

»Mladi za napredek Maribora 2016«

33. srečanje

**Vpliv najpogosteje uporabljenih umetnih in naravnih
sladil na rast izbranih črevesnih mikroorganizmov**

Biotehnologija, kmetijstvo, živilstvo

Raziskovalna naloga

PROSTOR ZA NALEPKO

Avtor: DOROTEJA TEJA PEČOVNIK,
GABRIELA ŠTUMBERGER

Mentor: KATJA HOLNTHANER ZOREC, ROK TKAVC

Šola: II. GIMNAZIJA MARIBOR

2016, Maribor

»Mladi za napredek Maribora 2016«

33. srečanje

**Vpliv najpogosteje uporabljenih umetnih in naravnih
sladil na rast izbranih črevesnih mikroorganizmov**

Biotehnologija, kmetijstvo, živilstvo

Raziskovalna naloga

PROSTOR ZA NALEPKO

2016, Maribor

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE	3
KAZALO SLIK	5
KAZALO GRAFOV	5
KAZALO TABEL	6
POVZETEK	7
ZAHVALA.....	8
1. UVOD.....	9
1.1 Raziskovalna vprašanja.....	11
1.2 Delovne hipoteze	11
2. TEORETIČNE OSNOVE.....	13
2.1 Sladila	13
2.1.1 Steviol glikozid.....	13
2.1.1 Ksilitol (Pentan-1,2,3,4,5-pentol)	14
2.1.2 Eritritol (butan-1,2,3,4-tetraol)	15
2.1.3 Natrijev ciklambat	16
2.1.4 Natrijev saharinat.....	17
2.1.5 Acesulfam-K.....	18
2.2 Črevesna mikrobiota človeka	18
2.3 Delovni mikroorganizmi	19
2.3.1 <i>Escherichia coli</i>	19
2.3.2 <i>Lactobacillus plantarum</i>	20
2.3.3 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	22
3. MATERIALI IN METODE DELA.....	23
3.1 Materiali	23
3.1.1 Delovni mikroorganizmi	23
3.1.2 Zaščitna oprema	23
3.1.3 Kemikalije	23
3.1.4 Laboratorijski pribor.....	24

3.1.5	Laboratorijske aparature.....	24
3.2	Metode dela	25
3.2.1	Priprava 10% založnih raztopin sladil in glukoze.....	25
3.2.2	Priprava gojišč	25
3.2.3	Priprava prekonočnih kultur	27
3.2.4	OF (oksidacija – fermentacija) test.....	27
3.2.5	Metoda merjenja optične gostote pri 599,9 nm.....	28
3.3	Statistična analiza podatkov.....	28
4.	REZULTATI	29
4.1	OF (oksidacija – fermentacija) test.....	29
4.2	Ocenjevanje uspešnosti rasti kultur na gojiščih s sladilom kot edinimi virom ogljika 31	
4.3	Ocenjevanje uspešnosti rasti kultur na gojišču z dodanim sladilom	35
5.	DISKUSIJA	38
6.	DRUŽBENA ODGOVORNOST	44
7.	ZAKLJUČEK.....	45
8.	PRILOGE.....	47
9.	VIRI IN LITERATURA.....	52

KAZALO SLIK

Slika 1 Strukturna formula steviol glikozida (en.wikipedia.org).....	14
Slika 2 Strukturna formula ksilitola (commons.wikimedia.org).....	15
Slika 3 Strukturna formula eritritola (en.wikipedia.org)	16
Slika 4 Strukturna formula natrijevega ciklamata (en.wikipedia.org).....	16
Slika 5 Strukturna formula natrijevega saharinata (commons.wikimedia.org)	17
Slika 6 Strukturna formula acesulfama-K (en.wikipedija.org).....	18
Slika 7 <i>Escherichia coli</i> pri 1000x povečavi (lasten vir).....	20
Slika 8 <i>Lactobacillus plantarum</i> pri 1000x povečavi (lasten vir)	21
Slika 9 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> pri 1000x povečavi (lasten vir)	22
Slika 10: Primer OF testa, ko mikroorganizem razgrajuje sladilo po fermentativni in oksidativni poti (epruveti F+, O+) s kontrolo FK, OK (na levi) ter primer ko mikroorganizem sladila ne razgrajuje (na desni) (lasten vir)	27

KAZALO GRAFOV

Graf 1 Optična gostota pri 599,9 nm \pm SD v odvisnosti od časa (h) pri <i>Escherichia coli</i> s sladilom kot edinim virom ogljika	32
Graf 2 Optična gostota pri 599,9 nm \pm SD v odvisnosti od časa (h) pri <i>Lactobacillus plantarum</i> s sladilom kot edinim virom ogljika.....	32
Graf 3 Optična gostota pri 599,9 nm \pm SD v odvisnosti od časa (h) pri <i>Saccharomyces cerevisiae</i> s sladilom kot edinim virom ogljika.....	33
Graf 4 Optična gostota pri 599,9 nm \pm SD v odvisnosti od časa (h) pri <i>Escherichia coli</i> na gojišču z 0,5% sladila in 0,5% glukoze kot virom ogljika	35
Graf 5 Optična gostota pri 599,9 nm \pm SD v odvisnosti od časa (h) pri <i>Lactobacillus plantarum</i> na gojišču z 0,5% sladila in 0,5% glukoze kot virom ogljika	36
Graf 6 Optična gostota pri 599,9 nm \pm SD v odvisnosti od časa (h) pri <i>Saccharomyces cerevisiae</i> na gojišču z 0,5% sladila in 0,5% glukoze kot virom ogljika	36

KAZALO TABEL

Tabela 1 Sprememba barve ter prisotnost plina v gojišču za OF test pri <i>Escherichia coli</i> po 48 h.....	29
Tabela 2 Sprememba barve ter prisotnost plina v gojišču za OF test pri <i>Lactobacillus plantarum</i> po 48 h.....	30
Tabela 3 Sprememba barve ter prisotnost plina v gojišču za OF test pri <i>Saccharomyces cerevisiae</i> po 48 h.....	30

POVZETEK

Cilj naloge je bil proučevati vpliv treh naravnih (steviol glikozid, ksilitol in eritritol) ter treh umetnih sladil (natrijev ciklamat, natrijev saharinat ter acesulfam-K) na rast črevesnih mikroorganizmov: bakterije *Escherichia coli*, bakterije *Lactobacillus plantarum* ter kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*. Ugotavljali smo sposobnost metaboliranja sladil, sposobnost uporabe kot edini vir ogljika pri 1% vsebnosti, ter vpliv na rast ob prisotnosti glukoze (0,5% sladila in 0,5% glukoze).

Vsi trije mikroorganizmi so pokazali sposobnost metaboliranja steviol glikozida ter sposobnost uporabe le tega kot edini vir ogljika. *S. cerevisiae* lahko presnavlja še ksilitol in eritritol ter ju uporabi kot edini vir ogljika. Ob prisotnosti glukoze rast najbolj pospešuje steviol glikozid, ksilitol in eritriol rast *L. plantarum* ter *S. cerevisiae* pospešujeta, na rast *E. coli* ksilitol ne vpliva, eritriol pa jo zavira. Ostala tri sladila rast večine mikroorganizmov zavirajo, najbolj pa acesulfam-K.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujema najini mentorici, ki naju je usmerjala na pravo pot z nasveti, z nama preživela veliko ur v šolskem laboratoriju ter odgovarjala na najina nešteta vprašanja.

Še posebej se zahvaljujema zunanjemu mentorju, ki nama je pomagal z nasveti in popravki, z izvedbo nekaterih poskusov ter pri nabavi potrebnega materiala za raziskovalno nalogo.

Zahvaljujema se tudi drugi profesorici biologije, ki je prav tako pomagala pri izpeljavi raznih poskusov.

Zahvaljujema se tudi šoli, ki nama je nudila delovni material in prostor za izvedbo raziskovalne naloge. Prav tako se zahvaljujema podjetju, ki je bilo pripravljeno odstopiti nekaj umetnih sladil. Najine zahvale so namenjene tudi vsem ostalim, ki so nama na kakršenkoli način pomagali pri izvedbi raziskovalne naloge.

Hvala vsem za vaš trud in čas!

1. UVOD

Človeška želja po sladkem je vrojena. Ljudje si instinktivno želimo užitka, povezanega z uživanjem sladkega. Zanimivo je, da beseda »sladko« ne opisuje le okusa, temveč tudi nekaj privlačnega in prijetnega, kot na primer italijanski idiomi »*la dolce vita*« ali pa angleški »*home sweet home*« (Reed in McDaniel, 2006).

Seveda sladkorja ne more ali pa, zaradi danes vedno bolj propagirani želji po vitkosti in zdravem življenjskem slogu, ne želi uživati vsak. Na današnjem trgu je na voljo velik izbor naravnih ter umetnih sladil, ki ponujajo nizkokalorično alternativo k konvencionalnim sladkorjem. Ta sladila so 30-13.000 krat slajša od sladkorja (Zygler in sod., 2011) in jih je posledično za doseganje enake ravni sladkosti potrebno dodati veliko manj.

Ravno zaradi nizke vsebnosti kalorij in nižjih stroškov izdelave se naravnih, predvsem pa umetnih sladil množično poslužuje prehranjevalna industrija (Zhu in sod., 2005). Najdemo jih v skoraj vseh izdelkih: v sladkih pijačah, mlečnih izdelkih kot so jogurt ali sladoled, sladica, žvečilnih gumijih, bonbonih in drugih sladkarijah, prelivih za solate, gorčicah, omakah, namiznih sladilih, itd. (Zygler in sod., 2011). Živilska industrija rada poudarja koristi uporabe sladil kot so prijaznost do zob (Ly in sod., 2006), primernost za diabetike ter nizka kalorična vrednost.

Za varstvo potrošnikov glede uporabe umetnih sladil v izdelkih skrbi Evropska direktiva 94/35/EC, ki določa katera sladila so lahko in v kakšni količini prisotna v določenih vrstah hrane (www.eur-lex.europa.eu/legal-content). Kljub temu nekatere potrošnike še vedno skrbi, mediji pa množično opozarjajo na pasti umetnih sladil in živilske industrije obtožujejo zamenjave naravnih sladkorjev za sladila le zaradi ekonomskih razlogov. Glede varnosti in uporabe sladil tako ponekod obstajajo nejasnosti in različna mnenja (Zygler in sod., 2009).

Mnogo sladil direktno preide skozi prebavni sistem, brez da bi jih telo pri tem razgradilo, zaradi česar jim je črevesna mikrobiota direktno izpostavljena (Roberts in sod., 2000). Le ta igra pomembno vlogo pri uravnavanju številnih fizioloških procesov (Clemente in sod., 2012).

Suez in sodelavci so pred kratkim v reviji Nature (2014) objavili članek, ki govori o vplivu nizkokaloričnih umetnih sladil na pojav glukozne intolerance. Ugotovili so, da je pri miših, ki so redno uživale nizkokalorična umetna sladila, prišlo do kompozicijskih in funkcionalnih sprememb v metabolnih poteh črevesne mikrobiote. Miši s tako spremenjeno črevesno mikrobioto so bile bolj dovzetne za presnovne bolezni. Pri sledečem poskusu izvedenem na ljudeh so dokazali, da pri ljudeh, podobno kot pri miših, nizkokalorična umetna sladila vplivajo na spremembo metabolnih poti črevesne mikrobiote, kar je ugodno vplivalo na razvoj glukozne intolerance. Ta članek je bil izhodišče našega raziskovanja.

Namen raziskovalne naloge je bil proučevati vpliv treh naravnih (steviol glikozid, ksilitol in eritritol) ter treh umetnih sladil (natrijev ciklamat, natrijev saharinat ter acesulfam-K) na rast črevesnih mikroorganizmov: bakterije *Escherichia coli*, bakterije *Lactobacillus plantarum* ter kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*. Pri tem smo ugotavljali sposobnost metaboliranja teh sladil, sposobnost uporabe kot edini vir ogljika pri 1% vsebnosti v gojišču ter vpliv na rast ob prisotnosti glukoze (0,5% sladila in 0,5% glukoze).

1.1 Raziskovalna vprašanja

Z raziskovalno nalogo smo želeli ugotoviti:

1. Ali so izbrani črevesni mikroorganizmi *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* ter *Saccharomyces cerevisiae* sposobni presnavljati izbrana naravna (steviol glikozid, ksilitol in eritritol) in umetna sladila (natrijev ciklamat, natrijev saharinat ter acesulfam-K)?
2. Ali lahko izbrani mikroorganizmi zgoraj omenjena sladila uporabljajo kot edini vir ogljika?
3. Ali imajo zgoraj omenjena sladila zaviralni učinek na rast oz. porabo glukoze *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* ter *Saccharomyces cerevisiae* in kakšne so razlike v zaviralnem učinku umetnih in naravnih sladil (če zaviralni učinek obstaja)?

1.2 Delovne hipoteze

1. Na podlagi prejšnjih raziskav (Renwick in Tarka, 2008) smo predvidevali, da so vsi trije mikroorganizmi tako fermentativno kot oksidativno sposobni razgrajevati steviol glikozid. Prav tako smo predvidevali, da sta ksilitol in eritritol sposobna razgrajevati le *Saccharomyces cerevisiae* (Edwardsson in sod., 1977; Heys in Roberts, 1978; Hiele in sod., 1993; Wu, 1976). Natrijevega ciklamata (Buss in sod., 1992; Drasar in sod., 1972; Wallace in sod., 1970), natrijevega saharinata (Anderson, 1985; Byard in Golberg, 1973) ter acesulfama-K (Zheng in Sarr, 2012) glede na izsledke drugih ni sposoben metabolirati noben od mikroorganizmov.
2. Na osnovi zgoraj omenjene raziskave smo predvidevali, da lahko steviol glikozid vsi trije mikroorganizmi uporabijo kot edini vir ogljika. Glede na zgoraj omenjene

raziskave in raziskave Zyl in sod. (1989) smo pričakovali, da lahko ksilitol in eritritol kot edini vir ogljika uporabi le *S. cerevisiae*. Natrijevega ciklamata, natrijevega saharinata ter acesulfama-K, glede na prejšnjo hipotezo, ne more kot vir ogljika uporabiti noben od treh mikroorganizmov, saj jih niso sposobni metabolirati.

3. Predvidevali smo, da steviol glikozid rasti ne zavira (Renwick in Tarka, 2008). Glede na druge raziskave ksilitol rasti nobenega od mikroorganizmov ne zavira (Edwardsson in sod., 1977; Jeffries in Jin, 2003; Zyl in sod., 1989). Pričakovali smo, da eritritol zavira rast le pri *E. coli* (Klewicki in Klewicka, 2004). Na podlagi drugih raziskav smo predvidevali, da natrijev ciklamat (Drasar in sod., 1972), natrijev saharinat ter acesulfam-K (Pfeffer in sod., 1985) zavirajo rast vseh treh mikroorganizmov.
4. Na podlagi prejšnje hipoteze predvidevamo, da imajo naravna sladila na rast vseh treh mikroorganizmov manjši zaviralni učinek kot umetna.

2. TEORETIČNE OSNOVE

2.1 Sladila

Po definiciji Oxford slovarja je sladilo snov, ki se uporablja za slajenje hrane ali pijače. V glavnem delimo sladila glede na sladilno moč na dve skupini:

Sladila, ki imajo veliko sladilno moč in jih posledično dodajamo v manjših količinah, imenujemo intenzivna sladila (angl. *intense sweeteners*)¹ oz. umetna sladila, ko želimo poudariti, da je večina od njih sintetičnega izvora. V veliki meri se uporabljajo v sladkih pijačah. V praksi nobeden od njih znatno ne pripomore k energijski vrednosti živila, saj so potrebne le majhne količine (Mortensen, 2006).

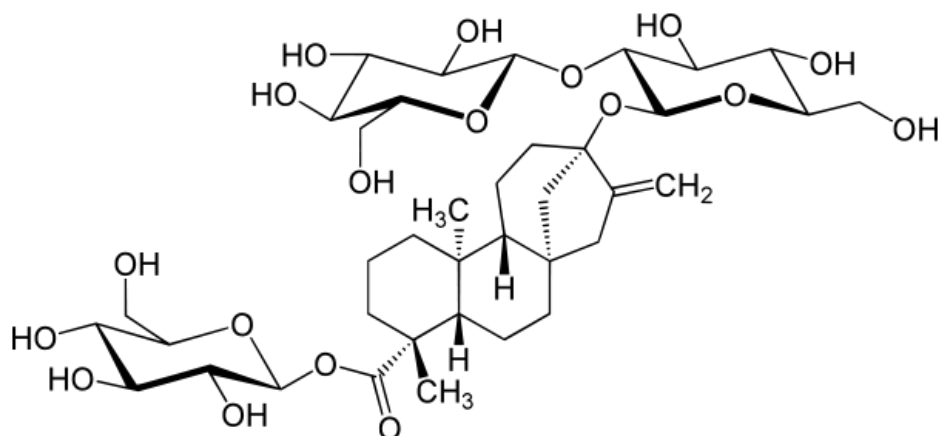
Druga skupina so nadomestna sladila (angl. *bulk sweeteners*)², včasih imenovana tudi naravna sladila. Ta vrsta sladil se najpogosteje uporablja kot »polnilo«. To je sestavina, ki zagotovljeno izboljša konsistenco. Uporaba teh sladil kot polnilo ali sladilo je dovoljena v večini živil (sladicah, sladoledih, marmeladah, pecivu, kruhu, kosmičih, omakah ...), razen v sladkih pijačah, v takšnih količinah, da dosežejo željen učinek (Mortensen, 2006). V nadaljevanju bomo zaradi praktičnih razlogov sladila delili glede na izvor: sintetična in naravna.

2.1.1 Steviol glikozid

Steviozid oz. steviol glikozid je intenzivno sladilo naravnega izvora, ki je 250 do 300 krat slajše kot namizni sladkor (saharoza) in je eno najpogosteje uporabljenih sladil. Pridobivajo ga iz listov rastline stevia *Stevia rebaudiana*, ki izvira iz južne Amerike (www.food.gov.uk). Uporablja se kot sladilo v prehranski industriji in za sladkanje brezalkoholnih pijač.

^{1,2}Tukaj slovenski prevodi rahlo škripajo, vseeno pa ne smemo enačiti inenzivnih z umetnimi ter nadomestnih z naravnimi sladili.

Steviol glikozid je sestavljen iz steviola, na katerega so z estrsko in glikozidno vezjo vezane 3 molekule glukoze (Slika 1), zaradi česar je dobro topen v vodi. Tališče ima pri 196 do 198 °C, sama molekula pa je stabilna do 100 °C (Soejarto in sod., 1982).



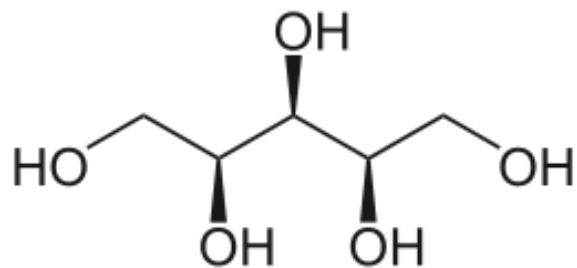
Slika 1 Strukturna formula steviol glikozida (en.wikipedia.org)

Stevia je bila nekaj časa prepovedana, saj naj bi povzročala genske mutacije (Matsui in sod., 1989, povzeto po Brusick 2008), vendar kasneje v 2 letni študiji toksičnosti, na podganah niso odkrili znakov nikakršnih sprememb (Xili in sod., 1992; Toskulkao in sod., 1997), steviol glikozid pa ni pokazal tudi nobenih kancerogenih (Toyoda in sod., 1997) ali genotoksičnih (Bakal in O'Brien Nabors, 1986; povzeto po O'Brien Nabors, 2011) učinkov na podganah. Vseeno so potrebne nadaljnje raziskave glede vpliva na človeka.

2.1.1 Ksilitol (Pentan-1,2,3,4,5-pentol)

Ksilitol je sladkorni alkohol naravnega izvora in je približno tako sladek kot namizni sladkor. Je linearna, aciklična molekula v osnovi iz 5 ogljikovih atomov (Slika 2). V manjših količinah ga najdemo v sadju in zelenjavi (Mäkinen in Söderling, 1980; Washuett in sod., 1973) in je vmesni produkt metabolize glukoze v človeškem telesu (Touster, 1974; povzeto po O'Brien Nabors, 2011).

Številne študije so dokazale, da ksilitol pomaga preprečevati karies, saj ga mikroorganizmi v ustih ne morejo metabolirati (Baer, 1988; Linke, 1986; Kiet in sod., 2006), zaradi česar ga pogosto najdemo v žvečilnih gumijih in drugih sladkarijah. Primeren pa je tudi diabetike, saj ne vpliva na raven krvnega sladkorja (Foerster in Mehnert, 1979; povzeto po O'Brien Nabors, 2011).

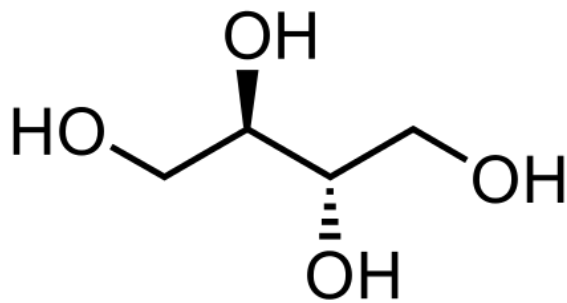


Slika 2 Strukturna formula ksilitola (commons.wikimedia.org)

2.1.2 Eritritol (butan-1,2,3,4-tetraol)

Eritritol je sladkorni alkohol oz. polioli, naravnega izvora, ki je približno 0,6 do 0,7 krat tako sladek kot namizni sladkor. Je linearna, aciklična molekula v osnovi 4 ogljikovih atomov (Slika 3). Zaradi svoje velikosti ima nižjo energijsko vrednost in je lažje prebavljiv kot ostali polioli (Goossens in Gonze, 1996). Tališče ima pri 126 °C in je dobro topen v vodi.

Najdemo ga v grozdju, hruškah, melonah in gobah (Goossens in Gonze, 1996). V človeškem telesu je prisoten v očesni leči (Tomana in sod., 1984), cerebrospinalni tekočini (Servo in sod., 1977) in krvi (Roboz in sod., 1984), v velikih koncentracijah pa je prisoten tudi v urinu. Za komercialno uporabo ga proizvajajo s fermentacijo škroba (Goossens in Gonze, 1996).

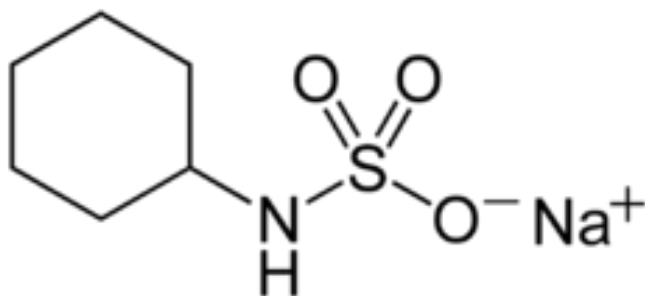


Slika 3 Strukturna formula eritritola (en.wikipedia.org)

Zaradi svoje majhnosti se v telesu hitro absorbira in izloči iz telesa preko urina (80%) v roku 24h. Tako ga lahko naše telo brez posledic prenaša tudi v večjih količinah (O'Brien Nabors, 2011).

2.1.3 Natrijev ciklamat

Natrijev ciklamat (Slika 4) je intenzivno sladilo sintetičnega izvora, 30 do 50 krat slajše od namiznega sladkorja. Tališče ima pri 170 °C. Uporablja se v proizvodnji brezalkoholnih pijač (večinoma v kombinaciji z drugimi sladili) in v farmaciji. Čeprav ni tako sladek kot saharin ali aspartam, je vseeno zaželeno sladilo, saj ob običajnih koncentracijah nima grenkega priokusa. Je stabilen tako pri nizkih kot visokih temperaturah in ne spreminja konzistence raztopin (O'Brien Nabors, 2011).

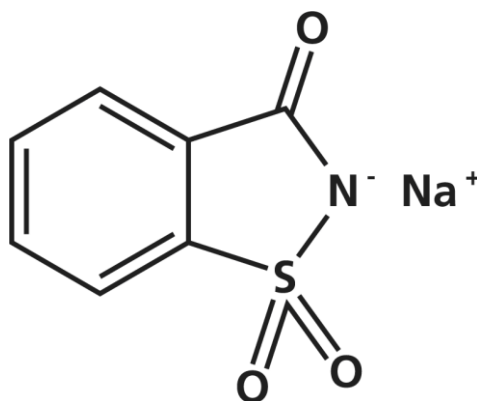


Slika 4 Strukturna formula natrijevega ciklamata (en.wikipedia.org)

V črevesju se absorbira le počasi in v manjših količinah (povprečno 37%), preostanek pa mikroorganizmi pretvorijo v cikloheksilamin (pri tem je zanimivo, da imajo posamezniki različno sposobnost pretvarjanja ciklamata v cikloheksilamin), ki se izloči preko urina (Bopp in sod. 1986). V raziskavi s podganami je natrijev ciklamat v koncentracijah 2600 mg/kg telesne teže na dan povzročil tumorje sečnega mehurja pri 10% testnih živali (Price in sod., 1970).

2.1.4 Natrijev saharinat

Natrijev saharinat (Slika 5) je intenzivno, umetno sladilo, ki je 200 do 700 krat slajše od namiznega sladkorja. Po izvoru je ena izmed oblik saharina. Pri višjih koncentracijah ima grenek priokus, zaradi česar se pogosto uporablja v kombinaciji z drugimi sladili.



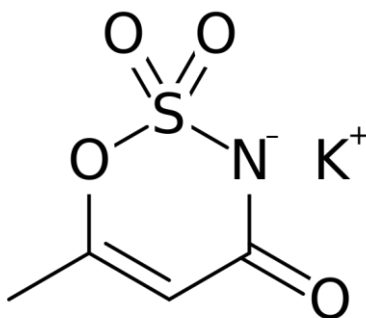
Slika 5 Strukturna formula natrijevega saharinata (commons.wikimedia.org)

Tako študije na miših kot na ljudeh so pokazale, da se natrijev saharinat izloči nespremenjen (Renwick, 1986; Byard in Goldberg, 1973). *In vivo* študije so pokazale (Hicks and Chowaniec, 1977; Hicks in sod., 1975), da je saharinat spodbudnik tvorbe raka na mehurju pri miših. Njegov možni vpliv na človeški mehur je do danes še neznan oz. neraziskan (Nicholsonin in sod., 1988).

2.1.5 Acesulfam-K

Kalijev acesulfam ali acesulfam-K (Slika 6) je intenzivno, sintetično sladilo, ki je približno od 180 do 200 slajše od saharoze. Tališče ima okoli 200 °C in je dobro topen v vodi. Najpogosteje se uporablja v kombinaciji z ostalimi sladili kot so aspartam ali natrijev ciklamat.

Pri poskusih na miših niso odkrili nobenih genotoksičnih učinkov ali vplivov na plodnost in da je acesulfam-K varen za uporabo. Prav tako so poskusi pokazali, da ga podgane, psi, prašiči in ljudje niso sposobni presnavljati, saj se nespremenjen izloči preko urina, kar pomeni tudi, da nima kalorične vrednosti (Toxicological Evaluation of Certain Food Additives, 1988; povzeto po O'Brien Nabors, 2011).



Slika 6 Strukturna formula acesulfama-K (en.wikipedia.org)

2.2 Črevesna mikrobiota človeka

Mikrobiom opisuje skupek vseh mikroorganizmov, ki naseljujejo določen ekosistem in jih s skupnim imenom imenujemo mikrobiota. Človeška črevesna mikrobiota je izredno pestra, saj v vsakem posamezniku živi okrog 10^3 ali več različnih vrst mikrobnih simbiotov, skupno število njihovih celic pa presega skupno število človekovih celic za 100 krat.

V mikrobioti prebavnega trakta, predvsem debelega črevesa, popolnoma prevladujejo predstavniki dveh bakterijskih debel. To so po Gramu pozitivne bakterije iz debla *Firmicutes* in po Gramu negativne bakterije iz debla *Bacteroidetes*. V črevesju je prisotnih še mnogo predstavnikov manj zastopanih mikrobnih skupin, ki pa imajo zelo pomembno vlogo v določenih procesih (Avguštin, 2015). *Lactobacilli* npr. stimulirajo metabolizem s proizvodnjo določenih vitaminov (folna kislina) ter encimov (npr. laktaza), vzdržujejo ravnovesje celotne črevesne mikroflore ter nadzorujejo rast črevesju škodljivih mikroorganizmov (Denev, 2006).

Presnovna dejavnost človeške mikrobiote igra ključno vlogo pri vzdrževanju črevesne homeostaze in uravnavanju fizioloških procesov po telesu (Avguštin, 2015). Znano je, da je zdrava črevesna mikrobiota na sploh v veliki meri odgovorna za zdravje gostitelja (Jandhyala in sod., 2015). Spremembe v črevesni mikrobioti so povezali s številnimi boleznimi kot so kronično vnetje črevesja (Frank in sod., 2007), glukozna intoleranca (Suez in sod., 2014) ter debelost (Ley in sod., 2006).

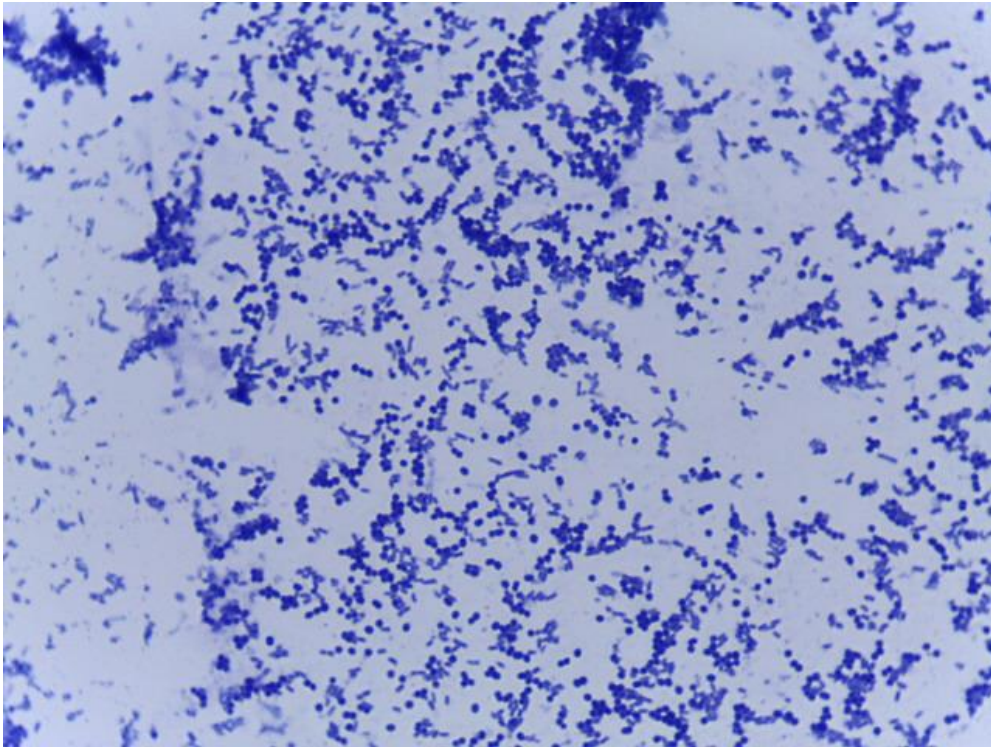
Sestava in delovanje črevesne mikrobiote sta v veliki meri odvisna od prehrane. Tako lahko nepravilno prehranjevanje vpliva na razvoj številnih, s črevesno mikrobioto povezanih bolezni (Cleasson in sod., 2012; Muegge in sod., 2012).

2.3 Delovni mikroorganizmi

2.3.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli (Slika 7) je paličasta po Gramu negativna bakterija, velika 1,1 do 1,5 μm x 2,0 do 6,0 μm . Je fakultativen anaerob in kemoorganotrof, ki optimalno raste pri 37 °C. Živi v prebavilu ljudi in toplokrvnih živali, kjer je del normalne črevesne mikrobiote. Vloga *E. coli* v črevesju je sintetiziranje vitamina K in vitaminov B ter varovanje ekološke niše pred patogenimi bakterijami.

Bakterijsko vrsto je leta 1885 odkril nemški bakteriolog Theodor Escherich. Takrat jo je poimenoval *Bacillus coli commune*. Kasneje so na čast odkritelju, rod *Bacterium* preimenovali v rod *Escherichia*. Omenjen rod uvrščamo v družino *Enterobacteriaceae* (Žgur-Bertok in Starčič Erjavec, 2009, str. 11).

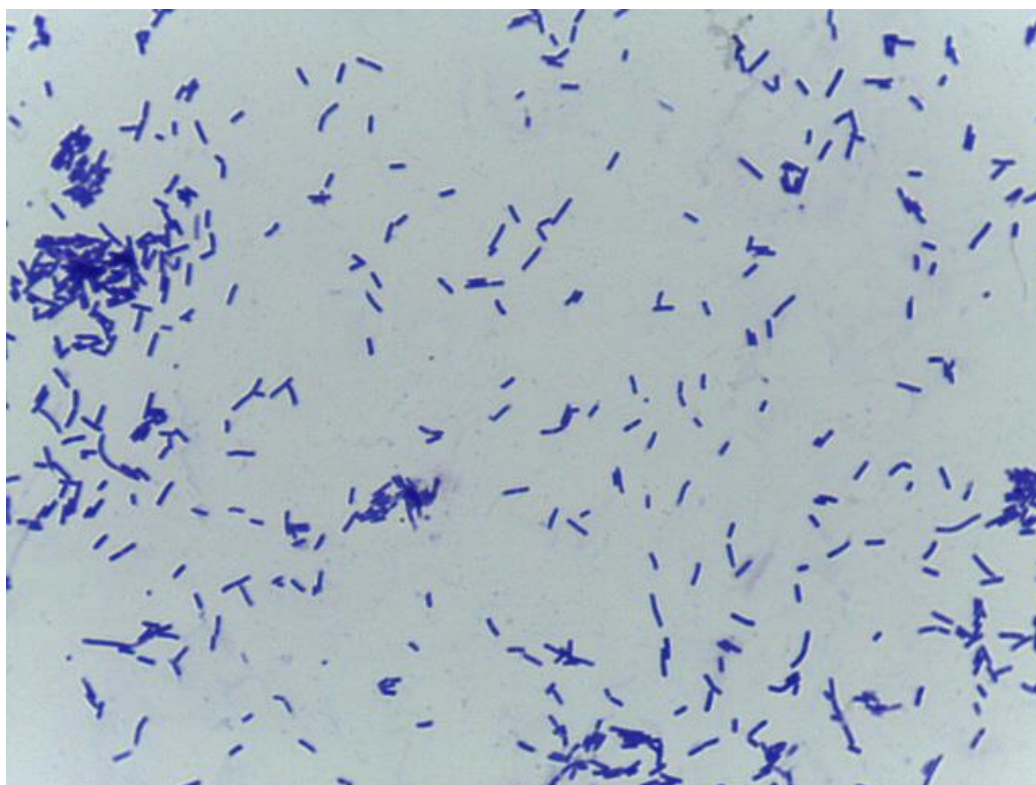


Slika 7 *Escherichia coli* pri 1000x povečavi obarvana z metilenskim modrilom (lasten vir)

2.3.2 *Lactobacillus plantarum*

Lactobacillus plantarum (Slika 8) je paličasta, Gram pozitivna bakterija, ki se nahaja v našem prebavnem sistemu in ga spodbuja k zdravemu delovanju. Njene naloge so proizvodnje določenih vitaminov (folna kislina) ter encimov (npr. laktaza), vzdrževanje ravnovesja celotne črevesne mikroflore ter nadzorovanje rasti črevesju škodljivih mikroorganizmov (Denev, 2006).

L. plantarum iz človeške črevesne sluznice je pri podganah pokazal izboljšanje stene sluznice, stanja jeter, imunološkega stanja sluznice in zmanjšanje vnetja sluznice. V človeku lahko *L. plantarum* poveča koncentracijo karboksilnih kislin v blatu in povzroči zmanjšanje napihnjenosti trebuha pri bolnikih s črevesnimi boleznimi. Prav tako lahko zmanjša koncentracijo fibrinogena³ v krvi. Organizem ne deluje le na bakterijsko floro črevesne sluznice, ampak lahko vpliva tudi na imunsko obrambo gostitelja (Molin, 2001).



Slika 8 *Lactobacillus plantarum* pri 1000x povečavi obarvan z metilenskim modrilom
(lasten vir)

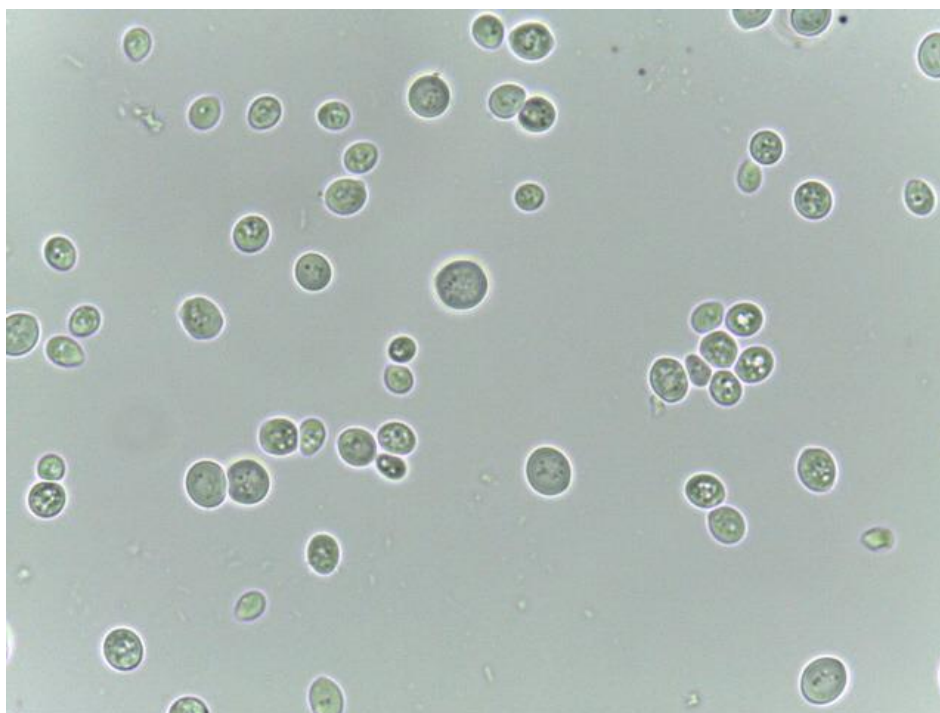
V prehrani najdemo *L. plantarum* v fermentiranih živilih rastlinskega izvora. Njej sorodni organizmi kot so npr. *L. rhamnosus* in *L. paracasei* pa nahajajo v mlečnih izdelkih (Molin, 2001).

³ Protein, ki nastaja v telesu in ima pomembno vlogo pri strjevanju krvi

2.3.3 *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae oz. pekovska kvasovka je enocelična gliva. Celice (Slika 9), ki v premeru znašajo 5 do 10 μm , so navadno sferične, občasno tudi elipsoidne ali cilindrične oblike (Feldmann, 2010).

Pod ugodnimi pogoji se kvasovke razmnožujejo z delitvijo ali brstenjem. Če celica kvasovke pride v neugodne pogoje, to je suša, mraz, pomanjkanje hrane ali dušika, sporulira (Horvat 2000, str. 26).



Slika 9 *Saccharomyces cerevisiae* pri 1000x povečavi (lasten vir)

Zmožne so anaerobne in aerobne rasti. Pri anaerobnih pogojih lahko oksidirajo sladkorje in jih pretvorijo v etanol in ogljikov dioksid. Pomembno vlogo pri rasti kvasovk imajo minerali. Podobno kot pri drugih celicah, delovanje celice ne bi potekalo brez makroelementov magnezija in kalija. Mikroelementi, kot so Ca, Fe, Ni, Ag, Li itd., ki se v celici pojavijo v večji

koncentraciji kot 100 μ M pa na kvasovke delujejo toksično. (Walker, 1996).

3. MATERIALI IN METODE DE LA

3.1 Materiali

3.1.1 Delovni mikroorganizmi

V poskusih smo uporabljali:

- sev bakterije *Escherichia coli* (Sigma EC1)
- sev bakterije *Lactobacillus plantarum*(ATCC, 14917)
- kvasovko *Saccharomyces cerevisiae*, ki smo jo pridobili iz suhega kvasa za peko (Dolceta)

3.1.2 Zaščitna oprema

- zaščitne rokavice za enkratno uporabo
- zaščitna halja

3.1.3 Kemikalije

- destilirana voda
- tekoč hranilni medij BHI (brain heart infusion)
- tekoč hranilni medij Bushnell Haas Broth
- agar
- pepton
- kvasni ekstrakt
- D-glukoza
- kuhinjska sol (NaCl)
- bromtimol modro
- dikalijev fosfat
- parafinsko olje
- 96,0% etanol

- steviol glikozid (Stevia)
- ksilitol (Vitamei)
- eritritol (Sukrin)
- natrijev ciklomat (Fibkomerc)
- natrijev saharin (Fibkomerc)
- acesulfam-K (Fibkomerc)

3.1.4 Laboratorijski pribor

- erlenmajerice (250mL)
- čaše (100mL, 500mL, 1000mL)
- merilni valj (100mL, 1000mL)
- epruvete (16 X 160 mm)
- cepilna zanka (eza)
- filtrirni nastavki za brizge
- injekcijska brizgalka (20 mL)
- kivete (Semi mikro, Ratiolab)
- avtomatske pipete s pripadajočimi nastavki LLG Micropipette (10 do 100 μ L, 100 do 1000 μ L, 1 do 10 mL)
- kapalka
- kovinska spatula
- sterilna plastična posoda

3.1.5 Laboratorijske aparature

- tehtnica (Kern)
- inkubator (Binder GmbH)
- avtoklav (CertoClav CVEL 12 LGS (LGA, Nurnberg))
- spektrofotometer UV/VIS (Vernier)
- laminarij - mikrobiološka zaščitna komora (MC-NC, Iskra PIO)
- vibracijski mešalnik za epruvete (Phoenix)
- grelna plošča (Kern)

- magnetno mešalo (JEIO TECH)
- elektronski termometer (Checktemp 1 by Hanna)
- prenosni računalnik s programom Logger Pro (Asus)

3.2 Metode dela

3.2.1 Priprava 10% založnih raztopin sladil in glukoze

10% založne raztopine posameznih sladil smo pripravili po naslednjem receptu:

Sladilo	5g
Destilirana voda	do 50 mL

V čašo odmerimo 5 g sladila ter dolijemo 40 mL destilirane vode. Mešamo, dokler se sladilo ne raztopi. Nato raztopino zaradi natančnosti prelijemo v merilni valj in dolijemo destilirano vodo do 50 mL. Raztopine nato v sterilne posode prefiltriramo s filtri za sterilizacijo.

3.2.2 Priprava gojišč

Gojišče BHI (za heterotrofne bakterije) pripravimo po navodilih na embalaži gojišča:

Brain Heart Infusion	37 g
Destilirana voda	do 1000 mL

V čašo nasujemo 37 g hranilnega medija, dolijemo 500 mL destilirane vode ter mešamo, dokler se hranilni medij popolnoma ne raztopi. V merilnem valju dolijemo vodo do 1000 mL. Nato prelijemo v čašo in ponovno premešamo. Medij nalijemo v epruvete ter avtoklaviramo 15 min pri 121 °C. Ko se gojišče ohladi, dodamo 10% raztopino sladila.

Gojišče YEPD (za glive) pripravimo po naslednjem postopku:

Kvasni ekstrakt	10 g
Pepton	20 g
D-glukoza	20 g

Destilirana voda do 1000 mL

Vse sestavine nasujemo v čašo ter dolijemo 500 mL destilirane vode. Mešamo, dokler se vse sestavine popolnoma ne raztopijo. Vse skupaj prelijemo v merilni valj in dolijemo destilirano vodo do 1000 mL, nato pa prelijemo nazaj v čašo in ponovno premešamo. Medij nalijemo v epruvete ter avtoklaviramo 15 min pri 121 °C. Ko se gojišče ohladi, aseptično dodamo 10% raztopino sladila.

Bushnell Haas Broth pripravimo po navodilih na embalaži:

BHB 3,25 g
Destilirana voda do 1000 mL

V čašo nasujemo 3,25 g Bushnell Haas Broth, dolijemo 500 mL destilirane vode ter mešamo, dokler se hranilni medij popolnoma ne raztopi. Vse skupaj prelijemo v merilni valj in dolijemo destilirano vodo do 1000 mL. Nato prelijemo v čašo in ponovno premešamo. Medij nalijemo v epruvete ter avtoklaviramo 15 min pri 121 °C. Ko se gojišče ohladi, dodamo 10% raztopino sladila. Hranimo pri 8 °C do uporabe.

Hugh in Leifsonov OF medij pripravimo po naslednjih navodilih:

Pepton 2,00 g
NaCl 5,00 g
Sladilo 10,00 g
Bromtimol modro 0,03 g
Agar 3,00 g
Dikalijev fosfat (K_2HPO_4) 0,30 g
Destilirana voda do 1000 mL

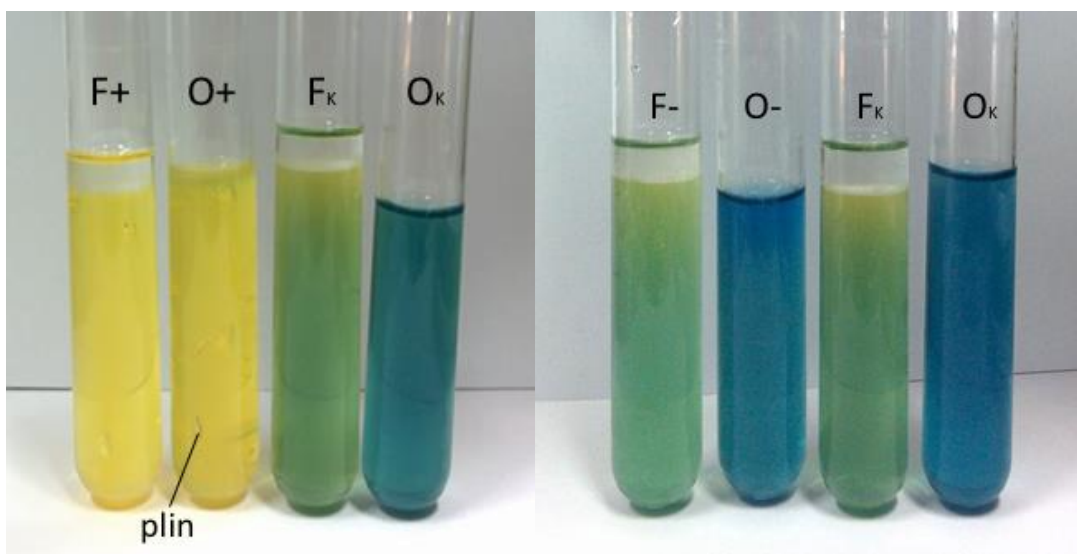
V čašo odmerimo vse sestavine razen agarja, dolijemo 500 mL destilirane vode ter mešamo, dokler se vse sestavine ne raztopijo. Vse skupaj prelijemo v merilni valj in dolijemo destilirano vodo do 1000 mL. Nato prelijemo v čašo in ponovno premešamo. Gojišče razdelimo v manjše čaše ter dodamo sladila. Z dodajanjem 0,1M NaCl oz. NaOH uravnamo pH vseh raztopin na 7,2. Nato dodamo še preračunano količino agarja ter ga s segrevanjem raztopimo. Gojišče nalijemo v epruvete in na polovico epruвет nalijemo 1 mL parafinskega olja. Gojišča prekuhavamo 30 min namesto avtoklaviranja, da ne uničimo sladil.

3.2.3 Priprava prekonočnih kultur

Iz posamezne plošče čiste kulture mikroorganizmov s cepilno zanko aseptično prenesemo eno kolonijo v 50 mL sterilnega tekočega gojišča (BHI za bakterije, YEPD za kvasovke), dobro premešamo ter inkubiramo za 24 h za bakterije (37 °C) ter 48h za kvasovke (sobna temperatura).

3.2.4 OF (oksidacija – fermentacija) test

V Hugh in Leifsonov OF medij vbodno, z ezo, nacepimo kulturo. Postopek ponovimo za vsako kombinacijo sladila ter kulture. Vse skupaj inkubiramo za 48 h pri 37 °C za bakterije in 24 °C za kvasovke. Če mikroorganizem sladilo razgrajuje, se gojišče obarva iz zelenomodre v rumeno, če sladila ne razgrajuje pa spremembe barve ni (Slika 10). (www.web.bf.uni-lj.si)



Slika 10: Primer OF testa, ko mikroorganizem razgrajuje sladilo po fermentativni in oksidativni poti epruveti F+, O+) s kontrolo FK, OK (na levi) ter primer, ko mikroorganizem sladila ne razgrajuje (na desni) (lasten vir)

3.2.5 Metoda merjenja optične gostote pri 599,9 nm

Za posamezno kombinacijo kulture in sladila v 7 mL Bushnell Haas Broth tekočega gojišča dodamo 10% raztopino sladila. Z avtomatsko pipeto nato dodamo 100 μ L prekonočne kulture mikroorganizma ter premešamo z vibracijskim mešalnikom za epruvete. Za vsako sladilo naredimo 5 ponovitev, pozitivno kontrolo z 1% glukozo in negativno kontrolo z destilirano vodo. Kulture inkubiramo pri 37 °C za bakterije oz. 24 °C za kvasovke za 24 h. Spektrofotometer kalibriramo z Bushnell Haas Broth gojiščem in nato izmerimo optično gostoto posameznih vzorcev pri 599,9 nm. Optično gostoto merimo zaporedno še 3 dni.

3.3 Statistična analiza podatkov

S programom za statistično obdelavo podatkov SPSS smo izvedli poenostavljen generaliziran linearni model, da bi ugotovili statistično pomembnost razlik med posameznimi sladili. P vrednosti kot rezultat te obdelave podatkov so predstavljeni v prilogi (Priloga 1).

4. REZULTATI

4.1 OF (oksidacija – fermentacija) test

Sposobnost metaboliranja smo preverjali s pomočjo OF testa v Hugh in Leifsonov OF mediju, z 1,0% koncentracijo sladila. Rezultate, dobljene po 48 h, smo prikazali v spodnjih tabelah (Tabela 1, 2, 3).

Tabela 1 Sprememba barve ter prisotnost plina v gojišču za OF test pri *Escherichia coli* po 48h

Sladilo	Sprememba barve pri aerobnih pogojih	Prisotnost plina pri aerobnih pogojih	Sprememba barve pri anaerobnih pogojih	Prisotnost plina pri anaerobnih pogojih
Steviol glikozid	+ (rumena)	+	+ (rumena)	+
Ksilitol	-	-	-	-
Eritritol	-	-	-	-
Natrijev ciklomat	-	-	-	-
Natrijev saharinat	-	-	-	-
Acesulfam-K	-	-	-	-
Glukoza	+ (rumena)	+	+ (rumena)	+
Negativna kontrola	-	-	-	-

Tabela 2 Sprememba barve ter prisotnost plina v gojišču za OF test pri *Lactobacillus plantarum* po 48 h

Sladilo	Sprememba barve pri aerobnih pogojih	Prisotnost plina pri aerobnih pogojih	Sprememba barve pri anaerobnih pogojih	Prisotnost plina pri anaerobnih pogojih
Steviol glikozid	+ (rumena)	+	+ (rumena)	+
Ksilitol	-	-	-	-
Eritritol	-	-	-	-
Natrijev ciklamat	-	-	-	-
Natrijev saharinat	-	-	-	-
Acesulfam-K	-	-	-	-
Glukoza	+ (rumena)	+	+ (rumena)	+
Negativna kontrola	-	-	-	-

Tabela 3 Sprememba barve ter prisotnost plina v gojišču za OF test pri *Saccharomyces cerevisiae* po 48 h

Sladilo	Sprememba barve pri aerobnih pogojih	Prisotnost plina pri aerobnih pogojih	Sprememba barve pri anaerobnih pogojih	Prisotnost plina pri anaerobnih pogojih
Steviol glikozid	+ (rumena)	+	+ (rumena)	+
Ksilitol	-	-	-	-
Eritritol	-	-	-	-

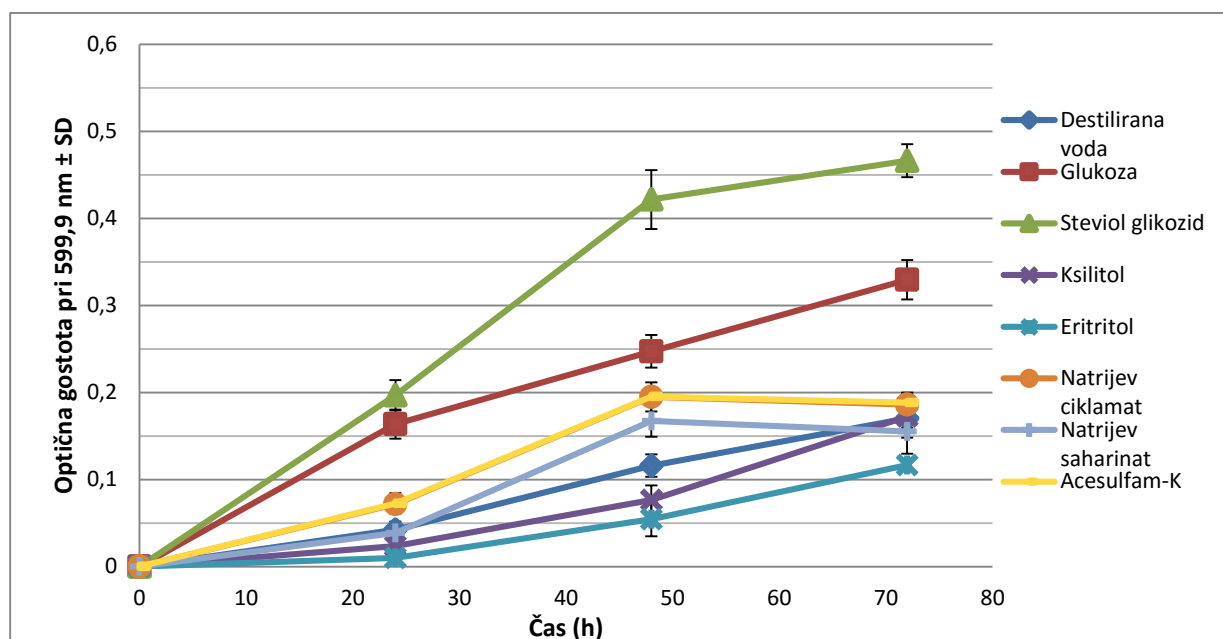
Natrijev ciklamat	-	-	-	-
Natrijev saharinat	-	-	-	-
Acesulfam-K	-	-	-	-
Glukoza	+ (rumena)	+	+ (rumena)	+
Negativna kontrola	-	-	-	-

Pri steviol glikozidu je pri vseh gojiščih prišlo do spremembe barve iz modrozeleno v rumeno. (Tabela 1,2,3). V obeh gojiščih so bili vidni tudi mehurčki, kar pomeni, da so vsi mikroorganizmi tako fermentativno kot oksidativno sposobni mebolirati steviol glikozid, pri čemer se sprošča plin. Do spremembe barve ni prišlo v nobenem od ostalih gojišč, razen pri pozitivni kontroli. To pomeni, da mikroorganizmi niso sposobni metabolirati nobenega od preostalih sladil.

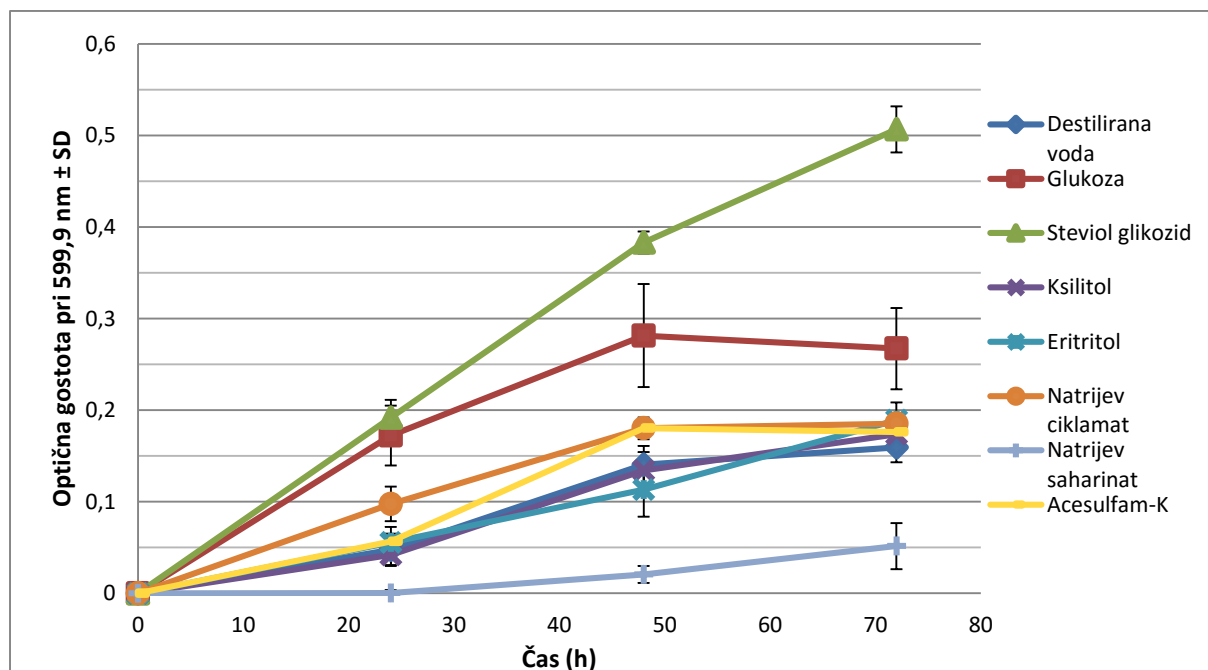
4.2 Ocenjevanje uspešnosti rasti kultur na gojiščih s sladilom kot edinimi virom ogljika

Rast treh mikroorganizmov smo spremljali v tekočem definiranem BHB gojišču z 1,0% koncentracijo sladil kot edinim virom ogljika. Optično gostoto pri 599,9 nm smo merili vsakih 24 h za 72 h. Pri tem dobljeni rezultati so predstavljeni v spodnjih grafih (Graf 1, 2, 3).

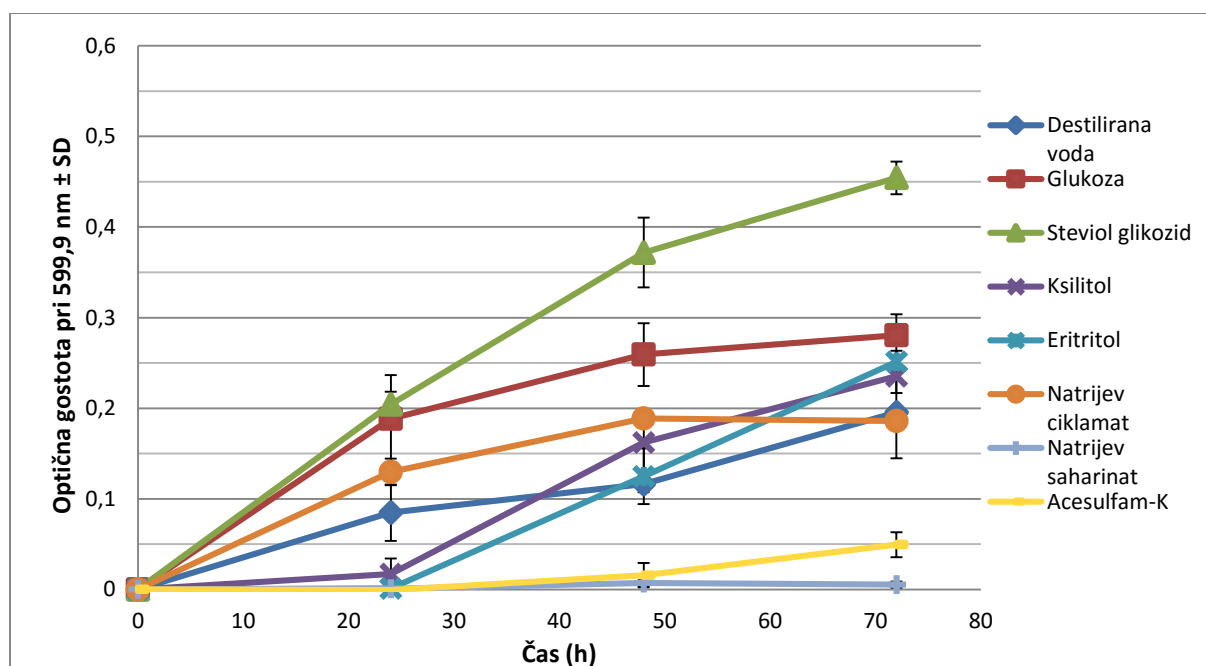
Graf 1 Optična gostota pri 599,9 nm \pm SD v odvisnosti od časa (h) pri *Escherichia coli* na gojišču z 1% sladilom kot edinim virom ogljika



Graf 2 Optična gostota pri 599,9 nm \pm SD v odvisnosti od časa (h) pri *Lactobacillus plantarum* na gojišču z 1% sladilom kot edinim virom ogljika



Graf 3 Optična gostota pri 599,9 nm \pm SD v odvisnosti od časa (h) pri *Saccharomyces cerevisiaena* gojišču z 1% sladilom kot edinim virom ogljika



Pri steviol glikozidu je bila optična gostota pri vseh treh mikroorganizmih povprečno 38,3% večja od glukoze (razlika je pri vseh treh mikroorganizmih statistično pomembna $p < 0,05$). S tega lahko sklepamo, da bakterije steviol glikozid lahko uporabijo kot edini vir ogljika. Pri glukozi se je po 48 h začela vzpostavljati stacionarna faza rasti, kar je vidno po manjšem naklonu krivulje na grafu (Graf 1, 2, 3), pri steviol glikozidu pa ta ni bila tako očitno vidna.

Rast pri ksilitolu je bila pri *Escherichia coli* in *Lactobacillus plantarum* skoraj enaka kot pri destilirani vodi (Graf 1 in 2) (razlika ni statistično pomembna $p > 0,05$), kar pomeni, da ga ta dva mikroorganizma nista sposobna uporabiti kot edini vir ogljika. Pri *Saccharomyces cerevisiae* je bila končna optična gostota 16,1% nižja od optične gostote kultur pri glukozi (Graf 3) ($P > 0,05$), a ne nižja kot pri destilirani vodi ($P < 0,05$). Pri tem je bila rast na začetku skoraj ničelna, po približno 24 h pa je hitro narasla. Iz tega lahko sklepamo, da *S. cerevisiae* ksilitol lahko uporabi kot edini vir ogljika.

Rezultati pri eritriitolu so bili zelo podobni tistim pri ksilitolu. Optična gostota pri *Lactobacillus plantarum* je bila vseskozi podobna tisti destilirane vode (Graf 2) ($p > 0,05$), kar

pomeni da *L. plantarum* eritritola ne more uporabiti kot vir ogljika. Pri bakteriji *Escherichia coli* je bila optična gostota po 72 h približno 31,6% nižja kot pri destilirani vodi (Graf 1) ($p < 0,05$), kar ne kaže le na to, da eritritola mikroorganizem ne more metabolirati, temveč tudi na zaviralni učinek eritritola na uporabo glukoze. To lahko vidimo po dinamiki rasti, ki je zelo podobna tisti pri kulturah z destilirano vodo kot virom ogljika. Pri *S. cerevisiae* je eritritol sposoben uporabiti kot edini vir ogljika, vendar je rast pri tem slabša kot pri glukozi, saj je bila optična gostota kulture pri eritritolu po 72 h (Graf 3) za približno 10,7% nižja kot pri glukozi. Vendar pa ta razlika ni statistično pomembna ($p > 0,05$).

Optična gostota kultur z natrijevim ciklamatom kot edinim virom ogljika se je pri vseh treh mikroorganizmih gibala nad optično gostoto kultur z destilirano vodo in pod optično gostoto kultur z glukozo (Graf 1, 2, 3). Po 48 h je rast vseh treh mikroorganizmov prešla v stacionarno fazo, končna optična gostota po 72 h pa je bila podobna optični gostoti kultur z destilirano vodo kot virom ogljika ($p > 0,05$). S tega lahko sklepamo, da mikroorganizmi natrijevega ciklamata ne morejo uporabiti kot vir ogljika.

Optična gostota kultur z natrijevim saharinatom kot edinim virom ogljika se je pri *Escherichia coli* (Graf 1) gibala okoli optične gostote kultur z destilirano vodo, se nekoliko dvignila in na koncu spet spustila na nivo kultur z destilirano vodo ($p > 0,05$). Iz tega lahko sklepamo, da *Escherichia coli* natrijevega saharinata ni sposobna metabolirati, a ima ta vseeno določen vpliv na rast. Pri *Lactobacillus plantarum* ter *Saccharomyces cerevisiae* je bila optična gostota skoraj enaka nič (Graf 2, 3), ter se je začela počasi dvigati šele po 48 h, kar ne kaže le na to, da mikroorganizmi natrijevega saharinata ne morejo metabolirati, temveč tudi na zaviralni učinek natrijevega saharinata na rast teh dveh mikroorganizmov.

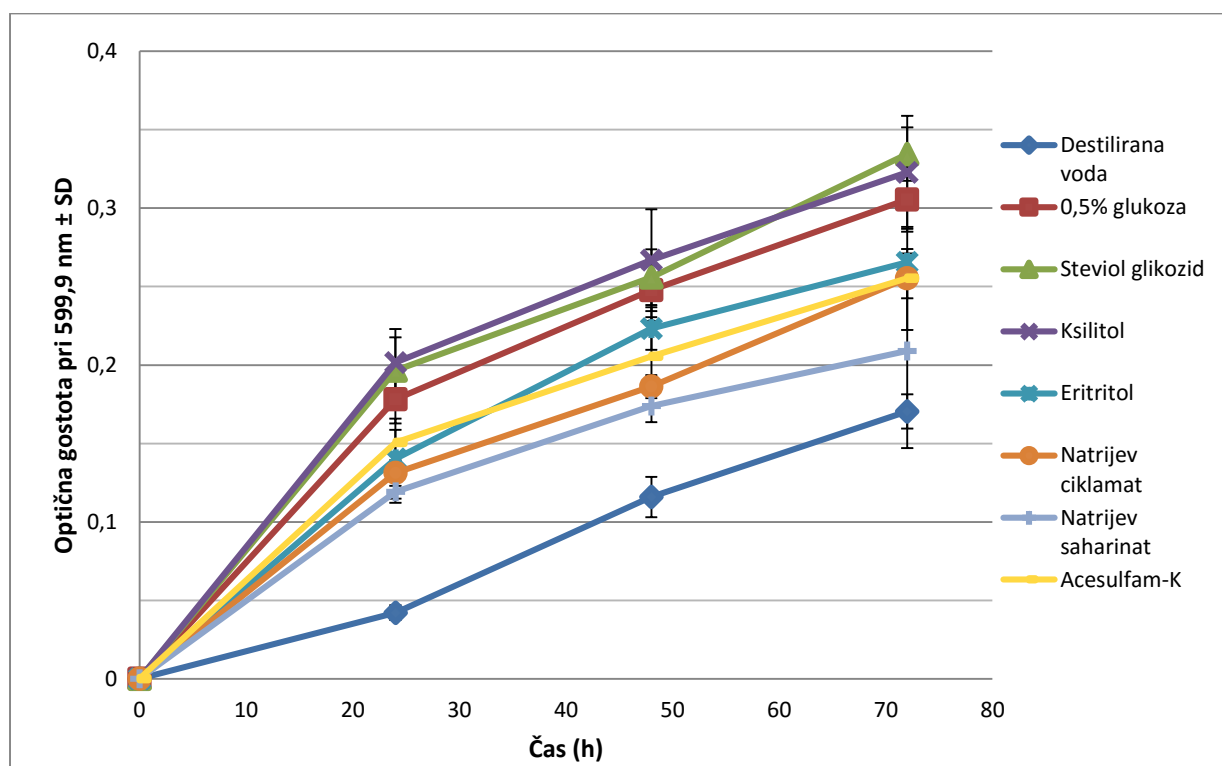
Pri kulturah z acesulfamom-K kot edinim virom ogljika je bila optična gostota za *Escherichia coli* (Graf 1) vseskozi zelo podobna tisti pri kulturah z natrijevim ciklamatom - optična gostota po 72 h je bila približno enaka optični gostoti kultur z destilirano vodo ($p > 0,05$). Pri *Lactobacillus plantarum* je bila rast na začetku nekoliko počasnejša kot pri *L. plantarum* z natrijevim ciklamatom (Graf 2), po 48 h pa se je dvignila na raven rasti kultur z destilirano vodo ($p > 0,05$). Optična gostota *Saccharomyces cerevisiae* je bila skoraj ničelna, kar kaže na

inhibitorni učinek. Iz tega lahko sklepamo, da mikroorganizmi acesulfama-K niso sposobni uporabiti kot edini vir ogljika.

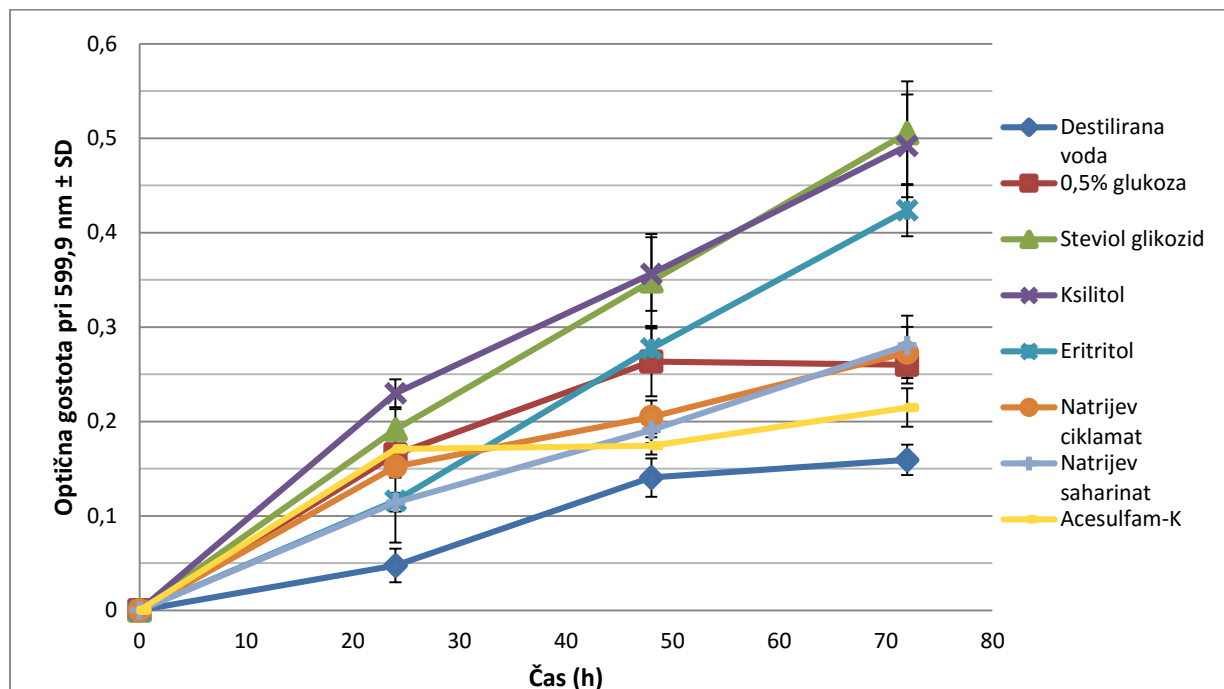
4.3 Ocenjevanje uspešnosti rasti kultur na gojišču z dodanim sladilom

Rast treh mikroorganizmov smo spremljali v tekočem BHB gojišču z 0,5% koncentracijo sladila in 0,5% koncentracijo glukoze kot virom ogljika. Optično gostoto pri 599,9 nm smo merili vsakih 24 h za 72 h. Pri tem dobljeni rezultati so predstavljeni v spodnjih grafih (Graf 4, 5, 6).

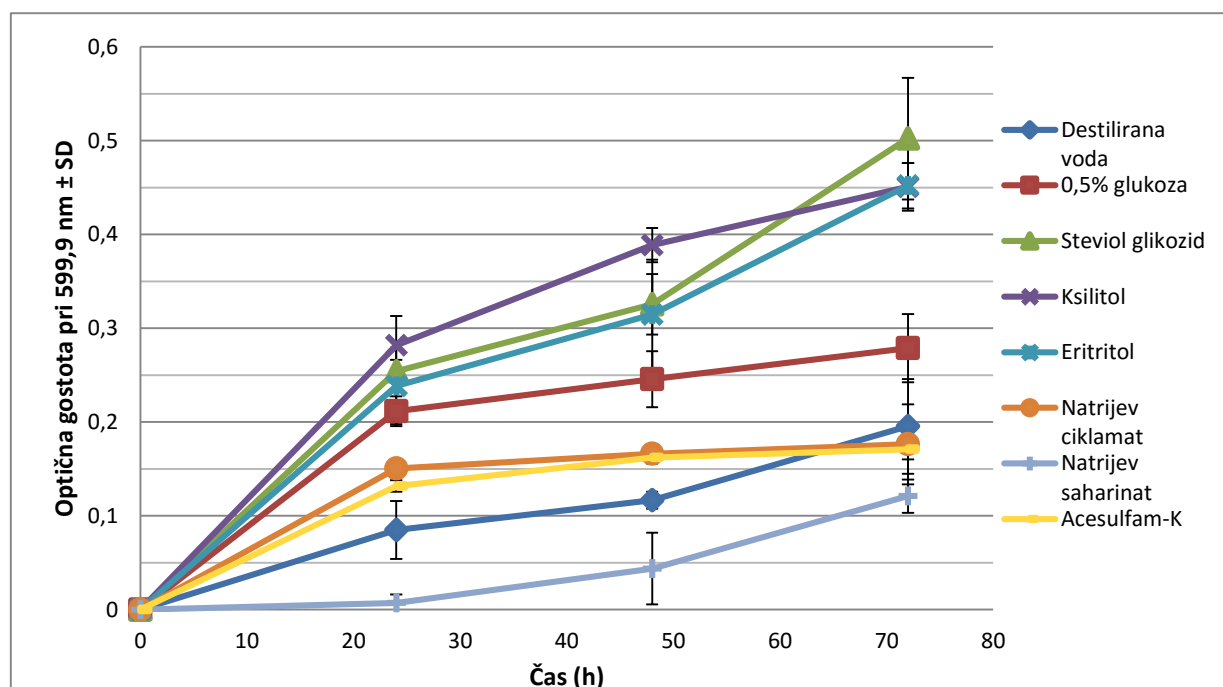
Graf 4 Optična gostota pri 599,9 nm \pm SD v odvisnosti od časa (h) pri *Escherichia coli* na gojišču z 0,5% sladila in 0,5% glukoze oz. destilirano vodo kot virom ogljika



Graf 5 Optična gostota pri 599,9 nm \pm SD v odvisnosti od časa (h) pri *Lactobacillus plantarum* na gojišču z 0,5% sladila in 0,5% glukoze oz. destilirano vodikot virom ogljika



Graf 6 Optična gostota pri 599,9 nm \pm SD v odvisnosti od časa (h) pri *Saccharomyces cerevisiae* na gojišču z 0,5% sladila in 0,5% glukoze oz. destilirano vodo kot virom ogljika



Optična gostota kultur *Escherichia coli* z dodanim steviol glikozidom in glukozo (Graf 4) je imela ves čas le rahlo večjo optično gostoto kot kulture z 0,5% glukozo ($p > 0,05$). Iz tega sklepamo, da steviol glikozid ob prisotnosti glukoze ne vpliva na rast *Escherichia*. Pri *Lactobacillus plantarum* ter *Saccharomyces cerevisiae* (Graf 5, 6) sta mikroorganizma rasla veliko bolje v prisotnosti mešanice glukoze ter steviol glikozida ($p < 0,05$) kot pri sami glukozii. To pomeni, da steviol glikozid rast *Lactobacillus plantarum* ter *Saccharomyces cerevisiae* v prisotnosti glukoze pospeši.

Ksilitol v prisotnosti glukoze na rast *Escherichia coli* (Graf 4) ni vplival, saj je bila optična gostota kultur skoraj enaka tistim, ki so rasle na 0,5% glukozii ($p > 0,05$). Rast pri *Lactobacillus plantarum* ter *Saccharomyces cerevisiae* (Graf 5, 6) je bila pospešena in končna optična gostota je bila primerljiva s tisto od kultur z mešanico steviol glikozida ter glukoze ($p > 0,05$). Iz tega lahko sklepamo, da ob prisotnosti glukoze ksilitol rast *Lactobacillus plantarum* ter *Saccharomyces cerevisiae* pospeši.

Pri *Escherichia coli* (Graf 4) je bila optična gostota pri kulturah z eritriolom in glukozo po 72 h 13,1% nižja kot pri 0,5% glukozii ($p > 0,05$), iz česar lahko sklepamo, da eritriol na rast *E. coli* vpliva zaviralno. Pri *Saccharomyces cerevisiae* ter *Lactobacillus plantarum* (Graf 5, 6) je bila rast najprej podobna rasti pri 0,5% glukozii. Nato se je, ko se je pri glukozii že pojavila stacionarna raven rasti, rast pri kombinaciji eritriola ter glukoze še nadaljevala (pri *L. plantarum* se to zgodi po 24 h, pri *S. cerevisiae* po 48 h). Iz tega sledi, da eritriol ob prisotnosti glukoze rast *Lactobacillus plantarum* ter *Saccharomyces cerevisiae* pospeši.

Natrijev ciklamat v kombinaciji z glukozo na *Escherichia coli* vpliva zaviralno (Graf 4), saj je bila optična gostota kultur s kombinacijo sladila in glukoze po 72 h je bila 16,4% nižja kot pri kulturah z 0,5% glukozo ($p < 0,05$). Končna optična gostota *L. plantarum* (Graf 5) po 72 h je bila enaka pri mešanici sladila in glukoze ter 0,5% glukoze ($p > 0,05$). To nakazuje, da natrijev ciklamat na rast *L. plantarum* ne vpliva. Optična gostota *S. cerevisiae* s kombinacijo natrijevega ciklamata in glukoze (Graf 6) je najprej naraščala, že po 24 h pa se je vzpostavila

stacionarna faza rasti. Po 72 h je bila ta optična gostota približno enaka tisti od kultur z destilirano vodo ($p > 0,05$), kar pomeni, da natrijev ciklamat na rast *S. cerevisiae* ne vpliva.

Natrijev saharinat v kombinaciji z glukozo ima tako na *Escherichia coli* kot na *Saccharomyces cerevisiae* zaviralni učinek, saj je bila končna optična gostota teh dveh kultur z natrijevim saharinatom manjša kot pri kulturah z destilirano vodo ($p < 0,05$) (Graf 4, 6). Pri *Escherichia coli* je bila dinamika rasti enaka dinamiki rasti pri kulturah z glukozo, pri *Saccharomyces cerevisiae* pa je rast najprej skoraj ničelna, po 24 h pa se začne počasi večati. Pri *L. plantarum* je bila rast na začetku sicer nižja kot pri kulturah z glukozo (Graf 5), vendar je bila končna optična gostota po 72 h enaka tisti pri kulturah z glukozo ($p > 0,05$). To pomeni, da natrijev saharinat na rast *L. plantarum* ne vpliva.

Acesulfam-K je izkazal zaviralni učinek na rast *Escherichia coli* ter *Saccharomyces cerevisiae* (Graf 4, 6). Rast se je pri obeh mikroorganizmih skoraj popolnoma prekrivala z rastjo pri kulturah z natrijevim ciklamatom ($p > 0,05$). Dinamika rasti je bila pri *E. coli* ves čas podobna kot pri glukozni. Pri *S. cerevisiae* pa je po 24 h dosegla stacionarno fazo. Podobna dinamika rasti kot za *S. cerevisiae* je bila vidna tudi pri *L. plantarum* (Graf 5), kjer acesulfam-K, prav tako kaže zaviralni učinek na rast.

5. DISKUSIJA

Rezultati OF testa so pokazali, da so vsi mikroorganizmi sposobni tako oksidativno kot fermentativno metabolirati steviol glikozid (Tabela 1, 2, 3). To se sklada z našima ostalima poskusoma in raziskavami drugih (Renwick in Tarka, 2008). Ta del našo prvo hipotezo potrjuje.

To, da nobeden od mikroorganizmov ni sposoben metabolirati niti ksilitola niti eritritola, se z našo hipotezo in ostalima dvema poskusoma ne sklada. *Sacchomyces cerevisiae* naj bi bil vsaj v manjših količinah sposoben metabolirati sladili (Hiele in sod., 1993; Richard in sod.,

1999; Bettiga in sod., 2008). Eden od možnih razlogov za dobljene rezultate bi lahko bil encim ksilitol dehidrogenaza, ki sodeluje pri razgradnji ksilitola ter eritritola (pri eritritolu encim deluje kot L-eritruloza reduktaza (www.kegg.com)) in ga je *S. cerevisiae* sposoben sintetizirati (www.orenza.u-psud.fr; Richard in sod., 1999). Ker mikroorganizem potrebuje nekaj časa, da začne proizvajati encim, saj ta ni prisoten ves čas (kar je vidno tudi pri dinamiki rasti poskusa ocenjevanja rasti mikroorganizmov s sladilom kot edinim virom ogljika (Graf 3), kjer optična gostota začne počasi naraščati šele po 24 h), je možno, da 48 h, kolikor je trajal naš poskus, ni bilo dovolj za vidne spremembe barve pH indikatorja. Za druga dva mikroorganizma se ti rezultati skladajo z našo hipotezo in ostalima poskusoma.

Natrijevega ciklamata, natrijevega saharinata ter acesulfama-K ni sposoben metabolirati nobeden od mikroorganizmov, kar se sklada z našima preostalima poskusoma ter rezultati drugih raziskav (Byard in Golberg, 1973; Drasar in sod., 1972; Zheng in Sarr, 2012). Ti rezultati potrjujejo našo prvo hipotezo.

Največja pomanjkljivost našega OF testa, ki smo jo opazili, je bila, da se je pri anaerobnem gojišču (prekritim s parafinskim oljem) že pri sterilizaciji rahlo spremenila barva gojišča (Slika 10). Poskus smo ponovili 5 krat v različnih variacijah in vedno dobili isti rezultat. Tako nismo mogli direktno primerjati aerobnih in anaerobnih gojišč, temveč le barvna odstopanja od kontrole, ki smo jih potem uporabili za primerjavo aerobnih in anaerobnih gojišč. Druga pomanjkljivost je bil inkubacijski čas, ki je znašal 48 h, kar je (glede na dobljene rezultate) premalo. To je vidno pri poskusu merjenja sposobnosti mikroorganizmov za uporabo sladila kot edini vir ogljika (Graf 3). Tam je po 24 h rast *S. cerevisie* skoraj ničelna in se prav začne šele pri 48 h. Na podlagi teh podatkov lahko utemeljeno trdimo, da bi moral inkubacijski čas za ta poskus trajati najmanj 72 h. Ta časovni interval bi bil glede na dobljene podatke najbolj primeren za pridobitev uporabnih in kvalitetnih podatkov.

Vseeno omenjene pomanjkljivosti niso bistveno vplivale na rezultate, saj je bila večina le teh v skladu s hipotezo. Tako lahko na podlagi zgoraj omenjenih rezultatov našo prvo hipotezo potrdimo.

V naslednjem delu smo ugotavljali sposobnost mikroorganizmov, da uporabijo sladila kot edini vir ogljika. Rezultati kažejo, da so vsi mikroorganizmi sposobni uporabiti steviol glikozid kot vir ogljika. Z dinamike rasti na grafih (Graf 1, 2, 3) je razvidno, da je rast mikroorganizmov bolj enakomerna kot pri glukozi in se stacionarna faza rasti ne pojavi. Iz tega bi lahko sklepali, da razgradnja steviol glikozida poteka postopoma, pri čemer se sproščena glukoza sproti porablja. Raziskave (Rowland in sod., 1986; povzeto po Renwick in Tarka, 2008; Koyama in sod., 2003) so pokazale, da človeška črevesna mikrobiota steviol glikozid hidrolizira na glukozo ter steviol, ki ga ne more dalje razgraditi (Koyama in sod., 2003). To se sklada z rezultati naših ostalih poskusov in z drugo hipotezo.

Ksilitola ter eritritola *Escherichia coli* in *Lactobacillus plantarum* nista sposobna uporabiti kot vir ogljika, kar se sklada tudi s našimi rezultati OF testa ter rezultati študije Eddwardsona in sod. (1977), ki so pokazali, da ta dva mikroorganizma ksilitola nista sposobna metabolirati. *Saccharomyces cerevisiae* je sladilo sposoben uporabiti kot vir ogljika, a je rast pri tem rahlo nižja, kot pri glukozi (Graf 3). 24 urni časovni zamik v rasti lahko, kot že zgoraj omenjeno, razložimo z delovanjem encima ksilitol dehidrogenaza, ki ni prisoten ves čas in ga začne mikroorganizem sintetizirati šele, ko zazna prisotnost ksilitola oz. eritritola. Rezultati se ne skladajo čisto z rezultati OF testa, vendar pa se ujemajo z rezultati preostalega poskusa, ostalimi raziskavami (Richard in sod., 1999) in našo hipotezo.

Rezultati kažejo, da nobeden od treh mikroorganizmov nobenega od treh umetnih sladil ni sposoben uporabiti kot vir ogljika. To je pričakovano, saj jih, glede na rezultate OF testa, niso sposobni metabolirati. Iste ugotovitve so vidne tudi pri drugih raziskovalcih (Buss in sod., 1992; Zheng in Sarr, 2012). Pri *E. coli* in *L. plantarum* je bila rast z natrijevim ciklamatom in acesulfamom-K zelo podobna. Dinamika rasti, ki ni bila podobna tisti pri kulturah z destilirano vodo, kaže, da vplivi na rast vseeno obstajajo. To se sklada tudi z rezultati našega poskusa ugotavljanja vpliva na rast. Podobnost pri vplivu na rast mikroorganizmov je odkril tudi O'Brien Nabors (2011). Natrijev saharinat je na *L. plantarum* ter *S. cerevisiae* izkazal izrazit zaviralni učinek. Dinamika rasti pri *E. coli* pa je bila podobna tisti natrijevega ciklamata in acesulfama-K. Na podlagi teh rezultatov lahko našo drugo hipotezo potrdimo.

Pri poskusu kultur z 0,5% sladila ter 0,5% glukoze kot virom ogljika so bili rezultati naslednji. Steviol glikozid v prisotnosti glukoze rast *Lactobacillus plantarum* ter *Saccharomyces cerevisiae* močno pospešuje. Iz grafa (Graf 5, 6) lahko sklepamo, da oba mikroorganizma kot vir ogljika uporabita tako glukozo, kot steviol glikozid. To je vidno po tem da, ko se rast v prisotnosti 0,5% glukoze ustavi, se pri mešanici še vedno nadaljuje. Na rast *Escherichia coli* steviol glikozid ne vpliva. Možno je, da je bila pri *E. coli* dosežena maksimalna koncentracija substrata, ki ga mikroorganizem lahko porabi naenkrat in za to prisotnost steviol glikozida ni vplivala. Dobljeni rezultati se skladajo tako z rezultati OF testa, kot tudi z rezultati poskusa rasti s sladilom kot edinim virom ogljika. Podobne rezultate so dobili tudi Koyama in sod. (2003).

Ksilitol ima v prisotnosti glukoze na rast *E. coli* enak učinek kot steviol glikozid, nanjo ne vpliva. Ta podatek se sklada z našim predvidevanjem o tem, da je bila najverjetneje dosežena maksimalna koncentracija substrata, saj je bila pri drugih dveh mikroorganizmih rast ob prisotnosti mešanica ksilitola in glukoze pospešena. Pospeševanje rasti za *S. cerevisiae* je logično, saj ga lahko uporablja kot substrat in tako koristi ksilitol ter glukozo hkrati. Pri *L. plantarum* pa je možno, da ksilitol pospešuje razgradnjo oz. porabo glukoze ali ga lahko *L. plantarum* ob prisotnosti glukoze uporabi kot vir ogljika (Almståhl in sod., 2013).

Podoben spodbujevalni vpliv na rast kot pri ksilitolu za *L. plantarum* ter *S. cerevisiae* opazimo tudi pri eritritolu. Ponovno lahko ta vpliv razlagamo kot pri ksilitolu. Na rast *E. coli* v prisotnosti glukoze eritritol vpliva rahlo zaviralno, kar se sklada tudi z rezultati poskusa ocenjevanja sposobnosti rasti s sladilom kot edinim virom ogljika.

Tako natrijev ciklamat kot natrijev saharinat v kombinaciji z glukozo na rast *Escherichia coli* ter *Saccharomyces cerevisiae* vplivata zaviralno. Rasti *Lactobacillus plantarum* natrijev ciklamat ne zavira, natrijev saharinat pa rast zavira le na začetku. Po dinamiki rasti *S. cerevisiae* (Graf 6) je razvidno, da natrijev ciklamat nima zaviralnega učinka takoj, temveč ta v našem primeru nastopi šele po 24 h. Nasprotno ima natrijev saharinat na rast *S. cerevisiae*

začetku močen zaviralni učinek, kasneje pa mikroorganizem prične rasti. To bi lahko pomenilo, da se je mikroorganizem na prisotnost sladila sposoben prilagoditi. Podobne rezultate so v svoji raziskavi dobili tudi Drasar in sodelujoči (1972), skladajo pa se tudi z našim predhodnim poskusom. Ugotovitev se sklada tudi z ugotovitvami Linke in Doyle (1985), ki sta odkrila manjši zaviralni učinek na rast Gram pozitivnih, paličastih bakterij, med katerimi so bili med drugim predstavniki rodu *Lactobacillus*.

Acesulfam-K je izkazal zaviralni učinek na rast *Escherichia coli* ter *Saccharomyces cerevisiae*. Rast se je pri obeh mikroorganizmih skoraj popolnoma prekrivala z rastjo pri kulturah z natrijevim ciklamatom, kar smo opazili tudi že pri prejšnjem poskusu. Dinamika rasti je bila pri *E. coli* ves čas podobna tisti glukoze, med tem, ko je pri *Saccharomyces c.* po 24 h dosegla stacionarno fazo. Podobna dinamika rasti kot za *S. cerevisiae* je bila vidna tudi pri *L. plantarum*, kjer acesulfam-K prav tako kaže zaviralni učinek na rast mikroorganizma. Na podlagi teh rezultatov lahko tretjo hipotezo potrdimo.

Če med seboj primerjamo vplive sladil na rast ob prisotnosti glukoze rast najbolj pospeši steviol glikozid, najbolj pa jo zavirata acesulfam-K ter natrijev saharinat. Steviol glikozid rast *L. plantarum* ter *S. cerevisiae* pospeši, na rast *E. coli* pa ne vpliva. Prav tako rast *L. plantarum* in *S. cerevisiae* pospešita ksilitol in eritritol, na rast *E. coli* pa ne vplivata. Pri umetnih sladilih sta si glede zaviralnega učinka najbolj podobna acesulfam-K ter natrijev ciklamat, katerih zaviralna učinka sta pri *E. coli* ter *S. cerevisiae* skoraj popolnoma enaka ($p < 0,05$). Natrijev saharinat rast zavira pri *E. coli* in *S. cerevisiae* na rast *L. plantarum* pa ne vpliva.

Na rast *E. coli* v prisotnosti glukoze ne vpliva nobeden od mikroorganizmov, rast pa najbolj zavre natrijev saharinat. Rast *L. plantarum* najbolj pospešita steviol glikozid ter ksilitol, najbolj zaviralno pa nanjo vpliva acesulfam-K. Rast *S. cerevisiae* najbolj pospeši steviol glikozid, najbolj pa jo zavre natrijev saharinat. V tej primerjavi vidimo, da imajo sladila naravnega izvora v prisotnosti glukoze večinoma na rast mikroorganizmov spodbujevalni učinek, umetna sladila pa rast večinoma inhibirajo. To potrjuje našo četrto hipotezo, da sladila umetnega izvora na rast mikroorganizmov vplivajo bolj zaviralno kot naravna sladila.

Največja napaka, ki smo jo storili pri metodi merjenja optične gostote je bila, da smo v gojišča dodali inokulat, v katerem smo pripravili prekonočne kulture mikroorganizmov (100 μ L inokulata na 7 mL gojišča, kar je približno 1,4% inokulata). Zaradi tega smo rast pri destilirani vodi vzeli kot izhodišče - ta rast ni posledica delovanja sladila, temveč hranilnih snovi iz inokulata ali pa založnih snovi, ki jih je mikroorganizem nakopičil med rastjo v bogatem gojišču BHI. Bolje bi bilo, da bi mikroorganizme 36 h pred izvedbo poskusa stradali, saj tako ne bi prišlo niti do uporabe hranilnih snovi iz inokulata, niti do uporabe založnih snovi. Vendar pa ta pomanjkljivost vseeno ni pomembno vplivala na rezultate našega poskusa, saj so razlike med optično gostoto kultur z destilirano vodo kot edinim virom ogljika statistično pomembne tudi pri primerjavi z 0,5% glukozo. To pomeni, da ta pomanjkljivost ne vpliva pomembno na rezultate.

Prav tako bi bilo bolje, če bi se kulture ves čas mešale (npr. z magnetnim mešalom), saj bi to zagotovilo bolj enakomerno razporeditev snovi po celotnem gojišču in povečalo dostop kisika. Mi smo kulture vorteksirali le po začetnem dodatku mikroorganizmov in sladil v gojišče ter pred vsako meritvijo, saj je bilo to energijsko in cenovno ugodneje.

Bolj zanesljivo merilo števila mikroorganizmov kot merjenje optične gostote bi bilo štetje kolonij na ploščah, kar bi bilo možno za nadaljevanje poskusa. Vendar je to cenovno, materialno in prostorsko mnogo bolj zahtevna metoda, ki bi bila za nas težko izvedljiva v šolskem laboratoriju.

6. DRUŽBENA ODGOVORNOST

Tema naše raziskovalne naloge in pridobljeni rezultati se nanašajo na osnovna načela družbene odgovornosti. Vsak posameznik zase odloča, katera živila bo užival in katere snovi bo s tem vnašal v svoje telo. Sladila, ki smo jih v naši nalogi testirali, so le začetek dolge liste sladil, ki jih lahko zaužijemo v vsakdanjem življenju.

Naloge smo se lotili odgovorno in ob koncu izvedenih poskusov smo vse mikroorganizme in z njimi kontaminirana gojišča primerno odstranili. Z raziskovalno nalogo smo želeli opozoriti, da kljub vsem prednostim uporabe umetnih sladil (nizka kalorična vrednost, manjši stroški proizvodnje ...) obstajajo tudi potencialne nevarnosti ob njihovem uživanju, ki se jih moramo zavedati.

Upamo, da smo z nalogo prispevali vsaj majhen del k temu, kar že vemo o vplivu umetnih sladil na mikroorganizme v črevesju. Kljub temu pa smo menja, da nas čaka še veliko raziskovanja, preden bomo lahko popolnoma odkrili in razumeli vplive umetnih sladil.

7. ZAKLJUČEK

Cilj raziskovalne naloge je bil ugotoviti, ali so črevesni mikroorganizmi *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* ter *Saccharomyces cerevisiae* sposobni metabolirati tri naravna (steviol glikozid, ksilitol, eritriol) ter tri umetna sladila (natrijev ciklamat, natrijev saharinat, acesulfam-K), ali so ta sladila sposobni uporabiti kot edini vir ogljika in ali ta sladila v prisotnosti glukoze na rast mikroorganizmov vplivajo zaviralno ter primerjati vpliv umetnih in naravnih sladil na rast ob prisotnosti glukoze.

Ugotovili smo, da so vsi mikroorganizmi sposobni tako fermentativno kot oksidativno metabolirati steviol glikozid. Ksilitol in eritriol je sposoben metabolirati le *Saccharomyces cerevisiae*. Vseh ostalih sladil trije dani mikroorganizmi niso sposobni metabolirati.

Steviol glikozid lahko vsi mikroorganizmi uporabijo kot vir ogljika in pri tem rastejo bolje kot z glukozo. Ksilitol in eritritol lahko kot vir ogljika uporabi le *Saccharomyces cerevisiae*, vendar je rast v primerjavi z glukozo nižja. Natrijevega ciklamata, natrijevega saharinata ter acesulfama-K ni sposoben kot vir ogljika uporabiti nobeden od mikroorganizmov. Pri tem najbolje rastejo pri steviol glikozidu, najslabše pa pri natrijevem saharinatu in acesulfamu-K, ki sta kazala celo inhibitorne učinke.

Steviol glikozid v kombinaciji z glukozo pri *S. cerevisiae* ter *L. plantarum* pospešuje rast, pri *Escherichia coli* pa na rast ne vpliva. Ob prisotnosti glukoze ksilitol na rast *Escherichia coli* ne vpliva, rast *Lactobacillus plantarum* ter *Saccharomyces cerevisiae* pa pospeši. Eritritol na rast *Escherichia coli* vpliva zaviralno, rast *Lactobacillus plantarum* ter *Saccharomyces cerevisiae* pa pospeši. Natrijev ciklamat ter natrijev saharinat na *Escherichia coli* ter *Saccharomyces cerevisiae* delujeta zaviralno, na rast *Lactobacillus plantarum* pa ne vplivata. Acesulfam-K ima na rast vseh treh mikroorganizmov v kombinaciji z glukozo zaviralni učinek.

Ugotovili pa smo tudi, da imajo umetna sladila na rast mikroorganizmov večji zaviralni učinek kot naravna, ki zaviralnega učinka sploh niso izkazala.

Da bi lahko bolj realno proučevali učinek sladil na črevesno mikrobioto, bi morali izvajati *in vivo* poskuse, kjer vpliva več dejavnikov, med drugim tudi prisotnost drugih mikroorganizmov. Vseeno menimo, da so rezultati naše raziskovalne naloge uporabni, saj kažejo vplive sladil na posamezne mikroorganizme. To je lahko izhodišče za nadaljnje raziskave. V prihodnje bi bilo zanimivo proučevati predvsem vpliv različnih kombinacij sladil, saj se v prehranski industriji pogosto uporablja mešanica dveh ali več sladil (eden pogostih primerov je Natreen, mešanica natrijevega saharinata ter ciklamata). Kljub temu, da so učinki večine sladil do določne mere znani, se pri marsikaterem sladilu poraja vprašanje, zakaj je tako. Do kakšne mere so mikroorganizmi sladila sposobni razgrajevati in kakšen vpliv imajo produkti te razgradnje na mikroorganizme, ali imajo kakšne kancerogene vplive ...? Kakšen vpliv imajo v kompleksnem mikrobiomu našega črevesa? Vsekakor so potrebne še nadaljnje raziskave.

8. PRILOGE

Priloga 1 P vrednosti primerjave pomembnosti razlik med optičnimi gostotami kultur z dodanimi različnimi sladili po 72 h z generaliziranim linearnim modelom

Sladilo 1	Sladilo 2	P - vrednost		
		<i>Escherichia coli</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
GLU	DES	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	STE	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	KSI	< 0,001	< 0,001	1,000
	ERI	< 0,001	0,001	1,000
	CIK	< 0,001	< 0,001	0,001
	SAH	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	ACE	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	0,5% GLU	1,000	0,017	1,000
	0,5% STE	1,000	< 0,001	< 0,001
	0,5% KSI	1,000	< 0,001	< 0,001
	0,5% ERI	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	0,5% CIK	< 0,001	1,000	0,189
	0,5% SAH	0,001	1,000	< 0,001
	0,5% ACE	< 0,001	0,400	< 0,001
DES	GLU	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	STE	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	KSI	1,000	1,000	< 0,001
	ERI	< 0,001	0,351	0,760
	CIK	1,000	0,051	1,000
	SAH	1,000	< 0,001	< 0,001
	ACE	0,504	1,000	< 0,001
	0,5% GLU	< 0,001	0,007	< 0,001
	0,5% STE	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	0,5% KSI	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	0,5% ERI	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	0,5% CIK	< 0,001	< 0,001	1,000
	0,5% SAH	1,000	< 0,001	0,040
	0,5% ACE	< 0,001	< 0,001	1,000
STE	GLU	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	DES	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	KSI	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	ERI	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	CIK	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	SAH	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	ACE	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	0,5% GLU	< 0,001	< 0,001	< 0,001

	0,5% STE	< 0,001	1,000	1,000
	0,5% KSI	< 0,001	1,000	1,000
	0,5% ERI	< 0,001	< 0,001	1,000
	0,5% CIK	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	0,5% SAH	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	0,5% ACE	< 0,001	< 0,001	< 0,001
KSI	GLU	< 0,001	< 0,001	1,000
	DES	1,000	1,000	< 0,001
	STE	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	ERI	< 0,001	1,000	1,000
	CIK	1,000	1,000	< 0,001
	SAH	1,000	< 0,001	< 0,001
	ACE	1,000	1,000	< 0,001
	0,5% GLU	< 0,001	0,903	1,000
	0,5% STE	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	0,5% KSI	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	0,5% ERI	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	0,5% CIK	< 0,001	< 0,001	0,156
	0,5% SAH	1,000	< 0,001	< 0,001
	0,5% ACE	< 0,001	0,006	< 0,001
ERI	GLU	< 0,001	0,001	1,000
	DES	< 0,001	0,351	0,760
	STE	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	KSI	< 0,001	1,000	1,000
	CIK	< 0,001	1,000	< 0,001
	SAH	0,027	< 0,001	< 0,001
	ACE	< 0,001	1,000	< 0,001
	0,5% GLU	< 0,001	1,000	1,000
	0,5% STE	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	0,5% KSI	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	0,5% ERI	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	0,5% CIK	< 0,001	< 0,001	0,003
	0,5% SAH	0,022	< 0,001	< 0,001
	0,5% ACE	< 0,001	1,000	< 0,001
CIK	GLU	< 0,001	< 0,001	0,001
	DES	1,000	0,051	1,000
	STE	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	KSI	1,000	1,000	< 0,001
	ERI	< 0,001	1,000	< 0,001
	SAH	0,728	< 0,001	< 0,001
	ACE	1,000	1,000	< 0,001
	0,5% GLU	< 0,001	1,000	1,000
	0,5% STE	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	0,5% KSI	< 0,001	< 0,001	< 0,001

	0,5% ERI	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	0,5% CIK	< 0,001	< 0,001	1,000
	0,5% SAH	1,000	< 0,001	< 0,001
	0,5% ACE	< 0,001	0,108	1,000
SAH	GLU	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	DES	1,000	< 0,001	< 0,001
	STE	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	KSI	1,000	< 0,001	< 0,001
	ERI	0,027	< 0,001	< 0,001
	CIK	0,728	< 0,001	< 0,001
	ACE	0,369	< 0,001	< 0,001
	0,5% GLU	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	0,5% STE	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	0,5% KSI	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	0,5% ERI	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	0,5% CIK	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	0,5% SAH	1,000	< 0,001	< 0,001
	0,5% ACE	< 0,001	< 0,001	< 0,001
ACE	GLU	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	DES	0,504	1,000	< 0,001
	STE	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	KSI	1,000	1,000	< 0,001
	ERI	< 0,001	1,000	< 0,001
	CIK	1,000	1,000	< 0,001
	SAH	0,369	< 0,001	< 0,001
	0,5% GLU	< 0,001	0,562	< 0,001
	0,5% STE	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	0,5% KSI	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	0,5% ERI	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	0,5% CIK	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	0,5% SAH	1,000	< 0,001	< 0,001
	0,5% ACE	< 0,001	0,001	< 0,001
0,5% GLU	GLU	1,000	0,017	1,000
	DES	< 0,001	0,007	< 0,001
	STE	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	KSI	< 0,001	0,903	1,000
	ERI	< 0,001	1,000	1,000
	CIK	< 0,001	1,000	1,000
	SAH	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	ACE	< 0,001	0,562	< 0,001
	0,5% STE	1,000	< 0,001	< 0,001
	0,5% KSI	1,000	< 0,001	< 0,001
	0,5% ERI	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	0,5% CIK	< 0,001	< 0,001	1,000

	0,5% SAH 0,5% ACE	0,001 < 0,001	< 0,001 1,000	0,032 1,000
0,5% STE	GLU DES STE KSI ERI CIK SAH ACE 0,5% GLU 0,5% KSI 0,5% ERI 0,5% CIK 0,5% SAH 0,5% ACE	1,000 < 0,001 < 0,001 < 0,001 < 0,001 < 0,001 < 0,001 < 0,001 1,000 1,000 < 0,001 < 0,001 < 0,001 < 0,001	< 0,001 < 0,001 1,000 < 0,001 < 0,001 < 0,001 < 0,001 < 0,001 < 0,001 1,000 0,095 < 0,001 < 0,001 < 0,001	< 0,001 < 0,001 1,000 < 0,001 < 0,001 < 0,001 < 0,001 < 0,001 < 0,001 1,000 1,000 < 0,001 < 0,001 < 0,001
0,5% KSI	GLU DES STE KSI ERI CIK SAH ACE 0,5% GLU 0,5% STE 0,5% ERI 0,5% CIK 0,5% SAH 0,5% ACE	1,000 < 0,001 < 0,001 < 0,001 < 0,001 < 0,001 < 0,001 < 0,001 1,000 1,000 0,007 0,001 0,008 0,019	< 0,001 < 0,001 1,000 < 0,001 < 0,001 < 0,001 < 0,001 < 0,001 < 0,001 1,000 1,000 0,555 < 0,001 < 0,001 < 0,001	< 0,001 < 0,001 1,000 < 0,001 < 0,001 < 0,001 < 0,001 < 0,001 < 0,001 1,000 1,000 1,000 < 0,001 < 0,001 < 0,001
0,5% ERI	GLU DES STE KSI ERI CIK SAH ACE 0,5% GLU 0,5% STE 0,5% KSI 0,5% CIK 0,5% SAH 0,5% ACE	< 0,001 < 0,001 < 0,001 < 0,001 < 0,001 < 0,001 < 0,001 < 0,001 < 0,001 < 0,001 < 0,001 1,000 1,000 1,000	< 0,001 < 0,001 < 0,001 < 0,001 < 0,001 < 0,001 < 0,001 < 0,001 < 0,001 0,095 0,555 < 0,001 < 0,001 < 0,001	< 0,001 < 0,001 1,000 < 0,001 < 0,001 < 0,001 < 0,001 < 0,001 < 0,001 1,000 1,000 < 0,001 < 0,001 < 0,001

0,5% CIK	GLU	< 0,001	1,000	0,189
	DES	< 0,001	< 0,001	1,000
	STE	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	KSI	< 0,001	< 0,001	0,156
	ERI	< 0,001	< 0,001	0,003
	CIK	< 0,001	< 0,001	1,000
	SAH	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	ACE	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	0,5% GLU	< 0,001	< 0,001	1,000
	0,5% STE	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	0,5% KSI	0,001	< 0,001	< 0,001
	0,5% ERI	1,000	< 0,001	< 0,001
	0,5% SAH	1,000	1,000	0,205
	0,5% ACE	1,000	0,002	1,000
0,5% SAH	GLU	0,001	1,000	< 0,001
	DES	1,000	< 0,001	0,040
	STE	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	KSI	1,000	< 0,001	< 0,001
	ERI	0,022	< 0,001	< 0,001
	CIK	1,000	< 0,001	< 0,001
	SAH	1,000	< 0,001	< 0,001
	ACE	1,000	< 0,001	< 0,001
	0,5% GLU	0,001	< 0,001	0,032
	0,5% STE	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	0,5% KSI	0,008	< 0,001	< 0,001
	0,5% ERI	1,000	< 0,001	< 0,001
	0,5% CIK	1,000	1,000	0,205
	0,5% ACE	1,000	0,001	< 0,001
0,5% ACE	GLU	< 0,001	0,400	< 0,001
	DES	< 0,001	< 0,001	1,000
	STE	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	KSI	< 0,001	0,006	< 0,001
	ERI	< 0,001	1,000	< 0,001
	CIK	< 0,001	0,108	1,000
	SAH	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	ACE	< 0,001	0,001	< 0,001
	0,5% GLU	< 0,001	1,000	1,000
	0,5% STE	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	0,5% KSI	0,019	< 0,001	< 0,001
	0,5% ERI	1,000	< 0,001	< 0,001
	0,5% CIK	1,000	0,002	1,000
	0,5% SAH	1,000	0,001	< 0,001

9. VIRI IN LITERATURA

Anderson: Some changes in gastro-intestinal metabolism and in the urine and bladders of rats in response to sodium saccharin ingestion. V: Food and Chemical Toxicology. 23(1985)4. Str. 457-463.

Asahina, Niimura, Yamaha, Takahashi: Formation of Cyclohexylamine and Cyclohexanone from Cyclamate by Microorganisms Isolated from the Feces of Guinea Pig. V: Agricultural and Biological Chemistry. 36(2014)5. Str. 711-718.

Almstahl, Lingström, Eliasson, Carlén: Fermentation of sugars and sugar alcohols by plaque Lactobacillus strains. V: Clinical Oral Investigations. 17(2013)6. Str. 1465-1470.

Authorised sweeteners. Povzeto 3. februarja 2016 iz EUR-Lex: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=URISERV:l21069>

Avguštin: Vpliv mikrobioma na človekovo zdravje. V: Medicinski razgled. (2015)2. str. 45-52.

Babič, Cencič, Turk: Organizacija in funkcija črevesne flore. V: Zdravniški Vestnik. 82(2013). Str. 573–579.

Bär: Caries prevention with xylitol. A review of the scientific evidence. V: World Rev. Nutr. Diet. 55(1988). Str. 183-209.

Bettiga, Hahn-Hägerdal, Gorwa-Grauslund: Comparing the xylose reductase/xylitol dehydrogenase and xylose isomerase pathways in arabinose and xylose fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains. V: Biotechnology for Biofuels. (2008).

Bopp, Sonders, Kesterson: Toxicological aspects of cyclamate and cyclohexylamine. V: Critical Review Toxicology. 16(1986)3. Str. 213-306.

Brusick: A critical review of the genetic toxicity of steviol and steviol glycosides. V: Food and Chemical Toxicology. 46(2008). Str. 83-91.

Buss, Renwick, Donaldson, George: The metabolism of cyclamate to cyclohexylamine and its cardiovascular consequences in human volunteers. V: Toxicology and Applied Pharmacology. 115(1992)2. Str. 199-210.

Byard, Golberg: The metabolism of saccharin in laboratory animals. V: Food and Cosmetics Toxicology. 11(1973)3. Str. 391-402.

Drasar, Renwick, Williams: The Role of the Gut Flora in the Metabolism of Cyclamate. V: Biochemical Journal. 129(1972). Str. 881-890.

Edwardsson, Birkhed, Mejàre: Acid production from Lycasin®, maltitol, sorbitol and xylitol by oral streptococci and lactobacilli. V: Acta Odontologica Scandinavica. 35(1977)5. Str. 257-263.

Frank, Amand, Feldman, Boedeker, Harpaz, Pace: Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. 104(2007). V: Proc Natl Acad Sci USA. Str. 780-785

Goossens in Gonze. Nutritional properties and applications of erythritol: a unique combination? ZDA: Springer US, 1996. Springer Link. Splet. 3. februar 2016.

Hayes, Roberts: The breakdown of glucose, xylitol and other sugar alcohols by human dental plaque. V: Archives of Oral Biology. 23(1978)6. Str. 0-451.

Hiele, Ghoo, Rutgeerts, Vantrappen: Metabolism of erythritol in humans-comparison with glucose and lactitol. V: Br J Nutr 69(1993)1. Str. 169-176.

Horvat. Surovine v pekarstvu in slaščičarstvu, Tehniška založba Ljubljana 2000, str. 26

Jandhyala, Talukdar, Subramanyam, Vuyyuru, Sasikala, Reddy: Role of the normal gut microbiota. V: World J Gastroenterol. 21(2015)29. Str. 8787-8803.

Jeffries, Jin: Metabolic engineering for improved fermentation of pentoses by yeasts. V: Applied Microbiology and Biotechnology. 63(2004)5. Str. 495-509.

Klewicki, Klewicka: Antagonistic activity of lactic acid bacteria as probiotics against selected bacteria of the Enterobacteriaceae family in the presence of polyols and their galactosyl derivatives. V: Biotechnological letter. 26(2004)4. Str. 317-320.

Kiet, Milgrom, Rothen: Xylitol, Sweeteners, and Dental Caries. V: Pediatric Dentistry. 28(2006)2. Str. 154-163.

Koyama, Sakai, Ohori, Kitazawa, Izawa, Kakegawa, Fujino, Ui: Absorption and metabolism of glycosidic sweeteners of stevia mixture and their aglycone, steviol, in rats and humans. V: Food and chemical toxicology. 41(2003)6. Str. 875-883.

Ley, Turnbaugh, Klein, Gordon: Microbialecology:humangutmicrobes associated with obesity. V: Nature. 444(2006). Str. 1022-1023.

Linke: Sugar Alcohols and Dental Health. Nutritional Problems and Education: Selected Topics. V: World Rev Nutr Diet. 47(1986). Str. 134-162.

Mäkeläinen, Mäkivuokko, Salminen, Rautonen, Ouwehand: The effects of polydextrose and xylitol on microbial community and activity in a 4-stage colon simulator. V: Journal of Food Science. 27(2007). Str. 153-159.

Mäkinen, Söderling: A Quantitative Study Of Mannitol, Sorbitol, Xylitol, And Xylose In Wild Berries And Commercial Fruits. V: Journal of Food Science. 45(1980)2. Str. 367-371.

Molin: Probiotics in foods not containing milk or milk constituents, with special reference to *Lactobacillus plantarum*. V: The American journal of clinical nutrition. 73(2001)2 Str. 380-385.

Mortensen: Sweeteners permitted in the European Union, Safety aspects. V: Scandinavian Journal of Food and Nutrition. 50(2006). Str. 104-116.

Nicholson, Jani: Effects of sodium cyclamate and sodium saccharin on focus induction in explant cultures of rat bladder. V: International Journal of Cancer. 42(1988)2. Str. 295-298.

O'Brien Nabors. Alternative sweeteners. New York: Marcel Dekker, 2011. Google Books. Splet. 3. februar 2016.

Pfeffer, Ziesenitz, Siebert: Acesulfame K, cyclamate and saccharin inhibit the anaerobic fermentation of glucose by intestinal bacteria. V: European Journal of Nutrition. 24(1985)4. Str. 231-235.

Price, Biava, Oser, Vogin, Steinfeld, Ley: Bladder tumors in rats fed cyclohexylamine or high doses of a mixture of cyclamate and saccharin. V: Science. 167(1970). Str. 1131-1132.

Renwick: The metabolism of intense sweeteners. V: Xenobiotica. 16(1986). Str. 1057-1071.

Reed, McDaniel: The Human Sweet Tooth. V: BMC Oral Health. 6(2006)1. Str. 0-17.

Renwick in Tarka: Microbial hydrolysis of steviol glycosides. V: Food and Chemical Toxicology. 46(2008)7. Str. 70-74.

Richard, Toivari, Penttilä: Evidence that the gene YLR070c of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a xylitol dehydrogenase. V: FEBS letter. 457(1999)1. Str. 135-138.

Roberts, Renwick, Sims, Snodin: Sucralose metabolism and pharmacokinetics in man. V: Food Chem. Toxicol. 38(2000). Str. 31–41.

Roboz, Kappatos, Greaves, Holland: Determination of polyols in serum by selected ion monitoring. V: Clin Chem. 30(1984)10. Str: 1611-1615.

Sardesai, Waldshan: Natural and synthetic intense sweeteners. V: The Journal of Nutritional Biochemistry. 2(1991)5. Str. 236-244.

Servo, Palo, Pitkänen: Gas chromatographic separation and mass spectrometric identification of polyols in human cerebrospinal fluid and plasma. V: Acta Neurologica Scandinavica. 56(1977)2. Str. 104-110.

Soejarto, Kinghorn, Farnsworth: Potential Sweetening Agents of Plant Origin. III. Organoleptic Evaluation of Stevia Leaf Herbarium Samples For Sweetness. V: J. Nat. Prod. 45(1982)5. Str. 590-599

Steviol Glycosides. Pridobljeno 3. februarja 2016 na:
<https://www.food.gov.uk/science/additives/stevia>

Suez, Korem, Zeevi, Zilberman-Schapira, Thaiss, Maza, Israeli, Zmora, Gilad, Weinberger, Kuperman, Harmelin, Kolodkin-Gal, Shapiro, Halpern, Segal, Elinav: Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. V: Nature. 514(2014). Str. 181-186

Tesoriero, Roxon: [³⁵S]Cyclamate Metabolism: Incorporation of ³⁵S into Proteins of Intestinal Bacteria *in vitro* and Production of Volatile ³⁵S-Containing Compounds. V: Xenobiotica. 5(1974)1. Str. 25-31.

Testi za identifikacijo bakterij. Pridobljeno 3. februarja 2016 na: http://web.bf.uni-lj.si/bi/biologija-mikroorganizmov/Studenti/Gradivo/Testi.htm#OF_test

Tomana, Prchal, Garner, Skalka, Barker: Gas chromatographic analysis of lens monosaccharides. V: J Lab Clin Med. 103(1984)1. Str. 137-42.

Toskulkao, Chaturat, Temcharoen, Glinsukon: Acute toxicity of stevioside, a natural sweetener, and its metabolite, steviol, in several animal species. V: Drug and Chemical Toxicology. 20(1997)1. Str. 31-44.

Toyoda, Matsui, Shoda, Uneyama, Takada, Takahashi: Assessment of the carcinogenicity of stevioside in F344 rats. V: Food and Chemical Toxicology. 35(1997)6. Str. 597-603.

Walker. Yeast: Physiology and biotechnology. West Sussex: John Wiley & Sons, 1996. Google Books. 3. februar 2016.

Wallace, Lethco, Brouwer: The metabolism of cyclamates in rats. V: JPET. 175(1970)2. Str. 325-330.

Washuet, Riederer, Bancher: A Qualitative And Quantitative Study Of Sugar-Alcohols In Several Foods. V: Journal of Food Science. 38(1973)7. Str. 1262-1263.

Wu: Growth of a mutant of Escherichia coli K-12 on xylitol by recruiting enzymes for D-xylose and L1,2-propanediol metabolism. V: Biochimica et Biophysica Acta. 428(1976)3. Str. 656-663.

Xili, Chengjiany, Eryi, Reiming, Yuengming, Haodong, Zhiyian: Chronic oral toxicity and carcinogenicity study of stevioside in rats. V: Food and Chemical Toxicology. 30(1992)11. Str. 957-965.

Zheng, Sarr: Effect of the Artificial Sweetener, Acesulfame Potassium, a Sweet Taste Receptor Agonist, on Glucose Uptake in Small Intestinal Cell Lines. V: Journal of Gastrointestinal Surgery. 17(2013). Str. 153-158.

Zhu, Guo, Ye, James: Separation and simultaneous determination of four artificial sweeteners in food and beverages by ion chromatography. V: Journal of Chromatography A. 1085(2005)1. Str. 143-146.

Zygler, Wasik, Namieśnik: Analytical methodologies for determination of artificial sweeteners in foodstuffs. V: TrAC Trends in Analytical Chemistry. 28(2009)9. Str. 1082-1102.

Zygler, Wasik, Kot-Wasik, Namieśnik: Determination of nine high-intensity sweeteners in various foods by high-performance liquid chromatography with mass spectrometric detection. V: Analytical and Bioanalytical Chemistry. 400(2011)7. Str. 2159-2172.

Zyl, Prior, Kilian, Kock: D-Xylose Utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. V: Microbiology Society. 135(1989)11. Str. 2791-2798.

Žgur - Bertok, Starčič Erjavec (2009). Teoretične osnove in navodila za vaje pri predmetu Mikrobna genetika. Ljubljana, Študentska založba: str. 11 in 116