

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Gregor GOLOB

**PRIMERJAVA UČINKOVITOSTI GOJITVENIH IN  
NEGOJITVENIH METOD ZA DETEKCIJO  
KVASOVK V RAZLIČNIH MATRICAH ŽIVIL**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja Mikrobiologija

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Gregor GOLOB

**PRIMERJAVA UČINKOVITOSTI GOJITVENIH IN NEGOJITVENIH  
METOD ZA DETEKCIJO KVASOVK V RAZLIČNIH MATRICAH  
ŽIVIL**

MAGISTRSKO DELO  
Magistrski študij - 2. stopnja Mikrobiologija

**COMPARISON OF CULTURE AND NON-CULTURE BASED  
METHODS FOR EFFICIENT DETECTION OF YEASTS IN  
DIFFERENT FOOD MATRICES**

M. SC. THESIS  
Master Study Programmes: Field Microbiology

Ljubljana, 2014

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študija 2. stopnje mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo na Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil Oddelka za živilstvo Biotehniške Fakultete Univerze v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorico magistrskega dela imenovala doc. dr. Nežo Čadež, za somentorja prof. dr. Petra Rasporja in za recenzentko doc. dr. Polono Zalar.

Mentorica: doc. dr. Neža Čadež

Somentor: prof. dr. Peter Raspor

Recenzentka: doc. dr. Polona Zalar

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: doc. dr. Tadeja MATOS  
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Član: doc. dr. Neža ČADEŽ  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: prof. dr. Peter RASPOR  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: doc. dr. Polona ZALAR  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisani se strinjam z objavo svojega magistrskega dela na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddal v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Gregor Golob

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

|    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ŠD | Du2                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| DK | UDK 579.67:579.24:577.083:582.282.23(043)=163.6                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| KG | živilska mikrobiologija/kvasovke/določanje kvasovk/gojitvene metode/molekularne tehnika/PCR/DGGE/živila/kvar živil/vino/pivo/sir/olje/pivo/med                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| AV | GOLOB, Gregor, dipl. inž. str.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| SA | ČADEŽ, Neža (mentorica)/RASPOR, Peter (somentor)/ ZALAR, Polona (recenzentka)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| KZ | SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| ZA | Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij mikrobiologije                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| LI | 2014                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| IN | PRIMERJAVA UČINKOVITOSTI GOJITVENIH IN NEGOJITVENIH METOD ZA DETEKCIJO KVASOVK V RAZLIČNIH MATRICAH ŽIVIL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| TD | Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja Mikrobiologija)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| OP | XI, 50 str., 12 pregl., 15 sl., 17 pril., 44 vir                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| IJ | sl                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| JI | sl/en                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| AI | Kvasovke se že vrsto let uporablja v prehranski industriji kot starter kulture. V zadnjih letih so kvasovke vse bolj obravnavane tudi kot kvarljivci, pri čemer imajo lahko proizvajalci živil ogromne izgube. V želji, da bi imeli proizvajalci možnost uspešne in hitre detekcije kvasovk v živilih, smo v nalogi primerjali različne metode in njihovo učinkovitost. Za primerjavo smo si izbrali pet različnih živil: pivo, vino, olje, med in sir. V izbrana živila smo inokulirali kvasovke, ki so znani kvarljivci za izbrano živilo v koncentraciji $10^6$ kvasovk na 100 ml/g. Temu je sledila mikrobiološka analiza z dvema pristopoma. Za gojitveno metodo smo izbrali detekcijo kvarljivcev na diferencialnem gojišču WL. Druga metoda je bila negojitvena; pri njej smo izolirani DNA kvasovk, pomnožili regijo D1/D2 26S ribosomske DNA, tem pomnožkom smo v naslednjem koraku z reakcijo PCR dodali še GC zanko, in jih ločili z gelsko elektroforezo v denaturacijskem gradientu (DGGE). Rezultati kažejo v prid gojitveni metodi, saj smo iz vseh vzorcev izbranih živil na izbranih gojiščih detektirali inokulirane vrste kvasovk, prav tako pa je njihova prednost v tem, da smo lahko te vrste kvasovk razlikovali glede na morfologijo kolonij. Problem gojitvenih metod je v tem, da mora slediti identifikacija vrste. Pri negojitvenih metodah, ki so sicer hitrejše, je bil problem v učinkovitosti izolacije DNA iz živil, prav tako pa so se na DGGE gelih posamezni pasovi različnih vrst prekrivali. Z našimi rezultati pridemo do sklepa, da gojitvene metode še vedno ostajajo zlati standard pri detekciji kvasovk v živilih. |

## KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du2

DC UDC 579.67:579.24:577.083:582.282.23(043)=163.6

CX food microbiology/yeasts/determination of yeasts/culture dependant  
methods/molecular techniques/PCR/DGGE/foods/food  
spoilage/wine/beer/cheese/oil/honey

AU GOLOB, Gregor

AA ČADEŽ, Neža (supervisor)/RASPOR, Peter (co-advisor)/ZALAR, Polona  
(reviewer)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Microbiology

PY 2014

TY COMPARISON OF CULTURE AND NON-CULTURE BASED METHODS FOR  
EFFICIENT DETECTION OF YEASTS IN DIFFERENT FOOD MATRICES

DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Microbiology)

NO XI, 50 p., 12 tab., 15 fig., 17 ann., 44 ref.

LA sl

Al sl/en

AB Yeasts are used for many years in food industry as starter culture. In the last few years they are recognized as spoilage microorganisms, and as such cause food industry big financial losses. In order to enable producers for rapid and unambiguous detection of yeast in food, we compared two different approaches to detect yeast in food and evaluate their efficiency. For comparison we chose five different food matrices, beer, wine, oil, honey and cheese. In each food type, typical spoilage yeast in concentration of  $10^6$  per 100 ml/g inoculated. Afterwards, two microbiological approaches, culture-dependent and culture-independent were applied. For culture-dependent approach we chose detection of spoilage yeasts on differential WL medium for spoilage microorganisms. Second method was culture independent, by which we isolated yeast DNA directly from food matrix, with PCR reaction amplified D1/D2 region of 26S ribosomal RNA gene, followed by nested PCR add a GC clamp. PCR fragments were detected by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). Results showed that culture-based method were better for detection of yeasts, because all inoculated yeast species were detected on plates from all food samples. Further, its advantage was that different yeast species could be differentiated by their colony morphology. Culture-independent method were faster but DNA isolation from food was not efficient for all species or some bands of different species were not well separated. With our results, we conclude, culture methods are still golden standard at detection of yeasts in foods.

## KAZALO VSEBINE

|                                                              |             |
|--------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....</b>             | <b>III</b>  |
| <b>KEY WORDS DOCUMENTATION .....</b>                         | <b>IV</b>   |
| <b>KAZALO VSEBINE .....</b>                                  | <b>V</b>    |
| <b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>                               | <b>VIII</b> |
| <b>KAZALO SLIK .....</b>                                     | <b>IX</b>   |
| <b>KAZALO PRILOG .....</b>                                   | <b>X</b>    |
| <b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....</b>                            | <b>XI</b>   |
| <b>1 UVOD .....</b>                                          | <b>1</b>    |
| 1.1 CILJ RAZISKOVALNE NALOGE .....                           | 2           |
| 1.2 DELOVNE HIPOTEZE .....                                   | 2           |
| <b>2 PREGLED OBJAV .....</b>                                 | <b>3</b>    |
| 2.1 KVASOVKE KOT KVARLJIVCI.....                             | 3           |
| 2.2 TEKMOVANJE MED BAKTERIJAMI, PLESNIMI IN KVASOVKAMI ..... | 3           |
| 2.3 POJEM KVARLJIVIH KVASOVK .....                           | 3           |
| 2.4 VLOGE KVASOVK PRI KVARU HRANE .....                      | 4           |
| 2.5 UČINEK IN RAZŠIRJENOST KVARA KVASOVK.....                | 5           |
| 2.6 FAKTORJI, KI VPLIVAJO NA AKTIVNOST KVASOVK .....         | 6           |
| 2.7 PREPREČEVANJE IN SPREMLJANJE KVARA KVASOVK .....         | 6           |
| 2.7.1 Kvaliteta surovin .....                                | 6           |
| 2.7.2 Postopki obdelave .....                                | 7           |
| 2.7.3 Higiena.....                                           | 7           |
| 2.7.4 Nadzor nad kvasovkami kvarljivkami .....               | 7           |
| 2.8 ŽIVILA .....                                             | 9           |
| 2.8.1 Med .....                                              | 9           |
| 2.8.1.1 Kvar medu .....                                      | 9           |
| 2.8.2 Olje.....                                              | 11          |
| 2.8.2.1 Pridobivanje oljčnega olja.....                      | 11          |
| 2.8.2.2 Shranjevanje .....                                   | 11          |
| 2.8.2.3 Kvar oljčnega olja .....                             | 11          |

|              |                                                                                      |           |
|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>2.8.3</b> | <b>Pivo.....</b>                                                                     | <b>12</b> |
| 2.8.3.1      | Varjenje piva .....                                                                  | 12        |
| 2.8.3.2      | Fermentacija piva .....                                                              | 12        |
| 2.8.3.3      | Zorenje piva.....                                                                    | 13        |
| 2.8.3.4      | Kvar piva .....                                                                      | 13        |
| 2.8.3.5      | Kvasovke .....                                                                       | 13        |
| <b>2.8.4</b> | <b>Vino .....</b>                                                                    | <b>14</b> |
| 2.8.4.1      | Kvasovke ki povzročajo kvar vina .....                                               | 14        |
| <b>2.8.5</b> | <b>Sir .....</b>                                                                     | <b>15</b> |
| 2.8.5.1      | Kvarljivci sira .....                                                                | 15        |
| <b>2.9</b>   | <b>OD GOJITEV NEODVISNE METODE, KI SE UPORABLJAJO V ŽIVILSKI MIKROBIOLOGIJI.....</b> | <b>16</b> |
| <b>2.9.1</b> | <b>Analiza DGGE DNA proti RNA .....</b>                                              | <b>18</b> |
| <b>3</b>     | <b>MATERIALI IN METODE .....</b>                                                     | <b>19</b> |
| <b>3.1</b>   | <b>METODE.....</b>                                                                   | <b>20</b> |
| 3.1.1        | Izolacija DNA kvasovk iz sira.....                                                   | 20        |
| 3.1.2        | Izolacija DNA kvasovk iz vina.....                                                   | 20        |
| 3.1.3        | Izolacija DNA kvasovk iz olja.....                                                   | 20        |
| 3.1.4        | Izolacija DNA kvasovk iz medu .....                                                  | 21        |
| 3.1.5        | Izolacija DNA kvasovk iz piva.....                                                   | 21        |
| 3.1.6        | Pomnoževanje DNA in začetni oligonukleotidi.....                                     | 21        |
| 3.1.7        | Pomnoževanje PCR produkta z GC zanko za DGGE .....                                   | 22        |
| 3.1.8        | DGGE .....                                                                           | 22        |
| 3.1.9        | Priprava živil za nacepitev na gojišče .....                                         | 23        |
| 3.1.9.1      | Vino .....                                                                           | 23        |
| 3.1.9.2      | Pivo.....                                                                            | 23        |
| 3.1.9.3      | Med.....                                                                             | 23        |
| 3.1.9.4      | Olje .....                                                                           | 23        |
| <b>3.2</b>   | <b>MATERIALI .....</b>                                                               | <b>23</b> |
| 3.2.1        | Komplet za izolacijo DNA.....                                                        | 23        |
| 3.2.2        | Agarozni gel .....                                                                   | 24        |
| 3.2.3        | 50 x TAE pufer.....                                                                  | 24        |

|       |                                           |    |
|-------|-------------------------------------------|----|
| 3.2.4 | Lizni pufer za vino (za 50 ml) .....      | 24 |
| 3.2.5 | CTAB ekstrakcijski pufer (za 30 ml) ..... | 24 |
| 3.2.6 | Reagenti za PCR .....                     | 25 |
| 3.2.7 | Gojišče WL .....                          | 25 |
| 3.2.8 | Mikroorganizmi .....                      | 25 |
| 3.2.9 | Živila .....                              | 26 |
| 4     | REZULTATI .....                           | 28 |
| 4.1   | VINO .....                                | 28 |
| 4.1.1 | Gojitvene metode .....                    | 28 |
| 4.1.2 | Negojitvene metode.....                   | 29 |
| 4.2   | PIVO .....                                | 31 |
| 4.2.1 | Gojitvene metode .....                    | 31 |
| 4.2.2 | Negojitvene metode.....                   | 32 |
| 4.3   | MED.....                                  | 33 |
| 4.3.1 | Gojitvene metode .....                    | 33 |
| 4.3.2 | Negojitvene metode.....                   | 34 |
| 4.4   | OLJE .....                                | 35 |
| 4.4.1 | Gojitvene metode .....                    | 35 |
| 4.4.2 | Negojitvene metode.....                   | 36 |
| 4.5   | SIR .....                                 | 37 |
| 5     | RAZPRAVA .....                            | 39 |
| 5.1   | DETEKCIJA KVASOVK V VINU .....            | 39 |
| 5.2   | DETEKCIJA KVASOVK V PIVU .....            | 40 |
| 5.3   | DETEKCIJA KVASOVK V MEDU.....             | 41 |
| 5.4   | DETEKCIJA KVASOVK V OLJU.....             | 41 |
| 5.5   | DETEKCIJA KVASOVK V SIRU .....            | 42 |
| 6     | SKLEPI .....                              | 44 |
| 7     | POVZETEK.....                             | 45 |
| 8     | VIRI.....                                 | 46 |

## KAZALO PREGLEDNIC

|                                                                                                                |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Preglednica 1: Glavne vrste kvasovk, ki povzročajo kvar živil (Loureiro in Malfeito-Ferreira, 2003).....       | 4  |
| Preglednica 2: Učinki kvara kvasovk pri različnih živilih (Loureiro in Malfeito-Ferreira, 2003) .....          | 5  |
| Preglednica 3: Povezava vsebnosti vode v medu (%) in nagnjenosti k fermentaciji (Poklukar in sod., 1998):..... | 10 |
| Preglednica 4: Sestava liznega pufra za vino .....                                                             | 24 |
| Preglednica 5: Sestava CTAB ekstrakcijskega pufra .....                                                        | 24 |
| Preglednica 6: Sestava mešanice PCR.....                                                                       | 25 |
| Preglednica 7: Uporabljeni sevi mikroorganizmov .....                                                          | 26 |
| Preglednica 8: Število kolonij na ploščah WL z redčenim vinom .....                                            | 29 |
| Preglednica 9: Število posameznih kolonij na WL ploščah nacepljenim s pivom.....                               | 31 |
| Preglednica 10: Število posameznih kolonij na WL ploščah nacepljenim z medom.....                              | 34 |
| Preglednica 11: Število posameznih kolonij na WL ploščah nacepljenim z oljem.....                              | 36 |
| Preglednica 12: Rezultati gojitvenih metod pri vzorcih sira (Šuranska in sod., 2014) .....                     | 38 |

## KAZALO SLIK

|                                                                                                                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Slika 1: Glavne točke vzorčenja za kontrolo prisotnosti kvarljivih kvasovk v polnilnici vina (Loureiro in Malfeito-Ferreira, 2003).....                       | 8  |
| Slika 2: Shema dela .....                                                                                                                                     | 19 |
| Slika 3: Gojišče WL z nacepljenim vinom teran, začetna koncentracija kvasovk $10^6$ celic v 100 ml, redčitev $10^{-4}$ .....                                  | 28 |
| Slika 4: Gojišče WL z nacepljenim vinom laški rizling, začetna koncentracija kvasovk $10^6$ celic v 100 ml, redčitev $10^{-4}$ .....                          | 28 |
| Slika 5: Gojišče WL z nacepljenim vinom cviček, začetna koncentracija kvasovk $10^6$ celic v 100 ml, redčitev $10^{-4}$ .....                                 | 28 |
| Slika 6: Rezultati DGGE za vino.....                                                                                                                          | 30 |
| Slika 7: Gojišče WL z nacepljenim pivom, začetna koncentracija kvasovk $10^6$ celic v 100 ml, redčitev $10^{-4}$ z označenimi različnimi vrstami kvasovk..... | 31 |
| Slika 8: Rezultati DGGE za pivo.....                                                                                                                          | 32 |
| Slika 9: Gojišče WL z nacepljenim gozdnim medom, začetna koncentracija kvasovk $10^6$ celic v 100 ml, redčitev $10^{-4}$ .....                                | 33 |
| Slika 10: Gojišče WL z nacepljenim akacijevim medom, začetna koncentracija kvasovk $10^6$ celic v 100 ml, redčitev $10^{-4}$ .....                            | 33 |
| Slika 11: Rezultati DGGE za med.....                                                                                                                          | 34 |
| Slika 12: Gojišče WL z nacepljenim ekstra deviškim oljem, začetna koncentracija kvasovk $10^6$ celic v 100 ml, redčitev $10^{-4}$ .....                       | 35 |
| Slika 13: Gojišče WL z nacepljenim bučnim oljem, začetna koncentracija kvasovk $10^6$ celic v 100 ml, redčitev $10^{-4}$ .....                                | 35 |
| Slika 14: Rezultati DGGE za olje.....                                                                                                                         | 36 |
| Slika 15: Rezultati DGGE pomnoženih DNA fragmentov iz vzorcev sira .....                                                                                      | 37 |

## KAZALO PRILOG

- Priloga A: Morfologija kolonij *Pichia membranifaciens* - ZIM 2304  
Priloga B: Morfologija kolonij *Dekkera/Brettanomyces anomala* – ZIM 701  
Priloga C: Morfologija kolonij *Meyerozyma guilliermondii* – ZIM 725  
Priloga D: Morfologija kolonij *Hanseniaspora uvarum* – ZIM 670  
Priloga E: Morfologija kolonij *Candida zemplinina* – ZIM 842  
Priloga F: Morfologija kolonij *Pichia kudriarzevii* – ZIM 2502  
Priloga G: Morfologija kolonij *Zygosaccharomyces bailii* – ZIM 850  
Priloga H: Morfologija kolonij *Schizosaccharomyces pombe* – ZIM 778  
Priloga I: Morfologija kolonij *Candida parapsilopsis* – ZIM 2499  
Priloga J: Morfologija kolonij *Saccharomyces ludwigii* - ZIM 1777  
Priloga K: Morfologija kolonij *Candida tropicalis* – ZIM 2011  
Priloga L: Morfologija kolonij *Pichia anomala* - ZIM 2301  
Priloga M: Morfologija kolonij *Pichia fermentas* – ZIM 2398  
Priloga N: Morfologija kolonij *Saccharomyces diastaticus* – ZIM 784  
Priloga O: Morfologija kolonij *Saccharomyces cerevisiae* – ZIM 753  
Priloga P: Morfologija kolonij *Zygosaccharomyces rouxii* – ZIM 2238  
Priloga Q: Morfologija kolonij *Candida boidinii* – ZIM 2228

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

|             |                                                             |
|-------------|-------------------------------------------------------------|
| <b>APS</b>  | amonijev persulfat                                          |
| <b>bp</b>   | bazni par, enota dolžine zaporedja nukleinske kisline       |
| <b>DGGE</b> | poliakrilamidna gelska elektroforeza v gradientu denaturata |
| <b>DNA</b>  | deoksiribonukleinska kislina                                |
| <b>GC</b>   | bazi gvanin in citozin                                      |
| <b>PCR</b>  | verižna reakcija s polimerazo                               |
| <b>rDNA</b> | zapis DNA, ki kodira rRNA                                   |
| <b>RNA</b>  | ribonukleinska kislina                                      |
| <b>VBNC</b> | žive vendar ne-kultivabilne celice                          |
| <b>WL</b>   | Wallersteinov-o gojišče                                     |
| <b>YPD</b>  | kvasni ekstrakt-pepton-glukozno gojišče                     |
| <b>ZIM</b>  | zbirka industrijskih mikroorganizmov                        |

## 1 UVOD

V zadnjih 30-ih letih je prišlo do velikih sprememb v pristopu mikrobioloških preiskav hrane. Z odkritjem verižne reakcije s polimerazo - PCR je prišlo do novih strategij preučevanja mikroorganizmov povezanih s hrano. V preteklosti se je za gojenje mikroorganizmov uporabljalo sintetično gojišče in to je bil edini način preiskave hrane, s prihodom PCR pa lahko sklepamo na prisotnost določenih mikroorganizmov preko njihove izolacije in analizo DNA, brez predhodnega gojenja. V začetku se je PCR uporabljal kot metoda za detekcijo DNA izoliranih iz čistih kultur mikroorganizmov. Ob koncu 90-ih pa se je razvilo več metod povezanih s PCR, te tehnike so omogočile znanstvenikom študije kompleksnih mikrobni ekosistemov (nastane pojem od gojenja neodvisne metode). Ta pojem zajema uporabo metod, ki ne temeljijo na gojenju, za preučevanje mikroorganizmov v določenih ekosistemih. Nedvomno, od gojitev neodvisne metode ponujajo število prednosti pred gojitvenimi metodami. Mikroorganizme proučujejo na osnovi njihove DNA, RNA in proteinov, ki so primarne tarče teh pristopov. Nadalje, fiziološko stanje mikrobni celic ne vpliva na rezultat preiskav. Pri tradicionalnih preiskavah pa so celice izpostavljene stresu in zato velikokrat ne rastejo na umetnem gojišču, ki vsebuje snovi, kot so antibiotiki. Tako lahko ustvarimo selektivno gojišče, kar vodi v lažno negativne rezultate. Nazadnje, populacij, ki so številčno manj pomembne, ne uspemo zaznati s tradicionalnimi metodami, ker jih prerastejo hitreje rastoči in mikroorganizmi. Večino problemov lahko rešimo z metodami, ki so neodvisne od gojenja (Cocolin in sod., 2013).

S predstavitvijo od gojitev neodvisnih metod so lahko znanstveniki odkrili omejitve gojenja mikrobov in leta 1998 je Hugenholtz s sodelavci objavil članek, v katerem je zapisal: »Naše poznavanje mikrobne različnosti je omejeno na gojenje mikroorganizmov. Ocenjujejo, da >99 % mikroorganizmov, ki jih najdemo v naravi, ne moremo gojiti s standardnimi tehnikami«. Tak dokaz je spodbudil raziskovalce k uporabi od gojitev neodvisnih metod na različnih področjih mikrobiologije. Pri živilski mikrobiologiji predstavljajo 90. leta ključno obdobje uporabe teh pristopov in prvih člankov ki se ukvarjajo s študijami mikrobne ekologije fermentirane hrane. En vidik, ki je bil kmalu opazen v pionirskih študijah, je bila prisotnost negojitvenih populacij v prehranskih sistemih, in ti rezultati so se ujemali z rezultati, ki so bili dobljeni na drugih področjih mikrobiologije, kot sta okoljska mikrobiologija in mikrobiologija prebavnega trakta. Prej jih niso nikoli zaznali s tradicionalnimi metodami, te populacije so bile prvič opisane z od gojenja neodvisnimi metodami. To stanje so imenovali »viable but not culturable« (VBNC) (Oliver, 1993) in celice opisuje kot metabolno aktivne, vendar pa nezmožne delitve, ki je potrebna za rast v ali na gojišču, ki običajno podpira rast celic, to lahko smatramo za strategijo preživetja kot odziv na neugodne okoljske pogoje (npr. stradanje, kislini stres). VBNC stanje je zaskrbljujoče, če je povezano s patogeni, ki se pojavijo v hrani, ker ne vemo kakšno tveganje predstavljajo VBNC celic. Ne moremo predvidevati, da te celice ne bodo začele rasti, ko bodo prišle v človeško telo in povzročile bolezen. Nadaljnje, možen je tudi vpliv pri

fermentaciji hrane, VBNC celice so odgovorne za biokemične aktivnosti pri oblikovanju končnih značilnosti produkta (Cocolin in sod., 2013).

Na področju živilske mikrobiologije se od gojitev neodvisne metode uporabljajo kot orodje za dobivanje profilov mikrobnih združb v ekosistemi, največ se uporabljajo pri fermentaciji hrane in pri kvaru hrane, v nekaterih primerih se tudi uporabljajo za študij ekologije prehranskih patogenov (Cocolin in sod., 2013).

Na splošno verjamemo, da je prisotnost kvasovk v hrani neškodljiva za javno zdravstvo, čeprav pride občasno do pojava alergij. Odsotnost patogenih kvasovk povezanih s hrano je zmanjšal interes v primerjavi z bakterijami in plesnimi, zato se je dolgo podcenjevalo njihovo pomembnost kot kontaminantov hrane. V zadnjem času kvasovke postajajo pomemben faktor pri kvaru hrane, kar vključuje vidne in zaznavne škodljive fizikalne in senzorične lastnosti hrane. Te nezaželene aktivnosti so odgovorne za resne ekonomske izgube, o katerih se večinoma ne poroča zaradi zaupnosti družb, ki so vključene od proizvajalcev, dobaviteljev surovega materiala, pakiranje do trgovanja (Loureiro in Malfeito-Ferreira, 2003).

## 1.1 CILJ RAZISKOVALNE NALOGE

Cilj naloge je izdelati postopke za učinkovito izolacijo DNA iz različnih živil in za pomnožitev informativne regije DNA z reakcijo PCR, ter določiti prisotnost kvarljivcev z metodo DGGE, vzporedno pa vzorce živil prav tako analizirati z gojitveno metodo na diferencialnem gojišču, ter primerjati uspešnost različnih metod.

## 1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- Pri primerjavi metod pričakujemo, da bomo z gojitvenimi metodami dobili boljše rezultate, saj predstavljajo standard za vpeljavo novejših in hitrejših gojitvenih metod.
- Ker ima vsako živilo svojevrstno sestavo, katere komponente vplivajo na učinkovitost izolacije DNA, bo potrebno metodo neposredne izolacije DNA iz različnih matrikov živil prilagoditi le-tim.
- Pri gojitvenih metodah zaradi različne stopnje hitrosti rasti različnih vrst kvasovk ne pričakujemo, da bomo zaznali vse vrste, saj bodo nekatere vrste prevladale.
- Različne vrste kvasovk imajo podobno sestavo baz regije gena za 26S rRNA, zato se v denuracijskem gradientu elektroforeze ne bodo ločile. S tem ne bo mogoče razlikovati med različnim vrstami kvasovk.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 KVASOVKE KOT KVARLJIVCI

Kvasovke so mikroorganizmi, ki so v splošnem prepoznani kot ugodne komponente v prehranskem sistemu, odkar poznamo njihovo vlogo pri predelavi hrane, sploh v kruhu, in fermentiranih pijač kot na primer v vinu, pivu ter jabolčniku. V zadnjem času se je njihova vloga močno okrepila, saj lahko kvasovke dobimo tudi v obliki kapsul kot vir B-kompleksa, vitaminov in se medicinsko predpisujejo za različna stanja. Pa vendar so lahko kvasovke odgovorne tudi za nezaželene učinke, kot je kvar hrane (Loureiro in Malfeito-Ferreira, 2003).

### 2.2 TEKMOVANJE MED BAKTERIJAMI, PLESNIMI IN KVASOVKAMI

Mikrobiota, ki lahko okuži hrano, je sestavljena v večini primerov iz mešanih populacij bakterij, plesni in kvasovk. Mikrobna sprememba postane tekmovalni proces med različnimi skupinami mikroorganizmov, prevladajo tisti, ki so bolj prilagojeni na okoljske razmere na posameznem produktu (Fleet, 2007).

V prehranskih proizvodih, pri optimalnih rastnih pogojih populacije večine bakterij prevladujejo nad plesnimi in kvasovkami, ker hitreje rastejo. Bakterije imajo običajni generacijski čas manjšega od 1 ure, v nekaterih primerih tudi 10-15 min, plesni in kvasovke lahko potrebujejo več ur (ali dni) za podvojitev. Zato lahko plesni in kvasovke tekmujejo z bakterijami le kadar okoljski pogoji zmanjšajo bakterijsko aktivnost. Nizek pH in nizka vodna aktivnost ( $a_w$ ) spodbujata rast plesni in kvasovk, ker so bolj odporne na kislino in so bolj kserotolerantne kot bakterije. Prisotnost kemičnih konzervansov, večina kislinskih, je tudi manj inhibitorna za plesni in kvasovke (Viljoen, 2006).

Aktivnost kvasovk lahko vodi do kasnejše bakterijske aktivnosti, kot pri kislinsko fermentirani hrani. V tem primeru organske kisline porabijo kvasovke, ki tvorijo film, to vodi v zmanjšanje kislosti, kar pa omogoči rast bakterijam. Tekmovanje med plesnimi in kvasovkami je odvisna od dostopnosti kisika. Prvi so obligatni aerobi, drugi pa so lahko fakultativni, ki rastejo pod aerobnimi ali anaerobnimi pogoji. Zato kvasovke večkrat najdemo v tekočinah, kjer so dobri aerobni pogoji le na interfazi zrak tekočina, medtem ko filamentozne glive prevladujejo na trdni hrani (Fleet, 2003).

### 2.3 POJEM KVARLJIVIH KVASOVK

Izmed vseh kvasovk izoliranih iz narave jih približno 1500 vrst danes prepoznajo taksonomi (Kurtzman in Piškur, 2005). Izmed teh jih približno četrtino lahko izoliramo iz hrane, ampak samo nekatere imajo pomembno vlogo pri predelavi hrane. Tiste, ki ne vplivajo na hrano jih imamo za naključne ali preproste kvasovke; tiste, ki pa so odgovorne za nezaželene spremembe v hrani in pijači pa jih imamo za kvasovke kvarljivke. Za živilske tehnologe ima pojem kvasovk kvarljivk bolj omejen pomen. V zakup vzamejo samo, če je določena vrsta

zmožna kvara hrane in pijače, ki je bila predelana in zapakirana po standardih dobre proizvodnje prakse. Moramo poudariti, da je pojem kvasovk kvarljivk povezan s tipom proizvoda in s trenutkom, ko kvasovke začnejo kazati aktivnost. Na primer, pri produkciji vina so nujno potrebne za fermentacijo kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*. Kakorkoli, kasneje v produkcijskih procesih, pa se to vrsto smatra za nevarnega kvarljivca v sladkih ustekleničenih vinih, kar lahko vidimo v preglednici 1, ker lahko fermentira ostanke sladkorjev (Loureiro in Malfeito-Ferreira, 2003)

Preglednica 1: Glavne vrste kvasovk, ki povzročajo kvar živil (Loureiro in Malfeito-Ferreira, 2003)

| Vrsta hrane                | Proizvodi                                                                | Vrste kvasovk                                                                                                                                                                                                                |
|----------------------------|--------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Sveže sadje in zelenjava   | Jagode, fige, paradižnik                                                 | <i>Hanseniaspora/Kloeckera</i> spp.                                                                                                                                                                                          |
| Hlajena in zmrznjena hrana | Sladoleđ, zmrznjen fižol                                                 | <i>Rhodotorula</i> spp.                                                                                                                                                                                                      |
| Pasterizirana hrana        | Jogurt, sadni sokovi, kečap                                              | <i>Kluyveromyces marxianus</i> ,<br><i>Saccharomyces cerevisiae</i> ,<br><i>Zygosaccharomyces bailii</i>                                                                                                                     |
| Konzervirana hrana         | Majoneza, solatni dresing, omake                                         | <i>Brettanomyces/Dekkera</i> spp.,<br><i>Issatchenkia orientalis</i> ,<br><i>Pichiamembranifaciens</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>Saccharomycodes ludwigii</i> , <i>Schizosaccharomyces pombe</i> , <i>Z. bailii</i>        |
| Fermentirana hrana         | Kumarice, olive, kislo zelje, siri, klobase                              | <i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>I. orientalis</i> , <i>P. membranifaciens</i> , <i>Yarrowia lipolytica</i> , <i>Z. bailii</i>                                                                                              |
| Alkoholne pijače           | Vino, pivo, cider                                                        | <i>Brettanomyces/Dekkera</i> spp.,<br><i>Pichia anomala</i> , <i>P. membranifaciens</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>S. cerevisiae</i> var. <i>diastaticus</i> , <i>Sac. ludwigii</i> , <i>Sc. pombe</i> , <i>Torulaspora</i> |
| Koncentrirani produkti     | Suho sadje, džemi, med, sadni koncentraciji, polnjene čokolade, marcipan | <i>Candida versatilis</i> , <i>D. hansenii</i> , <i>P. anomala</i> , <i>T. delbrueckii</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>Sc. pombe</i> , <i>Z. bailii</i> , <i>Z. rouxii</i> , <i>Z. bisporus</i>                              |

## 2.4 VLOGE KVASOVK PRI KVARU HRANE

Med dejavniki, ki so prispevali k večji pomembnosti vloge kvasovk pri predelavi hrane, so uporaba modernih tehnologij pri proizvodnji hrane, velika pestrost novih oblik hrane in pijače in strmenje k zmanjšanju uporabe konzervansov, posebno tistih, ki delujejo proti kvasovkam, kot so žveplov dioksid in benzojska kislina. Moderne tehnologije poskušajo vpeljati manj stroge razmere pri procesiranju tako, da se lahko ohrani čim več vonja, okusa in naravnih barv. Zato se na primer pri toplotni obdelavi proizvodov zelenjavnega izvora bolj uveljavlja hladno polnjenje po visoko temperaturni kratkočasovni pasterizaciji, kar precej poveča tveganje za kontaminacijo s kvasovkami in posledično tveganje za kvar. Nove oblike hrane in pijače z uporabo sokov in koncentriranega sadja, sadnih sirupov, narezanega

sadja, različni tipi jogurtov, so prav tako pomembno prispevali k pomembnosti kvasovk kot kvarljivci. Na enak način, nizko kalorična hrana, kjer konzerviranje ni več odvisno od učinka velike koncentracije sladkorja, kar ustavi vodno aktivnost, so dobra okolja za aktivnost kvasovk (Loureiro in Malfeito-Ferreira, 2003).

## 2.5 UČINEK IN RAZŠIRJENOST KVARA KVASOVK

Najbolj pogost učinek kvara sladko-kislih pijač je opisan z veliko produkcijo plina, ki lahko poškoduje ali eksplodira embalažo, povzroči lahko motnostjo, sediment ali nastanek filma, slabe vonjave in spremenjen okus (preglednica 2). Slabšanje hrane in pijače s kvasovkami se lahko kaže tudi z drugačnim učinkom, ki je lahko bolj ali manj opazen, odvisno od tipa hrane. Kakorkoli, v nekaterih primerih kvar kvasovk ni jasno izražen, večinoma pri fermentirani hrani in pijači (vina, piva, črne oljke, sojina omaka, siri), kjer metabolni produkti prispevajo k okusu in aromi. Razlikovanje med škodljivimi in koristnimi aktivnostmi niso vedno jasno ločene. Na primer, 4-etilfenol je produkt kvasovk *Brettanomyces/Dekkera* v rdečih vinih, ki se smatra kot kvar, kadar je ta sekundarni metabolit prisoten v koncentraciji večji kot  $700 \mu\text{g l}^{-1}$ . Pri koncentraciji manjši kot  $400 \mu\text{g l}^{-1}$  ugodno prispeva h kompleksnosti vinske arome (Loureiro in Malfeito-Ferreira, 2003).

Preglednica 2: Učinki kvara kvasovk pri različnih živilih (Loureiro in Malfeito-Ferreira, 2003)

| živilo                               | Izražanje kvara |                  |         |          |      |                       |                    |
|--------------------------------------|-----------------|------------------|---------|----------|------|-----------------------|--------------------|
|                                      | Sprememba barve | Produkcija plina | Motnost | Usedlina | Film | Sprememba vonja/okusa | Sprememba teksture |
| Sveže sadje in zelenjava             | x               | x                |         |          |      | x                     | x                  |
| Vložena zelenjava                    | x               | x                | x       | x        | x    | x                     | x                  |
| Sadni sokovi, vino, pivo             |                 | x                | x       | x        | x    | x                     |                    |
| Majoneza, solatni dressing           | x               | x                |         |          | x    | x                     | x                  |
| Slaščice                             | x               | x                |         |          | x    | x                     | x                  |
| Sirup, med, sadni koncentrat         |                 | x                | x       |          | x    | x                     |                    |
| Maslo, smetana                       | x               |                  |         |          |      | x                     |                    |
| Siri, jogurt                         | x               | x                |         |          |      | x                     |                    |
| Narezan kruh, nepečeno testo za kruh | x               |                  |         |          |      | x                     |                    |
| Klobase, mesni proizvodi             | x               | x                |         |          |      | x                     |                    |

Količina mikroorganizmov ni jasni indikator za kvar produkta. Na primer, v sirih, prekajenem mesu in pivu je število kvasovk med  $10^5$  in  $10^8$  celic/g, kar jim ne zmanjša vrednosti: prav nasprotno, predvideva se, da jim izboljšajo aromatsko kompleksnost. V drugih primerih lahko  $10^5$  / g celic povzroči kvar. To je primer, kjer se tvorijo vidne skupine celic v ustekleničenih belih vinih, ali pri nastanku površinskih barvnih madežev zaradi kolonij kvasovk na določeni trdni hrani, kot na primer v klobasi brez ovoja ali narezanem kruhu (Loureiro in Malfeito-Ferreira, 2003).

## 2.6 FAKTORJI, KI VPLIVAJO NA AKTIVNOST KVASOVK

Mikrobiološko stabilnost hrane in pijače lahko dosežemo s celotno odstranitvijo mikroorganizmov pred pakiranjem v končne proizvode, kot je npr. pri sterilni filtraciji pijače brez suspendiranih trdnih delcev. Lahko jo dosežemo s popolnim uničenjem mikroorganizmov, kot je toplotna sterilizacija, pasterizacija, gama sevanje ali z inhibicijo metabolne aktivnosti z zmrzovanjem. V večini primerov je mikrobiološka stabilnost hrane odvisna od inhibicije ali zmanjšanja mikrobiološke aktivnosti z ustvarjanjem enega ali več neugodnih pogojev, kot je nizka vodna aktivnost (sušenje, koncentriranje in soljenje hrane), nizek pH (kislota hrana), nizke temperature (ohlajena hrana) in prisotnost inhibitorjev (konzervirana hrana). V primeru sterilne filtracije toplotne obdelave, pasterizacije pod visokim pritiskom, gama sevanje je kontaminacija z mikroorganizmi mogoča le v primeru procesne napake ali pa, ko se kontaminacija zgodi po obdelavi (Sivasankar, 2002).

## 2.7 PREPREČEVANJE IN SPREMLJANJE KVARA KVASOVK

Če kvasovke povzročijo kvar živilskega proizvoda, takrat smatramo, da so prisotne kot kontaminanti. Okoljski pogoji jim v tem primeru omogočajo, da se hitreje razmnožujejo in so bolj odporne kot drugi mikroorganizmi. Preprečitev kvara z manj konzervansi in blažjimi tehnološkim procesiranjem, zahteva dobro razumevanje problema. Mikrobiolog potrebuje orodje, da lahko oceni celotno mikrobiološko združbo. Pri zapisu dobre proizvodnje in distribucijske prakse se mora upoštevati več pogojev, da preprečimo ali kontroliramo aktivnost kvarljivih kvasovk: (1) dobra kvaliteta surovin t.j. z majhnim številom mikrobov; (2) primerno in učinkovito higieno; (3) ustrezni in učinkoviti postopki obdelave; (4) skrben nadzor nad kvarljivimi kvasovkami (Loureiro in Malfeito-Ferreira, 2003).

### 2.7.1 Kvaliteta surovin

Mikrobiološka kakovost surovin je pomembna pri preprečevanju in kontroli kvasovk kvarljivk. Zaradi večje prvotne kontaminacije se poveča tveganje za neuspeh tehnoloških procesov. Naravne surovine, kot so sadje in sladkorni trs, imajo naključno bakterijsko floro, ki v živilih ni aktivna, po predelavi pa se zlahka nadzoruje z dobro proizvodnjo prakso. Če so surovine že obdelane, kot so na primer sadni koncentрати, sadni sokovi, sirupi in sladkor, ali v mnogih živilih kompleksne oblike, kot so na primer sladice, jogurti, koncentрати sadnih sokov ali polnjene čokolade, je ta kontaminacija s kvasovkami bolj nevarna. Do tega stanja

pride, zaradi množice kvasovk kvarljivk, ki so visoko odporne na okoljski stres, ki je prisoten med obdelavo naravnih surovin (Loureiro in Malfeito-Ferreira, 2003).

### 2.7.2 Postopki obdelave

Najučinkovitejša metoda za nadzor aktivnosti kvarnih kvasovk je toplotna obdelava pakirane hrane in pijače. Na žalost obstaja malo proizvodov, kjer je to mogoče brez dodatnih učinkov na kakovost prehranskih produktov. Med ukrepi, ki preprečujejo kvar s kvasovkami naj omenim še naslednje (Loureiro in Malfeito-Ferreira, 2003):

- **dodatek konzervansov**: dodamo jih takoj po pakiranju, da se izognemo stiku s kvasovkami, kar bi lahko vodilo do adaptacije in povečane rezistence na konzervanse,
- **odstranitev kisika**: kisik izčrpamo s pomočjo izsesavanja zraka ali z uvajanjem inertnih plinov pred pakiranjem, da preprečimo metabolizem kvasovk;
- **preprečitev navzkrižne kontaminacije**: predvsem pri predelavi rastlin, kjer se uporablja več različnih proizvodov, kot so džemi in sadni sokovi,
- **shranjevanje prehranskih proizvodov**: shranjujemo jih pri nizkih temperaturah, še posebej proizvode, ki vsebuje snovi, ki so bolj dovzetne za aktivnost kvasovk.

### 2.7.3 Higiena

Glavni vir kontaminacije s kvasovkami so ostanki hrane, ki ostanejo na opremi po nepopolnem čiščenju in razkuževanju. Pomembno je, da zagotovimo visoke standarde pri higieni, pri kateri morajo veljati določeni pogoji (Loureiro in Malfeito-Ferreira, 2003):

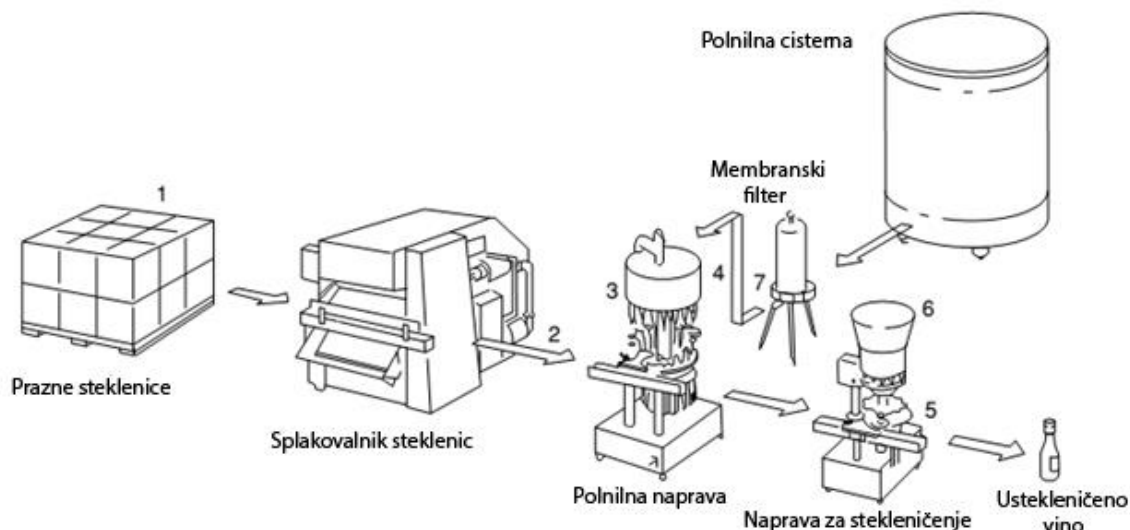
- primerna razporeditev v tovarni in dostopna oprema,
- poznavanje mest, kjer najverjetneje pride do kontaminacije s kvasovkami kot so filtrne glave, ventili, merilniki tlaka, slepi konci na sterilizacijskih filtrih, pumpe, ležaji mešalcev in zamaški,

### 2.7.4 Nadzor nad kvasovkami kvarljivkami

Živilski mikrobiološki nadzor ne zagotavlja zadovoljivih informacij za učinkovito preprečevanje kvasovk kvarljivk. Glavni razlogi za to so (Loureiro in Malfeito-Ferreira, 2003):

- pomanjkanje gojišč za gojenje in identifikacijo, ki nam ne zagotovijo razlikovanja med naključnimi in kvarljivimi vrstami, na primer večkrat se ne sme uporabljati isto gojišče za štetje kvasovk in plesni,
- postopki za vzorčenje so običajno statistično neprimerne zaradi časovnih in stroškovnih omejitev;
- velikost vzorca je pogosto neprimerna za zaznavo kontaminacije v majhni količini,
- pomanjkanje referenčnih vrednosti, ki so potrebne za primerno interpretacijo števila kvasovk.

Mikrobiološka kontrola nam omogoča določitev kritičnih kontrolnih točk v procesni liniji in oceno njihove relativne pomembnosti kot vir izbruha kvarljivih kvasovk. Kritične točke so odvisne od kakovosti opreme. Na primer, v liniji stekleničenja vin s slabo zasnovanimi polnilnimi stroji, so glavne kritične točke prikazane na sliki 1 (Loureiro in Malfeito-Ferreira, 2003).



Slika 1: Glavne točke vzorčenja za kontrolo prisotnosti kvarljivih kvasovk v polnilnici vina (Loureiro in Malfeito-Ferreira, 2003). Prazne steklenice (1) so pogosto okužene z glivami, nekaterimi bakterijami (običajno s tistimi, ki tvorijo spore) in naključnimi kvasovkami; po umivanju/splakovanju (2) se pogosto vidi povečanje mikrobiološke obremenitve, lahko pride do okužbe s kvasovkami (približno 5 % izbruhov). Polnilna naprava je običajno glavni povzročitelj kontaminacije (50 % primerov), prav zaradi pomanjkanja dezinfekcije polnilnih glav (3). Naprava za stekleničenje je odgovorna za 30 % izbruhov, v glavnem zaradi kontaminacije čeljusti za pluto (5) in zamaškov samih (6); membranski filtri so občasno (10 % primerov) vir okužb, kadar pride do pretrganja membrane.

Poleg detekcije in štetja kvasovk, mikrobiološka kontrola stremi k tipizaciji ali identifikaciji kvasovk kvarljivk. Klasična identifikacija temelji na fizioloških, biokemičnih, ali spolnih karakteristikah in se ne more rutinsko uporabljati v živilski industriji. Zato so razvili različne minimalizirane in poenostavljene identifikacijske metode. Kakorkoli, temeljijo na enakih pristopih kot klasične metode za identifikacijo kvasovk in so dolgotrajne, čeprav so postopki avtomatizirani in računalniško vodeni, vseeno pogosto dobijo napačne ali nezanesljive identifikacije. Za preprečitev teh težavnosti so razvili alternativne hitrejše metode tipizacije, med drugim, analiza skupnih proteinov, skupnih dolgo verižnih maščobnih kislin in izoencimov. Poleg tega se je v zadnjem času zelo razvila molekularna biologija, ki omogoča zelo specifične tehnike, npr. RFLP mitohondrijske DNA, elektroforeza kromosomske DNA, analiza z restrikcijskimi encimi s PCR pomnoženo ribosomsko DNA in različni testi pomnožene polimorfne DNA (Loureiro in Malfeito-Ferreira, 2003).

## 2.8 ŽIVILA

### 2.8.1 Med

Med je gosto tekoče ali kristalizirano živilo, ki ga pridelajo čebele. Nastane iz različnih virov: iz cvetličnega nektarja ali drugih izločkov živih rastlinskih delov ali pa iz različnih vrst mane, to je izločkov žuželk, ki so na živih delih rastlin. Osnovni material prinašajo čebele v panj, ga obdelajo, mu dajo izločke svojih žlez, ga zgostijo in nato shranjujejo v pokritih celicah satja (Poklukar in sod., 1998).

#### 2.8.1.1 Kvar medu

Primarni viri okužbe so najverjetneje cvetni prah, prebavni trakt čebel, prah, zrak in nektar, kar je zelo težko kontrolirati. Sekundarni vir okužbe je enak kot pri vseh živilih tj. zrak, delavci v živilski industriji, oprema (Snowdon in Cliver, 1996).

Razni sadni sokovi (grozdni, jabolčni itn.) so na splošno občutljivejši na delovanje kvasovk kot na delovanje drugih mikroorganizmov. V teh tekočinah, ki so navadno šibko kisle, se rade množijo kvasovke. Pri tem za svoje razmnoževanje porabijo hranilne snovi iz svoje okolice (Poklukar in sod., 1998).

Vrenje ali fermentacija medu povzroča kvar. Vrenje se vselej začne v vrhnji plasti in se nato širi navzdol. V začetku so spodnje plasti še povsem neprizadete. Nekateri raziskovalci menijo, da je za tovrstno vrenje potrebno nekaj kisika, ki je dostopen v zraku. Pri fermentaciji povpre le majhen del sladkorjev skupaj z beljakovinami iz medu. Ko teh v eni plasti zmanjka, se vrenje nadaljuje v nižji plasti, kjer je še dovolj beljakovin za razmnoževanje kvasovk. Kvasovke tvorijo iz sladkorjev alkohol, ki ob nadaljnjem delovanju prehaja v ocatno kislino in ogljikov dioksid. Med, ki je v stadiju fermentacije, ima nedoločljivo sadno aromo, ta se z nadaljevanjem fermentacije izgublja, medtem ko narašča okus po kvasovkah (Poklukar in sod., 1998).

V fermentiranem medu so prisotne predvsem naslednje vrste kvasovk: *Eremothecium gossypii*, *Zygosaccharomyces bisporus*, *Torulaspora delbrueckii*, *Schwanniomyces occidentalis*, *Zygosaccharomyces* spp., *Zygosaccharomyces rouxii*.

Na fermentacijo medu vplivajo številni dejavniki (Poklukar in sod., 1998):

#### - Temperatura skladiščenja

Temperatura skladiščenja je zelo pomembna pri fermentaciji. Optimalna temperatura za razvoj osmofilnih kvasovk je namreč med 13 in 21 °C. Pri temperaturah nad 27 °C pa poteka fermentacija zelo počasi in je pri medu z majhno vsebnostjo vode praktično ni. Ker pa so vse prehransko-fiziološko pomembne snovi v medu termolabilne, ta temperatura ni primerna

za shranjevanje medu. Pri temperaturah pod 11 °C pa je fermentacija ustavljena. V večjih čebelarstvih shranjujejo med v hladilnicah pri temperaturi 8 do 10 °C.

#### - Struktura kristalov

Na fermentacijo medu vpliva tudi struktura kristalov. Kristaliziran med, ki vsebuje več vode, je bolj nagnjen k fermentaciji kot tekoči med. Glukoza, ki kristalizira, ne more vezati vse vode iz medu; del vode tako ostane proste in v njej raztopljena fruktoza je ugodno gojišče za razvoj kvasovk (Poklukar in sod., 1998).

#### - Vsebnosti vode in kvasovk

Največji vpliv na fermentacijo ima vsekakor vsebnost vode v medu, kar je navedeno v Preglednici 3.

Preglednica 3: Povezava vsebnosti vode v medu (%) in nagnjenosti k fermentaciji (Poklukar in sod., 1998):

| Vsebnost vode [%] | Nagnjenost k fermentaciji           |
|-------------------|-------------------------------------|
| <17,1             | Je ni, neodvisna od števila kvasovk |
| 17,1 do 18,0      | Je ni, če je štev. kvasovk <1000/g  |
| 18,1 do 19,0      | Je ni, če je štev. kvasovk <10/g    |
| 19,1 do 20,0      | Je ni, če je štev. kvasovk <1/g     |
| >20,1             | Konstantna nevarnost fermentacije   |

#### - Zračna vlaga

Idealna relativna vlaga skladiščenja je odvisna od vlage medu saj je za vsak med je drugačna. Če med ni dobro zaprt in je zračna vlaga visoka, veže vlago na svojo površino. Hitrost vezave je v primeru večje viskoznosti medu počasnejša. Če je relativna vlaga v skladišču 66 %, ta ne vpliva na povečanje vlage medu. Vsebnost vlage na površini ne prekorači 21,5 %. V notranjosti posode z medom ni sprememb. Če je med skladiščenjem 86 % vlage, lahko že po 17 do 30 dneh doseže 28 do 29 % vode, kar že omogoča zelo ugoden razvoj kvasovk. Z vezavo zračne vlage v med se poveča tudi vsebnost cvetnega prahu na površini. Izločeni cvetni prah pa je dobra hrana za kvasovke. Med, ki fermentira spremeni lastnosti. Okus ni več tako prijeten, ker ga kvarijo snovi, nastale pri rasti kvasovk. Spremeni se tudi videz, saj v njem opazimo mehurčke ogljikovega dioksida. Vselej točimo zrel med in ga nato hranimo v čistih, po možnosti razkuženih posodah, ki se morajo dobro zapirati, da zrak oz. vlaga nima dostopa do medu. Proces fermentacije lahko ustavimo, če med za pol ure segrevamo na 71 °C in damo na vsak kilogram 1 g vinske kisline. Nato moramo med hitro ohladiti do sobne temperature, ker mu dlje trajajoča toplota zelo škoduje. Seveda pa kakovost takega medu ni več enaka začetni in je vprašanje, v kakšne namene naj ga uporabimo. Čebele shranjujejo med v pokritih voščenih celicah satja, tako se ohranja nespremenjen. Tu je med, ki je nastal pri zgoščevanju medicne, varen pred vsemi vplivi okolja, seveda do določene temperature, pri kateri se vosek začne mehčati (Poklukar in sod., 1998).

## 2.8.2 Olje

### 2.8.2.1 Pridobivanje oljčnega olja

Proces pridobivanja oljčnega olja se prične z obiranjem primerno zrelih oliv iz oljk. Večina oliv, obranih pri zgodnejši letini, ima višjo vsebnost polifenolov, tiste olive, obrane kasneje, pozimi, pa vsebujejo manj polifenolov in so zato bolj sočne. Koncentracija polifenolov narašča z dozorevanjem sadežev, vse dokler ti ne začno postajati rožnati, nato začne upadati. Olive se nato očisti, odstrani se listje, peclje in ostale morebitne »tujke«. Nato se jih zmelje v olivno pasto. V ta namen se danes najpogosteje uporabljajo mlini z velikimi mlinskimi kamni in kovinski zobati mlini. Kot zanimivost: olive se zmelje skupaj s koščicami, čeprav danes nekateri oljarji olivam pred mletjem le-te odstranijo, saj naj bi tako olje vsebovalo malenkost več antioksidantov in imelo nižjo kislinsko stopnjo. Po mletju olivno pasto približno 20 do 40 minut mešamo pri temperaturi približno 28 °C, kar omogoča združevanje majhnih oljnih kapljic in posledično večji pridelek, hkrati pa se olje navzame aromatičnih sestavin. Nato pride na vrsto ločevanje vode in olja iz olivne paste s stiskanjem ali centrifugiranjem, zatem pa še ločevanje olja od vode in morebitna nadaljnja rafinacija olja (Boskou, 2011).

### 2.8.2.2 Shranjevanje

Olje hranimo v temnem prostoru pri temperaturi od 12 do 15 °C. Oljčno olje je zelo občutljivo na oksidacijo z UV svetlobo, zato je bolje, da je hranjeno v temnih steklenicah (Boskou, 2011).

Olje hrani bogato aromo 12-18 mesecev, zato je rok trajanja deviškega oljčnega olja do 18 mesecev. Kot maščobni proizvod je lahko uporaben tudi več let, izvorna sestava olja se v tem času ne bo spreminjala, spreminjale pa se bodo substance, kot so vitamini, biofenoli in vse snovi, ki dajejo olju aromo, vonj, okus in barvo. Olje s pretečenim rokom trajanja je lahko še vedno uporabno za cvrtje, vendar še zdaleč ne ustreza zahtevanim kriterijem, ki veljajo za vrhunsko oljčno olje (Boskou, 2011).

### 2.8.2.3 Kvar oljčnega olja

Ciafardini in sod. (2006) so v raziskavah prikazali bogato mikrobioto ekstra deviškega oljčnega olja, ki je ostala vitalna pri celotnem procesu pridobivanja olja. Nekateri od teh mikroorganizmov povečajo kakovost olja z zmanjšanjem grenkega okusa z encimsko hidrolizo grenkega glukozeida znanega kot oleuropein. Med mikroorganizmi, ki so jih izolirali iz olja so bile tudi naslednje kvasovke: *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida wickerhamii*, *Williopsis californica* in *Candida boidinii*. V drugih raziskavah so odkrili kvasovke, ki proizvajajo lipaze v ekstra deviškem olju, ki so lahko potencialno škodljive za kvaliteto olja, ker povečajo kislost s hidrolizo trigliceridov (Frega, 1999). S testi so dokazali, da lipaze proizvajata *S. cerevisiae* in *W. californica*. Hidrolitična aktivnost lipaz obeh

kvasovk je odvisna od prisotnosti vode. Lipaze postanejo aktivne, ko je v olju vsaj 0,25 % vode, ta pa je že normalno prisotna v vegetaciji. Proste maščobne kisline so dobri spodbujevalci za produkcijo lipaz (Ciafardini in sod., 2006).

### 2.8.3 Pivo

Pri varjenju piva ločimo naslednje postopke: priprava surovin, varjenje, alkoholno vrenje oziroma kipenje in zorenje piva.

**Priprava surovin se nanaša** v glavnem na pripravo slada, hmelja, kvasa in vode. Priprava slada danes poteka v sladarnah. Hmelj pripravijo hmeljarji. Kvas pripravijo v pivovarniških laboratorijih. Pod pripravo slada razumemo delo v sladarnah, obsega pa naslednje operacije: priprava ječmena, namakanje, kaljenje in sušenje. V pripravo sodi čiščenje, sortiranje po velikosti in odstranjevanje primesi. Sortiranje po velikosti zrn je pomembno, ker zrna enake velikosti enakomerno kalijo. Očiščeni in prebrani ječmen namočijo za 24 ur. Potem se začne kaljenje. Koreninsko kal odstranijo, listno kal pa pustijo zrasti do približno  $\frac{3}{4}$  zrna. Tedaj postopek ustavijo. Ta proces traja 9-10 dni. S kaljenjem se škrob v ječmenovem zrnju pretvori v maltozo (sladni sladkor), ki se v varilnem procesu spremeni v alkohol in ogljikovo kislino. Sledi sušenje. Skaljeni ječmen, zeleni slad pride v sušilnico, kjer ga sušijo približno dva dni pri temperaturi 65 °C. Kalčki, ki se držijo pivovarniškega slada, odpadejo. Tedaj je pivovarniški slad pripravljen za varjenje piva. V nadaljnjem postopku lahko takšen slad pripravijo še za temno pivo. Slad pražijo in ga istočasno škropijo s sladkorno raztopino (karamelni slad), brez te je slad za grenka temna piva (Repe, 2012).

#### 2.8.3.1 Varjenje piva

Pivovarski slad gre najprej skozi mlin, nato ga v posodi za drozgo zmešajo s štiri do petkratno večjo količino vode. Nastalo drozgo postopoma kuhajo v posodi in jo vedno znova črpajo nazaj, dokler ne doseže v kadi zaželeno temperature okoli 60 °C. S tem se primerno osladi maltoza, ki se nahaja v sladju. Ko je postopek oslajevanja končan, drozgo odcedijo. Preostanki slada ostanejo v čistilniku. Ko tekočino odcedijo, ostane na odcejevalniku tako imenovana sladica. Sladica se nato položi v kuhalno posodo, kjer se ji primeša hmelj. Tekočino nato kuhajo, dokler ne doseže primerna gostota z izparevanjem tekočine. Dobljeno tekočino imenujemo pivino, ki pa sama po sebi še ni užitna. Potrebno jo je dovreti, saj je grenkoba hmelja še preveč občutna, pivo pa bi se hitro pokvarilo. Zgoraj opisani postopek traja približno 18 ur (Repe, 2012).

#### 2.8.3.2 Fermentacija piva

Pivino, ki se še nahaja v ponvi še enkrat precedijo in tako odstranijo ostanke hmelja. Potem ga pretočijo v hladilne kadi, kjer se ohladi na temperaturo 15 do 20 °C. Ohlajeno pivino prečrpajo v vrelne kadi in ji dodajo kvas, da tako sprožijo alkoholno vrenje.

Ves preostali sladkor v mladem pivu se pretvori v alkohol, ogljikov dioksid (CO<sub>2</sub>) in aromatske snovi. V temni vrelni kleti je stalna temperatura 5 do 6 °C, alkoholno vrenje pa traja 9 do 10 dni. Pri tem se sprošča precej toplote, zato morajo prostor hladiti. Do konca te faze se količina kvasa dvakrat do trikrat poveča in se usede na dno. To je znak, da smo dobili mlado pivo, ki pa še ni primerno za potrošnjo, saj nima niti okusa, niti vonja. Zato ga pustijo v vložni kleti zoreti. Zatem odcedijo ostanke in dovrelo pivo spustijo v skladiščno klet (Repe, 2012).

#### 2.8.3.3 Zorenje piva

Zorenje piva poteka v zaprtih tankih dovolj velike prostornine pri temperaturi od 0 do 1 °C. Sekundarna fermentacija poteka do tri tedne pri temperaturi (od -2 °C do 2 °C). Med to stopnjo del kvasovk, ki ostane v mladem pivu pretvori preostale sladkorje v ogljikov dioksid in komponente arome. V tem procesu se odstranijo tudi nezaželeni komponente, ki nastanejo kot stranski produkt vrenja. Pivo je potrebno še filtrirati, nato je pripravljeno za polnjenje v steklenice, sode in v novejšem času tudi pločevinke (Repe, 2012).

#### 2.8.3.4 Kvar piva

Definicija kvarljica pri pridobivanju piva je, da je to mikroorganizem ki ni namensko dodan in ima zmožnost preživetja in razmnoževanja v okolju tj. pivini, pivu po filtraciji ali že pakirano pivo (Jespersen in Jakobsen, 1996).

Čeprav prepoznavanje kvarljivcev piva z gojenjem v laboratorijskem gojišču vedno ne da dovolj specifičnih in občutljivih rezultatov, se uporaba selektivnih gojišč in inkubacijskih pogojev še vedno zdijo metode, ki se pogosto uporabljajo v pivovarnah. Med vsemi gojišči, ki se uporabljajo, ne obstaja en sam, ki bi se lahko uporabljal za prepoznavanje vseh predstavnikov ene skupine kvarljivcev piva (Jespersen in Jakobsen, 1996).

Prepoznavanje kvarljivcev v pivu je težko, ker so pogosto zastopani v majhnem številu npr. za divje kvasovke bi metoda, ki se uporablja morala biti zmožna zaznave enega kvarljivca na 10<sup>6</sup> gojitvenih kvasnih celic. Prav tako so nekateri kvarljivci velikokrat zelo poškodovani zaradi okoljskih razmer. Nekateri organizmi so zelo problematični glede pogojev za rast (*Lactobacillus* spp. in *Pediococcus* spp.) ali pa so prilagojeni na določen izdelek ali okolje in se težko podvajajo v drugih okoljih vključno z zelo hranljivim laboratorijskim gojiščem (Jespersen in Jakobsen, 1996).

#### 2.8.3.5 Kvasovke

Raznolikost divjih kvasovk v smislu kvara piva je taka, da ne moremo dati nobenega splošnega opisa. Kvasovke se delijo na *Saccharomyces* in ne-*Saccharomyces* divje kvasovke. Najhujše okužbe so pogosto povzročene s *Saccharomyces* spp. katere lahko, ko jih imamo enkrat izolirane, ločimo od lager kvasovk po celični morfologiji in tvorbi spor.

Okužbe s temi kvasovkami običajno povzročajo fenolne priokuse in redčenje končnega piva. Do produkcije fenolnih priokusov pride, ker lahko kvasovke dekarboksilirajo različne fenolne kisline, kot je ferulična in trans-cimetova kislina, medtem ko se redčenje dogaja zaradi produkcije in sekrecije glikoamilaz, ki cepijo škrob, kar pa omogoči divjim kvasovkam, da uporabijo dekstrine, ki jih produkcijski sev običajno ne fermentira. Najbolj pomembne med ne-*Saccharomyces* divjimi kvasovkami so *Pichia membranifaciens* in *Pichia anomala* prav tako nekaj vrst spada med rodove *Schizosaccharomyces*, *Hanseniaspora* in *Candida* (Ingledew in Casey, 1982). Ne-*Saccharomyces* divje kvasovke povzročajo različne tipe kvara, npr. *Pichia membranifaciens* povzroča motnost, priokuse in naredi film, *Candida* spp. povzroča redčenje. Kvar, ki ga povzročajo divje kvasovke iz rodov *Pichia*, *Hansenula* in *Debaryomyces*, je običajno povezan z aerobnimi razmerami, čeprav so kvasovke zmožne rasti v anaerobnih razmerah (Jespersen in Jakobsen, 1996).

## 2.8.4 Vino

Vino je zelo kompleksna mešanica sestavin, ki v glavnem definirajo njegov izgled, aromo, okus, občutek v ustih. Te lastnosti prihajajo iz virov kot so, grozdje, mikroorganizmi in les (Sweigers in sod., 2005).

### 2.8.4.1 Kvasovke, ki povzročajo kvar vina

V današnjem času je pri tako veliki proizvodnji nesprejemljivo prodajati vina, ki imajo senzorične okvare. Glavna skrb proizvajalcev vina je preprečevanje in/ali odprava okvar pri vinskih aromah. V zadnjem času se povečuje zanimanje za procese, ki zmanjšajo kakovost vina, npr. produkcija hlapnih fenolov in občasno hlapnih kislin. Arome imajo vonj po tinti, lepilu, konjskem znoju, usnju ali vonju po hlevu. Te arome se pojavijo večinoma zaradi dveh molekul, 4-etilfenol in 4-etilguajakol, ki nastane z redukcijo koumarne kisline in feruline kisline in so naravno prisotne v groznem moštu. V vinu je najbolj pogosta vrsta *Brettanomyces bruxellensis*. *Brettanomyces* so prisotne na grozdju in opremi za pridelavo vina, grozdni mošt se kmalu kontaminira. Rast kvasovk se zgodi po alkoholni in/ali malolaktični fermentaciji, med zorenjem vina in po ustekleničenju (Remize in sod., 2009).

Stranski produkti metabolizma kvasovk lahko povzročajo poslabšanje senzorične. Tako *Saccharomyces* in ne-*Saccharomyces* divje kvasovke lahko proizvedejo priokuse. Nekateri sevi *S. cerevisiae* proizvajajo vodikov sulfid v precej večjih količinah kot je zaznavni prag okusa. Velike koncentracije acetaldehida proizvedejo različne vrste rodu *Candida* (*C. vini*, *C. stellata* in *C. krusei*), *P. anomala* in druge vrste iz rodu *Pichia*. Vrste iz rodu *Hanseniaspora* so odgovorne za velike količine očetne kisline in estrov. Vrste rodu *Dekkera* prav tako proizvajajo očetno kislino, ampak njihovi najbolj sporni metaboliti so hlapni fenoli, ki ustvarijo okus po miših (Martorell in sod., 2006). Druga vrsta, ki je prav tako sposobna proizvajati etilne fenole v visokih koncentracijah je *P. guilliermondii* (Dias in sod., 2003).

Ob zaključku fermentacije je nadaljnja aktivnost kvasovk škodljiva za kvaliteto vina. Večina kvasovk se odstrani s pretakanjem, filtracijo in ostalimi kletarskimi postopki. Najbolj pogoste kvasovke, ki povzročajo kvar v sodih in cisternah, so vrste ki povzročajo nastanek filma, te so *C.vini*, *C. zeylanoides*, *C. rugosa* in *P. membranifaciens*. Rast kvasovk v ustekleničenih vinih je nesprejemljiva, ker se rezultat kaže v motnosti, sedimentu in slabem okusu. Produkcijske linije za vino so pogosto kontaminirane z različnimi kvasovkami, ki lahko povzročijo kvar ustekleničenega vina. Vrste, ki pogosto povzročajo kvar v ustekleničenem vinu so *Z. bailii*, *S. cerevisiae*, *C. rugosa*, *P. membranifaciens* in *C. vini* (Deak, 2008).

Pri izolaciji in PCR reakciji pomnoževanja DNA, dobljene iz kvasovk v vinu se pojavi problem, ker vino vsebuje inhibitorje reakcije PCR. Snovi v vinu, kot so tanini, polisaharidi in pigmenti vodijo v slabo izolacijo DNA in slabo podvajanje, pri čemer lahko dobimo lažno negativne rezultate (Remize in sod., 2009).

## 2.8.5 Sir

Verjetno ni nobeno fermentirano živilo sestavljeno iz tako preprostih surovin, ki se po fermentaciji spremenijo v izredno raznolik proizvod glede na okus, barvo, teksturo in izgled. Danes poznamo prek 2000 tipov različnih sirov. Večina tehnoloških postopkov proizvodnje sira je usmerjena v odstranjevanje vode in s tem koncentracijo proteinov in maščob. Prva stopnja je koagulacija proteinov mleka (v mleku je celokupno 3,3 % proteinov, od tega je 80 % kazeina in 20 % različnih proteinov sirotke) z dodatkom mlečno-kislinskih bakterij, ki znižajo pH mleka pod izoelektrično točko kazeina (pH pod 4,6) ter z dodatkom encima kimozina, ki hidrolizira specifične peptidne vezi v  $\kappa$ - kazein in s tem ujame večino mlečne maščobe v kazeinsko mrežo. S tem dobimo koagulum oz. mleko v gel stanju. Druga stopnja je odstranitev vode (sinereza) najprej z rezanjem na sirna zrna, s čimer se poveča površina mase gela in nato s počasnim segrevanjem (višja je temperatura segrevanja, bolj suh je sir). Ko je sirno zrno ločeno od sirotke, se ga oblikuje v zelene oblike (moduli, blago) in se ga največkrat blago obteži in odcedi. Sledi soljenje, ki izboljša okus, podaljša obstojnost sira in dodatno izboljša sinerezo (lahko z namakanjem v solnici, površinskim soljenjem ali soljenjem še sirnih zrn). Zadnja stopnja proizvodnje je zorenje med katerim se oblikuje značilen okus sira in je posledica delovanja encimov različnih mikroorganizmov ali dodanih encimov (kimozin, renet, lipazni ekstrakti) (Hutkins, 2006).

### 2.8.5.1 Kvarljivci sira

Močna rast kvasovk na siru lahko pripelje do poslabšanja arome in okusa (po kvasovkah, plesni, gnilobi, prezrelosti, alkoholu, zemlji, amonijaku, sladkem). Včasih *Pichia jadinii* povzroča razpoke v mladem siru. Površina lahko postane sluzasta in celo pol-tekoča, kar lahko pripišemo aktivnosti *Cryptococcus* spp. Vrsta *Pichiaanomala* zmanjša rast *P. roqueforti*. Nekateri sevi *D. hansenii* in *Y. lipolytica*, ki lahko razgrajujejo

dihidroksifenilalanin in imajo visoko metabolno aktivnost, proizvajajo neželen rjav pigment. *Y. lipolytica* prav tako proizvaja močan vonj po gnilem, medtem ko *T. beigeli* proizvaja vonj po žarkem. V sirih vloženi v slanici, kvasovke, ki porabljajo kisline, zvišujejo pH slanice do stopnje, ki omogoča rast *S. aureus* (Seiler, 2002).

## 2.9 OD GOJITEV NEODVISNE METODE, KI SE UPORABLJAJO V ŽIVILSKI MIKROBIOLOGIJI

Večina tehnik, ki so od gojenja neodvisne, temeljijo na reakciji PCR. Po pomnoževanju nukleinske kisline, ki je bila pridobljena iz matriksa hrane, podamo PCR produkte na analize, s katerimi lahko razlikujemo pomnožke DNA (Cocolin in sod., 2013).

Pravilen izbor DNA predela za analizo je zelo pomemben za določanje mikrobioloških profilov prehranskih sistemov. Tarčni gen mora imeti tri pomembne značilnosti: (i) mora biti prisoten v vseh predstavnikih mikrobne skupine, ki jo preučujemo, (ii) mora biti ohranjena regija, za katero lahko naredimo univerzalne začetne oligonukleotide in (iii) mora vsebovati variabilne odseke, da jih lahko razlikujemo. Geni ki kodirajo ribosomsko RNA sodijo v to kategorijo, pri kvasovkah je to 26S rRNA gen, pri bakterijah pa 16S rRNA. Prednost uporabe teh dveh genov je v tem, da obstajajo velike baze podatkov. Po drugi strani je slabost uporabe rRNA genov v tem, da imajo naravno heterogenost v isti vrsti, kar rezultira v več kopijah genov z malo razlikami v zaporedju (Fogel in sod., 1999).

Z analizo po podvajanju želimo zaznati razlike v heterogenosti DNA. To lahko naredimo z uporabo denaturacijske/temperature gelske elektroforeze (D/TGGE) in enoverižnega skladnostnega polimorfizma (SSCP – Single Strand Conformation Polimorphism) preko študije elektroforetske mobilnosti celotno ali delno denaturiranih PCR produktov, oziroma z uporabo restrikcijskih endonukleaz pri končnih restrikcijskih dolžinskih polimorfizmih (t-RFLP).

Elektroforeza D/TGGE predstavlja eklektroforetsko ločevanje PCR produktov v poliakrilamidnem gelu, ki vsebuje različne denaturate, kot so različne kemikalije (uree in formamida pri DGGE) ali fizikalni denaturat (temperaturni TGGE) denaturat, ki so v obliki gradienta. Ko DNA molekula naleti na primerni denaturacijski gradient, pride do sekvenčno odvisne delne denaturacije dvojne verige. Ta sprememba v konformaciji DNA strukture povzroči zmanjšano stopnjo potovanja molekule. Več kot ima molekula DNA GC baznih parov, bolj je odporna na denaturacijo in se zaradi tega razklene in ustavi pri višji koncentraciji denaturata (Fischer in Lerman, 1983). Z uporabo začetnih oligonukleotidov z GC zanko poskrbimo, da se dvoverižna DNA ne razgradi do konca in tako ne potuje kot enoverižna molekula DNA (Muyzer in Smalla, 1998). To metodo lahko uporabimo za mikrobno profiliranje kompleksne mešanice molekul DNA. Pasovi vidni pri T/DGGE predstavljajo komponente mikrobiote. Lahko jih izrežemo in ponovno podvojimo, lahko jim določimo nukleotidno zaporedje in tako dobimo informacijo o vrsti. Z uporabo te metode

lahko dobimo profil mikrobnih populacij, prav tako pa lahko sledimo časovni dinamiki. Ta metoda ni kvantitativna (Ercolini in sod., 2012).

Metoda SSCP razlikovanje temelji na mobilnosti enoverižne DNA. Majhne spremembe v nukleinskem zaporedju lahko zaznamo, ker se lahko bazni pari v posamezni verigi povežejo in tvorijo zanke, pregibe, kar daje verigi unikatno 3D strukturo, to pa vpliva na gibljivost v gelu. Pri SSCP analizi se pomnožke denaturira, da dobimo enojne verige, nato jih prenesemo na ne-denaturacijsko poliakrilamidno gelsko elektroforezo. V zadnjih nekaj letih SSCP metoda temelji na podvojevanju s fluoresceinom označenim začetnim oligonukleotidom in zaznavamo signal s fluorescenco. Za uporabo SSCP za profiliranje mikrobnega ekosistema, bi morali narediti robustno podatkovno bazo, da bi lahko prepoznavali posamezne komponente s primerjavo zadrževalnih časov vsakega signala z referenčnim časom v bazi. Če ne pride do ujemanja, ne moremo identificirati (Hayashi, 1992)

Pri metodi t-RFLP je eden od PCR začetnih oligonukleotidov označen s fluorescentnim barvilom in se uporablja za pomnoževanje izbrane regije. Končni PCR produkt je razrezan z eno (ali več) restriksijsko endonukleazo. Dobljene fragmente ločimo z DNA analizatorjem. Mikrobnno diverziteto združbe lahko ocenimo s številom in višino vrhov vzorcev. t-RFLP je učinkovito orodje za opisovanje dinamičnih sprememb, ki se zgodijo v kompleksnih združbah skozi čas (Sibley in sod., 2012).

Te analize vse temeljijo na PCR podvajanju (temeljijo na podvojevalni pristranosti). Pomembna je izbira pravilnega začetnega oligonukleotida, moramo pa vedeti, da ne obstaja univerzalni set začetnih oligonukleotidov za profiliranje združbe. Običajno so ponovljivi, čeprav maloštevilne populacije včasih ne zaznamo, tudi če naredimo več ponovitev istega vzorca. Za občutljivost so izračunali da lahko zaznamo do 1 % celotne združbe. Ta meja je odvisna od sestave mikrobnega ekosistema in detekcijske strategije (uporaba gela ali fluorescentnih barvil pri kapilarni elektroforezi). Pri DGGE analizi je meja detekcije približno  $10^3$  cfu/ml ali g (Cocolin in sod., 2001).

Med od gojitev neodvisnimi metodami, je ena redkih, ki ne temelji na PCR, fluorescenčna *in-situ* hibridizacija (FISH, Fluorescent In Situ Hybridization). Ta tehnika temelji na hibridizaciji fluorescentno označene lovke z določeno sekvenco rRNA. Tarčne celice se fiksira na mikroskopsko steklo nato sledi korak permeabilizacije tako, da lovka pride v celico. Po hibridizaciji so rezultati vidni pod UV mikroskopom (Bottari in sod., 2006). FISH se v živilski mikrobiologiji ne uporablja veliko, čeprav pa ima velik potencial za lociranje mikrobnih populacij na trdnem prehranskem matriksu (Ercolini in sod., 2003).

Metoda DGGE se uporablja na vseh področjih živilske mikrobiologije, kot je fermentacija hrane, kvar hrane in varnost hrane, največ člankov je vezanih na varnost hrane. DGGE je najbolj primeren za študije mikrobne ekologije spontanih fermentacij. Vino, meso in mesni izdelki, mleko in mlečni izdelki so najbolj preučena živila v sklopu fermentacij in procesih

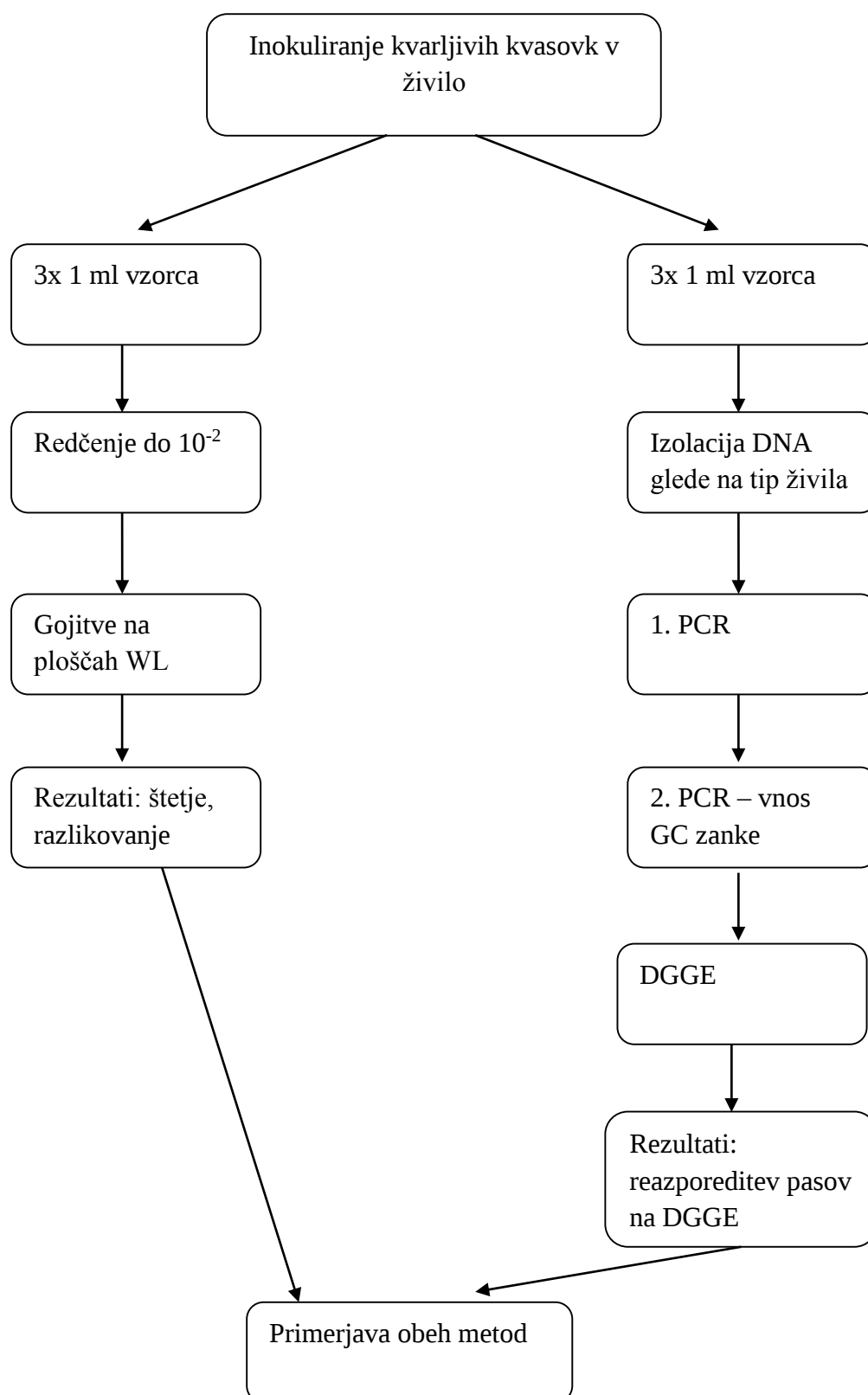
kvara, medtem ko se za zelenjavo manj uporablja metode neodvisne od gojenja (Cocolin in sod., 2013).

### **2.9.1 Analiza DGGE DNA proti RNA**

Eden od potencialov DGGE je, da nudi možnost ekoloških študij, ki ciljajo obe nukleinski kislini, tako DNA kot RNA. Molekuli imata povsem različen pomen, DNA ima zapis o dednosti, medtem ko je RNA direktno vpletena pri translaciji v proteine. Nadalje, DNA je izjemno stabilna v okolju, kot lahko vidimo pridobitev DNA in uspešno podvajanje s PCR iz arheoloških in paleontoloških vzorcev, ki so lahko stari po več tisoč let (Landweber, 1999), medtem ko RNA oz. bolj natančno mRNA obstaja le kratek čas v aktivno rastočih bakterijskih celicah, s povprečnim razpolovnim časom merjenim v minutah (Arraiano in sod., 1998). Preučevanje DNA mikrobioloških sistemov v ekoloških študijah, omogočijo definiranje mikrobne ekologije in raznovrstnosti, medtem ko z analizo RNA dobimo vpogled v mikrobno populacijo, ki je metabolno aktivna in tako sodeluje v mikrobioloških procesih. Število nepoškodovanih ribosomov predstavlja približno stopnjo proteinske sinteze, zato lahko ribosomsko RNA (rRNA) uporabimo kot marker za splošno metabolno aktivnost (Gosalbes in sod., 2011), čeprav se moramo zavedati da imajo te molekule večjo stopnjo zaščite kot mRNA. Druga strategija za določanje živosti populacije je uporaba etidijevega monazida (EMA) in propidijevega monazida (PMA), interkalacijska reagenta DNA, ki selektivno prodre skozi membrano mrtvih celic in tvorita stabilne monodukte DNA na osnovi fotolize, kar onemogoči podvajanje DNA s PCR. To se je veliko uporabljalo za razlikovanje mrtvih in živih celic patogenih organizmov (Rudi in sod., 2005), niso pa še pokazali uporabnosti pri kompleksnih mikrobni ekosistemi.

Prvič v zgodovini mikrobiološke preiskave hrane imajo znanstveniki na voljo orodja, ki ne temeljijo na gojenju in lahko tako preučujejo populacije, ki jih prej v umetnih gojiščih niso zaznali, ker so jih prerasli dominantni organizmi ali pa ker so bili v stanju VBNC. Zelo veliko je k temu pripomogla metoda DGGE. V zadnjih nekaj letih se je pojavila nova tehnika, nova generacija sekvenciranja (NGS, Next generation sequencing) in se pričakuje da se bo raba te tehnike z leti še izboljšala. NGS ima veliko prednost pred DGGE, pri DGGE smo lahko sekvencirali le pasove, ki so bili močni in dobro ločeni, tako da smo dobili informacijo le o delu populacije. Pri NGS pa lahko analiziramo veliko število sekvenc in tako pridobimo več informacij o populaciji (Cocolin in sod., 2013).

### 3 MATERIALI IN METODE



Slika 2: Shema dela

### 3.1 METODE

#### 3.1.1 Izolacija DNA kvasovk iz sira

V falkonke smo odtehtali 0,5 g vzorca sira in resuspendirali z 10 ml 2% natrijevim citratom, dodali smo tudi steklene kroglice premera  $\Phi$  500  $\mu$ m in nato inkubirali 30 min na 45 °C. Po inkubaciji smo vzorce vorteksirali 3 min in počakali da so se večji delci usedli. Čisti supernatant smo nato prenesli v čiste falkonke in centrifugirali pri 980 g za 10 min pri 4 °C. Po centrifugiranju smo z vatnimi palčkami odstranili maščobni sloj in centrifugirali pri enakih pogoji. Večino supernatanta smo odlili in dodali 300  $\mu$ l *Yeast Cell Lysis Solution* in 1  $\mu$ l RNaze A (5  $\mu$ g/ $\mu$ l) in resuspendirali celice. Nato smo celice inkubirali pri 65 °C za 15 min. Potem smo za 5 min položili celice na led. Dodali smo 150  $\mu$ l MPC reagent za precipitacijo proteinov in mešali s stresalnikom za epruvete 10 s. Ostanke celic smo centrifugirali pri 13000 g, 5 min. Supernatant smo prenesli v svežo mikrocentrifugirko in dodali 500  $\mu$ l izopropanola in premešali z obračanjem. DNA smo centrifugirali pri 13000 g, 5 min. S pipeto smo odstranili supernatant. Pelet smo sprali z 0,6 ml 70 % etanolom. Etanol smo nato pazljivo odstranili s pipeto. Nato smo na kratko še centrifugirali in odstranili etanol. DNA smo resuspendirali v 10  $\mu$ l pufra TE.

#### 3.1.2 Izolacija DNA kvasovk iz vina

V mikrocentrifugirke smo odpipetirali po 1 ml vina in centrifugirali 30 s pri 9300 g. Nato smo spirali s Tris-HCl (10 mM, pH 8) in ponovno centrifugirali. Pelet smo suspendirali z 0,2 ml liznim pufrom in dodali še 0,2 ml fenol:kloroform:izoamil alkohol 25:24:1 in 0,3 g steklenih kroglic premerom  $\Phi$  500  $\mu$ m. Vsebino smo centrifugirali pri največji hitrosti 3 minute in nato dodali 200  $\mu$ l TE pufra in na hitro vorteksirali. Sledilo je centrifugiranje pri visoki hitrosti pri sobni temperaturi 5 min, nato smo prenesli tekoči sloj v novo mikrocentrifugirko in dodali 1 ml 100 % etanola in premešali z obračanjem. To smo centrifugirali 3 minute pri visoki hitrosti, odstranili supernatant in resuspendirali z 0,4 ml TE pufrom. Dodali smo 30  $\mu$ l 1 mg/ml RNaze A, zmešali in inkubirali 5 min pri 37 °C. Dodali smo še 10  $\mu$ l 4 M amonijevega acetata in 1 ml 100 % etanola in premešali z obračanjem. Nato smo centrifugirali 3 minute pri visoki hitrosti in sobni temperaturi, potem smo odstranili supernatant in posušili pelet. Pelet - DNA smo nato resuspendirali z 0,25  $\mu$ l TE pufrom.

#### 3.1.3 Izolacija DNA kvasovk iz olja

V mikrocentrifugirke smo odpipetirali po 1 ml olja in dodali 500  $\mu$ l CTAB ekstrakcijskega pufra segretega na 60 °C, premešali in inkubirali 30 min pri 60 °C. Po inkubaciji smo dodali 500  $\mu$ l hladnega kloroform:izoamil alkohol (24:1). Mešanico smo centrifugirali pri 20.000 g, 30 min pri 4 °C. Zgornjo fazo smo prenesli v novo mikrocentrifugirko in ponovili centrifugiranje, da smo dobili bolj čist supernatant. Za precipitacijo DNA smo dodali 1x volumen hladnega izopropanola, premešali z obračanjem in pustili čez noč pri -20 °C.

Naslednji dan smo centrifugirali pri 4 °C, 20.000 g, 30 min, in odstranili supernatant. Pelet smo sprali s 500 µl 70 % v/v etanol/voda in ponovno centrifugirali pri 4 °C, 20.000 g, 30 min in posušili. Pelet - DNA smo nato resuspendirali z 0,25 µl TE pufrom.

### 3.1.4 Izolacija DNA kvasovk iz medu

1 ml pripravljenega medu smo odmerili v 1,5 ml mikrocentrifugirke in centrifugirali pri 13000 g, 5 min. Supernatant smo odlili in dodali 300 µl Yeast Cell Lysis Solution in 1 µl RNaze A (5 µg/µl) in resuspendirali celice na vrtniku. Nato smo celice inkubirali pri 65 °C za 15 min. Potem smo za 5 min celice odložili na led. Dodali smo 150 µl MPC reagent za precipitacijo proteinov in mešali s stresalnikom za epruvete 10 s. Ostanke celic smo centrifugirali pri 13000 g, 5 min. Supernatant smo prenesli v svežo mikrocentrifugirko in dodali 500 µl izopropanola in premešali z obračanjem. DNA smo s centrifugirali pri 14000 obratov/minuto, 5 min. S pipeto smo odstranili supernatant. Pelet smo sprali z 0,6 ml 70 % etanolom. Etanol smo nato pazljivo odstranili s pipeto. Nato smo na kratko še centrifugirali in odstranili etanol. DNA smo resuspendirali v 20 µl pufra TE.

### 3.1.5 Izolacija DNA kvasovk iz piva

Metoda izolacije DNA ni bila optimizirana za pivo, saj le ta ne vsebuje inhibitorjev izolacije DNA.

1 ml pripravljenega piva smo dali v 1,5 ml mikrocentrifugirke in centrifugirali pri 14.000 obratov/min, 5 min. Supernatant smo odlili in dodali 300 µl Yeast Cell Lysis Solution in 1 µl RNaze A (5 µg/µl) in resuspendirali celice na stresalniku za epruvete. Nato smo celice inkubirali pri 65 °C za 15 min. Potem smo za 5 min položili celice na led. Dodali smo 150 µl MPC reagenta za precipitacijo proteinov in mešali s stresalnikom za epruvete 10 s. Ostanke celic smo centrifugirali pri 14000 obratov/minuto, 10 min. Supernatant smo prenesli v svežo mikrocentrifugirko in dodali 500 µl izopropanola in premešali z obračanjem. DNA smo s centrifugirali pri 13000 g, 10 min. S pipeto smo odstranili supernatant. Pelet smo sprali z 0,6 ml 70 % etanolom. Etanol smo nato pazljivo odstranili s pipeto. Nato smo na kratko še centrifugirali in odstranili etanol. DNA smo resuspendirali v 20 µl pufra TE.

### 3.1.6 Pomnoževanje DNA in začetni oligonukleotidi

Pomnoževanje domen D1/D2 26S rDNA smo pomnoževali z napravo iCycler in Perkin Elmer. Oligonukleotida začetnika sta bila NL1(5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') in obratni NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'). Reakcijska mešanica je vsebovala 0,5 µM vsakega od začetnih oligonukleotidov, 1x PCR pufer (Promega), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 µM dNTP, 0,5 U Taq polimeraze, 156,6 µl bidestilirane vode. V vsako reakcijo smo dodali po 2 µl izolirane DNA in zgornjo pripravljeno reakcijsko mešanico po 18 µl. PCR poteka 36 ciklov, predcikel

pri 95 °C za 4min, denaturacija pri 94 °C za 1 min, prileganje začetnih oligonukleotidov pri 52 °C za 30 s, podaljševanje pri 72 °C za 2 min.

Pomnožke smo preverjali z gelsko elektroforezo pri pogojih 120 V, 400 mA, 30 min.

### **3.1.7 Pomnoževanje PCR produkta z GC zanko za DGGE**

Pomnožke (približna dolžina 600 bp) iz prve reakcije PCR smo pomnoževali v drugi reakciji PCR, kjer ima začetni oligonukleotid NL1 GC zanko (5'-CGCCCGCCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGGCCATATCAATAAGC-3'), kot drugi začetni oligonukleotid smo uporabili LS2 (5'-ATTCCCAAACAACCTCGACTC-3'). Reakcijska mešanica je bila enaka kot prejšnja. Pogoji reakcije pa so bili, predcikel pri 95 °C za 5 min, 30 ciklov denaturacije pri 95 °C za 1 min, prileganje začetnih oligonukleotidov pri 52 °C za 2 min, podaljševanje pri 72 °C za 2 min, zadnje podaljševanje pri 72 °C za 7 min.

### **3.1.8 DGGE**

Nosilec za gel smo pripravili po navodilih proizvajalca (Bio-Rad, ZDA).

Pripravili smo mešanico za dva gela. Za gel, ki je vseboval ureo kot denaturant (založna raztopina 1), smo v stekleno čašo zatehtali 42 g uree. Dodali smo 40 ml formamida in 2 ml 50× TAE pufra, potem pa še 25 ml 40 % akrilamid/bisakrilamid (37,5:1). Mešanico smo mešali na magnetnem mešalu in rahlo segrevali dokler se urea ni popolnoma raztopila. Nato smo dodali destilirano vodo do končnega volumna 100 ml in ponovno zmešali na mešalu. Za gel brez denaturanta (založna raztopina 2) smo 2 ml 50× TAE pufra dodali 30 ml 40 % akrilamid/bisakrilamid (37,5:1). Dodali smo destilirano vodo do 100 ml in na mešalu dobro premešali. Za DGGE smo uporabili 30 do 60-odstotne gradiente. Za en gel smo za višjo koncentracijo denaturanta (60 %, H) v plastični posodici zmešali 7,2 ml založne raztopine 1 in 4,8 ml založne raztopine 2, za nižjo koncentracijo denaturanta (30 %, L) pa smo zmešali 3,6 ml založne raztopine 1 in 8,4 ml založne raztopine 2. Tik pred vlivanjem gela smo v vsako plastično posodico dodali 98 µl amonijevega persulfata (APS; pripravljali smo ga sproti, v mikrocentrifugirko smo zatehtali 0,1 g trdnega APS in dodali destilirano vodo do 1 ml) in 9,8 µl TEMED-a ter dobro premešali. S H mešanico smo napolnili eno plastično brizgo do oznake 12 ml, drugo pa smo napolnili z L mešanico. Obe brizgi smo nato pritrdili na napravo za pripravo gradientnega gela in vlili gel. Ko se je denaturacijski gel strdil (približno ena ura), na vrh še vlijemo koncentracijski gel = 8 ml založne raztopine 2 v katero pred vlivanjem damo še 66 µl APS-a in 6,6 µl TEMED-a. Na koncu smo na vrhu gela vstavili še glavnik. Gel smo pustili polimerizirati 40-60 min. Elektroforezno posodo za DGGE smo napolnili z 1× TAE pufrom. Pred nalaganjem vzorcev na gel smo pufer segreti na 60 °C. Vzorcem smo dodali enako količino pufra za nalaganje in jih s pipeto naložili na gel. Elektroforeza je tekla pri konstantni napetosti 75 V in temperaturi 60 °C v anodni smeri 16 ur. Po končani elektroforezi smo gele previdno odstranili iz sistema steklenih plošč in jih obarvali v raztopini z etidijevim bromidom. Barvanje je trajalo 10 min, sledilo pa je še

nekajminutno namakanje v destilirani vodi. DNK v gelu smo odkrivali z zbujanjem z modro svetlobo in sliko dokumentirali s sistemom gel doc.

### **3.1.9 Priprava živil za nacepitev na gojišče**

#### **3.1.9.1 Vino**

Kvasovke iz preglednice 7 smo iz YPD trdnega gojišča prenesli v raztopino, jih nato prešteli s pomočjo mikroskopa (Leica) in programom imageJ, z uporabo Bürker-Türkove števne komore. Za inokulacijo kvasovk v vino smo redčitve pripravili tako, da je bilo v 100 ml vina  $10^6$  celic vsake vrste. Iz vina smo vzeli vzorce in jih redčili do  $10^{-4}$  za razmaze na plošče z gojiščem WL. Izolacija je potekala po zgoraj opisanem postopku. Plošče nacepljene z vinom smo inkubirali 3-4 dni pri temperaturi 37 °C. Prav tako pa smo za izolacijo DNA vzeli več vzorcev po 1 ml inokuliranega vina.

#### **3.1.9.2 Pivo**

Pri pivu je bila priprava enaka kot pri vinu, le da pivine dobljene v pivovarni Laško nismo inokulirali, ker smo želeli izvedeti katere kvasovke so tam normalno prisotne.

#### **3.1.9.3 Med**

Zatehtali smo 20 g medu in nato v vzorce inokulirali kvasovke (glej preglednico 7) tako, da jih je bilo  $10^6$  celic/ml. Da smo dobili volumen medu smo si pomagali s podatkom o gostoti 1,36 kg/l, ki smo ga našli na Wikipediji. Pred izolacijo smo dodali še 2x volumen destilirane vode in nato vzorce segrevali pri temperaturi 45 °C, 30 min. Iz tako pripravljenega medu smo vzeli vzorce in jih redčili in nacepili na petrijeve plošče z gojiščem WL. Iz istega medu smo prav tako odpipetirali vzorce po 1 ml, in naredili izolacijo DNA po zgoraj opisanem postopku.

#### **3.1.9.4 Olje**

Olje smo pripravili po enakem postopku kot vino, izbrane kvasovke smo inokulirali v olje in nato vzorce olja redčili in nacepili na petrijeve plošče z gojiščem WL. Ito olje smo prav tako uporabili za izolacijo DNA.

## **3.2 MATERIALI**

### **3.2.1 Komplet za izolacijo DNA**

Izolacija DNA pri siru, medu in pivu je potekala s pomočjo MasterPure Yeast DNA Purification Kit (Epicentre).

### 3.2.2 Agarozni gel

Agarozni gel, ki smo ga uporabljali za gelsko elektroforezo, je bil 1,5 %. Pripravili smo ga iz 0,9 g agaroze za rutinsko uporabo (Sigma Aldrich) in 60 ml 1x TAE pufra.

### 3.2.3 50 x TAE pufer

242 g Tris baza

57,1 ml očetne kisline

37,2 g Na<sub>2</sub>EDTA x 2H<sub>2</sub>O

Do 1 l destilirane vode

pH = 8,5

Tris bazo, očetno kislino, Na<sub>2</sub>EDTA x 2H<sub>2</sub>O smo natehtali v 1000 ml čašo, dodali vodo in raztopili s pomočjo magnetnega mešala. S pomočjo očetne kisline smo uravnali pH na 8,5. Pufer smo sterilizirali v avtoklavu (121 °C, 20 min, 1,1 bar).

Za pripravo 1x pufra TAE smo v 1000 ml čašo nalili 20 ml 50x TAE pufra in dodali destilirano vodo do oznake 1000 ml.

### 3.2.4 Lizni pufer za vino (za 50 ml)

Preglednica 4: Sestava liznega pufra za vino

| Reagent                | Količina   |
|------------------------|------------|
| 2 % (v/v) Triton X-100 | 1 ml       |
| 1 % (w/v) SDS          | 0,5 g      |
| 100 mM NaCl            | 0,2922 g   |
| 10 mM Tris HCl, pH 8   | 0,06057 g  |
| 1 mM EDTA, pH 8        | 0,014612 g |
| 1 % (w/v) PVPP         | 0,5 g      |

Sestavine (Preglednica 4) smo natehtali v 50 ml bučko, v katero smo nato do oznake nalili destilirano vodo. Za hrambo smo pufer prelili v manjšo steklenico in ga sterilizirali v avtoklavu (121 °C, 20 min, 1,1 bar). Pred uporabo smo pufra dodali PVPP.

Hrani se do 1 leta pri sobni temperaturi

### 3.2.5 CTAB ekstrakcijski pufer (za 30 ml)

Preglednica 5: Sestava CTAB ekstrakcijskega pufra

| Reagent                                                  | Količina    |
|----------------------------------------------------------|-------------|
| 2 % CTAB                                                 | 0,6 g       |
| 1,4 M NaCl                                               | 2,454 g     |
| 50 µM DTT (ditiotritol; 1,4-bis(sulfanil)butan-2,3-diol) | 0,0002314 g |
| 20 mM EDTA                                               | 0,17534 g   |
| 100 mM Tris-HCl                                          | 0,36342 g   |

Sestavine (Preglednica 5) smo natehtali v 30 ml bučko, v katero smo nato do oznake nalili destilirano vodo. Nato smo s pH metrom izmerili pH in ga z dodatkom 5 M NaOH, oziroma

0,5 M HCl, umerili na pH 8. Za hrambo smo pufer prelili v manjšo steklenico in ga sterilizirali v avtoklavu (121 °C, 20 min, 1,1 bar).

### 3.2.6 Reagenti za PCR

Mešanica za PCR je bila sestavljena iz:

- Pufra PCR,
- dNTP,
- polimeraza *Taq* (5U/μl ),
- MgCl<sub>2</sub>,
- Bidestilirane vode za PCR.

Preglednica 6: Sestava mešanice PCR

| Reagent                      | Proizvajalec | Začetna koncentracija | Končna koncentracija | Za 1 vzorec [μl] |
|------------------------------|--------------|-----------------------|----------------------|------------------|
| Pufer PCR                    | Promega, ZDA | 5,0 x                 | 1,0 x                | 4,0              |
| MgCl <sub>2</sub>            | Promega, ZDA | 25 mM                 | 2,0 mM               | 1,6              |
| dNTP                         | Sigma, ZDA   | 2,5 mM                | 0,2 mM               | 1,6              |
| Bidestilirana voda           | Qiagen       |                       |                      | 8,7              |
| 5 U/μl <i>Taq</i> polimeraza | Promega, ZDA | 5 U/μl                | 0,5 U/μl             | 0,1              |

Mešanici PCR smo dodali po 1 μl začetnega oligonukleotida (na 1 vzorec) in 2 μl izolirane DNA iz vzorca.

### 3.2.7 Gojišče WL

V steklenico smo zatehtali 80,25 g gojišča v prahu, ter do 1 l dolili destilirano vodo. Po sterilizaciji v avtoklavu (121 °C, 20 min, 1,1 bar) smo gojišče aseptično razlili na petrijeve plošče. V gojišču je pH indikator bromkresol zeleni in predvidevamo, da različne vrste kvasok različno zakisajo gojišče, na primer če se zniža pH se gojišče obarva rumeno, kvasovke pa se obarvajo belo, če pa se pH ne spremeni, gojišče ostane modro, kvasovke pa se obarvajo modro-zeleno. Gojišče nam omogoča razlikovanje zraslih kolonij uporabljenih sevov po barvi in morfolgiji. Uporabljeno je bilo za štetje posameznih vrst.

### 3.2.8 Mikroorganizmi

Uporabljene seve v nalogi smo dobili iz Zbirke Industrijskih Mikroorganizmov (ZIM) Katedre za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil, Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani.

Preglednica 7: Uporabljeni sevi mikroorganizmov

| Vrsta mikroorganizma                          | Oznaka   | Vino | Pivo | Med | Olje |
|-----------------------------------------------|----------|------|------|-----|------|
| <i>Dekkera/Brettanomyces anomala</i>          | ZIM 701  | X    | X    |     |      |
| <i>Candida zemplinina</i>                     | ZIM 842  | X    |      |     |      |
| <i>Pichia kudriarzevii</i>                    | ZIM 2502 | X    |      |     |      |
| <i>Hanseniaspora uvarum</i>                   | ZIM 670  | X    |      |     |      |
| <i>Pichia membranifaciens</i>                 | ZIM 2304 | X    | X    |     |      |
| <i>Meyerozyma guilliermondii</i>              | ZIM 725  | X    | X    |     |      |
| <i>Zygosaccharomyces bailii</i>               | ZIM 850  | X    |      | X   |      |
| <i>Saccharomycodes ludwigii</i>               | ZIM 1777 | X    |      |     |      |
| <i>Schizosaccharomyces pombe</i>              | ZIM 1778 | X    |      |     |      |
| <i>Saccharomyces cerevisiae (diastaticus)</i> | ZIM 784  |      | X    |     |      |
| <i>Pichia fermentas</i>                       | ZIM 2398 |      | X    |     |      |
| <i>Candida boidinii</i>                       | ZIM 2228 |      | X    |     | X    |
| <i>Candida parapsilosis</i>                   | ZIM 2499 |      | X    |     |      |
| <i>Candida tropicalis</i>                     | ZIM 2011 |      | X    |     |      |
| <i>Pichia anomala</i>                         | ZIM 2301 |      | X    |     |      |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i>               | ZIM 753  |      |      | X   |      |
| <i>Zygosaccharomyces rouxii</i>               | ZIM 2238 |      |      | X   |      |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i>               | ZIM 2507 |      |      |     | X    |
| <i>Candida wickerhamii</i>                    | ZIM 2223 |      |      |     | X    |
| <i>Williopsis californica</i>                 | ZIM 16   |      |      |     | X    |

### 3.2.9 Živila

Vino:

- Laški rizling 2012; pridelal P&F Jeruzalem Ormož (oznaka: A-C)
- Cviček 2012; Vinorodni okoliš Dolenjska; Konzorcij z.o.o. (oznaka D-F)
- Teran 2011; Vinakras z.o.o. (oznaka G-I)

Pivo:

- Laško Club Export (oznaka: P)
- Pivina pridobljena v Pivovarni Laško (oznaka: L)

Med:

- Akacijev med; Božnar čebelarstvo d.o.o. (oznaka: A)

- Gozdni med; Božnar čebelarstvo d.o.o. (oznaka: B)

Olje:

- Bučno olje (nerafinirano); Tovarna olja GEA d.d. (oznaka: BO A,B)
- Ekstra deviško oljčno olje; Poljoprivredna zadruga MARINA (oznaka: EDO A,B)

Sir:

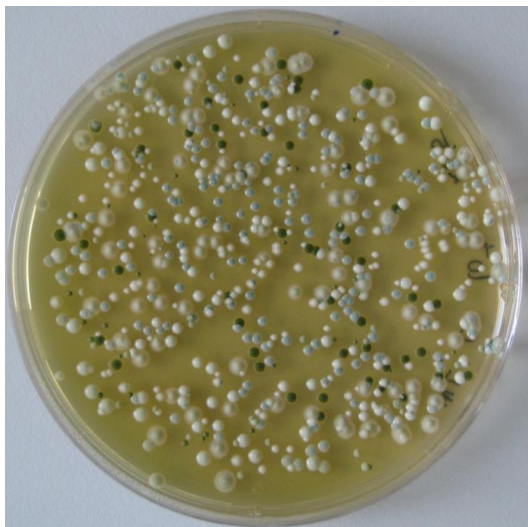
Pri siru smo analizirali 11 vzorcev sira. Ti so bili dobljeni iz Južno-Moravske regije, gore Golja in iz Vlasine v Srbiji ter iz Zagorja na Hrvaškem.

## 4 REZULTATI

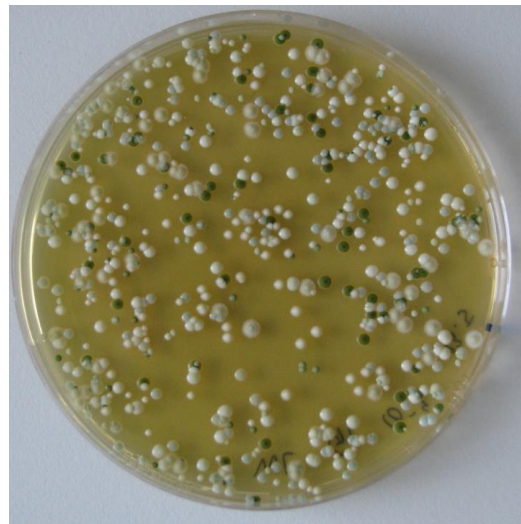
### 4.1 VINO

#### 4.1.1 Gojitvene metode

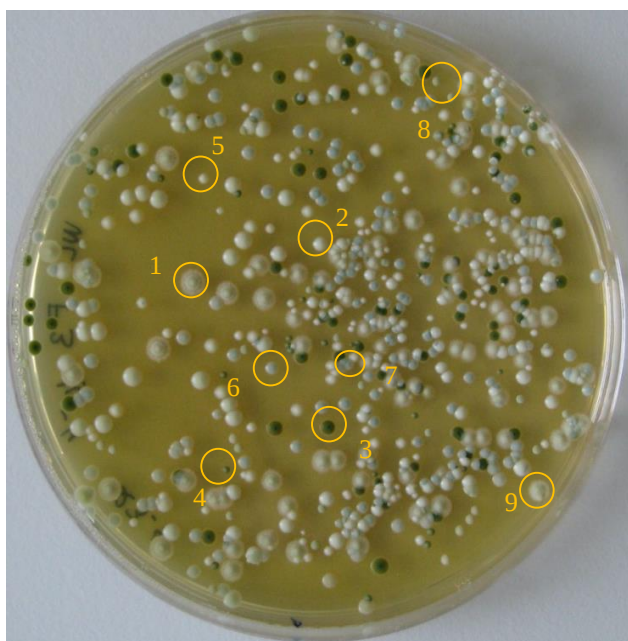
Na slikah 3, 4 in 5 vidimo različne kolonije kvasovk na gojišču WL. Za primerjavo in identifikacijo so v prilogah slike posameznih vrst kvasovk.



Slika 3: Gojišče WL z nacepljenim vinom teran, začetna koncentracija kvasovk  $10^6$  celic v 100 ml, redčitev  $10^{-4}$



Slika 4: Gojišče WL z nacepljenim vinom laški rizling, začetna koncentracija kvasovk  $10^6$  celic v 100 ml, redčitev



Slika 5: Gojišče WL z nacepljenim vinom cviček, začetna koncentracija kvasovk  $10^6$  celic v 100 ml, redčitev  $10^{-4}$

#### Legenda:

- 1 Velike zelenkaste, vataste (*Saccharomyces ludwigii*)
- 2 velike belo zelene, gladke (*Pichia membranifaciens*)
- 3 temno zelene brez robu
- 4 temno zelene z belim robom (*Hanseniaspora uvarum*)
- 5 kremaste gladke (*Dekkera/Brettanomyces anomala*)
- 6 turkizne gladke (*Meyerozyma guilliermondii*)
- 7 turkizne vataste (*Candida zemplinina*)
- 8 kremaste rjavkaste (*Schizosaccharomyces pombe*)
- 9 bele vataste (*Pichia kudriarzevii*)

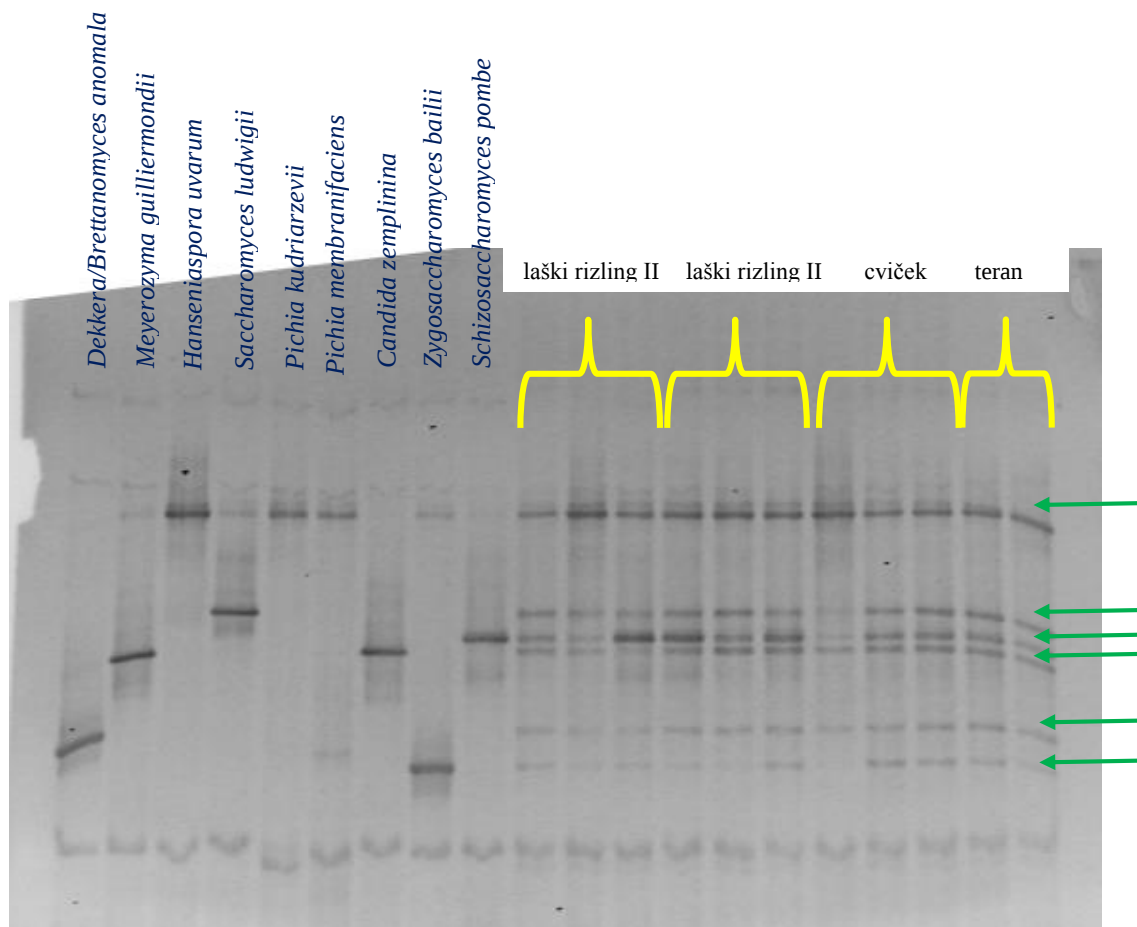
Preglednica 8: Število kolonij na ploščah WL z redčenim vinom

|   |                                                                 | laški rizling          |       | cviček             |       | teran              |       |
|---|-----------------------------------------------------------------|------------------------|-------|--------------------|-------|--------------------|-------|
|   |                                                                 | CFU/ml                 | Stdev | CFU/ml             | Stdev | CFU/ml             | Stdev |
| 1 | Velike zelenkaste, vataste<br>( <i>Saccharomyces ludwigii</i> ) | 58x10 <sup>4</sup>     | 9     | 52x10 <sup>4</sup> | 9     | 45x10 <sup>4</sup> | 8     |
| 2 | velike belo zelene, gladke<br>( <i>Pichia membranifaciens</i> ) | 34x10 <sup>4</sup>     | 4     | 32x10 <sup>4</sup> | 8     | 33x10 <sup>4</sup> | 5     |
| 3 | temno zelene brez robu                                          | 9 x10 <sup>4</sup>     | 4     | 21x10 <sup>4</sup> | 4     | 19x10 <sup>4</sup> | 8     |
| 4 | temno zelene z belim robom<br>( <i>Hanseniaspora uvarum</i> )   | 35<br>x10 <sup>4</sup> | 8     | 41x10 <sup>4</sup> | 8     | 39x10 <sup>4</sup> | 7     |
| 5 | kremaste gladke<br>( <i>Dekkera/Brettanomyces anomala</i> )     | 36x10 <sup>4</sup>     | 10    | 42x10 <sup>4</sup> | 8     | 26x10 <sup>4</sup> | 5     |
| 6 | turkizne gladke<br>( <i>Meyerozyma guilliermondii</i> )         | 82x10 <sup>4</sup>     | 10    | 95x10 <sup>4</sup> | 6     | 80x10 <sup>4</sup> | 19    |
| 7 | turkizne vataste<br>( <i>Candida zemplinina</i> )               | 24x10 <sup>4</sup>     | 2     | 21x10 <sup>4</sup> | 4     | 23x10 <sup>4</sup> | 5     |
| 8 | kremaste rjavkaste<br>( <i>Schizosaccharomyces pombe</i> )      | 11x10 <sup>4</sup>     | 8     | 14x10 <sup>4</sup> | 3     | 12x10 <sup>4</sup> | 2     |
| 9 | bele vataste<br>( <i>Pichia kudriarzevii</i> )                  | 1 x10 <sup>4</sup>     | 1     | 3x10 <sup>4</sup>  | 2     | 3x10 <sup>4</sup>  | 2     |

Ob pregledu plošč lahko med seboj ločimo 9 različnih tipov kolonij (preglednica 8), prav toliko, kolikor vrst smo inokulirali. V preglednici so opisi in število posameznih kolonij. Pri večjih redčitvah rezultati niso najbolj zanesljivi, zato jih v preglednici ni. Število kolonij posameznih vrst se razlikuje, čeprav je bila začetna koncentracija posamezne vrste enaka.

#### 4.1.2 Negojitvene metode

Vzorci smo sočasno vzeli iz istih inokuliranih vin kot pri gojitvenih metodah. Uspešnost izolacije DNA, ki smo jo potrdili z reakcijo PCR je bila 94 %. V kolikor je bila izolacija uspešna, smo te vzorce pomnožili še z GC zanko, da smo jih tako pripravili za DGGE. Slika DGGE gela (slika 6) prikazuje ločene fragmente DNA posameznih inokuliranih vrst in DNA dobljene iz vzorcev.

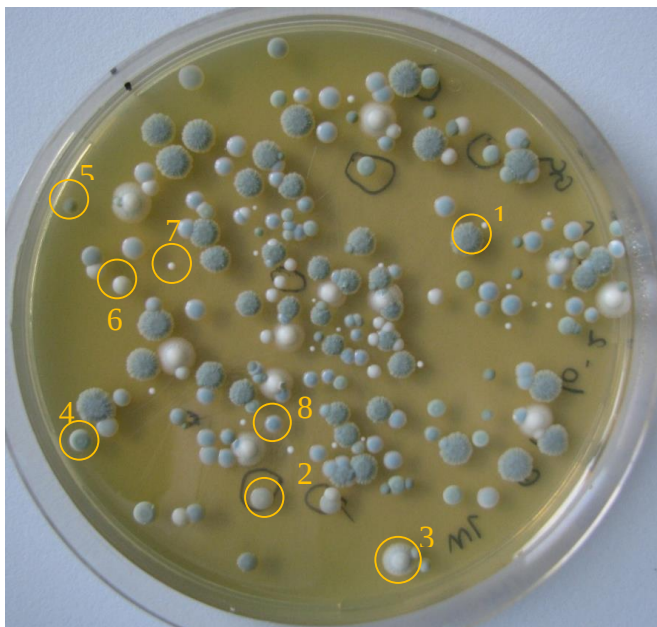


Slika 6: Rezultati DGGE za vino. V prvih kolonah so posamezne vrste kvasovk, nato so nanešeni naši vzorci vina. Zelene puščice prikazujejo posamezne vrste kvasovk, ki jih lahko ločimo v vzorcih vina.

Pri DGGE rezultatih lahko pri vzorcih iz vina med seboj ločimo 6 vrst kvasovk od 9 inokuliranih, kar je na sliki 6 označeno z zelenimi puščicami. Med seboj se prekrivajo fragmenti DNA kvasovk *Hanseniaspora uvarum*, *Pichia kudriarzevii*, *Pichia membranifaciens* in *Meyerozyma guilliermondii*, *Candida zemplinina*. Med različnimi sortami vina ni opaznih večjih razlik.

## 4.2 PIVO

### 4.2.1 Gojitvene metode



#### Legenda:

- 1 zelene vataste (*Pichia fermentas*)
- 2 Turkizne (*Meyerozyma guilliermondii*)
- 3 bele z robom (*Candida tropicalis*)
- 4 majhne svetlo zelene s piko na sredini (*Pichia anomala*)
- 5 majhne temno zelene (*Candida boidinii*)
- 6 majhne bele sluzaste (*Pichia membranifaciens*)
- 7 majhne bele (*Candida parapsilopsis*)
- 8 majhne svetlo zelene (*Saccharomyces diastaticus*)

Slika 7: Gojišče WL z nacepljenim pivom, začetna koncentracija kvasovk  $10^6$  celic v 100 ml, redčitev  $10^{-4}$  z označenimi različnimi vrstami kvasovk

Preglednica 9: Število posameznih kolonij na WL ploščah nacepljenim s pivom

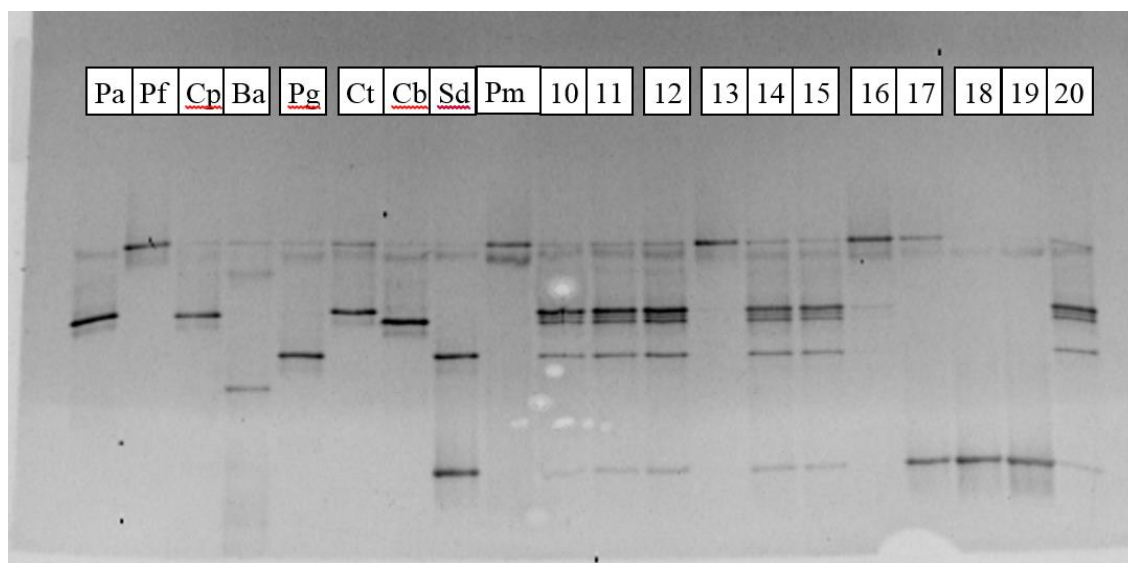
|   |                                                                  | CFU/ml           | Stdev |
|---|------------------------------------------------------------------|------------------|-------|
| 1 | zelene vataste ( <i>Pichia fermentas</i> )                       | $50 \times 10^4$ | 14    |
| 2 | Turkizne ( <i>Meyerozyma guilliermondii</i> )                    | $35 \times 10^4$ | 9     |
| 3 | bele z robom ( <i>Candida tropicalis</i> )                       | $17 \times 10^4$ | 8     |
| 4 | majhne svetlo zelene s piko na sredini ( <i>Pichia anomala</i> ) | $11 \times 10^4$ | 3     |
| 5 | majhne temno zelene ( <i>Candida boidinii</i> )                  | $10 \times 10^4$ | 2     |
| 6 | majhne bele sluzaste ( <i>Pichia membranifaciens</i> )           | $11 \times 10^4$ | 2     |
| 7 | majhne bele ( <i>Candida parapsilopsis</i> )                     | $10 \times 10^4$ | 5     |
| 8 | majhne svetlo zelene ( <i>Saccharomyces diastaticus</i> )        | $7 \times 10^4$  | 1     |

Na sliki 7 vidimo rast kolonij na gojišču WL, ki je bilo nacepljeno z vzorcem piva, kateremu smo predhodno inokulirali različne kvasovke. Kot vidimo so kolonije zrasle v različnih

razmerjih, čeprav so bile inokulirane v enakih začetnih koncentracijah. V preglednici 9 so podani opisi vseh kolonij in njihova količina. Najbolj sta gojišče prerasli vrsti *Pichia fermentas* in *Meyerozyma guilliermondii*, ostale vrste pa so bile približno v enakem razmerju.

#### 4.2.2 Negojitvene metode

Ves postopek je enak kot pri vinu. Uspešnost izolacije DNA, ki smo jo potrdili z reakcijo PCR je bila 100 %. Slika DGGE gela je prikazana kot slika 8.



Slika 8: Rezultati DGGE za pivo. Legenda: Pa - *Pichia anomala*; Pf - *Pichia fermentas*; Cp - *Candida parapsilosis*; Ba - *Dekkera/Brettanomyces/anomala*; Pg - *Meyerozyma guilliermondii*; Ct - *Candida tropicalis*; Cb - *Candida boidinii*; Sd - *Saccharomyces diastaticus*; Pm - *Pichia membranifaciens*; 10 do 12 - Laško Club Export I; 13 do 15 - Laško Club Export II; 16 in 20 - Laško Club Export III; 17 do 19 - Pivina iz pivovarne

Pri DGGE rezultatih piva lahko pri vzorcih vidimo do 7 ločenih pasov, ki predstavljajo vrste kvasovk (inokulirali smo jih 9). Med seboj se prekrivajo vrste *Pichia anomala*, *Candida parapsilosis* in *Candida tropicalis*. Vrste *Dekkera/Brettanomyces anomala* iz linije 4 pa med vzorci nikjer ne zaznamo. V kolonah 17-19 so vzorci iz pivovarne Laško, te kvasovke se ujemajo z linijo Sd - *Saccharomyces diastaticus*.

### 4.3 MED

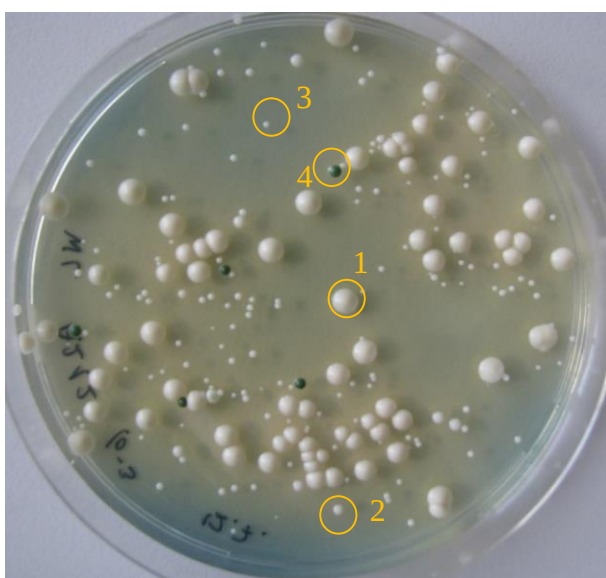
#### 4.3.1 Gojitvene metode



##### legenda

- 1 velike bele kolonije (*Saccharomyces cerevisiae*)
- 2 srednje velike bele kolonije (*Zygosaccharomyces bailii*)
- 3 male bele kolonije (*Zygosaccharomyces rouxii*)
- 4 zelene kolonije

Slika 9: Gojišče WL z nacepljenim gozdnim medom, začetna koncentracija kvasovk  $10^6$  celic v 100 ml, redčitev  $10^{-4}$



##### legenda

- 1 velike bele kolonije (*Saccharomyces cerevisiae*)
- 2 srednje velike bele kolonije (*Zygosaccharomyces bailii*)
- 3 male bele kolonije (*Zygosaccharomyces rouxii*)
- 4 zelene kolonije

Slika 10: Gojišče WL z nacepljenim akacijevim medom, začetna koncentracija kvasovk  $10^6$  celic v 100 ml, redčitev  $10^{-4}$

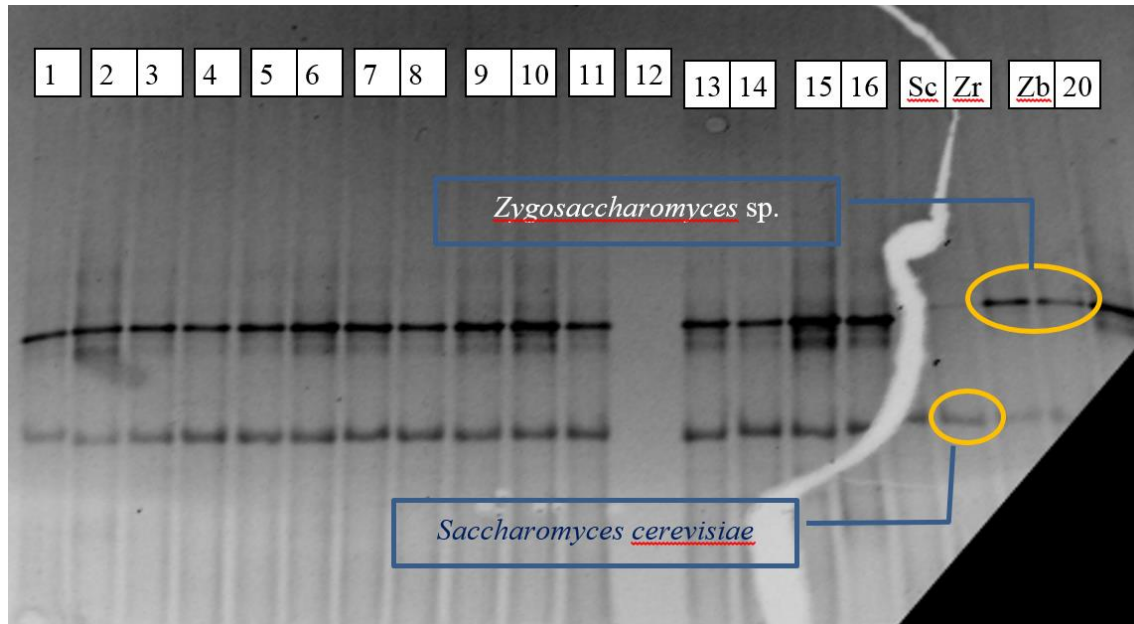
Preglednica 10: Število posameznih kolonij na WL ploščah nacepljenim z medom

|   | Opisi kolonij                                                       | Akacijev med       |       | Gozdni med         |       |
|---|---------------------------------------------------------------------|--------------------|-------|--------------------|-------|
|   |                                                                     | CFU/ml             | Stdev | CFU/ml             | Stdev |
| 1 | velike bele kolonije<br>( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )         | 68x10 <sup>4</sup> | 6     | 61x10 <sup>4</sup> | 5     |
| 2 | srednje velike bele kolonije<br>( <i>Zygosaccharomyces bailii</i> ) | 11x10 <sup>4</sup> | 2     | 42x10 <sup>4</sup> | 2     |
| 3 | male bele kolonije<br>( <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> )           | 84x10 <sup>4</sup> | 3     | 94x10 <sup>4</sup> | 10    |
| 4 | zelene kolonije                                                     | 7x10 <sup>4</sup>  | 2     | 13x10 <sup>4</sup> | 3     |

Na slikah 9 in 10 vidimo rast kolonij kvasovk na gojišču WL, ki je bilo nacepljeno z medom. V obeh primerih so na gojišču zrasle po 4 kolonije, čeprav smo jih inokulirali samo 3. V preglednici 10 vidimo, da so zrasle v različnem razmerju, čeprav so bile začetne koncentracije enake. Najbolj je gojišče prerasla vrsta *Zygosaccharomyces rouxii*.

#### 4.3.2 Negojitvene metode

Negojitvene metode potekajo po enakem postopku, kot je že opisano pri vinu in pivu. Izolacija DNA je bila 100 % uspešna.



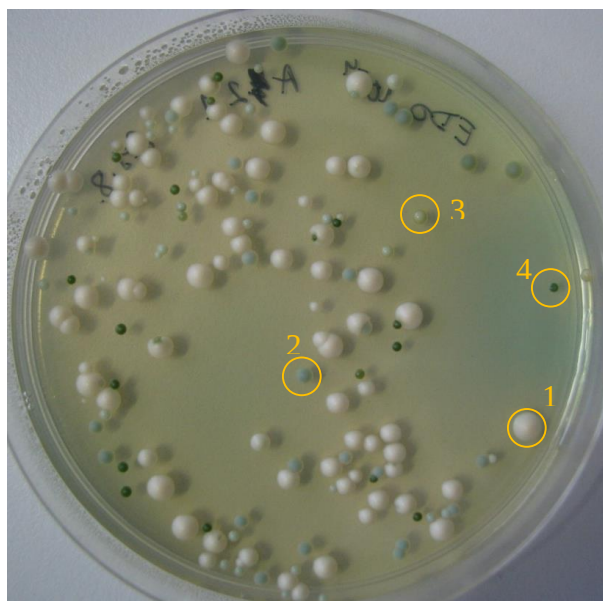
Slika 11: Rezultati DGGE za med. Legenda: 1 do 3 – gozdni med I; 4 do 6 – gozdni med II; 7 in 8 – gozdni med III; 9 do 11 – akacijev med I; 12 – prazno; 13 in 14 – akacijev med II; 15 in 16 – akacijev med III; Sc – *Saccharomyces cerevisiae*; Zr – *Zygosaccharomyces rouxii*; Zb – *Zygosaccharomyces bailii*; 20 – prazno

Pri DDGE rezultatih (slika 11) lahko v nekaterih linijah vidimo po 2 pasova, ki predstavljata različne vrste kvasovk. Ko pa te rezultate primerjamo s posameznimi izolati vrst (Sc, Zr in

Zb), vidimo, da se *Saccharomyces cerevisiae* pojavi pri vseh vzorcih, medtem, ko se ostali vrsti na elektroforezi nista dobro ločili (gre za isti rod *Zygosaccharomyces*) tako, da pri vzorcih ne bi mogli potrditi prisotnosti ene ali druge vrste.

#### 4.4 OLJE

##### 4.4.1 Gojitvene metode



##### legenda

- 1 bele velike kolonije  
(*Saccharomyces cerevisiae*)
- 2 turkizne kolonije  
(*Candida boidinii*)
- 3 svetlo zelene kolonije  
(nismo določili vrste)
- 4 temno zelene kolonije  
(nismo določili vrste)

Slika 12: Gojišče WL z nacepljenim ekstra deviškim oljem, začetna koncentracija kvasovk  $10^6$  celic v 100 ml, redčitev  $10^{-4}$



##### legenda

- 1 bele velike kolonije  
(*Saccharomyces cerevisiae*)
- 2 turkizne kolonije  
(*Candida boidinii*)
- 3 svetlo zelene kolonije  
(nismo določili vrste)
- 4 temno zelene kolonije  
(nismo določili vrste)

Slika 13: Gojišče WL z nacepljenim bučnim oljem, začetna koncentracija kvasovk  $10^6$  celic v 100 ml, redčitev  $10^{-4}$

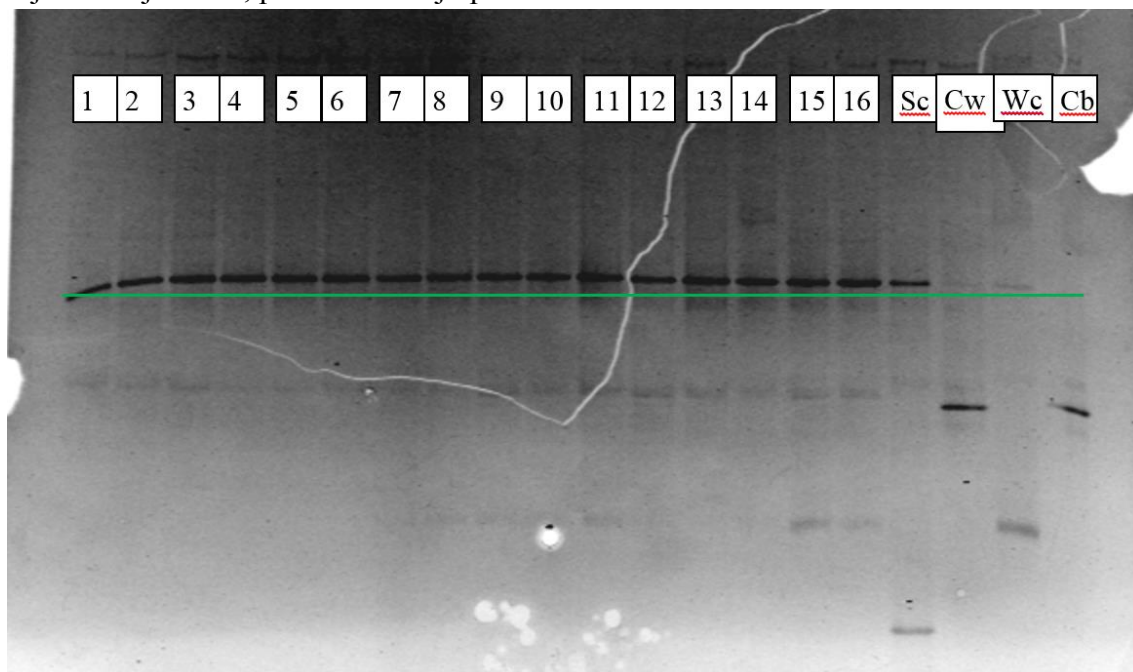
Preglednica 11: Število posameznih kolonij na WL ploščah nacepljenim z oljem

|   |                                                             | Bučno olje         |       | Ekstra deviško olje |       |
|---|-------------------------------------------------------------|--------------------|-------|---------------------|-------|
|   |                                                             | CFU/ml             | Stdev | CFU/ml              | Stdev |
| 1 | bele velike kolonije<br>( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ) | 98x10 <sup>4</sup> | 10    | 54x10 <sup>4</sup>  | 18    |
| 2 | turkizne kolonije<br>( <i>Candida boidinii</i> )            | 44x10 <sup>4</sup> | 4     | 20x10 <sup>4</sup>  | 6     |
| 3 | svetlo zelene kolonije<br>(nismo določili vrste)            | 36x10 <sup>4</sup> | 1     | 21x10 <sup>4</sup>  | 9     |
| 4 | temno zelene kolonije<br>(nismo določili vrste)             | 22x10 <sup>4</sup> | 4     | 17x10 <sup>4</sup>  | 5     |

Na slikah 12 in 13 vidimo kolonije, ki so zrasle na gojišču WL, ki je bilo nacepljeno z različnim oljem. Zrasle so vse vrste, ki smo jih inokulirali v olje. V preglednici 11 so opisi posameznih kolonij, vidimo pa tudi, da so zrastle v različnih razmerjih, čeprav so bile inokulirane v enakih začetnih koncentracijah. Na gojišču je najbolj prevladala vrsta *Saccharomyces cerevisiae*.

#### 4.4.2 Negojitvene metode

Uspešnost izolacije DNA, ki smo jo ugotavljali z reakcijo PCR je bila pri ekstra deviškem oljčnem olju 44 %, pri bučnem olju pa 33 %.

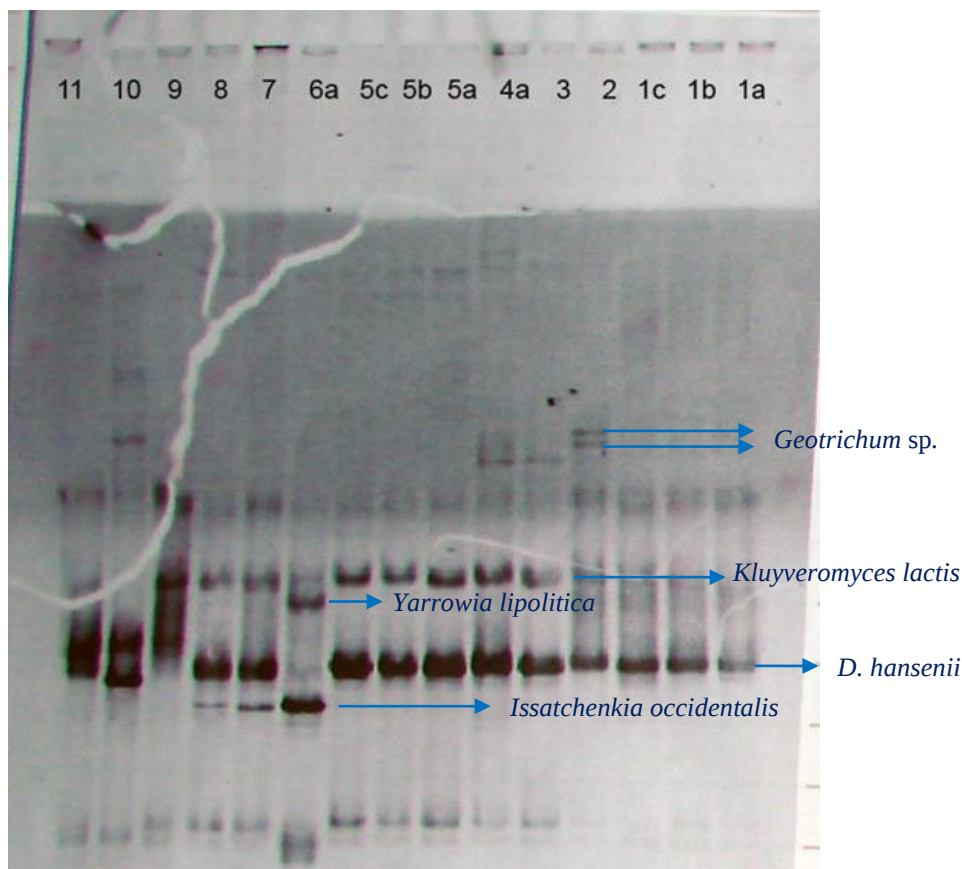


Slika 14: Rezultati DGGE za olje. Legenda: 1 do 3 - Ekstra deviško oljčno olje I; 4 do 7 - Ekstra deviško oljčno olje II; 8 do 10 - Bučno olje I; 11 do 13 - Bučno olje II; 14 do 16 - Bučno olje III; Sc - *Saccharomyces cerevisiae*; Cw - *Candida wickerhamii*; Wc - *Williopsis californica*; Cb - *Candida boidinii*; zelena črta najverjetneje predstavlja rastlinske fragmente DNA

Pri rezultatih DGGE (slika 14) lahko opazimo največ po 2 ločena pasova. V liniji Sc je *Saccharomyces cerevisiae*, ki je ne najdemo pri nobenem vzorcu. Do prekrivanja pride med vrstama *Candida wickerhamii* in *Candida boidinii*, kar je zanimivo, saj sta filogenetsko oddaljeni vrsti. V liniji Wc je *Williopsis californica*, ki pa se vidi le v nekaterih vzorcih bučnega olja. Zeleno označeni pasovi na sliki 14 so najverjetneje fragmenti DNA, ki pripadajo rastlinski DNA.

#### 4.5 SIR

Vzorci sira niso bili umetno kontaminirani, prav tako pa ni bilo dodane starter kulture, tako da je v njih med fermentacijo prevladala naravna mikrobiota. Iz vzorcev smo izolirali celokupno DNA kvasovk, pri čemer smo si v prvih fazah izolacije pomagali z drobnimi kroglicami, da smo razbili teksturo sira. Na sliki 15 pa so končni rezultati DGGE posameznih vzorcev.



Slika 15: Rezultati DGGE pomnoženih DNA fragmentov iz vzorcev sira. Številke od 1 do 11 predstavljajo različne vzorce sira. Zraven nekaterih pasov so označene vrste kvasovk, ki smo jim določili zaporedje.

Številke po linijah prikazujejo sir iz različnih lokacij, črke zraven pa so paralelke. Vsak pas v označeni liniji predstavlja svojo vrsto kvasovk. Iz slike je razvidno, da je v vsakem siru približno 5 različnih vrst kvasovk (kar smo bili sposobni zaznati z DGGE). V vseh sirih pa niso povsod enake kvasovke, kar je razvidno iz različnega profila fragmentov. Nekaj pasov je bilo v nadaljnjih postopkih (ne v sklopu mojega magistrskega dela) izrezanih iz gela in so bili poslani na sekvenciranje, tako da so ob sliki lahko napisane tudi vrste posameznih kvasovk.

Preglednica 12: Rezultati gojitvenih metod pri vzorcih sira (Šuranska in sod., 2014)

|                                   | CFU/g             |                   |                   |                   |                   |                   |                   |     |                   |  |
|-----------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-----|-------------------|--|
| Vrste kvasovk/št. vzorca sira     | 1                 | 3                 | 4                 | 5                 | 6                 | 7                 | 8                 | 10  | 11                |  |
| <i>Debaryomyces hansenii</i>      | 3x10 <sup>7</sup> | 10 <sup>6</sup>   | 9x10 <sup>6</sup> | 5x10 <sup>2</sup> | 2x10 <sup>5</sup> | 1x10 <sup>3</sup> | 3x10 <sup>3</sup> |     | 1x10 <sup>5</sup> |  |
| <i>Candida zeylanoides</i>        | 10 <sup>6</sup>   | 4x10 <sup>4</sup> | 3x10 <sup>6</sup> |                   | 8x10 <sup>4</sup> |                   |                   |     |                   |  |
| <i>Candida deformans</i>          | 1x10 <sup>5</sup> |                   |                   |                   | 4x10 <sup>3</sup> |                   |                   |     |                   |  |
| <i>Trichosporon gracile</i>       | 3x10 <sup>4</sup> |                   |                   |                   |                   |                   |                   |     |                   |  |
| <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>   | 7x10 <sup>4</sup> | 1x10 <sup>4</sup> | 7x10 <sup>4</sup> |                   |                   |                   |                   |     |                   |  |
| <i>Pichia fermentans</i>          | 2x10 <sup>5</sup> |                   |                   |                   |                   |                   | 3x10 <sup>3</sup> |     |                   |  |
| <i>Pichia anomala</i>             | 2x10 <sup>5</sup> |                   |                   |                   |                   |                   |                   |     |                   |  |
| <i>Cryptococcus curvatus</i>      |                   | 1x10 <sup>4</sup> |                   |                   |                   |                   |                   |     |                   |  |
| <i>Metschnikowia chrysoperlae</i> |                   | 4x10 <sup>3</sup> |                   |                   |                   |                   |                   |     |                   |  |
| <i>Kluyveromyces lactis</i>       |                   |                   | 8x10 <sup>4</sup> |                   |                   |                   |                   |     | 6x10 <sup>5</sup> |  |
| <i>Yarrowia lipolytica</i>        |                   |                   | 4x10 <sup>4</sup> | 30                | 1x10 <sup>6</sup> | 50                | 300               | 280 | 1x10 <sup>7</sup> |  |
| <i>Torulaspora delbrueckii</i>    |                   |                   |                   | 2x10 <sup>4</sup> |                   |                   |                   |     |                   |  |
| <i>Torulasporula quercuum</i>     |                   |                   |                   | 60                |                   |                   |                   |     |                   |  |
| <i>Pichia exigua</i>              |                   |                   |                   |                   | 2x10 <sup>5</sup> |                   |                   |     |                   |  |
| <i>Pichia membranifaciens</i>     |                   |                   |                   |                   | 3x10 <sup>3</sup> |                   |                   |     |                   |  |
| <i>Galactomyces geotrichum</i>    |                   |                   |                   |                   |                   | 300               |                   |     | 9x10 <sup>4</sup> |  |
| <i>Candida pararugosa</i>         |                   |                   |                   |                   |                   | 200               |                   |     |                   |  |
| <i>Trichosporon ovoides</i>       |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |     | 2x10 <sup>4</sup> |  |

Iz istih vzorcev sira, so na fakulteti za potrebe raziskave vzporedno analizirali sir z gojitvenimi metodami (Šuranska in sod., 2014). Rezultati gojitvenih metod so podani v preglednici 12. Ko med sabo primerjamo rezultate obeh metod najprej opazimo, da pri obeh metodah zaznamo približno enako število vrst kvasovk.

## 5 RAZPRAVA

V zadnjih letih se vse bolj uveljavljajo molekularne metode za preučevanje mikroorganizmov. To nam omogoča nove načine preiskovanja živil za prisotnost različnih organizmov. Izognemo se slabostim gojitvenih metod, kot so hitrejša rast nekaterih vrst mikroorganizmov, nekateri mikroorganizmi v gojišču niti ne rastejo, nekaj pridobimo tudi na času. Seveda pa nove metode niso idealne, kar lahko sklepamo iz naših rezultatov in lahko trdimo, da so gojitvene metode še vedno nenadomestljive.

V nalogi smo primerjali uporabnost različnih metod za detekcijo in identifikacijo kvasovk v različnih vrstah živil. Za ta namen smo si izbrali pet živil, v katerih so lahko kvasovke ali naravno prisotne ali so dodane živilom kot starter kulture ali pa zaradi kontaminacije povzročajo kvar živil. Štiri živila, pivo, vino, olje in med, smo umetno kontaminirali s kvasovkami, ki pogosto povzročajo kvar. Peto živilo je bilo sir, ki je že naravno vseboval različne vrste kvasovk, ki med zorenjem sira prispevajo k okusu in teksturi le-tega. Nato smo z gojitvenimi in negojitvenimi metodami določili koliko in katere vrste kvasovk lahko zaznamo.

### 5.1 DETEKCIJA KVASOVK V VINU

Za kontaminacijo vina smo za primerjavo izbrali tri različna vina, laški rizling, cviček in teran, pri katerih smo za umetno kontaminacijo uporabili devet različnih vrst kvasovk, ki smo jih izbrali na podlagi literature (Šikovec, 1993; Deak, 2008). Z gojitveno metodo, z gojenjem na diferencialnem gojišču WL, smo lahko opazili rast vseh devetih vrst, ki so bile zastopane v različnem razmerju, čeprav so bile na plošče nanesene v enakih končnih koncentracijah ( $10^6$  celic v 100 ml vina). Prevladovali sta vrsti *Meyerozyma guilliermondii* in *Saccharomyces ludwigii*, števično pa sta najmanj zrasli vrsti *Pichia kudriarzevii* in *Candida zemplinina*. Rezultati so bili podobni za različna vina. Za DGGE ne moremo trditi, da je bila enaka uspešnost, saj se dolžine/sestava vrst *Hanseniaspora uvarum*, *Pichia kudriarzevii*, *Pichia membranifaciens* *Meyerozyma guilliermondii* in *Candida zemplinina* med sabo prekrivajo.

Za primerjavo naj omenim še dve raziskavi. V prvi so na primeru riževega vina primerjali gojenje na gojišču z molekularno identifikacijo PCR-RFLP rDNA in od gojitev neodvisne metode PCR-DGGE, v drugi pa so raziskovali raznolikost in dinamiko kvasovk med produkcijo sladkih vin iz posušenega grozdja (Lv in sod., 2013; Urso in sod., 2013).

V samem eksperimentu so z enakimi metodami kot mi iskali vrste kvasovk v starter kulturah za riževino. Vrste, ki jih odkrijejo so drugačne kot v našem primeru, saj gre za različno vino, se pa pri obeh metodah v največjem številu pojavljajo iste vrste (*Saccharomycopsis fibuligera*, *Saccharomyces cerevisiae* in *Saccharomycopsis malanga*). Z obema metodama so zaznali trinajst različnih kvasovk, le da so z DGGE našli vrsto (*Candida glabrata*), ki jo

z od gojitev odvisnimi metodami niso odkrili, kar je obratno kot pri našem primeru, kjer smo z molekularno metodo manj uspešni (Lv in sod., 2013). Pri drugi raziskavi so vino analizirali z gojitveno metodo na WLN gojišču in PCR-DGGE metodo. Kolonije na ploščah so identificirali s sekvenciranjem. Podobno kot mi so opisali kolonije na ploščah in jih nato analizirali s PCR-DGGE, kjer pa so za isti tip kolonije dobili različne DGGE profile. Prav tako kot mi pa so z molekularnimi metodami zaznali manjše število vrst kvasovk, zaznali pa so še plesni in druge glive (Urso in sod., 2008).

Ugotavljajo, da je PCR-DGGE boljša metoda, ker se izognejo vmesnemu koraku izolacije seva, ker z gojenjem favoriziramo rast določenim vrstam. Vrste, ki pa je niso zaznali z DGGE so pripisali različnim učinkovitostim ekstrakcije DNA iz različnih vrst. Kot končno priporočilo avtor priporoča združitev obeh metod gojitvene in negojitvene, da lahko dobimo celoten profil mikrobne združbe (Lv in sod., 2013). S kombinacijo metod, kot predlaga prejšnji avtor, naj bi prišli do boljših rezultatov, čeprav v našem primeru ne bi dobili boljših rezultatov, saj se rezultati iz plošč, kjer smo gojili vsako vrsto posebej, in smo jim potem izolirali DNA, se nato na DGGE pasovi različnih vrst prekrivajo. V njihovem primeru bi bilo bolje, če bi uporabili diferencialni agar WL, kjer bi lahko razlikovali vrste med seboj in jih nato izolirali in naredili RFLP analizo, ker bi že v začetku po določenih kriterijih ločili kvasovke med seboj tako pa so naključno izolirali vrste. Seveda pa je ta metoda zelo zamudna in pride prav samo za znanstvene raziskave, v praksi kjer pa rezultate potrebujemo prej pa to ni najbolj primerno.

## 5.2 DETEKCIJA KVASOVK V PIVU

V pivo smo inokulirali devet vrst kvasovk do končne koncentracije  $10^4$  celic/100 ml. Izbrane kvasovke (*Dekkera/Brettanomyces anomala*, *Pichia membranifaciens*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia fermentas*, *Candida boidinii*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* in *Pichia anomala*) so najpogostejši kvarljivci piva glede na podatke iz literature (Jespersen in Jakobsen, 1996). Po inokulaciji smo vzeli po 1 ml vzorca za analizo z molekularnimi metodami, za gojitvene metode pa smo naredili redčitve na ploščah. Z gojitveno metodo smo zaznali osem od devetih vrst. Na gojišču namreč nismo opazili kolonij kvasovk *Dekkera/Brettanomyces anomala*, prevladovala pa so kolonije vrste *Pichia fermentas* in *Meyerozyma guilliermondii*. Z molekularnimi metodami smo jih zaznali sedem izmed devetih vrst. Prav tako je bil tu problem v tem, da so se fragmenti DNA nekaterih vrst prekrivali na gelu DGGE npr. *Pichia anomala*, *Candida parapsilosis* in *Candida tropicalis*. Prav tako kot pri gojitvenih metodah tudi tu nismo uspeli zaznati vrste *Dekkera/Brettanomyces anomala*. Podatki iz literature so za detekcijo kvarljivcev piva z različnimi metodami na fermentiranih živilih skopi, eno izmed njih je analiza prisotnih kvasovk v pivu tchoukoutou iz zahodne Afrike (Greppi in sod., 2013). V pivu so vsega skupaj zaznali štiri vrste različnih kvasovk, od tega so z molekularnimi metodami zaznali samo vrsto *Saccharomyces cerevisiae*, s pomočjo gojitvenih metod so uspeli zaznati tudi *Candida krusei*, *Clavispora lusitaniae* in *Candida rugosa*. Med vsemi je najbolj

prevladovala *C. krusei* (59 %), kar je posledica tega, da prekinejo fermentacijo po 12 urah, ker želijo pridelati pivo z manjšo vsebnostjo alkohola. Kot razlog za boljše zaznavanje kvasovk s pomočjo gojitvenih metod navajajo, da lahko pride do napak pri reakciji PCR, kjer je prisotnih več različnih vrst kvasovk in lahko te ovirajo vezavo začetnih oligonukleotidov na DNA *C. krusei*. To so uspeli tudi potrditi, saj so pri čistih kulturah izoliranih s precepljanjem iz enakega vzorca uspešno podvojili fragmente DNA z enakimi začetnimi oligonukleotidi.

V našem primeru smo, prav tako z gojitvenimi metodami, zaznali vseh devet inokuliranih vrst kvasovk, z negojitvenimi pa le šest. Z rezultati DGGE ne moremo trditi, da nismo uspeli izolirati DNA vseh vrst, saj je bilo očitno, da se nekateri pasovi med seboj prekrivajo.

### 5.3 DETEKCIJA KVASOVK V MEDU

Za namen magistrske naloge smo uporabili akacijev in gozdni med. Kvasovke, ki lahko kontaminirajo med glede na podatke iz literature so *Eremothecium (Ashbya) gossypii*, *Torulaspora delbrueckii*, *Schwanniomyces occidentalis*, *Zygosaccharomyces bisporus*, *Zygosaccharomyces mellis* in druge vrste rodu *Zygosaccharomyces* (Poklukar in sod., 1998). V oba tipa medu smo inokuliral tri vrste kvasovk, ki najpogosteje povzročajo kvar meda (Loureiro in Malfeito-Ferreira, 2003). Na gojišču je kljub enakomerni prisotnosti celic vseh treh vrst zraslo največ kolonij vrste *Z. rouxii*. Poleg vseh treh inokuliranih vrst smo na gojišču opazili še eno kolonijo neznane identitete, ki je nismo inokulirali in je šlo za možno kontaminacijo ali pa je bila naravno prisotna. Pri negojitvenih metodah je bila izolacija DNA uspešna, vendar pa pri rezultatih DGGE dobimo po dva ločena pasova od pričakovanih treh. Problem je že v tem, da se posamezno izolirane vrste prekrivajo na DGGE gelu.

Naj še omenim raziskavo, kjer so pri identifikacij kvasovk v medu med seboj primerjali učinkovitost različnih metod, dve molekularni in eno biokemijsko. V začetnem koraku pa so si vseeno pomagali z gojenjem na ploščah, s katerih so nato naključno izbirali kolonije za nadaljnje analize. Za najboljšo metodo se je izkazalo sekvenciranje 26S rDNA regije. To pomeni, da so podobno kot mi najprej s PCR reakcijo podvojili 26S rDNA regijo in jo nato direktno določili nukleotidno zaporedje, mi pa smo pomnožke analizirali z DGGE. Pri njih je bila uspešnost identifikacije 98 %. Za najslabšo metodo se je pri njih izkazal biokemijski test s kompletom API 20C AUX, kjer so uspešno določili vrsto kvasovk le v 58 % (Carvalho in sod., 2010).

### 5.4 DETEKCIJA KVASOVK V OLJU

Tudi za analizo kvasovk v olju smo si izbrali dva različna tipa, bučno olje in ekstra deviško oljčno olje. V vsako olje smo inokulirali ( $10^6$  celic v 100 ml) vrste *Candida boidini*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida wickerhamii* in *Williopsis californica*, ki so pogoste povzročiteljice kvara olja (Ciafardini in sod., 2006). Na ploščah so zrasle vse izbrane vrste kvasovk, ki smo jih tudi uspešno identificirali. V največjem številu sta na ploščah zrasli vrsti

*Saccharomyces cerevisiae* in *Candida boidinii*. Pri molekularnih metodah pa smo imeli težavo že z izolacijo DNA, saj je bila uspešnost izolacije DNA kvasovk iz ekstra deviškega oljčnega olja 44 %, iz bučnega olja pa 33 %.

Pri DGGE smo lahko DNA izolirali iz čiste kulture vrst kvasovk in ločili z DGGE. Pri izolaciji DNA iz olja pa rezultati niso bili najbolj uspešni, pri obeh tipih olj smo zaznali vrsti *Candida wickerhamii* ali *Candida boidinii*, pri bučnem olju pa se v nekaterih primerih zazna tudi vrsta *Williopsis californica*. Torej smo lahko zaznali le po dva pasova od štirih možnih, čeprav smo poskus večkrat ponovili so rezultati ostali nespremenjeni.

Pri olju v literaturi še ni zaslediti, da bi razvijali metode za detekcijo kvasovk iz olja. Znano je, da obstajajo določene vrste kvasovk, tudi te ki smo jih mi uporabili, ki z lipazno aktivnostjo škodujejo kvaliteti produkta.

## 5.5 DETEKCIJA KVASOVK V SIRU

Vzorci sira smo dobili na različnih kmetijah iz Južno-Moravske regije, gore Golja, iz Vlasine v Srbiji in iz Hrvaške. V siru so že bile prisotne kvasovke, kljub temu da ni bilo dodane starter kulture, vendar je bil njihov vir mleko ali sirarska oprema. Iz enajstih vzorcev sira smo izolirali celokupno DNA kvasovk. Pomnožili smo regijo D1/D2 26S ribosomske DNA in pomnožke ločili z DGGE. Kasneje smo iz gela izrezali tudi pasove DNA in jih sekvencirali. V posameznih vzorcih sira smo lahko na ta način zaznali do 5 različnih vrst kvasovk, med katerimi sta bili najpogostejši vrsti *D. hansenii* in *K. lactis* (Preglednica 12). Poleg teh vrst pa so bile v siru prisotne še *Issatchenkia occidentalis*, *Geotrichum* sp. in *Yarrowia lipolytica*, ki smo jih zaznali z metodo DGGE.

Za namen raziskav na fakulteti z enakimi vzorci sira naredili podoben eksperiment, kjer so prav tako primerjali od gojitve odvisne in od gojitve neodvisne molekularne metode. Pri gojitvenih metodah so ugotovili, da se v največjem številu pojavljata vrsti *D. hansenii* in *C. zeylanoides*. *Kluyveromyces lactis*, *Yarrowia lipolytica* in *Galactomyces geotrichum* se pojavijo samo na določenih lokacijah. Z negojitvenimi metodami ne uspejo zaznati vrste *Torulaspora delbrueckii*, ki pa jo z gojitvenimi metodami uspešno zaznajo (Šuranska in sod., 2014).

Na sirih je bilo prav tako narejeno že nekaj podobnih raziskav kot je naša, kjer primerjajo od gojitev odvisne in neodvisne metode pri iskanju mikroorganizmov v sirih. V primeru poljskega sira Ošipek (tradicionalni poljski dimljen sir z geografskim poreklom), so iskali mikrobno združbo, da bi lahko kasneje pripravili starter kulture za industrijsko proizvodnjo. Med seboj so primerjali gojitvene in negojitvene metode (PCR-DGGE). Z gojitvenimi metodami niso identificirali kvasovk, ampak samo bakterije, pri čemer so si pomagali s sekvenciranjem 16S regije rRNA. Molekularne metode so delali po enakem postopku kot mi in našli devet različnih vrst kvasovk (*Candida pararugosa*, *Geotrichum silvicola*,

*Torulaspora* spp., *Saccharomyces* spp., *Phialemonium* spp., *Candida zeylanoides*, *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces marxianus* in *Debaryomyces hansenii*), ki jih identificirajo s pirosekvenciranjem (Algeria in sod., 2012).

Za primerjavo lahko še omenim raziskavo kjer so primerjali mikrobno združbo bakterij in kvasovk pri italijanskem siru glede na lokacijo in sezono. Za velikost populacije bakterij so naredili redčitve plošče za posamezne mikroorganizme. DNA iz sira pa so izolirali po enakih postopkih kot mi. Njihove končne ugotovitve so, da se profil kvasovk ne spreminja glede na sezono (letni čas), pri bakterijah pa se. Prav tako ne moremo povezati določene vrste z neko lokacijo. V največji meri sta prevladovali vrsti *Geotrichum* spp. in *Kluyveromyces lactis*, ki pa jih najdemo tudi v našem primeru (Bonetta in sod., 2008).

## 6 SKLEPI

Na osnovi zastavljenih hipotez in rezultatov smo prišli do naslednjih sklepov:

- Gojitvene metode so se na podlagi naših rezultatov izkazale primernejše za detekcijo kvasovk v živilih, ker smo lahko v vseh živilih detektirali izbrane kvasovke, medtem ko nam z negojitvenimi metodami ni uspelo detektirati vseh vrst oz. nismo mogli ločiti določenih vrst kvarljivcev.
- Čeprav se v vinu nahajajo inhibitorji reakcije PCR, smo iz literature izbrali najučinkovitejšo metodo izolacije DNA, s katero smo dosegli uspešno pomnožitev DNA z reakcijo PCR v 94 %.
- Za izolacijo DNA iz piva metod ni bilo potrebno spreminjati, saj v pivu ni inhibitorjev reakcije PCR, posledično je bila tudi izolacija 100 % uspešna.
- Pri izolaciji DNA iz olja smo si pomagali z detergentom, vendar nam to ni pripomoglo k boljši izolaciji DNA, saj je bila uspešnost izolacije 33 % pri bučnem olju in 44 % pri ekstra deviškem oljčnem olju.
- Glede na primerjavo obeh metod lahko trdimo, da smo bili pri izolaciji DNA kvasovk iz sira uspešni, saj smo z gojitvenimi metodami prišli do podobnih rezultatov kot z negojitvenimi. V obeh primerih smo zaznali enako število vrst, prav tako so v obeh primerih prevladovale iste vrste.
- Visoko vsebnost sladkorjev v medu smo s segrevanjem in redčenjem uspešno odstranili, tako da ni vplivala na izolacijo DNA, in je bila posledično reakcija PCR 100 %.
- Pri delu z gojitvenimi metodami so se pojavili problemi, saj nekatere vrste kvasovk hitreje rastejo kot druge in slednjih zato ne uspemo detektirati, kar se še posebno opazi pri višjih redčitvah.
- Na gelski elektroforezi v denaturacijskem gradientu so se pomnožki DNA nekaterih vrst ustavili v gelu pri enakih koncentracijah denaturata, kar pomeni, da določenih vrst kvasovk nismo mogli razlikovati.

## 7 POVZETEK

Kvasovke se že mnogo let uporablja v živilstvu, saj so pivo izdelovali že stari Egipčani. Prav tako so kvasovke že dolgo tudi uporabljajo pri produkciji drugih živilih kot sta vino in sir. V zadnjih letih pa spoznavamo, da kvasovke niso vedno le koristne in so zmožne kvara hrane v obliki slabšanja okusa, videza in celo vpliva na zdravje. V hrani se pojavlja približno 100 različnih vrst kvasovk, nekaj od teh je koristnih, se pa pojavljajo tudi kvarljive kvasovke, ki povzročajo neželene učinke na hrani. Ene najbolj »slavnih« kvasovk *S. cerevisiae*, ki jih s pridom izkoriščamo pri izdelovanju alkoholnih pijač, peki kruha, so lahko prav tako škodljive in so celo nezaželeni po končni fermentaciji vina. Različne kvasovke rastejo pri različnih okoljskih pogojih, kar moramo upoštevati pri hranjenju različnih živil. Če želimo imeti kvalitetne produkte, moramo zagotoviti dobro kvaliteto surovin, imeti dobro načrtovane postopke obdelave, skrbeti za higieno in zagotoviti nadzor nad kvarljivimi kvasovkami. Za nalogo smo si izbrali naslednja živila: vino, pivo, olje, med in sir. Vsa ta živila so dovzetna za okužbo s kvasovkami. V medu se kvar s kvasovkami kaže v obliki fermentacije, vidijo se mehurčki, medu pa se spreminja aroma. Na fermentacijo vplivajo skladiščna temperatura, struktura kristalov, vsebnost vode in zračna vlaga. Kvasovke olju škodujejo predvsem s produkcijo lipaz, pri čemer se poveča kislost olja. Pri vinu in pivu je v prvi fazi produkcije –fermentacija delovanje kvasovk zelo zaželeno, saj nam sladkor spreminjajo v alkohol in CO<sub>2</sub>. Po končani fermentaciji pa je delovanje kvasovk neželeno, saj nam kvarijo končni produkt. V siru kvasovke z lipazno aktivnostjo vplivajo na teksturo prav tako na armo in okus. Problem v siru je v tem, da je določeno število kvasovk še sprejemljivo, če pa presežejo določeno mejo, pa je lahko zdravju škodljivo.

Za identifikacijo kvasovk smo primerjali gojitvene in ne gojitvene metode. Pri gojitvenih metodah smo si izbrali gojenje kvasovk na diferencialnem gojišču, za molekularne metode pa smo izbrali reakcijo PCR in DGGE metodo, saj je bila tudi v člankih povezanih s hrano največkrat uporabljena. Samo delo je potekalo tako, da smo v izbrana živila inokulirali kvarljive kvasovke za določeno živilo, nato pa smo iz vsakega živila vzeli po tri paralele vzorcev za molekularne in gojitvene analize. Za gojitvene metode smo vzorce redčili in jih inokulirali na diferencialno gojišče. Pri molekularnih metodah pa smo za vsako živilo metodo nekoliko prilagodili: pri siru smo dodali kroglice, pri vinu molekulo za odstranjevanje inhibitorjev reakcije PCR, in pri olju uporabili detergente saj imajo živila različno sestavo, ki različno vpliva na izolacijo in podvajanje DNA.

Obe metodi imata svoje prednosti in slabosti. Prva je preprosta za uporabo, druga pa je rahlo hitrejša. Seveda pa obstajajo še metode, ki so še hitrejša in bolj specifična, ki pa so dražja in so opisane že prej, ampak jih pri svoji nalogi nismo uporabili. Se pa bodo novejša metode zagotovo v večji meri uporabljale v prihodnosti, saj so zahteve po varnih in kakovostnih živilih vse večje. Modernizacija in napredki v znanosti pa nam omogočajo, da se poslužujemo novih tehnologij, ki postajajo vse bolj dostopne.

## 8 VIRI

- Algeria A., Szczesny P., Mayo B., Bardowski J., Kowalczyk M. 2012. Biodiversity in Oscypek, a traditional Polish cheese, determined by culture-dependent and -independent approaches. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 6: 1890-1898.
- Arraiano C., Yancey S., Kushner S. 1998. Stabilization of discrete mRNA breakdown products in ams, pnp and rnb multiple mutants of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, 170: 4625-4633.
- Bonetta S., Carraro E., Rantsiou K., Cocolin L. 2008. Microbiological characterisation of Robiola di Roccaverano cheese using PCR-DGGE. *Food Microbiology*, 25: 786-792.
- Boskou D. 2011. Olive oil. V: *Vegetable oils in food technology: Composition, properties and uses*. 2<sup>nd</sup> ed. Gunstone F. (ed.). West Sussex, Blackwell Publishing: 243-272.
- Bottari B., Ercolini D., Gatti M., Neviani E., 2006. Application of FISH technology for microbiological analysis: current state and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73: 485-494.
- Carvalho C., Meirinho S., Estevinho M., Choupina A. 2010. Yeast species associated with honey: different identification methods. *Archivos de Zootechnia*, 59, 225: 103-113.
- Ciafardini G., Zullo B.A., Iride A. 2006. Lipase production by yeasts from extra virgin olive oil. *Food Microbiology*, 23: 60-67.
- Ciafardini G., Zullo, B. 2002. Microbiological activity in stored olive oil. *International Journal of Food Microbiology* 75: 111-118.
- Cocolin L., Alessandria V., Dolci P., Gorra R., Rantsiou K. 2013. Culture independent methods to assess the diversity and dynamics of microbiota during food fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 167, 1: 29-43.
- Cocolin L., Manzano M., Cantoni C., Comi G. 2001. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the 16S rRNA gene V1 region to monitor dynamic changes in the bacterial population during fermentation of Italian sausages. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 5113-5121.
- Costa J., Mafra I., Amaral J. S. 2010. Detection of genetically modified soybean DNA in refined vegetable oils. *European Food Research and Technology*, 230: 915-923.
- Deak T. 1995. Methods for the rapid detection and identification of yeasts in foods. *Trends in Food Science & Technology*, 6: 287-292.

- Deak T. 2008. Handbook of spoilage yeast. 2<sup>nd</sup> ed. Boca Raton, CRC Press: 350 str.
- Dias L., Sancho T., Stender H., Querol A., Malfeito-Ferreira M. 2003. Identification of yeasts originated from wine related environments and capable of producing 4-ethylphenol. Food Microbiology, 20, 5: 567-574.
- Ercolini D., De Filippis F., La Stora A., Iacono M., 2012. "Remake" by high-throughput sequencing of the microbiota involved in the production of water buffalo mozzarella cheese. Applied and Environmental Microbiology, 78, 22: 8142-8145.
- Ercolini D., Hill P., Dodd E. 2003. Bacterial community structure and location in Stilton cheese. Applied and Environmental Microbiology, 69, 12: 3540-3548.
- Fischer S.G., Lerman L.S. 1983. DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 80, 6: 1579-1583.
- Fleet G. H. 2003. Yeast interactions and wine flavour. International Journal of Food Microbiology, 86: 11-22.
- Fleet G. H. 2007. Yeasts in foods and beverages: impact on product quality and safety. Current Opinion in Biotechnology, 18: 170-175.
- Frega N., Mozzon M., Lercker G. 1999. Effects of free acids on oxidative stability of vegetable oil. Journal of the American oil chemists society, 76, 6: 325-329.
- Fogel G., Collins C., Li J., Brunk C. 1999. Prokaryotic genome size and SSU rDNA copy number estimation of microbial relative abundance from a mixed population. Microbial Ecology, 38, 2: 93-113.
- Gosalbes M. J., Durban A., Pignatelli M., Abellan J. J., Jimenez-Hernandes N., Perez-Cobas A., Latorre A., Moya A. 2011. Metatranscriptomic approach to analyze the functional human gut microbiota. PLoS One, 6, 3: e17447, doi: 10.1371/journal.pone.0017447: 9 str.
- Greppi A., Rantsiou K., Padonou W., Hounhouigan J., Jespersen L., Jakobsen M., Cocolin L. 2013. Determination of yeast diversity in ogi, mawè, gowé and tchoukoutou by using culture-dependent and - independent methods. International Journal of Food Microbiology, 165, 2: 84-88.
- Hayashi K., 1992. PCR-SSCP: a method for detection of mutations. Genetic Analysis Techniques and Applications, 9, 3: 73-79.

- Hutkins R. W. 2006. Microbiology and technology of fermented foods. Chicago, IFT Press Blackwell Publishing: 473 str.
- Hugenholtz P., Goebel B. M., Pace N. R. 1998. Impact of culture-independent studies on emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal of Bacteriology*, 180, 18: 4765-4774.
- Ingledeu W., Casey G. 1982. The use and understanding of media used in brewing microbiology. *Brewers Digest*, 57: 18-22.
- Jany J.-L., Barbier G. 2008. Culture-independent methods for identifying microbial communities in cheese. *Food Microbiology*, 25: 839-848.
- Jespersen L., Jakobsen M. 1996. Specific spoilage organism in breweries and laboratory media for their detection. *International Journal of Food Microbiology*, 33: 139-155.
- Jespersen L., van der Aa Kühle A., 1998. Detection and identification of wild yeast in lager breweries. *International Journal of Food Microbiology*, 43: 205-213.
- Kurtzman Cletus P., Piškur J., 2006. Taxonomy and phylogenetic diversity among the yeast. *Topics in Current Genetics*, 15: 29-46.
- Landweber L. 1999. Something old for something new: the future of ancient DNA in conservation biology. V: Genetics and the extinction of species. Landweber L. F., Dobson A. P. (eds.). West Sussex, Princeton University Press: 163-167.
- Loureiro V., Malfeito-Ferreira M. 2003. Yeasts in spoilage. V: Encyclopedia of food sciences and nutrition. Vol. 9. 2<sup>nd</sup> ed. Caballero B., Trugo L.C., Finglas P.M. (eds.). Amsterdam, Academic Press: 5530-5537.
- Ly X. C., Zhang W., Rao P. F., Ni L. 2013. Yeast diversity of traditional alcohol fermentation starters for Hong Qu yeast diversity of traditional alcohol fermentation starters for Hong Qu glutinous rice wine brewing, revealed by culture-dependent and culture-independent methods. *Food Control*, 34: 183-190.
- Martorell P., Barata A., Malfeito-Ferreira M., Fernández-Espinar M. T., Loureiro V., Querol A. 2006. Molecular typing of the yeast species *Dekkera bruxellensis* and *Pichia guilliermondii* recovered from wine related sources. *International Journal of Food Microbiology*, 106, 1: 79-84.
- Muyzer G., Smalla K. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 73, 1: 127-141.

- Oliver J. D. 1993. Formation of viable but nonculturable cells. V: Starvation in bacteria. Kjelleberg S. (ed.). New York, Plenum Press: 239-272.
- Poklukar J., Jože B., Božič J. 1998. Od čebele do medu. Ljubljana, Kmečki glas: 472 str.
- Remize F., Tessonnière H., Vidal S., Barnavon L., Alexandre H. 2009. Design and performance testing of a real-time PCR assay for sensitive and reliable direct quantification of *Brettanomyces* in wine. *International Journal of Food Microbiology*, 129, 3: 237-243.
- Renouf V., Lonvaud-Funel A. 2007. Development of an enrichment medium to detect *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis*, a spoilage wine yeast, on the surface of grape berries. *Microbiological Research*, 162, 2: 154-167.
- Repe B. 2012. Hmelj in Slad božanski hlad: zgodovina piva na Slovenskem in po svetu. Celovec, Mohorjeva družba: 184 str.
- Rudi K., Moen B., Drømtorp S., Holck A. 2005. Use of ethidium monoazide and PCR in combination for quantification of viable and dead cells in complex samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 2: 1018-1024.
- Seiler H. 2002. Yeast in milk and dairy products. V: *Encyclopedia of dairy sciences*. Vol. 4 Fuquay J.W., Fox P. F. (eds.). Amsterdam, Elsevier: Academic Press, 2761-2769.
- Sibley C., Peirano G., Church D. 2012. Molecular methods for pathogen and microbial community detection and characterization: current and potential application in diagnostic microbiology. *Infection, Genetics and Evolution*, 12: 505-521.
- Sivasankar B. 2002. Food processing and preservation. Delhi, PHI Learning Private Limited: 372 str.
- Snowdon J. A., Cliver D. O. 1996. Microorganisms in honey. *International Journal of Food Microbiology*, 31, 1-3: 1-26.
- Sweigers J., Bartowsky E., Henschke P., Pretorius I. 2005. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11, 2: 139-173.
- Šikovec S. 1993. Vinarstvo - od grozdja do vina. Ljubljana, Kmečki glas: 283 str.
- Šuranska H., Raspor P., Uroić K., Golić N., Kos B., Mihajlović S., Begović J., Šušković J., Topisirović L., Čadež N. 2014. Culture-independent approach for semi-quantification and characterisation of yeast microbiota in traditional Serbian cheeses (neobjavljeni rezultati).

- Urso R., Rantsiou K., Dolci P., Rolle L., Comi G., Cocolin L. 2008. Yeast biodiversity and dynamics during sweet wine production as determined by molecular methods. *FEMS Yeast Research*, 8, 7: 1053-1062.
- Zullo B., Ciafardini G. 2008. Lipolytic yeasts distribution in commercial extra virgin olive oil. *Food Microbiology*, 25, 8: 970-977.
- Viljoen B. C. 2006. Yeast ecological interactions. yeast-yeast, yeast-bacteria, yeast-fungi interactions and yeasts as biocontrol agents. V: *The yeast handbook*. Vol. 2. Querol A., Fleet G. H. (eds.). Berlin, Springer-Verlag: 83-110.

## **ZAHVALA**

Najprej bi se najlepše zahvalil mentorici doc. dr. Neži Čadež, ki me je sprejela pod svoje mentorstvo, za vodenje, strokovno pomoč in nasvete pri izvedbi magistrske naloge.

Hvala tudi recenzentki doc. dr. Poloni Zalar za korekten in hiter pregled naloge.

Najlepša hvala tudi staršema, ki sta me dolgo podpirala pri mojem študiju.

Hvala tudi sošolcem Danielu, Mojci in Blažu, ki ste mi polepšali študentska leta.

## PRILOGE



Priloga A: Morfologija kolonij *Pichia membranifaciens* - ZIM 2304



Priloga B: Morfologija kolonij  
*Dekkera/Brettanomyces anomala* – ZIM 701



Priloga C: Morfologija kolonij  
*Meyerozyma guilliermondii* – ZIM 725



Priloga D: Morfologija kolonij  
*Hanseniaspora uvarum* – ZIM 670



Priloga E: Morfologija kolonij *Candida zemplinina* – ZIM 842



Priloga F: Morfologija kolonij *Pichia kudriarzevii* – ZIM 2502



Priloga H: Morfologija kolonij *Zygosaccharomyces bailii* – ZIM 850



Priloga G: Morfologija kolonij *Schizosaccharomyces pombe* – ZIM 778



Priloga J: Morfologija kolonij *Candida parapsilopsis* – ZIM 2499



Priloga I: Morfologija kolonij *Saccharomyces ludwigii* - ZIM 1777



Priloga K: Morfologija kolonij *Candida tropicalis* – ZIM 2011



Priloga L: Morfologija kolonij *Pichia anomala* - ZIM 2301



Priloga N: Morfologija kolonij *Pichia fermentas* – ZIM 2398



Priloga M: Morfologija kolonij *Saccharomyces diastaticus* – ZIM 784



Priloga P: Morfologija kolonij *Saccharomyces cerevisiae* – ZIM 753



Priloga O: Morfologija kolonij *Zygosaccharomyces rouxii* – ZIM 2238



Priloga Q: Morfologija kolonij *Candida boidinii* – ZIM 2228