

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Tinkara VARDJAN

**PROUČEVANJE FUNKCIONALNIH UČINKOV KEFIRANOGENIH
LAKTOBACILOV IN KEFIRANA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**STUDY OF FUNCTIONAL EFFECTS OF KEFIRAN PRODUCING
LACTOBACILLI AND KEFIRAN**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2015

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani in po sklepu Senata Biotehniške fakultete in Senata Univerze v Ljubljani z dne 11. 01. 2012 je bilo potrjeno, da kandidatka Tinkara Vardjan izpolnjuje pogoje za neposreden prehod na Interdisciplinarni doktorski študijski program Bioznanost, znanstveno področje živilstvo. Za mentorico je bila imenovana prof. dr. Irena Rogelj.

Celotna raziskava je bila opravljena v okviru javnega razpisa »Mladi raziskovalec iz gospodarstva – generacija 2009«, ki ga izvaja Javna agencija za tehnološki razvoj Republike Slovenije. Operacijo delno financira Evropska unija iz Evropskega socialnega sklada. Operacija se izvaja kot del Operativnega programa razvoja človeških virov za obdobje 2007–2013, in sicer v okviru prve razvojne prioritete – Spodbujanje podjetništva in prilagodljivosti, prednostne usmeritve; 1.1.: Strokovnjaki in raziskovalci za konkurenčnost podjetij. Raziskava je bila opravljena v laboratoriju Inštituta za mlekarstvo in probiotike ter v Centru za laboratorijske živali Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Mentorica: prof. dr. Irena ROGELJ

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Sonja SMOLE-MOŽINA

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: prof. dr. Bogdan PERKO

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Članica: prof. dr. Jagoda ŠUŠKOVIĆ

Univerza v Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Datum zagovora:

Naloga je rezultat kandidatkininega lastnega raziskovalnega dela. Podpisana izjavljam, da je disertacija rezultat mojega lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačano, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravico hranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Doktorandka:

Tinkara VARDJAN

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dd
- DK UDK 579.67:637.146.21:579.864:641.1(043)=163.6
- KG kefir/kefirna zrna/mikrobiota/laktobacili/kefiran/holesterol/laboratorijske podgane/oksidacijski stress/antioksidativna aktivnost/funkcionalna živila
- AV VARDJAN, Tinkara, univ. dipl. inž. zoot.
- SA ROGELJ, Irena (mentorica)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni doktorski študijski program Bioznanosti, znanstveno področje živilstvo
- LI 2015
- IN PROUČEVANJE FUNKCIONALNIH UČINKOV KEFIRANOGENIH LAKTOBACILOV IN KEFIRANA
- TD Doktorska disertacija
- OP XIII, 130 str., 11 pregl., 32 sl., 129 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Kefir sodi med najstarejše fermentirane mlečne izdelke z zdravju koristnimi učinki. Posebnost izdelave kefirja je uporaba kefirnih zrn, ki so simbiotična združba mlečnokislinskih bakterij, kvasovk in pogosto tudi oetnokislinskih bakterij, čvrsto povezanih s proteini in kefiranom. Mnenje je, da je prav kefiran tista aktivna substanca, ki daje kefirnemu zrnu in kefirju posebne funkcionalne lastnosti. V raziskavi smo s pomočjo klasičnih in molekularnih metod (DGGE, RT-PCR in sekvenciranja) najprej proučevali velikost in sestavo mikrobne združbe kefirnih zrn, posebno pozornost pa smo posvetili potencialno kefiranogenim laktobacilom. Ker laktobacili, osamljeni iz kefirnih zrn, v čisti kulturi in laboratorijskih pogojih gojenja niso tvorili kefirana, temveč kefiranu podobne eksopolisaharide, smo za proučevanje funkcionalnih učinkov kefirana pridobili kefiran iz kefirnih zrn. Funkcionalne učinke kefirana in celotnega kefirnega zrna smo v drugem delu raziskave proučevali v prehranskem poskusu na podganah vrste Wistar. Iz kefirnih zrn smo osamili in identificirali laktobacile vrst *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum*, *Lb. kefiri* in *Lb. parakefiri*. V *in vitro* pogojih smo potrdili antioksidativno aktivnost osamljenih laktobacilov in kefirana, ki je bila primerljiva z antioksidanti, kot so vitamin C, vitamin E in BHA. Potrdili smo prebiotične lastnosti kefirana, saj je dodatek kefirana v gojišču spodbudil rast izbranih laktobacilov. Z metodo lise na agarju smo potrdili protimikrobno aktivnost kefirana, ki je v koncentraciji 20 mg/ml inhibiral vrste *Bacillus cereus* IM 250, *Escherichia coli* IM 120, *Listeria monocytogens* IM 372, *L. innocua* IM 373 in *Staphylococcus aureus* IM 388. V prehranskem poskusu smo proučevali vpliv kefirana in kefirnih zrn na mikrobioto prebavnega trakta podgan, dve tipični motnji metabolnega sindroma (višjo raven serumskega holesterola in višjo raven trigliceridov) in oksidacijski stres. Podgane, ki so poleg krme z visoko vsebnostjo holesterola uživale kefiran oz. kefirna zrna, so imele v primerjavi s kontrolno skupino podgan, ki so bile krmljene samo s krmo z visoko vsebnostjo holesterola, v blatu značilno višje število laktobacilov in bifidobakterij, v krvni plazmi pa nižjo raven skupnega holesterola. Antioksidativnega delovanja kefirana in kefirnega zrna, ki smo ga ugotavljali preko stopnje lipidne peroksidacije v krvni plazmi, v *in vivo* študiji nismo potrdili.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dd
- DC UDC 579.67:637.146.21:579.864:641.1(043)=163.6
- CX kefir/kefir grains/microbiota/lactobacilli/kefiran/cholesterol/laboratory rats/oxidative stress/antioxidative activity/functional foods
- AU VARDJAN, Tinkara
- AA ROGELJ, Irena (supervisor)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdisciplinary Doctoral Programme in Biosciences/field Food Science and Technology
- PY 2015
- TI STUDY OF FUNCTIONAL EFFECTS OF KEFIRAN PRODUCING LACTOBACILLI AND KEFIRAN
- DT Doctoral dissertation
- NO XIII, 130 p., 11 tab., 32 fig., 129 ref.
- LA SI
- AL sl/en
- AB Offering many health benefits, kefir is one of the oldest traditional forms of fermented milk. It is produced using a starter culture known as kefir grains, which are a symbiotic association of yeasts, lactic and acetic acid bacteria, embedded in a complex matrix of protein and carbohydrate, called kefiran. Most likely, kefiran is the active substance that endows both kefir grains and kefir its specific properties. In our study a combination of conventional microbiological cultivation techniques and culture-independent methods (DGGE, RT-PCR sequencing) were used to investigate the microbial communities of kefir grains, with particular focus on the lactobacilli believed to be responsible for the production of kefiran. Under various laboratory conditions, pure cultures of the lactobacilli isolated from kefir grains were unable to produce kefiran, but kefiran-like exopolysaccharides. Kefiran obtained from kefir grains was used, while the functional effects of kefiran and kefir grains were also evaluated in an *in vivo* experiment using Wistar rats. The lactobacilli isolated from kefir grains were identified as *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum*, *Lb. kefiri* and *Lb. parakefiri*. The data obtained from our *in vitro* studies confirmed the antioxidant activity of lactobacilli isolated from kefir grains and kefiran, which was comparable to such antioxidants as vitamin C, vitamin E and BHA. Further to this, the prebiotic properties of kefiran was confirmed, while the addition of kefiran to the medium stimulated the growth of the selected lactobacilli. The antimicrobial activity of kefiran (20 mg/ml) against *Bacillus cereus* IM 250, *Escherichia coli* IM 120, *Listeria monocytogens* IM 372, *L. innocua* IM 373 and *Staphylococcus aureus* IM 388 was confirmed using agar spot tests. The effect of kefiran and kefir grains on the fecal microbiota of rats, together with two typical metabolic disorders (increased serum cholesterol and triglycerides) and oxidative stress, were studied in the *in vivo* experiment using Wistar rats. Results reveal that in comparison with the control group of rats, which were fed solely on a high-cholesterol diet, those rats fed with kefiran or kefir grains and a high-cholesterol diet had significantly higher levels of lactobacilli and bifidobacteria in their faeces, together with lower levels of total cholesterol in plasma. The antioxidant effects of kefiran and kefir grains were not confirmed.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key Words Documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	IX
Kazalo slik	X
Okrajšave in simboli	XII
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	2
1.2 HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 KEFIR	3
2.1.1 Proizvodnja kefirja	6
2.1.1.1 Tradicionalna izdelava kefirja	6
2.1.1.2 Ruska metoda izdelave kefirja	7
2.1.1.3 Izdelava kefirja s čistimi starterskimi kulturami	7
2.2 KEFIRNA ZRNA	8
2.2.1 Mikrobiota kefirnih zrn	9
2.3 BAKTERIJSKI EKSOPOLISAHARIDI	12
2.3.1 Kefiran	13
2.3.1.1 Zdravilni učinki kefirana	14
2.4 METABOLNI SINDROM IN HOLESTEROL	17
2.4.1 Holesterol	17
2.4.1.1 Metabolizem holesterola	18
2.4.1.2 Transport holesterola po krvi	19
2.4.2 Povezava med matabolnim sindromom in dislipidemijo	20

2.4.2.1	Zdravljenje dislipidemije	21
2.5	OKSIDACIJSKI STRES	22
3	MATERIAL IN METODE	24
3.1	MATERIAL	24
3.1.1	Reagenti	24
3.1.2	Gojišča in raztopine	26
3.1.3	Bakterijski sevi	28
3.1.4	Kefirna zrna	29
3.2	OVREDNOTENJE VELIKOSTI IN PESTROSTI POPULACIJE LAKTOBACILOV V KEFIRNIH ZRNH	29
3.2.1	Osamitev in identifikacija laktobacilov iz kefirnih zrn z uporabo gojitvenih tehnik	29
3.2.1.1	Osamitev in ugotavljanje števila laktobacilov v kefirnih zrnih	29
3.2.1.2	Izolacija DNA in identifikacija laktobacilov	30
3.2.1.3	Izolacija pomnožkov PCR za ugotavljanje zaporedja nukleotidov	31
3.2.2	Identifikacija laktobacilov v kefirnih zrnih z uporabo od gojenja neodvisne metode – poliakrilamidne gelske elektroforeze v denaturirajočem gradientu (DGGE)	32
3.3	SPREMLJANJE TVORBE EKSOPOLISAHARIDOV V ČISTIH KULTURAH ³³	
3.4	POSTOPEK IZOLACIJE KEFIRANA IZ KEFIRNIH ZRN	34
3.5	SPREMLJANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI BREZCELIČNIH INTRACELULARNIH EKSTRAKTOV LAKTOBACILOV IN KEFIRANA	35
3.5.1	Metoda za določanje antioksidativne aktivnosti s tiocianatom	36
3.5.2	Metoda za določanje antioksidativne aktivnosti z 2-deoksi-D-ribozo	37
3.5.3	Metoda za določanje antioksidativne aktivnosti z DPPH	38
3.5.4	Metoda za določanje antioksidativne aktivnosti z 1,10-fenantrolinom	39
3.6	DOLOČANJE PREBIOTIČNIH LASTNOSTI KEFIRANA	41
3.7	DOLOČANJE PROTIMIKROBNE AKTIVNOSTI KEFIRANA	41
3.8	PREHRANSKI POSKUS NA PODGANAH	42
3.8.1	Priprava kefirana in kefirnih zrn	43

3.8.2	Potek poskusa	44
3.8.3	Odvzem bioloških vzorcev	48
3.8.4	Mikrobiološke analize blata podgan	49
3.8.4.1	Klasične mikrobiološke analize	49
3.8.4.2	Verižna reakcija s polimerazo v realnem času (RT PCR)	50
3.8.5	Določanje vsebnosti holesterola in trigliceridov v krvni plazmi	52
3.8.6	Določanje stopnje lipidne peroksidacije v krvni plazmi	52
3.8.7	Statistična obdelava rezultatov	53
4	REZULTATI	54
4.1	VELIKOST IN PESTROST PREVLADUJOČE POPULACIJE LAKTOBACILOV V KEFIRNIH ZRNIH	54
4.1.1	Identifikacija laktobacilov, osamljenih iz kefirnih zrn, z uporabo gojitvenih tehnik	54
4.1.2	Identifikacija laktobacilov v kefirnih zrnih z metodo DGGE	56
4.2	TVORBA EKSOPOLISAHARIDOV V ČISTI KULTURI	57
4.3	SESTAVA KEFIRANA, PRIDOBLJENEGA IZ KEFIRNIH ZRN	60
4.4	ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST BREZCELIČNIH INTRACELULARNIH EKSTRAKTOV LAKTOBACILOV IN KEFIRANA	60
4.5	PREBIOTIČNE LASTNOSTI KEFIRANA	63
4.6	PROTIMIKROBNA AKTIVNOST KEFIRANA	67
4.7	PREHRANSKI POSKUS NA PODGANAH	68
4.7.1	Stabilnost mikrobiote kefirnih zrn	68
4.7.2	Rast podgan in količina zaužite krme	70
4.7.3	Vpliv krmljenja s kefiranom in kefirnimi zrni na mikrobioto blata podgan	73
4.7.4	Vsebnost skupnega holesterola, HDL in LDL holesterola ter trigliceridov v krvni plazmi podgan	84
4.7.5	Stopnja lipidne peroksidacije v krvni plazmi podgan	88
5	RAZPRAVA	90
5.1	VELIKOST IN PESTROST POPULACIJE LAKTOBACILOV V KEFIRNIH ZRNIH	90

5.2	SPOSOBNOST TVORBE EKSOPLISAHARIDOV V ČISTI KULTURI	92
5.3	ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST BREZCELIČNIH EKSTRAKTOV LAKTOBACILOV IN KEFIRANA	94
5.4	PREBIOTIČNE LASTNOSTI KEFIRANA	97
5.5	PROTIMIKROBNA AKTIVNOST KEFIRANA	97
5.6	PREHRANSKI POSKUS NA PODGANAH	98
5.6.1	Rast podgan in količina zaužite krme	98
5.6.2	Vpliv kefirana in kefirnih zrn na mikrobioto blata podgan	100
5.6.3	Vpliv kefirana in kefirnih zrn na vsebnost skupnega holesterola, HDL in LDL holesterola ter trigliceridov v krvni plazmi podgan	103
5.6.4	Vpliv kefirana in kefirnih zrn na stopnjo lipidne peroksidacije v krvni plazmi podgan	107
6	SKLEPI	109
7	POVZETEK	110
7.1	POVZETEK	110
7.2	SUMMARY	112
8	VIRI	116

ZAHVALA

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Energijska vrednost kefirja in vsebnost posameznih sestavin (Otles in Cagindi, 2003).	4
Preglednica 2: Najpogosteje osamljene bakterije in kvasovke iz kefirnih zrn (Marshall, 1993).	10
Preglednica 3: Nabor izbranih indikatorskih bakterij in pogoji kultivacije.	42
Preglednica 4: Sestava krme.	47
Preglednica 5: Gojišča in pogoji inkubacije za določanje posameznih skupin mikroorganizmov.	49
Preglednica 6: Gojišča in pogoji inkubacije za določanje posameznih vrst mikroorganizmov.	50
Preglednica 7: Začetni oligonukleotidi in programi PCR za RT PCR.	52
Preglednica 8: Antioksidativna aktivnost brezceličnih ekstraktov laktobacilov in kefirana, določena z različnimi metodami.	62
Preglednica 9: Povprečna začetna in končna telesna masa podgan, prirast telesne mase in konzumacija krme (prvi in drugi poskus).	72
Preglednica 10: Povprečna koncentracija skupnega holesterola, HDL in LDL holesterola ter trigliceridov v krvni plazmi podgan (prvi poskus; n=9/skupino).	85
Preglednica 11: Povprečna koncentracija skupnega holesterola, HDL in LDL holesterola ter trigliceridov v krvni plazmi podgan (drugi poskus; n=9/skupino).	87

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Kefirna zrna (Ratray in O`Connell, 2011).	8
Slika 2: Shematični prikaz tvorbe kefirnih zrn (Wang in sod., 2012).	9
Slika 3: Kemijska struktura kefirana (Badel in sod., 2011).	14
Slika 4: Kemijska struktura holesterola (Arnold in Kwiterovich, 2003).	18
Slika 5: Živali med poskusom.	44
Slika 6: Shema poteka prvega in drugega poskusa.	45
Slika 7: Aplikacija kefirana z gastrično sondo.	46
Slika 8: Odvzem vzorcev krvi iz repne vene.	48
Slika 9: Rezultati analize RAPD izolatov laktobacilov, osamljenih iz kefirnih zrn.	55
Slika 10: Profil DGGE DNA, izolirane iz vzorcev kefirnih zrn in osamljenih laktobacilov.	56
Slika 11: Količina in sestava eksopolisaharidov, ki so jih tvorili laktobacili v gojišču MRS pri različnih vrednostih pH.	58
Slika 12: Količine in sestava eksopolisaharidov, ki so jih tvorili laktobacili v gojišču MRSL pri različnih vrednostih pH.	59
Slika 13: Elektroferogram za kefirana	60
Slika 14: Antioksidativna aktivnost kefirana in brezceličnih ekstraktov laktobacilov - metoda s tiocianatom.	61
Slika 15: Koncentracije mikrobnih populacij laktobacilov (log KE/ml), osamljenih iz kefirnih zrn, po tridnevni inkubaciji v gojišču MRS pri različnih koncentracijah kefirana.	64
Slika 16: Koncentracije mikrobnih populacij laktobacilov (log KE/ml), značilnih za prebavni trakt, po tridnevni inkubaciji v gojišču MRS pri različnih koncentracijah kefirana.	65
Slika 17: Koncentracije mikrobnih populacij bifidobakterij (log KE/ml), po tridnevni inkubaciji v gojišču MRS z dodanim cisteinom in pri različnih koncentracijah kefirana.	66
Slika 18: Protimikrobna aktivnost kefirana - metoda lise na agarju.	67

Slika 19: Število laktobacilov in kvasovk v kefirnih zrnih med 14-tedenskim testom stabilnosti.	69
Slika 20: Profil DGGE DNA prevladujočih laktobacilov (A) in kvasovk (B) v kefirnih zrnih.	69
Slika 21: Povprečna teža posameznih skupin živali po tednih (prvi poskus).	70
Slika 22: Povprečna teža posameznih skupin živali po tednih (drugi poskus).	71
Slika 23: Povprečno število laktobacilov (n=9/skupino) v g blata podgan, določenih s štetjem KE na trdem gojišču MRS (A) in z metodo RT PCR (B) (prvi poskus).	74
Slika 24: Povprečno število bifidobakterij v g blata podgan, določenih s štetjem KE na trdem gojišču WCA (A) in z metodo RT PCR (B) (prvi poskus).	75
Slika 25: Povprečno število enterobakterij v g blata podgan, določenih s štetjem KE na agarju VRBG (A) in z metodo RT PCR (B) (prvi poskus).	76
Slika 26: Povprečno število kvasovk v g blata podgan, določenih s štetjem KE v gojišču KDM.	78
Slika 27: Povprečno število laktobacilov v g blata podgan, določenih s štetjem KE na agarju MRS (A) in z metodo RT PCR (B) (drugi poskus).	79
Slika 28: Povprečno število bifidobakterij v g blata podgan, določenih s štetjem KE na agarju WCA (A) in z metodo RT PCR (B) (drugi poskus).	80
Slika 29: Povprečno število enterobakterij v g blata podgan, določenih s štetjem KE na agarju VRBG (A) in z metodo RT PCR (B) (drugi poskus).	82
Slika 30: Povprečno število kvasovk v g blata podgan, določenih s štetjem KE na agarju KDM (A) in z metodo RT PCR (B) (drugi poskus).	83
Slika 31: Razlika v ravni skupnega holesterola med prvim in drugim (56. dan), prvim in tretjim (77. dan) ter prvim in četrtem (98. dan) vzorčenjem (drugi poskus).	88
Slika 32: Vsebnost MDA v krvni plazmi podgan (prvi poskus).	89

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A	absorbanca
ATTC	Ameriška zbirka celic (American Type Cell Collection)
BHA	butilhidroksianizol (butylhydroxyanisole)
BHI	gojišče Brain Heart Infusion
BHT	butilhidroksitoluen (butylhydroxytoluene)
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CO ₂	ogljikov dioksid
DGGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza v denaturirajočem gradientu (denaturing gradient gel electrophoresis)
DNA	deoksiribonukleinska kislina (deoxyribonucleic acid)
DPPH	1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)
DSM	Nemška zbirka mikroorganizmov in celičnih kultur, Braunschweig, Nemčija (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Germany)
EDTA	etilendiaminotetraocetna kislina (ethylenediaminetetraacetate)
EPS	eksopolisaharid
HCD	krma z visoko vsebnostjo holesterola (high cholesterol diet)
HDL	lipoproteinski delci velike gostote (high density lipoprotein)
H ₂ O ₂	vodikov peroksid
KE (CFU)	kolonijske enote (colony forming unit)
KDM	gojišče Kluyveromyces Differential Medium
KPL	gojišče za gojenje laktobacilov
LCD	krma z nizko vsebnostjo holesterola (low cholesterol diet)
LDL	lipoproteinski delci majhne gostote (low density lipoprotein)
LMG	Belgijska zbirka mikroorganizmov, Gent; Belgija (Belgium-co-ordinated collections of micro-organisms, Gent, Belgium)
M	molarnost (mol/l)
MDA	malondialdehid
MKB	mlečnokislinske bakterije

MRS	gojišče de Man, Rogosa in Sharp
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfat (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)
NCBI	National Center for Biotechnology Informations, Rockville Pike, Bethesda, ZDA
NCDO	Nacionalna zbirka mlekarških organizmov, Reading, Velika Britanija (National Collection of Dairy Organisms, Reading, England)
NTC	negativna kontrola (no tamplate control)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (polymerase chain reaction)
RAPD	naključno pomnoževanje polimorfne DNA (random amplification of polymorphic DNA)
rDNA	ribosomalna deoksiribonukleinska kislina (ribosomal deoxyribonucleic acid)
RNA	ribonukleinska kislina (ribonucleic acid)
Rpm	število obratov v minuti (rounds per minute)
rRNA	ribosomalna ribonukleinska kislina (ribosomal ribonucleic acid)
RT PCR	PCR v realnem času (real time PCR)
SŽB	srčno-žilne bolezni
TAE	tri acetatni pufer
TBA	tiobarbiturna kislina (tiobarbituric acid)
TCA	trikloroocetna kislina (trichloroacetic acid)
TG	trigliceridi
VRBG	vijolično rdeči žolčni agar z glukozo (violet red bile glucose agar)
WCA	gojišče Wilkins-Chalgren

1 UVOD

V mlekarški industriji srečamo vrsto mlečnokislinskih bakterij, sposobnih tvorbe eksopolisaharidov, ki izkazujejo pomembne tehnološke in fiziološke lastnosti, ki odpirajo široke možnosti uporabe v živilski in farmacevtski industriji. Eksopolisaharide zato v zadnjem času intenzivno proučujejo. Eksopolisaharidi omogočajo bakterijam uspešnejše zadrževanje v črevesju, poleg tega pa delujejo kot prebiotiki, saj selektivno spodbujajo razmnoževanje koristnih črevesnih bakterij. To sta pomembna funkcionalna učinka, ki ugodno vplivata na ravnotežje črevesne mikrobiote. Poleg tega naj bi eksopolisaharidi izkazovali protitumorske in imunostimulativne učinke, uspešno pa naj bi zniževali raven holesterola v krvi. Med takšne eksopolisaharide sodi tudi kefiran, v vodi topen polisaharid, ki ga najdemo v kefirnem zrnju in kefirju, starodavni fermentirani mlečni pijači, ki izvira s Kavkaza. Kefiranu pripisujejo številne zdravilne učinke, med drugim tudi preprečevanje nastanka metabolnega sindroma. Značilne indikacije metabolnega sindroma so povišana raven glukoze v krvi, inzulinska rezistenca, trebušna zamaščenost, dislipidemija in povišan krvni tlak. Omenjene motnje, h katerim v veliki meri prispeva prekomerna telesna teža (debelost), povečujejo tveganje za nastanek bolezni srca in ožilja ter sladkorne bolezni. Zaradi visokih stroškov zdravljenja in stranskih učinkov zdravil so za zdravljenje metabolnega sindroma vedno bolj zanimive alternativne terapije. V preteklih letih so zato opravili številne raziskave koristnih učinkov probiotičnih bakterij in prebiotikov ter njihovega potenciala pri preprečevanju in zdravljenju tovrstnih motenj.

Kefirno zrno je simbiotična združba mlečnokislinskih bakterij, kvasovk in pogosto tudi ocetnokislinskih bakterij, ki so čvrsto vpete v proteinsko polisaharidni matriks. Izvor kefirnih zrn ni natančno znan, tradicionalno pa so jih za proizvodnjo kefirja uporabljali predvsem na področju Kavkaza. Kefirja zunaj kavkaških gora dolga stoletja niso poznali, počasi pa so se začele širiti vesti o njegovih pozitivnih učinkih pri zdravljenju tuberkuloze, želodčnih in črevesnih težav. Kljub znanju in sodobnim metodam proučevanja mikrobnih združb in sistemov ostajajo kompleksna sestava kefirnega zrna in mehanizmi funkcionalnih učinkov še vedno neznanka in velik izziv za raziskovalce. Glavno težavo pri proučevanju kefirnega zrna predstavlja nestanovitna mikrobna populacija z raznolikim naborom mikrobov. Njihova razmerja in velikosti populacij so odvisni od okolja izvora

kefirnega zrna, načina kultivacije in substrata, ki ga uporabljamo za kultivacijo (vrsta in sestava mleka). Veliko raziskovalcev meni, da je prav kefiran tista aktivna substanca, ki daje kefirnemu zrnu in kefirju posebne funkcionalne učinke.

1.1 NAMEN DELA

Pozitivni učinki kefirja oziroma kefirana za zdravje so bili dokazani v različnih kliničnih študijah, vendar so mehanizmi redko natančno opisani, rezultati pa so si pogosto nasprotujoči. Zato je namen tega dela proučiti in ovrednotiti funkcionalne lastnosti kefirnih zrn, ki so last Mlekarne Krepko. Pri proučevanju mikrobne združbe kefirnih zrn smo se osredotočili predvsem na kefiranogene laktobacile in njihove probiotične lastnosti ter na prebiotične lastnosti kefirana. Proučevali smo tudi antioksidativni učinek kefirana in kefirnega zrna ter njuno zmožnost uravnavanja dislipidemije, značilne za metabolični sindrom.

1.2 HIPOTEZE

Glede na rezultate dosedanjih raziskav smo postavili naslednje hipoteze:

- Kefirna zrna bodo vsebovala pestro združbo laktobacilov, med njimi tudi kefiranogene predstavnike, saj je kefiran značilna komponenta kefirnega zrna, ki prispeva k njegovi stabilnosti.
- Med kefiranogenimi sevi bodo predstavniki z antioksidativno aktivnostjo.
- Izolirani kefirani bo imel prebiotične in/ali protimikrobne lastnosti.
- Krmljenje podgan s kefiranom in/ali kefirnimi zrni bo spremenilo sestavo črevesne mikrobiote živali, znižalo raven lipidov in holesterola v krvni plazmi živali ter stopnjo lipidne peroksidacije.

2 PREGLED OBJAV

2.1 KEFIR

Kefir, znan tudi kot *kefyr*, *kephir*, *kefer*, *kiaphur*, *knapon*, *kepi* in *kippi*, je tradicionalen fermentiran, rahlo alkoholni in osvežilen mlečni napitek (Sarkar, 2007; Rattray in O'Connell, 2011). Izvira s Kavkaza, kjer so ga stoletja izdelovali v usnjenih vrečah ali hrastovih sodih iz kravjega, kozjega ali ovčjega mleka z dodatkom kefirnih zrn. Danes je znan v mnogih deželah, še vedno pa ga največ izdelajo v Rusiji (Koroleva, 1988; Otles in Cagindi, 2003; Sarkar, 2007). Beseda kefir izhaja iz turške besede *kefi*, ki naj bi pomenila »dobro počutje«. Zaradi svojih hranilnih in terapevtskih lastnosti zavzema pomembno mesto v človeški prehrani. Zanimiv je postal, ko so se pojavili prvi zapisi o njegovi uporabi pri zdravljenju tuberkuloze, želodčnih in črevesnih bolezni. Zaradi vsebnosti številnih mikroorganizmov (bakterij in kvasovk), metabolitov, ki jih tvorijo mikroorganizmi, in raznolikih bioaktivnih snovi, ki v kefirju nastanejo med fermentacijo, ter številnih pozitivnih vplivov na zdravje človeka nekateri kefir imenujejo kar probiotik (Farnworth, 2005; Generoso in sod., 2005; Rattray in O'Connell, 2011). Tako kot nekateri probiotiki tudi kefir ugodno vpliva na prebavo. Po navedbah Marquina in sod. (2002) se je pri miših, ki so jih krmili s kefirjem, v tankem in debelem črevesju statistično značilno povečalo število mlečnokislinskih bakterij (MKB), medtem ko se je število enterobakterij in klostridijev zmanjšalo. Kefir je primerno živilo za ljudi z laktozno intoleranco. Med fermentacijo mikrobiota kefirja razgradi del laktoze v mlečno kislino (Spreer, 1998; Hertzler in Clancy, 2003; Rodrigues in sod., 2005). V *in vitro* poskusih in poskusih na živalih je bilo dokazano, da imajo kefir in njegove sestavine protitumorske (de Moreno de LeBlanc in sod., 2007), protimutagene (Hosono in sod., 1990), protivirusne in protimikrobne lastnosti (Rodrigues in sod., 2005). Kefirju pripisujejo še številne druge zdravilne učinke, kot je zniževanje holesterola in sladkorja v krvi ter krepitev imunskega sistema (Farnworth, 2005; Rattray in O'Connell, 2011; Huseini in sod., 2012). Čeprav so bili pozitivni učinki kefirja na zdravje dokazani v različnih kliničnih študijah, so mehanizmi redko natančno opisani, rezultati študij pa so si pogosto nasprotujoči.

Mikrobiološka in kemična sestava kefirja sta odvisni od izvora kefirnih zrn, velikosti inokuluma, vrste mleka in vsebnosti maščobe v mleku ter tehnoloških postopkov, predvsem od časa in temperature fermentacije. Karakteristični okus in vonj kefirja sta rezultat kompleksnega delovanja različnih bakterij in kvasovk (Marshall, 1993; Farnworth, 2005). 80 % mikrobne populacije v kefirju predstavljajo laktokoki iz vrste rodu *Leuconostock*, 10–15 % kvasovke, in 5–10 % laktobacili (Ratray in O'Connell, 2011). Najpogosteje osamljeni mikroorganizmi iz kefirja so *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lc. lactis* subsp. *cremoris*, *Lc. lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *Leu. mesenteroides* subsp. *dextranicum*, *Lactobacillus kefir*, *Lb. kefiranofaciens*, *Lb. kefirgranum*, *Lb. parakefir*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. acidophilus*, *Lb. brevis*, *Lb. helveticus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei*, *Lb. fermentum*, *Lb. plantarum*, *Lb. gasserii*, *Kluyveromyces marxianus*, *Kl. lactis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspota delbrueckii*, *Candida kefir*, *Pichia fermentans*, *Kazachstania unispora* in *K. exigua* (Angulo in sod., 1993; Marshall, 1993; Takizawa in sod., 1998; Garrote in sod., 2001; Simova in sod., 2002; Jianzhong in sod., 2009; Da Cruz Pedrozo Miguel in sod., 2010; Magalhães in sod., 2011; Ratray in O'Connell, 2011; Leite in sod., 2012; Londero in sod., 2012).

Preglednica 1: **Energijska vrednost kefirja in vsebnost posameznih sestavin (Otles in Cagindi, 2003).**

Table 1: **Energy value of kefir and shares of components (Otles and Cagindi, 2003).**

	V 100 g kefirja	
Energijska vrednost	65 kcal	Laktoza 4,0 %
Voda	87,6 %	Mlečna kislina 0,85 – 1 %
Beljakovine	3,3 %	Etanol 0,01 – 2,0 %
Maščoba	3,5 %	Minerali 0,8 %

Kefir poleg osnovnih hranil (Preglednica 1) vsebuje še vitamine skupine B (B3, B5, B6, B12, folno kislino, biotin), vitamin K, minerale (kalcij, magnezij, fosfor) in esencialne aminokislino (Otles in Cagindi, 2003). Vsebnost maščobe v kefirju je odvisna od vsebnosti maščobe v mleku, iz katerega je kefir izdelan. Tudi vsebnost mono-, di- in trigliceridov ter

prostih maščobnih kislin v kefirju je podobna vsebnosti teh sestavin v mleku, iz katerega je kefir izdelan (Farnworth in Mainville, 2003).

Tudi vsebnost beljakovin v kefirju je podobna vsebnosti beljakovin v mleku. Vendar pa ima kefir višjo biološko vrednost kot mleko, saj so beljakovine kefirja zaradi delne proteolize, ki nastane med fermentacijo, lažje prebavljive. Med fermentacijo in skladiščenjem se v kefirju vsebnost prostih aminokislin poveča, še posebno vsebnost lizina, cisteina, prolina, izolevcina, fenilalanina in arginina (Farnworth in Mainville, 2003). Nekateri mikroorganizmi, izolirani iz kefirnega zrna, imajo visoko proteolitsko aktivnost, kar poveča možnost, da so v kefirju prisotni tudi bioaktivni peptidi. Dokazano je, da imajo bioaktivni peptidi, ki nastanejo s hidrolizo beljakovin mleka, različne zdravju koristne učinke, kot so stimulacija imunskega sistema, uravnavanje krvnega tlaka in protimikrobna aktivnost (Ogles in Cagindi, 2003; Farnworth, 2005).

Med procesom fermentacije nastane iz laktoze mlečna kislina, kar povzroči padec vrednosti pH, ki se v končnem izdelku giblje med 4,2 in 4,6. Približno 30 % laktoze se pod vplivom delovanja β -galaktozidaze MKB razgradi do glukoze in galaktoze, ki ju nato predvsem MKB fermentirajo do mlečne kisline. Tradicionalni kefir vsebuje med 0,8–1,0 % mlečne kisline, od tega je 40–70 % D-izomere (Farnworth in Mainville, 2003; Generoso in sod., 2005).

Med fermentacijo pod vplivom kvasovk in nekaterih heterofermentativnih mlečnokislinskih bakterij nastajata etanol in CO₂ (Rattray in O'Connell, 2011). Kefir vsebuje približno 1,98 g/l CO₂, kar daje kefirju osvežilen okus in rahlo penečo strukturo. Po drugi strani pa visoke koncentracije CO₂ vodijo v napihovanje embalaže in marsikateri kupec napačno sodi, da je proizvod pokvarjen. Koncentracija etanola, ki se giblje od 0,02 do 0,11 %, je odvisna od števila in vrst prisotnih kvasovk ter od temperature in dolžine fermentacije. Etanol začne v kefirju nastajati proti koncu fermentacije, ko se zniža vrednost pH in zmanjša aktivnost MKB (Özer in Özer, 2000; Farnworth in Mainville, 2003; Sarkar, 2007).

2.1.1 Proizvodnja kefirja

Proizvodnja kefirja poteka s pomočjo mlečnokislinske in alkoholne fermentacije, ki jo omogoča raznovrstna mikrobiota kefirnih zrn, pri čemer nastajajo mlečna, mravljinčna, jantarna, očetna in propionska kislina, etanol, CO₂, acetaldehid, diacetil in acetoin ter druge manjše molekule, ki vplivajo na značilni okus kefirja (Farnworth in Mainville, 2003).

Kefir lahko izdelujemo na več načinov, odvisno predvsem od oblike starterske kulture, ki jo uporabimo. Za izdelavo kefirja lahko kot startersko kulturo uporabimo kefirna zrna ali mešanico tipičnih/prevladujočih predstavnikov mikrobne združbe kefirnega zrna v obliki »starterske kulture mikroorganizmov« (Farnworth in Mainville, 2003; Rattray in O'Connell, 2011). Danes v industriji prevladuje uporaba »mikrobne starterske kulture«, in sicer predvsem zaradi enostavnejše uporabe, cenejšega tehnološkega postopka, možnosti večje proizvodnje in stalnejše kakovosti končnega izdelka (Özer in Özer, 2000). Po mnenju nekaterih raziskovalcev je kefirna zrna pri izdelavi kefirja nemogoče nadomestiti s čisto kulturo, saj predstavljajo edinstveno simbiozo med bakterijami in kvasovkami, ki se je razvijala skozi čas in je nekaj posebnega (Koroleva, 1988). Kefir, izdelan s čistimi kulturami, namreč ne vsebuje vseh mikroorganizmov, ki se nahajajo v tradicionalnih kefirnih zrnih, zato naj bi mu primanjkovalo tudi metabolitov, ki pozitivno vplivajo na njegove organoleptične in zdravilne lastnosti (Özer in Özer, 2000; Rattray in O'Connell, 2011).

2.1.1.1 Tradicionalna izdelava kefirja

Pri tradicionalni izdelavi kefirja predstavljajo startersko kulturo kefirna zrna, ki jih cepijo v toplotno obdelano mleko (2–10 % w/v). Fermentacija običajno poteka 24 ur pri temperaturi od 20 do 25 °C. Po končani fermentaciji kefirna zrna s precejanjem odstranijo iz fermentiranega mleka/kefirja in jih spet uporabijo za izdelavo kefirja (Özer in Özer, 2000).

2.1.1.2 Ruska metoda izdelave kefirja

Opisani tradicionalni način proizvodnje kefirja za množično proizvodnjo ni primeren, saj predstavljajo razmnoževanje, odstranjevanje in vzdrževanje kefirnih zrn ter zagotavljanje stalne kakovosti končnega izdelka pri večjih količinah skoraj nerešljive tehnološke težave (Farnworth in Mainville, 2003; Rattray in O'Connell, 2011). Alternativa tradicionalni izdelavi kefirja je tako imenovana ruska metoda, ki vključuje pripravo matične kulture ter primarno in sekundarno fermentacijo. V prvem koraku se pripravi matično kulturo tako, da se pasteurizirano mleko cepi s kefirnimi zrnji (2–3 % w/v). Fermentacija poteka 24 ur pri temperaturi od 20 do 25 °C. Po končani fermentaciji se kefirna zrna odstrani. V drugem koraku se pasteurizirano mleko cepi z matično kulturo (1–3 % w/v). Primarna fermentacija poteka 12 do 18 ur pri temperaturi od 20 do 25 °C. Po zaključku primarne fermentacije se kefir ohladi na temperaturo 13–15 °C ter napolni v embalažo. Kefir se nato v embalaži postopoma ohladi na 6–8 °C, kjer poteka še sekundarna fermentacija. Zaradi znižane temperature se ustavi delovanje mlečnokislinskih bakterij, delujejo le še kvasovke. Pri tem nastaja CO₂, rahlo pa se poveča tudi vsebnost alkohola (Özer in Özer, 2000).

2.1.1.3 Izdelava kefirja s čistimi starterskimi kulturami

Moderna tehnologija omogoča, da se v proizvodnji kefirja izognemo uporabi kefirnih zrn. Na voljo so liofilizirane starterske kulture, ki vsebujejo mešanico bakterij in kvasovk, ki so jih v preteklosti najpogosteje našli v prevladujoči mikrobioti kefirnih zrn. Komercialno so na voljo starterske kulture z različnimi mešanicami mikroorganizmov, zato se tehnološki postopki, ki jih opisujejo različni avtorji, razlikujejo predvsem po temperaturnem in časovnem režimu fermentacije, ki je prilagojena sestavi starterske kulture, in po tem, ali dodajajo kulturo bakterij in kvasovk istočasno ali z zamikom (Marshall, 1993; Özer in Özer, 2000; Beshkova in sod., 2002). Kadar za proizvodnjo kefirja uporabljajo kulture kvasovk, ki ne fermentirajo laktoze (npr. *Saccharomyces cerevisiae*), dodajo v mleko saharozo, ki omogoči normalen potek fermentacije (Marshall, 1993). Pri proizvodnji kefirja z uporabo čistih starterskih kultur predstavlja največjo težavo vzpostavitev takšnega razmerja med bakterijami in kvasovkami, ki omogoča, da se izdelek s senzoričnimi in hranilnimi lastnostmi čim bolj približa tradicionalnemu kefirju (Özer in Özer, 2000).

2.2 KEFIRNA ZRNA

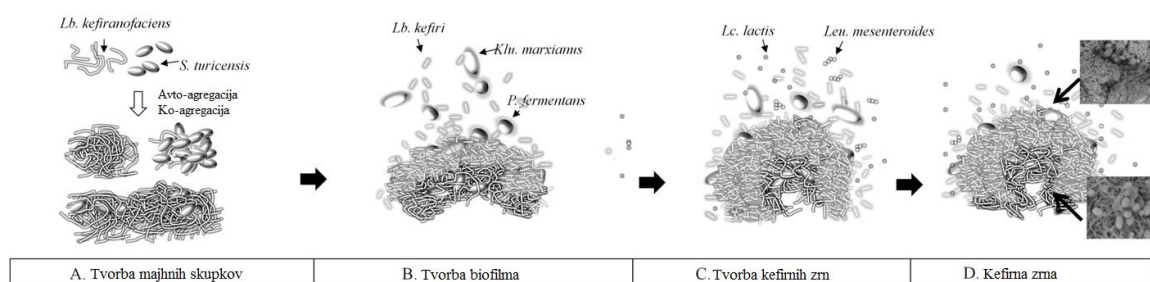
Kefirna zrna so nekoliko elastične želatinaste granule nepravilnih oblik in s hrapavo površino bele ali rumenkaste barve. Zrna so lahko podobna cvetači, lahko so ovalna ali okrogla, velika so od nekaj milimetrov do 2 ali 3 cm. V kefirnih zrnih je okoli 10 % suhe snovi, ki jo večinoma predstavljajo ogljikovi hidrati (56 %) in beljakovine (32 %) (Garrote in sod., 2001; Rattray in O`Connell, 2011).



Slika 1: Kefirna zrna (Rattray in O`Connell, 2011).

Figure 1: Kefir grains (Rattray and O`Connell, 2011).

Nova kefirna zrna nastanejo, kadar se odlomi delec starega zrna in začne spet rasti. Med fermentacijo se velikost in število kefirnih zrn v mleku povečujeta. Izvor in nastanek kefirnih zrn še danes nista povsem znana. Ena od teorij pravi, da so kefirna zrna nastala med fermentacijo mleka v vrečah iz kozje kože, ki naj bi jo sprožile naravna mikrobiota mleka in črevesne bakterije, prisotne na kozji koži. Po 48 urah fermentacije pri temperaturi 24–26 °C so odlili 75 % vsebine in dolili sveže mleko. Ta proces naj bi ponavljali 12 tednov, kar naj bi povzročilo oblikovanje plasti mikroorganizmov, ujetih v proteinsko polisaharidni matriks, ter tvorbo kefirnih zrn (Rattray in O`Connell, 2011). Rezultati raziskav, ki so jih opravili Wang in sod. (2012), nakazujejo, da sta za tvorbo kefirnih zrn pomembna dva laktobacila, *Lb. kefiranofaciens* in *Lb. kefiri*, ter kvasovka *Saccharomyces turicensis*. Avtorji sklepajo, da se tvorba kefirnih zrn prične z združevanjem laktobacilov vrste *Lb. kefiranofaciens* in kvasovk vrste *S. turicensis* v majhne skupke, ki jih *Lb. kefiri* nato skupaj z ostalimi mikroorganizmi in sestavinami mleka poveže v biofilm, ki je osnova tvorbe kefirnih zrn (Slika 2).



Slika 2: Shematični prikaz tvorbe kefirnih zrn (Wang in sod., 2012).

Figure 2: The schematic model of kefir grain formation (Wang et al., 2012).

2.2.1 Mikrobiota kefirnih zrn

Mikrobna združba kefirnega zrna, ki predstavlja simbiotski sistem mlečnokislinskih in oetnokislinskih bakterij in kvasovk, je ujeta v polisaharidni matriks, imenovan kefiran (Garrote in sod., 2010). Najpogosteje osamljene MKB iz kefirnih zrn so laktokoki, homofermentativni in heterofermentativni laktobacili ter bakterijske vrste rodu *Leuconostoc*. Deleži posameznih mikroorganizmov se v kefirnih zrnih razlikujejo. Na splošno predstavljajo laktobacili 65–80 % mikrobne populacije, kvasovke 10–15 %, ostalih 5–25 % pa predstavljajo laktokoki, leukonostoki in oetnokislinske bakterije. V kefirnih zrnih naj bi bilo med 10^8 – 10^9 KE/g laktobacilov, 10^8 – 10^9 KE/g laktokokov vrste *Leuconostoc* ter 10^6 – 10^8 KE/g kvasovk (Garrote in sod., 2001; Rattray in O'Connell, 2011).

Glavno težavo pri proučevanju mikrobiote kefirnega zrna predstavlja nestanovitna mikrobna populacija z raznolikim naborom mikroorganizmov, katerih razmerje in število sta odvisna od izvora kefirnih zrn, okoljskih pogojev, načina kultivacije in substrata, ki ga uporabljamo za kultivacijo (variabilna sestava mleka) (Witthuhn in sod., 2005). Poleg tega na rezultat mikrobiološke analize vpliva tudi izbrana metoda za osamitev in identifikacijo mikroorganizmov. Vrsto let so mikrobioto kefirnih zrn raziskovali s klasičnimi metodami, ki vključujejo osamitev in gojenje bakterij na ustreznih selektivnih gojiščih ter identifikacijo na osnovi morfoloških in biokemijskih lastnosti. Klasične metode so dolgotrajne, poleg tega pa z njimi ne moremo identificirati vseh mikroorganizmov, ki so prisotni v kefirnem zrnju, saj je nekatere vrste mikroorganizmov težko oziroma nemogoče

gojiti v sestavljenih gojiščih. Poleg tega predstavlja problem tudi razlikovanje sevov iste vrste (Jianzhong in sod., 2009; Garrote in sod., 2010). Zato so se v zadnjih letih uveljavile številne molekularne metode, ki so neodvisne od gojenja. Med njimi je za študij kompleksnih mikrobnih združb, kakršno najdemo v kefirnem zrnju, zelo primerna poliakrilamidna gelska elektroforeza v denaturirajočem gradientu (DGGE) (Garbers in sod., 2004; Jianzhong in sod., 2009).

Preglednica 2: Najpogosteje osamljene bakterije in kvasovke iz kefirnih zrn (Marshall, 1993).

Table 2: The most common bacteria and yeasts isolated from kefir grains (Marshall, 1993).

Laktobacili	Laktokoki in <i>Leuconostoc</i> spp.	Kvasovke	Drugo
	Homofermentativni	Laktozo fermentirajoče	<i>Acetobacter aceti</i>
<i>Lb. acidophilus</i>	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i> (t)/ <i>C. kefir</i> (a)	<i>A. rasens</i>
<i>Lb. kefiranofaciens</i>	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	<i>Kl. lactis</i> var. <i>lactis</i>	<i>Streptococcus</i> <i>thermophilus</i>
<i>Lb. kefirgranum</i>		Laktozo nefermentirajoče	
<i>Lb. helveticus</i>		<i>Saccharomyces unisporus</i>	
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>		<i>S. turicensis</i>	
		<i>S. cerevisiae</i>	
	Heterofermentativni	<i>S. exiguus</i>	
<i>Lb. kefir</i>	<i>Lc. lactis</i>	<i>S. pastorianus</i>	
<i>Lb. parakefiri</i>	<i>Leu. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	<i>Pichia fermentas</i> (t)/ <i>C.</i> <i>firmetaria</i> (a)	
<i>Lb. brevis</i>	<i>Leu. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	
<i>Lb. plantarum</i>		<i>Candida friedrichii</i>	
<i>Lb. casei</i>		<i>C. humilis</i>	
<i>Lb. paracesei</i>		<i>C. maris</i>	
<i>Lb. fermentum</i>			
<i>Lb. rhamnosus</i>		<i>Kazachstania exigua</i>	
<i>Lb. hilgardii</i>		<i>K. unispora</i>	

(t): teleomorf (spolni stadij); (a): anamorf (nespolni stadij).

V preglednici 2, ki prikazuje pestrost mikrobne populacije kefirnih zrn, so zbrani podatki različnih avtorjev (Angulo in sod., 1993; Marshall, 1993; Takizawa in sod., 1998; Garrote in sod., 2001; Simova in sod., 2002; Jianzhong in sod., 2009; Da Cruz Pedrozo Miguel in sod., 2010; Magalhães in sod., 2011; Rattray in O`Connell, 2011; Leite in sod., 2012; Londero in sod., 2012). V raziskavi, ki sta jo opravila Wood in Hodge (1985), so v proučevanih kefirnih zrnih laktobacili predstavljali večino mikrobiote kefirnih zrn, kar 90 % izoliranih laktobacilov pa je bilo homofermentativnih. Preostalih 10 % laktobacilov v zrnih je pripadalo heterofermentativni vrsti *Lb. kefiri*.

Ocetnokislinske bakterije imajo v kefirnih zrnih pomembno vlogo pri ohranjanju simbioze mikrobiote kefirnih zrn, poleg tega pa z zviševanjem viskoznosti izboljšujejo konsistenco kefirja. Te bakterije nepopolno oksidirajo alkohole in sladkorje do organskih kislin (Madigan in sod., 2000).

Pri oblikovanju okusa in arome kefirja imajo ključno vlogo kvasovke (Simova in sod., 2002; Jianzhong in sod., 2009). Kvasovke, ki fermentirajo laktozo, prevladujejo na površju kefirnih zrn, laktozo nefermentirajoče kvasovke pa se nahajajo v centru kefirnih zrn. Laktozo nefermentirajoče kvasovke predstavljajo večinski delež kvasovk v kefirnem zrnju. Kvasovke fermentirajo le majhen delež laktoze, zato njihova fermentacija laktoze ni bistvena za padec vrednosti pH in koagulacijo mleka (Angulo in sod., 1993; Rattray in O`Connell, 2011).

Mikrobiota kefirnih zrn je izredno stabilna. Če zrna pravilno vzdržujemo oziroma shranjujemo, lahko ohranijo svojo aktivnost skozi leta (Simova in sod., 2002). Rast in preživetje posameznih vrst mikroorganizmov v kefirnih zrnih sta odvisna od simbiotskega odnosa med mikroorganizmi. Nekatere vrste mikroorganizmov v čisti kulturi namreč pogosto ne rastejo ali pa je njihova biokemijska aktivnost omejena. Viljoen (2001) navaja, da se rast številnih bakterij, osamljenih iz kefirnih zrn, izboljša, če je v gojišče dodan kvasni ekstrakt. To kaže na to, da imajo kvasovke v kefirnih zrnih pomembno vlogo pri ohranjanju integritete in živosti ostalih mikroorganizmov. Kvasovke in ocetnokislinske bakterije spodbujajo rast MKB z delno razgradnjo beljakovin, tvorbo vitaminov in drugih rastnih faktorjev, kakor tudi z izkoriščanjem mlečne kisline kot vira energije. Po drugi strani pa tudi MKB s končnimi presnovnimi produkti kvasovkam in ocetnokislinskim

bakterijam zagotavljajo vir energije. Ocetnokislinske bakterije in kvasovke, ki ne fermentirajo laktoze, lahko rastejo v mleku le ob prisotnosti MKB, ki laktozo razgrajujejo do glukoze in galaktoze. Poleg tega lahko prisotnost nekaterih homofermentativnih laktobacilov delno inhibira razvoj kvasovk, kar povzroča postopno in počasno nastajanje alkohola (Ratray in O`Connell, 2011).

Svetlobna in elektronska mikroskopija sta pokazali, da je razporeditev mikroorganizmov v kefirnem zrnju nesimetrična, pri čemer različni mikroorganizmi niso naključno pomešani med seboj, temveč sledijo določenemu vzorcu. V centru kefirnega zrna prevladujejo kvasovke, poleg njih najdemo tudi nekaj bakterij. Površina zrna je prekrita s kompaktnim slojem paličastih bakterij in ovalnih kvasovk. Dolgo časa je veljalo, da je na zunanji strani kefirnega zrna prisotna samo bakterijska populacija, medtem ko naj bi v notranjosti kefirnega zrna prevladovala kvasovke. Natančnejši pregled kefirnega zrna z elektronskim mikroskopom pa je pokazal, da so kvasovke prisotne tudi na zunanjem delu kefirnega zrna (Wood in Hodge, 1985; Cheirsilp in sod., 2003; Witthuhn in sod., 2005; Lopitz-Otsoa in sod., 2006).

2.3 BAKTERIJSKI EKSOPOLISAHARIDI

Eksopolisaharidi (EPS) so polisaharidi, ki jih proizvajajo mnogi organizmi, kot so bakterije, alge, glive in rastline, in so v naravi zelo razširjeni. Bakterijski EPS so produkti bakterij; sestavljeni so iz različnih monosaharidov, ki so rahlo vezani na celično steno (kapsularni polisaharidi) ali pa jih bakterije izločajo v okolje kot sluz. Fiziološka funkcija tvorbe EPS še ni natančno znana, najverjetneje pa EPS predstavljajo zaščito mikrobnih celic in bakterijam omogočajo pripenjanje na različne površine in oblikovaje biofilmov. Bakterijske EPS uporabljajo v kozmetični, farmacevtski, prehranski in kemijski industriji (Badel in sod., 2011).

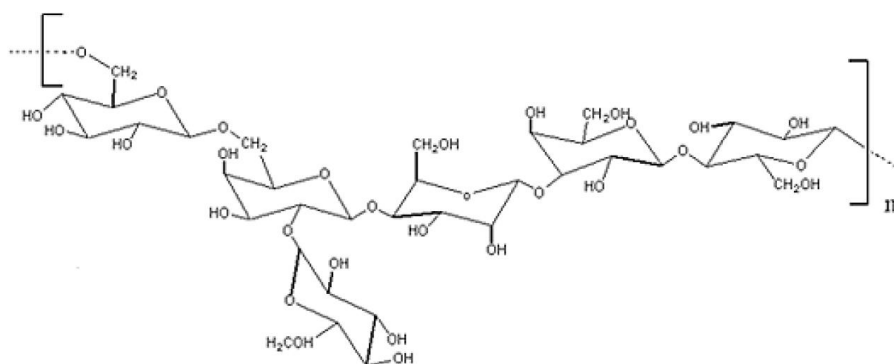
EPS, ki jih izločajo MKB, so zelo razširjeni predvsem v prehranski industriji, saj MKB veljajo za varne bakterije (GRAS – *generally recognized as safe*). Pomembni so za izboljšanje reologije in teksture fermentiranih mlečnih izdelkov, poleg tega delujejo kot stabilizatorji (Badel in sod., 2011). Uporabljajo se kot zgoščevalci, stabilizatorji, emulgatorji, želirne snovi in snovi za vezavo vode. MKB sintetizirajo številne EPS z

različno sestavo in strukturo, za vse pa je značilna visoka molekulska masa. Najbolj znani so dekstran, ksantan, gelan, pulan in glukan. Delimo jih na homopolisaharide in heteropolisaharide. Homopolisaharidi vsebujejo samo en tip/vrsto monosaharida, medtem ko heteropolisaharidi vsebujejo ponavljajoče se različne vrste monosaharidov, lahko pa vsebujejo tudi nesladkorne komponente (De Vuyst in Degeest, 1999).

2.3.1 Kefiran

Eden takih EPS je tudi kefiran, vodotopni glukogalakatan, sestavljen iz razvejanih verig D-glukoze in D-galaktoze (Slika 3). Deleža glukoze in galaktoze sta skoraj enaka in običajno v razmerju $r = 1,00:1,05$ (Rimada in Abraham, 2001; Rattray in O'Connell, 2011). Kemijsko strukturo kefirana je pred več kot štiridesetimi leti prvi pojasnil Kooiman (1968). Kefiran je dobil ime po kefirju, saj spontano nastaja v kefirnem zrnju. Po podatkih Michelija in sod. (1999) naj bi kefiran predstavljal vsaj 24 % suhe mase kefirnega zrna. Kefiran je morda najpomembnejši metabolit v kefirju, saj deluje kot lepilo in varuje kefirno zrno pred poškodbami (Farnworth in Mainville, 2003; Wang in Bi, 2008).

Kljub deljenim mnenjem raziskovalcev o tem, katere bakterije v kefirnem zrnju so odgovorne za proizvodnjo kefirana, kaže, da je glavni proizvajalec eksopolisaharidnega matriksa v kefirnem zrnju *Lb. kefiranofaciens* (Toba in sod. 1986; Rea in sod., 1996; Wang in Bi, 2008), ki je nepatogena gramsko pozitivna homofermentativna MKB (Vancanneyt in sod., 2004). Poleg vrste *Lb. kefiranofaciens* naj bi kefiran tvorile tudi druge vrste laktobacilov, kot so *Lb. brevis* (La Rivere in sod., 1967), *Lb. kefir* (Kandler in Kunath, 1983) in *Lb. parakefir* (Takizawa in sod., 1994). Zaradi velike variabilnosti v sestavi in velikosti mikrobne populacije kefirnega zrna, h kateri prispeva tudi geografski izvor zrn (Wang in Bi, 2008), je ta še vedno slabo poznana, očitno pa lokalno specifična. Nekateri avtorji (Cheirsilp in sod., 2003; Tada in sod., 2007) so odkrili, da *Lb. kefiranofaciens* v mešani kulturi s kvasovko *S. cerevisiae* tvori večje količine kefirana. Po njihovem mnenju naj bi laktobacile pri tvorbi kefirana stimuliral etanol, CO₂ ter druge neznane komponente. Ker so določene kvasovke sposobne izkoriščati mlečno kislino, ki v večjih količinah zaviralno deluje na bakterije, je to lahko eden od dejavnikov, ki prispeva k boljši rasti vrste *Lb. kefiranofaciens* in proizvodnji kefirana. Kljub znanim teoretičnim izhodiščem mehanizem nastajanja kefirana v mešanih kulturah še ni jasen.

Slika 3: **Kemijska struktura kefirana (Badel in sod., 2011).**Figure 3: **Chemical structure of kefiran (Badel et al., 2011).**

Količina kefirana, ki ga kefirna zrna/mikrobiota tvorijo v mleku oziroma ga MKB proizvajajo v gojišču, je dokaj nizka. Liu in sod. (2002) navajajo, da na proizvodnjo in sestavo EPS pri MKB močno vlivajo rastni pogoji, kot so temperatura, sestava gojišča, čas inkubacije in vir ogljika, kar odpira možnosti razvoja učinkovitejših postopkov pridobivanja kefirana. Kefiran je zanimiv zaradi raznolikih možnosti uporabe v prehranski, farmacevtski, kozmetični in kemijski industriji (Micheli in sod., 1999; Wang in Bi, 2008).

2.3.1.1 Zdravilni učinki kefirana

Kefiranu pripisujejo številne zdravilne učinke. Študije so potrdile protimikrobne, protimikotične, protitumorske in protivnetne lastnosti kefirana. Učinki kefirana so močno povezani z njegovo strukturo, ki preprečuje učinkovito encimsko razgradnjo. Tako nekateri encimi, kot so α -amilaza, galaktaza in zimoliza-20T, ne hidrolizirajo kefirana. Ob daljši inkubaciji ga lahko razgradi le celulaza. Ta lastnost je pomembna tako s tehnološkega kot s terapevtskega vidika, saj stabilnost polisaharida po eni strani pomeni ohranitev kefirnih zrn med procesom fermentacije, po drugi strani pa uspešen prehod do črevesja, kjer deluje kot prebiotik. Sposobnost vezave vode in viskoznost vplivata tudi na spremembe tranzitnega časa skozi črevesje (Maeda in sod., 2004a).

Različne študije kažejo, da ima kefiran lahko zaščitno vlogo pri številnih boleznih, vključno s preprečevanjem metabolnega sindroma. Rezultati raziskav fizioloških učinkov

kefirana, ki so jih opravili Maeda in sod. (2004a, 2004b), kažejo, da kefiran preprečuje nastanjanje nekaterih najpogostejših bolezni, kot so povišan holesterol, povišan krvni tlak in sladkorna bolezen; kefir so tako označili kot funkcionalno živilo. Študije, v katerih so živali uživale kefirana, so pokazale, da ima kefirana hipoglikemijski učinek (znižuje raven glukoze v krvi). Miši, ki so uživale kefirana, so imele v primerjavi s kontrolno skupino statistično značilno manj glukoze v krvi. Poleg tega so imele te miši ob koncu poskusa v primerjavi s prvim dnevom v krvi manj glukoze (Maeda in sod., 2004b). Dokazali so tudi, da so imele podgane s povišanim krvnim tlakom, ki so bile krmljene s krmo z dodatkom kefirana, v primerjavi s kontrolno skupino statistično značilno nižji krvni tlak (Maeda in sod., 2004a). Skopi podatki v literaturi kažejo, da kefirana niža tudi raven holesterola v serumu. Maeda in sod. (2004a) so dokazali, da se je raven lipidov in trigliceridov v serumu in jetrih podgan, ki so uživale kefirana, statistično značilno znižala. Presnovne in morfološke spremembe pri podganah kažejo, da lahko kefirana vpliva na presnovo maščob, vendar pa mehanizem ni bil pojasnjen. Ena od možnih razlag je, da kefirana deluje kot prebiotik. V debelem črevesu kefirana predstavlja hrano za bifidobakterije in laktobacile, kar lahko vpliva na sestavo in metabolne značilnosti črevesne mikrobiote. Znano je, da so nekateri laktobacili sposobni vezave holesterola in žolčnih kislin in tako znižujejo raven holesterola. Poleg tega lahko encimi, ki jih sintetizirajo laktobacili, pretvorijo žolčne kisline v dekonjugirano obliko. Konjugirana oblika žolčnih kislin se absorbira nazaj v telo, medtem ko se absorpcija dekonjugirane oblike žolčnih kislin zmanjša, posledično pa se zmanjša tudi raven holesterola v krvi (Xiao in sod., 2003; Ho in sod., 2003).

Nekaj raziskav je dokazalo, da kefirana deluje tudi kot antioksidant (Deeseenthum in Pejovic, 2010; Teruya in sod., 2002). Uchida in sod. (2010) so proučevali vpliv kefirana na razvoj ateroskleroze pri kuncih. Kunci, ki so poleg krme uživali še kefirana, so imeli v primerjavi s kontrolno skupino manj poškodb na stenah žil. To pripisujejo nižji lipidni peroksidaciji, ki je posledica uživanja kefirana. Literatura tudi navaja, da naj bi uživanje prebiotikov preprečevalo oksidacijski stres in zviševalo koncentracijo antioksidantov v plazmi. *In vitro* študije kažejo, da fermentacija oligosaharidov z bifidobakterijami vpliva na zniževanje koncentracije prostih radikalov. Ravno lipidi pa so najbolj podvrženi delovanju prostih radikalov, kar vodi do kompleksnih kemičnih sprememb. Lipidni

peroksidi so toksični in sposobni poškodovati večino telesnih celic, poleg tega pa imajo bistveno vlogo pri razvoju ateroskleroze (Wang in Bi., 2008; Yen in sod., 2011).

Uživanje kefirana ali zmerno uživanje kefirnih zrn lahko pripomore k uravnavanju imunskega sistema organizma. Raziskave na miših in podganah so pokazale, da ima kefiran protitumorske lastnosti. Pri miših, ki so uživale kefirana, se je sprožil specifičen imunski odziv, kar je povzročilo zmanjšanje velikosti tumorjev (Micheli in sod., 1999; Murofushi in sod., 1983). Shiomi in sod. (1982) so pri poskusu na miših proučevali vpliv polisaharida, izoliranega iz kefirnih zrn, na Erlichov karcinom. Miši so prejemale polisaharid raztopljen v vodi, in sicer sedem dni pred injiciranjem rakavih celic ali na dan injiciranja, nato pa še 24 dni. Izkazalo se je, da se je rast tumorjev zmanjšala, ne glede na to, ali so miši prejele polisaharid pred začetkom injiciranja tumorskih celic ali sočasno z njimi. Murofushi in sod. 1983 poročajo o protitumorskem delovanju kefirana glede na čas zdravljenja. Ugotovili so, da so večji odmerki učinkovitejši po injiciranju tumorja. Dokazano je bilo tudi, da oralno uživanje kefirana pred injiciranjem tumorja ali po njem zavira pljučne metastaze Lewisovega karcinoma. Furukawa in sod. (2000) so proučevali protimetastatski vpliv vodotopnega in nevodotopnega dela polisaharida iz kefirnih zrn na pljučnega raka in melanom B16 pri miših. Vodotopna frakcija polisaharida je zavrla razvoj pljučnega raka, medtem ko je nevodotopni del polisaharida zavrl metastazo melanoma B16. Sklepajo tudi, da kefirana zatire tumorsko rast s pomočjo limfokinsko aktiviranih makrofagov, in sicer preko limfnih tkiv v črevesju.

Rodrigues in sod. (2005) so v svoji študiji z difuzijsko metodo v agarju dokazovali protimikrobno delovanje kefirana proti več bakterijskim vrstam in kvasovki vrste *Candida albicans*. Rezultati so pokazali, da je kefirana deloval protimikrobno proti vsem testiranim vrstam. Največjo protimikrobno aktivnost je imel proti *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* in *Streptococcus salivarius*, najmanjšo pa proti *Escherichia coli* in *Pseudomonas aeruginosa*.

2.4 METABOLNI SINDROM IN HOLESTEROL

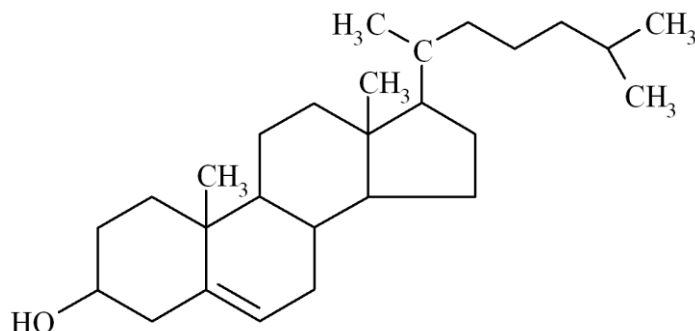
Metabolni sindrom, imenovan tudi »sindrom inzulinske rezistence« ali »sindrom X«, opisuje skupino različnih metabolnih stanj oziroma sprememb. Značilne indikacije metabolnega sindroma so povišana raven glukoze v krvi, inzulinska rezistenca, trebušna zamaščenost, dislipidemija in povišan krvni tlak. Omenjene motnje, h katerim v veliki meri prispeva prekomerna telesna teža (debelost), povečujejo tveganja za nastanek srčno-žilnih bolezni (SŽB) in sladkorne bolezni tipa II.

Eden od osnovnih vzrokov za nastanek debelosti in metabolnega sindroma je neustrezna prehrana (Blaton in sod., 2008). Vsakodnevno uživanje hrane z visoko vsebnostjo holesterola vpliva na povišano koncentracijo plazemskega holesterola. Na povečano koncentracijo skupnega holesterola in LDL holesterola vpliva tudi uživanje velike količine nasičenih maščobnih kislin in pomanjkanje tiroidnih hormonov in inzulina (Guyton in Hall, 2006). Inzulin v adipoznem tkivu stimulira transport glukoze v celice, te pa jo shranjujejo v obliki trigliceridov (TG). Pomanjkanje inzulina povzroči hidrolizo shranjenih TG, kar zviša koncentracijo prostih maščobnih kislin v krvni plazmi. Po mnenju Blatona in sod. (2008) imajo proste maščobne kisline pomembno vlogo pri razvoju metabolnega sindroma. V jetrih se proste maščobne kisline pretvorijo nazaj v TG; to naj bi pojasnilo povezavo med hipertrigliceridemijo in metabolnim sindromom. Ljudje z metabonim sindromom imajo pogosto povišano koncentracijo TG, znižano koncentracijo HDL in zvišano koncentracijo LDL. Zvišani TG so povezani z zvišanjem tveganja za SŽB predvsem v kombinaciji z znižano ravni HDL holesterola (De Backer in sod., 2003).

2.4.1 Holesterol

Holesterol ima v organizmu več pomembnih funkcij. Je pomembna komponenta celičnih membran (uravnava fluidnost), poleg tega pa je tudi izhodna molekula večjega števila pomembnih bioloških snovi, kot so steroidni hormoni, žolčne kisline in vitamin D (Arnold in Kwiterovich, 2003). Čeprav je holesterol potreben za normalno celično rast in razvoj, je potencialno nevarna molekula. Povišana koncentracija holesterola v plazmi je eden pomembnejših dejavnikov tveganja za nastanek ateroskleroze in SŽB. Do zdravstvenih

težav pride zaradi neučinkovitega prenosa in drugih motenj v metabolizmu (Libby in sod., 2002).



Slika 4: **Kemijska struktura holesterola (Arnold in Kwiterovich, 2003).**

Figure 4: **Chemical structure of cholesterol (Arnold and Kwiterovich, 2003).**

Holesterol uvrščamo v skupino sterolov s polarno hidroksilno (-OH) skupino. Je nenasičen policiklični alkohol s kemijsko formulo $C_{27}H_{45}OH$ in molekulska masa 386,7 g/mol (Sheppard in sod., 1993). Zaradi lipidnega značaja ga uvrščamo k lipidom, čeprav se strukturno precej razlikuje od njih.

2.4.1.1 Metabolizem holesterola

Holesterol se lahko sintetizira v celicah (endogeni holesterol), lahko pa ga zaužijemo s hrano (eksogeni holesterol). Glavni del sinteze endogenega holesterola poteka v jetrih, in sicer v endoplazmatskem retikulumu. Sinteza holesterola je regulirana z vnosom eksogenega holesterola. Holesterol, ki ga zaužijemo s hrano, namreč zmanjša aktivnost 3-hidroksi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) reduktaze, glavnega encima pri sintezi endogenega holesterola. Sinteza holesterola je regulirana še s sekrecijo holesterola iz plazemskih lipoproteinov s pretvorbo holesterola v žolčne soli in z novim kroženjem holesterola iz črevesja v jetra (Maxfield in Wüstner, 2002).

Jetra niso vključena samo v sintezo holesterola, temveč tudi v predelavo holesterola in ostalih lipidov, ki se absorbirajo z živili. Holesterol in njegovi metaboliti se izločajo v obliki žolčnih soli v črevesje, kjer se deloma resorbirajo nazaj v kri in preko enterohepatičnega kroženja potujejo do jeter. Žolčne soli so edina oblika steroidov, ki se

izločajo iz telesa, zato imajo klinični pomen pri zvišani koncentraciji holesterola (Arnold in Kwiterovich, 2003).

2.4.1.2 Transport holesterola po krvi

Holesterol je hidrofobna molekula, zato se v plazmi prenaša z lipoproteini, ki so sestavljeni iz lipidnega dela (triacilgliceroli, holesterol, holesterolni estri, fosfolipidi) in proteinskega dela (apolipoproteini). Lipoproteine delimo glede na njihovo gostoto, ta je v obratnem sorazmerju z njihovo velikostjo, na lipoproteine najmanjše gostote (hilomikroni), zelo majhne gostote (VLDL), majhne gostote (LDL) in velike gostote (HDL) (Arnold in Kwiterovich, 2003; Voet in Voet, 1995).

Hilomikroni so lipoproteini z najmanjšo gostoto, sestavljeni so iz 80–95 % triacilglicerolov, 2–7 % holesterola, 3–6 % fosfolipidov in 1–2 % beljakovin. Nastanejo v celicah stene tankega črevesja, se nato absorbirajo in preko limfe izločijo v kri, po kateri se prenesejo do perifernih tkiv. Tam encim lipoprotein-lipaza sprosti maščobne kisline iz triacilglicerolov. Lipoprotein tako izgubi večino trigliceridov in postane hilomikronski ostanek, bogat s holesterolom.

VLDL (lipoproteini zelo majhne gostote) nastanejo v jetrih in so sestavljeni iz 55–65 % triacilglicerolov, 10–15 % holesterola, 15–20 % fosfolipidov in 5–10 % beljakovin. Na VLDL so vezani apoproteini Apo B 100, CII, CIII in E. Ti prenašajo endogeno nastalo maščobo iz jeter do maščevja in drugih perifernih tkiv, kjer se skladiščijo in uporabijo kot vir energije.

LDL (lipoproteini majhne gostote) nastanejo z razpadom VLDL in so sestavljeni iz 10 % triacilglicerolov, 45 % holesterola, 22 % fosfolipidov in 45–50 % beljakovin. Na LDL so vezani apoproteini Apo B 100. LDL je glavni prenašalec holesterola in njegovih estrov, ki se sintetizirajo v jetrih, do perifernih tkiv. LDL holesterol ima največji vpliv na razvoj ateroskleroze in SŽB, še posebej njegova podvrsta majhni gosti LDL holesterol (sdLDL). Ker je tako majhen, lahko prestopi v žilno steno, ob oksidaciji pa se iz nje ne more več izločiti, kar postopno vodi do razvoja SŽB (Libby in sod., 2002).

HDL (lipoproteinski delci velike gostote) so sestavljeni iz 22 % holesterola, 30 % fosfolipidov in 45–50 % beljakovin. Glavna naloga HDL je prenos presežka holesterola iz perifernih tkiv v jetra, ki so edini organ, ki je sposoben izločati večje količine holesterola iz telesa. Poleg tega HDL holesterol v telesu zavira vnetja in preprečuje oksidacijo LDL holesterola. HDL holesterol predstavlja zaščito krvnih žil pred aterosklerotičnimi procesi. Velika koncentracija HDL holesterola je v obratnem sorazmerju s pojavom koronarnih obolenj (Blaton in sod., 2008).

2.4.2 Povezava med matabolnim sindromom in dislipidemijo

Dislipidemija je sestavni del metabolnega sindroma in pomeni povišan skupni holesterol, povišan LDL holesterol, povišane TG in znižan HDL holesterol oziroma kombinacijo teh parametrov. Spremembe metabolizma lipoproteinov se ponavadi pojavijo sočasno in predstavljajo ključni del metabolnega sindroma. Visoka raven skupnega in LDL holesterola ter nizka raven HDL holesterola so pomembni dejavniki tveganja za aterosklerozo in posledično za SŽB. Tveganje za SŽB pada premosorazmerno z ravnijo LDL in skupnega holesterola. 10 % znižanje LDL holesterola oziroma skupnega holesterola zmanjša nevarnost nastanka SŽB za 25 % oziroma 38 % (De Backer in sod., 2003).

Celice prevzamejo holesterol in njegove estre z receptorsko posredovano endocitozo LDL. Če je prevzem holesterola v celice blokiran, se holesterol kopiči v krvi, kar povzroči zožitev arterij oziroma aterosklerozo (Brown in Goldstein, 1985). Okvara v genetskem zapisu za komponente, potrebne pri prenosu in prevzemu holesterola, je eden glavnih razlogov za hiperholesterolemijo.

Na povišano raven skupnega holesterola in LDL holesterola ter na znižanje HDL holesterola v krvi vpliva dolgotrajen vnos sladkorjev, uživanje velikih količin nasičenih maščobnih kislin in trans maščobnih kislin z neustrezno prehrano (Guyton in Hall, 2006). Vsakodnevno uživanje hrane z visoko vsebnostjo holesterola vpliva na povišanje koncentracij plazemskega holesterola za 10–15 % (Arnold in Kwiterovich, 2003). Dodatno pa lahko stanje poslabšajo še telesna neaktivnost, hormonsko neravnovesje, oksidacijski stres in genske motnje. Zakaj nasičene maščobne kisline vplivajo na povišanje LDL

holesterola, še ni povsem jasno, predvidevajo pa, da pride do okvare ekspresije receptorjev LDL (Grundy, 2003). Poleg tega na povečanje koncentracije skupnega holesterola in LDL holesterola vpliva še pomanjkanje tiroidnih hormonov in inzulina. Po drugi strani pa naj bi uživanje nenasičenih maščobnih kislin zniževalo raven skupnega holesterola in LDL holesterola (Guyton in Hall, 2006). Eden najpomembnejših dejavnikov, ki uravnavajo raven holesterola, je razmerje med zaužitimi nenasičenimi in nasičenimi maščobnimi kislinami. Nasičena palmitinska maščobna kislina zavira receptorje za celični privzem LDL, kar zvišuje koncentracijo LDL holesterola v krvi, medtem ko nenasičena oleinska kislina znižuje LDL holesterol (De Backer in sod., 2003).

2.4.2.1 Zdravljenje dislipidemije

Ateroskleroza je glavni vzrok smrti v razvitem svetu. Pogostost ateroskleroze in drugih bolezni srca in ožilja je v pozitivni povezavi z ravniho holesterola in lipoproteinov v krvi. Poleg jasnih smernic za zdrav način življenja je prvi korak pri zdravljenju zniževanje LDL holesterola. Za zdravljenje uporabljajo statine, fibrate in adsorbente žolčnih kislin. Izkazalo se je, da so pri zdravljenju najučinkovitejši statini, saj poleg skupnega in LDL holesterola zmerno uravnavajo tudi raven HDL holesterola in trigliceridov. Statini imajo daleč najbolj raziskane klinične učinke in veljajo kot »zdravilo izbora«, saj je pri preventivi proti SŽB najpomembnejše znižanje LDL holesterola (De Backer in sod., 2003). Način delovanja statinov je dobro poznan. So močni kompetitivni inhibitorji HMG-CoA reduktaze, encima, ki katalizira reakcijo, ki odloča o hitrosti sinteze holesterola *in vivo* (Sudha in sod., 2009).

Zaradi visokih stroškov zdravljenja ter stranskih učinkov zdravil pa so v zadnjem času za zdravljenje hiperholesterolemije vedno bolj zanimive alternativne terapije. V preteklih letih so zato opravili številne raziskave, ki so bile usmerjene v proučevanje koristnih učinkov probiotičnih bakterij in prebiotikov ter njihovega potenciala pri preprečevanju in zdravljenju tovrstnih motenj. Večji potencial pri uravnavanju ravni holesterola imajo mikroorganizmi, ki so naravno prisotni oziroma imajo sposobnost preživetja v prebavilih, saj je tanko črevo glavno mesto absorpcije holesterola (Sudha in sod., 2009). Že leta 1985 so Anderson in sod. (citirano po Sudha in sod., 2009) poročali o tem, da uživanje laktobacilov vrste *Lb. acidophilus* znižuje raven holesterola v krvi z direktno razgradnjo holesterola in dekonjugacijo žolčnih soli. Tudi raziskava, ki so jo opravili Noh in sod.

(1997), je pokazala, da lahko sev *Lb. acidophilus* ATTC 43121 med rastjo v svojo membrano vgradi holesterol iz gojišča, kar posledično vpliva na raven holesterola. Holesterol, ki je vezan v/na celico, se tako izloči iz telesa. Za razliko od ostalih študij, ki so se osredotočile predvsem na žive celice, pa Kim in sod. (2008) poročajo o tem, da imajo sposobnost zniževanja ravni holesterola v gojišču tudi proteini, pridobljeni iz gojišča, v katerem so predhodno gojili sev *Lb. acidophilus* ATTC 43121. Rezultati raziskave, ki so jo opravili Nguyen in sod. (2007), kažejo, da ima potencial pri zniževanju holesterola tudi *Lb. plantarum*. Hiperholesterolnim miškam, ki so jim 14 dni v krmo dodajali sev *Lb. plantarum* PH04, se je v primerjavi s kontrolno skupino raven holesterola in trigliceridov v serumu zmanjšala za 7 do 10 %. Potencial pri uravnavanju holesterola pripisujejo še sevom laktobacilov vrst *Lb. casei* (Liong in Shah, 2006), *Lb. bulgaricus* (Beena in Prasad, 1997) in *Lb. reuteri* (Taranto in sod., 2000).

2.5 OKSIDACIJSKI STRES

Prosti radikali so atomi, molekule, ioni ali kompleksi, ki imajo neparno število elektronov. So zelo reaktivni in posledično tudi nestabilni. Zaradi omenjenih lastnosti hitro reagirajo z drugimi molekulami oziroma spojinami. Tovrstne reakcije potekajo nenadzorovano, mimo encimskih sistemov in so škodljive za celico. Prosti radikali v telesu nastajajo neprestano, in sicer kot produkti nepopolnega celičnega dihanja pri normalni celični presnovi. Organizem jih proizvaja tudi namerno, na primer za zaščito pred mikroorganizmi. Pomembni so pri procesih celičnega signaliziranja in pri regulaciji celične apoptoze. Veliko prostih radikalov lahko nastane tudi zaradi uživanja različnih snovi (zdravil, alkohola, konzervansov, umetnih barvil, aflatoksinov, analgetikov, anestetikov) ali zaradi izpostavljenosti UV in gama žarkom.

Prosti radikali sami po sebi ne povzročajo težav, pač pa težave povzročajo neravnovesje med njimi in antioksidanti. O oksidacijskem stresu torej govorimo, kadar pride do porušenega ravnotežja med prostimi radikali in antioksidanti, ki skrbijo za pretvorbo prostih radikalov v stabilne spojine oziroma preprečujejo njihov nastanek. Pri oksidacijskem stresu prihaja do reverzibilnih ali ireverzibilnih poškodb proteinov, lipidov, ogljikovih hidratov in DNA, kar povzroča napake oziroma slabše delovanje organov in organskih sistemov (imunskega sistema), lahko pa povzroči tvorbo toksičnih produktov. Oksidacijski stres je pogosto

vpleten v patologijo raka in nastanek ateroskleroze ter ima pomembno vlogo pri procesu staranja. Oksidacijski stres lahko nastopi v organizmu kot posledica okoljskih dejavnikov, lahko ga povzročijo različne bolezni ali neustrezna prehrana. Prehranski oksidacijski stres lahko povzroči prekomeren vnos snovi, ki oksidirajo, ali snovi, ki oksidacijski stres povzročajo. Tako na primer povzročajo oksidacijski stres rastlinske maščobe, ki vsebujejo velike količine nenasičenih maščobnih kislin, ki so oksidacijsko nestabilne (Valko in sod., 2007).

Učinkovito zaščito pred škodljivim vplivom prostih radikalov predstavljajo antioksidanti. Za antioksidante velja, da že pri nizki koncentraciji preprečijo oksidacijo drugih snovi v celici s tem, ko reagirajo s prostimi radikali, odstranijo oksidativno poškodovane molekule ali vežejo kovinske ione. Naloga antioksidantov je z različnimi mehanizmi odstraniti proste radikale, kadar njihova koncentracija in aktivnost v organizmu presežeta sposobnost celice, da jih inaktivira. Molekula antioksidanta donira enega od svojih elektronov radikal, ki tako postane stabilen in nereaktiven. Antioksidantov ne moremo uživati na zalogo: prevelike količine imajo lahko ravno nasprotno učinke in lahko celo povzročijo oksidacijski stres (Valko in sod., 2007). Antioksidante delimo na endogene (glutation, NADPH, Zn-superoksid dismutaza, Cu, Mn, sečna kislina) in eksogene (tokoferoli, tokotrienoli (vitamin E), askorbat (vitamin C), vitamin A, Se, BHA, BHT, prehranski in drugi dodatki) (Papass, 1999).

Ker imajo sintetični antioksidanti lahko tudi stranske učinke, je v zadnjem času veliko zanimanja za razvoj »naravnih antioksidantov«. Naravni antioksidanti, ki izvirajo iz hrane, predstavljajo naravno zaščito za človeško telo in lahko preprečijo napredovanje številnih kroničnih bolezni (Liu in sod., 2005). V primerjavi s sintetičnimi oksidanti imajo številne prednosti, vendar tudi nekaj slabih lastnosti. Prednost naravnih antioksidantov je njihova večja sprejemljivost za potrošnike, saj jih imajo ti za bolj varne. Veljajo za splošno priznane in varne sestavine živil, zato posebnih testov o njihovi škodljivosti ni treba opravljati. Naravni antioksidanti pa so dražji od sintetičnih, ker jih je pogosto treba očistiti. Neočiščeni so manj učinkoviti, prav tako pa lahko dodatno obarvajo izdelek, mu dajo priokus ali slabši vonj (Madhavi in Salunkhe, 1995).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Reagenti

- 1,10-fenantrolin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija; 131377-5G)
- 2-deoksi-D-riboza (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija; 31170-1G-F)
- aceton (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija; 650501-1L)
- agar agar (Merck, Darmstadt, Nemčija)
- amonijev tiocianat - NH_4SCN (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija; A7149-100 G)
- askorbinska kislina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija; A5960-25G)
- butilhidroksianizol - BHA (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija; D9132-1G)
- dikalijev fosfat - K_2HPO_4 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija; P3786-100G)
- 1,1-difenil-2-pikrilhidrozin - DPPH (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija; D9132-1G)
- etilendiaminotetraocetna kislina - EDTA (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija; EDS-100G)
- etanol 96 % (Merck, Darmstadt, Nemčija; 1.00967.2500)
- formamid (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija; F9037-100ML)
- fosfatni pufer s pH 7,4 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija; P3619-1GA)
- galaktoza (Merck, Darmstadt, Nemčija; 1.04058.0100)
- glukoza (Merck, Darmstadt, Nemčija; 1.04074.0500)
- izofluran (Torrex Chiesi Pharma GmbH, Dunaj, Avstrija)
- klorovodikova kislina - HCl (Merck, Darmstadt, Nemčija; 1.01834.1000)
- kvasni ekstrakt (Merck, Darmstadt, Nemčija)
- laktoza (Merck, Darmstadt, Nemčija; 1.07660.1000)
- ledocetna kislina (Fluka, Busch, Švica)
- linolna kislina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija; L1012-5G)
- lizocim (Sigma Chemical, St. Louis, ZDA)
- magnezijev sulfat (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija; M7506-500G)
- manganov sulfat (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija; M7634-100G)

- metanol (Merck, Darmstadt, Nemčija; 1.06009)
- mesni ekstrakt (Merck, Darmstadt, Nemčija)
- mupirocin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija; 1448901-50MG)
- mutanolizin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- natrijev acetat (Merck, Darmstadt, Nemčija)
- natrijev citrat (Kemika, Zagreb, Hrvaška)
- natrijev fosfat monohidrat (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija; S8282-500G)
- natrijev hidrogen fosfat heptahidrat (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija; 431478-50G)
- natrijev klorid (Merck, Darmstadt, Nemčija; 567440-1KG)
- očetna kislina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija; 320099-500ML)
- pepton (Biolife, Milano, Italija)
- poliakrilamid (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija; 9256-10G)
- Ringerjeve tablete (Merck, Darmstadt, Nemčija)
- sladni ekstrakt (Merck, Darmstadt, Nemčija; 1.05391.0500)
- srebrov nitrat (AMG Medical Inc, Montreal, Kanada)
- SYBER Safe (Invitrogene, Carlsbad, CA, ZDA)
- tiobarbiturna kislina - TBA (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija; T5500-25G)
- trikolroocetna kislina - TCA (Merck, Darmstadt, Nemčija; 1.00807.0100)
- tris baza (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- Tween 80 (Biolife, Milano, Italija)
- urea (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija; U4883-6X25ML)
- vodikov peroksid - H₂O₂ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija; 216763-500ML)
- želatina (Fluka, Busch, Švica)
- železov (III) klorid - FeCl₃ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija; 157740-5G)
- železov (II) klorid tertahidrat - FeCl₂ x 4H₂O (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija; 44939-50G)
- železov (II) sulfat heptahidrat - FeSO₄ x 7 H₂O (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija; F8048)

3.1.2 Gojišča in raztopine

Gojišče de Man, Rogosa in Sharpe (MRS)

Gojišče MRS smo pripravili po navodilih proizvajalca ter ga avtoklavirali 15 min pri temperaturi 118 °C. Po potrebi smo pred avtoklaviranjem z očetno kislino uravnali vrednost pH na 5,2 in/ali dodali cistein v končni koncentraciji 0,05 %.

Modificirano gojišče de Man, Rogosa in Sharpe (MRSL)

MRSL gojišče smo pripravili tako, da smo v 1000 ml deionizirane vode dodali: 10 g mesnega ekstrakta, 5 g kvasnega ekstrakta, 100 g laktoze, 10 g peptona, 2 g K₂HPO₄, 5 g natrijevega acetata, 0,2 g magnezijevega sulfata, 0,05 g manganovega sulfata, 1 ml Tween 80 in 15 g agarja. Gojišče smo avtoklavirali 15 min pri temperaturi 118 °C.

Gojišče Brain Heart Infusion (BHI)

Gojišče BHI smo pripravili po navodilih proizvajalca in ga avtoklavirali 15 min pri temperaturi 121 °C.

Vijolično rdeči žolčni agar z glukozo (VRBG)

Gojišče VRBG z dodatkom 1 % glukoze smo pripravili po navodilih proizvajalca in ga s segrevanjem samo raztopili (brez avtoklaviranja).

Gojišče KPL

Gojišče KPL smo pripravili tako, da smo 1000 ml sirotke dodali 70 ml belega namiznega vina, 10 g glukoze, 10 g galaktoze, 1 ml Tween 80 in 15 g agarja (Toba in sod., 1986). Gojišče smo avtoklavirali 15 min pri temperaturi 121 °C.

Gojišče Wilkins-Chalgren (WCA) z dodanim mupirocinom

Gojišče WCA smo pripravili po navodilih proizvajalca ter mu dodali 10 g/l glukoze, 5 g/l agarja, 5 ml/l Tween 80 in 0,5 g/l cisteina. Gojišče smo avtoklavirali 15 min pri temperaturi 121 °C. Po avtoklaviranju smo v gojišče dodali antibiotik mupirocin v koncentraciji 50 µg/ml. Mupirocin zavira rast MKB, ne zavira pa rasti bifidobakterij.

Antibiotik mupirocin smo pripravili tako, da smo v centrifugirko zatehtali 50 mg mupirocina in dodali 2 ml 96 % etanola. Ko se je mupirocin raztopil, smo dodali še 3 ml deionizirane vode. Raztopino mupirocina smo pred uporabo filtrirali skozi filter s porami velikosti 0,20 μm ter ga do uporabe hranili pri temperaturi $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Gojišče Kluyveromyces Differential Medium (KDM)

Gojišče KDM smo pripravili tako, da smo v enem litru deionizirane vode raztopili 5 g kvasnega ekstrakta, 3 g peptona, 3 g sladnega ekstrakta, 10 g glukoze in 20 g agarja (Valderrama in sod., 1999). Gojišče smo avtoklavirali 15 min pri temperaturi $121\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Fiziološka raztopina

$\frac{1}{4}$ Ringerjeve raztopine smo pripravili po navodilih proizvajalca. Dve Ringerjevi tableti smo raztopili v enem litru deionizirane vode, razdelili v epruvete (9 ml v vsako) in jih avtoklavirali 15 min pri temperaturi $121\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Anaerobni diluent

Anaerobni diluent smo pripravili tako, da smo ob gretju in mešanju v enem litru deionizirane vode raztopili 0,557 g cisteina, 8,5 g NaCl, 1 g peptona in 2 g želatine. Anaerobni diluent smo avtoklavirali 15 min pri temperaturi $121\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Pufer TAE

En liter 50-kratne raztopine TAE smo pripraviti tako, da smo zmešali 242 g Tris baze, 57,1 g ledocetne kisline in 18,6 g EDTA ter umerili pH na 8,0. Pufer smo avtoklavirali 15 min pri temperaturi $121\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Raztopina EDTA

Za pripravo 0,5 M raztopine EDTA smo v 100 ml deionizirane vode raztopili 18,6 g EDTA ter umerili pH na vrednost 8,0. Raztopino EDTA smo avtoklavirali 15 min pri temperaturi $121\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Fosfatni pufer

0,1 M fosfatni pufer s pH 7,0 smo pripravili tako, da smo v 100 ml deionizirane vode raztopili 0,58 g natrijevega fosfat-monohidrata in 1,54 g natrijevega hidrogen fosfat-heptahidrata.

3.1.3 Bakterijski sevi

Bakterijske seve *Bacillus cereus* IM 199, *Lactobacillus helveticus* IM 30, *Lactobacillus casei* IM 244, *Lactobacillus fermentum* IM 351, *Lactobacillus rahmnosus* IM 239, *Lactobacillus plantarum* IM 212, *Bifidobacterium breve* IM 386, *Bifidobacterium lactis* IM 414, *Bifidobacterium animalis* IM 417, *Escherichia coli* IM 120, *Listeria monocytogens* IM 372, *Listeria innocua* IM 373, *Staphylococcus aureus* IM 388 in *Bacillus cereus* IM 250 smo pridobili iz zbirke mikroorganizmov Inštituta za mlekarstvo in probiotike Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Bakterije *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* MP6, *Lactobacillus kefiri* MR3 in *Lactobacillus parakefiri* KP9 so izolati iz kefirnih zrn, pridobljeni med eksperimentalnim delom doktorske naloge in shranjeni v zbirki mikroorganizmov na Inštitutu za mlekarstvo in probiotike Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Seve vrst *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* DSM 10550 in *Bacteroides thetaiotaomicron* DSM 2079 smo pridobili iz nemške zbirke mikroorganizmov DSM (Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen).

Seve vrst *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* LMG 19149, *Lactobacillus kefiri* LMG 9480, *Bifidobacterium animalis* LMG 10508, *Bifidobacterium bifidum* LMG 11041 in *Enterococcus faecalis* LMG 7937T smo pridobili iz belgijske zbirke mikroorganizmov LMG (Belgium Co-originated Collection of Microorganisms).

Seva vrst *Lactobacillus plantarum* NCDO 1193 in *Lactobacillus sakei* NCDO 2714 smo pridobili iz zbirke mikroorganizmov NCDO (National Collection of Dairy Organisms, National Institute of Dairying, Reading, England).

Sev vrste *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATTC 53103) smo pridobili iz ameriške celične zbirke (American Type Cell Collection).

3.1.4 Kefirna zrna

V raziskavi smo uporabili kefirna zrna, ki so last Mlekarnе Krepko (Kele & Kele, d.o.o., Logatec, Slovenija).

3.2 OVREDNOTENJE VELIKOSTI IN PESTROSTI POPULACIJE LAKTOBACILOV V KEFIRNIH ZRNH

Velikost in pestrost populacije laktobacilov v kefirnih zrnih smo ovrednotili s pomočjo gojitvenih tehnik in s pomočjo od gojenja neodvisne metode – poliakrilamidne gelske elektroforeze v denaturirajočem gradientu (DGGE).

3.2.1 Osamitev in identifikacija laktobacilov iz kefirnih zrn z uporabo gojitvenih tehnik

3.2.1.1 Osamitev in ugotavljanje števila laktobacilov v kefirnih zrnih

Vzorci kefirnih zrn smo za homogenizacijo pripravili tako, da smo 10 g kefirnih zrn dodali 90 g natrijevega citrata (20 g/l). Kefirna zrna smo homogenizirali s pomočjo gnetilnika (BagMixer 400; Interscience, Saint Nom, Francija), homogenizirane vzorce pa nacepili v gojišči MRS (pH=5,2) in KPL, ki sta selektivni za laktobacile. Uporabili smo metodo razredčevanja po Kochu, tako da smo po inkubaciji dobili številne plošče (od 10 do 300 KE na ploščo).

Nacepljena gojišča smo inkubirali anaerobno, in sicer tri dni pri temperaturi 30 °C. Anaerobne pogoje smo zagotovili z uporabo anaerobnih posod in GENbox sistema (Bio-Merieux, Marcy-L'Etoile, Francija). Po inkubaciji smo s pomočjo elektronskega števca (EŠKO 7L, LABO, Ljubljana) prešteli število izraslih kolonij. Število kolonijskih enot (KE) v g kefirnih zrn smo izračunali po enačbi 1 (IDF Standard 100B, 1991):

$$N = \sum KE / ((n_1 + 0,1 \times n_2) \times R) \quad \dots(1)$$

Legenda:

N.....število kolonijskih enot (KE/g oz. KE/ml)

$\sum KE$vsota kolonij, prešteti na vseh ploščah

n_1število števni petrijevih plošč (10–300 kolonij) prve razredčitve

n_2število števni petrijevih plošč (10–300 kolonij) druge razredčitve

R.....razredčitveni faktor prve razredčitve, ki smo jo šteli

Iz vsake številne petrijeve plošče smo nato naključno izbrali nekaj kolonij, ki smo jih cepili v tekoče gojišče MRS s pH 5,2. Prečiščene izolate smo spet cepili na trdi gojišči MRS (pH=5,2) in KPL, pregledali značilnosti izraslih kolonij po inkubaciji (barvo, velikost, videz površine in roba), pripravili mikroskopski preparat z metodo barvanja po Gramu in z mikroskopiranjem ugotavljali morfološke lastnosti bakterijskih celic (obliko, velikost, formacijo in obarvanje po Gramu).

Za čim bolj natančno ovrednotenje pestrosti populacije laktobacilov v kefirnih zrnih smo vzorce kefirnega zrna vzorčili štirikrat. Delo je potekalo v aseptičnih pogojih.

3.2.1.2 Izolacija DNA in identifikacija laktobacilov

Iz prečiščenih izolatov laktobacilov, osamljenih iz kefirnih zrn, smo s komercialnim kitom Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, ZDA) izolirali DNA in jo kot tarčno DNA uporabili v verižni reakciji s polimerazo (PCR). S pomočjo specifičnih začetnih oligonukleotidov LbMA1-rev in R16-1 (Invitrogen Life Technologies, Paisley, Velika Britanija) smo ugotavljali pripadnost izolatov rodu *Lactobacillus*. Mešanica za en vzorec PCR (20 μ l) je vsebovala: 1x pufer s 3 mM MgCl₂ (GoTaq®; Promega, Madison, WI, ZDA), 0,1 mM nukleotid dNTP (Boehringer, Mannheim, Nemčija), 0,025 U/ μ l DNA-polimeraze (GoTaq®; Promega, Madison, WI, ZDA), 0,5 mM začetni oligonukleotid LbMA1-rev in R16-1 ter 0,5 μ l tarčne DNA. V vsako reakcijo PCR smo vključili tudi štiri kontrole, tri pozitivne in eno negativno. Negativno kontrolo je predstavljala mešanica, ki smo ji namesto DNA dodali deionizirano vodo. Pozitivno kontrolo za preiskovane bakterije je predstavljala mešanica, ki smo ji dodali DNA, pridobljeno iz referenčnih sevov. Mikroeprovete z 20 μ l reakcijske mešanice smo prenesli v aparaturo za PCR (Bio-Rad, Hercules, CA, ZDA) in vnesli ustrezen protokol za PCR. Začetna denaturacija je potekala

pri 95 °C (5 minut). Sledilo je 30 ciklov denaturacije pri 95 °C (30 sekund), prileganje začetnih nukleotidov pri 55 °C (30 sekund) ter podaljševanje verige DNA pri 72 °C (30 sekund). Zaključno podaljševanje verige DNA je potekalo pri 72 °C (7 minut). Pomnožke, ki smo jih dobili v reakcijah PCR, smo analizirali s pomočjo gelske elektroforeze v 1,5 % agaroznem gelu. Za analize smo uporabili po 20 µl pomnožkov PCR. Elektroforeza je potekala pri 100 V 2 uri. Po končani elektroforezi smo gel obarvali z barvilom SYBER Safe (Invitrogene, Carlsbad, CA, ZDA). Po 30 minutah barvanja smo gel pregledali pod UV svetlobo in ga računalniško dokumentirali s pomočjo programske opreme BioNumerics (Applied Maths Inc., Austin, TX, ZDA).

Za ugotavljanje podobnosti med izoliranimi laktobacili na ravni seva smo uporabili metodo RAPD. Za analizo RAPD smo uporabili mešanico v skupnem volumnu 20 µl, in sicer 1x puffer (GoTaq® Flexi; Promega, Madison, WI, ZDA), 3 mM MgCl₂ (GoTaq®; Promega, Madison, WI, ZDA), 0,8 µM začetni nukleotid 1254 (Invitrogen Life Technologies, Paisley, Velika Britanija), 0,2 mM dNTP (Boehringer, Mannheim, Nemčija), 0,025 U/µl DNA-polimeraze (GoTaq®, Promega, Madison, WI, ZDA) ter 1,0 µl tarčne DNA. Reakcija je potekala po naslednjem protokolu: 4 cikli začetne denaturacije pri 95 °C (5 minut), prileganje začetnih nukleotidov pri 36 °C (5 minut) ter podaljševanje verige DNA pri 72 °C (5 minut), sledilo je 30 ciklov denaturacije pri 94 °C (1 minuto), prileganje začetnih nukleotidov pri 36 °C (1 minuto) in podaljševanje verige DNA pri 72 °C (2 minuti) ter zaključno podaljševanje verige DNA pri 72 °C (10 minut). Pomnožke RAPD smo dokazali z elektroforezo v 2 % agaroznem gelu. Gel smo obarvali z barvilom SYBER Safe (Invitrogene, Carlsbad, CA, ZDA). Po 30 minutah barvanja smo gel pregledali pod UV svetlobo, ga računalniško dokumentirali in obdelali s pomočjo programske opreme BioNumerics (Applied Maths Inc., Austin, TX).

3.2.1.3 Izolacija pomnožkov PCR za ugotavljanje zaporedja nukleotidov

Vzorci DNA smo pomnožili z začetnimi oligonukleotidi P1 in P4 (Invitrogen Life Technologies, Paisley, Velika Britanija) v reakciji PCR, ki je potekala po naslednjem protokolu: začetna denaturacija je potekala pri 95 °C (5 minut); sledilo je 30 ciklov denaturacije pri 93 °C (1 minuto), prileganje začetnih oligonukleotidov pri 52 °C (30 sekund) in podaljševanje verige DNA pri 72 °C (30 sekund). Zaključno podaljševanje

verige DNA je potekalo pri 72 °C (7 minut). Za elektroforezo smo pripravili 1 % agarozni gel. Po končani elektroforezi smo gel obarvali z barvilom SYBER Safe (Invitrogene, Carlsbad, CA, ZDA). Za čiščenje pomnožkov PCR smo uporabili komercialni set PCR – Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, ZDA). Zaporedje nukleotidov so določili v laboratoriju Microsynth v Balgachu (Švica). Po sekvenciranju smo dobljena nukleotidna zaporedja analizirali in jih s pomočjo programa BLAST primerjali s tistimi, ki so shranjena v genski banki NCBI.

3.2.2 Identifikacija laktobacilov v kefirnih zrnih z uporabo od gojenja neodvisne metode – poliakrilamidne gelske elektroforeze v denaturirajočem gradientu (DGGE)

Za uspešno analizo DGGE je zelo pomemben izbor začetnih oligonukleotidov. Izbrali smo par začetnih oligonukleotidov HDA1-GC/HDA2 (Invitrogen Life Technologies, Paisley, Velika Britanija), ki pomnožuje regijo V2-V3 16S rDNA (Walter in sod., 2000). V analizo smo vključili tri referenčne seve iz zbirk, in sicer predstavnike bakterijskih vrst, ki so pogosto prisotne v kefirnih zrnih: *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* LMG 19149, *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* DSM 10550, *Lactobacillus kefir* LMG 9480, in 3 lastne referenčne seve, ki smo jih predhodno osamili iz kefirnih zrn in identificirali: *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* MP6, *Lactobacillus kefir* MR3 in *Lactobacillus parakefir* KP9. Poleg DNA, osamljene iz čistih sevov, smo analizirali tudi bakterijsko DNA, izolirano neposredno iz kefirnih zrn. Za čim bolj natančno ovrednotenje pestrosti populacije laktobacilov v kefirnih zrnih smo vzorce kefirnega zrna vzorčili desetkrat.

Skupno mikrobno DNA iz kefirnih zrn in DNA iz referenčnih sevov smo izolirali s komercialnim kitom Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, ZDA). Dele 16 rDNA smo pomnožili v reakciji PCR z začetnima oligonukleotidoma HDA1-GC in HDA2. Mešanica za PCR (50 µl) je vsebovala: 2 µl izolirane DNA, 1x pufer (GoTaq® Flexi, Promega, Madison, WI, ZDA), 0,1 mM dNTP (Boehringer, Mannheim, Nemčija), 0,5 µM začetna oligonukleotida HDA1-GC in HDA2 in 0,025 U/µl DNA-polimeraze (GoTaq®, Promega, Madison, WI, ZDA). Začetna denaturacija je potekala pri 95 °C (3 minute). Sledilo je 40 ciklov denaturacije pri 95 °C (30 sekund), prileganje

začetnih nukleotidov pri 58 °C (30 sekund) ter podaljševanje verige DNA pri 72 °C (40 sekund). Zaključno podaljševanje verige DNA je potekalo pri 72 °C (5 minut).

Pomnožke PCR smo nanesti na gele DGGE (D GENE System, Bio-Rad, Hercules, CA, ZDA) velikosti 16 cm × 16 cm × 1 mm. Na začetek, sredino in konec gela smo nanesti označevalec, sestavljen iz pomnožkov DNA bakterijskih sevov *Bifidobacterium animalis* LMG 10508, *Bifidobacterium bifidum* LMG 11041, *Enterococcus faecalis* LMG 7937T, *Lactobacillus plantarum* NCDO 1193, *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Bacillus cereus* IM 199 in *Bacteroides thetaiotaomicron* DSM 2079. Pomnožke smo ločevali na 8 % poliakrilamidnih gelih (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija) (razmerje akrilamid/bisakrilamid je bilo 37:1) s 30–70 % denaturacijskim gradientom (100 % ustreza 7 M urei in 40 % formamida) v 1-kratnem pufru TAE. Naložili smo po 25 µl produkta PCR. Elektroforeza je potekala 16 ur pri stalni napetosti 75 V in temperaturi 60 °C. Gele smo obarvali z barvilom SYBER Safe (Invitrogene, Carlsbad, CA, ZDA) in fotografirali z UV transiluminatorjem (Syngene, Cambridge, Velika Britanija) ter obdelali s pomočjo programske opreme BioNumerics (Applied Maths Inc., Austin, TX, ZDA).

3.3 SPREMLJANJE TVORBE EKSOPLISAHARIDOV V ČISTIH KULTURAH

Tvorbo eksopolisaharidov (EPS) smo spremljali pri laktobacilih, osamljenih iz kefirnih zrn (*Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* MP6, *Lactobacillus kefir* MR3 in *Lactobacillus parakefiri* KP9), ter pri referenčnih sevih iz zbirk (*Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* LMG 19149, *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* DSM 10550, *Lactobacillus kefir* LMG 9480). Za optimizacijo tvorbe EPS smo uporabili različna tekoča gojišča, in sicer MRS, MRSL in KPL, ter različne začetne vrednosti pH gojišč (4,5, 5,0 in 5,5). V gojišče smo nacepili 1 % inokulum. Nacepljena gojišča smo nato anaerobno inkubirali pri temperaturi 30 °C 5 dni. Anaerobne pogoje smo zagotovili z uporabo anaerobnih posod in GENbox sistema (Bio-Merieux, Marcy-L'Etoile, Francija).

Po inkubaciji smo EPS iz gojišča pridobili po postopku, ki so ga opisali Liu in sod. (2002), Rimada in Abraham (2003) ter Wang in Bi (2008). Vzorce smo najprej kuhali 30 min pri temperaturi 100 °C. Po kuhanju smo vzorce ohladili in raztopini dodali enak volumen 20

% raztopine TCA. Oborjene celice in proteine smo odstranili s centrifugiranjem pri hitrosti 11.000 rpm, in sicer 20 min pri temperaturi 4 °C. Nato smo k supernatantu dodali enako količino ohlajenega acetona. Raztopino smo čez noč pustili v hladilniku. Oborjeni EPS smo iz supernatanta odstranili s centrifugiranjem pri hitrosti 11.000 rpm, in sicer 30 min pri temperaturi 4 °C. Izolirani EPS smo sušili 48 ur pri temperaturi 42 °C. Po sušenju smo vzorce stehali in jih poslali v analizo.

Analizo sestave EPS so opravili na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Mariboru po postopku, ki ga opusujejo Doliška in sod. (2009) ter Zajšek in sod. (2011). Približno 50 mg izoliranega EPS so raztopili v 4 ml prečiščene vode in raztopino mešali 24 ur. Raztopino so nato za 30 min postavili v zvočno kopel s temperaturo 40 °C. Nato so izvedli hidrolizo tako, da so vzorcu EPS dodali 2 ml H₂SO₄ (c = 0,5 mol/l). Mešanico so nato segrevali v avtoklavu pri temperaturi 120 °C. Tako pripravljen vzorec so ohladili in razredčili na volumen 50 ml. Sledila je priprava standardne raztopine monosaharidov, in sicer za D-glukozo, D-galaktozo ter D-ksilozo s koncentracijo 1 g/l. Nato so s kapilarno elektroforezo (Agilent; CE3D Instrument G-1600), opremljeno z DAD (190-600), posneli njihove elektroferograme. Separacijo monosaharidov so izvajali v boratnem pufri (c = 0,1 mol/l) pri pH 10,5 z uporabo 30 % raztopine acetonitrila. Vzorce so pri 50 mbar injicirali hidrodinamsko in izmenično s pufrom pri temperaturi 20 °C in pri UV absorbanci 306 nm. Za vsak sladkor je značilen vrh na točno določeni širini. Določili so razmerje med površino vrha in koncentracijo sladkorja. Nato so posneli še spektre vzorcev EPS in na osnovi umeritvenih krivulj za standardne raztopine določili monosaharide v vzorcu (Doliška in sod., 2009; Zajšek in sod., 2011).

3.4 POSTOPEK IZOLACIJE KEFIRANA IZ KEFIRNIH ZRN

Kefiran iz kefirnih zrn smo z nekaj modifikacijami izolirali po postopku, ki ga opisujejo Wang in sod. (2008) ter Rimada in Abraham (2003). Kefirna zrna smo ob stalnem mešanju najprej tri ure kuhali v vreli vodi (1:100). Po kuhanju smo raztopino ohladili in centrifugirali pri 11.000 rpm, in sicer 20 min pri temperaturi 4 °C. Kefiran smo iz supernatanta oborili z dodatkom enakega volumna ohlajenega 96 % etanola. Raztopino smo čez noč pustili v hladilniku. Kefiran smo od raztopine ločili s centrifugiranjem pri 11.000 rpm in temperaturi 4 °C 20 min. Izolirani kefirani smo sušili 48 ur pri temperaturi

42 °C. Analiza sestave kefirana, pridobljenega iz kefirnih zrn, je bila opravljena po enakem postopku, kot je opisan v poglavju 3.3.

3.5 SPREMLJANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI BREZCELIČNIH INTRACELULARNIH EKSTRAKTOV LAKTOBACILOV IN KEFIRANA

Antioksidativno aktivnost kefirana in brezceličnih intracelularnih ekstraktov laktobacilov, osamljenih iz kefirnih zrn, in tipskih laktobacilov smo ugotavljali z:

- metodo za določanje antioksidativne aktivnosti s tiocianatom (Abbasi in sod., 2013),
- metodo za določanje antioksidativne aktivnosti z 2-deoksi-D-ribozo (Stoilova in sod., 2007),
- metodo za določanje antioksidativne aktivnosti z DPPH (Molyneux, 2004; Ahire in sod., 2013),
- metodo za določanje antioksidativne aktivnosti z 1,10-fenantrolinom (Ahire in sod., 2013).

Kefiran smo pridobili iz kefirnih zrn po postopku, ki je opisan v poglavju 3.4., in ga ustrezno redčili s sterilizirano deionizirano vodo, da smo dobili koncentracije 50, 70 in 100 mg/ml.

Določali smo antioksidativno aktivnost intracelularnih ekstraktov sevov vrst *Lb. kefir* MR3, *Lb. kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* MP6 in *Lb. parakefiri* KP9, ki smo jih predhodno osamili iz kefirnih zrn, in tipskih sevov *Lb. kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* LMG19149, *Lb. kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* DSM 10550, *Lb. kefiri* LMG 9480. Kot kontrola sta nam služila seva *Lb. casei* DN 114 in *Lb. helveticus* IM 30.

Brezcelične ekstrakte laktobacilov smo pridobili tako, da smo laktobacile nacepili v tekoče gojišče MRS in jih gojili 3 dni pri temperaturi 30 °C. Celice smo nato centrifugirali 10 minut pri 4.000 g. Pridobljeni pelet smo nato dvakrat sprali z 1 ml sterilne deionizirane vode in ga mehansko razbili z uporabo sonifikatorja (Soniprep 150 Plus, MSE (UK) Limited, London, Velika Britanija) po naslednjem programu: 50 s delovanja in 10 s

premora v petih ponovitvah. Celice smo odstranili s centrifugiranjem pri 6.000 g (10 min). Tako pridobljeni ekstrakt smo uporabili za določanje antioksidativne aktivnosti (Ahire in sod., 2013).

3.5.1 Metoda za določanje antioksidativne aktivnosti s tiocianatom

Tiocianatna metoda se uporablja za merjenje ravni peroksidov v začetni fazi oksidacije lipidov. Lipidna peroksidacija steče, ko radikal napade nenasičeno maščobno kislino. Pri tem se sprosti voda in nastane lipidni ogljikov radikal, ki reagira s kisikom. Nastane lipidni peroksidni radikal, ki napade druge maščobne kisline; tako se nadaljuje veriga omenjenih reakcij (Abbasi in sod., 2013).

Odstotek inhibicije peroksidacije linolne kisline smo določali spektrofotometrično. Med seboj smo primerjali antioksidativno aktivnost kefirana, pridobljenega iz kefirnih zrn, brezceličnih intracelularnih ekstraktov laktobacilov ter BHA in askorbinske kisline (vitamin C). Negativna kontrola je bila 0,1 M fosfatni pufer s pH 7,0.

Uporabljeni reagenti:

- 2,51 % raztopina linolne kisline: 270 μ l linolne kisline smo odpipetirali v merilno bučko (10 ml) in do oznake dodali 96 % etanol;
- 30 % raztopina NH_4SCN : 3 g NH_4SCN smo zatehtali v merilno bučko (10 ml) in do oznake dodali deionizirano vodo;
- raztopina FeCl_2 (0,02 M): 40 mg $\text{FeCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$ smo zatehtali v merilno bučko (100 ml), dodali 37 % raztopino HCl in do oznake dopolnili z deionizirano vodo;
- 0,1 M fosfatni pufer, pH = 7,0.

Osnovno raztopino BHA in vitamina C smo pripravili tako, da smo v epico zatehtali 2 mg BHA oziroma vitamina C in dodali 1 ml 96 % etanola.

Negativno kontrolo smo pripravili tako, da smo zmešali 400 μ l 0,1 M fosfatnega pufera (pH 7,0), 410 μ l raztopine linolne kisline, 800 μ l 0,1 M fosfatnega pufera s pH 7,0 in 390 μ l deionizirane vode. Vzorčne raztopine smo pripravili po enakem postopku kot negativno kontrolo, le da smo namesto 400 μ l 0,1 M fosfatnega pufera s pH 7,0 dodali 400 μ l vzorca. Vzorčne raztopine in negativno kontrolo smo nato tesno zaprli in inkubirali 24 ur v

temnem prostoru pri temperaturi 37 °C. Po inkubaciji smo k 10 µl posamezne vzorčne raztopine in negativni kontroli dodali 970 µl 75 % etanola, 10 µl raztopine NH₄SCN in 10 µl raztopine FeCl₂. Po točno treh minutah smo izmerili absorbanco pri valovni dolžini 500 nm.

Odstotek inhibicije peroksidacije linolne kisline smo izračunali po enačbi 2:

$$\% \text{ inhibicije} = (1 - (A_{\text{vzorec}} / A_{\text{kontrola}})) \times 100 \quad \dots(2)$$

3.5.2 Metoda za določanje antioksidativne aktivnosti z 2-deoksi-D-ribozo

Fe³⁺ ion in EDTA v prisotnosti askorbinske kisline tvorita kompleks Fe²⁺-EDTA. Po inkubaciji z vodikovim peroksidom pri pH 7,4 pride do nastanka kompleksa Fe³⁺-EDTA in hidroksilnih radikalov (OH·), ki jih uvrščamo med ene najbolj reaktivnih kisikovih spojin. OH· cepijo molekulo 2-deoksi-D-riboze v fragmente, ki pri segrevanju s TBA pri nizkem pH tvori rožnato obarvan kromogen. Ena izmed reakcij, ki stečejo, se imenuje Fentonova reakcija ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{OH}\cdot$). Bistveno vlogo pri tej reakciji ima askorbinska kislina, ki omogoči nastanek OH· iz vodikovega peroksida s tem, da povzroči začetno pretvorbo iona Fe³⁺ v obliko Fe²⁺. Po dodatku antioksidanta k raztopini 2-deoksi-D-riboze pride do zmanjšane obarvanja raztopine (Stoilova in sod., 2007).

Odstotek inhibicije oksidacije 2-deoksi-D-riboze smo določali spektrofotometrično. Med seboj smo primerjali antioksidativno aktivnost kefirana, pridobljenega iz kefirnih zrn, intracelularnih ekstraktov laktobacilov ter BHA in vitamina E. Negativna kontrola je bila 0,2 M fosfatni pufer s pH 7,4.

Uporabljeni reagenti:

- 0,2 M fosfatni pufer s pH 7,4;
- raztopina askorbinske kisline (1 mM): v merilno bučko (100 ml) smo zatehtali 17,6 mg askorbinske kisline in do oznake dodali 0,2 M fosfatni pufer s pH 7,4;
- raztopina EDTA (1 mM): v merilno bučko (100 ml) smo zatehtali 37,22 mg EDTA in do oznake dodali 0,2 M fosfatni pufer;
- raztopina FeCl₃ (1 mM): v merilno bučko (100 ml) smo zatehtali 13,52 mg FeCl₃ in do oznake dopolnili z deionizirano vodo;

- raztopina 2-deoksi-D-riboze (14 mM): v merilno bučko (100 ml) smo zatehtali 187,78 mg 2-deoksi-D-riboze in do oznake dodali 0,2 M fosfatni pufer s pH 7,4;
- raztopina H₂O₂ (10 mM): v merilno bučko (100 ml) smo odpipetirali 23,25 µl vodne raztopine H₂O₂ in do oznake dodali 0,2 M fosfatni pufer s pH 7,4;
- 10 % raztopina TCA z 0,5 % raztopino TBA: v merilno bučko (50 ml) smo zatehtali 5 g TCA in 0,25 g TBA ter do oznake dopolnili z deionizirano vodo.

Osnovno raztopino BHA in vitamina E smo pripravili tako, da smo v merilno bučko (10 ml) zatehtali 10 mg BHA oziroma vitamina E in do oznake dopolnili z 0,2 M fosfatnim puferom s pH 7,4.

Negativno kontrolo smo pripravili tako, da smo k 300 µl 0,2 M fosfatnega pufera s pH 7,4 dodali 200 µl 1 mM raztopine FeCl₃, 100 µl 1 mM raztopine askorbinske kisline, 100 µl raztopine EDTA, 200 µl 1 mM raztopine 2-deoksi-D-riboze in 100 µl 10 mM raztopine vodikovega peroksida, ki je povzročil začetek reakcije. Vzorčne raztopine smo pripravili po enakem postopku kot negativno kontrolo, le da smo namesto 300 µl 0,2 M fosfatnega pufera s pH 7,4 dodali 200 µl vzorca in 100 µl 0,2 M fosfatnega pufera s pH 7,4. Negativno kontrolo in vzorce smo inkubirali 60 min pri temperaturi 37 °C. Nato smo raztopinam dodali 1 ml 10 % TCA z 0,5 % TBA in tako zaustavili reakcijo. Raztopine smo 30 min kuhali v vreli vodi in jih nato na ledu ohladili. Absorbanco smo merili pri valovni dolžini 535 nm.

Odstotek inhibicije oksidacije 2-deoksi-D-riboze smo izračunali po enačbi 3:

$$\% \text{ inhibicije} = ((A_{\text{kontrola}} - A_{\text{vzorec}}) / (A_{\text{kontrola}})) \times 100 \quad \dots(3)$$

3.5.3 Metoda za določanje antioksidativne aktivnosti z DPPH

1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) je stabilen radikal. Prosti elektron je delokaliziran po celotni molekuli, kar daje molekuli stabilnost in intenzivno vijolično obarvanje. Po dodatku antioksidanta k raztopini DPPH pride do nastanka reducirane oblike DPPH in posledično do razbarvanja raztopine. Iz molekule antioksidanta pa nastane nov radikal, ki spet reagira z novo molekulo DPPH. Stehiometrija reakcije je odvisna od števila vodikovih atomov, ki jih antioksidant lahko donira. Če antioksidant donira 2 atoma, potem je

stehiometrija 2:1, kar pomeni, da ena molekula antioksidanta reducira 2 molekuli DPPH (Molyneux, 2004).

Tudi pri metodi z DPPH določamo antioksidativno aktivnost antioksidantov spektrofotometrično. Poleg antioksidativne aktivnosti kefirana, pridobljenega iz kefirnih zrn, in brezceličnih ekstraktov laktobacilov, smo za primerjavo določali tudi antioksidativno aktivnost BHA in vitamina C. Kontrolna raztopina je bila galna kislina, slepi vzorec pa deionizirana voda.

Uporabljeni reagenti:

- raztopina DPPH: v merilno bučko (50 ml) smo zatehtali 2 mg 1,1-difenil-2-pikrilhidrazila in do oznake dodali metanol. Bučko smo zavili v alufolijo, saj raztopina na svetlobi ni obstojna;
- metanol.

Osnovno raztopino BHA oz. vitamina C smo pripravili tako, da smo v merilno bučko (10 ml) zatehtali 10 mg BHA oziroma vitamina C ter do oznake dopolnili z deionizirano vodo.

Slepi vzorec smo pripravili tako, da smo zmešali 225 μ l raztopine DPPH ter 9 μ l deionizirane vode. Kontrolno raztopino smo pripravili tako, da smo v merilno bučko (10 ml) zatehtali 10 mg galne kisline in do oznake dopolnili s prečiščeno vodo. Nato smo 9 μ l galne kisline dodali 225 μ l raztopine DPPH. Tudi vzorce smo pripravili tako, da smo 9 μ l posameznega vzorca zmešali z 225 μ l raztopine DPPH. Slepi vzorec, kontrolo in vzorce smo inkubirali 30 min na sobni temperaturi in nato izmerili absorbanco pri valovni dolžini 517 nm.

Antioksidativno aktivnost smo izračunali po enačbi 4:

$$\% \text{ inhibicije} = ((A_{\text{slepa}} - A_{\text{vzorec}}) / (A_{\text{slepa}} - A_{\text{kontrola}})) \times 100 \quad \dots(4)$$

3.5.4 Metoda za določanje antioksidativne aktivnosti z 1,10-fenantrolinom

Pri metodi za določanje antioksidativne aktivnosti z 1,10-fenantrolinom steče Fentonova reakcija, pri kateri nastanejo hidroksilni radikali, ki oksidirajo 1,10-fenantrolin. Dodatek

antioksidanta k raztopini 1,10-fenantrolina povzroči zmanjšano oksidacijo 1,10-fenantrolina (Ahire in sod., 2013).

Metoda je spektrofotometrična. Poleg antioksidativne aktivnosti kefirana, pridobljenega iz kefirnih zrn, in intracelularnih ekstraktov laktobacilov smo za primerjavo določali tudi antioksidativno aktivnost vitamina C. Negativna kontrola je bila deionizirana voda, za slepi vzorec pa smo namesto H₂O₂ in testiranega vzorca dodali deionizirano vodo.

Uporabljeni reagenti:

- raztopina 1,10-fenantrolina (0,75 mM): v merilno bučko (100 ml) smo zatehtali 23,5 mg 1,10-fenantrolina in do oznake dopolnili s 96 % etanolom;
- raztopina FeSO₄ (0,75 mM): v merilno bučko (100 ml) smo zatehtali 21 mg FeSO₄ x 7 H₂O in do oznake dopolnili z deionizirano vodo;
- 0,15 M fosfatni pufer s pH 7,4;
- 0,01 % raztopina H₂O₂.

Osnovno raztopino askorbinske kisline smo pripravili tako, da smo v merilno bučko (10 ml) zatehtali 10 mg askorbinske kisline in do oznake dopolnili z deionizirano vodo.

Negativno kontrolo smo pripravili tako, da smo zmešali 1 ml deionizirane vode, 1 ml 0,75 mM raztopine 1,10-fenantrolina, 1 ml 0,75 mM raztopine FeSO₄, 1 ml raztopine H₂O₂ in 1,5 ml 0,15 M fosfatnega pufera. Vzorce smo pripravili po enakem postopku, le da smo namesto 1 ml deionizirane vode dodali 1 ml posameznega vzorca. Slepi vzorec (A[`]) smo pripravili tako, da smo namesto H₂O₂ in testiranega vzorca dodali deionizirano vodo. Slepi vzorec, negativno kontrolo in vzorce smo inkubirali 30 min pri temperaturi 37 °C in nato izmerili absorbanco pri valovni dolžini 536 nm.

Antioksidativno aktivnost smo izračunali po enačbi 5:

$$\% \text{ inhibicije} = ((A_{\text{vzorec}} - A_{\text{kontrola}}) / (A^{\text{`}} - A_{\text{kontrola}})) \times 100 \quad \dots(5)$$

3.6 DOLOČANJE PREBIOTIČNIH LASTNOSTI KEFIRANA

Prebiotične lastnosti kefirana, izoliranega iz kefirnih zrn (poglavje 3.4), smo določali tako, da smo spremljali vpliv različnih koncentracij kefirana na rast izbranih laktobacilov in bifidobakterij, in sicer: laktobacilov osamljenih iz kefirnih zrn (*Lb. kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* MP6, *Lb. kefiri* MR3 in *Lb. parakefiri* KP9) ter laktobacilov in bifidobakterij, značilnih za prebavni trakt (*Lb. sakei* NCDO 2714, *Lb. casei* IM 244, *Lb. fermentum* IM 351, *Lb. rahnmosus* IM 239, *Lb. plantarum* IM 212, *Bifidobacterium breve* IM 386, *B. lactis* IM 414, *B. animalis* IM 417).

Laktobacile smo cepili v tekoče gojišče MRS, bifidobakterije pa v MRS z dodanim cisetinom (0,5 g/l). V 100 ml gojišča smo dodali kefirana v koncentracijah 0,5 g, 1,0 g in 1,5 g. Za kontrolo smo uporabili gojišči brez dodanega kefirana. Gojišče, v katerega smo cepili laktobacile vrst *Lb. sakei* in *Lb. casei*, smo inkubirali anaerobno pri temperaturi 30 °C, laktobacile vrst *Lb. fermentum*, *Lb. rahnmosus*, *Lb. plantarum* pa aerobno pri temperaturi 37 °C. Gojišče, v katerega smo cepili bifidobakterije, smo inkubirali anaerobno pri temperaturi 37 °C. Vse vzorce smo inkubirali pri navedenih pogojih 72 ur. Anaerobne pogoje smo zagotovili z uporabo anaerobnih posod in GENbox sistema (Bio-Merieux, Marcy-L'Etoile, Francija).

Po inkubaciji v tekočem gojišču smo vzorce kultur laktobacilov in bifidobakterij cepili na trdo gojišče MRS oziroma MRS z dodanim cisteinom ter inkubirali pri zgoraj omenjenih pogojih 72 ur. Po inkubaciji smo prešteli izrasle kolonije. Število KE v ml kulture smo izračunali po enačbi 1.

3.7 DOLOČANJE PROTIMIKROBNE AKTIVNOSTI KEFIRANA

Protimikrobno aktivnost kefirana, ekstrahiranega iz kefirnih zrn, smo določali z metodo lise na agarju, in sicer proti bakterijam vrst *Escherichia coli*, *Listeria monocytogens*, *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Lb. helveticus*, *Lb. sakei*, *Lb. plantarum* in *Lb. rhamnmosus*. Preglednica 3 prikazuje izbrane indikatorske bakterije in pogoje kultivacije.

Kefiran smo iz kefirnih zrn pridobili po postopku, opisanem v poglavju 3.4., in ga ustrezno redčili s sterilizirano deionizirano vodo, da smo dobili koncentracije 2, 5, 10 in 20 mg/ml. Nato smo 1 ml kulture indikatorskega seva prenesli na petrijevo ploščo, prelili z ustreznim gojiščem, premešali ter pustili na sobni temperaturi, da se je gojišče strdilo. Nato smo 20 µl posamezne redčitve kefirana kapnili na označena mesta na petrijevih ploščah. Petrijeve plošče smo inkubirali v pogojih, primernih za posamezni indikatorski sev (Preglednica 3). Protimikrobno delovanje kefirana smo potrdili s pojavom lise, ki je nastala kot posledica inhibicije rasti indikatorskih sevov.

Preglednica 3: Nabor izbranih indikatorskih bakterij in pogoji kultivacije.

Table 3: **A set of indicator bacteria and cultivation conditions.**

Indikatorske bakterije	Gojišče	Pogoji inkubacije
<i>Escherichia coli</i> IM 120	BHI	30 °C, 24 ur, aerobno
<i>Listeria monocytogens</i> IM 372	BHI	37 °C, 24 ur, aerobno
<i>Listeria innocua</i> IM 373	BHI	37 °C, 24 ur, aerobno
<i>Staphylococcus aureus</i> IM 388	BHI	37 °C, 24 ur, aerobno
<i>Bacillus cereus</i> IM 250	BHI	30 °C, 24 ur, aerobno
<i>Lactobacillus helveticus</i> IM 30	MRS	42 °C, 24 ur, aerobno
<i>Lactobacillus sakei</i> NCDO 2714	MRS	30 °C, 24 ur, aerobno
<i>Lactobacillus plantarum</i> IM 212	MRS	37 °C, 24 ur, aerobno
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> IM 239	MRS	37 °C, 24 ur, aerobno

3.8 PREHRANSKI POSKUS NA PODGANAH

V prehranskem poskusu na podganah smo proučevali vpliv kefirana in kefirnih zrn na sestavo črevesne mikrobiote podgan, dve tipični motnji metabolnega sindroma (višja raven serumskega holesterola in višja reven trigliceridov) in oksidacijski stres. Poskus je potekal v Centru za laboratorijske živali Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Dovoljenje za izvajanje poskusov na živalih št. 34401-40/2011/3 je izdala Etična komisija Veterinarske uprave RS.

3.8.1 Priprava kefirana in kefirnih zrn

Kefirna zrna smo hranili v stekleni posodi pri sobni temperaturi. Vsak dan smo menjavali mleko. Kefirna zrna smo za krmljenje podgan pripravili tako, da smo jih del oprali z vodovodno vodo in jih homogenizirali s paličnim homogenizatorjem (Ultra-Turrax T8, Ika, Staufen, Nemčija).

V času poskusa smo enkrat tedensko, in sicer z metodo štetja KE na trdem gojišču in z uporabo poliakrilamidne gelske elektroforeze v denaturirajočem gradientu (DGGE), spremljali število in vrstno sestavo laktobacilov in kvasovk iz kefirnih zrn. Število in pestrost laktobacilov smo določali po enakem postopku, kot je opisan v poglavju 3.2. Za določanje števila kvasovk smo kefirna zrna pripravili po enakem postopku kakor za določanje števila laktobacilov. Vzorce kefirnih zrn smo nato nacepili v gojišče KDM in plošče inkubirali aerobno pri temperaturi 25 °C 5 dni. Po inkubaciji smo prešteli število kolonij s pomočjo elektronskega števca (EŠKO 7L, LABO, Ljubljana). Za identifikacijo kvasovk iz kefirnih zrn smo skupno mikrobno DNA izolirali s komercialnim kitom Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, ZDA). D1 regijo 26S rRNA smo pomnožili v reakciji PCR z začetnima oligonukleotidoma NL1 in LS2 po postopku, ki ga opisujejo Cocolin in sod. (2002). Mešanica za PCR (50 µl) je vsebovala: 2 µl izolirane DNA, 1x pufer (GoTaq® Flexi, Promega, Madison, WI, ZDA), 0,1 mM dNTP (Boehringer, Mannheim, Nemčija), 0,5 µM začetna oligonukleotida in 0,025 U/µl DNA-polimeraze (GoTaq®; Promega, Madison, WI, ZDA). Začetna denaturacija je potekala pri 95 °C (3 minute). Sledilo je 30 ciklov denaturacije pri 95 °C (1 minuto), prileganje začetnih nukleotidov pri 52 °C (45 sekund) in podaljševanje verige DNA pri 72 °C (1 minuto). Zaključno podaljševanje verige DNA je potekalo pri 72 °C (5 minut). Pomnožke DNA kvasovk smo ločevali na poliakrilamidnih gelih po enakem postopku, kakor je opisan za laktobacile.

Kefiran smo pridobili iz kefirnih zrn po postopku, ki je opisan v poglavju 3.4., in ga ustrezno redčili s sterilizirano deionizirano vodo.

3.8.2 Potek poskusa

Pri poskusu smo uporabili 72 podganjih samic seva Wistar, starih šest do osem tednov, ki smo jih prejeli iz laboratorijev Harlan (Udine, Italija). Temperatura prostora, v katerem so bile med poskusom nameščene živali, je bila 24 ± 1 °C, relativna vlažnost pa 55 ± 5 %. Živali so imele 12-urni cikel svetlobe in teme. Podgane so imele ves čas poskusa neomejen dostop do vode in krme. Ob vhlevitvi smo živali ustrezno označili in jih stehali.

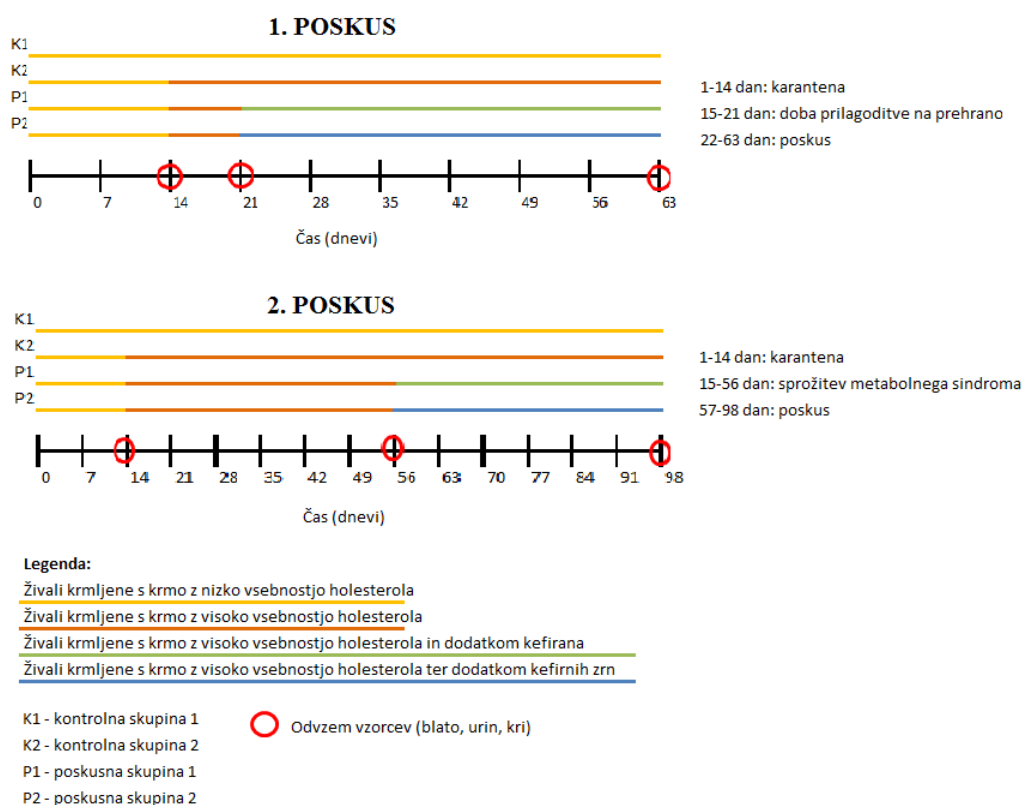


Slika 5: Živali med poskusom.

Figure 5: Animals in the experiment.

Slika 6 prikazuje shematski potek poskusa, ki smo ga razdelili na dva ločena poskusa. Pri prvem poskusu nas je zanimalo, kakšen vpliv imajo kefiran oziroma kefirna zrna na črevesno mikrobioto, raven serumskega holesterola in raven trigliceridov in oksidacijski stres, če smo živali sočasno krmili s krmo z visoko vsebnostjo holesterola in kefiranom oz. kefirnimi zrnji. Pri drugem poskusu smo pri podganah najprej poskušali s krmo z visoko vsebnostjo holesterola povišati raven serumskega holesterola in trigliceridov ter tako sprožiti oksidacijski stres, nato pa smo jim po šestih tednih krmljenja začeli dajati še kefiran oz. kefirna zrna. Za dvig ravni holesterola v krvni plazmi podgan smo krmi dodali holesterol (12,5 g/kg krmne mešanice) in holno kislino v obliki natrijevih žolčnih soli (5

g/kg), za dvig ravni trigliceridov pa svinjsko mast (75 g/kg krmne mešanice). Po podatkih Buettnerja in sod. (2007) naj bi dodatek svinjske masti v krmo pri podganah vrste Wistar povišal raven trigliceridov v krvni plazmi. V krmo HCD smo dodali tudi 50 g/kg lanenega olja. Frankič in sod. (2009) navajajo, da dodatek lanenega olja v krmo pri živalih sproži oksidacijski stres. Preglednica 4 prikazuje sestavo krme z nizko vsebnostjo holesterola (LCD) in peletirane krme HCD, ki so jo med poskusom dobivale podgane iz kontrolnih in poskusnih skupin.



Slika 6: Shema poteka prvega in drugega poskusa.

Figure 6: Scheme of the first and second experiment.

Tako pri prvem kakor pri drugem poskusu so bile živali naključno razdeljene v 4 skupine, in sicer v dve kontrolni (K1 in K2) in dve poskusni skupini (P1 in P2). V vsaki je bilo 9 živali, ki so bile nastanjene po 3 v kletki. Pri obeh poskusih je karantena trajala 14 dni. V

tem času so bile vse živali krmljene *ad libitum* s krmo LCD. Živali iz skupine K1 smo ves čas poskusa krmili s krmo LCD. Živali iz skupine K2 smo v času karantene krmili s krmo LCD in nato do konca poskusa s krmo HCD.

Pri prvem poskusu smo živali po karanteni 7 dni krmili s krmo HCD (obdobje prilagajanja na krmo). Temu je sledilo poskusno obdobje, ki je trajalo 42 dni. V tem času so živali iz skupine P1 dobivale poleg krme HCD še kefirana (0,1 mg/g telesne teže), živali iz skupine P2 pa kefirna zrna (3,7 g/kg telesne teže).

Pri drugem poskusu je po karanteni sledilo 42-dnevno obdobje, v katerem smo podgane iz skupin K2, P1 in P2 krmili s krmo z visoko vsebnostjo holesterola in tako skušali s prehrano povišati raven serumskega holesterola in trigliceridov ter sprožiti oksidacijski stres. Temu obdobju je sledilo poskusno obdobje, ki je tako kakor pri prvem poskusu trajalo 42 dni. Živali iz skupine P1 so tako kot pri prvem poskusu dobivale poleg krme HCD še kefirana (100 mg/ kg telesne teže), živali iz skupine P2 pa kefirna zrna (3,7 g/kg telesne teže).



Slika 7: Aplikacija kefirana z gastično sondo.

Figure 7: Application of kefirana by gastric intubation.

Živali so pri prvem in drugem poskusu kefirana in kefirna zrna prejemale vsak dan poskusa, in sicer raztopljeno v fiziološki raztopini peroralno z gastrično sondo (Slika 7). Aplikacija kefirana oz. kefirnih zrn z gastrično sondo predstavlja potencialen stres za živali. Da bi zagotovili čim bolj izenačene pogoje za vse živali, smo ostalima dvema skupinama podgan (K1 in K2) z gastrično sondo aplicirali samo fiziološko raztopino.

Preglednica 4: Sestava krme.

Table 4: Composition of the experimental diets.

	Krma z visoko vsebnostjo holesterola (HCD)		Krma z nizko vsebnostjo holesterola (LCD)	
	%	kcal %	%	kcal %
Beljakovine	21	20	18	20
Ogljikovi hidrati	46	45	64	69
Maščoba	16	35	4	11
Sestavine	g/kg	kcal	g/kg	kcal
Kazeini	75	300	75	300
Sojine beljakovine	130	520	130	520
DL-metionin	2	8	2	8
Koruzni škrob	275	1100	522,5	2090
Saharoza	30	120	30	120
Sojino olje	0	0	50	450
Laneno olje	50	450	0	0
Svinjska mast	75	675	0	0
Kokosovo olje	35	315	0	0
Mineralna mešanica	35	0	35	0
Vitaminska mešanica	10	40	10	40
Holin	2	0	2	0
Holesterol	12,5	0	0,3	0
Natrijeva žolčna kislina	5	0	0	0
Energijska vrednost		3528		3528

Živalim smo enkrat tedensko menjali kletke. Takrat smo živali tudi stehali in jim glede na telesno maso prilagodili odmerek kefirana oz. kefirnih zrn. Poleg tega smo enkrat tedensko spremljali tudi količino krme, ki so jo zaužile živali (3) v eni kletki (količina zaužite krme/kletko).

Zadnji dan poskusa smo živali omamili z inhalacijo CO₂ in izkrvavili s pomočjo intrakardialne punkcije. Odstranjevanje trupel poskusnih živali je potekalo v skladu s Pravilnikom o stranskih živalskih proizvodih, ki niso namenjeni prehrani ljudi (2004).

3.8.3 Odvzem bioloških vzorcev

Blato smo živalim odvzeli po koncu karantene (14. dan), pred začetkom poskusnega obdobja (21. dan pri prvem poskusu oz. 56. dan pri drugem poskusu) in ob koncu poskusa (63. dan oz. 98. dan). Blato smo vzorčili pri vsaki podgani posebej. Vzorce smo takoj po odvzemu zamrznili na -80 °C in jih zamrznjene shranili do analize.



Slika 8: **Odvzem vzorcev krvi iz repne vene.**

Figure 8: **Blood samples from tail vein.**

Podganam smo vzorce krvi odvzeli na iste dneve kot blato (Slika 8). Za analizo skupnega holesterola smo jim kri odvzeli še 42. dan (prvi poskus) oz. 77. dan (drugi poskus).

Podgane smo najprej ogreli v posebni ventilirani aparaturi (Datesand Ltd., Manchester, Velika Britanija) in tako povzročili dilatacijo ožilja. Živali smo nato s pomočjo izoflurana (Torrex Chiesi Pharma GmbH, Dunaj, Avstrija) uspavali in jim iz repne vene z injekcijsko iglo odvzeli kri. Po odvzemu krvi smo rano premazali s pasto srebrovega nitrata (AMG Medical Inc. Montreal, Kanada), ki ustavi krvavitev in pospeši celjenje. V povprečju smo na žival pridobili 500 µl krvi, ki smo jo shranili v epruveto z antikoagulantom. Vsebnost holesterola in trigliceridov smo določali v krvni plazmi, zato smo vzorce krvi centrifugirali pri vrtilni frekvenci 20.000 g in temperaturi 4 °C 20 minut. Tako pridobljeno plazmo smo odpipetirali v sterilne epruvete in jo do analize zamrznili na -80 °C.

3.8.4 Mikrobiološke analize blata podgan

Velikost in sestavo mikrobiote blata podgan smo določili s klasičnimi mikrobiološkimi analizami in z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (RT PCR). Analizirali smo posamezne vzorce blata podgan.

3.8.4.1 Klasične mikrobiološke analize

Za klasične mikrobiološke analize smo po 1 g blata homogenizirali s paličnim homogenizatorjem (Ultra-Turrax T8, Ika, Staufen, Nemčija) v 9 ml anaerobnega diluenta. Ustrezne redčitve vzorcev blata smo nacepili v različna selektivna gojišča. Gojišča in pogoji inkubacije, ki smo jih uporabili za določanje posameznih skupin mikroorganizmov, so prikazani v preglednici 5.

Preglednica 5: Gojišča in pogoji inkubacije za določanje posameznih skupin mikroorganizmov.

Table 5: Culture media and incubation conditions for the determination of different groups of microorganisms.

Skupina	Gojišče	Pogoji inkubacije
Laktobacili	MRS + cistein (0,5 g/l)	37 °C, 3 dni, anaerobno
Bifidobakterije	WCA + mupirocin (50 µg/ml)	37 °C, 3 dni, anaerobno
Enterobakterije	VRBG	30 °C, 1 dan, aerobno
Kvasovke	KDM	25 °C, 5 dni, aerobno

Anaerobne pogoje smo zagotovili z uporabo anaerobnih posod in GENbox sistema (Bio-Merieux, Marcy-L`Etoile, Francija). Po inkubaciji smo na petrijevih ploščah prešteli število kolonij s pomočjo elektronskega števca (EŠKO 7L, LABO, Ljubljana). Število KE v g blata podgan smo izračunali po enačbi 1.

3.8.4.2 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času (RT PCR)

Za določanje števila laktobacilov, bifidobakterij in enterobakterij v mikrobioti blata podgan z RT PCR smo zatehtali 0,1 g blata in mu prilili 9,9 g anaerobnega diluenta; to smo homogenizirali s paličnim homogenizatorjem (Ultra-Turrax T8, Ika, Staufen, Nemčija) in centrifugirali 10 min pri 3600 g. Po centrifugiranju smo odlili supernatant, k peletu pa smo odpipetirali 400 μ l 1 x TE ter 100 μ l mešanice lizocima (5 mg/ml) in mutanolizina (25 U/ml). S pomočjo sonikatorja (Soniprep 150 plus, MSE (UK) Limited, London, Velika Britanija) smo nato pelet mehansko razbili po naslednjem programu: 30 s delovanja, 15 s premora v treh ponovitvah. Sledila je inkubacija vzorca pri temperaturi 37 °C (2 uri). Po inkubaciji smo celoten vzorec prenesli v kartušo Maxwell 16 DNA Tissue Kit (Promega, Madison, WI, ZDA) in izvedli izolacijo DNA v skladu z navodili za avtomatizirano aparaturo Maxwell 16 (Promega, Madison, WI, ZDA). Izolirano DNA smo resuspendirali v 300 μ l elucijskega pufra in 1,5 μ l RNAze (4 mg/ml).

Preglednica 6: Gojišča in pogoji inkubacije za določanje posameznih vrst mikroorganizmov.

Table 6: Culture media and incubation conditions for the determination of different species of microorganisms.

Vrsta	Gojišče	Pogoji inkubacije	Število kopij 16S rRNA operona
<i>Bifidobacterium animalis</i> DSM 933	MRS + cistein (0,5 g/l)	37 °C, 18 ur, aerobno	4
<i>Escherichia coli</i> K12	BHI	37 °C, 24 ur, aerobno	7
<i>Lb. acidophilus</i> La5	MRS + cistein (0,5 g/l)	37 °C, 72 ur, anaerobno	6

DNA za pripravo standardnih krivulj je bila izolirana DNA iz bakterijskih kultur *Bifidobacterium animalis* DSM 933, *Escherichia coli* K12, *Lb. acidophilus* La5. Kultivacijski pogoji in gojišča so navedena v preglednici 6. Bakterije smo prešteli s pomočjo fazno kontrastne mikroskopije z uporabo števca Petroff-Hausser (Hausser Scientific, Horsham, PA, ZDA) po navodilih proizvajalca. Število bakterijskih celic za relativno kvantifikacijo je bilo preračunano glede na 16S rDNA oceno števila kopij (Preglednica 6) glede na podatke, dostopne v podatkovni bazi rrnDB (rrdb.mmg.msu.edu/search.php). Morebitne učinke fekalnega matriksa na učinkovitost izolacije DNA in učinkovitost reakcij RT PCR smo simulirali tako, da smo posamezne čiste kulture vcepili v fekalni matriks, to je v 1 ml redčenega fekalnega vzorca (1:100), ki smo ga predhodno dvakrat avtoklavirali in tretirali z UV, da smo razgradili v fecesu prisotno bakterijsko DNA. Po centrifugiranju (3600g, 10 minut) je bila DNA izolirana iz usedline, kakor je opisano zgoraj za vzorce.

Za izvedbo RT PCR smo uporabili aparat Stratagene Mx3000P (Stratagene, La Jolla, CA, ZDA). Programi PCR za RT PCR in pari uporabljenih začetnih oligonukleotidov so navedeni v preglednici 7. Volumen reakcijske mešanice za RT PCR je znašal 20 μ l (10 μ l Kapa Syber[®] Fast Master Mix (2x) (Kapa Biosystems, Boston, MA, ZDA), 0,2 μ M par začetnih oligonukleotidov in 1 μ l 10-krat redčene izolirane DNA. Vsak vzorec je bil analiziran v dveh paralelkah. Za vsako serijo RT PCR smo naredili dve negativni kontroli (NTC). V vzorce za negativno kontrolo smo v reakcijsko mešanico namesto bakterijske DNA dodali enako količino sterilne deionizirane vode. V vsak poskus smo vključili vsaj 1:2 redčitev ustrezne standardne DNA, ki je v različnih reakcijah pokrivala linearno dinamično območje od približno 3 do 6 logaritmov. Standardna krivulja, ki predstavlja povezavo med vrednostjo Ct in koncentracijo bakterij (CFU/g) v vzorcih blata, je bila ustvarjena s programsko opremo Stratagene Mx3000P (Stratagene, La Jolla, CA, ZDA). Učinkovitost reakcije je bila preračunana iz naklona standardne premice. Za večino vzorcev je bil Δ Ct med paralelkami v območju $\leq 0,5$ cikla.

Preglednica 7: Začetni oligonukleotidi in programi PCR za RT PCR.**Table 7: Oligonucleotide and PCR programs used for quantitative RT PCR.**

Vrsta bakterij	Začetni oligonukleotidi	Program PCR	Vir
Rod <i>Bifidobacterium</i>	Bif-F	95 °C (15 s)	Rinttilä in sod. (2004)
	Bif-R	59 °C (15 s)	
		72 °C (30 s)	
Rod <i>Lactobacillus</i>	LactoR`F	95 °C (30 s)	Songjinda in sod. (2007)
	LBFR	65 °C (15 s)	
		72 °C (20 s)	
Družina <i>Enterobacteriaceae</i>	Eco1457F	95 °C (30 s)	Bartosch in sod. (2004)
	Eco1652R	63 °C (30 s)	
		72 °C (30 s)	

3.8.5 Določanje vsebnosti holesterola in trigliceridov v krvni plazmi

Analizo vsebnosti holesterola in trigliceridov v krvni plazmi so opravili na Kliniki za prežvekovalce z ambulatorno kliniko Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani.

3.8.6 Določanje stopnje lipidne peroksidacije v krvni plazmi

Stopnjo lipidne peroksidacije v krvni plazmi so določali na Katedri za prehrano Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Metoda temelji na določanju stopnje lipidne peroksidacije preko kompleksa malondialdehid-tiobarbiturna kislina. Za določitev malondialdehida (MDA) v krvni plazmi so uporabili metodo, ki jo navajajo Wong in sod. (1987) z nekaj modifikacijami po Chiricu (1994) in Fukunagu in sod. (1995). MDA iz vzorcev so sprostil s pomočjo fosforne kisline. Med segrevanjem se je po dodatku tiobarbiturne kisline (TBA) med TBA in MDA tvoril rožnato obarvan kompleks. Vzorce plazme so nato ohladili in prefiltrirali. Koncentracijo MDA v vzorcih so določili s HPLC (Walters Alliance 2690 Apparatus, Mildford, MA, ZDA). Koncentracijo MDA v vzorcih so izračunali iz umeritvene krivulje, ki so jo pripravili z redčenjem osnovnega standarda (raztopina 1,1,3,3-tetraetoksipropān) v različnih koncentracijskih območjih.

Rezultate so obdelali s pomočjo računalniškega programa Millennium³² Chromatography Manager. Stopnjo lipidne peroksidacije so določali samo pri prvem poskusu.

3.8.7 Statistična obdelava rezultatov

Zbrane podatke smo obdelali s pomočjo statističnega programa R (R Core Team, 2013). Vsi podatki poskusov *in vitro* in poskusa *in vivo* so podani kot povprečne vrednosti s standardnimi odkloni. Statistično značilnost smo ovrednotili z analizo variance (ANOVA) in po ANOVI naredili še "post hoc" Tukeyev test, s katerim smo naknadno primerjali povprečja vseh skupin in ugotavljali, katere skupine v vzorcu se razlikujejo. Razlike med skupinami podatkov smo vzeli za statistično značilne, če je bila p vrednost enaka ali manjša od 0,05.

4 REZULTATI

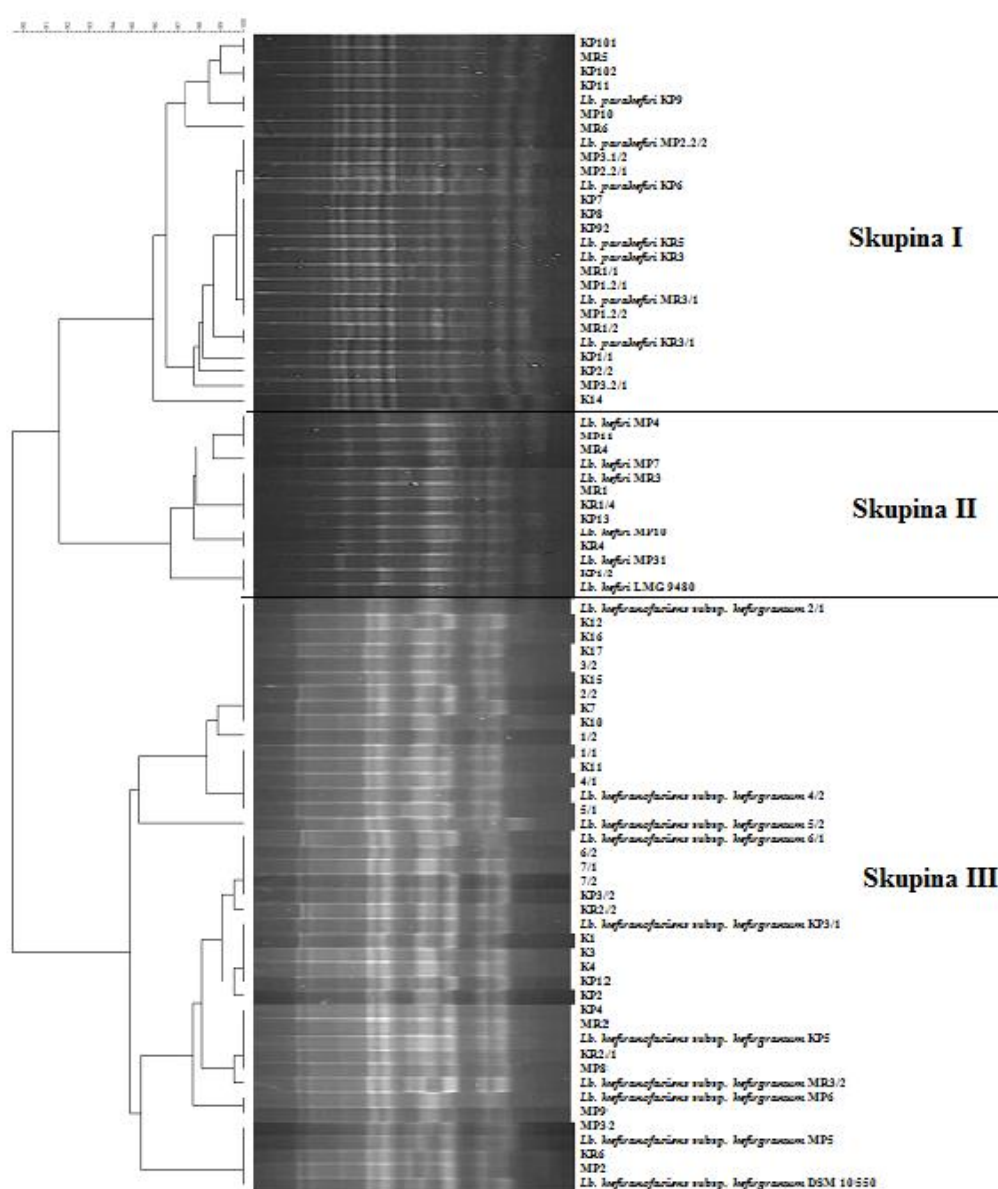
4.1 VELIKOST IN PESTROST PREVLAĐUJOČE POPULACIJE LAKTOBACILOV V KEFIRNIH ZRNH

4.1.1 Identifikacija laktobacilov, osamljenih iz kefirnih zrn, z uporabo gojitvenih tehnik

Za določanje velikosti mikrobne populacije laktobacilov smo kefirna zrna vzorčili 4x in cepili na trdi gojišči MRS in KPL. V gojišču MRS s pH 5,2 je v povprečju zrastle 7,39 log KE/g, v gojišču KPL pa 6,90 log KE/g kefirnih zrn. Iz vsake števne plošče smo naključno izbrali nekaj kolonij in tako iz kefirnih zrn osamili 88 izolatov. Rod *Lactobacillus* smo potrdili s PCR z za rod specifičnima začetnima oligonukleotidoma LbMa1-rev in R16-1, in sicer pri 79 izolatih. 9 izolatov ni pripadalo rodu *Lactobacillus*. Glede na morfološke značilnosti kolonij, izraslih na selektivnih gojiščih (oblika, velikost in formacija), in mikroskopske preparate smo osamljene izolate razvrstili v tri skupine, v skupino I, II in III. V gojišču MRS s pH 5,2 so izolati iz skupine I tvorili bele, izbočene kolonije nepravilnih oblik; izolati iz skupine II so tvorili bele, rahlo izbočene okrogle kolonije; izolati iz skupine III pa so tvorili kolonije, ki so bile popkasto dvignjene in na sredini bele, rob pa je bil svetlejši in nepravilen.

Za ugotavljanje raznolikosti laktobacilov, osamljenih iz kefirnih zrn, smo uporabili analizo RAPD. Analiza RAPD za vseh 79 izolatov, pri katerih smo s PCR z začetnima oligonukleotidoma LbMa1-rev in R16-1 potrdili pripadnost rodu *Lactobacillus*, je prikazana na sliki 9. Glede na rezultate analize RAPD smo osamljene laktobacile lahko razvrstili v tri skupine s podobnimi vzorci RAPD. Po 5 do 9 predstavnikov skupine s podobnim vzorcem RAPD smo identificirali s pomočjo sekvenciranja dela gena za 16S rDNA. Vseh 8 izolatov iz skupine I, ki smo jih poslali na sekvenciranje, je pripadalo vrsti *Lb. parakefiri*. V skupino I se je uvrstilo 26 izolatov, kar predstavlja 33,3 % osamljenih laktobacilov iz kefirnih zrn. Iz skupine II smo sekvencirali 5 izolatov; vsi so pripadali vrsti *Lb. kefiri*. Skupaj je skupini II pripadalo 12 izolatov, kar predstavlja 15,4 % vseh osamljenih laktobacilov iz kefirnih zrn. Največ izolatov je pripadalo skupini III, in sicer

40, kar predstavlja 51,3 % vseh osamljenih laktobacilov iz kefirnih zrn. Izkazalo se je, da je vseh 9 predstavnikov skupine III, ki smo jih poslali na sekvenciranje, pripadalo vrsti *Lb. kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum*.



Slika 9: Rezultati analize RAPD izolatov laktobacilov, osamljenih iz kefirnih zrn.

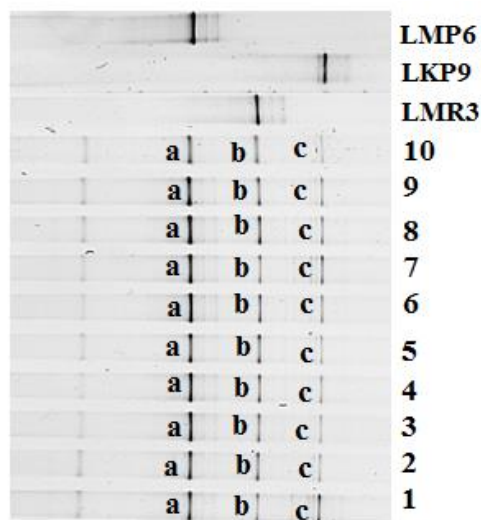
Skupina I: *Lactobacillus parakefiri*; skupina II: *Lactobacillus kefiri*; skupina III: *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum*. Tipski sevi: *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* DSM 10550 in *Lactobacillus kefiri* LMG 9480.

Figure 9: RAPD-PCR patterns of isolates obtained from kefir grains.

Group I: *Lactobacillus parakefiri*; group II: *Lactobacillus kefiri*; group III: *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum*. Type strains: *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* DSM 10550 and *Lactobacillus kefiri* LMG 9480.

4.1.2 Identifikacija laktobacilov v kefirnih zrnih z metodo DGGE

Za pomnoževanje skupne DNA, osamljene iz vzorcev kefirnih zrn in bakterijskih izolatov iz kefirnih zrn, smo uporabili začetna oligonukleotida HDA1-GC in HDA2. Pri analizi profilov DGGE smo opazovali položaj prog v gelu in jih primerjali s položajem prog referenčnih laktobacilov.



Slika 10: Profil DGGE DNA, izolirane iz vzorcev kefirnih zrn in osamljenih laktobacilov.

1 do 10: vzorci kefirnih zrn. Laktobacili, izolirani iz kefirnih zrn: LMP6 - *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* MP6, LMR3 - *Lactobacillus kefir* MR3, LKP9 - *Lactobacillus parakefiri* KP9.

Figure 10: DGGE fingerprints of bacterial community present in kefir grains.

1-10: samples of kefir grains. Lactobacilli isolated from kefir grains: LMP6 - *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* MP6, LMR3 - *Lactobacillus kefir* MR3, LKP9 - *Lactobacillus parakefiri* KP9.

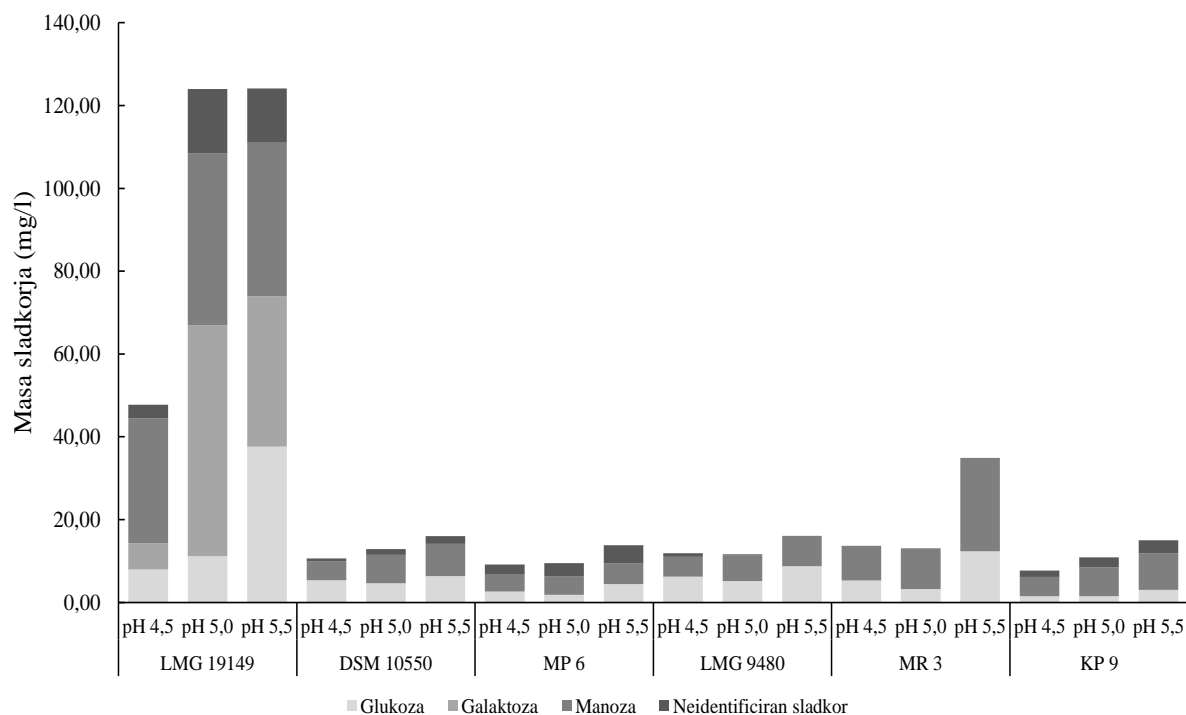
Profili DGGE DNA, osamljene iz vzorcev kefirnih zrn in izolatov iz kefirnih zrn so prikazani na sliki 10. Profili DGGE skupne DNA, izolirane neposredno iz vzorcev kefirnih zrn, so sestavljeni iz več bolj ali manj intenzivnih prog. Pri vseh vzorcih kefirnih zrn (1 do 10) so prisotne tri ostre, močnejše obarvane proge (proga a, b in c) ter ena manj izrazita proga. Proga (a) se pri vseh vzorcih kefirnih zrn nahaja na položaju, značilnem za *Lb. kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum*, proga (b) na položaju, značilnem za *Lb. kefir*, in proga (c) na položaju, značilnem za *Lb. parakefiri*.

4.2 TVORBA EKSOPLISAHARIDOV V ČISTI KULTURI

Tvorbo eksopolisaharidov (EPS) smo spremljali pri laktobacilih, osamljenih iz kefirnih zrn (iz vsake skupine smo naključno izbrali po enega predstavnika: *Lb. kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* MP6, *Lb. kefir* MR3 in *Lb. parakefir* KP9), in pri referenčnih sevih iz zbirk (*Lb. kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* LMG 19149, *Lb. kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* DSM 10550, *Lb. kefir* LMG 9480), ki so služili kot kontrola. Za optimizacijo tvorbe EPS smo uporabili različna gojišča, in sicer MRS, MRSL in KPL, ter različne začetne vrednosti pH gojišč (4,5, 5,0 in 5,5). Sestavo EPS smo določili s kapilarno elektroforezo.

Slika 11 prikazuje količine in sestavo eksopolisaharidov, ki so jih tvorili laktobacili v gojišču MRS pri različnih vrednostih pH. Rezultati kažejo, da so vsi laktobacili, osamljeni iz kefirnih zrn, in vsi referenčni sevi v gojišču MRS pri različnih vrednostih pH tvorili EPS. Največjo količino EPS je tvoril referenčni sev *Lb. kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* LMG 19149, in sicer pri vseh vrednostih pH gojišča. Višja kot je bila vrednost pH v gojišču, višja je bila tvorba EPS. Pri pH 4,5 je ta sev tvoril 47,78 mg/l EPS, pri pH 5,0 124 mg/l in pri pH 5,5 124,11 mg/l. Tako kakor sev *Lb. kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* LMG 19149 so tudi ostali sevi laktobacilov tvorili večje količine EPS pri pH 5,5; te pa so bile v primerjavi s sevom LMG 19149 precej nižje in so se gibale od 13,81 mg/l (*Lb. kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* MP6) do 34,92 mg/l (*Lb. kefir* MR3).

Samo sev *Lb. kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* LMG 19149 je v gojišču MRS tvoril EPS, sestavljen iz glukoze, galaktoze, manoze in neidentificiranega sladkorja. EPS ostalih laktobacilov ni vseboval galaktoze, temveč je bil sestavljen iz glukoze in manoze (*Lb. kefir* MR3) ter različnih deležev neidentificiranega sladkorja, od 0,23 mg/l (*Lb. kefir* LMG 9480 pri pH 5,0) do 4,33 mg/l (*Lb. kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* MP6 pri pH 5,5).



Legenda:

LMG 19149: *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* LMG 19149DSM 10550: *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* DSM 10550MP 6: *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* MP6LMG 9480: *Lactobacillus kefir* LMG 9480MR 3: *Lactobacillus kefir* MR3KP 9: *Lactobacillus parakefir* KP9

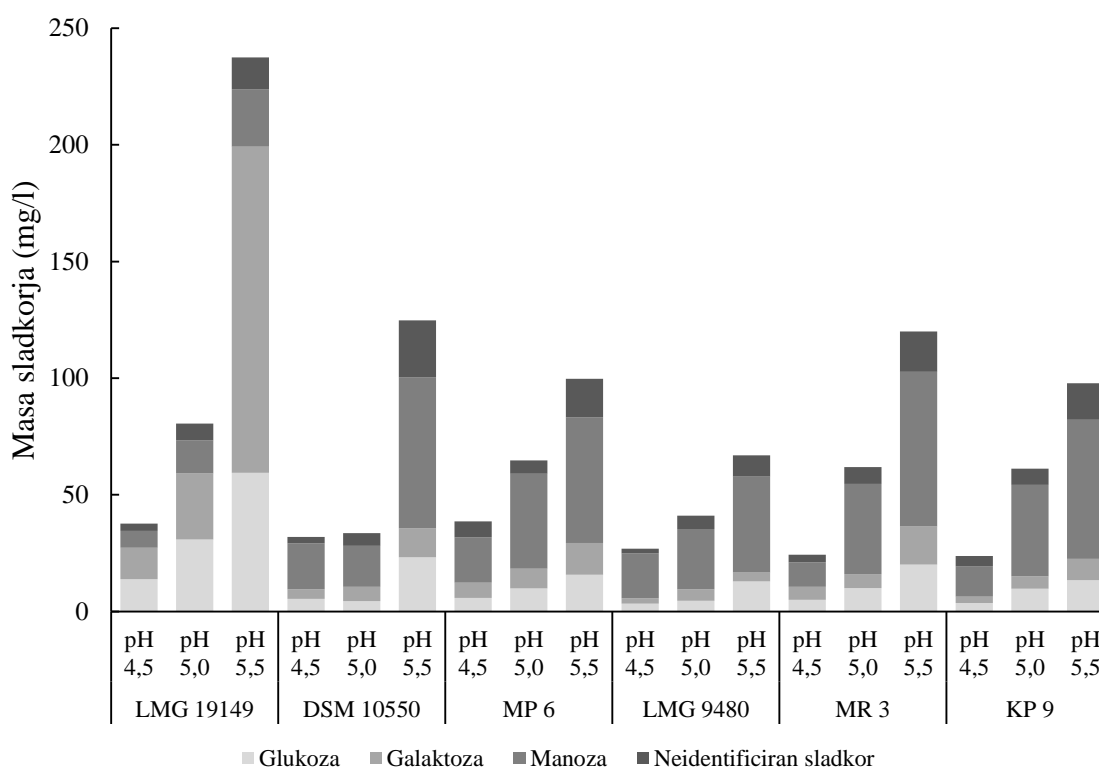
Slika 11: Količina in sestava eksopolisaharidov, ki so jih tvorili laktobacili v gojišču MRS pri različnih vrednostih pH.

Figure 11: Quantity and composition of exopolysaccharide, produced by lactobacilli in MRS medium at different pH values.

Tvorbo EPS smo spremljali tudi v gojišču MRSL (Slika 12). Proučevani sevi so v gojišču MRSL tvorili večje količine EPS kot v gojišču MRS. Pri vseh testiranih vrednostih pH je največ EPS spet tvoril sev *Lb. kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* LMG 19149, in sicer pri pH 4,5 37 mg/l, pri pH 5,0 80,57 mg/l in pri pH 5,5 237,43 mg/l. Pri ostalih sevih se je pri vrednosti pH 4,5 količina proizvedenega EPS gibala med 23,80 mg/l (*Lb. parakefir* KP9) in 38,56 mg/l (*Lb. kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* MP6); pri vrednosti pH 5,0 se je količina proizvedenega EPS gibala med 33,59 mg/l (*Lb. kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* DSM 10550) in 64,71 (*Lb. kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* MP6); pri

vrednosti pH 5,5 pa med 66,98 mg/l (*Lb. kefir* LMG 9480) in 124,80 mg/l (*Lb. kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* DSM 10550).

Eksopolisaharidi, ki so jih izbrani laktobacili tvorili v MRSL, so bili sestavljeni iz glukoze, galaktoze, manoze in neidentificiranega sladkorja. Tudi na tem gojišču je EPS seva LMG 19149 vseboval večji delež galaktoze kot eksopolisaharidi ostalih sevov, pri katerih je največji delež predstavljala manoz.



Legenda:

LMG 19149: *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* LMG 19149

DSM 10550: *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* DSM 10550

MP 6: *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* MP6

LMG 9480: *Lactobacillus kefir* LMG 9480

MR 3: *Lactobacillus kefir* MR3

KP 9: *Lactobacillus parakefir* KP9

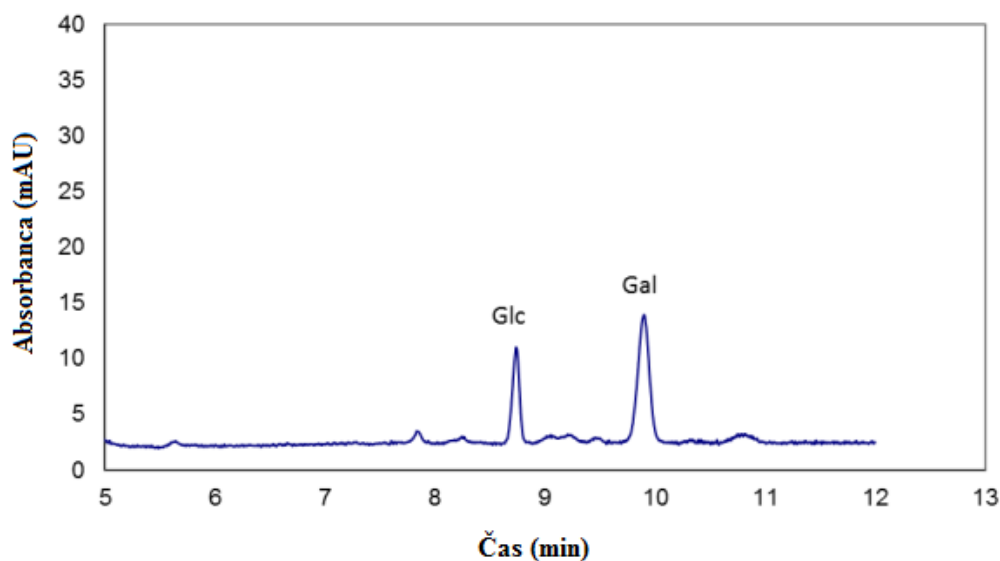
Slika 12: Količine in sestava eksopolisaharidov, ki so jih tvorili laktobacili v gojišču MRSL pri različnih vrednostih pH.

Figure 12: Quantity and composition of exopolysaccharide, produced by lactobacilli in MRSL medium at different pH values.

Sevi laktobacilov, proučevani v gojišču KPL, niso tvorili EPS pri nobeni vrednosti pH.

4.3 SESTAVA KEFIRANA, PRIDOBLJENEGA IZ KEFIRNIH ZRN

Na sliki 13 so prikazani rezultati kapilarne elektroforeze kefirana, pridobljenega iz kefirnih zrn. Analizirani vzorec kefirana je vseboval 28,36 % glukoze in 26,21 % galaktoze. Razmerje med glukozo in galaktozo v vzorcu kefirana je znašalo 1:0,92.



Legenda:

Glc: glukoza

Gal: galaktoza

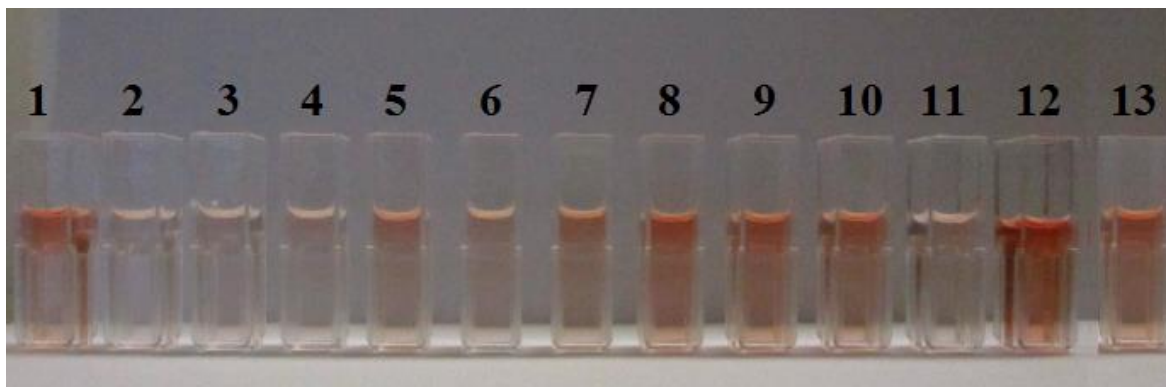
Slika 13: **Elektroferogram za kefiran**

Figure 13: **Electropherogram for kefiran.**

4.4 ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST BREZCELIČNIH INTRACELULARNIH EKSTRAKTOV LAKTOBACILOV IN KEFIRANA

Za spremljanje antioksidativne aktivnosti kefirana, pridobljenega iz kefirnih zrn, in brezceličnih ekstraktov laktobacilov smo uporabili štiri različne metode, in sicer metodo za določanje antioksidativne aktivnosti s tiocianatom (Abbasi in sod., 2013), metodo za določanje antioksidativne aktivnosti z 2-deoksi-D-ribozo (Stoilova in sod., 2007), metodo

za določanje antioksidativne aktivnosti z DPPH (Molyneux, 2004; Ahire in sod., 2013) in metodo za določanje antioksidativne aktivnosti z 1,10-fenantrolinom (Ahire in sod., 2013). Pri vseh metodah antioksidativno aktivnost določamo spektrofotometrično. Za končni izračun smo uporabili povprečje treh meritev. Rezultati antioksidativne aktivnosti kefirana in ekstraktov laktobacilov so prikazani v preglednici 8.



Legenda:

1: vitamin C; 2: *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* DSM 10550; 3: *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* LMG 19149; 4: *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* MP6; 5: *Lactobacillus kefir* LMG 9480; 6: *Lactobacillus parakefiri* KP9; 7: *Lactobacillus kefir* MR3; 8: kefiran – 50 mg/ml; 9: kefiran – 70 mg/ml; 10: kefiran – 100 mg/ml; 11: *Lactobacillus casei* DN 114; 12: BHA; 13: *Lactobacillus helveticus* IM 30.

Slika 14: **Antioksidativna aktivnost kefirana in brezceličnih ekstraktov laktobacilov - metoda s tiocianatom.**

Figure 14: **Antioxidant activity of kefiran and cell-free extracts of lactobacilli using thiocyanate method.**

Na Preglednica 8 vidimo, da se rezultati različnih metod med seboj razlikujejo, najbolj pa odstopa metoda z DPPH. S tiocianatno metodo smo določili najvišjo antioksidativno aktivnost pri butilhidroksianizolu (BHA) in askorbinski kislini (vitamin C). Odstotek inhibicije oksidacije linolne kisline je pri BHA znašal 80,51 % in pri vitaminu C 63,45 %. Visoko antioksidativno aktivnost smo izmerili tudi za kefiran, z naraščajočo koncentracijo kefirana je naraščal tudi odstotek inhibicije oksidacije linolne kisline. Brezcelični ekstrakti sevov vrst *Lb. kefir* in *Lb. helveticus* so bili po antioksidativni aktivnosti primerljivi s kefiranom, medtem ko so imeli ekstrakti sevov vrste *Lb. kefiranofaciens* manjšo antioksidativno aktivnost (Slika 14).

Preglednica 8: Antioksidativna aktivnost brezceličnih ekstraktov laktobacilov in kefirana, določena z različnimi metodami.

Table 8: Antioxidant activity of cell-free extracts of lactobacilli and kefiran determined by using different methods.

Vzorec /Metoda	Metoda s tiocianatom (AA v %)	Metoda z 2- deoksi-D- ribozo (AA v %)	Metoda z DPPH (AA v %)	Metoda z 1,10- fenantrolinom (AA v %)
<i>Lb. kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens</i> LMG 19149	29,60 ± 2,40	11,13 ± 1,76	2,24 ± 0,79	39,34 ± 3,42
<i>Lb. kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefirgranum</i> DSM 10550	23,80 ± 0,28	12,74 ± 1,90	2,28 ± 0,58	31,10 ± 4,58
<i>Lb. kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefirgranum</i> MP6	27,60 ± 6,55	11,99 ± 3,89	1,71 ± 0,55	21,21 ± 0,47
<i>Lb. kefir</i> LMG 9480	52,55 ± 10,96	44,62 ± 1,58	7,62 ± 1,41	50,99 ± 2,49
<i>Lb. kefir</i> MR3	52,70 ± 11,46	46,59 ± 4,97	7,61 ± 1,38	51,15 ± 3,81
<i>Lb. parakefir</i> KP9	45,90 ± 7,35	45,27 ± 5,90	6,92 ± 1,98	46,70 ± 0,78
<i>Lb. casei</i> DN 114	35,60 ± 4,07	30,80 ± 1,41	5,60 ± 0,57	35,22 ± 1,32
<i>Lb. helveticus</i> IM 30	54,30 ± 13,72	49,87 ± 5,03	8,70 ± 1,42	55,60 ± 6,84
Kefiran 50 mg/ml	50,60 ± 7,21	59,17 ± 2,51	/	76,29 ± 4,01
Kefiran 70 mg/ml	55,20 ± 3,54	60,66 ± 1,17	/	82,19 ± 3,43
Kefiran 100 mg/ml	57,09 ± 7,82	62,14 ± 1,03	/	91,90 ± 0,58
Vitamin C	63,45 ± 12,52	/	96,95 ± 12,29	88,03 ± 7,60
Vitamin E	/	67,85 ± 1,02	/	/
BHA	80,51 ± 12,59	64,80 ± 1,30	93,62 ± 7,44	/

AA: antioksidativna aktivnost; BHA: butilhidroksianizol

Podobne rezultate smo dobili tudi z metodo z 2-deoksi-D-ribozo. Vitamin E in BHA sta najmočnejše inhibirala oksidacijo 2-deoksi-D-riboze, in sicer 67,85 % oz. 64,80 %, sledi jima kefiran z 62,14 % pri koncentraciji 100 mg/ml, medtem ko so pokazali sevi *Lb. kefiranofaciens* spet najmanjšo antioksidativno aktivnost.

Najnižjo antioksidativno aktivnost brezceličnih ekstraktov laktobacilov smo ugotovili z metodo DPPH, medtem ko smo prav s to metodo določili najvišjo antioksidativno

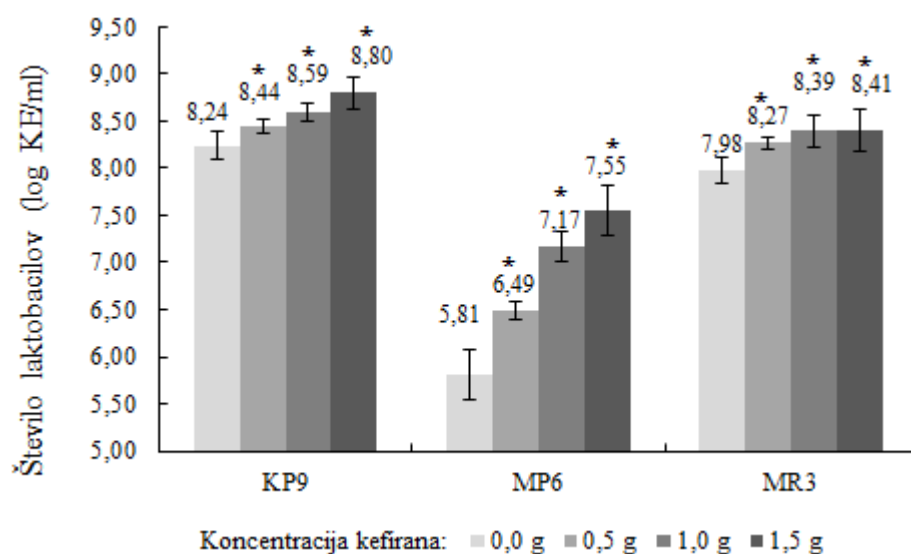
aktivnost vitamina C in BHA, ki imata očitno izjemno sposobnost reagiranja z 1,1-difenil-2-pikrilhidrazilskimi radikali. Njuna antioksidativna aktivnost je bila kar 96,95 % oz. 93,62 %. Antioksidativne aktivnosti kefirana nismo mogli izmeriti, saj se je kefirana ob prisotnosti metanola oboril.

Rezultati antioksidativne aktivnosti, ki smo jih dobili z 1,10-fenantrolinom, so primerljivi z rezultati, ki smo jih dobili pri metodi s tioacianatom in metodi z 2-deoksi-D-ribozo. Najvišjo antioksidativno aktivnost smo izmerili pri kefiranu v koncentraciji 100 mg/ml, in sicer 91,90 %, sledi mu vitamin C z 88,03 %. Z naraščanjem koncentracije kefirana narašča tudi odstotek inhibicije oksidacije 1,10-fenantrolina. Najmočnejšo antioksidativno aktivnost, in sicer 55,60 %, so imeli ekstrakti seva *Lb. helveticus* IM 30. Sevi *Lb. kefiranofaciens* so spet pokazali najmanjšo antioksidativno aktivnost.

4.5 PREBIOTIČNE LASTNOSTI KEFIRANA

Za spremljanje prebiotičnih lastnosti kefirana, ki smo ga pridobili iz kefirnih zrn, smo uporabili klasične mikrobiološke metode štetja KE v gojišču. Vpliv različnih koncentracij kefirana na rast izbranih laktobacilov in bifidobakterij smo določali tako, da smo izbrane bakterije cepili v tekoče gojišče MRS oziroma gojišče MRS z dodanim cisteinom. V 100 ml gojišča smo dodali 0,5 g, 1,0 g in 1,5 g kefirana. Kot kontrolo smo uporabili gojišče brez dodanega kefirana. Po 72-urni inkubaciji smo vzorce cepili na trdo gojišče MRS oziroma MRS z dodanim cisteinom, plošče inkubirali pri ustrezni pogojih in prešteli izrasle kolonije.

Prebiotične lastnosti kefirana smo testirali na laktobacilih, osamljenih iz kefirnih zrn (*Lb. kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* MP6, *Lb. kefir* MR3 in *Lb. parakefir* KP9), na nekaterih laktobacilih, značilnih za prebavni trakt (*Lb. sakei* NCDO 2714, *Lb. casei* IM 244, *Lb. fermentum* IM 351, *Lb. rahmnosus* IM 239, *Lb. plantarum* IM 212), in na bifidobakterijah *Bifidobacterium breve* IM 386, *B. lactis* IM 414 in *B. animalis* IM 417.



Legenda:

*: $p < 0,05$; statistično značilna razlika v primerjavi s kontrolno skupino

Slika 15: **Koncentracije mikrobnih populacij laktobacilov (log KE/ml), osamljenih iz kefirnih zrn, po tridnevni inkubaciji v gojišču MRS pri različnih koncentracijah kefirana.**

KP9 – *Lactobacillus parakefiri* KP9; MP6 – *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* MP6; MR3 – *Lactobacillus kefiri* MR3. Koncentracije kefirana: 0,0 g, 0,5 g, 1,0 g in 1,5 g na 100 ml gojišča.

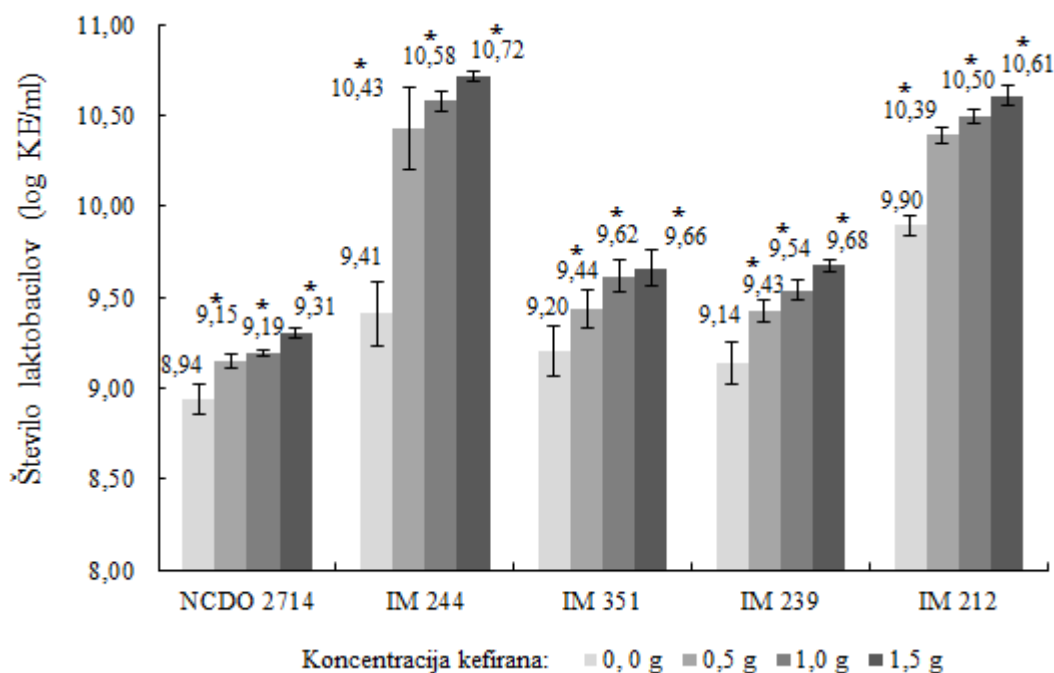
Figure 15: **The concentrations of microbial populations of lactobacilli (log CFU/ml), isolated from kefir grains, after three days of incubation in MRS medium with different concentrations of kefiran.**

KP9 – *Lactobacillus parakefiri* KP9; MP6 – *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* MP6; MR3 – *Lactobacillus kefiri* MR3. Kefiran concentrations: 0.00 g, 0.50 g, 1.00 g in 1.50 g per 100 ml of the medium.

Dodatek kefirana je povečal rast sevov *Lb. parakefiri* KP9, *Lb. kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* MP6 in *Lb. kefiri* MR3, prebiotični učinek pa je bil pozitivno povezan s koncentracijo kefirana v gojišču (Slika 15). Razlike v koncentraciji mikrobnih populacij laktobacilov, zraslih v gojišču brez kefirana (kontrola) in gojiščih z različnimi koncentracijami kefirana, so bile za vse seve statistično značilne ($p < 0,05$). Največji vpliv je imel kefirana na rast seva *Lb. kefiri* MP6.

Dodatek kefirana je podobno kakor na laktobacile, ki smo jih osamili iz kefirnih zrn, vplival tudi na rast laktobacilov, značilnih za prebavni trakt (Slika 16). Višja kot je bila koncentracija dodanega kefirana v gojišče, večja je bila po inkubaciji koncentracija mikrobnih populacij laktobacilov. Največja razlika v številu KE/ml kulture med kontrolo

(ko v gojišče ni bil dodan kefir) in vzorci z dodanim kefiranom se kaže pri sevu *Lb.casei* IM 244.



Legenda:

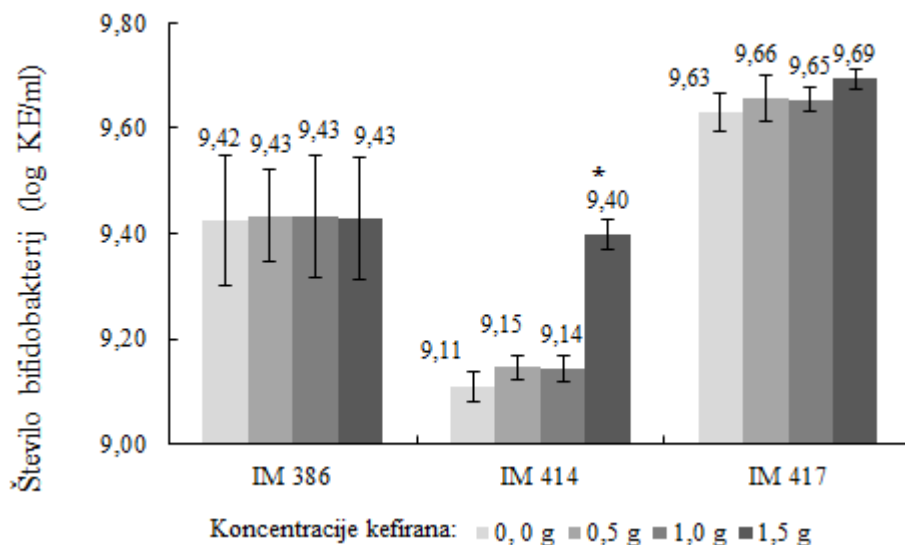
*: $p < 0,05$; statistično značilna razlika v primerjavi s kontrolno skupino

Slika 16: Koncentracije mikrobnih populacij laktobacilov (log KE/ml), značilnih za prebavni trakt, po tridnevni inkubaciji v gojišču MRS pri različnih koncentracijah kefirana.

NCDO 2714 - *Lactobacillus sakei* NCDO 2714; IM 244 - *Lactobacillus casei* IM 244; IM351 - *Lactobacillus fermentum* IM 351; IM239 - *Lactobacillus rahmnosus* IM 239; IM212 - *Lactobacillus plantarum* IM 212) Koncentracije kefirana: 0,0 g, 0,5 g, 1,0 g in 1,5 g na 100 ml gojišča.

Figure 16: The concentrations of microbial populations of lactobacilli (log CFU/ml) typical for gastrointestinal tract, after three days of incubation in MRS medium with different concentrations of kefiran.

NCDO 2714 - *Lactobacillus sakei* NCDO 2714; IM244 - *Lactobacillus casei* IM 244; IM351 - *Lactobacillus fermentum* IM 351; IM239 - *Lactobacillus rahmnosus* IM 239; IM212 - *Lactobacillus plantarum* IM 212). Kefiran concentrations: 0.00 g, 0.50 g, 1.00 g in 1.50 g per 100 ml of the medium.



Legenda:

*: $p < 0,05$; statistično značilna razlika v primerjavi s kontrolno skupino

Slika 17: **Koncentracije mikrobnih populacij bifidobakterij (log KE/ml), po tridnevni inkubaciji v gojišču MRS z dodanim cisteinom in pri različnih koncentracijah kefirana.**

IM 386 – *Bifidobacterium breve* IM 386; IM 414 – *Bifidobacterium lactis* IM 414; IM 417 – *Bifidobacterium animalis* IM 417. Koncentracije kefirana: 0,0 g, 0,5 g, 1,0 g in 1,5 g na 100 ml gojišča.

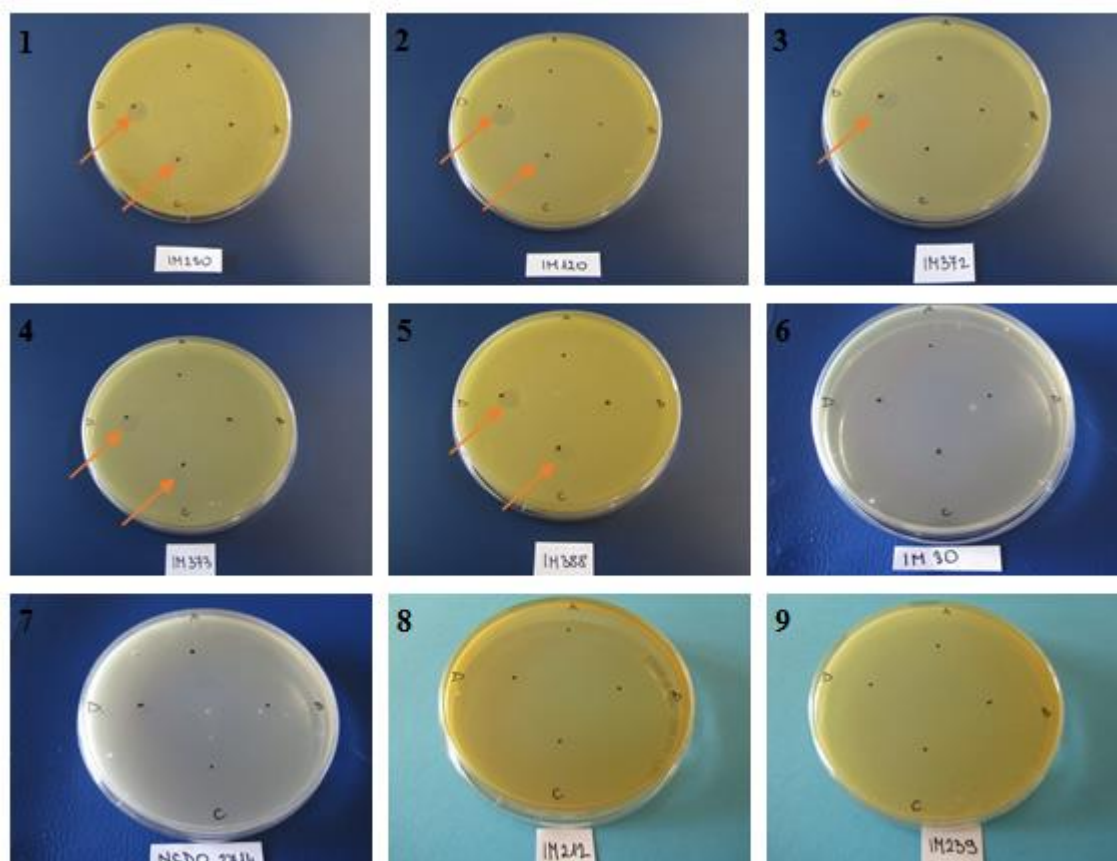
Figure 17: **The concentrations of microbial populations of bifidobacteria (log CFU/ml), after three days of incubation in MRS medium with cistein with different concentrations of kefirana.**

IM 386 – *Bifidobacterium breve* IM 386; IM 414 – *Bifidobacterium lactis* IM 414; IM 417 – *Bifidobacterium animalis* IM 417). Kefiran concentrations: 0.00 g, 0.50 g, 1.00 g in 1.50 g per 100 ml of the medium.

Slika 17 prikazuje velikosti mikrobnih populacij sevov *B. breve* IM 386, *B. lactis* IM 414 in *B. animalis* IM 417, zraslih v gojišču MRS s cisteinom ob različnih koncentracijah kefirana. Kefiran je statistično značilno vplival le na rast seva *B. lactis* IM 414, in sicer samo v koncentraciji 1,5 g/100 ml. Dodatek kefirana na rast ostalih testiranih sevov bifidobakterij ni vplival.

4.6 PROTIMIKROBNA AKTIVNOST KEFIRANA

Protimikrobno aktivnost kefirana smo spremljali z metodo lise na agarju, in sicer proti bakterijam vrst *Escherichia coli*, *Listeria monocytogens*, *L. innocua*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Lb. helveticus*, *Lb. sakei*, *Lb. plantarum* in *Lb. rhamnosus*.



Slika 18: Protimikrobna aktivnost kefirana - metoda lise na agarju.

Bacillus cereus IM 250 (1), *Escherichia coli* IM 120 (2), *Listeria monocytogens* IM 372 (3), *Listeria innocua* IM 373 (4), *Staphylococcus aureus* IM 388 (5), *Lactobacillus helveticus* IM 30 (6), *Lactobacillus sakei* NCDO 2714 (7), *Lactobacillus plantarum* IM 212 (8) in *Lactobacillus rhamnosus* IM 239 (9). Koncentracije kefirana - A: 2 mg/ml, B: 5 mg/ml, C: 10 mg/ml in D: 20 mg/ml.

Figure 18: Antimicrobial activity of kefiran - agar spot test.

Bacillus cereus IM 250 (1), *Escherichia coli* IM 120 (2), *Listeria monocytogens* IM 372 (3), *Listeria innocua* IM 373 (4), *Staphylococcus aureus* IM 388 (5), *Lactobacillus helveticus* IM 30 (6), *Lactobacillus sakei* NCDO 2714 (7), *Lactobacillus plantarum* IM 212 (8) and *Lactobacillus rhamnosus* IM 239 (9). Kefiran concentration - A: 2 mg/ml, B: 5 mg/ml, C: 10 mg/ml in D: 20 mg/ml.

Slika 18 prikazuje rezultate testiranja protimikrobne aktivnosti različnih koncentracij kefirana (2, 5, 10 in 20 mg/ml). Protimikrobno delovanje kefirana smo potrdili s pojavom

cone inhibicije rasti indikatorskih sevov. Kefiran v nobeni preskušani koncentraciji ni inhibiral sevov laktobacilov *Lb. helveticus* IM 30, *Lb. sakei* NCDO 2714, *Lb. plantarum* IM 212 in *Lb. rhamnosus* IM 239. Protimikrobno aktivnost kefirana smo opazili v koncentraciji 20 mg/ml proti sevom *B. cereus* IM 250, *E. coli* IM 120, *L. monocytogenes* IM 372, *L. innocua* IM 373 in *S. aureus* IM 388. Tudi pri koncentraciji 10 mg/ml je kefirana inhibiral rast sevov *B. cereus* IM 250, *E. coli* IM 120, *L. innocua* IM 373 in *S. aureus* IM 388, vendar cona ni bila tako jasna in izrazita kakor pri koncentraciji 20 mg/ml. Nižje koncentracije kefirana (2 in 5 mg/ml) proti izbranim bakterijskim sevom niso imele protimikrobnega učinka.

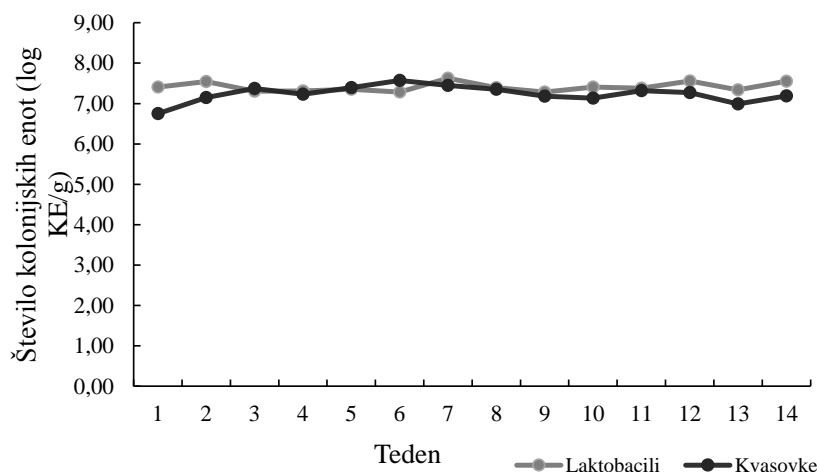
4.7 PREHRANSKI POSKUS NA PODGANAH

V prehranskem poskusu na podganah smo proučevali vpliv kefirana in kefirnih zrn na sestavo črevesne mikrobiote živali, povišano raven serumskega holesterola in trigliceridov ter oksidacijski stres. Veliko raziskovalcev meni, da je prav kefirana tista aktivna substanca, ki daje kefirnemu zrnu in kefirju posebne funkcionalne učinke, zato smo želeli v raziskavi ovrednotiti funkcionalne učinke kefirana v primerjavi s kompleksnim kefirnim zrnem. Poskus smo opravili v Centru za laboratorijske živali Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Pri poskusu, ki smo ga razdelili na dva ločena poskusa, smo uporabili 72 podganjih samic vrste Wistar, starih od 6 do 8 tednov. Pri prvem poskusu smo živali sočasno krmili s krmo z visoko vsebnostjo holesterola (HCD) in kefiranom oz. kefirnimi zrnji. Pri drugem poskusu smo pri živalih s prehrano najprej povišali raven serumskega holesterola in trigliceridov ter tako sprožili oksidacijski stres, nato pa jih pričeli krmili še s kefiranom oz. kefirnimi zrnji. Ker je pomemben dejavnik funkcionalnih učinkov kefirnega zrna mikrobná populacija, smo med poskusom preverjali stabilnost mikrobiote kefirnega zrna.

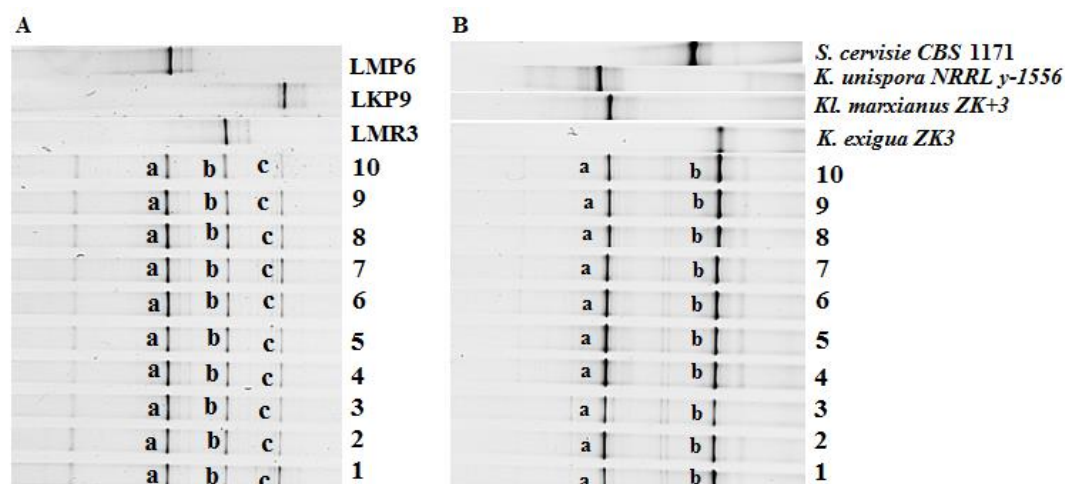
4.7.1 Stabilnost mikrobiote kefirnih zrn

Stabilnost mikrobiote kefirnih zrn smo v času poskusa spremljali z uporabo poliakrilamidne gelske elektroforeze v denaturirajočem gradientu (DGGE). Za ovrednotenje velikosti populacije laktobacilov in kvasovk v kefirnih zrnih smo uporabili metodo štetja kolonij na petrijevih ploščah.



Slika 19: Število laktobacilov in kvasovk v kefirnih zrnih med 14-tedenskim testom stabilnosti.

Figure 19: Counts of lactobacilli and yeasts in kefir grains during 14 weeks of stability test.



Slika 20: Profil DGGE DNA prevladujočih laktobacilov (A) in kvasovk (B) v kefirnih zrnih.

1-10: teden vzorčenja. A: LMP6 - *Lb. kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* MP6, LMR3 - *Lb. kefir* MR3, LKP9 - *Lb. parakefir* KP9 (referenčni laktobacili). Proge: a - *Lb. kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum*; b - *Lb. kefir*; c - *Lb. parakefir*. B: *K. exigua* ZK3, *Kl. marxianus* ZK+3, *K. unispora* NRRL y-1556, *S. cerevisie* CBS 1171 (referenčne kvasovke). Proge: a - *Kl. marxianus*; b - *K. Exigua*.

Figure 20: PCR-DGGE fingerprint of prevailing lactobacilli (A) and yeasts (B) community in kefir grains.

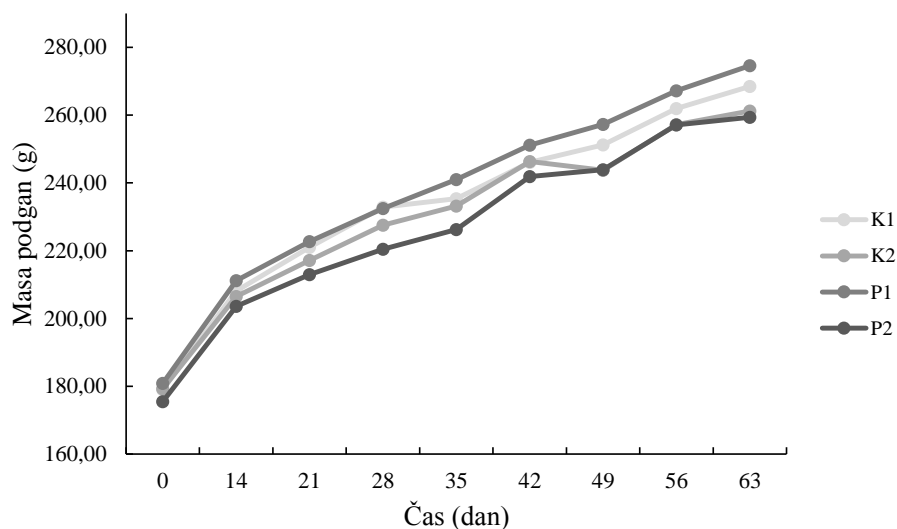
1-10: week of sampling. A: LMP6 - *Lb. kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* MP6, LMR3 - *Lb. kefir* MR3, LKP9 - *Lb. parakefir* KP9 (reference lactobacilli). Bands: a - *Lb. kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum*; b - *Lb. kefir*; c - *Lb. parakefir*. B: *K. exigua* ZK3, *Kl. marxianus* ZK+3, *K. unispora* NRRL y-1556, *S. cerevisie* CBS 1171 (reference yeasts). Bands: a - *Kl. marxianus*; b - *K. exigua*.

Število laktobacilov in kvasovk v g kefirnih zrn je bilo med celotnim poskusom zelo stabilno. Število laktobacilov se je gibalo med 7,28 in 7,62 log KE/g, število kvasovk pa med 6,75 in 7,57 log KE/g (Slika 19).

Stabilna je bila tudi prevladujoča mikrobiota kefirnih zrn, ki smo jih uporabili v prehranskem poskusu na podganah. Analiza DGGE je pokazala, da so v času poskusa v kefirnih zrnih prevladovali laktobacili vrst *Lb. kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum*, *Lb. kefiri* in *Lb. parakefiri* ter kvasovki vrst *Kluyweromyces marxianus* in *Kazachstania exigua* (Slika 20).

4.7.2 Rast podgan in količina zaužite krme

Živali pri prvem in drugem poskusu so bile naključno razdeljene v 4 skupine po 9 živali in nastanjene po 3 živali v kletki. Med poskusom smo živali tehtali enkrat tedensko (Slika 21 in Slika 22) in opazovali njihovo splošno zdravstveno stanje.



Legenda:

K1: kontrolna skupina 1 – živali, krmljene s krmo LCD

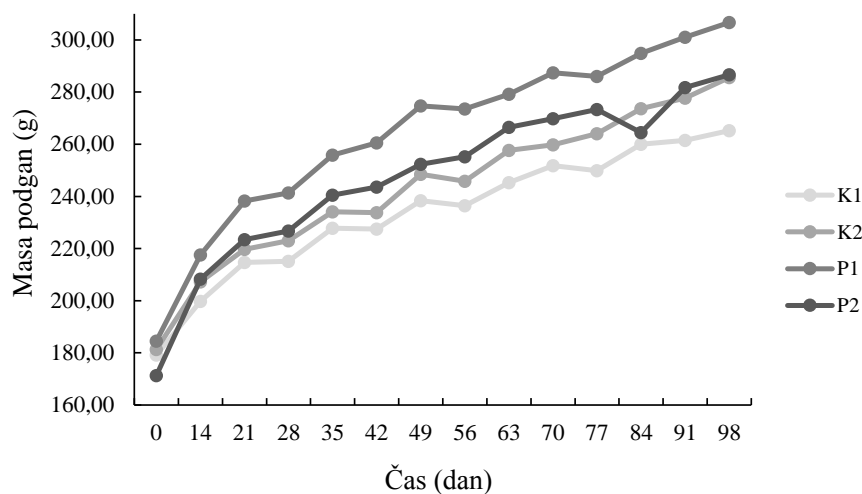
K2: kontrolna skupina 2 – živali, krmljene s krmoHCD

P1: poskusna skupina 1 – živali, krmljene s krmo HCD in dodatkom kefirana

P2: poskusna skupina 2 – živali, krmljene s krmo HCD in dodatkom kefirnih zrn

Slika 21: Povprečna teža posameznih skupin živali po tednih (prvi poskus).

Figure 21: Mean weight of animals from different groups by week in the first experiment.



Legenda:

K1: kontrolna skupina 1 – živali, krmljene s krmo LCD

K2: kontrolna skupina 2 – živali, krmljene s krmo HCD

P1: poskusna skupina 1 – živali, krmljene s krmo HCD in dodatkom kefirana

P2: poskusna skupina 2 – živali, krmljene s krmo HCD in dodatkom kefirnih zrn

Slika 22: Povprečna teža posameznih skupin živali po tednih (drugi poskus).

Figure 22: Mean weight of animals from different groups by week in the second experiment.

Preglednica 9 prikazuje začetno in končno povprečno telesno maso, prirast telesne mase in konzumacijo krme pri prvem in drugem poskusu. Tako pri prvem kakor pri drugem poskusu so živali v vseh skupinah pridobile na telesni masi. Pri prvem poskusu med skupinami ni bilo statistično značilnih razlik niti v povprečni začetni in končni telesni masi niti v prirastu ($p > 0,05$).

Čeprav smo podgane naključno razdelili v skupine, je bila pri drugem poskusu začetna masa podgan iz skupine K1 nekoliko nižja od povprečne mase podgan iz skupin K2, P1 in P2, vendar so bile samo podgane iz skupine P1 signifikantno težje v primerjavi s skupino K1. Na koncu drugega poskusa so bile podgane iz skupin K2, P1 in P2 signifikantno težje ($p < 0,05$) v primerjavi s podganami iz kontrolne skupine K1. Tudi povprečni prirast telesne mase je bil pri podganah iz skupin K2, P1 in P2 v primerjavi s skupino K1 statistično značilno višji ($p < 0,05$).

Preglednica 9: Povprečna začetna in končna telesna masa podgan, prirast telesne mase in konzumacija krme (prvi in drugi poskus).

Table 9: Average initial and final body weight of rats, body weight gain and feed intake in first and second experiment.

Prvi poskus				
Skupina	K1 (n=9)	K2 (n=9)	P1 (n=9)	P2 (n=9)
Začetna telesna masa (g)	208,11±13,16	206,47±13,32	211,20±11,75	203,60±13,54
Končna telesna masa (g)	268,45±19,83	261,25±25,21	274,58±13,76	259,41±16,46
Prirast telesne mase (g/dan)	1,21±0,26	1,10±0,27	1,27±0,19	1,12±0,23
Konzumacija krme (g/dan)	13,52±0,98	11,92±1,20 ^a	12,51±1,02 ^a	11,71±1,17 ^a
Drugi poskus				
Začetna telesna masa (g)	199,72±9,12	207,17±7,89	217,51±8,19 ^a	208,29±13,19
Končna telesna masa (g)	265,20±17,20	285,58±15,42 ^a	306,74±15,32 ^a	286,64±27,00 ^a
Prirast telesne mase (g/dan)	0,76±0,13	0,91±0,13 ^a	1,04±0,13 ^a	0,91±0,24 ^a
Konzumacija krme (g/dan)	12,02±1,17	11,33±1,31 ^a	12,54±1,41 ^b	12,16±1,11 ^b

V preglednici so prikazane povprečne vrednosti ± SD. a: $p < 0,05$ – statistično značilna razlika v primerjavi s skupino K1; b: $p < 0,05$ – statistično značilna razlika v primerjavi s skupino K2.

Legenda: K1: kontrolna skupina 1 – živali, krmljene s krmo LCD; K2: kontrolna skupina 2 – živali, krmljene s krmo HCD; P1: poskusna skupina 1 – živali, krmljene s krmo HCD in dodatkom kefirana; P2: poskusna skupina 2 – živali, krmljene s krmo HCD in dodatkom kefirnih zrn.

Količino zaužite krme smo spremljali enkrat tedensko, in sicer s tehtanjem krme pri skupini živali, ki so bile nastanjene v isti kletki. Čeprav je bila pri prvem poskusu povprečna končna telesna masa podgan v vseh skupinah zelo podobna, je bila povprečna dnevna konzumacija krme pri podganah iz skupine K1, ki so uživale krmo z nizko vsebnostjo holesterola, signifikantno višja ($p < 0,05$) kakor povprečna konzumacija krme pri skupinah K2, P1 in P2. Konzumacija krme se med skupinami K2, P1 in P2 ni statistično značilno razlikovala. Pri drugem delu poskusa je bil dnevni vnos krme pri skupinah P1 in P2 podoben kot pri kontrolni skupini K1, statistično značilnih razlik ni bilo.

Podgane iz skupine K2 so na dan v povprečju zaužile statistično značilno manj krme kot podgane iz skupin K1, P1 in P2.

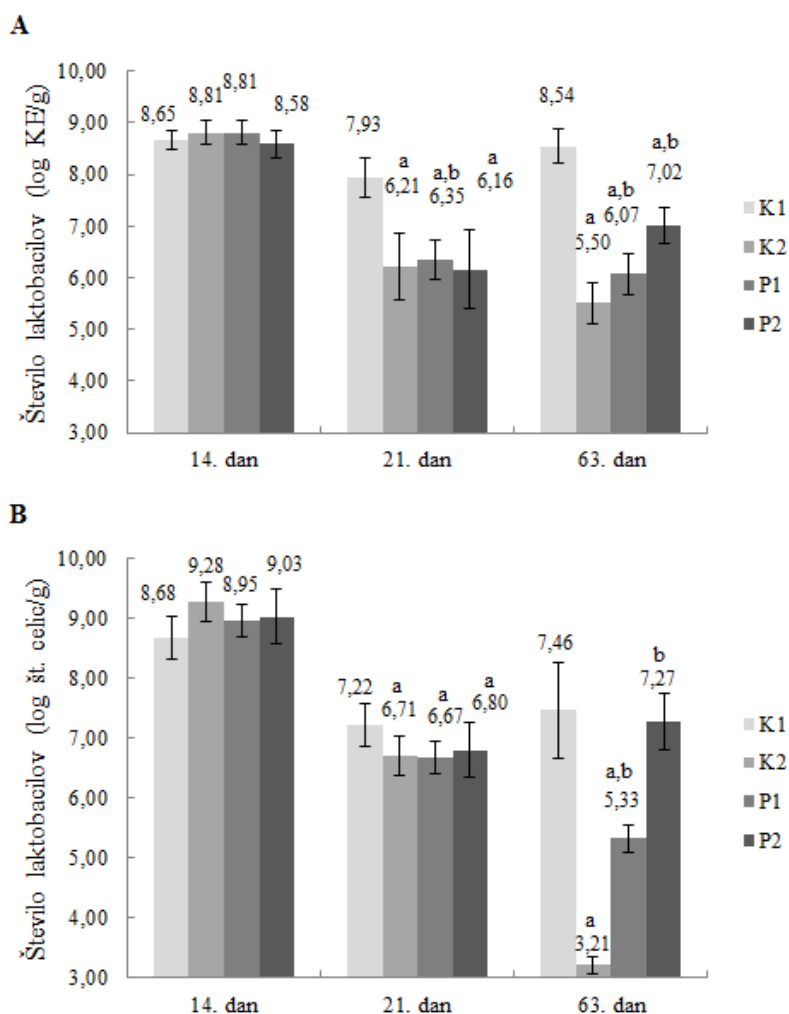
4.7.3 Vpliv krmljenja s kefiranom in kefirnimi zrni na mikrobioto blata podgan

Živalim smo blato odvzeli trikrat, in sicer po koncu karantene (14. dan), pred začetkom dodajanja kefirana oziroma kefirnega zrna (21. dan pri prvem poskusu oz. 56. dan pri drugem poskusu) ter ob koncu poskusa (63. oz. 98. dan). Analizirali smo vzorce posamezne živali. Velikost mikrobnih populacij kvasovk v blatu smo določali le z uporabo klasične mikrobiološke metode cepljenja vzorcev na trdo gojišče in štetjem izraslih kolonij po inkubaciji; velikost populacij laktobacilov, bifidobakterij in enterobakterij pa tudi z uporabo molekularno genetske metode, PCR v realnem času (RT PCR).

Pri prvem vzorčenju (14. dan) se vzorci blata podgan v različnih skupinah v številu laktobacilov niso statistično značilno razlikovali (Slika 23). Ne glede na uporabljeno analitsko metodo lahko pri drugem vzorčenju (21. dan) opazimo, da se je število laktobacilov v blatu podgan zmanjšalo, in sicer za več kot 2 log pri skupinah podgan (K2, P1 in P2), ki so uživale krmo z visoko vsebnostjo holesterola (HCD). Najmanjši padec števila laktobacilov smo opazili pri skupini K1, ki je statistično značilno odstopala od ostalih treh skupin. Tudi pri tretjem vzorčenju (63. dan) je imela skupina K1 v blatu največje število laktobacilov in se je statistično značilno razlikovala od ostalih treh skupin. Poleg tega se je statistično značilno ($p < 0,05$) razlikovalo tudi število laktobacilov v blatu med skupinama K2 in P1 ter med skupinama K2 in P2. Skupini P1 in P2 sta imeli v primerjavi s skupino K2 v blatu višje število laktobacilov. Ob koncu poskusa je bila populacija laktobacilov večja v blatu podgan, ki so uživale kefirna zrna (P2), kakor v skupini, ki je uživala kefiran (P1).

Podobno kot število laktobacilov se je v blatu podgan med vzorčenji spreminjalo tudi število bifidobakterij (Slika 24). Pri prvem vzorčenju se število bifidobakterij v blatu podgan med skupinami ni statistično značilno razlikovalo. Pri drugem vzorčenju je bilo število bifidobakterij v g blata pri skupinah K2, P1 in P2 v primerjavi s skupino K1 nižje. Med skupino K1 in ostalimi skupinami so bile statistično značilne razlike. Tudi zadnji dan poskusa so imele podgane iz skupine K1 v primerjavi s skupinami K2, P1 in P2 v blatu

statistično značilno višje število bifidobakterij. Skupini P1 in P2 sta imeli v primerjavi s skupino K2 v blatu večje število bifidobakterij, vendar med skupinama K2 in P2 razlika ni bila statistično značilna. Prav tako ni bilo statistično značilnih razlik med skupinama P1 in P2.



Legenda:

K1: kontrolna skupina 1 – živali, krmljene s krmo LCD

K2: kontrolna skupina 2 – živali, krmljene s krmo HCD

P1: poskusna skupina 1 – živali, krmljene s krmo HCD in dodatkom kefirana

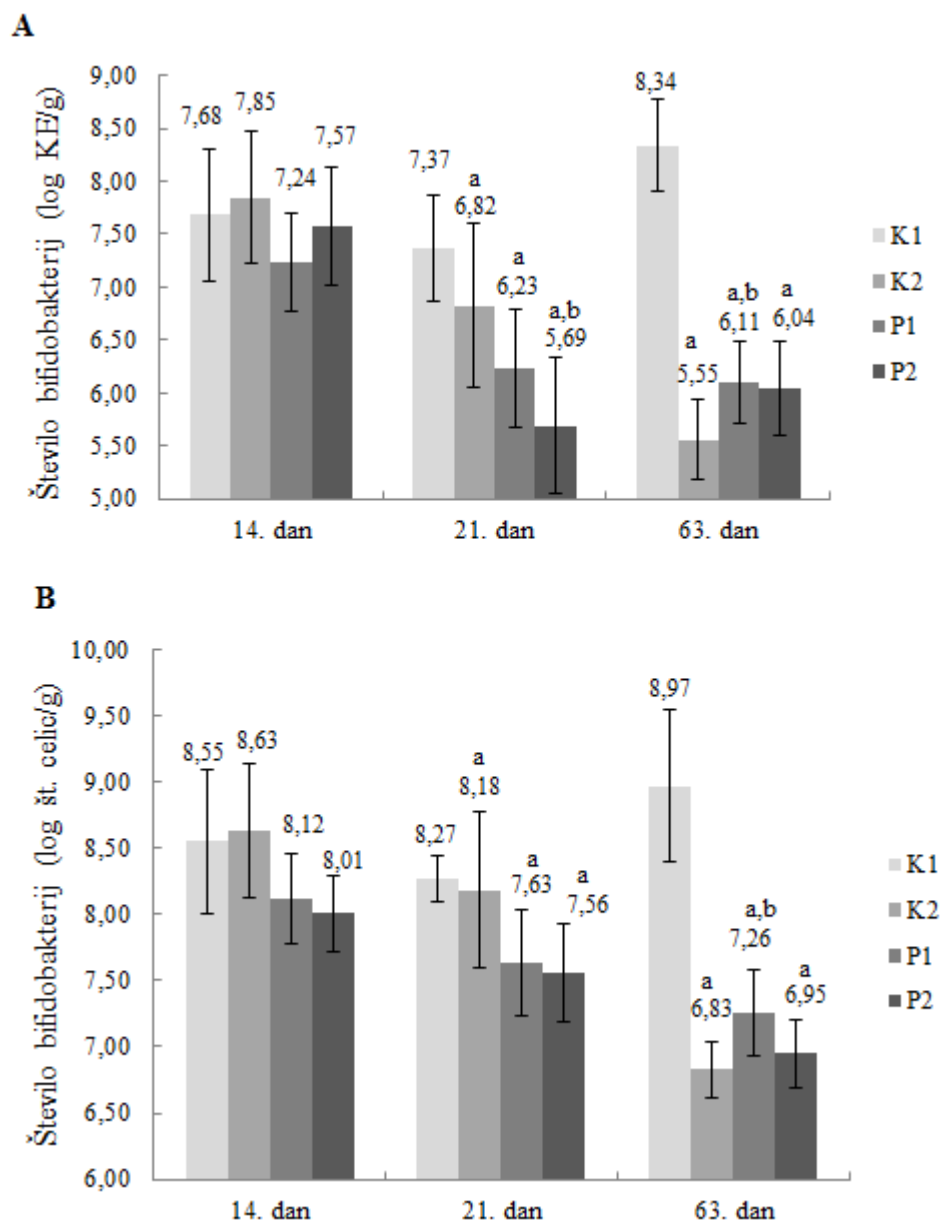
P2: poskusna skupina 2 – živali, krmljene s krmo HCD in dodatkom kefirnih zrn

a: $p < 0,05$; statistično značilna razlika v primerjavi s skupino K1

b: $p < 0,05$; statistično značilna razlika v primerjavi s skupino K2

Slika 23: Povprečno število laktobacilov ($n=9$ /skupino) v g blata podgan, določenih s štetjem KE na trdem gojišču MRS (A) in z metodo RT PCR (B) (prvi poskus).

Figure 23: Average count of lactobacilli in the feces of rats determined with plate counting (A) and Real-time PCR (B) (first experiment).



Legenda:

K1: kontrolna skupina 1 – živali, krmljene s krmo LCD

K2: kontrolna skupina 2 – živali, krmljene s krmo HCD

P1: poskusna skupina 1 – živali, krmljene s krmo HCD in dodatkom kefirana

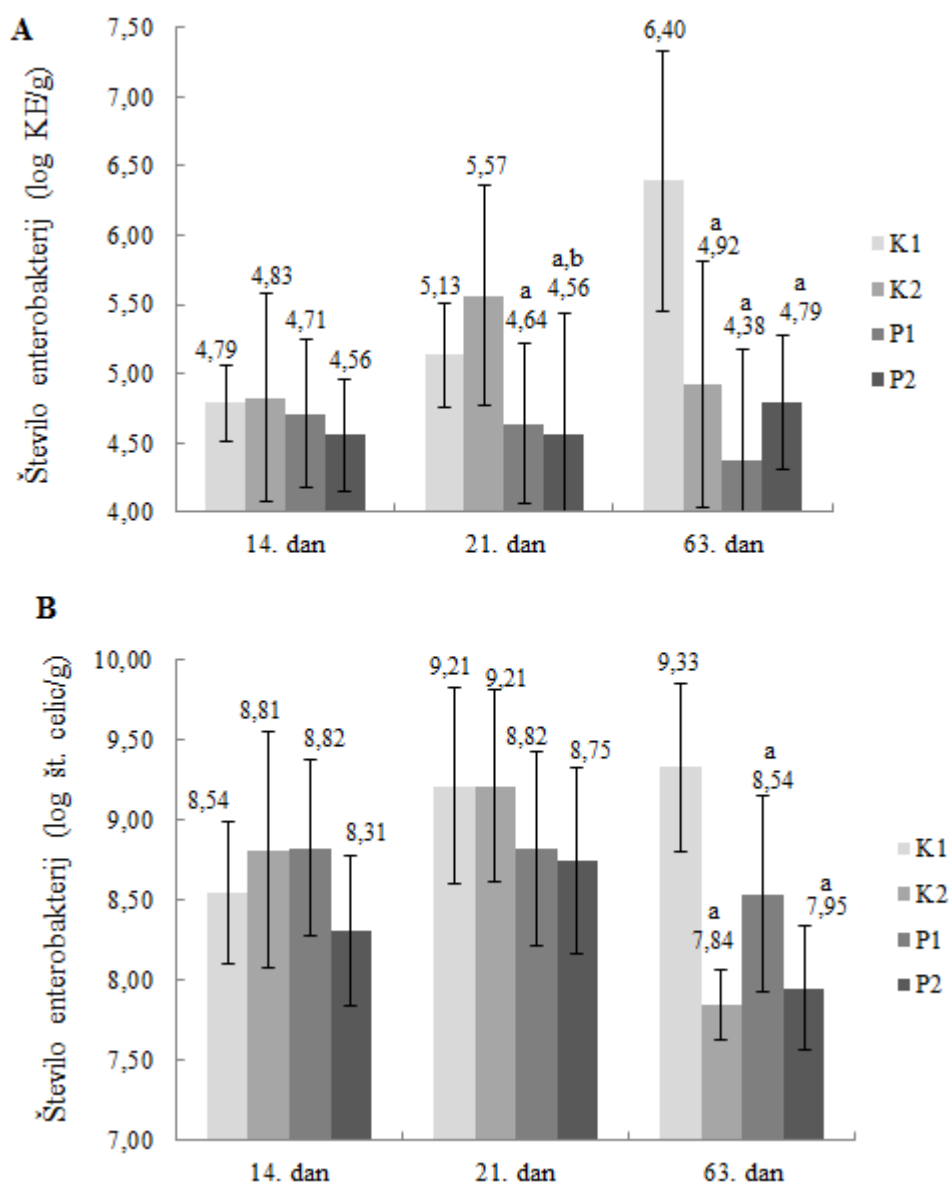
P2: poskusna skupina 2 – živali, krmljene s krmo HCD in dodatkom kefirnih zrn

a: $p < 0,05$; statistično značilna razlika v primerjavi s skupino K1

b: $p < 0,05$; statistično značilna razlika v primerjavi s skupino K2

Slika 24: Povprečno število bifidobakterij v g blata podgan, določenih s štetjem KE na trdem gojišču WCA (A) in z metodo RT PCR (B) (prvi poskus).

Figure 24: Average count of bifidobacteria in the feces of rats determined with plate counting (A) and real-time PCR (B) (first experiment).



Legenda:

K1: kontrolna skupina 1 – živali, krmljene s krmo LCD

K2: kontrolna skupina 2 – živali, krmljene s krmo HCD

P1: poskusna skupina 1 – živali, krmljene s krmo HCD in dodatkom kefirana

P2: poskusna skupina 2 – živali, krmljene s krmo HCD in dodatkom kefirnih zrn

a: $p < 0,05$; statistično značilna razlika v primerjavi s skupino K1

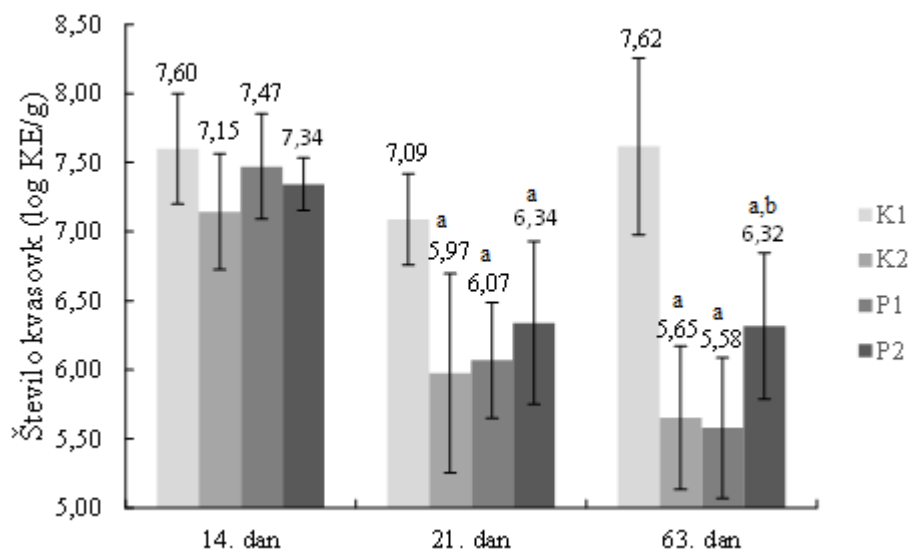
b: $p < 0,05$; statistično značilna razlika v primerjavi s skupino K2

Slika 25: Povprečno število enterobakterij v g blata podgan, določenih s štetjem KE na agarju VRBG (A) in z metodo RT PCR (B) (prvi poskus).

Figure 25: Average count of enterobacteria in the feces of rats determined with plate counting (A) and real-time PCR (B) (first experiment).

Ne glede na uporabljeno analitsko metodo se rezultati števila enterobakterij v blatu podgan pri prvem vzorčenju (14. dan) med skupinami niso statistično razlikovali (Slika 25). Tudi pri drugem vzorčenju (21. dan) ni bilo statistično značilnih razlik med skupinami pri rezultatih, dobljenih z metodo RT PCR. Rezultati štetja števila enterobakterij na podlogi VRBG pa so pokazali statistično značilne razlike med skupinami K1 in P1, K1 in P2 ter K2 in P2. Pri zadnjem vzorčenju (63. dan) so imele podgane iz kontrolne skupine K1 v blatu statistično značilno višje število enterobakterij v primerjavi s skupinami K2, P1 in P2, ki se med seboj niso statistično značilno razlikovale. Opazimo lahko tudi, da sta uporabljeni metodi dali različne rezultate. Pri metodi RT PCR so bili rezultati pri vseh treh vzorčenjih višji, kakor so bili pri metodi štetja števila enterobakterij na podlogi VRBG.

Velikost populacije kvasovk v blatu podgan smo določili samo s klasično mikrobiološko analizo cepljenja vzorca na trdo gojišče KDM. Rezultati prvega poskusa so prikazani na sliki 26. Število kvasovk v blatu podgan pri prvem vzorčenju (14. dan) je bilo med skupinami zelo podobno in se je gibalo med 7,15 in 7,60 log KE/g. Pri drugem vzorčenju (21. dan) je bilo število kvasovk v blatu podgan iz skupin K2, P1 in P2 v primerjavi s skupino K1 statistično značilno manjše. Skupini P1 in P2 se v številu kvasovk nista statistično značilno razlikovali od skupine K2. Tudi pri tretjem vzorčenju (63. dan) je imela skupina K1 statistično značilno višje število kvasovk v blatu in je odstopala od ostalih treh skupin. V primerjavi s skupino K2 je bila velikost populacije kvasovk v blatu podgan iz skupine P1 zelo podobna, velikost populacije kvasovk pri skupini P2 pa je bila statistično značilno višja tako v primerjavi s skupino K2 kot P1 ($p < 0,05$).



Legenda:

K1: kontrolna skupina 1 – živali, krmljene s krmo LCD

K2: kontrolna skupina 2 – živali, krmljene s krmo HCD

P1: poskusna skupina 1 – živali, krmljene s krmo HCD in dodatkom kefirana

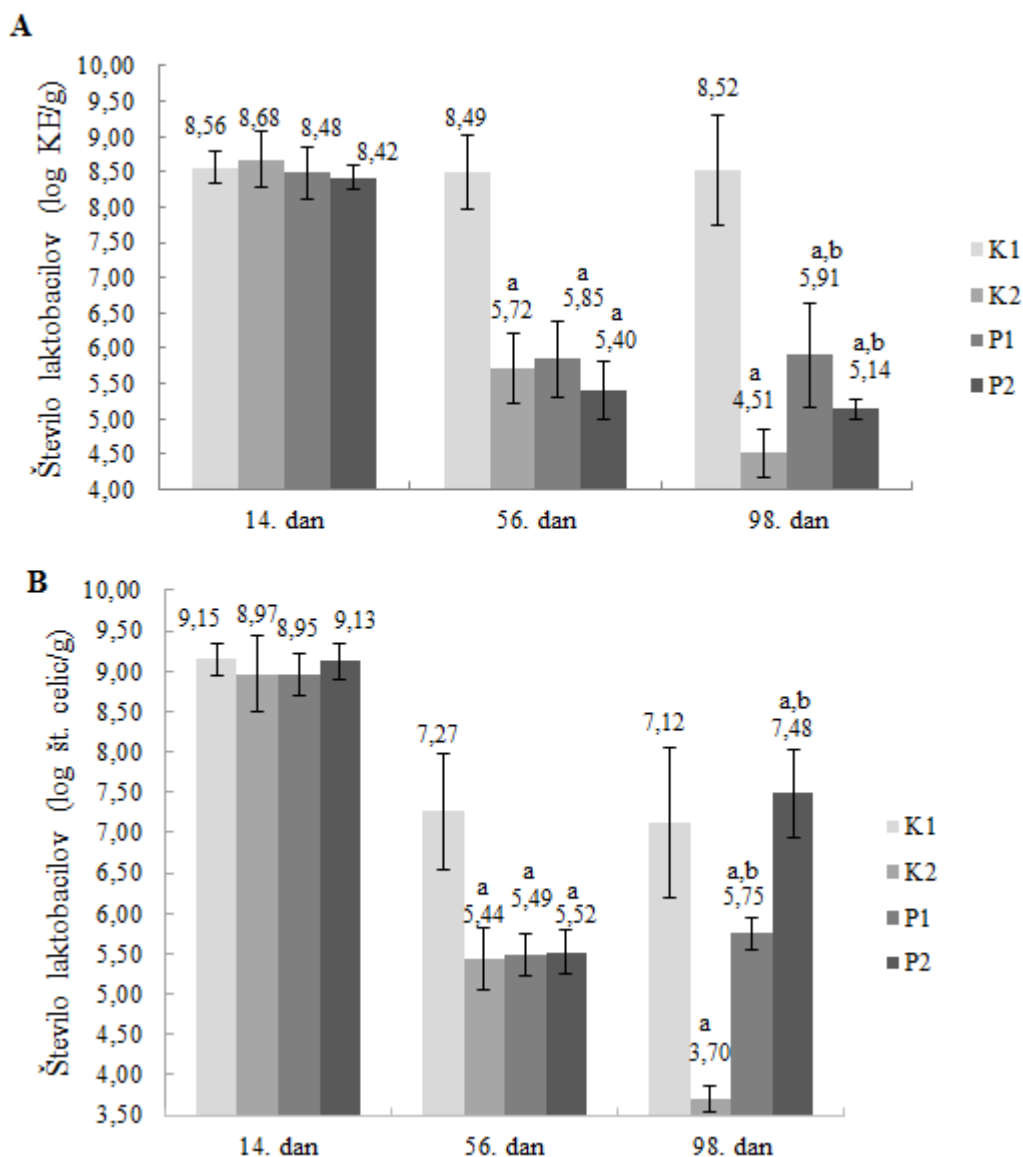
P2: poskusna skupina 2 – živali, krmljene s krmo HCD in dodatkom kefirnih zrn

a: $p < 0,05$; statistično značilna razlika v primerjavi s skupino K1

b: $p < 0,05$; statistično značilna razlika v primerjavi s skupino K2

Slika 26: Povprečno število kvasovk v g blata podgan, določenih s štetjem KE v gojišču KDM.
Figure 26: Average count of yeasts in the feces of rats determined with plate counting (first experiment).

Rezultati drugega poskusa so bili zelo podobni rezultatom prvega. Pri prvem vzorčenju (14. dan) se število laktobacilov v blatu podgan različnih skupin ni statistično značilno razlikovalo (Slika 27). Pri drugem vzorčenju (56. dan) je imela kontrolna skupina K1 v blatu največje število laktobacilov in se je statistično značilno razlikovala od ostalih skupin. Tudi pri tretjem vzorčenju (98. dan) so imele podgane iz skupine K1 v blatu v povprečju največje število laktobacilov, podgane iz skupine K2 pa najmanjše. Skupini P1 in P2 sta imeli v blatu v primerjavi s skupino K2 statistično značilno višje število laktobacilov. Rezultati določanja števila laktobacilov v blatu podgan so se pri zadnjem vzorčenju zelo razlikovali glede na uporabljeno metodo. Največjo razliko smo opazili pri skupini P2, pri kateri smo s klasično metodo cepljenja blata na trdi agar določili v povprečju 5,14 log KE/g blata, z metodo RT PCR pa 7,48 log celic/g blata, kar je več kot pri skupini K1.



Legenda:

K1: kontrolna skupina 1 – živali, krmljene s krmo LCD

K2: kontrolna skupina 2 – živali, krmljene s krmo HCD

P1: poskusna skupina 1 – živali, krmljene s krmo HCD in dodatkom kefirana

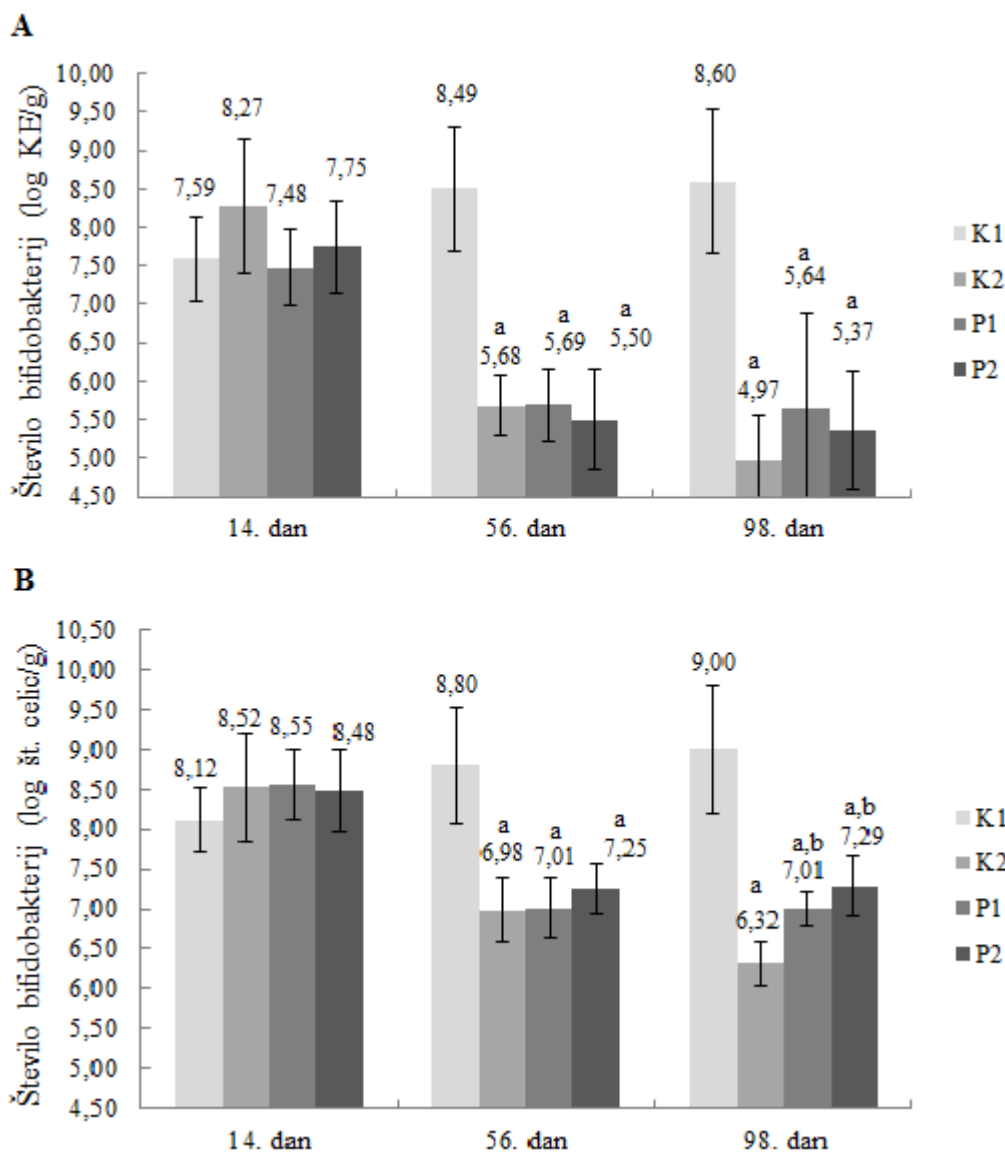
P2: poskusna skupina 2 – živali, krmljene s krmo HCD in dodatkom kefirnih zrn

a: $p < 0,05$; statistično značilna razlika v primerjavi s skupino K1

b: $p < 0,05$; statistično značilna razlika v primerjavi s skupino K2

Slika 27: Povprečno število laktobacilov v g blata podgan, določenih s štetjem KE na agarju MRS (A) in z metodo RT PCR (B) (drugi poskus).

Figure 27: Average count of lactobacilli in the feces of rats determined with plate counting (A) and Real-time PCR (B) (second experiment).



Legenda:

K1: kontrolna skupina 1 – živali, krmljene s krmo LCD

K2: kontrolna skupina 2 – živali, krmljene s krmo HCD

P1: poskusna skupina 1 – živali, krmljene s krmo HCD in dodatkom kefirana

P2: poskusna skupina 2 – živali, krmljene s krmo HCD in dodatkom kefirnih zrn

a: $p < 0,05$; statistično značilna razlika v primerjavi s skupino K1

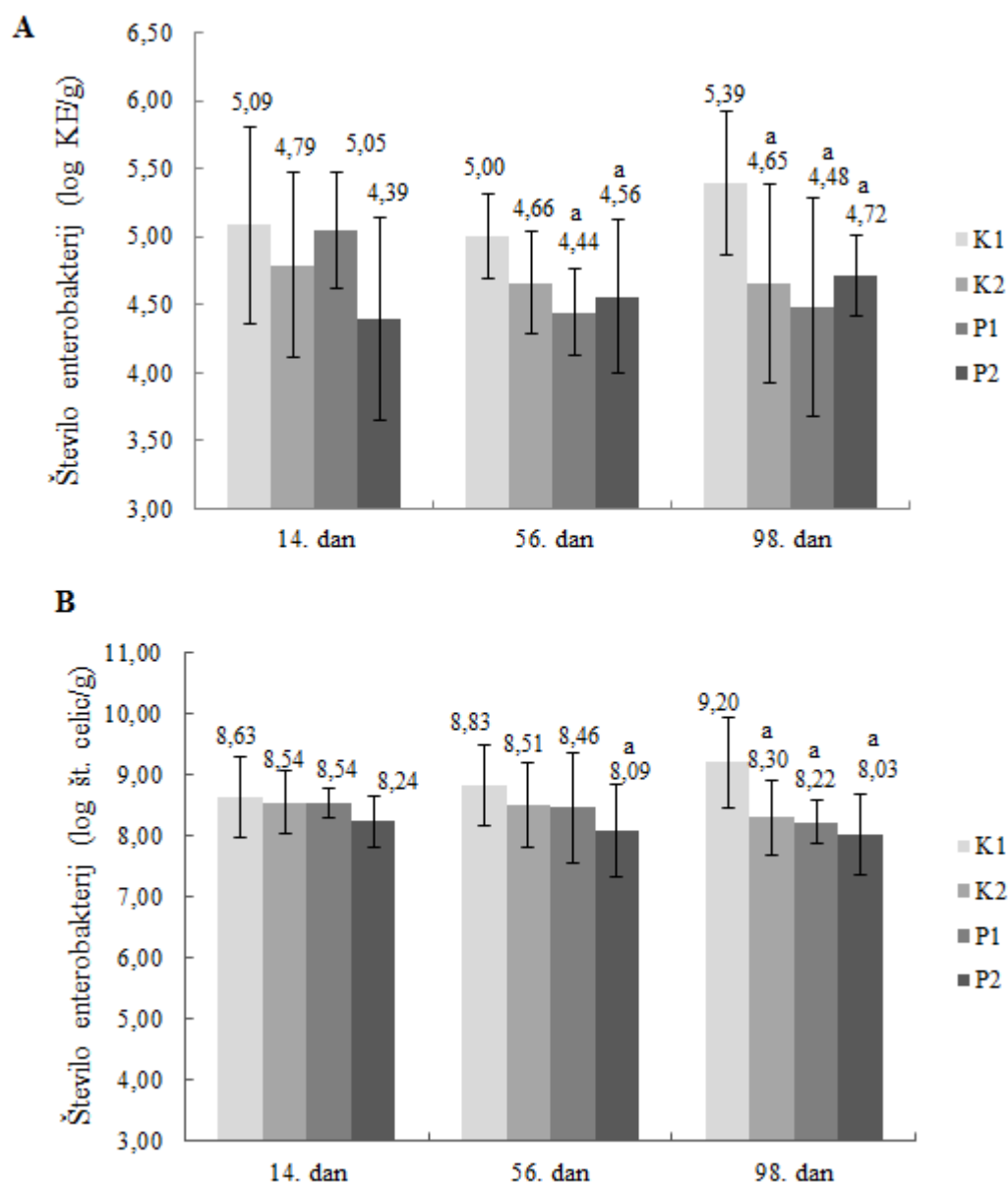
b: $p < 0,05$; statistično značilna razlika v primerjavi s skupino K2

Slika 28: Povprečno število bifidobakterij v g blata podgan, določenih s štetjem KE na agarju WCA (A) in z metodo RT PCR (B) (drugi poskus).

Figure 28: Average count of bifidobacteria in the feces of rats determined with plate counting (A) and real-time PCR (B) (second experiment).

Slika 28 prikazuje povprečno število bifidobakterij v g blata podgan pri drugem poskusu. Ne glede na uporabljeno metodo so imele pri prvem vzorčenju (14. dan) podgane iz vseh štirih skupin v blatu podobno število bifidobakterij. Statistično značilnih razlik med skupinami ni bilo. Pri obeh uporabljenih metodah so imele podgane iz skupine K1 pri drugem vzorčenju (56. dan) statistično značilno višje povprečno število bifidobakterij v blatu v primerjavi s skupinami K2, P1 in P2. Med podganami iz skupin K2, P1 in P2 statistično značilnih razlik v številu bifidobakterij ni bilo. Tudi pri tretjem vzorčenju (98. dan) so imele podgane iz skupine K1 v primerjavi s podganami iz skupin K2, P1 in P2 statistično značilno višje število bifidobakterij. Rezultati štetja števila bifidobakterij v gojišču WCA so pokazali, da med skupinami K2, P1 in P2 ni bilo statistično značilnih razlik, rezultati dobljeni z metodo RT PCR, pa so pokazali statistično značilno nižje število bifidobakterij v blatu podgan skupine K2 v primerjavi s skupinama P1 in P2.

Slika 29 prikazuje povprečno število enterobakterij v blatu podgan, ki smo jih določili pri drugem poskusu s štetjem na trdi podlogi VRBG (A) in z metodo RT PCR (B). Ne glede na uporabljeno metodo se število enterobakterij v blatu podgan pri prvem vzorčenju (14. dan) med skupinami ni statistično razlikovalo. Pri drugem vzorčenju (56. dan) se je velikost mikrobne populacije enterobakterij, ki smo jo določili s štetjem na trdi podlogi VRBG, gibala med 4,44 log in 5,00 log KE/g ter med 8,09 in 8,83 log celic/g, kar smo jo določili z metodo RT PCR. Pri tretjem vzorčenju (98. dan) se je velikost mikrobne populacije enterobakterij, določena s štetjem na trdi podlogi VRBG, gibala od 4,48 do 5,39 log KE/g in je bila pri skupini K1 signifikantno višja kakor pri skupinah K2, P1 in P2. Tudi rezultati, dobljeni z metodo RT PCR, so pokazali, da so imele podgane iz skupine K1 v primerjavi s skupinama K2, P1 in P2 v blatu statistično značilno višje število enterobakterij. Med skupinami K2, P1 in P2 statističnih razlik ni bilo. Tudi pri drugem poskusu so bili rezultati pri vseh treh vzorčenjih pri metodi RT PCR višji, kakor so bili pri metodi štetja števila enterobakterij na podlogi VRBG.



Legenda:

K1: kontrolna skupina 1 – živali, krmljene s krmo LCD

K2: kontrolna skupina 2 – živali, krmljene s krmo HCD

P1: poskusna skupina 1 – živali, krmljene s krmo HCD in dodatkom kefirana

P2: poskusna skupina 2 – živali, krmljene s krmo HCD in dodatkom kefirnih zrn

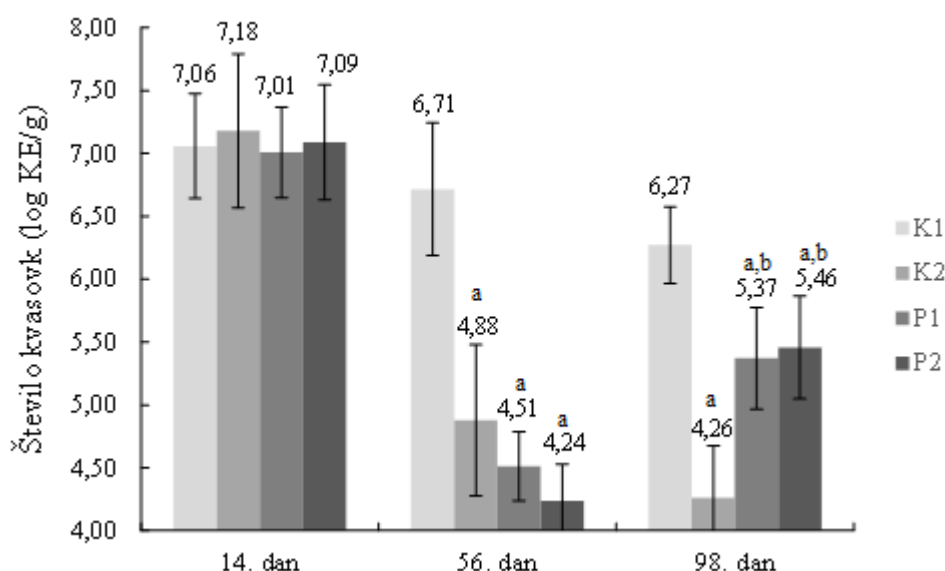
a: $p < 0,05$; statistično značilna razlika v primerjavi s skupino K1

b: $p < 0,05$; statistično značilna razlika v primerjavi s skupino K2

Slika 29: Povprečno število enterobakterij v g blata podgan, določenih s štetjem KE na agarju VRBG (A) in z metodo RT PCR (B) (drugi poskus).

Figure 29: Average count of enterobacteria in the feces of rats determined with plate counting (A) and real-time PCR (B) (second experiment).

Slika 30 prikazuje povprečno število kvasovk v blatu podgan pri drugem poskusu. Število kvasovk v blatu podgan pri drugem vzorčenjuje (14. dan) je bilo med skupinami zelo podobno in se je gibalo med 7,01 in 7,18 KE/g blata. Tudi pri drugem poskusu je bilo pri drugem vzorčenju (56. dan) v blatu podgan skupine K1 statistično značilno več kvasovk kakor v blatu skupin K2, P1 in P2. Med skupinami K2, P1 in P2 ni bilo statistično značilnih razlik. Tudi pri tretjem vzorčenju (63. dan) so imele podgane iz skupine K1 v povprečju v blatu statistično značilno več kvasovk kakor podgane iz skupine K2, P1 in P2. Povprečno število kvasovk v blatu podgan iz skupine P1 in P2 je bilo podobno in se je statistično značilno razlikovalo od števila kvasovk v blatu podgan skupine K2.



Legenda:

K1: kontrolna skupina 1 – živali, krmljene s krmo LCD

K2: kontrolna skupina 2 – živali, krmljene s krmo HCD

P1: poskusna skupina 1 – živali, krmljene s krmo HCD in dodatkom kefirana

P2: poskusna skupina 2 – živali, krmljene s krmo HCD in dodatkom kefirnih zrn

a: $p < <0,05$; statistično značilna razlika v primerjavi s skupino K1

b: $p < <0,05$; statistično značilna razlika v primerjavi s skupino K2

Slika 30: Povprečno število kvasovk v g blata podgan, določenih s štetjem KE na agarju KDM (A) in z metodo RT PCR (B) (drugi poskus).

Figure 30: Average count of yeasts in the feces of rats determined with plate counting (A) and real-time PCR (B) (second experiment).

4.7.4 Vsebnost skupnega holesterola, HDL in LDL holesterola ter trigliceridov v krvni plazmi podgan

Analizo vsebnosti holesterola in trigliceridov v krvni plazmi so opravili na Kliniki za prežvekovalce z ambulatorno kliniko Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani. Za analizo HDL in LDL holesterola ter trigliceridov smo podganam odvzeli vzorce krvi trikrat, za analizo skupnega holesterola pa štirikrat. Vzorce krvi smo odvzeli po koncu karantene (14. dan), pred začetkom dodajanja kefirana oziroma kefirnih zrn (21. dan pri prvem poskusu, 56. dan pri drugem poskusu) in ob koncu poskusa (63. dan pri prvem poskusu, 98. dan pri drugem poskusu). Za analizo skupnega holesterola smo podganam odvzeli vzorce krvi še 42. dan (prvi poskus) ter 77. dan (drugi poskus).

Vrednosti ravni skupnega holesterola, HDL in LDL holesterola ter trigliceridov v krvni plazmi podgan pri prvem poskusu so prikazane v preglednici 10. Pri prvem vzorčenju (14. dan) so imele podgane vseh skupin v krvni plazmi podobno vsebnost skupnega holesterola, ki se je gibala med 2,56 in 2,95 mmol/l. Statistično značilnih razlik med skupinami ni bilo. Po enem tednu krmljenja podgan s krmo HCD, so imele podgane iz skupin K2, P1 in P2 povišano raven skupnega holesterola, in sicer za 13,00 mmol/l (K2), 8,94 mmol/l (P1) oz. 7,49 mmol/l (P2). Podgane iz skupine K1, ki so uživale krmo LCD, so imele raven skupnega holesterola povišano le za 0,93 mmol/l. V primerjavi s skupino K1 so imele podgane iz skupin K2, P1 in P2 v plazmi značilno višjo raven skupnega holesterola. Podganam iz skupin K2, P1 in P2 je raven skupnega holesterola naraščala do konca poskusa (63. dan) in so imele v krvni plazmi statistično značilno višjo raven skupnega holesterola kakor podgane iz kontrolne skupine K1. Vendar pa so imele podgane, ki so uživale kefir (P1), in podgane, ki so uživale kefirna zrna (P2), ob koncu poskusa v plazmi nižjo raven skupnega holesterola kakor kontrolna skupina K2, ki je bila krmljena le s krmo HCD. Do konca poskusa (63. dan) se je podganam, ki so uživale kefir, v primerjavi s prvim vzorčenjem raven skupnega holesterola povišala za 7,89 mmol/l, podganam, ki so uživale kefirna zrna, za 8,96 mmol/l, podganam, ki so uživale samo krmo HCD, pa za kar 17,51 mmol/l.

Preglednica 10: Povprečna koncentracija skupnega holesterola, HDL in LDL holesterola ter trigliceridov v krvni plazmi podgan (prvi poskus; n=9/skupino).

Table 10: The average concentration of total cholesterol, HDL and LDL cholesterol and triglycerides in rats from first experiment (n=9/group).

	Dan	K1	K2	P1	P2
	vzorčenja				
Skupni	14.	2,56±0,75	2,86±0,66	2,80±0,84	2,95±0,68
holesterol	21.	3,49±1,48	15,86±5,82 ^a	11,74±4,26 ^{a, b}	10,44±3,27 ^{a, b}
(mmol/l)	42.	3,86±0,82	19,65±6,54 ^a	11,90±3,81 ^{a, b}	12,26±3,62 ^{a, b}
	63.	2,83±0,42	20,37±5,04 ^a	10,69±3,47 ^{a, b}	11,91±2,89 ^{a, b}
HDL	14.	0,55±0,18	0,61±0,09	0,51±0,09	0,53±0,06
holesterol	21.	0,69±0,10	0,23±0,16 ^a	0,21±0,09 ^a	0,27±0,11 ^a
(mmol/l)	63.	0,68±0,08	0,26±0,21 ^a	0,25±0,13 ^a	0,19±0,17 ^a
LDL	14.	0,11±0,03	0,10±0,02	0,09±0,02	0,09±0,02
holesterol	21.	0,12±0,03	2,12±1,01 ^a	1,56±0,87 ^{a, b}	1,40±0,80 ^{a, b}
(mmol/l)	63.	0,08±0,03	2,16±1,05 ^a	1,67±0,91 ^a	1,91±1,11 ^a
Trigliceridi	14.	1,98±0,85	1,85±0,62	1,45±0,61	1,62±0,52
(mmol/l)	21.	1,69±0,77	1,51±0,43	1,43±0,42	1,21±0,23
	63.	1,23±0,29	1,23±0,58	1,30±0,93	1,33±0,92

V preglednici so prikazane povprečne vrednosti ± SD. a: $p < 0,05$ – statistično značilna razlika v primerjavi s skupino K1; b: $p < 0,05$ – statistično značilna razlika v primerjavi s skupino K2.

Legenda: K1: kontrolna skupina 1 – živali, krmljene s krmo LCD; K2: kontrolna skupina 2 – živali, krmljene s krmo HCD; P1: poskusna skupina 1 – živali, krmljene s krmo HCD in dodatkom kefirana; P2: poskusna skupina 2 – živali, krmljene s krmo HCD in dodatkom kefirnih zrn.

Pri prvem vzorčenju (14. dan) so imele podgane iz vseh skupin podobno tudi raven HDL in LDL holesterola v krvni plazmi. Razlike med skupino K1 in ostalimi skupinami smo opazili že pri drugem vzorčenju (21. dan). Skupina K1 je imela v plazmi statistično značilno manj LDL holesterola in več HDL holesterola kot ostale skupine. Pri skupinah podgan, ki sta bili krmljeni s kefiranom (skupina P1) oz. kefirnimi zrn (skupina P2), je bila raven HDL holesterola podobna kot pri skupini K2 in nižja kot pri kontrolni skupini K1. Raven LDL holesterola je bila pri podganah iz skupin P1 in P2 nižja kot pri podganah iz kontrolne skupine K2. Tudi pri zadnjem vzorčenju (63. dan) so imele podgane iz

skupine K1 statistično značilno manj LDL in več HDL holesterola kot podgane iz ostalih skupin. Podobno kot pri drugem vzorčenju (21. dan), je bila raven LDL holesterola pri skupinah P1 in P2 nižja kakor pri skupini K2, vendar razlike niso bile statistično značilne.

Iz rezultatov vidimo, da krmljenje živali s krmo HCD ni povzročilo zvišanja ravni trigliceridov v plazmi podgan (Preglednica 10). Raven trigliceridov je bila že pri prvem vzorčenju med skupinami zelo različna, čeprav so bile podgane krmljene z enako krmo in so bile ob začetku poskusa naključno razdeljene v skupine. To lahko pripišemo veliki variabilnosti med podganami. Ob koncu poskusa (63. dan) so imele podgane iz vseh skupin primerljive in v primerjavi s prvim vzorčenjem celo nižje vrednosti serumskih trigliceridov.

Preglednica 11 prikazuje vsebnost skupnega holesterola, HDL in LDL holesterola ter trigliceridov v krvni plazmi podgan pri drugem poskusu. Tudi pri drugem poskusu so imele podgane pri prvem vzorčenju (14. dan) podobno raven skupnega holesterola v krvni plazmi. Po šestih tednih krmljenja s krmo HCD so imele podgane iz skupin K2, P1 in P2 statistično značilno višjo raven skupnega holesterola kot skupina K1. V primerjavi s prvim vzorčenjem se je pri drugem vzorčenju (56. dan) skupini K1 raven skupnega holesterola povišala za 1,43 mmol/l, skupini K2 za 11,49 mmol/l, skupini P1 za 10,78 mmol/l in skupini P2 za 10,37 mmol/l (Slika 31). Podgane iz skupin P1 (uživanje kefirana) in P2 (uživanje kefirnih zrn) so imele v krvni plazmi manj holesterola kot podgane kontrolne skupine K2 (krmljene samo s krmo HCD), vendar razlika ni bila statistično značilna. Raven skupnega holesterola v plazmi se je podganam iz skupine K1 od prvega do zadnjega vzorčenja povišala za 0,71 mmol/l, podganam iz skupine K2 za 16,47 mmol/l, podganam iz skupine P1 za 12,90 mmol/l in podganam iz skupine P2 za 11,87 mmol/l.

Tudi pri drugem poskusu se raven HDL in LDL holesterola v krvni plazmi podgan iz različnih skupin pri prvem vzorčenju (14. dan) ni statistično značilno razlikovala. Do razlik pa je prišlo že pri drugem vzorčenju (56. dan), saj so imele podgane iz skupine K1 v plazmi statistično značilno manj LDL holesterola in več HDL holesterola kot ostale skupine. Pri zadnjem vzorčenju (98. dan) so imele podgane iz skupine K2 najnižjo raven HDL holesterola, podgane iz skupin P1 in P2 pa celo višjo kot podgane iz kontrolne

skupine K1. Ob koncu poskusa so imele podgane iz skupin K2, P1 in P2 podobno raven LDL holesterola, ki je bila statistično značilno višja kot pri skupini K1.

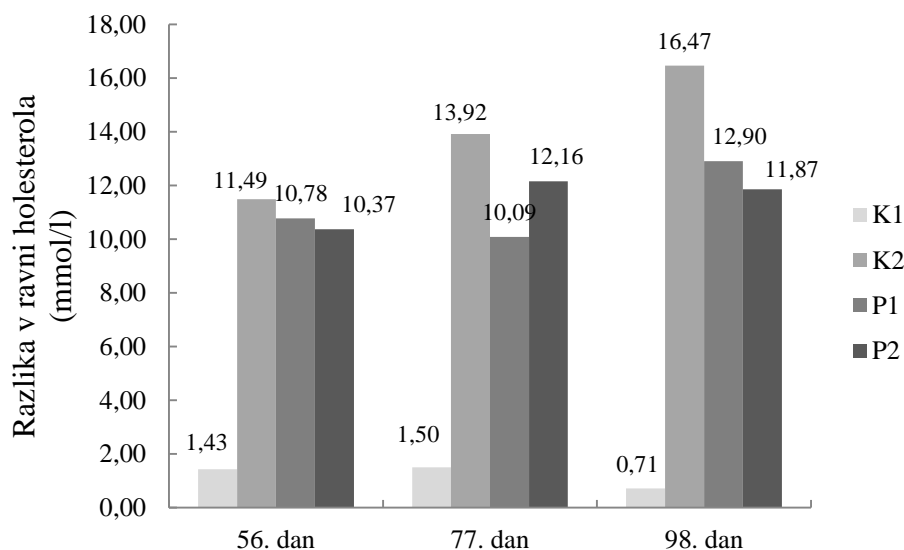
Preglednica 11: Povprečna koncentracija skupnega holesterola, HDL in LDL holesterola ter trigliceridov v krvni plazmi podgan (drugi poskus; n=9/skupino).

Table 11: The average concentration of total cholesterol, HDL and LDL cholesterol and triglycerides in rats from second experiment (n=9/group).

	Dan	K1	K2	P1	P2
	vzorčenja				
Skupni	14.	2,65±0,85	1,96±0,44	2,17±0,46	2,93±0,71 ^b
holesterol	56.	4,08±2,18	13,45±2,60 ^{aa}	12,95±2,74 ^{aa}	13,30±5,70 ^{aa}
(mmol/l)	77.	4,15±1,41	15,88±4,65 ^{aa}	12,26±5,30 ^{aa}	15,09±4,99 ^{aa}
	98.	3,36±1,06	18,43±3,36 ^{aa}	15,08±1,94 ^{aa}	14,80±2,59 ^{aa}
HDL –	14.	0,50±0,06	0,52±0,11	0,60±0,11	0,62±0,11
holesterol	56.	0,72±0,11	0,27±0,25 ^{aa}	0,52±0,27 ^{a, b}	0,37±0,21 ^{aa}
(mmol/l)	98.	0,65±0,09	0,52±0,32 ^a	0,88±0,30 ^{a, b}	0,87±0,44 ^{a, b}
LDL –	14.	0,09±0,02	0,06±0,02	0,06±0,01	0,07±0,03
holesterol	56.	0,08±0,02	1,94±0,69 ^{aa}	1,18±0,69 ^{aa, b}	1,37±0,71 ^{aa}
(mmol/l)	98.	0,10±0,04	1,38±0,45 ^{aa}	1,14±1,03 ^{aa}	1,46±0,96 ^{aa}
Trigliceridi	14.	1,57±0,66	1,19±0,30	1,29±0,58	1,68±0,53 ^b
(mmol/l)	56.	2,11±0,92	1,45±0,41 ^a	1,25±0,41 ^a	1,16±0,33 ^a
	98.	1,44±0,56	2,68±2,57	2,49±1,30	2,15±1,67

V preglednici so prikazane povprečne vrednosti ± SD. a: $p < 0,05$ – statistično značilna razlika v primerjavi s skupino K1; b: $p < 0,05$ – statistično značilna razlika v primerjavi s skupino K2.

Legenda: K1: kontrolna skupina 1 – živali, krmljene s krmo LCD; K2: kontrolna skupina 2 – živali, krmljene s krmo HCD; P1: poskusna skupina 1 – živali, krmljene s krmo HCD in dodatkom kefirana; P2: poskusna skupina 2 – živali, krmljene s krmo HCD in dodatkom kefirnih zrn.



Legenda:

K1: kontrolna skupina 1 – živali, krmljene s krmo LCD

K2: kontrolna skupina 2 – živali, krmljene s krmo HCD

P1: poskusna skupina 1 – živali, krmljene s krmo HCD in dodatkom kefirana

P2: poskusna skupina 2 – živali, krmljene s krmo HCD in dodatkom kefirnih zrn

Slika 31: **Razlika v ravni skupnega holesterola med prvim in drugim (56. dan), prvim in tretjim (77. dan) ter prvim in četrtem (98. dan) vzorčenjem (drugi poskus).**

Figure 31: **The difference in total cholesterol level between the first and second (day 56), the first and third (day 77) and the first and fourth (98 day) sampling in the second experiment.**

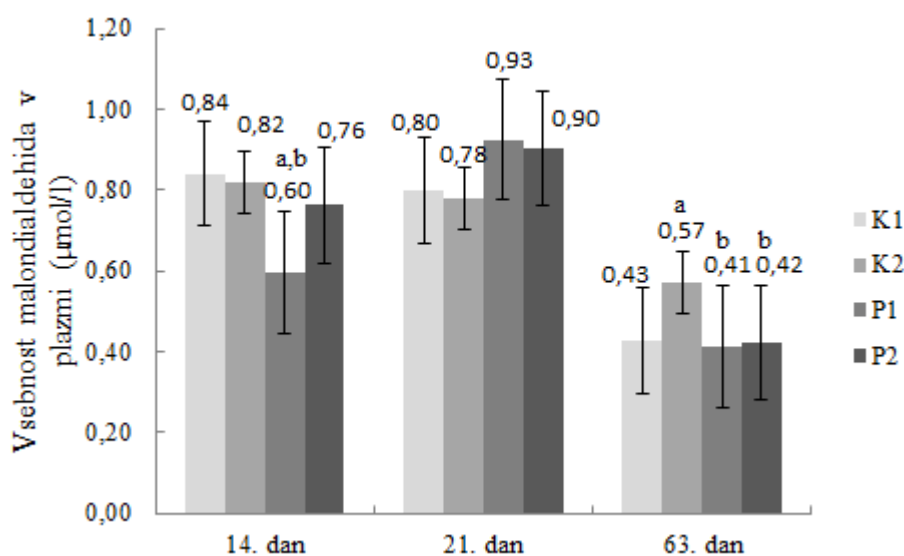
Tudi pri drugem poskusu, ki smo ga podaljšali za 35 dni, prehrana ni povzročila značilnega povišanja ravni trigliceridov v krvni plazmi podgan (Preglednica 11). Ob koncu poskusa so imele podgane iz skupin, ki so bile krmljene s krmo HCD (K2, P1 in P2), sicer višjo raven trigliceridov v plazmi kakor kontrolna skupina K1, vendar razlike niso bile statistično značilne.

4.7.5 Stopnja lipidne peroksidacije v krvni plazmi podgan

Stopnjo lipidne peroksidacije v krvni plazmi podgan smo določali preko kompleksa malondialdehid-tiobarbiturna kislina.

Slika 32 prikazuje vsebnost MDA v krvni plazmi podgan pri prvem poskusu. Pri prvem vzorčenju (14. dan) je bila vsebnost MDA v plazmi podgan iz skupine P1 statistično značilno nižja v primerjavi s podganami iz ostalih skupin. Pri drugem vzorčenju (21. dan)

ni bilo statistično značilnih razlik v koncentracija MDA v krvni plazmi različno tretiranih živali. Pri tretjem vzorčenju (63. dan) se je pri vseh skupinah podgan koncentracija MDA v krvni plazmi zmanjšala. Največjo koncentracijo MDA v plazmi so imele podgane iz skupine K2, ki se je statistično razlikovala od koncentracij MDA v ostalih skupinah. Med ostalimi skupinami ni bilo statistično značilnih razlik.



Legenda:

K1: kontrolna skupina 1 – živali, krmljene s krmo LCD

K2: kontrolna skupina 2 – živali, krmljene s krmo HCD

P1: poskusna skupina 1 – živali, krmljene s krmo HCD in dodatkom kefirana

P2: poskusna skupina 2 – živali, krmljene s krmo HCD in dodatkom kefirnih zrn

Slika 32: Vsebnost MDA v krvni plazmi podgan (prvi poskus).

Figure 32: The level of MDA in plasma of rats (first experiment).

5 RAZPRAVA

5.1 VELIKOST IN PESTROST POPULACIJE LAKTOBACILOV V KEFIRNIH ZRNIH

Kefir je tradicionalen fermentiran mlečni napitek. Izdelujemo ga s pomočjo mlečnokislinske in alkoholne fermentacije, ki jo omogoča raznovrstna mikrobiota kefirnih zrn. Kefirno zrno predstavlja simbiotično združbo mlečnokislinskih in očetnokislinskih bakterij ter kvasovk, ki je čvrsto vpeta v proteinsko polisaharidni matriks. Deleži posameznih skupin mikroorganizmov se razlikujejo, na splošno pa velja, da v kefirnih zrnih prevladujejo laktobacili (Rattary in O`Connell, 2011). Vrsto let so za ugotavljanje mikrobne pestrosti v kefirnih zrnih uporabljali klasične mikrobiološke metode, v zadnjem času pa za identifikacijo mikroorganizmov v kefirnih zrnih vse bolj uporabljajo molekularne metode, ki so neodvisne od predhodnega gojenja (Garrote in sod., 2010).

Velikost in pestrost prevladujoče populacije laktobacilov v kefirnih zrnih smo v naši raziskavi ovrednotili s pomočjo gojitvenih tehnik in s pomočjo od gojenja neodvisne metode – poliakrilamidne gelske elektroforeze v denaturirajočem gradientu (DGGE). Z uporabo gojitvenih tehnik smo iz kefirnih zrn osamili 79 izolatov roda *Lactobacillus*. Za ugotavljanje raznolikosti laktobacilov, osamljenih iz kefirnih zrn, smo uporabili analizo RAPD, ki omogoča hitro in enostavno, vendar grobo tipizacijo mikrobne združbe in se uporablja za ugotavljanje sorodnosti mikroorganizmov na ravni seva. Z metodo RAPD smo izolate uspešno razdelili v tri skupine s podobnim vzorcem. Za identifikacijo z ugotavljanjem nukleotidnega zaporedja smo iz vsake skupine z enakim vzorcem RAPD naključno izbrali nekaj predstavnikov. Od 79 proučevanih izolatov jih je 51,3 % pripadalo podvrsti *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum*, 33,3 % vrsti *Lb. parakefiri* in 15,4 % vrsti *Lb. kefiri*. Do zelo podobnih rezultatov so prišli tudi Takizawa in sod. (1998), ki so proučevali mikrobno sestavo kefirnih zrn s pomočjo klasičnih metod. Ugotovili so, da je največji delež (49 %) osamljenih laktobacilov iz kefirnih zrn predstavljal vrsta *Lb. kefirgranum*. Druga najbolj zastopana vrsta je bila *Lb. kefiranofaciens*, ki je iz naših kefirnih zrn nismo osamili. Poleg tega so iz kefirnih zrn osamili in identificirali še vrsti *Lb. kefiri* in *Lb. parakefiri*. V nasprotju z našimi rezultati so nekateri avtorji iz kefirnih zrn

osamili le vrsto *Lb. kefiri* (Kandler in Kunath, 1983; Marshall in sod., 1984), medtem ko so drugi iz kefirnih zrn osamili raznolik nabor laktobacilov, kot so *Lb. delbrueckii*, *Lb. acidophilus*, *Lb. brevis*, *Lb. helveticus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei*, *Lb. fermentum*, *Lb. plantarum* in *Lb. gasseri* (Angulo in sod., 1993; Takizawa in sod., 1998; Garrote in sod., 2001; Simova in sod., 2002; Jinzhong in sod., 2009; da Cruz Pedrozo Miguel in sod., 2010). Ti rezultati nakazujejo, da se vrstna sestava populacije laktobacilov v kefirnem zrnu spreminja v odvisnosti od pogojev in okolja, iz katerega kefirno zrno izvira, ter različnega načina kultivacije in substrata (Witthuhn in sod., 2005). Angulo in sod. (1993) navajajo, da v kefirnih zrnih prevladujejo heterofermentativni laktobacili, medtem ko nekateri drugi avtorji (Kandler in Kunath, 1983; Takizawa in sod., 1998) trdijo ravno nasprotno. V naši raziskavi je bilo razmerje med homofermentativnimi laktobacili vrste *Lb. kefirnofaciens* subsp. *kefirgranum* ter heterofermentativnimi laktobacili vrste *Lb. kefiri* in *Lb. parakefiri* skoraj 1:1. Zavedati se moramo, da so avtorji uporabljali različne postopke in analitske metode, kar je lahko vplivalo na rezultate.

Glavna pomanjkljivost od gojenja odvisnih metod je selektivni izbor sevov, sposobnih rasti na hranljivih gojiščih. V nasprotju z uporabo gojitvenih metod in identifikacijo z molekularnimi metodami so se od gojenja neodvisne metode izkazale kot učinkovite za popolnejši opis mikrobne raznolikosti, saj zajamejo tudi nekultivabilne bakterije, žal pa je onemogočen opis njihovih fizioloških in tehnoloških lastnosti. Ena od primernih in najpogosteje uporabljenih tehnik za študij kompleksnih mikrobnih združb, kakršna se nahaja v kefirnem zrnu, je poliakrilamidna gelska elektroforeza v denaturirajočem gradientu (DGGE). Metoda je neodvisna od kultivacije, hitra, dokaj zanesljiva in ponovljiva (Garrote in sod., 2010).

Tudi DGGE analiza DNA, izolirane neposredno iz vzorcev kefirnih zrn, je –tako kot uporaba gojitvenih tehnik v kombinaciji z ugotavljanjem nukleotidnega zaporedja rDNA (kultivacije in osamitve ter nato identifikacije s pomočjo sekvenciranja)– pokazala prisotnost vrste *Lb. parakefiri* in *Lb. kefiri* ter podvrste *Lb. kefirnofaciens* subsp. *kefirgranum*. V nasprotju z našimi rezultati pa Chen in sod. (2008) poročajo, da je bila za identifikacijo mikroorganizmov iz kefirnih zrn bolj uspešna kombinacija gojitvenih metod in poznejša identifikacija mikroorganizmov z ugotavljanjem nukleotidnega zaporedja. Z

uporabo gojitvenih metod so iz štirih različnih vzorcev kefirnih zrn osamili laktobacile vrst *Lb. kefir* in *Lb. kefiranofaciens*, medtem ko so z uporabo metode DGGE vrsto *Lb. kefir* identificirali le v enem vzorcu kefirnih zrn. Najbolj verjetna vzroka za slabo detekcijo laktobacilov z analizo DGGE iz kefirnih zrn sta nizko število posameznih vrst laktobacilov v vzorcih in težavna izolacija DNA. Podobno raziskavo so naredili tudi da Cruz Pedrozo Miguel in sod. (2010). Primerjali so raznolikost bakterij devetih različnih vzorcev kefirnih zrn z uporabo gojitvenih tehnik ter od gojenja neodvisne metode DGGE. Laktobacile vrste *Lactobacillus uvarum* so identificirali v dveh vzorcih kefirnih zrn, vendar samo z uporabo metode DGGE, medtem ko so laktobacile vrste *Lb. helveticus* in *Lb. parakefir* identificirali le z uporabo gojitvenih metod. To so pripisali slabši izolaciji DNA neposredno iz kefirnih zrn. Izolacija skupne DNA iz vzorcev kefirnih zrn je namreč težavna, ker so kefirna zrna po svoji konsistenci elastične, želatinaste granule, ki jih je težko homogenizirati, poleg tega pa je iz izolirane DNA težko odstraniti ostale sestavine, kot so polisaharidi (kefiran), proteini in maščobe, ki lahko delujejo kot inhibitorji PCR. Majhna količina iz vzorcev osamljene DNA namreč lahko vpliva na slabše zaznavanje manj zastopanih bakterijskih vrst v mikrobnih združbah.

5.2 SPOSOBNOST TVORBE EKSOPLISAHARIDOV V ČISTI KULTURI

Bakterijsko rast pogosto spremlja tvorba eksopolisaharidov (EPS), ki imajo pomembne ekološke in fiziološke funkcije. EPS mlečnokislinskih bakterij pa so tudi tehnološko zanimivi, saj izboljšajo reološke in senzorične lastnosti fermentiranih mlečnih izdelkov (Badel in sod., 2011). Med EPS sodi tudi kefiran, vodotopni glukogalaktan, značilen za kefirna zrna. Sestavljen je pretežno iz razvejanih verig glukoze in galaktoze (Rimada in Abraham, 2001). Iz kefirnih zrn je bilo osamljenih več laktobacilov, ki dokazano proizvajajo kefiran.

V raziskavi smo spremljali tvorbo kefirana pri laktobacilih, osamljenih iz kefirnih zrn (*Lb. kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* MP6, *Lb. kefir* MR3 in *Lb. parakefir* KP9) ter pri tipskih sevih (*Lb. kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* LMG 19149, *Lb. kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* DSM 10550, *Lb. kefir* LMG 9480), ki so služili kot pozitivna kontrola. Po navedbah literature imajo na tvorbo kefirana velik vpliv fermentacijski parametri. Poleg tega so za optimalno produkcijo kefirana najbolj primerna gojišča, ki so sestavljena iz

sirotke (Farnworth, 2005; Cheirsilp in Radchabut, 2011). Zato smo za optimizacijo tvorbe kefirana uporabili različna gojišča (MRS, MRSL, KPL) in različne začetne vrednosti pH (4,5, 5,0 in 5,5). Inkubacija je potekala anaerobno, in sicer 5 dni pri temperaturi 30 °C.

Čeprav so vsi izbrani laktobacili tvorili eksopolisaharide, noben od preiskovanih laktobacilov v čisti kulturi v izbranih gojiščih in pri izbranih vrednostih pH ni tvoril tipičnega kefirana, sestavljenega samo iz glukoze in galaktoze v razmerju 1:1. Po mnenju mnogih je glavni proizvajalec kefirana vrsta *Lb. kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens*, ki ga iz naših kefirnih zrn nismo osamili, vendar pa sodita med proizvajalce kefirana tudi *Lb. kefir* in *Lb. parakefir* (Wang in Bi, 2008), ki sta bila pomembna predstavnika populacije laktobacilov v naših kefirnih zrnih. Vendar tudi *Lb. kefir* in *Lb. parakefir* v danih pogojih nista tvorila kefirana temveč EPS, sestavljen iz glukoze, galaktoze, manoze in neidentificiranega sladkorja. Zanimivo je, da je bil v kefirnih zrnih, iz katerih so bili osamljeni omenjeni laktobacili, prisoten kefirana, saj smo ga iz zrn uspeli osamiti. EPS, ki smo ga izolirali iz kefirnih zrn, je bil namreč sestavljen iz glukoze in galaktoze v razmerju 1:0,92. Ena od možnih razlag je, da preiskovani sevi niso imeli primernih pogojev za tvorbo kefirana. Možno je tudi, da je bil za tvorbo kefirana odgovoren kefiranogeni laktobacil, ki ga iz kefirnih zrn nismo uspeli osamiti, ali pa simbioza laktobacilov z drugim mikroorganizmom. Cheirsilp in sod. (2003) namreč poročajo, da je tvorba kefirana večja, če MKB gojimo v sokulturi s kvasovkami. Tudi rezultati Taniguchija in sod. (2001) kažejo na to, da *Lactobacillus kefiranofaciens* tvori največje količine kefirana ob pogojih, ki so podobni pogojem, ko v sokulturi gojimo mlečnokislinske bakterije in kvasovke. *Lb. kefiranofaciens*, ki so ga proučevali, je največje količine kefirana namreč tvoril v gojišču MRS s pH 5,5, v katerega so dodali 75 g/l laktoze in 10 g/l etanola.

Med vsemi proučevanimi laktobacili je v gojišču MRS samo tipski sev *Lb. kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* LMG 19149 tvoril EPS, sestavljen iz glukoze in galaktoze, kar je značilno za kefirana, vendar pa je EPS vseboval še velik delež manoze in nekaj neidentificirane sladkorne komponente. EPS ostalih laktobacilov ni vseboval galaktoze, temveč je bil sestavljen le iz glukoze in manoze ter različnih deležev neidentificiranega sladkorja. V gojišču MRSL so sicer vsi preiskovani laktobacili tvorili EPS, ki je bil sestavljen iz glukoze in galaktoze, vendar pa so tudi ti EPS vsebovali še manozo in

neidentificiran sladkor. Različno sestavo EPS, ki so jih tvorili preiskovani laktobacili v gojiščih MRS in MRSL, lahko po vsej verjetnosti pripišemo različni sestavi gojišč MRS in MRSL. Glavna razlika v sestavi gojišč MRS in MRSL je namreč v tem, da je v gojišče MRS dodana glukoza, v gojišče MRSL pa laktoza. V literaturi je navedeno, da so za optimalno produkcijo kefirana primerna gojišča na osnovi sirotke, saj je sirotka bogat vir ogljika (Cheirsilp in Radchabut, 2011). Zato smo v naši raziskavi tvorbo EPS pri laktobacilih spremljali tudi v gojišču KPL, v katerem je osnovna sestavina sirotka. Vendar v gojišču KPL noben od izbranih laktobacilov pri nobeni začetni vrednosti pH ni tvoril EPS.

Tudi Frengova in sod. (2002) so v svoji raziskavi proučevali tvorbo kefirana pri različnih mlečnokislinskih bakterijah, osamljenih iz kefirnih zrn. Med štiridesetimi sevi, ki so jih osamili iz kefirnih zrn, je največje količine kefirana proizvedel sev *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* HP1, kar je presenetljivo, saj proizvodnja kefirana za to bakterijsko vrsto ni značilna. EPS, ki ga je proizvedel ta sev, je bil sestavljen iz glukoze in galaktoze v razmerju 1,00:0,91.

V naši raziskavi je bila tako v gojišču MRS kot v gojišču MRSL tvorba EPS največja pri začetni vrednosti pH 5,5, najmanjša pa pri pH 4,5, kar se ujema z literaturo, ki navaja, da dosežemo najvišjo koncentracijo EPS pri začetni vrednosti gojišča pH 5,5 in temperaturi 30 °C. Pri tej vrednosti pH in temperaturi naj bi MKB, ki tvorijo EPS, najhitreje rasle in porabljale sladkor ter proizvajale EPS (Wang in Bi, 2008). Največje koncentracije EPS nastajajo v eksponentni fazi, tvorba EPS pa se konča v stacionarni fazi. Med fermentacijo nastaja mlečna kislina, ki zniža pH, kar postopno inhibira rast MKB in tvorbo kefirana.

5.3 ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST BREZCELIČNIH EKSTRAKTOV LAKTOBACILOV IN KEFIRANA

V organizmu neprestano nastajajo škodljivi prosti radikali. Antioksidanti, ki predstavljajo obrambo pred prostimi radikali, so v telesu že prisotni, ob pomanjkanju pa jih je treba v telo vnesti s hrano. V normalnih okoliščinah so prosti radikali v stalnem ravnotežju z antioksidanti. Stanje porušenega ravnovesja imenujemo oksidacijski stres, pri katerem pride do poškodb DNA, lipidne peroksidacije in poškodb membranskih sistemov.

Antioksidanti v telesu torej preprečujejo oksidacijo biološko pomembnih molekul, kot so lipidi, beljakovine in nukleinske kisline, ki so tarča prostih radikalov. V zadnjem času se povečuje zanimanje za naravne antioksidante, saj imajo sintetični stranske učinke (Ahire in sod., 2013). Naravni antioksidanti, ki izvirajo iz hrane, predstavljajo naravno zaščito človeškega telesa pred prostimi radikali in preprečujejo napredovanje številnih kroničnih bolezni (Liu in sod., 2005).

Metode, ki se najpogosteje uporabljajo za določanje antioksidativne aktivnosti, se razlikujejo glede na njihov princip in pogoje (Lucas-Abellán in sod., 2010). Poznamo direktne in indirektne metode merjenja antioksidativnega potenciala. Direktne metode temeljijo na proučevanju vpliva dodanega antioksidanta na potek verižne oksidacije določenega substrata (lipidov, proteinov, DNA) s prostimi radikali. So bolj občutljive in natančne. Pri indirektnih metodah merimo sposobnost antioksidantov za lovljenje tistih prostih radikalov, ki niso neposredno povezani z oksidacijsko razgradnjo. Te metode so pogostejše in primernejše za analizo (Roginsky in Lissi, 2005). V raziskavi smo zato za ugotavljanje antioksidativne aktivnosti celičnih metabolitov laktobacilov in kefirana uporabili štiri različne metode, in sicer metodo s tiocianatom, metodo z 2-deoksi-D-ribozo, metodo z DPPH in metodo z 1,10-fenantrolinom. Antioksidativno aktivnost smo merili spektrofotometrično. Antioksidativno aktivnosti brezceličnih ekstraktov laktobacilov in kefirana, osamljenega iz kefirnih zrn, smo primerjali z antioksidativno aktivnostjo vitaminov C in E ter BHA. Vitamin C in E sta močna antioksidanta. Tudi BHA je zelo pogost antioksidant, ki ga uporabljajo v prehranski in kozmetični industriji, vendar je po mnenju nekaterih razpravljalcev kancerogen in povzroča nastajanje tumorjev (Papas, 1999).

Rezultati raziskave kažejo, da smo antioksidativno aktivnost kefirana uspeli potrditi z vsemi izbranimi metodami, razen z metodo z DPPH, saj se je kefirana ob prisotnosti metanola oboril. Pri tej metodi se je izkazalo, da imata vitamin C in BHA izjemno sposobnost reagiranja z radikali DPPH; njuna izmerjena antioksidativna aktivnost je bila kar 96,95 % oziroma 93,62 %. Antioksidativna aktivnost kefirana neodvisno od izbrane metode narašča z naraščajočo koncentracijo. Pri vseh metodah, s katerimi smo uspeli dokazati antioksidativno aktivnost kefirana, je bila izmerjena antioksidativna aktivnost

malo nižja oziroma primerljiva z vitaminom C, vitaminom E oziroma BHA. Dobljenih rezultatov antioksidativne aktivnosti kefirana ne moremo primerjati z drugimi rezultati, saj v literaturi nismo zasledili podobne študije. Antioksidativni vpliv kefirja sta v svoji raziskavi proučevala Deeseenthum in Pejovic (2010). Rezultati njune raziskave so pokazali, da je imel kefir podobno antioksidativno aktivnost kot BHA. O antioksidativni aktivnosti kefirja poročajo tudi Liu in sod. (2005). Antioksidativno aktivnost pripisujejo komponenti, ki je prisotna v kefirnih zrnih.

Antioksidativno aktivnost brezceličnih ekstraktov laktobacilov smo uspeli potrditi z vsemi izbranimi metodami. Antioksidativna aktivnost brezceličnih ekstraktov izbranih laktobacilov je bila nižja v primerjavi z vitaminom C, vitaminom E in BHA. Z vsemi uporabljenimi metodami smo najmanjšo antioksidativno aktivnost izmerili pri ekstraktu sevov *Lb. kefiranofaciens*. Antioksidativna aktivnost ekstrakta seva *Lb. kefir* MR3 je bila primerljiva z antioksidativno aktivnostjo ekstrakta tipskega seva *Lb. kefir* LMG 9480. Med brezceličnimi ekstrakti laktobacilov, ki smo jih osamili iz kefirnih zrn, je imel najboljšo antioksidativno aktivnost ekstrakt seva *Lb. kefir* MR3, sledil mu je sev *Lb. parakefir* KP9. V raziskavi smo za primerjavo spremljali tudi antioksidativno aktivnost brezceličnega ekstrakta seva *Lb. helveticus* IM 30, saj je bilo za sev *Lb. helveticus* CD6 dokazano, da ima antioksidativni potencial. V raziskavi, ki so jo opravili Ahire in sod. (2013), je bila pri metodi z DPPH antioksidativna aktivnost celičnega izločka seva *Lb. helveticus* CD6 6,80 %, kar je primerljivo z našimi rezultati, saj je bila antioksidativna aktivnost ekstrakta seva *Lb. helveticus* IM 30 8,70 %. Ko pa so antioksidativno aktivnost seva *Lb. helveticus* CD6 določali z metodo z 1,10-fenantrolinom, je bila 20,80 %. V naši raziskavi je bila s to metodo izmerjena antioksidativna aktivnost brezceličnega ekstrakta seva *Lb. helveticus* IM 30 višja, in sicer 55,60 %.

Glede na dobljene rezultate lahko zaključimo, da imajo posamezni sevi laktobacilov, osamljenih iz kefirnega zrna, antioksidativni potencial. Pomembno je poudariti, da mora biti za določanje antioksidativne aktivnosti izbrana primerna metoda, in sicer glede na molekulo, ki jo proučujemo.

5.4 PREBIOTIČNE LASTNOSTI KEFIRANA

Gibson in Roberfroid sta leta 1995 prebiotike opisala kot neprebavljive sestavine hrane, ki ugodno vplivajo na gostitelja, tako da selektivno stimulirajo rast mikrobiote prebavnega trakta. Prebiotiki so za človeka neprebavljivi ogljikovi hidrati in tako ne predstavljajo neposrednih hranil. Mikroorganizmi prebavnega trakta proizvajajo encime, ki lahko te ogljikove hidrate razgradijo in jih porabijo kot hranilo. V zadnjem času narašča zanimanje za uporabo prebiotikov v pripravi funkcionalnih živil in prehranskih dopolnil, in sicer z namenom spreminjanja sestave črevesne mikrobiote, kar naj bi vplivalo na dobro počutje in zdravje (Saad in sod., 2013).

In vitro poskus je potrdil domnevo, da bo kefirana stimuliral rast laktobacilov, izoliranih iz kefirnega zrna, in tipičnih predstavnikov črevesne mikrobiote ter s tem izkazal prebiotične lastnosti. Dodatek kefirana v gojišče je povečal rast populacije laktobacilov od 0,37 log (*Lb. sakei* NCDO 2714) do 1,74 log (*Lb. kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* MP6). Učinki kefirana na rast laktobacilov so bili povezani z dodano koncentracijo kefirana v gojišče. Višja kot je bila koncentracija dodanega kefirana v gojišče (v obsegu koncentracij od 0,5 do 1,5 g/100 ml), boljša je bila rast mikrobne populacije. V literaturi nismo zasledili nobene raziskave, ki bi proučevala prebiotične lastnosti kefirana, je pa v zadnjem času veliko raziskav, ki proučujejo prebiotične lastnosti ostalih prebiotikov, kot so inulin, fruktooligosaharidi, galaktooligosaharidi itn., za katere je značilno, da prav tako kakor kefirana vplivajo na število bifidobakterij in laktobacilov (Saad in sod., 2013).

5.5 PROTIMIKROBNA AKTIVNOST KEFIRANA

Med zanimive in pomembne funkcionalne učinke naravnih snovi sodi tudi njihova protimikrobna aktivnost. Ker kefirju pripisujejo tudi protimikrobne lastnosti, nas je zanimalo, koliko k temu prispeva kefirana.

Z metodo lise na agarju smo sicer potrdili protimikrobno aktivnost kefirana v koncentraciji 20 mg/ml proti indikatorskim sevom *Escherichia coli* IM 120, *Listeria monocytogens* IM 372, *Listeria innocua* IM 373, *Staphylococcus aureus* IM 388 in *Bacillus cereus* IM 250, vendar so bile pri poskusu uporabljene zelo visoke koncentracije kefirana (20 mg/ml), zato

je bila inhibicija rasti indikatorskih bakterij lahko posledica prisotnosti visokih koncentracij in ne protimikrobne aktivnosti kefirana.

Protimikrobno dejavnost kefirana in kefirja so dokazali tudi Rodriguez in sod. (2005). Z difuzijsko metodo v agarju so dokazali, da kefir in kefir delujeta protimikrobno proti bakterijam vrst *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* in proti kvasovki vrste *Candida albicans*. Večina raziskav proučuje predvsem protimikrobno delovanje kefirja in le redke kefirana. Farnworth in Mainville (2003) navajata, da imajo kefirna zrna boljše protimikrobno delovanje v primerjavi s kefirjem, še posebej proti po Gramu pozitivnim bakterijam. Morgan in sod. (2000) so v raziskavi proučevali protimikrobno aktivnost kefirnih zrn različnega izvora proti patogenima bakterijskima sevoma *Listeria innocua* DPC1770 in *E. coli* 0157:H45. Rezultati so pokazali, da je več kot polovica kefirnih zrn delovala protimikrobno proti sevu *L. innocua* DPC1770 in skoraj vsa kefirna zrna proti sevu *Escherichia coli* 0157:H45. Inhibitorni učinek proti sevu *L. innocua* DPC1770 pripisujejo bakteriocinom, medtem ko naj bi bila za inhibicijo seva *E. coli* 0157:H45 odgovorna predvsem mlečna kislina in vodikov peroksid.

5.6 PREHRANSKI POSKUS NA PODGANAH

5.6.1 Rast podgan in količina zaužite krme

V prehranskem poskusu, ki smo ga razdelili na dva ločena poskusa, smo uporabili 72 podganjih samic vrste Wistar. Pri prvem poskusu nas je zanimalo, kakšen vpliv imajo kefir in kefirna zrna na črevesno mikrobioto, raven serumskega holesterola in trigliceridov ter na oksidacijski stres, če smo živali sočasno krmili s krmo z visoko vsebnostjo holesterola in kefiranom oz. kefirnimi zni. Pri drugem poskusu pa smo pri podganah najprej poskušali s krmo z visoko vsebnostjo holesterola (HCD) povišati raven serumskega holesterola in trigliceridov ter sprožiti oksidacijski stres. Po šestih tednih krmljenja podgan s krmo HCD smo jim pričeli dajati še kefir in kefirna zrna. Pri obeh poskusih smo podgane naključno razdelili v štiri skupine – dve kontrolni (K1 in K2) in dve poskusni (P1 in P2). V vsaki skupini je bilo 9 živali, ki so bile nastanjene po tri v kletko. Živali iz skupine K1 smo ves čas poskusa krmili s krmo z nizko vsebnostjo holesterola

(LCD), podgane iz skupine K2 pa s krmo z visoko vsebnostjo holesterola (HCD). Podganam iz skupine P1 smo poleg krme HCD dajali še kefir, podganam iz skupine P2 pa kefirna zrna. Dnevne odmerke kefirana (100 mg/kg telesne teže) smo določili glede na podatke iz literature (Maeda in sod., 2004b). Dnevne odmerke kefirnih zrn smo določili glede na vsebnost kefirana v kefirnih zrnih. Pri tem smo upoštevali, da je bila količina zaužitega kefirana v obeh skupinah, P1 in P2, enaka. Med poskusom smo enkrat na teden preverjali tudi stabilnost mikrobiote kefirnih zrn. Rezultati so pokazali, da je bilo število laktobacilov in kvasovk v kefirnih zrnih stabilno. Poleg tega je bila stabilna tudi prevladujoča mikrobiota kefirnih zrn (glej poglavje 4.7.1).

Med poskusom smo živali tehtali enkrat tedensko in opazovali njihovo splošno stanje. Živali iz vseh skupin so bile med poskusom živahne, odzivale so se na zunanje dražljaje in kazale zanimanje za okolico. Po aplikaciji kefirana oz. kefirnih zrn živali niso imele driske in niso kazale znakov bolezni.

Pri prvem poskusu so podgane, ki so uživale krmo HCD, priraščale podobno kakor podgane, ki so uživale krmo LCD ($1,10 \pm 0,27$ g/dan oz. $1,21 \pm 0,26$ g/dan). Tudi Yokogoshi in sod. (1999) navajajo, da so podgane, ki so jih krmili s krmo z visoko vsebnostjo holesterola, priraščale podobno kot podgane iz kontrolne skupine. Do podobnih rezultatov so prišli tudi Uchida in sod. (2010), ko so proučevali vpliv kefirana na zmanjšanje arterioskleroze pri kuncih, ki so jih krmili s krmo z visoko vsebnostjo holesterola. Nasprotno pa Liu in sod. (2006) navajajo večji prirast pri živalih, ki jim je bil v krmo dodan holesterol, kakor pri živalih, ki so uživale krmo brez holesterola. Navajajo, da so hrčki, ki so uživali krmo brez holesterola, v povprečju priraščali 0,22 g/dan, hrčki, ki so uživali s holesterolom obogateno krmo, pa 0,57 g/dan. Za razliko od prvega poskusa naše raziskave je bil pri drugem poskusu povprečen prirast podgan iz skupin, ki so uživale krmo HCD (tudi pri podganah, ki so uživale kefir in kefirna zrna), signifikantno višji kakor pri podganah, ki so uživale krmo LCD (0,91 g/dan v skupini K2 in 0,76 g/dan v skupini K1). Dobljeni rezultati so najverjetneje posledica daljšega uživanja krme z visoko koncentracijo holesterola. Iz rezultatov lahko tudi zaključimo, da kefir in kefirna zrna niso vplivali na prirast podgan, saj so podgane, ki so uživale kefir in kefirna zrna, priraščale podobno

kakor podgane, ki so uživale le krmo HCD. Med skupinami ni bilo statistično značilnih razlik.

Pri prvem poskusu so podgane, krmljene s krmo HCD (tudi podgane, ki so uživale kefir in kefirna zrna), konzumirale signifikantno manj krme kakor podgane, ki so uživale le krmo LCD. Pri drugem poskusu pa so živali iz skupine K2, ki so bile ves čas poskusa krmljene s krmo HCD, v povprečju na dan zaužile manj krme kot podgane iz ostalih treh skupin, kar je spet najverjetneje posledica daljšega uživanja krme z visoko koncentracijo holesterola. Tudi Liu in sod. (2006) navajajo, da so živali, ki so uživale krmo brez holesterola, v povprečju na dan zaužile več krme kakor živali, ki so jih krmili s krmo, obogateno s holesterolom. Medtem pa Xie in sod. (2011) poročajo, da med kontrolno skupino podgan in skupino, ki je bila med poskusom krmljena s krmo z visoko vsebnostjo holesterola, razlik ni bilo.

5.6.2 Vpliv kefirana in kefirnih zrn na mikrobioto blata podgan

Prehrana pomembno vpliva na črevesno mikrobioto. Mikrobioti prebavnega trakta pripisujejo velik pomen, saj sodeluje v številnih procesih zaviranja oz. spodbujanja mnogih bolezni. Med pomembne funkcije črevesne mikrobiote sodijo uravnavanje imunskega sistema, metabolizem za človeka neprebavljivih snovi, sodelovanje pri popravilu poškodovanih celic, zniževanje holesterola ter aktivacija in inaktivacija določenih bioaktivnih komponent v hrani (Blaut in Clavel, 2007).

Velikost populacije laktobacilov, bifidobakterij, enterobakterij in kvasovk v blatu podgan smo določali s pomočjo klasične gojitvene metode in s pomočjo molekularno genetske metode RT PCR. Ne glede na uporabljeno analitsko metodo so rezultati prehranskega poskusa na podganah pokazali, da krma HCD negativno vpliva tako na število laktobacilov, bifidobakterij in enterobakterij kot na število kvasovk v blatu podgan. Pri obeh poskusih je bila populacija laktobacilov, bifidobakterij, enterobakterij in kvasovk ob koncu poskusa pri podganah, ki so bile ves čas poskusa krmljene le s krmo HCD, manjša v primerjavi s kontrolno skupino podgan, ki so bile krmljene s krmo LCD. Dlje kot so bile podgane krmljene s krmo HCD, manjša je bila populacija laktobacilov, bifidobakterij, enterobakterij in kvasovk v blatu. Do podobnih rezultatov so prišli tudi Xie in sod. (2011),

ki so proučevali vpliv dveh sevov laktobacilov na metabolizem lipidov in črevesno mikrobioto podgan, krmljenih s krmo z visoko vsebnostjo holesterola. Podgane, ki so bile krmljene s krmo z visoko vsebnostjo holesterola, so imele v debelem črevesju v primerjavi s kontrolno skupino statistično značilno manj laktobacilov in bifidobakterij.

Pričakovali smo, da bo krmljenje podgan s kefiranom oz. kefirnimi zrnji vplivalo na sestavo črevesne mikrobiote živali v smeri porasta števila laktobacilov in bifidobakterij in zmanjšanja števila enterobakterij. Ne glede na uporabljeno analitsko metodo rezultati prvega in drugega poskusa kažejo, da so imele podgane, krmljene s kefiranom ali s kefirnimi zrnji, v primerjavi s podganami, ki so prejemale le krmo HCD, ob koncu poskusa v blatu višje število laktobacilov in bifidobakterij, ki je bilo v večini primerov statistično značilno. Ker so bile med skupinama, ki sta uživali kefirani oz. kefirno zrno, razlike v povprečnem številu laktobacilov in bifidobakterij v večini primerov statistično neznačilne, lahko sklepamo, da je k temu efektu v večji meri prispeval prebiotični učinek kefirana kakor pa mikrobna populacija kefirnih zrn. Iz prehranskega stališča se nam zdi še bolj zanimivo to, da so imele vse skupine podgan, krmljene s krmo HCD, v blatu statistično značilno nižje število vseh zasledovanih skupin mikroorganizmov (laktobacilov, bifidobakterij, enterobakterij in kvasovk) kakor podgane kontrolne skupine, krmljene s krmo LCD. Samo pri zadnjem vzorčenju (98. dan drugega poskusa) smo v blatu podgan, krmljenih s krmo HCD in kefirnimi zrnji, ugotovili statistično značilno višje število laktobacilov kakor v blatu podgan, krmljenih s krmo LCD, pa še to samo z metodo RT-PCR, ki zajame tako mrtve kot žive celice. Dobljeni rezultati nakazujejo, da krma HCD značilno zmanjša velikost določenih mikrobnih populacij in s tem spremeni črevesno mikrobioto, kar je lahko prvi korak do porušanja črevesne homeostaze in posledičnega postopnega razvoja različnih bolezenskih simptomov, tudi metabolnega sindroma.

V literaturi nismo zasledili študije, ki bi proučevala vpliv kefirana oz. kefirnih zrn na mikrobioto prebavnega trakta. Narejenih pa je bilo veliko raziskav o vplivu kefirja na mikrobno sestavo blata pri živalih. Marquina in sod. (2002) navajajo, da se je pri miškah, ki so uživale kefir, število mlečnokislinskih bakterij v prebavilih statistično značilno povečalo, medtem ko se je število enterobakterij in klostridijev zmanjšalo. St-Onge in sod. (2002) so proučevali vpliv kefirja na raven holesterola in mikrobioto prebavnega trakta pri

moških s povišano ravno holesterola. Po enem mesecu uživanja kefirja so pri 73 % udeležencev v blatu našli bakterije iz rodu *Leuconostoc*, ki so jih pred tem osamili tudi iz kefirja. Analiza blata je tudi pokazala, da se je po prenehanju uživanja kefirja mikrobiota blata udeležencev povrnila nazaj na prvotno.

Številne študije so pokazale, da uživanje mlečnokislinskih bakterij zavira rast in širjenje patogenih bakterij, manjša tveganje za razvoj bolezni in na splošno spodbuja zdravje gostitelja (Marquina in sod., 2002). Na podlagi naših rezultatov ne moremo zaključiti, da se je število enterobakterij zmanjšalo pri skupinah podgan, ki so uživale kefir oz. kefirna zrna, saj se število enterobakterij pri teh dveh skupinah ni statistično značilno razlikovalo od podgan, ki so bile ves čas poskusa krmljene le s krmo HCD. Do podobnih rezultatov so prišli tudi Wang in sod. (2009). Ne glede na to, ali so bile živali krmljene samo s krmo z visoko vsebnostjo holesterola ali pa jim je bil v krmo dodan tudi laktobacil vrste *Lb. plantarum*, so imele ves čas poskusa v blatu stalno število bakterij vrste *E. coli*. Po drugi strani pa Lidbeck in sod. (1987) navajajo zmanjšanje števila bakterij vrste *E. coli* pri pacientih, ki so redno uživali bakterije vrste *Lb. acidophilus*. Ker protimikrobni učinek ni odvisen le od vrste temveč celo od seva bakterije, so različni rezultati pričakovani.

Številni raziskovalci opozarjajo na težave pri proučevanju črevesne mikrobiote, saj je velik del mikrobne populacije nekultivabilen, poleg tega pa je v črevesni vsebini vedno prisotnih veliko število mrtvih celic. Tako je rezultat določanja števila posameznih skupin mikroorganizmov v veliki meri odvisen od uporabljene metode. To se je pokazalo tudi v naši raziskavi, saj so bili rezultati števila laktobacilov, bifidobakterij, enterobakterij in kvasovk v blatu podgan, dobljeni z metodo RT PCR, znatno višji kot rezultati, dobljeni s pomočjo klasične gojitvene metode. Težava klasične gojitvene metode je nezmožnost kultivacije določenega deleža predstavnikov skupin, ki smo jih določali, v laboratorijskih pogojih, težava metode RT PCR pa, da zajame tako žive kot mrtve celice. Kljub temu sta obe metodi pokazali isti trend vpliva krme HCD, kefirja in kefirnih zrn na proučevane mikrobne populacije v blatu podgan: a) uživanje krme HCD je znižalo število laktobacilov, bifidobakterij, enterobakterij in kvasovk v blatu vseh skupin; b) uživanje kefirana ali kefirnih zrn je statistično značilno zvišalo število laktobacilov, bifidobakterij in kvasovk glede na skupino, ki je uživala samo krmo HCD, ni pa vplivalo na število enterobakterij; c)

med skupinama, ki sta uživali kefiran ali kefirno zrno, v številu laktobacilov in bifidobakterij ni bilo statistično značilnih razlik.

5.6.3 Vpliv kefirana in kefirnih zrn na vsebnost skupnega holesterola, HDL in LDL holesterola ter trigliceridov v krvni plazmi podgan

Povišana raven holesterola v krvi je pomemben marker razvoja bolezni, kot so ateroskleroza, bolezni srca in ožilja ter možganska kap. Znano je, da lahko znižanje holesterola za 1 % zmanjša tveganje za razvoj bolezni srca in ožilja za 2–3 % (Chen in sod., 2008). Zaradi relativno visokih stroškov zdravljenja hiperholesterolemije z zdravili in stranskih učinkov zdravil so novejšje raziskave usmerjene v iskanje alternativnih terapij, še posebej za ljudi z mejnimi vrednostmi holesterola. Veliko pozornosti pri preprečevanju tovrstnih motenj so pritegnile probiotične bakterije ter prebiotiki. Zato smo se odločili, da bomo v prehranskem poskusu na podganah spremljali, kako kefiran kot prebiotik oz. kefirna zrna kot simbiotik vplivajo na raven skupnega holesterola, HDL in LDL holesterola ter raven trigliceridov v krvni plazmi podgan. Večina raziskav je osredotočena predvsem na proučevanje vpliva kefirja na zniževanje ravni holesterola in trigliceridov v krvi (Liu in sod., 2006; Cenesiz in sod., 2008), le malo pa jih proučuje vpliv kefirana. V literaturi tudi nismo zasledili študije, ki bi proučevala vpliv kefirnih zrn na zniževanje ravni holesterola in trigliceridov.

Glede na literaturo (Mawatari in sod., 2003) naj bi se raven skupnega in LDL holesterola zvišala že po dveh tednih krmljenja podgan s krmo z visoko vsebnostjo holesterola. Pri poskusu, ki smo ga opravili, je raven skupnega holesterola pri podganah v kontrolni skupini skokovito narastla že po enem tednu krmljenja s krmo HCD (od 2,86 mmol/l do 15,86 mmol/l), nato pa se je iz tedna v teden postopoma višala.

Tako pri prvem kakor pri drugem poskusu so imele podgane, ki so uživale krmo HCD in kefiran oz. kefirna zrna, v primerjavi s skupino podgan, ki so uživale krmo LCD, statistično značilno višjo koncentracijo skupnega holesterola v plazmi. Uživanje kefirana oz. kefirnih zrn ni znižalo ravni skupnega holesterola na raven, ki so jo imele podgane, ki so ves čas poskusa uživale LDC krmo, je pa delovalo rahlo zaščitno, saj so imele v obeh poskusih podgane, ki so uživale kefiran oz. kefirna zrna, v primerjavi s kontrolno skupino,

ki je bila ves čas krmljen samo s krmo HCD, v plazmi ob koncu poskusa v povprečju nekoliko nižjo koncentracijo skupnega holesterola, ki pa ni bila statistično značilna. Podganam, ki so uživale kefiran oz. kefirna zrna, se je od prvega do zadnjega vzorčenja raven skupnega holesterola povišala manj kakor skupini podgan, ki je bila krmljena s krmo HCD. Koncentracija skupnega holesterola v krvni plazmi podgan, ki so uživale kefiran ali kefirna zrna, ni bila statistično značilno različna. Tudi Maeda in sod. (2004a) so dokazali, da se je koncentracija skupnega holesterola in trigliceridov v serumu in jetrih podgan vrste SHRSP/Hos Rat, ki so uživale kefiran, v primerjavi s kontrolno skupino statistično značilno znižala, koncentraciji HDL in LDL holesterola pa se med skupinami nista statistično značilno razlikovali. Avtorji so navedli, da presnovne in morfološke spremembe pri podganah kažejo, da lahko kefiran vpliva na presnovo maščob, vendar natančnega mehanizma niso pojasnili. Do podobnih ugotovitev so prišli tudi Uchida in sod. (2010). V raziskavi so proučevali vpliv kefirana na razvoj ateroskleroze pri kuncih, ki so bili krmljeni s krmo z visoko vsebnostjo holesterola. Ob koncu poskusa so imeli kunci, krmljeni s kefiranom, v primerjavi s kontrolno skupino v serumu nižjo koncentracijo skupnega holesterola, LDL in VLDL holesterola, koncentracija HDL holesterola pa je bila višja. Vendar razlike med skupinama niso bile statistično značilne. Avtorji so prišli tudi do spoznanja, da kefiran preprečuje nastanek in razvoj ateroskleroze pri kuncih s hiperholesterolemijo, kar so pripisali protivnetnemu in antioksidativnemu delovanju kefirana. Številne študije so dokazale, da uživanje prebiotikov vpliva na metabolizem lipidov. Predvsem za inulin in oligofruktozo je bilo dokazano, da vplivata na raven skupnega holesterola in trigliceridov (Saad in sod., 2013). Pri podganah, ki so uživale inulin oz. oligofruktozo, sta se koncentraciji skupnega holesterola in trigliceridov znižali za 15 oz. 20 %. To znižanje pripisujejo predvsem nižji koncentraciji VLDL holesterola ter manjši aktivnosti lipogenih encimov (Delzenne in sod., 2002).

Glede na literaturo in dobljene rezultate lahko domnevamo, da kefiran deluje kot prebiotik. Ob koncu poskusa so imele podgane, krmljene s kefiranom oz. kefirnimi zrnji, v primerjavi s skupino, ki je bila krmljena le s krmo HCD, v blatu višje število laktobacilov in bifidobakterij. Poleg tega so imele te podgane v krvni plazmi nižjo raven skupnega holesterola. Znano je, da laktobacili in bifidobakterije v debelem črevesju fermentirajo neabsorbirane ogljikove hidrate do kratkoverižnih maščobnih kislin, ki lahko znižajo raven

holesterola tako, da inhibirajo HMG-CoA reduktazo. Poleg tega lahko nekateri laktobacili vežejo oz. absorbirajo holesterol in tako preprečijo absorpcijo holesterola v telo. Encimi laktobacilov lahko pretvorijo žolčne kisline v dekonjugirano obliko, kar zniža količino absorbirane konjugirane oblike žolčnih soli nazaj v telo, posledično pa se zmanjša tudi raven holesterola v krvi (Kawase in sod., 2000; St-Onge in sod., 2000; Farnworth in Mainville, 2003; Chen in sod., 2008). Podobne ugotovitve navajajo tudi Xie in sod. (2011). Pri podganah, ki so jim v krmo dodajali laktobacile, se je v primerjavi s kontrolno skupino, ki je bila krmljena s krmo z visoko vsebnostjo holesterola, število laktobacilov in bifidobakterij v blatu povečalo, koncentracija skupnega holesterola, LDL holesterola ter trigliceridov v serumu pa je bila v primerjavi s kontrolno skupino nižja. Avtorji navajajo, da naj bi dodani laktobacili izboljšali črevesno mikrobno ravnovesje in s tem izboljšali čas prehajanja črevesne vsebine. Čeprav natančnih mehanizmov niso opisali, pa ima po njihovem mnenju črevesna mikrobiota velik vpliv na presnovo maščob. Do podobnih zaključkov so prišli tudi Wang in sod. (2009), ko so proučevali vpliv seva *Lactobacillus plantarum* MA2, osamljenega iz kefirja, na metabolizem lipidov in mikrobioto prebavnega trakta pri podganah, ki so jih krmili s krmo z visoko vsebnostjo holesterola.

V literaturi je mogoče zaslediti tudi nekaj raziskav o proučevanju vpliva kefirja na raven holesterola in trigliceridov v serumu poskusnih živali. Rezultati raziskav kažejo, da uživanje kefirja znižuje raven skupnega holesterola in fosfolipidov pri podganah, ki so bile krmljene s kefirjem. Vendar pa uživanje kefirja ni vplivalo na koncentracijo trigliceridov in HDL holesterola (Tamai in sod., 1996). Tudi Cenesiz in sod. (2008) poročajo, da je bila v primerjavi s kontrolno skupino raven skupnega holesterola v serumu nižja pri piščancih, ki so jim v krmo dodajali kefir. O podobnih rezultatih poročajo tudi Liu in sod. (2006). Hrčki, ki so jih poleg krme z visoko vsebnostjo holesterola krmili še s kefirjem, so imeli v primerjavi s kontrolno skupino v serumu in jetrih nižjo koncentracijo skupnega holesterola, LDL holesterola in trigliceridov, koncentracija HDL holesterola pa je bila višja. Po mnenju avtorjev naj bi imela mikrobiota kefirnih zrn zmožnost asimilacije holesterola. Nikjer v literaturi nismo zasledili študije, ki bi dokazala, da uživanje kefirja vpliva na znižanje ravni holesterola pri ljudeh. St-Onge in sod. (2002) so proučevali vpliv kefirja na zniževanje koncentracije holesterola v krvni plazmi moških s hiperholesterolemijo. Enomesečno uživanja kefirja ni znižalo ravni skupnega holesterola, LDL holesterola oz. trigliceridov v

krvi prostovoljcev. Avtorji navajajo, da je to lahko posledica premajhne zaužite količine bakterij, ki bi se lahko naselile v prebavnem traktu in tako vplivale na raven holesterola. Narejena pa je bila tudi raziskava o vplivu kefirnih zrn različnega izvora na prevzem holesterola iz mleka med 24-urno in 48-urno inkubacijo. Ugotovljeno je bilo, da so kefirna zrna po 48-urni inkubaciji asimilirala 22 do 63 % holesterola (Vujicic in sod., 1962).

Rezultati naše raziskave so pokazali, da je krmljenje podgan s krmo HCD vplivalo tudi na raven HDL in LDL holesterola v krvni plazmi živali. V krvi podgan, ki so uživale krmo HCD, se je v primerjavi s podganami, ki so uživale krmo LCD, koncentracija HDL holesterola ob koncu poskusa znižala, raven LDL holesterola pa znatno povišala. Wang in sod. (2009), Ibrahim in sod. (2005) ter St-Onge in sod. (2002) pa navajajo, da krmljenje podgan s krmo z visoko vsebnostjo holesterola ni vplivalo na raven HDL holesterola. Pri prvem poskusu naše raziskave uživanje kefirana oz. kefirnih zrn ni vplivalo na raven HDL holesterola, saj je bila koncentracija HDL holesterola v krvi podobna kakor pri podganah, ki so bile ves čas poskusa krmljene le s krmo HCD. Čeprav ni bilo statistično značilnih razlik v koncentraciji LDL holesterola, so imele podgane, ki so uživale kefirana oz. kefirna zrna, v povprečju nekoliko nižjo koncentracijo LDL holesterola kakor podgane, ki so uživale samo krmo HCD. Pri drugem poskusu, ki je potekal dalj časa, pa je bila povprečna koncentracija LDL holesterola v krvi podgan, ki so uživale kefirana oz. kefirna zrna, podobna povprečni koncentraciji LDL holesterola v krvi kontrolne skupine, krmljene samo s krmo HCD, povprečna koncentracija HDL holesterola pa višja.

Po navedbah Buettner in sod. (2007) se je koncentracija trigliceridov v krvi podgan vrste Wistar zvišala po šestih do sedmih tednih krmljenja s krmo, ki je vsebovala svinjsko mast. Ne pri prvem ne pri drugem poskusu naše raziskave krmljenje s krmo HCD ni značilno zvišalo koncentracije trigliceridov v krvi podgan. Pri prvem poskusu so imele podgane, ki so bile krmljene s krmo z dodano svinjsko mastjo (krma HCD), ob koncu poskusa primerljivo povprečno koncentracijo trigliceridov v plazmi kot podgane, krmljene s krmo LCD, čeprav so bile podgane krmljene s krmo HCD šest tednov. Pri drugem poskusu so bile podgane krmljene s krmo HCD dvanajst tednov. Te podgane so imele ob koncu poskusa sicer nekoliko višjo povprečno koncentracijo trigliceridov v plazmi v primerjavi s kontrolno skupino, vendar statističnih razlik ni bilo.

5.6.4 Vpliv kefirana in kefirnih zrn na stopnjo lipidne peroksidacije v krvni plazmi podgan

Prehrana ima velik vpliv na zdravje ljudi tudi z vidika vpliva na oksidacijski stres. Oksidacija biomolekul v organizmu lahko namreč vodi do poškodb in slabšega delovanja tkiv in sistemov. Oksidacijski stres povečujejo tudi mnoga bolezenska stanja in različni negativni okoljski dejavniki. Za zagotavljanje zdravja zato potrebujemo dobro antioksidativno zaščito. V prehranski industriji je v zadnjem času vse več zanimanja za naravne antioksidante, saj novejša študije kažejo, da so lahko sintetično proizvedeni antioksidanti (BHA, BHT) rakotvorni (Liu in sod., 2005). Zato smo v prehranskem poskusu na podganah proučevali tudi vpliv kefirana in kefirnih zrn na oksidacijski stres. Oksidacijski stres smo pri podganah poskušali sprožiti z dodatkom lanenega olja v krmo. Znano je namreč, da lahko predvsem rastlinske maščobe z visoko vsebnostjo nenasičenih maščobnih kislin povzročajo oksidacijski stres (Frankič in sod., 2009). Stopnjo lipidne peroksidacije smo merili preko kompleksa malondialdehid-tiobarbiturna kislina (MDA). Določanje MDA, sekundarnega produkta lipidne peroksidacije, preko kompleksa malondialdehid-tiobarbiturna kislina je ena najpogosteje uporabljenih metod. MDA ni samo pokazatelj lipidne peroksidacije, temveč je tudi sam po sebi toksičen (Halliwell in Gutteridge, 1999).

V naši raziskavi krmljenje podgan s krmo HCD, ki je vsebovala laneno olje, ni sprožilo oksidacijskega stresa. Pričakovali smo, da bodo imele podgane iz skupine K2, ki so bile ves čas poskusa krmljene samo s krmo HCD, v plazmi višjo koncentracijo MDA kot pri prvem vzorčenju, vendar so imele zadnji dan poskusa podgane iz vseh skupin v primerjavi s prvim vzorčenjem v krvni plazmi manjšo koncentracijo MDA. Zanimivo je, da so imele podgane, ki so uživale kefir in kefirna zrna, v primerjavi s skupino podgan, ki je bila ves čas poskusa krmljena samo s krmo HCD, ob koncu poskusa v plazmi statistično značilno nižjo koncentracijo MDA. Poleg tega je bila koncentracija MDA v krvni plazmi podgan, ki so uživale kefir oz. kefirna zrna, podobna koncentraciji MDA v plazmi podgan iz kontrolne skupine, krmljene s krmo LCD. Kljub dobljenim rezultatom žal ne moremo zaključiti, da kefir oz. kefirna zrna delujejo antioksidativno, saj ne vemo, zakaj je pri zadnjem vzorčenju pri vseh skupinah podgan prišlo do znižanja koncentracije MDA v

plazmi. Uchid in sod. (2010) so proučevali antiaterogeni vpliv kefirana pri kuncih, ki so jih krmili s krmo z visoko vsebnostjo holesterola. Pri kuncih so merili koncentracijo glukoze in galaktoze v serumu ter v β VLDL, bogatih s holesterolom. Rezultati so pokazali, da je bila koncentracija glukoze v serumu med kontrolno skupino in skupino, ki je prejela kefir, podobna. Vendar pa je bila koncentracija glukoze in galaktoze v β VLDL pri kuncih, ki so bili krmljeni s kefiranom, v primerjavi s kontrolno skupino višja. Dobljeni rezultati nakazujejo, da se je kefir »skladiščil« v β VLDL. Poleg tega je bila stopnja lipidne peroksidacije β VLDL pri skupini kuncev, ki je bila krmljena s kefiranom, nižja kot pri kontrolni skupini. Stopnja lipidne peroksidacije β VLDL pri skupini kuncev, ki so uživali kefir, je bila le 18 % lipidne peroksidacije β VLDL pri kontrolni skupini.

6 SKLEPI

- Hipotezo, da bodo kefirna zrna vsebovala pestro združbo laktobacilov, med katerimi so tudi kefiranogeni predstavniki, smo potrdili samo posredno. Iz kefirnega zrna smo osamili kefiran in tipične predstavnike kefiranogenih laktobacilov (*Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum*, *Lactobacillus kefiri* in *Lactobacillus parakefiri*), vendar tvorbe kefirana v laboratorijskih pogojih nismo uspeli potrditi. Izolati so v čistih kulturah tvorili polisaharide, različne od kefirana.
- Potrdili smo hipotezo, da bodo med kefiranogenimi sevi predstavniki z antioksidativno aktivnostjo, saj smo tako za brezcelične ekstrakte osamljenih laktobacilov kakor za kefiran, izoliran iz kefirnih zrn, dokazali antioksidativno delovanje.
- Kefiran je izkazal lastnosti prebiotika, saj je povečal rast mikrobnih populacij vseh testiranih laktobacilov in ene od treh testiranih bifidobakterij. Z metodo lise na agarju smo potrdili protimikrobno aktivnost kefirana, vendar samo pri zelo visokih koncentracijah kefirana (20 mg/ml). Hipotezo o prebiotičnih lastnostih kefirana smo potrdili, za dokaz protimikrobnih lastnosti pa bodo potrebne dodatne študije.
- Pri poskusu na podganah, krmljenih s krmo HCD, je dodatek kefirana in/ali kefirnega zrna spremenil sestavo črevesne mikrobiote (višje število laktobacilov, bifidobakterij in kvasovk) ter znižal raven holesterola v krvni plazmi živali. Krmljenje s kefiranom oz. kefirnim zrnom ni vplivalo na raven krvnih lipidov in stopnjo lipidne peroksidacije. S tem smo potrdili prvi del in ovrgli drugi del četrte hipoteze.

7 POVZETEK

7.1 POVZETEK

Kefir je eden najstarejših fermentiranih mlečnih izdelkov z dokazanimi zdravju koristnimi učinki. Mikrobno združbo kefirnega zrna predstavlja simbiotski sistem mlečnokislinskih in oecetnokislinskih bakterij ter kvasovk, ujetih v polisaharidni matriks, imenovan kefiran. Kefiran je morda najpomembnejši metabolit v kefirju, saj deluje kot lepilo in varuje kefirno zrno pred poškodbami, poleg tega pa mu pripisujejo številne zdravilne učinke. Pozitivni učinki kefirja in/ali kefirana na zdravje so bili dokazani v različnih kliničnih študijah, vendar so mehanizmi redko natančno opisani, rezultati pa so si pogosto nasprotujoči. Zato smo se odločili, da bomo v naši raziskavi proučili in ovrednotili funkcionalne lastnosti kefirana v primerjavi s kompleksnim kefirnim zrnem. Pri proučevanju mikrobne združbe kefirnih zrn smo se osredotočili predvsem na kefiranogene laktobacile.

V raziskavi smo najprej z uporabo gojitvenih tehnik in s pomočjo od gojenja neodvisnih metod DGGE in RAPD ovrednotili velikost in pestrost populacije laktobacilov v vzorcih kefirnih zrn, ki so last Mlekarne Krepko. Prevladujočo populacijo laktobacilov kefirnih zrn so predstavljale vrste *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum*, *Lb. kefir* in *Lb. parakefiri*, ki smo jih osamili in pripravili čiste kulture.

Po identifikaciji laktobacilov, osamljenih iz kefirnih zrn, smo ugotavljali njihovo sposobnost tvorbe kefirana in antioksidativno aktivnost. Za optimizacijo tvorbe kefirana smo uporabili različna gojišča in različne vrednosti pH. Iz kefirnih zrn osamljeni laktobacili v čisti kulturi v izbranih gojiščih in ob različnih vrednostih pH v laboratorijskih pogojih niso tvorili kefirana, temveč kefiranu podobne eksopolisaharide. Ker iz kefirnih zrn nismo uspeli osamiti kefiranogenih laktobacilov, smo v nadaljnjo raziskavo vključili kefiran, ki smo ga pridobili iz kefirnih zrn. Najvišjo antioksidativno aktivnost brezceličnega ekstrakta proučevanih laktobacilov smo določili pri sevu *Lb. kefir* MR3 (7,61 % – 52,70 %), najslabšo pa pri sevu *Lb. kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* MP6 (1,71 % – 27,60 %). Antioksidativna aktivnost kefirana je bila primerljiva z antioksidanti, kot so vitamin C, vitamin E in BHA.

V *in vitro* poskusu smo potrdili domnevo, da ima kefiran prebiotične lastnosti. Dodatek kefirana v gojišče je vplival na rast laktobacilov, ki smo jih predhodno osamili iz kefirnih zrn, na rast laktobacilov, ki so značilni za prebavni trakt, in na rast enega izmed treh testiranih sevov različnih vrst bifidobakterij, ki je pripadal vrsti *Bifidobacterium lactis*. Z metodo lise na agarju smo potrdili protimikrobno aktivnost kefirana v koncentraciji 20 mg/ml, in sicer proti bakterijam *Bacillus cereus* IM 250, *Escherichia coli* IM 120, *Listeria monocytogenes* IM 372, *L. innocua* IM 373 in *Staphylococcus aureus* IM 388.

V prehranskem poskusu na podganah vrste Wistar smo proučevali vpliv kefirana in kefirnih zrn na mikrobioto prebavnega trakta podgan, na dve tipični motnji metabolnega sindroma (višjo raven serumskega holesterola in višjo raven trigliceridov) in na oksidacijski stres. Pri poskusu, ki smo ga razdelili na dva dela, smo uporabili 72 podganjih samic, starih od šest do osem tednov. Pri prvem poskusu nas je zanimalo, kakšen vpliv imajo kefirana oz. kefirna zrna na črevesno mikrobioto, raven serumskega holesterola, raven trigliceridov in oksidacijski stres, če smo živali sočasno krmili s krmo z visoko vsebnostjo holesterola in kefiranom oz. kefirnimi zrnji. Pri drugem poskusu pa smo pri podganah najprej s prehrano poskušali zvišati raven serumskega holesterola in trigliceridov in tako sprožiti oksidacijski stres. Tako pri prvem kakor pri drugem poskusu so bile živali naključno razdeljene v štiri skupine, dve kontrolni (K1 in K2) in dve poskusni skupini (P1 in P2), po devet živali. Živali iz skupine K1 so bile ves čas poskusa krmljene s krmo z nizko vsebnostjo holesterola, živali iz skupine K2 pa s krmo z visoko vsebnostjo holesterola. Živali so bile v obeh poskusih 14 dni v karanteni. Pri prvem poskusu, ki je trajal 42 dni, so bile podgane iz poskusne skupine P1 krmljene s krmo z visoko vsebnostjo holesterola in kefiranom, podgane iz skupine P2 pa s krmo z visoko vsebnostjo holesterola in kefirnimi zrnji. Pri drugem poskusu smo podgane iz skupin K2, P1 in P2 najprej 42 dni krmili s krmo z visoko vsebnostjo holesterola. Sledilo je obdobje, ki je prav tako trajalo 42 dni, in med katerim so živali iz skupine P1 tako kakor pri prvem poskusu poleg krme z visoko vsebnostjo holesterola dobivale še kefirana, živali iz skupine P2 pa kefirna zrna. Vzorce blata za mikrobiološke analize črevesne mikrobiote smo odvzeli trikrat. Na selektivnih gojiščih in z uporabo molekularne metode RT PCR smo ugotavljali število laktobacilov, bifidobakterij, kvasovk in enterobakterij. Šesttedensko krmljenje podgan s kefirjem oz. kefirnimi zrnji je vplivalo na mikrobioto blata podgan. Krmljenje podgan s

krmo z visoko vsebnostjo holesterola je povzročilo znižanje števila laktobacilov, bifidobakterij, enterobakterij in kvasovk v blatu in s tem drastično spremenilo mikrobioto. Rezultati so tudi pokazali, da se blato podgan, ki so uživale kefiran oz. kefirna zrna, statistično značilno razlikuje po večjem številu laktobacilov in bifidobakterij v primerjavi s kontrolno skupino podgan, ki so bile krmljene samo s krmo z visoko vsebnostjo holesterola. Število enterobakterij se med skupinami ni statistično razlikovalo. Za določanje vsebnosti skupnega holesterola in trigliceridov v krvni plazmi podgan smo uporabili encimsko kolorimetrično metodo ter encimsko direktno metodo za določanje vsebnost HDL in LDL holesterola. Podgane v skupinah, krmljenih s krmo z visoko vsebnostjo holesterola, so imele po koncu poskusa v krvni plazmi statistično značilno višjo koncentracijo skupnega holesterola in LDL holesterola ter nižjo koncentracijo HDL holesterola kot kontrolna skupina, ki je ves čas poskusa uživala samo krmo z nizko vsebnostjo holesterola. Rezultati raziskave so tudi pokazali, da so imele ob koncu poskusa podgane, ki so uživale kefiran oz. kefirna zrna v primerjavi s kontrolno skupino podgan, ki so uživale krmo z visoko vsebnostjo holesterola, v krvni plazmi statistično značilno nižjo raven skupnega holesterola. Ravni trigliceridov v krvni plazmi s prehrano nismo uspeli povišati. Glede na literaturo in dobljene rezultate lahko domnevamo, da kefiran deluje kot prebiotik, kefirna zrna pa kot simbiotik. Ob koncu poskusa so imele podgane, ki so bile krmljene s kefiranom oz. kefirnimi zrnji, v primerjavi s skupino, ki je bila krmljena le s krmo z visoko vsebnostjo holesterola, v blatu večje število laktobacilov in bifidobakterij, poleg tega so imele te podgane v krvni plazmi nižjo raven skupnega holesterola. Stopnjo lipidne peroksidacije v krvni plazmi pri podganah smo določali preko kompleksa malondialdehid-tiobarbiturna kislina. Kljub dobljenim rezultatom žal ne moremo zaključiti, da kefiran oz. kefirna zrna delujejo antioksidativno.

V literaturi nismo zasledili primerjalne študije, ki bi v istem poskusu in pod enakimi pogoji ugotavljala učinkovitost kefirana in kefirnega zrna. Pridobljeni rezultati so tako natančneje opredelili vlogo kefirana pri funkcionalnih učinkih kefirnega zrna.

7.2 SUMMARY

As one of the world's earliest forms of fermented milk, kefir is believed to have many beneficent effects on human health. Kefir grains are a symbiotic association of yeasts,

lactic and acetic acid bacteria, embedded in a complex matrix of proteins and exopolysaccharide known as kefiran. Kefiran is perhaps the most important metabolite of kefir; not only can it act as a bond which also protects kefir grains from damage, it also has health benefits. Many studies have been published into the beneficent properties of both kefir and kefiran, but the exact mechanisms are rarely described, whilst the study results themselves are often contradictory. Therefore, the aim of this research was to evaluate the functional effects of kefiran in comparison with kefir grains. In this study of microbial communities within kefir grains, focus was for the most part on the lactobacilli that produces kefiran.

Through the application of a combination of conventional microbiological cultivation techniques and culture-independent DGGE and RAPD methodology, the size and diversity of lactobacilli present in kefir grains obtained from the local Mlekarna Krepko dairy plant in Logatec, Slovenia, were evaluated. The dominant lactobacilli populations of these kefir grains were *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum*, *Lb. kefiri* and *Lb. parakefiri*.

Upon identification of the lactobacilli isolated from kefir grains, their ability to produce kefiran and antioxidant activity were investigated. Various media and differing pH values were used to assess optimal environmental conditions for the production of kefiran. Under the disparate laboratory conditions, lactobacilli isolated from kefir grains in pure culture did not produce actual kefiran, but rather kefiran-like exopolysaccharides. Therefore, kefiran obtained from kefir grains was used for investigation into its effects. The highest antioxidant activity of cell-free extract obtained from the examined lactobacilli was of strain *Lb. kefir* MR3, and this ranged between 7.61 % and 52.70 %. The lowest antioxidant activity was observed in relation to the strain *Lb. kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* MP6, which ranged between 1.71% and 27.60%. The antioxidant effect of kefiran was comparable to vitamin C, vitamin E and BHA.

The data obtained in the *in vitro* studies confirmed the prebiotic properties of kefiran. The addition of kefiran to the culture stimulated the growth of lactobacilli, previously isolated from kefir grains and which are common to gastrointestinal tract; it also stimulated the growth of bifidobacteria *Bifidobacterium lactis*, one of the three bifidobacteria strains

tested. Kefiran (20 mg/ml) also exerted antimicrobial activity against *Bacillus cereus* IM 250, *Escherichia coli* IM 120, *Listeria monocytogens* IM 372, *L. innocua* IM 373 and *Staphylococcus aureus* IM 388.

The effect of kefiran and kefir grains on plasma lipids, oxidative stress and mammalian faecal microbiota were all investigated through the *in vivo* experiment using Wistar rats. 72 female rats, aged six to eight weeks, were used in the two-part experiment. The first experiment aimed to evaluate the impact of kefiran and kefir grains on plasma lipids, faecal microbiota and oxidative stress when animals were simultaneously fed with a high-cholesterol diet and kefiran or kefir grains. The second experiment was intended to increase the level of plasma cholesterol and triglycerides in rats. For both experiments rats were randomly divided into four groups, each comprising 9 animals. The experimental period followed a 14-day period of quarantine. Group K1 served as the control group, and received a low cholesterol diet (LCD) for the duration of the experiment. Group K2 was also a control group, but these animals received a high-cholesterol diet (HCD) for the initial duration of the experiment. Groups P1 and P2 served as experimental groups: P1 was fed with a high-cholesterol diet and kefiran, while P2 was fed with a high-cholesterol diet and kefir grains. The second experiment lasted 84 days. Groups K2, P1 and P2 were first fed a high cholesterol diet for 42 days, following which group P1 was fed with a high-cholesterol diet and kefiran, while group P2 was fed with high-cholesterol diet and kefir grains for a further 42 days. Samples of the rats' gut microbiota were taken on three occasions during the experiment for the purpose of microbiological analysis. Microbial counts were obtained by plate counting as well as real-time PCR.

From our results, it can be seen that kefiran and kefir grains diet had a significant influence on the composition of the microbiota of rats. Feeding rats with a high-cholesterol diet decreased the number of lactobacilli, bifidobacteria, enterobacteria and yeast in the faeces and thereby drastically changed their microbiota, and in relation to this it was also demonstrated that the administration of kefiran and kefir grains increased the levels of lactobacilli and bifidobacteria in rat-gut microbiota in comparison with the control group which were fed solely with the high-cholesterol diet. The amounts of enterobacteria per each of the experimental groups were not statistically different. Plasma total cholesterol

(TC), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) and triglycerides (TG) were measured using enzymatic colorimetric tests. Compared to the low-cholesterol diet group (K1), the high cholesterol diet group (K2) exhibited a decrease in HDL-C and an increase in LDL-C and TC. After six weeks of feeding rats with kefir or kefir grains, the results revealed that the kefir (P1) and kefir grains (P2) group had lower total plasma cholesterol in comparison with those of the control group, which had received solely the high-cholesterol diet. A high-cholesterol diet had no effect on triglyceride levels in rats. According to the literature - and the results obtained in this study - it may be assumed that kefir acts as a prebiotic and kefir grains as a symbiotic. At the end of the experiment, rats that had been fed with kefir and kefir grains had a higher number of lactobacilli and bifidobacteria in their faeces, in comparison with the group which had been fed solely on a high-cholesterol diet. Furthermore, these rats also had lower levels of total cholesterol in plasma. The level of lipid peroxidation in the plasma of rats was determined via a complex-malondialdehyde thiobarbituric acid. Unfortunately, and despite the results obtained, it cannot be concluded that kefir or kefir grains act as antioxidants.

No comparative studies under similar experimental conditions examining the efficacy of kefir and kefir grains were found in the literature. The results obtained in this study evaluated the role of kefir in comparison with the functional effects of kefir grains.

8 VIRI

- Abbasi M. A. Saleem H., Riaz A. T., Ajaib M. 2013. Determination of antioxidant activity and phytoconstituent screening of *Euphorbia heterophylla* Linn. *British Journal of Pharmaceutical Research*, 3: 202-216.
- Ahire J. J., Mokashe N. U., Patil H. J., Chaudhari B. L. 2013. Antioxidative potential of folate producing probiotic *Lactobacillus helveticus* CD6. *Journal of Food Science and Technology*, 50: 26-34.
- 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.
- Arnold D. R., Kwiterovich P. O. 2003. Cholesterol: Absorption, function and metabolism. V: *Encyclopedia of food sciences and nutrition*. Vol. 2. Caballero B., Trugo L.C., Finglas P. M. (ur.). 2nd ed. London, Academic Press: 1226-1237.
- Badel S., Bernardi T., Michaud P. 2011. New perspectives for *Lactobacilli exopolysaccharides*. *Biotechnology Advances*, 29: 54-60.
- Bartosch S., Fite A., Macfarlane G. T., McMurdo M. E. T. 2004. Characterization of bacterial communities in feces from healthy elderly volunteers and hospitalized elderly patients by using real-time PCR and effects of antibiotics treatment on the fecal microbiota. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 3575-3581.
- Beena A., Prasad V. 1997. Effect of yoghurt and bifidus yoghurt fortified with skim milk powder, condensed whey and lactose-hydrolysed condensed whey on serum cholesterol and triacylglycerol levels in rats. *Journal of Dairy Research*, 64: 625-651.
- Beshkova D. M., Simova E. D., Simov Z. I., Frengova G. I., Spasov Z. N. 2002. Pure culture for making kefir. *Food Microbiology*, 19: 537-544.
- Blaton V. H., Korita I., Buló A. 2008. How is metabolic syndrome related to dyslipidaemia. *Biochimica Medica*, 18: 14-24.

- Blaut M., Clavel T. 2007. Metabolic diversity of the intestinal microbiota: Implications for health and disease. *Journal of Nutrition*, 137: 751-755.
- Brown S. M., Goldstein L. J. 1985. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Physiology or Medicine*, 41: 284-324.
- Buettner R., Schölmerich J., Bollheimer C. 2007. High-fat diets: Modelling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity*, 15: 798-807.
- Cenesiz S., Yaman H., Ozcan A., Kart A., Karademir G. 2008. Effects of kefir as a probiotic on serum cholesterol, total lipid, aspartate amino transferase and alanine amino transferase activities in broiler chicks. *Medycyna Weterynaryjna*, 64: 168-170.
- Cheirsilp B., Shimizu H., Shioya S. 2003. Enhanced kefir production by mixed culture of *Lactobacillus kefiranofaciens* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biotechnology*, 100, 1: 43-53.
- Cheirsilp B., Radchabut S. 2011. Use of whey lactose from dairy industry for economical kefir production by *Lactobacillus kefiranofaciens* in mix cultures with yeasts. *New Biotechnology*, 28: 574-580.
- Chen H. C., Wang S. Y., Chen M. J. 2008. Microbiological study of lactic acid bacteria in kefir grains by culture-dependent and culture-independent methods. *Food Microbiology*, 25:492–501.
- Chirico S. 1994. High-performance liquid chromatography-based thiobarbituric acid tests. V: *Methods in enzymology: Oxygen radicals in biological systems*. Packer L. (ur). New York, Academic Press: 314-318.
- Cocolin L., Aggio D., Manzano M., Cantoni C., Comi G. 2002. An application of PCR-DGGE analysis to profile the yeasts populations in raw milk. *International Dairy Journal*, 12: 407-411.

- Da Cruz Pedrozo Miguel M. G., Gomes Cardoso P., de Assis Lago L., Schwan R. F. 2010. Diversity of bacteria present in milk kefir grains using culture-dependent and culture-independent methods. *Food Research International*, 43: 1523-1528.
- De Backer G., Ambrosioni E., Borch-Johnsen K., Brotons C., Cifkova R., Dallongevillr J., Ebrahim S., Faergeman O., Graham I., Mancia G., Manger Cats V., Orth-Gomer K., Perk J., Pyorala K., Rodicio J. L., Sans S., Sansoy V., Sechtem U., Silber S., Thomsen T., Wood D. 2003. European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. Third joint task force of European and other societies on cardiovascular disease prevention in clinical practice. *European Heart Journal*, 24: 1601-1610.
- Deeseenthum S., Pejovic J. 2010. Bacterial inhibition and antioxidant activity of kefir produced from Thai jasmine rice milk. *Biotechnology*, 9: 332-337.
- De Moreno de LeBlanc A., Mater C., Farnworth E., Perdigon G. 2007. Study of immune cells involved in the antitumor effect of kefir in a murine cancer model. *Journal of Dairy Science*, 90: 1920-1928.
- De Vuyst L., Degeest. 1999. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 23: 153-177.
- Delzenne N. M., Daubioul C., Neyrinck A., Lasa M., Taper H. S. 2002. Inulin and oligofructose modulate lipid metabolites in animals, review of biological events and future prospects. *British Journal of Nutrition*, 87: 255-259.
- Doliška A., Strnad S., Ribitsch V., Stana-Kleinschek K., Willför S., Saake B. 2009. Analysis of galactoglucomannans from spruce wood by capillary electrophoresis. *Cellulose*, 16: 1089-1097.
- Farnworth E. R., Mainville I. 2003. Kefir: A fermented milk product. V: *Handbook of fermented functional foods*. Farnworth R. (ur.). Boca Raton, CRC Press: 77-103.
- Farnworth E. R. 2005. Kefir – a complex probiotic. *Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods*, 2: 1-17.

- Frankič T., Salobir K., Salobir J. 2009. The comparison of *in vivo* antigenotoxic and antioxidative capacity of two propylene glycol extract of *Calendula officinalis* (marigold) and vitamin E in young growing pigs. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 93: 688-694.
- Frengova G. I., Simova E. D., Beshkova D. M., Simov Z. I. 2002. Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria of kefir grains. *Zeitschrift für Naturforschung*, 57: 805-810.
- Fukunaga K., Takama K., Suzuki T. 1995. High-performance liquid chromatographic determination of plasma malondialdehyde level without a solvent extraction procedure. *Analytical Biochemistry*, 230: 20-23.
- Furukawa N., Matsuoka A., Takahashi T., Yamanaka Y. 2000. Anti-metastatic effect of kefir grain components on lewis lung carcinoma and highly metastatic B16 melanoma in mice. *Journal of Agriculture Science*, 45: 62-70.
- Garbers I. M., Britz T. J., Witthuhn R. C. 2004. PCR-based denaturing gradient gel electrophoretic typification and identification of the microbial consortium present in kefir grains. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 20: 687-693.
- Garrote G. L., Abraham A. G., De Antoni G. L. 2001. Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. *Journal of Dairy Research*, 68: 639-652.
- Garrote G. L., Abraham A. G., De Antoni G. L. 2010. Microbial interactions in kefir: A natural probiotic drink. V: *Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel Applications*. Mozzi F., Raya R. R., Vignolo G. M. (ur.). Iowa, Wiley – Blackwell: 327-341.
- Generoso M., Wolf M., Dondi C. A., Vecchio C., De Rosa M. 2005. Kefir: a border line probiotic between innovation and tradition. V: *ATTI Abstracts 3rd probiotics, prebiotics and new food*. Rome, 4th–6thSeptember 2005. Rome, Università Urbaniana: str. 3. (loč. Pag.)

(http://www.agronavigator.cz/userfiles/file/agronavigator/kvasnickova/probiotics_prebiotics_3.pdf)

- Gibson G. R., Roberfroid M. B. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*, 125: 1401-1412.
- Grundy S. M. 2003. Cholesterol: Factors determining blood cholesterol levels. V: *Encyclopedia of food science and nutrition*. Vol. 2. Caballero B., Trugo L. C., Finglas P. M. (ur.). 2nd ed. London, Academic Press: 1237-1241.
- Guyton A. H., Hall J. E. 2006. *Textbook of medical physiology*. 11th ed. Philadelphia, Saunders Elsevier: 819-830.
- Halliwell B., Gutteridge J. M. C. 1999. *Free radicals in biology and medicine*. 3rd ed. Oxford, Oxford University Press: str. 936.
- Hertzler S. R., Clancy S. M. 2003. Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion. *Journal of the American Dietetic Association*, 103: 582-587.
- Ho H. M., Leung L. K., Chan F. L., Huang Y., Chen Z. Y. 2003. Soy leaf lowers the ratio of non-HDL to HDL cholesterol in hamsters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 4554-4558.
- Hosono A., Tanabe T., Otani H. 1990. Binding properties of lactic acid bacteria isolated from kefir milk with mutagenic amino acid pyrolyzates. *Milchwissenschaft*, 45: 647-651.
- Huseini H. F., Rahimzadeh G., Fazeli M. R., Mehrazma M., Salehi M. 2012. Evaluation of wound healing activities of kefir products. *Burns*, 38: 719-723.
- Ibrahim A., El-sayed E. M., El-zeini H. S. A. 2005. The hypocholesterolaemic effect of milk yoghurt and soy-yoghurt containing bifidobacteria in rats fed on a cholesterol-enriched diet. *International Dairy Journal*, 15: 556-560.

IDF Standard 100B. Milk and milk production – Enumeration of microorganisms – Colony-count technique at 30 °C. 1991: str. 3.

Jianzhong Z., Xiaoli L. B., Hanhu J., Mingsheng D. 2009. Analysis of the microflora in Tibetan kefir grains using denaturing gradient gel electrophoresis. *Food Microbiology*, 26: 770-775.

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

Kawase M., Hashimoto H., Hosoda M., Morita H., Hosono A. 2000. Effect of administration of fermented milk containing whey protein concentrate to rats and healthy men on serum lipids and blood cholesterol. *Journal of Dairy Science*, 83: 255-263.

Kim Y., Whang J. Y., Whang K. Y., Oh S., Kim S. H. 2008. Characterization of the cholesterol-reducing activity in a cell-free supernatant of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 72: 1483-1490.

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

Koroleva N. S. 1988. Technology of kefir and kumis. *Bulletin of the International Dairy Federation*, 227: 96-100.

La Rivere J. W. M., Kooiman P., Schmidt K. 1967. Kefiran, a novel polysaccharide produced in the kefir grain by *Lactobacillus brevis*. *Archives of Mikrobiology*, 59: 269-278.

Leite A. M. O., Mayo B., Rachid C. T. C. C., Peixoto R. S., Silva J. T., Paschoalin V. M. F., Delgado S. 2012. Assessment of the microbial diversity of Brazilian kefir grains by PCR-DGGE and pyrosequencing analysis. *Food Microbiology*, 31: 215-221.

- Libby P., Ridker P. M., Maseri A. 2002. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*, 105: 1135-1143.
- Lidbeck A., Gustafsson J. A., Kagler L., Nord C. E. 1987. Impact of *Lactobacillus acidophilus* supplements on the human oropharyngeal and intestinal microflora. *Scandinavian Journal of Infection Disease*, 19: 531-537.
- Liong T. M., Shah N. P. 2006. Effect of a *Lactobacillus casei* synbiotic on serum lipoprotein, intestinal microflora, and organic acids in rats. *Journal of Dairy Science*, 89: 1390-1399.
- Liu J. R., Chen M. J., Lin C. W. 2002. Characterization of polysaccharide and volatile compounds produced by kefir grains grown in soymilk. *Journal of Food Science*, 67: 104-108.
- Liu J. R., Chen M. J., Lin C. W. 2005. Antimutagenic and antioxidant properties of milk-kefir and soymilk-kefir. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 2467-2474.
- Liu J. R., Wang S. Y., Chen M. J., Chen H. L., Yueh P. Y., Lin C. W. 2006. Hypocholesterolaemic effects of milk-kefir and soymilk-kefir in cholesterol-fed hamsters. *British Journal of Nutrition*, 95: 939-946.
- Lopitz-Otsoa F., Rementeria A., Elguezabal N., Garaizar J. 2006. Kefir: A symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities. *Revista Iberoamericana De Micologia*, 23: 67-74.
- Londero A., Hamet M. F., De Antoni G. L., Garrote G., Abraham A. G. 2012. Kefir grains as a starter for whey fermentation at different temperatures: chemical and microbiological characterisation. *Journal of Dairy Research*, 79: 262-271.
- Lucas-Abellán C., Mercader-Ros M. T., Zafrilla M. P., Gabaldón J. A., Núñez-Delicado E. 2010. Comparative study of different methods to measure antioxidant activity of resveratrol in the presence of cyclodextrins. *Food and Chemical Toxicology*, 49: 1255-1260.

- Madhavi D. L., Salunkhe D. K. 1995. Toxicological aspects of foods antioxidants. V: Food antioxidants: technological, toxicological and health perspectives. Madhavi D. L., Deshpande S. S., Salunkhe D. K. (ur.). New York, Marcel Dekker Inc., 267-300.
- Madigan M. T., Martinko J. M., Parker J. 2000. Brock biology of microorganisms. 9th ed. Prentice Hall, Inc., New Jersey: str. 991.
- Maeda H., Zhu X., Omura K., Suzuki S., Kitamura S. 2004a. Structural characterization and biological activities of an exopolysaccharide kefiran produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* WT-2BT. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52: 5533-5538.
- Maeda H., Zhu X., Mitsuoka T. 2004b. Effect of an exopolysaccharide (kefiran) from *Lactobacillus kefiranofaciens* on blood glucose in KKAy mice and constipation in SD rats induced by a low-fiber diet. Bioscience Microflora, 23: 149-153.
- Magalhães K. T., de Melo Pereira G. V., Campos C. R., Dragone G., Schwan R. F. 2011. Brazilian kefir: structure, microbial communities and chemical composition. Brazilian Journal of Microbiology, 42: 693-702.
- Marquina D., Santos A., Corpas I., Munoz J., Zazo J., Peinado J. M. 2002. Dietary influence of kefir on microbial activities in the mouse bowel. Letters in Applied Microbiology, 35: 136-140.
- Marshall V. M. 1993. Fermented milks. V: Encyclopedia of food science, food technology and nutrition. Vol. 3. Macrae R., Robinson R. K., Sadler M. J. (ur.). London, Academic press: 1804-1808.
- Marshall V. M. 1984. Flavour development in fermented milks. V: Advances in the microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk. Lyndon F. (ur.). London, Elsevier Applied Science Publisher Ltd.: 153-177.
- Mawatari S., Ohnishi Y., Kaji Y., Maruyama T., Murakami K., Tsutsui K., Fujino T. 2003. High-cholesterol diets induce changes in lipid composition of rat

- erythrocyte membrane including decrease in cholesterol, increase α -tocopherol and changes in fatty acids of phospholipids. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 67: 1457-1464.
- Maxfield F. R., Wüstner D. 2002. Intracellular cholesterol transport. *Journal of Clinical Investigation*, 110: 891-898.
- Micheli L., Uccelletti D., Palleschi C., Crescenzi V. 1999. Isolation and characterization of a ropy *Lactobacillus* strain producing exopolysaccharide kefiran. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53: 69-74.
- Molyneux P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26: 211-219.
- Morgan S. M., Hickey R., Ross R. P., Hill C. 2000. Efficient method for the detection of microbially produced antibacterial substances from food systems. *Journal of Applied Microbiology*, 89: 56-62.
- Murofushi M., Shiomi M., Aibara K. 1983. Effect of orally administrated polysaccharide from kefir grain on delayed-type hypersensitivity and tumor growth in mice. *Japanese Journal of Medical Science and Biology*, 36: 49-53.
- Nguyen T. D. T., Kang J. H., Lee M. S. 2007. Characterization of *Lactobacillus plantarum* PH04, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects. *International Journal of Food Microbiology*, 113: 358-361.
- Noh D. O., Kim S. H., Gilliland S. E. 1997. Incorporation of cholesterol into the cellular membrane of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. *Journal of Dairy Science*, 80: 3107-3113.
- Otles S., Cagindi O. 2003. Kefir: A probiotic dairy-composition, nutritional and therapeutic aspects. *Pakistan Journal of Nutrition*, 2: 54-59.

- Özer D., Özer B. H. 2000. Products of Eastern Europe and Asia. V: Encyclopedia of food microbiology. Vol. 3. Robinson R. K., Batt C. A., Patel P. D. (ur.). London, Academic Press: 798-805.
- Papas A. M. 1999. Antioxidant status, diet, nutrition, and health. Boca Raton, CRC Press: 89-106.
- Pravilnik o stranskih živalskih proizvodih, ki niso namenjeni prehrani ljudi. 2004. Uradni list Republike Slovenije, 14, 28: 3264-3268.
- R Core Team. 2013. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, R Foundation for Statistical Computing (programska oprema).
<http://www.R-project.org/> (10.2.2014).
- Ratray F. P., O'Connell M. J. 2011. Kefir. V: Encyclopedia of dairy sciences. Vol. 3. Fuquay J. W., Fox P. F., McSweeney P. L. H. (ur.). 2nd ed. London, Academic Press: 518-524.
- Rea M. C., Lennartsson T., Dillon P., Drinan F. D., Reville W. J., Heapes M.; Cogan T. M. 1996. Irish kefir-like grain: the structure, microbial composition and fermentation kinetics. *Journal of Applied Bacteriology*, 81: 83-94.
- Rimada P. S., Abraham A. G. 2001. Polysaccharide production by kefir grains during whey fermentation. *Journal of Dairy Research*, 68: 653-661.
- Rimada P. S., Abraham A. G. 2003. Comparative study of different methodologies to determine exopolysaccharide produced by kefir grain in milk and whey. *Lait*, 83: 79-87.
- Rinttilä T., Kassinen A., Malinen E., Krogius L., Pavla A. 2004. Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology*, 97: 1166-1177.

- Rodrigues K. L., Caputo L. R. G., Carvahlo J. C. T., Evangelista J., Schneedorf J. M. 2005. Antimicrobial and healing activity of kefir and kefiran extract. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 25: 404-408.
- Roginsky V., Lissi E. A. 2005. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, 92: 235-254.
- Saad N., Delattre C., Urdaci M., Schmitter J. M., Bressollier P. 2013. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *LWT-Food Science and Technology*, 50 : 1-16.
- Sarkar S. 2007. Potential of kefir as a dietetic beverage – a review. *British Food Journal*, 109: 280-290.
- Sheppard A. J., Pennington J. A. T., O`Dell R. G. 1993. Cholesterol: Properties and determination. V: *Encyclopaedia of food sciences, food technology and nutrition*. Vol. 2. Macrae R., Robinson R. K., Sadler M. J. (ur.). London, Academic Press: 925-930.
- Shiomi M., Sasaki K., Murofushi M., Aibara K. 1982. Antitumor activity in mice of orally administrated polysaccharide from kefir grain. *Japanese Journal of Medical Science and Biology*, 35: 75-80.
- Simova E., Beshkova D., Angelov A., Hristozova T., Frengova G., Spasov Z. 2002. Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 28: 1-6.
- Songjinda P., Nakayma J., Tateyama A., Tanaka S., Tsubouchi M., Kiyohara C., Shirakawa T., Sonomoto K. 2007. Differences in developing intestinal microbiota between allergic and non-allergic infants: a pilot study in Japan. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 71: 2338-2342.
- Spreer E. 1998. *Milk and dairy product technology*. New York, Marcel Dekker Inc.: str. 483.

- Stoilova I., Kratanov A., Stoyanova A., Denev P., Gargova S. 2007. Antioxidant activity of ginger extract (*Zingiber officinale*). *Food Chemistry*, 102: 764-770.
- St-Onge M. P., Farnworth E. R., Jones P. J. H. 2000. Consumption of fermented and nonfermented dairy products: effects on cholesterol concentrations and metabolisms. *American Journal of Clinical Nutrition*, 71: 674-681.
- St-Onge M. P., Farnworth E. R., Savard T., Chabot D., Mafu A., Jones P. J. H. 2002. Kefir consumption does not alter plasma lipid levels or cholesterol fractional synthesis rates relative to milk in hyperlipidemic men: a randomized controlled trial. *BMC Complementary Alternative Medicine*, 2: 1-7.
- Sudha M. R., Chauhan P., Dixit K., Babu S., Jamil K. 2009. Probiotics as complementary therapy for hypercholesterolemia. *Biology and Medicine*, 1: 1-13.
- Tada S., Katakura Y., Ninomiya K., Shioya S. 2007. Fed-batch coculture of *Lactobacillus kefiranofaciens* with *Saccharomyces cerevisiae* for effective production of kefiran. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 103: 557-562.
- Takizawa S., Kojima S., Tamura S., Fujinaga S., Benno Y., Nakase T. 1994. *Lactobacillus kefiranofaciens* sp. nov. and *Lactobacillus parakefir* sp. nov.: two new species from kefir grains. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44: 435-439.
- Tamai Y., Yoshimitsu N., Watanabe Y., Kuwabara Y., Nagai S. 1998. The composition of the lactobacillus flora in kefir grains. *Systematic and Applied Microbiology*, 21: 121-127.
- Tamai Y., Yoshimitsu N., Watanabe Y., Kuwabara Y., Nagai S. 1996. Effects of milk fermented by culturing with various lactic acid bacteria and yeasts on serum cholesterol level in rats. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 81: 181-182.
- Taniguchi M., Nomura M., Itaya T., Tanaka T. 2001. Kefiran production by *Lactobacillus kefiranofaciens* under culture conditions established by mimicking

- the existence and activities of yeast in kefir grains. *Food Science and Technology Research*, 7: 333-337.
- Taranto M. P., Medici M., Perdigon G., Ruiz Holgado A. P., Valdet G. F. 2000. Effect of *Lactobacillus reuteri* on the prevention of hypercholesterolemia in mice. *Journal of Dairy Science*, 83: 401-403.
- Toba T., Abe S., Arihara K., Adachi S. 1986. A medium for the isolation of capsular bacteria from kefir grains. *Agricultural and Biological Chemistry*, 50: 2673-2674.
- Teruya K., Yamashita M., Tominaga R., Nagira T., Shim S. Y., Katamura Y., Tokumaru S., Tokumaru K., Barnes D., Shirahata S. 2002. Fermented milk, kefram-kefir enhances glucose uptake into insulin-responsive muscle cells. *Cytotechnology*, 40: 107-116.
- Uchida M., Ishii I., Inoue C., Akisato Y., Watanabe K., Hosoyama S., Toida T., Ariyoshi N., Kitada M. 2010. Kefiran reduces atherosclerosis in rabbits fed a high cholesterol diet. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 17: 980-988.
- Valderrama M. J., Siloniz M. I., Gonzalo P., Peinado J. M. 1999. A differential medium for the isolation of *Kluyveromyces marxianus* and *Kluyveromyces lactis* from dairy products. *Journal of Food Protection*, 62: 189-193.
- Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M. T. D., Mazur M., Telser J. 2007 Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39: 44-48.
- Vancanneyt M., Mengaud J., Cleenwerck I., Vanhonacker K., Hoste B., Dawyndt P., Degivry M. C., Ringuet D., Janssens D., Swings J. 2004. Reclassification of *Lactobacillus kefirgranum* (Takizawa et al. 1944) as *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* subsp. nov. and emended description of *L. kefiranofaciens* (Fujisawa et al. 1988). *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, 54: 551-556.

- Viljoen B. C. 2001. The interaction between yeasts and bacteria in dairy environments. *International Journal of Food Microbiology*, 69: 37-44.
- Voet D., Voet J. G. 1995. *Biochemistry*. 2nd ed. New York, John Wiley & Sons, Inc, str. 1361.
- Vujicic I. F., Vulic M., Konyves T. 1962. Assimilation of cholesterol in milk by kefir cultures. *Biotechnology Letters*, 14: 847-850.
- Walter J., Tannock G. W., Tilsala-Timisjavri A., Rodtong S., Loach D. M., Munro K., Alatossava T. 2000. Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 297-303.
- Wang M., Bi J. 2008. Modification of characteristics of kefir by changing the carbon source of *Lactobacillus kefiranofaciens*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88: 763-769.
- Wang Y., Ahimed Z., Feng W., Li C., Song S. 2008. Physicochemical properties of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 isolated from Tibet kefir. *International Journal of Biological Macromolecules*, 43: 283-288.
- Wang Y., Xu N., Xi A., Ahmed Z., Zhang B., Bai X. 2009. Effects of *Lactobacillus plantarum* MA2 isolated from Tibet kefir on lipid metabolism and intestinal microflora of rats fed on high-cholesterol diet. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84: 341-347.
- Wang S. Y., Chen K. N., Lo Y. M., Chiang M. L., Chen H. C., Liu J. R., Chen M. J. 2012. Investigation of microorganisms involved in biosynthesis of the kefir grain. *Food Microbiology*, 32: 274-285.
- 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.

- Wong S. H. Y., Knight J., Hopfer S. M., Zaharia O., Leach C. N., Sunderman W. Jr. 1987. Lipoperoxides in plasmas measured by liquid-chromatographic separation of malondialdehyde-tiobarbituric acid adduct. *Clinical Chemistry*, 33: 214-220.
- Wood B. J. B., Hodge M. M. 1985. Yeast-lactic acid bacteria interactions and fermented foods. V: *Microbiology of fermented foods*. Vol. 1. Wood B. J. B (ur.). London, Elsevier Applied Science Publishers Ltd: 272-276.
- Xiao JZ., Kondo S., Takahashi N., Miyaji K., Oshida K., Hiramatsu A., Iwatsuki K., Kokubo S., Hosono A. 2003. Effect of milk products fermented by *Bifidobacterium longum* on blood lipids in rats and healthy adult male volunteers. *Journal of Dairy Science*, 86: 2452-2461.
- Xie N., Cui Y., Yin Y., Zhao X., Yang J., Wang Z., Fu N., Tang Y., Wang X., Liu X., Wang C., Lu F. 2011. Effect of two *Lactobacillus* strains on lipid metabolism and intestinal microflora in rats fed a high-cholesterol diet. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 11: 1-11.
- Yen C. H., Kuo Y.W., Tseng Y. H., Lee M. C., Chen H. L. 2011. Beneficial effects of fructo-oligosaccharides supplementation on fecal bifidobacteria and index of peroxidation status in constipated nursing-home residents – A placebo-controlled, diet-controlled trial. *Nutrition*, 27: 323-328.
- Yokogoshi H., Mochizuki H., Nanami K., Hida Y., Miyachi F., Oda H. 1999. Dietary taurine enhances cholesterol degradation and reduces serum and liver cholesterol concentration in rats fed a high-cholesterol diet. *Nutrient Interactions and Toxicity*, 129: 1705-1712.
- Zajšek K., Kolar M., Goršek A. 2011. Characterisation of the exopolysaccharide kefiran produced by lactic acid bacteria entrapped within natural kefir grains. *International Journal of Dairy Technology*, 64: 544-548.

ZAHVALA

Zahvaljujem se:

prof. dr. Ireni Rogelj za mentorstvo, nasvete, spodbudo in strokovno pomoč pri opravljanju raziskovalnega dela. Hvala, da sem lahko bila del raziskovalne skupine na Katedri za mlekarstvo;

dr. Andreji Čanžek Majhenič za strokovno pomoč in nasvete pri vsakem koraku mojega raziskovalnega dela. Hvala, ker si mi svetovala in pomagala pri laboratorijskem delu in me ves čas spodbujala;

vsem ostalim sodelavcem na Katedri za mlekarstvo in Inštitutu za mlekarstvo in probiotike za sodelovanje in pomoč pri nastajanju moje naloge ter prijetno preživete trenutke. Še posebej se zahvaljujem Tjaši in Manueli, ki sta se z menoj smejali in mi v težkih trenutkih stali ob strani;

prof. dr. Simonu Horvatu, da sem lahko na Centru za laboratorijske živali opravljala prehranski poskus na podganah. Hvala tudi za vse nasvete in strokovno pomoč;

dr. Biljani Hacin za pomoč pri načrtovanju in izvedbi prehranskega poskusa. Hvala za vse koristne nasvete iz bogatih izkušenj pri delu s poskusnimi živalmi;

Vesni Mrak za pomoč pri delu s podganami. Hvala tudi za pomoč in nasvete pri statistični obdelavi podatkov in za vse ure, tudi tiste med vikendi in prazniki, ki si jih z menoj preživela v laboratoriju;

dr. Alenki Levart in mladim raziskovalkam za strokovno pomoč in opravljene analize v laboratoriju Katedre za prehrano;

Branislavu in Dunji Kelečević ter Sandri Turnšek, da sem v Mlekarni Krepko lahko opravljala delo mladega raziskovalca;

Jani Urbas za mentorstvo v Mlekarni Krepko. Hvala, ker si me vodila in mi pomagala pri spoznavanju dela v mlekarni. Zahvaljujem se tudi vsem ostalim sodelavcem za prijetno preživete trenutke v podjetju;

Klemnu za ljubezen in potrpežljivo spremljanje moje predanosti študiju. Hvala, ker si se z menoj iskreno veselil vseh mojih uspehov in mi stal ob strani tudi v slabih trenutkih.

staršem in bratoma za moralno podporo, nasvete in spodbudo pri študiju;

vsem drugim, ki vas nisem omenila, pa ste prav tako kakorkoli pomagali pri nastajanju moje naloge in prispevali k mojemu osebnostnemu, čustvenemu in intelektualnemu razvoju.

»Operacijo delno financira Evropska unija, in sicer iz Evropskega socialnega sklada. Operacija se izvaja v okviru Operativnega programa razvoja človeških virov za obdobje 2007 – 2013, 1. razvojne prioritete: Spodbujanje podjetništva in prilagodljivosti, prednostne usmeritve 1.1.: Strokovnjaki in raziskovalci za konkurenčnost podjetij.«



UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Tinkara VARDJAN

**PROUČEVANJE FUNKCIONALNIH UČINKOV
KEFIRANOGENIH LAKTOBACILOV IN KEFIRANA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2015