

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Janja ZORKO

**UGOTAVLJANJE USTREZNOSTI PROBIOTIČNIH PRIPRAVKOV
ZA LJUDI**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**ASSESSMENT OF SUITABILITY OF PROBIOTIC PRODUCTS FOR
HUMAN USE**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2006

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

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

Mentorica: prof. dr. Irena Rogelj

Somentorica: dr. Bojana Bogovič Matijašič

Recenzentka: prof. dr. Sonja Smole Možina

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Janja Zorko

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 579.67:615.372:614.31(043)=863
KG	probiotiki/probiotični izdelki/prehranski dodatki/Fermental/Linex/Probio /Prolife/ označevanje izdelkov/prisotnost probiotičnih mikroorganizmov/izolacija DNA/ molekularne metode/konvencionalne metode/nadzor nad živili
AV	ZORKO, Janja
SA	ROGELJ, Irena (mentorica)/BOGOVIČ MATIJAŠIĆ, Bojana (somentorica)/ SMOLE MOŽINA, Sonja (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI	2006
IN	UGOTAVLJANJE USTREZNOSTI PROBIOTIČNIH PRIPRAVKOV ZA LJUDI
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XIV, 53 str., 21 pregl., 4 sl., 1 pril., 55 vir.
IJ	Sl
JI	sl/en
AI	Razen živil, ki vsebujejo probiotične bakterije, je na slovenskem trgu vse več probiotičnih pripravkov, ki so na voljo kot prehranski dodatki, zdravila brez recepta ali dodatki živalski krmi. Mikrobiološke analize probiotičnih izdelkov nemalokrat razkrijejo neskladje med številom in vrsto dejansko prisotnih organizmov v izdelku ter informacijo na deklaraciji. Namen naloge je bil ugotoviti, ali probiotični pripravki, ki jih je mogoče kupiti na slovenskem trgu kot zdravila brez recepta ali prehranske dodatke, ustrezajo deklaracijam glede števila in vrste bakterij. V ta namen smo preizkusili različne mikrobiološke metode, tako konvencionalne, kot molekularno – genetske. V času vzorčenja smo na slovenskem trgu našli sedem liofiliziranih probiotičnih izdelkov za ljudi, enega kot zdravilo brez recepta in šest v obliki prehranskih dodatkov. V treh primerih smo naleteli na nepravilno poimenovanje bakterij. Na štirih izdelkih ni bilo deklariranega števila mikroorganizmov. Le v enem izdelku od treh, pri katerih je bilo število mikroorganizmov navedeno, je bilo skupno število ustrezno. <i>Lactobacillus acidophilus</i> je bil deklariran v 4 izdelkih, dokazali pa ga nismo v nobenem od njih. <i>Bifidobacterium bifidum</i> smo ugotovili le v enem izdelku od štirih, ki bi to vrsto bakterij morali vsebovati. V večini primerov smo uspeli dokazati prisotnost posameznih deklariranih vrst mikroorganizmov z reakcijo PCR neposredno na liofiliziranih vzorcih. Zaključili smo, da konvencionalne metode niso primerne za mikrobiološko analizo probiotikov, saj pogosto ne omogočajo razlikovanja med sorodnimi vrstami mikroorganizmov, jih je pa mogoče uspešno uporabiti za ugotavljanje števila posameznih bakterij v povezavi z metodo PCR. Tudi predpostavka, da so na slovenskem trgu prisotni probiotiki, ki ne ustrezajo delaraciji, se je pokazala za utemeljeno.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
 DC UDC 579.67:615.372:614.31(043)=863
 probiotic products/probiotic microorganisms/Fermental/Linex/Probio/Prolife/
 CX dietary supplements/labelling/presence of probiotic bacteria/ DNA isolation/
 molecular techniques/conventional methods/food control
 AU ZORKO, Janja
 AA ROGELJ, Irena (supervisor)/BOGOVIČ MATIJAŠIĆ, Bojana (co-advisor)/
 SMOLE MOŽINA, Sonja (reviewer)
 PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 PB University in Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and
 Technology
 PY 2006
 TI ASSESSMENT OF SUITABILITY OF PROBIOTIC PRODUCTS FOR HUMAN
 USE
 DT Graduation Thesis (University studies)
 NO XIV, 53 p., 21 tab., 4 fig., 1 ann., 55 ref.
 LA SI
 AL sl/en
 AB Beside foods containing probiotic bacteria, there is an increasing amount of other
 probiotic preparations such, as dietary supplements, over-the-counter (OTC) drugs
 or feed additives on the Slovenian market. Microbiological analysis of probiotic
 products often reveal a discrepancy between the number and identity of organisms
 actually present in the product and the information on the label. The aim of this
 work was to find out whether probiotic products sold on Slovenian market as OTC
 drugs or dietary supplements correspond to the declarations regarding number and
 species of microorganisms. For this purpose, different conventional as well as
 molecular – genetic methods of microbiological analysis were tested. Seven
 lyophilysed probiotic products for human use, one as OTC drug and six as dietary
 supplements, were found on Slovenian market at the time of sampling. In three
 cases, the bacterial names were not appropriate. The number of microorganisms
 was missing for four products. Only in one product out of four with declared
 number of microorganisms, the total count was satisfactory. *Lactobacillus*
acidophilus was not confirmed in any of the four products where was declared.
Bifidobacterium bifidum was found in one product out of four. In most samples,
 we were able to confirm the presence of declared bacteria by PCR performed
 directly on the lyophilysed products. It was concluded that conventional methods
 were not satisfactory for probiotic identification as usually they not enable
 differentiation between similar species of microorganismus. However they could
 be successfully applied for bacterial quantification, in combination with PCR
 identification. In addition, our presumption that probiotic products, which do not
 correspond the declarations can be found on Slovenian market, was confirmed.

KAZALO VSEBINE

	str
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VIII
KAZALO SLIK.....	X
KAZALO PRILOG	XI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XII
1 UVOD.....	1
1.1 DELOVNA HIPOTEZA	2
2 PREGLED OBJAV.....	3
2.1 DEFINICIJE PROBIOTIKOV SKOZI ZGODOVINO	3
2.2 OBLIKE PROBIOTIČNIH IZDELKOV	4
2.3 LASTNOSTI PROBIOTIKOV IN VARNOST POTROŠNIKA.....	4
2.4 OPIS RODOV BAKTERIJ, KI JIH NAJPOGOSTEJE UPORABLJAJO KOT PROBIOTIKE.....	5
2.4.1 Rod <i>Lactobacillus</i>	6
2.4.2 Rod <i>Bifidobacterium</i>	6
2.4.3 Rod <i>Bacillus</i>	6
2.4.4 Rod <i>Enterococcus</i>.....	6
2.5 MIKROBNA ZDRUŽBA PREBAVNEGA TRAKTA	7
2.6 VPLIV PROBIOTIKOV NA ZDRAVJE.....	7
2.7 UPORABA SPOR BAKTERIJ IZ RODU <i>Bacillus</i> KOT PROBIOTIKOV.....	9
2.8 USTREZNOST PROBIOTIČNIH IZDELKOV V EVROPI.....	10
3 MATERIAL IN METODE	13
3.1 NAČRT POSKUSA	13

3.2 MATERIAL	13
3.2.1 Probiotični izdelki.....	13
3.2.2 Bakterijski sevi in pogoji kultivacije.....	14
3.2.3 Gojišča in raztopine za razredčevanje.....	15
3.2.4 Kemikalije in encimi za izolacijo DNA in reakcijo PCR	17
3.3 METODE DELA	18
3.3.1 Ugotavljanje števila mikroorganizmov v probiotičnih izdelkih.....	18
3.3.2 Osamitev čistih kultur	19
3.3.3 Priprava čistih kultur za pomnoževanje DNA z metodo PCR.....	19
3.3.3.1 Postopek izolacije DNA iz čistih bakterijskih kultur s komercialnim setom za izolacijo genomske DNA (Promega, ZDA)	20
3.3.3.2 Postopek izolacije DNA iz čistih bakterijskih kultur s toploto in Tritonom X-100	21
3.3.3.3 Priprava vzorcev za izvedbo PCR neposredno na suspenziji probiotičnih izdelkov.....	21
3.3.4 Analiza DNA z metodo verižnega pomnoževanja s polimerazo (PCR).....	22
3.3.4.1 Princip PCR.....	22
3.3.4.2 Ugotavljanje vrste bakterij z metodo PCR.....	22
3.3.4.3 Pomnoževanje dela 16S rDNA z metodo PCR in priprava pomnoženih odsekov DNA za sekvenciranje.....	24
4 REZULTATI.....	25
4.1 USTREZNOST DEKLARACIJ PROBIOTIČNIH IZDELKOV.....	25
4.2 UGOTAVLJANJE ŠTEVILA PROBIOTIČNIH BAKTERIJ V POSAMEZNIH IZDELKIH.....	27
4.2.1 Linex®.....	27
4.2.2 Fermental®	28
4.2.2.1 Tablete Fermental®	28
4.2.2.2 Tekočina Fermental®	29
4.2.3 Prolife®	30
4.2.3.1 Kapsule Prolife®	31

4.2.3.2 Pastile Prolife®	31
4.2.3.3 Suspenzija Prolife®	32
4.2.4 Probio®	33
4.3 POTRJEVANJE PRISOTNOSTI DEKLARIRANIH MIKROORGANIZMOV V PROBIOTIČNIH IZDELKIH Z METODO PCR	34
4.3.1 Ugotavljanje prisotnosti kromosomske DNA bakterij v suspenzijah, izoliranih s toploto in detergentom, ter izoliranih s komercialnim setom za izolacijo genomske DNA.....	34
4.3.2 Ugotavljanje prisotnosti bakterijske DNA bakterij z reakcijo PCR in univerzalnimi bakterijskimi oligonukleotidnimi začetniki ali oligonukleotidnimi začetniki, specifičnimi za rod <i>Lactobacillus</i>	34
4.3.3 Ugotavljanje prisotnosti DNA bakterij posameznih vrst, deklariranih na izdelkih, z reakcijo PCR in vrstno specifičnimi oligonukleotidnimi začetniki	35
5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	40
5.1 PREGLED STANJA PROBIOTIČNIH IZDELKOV NA SLOVENSKEM TRGU IN NEKATERIH DRUGIH DRŽAV EU	40
5.2 KRITERIJI ZA VRSTE PROBIOTIKOV, KI SE UPORABLJAJO ZA HUMANO PREHRANO.....	42
5.3 RAZVOJ IDENTIFIKACIJSKIH METOD ZA UGOTAVLJANJE PROBIOTIKOV	43
5.4 ŠTEVILO PROBIOTIČNIH MIKROORGANIZMOV V IZDELKIH IN VPLIV ROKA TRAJANJA NA PREŽIVELOST PROBIOTIKOV	45
5.5 SKLEPI.....	47
6 POVZETEK.....	48
7 VIRI.....	49

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Mikroorganizmi, ki jih uporabljamo kot probiotike (Gardiner in sod., 2002)	4
Preglednica 2: Probiotični izdelki na slovenskem trgu, januarja 2005	14
Preglednica 3: Imena in izvor referenčnih bakterijskih sevov	15
Preglednica 4: Gojišča, temperatura, atmosferski pogoji in čas inkubacije za kvantitativno mikrobiološko analizo probiotikov s štejetjem izraslih kolonij na ploščah	19
Preglednica 5: Postopek barvanja po Gramu	19
Preglednica 6: Podatki o ustreznih oligonukleotidnih začetnikih, koncentraciji agaroznega gela in velikosti specifičnih produktov za posamezne vrste bakterij oz. rodu	22
Preglednica 7: Sestava reakcijske mešanice (100 µl) za reakcije PCR za posamezne vrste bakterij	23
Preglednica 8: Parametri reakcije PCR za ugotavljanje prisotnosti DNA posameznih bakterijskih vrst	23
Preglednica 9: Parametri reakcije PCR za pripravo DNA namenjeno sekvenciranju	24
Preglednica 10: Deklarirana sestava probiotičnih izdelkov, naprodaj v Sloveniji kot zdravila brez receptov ali prehranski dodatki januarja 2005.	26
Preglednica 11: Rezultati štetja KE na selektivnih gojiščih, morfološkega opazovanja bakterijskih celic in barvanja po Gramu (Linex®)	27
Preglednica 12: Vsebnost deklariranega in ugotovljenega števila MKB (KE/kapsulo) v treh izdelkih Linex®	28
Preglednica 13: Rezultati štetja KE na selektivnih gojiščih, morfološkega opazovanja bakterijskih celic in barvanja po Gramu (tablete Fermental®)	28
Preglednica 14: Rezultati štetja KE na selektivnih gojiščih, morfološkega opazovanja bakterijskih celic in barvanja po Gramu (tekočina Fermental®)	29

Preglednica 15: Vsebnost deklariranih in z analizo ugotovljenih bakterijskih vrst (KE/100 ml) v izdelku tekočina Fermental [®]	30
Preglednica 16: Rezultati štetja KE na selektivnih gojiščih, morfološkega opazovanja bakterijskih celic in barvanja po Gramu (kapsule Prolife [®])	31
Preglednica 17: Rezultati štetja KE na selektivnih gojiščih, morfološkega opazovanja bakterijskih celic in barvanja po Gramu (pastile Prolife [®])	31
Preglednica 18: Rezultati štetja KE na selektivnih gojiščih, morfološkega opazovanja bakterijskih celic in barvanja po Gramu (suspenzija Prolife [®])	32
Preglednica 19: Rezultati štetja KE na selektivnih gojiščih, morfološkega opazovanja bakterijskih celic in barvanja po Gramu (Probio [®])	33
Preglednica 20: Vsebnost deklariranih in z analizo ugotovljenih bakterijskih vrst (KE/kapsulo) v izdelku Probio [®]	33
Preglednica 21: Zbirna preglednica z rezultati ugotavljanja prisotnosti deklariranih mikroorganizmov v izdelkih s PCR ali z ugotavljanjem sekvenc regij V1/V2 gena za 16S rRNA.	38

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Možen vpliv probiotikov na zdravje posameznika (Saarela in sod., 2002).....	9
Slika 2: Rezultati reakcije PCR z univerzalnimi bakterijskimi oligonukleotidnimi začetniki in z začetniki, specifičnimi za rod <i>Lactobacillus</i> . Proge 1 – 7 vzorci z oznakami 1, 2, 3, 9, 10, 14 in 15; proga 8 – negativna kontrola (voda); progi 9 in 11 – pozitivna kontrola, DNA seva <i>Lb. acidophilus</i> , ATCC 4356; progi 10 in 20 – velikostni standard za DNA (Fermentas 250 bp); proge 12 – 19 vzorci z oznakami 17, 21, 30, 35, 37, 43, 44 in 47. Seznam vzorcev je podan v Prilogi A.....	35
Slika 3: Rezultati reakcije PCR z oligonukleotidnimi začetniki za vrsto <i>Bif. longum</i> . Progi 1 in 2 vzorca z oznakami 75 in 78; proga 3 pozitivna kontrola, DNA seva <i>Bif. longum</i> , ATCC 15708; proga 4 negativna kontrola (voda). Seznam vzorcev je podan v Prilogi A.....	36
Slika 4: Rezultati reakcije PCR z oligonukleotidnimi začetniki za <i>Lb. johnsonii</i> . Proge 1-12 vzorci z oznakami 2, 21, 38, 43, 46, 72, 73, 74, 75, 77, 78 in 79; proga 13 pozitivna kontrola, DNA seva <i>Lactobacillus johnsonii</i> ATCC 11506; proga 14 negativna kontrola (voda); proga 15 velikostni standard za DNA (Fermentas 100 bp).....	36

KAZALO PRILOG

	str.
Priloga A: Seznam vseh izolatov in vzorcev probiotičnih izdelkov, uporabljenih v diplomski nalogi, ter uporabljena gojišča, pogoji kultivacije in oblika celic pod mikroskopom	55

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ATCC	American type culture collection
<i>B.</i>	<i>Bacillus</i>
<i>Bif.</i>	<i>Bifidobacterium</i>
BHI	gojišče Brain Heart Infusion
bp	Bazni par
CH	Christian Hansen, Danska
CATC	gojišče Citrate Azide Tween Carbonate
cys	Cistein
cly	Klindamicin
DGGE	Elektroforetsko ločevanje DNA na poliakrilamidnem gelu z gradientom denaturacijskega sredstva
DNA	Deoksiribonukleinska kislina
rDNA	Ribosomalna deoksiribonukleinska kislina
dNTP	Mešanica nukleotidov
<i>E.</i>	<i>Enterococcus</i>
EMB	Eosin Methylene-blue Lactose Sucrose Agar
GRAS	Generally Recognized As Safe (splošno priznано kot varno)
K	Pozitivna kontrola
KE	Kolonijske enote
<i>Lb.</i>	<i>Lactobacillus</i>
<i>Lc.</i>	<i>Lactococcus</i>
MKB	Mlečnokislinske bakterije
MO	Mikroorganizmi
MRS	Gojišče de Man – Rogosa – Sharpe
NCDO	National Collection of Dairy Organism, Reading, Velika Britanija
NPNL	Nalidixic acid, LiCl, Neomycin-sulphate, Paromomycin sulphate agar
o.z.	Oligonukleotidni začetnik
P1	Oligonukleotidni začetnik 1
P2	Oligonukleotidni začetnik 2
PCR	Polymerase chain reaction (verižna reakcija s polimerazo)
PFGE	Gelska elektroforeza v utripajočem polju
RNA	Ribonukleinska kislina
rRNA	Ribosomalna ribonukleinska kislina
<i>Str.</i>	<i>Streptococcus</i>
Taq polimeraza	Polimeraza, izolirana iz mikroorganizma <i>Thermus aquaticus</i>
VRB	Violet – Red – Bile agar

1 UVOD

Na trgu se pojavlja vse več obogatene, tako imenovane funkcionalne hrane, ki potrošniku zagotavlja specifične, zdravju koristne učinke. Med temi izdelki prevladujejo takšni, ki vsebujejo probiotike. To so živi mikroorganizmi, ki dokazano ugodno vplivajo na zdravje ljudi, če jih zaužijemo v zadostnem številu. Najpogostejši predstavniki probiotikov za humano prehrano so bakterije rodov *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus* in *Bacillus*. Poleg probiotičnih živil je na trgu mogoče kupiti tudi vrsto probiotičnih pripravkov, ki so na voljo kot prehranski dodatki ali zdravila brez recepta. Označevanje izdelkov, ki vsebujejo probiotike, je pogosto pomanjkljivo in/ali neustrezno glede števila živih mikroorganizmov kot tudi vrste le-teh.

Tradicionalna identifikacija mlečnokislinskih bakterij je temeljila na fenotipskih lastnostih, kot so morfologija, pot fermentacije glukoze, temperaturno območje rasti, konfiguracija mlečne kisline in sposobnost fermentacije različnih ogljikovih hidratov. Hibridizacijski testi DNA-DNA in DNA-RNA in primerjalne sekvenčne analize genov za 16S rRNA in 23S rRNA so pokazali odstopanja klasično postavljenih taksonov od filogenetske sorodnosti, ki jo odraža nukleotidno zaporedje izbranih odsekov genoma, npr. ribosomskih genov. To je pripeljalo do velikih sprememb v taksonomiji številnih bakterijskih rodov. S stališča praktične uporabnosti, oz. identifikacije probiotičnih sevov je pomembno, da številnih sevov in celo vrst ni mogoče razločevati na osnovi fenotipskih lastnosti. To velja za pomembne probiotične bakterije iz skupin *Lb. acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* in nekatere vrste rodu *Bifidobacterium*. Vse to narekuje uporabo molekularnih metod identifikacije in tipizacije probiotičnih sevov v selekcijskih postopkih in pri sledenju njihove prisotnosti.

Glavna prednost, ki jo prinašajo molekularne metode, v primerjavi s klasičnimi mikrobiološkimi je ta, da ni potrebna kultivacija mikroorganizmov in zato zajamejo tudi tiste bakterije, ki jih ni mogoče kultivirati. Tako dobimo realnejšo sliko mikrobne raznolikosti kompleksnih mikrobnih združb.

Med molekularnimi metodami imajo prednost tiste, ki vključujejo analizo DNA, saj je ta manj odvisna od okoljskih dejavnikov kot ostale sestavine mikrobnih celic. Celotno DNA lahko osamimo iz mikrobnih celic in pri tem vključimo različne dele genoma. Veliko občutljivost pri odkrivanju prisotnosti mikroorganizmov v kompleksnih okoljih pa dosežemo z uporabo PCR, verižne reakcije s polimerazo. Ta omogoča encimsko pomnožitev kratkega dela matrične t.j. mikrobne DNA *in vitro*.

Najpopolnejšo nadaljno analizo pomnožkov PCR predstavlja direktno sekvenciranje, t.j. ugotavljanje nukleotidnega zaporedja pomnožkov DNA (Smole Možina in Jeršek, 2001).

1.1 DELOVNA HIPOTEZA

V okviru naloge smo nameravali z različnimi mikrobiološkimi metodami, tako konvencionalnimi kot molekularno – genetskimi, pregledati probiotične pripravke, ki jih je mogoče kupiti na slovenskem trgu kot zdravila brez recepta ali prehranske dodatke. Želeli smo ugotoviti, ali se mikrobiološka slika ujema s podatki glede števila in vrste bakterij, ki jih navajajo proizvajalci.

Glede na dejstvo, da se zakonodaja o probiotičnih izdelkih šele oblikuje, in na številne objave o neustreznosti probiotičnih izdelkov glede deklarirane količine in vrst dodanih mikroorganizmov, smo predvidevali, da so tudi na slovenskem trgu izdelki, katerih sestava ne ustreza deklaraciji.

Predpostavljali smo, da je mogoče ugotoviti prisotnost deklariranih vrst mikroorganizmov s hitrimi analizami, ki temeljijo na verižnem pomnoževanju celokupne DNA, izolirane neposredno iz probiotičnih izdelkov, z uporabo za posamezne vrste specifičnih oligonukleotidnih začetnikov.

2 PREGLED OBJAV

2.1 DEFINICIJE PROBIOTIKOV SKOZI ZGODOVINO

Lahko bi rekli, da so se probiotiki pojavili tedaj, ko je človek začel uživati fermentirano mleko. Vendar pa se prva spoznanja o njihovi terapevtskih lastnostih začenejo šele z začetkom 20. stoletja, ko je Metchnikoff opazil negativne učinke črevesne flore na gostitelja in predlagal uživanje fermentiranih izdelkov, da bi preprečili t.i. avtointoksikacijo (Schrezenmeir in de Vrese, 2001).

Izraz probiotiki se je pojavil leta 1974, ko ga je Parker (1974) uporabil za opis dodatkov živalski krmi, ki pospešujejo rast.

Fuller (1989) je definicijo probiotikov preoblikoval v »živ mikrobnii dodatek krmi, ki ugodno vpliva na žival gostiteljico z izboljšanjem njenega mikrobnega ravnotežja«.

Definicija probiotikov je bila dolgo omejena zgolj na živalsko prehrano, zato sta Haavenaar in Huis in't Veld (1992) predlagala razširitev definicije tudi na humano prehrano. Njuna definicija se glasi: »Probiotik je mono- ali mešana kultura živih mikroorganizmov, ki koristno učinkujejo na človeka ali žival z uravnavanjem črevesne mikroflore«.

Delovna skupina, ki deluje v okviru organizacije ILSI (International Life Science Institute) Europe je definirala probiotike kot »prehranski dodatki z živimi mikroorganizmi, ki ugodno vplivajo na zdravje gostitelja« (Salminen in sod., 1998). Iz istega leta izhaja definicija, ki pravi, da so probiotiki živi mikroorganizmi, ki dokazano ugodno učinkujejo na zdravje, če jih zaužijemo v zadostni količini (Guarner in Schaafsma, 1998).

Probiotični izdelki vsebujejo žive, natančno znane mikroorganizme, ki so sposobni vplivati na ostalo mikrobnii združbo gostitelja ter posredno na zdravje posameznika, če jih zaužije v zadostni količini (Schrezenmeir in de Vrese, 2001). Smatrajo, da je dnevni vnos 10^9 - 10^{10} živih probiotičnih mikroorganizmov najmanjša količina, ki zagotavlja pozitivne učinke na zdravje (Sanders in Veld, 1999; Fasoli in sod., 2003). Probiotične bakterije so večinoma prisotne kot funkcionalni dodatki v mlečnih in drugih fermentiranih izdelkih, kot prehranski dodatki ter kot krmni dodatki (Saarela in sod., 2002).

Mlečnokislinske bakterije so najpogostejši predstavniki probiotičnih bakterij, saj so naravno prisotne v humanem in živalskem prebavnem traktu ter na drugih mukoznih površinah (Holzapfel in Schillinger, 2002). Mikroorganizmi, ki jih najpogosteje najdemo kot probiotike, so prikazani v Preglednici 1. Največ je laktobacilov in bifidobakterij, ki že zelo zgodaj naselijo človeški prebavni trakt. Probiotične bakterije so selekcionirane tako, da lahko preživijo prehod skozi prebavni trakt, saj je to osnovni pogoj za uspešno učinkovanje v črevesju. Razen tega pa mora sev, ki ga želimo uporabiti v živilih, preživeti tehnološki postopek izdelave posameznega živila ter v zadostnem številu prispeti do ciljnega mesta v prebavnem traktu (Gardiner in sod., 1998). Dosedanje raziskave so pokazale, da so posamezni probiotični mikroorganizmi zelo specifični in jih je potrebno proučevati vsakega posebej (Yeung in sod., 2004).

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

laktobacili	bifidobakterije	enterokoki	ostali
<i>Lb. acidophilus</i>	<i>Bif. bifidum</i>	<i>E. faecium</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>Lb. plantarum</i>	<i>Bif. infantis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i>
<i>Lb. casei</i>	<i>Bif. adolescentis</i>		<i>Lactococcus lactis ssp. cremoris</i>
<i>Lb. rhamnosus</i>	<i>Bif. longum</i>		<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>Bif. breve</i>		<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>Lb. fermentum</i>	<i>Bif. lactis</i>		<i>Escherichia coli</i>
<i>Lb. johnsonii</i>			
<i>Lb. gasseri</i>			
<i>Lb. salivarius</i>			
<i>Lb. reuteri</i>			

2.2 OBLIKE PROBIOTIČNIH IZDELKOV

V zadnjem času se je ponudba probiotičnih izdelkov na evropskem trgu zelo povečala. Probiotične izdelke za ljudi lahko razdelimo v tri skupine:

- fermentirani mlečni izdelki s probiotičnimi bakterijami,
- druga fermentirana ali nefermentirana živila, v katerih so dodani probiotiki in
- prehranski dodatki ali zdravila brez recepta, ki so v obliki kapsul, tablet, pastil in praškov za pripravo suspenzij.

2.3 LASTNOSTI PROBIOTIKOV IN VARNOST POTROŠNIKA

Z vidika varnosti se za probiotične bakterije, namenjene za humano uporabo, zahteva, da ne povzročajo sistemskih infekcij ter prebavnih težav, da ne izločajo encimov s škodljivim delovanjem, kot je naprimer razgradnja glikopeptidov črevesne sluzi ali dekonjugacija žolčnih soli ter, da ne vsebujejo prenosljivih genov za odpornost proti antibiotikom (Adams, 1999).

Razen tega pa morajo probiotični sevi zadostiti tudi številnim drugim kriterijem, da so učinkoviti. Mednje sodijo odpornost proti kislini, želodčnemu soku in žolču, sposobnost vezave na črevesne epitelne celice ter ohranjanje aktivnosti v humanem prebavnem traktu, spodbujanje oziroma krepitev imunskega odziva, učinkovitost proti patogenim bakterijam kot so *Helicobacter pylori*, *Salmonella sp.*, *Listeria monocytogenes* in *Clostridium difficile*, ter protimutageno in protikarcinogeno delovanje (Saarela in sod., 2000). Poleg sposobnosti preživetja v pogojih črevesja, ki jo morajo imeti vsi sevi, učinkujejo različni sevi z različnimi mehanizmi.

Po zaužitju probiotičnih izdelkov morajo mikroorganizmi preiti biološke ovire, kot je kislina v želodcu, žolčne soli in bazičnost dvanajstnika, ter doseči črevo, kjer se morajo naseliti oziroma vsaj zadržati dovolj dolgo, da lahko pokažejo pozitivne učinke. Da je to mogoče, mora biti njihovo število v izdelku dovolj veliko (Fasoli in sod., 2003).

Sposobnost preživetja probiotičnih bakterij preskušajo *in vitro* ter *in vivo*. Probiotične mlečnokislinske bakterije, kot so *Lactobacillus gasseri* in *Lactobacillus acidophilus*, bolje preživijo prehod skozi želodec kot vrsti *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ter *Streptococcus thermophilus*, ki ju najdemo v tradicionalnem jogurtu. Bifidobakterije so večinoma bolj občutljive za želodčni sok kot laktobacili, glede občutljivosti za žolčne soli pa obstajajo velike razlike med sevi posameznih vrst (Lick in sod., 2001).

V primeru, da vključujemo probiotične seve v živila, morajo le-ti nenazadnje zadostiti tudi tehnološkim zahtevam industrijske proizvodnje. To pomeni, da ne smejo negativno vplivati na senzorične lastnosti, morajo biti odporni proti fagom, morajo preživeti postopke predelave ter skladiščenje do konca obstojnosti (Mattila-Sandholm in sod., 2002).

Mikroorganizmi, ki jih vključujejo v probiotične preparate, morajo biti sposobni tekrovati s številno in dobro organizirano črevesno mikrobno združbo gostitelja, morajo biti nepatogeni, netoksigeni in sposobni rasti v anaerobnih pogojih. Tem zahtevam najboljše ustrezajo izolati črevesnih bakterij oz. naravne mikrobne združbe prebavnega trakta. Da je tak preparat učinkovit, mora vsebovati veliko živih organizmov, z ustreznimi probiotičnimi in tehnološkimi lastnostmi.

Z vidika zaščite potrošnika morajo biti izpolnjene naslednje zahteve:

- če gre za živila, morajo biti taki izdelki varni, prav tako kot konvencionalna živila,
- če gre za pripravke z navedenimi učinki na zdravje, morajo biti ti ustrezno dokazani v kliničnih raziskavah na ljudeh in
- vsi izdelki morajo biti jasno in natančno označeni tako, da je uporabnik ob nakupu nedvoumno seznanjen z vsebino izdelka.

Kupcu prijazna deklaracija bi morala vsebovati naslednje podatke:

- zaznamek, da so prisotne žive bakterije,
- natančen opis bakterij,
- velikost populacije posameznih bakterijskih sevov, zapisane v enotah, razumljivih porabniku in strokovno pravih,
- minimalno količino bakterij, ki še zagotavlja zdravju koristne učinke ter
- vsebnost bakterij, ki jih mora imeti izdelek do konca roka obstojnosti, in ne samo podatek o številu bakterij v svežem izdelku (Rogelj in Bogovič Matijašič, 2004).

2.4 OPIS RODOV BAKTERIJ, KI JIH NAJPOGOSTEJE UPORABLJAJO KOT PROBIOTIKE

Kot probiotiki najpogosteje nastopajo mlečnokislinske bakterije, ki so po Gramu pozitivne, nesporogene, katalaza negativne bakterije, brez citokromov, energijo dobivajo izključno s fermentacijo. Mlečna kislina je njihov glavni proizvod fermentacije. Naseljujejo pretežno anaerobne ekološke niše, a so aerotolerantne. Odporne so proti nizkim vrednostim pH, glede hranil pa so zahtevni organizmi (Holzapfel in sod., 2001).

Razen mlečnokislinskih bakterij pa kot probiotike uporabljajo tudi druge, kot so predstavniki rodu *Bacillus*, vrste *Escherichia coli* in *Saccharomyces boulardii*.

2.4.1 Rod *Lactobacillus*

Laktobacili spadajo med najbolj razširjene MKB in so tudi najpogosteje zastopana skupina industrijsko uporabnih bakterij v živilstvu. To so po Gramu pozitivne, dolge ali kokoidne, negibljive in nesporogene palčke. Energijo pridobivajo izključno s fermentacijo sladkorjev. Glede odnosa do kisika so aerotolerantni anaerobi. Prehransko so zahtevni, poleg fermentabilnih sladkorjev potrebujejo mnoge rastne dejavnike, kot so aminokisliline, vitamini in organske baze. Lahko se razmnožujejo pri temperaturi od 2 °C do 45 °C, optimum je med 30 °C in 40 °C (Adamič in sod., 2003).

2.4.2 Rod *Bifidobacterium*

Bifidobakterije so obvezno anaerobne, negibljive, nesporogene, po Gramu pozitivne paličaste bakterije, ki ogljikove hidrate fermentativno presnavljajo v mlečno in očetno kislino kot glavna produkta. V človeškem debelem črevesu dosežejo koncentracijo 10^8 - 10^9 celic na gram vsebine, kar jih uvršča med pomembne organizme črevesne mikrobne združbe. Bifidobakterije različnih vrst veliko uporabljajo v proizvodnji probiotičnih mlečnih izdelkov (Adamič in sod., 2003).

2.4.3 Rod *Bacillus*

Bakterije rodu *Bacillus* so po Gramu pozitivne, ubikvitarne bakterije, prisotne v zemlji, zraku, v vodi, rastlinah in v človeških ter živalskih iztrebkih. So aerobne in fakultativno anaerobne paličice, ki oblikujejo endospore. Glede na temperaturno območje rasti so mezofilne, včasih psihotrofne, nekatere vrste pa so termofilne (npr. *B. coagulans*). Mnoge so saharolitične, proteolitične in lipolitične, zato so znani kvarljivci živil (Adamič in sod., 2003).

2.4.4 Rod *Enterococcus*

Zelo razširjena je uporaba predstavnikov vrste *E. faecium* kot probiotikov. Podatki, ki govorijo v prid aplikaciji enterokokov kot zaščitnih starter kultur ali probiotikov, so njihova prisotnost v naravni mikrobni združbi zdravih ljudi in živali ter v fermentirani hrani in krmi. Razen tega, da s svojimi produkti metabolizma značilno vplivajo na aromo mnogih fermentiranih izdelkov, na primer sirov, lahko proizvajajo tudi protimikrobne snovi (bakteriocine in druge), ki so sposobne zaviralno delovati proti nekaterim patogenim mikroorganizmom. Še bolj pa jih poznamo po negativnih lastnostih, saj so posamezni pripadniki tega rodu oportunistični patogeni. Pogosto jih omenjajo tudi v zvezi z možnostjo prenosa genov za rezistenco proti antibiotikom, predvsem tistih iz skupine glikopeptidov (vankomicin, teicoplanin), ki so zadnje orožje pri hudih infekcijah, kjer penicilinski antibiotiki odpovedo, na druge bakterije. Posebej skrbno spremljajo po svetu vpletenost enterokokov v bolnišnične infekcije ter iščejo možne izvore takih izolatov (Becquet, 2003).

2.5 MIKROBNA ZDRUŽBA PREBAVNEGA TRAKTA

Mikrobna združba prebavnega trakta predstavlja enega izmed najbolj kompleksnih ekosistemov, kar jih poznamo, saj jo po današnjih predvidevanjih sestavlja čez 400 ali celo 500 različnih vrst bakterij, ki pripadajo najmanj 50 rodovom. Naravna mikrobna populacija, ki naseljuje prebavni trakt, je zelo dobro prilagojena in navadno izjemno stabilna. To so pokazale številne novejšje raziskave, ki jih omogočajo molekularno genetske metode. Šele te metode namreč omogočajo odkrivanje tudi tistih vrst, ki jih s klasičnimi mikrobiološkimi metodami ni bilo moč odkriti (Rogelj, 2001).

Mikrobna združba prebavnega trakta igra ključno vlogo pri razgradnji hrane, proizvodnji esencialnih snovi, zaviranju rasti patogenih mikroorganizmov, vzpodbujanju črevesnega imunskega sistema ter tako bistveno prispeva k vzdrževanju zdravja posameznika. Normalna mikrobna združba prebavnega trakta je še vedno dokaj neraziskana, saj večine teh mikroorganizmov ni mogoče gojiti *in vitro*. Predstavlja oviro in obrambo pred patogenimi mikroorganizmi. Večina predstavnikov te mikrobne združbe je fakultativno ali striktno anaerobnih in zelo občutljivih za dejavnike okolja. V želodcu je okrog 10^3 bakterij/ml, dvanaestnik in tanko črevo pa vsebujeta okrog 10^5 bakterij/ml vsebine. Od tankega črevesa naprej koncentracija mikrobne združbe narašča in doseže okrog 10^{10} do 10^{12} bakterij/g vsebine debelega črevesa. Pomembnejši rodovi mikroorganizmov, ki so jih osamili iz blata, so *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Ruminococcus*, *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Peptococcus*, *Enterobacter* in *Veillonella*. Sicer pa raziskave kažejo, da pri vsakem odraslem posamezniku prevladuje 10-20 sevov (Saarela in sod., 2002).

Kolonizacija črevesja se začne takoj po rojstvu in je povezana z okoljem. Novorojenček dobi prvotno mikrobno združbo od svoje matere med rojstvom, kasneje pa ima nanjo velik vpliv predvsem prehrana (Saarela in sod., 2002).

Bifidobakterije so med najpomembnejšimi predstavniki mikrobne združbe prebavnega trakta človeka že od rojstva. V številnih študijah so proučevali, kako bi bilo mogoče povečati število bifidobakterij v črevesju. Uživanje nekaterih prebiotikov lahko značilno poveča koncentracijo bifidobakterij. Prevladujoče vrste bifidobakterij v prebavnem traktu odraslega človeka so *Bif. adolescentis*, *Bif. longum*, *Bif. infantis* in *Bif. breve* (Matsuki in sod., 1999).

2.6 VPLIV PROBIOTIKOV NA ZDRAVJE

Potrebno je razlikovati uporabo probiotikov kot sestavine funkcionalne hrane ali prehranskih dodatkov, od uporabe za terapevtske namene. Raziskave možne uporabe probiotikov za zdravljenje nekaterih obolenj, kot so kronična vnetja črevesa, rak ali alergije, so namreč v zadnjem času doživele pravi razcvet.

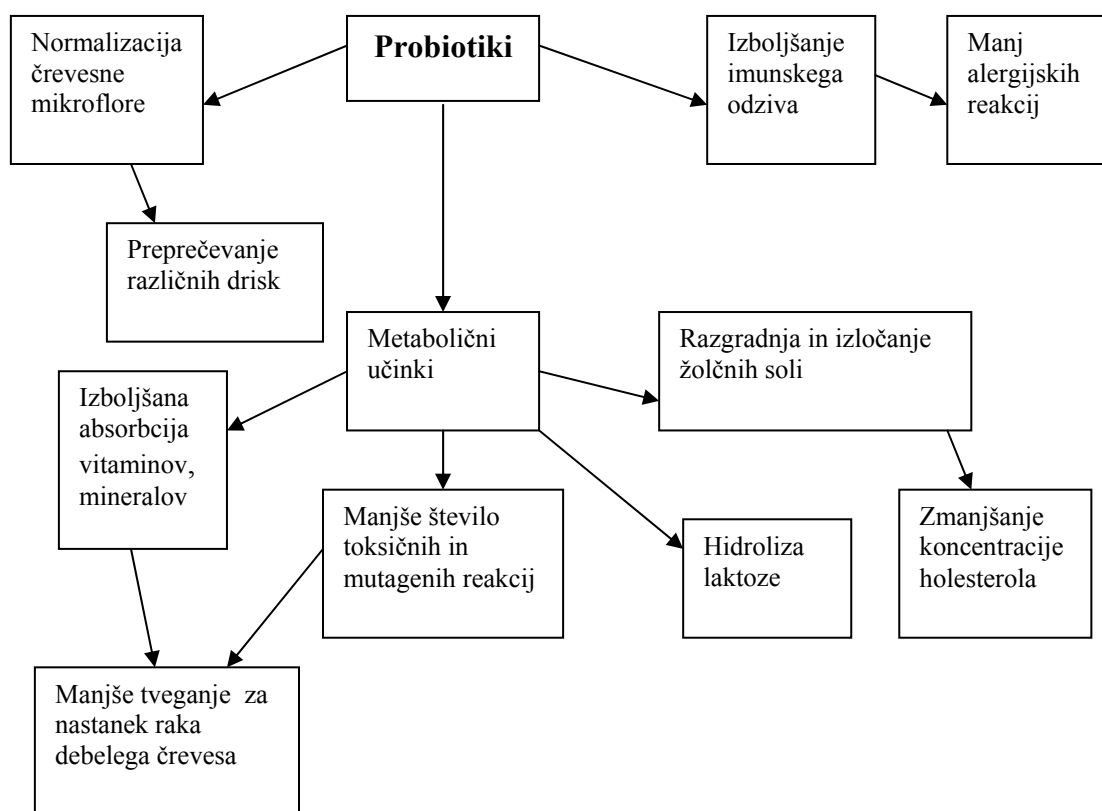
Kadar hrana ne služi le pokrivanju osnovnih prehranskih potreb, pač pa ima dodatne učinke na zdravje, lahko govorimo o funkcionalni hrani. Funkcionalna hrana se vse bolj uveljavlja in proizvajalci le-te se trudijo, da bi jo čimbolj približali potrošniku in predstavili njene dobre lastnosti. Prehranski izdelki s probiotiki so tipičen primer funkcionalne hrane, saj izbrani živi mikroorganizmi pozitivno vplivajo na ravnotežje mikrobne združbe in funkcije črevesja. V prihodnosti bodo probiotiki nove generacije vsebovali zelo specifične mikroorganizme, ki bodo delovali na različne načine in bodo namenjeni različnim kategorijam porabnikov, kot so otroci, starostniki, nosečnice in športniki (Rogelj, 2001; Saarela in sod., 2002).

Starejši ljudje imajo naprimer zmanjšano število bifidobakterij. Spremenjena mikrobna združba lahko povzroči degenerativne in infekcijske bolezni. Izbrani probiotiki za starejše bi lahko pomagali pri obnavljanju in obvarovanju črevesne mikrobne združbe ter delovali v smislu preprečevanja nekaterih težav, ki se lahko pojavijo zaradi porušenega ravnotežja le-te (Saarela in sod., 2002).

Smotno je tudi uživanje probiotikov pri ljudeh, ki so uživali antibiotike, saj ti zelo zmanjšajo število mikroorganizmov v črevesju (Silvi in sod., 2003).

Najbolj raziskani so gotovo učinki probiotikov pri virusnih driskah dojenčkov. *Lb. rhamnosus* GG dokazano pomaga pri premagovanju rotavirusov in drugih drisk. Zanimivo pa je, da probiotiki ne vplivajo vedno enako uspešno na potovalne driske. Predvidevajo, da bi morali glede na različne povzročitelje drisk, v različnih delih sveta, preskusiti tudi različne probiotike (Saarela in sod., 2002).

Možnost uporabe probiotikov pri zdravljenju kroničnih bolezni in motenj je zelo zanimiva, saj probiotiki nimajo stranskih učinkov, kakor večina konvencionalnih zdravil, pa tudi tveganja za negativne medsebojne učinke med probiotiki in zdravili ni. Bolezni, pri katerih si na podlagi do sedaj opravljenih kliničnih študij obetajo največ koristi od terapevtske uporabe probiotikov, so naslednje: preobčutljivo črevo, vneto črevo, vnetje sklepov in alergije na hrano (Baelde in sod., 2005). Probiotiki lahko delujejo na obstoječo mikrobno združbo, na imunski sistem in na funkcije črevesa. Tarčne celice probiotikov so lahko celice sluznice, ki predstavljajo mejo med povzročitelji infekcij in gostiteljem. Način delovanja se od seva do seva razlikuje. Možne načine delovanja probiotikov prikazuje Slika 1.



Slika 1: Možen vpliv probiotikov na zdravje posameznika (Saarela in sod., 2002)

2.7 UPORABA SPOR BAKTERIJ IZ RODU *Bacillus* KOT PROBIOTIKOV

Poleg mlečnokislinskih bakterij ter kvasovk vrste *Saccharomyces boulardii*, probiotični izdelki za ljudi, kot tudi za živali, pogosto vsebujejo spore nekaterih vrst rodu *Bacillus*. Njihova uporaba je v zadnjem času predmet številnih diskusij, saj ti organizmi niso običajni prebivalci črevesja. Normalni cikel spor je sestavljen iz germinizacije spore, klitja in rasti. Velik del použitih spor preživi prehod skozi želodec in pride v črevesje, kjer lahko učinkujejo. V tem primeru je zelo pomembno dobro preučiti seve z vidika varnosti, saj vemo, da posamezni predstavniki tega rodu lahko proizvajajo enterotoksine. Bacili naj bi stimulirali imunski odziv, proizvajali vitamin K2, pripisujejo pa jim tudi protitumorsko delovanje. Spore probiotikov najpogosteje uporabljajo za preprečevanje črevesnih obolenj, predvsem drisk kot posledice uživanja antibiotikov, pa tudi za zdravljenje uremije. Učinki na infekcije sečnih poti pa so posledica produkcije bakteriocina koagulina (Huynh in sod., 2005).

2.8 USTREZNOST PROBIOTIČNIH IZDELKOV V EVROPI

Zanimivo je, da je v evropskih deželah regulativa uporabe probiotikov za živali veliko bolj urejena kot regulativa uporabe probiotikov za ljudi. Regulation No. 1831/2003 of the European Parliament and of the council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition (2003), uvršča probiotične mikroorganizme v kategorijo krmnih dodatkov, znotraj te pa v funkcionalno skupino stabilizatorjev črevesne flore. Predpisano je tudi označevanje, ki zahteva rok trajanja, način uporabe, identifikacijsko številko seva in število KE/g. V EU je trenutno na seznamu registriranih probiotikov za krmila 29 mikroorganizmov.

Smernice za uporabo probiotikov pri ljudeh se še oblikujejo in pripravljajo se standardi, ki bodo predpisovali metode za ugotavljanje ustreznosti probiotičnih izdelkov. Nekateri se zavzemajo za to, da bi obravnavali probiotike za hrano ločeno od bioterapevtikov in tistih za klinično uporabo.

Ugotavljanje vrste mikroorganizmov v probiotičnih izdelkih je pomembno s stališča varnosti in učinkovitosti. Dosedanje raziskave so pokazale, da so posamezni probiotični mikroorganizmi zelo specifični in jih je potrebno testirati vsakega posebej. Uporabne so tako tradicionalne mikrobiološke metode, ki temeljijo na gojenju na hranljivih gojiščih, kakor tudi metode, ki temeljijo na analizi DNA: gelska elektroforeza v utripajočem polju (PFGE), verižno pomnoževanje s polimerazo (PCR), naključno pomnoževanje polimorfne DNA v kombinaciji s PCR (RAPD-PCR), analiza celične stene z denaturacijsko elektroforezo (SDS-PAGE), analiza skupne DNA iz vzorca z elektroforezo DGGE (elektroforetsko ločevanje DNA na poliakrilamidnem gelu z gradientom denaturacijskega sredstva) in druge (Hamilton-Miller in sod., 1999; Fasoli in sod., 2003).

Za ugotavljanje števila kolonijskih enot (KE) posameznih skupin mikroorganizmov, uporabljamo različna selektivna trdna gojišča, ki vsebujejo zaviralne snovi in/ali barvila oziroma različne substrate, v kombinaciji z različnimi pogoji rasti. Pogosto smo omejeni s slabo selektivnostjo gojišč, saj so si različni probiotični organizmi največkrat zelo podobni po videzu kolonij, prehranskih potrebah ali odpornosti proti zaviralnim snovem, ki jih vsebujejo selektivna gojišča (Gueimonde in sod., 2004).

Kolonije, ki izrastejo na trdnem gojišču, je potrebno pregledati tudi pod mikroskopom. Običajno jih v ta namen pobarvamo po Gramu (Yeung in sod., 2004).

Klasične metode izolacije, identifikacije in štetja mikroorganizmov v laboratoriju so drage in dolgotrajne. Rezultati, pridobljeni s fenotipskimi analizami, niso nujno zanesljivi, saj ne omogočajo razločevanja med sorodnimi vrstami. V zadnjem času se je uveljavila predvsem metoda PCR, ker omogoča hitro in specifično detekcijo širokega spektra bakterijskih vrst. Za identifikacijo in klasifikacijo mikroorganizmov je najbolj uporabno ugotavljanje nukleotidnega zaporedja 16S rDNA in primerjava z zaporedji v genski banki (Matsuki in sod., 1999).

V zadnjem času se vrstijo objave, ki vsebujejo rezultate analiz ter oceno ustreznosti probiotičnih izdelkov, ki so na voljo na tržišču v različnih evropskih državah. Coeuret in sod. (2004) so vzeli pod drobnogled 10 različnih probiotičnih izdelkov, od katerih sta bila dva krmna dodatka, en prehranski dodatek, en sir in šest fermentiranih mlečnih izdelkov. Probiotične izdelke so nacepili na trda gojišča, iz izbranih kolonij izolirali DNA in jo analizirali s pomočjo metod PCR in elektroforeze v utripajočem polju (PFGE). Štetje na ploščah je pokazalo, da je le v štirih izdelkih od desetih število laktobacilov zadostovalo deklariranemu, v štirih izdelkih je bilo število laktobacilov manjše kot na deklaraciji, v enem izdelku je bilo število laktobacilov tako majhno, da ni bilo več pogojev za probiotično učinkovanje. V enem izdelku sploh niso ugotovili laktobacilov, v dveh izdelkih pa ne deklarirane vrste *Lb. casei*. Odkrili so tudi nekaj nepravilnosti glede imen. Najslabši je bil, glede ustreznosti števila, prehranski dodatek, v katerem je bilo število laktobacilov pod mejo detekcije.

Fasoli in sod. (2003) so pregledali 14 komercialnih probiotičnih izdelkov z italijanskega tržišča, med katerimi je bilo 7 fermentiranih mlečnih izdelkov in 7 pripravkov liofiliziranih bakterij, v obliki kapsul. Uporabili so metodo verižnega pomnoževanja DNA s polimerazo (PCR) in vrstno specifičnimi začetniki, ter metodo DGGE, ki temelji na analizi DNA, pridobljene neposredno iz vzorcev hrane ali pripravkov. Identifikacijo so opravili s pomnoževanjem (PCR) in primerjavo zaporedja 16S rRNA. Pri probiotičnih jogurtih so dejansko ugotovili prisotnost bakterij, ki so bile deklarirane, medtem ko so naleteli na precejšnja odstopanja pri liofiliziranih izdelkih, v katerih so našli bakterije, ki niso bile deklarirane. Potrdili so uporabnost metode DGGE, ki ima sicer podobno mejo detekcije kot običajne metode štetja kolonijskih enot na selektivnih gojiščih, v kombinaciji z uporabo PCR z vrstno-specifičnimi začetniki in sekvenciranjem odsekov 16S rRNA, ki omogočajo zanesljivo identifikacijo prisotnih mikroorganizmov (Fasoli in sod., 2003).

Gueimonde in sod. (2004) so pregledali 14 probiotičnih fermentiranih mlečnih napitkov iz španskih trgovin. Izolate iz izdelkov so identificirali z ugotavljanjem sekvence dela 16S rRNA, razločevanje na nivoju seva pa so opravili s pomočjo elektroforeze v utripajočem polju (PFGE). *Streptococcus thermophilus* je bil prisoten v vseh izdelkih, kjer je bil deklariran. *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* je bil prisoten le v dveh izdelkih. *Lb. casei* in *Lb. acidophilus* pa sta bili najpogostejši vrsti laktobacilov, prisotni v izdelkih. Število laktobacilov je bilo ob koncu roka uporabnosti vedno višje kot 10^5 bakterij/ml. Število bifidobakterij je bilo v vseh izdelkih manjše od deklariranega. Sekvenciranje 16S rRNA gena se je izkazalo kot učinkovita metoda za identifikacijo prisotnih mikroorganizmov v probiotičnih izdelkih, elektroforeza PFGE pa je bila učinkovita na nivoju seva. Ugotovili so, da se deklaracije pogosto niso ujemale z dejanskim številom oziroma vrsto mikroorganizmov v izdelkih (Gueimonde in sod., 2004).

V še obsežnejši raziskavi, ki je zajela kar 55 evropskih probiotičnih izdelkov, od tega 30 izdelkov z liofiliziranimi bakterijami ter 25 mlečnih izdelkov, so Tammerman in sod. (2003) ugotavljali mikrobiološko sestavo izdelkov glede na deklaracijo. Poleg tega so testirali odpornost izolatov iz izdelkov proti antibiotikom. Za identifikacijo bakterij so uporabljali gojitvene tehnike na selektivnih gojiščih in analizo celokupnih celičnih proteinov z metodo SDS-PAGE, pri čemer so dobljene vzorce proteinov primerjali s tistimi za referenčne seve različnih vrst, shranjenimi v računalniški bazi.

Samo 6 izdelkov je vsebovalo natanko tiste in vse od navedenih bakterij, v 19 primerih so izolirali povsem druge bakterijske seve, nekaterih vrst (predvsem *Lb. acidophilus* in posameznih vrst *Bifidobacterium*) v izdelkih sploh niso ugotovili. Kar 38 % izolatov enterokokov, iz 4 izdelkov z liofiliziranimi bakterijami, je bilo odpornih proti vankomicinu (Tammerman in sod., 2003).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 NAČRT POSKUSA

Najprej smo želeli ugotoviti, kakšna je ponudba probiotičnih izdelkov iz skupine prehranskih dodatkov in zdravil brez recepta na slovenskem trgu. Take izdelke ponujajo lekarne in specializirane trgovine. Podatke smo poiskali tudi na medmrežju, kjer so predstavljeni probiotični izdelki iz ponudbe v lekarnah in specializiranih trgovinah. Našli smo sedem različnih izdelkov štirih proizvajalcev (Preglednica 2). Probio smo kupili v specializirani prodajalni, ostale izdelke pa v lekarni. Kupili smo po en probiotični izdelek vsake vrste, ter tri izdelke Linex-a z različnimi časi do poteka roka trajanja.

Izdelke smo hranili na sobni temperaturi do analize. Najprej smo pregledali deklaracije na izdelkih. Pravilnost poimenovanja bakterij smo preverili na seznamu veljavnih imen (Approved Lists of Bacterial Names, 2005). Na deklaracijah smo poiskali podatke o številu in vrsti prisotnih mikroorganizmov. Na osnovi teh podatkov smo izbrali ustrezna selektivna gojišča za ugotavljanje števila posameznih skupin, oziroma bakterijskih sevov ter ustrezne razredčitve vzorcev. Število živih bakterij smo ugotavljali s konvencionalnimi metodami štetja kolonijskih enot na selektivnih hranljivih gojiščih.

Poleg konvencionalnih metod smo za potrditev identitete probiotičnih bakterij uporabili tudi molekularno biološke, ki so vključevale osamitev DNA neposredno iz vzorca ali iz kultur posameznih izolatov ter verižno reakcijo s polimerazo.

3.2 MATERIAL

3.2.1 Probiotični izdelki

Probiotične izdelke smo kupili v lekarnah in v specializiranih trgovinah v Sloveniji. Hranili smo jih pri sobni temperaturi do analize.

Preglednica 2: Probiotični izdelki na slovenskem trgu, januarja 2005

Izdelek in proizvajalec	Rok trajanja	Datum analize
Linex®, LEK d.d., Ljubljana, Slovenija	1. vzorec: maj 2005 2. vzorec: junij 2006 3. vzorec: februar 2007	1. vzorec: 31.01.2005 2. vzorec: 31.01.2005 3. vzorec: 31.07.2005
Fermental® tablete, ESI s.p.a, Albissola Marina, Italija	avgust 2006	21.01.2005 in 25.01.2005
Fermental® tekočina, ESI s.p.a, Albissola Marina, Italija	marec 2006	11.02.2005, 01.03.2005 in 17.03.2005
Prolife® suspenzija, Zeta Farmaceutici SpA, Saudrigo, Italija	januar 2006	02.03.2005 in 11.3.2005
Prolife® kapsule, Zeta Farmaceutici SpA, Saudrigo, Italija	oktober 2006	11.02.2005, 01.03.2005 in 17.03.2005
Prolife® pastile, Zeta Farmaceutici SpA, Saudrigo, Italija	maj 2006	11.02.2005 in 16.02.2005
Probio® caps, izdelano v EU za NutriLAB d.o.o., Ljubljana, Slovenija	april 2006	07.03.2005 in 11.03.2005

3.2.2 Bakterijski sevi in pogoji kultivacije

Imena in izvor bakterijskih sevov, ki smo jih uporabili kot referenčne seve, so navedeni v Preglednici 3. Omenjene seve smo oživili iz zamrznjenih kultur, ki jih hranijo v mikrobnih zbirki na Katedri za mlekarstvo Biotehniške fakultete v Ljubljani, z dvakratnim precepljanjem v gojišče MRS (Merck, Darmstadt, Nemčija). *S. thermophilus* smo inkubirali pri 42 °C v aerobnih razmerah, vse ostale pa pri 37 °C. Bifidobakterije smo tako v tekočem kot v trdnem gojišču inkubirali v anaerobnih razmerah, ki smo jih zagotovili z uporabo sistema Generbox (Bio-Merieux, Marcy l'Etoile, Francija). Laktobacile smo inkubirali v anaerobnih razmerah, kadar smo jih kultivirali na ploščah s hranljivim gojiščem. Za gojenje bifidobakterij smo uporabili bujon MRS (Merck, Darmstadt, Nemčija) z dodanim cistein hidrokloridom (Merck, Darmstadt, Nemčija) v koncentraciji 0,05 %, laktobacile pa v običajnem gojišču MRS.

Preglednica 3: Imena in izvor referenčnih bakterijskih sevov

Bakterija	Izvor
<i>Lb. acidophilus</i>	ATCC 4356
<i>Lb. gasseri</i> Linex	Izolat iz izdelka Linex® (Lek)
<i>Lb. rhamnosus</i> GG	Valio, Finska
<i>Lb. gasseri</i>	ATCC 20243
<i>Lb. johnsonii</i>	ATCC 11506
<i>Str. thermophilus</i> TH4	Christian Hansen, Danska
<i>Enterococcus faecium</i> F14	Tracy J. Eaton, Norwich, Velika Britanija
<i>Bif. breve</i>	ATCC 15701
<i>Bif. longum</i>	ATCC 15708
ATCC	American type culture collection

3.2.3 Gojišča in raztopine za razredčevanje

3.2.3.1 MRS

Trdno hranljivo gojišče MRS smo uporabili v mikrobioloških analizah za ugotavljanje števila kolonijskih enot (KE) laktobacilov, tekoče gojišče MRS pa za gojenje posameznih izolatov laktobacilov in referenčnih sevov. Pripravili smo ga po navodilih proizvajalca (Merck, Darmstadt, Nemčija), razdelili v stekleničke (po 200 ml agarja) oziroma epruvete (po 10 ml bujona) in ga avtoklavirali 15 minut pri 115 °C.

3.2.3.2 Gojišče MRS z dodanim cisteinom (MRS + cys)

Agar oziroma bujon MRS smo pripravili po navodilih proizvajalca (Merck, Darmstadt, Nemčija) ter pred uporabo dodali cistein hidroklorid (Merck, Darmstadt, Nemčija) v koncentraciji 0,05 % (10 ml založne 5 % raztopine/l gojišča). Agar MRS z dodanim cisteinom smo uporabili v mikrobioloških analizah za ugotavljanje števila kolonijskih enot (KE) laktobacilov in za gojenje bifidobakterij. Založno raztopino cisteina smo pred uporabo sterilizirali s filtracijo (0,22 µm) ter jo hranili pri -20 °C.

3.2.3.3 Agar MRS z dodanim klindamicinom (MRS + cly)

Agar MRS smo pripravili po navodilih proizvajalca (Merck, Darmstadt, Nemčija), nato pa smo pred razlivanjem na plošče (45 °C) dodali še antibiotik klindamicin v koncentraciji 0,1 µg/ml (50 µl 0,02 % založne raztopine/100 ml gojišča). Uporabili smo ga za selektivno štetje laktobacilov vrste *Lb. acidophilus*. Založno raztopino smo pred uporabo sterilizirali s filtracijo (0,22 µm) ter hranili pri -20 °C.

3.2.3.4 Agar Rogosa

Agar Rogosa smo pripravili po navodilih proizvajalca (Merck, Darmstadt, Nemčija). Pred razlivanjem na plošče (45 °C) smo mu dodali 1,3 ml/l očetne kisline. Agar smo uporabili v mikrobioloških analizah za ugotavljanje števila kolonijskih enot laktobacilov.

3.2.3.5 Gojišče M17

Agar in bujon M17 smo pripravili po navodilih proizvajalca (Merck, Darmstadt, Nemčija) in ga uporabili v mikrobioloških analizah za ugotavljanje števila KE *Str. thermophilus* in *Lactococcus lactis* oziroma za gojenje posameznih izolatov ter referenčnih sevov teh vrst.

3.2.3.6 Agar CATC

Agar CATC smo pripravili po navodilih proizvajalca (Merck, Darmstadt, Nemčija), nato pa smo vanj pred razlivanjem na plošče (45 °C) dodali še Na-karbonat (20 ml 10 % založne raztopine/l agarja), TTC (10 ml 1 % založne raztopine/l agarja) in Na-azid (4 ml 10 % založne raztopine/l agarja) ter ga uporabili v mikrobioloških analizah za ugotavljanje števila KE enterokokov. Vse založne raztopine smo pred uporabo sterilizirali s filtracijo (0,22 µm) ter hranili pri sobni temperaturi v laboratoriju.

3.2.3.7 Gojišče BHI

Tekoče gojišče BHI smo pripravili po navodilih proizvajalca (Merck, Darmstadt, Nemčija), za agar BHI pa smo pred avtoklaviranjem dodali še 15 g/l agar agarja (Agar Bios Special Biolife, Milano, Italija). Gojišče smo uporabili v mikrobioloških analizah za ugotavljanje KE *Bacillus coagulans* v toplotno obdelanih vzorcih ter za gojenje posameznih izolatov.

3.2.3.8 Selektivno gojišče za bifidobakterije NPNL (BifNPNL)

Za ugotavljanje KE bifidobakterij smo uporabili selektivno gojišče NPNL, ki vsebuje tri antibiotike: nalidiksično kislino, paromomicin sulfat in neomicin sulfat. Pripravili smo ga po postopku, opisanem v IDF standardu 149 (1991).

3.2.3.9 Agar KAA

Agar s kanamicinom in Na azidom smo pripravili po navodilih proizvajalca (Merck, Darmstadt, Nemčija) in ga uporabili v mikrobioloških analizah za ugotavljanje KE enterokokov.

3.2.3.10 Agar YGC

Agar YGC s kvasnim ekstraktom, glukozo in kloramfenikolom za kvasovke smo pripravili po navodilih proizvajalca (Merck, Darmstadt, Nemčija) in ga uporabili v mikrobioloških analizah za ugotavljanje KE kvasovk.

3.2.3.11 Raztopina PBS

Založno raztopino (20 x) fosfatnega pufru smo pripravili iz naslednjih sestavin: 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na₂HPO₄ ter 0,24 g KH₂PO₄. Soli smo raztopili v približno 800 ml vode, uravnali pH na vrednost 7,4 s 5 M HCl, dopolnili do litra ter avtoklavirali. Pred uporabo smo v 85,5 ml deionizirane in avtoklavirane vode dodali 4,5 ml založne (20 x) raztopine PBS. Raztopino smo uporabili za pripravo vzorcev probiotičnih izdelkov.

3.2.3.12 Peptonska voda

Po navodilih proizvajalca (Merck, Darmstadt, Nemčija) smo pripravili ¼ Ringerjevo raztopino ter dodali 1 g/l peptona (Trypton, Merck, Darmstadt, Nemčija). Raztopino smo razdelili po 9 ml v epruvete in avtoklavirali. Uporabili smo jo za razredčevanje po Kochu.

3.2.3.13 Pufer TAE

Najprej smo pripravili založno raztopino iz 242 g tris baze, 57,1 ml ledoocetne kisline in 100 ml 0,5 M EDTA. Tako pripravljeno raztopino smo razredčili z vodo v razmerju 1:50. Nato smo dodali 40 ml tris acetata in 1mM EDTA (Sambrook in Russell, 2001).

3.2.4 Kemikalije in encimi za izolacijo DNA in reakcijo PCR

Za analizo smo uporabili naslednje kemikalije:

- EDTA, pH = 8 (Sigma Chemical, St. Louis, ZDA),
- Lizocim (Sigma Chemical, St. Louis, ZDA),
- Komercialni set za izolacijo genomske DNA (Promega, Madison, WI, ZDA),
- Izopropanol (Merck, Darmstadt, Nemčija),
- Etanol (Merck, Darmstadt, Nemčija),
- Triton X-100 (Sigma Chemical, St. Louis, ZDA),
- dNTP, 10 mM (Boehringer Mannheim, Nemčija),
- Magnezijev klorid – MgCl₂, 25 mM (Promega, Madison, WI, ZDA),
- 10 x pufer za polimerazo (Promega, Madison, WI, ZDA),
- Taq DNA polimerazo (Promega, Madison, WI, ZDA),
- Oligonukleotidne začetnike (Invitrogen life technologies, Paisley, Velika Britanija),
- Agarozo (Sigma Chemical, St. Louis, ZDA).

3.3 METODE DELA

3.3.1 Ugotavljanje števila mikroorganizmov v probiotičnih izdelkih

Najprej smo v mikrobiološki komori ob ognju odprli probiotični izdelek (tablete, kapsule ali pastilo) in ga prenesli v sterilno epruveto. Uporabili smo 1 g ali 1 ml izdelka, ki smo ga nato razredčili s fosfatno pufrno raztopino (PBS), v razmerju 1:10 (1 g/10 ml). Naslednje razredčitve smo naredili v peptonski vodi z metodo po Kochu, v sterilnih pogojih.

Ko smo imeli zaporedne razredčitve vzorcev in trda gojišča pripravljena, smo vzorce nanašali bodisi na površino gojišča ali smo jih vmešali v raztopljeno gojišče. Če smo se odločili, da bomo vzorec nanašali na trdo gojišče, smo le-tega najprej razlili v petrijevke in osušili. Nato smo ob ognju odpipetirali po 0,1 ml vzorca in s stekleno palčko razmazali vzorec po površini.

Če smo vzorce vmešali v hranljivi agar, smo po 1 ml vzorca prenesli v prazno petrijevko, dodali raztopljeno gojišče, ohlajeno na 45 °C, dobro premešali in pustili, da se agar strdi. Petrijevke smo inkubirali pri ustreznih pogojih, ki so navedeni v Preglednici 4.

Anaerobne pogoje za gojenje mikroorganizmov smo zagotovili z uporabo Generbox sistema (Bio-Mérieux, Marcy l'Etoile, Francija).

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

$$KE = \Sigma n / ((f_a \cdot 1 + f_b \cdot 0,1) \cdot d) \quad \dots(1)$$

Legenda:

Σn ... vsota kolonij izraslih na ploščah

f_a ... število plošč, uporabljenih v prvi razredčitvi

f_b ... število plošč, uporabljenih v drugi razredčitvi

d ... recipročni razredčitveni faktor najnižje razredčitve

Preglednica 4: Gojišča, temperatura, atmosferski pogoji in čas inkubacije za kvantitativno mikrobiološko analizo probiotikov s štetjem izraslih kolonij na ploščah

Gojišče	Skupina MO	Temperatura inkubacije	Pogoji inkubacije	Čas inkubacije
VRB	koliformni MO	30 °C	Aerobno	24 ur
BHI	spore <i>Bacillus coagulans</i>	37 °C, 42 °C	Aerobno	24 ur
M17	<i>Str. thermophilus</i>	42 °C	Aerobno	48 ur
M17	<i>Lc. lactis</i>	30 °C	Aerobno	48 ur
Rogosa	<i>Lb. bulgaricus</i>	37 °C, 42 °C	Anaerobno	48 ur
CATC	enterokoki	37 °C	Aerobno	48 ur
BifNPNL	bifidobakterije	37 °C	Anaerobno	72 ur
MRS	laktobacili	37 °C, 42 °C	Anaerobno	48 ur – 72 ur
MRS s klindamicinom	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	37 °C	Anaerobno	48 ur – 72 ur
MRS s cisteinom	bifidobakterije	37 °C	Anaerobno	72 ur
KAA	enterokoki	37 °C	Aerobno	48 ur

3.3.2 Osamitev čistih kultur

Po inkubaciji smo pregledali izgled kolonij. Izbrali smo posamezne predstavnike kolonij različnega izgleda, jih pobarvali po Gramu ter mikroskopirali. Po nekaj kolonij smo precepili v ustrezna tekoča gojišča. Kulture, ki so zrastle v tekočih gojiščih, smo prečistili tako, da smo jih s cepilno zanko razmazali na trdno gojišče ter posamezno kolonijo ponovno prenesli v tekoče gojišče. Tako prečiščene izolate smo shranili pri – 20 °C.

Za barvanje po Gramu smo uporabili komplet Bio-Mérieux, (Marcy l'Etoile, Francija). Postopek je opisan v Preglednici 5.

Preglednica 5: Postopek barvanja po Gramu

	Čas nanosa
Nanos barvila kristal violet G+	5 min
Spiranje z vodo	
Nanos barvila lugol	1 min
Spiranje z vodo	
Nanos raztopine aceton-etanol	1 min
Spiranje z vodo	
Nanos barvila safranin G-	1 min
Spiranje z vodo	
Sušenje, utrjevanje vzorca	

3.3.3 Priprava čistih kultur za pomnoževanje DNA z metodo PCR

Klasične metode identifikacije mikroorganizmov so velikokrat zamudne in dolge, zato se vedno pogosteje poslužujemo hitrejših in natančnejših metod. Ena izmed takih molekularno-bioloških metod je PCR, ki temelji na preiskavi DNA. Stopnje, ki so potrebne za preiskavo vzorca s PCR:

- izolacija DNA,
- priprava in izvedba PCR in
- ugotavljanje pomnožkov (Jeršek, 2003).

Vzorci za pomnoževanje DNA z reakcijo PCR smo pripravili bodisi z uporabo komercialnega seta za izolacijo DNA ali z obdelavo suspenzij bakterijskih celic s toploto in tritonom. Prvi postopek vključuje fizikalno kemijske postopke, toplotno obdelavo in obdelavo z encimi, s čimer pridobimo precej čisto suspenzijo DNA. Pri drugem postopku pa DNA le delno sprostimo iz bakterijskih celic z obdelavo celične stene s toploto in detergentom. Čeprav taka suspenzija vsebuje še različne celične sestavine oziroma sestavine analiziranih izdelkov, te običajno ne motijo reakcije PCR, če so v reakcijski mešanici dovolj razredčene.

3.3.3.1 Postopek izolacije DNA iz čistih bakterijskih kultur s komercialnim setom za izolacijo genomske DNA (Promega, ZDA)

Probiotične izdelke smo nacepili na selektivna gojišča. Iz selektivnih gojišč smo osamili in očistili posamezne probiotične seve. Seve smo nato namnožili v tekočem gojišču in tako pripravljeno celično kulturo uporabili za izolacijo tarčne DNA za reakcijo PCR. Uporabili smo set za izolacijo genomske DNA (Promega, ZDA) ter sledili navodilom proizvajalca:

- Dva ml celične kulture centrifugiramo pri 14500 g 2 minuti.
- Po centrifugiranju odstranimo supernatant.
- Sediment resuspendiramo v 600 µl 50 mM EDTA, z dodanim encimom lizocimom (1 mg/100 µl EDTA), ki razgradi celično steno mikroorganizmov. Raztopino pazljivo premešamo.
- Inkubiramo 45 min/37 °C, da omogočimo delovanje encima.
- Centrifugiramo pri 14000 g 2 minuti.
- Supernatant zavržemo in sediment nežno resuspendiramo v 600 µl raztopine za liziranje celic »Nuclei Lysis Solution«.
- Inkubiramo 5 minut pri 80 °C, nato vsebino ohladimo do sobne temperature.
- Dodamo 200 µl raztopine »Protein precipitation Solution«, ki omogoča odstranitev proteinov, ki lahko drugače motijo reakcijo PCR. Vsebino rahlo premešamo in damo na led za 5 minut.
- Centrifugiramo pri 14500 g 3 minute.
- Pripravimo sterilne 1,5 ml epruvetke s po 600 µl izopropanola.
- Supernatant odlijemo v epruvetke z izopropanolom in dobro premešamo. Izopropanol povzroči, da se DNA iz vzorca obori.
- Centrifugiramo pri 14500 g 2 minuti.
- Supernatant zavržemo, usedlino pa posušimo pri 42 °C, da odstranimo izopropanol.
- Usedlini dodamo 100 µl »DNA rehydration solution« in pustimo pri 4 °C preko noči.
- Naslednji dan dodamo 3 µl »RNase Solution«, ki razgradi RNA. Dobro premešamo in inkubiramo 45 minut pri 37 °C.
- Ohladimo na sobno temperaturo in hranimo v zmrzovalniku pri -20 °C.

Suspenzijo DNA, pripravljeno po zgoraj opisanem postopku, smo uporabili kot tarčno DNA v reakciji PCR.

Uspešnost izolacije DNA smo preverili z elektroforezo v 1 % agaroznem gelu. Pripravili smo po 4 μ l vzorca DNA, dodali po 2 μ l nalagalnega pufra in 6 μ l vode. Elektroforezo smo vodili pri 90 V. Gel smo po elektroforezi obarvali z etidijevim bromidom (0,5 μ g/ml) in pregledali pri UV svetlobi ($\lambda=302$ nm).

3.3.3.2 Postopek izolacije DNA iz čistih bakterijskih kultur s toploto in Tritonom X-100

Uporabili smo postopek, ki so ga opisali Silvi in sod. (2003):

- En ml celične kulture centrifugiramo pri 12000 rpm 3 minute.
- Odlijemo supernatant in usedlini dodamo 200 μ l deionizirane vode.
- Segrevamo 5 minut pri 100 °C.
- Ohladimo na ledu.
- V 1,5 ml epruveto odpipetiramo 180 μ l 1 % Tritona X-100 (Sigma Chemical Co., Saint Louis, ZDA) in dodamo 20 μ l termično obdelane suspenzije (razredčitev 1:10).
- Shranimo v zamrzovalnik na -20 °C.

Suspenzijo smo uporabili kot tarčno DNA v reakciji PCR.

3.3.3.3 Priprava vzorcev za izvedbo PCR neposredno na suspenziji probiotičnih izdelkov

Postopek je podoben tistemu, ki so ga opisali Silvi in sod. (2003), začetne korake pa smo prilagodili našim vzorcem.

- En g probiotičnega izdelka raztopimo v 9 ml peptonske vode.
- Pustimo 1 uro pri sobni temperaturi in občasno premešamo.
- Dvesto μ l vzorca segrevamo 5 minut pri 100 °C.
- Ohladimo na ledu.
- V 1,5 ml epruveto odpipetiramo 180 μ l 1% Tritona X-100 (Sigma Chemical Co., Saint Louis, ZDA) in dodamo 20 μ l termično obdelane suspenzije (razredčitev 1:10).
- Shranimo v zamrzovalnik na -20 °C.

Suspenzijo smo uporabili kot tarčno DNA v reakciji PCR.

3.3.4 Analiza DNA z metodo verižnega pomnoževanja s polimerazo (PCR)

Za analizo DNA smo uporabili metodo verižnega pomnoževanja s polimerazo (PCR). Pri tem smo uporabili različne oligonukleotidne začetnike (o.z.), univerzalne ali specifične za rod ali vrsto, ter različne parametre reakcij, ki so opisani v poglavju 3.3.4.2.

3.3.4.1 Princip PCR

Reakcija PCR je *in vitro* pomnožitev tarčne DNA z DNA-polimerazo v cikličnem termostatu. Termostabilna DNA-polimeraza je encim, ki so ga izolirali iz termofilnih bakterij. Encim ima optimalno temperaturo 72 °C. Poseben termostat v aparatu za PCR zagotavlja zvezno spreminjanje temperature v vsakem ciklu, ki zajema tri faze:

- denaturacijo, razdvajanje dvoverižne DNA,
- prileganje oligonukleotidnih začetnikov in
- podaljševanje oziroma sinteza nove verige (Jeršek, 2003).

3.3.4.2 Ugotavljanje vrste bakterij z metodo PCR

Kateri vrsti pripadajo posamezni izolati iz izdelkov, smo ugotavljali z metodo PCR, ki je potekala pod pogoji, navedenimi v Preglednicah 6-8.

Preglednica 6: Podatki o ustreznih oligonukleotidnih začetnikih, koncentraciji agaroznega gela in velikosti specifičnih produktov za posamezne vrste bakterij oz. rodu.

Bakterijska vrsta	Oligonukleotidni začetnik 1	Oligonukleotidni začetnik 2	Agarozni gel (%)	Velikost specifičnih produktov	Vir
<i>Bif. breve</i>	BiBRE-1	BiBRE-2	1	288 bp	Matsuki in sod., 1999
<i>Bif. longum</i>	BiLON-1	BiLON-2		831 bp	
<i>Bif. infantis</i>	BiINF-1	BiINF-2		828 bp	
<i>Bif. bifidum</i>	BiBIF-1	BiBIF-2		278 bp	
<i>L. gasseri</i>	Lga-1	Lga-2	2	197 bp	Walter in sod., 2000
<i>L. johnsonii</i>	Ljo-1	Ljo-2		766 bp	
<i>L. acidophilus</i>	Lac-1	Lac-2		759 bp	
<i>L. rhamnosus</i>	PrI	RhaII	1	186 bp	Tilsala-Timisjärvi in Alatossava, 1997
<i>Str. thermophilus</i>	ThI	ThII	1,5	200 bp	
<i>L. delbrueckii</i>	Del I	Del II	2	200 bp	
<i>E. faecium</i>	ddl <i>E. faecium</i> F1	ddl <i>E. faecium</i> F2	1,5	550 bp	Dutka-Malen in sod., 1995
<i>Lc. lactis</i>	L1	L2	1,5	587 bp	Deasy in sod., 2000
Rod <i>Lactobacillus</i>	LbLMA1-rev	R16-1	1	250 bp	Dubernet in sod., 2002
Vse bakterije	27f	100r	2	110 bp	Barakat in sod., 2000

Zorko J. Ugotavljanje ustreznosti probiotičnih pripravkov za ljudi.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za živilstvo, 2006

Preglednica 7: Sestava reakcijske mešanice (100 μ l) za reakcije PCR za posamezne vrste bakterij

Bakterijska vrsta	10 x pufer za polimerazo	Oligonukleotidni začetnik 1 in 2 (100 μ M)	2,5 U encima Taq polimeraze (5 UqL ⁻¹)	Konc. MgCl ₂ (25 mM)	dNTP (10 mM)	Voda		
<i>Bif. breve</i>	10 μ l	1 μ l	1 μ l	6 μ l	2 μ l	71 μ l		
<i>Bif. longum</i>								
<i>Bif. infantis</i>								
<i>Bif. bifidum</i>								
<i>L. gasseri</i>								
<i>L. johnsonii</i>								
<i>L. acidophilus</i>								
<i>L. rhamnosus</i>							8 μ l	69 μ l
<i>Str. thermophilus</i>							6 μ l	71 μ l
<i>L. delbrueckii</i>							8 μ l	69 μ l
<i>E. faecium</i>		20 μ l	1,5 μ l	56,5 μ l				
<i>Lc. lactis</i>		1,5 μ l						
Rod <i>Lactobacillus</i>		1 μ l	6 μ l	2 μ l	71 μ l			
Vse bakterije								

Preglednica 8: Parametri reakcije PCR za ugotavljanje prisotnosti DNA posameznih bakterijskih vrst

Bakterijska vrsta	Pogoji pri posameznih stopnjah reakcije PCR						
	Začetek	Denaturacija DNA	Prileganje	Podaljševanje	Zaključek		
<i>Bif. breve</i>	94 °C / 5 min, 1 cikel	94 °C / 20 s	55 °C / 20 s	72 °C / 30 s	72 °C / 5 min, 1 cikel		
<i>Bif. longum</i>							
<i>Bif. infantis</i>						35 ciklov	
<i>Bif. bifidum</i>							
<i>L. gasseri</i>	95 °C / 2 min, 1 cikel	95 °C / 30 s	55 °C / 30 s	72 °C / 30 s	72 °C / 1 min, 1 cikel		
						30 ciklov	
<i>L. johnsonii</i>	94 °C / 3 min, 1 cikel	95 °C / 30 s	57 °C / 30 s	72 °C / 30 s	72 °C / 3 min, 1 cikel		
						30 ciklov	
<i>L. acidophilus</i>	92 °C / 2 min, 1 cikel	95 °C / 30 s	62 °C / 30 s	72 °C / 30 s	72 °C / 1 min, 1 cikel		
						30 ciklov	
<i>L. rhamnosus</i>	95 °C / 2 min, 1 cikel	94 °C / 30 s	58 °C / 30 s	72 °C / 30 s	72 °C / 1 min, 1 cikel		
						30 ciklov	
<i>Str. thermophilus</i>	95 °C / 2 min, 1 cikel	95 °C / 30 s	55 °C / 30 s	72 °C / 30 s	72 °C / 3 min, 1 cikel		
						30 ciklov	
<i>L. delbrueckii</i>	92 °C / 2 min, 1 cikel	95 °C / 30 s	62 °C / 30 s	72 °C / 30 s	72 °C / 3 min, 1 cikel		
						30 ciklov	
<i>E. faecium</i>	95 °C / 3 min, 1 cikel	94 °C / 30 s	55 °C / 30 s	72 °C / 30 s	72 °C / 2 min, 1 cikel		
						30 ciklov	
<i>Lc. lactis</i>	95 °C / 3 min, 1 cikel	94 °C / 30 s	55 °C / 30 s	72 °C / 30 s	72 °C / 2 min, 1 cikel		
						30 ciklov	
Rod <i>Lactobacillus</i>	95 °C / 5 min, 1 cikel	95 °C / 30 s	55 °C / 30 s	72 °C / 30 s	72 °C / 7 min, 1 cikel		
						30 ciklov	
Vse bakterije	95 °C / 5 min, 1 cikel	94 °C / 30 s	55 °C / 45 s	72 °C / 60 s	72 °C / 3 min, 1 cikel		
						35 ciklov	

Reakcija PCR je potekala v 25 μ l. Po zaključeni reakciji smo po 10 μ l reakcijske mešanice pregledali z elektroforezo v agaroznem gelu, v pufru TAE. Elektroforezo smo vodili pri 90 V. Gel smo po elektroforezi barvali z etidijevim bromidom (0,5 μ g/ml) in pregledali pri UV svetlobi ($\lambda = 302$ nm).

3.3.4.3 Pomnoževanje dela 16S rDNA z metodo PCR in priprava pomnoženih odsekov DNA za sekvenciranje

Del 16S rRNA (regiji V1/V2) smo pomnožili s postopkom PCR, pri čemer smo uporabili univerzalna bakterijska oligonukleotidna začetnika, ki so ju opisali Ward in sod. (1998). Oligonukleotidna začetnika, ki smo ju uporabili, se imenujeta Y1 in Y2. Reakcija je potekala v 70 μ l, v dveh paralelkah. Po zaključeni reakciji smo po 10 μ l reakcijske mešanice pregledali z elektroforezo v 1 % agaroznem gelu, v pufru TAE. Elektroforezo smo vodili pri 90 V. Pričakovana velikost specifičnih produktov je bila 350 bp. Gel smo po elektroforezi barvali z etidijevim bromidom (0,5 μ g/ml) in pregledali pri UV svetlobi ($\lambda = 302$ nm). Parametri reakcije, ki smo jih povzeli po Gueimonde in sod. (2004), so opisani v Preglednici 9.

Reakcijska mešanica za PCR (100 μ l) je bila sestavljena iz:

- 10 μ l 10 x pufra za polimerazo,
- 10 μ l MgCl₂ (25 mM),
- 1,5 μ l Y1 (100 μ M),
- 1,5 μ l Y2 (100 μ M),
- 1,5 μ l dNTP (10 mM),
- 1 μ l 2,5 U encima Taq polimeraze (5 U μ l⁻¹),
- 66,5 μ l vode.

Reakcijske epruvetke so vsebovale po 64,4 μ l mešanice in 5,6 μ l tarčne DNA.

Preglednica 9: Parametri reakcije PCR za pripravo DNA, namenjeno sekvenciranju

Reakcija	Parametri	Št. ciklov
Začetek	95 °C / 5 min	1
Denaturacija DNA	94 °C / 45 s	30
Prileganje	56 °C / 1 min	
Podaljševanje	72 °C / 45 s	
Zaključek	72 °C / 10 min	1

Ko smo se prepričali, da smo pri reakciji PCR dobili fragmente pričakovane velikosti, smo ponovili elektroforezo tako, da smo naložili ves preostali vzorec (130 μ l). DNA smo po elektroforezi izrezali iz gela ter očistili s pomočjo reagentov JETquick Gel Extraction Spin Kit, po navodilih proizvajalca (Genomed, Bad Oeynhausen, Nemčija).

Sekvenciranje so opravili v specializiranih laboratorijih Microsynth v Balgachu (Švica).

Nukleotidna zaporedja smo primerjali s tistimi, ki so shranjena v genski banki NCBI (National Center for Biotechnology Informations, Rockville Pike, Bethesda, ZDA), s pomočjo programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), ki je dostopen na medmrežju (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

4 REZULTATI

4.1 USTREZNOST DEKLARACIJ PROBIOTIČNIH IZDELKOV

Januarja leta 2005, ko smo poizvedovali po lekarnah in specializiranih prodajalnah o ponudbi probiotičnih izdelkov, je bilo v prodaji sedem izdelkov štirih proizvajalcev:

- Linex, kapsule, Lek d.d., Ljubljana, Slovenija,
- Fermental, tablete in tekočina, ESI s.p.a, Italija,
- Prolife, kapsule, tekočina in pastile, Zeta Farmaceutici, Saudrigo, Italija ter
- Probio, kapsule, Nutrilab d.o.o., Ljubljana, Slovenija.

Deklarirana sestava posameznih probiotičnih izdelkov je podana v Preglednici 10.

Pravilnost imen mikroorganizmov, ki jih navajajo v deklaracijah, smo preverili v seznamu priznanih bakterijskih imen »Approved Lists of Bacterial Names«, ki je dostopen na medmrežju in ga redno obnavljajo (Euzéby J.P., 1997). Rezultati preverjanja so bili sledeči:

- Na izdelku Fermental[®] v obliki tablet je navedeno ime vrste *Lactobacillus thermophilus*, ki ne obstaja.
- Na izdelkih Fermental[®] v obliki tablet, kakor tudi v obliki liofiliziranih mikroorganizmov, zapakiranih v pokrovčku stekleničke, ki se ob odpiranju sprostitjo v tekočino (napitek ali suspenzija Fermental[®]), je navedeno neobstoječe ime *Lactobacillus sporogenes*. Podobno je to ime (*Lb. sporogenes*) navedeno tudi na vseh treh izdelkih Fermental[®], vendar je v oklepaju dodano pravo ime, to je *Bacillus coagulans*.
- Na izdelku Linex[®] je na embalaži še staro ime *Streptococcus faecium*, ki ne velja več.
- Pri tabletah Fermental[®] ni podatka o številu mikroorganizmov, za tekočino Fermental[®] pa je navedeno število za laktobacile skupaj: ni jasno, ali je mišljeno število vseh mikroorganizmov, skupaj z *Bif. bifidum*, ali res le tistih iz rodu *Lactobacillus*.
- Za pastile in kapsule Prolife[®] navajajo, da vsebujejo laktobacile, kar ne drži, saj v resnici vsebujejo spore vrste *B. coagulans*. Vrsta je nevedena na izdelku, vendar v oklepaju.
- Tudi pri tretjem izdelku Prolife[®], ki je v obliki napitka, so podatki na deklaraciji in embalaži nedosledni, saj omenjajo na prvi strani embalaže le laktobacile, v podrobnejšem opisu sestave pa najdemo tudi *Str. thermophilus*, *Bif. bifidum* in *Saccharomyces cerevisiae*.

Kar zadeva opis namena uživanja preiskovanih izdelkov ter načina delovanja, nismo našli na pomembnejše nepravilnosti.

- Izdelek Probio[®] priporočajo kot prehransko dopolnilo, ki lahko sodeluje pri krepitvi naravne obrambe telesa.
- Pastile in kapsule Prolife[®] so prehransko dopolnilo, naravni regulator črevesne flore, ki pomaga pri ohranjanju in vzpostavitvi ravnovesja normalne črevesne flore.

- Za kapsule Linex[®] pa je navedeno, da vsebujejo mlečnokislinske liofilizirane bakterije, ki uravnavajo fiziološko ravnotežje črevesne flore. Svetujejo uporabo pri driskah, napenjanju in drugih prebavnih motnjah, ki nastanejo zaradi bakterijskih in virusnih okužb prebavil dojenčkov, otrok in odraslih ter zaradi zdravljenja z nekaterimi antibiotiki.
- Izdelki Fermental[®] pa so predstavljeni kot naravna pomoč pri prebavnih težavah, vpliv pa pripisujejo vzpostavljanju ravnovesja črevesne mikroflore.

Preglednica 10: Deklarirana sestava probiotičnih izdelkov, naprodaj v Sloveniji kot zdravila brez receptov ali prehranski dodatki januarja 2005.

Izdelek in proizvajalec	Deklarirani mikroorganizmi	Deklarirano število mikroorganizmov	Rok trajanja
Linex [®] , LEK d.d., Ljubljana, Slovenija	<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Bifidobacterium infantis</i> v. <i>liberorum</i> <i>Streptococcus faecium</i>	Ena kapsula vsebuje najmanj $1,2 \times 10^7$ živih liofiliziranih mlečnokislinskih bakterij.	1. vzorec: maj 2005 2. vzorec: junij 2006 3. vzorec: februar 2007
Prolife [®] suspenzija, Zeta Farmaceutici SpA, Saudrigo, Italija	<i>Lactobacillus sporogenes</i> (<i>Bacillus coagulans</i>) <i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Lactobacillus bulgaricus</i> <i>Bifidobacterium bifidum</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Sacharomyces cerevisiae</i>	Ni podatka	januar 2006
Prolife [®] kapsule, Zeta Farmaceutici SpA, Saudrigo, Italija	<i>Lactobacillus sporogenes</i> (<i>Bacillus coagulans</i>)	Ni podatka	oktober 2006
Prolife [®] pastile, Zeta Farmaceutici SpA, Saudrigo, Italija	<i>Lactobacillus sporogenes</i> (<i>Bacillus coagulans</i>)	Ni podatka	maj 2006
Probio [®] caps, izdelano v EU za NutriLAB d.o.o., Ljubljana, Slovenija	<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Bifidobacterium bifidum</i> <i>Bifidobacterium longum</i> <i>Bifidobacterium breve</i> <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	$2,25 \times 10^9$ $7,5 \times 10^8$ $7,5 \times 10^8$ $5,0 \times 10^8$ $2,5 \times 10^8$ $5,0 \times 10^8$	april 2006
Fermental [®] tablete, ESI s.p.a, Albissola Marina, Italija	<i>Lactobacillus sporogenes</i> <i>Bifidobacterium bifidum</i> <i>Lactobacillus thermophilus</i> <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Ni podatka	avgust 2006
Fermental [®] tekočina, ESI s.p.a, Albissola Marina, Italija	<i>Lactobacillus sporogenes</i> <i>Bifidobacterium bifidum</i> <i>Lactobacillus thermophilus</i> <i>Lactobacillus bulgaricus</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i>	Skupno število laktobacilov vsaj 2×10^9 na stekleničko, oz. $28,6 \times 10^9$ na 100 mL	marec 2006

4.2 UGOTAVLJANJE ŠTEVILA PROBIOTIČNIH BAKTERIJ V POSAMEZNIH IZDELKIH

4.2.1 Linex[®]

Analize smo opravili na treh izdelkih, ki so imeli različen datum proizvodnje. Prvi vzorec smo analizirali ob poteku roka trajnosti (maj 2005), drugemu vzorcu je ob času analize manjkalo do preteka obstojnosti eno leto (junij 2006), tretjemu vzorcu pa leto in pol (februar 2007).

Preglednica 11: Rezultati štetja KE na selektivnih gojiščih, morfološkega opazovanja bakterijskih celic in barvanja po Gramu (Linex[®])

Trdo gojišče	Vrsta MO	1. vzorec (KE/g)	2. vzorec (KE/g)	3. vzorec (KE/g)	Opis kolonij	Barvanje po Gramu in oblika celic
BifNPNL	<i>Bifidobacterium infantis</i> v. <i>liberorum</i>	$6,5 \times 10^6$	$2,0 \times 10^7$	$1,1 \times 10^8$	Bele, okrogle, kolonije d= 0,3-1mm	G+ palčke
MRS+cly	<i>Lb. acidophilus</i>	$1,4 \times 10^8$	$1,1 \times 10^8$	$2,1 \times 10^8$	Bele, okrogle, valovit rob, d=1mm	G+ palčke
KAA	<i>Enterococcus faecium</i>	$1,7 \times 10^7$	$3,9 \times 10^7$	$7,0 \times 10^7$	Zelo drobne črne kolonije	G+ palčke

Iz Preglednice 11 lahko razberemo naslednje rezultate.

- Med skladiščenjem se je najbolj zmanjševalo število bifidobakterij, ki jih je bilo 16-krat manj v izdelku ob koncu roka trajanja v primerjavi z izdelkom, ki je bil analiziran leto in pol pred pretekom roka trajanja.
- Pri vrsti *Lb. acidophilus* razlika v številu med različnimi izdelki ni bila niti dvakratna.
- Število enterokokov pa se je razlikovalo med najstarejšim in najbolj svežim vzorcem za faktor štiri.
- Pri barvanju po Gramu in pregledu oblike bakterijskih celic smo opazili G+ palčke, tako pri vrsti, za katero smo predvidevali, da je *Bif. infantis*, kakor tudi pri *Lb. acidophilus*, pa tudi pri izolatih, ki so zrasli na KAA in smo predvidevali, da gre za vrsto *E. faecium*.
- V izdelku Linex[®] je število, ki smo ga ugotovili, preseglo deklarirano skupno število bakterij v vseh treh izdelkih, vključno s tistim na koncu roka uporabnosti. Ker je navedeno, da izdelek vsebuje najmanj $1,2 \times 10^7$ živih bakterij na kapsulo, lahko zaključimo, da je bila deklaracija ustrezna.

Preglednica 12: Vsebnost deklariranega in ugotovljenega števila MKB (KE/kapsulo) v treh izdelkih Linex®

Deklarirani mikroorganizmi	Deklarirano število mikroorganizmov	Ugotovljeno število mikroorganizmov
<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Bifidobacterium infantis</i> v. <i>liberorum</i> <i>Streptococcus faecium</i>	Ena kapsula vsebuje najmanj $1,2 \times 10^7$ živih liofiliziranih mlečnokislinskih bakterij.	1. vzorec, ob koncu roka trajanja: $4,58 \times 10^7$ KE/kapsulo* 2. vzorec, eno leto do izteka trajanja: $4,73 \times 10^7$ KE/kapsulo* 3. vzorec, leto in pol do izteka trajanja: $1,07 \times 10^8$ KE/kapsulo*

* Ena kapsula vsebuje 280 mg pripravka.

Skupno število mikroorganizmov v kapsuli Linexa se je glede na rok trajanja med izdelkom tik pred iztekom roka in izdelkom, ki mu manjka še leto in pol do konca roka trajanja, razlikovalo le za 2,4-krat, kar ni veliko (Preglednica 12).

4.2.2 Fermental®

Probiotični izdelek Fermental® je na trgu v dveh različicah, kot tablete in kot tekočina. Sestava je opisana v poglavju 4.1.

4.2.2.1 Tablete Fermental®

Preglednica 13: Rezultati štetja KE na selektivnih gojiščih, morfološkega opazovanja bakterijskih celic in barvanja po Gramu (tablete Fermental®)

Trdo gojišče	Vrsta MO	KE/g	Opis kolonij	Barvanje po Gramu in oblika celic
BifNPNL	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	$1,5 \times 10^6$	Bele, okrogle, izbočene, svetleče kolonije, d=1,3mm	G+ palčke
MRS+cys	Laktobacili, bifidobakterije	$2,6 \times 10^5$	Velike, bele, izbočene kolonije, d=2.5 mm	G+ palčke
MRS+cly	<i>Lb. acidophilus</i>	Ni rasti	Ni rasti	Ni rasti
Rogosa	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus thermophilus</i> *	$6,8 \times 10^4$	Velike, bele, diskaste kolonije, d=5mm in drobne bele kolonije d=0,3mm	G+ daljše palčke G+ kratke palčke
BHI	<i>Lactobacillus sporogenes</i> **	$3,7 \times 10^8$	Velike, površinske, bele kolonije, valovit rob, majhne, diskaste, bele kolonije	G+ palčke G+ koki
CATC	enterokoki	$1,7 \times 10^5$	Večje, temno rdeče, diskaste kolonije	G+ koki

*Taka vrsta ne obstaja. Predvidevali smo, da gre za kako drugo vrsto laktobacilov, ki tudi raste na gojišču Rogosa.

** Predvidevali smo, da gre za *Bacillus coagulans*.

- Na gojišču BifNPNL je izraslo ustrezno število bifidobakterij.
- Na gojišču MRS s klindamicinom ni bilo rasti, kar potrjuje dobro selektivnost tega gojišča, saj bakterije skupine *Lb. acidophilus* niso deklarirane v tem izdelku.
- Rast na gojišču BHI in morfologija kolonij sta kazali na možnost, da so v izdelku prisotne spore rodu *Bacillus*. Da so bakterije deklarirane kot *Lb. sporogenes* v resnici *B. coagulans*, smo sklepali na osnovi tega, da sta na nekaterih drugih probiotičnih izdelkih navedeni obe imeni, ki naj bi pomenili isto vrsto, pri čemer je *Lb. sporogenes* staro ime, ki ne ustreza sodobni nomenklaturi.
- Barvanje po Gramu celic in kolonij, izraslih na gojišču BHI nam je dalo dva različna rezultata, in sicer G+ palčke in G+ koke.
- Zanimivo je, da je na selektivnem gojišču za enterokoke (CATC) zraslo kar $1,7 \times 10^5$ kolonij, čeprav vsebnost bakterij rodu *Enterococcus* ni deklarirana.
- Na izdelku ni bilo navedenega števila prisotnih mikroorganizmov.

4.2.2.2 Tekočina Fermental[®]

Vzorec tekočine Fermental[®] naj bi vseboval *Lb. sporogenes*, *Bif. bifidum*, *Lb. thermophilus*, *Lb. bulgaricus* in *Lb. acidophilus*. Ker smo predvidevali, da so mikroorganizmi poimenovani kot *Lb. sporogenes*, dejansko spore vrste *B. coagulans*, smo en vzorec toplotno obdelali, da bi tako inaktivirali vegetativne celice in se prepričali, če so v izdelku res spore. Toplotna obdelava je potekala pri 80 °C za 10 minut.

Preglednica 14: Rezultati štetja KE na selektivnih gojiščih, morfološkega opazovanja bakterijskih celic in barvanja po Gramu (tekočina Fermental[®])

Trdo gojišče	Vrsta MO	KE/ml	Opis kolonij	Barvanje po Gramu in oblika celic
BifNPNL	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	$3,0 \times 10^3$	Bele, okrogle kolonije, nepravilen rob	G+ kratke, odebeljene palčke
BHI, 37 °C	<i>Lactobacillus sporogenes</i> **	$2,7 \times 10^7$	Bele, okrogle kolonije d=1,5 mm	G+ palčke
BHI, 37 °C, termiziran vzorec	<i>Lactobacillus sporogenes</i> **	$1,7 \times 10^7$	Velike bele, kolonije, valovit rob d=2-2,5 cm	G+ palčke
BHI, 42 °C	<i>Lactobacillus sporogenes</i> **	$6,0 \times 10^6$	Velike, bele, razvejane kolonije, d=15 mm	G+ palčke
BHI, 42 °C, termiziran vzorec	<i>Lactobacillus sporogenes</i> **	$6,8 \times 10^4$	Velike kolonije, valovit rob	G+ palčke
CATC	enterokoki	Ni rasti		
MRS + cly	<i>Lb. acidophilus</i>	Ni rasti		
MRS + cys	laktobacili, bifidobakterije	$6,6 \times 10^7$	Bele, okrogle kolonije, d= 0,3-0,5mm	G+ palčke, zelo dolge

** Predvidevali smo, da gre za *Bacillus coagulans*.

- Število bifidobakterij je bilo zelo majhno.
- Potrdili smo predvidevanje, da izdelek vsebuje spore *Bacillus*, saj so tudi po toplotni obdelavi vzorca na gojišču BHI izrasle kolonije, po izgledu tipične za ta rod.
- Inkubacija pri višji temperaturi (42 °C) je vrsti manj ustrezala, saj je zraslo manj kolonijskih enot kot pri 37 °C, sploh v primeru, ko smo vzorec toplotno obdelali. Število KE po inkubaciji pri 37 °C, je bilo v termiziranem vzorcu za 37 % manjše od tistega v netermiziranem vzorcu.
- Na gojišču MRS s klindamicinom, ki je selektivno gojišče za *Lb. acidophilus*, ni bilo rasti.

Na gojišču MRS s cisteinom je izraslo veliko število kolonij. Na tem gojišču so sposobni rasti predstavniki rodov *Lactobacillus* in *Bifidobacterium*. Glede na to, da smo na gojišču za bifidobakterije (BifNPNL) ugotovili $3,0 \times 10^3$ KE/g le-teh, so razliko lahko predstavljali predstavniki rodu *Lactobacillus*.

Preglednica 15: Vsebnost deklariranih in z analizo ugotovljenih bakterijskih vrst (KE/100 ml) v izdelku tekočina Fermental[®]

Deklarirani mikroorganizmi	Deklarirano število mikroorganizmov	Ugotovljeno število mikroorganizmov
<i>Lactobacillus sporogenes</i> <i>Bifidobacterium bifidum</i> <i>Lactobacillus thermophilus</i> <i>Lactobacillus bulgaricus</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i>	Skupno število laktobacilov vsaj 2×10^9 na stekleničko, oz. $28,6 \times 10^9$ /100 ml	$9,3 \times 10^9$ KE/100 ml

- Za tekočino Fermental[®] je navedeno število za laktobacile skupaj: ni jasno, ali je mišljeno število vseh mikroorganizmov, skupaj bifidobakterij in laktobacilov, ali res le tistih iz rodu *Lactobacillus*.
- V tekočini Fermental[®] je bilo deklarirano skupno število laktobacilov (verjetno je bilo mišljeno vseh bakterij) najmanj $28,6 \times 10^9$ v 100 ml. Vsota števila kolonijskih enot (KE) v 100 ml, ki smo jih ugotovili na gojiščih BHI in MRS s cisteinom, je bila $9,3 \times 10^9$, kar je tretjina deklarirane vrednosti.
- Na selektivnem gojišču za *Lb. acidophilus* (MRS s klindamicinom) ni bilo rasti, čeprav so mikroorganizmi te vrste deklarirani v izdelku (Preglednica 14).

4.2.3 Prolife[®]

Probiotični izdelek Prolife[®] lahko najdemo na trgu v treh različnih oblikah: pastile, kapsule in tekočino. Sestava izdelkov je opisana v poglavju 4.1

4.2.3.1 Kapsule Prolife®

Preglednica 16: Rezultati štetja KE na selektivnih gojiščih, morfološkega opazovanja bakterijskih celic in barvanja po Gramu (kapsule Prolife®)

Trdo gojišče	Vrsta MO	KE/g	Opis kolonij	Barvanje po Gramu in oblika celic
BHI, 37 °C	<i>Lactobacillus sporogenes</i> (<i>Bacillus coagulans</i>)	$8,3 \times 10^6$	Okrogle, bele kolonije, raven rob d=0,1-0,5mm	G+ palčke
BHI, 37 °C, termiziran vzorec	<i>Lactobacillus sporogenes</i> (<i>Bacillus coagulans</i>)	$2,4 \times 10^6$	Okrogle, bele kolonije, raven rob d=0,1-0,5mm	G+ palčke
BHI, 42 °C	<i>Lactobacillus sporogenes</i> (<i>Bacillus coagulans</i>)	$1,2 \times 10^6$	Velike kolonije, valovit rob d=4,5cm	G+ palčke
BHI, 42 °C, termiziran vzorec	<i>Lactobacillus sporogenes</i> (<i>Bacillus coagulans</i>)	$7,0 \times 10^4$	Bele kolonije, raven rob d=0,5-1cm	G+ palčke

- Potrdili smo predvidevanje, da izdelek vsebuje spore *Bacillus*, saj so tudi po toplotni obdelavi vzorca na gojišču BHI izrasle kolonije, po izgledu tipične za ta rod.
- Inkubacija pri višji temperaturi 42 °C je vrsti manj ustrezala, saj je zraslo manj kolonijskih enot, sploh v primeru, ko smo vzorec toplotno obdelali. Število KE po inkubaciji pri 37 °C, je bilo v termiziranem vzorcu za 71 % manjše od tistega v netermiziranem vzorcu.
- Na izdelku ni bilo navedenega števila prisotnih mikroorganizmov.

4.2.3.2 Pastile Prolife®

Preglednica 17: Rezultati štetja KE na selektivnih gojiščih, morfološkega opazovanja bakterijskih celic in barvanja po Gramu (pastile Prolife®)

Trdo gojišče	Vrsta MO	KE/g	Opis kolonij	Barvanje po Gramu in oblika kolonij
BHI, 37 °C	<i>Lactobacillus sporogenes</i> (<i>Bacillus coagulans</i>)	$5,2 \times 10^7$	Bele, okrogle kolonije d=1,5 mm	G+ dolge palčke
BHI, 37 °C, termiziran vzorec	<i>Lactobacillus sporogenes</i> (<i>Bacillus coagulans</i>)	$2,7 \times 10^7$	Velike, bele, valovit rob d=2-2,5 cm	G+ palčke
BHI, 42 °C	<i>Lactobacillus sporogenes</i> (<i>Bacillus coagulans</i>)	$9,9 \times 10^6$	Velike, bele kolonije, d=2,5 cm	G+ palčke
BHI, 42 °C, termiziran vzorec	<i>Lactobacillus sporogenes</i> (<i>Bacillus coagulans</i>)	$6,0 \times 10^6$	Bele, okrogle kolonije, d=1-3 mm	G+ palčke

Za pastile Prolife® velja enako kot za kapsule Prolife®. Vsebujejo spore *Bacillus*, sev bolje raste pri 37 °C kot pri 42 °C, na izdelku pa ni bilo navedenega števila prisotnih mikroorganizmov.

4.2.3.3 Suspenzija Prolife[®]

Preglednica 18: Rezultati štetja KE na selektivnih gojiščih, morfološkega opazovanja bakterijskih celic in barvanja po Gramu (suspenzija Prolife[®])

Trdo gojišče	Vrsta MO	KE/ml	Opis kolonij	Barvanje po Gramu in oblika celic
BifNPNL	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	$7,0 \times 10^2$	Bele kolonije, valovit bolj svetel rob, d=2-3 mm	G+ palčke, tudi v verižicah
M17, 37 °C	<i>Streptococcus thermophilus</i>	$2,2 \times 10^6$	Velike površinske kolonije, valovit rob d=1,5-2 cm	G+ palčke
M17, 42 °C	<i>Streptococcus thermophilus</i>	$1,7 \times 10^6$	Velike bele kolonije, valovit rob, d=1-2 cm	G+ palčke v verižicah
BHI, 37 °C	<i>Lactobacillus sporogenes</i> (<i>Bacillus coagulans</i>)	$2,4 \times 10^6$	Bele kolonije, valovit rob, d=0,5 cm	G+ palčke
BHI, 42 °C	<i>Lactobacillus sporogenes</i> (<i>Bacillus coagulans</i>)	$2,2 \times 10^7$	Velike, bele kolonije, valovit rob, d= 2,5 cm	G+ kratke palčke
CATC	enterokoki	Ni rasti		
MRS + cly	<i>Lb. acidophilus</i>	Ni rasti		
ROGOSA	laktobacili	$1,2 \times 10^{10}$	Bele okrogle kolonije, raven rob	G+ dolge palčke
YGC	kvasovke	Ni rasti		

- Gojišče M17 smo uporabili za *Str. thermophilus*. Ker pa gojišče ni selektivno, so na njem, po izgledu kolonij in celic obarvanih po Gramu sodeč, izrasle tudi spore *B. coagulans*, ki so prerasle morebitne kolonije *Str. thermophilus*.
- Na gojišču za bifidobakterije je izraslo zelo malo kolonij.
- Na gojišču MRS s klindamicinom ni bilo rasti, zato smo sklepali, da živih celic *Lb. acidophilus* ni v izdelku.
- Na gojišču Rogosa je bilo število KE veliko, kar pomeni, da je bilo skupno število laktobacilov v izdelku večje od 10^{10} KE/ml. Glede na deklaracijo bi lahko sklepali, da gre predvsem za vrsto *Lb. bulgaricus*.
- Zanimivo je, da je na gojišču BHI bilo število KE, ki so izrasle po inkubaciji pri 42 °C, za skoraj celo log enoto večje od tistega pri 37 °C, vse pa so bile po morfologiji tipične za rod *Bacillus*.
- Na gojišču za kvasovke ni bilo rasti.
- Na izdelku ni bilo navedenega števila prisotnih mikroorganizmov.

4.2.4 Probio®

Preglednica 19: Rezultati štetja KE na selektivnih gojiščih, morfološkega opazovanja bakterijskih celic in barvanja po Gramu (Probio®)

Trdo gojišče	Vrsta MO	KE/g	Opis kolonij	Barvanje po Gramu in oblika celic
BifNPNL	<i>Bif. bifidum</i> , <i>Bif. longum</i> , <i>Bif. breve</i>	$1,5 \times 10^9$	Bele, okrogle kolonije, raven rob	G+ kratke palčke
M17	<i>Lactococcus lactis</i>	$2,5 \times 10^6$	Bele, okrogle kolonije, raven rob $d=1,5$ mm	n.p.
MRS + cys	Laktobacili, bifidobakterije	$1,1 \times 10^{10}$	Bele kolonije, okrogle, raven rob	G+ palčke
MRS + cly	<i>Lb. acidophilus</i>	$8,3 \times 10^7$	Zelo drobne, bele kolonije	G+ palčke
MRS	Laktobacili	$1,2 \times 10^{10}$	Bele, okrogle kolonije, raven rob	G+ palčke

n.p. ni podatka

Preglednica 20: Vsebnost deklariranih in z analizo ugotovljenih bakterijskih vrst (KE/kapsulo) v izdelku Probio®

Deklarirani mikroorganizmi	Deklarirano število mikroorganizmov	Ugotovljeno število mikroorganizmov
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	$2,25 \times 10^9$	<i>Lb. acidophilus</i> : $2,58 \times 10^7$ KE/kapsulo
<i>Lactococcus lactis</i>	$7,5 \times 10^8$	
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	$7,5 \times 10^8$	<i>Lc. lactis</i> : $7,78 \times 10^5$ KE/kapsulo
<i>Bifidobacterium longum</i>	$5,0 \times 10^8$	
<i>Bifidobacterium breve</i>	$2,5 \times 10^8$	Vsi laktobacili: $3,73 \times 10^9$ KE/kapsulo
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	$5,0 \times 10^8$	
		Vse bifidobakterije: $4,67 \times 10^8$ KE/kapsulo

- Število bifidobakterij, ki smo jih ugotovili v izdelku Probio®, je bilo nekaj manjše od deklariranega (približno tretjino deklariranega).
- Število *Lb. acidophilus* je bilo za dve log enoti (oz. 100 x) manjše od deklariranega.
- Število *Lc. lactis* je bilo za tri log enote (oz. 1000 x) manjše od deklariranega.
- Skupno število laktobacilov, ugotovljenih na gojišču MRS, pa tudi na gojišču MRS s cisteinom, je presegalo navedeno število (seštevek števila *Lb. acidophilus* in *Lb. rhamnosus* v deklaraciji) za 36 %.

4.3 POTRJEVANJE PRISOTNOSTI DEKLARIRANIH MIKROORGANIZMOV V PROBIOTIČNIH IZDELKIH Z METODO PCR

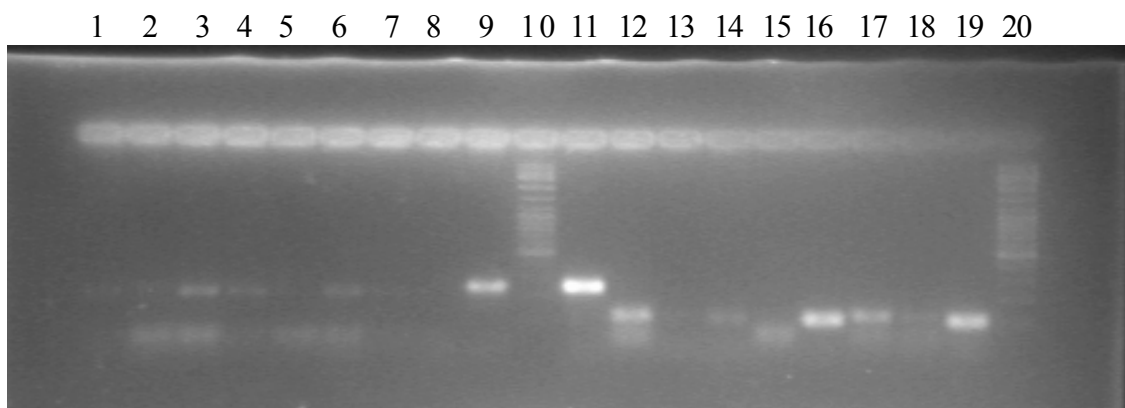
4.3.1 Ugotavljanje prisotnosti kromosomske DNA bakterij v suspenzijah, izoliranih s toploto in detergentom, ter izoliranih s komercialnim setom za izolacijo genomske DNA

V nalogi smo preizkusili dva različna postopka izolacije DNA iz celic, zamudnejšega s komercialnim setom in hitrejšega, s toploto in detergentom (triton). Najprej smo z elektroforezo želeli ugotoviti, ali smo uspešno izolirali DNA iz celic. Na podlagi jakosti pasov pa smo ocenili, koliko DNA bomo uporabili v reakcijah PCR. Vzorcev DNA, ki so bili pripravljene s toploto in tritonom, nismo mogli pregledati z elektroforezo, ker zaradi prisotnosti drugih sestavin ni mogoče dobiti lepo vidnih pasov. Ostale vzorce smo pregledali in ugotovili, da je 74 % teh vzorcev vsebovalo dovolj DNA, da smo jih lahko uporabili za nadaljne analize. Vzorci, pri katerih nismo dobili zadovoljivega rezultata, smo izločili iz analize.

4.3.2 Ugotavljanje prisotnosti bakterijske DNA bakterij z reakcijo PCR in univerzalnimi bakterijskimi oligonukleotidnimi začetniki ali oligonukleotidnimi začetniki, specifičnimi za rod *Lactobacillus*

Bakterijsko DNA v vzorcih, smo ugotovili z reakcijo PCR, v kateri smo uporabili univerzalne bakterijske oligonukleotidne začetnike ter/ali tiste, ki so specifični za rod *Lactobacillus*. Pri izolatih, pri katerih nismo dobili pomnožkov, smo bodisi povečali količino DNA v naslednjih reakcijah, oziroma smo jih izločili iz nadaljne analize, če kljub ponovitvi reakcije PCR nismo dobili pomnožkov. Pričakovana velikost pomnožkov z univerzalnimi bakterijskimi oligonukleotidnimi začetniki je bila 110 bp ter z začetniki za rod *Lactobacillus*, 250 bp.

Na Sliki 2 je prikazan obarvan agarozni gel po elektroforezi, na katerem smo ločevali vzorce reakcije PCR z začetniki, specifičnimi za rod *Lactobacillus* in vzorce reakcije PCR z univerzalnimi bakterijskimi začetniki.



Slika 2: Rezultati reakcije PCR z univerzalnimi bakterijskimi oligonukleotidnimi začetniki in z začetniki, specifičnimi za rod *Lactobacillus*. Proge 1 – 7 vzorci z oznakami 1, 2, 3, 9, 10, 14 in 15; proga 8 – negativna kontrola (voda); progi 9 in 11 – pozitivna kontrola, DNA seva *Lb. acidophilus*, ATCC 4356; progi 10 in 20 – velikostni standard za DNA (Fermentas 250 bp); proge 12 – 19 vzorci z oznakami 17, 21, 30, 35, 37, 43, 44 in 47. Seznam vzorcev je podan v Prilogi A.

Reakcijo z univerzalnimi bakterijskimi začetniki smo izvedli zato, da bi ugotovili, ali je v vzorcih dovolj DNA, oz. ali so prisotni morebitni inhibitorji reakcije PCR. Analizirali smo 62 vzorcev, od katerih smo dobili 53 pozitivnih rezultatov oziroma 85 %, kar pomeni, da je bila izolacija DNA uspešna in da ni bilo težav z morebitnimi inhibitorji. Vzorce, pri katerih nismo dobili rezultata, tudi če smo reakcijo ponovili, smo izločili.

Analize za rod *Lactobacillus* smo naredili pri tistih vzorcih, pri katerih nismo dobili pozitivnega rezultata z vrstno specifičnimi oligonukleotidnimi začetniki za posamezne vrste laktobacilov. Na ta način smo želeli ugotoviti, ali so v teh vzorcih sploh prisotne bakterije tega rodu. Dokazali smo, da so laktobacili prisotni v tabletah Fermental[®] in kapsulah Linex[®].

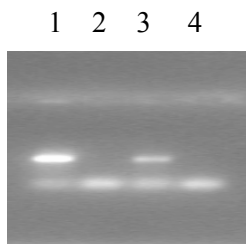
4.3.3 Ugotavljanje prisotnosti DNA bakterij posameznih vrst, deklariranih na izdelkih, z reakcijo PCR in vrstno specifičnimi oligonukleotidnimi začetniki

Za dokazovanje vrste *Bif. infantis* smo uporabili naslednje vzorce: 1, 5, 6, 15, 19, 36, 42, 43, 44, 55, 56, 58, 72, 73, 74, 75 in 80. Vsi vzorci so bili negativni, pripravljene pa so bili iz kapsul Linex[®] vzorcev 1 in 2, s starejšima datumoma proizvodnje. Ker smo imeli na razpolago še vzorec z novejšim datumom, smo ponovili PCR na DNA iz mešanice kolonij z gojišča za bifidobakterije (81) in na DNA, izolirani neposredno iz vsebine kapsul Linex[®] (82). V vzorcih 81 in 82 smo dokazali, da so bile prisotne bakterije vrste *Bif. infantis*. S tem smo potrdili našo domnevo, da je koncentracija bifidobakterij v probiotičnih izdelkih odvisna tudi od starosti izdelka.

Bif. bifidum smo dokazovali v naslednjih vzorcih: 1, 5, 6, 15, 19, 36, 42, 43, 44, 55, 56, 58, 73, 74, 75, 78, 79 in 80. V vzorcu 56 (kolonija z gojišča BifNPNL) in vzorcu 75, ki je bil izoliran neposredno iz izdelka kapsule Probio[®], smo dobili pozitiven rezultat. Drugi vzorci so bili negativni. *Bif. bifidum* nismo dokazali v naslednjih izdelkih, kjer so bili deklarirani: tablete in suspenzija Fermental[®] in suspenzija Prolife[®].

Bif. longum smo dokazovali v vzorcih: 1, 5, 6, 15, 19, 36, 42, 43, 44, 56, 58, 75, 78 in 80. V vzorcu 75 (izoliran neposredno iz izdelka kapsule Probio[®]) in 80 (mešanica kolonij z gojišča BifNPNL) smo potrdili *Bif. longum*. V ostalih vzorcih omenjene vrste ni bilo.

Bif. breve smo dokazovali v vzorcih: 1, 5, 6, 15, 19, 36, 42, 43, 44, 55, 56, 58 in 80. V vzorcu 80 (mešanica kolonij z gojišča BifNPNL), smo to vrsto tudi dokazali. Ostali vzorci so bili negativni.

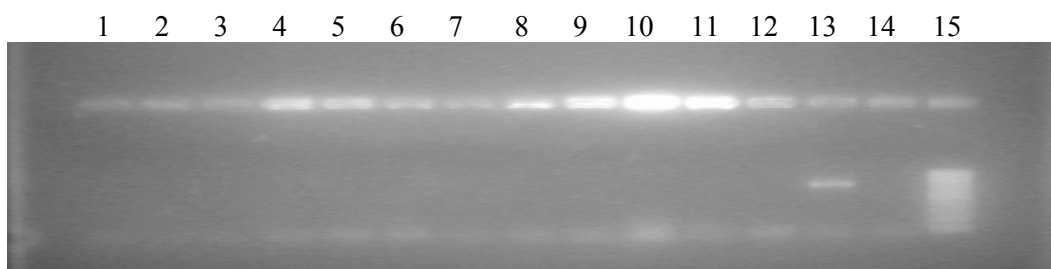


Slika 3: Rezultati reakcije PCR z oligonukleotidnimi začetniki za vrsto *Bif. longum*. Progi 1 in 2 vzorca z oznakami 75 in 78; proga 3 pozitivna kontrola, DNA seva *Bif. longum*, ATCC 15708; proga 4 negativna kontrola (voda). Seznam vzorcev je podan v Prilogi A.

Za bifidobakterije smo imeli dve pozitivni kontroli, in sicer za *Bif. longum* in *Bif. breve*. Pri obeh smo dobili pomnožke pričakovane velikosti. Za *Bif. bifidum* in *Bif. infantis* nismo imeli pozitivnih kontrol, vendar smo dobili pomnožke pričakovane velikosti. .

Lb. acidophilus je bil deklariran v štirih izdelkih. Analizirali smo vzorce: 5, 6, 17, 18, 21, 30, 38, 41, 49, 52, 72, 73, 75, 78, 79 in 82. *Lb. acidophilus* pa s PCR z vrstno specifičnimi začetniki nismo uspeli dokazati v nobenem vzorcu, kljub ponovitvi. Ker smo s pozitivno kontrolo *Lb. acidophilus*, ATCC 4356 dobili pričakovane pomnožke, lahko sklepamo, da je bila sama reakcija PCR uspešna.

Ker se pod imenom *Lb. acidophilus* pogosto pojavljajo tudi bakterije, ki pripadajo sorodnim vrstam, kot sta *Lb. gasseri* in *Lb. johnsonii*, smo napravili tudi reakcije PCR, specifične za ti dve vrsti. Vzorci, ki smo jih uporabili za dokazovanje vrste *Lb. johnsonii*, so na Sliki 4.



Slika 4: Rezultati reakcije PCR z oligonukleotidnimi začetniki za *Lb. johnsonii*. Proge 1-12 vzorci z oznakami 2, 21, 38, 43, 46, 72, 73, 74, 75, 77, 78 in 79; proga 13 pozitivna kontrola, DNA seva *Lactobacillus johnsonii* ATCC 11506; proga 14 negativna kontrola (voda); proga 15 velikostni standard za DNA (Fermentas 100 bp).

Vrsto *Lb. gaserii* pa smo dokazovali v vzorcih: 2, 3, 5, 6, 21, 30, 38, 41, 43, 46, 72, 73, 74, 75, 77, 78 in 79. Omenjeno vrsto smo dokazali v izdelku Linex[®], vzorec 73, kar potrjuje naše domneve, da se pod imenom *Lb. acidophilus* lahko pojavljajo tudi drugi laktobacili. *Lactobacillus johnsonii* nismo dokazali v nobenem izdelku. Za obe vrsti bakterij smo imeli pozitivni kontroli, in sicer *Lb. gaserii* Linex in *Lactobacillus johnsonii*, ATCC 11506. Obe smo dokazali.

Lb. bulgaricus je bil deklariran v treh izdelkih, in sicer tablete in tekočina Fermental[®] ter suspenzija Prolife[®]. Za reakcijo PCR za *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* smo uporabili naslednje vzorce: 2, 3, 5, 6, 14, 21, 30, 38, 41, 74, 78 in 79. Dokazali pa smo ga v dveh izdelkih, in sicer v vzorcu 74, kjer je bila DNA izoliran neposredno iz tablet Fermental[®] in vzorcu 78, kjer je bila DNA izolirana neposredno iz suspenzije Prolife[®]. Nismo pa ga dokazali v suspenziji Fermental[®], kjer je tudi deklariran. Pozitivne kontrole za to vrsto bakterij sicer nismo imeli na razpolago, vendar smo pri omenjenih vzorcih dobili pomnožke pričakovane velikosti.

Lb. rhamnosus je deklariran v Probio[®]. Za reakcijo PCR smo uporabili naslednje vzorce: 43, 46, 52, 75, 80 in 83. Dokazali pa smo ga v vzorcu 75 (DNA neposredno iz izdelka Probio[®]) in 83 (DNA mešanice več kolonij s selektivnega gojišča MRS).

Str. thermophilus naj bi bil v suspenziji Prolife[®], dokazovali pa smo ga v vzorcih: 10, 20, 22, 23, 25, 27, 33, 39, 40, 57, 74, 79, 72, 73, 75, 76, 77, 78, 79, 84, 85 in 86. Dokazali smo ga v vzorcu 57, ki je bil izoliran iz selektivnega gojišča M17 in 78, kjer je bila DNA izolirana neposredno iz suspenzije Prolife[®].

V izdelku Probio[®] je bi deklariran tudi *Lc. lactis*, zato smo naredili PCR z vrstno specifičnimi začetniki tudi za to vrsto bakterij. Uporabili smo naslednje vzorce: 47, 75, in 85. *Lc. lactis* smo dokazali v izdelku Probio[®], v vzorcu 85, ki je bil pridobljen iz mešanice kolonij s selektivnega gojišča M17. V ostalih vzorcih omenjene vrste nismo dokazali.

Tudi enterokoki se pogosto pojavljajo kot probiotični mikroorganizmi. V izdelku Linex[®] naj bi bil *Enterococcus faecium*, ki smo ga skušali dokazati z metodo PCR v vzorcih: 17, 20, 65, 72, 73 in 86. *E. faecium* smo dokazali v vzorcih 86, 17, 20 in 65. Vsi so bili pridobljeni iz izdelka Linex[®]. Tudi s pozitivno kontrolo *E. faecium* F14 smo dobili pričakovan rezultat.

Zorko J. Ugotavljanje ustreznosti probiotičnih pripravkov za ljudi.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za živilstvo, 2006

Preglednica 21: : Zbirna preglednica z rezultati ugotavljanja prisotnosti deklariranih mikroorganizmov v izdelkih s PCR ali z ugotavljanjem sekvenc regij V1/V2 gena za 16S rRNA.

Deklarirani MO	PCR na DNA iz posameznih izolatov	PCR na mešanici kolonij s selektivnega gojišča	PCR na skupni DNA iz vzorca izdelka	Sekvenciranje V1/V2 regije 16S rDNA
LINEX®				
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	- za <i>Lb. acidophilus</i> - za <i>Lb. gasseri</i> - za <i>Lb. johnsonii</i>	- za <i>Lb. gasseri</i>	- za <i>Lb. acidophilus</i> + za <i>Lb. gasseri</i> (vzorec 73) - za <i>Lb. johnsonii</i>	n.p.
<i>Bifidobacterium infantis</i> v. <i>liberorum</i>	-	+ (vzorec 81)	+ (vzorec 82)	n.p.
<i>Streptococcus faecium</i>	+ za <i>E. faecium</i> (vzorci 17, 20, 65)	+ za <i>E. faecium</i> (vzorec 86)	-	n.p.
TABLETE FERMENTAL®				
<i>Lactobacillus sporogenes</i>	n.p.	n.p.	n.p.	+ <i>Bacillus</i> sp., vendar ne <i>B. coagulans</i>
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	-	-	-	n.p.
<i>Lactobacillus thermophilus</i>	n.p. (vrsta ne obstaja)	n.p. (vrsta ne obstaja)	n.p. (vrsta ne obstaja)	<i>Lb. salivarius</i> (vzorec 2)
<i>Lactobacillus Bulgaricus</i>	-	-	+ (vzorec 74)	<i>E. faecium</i> (vzorec 3)
TEKOČINA FERMENTAL®				
<i>Lactobacillus sporogenes</i>	n.p.	n.p.	n.p.	+ <i>Bacillus</i> sp., vendar ne <i>B. coagulans</i>
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	-	-	-	n.p.
<i>Lactobacillus thermophilus</i>	n.p. (vrsta ne obstaja)	n.p. (vrsta ne obstaja)	n.p. (vrsta ne obstaja)	n.p.
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	-	-	-	n.p.
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	- za <i>Lb. acidophilus</i> - za <i>Lb. gasseri</i> - za <i>Lb. johnsonii</i>	- za <i>Lb. acidophilus</i> - za <i>Lb. gasseri</i> - za <i>Lb. johnsonii</i>	- za <i>Lb. acidophilus</i> - za <i>Lb. gasseri</i> - za <i>Lb. johnsonii</i>	n.p.
KAPSULE PROLIFE®				
<i>Lactobacillus sporogenes</i> (<i>Bacillus coagulans</i>)	n.p.	n.p.	n.p.	+ <i>Bacillus coagulans</i> (vzorec 60)
PASTILE PROLIFE®				
<i>Lactobacillus sporogenes</i> (<i>Bacillus coagulans</i>)	n.p.	n.p.	n.p.	+ <i>Bacillus</i> sp., vendar ne <i>B. coagulans</i> ; najverjetneje <i>B. subtilis</i> (vzorec 32)

se nadaljuje

nadaljevanje Preglednica 21: Zbirna preglednica z rezultati ugotavljanja prisotnosti deklariranih mikroorganizmov v izdelkih s PCR ali z ugotavljanjem sekvenc regij V1/V2 gena za 16S rRNA.

Deklarirani MO	PCR na DNA iz posameznih izolatov	PCR na mešanici kolonij s selektivnega gojišča	PCRna skupni DNA na vzorcu izdelka	Sekvenciranje V1/V2 regije 16S rDNA
SUSPENZIJA PROLIFE®				
<i>Lactobacillus sporogenes</i> (<i>Bacillus coagulans</i>)	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.
<i>Streptococcus thermophilus</i>	+ (vzorec 57)	-	+ (vzorec 78)	n.p.
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	-	-	+ (vzorec 78)	n.p.
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	-	-	-	n.p.
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	- za <i>Lb. acidophilus</i> - za <i>Lb. gasseri</i> - za <i>Lb. johnsonii</i>	- za <i>Lb. acidophilus</i> - za <i>Lb. gasseri</i> - za <i>Lb. johnsonii</i>	- za <i>Lb. acidophilus</i> - za <i>Lb. gasseri</i> - za <i>Lb. johnsonii</i>	n.p.
KAPSULE PROBIO®				
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	- za <i>Lb. acidophilus</i> - za <i>Lb. gasseri</i> - za <i>Lb. johnsonii</i>	- za <i>Lb. acidophilus</i> - za <i>Lb. gasseri</i> - za <i>Lb. johnsonii</i>	- za <i>Lb. acidophilus</i> - za <i>Lb. gasseri</i> - za <i>Lb. johnsonii</i>	n.p.
<i>Lactococcus lactis</i>	-	+ (vzorec 85)	-	n.p.
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	+ (vzorec 56)	-	+ (vzorec 75)	n.p.
<i>Bifidobacterium longum</i>	-	+ (vzorec 80)	+ (vzorec 75)	n.p.
<i>Bifidobacterium breve</i>	-	+ (vzorec 80)	-	n.p.
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	-	+ (vzorec 83)	+ (vzorec 75)	n.p.

Legenda:

n.p... ni podatka, preskus ni bil opravljen

-...negativni rezultat preskusa

+...pozitivni rezultat preskusa– PCR pomnožek pričakovane velikosti

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 PREGLED STANJA PROBIOTIČNIH IZDELKOV NA SLOVENSKEM TRGU IN NEKATERIH DRUGIH DRŽAV EU

V Sloveniji probiotični izdelki za ljudi, ki jih glede na namembnost uvrščamo nekje med živila in zdravila, zaenkrat še niso zakonsko regulirani. Po določilih Zakona o zdravstveni ustreznosti živil in izdelkov ter snovi, ki prihajajo v stik z živili, se živilom ne sme pripisovati zdravilnih lastnosti v smislu preprečevanja ter zdravljenja bolezni in jih oglaševati s sliko, znamenji ali besedili, ki bi porabnika lahko zavedli v zmotno glede sestave, lastnosti, namena uporabe ali učinka delovanja živila (Uradni list RS, št. 52/00, 2000).

Izdelki na slovenskem trgu so imeli praviloma ustrezne deklaracije, v smislu, da niso zavajale potrošnika. Izdelek Linex[®] priporočajo, da se uporablja kot podpora pri zdravljenju drisk, napenjanju in drugih prebavnih motnjah, ki nastanejo zaradi bakterijskih in virusnih okužb prebavil dojenčkov, otrok in odraslih. Pastile in kapsule Prolife[®] deklarirajo kot naravni regulator črevesne mikrobne združbe, ki pomaga pri ohranjanju in vzpostavitvi normalnega ravnovesja le-te. Oba izdelka Fermental sta predstavljena kot naravna pomoč pri prebavnih težavah, ker se z uživanjem teh dveh izdelkov vzpostavi ravnovesje črevesne mikrobne združbe. Probio pa priporočajo kot prehransko dopolnilo, ki lahko sodeluje pri krepitvi obrambe telesa.

Zaradi neizdelane regulative in pomanjkanja zakonsko določenega načina kontrole, oziroma kriterijev, kot so minimalno število mikroorganizmov v izdelku in natančne oznake sevov, se na slovenskem trgu srečujemo tudi s prehranskimi dodatki z nepravilnimi oznakami. Glede na to, da se interes porabnikov za tovrstne pripravke v EU in v Sloveniji povečuje, kar je pokazala tudi nedavna analiza trga v nutricevtski dejavnosti, bo potrebno področje probiotičnih živil in krme zakonsko regulirati. Razviti bo potrebno tudi primerne metode za kontrolo tovrstnih izdelkov (Zupančič, 2002).

Naša raziskava je pokazala, da je na splošno označevanje probiotikov nezadovoljivo. Nekaterih deklariranih mikroorganizmov sploh ni prisotnih v izdelku, ali pa je njihovo število tako majhno, da jih ne moremo dokazati. Lahko so bakterijske celice preveč poškodovane, da bi izrasle na hranljivih gojiščih.

Kljub temu, da je bilo na izdelkih napisano, da vsebujejo bifidobakterije, smo le v dveh izdelkih od petih njihovo prisotnost tudi ugotovili, in sicer v izdelkih Linex[®] in Probio[®]. V izdelku Probio[®] smo potrdili prisotnost vseh treh deklariranih vrst.

Laktobacile smo dokazali v štirih izdelkih od sedmih, v katerih naj bi bili prisotni. *Lb. gasseri* smo dokazali v izdelku Linex[®], kjer ta vrsta sicer ni bila deklarirana. *Lb. bulgaricus* smo dokazali v tabletah Fermental[®] in suspenziji Prolife[®]. *Lb. rhamnosus* smo dokazali v izdelku Probio[®].

Lb. acidophilus nismo zasledili v nobenem vzorcu, čeprav je bil deklariran v izdelkih Linex[®], tekočina Fermental[®], suspenzija Prolife[®] in Probio[®]. Tudi Tammerman in sod. (2003) niso v svoji raziskavi v nobenem izdelku odkrili vrste *Lb. acidophilus*, čeprav je bila pogosto deklarirana. Laktobacili so pogosto preiskovani mikroorganizmi, saj se veliko uporabljajo kot probiotiki (Lick in sod., 2001; Borriello in sod.; 2003; Coeuret in sod., 2004).

Enterokoke smo dokazali v izdelku Linex[®] in tabletah Fermental[®], in sicer *Enterococcus faecium*. Enterokoki v tabletah Fermental[®] niso bili deklarirani, vendar smo jih vseeno našli z metodo sekvenciranja. Enako se je zgodilo tudi avtorjem Coeuret in sod. (2004), ki so našli enterokoke v izdelkih, čeprav niso bili deklarirani.

Str. thermophilus smo dokazali v izdelku suspenzija Prolife[®], kjer je bil tudi deklariran.

Lc. lactis smo dokazali v izdelku Probio[®], kjer je bil deklariran.

S sekvenciranjem smo potrdili prisotnost bakterij rodu *Bacillus* v izdelkih kapsule, suspenzija in pastile Prolife[®] ter v tabletah in tekočini Fermental[®]. Identifikacija vrste je bila zanesljiva le za izdelek kapsule Prolife[®], ki je vseboval *B. coagulans*. V izdelku tablete Fermental[®] pa smo s sekvenciranjem dokazali prisotnost vrst *Lb. salivarius* in *E. faecium*, ki sploh nista deklarirani v izdelku.

Podobne pomanjkljivosti deklariranja probiotikov so pred nami ugotavljali tudi raziskovalci iz drugih držav. Gueimonde in sod. (2004) so v Španiji analizirali 14 fermentiranih mlečnih izdelkov, ki so vsebovali probiotike. V vseh izdelkih so ugotovili laktobacile in bifidobakterije, kakor tudi *Str. thermophilus*, ki pa ni probiotični mikroorganizem, pač pa le najpogostejši predstavnik jogurtove kulture.

Fasoli in sod. (2003) so v Italiji raziskali 14 probiotičnih izdelkov. Rezultati so pokazali veliko nepravilnosti glede poimenovanja mikroorganizmov, kakor tudi označevanja izdelkov.

Grand in sod. (2003) navajajo, da so bili mikroorganizmi iste vrste na treh izdelkih različno poimenovani. S tem se postavlja vprašanje, če sploh lahko zaupamo tistemu, kar je zapisano na etiketi izdelka. Tudi drugi avtorji navajajo podobne težave glede poimenovanja mikroorganizmov in podatkih o SŠMO v preiskovanih izdelkih (Coeuret in sod., 2004; Tammerman in sod., 2003).

5.2 KRITERIJI ZA VRSTE PROBIOTIKOV, KI SE UPORABLJAJO ZA HUMANO PREHRANO

O kriterijih, na podlagi katerih bi v prihodnosti odločali o tem, ali so sevi, ki jih želimo na novo uvesti v prehrano ljudi varni, intenzivno razpravljajo in izmenjujejo mnenja strokovnjaki z različnih področij, kot so mikrobiologija, patogeneza, prehrana, toksikologija in druge. Že leta 2003 so v Evropi različni strokovnjaki začeli pripravljati smernice in dokumente, s katerim bi uredili področje varne uporabe mikroorganizmov v prehrani (Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA related to a generic approach to the safety assessment by EFSA of microorganisms used in food/feed and the production of food/feed additives, 2005.). Kljub intenzivnim prizadevanjem v zadnjem času skupna evropska zakonodaja za probiotike še ni urejena.

Prizadevanja so usmerjena v to, da bi našli odgovore na ključna vprašanja, povezana z morebitnimi negativnimi vplivi probiotikov na zdravje ljudi. Predvsem je potrebno zagotoviti, da uživanje probiotičnih izdelkov ne predstavlja tveganja oportunističnih infekcij niti pri rizičnih skupinah, kot so ljudje z zmanjšano imunsko odpornostjo, niti pri dojenčkih in otrocih (Borriello in sod., 2003).

Glede na vse povedano je jasno, da tudi v Sloveniji uporaba probiotikov še ni zakonsko urejena, zato so tako potrošniki kot proizvajalci probiotikov prepuščeni lastni presoji, kaj je dobro za njih, in katere probiotike naj uporabijo v svojih izdelkih, oziroma kupijo.

Uporaba bakterijskih spor kot probiotikov je danes raziskana predvsem na področju uporabe probiotikov za živali, vendar pa niso redki pripravki za ljudi, ki prav tako vsebujejo spore. Najbolj razširjena je uporaba spor vrst *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. pumilus* in *B. coagulans*. Najpogostejše vprašanje, ki se postavlja pri tem je, kakšen je prehod spor skozi prebavni trakt in ali ima probiotični učinek že sama spora ali šele ko vzklije. Huynh in sod. (2005) so mnenja, da ne bi smeli uporabljati katerihkoli spor *Bacillus* kot probiotikov, ampak je potrebna velika pazljivost in testi *in vivo*, ki izključijo morebitna tveganja. Nekateri predstavniki rodu *Bacillus* so namreč sposobni izločati toksine.

Tudi na slovenskem trgu smo našli kar pet izdelkov, ki vsebujejo mikroorganizme iz rodu *Bacillus*, ki pa je deklariran le v treh izdelkih (vsi Prolife[®]), vendar še tukaj proizvajalec niha med dvema vrstama, in sicer *B. coagulans* in *Lb. sporogenes*, ki sploh ne obstaja. S sekvenciranjem smo uspeli dokazati vrsto *B. coagulans* v kapsulah Prolife[®] in vrsto *B. subtilis* v pastilah Prolife[®]. V ostalih treh vzorcih: tablete in tekočina Fermental[®] ter v suspenziji Prolife[®], pa vrste nismo uspeli določiti, zagotovo pa je v teh izdelkih prisoten rod *Bacillus*. Vprašamo se lahko, kako lahko proizvajalci tako nepremišljeno uporabljajo mikroorganizme, ki lahko prenašajo odpornost na antibiotike in celo povzročajo nekatere bolezni (Huynh in sod., 2005 ter Guidelines for evaluation of probiotics in food: Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for evaluation of probiotics in food, 2002). Dolžnost vsakega proizvajalca je, da zagotovi, da je probiotik uporabljen v njegovem izdelku, varen in ne predstavlja nobenega tveganja za potrošnika.

Raziskava, ki so jo opravili Zhou in sod. (2005), je naprimer pokazala, da nobeden od raziskanih mikroorganizmov (*Lb. rhamnosus*, *Lb. acidophilus* in *Bif. lactis*) nima plazmida za prenos rezistence proti antibiotikom, zato je njihova uporaba varna.

5.3 RAZVOJ IDENTIFIKACIJSKIH METOD ZA UGOTAVLJANJE PROBIOTIKOV

Pomanjkljivosti konvencionalnih mikrobioloških metod za ugotavljanje taksonomskega statusa ali za ugotavljanje števila mikroorganizmov so številne: zahtevajo veliko časa in materiala, gojišča so bodisi premalo selektivna bodisi posamezni predstavniki skupine mikroorganizmov, ki jih želimo zasledovati, na njih ne rastejo.

Tudi pravilne identifikacije si le na podlagi biokemijskih in morfoloških lastnosti ne predstavljamo več. Prav tako nemočni pa smo, če želimo zasledovati posamezne seve mikroorganizmov.

Eno izmed težišč predstavljene naloge je bilo tudi uvajanje novih metod, ki temeljijo na tehnikah molekularne biologije, za identifikacijo, zasledovanje in kvantifikacijo posameznih skupin mikroorganizmov (vrsta, rod) v različnih probiotičnih izdelkih.

Tudi pri izvajanju predstavljene naloge smo se lahko prepričali o omejeni uporabnosti posameznih gojišč za razlikovanje mikroorganizmov iste vrste ali seva, saj so bili rezultati, ki smo jih dobili z metodo PCR in sekvenciranjem, pogosto v nasprotju s pričakovanimi.

Morfologijo, tipično za bifidobakterije (razvejane palčke), smo pod mikroskopom ugotovili le pri vzorcu 58 iz izdelka Probio[®], ki je izrasel na gojišču za bifidobakterije. Pri tem istem vzorcu je tudi PCR analiza pokazala pripadnost temu rodu, in sicer vrsto *Bif. breve*. Ker na selektivnih gojiščih pogosto zrastejo tudi kolonije drugih mikroorganizmov, kot le tistih, ki jih pričakujemo, razlikovanje vrst po morfološkem izgledu pa ni vedno mogoče, lahko z izolacijo DNA iz posameznih kolonij zgrešimo tiste, ki jih iščemo. Zato je za potrjevanje prisotnosti posameznih vrst primernejša analiza skupne DNA neposredno iz izdelka, ali DNA, ki jo dobimo tako, da postrgamo več kolonij iz enega selektivnega gojišča in tako poskušamo zajeti v vzorec čimveč različnih kolonij na gojišču.

Če smo na mešanici več kolonij ali na skupni DNA neposredno iz izdelka za kako vrsto dobili pozitiven rezultat, na posamezni tipični koloniji pa ne, to pomeni, da na tistem gojišču, s katerega smo naključno tipično kolonijo pobrali, rastejo tudi druge vrste, ki so po izgledu podobne iskani koloniji, torej gojišče ni dovolj selektivno. Če pa smo na skupni DNA neposredno iz izdelka dobili pozitiven rezultat, na posamezni koloniji ali mešanici več kolonij iz posameznega selektivnega gojišča pa ne, to lahko pomeni, da bakterije niso bile več sposobne izrasti na gojišču (mrtve ali nekultivabilne), DNA pa je še bila prisotna, ker je še niso razgradile nukleaze. Posledica tega so lažno pozitivni rezultati, saj takšne celice niso več žive in zato ne morejo izrasti na gojišču. Številni avtorji namreč omenjajo tovrstne težave glede identifikacijskih metod za razlikovanje mikroorganizmov na posameznih selektivnih gojiščih in njihovo neselektivnost (Vinderola in sod., 1999).

Metodo PCR so uporabili že številni avtorji in izkazala se je za zelo primerno za identifikacijo probiotičnih mikroorganizmov. Silvi in sod. (2003) so poudarili, da je metoda PCR zanesljiva, hitra, natančna in dokaj poceni. Matsuki in sod. (1999) so uporabili specifične začetnike za rod *Bifidobacterium* in uporabili metodo PCR, ki se je izkazala za zelo primerno. Isto metodo so za identifikacijo laktobacilov uporabili tudi Walter in sod. (2000) in jo zelo pohvalili.

Metoda PCR se lahko uporablja tudi v kombinaciji z DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) (Fasoli in sod., 2003 ter Walter in sod., 2000) in PFGE (pulsed field gel electrophoresis) (Gueimonde in sod., 2004; Coeuret in sod., 2004 in Yeung in sod., 2004). Tudi pri teh kombinacijah metod so dobili dobre in zanesljive rezultate. Fasoli in sod. (2003) menijo, da bi bila lahko metoda PCR-DGGE zelo primerna za hitro ugotavljanje prisotnih mikroorganizmov v probiotičnih izdelkih.

Tudi v naši raziskavi smo z metodo PCR uspeli dokazali prisotnost večine deklariranih mikroorganizmov v izdelkih, pri čemer smo uporabili specifične oligonukleotidne začetnike, ki so jih skonstruirali in preiskusili v predhodnih raziskavah. Pri liofiliziranih izdelkih predstavlja veliko težavo preživetje probiotičnih mikroorganizmov skozi tehnološke postopke proizvodnje, zato moramo mogoče tukaj iskati težavo neprisotnosti deklariranih mikroorganizmov v izdelkih. Vemo, da je preživetje predvsem anaerobnih mikroorganizmov zelo slabo, povsem možno pa je, da so mikroorganizmi mrtvi in niso sposobni kultivacije, še vedno pa je prisotna DNA tega mikroorganizma, zato ga s PCR metodo lahko določimo, na gojišču pa ne izraste. Ravno zato moramo rezultate, dobljene z molekularno genetskimi metodami, uporabljati preudarno. Metoda PCR je sicer primerna za identifikacijo probiotikov v izdelkih, moramo pa upoštevati, da za vse vrste mikroorganizmov še ni na voljo dovolj selektivnih oligonukleotidnih začetnikov za razlikovanje posameznih vrst. V takih primerih nam preostane še sekvenciranje delov genov 16S rRNA. To smo v nekaterih primerih uporabili tudi mi in dobili zelo zanimive rezultate. V tabletah Fermental[®] smo našli *Lb. salivarius* in *E. faecium*, ki nista bila deklarirana v tem izdelku. V tabletah Prolife[®] smo dokazali *B. subtilis*, ki tudi ni bil nikjer omenjen. V kapsulah Prolife[®] pa *B. coagulans*, ki je sicer bil omenjen na deklaraciji izdelka, vendar le v oklepaju, zato smo predvidevali, da proizvajalec meni, da je to drugo ime za vrsto *Lb. sporogenes*, ki pa sploh ne obstaja.

Sekvenciranje je zelo primerna metoda za identifikacijo probiotikov, vendar zahteva predhodno kultivacijo posameznega bakterijskega seva, osamitev DNA, pomnoževanje s PCR ter ugotavljanje zaporedja nukleotidov. Metodo sekvenciranja so uporabili tudi Fasoli in sod. (2003) in zaključili, da je ta metoda najbrž najbolj zanesljiva za identifikacijo probiotičnih in drugih mikroorganizmov.

V poročilu Guidelines for evaluation of probiotics in food: Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for evaluation of probiotics in food (2002) trdijo, da je DNA-DNA hibridizacija sicer najbolj primerna metoda, za določanje posameznih vrst mikroorganizmov. Vendar je potrebno imeti veliko zbirko referenčnih sevov, kar je lahko ovira. Sekvenciranje delov 16S rRNA pa se lahko uporablja kot alternativa hibridizaciji, saj daje v kombinaciji s fenotipskimi testi zelo zanesljive rezultate, kar se je pokazalo tudi v naši raziskavi.

Zaradi težav in napak pri analiziranju probiotičnih preparatov s klasičnimi mikrobiološkimi analizami se vse bolj uveljavljajo sodobne molekularno biološke analize. Vendar pa tudi pri teh ne gre brez težav. Začnejo se že pri sproščanju DNA iz celice mikroorganizmov. Konvencionalne tehnike osamitve in čiščenja DNA so dolgotrajne in zahtevajo uporabo toksičnih kemikalij. Ker za pomnoževanje s PCR običajno ne potrebujemo tako čiste DNA, so alternativni postopki dobrodošli, saj omogočajo prihranek časa in reagentov. V naši raziskavi smo uporabili postopek sproščanja DNA iz celic mikroorganizmov s toploto in detergentom, ki smo ga povzeli po Silvi in sod. (2003) in je hiter ter enostaven. Preizkusili smo tudi nekoliko modificiran postopek za osamitev skupne DNA direktno iz probiotičnih izdelkov, ki je bil tudi uspešen. Temelji na predhodni rehidraciji kapsule ali tablete probiotičnega izdelka v peptonski vodi. Nato uporabimo to suspenzijo kot vzorec za izolacijo DNA. Probiotični izdelek, ki ga uživamo kot tekočino, pa uporabimo neposredno za izolacijo DNA.

5. 4 ŠTEVILO PROBIOTIČNIH MIKROORGANIZMOV V IZDELKIH IN VPLIV ROKA TRAJANJA NA PREŽIVELOST PROBIOTIKOV

Dnevni vnos 10^9 - 10^{10} KE živih probiotičnih mikroorganizmov je najmanjša količina, ki zagotavlja pozitivne učinke na zdravje (Sanders in Veld, 1999 ter Fasoli in sod., 2003). Gueimonde in sod. (2004) navajajo, da naj bi bilo minimalno število probiotičnih mikroorganizmov v komercialnih izdelkih 10^5 - 10^6 bakterij na ml. Vendar pa drugi avtorji predlagajo, da naj bi bilo število probiotikov vsaj med 10^6 in 10^8 bakterij na mililiter (Muller in sod., 2000). Nekateri navajajo spodnjo mejo koncentracije 10^7 mikroorganizmov na gram (Coeuret in sod., 2004 ter Ishibashi in Shimamura, 1993).

Mi smo preizkušali liofilizirane izdelke v različnih oblikah, kot kapsule, tablete ali suspenzija. Znano je, da je preživelost mikroorganizmov v le-teh slabša kot v fermentiranih izdelkih (Gueimonde in sod., 2004; Vinderola in sod., 1999 in Coeuret in sod., 2004). Slabša preživelost je posledica stresov zaradi tehnoloških postopkov, ki poškodujejo celično membrano (Fasoli in sod., 2003). Število probiotičnih bakterij v izdelkih mora biti visoko tudi zato, ker moramo upoštevati, da jih veliko ne preživi poti skozi prebavni trakt. Predvsem želodčna kislina, žolčne soli in bazičnost dvanajstnika zmanjšajo populacijo probiotikov (Saarela in sod., 2002).

V naši raziskavi smo ugotovili pri dveh izdelkih (tekočina Fermental[®] in suspenzija Prolife[®]) zelo nizko število bifidobakterij, saj niso dosegli niti 10^4 KE/ml. V dveh izdelkih, in sicer kapsule Prolife[®] in tablete Fermental[®], je število bifidobakterij preseglo 10^6 KE/g, v pastilah Prolife[®] 10^7 KE/g, v izdelkih Linex[®] in Probio[®], pa 10^8 KE/g.

Skupno število laktobacilov je v dveh izdelkih (pastile Prolife[®] in Probio[®]) preseglo število 10^{10} bakterij na gram. Število laktobacilov v ostalih izdelkih pa se je gibalo od 10^4 do 10^8 celic na gram ali milliter izdelka.

Avtorji Gueimonde in sod. (2004) so v svojem članku opisali tudi vpliv skladiščenja na preživetje probiotičnih mikroorganizmov. Ugotovili so, da se število laktobacilov precej zmanjša, če so izdelki 30 dni v hladilnici. Zanimivo je, da se je tudi število bifidobakterij zmanjšalo, vendar ne toliko kot laktobacilov, število streptokokov pa je ostalo skoraj nespremenjeno. Vendar pa moramo upoštevati, da so ti avtorji raziskovali probiotike v fermentiranih mlečnih izdelkih, ne pa v liofiliziranih. Liofilizirane izdelke običajno hranimo pri sobni temperaturi, kar vpliva na obstojnost probiotičnih mikroorganizmov v izdelku. V naši raziskavi smo analizirali tri izdelke Linex[®], z različnim časom do poteka roka trajanja, da bi videli, če le-ta kako vpliva na število mikroorganizmov v izdelku. Prvi vzorec je bil tik pred potekom roka trajanja, drugega smo analizirali približno leto pred pretekom roka trajanja, tretjega pa leto in pol. Rezultati so pokazali, da starost izdelka vpliva na preživelost mikroorganizmov. Najbolj se je zmanjšalo število bifidobakterij, ki je bilo tik pred pretekom roka kar 16-krat manjše kot eno leto in pol pred pretekom roka. Število laktobacilov se ni razlikovalo niti za 2-krat, enako tudi število enterokov. Zanimivo pa je, da se je SŠMO razlikovalo zelo malo, glede na datum roka uporabe. Tudi drugi avtorji so ugotavljali, da se zmanjša predvsem število bifidobakterij, ker so anaerobni mikroorganizmi bolj občutljivi za tehnološke postopke in skladiščenje (Fasoli in sod., 2003).

5.5 SKLEPI

- Ponudba probiotičnih izdelkov iz skupine prehranskih dodatkov in zdravil brez recepta je v Sloveniji precej skopa, saj je bilo v prvi polovici leta 2005 na trgu 7 tovrstnih izdelkov.
- V deklaracijah nekaterih izdelkov so napisana imena bakterij, ki ne obstajajo ali pa se ne uporabljajo več.
- Opisi namena in načina uživanja izdelkov so skladni z obstoječo zakonodajo.
- Na štirih od sedmih preiskovanih izdelkih ni bilo deklariranega števila mikroorganizmov. Na enem izdelku je bila navedba števila dvoumna. Le v enem izdelku je bilo podano število za vsak mikroorganizem posebej. Le v enem izdelku od treh, pri katerih je bilo število mikroorganizmov navedeno, je z analizo ugotovljeno skupno število ustrezalo deklariranemu.
- V nobenem od izdelkov, kjer je bil deklariran *Lb. acidophilus*, te vrste bakterij nismo ugotovili.
- Število živih bakterij med skladiščenjem izdelka pada, odvisno od vrste prisotnih probiotičnih bakterij v izdelku.
- Gojišča, ki so trenutno v uporabi za štetje in izolacijo posameznih skupin probiotičnih bakterij, niso dovolj selektivna.
- Reakcija PCR v večini primerov omogoča dokazovanje prisotnih mikroorganizmov neposredno na vzorcu izdelka, ki ga predhodno le rehidriramo ter obdelamo s toploto in tritonom.
- Postopek priprave DNA iz kultur posameznih izolatov s toploto in tritonom se je pokazal za uspešno alternativo za zamudnejše in dražje postopke čiščenja DNA.
- Kadar ni na voljo ustreznih vrstno specifičnih začetnikov za reakcijo PCR, je smiselno analizirati izolate z ugotavljanjem nukleotidnega zaporedja delov 16S rDNA.

6 POVZETEK

Kriteriji za uporabo probiotičnih mikroorganizmov v prehranske namene še niso definirani niti v Evropi niti v Sloveniji. Želeli smo preveriti, kakšna je ponudba probiotičnih preparatov v Sloveniji in ali so v izdelkih res mikroorganizmi, ki so napisani na deklaraciji, oz. če deklaracije ustrezajo dejanskemu stanju.

Na slovenskem trgu smo našli šest probiotičnih izdelkov iz skupine prehranskih dodatkov in enega iz skupine zdravil brez recepta. Pri petih izdelkih sta bila na deklaraciji omenjena *Lactobacillus sporogenes* in *Lactobacillus thermophilus*, ki v sodobni nomenklaturi ne obstajata. *Lactobacillus acidophilus* je bil deklariran v 4 izdelkih, našli pa ga nismo nikjer. Bifidobakterije so bile deklarirane v 5 izdelkih, dokazali pa smo jih samo v dveh. V dveh izdelkih, Linex[®] in Probio[®], smo potrdili večino deklariranih mikroorganizmov, v ostalih izdelkih pa je bil rezultat veliko slabši.

Prva težava pri analizi probiotičnih izdelkov je, da so si probiotične bakterije zelo podobne in jih s konvencionalnimi metodami ne ločimo. Druga težava pa je, da mnoge bakterije sploh ne izrastejo na hranljivih selektivnih gojiščih, saj so tehnološki postopki obdelave za mikroorganizme zelo stresni. Zato smo preizkusili tudi genetske metode, ki so sicer hitre, vendar tudi pri njih ne gre brez težav, predvsem pri izolaciji DNA iz celic mikroorganizmov. Kemijsko-encimatski postopki izolacije DNA so dolgi in zahtevajo veliko natančnost, zato smo poskusili z uporabo neencimskih metod izolacije DNA, in sicer z obdelavo vzorcev s toploto in tritonom. S to metodo smo dobili enako dobre in uspešne rezultate, kot s kemijsko-encimatsko metodo, zato smo mnenja, da je metoda izolacije DNA s toploto in tritonom primerna za izolacijo DNA, saj je veliko hitrejša. Manj je tudi tveganja, da pride pri izpeljavi analize do napake, saj odpade večina korakov kemijsko-encimatske metode, pri kateri je potrebno precizno paziti na temperature, zaporedje dodajanja reagentov in čas delovanja le-teh. Uspešna je tudi izolacija DNA s toploto in detergentom iz mešanice več različnih kolonij, ki jih postrgamo s selektivnega gojišča. Če izberemo samo eno kolonijo, ki naj bi morfološko ustrezala iskanemu mikroorganizmu, je veliko možnosti, da izločimo iskano kolonijo, torej izberemo napačno in vsa prizadevanja dokazati iskani mikroorganizem, so brez uspeha. Konvencionalne mikrobiološke metode niso dovolj zanesljive za identifikacijo in ugotavljanje števila probiotikov, saj na podlagi rasti na selektivnih gojiščih, morfoloških lastnosti kolonij na ploščah in opazovanjem celic pod mikroskopom pogosto ne moremo razlikovati sorodnih vrst mikroorganizmov. Omenjene pomanjkljivosti je mogoče odpraviti tako, da vključimo molekularno-biološke metode, kot je reakcija PCR. Z metodo PCR smo dokazali in potrdili mikroorganizme, ki so se nahajali v izdelkih. Za vse vrste mikroorganizmov še niso določeni oligonukleotidni začetniki, zato smo takšne izolate poslali na sekvenciranje. Metoda PCR je hitra in tudi natančna, vendar pa ne omogoča razlikovanja živih in mrtvih celic, kar je lahko ovira, saj dobimo lažno pozitivne rezultate.

Kot smo predvidevali v hipotezi, so tudi na slovenskem trgu probiotični izdelki, katerih sestava ne ustreza deklaraciji. Prisotnost posameznih mikroorganizmov v probiotičnih izdelkih lahko potrdimo z metodo PCR. Izolacija DNA iz celic pa je najhitrejša s toplotnim postopkom in detergentom. Dokazali smo, da lahko potrdimo iskani mikroorganizem v izdelku tudi z analizo celokupne DNA, izolirane neposredno iz probiotičnega preparata.

7 VIRI

- Adamič J., Smole Možina S., Jeršek B. 2003. Vloga in pomen mikroorganizmov v živilih in taksonomija. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 1-45.
- Adams M. R. 1999. Safety of industrial lactic acid bacteria. *Journal of Biotechnology*, 68:171-178.
- Baelde D., Brassart D., Corthier M.G., Dore M.J., Heyman M., Michel C., Berta L., Boele J-C., Antoine J-M., Auger I., Caers W., Farrokh C., Rousseau B. 2005. Effect of pre- and probiotics on the immune system. V: Effects of probiotics and prebiotics on flora and immunity in adults. Boele J-C., Thomann C. (eds). Paris, Agence Francaise de Securite Sanitaire des Aliments: 89-94.
www.afssa.fr/ftp/afssa/28176-28177.pdf (februar 2005)
- Barakat R.K., Griffiths M.W, Harris L.J. 2000. Isolation and characterization of *Carnobacterium*, *Lactococcus*, and *Enterococcus* spp. from cooked, modified atmosphere packaged, refrigerated, poultry meat. *International Journal of Food Microbiology*, 62: 83-94.
- Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). 2005. Bethesda, The National Center for Biotechnology Information.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast> (avgust 20005): 3 str.
- Becquet P. 2003. EU assessment of enterococci as feed additives. *International Journal of Food Microbiology*, 88: 247-254.
- Borriello S.P., Hammes W.P., Holzapfel W., Marteau P., Schrezenmeir J., Vaara M., Valtonen V. 2003. Safety of probiotics that contain lactobacilli or bifidobacteria. *Clinical Infection Diseases*, 36: 775-780.
- Coeuret V., Gueguen M., Vernoux J.P. 2004. Numbers and strains of lactobacilli in some probiotic products. *International Journal of Food Microbiology*, 97: 147-156.
- Deasy B.M., Rea M.C., Fitzgerald G.F., Cogan T.M., Beresdorf T.P. 2000. A rapid PCR based method to distinguish between *Lactococcus* and *Enterococcus*. *Systematic and Applied Microbiology*, 23: 510-522.

- Dubernet S., Desmasures N., Gueguen M. 2002. A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. *FEMS Microbiology Letters*, 214: 271-275.
- Dutka-Malen S., Evers S., Courvalin P. 1995. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 33: 24-27.
- Euzéby J.P. 1997. List of bacterial names with standing in nomenclature. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47: 590-592.
- Fasoli S., Marzotto M., Rizzoti L., Rossi F., Dellagio F., Torrini S. 2003. Bacterial composition of commercial probiotic products as evaluated by PCR-DGGE analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 82: 59-70.
- Fuller R. 1989. Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 66: 365-378.
- Gardiner G., Ross R. P., Collins J. K., Fitzgerald G., Stanton C. 1998. Development of probiotic cheddar cheese containing human-derived *Lactobacillus paracasei* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 2192-2199.
- Gardiner G., Ross R., Kelly P., Stanton C., Collins J., Fitzgerald G. 2002. Microbiology of therapeutic milks. V: Dairy microbiology handbook: the microbiology of milk and milk products. 3rd ed. Robinson R.K. (ed.). New York, John Wiley & Sons: 431-478.
- Grand M., Kuffer M., Baumgartner A. 2003. Quantitative analysis and molecular identification of bifidobacterial strains in probiotic milk products. *European Food Research and Technology*, 217: 90-92.
- Guarner F., Schaafsma G. J. 1998. Probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 39: 237-238.
- Gueimonde M., Delgado S., Mayo B., Ruas-Masiedo P., Margolles A., Reyes-Gavilan C.G. 2004. Viability and diversity of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* populations included in commercial fermented milks. *Food Research International*, 37: 839-850.
- Guidelines for evaluation of probiotics in food: Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for evaluation of probiotics in food. 2002. London, Ontario, Canada, Food and Agriculture Organization of the United Nations. <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf> (januar 2005): 9 str.

- Haavenaar R., Huis Veld J. H. J. 1992. Probiotics: general view. V: Lactic acid bacteria in health and disease. Wood J. B. J (ed.). London, Elsevier: 151-179.
- Hamilton-Miller J. M. T., Shah S., Winkler J. T. 1999. Public health issues arising from microbiological and labelling quality of foods and supplements containing probiotic microorganisms. *Public Health and Nutrition*, 2: 223-229.
- Holzapfel W.H., Haberer P., Geisen R., Bjorkroth J., Schillinger U. 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73: 365-373.
- Holzapfel W. H., Schillinger U. 2002. Introduction to pre- and probiotics. *Food Research International*, 35, 2/3: 109-116.
- Huynh H. A., Duc Le H., Cutting S.M. 2005. The use of bacterial spore formers as probiotics. *FEMS Microbiology Reviews*, 29,4: 813-835.
- IDF Standard 149. Annex A. 1991. Lactic acid starters. Section A.2-Enumeration of various microorganisms in lactic acid starters. 3 str.
- IDF Standard 100B. 1991. Milk and milk production-Enumeration of microorganisms-Colony count technique at 30 °C. 3 str.
- Ishibashi N., Shimamura S. 1993. Bifidobacteria: research and development in Japan. *Food Technology*, 46: 126-135.
- Jeršek B. 2003. Higiena živil. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, 21-25.
- Lick S., Drescher K., Heller K.J. 2001. Survival of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* in the terminal ileum of fistulated gottingen minipigs. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 4137-4143.
- Matsuki T., Watanabe K., Tanaka R., Fukuda M., Oyaizu H. 1999. Distribution of Bifidobacterial species in human intestinal microflora examined with 16S rRNA-gene-target species-specific primers. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 4506-4512.
- Mattila-Sandholm T., Myllärinen P., Crittenden R., Mogensen G., Fondén R., Saarela M. 2002. Technological challenges for future probiotic foods. *International Dairy Journal*, 12: 173-182.
- Muller M.R., Ehrmann M.A., Vogel R.F. 2000. Multiplex PCR for the detection of *Lactobacillus pontis* and two related species in a sourdough fermentation. *Applied and Environment Microbiology*, 66: 2113-2113.

- Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA related to a generic approach to the safety assessment by EFSA of microorganisms used in food/feed and the production of food/feed additives. 2005. The European Food Safety Agency Journal, 226: 12 str.
- Parker R. B. 1974. Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Animal Nutrition and Health*, 29: 4-8.
- Regulation No. 1831/2003 of the European Parliament and of the council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition. 2003. *Official Journal of the European Union*, L 268: 29-43.
- Rogelj I. 2001. Probiotiki, prebiotiki in simbiotiki. V: Probiotiki in možnosti njihove uporabe: Zbornik predavanj, Ljubljana, 8. marec 2001. Ljubljana, Zbornica nutricionistov in dietetikov: 6-15.
- Rogelj I., Bogovič Matijašič B. 2004. Probiotiki in varnost. V: Varnost živil. 22 Bitenčevi živilski dnevi, Radenci, 18. in 19. marec 2004. Gašperlin L., Žlender B. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 181-189.
- Saarela M., Mogensen G., Fonden R., Matto J., Mattila-Sandholm T. 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, 84: 197-215.
- Saarela M., Lahteenmaki L., Crittenden R., Salminen S., Mattila-Sandholm T. 2002. Gut bacteria and health foods-the European perspective. *International Journal of Food Microbiology*, 78: 99-117.
- Salminen S., Bouley M.C., Boutron-Rualt M.C., Cummings J., Franck A., Gibson G. Isolauri E., Moreau M.C., Roberfroid M., Rowland I. 1998. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *British Journal of Nutrition*, 1: 147-171.
- Sambrook J., Russell D. W. 2001. Preparation of buffers and stock solution. V: *Molecular cloning a laboratory manual*. New York, Cold Spring Harbor: A1.17.
- Sanders M.E., Veld J.H. 1999. Bringing a probiotic-containing functional food to the market: microbial, product regulatory and labelling issues. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76: 293-315.
- Schrezenmeir J., Vrese M. 2001. Probiotics, prebiotics, and synbiotics - approaching a definition. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 2: 361-364.
- Silvi S., Vardenelli M.C., Orpianesi C., Cresci A. 2003. EU project Crownalife: Functional foods, gut microflora and healthy ageing. Isolation and identification of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains from faecal samples of elderly subjects for a possible probiotic use in functional foods. *Journal of Food Engineering*, 56: 195-200.

- Smole Možina S., Jeršek B. 2001. Mikrobiološke in molekularne metode karakterizacije probiotičnih dodatkov funkcionalnim živilom. V: Funkcionalna hrana. 21. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 8. in 9. november 2001. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 207-218.
- Tammerman R., Pot B., Huys G., Swings J. 2003. Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *International Journal of Food Microbiology*, 81: 1-10.
- Tilsala-Timisjärvi A., Alatossava T. 1997. Development of oligonucleotide primers from the 16S-23S rRNA intergenic sequences for identifying different dairy and probiotic lactic acid bacteria by PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 35: 49-56.
- Vinderola C.G., Reinheimer J.A. 1999. Culture media for the enumeration of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in the presence of yoghurt bacteria. *International Dairy Journal*, 9: 497-505.
- Walter J., Tannock G.W., Tilsala-Timisjarvi A., Rodtong S., Loach D.M., Munro K., Alatossava T. 2000. Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 297-303.
- Ward L., Brown J., Graham D. 1998. Two methods for the genetic differentiation of *Lactococcus lactis* and *cremoris* based on differences in the 16S rRNA gene sequence. *FEMS Microbiology Letters*, 166: 15-21.
- Zakon o zdravstveni ustreznosti živil in izdelkov ter snovi, ki prihajajo v stik z živilom. 2000. Uradni list Republike Slovenije, 10, 52: 6949-6951.
- Zhou J. S., Pillidge C.J., Gopal P.K., Gill H.S. 2005. Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *International Journal of Food Microbiology*, 98: 211-217.
- Zupančič D. 2002. Analiza trga v nutricevtski dejavnosti. Diplomaska naloga. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Ekonomska fakulteta: 48 str.
- Yeung P.S.M., Kitts C.L., Cano R., Tong P.S., Sanders M.E. 2004. Application of genotypic and phenotypic analyses to commercial probiotic strain identity and relatedness. *Journal of Applied Microbiology*, 97: 1095-1104.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Ireni Rogelj in recenzentki prof. dr. Sonji Smole Možina za skrben pregled diplomske naloge in nasvete, ki so bili vsekakor dobrodošli.

Iskrena hvala somentorici dr. Bojani Bogovič Matijašič za vodstvo med praktičnim delom v laboratoriju ter vsej podpori in strokovni pomoči pri nastajanju diplomske naloge. Resnično hvala, ker vam ni bilo nikoli odveč pomagati in svetovati.

Zahvaljujem se celotnemu osebju laboratorija Katedre za mlekarstvo, za vso pomoč in podporo.

Zahvaljujem pa se tudi svoji družini in prijateljem za podporo in razumevanje, ker vem, da ni bilo vedno lahko...

PRILOGE

Priloga A: Seznam vseh izolatov in vzorcev probiotičnih izdelkov, uporabljenih v diplomski nalogi, ter uporabljena gojišča, pogoji kultivacije in oblika celic pod mikroskopom

Zap. št. vz.	Izdelek	Gojišče/priprava vzorca	T, atmosfera	Oblika bakt.	Pričakovana bakterijska vrsta ali rod
1	Fermental® tablete	BifNPNL	37 °C, anaerobno	Palčke	Bifidobakterije
2	Fermental® tablete	ROGOSA	37 °C, anaerobno	Dolge palčke	Lactobacili
3	Fermental® tablete	ROGOSA	37 °C, anaerobno	Kratke palčke	Lactobacili
5	Fermental® tablete	MRS+cys	37 °C, anaerobno	Palčke	Bifidobakterije
6	Fermental® tablete	MRS+cys	37 °C, anaerobno	Koki	Bifidobakterije
7	Fermental® tablete	BHI	37 °C, aerobno	Palčke	<i>B. coagulans</i>
9	Fermental® tablete	BHI	37 °C, aerobno	Palčke	<i>B. coagulans</i>
10	Fermental® tablete	CATC	37 °C, aerobno	Koki	Enterokoki
14	Fermental® tablete	MRS+cly	37 °C, anaerobno	Palčke	<i>Lb. acidophilus</i>
15	Fermental® tablete	BifNPNL	37 °C, anaerobno	Koki	Bifidobakterije
17	Linex®	MRS+cly	37 °C, anaerobno	Koki	<i>Lb. acidophilus</i>
18	Linex®	MRS+cly	37 °C, anaerobno	Palčke	<i>Lb. acidophilus</i>
19	Linex®	BifNPNL	37 °C, anaerobno	Palčke	Bifidobakterije
20	Linex®	CATC	37 °C, aerobno	Koki	Enterokoki
21	Fermental® suspenzija	MRS	42 °C, anaerobno	Palčke	Lactobacili
22	Fermental® suspenzija	M17, termizirano	37 °C, aerobno	Kratke palčke	<i>Str. thermophilus</i> (spore)
23	Prolife® kapsule	M17	37 °C, aerobno	Kratke palčke	<i>Str. thermophilus</i>
25	Fermental® suspenzija	M17	37 °C, aerobno	Palčke	<i>Str. thermophilus</i>
27	Fermental® suspenzija	M17	42 °C, aerobno	Kratke palčke	<i>Str. thermophilus</i>
28	Fermental® suspenzija	BHI, termizirano	37 °C, aerobno	Dolge palčke	<i>B. coagulans</i> (spore)
30	Fermental® suspenzija	MRS	42 °C, anaerobno	n.p.	Lactobacili
31	Prolife® pastile	BHI	37 °C, aerobno	Palčke	<i>B. coagulans</i>
32	Prolife® suspenzija	BHI	37 °C, aerobno	Palčke	<i>B. coagulans</i>
33	Prolife® suspenzija	M17	37 °C, aerobno	Palčke	<i>Str. thermophilus</i>
36	Fermental® suspenzija	BifNPNL	37 °C, anaerobno	Kratke palčke	Bifidobakterije
38	Prolife® suspenzija	ROGOSA	37 °C, anaerobno	Dolge palčke	Lactobacili
39	Prolife® kapsule	M17	42 °C, aerobno	Palčke	<i>Str. thermophilus</i>
40	Prolife® kapsule	M17, termizirano	42 °C, aerobno	Koki	<i>Str. thermophilus</i> (spore)
41	Prolife® suspenzija	ROGOSA	37 °C, anaerobno	Dolge palčke	Lactobacili
42	Prolife® suspenzija	BifNPNL	37 °C, anaerobno	Palčke	Bifidobakterije
43	Probio®	MRS+cys	37 °C, anaerobno	Kratke palčke	Bifidobakterije
44	Probio®	BifNPNL	37 °C, anaerobno	Kratke palčke	Bifidobakterije
46	Probio®	MRS	42 °C, anaerobno	Palčke	Lactobacili
47	Probio®	M17	30 °C, aerobno	n.p.	<i>Str. thermophilus</i>

se nadaljuje

nadaljevanje **Priloga A**: Seznam vseh izolatov in vzorcev probiotičnih izdelkov, uporabljenih v diplomski nalogi, ter uporabljena gojišča, pogoji kulture in oblika celic pod mikroskopom

Zap.št. vz	Izdelek	Gojišče/priprava vzorca	T, atmosfera	Oblika bakt.	Pričakovana bakterijska vrsta ali rod
48	Probio®	KVASOVKE		Palčke	
49	Probio®	MRS+cly	37 °C, anaerobno	Palčke	<i>Lb. acidophilus</i>
50	Prolife® suspenzija	BHI	42 °C, aerobno	Dolge palčke	<i>B. coagulans</i>
52	Probio®	MRS+cly	37 °C, aerobno	Kratke palčke	<i>Lb. acidophilus</i>
55	Probio®	BifNPNL	37 °C, anaerobno	Kratke palčke	Bifidobakterije
56	Ppobio®	BifNPNL	37 °C, anaerobno	Kratke palčke	Bifidobakterije
57	Prolife® suspenzija	M17	42 °C, aerobno	Palčke	<i>Str. thermophilus</i>
58	Probio®	BIF	37 °C, anaerobno	Palčke	Bifidobakterije
59	Prolif® suspenzija	BHI	42 °C, aerobno	Kratke palčke	<i>B. coagulans</i>
60	Prolife® kapsule	BHI	42 °C, aerobno	Kratke palčke	<i>B. coagulans</i>
62	Fermental® suspenzija	BHI	37 °C, aerobno	Palčke	<i>B. coagulans</i>
63	Fermental® suspenzija	BHI	37 °C, aerobno	Palčke	<i>B. coagulans</i>
65	Linex®	KAA	37 °C, aerobno	Palčke	
72	Linex® 1. vzorec	3 kap			
73	Linex® 2. vzorec	3 kap			
74	Fermental® tablete	2. tab			
75	Probio®	3 kap			
76	Prolife® pastile	2 pas			
77	Prolif® kapsule	2 kap			
78	Prolif® suspenzija	2 ml			
79	Fermental® suspenzija	2ml			
80	Probio®	Mešanica kolonij z BifNPNL		n.p.	Bifidobakterije
81	Linex® 3. vzorec	Mešanica kolonij z BifNPNL	37 °C, anaerobno	n.p.	Bifidobakterije
82	Linex® 3. vzorec	3 kapsule			
83	Probio®	Mešanica kolonij z MRS	37 °C, anaerobno	n.p.	Lactobacili
84	Prolife® suspenzija	Mešanica kolonij z M17	37 °C, aerobno	n.p.	<i>Str. thermophilus</i>
85	Probio®	Mešanica kolonij z M17	37 °C, aerobno	n.p.	<i>Str. thermophilus</i>
86	Linex® 3. vzorec	Mešanica kolonij z M17	37 °C, aerobno	n.p.	<i>Str. thermophilus</i>

Legenda

n.p....ni podatka