

Oznaka poročila: ARRS-RPROG-ZP-2014/37



ZAKLJUČNO POROČILO O REZULTATIH RAZISKOVALNEGA PROGRAMA

A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROGRAMU

1. Osnovni podatki o raziskovalnem programu

Šifra programa	P4-0097
Naslov programa	Prehrana in mikrobna ekologija prebavil
Vodja programa	11150 Bojana Bogovič Matijašić
Obseg raziskovalnih ur	40460
Cenovni razred	C
Trajanje programa	01.2009 - 12.2013
Izvajalci raziskovalnega programa (javne raziskovalne organizacije - JRO in/ali RO s koncesijo)	481 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta 489 Emona, Razvojni center za prehrano, d.o.o.
Raziskovalno področje po šifrantu ARRS	4 BIOTEHNIKA 4.02 Živalska produkcija in predelava
Družbeno-ekonomski cilj	08. Kmetijstvo
Raziskovalno področje po šifrantu FOS	4 Kmetijske vede 4.02 Znanosti o živalih in mlekarstvu

B. REZULTATI IN DOSEŽKI RAZISKOVALNEGA PROGRAMA

2. Povzetek raziskovalnega programa¹

SLO

Poglavitno izhodišče raziskovalnega programa »Prehrana in mikrobna ekologija prebavil« je vse močnejše zavedanje o pomenu prehrane pri vzdrževanju zdravja ljudi in živali, pri čemer mora biti hrana varna, hranljiva in funkcionalna, kar pomeni, da s specifičnimi fiziološkimi učinki v telesu zmanjša tveganje za razvoj različnih vrst sodobnih civilizacijskih bolezni. S prehrano lahko vplivamo na mikrobno združbo prebavil ljudi in živali, preko te na metabolizem in zdravje ljudi oz. živali, na prehransko vrednost in kakovost živalskih proizvodov, preko živalskih izločkov pa tudi na okolje. Težave, povezane s prehrano in zdravjem tako ne zadevajo le zdravstva, temveč tudi kmetijstvo kot pridelovalca in živilsko industrijo kot predelovalca hrane. V drugem 5-letnem obdobju raziskovanja v okviru programa Prehrana in mikrobna ekologija prebavil (P4-0097) smo se posvetili iskanju in proučevanju novih krmnih dodatkov, s katerimi bi lahko zagotovili

pridelavo varnejše hrane ob sočasnem zmanjšanju okoljskega bremena, kot so npr. izpusti toplogrednih plinov v govedoreji. Veliko pozornost smo posvetili proučevanju mikrobiote in mikrobioma v prebavnem traktu kot pomembnem dejavniku črevesne homeostaze, ki je potrebna za ohranjanje zdravja gostitelja (ljudje, živali). Raziskovali smo mikrobioto v prebavilih živalskih modelov (konvencionalne miši, model brejih miši, model debelih in suhih miši, prašiči, piščanci, kokoši, psi, kunci), rejnih živali ter različnih skupin ljudi (novorojenčki, matere, vegetarijanci, ljudje s kroničnimi črevesnimi boleznimi ali funkcionalnimi motnjami prebavil), pa tudi v kolostrumu in humanem mleku. Iskali smo mehanizme interakcij med gostiteljem in mikrobioto (endogena ali probiotiki), med predstavniki mikrobiote, mehanizme učinkovanja naravnih bioaktivnih snovi (rastlinski izvlečki, fibrolitični encimi, probiotiki) na gostitelja, s poudarkom na strukturi prebavnega mikrobioma, kakor tudi markerje na molekularnem in imunološkem nivoju, s katerimi je mogoče zadovoljivo meriti učinke živil ali krme, oziroma posameznih bioaktivnih funkcionalnih dodatkov. Dotaknili smo se tudi modulacije simbiotskih mikrobnogostiteljskih metabolnih interakcij v prebavnem traktu človeka in vpliva prehranskih dodatkov – probiotikov na strukturo prebavnega mikrobioma. Razvili ali izboljšali smo vrsto toksikoloških, genotoksikoloških, imunoloških in molekularno-bioloških metod za analize mikrobiote, za razlikovanje živih od neživih bakterij ter učinkov prehrane na gostitelja. Izvedli smo vrsto prehranskih poskusov na živalih, ki so vključevali tudi metagenomske, transkriptomске in proteomske analize fiziološkega stanja gostitelja, odzivov v tkivih ali sprememb v strukturi mikrobioma, kakor tudi sodelovali v kliničnih študijah na ljudeh (vegetarijanci, doječe/noseče matere in novorojenci, otroci z infekcijami prebavil ali dihal, otroci s funkcionalnimi motnjami prebavil oz. kroničnimi vnetnimi črevesnimi boleznimi).

ANG

The main starting point of the research program "Nutrition and microbial ecology of the gastrointestinal tract" is a growing awareness of the importance of nutrition in maintaining health of people and animals with food/feed which must be safe, nutritious and functional, i.e. it should reduce the risk of developing various types of modern civilization diseases through the specific physiological effects in the body. By nutrition we can influence the gut microbiota of humans and animals, and consequently also metabolism and health, improve nutritional value and quality of animal products and through animal feces also the environment. Problems related to diet and health does not concern only the healthcare but also agriculture and food industry. The last 5-year period of research was devoted to the search for and study of new feed additives, which could provide safer food production while reducing the environmental burden, such as greenhouse gas emissions in cattle production. A lot of attention has been devoted to studying the microbiota and microbiome in the digestive tract as an important factor for intestinal homeostasis, which is necessary for maintaining the health of the host (humans, animals). We investigated the microbiota in the gastrointestinal tract of animal models (pregnant mice model, fat and lean mice model, pigs, chickens, hens, dogs, rabbits), livestock and different groups of people (newborns, mothers,

vegetarians, people with chronic intestinal diseases or functional gastrointestinal disorders), as well as in human colostrum and milk. We were looking for mechanisms of interaction between the host and the microbiota (endogenous or probiotics), among representatives of the microbiota, the mechanisms of effect of natural bioactive substances (plant extracts, fibrolytic enzymes, probiotics), with emphasis on the structure of the gut microbiome and markers at the molecular and immunological level which can satisfactorily measure the effects of food, feed, or particular bioactive functional additives. The modulation of symbiotic microbial-host metabolic interactions in the gastrointestinal tract of man and the impact of nutritional supplements - probiotics on structure of intestinal microbiome was also addressed. A series toxicological, genotoxicological, immunological and molecular-biological methods were developed which enable the analysis of the microbiota, to distinguish viable from non-viable bacteria and to measure the effects of diet on the host. A series of nutritional experiments on animals were carried out, which also included metagenomic, transcriptomic and proteomic analysis of physiological state of the host, responses in tissues or changes in the structure of microbiome. We also participated in clinical studies (vegetarians, lactating/pregnant mothers and newborns, children with gastrointestinal or respiratory infections, children with functional gastrointestinal disorders or IBD).

3. Poročilo o realizaciji predloženega programa dela na raziskovalnem programu²

SLO

Izhodišče raziskav je bila hipoteza, da s prehrano lahko vplivamo na mikrobno združbo prebavil ljudi in živali, preko te na zdravje ljudi in živali, na metabolizem, na prehransko vrednost in kakovost živalskih proizvodov, preko živalskih izločkov pa tudi na okolje. Raziskovanje je potekalo *in vitro* (mikrobne kulture; celični modeli - Caco-2, THP-1..), *in vivo* na živalih (konvencionalne miši, model brejih miši, model debelih in suhih miši, prašiči, piščanci, kokoši, psi, kunci) ter na ljudeh, v treh večjih sklopih: (A) Bioaktivni krmni dodatki in njihov vpliv na ravni prebavil, mikrobnih simbiotov, zdravja domačih živali in vpliva na okolje, (B) Proučevanje interakcij med prebavno mikrobioto in gostiteljem ter (C) Modulacija simbiotskih mikrobno-gostiteljskih metabolnih interakcij v prebavnem traktu človeka in vpliv prehranskih dodatkov – probiotikov na strukturo prebavnega mikrobioma.

Sklop A. Ugotavljali smo vpliv naravnih prehranskih dodatkov in krmil na prebavne procese in zdravstveno stanje prebavil ter na delovanje organov in sistemov živali. Na rastočih piščancih smo raziskali učinkovitost s tanini bogatega ekstrakta lesa sladkega kostanja za zmanjšanje oksidacijskega stresa, inducirane s prehrano, bogato z večkrat nenasičenimi maščobami. Največja uporabljena koncentracija taninov (3 g ekstrakta/kg krme) je značilno zmanjšala parametre oksidacijskih poškodb DNA, ne pa tudi produktov oksidacije nenasičenih maščob in ni imela učinka na skupno antioksidacijsko kapaciteto krvne plazme in nekaterih antioksidacijskih encimov (SOD, GPx, GR). Ekstrakti lesa sladkega kostanja in kebrača pri tem niso negativno vplivali na izkoriščanje hranil, kar govori v prid uporabi takih naravnih izvlečkov kot antioksidantov. *In vivo* na piščancih

smo primerjali naravni RRR-tokoferol s sintetičnim sintetični DL-alfa tokoferol acetat, ki se pogosto uporablja kot vir vitamina E v prehrani živali. Ugotovili smo, da naravni tokoferol učinkoviteje preprečuje oksidacijo nenasičenih maščob in poškodbe DNA limfocitov (Voljč, Poultry Sci., 2011).

Z nutrigenomsko raziskavo na pitovnih piščancih smo preverjali delovanje α - in γ -tokoferola, različnih oblik vitamina E, v smislu preprečevanja lipidne oksidacije. Tako α - in γ -tokoferol kot njuna kombinacija so zaščitili DNA imunskih celic pred oksidativnimi poškodbami. V kombinaciji z γ -tokoferolom je bil α -tokoferol že pri polovičnem odmerku enako učinkovit pri zaviranju lipidne peroksidacije v plazmi in tkivih, kar je zanimivo predvsem zaradi tega, ker je γ -tokoferol prevladujoča oblika vitamina E v številnih oljih (koruzno, laneno, sojino). Pri piščancih je bila vsebnost obeh izomer v različnih tkivih različna. Transkriptomske analize vzorcev jeter so pokazale, da so različne maščobe in dodajanje vitamina E vplivali na ekspresijo različnih genov, predvsem tistih, ki so vpleteni v presnovo maščob in holesterola ter genov vpletenih v oksidativni stres (Tomažin, Archiv für Geflügelkunde, 2013; Voljč, British Poultry Science, 2013).

Na kuncih smo proučevali vpliv gobe Svetlikava pološčenka (*Ganoderma lucidum*, Reiši) in oljčnih listov na zdravstveno stanje prebavil ter zmanjšanje oksidacijskega stresa. Nobeden od dodatkov ni imel vpliva na histološke kazalnike zdravja tankega in slepega črevesa ter na antioksidacijsko kapaciteto v maščobah in v vodi topnih antioksidantov v tkivu tankega črevesa. Dodatek oljčnih listov je zmanjšal oksidacijo lipidov v nekaterih tkivih, dodatek gob pa ni imel vpliva, čeprav se je koncentracija α -tokoferola v jetrih in γ -tokoferola povečala.

V sodelovanju z Veterinarsko fakulteto smo opravili tudi raziskavi o vpletenosti oksidativnega stresa na nastanek atopičnega dermatitisa (AD). Analiza kazalnikov oksidativnega stresa je pokazala, da imajo psi z AD povišano raven oksidativnega stresa, ki se kaže predvsem s povišano ravni malondialdehida, torej je v nastanek AD je lahko vpletena tudi povečana peroksidacija lipidov (Plevnik, *Veterinary quarterly*, 2013).

Postopek kometnega testa, uporabnega tudi za ugotavljanje učinkov bioaktivnih krmnih dodatkov pri zmanjševanju oksidativnega stresa na ravni celične DNA, smo na celični liniji jetrnih celic HepG2 nadgradili z uporabo encimov FPG (formamidopirimidin glikozilaza) in EndoIII (endonukleaza III). Kometni test razvijamo tudi z modelnim evkariontskim mikroorganizmom *Tetrahymena thermophila*, ki predstavlja primerno izhodišče za prenos postopka na človeške in živalske celične linije. S tem modelom smo pokazali tudi, da kometni test ni ustrezna metoda za testiranje vpliva nonodelcev na jedrno DNA (Rajapakse, Nanotox., 2013).

Možnosti naravnih prehranskih dodatkov in krmil za izboljšanje tehnološke in prehranske vrednosti živalskih proizvodov, predvsem v smislu zaviranja peroksidacije maščobnih kislin v mesu z antioksidanti, s katerimi krmimo živali, smo raziskali na piščancih in kuncih. Krmljenje pitovnih piščancev z ekstrakti lesa sladkega kostanja, bogatih s tanini, ni vplivalo na stabilnost maščob v svežem ali skladiščenem mesu, ali v kuhanem mesu. Dodatek tanina pa je deloval sinergistično z dodatkom vitamina E, kar se je pokazalo predvsem pri kuhanem mesu, ter pri povečanju koncentracije α -tokoferola v krvi, mesu in jetrih (Tomažin, Arch. Geflügelkunde, 2103; Voljč, Brit. Poultry Sci., 2013). Pri kuncih smo proučevali možnost povečanja vsebnosti esencialnih maščobnih kislin (MK) v mesu z vidika izboljšanja oskrbe živali in kreiranja živil s funkcionalnimi lastnostmi. Povečana vsebnost n-3 MK v krmi z dodatkom lanu je povečala njihovo vsebnost v tkivih, kar je tudi za več kot trikrat zmanjšalo razmerje n-6/n-3 MK. Pričakovano je dodatek lanenega olja poslabšal oksidacijsko stabilnost mesa, ki pa ju dodatka oljčnih listov in gob *Ganoderma lucidum* (Reishi mushroom) nista v polnosti odpravila, sta pa vplivala na

zmanjšanje rumenega odtenka mesa, ki ga povzroči dodatek olja (Trebušak, Meat Sci., v tisku).

Del raziskav je bil usmerjen v spreminjanja obsega in smeri mikrobne fermentacije s ciljem zmanjšanja obremenjevanja okolja. *In vitro* smo ugotovili, da imajo izvlečki iz kostonjevega in kebračo lesa, bogati s tanini, vpliv na sproščanje maščobnih kislin in metana iz sojinih tropin, inokuliranih z vampnim sokom. Rezultati kažejo na potencialno primernost obeh ekstraktov za zmanjševanje obremenjevanja okolja z metanom, ki se sprošča iz prežvekovalcev.

Emisije toplogrednih plinov, do katerih prihaja med skladiščenjem živinskih gnojil in gnojenju z njimi, lahko v veliki meri preprečimo s kontroliranim zajemom metana, ki ga izkoristimo kot biogorivo. V tej povezavi smo preskušali različne kombinacije gnojil z odpadnimi organskimi substrati iz kmetijskega in agroživilskega sektorja, pri čemer smo se osredotočali na lignocelulozne odpadke. Na laboratorijskem, pilotnem in industrijskem nivoju smo preizkusili proizvodnjo bioplina iz odpadnih pivovarskih kvasovk in za ta postopek v letu 2012 vložili patentno prijavo, v letu 2013 pa je bil patent tudi podeljen (Zupančič, *Bioresource technology*, 2012).

Sklop B: V povezavi z raziskovanjem vplivov krme, obogatene z antioksidanti, na mikrobioto prebavnega trakta pri liniji debelih oz. vitkih miši, smo opravili T-RFLP analizo (polimorfizma dolžine terminalnih restrikcijskih fragmentov) vsebine slepega in debelega črevesa in iztrebkov modelnih živali. Statistična analiza (PCA) je pokazala razlike med mikrobno združbo vitkih in debelih miši v slepem črevesu, ne pa tudi v debelem črevesu. Za raziskave vplivov mikrobnih predstavnikov vitke/debele prebavne mikrobiote v čistih in mešanih kulturah po naselitvi na epitelne črevesne celice smo optimizirali in standardizirali model s celično linijo Caco-2, pri čemer smo kot modelno bakterijsko kulturo izbrali *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5T, anaerobno bakterijo z močno izraženo fibrolitično aktivnostjo, pripenjanje bakterij na celice pa smo ugotavljali preko merjenja dolžine lag faze rasti.

Z bioinformacijskimi analizami smo proučevali bakterije rodov *Prevotella* in *Bacteroides*, predstavnikov združbe fibrolitičnih mikroorganizmov, ki kodirajo v svojih genomih veliko število glikozidnih hidrolaz, polisaharidnih liaz in drugih proteinov, ki sodelujejo pri razgradnji rastlinskih polisaharidov. Odkrili smo doslej še neopisano regijo, ki je skupna takšnim tipom konjugativnih transpozonov, ki so najverjetneje vpleteni v procese horizontalnih genskih prenosov genomskih segmentov, ki vsebujejo zapise za glikozidne hidrolaze (Gorenc, *Folia microbiologica*, 2012).

Proučevanja polisaharidaz aktivnih razgrajevalcev strukturnih polisaharidov smo se lotili tudi s proteomskim pristopom na primeru vampne bakterije *Ruminococcus flavefaciens*. Primerjali smo ekstracelularna proteoma dveh sevov omenjene bakterije (*R. flavefaciens* 007C and 007S), ki se razlikujeta po uspešnosti razgrajevanja bombaževe celuloze. Identificirali smo štiri od petih t.i. skafoldinskih proteinov, ki predstavljajo ogrodje celulosoma, ter nekatere druge proteine, ki so se v večji meri izražali ob rasti na netopni celulozi. Razlike v izražanju proteinov pri obeh sevih bi lahko razložile funkcionalne razlike v razgradnji nekaterih oblik celuloze (Vodovnik, *PloS one*, 2013).

Sklop C: Na mišjem modelu C57BL/6J smo proučevali vpliv lastnega probiotičnega seva *Lactobacillus gasseri* K7 na uspešnost okužbe z enterohemoragično *E. coli* O157:H7 (Hacin, Dokt. Dis., 2010). Potrdili smo, da sev K7 (Rifr) vpliva na imunski odziv gostitelja, kar se je odražalo v povečanem obsegu limfatičnega tkiva v teščem in vitem črevesu in povečanem številu IgA pozitivnih celic vitega črevesa. V sodelovanju s švicarskimi partnerji so bile opravljene tudi analize transkriptoma krvnih celic miši iz iste

raziskave (Sagaya in sod., J. Appl. Microbiol., v tisku). Transkriptom miši, inficiranih z *E. coli* in *L. gasseri*, je bil bolj podoben tistemu od kontrolne skupine kot pa skupine *E. coli*, kar kaže na zaščitno vlogo seva *L. gasseri* K7.

Funkcionalne učinke probiotičnega seva *L. gasseri* K7 smo, v sodelovanju z raziskovalci UKC Ljubljana, preskušali tudi na različnih skupinah ljudi, ki so vključevale otroke z infekcijami dihal ali sečil, zdravljenimi z antibiotiki, otroke z driskami in osečnice. Uvedli smo metodo izolacije DNA iz blata, PCR v realnem času za kvantifikacijo različnih skupin bakterij v blatu ter za dokazovanje seva K7 v kliničnih vzorcih (Trachtova, Mol. Cryst. Liq. Cryst., 2012; Treven, Folia microbiol., 2012). Uspeli smo dokazati *L. gasseri* K7 v blatu otrok, ki so ga uživali. Klinične študije na otrocih so bile odložene zaradi nezadostnega vključevanja otrok, pa tudi slabe sprejemljivosti pripravka s strani otrok, zato razvijamo z industrijskim partnerjem novo formulacijo na osnovi olja. Zaključena pa je bila klinična študija na nosečnicah, ki so uživale probitični sev K7 zadnji mesec nosečnosti. Mikrobiom izbranih vzorcev kolostruma, mleka, mekonija in blata otrok je bil analiziran z metodo sekvenciranja nove generacije, bioinformacijske analize pa so še v teku. Zaključili smo tudi raziskavo na 60-ih vegetarijancih in vsejedi v Sloveniji, ki je pokazala razlike v sestavi mikrobiote blata, pogojenimi z dolgoročno vegetarijansko prehrano. Uživanje hrane živalskega izvora in vegetarijanske prehrane je pojasnilo največji del variance v sestavi mikrobne združbe. Vrednost raziskave je tudi zaradi vpeljave molekularnih metod, ki bodo koristne v prihodnjih raziskavah (Matijašič in sod., Eur. J. Nutr., v tisku).

Ker je za učinkovitost probiotičnih mikroorganizmov živost zelo pomemben dejavnik, smo razvijali metode za razlikovanje živih od neživih bakterij. Metodo, ki vključuje obdelavo vzorcev z interkalatnimi barvili in kvantifikacijo s PCR v realnem času (PMA-PCR v realnem času), smo razvili na probiotičnem zdravilu (Kramer in sod., Appl. Microbiol., Biotechnol., 2009), nadgradili za analize mikrokapsuliranih bakterij v sodelovanju z raziskovalci Univerze v Beogradu, Agronomske fakultete (Radulović in sod., Arch. Biol. Sci., 2012), uporabna pa bo v prihodnjih raziskavah tudi za analize bioloških vzorcev.

4. Ocena stopnje realizacije programa dela na raziskovalnem programu in zastavljenih raziskovalnih ciljev³

SLO

V programu smo si zastavili vrsto raziskovalnih ciljev, preko katerih smo želeli pridobiti odgovore na raziskovalne hipoteze. Rezultati dela na raziskovalnem programu so pokazali, da je z naravnimi bioaktivnimi krmnimi dodatki mogoče vplivati na mikrobno fermentacijo v različnih delih prebavil, v smislu večje učinkovitosti krmljenja in zmanjšanja obremenjevanja okolja. Ugotovili smo tudi vrsto pozitivnih učinkov na prebavne procese in zdravstveno stanje prebavil živalskih modelov ter na delovanje organov in sistemov. Slednje se odraža tudi v boljši tehnološki in prehranski vrednosti živalskih proizvodov (perutninsko meso). Dotaknili smo se tudi obremenjevanja okolja, ki ga je prav tako mogoče zmanjšati z naravnimi bioaktivnimi krmnimi dodatki. Proučili smo nekatere interakcije med prebavnim mikrobiomom in gostiteljem, ki so vključevale fiziološki, biokemijski in transkriptomski odziv gostitelja (miši, kunci). Vpliv probiotikov smo uspešno proučili na miših, okuženih z *E. coli*. Dve klinični študiji na ljudeh (vegetarijanci, doječe/noseče matere in novorojenci) smo realizirali v celoti, dve pa delno (otroci z infekcijami prebavil ali dihal). Iz opisanega lahko zaključimo, da smo pridobili pomembne odgovore za vprašanja, zastavljena v zapisanih hipotezah. Ocenjujemo, da je stopnja realizacije dela na raziskovalnem programu ustrezna.

5. Utemeljitev morebitnih sprememb programa raziskovalnega programa oziroma sprememb, povečanja ali zmanjšanja sestave programske skupine⁴

Delno je bil spremenjen en izmed sklopov raziskovalnega programa, v predlogu označen kot Sklop B, v katerem smo načrtovali več študij na liniji debelih oz. vitkih miši, v katerih bi proučili interakcije med prebavno mikrobioto in gostiteljem s kombiniranim pristopom, ki vključuje prehranske, fiziološke, biokemijske, genetske, molekularno biološke, metagenomske in mikrobiološke metode.

Cilja B3, kjer smo načrtovali proučiti vpliv ključnih predstavnikov mikrobiote vitke/debele linije miši na črevesne celice, z uporabo treh različnih celičnih linij Caco-2 (z mukoidno plastjo, brez nje, aerobno/anaerobni model) nam ni uspelo v celoti doseči zaradi okrnjenih možnosti sodelovanja s skupino dr. Josa Koninkxa z Utrecht University, Veterinary Medicine, zaradi velike strukturnih in

kadrovskih sprememb v omenjeni instituciji. Tako smo uporabili le eno celično linijo Caco-2, za kar imamo možnosti v sklopu infrastrukture dostopne v laboratorijih naše programske skupine. Vzpostavili pa smo sodelovanje z Univerzo v Mariboru (Medicinska fakulteta, Fakulteta za kmetijstvo in biosistemske vede) kjer razpolagajo s drugimi celičnimi modeli prebavil (človeške celice H4 in prašičje), s katerimi smo že opravili manjšo raziskavo (Treven, 2014) in kar bomo lahko izkoristili v prihodnje.

Raziskav, predvidenih v sklopih B1 in B2, nismo izvedli v tako velikem obsegu, kot je bilo načrtovano. Spremembe so deloma povezane z zmanjšanim financiranjem glede na sprejeti zakon (ZUJF 2012), delno pa z dognanji naše skupine in seveda tujih raziskovalnih skupin, ki so bile aktivne na tem področju. Tako debelost kot taka ne bo več obravnavana kot samostojna prebavno metabolna

motnja, temveč temveč kot del veliko večjega spleta metabolnih motenj, ki ga s skupnim imenom poznamo kot metabolni sindrom. Ker je postalo, glede na najnovejša odkritja, tudi vprašljivo, v kakšni meri je mišji model primeren za analizo interakcij med prebavno mikrobioto in gostiteljem v smislu interpretacije dogajanj pri človeku, smo več časa in sredstev namenili delu s človeško populacijo. Tako smo izvedli klinično raziskavo na slovenski populaciji vegetarijancev in vsejedov, rezultati katere bodo v letu 2014 objavljeni v ugledni reviji (Eur. J. Nutr.) in se že kaže kot precej odmevno. Programska skupina pa se je tudi povezala z raziskovalci Pediatrične klinike UKC v Ljubljani, s katerimi izvajamo klinično študijo na otrocih s funkcionalnimi motnjami prebavil oz. s kroničnimi črevesnimi vnetnimi boleznimi, v okviru katere raziskujemo povezavo med črevesno mikrobioto in pojavnostjo omenjenih bolezni.

Študijo na otrocih z infekcijami dihal ali sečil, v okviru katere bomo v sodelavi z zdravniki s Pediatrične klinike v Ljubljani proučili učinkovitost in varnost probiotične bakterije *L. gasseri* K7 za preprečevanje driske ob sočasnem zdravljenju z antibiotiki (Cilj C2),

smo prekinili, ker so bili starši manj pripravljeni za sodelovanje, kot so zdravniki pričakovali, in ker se je pokazalo, da je bila pogostnost z drisk pri otrocih, ki so imeli antibiotično terapijo, manjša od pričakovane. Kljub prekinitvi smo pridobili dragocene izkušnje in optimizirali metode analiz mikrobiote blata. Izkazalo se je tudi, da so otroci odklanjali probiotik v prašni formulaciji (neprijeten okus, konzistenca). Zaradi tega smo se v sodelovanju z industrijskim partnerjem v tujini (Italija) lotili razvoja nove formulacije probiotika, v obliki oljne suspenzije. Pričakujemo, da bomo v letu 2014 lahko nadaljevali s klinično študijo, na otrocih z infekcijami prebavil.

6. Najpomembnejši znanstveni rezultati programske skupine⁵

Znanstveni dosežek			
1.	COBISS ID	2573903	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Eksperimentalni dokazi o lažno pozitivnih rezultatih Kometnega testa zaradi interakcij z TiO ₂ delci
		ANG	Experimental evidence of false positive Comet test results due to TiO ₂ particle - assay interactions
	Opis	SLO	Proučili smo genotoksičnost TiO ₂ delcev na enocelične migetalkarje, <i>Tetrahymena thermophila</i> , s kometnim testom. Izpostavljenost prostih celic, celic imobiliziranih v gelu ali jeder imobiliziranih v gelu titanovemu oksidu oz. nanodelcem TiO ₂ je vedno privedla do pozitivnega rezultata kometnega testa, izida pa nismo uspeli potrditi z analizo citotoksičnosti, npr. peroksidacijo lipidov, povečano količino reaktivnih kisikovih vrst ali sestavo celičnih membran. Objavljena poročila navajajo, da do genotoksičnosti titanovega oksida oz. nanodelcev TiO ₂ v odsotnosti dokazljive citotoksičnosti ne prihaja neposredno. Možna razlaga naših rezultatov je, da so lažno pozitivni rezultati posledica postfestum interakcij med delci in DNK. Predlagamo, da se pred uporabo kometnega testa za analizo genotoksičnosti nanodelcev upošteva možnost postfestum interakcij zaradi izpostavljenosti DNK nanodelcem. Kometni test, ki je opisan v tem poročilu in se izvaja v acelični obliki, se lahko uporabi v ta namen.
		ANG	We have studied the genotoxicity of TiO ₂ particles with a Comet assay on a unicellular organism, <i>Tetrahymena thermophila</i> . Exposure to bulk or nanoTiO ₂ of free cells, cells embedded in gel or nuclei embedded in gel, all resulted in a positive Comet assay result but this outcome could not be confirmed by cytotoxicity measures such as lipid peroxidation, elevated reactive oxygen species or cell membrane composition. Published reports state that in the absence of cytotoxicity, nano and bulkTiO ₂ genotoxicity do not occur directly, and a possible explanation of our Comet assay results is that they are false positives resulting from post festum exposure interactions between particles and DNA. We suggest that before Comet assay is used for nanoparticle genotoxicity testing, evidence for the possibility of post festum exposure interactions should be considered. The acellular Comet test described in this report can be used for this purpose.
	Objavljeno v	Taylor & Francis; Nanotoxicology; 2013; Vol. 7, no. 5; str. 1043-1051; Impact Factor: 7.844; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 2.768; A': 1; WoS: NS, YO; Avtorji / Authors: Rajapakse Katarina, Drobne Damjana, Kastelec Damijana, Marinšek-Logar Romana	
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek	

2.	COBISS ID		3233672	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Izražanje celulosomskih proteinov in pilov tipa IV v zunajceličnem proteomu bakterije <i>Ruminococcus flavefaciens</i>	
		ANG	Expression of cellulosome components and type IV pili within the extracellular proteome of <i>Ruminococcus flavefaciens</i> 007	
	Opis	SLO	<i>Ruminococcus flavefaciens</i> je pomembna celulolitična bakterija, ki jo najdemo v prebavilih sesalcev. V študiji smo pridobili nove informacije o sestavi in uravnavanju izražanja sestavin zunajceličnega proteoma <i>R. flavefaciens</i> v odvisnosti od vira energije (celobioza, celuloza Avicel, ksilan). Primerjali smo tudi izražanje dveh sevov, od katerih je eden sposoben rasti na bombažu (007C), drugi pa je to sposobnost izgubil (007S). Pri obeh sevih smo ugotovili diferencialno izražanje nekaterih zunajceličnih proteinov v odvisnosti od substrata, pri čemer se ob rasti na celulozi pri sevu 007C najmočneje povečalo izražanje celulosomske hidrolaze GH48, proteina podobnega rubreritrinu (Rub) in proteina, sorodnega pilom tipa IV (Pil). Pri sevu 007S izražanje proteinov Rub in Pil ni bilo povečano, kar nakazuje na njuno potencialno vlogo pri razgradnji bombaža.	
		ANG	<i>Ruminococcus flavefaciens</i> is an important fibre-degrading bacterium found in the mammalian gut. Our study provides new information on the extracellular proteome of <i>R. flavefaciens</i> and its regulation in response to different growth substrates. The major proteins associated with the bacterial cell surface and with the culture supernatant were analyzed for <i>R. flavefaciens</i> cotton non-degrading strain (007S) and cotton-degrading strain (007C) grown with cellobiose, xylan or Avicel cellulose as energy sources. The study revealed that cellulosomal GH48 hydrolase, a rubrerithrin-like protein and a type IV-pili associated protein were the most strongly up-regulated in 007C cultures grown on Avicel compared with cellobiose. Strain 007S also showed substrate-related changes, but supernatant expression of the Pil protein and rubrerithrin in particular were markedly lower in 007S than in 007C during growth on Avicel. This suggest the potential role of the latter proteins in cotton cellulose degradation.	
	Objavljeno v		Public Library of Science; PloS one; 2013; Vol. 8, no. 6; str. 1-11, e-65333; Impact Factor: 3.730; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 2.514; A': 1; WoS: RO; Avtorji / Authors: Vodovnik Maša, Duncan Sylvia H., Reid Martin D., Cantlay Louise, Turner Keith, Parkhill Julian, Lamed Raphael, Yeoman Carl J., Berg Miller Margret E., White Bryan A., Bayer Edward A., Marinšek-Logar Romana, Flint Harry J.	
	Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek	
3.	COBISS ID		2888840	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Ocena različnih priporočil za uporabo vitamina E in bioaktivnost [alfa] tokoferola izomerov v prehrani pitovnih piščancev z merjenjem oksidativnega stresa in vivo in oksidativne stabilnosti mesa	
		ANG	Evaluation of different vitamin E recommendations and bioactivity of [alfa]-tocopherol isomers in broiler nutrition by measuring oxidative stress in vivo and the oxidative stability of meat	
	Opis	SLO	Namen raziskave je bil primerjati priporočila za dopolnitev krme z vitaminom E (VE) in bioaktivnost RRR- (rT) ter all-rac- -tokoferola (racT) pri oksidativnem (OKS) stresu in OKS stabilnosti mesa piščancev. Vse skupine (5) so dobivale krmo s 7,5% maščob, ena s palmovim, ostale z lanenim oljem (LO), ki so bile brez (K) ali z dodatkom 85 ali 200 IU racT ali 85 IU rT. OKS stres smo spremljali z merjenjem poškodb DNK, MDA (plazma, jetra, meso) in ACL. Analizirali smo tokoferole v plazmi, jetrih in mesu. OKS stabilnost smo proučevali v svežem, skladiščnem in toplotno	

			obdelanem mesu. LO povzroča poškodbe DNK in nastajanje MDA. Obe obliki in koncentraciji VE zmanjšata poškodbe DNK in MDA v mesu. Na -T v tkivih in plazmi vpliva raven dodatka VE. Za dobro OKS stabilnost mesa je potreben višji dodatek VE. Rezultati potrjujejo, da je razmerje bioaktivnosti med rT in racT 1,39.
		ANG	The aim of study was to compare recommendations for vitamin E (VE) supplementation and bioactivity of RRR (rT) and all-rac- -tocopherol (racT) with respect to oxidative (OX) stress and OX stability of broiler meat. All groups (5) received high fat (7.5%) diets, one with palm and others with linseed oil (LO), which were unsupplemented or supplemented with VE to contain 85 or 200 IU racT and 85 IU rT. OX stress was studied by measuring DNA damage, MDA and ACL. Tocopherols in plasma, liver, and meat were analyzed. OX stability was studied in fresh, stored, and heat-treated meat. LO induced DNA damage and MDA formation. Both forms and levels of VE reduced DNA damage and meat MDA. T levels in tissues and plasma were influenced by supplementation level. For good OX stability of meat, higher VE supplementation is needed. Results confirm that bioactivity ratio rT to racT is 1.39.
	Objavljeno v		Poultry Science Association; Poultry science; 2011; Vol. 90, no. 7; str. 1478-1488; Impact Factor: 1.728; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 0.887; A': 1; WoS: AD; Avtorji / Authors: Voljč Mojca, Frankič Tamara, Levart Alenka, Nemec Marija, Salobir Janez
	Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek
4.	COBISS ID		2912136 Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Bakterijska vrsta <i>Prevotella bryantii</i> ni sposobna tvoriti funkcionalne Shine-Dalgarnove interakcije, kar odseva edinstveno evolucijo ribosomskih vezavnih mest pri bakteroidetah
		ANG	Inability of <i>Prevotella bryantii</i> to form a functional Shine-Dalgarno interaction reflects unique evolution of ribosome binding sites in <i>Bacteroidetes</i>
	Opis	SLO	Nukleotidno zaporedje Shine-Dalgarno je bistven element iniciacije translacije pri bakterijah. Bioinformacijska analiza več kot štiridesetih genomov velikega bakterijskega debla <i>Bacteroidetes</i> pa je razkrila, da te sekvence v njih ne najdemo in da so 5' neporevedene regije mRNA zelo revne z GC in zato tam ne nastajajo močne sekundarne strukture mRNK. Poskusi s <i>Prevotella bryantii</i> TC1-1, ki sodi med <i>Bacteroidetes</i> so potrdili, da med iniciacijo translacije po vsej verjetnosti ne pride do nastanka SD interakcije med mRNK in malo ribosomsko podenoto, kar verjetno drži tudi za druge predstavnike <i>Bacteroidetes</i> . Predlagamo, da torej v iniciaciji ključno vlogo igra ribosomski protein S1, ki se veliko bolje veže pred start kodonom, kot znotraj gena zaradi močnejših sekundarnih struktur v njem.
		ANG	The Shine-Dalgarno sequence is a key element modulating the translation initiation in bacteria. Bioinformatic analysis of forty genomes from the major bacterial phylum <i>Bacteroidetes</i> revealed general absence of SD sequence, drop in GC content and consequently reduced tendency to form secondary structures in 5'UTRs. The experiments using <i>Prevotella bryantii</i> TC1-1, a member of <i>Bacteroidetes</i> , also suggested that a functional SD interaction does not take place during the translation initiation in <i>P. bryantii</i> TC1-1 and possibly other members of phylum <i>Bacteroidetes</i> . We thus propose that in the absence of the SD sequence interaction, the selection of start codons in <i>Bacteroidetes</i> is accomplished by binding of ribosomal protein S1 to unstructured 5'UTR as opposed to coding region which is inaccessible due to mRNA secondary structure.
	Objavljeno v		Public Library of Science; PloS one; 2011; Vol. 6, no. 8; str. 1-9, e22914; Impact Factor: 4.092; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 2.096; A': 1; WoS: CU; Avtorji / Authors: Accetto Tomaž, Avguštin

		Gorazd
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek
5.	COBISS ID	2799240 Vir: COBISS.SI
	Naslov	<i>SLO</i> Izražanje genov za nizin v siru
		<i>ANG</i> Expression of nisin genes in cheese
	Opis	<i>SLO</i> Nizin je najboljše proučeni bakteriocin mlečnokislinskih bakterij, značilen za vrsto <i>Lactococcus lactis</i> . V prispevku je bila predstavljena dinamika izražanja 11 genov, vpletenih v produkcijo nizina, v <i>Lc. lactis</i> M78 na modelu sira. Prisotnost nizina v modelnem siru smo uspeli potrditi tudi z biološkim testom. Delo je pomembno, ker prikazuje nov pristop (osamitev RNA, RT realtime PCR) za proučevanje bakteriocinov v kompleksnem okolju, kot so hrana ali prebavila, ki ga bo mogoče uporabiti tudi v študijah drugih bakteriocinov.
		<i>ANG</i> Nisin is the most studied bacteriocin of lactic acid bacteria, typical for <i>Lactococcus lactis</i> sp. In the presentation the dynamics of 11 gene expression involved in the production of nisin by <i>Lc. lactis</i> M78 in model cheese was described. The presence of nisin in model cheese was confirmed also by biological assay. The work is important because it shows a new approach (RNA isolation, RT realtime PCR) for the study of bacteriocins in a complex environment such as food or digestive tract, which can be used also in studies of other bacteriocins.
	Objavljeno v	American Dairy Science Association; co-published by Elsevier since 2009-; Journal of dairy science; 2011; Vol. 94, no. 1; str. 77-85; Impact Factor: 2.564; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 0.887; A": 1; A': 1; WoS: AD, JY; Avtorji / Authors: Trmčič Aljoša, Monnet C., Rogelj Irena, Bogovič Matijašič Bojana
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek

7. Najpomembnejši družbeno-ekonomski rezultati programske skupine⁶

		Družbeno-ekonomski dosežek
1.	COBISS ID	3324040 Vir: COBISS.SI
	Naslov	<i>SLO</i> Metoda za izolacijo in selekcijo bakterijskih sevov, bakterijski sevi in način njihove uporabe
		<i>ANG</i> Method for isolation and selection of bacterial strains, bacterial strains, and method for their use
	Opis	<i>SLO</i> Patentna prijava opisuje postopek izolacije in selekcije novih sevov <i>Lactobacillus</i> in <i>Bifidobacterium</i> iz bioptičnih vzorcev človeške črevesne sluznice. Sevi so bili izbrani na osnovi občutljivosti za protimikrobne snovi, sposobnosti preživetja v simuliranih razmerah okolja prebavil in izkazovanja protimikrobne aktivnosti. Osnova za ta izum so tudi celotna genomska zaporedja <i>Lactobacillus fermentum</i> L930BB in <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>animalis</i> IM386. Izum se nanaša na uporabo kateregakoli od teh dveh sevov ali obeh skupaj v proizvodnji probiotičnega ali farmacevtskega izdelka, predvsem pri preprečevanju in/ali zdravljenju funkcionalnih motenj prebavil in bolezni v območju spodnjega prebavnega trakta, kot so sindrom razdražljivega črevesja (IBS) in kronične vnetne črevesne bolezni (IBD) (Crohn-ova bolezen in ulcerozni kolitis). Farmacevtska družba Medis iz Ljubljane, ki je prijavitelj patenta, v sodelovanju s člani programske skupine P4-0097 že preskuša probiotični pripravek s sevoma iz patentne prijave na živalskih modelih in v klinični študiji na ljudeh s sindromom razdražljivega črevesa.

	ANG		The present invention provides a method of isolation and selection of new Lactobacillus and Bifidobacterium strains from bioptic specimens of human intestinal mucosa. The strains were selected on the basis of susceptibility to antimicrobials, ability to survive in simulated conditions of the gastrointestinal environment and to exhibit anti-inflammatory activity. The bases of this invention are also the whole-genome sequences of the Lactobacillus fermentum L930BB and Bifidobacterium animalis subsp. animalis IM386. The invention relates the use of any of these two strains or a combination of both for the manufacture of probiotic as pharmaceutical product, in particular for prevention and/or treatment of functional gastrointestinal disturbances and illnesses in region of the lower intestinal tract, such as IBS or IBD (Crohn's disease or ulcerative colitis). Pharmaceutical company Medis from Ljubljana, applicant of this patent, is already testing the probiotic preparation containing strain from this application on animal models and in a clinical study on patients with intestinal bowel syndrome.	
	Šifra		F.33 Patent v Sloveniji	
	Objavljeno v		Urad Republike Slovenije za intelektualno lastnino; 2013; 32 str.; Avtorji / Authors: Rogelj Irena, Bogovič Matijašič Bojana, Hacin Biljana, Čitar Manuela, Štempelj Mateja, Švigelj Karmen	
	Tipologija		2.23 Patentna prijava	
2.	COBISS ID		3220872	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Postopek za predelavo pivovarniške kvasine v bioplin	
		ANG	Process of transformation of waste beer yeast into biogas	
	Opis	SLO	V tem patentu smo razvili inovativni proces predelave odpadnih pivovarskih kvasovk v bioplin v UASB tipu bioreaktorja. UASB bioreaktorji ponavadi presnavljajo le raztopljene organske snovi, naš inovativni postopek pa omogoča dodajanje do 3% odpadnega kvasa v odpadno pivovarsko vodo, kar dvigne proizvodnjo bioplina v povprečju za 40%. Pivovarna Laško, ki je lastnik patenta, iz bioplina proizvede toliko toplote, da pokrije 60% potreb po toploti v proizvodnji piva. Postopek je bil preizkušen na laboratorijski, pilotni in industrijski ravni. V razvoju postopka so bili uporabljeni tradicionalni inženirski in novi mikrobno-biotehnološki pristopi, kjer smo uporabili znanje iz področja anaerobnih mikroorganizmov.	
		ANG	In this patent, we have developed an innovative process of transformation of waste beer yeast into biogas in a UASB-type bioreactor. UASB bioreactors usually metabolise only dissolved organic substances, but our innovative process allows the addition of up to 3% of waste yeast into brewery waste water, which increases the production of biogas by an average of 40%. Laško, who is the owner of the patent, produces so much heat from the biogas that covers 60% of the heat demand in the production of beer. The process has been tested at laboratory, pilot and industrial scale. In the development of the process were used traditional engineering and new microbial-biotechnological approaches, where we have applied the expertise from the field of anaerobic microorganisms.	
	Šifra		F.33 Patent v Sloveniji	
	Objavljeno v		Urad RS za intelektualno lastnino; 2013; 20 str.; Avtorji / Authors: Zupančič Gregor Drago, Klemenčič Miran, Oset Matej, Marinšek-Logar Romana, Roš Milenko, Klemenčič Miran	
	Tipologija		2.24 Patent	
3.	COBISS ID		2826376	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Probiotične bakterije in črevesne okužbe: Zaščita celic s probiotičnimi bakterijami	
		ANG	Probiotic bacteria and enteric infections	

	Opis	SLO	Črevesne bolezni so lahko posledica patogenov, kot so bakterije, glive, paraziti in virusi, vzroki pa še niso zadovoljivo pojasnjeni. Motnje v normalni mikrobioti so osrednjega pomena za razvoj mnogih, če ne vseh teh bolezni. Te motnje v črevesju so uvod v javno-zdravstvene probleme, kot so potovalna diareja, sindrom razdražljivega črevesja, vnetne črevesne bolezni in kolorektalnega raka. Ta knjiga razlaga, kako motnje v prebavilih vplivajo na črevesne mikroorganizme, kako moteno ravnotežje v mikrobioti vodi do črevesnih bolezni in kako je take motnje možno preprečiti.	
		ANG	Intestinal disorders can result from pathogens like bacteria, fungi, parasites and viruses, but the causes remain to be elucidated. Disturbances to the normal gut flora are central to the development of many, if not all, of these disorders. Disturbed gut microbiota is a prelude to public health issues like traveller's diarrhoea, irritable bowel syndrome, inflammatory bowel disease, and colorectal cancers. This book discusses the way intestinal disorders affect the microbiota, how the disturbed microbial balance leads to enteric disorders and the ways to prevent these disorders	
	Šifra	C.01 Uredništvo tujega/mednarodnega zbornika/knjige		
	Objavljeno v	Springer; 2011; XI, 476 str.; A": 1;A': 1; Avtorji / Authors: Malago J.J., Koninkx J.F.J.G., Marinšek-Logar Romana		
	Tipologija	2.01 Znanstvena monografija		
4.	COBISS ID	3348872	Vir: COBISS.SI	
	Naslov	SLO	Kaj je kakovosten probiotik	
		ANG	What is a good quality probiotic	
	Opis	SLO	Kontrola kakovosti probiotičnih izdelkov je v EU nezadostno zakonsko urejena. Povpraševanje po analizah probiotikov in pomanjkanje laboratorijev, pooblaščenih za tovrstne analize, nas je spodbudilo, da smo v letu 2010 začeli s postopki akreditacije metod za analize probiotikov. Oktobra 2010 je Inštitut za mlekarstvo in probiotike pridobil akreditacijski certifikat za ugotavljanja števila probiotičnih mikroorganizmov iz rodov Bifidobacterium (ISO 29981/IDF220:2010), Lactobacillus, Enterococcus ter iz skupine Lactobacillus acidophilus (ISO 20128/IDF 192:2006) v probiotičnih izdelkih, z metodo štetja na ploščah. Aprila 2013 se je seznam akreditiranih metod razširil za ugotavljanje števila Streptococcus thermophilus v probiotičnih izdelkih z metodo štetja na ploščah, ter za potrjevanje prisotnosti posameznih vrst probiotičnih mikroorganizmov z metodo verižnega pomnoževanja s polimerazo (polymerase chain reaction, PCR). Tako smo ustvarili pogoje za trženje tovrstnih analiz na prostoru EU. Problematika je predstavljena v strokovnem zborniku.	
ANG		Quality control of probiotic products in the EU is insufficiently regulated. Demand for the analysis of probiotics and the lack of laboratories authorized for this type of analysis encouraged us that we started in 2010 with the procedures of accreditation of methods for the analysis of probiotics. In October 2010, the Institute of Dairy Science and Probiotics gained accreditation certificate for the enumeration of probiotic microorganisms of the genera Bifidobacterium (ISO 29981/IDF220 : 2010) , Lactobacillus , Enterococcus and Lactobacillus acidophilus from the group (ISO 192:2006 20128/IDF) in probiotic products by plate counting. In April 2013 the list of accredited methods has expanded to enumeration of Streptococcus thermophilus in probiotic products by plate counting, and to the confirmation of the presence of certain species of probiotic microorganisms by polymerase chain reaction (PCR). Thus, the conditions for the marketing of such analyzes in the EU area were created. This issue		

		is presented in a proceedings of professional papers.
	Šifra	D.05 Akreditacija laboratorija
	Objavljeno v	Lek; Probiotiki; 2014; Str. 40-56; Avtorji / Authors: Bogovič Matijašič Bojana
	Tipologija	1.09 Objavljeni strokovni prispevek na konferenci
5.	COBISS ID	Vir: vpis v poročilo
	Naslov	SLO ANG
	Opis	SLO ANG
	Šifra	F.06 Razvoj novega izdelka
	Objavljeno v	http://www.arhiv.mkgp.gov.si/nc/si/medijsko_sredisce/novica/article/946/6 http://www.jataemona.si/omegaplus.html http://www.jataemona.si/zlato_jajce.html
	Tipologija	3.25 Druga izvedena dela

8. Drugi pomembni rezultati programske skupine⁷

Člani programske skupine smo sodelovali pri raziskavah BRIN – Kompetenčnega centra za biotehnoški razvoj in inovacije, ki sta jih financirala MVZT Ministrstvo za visoko šolstvo, znanost in tehnologijo in Evropski sklad za regionalni razvoj EU. Raziskave BRIN-a smo tako lahko obogatili s svojim znanjem in izkušnjami, prišlo je tudi do koristne izmenjave biološkega materiala med BRIN in raziskovalnim programom.

Pridobili in objavili smo genom lastnega probiotičnega seva *Lactobacillus gasseri* K7 (RefSeq Assembly ID: GCF_000406345.1, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/697858>), kar prispeva k boljšemu poznavanju in aplikativnemu potencialu tega dobro proučenega bakterijskega izolata ter predstavlja dobro podlago za nadaljnje raziskave na področju funkcionalne genomike.

V okviru raziskovalnega programa smo razvili metodo za selektivno kvantifikacijo probiotičnih sevov v izdelku z metodo PMA-PCR v realnem času, ki ne zahteva predhodnega gojenja, kar skrajša čas analize in ima več drugih prednosti pred konvencionalnimi analizami. Metodo so uspešno validirali tudi v farmacevtski družbi Lek, za redno kontrolo probiotičnega izdelka Linex (Pušnik S., magistrsko delo pod mentorstvom Accetto T, 2013), kar predstavlja dober primer prenosa znanstvenih izsledkov v prakso.

Nove metode za raziskave probiotikov predstavljajo dodano vrednost pri kontroli kakovosti probiotičnih izdelkov, ki jih opravljamo kot referenčni laboratorij za domača in tuja podjetja, pospešile pa bodo tudi razvoj novih probiotičnih izdelkov.

9. Pomen raziskovalnih rezultatov programske skupine⁸

9.1. Pomen za razvoj znanosti⁹

SLO

Raziskovanje učinkov prehrane na organizem gostiteljev - živali ali ljudi, na njihovo mikrobioto ter študij interakcij med mikroorganizmi v prebavnem traktu so zahtevali razvoj in uvajanje številnih molekularno bioloških, genetskih, genomskih in proteomskih metod, ki bodo koristne ne le za nadaljnje raziskave naše skupine, temveč za svetovno znanstveno javnost. Med drugim smo: v sodelovanju s švicarskimi raziskovalci dokazali uporabnost transkriptomske analize krvnih celic (miši) kot vira biomarkerjev za ugotavljanje vpliva probiotikov na infekcije, tudi subklinične; v sodelovanju s češkimi raziskovalci uvedli metodo za ekstrakcijo DNA iz fekalnih in drugih vzorcev, ki temelji na uporabi hidrofilnih magnetnih kroglic P(HEMA-co-GMA); dopolnili in razvili metodo kometnega testa za oceno toksičnosti in genotoksičnosti, ki smo ga na celični liniji jetrnih celic HepG2 nadgradili z uporabo encimov FPG (formamidopirimidin glikozilaza) in EndoIII (endonukleaza III), ter uvedli uporabo modelnega evkariontskega mikroorganizma *Tetrahymena thermophila*; optimizirali metodo PCR v realnem času za preiskave mikrobiote črevesne sluznice; uvedli metodo PMA-PCR v realnem času za selektivno ugotavljanje nepoškodovanih bakterij v probiotičnih izdelkih z liofiliziranimi ali mikrokapsuliranimi mikroorganizmi; preskusili trodimenzionalni in vitro model črevesnega epitelijskega tkiva, ki vsebuje dendritične celice, pridobljene iz človeških monocitov iz periferne krvi, človeške črevesne epitelne celice in probiotične bakterije. Izboljšane metode za analize probiotičnih izdelkov in za genotoksične teste prispevajo tudi k prizadevanju EU za standardizacijo in uzakonitev metod v evropskem prostoru ter nadomeščanja uporabe laboratorijskih živali s celičnimi linijami in enoceličnimi organizmi.

Raziskave vzorcev blata, črevesne sluznice, humanega mleka, kolostruma, mekonija, vampa ... so prinesle pomembna spoznanja o pestrosti mikrobne združbe, ki naseljujejo prebavni trakt različnih domačih in laboratorijskih živali ter človeka. Pridobljena spoznanja o mikrobioti različnih skupin ljudi (vegetarijancev, novorojencev, bolnikov s kroničnimi črevesnimi boleznimi) bodo koristna za izgradnjo novih prehranskih strategij in preventivnih ukrepov za uspešen boj proti različnim zdravstvenim težavam, ki pestijo vedno večji del človeštva.

Rezultati o načinu delovanja naravnih snovi, predvsem rastlinskih ekstraktov na različne pomembne

processe, vključene v antioksidativno obrambo, ki smo jih pridobili in vivo na različnih živalskih modelih, so posebej aktualni in pomembni, saj je izsledkov takih raziskav, zaradi težavnosti izvajanja, za razliko od in vitro raziskav, v svetovni znanstveni literaturi relativno malo.

Izpostaviti velja tudi spoznanja o sinergističnem delovanju različnih skupin antioksidantov, ki so topni v vodi in v maščobah. Slednji vplivajo na zdravje živali, na večjo učinkovitost krmljenja (vpliv na vampne bakterije in na razgradljivost in prebavljivost suhe snovi) in zmanjšanje obremenjevanja okolja. Predvsem slednje je pomembno iz globalnega vidika, saj predstavljajo izpusti toplogrednih plinov predvsem iz govedoreje resen globalni ekološki problem.

Tudi odkrivanje novih mikroorganizmov s probiotičnim potencialom ter dokazovanje mehanizmov njihovega delovanja, kakor dokazovanje varnosti in zaščitni sposobnosti seva *Lb. gasseri* K7 na mišjem modelu C57BL/6J, inficiranem z enterohemoragično *E. coli* O157:H7, preskušanje varnosti in protivnetnega delovanja komezalnih bakterij iz črevesne sluznice in proučevanje mehanizmov prenosa laktobacilov (*Lb. gasseri* K7, *Lb. rhamnosus* GG) iz črevesa v mlečno žlezo, je zanimivo na mednarodni ravni. Današnje zahteve za probiotične mikroorganizme vključujejo podrobno poznavanje pozitivnih in negativnih lastnosti takšnih mikroorganizmov, mehanizmov njihovega preživetja in delovanja v okolju prebavil ter vseh možnih interakcij, v katere lahko vstopajo bodisi z drugimi mikroorganizmi bodisi s celicami ali tkivi gostitelja.

ANG

Research of the effects of diet on the host organism, on their microbiota and studies of interactions among microorganisms in the gut demanded the development and implementation of molecular, genetic, genomic and proteomic methods that will be useful for the global scientific public. Among other achievements, we have, in collaboration with the Swiss investigators demonstrated the usefulness of transcriptomic analysis of blood cells (mice) as the source of biomarkers to determine the influence of probiotics on the infection, including subclinical, in cooperation with the Czech researchers introduced a method for extracting DNA from fecal and other samples which is based on the use of hydrophilic magnetic beads P(HEMA-co-GMA); improved a Comet assay to evaluate the toxicity and genotoxicity, which was upgraded on the cell line HepG2 liver cells with the use of enzymes FPG (formamidopirimidin glycosylase) and EndoIII (endonuclease III) and introduced the use of a model eukaryotic

micro-organism *Tetrahymena thermophila*; optimized real-time PCR method for investigation of the intestinal mucosal microbiota; introduced the PMA-real-time PCR method for the selective determination of intact bacteria in probiotic products with freeze-dried or microencapsulated microorganisms; tested three dimensional in vitro model of intestinal epithelium, which comprises dendritic cells derived from human monocytes from peripheral blood, human intestinal epithelial cells and probiotic bacteria. Improved methods for the analysis of probiotic products and for genotoxic tests also contribute to EU efforts to standardize and legitimize the methods in EU and replace the use of laboratory animals with cell lines and single-cell organisms.

Research of feces, intestinal mucosa, human milk, colostrum, meconium, rumen.. have brought important insights about the diversity of microbial communities that inhabit the gut of various domestic or laboratory animals and humans. Knowledge of the microbiota of different groups of people (vegetarians, newborns, patients with chronic intestinal diseases) will be useful for the construction of new dietary strategies and preventive measures for the successful fight against various health problems affecting increasing number of humans.

The results on the mode of action of natural compounds, particularly plant extracts in various important processes involved in antioxidative defense, obtained in vivo in various animal models, are particularly topical. Due to the difficulties of their implementation there are very few publication reporting in vivo studies in the scientific literature as opposed to in vitro studies. The recognition of the synergistic action of the various groups of antioxidants, soluble in water and fats. The latter affect the health of animals, feeding efficiency (the effect on rumen bacteria and degradability and digestibility of dry matter) and reduce environmental pollution. The latter is important from a global perspective, as the greenhouse gas emissions, mainly from cattle production present serious global ecological problem.

Also the discovery of new microorganisms with probiotic potential and demonstration of the mechanisms of their action on the host, such as demonstration of the safety and protective ability of *Lb. gasseri* K7 in the C57BL/6J mouse model infected with enterohaemorrhagic *E. coli* O157:H7, testing the safety and anti-inflammatory activity of commensal bacteria from the intestinal mucosa and study of the mechanisms of transmission of lactobacilli (*Lb. gasseri* K7, *Lb. rhamnosus* GG) from the intestine into the mammary gland, is interesting at the international level. Today's requirements for probiotic microorganisms include detailed knowledge of the positive and negative characteristics of such microorganisms, mechanisms of their survival and activity in the gut environment and all possible interactions, that they may encounter in with other microorganisms or with host cells and tissues.

9.2. Pomen za razvoj Slovenije¹⁰

SLO

Med cilji, ki smo jih dosegli z izpeljavo raziskovalnega programa Prehrana in mikrobna ekologija prebavil, velja na prvem mestu omeniti podporo izobraževalnemu procesu na prvi in drugi Bolonjski stopnji in na doktorskem študiju, v skladu s poslanstvom ustanove, ki ji pripada. Tako smo lahko študentom programov prve stopnje (Živilstvo in prehrane, Biotehnologija, Mikrobiologija in Kmetijstvo – Zootehnika), študentom programov druge stopnje (Živilstvo, Prehrana, Znanost o živalih, Biotehnologija, Mikrobiologija) neposredno prenesli nova dognanja s tega področja, enako pa velja za študente interdisciplinarnih doktorskih študijskih programov Bioznanosti, Biomedicina in Varstvo okolja.

Področje proizvodnje in oskrbe z varno hrano, kamor lahko uvrstimo rezultate raziskav te programske skupine, ostaja med najpomembnejšimi področji raziskav v Sloveniji in v Evropi nasploh tudi v naslednjih letih. Proizvodnja varne hrane temelji na za zdravje varnih resursih in upošteva paradigme trajnostnega razvoja. Obema aspektoma smo pri raziskovanju posvetili veliko pozornosti, saj smo preskušali učinkovitost in varnost naravnih bioaktivnih snovi v prehrani ljudi in živali, kot so naravni prehranski dodatki za krmo (ekstrakti lesa, naravni viri vitamina E, gobe, oljčni listi..) in naravni probiotiki. Programski sklop, ki je obravnaval vpliv prehrane nosečnic in mater na mikrobioto prebavil otrok in posledično na njihovo dolgoročno zdravlje, je in še bo prispeval k večjemu osveščanju, boljši prehrani in posledično boljšemu zdravstvenemu stanju prebivalcev Slovenije.

Nova znanja in metode smo, skupaj z našimi partnerji iz gospodarstva, že začeli vpeljevati v najmodernejše tehnologije pridelovanja krme, vodenja prehrane živali in prirejo/predelavo zdrave in varne hrane, ob sočasnem manjšem obremenjevanju okolja. Raziskave, ki smo jih opravili z rastlinskimi ekstrakti, so zanimive tudi za slovenske proizvajalce rastlinskih

ekstraktov, proizvajalcev krme in rejcev domačih živali, saj smo na podlagi rezultatov naših raziskav prišli do nekaterih znanstvenih ugotovitev, ki razlagajo in vivo delovanje naravnih rastlinskih ekstraktov kot antioksidantov v prehrani živali. Kažejo tudi na njihov potencial v obliki krmnih dodatkov za izboljšanje kakovosti in stabilnosti živalskih proizvodov in odpirajo možnosti ustvarjanja oz. trženja tovrstnih funkcionalnih živil. Pomembni so tudi izsledki glede njihove rabe za zmanjšanje obremenjevanja okolja. Ponujajo tudi spoznanja, ki bodo morda v prihodnosti predstavljala dobre temelje za uporabo takih naravnih rastlinskih ekstraktov kot antioksidantov v prehrani ljudi.

Zelo dobro poteka tudi prenos metod in spoznanj, pridobljenih v sklopu raziskav probiotikov, v uporabo, tako s strani proizvajalcev kakor tudi laboratorija za probiotike, ki od leta 2010 deluje na Inštitutu za mlekarstvo in probiotike. Slednje predstavlja dodano vrednost pri kontroli kakovosti probiotičnih izdelkov kakor tudi spodbuja razvoj novih probiotičnih izdelkov.

Vse omenjeno je nenazadnje pomembno za zagotavljanje neoporečnosti, kakovosti in konkurenčnosti slovenskih proizvodov in s tem tudi konkurenčnosti kmetijstva in agroživilske industrije. Med izvajanjem programa se je potrdilo, da prehranska tematika zahteva kompleksno notranjo povezanost raziskav in razvojnega dela (R&R), pri čemer je neobhodno potrebno komplementarno znanje različnih naravoslovnih in tehnoloških ved, kar je v naši programski skupini zagotovljeno.

ANG

Among the objectives that have been achieved by carrying out the research program Nutrition and microbial ecology of gastrointestinal tract it is worth mentioning first of all The support of the educational process at the first and second cycle of Bologna study programs and at the doctoral level, in accordance with the mission of the institution to which the programme group belongs. So we could directly transferred new developments in this field to the undergraduate academic study programs (Food Science and Nutrition, Biotechnology, Microbiology, Agriculture – Animal production), master study programs (Food Science, Nutrition, Animal Science, Biotechnology, Microbiology), as well as to the students of interdisciplinary PhD programs in Biosciences, Biomedicine and Environmental Protection.

The production and supply of safe food, where the results of of this research program group can be assigned, remains among the most important areas of research in Slovenia and in Europe in general in the coming years. The production of safe food is based on the healthy resources and should be implemented in the paradigm of sustainable production. The research team has focused on both aspect, as we tested the efficacy and safety of natural bioactive compounds in the diet of humans and animals, such as natural nutritional feed additives (wood extracts , natural resources of vitamin E , mushrooms, olive leaves..) and natural probiotics. A part of program which addressed the impact of nutrition of pregnant women and mothers on the gastrointestinal microbiota of children and consequently on their long-term health, has contributed and will contribute to greater awareness, better nutrition, and consequently improving the health status of the population of Slovenia.

Along with our partners from industry, we already started with the introduction of new knowledge and methods into the cutting-edge technologies of forage production, management of animal nutrition and the production / processing of healthy and safe food, while lesser burden on the environment. Studies carried out with plant extracts, are also interesting for Slovenian manufacturers of herbal extracts, feed producers and breeders of domestic animals as on the basis of the results of our research we came to certain scientific findings that explain the in vivo activity of natural plant extracts as antioxidants in animal nutrition. They also show their potential in the form of feed additives to improve the quality and stability of animal products and open up the possibility of creating and marketing of such functional foods. The research findings related to their use to reduce environmental pollution are also of significant importance. The results obtained may in the future represent a good foundation for the use of such natural plant extracts as antioxidants in human nutrition.

Very successful is also the transfer of methods and findings reached in the studies of probiotics into application by both the producers as well as the laboratory for probiotics, which operates in the frame of the Institute of dairy science and probiotics from year 2010. This represents an added value to the quality control of probiotic products as well as encourage the development of new probiotic products.

All of the above mentioned is ultimately important to ensure the integrity, quality and competitiveness of Slovenian products and thus the competitiveness of agriculture and agri-food industry. During the implementation of the program it was confirmed that the nutrition issues require complex internal integration of research and development work (R & D), where

complementary knowledge of various science and technology is indispensable, and was ensured in our program team.

10. Zaključena mentorstva članov programske skupine pri vzgoji kadrov v obdobju 1.1.2009-31.12.2013¹¹

10.1. Diplome¹²

vrsta usposabljanja	število diplom
bolonjski program - I. stopnja	66
bolonjski program - II. stopnja	7
univerzitetni (stari) program	111

10.2. Magisterij znanosti in doktorat znanosti¹³

Šifra raziskovalca	Ime in priimek	Mag.	Dr.	MR	
25513	Tamara Korošec	☐	☒	☒	
25514	Biljana Hacin	☐	☒	☒	
27549	Gorazd Tompa	☐	☒	☒	
25517	Nika Zajec	☐	☒	☒	
28656	Simon Guštin	☐	☒	☒	
29434	Mojca Voljč	☐	☒	☒	
28851	Maša Vodovnik	☐	☒	☐	
30759	Katja Gorenc	☐	☒	☒	
29429	Katarina Rajapakse	☐	☒	☒	
0	Mojca Podgorelec	☒	☐	☐	
0	Vitomira Elizabeta Erac	☒	☐	☐	
0	Maja Novak	☒	☐	☐	
33042	Ida Štoka	☒	☐	☐	
0	Domen Novak	☐	☒	☐	
30847	Mija Sežun	☐	☒	☐	
0	Luka Lipoglavšek	☐	☒	☐	
28206	Aljoša Trmčič	☐	☒	☒	
28402	Katja Zajšek	☐	☒	☐	
25025	Maksimiljan Brus	☒	☐	☐	
29489	Mirjana Bistan	☐	☒	☐	

Legenda:

Mag. - Znanstveni magisterij
Dr. - Doktorat znanosti
MR - mladi raziskovalec

11. Pretok mladih raziskovalcev – zaposlitev po zaključenem usposabljanju¹⁴

Šifra	Ime in priimek	Mag.	Dr.	Zaposlitev	
-------	----------------	------	-----	------------	--

raziskovalca					
25513	Tamara Korošec	☐	☒	F - Drugo	
25514	Biljana Hacin	☐	☒	D - Javni zavod	
27549	Gorazd Tompa	☐	☒	A - raziskovalni zavodi	
25517	Nika Zajec	☐	☒	C - Gospodarstvo	
28656	Simon Guštin	☐	☒	C - Gospodarstvo	
29434	Mojca Voljč	☐	☒	F - Drugo	
30759	Katja Gorenc	☐	☒	F - Drugo	
29429	Katarina Rajapakse	☐	☒	C - Gospodarstvo	
28206	Aljoša Trmčič	☐	☒	E - Tujina	

Legenda zaposlitev:

- A** - visokošolski in javni raziskovalni zavodi
- B** - gospodarstvo
- C** - javna uprava
- D** - družbene dejavnosti
- E** - tujina
- F** - drugo

12. Vključenost raziskovalcev iz podjetij in gostovanje raziskovalcev, podoktorandov ter študentov iz tujine, daljše od enega meseca, v obdobju 1.1.2009-31.12.2013

Šifra raziskovalca	Ime in priimek	Sodelovanje v programski skupini	Število mesecev	
0	Kristyna Turkova	C - študent – doktorand	6	
0	Ksenija Habjanič	C - študent – doktorand	2	
0	Lenka Ruprichova	C - študent – doktorand	1	
0	Alena Španova	B - uveljavljeni	1	
0	Bohuslav Rittich	B - uveljavljeni	1	
0	Hana Sulcerova	C - študent – doktorand	1	
0	Radka Burdychova	C - študent – doktorand	1	
0	Nemanja Mirković	C - študent – doktorand	2	
0	Milica Petrušić	B - uveljavljeni	1	
0	Domen Novak	A -	17	

Legenda sodelovanja v programski skupini:

- A** - raziskovalec/strokovnjak iz podjetja
- B** - uveljavljeni raziskovalec iz tujine
- C** - študent – doktorand iz tujine
- D** - podoktorand iz tujine

13. Vključevanje v raziskovalne programe Evropske unije in v druge mednarodne

raziskovalne in razvojne programe ter drugo mednarodno sodelovanje v obdobju 1.1.2009-31.12.2013 z vsebinsko obrazložitvijo porabe dodeljenih sredstev iz naslova dodatnega letnega sofinanciranja mednarodnega sodelovanja na podlagi pozivov za EU vpetost.¹⁵

SLO

- FP6-2004-FOOD-3-A"01626-2"TRUEFOOD Integrated EU Project - 6th FP Priority 5 – Food quality and Safety: Traditional United Europe Food (Contract No.: FOOD-CT-2006-016264); koordinator Danielle Rossi, partner: Univerza v Ljubljani (odgovorna nosilka za WP 2A v Sloveniji Irena Rogelj, odgovorna nosilka za WP 7A v Sloveniji Romana Marinšek Logar)

- ERA 133/01 SEE-ERA-NET PLUS's "RegTraC", »Characterisation and tracking the origin of specific features of traditional cheeses in Western Balkans Region«; koordinator: Jasmina Havranek, FAZ, Dairy Science Department, Zagreb, Hrvaška; (odgovorna nosilka slovenskega partnerja Irena Rogelj).

- INTERREG IIIA/Phare CBC Italia Slovenia. Azione 3.2.4. Uporaba znanstvenih dognanj in raziskovalnih metod v sonaravni in intenzivni prireji mleka (Andrej Lavrenčič, nosilec v programski skupini)

- Interreg Bellimpresa (Slovenija – Italija) = Racionalizacija notranjih virov in širitev dobre rejske prakse, nanašajoče se na multifunkcionalno in trajnostno gospodarjenje na živinorejskih obratih (Andrej Lavrenčič, nosilec v programski skupini).

- No 046010, Ministry of Science and Technological Development, Republika Srbija, 2011201: Nove mikrokapsulacijske in encimske za ustvarjanje novih biokatalizatorjev in biološko aktivnih snovi za izboljšanje kvalitete in varnosti hrane ter konkurenčnost (Bojana Bogovič Matijašić, nosilka v programski skupini).

- EUREKA ENZEGG E! 6750, v sodelovanju s Fakulteto za metalurgijo in tehnologijo Univerze v Beogradu (Matjaž Črvek, Emona RCP d.d.)

- SALUX - evropsko omrežje, katerega cilj je zmanjšati vsebnost maščobe (nasičenih in trans maščobnih kislin), sladkorja in soli v živilskih izdelkih. Ugotavljanje in izmenjava dobrih praks iz tehnoloških in ekonomskih vidikov in izboljšave v majhnih in srednjih podjetjih (Matjaž Črvek, Emona RCP).

-COST FA0802 Hrana za zdravje (Janez Salobir, nosilec v programski skupini)

-COST FA1005 Infogest. 20112015. Razumevanje vpliva hrane na zdravje ljudi (Janez Salobir, nosilec v programski skupini)

- BI-SR/10-11-035 Bilateralni projekt s Srbijo. Vpliv enkapsulacije mlečnokislinskih bakterij na njihovo preživetje in delovanje v hrani in pogojih prebavil (Bojana Bogovič Matijašić).

- BI-FI/11-12-010 Bilateralni projekt med Slovenijo in Finsko. Ugotavljanje peptidnih inhibitorjev angiotenzinske-(I) konvertaze in imunomodulatornih peptidov v tradicionalnih sirih Zahodnega Balkana (Irena Rogelj).

- Projekt, ki ga financira Ministarstvo znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske, Funkcionalni mliječni proizvodi od ovčjeg mlijeka. Nosilka Dubravka Samaržija, Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, sodelavke na projektu Irena Rogelj, Karmen

Godič Torkar, Bojana Bogovič Matijašić.

- International Scientific Research Cooperation in the framework of the international policy of the Vrije Universiteit Brussel (VUB). Partner: Research Group of Industrial Microbiology and Food Biotechnology (IMDO) Faculty of Sciences and Bioengineering Sciences

Zaradi sodelovanja v evropskem projektu (sklop WP4 projekta FP-6 2004-FOOD-3-A 016264-2 TRUEFOOD) smo v letu 2009 prejeli sredstva dodatnega letnega sofinanciranja v višini 2.717,99 €. Sredstva smo porabili za dodatne raziskovalne poskuse in materiale. Tako smo uvedli metodo real-time PCR za kvantifikacijo prevladujočih skupin bakterij v blatu novorojencev in v materinem mleku: Enterobacteriaceae, Bifidobacterium, Bacteroides-Prevotella, Clostridium leptum, Clostridium coccoides. Metodo bomo uporabljali za proučevanje razvoja prebavne mikroflore pri novorojencih. Za razvoj metode smo potrebovali predvsem kemikalije (encime, nukleotide, označene začetne oligonukleotide, polimerazo, fluorescentna barvila,...).

Zaradi sodelovanja v evropskem projektu (sklop WP7.2 projekta FP-6 2004-FOOD-3-A 016264-2 TRUEFOOD) smo v letu 2009 prejeli sredstva dodatnega letnega sofinanciranja v višini 2.869,50 €. Sredstva smo porabili za dopolnitev testnega sistema BMP, s katerim preizkušamo anaerobno razgradljivost organskih substratov iz področja agroživilstva in potencialni izplen bioplina. Tovrstno testiranje je bilo vezano na raziskave v sklopu WP7 projekta TRUEFOOD. Testni sistem smo dopolnili z dodatnim inkubatorskim stresalnikom Multitron II (Infors AG; celotna cena je 14.148,00 €, iz omenjenih sredstev smo investirali 1317€) in 10 novimi inkubacijskimi steklenicami Oxitop R (WTW, Ltd; tu smo investirali 1552 €).

V letu 2010 smo pridobili na podlagi dodatnega letnega sofinanciranja zaradi povečane raziskovalne aktivnosti v RS in EU sredstva v vrednosti 372 raziskovalnih ur raziskovalnega razreda C. Sredstva smo razdelili med več raziskovalcev in jih namenili za izvedbo eksperimentov v sklopu raziskovalnega programa (nakup kemikalij in reagentov) in nujno potrebne podporne infrastrukture (mešanice čistih plinov za vzdrževanje striktno anaerobne atmosfere v anaerobni komori).

14. Vključenost v projekte za uporabnike, ki v so obdobju trajanja raziskovalnega programa (1. 1. 2009 – 31. 12. 2013), potekali izven financiranja ARRS¹⁶

SLO

- BRIN - Kompetenčni center za biotehnološki razvoj in inovacije, MVZT Ministrstvo za visoko šolstvo, znanost in tehnologijo in Evropski sklad za regionalni razvoj EU (Irena Rogelj)

- Dolgoročna pogodba s podjetjem Tanin Sevnica d.d. (Janez Salobir).

- Kontrola kakovosti probiotičnega izdelka Linex, Pogodba Št. 002/10 (Bojana Bogovič Matijašić).

- Sodelovanje z Jato Emono na področju prehrane živali - analize, predavanja in svetovanje (Janez Salobir).

- Sodelava pri izvajanju randomizirane, s placebom kontrolirane, dvojno slepe

multicentrične

humane študije 4. faze (projekt LINPT01), Lek Pharmaceuticals d.d. iz Ljubljane, CRS Klinične raziskave in storitve d.o.o. (Bojana Bogovič Matijašić)

- Adria Medics (Slovenija) in Selur Pharma (Bolgarija): Identifikacija in raziskave probiotičnih lastnosti sevov *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* in *Streptococcus thermophilus* (Irena Rogelj) - sodelovanje pri izboljšavah procesa za proizvodnjo bioplina iz odpadnih pivovarskih substratov

v Pivovarni Laško (Romana Marinšek-Logar)

- Kontrola kakovosti probiotičnih izdelkov Waya (pogodba št. Z-MW01/10) z Medis d.d. Ljubljana

(Irena Rogelj)

- Validacija metode PMA-real time PCR za ugotavljanje števila *L. acidophilus* LA-5 in *Bif. animalis* ssp. *lactis* BB-12 v izdelku Linex Forte (Pogodba št. 003/10 z Lek farmacevtska družba d.d., Ljubljana, vodja projekta dr. Bojana Bogovič Matijašić)

- Sodelovanje z LPN Kozorog Kamnik, Vpliv različnih krmil na fermentacijo v prebavilih jelenov (*Cervus elaphus*), ulovljenih na dveh območjih, ki se močno razlikujeta glede naravnih prehranskih virov (Andrej Lavrenčič)

- Izvedba testov stabilnosti z metodo PMA real-time PCR za ugotavljanje števila *L. acidophilus* LA5 in *Bif. animalis* sp. *lactis* BB12 v izdelku Linex Forte (Pogodba št. 003/12), Lek farmacevtska družba d.d., Ljubljana, (Bojana Bogovič Matijašić).

15. Ocena tehnološke zrelosti rezultatov programa in možnosti za njihovo implementacijo v praksi (točka ni namenjena raziskovalnim programom s področij humanističnih ved)¹⁷

SLO

Rezultati programa so do neke mere že implementirani v prakso in sicer to velja za delo, v sklopu katerega je bil proučevan probiotični sev *Lactobacillus gasseri* K7. Ta je bil vključen v probiotični pripravek, ki se je pod komercialnim imenom Lyolact že tržil v tujini, proizvajalec pa je lociran v Bolgariji. Interes za probiotični sev so pokazali tudi nekateri drugi partnerji v tujini.

Tudi dva izolata iz črevesne sluznice, ki sta vključena v patentno prijavo iz leta 2013, nastalo v sodelavi s industrijskim partnerjem (Medis) in sta vključena v testne probiotične pripravke, sta blizu aplikacije v prehranskih dopolnilih.

Rezultati dela z rastlinskimi izvlečki, predvsem s tanini imajo še potencial za morebitno implementacijo v praksi, vendar so zaenkrat na še prenizki stopnji tehnološke zrelosti. Interes za razvoj teh produktov pa obstaja na strani slovenskih (Tanin Sevnica) in mednarodnih podjetij (Pancosma, Švica).

Postopek za predelavo pivovarniške kvasine v bioplinu, ki je patentno zaščiteno, je v bistvu tudi že implementiran v prakso.

Rezultati programa, ki se navezujejo na razvoj molekularnih metod za odkrivanje in detekcijo in kvantifikacijo posameznih sevov, vrst ali skupin mikroorganizmov, ter na testiranje probiotične aktivnosti mikroorganizmov so lahko za nadgradnjo tržne dejavnosti razvoja probiotičnih izdelkov in kontrole kakovosti probiotičnih izdelkov oziroma funkcionalnih živil, ki delno že poteka na Inštitutu za mlekarstvo in probiotike.

16. Ocenite, ali bi doseženi rezultati v okviru programa lahko vodili do ustanovitve spin-off podjetja, kolikšen finančni vložek bi zahteval ta korak ter kakšno infrastrukturo in opremo bi potrebovali

možnost ustanovitve spin-off podjetja	☐ DA ☒ NE
potrebni finančni vložek	
ocena potrebne infrastrukture in opreme ¹⁸	

17. Izjemni dosežek v 2013¹⁹

17.1. Izjemni znanstveni dosežek

RAJAPAKSE, Katarina, DROBNE, Damjana, KASTELEC, Damijana, MARINŠEK-LOGAR, Romana. Experimental evidence of false positive Comet test results due to TiO₂ particle - assay interactions. Nanotoxicology, ISSN 1743-5390, 2013, vol. 7, no. 5, str. 1043-1051. <http://dx.doi.org/10.3109/17435390.2012.696735>, doi: 10.3109/17435390.2012.696735.

17.2. Izjemni družbeno-ekonomski dosežek

--

C. IZJAVE

Podpisani izjavljam/o, da:

- so vsi podatki, ki jih navajamo v poročilu, resnični in točni
- se strinjamo z obdelavo podatkov v skladu z zakonodajo o varstvu osebnih podatkov za potrebe ocenjevanja in obdelavo teh podatkov za evidence ARRS
- so vsi podatki v obrazcu v elektronski obliki identični podatkom v obrazcu v papirnati obliki
- so z vsebino poročila seznanjeni in se strinjajo vsi izvajalci raziskovalnega programa

Podpisi:

*zastopnik oz. pooblaščen oseba JRO
in/ali RO s koncesijo:*

in

vodja raziskovalnega programa:

Univerza v Ljubljani, Biotehniška
fakulteta

Bojana Bogovič Matijašič

ŽIG

Kraj in datum:

Ljubljana, 11.4.2014	11.4.2014
----------------------	-----------

Oznaka prijave: ARRS-RPROG-ZP-2014/37

¹ Napišite povzetek raziskovalnega programa v slovenskem jeziku (največ 3.000 znakov vključno s presledki – približno pol strani, velikost pisave 11) in angleškem jeziku (največ 3.000 znakov vključno s presledki – približno pol strani, velikost pisave 11). [Nazaj](#)

² Napišite kratko vsebinsko poročilo, v katerem predstavite raziskovalno hipotezo in opis raziskovanja. Navedite ključne ugotovitve, znanstvena spoznanja, rezultate in učinke raziskovalnega programa in njihovo uporabo ter sodelovanje s tujimi partnerji. Največ 12.000 znakov vključno s presledki (približno dve strani, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

³ Realizacija raziskovalne hipoteze. Največ 3.000 znakov vključno s presledki (približno pol strani, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

⁴ V primeru bistvenih odstopanj in sprememb od predvidenega programa dela raziskovalnega programa, kot je bil zapisan v predlogu raziskovalnega programa oziroma v primeru sprememb, povečanja ali zmanjšanja sestave programske skupine v zadnjem letu izvajanja raziskovalnega programa, napišite obrazložitev. V primeru, da sprememb ni bilo, to navedite. Največ 6.000 znakov vključno s presledki (približno ena stran, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

⁵ Navedite znanstvene dosežke (največ pet), ki so nastali v okviru tega programa. Raziskovalni dosežek iz obdobja izvajanja programa (do oddaje zaključnega poročila) vpišete tako, da izpolnite COBISS kodo dosežka – sistem nato sam izpolni naslov objave, naziv, IF in srednjo vrednost revije, naziv FOS področja ter podatek, ali je dosežek uvrščen v A" ali A'. [Nazaj](#)

⁶ Navedite družbeno-ekonomske dosežke (največ pet), ki so nastali v okviru tega programa. Družbeno-ekonomski dosežek iz obdobja izvajanja programa (do oddaje zaključnega poročila) vpišete tako, da izpolnite COBISS kodo dosežka – sistem nato sam izpolni naslov objave, naziv, IF in srednjo vrednost revije, naziv FOS področja ter podatek, ali je dosežek uvrščen v A" ali A'.

Družbeno-ekonomski dosežek je po svoji strukturi drugačen kot znanstveni dosežek. Povzetek znanstvenega dosežka je praviloma povzetek bibliografske enote (članka, knjige), v kateri je dosežek objavljen.

Povzetek družbeno-ekonomskega dosežka praviloma ni povzetek bibliografske enote, ki ta dosežek dokumentira, ker je dosežek sklop več rezultatov raziskovanja, ki je lahko dokumentiran v različnih bibliografskih enotah. COBISS ID zato ni enoznačen, izjemoma pa ga lahko tudi ni (npr. prehod mlajših sodelavcev v gospodarstvo na pomembnih raziskovalnih nalogah, ali ustanovitev podjetja kot rezultat programa ... - v obeh primerih ni COBISS ID). [Nazaj](#)

⁷ Navedite rezultate raziskovalnega programa iz obdobja izvajanja programa (do oddaje zaključnega poročila) v primeru, da katerega od rezultatov ni mogoče navesti v točkah 6 in 7 (npr. ker se ga v sistemu COBISS ne vodi). Največ 2.000 znakov vključno s presledki (približno 1/3 strani, velikost pisave 11). [Nazaj](#)

⁸ Pomen raziskovalnih rezultatov za razvoj znanosti in za razvoj Slovenije bo objavljen na spletni strani: <http://sicris.izum.si/> za posamezen program, ki je predmet poročanja. [Nazaj](#)

⁹ Največ 4.000 znakov vključno s presledki. [Nazaj](#)

¹⁰ Največ 4.000 znakov vključno s presledki. [Nazaj](#)

¹¹ Upoštevajo se le tiste diplome, magisteriji znanosti in doktorati znanosti (zaključene/i v obdobju 1. 1. 2009 – 31. 12. 2013), pri katerih so kot mentorji sodelovali člani programske skupine. [Nazaj](#)

¹² Vpišite število opravljenih diplom v času trajanja raziskovalnega programa glede na vrsto usposabljanja. [Nazaj](#)

¹³ Vpišite šifro raziskovalca in/ali ime in priimek osebe, ki je v času trajanja raziskovalnega programa pridobila naziv magister znanosti in/ali doktor znanosti ter označite doseženo izobrazbo. V primeru, da se je oseba usposabljala po programu Mladi raziskovalci, označite MR. [Nazaj](#)

¹⁴ Za mlade raziskovalce, ki ste jih navedli v tabeli 11.2. točke (usposabljanje so uspešno zaključili v obdobju od 1. 1. 2009 do 31. 12. 2013), ustrezno označite, kje so se zaposlili po zaključenem usposabljanju. [Nazaj](#)

¹⁵ Navedite naslove projektov in ime člana programske skupine, ki je bil vodja/koordinator navedenega projekta. Točko izpolnijo tudi izvajalci raziskovalnega programa, prejemniki sredstev iz naslova dodatnega letnega sofinanciranja raziskovalnega programa zaradi mednarodnega sodelovanja (sodelovanja v projektih okvirnih programov Evropske unije). Izvajalec, ki je na podlagi pogodbe prejel sredstva iz navedenega naslova, vsebinsko opiše porabo prejetih sredstev za financiranje stroškov blaga in storitev ter amortizacije, nastalih pri izvajanju tega raziskovalnega programa. V primeru, da so bili v okviru raziskovalnega programa prejemniki sredstev različni izvajalci, vsak pripravi vsebinsko poročilo za svoj delež pogodbenih sredstev. Vodja raziskovalnega programa poskrbi, da je vsebinsko poročilo, ločeno za vsakega izvajalca, vključeno v navedeno točko poročila. Največ 6.000 znakov vključno s presledki (približno ena stran, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

¹⁶ Navedite naslove projektov, ki ne sodijo v okvir financiranja ARRS (npr: industrijski projekti, projekti za druge naročnike, državno upravo, občine idr.) in ime člana programske skupine, ki je bil vodja/koordinator navedenega projekta. Največ 3.000 znakov vključno s presledki (približno pol strani, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

¹⁷ Opišite možnosti za uporabo rezultatov v praksi. Opišite izdelke oziroma tehnologijo in potencialne trge oziroma tržne niše, v katere sodijo. Ocenite dodano vrednost izdelkov, katerih osnova je znanje, razvito v okviru programa oziroma dodano vrednost na zaposlenega, če jo je mogoče oceniti (npr. v primerih, ko je rezultat izboljšava obstoječih tehnologij oziroma izdelkov). Največ 3.000 znakov vključno s presledki (približno pol strani, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

¹⁸ Največ 1.000 znakov vključno s presledki (približno 1/6 strani, velikost pisave 11) [Nazaj](#)

¹⁹ Navedite en izjemni znanstveni dosežek in/ali en izjemni družbeno-ekonomski dosežek raziskovalnega programa v letu 2013 (največ 1000 znakov, vključno s presledki, velikost pisave 11). Za dosežek pripravite diapozitiv, ki vsebuje sliko ali drugo slikovno gradivo v zvezi z izjemnim dosežkom (velikost pisave najmanj 16, približno pol strani) in opis izjemnega dosežka (velikost pisave 12, približno pol strani). Diapozitiv/-a priložite kot priponko/-i k temu poročilu. Vzorec diapozitiva je objavljen na spletni strani ARRS <http://www.arrs.gov.si/sl/gradivo/>, predstavitev dosežkov za pretekla leta pa so objavljena na spletni strani <http://www.arrs.gov.si/sl/analize/dosez/>. [Nazaj](#)

Obrazec: ARRS-RPROG-ZP/2014 v1.00a

D1-B2-1A-36-D4-D3-7B-36-48-DB-5A-73-94-5C-9B-0F-AB-14-A5-8F

Priloga 1

BIOTEHNIKA

Področje: 4.02 – Živalska produkcija in predelava

Dosežek 1: Eksperimentalni dokazi o lažno pozitivnih rezultatih Comet testa zaradi delcev TiO_2 - testne interakcije, Vir: RAJAPAKSE, Katarina, DROBNE, Damjana, KASTELEC, Damijana, MARINŠEK-LOGAR, Romana. Experimental evidence of false positive Comet test results due to TiO_2 particle - assay interactions. *Nanotoxicology*, ISSN 1743-5390, 2013, vol. 7, no. 5, str. 1043-1051. doi: [10.3109/17435390.2012.696735](https://doi.org/10.3109/17435390.2012.696735).

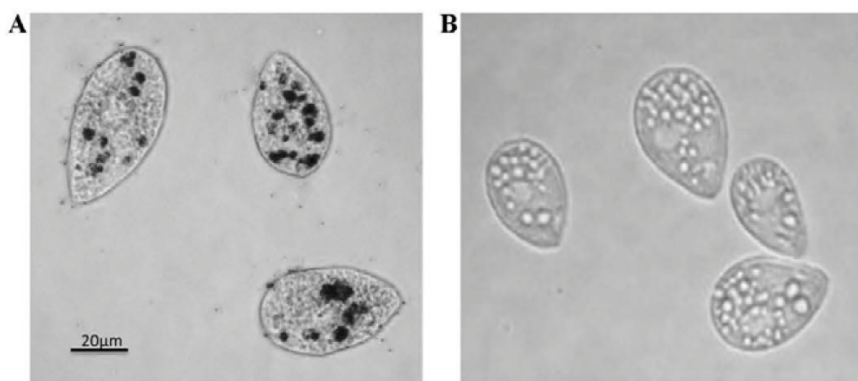


Fig. 2. Food vacuoles filled with particles were first visible under a light microscope after 4 h at exposure concentrations higher than 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of TiO_2 (A). Control cells with visible vacuoles, however were not filled with dark matter (TiO_2) (B).

V tej študiji smo ugotavljali genotoksičnost delcev TiO_2 pri mikroorganizmu *Tetrahymena thermophila* s kometnim testom, ki je zelo pogosta in sodobna metoda za dokazovanje poškodb jedrne DNA. Celice smo dvema različnima koncentracijama nanodelcev TiO_2 in delcev TiO_2 večjih od 100 nm izpostavili na tri različne načine: a) celice v suspenziji, b) celice vklopljene v gel c) jedra vklopljena v gel. Pri vseh treh izpostavitvah smo s kometnim testom dokazali genotoksičnost, nismo pa dokazali drugih kazalcev citotoksičnosti, kot so: lipidna peroksidacija, koncentracija reaktivnih kisikovih zvrsti, spremembe v profilih dolgoverižnih maščobnih kislin. Znanstvena poročila navajajo, da je v primeru odsotnosti citotoksičnosti, genotoksičnost posredna. Možna razlaga za pozitivne rezultate genotoksičnosti v naši študiji je lažno pozitiven rezultat kometnega testa zaradi interakcij med delci TiO_2 in DNA po opravljeni izpostavitvi mikroorganizma *T. thermophila*. Predlagamo uporabo acelularnega kometnega testa za preverjanje možnosti nastanka lažno pozitivnih rezultatov pri kometnem testu, saj je glede na dokaze v pričujočem delu, pomembno predvideti interakcije nanodelcev z DNA in posledično poškodbe. Z našim delom smo prvič dokazali, da je rezultate kometnega testa pri nanodelcih potrebno previdno interpretirati.