

## **58. srečanje mladih raziskovalcev Slovenije 2024**

# **ANALIZA MIKROORGANIZMOV KISLEGA ZELJA IN KIMČIJA Z NAVADNIM TER EKOLOŠKO PRIDELANIM ZELJEM**

Raziskovalno področje: BIOLOGIJA

Raziskovalna naloga

Avtorica: Devi Grobelšek

Mentor: dr. Jure Škraban

Somentorica: mag. Sabina Mlakar



Maribor, april 2024



## Vsebina

Kazalo slik .....	III
Kazalo grafov .....	III
Kazalo tabel .....	IV
Povzetek .....	V
Zahvala .....	VI
1 Uvod .....	1
1.1 Raziskovalna vprašanja .....	2
1.2 Hipoteze .....	2
2 Teoretični del .....	3
2.1 Zelje .....	3
2.1.1 Komercialno in ekološko pridelano zelje .....	3
2.2 Kislo zelje .....	3
2.3 Kimči .....	4
2.4 Mlečnokislinska fermentacija zelenjave .....	5
2.4.1 Fermentacija .....	5
2.4.2 Mlečnokislinska fermentacija .....	5
2.4.3 Mlečnokislinske bakterije .....	6
2.4.4 Glive .....	7
2.5 Uporabljene metode dela .....	8
2.5.1 Bakterijska gojišča MRS .....	8
2.5.2 Redčitvena vrsta in izolacija čiste kulture .....	9
2.5.3 MALDI-TOF MS .....	10
2.5.4 Mikroskopiranje – barvanje po Gramu .....	12
2.5.5 Ugotavljanje velikosti mikrobnih populacij .....	12
2.6 Identificirane bakterije .....	14

2.6.1	<i>Lactobacillus plantarum</i> .....	14
2.6.2	<i>Lactobacillus brevis</i> .....	15
2.6.3	<i>Pichia kudriavzevii</i> .....	17
3	Metodologija dela .....	18
3.1	Priprava kislega zelja in kimčija .....	18
3.2	Bakterijska gojišča .....	21
3.3	Priprava redčitvene vrste in izolacije čiste kulture.....	22
3.4	MALDI-TOF identifikacija.....	24
3.5	Mikroskopiranje – barvanje po Gramu .....	25
3.6	Statistična obdelava podatkov .....	26
4	Rezultati .....	27
4.1	Kislo zelje in kimči .....	27
4.2	Število kolonij in vrst .....	28
4.3	Identificirane kolonije z MALDI-TOF .....	34
4.4	Mikroskopiranje .....	36
5	Interpretacija .....	37
5.1	Hipoteza 1 .....	37
5.2	Hipoteza 2 .....	38
5.3	Hipoteza 3 .....	39
6	Zaključek.....	40
7	Družbena odgovornost.....	41
8	Viri in literatura.....	42
	Priloge .....	1

## **KAZALO SLIK**

Slika 1: Oblike in profili mikrobioloških kultur (Habulin idr., 2008) .....	10
Slika 2: Izolacija čiste kulture s cepilno zanko (Habulin idr., 2008) .....	10
Slika 3: Shema poteka dela (lastni vir) .....	18
Slika 4: Riževa lepljiva moka (lasten vir).....	20
Slika 5: Posode za fermentiranje (lastni vir).....	20
Slika 6: Gojišča in epruvete (lasten vir).....	22
Slika 7: Gojišča kolonij.....	23
Slika 8: MALDI kartica (lasten vir).....	24
Slika 9: Izbrani izolati (lastni vir).....	24
Slika 10: MALDI-TOF MS (lasten vir).....	24
Slika 11: Preparati (KE AN, KE, KN) (lastni vir) .....	26
Slika 12: Standard, navadno zelje (lastni vir) .....	27
Slika 13: Kimči, ekološko zelje (lastni vir). ....	27
Slika 14: Kimči, navadno zelje (lastni vir). ....	27
Slika 15: Standard, ekološko zelje (lastni vir) .....	27
Slika 16: KE AN (lastni vir) .....	34
Slika 17: Gojišče vzorca KN (lastni vir).....	35
Slika 18: Gojišče vzorca KE (lastni vir) .....	35
Slika 19: Gojišče vzorca SE (lastni vir).....	35
Slika 20: Gojišče vzorca SN (lastni vir) .....	35
Slika 21: Gojišče vzorca KN AN (lastni vir) .....	35
Slika 22: Gojišče vzorca KE (lastni vir) .....	35
Slika 23: <i>Pichia kudriavzevii</i> (lastni vir) .....	36
Slika 24: <i>Lactobacillus plantarum</i> (lastni vir).....	36
Slika 25: <i>Levilactobacillus brevis</i> (lastni vir).....	36

## **KAZALO GRAFOV**

Graf 1: Povprečno število CFU/ml pri vzorcih po kimči postopku z navadnim zeljem pri aerobnih (KN) in anaerobnih (KN AN) pogojih, kimči postopku z ekološkim zeljem pri aerobnih (KE) in anaerobnih pogojih, pri postopku kislega zelja z navadnim zeljem pri

aerobnih (SN) in anaerobnih (SN AN) pogojih ter pri postopku kislega zelja z ekološkim zeljem pri aerobnih (SE) in anaerobnih (SE AN) pogojih. Vstavljen je standardna deviacija.....	28
Graf 2: Skupno število različnih kolonij v posameznih vzorcih.....	29
Graf 3: Povprečno število CFU/ml pri primerjavi vzorcev ekološkega ter navadnega zelja. Vstavljen je standardna deviacija.....	30
Graf 4: Povprečno število CFU/ml pri primerjavi vzorcev kimčija in kislega zelja. Vstavljen je standardna deviacija.....	31
Graf 5: Povprečno število CFU/ml pri primerjavi vzorcev pri anaerobnih in aerobnih pogojih rasti kolonij. Vstavljen je standardna deviacija.....	32

## **KAZALO TABEL**

Tabela 1: Povprečno število CFU/ml v različnih vzorcih.....	28
Tabela 2: Skupno število različnih kolonij v posameznih vzorcih. ....	29
Tabela 3: Statistična pomembnost rezultatov pri primerjavi vrste zelja – ekološko in navadno zelje. ....	30
Tabela 4: Statistična pomembnost rezultatov pri primerjavi različnih postopkov – kimči in kislo zelje. ....	31
Tabela 5: Statistična pomembnost rezultatov pri primerjavi različnih dejavnikov – kolonije pri aerobnih in anaerobnih pogojih .....	32
Tabela 6: Statistična pomembnost rezultatov pri primerjavi vrste zelja (ekološko in navadno pridelano zelje), vrste postopka (kimči in kislo zelje) in pogojih gojenja (aerobni in anaerobni). ....	33
Tabela 8: Število kolonij in vrst KN.....	1
Tabela 9: Število kolonij in vrst KE. ....	1
Tabela 10: Število kolonij in vrst SN.....	1
Tabela 11: Število kolonij in vrst SE.....	2
Tabela 12: Število kolonij in vrst KN AN. ....	2
Tabela 13: Število kolonij in vrst KE AN.....	2
Tabela 14: Število kolonij in vrst SN AN.....	2
Tabela 15: Število kolonij in vrst SE AN. ....	3

## **POVZETEK**

Naša raziskovalna naloga je proučevala vpliv različnih pogojev gojenja na mikrobno sestavo in število kolonij v fermentiranih živilih, kot sta kimči ter kislo zelje. Z eksperimenti z aerobnimi in anaerobnimi pogoji rasti ter različnimi vrstami zelja smo analizirali, kako se mikroorganizmi razvijajo. Izstopajoča visoka številčnost kolonij v kimčiju z ekološko pridelanim zeljem je povezana s kompleksnostjo mikrobne sestave, ki jo prinaša ekološko zelje. Nasprotno pa je kislo zelje s komercialnim zeljem pokazalo najmanjše število kolonij, kar je deloma posledica anaerobnih pogojev gojenja. Identifikacija mikroorganizmov je potrdila prisotnost mlečnokislinskih bakterij in kvasovk v kimčiju. Zanimivo je, da je *Pichia kudriavzevii* prisotna le v ekološko pridelanem kimčiju, kar kaže, da vrsta surovin vpliva na mikrobno raznolikost.

**Ključne besede:** mikrobna sestava, gostota kolonij, fermentirana živila, kimči, kislo zelje, aerobni pogoji, anaerobni pogoji, raznoliko vzgojena zelja, mlečnokislinske bakterije, kvasovke.

## **ZAHVALA**

Rada bi se zahvalila svojemu mentorju, ki mi je nudil strokovno pomoč in usmerjal v moji raziskavi. Zahvalila bi se še za vso potrpežljivost in prijaznost, ki sem ju ob delu prejela. Za pomoč pri laboratorijskem delu raziskovalne naloge se zahvaljujem tudi šolski laborantki. Prav tako se želim zahvaliti Medicinski fakulteti Maribor za dovoljenje za rabo aparatur ter somentorici, da mi je pomagala pri izvedbi laboratorijskega dela. Hvala tudi šoli, ki jo obiskujem, saj je bila pripravljena odstopiti šolski laboratorij ter priskrbeti potreben material.

## 1 UVOD

Fermentacija je že stoletja prisotna v prehrani človeštva in predstavlja ključni postopek pri pripravi raznolikih fermentiranih živil. Med temi živili izstopata kislo zelje ter kimči, ki sta pridobila prepoznavnost zaradi svojega značilnega okusa, hkrati pa ju povezujemo z vrsto zdravstvenih koristi. Fermentacija hrane je kompleksen biološki proces, v katerem mikroorganizmi, predvsem bakterije in kvasovke, razgrajujejo in predelujejo sestavine živil. Kislo zelje in kimči sta odlična primera fermentirane hrane, kjer bakterije iz rodu *Lactobacillus* igrajo ključno vlogo pri pretvorbi sladkorjev v mlečno kislino. Poleg tega procesa fermentacije, ki izboljšuje prebavljenost in ohranja živilo, se razvijejo tudi različne snovi, ki prispevajo k okusu in aromi, kot so organske kisline, vitamini in encimi. Povezava med fermentirano hrano, kot sta kislo zelje ter kimči, ter zdravjem človeka je tema številnih zdravstvenih raziskav. Mnoge študije kažejo, da redno uživanje teh živil lahko pozitivno vpliva na črevesno zdravje, krepi imunski sistem in celo izboljšuje absorpcijo hranil. Natančna sestava bakterij v fermentiranih živilih pa je ključnega pomena pri razumevanju njihovih potencialnih učinkov na zdravje.

Poseben poudarek našega raziskovalnega dela bo namenjen mlečnikislinskim bakterijam, ki imajo ključno vlogo v procesu fermentacije tako pri kislem zelju kot tudi pri kimčiju. Kislo zelje je tradicionalno povezano z mlečnikislinskimi bakterijami iz rodu *Lactobacillus*, ki se vključuje v vsako fazo fermentacije, medtem ko kimči, kot korejska različica fermentirane zelenjave, izstopa po svoji raznoliki bakterijski sestavi. V kasnejših fazah fermentacije postanejo prevladujoče *Lactobacillus* bakterije, saj prispevajo k končni sestavi mlečnikislinskih bakterij v kimčiju.

Namen te raziskovalne naloge je bil proučiti bakterije v kislem zelju in kimčiju z navadnim ter ekološko pridelanim zeljem. Analizirali smo število kolonij in vrstno pestrost bakterij. Predvsem smo se osredotočali na MKB, zato smo za identifikacijo bakterij izbrali MALDI-TOF metodo (Zeng Ying, 2022). Z barvanjem po gramu smo pod mikroskopom opazovali velikost, obliko ter pozitivnost/negativnost bakterij po gramu. Naš namen je bil določiti, kateri postopek fermentacije – kimči ali kislo zelje – in kateri način pridelave zelja sta najbolj koristna za človeka z vidika mikrobiološke sestave fermentiranih živil. Rezultate analiz smo primerjali z literaturo ter ugotavliali pomen prisotnih bakterij za človeka.

## **1.1 Raziskovalna vprašanja**

Z nalogo smo želeli odgovoriti na tri raziskovalna vprašanja:

1. Kakšne so variacije v gostoti kolonij in diverziteti vrst med kislim zeljem, pripravljenim s konvencionalno pridelanim zeljem, kislom zeljem, pripravljenim z ekološko pridelanim zeljem, kimčijem, pripravljenim s konvencionalno pridelanim zeljem, ter kimčijem, pripravljenim z ekološko pridelanim zeljem?
2. Ali vpliv aerobnih in anaerobnih pogojev na rast mikroorganizmov prispeva k variacijam v gostoti in raznolikosti kolonij?
3. Katere mikrobne kolonije so prisotne v kislem zelju, pripravljenim s konvencionalno pridelanim zeljem, kislem zelju, pripravljenem z ekološko pridelanim zeljem, kimčiju, pripravljenem s konvencionalno pridelanim zeljem, ter kimčiju, pripravljenem z ekološko pridelanim zeljem, ter kakšen je njihov potencialni vpliv na človeško zdravje?

## **1.2 Hipoteze**

1. Pričakujemo največjo mikrobno gostoto kolonij v vzorcih, kjer se uporablja kimči kot postopek fermentacije z ekološko pridelanim zeljem, medtem ko predvidevamo najmanjšo gostoto kolonij v vzorcih kislega zelja s konvencionalnim zeljem.
2. Predvidevamo, da bodo vzorci kimčija, pripravljeni z ekološko pridelanim zeljem, ko kolonije rastejo v anaerobnih pogojih, pokazali najvišjo gostoto kolonij ter največjo mikrobno raznolikost v primerjavi z drugimi vzorci.
3. Pričakujemo, da bomo v analiziranih vzorcih ugotovili prisotnost mlečnokislinskih bakterij, pri čemer predvidevamo, da bodo najkoristnejše bakterijske vrste najbolj izrazito zastopane v vzorcih kimčija, pripravljenih z ekološko pridelanim zeljem.

## **2 TEORETIČNI DEL**

### **2.1 Zelje**

Zelje (*Brassica oleracea*) je zelenjava iz družine križnic. Gre za listnato zeleno ali vijolično rastlino, ki se goji kot enoletnica, čeprav je botanično dvoletnica, saj se zaradi gostih glavic uporablja predvsem listnata masa. Glave zelja so zelo čvrste in majhne ter se pogosto uporabljajo za konzerviranje (Featherstone, 2016).

#### **2.1.1 Komercialno in ekološko pridelano zelje**

Ekološko pridelano zelje se vzbaja v skladu z načeli ekološkega kmetijstva, ki vključujejo trajnostne pristope, varovanje okolja ter ohranjanje biotske raznolikosti. Primerjava med ekološko pridelanim zeljem in konvencionalno pridelanim zeljem prinaša več dimenzijs, ki vplivajo na kakovost, okus in prehransko vrednost končnega izdelka. Ekološko pridelano zelje se goji brez uporabe sintetičnih pesticidov, herbicidov in umetnih gnojil. Namesto tega se uporabljajo naravni pristopi za obvladovanje škodljivcev ter ohranjanje rodovitnosti tal. Konvencionalno pridelano zelje se lahko vzbaja z intenzivno uporabo kemičnih sredstev za povečanje donosa ter preprečevanje bolezni, kar lahko vpliva na končno kakovost izdelka. Ekološko zelje pogosto vsebuje višje koncentracije določenih hraničnih snovi, saj je gojeno v bolj naravnem okolju in običajno na rodovitejših tleh (Muleke idr., 2012).

### **2.2 Kislo zelje**

Kislo zelje je znano po svojih koristnih lastnostih, med katerimi izstopajo krepitev imunskega sistema, spodbujanje prebave ter protivnetno delovanje, priporoča pa se tudi za vzdrževanje zdrave črevesne flore. Poleg tega lahko pomaga pri zdravljenju virusnih in glivičnih okužb. Med procesom fermentacije sladkor, ki je prisoten v zelju, pretvorimo v mlečno kislino s pomočjo mikroorganizmov. Mlečnokislinske bakterije se med tem postopkom množijo hitreje kot druge vrste mikroorganizmov. Fermentirana živila, kot je kislo zelje, prispevajo k zdravju prebavnega sistema, uravnavanju črevesne flore, zmanjšanju tveganja za trebušne vnetne

bolezni ter preprečevanju težav s črevesjem, povezanih s stresom. Prav tako spodbujajo imunski sistem, prispevajo k tvorbi vitaminov v telesu, izboljšujejo absorpcijo mikroelementov, znižujejo raven holesterola ter uravnavajo krvni sladkor (Quirini, 2016).

Proizvodnja kislega zelja in njegove lastnosti so v veliki meri odvisne od mikrobne skupnosti in pogojev fermentacije. Čeprav se lahko mikrobnna sestava kislega zelja v začetnih fazah fermentacije spreminja, ustrezeni pogoji fermentacije, kot sta temperatura in relativna koncentracija sestavin, zagotavljam, da so mlečnokislinske bakterije (MKB) prevladujoči mikroorganizmi v končnem fermentiranem izdelku. Te MKB so ključnega pomena za uspešno fermentacijo; proizvajajo organske kisline, baktericidne, vitamine in aromatične spojine, ki so odgovorne za številne značilne senzorične lastnosti fermentiranih živil, vključno s podaljšanim rokom uporabe, okusom in hranilno vrednostjo (Zabat idr., 2018).

Fermentacija kislega zelja se začne z začetnim razraščanjem bakterije *Leuconostoc mesenteroides*, ki hitro proizvaja ogljikov dioksid in kislino. To hitro zniža pH okolja in zavira rast nezaželenih mikroorganizmov, ki bi lahko povzročili kvarjenje živil. Delovanje *L. mesenteroides* spremeni fermentacijsko okolje tako, da spodbuja uspevanje drugih MKB, kot sta *Lactobacillus brevis* in *Lactobacillus plantarum* (Zabat idr., 2018).

### 2.3 Kimči

Kimči je tradicionalna fermentirana korejska hrana, ki jo pripravljamo z različnimi postopki, vključno s predhodno obdelavo orientalskega zelja (ali redkvice), soljenjem, mešanjem z različnimi začimbami in fermentacijo. Lastnosti kimčija se lahko razlikujejo glede na vrsto, uporabljene surovine, postopek fermentacije in metode konzerviranja. Kljub temu ima kimči prepoznavne biokemične, prehranske in senzorične lastnosti, ki so povezane z zdravjem. Fermentacijo kimčija sprožijo različni mikroorganizmi, ki so prvotno prisotni v surovinah, vendar sčasoma fermentacijo prevladajo mlečnokislinske bakterije. Na fermentacijo, rast in zaporedni pojav glavnih mikroorganizmov, ki sodelujejo pri fermentaciji, vplivajo številni fizikalno-kemijski in biološki dejavniki. Med fermentacijo se pojavijo kompleksne biokemične spremembe, ki so odvisne od okolijskih razmer pred, med in po fermentaciji. Najpomembnejše značilnosti vključujejo spremembe sestave sladkorjev in vitaminov (zlasti askorbinske kisline),

tvorbo in kopičenje organskih kislin ter razgradnjo in mehčanje teksture. Kimči je prehransko pomemben vir vitaminov, mineralov, prehranskih vlaknin in drugih hranil (Cheigh idr., 2019).

Številne raziskave so dokumentirale koristne učinke uživanja kimčija. Ta fermentirana hrana ima protivnetne lastnosti, blaži rakovo kaheksijo, spodbuja apoptozo in zmanjšuje tveganje za raka debelega črevesa, preprečuje aterosklerozu ter ščiti jetra pred poškodbami zaradi visokega holesterola. Poleg tega izboljšuje splošne presnovne parametre, vključno z glukozo in holesterolom v krvi na tešče, ter lahko izboljša kognitivne funkcije, krepi imunski sistem ter varuje pred atopijskim dermatitisom. Zaradi teh številnih koristnih učinkov je kimči prepoznan kot vrsta funkcionalne hrane (Song idr., 2023).

## **2.4 Mlečnokislinska fermentacija zelenjave**

### **2.4.1 Fermentacija**

Fermentacija je biokemični proces, pri katerem se organske snovi pretvarjajo pod vplivom mikroorganizmov. Ta proces se uporablja za proizvodnjo različnih živil, kot so sir iz mleka, kruh iz žit in kislo zelje iz zelja. Fermentacija je koristna za alergike in tiste, ki se držijo posebnih diet, saj lahko spremeni lastnosti živil in poveča njihovo prebavljivost ter hranilno vrednost (Quirini, 2016).

Za začetek procesa fermentacije so potrebne ustrezne surovine, čas, primerna temperatura ter dodatki, kot so sladkor in sol. Razlikujemo med spontanim naravnim vrenjem, ki se zgodi, ko so mikroorganizmi že prisotni v surovinah in samodejno povzročijo fermentacijo, ter vrenjem, ki ga sprožijo dodatki mikroorganizmov. Pri naravnem vrenju so ključni dejavniki procesa lahko svetloba, temperatura ali mehanska obdelava, kot je stiskanje ali tolčenje. Za uspešen potek vrenja je poleg osnovnih sestavin pomembno tudi prisotnost spodbujevalcev fermentacije, kot sta sol in sladkor (Quirini, 2016).

### **2.4.2 Mlečnokislinska fermentacija**

Mlečnokislinska fermentacija (MKF) je pomemben biotehnološki proces, ki izboljšuje prehranske in funkcionalne lastnosti rastlinskega materiala. Ta proces lahko izboljša

biodostopnost vitaminov, mineralov, aminokislin in fitokemikalij, hkrati pa poveča tudi bioaktivnost določenih snovi, kot so antioksidanti. Poleg tega poveča vsebnost bakterijskih metabolitov ter izboljša prehransko vrednost substrata z razgradnjo antinutritivnih snovi in škodljivih spojin. MKF je učinkovit način za uporabo odpadkov živilske industrije za biokonverzijo v pomembne bioaktivne snovi (Di Cagno idr., 2016).

Veliko študij preučuje uporabo mlečnokislinske fermentacije (MKF) za povečanje antioksidativne aktivnosti substratov. Sevi rodu *Lactobacillus* vsebujejo encim, imenovan fenol esteraza, ki ga človeško telo ne proizvaja. Splošno je težko napovedati, ali se bo antioksidativna aktivnost med fermentacijo dejansko povečala ali zmanjšala. To je predvsem odvisno od uporabljenih starterskih kultur, kombinacije kultur, vrste substrata, pogojev fermentacije in metode določanja antioksidativne aktivnosti (Septembre idr., 2018). V eni študiji so opazili največ 90 % povečanje antioksidativne aktivnosti zelja, fermentiranega z bakterijami vrste *Lactobacillus plantarum* ali *Lactobacillus mesenteroides*, ali pa kombinacijo obeh v razmerju 1:1 (Martinez-Villaluenga idr., 2012).

#### **2.4.3 Mlečnokislinske bakterije**

Mlečnokislinske bakterije (MKB) so obsežna in raznolika skupina prokariontov, ki se odlikujejo po proizvodnji mlečne kislinske kot glavnega končnega presnovnega produkta. Gre za Gram-pozitivne, nesporogene in aerotolerantne bakterije. Njihov glavni produkt fermentacije ogljikovih hidratov je mlečna kislina, saj ne razpolagajo s funkcionalnim respiratornim sistemom in ne porabljajo kisika. MKB se naravno pojavljajo v različnih okoljih, kjer so na voljo topni ogljikovi hidrati, razgradni produkti beljakovin in kjer je nizka raven kisika. Ekstracelularna produkcija polisaharidov omogoča številnim MKB, da se učinkovito pritrđijo na površine in tvorijo biofilme. Te bakterije so tolerantne do nizkega pH in imajo povečano odpornost na visok osmotski tlak, kar je ključno za njihovo industrijsko uporabo, predvsem v prehrambeni industriji, kjer igrajo pomembno vlogo pri ohranjanju in zagotavljanju mikrobiološke varnosti številnih fermentiranih živil (Fan in Truelstrup Hansen, 2012).

Nekatere najpomembnejše vrste rodu *Lactobacillus* so:

- *Lactobacillus acidophilus*
- *Lactobacillus brevis*

- *Lactobacillus lactis*
- *Lactobacillus plantarum*
- *Lactobacillus fermentum*
- *Lactobacillus bulgaricus*

Sevi rodu *Lactobacillus* se smatrajo za varne za zauživanje. Zaradi tega, ker so vseprisotne v hrani in vloge pri obrambnih mehanizmih prebave (Arasu idr., 2013) – imajo status GRAS (Singh idr., 2009), kar pomeni, da jih zaradi dolgoletne uporabe in razširjenosti smatrajo varne za uporabo v prehrani ljudi in živali.

Mlečnokislinske bakterije imajo številne pozitivne učinke. Nekateri raziskovalci navajajo, da lahko mlečnokislinske bakterije vežejo in razgradijo potencialno kancerogene snovi, kar bi lahko prispevalo k njihovemu antikancerogenemu delovanju. Poleg tega tvorijo tudi antimutagene snovi in pozitivno vplivajo na delovanje imunskega sistema. Pomembno pa je omeniti, da mlečnokislinske bakterije lahko tudi sintetizirajo biogene amine, kar lahko povzroči morebitne negativne učinke (Barrangou in sod., 2012).

#### **2.4.4 Glive**

Glive so rastline z evkarijontsko celico, ki živijo kot zajedavke in gniloživke. So nefotosintetične in heterotrofne, kar pomeni, da se hranijo z mrtvo organsko snovjo. Glive človeku tudi koristijo, saj so nekatere cenjena hrana, s pomočjo drugih pridobivamo hrano in zdravila. Največkrat obravnavamo dve veliki skupini gliv: kvasovke in plesni. Kvasovke so enocelične in se razmnožujejo nespolno z brstenjem. Celica naredi izrastek in se kasneje razdeli na dva dela. Nekatere celice se ne razdvojijo, temveč tvorijo podolgovate oblike (hife) in psevdomicelij (Dragaš, 1998, Mikrobiologija).

Kvasovke so filogenetsko raznorodna skupina organizmov in pripadajo dvema glavnima taksonoma in sicer *Ascomycotina* in *Basidiomycotina* (Raspor, 1996).

Večinoma so fakultativni anaerobi. To pomeni, da kadar imajo na voljo kisik, presnavljajo sladkor (glukozo) z aerobnim celičnim dihanjem. Ko pa jim kisika zmanjka, sladkor presnavljajo anaerobno, z alkoholnim vrenjem (Vičar, 2011).

V proizvodnji hrane se kvas uporablja za spodbujanje fermentacije in vzhajanja. Glive se prehranjujejo s sladkorji, pri tem pa proizvajajo alkohol (etanol) in ogljikov dioksid. V proizvodnji piva in vina je zaželen prvi produkt, medtem ko je ogljikov dioksid ključen v pekarstvu (uredniki Enciklopedije Britannica, 2023).

## 2.5 Uporabljene metode dela

### 2.5.1 Bakterijska gojišča MRS

#### Gojitev bakterij

Za gojitev bakterij v laboratoriju uporabljamo trdna ali tekoča gojišča, v katerih je vir dušika v obliki polipeptidov in aminokislin, mesni izvleček, kvasni izvleček, kuhinjska sol, natrijevi in kalijevi fosfati in voda. Za trdnost gojišč dodajamo polisaharid morskih alg agar. V tekočih ali poltrdnih gojiščih rastejo bakterije razpršeno, kar vidimo s prostim očesom v obliki zamotnitve ali se usedajo na dno, kar vidimo kot usedlino. Na trdnih gojiščih pa lahko opazujemo drobne skupke bakterij, ki jih imenujemo bakterijske kolonije in jih vidimo s prostim očesom. Večino bakterij lahko gojimo v običajni atmosferi. Anaerobne bakterije moramo gojiti v posebnih posodah ali termostatih v atmosferi brez kisika (Dragaš, 1998, Mikrobiologija).

#### MRS agar

MRS agar (od De Man, Rogosa in Sharpe) se uporablja za odkrivanje in določanje števila *Lactobacillus* v mlečnih izdelkih in drugih živilskih izdelkih, kot tudi pri izdelkih namenjenih za krmo živali. Gojišče MRS omogoča rast vseh sevov laktobacilov, zlasti sevov s počasnim in težavnim razvojem, kot sta *L. brevis* in *L. fermenti*. Agar MRS se lahko uporabi za določanje števila *Lactobacillus*. Hranljivost zagotavlja mešanica peptonov, glukoze, govejega mesa in izvlečkov kvasa. Polisorbat 80 zagotavlja maščobne kisline, potrebne za presnovo laktobacilov. Selektivnost proti streptokokom in plesnim zagotavlja amonijev citrat in natrijev acetat. Amonijev citrat, ki se uporablja pri nizkem pH, omogoča rast laktobacilov, hkrati pa zavira številne druge skupine mikroorganizmov. Magnezijev sulfat in manganov sulfat zagotavlja bistvene ione za razmnoževanje laktobacilov (Medical Microbiology, b. d.)

## **2.5.2 Redčitvena vrsta in izolacija čiste kulture**

### **Redčitvena vrsta**

Redčitvena vrsta je mikrobiološka metoda, ki se uporablja za zmanjšanje koncentracije snovi v raztopini do bolj uporabne koncentracije. Postopki redčitvenih vrst se večinoma razlikujejo v razmerjih vzorca in redčitvene tekočine. Mi smo raziskovalno delo izvajale v razmerju 1:10

### **Izolacija čiste kulture**

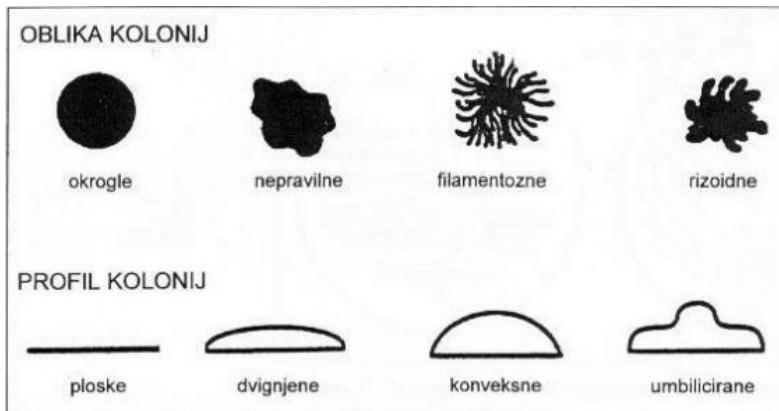
Vzorci običajno vsebujejo veliko različnih vrst mikroorganizmov in vsak od njih ima določene fiziološke in morfološke lastnosti. Le z osamitvijo vsake bakterijske vrste posebej v čisti kulturi je mogoče posamezne vrste preučevati in jih okarakterizirati. V čisti kulturi je samo ena vrsta bakterije in zato so lastnosti kulture lastnosti te bakterijske vrste. Govorimo o izolaciji ali osamitvi bakterije. V mešanih kulturah določeno lastnost ni mogoče pripisati samo eni od vrst bakterij v kulturi. Iz mešane kulture izoliramo bakterije po več metodah. Tako dobimo posamezne bakterijske kolonije iste vrste v čisti kulturi, saj je le na ta način mogoče proučevati vsako vrsto bakterijske kulture posebej (Habulin idr., 2008).

Vsaki kulturi je potrebno preveriti njeni čistost. Čistost tekoče kulture je mogoče preveriti pod mikroskopom. Običajno preparat čiste kulture vsebuje le celice iste oblike, izjemoma pa so lahko bakterijske kulture pleomorfne (vsebujejo celice različnih oblik). V kolikor se na ploščah pojavi le ena vrsta kolonij, lahko sklepamo, da je kultura čista (Habulin idr., 2008).

Kolonije različnih vrst mikroorganizmov se med seboj ločijo po izgledu. Ločijo se glede na:

- barvo (prozorne, bele, vijoličaste ...);
- površino (gladka, mokra, razbrazdana ...);
- velikost (premer manjši od 1 mm ... );
- prečni prerez (ploska, dvignjena ...);
- obliko (okrogla, rizoidne ...);
- rob (gladek, valovit ...).

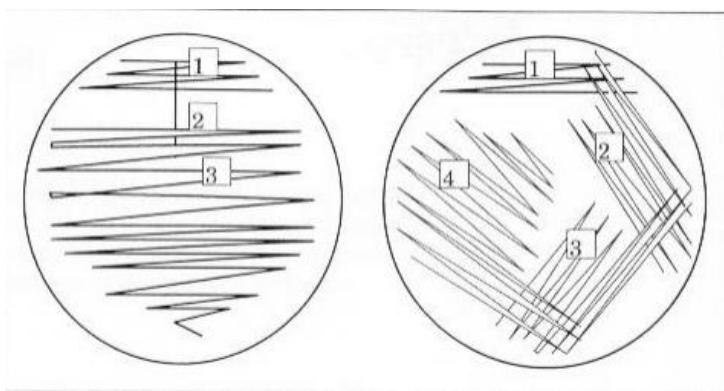
Čistost kulture lahko preverimo le, če je plošča »dobro cepljena« (kolonije morajo biti narazen, da lahko zrastejo do značilne velikosti in razvijejo druge značilnosti) (Habulin idr., 2008).



Slika 1: Oblike in profili mikrobioloških kultur (Habulin idr., 2008).

Zaželeno vrsto mikroorganizmov lahko iz izhodnega materiala izoliramo na več načinov:

- z direktno metodo
- z indirektno metodo (mešano kulturo najprej cepimo na gojišče do posameznih kolonij. (Habulin idr., 2008).



Slika 2: Izolacija čiste kulture s cepilno zanko (Habulin idr., 2008).

### 2.5.3 MALDI-TOF MS

Masna spektrometrija je analitska metoda, pri kateri z laserjem ioniziramo in uplinimo preiskano snov (npr. bakterije v kulturi) v nabite molekule, ki potujejo skozi električno polje do detektorja, ki meri razdaljo med maso ( $m$ ) in nabojem ( $z$ ) prepotovane molekule. Masni spektrometer je sestavljen iz treh enot: vira ionov, masnega analizatorja in detektorja (Singhal, idr., 2015).

MALDI-TOF MS štejemo med mehke ionizacijske metode. Pri teh se integriteta vzorca ne okrni zaradi ionizacijske energije, saj molekule vzorca obvaruje na vzorec predhodno nameščen

kisli, nereaktivni, organski matriks, ki absorbira odvečno pulzirajočo ionizacijsko energijo in pomaga pri sublimaciji vzorca, hkrati pa deluje kot vir protonov pri ionizaciji. Laser, ki presvetli posušen in tako kristaliziran matriks ter kokristaliziran vzorec, vzorec uplini in ustvari enkrat protonirane ione. Ti se elektrostatično pospešijo čez električno polje v vakuumskem cevastem stolpu in se ločijo glede na razmere m/z. Prestreže jih analizator (TOF), ki izmeri razmerje m/z glede na prepotovani čas dane ionizirane molekule. Delovanje analizatorja TOF temelji na prepotovanem času ionov, na katere deluje kinetična energija, ki jo ustvari električno polje. Manjši ioni potujejo hitreje kot večji. Računalnik nato ustvari masni spekter, ki ga primerja z zbirko že znanih profilov v podatkovni zbirki. Na takšnem spektru je na y osi oštevilčenost ionizirane molekule, na x osi pa razmerje m/z. Biomarkerji, ki zagotavljajo občutljivost MALDI-TOF MS, so dobro ohranjeni hišni proteini, kot so ribosomalni proteini, DNK ali RNK vezavni proteini, stresni proteini, faktorji iniciacije, translacije idr. Tako potrebujemo le majhno količino biomase ( $10^4$ – $10^6$  CFU) za analizo (Singhal, idr., 2015).

MALDI Biotyper Compass kot standardni modul je program, ki primerja podobne spektre, jih klasificira in obdeluje. Glede na frekvenčnost spektralnih vrhov, njihovo lego ter intenziteto, poda vrednosti rezultatov v obliki številčnih rezultatov. V treh korakih, kjer je najmanjša vrednost 0 in največja 1, algoritem izračuna intenziteto signala ter ujemanje vrhov spektra. Nato rezultate posameznih korakov pomnoži, jih normalizira na vrednost 1000 ter prikaže logaritemsko vrednost. Največji rezultat mejne vrednosti algoritma je 3 (ali log 1000). Rezultat, ki je enak 2,0 ali več, velja, da se vrhovi spektrov ujemajo in lahko govorimo o zanesljivi identifikaciji do vrste. Rezultat, ki je med 1,7 ter 2,0 govorí v prid zanesljivi identifikaciji do rodu (Wieser idr., 2012).

Boljše rezultate dobimo za po Gramu negativne bakterije kot pa za po Gramu pozitivne bakterije. To je posledica debelejšega peptidoglikanskega sloja pri po Gramu pozitivnih bakterijah (Singhal, idr., 2015). Sama gojišča, na katerih gojimo bakterije, in s tem pogoji gojitve, ne vplivajo na učinkovitost posredne identifikacije z MALDI-TOF MS, saj še vedno lahko pridobimo zanesljivo identifikacijo zaradi ribosomov, ki so reproduktivni ne glede na pogoje gojenja (Wieser idr., 2012).

## **2.5.4 Mikroskopiranje – barvanje po Gramu**

### **Barvanje po Gramu**

V bakteriologiji uporabljamo običajno barvanje po Gramu (sestavljeni barvanji – metilvijolično, lugol, etanol, fuksin ali safranin). Na osnovi tega barvanja razlikujemo po Gramu pozitivne (modrovijolične) in po Gramu negativne (rdeče) bakterije. Sposobnost sprejemanja barve je odvisna od zgradbe celične stene bakterije. (Dragaš, 1998, Mikrobiologija)

### **Oblike in velikosti bakterij**

Značilne bakterije imajo tri temeljne oblike: okrogle – koki, paličaste – bacili in svedraste (spiralne) – spirohete. Koki so lahko okrogle ali jajčaste oblike, urejene v grozde ali skupine (stafilocoki), verižice (strptokoki), v pare (diplokoki), po štiri skupaj (tetrade) ali po osem. Bacili so včasih zelo kratke paličke, podobne podolgovatim kokom, in jih imenujemo kokobacili; lahko so tanki ali dolgi, kratki ali debeli, vretenasti ali oglati, pa tudi razvezjani. Bacili ali paličke so lahko razporejeni v verižicah (streptobacili), razmetani v obliki kitajskih črk ali zloženi v palisadah. Spiralne bakterije so samo rahlo ukrivljene ali zavite, imajo le dva ali tri zavoje in so podobne črki S ali pa so zelo tanke in dolge nitke s spiralnimi zavoji, podobne svedru (svedraste ali spiralne bakterije). Značilni koki so veliki približno 1 um, bacili so od 2–5  $\mu\text{m}$  dolgi in 0,5–1,0  $\mu\text{m}$  debeli. Spiralne bakterije so dolge 5–20  $\mu\text{m}$ , debele pa so od 0,1–0,2  $\mu\text{m}$ . (Dragaš, 1998, Mikrobiologija).

## **2.5.5 Ugotavljanje velikosti mikrobnih populacij**

Poznamo več načinov za določanje števila mikrobnih celic. Pri nekaterih metodah merimo število živih celic, pri drugih pa težo celotne populacije, ki je neposredno sorazmerna s številom celic. Število celic običajno izražamo kot število celic v 1 ml tekočega vzorca ali v 1 g živila. Večina metod štetja temelji na neposrednem ali posrednem štetju majhnih vzorcev. Velikost celotne bakterijske populacije se nato izračuna (Habulin idr., 2008).

### **Indirektne ali gojitvene metode**

Štetje na trdnih gojiščih je najpogosteje uporabljeni metoda štetja celic. Ta metoda se uporablja predvsem za ugotavljanje števila mikroorganizmov v tekočinah (voda, mleko, itd.) in v

materialih, ki jih je mogoče suspendirati v tekočini. Pri tej metodi štejemo žive celice. V preiskovanem materialu je navadno preveč bakterij, da bi jih lahko šteli in je zato treba material ali kulturo najprej redčiti ter primerne razredčine cepiti na plošče hraničnega agarja. Število kolonij, ki zrastejo na plošči hraničnega agarja, ni zmeraj enako številu bakterij v kulturi. Zato pravimo, da na plošči preštejemo enote, ki tvorijo kolonije (colony forming units, CFU) (Habulin idr., 2008).

### Izračun povprečnega števila kolonij

Potrebno je izračunati povprečje za vsako razredčino posebej in nato še povprečje vseh razredčin (Habulin idr., 2008).

$$\frac{\sum \text{kolonij}}{\sum \text{paralelk}}$$
$$\frac{\sum \text{vseh pop. posamezne razred.}}{\text{št. razred.}}$$

## 2.6 Identificirane bakterije

### 2.6.1 *Lactobacillus plantarum*

*Lactobacillus plantarum* je po Gramu pozitivna, negibljiva bakterija, ki ne tvori spor. Je aerotolerantni anaerob, torej dela ATP z aerobnim dihanjem, če je prisoten kisik, vendar lahko preklopi na fermentacijo, če kisika ni. Bakterije te vrste imajo obliko kratkih palčic z zaobljenimi konci, običajne širine 0,9–1,2 µm in dolžine 3–8 µm. Med MKB imajo enega večjih genomov. Optimalen pH rasti je ocenjen na območje med 3,3 in 8,8 s temperaturnim razponom rasti med 12 in 40 °C. *L. plantarum* poseljuje gastrointestinalni trak človeka in drugih sesalcev (Landete idr., 2010).

#### Pomen za človeka

*L. plantarum* je pogosto prisotna v gastrointestinalnem traku. Ta vrsta je zanimiva za aplikativne medicinske raziskave zaradi svojih protivnetnih, antiproliferativnih, antioksidativnih in protirakovih lastnosti, uporabnost izkazuje tudi v boju proti debelosti in sladkorni bolezni (Arasu idr., 2016).

Sodobna spoznanja kažejo, da med predstavniki vrste *L. plantarum* obstajajo tudi primerni kandidati za aplikacijo na področjih medicine:

- Alzheimerjeva bolezen
- Parkinsonova bolezen
- rakava obolenja
- povišan pritisk
- urogenitalni zapleti
- sladkorna bolezen
- debelost in
- motnjah delovanja jeter (Arasu idr., 2016).

V splošnem mnoge bakterije *L. plantarum* izkazujejo protimikrobnou aktivnost proti različnim patogenom gastrointestinalnega traka (Arasu idr., 2016).

Za posamezne seve *L. plantarum* so dokazali, da sodelujejo pri naslednjih procesih:

- proizvajajo eksopolisaharide s protirakovimi lastnostmi (Wang idr., 2014),

- zmanjšujejo tveganja za nastanek ledvičnih kamnov (Sasikumar idr., 2014),
- ščitijo pred simptomi sindroma razdražljivega črevesja (Stevenson idr., 2014),
- okrepijo delovanje dendritskih celic (Ku idr., 2014),
- izboljšajo humoralni, mukozni in celični imunski odziv (Shi idr., 2014).

### **Pomen pri fermentaciji**

*Lactobacillus plantarum*, ki je pridobljen iz okolja ali uporabljen v nadzorovanih fermentacijah, je na splošno povezan z zaželenimi lastnostmi v številnih fermentiranih živilih in se dejansko dodaja različnim živilom, da bi izboljšali njihovo kakovost ali s tem povezane zdravstvene koristi (Behera idr., 2018).

Bakterije *Lb. plantarum* so bile identificirane iz številnih tradicionalnih živil in označene zaradi njihove sistematike in molekularne taksonomije, encimskih sistemov ( $\alpha$ -amilaza, esteraza, lipaza,  $\alpha$ -glukozidaza,  $\beta$ -glukozidaza, enolaza, fosfoketolaza, laktaza dehidrogenaza itd.) in bioaktivnih spojin (bakteriocin, dipeptidi in druge konzervansne spojine). Ta pregled poudarja, da *Lb. plantarum* imajo lahko s svojimi probiotičnimi lastnostmi odlične učinke proti škodljivi mikroflori (patogeni, ki se prenašajo s hrano), da povečajo varnost in rok uporabnosti fermentiranih živil (Behera idr., 2018)

*Lb. plantarum* se pogosto uporablja v industrijski fermentaciji in predelavi surove hrane in je splošno priznana kot varna (GRAS) in ima status kvalificirane domneve o varnosti (QPS). Med številnimi vrstami, identificiranimi v fermentirani zelenjavi, *Lb. plantarum* predstavlja levji delež v fermentirani zelenjavi zaradi svoje sposobnosti odpornosti na visoko vsebnost soli in kislosti fermentirane zelenjave, predvsem kumar, kislega zelja in oliv (Behera idr., 2018).

### **2.6.2 *Lactobacillus brevis***

*Lactobacillus brevis* je aerotolerantni anaerob, heterofermentativna, Gram pozitivna bakterija. Ne tvori spor in njena glavna presnovna pot vključuje fermentacijo heksoznih sladkorjev za proizvodnjo mlečne kisline. *Lb. Brevis* je vključen v proizvodnjo najrazličnejših fermentiranih izdelkov po vsem svetu. Vendar pa lahko v nekaterih okoliščinah povzroči kvarjenje različnih živil in pičač. Je eden najbolj nezaželenih mikroorganizmov, ki pokvarijo pivo (Teixeira, 2014).

Celice so paličaste oblike z zaobljenimi konci, običajno kratke in ravne ( $0,7\text{--}1,0 \times 2,0\text{--}4,0 \mu\text{m}$ ). Dolge palice pa so vedno prisotne. Običajno so ločeni ali v kratkih verigah. Kolonije so na splošno grobe ali vmesne, ploščate in so lahko skoraj prosojne. Čeprav so nekateri sevi pigmentirani oranžno do rdeče, so na splošno nepigmentirani (Teixeira, 1999).

### Pomen za človeka

*L. Brevis* ima mnoge pozitivne vplive na človeka:

- Ima protimikrobnو delovanje proti bakterijski vrsti (*Streptococcus mutans*), ki povzroča karies in zobno gnilobo (Fang idr., 2018).
- Ima protimikrobnو delovanje proti različnim patogenom, ki se prenašajo s hrano (Kariyawasam idr., 2020).
- Pomaga pri izboljšavi kognitivne funkcije, če se uporablja v kombinaciji z drugimi probiotiki (Stone, 2017).
- Pomaga pri krepitvi imunskega sistema s povečanjem proizvodnje naravnih celičnih ubijalk (Stone, 2017)
- Učinkovito celi poškodovane dlesni (Stone, 2017).

V eni raziskavi so *Lactobacillus brevis* izolirali iz kimčija in opravili karakterizacijo probiotika, vključno z analizo njegovih protimikrobnih in antioksidativnih učinkov. Pokazal je protimikrobnо delovanje proti patogenom, ki se prenašajo s hrano *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium* in *Staphylococcus aureus*. Antioksidativno vrednost pa je imel večjo kot probiotična kontrola (*Lactobacillus rhamnosus GG*) (Jang idr., 2019).

### Pomen za fermentacijo

Po študiji, kjer so uporabili pri fermentaciji *Lactobacillus brevis* in *Lactobacillus plantarum*, so ugotovili, da je donos mlečne kisline znatno povečan in proizvodnja etanola znatno zmanjšana, če sta ti bakteriji bili so-kultivirani. *L. plantarum* je prehitel *L. brevis* pri uporabi glukoze, kar pomeni da je bil *L. brevis* osredotočen na pretvorbo ksiloze v mlečno kislino in stranski produkt, etanol, se je zmanjšal zaradi manj NADH, ki nastane v fermentacijskem sistemu (Zhang idr., 2015).

### **2.6.3 *Pichia kudriavzevii***

*Pichia kudriavzevii* je nova nekonvencionalna kvasovka, ki je pritegnila vse več pozornosti zaradi uporabe na področju živil in biotehnologije. Razširjena je v različnih habitatih in se pogosto pojavlja v procesu spontane fermentacije tradicionalnih fermentiranih živil in pijač. *Pichia kudriavzevii* razgrajuje organske kisline, sprošča različne hidrolaze in aromatične spojine ter ima probiotične lastnosti, zato je obetavna kultura v živilski in krmni industriji. Poleg tega lahko s svojimi lastnostmi, vključno z visoko toleranco na ekstremne vrednosti pH, visoko temperaturo, hiperosmotski stres in inhibitorje fermentacije, rešuje tehnične izzive v industrijski uporabi. Z razvojem naprednih orodij genskega inženiringa in tehnik sistemsko biologije postaja *P. kudriavzevii* ena najbolj obetavnih nekonvencionalnih kvasovk (Chu idr., 2023).

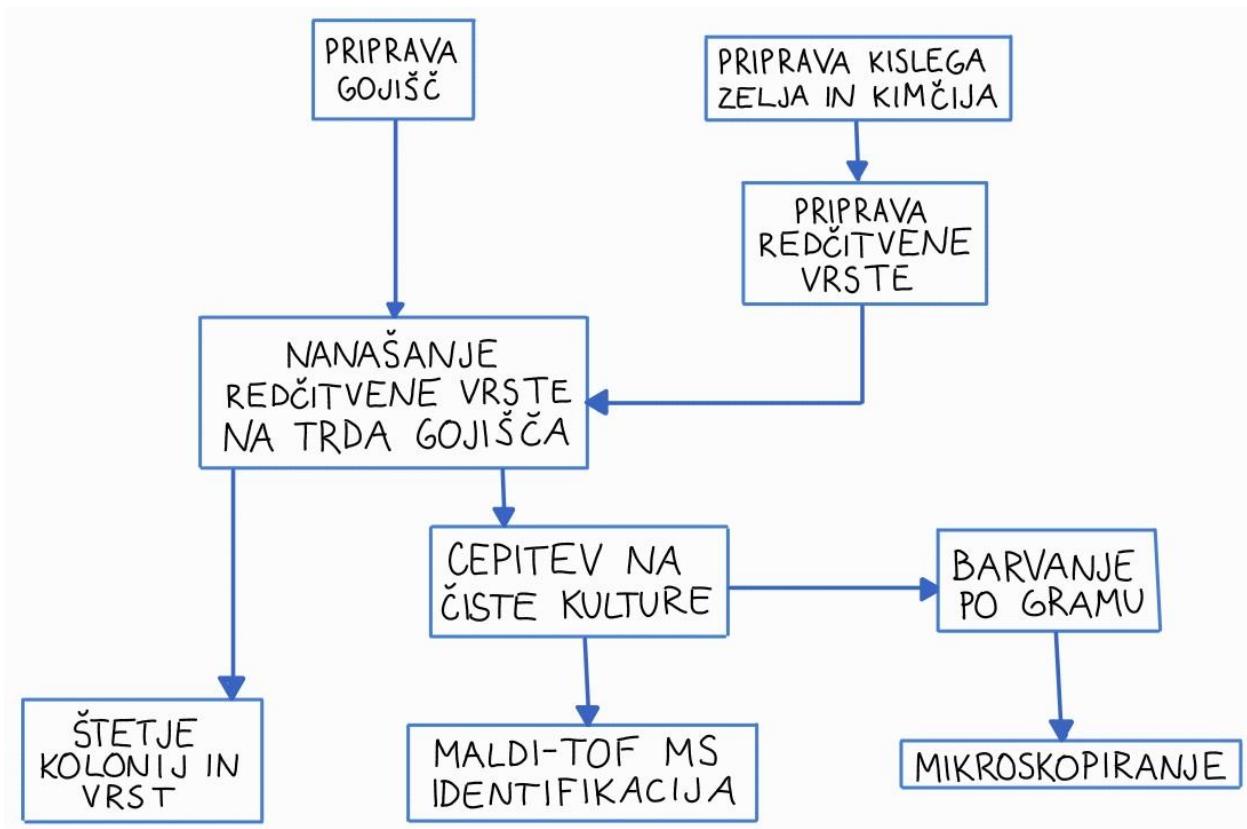
#### **Pomen za človeka in fermentacijo**

Rezultati študije, kjer so izbrali *P. kudriavzevii* na podlagi visoke kislinske tolerance in najširšega protimikrobnega delovanja, so pokazali, da izolat kaže močno protimikrobeno aktivnost proti vsem pregledanim patogenom, lahko tudi prenese visoko koncentracijo žolča idr. Rezultati so pokazali, da ima *P. kudriavzevii* različne koristne lastnosti, ki kažejo, da bi se lahko uporabljala kot probiotik. Encimi, ki jih proizvaja kvasni izolat, pomagajo izboljšati okus in razpoložljivost mineralov v fermentiranih izdelkih (Lata idr., 2022).

Po študiji, kjer so bile uspešno izolirane termotolerantne kvasovke z visokim potencialom, ki proizvajajo etanol, je *P. kudriavzevii* pokazala najvišje koncentracije etanola in pokazal toleranco na več stresov, kot so toleranca na topoto, etanol in ocetno kislino (Chamnipa idr., 2018).

*P. kudriavzevii* ima zanimivo presnovno lastnost, ki prispeva k uspešnem procesu fermentacije. Vrste *Pichia* so vključene v proizvodnjo niza aromatičnih spojin, ki naredijo te kvasovke zanimiv kandidat za razvoj novih vrst fermentirane hrane in pijač (van Rijswijck idr., 2015).

### 3 METODOLOGIJA DELA



Slika 3: Shema poteka dela (lastni vir).

#### 3.1 Priprava kislega zelja in kimčija

##### Seznam sestavin

- 1 kg ekološko pridelanega zelja (Norma),
- 1 kg navadnega zelja,
- 40 g soli,
- 200 ml vode,
- 8 g lepljive riževe moke,
- 1,4 cm ingverja,
- 8 g rdečega čilija.

## **Seznam materiala**

- 4 posode za fermentiranje (Kefirko),
- kuhinjski nož,
- tehnicka (Kern),
- žlica,
- plastična kuhinjska posoda.

## **Postopek priprave kislega zelja**

Najprej smo umili kozarce, delovno površino in pribor. Kislo zelje, ki smo ga vložili, je moralo biti sveže, ni smelo biti porjavelo ali nagnito. Očistili smo ga ter olupili, nato pa smo mu odstranili zunanje liste ter sredico in narezali na tanke traku podobne rezine. 0,5 kg narezanega zelja smo dali v večjo posodo ter dodali 10 g soli. Z rokami smo ga gnetli ter stiskali okoli 10 minut, dokler nismo opazili, da je zelje izpustilo dovolj tekočine, da pokrije vse zelje v kozarcu. Nato smo zelje tesno potisnili v posodo za fermentiranje, tako da je bilo vsaj 2 cm pod robom ter nalili slanico iz posode. Postopek smo ponovili z ekološko pridelanim zeljem.

## **Postopek priprave kimčija**

Očistili smo zelje ter ga olupili, nato pa smo mu odstranili zunanje liste ter sredico in narezali na tanke traku podobne rezine. 0,5 kg narezanega zelja smo dali v večjo posodo ter dodali 10 g soli. Z rokami smo ga gnetli ter stiskali okoli 10 minut, dokler nismo opazili, da je zelje izpustilo dovolj tekočine, da pokrije vse zelje v kozarcu. Zelje pustimo stati 1 uro. Med tem narežemo 0,7 cm ingverja. Za pripravo riževe lepljive moke smo jo kuhalili v ponvi s 50 ml vode, na srednjem ognju 5–8 minut, dokler se ne zgosti. Nato smo jo pustili, da se je ohladila. Ko se je ohladila, smo dodali 4 g rdečega čilija v prahu. Po eni uri zelje speremo pod vodo, da ga očistimo vse soli. Nato damo zelje v posodo ter dodamo ingver in riževo lepljivo moko z rdečim čilijem. Vse skupaj smo zmešali z rokavicami. Nato smo zelje tesno potisnili v posodo za fermentiranje, tako da je bilo vsaj 2 cm pod robom ter nalili slanico iz posode. Postopek smo ponovili z ekološko pridelanim zeljem.



Slika 4: Riževa lepljiva moka (lasten vir).

Posode s kislim zeljem ter kimčijem smo postavili v prostor s stalno temperaturo med 17 in 19 °C. Pustili smo jih 7 dni, nato pa dali v hladilnik na temperaturo 13 °C, preden smo delali naslednji del raziskovalne.



Slika 5: Posode za fermentiranje (lastni vir).

### **3.2 Bakterijska gojišča**

#### **Seznam materiala**

- 50 g MRS agar (Roth),
- 800 ml destilirane vode,
- čaša (1 L),
- steklena paličica za mešanje,
- tehnicka (Kern),
- avtoklav (SHP Steriltechnik AG),
- sterilne plastične petrijevke,
- merilni valj (1 L).

#### **Postopek**

Pripravili smo 45 petrijevk s trdnim LB gojiščem, za vsako petrijevko potrebujemo približno 20 mL gojišča.

1. Na koščku papirja odtehtamo ustreznou količine agarja.
2. Z merilnim valjem odmerimo potrebno količino destilirane vode.
3. V čašo nalijemo pol odmerjene količine vode, postopno med mešanjem dodamo agar, dolijemo preostanek vode.
4. Čašo pokrijemo z ALU folijo in avtoklaviramo 15 minut pri 121 °C.
5. Še vročo tekočo maso previdno ob gorilniku nalijemo v petrijevke.
6. Pustimo, da se gojišče ohladi in strdi.

### 3.3 Priprava redčitvene vrste in izolacije čiste kulture

#### Seznam materiala za redčitveno vrsto

- sterilizirana fiziološka raztopina,
- sterilne epruvete z zamaški,
- avtomatska pipeta LLG-proMLP (1–10 µL, 100–1000 µL) in sterilni nastavki za pipeto (1–10 µL, 100–1000 µL),
- spatula Drigalski,
- petrijevke s sterilnim agarjem MRS,
- 70 % etanol,
- stresalnik (Vortex),
- prenosni gorilnik (Campingaz),
- vibracijski mešalnik (RS-VA10, Phoenix Instrument)
- inkubator (Binder; nastavljen na 36,9 °C).

#### Postopek priprave redčitvene vrste

1. V stojalo postavimo 5 epruvet in v vsako nalijemo 9 mL fiziološke raztopine,
2. Iz premešane kulture prenesemo 1 mL v 1. epruveto ter dobro premešamo s stresalnikom.
3. Postopek ponavljamo, dokler ne dosežemo redčitev  $10^{-5}$ .
4. Po 100 µL posamezne redčitve s spatulo razmažemo po površini trdnega gojišča MRS.
5. Inkubiramo pri sobni temperaturi (aerobno in anaerobno).
6. Prešteli smo število kolonij, ki so zrasle pri posameznih redčitvah.



Slika 6: Gojišča in epruvete (lasten vir).

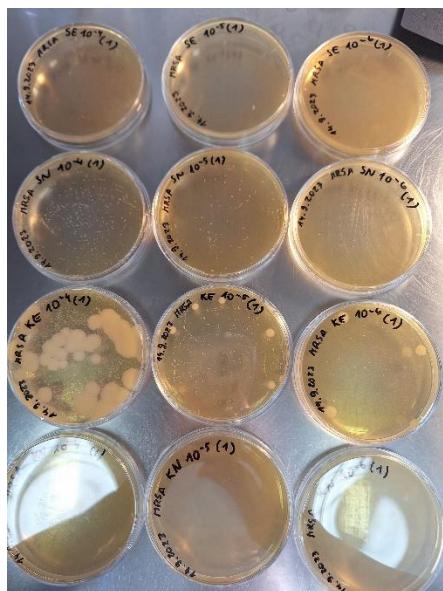
## Seznam materiala za izolacijo čiste kulture

- plošče z mešanimi kulturami,
- sveža plošča z MRS agarjem,
- cepilna zanka,
- inkubator (Binder; nastavljen na 36,9 °C).

## Potek izolacije čiste kulture

Za MALDI-TOF identifikacijo smo potrebovali čiste kulture.

Iz trdega gojišča z mešano kulturo smo izbrali eno izmed kolonij in jo izolirali v čisti kulturi z redkim cepljenjem na svežo ploščo do posameznih kolonij.



Slika 7: Gojišča kolonij.

### **3.4 MALDI-TOF identifikacija**

#### **Seznam materiala**

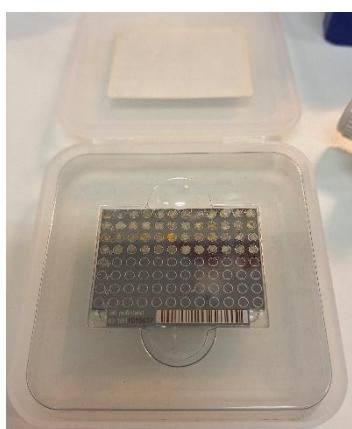
- cepilna zanka,
- avtomska pipeta LLG-proMLP (1–10 µL) in sterilni nastavki za pipeto (1–10 µL),
- 70 % mravljična kislina,
- Matrix TFA,
- MALDI kartica.

#### **Oprema**

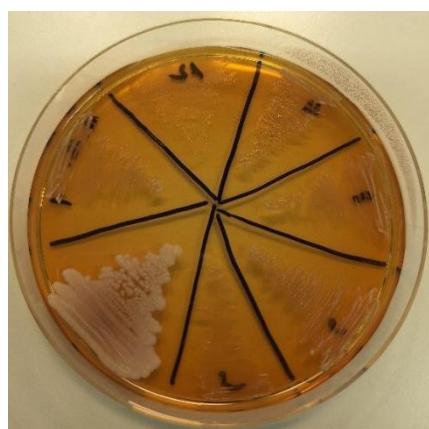
- MBT Compass HT RUO
- flexControl

#### **Postopek**

1. Izolate smo z ezo nanesli na MALDI kartico.
2. 1 µL mravljične kisline smo nanesli in počakali 30 minut.
3. Matrix TFA smo nanesli na kartico in počakali, da se je posušila.
4. Kartico smo dali v MALDI napravo.
5. Rezultate smo dobili na MBT compass HT RUO, ki je povezan s Flexcontrol.



Slika 8: MALDI kartica  
(lasten vir).



Slika 9: Izbrani izolati (lastni vir).



Slika 10: MALDI-TOF MS  
(lasten vir).

### **3.5 Mikroskopiranje – barvanje po Gramu**

#### **Seznam materiala**

- alkohol,
- sterilna fiziološka raztopina,
- cepilna zanka,
- prenosni gorilnik (Campingaz),
- bakterijske kolonije,
- metilovijolično barvilo,
- Lugolova raztopina joda,
- 3 % acetonski alkohol,
- fuksin,
- voda,
- mikroskop (Leica ICC50),
- objektno steklo,
- imerzijsko olje.

#### **Postopek**

Na očiščeno, z alkoholom razmaščeno objektno steklo, kanemo kapljico fiziološke raztopine. V kapljico s pomočjo eze aseptično prenesemo delček bakterijske kolonije in jo suspendiramo ter razmažemo po steklu v obliki pravokotnika. Ezo steriliziramo in odložimo. Objektno steklo potegnemo nekajkrat skozi plamen, dokler se tekočina ne posuši. Tako dobimo posušen fiksiran razmaz.

Na objektno steklo dodamo metilovijolično barvilo, tako da prekrijemo celotno površino bakterijske kolonije, pustimo stati 2 minuti, nato speremo z vodo. Nato nalijemo lugolovo raztopino joda ter pustimo stati 1 minuto ter speremo z vodo. Razmaz bakterij razbarvamo s 3 % acetonskim alkoholom, pustimo stati 1 minuto in nato speremo z vodo. Na koncu dodamo fuksin, pustimo stati 1 minuto, speremo z vodo ter posušimo na zraku.

Preparat si ogledamo pod mikroskopom pod povečavo 1000, pred tem na steklo nanesemo imerzijsko olje ter približamo preparat tako blizu, da se z oljem dotika stekla.



Slika 11: Preparati (KE AN, KE, KN) (lastni vir).

### 3.6 Statistična obdelava podatkov

Rezultati metode redčitve na trdnem gojišču so izraženi kot povprečne vrednosti meritev 8 paralelki z izračunanim standardnim odklonom. S pomočjo programa Microsoft Excel (funkcija TTEST) smo izračunali Studentov t-test ter tako preverjali ali so razlike pri povprečnem številu CFU/ml med kimčijem in kislim zeljem, ekološkim in navadnim zeljem ter kolonijami z aerobnimi in anaerobnimi pogoji statistično pomembne ( $p < 0,05$ ).

## 4 REZULTATI

LEGENDA:

K = kimči

S = standardni postopek (kislo zelje)

E = ekološko pridelano zelje

N = navadno (konvencionalno) zelje

AN = gojeno v anaerobnih pogojih

### 4.1 Kislo zelje in kimči



Slika 12: Standard, navadno zelje (lastni vir).



Slika 15: Standard, ekološko zelje (lastni vir).



Slika 13: Kimči, ekološko zelje (lastni vir).



Slika 14: Kimči, navadno zelje (lastni vir).

## 4.2 Število kolonij in vrst

Graf 1: Povprečno število CFU/ml pri vzorcih po kimči postopku z navadnim zeljem pri aerobnih (KN) in anaerobnih (KN AN) pogojih, kimči postopku z ekološkim zeljem pri aerobnih (KE) in anaerobnih pogojih, pri postopku kislega zelja z navadnim zeljem pri aerobnih (SN) in anaerobnih (SN AN) pogojih ter pri postopku kislega zelja z ekološkim zeljem pri aerobnih (SE) in anaerobnih (SE AN) pogojih. Vstavljen je standardna deviacija.

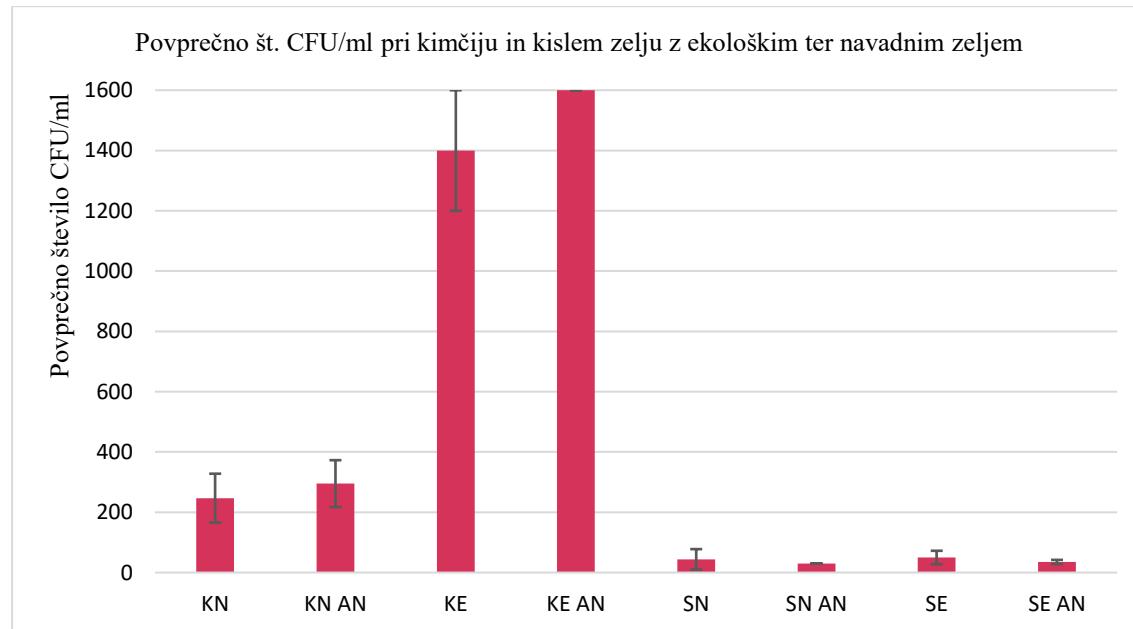


Tabela 1: Povprečno število CFU/ml v različnih vzorcih.

VZOREC	POVP. ŠT. KOLONIJ [CFU/ml]	VZOREC AN	POVP. ŠT. KOLONIJ [CFU/ml]
KN	$246,8 \times 10^5$	KN AN	$295 \times 10^5$
KE	$1400 \times 10^5$	KE AN	$1600 \times 10^5$
SN	$44 \times 10^5$	SN AN	$30 \times 10^5$
SE	$50 \times 10^5$	SE AN	$35 \times 10^5$

Graf 2: Skupno število različnih kolonij v posameznih vzorcih.

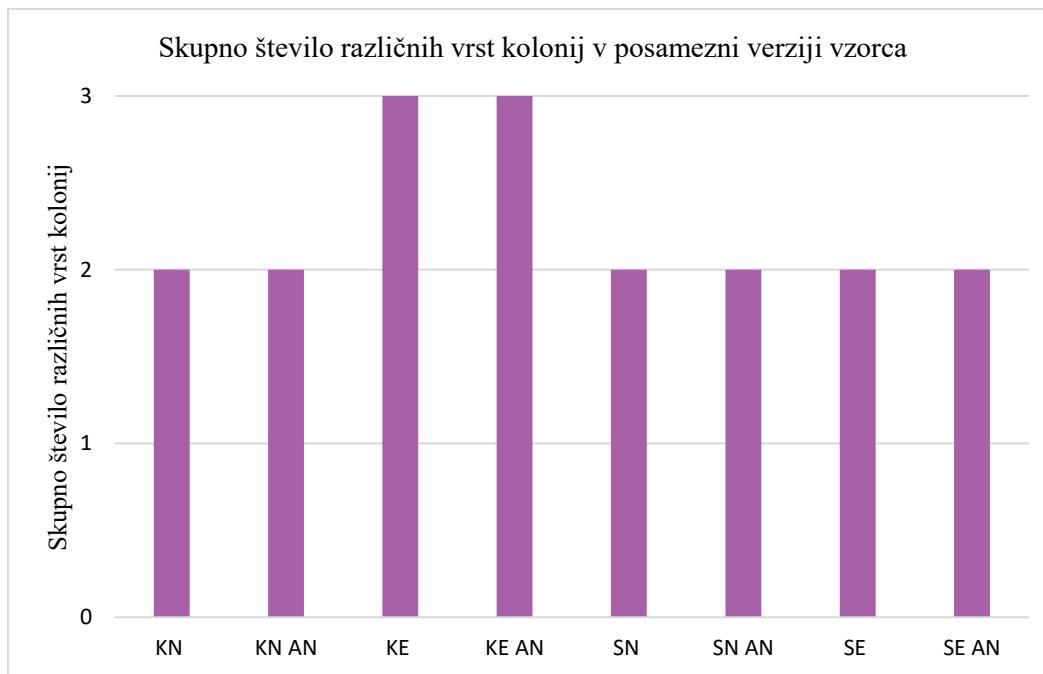


Tabela 2: Skupno število različnih kolonij v posameznih vzorcih.

VZOREC	ŠT. VRST	VZOREC AN	ŠT. VRST
KN	2	KN AN	2
KE	3	KE AN	3
SN	2	SN AN	2
SE	2	SE AN	2

Graf 3: Povprečno število CFU/ml pri primerjavi vzorcev ekološkega ter navadnega zelja. Vstavljeni so standardni deviaciji.

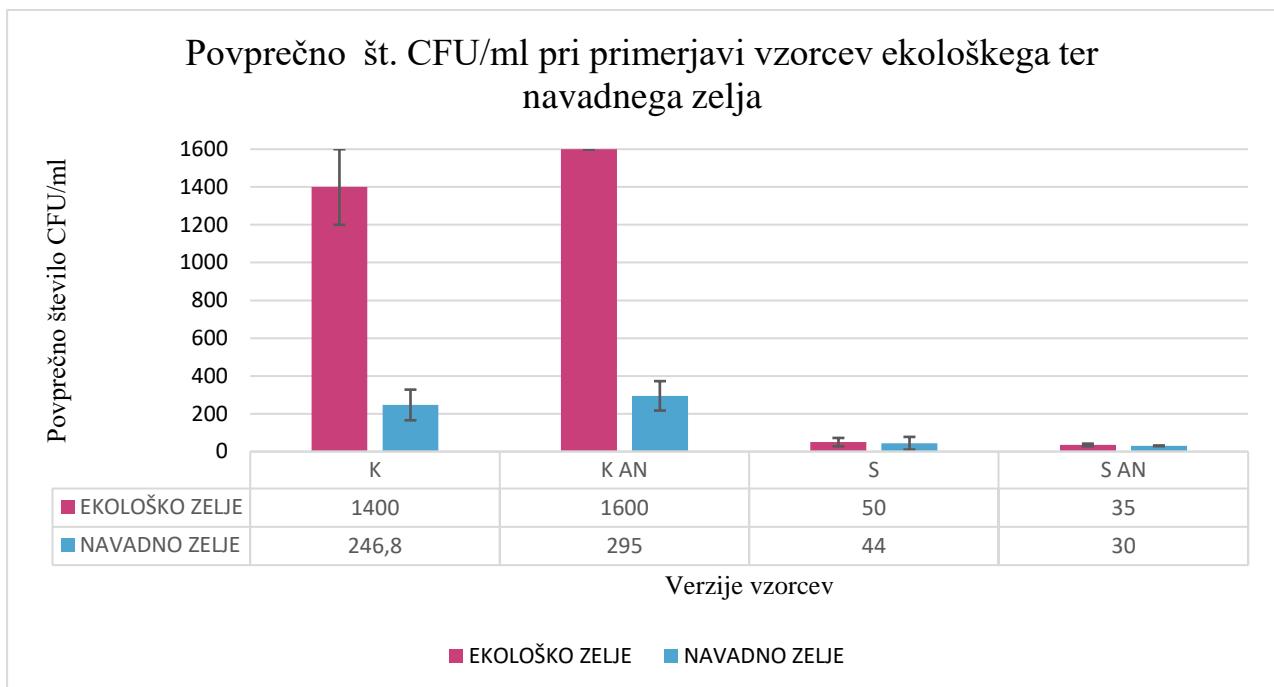


Tabela 3: Statistična pomembnost rezultatov pri primerjavi vrste zelja – ekološko in navadno zelje.

VZORCI	P VREDNOST	SIGNIFIKANTNOST
Vsi	0,09	Ne
KE, KE AN in KN, KN AN	0,03	Da
SE, SE AN in SN, SN AN	0,02	Da

Graf 4: Povprečno število CFU/ml pri primerjavi vzorcev kimčija in kislega zelja. Vstavljeni so standardni deviaciji.

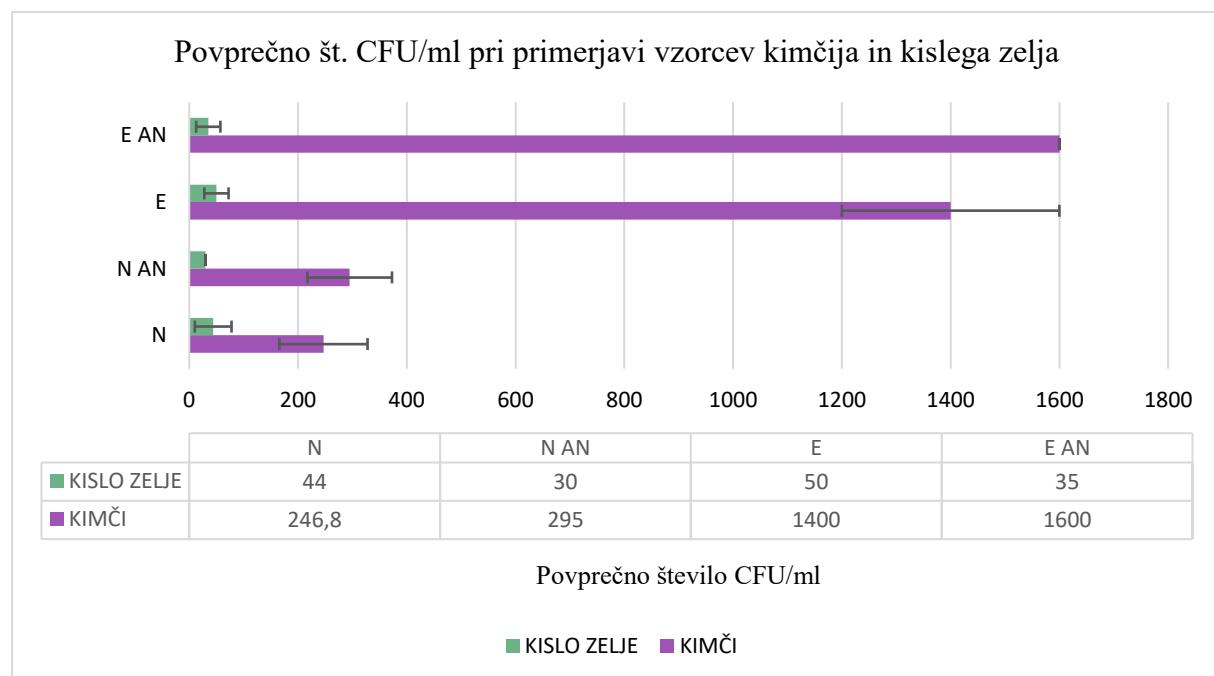


Tabela 4: Statistična pomembnost rezultatov pri primerjavi različnih postopkov – kimči in kislo zelje.

VZORCI	P VREDNOST	SIGNIFIKANTNOST
Vsi	0,04	Da
KN, SN in KN AN, SN AN	0,04	Da
KE, SE in KE AN, SE AN	0,02	Da

Graf 5: Povprečno število CFU/ml pri primerjavi vzorcev pri anaerobnih in aerobnih pogojih rasti kolonij. Vstavljen je standardna deviacija.

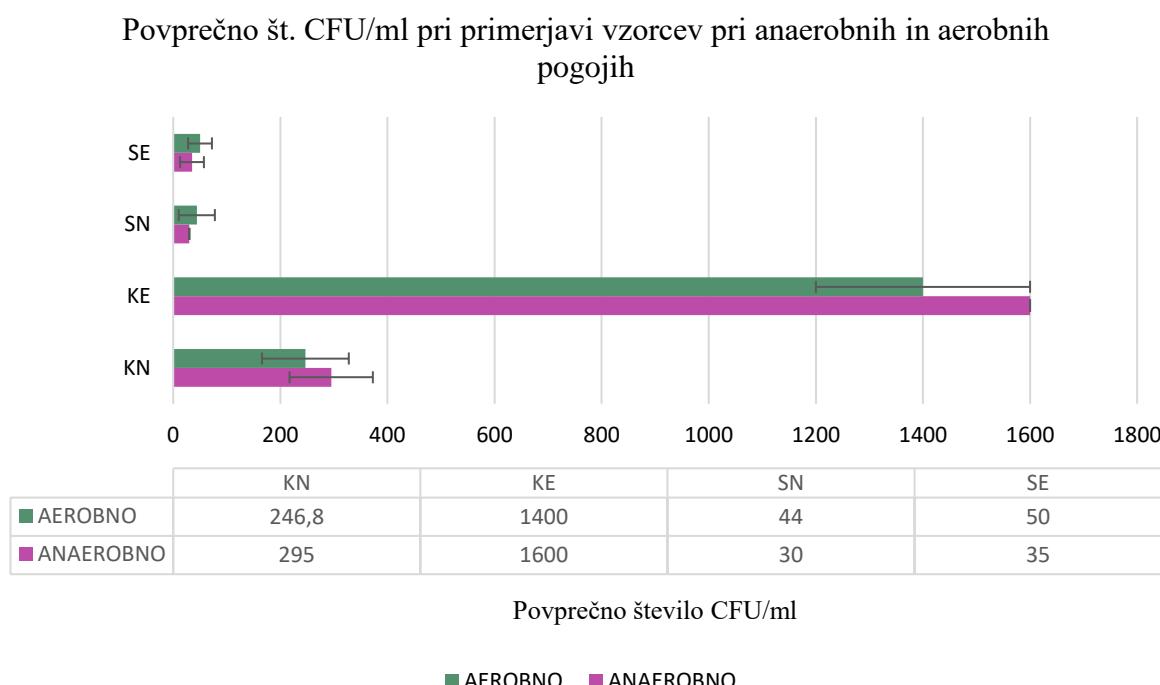


Tabela 5: Statistična pomembnost rezultatov pri primerjavi različnih dejavnikov – kolonije pri aerobnih in anaerobnih pogojih

VZORCI	P VREDNOST	SIGNIFIKANTNOST
Vsi	0,18	Ne
KN, KE in KN AN, KE AN	0,17	Ne
SN, SE in SN AN, SE AN	0,01	Da

Tabela 6: Statistična pomembnost rezultatov pri primerjavi vrste zelja (ekološko in navadno pridelano zelje), vrste postopka (kimči in kislo zelje) in pogojih gojenja (aerobni in anaerobni).<sup>1</sup>

DEJAVNIKI	VZOREC	P VREDNOST	SIGNIFIKANTNOST
vrsta zelja	KN in KE	0,002	Da
	KN AN in KE AN	/	/
	SN in SE	0,37	Ne
	SN AN in SE AN	0,25	Ne
vrsta postopka	KN in SN	0,002	Da
	KN AN in SN AN	0,02	Da
	KE in SE	0,003	Da
	KE AN in SE AN	/	/
pogoji gojenja	KN in KN AN	0,27	Ne
	KE in KE AN	/	/
	SN in SN AN	0,2	Ne
	SE in SE AN	0,11	Ne

---

<sup>1</sup> Pri vzorcu KE AN smo imeli samo en števen rezultat povprečnega števila CFU/ml, tako da t-testa ni možno narediti.

### 4.3 Identificirane kolonije z MALDI-TOF

Sample (type)	Id	Target pos.	Organism (best match)	log(score) (Conf.)	Organism (second best match)	log(score) (Conf.)	Consistency
1-KE AN		D7	<i>Lactobacillus plantarum</i>	2.31 (+++)	<i>Lactobacillus plantarum</i>	2.29 (+++)	(A)
3-KE		D8	<i>Pichia kudriavzevii</i>	2.3 (+++)	<i>Pichia kudriavzevii</i>	2.27 (+++)	(A)
5-KN		D9	<i>Levilactobacillus brevis</i>	2.22 (+++)	<i>Levilactobacillus brevis</i>	2.09 (+++)	(A)
6-SE		D10	<i>Lactobacillus plantarum</i>	2.31 (+++)	<i>Lactobacillus plantarum</i>	2.29 (+++)	(A)
8-SN		D11	<i>Lactobacillus plantarum</i>	2.38 (+++)	<i>Lactobacillus plantarum</i>	2.36 (+++)	(A)
11-KN AN		D12	<i>Lactobacillus plantarum</i>	2.31 (+++)	<i>Lactobacillus plantarum</i>	2.28 (+++)	(A)
12-KE		E1	<i>Levilactobacillus brevis</i>	2.15 (+++)	<i>Levilactobacillus brevis</i>	2.1 (+++)	(A)



Slika 16: KE AN (lastni vir).



Slika 18: Gojišće vzorca KE (lastni vir). Slika 17: Gojišće vzorca KN (lastni vir).

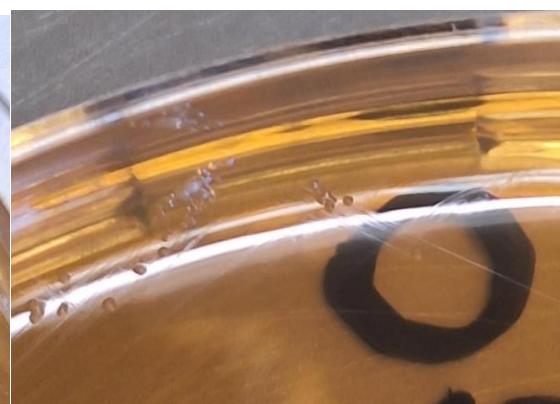


Slika 19: Gojišće vzorca SE (lastni vir).

Slika 20: Gojišće vzorca SN (lastni vir).



Slika 21: Gojišće vzorca KN AN (lastni vir). Slika 22: Gojišće vzorca KE (lastni vir).



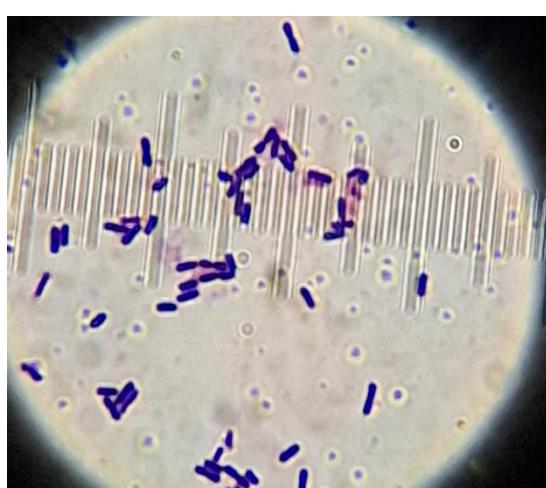
#### 4.4 Mikroskopiranje



Slika 23: *Pichia kudriavzevii* (lastni vir).

Na sliki je *Pichia kudriavzevii* iz izolata kimčija z ekološko pridelanim zeljem pri aerobnih pogojih.

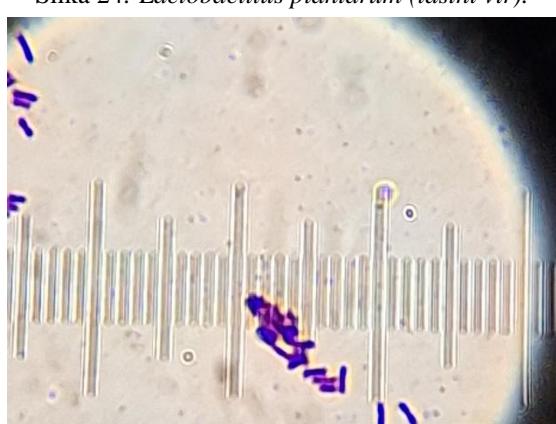
- so Gram pozitivne
- dolge so  $5\text{ }\mu\text{m}$
- široke so  $3\text{ }\mu\text{m}$
- opazno je brstenje
- imajo ovalno ali elipsoidno/podolgovato obliko



Slika 24: *Lactobacillus plantarum* (lastni vir).

Na sliki je *Lactobacillus plantarum* iz izolata kimčija z ekološko pridelanim zeljem pri anaerobnih pogojih rasti.

- so Gram pozitivne
- dolge so  $2\text{--}3\text{ }\mu\text{m}$
- široke so  $1\text{ }\mu\text{m}$
- imajo obliko kratkih palčic



Slika 25: *Levilactobacillus brevis* (lastni vir).

Na sliki je *Levilactobacillus brevis* iz izolata kimčija z komercialnim zeljem pri aerobnih pogojih.

- so Gram pozitivne
- dolge so  $1\text{--}2\text{ }\mu\text{m}$
- široke so  $0,5\text{ }\mu\text{m}$
- imajo obliko kratkih palčic

## 5 INTERPRETACIJA

### 5.1 Hipoteza 1

Kimči z ekološko pridelanim zeljem v anaerobnih pogojih (KE AN) se je izkazal za vodilnega glede na številčnost kolonij (Graf 1). Uporaba ekološko pridelanega zelja je lahko prispevala k višji številčnosti kolonij, saj je gojeno brez uporabe kemičnih pesticidov. Ta pristop pripomore k ohranjanju naravne raznolikosti organizmov v tleh in na površini zelja, ki se nato ohranja med fermentacijo, kar prispeva k številčnosti kolonij (Muleke idr., 2012). Anaerobni pogoji so se izkazali za izjemno ugodne za rast mikroorganizmov v KE AN. Brez prisotnosti kisika so nekateri anaerobni mikroorganizmi, kot je *L. plantarum*, verjetno imeli optimalne pogoje za intenzivno rast in razmnoževanje (Landete idr., 2010). Prisotnost treh različnih vrst mikroorganizmov, tj. *Lactobacillus plantarum*, *Pichia kudriavzevii* in *Levilactobacillus brevis*, kaže na kompleksno sodelovanje med mikroorganizmi med fermentacijo. Sinergijski učinki teh mikroorganizmov lahko prispevajo k oblikovanju ugodnega okolja za rast in razvoj kolonij. Ekološko pridelano zelje pogosto ohranja bolj uravnotežen ekosistem s številnimi koristnimi mikroorganizmi. V KE AN so ohranjene naravne populacije bakterij in kvasovk, ki lahko sodelujejo pri fermentaciji, vodijo k večji številčnosti kolonij ter pripomorejo k ustvarjanju bolj kompleksnih okusov in arom (van Rijswijck idr., 2015). Tudi raznolikost sestavin v kimčiju lahko ustvari bolj kompleksno mikrobiotsko okolje, kar vodi k višji številčnosti kolonij. Različne sestavine v kimčiju lahko omogočajo sinergijo med različnimi mikroorganizmi. Interakcije med bakterijami, kvasovkami in drugimi mikroorganizmi lahko spodbujajo rast kolonij. Dodatne začimbe in začimbe v kimčiju lahko imajo tudi vpliv na mikrobiotsko sestavo. Določene sestavine, kot je ingver, so znane po svojih antimikrobnih lastnostih, vendar lahko hkrati spodbujajo rast nekaterih koristnih bakterij (Cheigh idr., 2019).

Najmanjše število kolonij smo opazili pri kislem zelju s komercialno pridelanim zeljem pri anaerobnih pogojih gojenja bakterij (SN AN) (Graf 1). Če primerjamo s kimčijem, ki je bil narejen z navadnim zeljem pri anaerobnih pogojih (KN AN), je ta imel večje število kolonij. V tabeli 6 je razvidno, da je razlika statistično pomembna ( $p < 0,05$ ). Razlika med SN AN in KN AN lahko izhaja iz raznolike sestave jedi. Kimči je v nasprotju s kislom zeljem kompleksnejša jed, kjer se uporabljam različne sestavine, kar lahko vodi do bolj raznolike mikrobiotske skupnosti in posledično višjega števila kolonij (Cheigh idr., 2019). Drugi razlog je povezan z uporabo

komercialnega zelja za razliko od ekološko pridelanega. V SN AN, kjer se uporablja komercialno zelje, lahko opazimo manjše število kolonij v primerjavi z ekološko pridelanim zeljem v SE AN. Razlika ni statistično pomembna, sklepamo, da zaradi številčno premalo podatkov<sup>2</sup> (Tabela 6). Ekološko pridelano zelje pogosto vsebuje bogatejšo mikrobnou floro, saj je pridelano brez sintetičnih kemikalij in pesticidov, ki bi lahko vplivali na mikrobo (Mulek idr., 2012). Pomemben vidik tega rezultata je v načinu rasti bakterij, saj so iz SN AN zrasle anaerobno za razliko aerobne rasti v primeru vzorca kislega zelja s komercialno pridelanim zeljem (SN). V tabeli 1 je razvidno, da je bilo povprečno več CFU/ml v SN, kot pri SN AN, a ti rezultati niso statistično pomembni (Tabela 6).

## 5.2 Hipoteza 2

Pri preostalih vzorcih opazimo, da so vsi vzorci s kimčijem dosegli višje povprečno število CFU/ml, kot vzorci s kislim zeljem (graf 4). V tabeli 4 vidimo, da je razlika statistično pomembna ( $p < 0,05$ ).

Iz grafa 3 lahko razberemo, da je povprečno število CFU/ml višje pri vzorcih z ekološkim zeljem kot pa navadnim. Za primerjavo povprečno število CFU/ml v kimčiju ter kislem zelju z ekološkim zeljem je razlika statistično pomembna (Tabela 3). Prav tako smo zaznali, da je povprečno število CFU/ml v vzorcu kimčija z ekološko pridelanim zeljem (KE) ter pri kimčiju z navadnim zeljem (KN) večje pri anaerobnih izolatih v primerjavi z aerobnimi (KE AN in KN AN), kot je razvidno v grafu 5. V tabeli 5 vidimo, da podatki niso statistično pomembni, sklepamo, da zaradi nenormalne razporeditve podatkov. Dokazali smo, da je povprečno število CFU/ml pri vzorcu kislega zelja z navadnim ter ekološkim zeljem pri aerobnih pogojih (SE, SN) višje kot pri anaerobnih (SE AN, SN AN). Razlika je tudi statistično pomembna (Tabela 5). Pri vzorcih kimčija (KN in KN AN) in kislega zelja (SN in SN AN) smo opazili prisotnost dveh različnih vrst kolonij (Tabela 2). To bi lahko bilo posledica specifičnih pogojev fermentacije, ki so značilni za kimči in kislo zelje ter vplivajo na izbiro mikroorganizmov. Opazimo, da se pri anaerobnih pogojih (KN AN in SN AN) ohranja raznolikost vrst kolonij (Tabela 2). Ekološko pridelano kislo zelje (SE in SE AN) je prav tako pokazalo prisotnost dveh različnih vrst kolonij (Tabela 2). Pri anaerobnih pogojih (SE AN) ohranja podobno raznolikost

<sup>2</sup> Število gojišč pri anaerobnih pogojih je bilo opazno manj, kot pri aerobnih pogojih. Pri anaerobnih pogojih smo imeli za vsak vzorec (KN, KE, SN SE) tri gojišča, pri aerobnih pogojih pa v večini devet.

kot pri aerobnih, kar lahko nakazuje, da so mikroorganizmi prilagojeni na anaerobno okolje ne glede na vrsto zelja. To bi lahko bilo povezano z ekološko pridelanim zeljem in s tem povezano mikrobno raznolikostjo, ki se prenaša v končni izdelek.

### 5.3 Hipoteza 3

V vzorcih smo identificirali *Lactobacillus plantarum*, *Pichia kudriavzevii* in *Levilactobacillus brevis*. Rezultati identifikacije vrst mikroorganizmov kažejo, da so vse tri vrste bakterije prisotne v različnih vzorcih, kar potrjuje prisotnost mlečnokislinskih bakterij v fermentiranih živilih, tj. kimči in kislo zelje.

Rezultati identifikacije vrst kolonij v vzorcih kimčija ter kislega zelja z ekološko ter navadno pridelanim zeljem so pokazali pri vzorcu kimčija z ekološko pridelanim zeljem (KE) opazimo, da smo našli dve koloniji – *L. brevis* in *P. kudriavzevii* (Tabela 7). Pri vzorcu kimčija z ekološko pridelanim zeljem pri anaerobnih pogojih (KE AN) smo našli *L. plantarum* (Tabela 7). Glede na to, da so v vzorcu KE in KE AN 3 kolonije, lahko po rezultatih ter opazovanjih sklepamo, da sta *L. brevis* in *P. kudriavzevii* tudi pri KE AN in da je *L. plantarum* tudi pri KE. *Lactobacillus plantarum* je znana mlečnokislinska bakterija, ki ima koristne učinke na prebavni sistem, kar dodatno podkrepi predpostavko o koristnosti teh bakterij v živilih (Landete idr., 2010). Prisotnost kvasovk, torej *P. kudriavzevii* v fermentiranih živilih, kot je kimči, prav tako prispeva k raznolikosti mikrobnih skupnosti in lahko ima tudi nekatere koristne učinke na prebavo in druge procese v fermentaciji (Lata idr., 2022). Glede na kompleksnost fermentacijskih procesov so razlogi za specifično prisotnost *P. kudriavzevii* v KE in ne v drugih vzorcih verjetno kombinacija več dejavnikov, ki so vplivali na razvoj mikroorganizmov med fermentacijo. Glede na opazovanja plošč s kolonijami, mikroskopiranje ter rezultati sklepamo, da imata vzorca kimči z navadnim zeljem pri anaerobnih ter aerobnih pogojih *L. plantarum* ter *L. brevis*. Pri kislem zelju pri aerobnih pogojih je bila identificirana *L. plantarum* pri navadnem in ekološko pridelanem zelju (Tabela 7). Glede na to, da imata vzorca 2 vrsti bakterij (Tabela 2), sklepamo po opazovanja plošč s kolonijami, mikroskopiranju ter po rezultatih, da je ta druga vrsta *L. brevis*.

Naša opazovanja ob mikroskopiranju se tudi ujemajo z lastnostmi identificiranih mikroorganizmov, ki smo jih našli v literaturi.

## **6 ZAKLJUČEK**

Cilj te raziskovalne naloge je bila raziskava mikroorganizmov v kimčiju in kislem zelju z ekološko in navadno pridelanim zeljem. Osredotočili smo se predvsem na mlečnokislinske bakterije.

V naši raziskavi smo ugotovili, da je kimči z ekološko pridelanim zeljem v anaerobnih pogojih (KE AN) izkazal najvišjo številčnost kolonij. Anaerobni pogoji so se izkazali kot ugodni za rast mikroorganizmov, zlasti mlečnokislinskih bakterij, kot je *Lactobacillus plantarum*, ki so imele optimalne pogoje za razmnoževanje. Ekološko pridelano zelje brez pesticidov je verjetno prispevalo k višji številčnosti kolonij in ohranjanju naravne raznolikosti organizmov med fermentacijo, kar je prispevalo k bolj kompleksnim okusom in aromam v KE AN.

V nasprotju s tem smo opazili najmanjše število kolonij pri kislem zelju s komercialno pridelanim zeljem pri anaerobnih pogojih (SN AN). Primerjava s kimčijem, ki je bil narejen z navadnim zeljem pri anaerobnih pogojih (KN AN), je razkrila manjše število kolonij v SN. Razlike med SN AN in KN AN so lahko posledica kompleksnejše sestave kimčija, ki je vseboval različne sestavine, spodbujajoč raznolikost mikrobne skupnosti in posledično višje število kolonij. Uporaba komercialnega zelja v SN AN je verjetno vplivala na manjše število kolonij v primerjavi z ekološko pridelanim zeljem v SE AN, kjer je bogatejša mikrobna flora.

Raziskava je tudi pokazala, da so anaerobni pogoji ključni za večjo številčnost kolonij pri vzorcih kimčija in kislega zelja. Prisotnost treh različnih vrst mikroorganizmov, vključno z *Lactobacillus plantarum*, *Pichia kudriavzevii* in *Levilactobacillus brevis*, kaže na kompleksno sodelovanje med mikroorganizmi med fermentacijo. Kimči z ekološkim zeljem pri aerobnih in anaerobnih pogojih je izkazal največjo raznolikost vrst kolonij, kar je povezano z ekološko pridelanim zeljem in mikrobno raznolikostjo.

Pri identifikaciji vrst kolonij smo potrdili prisotnost mlečnokislinskih bakterij, kot je *L. plantarum*, in kvasovke *P. kudriavzevii* v vzorcih kimčija. Prisotnost slednje je bila na kimčiju z ekološko pridelanim zeljem, kar kaže na kompleksnost fermentacijskih procesov in vpliv različnih dejavnikov na razvoj mikroorganizmov med fermentacijo. Naši rezultati so podprli postavljene hipoteze in poudarili pomen pogojev rasti, sestave surovin ter vpliva na mikrobno raznolikost v fermentiranih živilih, kar omogoča boljše razumevanje kompleksnih interakcij med mikroorganizmi med procesom fermentacije kimčija in kislega zelja.

## **7 DRUŽBENA ODGOVORNOST**

V našem raziskovalnem pristopu smo izkazovali globoko zavezanost načelom družbene odgovornosti, kar predstavlja ključno vodilo za naše delovanje kot posameznikov, članov skupine ter raziskovalcev na področju biologije. Družbena odgovornost namreč zahteva resnost, zanesljivost in sposobnost zaupanja v vseh aspektih našega delovanja, od posameznika do širše družbe in sveta. S tem pristopom smo se zavedali, da vsi skupaj oblikujemo našo družbo in svet, zato smo se predano zavzemali za odgovorno delovanje v odnosu do narave, soljudi, dela/učenja in skupnosti, s čimer smo si prizadevali preprečevati morebitne težave.

Bili smo zavezani transparentnosti in odprtosti v našem delu. Predstavili smo našo metodologijo, da bi omogočili lažje razumevanje naših raziskovalnih postopkov. Verjeli smo, da je deljenje rezultatov znanstvenih raziskav ključnega pomena za napredek znanosti in izobraževanje javnosti.

V procesu raziskave smo si prizadevali za transparentnost in odprtost. Deljenje naših rezultatov in jasna predstavitev metodologije sta bila ključna, saj smo verjeli, da je javna dostopnost ključnega pomena za izgradnjo zaupanja v znanstveno skupnost in širšo javnost. Transparentnost je bila tudi ključna za odprto razpravo o naših ugotovitvah ter za spodbujanje nadaljnjega raziskovanja v tej pomembni smeri.

Poleg tega smo se posvetili ekološkim vidikom in trajnostnemu kmetovanju. Z raziskovanjem razlik med komercialno in ekološko pridelanim zeljem smo prispevali k ozaveščanju o pomenu trajnostne pridelave in njenem vplivu na okolje. S tem smo želeli prispevati k razvoju smernic, ki bodo podpirale varno pripravo in uživanje fermentirane hrane, obenem pa zagotavljale minimalen ekološki odtis.

V raziskavi smo poglobljeno preučevali, kako identificirane bakterijske kolonije pozitivno vplivajo na človekovo zdravje. Na primer, *Lactobacillus plantarum* je pokazal sposobnost izboljšanja prebave in spodbujanja absorpcije hranil v črevesju. *Pichia kudriavzevii* pa je lahko ključna za ohranjanje ravnotežja črevesne mikroflore. S temi ugotovitvami smo želeli poudariti pozitivne vidike bakterij in njihov potencialni prispevek k splošnemu dobremu počutju ljudi.

## 8 VIRI IN LITERATURA

1. Behera S. S., Ray R. C. in Zdolec N. (2018). Lactobacillus plantarum with Functional Properties: An Approach to Increase Safety and Shelf-Life of Fermented Foods. *BioMed Research International*. <https://doi.org/10.1155/2018/9361614>
2. Britannica, T. uredniki Enciklopedije (2023). Yeast. *Encyclopedia Britannica*. <https://www.britannica.com/science/yeast-fungus>
3. Chamnipa N., Thanonkeo S., Klanrit p. in Thanonkeo P. (2018). The potential of the newly isolated thermotolerant yeast *Pichia kudriavzevii* RZ8-1 for high-temperature ethanol production. *Biotechnology and Industrial Microbiology*. <https://www.elsevier.es/en-revista-brazilian-journal-microbiology-490-articulo-the-potential-newly-isolated-thermotolerant-S1517838217302885>
4. Di Cagno R., Fillannino P. in Gobetti M. 2016. Novel fermented fruit and vegetable-based products. V: Novel food fermentation technologies. Shikha Ojha K., Tiwari B.K. (ur.). CHam, *Springer International Publishing*
5. Dragaš A. Z. (1998). Mikrobiologija z epidemiologijo. DZS.
6. Eunhye Song, Lin Ang, Hye Won Lee, Myung-Sunny Kim, You Jin Kim, Daija Jang in Myeong Soo Lee. 2023. Effects of kimchi on human health: a scoping review of randomized controlled trials. *Journal of Ethnic Foods*.
7. Fan L. in Truelstrup Hansen L. 2012. Fermentation and biopreservation of plant-based foods with lactic acid bacteria. V: Handbook of plant-based fermented food and beverage technology. Hui Y.H. (ur.). Boca Raton, *CRC Press*.
8. Fang F., Xu J., Li Q., Xia X. in Du G. (2018). Characterization of a *Lactobacillus brevis* strain with potential oral probiotic properties. BioMed Research International. *BMC Microbiol* 18. <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1369-3>
9. Featherstone S. (ur.). (2016). Canning of vegetables. A Complete Course in Canning and Related Processes (Fourteenth Edition). <https://doi.org/10.1016/B978-0-85709-679-1.00001-5>
10. Habulin M. in Primožič M. (2008). Navodila za laboratorijske vaje (zbrano gradivo).

Biokemijska tehnika. Univerza v Mariboru. Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo.  
[https://www.fkkt.um.si/egradiva/fajli/Biokemijska\\_tehnika\\_navodila.pdf](https://www.fkkt.um.si/egradiva/fajli/Biokemijska_tehnika_navodila.pdf)

11. Hong-Sik Cheigh, Kun-Young Park in Professor C. Y. Lee. 2009. Biochemical, microbiological, and nutritional aspects of kimchi (Korean fermented vegetable products). V: *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* Volume 34 <https://www.tandfonline.com/doi/citedby/10.1080/10408399409527656?scroll=top&needAccess=true>
12. Jang, H.J., Lee, NK. in Paik, HD. (2019) Probiotic characterization of Lactobacillus brevis KU15153 showing antimicrobial and antioxidant effect isolated from kimchi. *Food Sci Biotechnol* 28. <https://doi.org/10.1007/s10068-019-00576-x>
13. Kariyawasam K. M. G. M. M., Yang S. J., Lee N. in Paik H. D. (2020). Probiotic Properties of Lactobacillus brevis KU200019 and Synergistic Activity with Fructooligosaccharides in Antagonistic Activity against Foodborne Pathogens. *Food Science of Animal Resources.* [https://www.kosfaj.org/archive/view\\_article?pid=kosfa-40-2-297](https://www.kosfaj.org/archive/view_article?pid=kosfa-40-2-297)
14. Ku H.-K., Lee H., Choi I. D., Ra J.-H., Kim T.-Y., Jeong J.-W., Kim S.-H., Sim J.-H. in Ahn Y. T. 2014. Immuno-stimulatory effect of Lactobacillus plantarum HY7712 via toll-like receptor 2 signaling pathway. *Cytokine*, 70, 1. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2014.07.109>
15. Landete J. M., Rodríguez H., Curiel J. A., de Las Rivas B., de Felipe F. L. in Muñoz R. 2010. Degradation of Phenolic Compounds Found in Olive Products by Lactobacillus plantarum Strains. V: Olives and olive oil in health and disease prevention. *Academic Press*
16. Lata P., Kumari R., Sharma K. B., Rangra S. in Savitri. (2022). In vitro evaluation of probiotic potential and enzymatic profiling of *Pichia kudriavzevii* Y33 isolated from traditional home-made mango pickle. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology.* <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9463414/>
17. MRS agar (deMan, Rogosa, Sharpe) Principle Preparation Interpretation. (b. d.). *Medical Microbiology.* <https://microbiologie-clinique.com/mrs-agar.html#Preparation>
18. Muleke E. M., Saidi M., Itulya F. M., Martin T. in Ngouadio M. (2012). The Assessment of the Use of Eco-Friendly Nets to Ensure Sustainable Cabbage Seedling Production in Africa. *Sustainable Crop Production.* <https://doi.org/10.3390/agronomy3010001>

19. Quirini C. B. (2016) Fermentiranje in najboljši shranki. Založba Kmečki glas.
20. Sasikumar P., Gomathi S., Anbazhagan K., Abhishek A., Paul E., Vasudevan V., Sasikumar S. in Selvam G.S. 2014. Recombinant Lactobacillus plantarum expressing and secreting heterologous oxalate decarboxylase prevents renal calcium oxalate stone deposition in experimental rats. *Journal of Biomedical Sciences*, 21, 1
21. Shi S. H., Yang W. T., Yang G. L., Cong Y. L., Huang H. B., Wang Q., Cai R. P., Ye L. P., Hu J. T., Zhou J. Y., Wang C. F. in Li Y. (2014). Immunoprotection against influenza virus H9N2 by the oral administration of recombinant Lactobacillus plantarum NC8 expressing hemagglutinin in BALB/c mice. *Virology*, 166, 1
22. Singhal N., Kumar M., Kanaujia P. K. in Virdi J. S. (2015). MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in Microbiology*, 6:791. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00791>
23. Stevenson C., Blaauw R., Fredericks E., Visser J. in Roux S. (2014). PP137-SUN: randomized clinical trial: effect of Lactobacillus plantarum 299V on symptoms of irritable bowel syndrome. *Clinical Nutrition*, 33, 1
24. Stone K. (2017). Lactobacillus Brevis: The Most Important Health Benefits. *BalanceOne*. <https://balanceone.com/blogs/news/lactobacillus-brevis>
25. Teixeira P. (2014). LACTOBACILLUS Lactobacillus brevis. Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00178-6>
26. Teixeira P. C.M. (1999). LACTOBACILLUS Lactobacillus Brevis. Encyclopedia of Food Microbiology. Elsevier: <https://doi.org/10.1006/rwfm.1999.0900>
27. Valan Arasu M. V., Jung M. W., Ilavenil S., Jane M., Kim D. H., Lee K. D., Park H. S., Hur T. Y., Choi G. J., Lim Y. C., Al-Dhabi N.A. in Choi K. C. (2013). Isolation and characterization of antifungal compound from Lactobacillus plantarum KCC-10 from forage silage with potential beneficial properties. *Journal of Applied Microbiology* <https://doi.org/10.1016/j.ecoser.2019.100916>
28. van Rijswijck, I.M.H., J. Dijksterhuis, J. C.M. Wolkers-Rooijackers, T. Abee in E.J. Smid. (2015). Nitrogen limitation leads to penetrative growth into agar and affects aroma

- formation in *Pichia fabianii*, *P. kudriavzevii* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 31
29. Wieser A., Schneider L., Jung J. in Schubert S. (2012). Maldi-TOF MS in microbiological diagnostics-identification of microorganisms and beyond (mini review). *Applied Microbiology and Biotechnology*
30. Yunfei Chu,<sup>1,2,†</sup> Mengmeng Li,<sup>1,2,†</sup> Jiahui Jin,<sup>1,2</sup> Xiameng Dong,<sup>3</sup> Ke Xu,<sup>1,2</sup> Libo Jin,<sup>1,2</sup> Yanming Qiao,<sup>4</sup>, in Hao Ji. (2023). Advances in the Application of the Non-Conventional Yeast *Pichia kudriavzevii* in Food and Biotechnology Industries. *National Library of Medicine*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9961021/>
31. Zabat M. A., Sano W. H., Wurster J. I., Cabral D. J. in Belenky P. (2018). Microbial Community Analysis of Sauerkraut Fermentation Reveals a Stable and Rapidly Established Community. *Foods*. 7(5):77. <https://doi.org/10.3390%2Ffoods7050077>
32. Zhang Y. in Vadlani P. V. (2015). Lactic acid production from biomass-derived sugars via co-fermentation of *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2014.10.027>

## PRILOGE

Tabela 7: Število kolonij in vrst KN.

VZOREC KN	ŠTEVILO KOLONIJ	ŠTEVILO VRST
KN 10-4 (2)	720	2
KN 10-4 (3)	720	2
KN 10-4 (4)	640	2
KN 10-5 (2)	200	2
KN 10-5 (3)	144	2
KN 10-5 (4)	240	2
KN 10-6 (2)	35	2
KN 10-6 (3)	30	2
KN 10-6 (4)	12	2

Tabela 8: Število kolonij in vrst KE.

VZOREC KE	ŠTEVILO KOLONIJ	ŠTEVILO VRST
KE $10^{-4}$ (2)	720	3
KE $10^{-4}$ (3)	880	3
KE $10^{-4}$ (4)	640	3
KE $10^{-5}$ (2)	640	3
KE $10^{-5}$ (3)	300	3
KE $10^{-5}$ (4)	480	3
KE $10^{-6}$ (2)	140	3
KE $10^{-6}$ (3)	120	3
KE $10^{-6}$ (4)	160	3

Tabela 9: Število kolonij in vrst SN.

VZOREC SN	ŠTEVILO KOLONIJ	ŠTEVILO VRST
SN $10^{-4}$ (2)	360	2
SN $10^{-4}$ (3)	240	2
SN $10^{-4}$ (4)	160	2
SN $10^{-5}$ (2)	50	2

SN $10^{-5}$ (3)	30	2
SN $10^{-5}$ (4)	100	2
SN $10^{-6}$ (2)	11	2
SN $10^{-6}$ (3)	15	2

Tabela 10: Število kolonij in vrst SE.

VZOREC SE	ŠTEVILO KOLONIJ	ŠTEVILO VRST
SE $10^{-4}$ (2)	280	2
SE $10^{-4}$ (3)	480	2
SE $10^{-4}$ (4)	300	2
SE $10^{-5}$ (2)	48	2
SE $10^{-5}$ (3)	64	2
SE $10^{-5}$ (4)	80	2
SE $10^{-6}$ (2)	20	2

Tabela 11: Število kolonij in vrst KN AN.

VZOREC KN AN	ŠTEVILO KOLONIJ	ŠTEVILO VRST
KN $10^{-4}$ (1)	880	2
KN $10^{-5}$ (1)	240	2
KN $10^{-6}$ (1)	35	1

Tabela 12: Število kolonij in vrst KE AN.

VZOREC KE AN	ŠTEVILO KOLONIJ	ŠTEVILO VRST
KE $10^{-4}$ (1)	1120	3
KE $10^{-5}$ (1)	560	3
KE $10^{-6}$ (1)	160	3

Tabela 13: Število kolonij in vrst SN AN.

VZOREC SN AN	ŠTEVILO KOLONIJ	ŠTEVILO VRST
SN $10^{-4}$ (1)	300	2
SN $10^{-5}$ (1)	30	2

SN $10^{-6}$ (1)	3	2
------------------	---	---

Tabela 14: Število kolonij in vrst SE AN.

VZOREC SE SN	ŠTEVILO KOLONIJ	ŠTEVILO VRST
SE $10^{-4}$ (1)	300	2
SE $10^{-5}$ (1)	40	2
SE $10^{-6}$ (1)	5	1