

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Gašper VOZEL

**STABILNOST POPULACIJE LAKTOBACILOV IN
KVASOVK V KEFIRNEM ZRNU IN KEFIRJU**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Gašper VOZEL

**STABILNOST POPULACIJE LAKTOBACILOV IN KVASOVK V
KEFIRNEM ZRNU IN KEFIRJU**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**STABILITY OF LACTOBACILLI AND YEASTS POPULATIONS IN
KEFIR GRAINS AND KEFIR**

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2016

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Raziskave, poskuse in analize podatkov smo opravili na Inštitutu za mlekarstvo in probiotike, Groblje 3, 1230 Domžale.

Za mentorico diplomskega dela je imenovana prof. dr. Irena Rogelj, za recenzentko prof. dr. Polona Jamnik.

Mentorica: prof. dr. Irena Rogelj

Recenzentka: prof. dr. Polona Jamnik

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Članica:

Datum zagovora:

Podpisani izjavljam, da je naloga 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.

Gašper Vozel

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 637.146.21:579.67(043)=163.6
KG	kefir/kefirna zrna/mikrobiota/mikrobne združbe/laktobacili/kvasovke/kefiran/ molekularne tehnike/PCR/DGGE
AV	VOZEL, Gašper
SA	ROGELJ, Irena (mentorica)/JAMNIK, Polona (recenzetka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI	2016
IN	STABILNOST POPULACIJE LAKTOBACILOV IN KVASOVK V KEFIRNEM ZRNU IN KEFIRJU
TD	Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
OP	XIII, 62 str., 6 pregl., 14 sl., 59 vir.
IJ	sl
JI	sl/en

AI Kefir je tradicionalni fermentirani mlečni napitek, ki izvira iz Kavkaza, Tibeta ali Mongolije. Tradicionalno ga izdelujejo s pomočjo kefirnih zrn. Zaradi mnogih pozitivnih učinkov na zdravje in zanimanja potrošnikov za tradicionalne izdelke, proizvodnja in poraba kefirja vztrajno raste. Industrijska proizvodnja kefirja je odvisna od aktivne in stabilne starterske kulture – kefirnih zrn. V naši raziskavi smo ugotavljali velikost in stabilnost mikrobnih populacij laktobacilov in kvasovk v kefirnem zrnu, ki smo ga ohranjali in razmnoževali v industrijskem obratu in raziskovalnem laboratoriju pod enakimi pogoji. Število kultivabilnih laktobacilov v kefirnem zrnu in kefirju smo določali na gojišču MRS, število kultivabilnih kvasovk pa na gojišču KDM. Sestavo mikrobnih populacij laktobacilov in kvasovk smo ugotavljali z metodo PCR in z metodo gelske elektroforeze v denaturacijskem gradientu (DGGE). V kefirnem zrnu in kefirju so v populaciji laktobacilov prevladovali *Lactobacillus kefiri*, *Lactobacillus kefiranoferiens* subsp. *kefirgranum* in *Lactobacillus parakefiri*, v populaciji kvasovk pa *Kluyveromyces marxianus* in *Kazachstania exigua*. Velikost populacij in sestava mikrobiomov laktobacilov in kvasovk v kefirnih zrnih in kefirju sta bili stabilni med 10-tedenskim vzdrževanjem v obeh preučevanih okoljih. Največja razlika v sestavi mikrobiomov je bila pri laktobacilih v kefirju. Z merjenjem pH in SH vrednosti smo preverjali aktivnost mikrobne združbe, kjer smo z meritvami dokazali, da so zrna aktivna in primerna za raziskavo.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn

DC UDC 637.146.21:579.67(043)=163.6

CX kefir/kefir grains/microbiota/microbial communities/lactobacilli/yeasts/kefiran/
molecular techniques/PCR/DGGE

AU VOZEL, Gašper

AA ROGELJ, Irena (supervisor)/JAMNIK, Polona (reviewer)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and
Technology

PY 2016

TI STABILITY OF LACTOBACILLI AND YEASTS POPULATIONS IN KEFIR
GRAINS AND KEFIR

DT Graduation Thesis (University studies)

NO XIII, 62 p., 6 tab., 14 fig., 59 ref.

LA sl

AL sl/en

AB Kefir is a traditional fermented milk drink originating in the Caucasus, Tibet or Mongolia. Traditionally it is made by using kefir grains. Due to the many positive effects on health and consumers' interest in traditional products the production and consumption of kefir are steadily increasing. Industrial production of kefir depends on the active and stable starter - kefir grains. In our study, we determined the size and stability of the microbial populations of lactobacilli and yeasts in kefir grains that we maintained and propagated in the industrial facility and in the research laboratory under the same conditions. The cultivable number of lactobacilli and yeasts in the kefir grains and kefir were determined on MRS and KDM media, respectively. The composition of lactobacilli and yeasts microbiomes were determined by PCR and denaturing gradient gel electrophoresis method (DGGE). In the lactobacilli population of kefir grains and kefir, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus kefirianofaciens* subsp. *kefirgranum* and *Lactobacillus parakefiri* were predominating. In the yeasts population of kefir grains and kefir, *Kluyveromyces marxianus* and *Kazachstania exigua* have predominated. The size of populations and composition of microbiomes of lactobacilli and yeasts in kefir grains and kefir were stable during the 10 -week maintenance in both studied environments. The biggest difference in the composition of microbiota of kefir was in lactobacilli in kefir. By measuring pH and SH values, we examined the activity of microbiota of kefir grains. With measurements we demonstrated that the grain is active and suitable for the study.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	IX
KAZALO SLIK	X
KAZALO PRILOG	XII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XIII
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	1
1.2 DELOVNA HIPOTEZA	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 ZGODOVINA PROIZVODNJE KEFIRJA	3
2.1.1 Tradicionalna proizvodnja kefirja	4
2.1.2 Lastnosti in uporaba kefirja	4
2.1.2.1 Pozitivni učinki kefirja na zdravje	4
2.1.2.2 Uporaba kefirja	5
2.2 MIKROBIOTA KEFIRNIH ZRN	6
2.2.1 Mlečnokislinske bakterije	9
2.2.1.1 <i>Lactobacillus kefir</i>	10
2.2.1.2 <i>Lactobacillus kefirianofaciens</i>	10
2.2.1.3 <i>Lactobacillus parakefiri</i>	10
2.2.1.4 <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	11
2.2.1.5 <i>Lactococcus lactis</i>	11
2.2.2 Kvasovke	11
2.2.3 Ocetnokislinske bakterije	12
2.3 KEMIJSKA SESTAVA KEFIRNIH ZRN	12

2.4	KEFIR	14
2.4.1	Mikrobiota kefirja	14
2.4.2	Postopki izdelave kefirja	15
2.4.2.1	Proizvodnja kefirja po tradicionalnem postopku	15
2.4.2.2	Industrijska proizvodnja kefirja	17
2.5	Določanje sestave mikrobnih združb kefirja in kefirnih zrn	18
2.5.1	Gelska elektroforeza v kombinaciji z denaturacijskim gradientom (DGGE)	18
3	MATERIALI IN METODE	20
3.1	MATERIALI	20
3.1.1	Kemikalije	20
3.1.2	Laboratorijska oprema in potrošni material	21
3.1.3	Gojišča	21
3.1.3.1	Gojišče MRS Merck (Darmstadt, Nemčija)	21
3.1.3.2	Gojišče KDM	22
3.1.4	Kefirna zrna in mleko	22
3.2	METODE	22
3.2.1	Priprava gojišč, raztopine natrijevega citrata in fiziološke raztopine	24
3.2.1.1	Priprava trdnega gojišča MRS	24
3.2.1.2	Priprava trdnega gojišča KDM	24
3.2.1.3	Priprava raztopine natrijevega citrata	24
3.2.1.4	Priprava fiziološke raztopine	25
3.2.1.5	Vzdrževanje kefirnih zrn v laboratoriju in mlekarni	25
3.2.2	Določanje števila laktobacilov in kvasovk v vzorcih kefirnih zrn in kefirja	25
3.2.2.1	Priprava vzorcev kefirnih zrn za mikrobiološke analize	25
3.2.2.2	Izdelava kefirja	26
3.2.2.3	Priprava vzorcev kefirja za mikrobiološke analize	26
3.2.3	Merjenje pH vrednosti in SH izdelanega kefirja	27
3.2.4	Osamitev DNK za izvedbo reakcije PCR in analizo DGGE	28
3.2.4.1	Postopek osamitve DNK bakterij iz spirkov kolonij, izraslih na gojišču MRS	28

3.2.4.2	Postopek osamitve DNK kvasovk iz spirkov kolonij, izraslih na gojišču KDM	29
3.2.5	Pomnoževanje DNK z reakcijo PCR	30
3.2.5.1	Pomnoževanje DNK laktobacilov z reakcijo PCR	30
3.2.5.2	Pomnoževanje DNK kvasovk z reakcijo PCR	31
3.2.6	Izvedba analize DGGE	31
3.3	STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV	32
4	REZULTATI	33
4.1	VELIKOST POPULACIJ LAKTOBACILOV IN KVASOVK V KEFIRNIH ZRNIH	33
4.1.1	Število laktobacilov v vzorcih kefirnih zrn, vzdrževanih v laboratoriju in mlekarni	34
4.1.2	Število kvasovk v vzorcih kefirnih zrn, vzdrževanih v laboratoriju in mlekarni	36
4.2	VELIKOST POPULACIJ LAKTOBACILOV IN KVASOVK V KEFIRJU	38
4.2.1	Število laktobacilov v vzorcih kefirja, narejenega s kefirnimi zrn, vzdrževanimi v laboratoriju in mlekarni	39
4.2.2	Število kvasovk v vzorcih kefirja narejenega s kefirnimi zrn, vzdrževanimi v laboratoriju in mlekarni	40
4.3	ANALIZA SESTAVE POPULACIJ LAKTOBACILOV IN KVASOVK V KEFIRNIH ZRNIH IN KEFIRJU Z METODO DGGE	42
4.3.1	Rezultati analize DGGE prevladujočih laktobacilov v kefirnih zrn, vzdrževanih v laboratoriju in mlekarni	42
4.3.2	Rezultati analize DGGE prevladujočih kvasovk v kefirnih zrn, vzdrževanih v laboratoriju in mlekarni	43
4.3.3	Rezultati analize DGGE prevladujočih laktobacilov v kefirju, narejenem s kefirnimi zrn, vzdrževanimi v laboratoriju in v mlekarni	45
4.3.4	Rezultati analize DGGE za kvasovke iz kefirja, narejenega s kefirnimi zrn iz laboratorija in mlekarne	46
4.4	FIZIKALNE LASTNOSTI KEFIRJA	48
4.4.1	Vrednosti pH kefirja izdelanega s kefirnimi zrn, vzdrževanimi v laboratoriju in mlekarni	48

4.4.2	Vrednosti SH kefirja izdelanega s kefirnimi zrni vzdrževanimi v laboratoriju in mlekarni	49
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	51
5.1	RAZPRAVA	51
5.2	SKLEPI	54
6	POVZETEK	56
7	VIRI	58
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1:	Najpogostejše izolirani mikroorganizmi iz kefirnih zrn in kefirja (Farnworth, 2005; Özer D. in Özer B. H., 2000; Lopitz – Otsoa in sod., 2006; Jianzhong in sod., 2009).....	7
Preglednica 2:	Kemikalije in komercialno dostopni kompleti.	20
Preglednica 3:	Laboratorijska oprema in potrošni material.....	21
Preglednica 4:	Sestavljeno gojišče za rast kvasovk - KDM	22
Preglednica 5:	Število laktobacilov in kvasovk (v ke/g) v kefirnih zrnih vzdrževanih v laboratoriju in mlekarni	34
Preglednica 6:	Število laktobacilov in kvasovk (v ke/g) v kefirju, narejenem s kefirnimi zrnji vzdrževanimi v laboratoriju in mlekarni	39

KAZALO SLIK

Slika 1:	Postopek proizvodnje tradicionalnega kefirja (Beshkova in sod., 2002).	16
Slika 2:	Načrt poskusa za ugotavljanje velikosti, stabilnosti in sestavo populacije laktobacilov in kvasovk v kefirnem zrnju in kefirju, ter aktivnost kefirnih zrn, vzdrževanih v dveh različnih okoljih.	23
Slika 3:	Število laktobacilov (v log (ke/g)) v vzorcih kefirnih zrn, vzdrževanih v laboratoriju in mlekarni.	35
Slika 4:	Kolonije laktobacilov kefirnega zrna iz mlekarne (levo) in laboratorija (desno).	36
Slika 5:	Število kvasovk (v log (ke/g)) v vzorcih kefirnih zrn, vzdrževanih v laboratoriju in mlekarni.	37
Slika 6:	Kolonije kvasovk kefirnega zrna iz mlekarne (levo) in laboratorija (desno).	38
Slika 7:	Število laktobacilov (v log (ke/g)) v vzorcih kefirja, narejenega s kefirnimi zrnji, vzdrževanimi v laboratoriju in mlekarni.	40
Slika 8:	Število kvasovk (v log (ke/g)) v vzorcih kefirja, narejenega s kefirnimi zrnji, vzdrževanimi v laboratoriju in mlekarni.	41
Slika 9:	Profili DGGE prevladujočih laktobacilov v kefirnih zrnjih, vzdrževanih v laboratoriju (ZL1 – ZL10) in mlekarni (ZM1 – ZM10) ter laktobacilov, predhodno osamljenih iz kefirnih zrn in identificiranih (<i>Lactobacillus kefir</i> ZMR 3, <i>Lactobacillus kefiranoferiens</i> subsp. <i>kefiranoferiens</i> 19149, <i>Lactobacillus kefiranoferiens</i> subsp. <i>kefirgranum</i> ZMP6, <i>Lactobacillus parakefir</i> ZKP9); M je molekularni označevalec.	42
Slika 10:	Profili DGGE prevladujočih kvasovk v kefirnih zrnjih vzdrževanih v laboratoriju (ZLK1 – ZLK10) in mlekarni (ZMK1 – ZMK10) ter kvasovk, predhodno osamljenih iz kefirnih zrn in identificiranih (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ZIM753, <i>Kazachstania unispora</i> ZIM797, <i>Rhodospiridium kratochvilovae</i> ZK3MOJ, <i>Kluyveromyces marxianus</i> ZK+3, <i>Torulaspora delbrueckii</i> ZIM765, <i>Kazachstania exigua</i> ZK3), M je molekularni označevalec.	44
Slika 11:	Profili DGGE prevladujočih laktobacilov v kefirju, narejenemu s kefirnimi zrnji, vzdrževanimi v laboratoriju (KL1 – KL10) in mlekarni (KM1 – KM10) ter laktobacilov, predhodno osamljenih iz kefirnih zrn in identificiranih (<i>Lactobacillus kefir</i> ZMR3, <i>Lactobacillus kefiranoferiens</i> subsp. <i>kefiranoferiens</i> 19149,	

	<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefirgranum</i> ZMP6, <i>Lactobacillus parakefiri</i> ZKP9).....	45
Slika 12:	Profili DGGE prevladujočih kvasovk v kefirju narejenem s kefirnimi zrnji vzdrževanimi v laboratoriju (KLK1 – KLK10) in mlekarni (KMK1 – KMK10) ter kvasovk, predhodno osamljenih iz kefirnih zrn in identificiranih (<i>Kluyveromyces marxianus</i> ZK+3, <i>Kazachstania exigua</i> ZK3).....	47
Slika 13:	Vrednosti pH kefirja izdelanega s kefirnimi zrnji, vzdrževanimi 10-tednov v mlekarni in laboratoriju.	48
Slika 14:	Vrednosti SH kefirja izdelanega s kefirnimi zrnji, pridobljenimi iz mlekarne in vzdrževanimi v laboratoriju.....	49

KAZALO PRILOG

Priloga A: Vrednosti pH in SH kefirja narejenega s kefirnimi zrnji vzdrževanimi v laboratoriju in mlekarji, s prikazano osnovno statistiko rezultatov

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

bp	bazni par
c	koncentracija
CO ₂	ogljikov dioksid
DGGE	gelska elektroforeza v kombinaciji z denaturacijskim gradientom (ang. denaturing gradient gel electrophoresis)
DNK	deoksiribonukleinska kislina
EDTA	etilendiamin tetraocetna kislina
EŠKO	elektronski števec kolonijskih enot
FAO/WHO	organizacija združenih narodov za prehrano in kmetijstvo/svetovna zdravstvena organizacija
ke/g	kolonijske enote/gram vzorca
MKB	mlečnokislinske bakterije
MgCl ₂	magnezijev diklorid
NaOH	natrijev hidroksid
Na – citrat	natrijev citrat
ppm	število masnih ali volumskih delov izbrane snovi v milijonu delov raztopine ali zmesi
PCR	verižna reakcija s polimerazo (ang. Polymerase Chain Reaction)
SH	kislinska stopnja po soxhlet henklovi metodi
Tris - HCl	trihidroksimetil aminometan klorovodikova kislina
z. o.	začetni oligonukleotid
Δ	sprememba
μ	mikro

1 UVOD

Kefir je tradicionalni fermentirani mlečni napitek, ki izvira iz Kavkaza, Tibeta ali Mongolije. Verjetno je nastal naključno, tako kot vse fermentirane vrste mleka. Prebivalci na območju Kavkaza so hranili sveže mleko v usnjenih vrečah. Mleko je v vrečah fermentiralo in dobili so mlečni napitek, imenovan kefir (Duitschaeffer in sod., 1987). Prvotno so kefir izdelovali iz ovčjega mleka, zdaj pa se kefir v evropskih industrijskih obratih izdeluje predvsem iz kravjega mleka (Wojtowski in sod., 2003). Kefir lahko izdelujemo tudi iz drugih vrst mleka (kozjega, ovčjega, kobiljega) ali rastlinskih sokov kokosa, riža in soje (Otles in Cagindi, 2003).

Tradicionalna kefirna zrna za proizvodnjo kefirja uporabljajo v mnogih deželah, posebno v vzhodnih državah Evrope. Uporabljajo jih kot naravno startersko kulturo pri izdelavi kefirja, ki je unikatni mlečni napitek. O kefirju in o njegovih blagodejnih učinkih na zdravje je bilo narejeno že veliko študij. Razlika med kefirjem in drugimi fermentiranimi mlečnimi izdelki je v obliki starterske kulture, ki je pri kefirju v obliki zrn. Zrna spominjajo na majhen cvet cvetače. So različnih velikosti od 3 do 30 mm. So mehka, nepravilnih oblik, belo rumenkasto obarvana in imajo čvrsto strukturo (Cruz Pedrozo Miguel in sod., 2010). Ker se kefirna zrna v mleku samodejno razmnožujejo, je sestava mikrobne populacije kefirnega zrna nedefinirana in v veliki meri odvisna od različnih okoljskih pogojev. Že majhne spremembe okoljskih pogojev lahko povzročijo preraščanje ali zmanjševanje števila določene skupine mikroorganizmov. Takšne spremembe so nezaželjene in se odražajo v spremenjenem poteku fermentacije, senzoričnih lastnostih in kakovosti kefirja.

1.1 NAMEN DELA

Namen diplomske naloge je bil preučiti velikost, stabilnost in sestavo populacije laktobacilov in kvasovk ter aktivnost kefirnih zrn, vzdrževanih v dveh različnih okoljih, in sicer v dobro kontroliranih laboratorijskih pogojih in v industrijskih pogojih, v mlekarni.

1.2 DELOVNA HIPOTEZA

Predvidevali smo, da bo pri vzdrževanju kefirnih zrn v različnih okoljih prišlo do razlik v velikosti in sestavi populacije laktobacilov in kvasovk ter posledično do spremenjene aktivnosti kefirnih zrn, ki bo vplivala tudi na fermentacijo kefirja.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ZGODOVINA PROIZVODNJE KEFIRJA

Zgodovina proizvodnje kefirja, ki je ena najstarejših fermentiranih mlečnih pijač, je omenjena v legendi. Med ljudstvi severnih pobočij kavkaških gora obstaja legenda, da je pravoslavni vernikom na tem območju kefirna zrna dal Mohamed, ki naj bi skozi to področje potoval pred približno 1400 leti. Naučil jih je tudi izdelovati kefir. Kot prvi proizvajalci kefirja sta omenjeni dve ljudstvi: Osetijci in Kabardinijci. Zrna so imenovali »prerokova zrna«, kefir pa »prerokova pijača«. Verjeli so, da bi zrna izgubila moč, če bi z njimi v stik prišel kdo drug, zato so jih skrbno varovali in jih niso delili z nikomer. Kefirna zrna so obravnavali kot del družinskega in plemenskega bogastva ter so jih prenašali iz generacije v generacijo. Druga ljudstva so le občasno slišala pripovedi o tem napitku, ki naj bi imel čudežne lastnosti. Kefir je omenil tudi Marco Polo v svojih kronikah o potovanju na vzhod (Jashbhai in Baboo, 2008; Anfiteatro, 2014).

Kefirna zrna naj bi bila darilo Boga. Pojavljajo pa se tudi namigovanja, da bi kefirna zrna lahko ustrezala opisu »nebeške mane«. To naj bi Bog poslal iz nebes, da bi nahranil lačne Izraelce, ko jih je Mojzes vodil v deželo »mleka in medu« (Anfiteatro, 2014).

Kefir dolgo ni bil poznan po svetu, saj so ga ljudstva kavkaških gora hotela obdržati le zase, vendar so se po svetu razširile novice o njegovih pozitivnih učinkih na zdravje in počutje (Jashbhai in Baboo, 2008). Predvsem Ruska zdravniška skupnost si je močno prizadevala, da bi dobili kefirna zrna. Prosili so brata Blandov, lastnika sirarne v mestu Kislovodsk, naj priskrbita kefirna zrna. Želeli so dobiti kefirna zrna in nato komercialno izdelovati kefir. Ker kefirnih zrn nista mogla priskrbeti, je Nikolaj Blandov prepričal lepo mlado uslužbenko Irino Sakharovo, naj uporabi svojo lepoto za pridobitev kefirnih zrn. Potovala je do princa Bek-Mirza Barchorova in ga poskušala prepričati, naj ji da nekaj zrn. Princ, ki se je bal povračilnih ukrepov zaradi kršenja verskih zakonov, ni hotel ugoditi njeni prošnji. Ker pa je bil tako prevzet od Irinine lepote, se ji ni mogel upreti in jo je na poti domov ugrabil. Princ se je hotel poročiti z njo, vendar sta jo njena delodajalca z drzno reševalno akcijo rešila. Irina je proti princu vložila tožbo na carskem sodišču in zahtevala

kefirna zrna. Sodišče ji je ugodilo in princ ji je moral pokloniti zrna. Kefirna zrna naj bi prispela v Moskvo septembra 1908 in začela se je proizvodnja kefirja tudi zunaj Kavkaških gora. Prve steklenice kefirja so bile namenjene predvsem v medicinske namene. Izdelovanje kefirja v komercialne namene se je začelo v Rusiji leta 1930 (Kefir, Yoghurt ..., 2002).

2.1.1 Tradicionalna proizvodnja kefirja

Izdelava tradicionalnega kefirja se je začela pred več stoletji. Kefir so najprej izdelovali prebivalci Kavkaških gora s surovim, polnomastnim kozjim ali kravjim mlekom. Svežemu mleku so dodali kefirna zrna in jih shranili v vreče iz kozjega usnja ter pustili 24 ur na sobni temperaturi, da je potekla fermentacija. Kefir so precedili in ga ločili od kefirnih zrn. V hladnem vremenu so vreče hranili na soncu ali blizu kamina. Navada pa je bila tudi, da so obesili vreče blizu vrat, da je lahko vsak, ki je prišel ali odšel, nežno zazibal vreče in tako premešal vsebino (Jashbhai in Baboo, 2008; Anfiteatro, 2014).

Neporabljeni kefir so občasno shranjevali v lesene zaprte sode, kjer je potekla sekundarna fermentacija brez kefirnih zrn in brez zraka. Kefir so pustili fermentirati nekaj dni, dodali so mu tudi sveže mleko. Dobili so napitek z večjo vsebnostjo CO₂ in rahlo višjo koncentracijo alkohola (Anfiteatro, 2014).

2.1.2 Lastnosti in uporaba kefirja

2.1.2.1 Pozitivni učinki kefirja na zdravje

Kefirju pripisujejo številne pozitivne učinke za zdravje (Farnworth, 2005; Otles in Cagindi, 2003; Lopitz – Otsoa in sod., 2006; Libudzisz in Piatkiewicz, 1990; Marshall, 1993a):

- Krepi imunski sistem
- Inhibira rast tumorskih celic
- Varuje pred patogenimi bakterijami
- Ima protimikrobne lastnosti (preprečuje okužbe)

- Učinkuje na lipide v krvi in znižuje holesterol (izboljšuje razmerje med LDL/HDL)
- Ugodno učinkuje na prebavni trakt
- Učinkuje na sladkor v krvi
- Izboljša presnovo maščob, sladkorja in beljakovin
- Zavira proces staranja
- Pomaga pri odpravi aken
- Pomirja, sprošča napetost, odpravlja težave z nespečnostjo
- Blaži stranske učinke zdravil
- Pomaga pri preprečevanju vnetja ledvic
- V Rusiji ga uporabljajo tudi pri zdravljenju tuberkuloze
- Pomaga pri depresiji
- Pomaga astmatikom
- Pomaga pri slabokrvnosti
- Razstruplja organizem
- Pripomore k hitrejšemu okrevanju po bolezni
- Ugodno vpliva na doječe matere in dojenčke, varuje pred okužbami in alergijami
- Lajša težave bolnikov z AIDS-om

Kefir poleg osnovnih hranil vsebuje tudi vitamine skupine: B (B_1 , B_3 , B_5 , B_6 , B_{12} , folno kislino, biotin), A, C, D, in E, niacin, esencialne aminokisline (npr. triptofan), minerale: kalcij, magnezij, kalij, natrij in veliko fosforja, ki je drugi najbolj zastopan mineral v človeškem telesu. Fosfor pomaga pri izkoriščanju ogljikovih hidratov, maščob in proteinov za celično rast (Otles in Cagindi, 2003; Sarkar, 2007).

2.1.2.2 Uporaba kefirja

Na internetnih straneh se pojavljajo številni napotki za uporabo kefirja v kulinariki. Primeren je za pripravo toplih ali hladnih juh, solatnih prelivov, sladoleda, tort, kruha, frapejev, kot preliv za kosmiče in žgance, dodatek pečenkam, zrezkom, sirom, osvežilnim pijačam. Njegova uporaba v kulinariki je neomejena. Kefir lahko pri pripravi jedi

uporabljamo namesto jogurta in mleka. Uporaba pa ni omejena samo na uporabo v kulinariki, nekateri ga priporočajo tudi za pripravo »tradicionalne domače kozmetike« in sicer za pripravo čistila za obraz, maske za obraz, kreme za roke, balzama za lase, kopeli iz kefirja (Kefir, Yoghurt ..., 2002).

2.2 MIKROBIOTA KEFIRNIH ZRN

Iz podatkov, objavljenih v znanstvenih člankih, je moč ugotoviti, da prihaja do velikih razlik glede velikosti in sestave mikrobiote kefirnih zrn. Zmeraj pa so prisotni določeni mikroorganizmi. Do razlik prihaja zaradi različnih serij zrn, izvora mleka v katerem so kultivirana zrna, časa kultivacije, sezonskih razlik in pogojev kultiviranja (Lopitz – Otsoa in sod., 2006). Kefirna zrna so zelo kompleksna in spremenljiva mikrobna združba simbiotskih mikroorganizmov (Ratray in O’Connell, 2011). Razmerje kvasovk proti mlečnokislinskim bakterijam, razmerje med heterofermentativnimi in homofermentativnimi mikroorganizmi ter razmerje med mezofilnimi in termofilnimi mikroorganizmi je edino, kar je približno konstantno v kefirnem zrnju (Stepaniak in Fetlinski, 2002).

Mikroorganizmi, ki so prisotni v kefirnih zrnih, živijo v simbiozi. Prevladujejo kvasovke in mlečnokislinske bakterije. Če iz kefirnih zrn izoliramo čiste kulture mikroorganizmov, pogosto ne rastejo v mleku ali pa imajo zmanjšano aktivnost. To pa oteži raziskovanje mikrobne populacije kefirnih zrn. Na splošno mlečnokislinske bakterije prevladujejo nad kvasovkami in ocetno kislinskimi bakterijami (Farnworth, 2005; Witthuhn in sod., 2005b).

Preglednica 1: Najpogosteje izolirani mikroorganizmi iz kefirnih zrn in kefirja (Farnworth, 2005; Özer D. in Özer B. H., 2000; Lopitz – Otsoa in sod., 2006; Jianzhong in sod., 2009).

Mlečnokislinske bakterije	
Laktobacili	<i>Lactobacillus kefir</i> <i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens</i> <i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefirgranum</i> <i>Lactobacillus parakefir</i> <i>Lactobacillus brevis</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>alactosus</i> <i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>tolerans</i> <i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> <i>Lactobacillus paracasei</i> <i>Lactobacillus fermentum</i> <i>Lactobacillus helveticus</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> <i>Lactobacillus fructivorans</i> <i>Lactobacillus hilgardii</i> <i>Lactobacillus viridescens</i> <i>Lactobacillus rhamnosus</i>
Laktokoki	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>
Streptokoki	<i>Streptococcus thermophilus</i>
Leukonostoki	<i>Leuconostoc cremoris</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i>
Očetno kislinske bakterije	
<i>Acetobacter aceti</i> <i>Acetobacter pasteurianus</i> <i>Acetobacter</i> sp.	

se nadaljuje

nadaljevanje Preglednice 1: Najpogostejše izolirani mikroorganizmi iz kefirnih zrn in kefirja (Farnworth, 2005; Özer D. in Özer B. H., 2000; Lopitz – Otsoa in sod., 2006; Jianzhong in sod., 2009).

Druge bakterije	
<i>Bacillus</i> sp. <i>Micrococcus</i> sp. <i>Pediococcus</i> sp. <i>Acetobacter</i> sp. <i>Escherichia coli</i>	
Kvasovke	
<i>Kluyveromyces lactis</i>	<i>Torulaspora delbrueckii</i>
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	<i>Brettanomyces anomalus</i>
<i>Candida kefir</i>	<i>Saccharomyces diarens</i>
<i>Candida pseudotropicalis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Candida tenuis</i>	<i>Saccharomyces exiguus</i>
<i>Candida inconspicua</i>	<i>Saccharomyces unisporus</i>
<i>Candida maris</i>	<i>Saccharomyces turicensis</i>
<i>Candida lambica</i>	<i>Saccharomyces delbrueckii</i>
<i>Candida holmii</i>	<i>Kazachstania unispora</i>
<i>Pichia fermentans</i>	<i>Kazachstania exigua</i>

Iz kefirnih zrn so izolirali veliko različnih vrst mikroorganizmov. Med njimi so tudi kvasovke in bakterije, ki živijo v simbiozi. To pomeni, da ene vrste mikroorganizmov preživijo in se razmnožujejo s pomočjo bioproduktov druge vrste mikroorganizmov. Bioprodukti jim služijo kot vir energije ali kot rastni faktorji. Nekateri mikroorganizmi, ki so bili izolirani iz kefirja, so dobili ime po njem, kot npr.: *Lactobacillus kefir*, *L. kefiranofaciens*, *L. kefirgranum*, *L. parakefir*, *Candida kefir*. Iz kefirja so izolirali tudi nove vrste mikroorganizmov, kot npr. *Saccharomyces turicensis* (Lopitz – Otsoa in sod., 2006).

Mikroorganizmi v kefirnem zrnju so razporejeni nesimetrično. Elektronska mikroskopija je pokazala, da kvasovke dominirajo v centru zrna in da je v centru zrna prisotno veliko manj mikroorganizmov v primerjavi s perifernim delom (Wood in Hodge, 1985). Osrednji del kefirnih zrn pa ni naseljen samo s kvasovkami, ampak se v njem nahaja tudi nekaj bakterij, ki so predvsem laktobacili dolge paličaste oblike. Prav tako pa na perifernem delu niso

prisotne samo bakterije, ampak so na površini zrna prisotne tudi posamezne kvasovke. Na površini zrna so prisotne predvsem kvasovke, ki fermentirajo laktozo, v notranjem delu pa kvasovke nimajo te lastnosti (Marshall, 1993a).

2.2.1 Mlečnokislinske bakterije

Pri predelavi mleka je najbolj razširjena mlečnokislinska fermentacija s starterskimi kulturami, ki so sestavljene iz ene ali več različnih vrst mlečnokislinskih bakterij. Mlečnokislinske bakterije povzročajo mlečnokislinsko fermentacijo, so po Gramu pozitivne, v obliki kokov ali palčk. Energijo pridobivajo s fermentacijo in ne potrebujejo prisotnosti kisika (so aerotolerantne). Za rast potrebujejo rastne faktorje, ker so zaradi prilagoditve na bogato naravno okolje, v katerem se navadno nahajajo (fermentirana hrana, prebavni trakt), izgubile sposobnost sinteze različnih metabolnih produktov (Hacin, 1996).

V kefirju in kefirnih zrnih so prisotne heterofermentativne in homofermentativne mlečnokislinske bakterije. Heterofermentativne bakterije s heterolaktično fermentacijo poleg mlečne kisline proizvajajo tudi etanol in CO₂. Pri homofermentativnih pa kot večinski produkt nastaja mlečna kislina (Hammes in Hertel, 2006). Nekatere homofermentativne mlečnokislinske bakterije v kefirju so (Ratnay in O'Connell, 2011; Farnworth, 2005; Simova in sod., 2002):

- laktobacili: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus kefirianofaciens*, *Lactobacillus kefirgranum*, *Lactobacillus acidophilus*,
- laktokoki: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*,
- streptokoki: *Streptococcus thermophilus*.

Heterofermentativne mlečnokislinske bakterije pa so: *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus parakefir*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus brevis* ter nekatere druge (Ratnay in O'Connell, 2011; Simova in sod., 2002). Obstajajo pa tudi izjeme kot npr. *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *Lactobacillus plantarum* in *Lactobacillus rhamnosus*, ki so fakultativne heterofermentativne mlečnokislinske bakterije (Tamime, 2002).

Deleži posameznih vrst mikroorganizmov se v kefirju in kefirnih zrnih razlikujejo. Večino mikrobne združbe kefirnega zrna predstavljajo laktobacili *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus plantarum*, in *Lactobacillus kefiranofaciens*. V kefirju predstavljajo našteje vrste laktobacilov največkrat 20 % vseh laktobacilov, ostalih 80 % laktobacilov v kefirju pa predstavlja *Lactobacillus kefiri* (Lopitz – Otsoa in sod., 2006). Na splošno predstavljajo laktobacili 65 – 80 %, kvasovke 10 – 15 % ter *Lactococci* in *Leuconostoc* spp. 5 – 25 % mikrobne populacije v zrnju (Ratray in O'Connell, 2011).

2.2.1.1 *Lactobacillus kefiri*

Lactobacillus kefiri je po Gramu pozitivna, negibljiva, nesporulirajoča, mikroaerofilna, heterofermentativna bakterija, paličaste oblike, z zaobljenimi konci. Bakterije se pogosto povežejo v verižice. Kolonije na agarju MRS (De Man, Rogosa and Sharp agar) so sivkaste barve, gladke in ploščate, velike od 2 do 4 mm. Rastejo pri temperaturah od 10 °C do 40 °C, optimum rasti imajo pri 30 °C. V kefirnem zrnju se nahajajo v majhnih regijah na površini zrna (Kandler in Kunath, 1983; Ratray in O'Connell, 2011).

2.2.1.2 *Lactobacillus kefiranofaciens*

Lactobacillus kefiranofaciens je po Gramu pozitivna, homofermentativna, negibljiva, nesporulirajoča, fakultativno anaerobna bakterija, paličaste oblike. Pojavlja se sama, v parih ali občasno v verižicah. Kolonije na agarju KPL (modificiran kefir grain polysaccharide – producing lactobacillus agar) so okrogle in nepravilnih oblik, gladke in izbočene, bele barve, velike od 0,5 do 3 mm. (Fujisawa in sod., 1988).

2.2.1.3 *Lactobacillus parakefiri*

Lactobacillus parakefiri je negibljiva, heterofermentativna bakterija v obliki palčke. Kolonije na agarju Rogosa – CW (Rogosa agar z dodatkom raztopine sirotke; Rogosa cheese whey agar) so po 5 dneh pri inkubaciji 30 °C okrogle in nepravilnih oblik, bele barve, z ravno in hrapavo površino, velike 0,5 do 2 mm (Vos in sod., 2009; Kojima in sod., 1993; Takizawa in sod., 1994).

2.2.1.4 *Leuconostoc mesenteroides*

Leuconostoc mesenteroides je po Gramu pozitivna, heterofermentativna, negibljiva, nesporulirajoča kokoidna mlečnokislinska bakterija, ki se nahaja v parih ali verižicah. Lahko tvori majhne do srednje velike verižice. Je fakultativni anaerob, ki razgrajuje laktozo na mlečno kislino, ocetno kislino, etanol in ogljikov dioksid. Citronsko kislino pa razgrajuje v diacetil, ki poskrbi za okus in aromo kefirja. Raste med 5 °C in 37 °C, optimalno med 20 °C in 30 °C (Tamime, 2002; Jianzhong in sod., 2009).

2.2.1.5 *Lactococcus lactis*

Lactococcus lactis je zelo pomembna mlečnokislinska bakterija v komercialni uporabi, saj se mnogokrat uporablja v raziskavah pri proizvodnji mlečnih produktov (Sandine in sod. 1972). Je po Gramu pozitivna, mezofilna, nemobilna, fakultativno anaerobna, nepatogena, homofermentativna mlečnokislinska bakterija. Pojavlja se v parih, lahko pa tvori verižice. Optimalno raste med 28 °C in 31 °C, pri pH = 4,5, ob prisotnosti vitaminov B kompleksa. Če je pH nižji, je rast ovirana (Tamime, 2002).

2.2.2 Kvasovke

Kvasovke so pomembne v kefirju, saj proizvajajo etanol in CO₂. Imajo pa tudi pomembno vlogo pri tvorbi rastnih faktorjev za MKB, kot npr. aminokislin in vitaminov (Farnworth, 2005). V kefirju so pomembne tudi pri oblikovanju okusa in arome (Simova in sod., 2002). Kvasovke, izolirane iz kefirja, lahko razdelimo v dve skupini (Lopitz – Otsoa in sod., 2006; Simova in sod., 2002; Rattray in O'Connell, 2011; Farnworth, 2005):

- Kvasovke, ki so sposobne fermentirati laktozo. Sem spadajo *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces lactis* var. *lactis*, *Candida kefir*, *Kluyveromyces fragilis*, *Torulaspora kefir*,
- Kvasovke, ki niso sposobne fermentirati laktoze. Te so predvsem: *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii*, *Saccharomyces unisporus*, *Saccharomyces exiguus*, *Torulopsis holmii*, *Candida inconspicua* in *Candida colliculosa*.

V kefirnem zrnju prevladujejo kvasovke, ki ne fermentirajo laktoze (60 – 100% od vseh kvasovk) in se nahajajo predvsem v globokih plasteh kefirnega zrna. Najpogostejše prisotni v kefirnem zrnju sta kvasovki *Saccharomyces cerevisiae* in *Torulaspora delbrueckii* (Ratnay in O'Connell, 2011; Simova in sod., 2002). Preživijo se s fermentacijo galaktoze, ki je produkt mikroorganizmov, sposobnih razgradnje laktoze (Cheirsilp in sod., 2003a). V kefirju pa prevladujejo kvasovke, ki fermentirajo laktozo. Te so npr. *Candida kefyr* in *Kluyveromyces marxianus*. *Candida kefyr* je nespolna oblika kvasovke *Kluyveromyces marxianus* (Tamime, 2002).

2.2.3 Ocetnokislinske bakterije

V kefirnih zrnih so pogosto prisotne tudi ocetnokislinske bakterije. So po Gramu negativne, spiralno zvite palčke. Te bakterije so pomembne pri ohranjanju simbioze mikrobiote kefirnega zrna. Najpogostejša predstavnik sta *Acetobacter aceti* in *Acetobacter rasens*. Ocetnokislinske bakterije oksidirajo alkohole in sladkorje do organskih kislin. Produkt nepopolne oksidacije alkohola je ocetna kislina. Ocetnokislinske bakterije povečajo viskoznost s produkcijo sluzi in s tem izboljšajo konsistenco kefirja (Robinson in sod., 2002; Zajšek, 2012).

2.3 KEMIJSKA SESTAVA KEFIRNIH ZRN

Podatki iz literature o sestavi kefirnih zrn so zelo različni. Glavni razlog velike variabilnosti podatkov je najverjetneje različen izvor proučevanih kefirnih zrn. V nekaterih študijah so zrna prihajala iz različnih regij, neimenovanih virov, v nekaterih primerih iz domače uporabe, kjer je vprašljiva higiena vzdrževanja zrn. Druge študije pa so se nanašale na komercialno dostopna zrna.

Kefirna zrna so nepravilnih oblik in so podobna cvetu cvetače, so bele ali rumenkasto bele barve. Velika so od 0,5 do 3 cm, so lepljiva in čvrste teksture. Farnworth (2005) navaja, da kefirna zrna v mleku rastejo približno 20 ur in pri tem povečajo svojo začetno maso za približno 25 %. Medtem ko Libudzisz in Piatkiewicz (1990) navajata, da naj bi kefirna

zrna v mleku povečala svojo prvotno maso za 5 – 7 % na dan. Intenzivno spiranje zrn pod vodo poveča rast zrn. Rast se poveča zaradi spiranja površinskih mikroorganizmov in njihovih metabolitov, kar povzroči boljšo dostopnost hranil iz mleka (Kolakowski in Ozimkiewicz, 2011). Zrnju moramo vsakodnevno zagotoviti sveža hranila – mleko, da lahko rastejo in obdržijo sposobnost fermentacije mleka v kefir. Stara in suha zrna imajo slabo ali pa sploh nimajo sposobnosti fermentacije mleka (Farnworth, 2005). Nekateri viri navajajo, da je v kefirnem zrnju 10 - 11 % suhe snovi, ki jo v večini sestavljajo ogljikovi hidrati (60 %) in proteini (30 %), prisotni so še lipidi (2 %), zrno pa vsebuje okoli 7 % pepela (Özer D. in Özer B. H., 2000). Liutkevičius in Šarkinas (2004) navajata, da kefirno zrno vsebuje 13,7 % suhe snovi, v kateri je 33 % proteinov, 0,2 % lipidov in 9 % pepela. Otles in Cagindi (2003) pa navajata, da kefirno zrno vsebuje 13 % proteinov in 24 % polisaharidov v suhi snovi.

Kvasovke in bakterije so v kefirnem zrnju ujete v polisaharid imenovan kefiran. Kefiran je v vodi topen glukogalakatan (Lopitz – Otsoa in sod., 2006). Sestavljajo ga razvejane verige D–glukoze in D–galaktoze, ki sta v enakem razmerju (Farnworth, 2005). Kefiran v največji meri proizvajajo laktobacili: *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lactobacillus bulgaricus* in *Lactobacillus kefir*. Izmed teh ga največ proizvede *Lactobacillus kefiranofaciens*. Največ ga nastane po 40 urah fermentacije, saj takrat poteka faza odmiranja mikroorganizmov in se zmanjšuje delež mikroorganizmov v kefirnem zrnju, s tem pa se povišuje delež kefirana. Delež kefirana se povečuje zato, ker bakterije v fazi odmiranja proizvedejo več kefirana za zaščito svojih celic (Zajšek in sod., 2011). Vrednost pH tekom fermentacije pada, kar pospešuje rast laktobacilov, ki proizvajajo kefiran (Frengova in sod., 2002). *Lactobacillus kefiranofaciens* kot čista kultura med fermentacijo ne proizvaja veliko kefirana, ker povečana koncentracija mlečne kisline zavira njegovo rast. Če dodamo čisti kulturi *Lactobacillus kefiranofaciens* kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*, se zmanjša koncentracija mlečne kisline in poveča proizvodnja kefirana, kar ponazarja pomembnost simbioze med bakterijami in kvasovkami (Cheirsilp in sod., 2003a). Sestava kefirana je odvisna od bakterijske vrste, ki ga sintetizira. Poleg D–glukoze in D–galaktoze so lahko v majhnih količinah prisotne še arabinoza, manoza in ramnoza (Frengova in sod., 2002).

Kefirno zrno sestavljajo, poleg kefirana z ujetimi mikroorganizmi, tudi mlečne maščobe in denaturirani mlečni proteini, ki so povezani s polisaharidnim matriksom (Kurmann in sod., 1992).

2.4 KEFIR

Kefir je mlečni napitek, ki ga tradicionalno proizvajajo s pomočjo kefirnih zrn, ki jih dodajo mleku, da poteče fermentacija. Fermentacija traja 24 ur pri sobni temperaturi, produkt pa je edinstven tako po okusu kot po obliki starterske kulture. Mlečni napitek ima po fermentaciji značilen okus po kvasu. Je rahlo kisel, gaziran in ima nizko vsebnost alkohola (Rattray in O'Connell, 2011; Sarkar, 2007). Kefir ima pomembno vlogo v prehrani ljudi. Razširjen je v jugozahodni Aziji, vzhodni in severni Evropi, severni Ameriki, Japonski, na bližnjem vzhodu, severni Afriki in Rusiji, predvsem zaradi hranilnih in terapevtskih lastnosti (Sarkar, 2007). Kefir ima vrednost pH med 4,1 in 4,8, vsebuje CO₂ (0,85 – 1,05 g/L), mlečno kislino (7,6 – 8,8 g/L) in alkohol (0,01 % – 0,25 %) (Farnworth, 2005; Simova in sod., 2002). Lahko ga izdelamo iz različnih vrst mleka, kot npr.: kravje, kozje, ovčje, kamelino, bivolje (Irigoyen in sod., 2005). Sestavine, ki dajo kefirju značilen okus, so predvsem: mlečna kislina, etanol, mravljična kislina, jantarna kislina, očetna kislina, propionska kislina, acetaldehid, diacetil in acetoin (Marshall 1993b; Marshall, 1984). Pri skladiščenju kefirja pri 5 °C ostaja število kvasovk in očetnokislinskih bakterij konstantno, število mlečnokislinskih bakterij pa se med 7 in 14 dnevom skladiščenja zmanjša. Delež maščobe, laktoze in vrednost pH (pH = 4,5) ostanejo konstantni do 14 dni skladiščenja. Na viskoznost, količino laktoze, pH in število mikroorganizmov v kefirju pa močno vpliva delež kefirnih zrn, ki jih uporabimo za izdelavo kefirja (Irigoyen in sod., 2005).

2.4.1 Mikrobiota kefirja

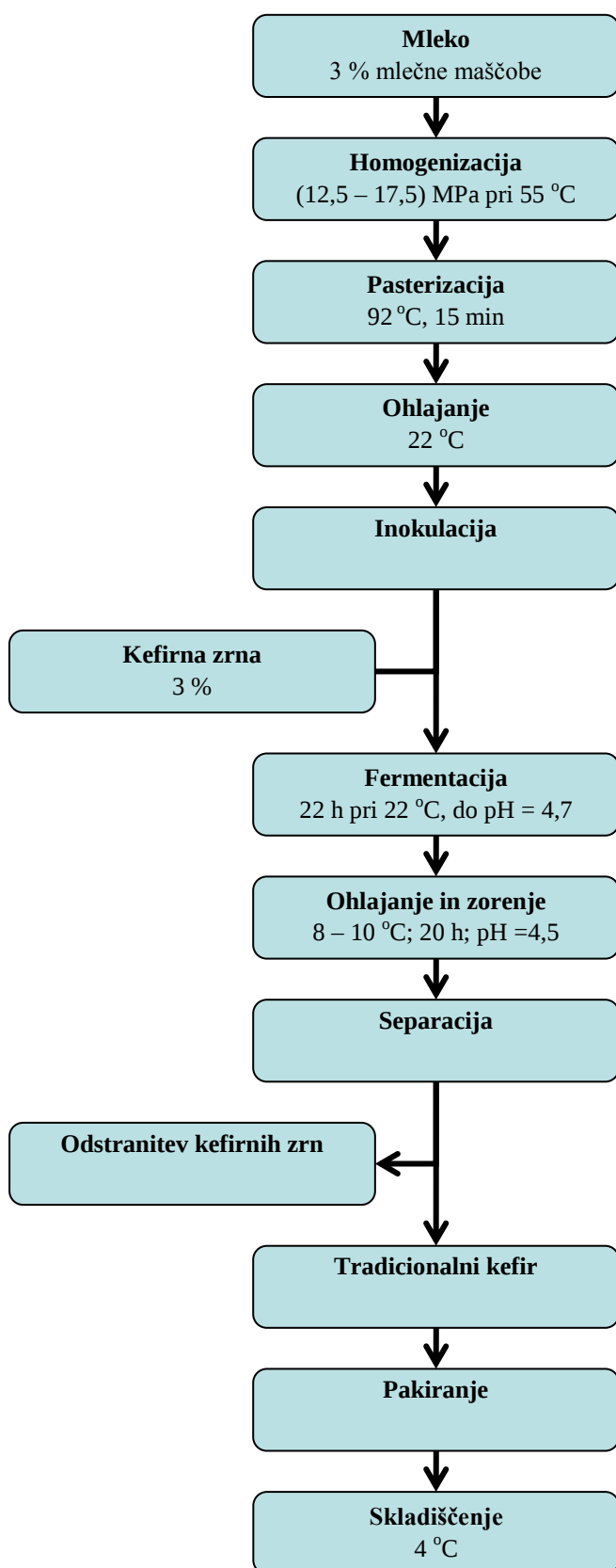
Kefirna zrna so ključna za proizvodnjo kefirja, ker ima kefir kot končni produkt fermentacije drugačno mikrobiološko sestavo in ga ne moremo uporabiti kot inokulum za izdelavo drugega kefirja (Farnworth, 2005). Mlečnokislinske bakterije v kefirju so v

glavnem odgovorne za pretvorbo laktoze v mlečno kislino, kar povzroči padec vrednosti pH. Kvasovke, ki fermentirajo laktozo, pretvarjajo laktozo v etanol in CO₂. V kefirju so prisotne tudi kvasovke, ki ne fermentirajo laktoze in v nekaterih primerih še ocetnokislinske bakterije. Mikrobiota kefirnega zrna vsebuje 65 – 80 % laktobacilov, 10 – 15 % kvasovk in 5 – 25 % laktokokov in vrst rodu *Leuconostoc*. V kefirju pa je prisotnih okoli 80 % (10^8 – 10^9 ke/g) laktokokov in levkonostokov, 10 – 15 % (10^5 – 10^6 ke/g) kvasovk in 5 – 10 % (10^7 – 10^8 ke/g) laktobacilov. Razmerje med mikrobno združbo kefirnih zrn in kefirja je lahko zelo spremenljivo in odvisno od več dejavnikov. Ti dejavniki so čas fermentacije, temperatura fermentacije, stopnja aktivacije zrn in vrsta mleka (Rattray in O'Connell, 2011).

2.4.2 Postopki izdelave kefirja

2.4.2.1 Proizvodnja kefirja po tradicionalnem postopku

Pri tradicionalnem postopku izdelave kefirja dodajo kefirna zrna (2 – 10 %) neposredno v pasterizirano in ohlajeno mleko. Zmes zrn in mleka nato pustijo fermentirati na 20 – 25 °C za 18 do 24 ur (Otlés in Cagindi, 2003), oziroma dokler ni dosežena določena vrednost pH ali dokler kefir ne doseže zelenega okusa in teksture. Zrna nato ločijo od fermentiranega mleka. Pogosto je v proces proizvodnje kefirja vključen tudi proces zorenja, ki pri temperaturi 8 – 10 °C traja približno 15 – 20 ur (Zajšek, 2012). Po zorenju kefirna zrna s filtriranjem odstranijo. Kefir nato čez noč ohladijo in naslednji dan je pripravljen za uživanje (Özer D. in Özer B. H., 2000). Zrna lahko uporabijo za novo fermentacijo ali pa shranijo v mleku (1 – 7 dni) (Zajšek, 2012). Lahko jih tudi posušijo, zamrznejo, liofilizirajo ali pa shranijo v hladilniku. Različni avtorji navajajo, da je najboljše shranjevanje zrn globoko zamrzovanje v mleku (Witthuhn in sod., 2005a; Irigoyen in sod., 2005). Postopek proizvodnje tradicionalnega kefirja je shematsko prikazan na sliki 1.



Slika 1: Postopek proizvodnje tradicionalnega kefirja (Beshkova in sod., 2002).

2.4.2.2 Industrijska proizvodnja kefirja

Industrijska proizvodnja kefirja poteka v fermentorjih. V njih poteka fermentacija, koagulacija, zorenje in hlajenje. V fermentorjih poteka tudi mešanje, ki je pomemben dejavnik za zagotavljanje homogenega produkta (Zajšek, 2012). Industrijska proizvodnja kefirja poteka v dveh stopnjah. Prva stopnja je priprava matične kulture z uporabo kefirnih zrn, druga pa vključuje primarno in sekundarno fermentacijo. Primarna fermentacija poteka v fermentorju, sekundarna, ki je pravzaprav zorenje kefirja, pa po pakiranju v embalaži. Matično kulturo pripravijo tako, da dodajo kefirna zrna v ohlajeno pasterizirano mleko v razmerju 1:10, 1 del zrn in 10 delov mleka. Kultivacija nato poteka 24 – 36 ur pri 20 – 22 °C, potem zrna odstranijo, jih operejo s sterilno vodo, in jih ponovno uporabijo za pripravo nove matične kulture. Sledi priprava delovne kulture. Vzorec matične kulture precepijo v večji volumen mleka (npr. 2 l). Po 16 urah, ko poteče fermentacija pri 20 – 22 °C, to matično kulturo uporabijo kot inokulum za večji volumen mleka. Matična kultura vsebuje samo 5 % kvasovk, ker se njihov delež zniža zaradi povečevanja deleža mlečnokislinskih bakterij, kar pa pripomore k boljšemu okusu kefirja (Boštar, 2006). Kefir, ki je narejen iz kefirnih zrn, se lahko od šarže do šarže zelo razlikuje, predvsem zaradi različne mikrobiološke sestave kefirnih zrn. Fermentacijski proces pa vpliva predvsem na okus in teksturo kefirja. Inkubacija pri višjih temperaturah (nad 30 °C) poviša rast termofilnih mlečnokislinskih bakterij, predvsem na račun kvasovk in mezofilnih mlečno kislinskih bakterij. Če pride do neugodnih pogojev med fermentacijo, se poveča rast homofermentativnih mlečnokislinskih bakterij. Rast očetno kislinskih in heterofermentativnih mlečno kislinskih bakterij pa se v tem primeru ne spreminja (Rattray in O'Connell, 2011).

Novejše tehnologije proizvodnje kefirja ne vključujejo uporabe kefirnih zrn, ampak kefir izdelujejo z uporabo čistih kultur mikroorganizmov, izoliranih iz kefirnih zrn. Postopek je bolj enostaven, saj omogoča boljšo kontrolo prisotnih mikroorganizmov, kefir izdelan z uporabo čistih kultur pa ima boljšo konsistenco. Največji problem pri uporabi čistih kultur je poiskati najboljše razmerje med mlečnokislinskimi bakterijami in kvasovkami. Praktično je to težko, ker se tudi razmerje mikroorganizmov v kefirnih zrnih zelo spreminja, zaradi različnih vplivov. Pri uporabi kefirnih zrn za izdelavo kefirja se iz njih sproščajo številne

naravne sestavine in metaboliti, ki v kefirju izdelanem z uporabo čistih kultur niso prisotne. Problem nastane tudi pri označevanju izdelka kot kefir, saj nima vseh značilnosti tradicionalnega kefirja in je za kupce pravzaprav zavajajoč (Zajšek, 2012).

2.5 DOLOČANJE SESTAVE MIKROBNIH ZDRUŽB KEFIRJA IN KEFIRNIH ZRN

Za proučevanje mikrobnih združb poznamo klasične metode in od gojenja neodvisne mikrobiološke metode. Pri konvencionalnih klasičnih metodah vzorec najprej nacepimo na različna selektivna gojišča in z njih osamimo posamezne izolate, ki jih identificiramo na osnovi morfoloških, biokemijskih in genetskih značilnosti. Klasičen postopek proučevanja mikrobnih združb je dolgotrajen, na rezultate pa vpliva tudi slaba sposobnost rasti določenih mikroorganizmov na gojišču in nizko število le teh v združbi. Zaradi teh razlogov se poleg klasičnih metod uporabljajo tudi od gojenja neodvisne metode, s katerimi lahko natančno, hitro in specifično določimo vrsto mikroorganizmov prisotnih v mikrobnih združbi. Te metode temeljijo na preučevanju DNK. Najpogosteje se uporabljajo tehnike PCR – DGGE, PCR – TTGE, SSCP – PCR in izdelava klonskih knjižnic (Cruz Pedrozo Miguel in sod., 2010; Jany in Barbier, 2008).

2.5.1 Gelska elektroforeza v kombinaciji z denaturacijskim gradientom (DGGE)

Gelska elektroforeza v kombinaciji z denaturacijskim gradientom je verjetno ena najuporabnejših tehnik pri določanju sestave in raznolikosti mikrobnih združb (Mohar Lorbeg in sod., 2009). Tehnika temelji na ločevanju delov 16S rDNK, pomnoženih v verižni reakciji s polimerazo (PCR), ki jih ločujemo v poliakrilamidnih gelih z linearno naraščajočo koncentracijo denaturantov. Pri metodi DGGE ločujemo enako velike pomnožke PCR, ki imajo različno zaporedje nukleotidov. Ločevanje enako dolgih pomnožkov je možno zaradi različnih denaturacijskih profilov. Pri potovanju odsekov DNK proti vedno višji koncentraciji denaturantov se vijačnica postopoma razklene in potovanje odsekov DNK se upočasni in na določenem mestu praktično ustavi. Točka, na kateri se odsek ustavi, se imenuje točka tališča (ang. melting point) in je odvisna od sestave baznih parov DNK in torej specifična za vsak odsek DNK (Ercolini, 2004; Muyzer in

sod., 1993). Pri ločevanju pomnožkov PCR z DGGE je smiselno uporabiti 40 bp dolge GC-čeljusti (ang. clamp), ki jih vgradimo v začetni 5' oligonukleotid in s tem preprečimo razpad dvoverižnih pomnožkov DNK (Ferris in sod., 1996), saj tako povečamo občutljivost metode. V mešani združbi mikroorganizmov lahko posamezno bakterijsko vrsto zaznamo z DGGE, če združba vsebuje vsaj 10^4 ke te vrste v enem gramu vzorca oz. če posamezna vrsta zastopa vsaj 1 % celotne mikrobne populacije vzorca (Mohar Lorbeg in sod., 2009).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Kemikalije

Preglednica 2: Kemikalije in komercialno dostopni kompleti.

Proizvajalec	Kemikalije in komercialno dostopni kompleti
Merck (Darmstadt, Nemčija)	MRS (De Man, Rogosa in Sharpe) bujon, malt extract bujon, agar, ringerjeve tablete za idelavo fiziološke raztopine, etanol, očetna kislina, natrijev hidroksid NaOH, kobaltov sulfat $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, fenoltalein, 50 mM EDTA (pH = 8,0), isopropanol
Kemika (Zagreb, Hrvaška)	Na – citrat (3-natrij-citrat-dihidrat), D(+) glukoza
Biolife (Milano, Italija)	Proteose peptone, kvasni ekstrakt
Promega (Madison, ZDA)	komplet za izoliranje DNA (Wizard genomic DNA purification kit: Cell Lysis Solution, Nuclei Lysis Solution, Protein Precipitation Solution, DNA Rehydration Solution, RNase A Solution), GoTaq TM DNA polimeraza, GoTaq TM fleksi pufer
Millipore (Billerica, Massachusetts)	Destilirana voda MILLI RO
Sigma – Aldrich (St. Luis, ZDA)	Lizocim (lysozyme from chicken egg white), mutanolizin (mutanolysin from streptomyces globisporus), litikaza (lyticase 20 mg/ml), poliakrilamidni gel, formamid, 7M urea
Boehringer (Manheim, Nemčija)	dNTP

3.1.2 Laboratorijska oprema in potrošni material

Preglednica 3: Laboratorijska oprema in potrošni material.

Proizvajalec	Laboratorijska oprema in potrošni material
Thermo scientific (Waltham, ZDA)	avtomatske pipete, nastavki za pipete
Hettich (Tuttlingen, Nemčija)	centrifuga Mikro 220 R
IKA (Žiri, Slovenija)	magnetno mešalo
Kambič (Semič, Slovenija)	parni sterilizator A – A 21V, inkubator za kulture mikroorganizmov
Mitsubishi gas chemical company (Tokyo, Japonska)	posoda za anaerobno gojenje mikroorganizmov
Mettler toledo (Zürich, Švica)	PH meter MP 220, tehnica P 1200
Tehnica (Železniki, Slovenija)	Vorteks – vibrator, vibromix 10
TPP (Trasadingen, Švica)	plastični laboratorijski material za delo z mikroorganizmi (centrifugirke, nastavki za avtomatske pipete za večje volumne, petrijeve plošče)
Različni proizvajalci	Steklene epruvete, stojalo za epruvete, merilni valji, plastične palčke za razmaz vzorca na gojišče, žličke, gorilnik, rokavice, mini plastične epruvetke za PCR
Brand (Wertheim, Nemčija)	Avtomatska pipeta za steklenico (pipetor)
Labo (Ljubljana, Slovenija)	EŠKO elektronski števec kolonijskih enot
Interscience (St. Nom, Francija)	Gnetilnik Bag Mixer R 400
Bio Rad (Hercules, Kalifornija ZDA)	MyCycler™ Thermal Cycler
Bio Rad (Hercules, Kalifornija ZDA)	DGGE sistem: D GENE™ system
Syngene	transiluminatorja: ChemiGenius ²

3.1.3 Gojišča

3.1.3.1 Gojišče MRS Merck (Darmstadt, Nemčija)

Za rast laktobacilov iz kefirnih zrn in kefirja smo uporabili neselektivno gojišče de Man, Rogosa in Sharpe – MRS (De Man in sod, 1960). Vzorce smo inkubirali v MRS gojišču, ki smo mu znižali pH na 5,2 v anaerobnih pogojih pri 30 °C. Anaerobne pogoje smo dosegli z inkubacijo vzorcev v posodi za anaerobno gojenje mikroorganizmov, zraven pa smo dodali

še poseben pripravek, ki nase veže kisik (GENbox anaer). Znižanje pH zavre rast bakterij *Streptococcus thermophilus*, ki bi sicer rastle pri teh pogojih, na laktobacile pa ne vpliva. Zato so na MRS gojišču rastli predvsem laktobacili (Curry in Crow, 2003).

3.1.3.2 Gojišče KDM

Za rast kvasovk iz kefirnih zrn in kefirja smo uporabili sestavljeno gojišče KDM - *Kluyveromyces differential medium* (Valderrama in sod., 1999).

Preglednica 4: Sestavljeno gojišče za rast kvasovk - KDM

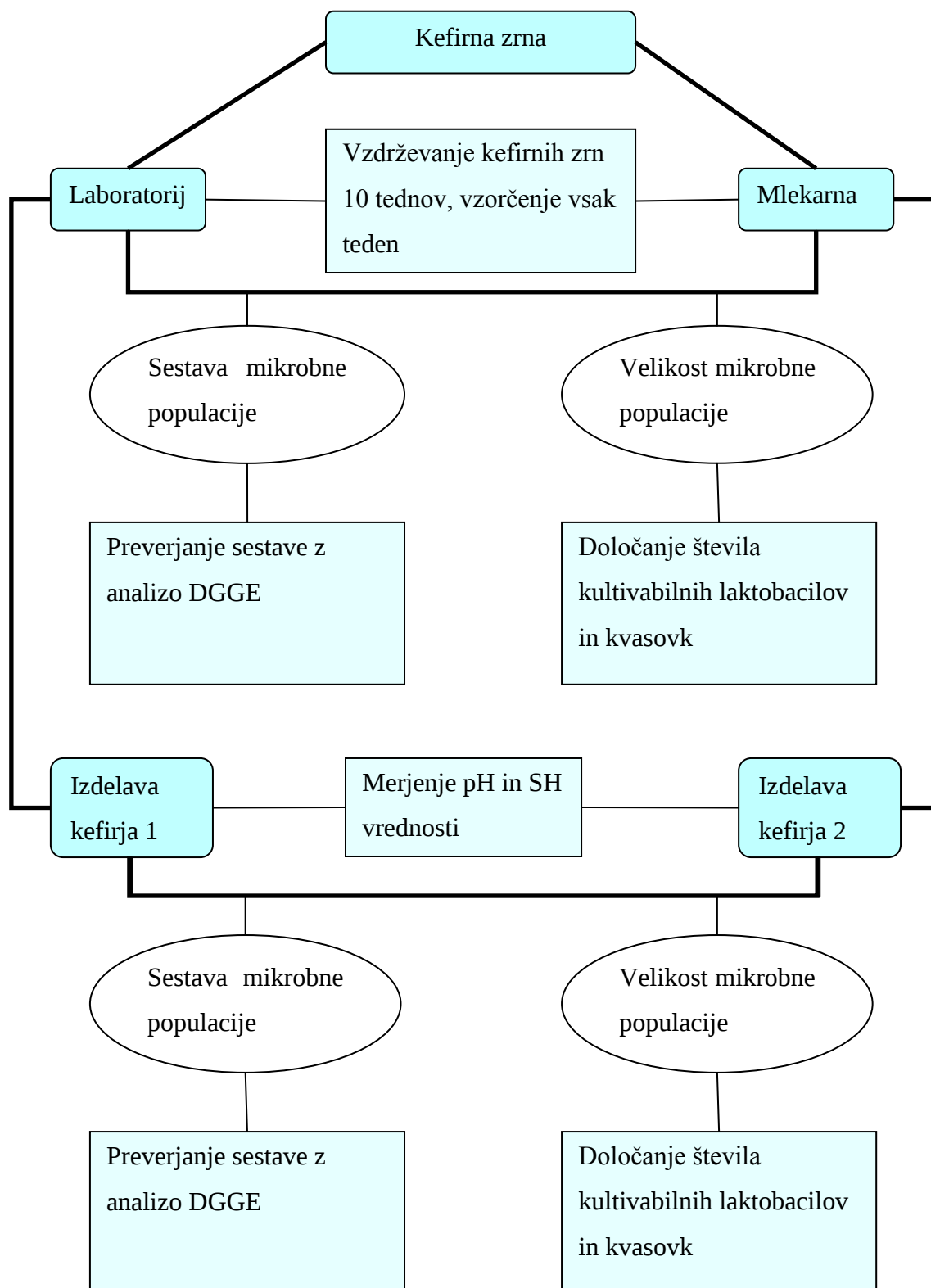
Sestavina	Koncentracija
Kvasni ekstrakt	5 g/l
Proteose peptone no. 3	3 g/l
Sladni ekstrakt	3 g/l
Glukoza	10 g/l
Agar	20 g/l

3.1.4 Kefirna zrna in mleko

Kefirna zrna smo dobili iz mlekarne Krepko, Kele & kele d.o.o., Laze 22a, 1370 Logatec. Mleko, iz katerega smo izdelovali kefir in v njem vzdrževali kefirna zrna, je bilo: bio mleko s 3,5 % mlečne maščobe iz mlekarne Krepko, Kele & kele d.o.o.

3.2 METODE

Na sliki 2 je prikazan načrt dela.



Slika 2: Načrt poskusa za ugotavljanje velikosti, stabilnosti in sestavo populacije laktobacilov in kvasovk v kefirnem zrnju in kefirju, ter aktivnost kefirnih zrn, vzdrževanih v dveh različnih okoljih.

Kefirna zrna, ki so jih po ustaljenem postopku vzdrževali v mlekarji, smo prejeli iz mlekarne vsak teden, in sicer 1 krat na teden, tako da smo imeli vsega skupaj 10 vzorcev.

3.2.1 Priprava gojišč, raztopine natrijevega citrata in fiziološke raztopine

3.2.1.1 Priprava trdnega gojišča MRS

Gojišče MRS smo pripravili tako, da smo natehtali 52,5 g gojišča v 1 liter destilirane vode. Zmes smo mešali na 500 obratov/min, dokler se raztopina ni zbistila. Da smo znižali pH raztopine na 5,2, smo počasi dodajali očetno kislino. Ker smo pri nacepljanju mikroorganizmov porabili manjšo količino gojišča, smo po 200 ml zmesi prelili v 250 ml steklenice z plastičnim pokrovom in v vsako dodali 3 g agarja. Vsebinsko smo premešali in jo avtoklavirali pri 118 °C, za 15 min. Po avtoklaviranju smo gojišče, razlili v petrijeve plošče. Uporabili smo aseptično tehniko razlivanja gojišča v petrijevke ob gorilniku. Če se je gojišče pred razlivanjem strdilo, smo ga raztopili v mikrovalni pečici. Petrijeve plošče smo pustili, da se je gojišče strdilo, višek petrijevk z gojiščem smo shranili v hladilniku, enak postopek razlivanja v petrijevke smo izvedli z gojiščem KDM.

3.2.1.2 Priprava trdnega gojišča KDM

KDM gojišče smo pripravili tako, da smo v 1 l destilirane vode natehtali 5 g kvasnega ekstrakta, 3 g proteose peptona, 3 g malt ekstrakta, 10 g glukoze. Zmes smo mešali (500 obratov/min) dokler se raztopina ni zbistila. Po 200 ml raztopine smo razlili v 250 ml steklenice z plastičnim pokrovom in dodali v vsako 3 g agarja. Vsebinsko smo premešali in avtoklavirali (15 min, 121 °C).

3.2.1.3 Priprava raztopine natrijevega citrata

Natrijev citrat smo dodali v destilirano vodo v koncentraciji 20 g/l, raztopini smo umerili pH na 7,5. Raztopino smo mešali (500 obratov/min), dokler se ni natrijev citrat raztopil. Za zniževanje pH smo uporabili očetno kislino, za višanje pa natrijev hidroksid. Raztopino natrijevega citrata smo polnili v 500-ml steklenice s plastičnim pokrovom in avtoklavirali (15 min, 121 °C).

3.2.1.4 Priprava fiziološke raztopine

Fiziološko raztopino smo pripravili po navodilu proizvajalca. V 500 ml destilirane vode smo dali 1 tableto za izdelavo ringerjeve raztopine. Vsebino smo premešali, razdelili po 9 ml v epruvete in avtoklavirali (15 min, 121 °C).

3.2.1.5 Vzdrževanje kefirnih zrn v laboratoriju in mlekarni

Zrna v laboratoriju smo vzdrževali v mleku pri temperaturi 23 °C, mleko smo zamenjali po 3 – 5 dneh. Zrna v mlekarni so vzdrževali po njihovem ustaljenem postopku v podobnih pogojih (menjava mleka na 24 – 36 ur pri 20 – 22 °C), ter jih dnevno uporabljali za izdelavo kefirja.

3.2.2 Določanje števila laktobacilov in kvasovk v vzorcih kefirnih zrn in kefirja

Na petrijeve plošče z razlitim ohlajenim gojiščem smo nacepljali homogenizate vzorcev kefirnih zrn in kefirja. Število smo določali kot št. ke/g.

3.2.2.1 Priprava vzorcev kefirnih zrn za mikrobiološke analize

V sterilno plastično vrečko za gnetilnik smo zatehtali 10 g kefirnih zrn in nato dolili 90 g raztopine natrijevega acetata (redčitev 10^{-1}). Vrečko smo zaprli in jo gnetli 180 sekund. Vrečko smo nato premešali in narahlo s prsti zmečkali večja zrna. Vsebino smo ponovno gnetli 180 sekund. Po gnetenju smo jo dali v inkubator na 30 °C za 15 min. Po inkubaciji smo jo še enkrat gnetli 180 sekund. Iz vrečke smo nato z avtomatsko pipeto z nastavkom s široko odprtino odpipetirali 1 ml vzorca in ga prenesli v epruveto z 9 ml sterilne fiziološke raztopine (redčitev 10^{-2}). Epruveto smo premešali na vorteksu. Iz epruvete smo odpipetirali 1 ml v naslednjo epruveto z 9 ml fiziološke raztopine (redčitev 10^{-3}). Epruveto smo zopet premešali na vorteksu. Postopek smo ponavljali, dokler nismo dobili redčitve 10^{-6} . Ves proces smo izvajali z aseptično tehniko ob gorilniku. Na gojišče smo nacepljali 100 µl vzorca. Nacepljali smo redčitve od 10^{-4} do 10^{-7} v dveh paralelkah. Po enakem postopku smo na gojišče MRS in KDM nacepljali vzorce kefirnih zrn, ki smo jih vzdrževali v laboratoriju in vzorce kefirnih zrn, ki so jih vzdrževali v mlekarni.

Petrijeve plošče z nacepljenimi vzorci na gojišču MRS smo prenesli v posodo za anaerobno gojenje mikroorganizmov, dodali GENbox anaer, posodo hermetično zaprli in jo dali v inkubator za 3 dni na 30 °C.

Nacepljene petrijeve plošče z gojiščem KDM smo inkubirali aerobno pri 23 °C, 4 dni.

3.2.2.2 Izdelava kefirja

S kefirnimi zrnji smo izdelovali kefir. Zatehtali smo 30 g kefirnih zrn v čašo in dolili 270 g mleka (bio mleko, iz mlekarne Krepko). Čašo smo pokrili z aluminijasto folijo in postavili v toplo komoro za 24 ur pri 23 °C. Po 24 urah smo odcedili kefirna zrna in kefirju izmerili pH ter SH. Kefir smo izdelovali z zrnji, ki smo jih vzdrževali v laboratoriju in zrnji, ki smo jih 1 krat na teden dobili iz mlekarne (zrna so vzdrževali po ustaljenem postopku v mlekarini). Zrna, ki smo jih vzdrževali v laboratoriju smo po odcejanju oprali pod tekočo vodo ter jih vrnili k ostalimi. Zrna iz mlekarne pa smo zavrgli. Ves postopek smo izvajali pri aseptičnih pogojih.

3.2.2.3 Priprava vzorcev kefirja za mikrobiološke analize

V 200 ml steklenice z plastičnim pokrovom smo zatehtali 10 g kefirja. Dodali smo 90 g raztopine natrijevega citrata in premešali. Naredili smo redčitve tako kot pri nacepljanju kefirnih zrn. Redčitve kefirja od 10^{-3} do 10^{-7} smo cepili na gojišče KDM in MRS v dveh paralelkah. Inkubirali smo jih kot pri zrnih, MRS anaerobno 3 dni na 30 °C in KDM aerobno pri 23 °C za 4 dni.

Po inkubaciji vzorcev smo prešteli izrasle kolonije. Plošče so bile številne, če je na njih zraslo od 30 do 300 kolonij. Kolonije smo šteli s pomočjo elektronskega števca kolonijskih enot (EŠKO). Število smo pomnožili z razredčitvijo posameznega vzorca in iz dveh paralelk izračunali povprečno koncentracijo kultivabilnih celic (ke/g).

Število kolonijskih enot (ke) v g kefirnih zrn in kefirja smo izračunali po sledeči formuli (Jeršek, 2013):

$$N = \frac{\Sigma C}{(n_1 + 0,1 \times n_2) \times R} \quad \dots(1)$$

Legenda:

N.....število kolonijskih enot v vzorcu (ke/g),

 ΣCvsota vseh kolonij na števnihi ploščah, n_1število plošč prve razredčitve, n_2število plošč druge razredčitve,

R.....prva razredčitev vzorca, pri kateri smo prešteli kolonije.

3.2.3 Merjenje pH vrednosti in SH izdelanega kefirja

Merjenje vrednosti pH smo izvajali s pH metrom (Mettler MP 220). Najprej smo umerili pH meter s pufri po navodilih proizvajalca, nato pa smo ob mešanju vzorca merili pH.

Kislinsko stopnjo kefirja (SH) smo določali po Soxhlet-Henklovi metodi (Anonymous, 1963), ki označuje število porabljenih mililitrov raztopine natrijevega hidroksida c (NaOH) = 0,25 mol/l, potrebnih za nevtralizacijo 100 ml kefirja ob dodatku indikatorja fenolftaleina. Za določanje kislinske stopnje kefirja v SH smo uporabili Morresovo modifikacijo, s čimer je mišljena uporaba decimolske raztopine natrijevega hidroksida c (NaOH) = 0,1 mol/l za nevtralizacijo 100 ml kefirja. V erlenmajerico smo odpipetirali 20 ml kefirja in dodali 1 ml raztopine fenolftaleina. Vsebinsko smo titrirali z decimolsko raztopino natrijevega hidroksida, dokler ni postal svetlo rožnate barve, ki smo jo primerjali s standardno barvo, pripravljeno v drugi erlenmajerici. Standardno barvo smo pripravili tako, da smo v drugo erlenmajerico odpipetirali 20 ml istega vzorca kefirja in dodali 0,1 ml raztopine kobaltovega sulfata.

Izračun

Kislinska stopnja,

$$(SH) = a \cdot F \cdot 2 \quad \dots(2)$$

kjer je:

a – število mililitrov decimolske raztopine natrijevega hidroksida, porabljenih za nevtralizacijo 20 ml mleka;

F – faktor raztopine natrijevega hidroksida s koncentracijo $c(\text{NaOH}) = 0,1 \text{ mol/l}$.

3.2.4 Osamitev DNK za izvedbo reakcije PCR in analizo DGGE

Ker je težko pridobiti kakovostno DNK direktno iz kefirnih zrn in ker je število celic določenih laktobacilov lahko manjše od meje zaznave metode PCR – DGGE, ki je od 10^7 do 10^8 ke/g (Vardjan in sod., 2013), smo uporabili kombinacijo nacepljanja vzorcev na gojišča ter osamitev genomske DNK iz spirkov kolonij (konzorciji), izraslih na hranljivih gojiščih MRS in KDM. Skupno mikrobno DNK smo izolirali s komercialnim kitom Wizard Genomic DNA Purification Kit.

3.2.4.1 Postopek osamitve DNK bakterij iz spirkov kolonij, izraslih na gojišču MRS

- Na kolonije smo odpipetirali 2 ml fiziološke raztopine, z pipeto smo nežno splakovali kolonije na gojišču, dokler nismo sprali vseh kolonij. Če so bile kolonije zelo čvrste, smo si pomagali s palčkami za razmaz vzorca.
- Vzeli smo 1 ml vzorca (splaknjene kolonije z fiziološko raztopino) in ga dali v sterilne mikroepruvete. Suspenzije kolonij smo pripravili v laminarju pod aseptičnimi pogoji.
- Pripravljene suspenzije kolonij smo nato centrifugirali 2 minuti pri 16000 g.
- Supernatant smo zavrgli, v usedlino pa dodali 600 μ l 50 mM EDTA z dodatkom 6 mg lizocima in 6 μ l raztopine mutanolizina (2500 U/ml).
- Vzorce smo previdno premešali in inkubirali pri 37 °C za 90 minut, da so encimi razgradili celično steno. V času inkubacije smo vzorce 1 – 2 krat previdno premešali.
- Po inkubaciji smo vzorce ponovno centrifugirali 2 minuti pri 16000 g in po centrifugiranju odstranili supernatant.
- Usedlini smo dodali 500 μ l raztopine za liziranje celic (Nuclei Lysis Solution) in vzorce nežno premešali s pipeto.
- Tako pripravljene vzorce smo inkubirali 5 min pri 80 °C in jih nato ohladili na sobno temperaturo.
- Dodali smo 200 μ l raztopine za obarjanje proteinov (Protein Precipitation Solution), dobro premešali na stresalniku (Vortex) in pustili 10 minut na ledu.
- Oborjene proteine smo odstranili s centrifugiranjem 3 minute pri 16000 g.

- Supernatant smo previdno odlili v novo mikroepruveto, v katero smo predhodno dali 600 µl izopropanola in nežno premešali.
- Mikroepruvete smo centrifugirali 2 minuti pri 16000 g in previdno odlili supernatant. Usedlini smo dodali 600 µl 70 % etanola, premešali, centrifugirali 2 minuti pri 16000 g in zopet odlili supernatant.
- Mikroepruvete smo pustili odprte pri 37 °C za 15 minut, da je izhlapel etanol in nato dodali 100 µl rehidracijske raztopine (DNA Rehydration Solution) ter 3 µl RNA-ze (RNase Solution).
- Izolirano DNA smo pustili rehidrirati v hladilniku preko noči in jo nato shranili v zamrzovalnik pri -20 °C.

3.2.4.2 Postopek osamitve DNK kvasovk iz spirkov kolonij, izraslih na gojišču KDM

- Izolacija DNA iz kvasovk izraslih na gojišču KDM je potekala po postopku opisanem v točki 3.2.4.1, le da smo za razgradnjo celične stene namesto lizocima in mutanolizina uporabili encim litikazo (v 600 µl 50 mM EDTA smo dodali 7,5 µl raztopine litikaze (20 mg/ml)).
- Usedlini smo namesto 500 µl dodali 300 µl raztopine za liziranje celic (Nuclei Lysis Solution),
- Vzorcev nismo inkubirali 5 min pri 80 °C ampak smo jim takoj dodali 100 µl raztopine za precipitacijo proteinov (Protein Precipitation Solution) ter jih hladili v zamrzovalni skrinji na ledu za 10 minut.
- Nato je postopek potekal kot je opisano v točki 3.2.4.1, le da smo uporabili manjše količine reagentov in sicer: 300 µl izopropanola, 300 µl 70 % etanola, 50 µl rehidracijske raztopine (DNA Rehydration Solution) in 1,5 µl RNA-ze (RNase Solution).

3.2.5 Pomnoževanje DNK z reakcijo PCR

Princip same reakcije PCR je *in vitro* pomnožitev dela tarčne DNK z DNK polimerazo v cikličnem termostatu (Jeršek, 2009).

3.2.5.1 Pomnoževanje DNK laktobacilov z reakcijo PCR

Bakterijsko DNK smo pomnožili z univerzalnima začetnima oligonukleotidoma HDA1 – GC (5' - CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GG GGC ACG GGG GGA CTC CTA CGG GAG GCA GCA GT - 3'; GC čeljust je podčrtana) in HDA2 (5' - GTA TTA CCG CGG CTG CTG GCAC - 3'), ki zajemata regijo V2 - V3 16S rDNK (Walter in sod., 2000). PCR pomnoževanje tarčnega dela DNK smo izvedli v 200 µl mikrocentrifugirkah v cikličnem termostatu MyCycler™ Thermal Cycler.

Za pomnoževanje tarčnega dela bakterijske DNK, ki smo jo izolirali iz kolonij izraslih na gojišču MRS je mešanica za PCR (50µl) vsebovala:

- 2 µl izolirane DNK,
- brezbarvni pufer GoTaq® Flexi (1 x),
- 2,5 mM MgCl₂,
- 0,5 µM začetnega oligonukleotida HDA1 – GC,
- 0,5 µM začetnega oligonukleotida HDA2,
- 0,1 mM dNTP,
- 0,025 U/µl GoTaq® DNK polimeraze.

Program za pomnoževanje je bil naslednji: začetna denaturacija DNK pri 95 °C 3 minute, sledilo je 40 ciklov sestavljenih iz 30 s denaturacije DNK pri 95 °C, 30 s prileganja začetnih oligonukleotidov pri 58 °C in 40 s podaljševanja verige DNK pri 72 °C, zaključno podaljševanje verige DNK pa je potekalo 5 minut pri 72 °C. Pomnožke PCR smo do analize DGGE hranili pri temperaturi 4 °C.

3.2.5.2 Pomnoževanje DNK kvasovk z reakcijo PCR

DNK kvasovk smo pomnožili z začetnima oligonukleotidoma NL1 (5' - CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCC ATA TCA ATA AGC GGA GGA AAAG-3'; GC čeljust je podčrtana) in LS2 (5' -ATT CCC AAA CAA CTC GAC TC - 3'), ki zajemata regijo D1 od 26S rRNK genov (Cocolin in sod., 2002).

Za pomnoževanje tarčnega dela DNK kvasovk smo v 50 µl mešanice za PCR dodali:

- 2 µl izolirane DNK,
- brezbarvni pufra GoTaq[®] Flexi (1 x),
- 0,5 µM začetnega oligonukleotida NL1,
- 0,5 µM začetnega oligonukleotida LS2,
- 0,1 mM dNTP,
- 0,025 U/µl GoTaq[™] DNK polimeraze.

Program za pomnoževanje je bil naslednji: po 3 minutni začetni denaturaciji DNK pri 95 °C, je sledilo 30 ciklov sestavljenih iz 1 min denaturacije DNK pri 95 °C, 45 s prileganja začetnih oligonukleotidov pri 52 °C in 1 min podaljševanja verige DNK pri 72 °C na koncu pa je sledilo 5 min zaključno podaljševanje verige DNK pri 72 °C (Cocolin in sod., 2002). Pomnožke PCR smo do analize DGGE hranili pri temperaturi 4 °C.

3.2.6 Izvedba analize DGGE

Pomnožke DNK laktobacilov in kvasovk, ki smo jih dobili v reakciji PCR, smo ločevali z analizo DGGE, ki smo jo izvedli s sistemom za DGGE (D GENE system). Pomnožke DNK (25 µl) smo ločevali na 8 % (vol/vol) poliakrilamidnem gelu (razmerje med akrilamidom in bisakrilamidom je bilo 37:1) velikosti 16 cm x 16 cm x 1 mm v 1x pufru TAE, z denuracijskim gradientom od 30 % do 70 % za ločevanje pomnožkov z začetnima oligonukleotidoma HDA1-GC/HDA2 in 30 % do 60 % za ločevanje pomnožkov z začetnima oligonukleotidoma NL1/LS2 (100 % ustreza 7 M urei in 40 % (vol/vol) formamida). Na začetek, sredino in konec gela smo nanесли označevalec, ki je bil sestavljen iz pomnožkov bakterijskih sevov *B. animalis* subsp. *animalis* LMG 10508, *B. bifidum* LMG 11041, *E. faecalis* LMG 7937T, *Lb. plantarum* NCDO 1193, *Lb. rhamnosus* GG,

Bacillus cereus IM 199 in *Bacteroides thetaiotaomicron* DSM 2079. Elektroforezo smo izvajali 16 ur pri stalni napetosti 75 V pri 60 °C. Po končani elektorforezi smo gele obarvali v raztopini barvila SYBR[®] Safe DNA Gel Stain. Po barvanju smo gele sprali v deionizirani vodi Mili Q in jih fotografirali s pomočjo UV transiluminatorja ter analizirali z programskim paketom BioNumerics.

DGGE analizo so opravili na Katedri za mikrobiologijo in mikrobn biotehnologijo, Oddelka za zootehniko, Biotehniške fakultete.

3.3 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

Pri statistični analizi smo najprej preverili, če so podatki normalno porazdeljeni. Izvedli smo Shapiro – Wilkov (SW) test. Če je bila po izračunu P_{SW} vrednost SW testa večja od stopnje značilnosti $\alpha = 0,01$, smo sprejeli ničelno hipotezo, kar je pomenilo da so podatki normalno porazdeljeni. Za statistično analizo rezultatov števila laktobacilov in števila kvasovk smo uporabili Studentov t-test. S programom Microsoft excel smo primerjali število laktobacilov in kvasovk (v log (ke/g)) v gramu kefirnega zrna, vzdrževanega v mlekarji in v laboratoriju ter v gramu kefirja, narejenega s kefirnimi zrnji, vzdrževanimi v mlekarji ali laboratoriju.

4 REZULTATI

4.1 VELIKOST POPULACIJ LAKTOBACILOV IN KVASOVK V KEFIRNIH ZRNIH

Rezultati spremljanja velikosti mikrobnih populacij laktobacilov in kvasovk v kefirnih zrnih med 10-tedenskim vzdrževanjem v mlekarini in laboratoriju so prikazani, skupaj z osnovnimi statističnimi podatki, v preglednici 5.

Z Shapiro – Wilkovim (SW) testom za normalno porazdelitev smo pri vseh vzorcih sprejeli ničelno hipotezo, da so podatki normalno porazdeljeni (pri vseh vzorcih $P_{SW} > \alpha = 0,01$).

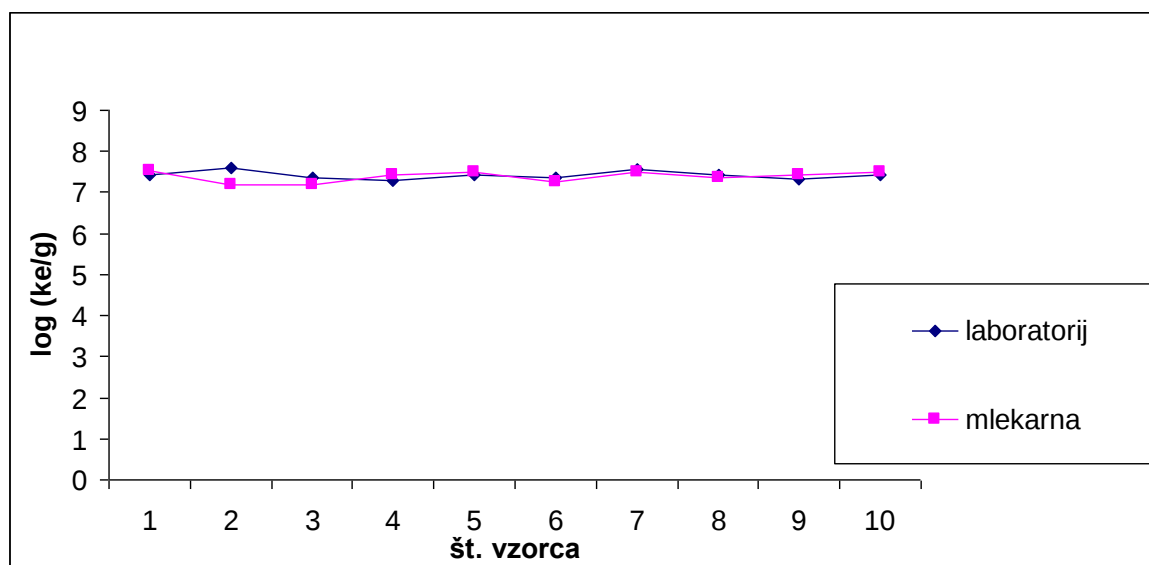
Velikosti mikrobnih populacij v kefirnih zrnih, vzdrževanih v mlekarini in laboratoriju smo primerjali s studentovim t testom. Postavili smo ničelno hipotezo, da se povprečni velikosti mikrobnih populacij v kefirnem zrnu, vzdrževanem v mlekarini in laboratoriju, statistično značilno ne razlikujeta. Po izračunu p vrednosti s studentovim t testom smo pri primerjavi vzorcev iz mlekarne in laboratorija sprejeli ničelno hipotezo, saj je bila p vrednost višja od stopnje značilnosti $\alpha = 0,05$.

Preglednica 5: Število laktobacilov in kvasovk (v ke/g) v kefirnih zrnih vzdrževanih v laboratoriju in mlekarini.

KEFIRNA ZRNA				
VZORČENJE (teden)	št. laktobacilov ($\times 10^5$ ke/g)		št. kvasovk ($\times 10^5$ ke/g)	
	laboratorij	mlekarna	laboratorij	mlekarna
1	258,7	344	45	162,5
2	400	156,5	159	262,5
3	228	154	137,5	98,5
4	195	273	138,5	137
5	265,3	320,8	237	241,5
6	227	178	383	211
7	355,5	301,3	272	312
8	272,3	232,5	249,5	375
9	217	272,8	159,5	220
10	267,5	311,3	163	213
MINIMUM	195	154	45	98,5
MAKSIMUM	400	344	383	375
POVPREČJE	268,63	254,42	194,4	223,3
STDEV	63,60	70,35	93,44	81,47
t TEST (vrednost p)	0,64	0,64	0,47	0,47
P _{SW}	0,11	0,27	0,52	0,95

4.1.1 Število laktobacilov v vzorcih kefirnih zrn, vzdrževanih v laboratoriju in mlekarini

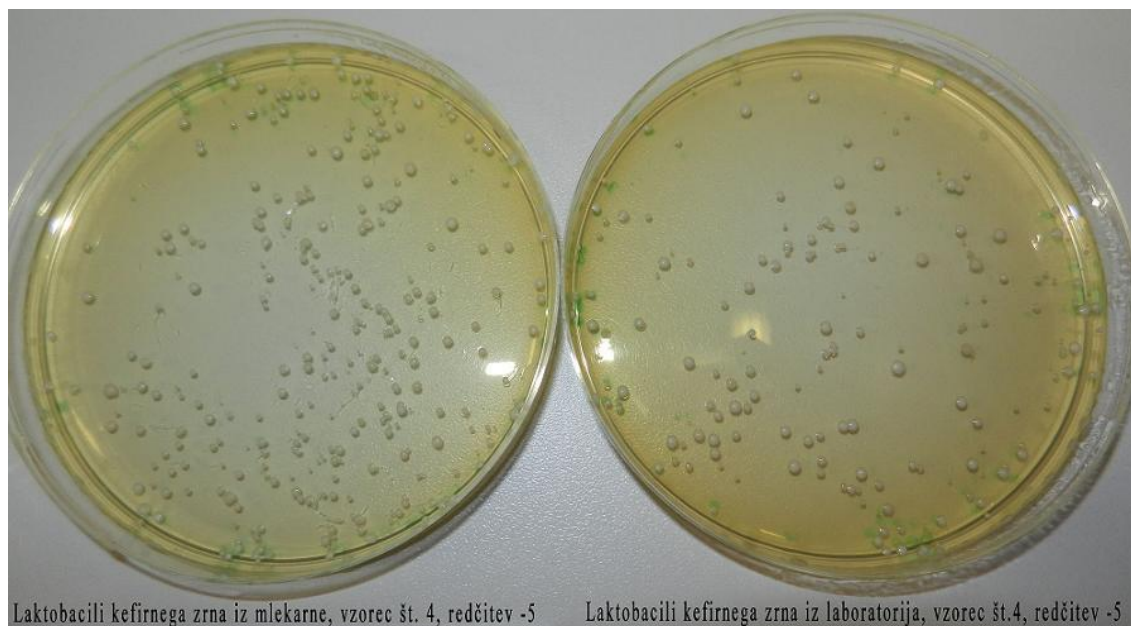
Slika 3 predstavlja spreminjanje velikosti populacije laktobacilov v vzorcih kefirnih zrn med 10-tedenskim vzdrževanjem v laboratoriju in v mlekarini. S slike je razvidno, da je bila velikost mikrobne populacije laktobacilov med vzdrževanjem zelo konstantna, ne glede na mesto vzdrževanja, poleg tega pa se povprečni vrednosti števila laktobacilov v zrnu, vzdrževanem v laboratoriju ($2,68 \times 10^7$ ke/g) in mlekarini ($2,54 \times 10^7$ ke/g) zelo malo razlikujeta, kar je pokazala tudi statistična analiza, s katero smo potrdili, da se velikosti mikrobnih populacij laktobacilov v kefirnih zrnih, vzdrževanih v mlekarini in laboratoriju statistično značilno ne razlikujeta ($p = 0,64$).



Slika 3: Število laktobacilov (v log (ke/g)) v vzorcih kefirnih zrn, vzdrževanih v laboratoriju in mlekarhi.

V gramu kefirnih zrn, ki smo jih vzdrževali v laboratoriju, se je število laktobacilov gibalo od 7,29 log (ke/g) (vzorec št. 4) do 7,6 log (ke/g) (vzorec št. 2), v gramu kefirnih zrn, vzdrževanih v mlekarhi pa od 7,18 log (ke/g) (vzorec št. 3) do 7,54 log (ke/g) (vzorec št. 1). Posamezna manjša odstopanja lahko delno pripišemo nehomogenosti kefirnih zrn oziroma vzorčenju in pripravi vzorca. Če primerjamo število laktobacilov v kefirnih zrnih laboratorija in mlekarne, se najbolj razlikuje pri prvih 3 vzorčenjih. Največja razlika je pri vzorčenju št. 2, kjer je število laktobacilov v kefirnih zrnih vzdrževanih v laboratoriju, večje za 0,41 log (ke/g).

Slika 4 predstavlja izrasle kolonije laktobacilov kefirnih zrn vzorca št. 4 iz mlekarne in laboratorija na gojišču MRS, pri redčitvi vzorca 10^{-5} .

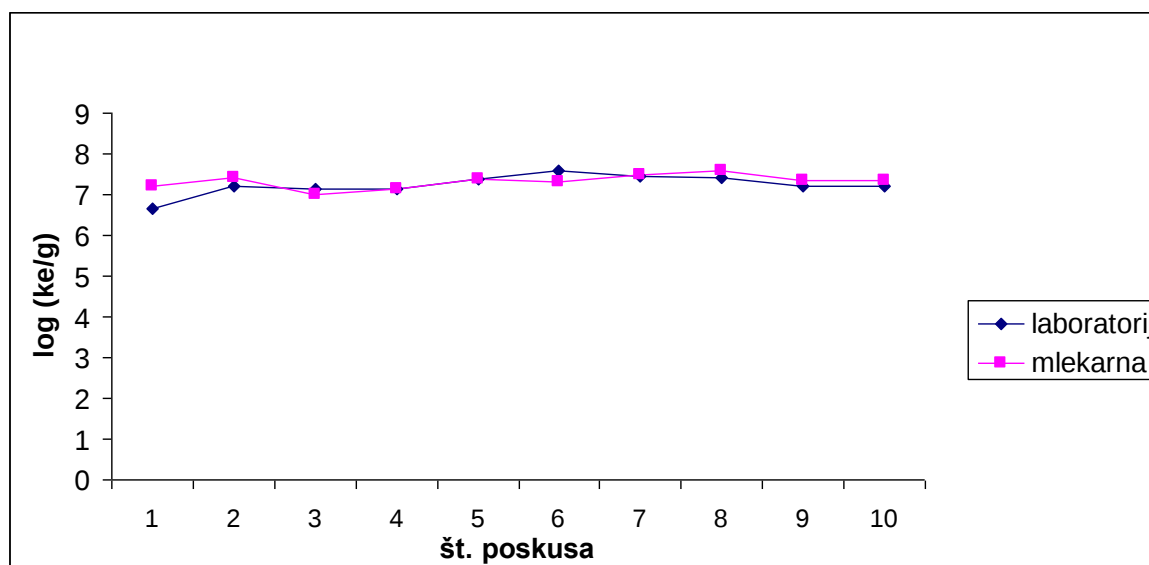


Slika 4: Kolonije laktobacilov kefirnega zrna iz mlekarne (levo) in laboratorija (desno).

Izrasle kolonije laktobacilov na gojišču MRS so bile majhne, okrogle, svetleče in bež barve. Morfološko se kolonije laktobacilov, izrasle iz vzorcev kefirnih zrn vzdrževanih v mlekarni ali laboratoriju niso razlikovale.

4.1.2 Število kvasovk v vzorcih kefirnih zrn, vzdrževanih v laboratoriju in mlekarni

Slika 5 predstavlja gibanje populacije kvasovk v vzorcih kefirnih zrn med 10-tedenskim vzdrževanjem v laboratoriju in v mlekarni.

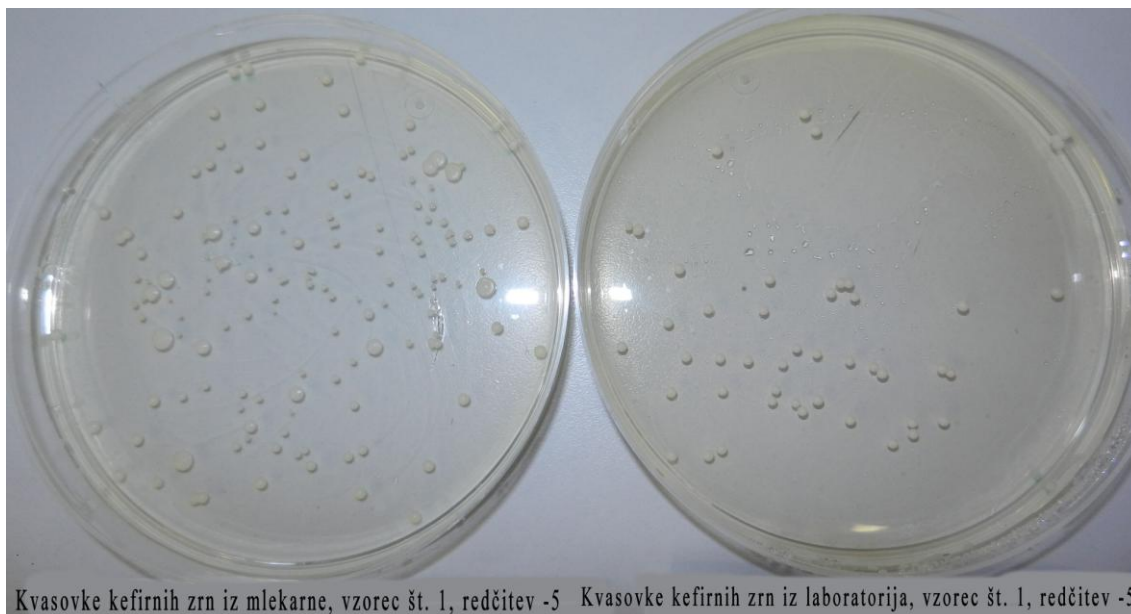


Slika 5: Število kvasovk (v log (ke/g)) v vzorcih kefirnih zrn, vzdrževanih v laboratoriju in mlekarhi.

Tudi število kvasovk v kefirnih zrnih je bilo stabilno, ne glede na mesto vzdrževanja, vendar manj kot število laktobacilov. Število kvasovk se je v kefirnih zrnih vzdrževanih v laboratoriju gibalo od 6,65 log (ke/g) (vzorec št. 1) do 7,58 log (ke/g) (vzorec št. 6), v zrnih vzdrževanih v mlekarhi pa od 6,99 log (ke/g) (vzorec št. 3) do 7,57 log (ke/g) (vzorec št. 8), s povprečno vrednostjo $1,94 \times 10^7$ ke/g v zrnu vzdrževanem v laboratoriju in $2,23 \times 10^7$ ke/g v zrnu vzdrževanem v mlekarhi (Preglednica 5). S statistično analizo smo potrdili, da se povprečni velikosti mikrobnih populacij kvasovk v kefirnem zrnu, vzdrževanem v mlekarhi in laboratoriju statistično značilno ne razlikujeta ($p = 0,47$).

Manjša nihanja v številu izraslih kolonij kvasovk so tudi v tem primeru lahko posledica nehomogenosti zrn ali pa njihove priprave za nacepljanje na gojišča, saj je zrna zelo težko popolnoma homogenizirati, ne da bi pri tem prišlo do poškodb celic. Do največje razlike v številu kvasovk v gramu kefirnih zrn vzdrževanih v laboratoriju in v mlekarhi je prišlo pri prvem vzorčenju kjer je bilo število kvasovk v zrnih, vzdrževanih v mlekarhi, višje za 0,56 log (ke/g). Zanimivo je, da je bilo v zrnih vzdrževanih v mlekarhi, v primerjavi z zrnih vzdrževanimi v laboratoriju, nekoliko nižje povprečno število laktobacilov, povprečno število kvasovk pa višje.

Slika 6 predstavlja izrasle kolonije kvasovk kefirnih zrn vzorca št. 1 iz mlekarne in laboratorija na gojišču KDM, pri redčitvi vzorca 10^{-5} .



Slika 6: Kolonije kvasovk kefirnega zrna iz mlekarne (levo) in laboratorija (desno).

S slike 6 je razvidno da so bile izrasle kolonije kvasovk na gojišču KDM majhne, okrogle, svetleče, bež barve. Morfološko se kolonije kvasovk, izrasle iz vzorcev kefirnih zrn vzdrževanih v mlekarini in laboratoriju niso razlikovale. Opazi pa se razlika v številu izraslih kolonij, ki je bilo v zrnih vzdrževanih v mlekarini za 0,56 log ke/g višje kot v zrnih vzdrževanih v laboratoriju.

4.2 VELIKOST POPULACIJ LAKTOBACILOV IN KVASOVK V KEFIRJU

Velikost populacij laktobacilov in kvasovk smo spremljali tudi v kefirju, narejenem po klasičnem postopku s kefirnimi zrnji, vzdrževanimi v laboratoriju oz. mlekarini. Število izraslih celic (v ke/g), največja, najmanjša in povprečna vrednost, standardna deviacija, izračun P_{SW} Shapiro – Wilkovega testa ter izračun studentovega t testa s programom Microsoft excel, so prikazani v preglednici 6. Z Shapiro – Wilkovim (SW) testom za normalno porazdelitev smo pri vseh vzorcih sprejeli ničelno hipotezo, ker je pri vseh vzorcih $P_{SW} > \alpha = 0,01$, iz tega sledi, da so podatki normalno porazdeljeni. Velikosti mikrobnih populacij v kefirju, narejenem s kefirnimi zrnji, vzdrževanimi v mlekarini in

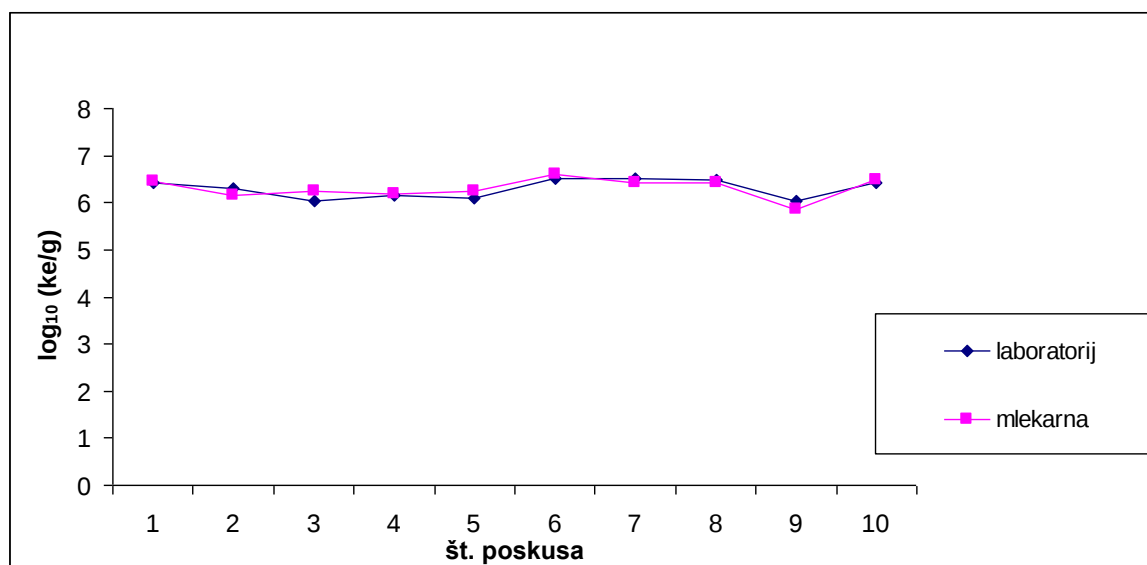
laboratoriju, smo primerjali s studentovim t testom. Postavili smo ničelno hipotezo, da se povprečni velikosti mikrobnih populacij v kefirju, narejenim s kefirnimi zrni vzdrževanimi v mlekarji in laboratoriju, statistično značilno ne razlikujeta. Po izračunu p vrednosti s studentovim t testom smo pri primerjavi vzorcev kefirja iz mlekarne in laboratorija sprejeli ničelno hipotezo, saj je bila p vrednost višja od stopnje značilnosti $\alpha = 0,05$.

Preglednica 6: Število laktobacilov in kvasovk (v ke/g) v kefirju, narejenim s kefirnimi zrni vzdrževanimi v laboratoriju in mlekarji

KEFIR				
VZORČENJE (teden)	št. laktobacilov ($\times 10^4$ ke/g)		št. kvasovk ($\times 10^4$ ke/g)	
	laboratorij	mlekarja	laboratorij	mlekarja
1	264,5	277,5	171,5	143,5
2	206,5	146	181	141,5
3	110,5	180	67,5	41,5
4	145	156	51,5	47
5	123	181,5	63,5	110,5
6	332,5	390	49,5	201,5
7	320,3	268,3	77	114
8	314,8	264,5	36,5	146,5
9	112,5	72,5	47	104,5
10	267,5	311,3	126,5	283
MINIMUM	110,5	72,5	36,5	41,5
MAKSIMUM	332,5	390	181	283
POVPREČJE	219,71	224,76	87,15	133,35
STDEV	91,11	93,71	53,11	70,71
t TEST (vrednost p)	0,90	0,90	0,12	0,12
P_{SW}	0,09	0,86	0,03	0,4

4.2.1 Število laktobacilov v vzorcih kefirja, narejenega s kefirnimi zrni, vzdrževanimi v laboratoriju in mlekarji

Slika 7 predstavlja gibanje populacije laktobacilov v vzorcih kefirja, narejenega s kefirnimi zrni, ki so bila vzdrževana v laboratoriju in v mlekarji.

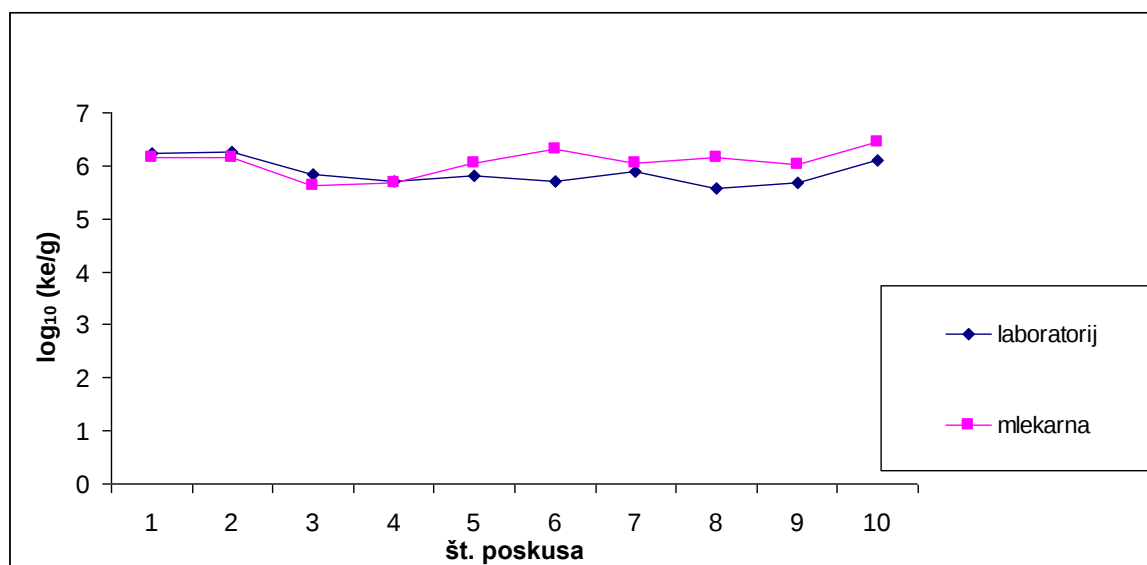


Slika 7: Število laktobacilov (v log (ke/g)) v vzorcih kefirja, narejenega s kefirnimi zrnji, vzdrževanimi v laboratoriju in mlekarji.

Število laktobacilov v vzorcih kefirja, narejenega s kefirnimi zrnji, ki so bila vzdrževana v laboratoriju in mlekarji, je bilo med 10 tedenskim opazovanjem podobno stabilno, kot v samih kefirnih zrnjih. Nekoliko večja nihanja smo opazili pri kefirju, izdelanem z zrnji iz mlekarne. V kefirju, izdelanem s kefirnimi zrnji iz laboratorija, se je število laktobacilov gibalo od $1,1 \times 10^6$ ke/g (vzorec št. 3) pa do $3,3 \times 10^6$ ke/g (vzorec št. 6), v kefirju izdelanem s kefirnimi zrnji iz mlekarne pa od $0,7 \times 10^6$ ke/g (vzorec št. 9) do $3,9 \times 10^6$ ke/g (vzorec št. 6). Tudi tukaj se povprečni velikosti mikrobnih populacij laktobacilov kefirja, narejega s kefirnimi zrnji vzdrževanimi v mlekarji in laboratoriju, statistično značilno ne razlikujeta ($p = 0,9$).

4.2.2 Število kvasovk v vzorcih kefirja narejenega s kefirnimi zrnji vzdrževanimi v laboratoriju in mlekarji

Slika 8 predstavlja gibanje populacije kvasovk v vzorcih kefirja, narejenega s kefirnimi zrnji, ki so bila vzdrževana v laboratoriju in v mlekarji.



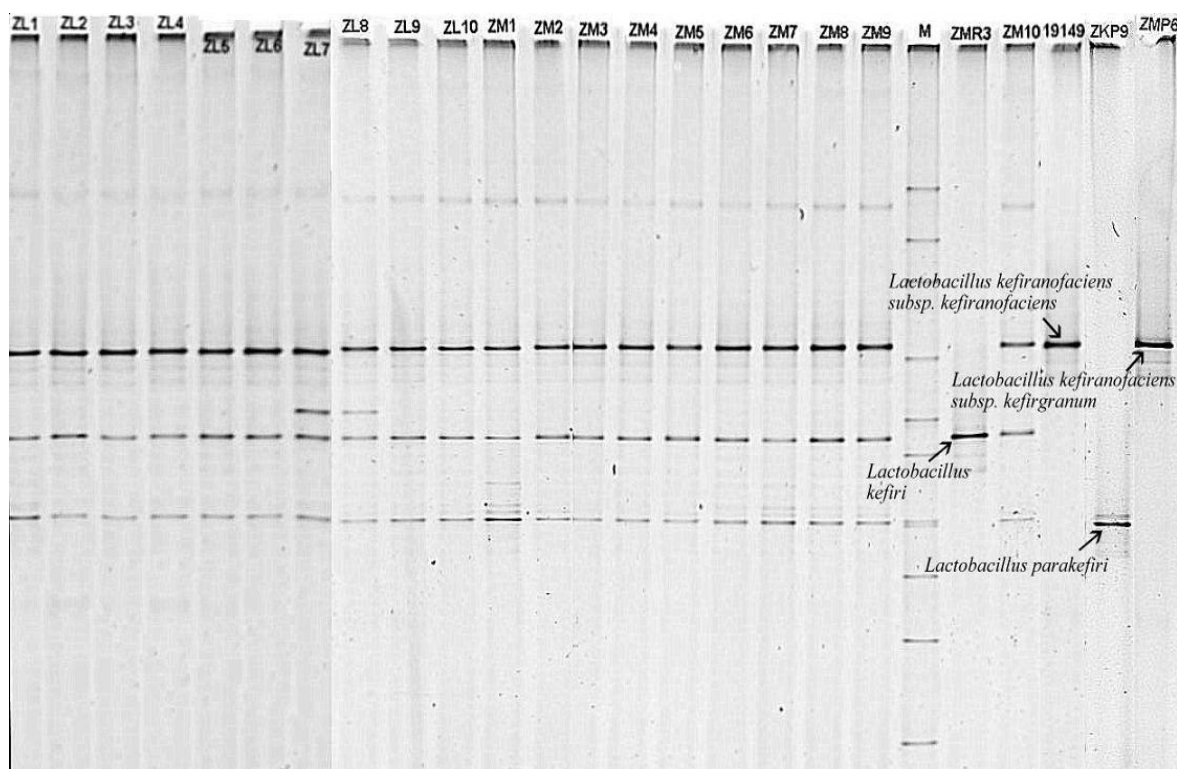
Slika 8: Število kvasovk (v log (ke/g)) v vzorcih kefirja, narejenega s kefirnimi zrnji vzdrževanimi v laboratoriju in mlekarini.

Število kvasovk v vzorcih kefirja, narejenega s kefirnimi zrnji, vzdrževanimi v laboratoriju in mlekarini, je bilo med 10 tedenskim opazovanjem nekoliko manj stabilno, pokazale pa so se tudi nekoliko večje razlike med kefirjem izdelanim iz zrna vzdrževanega v laboratoriju in mlekarini, saj je bilo povprečno število kvasovk v kefirju izdelanem z zrnjem vzdrževanem v laboratoriju $0,9 \times 10^6$ ke/ml, z zrnjem vzdrževanem v mlekarini pa $1,3 \times 10^6$ ke/ml. Število kvasovk v kefirju, izdelanem s kefirnimi zrnji iz laboratorija se je gibalo od 5,56 log (ke/g) (vzorec št. 8) pa do 6,26 log (ke/g) (vzorec št. 2), medtem ko se je število kvasovk v vzorcih kefirja, izdelanem s kefirnimi zrnji, vzdrževanimi v mlekarini gibalo od 5,62 log (ke/g) (vzorec št. 3) pa do 6,45 log (ke/g) (vzorec št. 10). S slike 8 vidimo, da je število kvasovk kefirja, narejenega s kefirnimi zrnji vzdrževanimi v mlekarini, od 4 vzorca naprej višje kot pri kefirju narejenem iz kefirnih zrn vzdrževanih v laboratoriju. Do največje razlike v številu kvasovk je prišlo pri vzorčenju št. 6, kjer je bilo število kvasovk v kefirju iz kefirnih zrn vzdrževanih v mlekarini večje od števila kvasovk v kefirju iz kefirnih zrn vzdrževanih v laboratoriju za 0,61 log (ke/g). Povprečni velikosti mikrobnih populacij kvasovk kefirja narejega s kefirnimi zrnji vzdrževanimi v mlekarini in laboratoriju, se statistično značilno ne razlikujeta ($p = 0,12$).

4.3 ANALIZA SESTAVE POPULACIJ LAKTOBACILOV IN KVASOVK V KEFIRNIH ZRNJIH IN KEFIRJU Z METODO DGGE

4.3.1 Rezultati analize DGGE prevladujočih laktobacilov v kefirnih zrnih, vzdrževanih v laboratoriju in mlekarji

Analizirali smo DNK laktobacilov, ki smo jo osamili iz konzorcijev (spirkov) laktobacilov desetih vzorcev kefirnih zrn, vzdrževanih v laboratoriju oz. v mlekarji. Osamljeno DNK smo pomnožili z začetnima oligonukleotidoma HDA1 – GC (5' - CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GG GGC ACG GGG GGA CTC CTA CGG GAG GCA GCA GT - 3'; GC čeljust je podčrtana) in HDA2 (5' - GTA TTA CCG CGG CTG CTG GCAC - 3'), ki zajemata regijo V2 - V3 16S rDNK in dobljene pomnožke ločili s pomočjo DGGE (Slika 9).

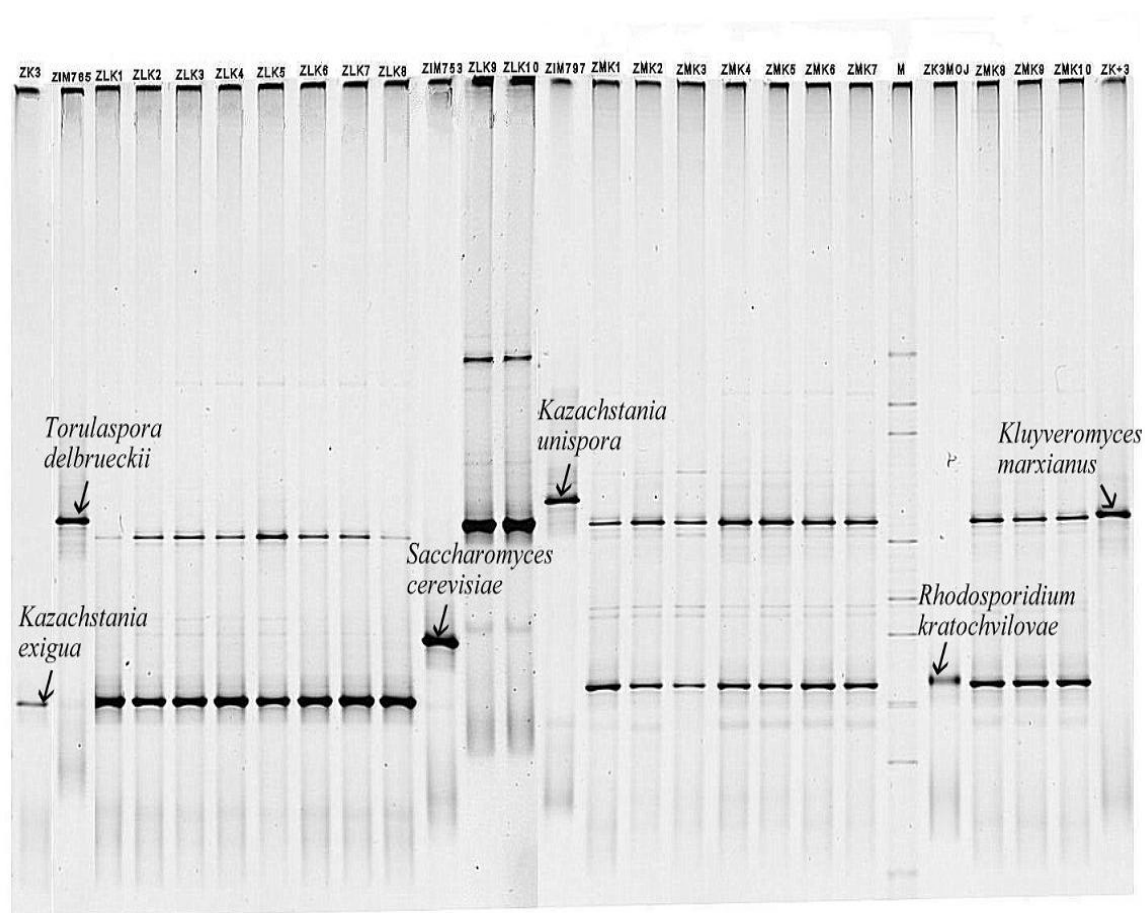


Slika 9: Profili DGGE prevladujočih laktobacilov v kefirnih zrnih, vzdrževanih v laboratoriju (ZL1 – ZL10) in mlekarji (ZM1 – ZM10) ter laktobacilov, predhodno osamljenih iz kefirnih zrn in identificiranih (*Lactobacillus kefir* ZMR 3, *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* 19149, *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* ZMP6, *Lactobacillus parakefiri* ZKP9); M je molekularni označevalec.

Kot je razvidno s slike 9 se profili DGGE prevladujočih laktobacilov v kefirnih zrnih, med 10-tedenskim vzdrževanjem v laboratoriju (ZL1 – ZL10) oz. mlekarni (ZM1 – ZM10), zelo malo spreminjajo. Iz analize prog posameznih profilov DGGE lahko zaključimo, da vzorci kefirnih zrn, ne glede na mesto vzdrževanja, vsebujejo laktobacile vrst *Lactobacillus kefiri* in *Lactobacillus parakefiri*. Ker nam podana kombinacija oligonukleotidov ne loči podvrsti *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* in *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* je lahko prisotna ena, druga ali pa obe podvrsti. Pri vseh DGGE profilih mikrobni združbi laktobacilov je vidna proga, ki ne ustreza nobeni progi referenčnih sevov, pri vzorcih kefirnih zrn ZL 7 in ZL 8, vzdrževanih v laboratoriju, pa se na isti višini pojavi še ena proga, ki ne ustreza nobeni od prog referenčnih sevov. Rezultati kažejo, da je bila, poleg običajno prevladujočih vrst laktobacilov v kefirnem zrnju *Lb. kefiri*, *Lb. parakefiri* in *Lb. kefiranofaciens*, v prevladujoči populaciji stalno prisotna vsaj še ena vrsta, v vzorcih zrn vzdrževanih v laboratoriju pa se ji prehodno, v dveh zaporednih vzorcih, priključi še ena.

4.3.2 Rezultati analize DGGE prevladujočih kvasovk v kefirnih zrnih, vzdrževanih v laboratoriju in mlekarni

Analizirali smo DNK kvasovk, ki smo jo osamili iz konzorcijev (spirkov) kvasovk desetih vzorcev kefirnih zrn, vzdrževanih v laboratoriju oz. v mlekarni. Osamljeno DNK kvasovk smo pomnožili z začetnima oligonukleotidoma NL1 (5' - CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCC ATA TCA ATA AGC GGA GGA AAAG-3'; GC čeljust je podčrtana) in LS2 (5' -ATT CCC AAA CAA CTC GAC TC - 3'), ki zajemata regijo D1 od 26S rRNK in dobljene pomnožke ločili s pomočjo DGGE (Slika 10).

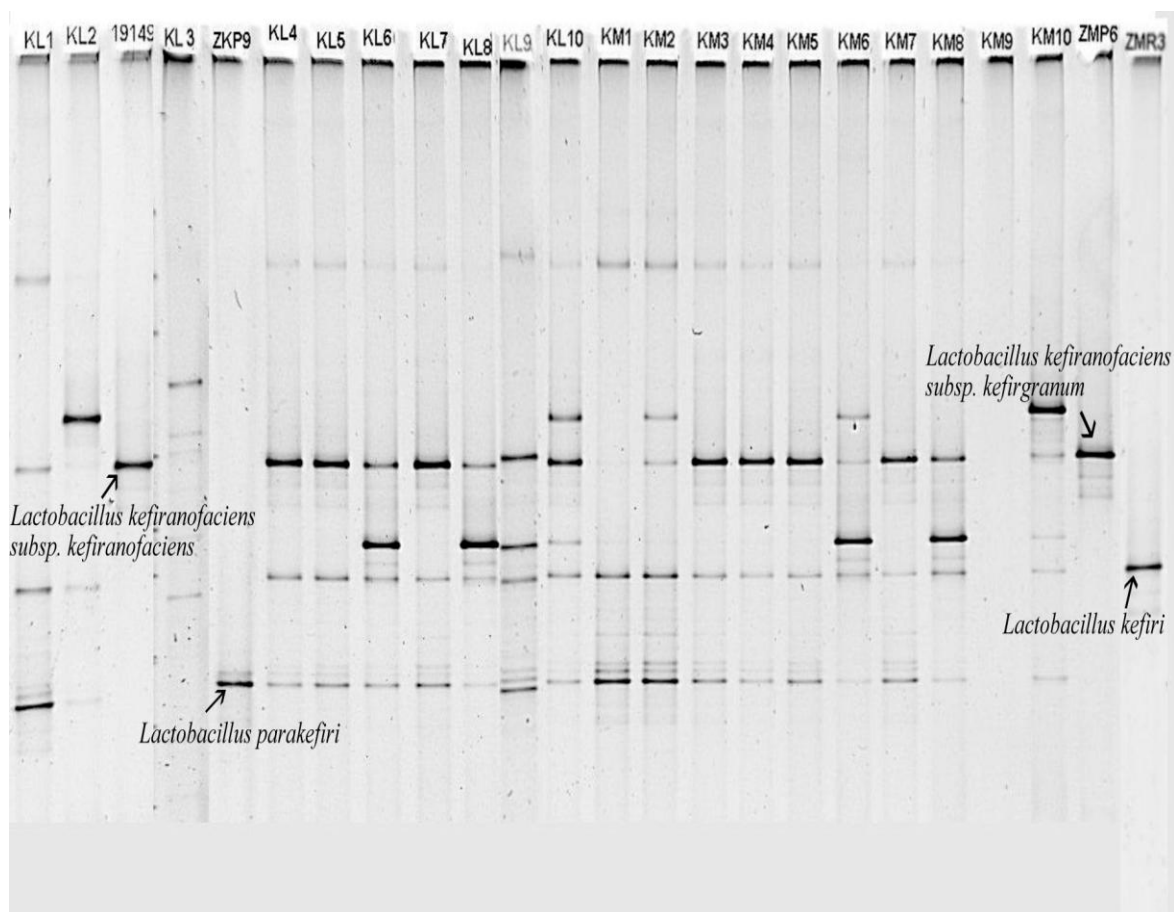


Slika 10: Profili DGGE prevladujočih kvasovk v kefirnih zrnih vzdrževanih v laboratoriju (ZLK1 – ZLK10) in mlekarji (ZMK1 – ZMK10) ter kvasovk, predhodno osamljenih iz kefirnih zrn in identificiranih (*Saccharomyces cerevisiae* ZIM753, *Kazachstania unispora* ZIM797, *Rhodosporidium kratochvilovae* ZK3MOJ, *Kluyveromyces marxianus* ZK+3, *Torulaspora delbrueckii* ZIM765, *Kazachstania exigua* ZK3), M je molekularni označevalec.

Iz profilov DGGE (slika 10) je razvidno, da je sestava prevladujoče populacije kvasovk v kefirnem zrnju iz laboratorija in mlekarne precej stabilna. Ne glede na mesto vzdrževanja, so v kefirnem zrnju prevladovali kvasovke iz vrst *Kazachstania exigua* in *Kluyveromyces marxianus*. Poleg prog, značilnih za omenjeni vrsti, pa so vidne proge, ki ne ustrezajo nobeni progi referenčnih sevov.

4.3.3 Rezultati analize DGGE prevladujočih laktobacilov v kefirju, narejenem s kefirnimi zrnji, vzdrževanimi v laboratoriju in v mlekarji

Analizirali smo DNK laktobacilov, ki smo jo osamili iz konzorcijev laktobacilov desetih vzorcev kefirja, izdelanega s kefirnimi zrnji, ki so bila vzdrževana v laboratoriju oz. v mlekarji. Osamljeno DNK smo pomnožili z začetnima oligonukleotidoma HDA1 – GC (5' - CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GG GGC ACG GGG GGA CTC CTA CGG GAG GCA GCA GT - 3'; GC čeljust je podčrtana) in HDA2 (5' - GTA TTA CCG CGG CTG CTG GCAC - 3'), ki zajemata regijo V2 - V3 16S rDNK in dobljene pomnožke ločili s pomočjo DGGE (Slika 11).

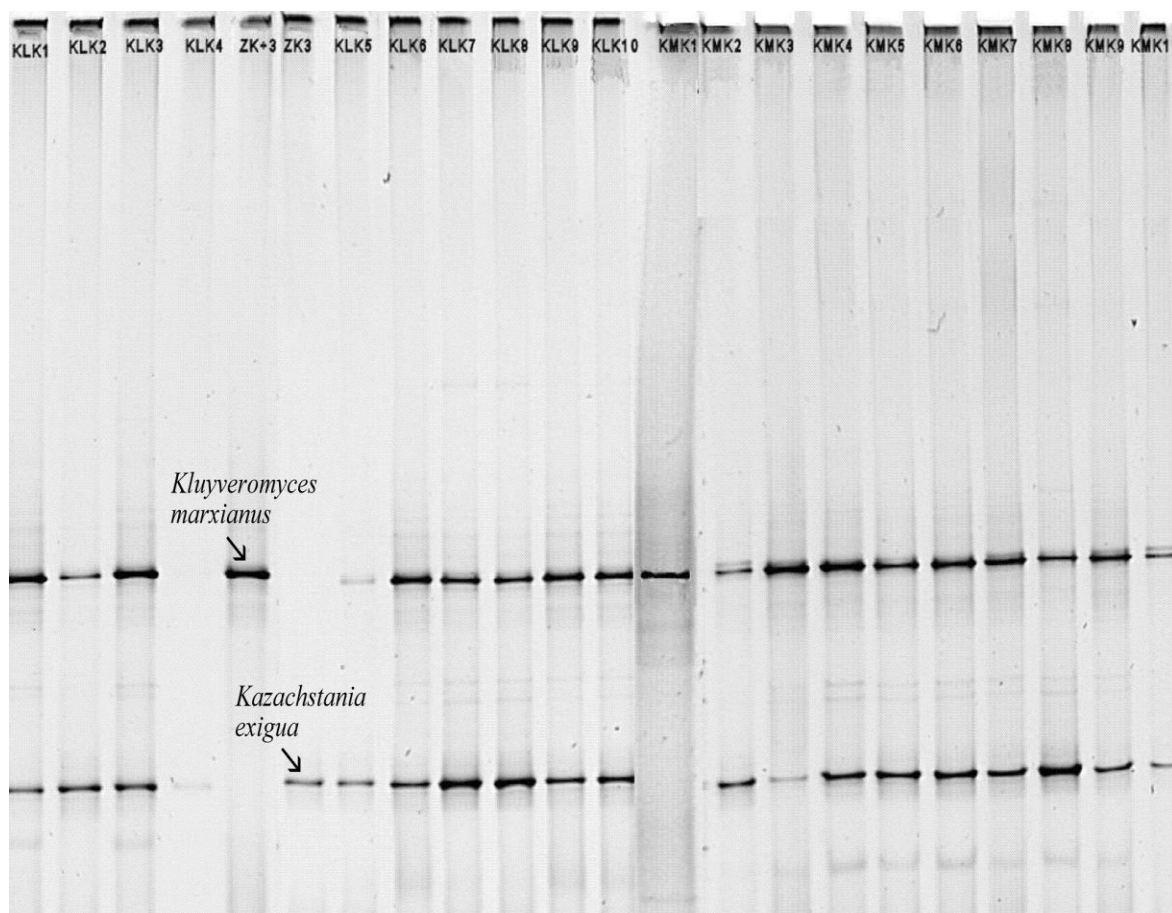


Slika 11: Profili DGGE prevladujočih laktobacilov v kefirju, narejenemu s kefirnimi zrnji vzdrževanimi v laboratoriju (KL1 – KL10) in mlekarji (KM1 – KM10) ter laktobacilov, predhodno osamljenih iz kefirnih zrn in identificiranih (*Lactobacillus kefir* ZMR3, *Lactobacillus kefirifaciens subsp. kefirifaciens* 19149, *Lactobacillus kefirifaciens subsp. kefirgranum* ZMP6, *Lactobacillus parakefir* ZKP9).

Profili DGGE prevladujočih laktobacilov v kefirju so mnogo bolj raznovrstni, kot profili DGGE prevladujočih laktobacilov v kefirnem zrnju, poleg tega pa tudi manj stabilni. Poleg prevladujočih laktobacilov v kefirnem zrnju, opazimo veliko prog, za katere ne vemo, katere vrste predstavljajo. Od tipičnih predstavnikov laktobacilov kefirnega zrna so bili v vzorcih KL1, KL4, KL5, KL6, KL7, KL8, KL9, KL10, KM2, KM3, KM4, KM5, KM6, KM7, KM8 in KM10 prisotni *Lactobacillus parakefiri*, *Lactobacillus kefiri* in *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefirgranu* in/ali *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens*. V vzorcih KL2 in KL3 je bil prisoten *Lactobacillus kefiri*, vzorec KM1 pa je vseboval *Lactobacillus parakefiri* in *Lactobacillus kefiri*. V vzorcu KM9 ni bilo opaznih prog, kar je najverjetneje napaka analize.

4.3.4 Rezultati analize DGGE za kvasovke iz kefirja, narejenega s kefirnimi zrnji iz laboratorija in mlekarne

Analizirali smo DNK kvasovk, ki smo jo osamili iz konzorcija kvasovk desetih vzorcev kefirja, izdelanega s pomočjo kefirnih zrn, ki so bila vzdrževana v laboratoriju oz. v mlekarini. Osamljeno DNK kvasovk smo pomnožili z začetnima oligonukleotidoma NL1 (5' - CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCC ATA TCA ATA AGC GGA GGA AAAG-3'; GC čeljust je podčrtana) in LS2 (5' -ATT CCC AAA CAA CTC GAC TC - 3'), ki zajemata regijo D1 od 26S rRNK in dobljene pomnožke ločili s pomočjo DGGE (Slika 12).



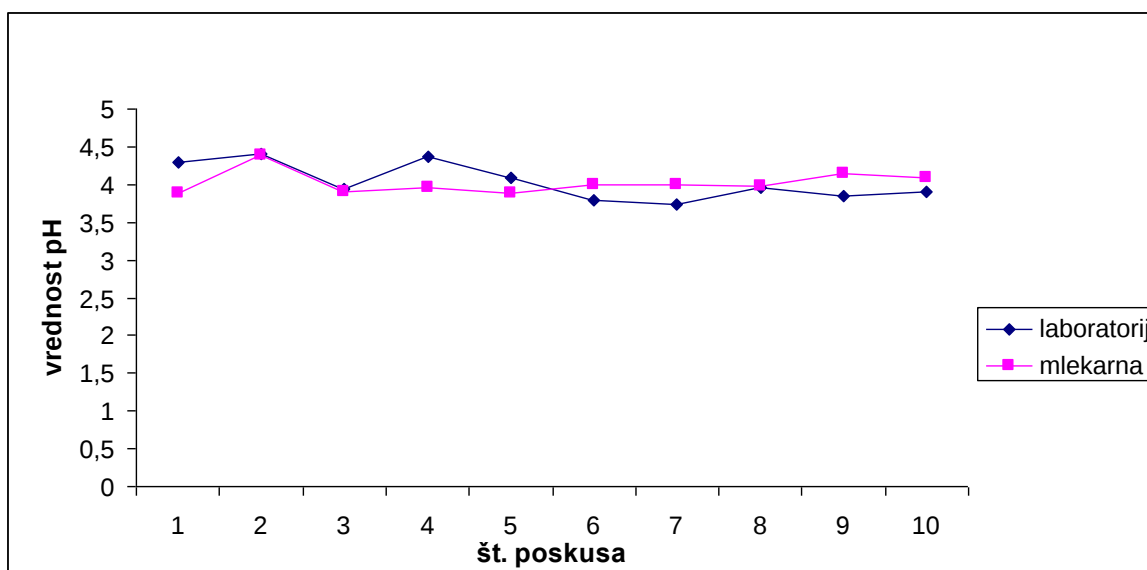
Slika 12: Profili DGGE prevladujočih kvasovk v kefirju narejenem s kefirnimi zrnji vzdrževanimi v laboratoriju (KLK1 – KLK10) in mlekarni (KMK1 – KMK10) ter kvasovk, predhodno osamljenih iz kefirnih zrn in identificiranih (*Kluveromyces marxianus* ZK+3, *Kazachstania exigua* ZK3).

Profili DGGE prevladujočih kvasovk v kefirju (slika 12) kažejo, da je med 10-tedenskim vzdrževanjem kefirnega zrna in izdelovanjem kefirja, sestava populacije kvasovk stabilnejša od populacije laktobacilov (slika 11). Tako kot v kefirnem zrnju (slika 10), ne glede na mesto vzdrževanja, tudi v kefirju prevladujeta vrsti *Kluveromyces marxianus* in *Kazachstania exigua*, razen pri vzorcih KLK4 in KMK1, kjer smo pri KLK4 identificirali samo kvasovko *Kazachstania exigua*, pri vzorcu KMK1 pa samo *Kluveromyces marxianus*. Pri večini vzorcev je slabše vidnih še nekaj prog, ki jih nismo identificirali.

4.4 FIZIKALNE LASTNOSTI KEFIRJA

4.4.1 Vrednosti pH kefirja izdelanega s kefirnimi zrnji, vzdrževanimi v laboratoriju in mlekarji

Slika 13 prikazuje nihanja vrednosti pH kefirja, ki smo ga izdelovali s kefirnimi zrnji, med 10-tedenskim vzdrževanjem v laboratoriju oz. mlekarji.



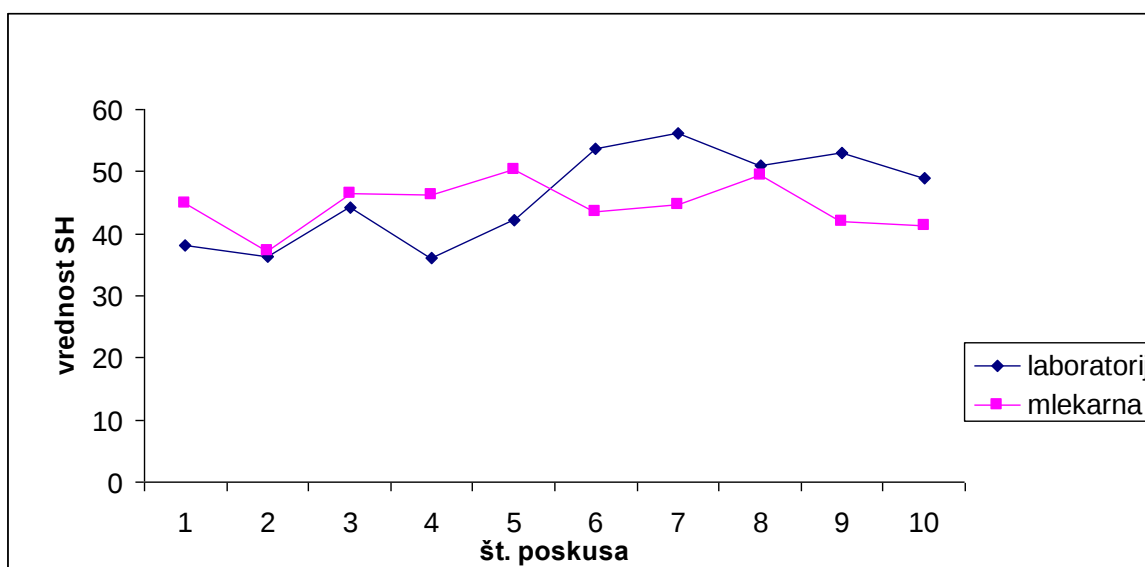
Slika 13: Vrednosti pH kefirja izdelanega s kefirnimi zrnji, vzdrževanimi 10-tednov v mlekarji in laboratoriju.

Kefir smo izdelovali vedno po istem postopku. V 270 g mleka smo dodali 30 g kefirnih zrn, fermentacija pa je potekala 24 ur pri 23 °C. Po 24 urah smo kefirna zrna odstranili in izmerili vrednost pH ter SH kefirja. Vrednosti pH kefirja narejenega s kefirnimi zrnji, vzdrževanimi v laboratoriju, so se gibale od 3,74 (vzorec št. 7) do 4,41 (vzorec št. 2). Vrednosti pH kefirja, ki smo ga naredili s kefirnimi zrnji iz mlekarne, pa so se gibale od 3,89 (vzorca št. 1 in 5) do 4,39 (vzorec št. 2). S Shapiro – Wilkovim (SW) testom za normalno porazdelitev smo pri vseh vzorcih sprejeli ničelno hipotezo, ker je pri vseh vzorcih $P_{SW} > \alpha = 0,01$, iz tega sledi, da so podatki normalno porazdeljeni. Vrednosti pH kefirja narejenega s kefirnimi zrnji vzdrževanimi v mlekarji in laboratoriju smo primerjali s studentovim t testom. Postavili smo ničelno hipotezo, da se povprečne vrednosti pH kefirja narejenega s kefirnimi zrnji vzdrževanimi v mlekarji in laboratoriju, statistično značilno ne

razlikujejo. Po izračunu p vrednosti s studentovim t testom smo pri primerjavi vzorcev kefirja iz mlekarne in laboratorija sprejeli ničelno hipotezo saj je bila izračunana p vrednost višja od stopnje značilnosti ($p = 0,91 > \alpha = 0,05$). Povprečni vrednosti pH kefirja narejenega s kefirnimi zrnji vzdrževanimi v mlekarji in laboratoriju se zato statistično značilno ne razlikujeta, podatki in izračuni so podani v prilogi A.

4.4.2 Vrednosti SH kefirja izdelanega s kefirnimi zrnji vzdrževanimi v laboratoriju in mlekarji

Slika 14 prikazuje dobljene vrednosti SH kefirja, ki smo ga izdelali s kefirnimi zrnji, vzdrževanimi v laboratoriju oz. mlekarji.



Slika 14: Vrednosti SH kefirja izdelanega s kefirnimi zrnji, pridobljenimi iz mlekarne in vzdrževanimi v laboratoriju.

Vrednosti SH kefirja narejenega s kefirnimi zrnji, vzdrževanimi v laboratoriju so se gibale od 36,2 (vzorec št. 4) do 56,1 (vzorec št. 7), povprečna vrednost SH pa je bila 45,9. Vrednosti SH kefirja narejenega s kefirnimi zrnji vzdrževanimi v mlekarji so se gibale od 37,2 (vzorec št. 2) do 50,3 (vzorec št. 5), povprečna vrednost SH pa je bila 44,6. Vrednosti SH kefirja narejenega s kefirnimi zrnji pridobljenimi iz mlekarne so bile do 5. vzorčenja višje od SH vrednosti kefirja narejenega s kefirnimi zrnji vzdrževanimi v laboratoriju. Po 5

vzorcu pa so bile višje vrednosti SH kefirja narejenega s kefirnimi zrni vzdrževanimi v laboratoriju. S Shapiro – Wilkovim (SW) testom za normalno porazdelitev smo pri vseh vzorcih sprejeli ničelno hipotezo, ker je pri vseh vzorcih $P_{SW} > \alpha = 0,01$, iz tega sledi, da so podatki normalno porazdeljeni. Vrednosti SH kefirja narejenega s kefirnimi zrni vzdrževanimi v mlekarini in laboratoriju, smo primerjali s studentovim t testom. Po izračunu p vrednosti s studentovim t testom smo pri primerjavi vzorcev kefirja iz mlekarne in laboratorija sprejeli ničelno hipotezo, saj je bila izračunana p vrednost višja od stopnje značilnosti ($p = 0,62 > \alpha = 0,05$). Povprečni vrednosti SH kefirja narejenega s kefirnimi zrni vzdrževanimi v mlekarini in laboratoriju se statistično značilno ne razlikujeta. Podatki in izračuni so podani v prilogi A.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Namen diplomskega dela je bil preučiti velikost in stabilnost dveh pomembnih mikrobnih populacij kefirnega zrna, laktobacilov in kvasovk. Ker nas je zanimalo, kako na velikost in sestavo mikrobnih populacij laktobacilov in kvasovk vpliva okolje vzdrževanja kefirnih zrn, smo po enakem postopku, kot vzdržujejo kefirna zrna v mlekarstvu, vzporeden vzorec kefirnih zrn vzdrževali v laboratoriju Katedre za mlekarstvo. Zrna v laboratoriju smo vzdrževali in precepljali v dobro kontroliranih laboratorijskih pogojih, ob upoštevanju dela v sterilnih pogojih. Kljub upoštevanju dobre proizvodne prakse, je v industrijskih pogojih pri precepljanju in vzdrževanju velikih količin kefirnih zrn večje tveganje, da pride do nihanj v temperaturi ali prehodne kontaminacije in s tem sprememb v sestavi in velikosti mikrobnih populacij kefirnih zrn.

Po standardu (CODEX STAN, 2003) je kefir fermentirano mleko, izdelano s kefirnimi zrnji ali s startersko kulturo, pripravljeno s kefirnimi zrnji, ki vsebuje vrsto *Lactobacillus kefir* in vrste rodov *Leuconostoc*, *Lactococcus* in *Acetobacter*. Kefirna zrna naj bi vsebovala tudi laktozo-fermentirajoče kvasovke (*Kluyveromyces marxianus*) in laktozo-ne-fermentirajoče kvasovke (*Saccharomyces unisporus*, *Saccharomyces cerevisiae* in *Saccharomyces exiguus*). Starterska kultura - kefirna zrna za izdelavo kefirja mora vsebovati najmanj 10^7 ke vseh mikroorganizmov/g in najmanj 10^4 ke kvasovk/g. V poskusu smo spremljali število laktobacilov in kvasovk, ne pa tudi drugih skupin bakterij. Velikost mikrobne populacije laktobacilov v kefirnih zrnih, ki smo jih vzdrževali v laboratoriju, se je gibala od najmanj $1,95 \times 10^7$ ke/g (vzorec št. 4) do največ 4×10^7 ke/g (vzorec št. 2), v kefirnih zrnih vzdrževanih v mlekarni pa od $1,54 \times 10^7$ ke/g (vzorec št. 3) do $3,44 \times 10^7$ ke/g (vzorec št. 1). Med 10-tedenskim precepljanjem je že velikost mikrobne populacije laktobacilov izpolnila pogoj standarda o najmanjšem številu 10^7 ke vseh mikroorganizmov/g, ne glede na mesto vzdrževanja kefirnih zrn. Velikost celotne mikrobne populacije pa je bila še nekoliko večja, saj Rattray in O'Connell (2011) navajata, da kefirno zrno vsebuje približno 65 – 80 % laktobacilov. Kefirno zrno je glede na standard, ki predpisuje najmanj 10^4 ke kvasovk/g, vsebovalo znatno višje število kvasovk.

V zrnih vzdrževanih v mlekarji povprečno $2,2 \times 10^7$ ke/g in v zrnih vzdrževanih v laboratoriju povprečno $1,9 \times 10^7$ ke/g. Število laktobacilov v kefirju izdelanem s kefirnimi zrnji, vzdrževanimi v laboratoriju ali mlekarji, ki se lahko uporabi kot matična kultura za izdelavo kefirja v industrijskih pogojih, se je gibalo od $0,72 \times 10^6$ ke/g (vzorec št. 9 - mlekarja) do $3,9 \times 10^6$ ke/g (vzorec št. 6 - mlekarja). Rattray in O'Connell (2011) navajata da je v kefirju prisotnih 5 – 10 % laktobacilov. Če bi hoteli zadostiti standardom za matično kulturo bi moral vzorec št. 9 (mlekarja) vsebovati 7,2 % ali manj odstotkov laktobacilov, da bi bilo število skupnih mikroorganizmov večje od 10^7 ke skupnih mikroorganizmov/g kefirja (matične kulture). Če predpostavljamo, da je bilo v kefirju (matični kulturi) prisotno 10 % laktobacilov, so vsi vzorci, ki so vsebovali več kot 1×10^6 ke laktobacilov/g kefirja vsebovali dovolj laktobacilov glede na standard. Vsi vzorci kefirja so vsebovali tudi znatno višje število kvasovk, kot jih določa standard (najmanj 10^4 ke/g), saj je kefir, narejen z zrnji, vzdrževanimi v laboratoriju ali mlekarji vseboval povprečno $8,7 \times 10^5$ in $1,3 \times 10^6$ ke kvasovk na gram kefirja. Kefir, ki smo ga izdelovali v našem poskusu, bi lahko uporabili kot matično kulturo za proizvodnjo kefirja, saj je ustrezal zahtevam standarda. Takšno matično kulturo uporabljajo predvsem za industrijsko proizvodnjo kefirja, ki poteka v dveh stopnjah. Prva stopnja je priprava matične kulture z uporabo kefirnih zrn, druga pa vključuje primarno in sekundarno fermentacijo. To metodo uporabljajo predvsem zato, ker lahko z manjšimi količinami kefirnih zrn naredijo večje količine kefirja. Takšna metoda izdelave kefirja pa tudi izboljša okus kefirja.

Poleg velikosti mikrobne populacije laktobacilov in kvasovk smo spremljali tudi njihovo stabilnost. Simova in sod. (2002) navajajo, da je bila mikrobna populacija laktobacilov, ki so jih je izolirali iz kefirja, narejenega s kefirnimi zrnji šestih populacij, zelo stabilna. Kefir je vseboval 15 – 20 % laktobacilov. Prav tako navajajo, da je bila stabilna tudi populacija kvasovk, ki so predstavljale 5 – 8 % celotne mikrobne populacije. Tudi v našem poskusu sta bili populaciji laktobacilov in kvasovk v kefirnem zrnju zelo stabilni, ne glede na mesto vzdrževanja kefirnega zrna. V kefirju pa je bila stabilna predvsem prevladujoča populacija kvasovk, medtem ko smo pri populaciji laktobacilov opazili večjo variabilnost. Z analizo DGGE smo v kefirnih zrnjih in kefirju, kot prevladujoče vrste laktobacilov in kvasovk identificirali: *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus kefirianofaciens* (subsp. *kefirgranum* in/ali subsp. *kefirianofaciens*) in *Lactobacillus parakefir* ter *Kazachstania exigua* in

Kluyveromyces marxianus. Vrste laktobacilov in kvasovk, ki smo jih identificirali, so v kefirnih zrnih določili tudi drugi raziskovalci (Gao in sod., 2012; Simova in sod., 2002). Lahko zaključimo, da so identificirani laktobacili in kvasovke značilni predstavniki mikrobiote kefirnega zrna.

Primerjava velikosti in sestave mikrobnih populacij laktobacilov in kvasovk v kefirnem zrnju med 10-tedenskim vzdrževanjem v mlekarni in laboratoriju je pokazala, da mesto vzdrževanja kefirnih zrn ni vplivalo niti na velikost niti na sestavo mikrobnih populacij. S tem smo dodatno potrdili stabilnost mikrobne populacije kefirnega zrna, ki ni odvisna od mesta vzdrževanja, če ga vzdržujemo pod kontroliranimi (enakimi) pogoji in ob upoštevanju dobre proizvodne prakse v industrijskih pogojih.

Ker je za izdelavo kefirja poleg sestave mikrobne populacije kefirnih zrn zelo pomembna tudi aktivnost mikrobne združbe, smo tedensko kefirna zrna uporabili tudi kot startersko kulturo za fermentacijo mleka. Fermentacijo smo izvajali vedno pod enakimi pogoji, 24 ur pri 23 °C in z enakim utežnim deležem kefirnih zrn. Po fermentaciji smo merili vrednosti pH in SH nastalega kefirja, ki so se gibale od 3,74 do 4,41 (pH) in od 36,2 do 56,08 (SH). Nizke vrednosti pH in visoke vrednosti SH kefirja so potrdile aktivnost mikrobne združbe kefirnega zrna. Kljub relativno stabilni populaciji laktobacilov in kvasovk v kefirnih zrnih smo opazili večjo variabilnost teh populacij v kefirju in velike razlike v vrednosti SH vzorcev kefirja. Možno je, da že majhne okoljske spremembe vplivajo na fermentacijsko sposobnost kefirnih zrn in povzročijo različno izločanje mikroorganizmov iz kefirnih zrn v mleko. Različni avtorji navajajo, da se lahko s povečanim številom kvasovk, ki za svojo rast porabljajo mlečno kislino, kot npr. *S. cerevisiae*, vrednost pH zviša kar stimulira nadaljno rast mlečnokislinskih bakterij (Cheirsilp in sod., 2003b; Rattray in O'Connell, 2011). Irigoyen in sod. (2005) navajajo, da je vrednost pH kefirja odvisna od začetne koncentracije dodanih kefirnih zrn. Kefir, ki so ga naredili z dodatkom 1 % kefirnih zrn je imel višje vrednosti pH kot kefir, ki so ga naredili z dodatkom 5 % kefirnih zrn, kjer je vrednost pH znašala 4,5. Pri našem poskusu smo dodali 10 % kefirnih zrn, povprečne vrednosti pH pa so bile nižje, kot pri zgoraj omenjenih raziskovalcih in so se gibale okoli pH 4.

Lopitz – Otsoa in sod. (2006) navajajo, da kvasovke in mlečnokislinske bakterije v kefirnem zrnju živijo v simbiozi, kjer se z metabolnimi produkti enih lahko poveča ali inhibira rast drugih mikroorganizmov. Kvasovke proizvajajo vitamine, aminokisline in ostale rastne faktorje za rast bakterij, medtem ko so metabolni produkti bakterij vir energije za rast kvasovk. Kvasovke lahko s svojimi mehanizmi odstranijo vodikov peroksid, ki je rastni inhibitor mlečnokislinskih bakterij (Cheirsilp in sod., 2003b). Če so pogoji vzdrževanja kefirnega zrna konstantni in ni močnih zunanjih vplivov, ki bi porušili simbiozo mikrobne populacije, je sestava mikrobne populacije očitno zelo stabilna in preprečuje razrast ene skupine mikroorganizmov, pa tudi kontaminantov. Večja variabilnost sestave mikrobne populacije laktobacilov v kefirju, izdelanem s kefirnim zrnjem, ki jo je pokazala analiza PCR-DGGE, je najverjetneje posledica različnega izločanja posameznih vrst laktobacilov iz kefirnega zrna in njihove sposobnosti rasti v mleku. Tako na izločanje mikroorganizmov iz kefirnega zrna kot na fermentacijsko sposobnost mikrobne združbe pa lahko vplivajo tudi kemijsko-fizikalne lastnosti mleka.

Kefirno zrno je torej zelo stabilna simbiotska združba mikroorganizmov, ki pa ne more kljubovati večjim okoljskim spremembam, se jim pa največkrat uspešno prilagodi. Dejavniki, ki najmočneje vplivajo na sestavo mikrobne populacije in jo pogosto spreminjajo so: izvor zrna, vrsta in tip mleka ali drugega medija za kultivacijo, temperaturno-časovni in tehnološki parametri (hitrost mešanja, aeracija) kultivacije (Zajšek, 2012). Vedno pa se v kefirnih zrnih pojavljajo značilne vrste mikroorganizmov (Witthuhn in sod., 2005b).

5.2 SKLEPI

Proučevali smo stabilnost populacije laktobacilov in kvasovk v kefirnem zrnju in kefirju ter predvidevali, da bo pri vzdrževanju kefirnih zrn v različnih okoljih prišlo do razlik v velikosti in sestavi populacije laktobacilov in kvasovk ter posledično do spremenjene aktivnosti kefirnih zrn. Delovno hipotezo smo z raziskavo ovrgli, saj do razlik v stabilnosti in sestavi laktobacilov in kvasovk v kefirnem zrnju ni prišlo.

Sklepi:

- Velikosti mikrobnih populacij laktobacilov in kvasovk v kefirnih zrnih sta bili med 10-tedenskim vzdrževanjem konstantni, ne glede na mesto vzdrževanja (mlekarna, laboratorij).
- Velikosti mikrobnih populacij laktobacilov in kvasovk v kefirju narejenem s kefirnimi zrn, sta bili med 10-tedenskim vzdrževanjem konstantni, ne glede na mesto vzdrževanja kefirnih zrn (mlekarna, laboratorij).
- Z merjenjem vrednosti pH in SH smo dokazali, da so kefirna zrna aktivna in imajo sposobnost fermentacije.
- Sestava mikrobiote laktobacilov kefirja narejenega s kefirnimi zrn je bila najbolj variabilna. Najverjetneje je odvisna od razmerja mikrobnih populacij laktobacilov in kvasovk, kemijsko-fizikalne lastnosti mleka, temperature in časa fermentacije, začetne koncentracije kefirnih zrn ter razlik v izločanju posameznih vrst laktobacilov iz kefirnih zrn in njihove sposobnosti rasti v mleku..
- Z analizo DGGE smo v kefirnih zrnih in kefirju kot prevladujoče vrste identificirali laktobacile: *Lactobacillus kefiri*, *Lactobacillus kefiranofaciens* (subsp. *kefirgranum* in/ali subsp. *kefiranofaciens*) in *Lactobacillus parakefiri* ter kvasovke: *Kazachstania exigua* in *Kluyveromyces marxianus*.
- Primerjava velikosti in sestave mikrobnih populacij laktobacilov in kvasovk v kefirnem zrnu med 10-tedenskim vzdrževanjem v mlekarni in laboratoriju je pokazala, da mesto vzdrževanja kefirnih zrn ni vplivalo na njihovo velikost in sestavo.

6 POVZETEK

Kefir je tradicionalni fermentirani mlečni napitek, ki izvira iz Kavkaza, Tibeta ali Mongolije. Tradicionalno kefir izdelujejo s fermentacijo mleka s pomočjo kefirnih zrn. Kefir je verjetno nastal naključno, kot vse fermentirane vrste mleka. Prebivalci na območju Kavkaza so hranili sveže mleko v usnjenih vrečah, mleko je v vrečah fermentiralo in dobili so mlečni napitek – kefir. Najprej so kefir izdelovali iz ovčjega mleka, zdaj pa se v Evropi kefir za komercialne namene proizvaja predvsem iz kravjega mleka. Kefir, ki je narejen s pomočjo kefirnih zrn, ima svojevrstno aromo in okus. Za zagotavljanje kakovostnega kefirja pa so potrebna kefirna zrna. Ker je kefirno zrno kompleksna združba mikroorganizmov, smo pričakovali, da bo v tej združbi med 10-tedenskim vzdrževanjem v dveh različnih okoljih, mlekarni in laboratoriju, prišlo do sprememb v številu oziroma sestavi populacije laktobacilov in kvasovk.

V diplomskem delu smo ugotavljali velikost in stabilnost združbe laktobacilov in kvasovk v kefirnih zrnih in kefirju narejenim s pomočjo kefirnih zrn. Za ugotavljanje velikosti populacije laktobacilov in kvasovk v kefirnih zrnih in kefirju smo uporabili klasične mikrobiološke metode, za preučevanje stabilnosti mikrobnih združb pa metodo PCR DGGE.

Na petrijeve plošče z razlitim ohlajenim gojiščem MRS in KDM smo nacepljali homogenizate vzorcev kefirnih zrn in kefirja. Po inkubaciji smo prešteli izrasle kolonije na ploščah, kjer je bilo od 30 do 300 kolonij. Število laktobacilov iz vzorcev kefirnih zrn, ki smo jih vzdrževali v laboratoriju, se je gibalo od $1,9 \times 10^7$ ke/g do $4,0 \times 10^7$ ke/g. Število laktobacilov v vzorcih kefirnih zrn, ki so jih vzdrževali v mlekarni pa se je gibalo od $1,5 \times 10^7$ ke/g do $3,4 \times 10^7$ ke/g. Ko smo statistično primerjali število laktobacilov v vzorcih kefirnih zrn vzdrževanih v laboratoriju in mlekarni, smo ob izračunu studentovega t – testa potrdili, da se povprečni velikosti mikrobnih populacij statistično značilno ne razlikujeta. Prav tako se statistično značilno ni razlikovalo povprečno število kvasovk v vzorcih kefirnih zrn vzdrževanih v laboratoriju in mlekarni. Število kvasovk se je gibalo

od $4,5 \times 10^6$ ke/g do $3,8 \times 10^7$ ke/g v kefirnih zrnih vzdrževanih v laboratoriju in od $9,8 \times 10^6$ ke/g do $3,7 \times 10^7$ ke/g v kefirnih zrnih vzdrževanih v mlekarini.

Pri določanju števila laktobacilov in kvasovk v kefirju narejenemu s kefirnimi zrnji, smo ob izračunu studentovega t – testa potrdili, da se povprečni velikosti mikrobnih populacij laktobacilov vzorcev iz laboratorija in mlekarne statistično značilno ne razlikujeta. Število laktobacilov v kefirju narejenem s kefirnimi zrnji, vzdrževanimi v laboratoriju se je gibalo od $1,1 \times 10^6$ ke/g do $3,3 \times 10^6$ ke/g in v mlekarini od $7,2 \times 10^5$ ke/g do $3,9 \times 10^6$ ke/g. Število kvasovk v laboratoriju pa od $3,6 \times 10^5$ ke/g do $1,8 \times 10^6$ ke/g in v mlekarini od $4,1 \times 10^5$ ke/g do $2,8 \times 10^6$ ke/g. Povprečni velikosti mikrobnih populacij kvasovk v vzorcih kefirja, narejenega s kefirnimi zrnji vzdrževanimi v laboratoriju in mlekarini se nista statistično značilno razlikovali.

Z metodo PCR DGGE smo v kefirnih zrnjih iz laboratorija in mlekarne identificirali laktobacile: *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus kefiranofaciens* (subsp. *kefirgranum* in/ali subsp. *kefiranofaciens*) in *Lactobacillus parakefir*. Prav tako smo z metodo PCR DGGE v kefirnih zrnjih laboratorija in mlekarne identificirali kvasovke *Kazachstania exigua* in *Kluyveromyces marxianus*. V kefirju narejenem iz kefirnih zrn laboratorija in mlekarne smo v prevladujoči populaciji določili enake vrste laktobacilov in kvasovk kot v kefirnih zrnjih.

Pri 10 tedenskem opazovanju vzorcev kefirnih zrn vzdrževanih v laboratoriju in mlekarini, ter kefirju narejenim s kefirnimi zrnji kot startersko kulturo, smo ugotovili, da sta populaciji laktobacilov in kvasovk zelo stabilni. Prav tako je bila precej stabilna sestava prevladujoče mikrobne populacije laktobacilov in kvasovk v kefirnih zrnjih. Do največje variabilnosti mikrobne populacije je prišlo pri sestavi mikrobne populacije laktobacilov v kefirju narejenim s kefirnimi zrnji iz laboratorija in mlekarne.

7 VIRI

- Anfiteatro D.N. 2014. Dom's kefir in-site. Adelaide, Australia, personal page: 68 str. <http://users.sa.chariot.net.au/~dna/kefirpage.html> (5. maj 2014)
- Anonymous. 1963. Säuregradbestimmung nach Soxhlet-Henkel (SH). Titratable acidity evaluation with the Soxhlet-Henkel (SH) method. *Milchwissenschaft*, 18: 520 - 520.
- Beskhova D. M., Simova E. D., Simov Z. I., Frengova G. I., Spasov Z. N. 2002. Pure cultures for making kefir. *Food Microbiology*, 19: 537 – 544.
- Boštar M. 2006. Vpliv kefirja na črevesno mikrobno združbo in kancerogenezo eksperimentalno induciranih črevesnih tumorjev na podganah. Magistrsko delo. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 111 str.
- Cheirsilp B., Shimizu H., Shioya S. 2003a. Enhanced kefir production by mixed culture of *Lactobacillus kefiranofaciens* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biotechnology*, 100: 43 – 53.
- Cheirsilp B., Shoji H., Shimizu H., Shioya S. 2003b. Interactions between *Lactobacillus kefiranofaciens* and *Saccharomyces cerevisiae* in mixed culture for kefir production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 96, 3: 279 – 284.
- Cocolin L., Aggio D., Manzano M., Cantoni C., Comi G. 2002. An application of PCR-DGGE analysis to profile the yeasts populations in raw milk. *International Dairy Journal*, 12: 407 – 411.
- CODEX STAN 243 – 2003. Codex standard for fermented milks. 2003: 11 str.
- Curry B., Crow V. 2003. *Lactobacillus* spp.: General characteristics. V: *Encyclopedia of dairy sciences*. Vol. 3. Roginski H., Fuquay J. W., Fox P. F. (eds.). London, Academic Press: 1479 – 1511.
- Cruz Pedrozo Miguel M. G., Gomes Cardoso P., Assis Largo L., Freitas Schwan R. 2010. Diversity of bacteria present in milk kefir grains using culture – dependent and culture – independent methods. *Food Research International*, 43: 1523 – 1528.
- De Man J. C., Rogosa M., Sharpe M. E. 1960. A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. *Journal of Applied Bacteriology*, 23: 130 – 135.
- Duitschaeffer C. L., Kemp N., Emmons D., 1987. Pure culture formulation and procedure for the production of kefir. *Milchwissenschaft*, 42, 2: 80 – 82.

- Ercolini D. 2004. PCR – DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *Journal of Microbiological Methods*, 56: 297 – 314.
- Farnworth E. R. 2005. Kefir – a complex probiotic. *Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods*, 2, 1: 1 – 17.
- Ferris M. J., Muyzer G., Ward D. M. 1996. Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA – defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 2: 340 – 346.
- Frengova G. I., Simova E. D., Beshkova D. M., Simov Z. I. 2002. Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria of kefir grains. *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung*, 57: 805 – 810.
- Fujisawa T., Adachi S., Toba T., Arihara K., Mitsuoka T. 1988. *Lactobacillus kefiranofaciens* sp. nov. Isolated from kefir grains. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 38, 1: 12 - 14.
- Gao J., Gu F., Abdella N.H., Ruan H., He G. 2012. Investigation on culturable microflora in Tibetan kefir grains from different areas of China. *Journal of Food Science*, 77, 8: 425 – 433.
- Hacin I. J. 1996. Simbiotske bakterije. V: *Biotehnologija, osnovna znanja*. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Bia: 51 – 68.
- Hammes W. P., Hertel C. 2006. The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. V: *The prokaryotes*. Vol. 4: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria. 3rd ed. Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K. H., Stackebrandt E. (eds.). New York, Springer: 320 – 403.
- Irigoyen A., Arana I., Castiella M., Torre P., Ibanez F. C. 2005. Microbiological, physicochemical, and sensory characteristics of kefir during storage. *Food Chemistry*, 90: 613 – 620.
- Jany L. J., Barbier G. 2008. Culture – independent methods for identifying microbial communities in cheese. *Food Microbiology*, 25: 839 – 848.
- Jashbhai B. P., Baboo M. N. 2008. The history of fermented foods. V: *Handbook of fermented functional foods*. 2nd ed. Farnworth E. R. (ed.). Boca Raton, Taylor and Francis: 1-24.
- Jeršek B. 2009. *Higiena živil: Laboratorijske vaje za študente živilstva in prehrane*. 2. izd. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 26–28.

- www.bf.uni-lj.si/fileadmin/groups/2752/Higiena_zivil.pdf (18. maj 2014).
- Jeršek B. 2013. Mikrobiološka analiza: navodila in delovni zvezek za laboratorijske vaje. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 4 – 4.
- www.bf.uni-lj.si/fileadmin/groups/.../Mikrobioloska_analiza_2013.pdf (18.maj 2014).
- Jianzhong Z., Xiaoli L., Hanhu J., Mingsheng D. 2009. Analysis of the microflora in Tibetan kefir grains using denaturing gradient gel electrophoresis. Food Microbiology, 26: 770 -775.
- Kandler O., Kunath P. 1983. *Lactobacillus kefir* sp. nov., a component of the microflora of kefir. Systematic and Applied Microbiology, 4, 2: 286 – 294.
- Kefir, yoghurt for life. 2002. Version 2. Gold Coast MC, Kefir Yoghurt for life: 2 str.
- <http://www.kefir.biz/terms.htm> (10. maj 2014).
- Kojima S., Takizawa S., Tamura S., Fujinaga S., Benno Y., Nakase T. 1993. An improved medium for the isolation of lactobacilli from kefir grains. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 57: 119 – 120.
- Kolakowski P., Ozimkiewicz M. 2011. Restoration of kefir grains subjected to different treatments. International Journal of Dairy Technology, 65, 1: 140 – 145.
- Kurmann J. A., Rašič J. L., Kroger M. 1992. Encyclopedia of fermented fresh milk products: An international inventory of fermented milk, cream, buttermilk, whey and related products. New York, Van Nostrand Reinhold: 368 str.
- Libudzisz Z., Piatkiewicz A. 1990. Kefir production in Poland. Dairy Industries International, 55: 31 – 33.
- Liutkevičius A., Šarkinas A. 2004. Studies on the growth conditions and composition of kefir grains – as a food and forage biomass. Veterinarija ir Zootechnika, 25: 64 – 70.
- Lopitz – Otsoa F., Rementeria A., Elguezabal N., Garaizar J. 2006. Kefir: A symbiotic yeasts – bacteria community with alleged healthy capabilities. Revista Iberoamericana de Micología, 23: 67 – 74.
- Marshall V. M. 1984. Flavour development in fermented milks. V: Advances in the microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk. Davies F. L., Law B. A. (eds.). London, Elsevier Applied Science Publishers Ltd.: 153 – 177.
- Marshall V. M. 1993a. Starter cultures for milk fermentation and their characteristics. Journal of the Society of Dairy Technology, 46, 2: 49 – 56.

- Marshall V. M. 1993b. Fermented milks. V: Encyclopedia of food science, food technology and nutrition. Vol. 3. Macrae R., Robinson R. K., Sadler M. J. (eds.). London, Academic Press: 1804 – 1808.
- Mohar Lorbeg P., Čanžek Majhenič A., Rogelj I. 2009. Evaluation of different primers for PCR – DGGE analysis of cheese – associated enterococci. Journal of Dairy Research, 76: 265 – 271.
- Muyzer G., De Waal E. C., Uitterlinden A. G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction – amplified genes coding for 16S rRNA. Applied and Environmental Microbiology, 59: 695 – 700.
- Otles S., Cagindi O. 2003. Kefir: A probiotic dairy – composition, nutritional and therapeutic aspects. Pakistan Journal of Nutrition, 2, 2: 54 – 59.
- Özer D., Özer B. H. 2000. Product of Eastern Europe and Asia. V: Encyclopedia of food microbiology. Vol. 2. Robinson R. K., Batt C. A., Patel P. D. (eds.). London, Academic Press: 798 – 805.
- Ratray E. P., O'Connell M. J. 2011. Fermented milks: kefir. V: Encyclopedia of dairy sciences. 2nd ed. Fuquay J. W. (ed.). San Diego, Academic Press: 518 – 524.
- Robinson R. K., Tamime Y. A., Wszolek M. 2002. Microbiology of fermented milks. V: Dairy microbiology handbook. 3rd ed. Robinson R. K. (ed.). New York, Wiley – Interscience: 367 – 430.
- Sandine W. E., Radich P. C., Eliker P. R. 1972. Ecology of the lactic streptococci. Journal of Milk Food Technology, 35: 176 – 184.
- Sarkar S. 2007. Potential of kefir as a dietetic beverage – a review. British Food Journal, 109, 4: 280 -290.
- Simova E., Beskhova D., Angelov A., Hristozova Ts., Frengova G., Spasov Z. 2002. Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 28: 1 – 6.
- Stepaniak L., Fetlinski A. 2002. Fermented milks: kefir. V: Encyclopedia of dairy sciences. Roginski H., Fuquaq J.W., Fox P.F. (eds.). London, Academic Press: 1049 – 1054.
- Takizawa S., Kojima S., Tamura S., Fujinaga S., Benno Y., Nakase T. 1994. *Lactobacillus kefirgranum* sp. nov. and *Lactobacillus parakefir* sp. nov., two new species from kefir grains. International Journal of Systematic Bacteriology, 44: 435 – 439.

- Tamime Y. A. 2002. Microbiology of starter cultures. V: Dairy microbiology handbook. 3rd ed. Robinson R. K. (ed.). New York, Wiley – Interscience: 261 – 366.
- Valderrama M. J., de Silo 'Niz M. I., Gonzalo P., Peinado J. M. 1999. A differential medium for the isolation of *Kluyveromyces marxianus* and *Kluyveromyces lactis* from dairy product. Journal of Food Protection, 62, 2: 189 – 193.
- Vardjan T., Mohar Lorbeg P., Rogelj I., Čanžek Majhenič A. 2013. Characterization and stability of lactobacilli and yeast microbiota in kefir grains. Journal of Dairy Science, 96, 5: 2729 – 2736.
- Vos P., Garrity G., Jones D., Krieg N. R., Ludwig W., Rainey F. A., Schleifer K. H., Whitman W. B. 2009. Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol 3: The Firmicutes. 2nd ed. New York, Springer: 1450 str.
- Walter J., Tannock G.W., Tilsala-Timisjarvi A., Rodtong S., Loach D.M., Munro K., Alatossava T. 2000. Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. Applied and Environmental Microbiology, 66, 1: 297 - 303.
- Witthuhn R. C., Cilliers A., Britz T. J. 2005a. Evaluation of different preservation techniques on the storage potential of kefir grains. Journal of Dairy Research, 72: 125 - 128.
- Witthuhn R. C., Schoeman T., Britz T. J. 2005b. Characterisation of the microbial population at different stages of kefir production and kefir grain mass cultivation. International Dairy Journal, 15: 383 - 389.
- Wojtowski J., Dankow R., Skrzyper R., Fahr R. D. 2003. The fatty acid profile in kefir from sheep, goat and cow milk. Milchwissenschaft, 58: 633 - 636.
- Wood B. J. B., Hodge M. M. 1985. Yeast – lactic acid bacteria interactions and fermented foods. V: Microbiology of fermented foods. Vol. 1. Wood B. J. B. (ed.). London, Elsevier Applied Science: 272 – 276.
- Zajšek K., Kolar M., Goršek A. 2011. Characterisation of the exopolysaccharide kefiran produced by lactic acid bacteria entrapped within natural kefir grains. International Journal of Dairy Technology, 64: 544 - 548.
- Zajšek K. 2012. Optimiranje bioprocenih parametrov proizvodnje etanola in kefirana z mikrobioto kefirnih zrn. Doktorska disertacija. Maribor, Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 123 str.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici, prof. dr. Ireni Rogelj za vso pomoč pri izdelavi diplomskega dela, za vse nasvete, popravke in razlage pri pisanju diplomskega dela.

Iskrena hvala tudi recenzentki, prof. dr. Poloni Jamnik za pregled diplomskega dela in vse koristne napotke.

Posebno se zahvaljujem staršema ter bratu in sestri za vso podporo v času študija.

Iz srca pa se zahvaljujem svoji družini, ženi Janji in otrokoma Anayi Gaji ter Galu za vse lepe besede, potrpežljivost in spodbujanje pri pisanju diplome.

PRILOGE

Priloga A: Vrednosti pH in SH kefirja narejenega s kefirnimi zrnji vzdrževanimi v laboratoriju in mlekarji, s prikazano osnovno statistiko rezultatov

vzorec št.	Vrednosti pH		Vrednosti SH	
	laboratorij	mlekarna	laboratorij	mlekarna
1	4,29	3,89	38,03	44,89
2	4,41	4,39	36,28	37,16
3	3,94	3,9	44,32	46,48
4	4,36	3,95	36,2	46,32
5	4,08	3,89	42,2	50,32
6	3,8	4	53,68	43,56
7	3,74	4	56,08	44,56
8	3,96	3,98	50,92	49,46
9	3,84	4,14	53	42,04
10	3,91	4,09	49	41,24
povprečje	4,03	4,02	45,97	44,6
standardni odklon	0,24	0,15	7,56	3,9
Shapiro Wilkov test P_{SW}	0,28	0,032	0,32	0,92
studentov t test (vrednost p)	0,91		0,62	