

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
INTERDISCIPLINARNI PODIPLOMSKI ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Matjaž BOŠTAR

**VPLIV KEFIRJA NA ČREVESNO MIKROBNO ZDRUŽBO  
IN KANCEROGENEZO EKSPERIMENTALNO  
INDUCIRANIH ČREVESNIH TUMORJEV NA PODGANAH**

MAGISTRSKO DELO

Ljubljana, 2006



UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
INTERDISCIPLINARNI PODIPLOMSKI ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Matjaž BOŠTAR

**VPLIV KEFIRJA NA ČREVESNO MIKROBNO ZDRUŽBO  
IN KANCEROGENEZO EKSPERIMENTALNO  
INDUCIRANIH ČREVESNIH TUMORJEV NA PODGANAH**

MAGISTRSKO DELO

**IMPACT OF KEFIR ON INTESTINAL MICROFLORA AND  
CANCER GENESIS OF EXPERIMENTALLY INDUCED  
TUMORS**

M. SC. THESIS

Ljubljana, 2006

## **POPRAVKI:**

Magistrsko delo je bilo opravljeno na Inštitutu za higieno živil in na Inštitutu za patologijo Medicinske fakultete v Ljubljani ter na Inštitutu za mlekarstvo, Oddelek za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Senat Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani je za mentorico magistrskega dela s področja biotehnologije imenoval prof. dr. Ireno Rogelj in za somentorja prof. dr. Petra Rasporja.

Mentor: prof. dr. Irena Rogelj

Somentor: prof. dr. Peter Raspor

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Janez Salobir  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Članica: prof. dr. Irena Rogelj  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Peter Raspor  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: doc. dr. Nataša Tozon  
Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Matjaž Boštar

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Md
- DK UDK 637.146:641.1(043)=863
- KG fermentirani mlečni izdelki/kefir/kefirna zrna/prehranska vrednost/črevesna mikrobnna združba/tumorji/podgane Wistar
- AV BOŠTAR, Matjaž, univ. dipl. inž. živil. tehnol.
- SA ROGELJ, Irena (mentorica) / RASPOR, Peter (somentor)
- KZ 1000 Ljubljana, SLO, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni podiplomski študij biotehnologije
- LI 2006
- IN VPLIV KEFIRJA NA ČREVESNO MIKROBNO ZDRUŽBO IN KANCEROGENEZO EKSPERIMENTALNO INDUCIRANIH ČREVESNIH TUMORJEV NA PODGANAH
- TD magistrsko delo
- OP XII, 111 str., 15 pregl., 28 sl., 4 pril., 184 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI V delu smo proučevali vpliv prehranjevanja z mlekom in kefirjem z različnimi stopnjami maščob (1,1 % in 3,5 %) na razvoj eksperimentalno induciranih tumorjev pri podganah seva vrste Wistar. Tumorje smo inducirali s subkutano aplikacijo 1,2 dimetilhidrazina. Zadnji teden pred zaključkom poskusa, ki je trajal 26 tednov, smo živalim odvzeli vzorce krvi za kometni test. Ob zaključku poskusa smo živali stehali in jih žrtvovali z inhalacijo CO<sub>2</sub>. Izvedli smo obdukcijo in pregledali vse notranje organe. Ugotavljali smo pojavnost različnih vrst tumorjev. Tkiva smo fiksirali in naredili histološke slike. Za namen mikrobiološke analize mikrobne združbe debelega črevesa smo uporabili vzorce vsebine debelega črevesa. Na selektivnih gojiščih smo ugotavljali prisotnost in število enterobakterij, enterokokov, klostridijev, mlečno-kislinskih bakterij, bifidobakterij in kvasovk. Kometni test smo uporabili za ugotavljanje poškodb jedrne DNK. Citološke in histološke študije so pokazale, da je bila pojavnost adenokarcinomov v povezavi z vsebnostjo maščobe v krmi statistično značilna ( $p = 0.0338$ ), statistično značilno je bilo tudi skupno število sprememb ( $p < 0,001$ ). Kometni test je pokazal zelo majhne in statistično neznačilne razlike med skupinami. Mikrobiološke analize pa so pokazale, da se skupine eksperimentalnih živali, ki so uživale kefir ali mleko od kontrolne skupine statistično značilno razlikujejo po manjšem številu enterobakterij in povečanem številu bifidobakterij v črevesju.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Md

DC UDC 637.146:641.1(043)=863

CX fermented dairy products/kefir/kefir grains/nutritional values/intestinal microflora/tumors/rats Wistar

AU BOŠTAR, Matjaž

AA ROGELJ, Irena (supervisor) / RASPOR. Peter (co-advisor)

PP 1000 Ljubljana, SLO, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdisciplinary Study in Biotechnology

PY 2006

TI IMPACT OF KEFIR ON INTESTINAL MICROFLORA AND CANCER GENESIS OF EXPERIMENTALLY INDUCED TUMORS

DT Master of Science Thesis

NO XII, 111 p., 15 tab., 28 fig., 4 ann., 184 ref.

LA sl

AL sl/en

AB In our study we investigated the effect of feeding milk and kefir (with different fat levels: 1,1 % milk fat and 3,5 % milk fat) to rats of Wistar variety on the incidence of experimentally induced colorectal epithelial tumors (CET). For the induction of intestinal tumors, we used 1,2 – dimethylhydrazine (DMH). The final week before the end of the experiment which lasted 26 weeks we collected blood samples from the animals for the purpose of the comet test. At the end of the experiment we weighed the animals and sacrificed them by CO<sub>2</sub> asphyxiation. We conducted an autopsy of all internal organs and assessed the appearance of different types of tumors. We fixed the tissues and took photos of them. We took rat faeces samples for the purpose of microbiological analysis of intestinal microflora. We analyzed the presence and number of enterobacteria, enterococci, clostridia, lactic acid bacteria, bifidobacteria and yeasts in the selective culture media. Comet assay was used for the assessment of DNA damage. Cytological and histological studies show a statistically significant correlation between the incidence of adenocarcinomas ( $p = 0,0338$ ) and all forms of CET ( $p < 0,001$ ) and the fat intake. Comet assays show very small and statistically insignificant differences between groups. Microbiological assays show that the faeces samples of groups of experimental animals that were fed kefir or milk contain statistically different lower numbers of enterobacteria and a higher number of bifidobacteria than the control group.

## KAZALO VSEBINE

POPRAVKI:	II
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	IV
KEY WORDS DOCUMENTATION	V
KAZALO VSEBINE	VI
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	XI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XII
<b>1 UVOD</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Hipoteza</b>	<b>2</b>
<b>2 PREGLED OBJAV</b>	<b>4</b>
<b>2.1 Zgodovina proizvodnje kefirja</b>	<b>4</b>
2.1.1 Tradicionalni način pridobivanja kefirja	5
2.1.2 Uporabnost kefirja	5
2.1.3 Dinamika mikrobne populacije v kefirnem zrnju in kefirju	7
2.1.4 Kefirna zrna in kefiran	15
2.1.5 Razmnoževanje kefirnih zrn	19
2.1.6 Kefirna zrna – naravna starterska kultura	23
2.1.7 Starterske kulture podobne kefirju	23
<b>2.2 Proizvodnja kefirja</b>	<b>24</b>
2.2.1 Industrijska proizvodnja kefirja	24
2.2.2 Proizvodnja kefirja brez uporabe kefirnih zrn	26
2.2.3 Kefir - končni produkt fermentacije s kefirnimi zrnji	27
<b>2.3 Vzdrževanje kefirnih zrn</b>	<b>30</b>
<b>2.4 Analiza tveganj</b>	<b>30</b>
2.4.1 Mikrobiološko tveganje	30
2.4.2 Kemično tveganje	31
2.4.3 Fizikalno tveganje	31
<b>2.5 Kefir in zdravje</b>	<b>31</b>
2.5.1 Infekcije in/ali intoksikacije povezane z uživanjem kefirja	31
2.5.2 Črevesna mikrobna združba	33
2.5.3 Probiotični mikroorganizmi	34
2.5.4 Črevesne bakterije in rak	34
2.5.5 <i>Helicobacter pylori</i> in rak na želodcu	35
2.5.6 Kemično inducirana kancerogeneza	36
2.5.7 Vloga črevesne mikroflore pri nastajanju in preprečevanju raka	36
2.5.8 Bakterijski encimi in kancerogeneza	37
<b>2.6 Prehrana in encimska aktivnost bakterij</b>	<b>39</b>
2.6.1 Mutageneza	41
2.6.2 Fekalni mutageni - fekapentaeni	41



2.6.3	Tumorski promotorji - sprožitelji .....	41
2.6.4	Eksogene (probiotične) bakterije in preprečevanje rakavih obolenj .....	42
2.6.5	Imunologija.....	42
2.6.6	Anti-mutagena aktivnost mlečno-kislinskih bakterij.....	43
2.6.7	Proti-tumorna aktivnost mlečno-kislinskih bakterij .....	43
<b>2.7</b>	<b>Prebiotiki.....</b>	<b>44</b>
2.7.1	Kefiran.....	45
<b>2.8</b>	<b>Postopki in metode ugotavljanja razvoja raka na debelem črevesju .....</b>	<b>46</b>
2.8.1	Eksperimentalni model za raka na debelem črevesju in danki.....	46
2.8.2	Intestinalni karcinom v podgani inducirani z 1,2-dimetilhidrazinom .....	46
<b>2.9</b>	<b>Mikrobiološke metode.....</b>	<b>49</b>
2.9.1	Identifikacija mlečno-kislinskih in bifidobakterij .....	49
<b>2.10</b>	<b>Metode za merjenje poškodb DNK.....</b>	<b>50</b>
2.10.1	Kometni test.....	50
<b>3</b>	<b>MATERIAL IN METODE DELA .....</b>	<b>54</b>
<b>3.1</b>	<b>Material .....</b>	<b>54</b>
3.1.1	Eksperimentalne živali .....	54
3.1.2	Krmljenje .....	55
3.1.3	Kancerogen.....	57
<b>3.2</b>	<b>Metode dela .....</b>	<b>58</b>
3.2.1	Obdukcija in pregled tkiv .....	58
3.2.2	Mikrobiološke analize .....	62
3.2.3	Kometni test.....	64
<b>4</b>	<b>REZULTATI.....</b>	<b>65</b>
<b>4.1</b>	<b>Rast poskusnih živali.....</b>	<b>65</b>
4.1.1	Količina zaužite krme in tekočine .....	66
4.1.2	Energijski deleži hranil v prehrani eksperimentalnih živali .....	68
4.1.3	Obdukcija in pregled tkiv .....	70
<b>4.2</b>	<b>Mikrobiološka analiza blata .....</b>	<b>72</b>
<b>4.3</b>	<b>Rezultati kometnega testa.....</b>	<b>77</b>
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI.....</b>	<b>79</b>
<b>5.1</b>	<b>Prirast telesne mase poskusnih živali in prehrabeni parametri .....</b>	<b>80</b>
<b>5.2</b>	<b>Mikrobiološke analize .....</b>	<b>82</b>
<b>5.3</b>	<b>Kometni test .....</b>	<b>83</b>
<b>5.4</b>	<b>Zaključki .....</b>	<b>84</b>
<b>6</b>	<b>POVZETEK (SUMMARY) .....</b>	<b>85</b>
<b>6.1</b>	<b>Povzetek.....</b>	<b>85</b>
<b>6.2</b>	<b>Summary .....</b>	<b>86</b>
<b>7</b>	<b>VIRI.....</b>	<b>87</b>
<b>ZAHVALA .....</b>	<b>107</b>	
<b>PRILOGE.....</b>	<b>108</b>	

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Mikroflora kefirja in kefirnih zrn – najpogostejši predstavniki (Marshall, 1993b; Angulo in sod., 1993; Spreer, 1998, Euzéby, 2002) .....	8
Preglednica 2: Število nekaterih predstavnikov mikroflore v kefirnih zrnih in kefirju (Marshall, 1993a) .....	9
Preglednica 3: Delež glavnih sestavin mleka (Scherz in Senser, 2000).....	27
Preglednica 4: Delež posameznih sestavin v kefirju ter energijska vrednost kefirja (Scherz in Senser, 2000) .....	28
Preglednica 5: Količina mineralov in vitaminov v 100 g kefirja (Scherz in Senser, 2000) 28	
Preglednica 6: Sestava peletirane krme .....	55
Preglednica 7: Krmni režimi različnih skupin poskusnih živali.....	56
Preglednica 6: Statistično značilne razlike v zaužiti peletirani krmi med skupinami .....	67
Preglednica 7: Povprečno zaužita količina krme in tekočine na podgano na dan.....	67
Preglednica 8: Razlike v dnevni količini zaužite vode med skupinami .....	68
Preglednica 9: Razlike med skupinami v količini dnevno zaužitega maltodekstrina.....	70
Preglednica 10: Razlike med skupinami v količini dnevno zaužite maščobe .....	70
Preglednica 11: Zbirni podatki o pojavnosti ACF, ADČ, adenokarcinomov in dnevnem energijskem vnosu ter deležu maščob v dnevni prehrani in skupnem številu črevesnih sprememb glede na skupine podgan .....	71
Preglednica 12: Osnovna preglednica števila vzorcev in povprečnih vrednosti log števila kolonij, zraslih na selektivnih gojiščih za enterobakterije (EMB), klostridije (SPS), enterokoke (KAA), MKB (MRS), kvasovke (YGL) in bifidobakterije (NPNL) .....	72
Preglednica 13: Povprečno število enterobakterij, enterokokov, MKB in bifidobakterij v 1 g blata živali različnih eksperimentalnih skupin (rezultati so prikazani kot log KE/g) .....	72
Preglednica 14: Opisna statistika za podganje vzorce polne krvi (stopnja poškodb DNK je podana kot Repni moment po Olivu, OTM) .....	78
Preglednica 15: Vrednosti p za OTM (Repni moment po Olivu) vzorcev podganje polne krvi.....	78

## KAZALO SLIK

Slika 1: Del kefirnih zrn, kjer prevladujejo kvasovke (elektronski mikroskop, povečava 4000x).....	12
Slika 2: Kefirna zrna (Canon A95).....	15
Slika 3: Kemijska struktura kefirana (Kooiman, 1968).....	15
Slika 4: Mikroorganizmi prekriti s polisaharidnim matriksom (elektronski mikroskop, povečava 4000x).....	16
Slika 5: Suha kefirna zrna (Canon A95).....	18
Slika 6: (A) Transmisijska in (B) SCAN elektronska mikrografija kefirnih zrn, ki prikazujeta mešano mikrofloro kvasovk in bakterij v vodi netopnem matriksu (Marshall, 1993b).....	19
Slika 7: Pretrganje kefirnega zrna na dva dela .....	20
Slika 8: Shematski prikaz proizvodnje kefirja (Boštar, 2002).....	24
Slika 9: Presnova 1,2-dimetilhidrazina. Karbonijev ion, končni produkt pretvorbe DMH, je končni kancerogen v sluznici črevesa. 1 – hepatični oksidativni encimi, 2 – hepatične in ekstrahepatične dehidrogenaze, DMH – 1,2-dimetilhidrazin, AZO – azometan, AZM – azoksimetan, MAM – metilazoksimetanol, MAF – metilazoksiformaldehid in MFK – metilazoksiformna kislina (Fiala, 1981).....	48
Slika 10: Prikaz vrednotenja poškodb levkocitne DNA s kometnim testom in računalniškim programom (KIK 5.0) .....	51
Slika 11: Shema skupin poskusnih živali .....	54
Slika 12: Živali v poskusu .....	54
Slika 13: Krmljenje podgan.....	56
Slika 14: Fiksiranje črevesja na stiropor.....	58
Slika 15: Makroskopski izgled eksperimentalno induciranih tumorjev debelega črevesa..	59
Slika 16: Aberantni kriptni fokus (povečava 6,3 x 2,5) .....	61
Slika 17: Dobro diferenciran adenokarcinom z začetno invazijo submukoze (povečava 6,3 x 2,5).....	61
Slika 18: Karcinom ob limfnem foliklu (povečava 6,3 x 2,5).....	62
Slika 19: Rastna krivulja poskusnih živali .....	65
Slika 20: Prirast telesne mase v času poskusa .....	66
Slika 21: Povprečni dnevni energijski vnos (kcal/dan/podg) .....	68
Slika 22: Energijski deleži, ki so jih živali zaužile s posameznimi hranili .....	69

Slika 23: Vpliv deleža zaužitih maščob na pojavnost vseh kemijsko induciranih sprememb v debelem črevesu (ACF, adenomov in adenokarcinomov).....	71
Slika 24: Povprečno število enterobakterij (log KE/g) v 1g blata živali različnih eksperimentalnih skupin (1=kefir 3,5; 2=kefir 1,1; 3=mleko 1,1; 4=voda) .....	73
Slika 25: Povprečno število enterokokov (log KE/g) v 1g blata živali različnih eksperimentalnih skupin (1=kefir 3,5; 2=kefir 1,1; 3=mleko 1,1; 4=voda) .....	74
Slika 26: Povprečno število mlečno-kislinskih bakterij (log KE/g) v 1g blata živali različnih eksperimentalnih skupin (1=kefir 3,5; 2=kefir 1,1; 3=mleko 1,1; 4=voda) .....	75
Slika 27: Povprečno število bifidobakterij (log KE/g) v 1g blata živali različnih eksperimentalnih skupin (1=kefir 3,5; 2=kefir 1,1; 3=mleko 1,1; 4=voda) .....	76
Slika 28: Stopnja poškodbe DNK (OTM vrednosti so ponazorjene s pravokotniki z držaji) .....	77

## KAZALO PRILOG

Priloga A: Kometni test na podganji krvi: 19. Oktober 2002 (I. skupina vzorcev – kefir 3.5 % maščobe) .....	108
Priloga B: Kometni test na podganji krvi: 16. Oktober 2002 (II. skupina vzorcev – kefir 1.1% maščobe) .....	109
Priloga C: Kometni test na podganji krvi: 22. Oktober 2002 (III. skupina vzorcev – mleko 1.1 % maščobe) .....	110
Priloga D: Kometni test na podganji krvi: 24. Oktober 2002 (IV. skupina vzorcev – voda) .....	111

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

<b>Okrajšava</b>	<b>Pomen</b>
ATCC	American Type Culture Collection – ameriška zbirka tipskih kultur
AZM	azoksimetan
ACF	aberant crypt foci – aberantni kriptni fokus
ADČ	adenom debelega črevesa
CIP	cleaning in place – industrijski zaprti cevni čistilni sistem
DAG	diacilgliceroli
DMH	1,2 dimetilhidrazin
DNK	deoksiribonukleinska kislina
EDTA	etilendiamin-tetraacetat
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations – Organizacija za prehrano in kmetijstvo pri Organizaciji združenih narodov
HDL	high density lipoprotein – lipoprotein visoke gostote
KE	kolonijske enote
KRK	kolorektalni karcinom
LDL	low density lipoprotein – lipoprotein nizke gostote
LMP	low melting point agarose – agarozna z nizko temperaturo tališča
MAF	metilazoksiformaldehid
MAM	metilazoskimetanol
MFK	metilazoksiformna kislina
NMP	normal melting point agarose – agarozna z normalno temperaturo tališča
n. p.	ni podatka
OTM	repni moment po Olivu
PBS	kalij-natrijev fosfatni pufer
RDA	recommended dietary allowances – priporočen dnevni odmerek
RNK	ribonukleinska kislina
SCGE	single cell gel electrophoresis – elektroforeza posameznih celic v gelu
USDA	The United States Department of Agriculture – Ministrstvo za kmetijstvo Združenih držav Amerike
WHO	World Health Organization – Svetovna zdravstvena organizacija

## 1 UVOD

Motiv za nalogo so bile številne objave, ki govorijo o koristnem delovanju kefirja na človeški organizem in njegovo zdravstveno stanje.

Kaj se dogaja z nami, ko redno uživamo fermentirane mlečne izdelke, kisló zelje, šunko, mošt, vino, pivo..., kaj se dogaja z želodcem, dvanajsternikom, tankim črevesom, debelim črevesom,... ožiljem, srcem, glavo... To so pogosta vprašanja, ki si jih človek zastavlja zavestno, pa tudi podzavestno. Precej časa porabimo za iskanje odgovorov na ta vprašanja, saj so pomembna v življenju slehernega človeka.

Pravzaprav še nobeno znanstveno delo ni nedvoumno pojasnilo vseh teh interakcij in kako naj se v njihovem prepletanju vedemo ljudje. Tudi ta naloga ne bo pojasnila vsega, bo se pa dotaknila delčka teh vprašanj in poskušala dati nekatere odgovore.

Kefir je tradicionalni mlečni fermentirani napitek stoletnikov s Kavkaza in nekaj posebnega med vsemi ostalimi mlečnimi fermentiranimi in drugimi izdelki, vsaj kar se tiče svojih pregovornih probiotičnih lastnosti. Posebnost pa je tudi njegov svojstveni biokemijski proces, ki se odvije med nastajanjem izdelka, ko kefirna zrna počivajo v mleku pri 22°C in zaradi katerega rezultatov ga ljudje radi uživamo.

Magistrsko delo je del obširnejše raziskave o vplivu prehrane na kancerogenezo eksperimentalno induciranih črevesnih tumorjev.

Kolorektalni karcinom (KRK) je po pojavnosti in smrtnosti v Sloveniji na drugem mestu med rakavimi obolenji. Mnoge raziskave so pokazale pomemben vpliv prehrane na razvoj KRK. Zato ima uravnotežena prehrana pomembno vlogo pri zmanjševanju obolevnosti za to vrsto raka. V literaturi so rezultati epidemioloških in eksperimentalnih študij o vplivu pitja alkoholnih pijač na razvoj KRK divergentni. Malo je tudi podatkov o vplivu hrane z različno vsebnostjo maščob, v kombinaciji z uživanjem alkohola na razvoj KRK. Po drugi strani je nekaj eksperimentalnih podatkov o inhibitorni vlogi fermentiranih mlečnih proizvodov na razvoj KRK, medtem ko so epidemiološki rezultati divergentni. Ni najti podatkov o vlogi različne vsebnosti maščob v fermentiranih mlečnih izdelkih na razvoj KRK. Mlečni izdelki so pomemben sestavni del prehrane

v Sloveniji. Poznavanje vloge teh izdelkov pri razvoju KRK je zato iz zdravstvenega vidika nacionalnega pomena.

Kefir je eden najstarejših fermentiranih mlečnih izdelkov. Je kisel, rahlo alkoholnen, osvežujoč mlečni napitek. Poreklo kefirja je Kavkaz, kjer ga že stoletja izdelujejo v usnjenih vrečah ali hrastovih sodih iz kozjega, kravjega ali ovčjega mleka (Oberman, 1985; Kočar, 1999). Imenujejo ga različno: kefir (kephir), kiafur (kiaphur), knapon (knapon), kepi (kepi) ali kipi (kippi) (Kwak in sod., 1996). Danes izdelujejo kefir predvsem iz kravjega mleka, pridobivati ga je možno tudi iz sojinega mleka, posamezniki pa proizvajajo tudi tako imenovani »vodni kefir«, brez uporabe mleka (Anfiteatro, 2002). Pripisujejo mu številne zdravilne učinke. Njegovo ime naj bi pomenilo »dobro življenje«.

Od ostalih fermentiranih mlečnih pijač se razlikuje po načinu uporabe starterske kulture. Pri proizvodnji jogurta ali sira na primer, se starterska kultura doda v obliki suspenzije rastočih celic, ki so enakomerno razporejene po mleku. Pri kefirju pa je starterska kultura v obliki kefirnih zrn. Kefirna zrna so bele ali rumenkaste barve in nepravilne oblike, ki spominja na cvet cvetače, lahko pa so tudi ovalne ali kroglaste oblike (Marshall, 1993a). Ob pravilnem ravnanju ne propadejo in jih lahko nešteto krat ponovno uporabimo. Zrna sestavlja simbiotska mikrobna združba kvasovk ter mlečnokislinskih in ostalih bakterij, ki je ujeta v mešanico polisaharidov in proteinov. Mešanica polisaharidov se imenuje kefiran (Steinkraus, 1996).

Zgodovina proizvodnje kefirja se začne z legendami, z industrijsko proizvodnjo pa so začeli Rusi v 30-ih letih dvajsetega stoletja. Danes ga industrijsko proizvajajo mnoge države, vključno s Slovenijo.

Ker pripisujejo kefirju različne zdravilne učinke, med drugim tudi preprečevanje nastajanja KRK, smo želeli na eksperimentalnih živalih (podganah) proučiti vlogo kefirja pri zaviranju KRK.

## 1.1 Hipoteza

Hipoteza naloge je, da bo več tedensko prehranjevanje s kefirjem, mlekom in vodo vplivalo na različno sestavo črevesne mikroflore eksperimentalnih živali. Pričakujemo, da bo prehranjevanje s kefirjem in mlekom povzročilo porast števila predvsem mlečnokislinskih bakterij in bifidobakterij.



Glede na podatke iz literature pa predvidevamo, da bo kefir v primerjavi z vodo in mlekom zaviral razvoj induciranih tumorjev.

Hipotezo bomo preverjali z raziskavo na eksperimentalnih živalih, na eksperimentalnem modelu KRK. Uporabili bomo odrasle samce podgan seva Wistar. Tumorje bomo inducirali s subkutano aplikacijo dimetilhidrazina (25 mg/kg, 1x tedensko, 20 tednov). Kontrolne skupine živali bodo pile vodo in uživale standardno pripravljeno krmo (vsebnost maščob 10 % energijske vrednosti), poskusnim skupinam pa bomo ves čas poskusa v prehrano dodajali eno od testiranih snovi oz. komponent hrane (mleko ali kefir z različnimi odstotki maščob – 1,1 % in 3,5 %).

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 Zgodovina proizvodnje kefirja

Zgodovina proizvodnje kefirja, ene najstarejših fermentiranih mlečnih pijač, se začneja z legendami. Med ljudstvi severnih pobočij kavkaških gora živi legenda, da je *ortodoksnim* vernikom na tem območju kefirna zrna dal Mohamed, ki naj bi skozi to področje potoval pred približno 1400 leti. Naučil jih je tudi izdelovati kefir (Sinclair, 2002). Kot prvi proizvajalci kefirja sta omenjeni dve plemeni: Osetijci in Kabardinijci (Kurmann in sod., 1992). Zrna so imenovali »prerokova zrna«, kefir pa »prerokova pijača«. Verjeli so, da bi zrna izgubila svojo moč, če bi z njimi v stik prišel kdo drug, zato so jih skrbno varovali in jih niso delili z nikomer. Kefirna zrna so obravnavali kot del družinskega in plemenskega bogastva in so jih prenašali iz generacije v generacijo. Druga ljudstva so le občasno slišala pripovedi o tem nenavadnem napitku, ki naj bi imel čudežne lastnosti. Kefir je omenil tudi Marko Polo v svojih kronikah o potovanju na vzhod (Sinclair, 2002).

Kefirna zrna naj bi bila torej darilo Alaha. Pojavljajo pa se tudi namigovanja, da bi kefirna zrna lahko ustrezala opisu »nebeške mane«, ki je padala z nebes, da bi nahranila lačne Izraelce, ko jih je Mojzes vodil v deželo »mleka in medu« (Anfiteatro, 2002).

Kefirja zunaj kavkaških gora dolga stoletja niso poznali. Nato pa se je začela širiti vest o njegovi uporabi za zdravljenje tuberkuloze v sanatorijih ter za zdravljenje želodčnih in črevesnih bolezni. Vendar je bilo v tem času do kefirja izjemno težko priti in komercialna proizvodnja ni bila mogoča, ne da bi najprej prišli do kefirnih zrn (Sinclair, 2002). Vse-ruska zdravniška skupnost je prosila brata Blandov, ki sta bila lastnika tovarne za proizvodnjo sira v mestu Kislovodsk na severnem Kavkazu, za pomoč. Nikolaj Blandov je prepričal lepo uslužbenko, Irino Sakharovo, naj uporabi svojo lepoto za pridobitev kefirnih zrn. Odpotovala je in poskušala prepričati princa Bek-Mirza Barchorova, naj ji omogoči dostop do zrn. Princ je zavrnil njeno prošnjo, prav tako pa se ni hotel odpovedati prisotnosti lepe Irine. Njegovi agenti so jo ujeli, ko se je vračala v Kislovodsk in jo pripeljali nazaj. Njena delodajalca sta jo rešila, ona pa je proti princu vložila tožbo na carskem sodišču. Princ ji je v opravičilo ponudil zlato in dragulje, a Irina je zahtevala, in tudi dobila, kefirna zrna kot poravnava za svojo ugrabitev. Prve steklenice kefirja je v Moskvo prinesla septembra 1908. V začetku so ga uporabljali le v medicinske namene (Kefir, Yoghurt ..., 2002). V letu 1973 je minister Prehrambene industrije Sovjetske zveze poslal pismo Irini Sakharovi, v katerem se ji zahvaljuje, da je ruskemu ljudstvu prinesla kefir (Steinkraus, 1996).

S komercialno proizvodnjo kefirja so začeli v Rusiji v 30-ih letih dvajsetega stoletja. Prvi komercialni postopek proizvodnje je vključeval gojenje določene količine kefirnih zrn v mleku, nato so to mleko odcedili in ga dodali večjim količinam svežega mleka. Mešanico so nato inkubirali pri določeni temperaturi in jo po inkubaciji pustili, da se ohladi. Vendar ta proizvod ni imel enakega okusa kot kefir, pridelan po tradicionalnem postopku. V 50-ih letih so delavci raziskovalnega inštituta (imenoval se je »All-Union Dairy Research Institute«) razvili nov postopek, ki je omogočil pridobivanje pijače, dovolj podobne tradicionalno pridobljenemu kefirju (Sinclair, 2002).

Danes je kefir najbolj priljubljeno fermentirano mleko v Rusiji. Dosega približno 65 % prodaje izdelkov iz fermentiranega mleka. Povprečna poraba na prebivalca znaša med 0,5 l in 0,8 l kefirja na dan (Steinkraus, 1996). Komercialno ga proizvajajo tudi v mnogih drugih državah, kot so Češka, Slovaška, Finska, Madžarska, Norveška, Švedska, Poljska, mnoge države bivše Sovjetske Zveze, Danska, Združene države Amerike, Francija, Nemčija, Kanada, v nekaterih predelih jugovzhodne Azije (Rea in sod., 1996; Marshall, 1993b; Steinkraus, 1996) ter tudi v Sloveniji.

### **2.1.1 Tradicionalni način pridobivanja kefirja**

Kefir so izdelovali iz kravjega, kozjega ali ovčjega mleka v vrečah (mehovih) iz živalskih kož. Občasno so ga izdelovali tudi v glinenih loncih, lesenih čebrih ali hrastovih sodih. V mleko so dodali kefirna zrna in pustili, da je fermentacija potekala 24 ur pri sobni temperaturi. Ob hladnejšem vremenu so usnjene vreče čez dan obesili na sonce in jih zvečer prinesli nazaj v hišo. Imeli so navado, da je vsak obiskovalec ob prihodu in odhodu vrečo nežno zazibal in s tem premešal vsebino (Sinclair, 2002). Občasno so izvedli še sekundarno fermentacijo, a brez kefirnih zrn. Kefir so prelili v lesene sode, včasih dodali sveže mleko, zaprli in onemogočili dostop zraka ter vsebino pustili fermentirati nekaj dni. Dobili so napitek z večjo vsebnostjo CO<sub>2</sub> in rahlo višjo alkoholno stopnjo (Anfiteatro, 2002).

### **2.1.2 Uporabnost kefirja**

#### **2.1.2.1 Prednost kefirja pred mlekom**

Kefir je primerno živilo za ljudi, ki niso zmožni prebavljati mleka zaradi laktozne intolerance. Vzrok je odsotnost encima laktaze. V kefirju med fermentacijo kefirna mikroflora razgradi večino

laktoze, jo pretvori v mlečno kislino in ljudje z oslABLJENO sposobnostjo razgradnje laktoze ga lažje prebavijo. Pri otrocih, z oslABLJENO prebavo laktoze, se lahko uporabi kot dopolnilo prehrani ali celo kot nadomestek za materino mleko (Spreer, 1998).

### 2.1.2.2 Zdravilni učinki kefirja

Zdravilni učinki, ki jih pripisujejo kefirju, so številni (Marshall, 1993a; Marshall, 1993b; Gorski, 1994; De Vrese, 1994; Libudzisz in Piatkiewicz, 1990; Juteršek, 1999):

- Učinki na prebavni trakt (ugodno vpliva na črevesno mikrofloro, odpravlja želodčne težave)
- Učinki na lipide v krvi, znižuje holesterol
- Učinki na sladkor v krvi
- Izboljša presnovo maščob, sladkorja in beljakovin
- Zavira proces staranja (vsebuje protitumorne snovi in antioksidante)
- Okrepi imunski sistem
- Preprečuje okužbe (protimikrobni učinki)
- Pomaga pri preprečevanju vnetja ledvic
- Pomaga pri zdravljenju tuberkuloze (uporaba v te namene predvsem v Rusiji)
- Blaži stranske učinke zdravil
- Pripomore k hitrejšemu okrevanju po boleznih
- Razstruplja organizem
- Ugodno vpliva na reproduktivne funkcije (hormone, libido, plodnost)
- Ugodno vpliva na doječe matere in dojenčke, varuje pred okužbami in alergijami
- Pomaga astmatikom
- Pomaga pri slabokrvnosti
- Pomaga pri zdravljenju aken
- Pomirja, sprošča napetost
- Odpravlja težave z nespečnostjo
- Pomaga pri depresiji
- Lajša težave bolnikov z AIDS-om in obolelih za rakom

Poleg osnovnih hranil vsebuje kefir še vitamine skupine B (B<sub>3</sub>, B<sub>5</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, folna kislina), biotin, minerale (kalcij, magnezij), esencialne amino kisline (npr. triptofan) in velike količine fosforja, ki je po količini druga sol v telesu.

### 2.1.2.3 Uporaba v kulinariki

Možnosti uporabe pri pripravi jedi so številne. Primeren je za pripravo solatnih prelivov, poletnih hladnih juh, kot preliv za žgance ali kosmiče, dodatek zrezkom, pečenkam, divjačini, pa tudi pecivu. Uporaben je tudi za pripravo sladolediv, sadnih frapejev in drugih osvežilnih pijač. Ker nasiti in ne redi, je primeren tudi kot dietna hrana.

### 2.1.3 Dinamika mikrobne populacije v kefirnem zrnu in kefirju

Kefir se od ostalih fermentiranih mlečnih pijač razlikuje po načinu uporabe starterske kulture. V nasprotju s suspenzijo rastočih celic, ki so v mleku pri proizvodnji jogurta ali sira enakomerno razporejene, je starterska kultura za kefir v obliki kefirnih zrn (Marshall, 1993a). Kefirna zrna so bele ali rumenkaste barve in nepravilne oblike. Vsebujejo simbiotsko mikrobno združbo (kvasovke, mlečno kislinske bakterije in pogosto tudi očetno kislinske bakterije), ki je ujeta v mešanico polisaharidov in proteinov. Elastični polisaharidni matriks so poimenovali kefiran (Wood in Hodge, 1985; Juteršek, 1999).

Kefirna zrna v mleku ustvarijo fizikalno-kemijske pogoje, ki zavrejo rast večine mikroorganizmov. Zrno je simbiotska asociacija kvasovk in mlečnokislinskih bakterij (*Lactobacillus* spp.), ki povzročijo kislinsko-alkoholno fermentacijo mleka. Vsebuje lahko tudi druge vrste bakterij, vendar nekateri avtorji trdijo, da je prisotnost drugih mlečnokislinskih bakterij (npr. *Lactococcus* spp. in *Leuconostoc* spp.), očetno-kislinskih bakterij (*Acetobacter* spp.), enterobakterij ter nekaterih drugih bakterijskih vrst, posledica pomanjkanja aseptičnega dela med postopkom pridobivanja kefirja. Drugi avtorji pa menijo, da so vrste iz rodov *Lactococcus* in *Leuconostoc* del običajne mikrobne združbe kefirnih zrn. Prav tako so očetno kislinske bakterije ponekod navedene kot del normalne mikroflore, drugje pa jih obravnavajo kot kontaminante (Angulo in sod., 1993, Witthuhn in sod., 2005).

Izmed mlečnokislinskih bakterij kefirja se, predvsem v starejših zapisih, zelo pogosto omenja bakterija *Lactobacillus caucasicus*. Vendar avtentični sev te bakterije ne obstaja več, poleg tega pa se je izkazalo, da je v ATCC (American Type Culture Collection) shranjena kultura te bakterije mešanica različnih laktobacilov. Raziskovalci so ponovno preučili najpogosteje izoliran heterofermentativni laktobacil in ga opisali kot novo vrsto, z imenom *Lactobacillus kefir* (Marshall, 1984).

Preglednica 1 prikazuje najpogostejše kvasovke in bakterije, izolirane iz kefirja in kefirnih zrn ter občasno prisotne bakterije, ki so najverjetneje posledica kontaminacije.

Preglednica 1: Mikroflora kefirja in kefirnih zrn – najpogostejši predstavniki (Marshall, 1993b; Angulo in sod., 1993; Spreer, 1998, Euzéby, 2002)

Table 1: Microflora of kefir and kefir grains – most important species representatives (Marshall, 1993b; Angulo in sod., 1993; Spreer, 1998, Euzéby, 2002)

	<b>Mlečno-kislinske bakterije</b>	
rod <i>Lactobacillus</i>	rod <i>Streptococcus/Lactococcus</i>	rod <i>Leuconostoc</i>
<i>Lb. brevis</i>	<i>Lac. lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	<i>Leuc. cremoris</i>
<i>Lb. cellobiosus</i>	<i>Lac. lactis</i> var. <i>diacetylactis</i>	<i>Leuc. mesenteroides</i>
<i>Lb. acidophilus</i>	<i>Lac. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	
<i>Lb. fermentum</i>	<i>S. thermophilus</i>	
<i>Lb. kefir</i>		
<i>Lb. kefiranofaciens</i>		
<i>Lb. casei</i> ssp. <i>alactosus</i>		
<i>Lb. casei</i> ssp. <i>tolerans</i>		
<i>Lb. casei</i> ssp. <i>rhamnosus</i>		
<i>Lb. casei</i>		
<i>Lb. helveticus</i>		
<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i>		
<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>		
<i>Lb. viridescens</i>		
<b>Kvasovke</b>	<b>Ocetno-kislinske bakterije</b>	<b>Kontaminanti</b>
<i>Kluyveromyces lactis</i>	<i>Acetobacter aceti</i>	<i>Pediococcus</i> spp.
<i>K. marxianus</i>	<i>Acetobacter rasens</i>	<i>Micrococcus</i> spp.
<i>Candida kefir</i>		<i>Bacillus</i> spp.
<i>Candida pseudotropicalis</i>		<i>Acetobacter</i> spp.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		<i>Escherichia coli</i>
<i>Saccharomyces exiguus</i>		
<i>Saccharomyces unisporus</i>		
<i>Torulasporea delbrueckii</i>		
<i>Torulopsis holmii</i>		

Iz kefirnih zrn so izolirali zelo širok spekter, ne le vrst, tudi rodov mikrobov: *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Acetobacter* in družin kvasovk. Med temi bakterijami in kvasovkami obstajajo simbiotski odnosi, kar pomeni, da preživijo in se razmnožujejo s pomočjo medsebojnega vzpodbujanja preko metabolitov, ki jim služijo kot vir energije ali rastni faktorji – gre za uravnotežene medsebojne odnose. Prisotni so lahko tudi bakteriocini (Marshall, 1993b). Šarže kefirnih zrn iz različnih virov se ponavadi med seboj razlikujejo v sestavi mikrobne populacije. V resnici se tudi mikroflora kefirnih zrn s precepljanjem postopno spreminja. To je odvisno od okoljskih pogojev, predvsem od razpoložljivih hranil in pogojev kultivacije. Številni opisi kefirja so nastali na osnovi dolgoletnih izkušenj posameznih opazovalcev, da pa bi to spravili v znanstvene okvire, bo, po mnenju različnih raziskovalcev, potrebno še precej raziskav (Angulo s sod., 1992; Leroi in Pidoux, 1993; Rea s sod., 1996; Marshall, 1993b; Witthuhn in sod., 2005).

Deleži posameznih mikroorganizmov se v kefirju in kefirnih zrnih razlikujejo. V splošnem predstavljajo vrste rodu *Lactobacillus* 65 – 80 % mikrobne populacije v zrnih, ostalih 20 % predstavljajo vrste iz rodov *Lactococcus*, *Streptococcus* in različne vrste kvasovk, ki so lahko laktoza nefermentirajoče ali laktoza fermentirajoče (Marshall, 1993a). Preglednica 2 prikazuje prisotnost nekaterih mikroorganizmov v kefirnih zrnih in kefirju.

Preglednica 2: Število nekaterih predstavnikov mikroflore v kefirnih zrnih in kefirju (Marshall, 1993a)

Table 2: Numbers of some microflora species representatives in kefir grains and in kefir (Marshall, 1993a)

<b>Mikroorganizem</b>	<b>Kefirna zrna</b>	<b>Kefir</b>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10 <sup>6</sup> Ke /g	10 <sup>5</sup> Ke /ml
<i>Candida kefir</i>	10 <sup>8</sup> Ke /g	-
<i>Candida pseudotropicalis</i>	-	10 <sup>6</sup> Ke /ml
<i>Lactobacillus kefiri</i>	10 <sup>9</sup> Ke /g	10 <sup>6</sup> - 10 <sup>8</sup> Ke /ml
<i>Lactobacillus brevis</i>	10 <sup>6</sup> Ke /g	10 <sup>6</sup> Ke /ml
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	10 <sup>8</sup> Ke /g	-
<i>Lactobacillus casei</i>	-	10 <sup>6</sup> Ke /ml
<i>Lactococcus lactis</i>	-	10 <sup>9</sup> Ke /ml
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	10 <sup>6</sup> Ke/g	10 <sup>6</sup> Ke /ml
Ocetno-kislinske bakterije	10 <sup>8</sup> Ke /g	10 <sup>6</sup> Ke /ml

Legenda: - = ni podatka; Ke = kolonijske enote

Nekateri raziskovalci, kot na primer Angulo s sod. (1993) in Anfiteatro (2002) predlagajo, da bi poleg glavnih štirih skupin mikroorganizmov, prisotnih v kefirnih zrnih, morali prišteti še peto – koliformne mikroorganizme, ki vendarle predstavljajo avtohtono mikrofloro. Kavkaška ljudstva so uživala kefir skupaj s koliformnimi bakterijami, prav tako njihovi stoletniki. Ne smemo tudi pozabiti, da so poleg kefirja uživali tudi sama kefirna zrna, kar je morda še dodaten ključ k njihovi visoki starosti. To področje je še posebej slabo raziskano.

### 2.1.3.1 Mlečnokislinske bakterije

Mlečnokislinske bakterije kefirja in kefirnih zrn so homofermentativne (homolaktična fermentacija, pri kateri kot večinski produkt nastaja mlečna kislina) in heterofermentativne (heterolaktična fermentacija, pri kateri poleg mlečne kisline nastajata tudi etanol in CO<sub>2</sub>; lahko nastane tudi očetna kislina) (Angulo in sod, 1993; Madigan in sod., 2000; Adnan, 2002).

V rodu *Lactobacillus* najdemo tako homofermentativne kot tudi heterofermentativne predstavnike. Med homofermentativne spadajo *Lactobacillus casei* ssp. *tolerans*, *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus* in nekateri drugi. Heterofermentativni laktobacili v kefirju in kefirnih zrnih so: *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus viridescens*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus fermentum* in nekateri drugi (Angulo in sod, 1993; Adnan, 2002).

Vrste rodov *Streptococcus* in *Lactococcus* so homofermentativne, rodu *Leuconostoc* pa heterofermentativne (Madigan in sod., 2000).

V raziskavah, ki so jih opravili Kandler in Kunath (1983), Marshall (1984) in Wood in Hodge (1985) so ugotovili, da predstavljajo laktobacili večino mikrobne flore kefirnih zrn in 90 % izoliranih bakterij tega rodu je homofermentativnih. Preostalih 10 % bakterij iz rodu *Lactobacillus* v zrnih predstavlja heterofermentativni *Lactobacillus kefir*. V kefirju je 80 % vseh prisotnih laktobacilov heterofermentativnih, vrste rodov *Lactobacillus* (dominira *Lactobacillus kefir*) in *Leuconostoc* pa so enako številčne. Poveča se tudi delež bakterij iz rodu *Streptococcus*.

#### 2.1.3.1.1 *Lactobacillus kefir*

Prvotno ime; *Lactobacillus kefir*, je bilo v letu 1997 spremenjeno v *Lactobacillus kefir* (Euzéby, 2002). *Lactobacillus kefir* je po Gramu pozitivna, mikroaerofilna, nesporulirajoča, negibljiva,



heterofermentativna bakterija, paličaste oblike, z zaobljenimi konci. Na terminalnih koncih pogosto vsebuje polifosfatne granule. Bakterije so pogosto v verižicah. Kolonije na MRS agarju (De Man, Rogosa and Sharp agar) so sivkaste barve, gladke in ploščate, velike od 2 do 4 mm. Raste pri temperaturah med 10 °C in 40 °C, optimalno pri 30 °C (Kandler in Kunath, 1983; MRS agar ..., 2002).

#### **2.1.3.1.2 *Lactobacillus casei***

Je po Gramu pozitivna, nesporulirajoča bakterija paličaste oblike z oglatimi konci, aerotolerantna in anaerobna. Bakterije tvorijo kratke ali dolge verižice. Raste med 15 °C in 45 °C, optimalno pri 37 °C. Prevladujoči produkt homolaktične fermentacije je mlečna kislina, nastane tudi nekaj očetne kisline, etanola in CO<sub>2</sub>. Najdemo ga predvsem v mlečnih izdelkih (Chandan in Shahani, 1995; Bergey's ..., 1994).

#### **2.1.3.1.3 *Lactobacillus acidophilus***

Je po Gramu pozitivna, nesporulirajoča mikroaerofilna bakterija paličaste oblike z zaobljenimi konci. Bakterije se nahajajo posamezno, v parih ali v kratkih verižicah. Temperaturno območje rasti sega od 20 °C do 48 °C; temperaturni optimum ima pri 37 °C. Je homofermentativen, večinski produkt fermentacije je mlečna kislina, nastane pa tudi nekaj očetne kisline. Najdemo ga predvsem v mlečnih izdelkih (Chandan in Shahani, 1995; Bergey's ..., 1994).

#### **2.1.3.1.4 *Lactococcus lactis***

Je po Gramu pozitivna kroglasta bakterija, ki se najpogosteje nahaja v parih ali kratkih verižicah. Je nesporulirajoča bakterija, anaerobna, a ni občutljiva za prisotnost kisika (aerotolerantna). Raste med 8 °C in 40 °C, optimalno med 28 in 31 °C. S homolaktično fermentacijo nastane predvsem mlečna kislina. Prisotna je predvsem v mlečnih izdelkih (Chandan in Shahani, 1995; Bergey's ..., 1994).

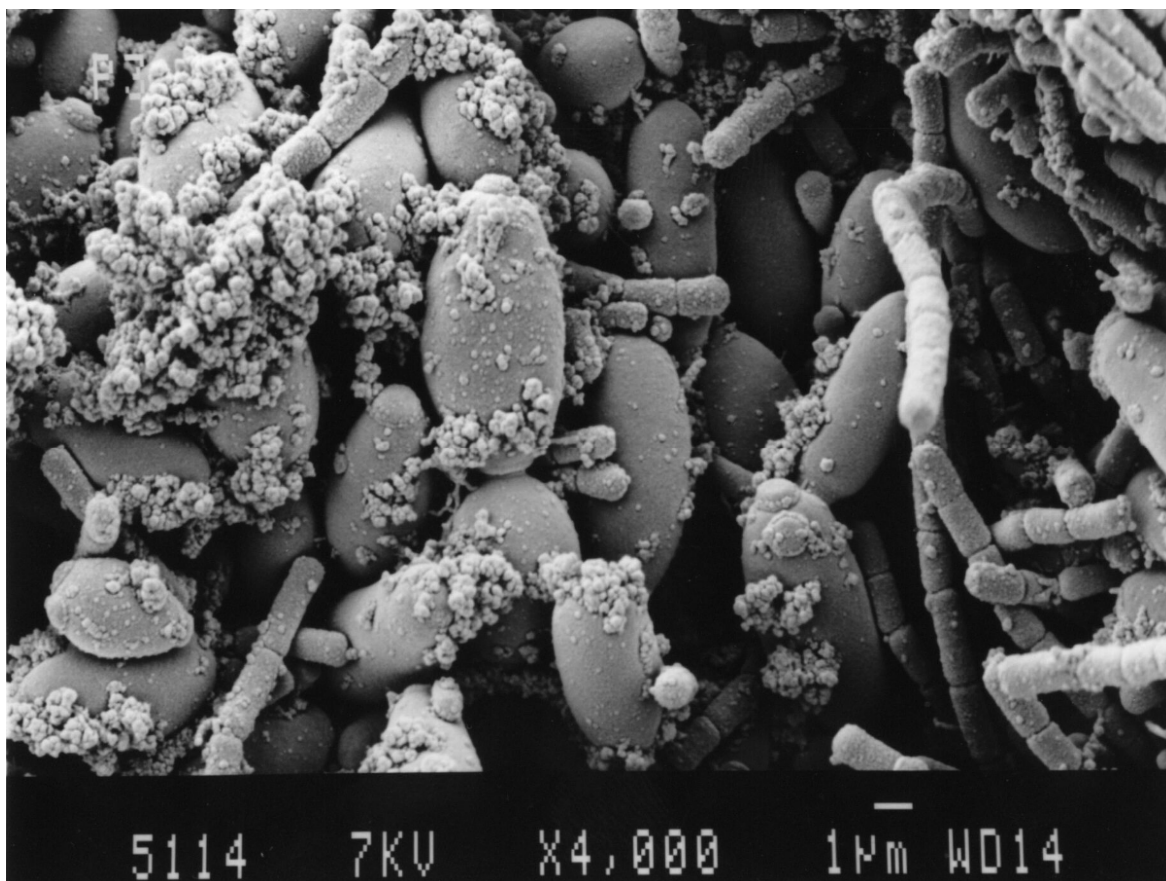
#### **2.1.3.1.5 *Leuconostoc mesenteroides***

Je po Gramu pozitivna nesporulirajoča kokoidna bakterija, ki se nahaja v parih ali verižicah. Je aerotoleranten anaerob. Raste med 4 °C in 37 °C, optimalno med 20 in 25 °C. Fermentacija rodu

*Leuconostoc* je heterolaktična. Nastaja mlečna kislina, očetna kislina, CO<sub>2</sub> in lahko tudi alkohol. Najdemo ga predvsem v mlečnih izdelkih (Chandan in Shahani, 1995; Bergey's ..., 1994).

### 2.1.3.2 Kvasovke

Kvasovke so v kefirju pomembne predvsem zaradi proizvodnje etanola in ogljikovega dioksida. Med kvasovke, ki niso sposobne fermentirati laktoze (laktoza negativne), spadajo *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii*, *Saccharomyces unisporus*, *Saccharomyces exigus*, *Torulopsis holmii* in *Candida colliculosa*. Predstavniki laktoza pozitivnih kvasovk so *Candida kefir*, *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces fragilis* in *Torulaspora kefir* (Angulo in sod., 1993; Juteršek, 1999).



Slika 1: Del kefirnih zrn, kjer prevladujejo kvasovke (elektronski mikroskop, povečava 4000x)

Figure 1: Section of kefir grains where yeasts predominate (electronic microscope, magnification 4000x)

V kefirnih zrnih prevladujejo predvsem kvasovke, ki niso sposobne fermentacije laktoze, na primer *Saccharomyces cerevisiae* in *Torulaspora delbrueckii* – kvasovki, ki sta v kefirnih zrnih

najpogosteje prisotni. V kefirju pa prevladujejo laktoza pozitivne kvasovke, kot so *Candida kefir* in *Kluyveromyces marxianus*. *Candida kefir* je anamorf (nespolna oblika) kvasovke *Kluyveromyces marxianus* (Angulo, 1993; Juteršek, 1999).

#### **2.1.3.2.1 *Kluyveromyces marxianus***

*Kluyveromyces marxianus* je askomicetna kvasovka. Vrsti *Kluyveromyces bulgaricus* in *Saccharomyces kefir*, ki sta pogosto omenjeni kvasovki v kefirju, sta zgolj sinonima za vrsto *Kluyveromyces marxianus* (Barnett in sod., 2000).

Kolonije *Kluyveromyces marxianus* so bele ali krem barve. Vegetativno se razmnožuje z brstenjem. Tvori enostavne psevdohife. V asku nastanejo največ štiri gladke, ovalne, okrogle ali ledvičaste askospore. Fermentira glukozo, laktozo in nekatere druge sladkorje, kot so galaktoza, maltoza, trehaloza in je pomemben producent etanola v kefirju. Dobro raste pri temperaturah do 37 °C, določeni sevi pa rastejo tudi pri 45 °C (Barnett in sod., 2000). Poleg kefirja so jo izolirali tudi iz drugih živil jogurta, kvasa, kumisa, sira in nekaterih drugih mlečnih izdelkov (Barnett in sod., 2000).

#### **2.1.3.2.2 *Saccharomyces cerevisiae***

Anamorf: *Candida robusta*

Kolonije askomicetne kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* so bele ali krem barve. Vegetativno se razmnožuje z brstenjem (Slika 1) in lahko tvori preproste psevdohife, ni pa nujno. Aski vsebujejo največ štiri ovalne ali okrogle askospore. Fermentira glukozo, galaktozo, maltozo in nekatere druge sladkorje, laktoze ne. Raste pri temperaturah do 30 °C, nekateri sevi do 42 °C (Barnett in sod., 2000). *Saccharomyces cerevisiae* je najbolj poznana kot pekovska kvasovka, prisotna je tudi v vinu, pivu, sadju, sadnih sokovih, kisu, kefirju in nekaterih drugih živilih (Barnett in sod., 2000).

#### **2.1.3.2.3 *Saccharomyces unisporus***

Je askomicetna kvasovka; kolonije so bele ali krem barve. Vegetativno se razmnožuje z brstenjem in ne tvori filamentov. Vsak ask vsebuje eno gladko, okroglo askosporo. Fermentira glukozo in galaktozo, laktoze ne. Raste pri temperaturah do 35 °C (Barnett in sod., 2000).

Poleg kefirja so jo izolirali tudi iz nekaterih sirov (Barnett in sod., 2000).

#### 2.1.3.2.4 *Torulopsis holmii*

Teleomorf: *Saccharomyces exiguus*.

Kolonije kvasovke *Torulopsis holmii* so bele, okrogle, z gladkimi robovi. Vegetativno se razmnožuje z brstenjem. Ask vsebuje 1 do 4 okrogle ali elipsoidne askospore z gladkimi stenami. Raste pri temperaturah, nižjih od 37 °C (pri 37 °C ni rasti) in prenese zelo nizke pH vrednosti: rast do pH 1,5 (Pitt in Hocking, 1997). Fermentira galaktozo in glukozo. V gojišču, kjer sta prisotna oba sladkorja, preferenčno uporablja galaktozo (Marshall, 1993b). Pogosto je prisoten v slanici v zgodnji stopnji fermentacije kumaric in v nekaterih drugih živilih, kot so zelene olive, kefir, siri (Pitt in Hocking, 1997).

#### 2.1.3.3 Očetno-kislinske bakterije

Očetno-kislinske bakterije, prisotne v kefirnih zrnih, nekateri obravnavajo kot normalno floro, drugi pa kot kontaminente. Najpogostejša predstavnika sta *Acetobacter aceti* in *Acetobacter rasens*. Te bakterije nepopolno oksidirajo alkohole in sladkorje do organskih kislin. Produkt nepopolne oksidacije etanola je očetna kislina (Madigan in sod., 2000).

##### 2.1.3.3.1 *Acetobacter aceti*

Je proteobakterija, po Gramu negativna. Celice so elipsoidne ali paličaste oblike, ravne ali ukrivljene. Optimalno raste pri temperaturah med 25 °C in 30 °C in je tolerantna na pH vrednosti, nižje od pH 5. Je aerobna bakterija, ki nepopolno oksidira alkohole in sladkorje, kar vodi v akumulacijo organskih kislin. Etanol oksidira do očetne kisline. *Acetobacter aceti* najdemo v kefirju, sakeju, vinu, palmovem vinu, kisu, pivu (Madigan in sod., 2000; Bergey's ..., 1994).

#### 2.1.3.4 Kontaminenti

Prisotnost kontaminentov je lahko posledica mikrobioloških lastnosti uporabljenega mleka in/ali pomanjkanja aseptičnega dela med postopkom pridobivanja kefirja. Ob uporabi surovega ali pasteriziranega mleka se pogosto izolirajo vrste iz rodov *Bacillus*, *Micrococcus* in *Pediococcus*. Drugi vir kontaminacije je pomanjkanje higiene med postopkom, pri čemer je možen vnos enterobakterij. Možen je tudi vnos vrst rodu *Acetobacter* (Angulo in sod., 1993).

## 2.1.4 Kefirna zrna in kefiran

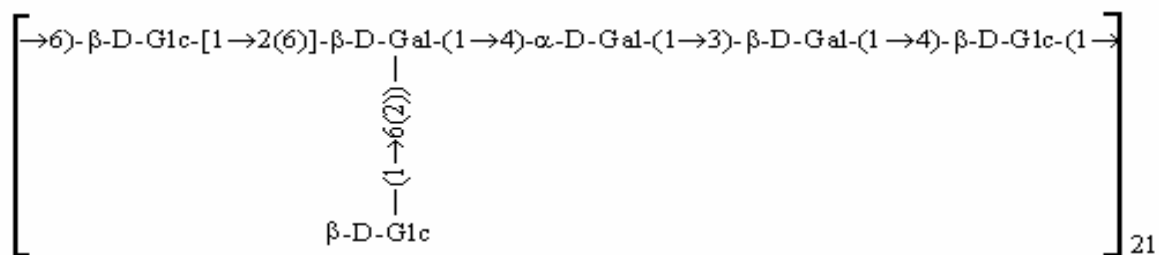
Kefirna zrna so bele ali rumenkaste barve, njihova nepravilna oblika spominja na cvet cvetače. Velika so od 5 mm do 3,5 cm, včasih tudi večja (Oberman, 1985; Marshall, 1993a). V kefirnem zrnju je okoli 10 % suhe snovi, ki jo večinoma sestavljajo ogljikovi hidrati (56 %) in proteini (32 %) (Spreer, 1998).



Slika 2: Kefirna zrna (Canon A95)

Figure 2: Kefir grains (Canon A95)

Mikrobna združba je v zrnju ujeta v elastičen polisaharidni matriks, imenovan kefiran, ki ustvarja naravni sistem imobiliziranih celic (Steinkraus, 1996). Sestavljen je iz razvejanih verig, ki vsebujejo D-glukozo in D-galaktozo (Slika 3). Deleža glukoze in galaktoze sta enaka. Topen je v vroči vodi, v hladni je netopen. Encimi ga večinoma ne hidrolizirajo (Wood in Hodge, 1985; Kooiman, 1968).

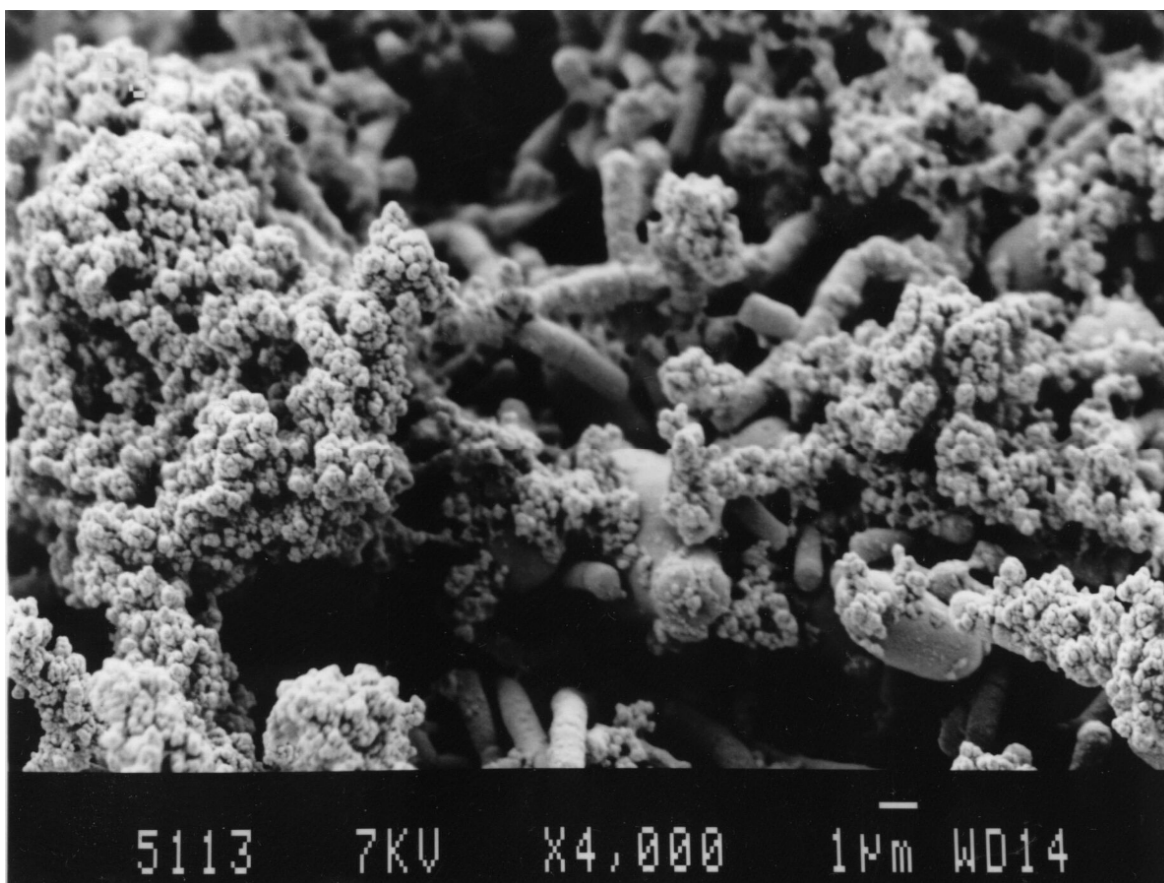


Slika 3: Kemijska struktura kefirana (Kooiman, 1968)

Figure 3: Chemical structure of kefiran (Kooiman, 1968)

Kefiran sintetizirajo bakterijske celice med razmnoževanjem (Wood in Hodge, 1985). Ni še dokončno potrjeno, katere bakterije iz rodu *Lactobacillus* ga proizvajajo, a kaže, da je glavni producent eksopolisaharidnega matriksa v kefirnem zrnju *Lactobacillus kefiranofaciens* (Rea in sod., 1996), morda pa sodelujejo tudi bakterije iz rodu *Lactococcus* (Marshall, 1993a). Če jih gojimo v čisti kulturi, to sposobnost izgubijo (Wood in Hodge, 1985). Obsežno obdajanje mikrobne populacije s kefiranom preprečuje difuzijo hranilnih snovi in metabolitov, zato na določenih delih zrna celice lizirajo (Kočar, 1999).

Poleg kefirana z ujetimi mikroorganizmi, sestavlja gobasto strukturo kefirnega zrna tudi del mlečne maščobe in denaturiranih mlečnih proteinov, ki so povezani s polisaharidnim matriksom (Kurmann in sod., 1992).



Slika 4: Mikroorganizmi prekriti s polisaharidnim matriksom (elektronski mikroskop, povečava 4000x)

Figure 4: Microorganisms covered with kefiran matrix (electronic microscope, magnification 4000x)

Razporeditev mikroorganizmov v kefirnem zrnju je nesimetrična. Elektronska mikroskopija je pokazala, da kvasovke dominirajo v centru zrna in da ima ta osrednji del veliko manj številčno mikrobno populacijo v primerjavi s perifernim delom, ki ga naseljujejo bakterije (Wood in Hodge, 1985). Vendar osrednji del ni naseljen izključno s kvasovkami. V njem se nahaja tudi nekaj bakterij – laktobacilov dolge paličaste oblike. Prav tako perifernega dela ne naseljujejo izključno bakterije (laktobacili kratke paličaste oblike) – tudi na površini zrna so prisotne kvasovke. Kvasovke na površini zrna fermentirajo laktozo, medtem ko kvasovke v osrednjem delu nimajo te lastnosti (Marshall, 1993a,b).

Mikroorganizmi v kefirnih zrnih so sposobni preživeti kontaminacijo z drugimi mikroorganizmi. Pomemben dejavnik pri vzdrževanju ugodne in specifične ekološke niše je kefiran (Wood in Hodge, 1985), rast ostalih mikroorganizmov pa zavirajo tudi z metabolo aktivnostjo: z zniževanjem pH v okolju in s produkcijo bakteriocinov (Juteršek, 1999). Med proizvodnjo kefirja mikroorganizmi ne propadejo in ista zrna je mogoče nešteto krat ponovno uporabiti (Wood in Hodge, 1985).

Pri mikroskopskem pregledu kefirnih zrn, fiksiranih v formalinu, so ugotovili, da so sestavljena iz proteinsko-polisaharidno-maščobnega kompleksa, sestavljenega pretežno iz netopnih proteinov in nevtralnih mukoznih-polisaharidov. Liofilizirana kefirna zrna, z vsebnostjo vlage 3,5 %, ki jih je proučeval ruski raziskovalec Dmitrichenko (1974) so vsebovala:

- maščoba 4.4 %
- pepel 12.1 %
- mukozni-polisaharidi 45.7 %
- skupne beljakovine 34.3 %; netopne beljakovine 27.0 %, topne beljakovine 1.6 % in proste aminokisliline 5.6 %

Dmitrichenko (1974) je na površini kefirnih zrn opazil amorfnu in kristalinično železo. V notranjosti zrn je lahko opazil tudi kristale velikosti 1-5  $\mu\text{m}$ .



Slika 5: Suha kefirna zrna (Canon A95)

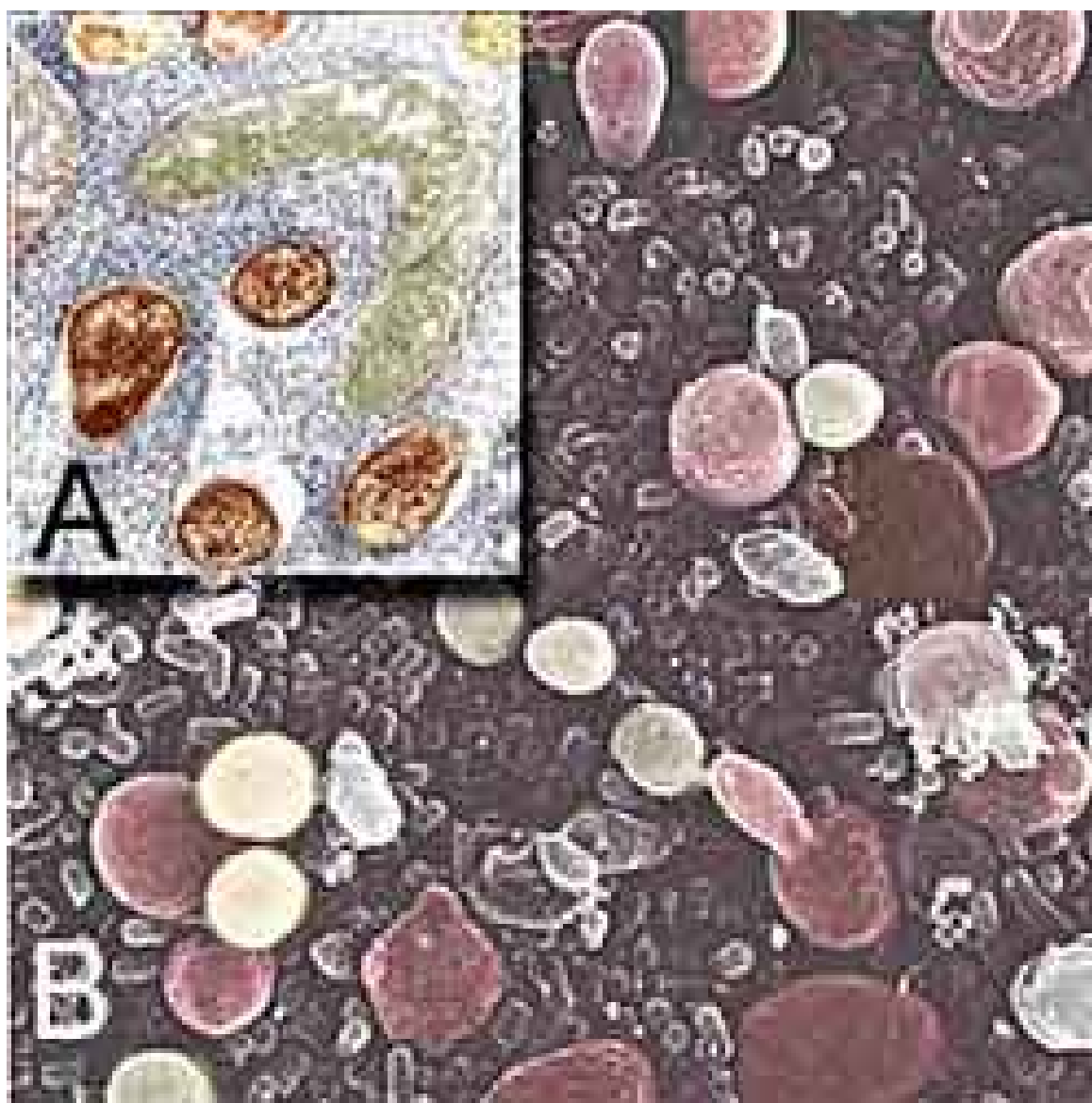
Figure 5: Dry kefir grains (Canon A95)

#### 2.1.4.1 Izvor kefirnih zrn

Izvor kefirnih zrn ni znan. Vsi laboratorijski poskusi reprodukcije zrna iz čistih kultur mikroorganizmov, ki jih zrno vsebuje, so propadli. Morda je to posledica neuspešne izolacije ključnih organizmov, ki so odgovorni za vzdrževanje strukture zrn, a tega znanstveniki ne morejo z gotovostjo trditi. Bakterije, ki v zrnih izločajo eksopolisaharidni matriks (*Lactobacillus kefiranofaciens* in verjetno tudi druge), to sposobnost izgubijo, če jih gojimo v čisti kulturi. Kavkaška ljudstva so pridobivala kefir v usnjenih vrečah. Vsak dan so iz vreče odlili fermentirano mleko in dodali sveže. Morda je to vodilo v nabiranje plasti mikroorganizmov, ujetih v proteinski in polisaharidni material in sčasoma v tvorbo pravih kefirnih zrn (Rea in sod, 1996; Wood in Hodge, 1985). Med proizvodnjo kefirja se velikost in število zrn v mleku povečujeta. Nova zrna nastanejo, ko se odlomi delec starega zrna in začne rasti (Wood in Hodge, 1985).



## 2.1.5 Razmnoževanje kefirnih zrn



Slika 6: (A) Transmisijska in (B) SCAN elektronska mikrografija kefirnih zrn, ki prikazujeta mešano mikrofloro kvasovk in bakterij v vodi netopnem matriksu (Marshall, 1993b)

Figure 6: (A) Transmission and (B) scanning electron micrographs of kefir grains showing mixed microflora of yeast and bacteria and the water-insoluble matrix (Marshall, 1993b)

Tradicionalna kavkaška kefirna zrna so zanimiva naravna matična starterska kultura. Zrna tvorijo plašček nepravilne ploščate oblike, sestavljen iz polisaharidnega, beljakovinskega in maščobnega kompleksa. Takšni plaščki rastejo na neenakomeren način tako, da tvorijo številne neenakomerne, manjše in večje mešičke, nekakšne brste, ki rastejo in jih lahko imenujemo tudi mlada (otroška) zrnca. Ti mešički tvorijo vase zaprto elastično krpasto biološko strukturo, vsako novo mlado zrnce

pa je povsem svoje oblike. Vsaka izmed teh krpic se povezuje v nekem skupnem središču in se širi navzven medtem, ko je pripeta na neko centralno točko matičnega zrna. Rastni vzorec novega mladega zrnca se vedno znova ponavlja, podobno kot pri matičnem zrnu. Nekatera kefirna zrna so na videz podobna strukturi človeških možganov, pankreasa ali drugih notranjih organov.

Po določenem času in verjetno zaradi zunanjih stresnih vplivov ali poškodb se eden ali več krpastih sekcij loči, osvobodi od matičnega zrna. Ta manjša telesa ali otroška zrnca se sčasoma sama razširijo in povečajo v novo matično zrno. Tak rastni cikel se potem vedno znova ponavlja – temu rečemo samopomnoževanje. Od nekaterih zrn se včasih tudi nekaj mesecev ali celo leto ne odcepi nobeno mlado zrnice (krpica). Takšno zrno, ki zadrži vse svoje novo nastajajoče manjše krpaste biostrukture, lahko močno naraste in njegova biomasa lahko postane zelo velika. Takšno veliko zrno lahko pretrgamo na manjše dele, da se številne manjše krpice hitreje odcepljajo, kar poteče spontano.



Slika 7: Pretrganje kefirnega zrna na dva dela

Figure 7: Tearing kefir grain on two parts

Ta proces se dogaja vedno znova tudi sam od sebe – ko malo zrnce zaceli mesto popkovine (kjer se stika z matičnim zrnem) ali mesto prejšnjega pretrganja, pri čemer pride do oslabitve vezi na teh delih matriksa in kasneje zaradi kakšnega fizičnega vzroka do oddelitve (Slika 7).

Zunanja površina vsakega zrna se spreminja od zelo gladkih delov do delov z veliko raznovrstnimi nepravilnimi oblikami, kjer je veliko majhnih okroglastih štrlečih izboklin, naključno razpršenih po površini. Površina zrna je v veliki meri lahko precej gladka, lahko pa je v isti šarži tudi precej takih zrn, katerih površina je prekrita z neenakomerno grobo hrapavo štrcljasto površino. Nekatera zrna v isti šarži so lahko mešanica obeh skrajnih variant oblike površine. Čeprav redko, ni neobičajno, da se nekateri deli mase kefirnih zrn razmnožujejo kot nepravilni sploščeni cevasti tulci. Lahko pa matično zrno oddeli malo zrnce nepravilne ploščate strukture. Če so razmere ugodne, se tudi takšna zrnca ob večanju počasi spremenijo v običajnejša, večja, vase zaprta zrna. Tak proces pa lahko traja tudi mesece.

Dolgotrajnejša opazovanja kulture kefirnih zrn v polnomastnem kozjem ali kravjem surovem mleku so razkrila, da nastajajo pri takšni kultivaciji pretežno zrna z gladko okroglasto (balonasto) površino, medtem ko zrna, kultivirana v pasteriziranem mleku tvorijo na površini bolj hrapave strukture, s številnimi drobnimi štrlečimi deli, ki prekrivajo večino zunanje površine. Zanimivo je dejstvo, da dolgotrajnejša kultura zrn v steriliziranem mleku privede do precejšnjega zmanjšanja aktivnosti zrn, ki se tudi po velikosti močno zmanjšajo. Na obliko površine zrn in prehajanje iz ene oblike v drugo, lahko močno vplivajo tudi sezonska nihanja kakovosti mleka. Skratka, tip medija, v katerem zrna kultiviramo, močno vpliva na njihovo rast, aktivnost in strukturo (lastna opazovanja 1992-2003).

Nekateri raziskovalci menijo, da je na bolj neenakomernih in hrapavih površinah večja aktivnost kvasovk, na bolj gladkih površinah pa prevladujejo bakterije. Kvasne in bakterijske celice, predvsem kvasovke, se močno namnožijo in skoncentrirajo na površini (mikro-kolonije), kar se kaže kot izbočenje. Notranja struktura zrn kaže na prevlado laktobacilov, med katerimi se nahajajo kvasovke; celice niso povezane ena z drugo, pač pa so ujete (imobilizirane) v mukozni-polisaharidni matriks, katerega ustvarjajo vanj ujete mikroorganizmi (Molska in sod., 1980). Nasprotno so druge študije, v katerih so predele kefirnih zrn barvali in opazovali pod mikroskopom, pokazale, da so kvasovke locirane pretežno na vhodih v luknje, ki vodijo v notranjost zrna, občasno pa so naključno razporejene tudi po kanalih v matriksu, po površju pa se

nahajajo pretežno bakterije (Rosi, 1978). Kratke in podolgovate paličaste bakterije in kvasovke formirajo ločene kolonije na zunanji in na notranji strani kefirnih zrn. Znotraj se filamenti imobiliziranih celic širijo radialno od podolgovatih paličastih bakterij. Še posebno *Lb. kefiranofaciens* naj bi bil odgovoren za tvorbo topnega polisaharida kefirana (Slika 4), medtem, ko *Lb. acidophilus* verjetno tvori cevasti polisaharid, ki daje kefirnemu zrnju elastične lastnosti. Zgodnejše raziskave kažejo na to, da so imobilizirane bakterije odgovorne za razmnoževanje kefirnih zrn (Toba in sod., 1990). Razlog za take zaključke je dejstvo, da se v odsotnosti *Lb. kefiranofaciens*, ki proizvaja kefiran v centru zrna, zrna ne razmnožujejo. Takšna zrna lahko imenujemo nerazmnožujoča se kefirna zrna.

### 2.1.5.1 Mirujoča kefirna zrna in njihova aktivnost

Nekateri raziskovalci so na osnovi svojih raziskav zaključili, da mirujoča kefirna zrna, ki se ne razmnožujejo, ohranijo sposobnost proizvodnje pravega kefirja (Toba in sod., 1990), s čemer se marsikateri opazovalci oz. raziskovalci kefirnih zrn ne strinjajo. Anfiteatro (2002) npr. navaja, da je starterska kultura sposobna iz mleka pripraviti podoben izdelek kot nerazmnožujoča se kefirna zrna. Kombucha starter je želatinasta tvorba, ki podobno kot kefirna zrna tudi vsebuje združbo različnih vrst mikroorganizmov (bakterij in kvasovk). Po 42 mesecih skupne kulture kefirnih zrn in kombucha starterske kulture je bila le ta tudi sama podobna kefirnim zrnom in tudi sama sposobna tvoriti podoben produkt kot kefirna zrna. Ta postopek bi lahko delno nakazoval tudi možen nastanek kefirnih zrn. Namesto kombucha starterja bi v eksperimentu lahko uporabili tudi koščke usnjenih kož. Vendarle pa po ločbi obeh kultur nikjer ni bilo sledi o kefiru, ki je esencialna komponenta razmnožujočih se kefirnih zrn. Narava divjih mikrobov je, da so sposobni kolonizirati porozne materiale, kot so nerazmnožujoča se kefirna zrna, kombucha starter, glineni materiali, leseni sodovi in kosi usnjenih kož. Če se kefir ne proizvaja, potem manjka tudi v končnem izdelku, torej kefirju. Takšne oblike fermentiranih mlečnih izdelkov, proizvedenih iz nerazmnožujočih se kefirnih zrn, se ne morejo klasificirati kot avtentični kefir. Takšni izdelki so bolj podobni komercialno pripravljenemu psevdo kefirju, ki se pripravi s kultivacijo laboratorijsko predpripravljene simulirane mešanice čistih starterskih kultur posameznih mikroorganizmov, ki se nahajajo v avtentičnem kefirju. Takšni izdelki pa se nikakor ne morejo enačiti, niti se ne bi smeli imenovati kefir, saj potvarjajo dejanske karakteristike originalnega avtentičnega izdelka s probiotičnimi lastnostmi. Pravega kefirja torej ne moremo dobiti brez direktnega stika mleka s kefirnimi zrnji (Anfiteatro, 2002).

### **2.1.6 Kefirna zrna – naravna starterska kultura**

Mikrobiološka sestava kefirnih zrn, ki so jih ruski mlekarški tehnologi opisali kot naravni starter, je precej odvisna od vira kefirnih zrn in posamezna kefirna zrna iz različnih virov se lahko po sestavi med seboj močno razlikujejo (Marshall, 1993b). V državah zahodnega sveta seveda velja prepričanje, da pač vse kar obstaja, lahko ponaredimo in simuliramo, in da lahko kontrolirano vodimo procese še učinkoviteje, kot se to dogaja v naravnih procesih oz. z naravnimi starterji. Danes so to zahodnjaško tezo povzele tudi druge dežele, npr. Rusija in Poljska, kjer so se sicer nekoč kefirna zrna tudi industrijsko uporabljala kot naravni starter. Danes se kefir praktično povsod po svetu komercialno proizvaja iz čistih, predpripravljenih mešanih kultur. S tem so masovno zamenjali avtentična kefirna zrna za proizvodnjo mlečnega izdelka, ki ga prodajajo pod imenom *kefir*. Glede na doslej znano in raziskave, so to vendarle ponaredki. Kefirja še vedno ne znamo simulirati brez direktnega stika kefirnih zrn z mlekom, lahko pa proizvodimo kefirju po okusu podoben izdelek (Anfiteatro, 2002; Robinson, 2002).

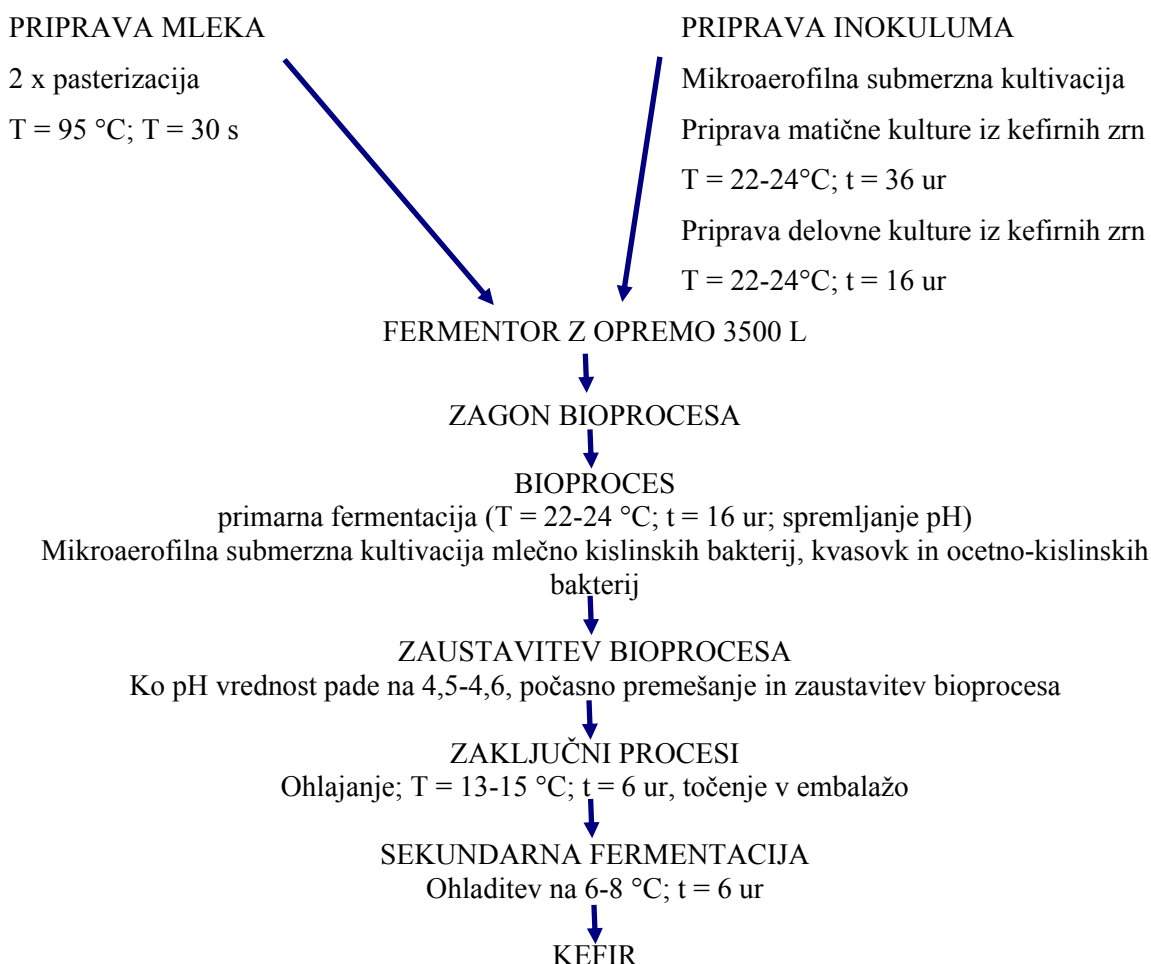
### **2.1.7 Starterske kulture podobne kefirju**

Iz številnih razlogov se je danes razvila in povsod razširila uporaba čistih predpripravljenih mešanih kultur za proizvodnjo izdelkov podobnih kefirju. Mnenje raziskovalcev je, da se te oblike mlečnega izdelka ne bi smele imenovati kefir ali avtentična kefirna starterska kultura. Še posebno naj se ime kefir ne bi uporabljalo za izdelke, pri katerih se kefirna zrna niso uporabila v stalnem direktnem kontaktu z mlekom v procesu kultivacije. Brez kultiviranja tradicionalnih kefirnih zrn, se številne naravne snovi, ki jih proizvajajo, vsebujejo in sproščajo v medij le kefirna zrna, v končnem komercialnem izdelku ne nahajajo, npr. vodotopni polisaharid kefiran. Poleg tega v psevdo-kefirjih manjkajo številni med seboj soodvisni zaščitni faktorji, s katerimi se dokazano zavira razvoj patogene mikroflore v črevesju, ki povzroča neugodne metabolne procese. V primeru označevanja izdelka, kultiviranega z uporabo čistih predpripravljenih mešanih kultur, kot kefir, gre za zavajanje potrošnika. Lahko bi ga poimenovali le kot mlečni fermentirani izdelek z okusom kefirja (Anfiteatro, 2002; Robinson, 2002).

## 2.2 Proizvodnja kefirja

### 2.2.1 Industrijska proizvodnja kefirja

Tradicionalna proizvodnja kefirja poteka v dveh stopnjah. Prva stopnja je priprava matične kulture z uporabo kefirnih zrn, druga pa vključuje primarno in sekundarno fermentacijo. Primarna fermentacija poteka v fermentacijskem tanku (fermentorju), sekundarna fermentacija (oziroma zorenje) pa poteče, ko je kefir že v embalaži (Marshall, 1993b; Boštar, 2002). V nadaljevanju opisani postopek je povzet po protokolu za proizvodnjo kefirja, ki ga uporabljajo v nekaterih mlekarnah in je zelo podoben tradicionalni ruski proizvodnji. Postopek proizvodnje je shematsko prikazan na sliki 8.



Slika 8: Shematski prikaz proizvodnje kefirja (Boštar, 2002)

Figure 8: Schematic presentation of kefir production (Boštar, 2002)

## 2.2.1.1 Pripravljalni procesi

### 2.2.1.1.1 Priprava mleka

Za industrijsko proizvodnjo kefirja uporabljajo pasterizirano posneto mleko ali pasterizirano mleko s standardizirano vsebnostjo maščobe (npr. 0,5 %, 1,5 %, 3,5 %). Različne mlekarnе uporabljajo različne postopke pasterizacije: lahko traja od 5-10 minut pri 85 - 87 °C ali 20 - 30 minut pri 92 – 95 °C, v uporabi pa so tudi drugi postopki (Marshall, 1993b). V slovenski Mlekarni Krepko uporabljajo postopek dvakratne pasterizacije: mleko dvakrat pasterizirajo pri temperaturi 95 °C, 30 sekund (Boštar, 2002). Tudi načinov dvakratne pasterizacije je več. Eden možnih je segrevanje mleka do 87 °C, ohlajevanje na 77 °C in vzdrževanje te temperature 30 minut, na to pa ponovno segrevanje do 87 °C (Marshall, 1993b).

### 2.2.1.1.2 Priprava inokuluma

Kefirna zrna za nadaljnjo prodajo razmnožujejo nekatera podjetja, ki se ukvarjajo s proizvodnjo starterskih kultur (Marshall, 1993b), naprodaj pa so tudi v specializiranih bankah kultur – npr. v Banki kultur v Pragi (Boštar, 2002).

Tradicionalna priprava inokuluma za industrijsko proizvodnjo se začne s pripravo majhnega volumna matične kulture. Zrna dodajo ohlajenemu pasteriziranemu mleku v razmerju 1:10, npr. 1 dl kefirnih zrn na 1 l mleka. Kultivacija poteka 24 - 36 ur pri 20 – 22 °C, po tem času kefirna zrna odzamejo, operejo s sterilizirano vodo, nato pa se lahko ponovno uporabijo za pripravo nove matične kulture (Marshall, 1993b; Boštar, 2002).

Nato sledi priprava 1. delovne kulture: vzorec matične kulture se precepi v večji volumen pasteriziranega mleka (npr. 2 l) in fermentacija poteka 16 ur pri temperaturi 20 – 22 °C. Do te stopnje poteka proizvodnja kefirja pod sterilnimi, laboratorijskimi pogoji. Nadaljuje pa se v nesterilnih, proizvodnih pogojih. Zaželjeno bi bilo sicer sterilno delo, vendar je težko izvedljivo (Boštar, 2002).

Sledi povečevanje volumna – priprava delovne kulture (odvisno od velikosti šarže). Kot inokulum uporabijo 1. delovno kulturo in jo ponovno kultivirajo 16 ur pri 20 – 22 °C (Boštar, 2002).

Matična kultura vsebuje okoli 5 % kvasovk (Marshal, 1993b). Med pripravo delovnih kultur se njihov delež niža na račun povečevanja deleža mlečnokislinskih bakterij, kar pripomore k boljšemu okusu kefirja. Prevelik delež kvasovk povzroči neprijeten, grenak okus kefirja (Boštar, 2002).

## **2.2.2 Proizvodnja kefirja brez uporabe kefirnih zrn**

V proizvodnji fermentiranega mleka z okusom kefirja se je uporabi kefirnih zrn mogoče izogniti. Na voljo so liofilizirane starterske kulture, ki pa vsebujejo samo najpogostejše bakterije in kvasovke, ki so prisotne v kefirnih zrnih in ne celotnega možnega spektra. Okus napitka, pridobljenega po tej poti, je podoben okusu kefirja, proizvedenega po tradicionalnem postopku, imenovati pa bi ga morali drugače, saj pravi kefir to ni (Boštar, 2002; Marshall, 1993b).

### **2.2.2.1 Bioproc**

Proizvodnja kefirja je zaprt bioproc. Uporablja se fermentor (bioreaktor) z mešalom. V pasterizirano mleko dodamo 5 % inokuluma delovne kulture, premešamo, da se inokulum enakomerno porazdeli, nato pa fermentacija poteka 16 ur pri temperaturi med 20 in 24 °C, brez mešanja (najbolj priporočljiva temperatura je 22 °C). Pogoji v fermentorju niso anaerobni, temveč so mikroaerofilni. Temperatura je edini parameter, ki ga reguliramo, poleg tega spremljamo vrednost pH. Pred zaključkom bioprocesa, ko vrednost pH v bioreaktorju pade na 4,5 - 4,6, vsebino še enkrat počasi premešamo (15 obr./min) (Boštar, 2002; Marshall, 1993b).

### **2.2.2.2 Zaključni procesi in sekundarna fermentacija**

Po zaključku fermentacije kefir pretočijo v pretočni tank preko hladilnika, kjer se ohladi na temperaturo 13 – 15 °C. Iz pretočnega tanka ga pakirajo neposredno v embalažo. Kefir nato v embalaži postopoma ohladijo na temperaturo 6 do 8 °C. Ohlajanje do končne temperature traja 6 ur. V embalaži poteče še sekundarna fermentacija oziroma zorenje. Zaradi znižane temperature se ustavi delovanje mlečnokislinskih bakterij in delujejo le še kvasovke: nastaja CO<sub>2</sub> in rahlo se poveča vsebnost alkohola. Rahlo se izboči pokrov embalaže (Boštar, 2002).



### 2.2.2.3 Čiščenje tehnološke linije

Uporablja se CIP metoda – avtomatizirano kemično krožno čiščenje (*»Cleaning in place«*). Fermentor, hladilnik in pretočni tank najprej spirajo z vodo, nato sledi čiščenje z alkalnim čistilom, spiranje z vodo, čiščenje s kislim čistilom in ponovno spiranje z vodo. Sledi še razkuževanje fermentorja (dezinfekcija) s peroksiocetno kislino (Boštar, 2002).

## 2.2.3 Kefir - končni produkt fermentacije s kefirnimi zrnji

### 2.2.3.1 Hranilna vrednost kefirja

Hranilna vrednost kefirja izhaja iz hranil, naravno prisotnih v mleku (Preglednica 3) in hranil, ki med njegovo proizvodnjo nastanejo s fermentacijo – nekatere sestavine v mleku se torej s fermentacijo spremenijo (Yukuchi in sod., 1992). Poglavitni vir ogljika in energije, ki je mikroorganizmom v mleku na voljo, je laktoza. Mikrobi, ki so sposobni izkoristiti laktozo, imajo kompetitivno prednost pred ostalimi mikroorganizmi, ki so prisotni (Wood in Hodge, 1985). Poleg laktoze je mleko bogato še z beljakovinami, maščobami in vitamini (Marshall, 1993b).

Preglednica 3: Delež glavnih sestavin mleka (Scherz in Senser, 2000)

Table 3: Shares of components in milk (Scherz in Senser, 2000)

	Delež glavnih sestavin v 100 g mleka (g)
Voda	87,20
Beljakovine	3,33
Maščobe	3,78
Ogljikovi hidrati	4,70
Organske kisline	0,21
Minerali	0,74
<b>Skupaj</b>	<b>100</b>

Če v mleku poteče le mlečnokislinska fermentacija (primer: jogurt), del laktoze ostane neizkoriščen in je v končnem izdelku prisotna v koncentraciji 2,5 – 4,0 g v 100 g izdelka. V kefirju pa poleg mlečnokislinskih bakterij laktozo fermentira tudi del kvasovk in se skoraj popolnoma porabi (Spreer, 1998). Okus, viskoznost in penjenje (zaradi vsebnosti CO<sub>2</sub>) končnega izdelka so odvisni od izvora kefirnih zrn, velikosti inokuluma, časa fermentacije ter temperature, pri kateri

fermentacija poteka (Steinkraus, 1996). Končni izdelek mora biti bele do rahlo rumene barve (Spreer, 1998), rahlo se mora peniti (zaradi vsebnosti CO<sub>2</sub>) in imeti primerno gostoto. Kefir je osvežujoč, kisel, rahlo alkoholnen in ima značilno aromo. pH vrednost kefirja je med 4,4 in 4,6, (Marshall, 1984; Marshall, 1993b).

Preglednica 4: Delež posameznih sestavin v kefirju ter energijska vrednost kefirja (Scherz in Senser, 2000)

Table 4: Shares of components in kefir and energy values of kefir (Scherz in Senser, 2000)

	Delež glavnih sestavin v 100 g kefirja [g]	Povprečna energijska vrednost 100 g kefirja [kJ]
Voda	87,60	-
Beljakovine	3,30	56
Maščobe	3,50	130
Ogljikovi hidrati	3,60	61
Organske kisline	0,70	9
Etanol	0,50	15
Minerali	0,80	-
<b>Skupaj</b>	<b>100</b>	<b>270</b>

Preglednica 5: Količina mineralov in vitaminov v 100 g kefirja (Scherz in Senser, 2000)

Table 5: Quantities of minerals and vitamins in 100 g of kefir (Scherz in Senser, 2000)

<b>Minerali</b>		<b>Vitamini</b>	
Natrij	46 mg	Vitamin A	40 µg
Kalij	160 mg	Beta-karoten	20 µg
Magnezij	14 mg	Vitamin E	110 µg
Kalcij	120 mg	Nikotinamid	90 µg
Železo	90 µg	Vitamin B <sub>1</sub>	40 µg
Baker	12 µg	Vitamin B <sub>2</sub>	170 µg
Cink	360 µg	Vitamin B <sub>6</sub>	50 µg
Fosfor	90 mg	Vitamin B <sub>12</sub>	500 ng
Fluor	13 µg	Biotin	3,5 µg
		Folna kislina	5 µg

Komponente, ki dajejo kefirju značilen okus, so predvsem: mlečna kislina (0,85 – 1,0 %), etanol (0,01 % - 2 %), mravljinčna kislina, sukcinat, očetna kislina, propionska kislina, acetaldehid (1-2 ppm), diacetil (do 3 ppm) in acetoin. Vsebnost CO<sub>2</sub> v kefirju je med 0,08 % in 0,2 %. Večina ogljikovega dioksida nastane kot rezultat presnove kvasovk, nekaj pa ga proizvedejo tudi heterofermentativne mlečnokislinske bakterije (Marshall, 1984; Marshall, 1993b).

Diacetil in acetaldehid je poleg mlečne kisline (večinski produkt fermentacije) presnovni produkt homofermentativnih streptokokov in nekaterih vrst iz rodov *Lactococcus* in *Leuconostoc*. Heterofermentativni *Lactobacillus brevis* proizvaja mlečno kislino, očetno kislino in CO<sub>2</sub>. Prav tako heterofermentativni *Lactobacillus kefir* poleg mlečne kisline in CO<sub>2</sub> proizvaja še etanol. Vrste rodu *Leuconostoc*, ki so heterofermentativne bakterije, lahko pretvarjajo acetaldehid v etanol (Marshall, 1984; Marshall, 1993b).

Kvasovke so v kefirju pomembne predvsem zaradi fermentacije virov ogljika v etanol in ogljikov dioksid (Angulo in sod., 1993). Fermentacija laktoze z laktoza fermentirajočimi kvasovkami predstavlja le majhen delež fermentacije laktoze in ni bistvena za nastanek kefirja (Marshall, 1984). Sicer predstavljajo večinski delež kvasovk v kefirju (pijači), v kefirnih zrnih pa prevladujejo laktoza nefermentirajoče vrste (Angulo in sod., 1993). Le-te kot vir ogljika in energije uporabljajo različne metabolite bakterij (Wood in Hodge, 1985). Metabolizem kvasovk v kefirju še ni natančno proučen. Laboratorijske raziskave so pokazale, da kot produkta fermentacije nastajata diacetil in acetoin ter da iz piruvata z encimom piruvat dekarboksilaza proizvajajo acetaldehid, ki ga lahko z encimom alkohol dehidrogenaza pretvorijo v etanol (Marshall, 1984).

### 2.2.3.2 Kefir na prodajnih policah

Rok trajanja industrijsko izdelanega kefirja je od 15 do 23 dni. Za kefir, embaliran v lončke, je značilen izbočen pokrovček. V nasprotju z jogurtom, izbočen pokrovček ne pomeni kvarjenja izdelka, temveč je posledica nastajanja ogljikovega dioksida med alkoholno fermentacijo (Boštar, 2002).

## 2.3 Vzdrževanje kefirnih zrn

Pridobivanje kefirja je okolju prijazen postopek, saj je malo odpadnih produktov. Ista kefirna zrna se lahko ob pravilnem ravnanju uporabljajo neomejeno, pa naj gre za domačo ali industrijsko proizvodnjo. Najlažje jih je vzdrževati, če jih neprestano uporabljamo. Če želimo pridobivanje kefirja prekiniti, je zrna potrebno primerno shraniti:

- Za krajši čas shranjevanja zadostuje, da kefirnim zrnom dodamo enako količino mleka, kot jo ponavadi fermentiramo in jih postavimo v hladilnik. Tako jih lahko shranimo za čas do enega tedna, oziroma do enega meseca, če mleko vsak teden zamenjamo (Anfiteatro, 2002).
- Zamrznjena kefirna zrna se lahko hranijo do dva meseca. Zrna se operejo s sterilno vodo, položijo v stekleno posodo ali plastično vrečko, popolnoma prekrijejo z mlekom v prahu in zamrznejo (Anfiteatro, 2002).

Med proizvodnjo kefirja se število kefirnih zrn veča, a ne nastajajo v zelo velikih količinah in se lahko brez težav zavržejo. Bioproces tudi ni pretirano energetsko zahteven. Potrebno je le vzdrževanje temperature (22-24 °C). Mešanje ali prepihanje z zrakom, ki pri mnogih bioprocseh predstavljata največji delež porabljene energije, se tu ne izvajata.

## 2.4 Analiza tveganj

### 2.4.1 Mikrobiološko tveganje

Mleko je lahko okuženo s patogenimi mikroorganizmi, zato ga pasterizirajo. Poleg tega mlečna kislina in nekateri drugi metaboliti, ki nastanejo s fermentacijo, znižujejo pH vrednost in s tem zavirajo rast mnogih mikroorganizmov. Nekatere bakterije v kefirju izločajo tudi bakteriocine in s tem izdelek dodatno zaščitijo. Možna je okužba z enterobakterijami. Če se to zgodi, pustijo, da fermentacija matične kulture poteka 72 ur namesto 36 ur (Boštar, 2002). V tem času se pH vrednost močno zniža, ob dovolj dolgi izpostavljenosti močno kislemu okolju enterobakterije propadejo in kefirna zrna se lahko spet uporabljajo. Najpogostejši kvarljivci fermentiranih izdelkov so plesni in kvasovke, ki so tolerantne za nizke pH vrednosti in lahko rastejo pri nizkih temperaturah (4 °C – temperaturah shranjevanja izdelkov) (Chandan in Shahani, 1995). Kvasovke so v kefirju naravno prisotne in nujno potrebne, poleg tega proizvodnja kefirja ne poteka aseptično in le-te vedno pridejo v sistem iz okolja. Vedno je prisotna različna živa mikroflora, zato se izdelek v embalaži

sčasoma spreminja in je potrebno strogo upoštevati rok uporabnosti izdelka, označenega na embalaži.

### **2.4.2 Kemično tveganje**

Proizvodne linije je potrebno po vsaki uporabi temeljito očistiti, da ne pride do kontaminacije z mikroorganizmi prejšnje fermentacije. Običajno v mlekarnah uporabljajo CIP metodo čiščenja, ki ji sledi razkuževanje s peroksi-ocetno kislino (Boštar, 2002). Čistilna sredstva je treba popolnoma izprati, za kar je potreben dovolj dolgo trajajoč pretok vode. Zaostanki čistil in razkužil ne smejo biti prisotni. Skrb, da bi izdelek vseboval večje količine antibiotikov iz mleka, je odveč. Prisotnost antibiotikov inhibira rast starterske kulture in fermentacija sploh ne more poteči.

### **2.4.3 Fizikalno tveganje**

Pakiranje kefirja v embalažo poteka avtomatizirano. Poškodbe embalaže ali slabo tesnjenje pokrovcov, kar bi vodilo v prezgodnji kvar izdelka, niso izključene, zato jih je potrebno nadzorovati.

## **2.5 Kefir in zdravje**

### **2.5.1 Infekcije in/ali intoksikacije povezane z uživanjem kefirja**

Doslej ni bilo še nobenega primera, ki bi govoril o zastrupitvi ali da bi imel kdo zaradi uživanja doma narejenega kefirja zdravstvene težave, kvečjemu nasprotno. Kljub temu pa je potrebno omeniti, da so izolirali iz šarž v proizvodnji kefirja ali iz kefirnih zrn, ki so jih analizirali v različnih delih sveta, tudi potencialno patogene bakterije kot so npr. *E. coli* oziroma koliformne bakterije. Četudi ni nobenih težav pri uživanju doma narejenega kefirja, so v skrbeh predvsem proizvajalci komercialnega tradicionalnega kefirja, ki se soočajo s težavami z okužbami kefirnih zrn in s tem posledično kefirja, kar jim otežuje trženje sicer originalnega produkta. Najpogosteje so iz tradicionalno narejenega kefirja izolirali *E. coli* (Babina in Rozhkova, 1974). To so bakterije, ki po sedaj veljavnih predpisih ne smejo biti prisotne v izdelkih. Proizvodnja in prodaja klasičnega kefirja sta s tem oteženi. Kljub zadržkom in zakonodaji pa nekateri proizvajalci, predvsem na Poljskem in v Rusiji, danes še vedno proizvajajo kefir s kefirnimi zrnji tudi industrijsko. Ena izmed redkih, ki tak postopek še obvlada, je tudi Mlekarna Krepko v Lazah pri Logatcu.

To pomanjkljivost bi lahko spravili tudi v okvire pomanjkanja specifičnega znanja modernih mikrobiologov, ki togo obravnavajo prisotnost določenih mikroorganizmov v kefirnih zrnih kot kontaminacijo. Potrebno je poudariti, da so kefirna zrna naravna kompleksna združba, ki morebitno prisotne oportuniste vzdržuje v relativno nizkem številu. Kompleksna mikroflora lahko s svojim metabolnim potencialom deluje zaščitno, zato velja kefir kot varen izdelek za porabnika. Nikoli se ne zgodi, da bi kontaminenti prerasli originalno mikrofloro. V industrijski proizvodnji se lahko uporabi postopek fermentacije do višje stopnje kislosti, ki močno zmanjša morebitno kontaminacijo s sicer naravno prisotnimi koliformnimi mikroorganizmi (Babina in Rozhkova, 1974).

V industrijski proizvodnji se prisotnost koliformnih bakterij uporablja kot indikator možnih fekalnih kontaminacij med proizvodnjo ali zaradi nečistih postopkov, med pridelavo in predelavo mleka in shranjevanja izdelkov. Koliformni mikroorganizmi pa so prav tako del zdrave intestinalne mikroflore, poleg še drugih mikroorganizmov, npr. podobnih *Candidi albicans*. Le ta se pogosto uporablja kot indikator zdravstvenega stanja gostitelja, podobno kot se koliformni uporabljajo za ugotavljanje kontaminacije proizvodnih šarž (Sukhov in sod., 1986).

Koliformne in mnoge druge patogene bakterije in kvasovke so in bodo vedno predstavljale pomemben del našega bodisi zunanega bodisi notranjega mikro-okolja. Skrivnost zdravega ravnovesja leži v vzdrževanju teh bakterij in kvasovk v primernem naravnem ravnotežju. Številne raziskave doslej so pokazale, da z uživanjem tradicionalnega kefirja takšne zaščitne faktorje prenesemo v prebavni trakt oziroma, da okrepimo tam že prisotno mikrofloro. S tem lahko naravni bio-sistem gostitelja obdržimo v ravnovesju. Uživanje kefirja, ali tudi zmerno uživanje kefirnih zrn samih, lahko pripomore k uravnavanju imunskega sistema organizma, kar lahko posledično pripomore k zadrževanju oziroma zniževanju števila oportunistov (sicer vedno prisotnih) v manjšem številu (Oleinichenko in sod., 1999).

Na zahodu se je uveljavila tendenca zagotavljanja, kolikor je le mogoče, čistega okolja (morda celo preveč čistega). Različne raziskave (Sukhov in sod., 1986; Oleinichenko in sod., 1999) v zadnjem času kažejo na to, da so ljudje, ki živijo v nekoliko manj higienskem okolju, bolj odporni proti določenim oblikam infekcij (gastritis ali gastroenteritis). Predvidevajo, da je to posledica stalne, zmerne izpostavljenosti določenim patogenim mikroorganizmom. Enostavno bi lahko tudi rekli, da ljudje v teh deželah stalno vzdržujejo svoj imunski sistem v pripravljenosti. Vsekakor je zelo verjetno, da uživanje manjših količin koliformnih mikroorganizmov, skupaj z večjimi količinami

človeku prijaznih mikroorganizmov, kot so laktobacili in določene kvasovke, lahko zmanjša možnost za pojav specifičnih infekcij.

## 2.5.2 Črevesna mikrobna združba

Številne raziskave so pokazale, da so prašiči in podgane dobri živalski modeli za proučevanje vpliva hrane in prehrane na biološko stanje prebavnega trakta ter posredno zdravstvenega stanja organizma, saj sta sestava prebavnega trakta in njihova presnova zelo podobni človeški (Parodi, 1999b).

Človeški gastrointestinalni trakt vsebuje izredno kompleksen mikrobni ekosistem, ki lahko izrazito vpliva na okolje v debelem črevesu in številne fiziološke funkcije črevesja. Analize blata kažejo na to, da se v črevesju nahaja preko 400 različnih, predvsem bakterijskih vrst. Večina vrst je saharolitičnih in pridobivajo energijo z razgradnjo rastlinskega materiala in preostankov nerazgrajenega škroba (Parodi, 1999a).

V črevesju so najbolj zastopane bakterijske vrste iz rodov: *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Fusobacterium*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Peptococcus* in *Peptostreptococcus*. Prisotne pa so še številne druge vrste v menjavajočem se, a manjšem številu (Parodi, 1999a). Te bakterije najdemo v prebavnem traktu, pogosto povezane z delci prebavljene in neprebavljene hrane, na površini epitelnih celic in celo globlje, znotraj prebavnih žlez (Lieberkuhnove kripte).

Kolonizacija črevesnih bakterij postaja vse izrazitejša na poti od želodca proti koncu debelega črevesa. Prevladujoče vrste v želodcu pripadajo rodovom *Streptococcus*, *Staphylococcus* in *Lactobacillus*. Te bakterije prihajajo iz ustne votline in se s slino spirajo v želodec, kjer večina propade zaradi močno kislega želodčnega soka. Vseeno pa želodec zdravega človeka vsebuje 10 do  $10^2$  KE (kolonijskih enot)/ml želodčnega soka. Skozi tanko črevo se število mikroorganizmov povečuje od  $10^3$  do  $10^4$  KE/ml vsebine črevesa v dvanajsterniku (duodenum) in naraste na  $10^6$  do  $10^7$  KE/ml v distalnem ileumu (vito črevo) (Parodi, 1999a).

Po prehodu ileocekalne valvule, koncentracija bakterij močno naraste. V debelem črevesu je njihova koncentracija  $10^{11}$  do  $10^{12}$  KE/g (blata) vsebine debelega črevesja. To lahko prevedemo v  $10^{14}$  organizmov v debelem črevesu, kar je 10-kratno število evkariontskih celic gostitelja. Izračunali so, da ima ta koncentracija bakterij metabolno aktivnost, enako metabolni aktivnosti

jeter (Savage, 1977; Goldin and Gorbach, 1992; Hill, 1995). Pomen intestinalnih bakterij v patofiziologiji debelega črevesa še podkrepi dejstvo, da predstavljajo bakterije 45-60 % trdne vsebine debelega črevesa (Stephen in Cummings, 1980).

### 2.5.3 Probiotični mikroorganizmi

Ena izmed definicij pravi, da so probiotiki »živi mikroorganizmi, ki ugodno vplivajo na gostitelja, ki jih uživa, z izboljšanjem ravnotežja mikrobne združbe v njegovem črevesju«. Koncept probiotikov je star že blizu 100 let. Vendarle pa je poznavanje njihovega vpliva na fiziologijo in zdravje človeka še vedno precej pomanjkljivo, področje probiotikov pa koncept, ki se razvija. Pomanjkanje prepričljivih znanstvenih pokazateljev učinkovitosti vpliva probiotikov na zdravje črevesja je glavni razlog za veliko mero previdnosti pri izjavah o vlogi probiotikov v prehrani človeka. Za potrjevanje znanstvenih rezultatov so potrebna ustrezna orodja za spremljanje učinkovitosti teh bakterij v črevesju posameznih organizmov, ki pa se prav tako šele razvijajo.

Razvoj novih kompleksnih molekularnih orodij, skupaj z izsledki, pridobljenimi s pomočjo klasičnih metod, že omogoča podrobnejše spoznavanje človeškega intestinalnega ekosistema in funkcionalne vloge specifičnih probiotičnih vrst na zdravje črevesja. Nova molekularna orodja omogočajo vpogled v podrobnejšo raznolikost in filogenezo črevesne flore. Razvijajo pa se tudi že orodja za hitro identifikacijo posameznih vrst intestinalnih mikroorganizmov. *In situ* analize pa danes omogočajo že zelo podrobne izsledke o mikroflori in njenih metabolnih aktivnostih v črevesju človeka (O'Sullivan, 1999).

### 2.5.4 Črevesne bakterije in rak

Najboljši način za preprečevanje raka je preventiva. Ocenjujejo, da je 1/3 rakastih obolenj v razvitih državah povezana z načinom prehranjevanja, z variabilnostjo 20-60 % glede na mesto nastanka (Parodi, 1999a). Rezultati raziskav zadnjih desetletij kažejo, da imajo določene probiotične bakterije pozitiven vpliv na zdravje (Lee and Salminen, 1995). Raziskave, opravljene na živalskih modelih potrjujejo, da nekatere bakterijske vrste ugodno spreminjajo določene markerje kancerogeneze pri živalih in ljudeh in zavirajo razvoj tumorjev. Kljub obetavnim napovedim pa je potrebno poudariti, da so rezultati zelo raznoliki.



Za razumevanje proti-kancerogenega vpliva probiotičnih bakterij in za razlago objavljenih študij, je pomembno upoštevati številne medsebojno povezane dejavnike. Ti dejavniki vključujejo tako proti- kot pro-kancerogene aktivnosti endogene intestinalne mikroflore, vpliv prehranskih komponent, vključno s prebiotiki in vpliv specifičnih lastnosti posameznega organizma (Parodi, 1999a).

Zaključki o proti-kancerogenih in drugih, za zdravje koristnih vplivih probiotičnih bakterij, prebiotikov, simbiotikov in prehrane, so še do pred nekaj leti temeljili na preprostih fizioloških poskusih, ugotavljanjih, predvidevanjih, legendah, ljudskem izročilu (Tannock, 2002).

Danes že poznamo številne tehnike, s katerimi skušamo znanstveno relevantno dokazati, kakšno pomembno vlogo lahko igrajo probiotične bakterije pri zaviranju kancerogeneze. Te tehnike so: uporaba klic-prostih (sterilnih in gnotobiotičnih) živali, kemično inducirana kancerogeneza, *faecal stream diversion*, uporaba antibiotikov, sprememba regulacije žolčnega metabolizma. Študije na živalih in ljudeh kažejo, da črevesne bakterije in njihovi metaboliti lahko proizvajajo, aktivirajo ali deaktivirajo kancerogene, in da se ti procesi lahko spreminjajo s prehrano. Oralno dodajanje določenih probiotičnih bakterij živalim in ljudem je povezano s številnimi proti-kancerogenimi vplivi, vključno z znižanjem pH v črevesju, imunostimulacijo, antimutagenostjo in znižanjem aktivnosti encimov, ki lahko povzročijo (sprožijo) pretvorbo pro-kancerogenov v kancerogene. Raziskave na živalih dokazujejo, da probiotične bakterije in prebiotiki zavirajo razvoj tumorjev, epidemiološke študije pa so pokazale, da redno uživanje fermentiranih mlečnih izdelkov lahko pripomore k zmanjšanju nevarnosti za razvoj številnih vrst raka (Parodi, 1999b).

### **2.5.5 *Helicobacter pylori* in rak na želodcu**

Gastrični karcinom je eden najpogostejših rakavih obolenj v razvijajočih se deželah in še vedno drugi najpogostejši vzrok smrti zaradi raka po vsem svetu. Leta 1994 je Mednarodna agencija za raziskave raka *H. pylori* označila kot karcinogen Skupine 1, torej kot nedvomnega povzročitelja želodčnega adenokarcinoma pri človeku. To je bila prva bakterija, ki so ji dali takšno oznako (Watanabe in sod., 1998).

### 2.5.6 Kemično inducirana kancerogeneza

Prisotnost bakterij v prebavnem traktu lahko spremeni občutljivost za kancerogenezo. Za dokazovanje vpliva različnih kemičnih snovi, metabolitov oz. delovanja bakterij v črevesju na razvoj kancerogeneze so, sočasno z razvojem metod, uporabljali različne snovi, ki so sprožale kancerogene pojave (kancerogeni). Eden izmed prvih kancerogenov, ki so jih uporabili pri raziskavah, je bil sikazin,  $\beta$  glukozid metilazoksimetanola (MAM), ki se nahaja v oreščku tropske praproti sagove palme (Laqueur, 1970). Kasneje so za proučevanje vloge intestinalnih bakterij pri preprečevanju razvoja tumorjev uporabljali še številne druge kancerogene.

Eden izmed teh je 1,2-dimetilhidrazin (DMH), pogost črevesni kancerogen, ki ga uporabljajo v raziskavah na živalih. To je pro-kancerogen, ki potrebuje aktivacijo skozi serijo *in vivo* kemičnih transformacij v jetrih, preko mikrosomalne oksidacije do kancerogena azometana in nadaljnje oksidacije do azoksimetana (AOM), ki je prav tako pogost črevesni kancerogen. Citokrom P450IIE1 metabolizira AOM do MAM, ki se razgradi do formaldehida in metil-diazonijevega iona. Ta ion razpade na dušik in ključni kancerogen metil-karbonijev ion, alkilirajočo snov, ki tvori vezi z nukleinskimi kislinami (Weisburger, 1994).

Poleg kemično inducirane kancerogeneze se uporabljajo pri raziskavah še različni drugi prijemi za proučevanje vpliva črevesne mikroflore:

- spreminjanje črevesne vsebine
- uporaba antibiotikov
- spremembe žolčnega metabolizma

Epidemiološke študije, skupaj z geografsko in socio-ekonomsko razporeditvijo kažejo, da prehrana, še posebno prevelik vnos maščob in mesa v povezavi z majhnim vnosom vlaknin, pomembno vpliva na etiologijo in pojavnost črevesnega raka. Obstaja splošno prepričanje, da je glavni vzrok za kancerogeno naravo teh prehranskih rizičnih faktorjev pravzaprav metabolno delovanje črevesnih bakterij (Hill in sod., 1971; Hill in sod., 1975; Simon and Gorbach, 1984).

### 2.5.7 Vloga črevesne mikroflore pri nastajanju in preprečevanju raka

Čeprav razlike pri običajnih načinih prehranjevanja ne kažejo na to, da bi prehrana bistveno vplivala na razlike v sestavi črevesne mikroflore, različna prehrana vendarle lahko močno vpliva na spremembo metabolne aktivnosti teh bakterij. Številne študije so pokazale, da lahko prehrana in

antibiotiki vplivajo na količino in aktivnost bakterijskih encimov, kot so  $\beta$ -glukoronidaze,  $\beta$ -glikozidaze, steroid  $7\alpha$ -dehidroksilaze, nitroreduktaze in azoreduktaze. Ti encimi lahko v črevesju povzročijo nastanek različnih mutagenih dejavnikov, karcinogenov, ko-karcinogenov in tumorskih promotorjev iz prekurzorjev tako endogenega kot eksogenega izvora (Rowland in sod., 1985; Goldin, 1986).

## 2.5.8 Bakterijski encimi in kancerogeneza

### 2.5.8.1 Beta glukoronidaze

Glukoronidati lahko potujejo skozi raztopino žolča, prehajajo v črevesje, kjer se lahko pretvorijo v prvotni karcinogen z bakterijskimi beta glukoronidazami, ki imajo široko substratno specifičnost. Karcinogen se potem absorbira iz črevesja v vhodni cirkulacijski sistem in se lahko udeleži enterohepatičnega cikla. Ti procesi povečajo čas zadrževanja karcinogena v telesu. *Escherichia coli* in vrste iz rodu *Clostridium* imajo največjo beta glukoronidazno aktivnost, medtem ko imajo vrste iz rodov *Lactobacillus* in *Bifidobacterium* najnižjo aktivnost (Rowland in sod., 1985; Goldin, 1986).

### 2.5.8.2 Steroid $7\alpha$ -dehidroksilaze

Epidemiološka opazovanja in študije na živalih so pokazale, da prehrana, bogata z maščobami, povečuje tveganje za raka na debelem črevesu. Vnos maščob povzroča izločanje žolčnih kislin, ki imajo pomembno vlogo pri emulzifikaciji in prebavi prehranskih maščob. V debelem črevesu se soli žolčnih kislin, ki se izognejo enterohepatičnega cikla, dekonjugirajo z bakterijskimi beta glukoronidazami. Dodatno pa bakterijske  $7\alpha$ -dehidroksilaze, prisotne pri določenih eubakterijah in klostridijih, izločajo  $7\alpha$ -hidroksilno skupino iz primarnih žolčnih kislin (pretežno holno in henodeoksiholno kislino), pri čemer nastajajo sekundarne žolčne kisline (deoksiholna in litoholna kislina).

Te sekundarne žolčne kisline so genotoksične in ko-mutagene. So tudi citotoksične za kolonocite zato vplivajo na povečano rast celic, kar je rizični faktor za raka na debelem črevesu. Epidemiološke raziskave in raziskave na živalih močno kažejo na to, da so sekundarne žolčne kisline pomemben rizični dejavnik za raka na debelem črevesu (Rowland in sod., 1985; Goldin, 1986; Nagengast in sod., 1995). Študije na ljudeh so pokazale, da oboleli za rakom na debelem

črevesu izločajo več sekundarnih žolčnih kislin kot zdravi posamezniki (Hill in sod., 1975; Reddy in sod., 1996).

### 2.5.8.3 Hidrolaze soli žolčnih kislin

Hidrolaze soli žolčnih kislin (hidrolaza glikoholne kisline/holoilglicin hidrolaza) katalazirajo dekonjugacijo soli žolčnih kislin do prostih žolčnih kislin. Te kisline so citotoksične za kolonocite in lahko pospešijo hitrejšo rast celic. Konjugacija žolčnih kislin lahko zmanjša citotoksičnost 7 do 10 krat (Van Munster in sod, 1993).

### 2.5.8.4 Nitroreduktaze in nitrat reduktaze

Aromatske in heterociklične nitro spojine so pogosti industrijski onesnaževalci. Bakterijske nitroreduktaze jih reducirajo do N-nitrozo in N-hidroksi spojin pred konverzijo v aromatske amine. Vmesne stopnje in končni produkti teh reakcij so dokazano mutageni in kancerogeni. Nitrati pa so običajni kontaminanti hrane (posebno v zelenjavi) in vode. Bakterije reducirajo nitrato do nitritov, ki lahko povzročijo mutacije in kromosomalne poškodbe, vendar ne delujejo kot močni kancerogeni. Vendarle pa se nitriti lahko povezujejo z različnimi aminskimi spojinami, pri čemer oblikujejo N-nitrozo spojine, ki so mutagene in kancerogene (Rowland in sod., 1985; Goldin, 1986).

### 2.5.8.5 Azoreduktaze

Azodi se pogosto uporabljajo kot komponente barvil v hrani, pijačah in kozmetiki. Bakterijske azoreduktaze v črevesju reducirajo azo spojine do aromatskih aminov, med katerimi je veliko mutagenih in kancerogenih (Rowland in sod., 1985; Goldin, 1986).

### 2.5.8.6 Aminokislinski metaboliti

Triptofanaze črevesnih bakterij pretvarjajo triptofan do indola, znanega kancerogena. Tumorska promotorja fenol in p-krezol prav tako nastajata iz tirozina s pomočjo aerobnih in anaerobnih bakterij (Rowland in sod., 1985; Goldin, 1986).

## 2.6 Prehrana in encimska aktivnost bakterij

Zdrava prehrana, ki daje človeku vse potrebne snovi za življenje, mora biti hranilno in energijsko uravnotežena, varna in varovalna (Pokorn, 1997). Uravnotežena prehrana vsebuje vse esencialne hranljive snovi v takih količinah in razmerjih, da zadoščajo za čim boljše potekanje vseh funkcij organizma, za katerega je prehrana zasnovana, nobene hranljive snovi pa ne sme vsebovati v takih količinah ali koncentracijah, da bi bilo kakorkoli zmanjšano ali ogroženo dobro počutje ali zdravje. Uravnotežena prehrana tudi ne sme vsebovati nobenih škodljivih snovi ali vsaj ne toliko, da bi bile škodljive (Mitchell, 1962).

Uživanje prehranskih maščob (ne več kot 30 % celotne vnesene energije) je priporočljivo, saj nam dajejo energijo, esencialne maščobne kisline in pomagajo pri absorpciji v maščobi topnih vitaminov iz črevesja v kri in limfo (Dietary..., 1995). Prehrana z večjim deležem (več kot 10 % zaužite energije) nasičenih maščobnih kislin in holesterola zvišuje krvni holesterol in pogostnost srčnih obolenj. Enkrat in večkrat nenasičene maščobne kisline zmanjšujejo raven krvnega holesterola, povečujejo pa nastanek reaktivnih prostih radikalov, ki nastanejo pri lipidni peroksidaciji, ki je naraven proces pri presnovi nenasičenih maščobnih kislin (Dietary..., 1995 in Pokorn, 1997). Povečana peroksidacijska obremenitev organizma povečuje potrebo po antioksidativni zaščiti. Tako oksidacijska obremenitev kot antioksidacijska zaščita organizma pa sta odvisni od prehrane kot integralne celote. Nekatere sestavine hrane (nenasičene maščobne kisline, železo, kancerogene snovi) sodelujejo pri nastanku celičnih okvar pri oksidacijskem stresu, druge sestavine (antioksidanti) pa celice ščitijo pred oksidacijskimi poškodbami. Škodljive učinke prostih radikalov lahko merimo s pomočjo biomarkerjev.

Čeprav imajo črevesne mukozne celice prav tako nekaj encimske aktivnosti, večina encimske aktivnosti vendarle izvira iz bakterijske črevesne mikroflore. S prehrano lahko pomembno vplivamo na bakterijsko encimsko aktivnost. Nanjo pa precej vplivata tudi starost in uporaba zdravil, še posebno uporaba antibiotikov (Parodi, 1999a).

Študije na živalih so pokazale, da diete, ki vključujejo veliko vlaknin, različne vrste maščob, mesa ali/in uporaba antibiotikov, zelo različno vplivajo bodisi na dvig bodisi na zmanjšanje aktivnosti posameznih vrst bakterijskih encimov. Na primer: nižje koncentracije  $\beta$ -glukoronidaze, nitroreduktaze in azoreduktaze so ugotovili v podganah, ki so bile poprej tretirane z antibiotiki. Skupina, ki je jedla meso, je imela po uporabi antibiotikov 3x manjšo aktivnost nekaterih encimov,

kar je imelo za posledico tudi manjšo pojavnost tumorjev na debelem črevesju. Za indukcijo tumorjev so uporabili DMH (Goldin in Gorbach, 1984).

Študije na ljudeh so pokazale podobne rezultate kot poprejšnje raziskave na podganah. Iz teh rezultatov lahko obenem sklepamo tudi, da so podgane primeren študijski model, na osnovi katerega lahko predvidevamo tudi nekatera dogajanja v črevesju ljudi (Parodi, 1999a).

Sprememba diete, iz omnivorske v pretežno vegetarijansko ali lakto-vegetarijansko, je že v kratkem času, v tednu ali dveh, spremenila aktivnost encimov v humanem črevesju. Količine posameznih encimov so se zmanjšale tudi za 75 do 90 % (Buddington in sod., 1996; Johansson in sod., 1997).

Hranjenje z mlečno-kislinskimi bakterijami lahko zmanjša aktivnost različnih fekalnih bakterijskih encimov, povezanih s kancerogenezo. V posameznih primerih gre za porabo snovi, ki so sicer potrebne za tvorbo določenih encimov, včasih gre za redčenje črevesne flore z mlečno-kislinsko mikrofloro, katere encimska aktivnost je drugačna (Rafter, 1995).

Epidemiološke študije so pokazale, da uživanje enakih količin beljakovin, maščob in vlaknin, vendar različnih vrst le-teh, pomembno vpliva na aktivnost posameznih rizičnih vrst encimov. Pomemben podatek je tudi, da dodatek inhibitorja  $\beta$ -glukoronidaze v prehrano izrazito zmanjša pojavnost induciranih tumorjev na debelem črevesju (Takada in sod., 1982).

Vse torej kaže na to, da prehrana nedvomno zelo raznoliko vpliva na metabolno aktivnost črevesnih bakterij. Prehranski substrat lahko izzove encimatsko aktivnost pri določenih vrstah bakterij, medtem ko nekatere bakterije ostanejo neaktivne (Rowland in sod., 1985). Prehrana lahko vpliva tudi na vrsto in število določenih vrst bakterij. Prehrana, na primer vlaknine, lahko vplivajo na spremembo fizikalnih lastnosti blata, čas prehoda skozi črevesje, maso blata in na vsebnost vode, prav tako pa tudi na proizvodnjo hlapnih maščobnih kislin in žolčnih kislin. Karakteristike blata vplivajo na dostopnost in na čas kontakta med bakterijami in prehranskim substratom, med encimi in kancerogeni ali mutageni ter med kancerogeni, mutageni in mukoznimi celicami. Poleg tega je potrebno poudariti tudi, da obstajajo pomembne razlike med moškimi in ženskami (Slattery in sod., 1994).

### **2.6.1 Mutageneza**

Mutageneza – spreminjanje nukleotidnih sekvenc v genomski DNK in v določenih kritičnih genih, kot npr. tumorskih supresorskih genih – igra pomembno vlogo v začetni fazi kancerogeneze. Hrana vsebuje veliko mutagenih snovi iz različnih virov. Zelo velik vir je pražena ali ocvrta proteinsko bogata hrana, kakor sta meso in ribe. Aminokislina in heksoze reagirajo, pri čemer tvorijo heteroaromske snovi, nato kondenzirajo s kreatininom in nastajajo imidazo snovi s heterocikličnimi aminami (Ames in sod., 1995). Heterociklični amini so potencialni mutageni, ki skupaj z drugimi eksogenimi toksini, na primer rastlinskimi ali s toksini gliv ter endogenimi mutageni, prehajajo iz metabolizma v organizem, kjer se morajo običajno aktivirati s citokromskimi oksidazami. Aktivacija ponavadi poteče v jetrih, lahko pa tudi v drugih tkivih. Črevesne bakterije lahko na splošno aktivirajo ali deaktivirajo mutagene z enakimi encimskimi sistemi, kot lahko inducirajo kancerogenezo (Overvik in Gustafsson, 1990).

### **2.6.2 Fekalni mutageni - fekapentaeni**

Prehrana ljudi zahodnih kultur, ki temelji pretežno na mesu, inducira precej mutagenih aktivnosti, ki jih v veliki meri pripisujejo fekapentaenom. Fekapentaene proizvajajo številne vrste iz rodu *Bacteroides* v debelem črevesu. Nastajajo iz prekurzorjev, znanih kot plazmalopentaeni, njihovo nastajanje pa vzpodbujajo žolčne kisline. Vloga fekapentaenov še ni natančno pojasnjena. Smatra se, da so potencialno genotoksični in mutageni dejavnik v bakterijskih, živalskih in človeških celicah in da povzročajo razrast epitelijskih celic debelega črevesa sesalcev, kar naj bi bil ključni element za kancerogenezo (Van Tassel in sod., 1990). De Kok in sodelavci (1993) so ugotovili pomembno vlogo vlaknin pri presnovi fekapentaenov, fekapentaeni se nanje namreč močno adsorbirajo, kar naj bi bil pomemben dejavnik pri zmanjšanju tveganja za kancerogenezo.

### **2.6.3 Tumorski promotorji - sprožitelji**

Znotraj kompleksnega, več faznega razvoja kancerogeneze, povzroča iniciator (mutagen ali kancerogen) nepopravljive spremembe v celični DNK. Transformacijo lahko stimulira sinergistični učinek tumorskih promotorjev, ki sami po sebi niso kancerogeni. Eden najpomembnejših tumorskih promotorjev za rakave spremembe na črevesju so žolčne kisline. Poleg žolčnih kislin so pomembni tudi diacilgliceroli (DAG). Diacilgliceroli nastajajo iz fosfolipidov. Njihovo nastajanje pa stimulirajo žolčne kisline. Prehrana z veliko maščobami povzroča večjo prisotnost fosfolipidov v blatu, kar posledično povzroča večje sproščanje DAG, preko kompleksnih encimskih procesov.

DAG so promotorji proteina (encima) kinaza C, ki vpliva na kontrolo rasti celic in je vedno udeležen tudi pri razrastu rakavih celic (Morotomi in sod., 1990).

#### **2.6.4 Eksogene (probiotične) bakterije in preprečevanje rakavih obolenj**

Fermentirane pijače, posebno fermentirani mlečni izdelki, jogurti, ki vsebujejo žive mikroorganizme, veljajo za zdrave že od nekdaj. Za učinkovit vpliv na endogeno mikrofloro in njihovo metabolno aktivnost v gostitelju pa morajo imeti eksogene (probiotične) bakterije, ki jih zaužijemo z izdelki, nekaj posebnih lastnosti: biti morajo normalna humana črevesna mikroflora, pri prehodu skozi gastrointestinalni trakt morajo preživeti tako kislo območje želodca, kot območje, bogato z žolčnimi kislinami pri prehodu skozi dvanajsternik; imeti morajo sposobnost pripenjanja na črevesne celice, posedovati ali proizvajati morajo snovi, ki imajo protibakterijske, antimutagene ali antikancerogene lastnosti, tako, da delujejo kot antagonisti za patogene in kancerogene bakterije; poleg tega morajo biti tudi varne za tistega, ki jih zaužije. Pomembno je, da ostanejo žive do konca roka uporabnosti izdelka, v katerem se nahajajo (Lee in Salminen, 1995).

Probiotični organizmi, ki so večinoma gram pozitivne mlečno-kislinske bakterije, lahko inhibirajo tvorbo tumorjev z različnimi mehanizmi: z redukcijo mutagenih snovi v črevesju, s spremembo encimske aktivnosti črevesne mikroflore ali s stimulacijo gostiteljevega imunskega sistema (Rafter, 1995).

#### **2.6.5 Imunologija**

Eden izmed najpomembnejši dejavnikov za uspešno preprečevanje raka je tudi pravilno delovanje imunskega sistema. Imunski odziv organizma lahko na grobo razdelimo na specifični in nespecifični, ki sta interaktivno medsebojno povezana. Gre za reakcijo telesa na prisotnost tujih, neobičajnih celic ali molekul, na posameznih mestih v telesu. (Prehn, 1994)

Primerjava sterilnih in konvencionalnih živali je pokazala, da ima črevesna mikroflora pomembno vlogo pri razvoju in vzpostavljanju pravilnega delovanja imunskega sistema. Številne študije so potrdile, da imajo mlečno-kislinske bakterije sposobnost spreminjanja in stimuliranja imunskega sistema. Te raziskave so pokazale, da lahko številne vrste iz rodov *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* in *Streptococcus*, ki jih v velikem številu najdemo v jogurtih in drugih fermentiranih mlečnih izdelkih, in ki lahko preživijo prehod skozi želodec in prebavni trakt, interaktivno reagirajo s



sluznicami in površinskimi celicami gostitelja ter s tem sprožijo nespecifični odziv imunskega sistema. Mehanizmi, ki sprožijo imunski odziv, so sicer še relativno slabo raziskani, nedvomno pa so v kompleksni mehanizem vključene komponente celičnih sten živih ali mrtvih bakterij in njihovi metaboliti, ki lahko prehajajo skozi črevesni epitelij (Falk in sod., 1998; Solis-Pereyra in sod., 1997; Gill, 1998).

### **2.6.6 Anti-mutagena aktivnost mlečno-kislinskih bakterij**

Številne študije doslej so pokazale, da mlečno-kislinske bakterije, ki se običajno uporabljajo v industriji fermentiranih mlečnih izdelkov, skupaj z nekaterimi endogenimi intestinalnimi bakterijami, lahko zavirajo mutagenost. Mutagene snovi, ki so ji preskusili, zajemajo različne kemične kancerogene, mutagene snovi iz okolja, vključno s heterocikličnimi amini, urinskimi in fekalnimi mutagenimi snovmi. Ugotovljeno je bilo, da še posebno določene vrste mlečno-kislinskih bakterij (bifidobakterije, *Lb. casei*, *Lb. acidophilus* in tudi drugi laktobacili) posebno intenzivno zavirajo delovanje mutagenih snovi. Poleg tega so raziskave pokazale, da mleko in njegove komponente, posebno kazein in njegovi razgradni produkti, tudi brez dodanih mlečno-kislinskih bakterij, delujejo močno anti-mutageno, in da se anti-mutageni faktorji tvorijo v mleku med procesom fermentacije. Mlečno-kislinske bakterije delujejo anti-mutageno tako, da vežejo mutagene snovi. Vezava je odvisna od pH vrednosti. Vezava mutagene snovi inaktivira, nakar se skupaj z blatom izločijo iz telesa. Še posebno pomembna za vezavo je zgradba celične stene bakterij. Celične stene mrtvih bakterij lahko namreč vežejo mutagene snovi skoraj z enako učinkovitostjo kot žive celice, še posebno je pomembna polisaharidna komponenta celične stene. Drug mehanizem, ki lahko spremeni anti-mutageno aktivnost v črevesju, je sprememba metabolne aktivnosti črevesnih bakterij, do katere pride zaradi delovanja MKB (Matar in sod., 1997; Van Boekel in sod., 1997; Sreekumar in Hosono, 1998).

### **2.6.7 Proti-tumorna aktivnost mlečno-kislinskih bakterij**

Podobno, kot v primeru anti-mutagenosti, so številne študije pokazale zaviranje razvoja tumorjev na celičnih kulturah pri živalih z vsajenimi tumorji in pri živalih s kemično induciranimi tumorji. Študije na celičnih kulturah so pokazale, da zavira razvoj tumorjev tako fermentirano mleko brez bakterij kot fermentirano mleko z bakterijami. Ti rezultati kažejo na to, da se med fermentacijo sproščajo topne snovi v medij, ki delujejo anti-kancerogeno ali pa aktivirajo anti-kancerogene komponente v mleku (Biffi in sod., 1997).

Študije kemično induciranih tumorjev zajemajo predvsem genezo tumorjev na debelem črevesu in tumorje na mehurju, v manjši meri pa tumorje, ki se pojavljajo na drugih mestih. Tumorje inducirajo z različnimi kemičnimi snovmi, med drugim tudi z DMH, ki smo ga uporabljali v naši raziskavi. Raziskave so pokazale, da genezo tumorjev zavirajo tako bakterije, kot tudi samo mleko, ki posredno spodbuja razvoj probiotičnih intestinalnih bakterij, predvsem bifidobakterij. Vedno je imelo predhodno uživanje fermentiranih mlečnih izdelkov za daljše obdobje za posledico precejšnje zaviranje razvoja tumorjev, medtem ko naknadno dodajanje bakterij (liofiliziranih) ali fermentiranih izdelkov ni bilo učinkovito. Čas hranjenja z mlečno-kislinskimi bakterijami pred kemično indukcijo tumorjev pomembno vpliva na razvoj tumorjev: daljši je čas, slabši je razvoj tumorjev. Bakterije s pozitivnimi učinki, ki se omenjajo, so predvsem *Lb. acidophilus*, *Lb. casei*, *B. bifidum* in *B. longum*. Pomembno vlogo pri zaviranju nastajanja tumorjev in kancerogeneze imajo tudi bakteriocini in nizka pH vrednost, ki jo v substratih povzročajo mlečno-kislinske bakterije, pomembna pa je tudi kompeticija s patogenimi bakterijami v borbi za hrano v črevesju. Posebno poglavje pri zaviranju nastanka rakavih obolenj je tudi lipidna frakcija mleka, ki vsebuje številne anti-tumorne komponente (Gallaher in sod., 1996; Goldin in sod., 1996; Singh in sod., 1997; Rowland in sod., 1998; Parodi, 1999a).

## 2.7 Prebiotiki

Prebiotiki so prehranski dodatki, ki lahko bistveno pripomorejo k spremembi metabolnih aktivnosti črevesnih bakterij. Uživanje neprebavljivih ogljikovih hidratov, kot so oligosaharidi, inulin ali laktuloza (keto-analog laktoze), dokazano stimulira in podpira rast določenih mlečno-kislinskih bakterij, posebno pa rast bifidobakterij, ki zato po številu preraščajo bakterioide, klostridije in koliformne vrste bakterij in jih izrivajo iz življenjskega prostora. Med prebiotike prištevamo tudi nekatere beljakovine in peptide v mleku ter določene stabilne lipide, kateri selektivno spodbujajo rast določenih črevesnih bakterij (probiotikov). Kombinirani učinek ugodnega delovanja prebiotikov in probiotikov imenujemo tudi simbiotika. Glavni končni produkt razgradnje neprebavljivih ogljikovih hidratov s pomočjo črevesnih bakterij so kratkoverižne maščobne kisline. Te maščobne kisline skupaj z mlečno kislino, ki jo proizvajajo mlečno-kislinske bakterije, ustvarjajo neugodne pogoje za nastanek raka – saj znižujejo običajni višji črevesni pH in zmanjšujejo količino amoniaka (Gibson in Roberfroid, 1995).

Znanstvene raziskave so do danes identificirale številne nerazgradljive prehranske dodatke, ki lahko pomembno vplivajo na spremembe medsebojnih razmerij intestinalne mikroflore. Spremembe se dogajajo zaradi njihovega vpliva na rast ali/in aktivnost koristnih in zaviranjem potencialno škodljivih mikroorganizmov. Z imenom »prebiotiki« tako poimenujemo laktulozo, laktitol, številne oligosaharide in inulin. Eden najbolj znanih, komercialno uporabljenih prebiotikov je inulin in njegove različne oblike (npr. komercialno ime *Raftilose*). Prav prebiotiki pomembno vplivajo na razrast človeku koristnih vrst iz rodu *Bifidobacterium* v debelem črevesju. Podrobnejša znanstvena dognanja o pomenu prebiotikov so še vedno v začetnih fazah, še vedno je premalo kliničnih testov za potrditev njihove učinkovitosti pri preprečevanju črevesnih obolenj. Vendarle pa dosednji izsledki jasno kažejo na to, da imajo prebiotiki lahko pomemben vpliv na človekovo zdravje. Pokazalo se je, da imajo prebiotiki močan potencial za preprečevanje in kontrolo črevesnih infekcij, kontrolo serumskih trigliceridov in holesterola, izboljšanje vnosa kalcija in zmanjšanje rizičnih faktorjev za nastanek raka na debelem črevesu (Crittenden, 1999). Kefir ima močan prebiotični in probiotični potencial, tako da se nam nakazujejo hipoteze o pomembnosti teh dveh povezanih faktorjev za vpliv na zdravje človeka ob rednem uživanju kefirja.

### 2.7.1 Kefiran

Polisaharid(i), izolirani iz kefirnih zrn, so prav tako naravni prebiotiki. Pravzaprav so to prebiotiki, ki spontano nastajajo ob sami rasti mikroorganizmov v mleku. Niso pa edini, ob teh je poznan še makropeptid iz kapa-kazeina in nekateri drugi. Pravi kefir lahko z njimi tudi identificiramo in le tak ima verjetno značilne probiotične lastnosti, kot mu jih pripisujejo. Pseudo kefirji ne vsebujejo kefirana in drugih sorodnih, za kefir tipičnih ekso-polisaharidnih in drugih kompleksov.

Kefiran je dobil ime po kefirju, saj je kefir mesto njegovega spontanega naravnega nastajanja, kjer ima tudi svojo funkcijo. Še vedno ni dognano, kakšen je mehanizem nastanka in tvorjenja biomatriksa strukture kefirnih zrn. Topni polisaharid, odkrit v kefirnih zrnih, je bil dovolj specifičen, da so mu dali svoje originalno ime – kefiran (KGF-C). Suha kefirna zrna so sestavljena iz matriksa, katerega cca. 50 % predstavlja kefiran. Ta polisaharid je sestavljen iz specifičnega deleža dveh mono-saharidov glukoze in galaktoze v skoraj enakih razmerjih. Kefiran nastaja v sredini kefirnega zrna, sintetizirajo ga laktobacili kot *Lb. kefiranofaciens*. Ta posebna bakterija je imobilizirana sredi kefirnega zrna, kjer vladajo pretežno anaerobne razmere, ki so ugodne za sintezo kefirana v prisotnosti etanola. V kefirnih zrnih so prisotni tudi drugi laktobacili, ki proizvajajo podobne polisaharide npr. *Lb. kefir*, *Lb. sp.* KPB-167B in *Lb. brevis* (Arihara in sod., 1990).

Raziskave na miših in podganah so pokazale, da ima kefiran proti-tumorne lastnosti. V raziskavah na miših, ki so uživale kefiran se je izkazalo, da je kefiran sprožil pri miših specifičen imunski odziv, kar je povzročilo zmanjšanje velikosti tumorjev. Veliko teh raziskav so naredili na Japonskem (Murofushi in sod., 1986; Yakugaku, 1992; Shiomi in sod., 1982; Shiomi in sod., 1983). Zadnje raziskave pa kažejo na to, da uživanje kefirnih zrn preprečuje vnetje črevesja pri podganah (Diniz in sod., 2003).

## 2.8 Postopki in metode ugotavljanja razvoja raka na debelem črevesju

### 2.8.1 Eksperimentalni model za raka na debelem črevesju in danki

Tumorji na prebavnem traktu so najpogostejši maligni tumorji, ki prizadenejo človeka. Zaradi tega so za raziskovalne namene razvili različne eksperimentalne modele za študij nastanka tumorjev. Eksperimentalni model nastanka tumorjev v požiralniku in gastrointestinalnem traktu podgan in miši je model, ki se veliko uporablja in njegovi rezultati kažejo relativno veliko podobnost z nastankom tumorjev pri človeku. Zato so tudi primerna osnova za študijo etiologije, patogeneze in terapije človekovih bolezni (Cerar, 2000).

### 2.8.2 Intestinalni karcinom v podgani induciran z 1,2-dimetilhidrazinom

#### 2.8.2.1 1,2 dimetilhidrazin (DMH)

DMH je bil odkrit in prvič uporabljen v raziskovalne namene leta 1967, ko je Druckrey opazoval vpliv različnih hidrazinov na nastanek tumorjev pri glodalcih. Kot posebno pomemben kancerogen se je pokazal DMH, še posebno potem, ko je bil dokazan v hrani (Toth, 1975) in tobačnem dimu (Liu in sod., 1974).

Lastnosti DMH so:

- z nizkimi koncentracijami selektivno povzročimo nastanek tumorja v prebavnem traktu
- nastali tumorji so makroskopsko in mikroskopsko zelo podobni človeškim tumorjem
- hitra indukcija
- velika zanesljivost
- majhna nespecifična toksičnost (Newborne in Rogers, 1997)

Uporaba DMH kot induktorja kolorektalnih tumorjev je zelo uspešna pri malih glodalcih, toda obstajajo razlike v primerjavi s človeškimi tumorji. Karcinom, ki nastane pri glodalcu, redko zaseva (Goldin, 1981), zato ta model ni uporaben za raziskovanje zasevanja tumorja debelega črevesja.

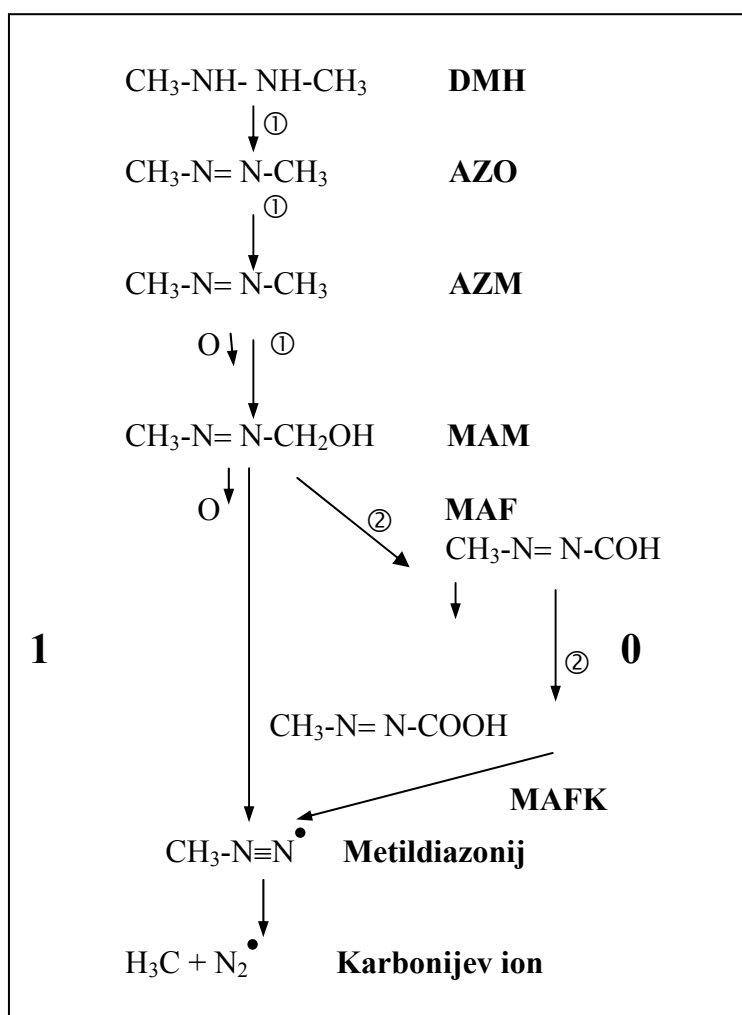
Večina človeških KRK zraste z maligno pretvorbo iz adenomatoznega polipa, pri živalskem modelu pa patogeneza tumorjev še ni povsem jasna. Po prvi hipotezi naj bi KRK nastal iz adenoma, po drugi hipotezi pa iz spremenjene sluznice debelega črevesja (Davis in sod., 1992).

### 2.8.2.2 Presnova 1,2 dimetilhidrazina

Dimetilhidrazin je prokarcinogen za tumorje debelega črevesa (Goldin, 1980) in potrebuje presnovno aktivacijo, da se spremeni v pravo, aktivno kancerogeno snov. Potek prikazuje Slika 9.

Začetek presnovne poti se začne v jetrih (Fiala, 1981), kjer poteka nekaj oksidacijskih reakcij, dokler ne nastane azoksimetan (AZM). AZM se N-hidroksilira do nastanka metilazoskimetanola (MAM), ki preide še stopnjo konjugacije z glukuronsko kislino, od tu pa tečeta dve poti do nastanka aktivnega kancerogena – karbonijevega iona. Prva pot je enostavna in poteka spontano v črevesju, kjer nestabilna molekula MAM hitro razpade. Druga pot poteka v jetrih, kjer se MAM pretvori v aldehyd in nato preko metilazoksiformne kisline do karbonijevega iona. MAM lahko deluje hkrati kot prokancerogen in kancerogen, ker potekata reakciji hkrati, končni produkt pa je enak – karbonijev ion. Karbonijev ion lahko metilira DNK, RNK in beljakovine in s tem povzroči točkovne mutacije, ki povzročijo maligno spremembo sluznice v debelem črevesu (Fiala, 1981).

Vsi presnovki, ki nastanejo v vmesnih reakcijah posredno ali neposredno so kancerogeni, razlikujejo pa se po stopnji delovanja. Azoksimetan (AZO) ob manjših odmerkih upočasnjuje kancerogenezo in je zelo uporaben v raziskovanju vpliva prehrane na nastanek KRK. Na fizikalno – kemijskem nivoju se DMH pretvori v pozitivno nabito molekulo, elektrofil (karbonijev ion), ki se razgradi v nenevarno snov v reakciji s prostim elektronskim parom v citoplazmi, ali pa se veže z negativno nabitim delom DNK. Ta reakcija privede do vezave metilne skupine na določene organske baze, zlasti na gvanin v DNK črevesnih epitelnih celic (LaMont in O’Gorman, 1978).



Slika 9: Presnova 1,2-dimetilhidrazina. Karbonijev ion, končni produkt pretvorbe DMH, je končni kancerogen v sluznici črevesa. 1 – hepatski oksidativni encimi, 2 – hepatske in ekstrahepatske dehidrogenaze, DMH – 1,2-dimetilhidrazin, AZO – azometan, AZM – azoksimetan, MAM – metilazoksimetanol, MAF – metilazoksiformaldehid in MFK – metilazoksiformna kislina (Fiala, 1981)

Figure 9: Metabolism of 1,2-dimethylhydrazin. Carbonium ion, end product of DMH transformation, is end cancerogen in intestinal mucous membrane. 1 – hepatic oxidative enzymes, 2 – hepatic and extra hepatic dehydrogenases, DMH – 1,2 dimethylhydrazin, AZO – azometan, AZM – azoksymetan, MAM – metylazoksymetanol, MAF – metylazoksyformaldehyde and MFK – metylazoksyformic acid (Fiala, 1981)

Mutirana DNK se običajno popravi s posebnimi encimi, če pa je mutacij preveč, se le te prenašajo v nadaljnje celične cikle in se kopičijo, kar končno privede do nastanka KRK in drugih črevesnih tumorjev. DMH postane kancerogen šele po aktivaciji v jetrih, od koder se z žolčem in s krvjo prenese do epitelnih celic debelega črevesa, kjer povzroči metilacijo jedrne DNA. Tarčne celice karcinogena so proliferativne celice (najverjetneje zarodne celice in mlajše generacije proliferativnih epitelnih celic), mnoge se zaradi inhibicije sinteze DNA in posledično inhibicije

mitoze degenerirajo in izločijo v lumen ali pa jih sosednje celice fagocitirajo. Mikroskopsko lahko identificiramo spremembo šele, ko je spremenjen del ali cela kripta (ne samo ena celica). Displastična kripta ima povečan obseg, dilatiran, nepravilen in zvijugan lumen in zadebeljen epitel z zmanjšano mucinsko sekrecijo. V displastičnih celicah je izražena citoplazemska bazofilija, spremenjeno je citoplazemsko razmerje, izrazita so jedrca in vidna je izguba celične polarnosti. Nadaljnja rast take neoplastične lezije je odvisna od intrinzičnih lastnosti proliferacijsko aktivnih celic in interakcij z mikrookoljem. Zaradi aktivacije razgradnih encimov pride do poškodb bazalne membrane, ki predstavlja prvo gostiteljevo bariero, in do invazije tumorskih celic (O'Dwyer in sod., 1988).

### 2.8.2.3 Vrste z DMH induciranih tumorjev

Raziskave so pokazale, da apliciranje DMH ne povzroča samo črevesnih tumorjev, temveč tudi druge tumorje, med njimi predvsem tumorje zunanjšega sluhovoda, jetrne tumorje in ledvične ciste (National Toxicology Program). Pomemben pa je tudi odmerek kancerogena. Ugotovili so, da je za glodavce učinkoviti tedenski odmerek 10-20 mg/kg telesne teže paranteralno, 10-15 tednov zapored. Po latentnem obdobju (približno 6 mesecev od prvega vnosa) se pri skoraj vseh živalih pojavijo tumorji. Dejstvo pa je, da čim višji je odmerek, več bo primarnih tumorjev, krajše bo latentno obdobje in večja je verjetnost za indukcijo nečrevesnih tumorjev.

## 2.9 Mikrobiološke metode

### 2.9.1 Identifikacija mlečno-kislinskih in bifidobakterij

Selektivna gojišča in fenotipski testi omogočajo ločbo laktobacilov od morfološko podobnih bakterij. Hitra identifikacija vrst iz rodu *Lactobacillus* se lahko dopolni s pomočjo 16S rRNA genskih sekvenc. Vrstno specifični PCR začetniki, za mesta znotraj območja 16S-23S rRNA, so prav tako na voljo za posamezne vrste rodu *Lactobacillus*. Molekularne metode za podrobnejšo analizo vrst iz rodu *Bifidobacterium* so manj razvite. Trenutno je DNA-DNA reasociacija primerno orodje za vrstno identifikacijo tega rodu. Bifidobakterije lahko od morfološko podobnih bakterij ločimo še z za rod specifičnimi PCR začetniki ali oligonukleotidnimi testi (Tannock, 1999).

## 2.10 Metode za merjenje poškodb DNK

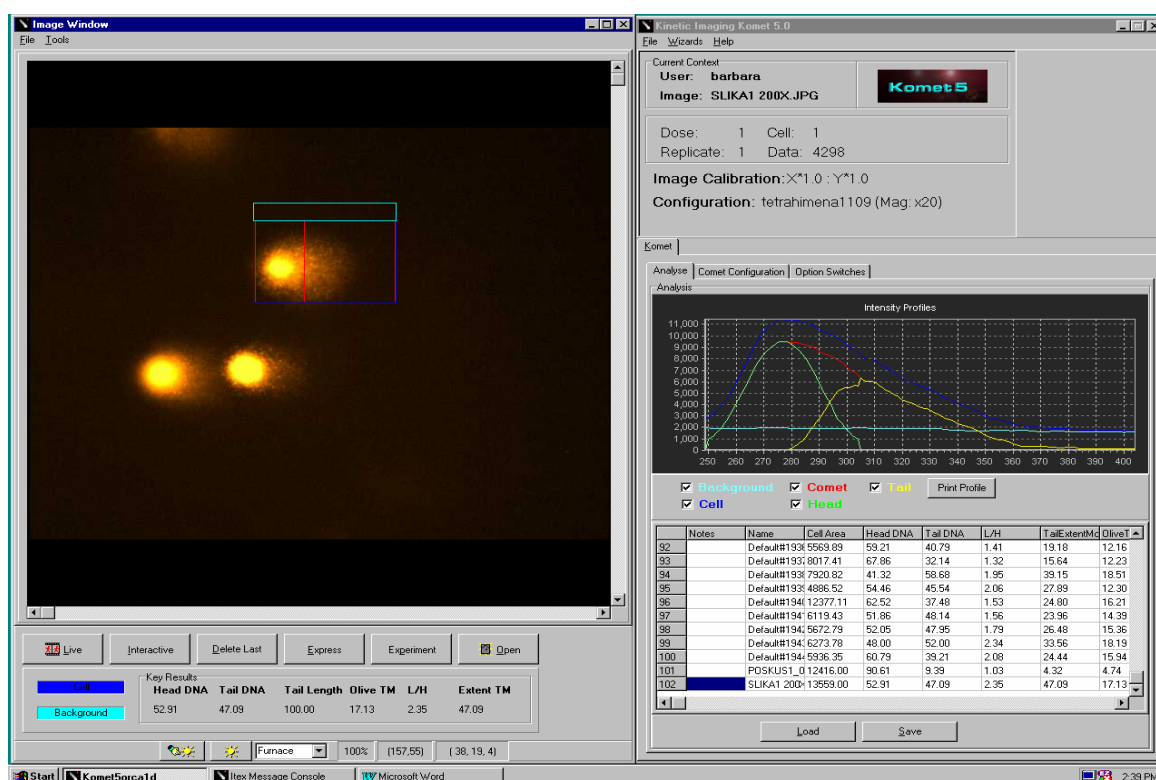
Prehrana je zelo pomembno povezana z nastajanjem prostih radikalov v organizmu in zaščito pred njimi. Tako na primer večkrat nenasičene maščobe povečujejo obremenitev organizma s prostimi radikali. Antioksidativne snovi proste radikale nevtralizirajo. Kljub delovanju antioksidantov, se nekateri prosti radikali izognejo nevtralizaciji z antioksidanti in tako povzročajo škodo v organizmu. DNK je neprestano izpostavljena oksidacijskim poškodbam, ki jih je potrebno popraviti. Vpliv genotoksičnih snovi na poškodbe DNK molekul lahko proučujemo z metodami kot so: test kromosomskih aberacij, test izmenjave sestrskih kromatid in mikronukleusni test (Marinšek Logar, 2000). Poškodbe DNK molekul lahko merimo tudi preko njenih oksidacijskih produktov (oksidirane baze) s HPLC (Esterbauer, 1996). Razlomljene verige DNK lahko ugotovljamo z elektroforezo v utripajočem električnem polju. Med novejšje metode merjenja poškodb DNK pa štejemo kometni test ali elektroforezo posameznih celic v gelu ali kot jo imenujejo v tuji literaturi Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE).

### 2.10.1 Kometni test

Kometni test ali elektroforeza posameznih celic v gelu (SCGE) je hitra, enostavna in občutljiva tehnika za merjenje in analizo poškodb molekul DNK in njihovega popravljanja v celicah sesalcev. Test je nastal s postopnim razvojem in adaptacijo drugih metod, kot so sedimentacija jeder, alkalna elucija in alkalna sedimentacija jedrne DNK v saharozi (Collins in sod., 1997) in so ga v obliki, kot ga uporabljamo danes, razvijali od leta 1988 (Singh in sod., 1988) do 1993 (McKelvey in sod., 1993). Poškodbe DNK spremljamo v posameznih celicah. Za analizo so primerne celice, ki so že naravno suspendirane (npr. krvne celice, največkrat pa so to humani periferni levkociti), celice tkiv, ki jih lahko brez večjih poškodb suspendiramo in celice namnožene v celičnih kulturah. Če celice, ki jih nameravamo testirati s kometnim testom, niso suspendirane, jih moramo z ustreznim postopkom, ki celičnih jeder ne sme poškodovati, pripraviti v suspendirani obliki. Za vsako vrsto tkiva je potrebno izbrati ustrezno metodo celične disociacije. Pri pripravi celic moramo vzorce zaščititi pred svetlobo, da bi se izognili dodatnim poškodbam DNK z UV sevanjem (Miyame in sod., 1998). Z ustreznimi postopki lahko pripravimo celice številnih tkiv in organov. Celice vklopimo v agarozo v obliki tankih gelov na mikroskopskih objektivih, sledi liza z detergentom in obdelava z veliko koncentracijo soli. Jedrna struktura se v teh postopkih razrahlja. Na mestih prelomov DNK se sprosti superzvita struktura DNK molekul (odvijanje, razvijanje verig DNK) in nastanejo prosti konci negativno nabite DNK, ki v pogojih alkalne elektroforeze, ki sledi v postopku, potujejo k anodi. Alkalni pogoji tudi pretvorijo alkalno labilna mesta v molekulah DNK



v prave prelome in s tem povečajo občutljivost metode. Po končani elektroforezi gele pobarvamo z ustreznim fluorescentnim barvilom (najpogosteje etidijev bromid), ki se veže na DNK, in rezultate opazujemo z epifluorescentno mikroskopijo. Poškodovani fragmenti DNK, ki med elektroforezo potujejo proti anodi, ustvarijo sliko repa »kometa«, kar je metodi dalo ime. Celice z nepoškodovano jedrno DNK dajejo sliko dokaj pravilnih krogel (Slika 10). Relativna intenziteta fluorescence v repu kometa je funkcija frekvence prelomov DNK (Pajk, 2000).



Slika 10: Prikaz vrednotenja poškodb levkocitne DNA s kometnim testom in računalniškim programom (KIK 5.0)

Figure 10: Presentation of assessment of leukocyte DNA damage with comet assay and PC program (KIK 5.0)

### 2.10.1.1 Rezultati analiz

Poškodbe lahko kvantificiramo vizualno (Miyame in sod., 1998) ali pa bolj natančno z denzitometrijo in računalniško podprto analizo slike (Collins in sod., 1995), pri čemer pa vizualna obdelava ni direktno primerljiva z računalniško obdelavo digitaliziranega signala. Računalniška analiza slike močno poveča hitrost in zanesljivost metode. Meri odstotek DNK v repu [T (%)], dolžino kometnega repa [TL (μm)] in nam izračuna moment repa [TM = T x TL (%)]. Običajno te parametre ugotavljamo za 100 jeder vsakega poskusnega objekta oz. subjekta in izračunamo

povprečni odstotek poškodovane DNK (Collins in sod., 1997). Dolžina repa je v korelaciji z najmanjšo dolžino fragmentov DNK, ki potujejo, intenziteta fluorescence pa kaže na število fragmentov. V enem vzorcu običajno obdelamo 100 naključno izbranih celičnih jeder. Med preiskanimi celicami najprej ovrednotimo delež poškodovanih jeder (jeder s kometovim repom) v primerjavi z negativno kontrolo. Z ustreznimi programi rezultate testa obdelamo.

### 2.10.1.2 Uporaba kometnega testa

Test uporabljamo v bazičnih raziskavah celičnega odgovora na poškodbe DNK, v *in vitro* in *in vivo* študijah genotoksičnosti na živalskih modelih (Fairbairn in sod., 1995) in v humanem biomonitoringu (Collins in sod., 1997). Na področju humanega biomonitoringa so test sprejeli kot orodje za hitro identifikacijo izpostavljenosti nizkim dozam genotoksičnih snovi in sevanja, čeprav je rezultate tega testa včasih težko interpretirati, poleg tega pa zanesljivost in ponovljivost nista najboljša (Collins in sod., 1997). Test so že prilagodili tudi za delo z rastlinskimi celicami (Koppen in Verschaeve, 1996) in kvasovkami, kar odpira nove možnosti na področju bazičnih raziskovanj genotoksičnosti. Izvedbe kometnega testa so številne, v glavnem pa sledijo metodi po Singhu (Singh in sod., 1988).

Genotoksične učinke kemičnih mutagenov na različne tarčne organe in celice lahko preučujemo tudi z drugimi metodami (glej poglavje 2.10 Metode za merjenje poškodb DNK), vendar ima kometni test prednost zaradi svoje enostavnosti, hitrosti in velike občutljivosti pri merjenju neposrednega biološkega učinka na genetski material. Poleg tega je uporaben za različne organe in celice (Miyame in sod., 1998). Končni rezultat kometnega testa odseva razliko med poškodbami DNK in učinkovitostjo popravljalnih mehanizmov DNK v testiranih celicah. Nizek nivo poškodb, ki ga dokažemo s kometnim testom, je na primer lahko odraz realno nizke stopnje poškodbe DNK (endogene ali eksogene) ali pa visoke učinkovitosti popravljalnih mehanizmov.

### 2.10.1.3 Ocenjevanje oksidacijskih poškodb DNK

Kometni test zelo uspešno uporabljajo za ocenjevanje oksidacijskih poškodb DNK (Collins s sod., 1997). Pri oksidacijskem metabolizmu človeka se 5 do 10 % kisika, ki nastopa kot končni prejemnik elektronov, reducira v superoksidni radikal ( $O_2^{\cdot-}$ ), vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ) in hidroksilni radikal ( $OH^{\cdot}$ ). Te reaktivne molekule povzročijo oksidacijske poškodbe lipidov, proteinov, ogljikovih hidratov in nukleinskih kislin. Pri zdravem človeku, ob normalnem vnosu

energije in ustrezni prehrani, antioksidativni obrambni sistem (vitamini C, A in E) običajno uspevne neutralizirati delovanje prostih radikalov (Esterbauer, 1996). Če je prooksidacijsko/antioksidacijsko razmerje porušeno v smeri prooksidantov, nastanejo genotoksične poškodbe.

#### 2.10.1.4 Spremljanje onesnaženja okolja in procesov staranja

Kometni test so v zadnjih treh letih zelo uspešno začeli uporabljati pri raziskovanju direktnih bioloških učinkov onesnaževanja okolja, saj se predvsem v industrijsko močno razvitih okoljih ravno zaradi naraščajočega onesnaževanja močno stopnjuje genotoksični pritisk na populacijo (Tafazoli in Kirsch-Volders, 1996). Eden od vidikov ugotavljanja okoljskih posledic potencialno nevarnih odpadkov je tudi ocenjevanje genotoksičnih poškodb pri indikatorskih organizmih (npr. deževnik). V tem smislu je kometni test idealen, saj je uporaben za vse evkariontske organizme in za različne vrste celic. Prednost tega testa pred kemijskimi določitvami vrste in koncentracij polutantov je v tem, da tu ugotavljamo direktno biološko tveganje, ki nastane v interakciji polutanta s kompleksnim okoljem in organizmom. Staranje spremlja povečana stopnja poškodb molekul DNK, kar je časovno vzporedno zmanjšani aktivnosti encimov, ki sodelujejo v popravljalnih mehanizmih (Kirkwood, 1990). Zato je tudi procese staranja možno spremljati s kometnim testom. Ker na fiziološki ravni obstajajo velike individualne razlike med osebami iste starosti, so te študije postale velik raziskovalni izziv.

#### 2.10.1.5 Uporaba kometnega testa v humanem biomonitoringu

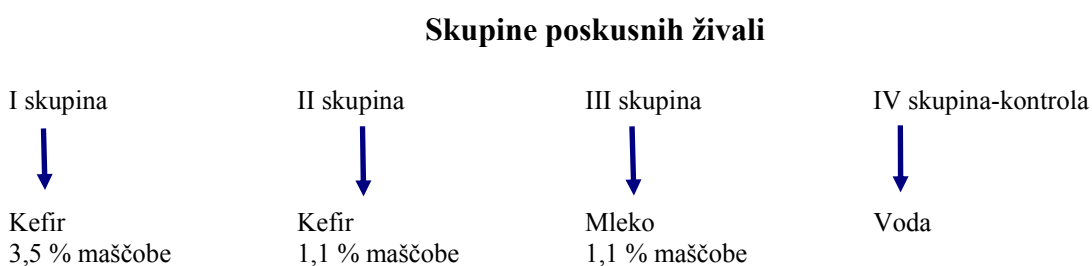
Indukcija genskih poškodb je kritična začetna stopnja v razvoju rakavih obolenj, številnih drugih kroničnih boleznih in pri sprožanju abortusov, zato je zaznavanje začetnih poškodb na ravni DNK s kometnim testom še pred samim nastankom bolezni lahko izjemnega pomena pri preprečevanju nadaljnjega razvoja obolenj. Uporaba biomarkerskih testov ima veliko prioriteto pri ugotavljanju zdravstvenega tveganja v povezavi z izpostavljenostjo različnim toksičnim snovem in sevanjem (Albertini in Becking, 1996).

## 3 MATERIAL IN METODE DE LA

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Eksperimentalne živali

Uporabili smo 120 podganjih samcev seva Wistar, starih 10 tednov, vzrejenih v Medicinskem eksperimentalnem centru Medicinske fakultete v Ljubljani, kjer je poskus tudi potekal.



Slika 11: Shema skupin poskusnih živali

Figure 11: Schema of groups of animals in experiment



Slika 12: Živali v poskusu

Figure 12: Animals in the experiment

Živali smo razdelili v štiri skupine po 30 podgan, glede na režim prehrane: tri skupine podgan so bile eksperimentalne in ena kontrolna skupina. Za izvedbo poskusa smo dobili dovoljenje Etične komisije Veterinarske uprave RS (št. 323-02-139/2002). Med poskusom je bila temperatura v prostoru, v katerem so bile živali 20 – 23°C, relativna vlažnost 45 – 70 %, svetlobni režim je bil naraven (Slika 12).

### 3.1.2 Krmljenje

Živali smo krmili z različnim režimom prehrane. Vse skupine smo krmili z peletirano krmo za glodavce (MK-M-K-02, Biotehniška fakulteta, Rodica) in vodovodno vodo, oboje *ad libitum* (Slika 13). Prva eksperimentalna skupina je kot dodatek dobivala kefir (Mlekarna KREPKO, Laze) s 3,5% mlečne maščobe, *ad libitum*. Druga eksperimentalna skupina podgan je kot dodatek dobivala kefir (Mlekarna KREPKO, Laze) z 1,1% mlečne maščobe na enak način kot prva skupina podgan. Tretja eksperimentalna skupina podgan je dobivala trajno (UVT) mleko (Ljubljanske mlekarne), tipizirano na 1,1% mlečne maščobe na enak način kot prva skupina podgan. Drugi in tretji eksperimentalni skupini podgan smo pripravili mlečne dodatke tako, da smo energijsko izenačili obroke z maltodekstrinom do enake energijske vrednosti s prvo skupino podgan. Četrta skupina podgan je bila kontrolna, kateri smo tudi energijsko izenačili dodatek k obroku z maltodekstrinom. Vse štiri skupine podgan so dobivale k osnovni dnevni prehrani dodatke (kefir 3,5%, kefir 1,1%, mleko 1,1% ali v vodi raztopljen maltodekstrin) pripravljene tako, da so imeli enako energijsko vrednost. Na tak način smo, kolikor je bilo le mogoče, izenačili skupni dnevni vnos energije, kar je pomembno pri ugotavljanju kancerogeneze (Guthrie in Carroll, 1999).

Preglednica 6: Sestava peletirane krme

Table 6: Composition of pellet food

	kcalJ/100 g	g/100 g
Energija	323,50	
Beljakovine	80,00	20,0
Maščobe	31,50	3,5
Ogljikovi hidrati	212,00	53,0
Kalcij		1,2
Fosfor		1,0
Natrij		0,03
Prehranska vlaknina		3,1

Preglednica 7: Krmni režimi različnih skupin poskusnih živali

Table 7: Feeding systems of different groups of tested animals

Skupine poskusnih živali	Peletirana krma ( <i>ad libitum</i> )	Tekoča krma ( <i>ad libitum</i> )	Napajanje ( <i>ad libitum</i> )
1. skupina: eksperimentalna skupina: kefir 3,5	Peletirana krma	Kefir 3,5% mlečne maščobe	Vodovodna voda
2. skupina: eksperimentalna skupina: kefir 1,1	Peletirana krma	Kefir 1,1% mlečne maščobe (+ maltodekstrin)	Vodovodna voda
3. skupina: eksperimentalna skupina: mleko 1,1	Peletirana krma	Mleko 1,1% mlečne maščobe (+ maltodekstrin)	Vodovodna voda
4. skupina: kontrola	Peletirana krma	Vodovodna voda (+ maltodekstrin)	Vodovodna voda



Slika 13: Krmljenje podgan

Figure 13: Feeding of the rats

Med poskusom smo količinsko ovrednotili vso zaužito krmo, vodo in dodatke. V Preglednici 6 je prikazana sestava peletirane krme, ki so jo med poskusom uživale podgane kontrolne in vseh eksperimentalnih skupin. Krmni režimi različnih skupin poskusnih živali pa so prikazani v Preglednici 7.

**Sestava in pH vrednost testnih tekočin je bila sledeča:**

**Kefir 3,5 % MM:**

- 140 ml kefirja 3,5 % MM + 70 ml vode
- pH = 4,58

**Kefir 1,1 % MM:**

- 140 ml kefirja 1,1 % MM + 70 ml vode + 5,52 g maltodekstrina
- pH = 4,51

**Mleko 1,1 % MM:**

- 140 ml UVT mleka (1,1 % MM): 31 ml 3,2 % MM + 109 ml 0,5 % MM + 70 ml vode + 7,56 g maltodekstrina
- pH = 6,7

**Kontrola (maltodekstrin raztopljen v vodi):**

- 22 g maltodekstrina do 210 ml vode
- pH = 6,95

Živali smo tehtali vsak teden in prilagajali odmerke DMH do 25 mg/kg telesne mase živali. Raztopino smo injicirali subkutano enkrat tedensko, 20 tednov zaporedno v kožno gubo na boku. Živali smo po koncu injiciranja pustili živeti še 7 tednov, nakar smo jih žrtvovali z inhalacijo CO<sub>2</sub> in izvedli obdukcijo.

### **3.1.3 Kancerogen**

Za indukcijo črevesnih tumorjev smo uporabili 1,2-dimetilhidrazin (DMH, Fluka Chemie Švica) pripravljen po standardni metodi: DMH-HCl smo raztopili v 0,001 M EDTA in izravnali pH na 6,5 z 0,1 M raztopino NaOH (Takahashi in sod., 1986). Sveže raztopine smo pripravljali enkrat tedensko.

## 3.2 Metode dela

Med poskusom smo izvajali tehtanje živali in preverjali njihovo zdravstveno stanje. Zadnji teden pred zaključkom poskusa smo živalim odvzeli vzorce krvi za kometni test. Po zaključku poskusa, ki je tekel 26 tednov, smo živali usmrtili z inhalacijo CO<sub>2</sub> in izvedli obdukcijo.

### 3.2.1 Obdukcija in pregled tkiv

Obdukcijo smo izvajali na Inštitutu za patologijo. Pri obdukciji smo pregledali vse notranje organe razen osrednjega živčevja. S palpacijo ušes in obušesnih regij smo ugotavljali pojavnost tumorjev zunanjega sluhovoda. Črevo smo odprli in nato spirali z vodo in z iglami fiksirali na stiropor (Slika 14), pri čemer smo sluznično stran črevesja obrnili navzgor.



Slika 14: Fiksiranje črevesja na stiropor

Figure 14: Fixation of the intestines on styropor



Tkiva smo fiksirali v 10% nevtraliziranem formalinu, nato vklopili v parafin in naredili histopatološke rezine debeline 4-5  $\mu\text{m}$ . Rezine smo obarvali s trikromno metodo po Kreybergu. V primeru tumorske najdbe smo naredili rezine na dveh globinah.

Za histološki pregled smo z debelega črevesa odvzeli 3 vzorce: rektum, kolon transversum in kolon ascendens. Poleg tega smo odvzeli tudi vse makroskopsko vidne lezije (Slika 15). V primerih, kjer ni bilo mogoče določiti histološke slike ali stadija tumorja iz ene rezine, smo naredili stopničasto serijo rezin.



Slika 15: Makroskopski izgled eksperimentalno induciranih tumorjev debelega črevesa

Figure 15: Macroscopic outlook of experimentally induced tumors on large intestines

Vse črevesne lezije so ocenili na Inštitutu za patologijo Medicinske fakultete v Ljubljani po histoloških kriterijih, ki veljajo tudi v humani patologiji. Povečava pri kateri so mikroskopirali je bila 6,3 x 2,5.

Stadije karcinomov so ocenili na Inštitutu za patologijo po izvorni *Dukesovi* klasifikaciji iz leta 1932 (Dukes, 1932):

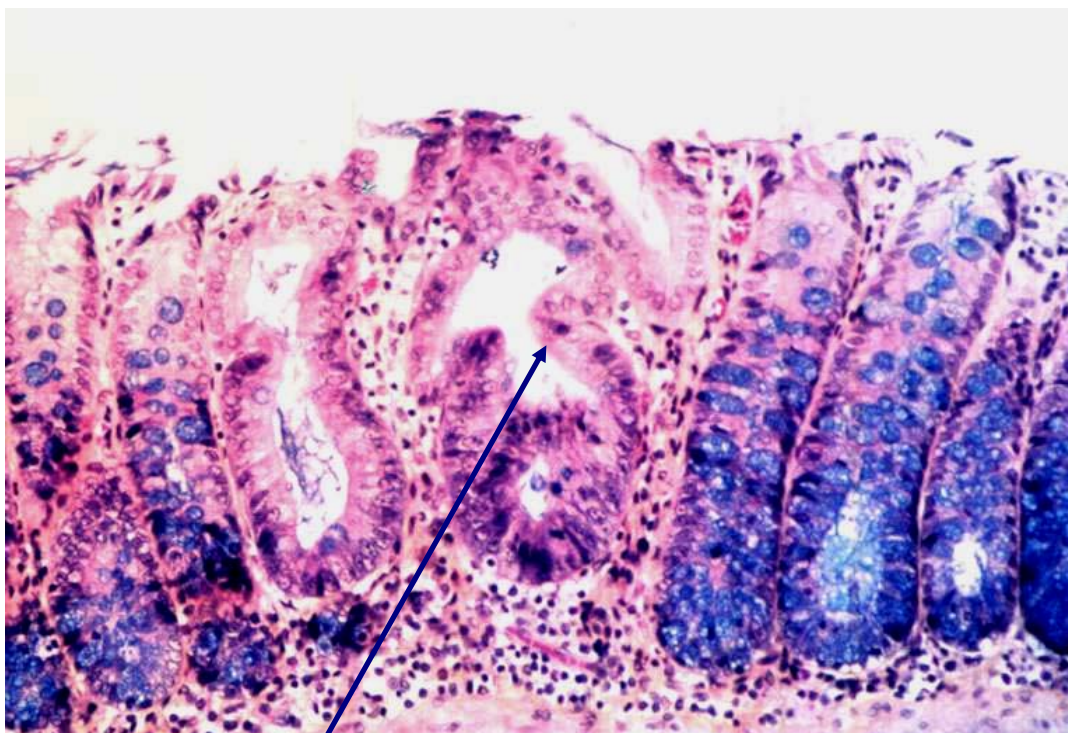
- *Dukes A* – tumorsko tkivo je omejeno na steno črevesa, zajema submukoza in muskularis proprio toda ne vrašča v serozo;
- *Dukes B* – tumorsko tkivo prerašča muskularis proprio in vrašča v serozo
- *Dukes C* – prisotnost zasevkov v bezgavkah
- *Dukes D* – oddaljene metastaze.

Histološki kriteriji za diagnozo adenoma so bili:

- Citološki; povečano število mitoz, polimorfija in hiperkromazija jeder, bazofilija citoplazme in zmanjšana količina mucina.
- Strukturni; stratifikacija jeder, nepravilno brstenje žleznih tvorb.
- Najmanj 5 aberantnih kriptnih fokusov skupaj je predstavljal adenom.

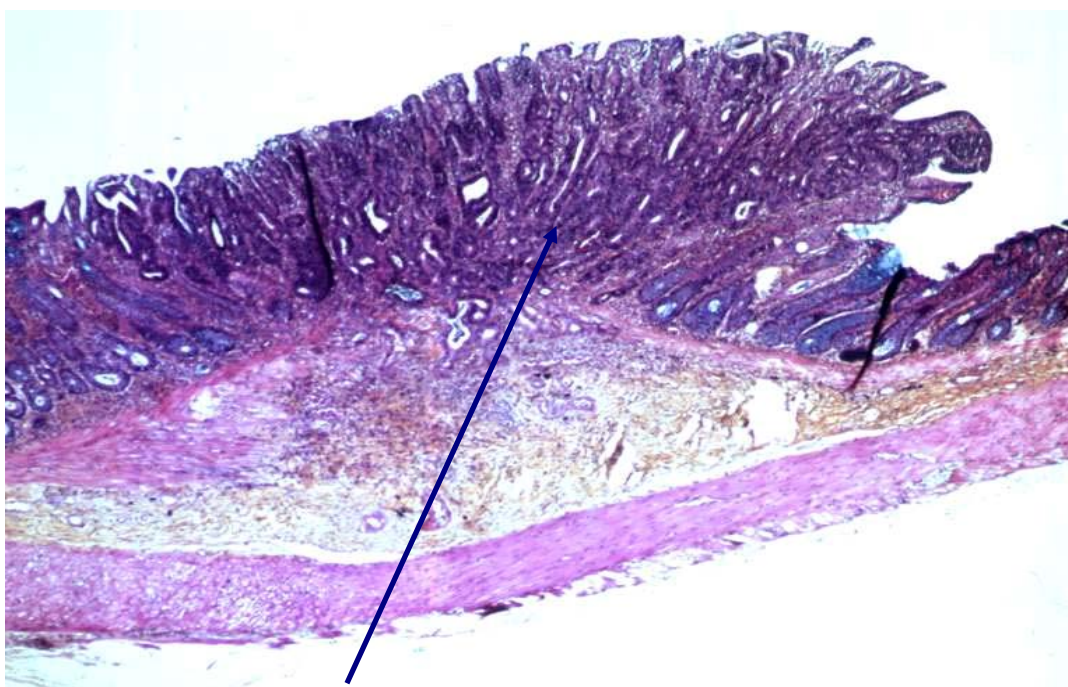
Poleg adenomov in karcinomov so ugotavljali tudi število aberantnih kriptnih fokusov v rektumu, kolonu transversumu in kolonu ascendensu, kot možne predstopnje adenoma. Maligni epitelni tumor kolona in rektuma je po definiciji tumor, ki penetrira skozi muskularis mukoze v submukoza (Slika 17). Aberantni kriptni fokus (Aberant crypt foci – ACF) je po definiciji najzgodnejši morfološki prekursor epitelne neoplazije (Slika 16).

Rezultate obdukcije in morfološke analize tkiv so na Inštitutu za patologijo, Medicinske fakultete, Univerze v Ljubljani tudi statistično obdelali. Natančne izsledke tega dela preiskave vsebuje doktorska naloga mag. Cirile Hlastan–Ribič, univ. dipl. ing (2005).



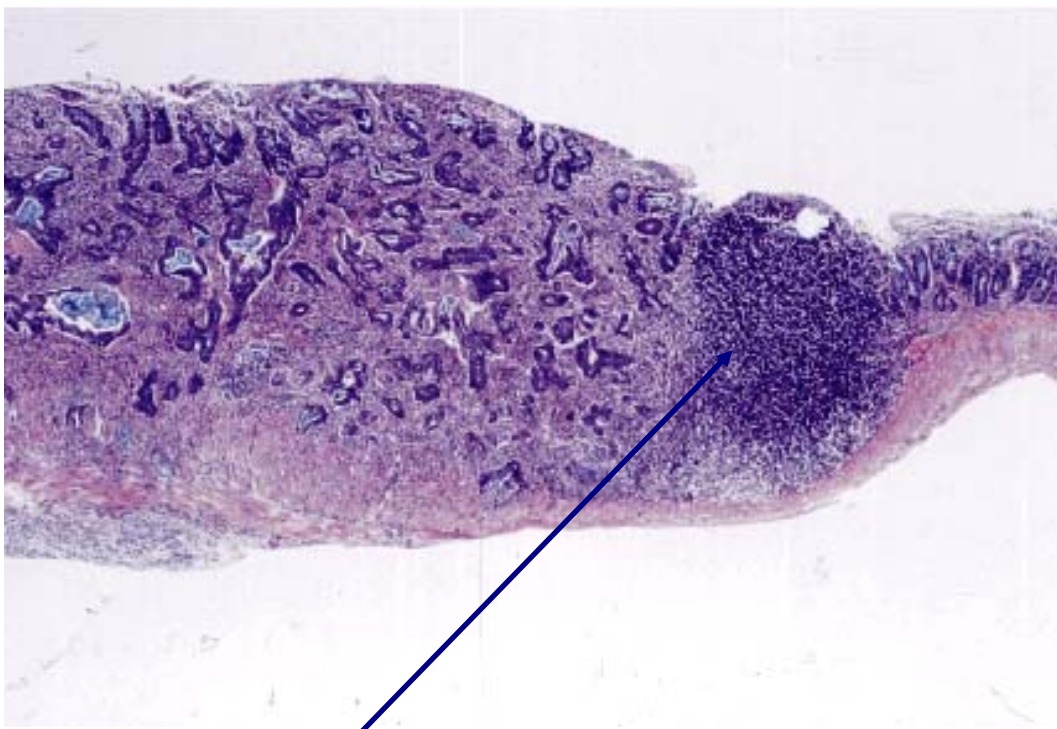
Slika 16: Aberantni kriptni fokus (povečava 6,3 x 2,5)

Figure 16: Aberrant crypt foci (magnification 6,3 x 2,5)



Slika 17: Dobro diferenciran adenokarcinom z začetno invazijo submukoze (povečava 6,3 x 2,5)

Figure 17: Good differentiated adenocarcinoma with initial invasion of submucosys (magnification 6,3 x 2,5)



Slika 18: Karcinom ob limfnem foliklu (povečava 6,3 x 2,5)

Figure 18: Carcinoma at lymphoid follicle (magnification 6,3 x 2,5)

### 3.2.2 Mikrobiološke analize

Mikrobiološke analize smo opravili na Katedri za mlekarstvo Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani.

Takoj po žrtvovanju podgan smo odvzeli blato iz predela debelega črevesa in ga zamrznili (-20°C). Za mikrobiološke analize smo po 1 g blata homogenizirali v 9 ml raztopine za razredčevanje z naslednjo sestavo: ¼ Ringerjeve raztopina, 0,05 % cistein hidroklorida (Merck, Nemčija, 1.02839.0025), 0,1 % peptona (Biolife, Italija, 412290). Aaerobne pogoje, kjer so bili potrebni, smo zagotovili z uporabo Generbox anaer systema proizvajalca Bio-Merieux, Mercy d'Etoile, Francija.

Ustrezno razredčene vzorce smo nacepili na selektivna gojišča za posamezne skupine bakterij. Za enterobakterije smo uporabili gojišče EMB (Eosin Methylene-Blue Lactose Sucrose Agar), (Merck, Nemčija, 1.01347.0500), inkubirali pa pri 37°C 24 ur.

Za sulfit-reduktorne klostridije smo uporabili gojišče SPS (Perfringens Selective Agar) (Merck, Nemčija, 1.10235.0500), inkubirali pri 37°C 24-48 ur v anaerobnih pogojih. Sulfit-reduktorni klostridiji izrastejo kot črne kolonije.

Za enterokoke smo uporabili gojišče KAA Kanamycin Esculin Azide Agar, (Merck, Nemčija, 1.05222.0500), plošče smo inkubirali pri 37°C 2-3 dni v aerobnih pogojih. Enterokoki izrastejo kot črne kolonije.

Za mlečno-kislinske bakterije smo uporabili gojišče MRS (Merck, Nemčija, 1.10661.0500), plošče smo inkubirali pri 37°C 2-3 dni v anaerobnih razmerah.

Za bifidobakterije smo uporabili gojišče NPNL, ki smo ga sestavili po IDF standardu 149 (IDF standard 149, str. 5-6, 1991), inokulirane plošče pa inkubirali pri 37°C 48 ur v anaerobnih pogojih. Za razredčevanje smo uporabili fiziološko raztopino z dodatkom 0,05% cistein hidroklorida (Merck, Darmstadt, Nemčija, 1.028390025) in 0,1% peptona (Merck, Darmstadt, Nemčija, 1.02239.0500).

Za kvasovke smo uporabili modificiran YGC (YGL) Agar (Yeast Extract Glucose Chloramphenicol Agar), pri katerem smo namesto glukoze kot sladkor uporabili laktozo (20g/l). Inkubacija je potekala pri 37°C 5-7 dni. YGC smo sestavili iz naslednjih sestavin: 5 g/l kvasni ekstrakt, Biolife, Milano, Italija, 412220; 20 g/l laktoza-monohidrat, Kemika, Zagreb, Italija, 1200607; 0.1 g/l chloramphenicol, Fluka Biochemica, Steinheim, Austria, 23215; 15 g/l agar-agar, Biolife, Milano, Italija, 411030.

### 3.2.2.1 Statistična obdelava rezultatov mikrobioloških analiz

Rezultate mikrobioloških analiz smo statistično obdelali z orodji, ki so na voljo v sklopu računalniškega programa Microsoft Excel. Značilnost razlik med povprečnimi vrednostmi za število mikroorganizmov pri posameznih skupinah smo preverjali z enofaktorsko analizo variance (ANOVA). Kadar smo ugotovili značilne razlike med različno tretiranimi skupinami ( $p < 0,05$ ), smo po dve povprečni vrednosti med seboj primerjali še s Studentovim t-testom.

### 3.2.3 Kometni test

Kometni test (elektroforeza posameznih celic v gelu) smo uporabili za *in vivo* testiranje poškodb jedrne DNK pri laboratorijskih podganah vrste WISTAR.

#### 3.2.3.1 Priprava krvi za kometni test

Kometni test so opravili na Katedri za mikrobiologijo in mikrobno biotehnologijo, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani.

Kri smo odvzeli iz vratnih žil podgan tik pred kometnim testom. Živali smo pred odvzemom krvi kratkotrajno omamili z etrom. Kri smo natočili v 3 ml epruvete Vacutainer (Brand, 367652), ki imajo že dodan antikoagulant ( $K_3EDTA$ ) in dobro premešali.

Za kometni test smo uporabili polno kri, po postopku, ki sta ga opisala Johnstone in Thorpe (1990).

#### 3.2.3.2 Kometni test s podganjo krvjo

Kometni test je potekal po postopku, ki so ga opisali Rezar in sod. (2003). Postopek po Rezar in sod. (2002) z manjšimi modifikacijami sledi originalnemu postopku po Singhu in sod. (1988).

Individualna jedra celic in kometi so dobro vidni in primerni za vrednotenje pri 200-kratni povečavi epifluorescentnega mikroskopa pri ekscitacijski svetlobi valovnih dolžin med 515 in 560 nm in emisijskem filtru 590 nm.

Poškodbe jedrne DNK so sorazmerne z dolžino kometnega repa in z intenziteto fluorescentnega signala v repu.

#### 3.2.3.3 Statistična obdelava rezultatov kometnega testa

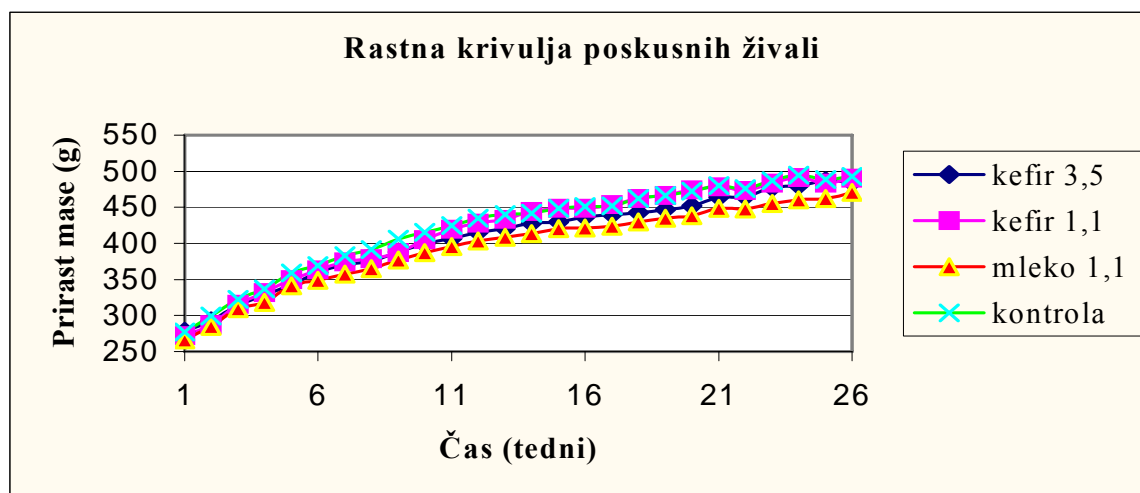
Stopnje poškodb so podane kot Repni moment po Olivu (OTM). Za statistično obdelavo podatkov smo uporabili proceduro GLM (*General linear models*) v programskem paketu SAS/STAT (SAS User's Guide, 1990). Pri obdelavi podatkov smo v statističnem modelu upoštevali vpliv skupine in vpliv časa odvzema krvi. Razlike med skupinami smo iz vrednotili s pomočjo Tukey-evega testa.

## 4 REZULTATI

V naši raziskavi smo proučevali vpliv krmljenja z mlekom in kefirjem z različnimi stopnjami maščob (1,1% MM in 3,5% MM) na razvoj eksperimentalno induciranih tumorjev pri podganah seva vrste Wistar. Tumorje smo v živalih inducirali s subkutano aplikacijo 1,2 dimetilhidrazina. Zadnji teden pred zaključkom poskusa smo živalim odvzeli vzorce krvi za kometni test. Ob zaključku poskusa, ki je trajal 26 tednov, smo živali stehtali in jih žrtvovali z inhalacijo CO<sub>2</sub>. Zatem smo izvedli obdukcijo in pregledali vse notranje organe. Ugotavljali smo pojavnost različnih vrst tumorjev. Tkiva smo tudi fiksirali in naredili histološke slike. Za namen mikrobiološke analize črevesne mikroflore smo odvzeli vzorce blata. Na selektivnih gojiščih smo ugotavljali prisotnost in število enterobakterij, enterokokov, klostridijev, mlečno-kislinskih bakterij, bifidobakterij in kvasovk. Kometni test smo uporabili za ugotavljanje poškodb jedrne DNK. Vse podatke smo statistično obdelali.

### 4.1 Rast poskusnih živali

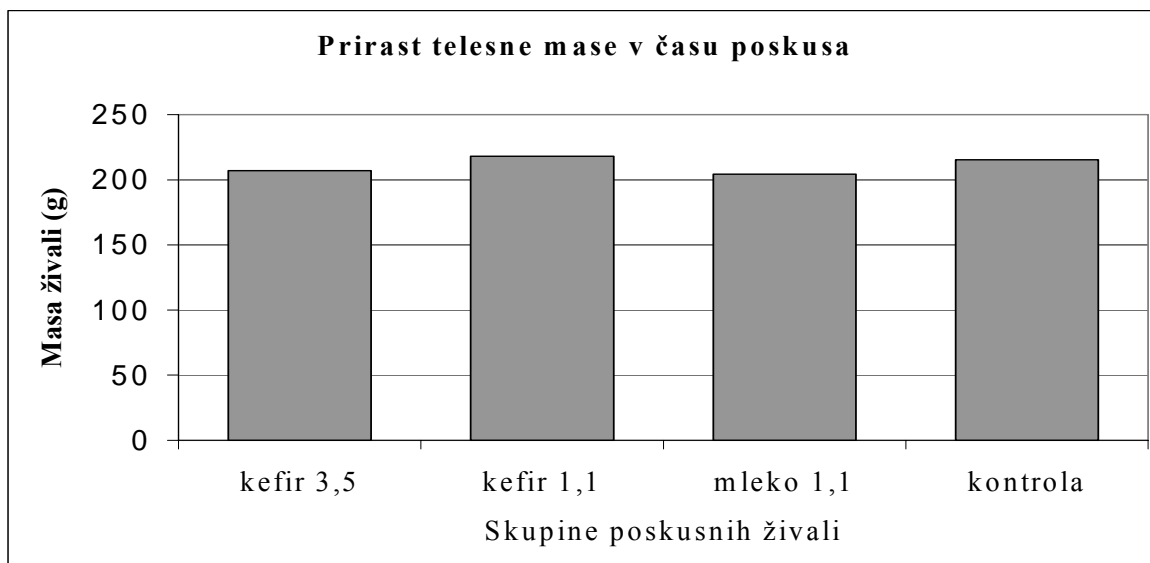
Med poskusom smo 1x - tedensko tehtali živali in opazovali njihovo splošno zdravstveno stanje. Slika 19. prikazuje krivulje rasti posameznih skupin poskusnih živali, iz katere je razvidno, da so razlike med skupinami majhne, kar je potrdila tudi statistična analiza, saj smo ugotovili, da v priraščanju povprečne telesne mase podgan, med skupinami ni statistično značilnih razlik ( $F=0.60$ ;  $p=0.618$ ). Kljub temu je bilo opaziti nekoliko boljše povprečno priraščanje živali iz kontrolne skupine v primerjavi s skupino živali, ki je pila mleko z 1,1% MM.



Slika 19: Rastna krivulja poskusnih živali

Figure 19: Growth curve of the testing animals

Slika 20. pa prikazuje povprečen prirast telesne mase podgan v času poskusa. Največji povprečen prirast telesne mase opazimo pri skupini podgan, ki smo ji dodajali kefir z 1,1% MM (217,9 g), sledi ji kontrolna skupina podgan 215,3 g in kefir 3,5. Najmanjši povprečen prirast telesne mase smo opazili pri podganah, katerim smo dodajali mleko 1,1 (204,4 g), kar potrjuje naše zgornje opažanje. Zanimivo je, da je skupina I. (kefir 3,5) priraščala slabše od kontrolne, najboljše pa skupina II. (kefir 1,1).



Slika 20: Prirast telesne mase v času poskusa

Figure 20: Increase of the body mass of animals during the time of the experiment

#### 4.1.1 Količina zaužite krme in tekočine

Povprečne količine zaužitih testnih dodatkov k osnovni peletirani krmi, bodisi same vode z dodatkom maltodekstrina, ali kefirja 3,5, kefirja 1,1 ali mleka 1,1 so bile pri posameznih skupinah dokaj izenačene (Preglednica 7). To smo dosegli z energijsko izenačitvijo ponujenih obrokov. Najmanjšo povprečno količino zaužitega dodatka smo opazili pri skupini podgan, ki so uživale kefir 3,5. Pri isti skupini podgan smo opazili največjo količino popite vode. Najmanjšo povprečno količino zaužite krme smo ugotovili pri skupinah podgan, ki so uživale kot dodatek mleko 1,1 in sicer 18,22 g/dan in se statistično značilno ( $p < 0,05$ ) razlikuje od ostalih skupin (Preglednica 6). Tudi povprečni dnevni energijski vnos je bil najmanjši pri omenjeni skupini in je znašal 78,03 kcal/dan (Preglednica 7).



Preglednica 6: Statistično značilne razlike v zaužiti peletirani krmi med skupinami

Table 6: Statistically significant differences in consumed food between groups of animals

Skupine poskusnih živali glede na krmo	Kefir 3,5	Kefir 1,1	Mleko 1,1	Kontrola
Kefir 3,5	n.p.	p = 1,00	n.p.	p = 0,593
Kefir 1,1	n.p.	n.p.	n.p.	p = 0,541
Mleko 1,1	p < 0,05	p < 0,05	n.p.	p < 0,05
Kontrola	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.

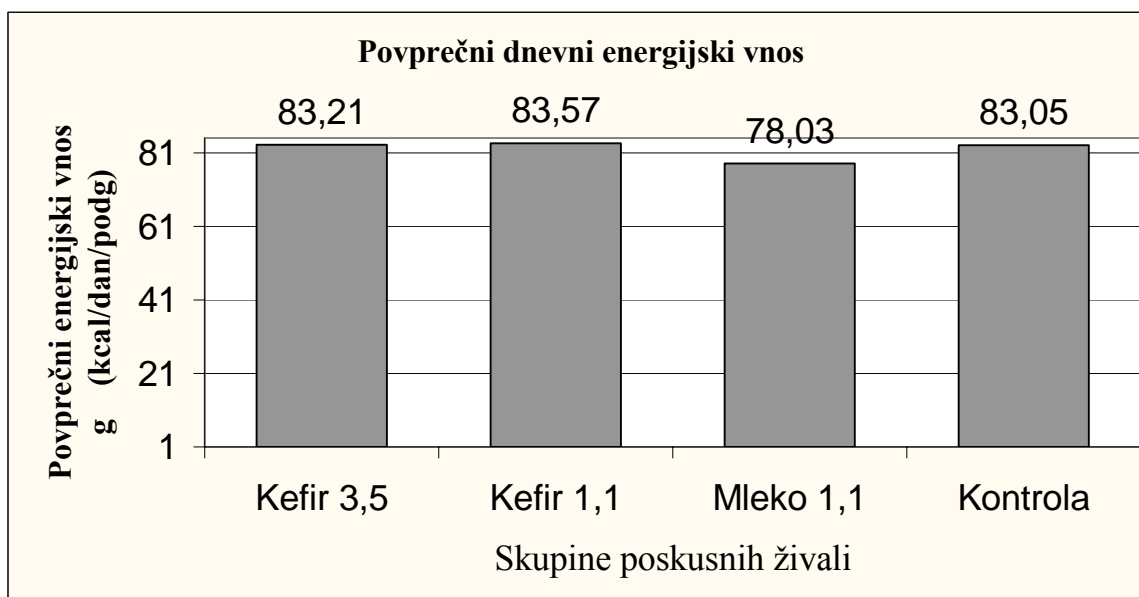
Pri skupinah podgan, ki sta kot dodatek dobivali kefir 1,1 in mleko 1,1 smo opazili enak količinski vnos kefirja 1,1 oziroma mleka 1,1 in sicer 41,18 ml/dan in podoben količinski vnos vode, ki je znašal pri skupini podgan, ki so dobivale kefir 1,1 13,98 ml/dan in mleko 1,1 13,54 ml/dan.

Preglednica 7: Povprečno zaužita količina krme in tekočine na podgano na dan

Table 7: Average consumption of food and liquid on rat per day

Skupine poskusnih živali	Tekoča krma (ml/dan)	Dnevni vnos peletirane krme (g/dan)	Dnevni energijski vnos (kcal/dan/podg)	Delež energije zaužite v obliki maščob	Dnevno zaužita voda (ml/dan/podg)
Kefir 3,5	43,23±5,15	19,91±1,30	83,21	<b>18,51</b>	<b>15,88±4,48</b>
Kefir 1,1	44,18±4,90	19,91±1,04	83,57	10,99	13,98±3,42
Mleko 1,1	44,18±4,47	18,22±1,00	<b>78,03<sup>a</sup></b>	11,20	13,54±3,11
Kontrola	44,18±3,98	19,75±0,94	<b>83,05</b>	7,48	12,43±3,39

Najmanjšo povprečno količino zaužite vodovodne vode smo opazili pri kontrolni skupini podgan in sicer 12,43 ml/dan in se statistično značilno ( $p = 0,001$ ) razlikuje od skupine podgan, ki je uživala kot dodatek kefir 3,5. Statistično značilno ( $p < 0,05$ ) pa se po količini zaužite vode / dan razlikujeta tudi skupini kefir 3,5 in mleko 1,1.



Slika 21: Povprečni dnevni energijski vnos (kcal/dan/podg)

Figure 21: Average daily energy intake (kcal/day/rat)

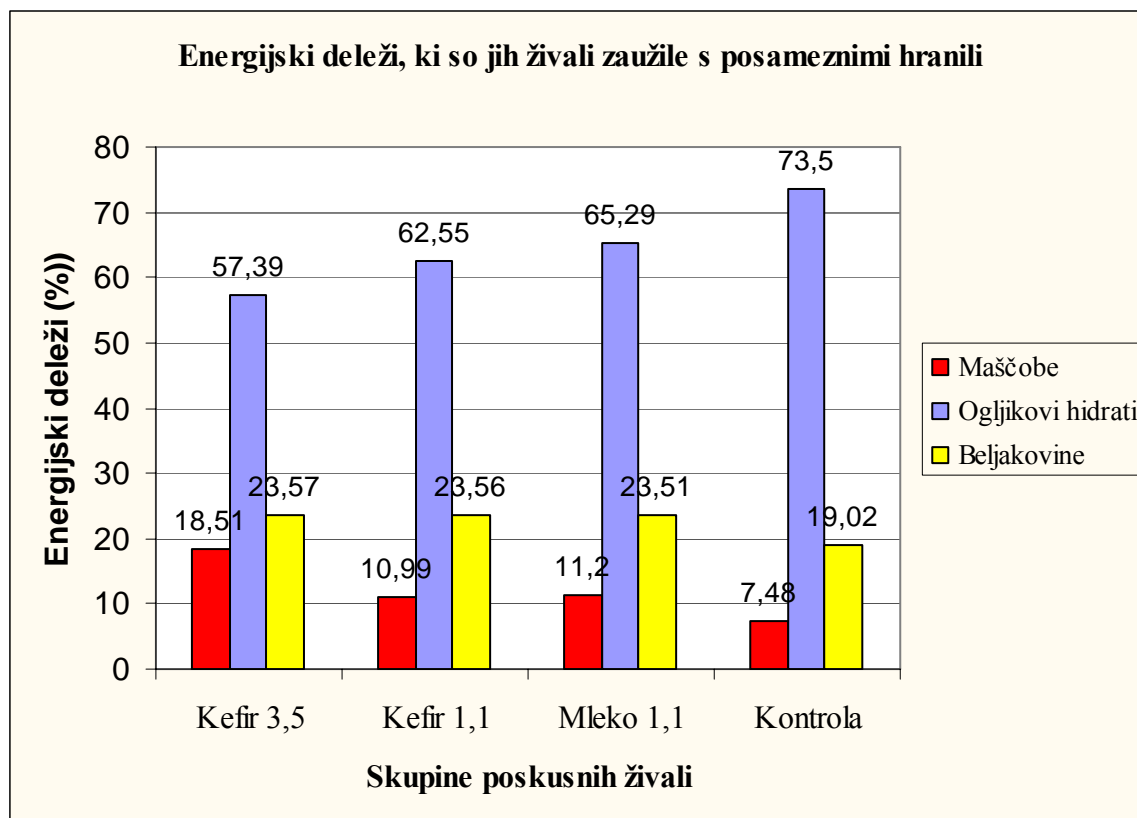
Preglednica 8: Razlike v dnevni količini zaužite vode med skupinami

Table 8: Differences in the daily intake of water between groups of animals

Skupine poskusnih živali	Kefir 3,5	Kefir 1,1	Mleko 1,1	Kontrola
<b>Kefir 3,5</b>	n.p.	p = 0,075	n.p.	<b>p = 0,001</b>
<b>Kefir 1,1</b>	n.p.	n.p.	n.p.	p = 0,088
<b>Mleko 1,1</b>	<b>p = 0,025</b>	p = 0,610	n.p.	p = 0,119
<b>Kontrola</b>	<b>n.p.</b>	n.p.	n.p.	n.p.

#### 4.1.2 Energijski deleži hranil v prehrani eksperimentalnih živali

Slika 22 nam prikazuje deleže energije zaužite z beljakovinami, maščobo in ogljikovimi hidrati v dnevni prehrani poskusnih živali. Statistično značilno višji energijski delež ( $p < 0,05$ ) so z maščobo zaužile podgane, krmljene s kefirjem s 3,5 % mlečne maščobe in sicer 18,51 %. Omenjena skupina je zaužila tudi največ vode 15,88 ml/dan.



Slika 22: Energijski deleži, ki so jih živali zaužile s posameznimi hranili

Figure 22: Energy shares that animals consumed with each component of food

Skupina podgan, ki je dobivala kot dodatek k dnevni prehrani kefir 1,1 se v energijskem deležu dnevno zaužitih maščob (11,20 %) ni bistveno ( $p > 0,05$ ) razlikovala od skupine podgan, ki je dobivala mleko 1,1 (10,99 %). Najmanjši energijski delež maščob (7,48 %) je zaužila kontrolna skupina. Deleži beljakovin v prehrani živali se bistveno ne razlikujejo ( $p > 0,05$ ), prav tako tudi ne energijski deleži ogljikovih hidratov. Najmanjši energijski delež ogljikovih hidratov (57,39 %) smo opazili pri skupini podgan, ki je uživala kefir 3,5, torej pri skupini, ki je imela največji vnos maščob (18,51 %). Največji energijski delež ogljikovih hidratov (73,50 %) ter najmanjši energijski delež beljakovin (19,02 %), je zaužila kontrolna skupina.

Preglednica 9: Razlike med skupinami v količini dnevno zaužitega maltodekstrina

Table 9: Differences on daily intake of maltodextrin between different groups of animals

Skupine poskusnih živali	Kefir 3,5	Kefir 1,1	Mleko 1,1	Kontrola
Kefir 3,5	n.p.	p = 0,474	n.p.	p = 0,435
Kefir 1,1	n.p.	n.p.	n.p.	p = 1,00
Mleko 1,1	p = 0,456	p = 1,00	n.p.	p = 1,00
Kontrola	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.

Preglednica 10: Razlike med skupinami v količini dnevno zaužite maščobe

Table 10: Differences on daily intake of fats between different groups of animals

Skupine poskusnih živali	Kefir 3,5	Kefir 1,1	Mleko 1,1	Kontrola
Kefir 3,5	n.p.	p = 0,049	n.p.	p = 0,001
Kefir 1,1	n.p.	n.p.	n.p.	p = 152
Mleko 1,1	p = 0,610	p = 0,939	n.p.	p = 0,128
Kontrola	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.

Ni statistično značilnih razlik med mlekom 1,1 in ostalimi tremi skupinami glede energijskega deleža zaužitih maščob ( $p > 0,05$ ).

### 4.1.3 Obdukcija in pregled tkiv

Rezultati naše raziskave prikazujejo statistično visoko povezavo med energijskim deležem zaužitih maščob in pojavnostjo vseh črevesnih sprememb: ACF, ADČ (adenomov) in adenokarcinomov;  $p < 0,001$ ; (Slika 23). Skupno število vseh sprememb na debelem črevesu je signifikantno višje ( $p < 0,05$ ) pri skupini podgan, ki so uživale kefir 3,5 (303), v primerjavi s skupino podgan, ki so uživale mleko 1,1 (185).

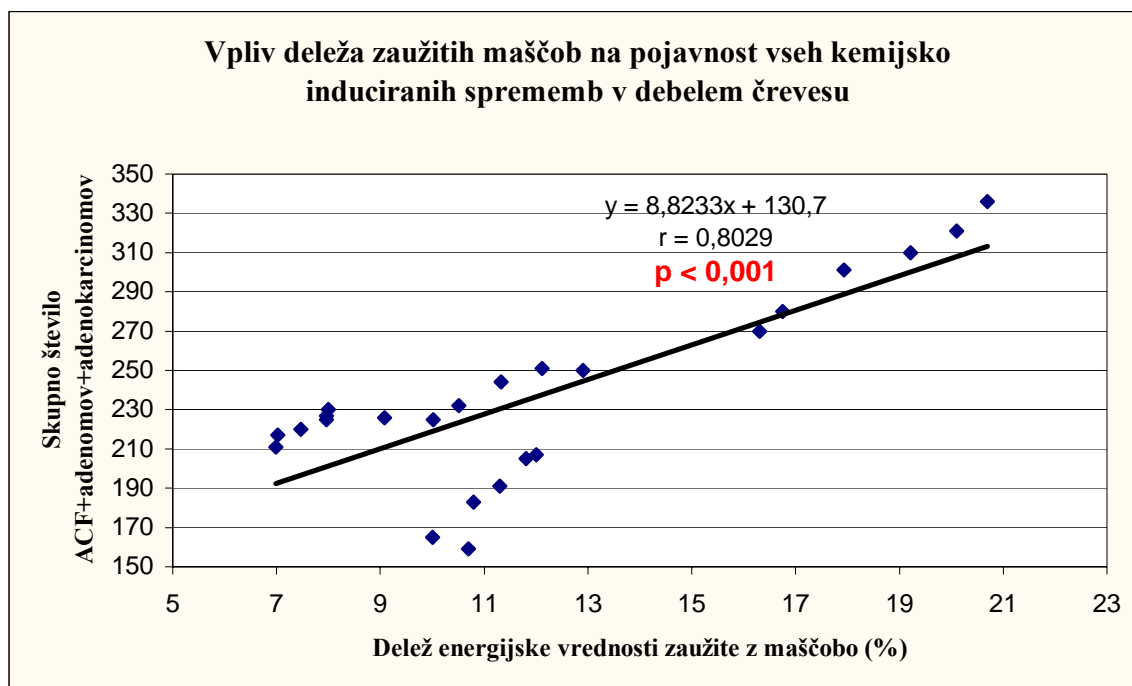
Preglednica 11 vsebuje zbirne podatke o pojavnosti posameznih vrst karcinomov oz. črevesnih sprememb po skupinah

Preglednica 11: Zbirni podatki o pojavnosti ACF, ADČ, adenokarcinomov in dnevnem energijskem vnosu ter deležu maščob v dnevni prehrani in skupnem številu črevesnih sprememb glede na skupine podgan

Table 11: Assembly of data on incidence of ACF, adenoma of large intestines, adenocarcinoma, daily input of energy, fat shares in daily feeding and total count of intestinal changes for all groups of animals

	Kefir 3,5	Kefir 1,1	Mleko 1,1	Kontrola
ACF	225	183	132	161
ADČ (adenomi)	34	14	21	18
Adenokarcinomi	44	41	32	41
Skupne črevesne spremembe	<b>303*</b>	238	<b>185*</b>	220
Dnevni energijski vnos	83,21	83,57	78,03	83,05
Energijski delež dnevno zaužitih maščob	18,51	10,99	11,20	7,48

\*  $p < 0,05$ , glede na kontrolo



Slika 23: Vpliv deleža zaužitih maščob na pojavnost vseh kemijsko induciranih sprememb v debelem črevesu (ACF, adenomov in adenokarcinomov)

Figure 23: Influence of fat share intake on incidence of all chemically induced changes in large bowel (ACF, adenoma and adenocarcinoma)

## 4.2 Mikrobiološka analiza blata

V poskus smo vključili 120 živali. Zaradi pogina dveh živali, smo imeli na koncu poskusa 118 živali. V nekaterih primerih, zaradi premajhne količine blata v črevesu žrtvovanih živali, vzorcev nismo mogli odvzeti. V posameznih vzorcih tudi pri najmanjši razredčitvi (10 x) nismo ugotovili prisotnosti bakterij. Takega vzorca v statistični analizi nismo upoštevali. V preglednici 12. so prikazani podatki o številu analiziranih vzorcev, katerih podatke smo vključili v statistično analizo in povprečno število izraslih kolonij na posameznih selektivnih hranljivih podlogah. Za kvasovke in klostridije ni bilo možno narediti primerne statistične obdelave, saj v večini vzorcev tudi pri najmanjši (10-kratni) razredčitvi ni izrasla nobena kolonija ( $KE/ml = <100 - 10^4$ ). Za ostale skupine smo naredili analizo variance (ANOVA) in ugotavljali statistično značilne razlike (Preglednica 12).

Preglednica 12: Osnovna preglednica števila vzorcev in povprečnih vrednosti log števila kolonij, zraslih na selektivnih gojiščih za enterobakterije (EMB), klostridije (SPS), enterokoke (KAA), MKB (MRS), kvasovke (YGL) in bifidobakterije (NPNL)

Table 12: Basic overview of the number of samples and average log values of colony counts on selective media for enterobacteria (EMB), clostridia (SPS), enterococci (KAA), LAB (MRS), yeast (YGL) and bifidobacteria (NPNL)

	EMB	SPS	KAA	MRS	YGL	NPNL
Št vzorcev	118,00	118,00	118,00	118,00	118,00	118,00
Št podatkov	94,00	43,00	105,00	106,00	14,00	84,00
% uporabnih podatkov	79,7%	36,4%	89,0%	89,8%	11,9%	71,2%
Povprečje log KE/ml	5,3437	3,6228	5,9592	8,2388	0,8431	6,2106
Standardni odklon	+0,9824	+0,7891	+1,0241	+0,5219	+0,1034	+0,8161

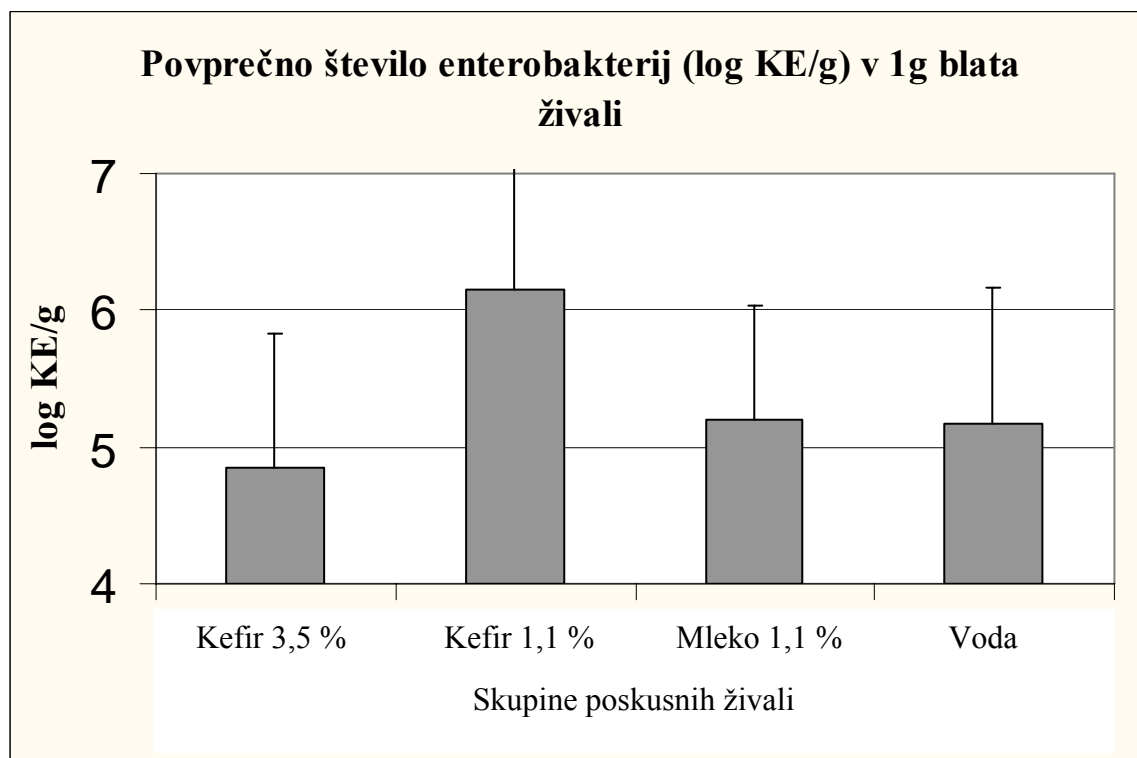
Preglednica 13: Povprečno število enterobakterij, enterokokov, MKB in bifidobakterij v 1 g blata živali različnih eksperimentalnih skupin (rezultati so prikazani kot log KE/g)

Table 13: Average count of enterobacteria, enterococci, LAB and bifidobacteria in 1 g of animal mud of different experimental groups of animals (results shown as log CU/g)

	enterobakterije	enterokoki	Mlečno-kislinske bakt.	bifidobakterije
I. kefir 3,5 % mašč.	4,8516 <sup>a</sup> ±0,9789	5,7628±1,0491	8,2488±0,3310	6,2994 <sup>a</sup> ±1,1212
II. kefir 1,1 % mašč.	6,1522 <sup>b</sup> ±1,1276	6,2193±0,8848	8,3415±0,5213	6,5258 <sup>a</sup> ±0,6338
III. mleko 1,1 % mašč.	5,1985 <sup>a</sup> ±0,8304	6,0136±1,0732	8,3711±0,4342	6,4111 <sup>a</sup> ±0,9687
IV. voda (kontrola)	5,1725 <sup>a</sup> ±0,9926	5,8410±1,0895	7,9936±0,8011	5,6062 <sup>b</sup> ±0,5406

a, b – povprečne vrednosti označene z različnimi črkami so se med seboj stat. razlikovale ( $p < 0,05$ )

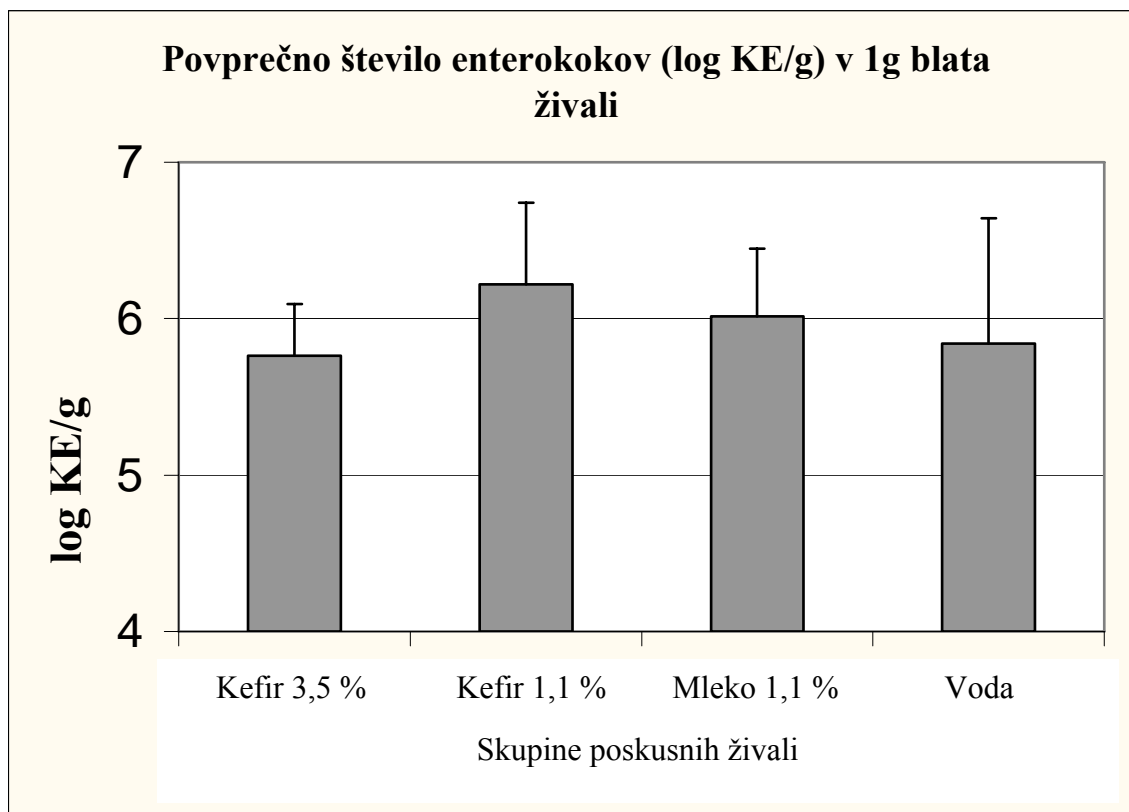
Število enterobakterij, ugotovljenih na gojišču EMB, je bilo zelo variabilno, saj so vzorci blata vsebovali od  $10^3$  do  $10^8$  KE/g (Slika 24). Najmanjšo povprečno vrednost smo tako kot pri enterokokih ugotovili pri I. skupini (kefir 3,5%;  $7,1 \times 10^4$  KE/g), največjo pa pri II. skupini (kefir 1,1%;  $1,4 \times 10^6$ ), ki je po številu enterobakterij v blatu statistično značilno ( $p < 0,05$ ) odstopala od ostalih treh skupin, med katerimi nismo ugotovili statistično značilnih razlik (Preglednica 13).



Slika 24: Povprečno število enterobakterij (log KE/g) v 1g blata živali različnih eksperimentalnih skupin (1=kefir 3,5; 2=kefir 1,1; 3=mleko 1,1; 4=voda)

Figure 24: Average count of enterobacteria (log CU/g) in 1 g of animal mud of different experimental groups of animals (1=kefir 3,5; 2= kefir 1,1; 3=milk; 4=water)

Velikosti populacije enterokokov so se gibale med  $10^4$  do  $10^8$  v 1 g blata. Najmanjše število enterokokov smo ugotovili v blatu I. skupine (kefir 3,5%:  $10^4$  do  $10^6$ ), vendar razlike med skupinami niso bile statistično značilne (Slika 25).

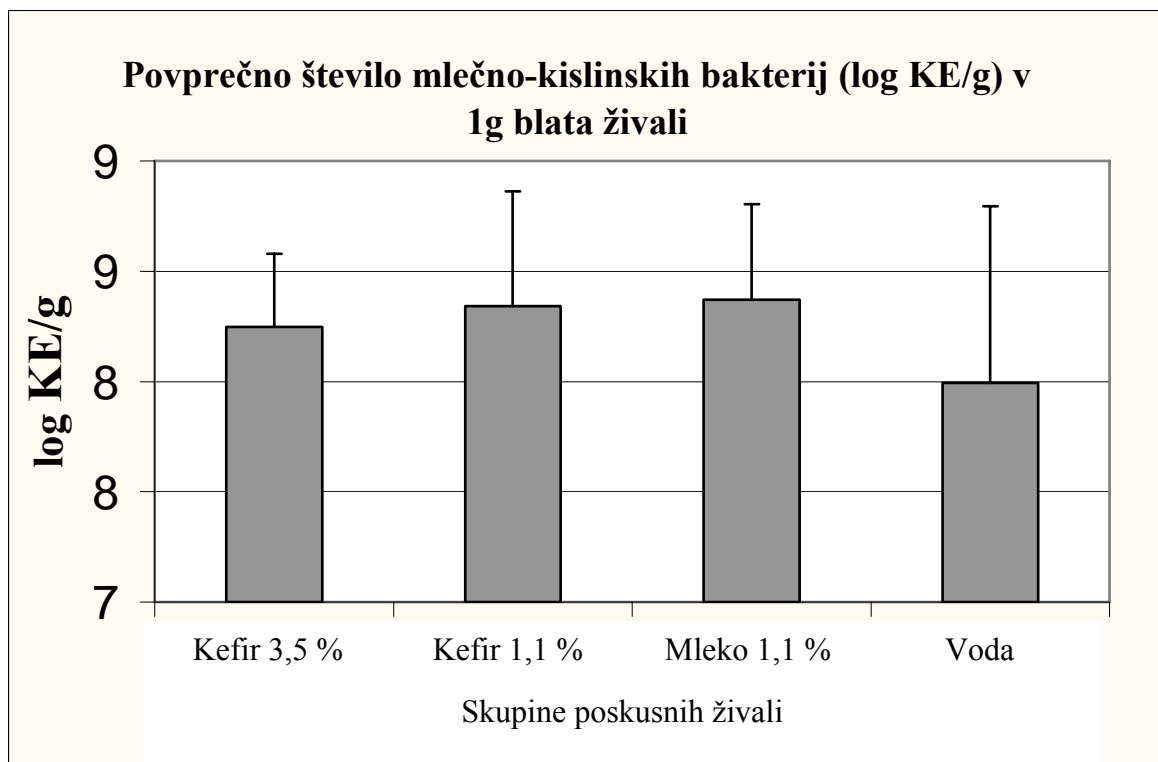


Slika 25: Povprečno število enterokokov (log KE/g) v 1g blata živali različnih eksperimentalnih skupin (1=kefir 3,5; 2=kefir 1,1; 3=mleko 1,1; 4=voda)

Figure 25: Average count of enterococci (log CU/g) in 1 g of animal mud of different experimental groups of animals (1=kefir 3,5; 2= kefir 1,1; 3=milk; 4=water)



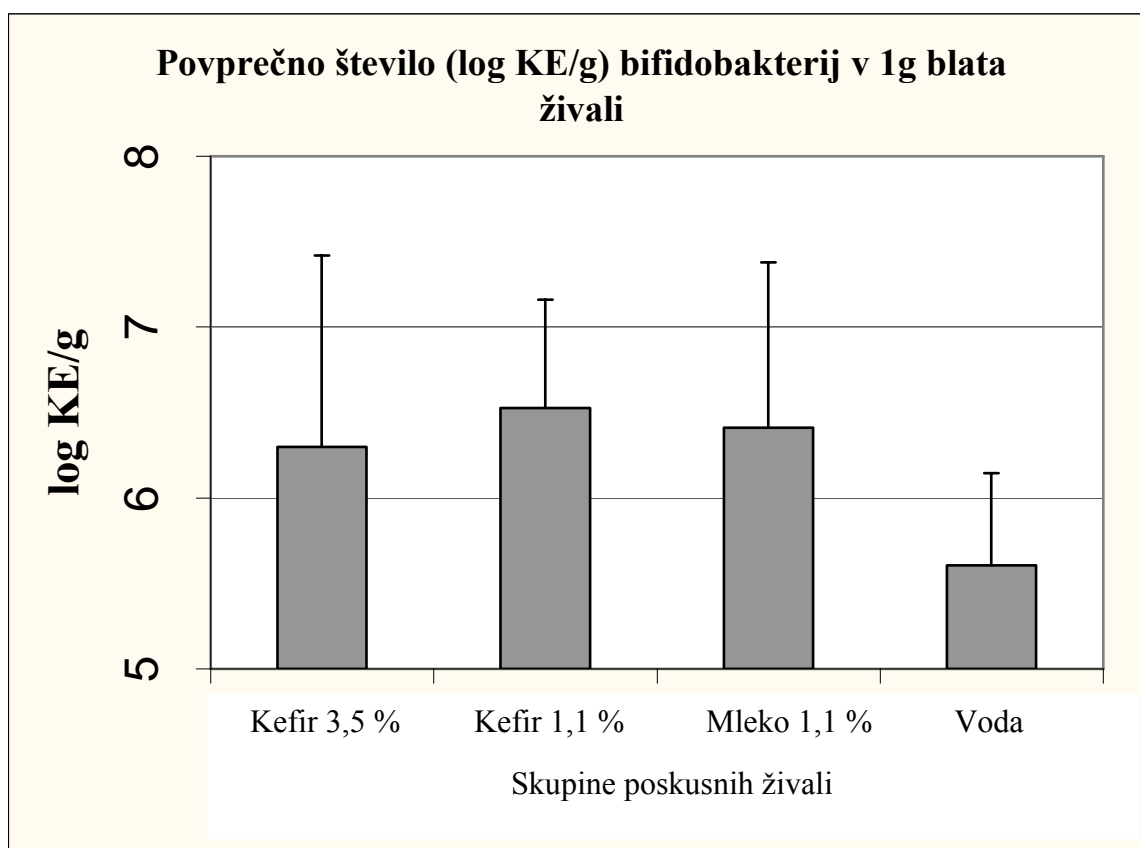
Blato živali je vsebovalo med  $10^5$  in  $10^9$  mlečnokislinskih bakterij v 1 gramu. Vzorci blata živali posameznih eksperimentalnih skupin se po povprečnem številu prisotnih mlečnokislinskih bakterij niso statistično značilno razlikovali (Slika 26).



Slika 26: Povprečno število mlečno-kislinskih bakterij (log KE/g) v 1g blata živali različnih eksperimentalnih skupin (1=kefir 3,5; 2=kefir 1,1; 3=mleko 1,1; 4=voda)

Figure 26: Average count of lactic acid bacteria (log CU/g) in 1 g of animal mud of different experimental groups of animals (1=kefir 3,5; 2= kefir 1,1; 3=milk; 4=water)

Število bifidobakterij se je v blatu živali skupin, ki so prejemale katerikoli mlečni dodatek gibalo med  $10^6$  in  $10^8$  KE/g vzorca blata, medtem ko je blato živali kontrolne skupine vsebovalo med  $10^5$  in  $10^6$  bifidobakterij/g, kar je bilo za približno 1 log nižje od ostalih skupin. Vse tri eksperimentalne skupine so se značilno ( $p < 0,05$ ) razlikovale od kontrolne skupine (Slika 27.).



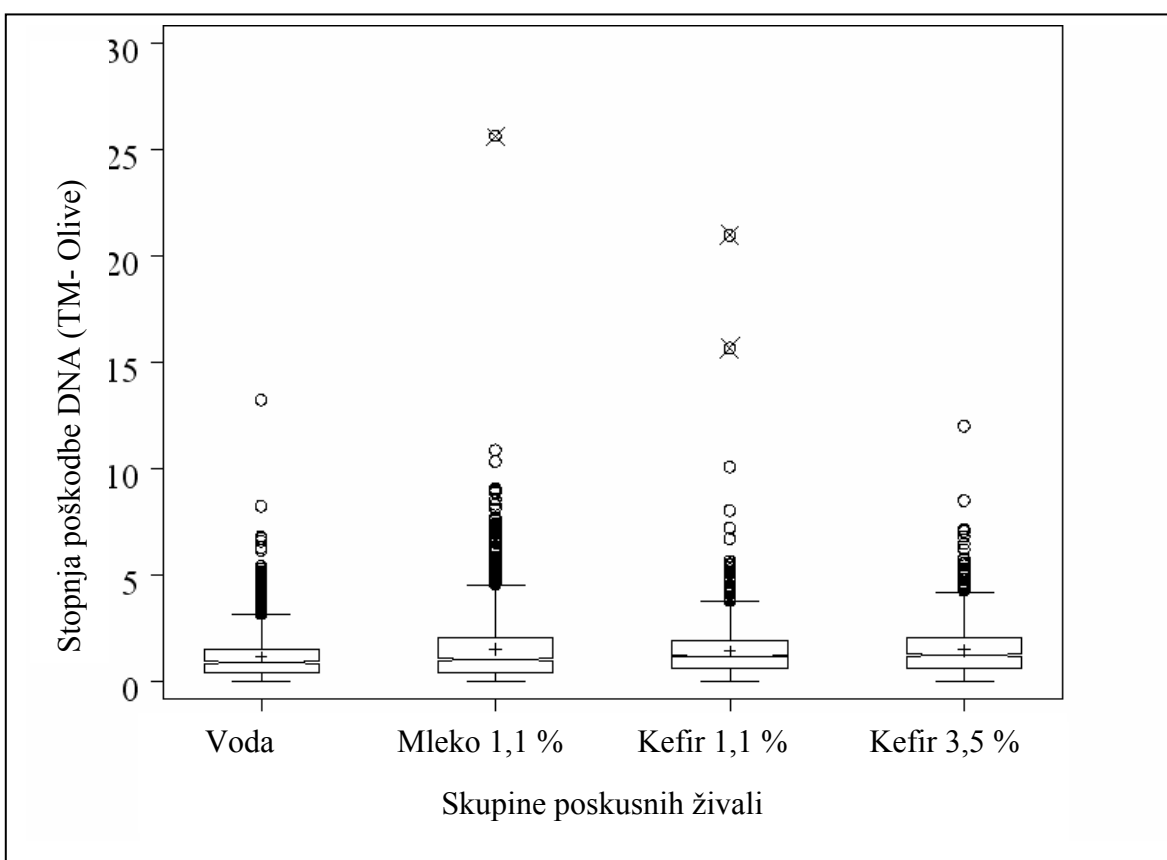
Slika 27: Povprečno število bifidobakterij (log KE/g) v 1g blata živali različnih eksperimentalnih skupin (1=kefir 3,5; 2=kefir 1,1; 3=mleko 1,1; 4=voda)

Figure 27: Average count of bifidobacteria (log CU/g) in 1 g of animal mud of different experimental groups of animals (1=kefir 3,5; 2= kefir 1,1; 3=milk; 4=water)

### 4.3 Rezultati kometnega testa

Pri testu, ki smo ga uporabili za ugotavljanje poškodbe jedrne DNK, je stopnja poškodbe DNK podana kot Repni moment po Olivu (OTM) (Bauer in sod., 1998). OTM vrednosti 100-tih kometov za vsako testno skupino so prikazane kot pravokotniki, ki vsebujejo 50% podatkov. Vrh in dno pravokotnikov označujeta 25-i in 75-i odstotek, notranja črta označuje mediano, medtem ko plus označuje povprečno vrednost. 25 % podatkov nad 75-im odstotkom in 25 % podatkov pod 25-im odstotkom je označenih z držaji, ki omejujejo največje in najmanjše vrednosti. Osamelci so označeni kot točke.

Iz slike 28. lahko razberemo, da so bile razlike v stopnji poškodovanosti DNK med skupinami živali zelo majhne, najmanjše poškodbe pa naj bi bile ugotovljene pri kontrolni skupini. To je potrdila statistična obdelava podatkov (Preglednici 14 in 15), ki je pokazala najmanjšo vrednost mediane pri kontrolni skupini, ki se je tudi statistično značilno ( $p < 0,001$ ) razlikovala od ostalih.



Slika 28: Stopnja poškodbe DNK (OTM vrednosti so ponazorjene s pravokotniki z držaji)

Figure 28: Level of DNA damage (OTM values are shown as rectangles with handles)

Preglednica 14: Opisna statistika za podganje vzorce polne krvi (stopnja poškodb DNK je podana kot Repni moment po Olivu, OTM)

Table 14: Descriptive statistics for rat total blood samples (level of DNA damage is shown as Olive Tail Moment, OTM)

	<b>Kefir 3.5% mm</b>	<b>Kefir 1.1% mm</b>	<b>Mleko 1.1% mm</b>	<b>Kontrola</b>
<b>Mediana</b>	<b>1.241<sup>bc</sup></b>	<b>1.171<sup>c</sup></b>	<b>1.041<sup>b</sup></b>	<b>0.871<sup>a</sup></b>
1.kvartil	0.611	0.611	0.401	0.401
3. kvartil	2.041	1.881	2.066	1.501
Minimum	0.001	0.001	0.001	0.001
Maksimum	12.001	20.961	25.641	13.231

a, b, c – povprečne vrednosti označene z različnimi črkami so se med seboj stat. razlikovale ( $p < 0,05$ )

Preglednica 15: Vrednosti p za OTM (Repni moment po Olivu) vzorcev podganje polne krvi

Table 15: p values for OTM (Olive Tail Moment) of rat total blood samples

<b>p-vrednost</b>	<b>Kefir 3.5% mm</b>	<b>Kefir 1.1% mm</b>	<b>Mleko 1.1% mm</b>	<b>Kontrola</b>
<b>Kefir 3.5% mm</b>	n.p.	<b>0.0995</b>	0.347	< 0.0001
<b>Kefir 1.1% mm</b>	n.p.	<b>n.p.</b>	0.0097	< 0.0001
<b>Mleko 1.1 % mm</b>	n.p.	<b>n.p.</b>	n.p.	< 0.0001
<b>Voda</b>	n.p.	<b>n.p.</b>	n.p.	n.p.

Preglednica 15 prikazuje, kako se posamezne stopnje poškodb razlikujejo. Nakazuje se trend ( $p = 0,0995$ ), da večja vsebnost maščobe povzroči večjo poškodovanost DNA (kefir 1,1% MM in kefir 3,5%MM).

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Izhajajoč iz postavljene hipoteze, ki pravi, da bo več tedensko prehranjevanje s kefirjem, mlekom in vodo vplivalo na različno sestavo črevesne mikrobne populacije eksperimentalnih živali, smo pričakovali, da bo prehranjevanje s kefirjem in mlekom povzročilo predvsem porast števila mlečnokislinskih bakterij in bifidobakterij. Glede na podatke iz literature smo predvidevali tudi, da bo kefir zaviral razvoj induciranih tumorjev. Predvidevali smo, da bo krmljenje *ad libitum* (Slika 13) eksperimentalnih živali (podgan) s kefirjem, z različno vsebnostjo maščob in z mlekom, različno vplivalo na pojavnost eksperimentalno induciranih črevesnih tumorjev. To naj bi ugotovili makroskopsko in mikroskopsko, kometni test pa naj bi prikazal različne stopnje poškodovanosti krvnih celic skladno z ostalimi rezultati.

Kolorektalni karcinom (KRK) je po incidenci in smrtnosti v Sloveniji na drugem mestu med rakavimi obolenji. Mnoge raziskave so pokazale pomemben vpliv prehrane na razvoj KRK. Zato ima uravnotežena prehrana pomembno vlogo pri zmanjševanju obolevnosti za to vrsto raka. Po drugi strani je nekaj eksperimentalnih podatkov o inhibitorni vlogi fermentiranih mlečnih proizvodov na razvoj KRK, medtem, ko so epidemiološki rezultati divergentni. Malo je tudi podatkov o vlogi različne vsebnosti maščob v fermentiranih mlečnih izdelkih na razvoj KRK. Mleko in mlečni izdelki so pomembna živila v prehrani prebivalcev Slovenije, zato so se na Inštitutu za higieno živil odločili raziskati njihov vpliv na razvoj KRK. Nas pa je vzporedno zanimala možna zaščitna vloga mleka in kefirja ter vpliv njihovega uživanja na velikost nekaterih mikrobnih populacij v črevesni mikroflori.

Raziskovalno delo je bilo opravljeno na Inštitutu za higieno živil, na Inštitutu za patologijo Medicinske fakultete v Ljubljani in na Inštitutu za mlekarstvo, Oddelek za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Uporabili smo 120 podganjih samcev seva Wistar, starih 10 tednov, vzrejenih v Medicinskem eksperimentalnem centru Medicinske fakultete v Ljubljani, kjer je poskus tudi potekal. Živali smo razdelili v štiri skupine po 30 podgan, glede na režim prehrane: tri skupine podgan so bile eksperimentalne in ena skupina je bila kontrolna (Slika 11). Za izvedbo poskusa smo dobili dovoljenje Etične komisije Veterinarske uprave RS (št. 323-02-139/2002). Med poskusom je bila temperatura v prostoru, v katerem so bile živali 20 – 23°C, relativna vlažnost 45 – 70 %, svetlobni režim je bil naraven (Slika 12).

## 5.1 Prirast telesne mase poskusnih živali in prehrabeni parametri

Iz literature je znano, da je skupni energijski vnos pomemben dejavnik pri kancerogenezi in, da omejitev energijskega vnosa zmanjša število spontanin in kemijsko povzročenih tumorjev. Podatke o tem, da omejen energijski vnos zmanjša nastanek in razvoj raka, navajajo številni avtorji (Garfinkel, 1985, Guthrie in Carroll, 1999; Kritchevsky, 1998, 2000 in 2002). Večina raziskav je bila opravljenih na živalskih modelih.

V našem poskusu smo zato poskušali izključiti vpliv energijskega vnosa na kancerogenezo z uravnavanjem energijskih vnosov (Preglednica 7, Slika 22) pri različnih dodatkih osnovni krmi (Preglednica 9). Čeprav v priraščanju telesne mase poskusnih živali nismo ugotovili statistično značilnih razlik med skupinami poskusnih živali (Preglednica 8, Slika 19, Slika 20), smo ugotovili, da je zaužila skupina podgan, ki smo ji dodajali mleko 1,1, najmanjši povprečni energijski vnos (Slika 21). Možno je, da so bolj agresivne živali pojedle več, zaradi česar je težko govoriti o nadzorovanem energijskem vnosu (Preglednica 11, Preglednica 12), kar je obenem tudi ugotovljena pomanjkljivost samega poskusa. Variabilnosti med živalmi tako nismo izključili. Morebitne nove raziskave bi morale biti zasnovane tudi z upoštevanjem teh dejstev. Iz zelo majhnih razlik med eksperimentalnimi skupinami tako po številu tumorjev kot tudi po rezultatih kometnega testa ne moremo izrazito sklepati niti o zaščitni vlogi kefirja niti o pomembnem vplivu energijskega vnosa ali vnosa maščob (Slika 23) v organizem na kancerogenezo.

Naši rezultati niso pokazali nobenih pomembnih razlik v kancerogenezi med eksperimentalnimi skupinami in kontrolno skupino. Ob koncu poskusa je bilo preživetje eksperimentalnih živali 98 odstotno, poginili sta samo dve živali iz različnih eksperimentalnih skupin, tako da nobena skupina v tem pogledu ni izstopala. Razlike pa so bile opazne v številu posameznih vrst karcinomov in v skupnem številu sprememb na črevesu. Odstopali sta skupini živali, ki sta uživali kot dodatek kefir s 3,5% MM z največ skupnih črevesnih sprememb in skupina, ki je uživala mleko z 1,1% MM z najmanj skupnih črevesnih sprememb (Preglednica 11).

V raziskavi, ki jo navajajo Shackelford in sod. (1983), je bila stopnja preživetja pri podganah, ki so bile krmljene s posnetim fermentiranim mlekom, signifikantno višja kot pri podganah, ki so bile hranjene s posnetim nefermentiranim mlekom in, pri katerih so inducirali črevesne tumorje z 1,2-dimetilhidrazinom. Število tumorjev na debelem črevesju se pri omenjenih dveh skupinah ni signifikantno razlikovalo, medtem, ko je bilo število tumorjev na tankem črevesju signifikantno višje pri skupinah podgan, ki so uživale fermentirano mleko.

Prospektivna raziskava, ki jo opisuje Parodi (1997) pa je pokazala, da uživanje mleka potencialno zmanjša tveganje za KRK. In vitro študije in eksperimentalne raziskave na živalih so delno potrdile, da vnos kalcija lahko zmanjša proliferacijo celic debelega črevesja in prepreči nastanek neoplazem debelega črevesja. Kalcij se veže z žolčnimi kislinami in prostimi maščobnimi kislinami in tako zmanjša njihovo toksično delovanje na lumen debelega črevesja (Gerland in sod., 1999, Hague in sod., 1995; Pence 1993; Pence in sod., 1996; Jarvinen in sod., 2001; Kearney in sod., 1996; Nelson in Tanure, 1987; Baron in sod., 1999; Boutron in sod., 1996). Mlečni sladkor (laktoza) je hrana, ki je potrebna za rast mlečno kislinskih bakterij, ki pa imajo antimitogene in antikancerogene lastnosti (Parodi 1996, 1997, 1998). Nekatere raziskave na živalih navajajo, da serumski proteini (laktoalbumini) lahko zmanjšajo tveganja za nastanek KRK (Sternhagen in Allen, 2001; Hakkak in sod., 2001; Papenberg in sod., 1990; Karagas in sod., 1998; Newmark in sod., 1984). Mleko vsebuje tudi druge potencialne antikancerogene komponente, kot so konjugirana linolna kislina (Krichevsky, 2000). In vitro študije so pokazale, da delujejo fosfolipidi in sfingomielini ter njihovi biološko aktivni metaboliti ceramidi in sfingozini, prisotni v mleku, antiproliferativno (Parodi, 1997; Berra, 2002). Butirat ima posebno funkcijo v stimulaciji fenotipske celične diferenciacije in inhibiciji proliferacije (Reddy 1999; Young in Gibson, 1994; Hass in sod., 1997).

Študije na celičnih kulturah, ki so jih opravili Biffi in sodelavci, so pokazale, da zavirata razvoj tumorjev tako fermentirano mleko z živimi mlečno-kislinskimi bakterijami kot fermentirano mleko z mrtvimi mlečno-kislinskimi bakterijami. Rezultati teh raziskav kažejo na to, da se med fermentacijo v medij sproščajo topne snovi, ki delujejo antikancerogeno ali pa aktivirajo antikancerogene komponente v mleku. Očitno je, da genezo tumorjev zavirajo tako bakterije, kot tudi samo mleko, ki posredno spodbuja razvoj probiotičnih intestinalnih bakterij, predvsem bifidobakterij (Biffi in sod., 1997).

Mattila-Sandholm in sodelavci (1999) navajajo, da so bakterijski metaboliti in sestavine celične stene laktobacilov dejavniki, ki vzpodbudijo specifični in nespecifični imunski sistem. Povišanje celičnega in humoralnega imunskega odgovora pa lahko, kot zгледа, povzroči tudi samo fermentirano mleko. Peptidi, ki nastanejo med fermentacijo, so lahko imunogeni in verjetno skupaj z laktobacili vplivajo na obe vrsti imunskega sistema (Perdigon in sod., 1990). Lastna flora je genetsko povezana z imunskim sistemom, pri vnosu eksogenih vrst pa lahko pride do interference z gostiteljevim imunskim sistemom. Kancerogeneza je tesno povezana s prizadetostjo imunskega

systema. Ugoden učinek probiotikov na imunski sistem naj bi bil povezan s preventivo KRK (Reddy, 1999).

Tudi Alejandra de Moreno de LeBlanc in Gabriela Perdigon v novejši raziskavi (2004) ugotavljata, da jogurt zavira rast in razvoj tumorjev in sicer s svojim vplivom na spremembe imunskega odziva in stimulacijo celične apoptoze rakavih celic.

Naši rezultati ne podpirajo teze o zaščitni vlogi kefirja oziroma fermentiranih mlečnih izdelkov pri razvoju kemijsko induciranih tumorjev.

## 5.2 Mikrobiološke analize

Mleko in mlečni izdelki lahko pomembno in raznoliko vplivajo na razvoj črevesne mikroflore. Podobno kot Brück s sodelavci (2002) ugotavljajo tudi drugi avtorji, da lahko določene sestavine mleka, kot sta na primer  $\alpha$ -lactoalbumin in glikomakropeptid, pomembno vplivajo na rast gostiteljevemu črevesu prijazne mikroflore. Mlečne sestavine vplivajo na spremembe v metabolnih procesih črevesne mikroflore, zaradi česar se spremenijo tudi razmerja med prisotnimi mikroorganizmi. Pride do porasta števila gostitelju prijazne mikroflore, zmanjša pa se število bakteroidov, klostridijev in tudi *Escherichia coli*. Vse te spremembe pa posledično vplivajo tudi na zmanjšano proizvodnjo nevarnih metabolitov in poškodbe črevesja oziroma na zmanjšanje pojava črevesnih sprememb (De Moreno de LeBlanc, A. in Perdigon, G., 2004).

Humblot s sodelavci ugotavlja (2004), da določena živila vsebujejo zaščitne faktorje. V njihovih raziskavah se je pokazalo, da fermentirano mleko pomembno zavira razvoj kemično induciranih tumorjev. Kemozaščitni učinek je povezan z indukcijo UDP glukoronozil transferaze in s spremembami na metabolizmu bakterij v črevesju (acidifikacija, povečanje deleža butirata, zmanjšanje aktivnosti  $\beta$ -glukoronidaze).

Iz naših rezultatov (Preglednica 13) lahko razberemo, da je v črevesju živali, ki so uživale kefir ali mleko zraslo statistično značilno več bifidobakterij kot pri kontrolni skupini živali (Slika 27). To kaže na stimulacijo rasti bifidobakterij v črevesju, kadar prehrana vsebuje mlečne izdelke. Statistično značilno pa je najmanj enterobakterij zraslo v skupini, ki je uživala kefir 3,5 (Slika 24). Drugih razlik glede prisotnosti posameznih skupin mikroorganizmov v blatu podgan različnih



eksperimentalnih skupin pa ni bilo opaziti (Slika 25, Slika 26). Poudariti pa velja izjemno veliko raznolikost v sestavi črevesne mikroflore med živalmi znotraj posamezne skupine.

Za kvasovke in klostridije ni bilo možno narediti primerne statistične obdelave, saj tudi pri najmanjši razredčitvi  $10^{-2}$  ni zrasla nobena kolonija. Zato je bila prikazana samo odstotkovna analiza rezultatov (Preglednica 12).

Posebnih povezav med mikrobiološkimi analizami, kometnim testom in analizo tkiv ni bilo. Verjetno je tudi, da je, zaradi kratkosti in obsežnosti črevesja podgan ter hitrosti prebave, na primer v primerjavi s človekom ali večjimi organizmi, vpliv mikroorganizmov v črevesju bistveno manjši, saj se morebitni procesi, ki bi jih želeli opaziti, niti ne utegnejo zgoditi. Verjetno je, da je kontaktni čas mikroorganizmov, encimov in ostalih ključnih komponent vseh procesov v črevesju podgan prekratek. Nepomembno morda ni niti dejstvo, da so bili tako voda pri kontrolni skupini, kot tudi mlečni izdelki med samim poskusom, ves čas izpostavljeni visokim temperaturam, ki so v prostoru dosegale tudi do  $35^{\circ}\text{C}$ . Ne vemo sicer, kako takšne temperature vplivajo na razvoj tumorjev, vemo pa, da se mlečni izdelki, tudi fermentirani, pri takšnih temperaturah hitro spreminjajo in kvarijo in takšni mlečni izdelki imajo lahko povsem drugačen vpliv tako na spremembe mikroflore v črevesju kot tudi na metabolne procese.

### 5.3 Kometni test

Ugotavljanje poškodb jedrne DNA krvnih celic (levkocitov) je pokazalo nizko stopnjo poškodb pri vseh skupinah, majhne pa so bile tudi razlike med skupinami. Sicer se nakazuje trend, da večja vsebnost maščobe povzroči večjo poškodbo DNA, saj sta mediani za skupino, ki je uživala kefir z 1,1% maščobe in skupino, ki je uživala kefir s 3,5% maščobe 1,17 in 1,24, vendar pa je bila višja maksimalna vrednost za OTM izmerjena pri skupini, ki je uživala kefir z 1,1% maščobe. Poleg tega je bila ugotovljena tudi statistično značilna razlika med skupino, ki je uživala mleko z 1,1% maščobe in tisto, ki je uživala kefir z 1,1 % maščobe, kar nakazuje možne zaščitne učinke kefirja. Skupina, ki je uživala mleko z 1,1% MM je imela nižjo vrednost mediane, vendar smo prav pri živalih iz te skupine izmerili najvišje vrednosti za OTM (Slika 28, Preglednica 15). Najbolj pa nas je presenetilo dejstvo, da so bile najmanjše poškodbe ugotovljene pri kontrolni skupini.

Iz rezultatov opravljene raziskave (Preglednica 15) ne moremo zaključiti, da ima kefir zaščitno vlogo pri preprečevanju nastajanja črevesnih sprememb pri podganah, saj smo najmanjše poškodbe jedrne DNA krvnih celic ugotovili pri kontrolni skupini podgan. Citološke preiskave so pokazale

neznačilno odstopanje v številu različnih oblik KRC med kontrolno skupino živali in eksperimentalnimi skupinami (Hlastan-Ribič in sod., 2005). Skupno število črevesnih sprememb je bilo najmanjše pri skupini, ki je uživala mleko z 1,1% MM, največje število črevesnih sprememb pa je bilo ugotovljeno pri skupini, ki je uživala mleko s 3,5% MM (Preglednica 11). Rezultati so presenetljivi in težko primerljivi s podatki iz literature, ki v večini primerov navajajo zaščitno vlogo fermentiranega mleka pri preprečevanju nastajanja črevesnih sprememb. Menimo, da so k neznačilnim rezultatom doprinesle tudi eksperimentalne težave, ki smo jih imeli zaradi nenadzorovanih vplivov okolja med samo izvedbo poskusa.

## 5.4 Zaključki

- Živali vseh eksperimentalnih skupin, ki so uživale mleko ali kefir, so imele v črevesni mikroflori statistično značilno višje število bifidobakterij od kontrolne skupine.
- Bifidogene učinke lahko pripišemo mleku, saj razlike v številu bifidobakterij, ki smo jih ugotovili v blatu eksperimentalnih živali skupin mleko 1,1% MM, kefir 1,1% MM in kefir 3,5% MM, niso bile statistično značilne.
- Mikrobiološke analize so pokazale tudi, da se skupine eksperimentalnih živali, ki so uživale kefir ali mleko, od kontrolne skupine statistično značilno razlikujejo po manjšem številu enterobakterij v blatu.
- Povezava med vsebnostjo zaužitih maščob in pojavnostjo črevesnih sprememb je bila pozitivna in statistično visoka ( $r=0,8$ ,  $p<0,001$ ).
- Stopnja poškodb DNA krvnih celic v vseh eksperimentalnih skupinah živali je bila majhna (merjeno s kometnim testom), razlike med skupinami so bile statistično neznačilne, najmanjše poškodbe pa so bile ugotovljene pri živalih kontrolne skupine.

## 6 POVZETEK (SUMMARY)

### 6.1 Povzetek

V naši raziskavi smo proučevali vpliv krmljenja z mlekom in kefirjem z različnimi stopnjami maščob (1,1% MM in 3,5% MM) na razvoj eksperimentalno induciranih tumorjev pri podganah seva vrste Wistar.

Tumorje smo v živalih inducirali s subkutano aplikacijo 1,2 dimetilhidrazina. Zadnji teden pred zaključkom poskusa smo živalim odvzeli vzorce krvi za kometni test. Ob zaključku poskusa, ki je trajal 26 tednov, smo živali stehtali in jih žrtvovali z inhalacijo CO<sub>2</sub>. Zatem smo izvedli obdukcijo in pregledali vse notranje organe. Ugotavljali smo pojavnost različnih vrst tumorjev. Tkiva smo tudi fiksirali in naredili histološke slike. Rezultate smo statistično obdelali. Za namen mikrobiološke analize črevesne mikroflore smo odvzeli vzorce blata. Na selektivnih gojiščih smo ugotavljali prisotnost in število enterobakterij, enterokokov, klostridijev, mlečno-kislinskih bakterij, bifidobakterij in kvasovk. Kometni test smo uporabili za ugotavljanje poškodb jedrne DNK levkocitov. Vse podatke smo statistično obdelali.

Citološke in histološke študije so pokazale, da je bilo skupno število sprememb na črevesju statistično značilno različno. Rezultati raziskave prikazujejo statistično visoko povezavo med skupnim številom sprememb na črevesju in vsebnostjo zaužitih maščob ( $p = 0,0338$ ). Najmanj sprememb je bilo pri skupini, ki je uživala mleko z 1,1% MM (185), največje število črevesnih sprememb pa je bilo opaziti pri skupini, ki je uživala kefir s 3,5% MM (303).

Večtedensko krmljenje s kefirjem je le deloma vplivalo na različno sestavo mikroflore. Po naših predvidevanjih naj bi bila sestava črevesne mikroflore eksperimentalnih živali, ki so uživale kefir in mleko ali vodo, med seboj bistveno različna. Mikrobiološke analize pa so pokazale, da se blato skupin eksperimentalnih živali, ki so uživale kefir ali mleko, od kontrolne skupine statistično značilno razlikujejo po manjšem številu enterobakterij in da je bilo v blatu živali istih skupin eksperimentalnih živali, statistično značilno povečano število bifidobakterij. Količina mlečno-kislinskih bakterij se med posameznimi skupinami ni statistično razlikovala, kakor smo pričakovali. Drugih pomembnih razlik nismo ugotovili.

Kometni test je pokazal zelo majhne in statistično neznačilne razlike med skupinami.

Na podlagi podatkov iz literature smo sklepali, da bo kefir deloval zaviralno na razvoj eksperimentalno induciranih črevesnih tumorjev. Iz naše raziskave tega nismo mogli zaključiti.

## 6.2 Summary

In our study we investigated the effect of feeding milk and kefir with different fat levels (1,1% milk fat and 3,5% milk fat) to rats of Wistar variety on the incidence of experimentally induced tumors. For the induction of intestinal tumors, we used 1,2 –dimethylhydrazine (DMH). The final week before the end of the experiment which lasted 26 weeks we collected blood samples from the animals for purpose aim of the comet assay. At the end of the experiment we weighed the animals and sacrificed them by CO<sub>2</sub> asphyxiation. We conducted an autopsy of all internal organs and assessed the appearance of different types of tumors. We fixed the tissues and took photos of them. We took rat faeces samples for the purpose of microbiological analysis of intestinal microflora. We analyzed the presence and number of enterobacteria, enterococci, clostridia, lactic acid bacteria, bifidobacteria and yeasts in the selective culture media. Comet assay was used for the assessment of DNA damage. All data were statistically analyzed.

Cytological and histological studies show a statistically significant correlation between the incidence of adenocarcinomas ( $p = 0,0338$ ) and of all forms of CET ( $p < 0,001$ ) and the fat intake. The lowest number of changes was found in the group that was fed milk with 1,1 % MF (185) and the highest number of changes on intestines was detected in the group that was fed with kefir with 3,5 % MF (303).

Additional weeks of feeding kefir did not significantly influence the gut microflora as we had presumed. Microbiological assays show that the faeces samples of groups of experimental animals that were fed kefir or milk contain statistically different lower numbers of enterobacteria and a higher number of bifidobacteria from the control group. The quantity of lactic acid bacteria in faeces was not statistically different between various groups. We didn't detect any other significant differences.

Comet assays show very small and statistically insignificant differences between the groups.

Based on the data found in scientific literature we assumed that kefir would reduce the incidence of experimentally induced tumors. We could not confirm that with our research.

## 7 VIRI

Albertini R. J., Becking G. 1996. Noncancer endpoint associated with butadiene exposure: biomarkers, genotoxicity and reproductive toxicity. *Toxicology*, 113: 56-58.

Ames B. N., Gold L. S. in Willett W. C. 1995. The causes and prevention of cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92: 5258-5265.

Anfiteatro D. N. 1999. Dom's Kefir in-site. Adelaide, Australia, personal page (2. nov. 2002) <http://users.chariot.net.au/~dna/kefirpage.html> (7. dec. 2002): 30 str.

Angulo L., Lopez E., Lema C. 1993. Microflora present in kefir grains of the Galician region (North-West of Spain). *Journal of Dairy Research*, 60: 263-267.

Arihara K., Tobo T., Adachi S. 1990. Immunofluorescence microscopic studies on distribution of *L. kefiranofaciens* and *L. kefir* in kefir grains. *International Journal of Food Microbiology*, 11: 127-134.

Babina N. A., Rozhkova I. V. 1974. Control of the microflora of kefir starters. *Vses. Nauchno-issled. Inst. Molochnoi Promyshlennosti, Molochnaya-Promyshlennost*, 4: 18-19.

Barnett J. A., Payne R. W., Yarrow D. 2000. *Yeasts. Characteristics and identification*. 3<sup>rd</sup> ed. Cambridge, Cambridge University Press: 1139 str.

Baron J. A., Beach M., Mandel J. S., van Stolk R. U., Sandler R. S., Rothstein R., Summers R. W., Snover D. C., Beck G. J., Greenberg E. R. 1999. Calcium supplements for the prevention of colorectal adenomas. *New English Journal of Medicine*, 340: 101-107.

Barone M., Berloco P., Ladisa R., Ierardi E., Caruso M. L., Valentini A. M., Notarnicola M. 2002. Demonstration of a direct stimulatory effect of bile salts on rat colonic epithelial cell proliferation. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 37, 1: 88-94.

Barone M., Francavilla A., Polimeno L., Ierardi E., Romanelli D., Berloco P. 1996. Modulation of rat hepatocyte proliferation by bile salts: in vitro and in vivo studies. *Hepatology*, 23: 1159-1166.

Bauer E., Recknagel R. D., Friedler U., Wollweber L., Bock C., Grenlich K. O. 1998. The distribution of the tail moments in single cell gel electrophoresis (comet assay) obeys a chi-square ( $\chi^2$ ) not Gaussian distribution. *Mutation Research*, 398: 101-111.

Bergey's manual of determinative bacteriology. 1994. 9<sup>th</sup> ed. Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T., Williams, S. T. (eds.). Baltimore. Williams and Wilkins: 787 str.

Berra B., Colombo I., Sottocornola E., Giacosa A. 2002. Dietary sphingolipids in colorectal cancer prevention. *European Journal of Cancer Prevention*, 11: 193-197.

Biffi A., Coradini C., Larsen R., Riva L. in Di Fronzo G. 1997. Antiproliferative effect of fermented milk on the growth of a human breast cancer cell line. *Nutrition and Cancer*, 28: 93-99.

Boštar, M. 2002. Proizvodnja kefirja v Sloveniji. Interno gradivo. Logatec, Mlekarna Krepko: 20 str.

Boutron M. C., Faivre J., Marteau P., Couillaud C., Senesse P., Quipourt V. 1996. Calcium, phosphorus, vitamin D, dairy products and colorectal carcinogenesis: a French case-control study. *British Journal of Cancer*, 74: 145-151.

Boyd N. F., Lockwood G. A., Greenberg C. V., Martin L. J., Trichler D. L. 1997. Effects of a low-fat high-carbohydrate diet on plasma sex hormones in premenopausal women: results from a randomized controlled trial. *British Journal of Cancer*, 78: 127-135.

Buddington R. K., Williams C. H., Chen S-C., Witherly S. A. 1996. Dietary supplement of neosugar alters the fecal flora and decreases activities of some reductive enzymes in human subjects. *American Journal of Clinical Nutrition*, 63: 709-716.

Chandan R. C., Shahani K. M. 1995. Other fermented dairy products. V: *Biotechnology: a multi-volume comprehensive treatise*. 2<sup>nd</sup> ed. Vol. 9. Enzymes, biomass, food and feed. Reed G., Nagodawithana T. W. (eds.). Weinheim, VCH Publishers Inc.: 386-418.

Cerar A., 2000. Mouse and rat experimental models of esophageal and gastrointestinal tumors. V: *Pokusni modeli u biomedicini*. Radačić M, Bašić I, Eljuga D (eds.). Zagreb, Medicinska naklada, 71-74.

Collins A. R., Dušinska M., Franklin M., Somorovska M., Petrovska H., Duthie S., Fillion L., Panayiotidis M., Rašlova K., Vaughan N. 1997. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation and applications. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 30: 139-146.

Collins A. R., Ma A. G., Duthie S. J. 1995. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. *Mutation Research*, 336: 69-77.

Crittenden R. G. 1999. *Prebiotics V: Probiotics: A critical review*, Tannock G. W. (ed.). Wymondham, Horizon Scientific Press: 141-157.

Davis A. E., Patterson F., Crouch R. 1992. The effects of therapeutic drugs used in inflammatory bowel disease on the incidence and growth of colonic cancer in the dimethylhydrazine rat model. *British Journal of Cancer*, 66: 777-80.

De Kok T. M. C. M., Van Iersel M. L. P. S., den Hoor F. in Kleinjans J. C. S. 1993. In vitro study on the effects of fecal composition on fecapentaene kinetics in the large bowel. *Mutation Research*, 302: 103-108.

De Moreno de LeBlanc A., Perdigon G. 2004. Yogurt feeding inhibits promotion and progression of experimental colorectal cancer. *Medical Science Monitor*, 10, 4: 96-104.

De Vrese M. 1994. Ernährung physiologische und gesundheitliche Bedeutung von lebenden Keimen in fermentierten Milchprodukten. *Deutsche Milchwirtschaft*, 45, 19: 884-889.

Deasy J. M., Steele G., Ross D. S., Lahey S. J., Wilson R. E., Madara J. 1983. Gut-associated lymphoid tissue and dimethylhydrazine-induced colorectal carcinoma in the Wistar/Furth rat. *Journal of Surgical Oncology*, 24: 36-40.

Dietary guidelines for Americans: Nutrition and your health. 4<sup>th</sup> ed. USDA. 1995. Washington, U.S. Department of Agriculture, <http://www.nal.usda.gov/fnic/dga/dguide95.html> (24.01.2006): 1-40.

Dillehay D. L., Webb S. K., Schmelz E. M., Merrill A. H. Jr. 1994. Dietary sphingomyelin inhibits 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer in CF1 mice. *Journal of Nutrition*, 124: 615-620.

Diniz R. O., Garla L. K., Schneedorf J. M., Carvalho J. C. 2003. Study of anti-inflammatory activity of Tibetan mushroom, a symbiotic culture of bacteria and fungi encapsulated into a polysaccharide matrix. *Pharmacological Research*, 47, 1: 49-52.

Dmitrichenko M. I. 1974. Microstructure and composition of kefir grains. V: Conference Proceedings. Kemerovo (USSR), Kemerovskii Tekh. Inst. Pishchevoi Promyshlennosti: 43-46.

Druckrey H., Preussmann R., Matzkies F., Ivankovic S. 1967. Selective production of intestinal cancer in rats by 1,2-dimethylhydrazine. *Naturwissenschaften*, 54, 11:285-286.

Dukes C. 1932. The classification of cancer of the rectum. *Journal of Pathology and Bacteriology*, 35: 313-32.

Euzéby J. P. 1997. List of bacterial names with standing in somenclature - Genus *Lactobacillus*. Toulouse, Société de Bactériologie Systématique et Vétérinaire (2002) <http://www.bacterio.cict.fr/l/lactobacillus.html> (28.1.2003): 44 str.

Esterbauer H. 1996. Estimation of peroxidative damage. *Pathologie et Biologie*, 44: 25-28.



Fairbairn D. W., Olive P. L., O'Neill K. L. 1995. The comet assay: A comprehensive review. *Mutation Research*, 273: 1605-1609.

Falk P. G., Hooper L. V., Midtvedt T. Gordon J. I. 1998. Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62: 1157-1170.

Feigelson H. S., Henderson B. 1996. Estrogens and breast cancer. *Carcinogenesis*, 17: 2279-2284.

Fiala E. S. 1981. Inhibition of carcinogen metabolism and action by disulfuram, pyrazole and related compounds. V: Zedeck M. S., Lipkin M. (eds.) *Inhibition of tumor induction and development*. New York, Plenum Publishing Corporation: 23-29.

Scherz H., Sencer F. 2000. S. W. Souci, W. Fachman, H. Kraut *Food composition and nutrition tables*. 6<sup>th</sup> rev. and completed ed. Stuttgart, CRC Press: 1182 str.

Gallagher D. D., Stallings W. H., Blessing L. L., Busta F. F., Brady L. J. 1996. Probiotics, cecal Microflora, and aberrant crypts in the rat colon. *Journal of Nutrition*, 126: 1362-1371.

Garbutt J. 1997. *Essentials of food microbiology*. London, Arnold: 251 str.

Garfinkel L. 1985. Overweight and cancer. *Annals of Internal Medicine*, 103: 1034-1036.

Gerland C. F., Garland F. C., Gorham E. D. 1999. Calcium and vitamin D. Their potential roles in colon and breast cancer prevention: *Annals of the New York Academy of Sciences*, 889: 107-119.

Gibson G. R., Roberfroid M. B. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of probiotics. *Journal of Nutrition*, 125: 1401-1412.

Gill H. S. 1998. Stimulation of the immune system by lactic cultures. *International Dairy Journal*, 8, 5/6: 535-544.

Goldin B. R., Gualtieri L. J., Moore R. P. 1996. The effect of *Lactobacillus* GG on the initiation and promotion of DMH-induced intestinal tumors in the rat. *Nutrition and Cancer*, 25: 197-204.

Goldin B. R., Gorbach S. L. 1992. Probiotics for humans. V: Probiotics: The scientific basis. Fuller R.(ed.). London, Chapman and Hall: 355-376.

Goldin B. R. in Gorbach S. L. 1984. Alterations to the intestinal microflora by diet, oral antibiotics, and *Lactobacillus*: decreased production of free amines from aromatic nitro compounds, azo dyes and glucuronides. *Journal of the National Cancer Institute*, 73: 689-695.

Goldin B. R. 1986. The metabolism of intestinal microflora and its relationships to dietary fat, colon and breast cancer. *Progress in Clinical and Biological Research*, 222: 655-685.

Goldin B. R., Gorbach S. L. 1981. Effect of antibiotics on incidence of rat intestinal tumours induced by 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride. *Journal of the National Cancer Institute*, 73: 689-695.

Goldin B. R., Gorbach S. L. 1980. Effect of *Lactobacillus acidophilus* dietary supplements on 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride-induced intestinal cancer in rats. *Journal of the National Cancer Institute*, 64: 263-265.

Gorski D. 1994. Kefir: 21<sup>st</sup> century yoghurt. *Dairy Foods*, 95, 2: 49-49

Guthrie N., Carroll K. K. 1999. Specific versus non-specific effects of dietary fat on carcinogenesis. *Progress in Lipid Research*, 38: 261-271.

Hague A., Elder D. J. E., Hicks D. J., Preskeva C. 1995. Apoptosis in colorectal tumour cells: induction by the short chain fatty acids butyrate, propionate and acetate and by bile salt deoxycholate. *International Journal of Cancer*, 60: 400-406.

Hakkak R., Korourian S., Ronis M. J., Johnston J. M., Badger T. M. 2001. Dietary whey protein protects against azoxymethane-induced colon tumors in male rats. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 10: 555-558.

Hass R., Busche R., Luciano L., Reale E., Engelhardt W. 1997. Lack of butyrate is associated with induction of bax and subsequent apoptosis in the proximal colon of guinea pig. *Gastroenterology*, 112: 875-881.

Hill M. J., Crowther J. S., Drasar B. S., Hawksworth G., Aries V., Williams R. E. O. 1971. Bacteria and etiology of cancer of large bowel. *Lancet*, 1, 7690: 95-100.

Hill M. J., Drasar B. S., Williams R. E. O., Meade T. W., Cox A. G., Simson J. E. P., Morson B. E. 1975. Faecal bile-acids and clostridia in patients with cancer of the large bowel. *Lancet*, 1, 7906: 535-539.

Hill M. J. 1995. Bacterial fermentation of complex carbohydrate in the human colon. *European Journal of Cancer Prevention*, 4: 353-358.

Hlastan Ribič C., Cerar A., Pokorn D., Perše M., Zebic A. 2004. Effects of kefir containing various levels of fat on chemically induces colorectal epithelial tumors in Wistar rats. *Nutrition Research*, 25, 1: 55-63.

Hlastan Ribič C. 2005. Učinek fermentiranega mleka v hrani poskusnih živali na pojavnost eksperimentalnih črevesnih tumorjev. Doktorska disertacija. Ljubljana, Medicinska fakulteta, 93 str.

Humblot, C., E. Lhoste, S. Knasmuller, K. Gloux, A. Bruneau, M. Bensaada, J. Durao, S. Rabot, C. Andrieux, in F. Kassie. 2004. Protective effects of Brussels sprouts, oligosaccharides and fermented milk towards 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ)-induced genotoxicity in the human flora associated F344 rat: role of xenobiotic metabolising enzymes and intestinal microflora. *Journal of Chromatography, B* 802:231-237.

Jarvinen R., Knekt P., Hakulinen T., Aromaa A. 2001. Prospective study on milk products, calcium and cancers of the colon and rectum. *European Journal of Clinical Nutrition*, 55: 1000-1007.

Javitt N. B., Budai K., Miller D. G., Cahan C., Raju U., Levitz M. 1994. Breast-gut connection: origin of chenodeoxycholic acid in breast cyst fluid. *Lancet*, 343: 633-635.

Johansson G., Holmen A., Persson L., Hogstedt B., Wassen C., Ottova, Gustaffson J-A. 1997. Dietary influence on some proposed risk factors for colon cancer: Fecal and urinary mutagenic activity and the activity of some intestinal bacterial enzymes. *Cancer Detection and Prevention*, 21: 258-266.

Johnstone A., Thorpe R. 1990. *Immunochemistry in practice*. 2<sup>nd</sup> ed. Oxford, Blackwell Scientific Publications: 306 str.

Juteršek B. 1999. Določanje populacije kvasovk v različnih stopnjah proizvodnje kefirja. Diplomaska naloga. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 68 str.

Kandler O., Kunath P. 1983. *Lactobacillus kefir* sp. nov., a component of the microflora of kefir. *Systematic and Applied Microbiology*, 4, 2: 286-294.

Karagas M. R., Tosteson T. D., Greenberg E. R., Rothstein R. I., Roebuck B. D., Herrin M., Ahnen D. 1998. Effect of milk and milk products on rectal mucosal cell proliferation in humans. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 7: 757-766.

Kearney J., Giovannucci E., Rimm E. B., Asherio A., Stampfer M. J., Colditz Ga, Wing A., Kampman E., Willett W. C. 1996. Calcium, vitamin D, and dietary foods and the occurrence of colon cancer in men. *International Journal of Cancer*, 59: 907-917.

Kefir, yoghurt for life. 2002. Verzija 2. Gold Coast MC, Queensland, Australia, Kefir Yoghurt for Life (1. jan. 2002) <http://www.kefir.biz/terms.htm> (7. dec. 2002): 4 str.

Kirkwood T. B. L. 1989. DNA mutation and aging. *Mutation Research*, 219: 1-7.

Kočar N. 1999. Karakterizacija kvasne populacije v kefirnih zrnih. Diplomski naloga. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 65 str.

Kooiman P. 1968. The chemical structure of kefiran, the water soluble polysaccharide of the kefir grain. *Carbohydrate Research*, 7, 2: 200-211.

Koppen G., Verschaeve L. 1996. The comet test on plant cells: a new genotoxicity test for DNA strand breaks in *Vicia faba* root cells. *Mutation Research*, 360: 193-198.

Krichevsky D. 1986. Fat, calories and cancer. V: *Dietary fat and cancer*. Ip C., Birt D. F., Rogers A. E., Mettlin C. (eds.). New York: Alan R., Liss: 495-515.

Kritchevsky D. 1998. Cancer: influence of fat and calories. V: *Nutrition Congress. Diet in disease*. I. Carroll K. K. (ed.). Ontario, University of Western Ontario, Centre for Human Nutrition: 258-269.

Kritchevsky D. 2000. Anmutagenic and some other effects of conjugated linoleic acid. *British Journal of Nutrition*, 83:459-65.

Kritchevsky D. 2002. Caloric restriction and experimental carcinogenesis. *Hybridoma, Hybridomics*, 2: 147-151.

Kubo M., Odani T., Nakamura S., Tokumaru S., Matsuda H. 1992. Pharmacological study on kefir- a fermented milk product in Caucasus. I. On antitumor activity. *Yakugaku Zasshi – Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 112: 489-495.

Kurmann J. A., Rašič J. L., Kroger M. 1992. *Encyclopedia of fermented fresh milk products. An international inventory of fermented milk, cream, buttermilk, whey, and related products*. New York, Van Nostrand Reinhold: 368 str.

Kwak H. S., Park S. K., Kim D. S. 1996. Biostabilization of kefir with a nonlactose – fermenting yeast. *Journal of Dairy Science*, 79: 937–942.

LaMont J. T., O'Gorman T. A. 1978. Experimental colon cancer. *Gastroenterology* 75: 1157-1169.

Laqueur G. I. 1970. Contribution of intestinal microflora and microflora to carcinogenesis. V: *Carcinoma of the colon and antecedant epithelium*. W. J. Burdette, Charles, C. Thomas (eds.). Illinois, Springfield Publishers: 305-313.

Lasko C., Good C. K., Adam J., Bird R. P. 1999. Energy restriction modulates the development of advanced preneoplastic lesions depending on the level of fat in the diet. *Nutrition and Cancer*, 33: 69-75.

Lavik P. S., Baumann C. A. 1943. Further studies on tumor-promoting action of fat. *Cancer Research*, 3: 749-756.

Lee Y. K., Salminen S. 1995. The coming of age of probiotics. *Trends in Food Science & Technology*, 6: 241-245.

Leroi F., Pidoux M. 1993. Detection of interactions between yeasts and lactic acid bacteria isolated from sugary kefir grains. *Journal of Applied Bacteriology*, 74: 48-53.

Libudzisz Z., Piatkiewicz A. 1990. Kefir production in Poland. *Dairy Industries International*, 55, 7: 31-33.

Liu Y., Schmeltz I., Hoffman D. 1974. Chemical studies on tobacco smoke. Quantitative analysis of hydrazine in tobacco and cigarette smoke. *Analytical Chemistry*, 46: 885-885.

Madigan M. T., Martinko J. M., Parker J. 2000. *Brock biology of microorganisms*. 9<sup>th</sup> ed. New Jersey, Prentice-Hall, Inc.: 991 str.

Marinšek Logar R. 2000. Kometni preskus v modelni prehranski raziskavi. Zbornik Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, 76,1: 105-111.

Marshall V. M. E. 1984. Flavour development in fermented milks. V: Advances in the microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk. Davies F. L., Law B. A. (eds.). London, Elsevier Applied Science Publishers Ltd.: 153-177.

Marshall V. M. 1993a. Starter cultures for milk fermentation and their characteristics. Journal of the Society of Dairy Technology, 46, 2: 49–56.

Marshall V. M. 1993b. Fermented milks. V: Encyclopedia of food science, food technology and nutrition. Volume 3. Macrae R., Robinson R. K., Sadler M. J. (eds.). London, Academic Press: 1804-1808.

Matar C., Nadathur S. S., Bakalinsky A. T. in Goulet J. 1997. Antimutagenic effects of milk fermented by *Lactobacillus helveticus* L89 and protease-deficient derivative. Journal of Dairy Science, 80: 1965-1970.

Mattila-Sandholm T., Mättö J., Saarela M. 1999. Lactic acid bacteria with health claims – interactions and interference with gastrointestinal flora. International Dairy Journal, 9: 25-35.

McKelvey V. J., Green M. H. L., Schmezer P., Pool-Zobel B. L., De Meo M. P., Collins A. R. 1993. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay). A European review. Mutation Research, 288: 47-63.

Miyame Y., Yamamoto M., Sasaki Y. F., Kobayashi H., Igarashi-Soga M., Shimoi K., Hayashi M. 1998. Evaluation of tissue homogenisation technique that isolates nuclei for the in vivo single cell gel electrophoresis (comet) assay: a collaborative study by five laboratories. Mutation Research, 418: 131-140.

Mitchell H. 1962. Comparative nutrition of man and domestic animals. Volume 1. New York, London, Academic Press: 10-50.

MRS agar (*Lactobacillus* Agar acc. to De Man, Rogosa and Sharpe). 2002. Darmstadt, Merck. (2002) [http://www.merck.de/english/services/chemdat/catalogs/mibio/tedisdata/prods/4973-1\\_10660\\_0500.html](http://www.merck.de/english/services/chemdat/catalogs/mibio/tedisdata/prods/4973-1_10660_0500.html) (28.1.2003): 10 str.

Molska I., Kocon J., Zmarlicki S. 1980. Electron microscopy studies on structures and microflora of kefir grains. *Acta Alimentaria Polonica*, 6, 3: 145-154.

Moreschi C. 1909. Beziehungen zwischen ernahrung und tumorwachstum. *Zeitschrift fur Immunitätsforschung*, 2: 651-675.

Morotomi M., Guillem J. C., LoGerfo P. Weinstein I. B. 1990. Production od diacylglycerol, an activator of protein kinase C, by human intestinal microflora. *Cancer Research*, 50: 3595-3599.

Morvay K., Szentleleki K., Tolok G., Pinter A., Borzsonyi M., Nawroth R. 1989. Effect of change of fecal bile acid excretion achieved by operative procedures in 1,2 dimethylhydrazine-induced colon cancer in rats. *Diseases of the Colon and Rectum*, 32: 860-863.

Murufushi M., Shiomi M., Aibara K. 1983. Effect of orally administered polysaccharide from kefir grain on delayed-type hypersensitivity and tumor growth in mice. *Japanese Journal of Medical Science and Biology*, 36: 49-53.

Murofushi M., Mizuguchi J., Aibara K., Matuhasi T. 1986. Immunopotentiative effect of polysaccharide from kefir grain, KGF-C, administered orally in mice. *Immunopharmacology*, 121: 29-35.

Nagengast F. M., Gruben M. J. A. L., Van Munster L. P. 1995. Role of the bile acids in colorectal carcinogenesis. *European Journal of Cancer*, 31A: 1067-1070.

National Toxicology Program. 1985. NTP Toxicology and Carcinogenesis Studies of Chrysotile Asbestos (CAS No. 12001-29-5) in F344/N Rats (Feed Studies). 1985. Department of Health and Human Services, Research Triangle Park, NC. Technical Report Series National Toxicology Program, 295: 1-390.



Nelson R. L., Tanure J. C., Andrianopoulos G. 1987. The effect of dietary milk and calcium on experimental colorectal carcinogenesis. *Diseases of the Colon and Rectum*, 30: 947-949.

Newborne P. M, Rogers A. E. 1997. Adenocarcinoma, colon and rectum, rat. V: *Digestive system*. Jones T. C., Popp J. A., Mohr U. (eds.). New York, Springer: 432-437.

Newmark H. L., Wargovich M. J., Bruce W. R. 1984. Colon cancer and dietary fat, phosphate and calcium: a hypothesis. *Journal of the National Cancer Institute*, 72: 1323-1325.

Newmark H. L., Lipkin M. 1992. Calcium, vitamin D, and colon cancer. *Cancer Research*, 15: 2067S-2068S.

Oberman H. 1985. Fermented milks. V: *Microbiology of fermented foods*. Volume 1. Wood, B. J. B. (ed.). London, Elsevier Applied Science Publishers Ltd.: 179-180.

O'Dwyer P. J., McCabe D. P., Sickel-Santanello B. J., Woltering E. A., Clausen K., Martin E. W. 1988. Use of polar solvents in chemoprevention of 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer. *Cancer*, 62: 944-948.

Oleinichenko E. V., Mitrokhin S. D., Nonikov V. E., Minaev V. I. 1999. Effectiveness of acripole in prevention of enteric dysbacteriosis due to antibacterial therapy. *Antibiotiki i Khimioterapiia*, 44: 23-25.

O'Sullivan D. J. 1999. Methods of analysis of the intestinal microflora. V: *Probiotics: A critical review*. Tannock G. W. (ed.). Wyomondham, Horizon Scientific Press: 23-45.

Overvik E., Gustafsson, J. A. 1990. Cooked-food mutagens: current knowledge of formation and biological significance. *Mutagenesis*, 5: 437-446.

Pajk T. 2000. Kometni test v modelni prehranski raziskavi. Diplomaska naloga. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 51 str.

Papenberg R., Bounous G., Fleiszer D., Gold P. 1990. Dietary milk proteins inhibit the development of dimethylhydrazine-induced malignancy. *Tumour Biology*, 11: 129-136.

Pariza M. W. 1987. Fat, calories, and mammary carcinogenesis: net energy effects. *American Journal of Clinical Nutrition*, 45: 261-263.

Parodi P. W. 1996. Milk fat components: possible chemopreventive agents for cancer and other diseases. *Australian Journal of Dairy Technology*, 51: 24-32.

Parodi P. W. 1997. Cow's milk fat components as potential anticarcinogenic agents. *Journal of Nutrition*, 127: 1055-1060.

Parodi P. W. 1998. A role for milk proteins in cancer prevention. *Australian Journal of Dairy Technology*, 53: 37-47.

Parodi P. W. 1999a. The role of intestinal bacteria in causation and prevention of cancer: modulation by diet and prebiotics. *Australian Journal of Dairy Technology*, 54: 103-121.

Parodi P. W. 1999b. Conjugated linoleic acid and other carcinogenic agents of bovine milk fat. *Journal of Dairy Science*, 82: 1339-1349.

Pence B. C. 1993. Role of calcium in colon cancer prevention: experimental and clinical studies. *Mutation Research*, 290: 87-95.

Pence B. C., Dunn D. M., Zhao C., Patel V., Hunter S., Landers M. 1996. Protective effects of calcium from nonfat dried milk against colon carcinogenesis in rats. *Nutrition and Cancer*, 25: 35-45.

Perdigon G., Alvares S., De Macias M. E. N., Roux M. E., De Ruiz Holgado A. P. 1990. The oral administration of lactic acid bacteria increase the mucosal intestinal immunity in response to enteropathogens. *Journal of Food Protection*, 53: 404-410.

Pitt J. I., Hocking A. D. 1997. Yeasts. V: Fungi and food spoilage. 2<sup>nd</sup> ed. London, Blackie Academic and Professional: 460-461.

Pokorn D. 1997. Zdrava prehrana in dietni jedilniki: priročnik za praktično predpisovanje diet. Ljubljana, Zdravstveno varstvo: 38-44.

Prehn R. T. 1994. Stimulatory effects of immune reactions upon the growths of untransplanted tumors. *Cancer Research*, 54: 908-914.

Rafter J. J. 1995. The role of lactic acid bacteria in colon cancer prevention. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 30: 497-502.

Rea M. C., Lennartsson T., Dillon P., Drinan F. D., Reville W. J., Heapes M., Cogan T. M. 1996. Irish kefir-like grains: their structure, microbial composition and fermentation kinetics. *Journal of Applied Bacteriology*, 81: 83-94.

Reddy B. S., Simi B., Patel N., Aliaga C., Rao C. V. 1996. Effect of amount and types of dietary fat on intestinal 7 $\alpha$ -dehydroxylase and phosphatidylinositol-specific phospholipase C and colonic mucosal diacylglycerol kinase and PKC activities during different stages of colon tumor promotion. *Cancer Research*, 56: 2314-2320.

Reddy B. S. 1999. Possible mechanisms by which pro- and prebiotics influence colon carcinogenesis and tumor growth. *Journal of Nutrition*, 129: 1478S-1482S.

Rezar V., Pajk T., Marinšek-Logar R., Ješe Janežič V., Salobir K., Salobir J. 2003. Wheat and oat bran effectively reduce oxidative stress induced by high fat diets in pigs. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 47, 2: 78-84.

Robinson K. R., Tamime A. Y., Wszolek M. 2002. Microbiology of fermented milks. V: Dairy microbiology handbook. 3<sup>rd</sup> ed. Robinson, R. K. (ed.). New York, Wiley-Interscience: 367-430.

Rosi J. 1978. Kefir micro-organisms: yeasts. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*, 29, 2: 59-67

Rowland I. R., Mallett A. K., Wise A. 1985. The effect of diet on the mammalian gut flora and its metabolic activities. *CRC Critical Reviews in Toxicology*, 16: 31-103.

Rowland, I. R., Rumney, C. J., Coutts, J. T. in Lievense, L. C. 1998. Effect of *Bifidobacterium longum* and inulin on gut bacterial metabolism and carcinogen-induced aberrant crypt foci in rats. *Carcinogenesis*, 19: 281-285.

Rumney C. J., Rowland I. J., Coutts T. M., Randerath K., Reddy R., Shah A. B., Ellul A., O'Neill I. K. O. 1993. Effects of risk-associated human dietary macrocomponents on processes related to carcinogenesis in human-flora-associated (HFA) rats. *Carcinogenesis*, 14: 79-84.

Savage D. C. 1977. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annual Review of Microbiology*, 31: 107-133.

Shackelford L. A., Rao D. R., Chawan C. B., Pulusani S. R. 1983. Effect of feeding fermented milk on the incidence of chemically induced colon tumors in rats. *Nutrition and Cancer*, 5: 159-164.

Shiomi M., Sasaki K., Murofushi M., Aibara K. 1982. Antitumor activity in mice of orally administered polysaccharide from Kefir grain. *Japanese Journal of Medical Science and Biology*, 35, 2: 75-80.

Shiomi M., Aibara K., Murofushi M. 1983. Effect of orally administered polysaccharide from kefir grain on delayed-type hypersensitivity and tumor growth in mice. *Japanese Journal of Medical Science and Biology*, 36, 1: 49-53.

Sinclair J. Kefir - the wonder food (and the bee in my bonnet). <http://www.pinoman.co.uk/Kefir.html> (6. dec. 2002): 5 str

Singh N. P., McCoy M. T., Tice R. R., Schneider E. L. 1988. A simple technique for quantization of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175: 184-191.

Singh J., Rivenson A., Tomita M. Shimamura S., Ishibashi N., Reddy B. S. 1997. *Bifidobacterium longum*, a lactic acid-producing intestinal bacterium inhibits colon cancer and modulates the intermediate biomarkers of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 18: 833-841.

Slattery M. L., Potter J. D., Sorenson A. W. 1994. Age and risk factors for colon cancer (United States and Australia): are there implications for understanding differences in case-control and cohort studies? *Cancer Causes Control*, 5: 557-563.

Slattery M., Potter J. D., Duncan D. M., Berry T. D. 1997. Dietary fats and colon cancer: assessment of risk associated with specific fatty acid. *International Journal of Cancer*, 73: 670-677.

Solis-Pereyra B., Aattouri N., Lemonnier D. 1997. Role of food in the stimulation of cytokine production. *American Journal of Clinical Nutrition*, 66: 521-525.

Spreer E. 1998. *Milk and dairy product technology*. New York, Marcel Dekker Inc.: 483 str.

Sreekumar O., Hosono A. 1998. Antimutagenicity and the influence of physical factors in binding *Lactobacillus gasseri* and *Bifidobacterium longum* cells to amino acid pyrolysates. *Journal of Dairy Science*, 81: 1508-1516.

Steinkraus K. H. 1996. *Acid fermentation. V: Handbook of indigenous fermented foods*. 2<sup>nd</sup> ed. Steinkraus K. H. (ed.). New York, Marcel Dekker, Inc.: 305-308.

Stephen A. M. and Cummings, J. H. 1980. The microbial contribution to human faecal mass. *Journal of Medical Microbiology*, 13: 45-56.

Sternhagen L. G., Allen J. C. 2001. Growth rates of a human colon adenocarcinoma cell line are regulated by the milk protein alpha-lactalbumin. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 501: 115-120.

Steinbach G., Kumar S. P., Reddy B. S., Lipkin M., Holt P. R. 1993. Effects of caloric restriction and dietary fat on epithelial cell proliferation in rat colon. *Cancer Research*, 53: 2745-2749.

Steinbach G., Heymsfield S., Olansen N. E., Tighe A., Holt P. R. 1994. Effect of caloric restriction on colonic proliferation in obese persons: implications for colon cancer prevention. *Cancer Research*, 54: 1194-1197.

Sukhov S. V., Kalamkarova L. I., Il'chenko L. A., Zhangabylov A. K. 1986. Microflora changes in the small and large intestines of chronic enteritis patients on diet therapy including sour milk products. *Voprosy Pitaniia*, 4: 14-17.

Tafazoli M., Kirsch-Volders M. 1996. In vitro mutagenicity and genotoxicity study of 1,2-dichloroethylene, 1,1,2-trichloroethylene, 1,3-dichloropropane, 1,2,3-trichloropropane and 1,1,3-trichloropropene, using the micronucleus test and the alkaline single cell gel electrophoresis technique (comet assay) in human lymphocytes. *Mutation Research*, 371: 185-202.

Takada H., Hirooka T., Hiramatsu Y., Yamamoto M. 1982. Effect of  $\beta$ -glucuronidase inhibitor on azoxymethane-induced colonic carcinogenesis in rats. *Cancer Research*, 42: 331-334.

Takahashi M., Fukuda K., Sugimura T., Wakabayashi K. 1998. Beta-catenin is frequently mutated and demonstrates altered cellular location in azoxymethane-induced rat colon tumors. *Cancer Research*, 58: 42-46.

Takizawa S., Kojima S., Tamura S., Fujinaga S., Benno Y., Nakase T. 1994. *Lactobacillus kefirgranum* sp. nov. and *Lactobacillus parakefir* sp. nov., two new species from kefir grains. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44: 435-439.

Tamime, A. Y. 2002. Microbiology of starter cultures. V: Dairy microbiology handbook. 3<sup>rd</sup> ed. Robinson R. K. (ed.). New York, Wiley-Interscience: 261-366.

Tannenbaum A. 1942. The genesis and growth of tumors. II. Effects of caloric restriction per se. Cancer Research, 2: 460-467.

Tannock G. W. 1999. Identification of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*. V: Probiotics: A critical review. Tannock G. W. (ed.). Wymondham, Horizon Scientific Press: 45-56.

Tannock G. W. 2002. Probiotics and prebiotics: Where are we going? Wymondham, Caister Academic Press: 336 str.

Tice R., Vazquez M. 1999. Protocol for the application of the pH>13 alkaline single cell gel (SCG) assay to the detection of DNA damage in mammalian cells. Research Triangle Park, NC, Integrated Laboratory Systems. (september 1999) [www.kineticimaging.com/kidocs/kometpro.doc](http://www.kineticimaging.com/kidocs/kometpro.doc) (30.09.1999): 9 str.

Toba T., Arihara K., Adachi S. 1990. Distribution of microorganisms with particular reference to encapsulated bacteria in kefir grains. International Journal of Food Microbiology, 10, 3/4: 219-224.

Toth B. 1975. Synthetic and naturally occurring hydrazines as possible cancer causative agents. Cancer Research, 35, 12: 3693-3697.

Watanabe T., Tada M., Nagai H., Sasaki S. Nakao M. 1998. *Helicobacter pylori* induces gastric cancer in Mongolian gerbils. Gastroenterology, 115: 642-648.

Weisburger E. K. 1994. General principles of chemical carcinogenesis. V: Carcinogenesis. M. P. Waalkes, J. M. Ward (eds.). New York, Raven Press: 1-23.

Witthuhn R. C., Schoeman T., Britz, T. J. 2005. Characterisation of the microbial population at different stages of kefir production and kefir grain mass cultivation. International Dairy Journal, 15: 383-389.

Wood B. J. B., Hodge, M. M. 1985. Yeast-lactic acid bacteria interactions and fermented foods. V: Microbiology of fermented foods. Volume 1. Wood B. J. B. (ed.). London, Elsevier Applied Science Publishers Ltd.: 272-276.

Woods M. N., Barnett J. B., Spiegelman D., Trail, N., Hertzmark, E., Langcope, C. in Gorbach, S. L. 1996. Hormone levels during dietary changes in premenopausal African-American women. Journal of the National Cancer Institute, 88: 1369-1374.

Wright C. L., Stewart I. D. 2003. Histopathology and mismatch repair status of 458 consecutive colorectal carcinomas. American Journal of Surgical Pathology, 27: 1393-1406.

Van Boekel M. A. J. S., Goepfert A. R., Alink G. M. 1997. Antimutagenic activity of casein against MNNG in the *E. coli* DNA repair host-mediated assay. Cancer Letters, 114: 85-87.

Van Munster L. P., Tangerman A., De Hann A. F. J., Nagengast F. M. 1993. A new method for the determination of the cytotoxicity of bile acids and aqueous phase of stool: the effect of calcium. European Journal of Clinical Investigation, 23: 773-777.

Van Tassel R. L., Kingston D. G. I., Wilkins T. D. 1990. Metabolism of dietary genotoxins by the human colonic Microflora; the fecapentaenes and heterocyclic amines. Mutation Research, 238: 209-221.

Young G. P., Gibson P. R. 1994. Butyrate and the colon cancer cell. V: Short chain fatty acids. Binder H. J., Cummings J., Soergel K. (eds.). London, Kluwer: 148-160.

Yukuchi H., Goto T., Okonogi S. 1992. The nutritional and physiological value of fermented milks and lactic milk drinks. V: Functions of fermented milk. Challenges for the health sciences. London, Elsevier Applied Science Ltd.: 217-225.



## ZAHVALA

Vsej moji družini, ki mi vedno stoji ob strani in me žene naprej, še posebno ženi Urški za potrpežljivo prenašanje mojih muh, za pogovore, za odlično hrano, za drugačno preživljanje časa,... gospe profesorici dr. Ireni Rogljevi za stalno vzpodbudo, pozornost in pomoč ter vsem njenim in mojim kolegom na Inštitutu za mlekarstvo, ki so sodelovali pri celotnem procesu nastajanja te naloge, prav tako gospodu profesorju dr. Petru Rasporju za prijazno podporo, za večno odgovornost do našega lepega materinega jezika, do najlepšega jezika slovenskega, do naše kulture, za skrb za odličnost povesod, kolegici dr. Cirili Hlastan Ribič za moralno in zagonsko vzpodbudo in pomoč pri nastajanju naloge od začetka do konca..., nenazadnje tudi svojemu podjetju, lastnikoma in sodelavcem, ki mi nudijo drugačno bivanje na tem planetu.

## PRILOGE

### Priloga A: Kometni test na podganji krvi: 19. Oktober 2002 (I. skupina vzorcev – kefir 3.5 % maščobe)

Zaporedna št. vzorca	Podgana	% DNA v glavi (stdev)	%DNA v repu (stdev)	Repni Moment po Olivu (OTM) (stdev)
3/1	45	87,83 (11,59)	12,17 (11,59)	<b>2,00 (2,05)</b>
3/2	46	89,47 (8,89)	10,52 (8,89)	<b>1,39 (0,96)</b>
3/3	47	89,05 (10,35)	10,94 (10,35)	<b>1,34 (1,17)</b>
3/4	43	88,98 (8,31)	11,01 (8,31)	<b>1,70 (1,10)</b>
3/5	44	88,89 (8,32)	11,10 (8,32)	<b>1,70 (1,02)</b>
3/6	48	89,47 (8,89)	10,53 (8,89)	<b>1,39 (0,96)</b>
2/1	38	87,91 (9,66)	12,08(9,66)	<b>1,62 (1,07)</b>
2/2	41	89,87 (8,91)	10,12 (8,91)	<b>1,32 (0,84)</b>
2/3	37	88,50 (10,52)	11,49 (10,52)	<b>1,45 (1,09)</b>
2/4	40	90,12 (9,03)	9,87 (9,03)	<b>1,31 (0,95)</b>
2/5	39	91,21 (8,99)	8,78 (8,99)	<b>1,26 (1,03)</b>
2/6	42	90,21 (9,98)	9,78 (9,98)	<b>1,30 (1,00)</b>
4/2	53	88,97 (10,51)	11,02 (10,51)	<b>1,54 (1,14)</b>
4/3	49	90,31 (9,64)	9,68 (9,64)	<b>1,27 (1,10)</b>
4/6	54	90,20 (9,19)	9,79 (9,19)	<b>1,28 (0,87)</b>

**Priloga B: Kometni test na podganji krvi: 16. Oktober 2002 (II. skupina vzorcev – kefir 1.1% maščobe)**

<b>Zaporedna št. vzorca</b>	<b>Podgana</b>	<b>% DNA v glavi (stdev)</b>	<b>%DNA v repu (stdev)</b>	<b>Repni Moment po Olivu (OTM) (stdev)</b>
<b>1/2</b>	6	90,43 (7,92)	9,57 (7,92)	<b>1,11 (0,75)</b>
<b>1/3</b>	4	87,30 (11,11)	12,69 (11,11)	<b>2,84 (2,65)</b>
<b>1/4</b>	2	88,61 (10,24)	11,83 (10,24)	<b>1,27 (1,05)</b>
<b>1/5</b>	5	91,13 (6,90)	8,86 (6,90)	<b>1,23 (0,88)</b>
<b>4/1</b>	35	91,96 (6,65)	8,03 (6,65)	<b>1,16 (0,76)</b>
<b>4/2</b>	33	91,32 (7,72)	8,67 (7,72)	<b>1,32 (1,07)</b>
<b>4/3</b>	25	89,37 (8,64)	10,62 (8,64)	<b>1,74 (1,08)</b>
<b>4/4</b>	32	91,99 (8,52)	8,00 (8,52)	<b>0,94 (0,79)</b>
<b>4/5</b>	34	92,18 (7,76)	7,81 (7,76)	<b>0,87 (0,68)</b>
<b>5/1</b>	10	91,23 (7,16)	8,76 (7,16)	<b>1,62 (1,25)</b>
<b>5/2</b>	14	93,67 (6,25)	6,32 (6,25)	<b>0,94 (0,69)</b>
<b>5/3</b>	13	89,37 (8,46)	10,26 (8,46)	<b>1,74 (1,08)</b>
<b>5/4</b>	9	86,40 (11,90)	13,59 (11,90)	<b>1,78 (1,46)</b>
<b>5/5</b>	12	90,07 (7,73)	9,92 (9,73)	<b>1,60 (0,83)</b>
<b>5/6</b>	11	90,53 (7,40)	9,46 (7,47)	<b>1,52 (1,20)</b>

**Priloga C: Kometni test na podganji krvi: 22. Oktober 2002 (III. skupina vzorcev – mleko 1.1 % maščobe)**

<b>Zaporedna št. vzorca</b>	<b>Podgana</b>	<b>% DNA v glavi (stdev)</b>	<b>%DNA v repu (stdev)</b>	<b>Repni Moment po Olivu (OTM) (stdev)</b>
<b>1/4</b>	55	90,72 (10,48)	9,27 (10,48)	<b>1,21 (1,32)</b>
<b>1/5</b>	57	84,15 (15,11)	15,84 (15,11)	<b>2,75 (2,41)</b>
<b>1/6</b>	56	90,90 (11,06)	9,09 (11,06)	<b>1,33 (1,40)</b>
<b>2/1</b>	69	88,18 (10,38)	11,81 (10,38)	<b>1,52 (1,14)</b>
<b>2/2</b>	60	91,20 (8,57)	8,79 (8,57)	<b>1,08 (0,91)</b>
<b>2/4</b>	62	90,31 (9,73)	9,68 (9,73)	<b>1,18 (1,08)</b>
<b>2/5</b>	70	90,84 (9,48)	9,15 (9,48)	<b>1,13 (0,97)</b>
<b>2/6</b>	71	83,23 (12,95)	16,76 (12,95)	<b>3,43 (2,43)</b>
<b>3/1</b>	75	90,72 (8,99)	9,27 (8,99)	<b>1,18 (0,99)</b>
<b>3/2</b>	74	91,15 (7,45)	8,84 (7,45)	<b>1,03 (0,80)</b>
<b>3/3</b>	73	92,37 (8,27)	7,62 (8,27)	<b>1,06 (0,93)</b>
<b>3/4</b>	72	89,43 (10,95)	10,56 (10,95)	<b>1,08 (1,01)</b>
<b>3/5</b>	77	91,26 (9,51)	8,73 (9,51)	<b>1,09 (1,10)</b>
<b>3/6</b>	76	90,36 (10,08)	9,63 (10,08)	<b>1,35 (1,22)</b>
<b>4/4</b>	80	87,00 (13,29)	12,99 (13,29)	<b>2,45 (3,06)</b>

**Priloga D: Kometni test na podganji krvi: 24. Oktober 2002 (IV. skupina vzorcev – voda)**

Zaporedna št. vzorca	Podgana	% DNA v glavi (stdev)	%DNA v repu (stdev)	Repni Moment po Olivu (OTM) (stdev)
1/4	92	89,31 (8,66)	10,68 (8,66)	<b>1,25 (1,11)</b>
1/5	95	91,27 (8,97)	8,72 (8,97)	<b>0,98 (0,88)</b>
1/6	93	90,69 (9,85)	9,30 (9,85)	<b>0,93 (0,93)</b>
2/1	112	88,30 (9,04)	11,69 (9,04)	<b>1,13 (0,82)</b>
2/4	107	90,73 (8,57)	9,27 (8,57)	<b>1,21 (1,06)</b>
2/5	105	92,33 (7,70)	7,66 (7,70)	<b>0,71 (0,61)</b>
3/1	109	91,35 (8,31)	8,65 (8,31)	<b>0,80 (0,65)</b>
3/2	108	91,13 (9,99)	8,68 (9,99)	<b>1,28 (1,36)</b>
3/3	101	89,77 (0,54)	10,22 (9,54)	<b>1,58 (1,39)</b>
3/4	103	90,85 (7,13)	9,14 (7,13)	<b>1,26 (0,90)</b>
3/5	102	90,61 (9,98)	9,38 (9,98)	<b>1,04 (1,00)</b>
3/6	104	89,13 (8,77)	10,86 (8,77)	<b>1,00 (0,69)</b>
4/2	99	90,55 (8,71)	9,44 (8,71)	<b>1,27 (1,25)</b>
4/4	96	90,07 (8,30)	9,92 (8,30)	<b>0,94 (0,27)</b>
4/5	100	89,29 (9,98)	10,70 (9,98)	<b>1,54 (1,75)</b>
4/6	97	90,52 (6,64)	9,47 (6,64)	<b>0,99 (0,61)</b>