

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Suzana GREŠAK

**OPTIMIZACIJA PRIPRAVE VZORCEV
PROBIOTIČNIH IZDELKOV ZA MIKROBIOLOŠKO
ANALIZO**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja Živilstvo

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Suzana GREŠAK

**OPTIMIZACIJA PRIPRAVE VZORCEV PROBIOTIČNIH
IZDELKOV ZA MIKROBIOLOŠKO ANALIZO**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja Živilstvo

**OPTIMIZATION OF PROBIOTIC SAMPLE PREPARATION FOR
MICROBIOLOGICAL ANALYSIS**

M. SC. THESIS
Master Study Programmes: Field Food Science and Technology

Ljubljana, 2016

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa druge stopnje Živilstvo. Mikrobiološki del je bil opravljen v laboratoriju Katedre za mlekarstvo, Oddelka za zootehniko, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorico magistrskega dela imenovala doc. dr. Andrejo Čanžek Majhenič, za somentorico asist. dr. Petro Mohar Lorbeg in za recenzentko prof. dr. Barbaro Jeršek.

Mentorica: doc. dr. Andreja Čanžek Majhenič

Somentorica: asist. dr. Petra Mohar Lorbeg

Recenzentka: prof. dr. Barbara Jeršek

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Podpisana 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.

Suzana Grešak

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	UDK 579.083:579.24:579.67(043)=163.6
KG	probiotične bakterije/priprava vzorcev/ štetje kolonij/mikrobiološka analiza/razredčevala/uporaba razredčeval/bifidobakterije/laktobacili
AV	GREŠAK, Suzana, dipl. inž. živ. in preh. (UN)
SA	ČANŽEK MAJHENIČ, Andreja (mentorica)/MOHAR LORBEG, Petra (somentorica)/JERŠEK, Barbara (recenzentka)
KZ	SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI	2016
IN	OPTIMIZACIJA PRIPRAVE VZORCEV PROBIOTIČNIH IZDELKOV ZA MIKROBIOLOŠKO ANALIZO
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja Živilstvo)
OP	X, 44 str., 10 pregl., 7 sl., 18 pril., 41 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	V nalogi smo želeli ugotoviti vpliv postopka priprave vzorca in uporabljenega razredčevala za določanje števila kultivabilnih laktobacilov in/ali bifidobakterij v petih prehranskih dopolnilih različnih oblik (prah, tableta, kapsula, mlečna formula, oljna suspenzija) in v fermentiranem živilu (sir). Za analize smo uporabili osem različnih razredčeval: Ringerjevo raztopino $\frac{1}{4}$ jakosti (RING), 20 % raztopino dikalijevega hidrogen fosfata (K_2HPO_4), 20 % raztopino natrijevega citrata z dodatkom Tweena 80 (1 g/L) (CITRAT+T), peptonsko vodo (PV), pufrirano peptonsko vodo (BPW), fosfatni pufer s soljo (pH 7,3) (PBS), Mitsuoka pufer (pH 6,5) (MITS) in anaerobni diluent (AD). Pri vzorcu Waya LGG smo uporabili dodatno razredčevalo, in sicer 20 % raztopino natrijevega citrata z dodatkom Tweena 80 (9 g/L) (TWEEN). Osnovne razredčitve vsakega vzorca smo osnovno homogenizirali z mešanjem v gnetilniku (2 minuti) (OS) ter nadalje obdelali z dolgotrajnim mešanjem (2×10 minut) (MEŠ) v gnetilniku (8 udarcev/sekundo), z laboratorijskim mešalom z rezili (1 minuto) (UT) ter z inkubacijo pri sobni temperaturi (2×12 minut) (SOB) oz. pri 37 °C (2×12 minut) z občasnim mešanjem (2 minuti) (INK), pri siru pa smo uporabili še postopek inkubacije pri 45 °C (5 minut) (KOPEL). Razlike med rezultati števila probiotičnih bakterij pri uporabi različnih postopkov obdelave oz. različnih razredčeval so bile majhne, zato težko izpostavimo univerzalno razredčevalo oz. postopek. Pri analizi prehranskih dopolnil smo najvišje število bifidobakterij dobili ob uporabi MITS in AD, število laktobacilov pa ob uporabi AD ali BPW. Od postopkov obdelave sta se pri določanju, tako laktobacilov kot bifidobakterij v prehranskih dopolnilih, bolje izkazali uporaba UT in inkubacija SOB. Pri analizi sira pa je bilo število bifidobakterij najvišje ob uporabi CITRAT+T v kombinaciji s kratkotrajnim segrevanjem osnovne raztopine KOPEL.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Du2
DC UDC 579.083:579.24:579.67(043)=163.6
CX probiotic bacteria/sample preparation/ plate count/microbiological analysis/diluents/use of diluents/bifidobacteria/lactobacilli
AU GREŠAK, Suzana
AA ČANŽEK MAJHENIČ, Andreja (supervisor)/MOHAR LORBEG, Petra (co-advisor)/JERŠEK, Barbara (reviewer)
PP SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
PY 2016
TI OPTIMIZATION OF PROBIOTIC SAMPLE PREPARATION FOR MICROBIOLOGICAL ANALYSIS

DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Food Science and Technolgy)
NO X, 44 p., 10 tab., 7 fig., 18 ann., 41 ref.
LA sl
AL sl/en
AB The aim of our study was to evaluate the impact of sample preparation and dilution media on assessment of cultivable counts of lactobacilli or/and bifidobacteria in five different commercial probiotic food supplements (powder, tablets, capsules, milk formula and oil suspension) and in one fermented food (cheese). Therefore, eight different diluents were used: ¼ strength Ringer's solution, 20 % dipotassium hydrogen phosphate solution (K_2HPO_4), 20 % sodium citrate solution with addition of Tween 80 (1 g/L) (CITRAT+T), peptone water (PV), buffered peptone water (BPW), phosphate buffered saline (pH 7.3) (PBS), Mitsuoka buffer (pH 6.5) (MITS) and anaerobic diluent (AD). For analysis of the sample Waya LGG we used an additional diluents, 20 % sodium citrate solution with addition of Tween 80 (9 g/L) (TWEEN). Initial suspensions of each sample were basically homogenized with stomacher (2 minutes) and further processed with five different treatments: long-term mixing with stomacher (2× 10 minutes) (MEŠ), mixing with Ultra-turrax (1 minute) (UT), and incubation at room temperature (2× 12 minutes) (SOB) and at 37 °C (2× 12 minutes) (INK), respectively, with occasional stirring (2 minutes), while cheese suspension was extra treated for 5 minutes at 45 °C (KOPEL). The differences between the results of using different diluents or treatments were small, and we cannot highlight one diluent or treatment. In food supplements, the counts of bifidobacteria were higher when Mitsuoka buffer (pH 6.5) or AD was used, while for lactobacilli enumeration the use of AD or BPW is recommended. Regarding the sample preparation procedures for enumeration of either bifidobacteria or lactobacilli in food supplements, UT and incubation at room temperature were assessed as preferential procedures. In cheese sample the use of 20 % sodium citrate solution with addition of Tween 80 (1 g/L) (CITRAT+T) combined with incubation of initial suspension at 45 °C (KOPEL) gave the highest bifidobacterial counts.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PRILOG	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
1 UVOD	1
1.1 NAMEN NALOGE	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 PROBIOTIKI.....	3
2.2 ROD <i>Bifidobacterium</i>	4
2.2.1 <i>Bifidobacterium animalis</i>	5
2.2.2 <i>Bifidobacterium bifidum</i>	5
2.3 ROD <i>Lactobacillus</i>	6
2.3.1 <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	6
2.3.2 <i>Lactobacillus acidophilus</i>	6
2.4 PROIZVODNI PROCESI PRIPRAVE PROBIOTIKOV	7
2.4.1 Fermentacija	8
2.4.2 Sušenje	8
2.4.3 Liofilizacija.....	9
2.4.4 Mikrokapsuliranje.....	9
2.4.5 Zamrzovanje	10
2.5 PRIPRAVA VZORCEV PROBIOTIKOV ZA MIKROBIOLOŠKE ANALIZE	10
2.5.1 Priprava zamrznjenih probiotičnih kultur in živil.....	11
2.5.2 Priprava sušenih probiotičnih kultur	12
2.5.3 Priprava vzorcev živil, ki vsebujejo probiotične bakterije	13
2.6 HOMOGENIZACIJA IN RAZREDČEVANJE	13
2.6.1 Homogenizacija.....	13
2.6.2 Razredčevalne raztopine.....	13
2.7 IZBIRA GOJIŠČA.....	15
2.7.1 Čiste kulture.....	15
2.7.2 Mešane kulture	15
2.8 RAZMERE INKUBACIJE.....	15
2.8.1 Temperatura	15
2.8.2 Atmosfera	15

2.9	METODA ŠTETJA KOLONIJ NA TRDIH GOJIŠČIH.....	16
3	MATERIAL IN METODE.....	17
3.1	NAČRT POSKUSA.....	18
3.2	MATERIALI	19
3.2.1	Razredčevalne raztopine.....	19
3.2.1.1	Anaerobni diluent	19
3.2.1.2	Ringerjeva raztopina ¼ jakosti	19
3.2.1.3	Pufirana peptonska voda.....	19
3.2.1.4	Peptonska voda	20
3.2.1.5	Mitsuoka pufer (pH 6,5)	20
3.2.1.6	Raztopina dikalijevega hidrogen fosfata.....	20
3.2.1.7	Fosfatni pufer s soljo (pH 7,3).....	20
3.2.1.8	Raztopina natrijevega citrata z 0,1 % Tweena 80.....	20
3.2.1.9	Raztopina natrijevega citrata z 0,9 % Tweena 80.....	20
3.2.2	Vzorci prehranskih dodatkov in funkcionalnih živil	21
3.2.3	Gojišča in dodatki.....	23
3.2.3.1	Gojišče MRS.....	23
3.2.3.2	Gojišče TOS z dodatkom mupirocina.....	23
3.3	METODE.....	24
3.3.1	Predpriprava vzorcev.....	24
3.3.2	Priprava osnovnih raztopin.....	24
3.3.3	Osnovna homogenizacija	24
3.3.4	Obdelava.....	24
3.3.5	Metoda štetja kolonij na trdih gojiščih in vrednotenje rezultatov.....	25
3.3.6	Statistična obdelava rezultatov	27
3.4	LABORATORIJSKA OPREMA	28
4	REZULTATI	29
4.1	NOVALAC CC.....	29
4.2	WAYA AB	30
4.3	WAYA LGG.....	30
4.4	LACTO SEVEN	31
4.5	FLORAZYM	32
4.6	SIR LCA	33
5	RAZPRAVA	35
6	SKLEPI	38
7	POVZETEK.....	39
8	VIRI.....	41
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Bakterije, ki so v uporabi kot probiotiki (Rogelj in Perko, 2003: 566).....	4
Preglednica 2: Pregled skupin probiotičnih izdelkov na tržišču (Bogovič Matijašić, 2014: 41).....	7
Preglednica 3: Predstavitev vzorcev prehranskih dodatkov in funkcionalnih živil.....	22
Preglednica 4: Načini priprave vzorcev pred začetnim vzorčenjem	24
Preglednica 5: Povprečne vrednosti skupnega števila bifidobakterij in laktobacilov v vzorcu Novalac CC.....	29
Preglednica 6: Povprečne vrednosti skupnega števila bifidobakterij in laktobacilov v vzorcu Waya AB	30
Preglednica 7: Povprečne vrednosti skupnega števila laktobacilov v vzorcu Waya LGG..	31
Preglednica 8: Povprečne vrednosti skupnega števila bifidobakterij in laktobacilov v vzorcu Lacto Seven	32
Preglednica 9: Povprečne vrednosti skupnega števila bifidobakterij in laktobacilov v vzorcu FloraZym	33
Preglednica 10: Povprečne vrednosti skupnega števila bifidobakterij v vzorcu sir LCA ...	34

KAZALO SLIK

Slika 1: <i>Bifidobacterium bifidum</i> , barvanje po Gramu (Todar, 2008a).....	5
Slika 2: <i>Lactobacillus acidophilus</i> (Todar, 2008b)	7
Slika 3: Potek poskusa.....	18
Slika 4: Pripravljene razredčevalne raztopine po avtoklaviranju	19
Slika 5: Razredčevanje in nacepljanje	26
Slika 6: Gojišča po 72 – urni inkubaciji	26
Slika 7: Štetje zraslih kolonij po 72 – urni inkubaciji	27

KAZALO PRILOG

Priloga A: Osnovni rezultati štetja zraslih kolonij iz dveh ponovitev za posamezen vzorec

Priloga A1: Število bifidobakterij (TOS+M) in laktobacilov (MRS) v vzorcu Novalac CC, izraženo v KE/g

Priloga A2: Število bifidobakterij (TOS+M) in laktobacilov (MRS) v vzorcu Waya AB izraženo v KE/g

Priloga A3: Število laktobacilov (MRS) v vzorcu Waya LGG, izraženo v KE/g

Priloga A4: Število bifidobakterij (TOS+M) in laktobacilov (MRS) v vzorcu Lacto Seven, izraženo v KE/g

Priloga A5: Število bifidobakterij (TOS+M) in laktobacilov (MRS) v vzorcu FloraZym, izraženo v KE/g

Priloga A6: Število bifidobakterij (TOS+M) v vzorcu sira LCA, izraženo v KE/g

Priloga B: Rezultati medsebojne statistične primerjave razredčeval in postopkov obdelave (ANOVA na rangih po metodi Kruskal-Wallis s testom mnogoterih primerjav po Dunn-u)

Priloga B1: Rezultati medsebojne statistične primerjave razredčeval za vzorec Novalac CC

Priloga B2: Rezultati medsebojne statistične primerjave obdelav za vzorec Novalac CC

Priloga B3: Rezultati medsebojne statistične primerjave razredčeval za vzorec Waya AB

Priloga B4: Rezultati medsebojne statistične primerjave obdelav za vzorec Waya AB

Priloga B5: Rezultati medsebojne statistične primerjave razredčeval za vzorec Waya LGG

Priloga B6: Rezultati medsebojne statistične primerjave obdelav za vzorec Waya LGG

Priloga B7: Rezultati medsebojne statistične primerjave razredčeval za vzorec Lacto Seven

Priloga B8: Rezultati medsebojne statistične primerjave obdelav za vzorec Lacto Seven

Priloga B9: Rezultati medsebojne statistične primerjave razredčeval za vzorec FloraZym

Priloga B10: Rezultati medsebojne statistične primerjave obdelav za vzorec FloraZym

Priloga B11: Rezultati medsebojne statistične primerjave razredčeval za vzorec sira LCA

Priloga B12: Rezultati medsebojne statistične primerjave obdelav za vzorec sira LCA

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Okrajšava ali simbol:	Pomen:
AD	anaerobni diluent
B.	<i>Bifidobacterium</i>
BPW	pufrirana peptonska voda (ang. buffered peptone water)
CITRAT + T	20 % raztopina natrijevega citrata z dodatkom Tween-a 80 (1 g/L)
E.	<i>Enterococcus</i>
FAO	Organizacija Združenih narodov za prehrano in kmetijstvo (ang. Food and Agriculture Organization)
GI	gastrointestinalen
GRAS	splošno priznan kot varen (ang. Generally Recognized As Safe)
INK	način obdelave vzorca – inkubacija pri temperaturi 37 °C z občasnim mešanjem
KE	kolonijska enota
KOPEL	način obdelave vzorca – inkubacija v vodni kopeli pri 45 °C
K ₂ HPO ₄	20 % raztopina dikalijevega hidrogen fosfata
L.	<i>Lactobacillus</i>
MEŠ	način obdelave vzorca – dolgotrajno mešanje
MITs	Mitsuoka pufer (pH 6,5)
MRS	gojišče de Man-Rogosa-Sharpe
OS	način obdelave vzorca - osnovna homogenizacija
PBS	fosfatni pufer s soljo (pH 7,3)
PV	peptonska voda
RING	Ringerjeva raztopina ¼ jakosti
SOB	način obdelave vzorca – inkubacija pri sobni temperaturi z občasnim mešanjem
ssp.	podvrsta (subspecies)
Str.	<i>Streptococcus</i>
TOS	TOS propionatni agar –gojišče z mešanico tri-, tetra-, penta- in heksasaharidov, pridobljenih z encimsko hidrolizo laktoze s pomočjo <i>Aspergillus oryzae</i> β-galaktozidaze
TOS+M	TOS propionatni agar z dodatkom mupirocina
TWEEN	20 % raztopina natrijevega citrata z dodatkom Tween-a 80 (9 g/L)
UT	način obdelave vzorca z laboratorijskim mešalom z rezili (ang. Ultra Turrax)
VBNC	žive, a ne kultivabilne (ang. viable but not cultivable)
WHO	Svetovna zdravstvena organizacija (ang. World Health Organization)

1 UVOD

Povpraševanje potrošnikov po izdelkih, ki vsebujejo probiotične bakterije, se iz leta v leto povečuje. Potrošniki vse bolj skrbijo za svoje zdravje, zato vedno pogosteje posegajo po funkcionalnih živilih in prehranskih dopolnilih, ki imajo varovalen učinek pred boleznimi sodobnega časa. To je tudi razlog povečanega zanimanja za probiotične izdelke, ki pozitivno vplivajo na zdravje potrošnika in sicer tako, da izboljšajo njegovo mikrobnoravnovesje v gastrointestinalnem (GI) traktu (Burgain in sod., 2011).

Pri uporabi probiotikov moramo biti pozorni na njihovo kakovost oziroma na njihovo število v prehranskih dopolnilih ali funkcionalnih živilih. Za ugotavljanje velikosti populacije probiotičnih bakterij v nekem izdelku se še vedno najpogosteje uporablja klasična metoda štetja kolonij na trdem gojišču (Champagne in sod., 2011).

Med tehnološkimi postopki priprave izdelkov s probiotičnimi bakterijami, so slednje podvržene številnim stresnim dejavnikom, ki lahko zmanjšajo njihovo aktivnost in število živih celic v izdelku. Ker pa vemo, da je učinek takega izdelka ob zaužitju odvisen od števila in kakovosti živih probiotičnih bakterij v njem, je bistvenega pomena tudi optimizacija postopkov, s katerimi določamo število kultivabilnih probiotičnih bakterij v izdelku (Champagne in sod., 2011).

Ponudba probiotičnih izdelkov se iz leta v leto širi. Izdelke s probiotičnimi bakterijami lahko razdelimo v dve skupini in sicer na funkcionalna živila in prehranska dopolnila, med katere prištevamo fermentirane mlečne izdelke kot so jogurti, siri ter izdelke v obliki tablet, praškov, kapsul (mikrokapsulirane probiotične bakterije), emulzij, kapljic. Od vrste in sestave izdelka (npr. prašek, kapsula, sir) je odvisno, katero razredčevalo je najustreznejše in kateri način priprave vzorca je najboljši, da dobimo najboljši rezultat oz. da omogočimo rast čim večjemu številu probiotičnih bakterij, ki so prisotne v izdelku. Iz tega razloga so potrebne modifikacije priprave vzorca in uporaba različnih razredčeval (Champagne in sod., 2011).

1.1 NAMEN NALOGE

Danes je na tržišču vedno več probiotičnih izdelkov v najrazličnejših oblikah, od fermentiranih mlečnih izdelkov do napitkov, praškastih pripravkov, tablet, oljnih suspenzij. Pomembna koraka za pravilen rezultat o velikosti in sestavi mikrobne populacije izdelka sta poleg izbire ustreznega gojišča zagotovo tudi vzorčenje in priprava teh vzorcev. Poleg tega še ni na voljo predpisov oz. standardov, ki bi, glede na obliko izdelkov, narekovali in hkrati poenotili postopke priprave probiotičnih izdelkov za mikrobiološke preiskave.

Namen magistrskega dela je bil, da z različnimi pristopi (uporaba različnih razredčeval in postopkov priprave vzorca) optimiziramo pripravo 6-ih probiotičnih izdelkov (pet prehranskih dopolnil in en fermentiran mlečni izdelek) za mikrobiološke analize tako, da omogočimo rast čim večjemu številu probiotičnih bakterij, prisotnih v izdelku. Iz primerjave rezultatov uporabe različnih razredčeval in postopkov priprave smo želeli izbrati najustreznejše razredčevalno sredstvo in postopek obdelave za analizo določenega tipa vzorca probiotičnega izdelka. Dobljene rezultate smo statistično obdelali in jih primerjali z literaturnimi podatki.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Iz rezultatov mikrobiološke analize posameznega probiotičnega izdelka, pripravljenega na različne načine, bomo lahko izbrali takšen način priprave vzorca, s katerim bomo v izdelku prisotnim bakterijam omogočili rast na ustreznih gojiščih in tako točneje ocenili število probiotičnih bakterij, prisotnih v izdelku.

2 PREGLED OBJAV

2.1 PROBIOTIKI

Beseda probiotik izvira iz grščine in pomeni »za življenje«, medtem ko je pomen besede antibiotik ravno nasproten, in sicer »zoper življenje« (Jungersen in sod., 2014).

O uživanju fermentiranega mleka za zdravljenje driske je pisal že Pinij v prvem stoletju pred našim štetjem. O konceptu probiotikov, kakršnega poznamo danes, pa je na prelomu iz 19. v 20. stoletje prvi pisal Elie Metchnikoff. Trdil je, da imajo mlečnokislinske bakterije pomembno vlogo pri vzdrževanju zdravja. Le te naj bi namreč zavirale »gnilobni tip« fermentacij v črevesju. Prav tako je pisal o prebivalcih Azije in Balkana ter njihovi prehrani, ki je vključevala veliko različnih vrst fermentiranega mleka, kot sta jogurt in kefir. Menil je, da je ravno zauživanje teh izdelkov razlog za doseganje tako visoke starosti teh ljudstev. Njegovo pisanje in razmišljanje je spodbudilo številne druge znanstvenike po svetu k raziskovanju teh mikroorganizmov (Adamič in sod., 2003).

Leta 1965 je bil izraz »probiotik« prvič uporabljen, ampak ne v kontekstu kot ga razumemo danes, temveč kot izraz za snovi, ki jih proizvaja en mikroorganizem in imajo stimulativen učinek za rast ostalih mikroorganizmov. Osnovno definicijo za probiotik pa je leta 1989 postavil Fuller. Probiotik je opisal kot »živ mikrobni dodatek krmi, ki ugodno vpliva na žival gostiteljico z izboljšanjem njenega črevesnega mikrobnega ravnotežja« (Rogelj in Perko, 2003).

Za dober probiotičen sev velja:

- da ob zaužitju pozitivno vpliva na zdravje gostitelja,
- da je nepatogen in netoksičen,
- da je prisoten v obliki živih in metabolno aktivnih celic ter v čim večjem številu,
- da je sposoben preživeti pogoje v gastrointestinalnem (GI) traktu,
- da je stabilen med skladiščenjem (Singh in sod., 2011).

Čeprav so leta 1998 Collins in sod. (1998) definirali 12 pomembnih zahtev oz. kriterijev pri izbiri potencialno probiotičnega seva, pa je ostalo bistvo teh zahtev enako kot pri zahtevah Fuller-ja iz leta 1989, in sicer da mora biti sev varen, živ in metabolno aktiven v GI traktu, da lahko uspešno pozitivno učinkuje na zdravje gostitelja.

Še danes veljavno definicijo probiotikov kot živih mikroorganizmov, ki pozitivno vplivajo na zdravje gostitelja, če jih uživamo v zadostni količini, sta leta 2001 povzeli tudi FAO in WHO (FAO/WHO, 2006). Čeprav med probiotiki prevladujejo bakterije, pa med njimi najdemo tudi plesni in kvasovke (Preglednica 1). Med bakterijskimi probiotiki, ki so v probiotičnih izdelkih, prednjačijo mlečnokislinske bakterije, predvsem sevi rodov *Lactobacillus* in *Bifidobacterium* (Davis, 2014).

Preglednica 1: Bakterije, ki so v uporabi kot probiotiki (Rogelj in Perko, 2003: 566)

Rod <i>Lactobacillus</i>	Rod <i>Bifidobacterium</i>	Rod <i>Enterococcus</i>	Ostali
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>E. faecium</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. plantarum</i>	<i>B. infantis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. adolescentis</i>		<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>
<i>L. rhamnosus</i>	<i>B. longum</i>		<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	<i>B. breve</i>		<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
<i>L. fermentum</i>	<i>B. lactis</i>		<i>Pediococcus acidilactici</i>
<i>L. johnsonii</i>			<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>L. gasseri</i>			<i>Escherichia coli</i>
<i>L. salivarius</i>			
<i>L. reuteri</i>			

Omeniti moramo tudi oznako GRAS (ang. Generally Recognized As Safe), ki mikroorganizmom s to oznako daje status »varnih« mikroorganizmov in se lahko uporabljajo v proizvodnji živil (Rogelj in Perko, 2003).

2.2 ROD *Bifidobacterium*

Bifidobakterije je prvi izoliral in opisal Henri Tissier leta 1900. Izoliral jih je iz blata novorojenčkov in jih poimenoval *Bacillus bifidus communis*. Danes je v rod *Bifidobacterium* vključenih že več kot 50 različnih vrst bifidobakterij (Genus *Bifidobacterium*, 2015).

Bifidobakterije so po Gramu pozitivne, nesporogene, negibljuje in katalaza-negativne anaerobne bakterije, ki so različnih oblik, od kratkih ukrivljenih do razvejanih paličic z obliko črke Y. Glukozo fermentirajo v mlečno in očetno kislino (Castillo Martinez in sod., 2013).

Na gojišču TOS z dodatkom mupirocina tvorijo bele, okrogle, lečaste in delno zvezdaste kolonije premera 1 mm do 4 mm. Optimalna temperatura za rast bifidobakterij je med 37 °C in 41 °C (ISO 29981, 2010).

Bifidobakterije so pomembni mikroorganizmi v aktivnem in kompleksnem ekosistemu kot je gastrointestinalni trakt, bodisi človeka ter toplokrvnih živali in čebel (Gomes in Malcata, 1999). So pomembna skupina mikrobiote človeškega GI trakta, saj predstavljajo pri odraslih 3-7 % ter pri novorojenčkih kar 91 % celotne črevesne mikrobiote (Castillo Martinez in sod., 2013).

V debelem črevesu odraslih ljudi je njihova koncentracija med 10^8 in 10^9 KE/g, kar jih uvršča med pomembnejše črevesne bakterije. Bifidobakterije najdemo tudi v ostalih ekoloških nišah, ker pa se sevi razlikujejo, je to eden izmed načinov odkrivanja vira kontaminacije. Tako postajajo tudi vse bolj pomembna indikatorska skupina mikroorganizmov, saj je njihovo odkrivanje, zahvaljujoč novim molekularnim metodam, bistveno hitrejše kot pri klasičnih kultivacijskih metodah (Adamič in sod., 2003).

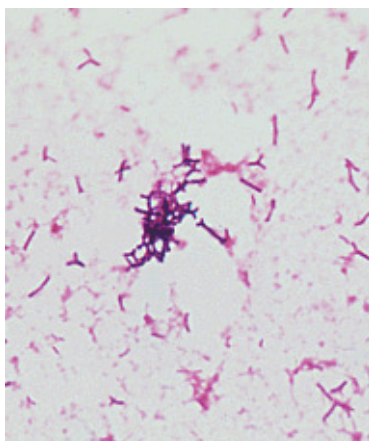
Najbolj raziskana probiotična bakterija je zagotovo *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB-12. Opisujejo jo v več kot 300 znanstvenih objavah, od tega je bilo več kot 130 kliničnih študij, opravljenih na ljudeh. Kot so potrdili rezultati številnih študij, je sev zelo primeren tudi s tehnološkega vidika. Je visoko aerotoleranten, zelo stabilen, je tolerant za nizke vrednosti pH in prisotnost žolča. Primeren je tudi za uporabo v liofiliziranih izdelkih in prehranskih dopolnilih. Poleg tega dodatek *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB-12 nima negativnega vpliva na okus, izgled izdelka, kot tudi ne na občutek v ustih. Sposoben je preživeti v probiotičnem izdelku vse do njegove porabe (Jungersen in sod., 2014).

2.2.1 *Bifidobacterium animalis*

Bifidobacterium animalis je ena izmed več kot petdeset vrst rodu *Bifidobacterium*, pomembne skupine bakterij, ki naseljujejo prebavni trakt ljudi in živali. V skupini *Bifidobacterium animalis* najdemo dve podvrsti in sicer *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* in *Bifidobacterium animalis* ssp. *animalis*. Danone, eden največjih proizvajalcev mlečnih izdelkov, uporablja *Bifidobacterium animalis* v svoji liniji izdelkov pod blagovno znamko Activia. Activia trži kot mlečni izdelek z edinstveno probiotično kulturo, ki na naraven način prispeva k urejeni prebavi (*Bifidobacterium animalis*, 2009).

2.2.2 *Bifidobacterium bifidum*

Med koristne mikrobe uvrščamo tudi probiotično bakterijo *Bifidobacterium bifidum*, ki naseljuje debelo črevo in nožnico. *B. bifidum* vzdržuje ravnovesje črevesne mikrobiote, uspešno tekmuje s škodljivimi bakterijami ob njihovem morebitnem pojavu v prebavilih, krepi imunski sistem in izboljšuje prebavo (*Bifidobacterium bifidum*, 2009). Slika 1 prikazuje mikroskopski preparat bakterij *Bifidobacterium bifidum*, pobarvanih po Gramu.



Slika 1: *Bifidobacterium bifidum*, barvanje po Gramu (Todar, 2008a)

B. bifidum, ki prevladuje v materinem mleku, ima pomembno vlogo v prehrani novorojenčkov saj poveča imunski odziv, kar je predvsem pomembno pri nedonošenčkih ali novorojenčkih z oslabljenim prebavnim sistemom (*Bifidobacterium bifidum*, 2009).

2.3 ROD *Lactobacillus*

Laktobacili so po Gramu pozitivne, nesporogene, anaerobne oz. aerotolerantne, striktno fermentativne palčke brez flagelov, ki glukozo fermentirajo v mlečno kislino (Gomes in Malcata, 1999). Leta 1990 je Moro kot prvi izoliral fakultativne anaerobne palčke iz blata dojenčkov, in jih je označil kot *Bacillus acidophilus*, to je generično ime za črevesne laktobacile (Gomes in Malcata, 1999). Trenutno je priznanih že več kot 200 vrst rodu *Lactobacillus* (Genus *Lactobacillus*, 2015). Komercialni sevi laktobacilov, ki se najpogosteje uporabljajo kot probiotiki so: *L. acidophilus* NCFM, *L. rhamnosus* HN001, *L. rhamnosus* R0011, *L. acidophilus* R0052, *L. acidophilus* LA5, *L. paracasei* CRL 431, *L. fermentum* VRI003 (PCC), *L. reuteri* RC-14, *L. rhamnosus* GR-1, *L. paracasei* F19, *L. casei* Shirota, *L. casei* DN-114 001, *L. johnsonii* Lj-1 (NCC533; *L. acidophilus* La-1), *L. plantarum* 299V, *L. reuteri* ATCC 55730, *L. rhamnosus* GG (LGG), *L. rhamnosus* LB21, *L. salivarius* UCC118 in *L. acidophilus* LB (CDRF, 2011).

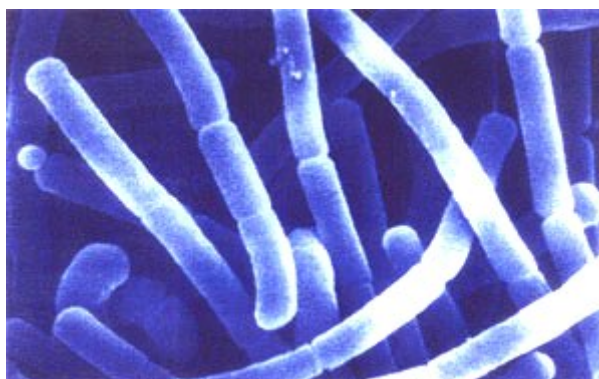
Laktobacili naseljujejo najrazličnejše ekološke niše in so pomembni predstavniki mikrobiote prebavnega in genitalnega trakta ljudi in višje razvitih živali. Njihova porazdelitev je odvisna od okoljskih dejavnikov kot so vrednost pH, razpoložljivost kisika, količina substratov, prisotnost metabolitov in interakcije med bakterijami (Gomes in Malcata, 1999).

2.3.1 *Lactobacillus rhamnosus* GG

Bakterijo *Lactobacillus rhamnosus* GG sta iz črevesa zdravega človeka leta 1983 izolirala znanstvenika Barry Goldin in Sherwood Gorbach, oznaka »GG« v imenu bakterije pa pomeni začetnici njunih priimkov. Izkazalo se je, da je *L. rhamnosus* GG izjemno toleranten v razmerah, ki vladajo v prebavnem traktu, predvsem za nizke vrednosti pH. Tako kot ostali probiotiki izkazuje tudi *L. rhamnosus* GG probiotične lastnosti, predvsem uravnava ravnovesje črevesne mikrobiote, krepi delovanje imunskega sistema in ob okužbah uspešno izpodriva patogene mikroorganizme v sečevodu in črevesu (*Lactobacillus rhamnosus*, 2009).

2.3.2 *Lactobacillus acidophilus*

Sevi vrste *Lactobacillus acidophilus* (Slika 2) so najpogosteje uporabljeni kot probiotične bakterije. Veliko koristnih bakterij, med njimi tudi *L. acidophilus*, naseljuje črevesje in nožnico, kjer nas s svojim delovanjem ščitijo pred škodljivimi bakterijami. *L. acidophilus* sodeluje pri prebavi hrane v črevesju, pri tem pa se sproščajo različne snovi kot npr. mlečna kislina in vodikov peroksid, ki skupaj ustvarita neustrezne razmere za t.i. slabe bakterije oz. patogene bakterije (Ehrlich, 2011).

Slika 2: *Lactobacillus acidophilus* (Todar, 2008b)

Uživanje probiotikov je še posebej priporočljivo ob terapijah z antibiotiki. Antibiotiki uničujejo bakterije, vendar ne uničujejo le »slabih« ampak tudi »dobre« bakterije. Zato je ob jemanju antibiotikov ravnotežje črevesne mikrobiote porušeno. To težavo lahko rešimo z uživanjem probiotikov, ki nam pomagajo ponovno vzpostaviti ustrezno ravnovesje črevesne mikrobiote (Ehrlich, 2011).

2.4 PROIZVODNI PROCESI PRIPRAVE PROBIOTIKOV

Probiotike najdemo danes v najrazličnejših oblikah. Najbolj razširjeni so v obliki fermentiranih mlečnih izdelkov, lahko so sestavine drugih živil, kot prehranska dopolnila, živila za posebne zdravstvene namene ali kot zdravila, v zadnjem času pa je vse več novih oblik, kot so vaginalne kapsule, kreme, tamponi in serumi, zobne paste in celo žvečilni gumiji (Preglednica 2).

Preglednica 2: Pregled skupin probiotičnih izdelkov na tržišču (Bogovič Matijašić, 2014: 41)

Skupina	Primer
Fermentirana probiotična živila	Probiotični jogurti, fermentirani napitki, sir, skuta, maslo, fermentirani mesni izdelki.
Nefermentirana probiotična živila	Žitarice, slaščice, tablice, kava, čokolada, sladoledi, ledeni čaj, sokovi, mleko, sojino mleko
Prehranska dopolnila	Kapsule, tablete, pastile za žvečenje, ampule ali zavočki s prašnatim izdelkom, suspenzije
Živila za posebne zdravstvene namene	Različna živila, prašnata oblika
Zdravila	Kapsule, tablete, praški za pripravo suspenzije
Izdelki za vaginalno uporabo	Vaginalne tablete
Izdelki za kozmetiko in higieno	Kreme in serumi, zobne paste, higienski vložki, žvečilni gumiji
Izdelki za živali	Krmni dodatki za rejene živali (prašiči, perutnina, govedo), prehranska dopolnila za družne živali, krmni dodatki za tekmovalne živali (konji)

Seveda pa je potrebno vsako probiotično bakterijo pred uporabo v kateri koli obliki ustrezno pripraviti, obdelati in zaščititi do te mere, da ohrani živost in ustrezno številčnost vse do zaužitja. Najpogosteje se za to uporabljajo tehnike mikrokapsulacije, sušenja, zamrzovanja, liofilizacije ali kombinacije različnih metod (Champagne in sod., 2011).

2.4.1 Fermentacija

Temperatura fermentacije je zelo pomembna za preživetje probiotičnih bakterij. Večini ustreza temperatura med 37 in 43 °C. Nekatere vrste (npr. *L. acidophilus*) pa lahko rastejo tudi pri temperaturah do 45 °C, čeprav je optimalna temperatura za njihovo rast med 40 do 42 °C. Temperature višje od 45 do 50 °C negativno vplivajo na preživelost probiotičnih bakterij. Tudi izpostavljenost kisiku med fermentacijo lahko negativno vpliva na preživelost probiotičnih bakterij, ki so občutljive na kisik. Zato se za zmanjšanje količine prisotnega kisika fermentacija lahko izvaja v vakuumu (Tripathi in Giri, 2014).

Občutljivost probiotičnih bakterij za višje temperature lahko omilimo z blagim segrevanjem pred uporabo. Ugotovljeno je bilo, da postopno prilagajanje na toploto poveča toplotno toleranco. To lahko dosežemo tako, da probiotične bakterije pred uporabo večkrat izpostavimo višjim temperaturam, ki pa nikakor ne smejo biti tako visoke, da bi uničile celice. Takšna metoda adaptacije na višje temperature je uporabna predvsem v industrijske namene fermentacije (Tripathi in Giri, 2014).

2.4.2 Sušenje

Postopek sušenja se v proizvodnji probiotičnih izdelkov pogosto uporablja, saj se sušeni probiotični izdelki lahko skladiščijo pri sobni temperaturi, s čimer so stroški skladiščenja sušenih izdelkov nižji od skladiščenja zamrznjenih izdelkov. V živilski industriji se uporabljajo različne oblike sušenja in sicer sušenje z vročim zrakom, sušenje z zamrzovanjem, sušenje z razprševanjem in vakuumsko sušenje. Sušenje z razprševanjem se najpogosteje uporablja za sušenje tekočih živil, vendar ta postopek dosega visoke temperature, ki pa so lahko usodne za preživetje probiotičnih bakterij. Bolj primeren za sušenje probiotikov je proces sušenja z zamrzovanjem (liofilizacija), ki pa je tudi dražji (Tripathi in Giri, 2014).

Sušenje z razprševanjem je sicer cenejši proces v primerjavi z liofilizacijo vendar poteka vbrizgavanje razpršenega tekočega živila v vroč sušilni medij pri temperaturah do 200 °C. Izdelki, ki vsebujejo probiotične kulture, so torej za kratek čas izpostavljeni zelo visokim temperaturam, kar pa lahko močno zmanjša stopnjo njihove preživelosti oz. poškoduje celice. Številne študije poročajo o stopnji preživelosti probiotikov, ki so bili posušeni z razprševanjem. Nekateri avtorji navajajo celo 80 % stopnjo preživelosti procesa sušenja z razprševanjem (z izhodno temperaturo 85 – 90 °C) bakterije *Lactobacillus paracasei* NFBC 338, ki pa je odporna proti višjim temperaturam (Tripathi in Giri, 2014).

Kot že rečeno so probiotične bakterije med sušenjem podvržene številnim stresnim dejavnikom, kot npr. namnoževanju, centrifugiranju, zamrzovanju, prečrpavanju, visokim temperaturam, oksidacijskemu stresu. Pri teh postopkih lahko pride do poškodb celic, kar pa ima neposreden vpliv na skupno število živih in aktivnih probiotičnih celic po rehidraciji (Champagne in sod., 2011).

Posebna oblika sušenih probiotičnih kultur so prehranska dopolnila. Na tržišču so prisotna v treh oblikah, in sicer:

- Kapsule; prašek v kapsuli iz gela
- Tablete; prašek stisnjen v tableto
- Zavojčki; prašek v porcijskih (približno 5 g) zavojčkih/vrečkah (Champagne in sod., 2011)

2.4.3 Liofilizacija

Za sušenje probiotičnih mikroorganizmov, ki se nato pojavljajo na trgu v obliki praškov, se največkrat uporablja liofilizacija oz. postopek sušenja z zamrzovanjem (Champagne in sod., 2011). Pri liofilizaciji se probiotične bakterije najprej zamrzne pri temperaturi -190 °C potem pa posuši s sublimacijo v vakuumu. Sušenje poteka v treh fazah: zamrzovanje, primarno sušenje in sekundarno sušenje. Liofilizirane celične kulture imajo visoko stopnjo preživetja, saj so proizvodne razmere milejše kot pri ostalih proizvodnih postopkih (Tripathi in Giri, 2014).

Liofilizirane bakterijske kulture lahko skladiščimo pri višjih temperaturah kot zamrznjene. Najustreznejša temperatura skladiščenja liofiliziranih probiotičnih kultur je temperatura hladilnika oz. 4 °C. Pri 22 °C je odmiranje celic desetkrat višje kot pri temperaturi 4 °C. Zahvaljujoč izboljšavam pri proizvodnji in izdelavi praškov je stabilnost izdelkov pri sobni temperaturi vedno boljša, pa vendar se je skladiščenje med 0 °C do 4 °C izkazalo za najoptimalnejše gledano s stališča preživelosti celic. Najbrž je smiselno omeniti tudi dejstvo, da je za proizvajalce probiotičnih izdelkov pomemben cilj, da se lahko izdelki, ki vsebujejo žive probiotične bakterije, skladiščijo pri sobni temperaturi (Champagne in sod., 2011).

Obstaja pa tudi relativno nova oblika liofilizacije in sicer t.i. liofilizacija z razprševanjem, ki združuje dva postopka in sicer sušenje z razprševanjem in liofilizacijo. Uporablja se za izdelavo biofarmaceutskih prašnatih izdelkov brez poškodb celic zaradi toplote. Liofilizacija z razprševanjem zahteva manj časa v primerjavi s klasično liofilizacijo, praški pa imajo večjo specifično površino in večji delež finih delcev. Pri procesu liofilizacije z razprševanjem se kapljice, ki nastanejo z razprševanjem raztopine, potopijo v tekoči dušik in posušijo z liofilizacijo. Stopnja preživelosti v končnem izdelku naj bi bila ob korektno izvedenem postopku kar 97,7 % (Her in sod., 2014).

2.4.4 Mikrokapsuliranje

Za izboljšanje viabilnosti probiotikov vzdolž prebavnega trakta in predvsem pri prehodu skozi želodec, se vse pogosteje uporablja tehnika mikrokapsulacije probiotikov (Berlec, 2014). Kapsuliranje je postopek, pri katerem mikrobnice celice obdamo z ovojem oz. plaščem, ki je lahko iz različnih materialov. Vloga ovoja je predvsem zaščita celic pred neugodnimi okoljskimi dejavniki. Njegova učinkovitost je odvisna od metode, koncentracije ovojnega materiala in prisotnosti oz. odsotnosti vezivnih sredstev (Albadran in sod., 2015).

Predlagane so bile številne metode za mikrokapsuliranje mlečnokislinskih in probiotičnih bakterij, najpogosteje uporabljeni materiali za kapsulacijo pa so alginat, rastlinske/mikrobne gume, hitozan, škrob, karagenan, želatina, mlečni proteini in maščobe (Tripathi in Giri, 2014). Za kapsulacijo prašnatih probiotikov se najpogosteje uporablja postopek, pri katerem prašek poškopimo z lipidom, s čemer se okoli probiotika ustvari lipidna ovojnica oz. plašč. Pogosto se uporablja tudi mikrokapsulacija probiotikov v alginatu (Champagne in sod., 2011).

Glede na dosedanje raziskave je mikrokapsuliranje ena izmed najobetavnejših oblik zaščite mikroorganizmov pred neugodnimi zunanjimi vplivi. V primeru probiotikov je to predvsem nizka vrednost pH v želodcu. Bakterije *L. rhamnosus*, ki so bile mikrokapsulirane v alginatu, so uspešno preživele 48-urno izpostavljenost vrednosti pH 2,0, medtem ko so bile nekapsulirane celice v enakih razmerah popolnoma inaktivirane oz. uničene. Podobne rezultate so dobili tudi pri poskusih z *B. longum* (Özer in sod., 2009). Tudi Champagne in sod. (2015), ki so ugotavljali vpliv različnih dejavnikov na preživelost probiotikov v sladoledu, navajajo, da je mikrokapsulacija odličen način zaščite probiotikov pred zunanjimi vplivi, ki bi lahko negativno vplivali na njihovo preživelost. Mikrokapsulirani probiotiki so uspešnejše preživeli proces proizvodnje probiotičnega sladoleda v primerjavi s probiotiki, ki niso bili mikrokapsulirani. Poleg tega pa so tudi boljše prenašali razmere skladiščenja.

2.4.5 Zamrzovanje

Zamrzovanje je način obdelave s katerim stabiliziramo mikrobne starterske kulture in probiotike med transportom in skladiščenjem, zato se priporoča vključevanje probiotikov v zamrznjena živila, kot npr. sladoled, zamrznjene jogurte. Žal pa lahko pride do uničenja celic tako med procesom zamrzovanja kot tudi med skladiščenjem (Champagne in sod., 2015). Za preživelost celic pri zamrzovanju je pomembno kako hitro zamrznemo celične kulture do določene temperature. Vsekakor je postopek hitrega zamrzovanja boljši od počasnejšega zamrzovanja. Pri počasnem zamrzovanju se namreč tvorijo veliki kristali, ki lahko poškodujejo celične membrane, nasprotno pa se pri hitrem zamrzovanju tvorijo majhni kristali, ki ne poškodujejo celičnih membran (Tripathi in Giri, 2014).

Glede skladiščenja zamrznjenih probiotičnih izdelkov velja pravilo, da nižja kot je temperatura skladiščenja, večja bo stopnja preživelosti probiotikov. Skladiščenje pri -80 °C je bistveno boljše kot skladiščenje pri -30 °C, da ohranimo čim večje število živih celic. Toda tudi pri temperaturi -80 °C lahko po nekaj mesečnem skladiščenju število živih celic močno upade, kar pomeni, da je potrebno poleg temperature skladiščenja upoštevati tudi čas skladiščenja zamrznjenega izdelka (Champagne in sod., 2011). V raziskavi, ki so jo izvedli Champagne in sod. (2015) so ugotovili, kako pomembna je konstantna temperatura skladiščenja zamrznjenih izdelkov, ki vsebujejo probiotične bakterije. Probiotiki v sladoledu, ki so bili skladiščeni pri konstantni temperaturi -20 °C brez temperaturnih nihanj, so imeli bistveno boljšo viabilnost kot pa probiotiki, ki so bili skladiščeni pri isti, vendar nekonstantni temperaturi.

2.5 PRIPRAVA VZORCEV PROBIOTIKOV ZA MIKROBIOLOŠKE ANALIZE

Ob upoštevanju definicije probiotikov, da morajo biti celice probiotičnih bakterij ob zaužitju žive, je potrebno preverjati njihovo število v probiotičnih izdelkih, za kar se

najpogosteje uporablja konvencionalna metoda štetja kolonij na trdih gojiščih. Vendar pa so celice probiotikov v izdelku pogosto pod stresom, kar je posledica proizvodnih postopkov priprave probiotičnih bakterij (npr. rast do visoke celične gostote, izpostavljenost različnim temperaturam, zraku, postopkom sušenja, mehanske obdelave), zato je ustrezna priprava vzorcev ključnega pomena za pravilne rezultate mikrobioloških analiz. Poleg tega iz opisa probiotičnega izdelka navadno ni razvidno, kako je bil probiotik pripravljen, kar spet lahko vodi do težav pri izbiri primernega protokola priprave vzorca in prenizkega rezultata kvantifikacije probiotičnih bakterij. Ne nazadnje pa ima tudi metoda štetja kolonij na trdih gojiščih nekatere pomanjkljivosti kot so zamudnost in nezadostna specifičnost, poleg tega pa rezultate štetja na trdih gojiščih navajamo kot število kolonijskih enot (KE), s čimer kvantificiramo izključno kultivabilni del populacije. Ob vsem tem pa je pomembno tudi dejstvo, da so mikroorganizmi pogosto v skupkih ali verižicah, ki pa jih z ustrezno pripravo vzorca razbijemo le do določene mere (Bogovič Matijašič, 2014).

Res je, da je zakonodaja EU na področju probiotikov še vedno nedorečena in da na voljo še ni standardiziranih metod za mikrobiološke analize, vendar se je ob tem potrebno zavedati, da je težko postaviti univerzalne protokole, ki bodo zadostili za analizo kateregakoli probiotika. Zato so zaenkrat na voljo predvsem priporočila proizvajalcev probiotikov oz. podatki iz literature za pripravo vzorcev glede na obliko izdelka in postopek priprave probiotičnih bakterij (Champagne in sod., 2011).

V svoji objavi so Champagne in sod. (2011) pripravili pregled oz. priporočila glede priprave in razredčevanja vzorcev probiotičnih izdelkov, kar je povzeto v naslednjih poglavjih.

2.5.1 Priprava zamrznjenih probiotičnih kultur in živil

Pri analizah zamrznjenih probiotičnih kultur in izdelkov je zelo pomemben korak odmrzovanja, saj neposredno vpliva na rezultat. Težko najdemo podatke o tem, kateri način odmrzovanja probiotikov je najboljši. Glede na rezultate določanja skupnega števila probiotičnih bakterij naj bi bil najprimernejši način odmrzovanje pri temperaturi hladilnika, pod 5 °C, od 10 do 18 ur. Ni jasno ali so postopki odmrzovanja, ki se priporočajo za mikrobiološke analize zamrznjenih živil, primerni tudi pri analizah zamrznjenih koncentriranih probiotičnih kultur. Številne raziskave so namreč pokazale, da je pri uporabi hitrega postopka odmrzovanja celičnih kultur probiotikov v vodni kopeli s temperaturo od 20 do 45 °C, stopnja preživelosti višja kot pri uporabi postopka odmrzovanja pri temperaturi hladilnika. Postopek hitrega odmrzovanja je torej priporočljiv za probiotične kulture, paziti pa je potrebno, da temperatura ni previsoka (višja od 50 °C) (Champagne in sod., 2011).

Proizvajalci zamrznjenih starterskih kultur priporočajo, da je potrebno odmrznjeno celično kulturo porabiti takoj oz. čimprej po odmrzovanju, še posebej, če je bila temperatura odmrzovanja enaka ali višja od sobne temperature. Iz tega podatka lahko sklepamo, da analizo zamrznjenih vzorcev probiotikov opravimo takoj, ko je izdelek popolnoma odmrznjen. V nasprotnem primeru namreč lahko dobimo napačen rezultat določanja skupnega števila mikroorganizmov. Prav tako že odmrznjenih probiotičnih kultur ali živil ne smemo pred analizo ponovno zamrzniti. Ponovna zamrznitev vzorca namreč negativno

vpliva na preživelost celic, ne glede na to, katero tehniko zamrzovanja uporabimo (Champagne in sod., 2011).

2.5.2 Priprava sušenih probiotičnih kultur

Na trgu so različne oblike sušenih celičnih kultur in sicer kot praški, praški v kapsulah in praški stisnjeni v tablete. V vseh treh primerih so v prašku lahko (Champagne in sod., 2011):

- a) liofilizirane probiotične bakterije ali
- b) liofilizirane in mikrokapsulirane probiotične bakterije.

Rezultati raziskav so pokazali, da prihaja do poškodb celic v čisto vseh fazah proizvodnje sušenih probiotičnih kultur. Iz tega razloga je torej zelo pomembno, katero metodo izberemo za rehidracijo probiotikov. Upoštevati moramo dejstvo, da je velik del celic poškodovan in temu prilagoditi pripravo vzorca in način rehidracije (Champagne in sod., 2011).

Tako kot je značilno za mikrobiološko preiskavo živil je tudi za sušene probiotične kulture, ki so na tržišču v obliki praškov, priporočljivo da jih do analize (določanje skupnega števila) skladiščimo pri temperaturi 4 °C, tudi če proizvajalec navaja, da se lahko izdelek skladišči pri sobni temperaturi. Vzorec je potrebno analizirati v 48 urah od odprtja embalaže. Pred vzorčenjem moramo prašek dobro homogenizirati. Priporočljivo je, da za analizo odvezamo od 10 do 50 g vzorca. Za rehidracijo se priporoča uporaba takega rehidracijskega medija, da dobimo po rehidraciji praška raztopino z 10 do 20 % suhe snovi, vključno s suho snovjo celične kulture, in ki ima ustrezno puferno kapaciteto. Rehidracija pred razredčevanjem naj bi potekala pri temperaturi med 30 in 37 °C od 15 do 30 minut (Champagne in sod., 2011).

Kadar določamo skupno število probiotičnih bakterij v mikrokapsuliranih praških, pa je zelo pomembno, da zagotovimo zadosten rehidracijski čas, ki je potreben, da se ovoji okrog celic razgradijo. Tako na primer za rehidracijo mikrokapsuliranih bakterij z najpogostejše uporabljanimi alginatnimi in lipidnimi ovoji Champagne in sod. (2011) priporočajo take rehidracijske raztopine, ki vsebujejo snovi, ki raztapljajo alginatne oz. lipidne ovojnice. Za alginatne ovojnice priporočajo uporabo citrata ali fosfata (1 - 2 %), za lipidne ovojnice pa uporabo emulgatorja, kot je npr. Tween 80. Champagne in sod. (2010) priporočajo dodatek 0,1 % Tweena 80 v rehidracijsko raztopino. Dodatek citrata in Tweena v rehidracijsko raztopino pa priporočajo tudi za pripravo vzorcev, za katere ne vemo, ali vsebujejo mikrokapsulirane probiotike ali ne. Postopek rehidracije ne »odstrani« lipidne oz. alginatne ovojnice okrog bakterij v celoti zato je priporočljivo, da vzorce mikrokapsuliranih probiotičnih izdelkov po oz. že med postopkom rehidracije tudi ustrezno homogeniziramo (Champagne in sod., 2011).

Priprava prehranskih dopolnil, kot so zavojčki in kapsule, je praktično enaka. Kapsulo oz. zavojček se v aseptičnih razmerah odpre ročno in se iz nje odvzame/strese prašek. Za analizo se priporoča uporaba celotne vsebine kapsule oz. zavojčka. Ostala priporočila so enaka kot za mikrobiološke analize praškov in mikrokapsuliranih praškov. V primerih kadar ni jasno ali gre za prašek, ki vsebuje proste ali mikrokapsulirane celice je

priporočljiva uporaba postopka za analize praškov mikrokapsuliranih celic (Champagne in sod., 2011).

Tablete so po navadi narejene iz praškov mikrokapsuliranih celic, saj naj bi mikrokapsulirane celice uspešneje preživele proces izdelave tablet, zato za pripravo probiotikov v obliki tablet veljajo enaka priporočila kot za praške, ki vsebujejo mikrokapsulirane probiotike. Poleg tega pa je tableto potrebno najprej dobro zdrobiti v aseptičnih razmerah, šele potem lahko nadaljujemo z rehidracijo in homogenizacijo (Champagne in sod., 2011).

Obstaja pa tudi peščica živil, ki vsebujejo sušene probiotične kulture, kot npr. žitarice za zajtrk, mlečne formule za dojenčke in mleka v prahu. Za pripravo tovrstnih vzorcev je domnevno najbolje upoštevati navodila za pripravo praškov, ki vsebujejo mikrokapsulirane probiotike (Champagne in sod., 2011).

2.5.3 Priprava vzorcev živil, ki vsebujejo probiotične bakterije

V to skupino živil uvrščamo jogurte, probiotične mlečne napitke, pasterizirana nefermentirana mleka, sire, sladolede, zamrznjene jogurte itd., pa tudi sadne sokove in žita. Večina živil predstavlja za probiotične bakterije precej stresno okolje (nizka vrednost pH, nizka temperatura skladiščenja, velika vsebnost sladkorjev, aktivnost vode itd.), kar vodi do poškodb celic in do prehoda v nekultivabilno obliko. V takšnih primerih je priporočljivo po rehidraciji opraviti t.i. pred-inkubacijo (4h pri 37 °C), ki omogoča obnovitev poškodovanih celic, vseeno pa se probiotiki v tem času ne namnožujejo. Ostala priporočila glede priprave vzorca pa so podobna kot za prašnate vzorce s tem, da homogenizacija poteka v obnovitvenem mediju (Champagne in sod., 2011).

2.6 HOMOGENIZACIJA IN RAZREDČEVANJE

Pred razredčevanjem je potrebno vzorec ustrezno homogenizirati in pripraviti primerno razredčevalno raztopino.

2.6.1 Homogenizacija

Največkrat se vzorce homogenizira zgolj z vrtinčnikom, preprostim stresanjem ali z gnetilnikom. Za dobro homogenizacijo probiotičnih vzorcev se priporoča uporaba homogenizacijskih tehnik, ki vključujejo uporabo metod, pri katerih delujejo velike strižne sile. Tak primer je obdelava z mešalniki, kot sta gnetilnik ali laboratorijsko mešalo z rezili. Uporabo teh naprav se priporoča predvsem kadar analiziramo vzorce mikroorganizmov, ki rastejo v skupkih ali verižicah, tako kot je to značilno za probiotične bakterije (Champagne in sod., 2011).

2.6.2 Razredčevalne raztopine

Za razredčevanje vzorcev, ki jih nato nacepljamo na agarske plošče, se največkrat uporabljajo razredčevalne raztopine oz. razredčevala, ki vsebujejo pepton, NaCl, Ringerjevo tableto in/ali fosfat (Champagne in sod., 2011). Po poročanju Champagne in sod. (2010) naj ne bi bilo razlik pri določanju bakterij vrst *L. rhamnosus* R0011 in *B. longum* ATCC 15708, ne glede na to, ali so uporabili razredčevalo, ki je vsebovalo pepton

ali fosfat. Na drugi strani pa Abe in sod. (2009) poročajo o tem, da pri določanju bifidobakterij dobimo boljše rezultate z uporabo razredčeval, ki vsebujejo pepton kot pa z razredčevali, ki vsebujejo fosfat.

Veliko probiotičnih bakterij je občutljivih za kisik. V ta namen se v gojišča dodaja reducente (askorbinska kislina, cistein), ni pa podatkov o tem, ali je priporočljivo dodati antioksidante že v razredčevala oz. rehidracijske raztopine. Nekateri avtorji sicer poročajo o uporabi cisteina v razredčevalu, ne poročajo pa o vplivu njegovega dodatka na rezultat (Champagne in sod., 2011). V raziskavi, ki so jo izvedli Abe in sod. (2009), kjer so določali skupno število bifidobakterij v prašnatih vzorcih in živilih, se je kot najboljši razredčeval izkazal Mitsuoka pufer (pH 6,5) (vsebuje fosfat, Tween, cistein in agar), vseeno pa rezultat ni bil bistveno boljši v primerjavi z rezultati, ki so jih dobili z uporabo peptona in fosfatnega pufra s soljo (pH 7,3). Boljši rezultat pri uporabi Mitsuoka pufra (pH 6,5) avtorji pripisujejo predvsem sestavinam kot so cistein, Tween in agar.

Muto in sod. (2010), ki so določali skupno število bifidobakterij v prašnatih izdelkih navajajo, da naj bi uporaba Mitsuoka pufra (pH 6,5) pri večini vzorcev podala bistveno boljše rezultate kot uporaba Ringerjeve raztopine ($\frac{1}{4}$ jakosti). Mitsuoka pufer (pH 6,5) naj bi bil celo boljši od osmih ostalih razredčeval. Po njihovem mnenju naj bi bil razlog za prednost pred ostalimi razredčevali prav v vsebnosti Tweena 80. Slednji omogoča, da se celice probiotičnih bakterij enakomerno razporedijo po raztopini, kar privede do boljšega rezultata. Tudi dodatek fosfata v Ringerjevo raztopino naj bi izboljšal rezultat določanja skupnega števila bifidobakterij. Ringerjeva raztopina načeloma ne vsebuje komponent, ki bi uravnale pH (npr. fosfati). Predvsem med rehidracijo izdelka naj bi bila stabilizacija vrednosti pH pomemben ukrep, saj tako povečamo viabilnost bakterij.

Številni avtorji so pri svojih raziskavah kot razredčevalno raztopino uporabili fosfatni pufer s soljo (pH 7,3). Tako so na primer Prasad in sod. (1999) v raziskavi proučevali in selekcionirali različne seve laktobacilov in bifidobakterij s pomočjo razredčevalne raztopine fosfatnega pufra s soljo (pH 7,3). Tudi Ouwehand in sod. (2004), ki so v raziskavi opisovali vključitev probiotičnega seva *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB-12 v ovsene žitne ploščice in njegovo preživelost skozi GI trakt po zaužitju izdelka, so vzorce blata za določanje bakterij seva *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB-12 razredčevali v fosfatnem pufri s soljo. Le tega so za pripravo suspenzij uporabili tudi Coeuret in sod. (2004) pri svoji raziskavi, v kateri so določali skladnost prisotnih probiotičnih bakterij v izdelkih s podatki na deklaraciji.

Glede na standard ISO 6887-5 (2010) je za analize sira najprimernejše razredčevalo 20 % raztopina natrijevega citrata. Mi smo pri našem poskusu uporabili 20 % raztopino natrijevega citrata, ki smo ji dodali emulgator Tween 80 (1 g/L raztopine).

Za vzorce z visoko vsebnostjo maščob (npr. več kot 20 % od skupne teže) se priporoča uporaba razredčeval, ki vsebujejo od 1 g do 10 g detergenta (Tween 80) na liter razredčevala. Količina dodanega Tweena 80 naj bi bila prenosorazmerna odstotku maščobe, npr. če vzorec vsebuje 40 % maščob v razredčevalo dodamo 4 g/L Tweena 80 (ISO 6887-4, 2003).

2.7 IZBIRA GOJIŠČA

2.7.1 Čiste kulture

Podatki iz literature kažejo, da je izbira najprimernejšega gojišča odvisna predvsem od proučevanega seva. Za določanje čistih kultur bifidobakterij in laktobacilov se najpogosteje uporablja gojišče MRS (de Man-Rogosa-Sharpe), ki se mu za večjo učinkovitost pogosto doda cistein ali ogljikovi hidrati. Veliko pa je napisanega tudi o prednostih uporabe gojišča RCMA (Reinforced Clostridial Medium agar). Prednost njegove uporabe naj bi bila predvsem pri določanju celic, ki so bile izpostavljene stresu (Champagne in sod., 2011).

2.7.2 Mešane kulture

Na temo učinkovitosti diferencialnih in selektivnih gojišč za določanje skupnega števila specifičnih vrst probiotikov v mešanih kulturah je bilo opravljenih že veliko raziskav. Selektivna gojišča za določanje bifidobakterij vsebujejo sestavine kot npr. cistein, askorbinsko kislino in natrijev sulfit (znižajo redoks potencial) ter antibiotike, kot sta kanamicin in mupirocin. Bifidobakterije so v glavnem odporne proti tovrstnim antibiotikom, laktobacili pa so dovzetnejši. Izbira gojišča je odvisna tudi od vrste vzorca (prašek, tableta, sir), vrste tarčnega mikroorganizma in raznolikosti ostale mikrobne populacije vzorca. Vseeno pa je potrebno poudariti, da selektivna gojišča povzročajo večji stres za tarčni mikroorganizem v primerjavi z neselektivnimi gojišči, zaradi česar je tudi rezultat lahko nižji (Champagne in sod., 2011).

2.8 RAZMERE INKUBACIJE

2.8.1 Temperatura

Naravno okolje večine probiotičnih sevov je GI trakt ljudi, zato je temperatura inkubacije teh sevov običajno 37 °C. Obstajajo pa primeri, kjer se inkubacija ne izvaja pri 37 °C, na primer pri metodi določanja skupnega števila bakterij vrste *L. casei* v jogurtu se inkubacija petrijevih plošč izvaja pri 15 °C. Verjetno bi bila ta metoda primerna tudi za določanje skupnega števila bakterij vrst *L. rhamnosus* in *L. plantarum*. Inkubacijska temperatura pa je tudi parameter s katerim lahko določamo ekspresijo nekaterih bioloških aktivnosti mikroorganizmov, kot npr. tvorba eksopolisaharidov pri bakterijah vrste *L. rhamnosus*. Na splošno pa inkubacija probiotičnih kultur le redko poteka pri temperaturah, različnih od 37 °C (Champagne in sod., 2011).

2.8.2 Atmosfera

Nekatere kulture lahko uspešno gojimo v aerobnih razmerah, vendar je največkrat potreben dodatek cisteina v gojišče. Večina raziskovalcev zato preprosto izvaja inkubacijo v anaerobnih razmerah. Obstajata dva načina anaerobne inkubacije, in sicer z uporabo posebnih posod (GasPack, AnaeroGen), v katerih z generatorji zagotovimo anaerobne razmere, ter z uporabo anaerobnih komor, v katerih je atmosfera brez kisika. V tem primeru je atmosfera sestavljena iz dušika, ogljikovega dioksida in vodika (Champagne in sod., 2011).

Potreba po zagotavljanju anaerobnih razmer inkubacije je od seva do seva različna. Kadar smo v dvomih glede inkubacije ali v aerobnih ali anaerobnih razmerah, je bolje da inkubiramo v anaerobnih razmerah (Champagne in sod., 2011).

2.9 METODA ŠTETJA KOLONIJ NA TRDIH GOJIŠČIH

Metoda določanja števila živih mikroorganizmov s štetjem kolonij na trdih gojiščih je najpogostejši način določanja števila mikroorganizmov v različnih ekoloških nišah (živila, preparati, blato,...). Slabosti te metode so zamudna priprava sterilnega materiala in običajno dolg čas inkubacije. Hkrati je to posredno in precej nespecifično določanje velikosti populacije mikroorganizmov, saj gre za štetje kolonij, ki so zrasle na trdih gojiščih, torej izključno kultivabilnega dela populacije (Smole Možina, 2003).

Celice lahko zaradi stresa med proizvodnjo in skladiščenjem preidejo iz kultivabilne oblike v nekultivabilno, mirujočo obliko, to so t.i. VBNC celice (žive a ne kultivabilne celice). Te celice so sicer žive in metabolno aktivne, ne tvorijo pa kolonij, vendar pa lahko v ugodnih razmerah zopet preidejo v kultivabilno obliko in tvorijo kolonije. Klasična tehnika štetja na trdih gojiščih upošteva samo kultivabilne celice ne pa tudi VBNC celic, kar pomeni, da ne dobimo točnega rezultata oz. podatka o dejanskem številu živih probiotičnih bakterij v vzorcu. Celice VBNC namreč prav tako kot kultivabilne izločajo metabolite, ki koristno učinkujejo na zdravje gostitelja (Davis, 2014).

Da bi delno zmanjšali razmeroma veliko napako pri določanju velikosti populacije mikroorganizmov v živilih ali pripravkih, si navadno pripravimo večje število paralelnih nacepljenih plošč pri posamezni razredčitvi. Velikost populacije v izhodnem vzorcu izračunamo z enačbo (1) (ISO 7218, 2007).

$$N = \frac{\sum C}{(n1 + 0,1 \times n2) \times d} \quad \dots (1)$$

Kjer je N..... število mikroorganizmov (KE/mL oz. KE/g)

$\sum C$ vsota kolonij na vseh števnihih ploščah

n1.....število števnih plošč prve upoštevane razredčitve

n2število števnih plošč druge upoštevane razredčitve

drazredčitveni faktor.

3 MATERIAL IN METODE

V nalogi smo uporabili osem (devet – pri vzorcu Waya LGG) različnih razredčeval za pripravo šestih različnih vzorcev probiotičnih izdelkov. Pri vsaki kombinaciji vzorca in razredčevala smo uporabili pet (šest – pri vzorcu sira LCA) različnih postopkov obdelave osnovne raztopine. Potek poskusa je prikazan na sliki 3.

Uporabili smo naslednja razredčevala:

- Ringerjeva raztopina $\frac{1}{4}$ jakosti (RING),
- 20 % raztopina dikalijevega hidrogen fosfata (K_2HPO_4),
- 20 % raztopina natrijevega citrata z dodatkom Tween-a 80 (1 g/L) (CITRAT+T),
- peptonska voda (PV),
- pufrirana peptonska voda (BPW),
- fosfatni pufer s soljo (pH 7,3) (PBS),
- Mitsuoka pufer (pH 6,5) (MITS),
- anaerobni diluent (AD),
- 20 % raztopina natrijevega citrata z dodatkom Tween-a 80 (9 g/L) (TWEEN) - samo pri vzorcu oljnih kapljic Waya LGG.

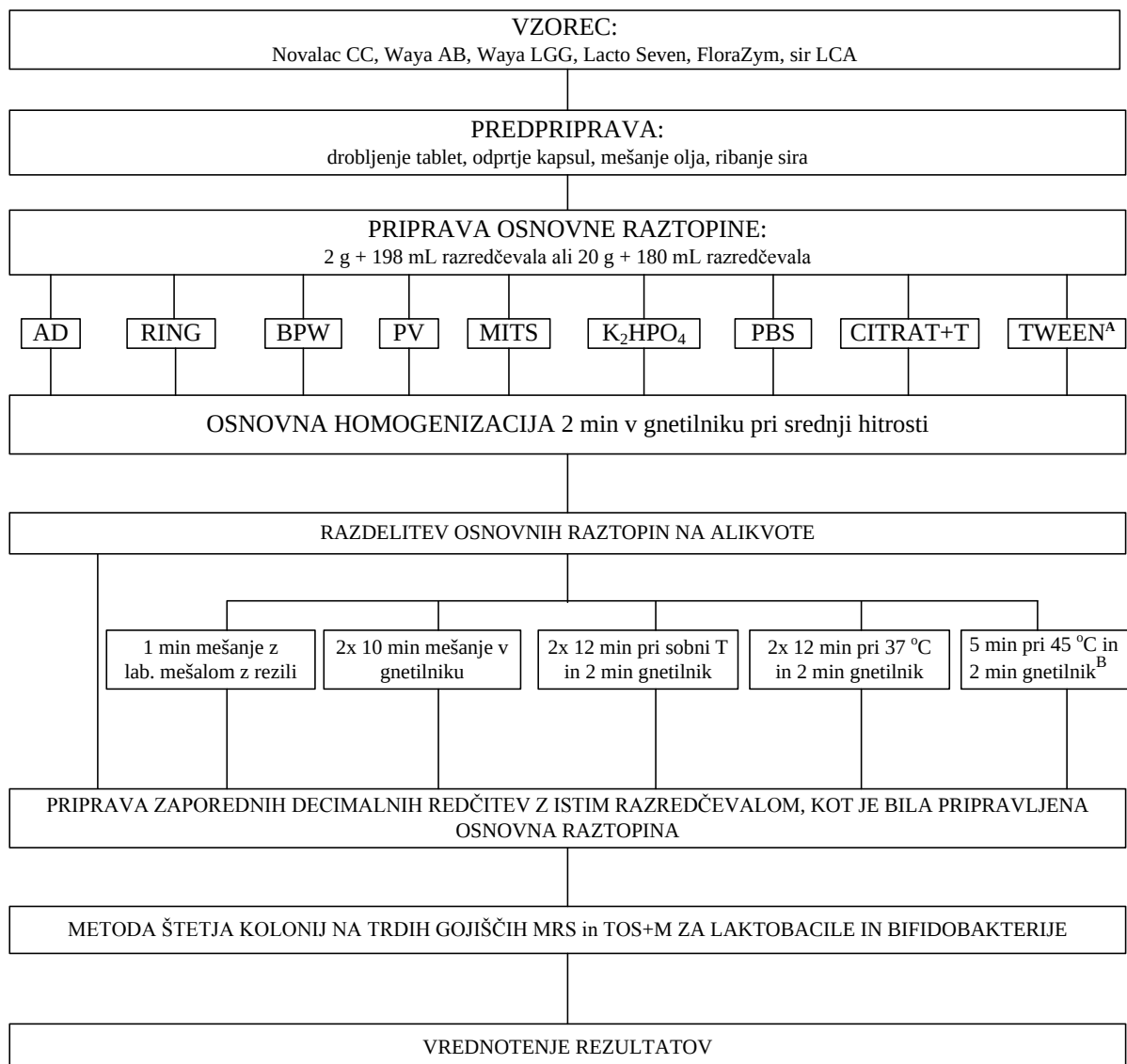
Postopki obdelave osnovne raztopine, ki smo jih uporabili so bili naslednji:

- osnovna homogenizacija – obdelava z gnetilnikom 2 minuti (OS),
- obdelava 60 sekund z laboratorijskim mešalom z rezili (UT),
- mešanje 2-krat po 10 minut v gnetilniku pri srednji jakosti (MEŠ),
- inkubacija 2-krat po: 12 minut pri sobni temperaturi + 2 minuti obdelave v gnetilniku (SOB),
- inkubacija 2-krat po: 12 minut v inkubatorju pri 37 °C + 2 minuti obdelave v gnetilniku (INK),
- 5 minutna inkubacija v vodni kopeli pri 45 °C + 2 minuti obdelave v gnetilniku (KOPEL) - samo pri vzorcu sira LCA.

Vsak vzorec smo pripravili z vsakim razredčevalom (8-imi oz. 9-imi pri Waya LGG) in obdelali po vsakem izmed 5-ih, oz. 6-ih pri siru LCA, postopku. Za vsak vzorec smo analizo delali v paralelkah.

3.1 NAČRT POSKUSA

V nalogi smo analizirali šest različnih probiotičnih izdelkov z uporabo osmih ali devetih različnih razredčeval. Osnovne suspenzije vzorcev smo obdelali na pet ali šest različnih načinov. Vsak vzorec smo v dveh paralelkah analizirali po postopku, kot ga prikazuje slika 3.



Slika 3: Potek poskusa

Legenda: AD: anaerobni diluent; RING: Ringerjeva raztopina $\frac{1}{4}$ jakosti; BPW: pufrirana peptonska voda; PV: peptonska voda; MITS: Mitsuoka pufer (pH 6,5); K_2HPO_4 : 20 % raztopina dikalijevega hidrogen fosfata; PBS: fosfatni pufer s soljo (pH 7,3); CITRAT+T: 20 % raztopina natrijevega citrata z dodatkom Tweena 80 (1 g/L); TWEEN: 20 % raztopina natrijevega citrata z dodatkom Tweena 80 (9 g/L); OS: osnovna homogenizacija; UT: laboratorijsko mešalom z rezili; MEŠ: mešanje; SOB: inkubacija pri sobni temperaturi; INK: inkubacija pri 37 °C; ^A: to razredčevalo smo uporabili samo pri vzorcu Waya LGG; ^B: ta postopek obdelave smo uporabili samo pri vzorcu sira LCA.

3.2 MATERIALI

3.2.1 Razredčevalne raztopine

Razredčevalne raztopine smo pripravljali sproti, ne več kot teden dni vnaprej. Do uporabe smo jih hranili pri temperaturi hladilnika.

3.2.1.1 Anaerobni diluent

Anaerobni diluent (AD) smo pripravili tako, da smo ob segrevanju in mešanju na mešalniku v demineralizirani vodi raztopili 0,56 g/L cistein-HCl (Merck, Darmstadt, Nemčija), 8,5 g/L NaCl (Merck), 1 g/L mesnega peptona (Biolife, Milano, Italija) in 2 g/L želatine (Fluka, Buchs). Ko so bile vse sestavine raztopljene, smo umerili vrednost pH na 7,0 in raztopino razdelili v stekleničke (500 mL) in epruvete (9 mL) ter avtoklavirali.

3.2.1.2 Ringerjeva raztopina $\frac{1}{4}$ jakosti

Ringerjevo raztopino (RING) smo pripravili tako, da smo dve Ringerjevi tabletki (Merck) raztopili v 1 L demineralizirane vode. Ko sta se tabletki raztopili smo umerili vrednost pH na 6,9, raztopino razdelili v stekleničke (500 mL) in epruvete (9 mL) ter avtoklavirali.

3.2.1.3 Pufrirana peptonska voda

Raztopino pufrirane peptonske vode (BPW) (ISO 6887-1:1999) smo pripravili tako, da smo na mešalniku v 1 L demineralizirane vode raztopili 25,5 g dehidrirane mešanice za pripravo pufrirane peptonske vode (BPW) (Merck). Raztopini smo najprej umerili vrednost pH na 7,0 nato pa smo jo razdelili v stekleničke (500 mL) in epruvete (9 mL) ter avtoklavirali.



Slika 4: Pripravljene razredčevalne raztopine po avtoklaviranju

3.2.1.4 Peptonska voda

Peptonsko vodo (PV) (ISO 6887-1:1999) smo pripravili tako, da smo v 1 L demineralizirane vode raztopili 8,5 g NaCl (Merck) in 1 g peptona iz kazeina (Merck). Ko sta se obe sestavini raztopili, smo umerili vrednost pH na 7,0, raztopino razdelili v stekleničke (500 mL) in epruvete (9 mL) ter avtoklavirali.

3.2.1.5 Mitsuoka pufer (pH 6,5)

Raztopino Mitsuoka pufra (MITS) (modificirano po Muto in sod., 2010) smo pripravili tako, da smo v 1 L demineralizirane vode raztopili 4,5 g KH_2PO_4 (Merck), 6 g Na_2HPO_4 (Merck), 0,5 g cistein hidroklorid-a (Merck) in 0,5 g Tweena 80 (Biolife). Ko so se vse sestavine raztopile, smo umerili vrednost pH na 6,5, razdelili raztopino v stekleničke (500 mL) in epruvete (9 mL) ter avtoklavirali.

3.2.1.6 Raztopina dikalijevega hidrogen fosfata

Raztopino dikalijevega hidrogen fosfata (K_2HPO_4) smo pripravili tako, da smo v 1 L demineralizirane vode raztopili 20 g K_2HPO_4 (Merck), umerili vrednost pH na 7,5, raztopino razdelili v stekleničke (500 mL) in epruvete (9 mL) ter avtoklavirali.

3.2.1.7 Fosfatni pufer s soljo (pH 7,3)

Fosfatni pufer s soljo (PBS) (Coeuret in sod., 2004) smo pripravili tako, da smo v 1 L demineralizirane vode raztopili 8 g NaCl (Merck), 0,2 g KCl (Sigma Aldrich, Saint Louis, ZDA), 1,15 g Na_2HPO_4 (Merck) in 0,2 g KH_2PO_4 (Merck). Ko so se vse sestavine raztopile, smo umerili vrednost pH na 7,3, raztopino razdelili v stekleničke (500 mL) in epruvete (9 mL) ter avtoklavirali.

3.2.1.8 Raztopina natrijevega citrata z 0,1 % Tweena 80

Raztopino (CITRAT+T) smo pripravili tako, da smo v 1 L demineralizirane vode raztopili 20 g trinatrijevega citrata dihidrata ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$) (Merck) in 1 g Tween-a 80 (Biolife). Tween smo najprej zatehtali v čašo in mu dodali del vode ter mešali z magnetnim mešalom, dokler nismo dobili homogene raztopine. V drugo posodo smo zatehtali trinatrijev citrat dihidrat, mu dodali preostali del vode in nato še homogeno zmes vode in Tween-a. Tako pripravljeni raztopini smo umerili vrednost pH na 7,0, raztopino razdelili v stekleničke (500 mL) in epruvete (9 mL) ter avtoklavirali.

3.2.1.9 Raztopina natrijevega citrata z 0,9 % Tweena 80

Raztopino (TWEEN) smo pripravili tako, da smo v 1 L demineralizirane vode raztopili 20 g trinatrijevega citrata dihidrata ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$) (Merck) in 9 g Tweena 80 (Biolife). Tween smo najprej zatehtali v čašo in mu dodali 100 ml vode ter mešali z magnetnim mešalom dokler nismo dobili homogene raztopine. V drugo posodo smo zatehtali trinatrijev citrat dihidrat, mu dodali vodo (900 mL), nato pa smo dodali še zmes vode in Tweena. Tako pripravljeni raztopini smo umerili vrednost pH na 7,0, raztopino razdelili v

stekleničke (500 mL) in epruvete (9 mL) ter avtoklavirali. To razredčevalno raztopino smo uporabili le pri analizi vzorca Waya LGG.

3.2.2 Vzorci prehranskih dodatkov in funkcionalnih živil

Analizirali smo šest različnih vzorcev prehranskih dodatkov in funkcionalnih živil, ki vsebujejo probiotične bakterije. Gre za komercialno dostopne izdelke, ki smo jih po nakupu hranili v razmerah, navedenih na deklaracijah. V času analize so bili vsi vzorci znotraj roka uporabe, označenega na embalaži. Analizirali smo naslednje vzorce: mlečna formula za dojenčke Novalac CC, probiotik Waya AB, probiotične kapljice Waya LGG, prehranski dodatek Lacto Seven, prehransko dopolnilo FloraZym in sir LCA (Preglednica 3). Za vsak vzorec smo naredili dve ponovitvi.

Preglednica 3: Predstavitev vzorcev prehranskih dodatkov in funkcionalnih živil

IME IN LASTNOSTI VZORCA	DEKLARIRANE BAKTERIJSKE VRSTE	SLIKA IZDELKA
NOVALAC CC: Mlečna formula (mleko v prahu) za dojenčke z dodanima probiotičnima bakterijama	<i>L. rhamnosus</i> <i>B. lactis</i>	
WAYA AB: Prehransko dopolnilo; prašek	<i>B. bifidum</i> (NIZO 3804) <i>B. lactis</i> (NIZO 3680) <i>L. acidophilus</i> (2x) (NIZO 3678, NIZO 3887) <i>L. paracasei</i> (NIZO 3672) <i>L. plantarum</i> (NIZO 3684) <i>L. rhamnosus</i> (NIZO 3689) <i>L. salivarius</i> (NIZO 3675) <i>E. faecium</i> (NIZO3886)	
WAYA LGG: Probiotične kapljice (olje), za dojenčke in otroke; vsebujejo mikrokapsulirano obliko	<i>L. rhamnosus</i> GG (LGG)	
LACTO SEVEN: Prehransko dopolnilo; tablete, ki vsebujejo sedem sevov bakterij (zaščitna ovojnica iz lipidov in ogljikovih hidratov) in inulin	<i>L. acidophilus</i> <i>L. casei</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. reuteri</i> <i>L. rhamnosus</i> <i>B. longum</i> <i>Str. thermophilus</i>	
FLORAZYM: Prehransko dopolnilo; kapsule, ki vsebujejo kombinacijo encimov, probiotikov in prebiotikov	<i>L. acidophilus</i> DDS-1 <i>L. bulgaricus</i> DDS-14 <i>B. bifidum</i>	
SIR LCA: Probiotični poltrdi sir	<i>B. animalis</i> – BB 12	

3.2.3 Gojišča in dodatki

Vzorce smo nacepljali na dve različni gojišči in sicer:

- MRS (de Man-Rogosa-Sharpe) agar (za določanje laktobacilov) in
- TOS z dodatkom mupirocina (TOS+M) (za določanje bifidobakterij).

Gojišča smo pripravljali sproti, največ teden dni vnaprej.

3.2.3.1 Gojišče MRS

Gojišče MRS smo pripravili tako, da smo zatehtali 13,64 g (68,2 g/L) prašnega gojišča MRS agar (Merck) in mu dodali 200 mL demineralizirane vode ter dobro premešali. Potem smo gojišče 15 min avtoklavirali pri 118 °C.

Pred uporabo smo gojišče raztopili v mikrovalovni pečici in ga do razlivanja hranili v vodni kopeli pri temperaturi 45 °C. Gojišče smo uporabili za določanje skupnega števila laktobacilov s klasično metodo štetja kolonij na ploščah.

3.2.3.2 Gojišče TOS z dodatkom mupirocina

Gojišče TOS+M smo pripravili tako, da smo v stekleničke zatehtali po 12,5 g (62,5 g/L) prašnega gojišča TOS (Yakult, Japonska) in mu dodali 200 mL demineralizirane vode. Sledilo je avtoklaviranje 15 min pri 115 °C.

Gojišče smo po avtoklavanju hranili v hladilniku in ga pred uporabo raztopili v mikrovalovni pečici. Raztopljeno gojišče smo do prelivanja petrijevih plošč hranili v vodni kopeli pri temperaturi 45 °C.

Tik pred prelivanjem pa smo v 200 mL ustrezno ohlajenega gojišča TOS (45-50 °C) dodali 1 mL založne raztopine predhodno pripravljenega antibiotika mupirocina. Koncentracija mupirocina v gojišču je bila 0,05 mg/mL.

Gojišče smo uporabili za določanje skupnega števila bifidobakterij s klasično metodo štetja kolonij na ploščah.

Mupirocin je antibiotik, ki zavira rast mlečnokislinskih bakterij ne zavira pa rasti bifidobakterij. Za pripravo založne raztopine antibiotika smo zatehtali 50,0 mg mupirocina (AppliChem, Darmstadt, Nemčija), dodali 2 mL 96 % etanola, dobro premešali in dodali še 3 mL sterilne destilirane vode. Koncentracija tako pripravljene založne raztopine mupirocina je bila 10 mg/mL. Pripravljeno založno raztopino smo takoj uporabili ali pa do uporabe hranili pri -20 °C.

3.3 METODE

3.3.1 Predpriprava vzorcev

Od oblike vzorca (tableta, fermentiran mlečni izdelek, prašek) je bila odvisna tudi predpriprava pred pripravo osnovnih raztopin. Postopke predpriprave izdelkov prikazuje preglednica 4, vse delo pa je potekalo v aseptičnih razmerah z uporabo sterilne opreme. Tako pripravljene vzorce smo uporabili za pripravo osnovnih raztopin.

Preglednica 4: Načini priprave vzorcev pred začetnim vzorčenjem

VZOREC	PREDPRIPRAVA
NOVALAC CC	ni potrebna
WAYA AB	ni potrebna
WAYA LGG	vsebino stekleničke dobro pretresemo
LACTO SEVEN	tablete razdrobimo v terilnici
FLORAZYM	kapsulo razpremo in vsebino stresemo v sterilno vrečko za tehtanje
SIR LCA	sir naribamo v aseptičnih razmerah

3.3.2 Priprava osnovnih raztopin

Za pripravo osnovnih raztopin posameznega izdelka smo uporabljali sterilne vrečke za homogenizacijo. Vsak vzorec smo z vsakim razredčevalom analizirali dvakrat.

Osnovne raztopine vzorcev smo pripravili tako, da smo v aseptičnih razmerah zatehtali po 2 g (Waya AB, Waya LGG, Lacto Seven in FloraZym) oz. po 20 g (sir LCA in Novalac CC) vsakega vzorca in k vsaki zatehti dodali 198 g oz. 180 g posameznega razredčevala, kar pomeni, da smo zatehtane količine vzorcev 10^{-2} oz. 10^{-1} razredčili. Tako smo dobili osnovne raztopine posameznega vzorca z vsakim razredčevalom posebej.

3.3.3 Osnovna homogenizacija

Vzorce smo v osnovni raztopini, v vsakem razredčevalu, 2 minuti homogenizirali v gnetilniku pri srednji jakosti.

Nato smo od osnovnih raztopin posameznega vzorca odpipetirali po 1 mL in pripravili ustrezne decimalne razredčitve (točka 3.3.4).

Ostali del primarnih raztopin, obdelanih z osnovnim postopkom, smo razdelili na 4, oz. pri vzorcu siru LCA na 5, enakih delov ter jih obdelali po ostalih postopkih obdelave (točke 3.3.3.2 do 3.3.3.6).

3.3.4 Obdelava

Pred nadaljnjim razredčevanjem in nacepljanjem, smo osnovne raztopine nadalje obdelali s štirimi in pri siru s petimi načini:

- Laboratorijsko mešalo z rezili – ang. Ultra turrax (UT)

Po osnovni homogenizaciji smo alikvot osnovne raztopine mešali z laboratorijskim mešalom z rezili 1 minuto (60 sekund).

- Mešanje (MEŠ)

Po osnovni homogenizaciji smo alikvot osnovne raztopine 2-krat izpostavili 10-minutnemu mešanju v gnetilniku (pri srednji jakosti), ki smo ga vmes prekinili za 5 minut.

- Inkubacija pri sobni temperaturi (SOB)

Po osnovni homogenizaciji smo alikvot osnovne raztopine 12 minut inkubirali pri sobni temperaturi in nato izvedli 2-minutno mešanje v gnetilniku (pri srednji jakosti). Postopek inkubacije in mešanja smo še enkrat ponovili.

- Inkubacija pri 37 °C (INK)

Po osnovni homogenizaciji smo alikvot osnovne raztopine inkubirali 12 minut v inkubatorju pri 37 °C, sledilo je 2-minutno mešanje v gnetilniku (pri srednji jakosti). Postopek inkubacije in mešanja smo še enkrat ponovili.

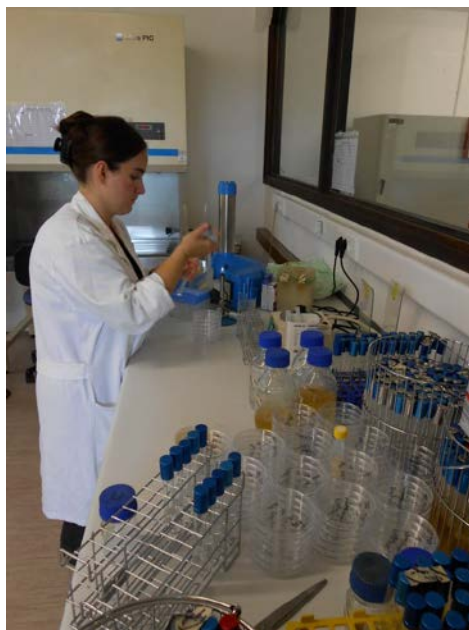
- Kopel (KOPEL) – samo pri vzorcu sir LCA

Po osnovni homogenizaciji smo alikvot osnovne raztopine inkubirali 5 minut v vodni kopeli (45 °C), nato smo jo mešali 2 minuti v gnetilniku (pri srednji jakosti).

3.3.5 Metoda štetja kolonij na trdih gojiščih in vrednotenje rezultatov

a) Razredčevanje in nacepljanje

V aseptičnih razmerah in s sterilnimi pripomočki smo po vsakem izmed končanih postopkov obdelave naredili ustrezne razredčitve obdelanih osnovnih raztopin. Razredčevali smo z istim razredčevalom, kot smo ga uporabili pri pripravi osnovne raztopine. Uporabili smo postopek zaporednega decimalnega razredčevanja po Kochu, kar pomeni, da smo odpipetirali 1 mL osnovne raztopine (obdelanem po enem izmed postopkov obdelave) in ga dodali v epruveto z 9 mL ustreznega razredčevala. Vsebino epruvete smo premešali na vrtinčniku in postopek ponavljali do želene decimalne razredčitve vzorca. Nato smo po 1 mL ustreznih razredčitev prenesli na petrijeve plošče. Vsako razredčino vzorca smo nacepili na štiri petrijeve plošče, ki smo jih nato prelili, dve z gojiščem MRS in dve z gojiščem TOS+M.



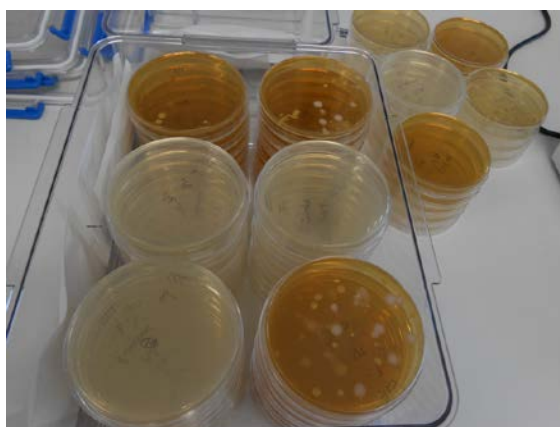
Slika 5: Razredčevanje in nacepljanje

b) Prelivanje z gojišči

Nacepljene petrijeve plošče smo aseptično prelili z gojišči MRS ali TOS+M, ki smo jih do prelivanja hranili v vodni kopeli (45 °C). Gojišče in vzorec smo pazljivo premešali.

c) Inkubacija

Petrieve plošče z nacepljenimi in strjenimi gojišči smo zložili v anaerobne škatle, dodali generatorje anaerobnih razmer (Anaer, BioMérieux, Francija) in škatle tesno zaprli. Sledila je 72 urna inkubacija pri 37 °C .



Slika 6: Gojišča po 72 – urni inkubaciji

d) Štetje zraslih kolonij in izračun

Po inkubaciji smo s pomočjo števca kolonij (Slika 7) prešteli izrasle kolonije. Po enačbi (1) smo izračunali število laktobacilov (upoštevali smo plošče z gojiščem MRS) in bifidobakterij (upoštevali smo plošče z gojiščem TOS+M).

Izračunali smo tudi povprečne vrednosti obeh meritev in nato rezultate pretvorili v log KE/g.



Slika 7: Štetje zraslih kolonij po 72 – urni inkubaciji

3.3.6 Statistična obdelava rezultatov

Statistična metoda, ki nam pove ali se trije ali več vzorcev med seboj statistično razlikujejo v določeni lastnosti je analiza variance (ANOVA) (Field, 2005). Analizo variance uporabimo, kadar nas zanima, ali obstaja razlika med aritmetičnimi sredinami (Knežević, 2006). Za statistično obdelavo smo uporabili program SigmaPlot 11.0 (Systat Software, Nemčija) s katerim smo izvedli test ANOVA na rangih po metodi Kruskal-Wallis. Statistično značilne razlike med posameznimi skupinami smo nato ugotavljali s testom mnogoterih primerjav po Dunn-u.

Ničelna hipoteza (H_0) trdi, da ni razlik med aritmetičnimi sredinami vzorcev (Knežević, 2006). To pomeni, da so povprečja v skupinah vzorcev statistično enaka, ko se ob upoštevanem tveganju ne razlikujejo med seboj. V raziskavah se najpogosteje upošteva, da obstaja statistično značilna razlika med vzorci kadar je stopnja tveganja manjša od 0,05 ($P < 0,05$), Kadar je stopnja tveganja večja od 0,05 ($P > 0,05$) med vzorci ni statistično značilne razlike (Field, 2005).

3.4 LABORATORIJSKA OPREMA

- Avtoklav (A-21 CA Kambič, Slovenija),
- Inkubator (BT 150, Marijan Krokter, Slovenija)
- Mikrovalovna pečica (32L Bosch, Nemčija)
- pH meter (Mettler Toledo MP 120, Mettler, Nemčija)
- Ultra Turrax (IKA, Nemčija)
- Gnetilnik (BagMixer, Interscience, Francija)
- Anaerobne škatle z generatorji anaerobnih razmer (GENBox anaer, BioMérieux, Francija)
- Laboratorijska oprema: tehtnice, petrijeve plošče, steklovina, pipete, pincete, stojala, gorilnik, kuhalnik, homogenizacijske vrečke.

4 REZULTATI

Osnovni rezultati štetja zraslih kolonij iz dveh ponovitev za posamezen vzorec so podani v Prilogi A (A1-A6). V prilogi B (B1-B8) pa so podani rezultati statistične primerjave rezultatov. V poglavjih od 4.1 do 4.6 so podana povprečna števila bakterij izražena v log KE/g.

4.1 NOVALAC CC

Iz rezultatov določanja skupnega števila bifidobakterij in laktobacilov v vzorcu Novalac CC (preglednica 5) vidimo, da med postopki obdelave ni bilo značilnih razlik v rezultatih tako pri določanju bifidobakterij kot tudi laktobacilov. Glede na razredčevalo smo pri določanju bifidobakterij dobili z uporabo Mitsuoka pufera (pH 6,5), natrijevega citrata z dodatkom Tweena 80 (1 g/L) in dikalijevega hidrogen fosfata višje število kot pri uporabi Ringerjeve raztopine (Priloga B1). Pri določanju laktobacilov pa smo višje število dobili z uporabo fosfatnega pufera s soljo (pH 7,3), pufrirane peptonske vode, anaerobnega diluenta in peptonske vode kot pri uporabi natrijevega citrata z dodatkom Tweena 80.

Preglednica 5: Povprečne vrednosti skupnega števila bifidobakterij in laktobacilov v vzorcu Novalac CC

OBDELAVA	RAZREDČEVALO								P
	AD	RING	BPW	PV	MITS	K ₂ HPO ₄	PBS	CITRAT + T	
Število bifidobakterij (log KE/g)									
OS	7,38	7,13	7,31	7,34	7,47	7,40	7,38	7,40	≥ 0,05
UT	7,35	7,30	7,35	7,35	7,50	7,40	7,34	7,39	
MEŠ	7,33	7,29	7,40	7,40	7,37	7,34	7,40	7,41	
SOB	7,36	7,26	7,37	7,37	7,56	7,43	7,41	7,43	
INK	7,52	7,25	7,39	7,36	7,41	7,35	7,37	7,37	
Povprečje	7,39	7,25 ^{A,B,C}	7,36	7,36	7,46 ^A	7,38 ^C	7,38	7,40 ^B	
Število laktobacilov (log KE/g)									
OS	7,72	7,52	7,72	7,68	7,70	7,62	7,73	7,36	≥ 0,05
UT	7,80	7,62	7,66	7,74	7,77	7,86	7,78	7,47	
MEŠ	7,78	7,75	7,83	7,77	7,66	7,45	7,78	7,54	
SOB	7,73	7,67	7,88	7,74	7,72	7,62	7,85	7,43	
INK	7,87	7,72	7,78	7,70	7,66	7,55	7,82	7,41	
Povprečje	7,78 ^C	7,66	7,78 ^B	7,72 ^D	7,70	7,62	7,79 ^A	7,44 ^{A,B,C,D}	

Legenda: AD: anaerobni diluent; RING: Ringerjeva raztopina $\frac{1}{4}$ jakosti; BPW: pufrirana peptonska voda; PV: peptonska voda; MITS: Mitsuoka pufer (pH 6,5); K₂HPO₄: 20 % raztopina dikalijevega hidrogen fosfata; PBS: fosfatni pufer s soljo (pH 7,3); CITRAT+T: 20 % raztopina natrijevega citrata z dodatkom Tweena 80 (1 g/L); OS: osnovna homogenizacija; UT: laboratorijsko mešalo z rezili; MEŠ: mešanje; SOB: inkubacija pri sobni temperaturi; INK: inkubacija pri 37 °C; ^{A, B, C, D}: števila z enakimi oznakami se med seboj statistično značilno razlikujejo (p<0,05).

4.2 WAYA AB

Glede na rezultate predstavljene v preglednici 6 lahko rečemo, da pri določanju bifidobakterij in laktobacilov med postopki obdelave ni bilo značilnih razlik v rezultatih. Glede na razredčevala smo z uporabo Mitsuoka pufra (pH 6,5), anaerobnega diluenta in dikalijevega hidrogen fosfata v primerjavi z natrijevim citratom z dodatkom Tweena 80 pri določanju bifidobakterij dobili višje rezultate (Priloga B3). Pri določanju laktobacilov pa smo z uporabo anaerobnega diluenta dobili višje število kot z uporabo natrijevega citrata z dodatkom Tweena 80 (1g/L), fosfatnega pufra s soljo (pH 7,3), pufrirane peptonske vode in peptonske vode. Prav tako smo višje število pri določanju laktobacilov dobili z uporabo Ringerjeve raztopine, dikalijevega hidrogen fosfata, Mitsuoka pufra (pH 6,5) in peptonske vode v primerjavi z uporabo natrijevega citrata z dodatkom Tweena 80 (1 g/L).

Preglednica 6: Povprečne vrednosti skupnega števila bifidobakterij in laktobacilov v vzorcu Waya AB

OBDELAVA	RAZREDČEVALO								p
	AD	RING	BPW	PV	MITs	K ₂ HPO ₄	PBS	CITRAT + T	
Število bifidobakterij (log KE/g)									
OS	8,63	8,57	8,49	8,58	8,62	8,51	8,51	8,10	≥ 0,05
UT	8,67	8,56	8,49	8,44	8,67	8,58	8,52	8,29	
MEŠ	8,51	8,54	8,73	8,47	8,46	8,54	8,44	8,32	
SOB	8,67	8,49	8,56	8,51	8,60	8,63	8,57	8,09	
INK	8,53	8,56	8,39	8,50	8,61	8,55	8,43	8,45	
Povprečje	8,60 ^B	8,54	8,53	8,50	8,59 ^A	8,56 ^C	8,49	8,25 ^{A,B,C}	
Število laktobacilov (log KE/g)									
OS	9,22	8,97	8,91	8,99	8,94	8,94	8,90	8,75	≥ 0,05
UT	9,16	8,89	8,91	8,85	8,97	8,95	8,86	8,74	
MEŠ	9,25	8,95	8,95	8,92	8,88	9,03	8,90	8,81	
SOB	9,21	9,03	8,86	8,92	8,98	8,88	8,94	8,69	
INK	9,21	8,96	8,91	8,92	8,95	8,96	8,86	8,79	
Povprečje	9,21 ^{A,B,C,D}	8,96 ^E	8,90 ^C	8,92 ^{D,H}	8,94 ^G	8,95 ^F	8,89 ^B	8,76 ^{A,E,F,G,H}	

Legenda: AD: anaerobni diluent; RING: Ringerjeva raztopina $\frac{1}{4}$ jakosti; BPW: pufrirana peptonska voda; PV: peptonska voda; MITs: Mitsuoka pufer (pH 6,5); K₂HPO₄: 20 % raztopina dikalijevega hidrogen fosfata; PBS: fosfatni pufer s soljo (pH 7,3); CITRAT+T: 20 % raztopina natrijevega citrata z dodatkom Tweena 80 (1 g/L); OS: osnovna homogenizacija; UT: laboratorijsko mešalo z rezili; MEŠ: mešanje; SOB: inkubacija pri sobni temperaturi; INK: inkubacija pri 37 °C; ^{A, B, C, D, E, F, G, H}: števila z enakimi oznakami se med seboj statistično značilno razlikujejo (p<0,05).

4.3 WAYA LGG

Iz rezultatov določanja skupnega števila bifidobakterij v vzorcu Waya LGG (preglednica 7) vidimo, da med postopki obdelave ni bilo značilnih razlik v rezultatih. Glede na razredčevalo smo pri določanju bifidobakterij dobili z uporabo peptonske vode in fosfatnega pufra s soljo višje število kot z uporabo Mitsuoka pufra (pH 6,5) in raztopin natrijevega citrata z dodatkom tako 1 g/L Tweena 80 kot tudi 9 g/L Tweena 80 (priloga B5). Prav tako smo višje število dobili z uporabo anaerobnega diluenta, dikalijevega

hidrogen fosfata, pufrirane peptonske vode in Ringerjeve raztopine kot z uporabo natrijevega citrata z dodatkom 9 g/L Tweena 80.

Preglednica 7: Povprečne vrednosti skupnega števila laktobacilov v vzorcu Waya LGG

OBDELAVA	RAZREDČEVALO									P
	AD	RING	BPW	PV	MITs	K ₂ HPO ₄	PBS	CITRAT + T	TWEEN	
Število laktobacilov (log KE/g)										
OS	9,32	9,39	9,40	9,50	9,23	9,39	9,39	9,17	9,18	≥ 0,05
UT	9,34	9,29	9,34	9,48	9,25	9,33	9,35	9,10	9,16	
MEŠ	9,29	9,32	9,32	9,53	9,17	9,40	9,32	9,20	9,03	
SOB	9,39	9,31	9,34	9,52	9,22	9,29	9,38	9,26	9,13	
INK	9,37	9,33	9,26	9,26	9,18	9,33	9,37	9,19	9,17	
Povprečje	9,34 ^G	9,33 ^I	9,33 ^I	9,46 ^{A,B,C}	9,21 ^{C,F}	9,35 ^H	9,36 ^{D,E,F}	9,19 ^{B,E}	9,13 ^{A,D,G,H,I,J}	

Legenda: AD: anaerobni diluent; RING: Ringerjeva raztopina $\frac{1}{4}$ jakosti; BPW: pufrirana peptonska voda; PV: peptonska voda; MITs: Mitsuoaka pufer (pH 6,5); K₂HPO₄: 20 % raztopina dikalijevega hidrogen fosfata; PBS: fosfatni pufer s soljo (pH 7,3); CITRAT+T: 20 % raztopina natrijevega citrata z dodatkom Tweena 80 (1 g/L); TWEEN: 20 % raztopina natrijevega citrata z dodatkom Tweena 80 (9 g/L); OS: osnovna homogenizacija; UT: laboratorijsko mešalo z rezili; MEŠ: mešanje; SOB: inkubacija pri sobni temperaturi; INK: inkubacija pri 37 °C; ^{A, B, C, D, E, F, G, H, I, J}: števila z enakimi oznakami se med seboj statistično značilno razlikujejo (p<0,05).

4.4 LACTO SEVEN

Povprečne vrednosti obeh ponovitev določanja skupnega števila bifidobakterij in laktobacilov v vzorcu Lacto Seven prikazuje preglednica 8. Glede na rezultate statistične primerjave razredčeval v prilogi B7 lahko rečemo, da smo pri določanju bifidobakterij višje število dobili z uporabo Ringerjeve raztopine, Mitsuoaka pufra (pH 6,5), anaerobnega diluenta, peptonske vode in fosfatnega pufra s soljo (pH 7,3), kot z uporabo natrijevega citrata z dodatkom Tweena 80 (1 g/L). Pri določanju laktobacilov smo višje število dobili z uporabo Ringerjeve raztopine, pufrirane peptonske vode in Mitsuoaka pufra (pH 6,5) kot z uporabo natrijevega citrata z dodatkom Tweena 80 (1 g/L). Nižje število pa smo pri določanju laktobacilov dobili z uporabo dikalijevega hidrogen fosfata v primerjavi z Ringerjevo raztopino in pufrirano peptonsko vodo. V prilogi B8 so predstavljeni rezultati statistične primerjave različnih obdelav, kjer vidimo, da pri določanju laktobacilov obdelave niso značilno vplivale na rezultat. Pri določanju bifidobakterij pa smo višje število dobili z inkubacijo pri sobni temperaturi in obdelavo z laboratorijskim mešalom z rezili, kot pa z inkubacijo pri 37 °C.

Preglednica 8: Povprečne vrednosti skupnega števila bifidobakterij in laktobacilov v vzorcu Lacto Seven

OBDELAVA	RAZREDČEVALO							
	AD	RING	BPW	PV	MITs	K ₂ HPO ₄	PBS	CITRAT +T
Število bifidobakterij (KE/g)								
OS	8,11	8,27	7,86	7,82	8,15	8,02	7,97	7,55
UT	8,01	8,21	8,14	8,09	8,19	8,09	8,13	7,59
MEŠ	8,20	8,11	7,73	7,94	8,04	7,87	7,96	7,41
SOB	8,09	8,24	8,32	8,24	8,32	7,87	8,10	7,73
INK	7,78	8,03	7,75	7,98	8,03	7,60	7,81	7,25
Število laktobacilov (KE/g)								
OS	8,29	8,46	8,38	8,19	8,28	8,62	8,13	7,94
UT	8,25	8,40	8,42	8,26	8,27	8,56	8,23	7,88
MEŠ	8,28	8,35	8,35	8,13	8,19	8,50	8,10	7,84
SOB	8,32	8,44	8,56	8,48	8,38	8,56	8,13	7,92
INK	8,08	8,27	8,34	8,27	8,23	8,34	8,09	7,76

Legenda: AD: anaerobni diluent; RING: ringerjeva raztopina $\frac{1}{4}$ jakosti; BPW: pufrirana peptonska voda; PV: peptonska voda; MITs: Mitsuka pufer (pH 6,5); K₂HPO₄: 20 % raztopina dikalijevega hidrogen fosfata; PBS: fosfatni pufer s soljo (pH 7,3); CITRAT+T: 20 % raztopina natrijevega citrata z dodatkom Tweena 80 (1 g/L); OS: osnovna homogenizacija; UT: laboratorijsko mešalo z rezili; MEŠ: mešanje; SOB: inkubacija pri sobni temperaturi; INK: inkubacija pri 37 °C.

4.5 FLORAZYM

Iz rezultatov določanja skupnega števila bifidobakterij in laktobacilov v vzorcu FloraZym (Preglednica 9) vidimo, da med postopki obdelave ni značilnih razlik v rezultatih. Glede na razredčevalo smo pri določanju bifidobakterij višje število dobili z uporabo pufrirane peptonske vode in anaerobnega diluenta kot pa z uporabo fosfatnega pufra s soljo (pH 7,3), Ringerjeve raztopine in dikalijevega hidrogen fosfata. Prav tako smo višje število dobili z uporabo peptonske vode in Mitsuka pufra (pH 6,5) v primerjavi z uporabo fosfatnega pufra s soljo (pH 7,3) in Ringerjeve raztopine. Pri določanju laktobacilov smo glede na razredčevalo z uporabo pufrirane peptonske vode in anaerobnega diluenta dobili višje število kot z uporabo natrijevega citrata z dodatkom Tweena 80 (1 g/L) in dikalijevega hidrogen fosfata. Nižje število pri določanju laktobacilov smo z uporabo natrijevega citrata z dodatkom Tweena 80 (1 g/L) dobili tudi v primerjavi z Mitsuka pufrom, fosfatnim pufrom s soljo in peptonsko vodo (Preglednica 9).

Preglednica 9: Povprečne vrednosti skupnega števila bifidobakterij in laktobacilov v vzorcu FloraZym

OBDELAVA	RAZREDČEVALO								p
	AD	RING	BPW	PV	MITs	K ₂ HPO ₄	PBS	CITRAT +T	
Število bifidobakterij (KE/g)									
OS	9,95	9,65	10,26	9,97	10,15	9,72	9,74	9,95	≥ 0,05
UT	10,36	9,79	10,34	10,11	10,58	9,80	9,71	9,84	
MEŠ	10,56	9,53	9,96	10,08	9,81	9,61	9,60	10,21	
SOB	10,33	9,75	10,40	10,18	9,85	9,83	9,70	9,85	
INK	9,90	9,52	10,40	9,75	9,86	9,62	9,59	9,98	
Povprečje	10,22 ^{D,E,F}	9,65 ^{B,E,H,I}	10,27 ^{A,B,C}	10,02 ^{G,H}	10,05 ^{I,J}	9,71 ^{C,F}	9,67 ^{A,D,G,I}	9,96	
Število laktobacilov (KE/g)									
OS	10,04	9,92	10,30	9,93	10,08	9,91	9,96	9,60	≥ 0,05
UT	9,96	9,98	10,03	9,89	10,42	9,84	10,02	9,67	
MEŠ	10,39	9,93	10,01	9,92	9,94	9,89	9,93	9,67	
SOB	10,08	9,97	10,29	10,25	9,93	9,83	10,02	9,90	
INK	10,05	9,84	10,02	10,01	9,92	9,92	9,98	9,50	
Povprečje	10,08 ^{C,D}	9,97	10,29 ^{A,B}	10,25 ^G	9,93 ^E	9,83 ^{B,D}	10,02 ^F	9,90 ^{A,C,E,F,G}	

Legenda: AD: anaerobni diluent; RING: ringerjeva raztopina $\frac{1}{4}$ jakosti; BPW: pufirana peptonska voda; PV: peptonska voda; MITS: Mitsuoaka pufer (pH 6,5); K₂HPO₄: 20 % raztopina dikalijevega hidrogen fosfata; PBS: fosfatni pufer s soljo (pH 7,3); CITRAT+T: 20 % raztopina natrijevega citrata z dodatkom Tweena 80 (1 g/L); OS: osnovna homogenizacija; UT: laboratorijsko mešalo z rezili; MEŠ: mešanje; SOB: inkubacija pri sobni temperaturi; INK: inkubacija pri 37 °C; ^{A, B, C, D, E, F, G, H, I, J}: števila z enakimi oznakami se med seboj statistično značilno razlikujejo (p<0,05).

4.6 SIR LCA

Povprečne vrednosti obeh ponovitev določanja skupnega števila bifidobakterij v vzorcu sira LCA so predstavljeni v preglednici 10. Glede na rezultate statistične primerjave razredčeval v prilogi B11 lahko rečemo, da smo pri določanju bifidobakterij z uporabo natrijevega citrata z dodatkom Tweena 80 (1 g/L) dobili višje število kot z uporabo peptonske vode, pufirane peptonske vode, dikalijevega hidrogen fosfata in Ringerjeve raztopine. Prav tako smo višje število dobili z uporabo fosfatnega pufra s soljo (pH 7,3), kot pa z uporabo peptonske vode. V prilogi B12 so predstavljeni rezultati statistične primerjave obdelav kjer vidimo, da smo višje število dobili z inkubacijo pri 45 °C kot pri inkubaciji pri 37 °C, mešanju v gnetilniku, inkubaciji pri sobni temperaturi in osnovni obdelavi.

Preglednica 10: Povprečne vrednosti skupnega števila bifidobakterij v vzorcu sir LCA

OBDELAVA	RAZREDČEVALO							
	AD	RING	BPW	PV	MITs	K ₂ HPO ₄	PBS	CITRAT +T
Število bifidobakterij (log KE/g)								
OS	7,40	7,29	7,06	6,99	7,33	7,30	7,39	7,76
UT	7,41	7,33	7,43	7,37	7,23	7,32	7,66	7,96
MEŠ	7,49	7,24	7,05	7,13	7,37	7,27	7,39	7,49
SOB	7,44	7,28	7,12	6,95	7,44	7,24	7,35	7,52
INK	7,38	7,25	7,26	7,09	7,29	7,11	7,40	7,49
KOPEL	7,45	7,62	7,65	7,70	8,33	8,12	8,22	8,14

Legenda: AD: anaerobni diluent; RING: ringerjeva raztopina $\frac{1}{4}$ jakosti; BPW: pufirana peptonska voda; PV: peptonska voda; MITS: Mitsuoka pufer (pH 6,5); K₂HPO₄: 20 % raztopina dikalijevega hidrogen fosfata; PBS: fosfatni pufer s soljo (pH 7,3); CITRAT+T: 20 % raztopina natrijevega citrata z dodatkom Tweena 80 (1 g/L); OS: osnovna homogenizacija; UT: laboratorijsko mešalo z rezili; MEŠ: mešanje; SOB: inkubacija pri sobni temperaturi; INK: inkubacija pri 37 °C; KOPEL: inkubacija pri 45 °C.

5 RAZPRAVA

Danes je paleta probiotičnih izdelkov zelo široka, od prašnatih pripravkov, mlečnih formul za dojenčke, tablet, fermentiranih mlečnih izdelkov in celo žvečilnih gumijev. Vsi ti izdelki se po sestavi zelo razlikujejo, zato je potrebno postopke priprave vzorca za mikrobiološko analizo prilagoditi oz. optimizirati glede na matriks - sestavo vzorca, ki ga proučujemo. Prav tako je pomembno, katere mikroorganizme bomo v vzorcu določali, koliko vzorcev bomo analizirali, kako hitro potrebujemo rezultate, kako natančne rezultate želimo/potrebujemo, itd. Vse to so pomembni podatki, ki jih moramo upoštevati kadar se odločamo kateri način priprave vzorca izbrati in katero razredčevalo je najustreznejše za naš vzorec.

Do podobnih ugotovitev smo prišli tudi v naši nalogi. Čeprav so bile razlike med rezultati uporabe različnih postopkov obdelave oz. različnih razredčeval majhne in smo večinoma dobili primerljive rezultate, pa so naši rezultati pokazali, da ne moremo izpostaviti enega oz. univerzalnega razredčevala, ki bi nam pri mikrobioloških analizah probiotičnih izdelkov vseh oblik (prašek, tableta, fermentiran mlečni izdelek) podal najboljši rezultat. Različni avtorji izpostavljajo nekatera razredčevala kot najboljša za določanje skupnega števila bifidobakterij in laktobacilov. Med njimi pogosto zasledimo taka, ki vsebujejo pepton, NaCl, Ringerjevo tableto in/ali fosfatne soli (Campagne in sod., 2011). Glede na podatke iz literature smo pri našem poskusu uporabili osem različnih razredčeval, ki so imela različno sestavo. Razredčevala se med seboj ne razlikujejo le po sestavi, ampak tudi po zamudnosti in načinu priprave. Med najenostavnejše za pripravo uvrščamo Ringerjevo raztopino ($1/4$ jakosti) (RING), peptonsko vodo (PV), pufrirano peptonsko vodo (BPW) in 20 % raztopino dikalijevega hidrogen fosfata (K_2HPO_4). Priprava ostalih razredčeval pa je bolj zamudna, saj vsebujejo več komponent, pri nekaterih (npr. anaerobni diluent) pa je potrebno tudi daljše segrevanje, da se komponente raztopijo. Pomemben korak pri pripravi razredčeval je tudi umerjanje vrednosti pH. Ugotovili smo, da se vrednost pH anaerobnega diluenta (AD) precej zniža po dodatku cisteina, zato smo pH umerjali šele po dodatku vseh komponent razredčevala.

Uporabo Mitsuoka pufru (pH 6,5) za določanje števila probiotičnih mikroorganizmov, predvsem bifidobakterij, priporočajo Campagne in sod. (2011), Muto in sod. (2010) in Abe in sod. (2009). Muto in sod. (2010) navajajo, da je uporaba Mitsuoka pufru (pH 6,5) za analizo bifidobakterij dala boljše rezultate v primerjavi z ostalimi tremi razredčevali (RING, PV in BPW). Po poročanju Abe in sod. (2009) je uporaba Mitsuoka pufru (pH 6,5) podala najboljše rezultate v primerjavi z ostalimi osmimi razredčevali, ki so jih uporabili pri določanju skupnega števila bifidobakterij. Po njihovem mnenju naj bi bil Mitsuoka pufer (pH 6,5) primeren za določanje skupnega števila bifidobakterij v prašnatih in tekočih vzorcih in zadovoljiv pri ostalih probiotičnih izdelkih. Tudi mi smo pri določanju bifidobakterij z uporabo Mitsuoka pufru (pH 6,5) dobili dobre rezultate. Poudariti pa moramo, da so odstopanja med rezultati uporabe nekaterih razredčeval majhna. Primerljive rezultate kot z uporabo Mitsuoka pufru (pH 6,5) smo dobili tudi z uporabo anaerobnega diluenta, ki pa se je zelo dobro izkazal tudi pri določanju laktobacilov. Na splošno lahko rečemo, je za določanje mešanih kultur laktobacilov in bifidobakterij primernejši slednji, o čemer pišejo tudi Champagne in sod. (2011), ki za analize mešanih kultur priporočajo uporabo razredčeval, ki vsebujejo komponente kot so pepton ter cistein. Za določanje bifidobakterij pa bi dali prednost Mitsuoka pufru (pH 6,5). Vendar moramo ob tem poudariti zahtevno in predvsem dolgotrajno pripravo anaerobnega diluenta in Mitsuoka

pufra (pH 6,5), zaradi česar bi za analizo večjih količin vzorcev morda raje izbrali katerega izmed razredčeval z enostavnejšo oz. hitrejšo pripravo, saj kot že rečeno med rezultati ni bilo velikih razlik. Tako bi za analize velikega števila vzorcev mešanih kultur namesto anaerobnega diluenta rajši izbrali pufirano peptonsko vodo, katere priprava je hitra in zelo enostavna saj je komercialno dostopna v obliki dehidrirane predpripravljenе raztopine.

Pri vzorcu sira LCA smo z našimi rezultati potrdili ustrezno izbiro razredčevala kot ga navaja standard ISO 6887-5 (2010). Slednji opredeljuje 20 % raztopino natrijevega citrata kot najprimernejše razredčevalo za analize sira, mi pa smo 20 % raztopini natrijevega citrata dodali še detergent Tween 80 (1 g/L). Tako pripravljeno razredčevalo smo uporabili na podlagi objave Champagne in sod. (2011), ki za analizo probiotikov v mikrokapsulirani obliki priporočajo uporabo razredčevala, ki vsebuje citrat (sicer nižjo koncentracijo) in dodatek Tweena 80 (v enaki koncentraciji kot pri našem razredčevalu – 1 g/L). Pričakovali smo, da bo tako razredčevalo primerno ne samo za sir, ampak tudi za vzorec Waya LGG, ki vsebuje laktobacile v mikrokapsulirani obliki, vendar pa so bili rezultati celo najnižji. Kljub temu, da se je to razredčevalo pokazalo kot neprimerno za analizo prehranskih dopolnil, pa se je izkazalo za najboljše pri analizi bifidobakterij v vzorcu sira.

Tako kot pri izbiri razredčevala moramo tudi pri izbiri postopka obdelave vzorca upoštevati več različnih dejavnikov, kot npr. časovna zamudnost, oprema oz. naprave, ki jih potrebujemo za obdelavo, možnost naknadne kontaminacije vzorca, itd. Pri večini vzorcev v našem poskusu vpliva postopka obdelave na rezultat nismo potrdili (Novalac CC, Waya AB, Waya LGG, FloraZym). Pri dveh vzorcih (Lacto Seven in sir LCA) pa smo pri določanju bifidobakterij dobili značilne razlike rezultatov pri medsebojni primerjavi nekaterih postopkov obdelav. Pri pripravi vzorca prehranskega dopolnila (Lacto Seven) smo z inkubacijo pri sobni temperaturi (SOB) in obdelavo z laboratorijskim mešalom z rezili (UT) dobili boljše rezultate v primerjavi z inkubacijo pri temperaturi 37 °C (INK). Obdelava (60 s) z laboratorijskim mešalom z rezili najverjetneje precej uspešno razbije skupke bifidobakterij, ne pa tudi laktobacilov, čeprav smo pričakovali celo boljše rezultate kot pri bifidobakterijah. Mislili smo, da bomo z intenzivnim mešanjem uspeli razbiti tudi verižice laktobacilov, a žal tega nismo potrdili. Zanimivo je, da smo pri določanju bifidobakterij v vzorcu prehranskega dopolnila (Lacto Seven) z uporabo inkubacije pri temperaturi 37 °C, ki jo v svoji objavi priporočajo Champagne in sod. (2011), dobili nižje rezultate od inkubacije pri sobni temperaturi in obdelave z laboratorijskim mešalom z rezili.

Za analizo prehranskih dopolnil bi torej bilo najbolj smiselno vzorce obdelati z laboratorijskim mešalom z rezili (UT) ali pa z inkubacijo pri sobni temperaturi (SOB) oz. katerim koli drugim postopkom obdelave razen INK, saj med ostalimi postopki obdelave nismo ugotovili značilnih razlik v rezultatih. Ker pa je obdelava z laboratorijskim mešalom z rezili zamudna in predstavlja možnost naknadne kontaminacije vzorca, kar je potrebno upoštevati pri izbiri postopka obdelave, bi jo za analize večjega števila vzorcev ali rutinske analize odsvetovali. Zato priporočamo uporabo obdelave pri sobni temperaturi (SOB) ali samo osnovno obdelavo (OS), pri katerih je verjetnost naknadne kontaminacije zelo nizka in zahteva manj manipulacije hkrati pa nam dajo enako dobre, v nekaterih primerih celo boljše rezultate. Potrebno pa je ponovno opozoriti na to, da razlike med rezultati niso bile velike in ne glede na izbrano vrsto obdelave dobimo primerljive rezultate.

Pri pripravi suspenzije sira LCA smo poleg ostalih postopkov obdelave uporabili tudi postopek, pri katerem smo osnovno raztopino pred mešanjem, 5 minut inkubirali v vodni kopeli pri 45 °C, da se je sir delno raztopil. Nad rezultati smo bili pozitivno presenečeni, saj smo z uporabo tega postopka t.i. predinkubacije dobili boljše rezultate kot pri inkubaciji pri 37 °C (INK), mešanju v gnetilniku (MEŠ), inkubaciji pri sobni temperaturi (SOB) in osnovni obdelavi (OS). Glede na razredčevalo pa smo pri analizi vzorca sira boljše rezultate dobili z uporabo 20 % raztopine natrijevega citrata z dodatkom Tweena 80 (1 g/L) v primerjavi s peptonsko vodo, pufirano peptonsko vodo, dikalijevim hidrogen fosfatom in Ringerjevo raztopino.

Presenečeni smo bili nad rezultati, ki smo jih dobili z uporabo peptonske vode pri določanju skupnega števila laktobacilov v vzorcu oljnih kapljic Waya LGG. Uporaba peptonske vode se je namreč obnesla bolje kot TWEEN, CITRAT+T in MITS, poleg tega pa je zelo enostavna za pripravo, dostopna pa je tudi komercialno pripravljena mešanica (npr. Maximum Recovery Dilluent podjetja Merck). Enako dobro, kot peptonska voda se je obnesla tudi uporaba fosfatnega pufra s soljo (pH 7,3). Vse skupaj je zanimivo predvsem zato, ker je omenjeni vzorec suspenzija probiotikov v olju, kar ni ravno pogost primer. Obstajajo priporočila in nasveti (ISO 6887-4, 2003) kako obdelati takšen vzorec in katero razredčevalo izbrati, da bi dobili čim boljši rezultat. Pri vzorcih, ki vsebujejo olja (več kot 20 %) naj bi se dobro obnesla uporaba diluentov, ki vsebujejo detergent (Tween 80). V ta namen smo pri analizi vzorca oljnih kapljic uporabili posebno razredčevalno raztopino, ki je pri ostalih vzorcih nismo, in sicer 20 % raztopino natrijevega citrata z maksimalnim dodatkom Tweena 80 (9 g/L raztopine). Rezultati uporabe tega razredčevala so bili pod pričakovanji, z uporabo tega razredčevala smo namreč dobili značilno slabše rezultate kot z uporabo šestih drugih razredčeval (razen CITRAT+T in MITS).

Zaključimo lahko, da je glede na razredčevalo za mikrobiološke analize vzorcev prehranskih dopolnil priporočljiva uporaba anaerobnega diluenta, Mitsuoka pufra (pH 6,5) in pufirane peptonske vode. Glede na postopek obdelave pa je najbolje vzorce obdelati z osnovno obdelavo (OS) ali inkubacijo pri sobni temperaturi (SOB). Kot že omenjeno so bile razlike med rezultati uporabe različnih razredčeval in postopkov obdelave majhne. Zato si v primeru, da analiziramo veliko število vzorcev lahko postopek poenostavimo tako, da namesto anaerobnega diluenta oz. Mitsuoka pufra (pH 6,5) izberemo razredčevalo, katerega priprava je hitra in enostavna npr. pufirano peptonsko vodo ali peptonsko vodo. Enako je pri izbiri postopka obdelave, kjer se je pokazalo, da z enostavnejšimi postopki obdelave dobimo dovolj dobre rezultate (npr. OS). Odsvetujemo pa obdelavo z mešanjem (MEŠ) in inkubacijo pri temperaturi 37 °C (INK) ter uporabo razredčeval kot so 20 % raztopina natrijevega citrata z dodatkom Tweena 80 (1 g/L), fosfatni pufer s soljo (pH 7,3) ter 20 % raztopina dikalijevega hidrogen fosfata.

Za analize vzorcev sira je najbolje izbrati 20 % raztopino natrijevega citrata z dodatkom Tweena 80 (1 g/L), kot to priporoča standard ISO 6887-5 (2010), v kombinaciji z inkubacijo v vodni kopeli (KOPEL).

6 SKLEPI

- Iz rezultatov našega poskusa ne moremo izpostaviti samo enega razredčevala in postopka obdelave vzorca, ki bi pri analizah različnih vrst vzorcev probiotičnih izdelkov omogočila rast bakterijam, prisotnih v vzorcu.
- Razredčevala s kompleksnejšo sestavo niso dala bistveno boljših rezultatov.
- Mitsuoka pufer (pH 6,5) je v našem poskusu opravičil navedbe številnih avtorjev, ki ga opisujejo kot najprimernejše razredčevalo za določanje bifidobakterij. Kljub temu pa smo primerljivo dobre rezultate dobili tudi z uporabo nekaterih razredčeval, katerih priprava ni tako zamudna.
- Obdelava vzorca z laboratorijskim mešalom z rezili (UT) se je izkazala za uspešno predvsem pri določanju skupnega števila bifidobakterij v prašnatih vzorcih in kapsulah. Zaradi zamudnosti obdelave in možnosti rekontaminacije pa obdelavo z laboratorijskim mešalom z rezili odsvetujemo, še posebej pri analizah večjega števila vzorcev.
- Pri analizi sira smo dober rezultat dobili z uporabo natrijevega citrata z dodatkom Tweena 80 (1 g/L), ki ga priporoča standard za analize sirov. Pri pripravi vzorca smo uporabili tudi postopek obdelave, kjer smo osnovno raztopino pred mešanjem, inkubirali v vodni kopeli pri temperaturi 45 °C (predinkubacija). Nad rezultati smo bili pozitivno presenečeni, saj smo dobili zelo dobre rezultate v primerjavi z ostalimi postopki obdelave.

7 POVZETEK

Na tržišču je vedno več probiotičnih izdelkov, ki pa se med seboj zelo razlikujejo. Številne raziskave poročajo o tem, da se skupno število prisotnih probiotičnih bakterij v izdelkih pogosto ne sklada z deklariranimi vrednostmi.

Seveda je pomembno, da med probiotičnimi izdelki, ki so na tržišču, lahko ločimo med ustreznimi in neustreznimi. Zato potrebujemo metode, s katerimi lahko čimbolj natančno določimo skupno število kultivabilnih probiotičnih bakterij v izdelku. Znano je namreč dejstvo, da imajo probiotiki pozitiven učinek na zdravje gostitelja le, če jih zaužijemo v zadostni količini. Prav tako pa morajo biti probiotične bakterije žive, ko pridejo do mesta svojega delovanja. To pomeni, da morajo preživeti postopek proizvodnje probiotičnega izdelka, pogoje transporta in skladiščenja ter vso pot skozi gostiteljev gastrointestinalni trakt vse do črevesa, kjer je njihovo mesto delovanja.

Opravljenih je bilo že veliko raziskav, ki bi prispevale k optimalnemu rezultatu določanja skupnega števila probiotičnih bakterij. Vendar se večina avtorjev posveča zgolj izbiri ustreznih gojišč ne pa sami pripravi vzorca in izbiri razredčevalne raztopine. Zato smo se odločili, da preizkusimo pet različnih postopkov obdelave vzorca in osem različnih razredčevalnih raztopin z željo, da bi lahko določili najprimernejšega.

Zaradi pestrosti probiotičnih izdelkov ne moremo izpostaviti univerzalnega razredčevala, ki bi bil primeren za pripravo vseh vrst probiotičnih izdelkov. Prav tako ni moč izpostaviti najprimernejšega postopka obdelave vzorca, ki bi ga lahko uporabili za vse probiotične izdelke. Razlike med rezultati uporabe različnih razredčeval in postopkov obdelave so bile majhne, pa vendar nakazujejo primernost razredčevala oz. postopka za obdelavo posameznih vzorcev.

Lahko rečemo da je, glede na dobljene rezultate, za vzorce mešanih kultur laktobacilov in bifidobakterij v prehranskih dopolnilih priporočljiva uporaba anaerobnega diluenta, Mitsuoka pufra (pH 6,5) in pufrirane peptonske vode. Za določanje laktobacilov pri večjemu številu vzorcev bi dali prednost pufrirani peptonski vodi pred anaerobnim diluentom, katerega priprava je precej zamudna in kompleksna.

Uporaba laboratorijskega mešala z rezili (UT) za obdelavo vzorca je smiselna predvsem pri določanju bifidobakterij pri analizah manjšega števila vzorcev. Drugače pa smo enako dobre rezultate dobili tudi pri inkubaciji na sobni temperaturi (SOB). Presenečeni smo tudi nad dobrimi rezultati, ki smo jih dobili z osnovno obdelavo (OS), saj je najenostavnejši postopek obdelave.

Zanimivo je, da se je pri analizi vzorca Waya LGG (oljne kapljice) precej dobro obnesla uporaba peptonske vode in fosfatnega pufra s soljo (pH 7,3). Oljne kapljice so namreč precej nenavaden matriks vzorca, ki vsebuje probiotične bakterije. Pričakovali bi, da bi za analizo takšnega vzorca potrebovali posebno in kompleksno sestavljeno razredčevalo, ampak v našem primeru temu ni bilo tako.

Pozitivno presenečeni smo bili nad rezultati, ki smo jih dobili z uporabo pufrirane peptonske vode (BPW) in peptonske vode (PV), saj sta se primerljivo dobro odrezali v primerjavi s kompleksnejšimi razredčevali. Seveda je izbira ustreznega razredčevala odvisna predvsem od matriksa vzorca (prašek, tableta, kapsula, oljne kapljice, sir, itd.) in

od vrste probiotika, ki ga določamo. Zato je priporočljivo, da pred obsežnejšimi analizami naredimo nekaj poskusov z različnimi razredčevali in postopki obdelave ter tako ugotovimo, z uporabo katerega razredčevala oz. postopka obdelave dobimo najboljše rezultate.

Za analize vzorcev sira je priporočljiva uporaba natrijevega citrata z dodatkom Tweena 80 (1 g/L) v kombinaciji z inkubacijo vzorca v vodni kopeli (KOPEL).

Kot že omenjeno so bile razlike med rezultati uporabe različnih razredčeval in postopkov obdelave majhne. Zato je za analize večjega števila vzorcev priporočljivo izbrati postopke obdelave, ki so lažji za izvedbo in ne zahtevajo posebne opreme, hkrati pa je verjetnost naknadne kontaminacije majhna. Enako je glede izbire razredčeval, za analize večjega števila vzorcev je vsekakor priporočljiva izbira razredčevala, katerega priprava je hitra in enostavna.

8 VIRI

- Abe F., Muto M., Yaeshima T., Iwatsuki K. 2009. Effects of suspension-dilution buffers and plating media on enumeration of *Bifidobacterium*. *Milchwissenschaft*, 64: 139–142.
- Adamič J., Smole Možina S., Jeršek B. 2003. Vloga in pomen mikroorganizmov v živilih in taksonomija. V: *Mikrobiologija živil živalskega izvora*. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 1–45
- Albadran H. A., Chatzifragkou A., Khutoryanskiy V. V., Charalampopoulos D. 2015. Stability of probiotic *Lactobacillus plantarum* in dry microcapsules under accelerated storage conditions. *Food Research International*, 74: 208–216
- Berlec A. 2014. Probiotiki prihodnosti. V: *Probiotiki, s kakovostjo do učinkovitosti*. Strašek H. (ur.). Ljubljana, Lek farmacevtska združba d.d.: 32–39
- Bifidobacterium animalis*. 2009. Thousand Oaks, Probiotic.org: 4 str.
<http://www.probiotic.org/bifidobacterium-animalis.htm> (februar 2015)
- Bifidobacterium bifidum*. 2009. Thousand Oaks, Probiotic.org: 4 str.
<http://www.probiotic.org/bifidobacterium-bifidum.htm> (februar 2015)
- Bogovič Matijašić B. 2014. Kaj je kakovosten probiotik. V: *Probiotiki, s kakovostjo do učinkovitosti*. Strašek H. (ur.). Ljubljana, Lek farmacevtska združba d.d.: 40–56
- Burgain J., Gaiani C., Linder M., Scher J. 2011. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering*, 104: 467–483
- Castillo Martinez F. A., Balciunas E. M., Converti A., Cotter P. D., de Souza Oliveira R. P. 2013. Bacteriocin production by *Bifidobacterium* spp. A review. *Biotechnology Advances*, 31: 482–488
- Champagne C. P., Raymond Y., Guertin N., Belanger G. 2015. Effects of storage conditions, microencapsulation and inclusion in chocolate particles on the stability of probiotic bacteria in ice cream. *International Dairy Journal*, 47: 109–117
- Champagne, C.P., Raymond, Y., Tompkins, T.A., 2010. The determination of viable counts in probiotic cultures microencapsulated by spray-coating. *Food Microbiology*, 24: 1104–1111
- Champagne C. P., Ross R. P., Saarela M., Flemming Hansen K., Charalampopoulos D. 2011. Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. *International Journal of Food Microbiology*, 149: 185–193
- Coeuret V., Gueguen M., Vernoux J. P. 2004. Numbers and strains of lactobacilli in some probiotic products. *International Journal of Food Microbiology*, 97: 147–156

- Collins J. K., Thornton G., Sullivan G. O. 1998. Selection of probiotic strains for human applications. *International Dairy Journal*, 8: 487–490
- CDRF. 2011. Commercial strains sold as probiotics. Davis, California Dairy Research Foundation: 1 str.
<http://cdrf.org/home/checkoff-investments/usprobiotics/products-with-probiotics/#commercial> (september, 2015)
- Davis C. 2014. Enumeration of probiotic strains: Review of culture-dependent and alternative techniques to quantify viable bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 103: 9–17
- Ehrlich S. D. 2011. *Lactobacillus acidophilus*. Baltimore, University of Maryland Medical Center: 8 str.
<http://umm.edu/health/medical/altmed/supplement/lactobacillus-acidophilus> (marec 2014)
- FAO/WHO. 2006. Probiotics in food: Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. Rome, Food and Agriculture Organization: 50 str.
- Field A. 2005. Discovering statistics using SPSS. 2nd ed. London, Sage Publications: 779 str.
- Genus *Bifidobacterium*. 2015. V: List of procaryotic names with standing in nomenclature. Parte A. C. (ed.). LPSN – bacterio.net: 16 str.
<http://www.bacterio.net/bifidobacterium.html> (junij 2015)
- Genus *Lactobacillus*. 2015. V: List of procaryotic names with standing in nomenclature. Parte A. C. (ed.). LPSN – bacterio.net: 55 str.
<http://www.bacterio.net/lactobacillus.html> (junij 2015)
- Gomes A. M. P., Malcata F. X. 1999. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in Food Science & Technology*, 10: 139–157
- Her J.-Y., Kim M. S., Lee K.-G. 2014. Preparation of probiotic powder by the spray freeze-drying method. *Journal of Food Engineering*, 150: 70–74
- ISO 29981. Milk products – Enumeration of presumptive bifidobacteria - Colony count technique at 37°C. 2010: 16 str.
- ISO 6887-1. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions. 1999: 5 str.
- ISO 6887-4. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 4: Specific rules for the preparation of products other than milk and milk products, meat and meat products, and fish and fishery products. 2003: 13 str.

- ISO 6887-5. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 5: Specific rules for the preparation of milk and milk products. 2010: 13 str.
- ISO 7218. Microbiology of food and animal feeding stuffs - General requirements and guidance for microbiological examinations. 2007: 74 str.
- Jungersen M., Wind A., Johansen E., Christensen J. E., Stuer-Lauridsen B., Eskesen D. 2014. The Science behind the Probiotic Strain *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12®. *Microorganisms*, 2, 2: 92–110
- Knežević M. 2006. Statistika z uporabo računalnika. Portorož, Turistica: 246 str.
- Lactobacillus rhamnosus*. 2009. Thousand Oaks, Probiotic.org: 3 str.
<http://probiotic.org/lactobacillus-rhamnosus.htm> (februar 2015)
- Muto M., Abe F., Yaeshima T., Iwatsuki K. 2010. Effect of enumeration method on bifidobacterium cell counts in commercial powder products. *Bioscience Microflora*, 29, 3: 143–148
- Ouwehand A. C., Kurvinen T., Rissanen P. 2004. Use of a probiotic *Bifidobacterium* in a dry food matrix, an *in vivo* study. *International Journal of Food Microbiology*, 95: 103–106
- Özer B., Kirmaci H. A., Senel E., Atamer M., Hayaloglu A. 2009. Improving the viability of *Bifidobacterium bifidum* BB-12 and *Lactobacillus acidophilus* LA-5 in white-brined cheese by microencapsulation. *International Dairy Journal*, 19: 22–29
- Prasad J., Gill H., Smart J., Gopal P. K. 1999. Selection and characterisation of *lactobacillus* and *bifidobacterium* strains for use as probiotics. *International Dairy Journal*, 8: 993–1002
- Rogelj I., Perko B. 2003. Mlečni izdelki. Mikrobiologija mleka in mlečnih izdelkov. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 541–577
- Singh K., Kallali B., Kumar A., Thaker V. 2011. Probiotics: A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1: S287–S290
- Smole Možina S. 2003. Pregled mikrobiološke analitike. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 87–113
- Todar K. 2012a. Todar's online textbook of bacteriology: Normal bacterial flora of humans. Madison, University of Wisconsin: 1 str.
<http://textbookofbacteriology.net/normalflora.html> (marec 2014)
- Todar K. 2012b. Todar's online textbook of bacteriology: Lactic acid bacteria. Madison, University of Wisconsin: 1 str.
<http://textbookofbacteriology.net/lactics.html> (marec 2014)

Tripathi M. K., Giri S. K. 2014. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods*, 9: 225–241

ZAHVALA

Hvala mentorici doc. dr. Andreji Čanžek Majhenič in somentorici asist. dr. Petri Mohar Lorbeg za strokovno pomoč, nasvete, vodenje in potrpežljivost pri opravljanju magistrskega dela.

Hvala recenzentki prof. dr. Barbari Jeršek za strokovni pregled naloge.

Hvala Lini Burkan Makivić, uni. dipl. inž., za tehnični pregled naloge.

Posebna zahvala gre staršema, ki sta mi omogočila brezskrbno šolanje. Hvala za vso pomoč in podporo.

Tadej, iskrena hvala tudi tebi.

PRILOGE

Priloga A: Osnovni rezultati štetja zraslih kolonij iz dveh ponovitev za posamezen vzorec

Priloga A1: Število bifidobakterij (TOS+M) in laktobacilov (MRS) v vzorcu Novalac CC, izraženo v KE/g

1. analiza		Število bifidobakterij (KE/g)							
gojišče	obdelava	razredčevalo							
		AD	RING	BPW	PV	MITs	K ₂ HPO ₄	PBS	CITRAT+T
TOS+M	OS	2,38×10 ⁷	1,29×10 ⁷	2,22×10 ⁷	2,10×10 ⁷	3,00×10 ⁷	2,64×10 ⁷	2,41×10 ⁷	2,42×10 ⁷
TOS+M	UT	1,97×10 ⁷	1,56×10 ⁷	2,15×10 ⁷	2,07×10 ⁷	2,55×10 ⁷	2,71×10 ⁷	2,30×10 ⁷	2,51×10 ⁷
TOS+M	MEŠ	1,80×10 ⁷	1,68×10 ⁷	2,76×10 ⁷	2,32×10 ⁷	2,07×10 ⁷	2,33×10 ⁷	2,82×10 ⁷	2,48×10 ⁷
TOS+M	SOB	1,84×10 ⁷	1,79×10 ⁷	2,46×10 ⁷	2,02×10 ⁷	2,67×10 ⁷	3,02×10 ⁷	2,50×10 ⁷	3,18×10 ⁷
TOS+M	INK	2,05×10 ⁷	1,88×10 ⁷	2,32×10 ⁷	2,16×10 ⁷	2,33×10 ⁷	2,42×10 ⁷	2,23×10 ⁷	2,59×10 ⁷
		Število laktobacilov (KE/g)							
MRS	OS	3,08×10 ⁷	2,59×10 ⁷	5,82×10 ⁷	3,81×10 ⁷	3,55×10 ⁷	3,16×10 ⁷	6,18×10 ⁷	1,77×10 ⁷
MRS	UT	5,27×10 ⁷	2,33×10 ⁷	6,18×10 ⁷	5,90×10 ⁷	4,64×10 ⁷	6,73×10 ⁷	6,55×10 ⁷	2,58×10 ⁷
MRS	MEŠ	5,73×10 ⁷	5,27×10 ⁷	5,91×10 ⁷	5,27×10 ⁷	3,73×10 ⁷	2,65×10 ⁷	5,91×10 ⁷	2,62×10 ⁷
MRS	SOB	5,45×10 ⁷	4,82×10 ⁷	8,00×10 ⁷	4,73×10 ⁷	2,83×10 ⁷	2,88×10 ⁷	6,18×10 ⁷	2,47×10 ⁷
MRS	INK	5,451×10 ⁷	4,73×10 ⁷	5,09×10 ⁷	3,17×10 ⁷	3,22×10 ⁷	3,06×10 ⁷	7,18×10 ⁷	2,58×10 ⁷
2. analiza		Število bifidobakterij (KE/g)							
gojišče	obdelava	razredčevalo							
		AD	RING	BPW	PV	MITs	K ₂ HPO ₄	PBS	CITRAT+T
TOS+M	OS	2,40×10 ⁷	1,43×10 ⁷	1,86×10 ⁷	2,24×10 ⁷	2,87×10 ⁷	2,36×10 ⁷	2,34×10 ⁷	2,64×10 ⁷
TOS+M	UT	2,48×10 ⁷	2,42×10 ⁷	2,31×10 ⁷	2,41×10 ⁷	3,73×10 ⁷	2,32×10 ⁷	2,07×10 ⁷	2,37×10 ⁷
TOS+M	MEŠ	2,43×10 ⁷	2,23×10 ⁷	2,30×10 ⁷	2,75×10 ⁷	2,63×10 ⁷	2,02×10 ⁷	2,23×10 ⁷	2,67×10 ⁷
TOS+M	SOB	2,75×10 ⁷	1,87×10 ⁷	2,18×10 ⁷	2,64×10 ⁷	4,64×10 ⁷	2,38×10 ⁷	2,61×10 ⁷	2,16×10 ⁷
TOS+M	INK	4,64×10 ⁷	1,68×10 ⁷	2,55×10 ⁷	2,37×10 ⁷	2,78×10 ⁷	2,07×10 ⁷	2,48×10 ⁷	2,06×10 ⁷
		Število laktobacilov (KE/g)							
MRS	OS	7,45×10 ⁷	4,00×10 ⁷	4,64×10 ⁷	5,82×10 ⁷	6,45×10 ⁷	5,20×10 ⁷	4,45×10 ⁷	2,82×10 ⁷
MRS	UT	7,45×10 ⁷	6,00×10 ⁷	3,01×10 ⁷	5,00×10 ⁷	7,27×10 ⁷	7,64×10 ⁷	5,45×10 ⁷	3,36×10 ⁷
MRS	MEŠ	6,27×10 ⁷	6,00×10 ⁷	7,73×10 ⁷	6,45×10 ⁷	5,45×10 ⁷	3,05×10 ⁷	6,18×10 ⁷	4,27×10 ⁷
MRS	SOB	5,27×10 ⁷	4,64×10 ⁷	7,18×10 ⁷	6,18×10 ⁷	7,64×10 ⁷	5,45×10 ⁷	8,00×10 ⁷	2,86×10 ⁷
MRS	INK	9,45×10 ⁷	5,73×10 ⁷	7,00×10 ⁷	6,80×10 ⁷	5,91×10 ⁷	4,00×10 ⁷	6,18×10 ⁷	2,59×10 ⁷

Legenda: AD: anaerobni diluent; RING: Ringerjeva raztopina ¹/₄ jakosti; BPW: pufirana peptonska voda; PV: peptonska voda; MITs: Mitsuka pufer (pH 6,5); K₂HPO₄: 20 % raztopina dikalijevega hidrogen fosfata; PBS: fosfatni pufer s soljo (pH 7,3); CITRAT+T: 20 % raztopina natrijevega citrata z dodatkom Tweena 80 (1 g/L); OS: osnovna homogenizacija; UT: laboratorijsko mešalom z rezili; MEŠ: mešanje; SOB: inkubacija pri sobni temperaturi; INK: inkubacija pri 37 °C; TOS+M: propionatni agar TOS z dodatkom mupirocina za določanje bifidobakterij; MRS: de Man-Rogosa-Sharpe agar za določanje laktobacilov.

Priloga A2: Število bifidobakterij (TOS+M) in laktobacilov (MRS) v vzorcu Waya AB, izraženo v KE/g

1. analiza		Število bifidobakterij (KE/g)							
gojišče	obdelava	razredčevalo							
		AD	RING	BPW	PV	MITs	K ₂ HPO ₄	PBS	CITRAT+T
TOS+M	OS	3,91×10 ⁸	3,36×10 ⁸	3,27×10 ⁸	4,09×10 ⁸	3,73×10 ⁸	3,45×10 ⁸	3,18×10 ⁸	1,45×10 ⁸
TOS+M	UT	3,82×10 ⁸	3,82×10 ⁸	4,09×10 ⁸	3,64×10 ⁸	4,91×10 ⁸	3,55×10 ⁸	3,64×10 ⁸	2,09×10 ⁸
TOS+M	MEŠ	3,45×10 ⁸	4,36×10 ⁸	5,36×10 ⁸	3,09×10 ⁸	3,45×10 ⁸	3,36×10 ⁸	2,64×10 ⁸	1,27×10 ⁸
TOS+M	SOB	5,27×10 ⁸	3,09×10 ⁸	3,00×10 ⁸	3,18×10 ⁸	4,00×10 ⁸	5,09×10 ⁸	4,10×10 ⁸	1,45×10 ⁸
TOS+M	INK	2,82×10 ⁸	4,36×10 ⁸	2,64×10 ⁸	3,73×10 ⁸	4,36×10 ⁸	3,45×10 ⁸	2,73×10 ⁸	1,40×10 ⁸
		Število laktobacilov (KE/g)							
MRS	OS	1,44×10 ⁷	9,91×10 ⁸	6,73×10 ⁸	8,73×10 ⁸	1,02×10 ⁷	9,82×10 ⁸	7,73×10 ⁸	5,27×10 ⁸
MRS	UT	1,00×10 ⁷	8,45×10 ⁸	8,36×10 ⁸	8,82×10 ⁸	1,01×10 ⁷	8,91×10 ⁸	7,27×10 ⁸	5,91×10 ⁸
MRS	MEŠ	1,78×10 ⁷	1,01×10 ⁷	9,36×10 ⁸	8,73×10 ⁸	8,20×10 ⁸	1,22×10 ⁵	7,91×10 ⁸	6,09×10 ⁸
MRS	SOB	1,10×10 ⁷	1,17×10 ⁷	7,00×10 ⁸	7,91×10 ⁸	9,91×10 ⁸	8,45×10 ⁸	9,82×10 ⁸	5,18×10 ⁸
MRS	INK	1,23×10 ⁷	1,04×10 ⁷	7,27×10 ⁸	9,27×10 ⁸	9,09×10 ⁸	9,64×10 ⁸	8,45×10 ⁸	5,27×10 ⁸
2. analiza		Število bifidobakterij (KE/g)							
gojišče	obdelava	razredčevalo							
		AD	RING	BPW	PV	MITs	K ₂ HPO ₄	PBS	CITRAT+T
TOS+M	OS	4,64×10 ⁸	4,09×10 ⁸	2,91×10 ⁸	3,55×10 ⁸	4,55×10 ⁸	3,09×10 ⁸	3,27×10 ⁸	1,09×10 ⁸
TOS+M	UT	5,55×10 ⁸	3,36×10 ⁸	2,09×10 ⁸	1,82×10 ⁸	4,36×10 ⁸	4,09×10 ⁸	3,00×10 ⁸	1,82×10 ⁸
TOS+M	MEŠ	3,09×10 ⁸	2,64×10 ⁸	5,27×10 ⁸	2,82×10 ⁸	2,36×10 ⁸	3,64×10 ⁸	2,82×10 ⁸	2,90×10 ⁸
TOS+M	SOB	4,18×10 ⁸	3,09×10 ⁸	4,27×10 ⁸	3,27×10 ⁸	/	3,36×10 ⁸	3,27×10 ⁸	1,00×10 ⁸
TOS+M	INK	4,00×10 ⁸	2,91×10 ⁸	2,27×10 ⁸	2,55×10 ⁸	3,82×10 ⁸	3,64×10 ⁸	2,64×10 ⁸	4,18×10 ⁸
		Število laktobacilov (KE/g)							
MRS	OS	1,85×10 ⁷	8,64×10 ⁸	9,36×10 ⁸	1,08×10 ⁷	7,27×10 ⁸	7,73×10 ⁸	8,00×10 ⁸	6,09×10 ⁸
MRS	UT	1,90×10 ⁷	7,18×10 ⁸	7,73×10 ⁸	5,27×10 ⁸	8,64×10 ⁸	8,91×10 ⁸	7,09×10 ⁸	5,18×10 ⁸
MRS	MEŠ	1,79×10 ⁷	7,55×10 ⁸	8,27×10 ⁸	8,09×10 ⁸	6,82×10 ⁸	9,09×10 ⁶	8,00×10 ⁸	6,82×10 ⁸
MRS	SOB	2,12×10 ⁷	9,55×10 ⁸	7,36×10 ⁸	8,73×10 ⁸	9,09×10 ⁸	6,82×10 ⁸	7,73×10 ⁸	4,55×10 ⁸
MRS	INK	1,99×10 ⁷	7,73×10 ⁸	8,91×10 ⁸	7,45×10 ⁸	8,90×10 ⁸	8,73×10 ⁸	6,09×10 ⁸	7,09×10 ⁸

Legenda: AD: anaerobni diluent; RING: Ringerjeva raztopina ¹/₄ jakosti; BPW: pufirana peptonska voda; PV: peptonska voda; MITs: Mitsuka pufer (pH 6,5); K₂HPO₄: 20 % raztopina dikalijevega hidrogen fosfata; PBS: fosfatni pufer s soljo (pH 7,3); CITRAT+T: 20 % raztopina natrijevega citrata z dodatkom Tweena 80 (1 g/L); OS: osnovna homogenizacija; UT: laboratorijsko mešalom z rezili; MEŠ: mešanje; SOB: inkubacija pri sobni temperaturi; INK: inkubacija pri 37 °C; TOS+M: propionatni agar TOS z dodatkom mupirocina za določanje bifidobakterij; MRS: de Man-Rogosa-Sharpe agar za določanje laktobacilov; /: neštevno.

Priloga A3: Število laktobacilov (MRS) v vzorcu Waya LGG, izraženo v KE/g

1. analiza		Število laktobacilov (KE/g)								
gojišče	obdelava	razredčevalo								
		AD	RING	BPW	PV	MITs	K ₂ HPO ₄	PBS	CITRAT+T	TWEEN
MRS	OS	1,95×10 ⁹	2,23×10 ⁹	2,69×10 ⁹	4,18×10 ⁹	2,03×10 ⁹	2,77×10 ⁹	2,27×10 ⁹	1,81×10 ⁹	1,29×10 ⁹
MRS	UT	2,24×10 ⁹	1,81×10 ⁹	1,98×10 ⁹	4,00×10 ⁹	1,95×10 ⁹	2,50×10 ⁹	1,91×10 ⁹	9,20×10 ¹⁰	1,28×10 ⁹
MRS	MEŠ	1,97×10 ⁹	2,06×10 ⁹	2,23×10 ⁹	4,55×10 ⁹	1,68×10 ⁹	3,00×10 ⁹	1,95×10 ⁹	1,58×10 ⁹	8,70×10 ¹⁰
MRS	SOB	2,51×10 ⁹	1,81×10 ⁹	2,63×10 ⁹	4,09×10 ⁹	1,93×10 ⁹	/	2,55×10 ⁹	2,07×10 ⁹	1,14×10 ⁹
MRS	INK	2,22×10 ⁹	2,07×10 ⁹	2,30×10 ⁹	1,39×10 ⁹	1,77×10 ⁹	2,36×10 ⁹	2,19×10 ⁹	1,81×10 ⁹	1,03×10 ⁹
2. analiza		Število laktobacilov (KE/g)								
gojišče	obdelava	razredčevalo								
		AD	RING	BPW	PV	MITs	K ₂ HPO ₄	PBS	CITRAT+T	TWEEN
MRS	OS	2,24×10 ⁹	2,64×10 ⁹	2,37×10 ⁹	2,16×10 ⁹	1,33×10 ⁹	2,11×10 ⁹	2,67×10 ⁹	1,18×10 ⁹	1,72×10 ⁹
MRS	UT	2,10×10 ⁹	2,12×10 ⁹	2,35×10 ⁹	2,06×10 ⁹	1,61×10 ⁹	1,78×10 ⁹	2,53×10 ⁹	1,61×10 ⁹	1,60×10 ⁹
MRS	MEŠ	1,88×10 ⁹	2,14×10 ⁹	1,96×10 ⁹	2,17×10 ⁹	1,26×10 ⁹	2,01×10 ⁹	2,23×10 ⁹	1,57×10 ⁹	1,29×10 ⁹
MRS	SOB	2,35×10 ⁹	2,29×10 ⁹	1,79×10 ⁹	2,46×10 ⁹	1,42×10 ⁹	1,93×10 ⁹	2,23×10 ⁹	1,59×10 ⁹	1,56×10 ⁹
MRS	INK	2,51×10 ⁹	2,23×10 ⁹	1,32×10 ⁹	2,29×10 ⁹	1,25×10 ⁹	1,88×10 ⁹	2,52×10 ⁹	1,29×10 ⁹	1,96×10 ⁹

Legenda: AD: anaerobni diluent; RING: Ringerjeva raztopina $\frac{1}{4}$ jakosti; BPW: pufirana peptonska voda; PV: peptonska voda; MITs: Mitsuoka pufer (pH 6,5); K₂HPO₄: 20 % raztopina dikalijevega hidrogen fosfata; PBS: fosfatni pufer s soljo (pH 7,3); CITRAT+T: 20 % raztopina natrijevega citrata z dodatkom Tweena 80 (1 g/L); TWEEN: 20 % raztopina natrijevega citrata z dodatkom Tweena 80 (9 g/L); OS: osnovna homogenizacija; UT: laboratorijsko mešalom z rezili; MEŠ: mešanje; SOB: inkubacija pri sobni temperaturi; INK: inkubacija pri 37 °C; MRS: de Man-Rogosa-Sharpe agar za določanje laktobacilov; /: neštevno.

Priloga A4: Število bifidobakterij (TOS+M) in laktobacilov (MRS) v vzorcu Lacto Seven, izraženo v KE/g

1. analiza		Število bifidobakterij (KE/g)							
gojišče	obdelava	razredčevalo							
		AD	RING	BPW	PV	MITs	K ₂ HPO ₄	PBS	CITRAT+T
TOS+M	OS	1,77×10 ⁸	2,18×10 ⁸	6,55×10 ⁷	6,36×10 ⁷	1,11×10 ⁸	9,80×10 ⁷	1,03×10 ⁶	3,55×10 ⁷
TOS+M	UT	9,20×10 ⁹	1,53×10 ⁸	1,40×10 ⁸	1,05×10 ⁸	1,23×10 ⁸	9,50×10 ⁷	1,44×10 ⁶	1,91×10 ⁷
TOS+M	MEŠ	1,28×10 ⁸	1,03×10 ⁸	7,36×10 ⁷	1,02×10 ⁸	1,25×10 ⁸	6,50×10 ⁷	8,50×10 ⁷	2,00×10 ⁷
TOS+M	SOB	1,45×10 ⁸	1,54×10 ⁸	2,50×10 ⁸	1,36×10 ⁸	2,29×10 ⁸	6,50×10 ⁷	1,04×10 ⁶	4,18×10 ⁷
TOS+M	INK	4,70×10 ⁹	9,82×10 ⁷	6,55×10 ⁷	6,82×10 ⁷	5,00×10 ⁸	4,50×10 ⁷	7,50×10 ⁷	1,09×10 ⁷
		Število laktobacilov (KE/g)							
MRS	OS	2,28×10 ⁸	2,75×10 ⁸	2,90×10 ⁸	1,54×10 ⁸	8,90×10 ⁹	2,70×10 ⁷	1,15×10 ⁶	9,27×10 ⁷
MRS	UT	1,35×10 ⁸	2,15×10 ⁸	3,10×10 ⁹	1,45×10 ⁸	1,18×10 ⁸	3,00×10 ⁸	1,50×10 ⁶	7,36×10 ⁷
MRS	MEŠ	1,47×10 ⁸	1,55×10 ⁸	3,09×10 ⁸	1,15×10 ⁸	1,38×10 ⁸	2,65×10 ⁶	1,20×10 ⁶	5,91×10 ⁷
MRS	SOB	2,19×10 ⁸	2,46×10 ⁸	4,50×10 ⁹	1,53×10 ⁸	2,05×10 ⁸	2,89×10 ⁶	1,15×10 ⁶	8,00×10 ⁷
MRS	INK	9,60×10 ⁹	1,66×10 ⁸	2,70×10 ⁸	1,18×10 ⁸	9,50×10 ⁹	1,69×10 ⁶	1,38×10 ⁶	5,36×10 ⁷
		Število bifidobakterij (KE/g)							
gojišče	obdelava	razredčevalo							
		AD	RING	BPW	PV	MITs	K ₂ HPO ₄	PBS	CITRAT+T
TOS+M	OS	8,00×10 ⁷	1,56×10 ⁸	7,91×10 ⁷	7,00×10 ⁷	1,74×10 ⁸	1,14×10 ⁶	8,50×10 ⁷	3,55×10 ⁷
TOS+M	UT	1,13×10 ⁸	1,75×10 ⁸	1,35×10 ⁸	1,38×10 ⁸	1,85×10 ⁸	1,53×10 ⁶	1,24×10 ⁶	5,82×10 ⁷
TOS+M	MEŠ	1,91×10 ⁸	1,55×10 ⁸	3,27×10 ⁷	7,36×10 ⁷	9,40×10 ⁹	8,40×10 ⁷	9,70×10 ⁷	3,09×10 ⁷
TOS+M	SOB	1,03×10 ⁸	1,94×10 ⁸	1,67×10 ⁸	2,12×10 ⁸	1,94×10 ⁸	8,50×10 ⁷	1,49×10 ⁶	6,45×10 ⁷
TOS+M	INK	7,30×10 ⁹	1,19×10 ⁸	4,64×10 ⁷	1,21×10 ⁸	1,64×10 ⁸	3,50×10 ⁷	5,50×10 ⁷	2,45×10 ⁷
		Število laktobacilov (KE/g)							
MRS	OS	1,59×10 ⁸	3,02×10 ⁸	1,93×10 ⁸	1,57×10 ⁸	2,88×10 ⁸	5,60×10 ⁷	1,55×10 ⁶	8,00×10 ⁷
MRS	UT	2,18×10 ⁸	2,94×10 ⁸	1,91×10 ⁸	2,21×10 ⁸	2,54×10 ⁸	4,00×10 ⁸	1,92×10 ⁶	7,82×10 ⁷
MRS	MEŠ	2,36×10 ⁸	2,94×10 ⁸	1,41×10 ⁸	1,57×10 ⁸	1,70×10 ⁸	3,40×10 ⁷	1,35×10 ⁶	8,00×10 ⁷
MRS	SOB	1,98×10 ⁸	3,05×10 ⁸	2,33×10 ⁸	4,50×10 ⁸	2,73×10 ⁸	3,90×10 ⁷	1,52×10 ⁶	8,73×10 ⁷
MRS	INK	1,46×10 ⁸	2,08×10 ⁸	1,71×10 ⁸	2,51×10 ⁸	2,40×10 ⁸	2,73×10 ⁶	1,09×10 ⁶	6,18×10 ⁷

Legenda: AD: anaerobni diluent; RING: Ringerjeva raztopina ¹/₄ jakosti; BPW: pufirana peptonska voda; PV: peptonska voda; MITs: Mitsuoka pufer (pH 6,5); K₂HPO₄: 20 % raztopina dikalijevega hidrogen fosfata; PBS: fosfatni pufer s soljo (pH 7,3); CITRAT+T: 20 % raztopina natrijevega citrata z dodatkom Tweena 80 (1 g/L); OS: osnovna homogenizacija; UT: laboratorijsko mešalom z rezili; MEŠ: mešanje; SOB: inkubacija pri sobni temperaturi; INK: inkubacija pri 37 °C; TOS+M: propionatni agar TOS z dodatkom mupirocina za določanje bifidobakterij; MRS: de Man-Rogosa-Sharpe agar za določanje laktobacilov.

Priloga A5: Število bifidobakterij (TOS+M) in laktobacilov (MRS) v vzorcu FloraZym, izraženo v KE/g

1. analiza		Število bifidobakterij (KE/g)							
gojišče	obdelava	razredčevalo							
		AD	RING	BPW	PV	MITs	K ₂ HPO ₄	PBS	CITRAT+T
TOS+M	OS	8,27×10 ⁹	4,00×10 ⁹	1,80×10 ¹⁰	1,10×10 ¹⁰	1,55×10 ¹⁰	4,55×10 ⁹	5,27×10 ⁹	1,00×10 ¹⁰
TOS+M	UT	2,50×10 ¹⁰	5,09×10 ⁹	2,23×10 ¹⁰	1,36×10 ¹⁰	5,40×10 ¹⁰	6,27×10 ⁹	5,82×10 ⁹	6,73×10 ⁹
TOS+M	MEŠ	5,00×10 ¹⁰	3,00×10 ⁹	8,82×10 ⁹	1,33×10 ¹⁰	6,55×10 ⁹	4,82×10 ⁹	3,64×10 ⁹	1,20×10 ¹⁰
TOS+M	SOB	2,10×10 ¹⁰	6,73×10 ⁹	3,09×10 ¹⁰	1,50×10 ¹⁰	8,00×10 ⁹	6,27×10 ⁹	4,73×10 ⁹	7,55×10 ⁹
TOS+M	INK	9,73×10 ⁹	2,36×10 ⁹	2,74×10 ¹⁰	6,46×10 ⁹	8,46×10 ⁹	3,73×10 ⁹	3,36×10 ⁹	1,00×10 ¹⁰
		Število laktobacilov (KE/g)							
MRS	OS	9,91×10 ⁹	7,27×10 ⁹	2,62×10 ¹⁰	7,18×10 ⁹	1,22×10 ¹⁰	7,91×10 ⁹	8,55×10 ⁹	4,09×10 ⁹
MRS	UT	7,36×10 ⁹	8,09×10 ⁹	8,09×10 ⁹	7,27×10 ⁹	2,47×10 ¹⁰	7,27×10 ⁹	1,20×10 ¹⁰	5,18×10 ⁹
MRS	MEŠ	3,10×10 ¹⁰	8,09×10 ⁹	9,82×10 ⁹	9,55×10 ⁹	9,27×10 ⁹	6,73×10 ⁹	8,82×10 ⁹	3,91×10 ⁹
MRS	SOB	1,10×10 ¹⁰	1,05×10 ⁸	1,96×10 ¹⁰	1,70×10 ¹⁰	8,46×10 ⁹	7,73×10 ⁹	1,00×10 ¹⁰	6,55×10 ⁹
MRS	INK	1,40×10 ¹⁰	5,64×10 ⁹	1,09×10 ¹⁰	1,07×10 ¹⁰	7,36×10 ⁹	7,82×10 ⁹	9,82×10 ⁹	3,36×10 ⁹
2. analiza		Število bifidobakterij (KE/g)							
gojišče	obdelava	razredčevalo							
		AD	RING	BPW	PV	MITs	K ₂ HPO ₄	PBS	CITRAT+T
TOS+M	OS	9,45×10 ⁹	4,91×10 ⁹	1,86×10 ¹⁰	7,46×10 ⁹	1,29×10 ¹⁰	5,91×10 ⁹	5,64×10 ⁹	7,82×10 ⁹
TOS+M	UT	2,10×10 ¹⁰	7,27×10 ⁹	2,13×10 ¹⁰	1,20×10 ¹⁰	2,15×10 ¹⁰	6,27×10 ⁹	4,55×10 ⁹	7,00×10 ⁹
TOS+M	MEŠ	2,30×10 ¹⁰	3,82×10 ⁹	9,27×10 ⁹	1,06×10 ¹⁰	6,36×10 ⁹	3,27×10 ⁹	4,27×10 ⁹	2,10×10 ¹⁰
TOS+M	SOB	2,20×10 ¹⁰	4,64×10 ⁹	1,90×10 ¹⁰	1,50×10 ¹⁰	6,18×10 ⁹	7,27×10 ⁹	5,18×10 ⁹	6,45×10 ⁹
TOS+M	INK	6,27×10 ⁹	4,27×10 ⁹	2,35×10 ¹⁰	4,82×10 ⁹	6,00×10 ⁹	4,64×10 ⁹	4,36×10 ⁹	9,00×10 ⁹
		Število laktobacilov (KE/g)							
MRS	OS	1,20×10 ¹⁰	9,27×10 ⁹	1,39×10 ¹⁰	9,82×10 ⁹	1,17×10 ¹⁰	8,18×10 ⁹	9,64×10 ⁹	3,91×10 ⁹
MRS	UT	1,10×10 ¹⁰	1,10×10 ⁸	1,30×10 ¹⁰	8,09×10 ⁹	2,80×10 ¹⁰	6,64×10 ⁹	9,27×10 ⁹	4,09×10 ⁹
MRS	MEŠ	1,80×10 ¹⁰	8,91×10 ⁹	1,08×10 ¹⁰	7,00×10 ⁹	8,00×10 ⁹	8,73×10 ⁹	8,36×10 ⁹	5,55×10 ⁹
MRS	SOB	1,30×10 ¹⁰	8,09×10 ⁹	1,94×10 ¹⁰	1,83×10 ¹⁰	8,73×10 ⁹	5,91×10 ⁹	1,10×10 ¹⁰	9,27×10 ⁹
MRS	INK	8,73×10 ⁹	8,18×10 ⁹	1,02×10 ¹⁰	9,64×10 ⁹	9,09×10 ⁹	9,00×10 ⁹	9,18×10 ⁹	2,91×10 ⁹

Legenda: AD: anaerobni diluent; RING: Ringerjeva raztopina 1/4 jakosti; BPW: pufirana peptonska voda; PV: peptonska voda; MITs: Mitsuoka puffer (pH 6,5); K₂HPO₄: 20 % raztopina dikalijevega hidrogen fosfata; PBS: fosfatni puffer s soljo (pH 7,3); CITRAT+T: 20 % raztopina natrijevega citrata z dodatkom Tweena 80 (1 g/L); OS: osnovna homogenizacija; UT: laboratorijsko mešalom z rezili; MEŠ: mešanje; SOB: inkubacija pri sobni temperaturi; INK: inkubacija pri 37 °C; TOS+M: propionatni agar TOS z dodatkom mupirocina za določanje bifidobakterij; MRS: de Man-Rogosa-Sharpe agar za določanje laktobacilov.

Priloga A6: Število bifidobakterij (TOS+M) v vzorcu sira LCA, izraženo v KE/g

1. analiza		Število bifidobakterij (KE/g)							
gojišče	obdelava	razredčevalo							CITRAT+T
		AD	RING	BPW	PV	MITs	K ₂ HPO ₄	PBS	
TOS+M	OS	2,68×10 ⁷	2,14×10 ⁷	1,15×10 ⁷	1,07×10 ⁷	1,76×10 ⁷	2,18×10 ⁷	2,23×10 ⁷	4,70×10 ⁷
TOS+M	UT	2,44×10 ⁷	2,15×10 ⁷	2,56×10 ⁷	2,64×10 ⁷	1,72×10 ⁷	2,02×10 ⁷	5,90×10 ⁷	1,00×10 ⁸
TOS+M	MEŠ	4,00×10 ⁸	1,87×10 ⁷	1,23×10 ⁷	1,11×10 ⁷	2,24×10 ⁷	1,62×10 ⁷	2,60×10 ⁷	3,20×10 ⁷
TOS+M	SOB	3,30×10 ⁸	1,96×10 ⁷	1,35×10 ⁷	9,55×10 ⁶	2,73×10 ⁷	1,68×10 ⁷	2,15×10 ⁷	3,90×10 ⁷
TOS+M	INK	2,75×10 ⁷	1,75×10 ⁷	1,57×10 ⁷	1,33×10 ⁷	1,69×10 ⁷	1,23×10 ⁷	2,38×10 ⁷	3,80×10 ⁷
TOS+M	KOPEL	2,62×10 ⁷	5,91×10 ⁷	3,27×10 ⁷	5,00×10 ⁷	3,00×10 ⁸	1,70×10 ⁸	1,50×10 ⁸	1,60×10 ⁷
2. analiza		Število bifidobakterij (KE/g)							
gojišče	obdelava	razredčevalo							CITRAT+T
		AD	RING	BPW	PV	MITs	K ₂ HPO ₄	PBS	
TOS+M	OS	2,39×10 ⁷	1,80×10 ⁷	1,15×10 ⁷	9,01×10 ⁶	2,48×10 ⁷	1,79×10 ⁷	2,73×10 ⁷	6,80×10 ⁷
TOS+M	UT	2,75×10 ⁷	2,09×10 ⁷	2,79×10 ⁷	2,06×10 ⁷	1,65×10 ⁷	2,12×10 ⁷	3,34×10 ⁷	8,10×10 ⁷
TOS+M	MEŠ	1,80×10 ⁷	1,63×10 ⁷	1,02×10 ⁷	1,56×10 ⁷	2,42×10 ⁷	2,06×10 ⁷	2,36×10 ⁷	3,02×10 ⁷
TOS+M	SOB	1,95×10 ⁷	1,86×10 ⁷	1,29×10 ⁷	8,20×10 ⁶	2,75×10 ⁷	1,77×10 ⁷	2,34×10 ⁷	2,74×10 ⁷
TOS+M	INK	2,07×10 ⁷	1,83×10 ⁷	2,11×10 ⁷	1,13×10 ⁷	2,23×10 ⁷	1,33×10 ⁷	2,60×10 ⁷	2,45×10 ⁷
TOS+M	KOPEL	3,01×10 ⁷	2,49×10 ⁷	5,73×10 ⁷	5,00×10 ⁷	1,30×10 ⁸	1,00×10 ⁸	1,90×10 ⁸	1,14×10 ⁷

Legenda: AD: anaerobni diluent; RING: Ringerjeva raztopina 1/4 jakosti; BPW: pufirana peptonska voda; PV: peptonska voda; MITs: Mitsuka pufer (pH 6,5); K₂HPO₄: 20 % raztopina dikalijevega hidrogen fosfata; PBS: fosfatni pufer s soljo (pH 7,3); CITRAT+T: 20 % raztopina natrijevega citrata z dodatkom Tweena 80 (1 g/L); OS: osnovna homogenizacija; UT: laboratorijsko mešalom z rezili; MEŠ: mešanje v gnetilniku; SOB: inkubacija pri sobni temperaturi; INK: inkubacija pri 37 °C; KOPEL: inkubacija pri 45 °C; TOS+M: propionatni agar TOS z dodatkom mupirocina za določanje bifidobakterij.

Priloga B: Rezultati medsebojne statistične primerjave razredčeval in postopkov obdelave (ANOVA na rangih po metodi Kruskal-Wallis s testom mnogoterih primerjav po Dunn-u)

Priloga B1: Rezultati medsebojne statistične primerjave razredčeval za vzorec Novalac CC

Primerjava razredčeval (bifidobakterije)	p	Primerjava razredčeval (laktobacili)	p
MITs – RING	< 0,05	PBS – CITRAT+T	< 0,05
MITs – PV	≥ 0,05	PBS – K ₂ HPO ₄	≥ 0,05
MITs – BPW	≥ 0,05	PBS – RING	≥ 0,05
MITs – AD	≥ 0,05	PBS – MITs	≥ 0,05
MITs – PBS	≥ 0,05	PBS – PV	≥ 0,05
MITs – K ₂ HPO ₄	≥ 0,05	PBS – AD	≥ 0,05
MITs – CITRAT+T	≥ 0,05	PBS – BPW	≥ 0,05
CITRAT+T – RING	< 0,05	BPW – CITRAT+T	< 0,05
CITRAT+T – PV	≥ 0,05	BPW – K ₂ HPO ₄	≥ 0,05
CITRAT+T – BPW	≥ 0,05	BPW – RING	≥ 0,05
CITRAT+T – AD	≥ 0,05	BPW – MITs	≥ 0,05
CITRAT+T – PBS	≥ 0,05	BPW – PV	≥ 0,05
CITRAT+T – K ₂ HPO ₄	≥ 0,05	BPW – AD	≥ 0,05
K₂HPO₄ – RING	< 0,05	AD – CITRAT+T	< 0,05
K ₂ HPO ₄ – PV	≥ 0,05	AD – K ₂ HPO ₄	≥ 0,05
K ₂ HPO ₄ – BPW	≥ 0,05	AD – RING	≥ 0,05
K ₂ HPO ₄ – AD	≥ 0,05	AD – MITs	≥ 0,05
K ₂ HPO ₄ – PBS	≥ 0,05	AD – PV	≥ 0,05
PBS – RING	≥ 0,05	PV – CITRAT+T	< 0,05
PBS – PV	≥ 0,05	PV – K ₂ HPO ₄	≥ 0,05
PBS – BPW	≥ 0,05	PV – RING	≥ 0,05
PBS – AD	≥ 0,05	PV – MITs	≥ 0,05
AD – RING	≥ 0,05	MITs – CITRAT+T	≥ 0,05
AD – PV	≥ 0,05	MITs – K ₂ HPO ₄	≥ 0,05
AD – BPW	≥ 0,05	MITs – RING	≥ 0,05
BPW – RING	≥ 0,05	RING – CITRAT+T	≥ 0,05
BPW – PV	≥ 0,05	RING – K ₂ HPO ₄	≥ 0,05
PV – RING	≥ 0,05	K ₂ HPO ₄ – CITRAT+T	≥ 0,05

Legenda: AD: anaerobni diluent; RING: Ringerjeva raztopina $\frac{1}{4}$ jakosti; BPW: pufrirana peptonska voda; PV: peptonska voda; MITs: Mitsuka pufer (pH 6,5); K₂HPO₄: 20 % raztopina dikalijevega hidrogen fosfata; PBS: fosfatni pufer s soljo (pH 7,3); CITRAT+T: 20 % raztopina natrijevega citrata z dodatkom Tweena 80 (1 g/L); p < 0,05: med rezultati je statistično značilna razlika; p ≥ 0,05: med rezultati ni statistično značilne razlike.

Priloga B2: Rezultati medsebojne statistične primerjave obdelav za vzorec Novalac CC

Primerjava obdelav (bifidobakterije)	p	Primerjava obdelav (laktobacili)	p
OS – UT	$\geq 0,05$	OS – UT	$\geq 0,05$
OS – MEŠ	$\geq 0,05$	OS – MEŠ	$\geq 0,05$
OS – SOB	$\geq 0,05$	OS – SOB	$\geq 0,05$
OS – INK	$\geq 0,05$	OS – INK	$\geq 0,05$
UT – MEŠ	$\geq 0,05$	UT – MEŠ	$\geq 0,05$
UT – SOB	$\geq 0,05$	UT – SOB	$\geq 0,05$
UT – INK	$\geq 0,05$	UT – INK	$\geq 0,05$
MEŠ – SOB	$\geq 0,05$	MEŠ – SOB	$\geq 0,05$
MEŠ – INK	$\geq 0,05$	MEŠ – INK	$\geq 0,05$
SOB – INK	$\geq 0,05$	SOB – INK	$\geq 0,05$

Legenda: OS: osnovna homogenizacija; UT: laboratorijsko mešalo z rezili; MEŠ: mešanje v gnetilniku; SOB: inkubacija pri sobni temperaturi; INK: inkubacija pri 37 °C; $p \geq 0,05$: med rezultati ni statistično značilne razlike.

Priloga B3: Rezultati medsebojne statistične primerjave razredčeval za vzorev Waya AB

Primerjava razredčeval (bifidobakterije)	p	Primerjava razredčeval (laktobacili)	p
MITS – CITRAT+T	< 0,05	AD – CITRAT+T	< 0,05
MITS – PBS	≥ 0,05	AD – PBS	< 0,05
MITS – PV	≥ 0,05	AD – BPW	< 0,05
MITS – BPW	≥ 0,05	AD – PV	< 0,05
MITS – RING	≥ 0,05	AD – MITS	≥ 0,05
MITS – K ₂ HPO ₄	≥ 0,05	AD – K ₂ HPO ₄	≥ 0,05
MITS – AD	≥ 0,05	AD – RING	≥ 0,05
AD – CITRAT+T	< 0,05	RING – CITRAT+T	< 0,05
AD – PBS	≥ 0,05	RING – PBS	≥ 0,05
AD – PV	≥ 0,05	RING – BPW	≥ 0,05
AD – BPW	≥ 0,05	RING – PV	≥ 0,05
AD – RING	≥ 0,05	RING – MITS	≥ 0,05
AD – K ₂ HPO ₄	≥ 0,05	RING – K ₂ HPO ₄	≥ 0,05
K₂HPO₄ – CITRAT+T	< 0,05	K₂HPO₄ – CITRAT+T	< 0,05
K ₂ HPO ₄ – PBS	≥ 0,05	K ₂ HPO ₄ – PBS	≥ 0,05
K ₂ HPO ₄ – PV	≥ 0,05	K ₂ HPO ₄ – BPW	≥ 0,05
K ₂ HPO ₄ – BPW	≥ 0,05	K ₂ HPO ₄ – PV	≥ 0,05
K ₂ HPO ₄ – RING	≥ 0,05	K ₂ HPO ₄ – MITS	≥ 0,05
RING – CITRAT+T	≥ 0,05	MITS – CITRAT+T	< 0,05
RING – PBS	≥ 0,05	MITS – PBS	≥ 0,05
RING – PV	≥ 0,05	MITS – BPW	≥ 0,05
RING – BPW	≥ 0,05	MITS – PV	≥ 0,05
BPW – CITRAT+T	≥ 0,05	PV – CITRAT+T	< 0,05
BPW – PBS	≥ 0,05	PV – PBS	≥ 0,05
BPW – PV	≥ 0,05	PV – BPW	≥ 0,05
PV – CITRAT+T	≥ 0,05	BPW – CITRAT+T	≥ 0,05
PV – PBS	≥ 0,05	BPW – PBS	≥ 0,05
PBS – CITRAT+T	≥ 0,05	PBS – CITRAT+T	≥ 0,05

Legenda: AD: anaerobni diluent; RING: Ringerjeva raztopina $\frac{1}{4}$ jakosti; BPW: pufirana peptonska voda; PV: peptonska voda; MITS: Mitsuoka pufer (pH 6,5); K₂HPO₄: 20 % raztopina dikalijevega hidrogen fosfata; PBS: fosfatni pufer s soljo (pH 7,3); CITRAT+T: 20 % raztopina natrijevega citrata z dodatkom Tweena 80 (1 g/L); p < 0,05: med rezultati je statistično značilna razlika; p ≥ 0,05: med rezultati ni statistično značilne razlike.

Priloga B4: Rezultati medsebojne statistične primerjave obdelav za vzorec Waya AB

Primerjava obdelav (bifidobakterije)	p	Primerjava obdelav (laktobacili)	p
OS – UT	$\geq 0,05$	OS – UT	$\geq 0,05$
OS – MEŠ	$\geq 0,05$	OS – MEŠ	$\geq 0,05$
OS – SOB	$\geq 0,05$	OS – SOB	$\geq 0,05$
OS – INK	$\geq 0,05$	OS – INK	$\geq 0,05$
UT – MEŠ	$\geq 0,05$	UT – MEŠ	$\geq 0,05$
UT – SOB	$\geq 0,05$	UT – SOB	$\geq 0,05$
UT – INK	$\geq 0,05$	UT – INK	$\geq 0,05$
MEŠ – SOB	$\geq 0,05$	MEŠ – SOB	$\geq 0,05$
MEŠ – INK	$\geq 0,05$	MEŠ – INK	$\geq 0,05$
SOB – INK	$\geq 0,05$	SOB – INK	$\geq 0,05$

Legenda: OS: osnovna homogenizacija; UT: laboratorijsko mešalo z rezili; MEŠ: mešanje v gnetilniku; SOB: inkubacija pri sobni temperaturi; INK: inkubacija pri 37 °C; $p \geq 0,05$: med rezultati ni statistično značilne razlike.

Priloga B5: Rezultati medsebojne statistične primerjave razredčeval za vzorec Waya LGG

Primerjava razredčeval (laktobacili)	p
PV – TWEEN	< 0,05
PV – CITRAT+T	< 0,05
PV – MITS	< 0,05
PV – RING	≥ 0,05
PV – BPW	≥ 0,05
PV – K ₂ HPO ₄	≥ 0,05
PV – AD	≥ 0,05
PV – PBS	≥ 0,05
PBS – TWEEN	< 0,05
PBS – CITRAT+T	< 0,05
PBS – MITS	< 0,05
PBS – RING	≥ 0,05
PBS – BPW	≥ 0,05
PBS – K ₂ HPO ₄	≥ 0,05
PBS – AD	≥ 0,05
AD – TWEEN	< 0,05
AD – CITRAT+T	≥ 0,05
AD – MITS	≥ 0,05
AD – RING	≥ 0,05
AD – BPW	≥ 0,05
AD – K ₂ HPO ₄	≥ 0,05
K₂HPO₄ – TWEEN	< 0,05
K ₂ HPO ₄ – CITRAT+T	≥ 0,05
K ₂ HPO ₄ – MITS	≥ 0,05
K ₂ HPO ₄ – RING	≥ 0,05
K ₂ HPO ₄ – BPW	≥ 0,05
BPW – TWEEN	< 0,05
BPW – CITRAT+T	≥ 0,05
BPW – MITS	≥ 0,05
BPW – RING	≥ 0,05
RING – TWEEN	< 0,05
RING – CITRAT+T	≥ 0,05
RING – MITS	≥ 0,05
MITS – TWEEN	≥ 0,05
MITS – CITRAT+T	≥ 0,05
CITRAT+T – TWEEN	≥ 0,05

Legenda: AD: anaerobni diluent; RING: Ringerjeva raztopina $\frac{1}{4}$ jakosti; BPW: pufirana peptonska voda; PV: peptonska voda; MITS: Mitsuoka pufer (pH 6,5); K₂HPO₄: 20 % raztopina dikalijevega hidrogen fosfata; PBS: fosfatni pufer s soljo (pH 7,3); CITRAT+T: 20 % raztopina natrijevega citrata z dodatkom Tweena 80 (1 g/L); p < 0,05: med rezultati je statistično značilna razlika; p ≥ 0,05: med rezultati ni statistično značilne razlike.

Priloga B6: Rezultati medsebojne statistične primerjave obdelav za vzorec Waya LGG

Primerjava obdelav (laktobacili)	p
OS – UT	$\geq 0,05$
OS – MEŠ	$\geq 0,05$
OS – SOB	$\geq 0,05$
OS – INK	$\geq 0,05$
UT – MEŠ	$\geq 0,05$
UT – SOB	$\geq 0,05$
UT – INK	$\geq 0,05$
MEŠ – SOB	$\geq 0,05$
MEŠ – INK	$\geq 0,05$
SOB – INK	$\geq 0,05$

Legenda: OS: osnovna homogenizacija; UT: laboratorijsko mešalo z rezili; MEŠ: mešanje v gnetilniku; SOB: inkubacija pri sobni temperaturi; INK: inkubacija pri 37 °C; $p \geq 0,05$: med rezultati ni statistično značilne razlike.

Priloga B7: Rezultati medsebojne statistične primerjave razredčeval za vzorec Lacto Seven

Primerjava razredčeval (bifidobakterije)	p	Primerjava razredčeval (laktobacili)	p
RING – CITRAT+T	< 0,05	RING – CITRAT+T	< 0,05
RING – K ₂ HPO ₄	≥ 0,05	RING – K₂HPO₄	< 0,05
RING – BPW	≥ 0,05	RING – PBS	≥ 0,05
RING – PBS	≥ 0,05	RING – PV	≥ 0,05
RING – PV	≥ 0,05	RING – AD	≥ 0,05
RING – AD	≥ 0,05	RING – MITS	≥ 0,05
RING – MITS	≥ 0,05	RING – BPW	≥ 0,05
MITs – CITRAT+T	< 0,05	BPW – CITRAT+T	< 0,05
MITs – K ₂ HPO ₄	≥ 0,05	BPW – K₂HPO₄	< 0,05
MITs – BPW	≥ 0,05	BPW – PBS	≥ 0,05
MITs – PBS	≥ 0,05	BPW – PV	≥ 0,05
MITs – PV	≥ 0,05	BPW – AD	≥ 0,05
MITs – AD	≥ 0,05	BPW – MITS	≥ 0,05
AD – CITRAT+T	< 0,05	MITs – CITRAT+T	< 0,05
AD – K ₂ HPO ₄	≥ 0,05	MITs – K ₂ HPO ₄	≥ 0,05
AD – BPW	≥ 0,05	MITs – PBS	≥ 0,05
AD – PBS	≥ 0,05	MITs – PV	≥ 0,05
AD – PV	≥ 0,05	MITs – AD	≥ 0,05
PV – CITRAT+T	< 0,05	AD – CITRAT+T	≥ 0,05
PV – K ₂ HPO ₄	≥ 0,05	AD – K ₂ HPO ₄	≥ 0,05
PV – BPW	≥ 0,05	AD – PBS	≥ 0,05
PV – PBS	≥ 0,05	AD – PV	≥ 0,05
PBS – CITRAT+T	< 0,05	PV – CITRAT+T	≥ 0,05
PBS – K ₂ HPO ₄	≥ 0,05	PV – K ₂ HPO ₄	≥ 0,05
PBS – BPW	≥ 0,05	PV – PBS	≥ 0,05
BPW – CITRAT+T	≥ 0,05	PBS – CITRAT+T	≥ 0,05
BPW – K ₂ HPO ₄	≥ 0,05	PBS – K ₂ HPO ₄	≥ 0,05
K ₂ HPO ₄ – CITRAT+T	≥ 0,05	K ₂ HPO ₄ – CITRAT+T	≥ 0,05

Legenda: AD: anaerobni diluent; RING: Ringerjeva raztopina ¹/₄ jakosti; BPW: pufirana peptonska voda; PV: peptonska voda; MITS: Mitsuoaka pufer (pH 6,5); K₂HPO₄: 20 % raztopina dikalijevega hidrogen fosfata; PBS: fosfatni pufer s soljo (pH 7,3); CITRAT+T: 20 % raztopina natrijevega citrata z dodatkom Tweena 80 (1 g/L); p < 0,05: med rezultati je statistično značilna razlika (P < 0,05); p ≥ 0,05: med rezultati ni statistično značilne razlike.

Priloga B8: Rezultati medsebojne statistične primerjave obdelav za vzorec Lacto Seven

Primerjava obdelav (bifidobakterije)	p	Primerjava obdelav (laktobacili)	p
SOB – INK	< 0,05	SOB – INK	$\geq 0,05$
SOB – MEŠ	$\geq 0,05$	SOB – MEŠ	$\geq 0,05$
SOB – OS	$\geq 0,05$	SOB – OS	$\geq 0,05$
SOB – UT	$\geq 0,05$	SOB – UT	$\geq 0,05$
UT – INK	< 0,05	UT – INK	$\geq 0,05$
UT – MEŠ	$\geq 0,05$	UT – MEŠ	$\geq 0,05$
UT – OS	$\geq 0,05$	UT – OS	$\geq 0,05$
OS – INK	$\geq 0,05$	OS – INK	$\geq 0,05$
OS – MEŠ	$\geq 0,05$	OS – MEŠ	$\geq 0,05$
MEŠ – INK	$\geq 0,05$	MEŠ – INK	$\geq 0,05$

Legenda: OS: osnovna homogenizacija; UT: laboratorijsko mešalo z rezili; MEŠ: mešanje v gnetilniku; SOB: inkubacija pri sobni temperaturi; INK: inkubacija pri 37 °C; $p < 0,05$: med rezultati je statistično značilna razlika; $p \geq 0,05$: med rezultati ni statistično značilne razlike.

Priloga B9: Rezultati medsebojne statistične primerjave razredčeval za vzorec FloraZym

Primerjava razredčeval (bifidobakterije)	p	Primerjava razredčeval (laktobacili)	p
BPW – PBS	< 0,05	BPW – CITRAT+T	< 0,05
BPW – RING	< 0,05	BPW – K₂HPO₄	< 0,05
BPW – K₂HPO₄	< 0,05	BPW – RING	≥ 0,05
BPW – CITRAT+T	≥ 0,05	BPW – PV	≥ 0,05
BPW – MITS	≥ 0,05	BPW – PBS	≥ 0,05
BPW – PV	≥ 0,05	BPW – MITS	≥ 0,05
BPW – AD	≥ 0,05	BPW – AD	≥ 0,05
AD – PBS	< 0,05	AD – CITRAT+T	< 0,05
AD – RING	< 0,05	AD – K₂HPO₄	< 0,05
AD – K₂HPO₄	< 0,05	AD – RING	≥ 0,05
AD – CITRAT+T	≥ 0,05	AD – PV	≥ 0,05
AD – MITS	≥ 0,05	AD – PBS	≥ 0,05
AD – PV	≥ 0,05	AD – MITS	≥ 0,05
PV – PBS	< 0,05	MITs – CITRAT+T	< 0,05
PV – RING	< 0,05	MITs – K ₂ HPO ₄	≥ 0,05
PV – K ₂ HPO ₄	≥ 0,05	MITs – RING	≥ 0,05
PV – CITRAT+T	≥ 0,05	MITs – PV	≥ 0,05
PV – MITS	≥ 0,05	MITs – PBS	≥ 0,05
MITs – PBS	< 0,05	PBS – CITRAT+T	< 0,05
MITs – RING	< 0,05	PBS – K ₂ HPO ₄	≥ 0,05
MITs – K ₂ HPO ₄	≥ 0,05	PBS – RING	≥ 0,05
MITs – CITRAT+T	≥ 0,05	PBS – PV	≥ 0,05
CITRAT+T – PBS	≥ 0,05	PV – CITRAT+T	< 0,05
CITRAT+T – RING	≥ 0,05	PV – K ₂ HPO ₄	≥ 0,05
CITRAT+T – K ₂ HPO ₄	≥ 0,05	PV – RING	≥ 0,05
K ₂ HPO ₄ – PBS	≥ 0,05	RING – CITRAT+T	≥ 0,05
K ₂ HPO ₄ – RING	≥ 0,05	RING – K ₂ HPO ₄	≥ 0,05
RING – PBS	≥ 0,05	K ₂ HPO ₄ – CITRAT+T	≥ 0,05

Legenda: AD: anaerobni diluent; RING: Ringerjeva raztopina $\frac{1}{4}$ jakosti; BPW: pufirana peptonska voda; PV: peptonska voda; MITS: Mitsuka pufer (pH 6,5); K₂HPO₄: 20 % raztopina dikalijevega hidrogen fosfata; PBS: fosfatni pufer s soljo (pH 7,3); CITRAT+T: 20 % raztopina natrijevega citrata z dodatkom Tweena 80 (1 g/L); p < 0,05: med rezultati je statistično značilna razlika; p ≥ 0,05: med rezultati ni statistično značilne razlike.

Priloga B10: Rezultati medsebojne statistične primerjave obdelav za vzorec FloraZym

Primerjava obdelav (bifidobakterije)	p	Primerjava obdelav (laktobacili)	p
OS – UT	$\geq 0,05$	OS – UT	$\geq 0,05$
OS – MEŠ	$\geq 0,05$	OS – MEŠ	$\geq 0,05$
OS – SOB	$\geq 0,05$	OS – SOB	$\geq 0,05$
OS – INK	$\geq 0,05$	OS – INK	$\geq 0,05$
UT – MEŠ	$\geq 0,05$	UT – MEŠ	$\geq 0,05$
UT – SOB	$\geq 0,05$	UT – SOB	$\geq 0,05$
UT – INK	$\geq 0,05$	UT – INK	$\geq 0,05$
MEŠ – SOB	$\geq 0,05$	MEŠ – SOB	$\geq 0,05$
MEŠ – INK	$\geq 0,05$	MEŠ – INK	$\geq 0,05$
SOB – INK	$\geq 0,05$	SOB – INK	$\geq 0,05$

Legenda: OS: osnovna homogenizacija; UT: laboratorijsko mešalo z rezili; MEŠ: mešanje v gnetilniku; SOB: inkubacija pri sobni temperaturi; INK: inkubacija pri 37 °C; $p \geq 0,05$: med rezultati ni statistično značilne razlike ($P > 0,05$).

Priloga B11: Rezultati medsebojne statistične primerjave razredčeval za vzorec sira LCA

Primerjava razredčeval (bifidobakterije)	p
CITRAT+T – PV	< 0,05
CITRAT+T – BPW	< 0,05
CITRAT+T – K₂HPO₄	< 0,05
CITRAT+T – RING	< 0,05
CITRAT+T – MITS	≥ 0,05
CITRAT+T – AD	≥ 0,05
CITRAT+T – PBS	≥ 0,05
PBS – PV	< 0,05
PBS – BPW	≥ 0,05
PBS – K ₂ HPO ₄	≥ 0,05
PBS – RING	≥ 0,05
PBS – MITS	≥ 0,05
PBS – AD	≥ 0,05
AD – PV	≥ 0,05
AD – BPW	≥ 0,05
AD – K ₂ HPO ₄	≥ 0,05
AD – RING	≥ 0,05
AD – MITS	≥ 0,05
MITS – PV	≥ 0,05
MITS – BPW	≥ 0,05
MITS – K ₂ HPO ₄	≥ 0,05
MITS – RING	≥ 0,05
RING – PV	≥ 0,05
RING – BPW	≥ 0,05
RING – K ₂ HPO ₄	≥ 0,05
K ₂ HPO ₄ – PV	≥ 0,05
K ₂ HPO ₄ – BPW	≥ 0,05
BPW – PV	≥ 0,05

Legenda: AD: anaerobni diluent; RING: Ringerjeva raztopina $\frac{1}{4}$ jakosti; BPW: pufirana peptonska voda; PV: peptonska voda; MITS: Mitsuoka pufer (pH 6,5); K₂HPO₄: 20 % raztopina dikalijevega hidrogen fosfata; PBS: fosfatni pufer s soljo (pH 7,3); CITRAT+T: 20 % raztopina natrijevega citrata z dodatkom Tweena 80 (1 g/L); p < 0,05: med rezultati je statistično značilna razlika; p ≥ 0,05: med rezultati ni statistično značilne razlike.

Priloga B12: Rezultati medsebojne statistične primerjave obdelav za vzorec sira LCA

Primerjava obdelav (bifidobakterije)	p
KOPEL – INK	< 0,05
KOPEL – MEŠ	< 0,05
KOPEL – SOB	< 0,05
KOPEL – OS	< 0,05
KOPEL – UT	≥ 0,05
UT – INK	≥ 0,05
UT – MEŠ	≥ 0,05
UT – SOB	≥ 0,05
UT – OS	≥ 0,05
OS – INK	≥ 0,05
OS – MEŠ	≥ 0,05
OS – SOB	≥ 0,05
SOB – INK	≥ 0,05
SOB – MEŠ	≥ 0,05
MEŠ – INK	≥ 0,05

Legenda: OS: osnovna homogenizacija; UT: laboratorijsko mešalo z rezili; MEŠ: mešanje v gnetilniku; SOB: inkubacija pri sobni temperaturi; INK: inkubacija pri 37 °C; KOPEL: inkubacija pri 45 °C; p < 0,05: med rezultati je statistično značilna razlika; p ≥ 0,05: med rezultati ni statistično značilne razlike.