin production by *Lactobacillus pentosus* B96 can be expressed as a function of temperature and NaCl concentration. *Food Microbiology*, 22, 6: 521–528

De Giulio B., Orlando P., Barba G., Coppola R., De Rosa M., Sada A., De Prisco P.P., Nazzaro F. 2005. Use of alginate and cryo-protective sugars to improve the viability of lactic acid bacteria after freezing and freeze-drying. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21: 739–746

Doloyres Y., Lacroix C. 2005. Technologies with free and immobilised cells for probiotic bifidobacteria production and protection. *International Dairy Journal*, 15: 973–988

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

- Eijsink V.G.H., Axelsson L., Diep D.B., Håvarstein L.S., Holo H., Nes I.F. 2002. Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81: 639–654
- Fernández Murga M.L., Cabrera G.M., Font de Valdez G., Disalvo A., Seldes A.M. 2000. Influence of growth temperature on cryotolerance and lipid composition of *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Applied Microbiology*, 88: 342–348
- Fonseca F., Béal C., Corrieu G. 2000. Method for quantifying the loss of acidification activity of lactic acid starters during freezing and frozen storage. *Journal of Dairy Research*, 67: 83–90
- Fonseca F., Béal C., Mihoub F., Marin M., Corrieu G. 2003. Improvement of cryopreservation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CFL1 with additives displaying different protective effects. *International Dairy Journal*, 13: 917–926
- Fonseca F., Passot S., Cunin O., Marin M. 2004. Collapse temperature of freeze-dried *Lactobacillus bulgaricus* suspensions and protective media. *Biotechnology Progress*, 20: 229–238
- Gardiner G.E., O'Sullivan E., Kelly J., Auty M.A.E., Fitzgerald G.F., Collins J.K., Ross R.P., Stanton C. 2000. Comparative survival rates of human-derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salivarius* strains during heat treatment and spray drying. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 6: 2605–2612
- Giraffa G. 2002. Enterococci from foods. *FEMS Microbiology Reviews*, 26, 2: 163–171
- Hofvendahl K., Hahn-Hägerdal B. 2000. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme and Microbial Technology*, 26, 2-4: 87–107
- Kailasapathy K., Sureta B.S. 2004. Effect of storage on shelf life and viability of freeze-dried and microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium infantis* cultures. *Australian Journal of Dairy Technology*, 59, 3: 204–208
- Kets E.P.W., Teunissen P.J.M., De Bont J.A.M. 1996. Effect of compatible solutes on survival of lactic acid bacteria subjected to drying. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 1: 259–261
- Kimoto H., Ohmomo S., Okamoto T. 2002. Enhancement of bile tolerance in lactococci by Tween 80. *Journal of Applied Microbiology*, 92: 41–46

Klaenhammer T.R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 12: 39–85

Linders L.J.M., de Jong G.I.W., Meerdink G., van't Riet K. 1997. Carbohydrates and the dehydration inactivation of *Lactobacillus plantarum*: The role of moisture distribution and water activity. *Journal of Food Engineering*, 31, 2: 237–250

Mattila-Sandholm T., Myllärinen P., Crittenden R., Mogensen G., Fondén R., Saarela M. 2002. Technological challenges for future probiotic foods. *International Dairy Journal*, 12: 173–182

Monnet C., Béal C., Corrieu G. 2003. Improvement of the resistance of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* to freezing by natural selection. *Journal of Dairy Science*, 86: 3048–3053

Narvhus J.A. 2003. Lactic acid bacteria. V: *Encyclopedia of food sciences and nutrition*. Vol. 6. 2<sup>nd</sup> ed. Caballero B., Trugo L.C., Finglas P.M. (eds.). Amsterdam, Academic Press Elsevier Science: 3465–3472

Oldenhof H., Wolkers W.F., Fonseca F., Passot S., Marin M. 2005. Effect of sucrose and maltodextrin on physical properties and survival of air-dried *Lactobacillus bulgaricus*: an in situ fourier transform infrared spectroscopy study. *Biotechnology Progress*, 21: 885–892

Palmfeldt J., Hähn-Hägerdal B. 2000. Influence of culture pH on survival of *Lactobacillus reuteri* subjected to freeze-drying. *International Journal of Food Microbiology*, 55: 235–238

Patist A., Zoerb H. 2005. Preservation mechanisms of trehalose in food and biosystems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 40: 107–113

Perko B., Bogovič Matijašić B., Rogelj I. 2002. Izdelava probiotičnega sira z dodatkom *Lactobacillus gasseri* LF221 (Rif<sup>r</sup>) in K7 (Rif<sup>r</sup>). Zbornik Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, Kmetijstvo (Zootehnika), 80: 61–70

Perry S.F. 1998. Freeze-drying and cryopreservation of bacteria. *Molecular Biotechnology*, 9: 59–64

Picot A., Lacroix C. 2004. Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Dairy Journal*, 14: 505–515

Pomeranz Y. 1992. Whey: composition, properties, processing and uses. V: Encyclopedia of food science and technology. Vol. 3. Hui H.Y. (ed). New York, J. Wiley & Sons: 2835–2845

Prasad J., McJarrow P., Gopal P. 2003. Heat and osmotic stress responses of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20) in relation to viability after drying. Applied and Environmental Microbiology, 69, 2: 917–925

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

Rolf D.J., Hoover D.G. 2000. Bacteriocines. V: Encyclopedia of microbiology. Vol.1. 2<sup>nd</sup> ed. Lederberg J. (ed.). New York, The Rockefeller University: 383–397

Saarela M., Virkajärvi I., Alakomi H.-L., Mattila-Sandholm T., Vaari A., Suomalainen T., Mättö D. 2005. Influence of fermentation time, cryoprotectant and neutralization of cell concentrate on freeze-drying survival, storage stability, and acid and bile exposure of *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* cells produced without milk-based ingredients. Journal of Applied Microbiology, 98: 1330–1339

Schoug A., Ollson J., Carlfors J., Schnürer J., Håkansson S. 2006. Freeze-drying of *Lactobacillus coryniformis* Si-3- effects of sucrose concentration, cell density, and freezing rate on cell survival and thermophysical properties. Cryobiology, 53,1: 119-127

Silva J., Carvalho A.S., Ferreira R., Vitorino R., Amado F., Domingues P., Teixeira P., Gibbs P.A. 2005. Effect of the pH of growth on the survival of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* to stress conditions during spray-drying. Journal of Applied Microbiology, 98, 3: 775–782

Souzu H. 2000. Freeze-drying of microorganisms. V: Encyclopedia of microbiology. Vol. 2. 2<sup>nd</sup> ed. Lederberg J. (ed.). New York, Rockefeller University: 431–437

Stanton C., Ross R.P., Fitzgerald G.F., Sinderen D.V. 2005. Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. Current Opinion in Biotechnology, 16: 198–203

Tanghe A., van Dijck P., Thevelein J.M. 2006. Why do microorganisms have aquaporins. Trends in Microbiology, 14, 2: 78–85

Tannock G.W. 1997. Probiotic properties of lactic-acid bacteria: plenty of scope for fundamental R&D. *Trends in Biotechnology*, 15, 7: 270–274

Teixeira P., Castro H., Kirby R. 1995. Spray drying as a method for preparing concentrated cultures of *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of Applied Bacteriology*, 78: 456–462

Teixeira P., Castro H., Kirby R., 1996. Evidence of membrane lipid oxidation of spray-dried *Lactobacillus bulgaricus* during storage. *Letters in Applied Microbiology*, 22: 34–38

Tršić-Milanović N., Kodžić A., Baras J., Dimitrijevič-Branković S. 2001. The influence of a cryoprotective medium containing glycerol on the lyophilization of lactic acid bacteria. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 66, 7: 435–441

Wang Y.-C., Yu R.-C. 2004. Viability of lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented soymilk after drying, subsequent rehydration and storage. *International Journal of Food Microbiology*, 93, 2: 209–217

Wisselink H.W., Weusthuis R.A., Eggink G., Hugenholtz J., Grobber G.J. 2002. Mannitol production by lactic acid bacteria: a review. *International Dairy Journal*, 12: 151–161

Zadow J.G. 2003. Whey and whey powders. V: *Encyclopedia of food sciences and nutrition*. Vol. 10. 2<sup>nd</sup> ed. Caballero B., Trugo L.C., Finglas P.M. (eds.). Amsterdam, Academic Press Elsevier Science: 6147–6170

Zayed G., Roos Y.H. 2004. Influence of trehalose and moisture content on survival of *Lactobacillus salivarius* subjected to freeze-drying and storage. *Process Biochemistry*, 39: 1081–1086

Zhao G., Zhang G. 2005. Effect of protective agents, freezing temperature, rehydration media on viability of malolactic bacteria subjected to freeze-drying. *Journal of Applied Microbiology*, 99: 333–338

Ziadi M., Touhami Y., Achour M., Thonart Ph., Hamdi M. 2005. The effect of heat stress on freeze-drying and conservation of *Lactococcus*. *Biochemical Engineering Journal*, 24: 141–145

## PRILOGE

Priloga A1: Spremljanje rasti *Lb. gasseri* K7 v sirotki z dodatkom tweena 80 in kvasnega ekstrakta pri temperaturi 37 °C, pH vrednosti 5,75, z merjenjem OD pri 600 nm

Čas merjenja (h)	Vrednost OD 600 nm
0	0,34
1	0,44
2	0,51
3	0,61
4	0,69
5	0,77
6	0,84
7	0,99
8	1,2
9	1,39
10	1,53
11	1,64
12	1,68

Priloga A2: Preživelost seva *Lb. gasseri* K7 in bakteriocinska aktivnost pripravka v mediju brez dodanih zaščitnih snovi pred liofilizacijo in po njej ter med 8-tedenskim skladiščenjem

Čas analize	log ke/ml	BA/ml
Po fermentaciji	8,94	256000
Pred liofilizacijo	7,52	128000
Po liofilizaciji	7,08	128000
Po 1. tednu	7,00	128000
Po 2. tednu	6,36	128000
Po 3. tednu	6,11	64000
Po 4. tednu	6,04	64000
Po 8. tednu	5,74	32000

Priloga A3: Preživelost seva *Lb. gasseri* K7 in bakteriocinska aktivnost pripravka v mediju z dodatkom saharoze (5, 10, 15 in 20 %) pred liofilizacijo in po njej ter med 8-tedenskim skladiščenjem

	Koncentracija saharoze							
	5 %		10 %		15 %		20 %	
Čas analize	log ke/ml	BA/ml	log ke/ml	BA/ml	log ke/ml	BA/ml	log ke/ml	BA/ml
Po fermentaciji	8,94	256000	8,94	256000	8,94	256000	8,94	256000
Pred liofilizacijo	8,32	128000	8,41	128000	8,59	128000	8,70	128000
Po liofilizaciji	7,99	128000	8,11	128000	8,00	128000	8,34	128000
Po 1. tednu	7,36	64000	7,50	64000	7,69	64000	8,08	64000
Po 2. tednu	6,80	128000	6,79	128000	7,00	128000	7,28	128000
Po 3. tednu	6,28	64000	5,99	128000	6,34	128000	6,98	128000
Po 4. tednu	5,86	64000	5,72	64000	6,36	128000	6,41	64000
Po 8. tednu	5,96	64000	5,50	64000	<4	32000	<4	32000

Priloga A4: Preživelost seva *Lb. gasseri* K7 in bakteriocinska aktivnost pripravka v mediju z laktozo (5 in 10 %) pred liofilizacijo in po njej ter med 8-tedenskim skladiščenjem

	Koncentracija laktoze			
	5 %		10 %	
Čas analize	log ke/ml	BA/ml	log ke/ml	BA/ml
Po fermentaciji	8,94	256000	9,84	256000
Pred liofilizacijo	8,15	128000	8,28	64000
Po liofilizaciji	7,86	64000	8,00	128000
Po 1. tednu	7,23	128000	7,75	64000
Po 2. tednu	6,98	128000	7,41	64000
Po 3. tednu	6,90	64000	7,04	64000
Po 4. tednu	6,85	128000	6,58	32000
Po 8. tednu	6,80	64000	6,04	64000

Priloga A5: Preživelost seva *Lb. gasseri* K7 in bakteriocinska aktivnost pripravka v mediju s škrobom (5, 10, 15, 20 %) pred liofilizacijo in po njej ter med 8-tedenskim skladiščenjem

	Koncentracija škroba							
	5 %		10 %		15 %		20 %	
Čas analize	log ke/ml	BA/ml	log ke/ml	BA/ml	log ke/ml	BA/ml	log ke/ml	BA/ml
Po fermentaciji	8,94	256000	8,94	256000	8,94	256000	8,94	256000
Pred liofilizacijo	8,77	128000	8,46	128000	8,46	128000	8,64	128000
Po liofilizaciji	8,11	128000	8,15	128000	8,08	128000	8,11	128000
Po 1. tednu	7,50	64000	7,77	32000	7,61	64000	7,88	64000
Po 2. tednu	7,18	64000	7,70	128000	7,25	128000	7,85	128000
Po 3. tednu	6,41	64000	7,68	128000	6,67	128000	7,75	128000
Po 4. tednu	6,28	64000	6,96	64000	6,58	64000	7,32	128000
Po 8. tednu	6,08	64000	7,18	64000	6,44	64000	7,48	64000

Priloga A6: Preživelost seva *Lb. gasseri* K7 in bakteriocinska aktivnost pripravka v mediju z glicerolom (5 %) pred liofilizacijo in po njej ter med 8-tedenskim skladiščenjem

	Konc. glicerola	
	5 %	
Čas analize	log ke/ml	BA/ml
Po fermentaciji	8,94	256000
Pred liofilizacijo	8,72	128000
Po liofilizaciji	8,18	128000
Po 1. tednu	7,00	32000
Po 2. tednih	5,40	16000
Po 3. tednih	4,32	16000
Po 4. tednih	3,11	8000
Po 8. tednih	1,00	4000

Priloga A7: Preživelost seva *Lb. gasseri* K7 in bakteriocinska aktivnost pripravka v mediju z askorbinsko kislino pred liofilizacijo in po njej ter med 8-tedenskim skladiščenjem

Čas analize	Konc. askor. ksl.	
	log ke/ml	BA/ml
	0,05 %	
Po fermentaciji	8,94	256000
Pred liofilizacijo	7,71	128000
Po liofilizaciji	7,65	128000
Po 1. tednu	6,94	128000
Po 2. tednu	6,99	128000
Po 3. tednu	7,14	128000
Po 4. tednu	6,99	64000
Po 8. tednu	6,74	64000



## ZAHVALA

Prof. dr. Ireni Rogelj se zahvaljujem za mentorstvo pri dipolmski nalogi, za pomoč in strokovno vodenje.

Hvala dr. Andreji Miklič za pomoč pri vodenju eksperimentalnega dela in izdelavi diplomskega dela.

Prof. dr. Petru Rasporju se zahvaljujem za recenzijo diplomske naloge.

Hvala Katedri za mlekarstvo Oddelka za Zootehniko za pomoč.

Hvala gospe Marjetki Šivic za jezikovni pregled.

Velika zahvala očetu, mami in sestri za podporo tekom študija.

Hvala tudi vsem drugim, ki Vas nisem omenil, za pomoč in vzpodbudne besede.

Na koncu bi se rad še enkrat zahvalil vsem. Vsak od zgoraj omenjenih je pomembno prispeval, da sedaj s ponosom stojim na cilju.