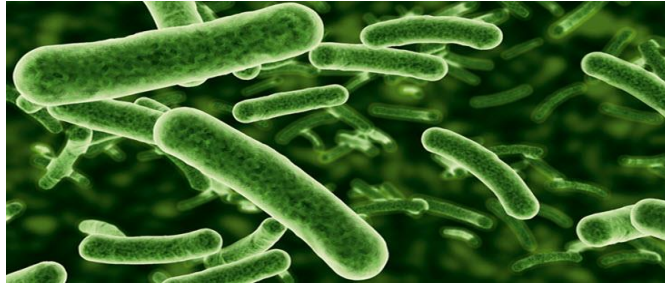


ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«Μελέτη του προβιοτικού δυναμικού οξυγαλακτικών βακτηρίων από ζυμώμενες ελιές και ανίχνευση μορίων σημάτων επικοινωνίας (Quorum Sensing, QS)»



Τασούλα Ε. Βασιλική

Επιβλέπων: Γεώργιος-Ιωάννης Νοχάς , Καθηγητής ΓΠΑ

ΑΘΗΝΑ

2017

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**«Μελέτη του προβιοτικού δυναμικού οξυγαλακτικών βακτηρίων από ζυμώμενες
ελιές και ανίχνευση μορίων σημάτων επικοινωνίας (Quorum Sensing, QS)»**

Τασούλα Ε. Βασιλική

Επιβλέπων: Γεώργιος-Ιωάννης Νυχάς , Καθηγητής ΓΠΑ

ΑΘΗΝΑ

2017

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«Μελέτη του προβιοτικού δυναμικού οξυγαλακτικών βακτηρίων από ζυμώμενες ελιές και ανίχνευση μορίων σημάτων επικοινωνίας (Quorum Sensing, QS)»

Τασούλα Ε. Βασιλική

Επιβλέπων: Γεώργιος-Ιωάννης Νυχάς , Καθηγητής ΓΠΑ

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

Επιβλέπων: : Γεώργιος Γ. Νυχάς, Καθηγητής ΓΠΑ Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων

Μέλη: Ευστάθιος Πανάγου, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων

Ελευθέριος Δροσινός, Καθηγητής ΓΠΑ Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου Τροφίμων και Ποτών

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι επιτραπέζιες ελιές θεωρούνται ένα από τα πιο διαδεδομένα παραδοσιακά προϊόντα ζυμούμενων τροφίμων κυρίως στις χώρες της μεσογειακής λεκάνης. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια και οι ζύμες παίζουν κυρίαρχο ρόλο στη διάρκεια της ζύμωσης αυτών των προϊόντων. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια όπως τα στελέχη του γένους *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* και *Leuconostoc* είναι η πιο σημαντική ομάδα των βακτηρίων στις ελιές, όπως και οι ζυμομύκητες που επηρεάζουν την πορεία της ζύμωσης. Στην παρούσα μελέτη, έγινε προσπάθεια ανάδειξης του προβιοτικού δυναμικού οξυγαλακτικών βακτηρίων απομονωμένων από ζυμούμενες ελιές της ποικιλίας Κονσερβολιά, μέσω *in vitro* δοκιμών.

Η αξιολόγηση έγινε με διάφορες δοκιμές όπως η ανθεκτικότητα σε χαμηλό pH, η ανθεκτικότητα σε χολικά άλατα, η υδρόλυση χολικών αλάτων, η αιμολυτική δραστηριότητα, η αντιμικροβιακή δράση ενάντια σε παθογόνους μικροοργανισμούς και η ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά. Με την ολοκλήρωση αυτών των δοκιμασιών διαπιστώθηκε πως ορισμένα στελέχη πληρούσαν τις απαιτήσεις για να χαρακτηριστούν ως πιθανά προβιοτικά βακτήρια που προάγουν την υγεία του ξενιστή τους. Είναι λοιπόν πιθανόν μελλοντικά και μετά από εκτεταμένες έρευνες να προστεθούν στον κατάλογο με τα προβιοτικά στελέχη που χρησιμοποιούνται ως εναρκτήριες καλλιέργειες σε προηγμένες επιχειρήσεις τροφίμων και να αξιοποιηθούν με τον τρόπο αυτό στα τρόφιμα καθημερινής κατανάλωσης. Στο δεύτερο πείραμα έγινε ανίχνευση αίσθησης απαρτίας μέσω της παραγωγής μορίων σημάτων αυτεπαγωγέων τύπου 2 (AI-2) από οξυγαλακτικά βακτήρια. Η παραγωγή αυτεπαγωγέων τύπου 2 θεωρείται ότι γίνεται για την επικοινωνία των βακτηριακών κυττάρων καθώς παράγονται όταν ο πληθυσμός τους βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις, όπως επίσης και για άλλους σκοπούς οι οποίοι δεν είναι ακόμα ξεκάθαροι. Το βακτήριο *Vibrio harveyi* το οποίο είναι ένα Gram –αρνητικό θαλάσσιο βακτήριο υπήρξε από τα πρώτα βακτήρια στα οποία μελετήθηκε για πρώτη φορά η αίσθηση απαρτίας, καθώς έχουν την ξεχωριστή ιδιότητα να παράγουν φως σε υψηλές συγκεντρώσεις πληθυσμού. Επίσης μια ακόμη αξιολογη ιδιότητα που έχει το *Vibrio harveyi* είναι ότι παράγει και αναγνωρίζει τους αυτεπαγωγείς. Στην παρούσα μελέτη, έγιναν δοκιμές με δύο διαφορετικά μέσα ανάπτυξης για την ανίχνευση αυτεπαγωγέων τύπου 2, το ¼ quarter strength BHI και το m.MRS. Στο θρεπτικό μέσο ¼ quarter strength BHI, η ανίχνευση AI-2 ήταν δύσκολη διότι περιέχει γλυκόζη, η παρουσία της οποίας εμποδίζει την απορρόφηση του συγκεκριμένου μήκους κύματος με αποτέλεσμα μόνο ένα από τα εξεταζόμενα οξυγαλακτικά βακτήρια να παράγει σημαντική ποσότητα AI-2. Στο θρεπτικό μέσο mMRS όπου η γλυκόζη έχει αντικατασταθεί από γαλακτόζη, οι καλλιέργειες και οι μετρήσεις έγιναν σε συνθήκες στρες για τα βακτήρια όπως συγκέντρωση χολικών αλάτων και περιβάλλον χαμηλού pH. Στην περίπτωση αυτή παρατηρήθηκε αύξηση αυτεπαγωγέων τύπου 2 ιδιαίτερα σε χαμηλό pH.

Λέξεις κλειδιά: Προβιοτικά, Οξυγαλακτικά βακτήρια, Αίσθηση απαρτίας, αυτεπαγωγείς τύπου 2

ABSTRACT

Table olives are considered to be one of the most widespread traditional products of fermented foods mainly in the countries of the Mediterranean era. Lactic acid bacteria and yeasts play a dominant role during the fermentation of these products. Lactic acid bacteria such as strains of the genus *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* and *Leuconostoc* are the most important group of bacteria in olives, as well as yeasts that influence the course of fermentation. In the present study, an attempt was made to highlight the probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from fermented olives of the Conservolia variety through in vitro tests.

Evaluation was made by various tests such as low pH resistance, bile resistance, bile hydrolysis, hemolytic activity, antimicrobial activity against pathogenic microorganisms and resistance to antibiotics. Upon completion of these tests, it was found that certain strains met the requirements to be classified as probiotic bacteria that promote the health of their host. It is therefore likely that in the future and after extensive research, they will be added to the list of probiotic strains used as starter cultures in advanced food businesses and thus used in everyday food.

In the second experiment an attempt was made to detect quorum sensing through the production of type 2 (AI-2) signal molecules from acid bacterial bacteria. The production of type 2 inducers is considered to be for the communication of bacterial cells as they are produced when their population is in high concentrations, as well as for other purposes that are not yet clear. The *Vibrio harveyi* bacterium, a Gram-negative marine bacterium, has been one of the first bacteria to study the quorum sensing for the first time since it has the distinct property of generating light in high concentrations of the population. Another remarkable feature of *Vibrio harveyi* is that it produces and recognizes the autoinducers. In the present study, two different growth media were tested for the detection of type 2 inducers, ¼ quarter strength BHI and m.MRS. In the ¼ quarter strength BHI medium, AI-2 detection was difficult because it contains glucose, the presence of which prevents the absorption of the particular wavelength, with the result that only one of the tested bacterial bacteria could produce a significant amount of AI-2. In the mMRS medium where glucose has been replaced by galactose, cultures and measurements were made under stress conditions for bacteria such as bile salt concentration and low pH environment. In this case, an increase in type 2 autoinducers was observed especially in the case of low pH.

Keywords: Probiotics, Lactic acid Bacteria, Quorum sensing, autoinducer AI-2

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Γεώργιο Γ. Νυχά για την επιστημονική υποστήριξη, την καθοδήγηση και τις πολύτιμες συμβουλές κατά τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής. Επίσης θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για το χρόνο που αφιέρωσε, το ενδιαφέρον και τις καίριες υποδείξεις του για τη συγγραφή της παρούσας διατριβής.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τους κ. Ευστάθιο Πανάγου Επίκουρο Καθηγητή ΓΠΑ και κ. Ελευθέριο Δροσινό, Καθηγητή ΓΠΑ που δέχθηκαν να συμμετέχουν στην τριμελή εξεταστική επιτροπή.

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην υποψήφια διδάκτορα Φωτεινή Παυλή η οποία με την επιστημονική της κατάρτιση και τις υποδείξεις της μου προσέφερε πολύτιμη βοήθεια σε όλα τα στάδια των πειραμάτων και στη συγγραφή της παρούσας διατριβής.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλα τα μέλη του Εργαστηρίου για την πολύ καλή συνεργασία που είχα μαζί τους, τους μεταπτυχιακούς συμφοιτητές-φίλους μου για την στήριξη και την κατανόηση μέχρι τέλους.

Τέλος ευχαριστώ θερμά την οικογένειά μου για την αγάπη τους, την εμπιστοσύνη και την υποστήριξη τους σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Βασιλική Ε. Τασούλα

Αθήνα, Μάιος 2017

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	6
1. Η Ελιά ως τρόφιμο	6
1.1. Ιστορικά στοιχεία	6
1.2. Βοτανικά στοιχεία.....	7
1.3. Δομή και Χημική Σύσταση Ελαιόκαρπου	8
1.4. Διατροφική αξία της ελιάς.....	10
2. Τα Όξυγαλακτικά Βακτήρια	12
2.1. Ταξινόμηση – Μεταβολισμός – Κύρια Γένη	12
2.2. Η μικροβιακή ζύμωση των ελιών και οι υπεύθυνοι μικροοργανισμοί.....	16
2.3. Ορισμός Προβιοτικών.....	19
2.4. Τρόπος Δράσης των Προβιοτικών	21
2.5. Προβιοτικοί Μικροοργανισμοί που Χρησιμοποιούνται στο Εμπόριο.....	21
2.6. Κριτήρια Επιλογής Προβιοτικών Μικροοργανισμών.....	22
2.7. Θετικές Επιδράσεις των Προβιοτικών Μικροοργανισμών	24
3. Αίσθηση Απαρτίας (QS) και Αυτεπαγωγείς τύπου 2 (AI-2)	27
3.1. Αίσθηση απαρτίας – Quorum sensing (QS)	27
3.2. Ο ρόλος της αίσθησης απαρτίας στις κοινωνικές δραστηριότητες και στην εξέλιξη των βακτηρίων	28
3.3. <i>Vibrio harveyi</i>	30
3.4. Αυτεπαγωγείς τύπου 2 (AI-2)	32
3.5. Τύποι μορίων- σημάτων επικοινωνίας.....	34
3.6 Τύποι συστημάτων επικοινωνίας	35
3.7. Σκοπός της παρούσας μελέτης	37
<p>Ο σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης ήταν η μελέτη του προβιοτικού δυναμικού οξυγαλακτικών βακτηρίων απομονωμένων από ζυμώμενες ελιές της ποικιλίας Κονσερβολιά, μέσω <i>in vitro</i> δοκιμών. Πιο συγκεκριμένα μελετήθηκε η ανθεκτικότητα σε χαμηλό pH, η ανθεκτικότητα σε χολικά άλατα, η υδρόλυση χολικών αλάτων, η αιμολυτική δραστηριότητα, η αντιμικροβιακή δράση ενάντια σε παθογόνους μικροοργανισμούς και η ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά. Επίσης μελετήθηκε η ανίχνευση μορίων σημάτων (αυτεπαγωγείς τύπου 2 (AI-2)), οι οποίοι παρήχθησαν από οξυγαλακτικά στελέχη βακτηρίων, υπό άριστες συνθήκες ανάπτυξης σε δύο διαφορετικά μέσα ανάπτυξης καθώς και υπό συνθήκες καταπόνησης που προσομοιάζουν αυτές του γαστρεντερικού συστήματος.....</p>	
B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	38
4. Υλικά και Μέθοδοι	38
4.3. Μελέτη προβιοτικού δυναμικού οξυγαλακτικών βακτηρίων	42

4.4.	Διαδικασία μέτρησης Βιοφωταύγειας (ανίχνευσης μορίων AI-2).....	44
4.5.	Αποτελέσματα και Συζήτηση	48
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	66

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 2.5.1. Μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται ως προβιοτικές καλλιέργειες.....	22
Πίνακας 4.1.1. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια που μελετήθηκαν και τα δύο προβιοτικά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες.....	38
Πίνακας 4.1.2. Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν.....	40
Πίνακας 4.3.1. ^a FMCC: Food Microbiology Culture Collection (Βάση Μικροοργανισμών Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων), ^b Χαρακτηριστικά που σχετίζονται με τη χρήση των συγκεκριμένων στελεχών στην παρούσα μελέτη.....	40
Πίνακας 4.5.3.1 Υδρόλυση χολικών αλάτων από τα οξυγαλακτικά στελέχη υπό εξέταση.....	51
Πίνακας 4.5.4.1 Αντιμικροβιακή δράση ενάντια στα παθογόνα: <i>Escherichia coli</i> B13, B18, B289, B453, <i>Salmonella</i> Enteritidis B286, <i>Salmonella enterica</i> B56, B64, B193, <i>Listeria monocytogenes</i> B122, B124, B154, B411.....	53
Πίνακας 4.5.5.1 Η πλειονότητα των στελεχών δημιουργούσε γ-αιμόλυση, ενώ μόνο το στέλεχος B379 δημιουργούσε α-αιμόλυση.....	55
Πίνακας 4.5.6.1 Η αντίσταση των στελεχών των οξυγαλακτικών βακτηρίων στα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν και στην αντίστοιχη συγκέντρωση.....	57
Πίνακας 4.5.8.1. Τα στελέχη των οξυγαλακτικών βακτηρίων στα οποία έγιναν οι δοκιμές χολικών αλάτων 0%, 0.5% και 2% και χαμηλού pH 2, 4 και 6.5.....	63

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΓΡΑΦΗΜΜΑΤΩΝ

Γράφημα 4.5.1.1. Απαρίθμηση πληθυσμού μετά από επώαση σε pH 2.5 στους 37°C για 0 και 3 ώρες.....	48
Γράφημα 4.5.1.2 Απαρίθμηση πληθυσμού μετά από επώαση σε pH 2.5 στους 37°C για 0, 1, 2 και 3 ώρες.....	49
Γράφημα 4.5.2.2. Απαρίθμηση πληθυσμού μετά από επώαση στους 37°C, παρουσία χολικών αλάτων για 0, 1, 2, 3 και 4 ώρες.....	50
Γράφημα 4.5.7.1. Σχετική δραστηριότητα AI-2 μετά από 20 ώρες επώασης στους 30°C για τα στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων B355, B356, B357, 359, B360, B361, B362, B363, B364, B365, B366, B367, B368, B369, B370 σε θεραπευτικό μέσο ¼ quarter strength BHI.....	61
Γράφημα 4.5.7.2. Σχετική δραστηριότητα AI-2 μετά από 20 ώρες επώασης στους 30°C για τα στελέχη οξυγαλακτικών B371, B372, B373, B374, B375, B376, B377, B378, B379, B380, B381, B382, B383, B384, B385, B386 σε θεραπευτικό μέσο ¼ quarter strength BHI	61
Γράφημα 4.5.7.3. Σχετική δραστηριότητα AI-2 μετά από 20 ώρες επώασης στους 30°C για τα στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων B387, B389, B390, B391, B392, B393, B394, B395, B396, B397, B398, B399, B400, B401, B402, B403 σε θεραπευτικό μέσο ¼ quarter strength BHI.....	62
Γράφημα 4.5.8.2. Σχετική δραστηριότητα AI-2 μετά από 90 λεπτά στους 37°C σε θεραπευτικό μέσο modified MRS και σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις χολικών αλάτων: 0%, 0.5% και 2%. Τα στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων που έδειξαν αντοχή σε περιβάλλον με συγκεντρώσεις χολικών αλάτων: B356, B362, B363, B364, B366, B368, B370, B371, B372, B373, B375, B376, B377, B378, B379, B380, B381, B382, B385, B387, B399, B384.....	64
Γράφημα 4.5.9.1. Σχετική δραστηριότητα AI-2 μετά από 60 λεπτά στους 37°C σε θεραπευτικό μέσο modified MRS και σε τρεις διαφορετικές τιμές pH 2, 4 και 6.5. Για τα στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων που έδειξαν αντοχή σε όξινο περιβάλλον: B356, B362, B363, B364, B366, B368, B370, B371, B372, B373, B375, B376, B377, B378, B380, B381, B382, B384, B385, B387.....	65

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 2.1.1. Τα μονοπάτια του μεταβολισμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων...	16
Εικόνα 2.3.1. Άποψη προβιοτικών βακτηρίων από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης.....	19
Εικόνα 3.3.1. Το σύστημα ανίχνευσης της απαρτίας του <i>V.harveyi</i> . Οι καταστάσεις χαμηλής και υψηλής κυτταρικής πυκνότητας του συστήματος επικοινωνίας του <i>V. harveyi</i> παρουσιάζονται στο σχήμα (Α και Β, αντίστοιχα). Το 'Ρ' στον κύκλο υποδηλώνει ότι η μεταγωγή σήματος λαμβάνει χώρα με τη βοήθεια φωσφορυλίωσης. Τα AI-1 και AI-2 απεικονίζονται ως πεντάγωνα και τρίγωνα, αντίστοιχα.....	31
Εικόνα 3.4.1. Ο τρόπος που επιτυγχάνεται η αίσθηση απαρτίας για το <i>Vibrio harveyi</i> μέσω της παραγωγής αυτεπαγωγέων τύπου 2.....	34
Εικόνα 3.5.1. Χημικές δομές των μορίων σήματος ανίχνευσης απαρτίας: (Α) νισίνη από <i>L. lactis</i> ,) (επάνω) αυτό-επαγωγικό πεπτίδιο-1 (AIP-1) από <i>S. aureus</i> και (κάτω) σχηματικές δομές σταφυλόκοκκων AIPs. (C) ComX από <i>B. Subtilis</i> RO-E-2; Δ) AIP από <i>Lactobacillus plantarum</i> , Και (ε) 28-μελή AIP από <i>E. Faecalis</i> ...	35
Εικόνα 3.6.1. Οι τρεις βασικοί τύποι συστημάτων επικοινωνίας της αίσθησης απαρτίας.....	36
Εικόνα 4.4.1. Αδιαφανές πλακίδιο μclear 96 βοθρίων που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση Βιοφωταύγειας.....	45
Εικόνα 4.4.2. Φωτόμετρο Synergy HT – Multimode Microplate reader της εταιρίας Bioteck, που χρησιμοποιήθηκε για τις μετρήσεις Βιοφωταύγεια.....	46
Εικόνα 4.5.3.2. Υδρόλυση χολικών αλάτων όπως παρατηρήθηκε στο εργαστήριο μετά από αλλαγή της υφής της καλλιέργειας σε σύγκριση με τον μάρτυρα.....	52
Εικόνα 4.5.4.2 Το υπερκείμενο των υπό εξέταση οξυγαλακτικών στελεχών (CFCS) ερευνήθηκε για τη δράση του ενάντια στα παθογόνα χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της διάχυσης μέσω βοθρίων (well diffusion assay).....	54
Εικόνα 4.5.5.2 Το στέλεχος B379 που δημιούργησε α-αιμόλυση.....	56
Εικόνα 4.5.5.3 Ένα από τα στελέχη που δημιούργησε γ-αιμόλυση.....	56
Εικόνα 4.5.6.2 Τα οξυγαλακτικά βακτήρια εμβολιάστηκαν σε ζωμό MRS, το οποίο περιείχε αντιβιοτικά σε διάφορες συγκεντρώσεις και έγινε εύρυνα για ανίχνευση της ανάπτυξή τους σε microplate reader (OD στα 610nm) μετά από 24 ώρες επώασης στους 30°C	59

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η Ελιά ως τρόφιμο

1.1. Ιστορικά στοιχεία

Η ελιά θεωρείται ένα από τα αρχαιότερα καλλιεργούμενα δένδρα στον κόσμο. Η γέννηση της καλλιέργειας της ελιάς βρίσκεται στους μύθους και στις παραδόσεις. Η πρώτη αναφορά στο δένδρο της ελιάς βρίσκεται στη Βίβλο, στο πρώτο βιβλίο Γένεσης, όπου περιγράφεται ότι ένα περιστέρι πέταξε με κλαδί ελιάς ανακοινώνοντας έτσι το τέλος της πλημμύρας (Loussert and Brousse, 1980).

Μέχρι και σήμερα δεν έχει προσδιοριστεί με ακρίβεια το αρχικό είδος από το οποίο έχει προέλθει το δένδρο της ελιάς όπως το γνωρίζουμε σήμερα. Υπάρχουν δυο εκδοχές που προσδιορίζουν την πιθανή προέλευση της ελιάς. Η μια ορίζει ότι προέρχεται από την αγριελιά που συναντάται μέχρι και σήμερα σε άγρια κατάσταση στη βόρεια Αφρική, στην Πορτογαλία, στη νότια Γαλλία, στην Ιταλία και στις περιοχές της Μαύρης Θάλασσας. Και η άλλη ορίζει ως τόπο προέλευσης της ελιάς την τροπική Αφρική και ότι προέρχεται από το είδος *Olea chrysoxylla*. Ανεξάρτητα από την προέλευσή της, η ελιά είναι γεγονός ότι εξαπλώθηκε σε πάρα πολύ μεγάλη έκταση στην ευρωπαϊκή ήπειρο και πιθανολογείται ότι αυτός είναι ο λόγος της ονομασίας *Olea europaea* (ελιά η ευρωπαϊκή) (Κυριτσάκης, 1993).

Η καλλιέργεια της ελιάς εξαπλώθηκε σε όλη τη λεκάνη της Μεσογείου και σε αυτό συνέβαλλαν διάφοροι πολιτισμοί της Μεσογείου όπως οι Φοίνικες, οι Έλληνες και οι Εβραίοι. Εκτός από τη Μεσόγειο οι άποικοι επέκτειναν τη φύτευση των ελαιόδεντρων και τη διαδικασία παραγωγής των ελιών σε χώρες του τότε νέου κόσμου όπως στην Καλιφόρνια, Μεξικό και Σαν Ντιέγκο. Κατά τον ίδιο τρόπο ο μισθοφόροι μετέφεραν το ελαιόδεντρο και το διάδωσαν σε χώρες όπως η Αυστραλία, η νότια Αφρική καθώς και σε χώρες της Άπω Ανατολής όπως την Ιαπωνία (Connell, 1994). Η ελιά στην αρχαία Ελλάδα θεωρούνταν ένα από τα πιο σημαντικά δένδρα καθώς δινόταν μεγάλη σημασία στην καλλιέργειά της. Μεγάλοι συγγραφείς της εποχής είχαν ασχοληθεί με την παραγωγή της ελιάς και την σημαντικότητά της για τον άνθρωπο. Ένα κλαδί ελιάς αποτελούσε εξαιρετική διάκριση καθώς δινόταν στους νικητές των ολυμπιακών αγώνων. Ακόμη συνδεόταν με τη διατροφή τους, τη θρησκεία, τη διακόσμηση των αγγείων, των τοίχων και των χρυσών κομμοτεχνημάτων. Η ελιά αποτελούσε και αποτελεί και στη σημερινή Ελλάδα ένα σύμβολο ειρήνης και φιλίας ανάμεσα στους λαούς (Κυριτσάκης, 1993).

Η ελαιοκαλλιέργεια υπήρξε η κυριότερη καλλιέργεια σε όλη τη λεκάνη της Μεσογείου, καθώς η ελιά υπήρξε η βασικότερη τροφή για τον άνθρωπο και σημαντικό εμπορεύσιμο προϊόν. Η Ελλάδα είναι μια από τις σημαντικότερες χώρες στον τομέα της ελαιοκαλλιέργειας και κατατάσσεται σε παγκόσμια κλίμακα στην τρίτη θέση σε παραγωγή λαδιού και στη δεύτερη θέση σε παραγωγή βρώσιμης ελιάς (Κυριτσάκης, 1993).

Η ελαιοκαλλιέργεια στη χώρα μας είναι μια από τις πιο διαδεδομένες γεωργικές καλλιέργειες καθώς επικρατούν κατάλληλες περιβαλλοντολογικές και γεωλογικές συνθήκες για την παραγωγή αρίστης ποιότητας καρπού. Η οικονομική σημασία της παραγωγής ελιάς στην Ελλάδα είναι μεγάλη, καθώς προσφέρει οφέλη όπως την εξασφάλιση απασχόλησης εργατικού δυναμικού στις αγροτικές περιοχές και τη διατήρηση της γεωργικής δραστηριότητας σε άγονα εδάφη που δεν είναι δυνατή άλλου είδους καλλιέργεια (Κυριτσάκης, 2007).

1.2. Βοτανικά στοιχεία

Η ελιά ανήκει στην οικογένεια των Oleaceae και η βοτανική λατινική ονομασία της είναι *Olea europaea*. Ένα από τα χαρακτηριστικά των ειδών του γένους *Olea* sp. είναι η μακροζωία τους, που μπορεί να ξεπεράσει και τα 100 χρόνια, χωρίς μάλιστα να σταματήσει ή να μειωθεί η παραγωγικότητα αυτών των δένδρων. Η ελιά είναι ένα δένδρο που αντέχει σε ξηρές και θερμές περιοχές καθώς και σε άγονα εδάφη. Επίσης έχει την ικανότητα να βλαστάνει ξανά μετά από τραυματισμό ή καταστροφές του υπέργειου τμήματός της (Κυριτσάκης, 1993).

Το είδος *Olea europaea* περιλαμβάνει τουλάχιστον 5 υποείδη: *Olea europaea* subsp. *europaea* (Ευρώπη), *Olea europaea* subsp. *cuspidata* (Αφρική, Ιράν, Κίνα), *Olea europaea* subsp. *guanchica* (Κανάρια), *Olea europaea* subsp. *maroccana* (Μαρόκο), *Olea europaea* subsp. *laperrinei* (Αλγερία, Σουδάν, Νιγηρία, Ινδία). Υπάρχουν δεκάδες καλλιεργούμενες ποικιλίες ελιάς οι οποίες χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με την χρήση τους:

- ποικιλίες που παράγουν καρπό μόνο για βρώση (επιτραπέζιες ελιές)
- ποικιλίες που παράγουν καρπό μόνο για την παραγωγή ελαιολάδου
- ποικιλίες που παράγουν καρπό για διπλή χρήση, δηλαδή για ελαιοποίηση και για βρώση ως επιτραπέζιες ελιές (Μπαλατσούρας, 1995).

Η *Olea europaea* είναι ένα μεσαίου μεγέθους δένδρο αειθαλές που αναπτύσσεται σε μεσογειακό κλίμα, στη νότια Αυστραλία, σε μερικά μέρη στη Νέα Ζηλανδία, στην Αμερική, στη νότια Αφρική και σε μικρότερη έκταση σε άλλες χώρες. Τα δένδρα της ελιάς, ανάλογα με την ποικιλία και τις συνθήκες ανάπτυξης μπορεί να φτάσουν στο ύψος των 15-20 m, ωστόσο για καλύτερο χειρισμό κατά την διαδικασία συγκομιδής προτιμάται ύψος δένδρου 3-6 m. Το δένδρο της ελιάς δίνει καρπούς οι οποίοι είναι πικροί λόγω της παρουσίας του γλυκοσιδίου ελευρωπαΐνη. Τα δένδρα της ελιάς, χρειάζονται αρκετά κρύο χειμώνα για την καρπόδεση και μεγάλο διάστημα ζεστής περιόδου για την ανάπτυξη και την ωρίμανση των καρπών. Η παγωνιά κατά την διάρκεια της ανοιξιάτικης άνθησης και οι ζεστοί άνεμοι είναι επιβλαβείς για την παραγωγή των ελιών. Τα δένδρα της ελιάς έχουν μεγάλη διάρκεια ζωής και μπορούν να επιζήσουν κάτω από δυσμενείς συνθήκες. Οι ελιές μεγαλώνουν κάτω από τροπικές συνθήκες αλλά αντέχουν και σε ώρες παγετώνα κατά την άνθηση και την παραγωγή καρπού (Kailis et al., 2007).

Τα δένδρα της ελιάς πολλαπλασιάζεται αγενώς με σταυρογονιμοποίηση και με αερογονιμοποίηση με γύρη. Προσαρμόζεται εύκολα στα μικροκλίματα και στο

μικροπεριβάλλον της κάθε χώρας ανάπτυξής της. Η αναλογία του λαδιού και η σύσταση του ελαιοπολτού είναι ασταθής και εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως το έδαφος, το κλίμα, τα καλλιεργητικά συστήματα, το κλάδεμα, το λίπασμα και τις μεθόδους συλλογής (Garrido Fernández et al., 1997).

1.3. Δομή και Χημική Σύσταση Ελαιόκαρπου

Ο ελαιόκαρπος κατατάσσεται στην κατηγορία της δρύπης όπου συμπεριλαμβάνονται τα αμύγδαλα, το κεράσι, το δαμάσκηνο κ.λπ. Οι δρύπες χωρίζονται σε δυο μέρη:

1. το περικάρπιο το οποίο περιλαμβάνει:
 - ❖ το επικάρπιο ή την επιδερμίδα ή τη μεμβράνη που καλύπτει 1.5 - 3.5 του βάρους του καρπού,
 - ❖ το μεσοκάρπιο ή σάρκα, που περιέχει ιστούς πλούσιους σε λάδι και σε νερό και καλύπτει το 70% - 90% του καρπού,
2. το ενδοκάρπιο ή πυρήνας που αποτελείται από το ξυλώδες τμήμα στο οποίο περιέχεται το ενδοσπέρμιο. Η διαφορά του ελαιόκαρπου από τις άλλες δρύπες περιορίζεται στην χημική του σύσταση.

Σε ότι αφορά στη χημική σύσταση του ελαιόκαρπου, τα κύρια συστατικά της σάρκας της ελιάς είναι το νερό (50%), το λάδι (22%), τα σάκχαρα (19.1%) (όπως: η γλυκόζη, η φρουκτόζη και η σακχαρόζη), οι πρωτεΐνες (1.6%), οι πηκτίνες, τα οργανικά οξέα (όπως το κιτρικό, το μηλικό, το οξαλικό και όλα μαζί συνθέτουν το 0.1%), οι τανίνες, η ελευρωπαΐνη, τα ανόργανα συστατικά και άλλα. Η σύνθεση του ελαιόκαρπου διαφέρει ανάλογα με την ποικιλία, την περιοχή καλλιέργειας, τη χρονιά και το στάδιο ανάπτυξης. Αυτός είναι ο λόγος που κάποιες ελιές περιέχουν μικρό ποσοστό λαδιού και μεγάλο ποσοστό ζαχάρων όπως συμβαίνει στις μεγαλόκαρπες ποικιλίες και συνήθως χρησιμοποιούνται για βρώση. Ενώ αντίθετα στις μικρότερες ποικιλίες παρατηρείται μεγαλύτερο ποσοστό λαδιού για αυτό και προορίζονται για ελαιοποίηση (Κυριτσάκης, 1993).

Τα συστατικά του ελαιόκαρπου μεταβάλλονται κατά την πορεία της ωρίμανσης, όπως το χρώμα που από πράσινο μεταβάλλεται σε μαύρο λόγω της αλλαγής των χρωστικών. Ο πράσινος καρπός περιέχει χλωροφύλλες ενώ ο μαύρος καρπός περιέχει μελανίνες που σχηματίζονται από την οξειδωση των φαινολικών ουσιών. Εκτός από το χρώμα μεταβάλλονται και άλλα συστατικά του ελαιόκαρπου όπως:

- ❖ Το νερό, το οποίο αντιπροσωπεύει το 50% του νωπού βάρους του καρπού και είναι η ποσότητα αυτού που δίνει στον καρπό το τελικό του σχήμα, καθώς με την κανονική ποσότητα νερού τα κύτταρα βρίσκονται σε σπαργή και δεν συρρικνώνεται ο καρπός. Μέσα στο νερό του κυτταρικού χυμού βρίσκονται διαλυμένα και τα ζάχαρα, η ελευρωπαΐνη, τα οργανικά οξέα, οι

τανίνες και άλλα. Η ποσότητα του νερού και του λαδιού εξαρτάται από το στάδιο ανάπτυξης, την ποικιλία και τις συνθήκες περιβάλλοντος,

- ❖ Η ελευρωπαΐνη, είναι ένα συστατικό του ελαιόκαρπου στο οποίο οφείλεται η πικρή γεύση του καρπού. Είναι μια πολυφαινόλη και συναντάται της άγουρες ελιές σε μεγάλο ποσοστό και πολύ λιγότερο της ώριμες ελιές. Είναι υδατοδιαλυτή ουσία. Δεν είναι διαλυτή στο ελαιόλαδο γι' αυτό δε δημιουργεί πρόβλημα κατά την ελαιοποίηση, καθώς απομακρύνεται με τα φυτικά υγρά. Αντίθετα της ελιές που προορίζονται για βρώση, η ελευρωπαΐνη δημιουργεί πρόβλημα καθώς οι ελιές πρέπει να δεχτούν συγκεκριμένους χειρισμούς της συνεχή πλυσίματα (Παρασκευή ελιών τύπου καλαμών ή τσακιστών) ή προσθήκη διαλύματος καυστικού νατρίου και πλυσιμάτων (Παρασκευή ελιών Ισπανικού τύπου) για την απομάκρυνσή της από αυτές. Για να μπορέσει να καταναλωθεί η ελιά πρέπει η ελευρωπαΐνη να υποστεί υδρόλυση είτε με τη δράση οξέων και αλκάλων ή με τη δράση ενζύμων. Το μόριο της ελευρωπαΐνης περιέχει ένα γλυκοζιδικό και έναν εστερικό δεσμό. Με την ενζυμική υδρόλυση αυτή διασπάται σε γλυκόζη και ένα άγλυκο μόριο, το οποίο στη συνέχεια υδρολύεται προς μόρια τα οποία δεν είναι πικρά, όπως είναι το ελενολικό οξύ και η 3,4-διυδροξύ-φαινυλ-αιθανόλη. Συγκεκριμένα η ενζυμική υδρόλυση της ελευρωπαΐνης γίνεται με το ένζυμο β-γλυκοζιδάση με τη δράση του οποίου απελευθερώνεται γλυκόζη (που χρησιμοποιείται από τους οργανισμούς ως πηγή άνθρακα) και ένα άγλυκο μόριο εστέρα. Το τελευταίο μετατρέπεται σε πιο απλά παράγωγα όπως το ελενολικό οξύ (άπικρη ουσία), με την δράση του ενζύμου εστεράση. Η εκτίκρυνση αυτή απαιτεί ένα στάδιο ζύμωσης των ελιών σε άλμη κάποιων μηνών ή την χρήση NaOH (μέθοδος ισπανικού τύπου) (Ciafardini et al., 1994).
- ❖ Τα διαλυτά σάκχαρα που περιέχονται στην ελιά (κυρίως γλυκόζη, φρουκτόζη, μανόζη, γαλακτόζη και ζαχαρόζη) έχουν ιδιαίτερη σημασία για τη ζύμωσή της από τα οξυγαλακτικά βακτήρια και για τη συντήρησή της στη συνέχεια. Για την παρασκευή των πράσινων ελιών Ισπανικού τύπου και των φυσικώς μαύρων ελιών Ελληνικού τύπου απαιτείται μεγάλη ποσότητα σακχάρων προκειμένου να λάβει χώρα η γαλακτική ζύμωση κατά την οποία σχηματίζεται γαλακτικό οξύ από τη ζύμωση αυτών των σακχάρων. Η ζύμωση αυτή συντελεί στην συντήρηση της ελιάς αλλά και προσδίδει σε αυτές την ιδιαίτερη γεύση τους. Έχει βρεθεί ότι κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης η συγκέντρωση των σακχάρων στον ελαιόκαρπο μειώνεται καθώς αυξάνεται η ποσότητα του ελαιολάδου που συντίθεται. Για το λόγο αυτό έχει αποδοθεί συσχέτιση ανάμεσα στη μείωση των σακχάρων και τη βιοσύνθεση του ελαιολάδου (Garrido Fernández et al., 1997).
- ❖ Ο ελαιόκαρπος περιέχει μια ποσότητα πρωτεϊνών της τάξεως του 1.5-3% που κυμαίνεται ανάλογα με το στάδιο ωρίμανσης και την ποικιλία. Στις πρωτεΐνες του ελαιόκαρπου απαντώνται τα αμινοξέα αργινίνη,

ασπαραγινικό οξύ και γλουταμινικό οξύ που βρίσκονται στον καρπό των ποικιλιών κορωνέικη, θρούμπα και μεγαρίτικη.

- ❖ Το ελαιόλαδο, το οποίο είναι από τα πιο σημαντικά θρεπτικά συστατικά για τον άνθρωπο, περιέχεται στη σάρκα της ελιάς σε ποσοστό 17-35% και επηρεάζει τη συνεκτικότητα της σάρκας καθώς και το σχήμα.
- ❖ Στην ελιά περιέχονται επίσης ανόργανα στοιχεία όπως ασβέστιο, κάλιο, νάτριο, μαγνήσιο, μαγγάνιο, σίδηρος, ψευδάργυρος, χλώριο και φώσφορος. Το μεγαλύτερο ποσοστό, συγκριτικά με τα άλλα, καλύπτει το κάλιο.
- ❖ Τέλος στον καρπό της ελιάς συναντάμε ορισμένα οξέα όπως το οξικό, το οξαλικό, το μηλονικό, το γαλακτικό, το τρυγικό, το μηλικό και το κιτρικό. Τα οξέα συναντούνται είτε σε μορφή αλάτων είτε σαν ελεύθερα οξέα. Γενικά τα οξέα του καρπού της ελιάς συμπαρασύρονται με τα φυτικά υγρά και μεταφέρονται στα απόνερα μαζί με άλλα υδατοδιαλυτά συστατικά (Κυριτσάκης, 1993).

1.4. Διατροφική αξία της ελιάς

Ο άνθρωπος πρέπει να καλύπτει τις ημερήσιες ανάγκες του οργανισμού του σε τροφή για να μπορέσει να διατηρηθεί υγιής και παραγωγικός. Οι ανάγκες του ανθρώπου σε τροφή καλύπτονται από τροφές που είναι πλούσιες σε πρωτεΐνη (πρωτεϊνούχες), επίσης από τροφές που περιέχουν ζάχαρα ή υδατάνθρακες και τέλος από τροφές που περιέχουν/έχουν μεγάλο ποσοστό σε λιπαρές ουσίες. Στην τελευταία κατηγορία τροφών ανήκουν και οι επιτραπέζιες ελιές, κυρίως οι επιτραπέζιες, διότι περιέχουν λιπαρές ουσίες σε ποσοστό 20-30% του βάρους τη σάρκας τους. Λόγω της υψηλής θερμιδικής αξίας του καρπού της ελιάς αποτέλεσε κύρια τροφή στους λαούς γύρω από την λεκάνη της μεσογείου όπου κυρίως καλλιεργήθηκε (Μπαλατσούρας, 1995).

Η βιολογική αξία της ελιάς προσδιορίζεται από ορισμένα συστατικά με μηδαμινή θερμιδική αξία που όμως είναι απαραίτητα για την σωστή διατροφή του ανθρώπου. Συστατικά τα οποία προσδιορίζουν την βιολογική αξία της ελιάς είναι κάποια αμινοξέα, λιπαρά οξέα, βιταμίνες, ανόργανα συστατικά και η ελευρωπαΐνη (Μπαλατσούρας, 1995):

- Στη σάρκα της ελιάς περιέχονται χαμηλά επίπεδα από διαλυτή και αδιάλυτη πρωτεΐνη σε συγκέντρωση 1.5% w/w. Διαλύτες πρωτεΐνες μπορούν να μεταφερθούν στην άλμη εξασφαλίζοντας αμινοξέα για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών που επιτελούν τη ζύμωση. Η επεξεργασία ελιών με υδροξείδιο του νατρίου οδηγεί σε χαμηλότερα επίπεδα πρωτεΐνης στη σάρκα της ελιάς όταν τις συγκρίνουμε με ακατέργαστες ελιές.

- Στην υψηλή βιολογική αξία της ελιάς συμβάλλουν οι λιπαρές ουσίες με την ποιότητά τους και τον μέτριο βαθμό κορεσμού τους. Ειδικότερα, η σάρκα της ελιάς περιέχει ελαιόλαδο 20%-30% κατά νωπό βάρος, που προσφέρει προστασία λόγω της περιεκτικότητάς του σε αντιοξειδωτικές ουσίες. Επίσης η επιδερμίδα δρα προστατευτικά, αποκλείοντας την άμεση επαφή του ελαιολάδου με το οξυγόνο. Το κύριο ακόρεστο λιπαρό οξύ του ελαιολάδου είναι το ελαϊκό οξύ το οποίο κατέχει πλεονεκτική θέση έναντι των λιπαρών οξέων διότι παρουσιάζει μεγάλη αντοχή στο τάγγισμα. Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και κυρίως το λινελαϊκό, έχουν βιταμινική αξία για τον ανθρώπινο οργανισμό και θα πρέπει να καλύπτουν το 1-2% της ολικής θερμιδικής αξίας του διαιτολογίου του. Τα κορεσμένα λιπαρά οξέα αυξάνουν την χοληστερίνη, τα πολυακόρεστα την μειώνουν και τα μονοακόρεστα δρουν κατά ουδέτερο τρόπο (Μπαλατσούρας, 1995).
- Οι επιτραπέζιες ελιές είτε πράσινες είτε ώριμες θεωρούνται πηγές βιταμινών για τον άνθρωπο. Οι βιταμίνες χωρίζονται σε υδατοδιαλυτές και σε λιποδιαλυτές. Οι υδατοδιαλυτές βιταμίνες χάνονται κατά την διαδικασία της επεξεργασίας της επιτραπέζιας ελιάς ενώ οι διαλυτές στο λάδι διατηρούνται στο προϊόν έως την κατανάλωσή του. Υδατοδιαλυτές βιταμίνες είναι το ασκορβικό οξύ, η θειαμίνη, η ριβοφλαβίνη και η νιασίνη. Οι διαλυτές στο λάδι βιταμίνες (λιποδιαλυτές) είναι οι καροτενοειδείς και οι τοκοφερόλες όπου είναι και αντιοξειδωτικές. Η παρουσία των παραπάνω βιταμινών στη σάρκα προσθέτει στη βιολογική αξία της ελιάς ως τροφή του ανθρώπου (Μπαλατσούρας, 1995).
- Τα ανόργανα συστατικά σε φρέσκιες ακατέργαστες ελιές περιλαμβάνουν μακροστοιχεία και ιχνοστοιχεία. Στα μακροστοιχεία περιλαμβάνονται ο φώσφορος, το ποτάσιο, το νάτριο, το κάλιο και το μαγνήσιο που βρίσκεται σε ιδιαίτερα υψηλή συγκέντρωση στην ελιά και είναι πολύτιμο συστατικό για τη σωστή διατροφή του ανθρώπου. Όσον αφορά τα ιχνοστοιχεία που απαντώνται στην ελιά και είναι απαραίτητα για τον άνθρωπο, περιλαμβάνουν το βόρειο, το χαλκό, το σίδηρο, τον ψευδάργυρο και το μαγγάνιο. Τα επίπεδα αυτών των στοιχείων εξαρτώνται από τις συνθήκες καλλιέργειας, την ποιότητα του εδάφους, τη διαθεσιμότητα του νερού και την ποσότητα των λιπασμάτων που χρησιμοποιούνται. Οι φυσικές ελιές είναι μια καλή πηγή πρόσληψης ιχνοστοιχείων που εξαρτώνται βέβαια από την ποικιλία, την ωρίμανση και τη μέθοδο επεξεργασίας.
- Η ελιά είναι η μόνη δρύπη η οποία περιέχει την πικρή ουσία ελευρωπαΐνη. Η ελευρωπαΐνη είναι μια πολυφαινόλη που ανήκει σε μια ομάδα παραγώγων τα οποία ονομάζονται ιριδοειδή γλυκοσιδία και απαντάται στο μεσοκάρπιο χώρο της ελιάς. Είναι υδατοδιαλυτή ουσία, καθώς είναι μια πολική ένωση που απομακρύνεται μερικώς με τα φυτικά υγρά κατά την ελαιοποίηση. Όσον αφορά την ελιά, για να μπορέσει να καταναλωθεί πρέπει η ελευρωπαΐνη να υποστεί υδρόλυση σε γλυκόζη και ένα άγλυκο μόριο, το

οποίο στη συνέχεια υδρολύεται προς μόρια τα οποία δεν είναι πικρά, όπως είναι το ελενολικό οξύ και η 3,4- διυδροόξυ-φαινυλ-αιθανόλη. Συγκεκριμένα η υδρόλυση της ελευρωπαΐνης που περιέχεται στις επιτραπέζιες ελιές γίνεται με το ένζυμο β-γλυκοζιδάση όπου απελευθερώνεται γλυκόζη (που χρησιμοποιείται από τους οργανισμούς ως πηγή άνθρακα) και ένα άγλυκο μόριο εστέρα. Το τελευταίο μετατρέπεται σε πιο απλά παράγωγα όπως το ελενολικό οξύ (άπικρη ουσία), με την δράση του ενζύμου εστεράση. Η εκκίκραση αυτή απαιτεί ένα στάδιο ζύμωσης των ελιών σε άλμη κάποιων μηνών ή την χρήση NaOH (μέθοδος ισπανικού τύπου).

Οι πικρές ουσίες που απαντώνται στα τρόφιμα φυτικής προέλευσης είναι τα φλαβονοειδή, τα τριτερπενικά σώματα και τα αλκαλοειδή. Με εξαίρεση την ελευρωπαΐνη και τα φλαβονοειδή των εσπεριδοειδών όλες οι πικρές ουσίες είναι επικίνδυνες για τον άνθρωπο ζημιώνουν τους οργανοληπτικούς χαρακτήρες των τροφίμων, προξενούν στομαχικές διαταραχές και σε ορισμένες περιπτώσεις το θάνατο. Η ελευρωπαΐνη και οι πικρές ουσίες των εσπεριδοειδών επιζητούνται από το καταναλωτικό κοινό σε μικροποσότητες, γιατί είναι ποιοτικά χαρακτηριστικά για τα αντίστοιχα τρόφιμα. Εισαγόμενες στον οργανισμό επαυξάνουν την έκκριση του γαστρικού υγρού και τονώνουν την όρεξη. Ειδικά οι υπόπικρες επιτραπέζιες ελιές που παράγονται στην χώρα μας, όχι μόνο δεν βλάπτουν, αλλά δρουν ευνοϊκά σε περιπτώσεις παθήσεων του στομάχου που οδηγούν σε μειωμένες εκκρίσεις, αλλά και καρδιακών και άλλων παθήσεων (Μπαλατσούρας, 1995).

2. Τα Όξυγαλακτικά Βακτήρια

2.1. Ταξινόμηση – Μεταβολισμός – Κύρια Γένη

Η έννοια των όξυγαλακτικών βακτηρίων (LAB), ως μια ομάδα οργανισμών που αναπτύχθηκε κατά την έναρξη του 1900. Οι αλληλεπιδράσεις και η σχέση των όξυγαλακτικών βακτηρίων με τα τρόφιμα μελετήθηκε για πρώτη φορά από τον Pasteur το 1857 με τη μελέτη της ζύμωσης του γαλακτικού οξέος και ακολούθησε η πρώτη απομόνωση μιας καθαρής καλλιέργειας του *Bacterium lactis* αργότερα το 1873 από το Lister. Τη χρησιμοποίηση καλλιέργειας εκκίνησης στο τυρί, εισήγαγε για πρώτη φορά ο Weigmann το 1890 στη Κοπεγχάγη. Αυτός άνοιξε το δρόμο για τη βιομηχανοποίηση της ζυμώσεως των τροφίμων. Τα όξυγαλακτικά βακτήρια βρίσκονται σε μεγάλο αριθμό σε ζυμούμενα τρόφιμα καθώς επίσης είναι στενά συνδεδεμένα με τον άνθρωπο. Αναφορές για ζυμούμενα γαλακτοκομικά προϊόντα (τυρί, γιαούρτι, βούτυρο) είναι καταγεγραμμένα σε αρχαϊκά κείμενα από τον Uruk / Warka (Ιράκ) γύρω στο 3200 π.Χ. (Nissen et al. 1991). Μύρα παραγόμενη από τους Βαβυλώνιους που εξάγονταν στην Αίγυπτο γύρω στο 3000 π.Χ. ήταν πιθανότατα το προϊόν τόσο αλκοολικής όσο και γαλακτικής ζύμωσης. Αρκετές από αυτές τις «εμπειρικές» βιοτεχνολογικές διαδικασίες είναι ακόμη σε χρήση, αλλά σε βιομηχανική κλίμακα έχουν εφαρμοστεί κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες, π.χ. λάχανο τουρσί και ζυμώσεις αγγουριού. Ορισμένοι παρασκευαστές/βιοτέχνες

εξακολουθούν να βασίζονται στις παραδοσιακές τεχνολογίες για την επεξεργασία του τυριού και άλλων προϊόντων ζύμωσης, χωρίς τη χρήση καλλιέργειών εκκίνησης.

Σύμφωνα με τον Orla-Jensen (1919) τα «πραγματικά βακτήρια του γαλακτικού οξέος» αποτελούν μια ομάδα gram- θετικών, μη σπορογόνων βακτηρίων, σε σχήμα ράβδου και κόκκου που ζυμώνουν τους υδατάνθρακες και τις ανώτερες αλκοόλες κυρίως σε γαλακτικό οξύ. Το ενδιαφέρον για τη δράση των οξυγαλακτικών βακτηρίων στη διατροφή του ανθρώπου ήταν σε άνοδο τον 20ο αιώνα, όταν ο Elie Metchnikoff στο Ινστιτούτο Pasteur στο Παρίσι προώθησε τη χρήση τους στη διατροφή για βελτίωση της υγείας του ανθρώπου (Bibel 1988), αλλά η θεωρία του για όφελος προς την υγεία και την μακροζωία έπεσε στο κενό λόγω των ελλειπών επιστημονικών στοιχείων που είχε. Οι ισχυρισμοί ότι τα οξυγαλακτικά βακτήρια είναι σημαντικά στην υγεία των ανθρώπων και των ζώων ήρθαν ξανά στο προσκήνιο όταν ο Fuller (1989) ισχυρίστηκε ότι ευνοούν την υγεία (προβιοτικά) και έχουν θετική επίδραση στο γαστρεντερικό σύστημα.

Η κλασική προσέγγιση της ταξινόμησης των βακτηρίων βασίστηκε σε μορφολογικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά. Αυτό αργότερα επεκτάθηκε ώστε να περιλαμβάνει και τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος, τα λιπαρά οξέα και άλλα χαρακτηριστικά των κυττάρων. Τα μοριακά χαρακτηριστικά είναι επίσης σημαντικά ταξινομικά εργαλεία, όπως το ποσοστό γουανίνης και κυτοσύνης στο DNA, ηλεκτροφορητικές ιδιότητες των γονιδιακών προϊόντων, DNA μελέτες υβριδισμού και οι δομή και η αλληλουχία του ριβοσωμικού RNA (rRNA). Αυτό οδήγησε αργότερα σε σημαντικές αλλαγές στην ταξινόμηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων (Schleifer et al. 1987). Η κατάταξη των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος παραμένει ακόμα όμως ευμετάβλητη και αυτό αποτελεί το επίκεντρο της έντονης ταξινομικής μελέτης πολλών ερευνητών που θεωρούν πλέον αναγκαία την πολυφασική προσέγγιση με τη συμμετοχή τόσο φαινοτυπικών αλλά και φυλογενετικών χαρακτηριστικών των βακτηρίων (Vandamme et al. 1996).

Οι Aguirre και Collins (1993) στις μελέτες τους εστίασαν την προσοχή τους στους εντερόκοκκους και την άμεση σχέση αυτών με τις κλινικές λοιμώξεις. Ωστόσο, πολλές εργασίες αναφερόμενες στα *Lactobacillus* (Sussman et al. 1986) και στα *Leuconostocs* (Handwenger et al. 1990) κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι ορισμένα από αυτά τα βακτήρια θα πρέπει να θεωρούνται πιθανοί παθογόνοι παράγοντες. Στη μεγάλη πλειοψηφία αυτών των κλινικών περιπτώσεων που τα βακτήρια είχαν παθογόνο δράση οι ασθενείς είτε είχαν ιστορικό κάποιας νόσου ή ήταν ανοσοκατεσταλμένοι. Αυτό οδήγησε στο συμπέρασμα ότι αυτά τα βακτήρια εμπίπτουν στην κατηγορία των ευκαιριακά παθογόνων. Σαφώς οι επιστήμονες τροφίμων θα πρέπει να λαμβάνουν υπόψη ότι τα οξυγαλακτικά βακτήρια συνδέονται με κλινικές λοιμώξεις κάτω από ορισμένες καταστάσεις του ασθενή, αλλά μέχρι τώρα δεν υπάρχουν αποδείξεις ότι τα ζυμούμενα τρόφιμα που περιέχουν οξυγαλακτικά βακτήρια βλαπτικά επηρεάζουν την διατροφή.

Φυλογενετικά τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος ανήκουν στο παρακλάδι των κλωστηριδίων των gram-θετικών βακτηρίων, τα οποία έχουν αρνητική δοκιμή καταλάσης, είναι μη σπορογόνα σε σχήμα κόκκου, κοκκοβάκιλου ή ραβδιού και έχουν λιγότερο από 55% mol% G + C (γουανίνη και κυτοσύνη) στο DNA τους.

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια τα οποία συναντώνται στα τρόφιμα ανήκουν στα γένη: *Curnohctcteriun*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* και *Vugococcus* (Vandamme et al. 1996). Τα στοιχεία από το 16s rRNA στα οξυγαλακτικά βακτήρια υποδηλώνουν νέες ομάδες στην ταξινόμηση. Τα *Lactobacillus* και τα *Leuconostoc* αναταξινομήθηκαν σε τρεις μεγάλες ομάδες (Collins et al.1993b, Schleifer and Ludwig, 1995, Vandamme et al. 1996) την ομάδα των *Leuconostoc*, *Lb. delbrueckii* και *Lb. casei**Pediococcus*.

Τα βακτήρια του γαλακτικού οξέως βρίσκονται σχεδόν παντού: στο περιβάλλον όπου έχει διαθέσιμους υδατάνθρακες όπως για παράδειγμα στα τρόφιμα (γαλακτοκομικά προϊόντα, ζυμούμενα κρέατα, λαχανικά, φρούτα, ποτά), στο γαστρεντερικό σύστημα και στα φυτά. Σύμφωνα με το “Taxonomic Outline of the Procaryotes” (Garrity et al. 2004), το γένος *Lactobacillus* ανήκει στη φυλή *Firmicutes*, στη κατηγορία των βακίλων, στην τάξη *Lactobacillales* και στην οικογένεια *Lactobacillaceae* και τα πλησιέστερα συγγενή γένη είναι τα *Paralactobacillus* και τα *Pediococcus*. Η φυλογενετικά πλησιέστερη οικογένεια φαίνεται να είναι η οικογένεια *Leuconostocaceae*, η οποία περιλαμβάνει τα γένη *Leuconostoc*, *Oenococcus* και *Weissella* (Hammes και Hertel, 2003).

Το γένος *Lactobacillus* περιλαμβάνει 106 είδη και είναι το πολυπληθέστερο γένος της τάξης *Lactobacillales*. Επιπλέον, 1 είδος έχει περιγραφεί αλλά δεν έχει εγκριθεί ακόμη (*Lactobacillus tucseti*, Chenoll και συν. 2006). Επτά είδη του γένους *Lactobacillus* περιλαμβάνουν 2 υποείδη ή περισσότερα:

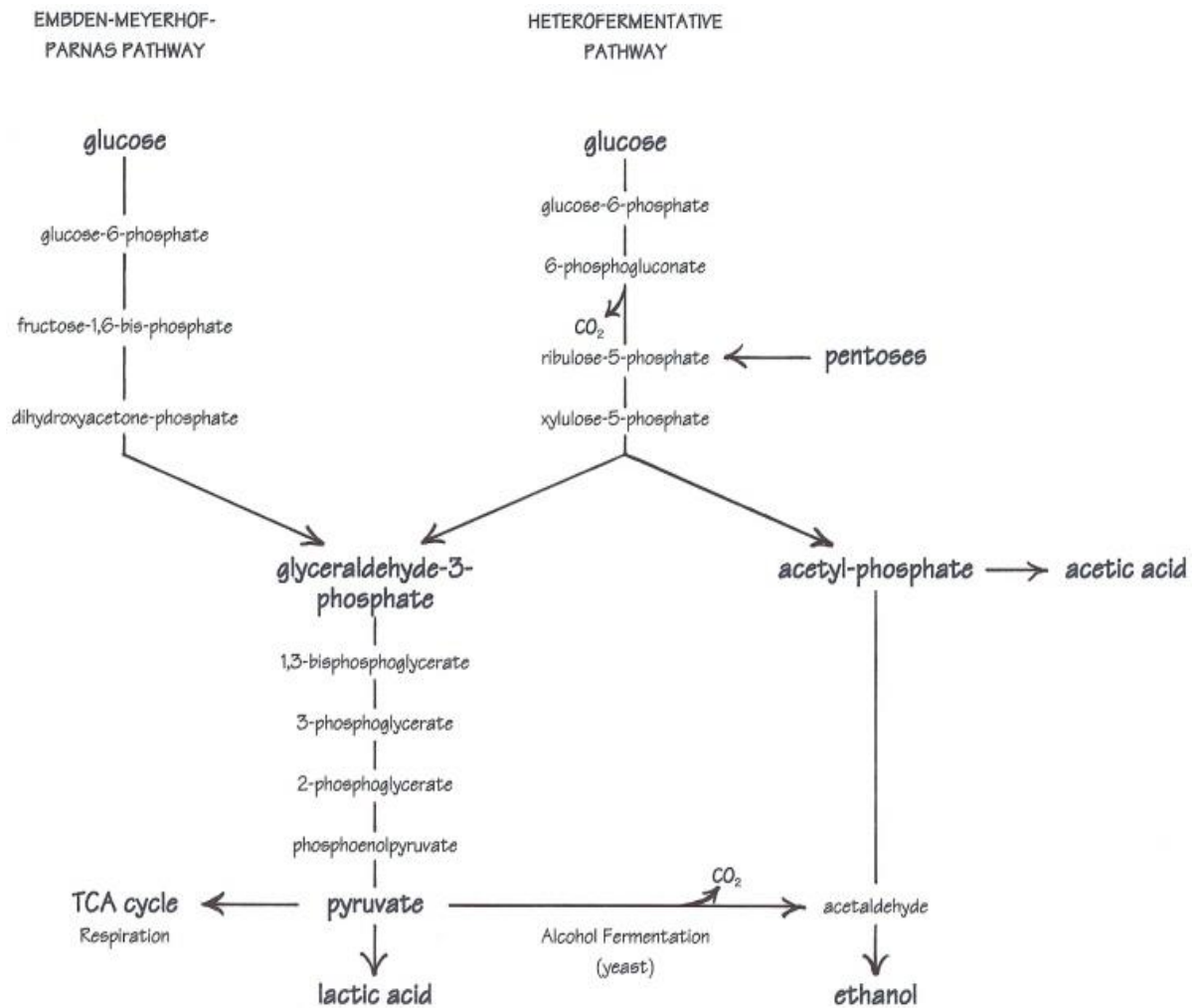
1. *Lactobacillus aviarius* (*L. aviarius* subsp. *aviarius* και *L. aviarius* subsp. *araffinosus*),
2. *Lactobacillus coryniformis* (*L. subsp coryniformis. coryniformis* και *L. subsp coryniformis. torquens*),
3. *Lactobacillus delbrueckii* (*L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. delbrueckii* subsp. *indicus*, και *L. delbrueckii* subsp. *lactis*),
4. *Lactobacillus kefiranofaciens* (*L. subsp. kefiranofaciens. kefiranofaciens* και *L. subsp. kefiranofaciens. kefirgranum*),
5. *Lactobacillus paracasei* (*L. paracasei* subsp. *paracasei* και *L. paracasei* subsp. *tolerans*),

6. *Lactobacillus plantarum* (*L. plantarum* subsp. *plantarum* και *L. subsp. plantarum. argentoratensis*), και

7. *Lactobacillus sakei* (*L. sakei* subsp. *sakei* και *L. sakei* subsp. *carnosus*).

Η κύρια διαφορά στην ταξινόμηση του γένους *Lactobacillus* είναι η μη αντιστοιχία μεταξύ της φυλογενετικής τοποθέτησης και των μεταβολικών ιδιοτήτων τους. Σύμφωνα με τον Pot et al. (1994) το γένος *Lactobacillus* χωρίζεται σε τρεις ομάδες με βάση την μορφή ζύμωσης σε: «υποχρεωτικά ομοζυμωτικούς», «προαιρετικά ετεροζυμωτικούς» και «υποχρεωτικά ετεροζυμωτικούς». Οι αποδεκτοί ορισμοί των παραπάνω δόθηκαν αργότερα από τους Hammes και Vogel (1995):

- υποχρεωτικά ομοζυμωτικοί γαλακτοβάκιλλοι, είναι αυτοί που ζυμώνουν σχεδόν αποκλειστικά τις εξόζες σε γαλακτικό οξύ από την Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) οδό.
- προαιρετικά ετεροζυμωτικοί γαλακτοβάκιλλοι, είναι αυτοί οι οποίοι οξειδώνουν την γλυκόζη προς 6- φωσφό-γλυκονικό οξύ, ακολουθούμενο από μία αποκαρβοξλίωση. Η πεντόζη στη συνέχεια διασπάται σε 3-φωσφο-γλυκεριναλδεύδη και ακέτυλο- φωσφοτικό οξύ με τη δράση μιας φωσφοκετολάσης
- υποχρεωτικά ετεροζυμωτικοί γαλακτοβάκιλλοι είναι αυτοί οι οποίοι ζυμώνουν την γλυκόζη σε γαλακτικό οξύ, αιθανόλη ή οξικό οξύ και διοξείδιο του άνθρακα.



Εικόνα 2.1.1. Τα μονοπάτια του μεταβολισμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων.

2.2. Η μικροβιακή ζύμωση των ελιών και οι υπεύθυνοι μικροοργανισμοί

Η οξυγαλακτική ζύμωση είναι το σημαντικότερο στάδιο στην παραγωγή επιτραπέζιων ελιών. Η ομαλή εξέλιξη αυτής της ζύμωσης δίνει ένα άριστο ποιοτικά προϊόν με καλή συντηρησιμότητα και εμπορική ικανότητα ενώ αντίθετα η εκτροπή της ζύμωσης οδηγεί σε ένα προϊόν ποιοτικά υποβαθμισμένο. Για την πραγματοποίηση μιας επιτυχημένης ζύμωσης θα πρέπει μέσα στους περιέκτες όπου τοποθετούνται οι ελιές να επικρατούν όσο το δυνατό περισσότερο αναερόβιες συνθήκες. Επίσης, στη σάρκα του ελαιοκάρπου πρέπει, μετά την έκλυση και την εκκίκραση, να παραμένουν αρκετά ζυμώσιμα σάκχαρα τα οποία θα μεταφερθούν στην άλμη και θα επιτρέψουν την ανάπτυξη των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος (οξυγαλακτικά βακτήρια) που επιτελούν τη συγκεκριμένη ζύμωση. Παράγοντες όπως η συγκέντρωση της άλμης, η περιεκτικότητά της σε ελευρωπαΐνη, η θερμοκρασία της ζύμωσης και το pH διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην πορεία εξέλιξης της ζύμωσης αυτής (Nychas et al., 2002).

Στα βακτήρια του γαλακτικού οξέος ανήκουν τα γένη *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* και *Streptococcus*. Τα βακτήρια αυτά είναι διαδεδομένα στη φύση και απαντώνται κυρίως στα φυτά ενώ συχνή είναι η παρουσία κάποιων στον ανθρώπινο οργανισμό. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια για την ανάπτυξή τους έχουν ανάγκη διάφορα αμινοξέα, βιταμίνες του συμπλέγματος Β, πουρίνες και πουριμιδίνες. Είναι μεσόφιλοι και μπορούν να αναπτύσσονται σε θερμοκρασία 5 °C έως 45 °C. Αναπτύσσονται ακόμα και σε χαμηλά pH (συνήθως 4.0-4.5 αλλά και σε χαμηλότερα). Είναι Gram θετικά βακτήρια και δεν μπορούν να συνθέσουν το ένζυμο καταλάση.

Κατά τη διάρκεια παραμονής των ελιών στην άλμη λαμβάνει χώρα φυσική ζύμωση από μικτή μικροβιακή ενδογενή χλωρίδα της ελιάς. Η άλμη μέσα στην οποία βρίσκονται οι ελιές μετατρέπεται σε ένα θρεπτικό υλικό κατάλληλο για την ανάπτυξη μικροοργανισμών, διότι οσμωτικά φαινόμενα οδηγούν σε εκχύλιση θρεπτικών συστατικών από τη σάρκα της ελιάς στην άλμη. Τέτοια συστατικά είναι τα σάκχαρα (π.χ. γλυκόζη, μανιτόλη, σουκρόζη) και τα οργανικά οξέα (π.χ. κιτρικό, οξικό, ηλεκτρικό) που χρησιμοποιούνται ως πηγή άνθρακα και ενέργειας για τους μικροοργανισμούς που επιτελούν τη ζύμωση. Η επιτελούμενη ζύμωση μέσα στην άλμη έχει ως αποτέλεσμα, αφενός μεν, την εκπίκρυνση των ελιών λόγω εκχύλισης και διάσπασης της ελευρωπαΐνης και των φαινολικών ουσιών, αφετέρου δε, το σχηματισμό οξέων που λειτουργούν ως φυσικά συντηρητικά. Επίσης αναπτύσσονται σύνθετες αρωματικές ουσίες, προϊόντα της μικροβιακής ζύμωσης, που συμβάλλουν στην ανάπτυξη των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών της ελιάς.

Το είδος και η αναλογία των μικροοργανισμών που επιτελούν αυτή τη ζύμωση εξαρτάται από διάφορους παράγοντες τόσο ενδογενείς, όπως για παράδειγμα το είδος της ενδογενούς μικροχλωρίδας των καρπών, η διαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών (π.χ. σάκχαρα) στην άλμη η οποία με τη σειρά της εξαρτάται από τη διαθεσιμότητά τους στον καρπό της ελιάς καθώς και από τη διαπερατότητα της επιδερμίδας της, η παρουσία αντιμικροβιακών ουσιών στην άλμη (π.χ. ελευρωπαΐνης και οργανικών οξέων), η ποικιλία της ελιάς κ.ά., όσο και εξωγενείς όπως η συγκέντρωση της άλμης και η θερμοκρασία στην οποία λαμβάνει χώρα η ζύμωση (Nychas et al., 2002).

Ζύμες, ασποριογόνα Gram (-) βακτήρια και οξυγαλακτικά βακτήρια είναι συνήθως οι υπεύθυνες μικροβιακές ομάδες για τη φυσική ζύμωση των ελιών σε άλμη (Tsapatsaris and Kotzekidou, 2004). Η ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων και η επικράτησή τους έναντι των ζυμών εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως η ποικιλία της ελιάς, η συγκέντρωση της άλμης και η αρχική διόρθωση του pH της άλμης (Kotzekidou and Tsakalidou, 2006).

Λόγω της αργής διάχυσης των σακχάρων και άλλων διαλυτών συστατικών από τη σάρκα της ελιάς στην άλμη, σε αυτού του τύπου τις ελιές που δεν έχουν υποστεί καμία επεξεργασία πριν τοποθετηθούν στην άλμη, και λόγω της παρουσίας της ελευρωπαΐνης που έχει αντιμικροβιακή δράση κυρίως έναντι των οξυγαλακτικών βακτηρίων, η διαδικασία της αυθόρμητης ζύμωσης είναι αργή (3-9

μήνες) και μπορεί να μην ολοκληρωθεί πλήρως χωρίς την εφαρμογή χημικών, φυσικών και μικροβιολογικών ελέγχων και επεμβάσεων. Έτσι, η τελική οξύτητα της άλμης σε μια αυθόρμητη ζύμωση ελιών είναι συνήθως χαμηλότερη από 0.5% και το pH κυμαίνεται μόλις στο 4.3-4.5 (Garrido-Fernandez et al., 1997). Όταν όμως επιτευχθεί πλήρης ζύμωση και τα σάκχαρα έχουν εξαντληθεί λόγω κατανάλωσής τους από τους μικροοργανισμούς, η τελική οξύτητα μπορεί να φτάσει το 0.8-1.0%.

Για την ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων, η αρχική συγκέντρωση της άλμης θα πρέπει να είναι χαμηλή (3-6% NaCl) και όταν ολοκληρωθεί η ζύμωση θα πρέπει να προστίθεται αλάτι ώστε η τελική συγκέντρωση της άλμης μετά την εξισορρόπηση να φτάσει το 6-8% NaCl. Το τελικό pH στην περίπτωση αυτή είναι χαμηλότερο (3.9-4.1) και η τελική οξύτητα μεγαλύτερη από 0.6%.

Τα κύρια γένη οξυγαλακτικών βακτηρίων που εμπλέκονται με την ζύμωση των επιτραπέζιων ελιών είναι τα *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* και *Streptococcus* (Kailis et al., 2007). Η ανάπτυξη των παραπάνω μικροοργανισμών παράλληλα με την δράση των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων επηρεάζει την οξύτητα του τελικού προϊόντος. Επιπλέον, παρατηρείται έντονη ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων κυρίως του είδους *Lactobacillus plantarum*, ο οποίος υπό κανονικές συνθήκες κυριαρχεί και είναι υπεύθυνος για την ζύμωση των πράσινων ελιών. Ωστόσο έχουν ταυτοποιηθεί κι άλλα είδη όπως *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus cellobiosus*, *Lactobacillus coryniformis* και *Lactobacillus brevis*, η παρουσία των οποίων εξαρτάται από την ποικιλία της ελιάς. Λόγω της ανάπτυξης του *L. plantarum* που είναι και ο επικρατέστερος μικροοργανισμός παρατηρείται μια σταθερή αύξηση της οξύτητας καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης με επακόλουθη μείωση του pH σε τιμές κοντά στο τέσσερα ή και χαμηλότερα. Ο αριθμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων μειώνεται όταν τα θρεπτικά συστατικά του υποστρώματος εξαντληθούν και το pH φτάσει σε τόσο χαμηλές τιμές που καθιστούν αδύνατη ακόμη και την ανάπτυξη του *L. plantarum*, του πιο ανθεκτικού γαλακτοβακίλλου που ολοκληρώνει τις περισσότερες ζυμώσεις των λαχανικών (Garrido Fernandez et al., 1997).

Κατά συνέπεια, η σύνθεση της μικροβιακής χλωρίδας και η εξέλιξή της επηρεάζει σημαντικά τη διαδικασία της ζύμωσης των ελιών και την ποιότητα του τελικού προϊόντος. Σε μία φυσιολογική ζύμωση, οι κυρίαρχες μικροβιακές ομάδες είναι οι ζύμες και τα οξυγαλακτικά βακτήρια, ενώ η αναλογία των πληθυσμών αυτών των δύο ομάδων καθορίζει την ποιότητα του τελικού προϊόντος (Panagou et al., 2008). Από την άλλη μεριά, η ανάπτυξη βακτηρίων όπως αυτά του γένους *Enterobacter*, *Clostridium* και *Propionibacterium*, μπορεί να οδηγήσει σε υποβάθμιση της ποιότητας του τελικού προϊόντος με εμφάνιση δυσάρεστης γεύσης και οσμής.

2.3. Ορισμός Προβιοτικών

Τα προβιοτικά έχουν οριστεί με διάφορους τρόπους, ανάλογα με το μηχανισμό δράσης τους και τις συνέπειες που έχουν στην υγεία και την ευεξία των ανθρώπων. Ο πιο κοινά αποδεκτός ορισμός είναι αυτός του Fuller (1989):

«τα προβιοτικά, είναι ζωντανά μικροβιακά συμπληρώματα που ευεργετικά επηρεάζουν και βελτιώνουν την εντερική μικροχλωρίδα»

Ο Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας (FAO) των Ηνωμένων Εθνών και η Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας (WHO) καθόρισε ως προβιοτικά:

«τους ζωντανούς μικροοργανισμούς (βακτήρια ή ζύμες), τα οποία κατά την κατάποση ή όταν εφαρμόζονται σε τοπικό επίπεδο σε επαρκή αριθμό παρέχουν ένα ή περισσότερα αποδεδειγμένα οφέλη για την υγεία του υποδοχέα - ασθενή» («Live microorganisms (bacteria or yeasts), which when ingested or locally applied in sufficient numbers confer one or more specified demonstrated health benefits for the host» FAO /WHO, 2001).



Εικόνα 2.3.1. Άποψη προβιοτικών βακτηρίων από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης.

Επειδή μπορούν να μένουν ζωντανοί μέσα στο έντερο και να παρέχουν ευεργετικά αποτελέσματα για την υγεία του ξενιστή, τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος, τα βακτήρια μη γαλακτικού οξέος και οι ζύμες μπορούν να θεωρηθούν προβιοτικά. Επίσης θεωρούνται τα σημαντικότερα προβιοτικά με ευεργετικά αποτελέσματα για ανθρώπινο οργανισμό.

Αρκετοί ωφέλιμοι μικροοργανισμοί είναι εγκατεστημένοι στον γαστρεντερικό σωλήνα του ανθρώπου. Πρόσφατα τα προβιοτικά χαρακτηρίστηκαν ως ζωντανοί μικροοργανισμοί που παρουσιάζουν αντοχή στις γαστρικές, χολικές και παγκρεατικές εκκρίσεις, προσκολλώνται στα επιθηλιακά κύτταρα και δημιουργούν αποικίες στο έντερο του ανθρώπου. Έτσι, ο ορισμός των προβιοτικών άλλαξε από την αρχική του περιγραφή ως ζωντανή καλλιέργεια που επιδρά θετικά στην υγεία του ξενιστή επηρεάζοντας τη μικροβιακή ισορροπία του εντέρου, και εξελίχθηκε στη συνέχεια να περιλαμβάνει και κλινικές επιδράσεις. Οι καλλιέργειες και το γάλα με προβιοτικές ιδιότητες που έχουν υποστεί ζύμωση έχουν μακρά ιστορική διαδρομή. Στη Βίβλο υπάρχουν αρκετές αναφορές στα όξινα γάλατα ενώ το 1908 ο Metchnikoff αναφέρεται στη διατροφή των Βουλγάρων, η οποία περιλάμβανε γιαούρτι εμπλουτισμένο με γαλακτοβάκιλλους, και τη συσχετίζε με την παράταση του χρόνου ζωής.

Οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί δεν είναι παθογόνοι. Είναι απαραίτητο να διατηρούν τη ζωικότητά τους κατά τη διάρκεια των τεχνολογικών διεργασιών που υφίσταται το τρόφιμο αλλά και κατά τη διάρκεια της διέλευσής τους από το γαστρεντερικό σωλήνα. Επίσης, είναι επιθυμητή η ακινητοποίησή τους στο επιθήλιο του εντέρου, η ανταγωνιστική δράση έναντι των παθογόνων μικροοργανισμών καθώς και η ανθεκτικότητά τους σε αντιβιοτικές ουσίες. Οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί διατηρούνται ζωντανοί όταν βρίσκονται σε λυοφιλωμένη μορφή καθώς και όταν εμβολιάζονται σε ζυμωμένα γαλακτοκομικά προϊόντα. Η περισσότερο αποδεκτή μορφή χορήγησης των προβιοτικών μικροοργανισμών από τους καταναλωτές είναι αυτοί που περιέχονται σε ζυμωμένα τρόφιμα και αναψυκτικά, όπως ζυμωμένα προϊόντα γάλακτος.

Τα προβιοτικά μπορούν να καταναλωθούν είτε ως προϊόντα διατροφής (που έχουν υποστεί ζύμωση ή δεν έχουν υποστεί ζύμωση) ή ως διαιτητικά συμπληρώματα (προϊόντα σε σκόνη, κάψουλα ή δισκίο μορφές). Η κατανάλωση προβιοτικών κυττάρων μέσω των προϊόντων διατροφής είναι η πιο δημοφιλής προσέγγιση προς το παρόν. Τα τρόφιμα στα οποία βρίσκονται αναφέρονται ως λειτουργικά τρόφιμα και η ζήτησή τους αυξάνεται με ταχείς ρυθμούς λόγω της αύξησης της ευαισθητοποίησης των καταναλωτών. Σημαντική επιτυχία έχει επιτευχθεί κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών στην ανάπτυξη των γαλακτοκομικών προϊόντων που περιέχουν προβιοτικά βακτήρια, όπως γάλατα που έχουν υποστεί ζύμωση, παγωτό, διάφορα είδη τυριών, παιδικές τροφές, γάλα σε σκόνη, κατεψυγμένα γαλακτοκομικά επιδόρπια, κρέμα γάλακτος, βουτυρόγαλα, (Mohammadi & Mortazavian, 2011). Ωστόσο, έχοντας κατά νου το υψηλό ποσοστό της δυσανεξίας στη λακτόζη καθώς και τους χορτοφάγους άρχισαν να κυκλοφορούν στο εμπόριο διάφορα μη-γαλακτοκομικά προβιοτικά προϊόντα, με βάση τα δημητριακά, όπως ζυμωμένα προϊόντα βρώμης, οι χυμοί φρούτων και τα ζυμωμένα προϊόντα σόγιας.

Σήμερα, τα προβιοτικά προϊόντα διευρύνουν διαρκώς το μερίδιό τους στη αγορά κυρίως στις ανεπτυγμένες χώρες της Ευρώπης, της Ιαπωνίας, της

Αυστραλίας και της Αμερικής. Στην Ευρώπη, ο τομέας των γαλακτοκομικών καταλαμβάνει το μεγαλύτερο μέρος στην αγορά των προβιοτικών. Τα προϊόντα με τη μεγαλύτερη κατανάλωση είναι τα προβιοτικά γιαούρτια και τα προϊόντα γάλακτος που έχουν υποστεί ζύμωση. Μερικά από τα προβιοτικά τρόφιμα περιέχουν επιπλέον βιοενεργά συστατικά όπως φυτικές στανόλες και στερόλες που μειώνουν τα επίπεδα της χοληστερόλης.

2.4. Τρόπος Δράσης των Προβιοτικών

Τα προβιοτικά τρόφιμα πρέπει να είναι ασφαλή και να περιλαμβάνουν τον κατάλληλο αριθμό προβιοτικών μικροοργανισμών σε επαρκή ποσότητα την στιγμή της κατανάλωσης. Τότε παρέχουν μια σειρά από οφέλη για την υγεία, κυρίως μέσω της διατήρησης της φυσιολογικής εντερικής μικροχλωρίδας και την προστασία έναντι γαστρεντερικών παθογόνων, της ενίσχυσης του ανοσοποιητικού συστήματος (Gilliland, 1990), την μείωση του επιπέδου της χοληστερόλης στον ορό και της αρτηριακής πίεσης (Rasic, 2003), της αντι-καρκινογόνου δράσης (Rasic, 2003), της βελτίωσης της χρησιμοποίησης των θρεπτικών ουσιών και της διατροφικής αξίας των τροφίμων, διατήρηση της υγείας της εντερικής χλωρίδας, τη σύνθεση βιταμινών και αντιμικροβιακών παραγόντων και τη διευκόλυνση στη πέψη των πρωτεϊνών.

Κάθε είδος προβιοτικών βακτηρίων έχει διαφορετικά οφέλη για την υγεία. Η ποσότητα που χρειάζεται να λαμβάνεται καθημερινά εξαρτάται από το είδος του προβιοτικού. Θεωρείται ότι στόχος είναι η κατανάλωση $10^6 - 10^7$ CFU/g προϊόντος ανά ημέρα, ώστε να επωφεληθεί ο ξενιστής από τις ευεργετικές του ιδιότητες. Υποτίθεται ότι αυτά τα οφέλη μπορεί να προκύψουν από την ανάπτυξη και την δράση των προβιοτικών κατά την παρασκευή των τροφίμων, ενώ μερικά μπορεί να προκύψουν από την ανάπτυξη και τη δράση ορισμένων ειδών των προβιοτικών στην εντερική οδό (Rasic, 2003). Τα οφέλη για την υγεία από τα λειτουργικά τρόφιμα που έχουν υποστεί ζύμωση είναι είτε λόγω της προβιοτικής δράσης (μέσω της αλληλεπίδρασης των ζωντανών μικροοργανισμών με τον ξενιστή), ή έμμεσα λόγω βιογενών αποτελεσμάτων ως συνέπεια της αφομοίωσης των μικροβιακών μεταβολιτών που παράγονται κατά τη διαδικασία της ζύμωσης.

2.5. Προβιοτικοί Μικροοργανισμοί που Χρησιμοποιούνται στο Εμπόριο

Αν και μια ευρεία ποικιλία από διάφορα είδη μικροοργανισμών θεωρούνται ως πιθανοί προβιοτικοί εκείνοι που χρησιμοποιούνται στα προβιοτικά τρόφιμα είναι κυρίως είδη των γενών *Lactobacillus* και *Bifidobacterium*. Ο κύριος λόγος είναι η μακρά ιστορία ασφαλούς χρήσης τους κι επειδή τα βακτήρια του γένους *Lactobacillus* είναι κυρίαρχοι μικροοργανισμοί στο λεπτό έντερο και του γένους *Bifidobacterium* κυρίαρχοι στο παχύ έντερο. Μικροοργανισμοί που συνήθως χρησιμοποιούνται ως προβιοτικές καλλιέργειες δίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 2.5.1. Μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται ως προβιοτικές καλλιέργειες.

Γαλακτοβάκιλλοι	Bifidobacteria	Άλλα γαλακτικά βακτήρια	Άλλοι μικροοργανισμοί
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Bifidobacterium animalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Bifidobacterium breve</i>		<i>Saccharomyces boulardi</i>
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	<i>Bifidobacterium infantis</i>		<i>Clostridium butyricum</i>
<i>Lactobacillus reuter</i>	<i>Bifidobacterium longum</i>		
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>		
<i>Lactobacillus salvarius</i>	<i>Bifidobacterium lactis</i>		
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Bifidobacterium bifidum</i>		
<i>Lactobacillus crispatus</i>			

2.6. Κριτήρια Επιλογής Προβιοτικών Μικροοργανισμών

Διαφορετικά είδη προβιοτικών μικροοργανισμών καθώς και διαφορετικά στελέχη του ίδιου είδους, έχουν χαρακτηριστικές ιδιότητες οι οποίες επηρεάζουν σημαντικά την επιβίωσή τους στα τρόφιμα, τις ζυμωτικές και προβιοτικές τους ιδιότητες (Klaenhammer, 2001). Η επιλογή των κατάλληλων κάθε φορά στελεχών έχει ιδιαίτερη σημασία τόσο για την συμπεριφορά της καλλιέργειας όσο και για την εκδήλωση των προβιοτικών ιδιοτήτων της:

Καταλληλότητα

- Ασφάλεια, μη τοξικότητα ή παθογένεια, γενικά αναγνωρισμένο ως ασφαλές (GRAS, Generally recognized as safe).
- Προέλευση από τη φυσιολογική μικροχλωρίδα του οργανισμού

Τεχνολογική καταλληλότητα

- Επαρκής ανάπτυξη
- Επιβίωση πληθυσμού (10^7 έως 10^9 cfu/g)
- Συντήρηση των επιθυμητών χαρακτηριστικών κατά την προετοιμασία και τη συντήρηση της καλλιέργειας
- Επιθυμητά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά στα τρόφιμα

- Διατήρηση φαινοτυπικών ιδιοτήτων

Αντοχή

- Ικανότητα επιβίωσης, ανάπτυξης και μεταβολικής δραστηριότητας σε συνθήκες *in vivo*
- Αντοχή στα χολικά άλατα
- Αντοχή σε χαμηλό pH (γαστρικό υγρό)
- Ικανότητα ανταγωνισμού με παθογόνους μικροοργανισμούς, ανθεκτικότητα στις βακτηριοσίνες καθώς και στις αντιμικροβιακές ουσίες που παράγονται από τη μικροχλωρίδα του εντέρου
- Ακίνητοποίηση στο επιθήλιο του εντέρου

Επίδραση στην υγεία

- Ικανότητα έκφρασης μίας ή περισσότερων κλινικά αποδεδειγμένων ευεργετικών για την υγεία ιδιοτήτων
- Ανταγωνισμός στους παθογόνους μικροοργανισμούς
- Παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών
- Αντικαρκινικές - αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες
- Διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος και παραγωγή βιοενεργών ενώσεων

Παρά την αναφορά σε μεγάλο αριθμό κριτηρίων επιλογής στη βιβλιογραφία, υπάρχει ταύτιση απόψεων για τη διάκριση των σημαντικότερων κριτηρίων στην επιλογή των προβιοτικών μικροοργανισμών. Αυτά είναι (i) η ανθρώπινη προέλευση των στελεχών, (ii) η ανθεκτικότητά τους σε όξινο περιβάλλον και στα χολικά άλατα, (iii) η σταθερότητά τους κατά την επεξεργασία του τροφίμου, (iv) η διατήρηση της ζωτικότητάς τους κατά τη συντήρηση του τροφίμου καθώς και (v) η ύπαρξη αποδεδειγμένων ευεργετικών ιδιοτήτων για την ανθρώπινη υγεία. Σύμφωνα με τους οργανισμούς FAO/WHO (2002), οι σημαντικότερες *in vitro* δοκιμές για την επιλογή προβιοτικών μικροοργανισμών είναι (α) η αντοχή στην οξύτητα του στομάχου και στα χολικά άλατα, (β) η ακίνητοποίηση στα επιθηλιακά κύτταρα, (γ) η αντιμικροβιακή δραστηριότητα έναντι δυνητικά παθογόνων μικροοργανισμών, (δ) η ικανότητα περιορισμού της δράσης των παθογόνων μικροοργανισμών μέσω ανταγωνισμού, (ε) η υδρόλυση των χολικών αλάτων καθώς και (στ) η αντοχή στις φαρμακευτικές ουσίες (FAO/WHO, 2002). Ιδιαίτερα σημαντικό για την αποτελεσματικότητα του προβιοτικού μικροοργανισμού είναι το πέρασμά του από τον γαστρεντερικό σωλήνα. Κι αυτό επειδή το περιβάλλον του στομάχου, με την παρουσία του γαστρικού υγρού σαν

άμυνα του οργανισμού στους μικροοργανισμούς, είναι πιθανόν να αποκλείσει τη μεταφορά των ζωντανών κυττάρων στο έντερο. Η προστασία και η επιβίωση της καλλιέργειας επιτυγχάνεται ως ένα βαθμό με την προσθήκη τους σε γαλακτοκομικά προϊόντα.

Οι τεχνολογικές ιδιότητες των βακτηρίων παίζουν εξίσου σημαντικό ρόλο στην παραγωγή των προβιοτικών τροφίμων. Στα πλαίσια αυτά πρέπει να προσδίδουν τα επιθυμητά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά στο προϊόν, ικανοποιητικούς ρυθμούς ζύμωσης, υψηλή βιωσιμότητα, τόσο κατά τις μεθόδους ξήρανσής τους, όπως είναι η λυοφιλίωση, όσο και κατά την παραγωγή των τροφίμων. Επίσης πρέπει να παρουσιάζουν σταθερότητα στη μακρόχρονη αποθήκευσή τους. Τα κριτήρια επιλογής που εξετάζουν την αντοχή των μικροοργανισμών, την ακινητοποίησή τους στο έντερο, τις αντικαρκινικές ιδιότητες και τη διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος, είναι ιδιαίτερα σύνθετα επειδή οι μηχανισμοί με τους οποίους οι μικροοργανισμοί εκφράζουν τις συγκεκριμένες ιδιότητες δεν έχουν μελετηθεί επαρκώς. Έτσι, είναι δύσκολο τη συγκεκριμένη χρονική στιγμή να οριστούν οι χαρακτήρες των προβιοτικών μικροοργανισμών που συνδέονται με τα παραπάνω κριτήρια. Η μελέτη των μηχανισμών που συνδέουν τα χαρακτηριστικά των μικροοργανισμών σε συνθήκες *in vitro* με την λειτουργικότητά τους σε συνθήκες *in vivo*, αποτελεί τον κύριο μελλοντικό τομέα έρευνας για τους προβιοτικούς μικροοργανισμούς.

2.7. Θετικές Επιδράσεις των Προβιοτικών Μικροοργανισμών

Ο ρόλος της εντερικής μικροχλωρίδας στην υγεία και την αντοχή στις ασθένειες είναι ιδιαίτερα σημαντικός. Κλινικές μελέτες με καλλιέργειες που έχουν εξεταστεί κατ' επανάληψη, έδωσαν αποτελέσματα που στηρίζουν την άποψη ότι οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί έχουν θετική επίδραση στη χλωρίδα του εντέρου, καθώς και ότι προσφέρουν προστασία έναντι των γαστρεντερικών λοιμώξεων και των φλεγμονών του εντέρου. Όμως, οι ευεργετικές επιδράσεις των προβιοτικών συχνά αμφισβητούνται, αν και ένα πλήθος κλινικών μελετών με τη χρήση συγκεκριμένων προβιοτικών μικροοργανισμών, αποδεικνύει αρκετές από αυτές. Για την εμφάνιση του ευεργετικού αποτελέσματος απαιτείται συγκεκριμένος αριθμός κυττάρων του προβιοτικού μικροοργανισμού. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, για την καθημερινή κατανάλωση προβιοτικών μικροοργανισμών ο προτεινόμενος αριθμός είναι 10^7 έως 10^9 κύτταρα/mL ή και 10^9 έως 10^{10} κύτταρα/mL όταν αναμένονται σημαντικές απώλειες ύστερα από την παραμονή στο περιβάλλον του στομάχου (Sanders, et al. 2008). Οι τροφές που περιέχουν προβιοτικούς μικροοργανισμούς επιδρούν τόσο στη μικροχλωρίδα όσο και στις μεταβολικές και ενζυμικές δραστηριότητες των παθογόνων μικροοργανισμών. Οι αλλαγές στη μικροχλωρίδα έχουν σχέση με τη μείωση της παραγωγής των προκαρκινικών ενζύμων καθώς και των καρκινογόνων ουσιών από τους μικροοργανισμούς του γαστρεντερικού σωλήνα. Επιπρόσθετα, οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί με την ακινητοποίηση στο επιθήλιο του εντέρου, τα κυτταρικά τους συστατικά και την

επίδραση στη μικροχλωρίδα του εντέρου, βελτιώνουν τη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος στο γαστρεντερικό σωλήνα. Οι θετικές επιδράσεις των προβιοτικών μικροοργανισμών καθώς και οι πιθανοί μηχανισμοί τους δίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Πιθανή θετική επίδραση	Μηχανισμοί
Αντιμετώπιση δυσανεξίας στη λακτόζη	<ul style="list-style-type: none"> • Δράση των ενζύμων λακτασών των μικροοργανισμών • Απελευθέρωση των ενζύμων λακτασών των μικροοργανισμών στο έντερο
Αντίσταση στους παθογόνους μικροοργανισμούς του εντέρου	<ul style="list-style-type: none"> • Ανταγωνισμός στην αποίκηση • Δημιουργία αντίξοων συνθηκών για τους παθογόνους μικροοργανισμούς όπως είναι το χαμηλό pH και η παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών
Αντικαρκινικές ιδιότητες	<ul style="list-style-type: none"> • Αντιμεταλλαξιογόνος δράση • Περιορισμός της δράσης προκαρκινικών ενζύμων
Ενίσχυση ανοσοποιητικού συστήματος	<ul style="list-style-type: none"> • Ενδυνάμωση της άμυνας του ανθρώπινου οργανισμού έναντι των λοιμώξεων
Καρδιαγγειακά νοσήματα	<ul style="list-style-type: none"> • Μείωση της χοληστερόλης
Περιορισμός της δράσης του <i>Helicobacter pylori</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών
Περιορισμός λοιμώξεων του ουροποιητικού και του γεννητικού συστήματος	<ul style="list-style-type: none"> • Ανταγωνισμός με τους παθογόνους μικροοργανισμούς • Προσκόλληση στα επιθηλιακά κύτταρα • Παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών

Το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού (*Helicobacter pylori*) εγκαθίσταται στο επιθήλιο του στομάχου και προκαλεί γαστρικές διαταραχές όπως γαστρίτιδα, έλκος και σε ορισμένες περιπτώσεις καρκινώματα (Gibson, 1998). Συγκεκριμένοι προβιοτικοί μικροοργανισμοί περιορίζουν τη δράση του ελικοβακτηριδίου του πυλωρού με την παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών. Η συμβιωτική καλλιέργεια λακτοβακίλλων και ζυμών είχε θανατηφόρο αποτέλεσμα έναντι του *H. pylori*, όταν η καλλιέργεια εμβολιάστηκε σε αγελαδινό γάλα και σε άλλα υποστρώματα. Σύμφωνα με τους Salminen et al. (1998), οι θετικές επιδράσεις των προβιοτικών μικροοργανισμών, η ακρίβεια των οποίων στηρίζεται σε τουλάχιστον δύο επιστημονικές εργασίες που έγιναν με αντικείμενο τον άνθρωπο, είναι η ανακούφιση των συμπτωμάτων της δυσανεξίας στη λακτόζη, ο περιορισμός της ενζυμικής δραστηριότητας των μη ωφέλιμων μικροοργανισμών του γαστρεντερικού σωλήνα και η ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος. Οι δοκιμές *in vitro* είναι ιδιαίτερα χρήσιμες για τη μελέτη των υποψήφιων μικροοργανισμών για προβιοτική χρήση καθώς και για την κατανόηση των μηχανισμών των προβιοτικών δράσεων. Όμως, οι δοκιμές αυτές δεν επαρκούν για να γίνει πρόβλεψη της λειτουργικότητας του μικροοργανισμού στον ανθρώπινο οργανισμό (FAO/WHO, 2002).

Ιδιαίτερα σημαντική είναι η επίδραση των προβιοτικών μικροοργανισμών στον έλεγχο των λοιμώξεων του ουροποιητικού και του γεννητικού συστήματος από παθογόνους μικροοργανισμούς όπως *Candida*, *Trichomonas*, *Mycoplasma*, *Chlamydia* και *E. coli*. Ένα επιπλέον πλεονέκτημα για τη χρήση των προβιοτικών μικροοργανισμών στην πρόληψη αυτού του είδους των λοιμώξεων, είναι η απουσία εμφάνισης παρενεργειών από τη χορήγηση, καθώς και η πιθανή χρήση των μικροοργανισμών ως πρόσθετο σε συγκεκριμένα τρόφιμα. Επιπλέον, προβιοτικοί μικροοργανισμοί επιδρούν προληπτικά και θεραπευτικά στη διάρροια. Η δράση των προβιοτικών μικροοργανισμών έναντι της διάρροιας αποτελεί την πιο μελετημένη επίδραση στην υγεία που έγινε με κλινικές δοκιμές σε ανθρώπους. Προβιοτικοί μικροοργανισμοί όπως ο *L. Rhamnosus* και ο *S. Boulardii* δρουν τόσο στην κοινή διάρροια, που προέρχεται από τη χρήση αντιβιοτικών και η οποία προκαλείται από διατάραξη της ισορροπίας της φυσιολογικής χλωρίδας του εντέρου, όσο και έναντι της διάρροιας που προκαλείται όταν το άτομο έχει μολυνθεί από παθογόνους μικροοργανισμούς (Elmer, 2001). Επίσης, η χρήση των προβιοτικών βοηθά στην πρόληψη της διάρροιας που εμφανίζεται σε παιδιά των αναπτυσσόμενων χωρών που δεν τρέφονται επαρκώς, αλλά και στην οξεία διάρροια προκαλώντας μείωση του χρόνου των διαρροϊκών επεισοδίων.

Προβιοτικοί μικροοργανισμοί χρησιμοποιήθηκαν στη διατροφή των ζώων ως ενισχυτές ανάπτυξης, αντικαθιστώντας έτσι τις αντιβιοτικές ουσίες στο σιτηρέσιο των ζώων. Η προσθήκη μικροοργανισμών στην τροφή των ζώων, όπως είναι τα στελέχη του γένους *Lactobacillus*, είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της ημερήσιας απόκτησης βάρους καθώς και τη βελτίωση του μεταβολισμού των συστατικών της τροφής. Στη διατροφή των ζώων, εκτός των στελεχών του είδους *Lactobacillus*, χρησιμοποιήθηκαν και στελέχη των ειδών *Saccharomyces* καθώς και *Clostridium* ως συμπληρώματα με προβιοτικές ιδιότητες. Τα προβιοτικά πρόσθετα διατροφής είναι αποτελεσματικά σε πουλερικά, χοίρους και νεαρά βοοειδή, ενώ τα προβιοτικά πρόσθετα διατροφής που περιέχουν μύκητες έχουν καλύτερα αποτελέσματα σε ενήλικα μηρυκαστικά. Η έρευνα στον τομέα των προβιοτικών μικροοργανισμών συνεχίζεται και σύμφωνα με τη μελέτη Owehand et al. (2002) διερευνάται η χρήση των προβιοτικών μικροοργανισμών στο δέρμα για την ανταγωνιστική απομάκρυνση διάφορων παθογόνων μικροοργανισμών που το προσβάλλουν όπως είναι ο *S. aureus*, η *C. albicans* και ο *Malassezia furfur*.

3. Αίσθηση Απαρτίας (QS) και Αυτεπαγωγείς τύπου 2 (AI-2)

3.1. Αίσθηση απαρτίας – Quorum sensing (QS)

Για πολλά χρόνια τα βακτήρια θεωρούνταν πρωτίστως ως αυτόνομοι μονοκύτταροι οργανισμοί με μικρή δυνατότητα συλλογικής συμπεριφοράς. Ωστόσο, εκτιμάται τώρα ότι τα βακτηριακά κύτταρα έχουν στην πραγματικότητα πολλούς τρόπους επικοινωνίας μεταξύ ατόμων του ίδιου είδους και μεταξύ ατόμων διαφορετικού είδους. Ο γενικός όρος «αίσθηση απαρτίας» υιοθετήθηκε για να περιγράψει τους μηχανισμούς επικοινωνίας μεταξύ των βακτηριακών κυττάρων που συντονίζουν την έκφραση γονιδίων συνήθως, αλλά όχι πάντοτε, όταν ο πληθυσμός τους φθάσει σε υψηλή κυτταρική πυκνότητα. Η αίσθηση της απαρτίας εξαρτάται από τη σύνθεση μικρών μορίων (συχνά αναφερόμενων ως αυτεπαγωγείς) που διαχέονται μέσα και έξω από τα βακτηριακά κύτταρα. Καθώς αυξάνεται η πυκνότητα του βακτηριακού πληθυσμού, η σύνθεση των μορίων-σημάτων επικοινωνίας, και συνεπώς η συγκέντρωσή τους στο εξωτερικό περιβάλλον αυξάνεται. Μόλις επιτευχθεί μια κρίσιμη συγκέντρωση, ενεργοποιείται (ή καταστέλλεται) ένας ρυθμιστής κινάσης αισθητήρα-στόχου ή ένας ρυθμιστής απόκρισης, διευκολύνοντας έτσι την έκφραση γονιδίων που εξαρτώνται από την ανίχνευση της απαρτίας. Η αίσθηση της απαρτίας επιτρέπει σε έναν πληθυσμό βακτηρίων να αναπτύξει μια συνεταιριστική απόκριση που βελτιώνει την πρόσβαση σε θρεπτικά στοιχεία ή συγκεκριμένες περιβαλλοντικές θέσεις, προάγει τη συλλογική άμυνα έναντι άλλων ανταγωνιστικών προκαρυωτικών ή ευκαρυωτικών αμυντικών μηχανισμών και διευκολύνει την επιβίωση μέσω διαφοροποίησης σε μορφολογικές μορφές που μπορούν να καταπολεμήσουν περιβαλλοντικές απειλές. Ωστόσο, υπάρχουν πολλές καταστάσεις όπου η ικανότητα ενός βακτηριακού πληθυσμού να συμπεριφέρεται ως ένα ενιαίο σύνολο και να αντιλαμβάνεται το είδος του ως διαφορετικό από ένα άλλο πληθυσμό θα μπορούσε να είναι ιδιαίτερα επωφελής, ιδιαίτερα στα πλαίσια της συμβίωσης και προσαρμογής στο περιβάλλον, στην παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών όπως τα αντιβιοτικά, την καταπολέμηση των αμυντικών μηχανισμών των ανώτερων οργανισμών και τη διευκόλυνση της μετανάστευσης πληθυσμού όπου οι συνθήκες που επικρατούν σε μια συγκεκριμένη περιβαλλοντική θέση έχουν γίνει δυσμενείς.

Ωστόσο, ο όρος αίσθηση απαρτίας δεν περιγράφει επαρκώς όλες τις καταστάσεις όπου τα βακτήρια χρησιμοποιούν διάχυτα χημικά σήματα. Το μέγεθος της απαρτίας, για παράδειγμα, δεν είναι σταθερό αλλά θα ποικίλει ανάλογα με τους σχετικούς ρυθμούς παραγωγής και απώλειας του μορίου σήματος, δηλαδή εξαρτάται από τις επικρατούσες τοπικές περιβαλλοντικές συνθήκες (Qazi et al. 2001).

Επομένως, η αίσθηση της απαρτίας μπορεί να θεωρηθεί καλύτερα ως μια ειδική κατηγορία ανίχνευσης διάχυσης, όπου σε ένα δεδομένο περιβάλλον το όριο της συγκέντρωσης του μορίου σήματος που απαιτείται για την ενεργοποίηση μιας

απόκρισης μπορεί να επιτευχθεί μόνο με περισσότερα από ένα κύτταρα (Redfield 2002; Winzer et al. 2002b).

Επιπλέον, η αίσθηση της απαρτίας, ως καθοριστικός παράγοντας της πυκνότητας του κυτταρικού πληθυσμού, είναι μόνο ένα από τα πολλά διαφορετικά περιβαλλοντικά σήματα (π.χ. θερμοκρασία, pH, όσμωση, οξειδωτικό στρες, έλλειψη θρεπτικών στοιχείων) τα οποία πρέπει να αποκωδικοποιήσουν τα βακτηριακά κύτταρα για βέλτιστη στρατηγική επιβίωσης. Έτσι, η αίσθηση της απαρτίας αποτελεί σημαντικό παράγοντα για τη διευκόλυνση της βακτηριακής προσαρμογής στο περιβαλλοντικό στρες.

Η δυνατότητα των βακτηρίων να αντιλαμβάνονται τον πληθυσμό τους και τις χημικές ουσίες που παράγουν τα γειτονικά τους κύτταρα αλλά και τα ίδια τα προϊόντα τους περιγράφηκε για πρώτη φορά στο βακτήριο *Vibrio fisheri* (Hastings and Nealson, 1977). Το *Vibrio fisheri* είναι ένα θαλάσσιο βακτήριο που έχει την ξεχωριστή ιδιότητα να παράγει φως, ή αλλιώς, βιοφωταύγεια. Τα βακτήρια αυτά όταν βρίσκονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις δεν παράγουν φως, αλλά όταν φτάσουν ένα συγκεκριμένο αριθμό κυττάρων τότε ταυτόχρονα παράγουν φως όλα μαζί. Αυτό συμβαίνει γιατί όταν τα βακτήρια μεγαλώνουν και διπλασιάζονται συμμετέχουν όλα στη διαδικασία παραγωγής κάποιων μορίων (τους αυτεπαγωγείς), η εξωκυτταρική ποσότητα αυτού του μορίου αυξάνεται σε αναλογία με τον αριθμό κυττάρων. Όταν το μόριο φτάσει μια ορισμένη ποσότητα, τα βακτήρια το αντιλαμβάνονται και το αναγνωρίζουν με αποτέλεσμα να παράγουν φως συγχρόνως.

Ο λόγος για τον οποίο το *Vibrio fisheri* το κάνει αυτό, εξηγείται από τη βιολογία, καθώς το βακτήριο αυτό ζει συμβιωτικά σε μεγάλους πληθυσμούς με ένα είδος καλαμαριού. Και οι δύο οργανισμοί ζουν συμβιωτικά γιατί επωφελείται ο ένας από τον άλλο. Το καλαμάρι έχει τη δυνατότητα να ξεφεύγει από τους εχθρούς του λόγω του φωτός που ακτινοβολεί από το σώμα του και το κάνει να μην παράγει σκιά. Με τον τρόπο αυτό οι θηρευτές δεν μπορούν να υπολογίσουν την τροχιά του. Σε αντάλλαγμα το καλαμάρι προσφέρει στο *Vibrio fisheri* ένα πολύ θρεπτικό υπόστρωμα για την ανάπτυξή του (Schauder and Bassler, 2001).

3.2. Ο ρόλος της αίσθησης απαρτίας στις κοινωνικές δραστηριότητες και στην εξέλιξη των βακτηρίων

Τα περισσότερα μικρόβια ζουν σε πληθυσμούς και βασίζονται σε χαρακτηριστικά του πληθυσμού για την επιβίωση και τις φυσιολογικές τους δραστηριότητες. Επίσης, τα βακτήρια επιτυγχάνουν την παθογένεια μέσω της συγκέντρωσής τους σε μεγάλους πληθυσμούς. Κατά τη διάρκεια της ανίχνευσης μορίων αίσθησης απαρτίας, τα βακτηριακά κύτταρα συνεργάζονται για να αποκτήσουν οφέλη ειδικά για την ομάδα. Ένα από τα καλύτερα περιγραφέντα παραδείγματα είναι η περίπτωση του *Myxococcus xanthus* το οποίο απαιτεί κοινωνική συνεργασία για να σχηματίσει ένα καρποφόρο σώμα που περιέχει

σπόρια σκληραγωγημένων κυττάρων ως αντίδραση στην στέρηση τροφής. Μέσω της κοινωνικής συνεργασίας, ένα τμήμα του πληθυσμού επιβιώνει στην πείνα σχηματίζοντας τα καρποφόρα σώματα, αλλά τα περισσότερα κύτταρα του πληθυσμού που παρέχουν τη συνεργασία θυσιάζονται. Στο φαινόμενο η συνεργασία ωφελεί το σύνολο, αλλά το κόστος είναι η θυσία κάποιου μέρους του πληθυσμού. Έχει βρεθεί ότι μια τέτοια ελεγχόμενη από την απαρτία συνεργασία είναι ευρέως διαδεδομένη σε πολλά βακτήρια.

Από εξελικτική άποψη, όμως, η βακτηριακή κοινωνική συμπεριφορά μπορεί να δημιουργήσει ανταγωνισμό και ακόμη και δυνητικό κίνδυνο για τον πληθυσμό, επειδή η θεωρία της εξέλιξης προβλέπει ότι τα άτομα που συνεργάζονται μπορούν να εκμεταλλευτούν άτομα που δεν συνεργάζονται, για να επωφεληθούν από τα συνεργαζόμενα κύτταρα. Το πλεονέκτημα της συνεργασίας είναι εύκολο να γίνει κατανοητό εάν οι πληθυσμοί είναι μονοκλωνικοί και το κόστος φυσικής κατάστασης σε μεμονωμένα κύτταρα αντισταθμίζεται από το όφελος για τον πληθυσμό. Ωστόσο, σε πολλές ρεαλιστικές καταστάσεις, οι μικροβιακοί πληθυσμοί δεν είναι μονοκλωνικοί, αλλά μάλλον ετερογενείς πληθυσμοί, όπου οι συνεργάτες και οι μη συνεργαζόμενοι αλληλεπιδρούν. Η συνεργασία παρέχει πολλά οφέλη στον πληθυσμό, αλλά τα οφέλη του πληθυσμού συχνά επιβαρύνουν τα άτομα. Πρόκειται για ανταγωνισμό μεταξύ της ικανότητας των ατόμων και της ικανότητας της ομάδας. Μια καλή εικόνα αυτής της σύγκρουσης είναι η αργή ανάπτυξη με υψηλή απόδοση έναντι της ταχείας αλλά σπατάλης ανάπτυξης. Το ωφέλιμα του πληθυσμού έρχεται εις βάρος σε επίπεδο ατόμου, καθώς τα κύτταρα θα μπορούσαν να αναπτυχθούν ταχύτερα με χαμηλότερες αποδόσεις.

Υπάρχει και η περίπτωση της εμφάνισης μη συνεργάσιμων κυττάρων λόγω μετάλλαξης η οποία αποτελεί μείζονα πρόκληση για τους συνεργάσιμους φαινότυπους. Οι Diggle et al, παρατήρησαν αυτή την επίδραση στους πληθυσμούς που ανιχνεύουν την απαρτία του ευκαιριακού παθογόνου *P. aeruginosa* (Diggle et al, 2007). Διαπιστώθηκε ότι η αίσθηση της απαρτίας παρείχε ένα όφελος σε επίπεδο ομάδας, αλλά τα εκμεταλλευόμενα άτομα μπορούσαν να αποφύγουν το κόστος παραγωγής του σήματος QS ή της εκτέλεσης της συνεταιριστικής συμπεριφοράς που συντονίζεται από την αίσθηση απαρτίας. Συνεπώς, αυτά τα μη συνεργαζόμενα άτομα μπορούν να εξαπλωθούν στον πληθυσμό. Αυτοί οι ερευνητές υπέδειξαν επίσης μια λύση στο πρόβλημα της εκμετάλλευσης από την επιλογή γονιδίων, η οποία μπορεί να είναι εξαιρετικά σημαντική στις μικροβιακές κοινωνικές συμπεριφορές λόγω της κλωνικής τους αναπαραγωγής και των σχετικών τοπικών αλληλεπιδράσεων.

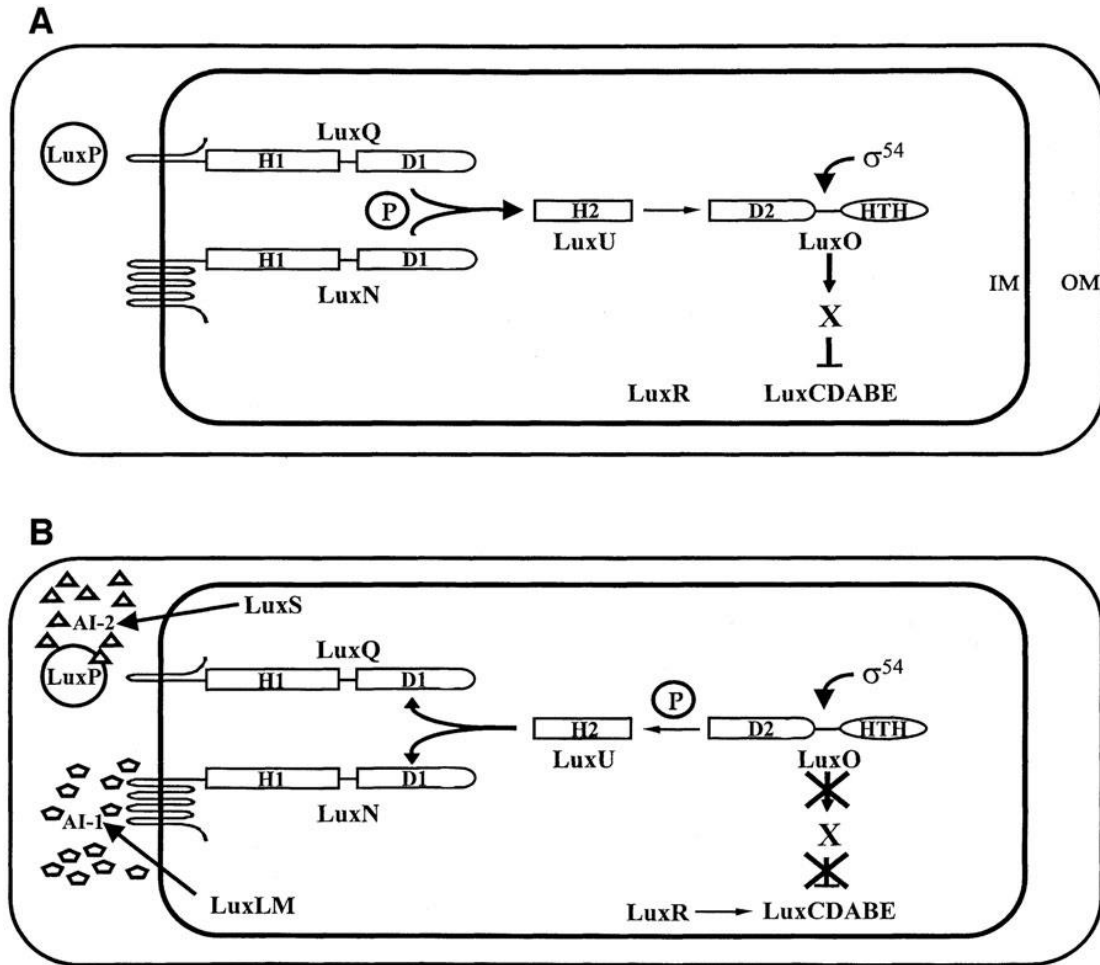
Τα φυσικά βιοϋμένια σε πολλά περιβάλλοντα χαρακτηρίζονται συχνά από υψηλή κυτταρική πυκνότητα και μεγάλη ποικιλότητα μικροβιακών ειδών. Η κοινότητα των βιοϋμένων επιτρέπει κλειστές αλληλεπιδράσεις κυττάρου-κυττάρου μέσα ή μεταξύ των ειδών, με αποτέλεσμα αναπόφευκτες αλληλεπιδράσεις εντός και μεταξύ των ειδών, συμπεριλαμβανομένων τόσο της συνεργασίας όσο και των ανταγωνισμών. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις μπορεί να διαδραματίζουν πολύ

σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης μικροβίων σε μια κοινότητα βιοϋμενίου. Η ποικιλομορφία και οι αλληλεπιδράσεις που μπορούν να προκύψουν στα βιοϋμένια αποτελούν μοναδική ευκαιρία για δοκιμή οικολογικών και εξελικτικών θεωριών (Kolenbrander et al, 2002), (Kuramitsu et al, 2007).

3.3. *Vibrio harveyi*

Η αίσθηση της απαρτίας ρυθμίζει επίσης τη βιοφωταύγεια στο *Vibrio harveyi*, ένα ελεύθερο διαβίον Gram-αρνητικό θαλάσσιο βακτήριο. Τα περισσότερα συστήματα Gram-αρνητικών βακτηρίων που ανιχνεύουν την αίσθηση απαρτίας αποτελούνται από ένα μόριο σήμα, την ακυλιωμένη λακτόνη της ομοσερίνης (AHL) εξαρτώμενο από το γονίδιο LuxI και την πρωτεΐνη μεταγραφικού ρυθμιστή μεταγραφικής δέσμευσης τύπου LuxR. Αυτό το περίπλοκο κύκλωμα καλείται να διευκολύνει την επικοινωνία μεταξύ κυττάρων-κυττάρων εντός και μεταξύ των ειδών και να παράσχει στον *V. harveyi* έναν μηχανισμό για την παρακολούθηση τόσο της πυκνότητας πληθυσμού όσο και της σύνθεσης των ειδών της βακτηριακής κοινότητας (Bassler, 1999).

Στο *V. harveyi*, η έκφραση της βιοφωταύγειας εξαρτάται από την παραγωγή και την ανίχνευση δύο διαφορετικών αυτεπαγωγέων, AI-1 και AI-2. (Εικόνα 3.3.1.). Ο αυτεπαγωγέας τύπου 1 (AI-1) παράγεται από το ένζυμο LuxLM και ο αυτεπαγωγέας τύπου 2 (AI-2) από το ένζυμο LuxS. AI-1 και AI-2 ανιχνεύονται μέσω των συγγενών τους αισθητήρων LuxN και LuxPQ, αντίστοιχα.



Εικόνα 3.3.1. Το σύστημα ανίχνευσης της απαρτίας του *V. harveyi*. Οι καταστάσεις χαμηλής και υψηλής κυτταρικής πυκνότητας του συστήματος επικοινωνίας του *V. harveyi* παρουσιάζονται στο σχήμα (A και B, αντίστοιχα). Το 'P' στον κύκλο υποδηλώνει ότι η μεταγωγή σήματος λαμβάνει χώρα με τη βοήθεια φωσφορυλίωσης. Τα AI-1 και AI-2 απεικονίζονται ως πεντάγωνα και τρίγωνα, αντίστοιχα.

Σε χαμηλή πυκνότητα κυττάρων (Εικόνα 3.2.1.A), τα LuxN και LuxQ δρουν ως κινάσες και μεταφέρουν φωσφοριλιωμένο σήμα μεταγωγής στην κοινή πρωτεΐνη φωσφοτρανσφεράσης LuxU. Το LuxU μεταδίδει το φωσφοριλιωμένο σήμα μεταγωγής στην πρωτεΐνη του ρυθμιστή απόκρισης LuxO. Μαζί με τον εναλλακτικό σίγμα συντελεστή σ^{54} , το LuxO υποτίθεται ότι ενεργοποιεί την έκφραση ενός ακόμη μη αναγνωρισμένου καταστολέα «X», ο οποίος ρυθμίζει αρνητικά την έκφραση της luxCDABE (λουσιφεράσης), και το *V. harveyi* δεν παράγει φως (Bassler et al., 1994b; Freeman and Bassler, 1999a).

Σε υψηλή κυτταρική πυκνότητα (Εικόνα 3.3.1.B), οι αισθητήρες LuxN και LuxPQ ανιχνεύουν τους συγγενείς αυτεπαγωγείς τους, AI-1 και AI-2, αντίστοιχα, οι οποίοι μετατρέπουν τα LuxN και LuxQ από κινάσες σε φωσφατάσες. Αυτή η ενέργεια αναστρέφει τη ροή φωσφορικού διαμέσου του μονοπατιού, από LuxO σε

LuxU, και τελικά σε LuxN και LuxQ, όπου η ομάδα φωσφορυλίου υδρολύεται. Η αποφωσφορυλίωση του LuxO το απενεργοποιεί και τερματίζει την έκφραση του καταστολέα X. Ένας μεταγραφικός ενεργοποιητής, LuxR (όχι παρόμοιος με άλλες πρωτεΐνες που ανιχνεύουν απαρτία τύπου LuxR) δεσμεύει το LuxCDABE, ενεργοποιεί τη μεταγραφή και παράγει φως.

Η χρήση δύο αυτεπαγωγέων για τον έλεγχο της ανίχνευσης της απαρτίας στο *V. harveyi* είναι ενδιαφέρουσα, καθώς ένας αυτεπαγωγέας είναι επαρκής για τη ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου που εξαρτάται από την πυκνότητα του πληθυσμού. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω οι δύο αυτεπαγωγείς διαδραματίζουν ξεχωριστούς ρόλους στην ανίχνευση της απαρτίας στο *V. harveyi*. Ο ισχυρισμός αυτός προέρχεται από δύο ευρήματα: (i) Ο AI-1 είναι εξαιρετικά εξειδικευμένο και η μέχρι τώρα γνωστή παραγωγή του περιορίζεται στο *V.harveyi* και στο στενά συνδεδεμένο είδος *Vibrio parahaemolyticus*. Και (ii) η παραγωγή AI-2 και η συνθέταση AI-2, LuxS, είναι ευρέως διαδεδομένα στα βακτήρια και μέχρι σήμερα έχουν αποδειχθεί ότι υπάρχουν σε περισσότερα από 40 Gram-αρνητικά και Gram-θετικά βακτηριακά είδη (Bassler et al., 1994b; Freeman and Bassler, 1999a). Έτσι, οι AI-1 και AI-2 χρησιμοποιούνται από το *V.harveyi* και για ενδο-επικοινωνία, που επιτρέπει στο *V. harveyi* να διακρίνει μεταξύ καταστάσεων όταν υπάρχει κυρίως ως μονο-καλλιέργεια σε σχέση με περιπτώσεις στις οποίες συνυπάρχει με άτομα διαφορετικού είδους ή γένους (Bassler et al., 1997; Surette et al., 1999; Schauder and Bassler, 2001).

3.4. Αυτεπαγωγείς τύπου 2 (AI-2)

Οι αυτεπαγωγείς τύπου 2 επιτρέπουν στα βακτηριακά κύτταρα να επικοινωνούν μεταξύ του ιδίου είδους και μεταξύ διαφορετικών ειδών για το λόγο αυτό είναι πολύ σπουδαίος τρόπος επικοινωνίας για βακτήρια που ζουν σε μεικτές κοινωνίες.

Η LuxS, η συνθάση του AI-2, εμφανίζεται σε πάνω από 40 είδη αρνητικών κατά Gram και Gram θετικών βακτηρίων. Πρόσφατα συμπεράσματα υποδεικνύουν έντονα ότι τα μόρια AI-2 από διαφορετικά είδη βακτηρίων είναι πανομοιότυπα.

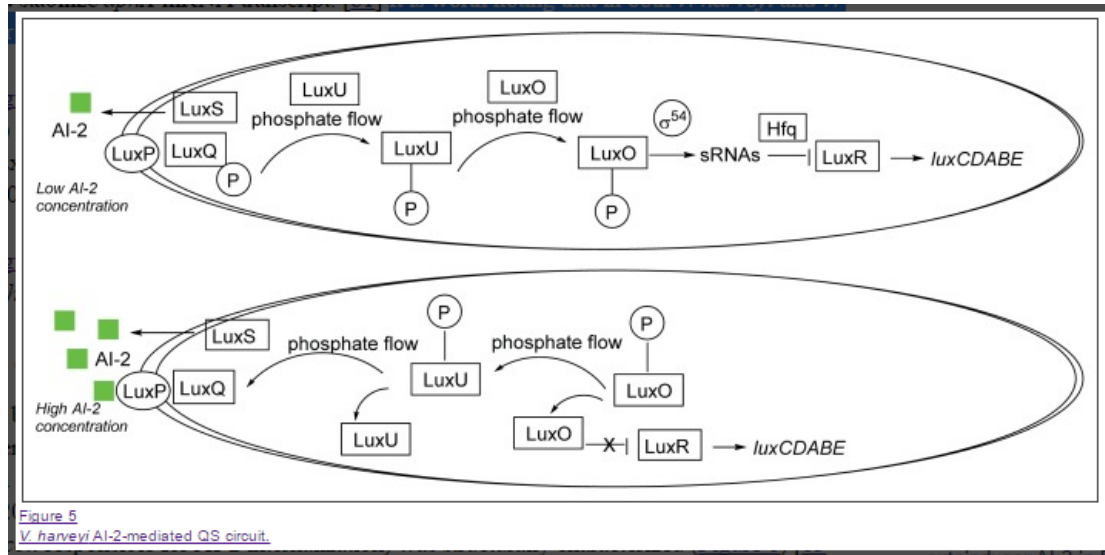
Οι αυτεπαγωγείς τύπου 2 (AI-2) έχουν χαρακτηριστεί ως αυτοδιεγέρτες και έχει αποδειχθεί ότι ρυθμίζουν τη διαφορετική φυσιολογία των βακτηρίων καθώς επίσης και επηρεάζουν τον σχηματισμό βιοϋμενίου σε μερικά βακτήρια.

Η κύρια βιοσυνθετική οδός των AI-2 σε βακτήρια είναι η καταλυόμενη από LuxS παραγωγή 4,5-Διωδροξυ-2,3-πεντανοδιόνης (DPD) από S-ριβοσυλ-1-ομοκυστεΐνη. Τα ομόλογα των *LuxS* γονιδίων υπάρχουν σε περίπου 50% όλων των αλληλουχιών βακτηρίων (τόσο Gram-αρνητικά όσο και Gram-θετικά). Αξίζει να σημειωθεί ότι το *LuxS* είναι ένα ένζυμο διπλής λειτουργίας, το οποίο όχι μόνο παράγει AI-2 αλλά συμμετέχει και στον ενεργοποιημένο κύκλο μεθυλίου (AMC). Ως εκ τούτου, εξακολουθεί να υπάρχει θέμα συζήτησης εάν το AI-2 είναι απλώς

μεταβολίτης στο AMC. Έχει επίσης προταθεί μια άλλη οδός προς την βιοσύνθεση των AI-2, η οποία δεν περιλαμβάνει τον ενεργοποιημένο κύκλο μεθυλίου. Έχει αποδειχθεί ότι παρουσία οξέος, τόσο η DPD όσο και η 4-υδροξυ-5-μεθυλο-3 (2H) - φουρανόνη σχηματίζονται αυθόρμητα από d-ριβουλόζη-5-φωσφορικό.

Οι αυτεπαγωγείς τύπου 2 μπορούν να χρησιμεύσουν ως μεταβολικό παραπροϊόν σε ορισμένα είδη, αλλά υπάρχουν πολλά στοιχεία που υποστηρίζουν το ρόλο τους στην καταστολή και την ενεργοποίηση ενός ευρέος φάσματος γονιδίων.

Στο *V. harveyi*, ο AI-2 συντίθεται από το *LuxS* και εξάγεται έξω από την κυτταρική μεμβράνη, όπου δεσμεύεται με έναν εξωκυτταρικό υποδοχέα *LuxP* ο οποίος συνδέεται με το *LuxQ* για να σχηματίσει το *LuxPQ* για να ρυθμίσει τον καταρράκτη μεταγωγής σήματος φωσφορυλίωσης. Σε χαμηλή πυκνότητα κυττάρων, η οποία συσχετίζεται με χαμηλή συγκέντρωση AI-2, το *LuxPQ* δρα ως κινάση και μεταφέρει φωσφορικό σε *LuxU*, το οποίο στη συνέχεια αναστέλλει φωσφορική ομάδα στο *LuxO*. Το *LuxO*-φωσφορικό (ένας μεταγραφικός ενεργοποιητής), μαζί με τον σίγμα παράγοντα σ^{54} , ενεργοποιεί την έκφραση ρυθμιστικών μικρών RNAs (sRNAs) *Qrr1-5*. Το *Qrr1-5*, σε συνδυασμό με το *Hfq*, αποσταθεροποιεί το *luxR* mRNA έτσι ώστε να καταστέλλεται η σύνθεση *LuxR*. Σε υψηλή συγκέντρωση AI-2, οι AI-2 δεσμεύονται στο σύμπλεγμα *LuxPQ* και το σύμπλεγμα AI-2 / *LuxPQ* μετατρέπεται σε φωσφατάση, η οποία αποφωσφορυλιώνει *LuxU*, η οποία με τη σειρά της αποφωσφορυλιώνει *LuxO* (Εικόνα 3.5.1.). Το αποφωσφορυλιωμένο *LuxO* δεν είναι πλέον δραστικό και επομένως, οι συγκεντρώσεις του *Qrr1-5*, οι οποίες αποικοδομούν το mRNA του *LuxR*, μειώνονται. Καθώς η συγκέντρωση του *LuxR*, που είναι ένας παράγοντας μεταγραφής, αυξάνεται, τα γονίδια που ελέγχονται από το *LuxR* (μερικά από τα οποία είναι καθοριστικοί παράγοντες μολυσματικότητας) εκφράζονται. Αξίζει να σημειωθεί ότι τόσο στο *V. harveyi* όσο και στο *V. cholerae*, τα sRNAs *Qrr1-5* όχι μόνο ρυθμίζονται από AI-2 αλλά και από CAI-1 μέσω του υποδοχέα *CqsS*.

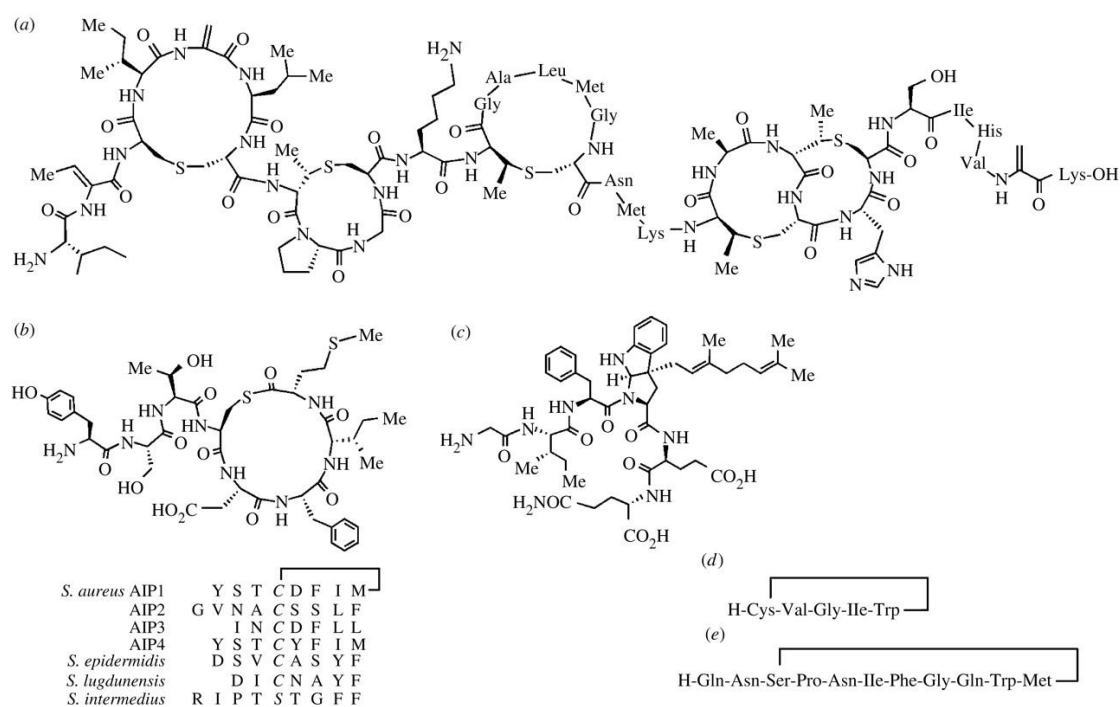


Εικόνα 3.4.1. Ο τρόπος που επιτυγχάνεται η αίσθηση απαρτίας για το *Vibrio harveyi* μέσω της παραγωγής αυτεπαγωγέων τύπου 2.

3.5. Τύποι μορίων- σημάτων επικοινωνίας

Υπάρχουν τέσσερις διαφορετικές κατηγορίες βακτηριακών μορίων σημάτων:

1. Ακυλιωμένες λακτόνες της ομοσερίνης (AHLs) οι οποίες χρησιμοποιούνται από αρνητικά κατά Gram βακτήρια μεταξύ κυττάρων του ίδιου είδους και ονομάζονται αυτεπαγωγείς τύπου 1 (AI-1). Υπάρχουν διαφορές στο μήκος της ακυλικής αλυσίδας και στους υποκαταστάτες οι οποίες καθορίζουν κάθε φορά και το είδος της αίσθησης απαρτίας. Οι AHLs μεταφέρονται με διάχυση, ενώ οι AHLs μεγαλύτερου μήκους μεταφέρονται με τη βοήθεια της ενεργού μεταφοράς (Miller and Bassler, 2001).
2. Οι φουρανόσυλο-βορικοί-διεστέρες ή αλλιώς αυτεπαγωγείς τύπου 2 (AI-2), οποίοι παράγονται από αρνητικά και θετικά κατά Gram βακτήρια και χρησιμοποιούνται στην επικοινωνία μεταξύ κυττάρων του ίδιου ή διαφορετικού είδους.
3. Οι αυτεπαγωγείς τύπου 3 (AI-3) των οποίων η δομή είναι μέχρι τώρα άγνωστη. Χρησιμοποιείται στην επικοινωνία μεταξύ βασιλείων και στην παθογένεια του εντεροαιμοραγικού *E. coli* (Sperandio et al. 2003).
4. Αμινοξέα και μικρά πεπτίδια που χρησιμοποιούνται από τα θετικά κατά Gram βακτήρια. Τα ολιγοπεπτίδια συντίθενται ριβοσωμικά ως πρόδρομα πεπτίδια και στη συνέχεια σχίζονται για να αποτελέσουν το ώριμο πεπτίδιο, που εξέρχεται από τα κύτταρα με μια διαδικασία που δεσμεύει ATP, μέσω μιας πρωτεΐνης μεταφορέα που ανιχνεύεται από τα γειτονικά κύτταρα (Miller and Bassler, 2001).



Εικόνα 3.5.1. Χημικές δομές των μορίων σήματος αντίχνευσης απαρτίας: (Α) νισίνη από *L. lactis*, (επάνω) αυτό-επαγωγικό πεπτίδιο-1 (AIP-1) από *S. aureus* και (κάτω) σχηματικές δομές σταφυλόκοκκων AIPs. (C) ComX από *B. Subtilis* RO-E-2; Δ) AIP από *Lactobacillus plantarum*, Και (ε) 28-μελή AIP από *E. Faecalis*.

3.6 Τύποι συστημάτων επικοινωνίας

Τα συστήματα αίσθησης απαρτίας μπορούν να χωριστούν σε τρεις κύριες κατηγορίες βασισμένα στον τύπο του σήματος και στον τρόπο που αυτό ανιχνεύεται:

1. Συστήματα επικοινωνίας που χρησιμοποιούν τα Gram αρνητικά βακτήρια και βασίζονται στο σύστημα LuxI/R.
2. Συστήματα επικοινωνίας που χρησιμοποιούν τα Gram θετικά βακτήρια τα οποία χρησιμοποιούν τροποποιημένα ολιγοπεπτίδια ως αυτεπαγωγείς. Τα σήματα συντίθενται ως πρόδρομα πεπτίδια, τα οποία στη συνέχεια επεξεργάζονται και εκκρίνονται.
3. Η τρίτη κατηγορία σημάτων αίσθησης απαρτίας είναι υβριδική, είναι δηλαδή ένα ενδιάμεσο σύστημα μεταξύ των δύο παραπάνω συστημάτων επικοινωνίας που χρησιμοποιούν τα αρνητικά και θετικά κατά Gram βακτήρια. Αυτό το υβριδικό σύστημα επικοινωνίας εντοπίστηκε για πρώτη φορά στο θαλάσσιο βακτήριο *Vibrio harveyi* το οποίο παράγει βιοφωταύγεια. Το βακτήριο αυτό παράγει και αναγνωρίζει δύο διαφορετικούς αυτεπαγωγείς τους AI-1 και AI-2. Ο αυτεπαγωγέας τύπου 1

είναι Ακυλιωμένες λακτόνες της ομοσερίνης (AHLs) ίδιες όπως και σε άλλα συστήματα επικοινωνίας των Gram αρνητικών βακτηρίων. Αντίθετα, οι αυτεπαγωγείς τύπου 2 του *Vibrio harveyi* είναι φουρανοσυλο-βορικοί διεστέρες (Jennifer M. Henkel and B.Bassler, 2004).

	Gram-negative: LuxI/R	Gram-positive: oligopeptide	Hybrid
Circuit organization			
Autoinducer structures	 3-O-C12-HSL/LasI <i>Pseudomonas aeruginosa</i> C4-HSL/RhlI <i>P. aeruginosa</i> C8-HSL/TraI <i>Agrobacterium tumefaciens</i> C6-HSL/LuxI <i>Vibrio fischeri</i>	ERGMT CSF/phrC <i>Bacillus subtilis</i> ADPITRQWGD comX <i>B. subtilis</i> YSTCDFIM GVNACSSLF INCDFLL YSTCYFIM AIP I-IV <i>Staphylococcus aureus</i>	 3-OH-C4-HSL/LuxM <i>Vibrio harveyi</i> AI-2/LuxS <i>V. harveyi</i> AI-2/LuxS <i>Salmonella typhimurium</i>
Regulated behaviors	<i>P. aeruginosa</i> : Elastase production, rhamnolipid production (virulence factors) <i>V. fischeri</i> : Bioluminescence <i>Erwinia carotovora</i> : Exoenzyme production (virulence), antibiotic production <i>A. tumefaciens</i> : Conjugation of the Ti plasmid <i>Serratia liquefaciens</i> : Pigment production, antibiotic production <i>Stenotrophobium meliloti</i> : Exopolysaccharide synthesis (symbiosis)	<i>B. subtilis</i> : Competence, sporulation <i>S. aureus</i> : Virulence, biofilms <i>Lactococcus lactis</i> : Nisin production <i>Streptococcus pneumoniae</i> : Competence	<i>V. harveyi</i> : Luminescence, type III secretion <i>Vibrio cholerae</i> : Virulence, biofilm production <i>Vibrio anguillarum</i> : Protease production <i>S. typhimurium</i> : Lsr transporter ** <i>Photobacterium luminescens</i> : Antibiotic production ** <i>Clostridium perfringens</i> : Toxin production ** <i>Streptococcus pyogenes</i> : Hemolysin production

Εικόνα 3.6.1. Οι τρεις βασικοί τύποι συστημάτων επικοινωνίας της αίσθησης απαρτίας.

3.7. Σκοπός της παρούσας μελέτης

Ο σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης ήταν η μελέτη του προβιοτικού δυναμικού οξυγαλακτικών βακτηρίων απομονωμένων από ζυμώμενες ελιές της ποικιλίας Κονσερβολιά, μέσω *in vitro* δοκιμών. Πιο συγκεκριμένα μελετήθηκε η ανθεκτικότητα σε χαμηλό pH, η ανθεκτικότητα σε χολικά άλατα, η υδρόλυση χολικών αλάτων, η αιμολυτική δραστηριότητα, η αντιμικροβιακή δράση ενάντια σε παθογόνους μικροοργανισμούς και η ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά. Επίσης μελετήθηκε η ανίχνευση μορίων σημάτων (αυτεπαγωγείς τύπου 2 (AI-2)), οι οποίοι παρήχθησαν από οξυγαλακτικά στελέχη βακτηρίων, υπό άριστες συνθήκες ανάπτυξης σε δύο διαφορετικά μέσα ανάπτυξης καθώς και υπό συνθήκες καταπόνησης που προσομοιάζουν αυτές του γαστρεντερικού συστήματος.

B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4. Υλικά και Μέθοδοι

4.1. Στελέχη μικροοργανισμών

Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, καθώς και τα στελέχη τους προέρχονται από τη Βάση Μικροοργανισμών του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα:

Πίνακας 4.1.1. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια που μελετήθηκαν και τα δύο προβιοτικά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες.

ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΚΩΔΙΚΟΣ FMCC ^a	ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ^b	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ
<i>Lactobacillus plantarum</i>	B355	Στέλεχος υπό μελέτη	30°C
<i>L. pentosus</i>	B356	Στέλεχος υπό μελέτη	30°C
<i>L. pentosus</i>	B357	Στέλεχος υπό μελέτη	30°C
<i>L. plantarum</i>	B359	Στέλεχος υπό μελέτη	30°C
<i>L. pentosus</i>	B360	Στέλεχος υπό μελέτη	30°C
<i>L. pentosus</i>	B361	Στέλεχος υπό μελέτη	30°C
<i>L. pentosus</i>	B362	Στέλεχος υπό μελέτη	30°C
<i>L. pentosus</i>	B363	Στέλεχος υπό μελέτη	30°C
<i>L. pentosus</i>	B364	Στέλεχος υπό μελέτη	30°C
<i>L. plantarum</i>	B365	Στέλεχος υπό μελέτη	30°C
<i>L. pentosus</i>	B366	Στέλεχος υπό μελέτη	30°C
<i>L. pentosus</i>	B367	Στέλεχος υπό μελέτη	30°C
<i>L. pentosus</i>	B368	Στέλεχος υπό μελέτη	30°C
<i>L. pentosus</i>	B369	Στέλεχος υπό μελέτη	30°C
<i>L. pentosus</i>	B370	Στέλεχος υπό μελέτη	30°C
<i>L. pentosus</i>	B371	Στέλεχος υπό μελέτη	30°C
<i>L. plantarum</i>	B372	Στέλεχος υπό μελέτη	30°C
<i>L. plantarum</i>	B373	Στέλεχος υπό μελέτη	30°C
<i>L. plantarum</i>	B374	Στέλεχος υπό μελέτη	30°C
<i>L. plantarum</i>	B375	Στέλεχος υπό μελέτη	30°C
<i>L. pentosus</i>	B376	Στέλεχος υπό μελέτη	30°C
<i>L. pentosus</i>	B377	Στέλεχος υπό μελέτη	30°C
<i>L. pentosus</i>	B378	Στέλεχος υπό μελέτη	30°C
<i>L. pentosus</i>	B379	Στέλεχος υπό μελέτη	30°C
<i>L. plantarum</i>	B380	Στέλεχος υπό μελέτη	30°C
<i>L. pentosus</i>	B381	Στέλεχος υπό μελέτη	30°C
<i>L. pentosus</i>	B382	Στέλεχος υπό μελέτη	30°C
<i>L. pentosus</i>	B383	Στέλεχος υπό μελέτη	30°C
<i>L. plantarum</i>	B384	Στέλεχος υπό μελέτη	30°C
<i>L. pentosus</i>	B385	Στέλεχος υπό μελέτη	30°C
<i>L. pentosus</i>	B386	Στέλεχος υπό μελέτη	30°C
<i>L. pentosus</i>	B387	Στέλεχος υπό μελέτη	30°C
<i>Pediococcus</i>	B389	Στέλεχος υπό μελέτη	30°C

<i>ethanolidurans</i>			
<i>P. ethanolidurans</i>	B390	Στέλεχος υπό μελέτη	30°C
<i>P. ethanolidurans</i>	B391	Στέλεχος υπό μελέτη	30°C
<i>P. ethanolidurans</i>	B392	Στέλεχος υπό μελέτη	30°C
<i>P. ethanolidurans</i>	B393	Στέλεχος υπό μελέτη	30°C
<i>L. coryniformis</i>	B394	Στέλεχος υπό μελέτη	30°C
<i>L. coryniformis</i>	B395	Στέλεχος υπό μελέτη	30°C
<i>L. coryniformis</i>	B396	Στέλεχος υπό μελέτη	30°C
<i>P. ethanolidurans</i>	B397	Στέλεχος υπό μελέτη	30°C
<i>L. coryniformis</i>	B398	Στέλεχος υπό μελέτη	30°C
<i>L. pentosus</i>	B399	Στέλεχος υπό μελέτη	30°C
<i>L. pentosus</i>	B400	Στέλεχος υπό μελέτη	30°C
<i>L. pentosus</i>	B401	Στέλεχος υπό μελέτη	30°C
<i>L. pentosus</i>	B402	Στέλεχος υπό μελέτη	30°C
<i>L. coryniformis</i>	B403	Στέλεχος υπό μελέτη	30°C
<i>L. casei</i> Shirota	B407	Μάρτυρας, Οξυγαλακτικό στέλεχος με προβιοτικές ιδιότητες	30°C
<i>L. rhamnosus</i> GG	B408	Μάρτυρας, Οξυγαλακτικό στέλεχος με προβιοτικές ιδιότητες	30°C
49 στελέχη οξυγαλακτικών			
47 στελέχη υπό εξέταση			

^aFMCC: Food Microbiology Culture Collection (Βάση Μικροοργανισμών Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων), ^βΧαρακτηριστικά που σχετίζονται με τη χρήση των συγκεκριμένων στελεχών στην παρούσα μελέτη.

Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, καθώς και τα στελέχη τους προέρχονται από τη Βάση Μικροοργανισμών του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα:

Πίνακας 4.1.2. Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν.

ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΚΩΔΙΚΟΣ FMCC ^α	ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ^β / ΜΕΣΟ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
<i>Salmonella enterica</i> sub.sp. enterica	B56	Παθογόνο στέλεχος TSB
<i>Salmonella enterica</i> sub.sp. enterica	B193	Παθογόνο στέλεχος LB
<i>Salmonella enterica</i> sub.sp. enterica	B64	Παθογόνο στέλεχος Nutrient
<i>Salmonella</i> Enteritidis	B286	Παθογόνο στέλεχος TSB
<i>Listeria monocytogenes</i>	B124	Παθογόνο στέλεχος BHI
<i>Listeria monocytogenes</i>	B154	Παθογόνο στέλεχος BHI
<i>Listeria monocytogenes</i>	B129	Παθογόνο στέλεχος BHI
<i>Listeria monocytogenes</i>	B411	Παθογόνο στέλεχος TSB
<i>Escherichia coli</i>	B13	Παθογόνο στέλεχος Nutrient
<i>Escherichia coli</i>	B18	Παθογόνο στέλεχος Nutrient
<i>Escherichia coli</i>	B289	Παθογόνο στέλεχος TSB
<i>Escherichia coli</i>	B453	Παθογόνο στέλεχος TSB

^αFMCC: Food Microbiology Culture Collection (Βάση Μικροοργανισμών Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων), ^βΧαρακτηριστικά που σχετίζονται με τη χρήση των συγκεκριμένων στελεχών στην παρούσα μελέτη.

Ο ακόλουθος πίνακας παρουσιάζει τα βακτήρια *Vibrio harvei* BAA-117 και *Vibrio harvei* BAA-119 τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα με τον παρακάτω τρόπο:

Πίνακας 4.1.3. ^αFMCC: Food Microbiology Culture Collection (Βάση Μικροοργανισμών Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων), ^βΧαρακτηριστικά που σχετίζονται με τη χρήση των συγκεκριμένων στελεχών στην παρούσα μελέτη.

ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΚΩΔΙΚΟΣ FMCC ^α	ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ^β	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ
<i>Vibrio harveyi</i> BAA-1117	B179	Βιοαισθητήρας ανίχνευσης AI-2 μορίων-σημάτων	30°C
<i>Vibrio harveyi</i> BAA-1119	B181	Θετικός μάρτυρας αναφοράς, παραγωγή AI-2 μορίων-σημάτων	30°C

4.2. Θρεπτικά μέσα ανάπτυξης

Τα θρεπτικά μέσα ανάπτυξης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

Το θρεπτικό μέσο MRS (De Man Rogosa) broth και το θρεπτικό μέσο MRS (De Man Rogosa) agar της εταιρίας Biolife Italiana Srl. Με pH 5.7 ± 0.1 . Η αποστείρωση του υλικού έγινε στους 121°C για 15 λεπτά.

Το θρεπτικό μέσο BHI (Brain Heart Infusion) broth της εταιρίας Biolife Italiana Srl. Η τιμή του pH υλικού είναι $7,4 \pm 0,2$. Η αποστείρωση του υλικού έγινε στους 121°C για 15 λεπτά.

Το θρεπτικό μέσο LB broth, η σύσταση του οποίου ήταν ανά λίτρο: εκχύλισμα ζύμης (yeast extract) 5g, τρυπτόνη (tryptone) 10g, χλωριούχο νάτριο (sodium chloride) 10g και ρύθμιση pH 6.5. Η αποστείρωση του υλικού έγινε στους 121°C για 15 λεπτά.

Το θρεπτικό μέσο TSB (Tryptic Soy Broth) της εταιρίας Biolife Italiana Srl. Με pH 7.3 ± 0.2 . Η αποστείρωση του υλικού έγινε στους 121°C για 15 λεπτά.

Το θρεπτικό μέσο Nutrient broth της εταιρίας Biolife Italiana Srl. Με pH 7.0 ± 0.2 μετά την αποστείρωση στους 121°C για 15 λεπτά.

Το θρεπτικό μέσο PBS, η σύσταση του οποίου ήταν ανά λίτρο: χλωριούχο νάτριο 8g, χλωριούχο κάλιο 0.2g, δισόξινο φωσφορικό κάλιο 44g, φωσφορικό κάλιο 0.24g. η ρύθμιση του pH έγινε στην τιμή 7.5 και στην τιμή 2.5. Η αποστείρωση του υλικού έγινε στους 121°C για 15 λεπτά.

Το θρεπτικό μέσο BPW (Buffered Peptone Water) της εταιρίας Biolife Italiana Srl. Με pH 7.0 ± 0.2 . Η αποστείρωση του υλικού έγινε στους 121°C για 15 λεπτά.

Για το διάλυμα PBS με 0.5% χολικά άλατα: σε 300ml PBS προστέθηκαν 1,5g χολικών αλάτων (bile salts). Η αποστείρωση του υλικού έγινε στους 121°C για 15 λεπτά.

Το θρεπτικό μέσο Columbia agar base της εταιρίας Biolife Italiana Srl. Με προσθήκη 5% w/v αίμα αλόγου. Με pH 7.3 ± 0.2 . Η αποστείρωση του υλικού έγινε στους 121°C για 15 λεπτά πριν την προσθήκη.

Τα θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών ήταν οι θρεπτικοί ζωμοί AB Autoinducer bioassay broth για τα δύο στελέχη *Vibrio harveyi* B179 και B181 στη γέμιση των βοθρίων, για τη μέτρηση Βιοφωταύγειας και για την επώαση της καλλιέργειας. Η χρήση AB Autoinducer bioassay agar έγινε για την ανάπτυξη του πληθυσμού του *Vibrio harveyi* σε τρυβλία Petri για την καταμέτρηση του πληθυσμού του. Επίσης χρησιμοποιήθηκε $\frac{1}{4}$ quarter strength Brain Heart Infusion agar (BHI agar) για την ανάπτυξη των στελεχών των οξυγαλακτικών βακτηρίων και ως αρνητικός μάρτυρας στη μέτρηση βιοφωταύγειας. Ακόμα χρησιμοποιήθηκε Tryptone Soy Agar (TSA)

για την ανάπτυξη του πληθυσμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων. Τέλος χρησιμοποιήθηκε ¼ Ringer solution.

Η σύσταση του θρεπτικού μέσου AB ήταν ανά λίτρο: 17,5g χλωριούχο νάτριο (sodium chloride-NaCl), 12,3g θεικό μαγνήσιο (magnesium sulfate-MgSO₄) και 2g καζαμινοοξέα (casami- acids). Η τιμή του pH ρυθμίστηκε πριν την αποστείρωση του υλικού στους 121°C για 15 λεπτά, στο 7,5 με την προσθήκη διαλύματος KOH 1M. μετά την αποστείρωση και την πτώση της θερμοκρασίας του υλικού προστέθηκαν 10ml φωσφορικού καλίου συγκέντρωσης 1M με τιμή pH 7, 10ml διαλύματος αργινίνης συγκέντρωσης 1M και 20ml διαλύματος γλυκερόλης συγκέντρωσης 50% v/v. Τα τρία διαλύματα που προστέθηκαν ήταν αποστειρωμένα. Για την Παρασκευή του στερεού θρεπτικού μέσου AB (AB agar) έγινε προσθήκη 1,5% w/v άγαρ.

Για την παρασκευή του θρεπτικού μέσου m.MRS έγινε αντικατάσταση της γλυκόζης από γαλακτόζη σύμφωνα με τους DeKeermaecker και Vanderleyden (2003), Lebeer et al.(2007) και Buck et al. (2009). Η σύσταση του θρεπτικού μέσου m.MRS broth ήταν ανά λίτρο: 10g πεπτόνη, 10g εκχύλισμα κρέατος, 5g εκχύλισμα ζύμης, 20g γαλακτόζη, 1g πολυσορβικό 80, 2g κιτρικό αμμώνιο, 5g οξικό νάτριο, 0,2g επταένυδρο θεικό μαγνήσιο, 0.07g τετραένυδρο θεικό μαγγάνιο και 2g φωσφορικό κάλιο.

Το μέσο αραίωσης PBS της εταιρίας εταιρίας Biolife Italiana Srl. Η ρύθμιση του pH έγινε στην τιμή 7.5 και στην τιμή 2.5 πριν την αποστείρωση η οποία έγινε στους 121°C για 15 λεπτά.

Το θρεπτικό μέσο TSA (Tryptic Soy Agar) της εταιρίας Biolife Italiana Srl. Η τιμή του pH υλικού είναι 7.3 ±0.2. Η αποστείρωση του υλικού έγινε στους 121°C για 15 λεπτά.

4.3. Μελέτη προβιοτικού δυναμικού οξυγαλακτικών βακτηρίων

4.3.1. Ανθεκτικότητα σε χαμηλές τιμές pH

Βακτηριακά κύτταρα από 18ωρη καλλιέργεια στους 30°C φυγοκεντρήθηκαν (5000g, 5min, 4°C). Μετά τη φυγοκέντριση έγινε επαναιώρηση σε PBS με pH 7,4 και πραγματοποιήθηκε φυγοκέντριση ξανά υπό τις ίδιες συνθήκες (εις διπλούν). Τέλικά, τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε διάλυμα PBS με pH 2,5. Και επωάστηκαν στους 37°C υπό ανάδευση για 0, 0.5, 1, 2, και 3ώρες. Στα συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα γίνονταν απαρίθμηση του βακτηριακού πληθυσμού σε MRS agar.

4.3.2. Ανθεκτικότητα στα χολικά άλατα

Βακτηριακά κύτταρα από 18ωρη καλλιέργεια στους 30°C φυγοκεντρήθηκαν (5000g, 5min, 4°C). Μετά τη φυγοκέντριση έγινε επαναιώρηση σε PBS ουδέτερου pH 7,2 και πραγματοποιήθηκε φυγοκέντριση ξανά υπό τις ίδιες

συνθήκες (εις διπλούν). Τελικά τα κύτταρα επανεωρήθηκαν σε διάλυμα PBS με pH 8, που περιείχε 0,5% χολικά άλατα. Και επώαστηκαν στους 37°C υπό ανάδευση για 0, 1, 2, 3 και 4 ώρες. Στα συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα γίνονταν απαρίθμηση του βακτηριακού πληθυσμού σε MRS άγαρ.

4.3.3. Υδρόλυση χολικών αλάτων

Έγινε καλλιέργεια των οξυγαλακτικών στελεχών με τη μέθοδο των ραβδώσεων (streaking) από 18ωρες καλλιέργειες οξυγαλακτικών στελεχών σε MRS άγαρ το οποίο περιείχε 0.5% ταυροδεοξυχολικό οξύ (TDCA). Η υδρόλυση εκδηλώθηκε με διαφορετική εμφάνιση της μορφολογίας της αποικίας (μερική υδρόλυση ή πλήρης) σε σύγκριση με τη μορφολογία των αποικιών που αναπτύχθηκαν στα τρυβλία του μάρτυρα, όπου μάρτυρας ήταν καλλιέργειες οξυγαλακτικών στελεχών σε τρυβλία MRS χωρίς την προσθήκη ταυροδεοξυχολικό οξέος (TDCA). Η επώαση έγινε υπό αναερόβιες συνθήκες στους 37°C για 48 ώρες.

4.3.4. Αντιμικροβιακή δράση ενάντια στα παθογόνα

Όλα τα στελέχη των οξυγαλακτικών βακτηρίων δοκιμάστηκαν ενάντια σε τέσσερα στελέχη *Escherichia coli*, τρία στελέχη *Salmonella enterica*, ένα στέλεχος *Salmonella Enteritidis* και τέσσερα στελέχη *Listeria monocytogenes*. Μετά από φυγοκέντρηση (5000g, 5min, 4°C), συλλέχθηκε το υπερκείμενο των υπό εξέταση οξυγαλακτικών στελεχών, έγινε ρύθμιση pH 6.5 και αποστείρωση των υπερκείμενων με χρήση φίλτρων Whatman 0.22μm. Το υπερκείμενο των υπό εξέταση γαλακτικών στελεχών (CFCS) ερευνήθηκε για τη δράση του ενάντια στα παθογόνα χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία διάχυσης μέσω βοθρίων.

Στη δοκιμασία αυτή, σε κάθε θρεπτικό μέσο προστέθηκε 1ml από καλλιέργεια παθογόνου (την αντίστοιχη) η οποία ήταν ανανεωμένη δύο φορές. Στη συνέχεια έγινε μια μικρή ανάδευση και στρώσιμο τρυβλίων. Σε κάθε τρυβλίο έγιναν 5 μικρά βοθρία όπου προστέθηκε το υπερκείμενο των καλλιεργειών των γαλακτικών βακτηρίων. Βάλαμε 60μl από το υπερκείμενο σε κάθε βοθρίο και ακολούθησε επώαση για 24 ώρες στους 37°C. Στην περίπτωση όπου δεν παρατηρηθεί ανάπτυξη της καλλιέργειας του παθογόνου γύρω από το βοθρίο με το υπερκείμενο τότε το γαλακτικό στέλεχος παράγει παρεμποδιστικές ουσίες (βακτηριοσύνες) και έχει αντιμικροβιακή δράση.

10⁶ cfu/ml από το κάθε στέλεχος των παθογόνων, εμβολιάστηκε σε soft άγαρ (1%, w/v) στο αντίστοιχο θρεπτικό μέσο για το κάθε παθογόνο. Το υπερκείμενο από κάθε οξυγαλακτικό στέλεχος (50μL) μεταφέρθηκε στα βοθρία που διανοίχτηκαν στο soft άγαρ (5 mm διάμετρο). Τα τρυβλία επώαστηκαν στους 37°C, σύμφωνα με το κατάλληλο μέσο για την ανάπτυξη του κάθε παθογόνου στέλεχους, και η αντιμικροβιακή δράση καταγράφηκε ως ζώνη ελεύθερη αποικιών γύρω από το βοθρίο. Το αντιβιοτικό καναμυκίνη (30μg/ml) χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας, ενώ ζωμός MRS με pH ρυθμισμένο στο 6.5 και φιλτραρισμένο χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας.

4.3.5. Αιμολυτική δράση

Έγινε καλλιέργεια των οξυγαλακτικών στελεχών με τη μέθοδο των ραβδώσεων (streaking) από 18ωρες καλλιέργειες οξυγαλακτικών στελεχών σε Columbia agar τρυβλία που περιείχαν 5% w/v αίμα αλόγου και επώαστηκαν για 48 ώρες στους 30°C. Τα τρυβλία ελέγχθηκαν για ίχνη β-αιμόλυσης (καθαρές ζώνες γύρω από τις αποικίες), α-αιμόλυση (πράσινες ζώνες γύρω από τις αποικίες) ή γ-αιμόλυση (χωρίς ζώνες γύρω από τις αποικίες).

4.3.6. Ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά

Για το τεστ της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά, τα οξυγαλακτικά στελέχη εμβολιάστηκαν (1% v/v) σε ζωμό MRS, το οποίο περιείχε αντιβιοτικά (Ampicillin, Gentamycin, Kanamycin, Streptomycin, Erythromycin, Tetracyclin, Vancomycin) σε διάφορες τελικές συγκεντρώσεις (2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512, και 1024 μg/ml) και εξετάστηκαν για τυχόν ανάπτυξή τους σε micropate reader (OD στα 610nm) μετά από 24 ώρες επώασης στους 30°C.

4.4. Διαδικασία μέτρησης Βιοφωταύγειας (ανίχνευσης μορίων AI-2)

Η διαδικασία παρασκευής εκχυλίσματος για ανίχνευση μορίων AI-2 δίνεται στα παρακάτω βήματα:

1. Αρχικά έγινε αναζωογόνηση των στελεχών των οξυγαλακτικών βακτηρίων από το κατεψυγμένο στοκ σε γλυκερόλη σε θρεπτικό ζωμό ¼ quarter strength BHI και επώασή τους στους 30°C για 24 ώρες υπό ανάδευση (160rpm). Έπειτα έγινε πάλι αναζωογόνηση στο ίδιο υπόστρωμα, υπό τις ίδιες συνθήκες στους 30°C για 20 ώρες.
2. Χρησιμοποιήθηκε 1ml από τη 2^η ανακαλλιέργεια από κάθε στέλεχος για απαρίθμηση του πληθυσμού μετά από δεκαδικές αραιώσεις (έως την 10⁻⁶ αραιώση) και εμβολιασμός των τρυβλίων με TSA θρεπτικό υπόστρωμα.
3. Στη συνέχεια έγινε παραλαβή υπερκείμενου (CFCS) από τη 2^η ανακαλλιέργεια μετά από φυγοκέντρηση στα 5000g για 10 λεπτά στους 4°C.
4. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης πραγματοποιήθηκε συλλογή υπερκείμενου σε eredorf με χρήση φίλτρου Whatman 0.22μm.
5. Τέλος ακολούθησε η φύλαξη των υπερκείμενων των στελεχών των οξυγαλακτικών βακτηρίων (CFCS) στους -20°C.
6. Για την προετοιμασία της ανακαλλιέργειας του στελέχους *Vibrio harveyi* B179 που χρησιμοποιήθηκε ως βιοαισθητήρας ανίχνευσης (biosensor strain) ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία όπως στο βήμα 1 με μοναδική διαφορά το θρεπτικό μέσο ανάπτυξης που ήταν ζωμός AB και παραλαβή της 2^{ης} ανακαλλιέργειας στις 16 ώρες επώασης.

7. Για την προετοιμασία της ανακαλλιέργειας του στελέχους *Vibrio harveyi* B181 που χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας που παράγει τους αυτεπαγωγείς τύπου 2 (producer strain-positive control) ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία όπως στο βήμα 1 με μοναδική διαφορά το θρεπτικό μέσο ανάπτυξης που ήταν ο θρεπτικός ζωμός AB και παραλαβή της 2^{ης} ανακαλλιέργειας στις 16 ώρες επώασης. Επίσης έγινε παραλαβή του υπερκείμενου της καλλιέργειας όπως στα βήματα 3 και 4.
8. Ακολούθησε βιοδοκιμή σε *μclear* microplate και επώαση στο microplate reader μέχρι την επαγωγή του αρνητικού μάρτυρα, ο οποίος ήταν ο θρεπτικός ζωμός ¼ quarter strength BHI.

Επίσης χρησιμοποιήθηκε και το m.MRS ως θρεπτικό μέσο ανάπτυξης και για την πλήρωση των βοθρίων κατά τη μέτρηση της Βιοφωταύγειας. Η χρήση του m.MRS πραγματοποιήθηκε για να γίνει πιο εύκολα η απορρόφηση του μήκους κύματος κατά τη μέτρηση της Βιοφωταύγειας και να μην εμποδίζεται από την παρουσία γλυκόζης η οποία υπάρχει στο θρεπτικό μέσο ¼ quarter strength BHI ενώ απουσιάζει από το m.MRS το οποίο περιέχει γαλακτόζη. Η παραγωγή αυτεπαγωγέων τύπου 2 επηρεάζεται από περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως η θερμοκρασία και από τα συστατικά του θρεπτικού μέσου ανάπτυξης, οι οποίοι μπορούν να δώσουν λανθασμένα αποτελέσματα είτε θετικά (παραγωγή AI-2) είτε αρνητικά (απουσία AI-2). Τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή AI-2 (*luxS*) υπόκεινται σε καταστολή του καταβολισμού από τη γλυκόζη, επομένως, η δραστηριότητα των αυτεπαγωγέων τύπου 2 δεν μπορεί να ανιχνευθεί όταν τα βακτηριακά κύτταρα που εκφράζουν αυτά τα γονίδια έχουν αναπτυχθεί παρουσία γλυκόζης (Blana et al., 2011).



Εικόνα 4.4.1. Αδιαφανές πλακίδιο *μclear* 96 βοθρίων που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση Βιοφωταύγειας.



Εικόνα 4.4.2. Φωτόμετρο Synergy HT – Multimode Microplate reader της εταιρίας Biotech, που χρησιμοποιήθηκε για τις μετρήσεις Βιοφωταύγειας.

4.4.1. Διαδικασία φόρτωσης των πλακιδίων

Στο αδιαφανές πλακίδιο clear 96 βοθρίων προστέθηκε σε όλες τις θέσεις 90μl από την 10^{-3} αραιώση της καλλιέργειας του *Vibrio harveyi* B179 σε AB. Ως αρνητικός μάρτυρας (negative control) προστέθηκαν 10μl από το θρεπτικό μέσο ¼ quarter strength BHI και για θετικό μάρτυρα (positive control) 10μl από το υπερκείμενο της καλλιέργειας *Vibrio harveyi* B181 το οποίο είχε προηγουμένως αποθηκευτεί στους -20°C . Επίσης προστέθηκε 10μl από το υπερκείμενο των καλλιεργειών των οξυγαλακτικών βακτηρίων προς εξέταση στα υπόλοιπα βοθρία. Ακολούθησε η απαρίθμηση του πληθυσμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων μετά από διαδοχικές αραιώσεις σε θρεπτικό μέσο TSA και η απαρίθμηση του πληθυσμού του *Vibrio harveyi* B179 σε AB άγαρ.

Έγινε επίσης δοκιμή μέτρησης Βιοφωταύγειας και σε συνθήκες στρες όπως χαμηλό pH σε θρεπτικό μέσο ¼ quarter strength BHI.

Για τη δοκιμή μέτρησης Βιοφωταύγειας με θρεπτικό μέσο m.MRS, μετά τη 2^η ανανέωση των καλλιεργειών των οξυγαλακτικών βακτηρίων έγινε φυγοκέντρηση στα 5000g για 15 λεπτά στους 4°C , απόρριψη του υπερκειμένου και επανεώρηση του pellet σε PBS και στη συνέχεια ακολούθησε δεύτερη φυγοκέντρηση. Απορρίφθηκε το υπερκείμενο και τα κύτταρα από τα στελέχη επανεωρήθηκαν σε m.MRS με 0% bile salts. Ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία για τα ίδια στελέχη από την άλλη καλλιέργεια, μόνο που αυτή τη φορά η επανεώρηση έγινε σε m.MRS και 0,5% bile salts και 2% bile salts. Στη συνέχεια τα κύτταρα επωάστηκαν στους 37°C για 90 λεπτά. Ακολούθησε πάλι φυγοκέντρηση για να κρατηθεί αυτή τη φορά το υπερκείμενο των καλλιεργειών και να γίνει ρύθμιση του pH στο 8. Έπειτα έγινε

φιλτράρισμα για αποστείρωση και αποθήκευση στους -20°C μέχρι να πραγματοποιηθεί η ανάλυση τους.

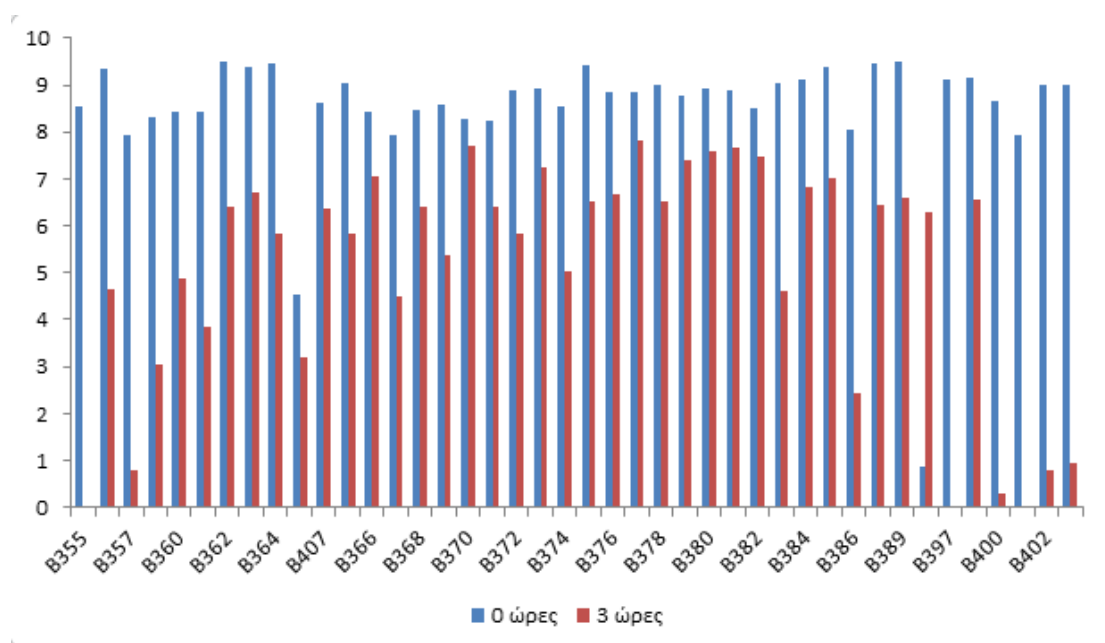
Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για τη δοκιμή μέτρησης Βιοφωταύγειας με θρεπτικό μέσο m.MRS σε περιβάλλον χαμηλού pH. Συγκεκριμένα οι τιμές pH ήταν οι εξής: 2, 4 και 6.5. Η μοναδική διαφορά σε αυτή τη δοκιμασία ήταν ότι η επώαση έγινε για 60 λεπτά στους 37°C .

Στο αδιαφανές πλακίδιο μclear 96 βοθρίων προστέθηκε σε όλες τις θέσεις 90μl από την 10^{-3} αραιώση της καλλιέργειας του *Vibrio harveyi* B179 σε AB και 10μl από το υπερκείμενο των οξυγαλακτικών βακτηρίων. Ως αρνητικός μάρτυρας (negative control) προστέθηκαν 10μl m.MRS και για θετικό μάρτυρα (positive control) 10μl από το υπερκείμενο της καλλιέργειας *Vibrio harveyi* B181 το οποίο είχε προηγουμένως αποθηκευτεί στους -20°C . Για κάθε κωδικό έγιναν τρεις διαφορετικές δοκιμές με τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις bile salts 0%, 0.5% και 2%.

4.5. Αποτελέσματα και Συζήτηση

4.5.1. Ανθεκτικότητα σε χαμηλές τιμές pH

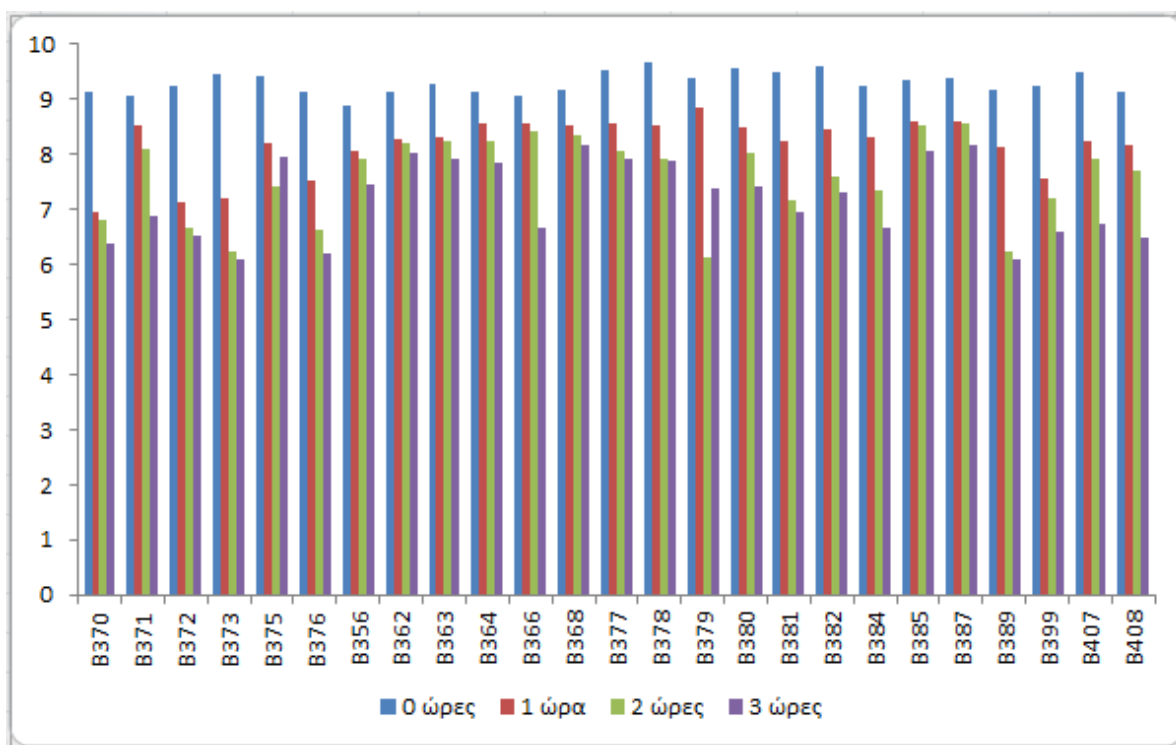
Αρχικά, εξετάστηκαν όλα τα στελέχη σχετικά με την επιβίωση που είχαν μετά από 0 ώρες σε pH 2.5 και μετά από 3 ώρες σε pH 2.5. Οι καλλιέργειες προέρχονταν πάντα μετά από δεύτερη ανανέωση και μετά από επώαση 18 ωρών στους 30°C. Ακολουθούσαν διαδοχικές αραιώσεις σε BPW για να γίνει η απαρίθμηση του πληθυσμού που επιβίωσε μετά την έκθεσή των κυττάρων σε χαμηλό pH.



Γράφημα 4.5.1.1. Απαρίθμηση πληθυσμού μετά από επώαση σε pH 2.5 στους 37°C για 0 και 3 ώρες.

Στο παραπάνω γράφημα φαίνεται η σύγκριση μεταξύ αρχικού (μετά από 0 ώρες επώαση σε χαμηλό pH) και τελικού πληθυσμού (μετά όμως από επώαση σε pH 2.5) των οξυγαλακτικών βακτηρίων στους 37°C, κάποια στελέχη δεν επιβίωσαν.

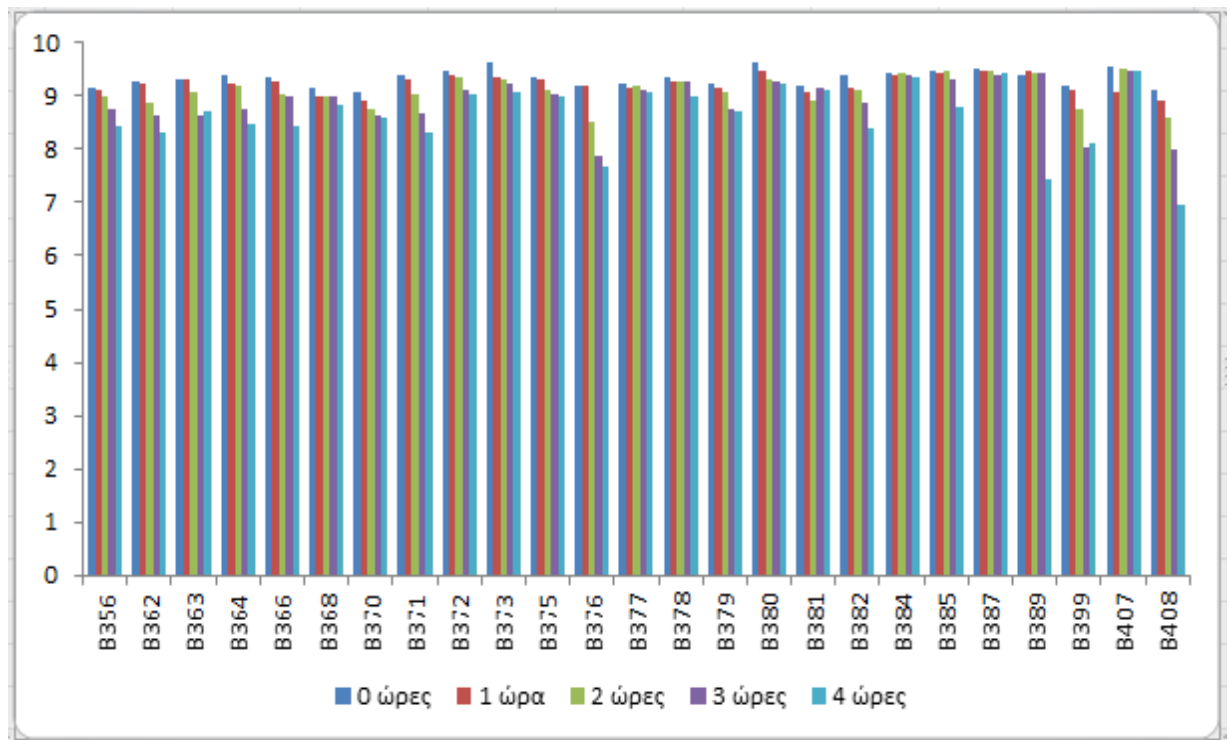
Στη συνέχεια έγινε απαρίθμηση πληθυσμού για 0, 1, 2 και 3 ώρες σε pH 2.5 στους 37°C για να διαπιστωθεί η πορεία της ανθεκτικότητας μέσω της ανάπτυξης σε συνθήκες που προσομοιάζουν το περιβάλλον στο ανθρώπινο στομάχι. Ένα γαλακτικό στέλεχος βακτηρίου για να χαρακτηριστεί προβιοτικό θα πρέπει να έχει την ικανότητα να αντέχει και να αναπτύσσεται σε περιβάλλον με χαμηλό pH.



Γράφημα 4.5.1.2 Απαρίθμηση πληθυσμού μετά από επώαση σε pH 2.5 στους 37°C για 0, 1, 2 και 3 ώρες.

4.5.2. Ανθεκτικότητα στα χολικά άλατα

Στο παρακάτω γράφημα φαίνεται η απαρίθμηση πληθυσμού μετά το πέρας 0, 1, 2,3 και 4 ωρών παρουσία χολικών αλάτων 0,5% στους 37°C για να διαπιστωθεί η ανθεκτικότητας μέσω της ανάπτυξης σε συνθήκες που προσομοιάζουν το περιβάλλον στο ανθρώπινο εντερικό σωλήνα. Επίσης ένα οξυγαλακτικό στέλεχος βακτηρίου για να χαρακτηριστεί προβιοτικό θα πρέπει να έχει την ικανότητα να αντέχει και να αναπτύσσεται σε περιβάλλον με συγκέντρωση χολικών αλάτων.



Γράφημα 4.5.2.2. Απαρίθμηση πληθυσμού μετά από επώαση στους 37°C, παρουσία χολικών αλάτων για 0, 1, 2, 3 και 4 ώρες.

Όπως γίνεται αντιληπτό και από το γράφημα η ανθεκτικότητα ελαττώνεται με το πέρας του χρόνου παραμονής των στελεχών σε συγκέντρωση 0,5% χολικών αλάτων. Αλλά η επιβίωση μετά το πέρας των 4 ωρών φαίνεται πως είναι σχετικά ικανοποιητική.

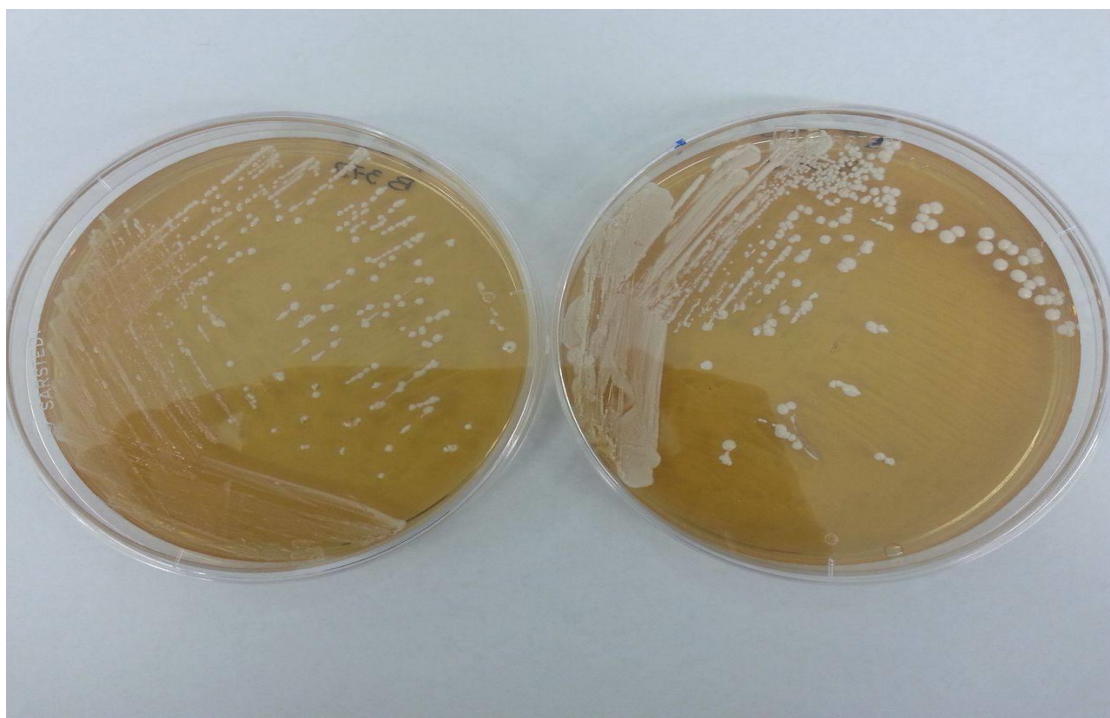
4.5.3. Υδρόλυση χολικών αλάτων

Σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα, τα περισσότερα στελέχη δημιουργούσαν μερική υδρόλυση, ενώ έντονη υδρόλυση παρατηρήθηκε ότι έκαναν τα στελέχη B372, B373, B375, B384.

Η υδρόλυση των χολικών αλάτων συνδέεται με τη μείωση της χοληστερόλης στο αίμα. Μια υπόθεση υποστηρίζει ότι η μείωση της χοληστερόλης γίνεται λόγω της ενσωμάτωσης της χοληστερόλης στις κυτταρικές μεμβράνες των προβιοτικών βακτηρίων από το περιβάλλον του. Πράγματι κάποια στελέχη οξυγαλακτικών παράγουν ένζυμα υδρόλυσης χολικών αλάτων και απελευθερώνονται έτσι αμινοξέα. Υπάρχει όμως και η αντίθετη άποψη που εκφράζει τον προβληματισμό απέναντι στην υδρόλυση χολικών αλάτων από οξυγαλακτικά βακτήρια, γιατί μπορεί έτσι να απελευθερώνονται μεγάλες ποσότητες αποσυζευγμένων χολικών αλάτων που μπορεί να προκαλέσουν μη επιθυμητά αποτελέσματα στον ξενιστή.

Πίνακας 4.5.3.1 Υδρόλυση χολικών αλάτων από τα οξυγαλακτικά στελέχη υπό εξέταση.

Κωδικοί οξυγαλακτικών βακτηρίων	Έντονη Υδρόλυση	Μερική υδρόλυση	Καθόλου Υδρόλυση
B356		X	
B362		X	
B363		X	
B364		X	
B366		X	
B368		X	
B370		X	
B371		X	
B372	X		
B373	X		
B375	X		
B376		X	
B377		X	
B378			X
B379			X
B380		X	
B381			X
B382		X	
B384	X		
B385		X	
B387		X	
B399			X
B407		X	
B408			X



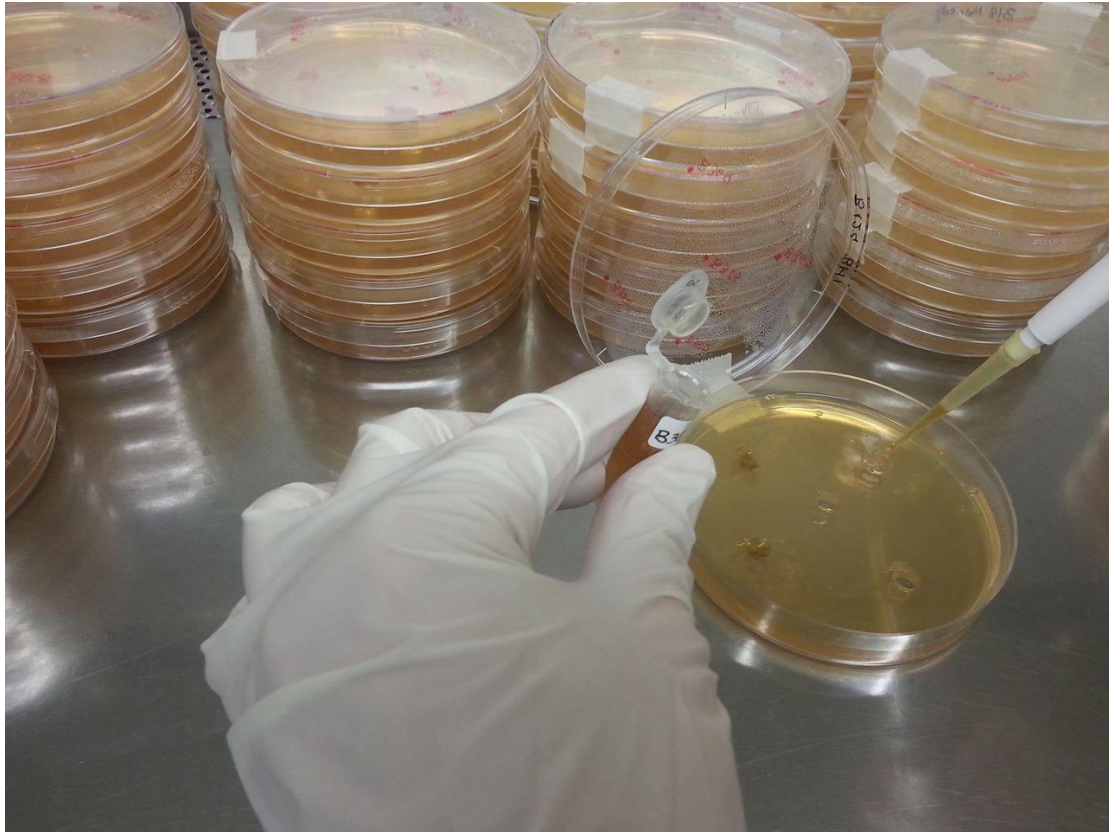
Εικόνα 4.5.3.2. Υδρόλυση χολικών αλάτων όπως παρατηρήθηκε στο εργαστήριο μετά από αλλαγή της υφής της καλλιέργειας σε σύγκριση με τον μάρτυρα.

4.5.4. Αντιμικροβιακή δράση ενάντια στα παθογόνα

Ένα από τα επιθυμητά χαρακτηριστικά που καλείται να έχει ένα στέλεχος προβιοτικού βακτηρίου είναι η αντιμικροβιακή δράση ενάντια στα παθογόνα. Στη συγκεκριμένη μελέτη κανένα από τα οξυγαλακτικά στελέχη βακτηρίων που μελετήθηκαν δεν έδειξε να έχει αντιμικροβιακή δράση στα παθογόνα: *Escherichia coli* B13, B18, B289, B453, *Salmonella* Enteritidis B286, *Salmonella enterica* B56, B64, B193, *Listeria monocytogenes* B122, B124, B154, B411. Το οποίο οδήγησε στο συμπέρασμα ότι δεν υπάρχει έκλυση βακτηριοσυνών.

Πίνακας 4.5.4.1 Αντιμικροβιακή δράση ενάντια στα παθογόνα: *Escherichia coli* B13, B18, B289, B453, *Salmonella* Enteritidis B286, *Salmonella enterica* B56, B64, B193, *Listeria monocytogenes* B122, B124, B154, B411 .

Κωδικοί γαλακτικών βακτηρίων	<i>Escherichia coli</i> B13, B18, B289, B453	<i>Salmonella Enteritidis</i> B286	<i>Salmonella enterica</i> B56, B64, B193	<i>Listeria monocytogene s</i> B122, B124, B154, B411
B356	-	-	-	-
B362	-	-	-	-
B363	-	-	-	-
B364	-	-	-	-
B366	-	-	-	-
B368	-	-	-	-
B370	-	-	-	-
B371	-	-	-	-
B372	-	-	-	-
B373	-	-	-	-
B375	-	-	-	-
B376	-	-	-	-
B377	-	-	-	-
B378	-	-	-	-
B380	-	-	-	-
B381	-	-	-	-
B382	-	-	-	-
B384	-	-	-	-
B385	-	-	-	-
B387	-	-	-	-
B399	-	-	-	-
B407	-	-	-	-
B408	-	-	-	-



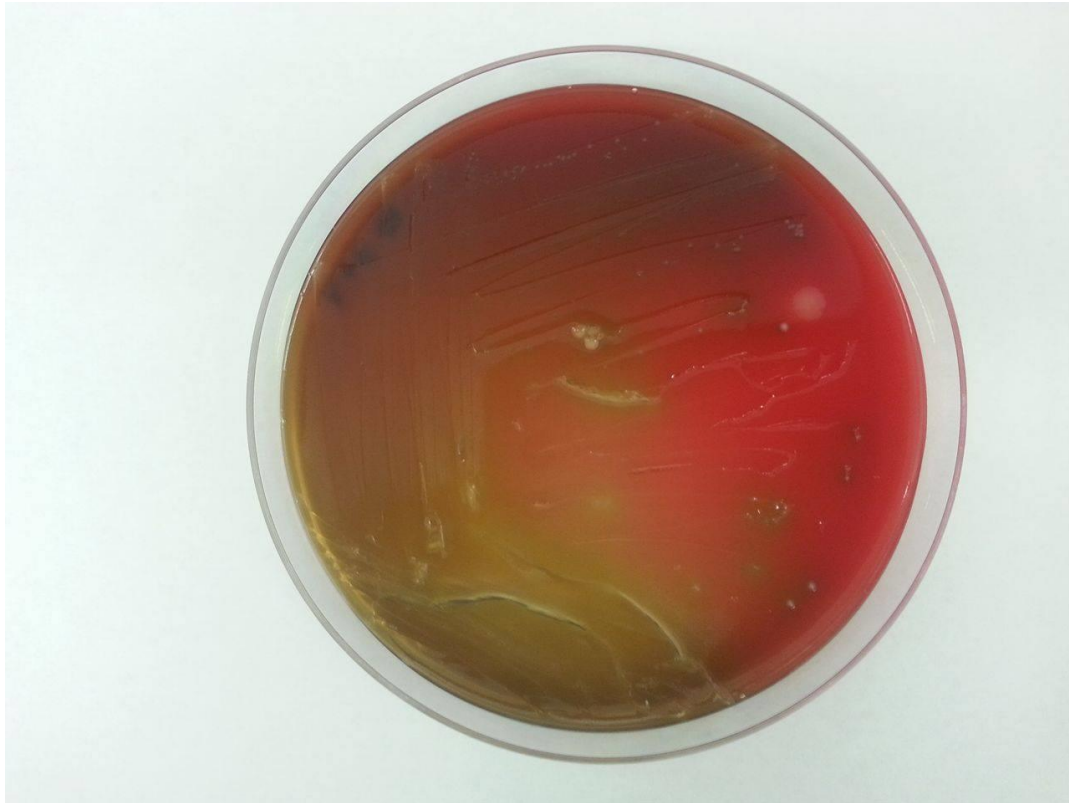
Εικόνα 4.5.4.2 Το υπερκείμενο των υπό εξέταση οξυγαλακτικών στελεχών (CFCS) ερευνήθηκε για τη δράση του ενάντια στα παθογόνα χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της διάχυσης μέσω βοθρίων (well diffusion assay).

4.5.5. Αιμολυτική δράση

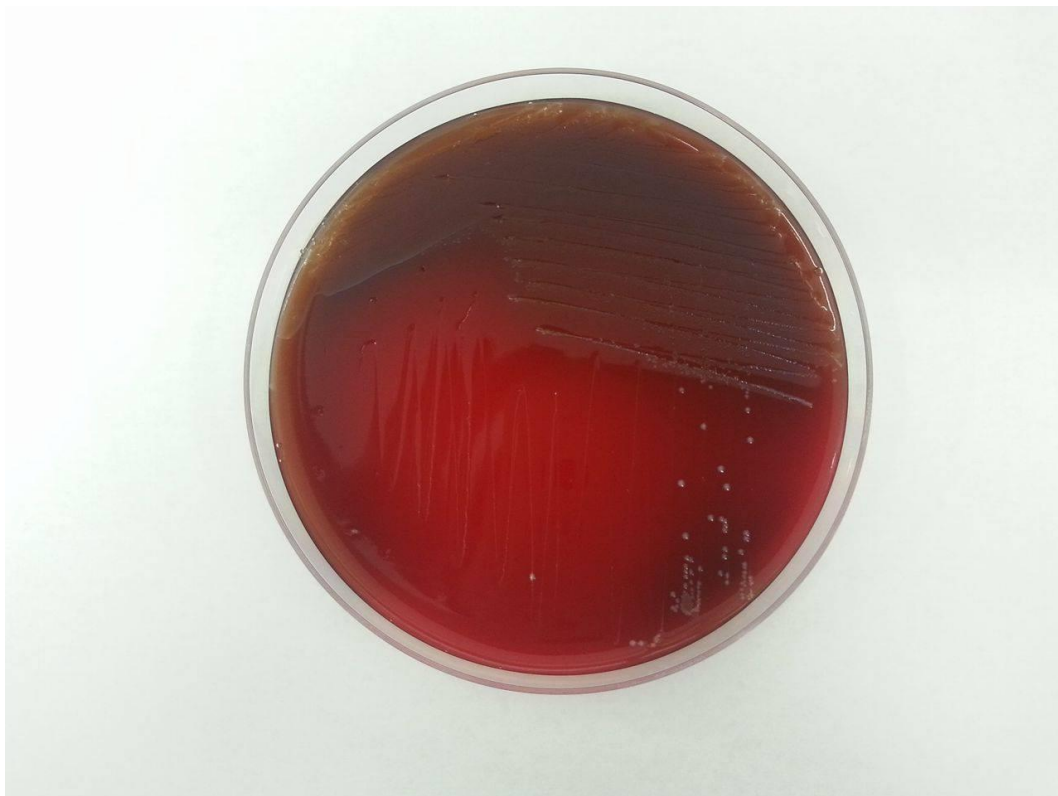
Η απουσία αιμόλυσης θεωρείται προαπαιτούμενο για να χαρακτηριστεί ένα οξυγαλακτικό βακτήριο ως προβιοτικό. Κανένα από τα εξεταζόμενα στελέχη δεν δημιούργησε β-αιμόλυση, η οποία είναι και η πιο επικίνδυνη μορφή, όταν αναπτύχθηκε σε Columbia agar με αίμα αλόγου. Τα περισσότερα στελέχη δημιούργησαν γ-αιμόλυση (δηλαδή δεν δημιούργησαν αιμόλυση), ενώ ένα στέλεχος το B379 δημιούργησε α-αιμόλυση.

Πίνακας 4.5.5.1 Η πλειονότητα των στελεχών δημιούργησε γ-αιμόλυση, ενώ μόνο το στέλεχος B379 δημιούργησε α-αιμόλυση.

Κωδικοί γαλακτικών βακτηρίων	α-Haemolysis	β-Haemolysis	γ-Haemolysis
B356			X
B262			X
B363			X
B364			X
B366			X
B368			X
B370			X
B371			X
B2372			X
B373			X
B375			X
B376			X
B377			X
B378			X
B379	X		
B380			X
B381			X
B382			X
B384			X
B385			X
B387			X
B389			X
B399			X
B407			X
B408			X



Εικόνα 4.5.5.2 Το στέλεχος B379 που δημιούργησε α -αιμόλυση.



Εικόνα 4.5.5.3 Ένα από τα στελέχη που δημιούργησε γ -αιμόλυση.

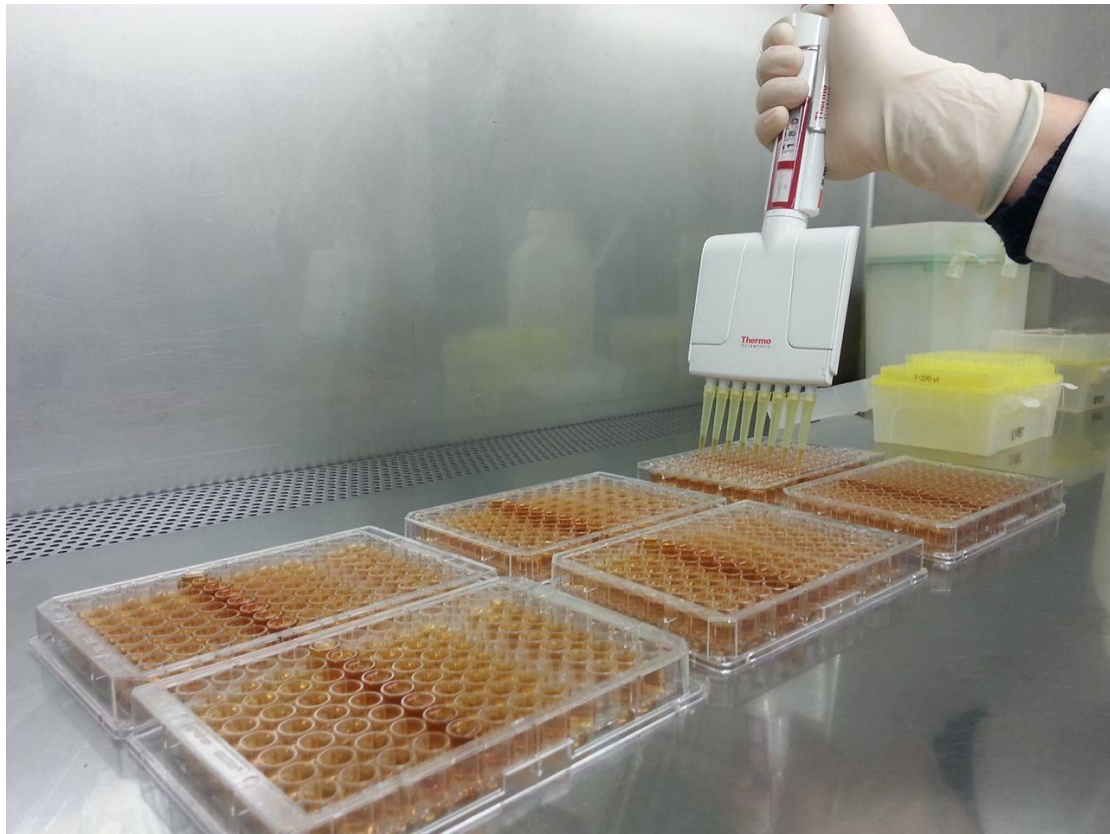
4.5.6. Ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά

Επικρατούν διάφορες απόψεις σχετικά με το αν είναι επιθυμητό να παρουσιάζουν τα προβιοτικά ανθεκτικότητα σε ορισμένα αντιβιοτικά. Για παράδειγμα είναι επιθυμητό να παρουσιάζουν αντίσταση σε κάποια αντιβιοτικά για τη διάρροια, αλλά είναι και πολύ πιθανό να μεταφερθούν αυτά τα γονίδια ανθεκτικότητας μέσω πλασμιδίων σε παθογόνα στελέχη ή σε ευκαιριακά παθογόνα. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν πλακίδια πολυστυρενίου (microplates) για την τοποθέτηση σε κάθε βοθρίο της αντίστοιχης συγκέντρωσης του κάθε αντιβιοτικού για κάθε εμβόλιο (καλλιέργεια γαλακτικού βακτηρίου). Γίνεται μία μέτρηση στο φωτόμετρο (microplate reader) και στη συνέχεια επώαση στους 30°C και ακολουθεί άλλη μια μέτρηση την επόμενη μέρα.

Πίνακας 4.5.6.1 Η αντίσταση των στελεχών των οξυγαλακτικών βακτηρίων στα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν και στην αντίστοιχη συγκέντρωση.

Κωδικός	Ampicilin	Gentamycin	Kanamycin	Streptomycin	Erythromycin	Tetracyclin	Vancomycin
<i>L.plantarum</i> B356	<1	>256	>1024	>512	64	128	>1024
<i>L.pentusus</i> B362	<1	128	512	256	32	64	>1024
<i>L.pentusus</i> B363	<1	<32	128	64	8	8	>1024
<i>L.pentusus</i> B364	<1	>256	128	64	16	64	>1024
<i>L.pentusus</i> B366	<1	64	512	256	8	16	>1024
<i>L.pentusus</i> B368	<1	>256	1024	256	>128	128	>1024
<i>L.pentusus</i> B370	<1	64	512	>512	>128	128	>1024
<i>L.pentusus</i> B371	<1	>256	512	128	8	16	>1024
<i>L.plantarum</i> B372	<1	128	512	>512	16	16	>1024
<i>L.plantarum</i> B373	<1	>256	512	>512	16	32	>1024
<i>L.plantarum</i> B375	<1	128	512	256	8	16	>1024
<i>L.pentusus</i> B376	<1	<32	256	128	8	8	>1024
<i>L.pentusus</i> B377	<1	64	1024	128	8	32	>1024
<i>L.pentusus</i>	<1	<32	>1024	64	8	32	>1024

<i>us</i> B378							
<i>L.plalnta</i> <i>rum</i> B380	<1	>256	1024	>512	32	64	>1024
<i>L.pentos</i> <i>us</i> B381	<1	256	1024	>512	16	64	>1024
<i>L.pentos</i> <i>us</i> B382	<1	<32	256	128	8	8	>1024
<i>L.planta</i> <i>rum</i> B384	<1	64	>1024	>512	16	16	>1024
<i>L.pentos</i> <i>us</i> B385	<1	<32	256	256	8	16	>1024
<i>L.pentos</i> <i>us</i> B387	<1	64	256	128	4	8	>1024
<i>L.pentos</i> <i>us</i> B399	<1	<32	256	64	8	32	>1024
<i>L.casei</i> <i>Shirota</i> B407	<1	64	512	64	2	8	>1024
<i>L.rham-</i> <i>sus</i> B408	16	<32	512	32	8	8	>1024



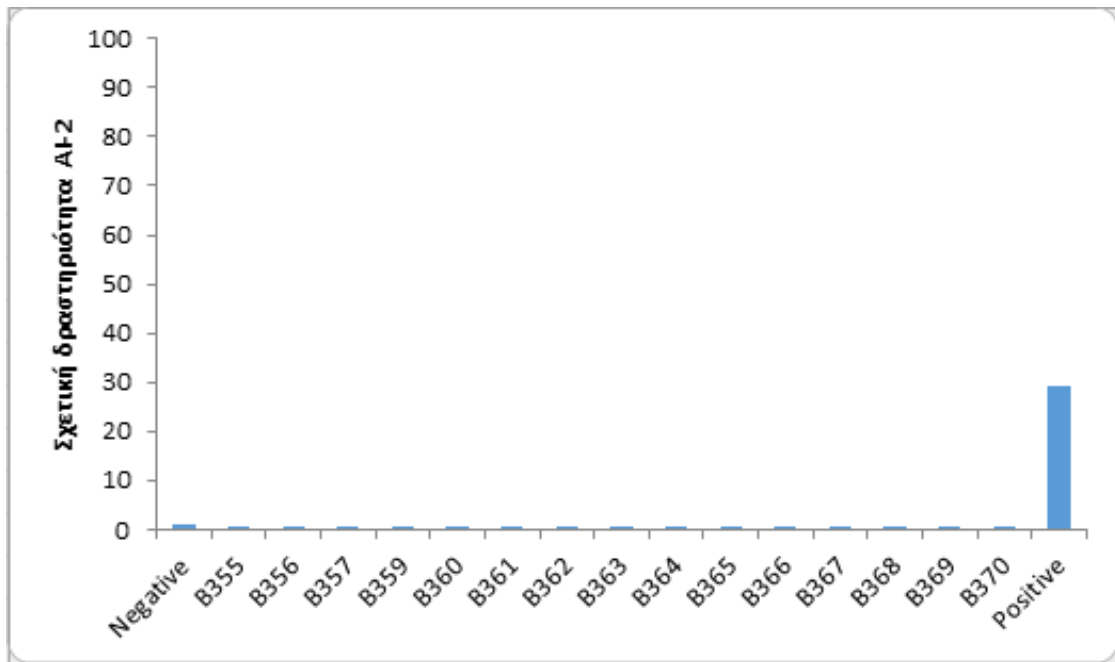
Εικόνα 4.5.6.2 Τα οξυγαλακτικά βακτήρια εμβολιάσθηκαν σε ζωμό MRS, το οποίο περιείχε αντιβιοτικά σε διάφορες συγκεντρώσεις και έγινε εύρυνα για ανίχνευση της ανάπτυξή τους σε micorplate reader (OD στα 610nm) μετά από 24 ώρες επώασης στους 30°C.

4.5.7. Ανίχνευση αίσθησης απαρτίας σε θρεπτικό μέσο ¼ quarter strength BHI

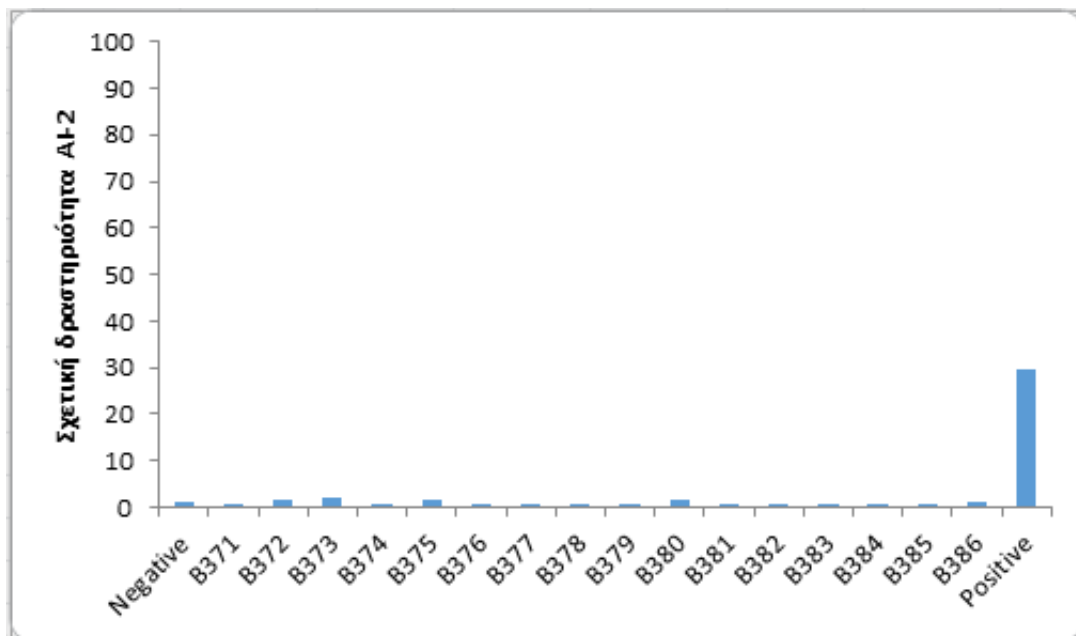
Στην παρούσα μελέτη, ανιχνεύθηκαν και προσδιορίστηκαν οι αυτεπαγωγείς τύπου 2 (AI-2), οι οποίοι παρήχθησαν από οξυγαλακτικά στελέχη βακτηρίων και ανιχνεύθηκαν από το βακτήριο *Vibrio harveyi* BAA-1117 B179. Αρχικά, έγιναν δοκιμές για την επιλογή του κατάλληλου μέσου ανάπτυξης το οποίο δεν θα εμπόδιζε την απορρόφηση κατά την μέτρηση στο φωτόμετρο. Στην αρχή χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό μέσο ¼ quarter strength BHI το οποίο όμως περιέχει γλυκόζη η οποία εμποδίζει στη μέτρηση το φωτόμετρο. Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό μέσο m.MRS, το οποίο αποτελείται ακριβώς από τα ίδια συστατικά όπως το MRS με μόνη διαφορά στην περιεκτικότητα του σε γαλακτόζη αντί για γλυκόζη.

Πράγματι, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης όταν τα στελέχη είχαν αναπτυχθεί σε θρεπτικό μέσο ¼ quarter strength BHI η παραγωγή αυτεπαγωγέων τύπου 2 ήταν σχεδόν μηδενική, όπως φαίνεται στα διαγράμματα 4.5.7.1, 4.5.7.2, 4.5.7.3.

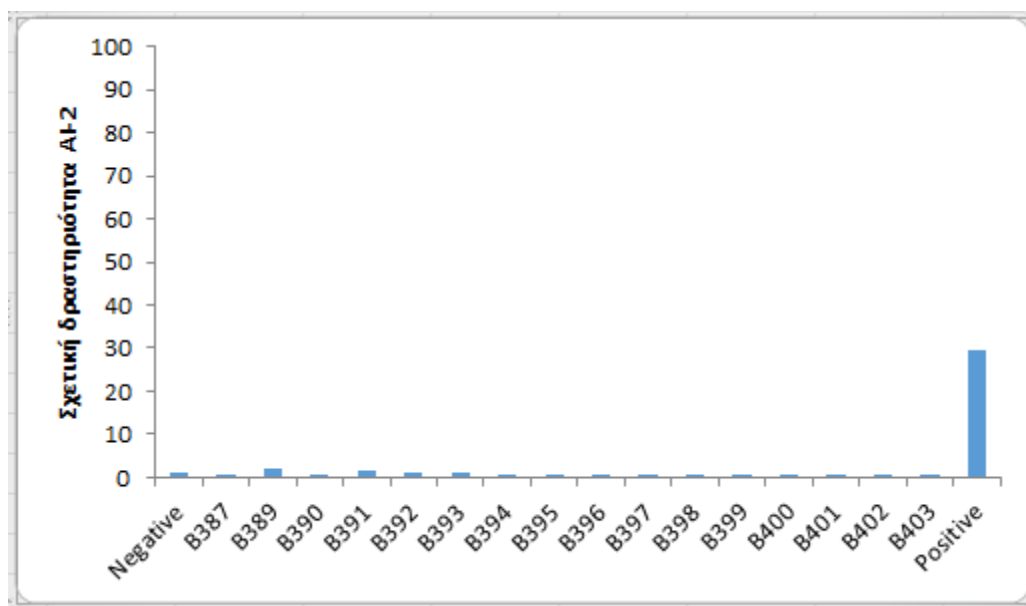
Η δοκιμή για την ανίχνευση αυτεπαγωγέων τύπου 2 (AI-2) σε θρεπτικό μέσο ¼ quarter strength BHI με αρνητικό μάρτυρα (negative control) 10μl ¼ quarter strength BHI και 90μl από την 10^{-3} αραιώση του *Vibrio harveyi* B179 και για θετικό μάρτυρα (positive control) 10μl από το υπερκείμενο της καλλιέργειας *Vibrio harveyi* B181 και 90μl από την 10^{-3} αραιώση του *Vibrio harveyi* B179. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια προς ανάλυση είχαν αναπτυχθεί σε θρεπτικό μέσο ¼ quarter strength BHI.



Γράφημα 4.5.7.1 Σχετική δραστηριότητα AI-2 μετά από 20 ώρες επώασης στους 30°C για τα στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων B355, B356, B357, 359, B360, B361, B362, B363, B364, B365, B366, B367, B368, B369, B370 σε θρεπτικό μέσο ¼ quarter strength BHI.



Γράφημα 4.5.7.2 Σχετική δραστηριότητα AI-2 μετά από 20 ώρες επώασης στους 30°C για τα στελέχη οξυγαλακτικών B371, B372, B373, B374, B375, B376, B377, B378, B379, B380, B381, B382, B383, B 384, B385, B386 σε θρεπτικό μέσο ¼ quarter strength BHI .



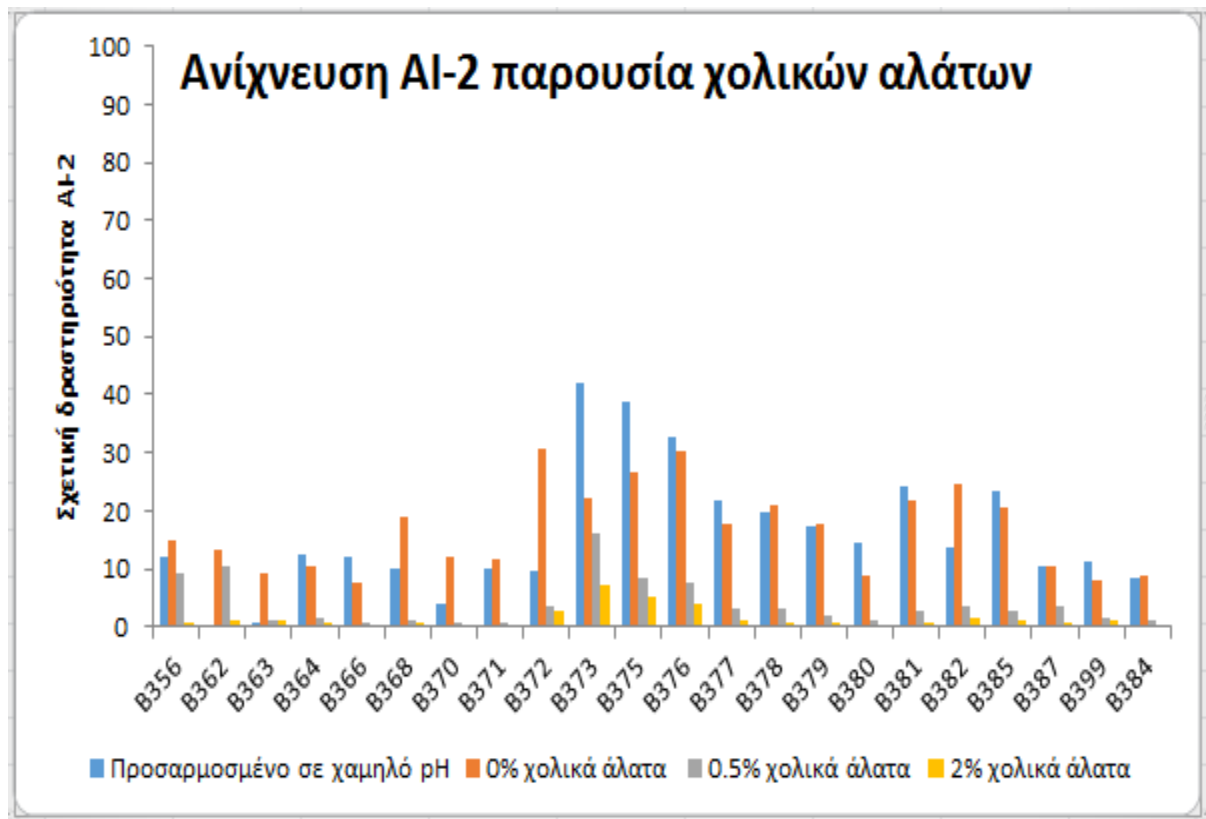
Γράφημα 4.5.7.3 Σχετική δραστηριότητα AI-2 μετά από 20 ώρες επώασης στους 30°C για τα στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων B387, B389, B390, B391, B392, B393, B394, B395, B396, B397, B398, B399, B400, B401, B402, B403 σε θρεπτικό μέσο ¼ quarter strength BHI.

4.5.8. Ανίχνευση αίσθησης απαρτίας σε θρεπτικό μέσο m.MRS με προσθήκη χολικών αλάτων.

Η δοκιμή για την ανίχνευση αυτεπαγωγέων τύπου 2 (AI-2) σε θρεπτικό μέσο modified MRS (m.MRS), με αρνητικό μάρτυρα (negative control) 10μl m.MRS και 90μl από την 10^{-3} αραιώση του *Vibrio harveyi* B179 και συγκέντρωση χολικών αλάτων 0% (bile salts). Για θετικό μάρτυρα (positive control) 10μl από το υπερκείμενο της καλλιέργειας *Vibrio harveyi* B181 και 90μl από την 10^{-3} αραιώση του *Vibrio harveyi* B179. Κάθε στέλεχος δοκιμάστηκε σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις χολικών αλάτων (bile salts) τις εξής 0%, 0.5% και 2%. Τα στελέχη στα οποία έγιναν οι δοκιμές ήταν ανθεκτικά στις παραπάνω συγκεντρώσεις μετά από καλλιέργεια σε θρεπτικό μέσο modified MRS (m.MRS) παρουσία χολικών αλάτων και για επώαση στους 37°C για 90 λεπτά. Τα υπόλοιπα στελέχη δεν έδειξαν ανθεκτικότητα και δεν αναπτύχθηκαν στις συγκεντρώσεις χολικών αλάτων και χαμηλού pH. Τα στελέχη που έδειξαν ανθεκτικότητα ήταν:

Πίνακας 4.5.8.1. Τα στελέχη των οξυγαλακτικών βακτηρίων στα οποία έγιναν οι δοκιμές χολικών αλάτων 0%, 0.5% και 2% και χαμηλού pH 2, 4 και 6.5.

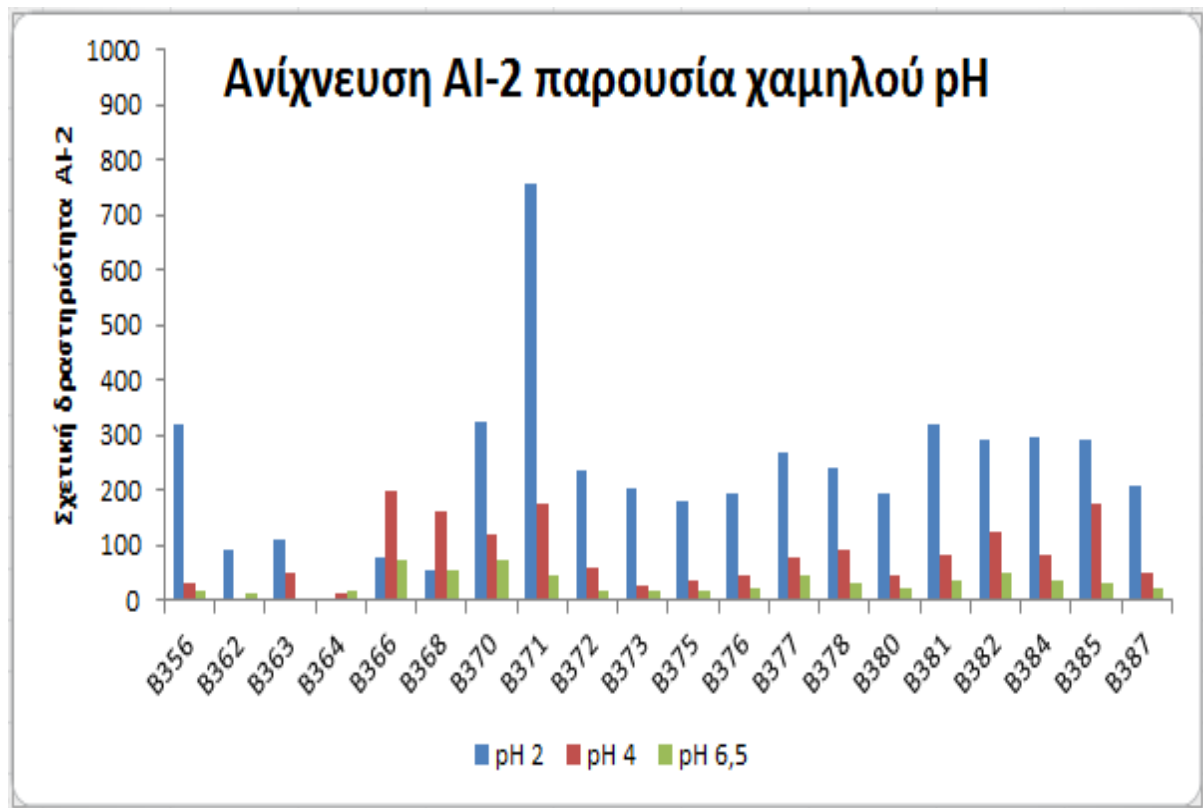
ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΚΩΔΙΚΟΣ FMCC	ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ
<i>L. pentosus</i>	B356	Στέλεχος υπό μελέτη
<i>L. pentosus</i>	B362	Στέλεχος υπό μελέτη
<i>L. pentosus</i>	B363	Στέλεχος υπό μελέτη
<i>L. pentosus</i>	B364	Στέλεχος υπό μελέτη
<i>L. pentosus</i>	B366	Στέλεχος υπό μελέτη
<i>L. pentosus</i>	B368	Στέλεχος υπό μελέτη
<i>L. pentosus</i>	B370	Στέλεχος υπό μελέτη
<i>L. pentosus</i>	B371	Στέλεχος υπό μελέτη
<i>L. plantarum</i>	B372	Στέλεχος υπό μελέτη
<i>L. plantarum</i>	B373	Στέλεχος υπό μελέτη
<i>L. plantarum</i>	B375	Στέλεχος υπό μελέτη
<i>L. pentosus</i>	B376	Στέλεχος υπό μελέτη
<i>L. pentosus</i>	B377	Στέλεχος υπό μελέτη
<i>L. pentosus</i>	B378	Στέλεχος υπό μελέτη
<i>L. plantarum</i>	B380	Στέλεχος υπό μελέτη
<i>L. pentosus</i>	B381	Στέλεχος υπό μελέτη
<i>L. pentosus</i>	B382	Στέλεχος υπό μελέτη
<i>L. plantarum</i>	B384	Στέλεχος υπό μελέτη
<i>L. pentosus</i>	B385	Στέλεχος υπό μελέτη
<i>L. pentosus</i>	B387	Στέλεχος υπό μελέτη
<i>L. pentosus</i>	B399	Στέλεχος υπό μελέτη
<i>Vibrio harveyi</i> BAA-1117	B179	Βιοαισθητήρας ανίχνευσης AI-2 μορίων-σημάτων
<i>Vibrio harveyi</i> BAA-1119	B181	Θετικός μάρτυρας αναφοράς, παραγωγή AI-2 μορίων-σημάτων



Γράφημα 4.5.8.2 Σχετική δραστηριότητα AI-2 μετά από 90 λεπτά στους 37°C σε θρεπτικό μέσο modified MRS και σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις χολικών αλάτων: 0%, 0.5% και 2%. Τα στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων που έδειξαν αντοχή σε περιβάλλον με συγκεντρώσεις χολικών αλάτων: B356, B362, B363, B364, B366, B368, B370, B371, B372, B373, B375, B376, B377, B378, B379, B380, B381, B382, B385, B387, B399, B384.

4.5.9. Ανίχνευση αίσθησης απαρτίας σε θρεπτικό μέσο m.MRS σε περιβάλλον χαμηλού pH

Η δοκιμή για την ανίχνευση αυτεπαγωγέων τύπου 2 (AI-2) σε θρεπτικό μέσο modified MRS (m.MRS), με αρνητικό μάρτυρα (negative control) 10μl m.MRS και 90μl από την 10^{-3} αραιώση του *Vibrio harveyi* B179. Για θετικό μάρτυρα (positive control) 10μl από το υπερκείμενο της καλλιέργειας *Vibrio harveyi* B181 και 90μl από την 10^{-3} αραιώση του *Vibrio harveyi* B179. Κάθε στέλεχος οξυγαλακτικών βακτηρίων δοκιμάστηκε σε τρεις διαφορετικές τιμές pH, τις εξής 2, 4 και 6.5. Τα στελέχη στα οποία έγιναν οι δοκιμές ήταν ανθεκτικά σε συνθήκες χαμηλού pH και δίνονται στον πίνακα 4.5.9.1.



Γράφημα 4.5.9.1 Σχετική δραστηριότητα AI-2 μετά από 60 λεπτά στους 37°C σε θρεπτικό μέσο modified MRS και σε τρεις διαφορετικές τιμές pH 2, 4 και 6.5. Για τα στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων που έδειξαν αντοχή σε όξινο περιβάλλον: B356, B362, B363, B364, B366, B368, B370, B371, B372, B373, B375, B376, B377, B378, B380, B381, B382, B384, B385, B387

Όπως έχει αποδειχθεί μια περίπτωση στην οποία είναι πολύ πιθανό να παραχθούν αυτεπαγωγείς τύπου 2 είναι όταν τα κύτταρα βρίσκονται σε αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες όπως η παρουσία χολικών αλάτων και οι χαμηλές τιμές pH.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης (Γράφημα 4.5.8.2.) παρατηρήθηκε υψηλή σχετική δραστηριότητα στις συγκεντρώσεις χολικών αλάτων, με την παραγωγή AI-2 να μειώνεται όσο αυξάνονταν η συγκέντρωση των χολικών αλάτων. Τα στελέχη B356, B362, B373, B375 και B376 φαίνεται στο γράφημα 4.5.8.2 ότι παρήγαγαν αρκετή ποσότητα AI-2 σε συγκέντρωση 0,5%, ενώ ελαττώνονταν στην υψηλότερη συγκέντρωση 2%. Επίσης στο ίδιο γράφημα φαίνεται ότι η παραγωγή AI-2 ήταν σημαντική και σε όξινο περιβάλλον για τα στελέχη: B373, B375, B376, B377, B378, B379, B381, B385.

Η παραγωγή AI-2 φαίνεται από το γράφημα 4.5.9.1. ότι ήταν αρκετά σημαντική, ιδιαίτερα στο περιβάλλον χαμηλού pH 2, όπου η παραγωγή αυτεπαγωγέων ήταν έντονη ειδικά στα στελέχη B356, B370, B371, B381, B382, B384, B385, με το στέλεχος B371 να παρουσιάζει τη μεγαλύτερη δραστηριότητα αυτεπαγωγέων τύπου 2.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ελληνική

Κυριτσάκης Κ. Α. (1993) Το ελαιόλαδο. Χημική σύνθεση, τεχνολογία, ποιοτικός έλεγχος, βιολογική αξία. Έκδοση Κυριτσάκη, Θεσσαλονίκη.

Κυριτσάκης Κ. Α. (2007) Ελαιόλαδο, Συμβατικό και βιολογικό βρώσιμη, ελιά – πάστα ελιάς. Αγροτύπος.

Μπαλατσούρας Δ. Γ. (1995) Η επιτραπέζια ελιά. Έκδοση Μπαλατσούρας, Αθήνα.

Μπαλατσούρας Δ. Γ. (2006) Μικροβιολογία Τροφίμων. Εκδόσεις Έμβρυο, Αθήνα.

Ξενόγλωσση

Aguirre. M. and Collins, M.D. (1993) Lactic acid bacteria and human clinical infection. J. Appl. Bacteriol. 75, 95- 107.

Argyri A., Zoumpopoulou G., Karatzas K.A., Tsakalidou E., Nychas G.j., Panagou E., Tassou C. (2013) Selection of potential lactic acid bacteria from fermented olives by *in vitro* tests. Food Microbiology 33(2013) 282-291.

Balatsouras G.D. (1990) Edible olive cultivars, chemical composition of fruit, harvesting, transportation, processing, sorting and packaging, styles of black olives, deterioration, quality standards, chemical analysis, nutritional and biological value of the end product. In Olio d'oliva e olive da tavola: tecnologia e qualità. Istituto Sperimentale per la Elaiotecnica, Pescara.

Blana V. (2011) Autoinducer-2-like Activity in Lactic Acid Bacteria Isolated from Minced Beef Packaged under Modified Atmospheres. Journal of Food Protection Vol. 74, -. 4, 2011 P 631-635.

Blekas G., Vassilakis C., Harizanis C., Tsimidou M., Boskou D. (2002) Biophe-Is in table olives. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2002, 50. 3688-3692.

Bassler BL (1999) How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. Curr Opin Microbiol, 2, 582–587.

Bassler BL, Wright M, Showalter RE and Silverman MR (1993) Intercellular signalling in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes regulating expression of luminescence. Mol Microbiol, 9, 773–786.

Bassler BL, Wright M and Silverman MR (1994a) Multiple signalling systems controlling expression of luminescence in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes encoding a second sensory pathway. Mol Microbiol, 13, 273–286.

- Bassler BL, Wright M and Silverman MR (1994b) Sequence and function of LuxO, a negative regulator of luminescence in *Vibrio harveyi*. *Mol Microbiol*, 12, 403–412.
- Bautista-Gallego, Arroyo-Lopez, Rantsiou, Jimenez-Diaz. Screening of lactic acid bacteria isolated from fermented table olives with probiotic potential. *Food Research International* 50 (2013) 135-142.
- BlanaV, Doulgeraki A., Nychas G.J. Autoinducer-2-like Activity in Lactic Acid Bacteria Isolated from Minced Beef Packaged under Modified Atmospheres. *Journal of Food Protection*, Vol. 74, - 4, 2011, Pages 631-635.
- Brenes M., De Castro A. Transformation of Oleuropein and its Hydrolysis Products during Spanish – style Green Olive Processing. *Journal of Science Food and Agriculture* 1998, 77, 353-358.
- Buck, B.L., Azcarate-Peril, M.A., Klaenhammer, T.R., 2009. Role of autoinducer-2 on the adhesion ability of *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Applied Microbiology* 107, 269-279.
- Connell J.H. (1994) Botany of the olive. In *Olive Production Manual*. University of California, Division of Agriculture and Natural Resources, Oakland, CA.
- Ciafardini G., Marsilio V., Lanza B., and Pozzi N. (1994) Hydrolysis of Oleuropein by *Lactobacillus plantarum* Strains Associated with Olive Fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 4142-4147.
- DeKeersmaecker, S.C.J., Vanderleyden, j., 2003. Constrains on detection of autoinducer-2 (AI-2) signaling molecules using *Vibrio harveyi* as a reporter. *Microbiology Comment* 149.1953-1956.
- Diggle, S.P.; Griffin, A.S.; Campbell, G.; West, S.A. Cooperation and conflict in quorum sensing bacterial populations. *Nature* 2007, 450, 411–414.
- Elmer, G.W., (2001), Probiotics: “living drugs,” *Am. J. Health-Syst. Pharm.*, 58, 1101– 1109.
- FAO/WHO (2006). Probiotics in Food. Health and Nutritional Properties and Guidelines for Evaluation, FAO Food and Nutrition Paper -. 85. World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- Garrido Fernández A., Fernández Diez M.J., Adams M.R. (1997) Table olives production and processing. Springer.
- Garrity, G.M., Bell, J.A., and Lilburn, T.G. (2004). Taxo-mic Outline of the Procaryotes. *Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edition, Release 5.0, Springer-Verlag, New York. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/bergeysoutline200405>.

Gibson, G.R. (1998). Dietary modulation of the human gut microflora using prebiotics. *British Journal of Nutrition*, 80, 209C212.

Gilliland, S.E., (1991), Properties of yogurt, in *Therapeutic Properties of Fermented Milks*, Robinson, R.K., Ed., Elsevier Applied Science, London, p. 75.

Hammes, W.P. and Hertel, C. (2003). The Genera *Lactobacillus* and *Car-bacterium*. In: *The Prokaryotes Release 3.15*, Editor Martin Dworkin. Che-ll, E., Carmen Macian, M., and Aznar, R. (2006). *Lactobacillus tuceti* sp. -v., a new lactic acid bacterium isolated from sausage. *Syst. Appl. Microbiol.* 29, 389–395.

Handwerger, S., Horowitz. H., Coburn. K., Kolokathis, .4. and Wormser. G.P. (1990) Infection due to *Leuco-stoc* species: six cases and review. *Rev. Infect. Dis.* 12. 602- 610.

Hanne Jensen, Grimmer, Naterstad, Axelsson. *In vitro* testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria

Hastings, J.W and Nealson, K.H. 1977. Bacterial bioluminescence. *Annu. Rev. Microbiology* 31:549-595.

Jenifer M. Henkel and B.Bassler, *Bacterial social engagements*, Elsevier 2004.

Jose Luis Ruiz-Barba, Belen Caballero-Guerrero, Maldonado-Barragan, Jimenez-Diaz. Coculture with specific bacteria enhances survival of *Lactobacillus plantarum* NC8, an autoinducer-regulated bacteriocin producer, in olive fermentations. *Food Microbiology* 27 (2010) 413-417.

Kailis S. and Harris D. (2007) *Producing Table olives*. Landlinks Press.

Kotzekidou P. and Tsakalidou E. (2006) Fermentation Biotechnology of Plant Based Traditional Foods of the Middle East and Mediterranean Region. In : *Food Biotechnology*, Eds. K. Shetty, G. Paliyath, A. Pometto & R. Levin. p. 1795-1828, CRC Press, Boca Raton, FL.

Kolenbrander, P.E.; Andersen, R.N.; Blehert, D.S.; Eglund, P.G.; Foster, J.S.; Parmer, R.J., Jr. Communication among oral bacteria. *Microbiol. Mol. Bio. Rev.* 2002, 66, 486–505.

Kuramitsu, H.K.; He, X.; Lux, R.; Anderson, M.H.; Shi, WY. Interspecies interactions within oral microbial communities. *Microbiol. Mol. Rev.* 2007, 71, 653–670.

Leeber, S., De Keersmaecker, Verhoeven, Fadda, Marchal, Vanderleyden, 2007. Functional analysis of *luxS* in the probiotic strain *Lactobacillus rham-sus* GG reveals a central metabolic role important for growth and biofilm formation. *Journal of bacteriology* 189, 860-871.

Loussert R. and Brousse G. (1980) Botánica, biología y fisiología, in El olivo, Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.

Min Guo, Sonja Gamby, Yue Zheng, Herman O.Sintin (2013). Small Molecule Inhibitors of AI-2 Signaling in Bacteria: State of the art and future perspectives for Anti-Quorum sensing agents. *International Journal of Molecular Sciences*.

Monteagudo-Mera, Rodriguez-Aparicio, Rua, Martinez-Blanco, Navasa, Garcia-Armesto, Ferrero. In vitro evaluation of physiological probiotic properties of different lactic acid bacteria strains of dairy and human origin. *Journal of functional foods* 4 (2012) 531-541.

Mortazavian, A.M., Sohrabvandi S. (2006) Probiotics and food Probiotic products. Eta Publication, Iran, (In Farsi).

Mortazavian, A., Razavi, S. H., Ehsani, M. R., & Sohrabvandi, S. (2007). Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. *Iranian Journal of Biotechnology*, 5, 1- 18.

Nychas G.-J.E., Panagou E.Z., Parker M.L., Waldron K.W. and Tassou C.C. (2002) Microbial colonization of naturally black olives during fermentation and associated biochemical activities in the cover brine. *Letters in Applied Microbiology* 34, 173-177.

Ouwehand, A.C., Salminen, S., Isolauri, E. (2002) Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 82: 279–289

Panagou E.Z., Schillinger U., Franz C.M.A.P. and Nychas G.-J.E. (2008) Microbiological and biochemical profile of cv. Conservolea naturally black olives during controlled fermentation with selected strains of lactic acid bacteria. *Food Microbiology* 25, 348-358.

Pot, B., Ludwig, W., Kersters, K., and Schleifer, K.-H. (1994). Taxonomy of lactic acid bacteria. In: *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, Genetics and Applications*, pp. 13–90. Edited by L. De Vuyst and E.J.

Qazi S.N.A, Counil E, Morrisey J, Rees C.E.D, Chan W.C, Williams P, Hill P.J 2001 agr-expression precedes escape from the endosome of internalised *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 69, 7074–7082.

Rasic, J.L. and Kurmann, J.A., (1978). *Yogurt*, Technical Dairy Publishing House, Copenhagen.

Redfield R 2002 Is quorum sensing a side effect of diffusion sensing?. *Trends. Microbiol.* 10, 365–370.

Romero C., Garcia A., Medina E. Triterpenic acids in table olives. *Food Chemistry* 118 (2010) 670-674.

- Romero C., Brenes M., Yousfi K., Gacia P., Garcia A and Garrido A. Effect of cultivar and Processing Method on the Contents of Polyphenols in Table Olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2004, 52, 479-484.
- Salomeh Moslehi-Jenabian, Klaus Gori, Lene Jespersen (2009). AI-2 signaling is induced by acidic shock in probiotic strains of *Lactobacillus* spp. *International Journal of Food Microbiology* 135 (2009) 295-302.
- Salminen, S., et al., (1998), Demonstration of safety of probiotics -- a review. *Int J Food Microbiol*, 44 (1-2): p. 93 - 106.
- Sanders, M.E. (2008) Probiotics: definition, sources, selection and uses. *Clinical Infectious Diseases*, 46 (Suppl.): S58–S61.
- Sanders, M.E., Gibson, G., Gill, H.S. & Guarner, F. (2007) Probiotics: their potential to impact human health. *CAST issue paper* - 36, October 2007.
- Schauder, S., and Bassler, B.A. (2001). The languages of bacteria. *Genes Dev.* 15: 1468-1480.
- Schleifer, K.H. and Kilpper-Bälz, R. (1987) Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of streptococci, enterococci and lactococci: a review. *Syntl. Appl Microbiol.* 10: 1-10.
- Soyoung Yeo, Hyunjoon Park, Ji Y. Holzapfel W. (2015) Influence of gastrointestinal stress on autoinducer-2 activity of two *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiology Ecology*, 91, 2015.
- Sperandio, V., Torres, A.G., Jarvis, B., Nataro, J.P. and Kaper J.B. (2003). Bacteria-host communication: the language of hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:8951-8956.
- Susman, J.I., Baron, E.J., Goldberg, S.M., Kaplan, M.H. and Pizzarello, R.A. (1986) Clinical manifestations and therapy of *Lactobacillus* endocarditis: Report of a case and review of the literature. *Rev. Infect. Dis.* 8: 771-776.
- Tassou C.C., Panagou E.Z. and Katsaboxakis K.Z. (2002) Microbiological and physicochemical changes of naturally black olives fermented at different temperatures and NaCl levels in the brines. *Food Microbiology* 19, 605-615.
- Tassou C.C., Katsaboxakis C., Georget D., Parker M., Waldron K., Smith A and Panagou E. Effect of calcium chloride on mechanical properties and microbiological characteristics of cv. *Conservolea* naturally black olives fermented at different sodium chloride levels. *Journal of Science of Food and Agriculture* 87: 1123-1131 (2017).
- Tsapatsaris S., Kotzekidou P. (2004) Application of central composite design and response surface methodology to the fermentation of juice by *Lactobacillus*

plantarum and *Debaryomyces hansenii*. *International Journal of Food Microbiology* 95, 157-168.

Vandamme. P., Pot. B., Gillis. M . de Vos P. Kerster, K and Swings. .I (1996) Polyphasic taxo-my. A consensus approach to bacterial cystematics. *Microhiol. Rev.* 60, 407- 438.

Vaughn R., Won W, Spencer F, Pappagianis D., Foda O., Krumperman Paul. *Lactobacillus Plantarum*, The Cause of Yeast Spots on Olives. Department of Food Tech-logy, University of California.