

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Martina MODIC

**VPLIV TANINSKEGA PRIPRAVKA FARMATAN® NA RAST IN
ENCIMSKO AKTIVNOSTI BAKTERIJ *Butyrivibrio fibrisolvens* IN
*Clostridium proteoclasticum***

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**INFLUENCE OF TANNIN PREPARATION FARMATAN® ON
GROWTH AND ENZYME ACTIVITIES OF BACTERIA *Butyrivibrio*
fibrisolvens AND *Clostridium proteoclasticum***

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2007

Diplomsko delo predstavlja zaključek univerzitetnega medoddelčnega dodiplomskega študija mikrobiologije. Opravljeno je bilo na Katedri za mikrobiologijo in mikrobnobiotehnologijo Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete v Domžalah.

Študijska komisija univerzitetnega dodiplomskega študija mikrobiologije je dne 20. 10. 2005 odobrila temo in naslov diplomske naloge in za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Romano Marinšek Logar. Za recenzenta je bil imenovan prof. dr. Gorazd Avguštin.

Mentorica: prof. dr. Romana Marinšek Logar

Recenzent: prof. dr. Gorazd Avguštin

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Franc Viktor Nekrep
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Članica: prof. dr. Romana Marinšek Logar
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Gorazd Avguštin
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Martina Modic

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 579.22:577.15:636.2./3.085 (043) = 863
KG	vampni mikroorganizmi/ <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> / <i>Clostridium proteoclasticum</i> /tanini/Farmatan®/rast bakterij/encimi/encimske aktivnosti
AV	MODIC, Martina
SA	MARINŠEK LOGAR, Romana (mentor)/AVGUŠTIN, Gorazd (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2007
IN	VPLIV TANINSKEGA PRIPRAVKA FARMATAN® NA RAST IN ENCIMSKE AKTIVNOSTI BAKTERIJ <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> IN <i>Clostridium proteoclasticum</i>
TD	Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
OP	XII, 59 str., 1 pregl., 22 sl., 95 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Vamp je stabilen in dinamičen ekosistem, v katerem se je izoblikovala kompleksna mikrobna združba, ki omogoča svojemu gostitelju razgradnjo rastlinskih polisaharidov, za katere sam nima encimov. V vamp s krmo prihajajo tudi za vampne mikroorganizme škodljive snovi. Med njimi so tudi tanini. To je velika in heterogena skupina polifenolnih molekul. Njihova skupna lastnost je, da so sposobni tvorbe stabilnih kompleksov z raznimi makromolekulami, kar ima na razgradljivost hranil in na vampne mikroorganizme različne vplive. V manjših koncentracijah tanini s tvorbo kompleksov s proteini le-te ščitijo pred neželeno razgradnjo. Na ta način se pri živali poveča oskrba z beljakovinami in posledično tudi prirast živali. Večje koncentracije pa lahko negativno vplivajo na metabolne procese ter tudi na samo zdravje živali. V diplomski nalogi smo preverili vpliv taninskega pripravka Farmatan® na vampni bakteriji, <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> in <i>Clostridium proteoclasticum</i>. Uporabili smo tri koncentracije Farmatana® (0,05 g/l, 0,25 g/l in 1,00 g/l), vpliv smo preverjali pri 7 inkubacijskih časih (5,10, 13,16, 20, 32 in 48 urah). Preverjali smo vpliv na rast in encimske aktivnosti. Rast smo ugotavljali z merjenjem količine celičnih proteinov. Pri encimskih aktivnostih smo spremljali celične in izvencelične aktivnosti amilaz, karboksimetil celuloz (CMC-az), ksilanaz in proteaz. Farmatan® je vplival na rast obeh bakterij, ta se je povečala. Pri <i>B. fibrisolvens</i> smo opazili velik vpliv na celične aktivnosti vseh encimov, predvsem zaviralen. Pri celični amilolitični aktivnosti z večanjem koncentracije taninov aktivnosti prej dosežejo maksimalne vrednosti. Inhibicija se je v največji meri izražala pri proteolitični aktivnosti. Pri <i>C. proteoclasticum</i> vpliv ni bil tako izrazit. V večini primerov so tanini inhibirali encimske aktivnosti. Na proteolizo ni bilo opaziti značilnega vpliva. Z naraščanjem koncentracije se je vpliv Farmatana® večal. Obseg vpliva na bakteriji je odvisen od lastnosti posamezne vrste ter od koncentracije njihovih encimov.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 579.22:577.15:636.2./3.085 (043) = 863
CX rumen microorganisms/*Butyrivibrio fibrisolvens*/*Clostridium proteoclasticum*/tannins/ Farmatan®/bacterial growth/ enzymes/enzyme activity
AU MODIC, Martina
AA MARINŠEK LOGAR, Romana (supervisor)/AVGUŠTIN, Gorazd (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY 2007
TI INFLUENCE OF TANNIN PREPARATION FARMATAN® ON GROWTH AND ENZYME ACTIVITIES OF BACTERIA *Butyrivibrio fibrisolvens* AND *Clostridium proteoclasticum*
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XII, 59 p., 1 t., 22 fig., 95 ref.
LA sl
AL sl/en

AB Rumen is stable and dynamic ecosystem, containing of complex microbial community. Rumen microorganisms can degrade most of the plant polymers present in the food. During the digestion, organisms in rumen get in contact with different substances, some of them acting as antinutrients. Tannins are naturally occurring plant polyphenols with heterogeneous structures and molekular weight. Their main characteristic is that they can bind and form stable complexes with various macromolecules. This can have an influence on the nutritive value of the feed and also on the digestion processes. Low concentrations of tannins reduce rumen forage protein degradation due to reversible binding to proteins, which can result in increased growth rate and production of ruminants. On the other hand, high concentrations generally reduce voluntary feed intake, digestibilities and also health status of animal. The main goal of our experiment was to evaluate the influence of tannin preparation Farmatan® on growth and enzyme activities of two rumen bacteria, *Butyrivibrio fibrisolvens* and *Clostridium proteoclasticum*. We have tested 3 different concentrations of Farmatan® i.e. 0,05 g/l, 0,25 g/l and 1,00 g/l. The measurements have been taken at 7 different times of incubation – after 5, 10, 13, 16, 20 32 and 48 hours. Cell growth (proteins) and enzyme activities of xylanases, carboxymethylcellulases, amylases and proteases were measured in supernatants and cell extracts. Farmatan® improved growth of both tested bacterial species. *B. fibrisolvens* and *C. proteoclasticum* cellular xylanase, CMC-ase and protease activities were significantly reduced, specially at concentrations 0,25 and 1,00 g/l. Proteolytic activity of *B. fibrisolvens* has been influenced at the highest rate unlike at *C. proteoclasticum*. The degree of tannins influence on bacteria depends on concentration of tannins and on specific bacterial properties.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	Error! Bookmark not defined.
KAZALO PRILOG	XI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XIV
1 UVOD	1
1.1 GLAVNE HIPOTEZE IN NAMEN DELA	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 VAMPNI EKOSISTEM	3
2.1.1 Zgradba in funkcija želodca	3
2.1.2 Razmere v vampu	3
2.1.3 Proces prebave	4
2.1.4 Mikrobna razgradnja krme	4
2.1.4.1 Škrob in amilolitični mikroorganizmi	5
2.1.4.2 Celuloza in celulolitični mikroorganizmi	5
2.1.4.3 Hemiceluloza in ksilanolitični mikroorganizmi	6
2.1.4.4 Dušikove spojine in proteolitični mikroorganizmi	6
2.2 <i>Butyrivibrio</i>	7
2.2.1 <i>B. fibrisolvens</i>	8
2.3 <i>Clostridium</i>	9
2.3.1 <i>C. proteoclasticum</i>	9
2.4 SEKUNDARNI METABOLITI RASTLIN V PREHRANI PREŽVEKOVALCEV	10
2.4.1 Tanini	10
2.4.1.1 Kondenzirani tanini	11
2.4.1.2 Hidrolizirajoči tanini	12
2.5 VLOGA TANINOV V PREBAVNEM TRAKTU ŽIVALI	12
2.5.1 Vpliv delovanja taninov na prirast živali	12
2.5.2 Vpliv vezave taninov s proteini na proteolizo	13
2.5.3 Vpliv vezave taninov na razgradnjo ogljikovih hidratov	14
2.5.4 Vpliv taninov na rast in encimske aktivnosti mikroorganizmov	14

2.5.4.1 Vpliv taninov na morfologijo mikroorganizmov	15
2.5.5 Vpliv taninov na metabolizem vitaminov in mineralov	15
2.5.6 Vloga taninov pri preprečevanju napenjanja	15
2.5.7 Prilagoditev živali na tanine	16
2.5.8 Prilagoditev mikroorganizmov na tanine	16
2.5.9 Uporabnost taninov	17
3. MATERIALI IN METODE	18
3.1 GOJENJE BAKTERIJ	18
3.1.1 Bakterijski sevi	18
3.1.2 Gojišče	18
3.1.3 Tehnike gojenja in shranjevanja anaerobnih kultur	19
3.1.4 Priprava raztopin Farmatana® ter priprava vzorcev bakterijskih kultur za določanje rasti in encimskih aktivnosti	19
3.2 SPREMLJANJE RASTI BAKTERIJSKIH KULTUR	20
3.2.1 Ugotavljanje koncentracije proteinov kot mera rasti bakterijskih kultur	20
3.3 KVANTITATIVNO DOLOČANJE ENCIMSKIH AKTIVNOSTI	20
3.3.1 Merjenje amilazne encimske aktivnosti	20
3.3.2 Merjenje CMC-azne encimske aktivnosti	21
3.3.3 Merjenje ksilanazne encimske aktivnosti	22
3.3.4 Merjenje proteazne encimske aktivnosti	22
3.5 SHEMATSKI POTEK DELA	24
4. REZULTATI	25
4.1 RAST IN ENCIMSKA AKTIVNOSTI BAKTERIJE <i>B. fibrisolvens</i>	25
4.2 RAST IN ENCIMSKA AKTIVNOSTI BAKTERIJE <i>C. proteoclasticum</i>	31
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	38
5.1 VPLIV FARMATANA® NA RAST BAKTERIJ <i>B. fibrisolvens</i> IN <i>C. proteoclasticum</i>	38
5.2 VPLIV FARMATANA® NA AMIOLITIČNO AKTIVNOST BAKTERIJ <i>B. fibrisolvens</i> IN <i>C. proteoclasticum</i>	40
5.3 VPLIV FARMATANA® NA CMC-azno AKTIVNOST BAKTERIJ <i>B. fibrisolvens</i> IN <i>C. proteoclasticum</i>	41
5.4 VPLIV FARMATANA® NA KSILANOLITIČNO AKTIVNOST BAKTERIJ <i>B. fibrisolvens</i> IN <i>C. proteoclasticum</i>	42
5.5 VPLIV FARMATANA® NA PROTEOLITIČNO AKTIVNOST BAKTERIJ <i>B. fibrisolvens</i> IN <i>C. proteoclasticum</i>	43

5.6 SKLEPI	47
6 POVZETEK	49
7 VIRI	51
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

STR.

Preglednica 1: Oznake bakterijskih sevov, na katerih smo ugotavljali vpliv taninskega pripravka Farmatan®	18
---	----

KAZALO SLIK

	STR.
Slika 1:	Shematski prikaz mikrobne razgradnje krmnih proteinov in usoda končnih produktov vampu 7
Slika 2:	Struktura polimernega kondenziranega tanina, ki prikazuje oznake obročev in ogljikovih atomov ter 4-8 in 4-6 interflavonoidnih vezi 11
Slika 3:	Strukturni formuli dveh podskupin hidrolizirajočih taninov - galotanina in elagitanina 12
Slika 4:	Shema poteka dela pri preučevanju vpliva taninskega pripravka Farmatan® na rast in encimske aktivnosti vampnih bakterij <i>B. fibrisolvens</i> in <i>C. proteoclasticum</i> 24
Slika 5:	Rast bakterijske kulture <i>B. fibrisolvens</i> pri treh različnih dodanih koncentracijah taninskega pripravka Farmatan® (0,05, 0,25 in 1,00 g/l) in kontrolni kulturi brez dodanega tanina 25
Slika 6:	Specifična celična amilolitična aktivnost <i>B. fibrisolvens</i> pri treh različnih dodanih koncentracijah taninskega pripravka Farmatan® (0,05, 0,25 in 1,00 g/l) in kontrolni kulturi brez dodanega tanina 26
Slika 7:	Specifična izvencelična amilolitična aktivnost <i>B. fibrisolvens</i> pri treh različnih dodanih koncentracijah taninskega pripravka Farmatan® (0,05, 0,25 in 1,00 g/l) in kontrolni kulturi brez dodanega tanina 27
Slika 8:	Specifična celična CMC-azna aktivnost <i>B. fibrisolvens</i> pri treh različnih dodanih koncentracijah taninskega pripravka Farmatan® (0,05, 0,25 in 1,00 g/l) in kontrolni kulturi brez dodanega tanina 27
Slika 9:	Specifična izvencelična CMC-azna aktivnost <i>B. fibrisolvens</i> pri treh različnih dodanih koncentracijah taninskega pripravka Farmatan® (0,05, 0,25 in 1,00 g/l) in kontrolni kulturi brez dodanega tanina 28
Slika 10:	Specifična celična ksilanolitična aktivnost <i>B. fibrisolvens</i> pri treh različnih dodanih koncentracijah taninskega pripravka Farmatan® (0,05, 0,25 in 1,00 g/l) in kontrolni kulturi brez dodanega tanina 29
Slika 11:	Specifična izvencelična ksilanolitična aktivnost <i>B. fibrisolvens</i> pri treh različnih dodanih koncentracijah taninskega pripravka Farmatan® (0,05, 0,25 in 1,00 g/l) in kontrolni kulturi brez dodanega tanina 29
Slika 12:	Specifična celična proteolitična aktivnost <i>B. fibrisolvens</i> pri treh različnih dodanih koncentracijah taninskega pripravka Farmatan® (0,05, 0,25 in 1,00 g/l) in kontrolni kulturi brez dodanega tanina 30
Slika 13:	Specifična izvencelična proteolitična aktivnost <i>B. fibrisolvens</i> pri treh različnih dodanih koncentracijah taninskega pripravka Farmatan® (0,05, 0,25 in 1,00 g/l) in kontrolni kulturi brez dodanega tanina 31
Slika 14:	Rast bakterijske kulture <i>C. proteoclasticum</i> pri treh različnih dodanih koncentracijah taninskega pripravka Farmatan® (0,05, 0,25 in 1,00 g/l) in kontrolni kulturi brez dodanega tanina 31

Slika 15:	Specifična celična amilolitična aktivnost <i>C. proteoclasticum</i> pri treh različnih dodanih koncentracijah taninskega pripravka Farmatan® (0,05, 0,25 in 1,00 g/l) in kontrolni kulturi brez dodanega tanina	32
Slika 16:	Specifična izvencelična amilolitična aktivnost <i>C. proteoclasticum</i> pri treh različnih dodanih koncentracijah taninskega pripravka Farmatan® (0,05, 0,25 in 1,00 g/l) in kontrolni kulturi brez dodanega tanina	33
Slika 17:	Specifična celična CMC-azna aktivnost <i>C. proteoclasticum</i> pri treh različnih dodanih koncentracijah taninskega pripravka Farmatan® (0,05, 0,25 in 1,00 g/l) in kontrolni kulturi brez dodanega tanina	33
Slika 18:	Specifična izvencelična CMC-azna aktivnost <i>C. proteoclasticum</i> pri treh različnih dodanih koncentracijah taninskega pripravka Farmatan® (0,05, 0,25 in 1,00 g/l) in kontrolni kulturi brez dodanega tanina	34
Slika 19:	Specifična celična ksilanolitična aktivnost <i>C. proteoclasticum</i> pri treh različnih dodanih koncentracijah taninskega pripravka Farmatan® (0,05, 0,25 in 1,00 g/l) in kontrolni kulturi brez dodanega tanina	35
Slika 20:	Specifična izvencelična ksilanolitična aktivnost <i>C. proteoclasticum</i> pri treh različnih dodanih koncentracijah taninskega pripravka Farmatan® (0,05, 0,25 in 1,00 g/l) in kontrolni kulturi brez dodanega tanina	35
Slika 21:	Specifična celična proteolitična aktivnost <i>C. proteoclasticum</i> pri treh različnih dodanih koncentracijah taninskega pripravka Farmatan® (0,05, 0,25 in 1,00 g/l) in kontrolni kulturi brez dodanega tanina	36
Slika 22:	Specifična izvencelična proteolitična aktivnost <i>C. proteoclasticum</i> pri treh različnih dodanih koncentracijah taninskega pripravka Farmatan® (0,05, 0,25 in 1,00 g/l) in kontrolni kulturi brez dodanega tanina	37

KAZALO PRILOG

- PRILOGA A: Vir variabilnosti in statistična značilnost vplivov pri spremljanju rasti in encimskih aktivnosti bakterije *B. fibrisolvens*
- PRILOGA B1: Vpliv Farmatana® na rast bakterije *B. fibrisolvens* - ocenjene srednje vrednosti (SEE = 0.0513) in razlike (SEE = 0.145) s statistično značilnostjo razlik.
- PRILOGA B2: Vpliv Farmatana® na koncentracijo proteinov v supernatantu bakterijske kulture *B. fibrisolvens* - ocenjene srednje vrednosti (SEE=0.192) in razlike (SEE=0.542) s statistično značilnostjo razlik.
- PRILOGA B3: Koncentracija proteinov v supernatantu bakterijske kulture *B. fibrisolvens* pri treh različnih koncentracijah Farmatana® (0,05 g/l, 0,25 g/l in 1 g/l) in kontrolni kulturi brez dodanega tanina.
- PRILOGA C: Vpliv Farmatana® na specifično celično amilolitično aktivnost bakterije *B. fibrisolvens* – ocenjene srednje vrednosti (SEE = 0.0151) in razlike (SEE = 0.0426) s statistično značilnostjo razlik.
- PRILOGA D: Vpliv Farmatana® na specifično izvencelično amilolitično aktivnost bakterije *B. fibrisolvens* – ocenjene srednje vrednosti (SEE=0.0178) in razlike (SEE=0.0501) s statistično značilnostjo razlik.
- PRILOGA E: Vpliv Farmatana® na specifično celično CMC-azno aktivnost bakterije *B. fibrisolvens* – ocenjene srednje vrednosti (SEE=0.0224) in razlike (SEE=0.0632) s statistično značilnostjo razlik.
- PRILOGA F: Vpliv Farmatana® na specifično izvencelično CMC-azno aktivnost bakterije *B. fibrisolvens* – ocenjene srednje vrednosti (SEE=0.0026) in razlike (SEE=0.0072) s statistično značilnostjo razlik.
- PRILOGA G: Vpliv Farmatana® na specifično celično ksilanolitično aktivnost bakterije *B. fibrisolvens* – ocenjene srednje vrednosti (SEE = 0.342) in razlike (SEE = 0.964) s statistično značilnostjo razlik.
- PRILOGA H: Vpliv Farmatana® na specifično izvencelično ksilanolitično aktivnost bakterije *B. fibrisolvens* – ocenjene srednje vrednosti (SEE = 0.0418) in razlike (SEE = 0.1178) s statistično značilnostjo razlik.
- PRILOGA I: Vpliv Farmatana® na specifično celično proteolitično aktivnost bakterije *B. fibrisolvens* – ocenjene srednje vrednosti (SEE = 2668.4) in razlike (SEE = 7535.9) s statistično značilnostjo razlik.
- PRILOGA J: Vpliv Farmatana® na specifično izvencelično proteolitično aktivnost bakterije *B. fibrisolvens* – ocenjene srednje vrednosti (SEE = 8.82) in razlike (SEE = 24.88) s statistično značilnostjo razlik.
- PRILOGA K: Vir variabilnosti in statistična značilnost vplivov pri spremljanju rasti in encimskih aktivnosti bakterije *C. proteoclasticum*
- PRILOGA L1: Vpliv Farmatana® na rast bakterije *C. proteoclasticum* – ocenjene srednje vrednosti (SEE = 0.0240) in razlike (SEE = 0.0677) s statistično značilnostjo razlik.
- PRILOGA L2: Vpliv Farmatana® na koncentracijo proteinov v supernatantu bakterijske kulture *C. proteoclasticum* – ocenjene srednje vrednosti (SEE = 0.076) in razlike (SEE = 0.214) s statistično značilnostjo razlik.

- PRILOGA L3: Koncentracija proteinov v supernatantu bakterijske kulture *C. proteoclasticum* pri treh različnih koncentracijah Farmatana® (0,05 g/l, 0,25 g/l in 1 g/l) in kontrolni kulturi brez dodanega tanina.
- PRILOGA M: Vpliv Farmatana® na specifično celično amilolitično aktivnost bakterije *C. proteoclasticum* – ocenjene srednje vrednosti (SEE = 0.0591) in razlike (SEE = 0.1666) s statistično značilnostjo razlik.
- PRILOGA N: Vpliv Farmatana® na specifično izvencelično amilolitično aktivnost bakterije *C. proteoclasticum* – ocenjene srednje vrednosti (SEE = 0.01852) in razlike (SEE = 0.05224) s statistično značilnostjo razlik.
- PRILOGA O: Vpliv Farmatana® na specifično celično CMC-azno aktivnost bakterije *C. proteoclasticum* – ocenjene srednje vrednosti (SEE = 0.01200) in razlike (SEE = 0.03378) s statistično značilnostjo razlik.
- PRILOGA P: Vpliv Farmatana® na specifično izvencelično CMC-azno aktivnost bakterije *C. proteoclasticum* – ocenjene srednje vrednosti (SEE = 0.0025) in razlike (SEE = 0.0069) s statistično značilnostjo razlik.
- PRILOGA R: Vpliv Farmatana® na specifično celično ksilanolitično aktivnost bakterije *C. proteoclasticum* – ocenjene srednje vrednosti (SEE = 0.1925) in razlike (SEE = 0.5430) s statistično značilnostjo razlik.
- PRILOGA S: Vpliv Farmatana® na specifično izvencelično ksilanolitično aktivnost bakterije *C. proteoclasticum* – ocenjene srednje vrednosti (SEE = 0.0352) in razlike (SEE = 0.0992) s statistično značilnostjo razlik.
- PRILOGA T: Vpliv Farmatana® na specifično izvencelično proteolitično aktivnost bakterije *C. proteoclasticum* – ocenjene srednje vrednosti (SEE = 2.28) in razlike (SEE = 6.44) s statistično značilnostjo razlik.
- PRILOGA U: Meritve pH kulture *Butyrivibrio fibrisolvens* po 24 in 48 urni inkubaciji v modificiranem M2 gojišču z dodanim Farmatanom® s končnimi koncentracijami 0.5, 0.25 ter 1.00 g/l ter pri kontrolni kulturi brez dodanega taninskega pripravka.
- PRILOGA V: Izračunane srednje vrednosti specifične celične proteolitične aktivnosti bakterije *C. proteoclasticum*

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ΔA	Koncentracija razgrajenega azokazeina, ki je posledica delovanja encimov v vzorcih (razlika koncentracije vzorca in negativne kontrole)
AK	aminokisline
ATTC	ang.: American Type Culture Collection, Rockville; ameriška zbirka tipskih kultur
<i>B. fibrisolvens</i>	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>
BSA	ang.: bovine serum albumin, goveji serumski albumin
CMC	karboksimetil celuloza
CMC-aze	karboksimetil celulaze
<i>C. proteoclasticum</i>	<i>Clostridium proteoclasticum</i>
Da	dalton, enota za molekulsko maso proteinov
DNK	deoksiribonukleinska kislina
DSM	nem.: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig; nemška zbirka mikroorganizmov in celičnih kultur
DTT	ditiotreitol
h	ura
kat	katal, enota za količino encima, ki sprosti 1 mol produktov v 1 sekundi
mV	milivolt, enota za električno napetost
PAHBAH	hidrazid parahidroksibenzojske kisline
PEG	polietilenglikol
PROT	koncentracija proteinov
RS	reducirajoči sladkorji
ΔRS	količina sproščenih reducirajočih sladkorjev zaradi delovanja encimov v vzorcih (razlika koncentracij vzorca in negativne kontrole)
SEE	standardna napaka ocene
TCA	trikloroacetna kislina
t _g	podvojevalni čas
U	ang.: unit, enota – količina encima, ki razgradi 1 μg azokazeina v 1 uri

1 UVOD

Živinoreja je zaradi naravnih danosti v Sloveniji še vedno prevladujoča kmetijska panoga. Kot druge gospodarske panoge, se tudi kmetijska dejavnost v današnjem času sooča z velikimi spremembami in novimi izzivi. Po eni strani napredki v tehnologiji omogočajo razvoj modernega in proizvodno učinkovitega kmetijstva, po drugi strani pa se povečujejo zahteve potrošnikov. Z zavedanjem ljudi o pomembnosti ohranjanja naravnega okolja in o skrbi za lastno zdravje, se pojavljajo potrebe po čimbolj naravnem načinu pridelave hrane. Za doseg te ciljev je zelo pomembno vzajemno sodelovanje različnih strok, tako iz naravoslovnih kot tudi družboslovnih ved. Delček k temu lahko prispevajo tudi raziskave iz področja mikrobiologije.

Prežvekovalci predstavljajo večinski delež živali, namenjenih za proizvodnjo hrane. Tako kot ostali predstavniki živalskega kraljestva, tudi sami nimajo lastnih encimov za razgradnjo kompleksnih rastlinskih polisaharidov. Pri teh procesih jim pomagajo mikroorganizmi, ki so s svojim gostiteljem v vampu vzpostavili učinkovito simbiozo. Kljub temu, da mikrobn encimi živali zagotovijo poglavitni vir energije, potrebne za rast in proizvodnjo mesa, mleka in volne, nemalokrat ne dosegamo želenega obsega prireje. Največkrat vzrok za to najdemo v pomanjkanju beljakovin v prehrani oz. neučinkoviti izrabi le-teh. Večina beljakovin, ki pride v vamp s krmo, se tam tudi razgradi. Večji del razgradnih produktov in nastale energije se porabi za rast in razmnoževanje mikroorganizmov, del pa z ostalimi nerazgrajenimi delci in mikrobno biomaso potuje do pravega želodca in tankega črevesja, kjer jih prebavijo encimi gostitelja. Optimalna sinteza mikrobnih proteinov v vampu poteka, ko je v zaužitem obroku pravo razmerje med energijo in razgradljivimi beljakovinami. V kolikor se to razmerje poruši, se dušik iz proteinov pretvarja v amoniak, ta pa se potem preko sečnine izloči iz organizma. Prevelike, vendar pa tudi prenizke koncentracije amoniaka posledično privedejo do zmanjšane prireje. Med rešitvami za izboljšanje preskrbe oz. zaščito proteinov pred razgradnjo v vampu veliko obetajo tanini.

Tanini so rastlinski sekundarni metaboliti, ki jih uvrščamo med polifenole. Tvorijo zelo veliko in heterogeno skupino, ki še vedno ni povsem jasno kemijsko definirana. Med seboj se razlikujejo po velikost, molekulski zgradbi, po mestu ter po deležu, s katerim se nahajajo v rastlini. Znanstveniki se o vlogi taninov v rastlinah še niso popolnoma zedinili, vendar prevladuje mnenje, da te molekule služijo kot obramba pred mikroorganizmi, insekti in rastlinojedimi živalmi. Vsem vrstam taninov je skupno, da se lahko z beljakovinami, ogljikovimi hidrati, minerali in vitamini povezujejo v komplekse. Zaradi te lastnosti so med rejci veljali za nezaželene, saj z vezavo na sestavine krme lahko zmanjšajo njihovo prebavljivost, dolgotrajno uživanje večjih koncentracij pa lahko privede tudi do zastrupitev. V zadnjem času pa odkrivajo tudi pozitivne značilnosti taninov, ki pripomorejo k boljši presnovi in zdravstvenemu stanju živali. Poleg porasta žive teže, izboljšanja kakovosti mleka in volne, poročajo tudi o pozitivnem vplivu taninov pri

preprečevanju napenjanja ter v boju s črevesnimi zajedalci. Večino od naštetega gre pripisati zmožnosti, da tanini tvorijo komplekse z makromolekulami, predvsem s proteini.

1.1 GLAVNE HIPOTEZE IN NAMEN DELA

Glede na to, da imajo tanini sposobnost reagiranja z makromolekulami, ki se pojavljajo v krmi prežvekovalcev ter s proteini, ki so tudi sestavni deli celične stene mikroorganizmov oz. encimov, ki sodelujejo v temeljnih metabolnih procesih, smo se v naši raziskavi osredotočili prav na te elemente vampnega ekosistema. Naš namen je bil preveriti vpliv taninskega pripravka Farmatan®, ki ga proizvaja slovensko podjetje Tanin Sevnica d.d., na rast ter aktivnosti amilaz, ksilanaz, CMC-az in proteaz pri dveh predstavnikih vampne mikrobne združbe. Prvi, *Butyrivibrio fibrisolvens* sodi med najštevilčnejše in metabolno najbolj vsestranske vampne bakterije, *Clostridium proteoclasticum* pa je pomemben predvsem zaradi izrazite proteolitične aktivnosti. Primerjali smo delovanje treh različnih koncentracij taninskega pripravka z negativno kontrolo, pri kateri tanina nismo dodali. Ker je naš postopek potekal na čistih kulturah v *in vitro* sistemih, rezultatov ne moremo enačiti z rezultati, ki bi jih dobili na vzorcu popolne mikrobne združbe vampnega ekosistema. Kljub temu pa nam lahko rezultati na posameznih mikrobnih vrstah pomagajo pri razumevanju mehanizmov delovanja taninov tudi v samem sistemu *in situ*.

V delu smo preverjali sledeče hipoteze:

- ali taninski pripravek Farmatan® pospešuje ali zavira rast čistih kultur vampnih bakterij *B. fibrisolvens* in *C. proteoclasticum*
- ali Farmatan® zavira proteolitično aktivnost *B. fibrisolvens* in *C. proteoclasticum* ter hkrati nima negativnega vpliva na ostale encimske aktivnosti; amilolitično, CMC-azno in ksilanolitično
- ali ima koncentracija Farmatana® 0,25 g/l, ki jo priporoča proizvajalec, podjetje Tanin Sevnica d.d., najbolj optimalen vpliv tudi na rast in encimske aktivnosti bakterij *B. fibrisolvens* in *C. proteoclasticum*
- ali se vpliv Farmatana® enako izraža na obeh bakterijskih vrstah

2 PREGLED OBJAV

2.1 VAMPNI EKOSISTEM

Živali tekom evolucije niso razvile lastnih encimov za razgradnjo celuloze in ostalih kompleksnih rastlinskih polisaharidov, ki so v veliki meri prisotni v njihovi prehrani. To pomanjkljivost so uspešno nadomestile z razvojem mutualističnih odnosov z mikroorganizmi. Pojavili so se številni sistemi, kjer mikroorganizmi izkoriščajo določene snovi, ki jih njihovi gostitelji sami niso sposobni. Mikrobne populacije tako najdemo v prebavnem traktu v vseh razredih živalskega sveta. Živali so morale v ta namen prilagoditi del svojega prebavnega sistema. Glede na to, v katerem delu se vrši glavna mikrobna aktivnost, ločimo živali s poželodčno in tiste s predželodčno fermentacijo. Med slednje sodijo tudi prežvekovalci. Njihova edinstvena pridobitev je štiridelen želodec, v katerem so idealne razmere za ohranjanje raznolike in zgoščene združbe bakterij, arhej, protozojev in gliv, ki so odgovorne za procese razgradnje. Tekom teh procesov se biorazgradljivi organski polimeri, ki sestavljajo rastlinske celice, najprej hidrolizirajo do enostavnih sladkorjev, v drugi stopnji pa se spremenijo v hlapne maščobne kisline in mikrobno biomaso, ki zagotavlja zalogo energije in proteinov za gostitelja. Zaradi velikega prehranskega in gospodarskega pomena goveda in ovc je vampni ekosistem najbolj preučevan model tovrstnih simbioz (Atlas in Bartha, 1998; Dehority, 2003).

2.1.1 Zgradba in funkcija želodca

Želodec prežvekovalcev sestavljajo trije predželodci; kapica, vamp in prebiralnik ter pravi želodec ali sirišnik. Leži na levi strani trebušne votline, kjer zavzema okoli $\frac{3}{4}$ celotnega prostora. Vamp je izmed vseh delov največji, pri govedu njegov volumen znaša od 75 - 190, pri ovcah pa od 5 - 15 litrov (Dehority, 2003). Sestavljen je iz posameznih dorzalnih in ventralnih vreč, ki so med seboj ločene s stebrički. V notranjosti je površina porasla s papilami. Vamp in kapica kljub anatomski različnosti sestavljata funkcionalno razmeroma enoten prostor, ločen je le z dorzalno in ventralno retikularno gubo. Delno prebavljena krma iz predželodcev potuje v sirišnik. Njegove stene pokriva sluznica, ki izloča enake prebavne sokove kot želodci monogastričnih živali (Žgajnar, 1990). Vloga in zgradba predželodcev se s starostjo živali spreminjata. Čeprav so takoj po rojstvu teleta že razviti, še ne vsebujejo mikroorganizmov. Ti začnejo prebavni trakt naseljevati že nekaj ur po skotitvi. Po približno 20 dneh je v vampu že izoblikovano okolje s kompletno mikrobioto (McAllister in sod., 1994).

2.1.2 Razmere v vampu

Vamp je stabilen in dinamičen ekosistem. Vanj s hrano, z vodo in zrakom vsakodnevno pride na milijone mikroorganizmov. Nekateri od njih so zaradi razmer, ki vladajo v vampu, le prehodni člani. Ostali pa kljub dejstvu, da se populacija številčno spreminja glede na vrsto krme, sestavljajo stalno združbo. S preko dvesto opisanimi vrstami in gostoto do 10^{11}

celic/g vampne vsebine so bakterije prevladujoči predstavniki. Molekularne študije pa kažejo, da je teh vrst v vampu precej več, morda tudi več kot 10000. Sledijo praživali s 10^4 – 10^5 celic/g ter anaerobne glive, ki jih je od 10^3 – 10^5 celic/g. Prisotnost bakteriofagov z gostoto 10^7 – 10^9 delcev/ml, prav tako ni zanemarljiva. V vampu se nahajajo tudi metanogene arheje, vendar je bilo kljub številnim raziskavam, opisanih le nekaj vrst (Hobson, 1997). Glavni dejavniki, ki poleg stalnega dovajanja hrane in odstranjevanja fermentacijskih produktov ter nerazgrajenih rastlinskih delcev še vplivajo na rast in aktivnost mikrobne populacije so temperatura, pH, puferska kapaciteta, osmotski pritisk, vsebnost suhe snovi in oksidacijsko-redukcijski potencial. Temperatura znotraj vampa je relativno konstantna in se giblje med 38 in 41 °C. Najbolj spremenljiv dejavnik je pH, ki običajno niha med 5,5 in 7,0. Za ohranjanje znotraj tega okvira je pomembna slina, ki vsebuje velike količine bikarbonata in fosfata. Suha snov v vampu zavzema od 10 do 18 %. Približno tretjino prostornine pa zapolnjuje plinska faza, ki je sestavljena iz 65 % CO₂, 27 % CH₄, 7 % N₂, 0,6 % O₂ in 0,2 % H₂. Oksidacijsko-redukcijski potencial tekoče faze se giblje med - 350 in - 400 mV (Dehority, 2003; Hobson, 1997).

2.1.3 Proces prebave

Za zadostitev svojih energijskih potreb morajo prežvekovalci pojesti velike količine krme, saj je ta v večini primerov voluminozna. Zaužita hrana se v ustih zadrži le toliko časa, da ob mešanju s slino nastanejo približno 100 g težki zalogaji ali bolusi, ki s pomočjo krčenja v požiralniku preidejo v vamp. V predželodcih poteka časovno usklajen sistem krčenja, ki omogoča mešanje vsebine vampa. Poleg tega je odgovoren tudi za izrigavanje nastalih plinov ter za nemoten potek prežvekovanja (Dehority, 2003; Žgajnar, 1990). Trdni delci krme se v vampu zadržujejo v povprečju dva do trikrat dlje kot tekoča faza. Mikroorganizmi z vezavo na delce še povečajo ta čas. Krma se tako v vampu zadržuje od 50 – 60 ur, kar je izredno pomembno tudi za počasi rastoče mikroorganizme kot so glive ($t_g = 24 - 30$ h) ter praživali ($t_g = 5 - 14$ h) (McAllister in sod., 1994). Čas zadrževanja je odvisen predvsem od velikosti delcev. Približno 35 % nerazgrajenih delcev, primerne velikosti, preide v sirišnik. V tankem in debelem črevesu se prebava nadaljuje, vendar se glede na energijski doprinos ne more primerjati s prej opisanimi procesi, ki potekajo v vampu (Dehority, 2003).

2.1.4 Mikrobna razgradnja krme

Polisaharidi so najpomembnejši vir energije v rastlinski krmi. Ločimo rezervne in strukturne polisaharide. Med prvimi sta v glavnem prisotna škrob in fruktozan, kot gradniki večjega dela celične stene pa se pojavljajo celuloza, hemiceluloza, pektin in lignin. Poleg omenjenih sestavin so pomembne spojine v krmi tudi dušikove spojine pri katerih prevladujejo proteini (Hobson, 1997). Večina mikroorganizmov v prebavnem traktu ima kompleksne prehranjevalne zahteve in lahko izrabljajo le enega ali dva od glavnih strukturnih polisaharidov, zato je za učinkovito izrabo krme sinergizem med posameznimi organizmi izjemnega pomena (Dehority, 1991).

2.1.4.1 Škrob in amilolitični mikroorganizmi

Škrob je glavni rezervni polisaharid v celicah zelenih rastlin. Molekula škroba je sestavljena iz dveh strukturno različnih glukoznih polimerov, iz amiloze in amilopektina. Amiloza je linearna veriga nekaj sto glukoznih ostankov, ki so med seboj povezani z α -1,4 glikozidno vezjo. Glukozne enote v amilopektinu se povezujejo tudi z α -1,6 vezmi, kar vodi k razvejanosti škrobne molekule (Chesson in Forsberg, 1997). V vampu se razgradi od 50 do 90 % škroba. V kolikor krma vsebuje velike količine lahko topnih ogljikovih hidratov, lahko zaradi hitre fermentacije pride do znatnega znižanja pH ter spremembe v sestavi mikroflore. Razmnožijo se predvsem mlečno-kislinske bakterije, ki zaradi proizvodnje mlečne kisline še dodatno znižajo pH. Če pH vrednost pade pod 5, lahko pride do acidoze oz. zakisanja vampa. Težje oblike lahko povzročijo tudi smrt živali (Nocek, 1997). Pri razgradnji škroba so vključeni naslednji encimi: glukoamilaze, pululanaze, dekstrinaze, izoamilaze in α -glukozidaze. Imajo jih številne bakterije, praživali ter glive. Pomembne amilolitične bakterije so *Streptococcus bovis*, *Ruminobacter amylophilus*, *Prevotella ruminicola*, *Selenomonas ruminantium*, *Succinimonas amyolytica*, *Butyrivibrio fibrisolvens* in vrste iz rodu *Clostridium* (Chesson in Forsberg, 1997).

2.1.4.2 Celuloza in celulolitični mikroorganizmi

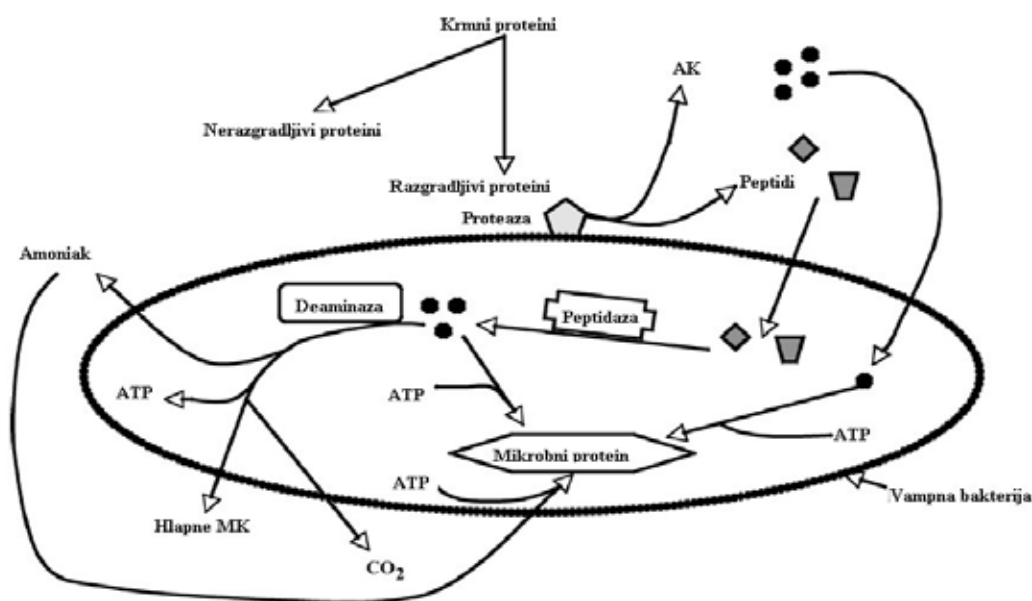
Celuloza je najbolj pogosto zastopana sestavina rastlinske biomase. Gradniki celuloze so z β -1,4 glikozidnimi vezmi povezane D-glukozne enote. Nastala vlakna se povezujejo z vodikovimi vezmi in oblikujejo kristalno zgradbo, ki je na določenih mestih tako tesna, da prepreči dostop tako encimom kot tudi manjšim molekulam, kot je npr. voda. V večini primerov so celulozna vlakna vložena v matriks, ki je pretežno iz hemiceluloze in lignina, kar mikroorganizmom pri razgradnji predstavlja še dodatno oviro (Lynd in sod., 2002). Dodatna plast, ki ovira delovanje encimov so tudi tanini. Bakterije začnejo prodirati skozi lahko razgradljive dele rastlin, npr. reže, lenticele, hidatode ter mesta, ki so poškodovana, glive pa z micelijem lahko prodrejo tudi skozi kutikulo in celično steno (Varga in Kolver, 1997). Mikroorganizmi za hidrolizo in metabolizem celuloze potrebujejo zunajcelične encime, ki so bodisi prosti ali celično vezani. Pri anaerobnih bakterijah so celulaze večkrat organizirane v stabilne multiencimske komplekse, imenovane celulosomi. V vampu so pomembni razgrajevalci celuloze prav bakterije, in sicer *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus*, nekateri sevi vrste *B. fibrisolvens* ter *Eubacterium celulosolvens* in nekatere vrste iz rodu *Clostridium*, ki pa jih ne prištevamo med bistvene celulolitične bakterijske predstavnike. Prvi in zelo pomemben korak pri hidrolizi rastlinskih vlaknin je pritrditev bakterij na substrat. S pritrditvijo bakterije zagotovijo, da so celulaze skoncentrirane na substratu in da so drugi mikroorganizmi izločeni iz mesta hidrolize. Močne povezave varujejo bakterije pred praživalmi, encime pa pred vampnimi proteazami (Miron in sod., 2001).

2.1.4.3 Hemiceluloza in ksilanolitični mikroorganizmi

Hemiceluloza je za celulozo drugi najpogostejši sestavni del celične stene. Je kompleksna mešanica polisaharidnih polimerov. Njihova sestava in delež se med različnimi rastlinskimi vrstami, posameznimi tkivi in razvojnimi stopnjami rastline precej spreminjajo (Selinger in sod., 1996; Hespell in sod., 1987). Med polimeri je najbolj zastopan ksilan, heteropolisaharid, katerega osnovno ogrodje tvorijo z 1,4- β glikozidnimi vezani D-ksilopiranozni ostanki. Polimeri ksilana so med seboj prečno povezani z vodikovimi vezmi, s katerimi se povezujejo tudi na lignin ali celulozo. Rezultat teh povezav so semikristalni agregati, ki povečajo netopnost hemiceluloze (Hespell in Cotta, 1995). Zaradi zapletene zgradbe molekul, je za mikrobno razgradnjo ksilana potrebno vzajemno delovanje več encimov. Sposobnost hidrolize ksilana imajo tako bakterije, glive kot tudi praživali, vendar so bakterije glavni razgrajevalci, med njimi pa so najpomembnejše naslednje vrste: *B. fibrisolvens*, *F. succinogenes*, *R. albus*, *R. flavefaciens*, *Eubacterium ruminantium* ter *Prevotella ruminicola*. Pri bakteriji *B. fibrisolvens* so odkrili strukture, primerljive s celulosomi, vendar so jih zaradi ksilanolitične aktivnosti poimenovali ksilanosomi (McAllister in sod., 1994).

2.1.4.4 Dušikove spojine in proteolitični mikroorganizmi

V vamp pride s krmo tudi več različnih dušikovih spojin (nukleinske kisline, etanolamin, nitrat, N_2 , holin), ki pa imajo v prehrani manjši pomen. Kot glavni vir dušika za mikroorganizme namreč služijo proteini, ki so prisotni v krmi. Po znanih podatkih ti v vampu razgradijo tudi do 80 % razpoložljivih krmnih proteinov (Cotta in Hespell, 1986; Selinger in sod., 1996). Proteolitično aktivnost so zaznali pri vseh skupinah vampnih mikroorganizmov. Glive so med vsemi najmanj pomembne, njihova vloga se kaže predvsem v začetnih stopnjah razgradnje. Praživali s požiranjem rastlinskih proteinov, bakterijskih in glivnih celic ter celo manjših praživali prispevajo velik delež h kroženju dušika znotraj vampnega ekosistema, saj zagotavljajo stalen vir topnih proteinov potrebnih za mikrobno rast. Med vampnimi bakterijami je proteolitična aktivnost razmeroma pogosta, opazili so jo pri približno polovici preučenih bakterij (Bach in sod., 2005; Wallace in sod., 1997). Med prevladujoče predstavnike uvrščamo naslednje vrste: *P. ruminicola*, *Ruminobacter amylophilus*, *B. fibrisolvens*, aktivni pa so tudi izolati iz rodov *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Eubacterium*, *Lachnospira*, *Selenomonas*, *Succinivibrio*, *Peptostreptococcus* ter *Streptococcus* (Attwood in sod., 1996; Wallace in sod., 1997).



Slika 1: Shematski prikaz mikrobne razgradnje krmnih proteinov in usoda končnih produktov v vampu (Bach in sod., 2005).

Tudi pri metabolizmu proteinov je zelo pomemben prvi korak, t.j. pritrdjevanje različnih mikrobnih celic na delce krme. Sledi aktivnost s strani izvenceličnih proteaz, ki pa so povečini pritrdjene na celice. Produkti teh encimov so peptidi in aminokisline (AK), ki se transportirajo v notranjost mikrobne celice. Peptidi lahko peptidaze nadalje razgradijo do AK. Te se vgradijo v mikrobné proteine ali pa so deaminirane v hlapne maščobne kisline, CO₂ in amoniak. Usoda absorbiranih peptidov in AK je odvisna od razpoložljive energije v obliki ogljikovih hidratov. Če je energije dovolj, se AK direktno porabijo za sintezo proteinov. V kolikor pa je vir energije omejen, se AK deaminirajo, njihovo ogljikovo ogrodje pa se fermentira v hlapne maščobne kisline. Nekatere vampne bakterije nimajo sistema za prenos AK iz citoplazme v ekstracelularno okolje, zato se odvečno absorbirane AK iz citoplazme izločijo kot amoniak. Glavni vir dušika za večino vampnih bakterij je ravno amoniak, vendar razgradnja proteinov v vampu pogosto poteka hitreje kot mikroorganizmi porabljajo produkte razgradnje, kar lahko vodi do prekomernega kopičenja amoniaka in posledično do prekomerne absorpcije iz vampa v jetra, kjer se pretvori v sečnino, ta pa se nato izloči z urinom (Bach in sod., 2005). Zaradi proteolize v vampu se na ta način lahko izgubi velik delež visoko kakovostnih proteinov. Po rezultatih, ki jih je leta 1998 objavil Attwood s sodelavci, lahko ta številka doseže tudi 80 %.

2.2 *Butyrivibrio*

Butirivibriji so med najpogostejšimi izolati vampne mikrobiote. V preteklosti je uvrstitev med butirivibrije temeljila na fenotipskih kriterijih, vendar so že relativno zgodaj opazili velike morfološke, fiziološke in serološke razlike znotraj skupine (Margherita in Hungate, 1963). Z razvojem molekularnih metod je klasifikacija dobila nove razsežnosti. Analize rDNK ter hibridizacijske metode nakazujejo, da rod *Butyrivibrio* sestavljajo vsaj tri precej

oddaljene skupine (Forster in sod., 1997). Številni avtorji priporočajo preureditev rodu, z opisom novih vrst pa so opazni tudi napredki v taksonomiji teh anaerobnih bakterij (Kopečny in sod., 2003).

Po Bergeyevem priročniku sistematske bakteriologije rod *Butyrivibrio* uvrščamo med G+ bakterije z nizko vsebnostjo G+C baznih parov, preostala uvrstitev je sledeča; deblo: *Firmicutes*, razred: *Clostridia*, red: *Clostridiales*, družina: *Lahnospiraceae* ter rod: *Butyrivibrio*.

V rodu sta poleg tipske vrste *B. fibrisolvens* še *B. hungatei* in *B. crossotus* (Madigan in sod., 2000).

2.2.1 *B. fibrisolvens*

Mnogi avtorji so to bakterijo opazili že v začetku 50-tih let prejšnjega stoletja, prvi jo je izoliral Hungate, opisala in poimenovala pa sta jo Bryant in Small leta 1955. Ime *Butyrivibrio* izhaja iz opažanja, da pri fermentaciji glukoze nastajajo velike količine maslene kisline, *fibrisolvens* pa nakazuje pomembno vlogo pri razgradnji vlaknin v krmi. To so anaerobne, rahlo ukrivljene palčke s topo zaobljenimi konci. Ne tvorijo endospor. Celice v dolžino merijo od 2 do 5 µm, široke so od 0,4 do 0,6 µm. So gibljive, imajo en polaren biček (Bryant in Small, 1956). S standardnimi tehnikami se barvajo po Gramu negativno, vendar celična stena vsebuje derivate tejhojske kisline, ki so drugače tipični sestavni deli Gram pozitivnih celičnih sten. Poleg kemijske sestave Gram pozitivni celični steni v prid govori tudi molekularna zgradba. Zakaj potem Gram negativno barvanje? Glavni razlog se skriva v debelini celične stene. Ta namreč namesto običajnih 30-50 nm znaša le od 12 do 18 nm, kar je premalo, da bi se v celicah ohranil netopni kompleks kristalno vijoličnega barvila z jodom (Cheng in Costerton, 1976).

Zaradi opaznih razlik med sevi znotraj vrste *B. fibrisolvens* naslednje lastnosti veljajo za tipski sev DSM 3071, ki smo ga uporabljali pri našem raziskovalnem delu. Celice so običajno organizirane v kratke verižice, sestavljene iz dveh do treh celic, lahko pa se pojavljajo tudi kot samostojne ali v dolgih verižicah. Kolonije na agarju po prvotni izolaciji so rahlo konveksne, prosojne svetlo rjave barve. V premeru merijo od 2 do 4 mm. Po nekaj zaporednih precepljanjih kolonije postanejo bolj ploske, svetlejše in s filamentoznimi robovi. Pri rasti v tekoči kulturi nastajajo flokuli in granularni sedimenti. Rastejo pri temperaturah med 30 in 45 °C, pri 22 in 50 °C rast ni opazna. Glavni produkti pri fermentaciji glukoze so maslena, mravljična in mlečna kislina, CO₂ ter H₂. Končni pH v tekočem glukoznem gojišču je 5,1. Poleg glukoze *B. fibrisolvens* fermentira tudi D-ksilozo, L-arabinozo, galaktozo, fruktozo, maltozo, celobiozo, saharozo, laktozo, dekstrin, inulin, salicin, eskulin, pektin in ksilan. Ne raste na trehalozi, glicerolu, manitolu in celulozi. Ne reducira nitrata, prav tako ne tvori indola, H₂S ter ne sintetizira katalaze. Želatina se ne utekočini (Bryant in Small, 1956). Razmerje G+C baznih parov je 41,2 % (Kopečny in sod., 2003). Zaradi svoje metabolne vsestranskosti pripisujemo tem bakterijam v vampu pomembno vlogo pri razgradnji škroba, proteinov ter polisaharidov z izjemo celuloze.

2.3 *Clostridium*

Za razliko od butirivibrijev, vrste iz rodu *Clostridium* ne sodijo med dominantne vampne bakterije, čeprav so pogosto izolirane iz tega okolja (Stewart in sod., 1997). Prisotne so v številnih anaerobnih habitatih, najdemo jih mrzlih, zmernih, toplih razmerah, v tleh, vodi, razpadajočem organskem materialu, v hrani ter tudi pri živalih in človeku. Od leta 1880, ko je bil rod poimenovan, je bilo opisanih že preko dvesto vrst. Glavne značilnosti, ki so definirale to veliko in zelo heterogeno skupino, so bile anaerobna rast, pozitivno barvanje po Gramu, nesposobnost disimilatorne redukcije sulfata ter tvorba temperaturno obstojnih endospor. Uporaba molekularnih metod je razkrila, da fenotipske lastnosti, ki so bile glavno orodje pri tradicionalni klasifikaciji, ne odražajo visoke stopnje genomske nesorodnosti in filogenetske oddaljenosti (Stackebrandt in sod., 1999). Analize 16S rDNK in zgradba DNK (mol % G + C) so namreč pokazale, da rod filogenetsko vključuje bakterije iz različnih rodov, ki niso opisane z lastnostmi značilnimi za klostridije ter, da so mnoge vrste bolj sorodne z neklostridijskimi vrstami, kot pa so sorodne med seboj (Keis in sod., 1995). V sedanjosti klasifikacija temelji tako na genotipskih kot tudi na fenotipskih lastnostih, kar vedno znova privede do protislovja med filogenetsko različnostjo in fenotipskimi podobnostmi mikroorganizmov, ki jim pravimo klostridiji. Danes klostridijske vrste najdemo v devetnajstih gručah v skupini *Clostridium*, osnovanih glede na homolognost sekvenc 16S rDNK. Največja in filogenetsko najbolj definirana linija je tista, ki tvori I. gručo. V tej skupini je tudi tipska vrsta *Clostridium butyricum*. Vse to nakazuje, da bo v prihodnosti potrebna temeljita taksonomska preureditev, ki pa jo še dodatno otežuje dejstvo, da je v rodu *Clostridium* okoli štirideset patogenih vrst, kar bi v medicinski mikrobiologiji povzročilo veliko zmedo (Keis in sod., 1995). Zaenkrat še velja naslednja uvrstitev v bakterijski sistem: G+ bakterije z nizko vsebnostjo G + C, *Bacteria*, deblo: *Firmicutes*, razred: *Clostridia*, red: *Clostridiales*, družina: *Clostridiaceae*, rod: *Clostridium* (Madigan in sod., 2000).

2.3.1 *C. proteoclasticum*

Bakterijo *C. proteoclasticum* so prvič izolirali leta 1995 iz goveda na Novi Zelandiji. Sprva so jo poimenovali kot butirivibrijem podobno, saj so poleg fenotipske podobnosti sekvence 16S rDNK tudi več kot 96 % podobne s sekvencami nekaterih sevov *B. fibrisolvens* (Reilly in Attwood, 1998). Dodatne fenotipske in filogenetske analize pa so potrdile, da gre za novo vrsto iz rodu *Clostridium*. Od *B. fibrisolvens* se v glavnem razlikuje po nižji vsebnosti G + C baznih parov (28 %), ker ne raste na dekstrinu ter po gibljivosti, saj kljub subterminalnemu bičku v tekočem gojišču ni gibljiva. Obe vampni bakteriji uvrščamo v t.i. XIVa klostridijsko gručo. Pod mikroskopom jih vidimo kot ravne do rahlo ukrivljene palčke, ki v dolžino merijo od 1,3 do 3,0 µm, široke pa so od 0,4 do 0,6 µm. Celice se združujejo v kratke verižice. Ne tvorijo endospor. Prekonočne kulture na trdnem glukoznem gojišču tvorijo gladke konveksne kolonije z nepravilnimi robovi in s premerom 0,5 mm. Po 2-3 dneh inkubacije kolonije v premeru dosežejo 1 mm ter dobijo

granularen izgled. V enodnevnih tekočih kulturah nastaja vlaknasta usedlina, ki že ob rahlem tresenju razpade, v starejših kulturah pa so opazni sferoplasti. Čeprav se stare kulture barvajo po Gramu negativno, imajo značilno Gram pozitivno zgradbo celične stene. Rast poteka pri 39 °C, pri 25 in 45 °C rasti ni. Za rast lahko uporablja arabinozo, fruktozo, galaktozo, glukozo, glikogen, inulin, laktozo, maltozo, manozo, melibiozo, ramnozo, salicin, škrob, saharozo, ksilan in ksiloza. Ne raste na celulozi, adonitolu, eritritolu, galaktouronski kislini, glicerolu, inozitolu, manitolu, sorbitolu, sorbozi, trehalozi in kot že rečeno na dekstrinu. Razgrajuje želatino, kazein in eskulin. Ne tvori indola in ne proizvaja katalaze, lipaze in lecitinaze. Ne reducira nitrata. pH po končani inkubaciji v glukoznem gojišču znaša 5,8. Končni produkti fermentacije v enakem gojišču so mravljična, maslena, očetna, propionska, jantarna kislina ter vodik. Zmožnost uporabe različnih ogljikovih hidratov kaže, da je v vampu udeležena pri fermentaciji topnih ogljikovih hidratov, ki se sprostijo po razgradnji rastlinskih vlaken (Attwood in sod., 1996). Zaradi visoke proteolitične aktivnosti je verjetno pomembnejša njena vloga pri razgradnji rastlinskih proteinov. Pri fermentaciji ne tvori dušika, poleg tega pa ni sposobna rasti zgolj na peptonu in kvasnem ekstraktu, kar nakazuje, da *C. proteoclasticum* sodeluje pri primarni hidrolizi proteinov do peptidov (Attwood in sod., 1996; Reilly in Attwood, 1998).

2.4 SEKUNDARNI METABOLITI RASTLIN V PREHRANI PREŽVEKOVALCEV

Rastline so za obrambo pred bakterijami, glivami, insekti in rastlinojedimi živalmi razvile številne obrambne mehanizme. Ti vključujejo posebne strukture, ki preprečijo vstop in širjenje po rastlini ter biokemijske reakcije v rastlinskih celicah in tkivih, kjer nastajajo in se kopičijo organske snovi, ki imajo bodisi neprijeten okus, vonj, delujejo kot antinutrienti ali celo kot toksini. Ker so vse te snovi produkt sekundarnega metabolizma in ker njihova sinteza zahteva velik vložek energije, se običajno kopičijo v najbolj izpostavljenih delih rastline kot so listi in plodovi. V rastlinah, ki se uporabljajo za živalsko krmo, so ti presnovki pogosto prisotni. Obstaja dolg seznam poznanih spojin, pri vrhu pa se nahajajo fenoli, cianogeni glikozidi, glikoalkaloidi, fluoroacetati, saponini, oksalati, lektini, mimosin, glukozinolati,... (Caygill, 1999; Harborne, 1999).

2.4.1 Tanini

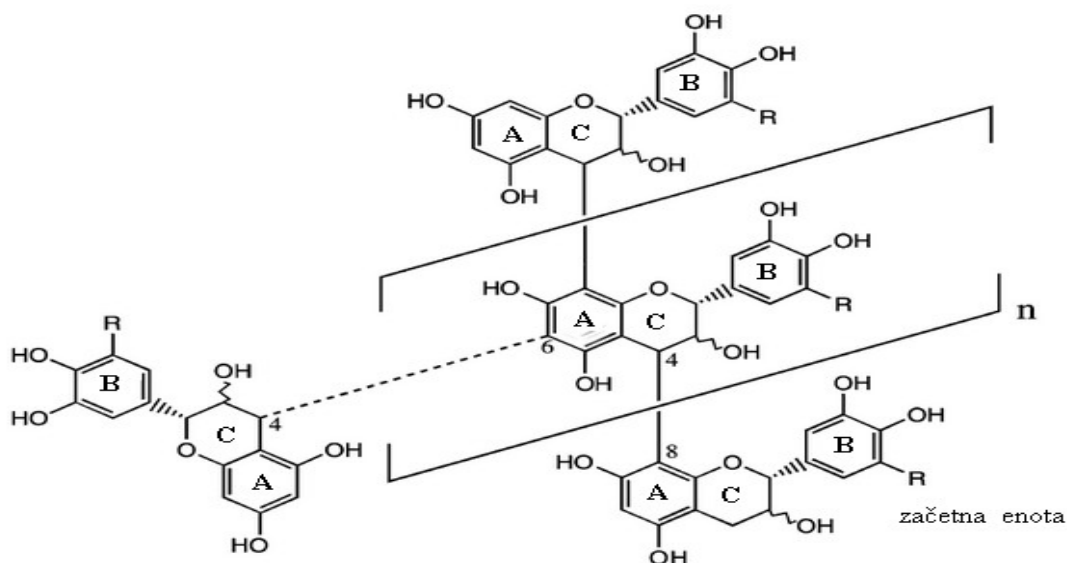
Po Horvathu so tanini vse fenolne snovi s primerno veliko molekulsko maso, ki vsebujejo dovolj fenolnih hidroksilnih in ostalih skupin (predvsem karboksilnih) za nastanek učinkovito močnih kompleksov s proteini in ostalimi makromolekulami v določenih razmerah (Reed, 1995). Že sama definicija nakazuje, da je to zelo heterogena skupina, v kateri najdemo molekule različnih kemijskih struktur in velikosti. Nahajajo se v lesu, steblih, listih, koreninah in semenih mnogih višjih rastlinskih vrst. Največkrat jih najdemo v dvokaličnicah, še posebno v stročnicah (Jansman, 1993). Količina taninov med posameznimi vrstami močno variira, v povprečju pa se giblje nekje med 1,5 – 30 % suhe

snovi (Mueller-Harvey, 1999). Poleg rastlinske vrste je vsebnost odvisna tudi od genotipa, faze rasti, dela rastline, letnega časa ter od okoljskih razmer (Norton, 2000).

Tanine v osnovi razdelimo na hidrolizirajoče, kondenzirane in kompleksne tanine oz. t.i. flavanoelagitanine, ki združujejo lastnosti obeh skupin.. Razdelitev je narejena na osnovi strukturnih razlik, različnih prehranskih in toksičnih učinkov ter reaktivnosti z različnimi hidrolitičnimi reagenti. Čeprav tanine po eni strani ločujejo velike razlike, jih po drugi strani povezuje pomembna lastnost, in sicer tvorba stabilnih kompleksov z beljakovinami, ogljikovimi hidrati, vitamini in minerali (Khanbabaee in van Ree, 2001).

2.4.1.1 Kondenzirani tanini

Kondenzirani tanini so kompleksi oligomerov in polimerov flavonoidnih enot, in sicer flavan-3-olov in flavan-3,4-diolov, ki so med seboj povezani s C - C vezjo (Min in sod., 2003). Imenujemo jih tudi proantocianidini, saj pri segrevanju v kislih alkoholnih raztopinah nastanejo rdeče obarvani antocianidini (Hagerman in Butler, 1981; Reed, 1995). V naravi so takoj za ligninom druga najbolj pogosta skupina naravnih fenolov. Imajo različne kemijske sestave in molekulske mase, ki se gibljejo od 800 do preko 28000 (Norton, 2000).



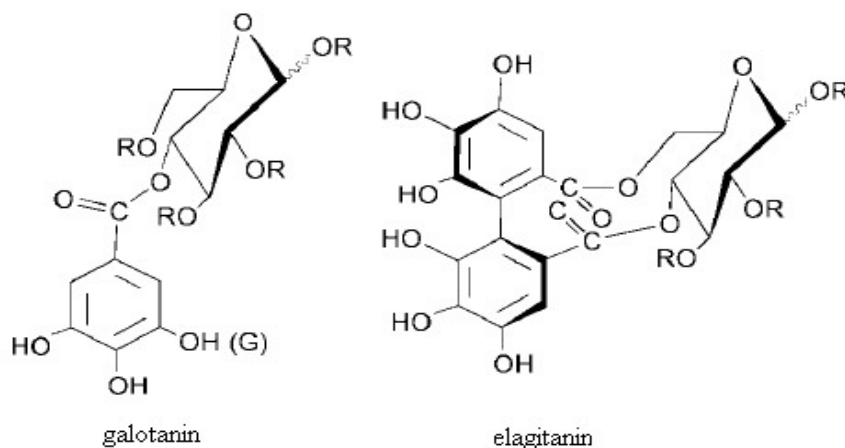
Slika 2: Struktura polimernega kondenziranega tanina, ki prikazuje oznake obročev in ogljikovih atomov ter 4 – 8 in 4 – 6 interflavonoidne vezi. (Schofield in sod., 2001).

Pri polimerizacijskih reakcijah je možen nastanek več raznovrstnih struktur. Dve enoti povezuje bodisi vez med 4. in 8. ali med 4. in 6. ogljikovim atomom. V prvem primeru je rezultat linearna molekula, pri večjem številu drugih pa te postanejo razvejane. Dimere s tem tipom vezi označujemo kot tip B. Pri tipu A je poleg omenjenih vezi prisotna še dodatna eterska vez, ki povezuje 2. C atom in hidroksilno skupino na A obroču. Velikost molekule je določena s stopnjo polimerizacije, razlikujejo pa se tudi po številu hidroksilnih

skupin na aromatskih obročih ter po stereokemiji ogljikovih atomov (Prior in Gu, 2005). Sinteza polimerov je lahko posledica encimatske oksidacije s strani polifenolnih oksidaz ali pa poteka s spontano oksidacijo (Tanner in sod., 2000). Znanstvenikom zaenkrat še ni uspelo dokazati encimatske razgradnje kondenziranih taninov v anaerobnih razmerah, zaradi česar sklepajo, da ta proces v vampu najverjetneje ne poteka (McSweeney in sod., 2001).

2.4.1.2 Hidrolizirajoči tanini

Hidrolizirajoči tanini so estri kislin in monosaharidov. Od sladkorjev je najpogostejše prisotna glukoza, od kislin pa galna, digalna in elagna kislina. Od tega, katera kislina je prisotna, je odvisno ali nastanejo t.i. galotanini ali elagitanini (Reed, 1995).



Slika 3: Strukturni formuli dveh podskupin hidrolizirajočih taninov – galotanina in elagitanina (Khanbabaee in van Ree, 2001).

Njihova zastopanost v naravi je v primerjavi s kondenziranimi tanini znatno manjša, v medsebojni primerjavi obeh skupin hidrolizirajočih taninov pa imajo elagitanini večji delež. V nasprotju z večinskim mnenjem, da se tanini nahajajo v vakuolah, Grundhöfer s sod. (2001) poroča, da se hidrolizirajoči sestavljajo in odlagajo v celičnih stenah mezofilnih celic. Molekulska masa, ki se navaja v literaturi, se giblje med 500 in 3000.

Hidrolizirajoči tanini so potencialno toksični, predvsem za monogastrične živali, saj se v vampu lahko razgradijo s kislno hidrolizo ali z encimsko razgradnjo. Če pa koncentracija preseže kapaciteto razgradnje v vampu, lahko povzročijo nekroze jeter in ledvic, zlatenico, v resnih primerih pa tudi smrt (Norton, 2000).

2.5 VLOGA TANINOV V PREBAVNEM TRAKTU ŽIVALI

2.5.1 Vpliv delovanja taninov na prirast živali

V vzreji goveda oz. v živinoreji nasploh stremimo k čim večjemu prirastu živali. To poskušajo stroka in rejci doseči na različne načine (Orešnik, 2001). Ena od metod vključuje tudi tanine, vendar je pri njihovi uporabi v živalski prehrani potrebna tudi pazljivost, saj lahko poleg koristnih lastnosti povzročajo tudi nevšečnosti. Znanstveniki se še niso zedinili, katera koncentracija taninov naj bi predstavljala mejo med pozitivnimi in negativnim vplivom (Waghorn in McNabb, 2003). V zvezi s prednostmi, ki jih pri vzreji prežvekovalcev prinašajo tanini, se v literaturi največkrat omenjajo povečana rast volne, proizvodnje in kakovosti mleka, večji odstotek rodnosti, izboljšano zdravstveno stanje živali ter porast žive teže. Tanini po eni strani zaradi neokusnosti zmanjšajo vnos krme, po drugi strani pa se zaradi tvorjenja kompleksov s proteini, polisaharidi, minerali in vitamini omeji mikrobnna prebava energetsko bogatih snovi (Barry in McNabb, 1999; Min in sod., 2003; Reed, 1995; Silanikove in sod., 2001; Waghorn in McNabb, 2003).

Dodatna lastnost, ki taninom daje negativno oznako, je njihova toksičnost. Dolgotrajno uživanje krme z visoko vsebnostjo taninov namreč lahko povzroči zastrupitve živali. Te so največkrat povezane s poškodbami različnih delov prebavnega trakta, poškodbami ledvic in jeter (Kumar in Vaithiyanathan, 1990; Lowry in sod., 1996; Reed, 1995; Scalbert, 1991).

2.5.2 Vpliv vezave taninov s proteini na proteolizo

Vezava s proteini je ena izmed bistvenih lastnosti, ki tanine definira. Beljakovine v krmi namreč v največji meri pogojujejo intenzivnost rasti in obseg prireje (Lavrenčič, 2001). Nastanek kompleksov med proteini in molekulami taninov je pogojen z mnogimi dejavniki. Odvisen je od velikosti molekul tanina in proteinov, beljakovinske sestave in strukture, upoštevati pa je potrebno še pH, temperaturo, ionsko jakost, čas inkubacije, vrsto medija (Hagerman in Butler, 1981; Jansman, 1993; Waterman, 2000). Kompleksi nastajajo v pH območju med 3,5 – 8, pod oz. nad temi vrednostmi pa razpadejo (Ben Salem in sod., 2005; Chung in sod., 1998; Orešnik, 1996). Maksimalna stabilnost je dosežena pri pH vrednosti, ki je v bližini izoelektrične točke proteina, pri rastlinskih proteinih se ta giblje med 3,5 in 5,5, kar pomeni, da taninsko – beljakovinski kompleksi razpadejo pri pH vrednostih, ki so v siriščniku in tankem črevesju (Perez – Maldonado in sod., 1995).

Tanini se z beljakovinami povezujejo na osnovi vodikovih, hidrofobnih, ionskih in kovalentnih vezi. Glavne vezi, ki stabilizirajo kompleks, so vodikove vezi med fenolno hidroksilno in karboksilno skupino na proteinu. Delež hidrofobnih povezav se povečuje z višanjem ionske jakosti in temperature. Kovalentne vezi so irreverzibilne, do tvorbe pride v aerobnih razmerah, pri segrevanju, izpostavitvi UV sevanju in delovanju polifenol oksidaz (Hagerman in Butler, 1981; Jansman, 1993; Oh in sod., 1980).

Po vseh zgoraj naštetih lastnostih je razvidno, da tanini s tvorbo kompleksov lahko zaščitijo beljakovine pred mikrobnno razgradnjo v predželodcih. Takšni kompleksi začnejo nastajati že v gobcu med prežvekovanjem krme, proces pa se nadaljuje v vampu. Uspeh

zaščite je odvisen od količine taninov v krmi, vrste tanina in vrste živali. Številne raziskave so pokazale, da so tanini, kljub omenjenim razlikam, v splošnem zmanjšali razgradnjo proteinov v vampu, povečali njihov pretok do tankega črevesa, znižali topnost proteinov v *in vitro* sistemih ter zmanjšali proteolitično aktivnost in populacijo proteolitičnih bakterij v *in vivo* ter v *in vitro* sistemih (Barry in McNabb, 1999; Min in sod., 2003; Perez – Maldonado in Norton, 1996). Priporočene koncentracije taninov, ki imajo še pozitiven vpliv na razgradnjo proteinov, se zaradi že omenjenih razlogov med avtorji precej razlikujejo.

2.5.3 Vpliv vezave taninov na razgradnjo ogljikovih hidratov

Tanini lahko reagirajo in tvorijo komplekse tudi z ogljikovimi hidrati, vendar je afiniteta za vezavo bistveno nižja kot pri proteinih. Kljub manjši težnji k povezovanju pa so v mnogih primerih ugotovili negativne vplive taninov, ki se kažejo kot zmanjšanje oz. upočasnitev prebave vseh vrst ogljikovih hidratov (Barry in McNabb, 1999; Butter in sod., 1999; Waghorn in McNabb, 2003). Učinek na razgradnjo ni zgolj posledica neposredne vezave taninov na ogljikove hidrate, pač pa se kaže tudi posredno preko drugih načinov delovanja. V zvezi s tem največkrat omenjajo mikroorganizme, ki so udeleženi v procesih presnove ogljikovih hidratov. Kondenzirani tanini namreč po poročanju večih znanstvenikov znižujejo delež populacije omenjenih bakterij oz. zavirajo aktivnost njihovih CMC-az, ksilanaz, pektinaz (Acamovic in sod., 2000; Barry in McNabb, 1999; Makkar in sod., 1988; McSweeney in sod., 2000; McSweeney in sod., 2001; Min in sod., 2005).

Nižja stopnja presnove rastlinskih polisaharidov, ne glede na način, ki privede do tega, zmanjša zaloge energije, ki je na razpolago vampnim mikroorganizmom, kar upočasni njihovo rast in sintezo mikrobnih proteinov ter s tem tudi zalogo proteinov, ki je na voljo živali v siriščniku in tankem črevesu (Butter in sod., 1999).

2.5.4 Vpliv taninov na rast in encimske aktivnosti mikroorganizmov

Protimikrobno delovanje taninov je že dolgo poznano. Mehanizmi delovanja pa kljub številnim raziskavam še vedno niso v celoti pojasnjeni. V literaturi se pojavlja nekaj možnih razlag. Domnevno je glavni cilj delovanja taninov celična stena mikroorganizmov. Pri povezovanju taninov in sestavnih delov celične stene se lahko spremeni prepustnost membrane, kar zavira prenos hranil v celico in posledično tudi rast. Prerazporeditev membrane lahko prekine tudi prenos elektronov in s tem povezane reakcije (Min in sod., 2003; McSweeney in sod., 2001; Reed, 1995). Po do sedaj opisanih raziskavah, kondenzirani tanini različnega izvora zavirajo rast številnih populacij vampnih bakterij (McSweeney in sod., 2000; Min in sod., 2005). Tanini ne delujejo bakteriostatično le na vampne bakterije, pač pa tudi na nekatere patogene vrste kot so *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *B. anthracis*, *B. subtilis*, *S. dysenteriae*, *C. botulinum*. Zasledili pa so tudi inaktivacijo virulence različnih virusnih vrst (Chung in sod., 1998).

Razgradnja rastlinskih polimerov poteka s pomočjo izvenceličnih encimov, ki jih mikroorganizmi izločajo v okolje ali pa ti ostanejo vezani na zunanji površini celic. Tanini lahko reagirajo s temi encimi, spremenijo njihovo konformacijo in zmanjšajo njihovo aktivnost. Poleg direktnega delovanja na encime pa je zaviranje možno tudi preko substrata, ki po vezavi na tanine postane nedostopen za vezavo na encime. Opazili so zmanjšanje aktivnosti CMC-az, proteaz, glutamat dehidrogenaze, alanin aminotransferaze, pektinaz, celulaz, endoglukanaz, ksilanaz (Acamovic in sod., 2000; Chung in sod., 1998; McSweeney in sod., 2001).

2.5.4.1 Vpliv taninov na morfologijo mikroorganizmov

Poleg že omenjenega delovanja taninov na mikroorganizme velja omeniti tudi vpliv, ki ga imajo na morfologijo. Ta se različno izraža pri različnih bakterijskih vrstah oz. sevih, odvisen pa je tudi od vrste in koncentracije taninov. Kondenzirani tanini iz turške detelje (*Onobrychis viciifolia*) povzročajo flokulacijo in podaljšanje celic *B. fibrisolvens* (McAllister in sod., 1994). Prav tako pri *B. fibrisolvens*, vendar pri sevu A38, so Min in sod. (2005) opazili, da so se ob prisotnosti taninov iste rastlinske vrste, drugače samostojne palčke, začele združevati v nitke, inhibirano pa je bilo tudi ločevanje celic po delitvi. Celice bakterij *S. bovis* se običajno pojavljajo kot diplokokci, s povečevanjem koncentracije dodane taninske kisline se je povečevale tudi dolžina verižic. Pri 4 % taninski kislini je bilo v verižici 40 - 50 celic (Goel in sod., 2005). Po opažanjih Jonesa in sod. (1994) so celice v verižici nepravilnih oblik, prav tako so opazili flokulacijo in nalaganje elektronsko gostega materiala, po vsej verjetnosti precipitiranega tanina na površini celic. Isti avtorji so opisali tudi spremembe pri *P. ruminicola*, pri kateri se celice zaradi kondenziranih taninov z ekstracelularnim materialom med seboj povezujejo v verižice.

2.5.5 Vpliv taninov na metabolizem vitaminov in mineralov

Tanini tvorijo komplekse z vitaminom A, B₁₂ in tiaminom, s čimer se zmanjša njihova absorptivnost v tankem črevesju (Jansman, 1993). Pri povezovanju taninov s kovinskimi ioni kot so Fe, Co, Cu in Cr prav tako nastajajo netopni kompleksi, ki omejujejo razpoložljivost teh ionov, tako za žival kot tudi za predstavnike mikrobne združbe (Okuda, 2005). Scalbert (1991) predlaga, da je sposobnost vezave s kovinskimi ioni lahko učinkovit mehanizem, s katerim naj bi tanini inhibirali delovanje metaloencimov kot sta glivna peroksidaza in lakaza.

2.5.6 Vloga taninov pri preprečevanju napenjanja

Napenjanje vampa je razmeroma razširjen pojav pri prežvekovalcih, predvsem pri tistih, ki se hranijo s krmo, ki vsebuje velike količine topnih proteinov (Butter in sod., 1999). Proteini povzročajo nastajanje stabilne penaste mase, ki napolni dorzalno vrečo vampa. Če se razmere ne spremenijo, pride pri živali do hude kompresije srca, ožilja in pljuč, kar

lahko vodi do anoksije in hitre smrti. Napenjanje se preprečuje zlasti s protipenilnimi olji in z neionskimi detergenti, s katerimi poškropijo krmo. Vse te metode predstavljajo velike stroške in zahtevajo veliko dela, zato si prizadevajo najti nadomestne postopke, ki bi učinkovito zmanjševali nastanek pene (Mangan, 1988). Med obetavnimi kandidati so se znašle tudi rastline, ki vsebujejo tanine. Večje koncentracije taninov namreč zmanjšujejo nastanek plinov, poleg tega pa tanini, ki tvorijo komplekse s proteini, preprečujejo tudi nastanek pene. Minimalna koncentracija kondenziranih taninov, ki je potrebna za pozitiven vpliv, po mnenju različnih raziskovalcev znaša 5 g kondenziranih taninov/kg suhe snovi (Barry in McNabb; 1999, Mangan, 1988; Butter in sod., 1999).

2.5.7 Prilagoditev živali na tanine

Nekateri rastlinojedci se hranijo s krmo, ki vsebuje večje količine taninov, pa vendar pri njih ni opaziti toksičnih vplivov, kar kaže na to, da so se živali v določeni meri prilagodile na prisotnost teh antinutrientov (Jansman, 1993). V prvi vrsti se omenja proteine z visoko vsebnostjo prolina, ki se izločajo s slino. Zaradi visoke vezavne afinitete naj bi ti proteini predstavljali prvo linijo obrambe pri kozah, saj s tvorbo kompleksov s tanini že v ustni votlini preprečijo reakcijo taninov z drugimi proteini kot so encimi, proteini v sluznici in epitelu, poleg tega pa tanine ščitijo tudi pred razgradnjo do škodljivih produktov (Kumar in Vaithyanathan, 1990; Shimada, 2006). Pri govedu in ovcah teh proteinov v slini zaenkrat še niso odkrili. Pri njih pa najdemo ostale vrste obrambnih mehanizmov; izogibanje hrane z visoko koncentracijo tanina, povečana proizvodnja sluzi v prebavnem traktu, razgradnja, detoksifikacija taninov in njihovih razgradnih produktov, nastanek surfaktantov (Brooker in sod., 2000; Goel in sod., 2005; Makkar in Becker, 1998).

2.5.8 Prilagoditev mikroorganizmov na tanine

Kljub antimikrobnim lastnostim taninov mnogi mikroorganizmi lahko rastejo in se delijo v prisotnosti rastlin, ki vsebujejo večje količine teh fenolnih snovi. Obstaja več razlag, zakaj so bakterije tolerantne na tanine. Pri nekaterih bakterijah so ob dodatku taninov zaznali podaljšanje lag faze. V tem času se celice s sintezo encimov in glikokaliksa pripravijo na potrebne prilagoditve za rast v spremenjenem okolju. Izvencelični polimeri imajo visoko afiniteto do taninov, s čimer si bakterije zagotovijo "poceni" tarčo, na katero se lahko vežejo tanini in s tem postanejo nedostopni za vezavo na druge molekule (Brooker in sod., 2000; O'Donovan in Brooker, 2001; Pell in sod., 2000; Scalbert, 1991). Druga taktika je povezana s sposobnostjo razgradnje taninov. Po dosedanjih odkritjih so mikroorganizmi sposobni v anaerobnih pogojih razgraditi le hidrolizirajoče tanine. Glavne reakcije pri tem procesu vključujejo hidrolizo in redukcijo, ključni encimi pa naj bi bili tanaza oz. tanin acilhidrolaza ter esteraze. Do sedaj znane bakterije, ki razgrajujejo tanine so *S. ruminantium*, *S. caprinus*, *S. bovis*, *Eubacterium oxidoreductans*, *Syntrophococcus*

sucromutans, *B. fibrisolvens*, vrste iz *Caprococcus*, nekatere vrste iz rodu *Clostridium* in nekatere enterobakterije (Brooker in sod., 2000; McSweeney in sod., 2001; Odenyo in sod., 2001). Glavni metaboliti pri razgradnji hidrolizirajočih taninov so galat, pirogalol, rezorcinol, floroglucinol, ki so tudi lahko toksični. Za nevtralizacijo teh produktov sta pomembni metilacija in hidroksilacija (Skubic in Vengušt, 1993; Pell in sod., 2000). Tanini z vezavo na kovinske ione zmanjšajo njihovo razpoložljivost. Nekatere bakterije in glive so pomanjkanje premostile s pomočjo sideroforjev (Lowry in sod., 1996). Pell s sod. (2000) omenja še eno izmed možnih razlag, in sicer naj bi mikroorganizmi ključne membranske encime varovali s strateško razporeditvijo lipidov.

Podnebne razmere, geografska širina ali gostiteljska žival nimajo vpliva na bakterijsko toleranco. Ta je odvisna predvsem od vrste hranil, s katerimi se žival prehranjuje (Nelson in sod., 1998).

2.5.9 Uporabnost taninov

Začetki uporabe taninov segajo že v obdobje pred našim štetjem, ko so takratna plemena s pomočjo taninov iz živalskih kož pridobivala usnje (Khanbabaee in van Ree, 2001). Poleg usnjarstva so tanini dolga leta oz. tisočletja nevede prisotni tudi v t.i. etnomedicini, predvsem vzhodni, kjer so prisotni v pripravkih za preprečevanje diareje, črevesnih tumorjev, kot diuretiki, protivnetna in antiseptična sredstva,... (Khanbabaee in van Ree, 2001). Taninom se pripisuje antikancerogeno in antimutageno delovanje (Chung in sod., 1998; Okuda, 2005). Zaviralni vplivi, ki jih imajo na širok izbor mikroorganizmov, tanine uvršča med potencialna antivirusna, antihelminтна, bakteriostatična, bakteriocidna sredstva (Chung in sod., 1998; Grundhöfer in sod., 2001; Mueller-Harvey, 1999). Z vse večjo zavednostjo ljudi za varovanje okolja, se ponujajo dodatne možnosti za uporabo taninov. Njihova prisotnost v prehrani živali lahko pripomore k zmanjšanju nastanka metana ter posledično k zmanjšanju emisij tega toplogrednega plina (Waghorn in McNabb, 2003). Nekateri tanini so že vrsto let prisotni v prehranski industriji. Taninska kislina velja za GRAS in se uporablja kot prehranski aditiv. Poleg omenjenega so tanini udeleženi tudi pri proizvodnji črnih, barv za tekstil, kot koagulanti pri pridelavi gume, v elektronski mikroskopiji za fiksacijo membran,... (Chung in sod., 1998; Khanbabaee in van Ree, 2001)

3. MATERIALI IN METODE

V okviru raziskovalnega dela diplomske naloge smo preučevali vpliv taninskega pripravka Farmatan® na rast in encimske aktivnosti vampnih bakterij *Butyrivibrio fibrisolvens* in *Clostridium proteoclasticum*. Primerjali smo učinek treh različnih koncentracij omenjenega pripravka (0.05, 0.25 in 1.00 g/l) z negativno kontrolo, pri kateri taninskega izvlečka v gojišče nismo dodali. Z merjenjem koncentracije proteinov smo spremljali rast bakterijskih kultur pri 7 različnih inkubacijskih časih: 0, 5, 10, 13, 16, 20, 32 in 48 ur. Ob istih časih smo preverjali tudi amilolitično, karboksimetil-celulazno (CMC-azno), ksilanolitično ter proteolitično encimsko aktivnost, ki smo jo določili glede na koncentracijo proteinov v bakterijski kulturi. Vse poskuse smo izvajali v treh ponovitvah.

3.1 GOJENJE BAKTERIJ

3.1.1 Bakterijski sevi

Raziskave so potekale na dveh različnih vampnih bakterijskih vrstah *B. fibrisolvens* in *C. proteoclasticum*, ki smo jih dobili iz nemške zbirke mikroorganizmov iz raziskovalnega centra Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSM) v Braunschweigu. Oba uporabljena seva sta tipska seva vrste.

Preglednica 1: Oznake bakterijskih sevov, na katerih smo določali vpliv taninskega pripravka Farmatan®

Organizem	Oznaka seva (druga oznaka)	Izvor	Država	Izoliral
<i>B. fibrisolvens</i>	DSM 3071 (ATCC 19171, D1)	krava	ZDA	M. P. Bryant
<i>C. proteoclasticum</i>	DSM 14932 (ATCC 51982, B316)	krava	Nova Zelandija	G. T. Attwood

3.1.2 Gojišče

Za namnoževanje in shranjevanje bakterijskih kultur smo uporabljali modificirano M2 gojišče (Hobson, 1969), ki smo mu dodali še ksilan ovsenih plev. Sestava gojišča je bila sledeča:

- tripton (10,0 g/l),
- kvasni ekstrakt (2,5 g/l),
- glukoza (2,0 g/l),
- celobioza (2,0 g/l),
- topni škrob (2,0 g/l),
- NaHCO₃ (4,0 g/l),
- L-cistein HCl (1,0 g/l),

- resazurin (0,01 g/l),
- ksilan (2,0 g/l),
- mineralna raztopina I (15 % (vol.)): K_2HPO_4 (3 g/l), destilirana voda do 1000 ml,
- mineralna raztopina II (15 % (vol.)): KH_2PO_4 (3 g/l), $(NH_4)_2SO_4$ (6 g/l), NaCl (6 g/l), $MgSO_4 \cdot 6H_2O$ (0,65 g/l), $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (0,6 g/l), destilirana voda do 1000 ml,
- vampni sok (30 % (vol.)),
- destilirana voda (40 % (vol.)).

Sestavine smo zatehtali in odmerili po danem receptu, med mešanjem smo segrevali. Ko je mešanica zavrela, smo dodali L-cistein HCl, ponovno zavreli ter odstavili. Sledilo je prepihovanje s CO_2 . Sprememba barve gojišča iz rožnate na rumeno je pokazatelj odsotnost kisika. Pod zaščitnim plinom smo nato po 8 ml gojišča razlili v Hungate epruvete. Epruvete smo zaprli z zamaški iz butilne gume, ki je nepropustna za pline. Tako nepredušno zaprte epruvete smo 15 min avtoklavirali na 121 °C.

3.1.3 Tehnike gojenja in shranjevanja anaerobnih kultur

Zaradi anaerobne narave smo bakterijska seva gojili v razmerah brez kisika. Uporabljali smo Bryantovo modifikacijo Hungatove tehnike (Bryant, 1972). Precepljanje in gojenje je potekalo pod zaščitnim plinom (100 % CO_2). Pot plina iz jeklenke do preprihvalnih šob je speljana prek kolone z reduciranimi bakrovimi opilki, segretim na 350 °C, kjer se odstranijo primesi kisika, ki so prisotne v tehničnem plinu. Vcepek je bila ena cepilna zanka čistih 24-urnih bakterijskih kultur v gojišču M2 + ksilan. Kulture smo shranjevali v vbojnikih (M2 + 0,75 ut. % agarja) pri -18 °C.

3.1.4 Priprava raztopin Farmatana® ter priprava vzorcev bakterijskih kultur za določanje rasti in encimskih aktivnosti

Taninski pripravek Farmatan® je naravni izvleček, pridobljen iz lesa pravega kostanja (*Castanea Sativa* Mill.). Proizvaja ga slovensko podjetje Tanin Sevnica d.d.. Postopek pridelave vključuje ekstrakcijo lesa z vročo vodo, izhlapevanje tekočine, mešanje z raztopino enostavnih sladkorjev in sušenje. Rezultat opisanega postopka je droben svetlo rjav prašek s kiselkastim vonjem in trpkim okusom. Temperaturno je stabilen pod 200 °C, nad to temperaturo se razgradi (Anadon in sod, 2005). Komercialno je dostopen v treh oblikah; prašku, gelu in v obliki kapsul. Pripravek vsebuje 75 % (oz. po podatkih Anadona in sod. (2005) v povprečju 55 %) mešanico kondenziranih in hidrolizirajočih taninov, med katerimi večji delež pripada slednjim. Podrobnejša analiza je naslednja: 53 % veskalagina, 25 % kastalagina, 8 % veskalina, 3 % kastalina, ostali delež zapolnjujejo kondenzirani tanini, pri katerih sta v prevladi katehin in leukoantocianidin (Tanin Sevnica d.d., 2004).

Raztopine Farmatana® smo pripravili in gojišču dodali tik pred nacepljanjem, saj je tanin občutljiv na visoke temperature, ki se uporabljajo pri avtoklaviranju gojišč. Za pripravo raztopin smo uporabljali 0,1 M Na-fosfatni pufer (pH = 6,5). V 8 ml pufra smo dodali

primerno odtehtane količine taninskega pripravka (16, 82 ter 328 mg). Z dodatkom 200 µl raztopine v 8 ml gojišča smo dosegli želene končne vrednosti tanina v gojišču, in sicer 0.05, 0.25 ter 1.00 g/l. Nacepljena gojišča smo inkubirali pri 37 °C. Po 5, 10, 13, 16, 20, 32 in 48 urah smo inkubacijo prekinili ter kulture z omenjenimi koncentracijami tanina, vključno s kontrolo pripravili za nadaljnjo obdelavo. Epruvete z bakterijskimi kulturami smo 15 min centrifugirali pri 3000 obr./min. Odvzeli smo 1,5 ml supernatanta in ga v Eppendorf centrifugirkah shranili pri -18 °C. Previdno smo odstranili še preostali supernatant, celice sprali s 50 mM Na-fosfatnim pufrom (pH = 6,5) ter ponovno centrifugirali. Po drugem spiranju smo celice resuspendirali v 1,3 ml miliQ in jih nato shranili pri -18 °C. Priprava vzorcev ter vsi izvedeni testi so potekali v aerobnih razmerah.

3.2 SPREMLJANJE RASTI BAKTERIJSKIH KULTUR

3.2.1 Ugotavljanje koncentracije proteinov kot merilo za rast bakterijskih kultur

Koncentracijo proteinov smo merili s spektrofotometrično metodo, ki jo je leta 1951 razvil Lowry s sodelavci. Metoda temelji na dveh barvnih reakcijah. Pri prvi, biuretski reakciji, se Cu^{2+} veže s peptidnimi vezmi v proteinih. Nastane modro obarvan kompleks. Po dodatku Folin-Ciocalteujevega reagenta se barva še okrepi, saj se reagent po vezavi na kompleks protein- Cu^+ počasi reducira in spremeni barvo iz rumene v modro. Obe reakciji potekata v alkalnem okolju. Količino proteinov v naših vzorcih smo ugotavljali na podlagi umeritvene krivulje, ki smo jo pripravili s standardnimi raztopinami govejega serumskega albumina (BSA) z naslednjimi koncentracijami: 0,00 mg/ml; 0,08 mg/ml; 0,16 mg/ml; 0,24 mg/ml; 0,32 mg/ml; 0,40 mg/ml. V Eppendorf centrifugirkah smo zmešali 125 µl raztopine BSA in 125 µl 1 M NaOH ter 5 min inkubirali pri 100 °C. Nato smo hidrolizirane vzorce ohladili, jim dodali 625 µl OD mešanice (reagent Lowry A : reagent Lowry B = 50 :1) in 125 µl Folin-Ciocalteujevega reagenta, premešali ter počakali 30 minut, da se je razvila barva. Pri valovni dolžini 700 nm smo s spektrofotometrom (Schimadzu, UV – 160A) vzorcem izmerili absorbanco. Merjenje koncentracij celičnih in izvenceličnih bakterijskih proteinov smo izvedli po enakem postopku, le da smo namesto standardnih raztopin BSA uporabili ustrezne redčitve vzorcev.

3.3 KVANTITATIVNO DOLOČANJE ENCIMSKIH AKTIVNOSTI

3.3.1 Merjenje amilazne encimske aktivnosti

Amilazno encimsko aktivnost smo ločeno ugotavljali v celični frakciji in v supernatantu. Razgradnjo škroba smo spremljali z metodo redukcijskih sladkorjev z reagentom DNS (Pettersen in Porath, 1966). Substrat je bil krompirjev škrob (1 %) raztopljen v 0,1 M pufru PIPES s pH vrednostjo 6,8. V eppendorfovo centrifugirko smo odpipetirali 200 µl substrata, dodali 200 µl ustrezno redčenega vzorca, pomešali in inkubirali pri 39 °C. Po 10 min smo reakcijo zaustavili z dodatkom 600 µl DNS reagenta. Reagent smo pripravili tako, da smo v destilirani vodi raztopili Na-K tartrat (20 ut %) in NaOH (2 ut %), na koncu pa

dodali še DNS (1 ut % dinitrosalicilne kisline). Zaradi občutljivosti DNS reagenta na svetlobo smo serumske stekleničke, v katerih smo ga shranjevali, ovili z ALU folijo in postavili na temen prostor. Po dodatku reagenta smo reakcijsko mešanico za 15 min postavili v kopel, segreto na 100 °C. Po hlajenju smo vzorcem izmerili absorbanco pri valovni dolžini 540 nm. Intenziteta barve je bila sorazmerna s količino sproščenih redukcijskih sladkorjev. Poleg testne mešanice smo pripravili tudi kontrolne vzorce, pri katerih smo izpustili 10 minutno inkubacijo pri 39 °C. Preostali del je bil izveden po opisanem postopku. Koncentracijo redukcijskih sladkorjev je spektrofotometer izračunal na podlagi umeritvene krivulje, ki smo jo izdelali iz 0 mM, 0,5 mM, 1 mM, 2mM, ter 3,8 mM standardnih raztopin glukoze. K 400 µl navedenih raztopin smo dodali 600 µl DNS reagenta, 15 min segrevali pri 100 °C, ohladili in izmerili absorbanco pri 540 nm. Specifično encimsko aktivnost smo izračunali po naslednji enačbi:

$$SA [nkat/mg \text{ PROT}] = \Delta RS \cdot 1000 / (PROT \cdot 0,2 \cdot 600) \quad \dots(1)$$

kjer so:

- SA – specifična encimska aktivnost,
- ΔRS – količina sproščenih redukcijskih sladkorjev, ki so posledica delovanja encimov v vzorcih; koncentracija redukcijskih sladkorjev v testnih vzorcih – koncentracija redukcijskih sladkorjev v kontrolnih vzorcih,
- PROT – oznaka za koncentracijo proteinov v posameznem vzorcu (mg/ml), ki smo jo določili z metodo po Lowryju,
- 1000 – količina testne mešanice (1000 µl),
- 0,2 – količina vzorca v mešanici (200 µl)
- 600 – čas inkubacije (600 sekund).

Katal (kat) je mednarodna enota, ki je definirana kot količina encima, ki sprosti 1 mol produktov v 1 sekundi.

3.3.2 Merjenje CMC-azne encimske aktivnosti

Karboksimetil celulozno (CMC-azno) aktivnost smo ugotavljali s postopkom po Leverju (Lever, 1977). To je metoda, ki temelji na sproščanju redukcijskih sladkorjev in razvoju barve, ki se pojavi pri reakciji med reagentom PAHBAH in sladkorji. Sproščene sladkorje smo merili spektrofotometrično. Razgradnjo CMC smo preverjali v treh paralelkah. 1 % raztopina karboksimetil celuloze v 50 mM fosfatnem pufru (pH = 6,5) je predstavljala substrat encimom, katerim smo ugotavljali aktivnost. V Eppendorf centrifugirkah smo k 230 µl substrata dodali 20 µl odmrznjenega vzorca. Inkubacija je potekala 150 min pri 37 °C. Dodatek 30 µl 10 % trikloroacetne kisline (TCA) je zaustavil reakcijo. Reagentno mešanico PAHBAH smo zaradi slabe obstojnosti vedno pripravili tik pred uporabo, in sicer jo sestavljajo sledeče sestavine: 1 M Na₂SO₃ (5 % (v/v)); 0,5 M Na-citrat (5 % (v/v)); 5 M NaOH (5 % (v/v)); destilirana voda (80 % (v/v)); 0,2 M CaCl₂ (5 % (v/v)); PAHBAH (hidrazid parahidroksibenzojske kisline) (10 g/l). Kalcijev klorid smo dodajali

po kapljicah, s čimer smo preprečili, da bi se reagent oboril. Test smo izvedli v epruvetah HACH, kamor smo poleg 5 ml reagenta PAHBAH odpipetirali tudi 100 µl oborjenega vzorca. Vsebinsko epruvete smo premešali, zamašili ter 10 min inkubirali pri 100 °C. Vzorce smo ohladili in jih nato 10 min centrifugirali pri 3000 obr./min. Pri reakciji se je razvila rumena barva. Tudi v tem primeru je bila intenzivnost barve sorazmerna količini sproščenih redukcijskih sladkorjev. Merili smo jo s spektrofotometrom pri valovni dolžini 420 nm. Uporabljali smo kvarčne kivete. Za izračun dejanske aktivnosti encimov v vzorcu smo potrebovali tudi koncentracijo redukcijskih sladkorjev v ničelnih vzorcih, ki smo jo merili vzporedno s koncentracijo testnih vzorcev. Postopek se je razlikoval le v začetni stopnji, kjer smo inkubirali le substrat, vzorec z encimi pa smo dodali hkrati z 10 % TCA. Umeritveno krivuljo smo pripravili iz standardnih raztopin glukoze s koncentracijami 0 mM, 0,5 mM, 1 mM, 2 mM ter 3, 8 mM. Specifične encimske aktivnosti (SA) smo izračunali po enačbi (2):

$$SA [nkat/mg \text{ PROT}] = \Delta RS \cdot 280 / (PROT \cdot 0,02 \cdot 9000) \quad \dots(2)$$

kjer so:

- SA – specifična encimska aktivnost,
- PROT – oznaka za koncentracijo proteinov v posameznem vzorcu (mg/ml), ki smo jo določili z metodo po Lowryju,
- ΔRS – količina sproščenih redukcijskih sladkorjev, ki so posledica delovanja encimov v vzorcih; koncentracija redukcijskih sladkorjev v testnih vzorcih – koncentracija redukcijskih sladkorjev v kontrolnih vzorcih,
- 280 – faktor, ki se nanaša na količino testne mešanice (280 µl)
- 0,02 – količina vzorca v mešanici (20 µl)
- 9000 – čas inkubacije (9000s).

Katal (kat) je mednarodna enota, ki je definirana kot količina encima, ki sprosti 1 mol produktov v 1 sekundi.

3.3.3 Merjenje ksilanazne encimske aktivnosti

Specifično ksilanazno encimsko aktivnost smo ravno tako merili s sproščanjem redukcijskih sladkorjev. Metoda je potekala po enakem protokolu kot pri določanju CMC-azne encimske aktivnosti. Za razliko od omenjene metode nam je kot substrat služila raztopina ksilana (1% ksilana v 50 mM Na-fosfatnem pufru). Za pripravo umeritvene krivulje smo uporabili raztopino ksiloze v vodi (0 mM, 1 mM, 2 mM, 4 mM, 6 mM).

3.3.4 Merjenje proteazne encimske aktivnosti

Encimsko aktivnost proteaz smo ugotavljali po metodi z azokazeinom (Kopečný in Wallace, 1982). V centrifugirkah Eppendorf smo zmešali 300 µl 0,1 M Na-fosfatnega pufru (pH = 6,5), 100 µl 50 mM ditiotreitola (DTT) ter 200 µl 0,5 % azokazeina.

Reakcijski mešanici smo dodali 200 µl odmrznjenega encimskega vzorca. Inkubacija je potekala pri 40 °C. Po 60 min smo reakcijo zaustavili s 25 % TCA, ki obori proteine v vzorcu. Le te smo odstranili z 10 minutnim centrifugiranjem pri 4000 × g. 500 µl supernatanta smo odpipetirali v drugo centrifugirko in tik pred merjenjem absorbance dodali enako količino 0,5 M NaOH. Meritve so potekale pri valovni dolžini 440 nm. Umeritveno krivuljo smo pripravili s standardnimi koncentracijami azokazeina v reakcijski mešanici, brez encimskega vzorca (0,0 mg/ml; 1,0 mg/ml; 2,5 mg/ml; 4,0 mg/ml; 5,0 mg/ml). Intenziteta barve je sorazmerna z razgradnjo azokazeina in je tako tudi pokazatelj proteazne aktivnosti. Za izračun aktivnosti smo potrebovali tudi koncentracije kontrolnih vzorcev, pri katerih smo delovanje encimov takoj po dodatku encimskega vzorca reakcijski mešanici zaustavili s TCA.

Specifično protezano encimsko aktivnost smo izračunali z enačbo 3:

$$SA [Enota/mg PROT] = \Delta A \cdot 1000 / (PROT \cdot 0,2) \quad \dots(3)$$

kjer so:

- SA – specifična encimska aktivnost,
- PROT – oznaka za koncentracijo proteinov v posameznem vzorcu (mg/ml), ki smo jo določili z metodo po Lowryju,
- ΔA – koncentracija razgrajenega azokazeina v vzorcu, ki je posledica delovanja encimov v vzorcih; izračunali smo jo tako, da smo vrednosti, dobljene v kontrolnih vzorcih odšteli od koncentracij, ki smo jih dobili v testni mešanici,
- 1000 – faktor, ki označuje količino testne mešanice (1000 µl),
- 0,2 – količina encimskega vzorca v mešanici (200 µl).

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

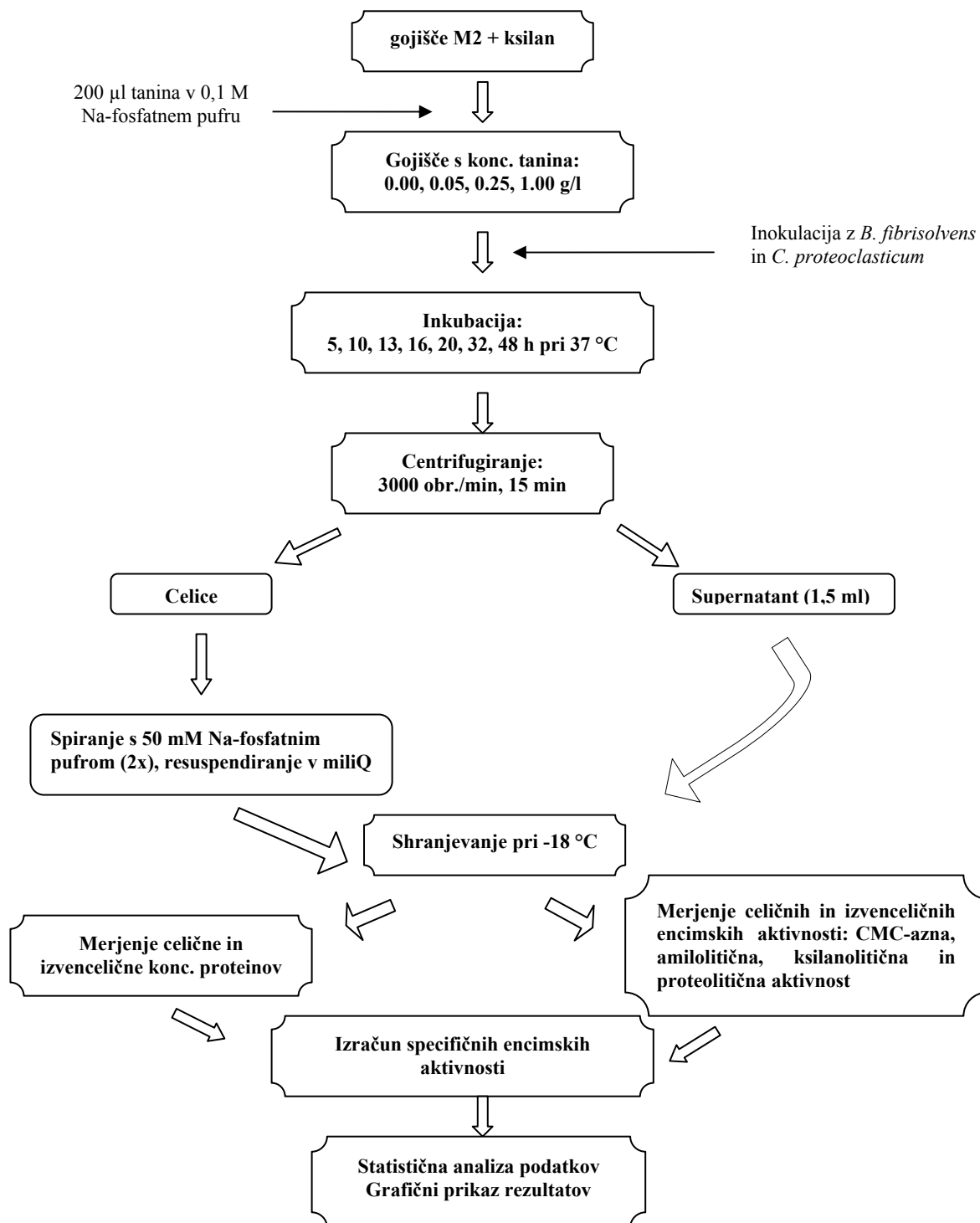
3.4 STATISTIČNA ANALIZA REZULTATOV

Pri statistični analizi podatkov smo uporabili metodo najmanjših kvadratov v postopku splošnih linearnih modelov (GLM) statističnega paketa SAS-STAT (SAS, 2002). Kot sistematski vplivi z nivoji so bili v model za vse lastnosti vključeni čas inkubacije (U_i), koncentracija tanina (T_j) ter interakcija med časom inkubacije in koncentracijo tanina (U_{ij}). Odvisno spremenljivko v modelu predstavlja y_{ijk} , medtem, ko je e_{ijk} ostanek.

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

Za primerjavo nivojev vpliva koncentracije tanina ob posameznih urah inkubacije smo uporabili multipli test sredin po Tukeyu, kjer je bila interakcija statistično značilna.

3.5 SHEMATSKI POTEK DELA

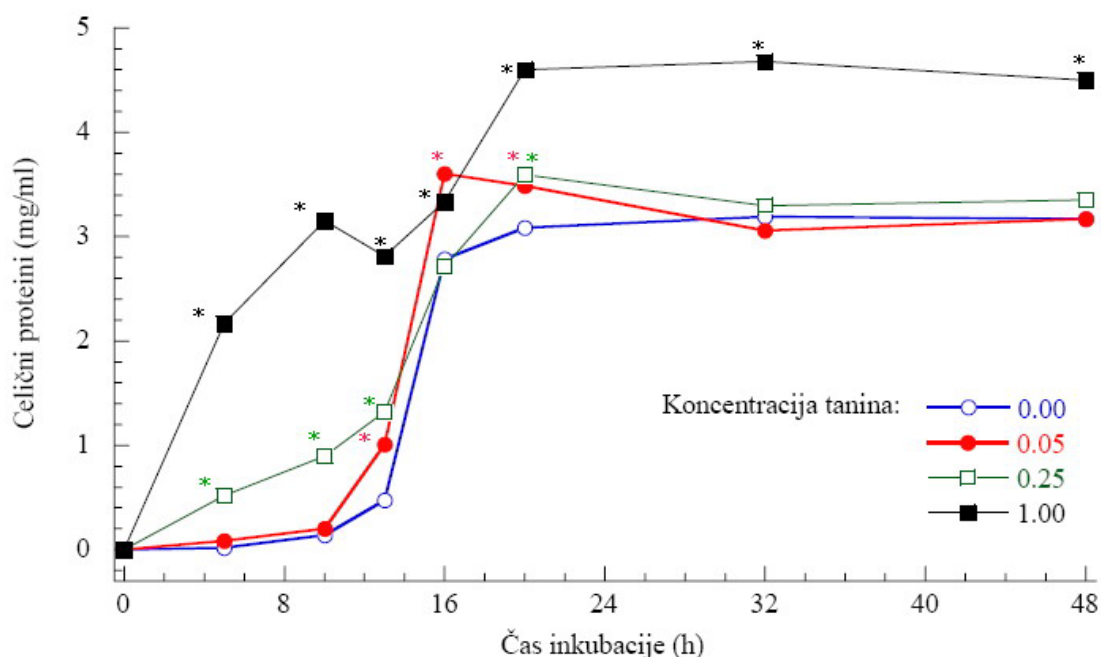


Slika 4: Shema poteka dela pri preučevanju vpliva taninskega pripravka Farmatan® na rast in encimske aktivnosti vampnih bakterij *B. fibrisolvens* in *C. proteoclasticum*

4. REZULTATI

4.1 RAST IN ENCIMSKE AKTIVNOSTI BAKTERIJE *B. fibrisolvens*

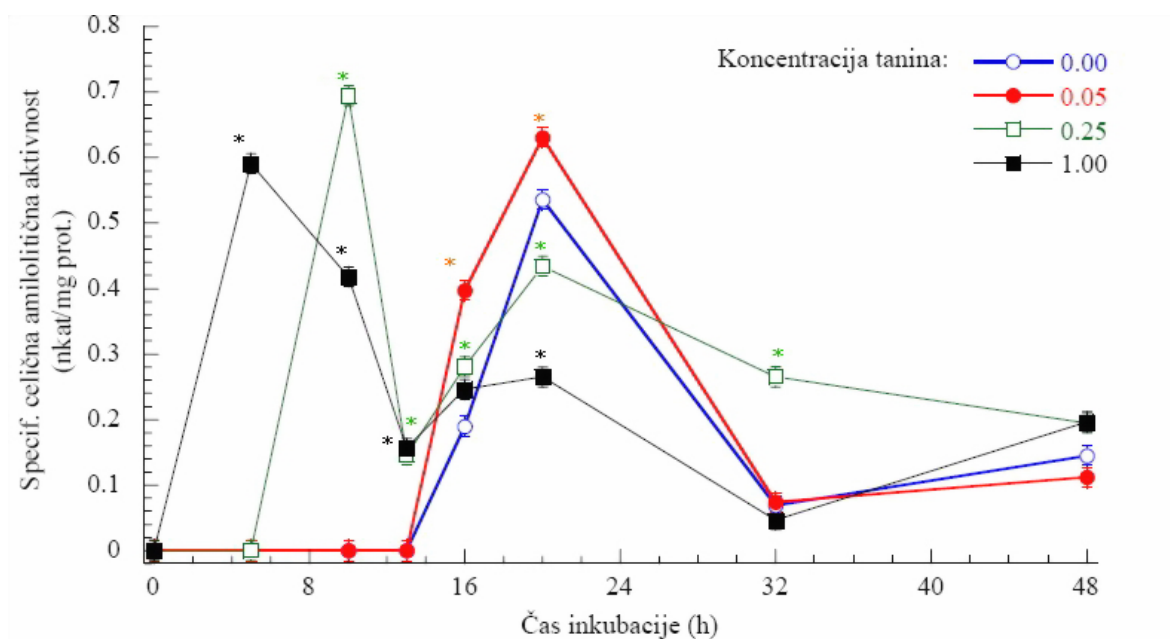
Delovanje taninskega pripravka Farmatan® na rast in encimske aktivnosti bakterije *B. fibrisolvens* smo ugotavljali med 48-urno inkubacijo. Meritve smo opravili pri sedmih različnih časih, in sicer po 5, 10, 13, 16, 20, 32 ter po 48 urah inkubacije. V poskusu smo preverjali vpliv treh koncentracij tanina. Kot kontrola nam je služila kultura brez dodanega tanina.



Slika 5: Rast bakterijske kulture *B. fibrisolvens* pri treh različnih dodanih koncentracijah taninskega pripravka Farmatan® (0,05 g/l, 0,25 g/l in 1 g/l) in kontrolni kulturi brez dodanega tanina (* - statistično značilno odstopanje od negativne kontrole; $p < 0,05$).

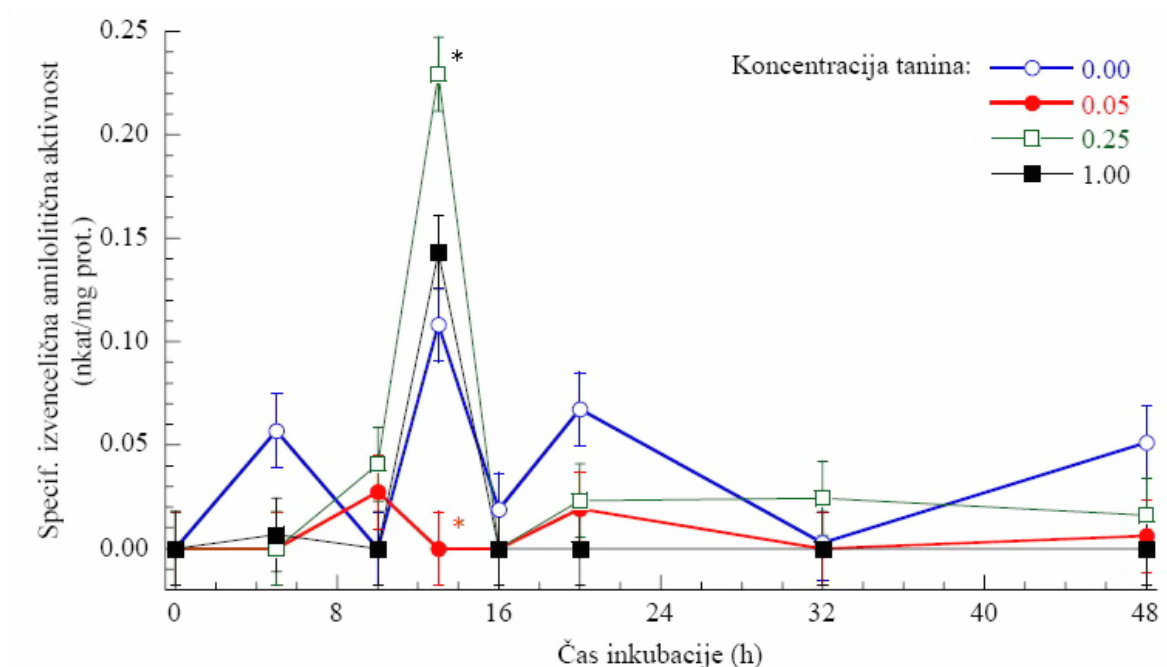
Rast bakterijske kulture smo spremljali z merjenjem koncentracije celičnih proteinov. Rastno krivuljo prikazuje slika 5. Z * so na grafih pri posameznih časih inkubacije označene vrednosti, ki se statistično razlikujejo vrednosti v negativni kontroli. Dodatek Farmatana® ima statistično značilen pozitiven vpliv na rast bakterije *B. fibrisolvens* pri vseh koncentracijah, ki so večje od 0,05 g/l. Pri tej koncentraciji pa je rast statistično značilno večja pri treh časih inkubacije (13., 16. in 20. uri). Ta se v večji meri izraža v logaritemski fazi rasti. Koncentracija 1,00 g/l močno pospešuje rast *B. fibrisolvens* in tudi vpliva na večji končni nivo celične biomase. Statistično značilne razlike so prisotne pri vseh časih, kjer so potekale meritve. Pri kontrolni kulturi in kulturi z 0,05 g/l dodanega Farmatana® lag faza traja približno do 10 ure inkubacije. Pri obeh višjih koncentracijah pa kultura takoj preide v fazo rasti. Preglednica s podrobnimi podatki, ki se nanašajo na sliko 5, je prikazana v Prilogi B1.

Slika 6 kaže spreminjanje celične amilolitične aktivnosti s časom ter vpliv, ki ga imajo posamezne koncentracije Farmatana®. Z večanjem koncentracije tanina aktivnosti prej dosežejo maksimalne vrednosti, kar je razvidno iz dveh vrhov na sliki. Amilolitični aktivnosti pri koncentracijah 0,25 in 1,00 g/l tvorita prvi vrh. Negativna kontrola in koncentracija tanina 0,05 g/l dosežeta maksimalne vrednosti kasneje (20. ura inkubacije) in tvorita drugi vrh. Srednje vrednosti in vrednosti p so prikazane v prilogi C.

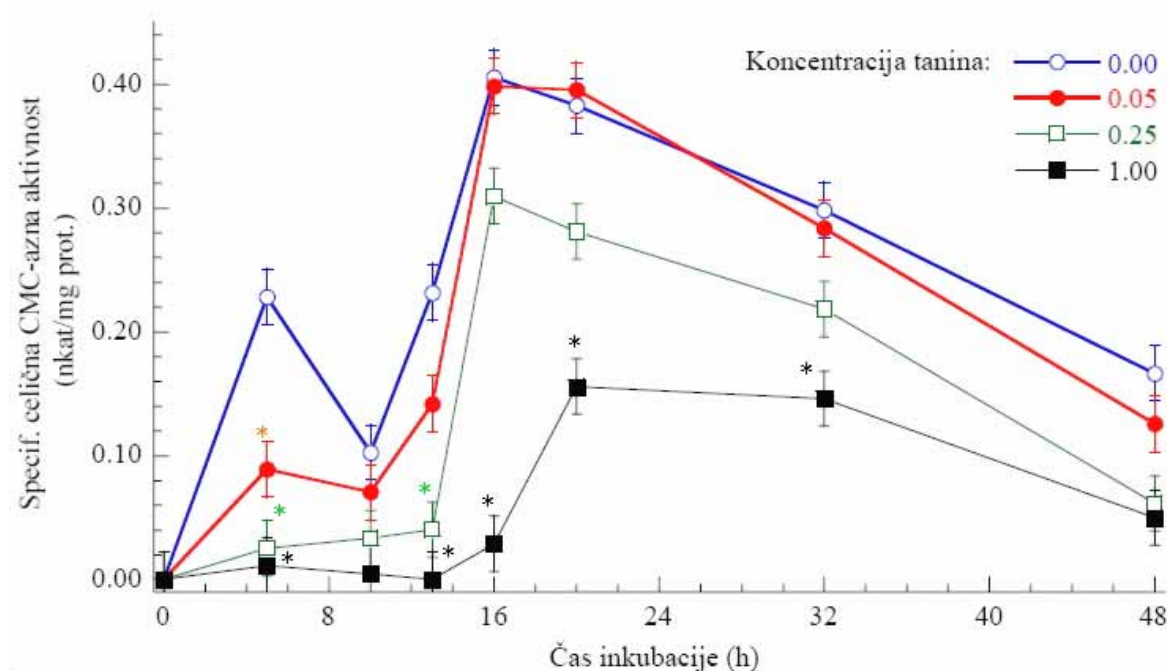


Slika 6: Specifična celična amilolitična aktivnost bakterijske kulture *B. fibrisolvens* pri treh različnih dodanih koncentracijah taninskega pripravka Farmatan® (0,05 g/l, 0,25 g/l in 1 g/l) in kontrolni kulturi brez dodanega tanina (* - statistično značilno odstopanje od negativne kontrole; $p < 0,05$).

Specifična izvencelična amilolitična aktivnost (stran 27) je v primerjavi s celično v splošnem vidno manjša, vrednosti pri nobeni koncentraciji tanina ne presežejo 0,25 nkat/mg prot. Prav tako ni opaznega izrazitega statističnega vpliva, ki bi ga imele posamezne koncentracije Farmatana® na encimske aktivnosti. Izjema sta vrednosti pri 13. uri inkubacije, kjer je aktivnost izvencelične amilaze pri 0,05 g/l v primerjavi z negativno kontrolo povsem inhibirana ter pri 0,25 g/l, kjer smo zabeležili statistično značilno povečanje aktivnosti. Omenjeni rezultati so prikazani na sliki 7, pripadajoče podatke pa vsebuje Priloga D.



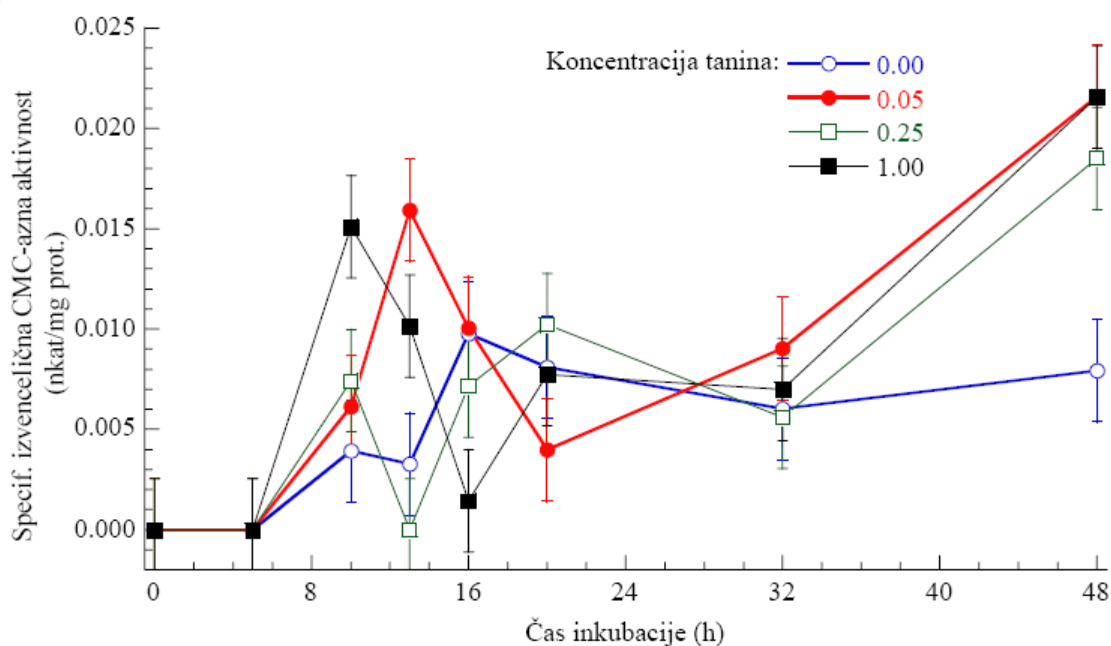
Slika 7: Specifična izvenselična amilolitična aktivnost bakterijske kulture *B. fibrisolvens* pri treh različnih dodanih koncentracijah taninskega pripravka Farmatan® (0,05 g/l, 0,25 g/l in 1 g/l) in kontrolni kulturi brez dodanega tanina (* - statistično značilno odstopanje od negativne kontrole; $p < 0,05$).



Slika 8: Specifična celična CMC-azna aktivnost bakterijske kulture *B. fibrisolvens* pri treh različnih dodanih koncentracijah taninskega pripravka Farmatan® (0,05 g/l, 0,25 g/l in 1 g/l) in kontrolni kulturi brez dodanega tanina (* - statistično značilno odstopanje od negativne kontrole; $p < 0,05$).

Vse testirane koncentracije Farmatana® zavirajo delovanje celičnih CMC-az (slika 8). Z večanjem koncentracije se zaviralni vpliv tanina povečuje. Najmanjši vpliv je pri koncentraciji 0,05 g/l, aktivnost je statistično značilno manjša le pri 5. uri inkubacije. Koncentracija 1,00 g/l najbolj zavira celično CMC-azno aktivnost. Statistično značilno odstopanje od negativne kontrole pri največji koncentraciji Farmatana® je, razen pri 10. in 48. uri, prisotno na celem inkubacijskem območju. Podrobni podatki, ki se navezujejo na sliko 8, so prikazani v Prilogi E.

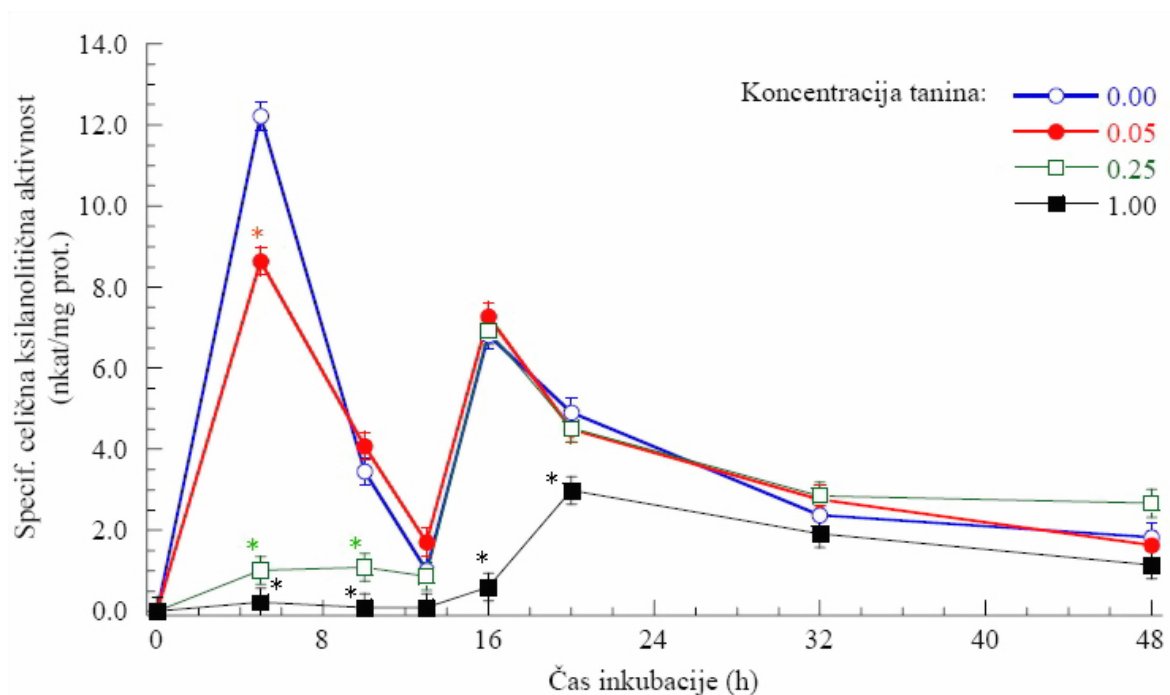
Slika 9 prikazuje specifične izvencelične CMC-azne aktivnosti. V primerjavi s celično aktivnostjo so vrednosti izrazito nižje. Le te v nobenem primeru ne dosežejo 0,025 nkat/mg prot.. Statistično izrazitega vpliva taninov ni zaznati pri nobenem meritvenem času in pri nobeni koncentraciji. Priloga F vsebuje pripadajoče ocenjene srednje vrednosti in vrednosti p.



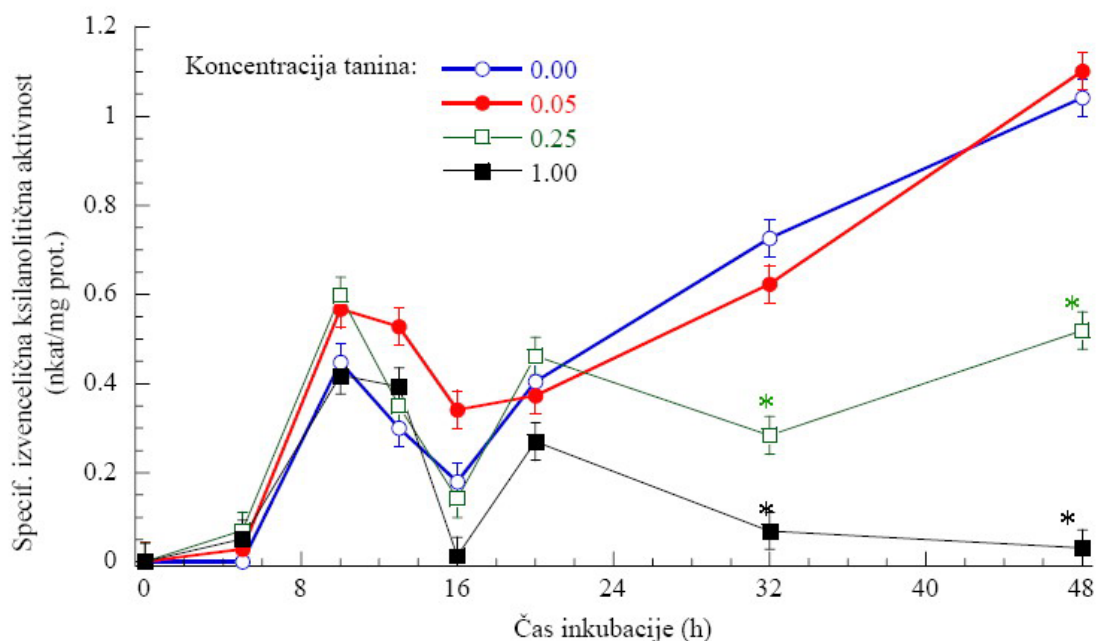
Slika 9: Specifična izvencelična CMC-azna aktivnost bakterijske kulture *B. fibrisolvens* pri treh različnih dodanih koncentracijah taninskega pripravka Farmatan® (0,05 g/l, 0,25 g/l in 1 g/l) in kontrolni kulturi brez dodanega tanina (* - statistično značilno odstopanje od negativne kontrole; $p < 0,05$).

Sliki 10 in 11 prikazujeta, kakšen učinek ima dodatek različnih koncentracij Farmatana® na razgradnjo ksilana. Slika 10 prikazuje specifične aktivnosti celičnih, slika 11 pa izvenceličnih ksilanaz. Tanini imajo zaviralen vpliv tudi na ksilanaze. Za najbolj učinkovito se je izkazala koncentracija 1,00 g/l, ki ima največji zaviralni učinek tako pri celični kot tudi izvencelični ksilanazni aktivnosti. Farmatan® celično aktivnost zavira v prvi fazi inkubacije (do 20. ure), pri izvencelični aktivnosti pa se po 20. uri ta vpliv šele začne izražati in se nadaljuje do konca inkubacije. Z manjšanjem koncentracije Farmatana®

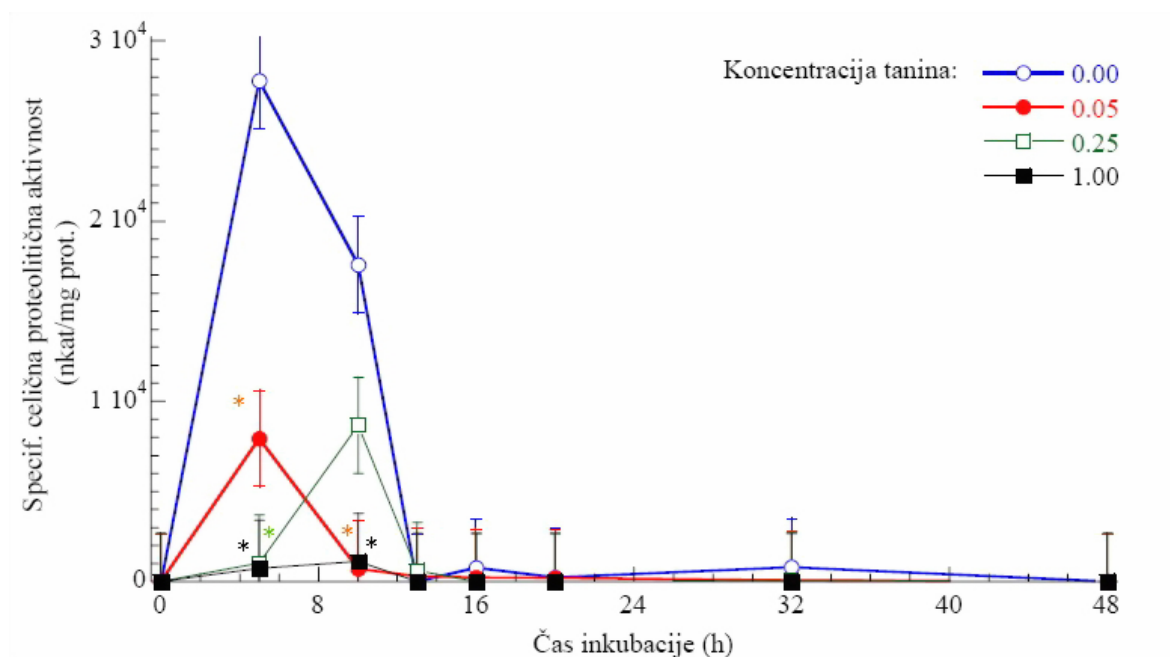
se vpliv tanina postopoma zmanjšuje. Pri najmanjši koncentraciji tanina (0,05 g/l) razlik v primerjavi z negativno kontrolo skoraj ni, z izjemo celične aktivnosti pri 5. uri inkubacije, kjer je vrednost statistično značilno manjša kot pri kontroli. Tudi pri delovanju ksilanaz opazamo, da je celična aktivnost bistveno večja kot izvencelična. Bolj podrobni podatki za celično aktivnost so v Prilogi G, za izvencelično pa v Prilogi H.



Slika 10: Specifična celična ksilanolitična aktivnost bakterijske kulture *B. fibrisolvens* pri treh različnih dodanih koncentracijah taninskega pripravka Farmatan® (0,05 g/l, 0,25 g/l in 1 g/l) in kontrolni kulturi brez dodanega tanina (* - statistično značilno odstopanje od negativne kontrole; $p < 0,05$).



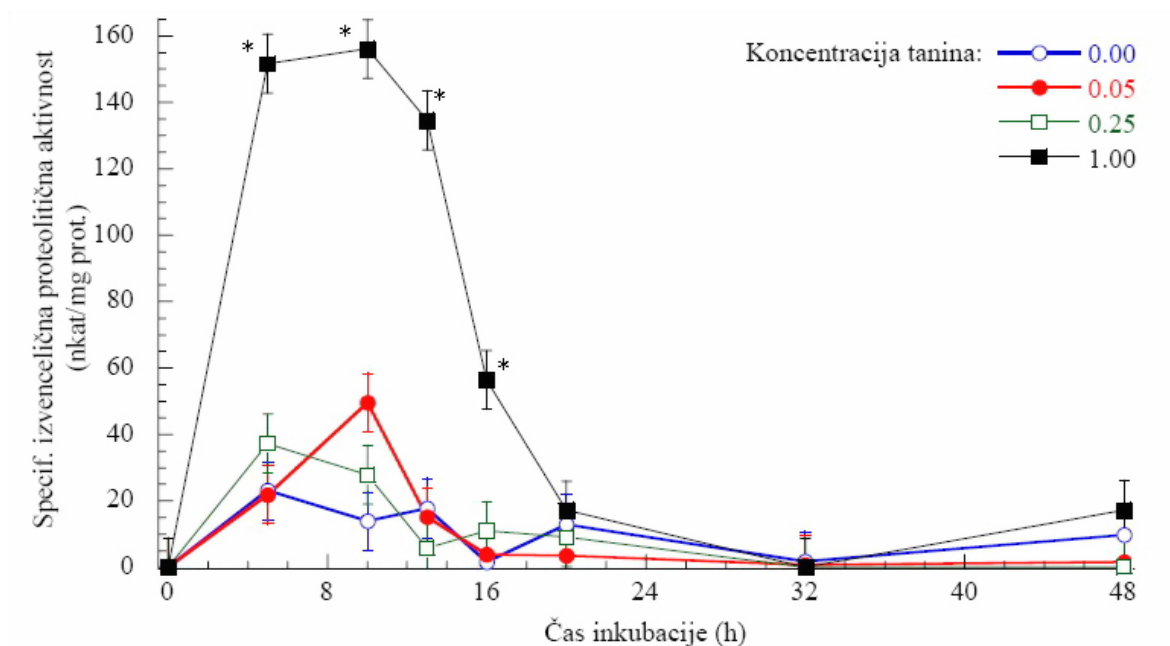
Slika 11: Specifična izvencelična ksilanolitična aktivnost bakterijske kulture *B. fibrisolvens* pri treh različnih dodanih koncentracijah taninskega pripravka Farmatan® (0,05 g/l, 0,25 g/l in 1 g/l) in kontrolni kulturi brez dodanega tanina (* - statistično značilno odstopanje od negativne kontrole; $p < 0,05$).



Slika 12: Specifična celična proteolitična aktivnost bakterijske kulture *B. fibrisolvens* pri treh različnih dodanih koncentracijah taninskega pripravka Farmatan® (0,05 g/l, 0,25 g/l in 1 g/l) in kontrolni kulturi brez dodanega tanina (* - statistično značilno odstopanje od negativne kontrole; $p < 0,05$).

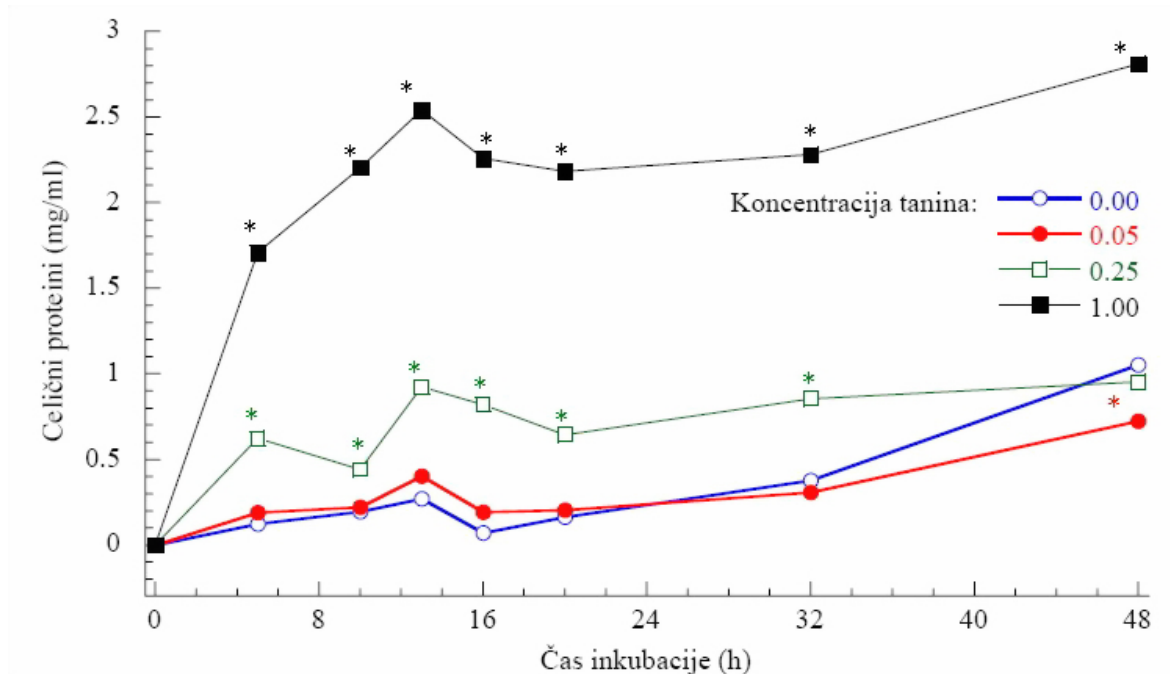
Specifična celična proteolitična aktivnost, ki jo prikazuje slika 12, je pri *B. fibrisolvens* največja od vseh encimskih aktivnosti. Prisotna je le do 13. ure, kasneje proteolize tako rekoč ni zaznati. Pri vseh koncentracijah Farmatana® je opazen zaviralen vpliv na proteolitično aktivnost. Največji je pri koncentraciji 1 g/l. Vrednosti p in srednje vrednosti so prikazane v Prilogi I.

Iz prikaza izvencelične proteolitične aktivnosti (slika 13) je razvidno, da 1,00 g/l dodanega tanina močno spodbudi delovanje izvenceličnih proteaz. Od negativne kontrole statistično odstopa le do 16. ure, v nadaljevanju je aktivnost pri vseh kulturah zelo majhna oz. je praktično ni. Proteolitična aktivnost je pri ostalih primerih tudi v začetni fazi zelo majhna, vrednosti se med seboj bistveno ne razlikujejo. Razlike med celično in izvencelično aktivnostjo so pri proteolizi najbolj značilne. V Prilogi J so podani podrobnejši podatki.



Slika 13: Specifična izvencelična proteolitična aktivnost bakterijske kulture *B. fibrisolvens* pri treh različnih dodanih koncentracijah taninskega pripravka Farmatan® (0,05 g/l, 0,25 g/l in 1 g/l) in kontrolni kulturi brez dodanega tanina (* - statistično značilno odstopanje od negativne kontrole; $p < 0,05$).

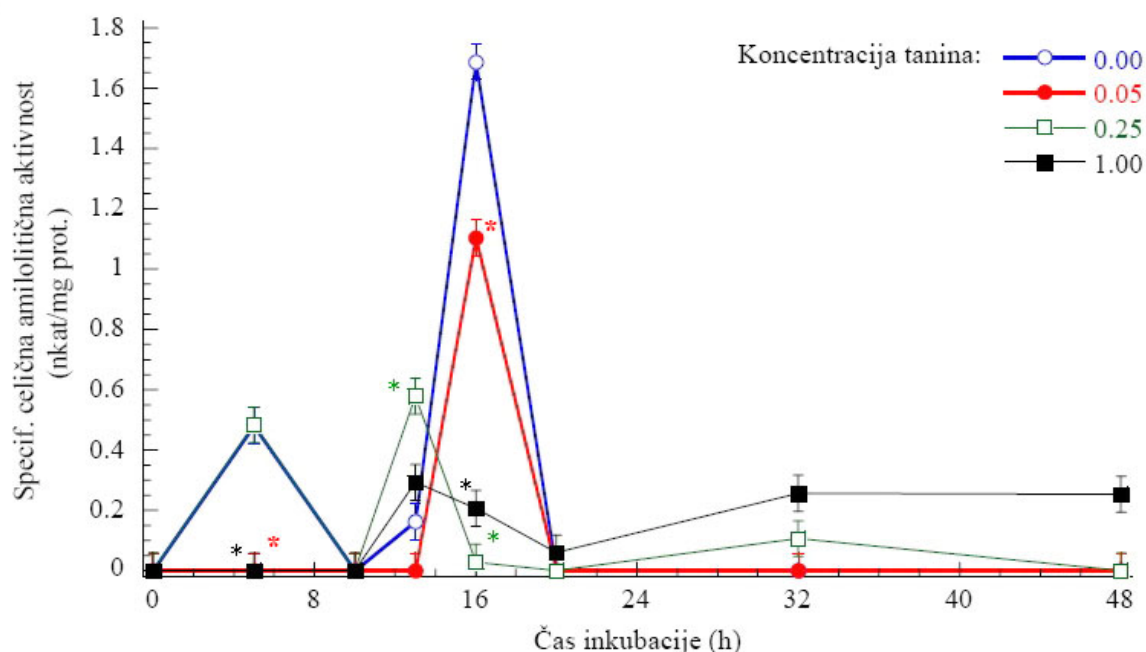
4.2 RAST IN ENCIMSKE AKTIVNOSTI BAKTERIJE *C. proteoclasticum*



Slika 14: Rast bakterijske kulture *C. proteoclasticum* pri treh različnih dodanih koncentracijah taninskega pripravka Farmatan® (0,05 g/l, 0,25 g/l in 1 g/l) in kontrolni kulturi brez dodanega tanina (* - statistično značilno odstopanje od negativne kontrole; $p < 0,05$).

Podobno kot pri *B. fibrisolvens*, smo vpliv taninskega pripravka Farmatan® preučevali tudi pri bakteriji *Clostridium proteoclasticum*. Vrednosti, ki se statistično razlikujejo od negativne kontrole, so na slikah označene z *. Na sliki 14 je prikazana rast omenjene bakterije v prisotnosti treh različnih koncentracij Farmatana® in rast kontrolne kulture, kjer tanin ni bil dodan. Pri opisu krivulje pri negativni kontroli bakterijske kulture *C. proteoclasticum* ne moremo govoriti o običajni rastni krivulji, saj posamezne faze rasti niso jasno razvidne. Prav tako pri najmanjši koncentraciji dodanega tanina (0,05 g/l) praktično ni opaziti vpliva na rast. Veliko večji vpliv imata koncentraciji 0,25 in 1,00 g/l, ki statistično značilno pospešujeta rast bakterije. Največji vpliv ima koncentracija 1,00 g/l. Poleg pospešene rasti se vpliv pri tej koncentraciji odraža tudi na drugih nivojih. Farmatan® močno skrajša lag fazo, opazimo pa tudi bistveno povečan končni nivo celične biomase. Podrobnejši podatki so prikazani v Prilogi K.

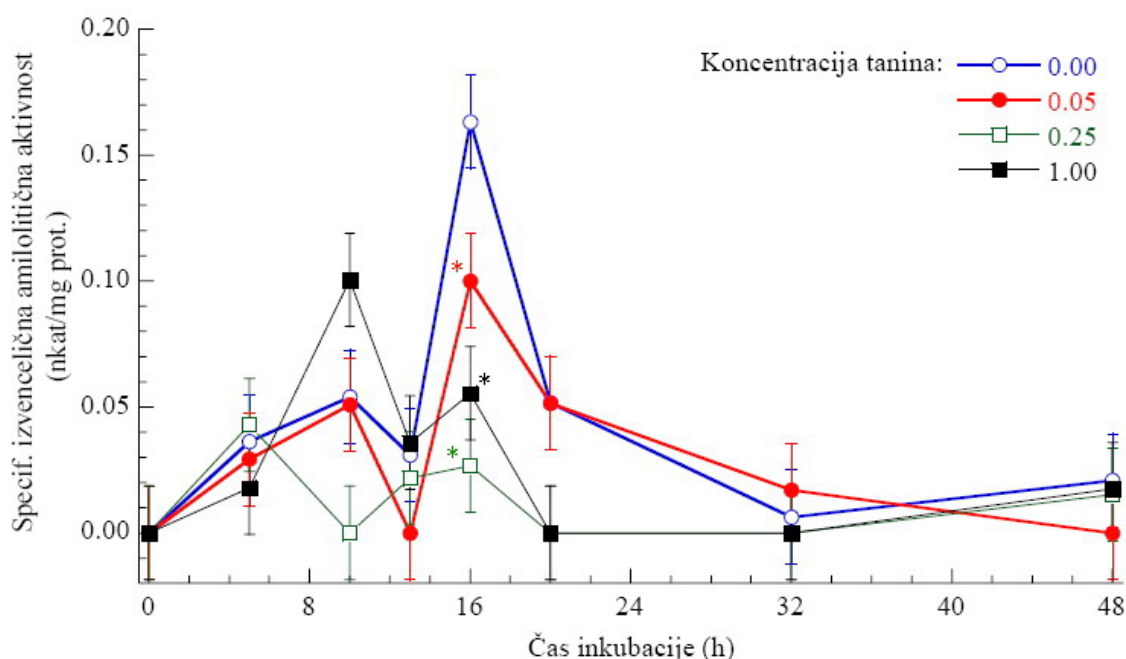
Slika 15 prikazuje vpliv Farmatana® na specifično celično amilolitično aktivnost bakterijske kulture *C. proteoclasticum*. Največji vpliv je opazen pri koncentraciji 1,00 g/l. Amilolitična aktivnost te kulture je inhibirana znotraj celotnega inkubacijskega časa, statistično značilna odstopanja od negativne kontrole so pri 5. in 16. uri inkubacije. Zaviranje amilolitične aktivnosti smo dokazali tudi pri koncentracijah tanina 0,05 in 0,25 g/l. Pri najmanjši koncentraciji Farmatana® so statistično značilne manjše vrednosti pri 5. in 16. uri, pri koncentraciji 0,25 g/l pa pri 10. in 16. uri inkubacije. Srednje vrednosti ter vrednosti p so prikazane v Prilogi M.



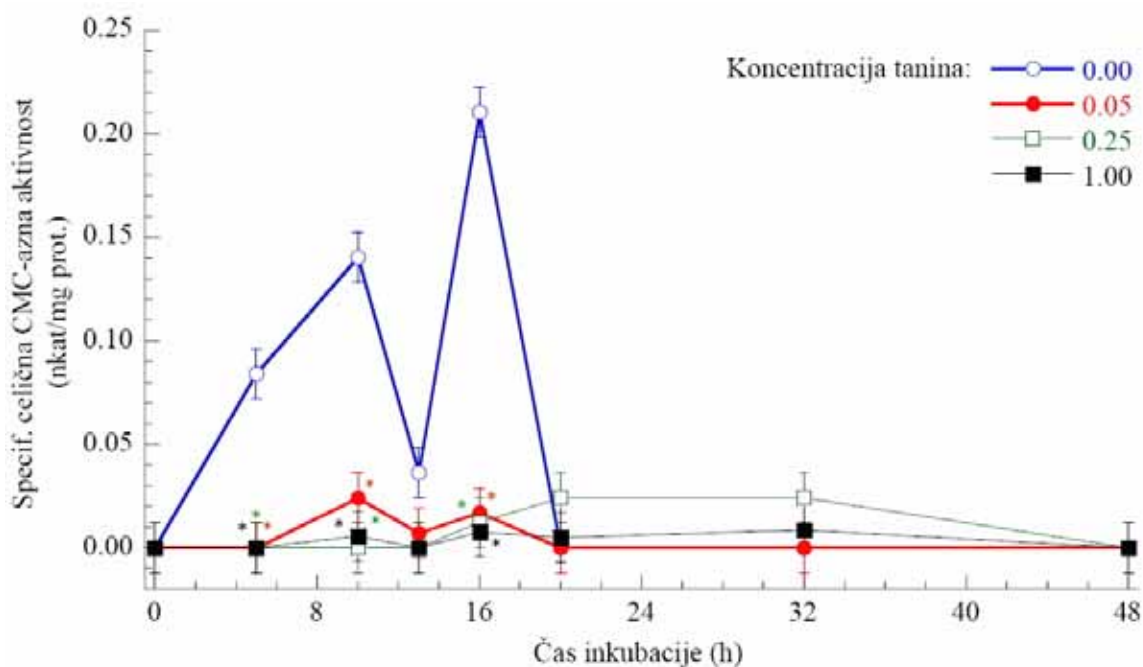
Slika 15: Specifična celična amilolitična aktivnost bakterijske kulture *C. proteoclasticum* pri treh različnih dodanih koncentracijah taninskega pripravka Farmatan® (0,05 g/l, 0,25 g/l in 1 g/l) in kontrolni kulturi brez dodanega tanina (* - statistično značilno odstopanje od negativne kontrole; $p < 0,05$).

Vpliv Farmatana® na izvencelično aktivnost amilaz prikazuje slika 16. Aktivnost teh encimov je manjša kot aktivnost celičnih amilaz. Farmatan® je zaviral tudi izvencelično

amilolitično aktivnost. Statistično značilno inhibicijo smo pri vseh koncentracijah tanina dokazali le pri 16. uri inkubacije. Največji vpliv je imela največja koncentracija tanina (1,00 g/l). Podrobnejši podatki, ki se nanašajo na sliko 16, so prikazani v Prilogi N.



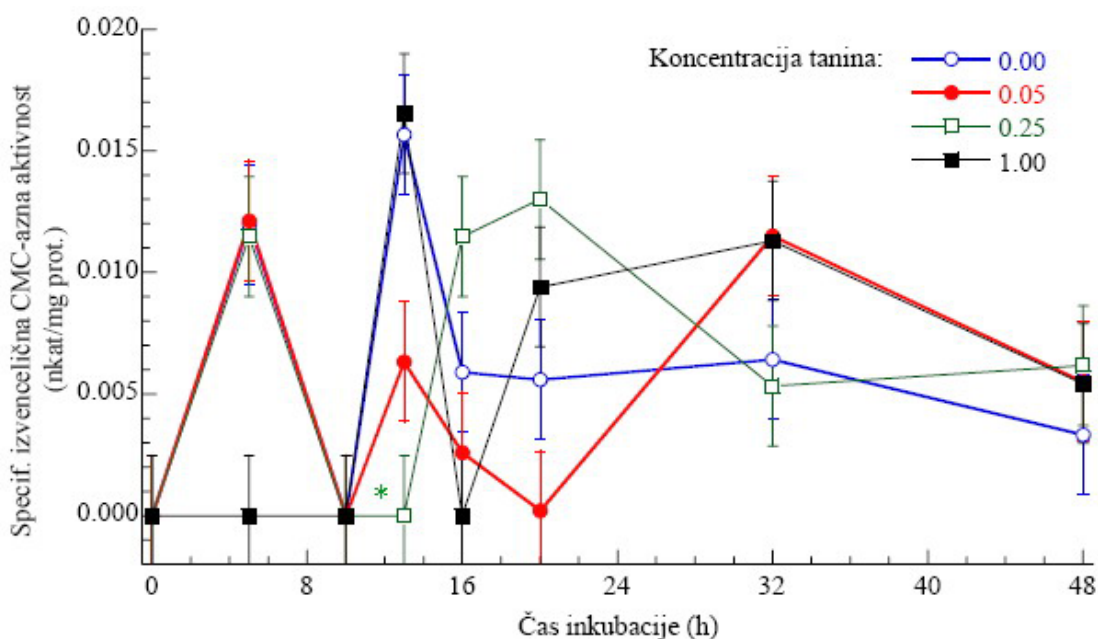
Slika 16: Specifična izvencelična amilolitična aktivnost bakterijske kulture *C. proteoclasticum* pri treh različnih dodanih koncentracijah taninskega pripravka Farmatan® (0,05 g/l, 0,25 g/l in 1 g/l) in kontrolni kulturi brez dodanega tanina (* - statistično značilno odstopanje od negativne kontrole; $p < 0,05$).



Slika 17: Specifična celična CMC-azna aktivnost bakterijske kulture *C. proteoclasticum* pri treh različnih dodanih koncentracijah taninskega pripravka Farmatan® (0,05 g/l, 0,25 g/l in 1 g/l) in kontrolni kulturi brez dodanega tanina (* - statistično značilno odstopanje od negativne kontrole; $p < 0,05$).

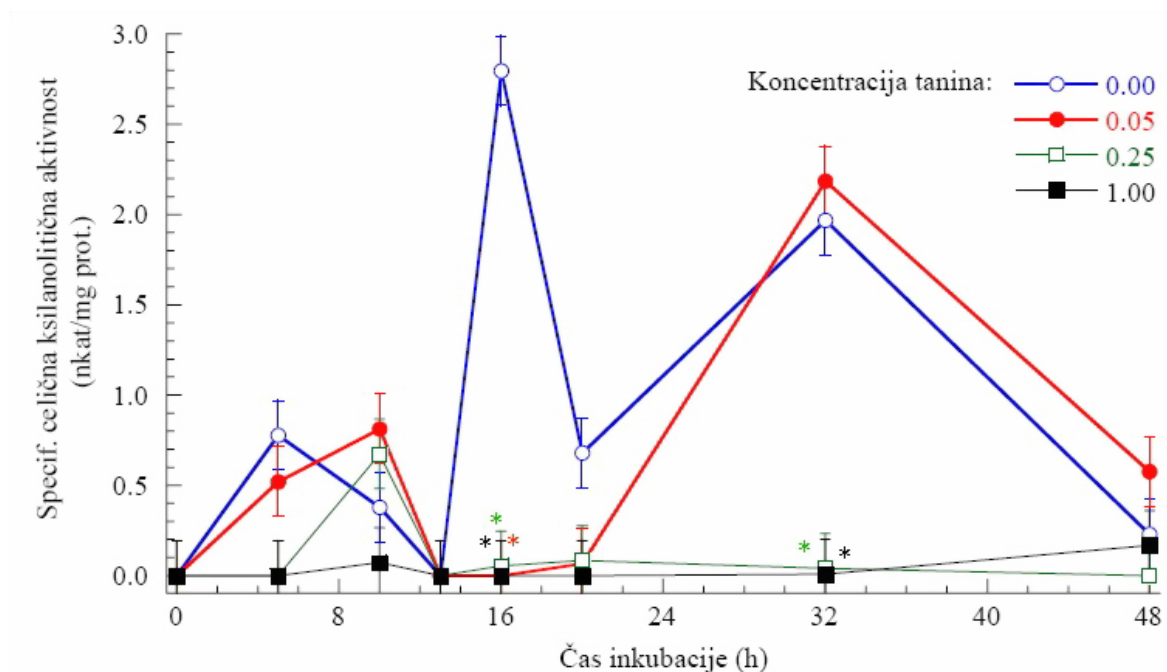
Specifična celična aktivnost CMC-az bakterije *C. proteoclasticum* je majhna, kar je razvidno iz krivulje kontrolne kulture na sliki 17. Aktivnost encimov je prisotna v prvih dvajsetih urah, maksimalno vrednost doseže pri 16. uri inkubacije. Dodatek vseh treh koncentracij Farmatana® je zaviral že tako majhne CMC-azne aktivnosti, ki so z izjemo 13. ure vse do 20. ure statistično značilno manjše kot pri kontrolni kulturi. Vrednosti p in srednje vrednosti so prikazane v Prilogi O.

Slika 18 kaže, da taninski pripravek Farmatan®, z izjemo ene same vrednosti (13. ura, 0,25 g/l), nima statistično značilnega vpliva na aktivnost izvenceličnih CMC-az. Aktivnost teh encimov je pri vseh kulturah manjša med celotno inkubacijsko in ne doseže niti 0,018 nkat/mg proteinov. Podrobnejši podatki, ki se navezujejo na sliko 18, so prikazani v Prilogi P.

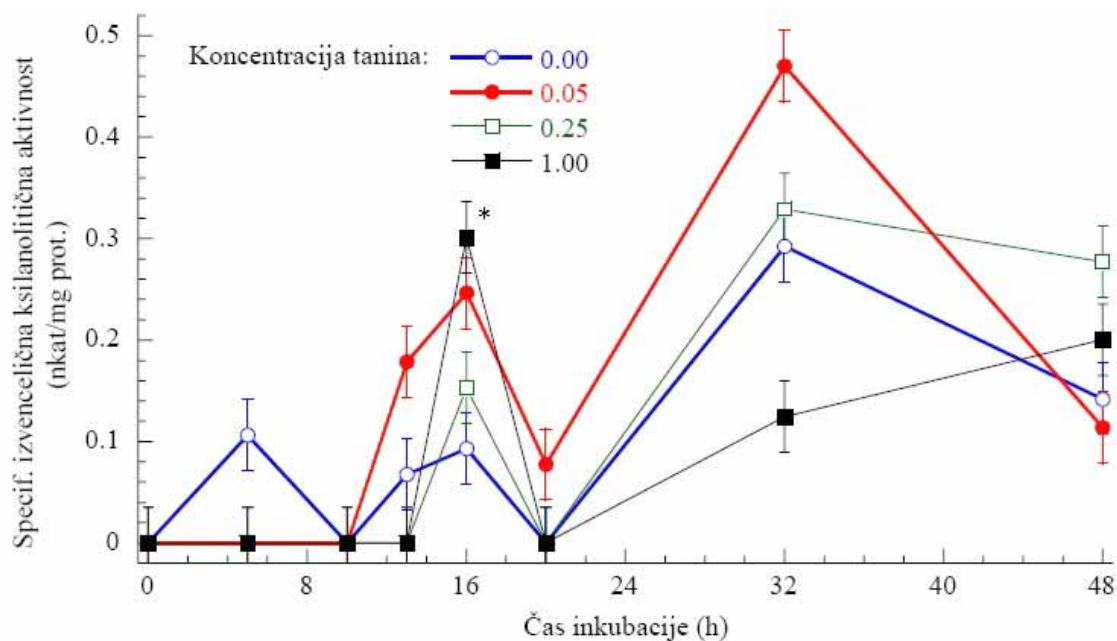


Slika 18: Specifična izvencelična CMC-azna aktivnost bakterijske kulture *C. proteoclasticum* pri treh različnih dodanih koncentracijah taninskega pripravka Farmatan® (0,05 g/l, 0,25 g/l in 1 g/l) in kontrolni kulturi brez dodanega tanina (* - statistično značilno odstopanje od negativne kontrole; $p < 0,05$).

Vpliv kostanjevih taninov v Farmatanu® na aktivnost celičnih ksilanaz (slika 19) se pokaže šele po 13. uri inkubacije, in sicer je najbolj izrazit pri koncentracijah 0,25 in 1,00 g/l. Z izjemo 13. ure pri koncentraciji 0,25 g/l aktivnosti pri obeh kulturah tako rekoč ni zaznati, vendar so razlike statistično značilne le pri 16. in 32. uri. Aktivnost kontrolne kulture je v prvih trinajstih urah majhna, po tej meritvi pa je aktivnost večja, maksimalno vrednost pa doseže pri naslednjem merilnem času. Pripadajoči podatki so prikazani v Prilogi R.



Slika 19: Specifična celična ksilanolitična aktivnost bakterijske kulture *C. proteoclasticum* pri treh različnih dodanih koncentracijah taninskega pripravka Farmatan® (0,05 g/l, 0,25 g/l in 1 g/l) in kontrolni kulturi brez dodanega tanina (* - statistično značilno odstopanje od negativne kontrole; $p < 0,05$).

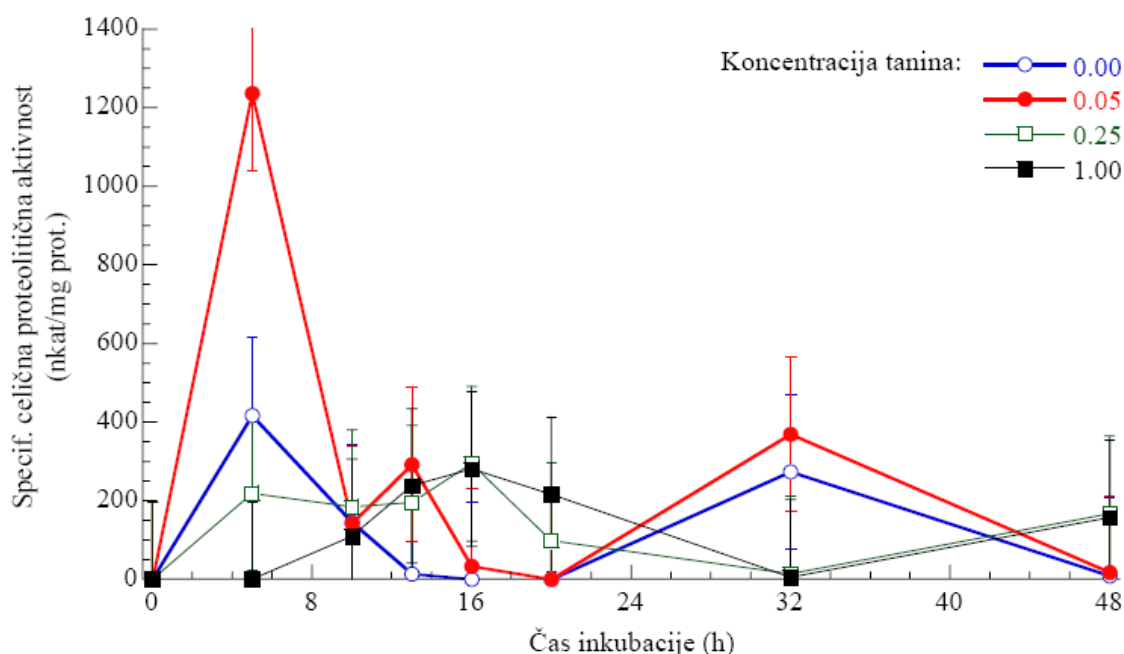


Slika 20: Specifična izvencelična ksilanolitična aktivnost bakterijske kulture *C. proteoclasticum* pri treh različnih dodanih koncentracijah taninskega pripravka Farmatan® (0,05 g/l, 0,25 g/l in 1 g/l) in kontrolni kulturi brez dodanega tanina (* - statistično značilno odstopanje od negativne kontrole; $p < 0,05$).

Slika 20 prikazuje specifično izvencelično ksilanolitično aktivnost. Vrednosti so v primerjavi s celično frakcijo precej nižje. Tanini na delovanje encimov niso imeli bistvenega vpliva, opazimo lahko le rahlo povečanje aktivnosti pri koncentraciji 0,05 g/l,

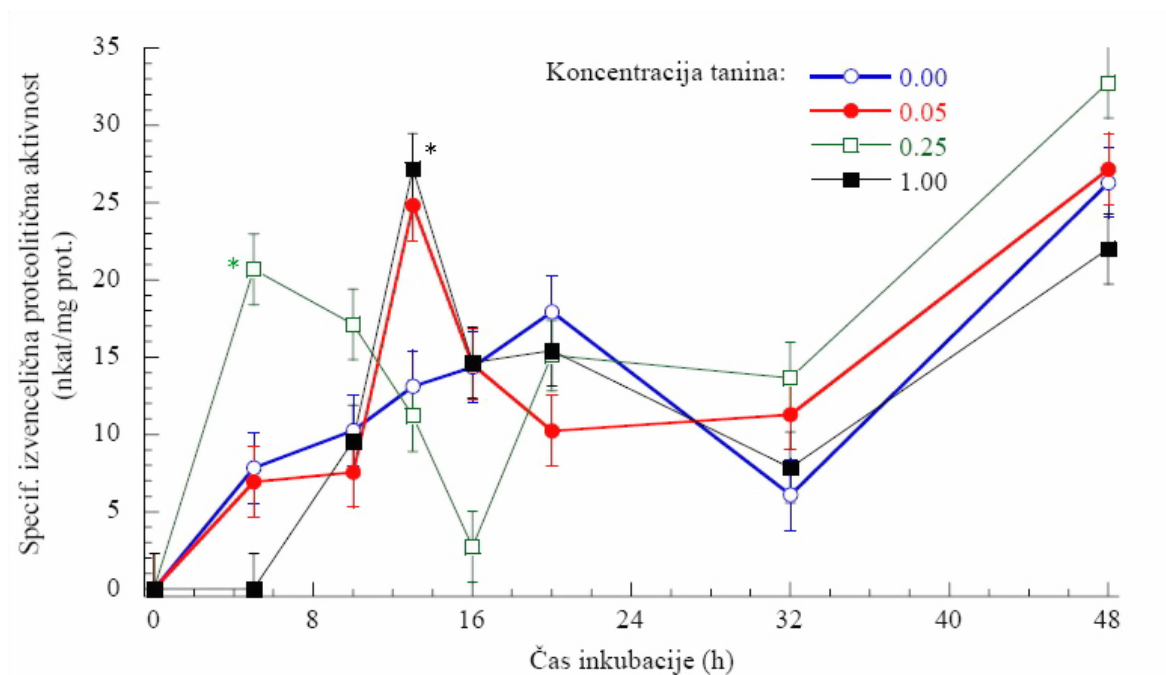
vendar odstopanja od kontrole niso statistično značilna. Podrobnejše podatke prikazuje Priloga S.

Pri specifični aktivnosti celičnih proteaz odstopanja od negativne kontrole niso prikazana, saj interakcija med časom inkubacije in koncentracijo Farmatana® ni bila statistično značilna (Priloga K), prikazane so le izračunane srednje vrednosti (Priloga V). Kljub temu lahko na sliki 21 opazimo, da je dodatek tanina povečal proteolitično aktivnost, in sicer je pri koncentraciji 0,05 g/l ta vpliv v največji meri viden do 16. ure inkubacije, pri ostalih dveh kulturah pa se izraža med 10. in 20. uro, drugače pa so vrednosti v primerjavi s kontrolo manjše.



Slika 21: Specifična celična proteolitična aktivnost bakterijske kulture *C. proteoclasticum* pri treh različnih dodanih koncentracijah taninskega pripravka Farmatan® (0,05 g/l, 0,25 g/l in 1 g/l) in kontrolni kulturi brez dodanega tanina (* - statistično značilno odstopanje od negativne kontrole; $p < 0,05$).

Slika 22 prikazuje vpliv Farmatana® na izvencelično proteolitično aktivnost, ki je manjša kot aktivnost celičnih proteaz. Vpliv kostenjevega tanina je opazen – statistično značilen le v dveh točkah. Pri koncentraciji 0,25 g/l pri 5. uri inkubacije ter pri 1,00 g/l pri 13. uri tanini pospešujejo izvencelično proteolitično aktivnost, druge vpliva nismo uspeli dokazati. Podrobnejši podatki, ki se navezujejo na sliko 22, so prikazani v Prilogi T.



Slika 22: Specifična izvencelična proteolitična aktivnost bakterijske kulture *C. proteoclasticum* pri treh različnih dodanih koncentracijah taninskega pripravka Farmatan® (0,05 g/l, 0,25 g/l in 1 g/l) in kontrolni kulturi brez dodanega tanina (* - statistično značilno odstopanje od negativne kontrole; $p < 0,05$).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Tanini imajo zaradi svojih lastnosti pomembno mesto v prehrani živali. Če so prisotni v velikih koncentracijah, lahko negativno vplivajo na mikrobno populacijo vampa in na zdravje samih živali. V ustreznih manjših koncentracijah pa imajo pozitiven vpliv na celoten proces prebave krme in absorbcijo hranilnih snovi v tankem črevesu.

Zaradi ugodnih učinkov na živali, ki so posledica različnih mehanizmov delovanja, lahko tanine uporabljamo tudi kot krmne dodatke. Ker obstaja veliko različnih kemijskih oblik taninov, ki so posledica različnega izvora in priprave taninskih pripravkov, je pomembno ovrednotenje vpliva posamezne vrste in različnih koncentracij tanina na mikrobno združbo. Raziskave na čistih kulturah vampnih mikroorganizmov so potrebne za boljše razumevanje mehanizmov delovanja.

V našem primeru sta bila testna organizma vampni bakteriji, *B. fibrisolvens* in *C. proteoclasticum*. Obe vrsti sta pomembna člana vampne mikrobiote. *B. fibrisolvens* je poleg tega, da jo uvršajo med dominantne vrste v vampu, tudi metabolno zelo aktivna (Kalmokoff in Teather, 1997; Willems in sod., 1996). Poleg fermentacije velikega števila enostavnih sladkorjev, hidrolize škroba, je med najaktivnejšimi razgrajevalci ksilana ter, kar je nas še posebej pomembno, izraža veliko proteolitično aktivnost (Cotta in Hespell, 1986; Cotta in Zeltwanger, 1995). Druga bakterija, *C. proteoclasticum*, je sposobna izrabe topnih ogljikovih hidratov, upali smo, da izraža veliko aktivnost proteolitičnih encimov (Attwood in sod., 1996). Zaradi naštetih lastnosti bomo lahko na podlagi dobljenih rezultatov poleg vpliva tanina na rast, sklepali tudi na vpliv na štiri bistvene metabolne procese, t.j. razgradnjo škroba, celuloze, ksilana in proteinov. Kot vir tanina nam je služil pripravek Farmatan®, ki vsebuje tanine iz pravega kostanja in je kot domači proizvod pogosto uporabljen krmni dodatek pri prireji živali v Sloveniji. Živinorejci ga v veliki meri uporabljajo kot enega od načinov za zaščito krmnih proteinov pred popolno razgradnjo v vampu. Koncentracije Farmatana®, ki smo jih preverjali v naši raziskavi, smo izbrali glede na priporočene količine s strani proizvajalca. Priporočen dnevni odmerek v krmi za prežvekovalce znaša 0,25 g/l. Ta vrednost je ocenjena na podlagi približnega volumna vampa ter ustrezne količine taninov, ki so brez škodljivih vplivov še lahko prisotne v krmi. Poleg omenjene smo preverjali tudi koncentracijo 0,05 g/l ter koncentracijo, ki močno presega priporočeno t.j. 1,00 g/l.

5.1 VPLIV FARMATANA® NA RAST BAKTERIJ *B. fibrisolvens* IN *C. proteoclasticum*

Rast obeh bakterij smo sledili z merjenjem koncentracije celičnih proteinov. Kostanjevi tanini, ki so prisotni v pripravku Farmatan®, vplivajo na rast obeh bakterijskih kultur. Pri obeh je moč zaznati povečanje rasti, vendar se vpliv v večji meri izraža pri bakteriji *C. proteoclasticum* (slika 14). Pri *B. fibrisolvens* rast pospešujejo vse tri uporabljene koncentracije. Iz slike 5 je razvidno, da je rast najbolj povečana pri največji koncentraciji

(1,00 g/l), in sicer so koncentracije celičnih proteinov pri tej kulturi v primerjavi s kontrolno kulturo večje v celotnem inkubacijskem času. Poleg samih odstopanj v koncentraciji proteinov, je opazna tudi razlika v poteku rasti, predvsem v začetni stopnji. Kultura brez dodanega tanina je do 10. ure v lag fazi, po tem inkubacijskem času pa nastopi intenzivna rast, ki se jasno izraža tudi na poteku krivulje. Koncentracija 1,00 g/l povzroči skrajšanje lag faze. Koncentracija Farmatana® 0,25 g/l prav tako pospešuje rast celic, vendar je rast manj intenzivna kot pri kulturi z največ dodanega tanina. Koncentracija 0,05 g/l je zelo majhna, zato je pri tej kulturi po pričakovanjih najmanjši vpliv na rast, ki je povečana le v logaritemski fazi. Rastne krivulje so, z izjemo začetne stopnje pri največji koncentraciji, pri vseh kulturah zelo podobne.

Tudi pri *C. proteoclasticum* se rastne krivulje precej ujemajo med seboj. Največje razlike so zopet pri kulturi z največ dodanega Farmatana®, kjer opazimo najhitrejšo rast. Koncentracija 0,25 g/l je prav tako povzročila povečanje rasti, vendar manj kot pri 1,00 g/l. Razlike so tudi v tem primeru statistično večinoma značilne (razen pri 48. uri). Vrednosti so pri koncentraciji 0,05 g/l v primerjavi z negativno kontrolo le malenkostno višje in niso statistično značilne. Po 32 urah inkubacije pri vseh kulturah opazimo povečanje rasti. Rast kontrolne kulture *C. proteoclasticum* je bila počasna in brez izrazitih faz rasti. Iz tega lahko sklepamo, da se začnejo celice šele intenzivneje razmnoževati šele po 32. uri in da vzpon lahko nakazuje logaritemsko fazo. Pri koncentraciji tanina 1,00 g/l je rast občutno večja, po 16 urah že nastopi stacionarna faza, zato je vzrok za ponoven porast potrebno poiskati drugje. Eden od možnih vzrokov bi lahko bila sprememba pH v gojišču. Po podatkih Attwooda in sod. (1996) pH v gojišču po končani inkubaciji znaša 5,8. Ta podatek je za glukozno gojišče. V našem primeru je imelo gojišče drugačno sestavo. Meritve pH vrednosti smo opravili naknadno po ostalih testih, vendar smo imeli težave z živostjo seva *C. proteoclasticum*. pH smo zato merili le pri bakteriji *B. fibrisolvens*. Rezultati so prikazani v Prilogi U, kjer vidimo, da se je z večanjem koncentracije Farmatana® v gojišču manjšal padec pH po končani inkubaciji, tako po 24 kot tudi po 48 urah. pH negativne kontrole je iz začetnega 6,5 padel na 5,19 (po 24 urah) oz. na 5,03 (po 48 urah inkubacije). pH pri 0,05 g/l tanina je bil po 24. urah 5,18 ter 5,09 po 48. urah. Po 24. urah smo pri koncentraciji 0,25 g/l zmerili pH 5,23, pri največji koncentraciji tanina (1,00 g/l) pa 5,31. Po 48. urah je bila pH vrednost pri teh dveh kulturah naslednja: 5,12 pri 0,25 g/l ter 5,14 pri 1,00 g/l. Čeprav ima *B. fibrisolvens* drugačne končne produkte fermentacije, vseeno lahko povzamemo, da se končni pH tudi pri *C. proteoclasticum* giblje v območju teh vrednosti. McSweeney s sod. (1999) poroča, da v kislih pogojih v vampu lahko poteka neencimska razgradnja hidrolizirajočih in kondenziranih taninov. Zaradi velike koncentracije taninov (1,00 g/l), bi lahko produkti razgradnje predstavljali vir energije in ogljika in vzrok za morebitno sekundarno logaritemsko fazo. Za povečanje rasti obeh bakterijskih kultur z večanjem koncentracije dodanega Farmatana® pa moramo vzroke poiskati še drugje. Številni avtorji poročajo, da kljub antimikrobnim lastnostim taninov, mnogi mikroorganizmi lahko rastejo in se razmnožujejo v prisotnosti snovi, ki vsebujejo velike količine taninov. Med omenjenimi bakterijami so v glavnem sevi, ki pripadajo vrstama *Selenomonas* in *Streptococcus*, med drugimi pa so našli tudi izolate, ki pripadajo

vrsti *B. fibrisolvens* (Odenyo in sod., 2001). Gasparič in sod. (1996) so ugotovili, da vrste iz rodu *Butyrivibrio* ponavadi razgrajujejo predvsem enostavne hidrolizirajoče tanine. Ker taninske pripravek Farmatan® vsebuje mešanico obeh vrst taninov, bi to lahko pojasnilo pozitiven vpliv na rast. Tanazna aktivnost *C. proteoclasticum* zaenkrat še ni bila dokumentirana, vendar Min in sod. (2005) poročajo, da so nizke koncentracije kondenziranih taninov (100-200 µg/ml) iz *Lotus corniculatus* povečale rast tipskega seva *C. proteoclasticum*. Zaradi raznovrstnih kemijskih struktur imajo tanini iz različnih rastlinskih virov, različen vpliv na posamezne bakterijske vrste, zato je naših rezultatov ne moremo enačiti z omenjenimi, lahko pa potegnemo nekaj vzporednic. V našem primeru so tanini pridobljeni iz lesa pravega kostanja, poleg tega smo uporabili tudi večje koncentracije, tako, da je večja rast, predvsem pri koncentraciji tanina 1,00 g/l, lahko posledica teh dejstev. Natančni mehanizmi za pozitivne vplive na biološke aktivnosti še niso popolnoma pojasnjeni, a se kljub temu navaja nekaj bolj verjetnih razlogov. Min in sod. (2005) so odkrili, da so vse bakterije, pri katerih tanini pospešujejo rast, vrste z visoko proteolitično aktivnostjo, zaradi česar sklepajo, da tanini po vsej verjetnosti povzročijo strukturne spremembe pri substratnih proteinih in s tem lažji dostop proteolitičnim encimom. Poleg tega produkti mikrobne razgradnje taninov lahko služijo kot dodaten vir ogljika in energije in na ta način pospešijo rast. Ostali mehanizmi, vključujejo še sintezo ekstracelularnih polisaharidov, ki naj bi bili tarča za vezavo taninov ter tako zaščita celic pred njihovimi negativnimi vplivi. Omenjajo tudi strukturne spremembe encimov, membrane, vpliv na substrate, sintezo sideroforjev za prenos ionov (Brooker in sod., 2000; Goel in sod., 2005; Lowry in sod., 1996; Pell in sod., 2000).

5.2 VPLIV FARMATANA® NA AMILOLITIČNO AKTIVNOST BAKTERIJ *B. fibrisolvens* IN *C. proteoclasticum*

B. fibrisolvens ima encime za razgradnjo škroba, vendar ne sodi med najaktivnejše razgrajevalce tega substrata. To je lepo razvidno tudi iz vrednosti specifičnih aktivnosti na slikah 7, 8 ter v Prilogah C in D. Škrob je glavni rezervni polisaharid v rastlinskih celicah. Zaradi svoje vloge in sestave je to hitro razgradljiva polimerna molekula in kot taka med prvimi snovmi, ki jih mikroorganizmi razgradijo za pridobivanje energije (Dehority, 2003). Da bakterije za rast in razmnoževanje na začetku inkubacije izrabljajo hitro dostopne molekule kot je škrob, potrjuje tudi naš primer. Slika 7 namreč prikazuje vpliv Farmatana® na celično amilolitično aktivnost, iz katere je razvidno, da se pri koncentracijah tanina 0,25 in 1,00 g/l aktivnost izraža že na začetku inkubacije, ko je pri ostalih dveh še ni. Aktivnost amilaz sovпада z rastjo (slika 5), kjer opazimo, da sta v prvih 13 urah, ko še ni encimske aktivnosti, pri negativni kontrolni in koncentraciji 0,05 g/l, kulturi v lag fazi. Ker v tem času ni razmnoževanja celic, tudi ni aktivnosti encimov. Prav tako je, zaradi različne hitrosti rasti, opazna tudi razlika pri amilolitičnih aktivnostih z večjima koncentracijama tanina. Z večanjem koncentracije Farmatana® celične amilolitične aktivnosti hitreje dosežejo maksimalne vrednosti. Najprej se to zgodi pri kulturi z največjo koncentracijo tanina (1,00 g/l).

Izvenscelična amilolitična aktivnost je v primerjavi s celično zelo majhna (slika 7). Pri kulturah z dodanim Farmatanom® je aktivnost skoraj povsod manjša kot pri negativni kontroli, vendar so razlike tako majhne, da večinoma niso statistično značilne.

Pri *C. proteoclasticum* je specifična celična amilolitična aktivnost večja kot pri *B. fibrisolvens*. Prav tako se drugače izraža tudi vpliv Farmatana®, ki zavira delovanje amilaz. Inhibicija je prisotna pri vseh koncentracijah tanina, največja je pri koncentraciji 1,00 g/l. Z manjšanjem koncentracije se manjša tudi zaviralni učinek, najmanjši je pri koncentraciji 0,05 g/l. Zaviralni vpliv Farmatana® smo dokazali pri celični (slika 15) in izvenscelični (slika 16) amilolitični aktivnosti. Specifične izvenscelične aktivnosti amilaz so bistveno manjše kot celične.

V literaturi zasledimo, da imajo tanini lahko zaviralne učinke na hidrolizo škroba. Butter s sod. (1999) poroča o 9 – 17 % zmanjšanju prebave tega polisaharida v prisotnosti kondenziranih taninov. Zmanjšano delovanje amilaz opisujejo tudi Jansman (1993) ter Chung in sod. (1998), ki ta pojav pripisujejo vezavi taninov na encime, ki naj bi zaradi reverzibilne spremembe konformacije izgubili aktivnost. Raziskave v zadnjem času razkrivajo, da se tanini ne vežejo na prebavne encime, ker so ti ponavadi stabilizirani v polisaharidnem glikokaliksu na celični površini (Shimada, 2006). Min in sod. (2005) pa ugotavljajo, da je glavna tarča vezave taninov celična površina, kar preprečuje zaviranje transporta encimov v gojišče. To do določene mere potrjujejo tudi rezultati izvenscelične amilolitične aktivnosti, ki je zelo majhna, poleg tega pa je pri vseh dodanih koncentracijah Farmatana® v večini primerov manjša kot pri kontrolni kulturi. Aktivnost ter rahel vzpon le-te pri kulturah z večjima koncentracijama tanina v fazi, kjer encimi ostalih dveh kultur sploh nimajo aktivnosti, lahko pojasnimo z razgradnjo taninov. Ko se ti razgradijo, se povrne tudi aktivnost encimov. Večja koncentracija tanina je imela večji zaviralni učinek, zato je po morebitni razgradnji te količine tanina, razumljiva tudi večja aktivnost amilaz.

5.3 VPLIV FARMATANA® NA CMC-azno AKTIVNOST BAKTERIJ *B. fibrisolvens* IN *C. proteoclasticum*

Za obe testni bakteriji je bilo ugotovljeno, da nista sposobni razgradnje native celuloze (Bryant in Small, 1956; Attwood in sod., 1996). Substrat, ki smo ga uporabljali, je bila karboksimetil-celuloza, ki je topen polimerni derivat celuloze, zaradi česar je encimska aktivnost vseeno prisotna, vendar so vrednosti zelo nizke. Pri celični CMC-azni aktivnosti bakterije *B. fibrisolvens* vse tri koncentracije kostanjevih taninov zavirajo optimalno delovanje encimov (slika 8). Najmanjši vpliv je po pričakovanjih prisoten pri najmanjši koncentraciji tanina (0,05 g/l), in sicer le v začetni fazi rasti. Veliko večji vpliv je opazen pri večjih koncentracijah tanina, predvsem pri največji (1,00 g/l) se ta inhibicija statistično značilno izraža. Potek krivulj je pri aktivnostih vseh kultur podoben in sledi tudi poteku rastnih krivulj. Maksimalne vrednosti so dosežene pri 13. uri, ko so celice sredi

logaritemske faze rasti. V tem času se lažje dostopni viri energije že porabijo in začne se tudi razgradnja drugih polimernih molekul. Tudi pri CMC-azni aktivnosti smo ugotovili, da se z večanjem koncentracije Farmatana®, povečuje zaviralni učinek, ki je največji pri koncentraciji 1,00 g/l. Izvencelične CMC-azne aktivnosti so zelo majhne (slika 9). Farmatan® na izvencelično CMC-azno aktivnost ni imel statistično značilnega vpliva.

Pri *P. proteoclasticum* je celična CMC-azna aktivnost prav tako zelo majhna. Že iz prvega pogleda na sliko 17, na kateri je prikazana celična CMC-azna aktivnost, je razvidno, da Farmatan® močno zavira delovanje teh encimov. Aktivnost negativne kontrole je prisotna v prvih 20-ih urah, kasneje je ni več. Pri kulturi z najmanjšo koncentracijo tanina (0,05 g/l) je aktivnost zaznati med 5. in 20. uro, potem so vrednosti pri vseh meritvenih časih enake nič. Še večjo inhibicijo opazimo pri koncentracijah 0,25 g/l in 1,00 g/l, kjer so specifične CMC-azne aktivnosti vseskozi blizu nič, nekoliko se dvignejo le drugi polovici inkubacijske dobe, kar gre verjetno zopet pripisati razgradnji taninov. Pri izvencelični CMC-azni aktivnosti (slika 18) so vrednosti še nekoliko manjše kot pri *B. fibrisolvens*, zato iz specifičnih aktivnosti ne moremo sklepati na vpliv Farmatana®. Prav tako med njimi ni pomembnih statistično značilnih razlik (Priloga G). Do sedaj opravljene raziskave o vplivu taninov na aktivnost celulolitičnih vampnih bakterij, ugotavljajo redukcijo populacije teh bakterij, omenjajo pa tudi zaviralen učinek na delovanje CMC-az (Butter in sod., 1999; McSweeney in sod., 2000).

5.4 VPLIV FARMATANA® NA KSILANOLITIČNO AKTIVNOST BAKTERIJ *B. fibrisolvens* IN *C. proteoclasticum*

B. fibrisolvens je med najpomembnejšimi razgrajevalci hemiceluloze (Hespell in sod., 1987). Pri tej bakteriji so odkrili strukture, ki spominjajo na celulosome, vendar so v njej skoncentrirani encimi za razgradnjo ksilana. Poimenovali so jo ksilosom (McAllister in sod., 1994). Ker je locirana na površini celic, je razumljivo, da je glavna ksilanolitična aktivnost vezana na celice (slika 10), kar lahko opazimo tudi v našem primeru, kjer je specifična aktivnost ksilanaz v supernatantu (slika 11) občutno manjša. Cotta in Zeltwanger (1995) sta odkrila, da je pri številnih bakterijskih sevih začetna encimska hidroliza hitrejša od poznejše fermentacije. Med te vrste spada tudi *B. fibrisolvens*. Tudi v našem primeru je celična ksilanolitična aktivnost negativne kontrole največja v prvih 13. urah inkubacije. Dodatek Farmatana® je povzročil inhibicijo aktivnosti celičnih ksilanaz. Zaviralni vpliv taninov se povečuje s povečevanjem koncentracije Farmatana®, največji negativni učinek je opazen pri koncentraciji 1,00 g/l. S povečevanjem koncentracije tanina pa se inhibicija podaljšuje tudi časovno. Pri koncentraciji 0,05 g/l je ta prisotna le pri prvi meritvi (po 5 urah), pri koncentraciji 1,00 g/l pa je zaviralni vpliv prisoten med celotno inkubacijo. Tudi pri izvencelični specifični aktivnosti (slika 11) smo dokazali inhibitorski vpliv Farmatana®, in sicer se ta izraža v zadnji fazi inkubacije. Največji vpliv ima koncentracija Farmatana® 1,00 g/l.

Inhibitorni vpliv taninskega pripravka Farmatan® na aktivnost celičnih ksilanaz (slika 19) je pri *C. proteoclasticum* še bolj izrazit kot pri *B. fibrisolvens*. Največja koncentracija tanina ima močan zaviralni učinek vseh 48 ur. Nekoliko manjši vpliv, a le v prvih 13-ih urah, je opazen pri koncentraciji 0,25 g/l, potem pa so vrednosti tako rekoč enake kot pri 1,00 g/l. Pri najmanjši koncentraciji tanina je pričakovano tudi najmanjši vpliv. Pri izvencelični aktivnosti (slika 20) je negativen vpliv manj izrazit, saj so te vrednosti izredno nizke.

O vplivu taninov na ksilanazno aktivnost pri vampnih mikroorganizmih je poročalo več avtorjev. Acamovic in sod. (2000) so ugotovili, da taninska kislina inhibira aktivnost glivnih in bakterijskih ksilanaz. Barry in McNabb (1999) pa sta ugotovila, da so visoke koncentracije kondenziranih taninov iz *L. pedunculatus* zmanjšale prebavo hemiceluloze. Prav tako o poslabšanju razgradnje hemiceluloze z večanjem koncentracije taninov v obroku poročata Barry in Manley (1984).

5.5 VPLIV FARMATANA® NA PROTEOLITIČNO AKTIVNOST BAKTERIJ *B. fibrisolvens* IN *C. proteoclasticum*

Znanstveniki si o mestu delovanja proteaz niso enotni. Po podatkih Wallaca in sod. (1997) je večina proteolitične aktivnosti celično vezane. Proteolitični encimi se lahko že ob rahlem tresenju sprostijo v medij. Po podatkih Jonesa in sod. (1994) pa celično vezanih proteaz ni odstranil niti postopek centrifugiranja. Sales in sod. (2000) so odkrili, da imajo sevi *B. fibrisolvens* z veliko proteolitično aktivnostjo do 60 % ekstracelularne aktivnosti, medtem, ko naj bi imeli tisti z najhno aktivnostjo le okoli 10 % aktivnosti v supernatantu. Proteolitična aktivnost seva *B. fibrisolvens* DSM 3071 je vezana predvsem na celično frakcijo, manj pa se izraža izvencelično (sliki 12,13). Aktivnost je prisotna do 13. ure inkubacije, kasneje ni opazna pri nobeni kulturi. Največja razgradnja azokazeina, ki smo ga uporabljali kot substrat, je vidna pri negativni kontroli in pada z večanjem koncentracije Farmatana®. Pri koncentraciji 1,00 g/l je inhibicija popolna, aktivnosti ni zaznati med celotno inkubacijo. Pri srednji koncentraciji (0,25 g/l) je poleg inhibicije viden tudi premik maksimalne vrednosti. Pri proteolizi je opazen dvojni vpliv Farmatana®, saj pri izvencelični proteolitični aktivnosti tanini po enakem vzorcu kot v celični frakciji delujejo na encimsko aktivnost, le da je v tem primeru največja koncentracija (1,00 g/l) pospešila aktivnost proteaz (slika 13). Ostale kulture imajo, vključno z negativno kontrolo, približno enake vrednosti. Pri tistih, kjer smo dodali tanin, so aktivnosti nekoliko večje, vendar nikjer niso statistično značilne (Priloga J). Domnevajo, da je primarno mesto delovanja taninov celična stena (McLeod, 1979). Inhibicija celično vezane proteazne aktivnosti je lahko posledica tega, da je večina taninov vezanih na celično površino, zaradi česar je oviran transport encimov v gojišče. V gojišču je potemtakem le manjši delež taninov, ki so na voljo za vezavo na izvencelične proteaze. Ker smo pri *B. fibrisolvens* ugotovili največjo rast pri 1,00 g/l, je razumljivo, da je zaradi večjega števila celic tudi več proteaz, ki jih

majhen delež prostih taninskih molekul ne more popolnoma inhibirati. S tem lahko pri koncentraciji 1,00 g/l tudi razložimo največjo izvencelično aktivnost.

O vplivu taninov na proteaze *B. fibrisolvens* in ostalih proteolitičnih bakterijah je bilo opravljenih že veliko raziskav. Ker so bili uporabljeni različni viri tanina ter različne metode preverjanja tega vpliva, lahko zaključke le deloma primerjamo z našimi rezultati. V literaturi se največkrat pojavlja podatek, da tanini povzročajo inhibicijo proteolitične aktivnosti. Jones in sod. (1994) so opazili, da je prisotnost 25 µg kondenziranih taninov/ml povzročilo do 92 % zmanjšanje aktivnosti pri *S. bovis* in *B. fibrisolvens*, pri *P. ruminicola* pa se je po drugi strani ob nekoliko večji koncentraciji (100 µg kondenziranih taninov/ml) le-ta povečala za 36 %. O zaviralnem učinku taninov lahko preberemo tudi v člankih naslednjih avtorjev; Kumar in Vaithyanathan, 1990; McSweeney in sod. (2001); Min in sod., 2005). Kondenzirani tanini iz različnih virov so, v *in vivo* poskusu, zaradi inhibicije proteolize bili odgovorni za povečan pretok dušika do siriščnika in zmanjšane izgube le-tega v vampu (Ben Salem in sod., 2005). O podobnem pozitivnem učinku na zaščito proteinov v vampu poročata tudi Barry in McNabb (1999), ki sta ugotovila, da so kondenzirani tanini iz navadne nakote (*Lotus corniculatus*) za 53 % povečali pretok proteinov v siriščnik.

Pri *C. proteoclasticum* je večji del proteolitične aktivnosti prav tako celično vezan. Zaradi velikih standardnih deviacij interakcija med časom inkubacije in koncentracijo Farmatana® ni bila statistično značilna, zato tudi pri odstopanjih od negativne kontrole ni statistično značilnih razlik (Priloga K). Na sliki 21 lahko opazimo, da je tanin pri vseh testiranih koncentracijah tako aktiviral kot tudi zaviral celične proteolitične aktivnosti, vendar vpliva nismo uspeli dokazati. Tudi pri izvencelični aktivnosti proteaz (slika 22) ne moremo govoriti o izrazitem vplivu Farmatana®.

Azokazeinski test, ki smo ga uporabljali za določanje proteolitične aktivnosti, je bil izmed vseh encimskih testov najbolj občutljiv za morebitne napake tekom priprave vzorcev. Najbolj kritična točka je bila tik pred samo meritvijo absorbance, kjer smo vzorce po dodatku NaOH premešali in prelili v kivete. Zaradi hitrega usedanja delcev smo morali meritev izvesti v najhitrejšem možnem času, da ni bilo prevelikih razlik med vrednostmi posameznih paralelnih vzorcev. Protokol bi bilo najbrž potrebno dopolniti s filtracijo vzorcev tik pred merjenjem s spektrofotometrom. Primerljivi rezultati so zaradi pomena proteolize zelo pomembni, sploh če upoštevamo, da je večji del uporabe taninov namenjen zaščiti proteinov pred prekomerno razgradnjo v vampu. Poleg povečanega pretoka nerazgrajenih proteinov v siriščnik, bi bilo optimalno, da tanini ne bi pretirano vplivali na ostale metabolne procese in s tem posledično tudi na rast samih bakterij oz., da bi ta vpliv, v kolikor je že prisoten, ne bil negativen. Vemo namreč, da je za optimalen prirast potrebno doseči pravilno razmerje med procesi, ki zagotavljajo vir energije ter med tistimi, ki mikroorganizme oskrbujejo z amoniakom, ki je za večino glavni vir dušika.

Na tem mestu je potrebno omeniti še nekaj omejitev, ki jih moramo upoštevati pri interpretaciji dobljenih rezultatov in so predvsem posledica načina izvedbe naše raziskave. Prva izmed njih je gotovo že samo dejstvo, da je celoten postopek potekal na čistih kulturah v *in vitro* sistemih. V takih okoljih vladajo povsem drugačne razmere kot v *in vivo* sistemih, kjer je poleg nestalnega okolja, številnih dejavnikov prisotna tudi kompleksna mikrobna združba, ki se kot celota lahko popolnoma drugače odziva kot čista kultura. Naslednja se nanaša na izvedbo metode za ugotavljanje rasti in encimskih aktivnosti. Na podlagi meritev iz predhodnih poskusov je bilo namreč ugotovljeno, da je bil tanin, ki je bil dodan vzorcem pred inkubacijo, kljub večkratnemu spiranju v manjši meri še vedno prisoten v vzorcih pri vseh analizah. Opazen je bil določen vpliv tanina na spektrofotometrično meritev koncentracije celičnih proteinov. To se je v največji meri pokazalo pri večjih koncentracijah Farmatana® (0,25 in 1,00 g/l), in sicer zgolj v začetni stopnji rasti (predvsem po 5 urah inkubacije), ko je bila koncentracija celic še zelo majhna. Kasneje, ko se celice namnožijo, tega vpliva tako rekoč ni bilo več zaznati. Pri ugotavljanju proteinov v supernatantu ostanki niso vplivali na meritve, saj se je prosti tanin zaradi centrifugiranja po koncu inkubacije usedel na dno in ni bil prisoten v vzorcih. Prav tako o vplivu ne poročajo pri merjenju encimskih aktivnosti, kjer se ta zaradi upoštevanja negativnih kontrolnih vzorcev izniči. Pri izračunu specifičnih encimskih aktivnosti pa se rahlo višje koncentracije proteinov pri prvi meritvi niso poznale, saj so bile dobljene vrednosti v večini primerov blizu ničle. Poleg tega je zaradi izvajanja eksperimenta v paralelkah opaziti, da se pri izmerjenih vrednostih, ki so blizu skupaj in kjer ni statističnih razlik, vpliv ne izraža. Pri tistih, kjer so prisotne statistične razlike, pa so le-te dovolj velike, da jih omenjeni vpliv bistveno ne spremeni (Tratnik, 2005). Dodatno kontrolo specifičnih encimskih aktivnosti omogočajo izmerjene (dejanske) absolutne encimske aktivnosti, kjer ni upoštevana koncentracija proteinov v vzorcu. Tudi v primeru našega poskusa smo pri razlagi rezultatov obeh bakterijskih kultur upoštevali morebiten vpliv ostankov tanina.

Glaven problem, ki se pojavlja pri uporabi taninov, je določitev primerne koncentracije, katere vpliv bi dosegal čimbolj idealen izkoristek vseh hranil in s tem seveda želen prirast živali. Razlog, zakaj je to tako težko doseči, tiči v dejstvu, da so tanini zelo velika skupina kompleksnih molekul z ogromno različnimi strukturami in mehanizmi delovanja. Poleg tega zaradi množice testov rezultate različnih metod med seboj težko primerjamo, kar še dodatno otežuje določanje prehranskega in ekološkega vpliva taninov. V zadnjem času se sicer pojavlja težnja po standardizaciji metod, ki pa bi le delno pomagala pri rešitvi tega problema (Makkar, 2005). Dodatno oviro predstavlja tudi izvedba posameznega poskusa. V našem primeru smo uporabljali čiste kulture, gojenje je potekalo v kontroliranih razmerah v zaprtem sistemu. V vampu seveda vladajo popolnoma drugačne razmere. To je dinamičen sistem, kjer se stalno spreminja sestava hranil, glede na to pa tudi populacija mikroorganizmov, med katerimi vladajo zapleteni odnosi. Sinergizem in antagonizem med različnimi skupinami mikrobov in med različnimi rodovi znotraj ene skupine je tako raznolik in kompliciran, da težko ocenimo vlogo, ki jo ima posamezen organizem.

Zadrževalni čas krme v vampu je ponavadi okoli 12 ur, vendar se zaradi določenih snovi v krmi (npr. taninov) lahko tudi podaljša (McAllister in sod., 1994). V našem primeru je bil čas inkubacije jasno določen (48 ur). Poleg vsega naštetega, moramo omeniti tudi kemijske razmere, kot npr. pH, ki je v vampu ponavadi razmeroma konstanten. V zaprtem sistemu se ta nenehno spreminja, po končani inkubaciji je ta običajno občutno nižji v primerjavi z začetnim, kar lahko dodatno vpliva na stabilnost taninov in kompleksov, ki jih tvorijo z makromolekulami, predvsem s proteini (Rakhmani in sod., 2005). Zaradi omenjenih razlik, tako izvedenih poskusov ne gre enačiti z dejanskim stanjem. Kljub temu lahko iz dobljenih rezultatov potegnemo določene zaključke, ki nam pomagajo pri razumevanju vpliva, ki bi ga imela uporabljena vrsta in koncentracija tanina na realen primer v *in vivo* sistemu.

Farmatan®, ki smo ga uporabljali v našem eksperimentu, je izboljšal rast bakterije *B. fibrisolvens*. Ob boljši rasti so opazni tudi negativni vplivi na nekatere specifične encimske aktivnosti. Zaradi velikosti rastlinskih polimerov, razgradnja teh molekul v vampu poteka z encimi, ki jih mikroorganizmi sproščajo v okolje. Pri tem je pomembno, da so celice v bližini poteka razgradnje, s čimer si zagotovijo lažji prevzem enostavnejših razgradnih produktov. To največkrat dosežejo s pritrdjevanjem na rastlinske delce. Bakterije, ki so pritrdjene, imajo na razpolago večje količine hranil kot tiste, ki so v tekočini. Te imajo majhno aktivnost, kar nakazuje, da se njihovi encimi hitro inaktivirajo, saj so podvrženi večjemu vplivu neposrednega okolja, npr. tudi taninom (McAllister in sod., 1994). Ker je zaradi vezave taninskih molekul in preprečevanja izločanja encimov v gojišče, v našem primeru večina encimskih aktivnosti celično vezana, moramo upoštevati rezultate obeh frakcij, saj v dejanskem okolju lahko pričakujemo podobne vplive taninov, katerih glavno mesto delovanja naj bi bila prav celična površina mikroorganizmov (McLeod, 1974). Kostanjevi tanini iz taninskega pripravka Farmatan® imajo od vseh encimskih aktivnosti največji vpliv na proteolitično aktivnost, ki je bila od vseh tudi največja. Pri tej aktivnosti lahko opazimo dvojno delovanje. Pri celični aktivnosti, ki je bistveno večja, je opazen zaviralen učinek pri vseh treh preverjanih koncentracijah tanina, z največjim vplivom koncentracije 1,00 g/l, ki popolnoma inhibira razgradnjo azokazeina. Vpliv na izvencelično aktivnost je ravno nasproten, saj največja koncentracija tanina, iz že prej omenjenih razlogov, izrazito poveča specifično aktivnost proteaz. Na ostalih kulturah vpliv ni bil tako značilen. CMC-azna aktivnost je pri *B. fibrisolvens* od vseh najmanjša, a kljub temu lahko opazimo zaviralen učinek, ki je prisoten pri vseh koncentracijah, z večanjem le-te se povečuje tudi inhibicija. Pri največji koncentraciji je prisotna med celotno inkubacijo, pri manjših dveh koncentracijah pa le v prvih 13-ih urah. Podobne zaključke lahko potegnemo tudi pri ksilanolitični aktivnosti. Tudi v tem primeru se zaviralen učinek stopnjuje z večanjem koncentracije dodanega Farmatana®. Vpliv koncentracije 0,05 g/l je sicer opazen, vendar je v primerjavi z večjima koncentracijama zanemarljiv. Veliko večji učinek dosežejo tanini s koncentracijo 0,25 g/l, največji in časovno najdlje trajajoč pa je vpliv največje koncentracije. Amiloliza je zaradi dodatka Farmatana® od vseh procesov utrpela najmanjše posledice. Po rezultatih sodeč je pri amilolitičnih encimih zaradi posrednega vpliva rasti, ki je bila povišana, prav tako opaziti tudi porast specifične aktivnosti. Iz omenjenega lahko zaključimo, da se z večanjem koncentracije Farmatana® povečuje tudi

vpliv, tako na rast kot na encimske aktivnosti. Tanini so pospeševali rast, posledično se je zaradi tega povečala tudi amilolitična aktivnost, po drugi strani pa so imeli zaviralen učinek na aktivnost drugih encimov, tako CMC-az, ksilanaz kot tudi proteaz.

Pri bakteriji *C. proteoclasticum* je vpliv Farmatana® na rast še očitnejši. Tudi v tem primeru gre za pospešeno rast, ki se povečuje z večanjem koncentracije tanina. Pri najmanjši koncentraciji razlik tako rekoč ni, pri večjih pa se rast povečuje sorazmerno s koncentracijo tanina, in sicer je vpliv prisoten vseh 48 ur. Koncentracije celičnih proteinov, s katerimi smo spremljali rast bakterijskih kultur, so kljub povečani rasti še vedno manjše kot pri *B. fibrisolvens*. Iz negativne kontrole je tudi razvidno, da je rast *C. proteoclasticum* zelo počasna, zaradi česar mogoče tudi ni opaziti tako izrazitega vpliva Farmatana® na encimske aktivnosti. Največji vpliv je opazen pri CMC-azni aktivnosti. Aktivnost je inhibirana pri vseh koncentracijah tanina, vendar se le-ta ne povečuje z večanjem koncentracije. Pri ksilanolitični aktivnosti opazimo zaviralni učinek predvsem v drugi polovici inkubacije, kjer sta koncentraciji pri 0,25 in 1,00 g/l bistveno manjši, kot pri negativni kontroli in koncentraciji 0,05 g/l. Inhibicija je prisotna tudi pri amilolitični aktivnosti, večji koncentraciji imata nekoliko večji vpliv, vendar razlike niso tako očitne. Tudi pri proteolitični aktivnosti, ki je razmeroma visoka, ne moremo govoriti o statistično značilnem vplivu Farmatana®. Vse encimske aktivnosti so zaradi že omenjenega kopičenja encimov v celicah, veliko večje v celični frakciji. Pri izvenceličnih aktivnostih prav zaradi nizkih vrednosti vpliv taninov ni tako izrazit. Iz vseh rezultatov lahko ugotovimo, da dodatek Farmatana® ni popolnoma izpolnil naših pričakovanj, predvsem kar se tiče vpliva na proteolizo, pri katerem smo pričakovali večjo aktivnost in bolj izrazit učinek oz. večjo inhibicijo aktivnosti teh encimov. Z izjemo celičnih aktivnosti CMC-az in ksilanaz, ki sta pri večjih koncentracijah tanina inhibirani, se pri drugih aktivnostih prav tako večinoma pojavlja inhibicija, vendar pri njih ne moremo govoriti o izrazito značilnem vplivu. Kot je opaziti ima Farmatan® na vsako vrsto drugačen vpliv. Za razlago teh razlik, bi morali bolj podrobno raziskati njune encimske značilnosti, sposobnosti izkoriščanja posameznih substratov ter mehanizme tolerance oz. razgradnje taninov, ki jim omogočajo boljšo rast v prisotnosti le-teh.

5.6 SKLEPI

- Obseg vpliva taninskega pripravka Farmatan® na rast je odvisen od lastnosti posamezne bakterije in od koncentracije taninov, ki so prisotni v gojišču.
- Farmatan® pospešuje rast čistih kultur bakterij *B. fibrisolvens* in *C. proteoclasticum*. Rast se povečuje z naraščanjem koncentracije Farmatana®.

- Vplivi kostanjevih taninov iz Farmatana® na encimske aktivnosti pri posamezni bakterijski vrsti so različni, v glavnem pa smo dokazali zaviralne učinke na specifične encimske aktivnosti.
- Celična aktivnost CMC-az, ksilanaz in proteaz bakterije *B. fibrisolvens* se zmanjša ob prisotnosti Farmatana®. Inhibicija se stopnjuje z večanjem koncentracije taninov.
- Pri celičnem amilolitičnem encimskem sistemu *B. fibrisolvens* se vpliv Farmatana® izraža posredno preko rasti. Zaradi povečanja rasti, se posledično poveča tudi amilolitična aktivnost, ki lepo sledi trendu posameznih rastnih krivulj.
- Pri *B. fibrisolvens* je med vsemi encimskimi sistemi najbolj aktiven proteazni, na katerega ima Farmatana® tudi največji vpliv.
- Pri bakteriji *C. proteoclasticum* je največji vpliv tanina izražen na celično ksilanazno, CMC-azno in amilazno aktivnost. Inhibicija je prisotna pri vseh treh koncentracijah Farmatana®.
- Želenega negativnega vpliva Farmatana® na proteolitično aktivnost *C. proteoclasticum* nam ni uspelo dokazati.
- Izmed treh preverjenih koncentracij Farmatana® v gojišču, sta v večini primerov koncentraciji 0,25 in 1,00 g/l pokazali statistično značilen vpliv, rast sta aktivirali, pri encimskih aktivnostih je bil vpliv inhibitoren. Vpliv se je ponavadi povečeval s koncentracijo pripravka, največji vpliv pa se je pokazal pri največji koncentraciji (1,00 g/l), tako pri rasti kot tudi pri encimskih aktivnostih.
- Za najbolj optimalno količino Farmatana® se je izkazala koncentracija 0,25 g/l, ki po eni strani pospešuje rast bakterij, po drugi pa je pri tej koncentraciji dosežena inhibicija proteolitične aktivnosti. Opazen je tudi negativni vpliv na ostale encimske aktivnosti, vendar je ta v večini primerov manjši kot pri koncentraciji 1,00 g/l.
- Glede na cilje, ki jih skušamo doseči z dodajanjem taninov v krmo živali, bi bilo potrebno nadaljevati raziskave s čistimi kulturami pomembnejših vampnih bakterij ter opredeliti vpliv na posamezne pomembne encimske sisteme in na podlagi tega določiti optimalno koncentracijo. Le-to bi bilo potrebno preveriti tudi na kompletni združbi vampnih mikroorganizmov ter v *in vivo* sistemih.

6 POVZETEK

Vamp je stabilen in zelo dinamičen ekosistem, v katerem obstaja kompleksna mikrobnna združba. Mikroorganizmi so s svojim gostiteljem razvili učinkovit odnos, ki mu v zameno za življenjsko okolje nudijo aktivnosti svojih encimov, ki jih sami nimajo. Prehrana živali pogosto vsebuje snovi, ki imajo lahko neželene učinke ne samo na žival, vendar tudi na mikroorganizme, prisotne v vampu. Med take sestavine uvrščamo tudi tanine, ki so v krmi pogosto prisotni. To je velika in zelo heterogena skupina fenolnih spojin z raznolikimi velikostmi in kemijskimi sestavami. Kljub velikim razlikam tanine povezuje posebna lastnost, sposobnost vezave z različnimi makromolekulami, kot so beljakovine, ogljikovi hidrati, vitamini in minerali.

Zaradi omenjenih lastnosti, tanini po eni strani med rejci veljajo za zaželene, po drugi strani pa se jih poskušajo izogibati. V majhnih koncentracijah imajo namreč tanini lahko pozitiven vpliv na prirast in zdravstveno stanje živali, k čemur v živinoreji tudi stremimo. Za doseg tega se poslužujejo različnih načinov, eden od njih je prav uporaba taninov kot krmnih dodatkov z namenom zaščite rastlinskih proteinov, ki jih razgrajujejo mikroorganizmi v vampu. Ob neustreznem razmerju med razpoložljivo energijo in virom dušika lahko pride preko prevelike sinteze amoniaka do prekomerne izgube dušika. Različne vrste taninov imajo različen učinek, prav tako tudi koncentracije, zato je pomembno, da to dvojje uskladimo v taki meri, da poleg zaščite proteinov ne inhibiramo ostalih pomembnih metabolnih procesov, ki potekajo v vampu.

Naš namen v okviru raziskovalnega dela diplomske naloge je bil preučiti vpliv taninskega pripravka Farmatan® na rast in amilolitično, CMC-azno, ksilanolitično ter proteolitično aktivnost vampnih bakterij *Butyrivibrio fibrisolvens* in *Clostridium proteoclasticum*. Primerjali smo učinek treh različnih koncentracij omenjenega pripravka (0.05, 0.25 in 1.00 g/l) z negativno kontrolo, pri kateri taninskega izvlečka v gojišče nismo dodali. Rast in encimske aktivnosti smo spremljali pri 7 različnih inkubacijskih časih: 0, 5, 10, 13, 16, 20, 32 in 48 ur. Izračunane specifične encimske aktivnosti in koncentracije proteinov smo statistično analizirali in grafično prikazali.

Pri bakteriji *B. fibrisolvens* smo ugotovili pozitiven vpliv Farmatana® na rast. Rast se je povečala pri vseh testiranih koncentracijah, z večanjem koncentracije se je povečal tudi vpliv. Pri največji koncentraciji (1,00 g/l) je bila rast največja. Najmanjši vpliv je bil pri koncentraciji (0,05 g/l). Pri vseh encimskih aktivnosti smo opazili večje vrednosti pri celično vezani frakciji. Pri ksilanolitični, CMC-azni in proteolitični aktivnosti smo ugotovili, da je Farmatan® inhibiral te encimske aktivnosti. Zaviralni vpliv se je povečeval z večanjem koncentracije, največji vpliv je opazen pri koncentraciji tanina 1,00 g/l. Aktivnost amilolitičnih encimov se je zaradi dodajanja Farmatana® povečala, vendar verjetno posledično zaradi večje rasti. Še posebej je razveseljiv podatek, da je prisotnost Farmatana® zavirala proteolitično celično aktivnost, ki je pri *B. fibrisolvens* zelo velika. Pri

izvenceličnih aktivnostih je prav tako pri večini primerov prisotna inhibicija, ki pa ni tako izrazita.

Pri bakteriji *C. proteoclasticum* smo ob prisotnosti Farmatana® ravno tako zaznali povečanje rasti, ki sta ga povzročili koncentraciji 0,25 in 1,00 g/l. Z večanjem koncentracije se je sorazmerno povečeval tudi vpliv. Pri koncentraciji (0,05 g/l) bistvenega povečanja rasti nismo dokazali. Aktivnosti encimov so tudi pri *C. proteoclasticum* večinoma vezane na celično frakcijo. Glavno delovanje kostanjevih taninov je povezano s celičnimi aktivnostmi; ksilanolitično, CMC-azno in amilolitično. Zaviralni učinek na celično amilolizo je bil dosežen pri vseh koncentracijah, pri večjih dveh skoraj popolnoma, pri koncentraciji 0,05 g/l pa je bila inhibicija le delna. Pri izvencelični aktivnosti pri dodanem Farmatanu® opazimo povečanje aktivnosti, vendar razlike niso tako velike, da bi bile statistično značilne. Celična CMC-azna aktivnost je prav tako bistveno zmanjšana ob prisotnosti taninov, vendar imajo tu vse koncentracije podoben vpliv. Izvencelične aktivnosti so zelo majhne, Farmatan® na delovanje teh encimov nima izrazitega vpliva. Pri amilolizi se vpliv prav tako najbolj izraža pri največji koncentraciji. Na proteolitično aktivnost pa Farmatan® nima izrazitega vpliva.

Če upoštevamo, da želimo z dodatkom Farmatana® po eni strani doseči čim boljšo zaščito krmnih proteinov, po drugi pa čim manjši vpliv (posebej zaviralni), na ostale prebavne procese, iz naših rezultatov lahko zaključimo, da je najbolj primerna koncentracija prav 0,25 g/l. Pri tej količini je namreč opaziti pozitiven vpliv na rast, inhibicija proteolize je prisotna, opazen je tudi zaviralen učinek na ostale encimske aktivnosti, vendar je le-ta večinoma manjši kot pri največji koncentraciji Farmatana®.

Čeprav nam dajo rezultati na čistih kulturah določeno sliko o mehanizmu delovanja taninov, teh zaključkov ne moremo prenesti direktno na dogajanje v vampu, saj tam vladajo drugačne razmere, poleg tega pa je tam prisotna tudi kompleksna združba različnih mikroorganizmov, ki so med seboj povezani z zapletenimi interakcijami. Za boljše razumevanje bi bilo potrebno, poleg raziskav na ostalih posameznih vampnih mikroorganizmih, raziskave prenesti tudi na kompletno združbo ter v *in vivo* sisteme.

7 VIRI

Acamovic T., Stewart C. S., Brooker J. D. 2000. Plant phenolic compounds and gastrointestinal microorganisms. V: Tannins in livestock and human nutrition. Proceedings of an International Workshop, Adelaide, Australia, 31 May – 2 June, 1999. Canberra, Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR): 137 - 139

Anadon A., Abroix Arzo M., Bories G., Brantom P., Brufau de Barbera J., Chesson A., Concencelli P. S., de Knecht J., Dierick N., Flachowsky G., Franklin A., Gropp J., Haldorsen A. –K., Halle I., Mantovani A., Peltonen K., Rychen G., Sanders P., Soares A., Wester P., Windisch W. 2005. Opinion of the FEEDAP Panel of safety and efficacy of the product Farmatan for rabbits and piglets. EFSA Journal, 222: 1 - 20

Atlas R. M., Bartha R. 1998. Microbial ecology: fundamentals and applications. 4th ed. Menlo Park, Benjamin/Cummings Publishing Company: 694 str.

Attwood G. T., Klieve A. V., Ouwerkerk D., Patel B. K. C. 1998. Ammonia-hyperproducing bacteria from New Zealand ruminants. Applied and Environmental Microbiology, 64, 5: 1796 - 1804

Attwood G. T., Reilly K., Patel B. K. C. 1996. *Clostridium proteoclasticum* sp. nov., a novel proteolytic bacterium from the bovine rumen. International Journal of Systematic Bacteriology, 46, 3: 753 - 758

Bach A., Calsamiglia S., Stern M. D. 2005. Nitrogen metabolism in the rumen. Journal of Dairy Science, 88: 9 – 21

Barry T. N., Manley T. R. 1984. The role of condensed tannins in the nutritional value of *Lotus pedunculatus* for sheep. British Journal of Nutrition, 51: 493-504

Barry T. N., McNabb W. C. 1999. The implications of condensed tannins on the nutritive value of temperate forages fed to ruminants. British Journal of Nutrition, 81: 263 - 272

Ben Salem H., Makkar H. P. S., Nefzaoui A., Hassayoun L., Abidi S. 2005. Benefit from association of small amounts of tannin-rich shrub foliage (*Acacia cyanophylla* Lindl.) with soya bean meal given as supplements to Barbarine sheep fed on oaten hay. Animal Feed Science and Technology, 122, 1 - 2: 173 - 186

Brooker J. D., O'Donovan L., Skene I., Sellick G. 2000. Mechanisms of tannin resistance and detoxification in the rumen. V: Tannins in livestock and human nutrition: Proceedings of an International Workshop, Adelaide, Australia, 31 May – 2 June, 1999. Canberra, Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR): 127 - 132

Bryant M. P. 1972. Commentary on the Hungate technique for culture of anaerobic bacteria. *American Journal of Clinical Nutrition*, 25: 1324 - 1328

Bryant M. P., Small N. 1956. The anaerobic monotrichous butyric acid-producing curved rod-shaped bacteria of the rumen. *Journal of Bacteriology*, 72, 1: 16 – 21

Butter N. L., Dawson J. M., Buttery P. J. 1999. Effects of dietary tannins on ruminants. V: *Secondary plant products*. Caygill J. C., Muller-Harvey I. (eds.). Nottingham, Nottingham University Press: 51 - 70

Caygill J. C. 1999. Background and introduction. V: *Secondary plant products*. Caygill J. C., Muller-Harvey I. (eds.). Nottingham, Nottingham University Press: 1 – 3

Cheng K. J., Costerton J. W. 1976. Ultrastructure of *Butyrivibrio fibrisolvens*: a Gram-positive bacterium? *Journal of Bacteriology*, 129, 3: 1506 - 1512

Chesson A., Forsberg C. W. 1997. Polysaccharide degradation by rumen mikroorganisms. V: *The rumen microbial ecosystem*. Hobson P. N., Stewart C. S. (eds.). London, Thomas science: 329 - 381

Chung K. T., Wong T. Y., Wei C. I., Huang Y. W. 1998. Tannins and human health: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38, 6: 421 - 464

Cotta M. A., Hespell R. B. 1986. Proteolytic activity of the ruminal bacterium *Butyrivibrio fibrisolvens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 52, 1: 51 - 58

Cotta M. A., Zeltwanger R. L. 1995. Degradation and utilization of xylan by the ruminal bacteria *Butyrivibrio fibrisolvens* and *Selenomonas ruminantium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 12: 4396 - 4402

Dehority B. A. 1991. Symposium on fibre digestion in farm livestock. *Proceedings of the Nutrition Society*, 50: 149 - 159

Dehority B. A. 2003. *Rumen microbiology*. 1st ed. Nottingham, Nottingham University Press: 372 str.

Farmatan®, naraven izvleček pridobljen iz zdravega kostanjevega lesa. 2006. Navodilo za uporabo, Sevnica, Tanin Sevnica d. d. : 5 str.

Forster R. J., Gong J., Teather R. M. 1997. Group-specific 16 rRNA hybridization probes for dererminative and community structure studies of *Butyrivibrio fibrisolvens* in the rumen. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 4: 1256 - 1260

Gasparič A., Štruklec M., Orešnik A., Marinšek Logar R., Rupnik I., Stibilj V. 1996. The influence on different concentrations of tannins on the rumen proteolytic microorganisms. V: Effects of antinutrients on the nutritional value of legume diets. Vol 3. The impact of food antinutrients on the microbial ecology of the gut. Bardocz S., Nekrep F. V., Pustai A. (eds.). Luxembourg, Office for Official Publications of the European Communities: 57 - 64

Goel G., Puniya A. K., Singh K. 2005. Tannic acid resistance in ruminal streptococcal isolates. Journal of Basic Microbiology, 45, 3: 243 - 245

Grundhöfer P., Niemetz R., Schilling G., Gross G. G. 2001. Biosynthesis and subcellular distribution of hydrolyzable tannins. Phytochemistry, 57, 6: 915 - 927

Hagerman A. E., Butler L. G. 1981. The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. Journal of Biological Chemistry, 256, 9: 4494 - 4497

Harborne J. B. 1999. An overview of antinutritional factors in higher plants. V: Secondary plant products. Caygill J. C., Muller-Harvey I. (eds.). Nottingham, Nottingham University Press: 7 - 16

Hespell R. B., Cotta A. M. 1995. Degradation and utilization by *Butyrivibrio fibrisolvens* H17c of xylans with different chemical and physical properties. Applied and Environmental Microbiology, 61, 8: 3042 – 3050

Hespell R. B., Wolf R., Bothast R. J. 1987. Fermentation of xylans by *Butyrivibrio fibrisolvens* and other ruminal bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 53, 12: 2849 - 2853

Hobson P. N. 1969. Rumen bacteria. V: Methods in microbiology. Vol 3B. Norris J. R., Ribbons D. W. (eds.). New York, Academic Press: 133 – 149

Hobson P. N. 1997. Introduction. V: The rumen microbial ecosystem. Hobson P. N., Stewart C. S. (eds.). London, Thomas Science: 1-9

Jansman A. J. M. 1993. Taninns in feedstuff for simple-stomached animals. Nutrition Research Reviews, 6: 209 - 236

Jones G. A., McAllister T. A., Muir A. D., Cheng K. J. 1994. Effects of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) condensed tannins on growth and proteolysis by four strains of ruminal bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 60, 4: 1374 - 1378

Keis S., Bennett C. F., Ward V. K., Jones D. T. 1995. Taxonomy and phylogeny of industrial solvent-producing Clostridia. International Journal of Systematic Bacteriology, 45, 4: 693 - 705

Khanbabae K., van Ree T. 2001. Tannins: Classification and definition. Natural Product Report, 18: 641 – 649

Kopečný J., Marinšek Logar R., Zorec M., Mrazek J., Kobayashi Y. 2003. *Butyrivibrio hungatei* sp.nov., and *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* sp.nov., butyrat-producing bacteria from the rumen. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 53, 1: 201 – 209

Kopečný J., Wallace R.J. 1982. Cellular location and some properties of proteolytic enzymes of rumen bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 43, 5: 1026-1033

Kumar R., Vaithyanatan S. 1990. Occurance, nutritional significance and effect on animal productivity of tannins in tree leaves. Animal Feed Science and Technology, 30: 21 – 38

Lavrenčič A. 2001. Razgradljivost beljakovin v predželodcih prežvekovalcev. V: 9. tradicionalno posvetovanje Uporaba kostanjevega tanina v prehrani živali, Podčetrtek, 22 mar. 2001. Sevnica, Tanin: 39 - 47

Lever M. 1977. Carbohydrate determination with 4-hydroxybenzoic acid hydrazide (PAHBAH): effect of bismuth on the reaction. Analytical Biochemistry, 81: 21 - 27

Lowry B. J., McSweeney C. S., Palmer B. 1996. Changing perceptions of the effect of plant phenolic on nutrient supply in the ruminant. Australian Journal of Agricultural Research, 47, 2: 829 - 842

Lowry O.H., Rosebrough A.L., Farr N.H., Randal R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry, 193: 265 - 275

Lynd L. R., Weimer P. J., van Zyl W. H., Pretorius I. S. 2002. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 66, 3: 506 - 577

Madigan M. T., Martinko J. M., Parker J. 2000. Prokaryotic diversity: Bacteria. V: Brock biology of microorganism. 9th ed. Madigan M. T., Martinko J. M., Parker J. (eds.). New Jersey, Prentice-Hall Inc: 453 - 544

Makkar H. P. S. 2005. Use of nuclear and related techniques to develop simple tannin assays for predicting and improving the safety and efficiency of feeding ruminants on tanniniferous tree foliage: Achievements, result implications, and future research. Animal Feed Science and Technology, 122, 1 - 2: 3 - 12

Makkar H. P. S., Becker K. 1998. Adaptation of cattle to tannins: role of proline-rich proteins in oak-fed cattle. *Animal Science*, 67: 277 - 281

Makkar H. P. S., Singh B., Dawra R. K. 1988. Effect of tannin-rich leaves of oak (*Quercus incana*) on various microbial enzyme activities of the bovine rumen. *British Journal of Nutrition*, 60: 287 - 296

Mangan J. L. 1988. Nutritional effects of tannins in animal feeds. *Nutrition Research Reviews*, 1: 209 – 231

Margherita S. S., Hungate R. E. 1963. Serological analysis of *Butyrivibrio* from the bovine rumen. *Journal of Bacteriology*, 86: 855 - 860

McAllister T. A., Bae H. D., Jones G. A., Cheng K. J. 1994. Microbial attachment and feed digestion in the rumen. *Journal of Animal Science*, 72: 3004 – 3018

McSweeney C. S., Palmer B., Bunch R., Krause D. O. 1999. *In vitro* quality assessment of tannin-containing tropical shrub legumes: protein and fibre digestion. *Animal Feed Science and Technology*, 88, 3-4: 227-241

McSweeney C. S., Palmer B., Krause D. O. 2000. Rumen microbial ecology and physiology in sheep and goats fed a tannin-containing diet. V: Tannins in livestock and human nutrition: Proceedings of an International Workshop, Adelaide, Australia, 31 May – 2 June, 1999. Canberra, Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR): 150 - 155

McSweeney C. S., Palmer B., McNeill D. M., Krause D. O. 2001. Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 91, 1 - 2: 83 - 93

Min B. R., Attwood G. T., McNabb W. C., Molan A. L., Barry T. N. 2005. The effect of condensed tannins from *Lotus corniculatus* on the proteolytic activities and growth of rumen bacteria. *Animal Feed Science and Technology*, 121, 1 - 2: 45 - 58

Min B. R., Barry T. N., Attwood G. T., McNabb W. C. 2003. The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review. *Animal Feed Science and Technology*, 106, 1 - 2: 3 - 19

Miron J., Ben-Ghedalia D., Morrison M. 2001. Invited review: Adhesion mechanisms of rumen cellulolytic bacteria. *Journal of Dairy Science*, 84, 6: 1294 - 1309

Mueller-Harvey I. 1999. Tannins: their nature and biological significance. V: Secondary plant products. Caygill J. C., Mueller-Harvey I. (eds.). Nottingham, Nottingham University Press: 17 - 39

Nelson K. E., Thonney M. L., Woolston T. K., Zinder S. H., Pell A. N. 1998. Phenotypic and phylogenetic characterization of ruminal tannin - tolerant bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 64, 10: 3824 - 3830

Nocek J. E. 1997. Bovine acidosis: Implications on laminitis. Journal of Dairy Science, 80, 5: 1005 - 1028

Norton B. W. 2000. The significance of tannins in tropical animal production. V: Tannins in livestock and human nutrition: Proceedings of an International Workshop, Adelaide, Australia, 31 May – 2 June, 1999. Canberra, Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR): 14 - 23

Odenyo A. A., Bishop R., Asefa G., Jamnadass R., Odongo D., Osuji P. 2001. Characterization of tannin-tolerant bacterial isolates from East African ruminants. Anaerobe, 7: 5 – 15

O'Donovan L., Brooker J. D. 2001. Effect of hydrolysable and condensed tannins on growth, morphology and metabolism of *Streptococcus gallolyticus* (*S. caprinus*) and *Streptococcus bovis*. Microbiology, 147: 1025 – 1033

Oh H. I., Hoff J. E., Armstrong G. S., Haff L. A. 1980. Hydrophobic interaction in tannin-protein complexes. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 28: 394-398

Okuda T. 2005. Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medical plants. Phytochemistry, 66, 17: 2012 - 2031

Orešnik A. 1996. The effect of chesnut tannins of milk protein content in dairy cattle. Krmiva, 38, 1: 21 - 24

Orešnik A. 2001. Gospodarnost prireje mleka je odvisna od postopkov vzreje in prehrane telet. V: 9. tradicionalno posvetovanje Uporaba kostanjevega tanina v prehrani živali, Podčetrtek, 22 mar. 2001. Sevnica, Tanin: 36 - 38

Pell A. N., Woolston T. K., Nelson K. E., Schofield P. 2000. Tannins: Biological activity and bacterial tolerance. V: Tannins in livestock and human nutrition: Proceedings of an International Workshop, Adelaide, Australia, 31 May – 2 June, 1999. Canberra, Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR): 121 - 126

- Perez–Maldonado R. A., Norton B. W., Kerven G.R. 1995. Factors affecting in vitro formation of tannin – protein complexes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 69: 291-298
- Petterson G., Porath J. 1966. A cellulolytic enzyme from *Penicillium notatum*. *Methods in Enzymology*, 8: 603 – 607
- Prior R. L., Gu L. 2005. Occurrence and biological significance of proanthocyanidins in the American diet. *Phytochemistry*, 66, 18: 2264 - 2280
- Rakhmani S. I. W., Brooker J. D., Jones G. P. 2000. HPLC profiles of phenolic compounds in the accessions of *Calliandra* (*Calliandra calothyrsus*). V: Tannins in livestock and human nutrition: Proceedings of an International Workshop, Adelaide, Australia. Brooker J. D. (ed.). ACIAR Proceedings, No. 92: 175- 180
- Reed J. D. 1995. Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. *Journal of Animal Science*, 73: 1516 - 1528
- Reilly K., Attwood G. T. 1998. Detection of *Clostridium proteoclasticum* and closely related strains in the rumen by competitive PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 3: 907 – 913
- Russell J. B., Wallace R. J. 1997. Energy-yielding and energy-consuming reactions. V: The rumen microbial ecosystem. Hobson P. N., Stewart C. S. (eds.). London, Thomas Science: 247 - 282
- Russell J. B., Wilson D. B. 1996. Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest cellulose at low pH? *Journal of Dairy Science*, 79, 8: 1503 - 1509
- Sales M., Lucas F., Blanchart G. 2000. Effects of ammonia and amino acids on growth and proteolytic activity of three species of rumen bacteria: *Prevotella albensis*, *Butyrivibrio fibrisolvens* and *Streptococcus bovis*. *Current Microbiology*, 40: 380 – 386
- SAS/STAT Softwear. Version 8.2. 2002. Cary, SAS Institute Inc: Softwear
- Scalbert A. 1991. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30, 12: 3875 - 3883
- Schofield P., Mbugua D. M., Pell A. N. 2001. Analysis of condensed tannins: a review. *Animal Feed Science and Technology*, 91, 1 -2: 21 - 40
- Selinger L. B., Forsberg C. W., Cheng K. J. 1996. The rumen: A unique source of enzymes for enhancing livestock production. *Anaerobe*, 2: 263 - 284

Shimada T. 2006. Salivary proteins as a defense against dietary tannins. *Journal of Chemical Ecology*, 32: 1149 - 1163

Silanikove N., Perevolotsky A., Provenza F. D. 2001. Use of tannin-binding chemicals to assay for tannins and their negative postingestive effects in ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 91, 1-2: 69 - 81

Skubic B., Vengušt M. 1993. Prebava in presnova kostanjevega tanina pri sesalcih in njegovi vplivi na prebavne encime. Diplomsko delo, Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta: 32 str.

Stackebrandt E., Kramer I., Swiderski J., Hippe H. 1999. Phylogenetic basis for a taxonomic dissection of the genus *Clostridium*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 24: 253 - 258

Stewart C. S., Flint H. J., Bryant M. P. 1997. The rumen bacteria. V: The rumen microbial ecosystem. 2nd ed. Hobson P. N., Stewart C. S. (eds.). London, Thomas Science: 10 - 72

Tanin Sevnica d.d. 2004. Tovarniška analiza Farmatana®. Sevnica, Tanin Sevnica: 1 str.

Tanner G. J., Abrahams S., Larkin P. J. 2000. Biosynthesis of proanthocyanidins (Condensed tannins). V: Tannins in livestock and human nutrition: Proceedings of an International Workshop, Adelaide, Australia, 31 May – 2 June, 1999. Canberra, Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR): 52 - 61

Tratnik M. 2005. Vpliv kostanjevega tanina na rast in encimske aktivnosti vampnih bakterij *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5 in *Prevotella bryantii* B₁₄. Diplomsko delo, Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 89 str.

Varga G. A., Kolver E. S. 1997. Microbial and animal limitations to fiber digestion and utilization. *Journal of Nutrition*, 127, 5: 819 – 823

Waghorn G. C., McNabb W. C. 2003. Consequences of plant phenolic compounds for productivity and health of ruminants. *Proceedings of the Nutrition Society*, 63: 383 - 392

Wallace R. J., Onodera R., Cotta M. A. 1997. Metabolism of nitrogen-containing compounds. V: The rumen microbial ecosystem. Hobson P. N., Stewart C. S. (eds.). London, Thomas Science: 383 - 329

Waterman P. G. 2000. The tannins – An overview.). V: Tannins in livestock and human nutrition: Proceedings of an International Workshop, Adelaide, Australia. Brooker J. D. (ed.). ACIAR Proceedings, No. 92: 10 - 13

Žgajnar J. 1990. Prehrana in krmljenje goved. Ljubljana, ČZP Kmečki glas: 564 str.

ZAHVALA

*"Osamljen delavec sicer odkrije
novo stvar, toda kolikor bolj je svet
zapleten, toliko manj smo sposobni,
da bi uspešno končali karkoli brez
sodelovanja drugih."*

Alexander Fleming

Iskreno se zahvaljujem mentorici prof. dr. Romani Marinšek Logar za strokovno pomoč, nasvete in prijaznost med nastajanjem te diplomske naloge.

Hvala prof. dr. Gorazdu Avguštinu za strokovno recenzijo in dr. Špeli Malovrh za statistično analizo rezultatov.

Najlepše se zahvaljujem vsem na Katedri za mikrobiologijo in mikrobno biotehnologijo za koristne napotke pri izvajanju laboratorijskega dela. Hvala tudi za vse prijetne trenutke in obilico smeha ob kavicah in sladkih dobrotah ter za družbo med številnimi centrifugiranj.

Hvala Simoni Grm, ki je od samega začetka bedela nad mojim delom, me spodbujala, s svojimi nasveti prizanesla z marsikatero ponovitvijo, me večkrat nasmejela,...skratka hvala za vso pomoč!

Zahvala gre tudi "Muratu" in "Josu", ki sta mi večkrat nesebično odstopila del svojega vampnega soka.

Hvala pa tudi vsem cimram in prijateljem, ki so pripomogli, da so moja študentska leta pridobila še druge dimenzije, ki so me obogatile z marsikatero življenjsko izkušnjo.

Nenazadnje pa bi se v največji meri zahvalila mojima staršema, Francu in Veri ter Titi za vse spodbudne besede, potrpežljivost in finančno pomoč med mojim (pre)dolgim študijem.

PRILOGE

PRILOGA A: Vir variabilnosti in statistična značilnost vplivov pri spremljanju rasti in encimskih aktivnosti bakterije *B. fibrisolvens*

Lastnost	P-vrednost		
	Ura inkubacije	Koncentracija tanina	Interakcija
Proteini – celice	<.0001	<.0001	<.0001
Proteini – supernanant	<.0001	<.0001	<.0001
Spec. celična amilolitična aktivnost	<.0001	<.0001	<.0001
Spec. izvencelična amilolitična aktivnost	<.0001	0.0004	<.0001
Spec. celična CMC-azna aktivnost	<.0001	<.0001	<.0001
Spec. izvencelična CMC-azna aktivnost	<.0001	0.0308	0.0015
Spec. celična ksilanolitična aktivnost	<.0001	<.0001	<.0001
Spec. izvencelična ksilanolitična aktivnost	<.0001	<.0001	<.0001
Spec. celična proteazna aktivnost	<.0001	0.0003	<.0001
Spec. izvencelična proteazna aktivnost	<.0001	<.0001	<.0001

Opombe:

- primerjava nivojev vpliva koncentracije tanina ob posameznih urah inkubacije je bila narejena, kjer je bila interakcija med uro inkubacije in koncentracijo tanina statistično značilna ($p < 0,05$)

PRILOGA B1: Vpliv Farmatana® na rast bakterije *B. fibrisolvens* - ocenjene srednje vrednosti (SEE = 0.0513) in razlike (SEE = 0.145) s statistično značilnostjo razlik.

Čas inkubacije (h)	Konc. tanina (g/l)	Srednje vrednosti	Koncentracija tanina (g/l)			
			0.00	0.05	0.25	1.00
0	0.00	0.0000		0.000	0.000	0.000
	0.05	0.0000	1.0000		0.000	0.000
	0.25	0.0000	1.0000	1.0000		0.000
	1.00	0.0000	1.0000	1.0000	1.0000	
5	0.00	0.0160		-0.069	-0.503	-2.150
	0.05	0.0847	1.0000		-0.434	-2.081
	0.25	0.5187	<.0001	<.0001		-1.647
	1.00	2.1657	<.0001	<.0001	<.0001	
13	0.00	0.1380		-0.067	-0.759	-3.012
	0.05	0.2047	1.0000		-0.692	-2.945
	0.25	0.8967	<.0001	<.0001		-2.253
	1.00	3.1500	<.0001	<.0001	<.0001	
13	0.00	0.4773		-0.529	-0.846	-2.335
	0.05	1.0067	<.0001		-0.317	-0.067
	0.25	1.3233	<.0001	0.0149		-1.489
	1.00	2.8120	<.0001	<.0001	<.0001	
16	0.00	2.7873		-0.815	0.074	-0.550
	0.05	3.6027	<.0001		0.889	0.265
	0.25	2.7133	1.0000	<.0001		-0.624
	1.00	3.3373	<.0001	0.1114	<.0001	
20	0.00	3.0860		-0.403	-0.505	-1.514
	0.05	3.4887	0.0002		-0.103	-1.111
	0.25	3.5913	<.0001	0.9999		-1.009
	1.00	4.6000	<.0001	<.0001	<.0001	
32	0.00	3.1927		0.135	-0.107	-1.484
	0.05	3.0580	0.9907		-0.242	-1.619
	0.25	3.3000	0.9998	0.2342		-1.377
	1.00	4.6767	<.0001	<.0001	<.0001	
48	0.00	3.1700		0.000	-0.183	-1.329
	0.05	3.1700	1.0000		-0.183	-1.329
	0.25	3.3533	0.7736	0.7736		-1.146
	1.00	4.4993	<.0001	<.0001	<.0001	

Opombe:

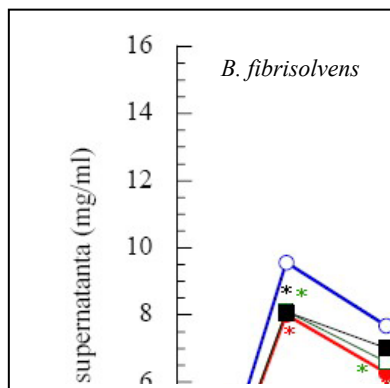
- Statistično značilne razlike so pri vrednostih ($P < 0,05$), te vrednosti so v poudarjenem tisku.
- Srednje vrednosti so ocenjene po metodi najmanjših kvadratov.
- Pod diagonalo so prikazane p-vrednosti, nad diagonalo pa razlike med različnimi konc. tanina.

PRILOGA B2: Vpliv Farmatana® na koncentracijo proteinov v supernatantu bakterijske kulture *B. fibrisolvens* - ocenjene srednje vrednosti (SEE=0.192) in razlike (SEE=0.542) s statistično značilnostjo razlik.

Čas inkubacije (h)	Konc. tanina (g/l)	Srednje vrednosti	Koncentracija tanina (g/l)			
			0.00	0.05	0.25	1.00
0	0.00	0.000		0.000	0.000	0.000
	0.05	0.000	1.0000		0.000	0.000
	0.25	0.000	1.0000	1.0000		0.000
	1.00	0.000	1.0000	1.0000	1.0000	
5	0.00	9.557		1.550	1.448	1.465
	0.05	8.007	0.0001		-0.102	-0.085
	0.25	8.109	0.0006	1.0000		0.017
	1.00	8.092	0.0004	1.0000	1.0000	
10	0.00	7.678		1.393	1.077	0.656
	0.05	6.285	0.0012		-0.316	-0.737
	0.25	6.601	0.0499	1.0000		-0.421
	1.00	7.022	0.8406	0.6490	0.9995	
13	0.00	9.226		1.391	4.138	1.213
	0.05	7.835	0.0012		2.747	1.393
	0.25	5.088	<.0001	<.0001		-2.925
	1.00	8.013	0.0110	1.0000	<.0001	
16	0.00	15.006		1.922	3.150	-0.020
	0.05	13.084	<.0001		1.228	-1.942
	0.25	11.856	<.0001	0.0092		-3.170
	1.00	15.026	1.0000	<.0001	<.0001	
20	0.00	8.808		0.766	0.797	2.063
	0.05	8.042	0.5706		0.031	1.297
	0.25	8.011	0.4869	1.0000		1.266
	1.00	6.745	<.0001	0.0040	0.0058	
32	0.00	10.223		1.401	0.867	1.507
	0.05	8.822	0.0010		-0.534	0.106
	0.25	9.356	0.3150	0.9806		0.640
	1.00	8.716	0.0003	1.0000	0.8701	
48	0.00	7.340		-0.742	0.333	-0.193
	0.05	8.082	0.6356		1.075	0.549
	0.25	7.007	1.0000	0.0509		-0.526
	1.00	7.533	1.0000	0.9728	0.9840	

Opombe:

- Statistično značilne razlike so pri vrednostih ($P < 0,05$), te vrednosti so v poudarjenem tisku.
- Srednje vrednosti so ocenjene po metodi najmanjših kvadratov.
- Pod diagonalo so prikazane p-vrednosti, nad diagonalo pa razlike med različnimi konc. tanina.



PRILOGA B3: Koncentracija proteinov v supernatantu bakterijske kulture *B. fibrisolvens* pri treh različnih koncentracijah Farmatana® (0,05 g/l, 0,25 g/l in 1 g/l) in kontrolni kulturi brez dodanega tanina.

PRILOGA C: Vpliv Farmatana® na specifično celično amilolitično aktivnost bakterije *B. fibrisolvens* – ocenjene srednje vrednosti (SEE = 0.0151) in razlike (SEE = 0.0426) s statistično značilnostjo razlik.

Čas inkubacije (h)	Konc. tanina (g/l)	Srednje vrednosti	Koncentracija tanina (g/l)			
			0.00	0.05	0.25	1.00
0	0.00	0.0000		0.0000	0.0000	0.0000
	0.05	0.0000	1.0000		0.0000	0.0000
	0.25	0.0000	1.0000	1.0000		0.0000
	1.00	0.0000	1.0000	1.0000	1.0000	
5	0.00	0.0000		0.0000	0.0000	-0.5913
	0.05	0.0000	1.0000		0.0000	-0.5913
	0.25	0.0000	1.0000	1.0000		-0.5913
	1.00	0.5913	<.0001	<.0001	<.0001	
10	0.00	0.0000		0.0000	-0.6946	-0.4181
	0.05	0.0000	1.0000		-0.6946	-0.4181
	0.25	0.6946	<.0001	<.0001		0.2764
	1.00	0.4181	<.0001	<.0001	<.0001	
13	0.00	0.0000		0.0000	-0.1457	-0.1567
	0.05	0.0000	1.0000		-0.1457	0.0000
	0.25	0.1457	<.0001	<.0001		-0.0110
	1.00	0.1567	<.0001	<.0001	10.000	
16	0.00	0.1894		-0.2077	-0.0914	-0.0567
	0.05	0.3971	<.0001		0.1163	0.1510
	0.25	0.2808	0.0199	0.0004		0.0346
	1.00	0.2462	0.6899	<.0001	0.9988	
20	0.00	0.5361		-0.0945	0.1018	0.2710
	0.05	0.6306	0.0125		0.1964	0.3656
	0.25	0.4342	0.0041	<.0001		0.1692
	1.00	0.2650	<.0001	<.0001	<.0001	
32	0.00	0.0687		-0.0050	-0.1966	0.0221
	0.05	0.0737	1.0000		-0.1916	0.0271
	0.25	0.2652	<.0001	<.0001		0.2186
	1.00	0.0466	1.0000	1.0000	<.0001	
48	0.00	0.1448		0.0333	-0.0503	-0.0519
	0.05	0.1115	0.9994		-0.0835	-0.0851
	0.25	0.1950	0.8714	0.0580		-0.0016
	1.00	0.1966	0.8336	0.0471	1.0000	

Opombe:

- Statistično značilne razlike so pri vrednostih ($P < 0,05$), te vrednosti so v poudarjenem tisku.
- Srednje vrednosti so ocenjene po metodi najmanjših kvadratov.
- Pod diagonalo so prikazane p-vrednosti, nad diagonalo pa razlike med različnimi konc. tanina.

PRILOGA D: Vpliv Farmatana® na specifično izvencelično amilolitično aktivnost bakterije *B. fibrisolvens* – ocenjene srednje vrednosti (SEE=0.0178) in razlike (SEE=0.0501) s statistično značilnostjo razlik.

Čas inkubacije (h)	Konc. tanina (g/l)	Srednje vrednosti	Koncentracija tanina (g/l)			
			0.00	0.05	0.25	1.00
0	0.00	0.0000		0.0000	0.0000	0.0000
	0.05	0.0000	1.0000		0.0000	0.0000
	0.25	0.0000	1.0000	1.0000		0.0000
	1.00	0.0000	1.0000	1.0000	1.0000	
5	0.00	0.0570		0.0570	0.0570	0.0503
	0.05	0.0000	0.9075		0.0000	-0.0066
	0.25	0.0000	0.9075	1.0000		-0.0066
	1.00	0.0066	0.9754	1.0000	1.0000	
10	0.00	0.0000		-0.0274	-0.0407	0.0000
	0.05	0.0274	1.0000		-0.0133	0.0274
	0.25	0.0407	0.9988	1.0000		0.0407
	1.00	0.0000	1.0000	1.0000	0.9988	
13	0.00	0.1082		0.1082	-0.1211	-0.0351
	0.05	0.0000	0.0181		-0.2293	-0.0274
	0.25	0.2293	0.0034	<.0001		0.0861
	1.00	0.1433	0.9999	0.0001	0.1942	
16	0.00	0.0188		0.0188	0.0188	0.0188
	0.05	0.0000	1.0000		0.0000	0.0000
	0.25	0.0000	1.0000	1.0000		0.0000
	1.00	0.0000	1.0000	1.0000	1.0000	
20	0.00	0.0673		0.0481	0.0440	0.0673
	0.05	0.0192	0.9862		-0.0040	0.0192
	0.25	0.0233	0.9960	1.0000		0.0233
	1.00	0.0000	0.6730	1.0000	1.0000	
32	0.00	0.0027		0.0027	-0.0216	0.0027
	0.05	0.0000	1.0000		-0.0243	0.0000
	0.25	0.0243	1.0000	1.0000		0.0243
	1.00	0.0000	1.0000	1.0000	1.0000	
48	0.00	0.0513		0.0453	0.0353	0.0513
	0.05	0.0061	0.9940		-0.0100	0.0061
	0.25	0.0161	0.9999	1.0000		0.0161
	1.00	0.0000	0.9690	1.0000	1.0000	

Opombe:

- Statistično značilne razlike so pri vrednostih ($P < 0,05$), te vrednosti so v poudarjenem tisku.
- Srednje vrednosti so ocenjene po metodi najmanjših kvadratov.
- Pod diagonalo so prikazane p-vrednosti, nad diagonalo pa razlike med različnimi konc. tanina.

PRILOGA E: Vpliv Farmatana® na specifično celično CMC-azno aktivnost bakterije *B. fibrisolvens* – ocenjene srednje vrednosti (SEE=0.0224) in razlike (SEE=0.0632)s statistično značilnostjo razlik.

Čas inkubacije (h)	Konc. tanina (g/l)	Srednje vrednosti	Koncentracija tanina (g/l)			
			0.00	0.05	0.25	1.00
0	0.00	0.0000		0.0000	0.0000	0.0000
	0.05	0.0000	1.0000		0.0000	0.0000
	0.25	0.0000	1.0000	1.0000		0.0000
	1.00	0.0000	1.0000	1.0000	1.0000	
5	0.00	0.2284		0.1394	0.2029	0.2170
	0.05	0.0890	0.0134		0.0634	0.0775
	0.25	0.0256	<.0001	0.9756		0.0141
	1.00	0.0115	<.0001	0.8223	1.0000	
10	0.00	0.1026		0.0320	0.0692	0.0981
	0.05	0.0706	1.0000		0.0371	0.0661
	0.25	0.0335	0.9360	1.0000		0.0289
	1.00	0.0045	0.3733	0.9608	1.0000	
13	0.00	0.2318		0.0898	0.1915	0.2318
	0.05	0.1420	0.5579		0.1017	0.0320
	0.25	0.0403	<.0001	0.3031		0.0403
	1.00	0.0000	<.0001	0.0103	1.0000	
16	0.00	0.4056		0.0070	0.0959	0.3767
	0.05	0.3986	1.0000		0.0889	0.3697
	0.25	0.3097	0.4192	0.5797		0.2808
	1.00	0.0289	<.0001	<.0001	<.0001	
20	0.00	0.3827		-0.0128	0.1016	0.2268
	0.05	0.3955	1.0000		0.1143	0.2396
	0.25	0.2812	0.3055	0.1266		0.1253
	1.00	0.1559	<.0001	<.0001	0.0511	
32	0.00	0.2985		0.0148	0.0801	0.1524
	0.05	0.2837	1.0000		0.0653	0.1376
	0.25	0.2184	0.7742	0.9654		0.0723
	1.00	0.1461	0.0035	0.0161	0.9020	
48	0.00	0.1666		0.0409	0.1050	0.1166
	0.05	0.1257	1.0000		0.0641	0.0757
	0.25	0.0616	0.2463	0.9723		0.0116
	1.00	0.0500	0.1057	0.8526	1.0000	

Opombe:

- Statistično značilne razlike so pri vrednostih ($P < 0,05$), te vrednosti so v poudarjenem tisku.
- Srednje vrednosti so ocenjene po metodi najmanjših kvadratov.
- Pod diagonalo so prikazane p-vrednosti, nad diagonalo pa razlike med različnimi konc. tanina.

PRILOGA F: Vpliv Farmatana® na specifično izvencelično CMC-azno aktivnost bakterije *B. fibrisolvens* – ocenjene srednje vrednosti (SEE=0.0026) in razlike (SEE=0.0072)s statistično značilnostjo razlik.

Čas inkubacije (h)	Konc. tanina (g/l)	Srednje vrednosti	Koncentracija tanina (g/l)			
			0.00	0.05	0.25	1.00
0	0.00	0.0000		0.0000	0.0000	0.0000
	0.05	0.0000	1.0000		0.0000	0.0000
	0.25	0.0000	1.0000	1.0000		0.0000
	1.00	0.0000	1.0000	1.0000	1.0000	
5	0.00	0.0000		0.0000	0.0000	0.0000
	0.05	0.0000	1.0000		0.0000	0.0000
	0.25	0.0000	1.0000	1.0000		0.0000
	1.00	0.0000	1.0000	1.0000	1.0000	
10	0.00	0.0039		-0.0022	-0.0035	-0.0112
	0.05	0.0061	1.0000		-0.0013	-0.0090
	0.25	0.0074	1.0000	1.0000		-0.0077
	1.00	0.0151	0.3728	0.7994	0.9514	
13	0.00	0.0033		-0.0127	0.0033	-0.0069
	0.05	0.0159	0.1590		0.0159	-0.0022
	0.25	0.0000	1.0000	0.0127		-0.0101
	1.00	0.0101	0.9870	0.9990	0.5763	
16	0.00	0.0098		-0.0003	0.0026	0.0083
	0.05	0.0101	1.0000		0.0029	0.0086
	0.25	0.0072	1.0000	1.0000		0.0057
	1.00	0.0014	0.8895	0.8505	0.9991	
20	0.00	0.0081		0.0041	-0.0021	0.0004
	0.05	0.0040	1.0000		-0.0062	-0.0037
	0.25	0.0102	1.0000	0.9967		0.0025
	1.00	0.0077	1.0000	1.0000	1.0000	
32	0.00	0.0060		-0.0030	0.0004	-0.0010
	0.05	0.0090	1.0000		0.0034	0.0020
	0.25	0.0056	1.0000	1.0000		-0.0014
	1.00	0.0070	1.0000	1.0000	1.0000	
48	0.00	0.0079		-0.0137	-0.0106	-0.0136
	0.05	0.0216	0.0797		0.0031	0.0000
	0.25	0.0185	0.4880	1.0000		-0.0031
	1.00	0.0216	0.0817	1.0000	1.0000	

Opombe:

- Statistično značilne razlike so pri vrednostih ($P < 0,05$), te vrednosti so v poudarjenem tisku.
- Srednje vrednosti so ocenjene po metodi najmanjših kvadratov.
- Pod diagonalo so prikazane p-vrednosti, nad diagonalo pa razlike med različnimi konc. tanina.

PRILOGA G: Vpliv Farmatana® na specifično celično ksilanolitično aktivnost bakterije *B. fibrisolvens* – ocenjene srednje vrednosti (SEE = 0.342) in razlike (SEE = 0.964) s statistično značilnostjo razlik.

Čas inkubacije (h)	Konc. tanina (g/l)	Srednje vrednosti	Koncentracija tanina (g/l)			
			0.00	0.05	0.25	1.00
0	0.00	0.000		0.000	0.000	0.000
	0.05	0.000	1.0000		0.000	0.000
	0.25	0.000	1.0000	1.0000		0.000
	1.00	0.000	1.0000	1.0000	1.0000	
5	0.00	12.223		3.584	11.207	11.990
	0.05	8.639	<.0001		7.623	8.407
	0.25	1.016	<.0001	<.0001		0.784
	1.00	0.233	<.0001	<.0001	0.9988	
10	0.00	3.453		-0.624	2.365	3.355
	0.05	4.077	1.0000		2.989	3.979
	0.25	1.088	0.0026	<.0001		0.990
	1.00	0.098	<.0001	<.0001	0.9680	
13	0.00	1.020		-0.683	0.158	0.924
	0.05	1.703	0.9999		0.841	-0.624
	0.25	0.862	1.0000	0.9964		0.766
	1.00	0.096	0.9863	0.2407	0.9992	
16	0.00	6.817		-0.467	-0.109	6.223
	0.05	7.284	1.0000		0.358	6.690
	0.25	6.925	1.0000	1.0000		6.331
	1.00	0.594	<.0001	<.0001	<.0001	
20	0.00	4.915		0.422	0.391	1.932
	0.05	4.493	1.0000		-0.031	1.510
	0.25	4.524	1.0000	1.0000		1.541
	1.00	2.983	0.0451	0.3546	0.3153	
32	0.00	2.381		-0.376	-0.468	0.459
	0.05	2.758	1.0000		-0.092	0.835
	0.25	2.850	1.0000	1.0000		0.927
	1.00	1.923	1.0000	0.9967	0.9856	
48	0.00	1.833		0.195	-0.832	0.684
	0.05	1.638	1.0000		-1.027	0.490
	0.25	2.665	0.9969	0.9516		1.516
	1.00	1.149	0.9999	1.0000	0.3462	

Opombe:

- Statistično značilne razlike so pri vrednostih ($P < 0,05$), te vrednosti so v poudarjenem tisku.
- Srednje vrednosti so ocenjene po metodi najmanjših kvadratov.
- Pod diagonalo so prikazane p-vrednosti, nad diagonalo pa razlike med različnimi konc. tanina.

PRILOGA H: Vpliv Farmatana® na specifično izvencelično ksilanolitično aktivnost bakterije *B. fibrisolvens* – ocenjene srednje vrednosti (SEE = 0.0418) in razlike (SEE = 0.1178) s statistično značilnostjo razlik.

Čas inkubacije (h)	Konc. tanina (g/l)	Srednje vrednosti	Koncentracija tanina (g/l)			
			0.00	0.05	0.25	1.00
0	0.00	0.0000		0.0000	0.0000	0.0000
	0.05	0.0000	1.0000		0.0000	0.0000
	0.25	0.0000	1.0000	1.0000		0.0000
	1.00	0.0000	1.0000	1.0000	1.0000	
5	0.00	0.0000		-0.0289	-0.0698	-0.0513
	0.05	0.0289	1.0000		-0.0409	-0.0224
	0.25	0.0698	1.0000	1.0000		0.0185
	1.00	0.0513	1.0000	1.0000	1.0000	
10	0.00	0.4477		-0.1194	-0.1495	0.0289
	0.05	0.5670	0.9724		-0.0301	0.1482
	0.25	0.5971	0.7716	1.0000		0.1783
	1.00	0.4188	1.0000	0.7846	0.4237	
13	0.00	0.3007		-0.2270	-0.0494	-0.0924
	0.05	0.5277	0.0687		0.1777	-0.1194
	0.25	0.3501	1.0000	0.4316		-0.0430
	1.00	0.3931	0.9993	0.9018	1.0000	
16	0.00	0.1797		-0.1616	0.0384	0.1666
	0.05	0.3413	0.6298		0.2000	0.3282
	0.25	0.1412	1.0000	0.2102		0.1282
	1.00	0.0130	0.5670	0.0002	0.9392	
20	0.00	0.4043		0.0310	-0.0573	0.1343
	0.05	0.3733	1.0000		-0.0883	0.1033
	0.25	0.4616	1.0000	0.9997		0.1916
	1.00	0.2700	0.9040	0.9960	0.2825	
32	0.00	0.7263		0.1033	0.4429	0.6568
	0.05	0.6230	0.9960		0.3395	0.5535
	0.25	0.2835	<.0001	0.0001		0.2140
	1.00	0.0695	<.0001	<.0001	0.1216	
48	0.00	1.0415		-0.0590	0.5227	1.0112
	0.05	1.1006	1.0000		0.5818	1.0703
	0.25	0.5188	<.0001	<.0001		0.4885
	1.00	0.0303	<.0001	<.0001	<.0001	

Opombe:

- Statistično značilne razlike so pri vrednostih ($P < 0,05$), te vrednosti so v poudarjenem tisku.
- Srednje vrednosti so ocenjene po metodi najmanjših kvadratov.
- Pod diagonalo so prikazane p-vrednosti, nad diagonalo pa razlike med različnimi konc. tanina.

PRILOGA I: Vpliv Farmatana® na specifično celično proteolitično aktivnost bakterije *B. fibrisolvens* – ocenjene srednje vrednosti (SEE = 2668.4) in razlike (SEE = 7535.9) s statistično značilnostjo razlik.

Čas inkubacije (h)	Konc. tanina (g/l)	Srednje vrednosti	Koncentracija tanina (g/l)			
			0.00	0.05	0.25	1.00
0	0.00	0.0		0.00	0.00	0.00
	0.05	0.0	1.0000		0.00	0.00
	0.25	0.0	1.0000	1.0000		0.00
	1.00	0.0	1.0000	1.0000	1.0000	
5	0.00	27809.2		19863.00	26784.00	27068.00
	0.05	7946.4	0.0007		6920.76	7205.63
	0.25	1025.6	<.0001	0.9922		284.86
	1.00	740.7	<.0001	0.9865	1.0000	
10	0.00	17581.7		16877.00	8919.14	16463.00
	0.05	704.6	0.0106		-7957.91	-414.06
	0.25	8662.5	0.8653	0.9554		7543.86
	1.00	1118.7	0.0150	1.0000	0.9759	
13	0.00	0.0		-281.43	-602.50	0.00
	0.05	281.4	1.0000		-321.07	16877.00
	0.25	602.5	1.0000	1.0000		602.50
	1.00	0.0	1.0000	1.0000	1.0000	
16	0.00	774.3		545.20	774.33	774.33
	0.05	229.1	1.0000		229.14	229.14
	0.25	0.0	1.0000	1.0000		0.00
	1.00	0.0	1.0000	1.0000	1.0000	
20	0.00	241.8		60.79	241.77	241.77
	0.05	181.0	1.0000		180.99	180.99
	0.25	0.0	1.0000	1.0000		0.00
	1.00	0.0	1.0000	1.0000	1.0000	
32	0.00	813.0		728.66	736.60	813.02
	0.05	84.4	1.0000		7.94	84.36
	0.25	76.4	1.0000	1.0000		76.43
	1.00	0.0	1.0000	1.0000	1.0000	
48	0.00	0.0		0.00	0.00	0.00
	0.05	0.0	1.0000		0.00	0.00
	0.25	0.0	1.0000	1.0000		0.00
	1.00	0.0	1.0000	1.0000	1.0000	

Opombe:

- Statistično značilne razlike so pri vrednostih ($P < 0,05$), te vrednosti so v poudarjenem tisku.
- Srednje vrednosti so ocenjene po metodi najmanjših kvadratov.
- Pod diagonalo so prikazane p-vrednosti, nad diagonalo pa razlike med različnimi konc. tanina.

PRILOGA J: Vpliv Farmatana® na specifično izvencelično proteolitično aktivnost bakterije *B. fibrisolvens* – ocenjene srednje vrednosti (SEE = 8.82) in razlike (SEE = 24.88) s statistično značilnostjo razlik.

Čas inkubacije (h)	Konc. tanina (g/l)	Srednje vrednosti	Koncentracija tanina (g/l)			
			0.00	0.05	0.25	1.00
0	0.00	0.00		0.00	0.00	0.00
	0.05	0.00	1.0000		0.00	0.00
	0.25	0.00	1.0000	1.0000		0.00
	1.00	0.00	1.0000	1.0000	1.0000	
5	0.00	23.10		1.27	-14.19	-128.56
	0.05	21.83	1.0000		-15.46	-129.83
	0.25	37.29	1.0000	1.0000		-114.37
	1.00	151.66	<.0001	<.0001	<.0001	
10	0.00	13.88		-35.67	-14.02	-142.24
	0.05	49.55	0.5389		21.65	-106.57
	0.25	27.90	1.0000	0.9965		-128.21
	1.00	156.12	<.0001	<.0001	<.0001	
13	0.00	17.78		2.60	12.06	-116.82
	0.05	15.18	1.0000		9.46	-35.67
	0.25	5.72	1.0000	1.0000		-128.88
	1.00	134.60	<.0001	<.0001	<.0001	
16	0.00	1.60		-2.19	-9.31	-54.84
	0.05	3.79	1.0000		-7.12	-52.65
	0.25	10.92	1.0000	1.0000		-45.53
	1.00	56.44	0.0135	0.0233	0.1138	
20	0.00	12.89		9.29	3.82	-4.32
	0.05	3.61	1.0000		-5.47	-13.61
	0.25	9.07	1.0000	1.0000		-8.14
	1.00	17.21	1.0000	1.0000	1.0000	
32	0.00	1.86		1.10	1.86	1.86
	0.05	0.76	1.0000		0.76	0.76
	0.25	0.00	1.0000	1.0000		0.00
	1.00	0.00	1.0000	1.0000	1.0000	
48	0.00	9.71		8.01	9.71	-7.54
	0.05	1.69	1.0000		1.69	-15.55
	0.25	0.00	1.0000	1.0000		-17.24
	1.00	17.24	1.0000	1.0000	0.9999	

Opombe:

- Statistično značilne razlike so pri vrednostih ($P < 0,05$), te vrednosti so v poudarjenem tisku.
- Srednje vrednosti so ocenjene po metodi najmanjših kvadratov.
- Pod diagonalo so prikazane p-vrednosti, nad diagonalo pa razlike med različnimi konc. tanina.

PRILOGA K: Vir variabilnosti in statistična značilnost vplivov pri spremljanju rasti in encimskih aktivnosti bakterije *C. proteoclasticum*

Lastnost	P-vrednost		
	Ura inkubacije	Koncentracija tanina	Interakcija
Proteini – celice	<.0001	<.0001	<.0001
Proteini – supernanant	<.0001	<.0001	<.0001
Spec. celična amilolitična aktivnost	<.0001	<.0001	<.0001
Spec. izvencelična amilolitična aktivnost	<.0001	0.0107	0.0090
Spec. celična CMC-azna aktivnost	<.0001	<.0001	<.0001
Spec. izvencelična CMC-azna aktivnost	<.0001	0.6953	<.0001
Spec. celična ksilanolitična aktivnost	<.0001	<.0001	<.0001
Spec. izvencelična ksilanolitična aktivnost	<.0001	0.0092	<.0001
Spec. celična proteazna aktivnost	0.0737	0.4020	0.2273
Spec. izvencelična proteazna aktivnost	<.0001	0.2157	<.0001

Opombe:

- primerjava nivojev vpliva koncentracije tanina ob posameznih urah inkubacije je bila narejena, kjer je bila interakcija med uro inkubacije in koncentracijo tanina statistično značilna ($p < 0,05$)
- statistično neznačilne interakcije so v poudarjenem tisku

PRILOGA L1: Vpliv Farmatana® na rast bakterije *C. proteoclasticum* – ocenjene srednje vrednosti (SEE = 0.0240) in razlike (SEE = 0.0677) s statistično značilnostjo razlik.

Čas inkubacije (h)	Konc. tanina (g/l)	Srednje vrednosti	Koncentracija tanina (g/l)			
			0.00	0.05	0.25	1.00
0	0.00	0.0000		0.0000	0.0000	0.0000
	0.05	0.0000	1.0000		0.0000	0.0000
	0.25	0.0000	1.0000	1.0000		0.0000
	1.00	0.0000	1.0000	1.0000	1.0000	
5	0.00	0.1227		-0.0674	-0.5000	-1.5851
	0.05	0.1901	0.9777		-0.4325	-1.5176
	0.25	0.6227	<.0001	<.0001		-1.0851
	1.00	1.7078	<.0001	<.0001	<.0001	
10	0.00	0.1956		-0.0275	-0.2454	-2.0081
	0.05	0.2231	1.0000		-0.2179	-1.9806
	0.25	0.4410	<.0001	<.0001		-1.7627
	1.00	2.2036	<.0001	<.0001	<.0001	
13	0.00	0.2713		-0.1330	-0.6530	-2.2685
	0.05	0.4043	0.0562		-0.5200	-0.0275
	0.25	0.9243	<.0001	<.0001		-1.6155
	1.00	2.5398	<.0001	<.0001	<.0001	
16	0.00	0.0709		-0.1216	-0.7494	-2.1870
	0.05	0.1925	0.1343		-0.6278	-2.0654
	0.25	0.8203	<.0001	<.0001		-1.4376
	1.00	2.2579	<.0001	<.0001	<.0001	
20	0.00	0.1646		-0.0395	-0.4773	-2.0192
	0.05	0.2041	1.0000		-0.4378	-1.9797
	0.25	0.6418	<.0001	<.0001		-1.5420
	1.00	2.1838	<.0001	<.0001	<.0001	
32	0.00	0.3780		0.0707	-0.4760	-1.9014
	0.05	0.3073	0.9614		-0.5467	-1.9720
	0.25	0.8540	<.0001	<.0001		-1.4253
	1.00	2.2794	<.0001	<.0001	<.0001	
48	0.00	1.0531		0.3277	0.1009	-1.7566
	0.05	0.7254	<.0001		-0.2268	-2.0843
	0.25	0.9522	0.4574	<.0001		-1.8575
	1.00	2.8097	<.0001	<.0001	<.0001	

Opombe:

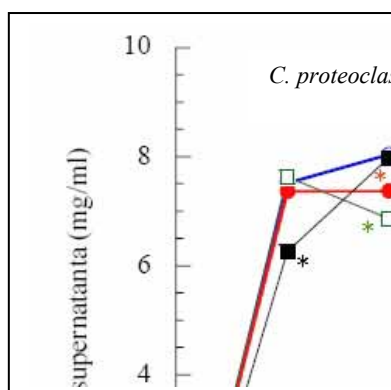
- Statistično značilne razlike so pri vrednostih ($P < 0,05$), te vrednosti so v poudarjenem tisku.
- Srednje vrednosti so ocenjene po metodi najmanjših kvadratov.
- Pod diagonalo so prikazane p-vrednosti, nad diagonalo pa razlike med različnimi konc. tanina.

PRILOGA L2: Vpliv Farmatana® na koncentracijo proteinov v supernatantu bakterijske kulture *C. proteoclasticum* – ocenjene srednje vrednosti (SEE = 0.076) in razlike (SEE = 0.214) s statistično značilnostjo razlik.

Čas inkubacije (h)	Konc. tanina (g/l)	Srednje vrednosti	Koncentracija tanina (g/l)			
			0.00	0.05	0.25	1.00
0	0.00	0.000		0.000	0.000	0.000
	0.05	0.000	1.0000		0.000	0.000
	0.25	0.000	1.0000	1.0000		0.000
	1.00	0.000	1.0000	1.0000	1.0000	
5	0.00	7.518		0.149	-0.107	1.263
	0.05	7.369	0.9999		-0.255	1.114
	0.25	7.624	1.0000	0.8562		1.370
	1.00	6.255	<.0001	<.0001	<.0001	
10	0.00	8.045		0.670	1.184	0.061
	0.05	7.375	<.0001		0.514	-0.609
	0.25	6.861	<.0001	0.0036		-1.123
	1.00	7.984	1.0000	0.0001	<.0001	
13	0.00	7.706		0.351	-0.280	0.222
	0.05	7.355	0.2656		-0.632	0.670
	0.25	7.987	0.7154	<.0001		0.502
	1.00	7.485	0.9642	1.0000	0.0053	
16	0.00	6.661		0.631	-0.488	-0.485
	0.05	6.030	<.0001		-1.119	-1.116
	0.25	7.149	0.0081	<.0001		0.003
	1.00	7.146	0.0089	<.0001	1.0000	
20	0.00	7.572		0.549	0.475	-0.764
	0.05	7.023	0.0012		-0.073	-1.313
	0.25	7.096	0.0120	1.0000		-1.240
	1.00	8.336	<.0001	<.0001	<.0001	
32	0.00	6.415		-0.441	-0.805	-1.066
	0.05	6.856	0.0320		-0.364	-0.625
	0.25	7.220	<.0001	0.2058		-0.261
	1.00	7.481	<.0001	<.0001	0.8283	
48	0.00	6.416		0.148	-0.599	-1.489
	0.05	6.268	0.9999		-0.747	-1.637
	0.25	7.015	0.0002	<.0001		-0.890
	1.00	7.905	<.0001	<.0001	<.0001	

Opombe:

- Statistično značilne razlike so pri vrednostih ($P < 0,05$), te vrednosti so v poudarjenem tisku.
- Srednje vrednosti so ocenjene po metodi najmanjših kvadratov.
- Pod diagonalo so prikazane p-vrednosti, nad diagonalo pa razlike med različnimi konc. tanina.



L3: Koncentracija proteinov v supernatantu bakterijske kulture *C. proteoclasticum* pri treh različnih koncentracijah Farmatana® (0,05 g/l, 0,25 g/l in 1 g/l) in kontrolni kulturi brez dodanega tanina.

PRILOGA M: Vpliv Farmatana® na specifično celično amilolitično aktivnost bakterije *C. proteoclasticum* – ocenjene srednje vrednosti (SEE = 0.0591) in razlike (SEE = 0.1666) s statistično značilnostjo razlik.

Čas inkubacije (h)	Konc. tanina (g/l)	Srednje vrednosti	Koncentracija tanina (g/l)			
			0.00	0.05	0.25	1.00
0	0.00	0.0000		0.0000	0.0000	0.0000
	0.05	0.0000	1.0000		0.0000	0.0000
	0.25	0.0000	1.0000	1.0000		0.0000
	1.00	0.0000	1.0000	1.0000	1.0000	
5	0.00	0.4808		0.4808	-0.0018	0.4808
	0.05	0.0000	0.0001		-0.4826	0.0000
	0.25	0.4826	1.0000	0.0001		0.4826
	1.00	0.0000	0.0001	1.0000	0.0001	
10	0.00	0.0000		0.0000	0.0000	0.0000
	0.05	0.0000	1.0000		0.0000	0.0000
	0.25	0.0000	1.0000	1.0000		0.0000
	1.00	0.0000	1.0000	1.0000	1.0000	
13	0.00	0.1626		0.1626	-0.4164	-0.1299
	0.05	0.0000	0.9827		-0.5789	0.0000
	0.25	0.5789	0.0019	<.0001		0.2864
	1.00	0.2925	0.9994	0.1627	0.1919	
16	0.00	1.6870		0.5836	1.6588	1.4804
	0.05	1.1034	<.0001		1.0751	0.8968
	0.25	0.0282	<.0001	<.0001		-0.1783
	1.00	0.2066	<.0001	<.0001	0.9490	
20	0.00	0.0000		0.0000	0.0000	-0.0593
	0.05	0.0000	1.0000		0.0000	-0.0593
	0.25	0.0000	1.0000	1.0000		-0.0593
	1.00	0.0593	1.0000	1.0000	1.0000	
32	0.00	0.0000		0.0000	-0.1059	-0.2560
	0.05	0.0000	1.0000		-0.1059	-0.2560
	0.25	0.1059	1.0000	1.0000		-0.1501
	1.00	0.2560	0.3934	0.3934	0.9941	
48	0.00	0.0000		0.0000	0.0000	-0.2529
	0.05	0.0000	1.0000		0.0000	-0.2529
	0.25	0.0000	1.0000	1.0000		-0.2529
	1.00	0.2529	0.4183	0.4183	0.4183	

Opombe:

- Statistično značilne razlike so pri vrednostih ($P < 0,05$), te vrednosti so v poudarjenem tisku.
- Srednje vrednosti so ocenjene po metodi najmanjših kvadratov.
- Pod diagonalo so prikazane p-vrednosti, nad diagonalo pa razlike med različnimi konc. tanina.

PRILOGA N: Vpliv Farmatana® na specifično izvencelično amilolitično aktivnost bakterije *C. proteoclasticum* – ocenjene srednje vrednosti (SEE = 0.01852) in razlike (SEE = 0.05224) s statistično značilnostjo razlik.

Čas inkubacije (h)	Konc. tanina (g/l)	Srednje vrednosti	Koncentracija tanina (g/l)			
			0.00	0.05	0.25	1.00
0	0.00	0.0000		0.0000	0.0000	0.0000
	0.05	0.0000	1.0000		0.0000	0.0000
	0.25	0.0000	1.0000	1.0000		0.0000
	1.00	0.0000	1.0000	1.0000	1.0000	
5	0.00	0.0363		0.0069	-0.0066	0.0185
	0.05	0.0293	1.0000		-0.0135	0.0115
	0.25	0.0429	1.0000	1.0000		0.0251
	1.00	0.0178	1.0000	1.0000	1.0000	
10	0.00	0.0541		0.0031	0.0541	-0.0462
	0.05	0.0510	1.0000		0.0510	-0.0493
	0.25	0.0000	0.9646	0.9826		-0.1003
	1.00	0.1003	0.9954	0.9886	0.0712	
13	0.00	0.0309		0.0309	0.0091	-0.0049
	0.05	0.0000	1.0000		-0.0217	0.0031
	0.25	0.0217	1.0000	1.0000		-0.0140
	1.00	0.0358	1.0000	0.9999	1.0000	
16	0.00	0.1632		0.0630	0.1365	0.1077
	0.05	0.1001	0.8432		0.0734	0.0446
	0.25	0.0266	0.0008	0.5798		-0.0288
	1.00	0.0554	0.0322	0.9973	1.0000	
20	0.00	0.0516		0.0000	0.0516	0.0516
	0.05	0.0516	1.0000		0.0516	0.0516
	0.25	0.0000	0.9795	0.9797		0.0000
	1.00	0.0000	0.9795	0.9797	1.0000	
32	0.00	0.0064		-0.0106	0.0064	0.0064
	0.05	0.0170	1.0000		0.0170	0.0170
	0.25	0.0000	1.0000	1.0000		0.0000
	1.00	0.0000	1.0000	1.0000	1.0000	
48	0.00	0.0210		0.0210	0.0058	0.0036
	0.05	0.0000	1.0000		-0.0151	-0.0174
	0.25	0.0151	1.0000	1.0000		-0.0022
	1.00	0.0174	1.0000	1.0000	1.0000	

Opombe:

- Statistično značilne razlike so pri vrednostih ($P < 0,05$), te vrednosti so v poudarjenem tisku.
- Srednje vrednosti so ocenjene po metodi najmanjših kvadratov.
- Pod diagonalo so prikazane p-vrednosti, nad diagonalo pa razlike med različnimi konc. tanina.

PRILOGA O: Vpliv Farmatana® na specifično celično CMC-azno aktivnost bakterije *C. proteoclasticum* – ocenjene srednje vrednosti (SEE = 0.01200) in razlike (SEE = 0.03378) s statistično značilnostjo razlik.

Čas inkubacije (h)	Konc. tanina (g/l)	Srednje vrednosti	Koncentracija tanina (g/l)			
			0.00	0.05	0.25	1.00
0	0.00	0.0000		0.0000	0.0000	0.0000
	0.05	0.0000	1.0000		0.0000	0.0000
	0.25	0.0000	1.0000	1.0000		0.0000
	1.00	0.0000	1.0000	1.0000	1.0000	
5	0.00	0.0841		0.0841	0.0841	0.0841
	0.05	0.0000	0.0020		0.0000	0.0000
	0.25	0.0000	0.0020	1.0000		0.0000
	1.00	0.0000	0.0020	1.0000	1.0000	
10	0.00	0.1403		0.1162	0.1403	0.1347
	0.05	0.0241	<.0001		0.0241	0.0185
	0.25	0.0000	<.0001	0.9999		-0.0056
	1.00	0.0056	<.0001	1.0000	1.0000	
13	0.00	0.0364		0.0292	0.0364	0.0364
	0.05	0.0071	0.9968		0.0071	0.1162
	0.25	0.0000	0.9453	1.0000		0.0000
	1.00	0.0000	0.9453	1.0000	1.0000	
16	0.00	0.2105		0.1935	0.1983	0.2028
	0.05	0.0169	<.0001		0.0047	0.0093
	0.25	0.0122	<.0001	1.0000		0.0045
	1.00	0.0076	<.0001	1.0000	1.0000	
20	0.00	0.0000		0.0000	-0.0242	-0.0049
	0.05	0.0000	1.0000		-0.0242	-0.0049
	0.25	0.0242	0.9999	0.9999		0.0193
	1.00	0.0049	1.0000	1.0000	1.0000	
32	0.00	0.0000		0.0000	-0.0241	-0.0086
	0.05	0.0000	1.0000		-0.0241	-0.0086
	0.25	0.0241	0.9999	0.9999		0.0155
	1.00	0.0086	1.0000	1.0000	1.0000	
48	0.00	0.0000		0.0000	0.0000	0.0000
	0.05	0.0000	1.0000		0.0000	0.0000
	0.25	0.0000	1.0000	1.0000		0.0000
	1.00	0.0000	1.0000	1.0000	1.0000	

Opombe:

- Statistično značilne razlike so pri vrednostih ($P < 0,05$), te vrednosti so v poudarjenem tisku.
- Srednje vrednosti so ocenjene po metodi najmanjših kvadratov.
- Pod diagonalo so prikazane p-vrednosti, nad diagonalo pa razlike med različnimi konc. tanina.

PRILOGA P: Vpliv Farmatana® na specifično izvencelično CMC-azno aktivnost bakterije *C. proteoclasticum* – ocenjene srednje vrednosti (SEE = 0.0025) in razlike (SEE = 0.0069) s statistično značilnostjo razlik.

Čas inkubacije (h)	Konc. tanina (g/l)	Srednje vrednosti	Koncentracija tanina (g/l)			
			0.00	0.05	0.25	1.00
0	0.00	0.0000		0.0000	0.0000	0.0000
	0.05	0.0000	1.0000		0.0000	0.0000
	0.25	0.0000	1.0000	1.0000		0.0000
	1.00	0.0000	1.0000	1.0000	1.0000	
5	0.00	0.0120		-0.0002	0.0005	0.0120
	0.05	0.0121	1.0000		0.0007	0.0121
	0.25	0.0115	1.0000	1.0000		0.0115
	1.00	0.0000	0.1863	0.1670	0.2536	
10	0.00	0.0000		0.0000	0.0000	0.0000
	0.05	0.0000	1.0000		0.0000	0.0000
	0.25	0.0000	1.0000	1.0000		0.0000
	1.00	0.0000	1.0000	1.0000	1.0000	
13	0.00	0.0157		0.0093	0.0157	-0.0009
	0.05	0.0063	0.6674		0.0063	0.0000
	0.25	0.0000	0.0095	0.9929		-0.0165
	1.00	0.0165	1.0000	0.4846	0.0042	
16	0.00	0.0059		0.0033	-0.0056	0.0059
	0.05	0.0026	1.0000		-0.0089	0.0026
	0.25	0.0115	0.9990	0.7593		0.0115
	1.00	0.0000	0.9975	1.0000	0.2536	
20	0.00	0.0056		0.0054	-0.0074	-0.0038
	0.05	0.0002	0.9994		-0.0128	-0.0092
	0.25	0.0130	0.9506	0.1051		0.0036
	1.00	0.0094	1.0000	0.6946	1.0000	
32	0.00	0.0064		-0.0051	0.0011	-0.0049
	0.05	0.0115	0.9998		0.0062	0.0002
	0.25	0.0053	1.0000	0.9951		-0.0060
	1.00	0.0113	0.9999	1.0000	0.9970	
48	0.00	0.0033		-0.0022	-0.0028	-0.0021
	0.05	0.0055	1.0000		-0.0007	0.0001
	0.25	0.0062	1.0000	1.0000		0.0007
	1.00	0.0054	1.0000	1.0000	1.0000	

Opombe:

- Statistično značilne razlike so pri vrednostih ($P < 0,05$), te vrednosti so v poudarjenem tisku.
- Srednje vrednosti so ocenjene po metodi najmanjših kvadratov.
- Pod diagonalo so prikazane p-vrednosti, nad diagonalo pa razlike med različnimi konc. tanina.

PRILOGA R: Vpliv Farmatana® na specifično celično ksilanolitično aktivnost bakterije *C. proteoclasticum* – ocenjene srednje vrednosti (SEE = 0.1925) in razlike (SEE = 0.5430) s statistično značilnostjo razlik.

Čas inkubacije (h)	Konc. tanina (g/l)	Srednje vrednosti	Koncentracija tanina (g/l)			
			0.00	0.05	0.25	1.00
0	0.00	0.0000		0.0000	0.0000	0.0000
	0.05	0.0000	1.0000		0.0000	0.0000
	0.25	0.0000	1.0000	1.0000		0.0000
	1.00	0.0000	1.0000	1.0000	1.0000	
5	0.00	0.7777		0.2560	0.7777	0.7777
	0.05	0.5217	1.0000		0.5217	0.5217
	0.25	0.0000	0.5412	0.9858		0.0000
	1.00	0.0000	0.5412	0.9858	1.0000	
10	0.00	0.3788		-0.4353	-0.2950	0.3061
	0.05	0.8141	0.9990		0.1403	0.7413
	0.25	0.6738	1.0000	1.0000		0.6011
	1.00	0.0728	1.0000	0.6398	0.9280	
13	0.00	0.0000		0.0000	0.0000	0.0000
	0.05	0.0000	1.0000		0.0000	-0.4353
	0.25	0.0000	1.0000	1.0000		0.0000
	1.00	0.0000	1.0000	1.0000	1.0000	
16	0.00	27.966		2.7966	2.7421	2.7966
	0.05	0.0000	<.0001		-0.0544	0.0000
	0.25	0.0544	<.0001	1.0000		0.0544
	1.00	0.0000	<.0001	1.0000	1.0000	
20	0.00	0.6796		0.6120	0.5959	0.6796
	0.05	0.0676	0.9142		-0.0161	0.0676
	0.25	0.0837	0.9339	1.0000		0.0837
	1.00	0.0000	0.7931	1.0000	1.0000	
32	0.00	1.9697		-0.2170	1.9296	1.9633
	0.05	2.1867	1.0000		2.1466	2.1803
	0.25	0.0402	<.0001	<.0001		0.0337
	1.00	0.0064	<.0001	<.0001	1.0000	
48	0.00	0.2299		-0.3474	0.2299	0.0628
	0.05	0.5773	1.0000		0.5773	0.4102
	0.25	0.0000	1.0000	0.9526		-0.1671
	1.00	0.1671	1.0000	0.9997	1.0000	

Opombe:

- Statistično značilne razlike so pri vrednostih ($P < 0,05$), te vrednosti so v poudarjenem tisku.
- Srednje vrednosti so ocenjene po metodi najmanjših kvadratov.
- Pod diagonalo so prikazane p-vrednosti, nad diagonalo pa razlike med različnimi konc. tanina.

PRILOGA S: Vpliv Farmatana® na specifično izvencelično ksilanolitično aktivnost bakterije *C. proteoclasticum* – ocenjene srednje vrednosti (SEE = 0.0352) in razlike (SEE = 0.0992) s statistično značilnostjo razlik.

Čas inkubacije (h)	Konc. tanina (g/l)	Srednje vrednosti	Koncentracija tanina (g/l)			
			0.00	0.05	0.25	1.00
0	0.00	0.0000		0.0000	0.0000	0.0000
	0.05	0.0000	1.0000		0.0000	0.0000
	0.25	0.0000	1.0000	1.0000		0.0000
	1.00	0.0000	1.0000	1.0000	1.0000	
5	0.00	0.1067		0.1067	0.1067	0.1067
	0.05	0.0000	0.9463		0.0000	0.0000
	0.25	0.0000	0.9463	1.0000		0.0000
	1.00	0.0000	0.9463	1.0000	1.0000	
10	0.00	0.0000		0.0000	0.0000	0.0000
	0.05	0.0000	1.0000		0.0000	0.0000
	0.25	0.0000	1.0000	1.0000		0.0000
	1.00	0.0000	1.0000	1.0000	1.0000	
13	0.00	0.0679		-0.1110	0.0679	0.0679
	0.05	0.1789	0.9197		0.1789	0.0000
	0.25	0.0000	0.9999	0.1296		0.0000
	1.00	0.0000	0.9999	0.1296	1.0000	
16	0.00	0.0931		-0.1535	-0.0599	-0.2082
	0.05	0.2466	0.3779		0.0936	-0.0547
	0.25	0.1530	1.0000	0.9887		-0.1483
	1.00	0.3013	0.0258	1.0000	0.4498	
20	0.00	0.0000		-0.0776	0.0000	0.0000
	0.05	0.0776	0.9994		0.0776	0.0776
	0.25	0.0000	1.0000	0.9994		0.0000
	1.00	0.0000	1.0000	0.9994	1.0000	
32	0.00	0.2928		-0.1773	-0.0364	0.1683
	0.05	0.4701	0.1398		0.1409	0.3456
	0.25	0.3292	1.0000	0.5576		0.2047
	1.00	0.1245	0.2110	<.0001	0.0318	
48	0.00	0.1422		0.0282	-0.1349	-0.0582
	0.05	0.1140	1.0000		-0.1630	-0.0863
	0.25	0.2771	0.6474	0.2638		0.0767
	1.00	0.2004	1.0000	0.9965	0.9995	

Opombe:

- Statistično značilne razlike so pri vrednostih ($P < 0,05$), te vrednosti so v poudarjenem tisku.
- Srednje vrednosti so ocenjene po metodi najmanjših kvadratov.
- Pod diagonalo so prikazane p-vrednosti, nad diagonalo pa razlike med različnimi konc. tanina.

PRILOGA T: Vpliv Farmatana® na specifično izvencelično proteolitično aktivnost bakterije *C. proteoclasticum* – ocenjene srednje vrednosti (SEE = 2.28) in razlike (SEE = 6.44) s statistično značilnostjo razlik.

Čas inkubacije (h)	Konc. tanina (g/l)	Srednje vrednosti	Koncentracija tanina (g/l)			
			0.00	0.05	0.25	1.00
0	0.00	0.00		0.0000	0.0000	0.0000
	0.05	0.00	1.0000		0.0000	0.0000
	0.25	0.00	1.0000	1.0000		0.0000
	1.00	0.00	1.0000	1.0000	1.0000	
5	0.00	7.84		0.9000	-12.84	7.84
	0.05	6.94	1.0000		-13.74	6.94
	0.25	20.68	0.0482	0.0213		20.68
	1.00	0.00	0.8333	0.9455	<.0001	
10	0.00	10.29		2.72	-6.84	0.69
	0.05	7.57	1.0000		-9.56	-2.03
	0.25	17.13	0.9536	0.4665		7.53
	1.00	9.60	1.0000	1.0000	0.8809	
13	0.00	13.13		-11.69	1.93	-14.05
	0.05	24.82	0.1229		13.62	2.72
	0.25	11.20	1.0000	0.0237		-15.98
	1.00	27.18	0.0157	1.0000	0.0022	
16	0.00	14.36		-0.18	11.63	-0.28
	0.05	14.54	1.0000		11.81	-0.10
	0.25	2.73	0.1288	0.1124		-11.92
	1.00	14.64	1.0000	1.0000	0.1036	
20	0.00	17.95		7.69	2.83	2.51
	0.05	10.25	0.8566		-4.86	-5.18
	0.25	15.11	1.0000	0.9997		-0.32
	1.00	15.43	1.0000	0.9990	1.0000	
32	0.00	6.11		-5.19	-7.56	-1.76
	0.05	11.29	0.9990		-2.37	3.43
	0.25	13.67	0.8765	1.0000		5.80
	1.00	7.86	1.0000	1.0000	0.9942	
48	0.00	26.31		-0.87	-6.45	4.31
	0.05	27.18	1.0000		-5.58	5.17
	0.25	32.76	0.9763	0.9967		10.76
	1.00	22.00	1.0000	0.9990	0.2380	

Opombe:

- Statistično značilne razlike so pri vrednostih ($P < 0,05$), te vrednosti so v poudarjenem tisku.
- Srednje vrednosti so ocenjene po metodi najmanjših kvadratov.
- Pod diagonalo so prikazane p-vrednosti, nad diagonalo pa razlike med različnimi konc. tanina.

PRILOGA U: Meritve pH kulture *Butyrivibrio fibrisolvens* po 24 in 48 urni inkubaciji v modificiranem M2 gojišču z dodanim Farmatanom® s končnimi koncentracijami 0.5, 0.25 ter 1.00 g/l ter pri kontrolni kulturi brez dodanega taninskega pripravka.

konc. Farmatana® (g/l)	0	0,05	0,25	1
začetni pH	6,5	6,5	6,5	6,5
pH (24 ur)	5,19	5,18	5,23	5,31
pH (48 ur)	5,03	5,09	5,12	5,14

PRILOGA V: Izračunane srednje vrednosti specifične celične proteolitične aktivnosti bakterije *C. proteoclasticum*

Čas inkubacije (h)	Konc. tanina (g/l)	Srednje vrednosti
0	0.00	0.00
	0.05	0.00
	0.25	0.00
	1.00	0.00
5	0.00	416,98
	0.05	1236,41
	0.25	218,89
	1.00	0,00
10	0.00	145,94
	0.05	214,79
	0.25	184,10
	1.00	109,45
13	0.00	13,84
	0.05	292,80
	0.25	195,33
	1.00	237,87
16	0.00	0,00
	0.05	33,62
	0.25	294,68
	1.00	281,10
20	0.00	0,00
	0.05	0,00
	0.25	99,15
	1.00	215,87
32	0.00	273,86
	0.05	369,44
	0.25	14,44
	1.00	5,76
48	0.00	9,69
	0.05	17,59
	0.25	167,60
	1.00	157,70