

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Leon KEJŽAR

**DINAMIKA PORABE GLUKOZE TER PRODUKCIJA MLEČNE  
KISLINE IN BAKTERIOCINOV MED GOJENJEM *Lactobacillus*  
*gasseri* K7**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**DYNAMICS OF GLUCOSE CONSUMPTION AND PRODUCTION OF  
LACTIC ACID AND BACTERIOCINS DURING CULTIVATION OF  
*Lactobacillus gasseri* K7**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2016

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

Za mentorico diplomskega dela je imenovana viš. znan. sod. dr. Bojana Bogovič Matijašič in za recenzentko prof. dr. Sonja Smole Možina.

Mentorica: viš. znan. sod. dr. Bojana Bogovič Matijašič

Recenzentka: prof. dr. Sonja Smole Možina

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Podpisani izjavljam, da je diplomsko delo rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Leon Kejžar

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 602.3/.4:604.4:579.22+579.26(043)=163.6
KG	bakteriocini/bioproses/poraba glukoze/produkcija mlečne kisline/ <i>Lactobacillus gasseri</i> K7
AV	KEJŽAR, Leon
SA	BOGOVIČ MATIJAŠIČ, Bojana (mentorica)/ SMOLE MOŽINA, Sonja (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI	2016
IN	DINAMIKA PORABE GLUKOZE TER PRODUKCIJA MLEČNE KISLINE IN BAKTERIOCINOV MED GOJENJEM <i>Lactobacillus gasseri</i> K7
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XI, 45 str., 3 pregl., 8 sl., 22 pril., 93 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	V predhodnih raziskavah je bilo ugotovljeno, da sev <i>Lactobacillus gasseri</i> K7 tvori vsaj dva dvo-komponentna bakteriocina, ki delujeta zaviralno proti številnim bakterijskim sevom. Osnovni cilj naloge je bil primerjati dinamiko porabe glukoze in produkcije mlečne kisline seva <i>Lactobacillus gasseri</i> K7 v različnih bioprosesih ter ob različni začetni koncentraciji glukoze v gojišču. Spremljali smo tudi rast in produkcijo bakteriocinov. Procese smo izvajali v 250 ml steklenicah in v laboratorijskem bioreaktorju z delovnim volumnom 2,2 l, uporabili pa smo modificirani bujon MRS. Razlika med kultivacijami je bila v tem, da smo v laboratorijskem bioreaktorju uravnavali pH, v steklenicah pa ne, vsi ostali pogoji pa so bili enaki (sestava gojišča, temperatura, velikost inokuluma). Bakteriocinsko aktivnost smo ugotavljali z biološkim testom z indikatorskim sevom <i>Lactobacillus sakei</i> NCDO 2714. Ugotovili smo, da je vrsta bioprosesa vplivala predvsem na produkcijo bakteriocinov in na porabo glukoze, ne pa na rast in na produkcijo mlečne kisline. Med procesom v bioreaktorju sta bili poraba glukoze in proizvodnja bakteriocinov večji. Večje koncentracije glukoze (20 g/l) so negativno vplivale na produkcijo bakteriocinov v bioreaktorju, produkcija v steklenicah pa je bila pri vseh pogojih manjša kot v bioreaktorju.

### KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC UDC 602.3/.4:604.4:579.22+579.26(043)=163.6
- CX bacteriocins/bioprocesses/glucose consumption/production of lactic acid/  
*Lactobacillus gasseri* K7
- AU KEJŽAR, Leon
- AA BOGOVIČ MATIJAŠIČ, Bojana (supervisor)/ SMOLE MOŽINA, Sonja (reviewer)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
- PY 2016
- TI DYNAMICS OF GLUCOSE CONSUMPTION AND PRODUCTION OF LACTIC ACID AND BACTERIOCINS DURING CULTIVATION OF *Lactobacillus gasseri* K7
- DT Graduation Thesis (University studies)
- NO XI, 45 p., 3 tab., 8 fig., 22 ann., 93 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB In previous studies it has been found that strain *Lactobacillus gasseri* K7 produces at least two two-component bacteriocins which have an inhibitory impact on several bacterial strains. The basic aim of this thesis was to compare the dynamics of glucose consumption and the production of lactic acid by the strain *Lactobacillus gasseri* K7 in various bioprocesses and with different initial glucose concentration in the medium. In addition, the growth and bacteriocin production were determined. The processes were carried out in 250 ml bottles and in a laboratory bioreactor with working volume of 2,2 l, using modified MRS broth. The distinction among cultivations was in the fact that in laboratory bioreactor pH was regulated while in the bottles it was not, all other conditions were the same (medium composition, temperature, inoculum size). Bacteriocin activity was determined by biological test using *Lactobacillus sakei* NCDO 2714 indicator strain. We found out that the type of bioprocess influenced bacteriocin production and glucose consumption, but not growth and lactic acid production. During the process in bioreactor, the glucose consumption and bacteriocin production were higher. Higher initial glucose concentration (20 g/l) negatively influenced the bacteriocin production in bioreactor, while the bacteriocin production in bottles was lower than in a laboratory bioreactor.

## 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>VII</b>
<b>KAZALO SLIK.....</b>	<b>VIII</b>
<b>KAZALO PRILOG.....</b>	<b>IX</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....</b>	<b>XII</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA.....	1
1.2 CILJ RAZISKOVANJA .....	2
1.3 DELOVNE HIPOTEZE .....	2
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>3</b>
2.1 MLEČNOKISLINSKE BAKTERIJE.....	3
2.2 BAKTERIOCINI MLEČNOKISLINSKIH BAKTERIJ .....	5
2.2.1 Definicija bakteriocinov .....	5
2.2.2 Uporaba bakteriocinov .....	6
2.2.3 Razvrstitev bakteriocinov .....	6
2.2.4 Biosinteza bakteriocinov .....	7
2.2.5 Način delovanja .....	9
2.2.6 Imunost bakteriocinogene bakterije .....	9
2.3 LASTNOSTI SEVA <i>Lactobacillus gasseri</i> K7 .....	9
2.3.1 Sev <i>Lactobacillus gasseri</i> K7 .....	9
<b>3 MATERIAL IN METODE .....</b>	<b>12</b>
3.1 NAČRT POSKUSA.....	12
3.2 MATERIAL.....	13
3.2.1 Bakterijski sevi.....	13
3.2.2 Gojišča .....	13
3.2.2.1 Tekoča gojišča.....	13
3.2.2.2 Trdna gojišča .....	14
3.2.2.3 Poltrdna gojišča .....	14
3.2.3 Priprava raztopin .....	14
3.3 METODE DELA .....	14
3.3.1 Priprava inokuluma .....	14
3.3.2 Ugotavljanje števila kolonijskih enot (KE/ml).....	15
3.3.3 Merjenje optične gostote .....	15
3.3.4 Priprava supernatanta z bakteriocini.....	15

<b>3.3.5</b>	<b>Ugotavljanje bakteriocinske aktivnosti na mikrotitrskih ploščah z indikatorskim sevom <i>L. sakei</i> NCDO 2714.....</b>	<b>15</b>
<b>3.3.6</b>	<b>Izračun specifične hitrosti rasti.....</b>	<b>17</b>
<b>3.3.7</b>	<b>Merjenje koncentracije mlečne kisline.....</b>	<b>17</b>
<b>3.3.8</b>	<b>Merjenje koncentracije glukoze.....</b>	<b>18</b>
<b>3.4</b>	<b>PRIPRAVA IN VODENJE FERMENTACIJE.....</b>	<b>18</b>
<b>3.4.1</b>	<b>Bioprocес v steklenicah.....</b>	<b>18</b>
3.4.1.1	Priprava materiala za fermentacijo v steklenicah.....	18
3.4.1.2	Zagon bioprocеса.....	18
3.4.1.3	Spremljanje bioprocеса.....	19
<b>3.4.2</b>	<b>Bioprocес v bioreaktorju.....</b>	<b>19</b>
3.4.2.1	Priprava materiala za zagon bioprocеса v bioreaktorju.....	19
3.4.2.2	Priprava bioreaktorja.....	19
3.4.2.3	Priprava na sterilizacijo.....	20
3.4.2.4	Sterilizacija.....	20
3.4.2.5	Zagon bioprocеса.....	20
3.4.2.6	Oprema bioreaktorja:.....	23
<b>4</b>	<b>REZULTATI.....</b>	<b>24</b>
<b>4.1</b>	<b>REZULTATI KULTIVACIJ.....</b>	<b>24</b>
<b>4.1.1</b>	<b>Rast seva <i>Lactobacillus gasseri</i> K7 in produkcija bakteriocinov med gojenjem v steklenicah (S) brez uravnavanja pH ter v bioreaktorju (B) z uravnavanjem pH, pri različnih začetnih koncentracijah glukoze.....</b>	<b>24</b>
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI.....</b>	<b>31</b>
5.1	RAZPRAVA.....	31
5.2	SKLEPI.....	34
<b>6</b>	<b>POVZETEK.....</b>	<b>36</b>
<b>7</b>	<b>VIRI.....</b>	<b>38</b>
	<b>ZAHVALA</b>	
	<b>PRILOGE</b>	

## KAZALO PREGLEDNIC

- Preglednica 1:** Maksimalno število kolonijskih enot, maksimalna specifična hitrost rasti ter maksimalna bakteriocinska aktivnost *Lactobacillus gasseri* K7 v bujonu MRS (konc. glukoze=10, 15 in 20 g/l, T=37 °C, v bioreaktorju je vrednost pH=5,75, št. vrt./min=200), v steklenicah (S) in v bioreaktorju (B). Prikazane so maksimalne vrednosti vsakega testa. V oklepaju je navedeno, po koliko urah smo ugotovili te vrednosti. .... 28
- Preglednica 2:** Število kolonijskih enot, specifična hitrost rasti ter bakteriocinska aktivnost *Lactobacillus gasseri* K7 v bujonu MRS (konc. glukoze=10, 15 in 20 g/l, T=37 °C), v steklenicah. Prikazana so povprečja procesov z dvema paralelkama..... 28
- Preglednica 3:** Število kolonijskih enot, specifična hitrost rasti ter bakteriocinska aktivnost *Lactobacillus gasseri* K7 v bujonu MRS (konc. glukoze=10, 15 in 20 g/l, T=37 °C, v bioreaktorju je vrednost pH=5,75, št. vrt./min=200), v bioreaktorju. Prikazana so povprečja treh procesov za vsako koncentracijo (n=3)..... 29

## KAZALO SLIK

<b>Slika 1:</b> Potek poskusa .....	12
<b>Slika 2:</b> Shema merjenja bakteriocinske aktivnosti na mikrotitrski plošči .....	16
<b>Slika 3:</b> Shema laboratorijskega bioreaktorja (BIOENGINEERING, Švica).....	22
<b>Slika 4:</b> Rast skupne biomase, poraba glukoze, produkcija mlečne kisline ter bakteriocinska aktivnost <i>Lactobacillus gasseri</i> K7, v MRS bujonu (konc. glukoze=10 g/l, T=37 °C, v bioreaktorju je vrednost pH=5,75, št. vrt./min=200), pri gojenju v steklenicah (S) in bioreaktorju (B). Prikazana so povprečja vseh testov, dveh procesov z dvema paralelkama v steklenicah in treh procesov za vsako koncentracijo v bioreaktorju.....	25
<b>Slika 5:</b> Rast skupne biomase, poraba glukoze, produkcija mlečne kisline ter bakteriocinska aktivnost <i>Lactobacillus gasseri</i> K7 v MRS bujonu (konc. glukoze=15 g/l, T=37 °C, v bioreaktorju je vrednost pH=5,75, št. vrt./min=200), pri gojenju v steklenicah (S) in bioreaktorju (B). Prikazana so povprečja vseh testov, dveh procesov z dvema paralelkama v steklenicah in treh procesov za vsako koncentracijo v bioreaktorju.....	26
<b>Slika 6:</b> Rast skupne biomase, poraba glukoze, produkcija mlečne kisline ter bakteriocinska aktivnost <i>Lactobacillus gasseri</i> K7 v MRS bujonu (konc. glukoze=20g/l, T=37 °C, v bioreaktorju je vrednost pH=5,75, št. vrt./min=200), pri gojenju v steklenicah (S) in bioreaktorju (B). Prikazana so povprečja vseh testov, dveh procesov z dvema paralelkama v steklenicah in treh procesov za vsako koncentracijo v bioreaktorju.....	27
<b>Slika 7:</b> Prikaz razmerja L in D mlečne kisline med kultivacijo <i>Lactobacillus gasseri</i> K7 v steklenicah (S) in bioreaktorju (B) (T=37 °C, v bioreaktorju je vrednost pH=5,75, št. vrt./min=200). Vrednosti v oklepaju (10, 15 ali 20 g/l) pomenijo začetno koncentracijo glukoze v gojišču. Prikazana so povprečja dveh procesov z dvema paralelkama v steklenicah (n=4) in treh procesov za vsako koncentracijo v bioreaktorju (n=3). .....	29
<b>Slika 8:</b> Poraba glukoze med kultivacijo <i>Lactobacillus gasseri</i> K7 v steklenicah (S) in bioreaktorju (B) (T=37 °C, v bioreaktorju je vrednost pH=5,75, št. vrt./min=200). Vrednosti v oklepaju (10, 15 ali 20 g/l) pomenijo začetno koncentracijo glukoze v gojišču. Prikazana so povprečja dveh procesov z dvema paralelkama v steklenicah (n=4) in treh procesov za vsako koncentracijo v bioreaktorju (n=3).....	30



## KAZALO PRILOG

**Priloga A:** Spremljanje rastnih parametrov in produkcije bakteriocinov med kultivacijo seva *Lactobacillus gasseri* K7 v steklenicah (S1) pri začetni vrednosti pH 5,75 in koncentraciji glukoze 10 g/l (I. poskus, 1. paralelka).

**Priloga B:** Spremljanje rastnih parametrov in produkcije bakteriocinov med kultivacijo seva *Lactobacillus gasseri* K7 v steklenicah (S2) pri začetni vrednosti pH 5,75 in koncentraciji glukoze 15 g/l (I. poskus, 1. paralelka).

**Priloga C:** Spremljanje rastnih parametrov in produkcije bakteriocinov med kultivacijo seva *Lactobacillus gasseri* K7 v steklenicah (S3) pri začetni vrednosti pH 5,75 in koncentraciji glukoze 20 g/l (I. poskus, 1. paralelka).

**Priloga D:** Spremljanje rastnih parametrov in produkcije bakteriocinov med kultivacijo seva *Lactobacillus gasseri* K7 v steklenicah (S1) pri začetni vrednosti pH 5,75 in koncentraciji glukoze 10 g/l (I. poskus, 2. paralelka).

**Priloga E:** Spremljanje rastnih parametrov in produkcije bakteriocinov med kultivacijo seva *Lactobacillus gasseri* K7 v steklenicah (S2) pri začetni vrednosti pH 5,75 in koncentraciji glukoze 15 g/l (I. poskus, 2. paralelka).

**Priloga F:** Spremljanje rastnih parametrov in produkcije bakteriocinov med kultivacijo seva *Lactobacillus gasseri* K7 v steklenicah (S3) pri začetni vrednosti pH 5,75 in koncentraciji glukoze 20 g/l (I. poskus, 2. paralelka).

**Priloga G:** Spremljanje rastnih parametrov in produkcije bakteriocinov med kultivacijo seva *Lactobacillus gasseri* K7 v steklenicah (S1) pri začetni vrednosti pH 5,75 in koncentraciji glukoze 10g/l (II. poskus, 1. paralelka).

**Priloga H:** Spremljanje rastnih parametrov in produkcije bakteriocinov med kultivacijo seva *Lactobacillus gasseri* K7 v steklenicah (S2) pri začetni vrednosti pH 5,75 in koncentraciji glukoze 15 g/l (II. poskus, 1. paralelka).

**Priloga I:** Spremljanje rastnih parametrov in produkcije bakteriocinov med kultivacijo seva *Lactobacillus gasseri* K7 v steklenicah (S3) pri začetni vrednosti pH 5,75 in koncentraciji glukoze 20 g/l (II. poskus, 1. paralelka).

**Priloga J:** Spremljanje rastnih parametrov in produkcije bakteriocinov med kultivacijo seva *Lactobacillus gasseri* K7 v steklenicah (S1) pri začetni vrednosti pH 5,75 in koncentraciji glukoze 10 g/l (II. poskus, 2. paralelka).

**Priloga K:** Spremljanje rastnih parametrov in produkcije bakteriocinov med kultivacijo seva *Lactobacillus gasseri* K7 v steklenicah (S2) pri začetni vrednosti pH 5,75 in koncentraciji glukoze 15 g/l (II. poskus, 2. paralelka).

**Priloga L:** Spremljanje rastnih parametrov in produkcije bakteriocinov med kultivacijo seva *Lactobacillus gasseri* K7 v steklenicah (S3) pri začetni vrednosti pH 5,75 in koncentraciji glukoze 20 g/l (II. poskus, 2. paralelka).

**Priloga M:** Spremljanje rastnih parametrov in produkcije bakteriocinov med kultivacijo seva *Lactobacillus gasseri* K7 v bioreaktorju (B1) pri vrednosti pH 5,75 in koncentraciji glukoze 10 g/l (1. poskus).

**Priloga N:** Spremljanje rastnih parametrov in produkcije bakteriocinov med kultivacijo seva *Lactobacillus gasseri* K7 v bioreaktorju (B1) pri vrednosti pH 5,75 in koncentraciji glukoze 15 g/l (2. poskus).

**Priloga O:** Spremljanje rastnih parametrov in produkcije bakteriocinov med kultivacijo seva *Lactobacillus gasseri* K7 v bioreaktorju (B1) pri vrednosti pH 5,75 in koncentraciji glukoze 20 g/l (3. poskus).

**Priloga P:** Spremljanje rastnih parametrov in produkcije bakteriocinov med kultivacijo seva *Lactobacillus gasseri* K7 v bioreaktorju (B2) pri vrednosti pH 5,75 in koncentraciji glukoze 10 g/l (1. poskus).

**Priloga R:** Spremljanje rastnih parametrov in produkcije bakteriocinov med kultivacijo seva *Lactobacillus gasseri* K7 v bioreaktorju (B3) pri vrednosti pH 5,75 in koncentraciji glukoze 15 g/l (2. poskus).

**Priloga S:** Spremljanje rastnih parametrov in produkcije bakteriocinov med kultivacijo seva *Lactobacillus gasseri* K7 v bioreaktorju (B2) pri vrednosti pH 5,75 in koncentraciji glukoze 20g/l (3. poskus).

**Priloga T:** Spremljanje rastnih parametrov in produkcije bakteriocinov med kultivacijo seva *Lactobacillus gasseri* K7 v bioreaktorju (B3) pri vrednosti pH 5,75 in koncentraciji glukoze 10 g/l (1. poskus).

**Priloga U:** Spremljanje ravnih parametrov in produkcije bakteriocinov med kultivacijo seva *Lactobacillus gasseri* K7 v bioreaktorju (B3) pri vrednosti pH 5,75 in koncentraciji glukoze 15 g/l (2. poskus).

**Priloga V:** Spremljanje ravnih parametrov in produkcije bakteriocinov med kultivacijo seva *Lactobacillus gasseri* K7 v bioreaktorju (B3) pri vrednosti pH 5,75 in koncentraciji glukoze 20 g/l (3. poskus).

**Priloga Z:**

Spremljanje koncentracije glukoze in mlečne kisline med kultivacijo seva *Lactobacillus gasseri* K7 v steklenicah (S) in bioreaktorju (B) pri različnih začetnih koncentracijah glukoze v treh časovnih obdobjih (na začetku, po šestih urah in po desetih urah). Rezultati so povprečje dveh paralelk pri steklenicah in treh pri bioreaktorju.

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ABC	aktivni transport, vezan na energijo ATP (ATP binding cassette)
BA/ml	bakteriocinska aktivnost/ml supernatanta (izražena v delovnih enotah)
Da, kDa	velikost proteinov, izražena kot število daltonov, kilodaltonov
DNA	deoksiribonukleinska kislina
<i>E.</i>	<i>Escherichia coli</i>
G+	po Gramu pozitivne bakterije
G-	po Gramu negativne bakterije
KE/ml	število kolonijskih enot/ml
<i>L.</i>	<i>Lactobacillus</i>
<i>Lc.</i>	<i>Lactococcus</i>
MKB	mlečnokislinske bakterije
MRS	gojišče za mlečnokislinske bakterije po De Man Rogosa Sharp
NCDO	National Collection of Dairy Organisms, National Institute for Dairying, Reading, England
OD (660 nm)	optična gostota celic, izmerjena pri valovni dolžini 660 nm
ssp.	podvrsta (subspecies)

## 1 UVOD

### 1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Mlečnokislinske bakterije (MKB) so osrednjega pomena za proizvodnjo mnogih vrst fermentirane hrane. MKB lahko zavrejo razmnoževanje kvarljivih mikroorganizmov z različnimi mehanizmi, najbolj običajno z znižanjem pH okolja. Še več, lahko proizvajajo protimikrobne peptide, bakteriocine, ki primarno delujejo proti drugim MKB v isti ekološki niši, ali drugim mikroorganizmom (Eijsink in sod., 2002; De Vuyst in Vandamme, 1994a, 1994b; Schillinger in sod., 1996).

MKB se nahajajo na mukoznih površinah ljudi in živali, v mlečnih izdelkih ter na površini nekaterih rastlin (Rogelj, 1994). Številne vrste se kot starterske kulture uporabljajo za proizvodnjo fermentiranih mlečnih in mesnih izdelkov (Salminen in sod., 1993).

MKB tradicionalno uporabljajo pri fermentaciji živil zaradi njihovega učinka konzerviranja. Imajo sposobnost produkcije različnih snovi s protibakterijskim delovanjem, ki jih lahko uporabimo kot biokonzervanse (Cleveland in sod., 2001). Zaradi dolge zgodovine varne uporabe v proizvodnji fermentirane hrane MKB uživajo status GRAS (angl. Generally Regarded As Safe). Njihovi glavni metaboliti so: organske kisline, diacetil, acetaldehid, vodikov peroksid, CO<sub>2</sub>, bakteriocini in druge protimikrobne snovi. Protimikrobni peptidi MKB so dobro proučeni, zanimivi pa so predvsem zaradi njihovega potenciala za konzerviranje živil (Garneau in sod., 2002; Eijsink in sod., 2002).

Bakteriocini so metaboliti bakterij. So proteini ali proteinski kompleksi, katerih produkcija je odvisna od okoljskih razmer, kot so temperatura, sestava gojišča, vrednost pH, intenzivnost mešanja in drugo. Bakteriocine tvorijo mnoge po Gramu pozitivne kot tudi po Gramu negativne bakterije. Med seboj se razlikujejo po spektru protimikrobnega delovanja in po strukturi. Za uporabo so zanimivejši tisti, ki zavirajo patogene bakterije kot tudi bakterije, ki kvarijo hrano, na primer: *Bacillus cereus*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes* in *Staphylococcus aureus*. Vloga bakteriocinov v prebavnem traktu ljudi in živali je manj raziskana kot v hrani. (Parente in Ricciardi, 1999).

Poznamo dva načina vnašanja bakteriocinov v hrano. Prvi je uporaba bakteriocinogenih starterskih kultur, drugi pa neposredno dodajanje bakteriocinov kot bioloških aditivov, ki so v delno očiščeni ali očiščeni obliki. Uporaba bakteriocinov omogoča manjšo porabo

kemičnih konzervansov in tehnoloških postopkov, ki negativno vplivajo na biološko vrednost (Cleveland in sod., 2001; Schillinger in sod., 1996).

## 1.2 CILJ RAZISKOVANJA

Osnovni cilj naloge je bil proučiti dinamiko porabe glukoze in produkcije mlečne kisline ter bakteriocinov seva *Lactobacillus gasseri* K7 v tekočem gojišču MRS in dveh različnih bioprocesih – v steklenicah ali v šaržnem procesu v bioreaktorju, ob uravnavanju vrednosti pH.

## 1.3 DELOVNE HIPOTEZE

Na osnovi dosedanjih raziskav in podatkov iz literature smo postavili naslednje hipoteze:

- dinamika rasti seva *Lactobacillus gasseri* K7, ki jo bomo spremljali z merjenjem optične gostote in ugotavljanjem števila kolonijskih enot (KE/ml), se v dveh bioprocesih, v steklenicah ali v šaržnem procesu v bioreaktorju ob uravnavanju pH, razlikuje;
- dinamika rasti seva *Lactobacillus gasseri* K7 v gojiščih z različno začetno koncentracijo glukoze se razlikuje;
- dinamika porabe glukoze in produkcije mlečne kisline je pri obeh bioprocesih, kakor tudi v istem bioprocesu, z različnimi začetnimi koncentracijami glukoze v gojišču, različna;
- dinamika produkcije bakteriocinov je odvisna tako od vrste bioprocesa kakor tudi od začetne koncentracije glukoze v gojišču.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 MLEČNOKISLINSKE BAKTERIJE

Mlečnokislinske bakterije (MKB) sodijo med najpomembnejše bakterije, ki jih širom po svetu uporabljajo v industrijske in biotehnološke namene. MKB sestavljajo skupino po Gramu pozitivnih bakterij, ki jih družijo skupne morfološke, metabolne in fiziološke značilnosti. Splošen opis bakterij vključenih v to skupino zajema naslednje: so po Gramu pozitivne, nesporulirajoče, anaerobne bakterije v obliki kokov oz. paličastih bakterij, ki proizvajajo mlečno kislino kot glavni končni produkt fermentacije ogljikovih hidratov. Izraz MKB je tesno povezan z bakterijami, ki so vpletene v fermentacijo hrane (meso, zelenjava, mleko in mlečni izdelki, sadje, pijače) in krme (silaza), vključno z bakterijami, ki so običajno povezane z (zdravimi) mukoznimi površinami človeka in živali (genitalije, prebavila in respiratorni trakt) (Plantarič, 1998).

Rodovi *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* in *Streptococcus* tvorijo jedro skupine MKB, vseh rodov v tej skupini pa je dvajset. Najbolj razširjeni so naslednji: *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* in *Weissella*. Tudi bakterije iz rodu *Bifidobacterium* pogosto obravnavajo v sklopu MKB, čeprav filogenetsko sodijo v drugo vejo in imajo izviren način fermentacije sladkorja. Klasifikacija MKB v različne rodove večinoma temelji na morfologiji, načinu fermentacije sladkorja, rasti pri različnih temperaturah, konfiguraciji proizvedene mlečne kisline, sposobnosti rasti pri visokih koncentracijah soli ter toleranci za kislino in bazično okolje. Kemotaksonomski označevalci, kot je npr. kompozicija maščobnih kislin in gradnikov celičnih sten, se prav tako uporabljajo v klasifikaciji. Skupni značilnosti MKB sta, da ne vsebujejo katalaze in da njihova DNA vsebuje manj kot 50 mol % G+C (guanina in citozina) (Bogovič Matijašič, 1997; Axelsson, 2004).

MKB se uporabljajo kot starterske kulture v živilsko-predelovalni industriji (mleko, meso, zelenjava). S svojimi metabolnimi produkti vplivajo na aromo in teksturo fermentiranih izdelkov, hkrati pa proizvajajo raznovrstne protimikrobne spojine, ki so zmožne zavirati rast mnogih po Gramu pozitivnih bakterij, vključno s kvarljivci in patogenimi bakterijami, tako da znižujejo pH in/ali s proizvodnjo protimikrobnih peptidov, t.i. bakteriocinov. V zadnjih letih je predmet mnogih raziskav bakteriocinov MKB njihova potencialna raba kot biokonzervansov, ki zavirajo rast patogenih bakterij in drugih bakterij, ki živila kvarijo, in s tem podaljšujejo obstojnost živila (Schillinger in sod., 1996).

Zaradi njihove fermentacijske sposobnosti so MKB industrijsko zelo pomembni mikroorganizmi. Od nekdaj do danes je bilo preizkušenih mnogo metod, da bi izboljšali MKB in pridobili visoke donose produktov zaradi interesov industrije. Trendi v svetovni ekonomiji so sprožili povečano zanimanje za materiale naravnega izvora, ki so poceni, jih je dovolj na razpolago in so lahko dostopni skozi celo leto. Sodobni trendi kažejo, da ima iz okoljevarstvenega vidika proizvodnja hrane s fermentacijo z MKB prednost pred kemičnim konzerviranjem. Okolju prijazno procesiranje in zmožnost fermentacije mnogih kmetijskih in agro-industrijskih surovin ali stranskih produktov jih tako uvršča med atraktivne kandidate v fermentacijski biotehnologiji, za pridobivanje produktov z dodano vrednostjo. V zadnjih letih je opazen velik napredek pri selekciji mlečnokislinskih bakterij za optimalne donose (Ghaffar in sod., 2014).

Organske kisline so najpomembnejše snovi s protimikrobnim delovanjem, zlasti očetna in mlečna kislina, ki sta končna produkta metabolizma ogljikovih hidratov. Njuna prisotnost povzroči znižanje vrednosti pH okolja, poleg tega lahko kot nedisociirani molekuli vstopita v mikrobo celico in disociirata v citoplazmi ter jo uničita. Poleg tega tvorijo MKB še vrsto drugih snovi s protimikrobnim delovanjem, ki se tvorijo v majhnih količinah, vendar pa pomembno prispevajo k celotnemu protimikrobnemu delovanju. To so: ogljikov dioksid, mravljična kislina, proste maščobne kisline, amoniak, etanol, vodikov peroksid, diacetil, acetoin, acetaldehid, 2,3-butandiol, benzoat, bakteriolitični encimi, bakteriocini, reuterin, antibiotiki, D-izomere aminokislin in neidentificirane zaviralne snovi (Klaenhammer, 1988; Lindgren in Dobrogosz, 1990; Piard in Desmazeaud, 1992).

Probiotične mikroorganizme izolirajo iz človeškega prebavnega trakta. Mnogo vrst MKB so že od nekdaj uporabljali kot probiotike (npr. *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* in *Lactococcus*, *Bifidobacterium*, *Bacillus*). Potencialni probiotični organizem mora imeti naslednje značilnosti: sposobnost preživeti v črevesju, protimikrobo delovanje ter zmožnost, da se prilepi na črevesno celico gostitelja (Mataragas in sod., 2003). Probiotiki so organizmi, ki jih vnesemo skozi ustno odprtino v prebavni trakt, kjer pozitivno vplivajo na aktivnost naravne mikrobiote prebavnega trakta ter posledično na zdravje gostitelja (Zacharof in Lovitt, 2012). Tako MKB in bifidobakterije zaradi domnevno ugodnega vpliva na zdravje uporabljajo kot probiotike za preventivo, lajšanje ali zdravljenje bolezni prebavnega trakta človeka ali živali (Fukushima in Hurt, 2011).

V zadnjih letih se je zanimanje za probiotike povečalo. Pogosto probiotične seve dodajajo fermentiranim mlečnim izdelkom, kot je npr. jogurt (Yerlikaya, 2014). Pogosto se kot probiotiki uporabljajo *Bifidobacterium*, *Lactobacillus (L.) acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. casei*, *L. reuteri*, *E. faecium*, *E. faecalis*, *S. thermophilus*, *Lc. lactis subsp.*



*lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Propionibacterium freudenreichii*, *Pediococcus acidilactici* *Sporolactobacillus inulinus*, *E. coli*, nekatere vrste rodu *Bacillus* ter kvasovke, kot so *Saccharomyces cerevisiae* ali *Saccharomyces boulardii* (Foulquié Moreno in sod., 2006; Parvez in sod., 2006; Granato in sod., 2010; Cutting, 2011; Nagpal in sod., 2012).

Med probiotičnimi MKB so močno zastopani laktobacili. Rod *Lactobacillus* sestavljajo različne vrste bakterij, ki imajo za človeka številne koristne učinke. Ker so od vseh MKB najboljše proizvajalke mlečne kisline, pa tudi najbolj odporne proti kislini, zaključijo večino spontanij fermentacij. Poleg tega pa so sestavni del naravne mikrobiote človeškega in živalskega gastro-intestinalnega trakta. Dolgo je veljalo, da je v prebavnem traktu med laktobacili pomembna vrsta *L. acidophilus*, saj so jo pogosto izolirali iz blata. Z razvojem tehnik molekularne biologije so na podlagi homologij DNA znotraj skupine *L. acidophilus* določili dve DNA homologni skupini (A, B) oziroma identificirali šest vrst (Johnson in sod., 1980):

- A-1: *L. acidophilus*,
- A-2: *L. crispatus*,
- A-3: *L. amylovorus*,
- A-4: *L. gallinarum*,
- B-1: *L. gasseri*,
- B-2: *L. johnsonii*.

Danes vemo, da so med laktobacili v humanem prebavnem traktu pogosteje prisotni sevi vrst *L. crispatus* in *L. gasseri*, medtem ko sta vrsti *L. acidophilus* in *L. johnsonii* redkeje zastopani.

## 2.2 BAKTERIOCINI MLEČNOKISLINSKIH BAKTERIJ

### 2.2.1 Definicija bakteriocinov

Bakteriocini so protimikrobne spojine, ki jih tvori mnogo različnih vrst bakterij. To so ribosomsko sintetizirani proteini, ki so sposobni nadzorovati rast patogenih bakterij ter kvarljivcev živil. Tisti bakteriocini, ki jih sintetizirajo MKB, imajo velik potencial v živilski industriji kot biokonzervansi (Cotter in sod., 2005a, Malherios in sod., 2014). Nizin, ki ga proizvaja sev *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, je najbolj proučen bakteriocin MKB. Njegova uporaba v živilski industriji je dovoljena v več kot 50 državah na svetu (Malherios in sod., 2014). Vendar pa lahko nekatere bakterije postanejo odporne proti nizinu ali tvorijo proteolitične spojine, ki zavirajo njegovo delovanje (Garde in sod., 2004; Malherios in sod., 2014).

### 2.2.2 Uporaba bakteriocinov

Bakteriocini imajo zaradi svoje sposobnosti zaviranja mikrobiote v živilih velike potenciale kot nadomestilo za kemijske konzervanse. Omogočajo proizvodnjo varnih živil in krme s čim daljšo obstojnostjo, brez umetnih dodatkov in z minimalno obdelavo. Bakteriocine lahko vključimo v živila z uporabo starterske kulture, ki tvori bakteriocine ali kot (delno) očiščen bakteriocinski pripravek (Deegan in sod., 2006).

Velik pomen danes pripisujejo kombinirani uporabi večih bakteriocinov, katerih interakcije prispevajo k dodatnemu oziroma sinergističnemu učinku (Ouweland, 1998; de Vuyst in Vandamme, 1994a).

Bakteriocini imajo širok potencial uporabe, tako v prehrani ljudi in živali kot tudi v farmacevtski industriji in biomedicini. Zaradi pretirane uporabe antibiotikov, predvsem v živinoreji, obstaja vse več odpornih sevov, zato se vse bolj omenja uporaba bakteriocinov kot alternativa antibiotikom (de Vuyst in Vandamme, 1994b; Ennahar in sod., 1999; Diep in Nes, 2002; Hansen, 2002; Deegan in sod., 2006).

Z izjemo nizina uporaba bakteriocinov v prehranski in farmacevtski industriji še ni razširjena, saj je tehnologija priprave bakteriocinov, ki mora biti cenovno sprejemljiva za komercialno uporabo, še precej omejena. Številne raziskave pa kažejo velik potencial uporabe bakteriocinskih pripravkov kot biokonzervansov (Cintas in sod., 2000; Navarro in sod., 2008).

### 2.2.3 Razvrstitev bakteriocinov

Bakteriocini so velika in heterogena skupina proteinov s protimikrobnim delovanjem, ki se med seboj razlikujejo po molekularni masi, mestu nahajanja genskega zapisa, biokemijskih lastnostih, strukturi, spektru protimikrobnega učinka in načinu delovanja. Po klasifikaciji avtorja Klaenhammerja (1993), ki je najbolj uveljavljena, delimo bakteriocine v štiri glavne skupine, ki se nadalje delijo še v podskupine:

- Skupina 1 – lantibiotiki, majhni, toplotno obstojni peptidi z majhno molekularno maso (do 5 kDa), ki vsebujejo lantionin in njegove derivate. Med predstavniki najdemo nizin.
- Skupina 2 – nemodificirani, toplotno obstojni bakteriocini (do 10 kDa).

To so majhni, toplotno obstojni peptidi, ki se delijo v 3 podskupine: IIa – s predstavniki pediocini in enterocini, IIb – laktacinu G podobni ter IIc – laktacin B in sorodi bakteriocini.

- Skupina 3 – veliki, toplotno občutljivi peptidi z visoko molekulsko maso (do 30 kDa). Predstavniki so helveticin J.
- Skupina 4 – veliki peptidi s komponento ogljikovih hidratov ali lipidov.

V zadnjih letih so nekateri raziskovalci predlagali nove klasifikacije bakteriocinov, npr. razvrstitev v zgolj dve kategoriji (lantibiotiki in bakteriocini, ki ne vsebujejo lantionina), medtem ko naj bi veliki, toplotno občutljivi peptidi z visoko molekulsko maso bili ločeno označeni kot 'bakteriolizini' (Cotter in sod., 2005a). Omenjeni avtorji so ukinili 4. skupino. Avtorji Drider in sod. (2006) pa so razdelili bakteriocine v tri glavne skupine glede na njihove genetske in biokemijske lastnosti: bakteriocine z lantioninom, majhne termostabilne bakteriocine in velike termostabilne bakteriocine. Skupino majhnih termostabilnih bakteriocinov pa so nadalje razdelili v podrazrede a (protilisterijski bakteriocini, podobni pediocinu), b (dvopeptidni) in c (ostali).

#### 2.2.4 Biosinteza bakteriocinov

Večina bakteriocinov G+ bakterij se sintetizira kot prepeptidi, ki šele po nadaljnjem procesiranju postanejo biološko aktivne molekule. Z biosintezo bakteriocinov sta povezani funkciji transporta bakteriocinov iz celice in zagotavljanja imunosti proti lastnim bakteriocinom (Jack in sod., 1995). Produkcija bakteriocinov MKB je pri večini bakterij vezana na rastno fazo celic. Običajno se odvija skozi rastno fazo in se zaključi ob koncu eksponentne faze, včasih pa že pred koncem faze rasti (Parente in sod., 1997; Savadogo in sod., 2006).

Bakteriocinogena bakterija mora biti poleg sinteze bakteriocina sposobna tudi izločiti bakteriocin v okolje. Ni nujno, da se celotna količina bakteriocinov izloči vedno v okolje, del namreč lahko ostane tudi v celici. V večini primerov je biosinteza povezana s količino proizvedene biomase. Produkcija nizina se začne tedaj, ko je dosežena biomasa enaka polovici končne (Piard in Desmazeaud, 1992).

Tudi za biosintezo nekaterih drugih bakteriocinov velja podobno. Koncentracijo biomase, optimalno za tvorbo določenega bakteriocina, je mogoče vzdrževati z dodajanjem sladkorjev, vitaminov in virov dušika v gojišče. Suganthi in sod. (2014), na primer, so ugotovili, da se je proizvodnja bakteriocinov pri sevu *Pediococcus pentosaceus* KC692718

kar 20-krat povečala, če so modificirali sestavo gojišča MRS (sahroza namesto glukoze, dodatek sojinih peptidov), vzdrževali pH na 5,5 in uporabili temperaturo gojenja 34,5 °C. Na biosintezo nekaterih bakteriocinov vpliva tudi viskoznost gojišča. Pri streptokokih so ugotovili, da povečanje viskoznosti vodi do večje proizvodnje bakteriocinov, zato tekočim gojiščem dodajajo agar, dekstran, glicerol ali pa škrob (Plantarič, 1998).

Na tvorbo bakteriocinov vpliva vrsta in nivo ogljika, dušika ali fosfata, kationske površinsko aktivne snovi in inhibitorji. Bakteriocini lahko nastajajo v gojiščih, ki vsebujejo različne vire ogljikovih hidratov. *Lactococcus lactis* IO-1 lahko proizvaja nizin Z ob prisotnosti glukoze, saharoze in ksiloze iz seva (Savadogo in sod., 2006), vendar so bili boljši rezultati pri uporabi glukoze namesto ksiloze. Glukoza, saharoza, ksiloza in galaktoza so bili najboljši viri ogljika za tvorbo pediocina AcH v nepuferiranem gojišču (Biswas in sod., 1991).

Na biosintezo bakteriocinov vplivajo tudi pogoji kultivacije, kot so temperatura, prisotnost kisika in vrednost pH. Pogoji, ki so najboljši za rast mikrobne populacije, niso vedno najboljši tudi za proizvodnjo bakteriocinov (De Vuyst in Vandamme, 1994a). Lim (2010) je v svoji raziskavi predstavil rastne pogoje in komponente, ki vplivajo na rast in bakteriocinsko produkcijo seva *L. plantarum* KC21. Ugotovil je, da je kvasni ekstrakt (0,25 ali 0,5 %), ki je bil dodan bujonu MRS, povečal bakteriocinsko aktivnost. Še več, bakteriocinska aktivnost v prisotnosti 1 ali 3 % NaCl, 0,5 % NH<sub>4</sub>PO<sub>4</sub>, 0,25 ali 0,5 % KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> je zelo narasla. Ugotovil je tudi, da prisotnost NaCl (1-3 %) poveča bakteriocinsko aktivnost, vendar izredno visoka koncentracija soli zavira celično rast in bakteriocinsko aktivnost. Poleg tega je prisotnost 1 mM ali 2 mM MgSO<sub>4</sub> izredno povečala bakteriocinsko aktivnost, ne da bi vplivala na rast *L. plantarum* KC21; askorbinska kislina (1 ali 3 ppm) pa je do dvakrat povečala bakteriocinsko aktivnost.

Cheigh in sod. (2002) so v svoji raziskavi ugotovili, da je bakteriocinska aktivnost seva *L. lactis* ssp. *lactis* A164 4-krat večja v bujonu M17, ki mu je namesto drugih virov ogljika dodana laktoza. Todorov in sod. (2006) pa so odkrili, da maltoza stimulira bakteriocinsko produkcijo seva *L. plantarum* ST23LD.

Biosintezo je včasih mogoče povečati tudi z indukcijskim dejavnikom, kot je osvetljevanje z ultravijolično svetlobo ali dodajanje mitomicina C. Pri bakterijskem sevu *L. casei* B80 je dodatek mitomicina C kot indukcijskega faktorja povečal produkcijo bakteriocina kazeicina 80v 5- do 7-krat (Piard in Desmazeaud, 1992).

### 2.2.5 Način delovanja

Delovanje bakteriocinov mlečnokislinskih bakterij se prične pri vstopu bakteriocina skozi celično membrano v tarčno celico. Ti delujejo predvsem proti G<sup>+</sup> bakterijam. Zaradi uhajanja nizko molekularnih metabolitov (AK) in anorganskih fosfatov (ATP) iz celice se poruši ravnovesje v celici, kar povzroči njeno smrt. Ustavljena je produkcija energije in biosinteza proteinov oziroma nukleinskih kislin. Bakteriocini v membrani tvorijo pore. Na tvorbo por vplivajo vrednost pH, membranski potencial in stanje celice. Zaradi amfifilne strukture pride pri prehajanju bakteriocinov skozi celično membrano do oligomerizacije po mehanizmu valja in palice (angl. barrel-stave) (Zorič Peternel, 2007).

### 2.2.6 Imunost bakteriocinogene bakterije

Tvorba proteinov imunosti daje bakteriji zaščito pred lastnim bakteriocinom. Pri večini nelantibiotikov imunost zagotavlja en sam protein. Proteini imunosti so prav tako kationski kot bakteriocini. Sev, ki proizvaja bakteriocine, je imun proti lastnim bakteriocinom. To doseže s proizvodnjo proteinov imunosti. Ni pa nujno, da je imun proti bakteriocinom drugih sevov. Proteini imunosti, ki se nahajajo v notranjosti celice, vplivajo na proces tvorbe por s strani bakteriocinov. V nekaterih poskusih *in vitro* so ugotovili, da ob dodatku proteina imunosti od zunaj občutljive celice niso postale imune. To se je zgodilo le, če so vanje klonirali gen za imunost (Nes in Holo, 2000). Diep in sod. (2007) so odkrili povezavo med mehanizmom prepoznavanja bakteriocina s strani ciljne celice ter imunostjo bakteriocinogene celice. Nekateri proteini imunosti tvorijo z bakteriocini in receptorskimi proteini v membrani bakteriocinogene celice močan kompleks, kar daje bakteriocinogeni celici imunost pred lastnim bakteriocinom.

## 2.3 LASTNOSTI SEVA *Lactobacillus gasseri* K7

### 2.3.1 Sev *Lactobacillus gasseri* K7

Sev *L. gasseri* K7 so izolirali iz blata dojenčka. *L. gasseri* je po Gramu pozitivna vrsta mlečnokislinskih bakterij, ki naseljuje človeški gastrointestinalni, vaginalni in respiratorni trakt. Sev K7 je potencialni probiotik, saj izkazuje osnovne probiotične lastnosti, ki so jih dokazali *in vitro*, *ex vivo* in *in vivo*. Sev je odporen proti žolčnim solem in nizkim vrednostim pH ter preživi v simuliranih razmerah prebavil. Proizvaja bakteriocine s širokim spektrom protimikrobnega delovanja. Dokazano je, da njegovi bakteriocini delujejo proti nekaterim vrstam mlečnokislinskih bakterij, nekaterim vrstam *Clostridium* sp. ter drugim G<sup>+</sup> bakterijam. Med njimi so tudi vegetativne celice *Clostridium*

*perfringens* in *Clostridium difficile*, ter vegetativne celice in spore vrste *Clostridium tyrobutyricum*. Bakteriocini se tvorijo med eksponentno fazo rasti (Bogovič Matijašič in Rogelj, 1999). Sev K7 je sposoben vezave na epitelne celice Caco-2 in na prašičji črevesni epitelij *ex vivo* (Bogovič Matijašič in sod., 2006). Raziskave na živalskih modelih so pokazale, da preživi v prebavnem traktu miši in odstavljenih prašičkov ter ga vsaj začasno poseli (Bogovič Matijašič in sod., 1998; Bogovič Matijašič in Rogelj, 2000; Rogelj in sod., 2002; Bogovič Matijašič in sod., 2003; Bogovič Matijašič in sod., 2004; Bogovič Matijašič in sod., 2006).

Sev K7 preživi postopke sušenja (z liofilizacijo in razprševanjem) in skladiščenja ter pri tem ohrani funkcionalne lastnosti in sposobnost produkcije bakteriocinov. To nakazuje možnost uporabe seva za pripravo komercialnih probiotičnih oziroma bakteriocinskih pripravkov (Stojković, 2003). Prav tako preživi postopek izdelave in zorenje sira, pri čemer ne vpliva negativno na senzorične lastnosti (Perko in sod., 2002).

Sev K7 tvori dva dvo-komponentna bakteriocina, to sta gassericin K7 A in gassericin K7 B (Majhenič, 2002; Majhenič in sod., 2004; Zorič in sod., 2010). Njihov genski zapis se nahaja na kromosomu (Majhenič in sod., 2003). Mavrič s sod. (2014) je uspela aktivne komponente bakteriocinskega kompleksa tudi osamiti iz gojišča in identificirati.

Na podlagi analiz nukleotidnih in izpeljanih aminokislinskih zaporedij, značilnosti N-terminalnih vodilnih zaporedij ter ugotovljenih homologij gassericina K7 A in gassericina K7 B z dvopeptidnimi bakteriocini, uvrščajo gassericina K7 A in K7 B med dvopeptidne bakteriocine (dvo-peptidne nelantibiotike), v podskupino 2b (Nes in sod., 1996; Diep in Nes, 2002).

Primerjava nukleotidnih zaporedij gassericinov K7 A in K7 B z drugimi v genski banki je pokazala, da je strukturni gen za gassericin K7 A identičen acidocinu LF221 A, ki ga proizvaja sev *L. gasseri* LF221, gassericin K7 B pa acidocinu LF221 B ter zelo podoben gassericinu T (Majhenič in sod., 2004; Kawai in sod., 2000). Seva *L. gasseri* K7 in *L. gasseri* LF221 sta bila izolirana iz iste ekološke niše (blata dojenčka), zato niti ni presenetljivo, da tvorita bakteriocine z enakim aminokislinskim zaporedjem. Sicer se pa njuna kompleksa razlikujeta po kinetiki produkcije bakteriocinov (Matijašič in Rogelj, 1998; Bogovič Matijašič in sod., 1999; Bogovič Matijašič in Rogelj, 2000; Mavrič in sod., 2014).

Kot večina laktobacilov sev K7 potrebuje za rast in razmnoževanje mikroaerofilno atmosfero.

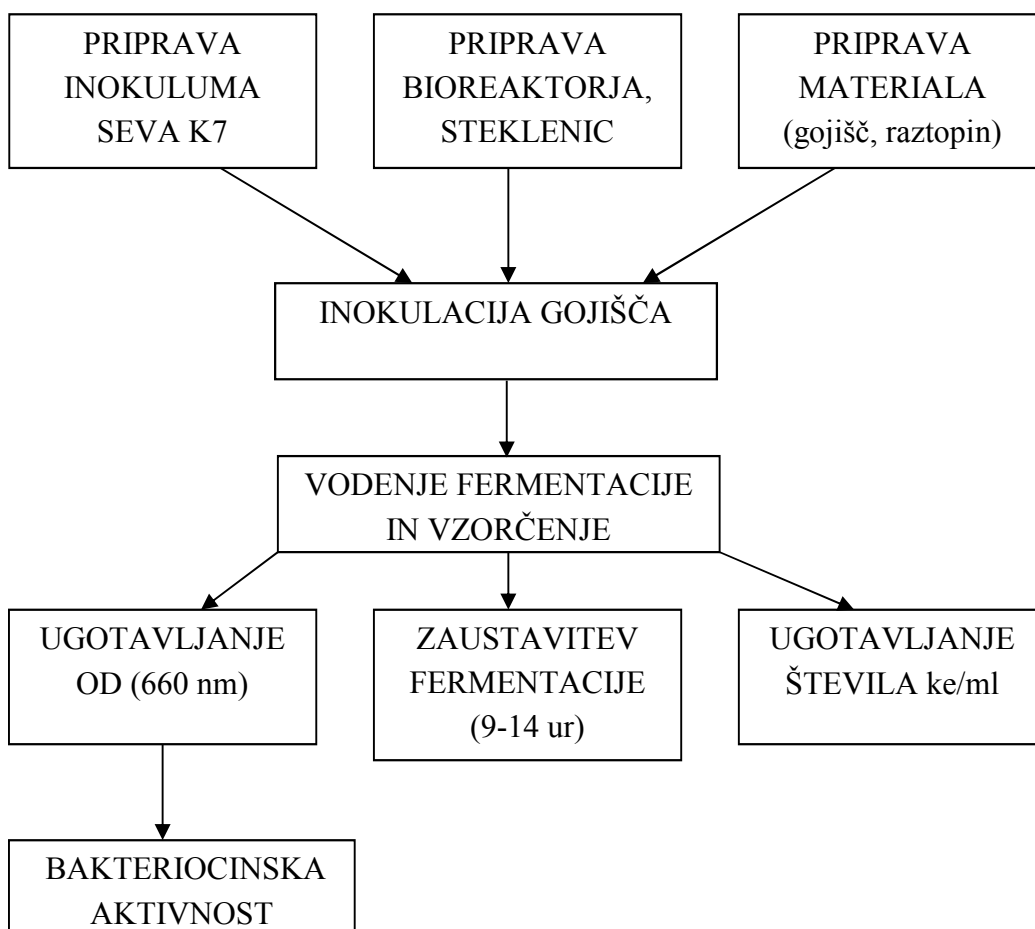
Med gojenjem seva K7 v bujonu MRS in pri 37 °C, kar je optimalna temperatura za rast laktobacilov, so bakteriocine uspeli zaznati v supernatantu kulture že po dveh urah inkubacije in doseže največjo aktivnost nekje po osmih urah (32000 AU/ml), potem pa začne aktivnost padati, kljub temu da optična gostota še narašča. Vzrok za padec bakteriocinske aktivnosti je razen zmanjšane produkcije tudi adsorpcija bakteriocinov na celice proizvajalke (Bogovič Matijašič in Rogelj, 2000; Stojković, 2003).

Tudi drugi avtorji so poročali o padcu bakteriocinske aktivnosti med šaržnim procesom ob nekontrolirani vrednosti pH. To velja na primer za sev *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, kjer avtorja navajata različne mehanizme za razlago padca aktivnosti, kot so adsorpcija na površino celic prek ionskih ali hidrofobnih interakcij ali vezava bakteriocinov in drugih beljakovin v skupke, proteolitična razgradnja ali proteinska agregacija (De Vuyst in Vandamme, 1994a).

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 NAČRT POSKUSA

Poglavitni namen naloge je bil primerjati dinamiko porabe glukoze, produkcije mlečne kisline in produkcije bakteriocinov seva *L. gasseri* K7 v dveh različnih bioprocesih. Procese smo izvajali v 250 ml steklenicah in v laboratorijskem bioreaktorju z delovnim volumnom 2,2 l. Vzorce iz steklenic smo jemali vsaki dve uri, medtem ko smo v bioreaktorju vzorčili vsako uro. Vzorcem smo izmerili optično gostoto pri 660 nm ter jih nacepljali na gojišče MRS, da bi ugotovili število KE/ml. Del vzorcev smo centrifugirali (8000 vrt./15 min), da smo odstranili bakterijske celice, nato pa supernatante shranili v zamrzovalniku, dokler nismo opravili testov ugotavljanja bakteriocinske aktivnosti. Proces smo običajno vodili do stacionarne faze, včasih pa tudi do faze umiranja. Uporabljene metode dela so opisane v poglavju 3.3.



Slika 1: Potek poskusa



## 3.2 MATERIAL

### 3.2.1 Bakterijski sevi

- Sev *L. gasseri* K7 je bil leta 1996 izoliran iz blata en teden starega dojenčka na Katedri za mlekarstvo, Oddelek za zootehniko, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani (Bogovič Matijašič in Rogelj, 1999); shranjen je tudi v Czech Collection of Microorganisms (CCM 7710).
- Sev *L. sakei* NCDO 2714 (National Collection of Dairy Organisms, National Institute for Dairying, Reading, Velika Britanija) smo uporabili kot indikatorski sev za ugotavljanje bakteriocinske aktivnosti.

Vsi sevi so shranjeni v bujonu MRS s 30 % dodatkom glicerola, pri -80 °C, v zbirki mikroorganizmov Inštituta za mlekarstvo in probiotike (IM) na Oddelku za zootehniko, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani.

### 3.2.2 Gojišča

#### 3.2.2.1 Tekoča gojišča

**Bujon MRS** (Biolife, Milano, Italija) (De Man in sod., 1960)

Tekoče gojišče MRS smo pripravili iz posameznih sestavin po opisu De Man-a in sod. (1960), pri čemer smo spreminjali koncentracijo glukoze (10, 15 ali 20 g/l). Mesni ekstrakt, kvasni ekstrakt, bakteriološki pepton in Tween 80 so bili proizvodi Biolife (Milano, Italija), ostale sestavine (Na-acetat, MnSO<sub>4</sub>, biamonijev citrat) pa proizvodi Merck (Darmstadt, Nemčija). Pred avtoklaviranjem smo uravnali vrednost pH na 5,75. Gojišče, ki smo ga uporabili v bioreaktorju, smo sterilizirali in situ v biorektorski posodi (121 °C/15 min), gojišče, ki smo ga uporabili v steklenicah in epruvetah, pa v avtoklavu (121 °C/15 min).

**¼ Ringerjeva raztopina** (Merck, Darmstadt, Nemčija)

¼ Ringerjeve raztopine smo pripravili tako, da smo eno tableto raztopili v 0,5 l demineralizirane vode in jo nato razdelili po 9,2 ml v epruvete ter avtoklavirali (121 °C/15 min). Po avtoklaviranju je bilo v vsaki epruveti po 9 ml raztopine. Uporabili smo jo za zaporedno, 10-kratno razredčevanje vzorca pri metodi štetja na ploščah.

### 3.2.2.2 Trdna gojišča

#### **Hranljiva podloga MRS** (Merck, Darmstadt, Nemčija) (De Man in sod., 1960)

Postopek priprave je potekal po navodilih proizvajalca. Ustrezno količino dehidriranega agarja MRS smo raztopili s kuhanjem v demineralizirani vodi, prelili v steklenice in nato avtoklavirali (121 °C/15 min). Agar MRS smo uporabili za ugotavljanje števila kolonijskih enot v ml po vsakem vzorčenju.

### 3.2.2.3 Poltrdna gojišča

#### **Poltrdno gojišče MRS** (De Man in sod., 1960)

Poltrdno gojišče MRS smo pripravili iz bujona MRS (Biolife, Milano, Italija), ki smo mu pred avtoklaviranjem dodali 7,5 g/l agar-agarja (Biolife, Milano, Italija).

## 3.2.3 Priprava raztopin

- Priprava 4M NaOH: 40 g NaOH smo raztopili v 250 ml demineralizirane vode ter raztopino avtoklavirali (121 °C/15 min).
- Priprava 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: koncentrirano H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> smo ustrezno razredčili z demineralizirano vodo do končne koncentracije 1 mol/l ter avtoklavirali (121 °C/15 min).

## 3.3 METODE DELA

### 3.3.1 Priprava inokuluma

Na začetku raziskave smo pripravili zamrznjeno kulturo *L. gasseri* K7, ki je zadostovala za vse fermentacije. V ta namen smo sev K7 (1 %) nacepili v 10 ml bujona MRS (Biolife, Italija). Nacepljeni bujon smo inkubirali pri temperaturi 37 °C 18 ur. Zraslo kulturo smo ponovno precepili (1 %) v 50 ml bujona MRS in inkubirali 18 ur pri temperaturi 37 °C. Zatem smo inokulirali (1 %) alikvote po 220 ml bujona MRS, kar je desetina delovnega volumna bioreaktorja (2200 ml). Po 18-urni inkubaciji smo vsebino posameznih steklenic aseptično prenesli v sterilne centrifugirke in centrifugirali 15 min pri 8000 vrtljajih na minuto. Supernatant smo odlili in usedlino resuspendirali v 20 ml bujona MRS s 5 ml glicerola, ki je služil kot zaščita pri zamrzovanju. Tako pripravljen inokulum smo zamrznili pri -20 °C. Pred uporabo smo po en alikvot inokuluma odmrznili in sterilno prenesli v bioreaktor. Za inokulacijo gojišča v steklenicah smo uporabili sorazmerno manjši odmerek inokuluma (2 ml), tako da je bila začetna koncentracija seva K7 enaka kot v bioreaktorju.

### 3.3.2 Ugotavljanje števila kolonijskih enot (KE/ml)

Število kolonijskih enot (KE/ml) smo ugotavljali na ploščah z agarjem MRS (Merck, Nemčija). Inkubacija je potekala pri 37 °C 72 ur v aerobni atmosferi. Takoj po vzorčenju smo aseptično odvzeli 1 ml vzorca in ga ustrezno razredčili s fiziološko raztopino v razmerju 1:9. Ustrezne razredčitve smo odpipetirali na petrijeve plošče in prelili s temperiranim agarjem MRS.

### 3.3.3 Merjenje optične gostote

Vzorcem smo takoj po vzorčenju izmerili optično gostoto pri 660 nm. S centrifugiranjem (15 min pri 8000 vrt./min) smo odstranili bakterije in nato izmerili še optično gostoto supernatanta. Optično gostoto suspenzije celic smo nato izračunali po spodnji enačbi.

$$A = A_s - A_g \quad \dots(1)$$

$A_s$  = skupna optična gostota

$A_g$  = optična gostota gojišča

### 3.3.4 Priprava supernatanta z bakteriocini

Bakteriocinsko aktivnost smo ugotavljali v supernatantu, ki smo ga pridobili s centrifugiranjem vzorca. Pred ugotavljanjem bakteriocinske aktivnosti smo supernatant prefiltrirali skozi 0,45 µm filter Sartorius AG (Minisart, Nemčija).

### 3.3.5 Ugotavljanje bakteriocinske aktivnosti na mikrotitrskih ploščah z indikatorskim sevom *L. sakei* NCDO 2714

Uporabili smo metodo kritične razredčitve na mikrotitrskih ploščah s sevom *L. sakei* NCDO 2714 po Bogovič Matijašič in Rogelj (1998).

Sev *L. sakei* NCDO 2714 smo inkubirali v bujonu MRS 18 ur pri 30 °C. Po inkubaciji smo kulturo 10.000-krat razredčili v svežem bujonu MRS. V vsako luknjico na mikrotitrski plošči smo vnesli po 50 µl bujona MRS, v luknjice v drugi koloni pa še 50 µl MRS bujona in 4 µl vzorca filtriranega supernatanta brez celic. Z večkanalno pipeto smo prenesli po 50 µl bujona z vzorcem v naslednje kolone, tako da smo dobili zaporedne 2-kratne razredčitve. Edino iz predzadnje kolone 50 µl odvzete suspenzije nismo prenesli v zadnjo, ampak smo jo zavrgli. Na koncu smo v vse luknjice razen prve kolone dodali še po 150 µl 10.000-krat razredčene kulture *L. sakei* NCDO 2714. V prvo kolono smo vnesli namesto

razredčenega vzorca še 150  $\mu$ l bujona MRS. Plošče smo inkubirali 18 ur pri 30 °C ter nato odčitali optično gostoto pri 620 nm (Titertek Multiskan MCC). Enota bakteriocinske aktivnosti, ki smo jo označili z BA/ml, predstavlja količino bakteriocinov, ki je povzročila 50 % inhibicijo rasti seva *L. sakei* NCDO 2174 v primerjavi s kontrolo (zadnja kolona), ki je bila brez bakteriocina (Bogovič Matijašič in sod., 1998). Bakteriocinsko aktivnost smo izračunali po naslednji formuli:

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

n = število korakov pri razredčevanju; n=0 za nerazredčen vzorec. Če smo v prvo kolono dali 4  $\mu$ l vzorca, smo v formuli uporabili samo polovico (2  $\mu$ l), saj smo polovico prenesli v naslednjo kolono.

razr. vzorec	1 MRS	2 1:1	3 1:2	4 1:4	5 1:8	6 1:16	7 1:32	8 1:64	9 1:128	10 1:256	11 1:512	12 <i>L. sakei</i>
1	/	500	1000	2000	4000	8000	16000	32000	64000	128000	256000	
2												
3												
4												
5												
6												
7												
8												

**Slika 2: Shema merjenja bakteriocinske aktivnosti na mikrotitrski plošči.**

### 3.3.6 Izračun specifične hitrosti rasti

Specifično hitrost rasti smo ( $\mu$ ) smo izračunali iz podatkov za število KE/ml, ki smo ga ugotavljali ob vsakem vzorčenju. Uporabili smo enačbo (Raspor in Smole Možina, 1993):

$$\ln X/X_0 = \mu \times (t-t_0) \quad \dots(2)$$

X in  $X_0$  = število KE/ml v času t in  $t_0$

Maksimalno specifično hitrost rasti ( $\mu$ ) smo izračunali iz rastne krivulje vsake posamezne kulture v eksponentni fazi.

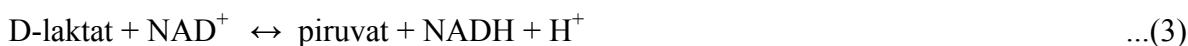
### 3.3.7 Merjenje koncentracije mlečne kisline

Mlečnokislinske bakterije so sposobne pretvorbe sladkorjev v mlečno kislino. V našem primeru so bakterije izkoriščale glukozo, ki smo jo dodali gojišču.

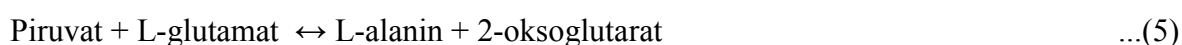
Mlečno kislino smo merili v gojišču pred začetkom bioprocesa, torej v času 0, v gojišču po 6-ih urah in na koncu procesa, po 10-ih urah. Ugotavljali smo jo po encimski UV metodi za D- in L-mlečno kislino, po navodilih proizvajalca (Boehringer Mannheim/R-Biopharm/Roche, Mannheim, Nemčija).

3.3.7.1 Princip UV metode za ugotavljanje D- in L-mlečne kisline (Boehringer Mannheim/R-Biopharm/Roche, Mannheim, Nemčija)

V prisotnosti D-laktat dehidrogenaze D-mlečna kislina oksidira v piruvat z NAD. Oksidacija L-mlečne kisline zahteva prisotnost encima L-laktat dehidrogenaze.



Ravnovesje teh reakcij leži na strani laktata. Če ujamemo piruvat v nadaljnjo reakcijo, ki jo katalizira encim glutamatpiruvat transaminaza v prisotnosti L-glutamata, se ravnovesje poruši v korist piruvata in NADH.



Količina NADH, ki nastane v zgoraj omenjenih reakcijah, stehiometrično odgovarja količini D-mlečne kisline in L-mlečne kisline. Povečanje NADH ugotavljamo z merjenjem absorbanse svetlobe pri 334, 340 in 365 nm.

### 3.3.8 Merjenje koncentracije glukoze

Glukozo smo merili v gojišču ob času 0, 6 in 10 ur, s pomočjo encimske UV metode, po navodilih proizvajalca (Boehringer Mannheim/R-Biopharm/Roche, Mannheim, Nemčija).

D-glukoza se fosforilizira v D-glukoze-6-fosfat (G-6-P) v prisotnosti encima heksogenaza (HK) in adenzin-5-trifosfata (ATP), s sočasno tvorbo ADP.



V prisotnosti encima glukoza-6-fosfat dehidrogenaza (G-6P-DH) G-6-P oksidira pod vplivom nikotinamid-adenin-dinukleotid fosfat (NADPH).



Količina NADPH, ki nastane v tej reakciji, stehiometrično ustreza količini D-glukoze. Povečanje NADPH se izmeri s pomočjo merjenja absorbanse pri 334, 340 in 365 nm.

## 3.4 PRIPRAVA IN VODENJE FERMENTACIJE

### 3.4.1 Bioproces v steklenicah

#### 3.4.1.1 Priprava materiala za fermentacijo v steklenicah

Steklenice (S), v katerih je potekal bioproces, so vsebovale po 200 ml bujona MRS, ki smo ga sestavili, kakor je opisano v poglavju 3.2.2.1, iz posameznih sestavin, uravnali pH na 5,75 ter avtoklavirali. Gojišče je vsebovalo 10 g, 15 g ali 20 g glukoze, ostale sestavine pa v običajnih koncentracijah (de Man in sod., 1960). Poskus smo izvedli dvakrat, za vsako raven koncentracije glukoze smo izvedli po dve paralelki.

#### 3.4.1.2 Zagon bioprocesa

6 steklenic z bujonom MRS (3 različne koncentracije glukoze po 2 paralelki) smo termostatirali na 37 °C. Vsako smo inokulirali s po 2 ml zamrznjenega inokuluma seva

K7, pripravljenega, kakor je opisano v poglavju 3.3.1. Dobro smo premešali in takoj prvič vzorčili. Po vzorčenju smo steklenice vrnili v komoro na 37 °C. Pri vsakem naslednjem vzorčenju smo odpipetirali 1 ml vzorca v epruveto in nato razredčevali za nacepljanje na gojišče za štetje KE/ml. Nacepljali smo 10<sup>5</sup>-krat in 10<sup>6</sup>-krat razredčene vzorce. Supernatante vzorcev (8000 vrt./min, 15 min) smo shranili v zamrzovalniku za kasnejše analize bakteriocinske aktivnosti, glukoze in mlečne kisline. Takoj po odvzemu smo tudi izmerili optično gostoto pri 660 nm.

#### 3.4.1.3 Spremljanje bioprocasa

Prvo vzorčenje smo opravili takoj po inokulaciji, nato pa na vsaki dve uri do konca fermentacije po 14 urah. Ugotavljanje KE/ml, optične gostote in bakteriocinske aktivnosti je potekalo, kakor je opisano v poglavju 3.3.

### 3.4.2 Bioprocas v bioreaktorju

#### 3.4.2.1 Priprava materiala za zagon bioprocasa v bioreaktorju

Pred začetkom fermentacije smo pripravili 2200 ml bujona MRS, ki smo ga sestavili, kakor je opisano v poglavju 3.2.2.1, uravnali pH na 6 ter sterilizirali v bioreaktorju. Gojišče je vsebovalo 10 g, 15 g ali 20 g glukoze, ostale sestavine pa v običajnih koncentracijah (de Man in sod., 1960). 4M NaOH in 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> smo uporabili za uravnavanje in vzdrževanje vrednosti pH. Pred uporabo smo obe raztopini avtoklavirali v avtoklavu.

#### 3.4.2.2 Priprava bioreaktorja

a) **čiščenje:** Bioreaktor smo očistili po vsakem procesu z močnim curkom vroče vode.

b) **vstavljanje in preverjanje tesnitve ventilov in naprav na spodnjem delu bioreaktorja:** Pred vsakim procesom smo zatisnili iztočni ventil, grelec, pretočni hladilnik in termometer (Pt-100).

c) **vstavljanje diafragem in priključkov na zgornjem delu bioreaktorja:** V odprtine, kjer smo vstavili cevke za dovod kisline in baze, zračni filter za izstop zraka in cevko za vzorčenje, smo vstavili diafragme. To so posebne gumijaste membrane, ki preprečujejo vstop zraka v bioreaktor. Na diafragme smo privili ventile in jih zatisnili. Na zgornjem delu bioreaktorja so vstopni in izstopni zračni filter, varnostni ventil in odprtina za vnos gojišča in inokulacijo.

d) **umerjanje pH elektrode s pufrom 4 in 7:** Pred vsakim bioprocasom smo elektrodo umerili. Priključili smo jo na procesno enoto in jo umerili na pH 7,0 in nato še na pH

4,01. Pred tem je bilo potrebno izmeriti tudi temperaturo pufra, ki smo jo potem nastavili v procesni enoti. Po umerjanju smo vstavili elektrodo na zgornji del bioreaktorja in jo primerno zatisnili z vijakom.

e) **avtoklaviranje vzorčne pipe, cevk in filtrov:** Dovodne cevke za kislino in bazo, zračni filter z ogrodjem za vstop zraka in vzorčno pipo je bilo potrebno pred procesom sterilizirati, in sicer tako, da smo jih ovili z ALU-folijo in jih avtoklavirali pri 121 °C 15 min.

#### 3.4.2.3 Priprava na sterilizacijo

Ob ognju smo v bioreaktor vlili gojišče skozi odprtino na zgornjem delu bioreaktorja. Z vijakom smo zaprli odprtino za dolivanje gojišča, vstavili pH elektrodo in jo zatisnili. Z zračno tlačilko smo povečali tlak v pH elektrodi na vrednost 1.2 bara, da ni prišlo do poškodb elektrode pri visokem tlaku in temperaturi sterilizacije. Nato smo vklopili mešalo in ga naravnali na 400 vrt./min.

#### 3.4.2.4 Sterilizacija

Sterilizirali smo gojišče, bioreaktor in vse priključke na bioreaktorju. Pred sterilizacijo smo preverili varnostni ventil, če morda ni zamašen. Sterilizacija je potekala pri temperaturi 121 °C 15 minut. Postopek sterilizacije je potekal tako, da smo najprej vključili procesno enoto in nastavili temperaturo sterilizacije. Procesna enota je avtomatsko začela segrevati gojišče v bioreaktorju na temperaturo sterilizacije. Odprli smo pipo za vodo, ki je služila za hlajenje bioreaktorja. Ko je temperatura sterilizacije narasla nad 105-110 °C, smo nekoliko odprli izstopni zračni filter, da tlak v posodi ni narasel preveč. Okužba ni bila mogoča, saj že sam zračni filter ne dopušča okužbe iz zraka, poleg tega pa zaradi višjega tlaka znotraj posode ne pride do vsrkavanja zraka od zunaj. Po vzdrževanju temperature na 121 °C 15 minut smo izklopili sterilizacijo in bioreaktor se je začel hladiti. Ko je padla temperatura pod 100 °C, smo zaprli ventil izstopnega zraka in ohladili bioreaktor. Na koncu smo izpustili še zrak iz pH elektrode. Sterilizacija cevk za vzorčenje, dovod kisline ter baze in vstopnega filtra za zrak je potekala v avtoklavu.

#### 3.4.2.5 Zagon bioprocesa

V bioreaktorju smo izvedli tri poskuse za vsako koncentracijo glukoze. Proces, ki smo ga vodili en dan po sterilizaciji, je bil sestavljen iz naslednjih faz:

a) priprava:

Proces smo začeli z vklopom glavnega stikala, z vklopom procesne enote, s priključitvijo pH elektrode in odprtjem pipe za vodo. Vključili smo še gretje in mešanje. Na procesni



enoti smo naravnali temperaturo na 37 °C, kar je bila temperatura fermentacije v vseh naših poskusih. Mešalo smo naravnali na 200 vrt./min.

Na bioreaktor smo priključili cevke za bazo in kislino ter zračni filter, ki smo jih prejšnji dan avtoklavirali. Vrednost pH smo uravnali ročno na 5,75, nato pa smo vklopili avtomatsko uravnavanje z doziranje kisline in baze preko dveh peristaltičnih črpalk. Delo je potekalo v aseptičnih pogojih, da ne bi prišlo do okužbe. Pipo za vzorčenje smo potopili v 10 % raztopino vodikovega peroksida, kar nam je zagotavljalo sterilno vzorčenje. S tem je bioreaktor pripravljen na inokulacijo.

#### b) inokulacija:

Gojišče smo inokulirali s sevom *L. gasseri* K7, tako da smo pol ure pred fermentacijo vzeli iz zamrzovalnika en odmerek zamrznjenega inokuluma (priprava opisana v poglavju 3.3.1) in ga odtalili. Količina inokuluma je bila 25 ml, vendar je bila koncentracija celic velika, saj smo ta inokulum dobili s centrifugiranjem 220 ml 18-urne kulture. Inokulacijo smo izvedli aseptično, ob ognju. Odvili smo vijak na vrhu bioreaktorja, ga ožgali, okolico pa prav tako. Nato smo vlili inokulum skozi odprtino ter privili vijak.

Po inokulaciji smo prepihali celotno gojišče z dušikom, saj smo proces izvajali pod mikroaerofilnimi oz. anaerobnimi pogoji. Prepihovali smo 15-20 minut. Preden smo končali s prepihanjem, smo zaprli izstopni zračni ventil, tako da je bil v biorektorju nadtlak, kar je omogočilo anaerobne pogoje.

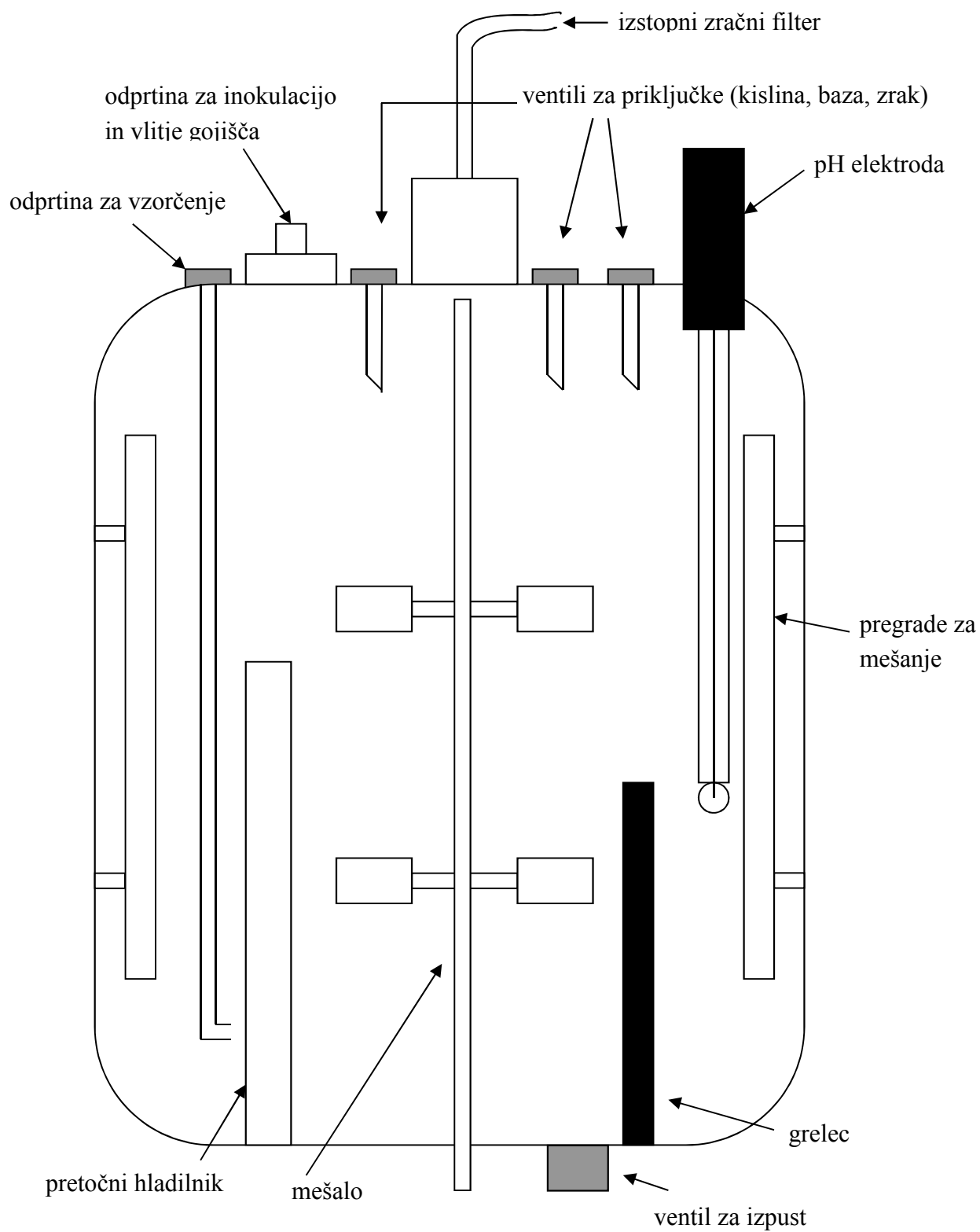
#### c) spremljanje procesa:

##### - vzorčenje

Prvo vzorčenje smo opravili takoj po inokulaciji, nato pa vsako uro do konca fermentacije, ko smo dosegli stacionarno fazo rasti (10 do 14 ur). Vzorčili smo skozi pipo na bioreaktorju ob ognju. Prvih 10 ml vzorca smo zavrgli, drugih 10 ml pa smo nalili v sterilne centrifugirke (12 ml). Po končanem vzorčenju smo konec pipe pomočili v 10 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

##### - kontrola parametrov bioprocasa

Redno smo preverjali, ali se niso spremenili nastavljeni parametri procesne enote, kot je temperatura fermentacije in vrednost pH. Oba parametra je procesna enota avtomatsko uravnavala na nastavljeno vrednost. Temperatura se je uravnavala z vklopom ali izklopom grelca ali pretočnega hladilnika, doziranje kisline ali baze pa preko peristaltične črpalke. Občasno smo izvedli kontrolo vrednosti pH v odvzetih vzorcih, s prenosnim pH-metrom (Mettler-Toledo).



Slika 3: Shema laboratorijskega bioreaktorja (BIOENGINEERING, Švica)

#### 3.4.2.6 Oprema bioreaktorja:

- mešalo: dve Rushtonovi turbini na eni osi
- pH elektroda (Mettler-Toledo): Ag/AgCl v raztopini KCl
- termometer: Pt 100, razpon merjenja od 0-150 °C
- grelec: moč = 800W, tip 30355
- pretočni hladilnih: vodno hlajenje
- zračni filtri: celulozni, 0,3 µm pore
- pipa za vzorčenje
- peristaltična črpalka: moč = 13 W, max vrt. = 50 rpm, tip: FuseT630mAL250V
- posoda bioreaktorja: steklena posoda

$$V=3.7 \text{ l, } V_{\text{delovni}}=2,2 \text{ l}$$

$$T_{\text{max}}=150^{\circ}\text{C}$$

$$p_{\text{max}}=1,5 \text{ bar — varnostni ventil}$$

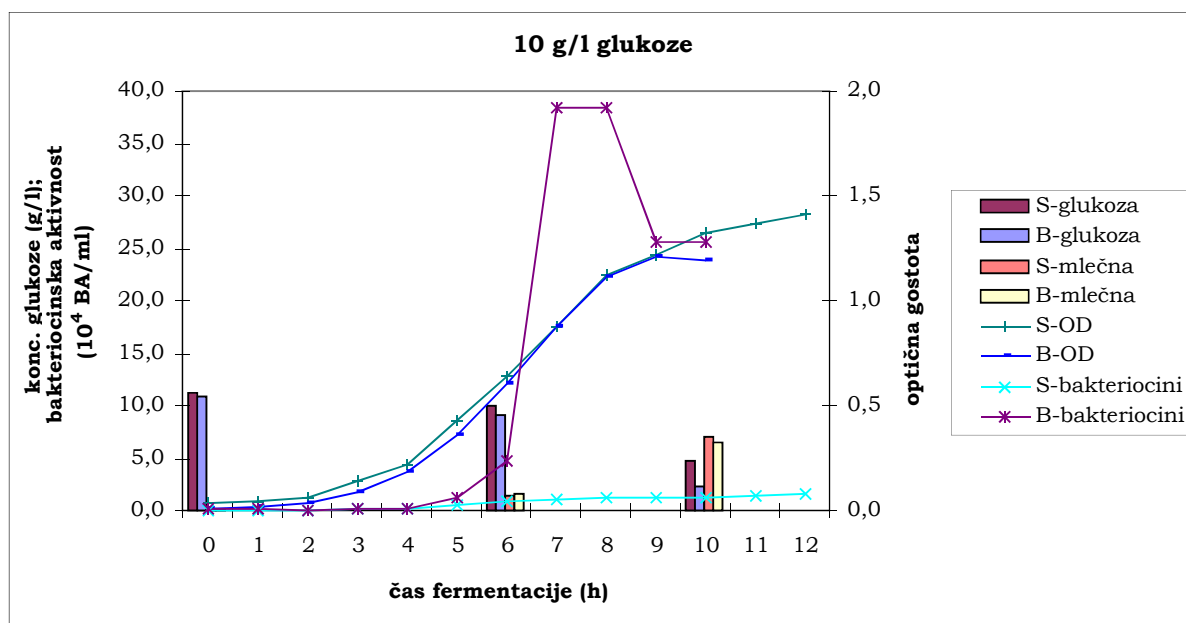
## 4 REZULTATI

### 4.1 REZULTATI KULTIVACIJ

Procese fermentacije smo izvajali v 250 ml steklenicah (S) in v laboratorijskem bioreaktorju (B) z delovnim volumnom 2,2 l. Procesi so bili vodeni šaržno, saj med fermentacijo nismo dodajali hranil. Optično gostoto smo ugotavljali spektrofotometrično pri 660 nm, bakteriocinsko aktivnost pa z biološkim testom inhibicije *L. sakei* NCDO 2174. Poleg tega smo vzorce tudi nacepljali na gojišče MRS, da bi ugotovili število KE/ml.

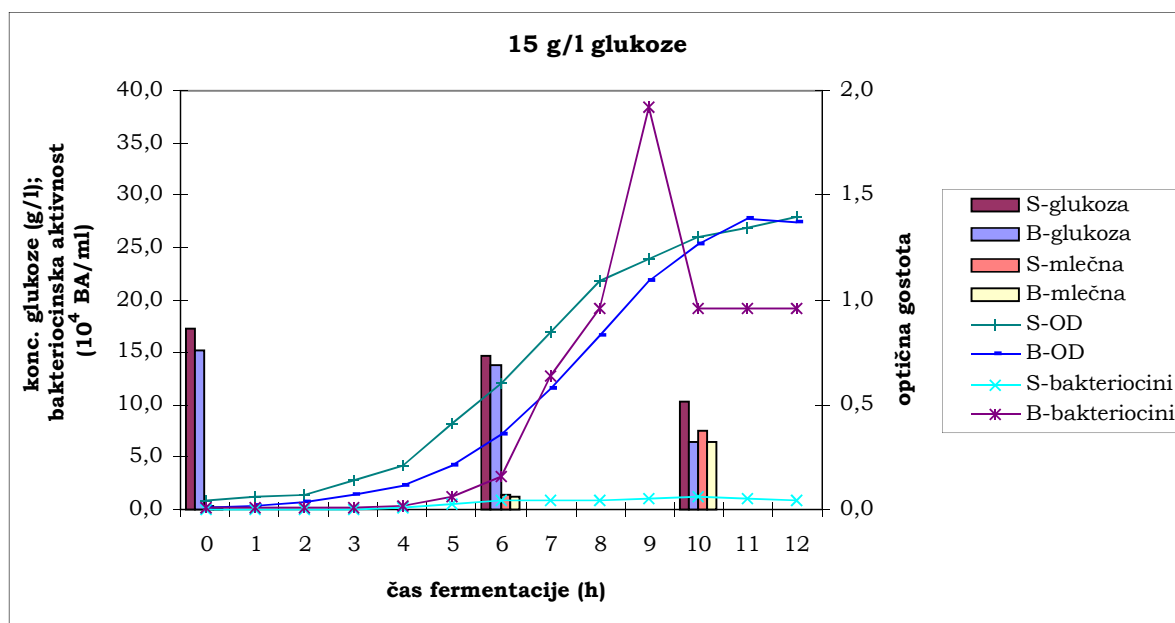
#### **4.1.1 Rast seva *Lactobacillus gaseri* K7 in produkcija bakteriocinov med gojenjem v steklenicah (S) brez uravnavanja pH ter v bioreaktorju (B) z uravnavanjem pH, pri različnih začetnih koncentracijah glukoze.**

Najprej smo ugotavljali optimalno začetno koncentracijo glukoze za rast seva K7 in produkcijo bakteriocinov v steklenicah, nato pa še v bioreaktorju z uravnavanjem pH. Testirali smo 3 različne začetne koncentracije glukoze v modificiranem gojišču MRS: 10 g/l, 15 g/l in 20 g/l.



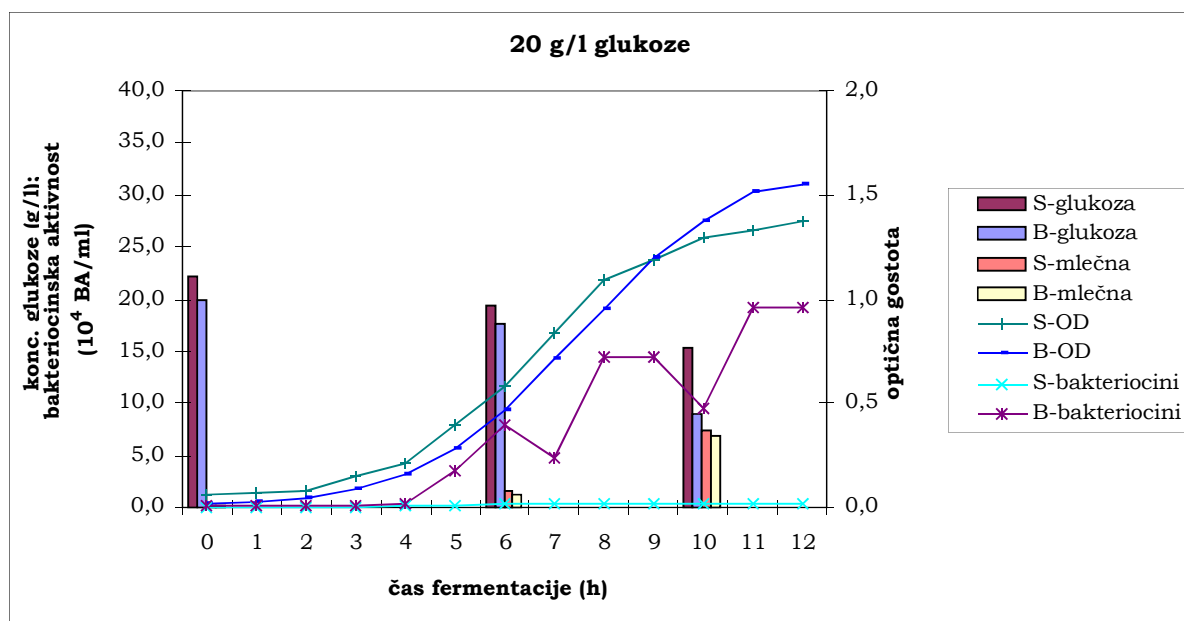
**Slika 4: Rast skupne biomase, poraba glukoze, produkcija mlečne kisline ter bakteriocinska aktivnost *Lactobacillus gasseri* K7, v MRS bujonu (konc. glukoze=10 g/l, T=37 °C, v bioreaktorju je vrednost pH=5,75, št. vrt./min=200), pri gojenju v steklenicah (S) in bioreaktorju (B). Prikazana so povprečja vseh testov, dveh procesov z dvema paralelkama v steklenicah in treh procesov za vsako koncentracijo v bioreaktorju.**

Podatki na Sliki 4 kažejo, da pri začetni koncentraciji glukoze v gojišču 10 g/l prvih 9 ur ni bilo bistvene razlike med rastjo v bioreaktorju s kontroliranim pH in v steklenicah. V nadaljnjih treh urah pa je koncentracija biomase v bioreaktorju še nekoliko narasla, v stekleničkah pa ne. Faza prilagajanja je bila kratka, sorazmerno velika pa je bila hitrost rasti v eksponentni fazi. Po devetih urah je bila optična gostota pri obeh bioprocseh enaka, s tem da je v bioreaktorju rast že dosegla stacionarno fazo, zato smo po 10 urah proces prekinili. V steklenici pa je populacija rahlo naraščala še naslednje tri ure inkubacije. Bistvena pa je bila razlika pri produkciji bakteriocinov. V steklenicah je bila produkcija bakteriocinov zanemarljiva v primerjavi s tisto v bioreaktorju z uravnavanjem pH, kjer smo po sedmih urah zabeležili 400000 BA/ml. Produkcija bakteriocinov je bila najintenzivnejša med 6. in 7. uro. Poraba glukoze je bila v bioreaktorju nekoliko večja kot pa v steklenicah, kljub temu da je bila tako rast mikrobne populacije kakor produkcija mlečne kisline v obeh primerih podobna. Verjetno je večjo porabo glukoze mogoče pripisati tudi za celico energijsko zahtevni biosintezi bakteriocinov.



**Slika 5:** Rast skupne biomase, poraba glukoze, produkcija mlečne kisline ter bakteriocinska aktivnost *Lactobacillus gasseri* K7 v MRS bujonu (konc. glukoze=15 g/l, T=37 °C, v bioreaktorju je vrednost pH=5,75, št. vrt./min=200), pri gojenju v steklenicah (S) in bioreaktorju (B). Prikazana so povprečja vseh testov, dveh procesov z dvema paralelkama v steklenicah in treh procesov za vsako koncentracijo v bioreaktorju.

Podatki na Sliki 5 kažejo, da pri začetni koncentraciji glukoze v gojišču 15 g/l vrsta bioprocasa oziroma uravnavanje pH kot bistvena razlika med njima nista bistveno vplivala na rast mikrobne populacije. V bioreaktorju je mikrobna populacija dosegla stacionarno fazo po enajstih urah, v steklenicah pa je tudi med zadnjo uro fermentacije optična gostota še rahlo narasla. Opazili pa smo bistveno razliko pri produkciji bakteriocinov. V steklenicah, kjer se pH ne uravnava, je bila produkcija bakteriocinov zanemarljiva, medtem ko je bila v bioreaktorju z uravnavanjem pH velika, najintenzivnejša pa med 6. in 8. uro. Prav tako je bila poraba glukoze v bioreaktorju večja, produkcija mlečne kisline pa manjša kot pa v steklenicah. Nekaj več glukoze se je v prvih desetih urah sicer porabilo v bioreaktorju, najverjetneje zaradi biosinteze bakteriocinov.



**Slika 6:** Rast skupne biomase, poraba glukoze, produkcija mlečne kisline ter bakteriocinska aktivnost *Lactobacillus gasseri* K7 v MRS bujonu (konc. glukoze=20 g/l, T=37 °C, v bioreaktorju je vrednost pH=5,75, št. vrt./min=200), pri gojenju v steklenicah (S) in bioreaktorju (B). Prikazana so povprečja vseh testov, dveh procesov z dvema paralelkama v steklenicah in treh procesov za vsako koncentracijo v bioreaktorju.

Tudi pri začetni koncentraciji glukoze v gojišču 20 g/l (Slika 6) vrsta bioprocasa ni bistveno vplivala na rast mikrobne populacije, manjši pozitivni učinek gojenja v bioreaktorju smo sicer opazili zadnje 3 ure inkubacije. Končna gostota populacije v steklenicah je bila, ne glede na začetno koncentracijo glukoze, malo pod vrednostjo OD 0,5, s tem da je več glukoze ostalo neporabljen v pogojih, ko je bilo v gojišču več. Tudi stacionarna faza po 12 urah še ni bila popolnoma dosežena. Kakor pri prejšnjih dveh procesih je bila produkcija bakteriocinov v steklenicah zanemarljiva, medtem ko je bila v bioreaktorju z uravnavanjem pH intenzivnejša, vendar bistveno slabša kot pri drugih dveh procesih v bioreaktorju, ko je bilo začetne glukoze manj.

Večje razlike v proizvodnji mlečne kisline v steklenicah ali bioreaktorju nismo zaznali, vendar se je znatno več glukoze porabilo v bioreaktorju. Nekaj verjetno na račun boljše rasti, nekaj pa na račun produkcije bakteriocinov.

V Preglednici 1 so zbrani podatki o največji doseženi optični gostoti bakterijskih celic (Max OD), o največji doseženi koncentraciji KE/ml (Max KE/ml), o največji specifični hitrosti rasti ter o največji bakteriocinski aktivnosti v gojišču (Max BA/ml) za 6 izvedenih bioprocsov. Podano je tudi, ob katerem času so bile dosežene najvišje izmerjene vrednosti za omenjene parametre.

**Preglednica 1:** Maksimalno število kolonijskih enot, maksimalna specifična hitrost rasti ter maksimalna bakteriocinska aktivnost *Lactobacillus gasseri* K7 v bujonu MRS (konc. glukoze=10, 15 in 20 g/l, T=37 °C, v bioreaktorju je vrednost pH=5,75, št. vrt./min=200), v steklenicah (S) in v bioreaktorju (B). Prikazane so maksimalne vrednosti vsakega testa. V oklepaju je navedeno, po koliko urah smo ugotovili te vrednosti.

Kultivacija	Glukoza (g/l)	Max OD (čas v h)	Max KE/ml (čas v h)	Max spec. hitr. r. (čas v h)	Max BA/ml (čas v h)
S1	10	1,440 (14)	$3,67 \times 10^8$ (10)	0,73702 (6)	16000 (12)
S2	15	1,436 (14)	$3,62 \times 10^8$ (8)	0,77679 (6)	16000 (10)
S3	20	1,458 (14)	$3,75 \times 10^8$ (10)	0,68538 (6)	4000 (6)
B1	10	1,2650 (10)	$3,13 \times 10^8$ (9)	1,14990 (6)	512000 (7)
B2	15	1,4327 (12)	$4,35 \times 10^8$ (9)	0,89091 (6)	512000 (9)
B3	20	1,5667 (12)	$3,26 \times 10^8$ (10)	0,83870 (5)	256000 (8)

V Preglednicah 2 in 3 so zbrani rezultati ugotavljanja bakteriocinske aktivnosti v gojišču, izračuna specifične hitrosti rasti ter števila KE/ml, za 3 bioprocese v steklenicah (Preglednica 2) ali v bioreaktorju (Preglednica 3), ki so se med seboj razlikovali po izhodiščni koncentraciji glukoze v gojišču.

Število kolonijskih enot, specifična hitrost rasti ter bakteriocinska aktivnost *Lactobacillus gasseri* K7 v bujonu MRS (konc. glukoze=10, 15 in 20g/l, T=37 °C), v steklenicah. Prikazana so povprečja procesov z dvema paralelkama.

**Preglednica 2:** Število kolonijskih enot (KE), specifična hitrost rasti ter bakteriocinska aktivnost (BA) *Lactobacillus gasseri* K7 v bujonu MRS (konc. glukoze=10, 15 in 20g/l, T=37 °C), v steklenicah. Prikazana so povprečja procesov z dvema paralelkama.

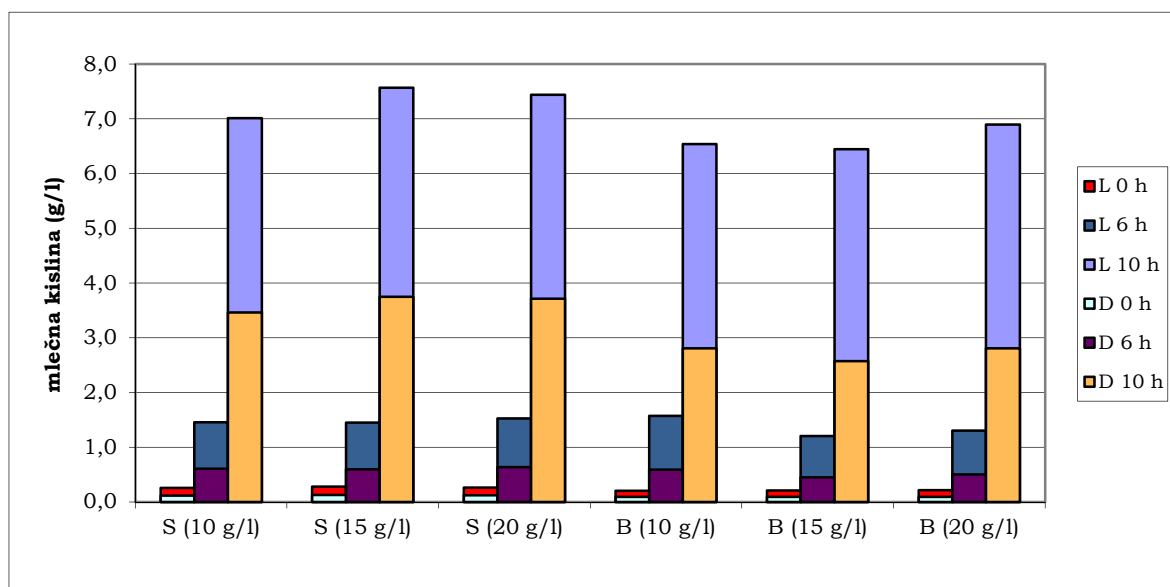
Steklenice	Začetna koncentracija glukoze v gojišču								
	10 g/l	15 g/l	20 g/l	10 g/l	15 g/l	20 g/l	10 g/l	15 g/l	20 g/l
Čas	BA/ml	BA/ml	BA/ml	spec. hitr. rasti	spec. hitr. rasti	spec. hitr. rasti	KE/ml	KE/ml	KE/ml
0	0	0	0				$1,15 \times 10^7$	$1,05 \times 10^7$	$1,12 \times 10^7$
2	0	0	0	0,2134	0,24465	0,14246	$1,76 \times 10^7$	$1,73 \times 10^7$	$1,48 \times 10^7$
4	1000	1000	1000	0,5735	0,51315	0,59306	$5,70 \times 10^7$	$4,91 \times 10^7$	$4,89 \times 10^7$
6	4000	<b>8000</b>	2000	<b>0,65189</b>	<b>0,7001</b>	<b>0,6115</b>	$2,10 \times 10^8$	$1,98 \times 10^8$	$1,66 \times 10^8$
8	8000	<b>8000</b>	<b>4000</b>	0,18663	0,20648	0,25645	<b><math>2,95 \times 10^8</math></b>	<b><math>2,96 \times 10^8</math></b>	$2,77 \times 10^8$
10	8000	<b>8000</b>	<b>4000</b>	-0,0415	0,00674	0,04338	$2,75 \times 10^8$	$2,92 \times 10^8$	<b><math>3,06 \times 10^8</math></b>
12	<b>16000</b>	<b>8000</b>	<b>4000</b>	0,01989	-0,02327	0,0498	$2,68 \times 10^8$	$2,76 \times 10^8$	$3,00 \times 10^8$
14	8000	4000	2000			-0,00628	$2,35 \times 10^8$	$2,65 \times 10^8$	$2,96 \times 10^8$



**Preglednica 3:** Število kolonijskih enot, specifična hitrost rasti ter bakteriocinska aktivnost *Lactobacillus gasseri* K7 v bujonu MRS (konc. glukoze=10, 15 in 20g/l, T=37 °C, v bioreaktorju je vrednost pH=5,75, št. vrt./min=200), v bioreaktorju. Prikazana so povprečja treh procesov za vsako koncentracijo (n=3).

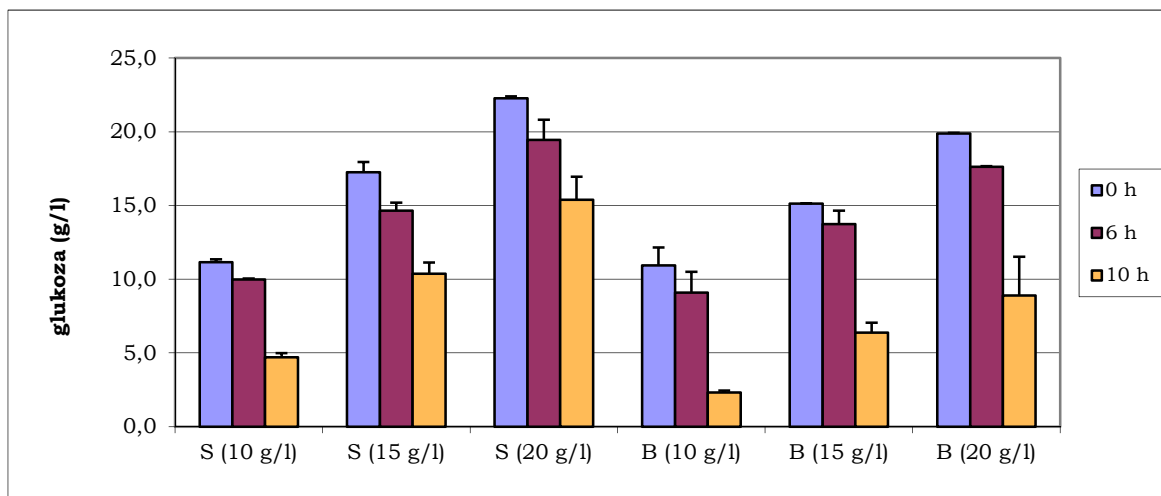
Bioreaktor	10 g/l	15 g/l	20 g/l	10 g/l	15 g/l	20 g/l	10 g/l	15 g/l	20 g/l
Čas	BA/ml	BA/ml	BA/ml	spec. hitr. rasti	spec. hitr. rasti	spec. hitr. rasti	KE/ml	KE/ml	KE/ml
0	1000	1000	1000				9,10 x 10 <sup>6</sup>	9,80 x 10 <sup>6</sup>	7,80 x 10 <sup>6</sup>
1	1000	1000	1000	0,1866033	0,1222967	0,3209333	1,09 x 10 <sup>7</sup>	1,11 x 10 <sup>7</sup>	1,01 x 10 <sup>7</sup>
2	1000	1000	1000	0,1495633	0,2291967	0,3454133	1,26 x 10 <sup>7</sup>	1,43 x 10 <sup>7</sup>	1,44 x 10 <sup>7</sup>
3	1000	2000	1000	0,20843	0,2135367	0,21144	1,56 x 10 <sup>7</sup>	1,81 x 10 <sup>7</sup>	1,80 x 10 <sup>7</sup>
4	2000	2000	4000	0,44183	0,3352133	0,2687367	2,47 x 10 <sup>7</sup>	2,54 x 10 <sup>7</sup>	2,37 x 10 <sup>7</sup>
5	16000	16000	32000	0,69462	0,6323667	<b>0,8698933</b>	5,17 x 10 <sup>7</sup>	4,91 x 10 <sup>7</sup>	5,70 x 10 <sup>7</sup>
6	32000	32000	64000	<b>0,9880533</b>	<b>0,7319267</b>	0,8275333	1,35 x 10 <sup>8</sup>	9,96 x 10 <sup>7</sup>	1,31 x 10 <sup>8</sup>
7	<b>256000</b>	128000	64000	0,417	0,70387	0,4706433	1,99 x 10 <sup>8</sup>	1,94 x 10 <sup>8</sup>	2,07 x 10 <sup>8</sup>
8	<b>512000</b>	256000	<b>128000</b>	0,20596	0,2636067	0,2172467	2,43 x 10 <sup>8</sup>	2,52 x 10 <sup>8</sup>	2,54 x 10 <sup>8</sup>
9	<b>256000</b>	<b>512000</b>	<b>128000</b>	0,1278967	0,1859567	0,0898067	2,76 x 10 <sup>8</sup>	<b>3,08 x 10<sup>8</sup></b>	2,76 x 10 <sup>8</sup>
10	<b>256000</b>	256000	<b>128000</b>	-0,156773	-0,020007	0,1044267	2,39 x 10 <sup>8</sup>	2,94 x 10 <sup>8</sup>	3,07 x 10 <sup>8</sup>
11	<b>256000</b>	256000	<b>128000</b>	-0,08408	-0,06328	-0,009473	<b>2,85 x 10<sup>8</sup></b>	2,73 x 10 <sup>8</sup>	3,07 x 10 <sup>8</sup>
12		128000	<b>128000</b>		-0,04523	0,04411		2,66 x 10 <sup>8</sup>	<b>3,19 x 10<sup>8</sup></b>
13			32000			0,04879			3,15 x 10 <sup>8</sup>

Na Sliki 7 je prikazan potek produkcije L-mlečne kisline in D-mlečne kisline med gojenjem *L. gasseri* K7 za 6 bioprocsov.



Slika 7: Prikaz razmerja L in D mlečne kisline med kultivacijo *Lactobacillus gasseri* K7 v steklenicah (S) in bioreaktorju (B) (T=37 °C, v bioreaktorju je vrednost pH=5,75, št. vrt./min=200). Vrednosti v oklepaju (10, 15 ali 20 g/l) pomenijo začetno koncentracijo glukoze v gojišču. Prikazana so povprečja dveh procesov z dvema paralelkama v steklenicah (n=4) in treh procesov za vsako koncentracijo v bioreaktorju (n=3).

Na Sliki 8 je prikazana poraba glukoze med gojenjem *L. gasseri* K7 za 6 bioprosesov.



**Slika 8:** Poraba glukoze med kultivacijo *Lactobacillus gasseri* K7 v steklenicah (S) in bioreaktorju (B) ( $T=37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , v bioreaktorju je vrednost  $\text{pH}=5,75$ , št. vrt./min=200). Vrednosti v oklepaju (10, 15 ali 20 g/l) pomenijo začetno koncentracijo glukoze v gojišču. Prikazana so povprečja dveh procesov z dvema paralelkama v steklenicah ( $n=4$ ) in treh procesov za vsako koncentracijo v bioreaktorju ( $n=3$ ).

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

Sev *L. gasseri* K7, ki smo ga v tem delu uporabili v bioprocesih, je bil izoliran iz blata dojenčka. Je predstavnik po Gramu pozitivnih mlečnokislinskih bakterij, ki naseljujejo človeški gastrointestinalni, vaginalni in respiratorni trakt. Sev K7 izkazuje nekatere probiotične lastnosti in tvori bakteriocine s širokim spektrom protimikrobnega delovanja (Rogelj in sod., 2002; Bogovič Matijašič in sod., 2004). Producira dva bakteriocina, ki so ju poimenovali gassericin K7 A in gassericin K7 B (Čanžek Majhenič, 2002; Čanžek Majhenič in sod., 2004).

Osnovni cilj naloge je bil primerjati dinamiko porabe glukoze in produkcije mlečne kisline seva *L. gasseri* K7 v dveh različnih bioprocesih, v 250 ml steklenicah in v laboratorijskem bioreaktorju v 2,2 l gojišča. Spremljali pa smo tudi rast in produkcijo bakteriocinov. Oba procesa sta šaržna, poglobitna razlika med njima pa je, da smo v laboratorijskem bioreaktorju med mešanjem uravnavali pH, v steklenicah pa ne. Temperatura, sestava gojišča in velikost inokuluma so bili pri obeh procesih enaki. Proces smo prekinili po 12 urah oziroma prej, če optična gostota ni več naraščala.

MRS je osnovno gojišče za gojenje laktobacilov, ki je bogato z viri ogljika in dušika, mineralnimi solmi, elementi v sledovih, peptoni, aminokislinami, vitamini in ostalimi rastnimi dejavniki. Omogoča dobro rast in praviloma tudi dobro produkcijo metabolitov, vključno z mlečno kislino in bakteriocini. Vendar pa so nekatere predhodne raziskave pokazale, da razmere, najboljše za rast, ne sovpadajo nujno s tistimi, ki so najboljše za proizvodnjo bakteriocinov.

Predhodne raziskave so namreč pokazale, da sev K7 v gojišču MRS tvori bakteriocine med eksponentno fazo rasti. Največjo bakteriocinsko aktivnost je sev K7 dosegel v pozni logaritemski fazi. Ker je bila produkcija bakteriocinov najboljša, kadar so sev gojili v biorektorju z uravnavanjem pH na vrednost 5,75, smo take razmere ustvarili tudi v tej raziskavi (Bogovič Matijašič in Rogelj, 2000; Bogovič Matijašič in sod., 2001).

Vzporedno smo sev K7 gojili v steklenicah brez uravnavanja vrednosti pH, pri 37 °C in pri različnih koncentracijah glukoze (10 g/l, 15 g/l, 20 g/l). Za gojišče smo uporabili bujon MRS z običajno (20 g/l) ali z zmanjšano vsebnostjo glukoze (10 g/l, 15 g/l). Pri kultivacijah z uravnavanjem pH smo sev K7 gojili v bioreaktorju pri 37 °C in pH 5,75. Za

učinkovito uravnavanje pH je bilo potrebno tudi mešanje (200 vrt/min). Tudi v tem primeru so bile koncentracije glukoze v gojišču 10 g/l, 15 g/l ali 20 g/l. Konstantno vrednost pH smo vzdrževali z avtomatskim dodajanjem kisline oziroma baze.

Pri katerikoli začetni vrednosti glukoze v gojišču (10 g/l, 15 g/l ali 20 g/l) ni bilo večjih razlik v rasti mikrobne populacije med procesoma v steklenicah in v bioreaktorju. Med gojenjem v bioreaktorju je bila sicer končna OD največja v gojišču z 20 g/l dodane glukoze. Sklepamo, da uravnavanje vrednosti pH ni bistveno vplivala na samo rast seva K7. Tako v steklenicah kot v bioreaktorju je bila rast mikrobne populacije relativno hitra, saj je mikrobna populacija dosegla stacionarno fazo v desetih do dvanajstih urah. Pomembnejših razlik v specifični hitrosti rasti v odvisnosti od začetne koncentracije glukoze ali od vrste bioprocesa nismo zasledili. Povprečne maksimalne hitrosti rasti, ki smo jih ugotovili pri kultivaciji v steklenicah, so bile 0,73702 h, 0,77679 h in 0,68539 h ter pri kultivaciji v bioreaktorju 1,14990 h, 0,89091 h, in 0,83870 h, pri začetnih koncentracijah glukoze 10 g/l, 15 g/l ali 20 g/l.

Bistveno razliko med obema procesoma pa smo ugotovili v produkciji bakteriocinov. V steklenicah, kjer se je vrednost pH med rastjo spontano zniževala, je bila produkcija bakteriocinov zanemarljiva, medtem ko je bila v bioreaktorju z uravnavanjem pH intenzivna. Produkcija bakteriocinov je bila najintenzivnejša med 6. in 8. uro. Pri izhodiščnih koncentracijah glukoze 10 in 15 g/l je največja bakteriocinska aktivnost dosegla vrednost 512000 BA/ml, pri čemer je bila v gojišču z 10 g/l glukoze ta dosežena 2 uri prej (po 7 urah), kot v gojišču s 15 g/l glukoze (po 9 urah). V gojišču z največ glukoze pa je bila produkcija bakteriocinov počasnejša in precej slabša, saj je bila končna koncentracija za polovico manjša (256000 BA/ml). Največjo bakteriocinsko aktivnost (512000 BA/ml) smo torej dobili pri kultivaciji v bioreaktorju, pri konstantni pH vrednost 5,75 in začetni koncentraciji glukoze v gojišču 10 g/l.

Naše opažanje, da razlike v produkciji bakteriocinov niso sovpadale z razlikami v rasti kultur, niso presenetljive, saj so do podobnih zaključkov prišli v podobnih predhodnih raziskavah. Produkcija bakteriocinskega kompleksa *Lactobacillus* LF221, zelo podobnega bakteriocinom seva K7, ni bila v neposredno povezana z rastjo. Medtem ko je bil najugodnejši pH za proizvodnjo bakteriocinov LF221 6,5, je bila hitrost rasti največja pri pH=5,5, največjo koncentracijo KE/ml pa so dosegli v kulturi v steklenicah z istim gojiščem (MRS), ne pa v bioreaktorju ob uravnavanju pH (Bogovič Matijašič in Rogelj, 1998). Pri sevu *L. plantarum* KC21, na primer, je bila optimalna temperatura za rast 37 °C, za proizvodnjo bakteriocinov pa 30 °C (Lim, 2000). Ten Brink in sod. (1994) so pokazali, da acidocin B producirajo tudi nerastoča kultura *L. acidophilus* M46, ki je bila vzpostavljena stresu zaradi prenosa celic v gojišče brez pomembne sestavine gojišča

Tween 80. Tudi proizvodnja amilovorina L471 je bila večja v stresnih razmerah, pri nizkih temperaturah, prisotnosti NaCl, etanola in kisika (De Vuyst in sod., 1996). Pojav je mogoče razložili tako, da pri počasnejši rasti ostane na razpolago več energije za tvorbo bakteriocinov. Nenazadnje pa je tudi predhodna raziskava s sevom *L. gasseri* K7, v kateri smo iskali najprimernejšo vrednost pH za čimboljšo proizvodnjo bakteriocinov K7 v bioreaktorju, pokazala, da je bila vrednost pH, pri kateri sta bili hitrost rasti in pridobljena biomasa največji, za celo enoto višja od tiste, ki je bila najugodnejša za proizvodnjo bakteriocinov (Bogovič Matijašič in sod., 2001).

Za iskanje najboljših razmer za rast in proizvodnjo bakteriocinov v zadnjem času pogosto uporabljajo takoimenovani pristop "response surface methodology" (RSM) oz. metodologija površine odgovora. Tako so v več raziskavah spreminjali sestavo gojišča MRS, ki je še vedno najbolj razširjeno za gojenje laktobacilov in proizvodnjo njihovih metabolitov, ter iskali najboljše kombinacije sestave, pH in temperature. V naši raziskavi smo spreminjali le dva parametra – koncentracijo glukoze in način gojenja – v bioreaktorju z uravnavanjem pH ali v stekleničkah, brez uravnavanja pH.

Znano je, da glukoza lahko pomembno vpliva na rast in proizvodnjo metabolitov, vključno z bakteriocini in mlečno kislino. Song in sodelavci (2012) so pokazali, da so trije dejavniki zelo vplivali na produkcijo bakteriocinov v *L. ZJ 317* v gojišču MRS, v katerem so spreminjali koncentracijo glukoze (0,75-2,5 %), koncentracijo kvasnega ekstrakta (0,75-2,5 %) in velikost inokuluma. Gojišče, optimalno za produkcijo bakteriocinov, je vsebovalo 2 % glukoze in 1,02 % kvasnega ekstrakta. Niso pa spremljali proizvodnje mlečne kisline in porabe sladkorja. V našem primeru pa so večje koncentracije glukoze (20 g/l) negativno vplivale na produkcijo bakteriocinov v bioreaktorju. Najnižja testna koncentracija (10 g/l) je bila bolj primerna za produkcijo bakteriocinov.

Lee in sodelavci (2012) so z metodologijo "površine odgovora" (response surface methodology) ugotavljali, kako spreminjanje različnih dejavnikov: temperature, izhodiščnega pH, koncentracije glukoze, kvasnega ekstrakta in MgSO<sub>4</sub> v gojišču MRS vpliva na proizvodnjo bakteriocinov med gojenjem seva *L. brevis* DF01. Kombinacija dejavnikov, najprimernejša za proizvodnjo bakteriocinov, je bila 14,56 g/l kvasnega ekstrakta, 28,95 g/l glukoze in začetni pH 6,8.

Kanmani in sodelavci (2012) so odkrili, da koncentracija glukoze, kvasnega ekstrakta in K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> v gojišču vplivajo na proizvodnjo bakteriocinov v *Streptococcus phocae* PI80. Za optimalno se je izkazalo gojišče, ki je vsebovalo 19 g/l natrijevega sukcinata, 4 g/l kvasnega ekstrakta, 9 g/l glukoze, 10 g/l NaCl, 6,0 g/l Tween 80 in 1,0 g/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>).

Malheiros in sodelavci (2015) so prav tako ugotovili, da je ob primernem pH, temperaturi in dodanem Tween 20 za proizvodnjo bakteriocinov s strani *Lactobacillus sakei* 2a bila ugodnejša nižja koncentracija glukoze (5,5 g/l) kot je v komercialnem gojišču MRS (20 g/l oz. 2 %). To se sklada z našimi izsledki gojenja v bioreaktorju.

Lim (2010) pa je prišel do zaključka, da že 2 % glukoze v gojišču MRS zavre rast in proizvodnjo bakteriocinov pri sevu *L. plantarum* KC21.

Za razliko od vpliva različnih koncentracij ogljikovih hidratov in drugih sestavin gojišča na proizvodnjo bakteriocinov je podatkov iz prejšnjih raziskav o neposredni povezavi med proizvodnjo bakteriocinov in mlečne kisline malo. Parente in sod. (1994) so na primer poročali, da je bila slabša rast in proizvodnja mlečne kisline med kultivacijo *Lc. lactis* 140 NWC kompenzirana z večjimi količinami proizvedenih bakteriocinov. Takšen trend se v naši raziskavi ni pokazal. Potrdili smo pa izsledke predhodne raziskave *L. gasseri* K7, ki ni pokazala neposredne povezave med količino proizvedenih bakteriocinov in mlečne kisline (Bogovič Matijašič in sod., 2001).

## 5.2 SKLEPI

- Poraba glukoze v bioreaktorju je bila večja kot v steklenicah, čeprav je bila rast mikrobne populacije in produkcija mlečne kisline v obeh primerih podobna. Večjo porabo glukoze je mogoče pripisati tvorbi bakteriocinov, ki je bila v bioreaktorju večja kot v steklenicah.
- Po 10 urah glukoza v gojiščih še ni bila porabljena pri nobenem od testnih pogojev. Tudi med gojenjem v steklenicah z gojiščem z 10 g dodane glukoze, kjer je stacionarna faza nastopila po 9 urah, smo v gojišču ugotovili preostalo glukozo (2,32 g/l). Neposrednega vpliva začetne koncentracije glukoze na rast seva *L. gasseri* K7 nismo ugotovili, razen nekoliko večje gostote kulture in števila KE/ml v bioreaktorju po 12 urah v gojišču z 20 g/l glukoze.
- Začetna koncentracija glukoze v gojišču je vplivala na produkcijo bakteriocinov v bioreaktorju.
- Niti vrsta bioprocesa niti količina dodane glukoze nista neposredno vplivali na količino proizvedene mlečne kisline.

- Potrdili smo že znano dejstvo, da je uravnavanje vrednosti pH na 5,75 med kultivacijo pozitivno vpliva na produkcijo bakteriocinov. Med kultivacijo brez uravnavanja pH v steklenicah je bila produkcija bakteriocinov zanemarljiva.

## 6 POVZETEK

Sev *L. gasseri* K7 je bil izoliran iz blata dojenčka in spada v DNA-homologno podskupino B1 skupine *L. acidophilus*. Je predstavnik po Gramu pozitivnih mlečnokislinskih bakterij, ki naseljuje človeški gastrointestinalni, vaginalni in respiratorni trakt. Sev izkazuje osnovne probiotične lastnosti in tvori bakteriocine s širokim spektrom protimikrobnega delovanja. Bakteriocini mlečnokislinskih bakterij so uporabni kot biokonzervansi, po vsej verjetnosti pa igrajo tudi pozitivno vlogo v prebavilih ljudi in živali.

S ciljem proučiti dinamiko porabe glukoze in produkcije mlečne kisline ter bakteriocinov, smo *L. gasseri* K7 gojili pri 37 °C v modificiranem gojišču za laktobacile MRS, v dveh različnih bioprocseh – v steklenicah (200 ml gojišča) ali v šaržnem procesu v bioreaktorju (2200 ml gojišča) ob uravnavanju pH na vrednost 5,75. Predvidevali smo, da je dinamika rasti, produkcije bakteriocinov in porabe glukoze odvisna tako od vrste bioprocasa kakor od začetne koncentracije glukoze v gojišču.

Pri obeh procesih kultivacije smo spreminjali začetno koncentracijo glukoze v gojišču: 10, 15 in 20g/l. V vzorcih, odvzetih vsaki dve uri, smo ugotavljali število kolonjskih enot (KE/ml), optično gostoto pri 660 nm valovne dolžine in bakteriocinsko aktivnost. Izračunavali smo tudi specifično hitrost rasti. Koncentracijo glukoze in mlečne kisline smo merili na začetku, po 6-ih urah in po 10-ih urah.

Tako v steklenicah kot v bioreaktorju je bila rast mikrobne populacije seva K7 relativno hitra. Vrsta bioprocasa ni bistveno vplivala na rast mikrobne populacije, ugotovili pa smo razlike pri produkciji bakteriocinov. V steklenicah, kjer se je vrednost pH spontano zniževala zaradi produkcije mlečne kisline, je bila koncentracija bakteriocinov zanemarljiva, medtem ko je v bioreaktorju z uravnavanjem pH na 5,75 dosegla koncentracije do 256000 BA/ml. Produkcija bakteriocinov je bila najintenzivnejša med 6. in 8. uro. Pri manjši začetni koncentraciji glukoze je bila produkcija bakteriocinov v bioreaktorju praviloma boljše kot pri večji. Rezultati kažejo na to, da je za boljše produkcijo bakteriocinov smiselno gojišče MRS, ki sicer vsebuje 20 g/l glukoze, modificirati tako, da je koncentracija glukoze za polovico manjša.

Pri gojenju seva K7 v bioreaktorju smo zasledili tudi večjo porabo glukoze, kar je vsaj delno mogoče razložiti s povečano potrebo po energiji, ki jo je povzročila intenzivnejša produkcija bakteriocinov. Na količino proizvedene mlečne kisline nista neposredno vplivali niti vrsta bioprocasa niti količina dodane glukoze.



Če je cilj bioprocesa predvsem pridobivanje mikrobne biomase, z uravnavanjem vrednosti pH med fermentacijo in s spreminjanjem izhodiščne koncentracije glukoze ne bomo dosegli učinkov. Če pa želimo poleg biomase v fermentacijski brozgi tudi bakteriocine, je smiselno uravnavati pH ter zmanjšati začetno koncentracijo glukoze. Potrebno pa je proces pravočasno prekiniti, preden se koncentracija bakteriocinov v gojišču zmanjša.

## 7 VIRI

- Axelsson L. 2004. Lactic acid bacteria: classification and physiology. V: Lactic acid bacteria, microbiology and functional aspects. 3<sup>rd</sup> ed. Seppo S., von Wright A., Ouwenhand A. (eds.). New York, CRC Press: 2-66
- Bias S. R., Johnson M. C., Ray B. 1991. Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin pediocin AcH by *Pediococcus acidilactici* AcH. Applied and Environmental Microbiology, 57: 1265-1267
- Bogovič Matijašič B. 1997. Bakteriocini seva *Lactobacillus acidophilus* LF 221: preučevanje tvorbe, protibakterijske aktivnosti biokemijskih lastnosti in sestave. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 1-27
- Bogovič Matijašič B., Rogelj I. 1998. Bacteriocin complex of *Lactobacillus acidophilus* LF221-production studies in MRS media at different pH values and effect against *Lactobacillus helveticus* ATCC 15009. Process Biochemistry, 33: 345-352
- Bogovič Matijašič B., Rogelj I., Nes I. F., Holo H. 1998. Isolation and characterization of two bacteriocins of *Lactobacillus acidophilus* LF221. Applied and Environmental Microbiology, 49: 606-612
- Bogovič Matijašič B., Rogelj I. 1999. Bacteriocinogenic activity of lactobacilli isolated from cheese and baby faeces. Food Technology and Biotechnology, 37, 2: 93-100
- Bogovič Matijašič B., Rogelj I. 2000. *Lactobacillus* K7 – new candidate for a probiotic strain. Food Technology and Biotechnology, 38: 113-120
- Bogovič Matijašič B., Rogelj I., Batič M., Raspor P. 2001. Influence of pH on bacteriocin production by *Lactobacillus* K7 during batch fermentation. Periodicum Biologorum, 103: 163-167
- Bogovič Matijašič B., Narat M., Zorič M. 2003. Adhesion of two *Lactobacillus gasseri* probiotic strains on Caco-2 cells. Food Technology and Biotechnology, 41, 1: 83-88
- Bogovič Matijašič B., Stojković S., Salobir J., Malovrh Š., Rogelj I. 2004. Evaluation of the *Lactobacillus gasseri* K7 and LF221 strains in weaned piglets for their possible probiotic use and their detection in the faeces. Animal Research, 53: 35-44
- Bogovič Matijašič B., Narat M., Peternel M. Z., Rogelj I. 2006. Ability of *Lactobacillus gasseri* K7 to inhibit *Escherichia coli* adhesion in vitro on Caco-2 cells and ex vivo on pigs' jejunal tissue. International Journal of Food Microbiology, 107: 92-96
- Bruno M. E. C., Montville T. J. 1993. Common mechanistic action of bacteriocin from lactic acid bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 59: 3003-3010

- Casaus P., Nilsen T., Cintas L. M., Nes I. F., Hernandez P. E., Holo H. 1997. Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* TI36 which can act synergistically with enterocin A. *Microbiology*, 143: 2287-2294
- Cheigh C. I., Choi H. J., Park H., Kim S. B., Kook M. C., Kim T. S., Hwang J. K., Pyun Y. R. 2002. Influence of growth conditions on the production of a nisin-like bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 isolated from kimchi. *Journal of Biotechnology*, 95: 225–235
- Cintas L. M., Rodriguez J. M., Fernandez M. F., Sletten K., Nes I. F., Hernandez P. E., Holo H. 1995. Isolation and characterization of pediocin L50, a new bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* with a broad inhibitory spectrum. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 2643-2648
- Cintas L. M., Casaus P., Herranz C., Håvarstein L.S., Holo H., Hernández P. E., Nes I. F. 2000. Biochemical and genetic evidence that *Enterococcus faecium* L50 produces enterocins L50A and L50B, the sec-dependent enterocin P, and a novel bacteriocin secreted without an N-terminal extension termed enterocin Q. *Journal of Bacteriology*, 182: 6806–6814
- Cleveland J., Montville T. J., Nes I.F., Chikindas M. L. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 71: 1-20
- Cobos E. S., Filimonov V. V., Galvez A., Maqueda N., Valdivia E., Martinez J. C., Mateo P. L. 2001. AS-48: a circular protein with an extremely stable globular structure. *FEBS Letters*, 505: 379-382
- Cotter P. D., Hill C., Ross R. P. 2005a. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, 3: 777-788
- Cotter P. D., Hill C., Ross R. P. 2005b. Bacterial lantibiotics: strategies to improve therapeutical potential. *Current Protein and Peptide Science*, 6: 61-75
- Cutting S. M. 2011. *Bacillus* probiotics. *Food Microbiology*, 28, 2: 214-220
- Čanžek Majhenič A. 2002. Klasifikacija bakteriocinov seva *Lactobacillus gasseri* LF221 na osnovi genskega zapisa. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni podiplomski študij biotehnologije: 80 str.
- Čanžek Majhenič A., Bogovič Matijašič B., Rogelj I. 2003. Chromosomal location of the genetic determinants for bacteriocins produced by *Lactobacillus gasseri* K7. *Journal of Dairy Research*, 70: 199-203
- Čanžek Majhenič A., Venema K., Allison G. E., Bogovič Matijašič B., Rogelj I., Klaenhammer T. R. 2004. DNA analysis of the genes encoding acidocin LF221 A and

- acidocin LF221 B, two bacteriocins produced by *Lactobacillus gasseri* LF221. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63: 705-714
- Deegan L. H., Cotter P. D., Hill C., Ross P. 2006. Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *International Dairy Journal*, 16, 9: 1058-1071
- De Man J. C., Rogosa M., Sharpe E. 1960. A medium for cultivation of *Lactobacilli*. *Journal of Applied Bacteriology*, 23: 130-135
- De Vuyst L., Vandamme E. J. 1994a. Lactic acid bacteria and bacteriocins: their practical importance. V: *Bacteriocins of lactic acid bacteria*. De Vuyst L., Vandamme E. J. (eds.). London, Blackie Academic and Professional: 1-11
- De Vuyst L., Vandamme E. J. 1994b. Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. V: *Bacteriocins of lactic acid bacteria*, De Vuyst L., Vandamme E. J. (eds.). London, Blackie Academic and Professional: 91-142
- De Vuyst L., Callewaert R., Crabbe K. 1996. Primary metabolite kinetics of bacteriocin biosynthesis by *Lactobacillus amylovorus* and evidence for stimulation of bacteriocin production under unfavorable growth conditions. *Microbiology UK, Part 4*, 142: 817-827
- Diep D. B., Nes I. F. 2002. Ribosomally synthesized antibacterial peptides in Gram positive bacteria. *Current Drug Targets*, 3: 107-122
- Diep D. B., Skaugen M., Salehian Z., Holo H., Nes I. F. 2007. Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 7: 2384-2389
- Eijsink V. G. H., Axelsson L., Diep D. B., Havarstein L. S., Holo H., Nes I. F. 2002. Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria: an example of biological welfare and communication. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81: 639-654
- Ennahar S., Sonomoto K., Ishizaki A. 1999. Class IIa bacteriocins from lactic acid bacteria: antibacterial activity and food preservation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 87: 705-716
- Ennahar S., Sashihara T., Sonomoto K., Ishizaki A. 2000. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity, *FEMS Microbiology Reviews*, 24: 85-106
- Fukushima Y., Hurt E. 2011. Probiotics health claims in Japan and Europe. V: *Lactic acid bacteria and bifidobacteria: current progress in advanced research*. Sonomoto K., Yokota A. (eds.). Norfolk, Caister Academic Press: 269-286
- Garde S., Ávila M., Medina M., Nuñez M. 2004. Fast induction of nisin resistance in *Streptococcus thermophilus* INIA 463 during growth in milk. *International Journal of Food Microbiology*, 96, 2: 165-172

- Garneau S., Martin N. I., Vederas J. C. 2002. Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie*, 84: 577-592
- Gerritse K., Posno M., Schellekens M. M., Boersma W. J., Claassen E. 1990. Oral administration of TNP-Lactobacillus conjugates in mice: a model for evaluation of mucosal and systemic immune responses and memory formation elicited by transformed lactobacilli. *Research in Microbiology*, 141: 955-962
- Ghaffar T., Irshad M., Anwar Z., Aqil T., Zulifqar Z., Tariq A., Kamran M., Ehsan N., Mehmood S. 2014. Recent trends in lactic acid biotechnology: A brief review on production to purification. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 7, 2: 222–229.
- Granato D., Branco G. F., Cruz G., Faria J. F., Shah N. P. 2010. Probiotic dairy products as functional foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9, 5: 455-470
- Hansen E. B. 2002. Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future. *International Journal of Food Microbiology*, 78: 119-131
- Helander I. M., von Wright A., Mattila-Sandholm T. M. 1997. Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria. *Trends in Food Science & Technology*, 8: 146-150
- Holo H., Nilssen O., Nes I. F. 1991. Lactococcin A, a new bacteriocin from *Lactococcus lactis subsp. cremoris*: isolation and characterization of the protein and its gene. *Journal of Bacteriology*, 173, 12: 3879-3887
- Jack R. W., Tagg J. R., Ray B. 1995. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiological Reviews*, 59, 2: 171-200
- Johnson J. L., Phelps C. F., Cummins C. S., London J., Gasser F. 1980. Taxonomy of the *Lactobacillus acidophilus* group. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 30: 53-68
- Kanmani P., Satish Kumar R., Yuvaraj N., Paari K. A., Pattukumar V., Venkatesan A. 2012. Application of response surface methodology in the optimisation of a growth medium for enhanced natural preservative bacteriocin production by a probiotic bacterium. *Natural Product Research*, 26, 16: 1539–1543
- Kawai Y., Saitoh B., Takahashi O., Kitazawa H., Saito T., Nakajima, H., Itoh T. 2000. Primary amino acid and DNA sequences of gassericin T, a lactacin F-family bacteriocin produced by *Lactobacillus gasseri* SBT2055. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 64, 10: 2201-2208
- Klaenhammer T. R. 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70: 337-349

- Klaenhammer T. R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 12: 39-86
- Krier F., Revol-Junelles A. M., Germain P. 1998. Influence of temperature and pH on production of two bacteriocins by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides acidophilus*. *Microbiology*, 141: 1629-1635
- Kuipers O. P., de Ruyter P. G. G. A., Kleerebezem M., de Vos W. M. 1998. Quorum sensing-controlled gene expression in LAB. *Journal of Biotechnology*, 64: 15-21
- Lee Y. M., Kim J. S. and Kim W. J. 2012. Optimization for the maximum bacteriocin production of *Lactobacillus brevis* DF01 using response surface methodology. *Food Science and Biotechnology*, 21, 3: 653-659
- Lim S. M. 2010. Cultural conditions and nutritional components affecting the growth and bacteriocin production of *Lactobacillus plantarum* KC21. *Food Science and Biotechnology*, 19, 3: 793-802
- Lindgren S. E., Dobrogosz W. J. 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiology Reviews*, 87: 149-164
- Malherios P. S., Voltaire S. A., Todorov S. D., Franco B. D. G. M. 2015. Optimization of growth and bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 2a. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46, 1: 825-834
- Mavrič A., Tompa G., Trmčič A., Rogelj I., Bogovič Matijašič B. 2014. Bacteriocins of *Lactobacillus gasseri* K7 – Monitoring of gassericin K7 A and B genes' expression and isolation of an active component. *Process Biochemistry* 49, 8: 1251-1259
- McAuliffe O., Ross R. P., Hill C. 2001. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiology Reviews*, 25: 285-308
- Montville T. J., Bruno M. E. C. 1995. Evidence that dissipation of proton motive force is a common mechanism of action for bacteriocins and other antimicrobial proteins. *International Journal of Food Microbiology*, 24: 53-74
- Moreno F., Sarantinopoulos P., Tsakalidou E., De Vuyst L. 2006. The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*, 106: 1-24
- Muriana P. M., Klaenhammer T. R. 1991. Cloning, phenotypic expression, and DNA sequence of the gene for lactacin F, an antimicrobial peptide produced by *Lactobacillus spp.* *Journal of Bacteriology*, 173: 1779-1788
- Muriana P. M. 1996. Bacteriocins for control of *Listeria spp.* in food. *Journal of Food Protection*, 56: 54-63

- Nagpal R., Kumar A., Kumar M., Behare P. V., Jain S., & Yadav H. 2012. Probiotics, their health benefits and applications for developing healthier foods: a review. *FEMS Microbiology Letters*, 334, 1: 1-15
- Navarro L., Rojo-Bezares B., Sáenz Y., Díez L., Zarazaga M., Ruiz-Larrea F., Torres C. 2008. Comparative study of the *pln* locus of the quorum-sensing regulated bacteriocin-producing *Lactobacillus plantarum* J51 strain. *International Journal of Food Microbiology*. 128: 390–394
- Nes I. F., Diep D. B., Havarstein L. S., Brurberg M. B., Eijsink V., Holo H. 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70: 113-128
- Nes I. F., Holo H. 2000. Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. *Biopolymers (Peptide Science)*, 55: 50-61
- Nettles C. G., Barefoot S. F. 1993. Biochemical and genetic characteristic of bacteriocins of food-associated lactic acid bacteria. *Journal of Food Protection*, 56: 338-356
- Ouwehand A. C. 1998. Antimicrobial components from lactic acid bacteria. V: *Lactic acid bacteria*. Salminen S., Von Wright A. (eds.). New York, Marcel Dekker: 139-160
- Parente E., Ricciardi A., Addario G. 1994. Influence of pH on growth and bacteriocin production by *Lc. Lactis subsp. lactis* 140 NWC during batch fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 41: 388-394
- Parente E., Ricciardi A. 1999. Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52: 628-638
- Parvez S., Malik K. A., Kang A., Kim, H. Y. 2006. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal of Applied Microbiology*, 100, 6: 1171-1185
- Perko B., Bogovič Matijašić B., Rogelj I. 2002. Development of a probiotic semi-hard cheese – optimisation of the technological process. V: *Proceedings of the 4<sup>th</sup> Croatian Congress of Food Technologists, Biotechnologists and Nutritionists – Central European Meeting, October 3-5, 2001, Opatija, Croatia*. Tipalo B. (ed.). Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology: 196-200
- Piard J. C., Desmazeaud M. 1992. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 2. Bacteriocins and other antibacterial substances. *Lait*, 72: 113-142
- Plantarič I. 1998. Imunski odziv miši na imunizacijo z *Lactobacillus acidophilus* LF221 in *Lactobacillus casei* ATCC 393. Magistrsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 1-10
- Quadri L. E., Sailer M., Terebiznik M. R., Roy K. I., Vederas J. C., Stiles M. E. 1995. Characterization of the protein conferring immunity to the antimicrobial peptide

- carnobacteriocin B2 and the expression of carnobacteriocin B2 and BM1. *Journal of Bacteriology*, 177: 1144-1151
- Quadri L. E., Kleebezem M., Kuipers O. P., de Vos W. M., Roy K. I., Vederas J. C., Stiles M. E. 1997. Characterization of a locus from *Carnobacterium piscicola* LV17B involved in bacteriocin production and immunity: evidence for global inducer-mediated transcriptional regulation. *Journal of Bacteriology*, 179: 6163-6171
- Rogelj I., Bogovič Matijašič B., Čanžek Majhenič A., Stojković S. 2002. The survival and persistence of *Lactobacillus acidophilus* LF221 in different ecosystems. *International Journal of Food Microbiology*, 76: 83-91
- Sablon E., Contreras B., Vandamme E. 2000. Antimicrobial peptides of lactic acid bacteria: mode of action, genetics and biosynthesis. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 68: 21-60
- Salminen S., Deighton M., Gorbach S. 1993. Lactic acid bacteria in health and disease. V: Lactic acid bacteria. Salminen S., von Wright A. (eds.). New York, Hing Kong, Marcel Dekker: 199-225
- Savado A., Ouattara C. A. T., Bassole I. H. N., Traor S. A. 2006. Bacteriocins and lactic acid bacteria – a minireview. *African Journal of Biotechnology*, 5: 678-683
- Schillinger U., Geisen R., Holzappel W. H. 1996. Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. *Trends in Food Science and Technology*, 7: 158-164
- Song D., Chen Y., Zhu M., Gu Q. 2012. Optimization of bacteriocin production by a new *Lactobacillus* strain, ZJ317, using response surface methodology. *Journal of Pure and Applied Microbiology* 6, 4: 1507-1515.
- Sprules M., Kawulka K. E., Vederas J. C. 2004. NMR solution structure of ImB2, a protein conferring immunity to antimicrobial activity of the type IIa bacteriocin, carnobacteriocin B2. *Biochemistry*, 43, 37: 11740-11749
- Stackenbrandt E., Teuer M. 1988. Molecular taxonomy and phylogenetic position of lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70: 317-324
- Stojković S. 2003. Preživetje in učinkovitost sevov *Lactobacillus gasseri* K7 in LF221 v različnih okoljskih razmerah. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni podiplomski študij biotehnologije: 133 str.
- Suganthi V., Mohanasrinivasan V. 2014. Optimization studies for enhanced bacteriocin production by *Pediococcus pentosaceus* KC692718 using response surface methodology. *Journal of Food, Science and Technology*, 52: 3773-3783.
- Tagg J. R., Dajani A. S., Wannamaker L. W. 1976. Bacteriocins of Gram positive bacteria. *Bacteriological Reviews*, 40: 722-756



- Ten Brink B., Minekus M., van der Vossen, J. M. B. M., Leer, R. J., Huis in't Veld, J. H. J. 1994. Antimicrobial activity of lactobacilli: preliminary characterization and optimization of production of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* M46. *Journal of Applied Bacteriology*, 77: 140-148
- Todorov S. D., Dicks L. M. T. 2006. Effect of medium components on bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* strains ST23LD and ST341LD, isolated from spoiled olive brine. *Microbiology Research*, 161: 102-108
- van Belkum M. J., Stiles M. E. 2000. Nonlantibiotic antibacterial peptides from lactic acid bacteria. *Natural Product Reports*, 17: 323-335
- Yerlikaya O. 2014. Starter cultures used in probiotic dairy product preparation and popular probiotic dairy drinks. *Food Science and Technology (Campinas)*, 34, 2: 221-229
- Zacharof M. P., Lovitt R. W. 2012. Bacteriocins produced by lactic acid bacteria – a review article. *APCBEE Procedia*, 2: 50-56
- Zorič Peternel M. 2007. Aktivnost bakteriocinskih kompleksov sevov *Lactobacillus gasseri* K7 in *Lactobacillus gasseri* LF221 v različnih ekspresijskih sistemih. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani. Biotehniška fakulteta, Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti: 179 str.

## ZAHVALA

Največja zahvala gre moji mentorici pri izdelavi diplomske naloge, dr. Bojani Bogovič Matijašič, za strokovno vodstvo, pomoč in vsakršno spodbudo pri izdelavi naloge. Prav tako se iskreno zahvaljujem prof. dr. Sonji Smole Možina za recenzijo diplomske naloge.

Za strokovne nasvete, usmerjanje pri izvedbi raziskave in pomoč pri nastajanju naloge se zahvaljujem tudi predstojnici katedre za živilstvo, prof. dr. Ireni Rogelj.

Zahvaljujem se tudi Saši Stojkoviću in Andreji Miklič Anderlič za pomoč pri izvedbi raziskave.

Hvala vsem na Inštitutu za mlekarstvo za prijetno delovno okolje.

Za pomoč pri oblikovanju diplomske naloge se lepo zahvaljujem Mateju Pintarju.

Zahvaljujem se tudi osebju knjižnice Oddelka za živilstvo, predvsem Lini Burkan Makivić za pomoč in nasvete pri iskanju in navajanju literature in Bernardi Kejžar za lektoriranje.

Hvala prijateljem, predvsem Poloni Slokan, sodelavcem in vsem ostalim, ki so mi na kakršen koli način pomagali pri izdelavi te naloge, me spodbujali in mi stali ob strani.

Srčna zahvala pa velja moji družini: staršem, širšemu sorodstvu, še posebej pa ženi Bernardi in otrokom, da so mi v času študija in med nastajanjem tega dela pomagali, me podpirali, razumeli in bili z menoj potrpežljivi.

HVALA!

## PRILOGE

### Priloga A:

Spremljanje rastnih parametrov in produkcije bakteriocinov med kultivacijo seva *Lactobacillus gasseri* K7 v steklenicah (S1) pri začetni vrednosti pH 5,75 in koncentraciji glukoze 10 g/l (I. poskus, 1. paralelka).

1.S1		Glu: 10 g/l			
Čas	OD (660 nm)	KE/ml	log KE/ml	spec. hitr. r.	BA/ml
0	0,0304	$1,1 \times 10^7$	7,04		1000
2	0,0587	$1,7 \times 10^7$	7,24	0,2264	1000
4	0,2259	$5,5 \times 10^7$	7,74	0,57466	1000
6	0,6646	$2,1 \times 10^8$	8,31	<b>0,66148</b>	8000
8	1,125	<b><math>2,6 \times 10^8</math></b>	8,42	0,12646	8000
10	1,33	<b><math>2,6 \times 10^8</math></b>	8,42	0	8000
12	1,436	$2,3 \times 10^8$	8,37	0,06031	<b>16000</b>
14	<b>1,444</b>	$2,2 \times 10^8$	8,34	-0,0308	8000

### Priloga B:

Spremljanje rastnih parametrov in produkcije bakteriocinov med kultivacijo seva *Lactobacillus gasseri* K7 v steklenicah (S2) pri začetni vrednosti pH 5,75 in koncentraciji glukoze 15 g/l (I. poskus, 1. paralelka).

1.S2		Glu:15 g/l			
Čas	OD (660 nm)	KE/ml	log KE/ml	spec. hitr. r.	BA/ml
0	0,0461	$1,10 \times 10^7$	7,04		0
2	0,0699	$1,55 \times 10^7$	7,19	0,17147	0
4	0,2064	$4,15 \times 10^7$	7,62	0,49242	1000
6	0,602	$1,65 \times 10^8$	8,22	<b>0,69012</b>	8000
8	1,105	$2,77 \times 10^8$	8,44	0,25903	8000
10	1,292	<b><math>3,45 \times 10^8</math></b>	8,54	0,10976	<b>16000</b>
12	1,402	$2,71 \times 10^8$	8,43	-0,12071	8000
14	<b>1,436</b>	$2,65 \times 10^8$	8,42	-0,01119	8000

### Priloga C:

Spremljanje rastnih parametrov in produkcije bakteriocinov med kultivacijo seva *Lactobacillus gasseri* K7 v steklenicah (S3) pri začetni vrednosti pH 5,75 in koncentraciji glukoze 20 g/l (I. poskus, 1. paralelka).

1.S3 Glu: 20 g/l					
Čas	OD (660 nm)	KE/ml	log KE/ml	spec. hitr. r.	BA/ml
0	0,0599	$9,5 \times 10^6$	6,98		0
2	0,081	$1,54 \times 10^7$	7,19	0,24153	0
4	0,2225	$4,45 \times 10^7$	7,65	0,53056	1000
6	0,5958	$1,55 \times 10^8$	8,19	<b>0,62396</b>	<b>4000</b>
8	1,101	$2,6 \times 10^8$	8,41	0,25867	<b>4000</b>
10	1,297	$2,7 \times 10^8$	8,43	0,01887	<b>4000</b>
12	1,383	$2,66 \times 10^8$	8,42	-0,0075	<b>4000</b>
14	<b>1,458</b>	$2,43 \times 10^8$	8,39	-0,0452	<b>4000</b>

### Priloga D:

Spremljanje rastnih parametrov in produkcije bakteriocinov med kultivacijo seva *Lactobacillus gasseri* K7 v steklenicah (S1) pri začetni vrednosti pH 5,75 in koncentraciji glukoze 10 g/l (I. poskus, 2. paralelka).

1.S4 Glu:10 g/l					
Čas	OD (660 nm)	KE/ml	log KE/ml	spec. hitr. r.	BA/ml
0	0,0332	$1,09 \times 10^7$	7,04		0
2	0,0613	$1,38 \times 10^7$	7,14	0,11795	0
4	0,2214	$3,34 \times 10^7$	7,52	0,44194	2000
6	0,6199	$1,25 \times 10^8$	8,1	<b>0,65988</b>	8000
8	1,115	$2,37 \times 10^8$	8,37	0,31987	<b>16000</b>
10	1,311	$2,01 \times 10^8$	8,3	-0,08237	<b>16000</b>
12	1,395	$2,08 \times 10^8$	8,32	0,01711	<b>16000</b>
14	<b>1,436</b>	$2,49 \times 10^8$	8,4	0,08995	8000

### Priloga E:

Spremljanje rastnih parametrov in produkcije bakteriocinov med kultivacijo seva *Lactobacillus gasseri* K7 v steklenicah (S2) pri začetni vrednosti pH 5,75 in koncentraciji glukoze 15 g/l (I. poskus, 2. paralelka).

1.S5 Glu:15 g/l					
Čas	OD (660 nm)	KE/ml	log KE/ml	spec. hitr. r.	BA/ml
0	0,0455	$1,17 \times 10^7$	7,07		0
2	0,069	$1,55 \times 10^7$	7,19	0,14062	0
4	0,2066	$3,71 \times 10^7$	7,57	0,43638	1000
6	0,6116	$1,55 \times 10^8$	8,19	<b>0,7149</b>	<b>8000</b>
8	1,085	$2,40 \times 10^8$	8,38	0,2186	<b>8000</b>
10	1,302	$2,33 \times 10^8$	8,37	-0,0148	<b>8000</b>
12	1,389	$2,65 \times 10^8$	8,42	0,06434	<b>8000</b>
14	<b>1,436</b>	<b><math>3,30 \times 10^8</math></b>	8,52	0,10968	<b>8000</b>

### Priloga F:

Spremljanje rastnih parametrov in produkcije bakteriocinov med kultivacijo seva *Lactobacillus gasseri* K7 v steklenicah (S3) pri vrednosti pH 5,75 in začetno koncentracijo glukoze 20g/l (I. poskus, 2. paralelka).

1.S6 Glu: 20 g/l					
Čas	OD (660 nm)	KE/ml	log KE/ml	spec. hitr. r.	BA/ml
0	0,0563	$1,02 \times 10^7$	7,01		0
2	0,0763	$1,26 \times 10^7$	7,1	0,10565	1000
4	0,2032	$3,70 \times 10^7$	7,57	0,53861	1000
6	0,562	$1,27 \times 10^8$	8,1	<b>0,61663</b>	2000
8	1,078	$2,14 \times 10^8$	8,33	0,26089	<b>4000</b>
10	1,292	$2,12 \times 10^8$	8,33	-0,00469	<b>4000</b>
12	1,358	$3,26 \times 10^8$	8,51	0,21515	<b>4000</b>
14	<b>1,422</b>	<b><math>3,48 \times 10^8</math></b>	8,54	0,03265	<b>4000</b>

### Priloga G:

Spremljanje rastnih parametrov in produkcije bakteriocinov med kultivacijo seva *Lactobacillus gasseri* K7 v steklenicah (S1) pri začetni vrednosti pH 5,75 in koncentraciji glukoze 10 g/l (II. poskus, 1. paralelka).

2.S1		Glu: 10 g/l			
Čas	OD (660 nm)	KE/ml	log KE/ml	spec. hitr. r.	BA/ml
0	0,0227	$1,47 \times 10^7$	7,17		0
2	0,0478	$2,24 \times 10^7$	7,35	0,2106	0
4	0,1913	$6,60 \times 10^7$	7,82	0,54029	1000
6	0,5953	$2,86 \times 10^8$	8,46	<b>0,73331</b>	4000
8	1,0503	$3,45 \times 10^8$	8,54	0,09377	<b>8000</b>
10	1,2673	<b><math>3,67 \times 10^8</math></b>	8,56	0,0309	<b>8000</b>
12	<b>1,2983</b>	$3,36 \times 10^8$	8,53	-0,04412	<b>8000</b>

### Priloga H:

Spremljanje rastnih parametrov in produkcije bakteriocinov med kultivacijo seva *Lactobacillus gasseri* K7 v steklenicah (S2) pri začetni vrednosti pH 5,75 in koncentraciji glukoze 15 g/l (II. poskus, 1. paralelka).

2.S2		Glu: 15 g/l			
Čas	OD (660 nm)	KE/ml	log KE/ml	spec. hitr. r.	BA/ml
0	0,028	$1,21 \times 10^7$	7,08		0
2	0,0498	$2,07 \times 10^7$	7,32	0,26846	0
4	0,1789	$6,82 \times 10^7$	7,83	0,59615	0
6	0,5538	$2,35 \times 10^8$	8,37	<b>0,61857</b>	<b>8000</b>
8	1,0008	<b><math>3,62 \times 10^8</math></b>	8,56	0,21603	4000
10	1,2258	$2,80 \times 10^8$	8,45	-12842	4000
12	<b>1,3038</b>	$2,84 \times 10^8$	8,45	0,00709	4000

### Priloga I:

Spremljanje rastnih parametrov in produkcije bakteriocinov med kultivacijo seva *Lactobacillus gasseri* K7 v steklenicah (S3) pri začetni vrednosti pH 5,75 in koncentraciji glukoze 20 g/l (II. poskus, 1. paralelka).

2.S3		Glu: 20 g/l			
Čas	OD (660 nm)	KE/ml	log KE/ml	spec. hitr. r.	BA/ml
0	0,0223	$1,38 \times 10^7$	7,14		0
2	0,0437	$1,65 \times 10^7$	7,22	0,08934	0
4	0,1768	$5,64 \times 10^7$	7,75	0,61455	0
6	0,5229	$2,09 \times 10^8$	8,32	<b>0,65493</b>	<b>2000</b>
8	0,9708	$2,91 \times 10^8$	8,46	0,16549	<b>2000</b>
10	1,1895	<b><math>3,75 \times 10^8</math></b>	8,57	0,1268	<b>2000</b>
12	<b>1,2695</b>	$3,04 \times 10^8$	8,48	-0,10494	<b>2000</b>

### Priloga J:

Spremljanje rastnih parametrov in produkcije bakteriocinov med kultivacijo seva *Lactobacillus gasseri* K7 v steklenicah (S1) pri začetni vrednosti pH 5,75 in koncentraciji glukoze 10 g/l (II. poskus, 2. paralelka).

2.S4		Glu: 10 g/l			
Čas	OD (660 nm)	KE/ml	log KE/ml	spec. hitr. r.	BA/ml
0	0,023	$9,3 \times 10^6$	6,97		0
2	0,0497	$1,69 \times 10^7$	7,23	0,29864	0
4	0,2063	$7,38 \times 10^7$	7,87	<b>0,73702</b>	1000
6	0,6053	$2,23 \times 10^8$	8,35	0,5529	<b>4000</b>
8	1,0461	$3,37 \times 10^8$	8,53	0,20645	<b>4000</b>
10	1,2521	$2,68 \times 10^8$	8,43	-0,11454	<b>4000</b>
12	<b>1,3241</b>	<b><math>2,94 \times 10^8</math></b>	8,47	0,04629	<b>4000</b>

### Priloga K:

Spremljanje rastnih parametrov in produkcije bakteriocinov med kultivacijo seva *Lactobacillus gasseri* K7 v steklenicah (S2) pri začetni vrednosti pH 5,75 in koncentraciji glukoze 15 g/l (II. poskus, 2. paralelka).

2.S5		Glu: 15 g/l			
Čas	OD (660 nm)	KE/ml	log KE/ml	spec. hitr. r.	BA/ml
0	0,0229	$7,0 \times 10^6$	6,85		0
2	0,0439	$1,73 \times 10^7$	7,24	0,45239	0
4	0,1755	$4,97 \times 10^7$	7,7	0,52764	0
6	0,5474	$2,35 \times 10^8$	8,37	<b>0,77679</b>	4000
8	1,0008	$3,06 \times 10^8$	8,49	0,132	4000
10	1,2128	<b><math>3,10 \times 10^8</math></b>	8,49	0,00649	<b>8000</b>
12	<b>1,2878</b>	$2,84 \times 10^8$	8,45	-0,0438	4000

### Priloga L:

Spremljanje rastnih parametrov in produkcije bakteriocinov med kultivacijo seva *Lactobacillus gasseri* K7 v steklenicah (S3) pri začetni vrednosti pH 5,75 in koncentraciji glukoze 20 g/l (II. poskus, 2. paralelka).

2.S6		Glu: 20 g/l			
Čas	OD (660 nm)	KE/ml	log KE/ml	spec. hitr. r.	BA/ml
0	0,0219	$1,12 \times 10^7$	7,05		0
2	0,0463	$1,46 \times 10^7$	7,16	0,13255	0
4	0,1749	$5,75 \times 10^7$	7,76	<b>0,68538</b>	0
6	0,5293	$1,73 \times 10^8$	8,24	0,55075	2000
8	0,9745	$3,42 \times 10^8$	8,53	0,34075	<b>4000</b>
10	1,1866	<b><math>3,65 \times 10^8</math></b>	8,56	0,03254	<b>4000</b>
12	<b>1,2546</b>	$3,01 \times 10^8$	8,48	0,09639	<b>4000</b>



### Priloga M:

Spremljanje rastnih parametrov in produkcije bakteriocinov med kultivacijo seva *Lactobacillus gasseri* K7 v bioreaktorju (B1) pri vrednosti pH 5,75 in začetni koncentraciji glukoze 10 g/l (1. poskus).

B1		Glu:10 g/l			
Čas	OD (660 nm)	KE/ml	log KE/ml	spec. hitr. r.	BA/ml
0	0,012	1,10 x 10 <sup>7</sup>	7,04139		0
1	0,0182	1,08 x 10 <sup>7</sup>	7,03342	-0,01835	1000
2	0,0366	1,22 x 10 <sup>7</sup>	7,08636	0,12188	0
3	0,0784	1,59 x 10 <sup>7</sup>	7,2014	0,26488	1000
4	0,1717	2,84 x 10 <sup>7</sup>	7,45332	0,58007	1000
5	0,3297	5,95 x 10 <sup>7</sup>	7,77452	0,73958	8000
6	0,56	1,40 x 10 <sup>8</sup>	8,14613	<b>0,85566</b>	32000
7	0,8346	2,10 x 10 <sup>8</sup>	8,32222	0,40546	256000
8	1,083	2,33 x 10 <sup>8</sup>	8,36736	0,10393	<b>512000</b>
9	1,26	<b>2,70</b> x 10 <sup>8</sup>	8,43136	0,16034	256000
10	<b>1,265</b>	2,14 x 10 <sup>8</sup>	8,33041	-0,23244	256000

### Priloga N:

Spremljanje rastnih parametrov in produkcije bakteriocinov med kultivacijo seva *Lactobacillus gasseri* K7 v bioreaktorju (B1) pri vrednosti pH 5,75 in začetni koncentraciji glukoze 15 g/l (2. poskus).

B2		Glu 15 g/l			
Čas	OD (660 nm)	KE/ml	log KE/ml	spec. hitr. r.	BA/ml
0	0,0126	9,5 x 10 <sup>6</sup>	6,977724		1000
1	0,0205	1,03 x 10 <sup>7</sup>	7,012837	0,08085	2000
2	0,0433	1,07 x 10 <sup>7</sup>	7,029384	0,03809	2000
3	0,0756	1,24 x 10 <sup>7</sup>	7,093422	0,14745	4000
4	0,1097	1,58 x 10 <sup>7</sup>	7,198657	0,24231	4000
5	0,1812	2,70 x 10 <sup>7</sup>	7,431364	0,53582	8000
6	0,2969	5,60 x 10 <sup>7</sup>	7,748188	0,72951	32000
7	0,4754	1,36 x 10 <sup>8</sup>	8,133539	<b>0,8873</b>	128000
8	0,7089	1,76 x 10 <sup>8</sup>	8,245513	0,25782	128000
9	0,9762	2,25 x 10 <sup>8</sup>	8,352183	0,24561	<b>512000</b>
10	1,2357	2,55 x 10 <sup>8</sup>	8,40654	0,12516	128000
11	1,4187	2,59 x 10 <sup>8</sup>	8,4133	0,01556	128000
12	<b>1,4327</b>	<b>2,60</b> x 10 <sup>8</sup>	8,414973	0,00385	256000

### Priloga O:

Spremljanje rastnih parametrov in produkcije bakteriocinov med kultivacijo seva *Lactobacillus gasseri* K7 v bioreaktorju (B1) pri vrednosti pH 5,75 in začetni koncentraciji glukoze 20 g/l (3. poskus).

B3		Glu 20 g/l			
Čas	OD (660 nm)	KE/ml	log KE/ml	spec. hitr. r.	BA/ml
0	0,0179	1,05 x 10 <sup>7</sup>	7,021189		1000
1	0,0251	1,10 x 10 <sup>7</sup>	7,041393	0,04652	1000
2	0,0472	1,22 x 10 <sup>7</sup>	7,08636	0,10354	1000
3	0,0788	1,37 x 10 <sup>7</sup>	7,136721	0,11595	1000
4	0,1282	1,72 x 10 <sup>7</sup>	7,235528	0,21302	2000
5	0,2138	3,93 x 10 <sup>7</sup>	7,594393	0,82631	8000
6	0,3647	9,0 x 10 <sup>7</sup>	7,954243	<b>0,82858</b>	32000
7	0,5861	1,55 x 10 <sup>8</sup>	8,190332	0,54361	32000
8	0,8219	2,18 x 10 <sup>8</sup>	8,338456	0,34106	32000
9	1,1017	2,77 x 10 <sup>8</sup>	8,44248	0,23952	32000
10	1,3107	3,25 x 10 <sup>8</sup>	8,511883	0,1598	64000
11	1,4867	3,63 x 10 <sup>8</sup>	8,559907	0,11057	<b>256000</b>
12	<b>1,5667</b>	<b>3,65 x 10<sup>8</sup></b>	8,562293	0,00549	128000

### Priloga P:

Spremljanje rastnih parametrov in produkcije bakteriocinov med kultivacijo seva *Lactobacillus gasseri* K7 v bioreaktorju (B2) pri vrednosti pH 5,75 in začetni koncentraciji glukoze 10 g/l (1. poskus).

B4		Glu 10g/l			
Čas	OD (660 nm)	KE/ml	log KE/ml	spec. hitr. r.	BA/ml
0	0,0116	7,5 x 10 <sup>6</sup>	6,875061		1000
1	0,0197	1,0 x 10 <sup>7</sup>	7	0,28768	1000
2	0,0435	1,25 x 10 <sup>7</sup>	7,09691	0,22314	1000
3	0,0736	1,4 x 10 <sup>7</sup>	7,146128	0,11332	1000
4	0,1326	1,8 x 10 <sup>7</sup>	7,255273	0,25131	2000
5	0,246	2,85 x 10 <sup>7</sup>	7,454845	0,45953	16000
6	0,4133	9,0 x 10 <sup>7</sup>	7,954243	<b>1,1499</b>	32000
7	0,6646	1,66 x 10 <sup>8</sup>	8,220108	0,61217	128000
8	0,9253	2,61 x 10 <sup>8</sup>	8,416641	0,45253	256000
9	1,173	<b>3,13 x 10<sup>8</sup></b>	8,495544	0,18168	<b>512000</b>
10	<b>1,249</b>	<b>3,10 x 10<sup>8</sup></b>	8,491362	-0,00963	<b>512000</b>
11	1,217	2,85 x 10 <sup>8</sup>	8,454845	-0,08408	256000

### Priloga R:

Spremljanje rastnih parametrov in produkcije bakteriocinov med kultivacijo seva *Lactobacillus gasseri* K7 v bioreaktorju (B2) pri vrednosti pH 5,75 in začetni koncentraciji glukoze 15 g/l (2. poskus).

B5		Glu: 15 g/l			
Čas	OD (660 nm)	KE/ml	log KE/ml	spec. hitr. r.	BA/ml
0	0,0113	8,3 x 10 <sup>6</sup>	6,919078		1000
1	0,0172	9,3 x 10 <sup>6</sup>	6,968483	0,11375	1000
2	0,0332	1,25 x 10 <sup>7</sup>	7,09691	0,29571	1000
3	0,0605	1,49 x 10 <sup>7</sup>	7,173186	0,17563	1000
4	0,1173	2,35 x 10 <sup>7</sup>	7,371068	0,45563	2000
5	0,2318	4,39 x 10 <sup>7</sup>	7,642465	0,63491	16000
6	0,4242	1,07 x 10 <sup>8</sup>	8,029384	<b>0,89091</b>	32000
7	0,6719	2,08 x 10 <sup>8</sup>	8,318063	0,6647	128000
8	0,957	3,09 x 10 <sup>8</sup>	8,489958	0,3958	<b>256000</b>
9	1,213	<b>4,35</b> x 10 <sup>8</sup>	8,638489	0,342	<b>256000</b>
10	1,297	3,67 x 10 <sup>8</sup>	8,564666	-0,16998	<b>256000</b>
11	<b>1,352</b>	3,00 x 10 <sup>8</sup>	8,477121	-0,20157	<b>256000</b>
12	1,313	2,73 x 10 <sup>8</sup>	8,436163	-0,09431	128000

### Priloga S:

Spremljanje rastnih parametrov in produkcije bakteriocinov med kultivacijo seva *Lactobacillus gasseri* K7 v bioreaktorju (B2) pri vrednosti pH 5,75 in začetni koncentraciji glukoze 20 g/l (3. poskus).

B6		Glu: 20 g/l			
Čas	OD (660 nm)	KE/ml	log KE/ml	spec. hitr. r.	BA/ml
0	0,0175	5,4 x 10 <sup>6</sup>	6,732394		1000
1	0,0243	1,05 x 10 <sup>7</sup>	7,021189	0,66497	1000
2	0,0478	1,52 x 10 <sup>7</sup>	7,181844	0,36992	2000
3	0,0954	2,18 x 10 <sup>7</sup>	7,338456	0,36061	2000
4	0,1889	2,84 x 10 <sup>7</sup>	7,453318	0,26447	8000
5	0,3405	6,57 x 10 <sup>7</sup>	7,817565	<b>0,8387</b>	32000
6	0,5452	1,32 x 10 <sup>8</sup>	8,120574	0,6977	64000
7	0,7184	2,54 x 10 <sup>8</sup>	8,404834	0,65453	<b>128000</b>
8	0,9504	2,59 x 10 <sup>8</sup>	8,4133	0,01949	<b>128000</b>
9	1,132	2,87 x 10 <sup>8</sup>	8,457882	0,10265	<b>128000</b>
10	1,226	<b>3,26</b> x 10 <sup>8</sup>	8,513218	0,12741	<b>128000</b>
11	1,313	3,05 x 10 <sup>8</sup>	8,4843	-0,06658	<b>128000</b>
12	<b>1,422</b>	3,00 x 10 <sup>8</sup>	8,477121	-0,01652	32000
13	<b>1,422</b>	3,15 x 10 <sup>8</sup>	8,498311	0,04879	32000

### Priloga T:

Spremljanje rastnih parametrov in produkcije bakteriocinov med kultivacijo seva *Lactobacillus gasseri* K7 v bioreaktorju (B3) pri vrednosti pH 5,75 in začetni koncentraciji glukoze 10 g/l (1. poskus).

B7		Glu: 10 g/l			
Čas	OD (660 nm)	KE/ml	log KE/ml	spec. hitr. r.	BA/ml
0	0,01	$8,9 \times 10^6$	6,94939		2000
1	0,018	$1,19 \times 10^7$	7,075547	0,29048	1000
2	0,042	$1,32 \times 10^7$	7,120574	0,10367	1000
3	0,0925	$1,69 \times 10^7$	7,227887	0,24709	2000
4	0,205	$2,77 \times 10^7$	7,44248	0,49411	2000
5	0,3981	$6,71 \times 10^7$	7,826723	0,88475	16000
6	0,6458	$1,75 \times 10^8$	8,243038	<b>0,9586</b>	64000
7	0,9147	$2,21 \times 10^8$	8,344392	0,23337	<b>512000</b>
8	1,15	$2,35 \times 10^8$	8,371068	0,06142	256000
9	1,154	<b>2,45</b> $\times 10^8$	8,389166	0,04167	256000
10	<b>1,125</b>	$1,95 \times 10^8$	8,290035	-0,22825	

### Priloga U:

Spremljanje rastnih parametrov in produkcije bakteriocinov med kultivacijo seva *Lactobacillus gasseri* K7 v bioreaktorju (B3) pri vrednosti pH 5,75 in začetni koncentraciji glukoze 15 g/l (2. poskus).

B8		Glu: 15 g/l			
Čas	OD (660 nm)	KE/ml	log KE/ml	spec. hitr. r.	BA/ml
0	0,0169	$1,17 \times 10^7$	7,068186		1000
1	0,0246	$1,39 \times 10^7$	7,143015	0,17229	1000
2	0,0493	$1,98 \times 10^7$	7,296665	0,35379	1000
3	0,103	$2,72 \times 10^7$	7,434569	0,31753	1000
4	0,215	$3,70 \times 10^7$	7,568202	0,3077	2000
5	0,3948	$7,65 \times 10^7$	7,883661	<b>0,72637</b>	16000
6	0,6321	$1,36 \times 10^8$	8,133539	0,57536	64000
7	0,9389	$2,38 \times 10^8$	8,376577	0,55961	256000
8	1,157	<b>2,73</b> $\times 10^8$	8,436163	0,1372	256000
9	1,352	$2,65 \times 10^8$	8,423246	-0,02974	<b>512000</b>
10	1,422	$2,61 \times 10^8$	8,416641	-0,0152	256000
11	<b>1,444</b>	$2,60 \times 10^8$	8,414973	-0,00383	256000

**Priloga V:**

Spremljanje rastnih parametrov in produkcije bakteriocinov med kultivacijo seva *Lactobacillus gasseri* K7 v bioreaktorju (B3) pri vrednosti pH 5,75 in začetni koncentraciji glukoze 20 g/l (3. poskus).

B9 Glu: 20 g/l					
Čas	OD (660 nm)	KE/ml	log KE/ml	spec. hitr. r.	BA/ml
0	0,0208	$7,7 \times 10^6$	6,886491		1000
1	0,0285	$9,0 \times 10^6$	6,954243	0,25131	1000
2	0,049	$1,58 \times 10^7$	7,198657	0,56278	1000
3	0,0928	$1,85 \times 10^7$	7,267172	0,15776	1000
4	0,1833	$2,57 \times 10^7$	7,409933	0,32872	4000
5	0,3497	$6,61 \times 10^7$	7,820201	0,94467	64000
6	0,5735	$1,72 \times 10^8$	8,235528	<b>0,95632</b>	128000
7	0,8435	$2,13 \times 10^8$	8,32838	0,21379	64000
8	1,085	<b><math>2,85 \times 10^8</math></b>	8,454845	0,29119	<b>256000</b>
9	1,302	$2,65 \times 10^8$	8,423246	-0,07275	<b>256000</b>
10	1,436	$2,72 \times 10^8$	8,434569	0,02607	128000
11	<b>1,549</b>	$2,53 \times 10^8$	8,403121	-0,07241	128000
12	1,531	<b><math>2,92 \times 10^8</math></b>	8,465383	0,14336	256000

**Priloga Z:**

Spremljanje koncentracije glukoze in mlečne kisline med kultivacijo seva *Lactobacillus gasseri* K7 v steklenicah (S) in bioreaktorju (B), pri različnih začetnih koncentracijah glukoze, v treh časovnih obdobjih (na začetku, po šestih urah in po desetih urah). Rezultati so povprečje dveh paralelk pri steklenicah in treh paralelk pri bioreaktorju.

**10 g/l**

Čas	S-glukoza	S-mlečna	B-glukoza	B-mlečna
0	11,1486	0,2558	10,9348	0,2033
6	9,9773	1,4551	9,1029	1,5690
10	4,7029	7,0140	2,3280	6,5386

**15 g/l**

Čas	S-glukoza	S-mlečna	B-glukoza	B-mlečna
0	17,2553	0,2764	15,1341	0,2100
6	14,6537	1,4502	13,7383	1,2030
10	10,3778	7,5684	6,3761	6,4466

**20 g/l**

Čas	S-glukoza	S-mlečna	B-glukoza	B-mlečna
0	22,2804	0,2617	19,8796	0,2121
6	19,4586	1,5222	17,6331	1,3054
10	15,3813	7,4412	8,8989	6,8940