



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου
Εργαστήριο Γαλακτοκομίας

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
«Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων και Διατροφή του Ανθρώπου»

Μεταπτυχιακή Διατριβή

*Μελέτη προβιοτικών ιδιοτήτων μικροβιακών στελεχών απομονωμένων
από ζυμωμένο γάλα που παρασκευάσθηκε στα Νησιά Fiji*

Μαργαρίτα Ι. Δημητριάδου
Γεωπόνος

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Τσακαλίδου Έφη, Καθηγήτρια

ΑΘΗΝΑ 2019



Μεταπτυχιακή Διατριβή

*Μελέτη προβιοτικών ιδιοτήτων μικροβιακών στελεχών απομονωμένων
από ζυμωμένο γάλα που παρασκευάσθηκε στα Νησιά Fiji*

*Exploring the probiotic potential of bacteria isolated from fermented milk
sample from Fiji Islands*

Μαργαρίτα Ι. Δημητριάδου
Γεωπόνος

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Τσακαλίδου Έφη, Καθηγήτρια

Μέλη Εξεταστικής Επιτροπής: Χαδιώ – Μάντζαρη Στέλλα, Καθηγήτρια
Ακτύπης Αναστάσιος, Λέκτορας

ΑΘΗΝΑ 2019

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα ζυμωμένα γαλακτοκομικά προϊόντα συγκαταλλέγονται στα πιο δημοφιλή λειτουργικά τρόφιμα παγκοσμίως, με τη γιαούρτη να κατέχει ένα σημαντικό μερίδιο της αγοράς. Η γιαούρτη παρασκευάζεται με ζύμωση του γάλακτος χρησιμοποιώντας συμβιωτική καλλιέργεια στελεχών των ειδών *Lactobacillus bulgaricus* και *Streptococcus thermophilus*. Είναι πηγή πολύτιμων θρεπτικών συστατικών, όπως βιταμινών και μετάλλων, καθώς και πρωτεΐνης υψηλής βιολογικής αξίας. Τα τελευταία χρόνια, η γιαούρτη αποτελεί το κύριο όχημα χορήγησης προβιοτικών μικροοργανισμών. Σύμφωνα με την κοινή επιτροπή ειδικών των FAO/WHO «προβιοτικοί είναι ζωντανοί μικροοργανισμοί, οι οποίοι όταν καταναλωθούν σε ικανές ποσότητες επιφέρουν ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία του ξενιστή» (FAO/WHO, 2002). Οι μικροοργανισμοί αυτοί ανήκουν σε διαφορετικά γένη και είδη και μπορεί να είναι βακτήρια ή ζύμες, και προκειμένου να χρησιμοποιηθούν ως εναρκτηρίες ή συμπληρωματικές καλλιέργειες, πρέπει να πληρούν ορισμένα κριτήρια, τα οποία σχετίζονται τόσο με την ικανότητά τους να επιβιώνουν στο ανθρώπινο πεπτικό σύστημα όσο και να εμφανίζουν συγκεκριμένες ευεργετικές δράσεις στην υγεία του ανθρώπου. Στην παρούσα μελέτη ερευνήθηκε το μικροβίωμα γιαούρτης που παρασκευάστηκε στην Πολυνησία από αγελαδινό γάλα. Τα απομονωθέντα στελέχη βακτηρίων και ζυμών αρχικά ομαδοποιήθηκαν με τη μέθοδο της *rep-PCR* και εν συνεχεία, αντιπροσωπευτικά στελέχη βακτηρίων και ζυμών ταυτοποιήθηκαν με την αλληλούχηση του γονιδίου 16S rRNA και της περιοχής ITS DNA, αντίστοιχα. Ταυτοποιήθηκαν κυρίως είδη του γένους *Lactobacillus* και του γένους *Candida*. Ακολούθως πραγματοποιήθηκε διερεύνηση του προβιοτικού δυναμικού και της ασφάλειας των απομονωθέντων στελεχών των βακτηρίων *in vitro*. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ορισμένα στελέχη θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως προβιοτικοί μικροοργανισμοί αφού γίνουν και περαιτέρω έλεγχοι των ευεργετικών τους ιδιοτήτων.

Λέξεις κλειδιά: ζυμωμένα προϊόντα γάλακτος, γιαούρτη, βακτήρια, προβιοτικά

Exploring the probiotic potential of bacteria isolated from fermented milk sample from Fiji Islands

ABSTRACT

Fermented milk products are among the most popular functional foods in the world and especially yogurt holds a high market share. Yogurt is prepared by fermenting milk using a symbiotic culture of Lactic Acid Bacteria (LAB), *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. It provides essential nutrients like vitamins and minerals and it is an excellent source of proteins. Nowadays yogurt is also well known for its probiotic properties as it contains beneficial viable microorganisms. According to FAO/WHO (2002) “probiotics are the living microorganisms which when ingested in adequate amounts confer some health benefits to the host”. These microorganisms are derived from different genera and species and may be bacteria or yeasts. Probiotic strains have to meet some criteria to be selected for use as starters or adjuncts. Survival and colonization of the gastro-intestinal tract are critical; probiotic bacteria must retain viability during their interaction with stomach acid and bile salts. Many probiotic strains, such as lactobacilli and bifidobacteria, can be considered as components of normal healthy intestinal microbiota, and thus are not thought to pose a risk for human health. Nevertheless, the safety of every strain must be assessed. In the present study, the microbiota of a home-made yogurt prepared from Polynesian cow milk, was explored. PCR techniques were used to group and then identify the isolated microorganisms. The isolated bacteria and yeasts were grouped using the genotyping technique of rep-PCR. Then, representative bacterial and yeast isolates of each group were identified at the species level by sequencing the 16S rRNA gene and ITS DNA region, respectively. The results obtained from the sequencing of 16S rRNA gene and ITS DNA region were analyzed using advanced bioinformatics tools. One bacterial and one yeast genus, i.e. *Lactobacillus* and *Candida*, respectively, were identified. Finally, the probiotic potential and the safety of the isolated bacterial strains were evaluated *in vitro*. To conclude, findings suggest that some bacterial strains could be characterized as probiotics, however, further investigation is needed.

Keywords: fermented milk products, yoghurt, bacteria, probiotics

Ευχαριστίες

Έχοντας περατώσει τη Μεταπτυχιακή Διατριβή μου αισθάνομαι την ανάγκη να αναφερθώ στους ανθρώπους εκείνους οι οποίοι συνέβαλαν στο επιστέγασμα μιας απαιτητικής επιστημονικής διαδρομής και να τους ευχαριστήσω από καρδιάς, ως ακολούθως:

Κατ' αρχάς την επιβλέπουσα Καθηγήτρια του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, κυρία Έφη Τσακαλίδου, Διευθύντρια του Εργαστηρίου Γαλακτοκομίας, όπου διενεργήθηκαν οι πειραματικές διαδικασίες. Καταξιωμένη στην Πανεπιστημιακή Κοινότητα και στον ευρύτερο χώρο του γνωστικού της αντικειμένου, η κυρία Τσακαλίδου με εμπιστεύτηκε και με τίμησε με την ανάθεση της συγκεκριμένης μελέτης. Διαρκώς παρούσα με καθοδήγησε, μου μεταλαμπαδέυσε γνώσεις και μου δημιούργησε περαιτέρω ερεθίσματα για έρευνα. Η μαθητεία δίπλα σε μία πρωτοπόρο επιστήμονα του κύρους της μου χάρισε εφόδια τόσο ως προς την προσέγγιση της έρευνας σε νοητικό επίπεδο όσο και ως προς την υλοποίησή της.

Την Καθηγήτρια του Τμήματος Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής και Υδατοκαλλιεργειών, κυρία Στέλλα Χαδιώ - Μάντζαρη της οποίας την επιστημοσύνη και την προσήνεια γνώρισα κατά τη διάρκεια των προπτυχιακών σπουδών μου. Υπό την επίβλεψή της εκπόνησα την πτυχιακή μου εργασία γεγονός το οποίο έθεσε τις απαραίτητες βάσεις για να ανταποκριθώ στις ανάγκες της Μεταπτυχιακής Μελέτης. Με στήριξε αποδεχόμενη αμέσως να είναι μέλος της Εξεταστικής Επιτροπής και μοιράστηκε μαζί μου τις πολύτιμες γνώσεις της στον τομέα της Φυσιολογίας.

Τον κύριο Αναστάσιο Ακτύπη, Λέκτορα του τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου και μέλος της Εξεταστικής Επιτροπής, ο οποίος ήταν ο πρώτος που προπτυχιακά μου έδωσε τη δυνατότητα να δουλέψω στο Εργαστήριο Γαλακτοκομίας στα πλαίσια Πρακτικής Άσκησης. Η εκπαίδευση μου υπό την άρτια καθοδήγησή του συνετέλεσε στην επιλογή του συγκεκριμένου Μεταπτυχιακού Προγράμματος.

Τη Δρ. Ουρανία Αναστασίου, ΕΔΙΠ του εν λόγω Εργαστηρίου, για την καθοριστική αρωγή της καθόλη τη διάρκεια του πειράματος αλλά και για την ανθρώπινη προσέγγισή της. Χωρίς και τη δική της συμμετοχή, η προσπάθειά μου δε θα ήταν τελεσφόρος.

Τη Δρ. Μαρίνα Γεωργαλάκη και την Δρ. Γεωργία Ζουμποπούλου, επίσης ΕΔΙΠ του Εργαστηρίου, για την ουσιαστική συμβολή τους, όποτε παρέστη ανάγκη, στα πρωτόκολλα που εφαρμόστηκαν.

Τον Διευθυντή του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών, Καθηγητή κύριο Ελευθέριο Δροσινό καθώς και όλους τους διδάσκοντες, αεί παρόντες ως δάσκαλοι και ως άνθρωποι.

Ολοκληρώνοντας, επιθυμώ να αναφερθώ στους γονείς μου οι οποίοι στήριξαν την επιλογή μου να ακολουθήσω το συγκεκριμένο Πρόγραμμα. Δίπλα μου σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου, με παρόθησαν και με ενθάρρυναν να κατακτήσω τους στόχους μου.

Πίνακας περιεχομένων

A. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ	8
1. Ζυμωμένα προϊόντα – Εισαγωγή	8
1.1 Μικροοργανισμοί στο νοπό γάλα και τα προϊόντα του	8
1.1.1 Οξυγαλακτικά βακτήρια	8
1.1.2 Άλλα γένη βακτηρίων	13
1.1.3 Μύκητες	15
1.2 Προβιοτικά	16
1.2.1 Κριτήρια επιλογής προβιοτικών στελεχών	16
1.2.2 Θετικές επιδράσεις των προβιοτικών	18
2.1 Ο ρόλος της λακτόζης στα προϊόντα του γάλακτος	21
2.2 Ζυμώσεις της λακτόζης	21
2.2.1 Γαλακτική ζύμωση	21
2.2.3 Αλκοολική ζύμωση	23
3. Ζυμωμένα προϊόντα γάλακτος – Γιαούρτη	24
3.1 Ελληνική νομοθεσία	25
3.2 Η δράση των μικροβιακών καλλιιεργειών	26
3.3 Τύποι γιαούρτης στην Ελλάδα	26
3.4 Θρεπτική αξία της γιαούρτης – Ευεργετικές ιδιότητες	29
B. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	30
Γ. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	31
4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	31
4.1 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ	32
4.1.1 Απομόνωση DNA από βακτήρια	32
4.1.2 Ομαδοποίηση στελεχών βακτηρίων με τη μέθοδο <i>rep</i> -PCR	34
4.1.3 Ταυτοποίηση στελεχών βακτηρίων με την αλληλούχηση του γονιδίου 16S rRNA	36
4.1.4 Απομόνωση DNA από ζύμες	38
4.1.5 Ομαδοποίηση στελεχών ζυμών με τη μέθοδο <i>rep</i> -PCR	39
4.1.6 Ταυτοποίηση στελεχών ζυμών με τη μέθοδο αλληλούχησης της περιοχής ITS	40
4.2 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΟΥ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ	41
4.2.1 Έλεγχος αντιμικροβιακής δράσης βακτηρίων	41
4.2.2 Έλεγχος ανθεκτικότητας σε χαμηλό pH	43
4.2.4 Έλεγχος ικανότητας πρόσδεσης σε κολλαγόνο	44
4.3 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ	45
4.3.1 Έλεγχος ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά	45
5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	46
5.1 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ	46
5.1.1 Ομαδοποίηση στελεχών βακτηρίων με τη μέθοδο <i>rep</i> -PCR	46
5.1.2 Ταυτοποίηση στελεχών βακτηρίων με την αλληλούχηση του γονιδίου 16S rRNA	49
5.1.4 Ταυτοποίηση στελεχών ζυμών με τη μέθοδο αλληλούχησης της περιοχής ITS	53
5.2 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΟΥ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ	55
5.2.1 Έλεγχος αντιμικροβιακής δράσης βακτηρίων	55
5.2.2 Έλεγχος ανθεκτικότητας σε χαμηλό pH	57
5.2.3 Έλεγχος ικανότητας υδρόλυσης χολικών αλάτων	59
5.2.4 Έλεγχος ικανότητας πρόσδεσης σε κολλαγόνο	61
5.3.1 Έλεγχος ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά	63

Δ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	71
Ε. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	72
Ζ. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	84

A. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

1. Ζυμωμένα προϊόντα – Εισαγωγή

Διαχρονικά μεγάλο μέρος των τροφίμων που καταναλώνονται από τον άνθρωπο είναι προϊόντα ζύμωσης (fermented foods), όπως γαλακτοκομικά προϊόντα (π.χ. γιαούρτη, τυριά, βούτυρο, κεφίρ, κούμης, ξινόγαλα), προϊόντα κρέατος (π.χ. σαλάμι) και αλκοολούχα ποτά (π.χ. μύρα, κρασί). Πολλά χρόνια πριν οι επιστήμονες ασχολήθηκαν με το φαινόμενο της ζύμωσης. Ο Γάλλος χημικός Louis Pasteur αφιέρωσε πολλά χρόνια ερευνών ώσπου το 1857 απέδειξε πως η ζύμωση είναι αποτέλεσμα της δράσης μικροοργανισμών και τη χαρακτήρισε τη ζωή εν τη απουσία αέρος «*La fermentation est la vie sans air*», το 1860. Το 1876 εξέδωσε το βιβλίο «*Études sur la Bière*» (Μελέτες στην Μύρα) που περιελάμβανε τα αποτελέσματα των ερευνών του και σύντομα μεταφράστηκε στα Αγγλικά υπό τον τίτλο «*Studies On Fermentation*».

Σήμερα, με τον όρο ζύμωση περιγράφεται η διαδικασία μετατροπής –μέσω της δράσης μικροοργανισμών - πρώτων υλών, πρακτικά κάτω από αναερόβιες συνθήκες, σε προϊόντα περισσότερο ωφέλιμα για τον άνθρωπο. Οι πρώτες ύλες ή υποστρώματα, είναι πλούσιες σε σάκχαρα, τα οποία αποικοδομούνται από τους μικροοργανισμούς που είναι κατά κανόνα βακτήρια ή ζύμες και μύκητες. Η διεργασία αυτή βασίζεται στην ανάπτυξη και τη μεταβολική δραστηριότητα των μικροοργανισμών, οι οποίοι επηρεάζουν τα τεχνολογικά και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των παραγόμενων προϊόντων. Επιπροσθέτως, μέσω των μεταβολιτών τους οι μικροοργανισμοί αυτοί παρεμποδίζουν την ανάπτυξη αλλοιωγόνων και παθογόνων μικροβίων συμβάλλοντας στη συντήρηση των τροφίμων.

1.1 Μικροοργανισμοί στο νωπό γάλα και τα προϊόντα του

1.1.1 Οξυγαλακτικά βακτήρια

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια (Lactic Acid Bacteria, LAB) ανήκουν στην τάξη *Lactobacillales* της κλάσης *Bacilli* του φύλου *Firmicutes* και αποτελούνται από περίπου 40 γένη.

Διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο στη γαλακτοκομία αφού συμμετέχουν στην παραγωγή ζυμωμένων προϊόντων κυρίως ως εναρκτήριες καλλιέργειες (starters) καθώς παράγουν γαλακτικό οξύ από τη ζύμωση της λακτόζης, το οποίο οδηγεί στην πήξη του γάλακτος. Υπάρχουν ακόμη και οι μη εναρκτήριες καλλιέργειες (Non Starter Lactic Acid Bacteria - NSLAB), οι οποίες αποτελούν φυσική μικροχλωρίδα του νωπού γάλακτος, κυρίως στελέχη του γένους *Lactobacillus* π.χ. *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum* αλλά ανευρίσκονται και βακτήρια του γένους *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* sp. (Settanni and Moschetti, 2010; Gobbetti et al., 2015). Και οι δύο τύποι καλλιεργειών είναι σημαντικοί για το στάδιο της ωρίμανσης αφού επηρεάζουν τη γεύση, την υφή και το άρωμα των τυριών.

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια είναι Gram θετικά, αρνητικά στη δοκιμή της καταλάσης, μη σπορογόνα, με μεγάλη αντοχή σε χαμηλό pH ενώ τα περισσότερα είδη δεν έχουν την ικανότητα κίνησης (Narvhus and Axelsson, 2003). Αντλούν την ενέργειά τους από τη ζύμωση των υδατανθράκων, αναπτύσσονται υπό αναερόβιες συνθήκες αλλά είναι και αεροανεκτικά (aerotolerant anaerobes) (Khalid, 2011).

Με κριτήριο τη μορφολογία τους κατατάσσονται σε βάκιλλους και κόκκους ενώ με βάση τη βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης, σε μεσόφιλα (20-30°C) και θεرمόφιλα (35-45°C). Ανάλογα με το προϊόν της ζύμωσης της λακτόζης διακρίνονται σε

ομοζυμωτικά που διαθέτουν το ένζυμο αλδολάση, και ετεροζυμωτικά που διαθέτουν το ένζυμο φωσφοκετολάση. Όταν το κύριο προϊόν της ζύμωσης είναι το γαλακτικό οξύ (>85%) ανήκουν στην πρώτη κατηγορία ενώ όταν παράγονται και άλλα προϊόντα, κυρίως αιθανόλη, διοξείδιο του άνθρακα και οξικό οξύ, ανήκουν στη δεύτερη κατηγορία (Papadimitriou et al., 2016).

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια διαχωρίζονται επίσης σε τρεις ομάδες ανάλογα με τις μεταβολικές οδούς που διαθέτουν για τη ζύμωση της γλυκόζης αλλά και με την ικανότητά τους να μεταβολίζουν πεντόζες.

1^η κατηγορία – υποχρεωτικά ομοζυμωτικά: γαλακτοβάκιλλοι (ομάδα I των *Lactobacillus* spp.), οι οποίοι ζυμώνουν τη γλυκόζη προς γαλακτικό οξύ αποκλειστικά μέσω της γλυκολυτικής οδού και δεν δύνανται να μεταβολίζουν πεντόζες.

2^η κατηγορία – προαιρετικά ετεροζυμωτικά: βακτήρια που ζυμώνουν τη γλυκόζη προς γαλακτικό οξύ αποκλειστικά αλλά ζυμώνουν και πεντόζες μέσω του μονοπατιού των φωσφορικών πεντοζών. Σε αυτή την κατηγορία εντάσσονται οι μικροοργανισμοί της ομάδας II των *Lactobacillus* spp. και τα γένη *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* και *Pediococcus*.

3^η κατηγορία – υποχρεωτικά ετεροζυμωτικά: βακτήρια που μεταβολίζουν τη γλυκόζη και τις πεντόζες μέσω της οδού των φωσφορικών πεντοζών. Σε αυτή την κατηγορία εντάσσονται οι μικροοργανισμοί της ομάδας III των *Lactobacillus* spp. και τα γένη *Leuconostoc*, *Weissella* και *Oenococcus*.

Η ταυτοποίηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων βασίζεται συχνά σε φαινοτυπικές μεθόδους, όπως η μορφολογία των κυττάρων, η ανάλυση των προϊόντων της ζύμωσης και της συναφούς ενζυμικής δραστηριότητας, καθώς και η ικανότητα αξιοποίησης διαφορετικών υδατανθρακικών υποστρωμάτων (Kozaki et al., 1992; Pot et al., 1994; Hammes and Vogel 1995; Tannock, 1999 ; Gonzalez et al., 2000; Corsetti et al., 2001). Οι επιστήμονες όμως έχουν επισημάνει πως χρειάζονται και οι μοριακές τεχνικές για την ακριβή ταυτοποίηση των βακτηρίων, όπως η ανάλυση του ποσοστού γουανίνης και κυτοσίνης (mol % G+C) στο DNA τους και μέσω της αλληλούχησης του 16S rRNA γονιδίου (Gürtler and Stanisich, 1996; Antonsson et al., 2003; Woo et al., 2008; Liu et al., 2012). Τα LAB έχουν γενικά χαμηλό περιεχόμενο G+C (<50 mol%), ενώ κάποιοι γαλακτοβάκιλλοι έχουν αναφερθεί να φθάνουν το 57 mol% (Sun et al., 2015). Άλλες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται είναι η ηλεκτροφόρηση παλλόμενου ηλεκτρικού πεδίου (Pulse field gel electrophoresis, (PFGE) (Vernile et al., 2008, Xu et al., 2016), η μέθοδος του τυχαία ενισχυμένου πολυμορφικού DNA (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD) και ο πολυμορφισμός μήκους ενισχυμένου θραύσματος (Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP) (Donelli et al., 2013).

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια που σχετίζονται με τα τρόφιμα ανήκουν κυρίως στα γένη *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Weissella*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus* και *Carnobacterium* και από αυτά τα *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* και *Pediococcus* χρησιμοποιούνται ως starters (Μάντης κ.ά., 2015). Οι κατηγορίες στις οποίες διακρίνονται αποδίδονται στο Σχήμα 1.

1.1.1.1 Γένος *Lactococcus*

Το γένος αυτό προέρχεται από το γένος *Streptococcus*, από το οποίο και διαχωρίστηκε το 1985 (Schleifer et al., 1985). Τα βακτήρια αυτά είναι κόκκοι, μονήρεις σε βραχείες αλύσους ή ζεύγη, μεσόφιλοι και ομοζυμωτικοί (Μάντης κ.ά., 2015). Στο νωπό αγελαδινό, κατσικίσιο και πρόβειο γάλα ανευρίσκονται στελέχη του *Lactococcus lactis* (Weerkamp et al., 1996; Gaya et al., 1999; Callon et al., 2007), το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως στη γαλακτοβιομηχανία και περιλαμβάνει 4 υποείδη τα: *L. lactis* subsp. *lactis* (που περιλαμβάνει τον *L. lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis*), *L. lactis* subsp. *cremoris*, *L. lactis* subsp. *hordniae*, από τα οποία μόνο τα *L. lactis* subsp. *lactis* και *L. lactis* subsp. *cremoris* είναι εναρκτήριες καλλιέργειες (Dhaisne et al., 2013).

- *L. lactis* subsp. *lactis*: αναπτύσσεται σε θερμοκρασία από 20 έως 40 °C με τους 30 °C να είναι η βέλτιστη τιμή. Μπορεί επίσης να αναπτυχθεί σε pH 9.2 αλλά και παρουσία 4% NaCl (Kim et al., 2006). Παράγει τη βακτηριοσίνη νισίνη (nisin – E234), η οποία είναι εμπορικά διαθέσιμη με την ονομασία nisaplin. Ανακαλύφθηκε από τους Rogers και Whittier το 1928, ανήκει στα λαντιβιοτικά και εγκρίθηκε το 1988 ως βιοσυντηρητικό από τον FDA.
- *L. lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis*: παράγει διακετύλιο από το πυροσταφυλικού οξύ που προκύπτει από τον καταβολισμό του κιτρικού οξέος (Kimoto et al., 1999). Το διακετύλιο προσδίδει ιδιαίτερο άρωμα σε γαλακτοκομικά προϊόντα, όπως η γιαούρτη και το βούτυρο (Clark and Winter, 2015).
- *L. lactis* subsp. *cremoris*: υποείδος πιο ευαίσθητο σε αλλαγές του περιβάλλοντος που δε μπορεί να αναπτυχθεί σε pH 9.2 ή και παρουσία 4% NaCl, αλλά δύναται να αναπτυχθεί μεταξύ 15 έως και 30 °C (Μάντης κ.ά., 2015). Συμβάλλει στη διαμόρφωση της υφής ορισμένων γαλακτοκομικών προϊόντων, μέσω των πολυσακχαριτών που παράγει, και της γεύσης. Προτιμάται ως εναρκτήρια καλλιέργεια για την παραγωγή σκληρών τυριών ενώ το *L. lactis* subsp. *lactis* για μαλακά τυριά (Bolotin et al., 2001)

1.1.1.2 Γένος *Lactobacillus*

Μη σπορογόνοι βάκιλλοι με μέγεθος από 1-2 μm έως 10-20 μm, στην πλειοψηφία δεν εμφανίζουν κινητικότητα, συχνά σχηματίζουν βραχείες αλύσους και η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους κυμαίνεται κυρίως από 30 έως και 40 °C. Όσον αφορά στο pH, μπορούν να αναπτυχθούν όταν οι τιμές του βρίσκονται στο εύρος από 3 έως και 8 (Pot et al., 2014). Οι γαλακτοβάκιλλοι κατανέμονται σε 3 ομάδες με βάση την ταξινόμηση Orla-Jensen που στηρίζεται στον τρόπο διάσπασης των υδατανθράκων (Heinemann, 1920).

Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωριστεί περισσότερα από 170 είδη (Goldstein et al., 2015), κάποια από τα οποία χρησιμοποιούνται στην τεχνολογία των γαλακτοκομικών προϊόντων.

Βακτήρια της πρώτης ομάδας – φυλογενετική ομάδα *delbrueckii*:

- *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*: θερμόφιλο είδος που χρησιμοποιείται κυρίως στην παραγωγή τυριού (τύπου Emmental και Parmesan) (Kafsi et al., 2014).
- *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*: θερμόφιλο είδος που χρησιμοποιείται κυρίως στην παραγωγή γιαούρτης (Kafsi et al., 2014).

- *Lb. helveticus*: θερμόφιλο είδος που χρησιμοποιείται στην παραγωγή τυριών Ελβετικού τύπου και Ιταλικών μακράς ωρίμανσης (Giraffa, 2014). Παράγει τη βακτηριοσίνη helveticin J (Joerger and Klaenhammer, 1986).
- *Lb. acidophilus*: θερμόφιλο είδος που χρησιμοποιείται στην παραγωγή κεφίρ και ξινογάλακτος.

Βακτήρια της δεύτερης ομάδας

- *Lb. casei* (φυλογενετική ομάδα *casei*): μεσόφιλο είδος που χρησιμοποιείται στην παραγωγή τυριού, όπως το Cheddar (Goldstein et al., 2015).
- *Lb. plantarum* (φυλογενετική ομάδα *plantarum*): μεσόφιλο είδος που χρησιμοποιείται στην παραγωγή τυριών (Papadopoulou and Chorianooulos, 2016)

Βακτήρια της τρίτης ομάδας

- *Lb. brevis* (φυλογενετική ομάδα *brevis*): είδος με βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 30-32 °C το οποίο βρίσκεται σε τυριά όπως το τουλουμοτύρι και η φέτα (Gurses and Erdogan, 2006, Rantsiou et al., 2008) και κατά την ωρίμανση του τυριού μπορεί να επηρεάσει τη γεύση (Goldstein et al., 2015).

1.1.1.3. Γένος *Streptococcus*

Στο γένος *Streptococcus* ανήκουν περίπου 80 είδη, εκ των οποίων μόνο ο *Streptococcus thermophilus* χρησιμοποιείται για την παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων. Στα υπόλοιπα είδη του γένους *Streptococcus* ανήκουν παθογόνα, όπως ο *S. pyogenes* που ευθύνεται για την εμφάνιση φαρρυγίτιδας (Morris and Potter, 2013) και ο *S. pneumoniae* που προκαλεί πνευμονία στον άνθρωπο (Krzyściak et al., 2013).

Ο *S. thermophilus* είναι ομοζυμωτικό βακτήριο με σχήμα κόκκου, προαιρετικά αναερόβιο, χωρίς δυνατότητα κίνησης και σχηματίζει μακρές αλύσους. Μπορεί να αναπτυχθεί σε θερμοκρασίες από 20 έως 50 °C με άριστη τους 40-45 °C (Μάντης κ.ά., 2015). Δεν μπορεί να αναπτυχθεί σε pH 9.6 ενώ η ανάπτυξη του σε 2% NaCl εξαρτάται από το στέλεχος (Sturino and Klaenhammer, 2004). Ο *S. thermophilus* είναι θερμοάντοχος και μπορεί να επιβιώσει ακόμα και κατά την παστερίωση (72 °C, 15 s) (Flint et al., 2002; Delgado et al., 2013). Κάποια στελέχη παράγουν βακτηριοσίνη (Aktypis et al., 1998) και είναι από τα πιο σημαντικά οξυγαλακτικά βακτήρια, οικονομικά. Χρησιμοποιείται για την παραγωγή τυριών, όπως το Provolone, έχοντας παράλληλα απομονωθεί και από Φέτα (Rantsiou, 2008), και χρησιμοποιείται στην παρασκευή της γιαούρτης συνεργιστικά με τον *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Οι δύο αυτοί μικροοργανισμοί αναμιγνύονται σε αναλογία 1:1 και αναπτύσσονται γρηγορότερα απ' ό,τι μόνοι τους παράγοντας περισσότερο γαλακτικό οξύ και αιθανάλη (Sturino and Klaenhammer, 2004).

Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως Έλληνες επιστήμονες απομόνωσαν ένα είδος στρεπτόκοκκου από Ελληνικό παραδοσιακό τυρί, το Κασέρι. Ονομάστηκε *Streptococcus macedonicus* λόγω της γεωγραφικής προέλευσής του, την Μακεδονία (Tsakalidou et al., 1998), και ανήκει στο σύμπλεγμα *S. bovis/S. equinus* (De Vuyst and Tsakalidou, 2008). Είναι θερμόφιλο, ομοζυμωτικό και το στέλεχος *S. macedonicus* ACA-DC 198 παράγει δύο λαντιβιοτικά, τη μασεδοσίνη (macedocin) και τη μασεδοβισίνη (macedovicin) (Georgalaki et al., 2002; Georgalaki et al., 2013). Από την ανακάλυψη του κι έπειτα η παρουσία του αποδείχθηκε και σε Ιταλικά τυριά (Pacini et al., 2006; Aronte et al., 2008). Οι φυσιολογικές και τεχνολογικές του ιδιότητες το καθιστούν υποψήφιο για χρήση ως συμπληρωματικής προστατευτικής εναρκτήριας καλλιέργειας στη

γαλακτοκομία και σε αυτό το πλαίσιο ήδη επιστήμονες έχουν πραγματοποιήσει πειράματα με θετικά αποτελέσματα (Anastasiou et al., 2007).

1.1.1.4 Γένος *Leuconostoc*

Πρόκειται για βακτήρια με κοκκοειδή μορφολογία κυττάρων που διατάσσονται σε αλυσίδες, υποχρεωτικά ετεροζυμωτικά και μεσόφιλα με βέλτιστο εύρος ανάπτυξης τους 20 έως 30 °C. Έχουν αναγνωριστεί όμως και ψυχότροφα στελέχη που δρουν ως αλλοιωγόνους μικροοργανισμοί σε ορισμένα τρόφιμα όπως τα *Leuconostoc gasicomitatum* και *Leuconostoc gelidum* (Vihavainen and Björkroth, 2007; Björkroth et al., 2014). Στο γένος περιλαμβάνονται 13 είδη, εκ των οποίων τα *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *Leuc. mesenteroides* subsp. *dextranicum*, *Leuc. mesenteroides* subsp. *cremoris*, *Leuc. pseudomesenteroides* και *Leuc. lactis* χρησιμοποιούνται στην τεχνολογία των γαλακτοκομικών προϊόντων. Πιο συγκεκριμένα, επιδρούν στα χαρακτηριστικά των προϊόντων, μέσω ενώσεων που παράγουν, σε χαρακτηριστικά όπως στην δομή, το άρωμα και τη γεύση ενώ μπορούν να διαθέτουν και αντιμικροβιακές ιδιότητες (πχ. μέσω των βακτηριοσινών) (Hemme and Foucaud-Scheunemann, 2004; Nieto-Arribas et al., 2010; Gu et al., 2012; Alegria et al., 2013; Pedersen et al., 2014). Τέλος, με βάση τα χαρακτηριστικά τους αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως συμπληρωματικές ή εναρκτηρίες καλλιέργειες (Florez et al., 2016).

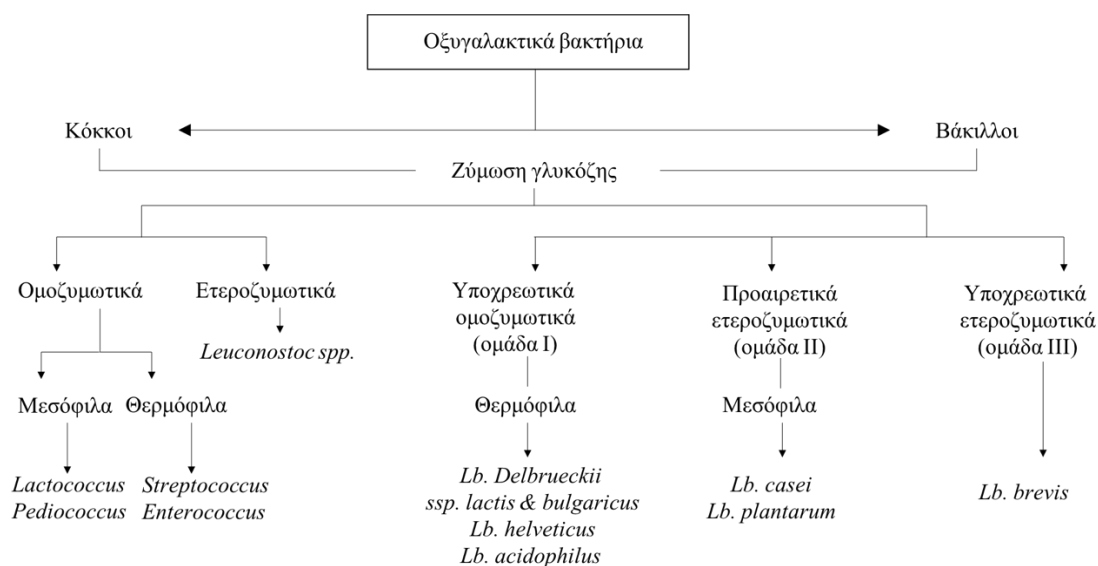
1.1.1.5 Γένος *Pediococcus*

Στο γένος *Pediococcus* ανήκουν 11 είδη. Είναι κόκκοι, ομοζυμωτικοί, των οποίων τα όρια ανάπτυξης βάσει της θερμοκρασίας διαφέρουν ανάλογα με το είδος. Μπορούν ακόμη να αναπτυχθούν σε συγκεντρώσεις NaCl 4-5% και σε pH 4.5 (Μάντης κ.ά., 2015). Στη γαλακτοκομία ως Non-Starter Lactic Acid Bacteria χρησιμοποιούνται στο στάδιο της ωρίμανσης των τυριών, συχνότερα τα *Pediococcus acidilactici* και *Pediococcus pentosaceus* (Settanni and Moschetti, 2010).

1.1.1.6 Γένος *Enterococcus*

Το γένος *Enterococcus* περιλαμβάνει περισσότερα από 40 είδη προαιρετικά αναερόβιων, μη σπορογόνων βακτηρίων. Είναι κόκκοι, ομοζυμωτικοί, αρνητικοί στην καταλάση -οι περισσότεροι- χωρίς δυνατότητα κίνησης και αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες 10-45 °C με βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 37 °C (Švec and Franz, 2014). Αντέχουν και σε υψηλότερες θερμοκρασίες (30 min στους 60 °C), σε 6.5 % NaCl και σε pH 9.6 (Morandi et al., 2005).

Οι μικροοργανισμοί αυτοί βρίσκονται στον εντερικό σωλήνα ανθρώπων, ζώων και πτηνών και είναι σημαντικοί και για την Τεχνολογία Τροφίμων και για τη Δημόσια Υγεία. Η πρωτεολυτική και λιπολυτική τους δράση είναι σημαντική για την παραγωγή τυριών όπου μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως συμπληρωματικές καλλιέργειες. Ακόμη, μεταβολίζουν το κιτρικό οξύ προς αρωματικές ουσίες (οξικό οξύ, ακετοΐνη) διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη αρώματος σε ζυμωμένα προϊόντα και παράγουν βακτηριοσίνες (Moreno et al., 2006). Στελέχη εντερόκοκκων κυρίως των *E. faecalis* και *E. faecium* είναι παθογόνα και ευθύνονται για ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις, παρουσιάζοντας παράλληλα μεγάλη ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά (Franz et al., 2011; Iweriebor, 2015; Pidot, 2018).



Σχήμα 1. Διάκριση των οξυγαλακτικών βακτηρίων βάσει της μορφής των κυττάρων, τη ζύμωση της λακτόζης και τη βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης. Πηγή: Καμινारीδης και Μοάτσου, 2009.

1.1.2. Άλλα γένη βακτηρίων

Εκτός των προαναφερθέντων οξυγαλακτικών βακτηρίων σημαντικό ρόλο στον κλάδο της γαλακτοκομίας διαδραματίζουν κι άλλα γένη βακτηρίων με παρεμφερή φυσιολογικά χαρακτηριστικά που διαφοροποιούνται όμως φυλογενετικά.

1.1.2.1. Γένος *Bifidobacterium*

Οι μικροοργανισμοί αυτοί ανήκουν στο φύλο Actinobacteria. Είναι βάκιλλοι, Gram θετικοί, στερούνται της δυνατότητας κίνησης και είναι υποχρεωτικά αναερόβιοι. Ακόμη είναι μη σπορογόνα βακτήρια, αρνητικά στην καταλάση και έχουν υψηλό περιεχόμενο G + C (55-67 mol %) (Lee and O'Sullivan, 2010). Ήταν από τα πρώτα μικρόβια που αναγνωρίστηκαν να αποικούν στην ανθρώπινο γαστρεντερικό σωλήνα. Συγκεκριμένα, απομονώθηκαν το 1899 από κόπρανα βρεφών που θήλαζαν και ονομάστηκαν *Bacillus bifidus* (Tissier, 1900). Αρχικά ταξινομήθηκαν ως γαλακτοβάκιλλοι ενώ τελικά το 1973 και το 1974 επαναταξινομήθηκαν ως νέο γένος που ονομάστηκε *Bifidobacterium* (Rouparad et al., 1973; Buchanan et al., 1974).

Στο γένος περιλαμβάνονται 35 είδη, κάποια από τα οποία χρησιμοποιούνται στην παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων ως συμπληρωματικές καλλιέργειες παράλληλα με τα οξυγαλακτικά βακτήρια καθώς έχει αποδειχθεί πως διαθέτουν ευεργετικές για την υγεία ιδιότητες. Εντάσσονται έτσι στα «προβιοτικά», μία ομάδα μικροοργανισμών που θα αναλυθεί στη συνέχεια της εργασίας (Turroni et al., 2014).

1.1.2.2. Γένος *Brevibacterium*

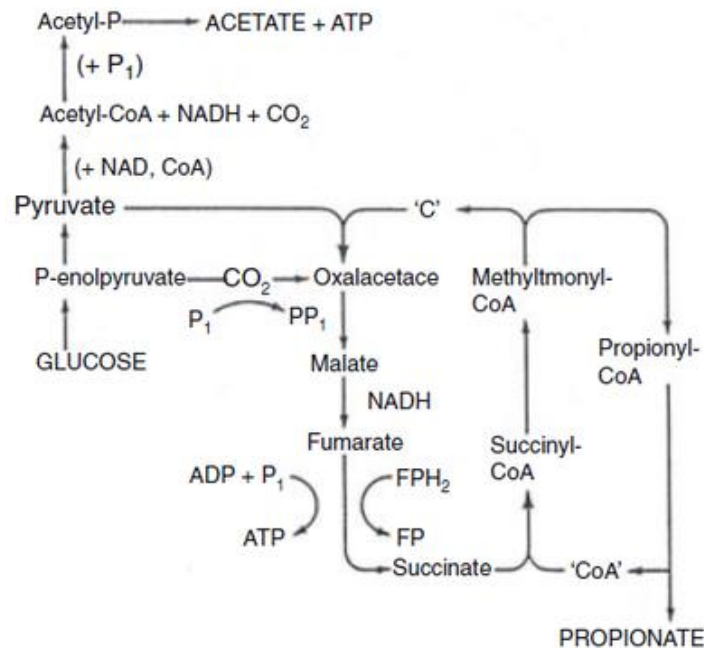
Το γένος ανήκει στο φύλο Actinobacteria και περιλαμβάνει το *Brevibacterium linens*, το οποίο χρησιμοποιείται στην παραγωγή smear cheeses, όπως το Livarot (Larpin-Laborde et al., 2011) και το Brick (Mounier et al., 2017). Δεν έχει δυνατότητα

κίνησης, είναι υποχρεωτικά αερόβιο, θετικό στην καταλάση και αναπτύσσεται στο εύρος των 20 – 35°C και σε pH από 5.5 έως 9.5 (Bikash et al., 2000; Betts, 2006). Αναπτύσσεται στην επιφάνεια των τυριών με χαρακτηριστικό επίχρισμα πορτοκαλί ή κιτρινωπό, έχει πρωτεολυτικές ιδιότητες και προσδίδει σε αυτά ιδιαίτερο άρωμα. Τέλος, παράγει αντιμικροβιακές ενώσεις έναντι τροφιμογενών παθογόνων βακτηρίων αλλά και ζυμών και μυκήτων (Ratray and Fox, 1999; Bikash et al., 2000).

1.1.2.3. Γένος *Propionibacterium*

Πρόκειται για Gram θετικά, μη σποριογόνα, χωρίς ικανότητα κίνησης και αναερόβια - αλλά και αεροανεκτικά - βακτήρια, θετικά στην καταλάση και με υψηλό περιεχόμενο G + C, 67.3 mol % (Falentin et al., 2016). Τα είδη του γένους αυτού διαχωρίζονται σε δύο ομάδες, τα γαλακτικά προπιονικά βακτήρια που χρησιμοποιούνται στην παραγωγή τυριών Ελβετικού τύπου (π.χ. *P. freudenreichii*, *P. acidipropionici*) και τα δερματικά που σχετίζονται με παθήσεις του δέρματος (π.χ. *P. acnes*).

Σε γαλακτοκομικά προϊόντα, όπου η δράση των οξυγαλακτικών βακτηρίων προκαλεί την παραγωγή γαλακτικού οξέος, τα προπιονικά βακτήρια ζυμώνουν το γαλακτικό οξύ προς προπιονικό, οξικό και CO₂ (Σχήμα 2). Το CO₂ είναι υπεύθυνο για τις χαρακτηριστικές οπές σε τυριά Ελβετικού τύπου και ιδίως στο Emmental (Thierry et al., 2011, Lee et al., 2014).



Σχήμα 2. Προπιονική ζύμωση. Πηγή: www.onlinebiologynotes.com

1.1.3 Μύκητες

Πρόκειται για ευκαρυωτικούς μικροοργανισμούς που διακρίνονται σε μυκητηλιακούς και ζυμοειδείς, με τους πρώτους να σχηματίζουν τη «μούχλα» στα τυριά.

Μυκητηλιακοί μύκητες

Οι μυκητηλιακοί μύκητες είναι αερόβιοι μικροοργανισμοί που αναπτύσσουν υφές, εκ των οποίων είδη του γένους *Penicillium* (*P. roqueforti*, *P. camemberti*) χρησιμοποιούνται στην παραγωγή τυριών όπως το Danablu, το Roquefort, η Gorgonzola, το Camembert, το Brie (Babel, 1953). Το *P. roqueforti* αναπτύσσεται εσωτερικά του τυριού προσδίδοντας το χαρακτηριστικό μπλε χρώμα στα τρία πρώτα τυριά ενώ το *P. camemberti* επιφανειακά στα άλλα δύο (Beresford et al., 2001).

Εκτός από αυτούς τους μύκητες υπάρχουν και είδη που προκαλούν ανεπιθύμητες αλλοιώσεις στα τυριά και η παρουσία τους συνήθως είναι αποτέλεσμα αερογενούς επιμόλυνσης μετά την παστερίωση. Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως ορισμένοι μύκητες παράγουν μυκοτοξίνες, τις αφλατοξίνες, οι οποίες μπορεί να προκαλέσουν πληθώρα ασθενειών στον ανθρώπινο οργανισμό, έως και καρκίνο (Pitt, 2000). Ακόμα και εργαστηριακά στελέχη των *P. roqueforti* και *P. camemberti* έχει βρεθεί ότι παράγουν μυκοτοξίνες (Frisvad et al., 2004). Οι μυκοτοξίνες εντάσσονται στο νομοθετικό πλαίσιο της ΕΕ: κανονισμός (ΕΚ) 1881/2006 της επιτροπής της 19ης Δεκεμβρίου 2006 για καθορισμό μέγιστων επιτρεπτών επιπέδων για ορισμένες ουσίες, οι οποίες επιμολύνουν τα τρόφιμα, όπου ως ανώτατα επιτρεπτά όρια για την παρουσία της μυκοτοξίνης Μ₁ στο γάλα ορίζονται τα 0,050 μg/kg.

Ζυμομύκητες ή ζύμες

Είναι μονοκύτταροι μικροοργανισμοί, σφαιρικού ή ωοειδούς ή και ραβδοειδούς σχήματος, με ευδιάκριτο πυρήνα που χαρακτηρίζονται από μεγάλη ετερογένεια και δεν αναπτύσσουν υφές.

Οι ζύμες αναπτύσσονται σε μεγάλο θερμοκρασιακό εύρος ακόμα και στους 0 °C καθώς και σε μεγάλο εύρος pH αλλά κυρίως όξινο. Ζυμώνουν τη λακτόζη, παράγουν λιπολυτικά και πρωτεολυτικά ένζυμα και μεταβολίζουν το κιτρικό και το γαλακτικό οξύ. Ορισμένα είδη αντέχουν σε συγκέντρωση NaCl μέχρι 15% (*Debaryomyces hansenii*).

Οι μικροοργανισμοί αυτοί είναι πολύ σημαντικοί αφού έχουν και θετικές και αρνητικές επιδράσεις. Χρησιμοποιούνται ως καλλιέργειες για την παραγωγή του Κεφίρ (Leite et al., 2013) αλλά παράλληλα μπορεί να επιμολύνουν γαλακτοκομικά προϊόντα επιφέροντας τεχνολογικά ελαττώματα ή και αλλοιώσεις. Οι περισσότερες εκ των ζυμών που αναπτύσσονται στο γάλα και τα προϊόντα του λαμβάνουν την απαραίτητη ενέργεια από το γαλακτικό οξύ με αποτέλεσμα η ανάπτυξή τους να επιφέρει αύξηση του pH. Ευνοούνται έτσι τα ευαίσθητα στην οξύτητα βακτήρια και επιταχύνεται η δράση των πρωτεολυτικών ενζύμων με αποτέλεσμα την παραγωγή δυσάρεστων οσμών. Ακόμη, η παραγωγή CO₂ από τις ζύμες προκαλεί «φούσκωμα» του τυριού στους περιέκτες καθώς και διόγκωση του γιουρτιού (Fleet, 1990; Roostita and Fleet, 1996).

1.2 Προβιοτικά

Ο όρος προβιοτικό χρησιμοποιήθηκε πρώτη φορά από τους Lilly και Stillwell (1965), οι οποίοι περιέγραψαν έτσι ουσίες που παράγονται από πρωτόζωα, κατά την εκθετική φάση της ανάπτυξής τους, και προάγουν την ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών. Ο όρος με την πάροδο του χρόνου διευρύνθηκε και τελικά το 1989 ο Fuller τον τροποποίησε εστιάζοντας στη σημασία των ζωντανών κυττάρων (“live cells”) διατυπώνοντας πως προβιοτικά είναι *ζωντανά μικροβιακά συμπληρώματα που ενεργητικά επηρεάζουν και βελτιώνουν την εντερική μικροχλωρίδα*. Ο πιο πρόσφατος ορισμός που ισχύει έως και σήμερα προήλθε από μία επιτροπή ειδικών των FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations / World Health Organization) σύμφωνα με τους οποίους *προβιοτικοί είναι ζωντανοί μικροοργανισμοί, οι οποίοι όταν καταναλωθούν σε ικανές ποσότητες επιφέρουν ενεργητικές επιδράσεις στην υγεία του ξενιστή* (FAO/WHO, 2002).

Τα προβιοτικά χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων σε ζυμωμένα γαλακτοκομικά προϊόντα («λειτουργικά τρόφιμα») και σε συμπληρώματα διατροφής.

1.2.1 Κριτήρια επιλογής προβιοτικών στελεχών (Thakur et al., 2016)

- Επιβίωση στο ανθρώπινο γαστρεντερικό σύστημα: στο γαστρεντερικό σύστημα το χαμηλό pH και η παρουσία χολικών αλάτων διαμορφώνουν αντίξοες συνθήκες για την ανάπτυξη και την επιβίωση μικροοργανισμών οπότε επιλέγονται στελέχη που δεν επηρεάζονται αρνητικά από το περιβάλλον του πεπτικού συστήματος.
 - ◆ Το περιβάλλον του στομάχου είναι όξινο κυρίως λόγω του γαστρικού υγρού. Το υγρό αυτό παράγεται από αδένες του στομάχου και περιέχει υδροχλωρικό οξύ το οποίο είναι υπεύθυνο για το χαμηλό pH με τιμές που κυμαίνονται κυρίως μεταξύ του 1 και του 4-5 και εξαρτώνται από παράγοντες όπως η πρόσληψη τροφής κ.ά (Beasley et al., 2015).
 - ◆ Τα χολικά οξέα σχηματίζονται στο ήπαρ με πρόδρομη ένωση τη χοληστερόλη και απαντώνται στο λεπτό έντερο υπό τη μορφή συζευγμένων αλάτων. Η βασική τους λειτουργία είναι η γαλακτωματοποίηση του λίπους της τροφής ενώ μεταξύ των υπολοίπων επιδράσεών τους στον οργανισμό, είναι και η ρύθμιση των επιπέδων της χοληστερόλης στο αίμα. Η συγκέντρωση των χολικών αλάτων στο έντερο εξαρτάται από το είδος και την ποσότητα των τροφίμων που καταναλώνονται, και κυμαίνεται περίπου από 0.2 έως 2% (w/v) (Kristoffersen et al., 2007).
Η δράση των βακτηρίων της εντερικής χλωρίδας μπορεί να επιφέρει αποσύζευξη των χολικών αλάτων μέσω του ενζύμου υδρολάση των χολικών αλάτων (Bile Salt Hydrolase -BSH- enzyme). Τα συζευγμένα χολικά άλατα απορροφώνται ξανά από το έντερο και επιστρέφουν στο ήπαρ μέσω της εντεροηπατικής λειτουργίας ενώ τα ασύζευκτα αποβάλλονται από τον οργανισμό ταχύτερα, καθώς είναι λιγότερο υδατοδιαλυτά και απορροφώνται δυσκολότερα από τα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου. Το γεγονός αυτό επιφέρει αύξηση της de novo σύνθεσης των χολικών οξέων χρησιμοποιώντας χοληστερόλη.
Δηλαδή, η δράση της υδρολάσης οδηγεί σε έλλειμμα χολικών οξέων στον οργανισμό λόγω της πιο εύκολης απομάκρυνσης των ασύζευκτων χολικών οξέων που προκύπτουν. Εξαιτίας αυτού του ελλείματος συντελείται μετατροπή της χοληστερόλης προς χολικά οξέα για την αποκατάσταση της

ισορροπίας στον οργανισμό. Αυτός ο μηχανισμός επιδρά θετικά στον οργανισμό αφού οδηγεί σε μείωση των επιπέδων της χοληστερόλης στο αίμα, η υψηλή συγκέντρωση της οποίας συγκαταλέγεται στους παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση καρδιαγγειακών παθήσεων (βλ. 1.2.2) (Chand et al., 2017)

- Χαρακτηρισμένα ως ασφαλή για τον ανθρώπινο οργανισμό - GRAS (Genarally Recognized As Safe): πρέπει να αποφεύγονται αρνητικές επιδράσεις στην υγεία από την κατανάλωση προβιοτικών συνεπώς προτείνεται η χρήση πλήρως ταυτοποιημένων στελεχών με ιστορικό ασφαλούς χορήγησης. Οι παράμετροι ασφαλείας που εξετάζονται περιλαμβάνουν: την ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά, την αιμολυτική δράση, την παραγωγή βιογενών αμινών κ.ά.
- Σταθερότητα – τεχνολογική καταλληλότητα: για να δράσουν ευεργετικά στον άνθρωπο τα προβιοτικά στελέχη θα πρέπει να αντέξουν τις αντίξοες συνθήκες των διαδικασιών παραγωγής και συσκευασίας των τροφίμων ώστε ο πληθυσμός τους στο τελικό προϊόν, και ως την ημερομηνία λήξης, να κυμαίνεται σε επαρκή επίπεδα. Ακόμη, δε θα πρέπει να επιδρούν αρνητικά στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του προϊόντος όπως το άρωμα και το χρώμα.

Ως προβιοτικοί μικροοργανισμοί χρησιμοποιούνται οξυγαλακτικά βακτήρια, κυρίως του γένους *Lactobacillus*, άλλα βακτήρια, κυρίως Bifidobacteria, και ζύμες, κατά κύριο λόγο του γένους *Saccharomyces*. Μικροοργανισμοί που συνήθως δρουν ως προβιοτικές καλλιέργειες δίνονται στον παρακάτω Πίνακα 1:

Πίνακας 1. Μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται ως προβιοτικές καλλιέργειες (Fijan, 2014; Rabah et al., 2017)

Γένος <i>Lactobacillus</i>	Γένος <i>Bifidobacterium</i>	Λοιπά LAB	Λοιποί μικροοργανισμοί
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>L. amylovorus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Bacillus coagulans</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. breve</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Escherichia coli</i> Nissle
<i>L. fermentum</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
<i>L. gallinarum</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>bouardii</i>
<i>L. gasseri</i>	<i>B. longum</i>		
<i>L. johnsonii</i>			
<i>L. paracasei</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. rhamnosus</i>			
<i>L. salivarius</i>			

1.2.2 Θετικές επιδράσεις των προβιοτικών

Η σημασία της χλωρίδας του εντέρου

Στο ανθρώπινο σώμα αποικίζουν εκατοντάδες μικροοργανισμοί, το σύνολο των οποίων ονομάζεται «ανθρώπινο μικροβίωμα». Πρόκειται για ένα πολύπλοκο οικοσύστημα το οποίο αριθμεί περίπου 10^{14} βακτήρια, δηλ. 10 φορές περισσότερα από τα ανθρώπινα κύτταρα. Οι έρευνες των επιστημόνων επικεντρώνονται κυρίως στο ρόλο του εντερικού μικροβιώματος ή εντερικής χλωρίδας (“gut microbiota”). Ο όρος gut microbiota χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τον Lederberg περιγράφοντας έτσι μία οικολογική κοινότητα συμβιωτικών και δυνητικά παθογόνων μικροοργανισμών που μοιράζονται το χώρο του σώματος και αγνοείται ο καθοριστικός ρόλος τους στις ασθένειες (Lederberg, 2001). Τα βακτηριακά είδη που έχουν βρεθεί στο εντερικό μικροβίωμα ανήκουν κυρίως στα φύλα *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* και *Proteobacteria* (Mentis and Gypas, 2013). Το εντερικό μικροβίωμα επιδρά σημαντικά στο μεταβολισμό, την ανάπτυξη και τη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, την πέψη, καθώς και στη βιοσύνθεση των βιταμινών και την άμυνα έναντι παθογόνων (Zhang et al., 2015; Azad et al., 2018). Γίνεται επομένως κατανοητό πως είναι σημαντικό για την εύρυθμη λειτουργία του οργανισμού η εντερική χλωρίδα να διατηρείται σε ισορροπία.

Η λήψη προβιοτικών είτε μέσω τροφίμων (π.χ. γιαούρτι) είτε ως συμπλήρωμα διατροφής υπό μορφή κάψουλας, βοηθά στην αποκατάσταση του πληθυσμού των μικροοργανισμών του εντέρου σε περίπτωση που αυτός διαταραχθεί, όπως συμβαίνει για παράδειγμα με τη λήψη αντιβιοτικών.

Η ευεργετική όμως δράση των προβιοτικών στον ανθρώπινο οργανισμό δεν περιορίζεται εδώ. Συνεχείς μελέτες επί του θέματος υπογραμμίζουν τον σπουδαίο ρόλο των προβιοτικών, παραδείγματα των οποίων συνοψίζονται ως εξής:

- **Ανοσοποιητικό σύστημα:** Μελέτες έδειξαν πως τα προβιοτικά ρυθμίζουν την έμφυτη και την επίκτητη ανοσολογική απόκριση τροποποιώντας τις λειτουργίες των δενδριτικών κυττάρων, των μακροφάγων και των Β και Τ λεμφοκυττάρων. Ένας από τους μηχανισμούς δράσης που εμπλέκεται στην ανοσορύθμιση είναι η ενεργοποίηση των υποδοχέων τύπου Toll (Toll-like receptors, TLRs), οι οποίοι είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες με σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση της φυσικής και της ειδικής ανοσίας (Yan and Polk, 2011; Castillo et al., 2011; Maldonado et al., 2015). Ακόμη, κλινικές μελέτες σε ανθρώπους διαφορετικών ηλικιών έχουν δείξει πως η χορήγηση προβιοτικών συμβάλλει στην ενεργοποίηση της έμφυτης ανοσολογικής απόκρισης επιδρώντας θετικά στη φαγοκυττάρωση και τη δράση των κυττάρων natural killers (NK) (Nova et al., 2007; Lee et al., 2017; Lee et al., 2018).
- **Αλλεργίες:** Υπάρχουν ενδείξεις πως προβιοτικά στελέχη μπορούν να επιδράσουν θετικά σε περιπτώσεις αλλεργιών και συγκεκριμένα σε χρόνιες φλεγμονώδεις παθήσεις του δέρματος, όπως η ατοπική δερματίτιδα ή το έκζεμα. Οι αλλεργικές παθήσεις σχετίζονται με μη ισορροπημένη ενεργοποίηση των κυτταροκινών Th 1 (T helper 1 cells) και Th 2 (T helper 2 cells), οι οποίες εκκρίνονται κυρίως από τα βοηθητικά Τ- λεμφοκύτταρα. Οι Th 1 ενεργοποιούν φλεγμονώδεις αντιδράσεις ενώ οι Th 2 συμμετέχουν στην ενεργοποίηση των Β-λεμφοκυττάρων και την παραγωγή αντισωμάτων. Οι κυτταροκίνες είναι διαλυτές πρωτεΐνες που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην επικοινωνία των κυττάρων κατά την ανοσολογική απόκριση. Τα προβιοτικά μπορούν να διεγείρουν την παραγωγή Th 1, όπως η ιντερφερόνη- γ (INF- γ), και να παρεμποδίσουν την απόκριση της Th 2

όπως η IL-4 (Watanabe et al., 2009; Nole et al., 2014). Ακόμη, έρευνες έχουν δείξει πως τα προβιοτικά μπορούν να μειώσουν την παραγωγή ανοσοσφαιρίνης E (IgE, Immunoglobulin E), δηλαδή των αντισωμάτων που είναι υπεύθυνα για την εμφάνιση αλλεργικής αντίδρασης (Hayashi et al., 2009; Pascal et al., 2018). Υπάρχουν ακόμη κυτταροκίνες που δεν ανήκουν στις δύο παραπάνω κατηγορίες αλλά συμμετέχουν στην ανοσολογική απόκριση. Παράγονται κυρίως από τα ρυθμιστικά T-λεμφοκύτταρα (T regulatory cells, Treg) και έχουν ανοσορυθμιστικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Σε ασθενείς με ατοπική δερματίτιδα έχει αναφερθεί μειωμένη δράση των Treg, η οποία φαίνεται να μπορεί να ρυθμιστεί από προβιοτικά στελέχη (Kwon et al., 2010; Kim et al., 2017).

- Παθήσεις του εντέρου: Στην περίπτωση της φλεγμονώδους νόσου του εντέρου υπάρχει συσχέτιση ανάμεσα στη διαταραγμένη εντερική χλωρίδα και τη φλεγμονή γεγονός που δείχνει πως τα προβιοτικά μπορούν να δράσουν ελέγχοντας τη σοβαρότητα αλλά ίσως και την επανεμφάνιση των συμπτωμάτων (Thakur et al., 2016). Μελετώντας τους πιθανούς μηχανισμούς δράσης των προβιοτικών στην πάθηση αυτή επιστήμονες έδειξαν πως καταστέλλονται οι φλεγμονώδεις κυτταροκίνες (pro-inflammatory cytokines) TNF- α , IFN- γ , IL-8 και IL-12 μέσω ρύθμισης του μεταγραφικού παράγοντα NF- κ B (Mikon et al., 2014). Επιπροσθέτως, αποτελέσματα έρευνας έδειξαν πως η επανεμφάνιση των συμπτωμάτων μπορεί ίσως να ελεγχθεί μέσω της διατήρησης της ισορροπίας της μικροχλωρίδας (Miquel et al., 2013). Τέλος, έχει βρεθεί πως τα προβιοτικά μπορούν να αλληλεπιδρούν με τα καλκοειδή κύτταρα του εντερικού βλεννογόνου αυξάνοντας την παραγωγή βλέννης ή αντιμικροβιακών πεπτιδίων, όπως η λυσοζύμη, βελτιώνοντας παράλληλα τη λειτουργία του εντέρου που είναι πολύ σημαντική για τη διατήρηση της υγείας. Τα κύτταρα του εντερικού επιθηλίου σχηματίζουν έναν πολύπλοκο φραγμό που ονομάζεται εντερικός βλεννογόσιος φραγμός ο οποίος επιτρέπει την είσοδο των θρεπτικών συστατικών και του νερού, αποτρέποντας παράλληλα την είσοδο βλαβερών ουσιών και παθογόνων μικροοργανισμών. Στην περίπτωση της φλεγμονώδους νόσου ο φραγμός δεν λειτουργεί σωστά και γίνεται έτσι κατανοητό πως είναι σημαντική η δράση των προβιοτικών στελεχών (Rioux et al., 2005; Veerappan et al., 2012).
- Καρδιαγγειακές παθήσεις: Στους παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση καρδιαγγειακών παθήσεων συγκαταλέγονται η υπέρταση και η υπερχοληστερολαιμία. Αντικείμενο ερευνών με θετικά αποτελέσματα αποτέλεσε η αντιυπερτασική δράση των προβιοτικών. Αποδείχθηκε πως προβιοτικά στελέχη μπορούν να δράσουν μέσω των βιοενεργών τους πεπτιδίων, τα οποία παράγονται μέσω της υδρόλυσης των πρωτεϊνών του γάλακτος, αναστέλλοντας τη δράση του ενζύμου μετατροπής της αγγειοτενσίνης I (ACE-I) που έχει συσχετιστεί με το σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης, το οποίο ρυθμίζει την αρτηριακή πίεση (Ahtesh et al., 2016; Ahtesh et al., 2018). Ακόμη, Έλληνες επιστήμονες απομόνωσαν στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων από Ελληνικά γαλακτοκομικά προϊόντα και κατέγραψαν τη δράση των βιοενεργών τους πεπτιδίων ως προς την αναστολή του ενζύμου ACE I (Georgalaki et al., 2017). Σε ό,τι αφορά τη χοληστερόλη η βιβλιογραφική ανασκόπηση φανερώνει την επίσης θετική επίδραση των προβιοτικών αφού έχει καταγραφεί πως μπορούν να μειώσουν τα επίπεδα της LDL (Low Density Lipoprotein) χοληστερόλης στο αίμα και να βελτιώσουν την αναλογία LDL/HDL (Low Density Lipoproteins/High Density Lipoproteins) (Thushara et al., 2016).

- Αντιμικροβιακές ενώσεις: Οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί παράγουν αντιμικροβιακές ενώσεις με σημαντικότερες τις βακτηριοσίνες που αναφέρθηκαν στο πρώτο κεφάλαιο της εργασίας. Πρόκειται για ενώσεις πρωτεϊνικής φύσης, οι οποίες συντίθενται στα ριβοσώματα των βακτηρίων και δρουν έναντι φυλογενετικά συγγενών μικροοργανισμών (Yang et al., 2014). Άλλοι μεταβολίτες προβιοτικών μικροοργανισμών με αντιμικροβιακή δράση είναι οργανικά οξέα - κυρίως γαλακτικό και οξικό οξύ - , υπεροξειδίου του υδρογόνου, διακετύλιο, ακεταλδεΐδη κ.ά. (Šuškonović et al., 2010).
- Καρκίνος: Υπάρχουν ενδείξεις πως προβιοτικά στελέχη μπορούν να μειώσουν τα επίπεδα ενζύμων του παχέος εντέρου που μετατρέπουν προκαρκινογόνες ουσίες σε καρκινογόνες και συγκεκριμένα μέσω των ενζύμων β-γλυκουρονιδάση, αζωτοαναγωγή και νιτροαναγωγή (β-glucuronidase, azoreductase, nitroreductase) (Fernandes and Shakani, 1990). Νεότερες έρευνες έδειξαν πως προβιοτικοί μικροοργανισμοί μπορούν να παρεμποδίσουν τον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων μέσω της προσκόλλησης τους σε αυτά αλλά και της παραγωγής λιπαρών οξέων βραχείας αλύσου (βουτυρικό, προπιονικό) (Thirabunyanon and Hongwittayakorn, 2013), και να ευνοήσουν την κυτταρική απόπτωση των καρκινικών κυττάρων επίσης μέσω της παραγωγής λιπαρών οξέων βραχείας αλύσου (βουτυρικό οξύ) και βακιτρακίνης (πολυπεπτιδίου αντιβιοτικό, bacitracin) (Chen et al., 2015).
- Άξονας εντέρου – εγκεφάλου: Ο άξονας εντέρου – εγκεφάλου (gut-brain axis) ορίζεται ως ένα σύστημα αμφίδρομης επικοινωνίας που συνδέει το γαστρεντερικό σύστημα με το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ) μέσω πολλαπλών οδών με τη συμμετοχή ενδοκρινικών, νευρικών και ανοσολογικών κυττάρων. Στις οδούς αυτές συγκαταλέγονται η άμεση νευρική οδός, το ανοσολογικό σύστημα και οι εντεροενδοκρινικές συνδέσεις. Ο άξονας αυτός επιτρέπει στο ΚΝΣ να ρυθμίζει τις γαστρεντερικές λειτουργίες – όπως η πέψη – και στο γαστρεντερικό σύστημα να δίνει σήμα για την όρεξη και την πρόσληψη τροφής. Επιπλέον, διατηρεί την ομοιόσταση κυρίως σε συνθήκες stress (Cryan and Dinan 2012; Cryan, 2016; Osadchiy et al., 2018). Το μικροβίωμα μέσω του άξονα εντέρου – εγκεφάλου συμμετέχει στη ρύθμιση εντερικών και εγκεφαλικών λειτουργιών, όπως η πέψη, η ψυχική διάθεση και η συμπεριφορά. Στα πλαίσια αυτά διεξάγονται έρευνες αναφορικά με επιδράσεις των προβιοτικών στη λειτουργία του άξονα. Υπάρχουν, για παράδειγμα, ενδείξεις πως προβιοτικά στελέχη μπορούν να μειώσουν την ένταση των συμπτωμάτων κατάθλιψης μέσω ενεργοποίησης του σηματοδοτικού μονοπατιού AKT (PI3K-Akt Pathway, μονοπάτι υποδοχέων κινάσης τυροσίνης), το οποίο είναι ένα από τα κύρια ενδοκυτταρικά μονοπάτια που επάγουν την κυτταρική αύξηση (Xu et al., 2018). Ακόμη, φαίνεται πως τα προβιοτικά μπορούν να επιδράσουν θετικά σε στρεσογόνες καταστάσεις, όπως έδειξε για παράδειγμα κλινική μελέτη σε φοιτητές, μειώνοντας την ένταση των συμπτωμάτων στο πεπτικό μέσω μείωσης των επιπέδων της κορτιζόλης, δηλαδή της «ορμόνης του στρες» που παράγεται στο φλοιό των επινεφριδίων (Messaoudi et al., 2011a, 2011b; Kato-Kataoka et al., 2016). Τέλος, προβιοτικά στελέχη δείχνουν ικανότητες ρύθμισης των συγκεντρώσεων νευροδιαβιβαστών δηλαδή χημικών ουσιών που απελευθερώνονται από τις αξονικές απολήξεις των νευρικών κυττάρων στην περιοχή των συνάψεων και είναι υπεύθυνες για τη μετάδοση του εκάστοτε ερεθίσματος από τον έναν νευρώνα στους επόμενους. Συγκεκριμένα, επιφέρουν αύξηση των συγκεντρώσεων του γλουταμινικού οξέος (glutamate), του γ-αμινοβουτυρικού οξέος (Gamma-Aminobutyric Acid-GABA) και του Ν-ακετύλο-ασπαρτικού οξέος (N-acetyl aspartate) (Janik et al., 2016).

2.1 Ο ρόλος της λακτόζης στα προϊόντα του γάλακτος

Για την τεχνολογία του γάλακτος και των προϊόντων του είναι ιδιαίτερα σημαντικός ο ρόλος ενός δισακχαρίτη, της λακτόζης. Αποτελείται από τους μονοσακχαρίτες D-γλυκόζη και D-γαλακτόζη ενωμένους με γλυκοζιτικό δεσμό β διατάξης (1,4) και ανήκει στα ανάγοντα σάκχαρα. Στο γάλα υπάρχει με τις α- και β- ανωμερείς μορφές με τη β-λακτόζη να είναι θερμοδυναμικά σταθερότερη. Συντίθεται στις μεμβράνες των οργανιδίων Golgi των γαλακτικών κυττάρων του μαστού από τη γλυκόζη του αίματος. Αποτελεί τον κύριο υδατάνθρακα του γάλακτος των περισσότερων θηλαστικών και παρέχει ενέργεια στον οργανισμό αφού διαπαστεί σε γλυκόζη και γαλακτόζη από το ένζυμο λακτάση του πεπτικού συστήματος. Κάποιοι όμως άνθρωποι πάσχουν από ανεπάρκεια του εν λόγω ενζύμου με αποτέλεσμα να εμφανίζουν δυσανεξία στη λακτόζη, γεγονός που οδηγεί σε πεπτικές διαταραχές. Για τον λόγο αυτό σήμερα υπάρχουν τύποι γάλακτος ειδικά επεξεργασμένοι ώστε να μην περιέχουν λακτόζη.

Η λακτόζη είναι πηγή ενέργειας για βακτήρια που ανήκουν στη μικροχλωρίδα του γάλακτος, η ζύμωση της οποίας μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ζυμώμενων γαλακτοκομικών προϊόντων ή την ανεπιθύμητη οξύνιση του γάλακτος. Συμμετέχει επίσης στην αντίδραση Maillard επηρεάζοντας έτσι τη γεύση και το χρώμα γαλακτοκομικών προϊόντων που υφίστανται θερμική επεξεργασία. Συγκεκριμένα, η αλδεϋδική ομάδα της λακτόζης αντιδρά με τις ελεύθερες αμινομάδες των αμινοξέων των πρωτεϊνών του γάλακτος, μη αντιστρεπτά (Schaafsma, 2008, Καμινναρίδης και Μοάτσου, 2009).

2.2 Ζυμώσεις της λακτόζης

Όπως προαναφέρθηκε η λακτόζη μεταβολίζεται από μικροοργανισμούς που βρίσκονται στο γάλα και η δράση αυτή χρησιμοποιείται από τον άνθρωπο για την παραγωγή προϊόντων με επιθυμητά χαρακτηριστικά.

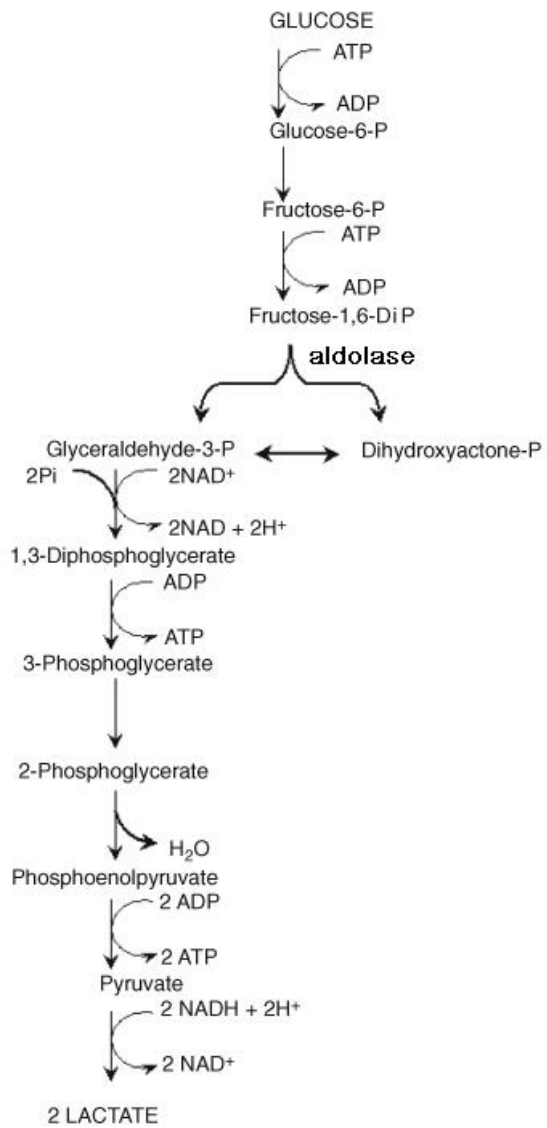
2.2.1 Γαλακτική ζύμωση

Η γαλακτική ζύμωση προκαλείται από τη δράση οξυγαλακτικών βακτηρίων και ανάλογα με τα τελικά προϊόντα της αντίδρασης διαχωρίζεται σε ομογαλακτική (Σχήμα 3) και ετερογαλακτική ζύμωση (Σχήμα 4). Στην πρώτη περίπτωση η λακτόζη ζυμώνεται σχεδόν πλήρως προς γαλακτικό οξύ ενώ στη δεύτερη εκτός από γαλακτικό οξύ παράγονται και άλλοι μεταβολίτες όπως αιθανόλη, οξικό οξύ, CO₂.

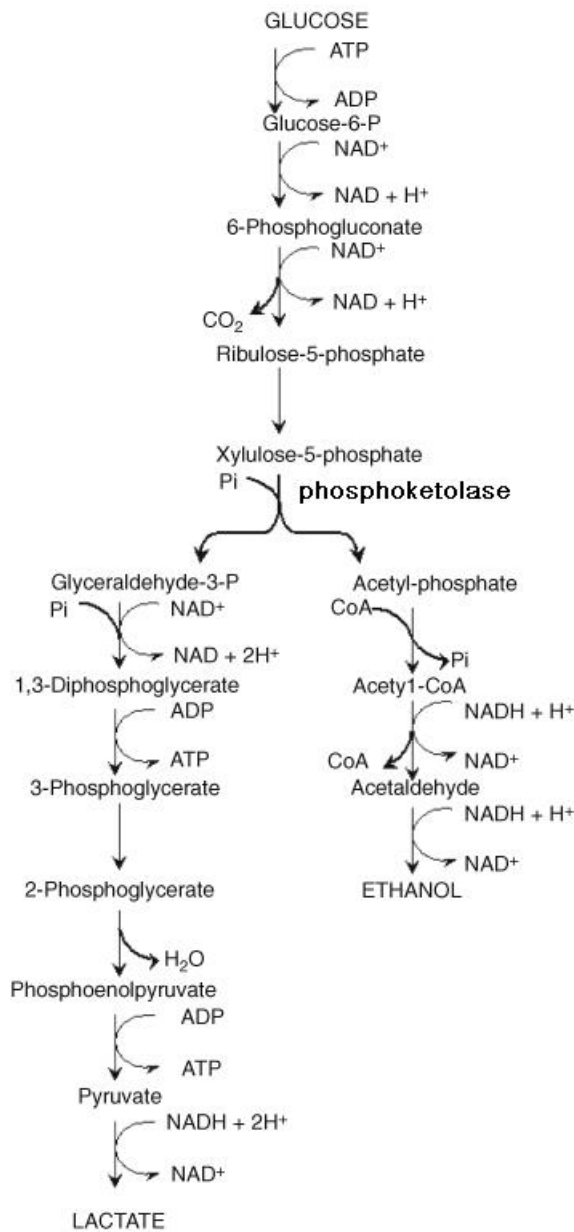
Το οξικό οξύ, η αιθανόλη και το διοξείδιο του άνθρακα περιλαμβάνονται στα προϊόντα της ετεροζυμωτικής γαλακτικής ζύμωσης υπό αερόβιες συνθήκες

Για να ξεκινήσει η ζύμωση, η λακτόζη μεταφέρεται στο εσωτερικό του κυττάρου όπου υπό την επίδραση του ενζύμου β-D-γαλακτοζιδάση (λακτάση) υδρολύεται σε γλυκόζη και γαλακτόζη. Η γλυκόζη εισέρχεται έπειτα στη γλυκολυτική οδό και με μία σειρά αντιδράσεων μετατρέπεται σε πυροσταφυλικό οξύ, το οποίο ακολούθως ανάγεται σε γαλακτικό οξύ. Ένα μόριο γλυκόζης καταβολίζεται προς δύο μόρια πυροσταφυλικού με την ταυτόχρονη καθαρή παραγωγή δύο μορίων ATP (γλυκόλυση).

Κατά την ετερογαλακτική ζύμωση τα βακτήρια μπορούν να ακολουθήσουν διαφορετικές οδούς μετατροπής της γλυκόζης σε πυροσταφυλικό οξύ μεταξύ των οποίων συνηθέστερη είναι η οδός των φωσφορικών πεντοζών (Καμινναρίδης και Μοάτσου, 2009).



Σχήμα 3. Ομογαλακτική ζύμωση, μονοπάτι Embden-Meyerhof. Πηγή: <http://textbookofbacteriology.net/index.html>



Σχήμα 4. Ετερογαλακτική ζύμωση, οδός φωσφορικών πεντοζών. Πηγή: <http://textbookofbacteriology.net/index.html>

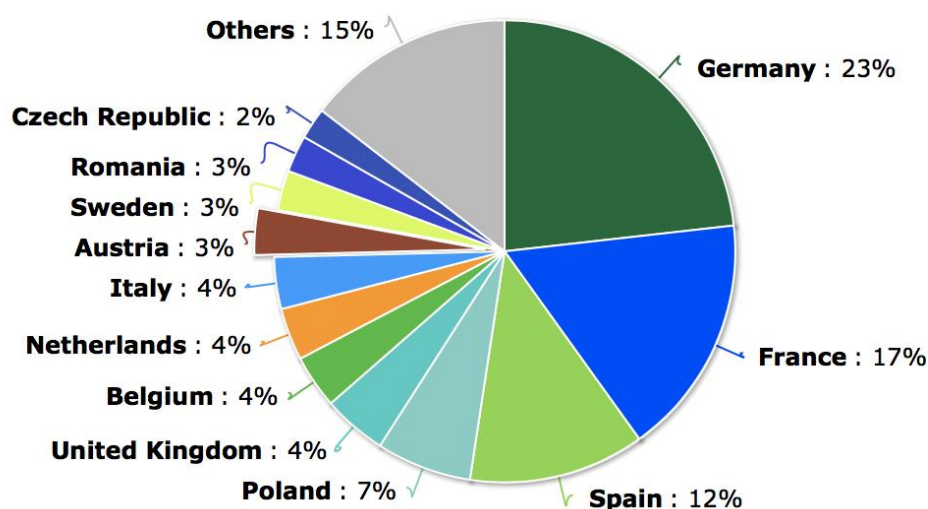
2.2.3 Αλκοολική ζύμωση

Η αλκοολική ζύμωση συντελείται από τους ζυμομύκητες, οι οποίοι παράγουν αιθανόλη και CO₂ από το πυροσταφυλικό οξύ. Είναι ζύμωση ωφέλιμη για την παρασκευή αλκοολούχων γαλακτοκομικών προϊόντων, όπου συντελείται παράλληλα με τη γαλακτική (Κεφίρ, Κούμης), ενώ είναι επιβλαβής κατά την παρασκευή του γιαουρτιού (Brunner et al., 1974).

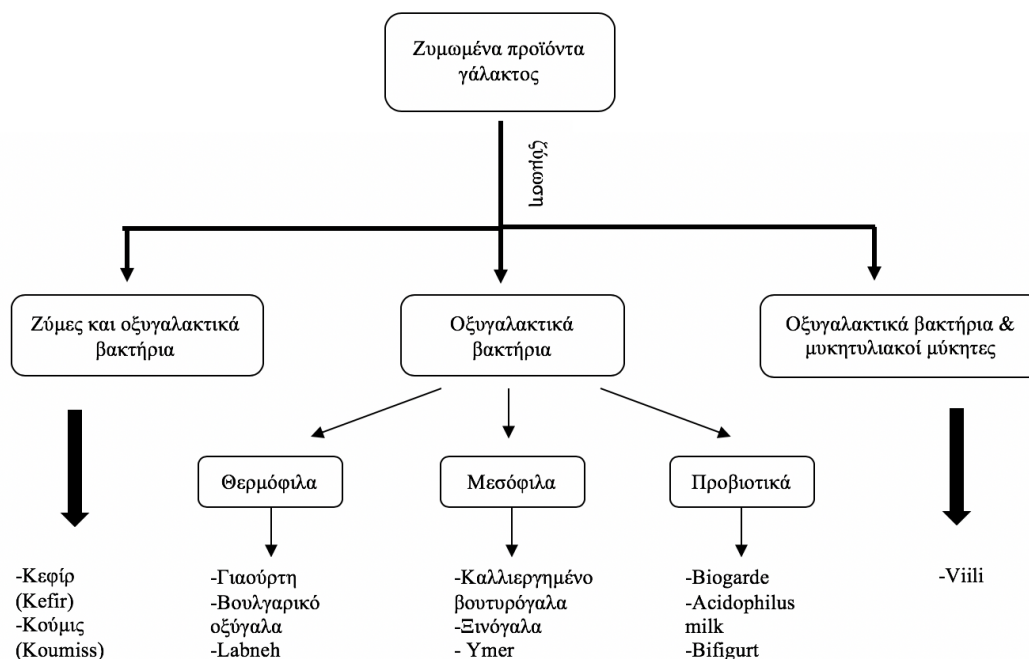
3. Ζυμωμένα προϊόντα γάλακτος – Γιαούρτη

Με τον όρο ζυμωμένα γάλατα (fermented milks) περιγράφονται τα προϊόντα που παρασκευάζονται ύστερα από ζύμωση και όξινη πήξη του γάλακτος με τη βοήθεια οξυγαλακτικών βακτηρίων. Σύμφωνα με τη Διεθνή Ομοσπονδία Γάλακτος (International Dairy federation, IDF) ζυμωμένα προϊόντα γάλακτος είναι τα προϊόντα που παρασκευάζονται από γάλα (πλήρες, μερικώς ή πλήρως αποβουτυρωμένο, συμπυκνωμένο, ή παρασκευασμένο από σκόνη γάλακτος) ομογενοποιημένο ή όχι, παστεριωμένο ή αποστειρωμένο και ζυμωμένο με τη βοήθεια ειδικών μικροοργανισμών (IDF, 1969). Για το 2018, η παραγωγή των όξινων ζυμωμένων προϊόντων γάλακτος στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης διαμορφώνεται όπως φαίνεται στο Σχήμα 5. Ανάλογα με τον τύπο της ζύμωσης και τους μικροοργανισμούς που συμμετέχουν σε αυτή, διακρίνονται σε διάφορα προϊόντα (Σχήμα 6).

Το γιαούρτι είναι το πιο διαδεδομένο προϊόν ζυμωμένου γάλακτος που παράγεται από πλήρες ή αποκορυφωμένο γάλα υπό τη συνεργιστική δράση των οξυγαλακτικών βακτηρίων *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* και *Streptococcus thermophilus*. Σύμφωνα με τον Codex Alimentarius οι μικροοργανισμοί αυτοί πρέπει να είναι ζωντανοί και άφθονοι στο τελικό προϊόν (ελάχιστος αριθμός 10^7 cfu/gr) (FAO/WHO, 1977a). Άλλα προϊόντα ζύμωσης του γάλακτος είναι το Κεφίρ, το Κούμης κ.ά. (Σχήμα 6).



Σχήμα 5. Η κατανομή της παραγωγής όξινων ζυμωμένων προϊόντων γάλακτος στην Ε.Ε. το διάστημα Ιανουάριος-Ιούλιος 2018. Πηγή: www.clal.it



Σχήμα 6. Προϊόντα ζύμωσης του γάλακτος σε κατηγορίες βάσει της ζύμωσης και των μικροοργανισμών. Πηγή: Καμιναρίδης και Μοάτσου, 2009.

3.1 Ελληνική νομοθεσία

Ο κανονισμός για το γιαούρτι αναφερόταν στο άρθρο 82 του Κ.Τ.Π. (ΦΕΚ 788/Β'31.12.1987), το οποίο αναθεωρήθηκε πλήρως το 2016. Συγκεκριμένα, πλέον στο άρθρο 82 αναφέρονται τα εξής:

- «Γιαούρτι» χαρακτηρίζεται το γαλακτοκομικό προϊόν το οποίο παράγεται από τη ζύμωση και πήξη του γάλακτος, με τη χρήση υποχρεωτικά των καλλιεργειών - εκκινητών *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* και *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, ώστε το τελικό ζυμωμένο προϊόν να περιέχει τουλάχιστον 10^7 cfu/g προϊόντος μέχρι την ημερομηνία ανάλωσής του.
- «Στραγγιστό γιαούρτι» χαρακτηρίζεται το προϊόν που λαμβάνεται από το γιαούρτι μετά από αποστράγγιση μέρους του ορού μετά την πήξη και έχει κατ' ελάχιστο 5,6% πρωτεΐνες για το αγελαδινό ή γίδινο γάλα και 8% για το πρόβειο γάλα. Σε περίπτωση μιγμάτων διαφόρων ειδών γάλακτος η ελάχιστη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες υπολογίζεται με βάση την αναλογία των ειδών γάλακτος.
- «Παραδοσιακό» είναι το γιαούρτι που πληροί τις παρακάτω προδιαγραφές:
 - α) Παρασκευάζεται με την παραδοσιακή μέθοδο ώστε να φέρει υμένα (πέτσα) στην επιφάνεια του.
 - β) Προκύπτει από την πήξη αποκλειστικά νωπού ή παστεριωμένου γάλακτος που δεν έχει υποστεί τροποποίηση της φυσικής του σύνθεσης με μόνη εξαίρεση τη ρύθμιση της λιποπεριεκτικότητας, έως του σημείου που είναι τεχνικά επιτεύξιμη η δημιουργία υμένα.

3.2 Η δράση των μικροβιακών καλλιεργειών

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια *Streptococcus thermophilus* και *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* χρησιμοποιούνται ως καλλιέργειες εκκίνησης. Ζυμώνουν τη λακτόζη παράγοντας γαλακτικό οξύ, το οποίο προκαλεί τη μείωση του pH. Όταν η τιμή του pH φτάσει στο ισοηλεκτρικό σημείο των καζεϊνών (pH 4.6) τα καζεϊνικά μικκύλια αποδεσμεύονται πλήρως από τα ιόντα ασβεστίου και φωσφόρου που είναι συνδεδεμένα σε αυτά με τη μορφή συμπλόκου, οπότε αρχίζει η συσσωμάτωση των μικκυλίων με τελικό αποτέλεσμα την όξινη πήξη και τη δημιουργία του πήγματος του γιαουρτιού.

Η συμβίωση των δύο ειδών βακτηρίων επιφέρει τη γρήγορη ανάπτυξή τους καθώς και τη γρήγορη παραγωγή οξύτητας αφού το ένα ενισχύει την ανάπτυξη του άλλου μέσω των προϊόντων του μεταβολισμού τους. Για παράδειγμα, έχειδειχθεί πως ανταλλάσσουν αυξητικούς παράγοντες, με τον *S. thermophilus* να παρέχει στον *L. bulgaricus* CO₂ (Driessen et al., 1982) και οξέα (φυλλικό, μεθανικό, πυροσταφυλικό) (Crittenden et al., 2003). Το φυλλικό και το μεθανικό οξύ επηρεάζουν θετικά την ανάπτυξη του *L. bulgaricus*, μέσω της βιοσύνθεσης των πουρινών, στην οποία συμμετέχει το φυλλικό οξύ ως συμπαράγοντας (Sybesma et al., 2003; Wegkamp et al., 2004).

Το μυρμηκικό οξύ (ή μεθανικό) ως πρόδρομη ένωση για τη βιοσύνθεση των πουρινών είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη του *L. bulgaricus*. Ο *L. bulgaricus* όμως δεν διαθέτει το ένζυμο λυαση πυροσταφυλικού-μυρμηκικού (pyruvate-formate lyase), το οποίο καταλύει την αντίδραση μετατροπής πυροσταφυλικού οξέος και CoA σε μυρμηκικό και ακετυλο-CoA. Αντιθέτως, το ένζυμο αυτό αφθονεί στον *S. thermophilus* και υπάρχουν ενδείξεις πως μπορεί να παρέχει στον *L. bulgaricus* το μυρμηκικό οξύ σε περιπτώσεις συμβιωτικής καλλιέργειας (Courtin and Rul, 2004; Derzelle et al., 2005).

Επιπλέον, στελέχη του *L. bulgaricus* παράγουν ελεύθερα αμινοξέα Μεθειονίνη, Ιστιδίνη και Προλίνη, τα οποία χρησιμοποιούνται από στελέχη του *S. thermophilus* για την ανάπτυξή τους (Courtin and Rul, 2004).

Αρχικά, στην καλλιέργεια τα κύτταρα του *S. thermophilus* αναπτύσσονται ταχύτερα καθώς ευνοούνται από την μείωση του CO₂. Αργότερα όμως λόγω της συσώρευσης του γαλακτικού οξέος που δρα ανασταλτικά περισσότερο στον *S. thermophilus*, ο ρυθμός ανάπτυξης του επιβραδύνεται, ώσπου στο τελικό προϊόν οι μικροοργανισμοί βρίσκονται σε αναλογία 1:1. Ο *S. thermophilus* προκαλεί την πτώση του pH του γιαουρτιού αρχικά ως το 5.0 και ο *L. bulgaricus* στο 4.2 που είναι και χαρακτηριστικό του γιαουρτιού (Καμινारीδης και Μοάτσου, 2009).

3.3 Τύποι γιαούρτης στην Ελλάδα

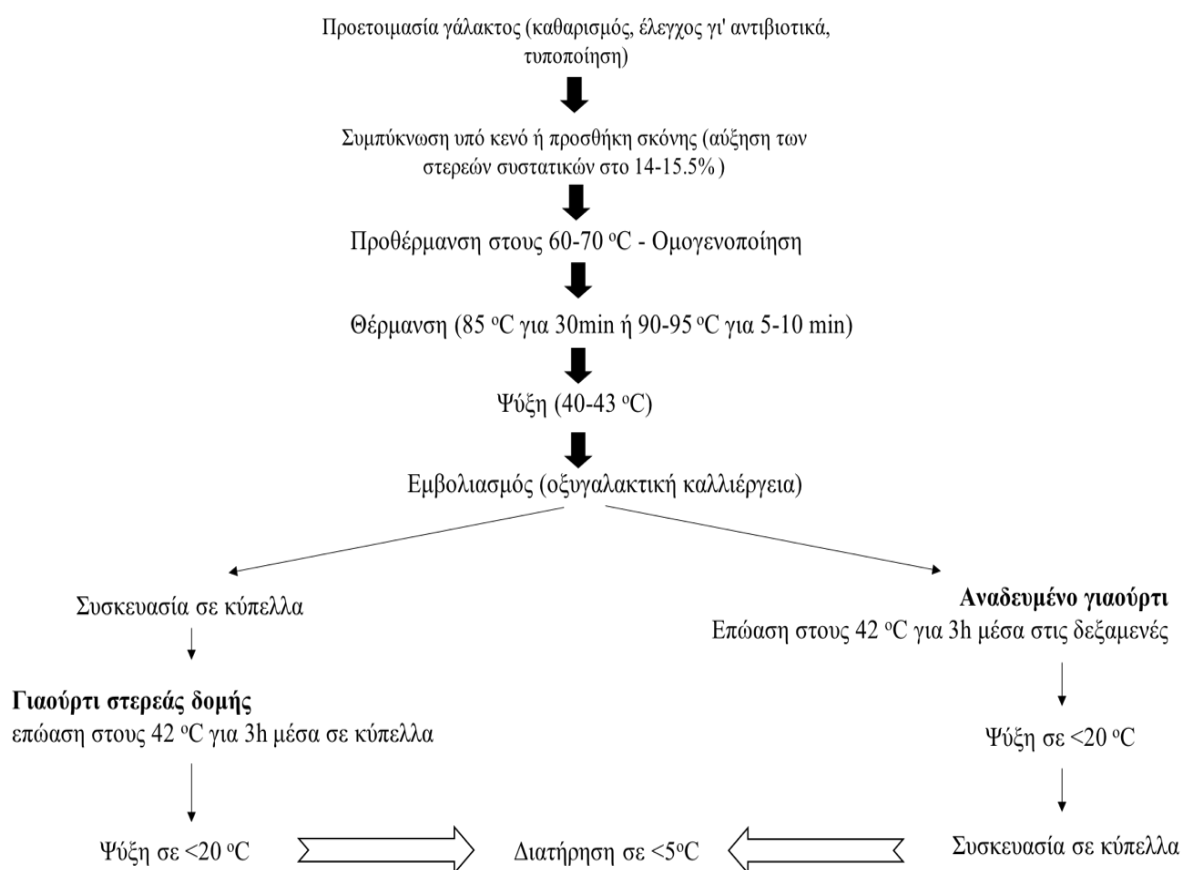
3.3.1 Βιομηχανική γιαούρτη

Η βιομηχανική γιαούρτη διακρίνεται σε στερεάς δομής, ή συνεκτική γιαούρτη (set) και σε αναδευμένη (stirred). Σε ορισμένες περιπτώσεις η πήξη του γάλακτος δεν συντελείται ομαλά και δύναται ακόμα και να ανασταλεί εξαιτίας κυρίως της ύπαρξης αντιμικροβιακών παραγόντων, όπως κατάλοιπα αντιβιοτικών τα οποία παρεμποδίζουν την ανάπτυξη των μικροβιακών καλλιεργειών.

Στη συνεκτική γιαούρτη, η επώαση του γάλακτος γίνεται σε περιέκτες (κύπελλα), ενώ στην αναδευμένη σε δεξαμενές. Η διαδικασία παραγωγής της βιομηχανικής γιαούρτης απεικονίζεται στο Σχήμα 7.

Το γάλα μετά την ομογενοποίηση θερμαίνεται σε υψηλή θερμοκρασία (90-95 °C) με αποτέλεσμα: την αδρανοποίηση των φυσικών αντιμικροβιακών ουσιών που θα μπορούσαν να διαταράξουν την πήξη, την αδρανοποίηση των ενδογενών ενζύμων, την καταστροφή παθογόνων, τη συμπύκνωση των στερεών συστατικών και φυσικοχημικές αλλαγές στις πρωτεΐνες του γάλακτος για τη δημιουργία καλύτερου πήγματος (Καμινारीδης και Μοάτσου, 2009, Μάντης κ.ά., 2015).

Με την προσθήκη γλυκαντικών υλών, γαλακτοκομικών συστατικών, χυμού ή παρασκευασμάτων φρούτων και άλλων ουσιών, προκύπτουν τα «επιδόρπια γιαουρτιού». Τα χαρακτηριστικά του επιδόρπιου (dessert) περιγράφονται στο άρθρο 84 του Κ.Τ.Π., 2011.

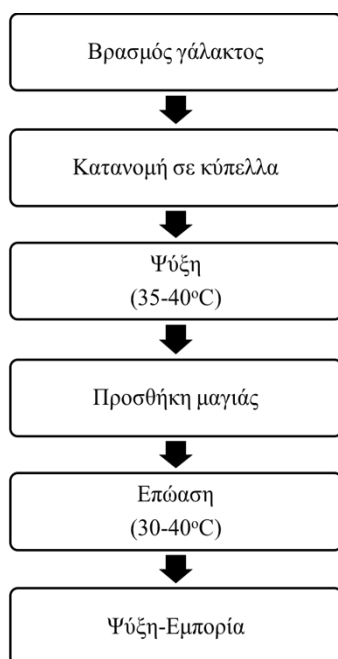


Σχήμα 7. Διάγραμμα ροής παραγωγής βιομηχανικού γιαουρτιού. Πηγή: Καμινारीδης και Μοάτσου, 2009

3.3.2 Παραδοσιακή γιαούρτη

Η παραδοσιακή γιαούρτη με τη χαρακτηριστική επιδερμίδα (πέτσα) παρασκευάζεται από βρασμένο γάλα χωρίς να έχει προηγηθεί ομογενοποίηση. Μετά το βρασμό, το γάλα διανέμεται σε περιέκτες όπου, χωρίς ανάδευση, αφήνεται να κρυώσει ως τους 45 °C και να δημιουργηθεί η επιδερμίδα στην επιφάνειά του η οποία είναι στοιβάδα λιποσφαιρίων. Τότε, η επιδερμίδα ανασηκώνεται ελαφρά και προσεκτικά, και γίνεται ο εμβολιασμός με ορισμένη ποσότητα παραδοσιακού γιαουρτιού (χωρίς

επιδερμίδα) που παρασκευάστηκε την προηγούμενη μέρα («μαγιά»), η οποία αποτελεί την καλλιέργεια εκκίνησης. Ακολουθεί επώαση και ψύξη (Καμιναρίδης και Μοάτσου, 2009, Μάντης κ.ά., 2015) (Σχήμα 8).



Σχήμα 8. Διάγραμμα ροής παραγωγής παραδοσιακής γιαούρτης

3.3.3 Στραγγισμένη γιαούρτη

Στη στραγγισμένη γιαούρτη τα στερεά συστατικά βρίσκονται σε αυξημένη αναλογία, 23-25%. Το νερό με τα διαλυμένα σε αυτό συστατικά μπορεί να απομακρυνθεί είτε παραδοσιακά με τη χρήση υφασμάτων των σάκων είτε με σύγχρονες μεθόδους. Συγκεκριμένα:

- Στραγγισμένη σακούλας: Αρχικά το γάλα πήζει σε δεξαμενές, το πήγμα θραύεται, έπειτα ψύχεται και κατανέμεται σε υφασμάτινους σάκους των 15-20 kg. Για να βοηθηθεί η στράγγιση οι σάκοι τοποθετούνται ο ένας πάνω στον άλλο. Η διαδικασία γίνεται σε θερμοκρασία 0 έως 5 °C και διαρκεί από 8 έως 16 h. Όταν ολοκληρωθεί η στράγγιση το περιεχόμενο των σάκων μεταφέρεται σε ειδικό ζυμωτήριο όπου γίνεται η μηχανική ανάδευση της γιαούρτης και η τυποποίησή της. Σ αυτό το στάδιο, αν χρειάζεται, προστίθεται παστεριωμένος ορός ή κρέμα. Ο ορός που αποβάλλεται με τη στράγγιση περιέχει στο μεγαλύτερο ποσοστό του λακτόζη, άλατα και σε μικρότερο ποσοστό αμινοξέα και πεπτίδια.
- Στραγγισμένη με φυγοκέντρηση: Το πήγμα μετά την πήξη φυγοκεντρείται σε ειδικού τύπου διαχωριστήρες οπότε αποβάλλεται μέρος του ορού με αποτέλεσμα την παραγωγή πήγματος με αυξημένη αναλογία στερεών συστατικών. Η αποβουτύρωση ή μη του γάλακτος πριν από την πήξη εξαρτάται από τον τύπο της φυγοκέντρου κι έτσι υπάρχει ή όχι ανάγκη

προσθήκης κρέμας πριν τη ψύξη και τη συσκευασία. Σε κάθε περίπτωση τελικά η αναλογία του λίπους είναι περίπου 10%.

- Συμπυκνωμένη με υπερδιήθηση: Το γάλα αρχικά αποβουτυρώνεται και μετά θερμαίνεται στους 90–95 °C για 5 με 10 min. Ακολούθως, ψύχεται σε 47-50 °C και συμπυκνώνεται με υπερδιήθηση μέχρι το μισό του αρχικού του όγκου. Προστίθεται κρέμα και το μίγμα ψύχεται στους 42 °C όπου προστίθεται η οξυγαλακτική καλλιέργεια και λαμβάνει χώρα η ζύμωση (Μάντης κ.ά., 2015).

3.4 Θρεπτική αξία της γιαούρτης – Ευεργετικές ιδιότητες

Σε γενικές γραμμές, η σύσταση της γιαούρτης είναι παρόμοια με αυτή του γάλακτος απ' το οποίο παράχθηκε. Είναι εξαιρετική πηγή πρωτεΐνης υψηλής βιολογικής αξίας, ασβεστίου, φωσφόρου, και βιταμινών A και του συμπλέγματος B (μεταξύ των οποίων άριστη πηγή ριβοφλαβίνης B₂). Περιέχει επίσης μαγνήσιο, ψευδάργυρο και φυλλικό οξύ σε βιοδιαθέσιμες μορφές.

Άτομα με δυσανεξία στη λακτόζη μπορούν να καταναλώσουν γιαούρτη αφού το μεγαλύτερο μέρος της έχει ζυμωθεί από τα οξυγαλακτικά βακτήρια (μείωση της περιεκτικότητας της λακτόζης έως 30%).

Πλήθος ερευνών έχουν δείξει τις θετικές δράσεις της κατανάλωσης γιαούρτης στον ανθρώπινο οργανισμό και πολλές βρίσκονται στο στάδιο των πειραματόζωων, χωρίς να έχουν γίνει ακόμα κλινικές δοκιμές σε ανθρώπους.

- Οι γιατροί προτείνουν την κατανάλωση γιαούρτης όταν χορηγούν αντιβίωση στους ασθενείς για την αναγέννηση της μικροχλωρίδας του εντέρου που διαταράσσεται από τα φάρμακα.
- Έχει αντιμικροβιακή δράση κυρίως έναντι παθογόνων του πεπτικού.

Υπάρχουν ενδείξεις πως:

- I. Σχετίζεται θετικά με το σωματικό βάρος, το δείκτη μάζας σώματος και την απώλεια λίπους (Eales et al., 2016).
- II. Ενισχύει το ανοσοποιητικό σύστημα (Meydani and Ha, 2000).
- III. Μειώνει την πιθανότητα εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου (Rice, 2014) και την υψηλή αρτηριακή πίεση (Park and Cifelli, 2013).
- IV. Μειώνει την πιθανότητα εμφάνισης υπεργλυκαιμίας (Lee et al., 2018).
- V. Έχει αντικαρκινικές δράσεις (Pala et al., 2011; Dong et al., 2011; McCann et al., 2017)

B. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η μελέτη στοχεύει στην ταυτοποίηση στελεχών βακτηρίων και ζυμών, τα οποία απομονώθηκαν από ζυμωμένο γάλα (γιαούρτη) που παρασκευάστηκε στα Νησιά Fiji, καθώς και τη διερεύνηση του προβιοτικού τους δυναμικού και της ασφάλειάς τους.

Γ. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Παρελήφθη δείγμα ζυμωμένου γάλακτος από τα Νησιά Fiji βάρους 130,9g και pH 4,25. Αρχικά έγιναν η απομόνωση των μικροβιακών στελεχών του δείγματος και έπειτα οι διαδικασίες της ταυτοποίησης και της διερεύνησης του προβιοτικού δυναμικού και της ασφάλειάς τους.

Τα στελέχη των μικροοργανισμών που χρησιμοποιήθηκαν στις πειραματικές διαδικασίες αναγράφονται στον Πίνακα 1. Πρόκειται για 34 στελέχη βακτηρίων και 2 στελέχη ζυμών, τα οποία απομονώθηκαν από τα θρεπτικά υποστρώματα MRS (Biokar Diagnostics, Beauvais, France), M17 (Biokar Diagnostics, Beauvais, France), Rogosa (Biokar Diagnostics, Beauvais, France), KAA - Kanamycin aesculin azide agar (Oxoid, Hampshire, UK) και YGC –Yeast Extract Glucose Chloramphenicol agar (Merck, Darmstadt, Germany).

Πίνακας 1. Στελέχη βακτηρίων και ζυμών που απομονώθηκαν από γιαούρτη που παρασκευάστηκε στα νησιά Fiji.

Στέλεχος	ACA-DC Number	Μορφολογία	Θρεπτικό υπόστρωμα απομόνωσης	Θερμοκρασία απομόνωσης °C
Βακτήρια				
FjY1-1a	1492	βάκιλλος	MRS	37
FjY1-1b	1493	βάκιλλος	MRS	37
FjY1-2	1494	βάκιλλος	MRS	37
FjY1-3a	1495	βάκιλλος	MRS	37
FjY1-3b	1496	βάκιλλος	MRS	37
FjY1-4a	1497	βάκιλλος	MRS	37
FjY1-4b	1498	βάκιλλος	MRS	37
FjY1-5a	1499	βάκιλλος	MRS	37
FjY1-5b	1501	βάκιλλος	MRS	37
FjY2-1a	1517	βάκιλλος	MRS	30
FjY2-2	1518	βάκιλλος	MRS	30
FjY2-3a	1526	βάκιλλος	MRS	30
FjY2-4a	1527	βάκιλλος	MRS	30
FjY2-5	1528	βάκιλλος	MRS	30
FjY3-1	1535	βάκιλλος	M17	37
FjY3-2	1536	βάκιλλος	M17	37
FjY3-3a	1537	βάκιλλος	M17	37
FjY3-3b	1538	βάκιλλος	M17	37
FjY3-4	1539	βάκιλλος	M17	37
FjY3-5	1540	βάκιλλος	M17	37
FjY4-1	1541	βάκιλλος	M17	30
FjY4-2	1542	βάκιλλος	M17	30

FjY4-3	1543	βάκιλλος	M17	30
FjY4-4	1544	βάκιλλος	M17	30
FjY4-5	1545	βάκιλλος	M17	30
FjY5-2	1546	βάκιλλος	ROGOSA	30
FjY5-3	1547	βάκιλλος	ROGOSA	30
FjY5-4	1548	βάκιλλος	ROGOSA	30
FjY5-5	1549	βάκιλλος	ROGOSA	30
FjY6-1	1550	βάκιλλος	KAA	37
FjY6-2	1551	βάκιλλος	KAA	37
FjY6-3	1552	βάκιλλος	KAA	37
FjY6-4	1553	βάκιλλος	KAA	37
FjY6-5	1554	βάκιλλος	KAA	37
Ζύμες				
FjY7-1	5291	ζύμη	YGC	30
FjY7-2	5292	ζύμη	YGC	30

4.1 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

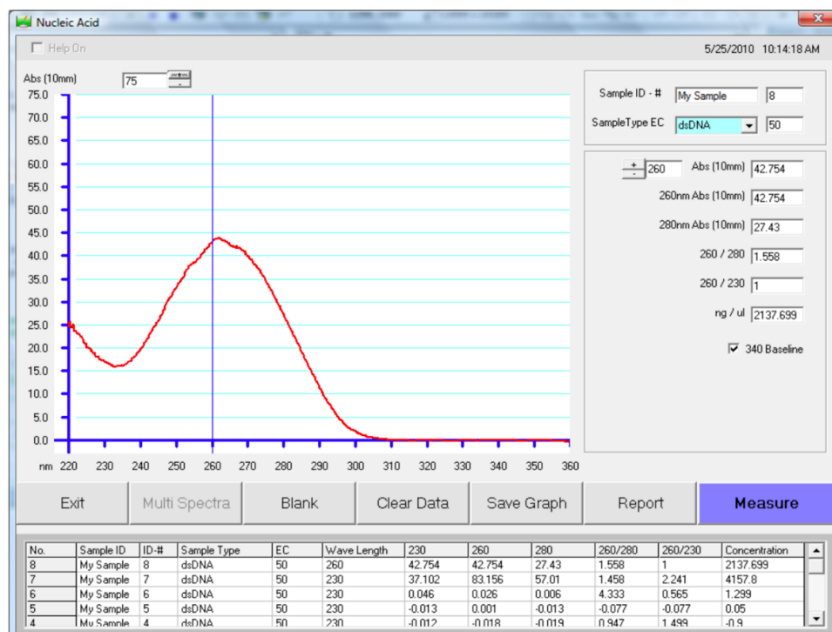
4.1.1 Απομόνωση DNA από βακτήρια [πρωτόκολλο Pitcher et al. (1989) μερικώς τροποποιημένο]

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε στηρίζεται στη χρήση θειοκυανιούχου γουανιδίνης (GES), ενός ισχυρού αποδιατακτικού παράγοντα πρωτεϊνών, με στόχο την απομόνωση DNA υψηλής ποιότητας και καθαρότητας. Τα στάδια της διαδικασίας απομόνωσης περιγράφονται αναλυτικά ως εξής:

- Εμβολιασμός υγρού θρεπτικού υποστρώματος από vial (1% v/v). Επώαση καλλιέργειας για 24-48 h.
- Συλλογή κυττάρων από την υγρή καλλιέργεια στη τέλος της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης με φυγοκέντρηση (10.000 rpm, 2 min, 25 °C). Το ίζημα των κυττάρων πρέπει να έχει μέγεθος μεγαλύτερο από ένα κόκκο ρυζιού. Επιλέχθηκε η λογαριθμική φάση ανάπτυξης για τη συλλογή των κυττάρων, ώστε να αποφευχθεί η αποικοδόμηση του DNA από περιοριστικές ενδονουκλεάσες που απελευθερώνονται μετά τη λύση των κυττάρων.
- Επαναιώρηση των κυττάρων σε 1 ml ρυθμιστικού φωσφορικού διαλύματος PBS (0,8% w/v NaCl, 0,02% w/v KCl, 0,144% w/v Na₂HPO₄, 0,024% w/v KH₂PO₄, pH 7,4), με σκοπό την απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού. Φυγοκέντρηση (8.000 rpm, 1 min, 25 °C).
- Επαναιώρηση των κυττάρων σε 1 ml PBS. Θέρμανση στους 65 °C για 10 min με σκοπό την αποδιάταξη μέρους των πρωτεϊνών. Ακολούθησε φυγοκέντρηση (10.000 rpm, 1 min, 25 °C) και πλήρης απομάκρυνση του υπερκείμενου.
- Στο κυτταρικό ίζημα προστέθησαν 100 μl λυσοζύμης (50 mg/ml, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, United States), 10 μl μουτανολυσίνης (5 U/μl, Sigma-Aldrich) και 20 μl ριβονουκλεάσης (RNase, Sigma-Aldrich) Τα δύο πρώτα ένζυμα συμβάλλουν στη λύση του κυτταρικού τοιχώματος, ενώ το τρίτο στην υδρόλυση του υπολειμματικού RNA. Εν συνεχεία έγινε επώαση στους 37 °C για 30 min με περιοδική ανάδευση των Eppendorfs ανά 10 min. Μετά τη λύση των κυττάρων και για αποφυγή αποικοδόμησης του DNA, ο χειρισμός των δειγμάτων έγινε με ήπιες κινήσεις.

- Μεταφορά των δειγμάτων σε απαγωγό. Σε κάθε δείγμα προστέθηκαν 0,5 ml αντιδραστηρίου GES (5 M Guanidium thiocyanate, 100 mM EDTA, 0,5% v/v Sarcosyl) και ακολούθησε ήπια ανάδευση και ψύξη σε πάγο για 5 min.
- Προσθήκη 0,25 ml παγωμένου διαλύματος οξικού αμμωνίου (7,5 M) και μετά από ήπια ανάδευση παραμονή των δειγμάτων στον πάγο για 10 min.
- Προσθήκη 0,5 ml χλωροφορμίου και ήπια ανάδευση ώστε να αναμειχθούν οι δύο φάσεις. Φυγοκέντρηση (13.000 rpm, 2 min, 4 °C). Προσεκτική μεταφορά υπερκειμένου σε καθαρό Eppendorf και αποφυγή λήψης των πρωτεϊνών της μεσόφασης.
- Προσθήκη 0,54 του όγκου παγωμένης ισοπροπανόλης και ήπια ανάδευση μέχρι να κατακρημνιστεί το DNA.
- Φυγοκέντρηση (6.500 rpm, 1 min, 4 °C) και απόχυση του υπερκειμένου.
- Προσθήκη 0,7 ml παγωμένης αιθανόλης (70%) και ανάδευση για επαναιώρηση του ιζήματος ούτως ώστε να απομακρυνθούν τα άλατα. Φυγοκέντρηση (11.000 rpm, 3 min, 4 °C) και απόχυση υπερκειμένου. Πλύσιμο με αιθανόλη συνολικά 3 φορές.
- Πλήρης απομάκρυνση της αιθανόλης με φυγοκέντρηση (8.500 rpm, 3 min, 4 °C) και χρήση πιπέτας. Τοποθέτηση των δειγμάτων σε κλίβανο στους 37 °C για 8-10 min ώστε να εξατμιστεί η αιθανόλη, χωρίς όμως να στεγνώσει το ίζημα.
- Διαλυτοποίηση του DNA σε 30 μl TE buffer (10mmol/L Tris-HCl, 1mmol/L EDTA, pH 8).
- Τοποθέτηση των δειγμάτων στους 37 °C για 24 h και έπειτα στους 4 °C.

Μετά την απομόνωση, η συγκέντρωση του DNA στα δείγματα μετρήθηκε με το φασματοφωτόμετρο μικροποσοτήτων Q5000 (Quawell Q5000 UV-Vis Spectrophotometer, Quawell Technology Inc., San Jose, USA) και με το πρόγραμμα Q5000 V6.0.3. Η φωτομέτρηση έγινε σε μήκος κύματος 260nm και υπολογίστηκε αυτόματα η συγκέντρωση από την τιμή της οπτικής απορρόφησης (O.D.). Η μέτρηση του λόγου των οπτικών απορροφήσεων A_{260}/A_{280} (αναμένεται να είναι 2.0 για υψηλής καθαρότητας δείγματα νουκλεϊκών οξέων) χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της καθαρότητας των νουκλεϊκών οξέων, δηλαδή της ποιότητας του γενετικού υλικού και γίνεται μέσω χρήσης του προγράμματος στον ηλεκτρονικό υπολογιστή όπως φαίνεται στο παράδειγμα της Εικόνας 1.



Εικόνα 1. Παράδειγμα χρήσης του φωτόμετρου. Πηγή: <http://www.quawell.com>

4.1.2 Ομαδοποίηση στελεχών βακτηρίων με τη μέθοδο rep-PCR

Η μέθοδος rep-PCR (Repetitive-element Polymerase Chain Reaction) βασίζεται στην ενίσχυση επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών που ανευρίσκονται στους δυο κλώνους του πυρηνικού και του πλασμιδιακού DNA του προκαρυωτικού γονιδιώματος. Είναι τεχνική αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης όπου χρησιμοποιείται εκκινητής ο οποίος φέρει παλίνδρομη αλληλουχία (δηλαδή διαβάζεται το ίδιο και στις δυο κατευθύνσεις) και μπορεί να υβριδίσει και να ενισχύσει διακριτές περιοχές του ευκαρυωτικού και προκαρυωτικού γονιδιώματος. Αρχικά η ανακάλυψη rep αλληλουχιών έγινε στα γονιδιώματα *E. coli* και *Salmonella* (Versalovic et al., 1991). Οι εκκινητές rep έχουν μήκος 33 έως 40 bp και παρέχουν 500 έως 1000 αντίγραφα ανά γονιδίωμα. Τα ενισχυμένα θραύσματα του DNA, όταν διαχωριστούν με ηλεκτροφόρηση, δίνουν ένα χαρακτηριστικό γενετικό αποτύπωμα το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διάκριση σε υποείδη και στελέχη (Hiett et al., 2009).

Για την ομαδοποίηση των βακτηριακών στελεχών εφαρμόστηκε η τεχνική της rep-PCR στο θερμικό κυκλοποιητή SimpliAmp™ (Applied Biosystems) Thermal Cycler της ThermoFisher Scientific. Σε αυτού του είδους την PCR χρησιμοποιούνται εκκινητές συμπληρωματικοί ως προς την αλληλουχία REP (Repetitive Extragenic Palindromic sequence).

Πίνακας 2. Αντιδραστήρια, ποσότητες & εκκινητής qpcr-PCR

Αντιδραστήριο	Ποσότητα ανά αντίδραση
OneTaq-quick load 2x Mastermix with standard buffer (New England Biolabs, UK)	12,5 µl
DNA template (25 ng/µl)	1 µl
Primer (7.5 pmol/µl)	1µL (BOXAIR)
ddH ₂ O	10,5µl
Τελικός όγκος	25 µl
BOXAIR	5' → 3' CTACGGCAAGGCGACGCTGACG

Συνθήκες αντίδρασης:

- 2 min στους 92 °C
- 30 κύκλοι
 - ◆ 30 sec στους 92 °C
 - ◆ 2 min στους 40 °C
 - ◆ 3 min στους 72 °C
- Παραμονή στους 72 °C για 15 min

Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση είναι τεχνική που χρησιμοποιείται για την ανάλυση των νουκλεϊκών οξέων και των πρωτεϊνών. Βασίζεται στον διαχωρισμό φορτισμένων μορίων κατά μήκος ενός στερεού πορώδους υποστρώματος στα άκρα του οποίου εφαρμόζεται ηλεκτρική τάση. Τα φορτισμένα μόρια κινούνται μέσα στο υπόστρωμα και διαχωρίζονται ανάλογα με το μέγεθός τους. Το DNA είναι αρνητικά φορτισμένο μόριο λόγω των φωσφορικών ομάδων που βρίσκονται στο φωσφοδιεστερικό σκελετό. Επομένως μέσα σε ηλεκτρικό πεδίο τα μόρια του DNA θα κινηθούν προς το θετικό πόλο με ταχύτητα εξαρτώμενη από το σχήμα και το μέγεθος του φωσφοδιεστερικού σκελετού τους, με τα μικρότερα να κινούνται ταχύτερα.

Για να διαπιστωθεί η επιτυχία της qpcr-PCR σε όλα τα δείγματα πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης:

- 1,2% w/v αγαρόζη
- 0.5 µg/ml EtBr (τελική συγκέντρωση στην πηκτή)
- 1kb DNA Ladder (Invitrogen, Grand Island, USA)
- 60 V για 140 min

Για να απεικονιστούν τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιήθηκε η συσκευή High Performance Ultraviolet Transilluminator (Ultra-Violet Products, UK), η οποία διαθέτει λάμπα εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας. Όταν η πηκτή εκτεθεί στην

υπεριώδη ακτινοβολία τα τμήματα του DNA που ενισχύονται διακρίνονται ως φωτεινές ζώνες λόγω του φθορισμού του βρωμιούχου αιθιδίου.

Στη συσκευή περιέχεται ψηφιακή φωτογραφική μηχανή και συνδέεται με ηλεκτρονικό υπολογιστή, όπου καταγράφηκαν οι εικόνες της ηλεκτροφόρησης με τη χρήση του λογισμικού προγράμματος Doc-IT 2.4.0.2. (Syngene, Cambridge, UK).



Επεξεργασία των εικόνων της ηλεκτροφόρησης με το πρόγραμμα BioNumerics

Για την ομαδοποίηση των στελεχών των βακτηρίων ακολούθησε επεξεργασία των φωτογραφιών της πηκτής αгарόζης μέσω του προγράμματος BioNumerics (Applied Maths, Keistraat, Belgium). Το πρόγραμμα αυτό συγκρίνει τα ηλεκτροφορητικά προφίλ των στελεχών μεταξύ τους αλλά και με το μάρτυρα μοριακών μαζών, και βάσει των ποσοστών ομοιότητάς τους, τα ομαδοποιεί δημιουργώντας ένα δενδρόγραμμα. Στελέχη με ποσοστά ομοιότητας >80% θεωρήθηκε ότι αποτελούν μία ομάδα.

4.1.3 Ταυτοποίηση στελεχών βακτηρίων με την αλληλούχηση του γονιδίου 16S rRNA

Η αλληλούχηση του γονιδίου 16S rRNA (μικρή υπομονάδα ριβοσωμικού RNA – συναντάται σε όλα τα είδη βακτηρίων) μέσω PCR είναι μία μοριακή μέθοδος που χρησιμοποιείται για την ταξινόμηση και την ταυτοποίηση προκαρυωτικών μικροοργανισμών. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται σε σύγκριση της αλληλουχίας του υπό μελέτη στελέχους με μία βάση δεδομένων γνωστών αλληλουχιών. Συγκεντρώνει αρκετά πλεονεκτήματα καθώς μπορεί να εφαρμοστεί ευρέως, δεν απαιτεί ειδικές γνώσεις και είναι οικονομική. (Kim and Chun, 2014).

Πίνακας 3. Αντιδραστήρια, ποσότητες & εκκινητές 16S PCR

Αντιδραστήριο	Ποσότητα ανά αντίδραση
OneTaq-quick load 2x Mastermix with standard buffer (New England Biolabs, UK)	12,5 μl
DNA template (200 ng/μl)	1 μl
Primer (10 pmol/μl)	1 μL (16S F) 1μL (16S R)
ddH ₂ O	9,5 μl
Τελικός όγκος	25 μl
16S F (Ntougias <i>et al.</i> , 2006).	5'  3' GGAGAGTTAGATCTTGGCTCAG
16S R	5'  3' AGAAAGGAGGTGATCCAGCC

Συνθήκες αντίδρασης:

- 2 min στους 94 °C
- 30 κύκλοι
 - ◆ 30 s στους 94 °C
 - ◆ 30 s στους 56 °C
 - ◆ 1 min στους 72 °C
- Παραμονή στους 72 °C για 5 min

Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Μετά την PCR ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης για τον έλεγχο του μεγέθους και της καθαρότητας του προϊόντος της αντίδρασης, όπως αναφέρθηκε και στην Παράγραφο 4.1.2 με τα εξής υλικά/συνθήκες:

- 1% w/v αγαρόζη
- 0.5 μg/ml EtBr (τελική συγκέντρωση στην πηκτή)
- 1kb DNA Ladder (Invitrogen, Grand Island, USA)
- 70 V για 45 min

Καθαρισμός των προϊόντων της PCR

Τα προϊόντα της PCR καθαρίστηκαν με το NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit της Macherey-Nagel (Duren, Germany) ώστε να απομακρυνθούν υπολείμματα των εκκινητών, των δεοξυνουκλεοτιδίων, του ρυθμιστικού διαλύματος και των μη ειδικών προϊόντων μικρού μοριακού βάρους και να παραμείνει μόνο γενετικό υλικό των μικροοργανισμών.

Το πρωτόκολλο καθαρισμού περιλάμβανε τα εξής στάδια:

- Προσθήκη διπλάσιου όγκου διαλύματος πρόσδεσης NT1 (Binding Buffer) στο φιαλίδιο με το προϊόν της PCR
- Μεταφορά του διαλύματος στη στήλη χαλαζία -για πρόσδεση του DNA σε αυτή - και φυγοκέντρηση (11.000 rpm, 1 min, 25 °C).
- Απόρριψη του διηθήματος
- Προσθήκη στη στήλη 700 μl αλκοολούχου διαλύματος NT3 για καθαρισμό της μεμβράνης χαλαζία και φυγοκέντρηση (11.000 rpm, 1 min, 25 °C).
- Επανάληψη φυγοκέντρησης (μεγίστη ταχύτητα σε θερμοκρασία δωματίου) ούτως ώστε να απομακρυνθεί όλη η ποσότητα του NT3
- Επώαση σε κλίβανο στους 37 °C για 2 min για να εξατμιστεί η αιθανόλη
- Τοποθέτηση της στήλης σε καθαρό φιαλίδιο και προσθήκη 20 μl από το διάλυμα έκλουσης NE (5mM Tris-HCl, pH 8.5) στη στήλη. Το DNA εκλούεται κάτω από τις χαμηλής ιοντικής ισχύος συνθήκες και το ελαφρώς αλκαλικό pH του NE. Μετά, επώαση για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση της στήλης (11.000 rpm, 2 min, 25 °C).
- Στο διήθημα περιέχεται πλέον το καθαρό προϊόν και φυλάσσεται στους -20 °C.

Μέτρηση της συγκέντρωσης των δειγμάτων μετά την PCR

Η συγκέντρωση του DNA στα καθαρισμένα δείγματα μετρήθηκε με το φωτόμετρο Q5000 της Quawell και ρυθμίστηκε στο επιθυμητό επίπεδο για να αποσταλούν στην εταιρεία Eurofins Genomics (Austria) που θα πραγματοποιήσει το sequencing.

Εν συνεχεία, η ταυτοποίηση των στελεχών μετά την αλληλούχηση του 16S γονιδίου, πραγματοποιήθηκε με σύγκριση αυτών με τις διαθέσιμες αλληλουχίες της βάσης δεδομένων GenBank, χρησιμοποιώντας τη μηχανή αναζήτησης BLAST (Basic Local Alignment Tool) του NCBI (National Center for Biotechnology Information).

4.1.4 Απομόνωση DNA από ζύμες (κατά Kopsahelis et al., 2009)

Το DNA απομονώθηκε από κύτταρα ζυμών που αναπτύχθηκαν σε υγρό θρεπτικό μέσο που περιείχε 5 g/l Yeast extract και 20 g/l γλυκόζη και επώαστηκαν στους 30 °C για 24 ώρες. Τα στάδια της διαδικασίας απομόνωσης περιγράφονται αναλυτικά ως εξής:

- Συλλογή καλλιέργειας σε σωληνάρια τύπου Eppendorf με φυγοκέντρηση (8000 rpm, 1 min)
- Έκπλυση της καλλιέργειας σε αποστειρωμένο νερό
- Επαναιώρηση της καλλιέργειας σε 500 μl αποστειρωμένο νερό. Επώαση στους 65 °C για 10 min
- Φυγοκέντρηση 12000 rpm, 10 min
- Επαναιώρηση σε 500 μl διαλύματος (1 M σορβιτόλη, 0.1 M EDTA, pH 7.5)
- Προσθήκη 20 μL λυτικής (200 U), επώαση του κυτταρικού εναιωρήματος στους 37 °C για 2 ώρες
- Φυγοκέντρηση (12000 rpm, 1 min) και επαναιώρηση του ιζήματος σε 500 μl διαλύματος (50 mM Tris-Cl, pH 7.4, 20 mM EDTA)
- Προσθήκη 50 μl 20% SDS.
- Επώαση του εναιωρήματος στους 65°C για 30 min.
- Προσθήκη 200 μl 5M οξικού καλίου και τοποθέτηση του μίγματος στον πάγο για 1 ώρα.
- Φυγοκέντρηση (12500 rpm, 5 min) και μεταφορά του υπερκείμενου σε καθαρά Eppendorf
- Προσθήκη ίσου όγκου 100% ισοπροπανόλης και επώαση 5 min στον πάγο
- Φυγοκέντρηση (12000 rpm, 15 min)
- Απόρριψη υπερκείμενου, ξήρανση του ιζήματος σε αέρα και επαναιώρηση σε 20 μl νερό

Μετά την απομόνωση η συγκέντρωση του DNA στα δείγματα μετρήθηκε με το φωτόμετρο Q5000 της Quawell με τρόπο αντίστοιχο με αυτόν των βακτηρίων (βλ. 4.1.1).

4.1.5 Ομαδοποίηση στελεχών ζυμών με τη μέθοδο rep-PCR

Τα δείγματα DNA των ζυμών που απομονώθηκαν υποβλήθηκαν σε ενίσχυση των τμημάτων του γενετικού υλικού μέσω rep-PCR στο θερμικό κυκλοποιητή SimpliAmp™ Thermal Cycler της ThermoFisher Scientific.

Πίνακας 4. Αντιδραστήρια, ποσότητες & εκκινητής rep-PCR για τις ζύμες

Αντιδραστήριο	Ποσότητα ανά αντίδραση
OneTaq-quick load 2x Mastermix with standard buffer (New England Biolabs, UK)	12,5 μl
DNA template (50 ng/μl)	1 μl
Primer (10 pmol/μl)	0,5 μl (GTG) ₅
ddH ₂ O	11 μl
Τελικός όγκος	25 μl
(GTG) ₅	5' → 3' GTGGTGGTGGTGGTG

Συνθήκες αντίδρασης (da Silva-Filho et al., 2005):

- 5 min στους 94 °C
- 40 κύκλοι
 - ◆ 15 s στους 94 °C
 - ◆ 45 s στους 55 °C
 - ◆ 90 s στους 72 °C
- Παραμονή στους 72 °C για 6 min

Για να παρατηρήσουμε το προφίλ των ζωνών που δίνει κάθε στέλεχος πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της rep-PCR σε πηκτή αγαρόζης (da Silva et al., 2005):

- 1.3 % w/v αγαρόζη
- 0.5 μg/ml EtBr (τελική συγκέντρωση στην πηκτή)
- 60 V για 140 min

Εν συνεχεία πραγματοποιήθηκαν φωτογράφιση της πηκτής αγαρόζης και επεξεργασία των εικόνων με τη χρήση του BioNumerics για την ομαδοποίηση των στελεχών των ζυμών όπως αναλύεται στην παράγραφο 4.1.2 για τα βακτηριακά στελέχη.

4.1.6 Ταυτοποίηση στελεχών ζυμών με τη μέθοδο αλληλούχησης της περιοχής ITS (Internal Transcribed Spacer Polymerase Chain Reaction; κατά Korabecna, 2007)

Τα απομονωμένα δείγματα υποβλήθηκαν επίσης σε ITS-PCR κατά την οποία χρησιμοποιούνται εκκινητές που πολλαπλασιάζουν τμήματα σε εσωτερικά μεταγραφόμενα διαστήματα που βρίσκονται σε περιοχές του γονιδιώματος των μικροοργανισμών. Οι ITS περιοχές χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση ζυμών και είναι τμήματα DNA τα οποία δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες και βρίσκονται ανάμεσα σε δύο γονίδια τα οποία κωδικοποιούν rRNA.

Πίνακας 5. Αντιδραστήρια, ποσότητες & εκκινητές ITS-PCR

Αντιδραστήριο	Ποσότητα ανά αντίδραση
OneTaq-quick load 2x Mastermix with standard buffer (New England Biolabs,UK)	25 μl
DNA template (400 ng/μl)	1 ml
Primer (10 pmol/μl)	2,5 μl ITS1 2,5 μl ITS4
ddH ₂ O	
Τελικός όγκος	50 μl
ITS1	5' → 3' TCC GTA GGT GAA CCT TGC GG
ITS4	5' → 3' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC

Συνθήκες αντίδρασης:

- 4 min στους 94 °C
- 35 κύκλοι
 - ◆ 1 min στους 94 °C
 - ◆ 1 min στους 55.5 °C
 - ◆ 1 min στους 72 °C
- Παραμονή στους 72 °C για 10 min

Πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων μετά την ITS-PCR για τον έλεγχο του μεγέθους και της καθαρότητας του προϊόντος της αντίδρασης σε πηκτή αγαρόζης:

- 1 % w/v αγαρόζη
- 0.5 μg/ml EtBr (τελική συγκέντρωση στην πηκτή)
- 60 V για 45 min

Καθαρισμός των προϊόντων της PCR

Τα δείγματα των ζυμών καθαρίστηκαν με NucleoSpin® Gel and PCR Clean-upkit της Macherey-Nagel (Duren, Germany) ώστε να απομακρυνθούν υπολείμματα των εκκινητών, των δεοξυνουκλεοτιδίων, του ρυθμιστικού διαλύματος και των μη ειδικών προϊόντων μικρού μοριακού βάρους και να παραμείνει μόνο γενετικό υλικό των μικροοργανισμών που θα μελετηθούν. Χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο που αναφέρεται στην Παράγραφο 4.1.3.

Μέτρηση της συγκέντρωσης των δειγμάτων από την PCR (βλ. 4.1.3)

Η συγκέντρωση του DNA στα καθαρισμένα δείγματα από το ITS-PCR μετρήθηκε με το φωτόμετρο Q5000 της Quawell και ρυθμίστηκε στο επιθυμητό επίπεδο για να αποσταλούν στην εταιρεία Eurofins Genomics (Austria) που θα πραγματοποιήσει την αλληλούχηση.

Ακολούθως, η ταυτοποίηση των στελεχών μετά την αλληλούχηση τους, πραγματοποιήθηκε με σύγκριση αυτών με τις διαθέσιμες αλληλουχίες της βάσης δεδομένων GenBank, χρησιμοποιώντας τη μηχανή αναζήτησης BLAST (Basic Local Alignment Tool) του NCBI (National Center for Biotechnology Information).

4.2 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΟΥ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ

Με την ολοκλήρωση της ταυτοποίησης των στελεχών των βακτηρίων, τα οποία απομονώθηκαν από το δείγμα του ζυμωμένου γάλακτος, ακολούθησε διερεύνηση του προβιοτικού τους δυναμικού.

4.2.1 Έλεγχος αντιμικροβιακής δράσης βακτηρίων

Τα στελέχη των βακτηρίων εξετάστηκαν ως προς την παραγωγή βακτηριοσινών με τη μέθοδο διάχυσης υπερκειμένου σε άγαρ (Well Diffusion Assay, WDA) έναντι επιλεγμένων στελεχών-στόχων από τη συλλογή ACA-DC του Εργαστηρίου Γαλακτοκομίας (Πίνακας 6).

Έγινε εμβολιασμός των στελεχών σε θρεπτικό υπόστρωμα MRS (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) - εμβόλιο 1% v/v - και σε 10% w/v εργαστηριακό γάλα (Skimmed Milk, Oxoid, Hampshire, UK) που περιείχε 0,3% w/v εκχύλισμα ζύμης (Yeast Extract, Biokar Diagnostics, Beauvais, France). Ακολούθησε επώαση για 24 h στους 37 °C. Έπειτα έγινε φυγοκέντρηση των καλλιέργειών (12000 rpm, 15 min, 25 °C), απόρριψη του ιζήματος και ρύθμιση του pH του υπερκειμένου στο 6.5 με τη χρήση διαλυμάτων 1N HCl και NaOH. Η ρύθμιση του pH πραγματοποιήθηκε ούτως ώστε να αποκλειστεί περίπτωση παρατήρησης ζώνης διαύγασης οφειλόμενη σε χαμηλό pH. Τέλος, τα υπερκείμενα μεταφέρθηκαν σε Eppendorf και αποθηκεύτηκαν στους -20 °C.

Τα στελέχη-στόχοι εμβολιάστηκαν στο κατάλληλο θρεπτικό μέσο (εμβόλιο 1% v/v) και επώαστηκαν για 24 h στην κατάλληλη θερμοκρασία (Πίνακας 6). Από την καλλιέργεια αυτή εμβολιάστηκε το ίδιο θρεπτικό υλικό με προσθήκη άγαρ (1,3% w/v) (εμβόλιο 0,1% v/v) (Bacteriological Agar Type E, Biokar, Diagnostics, Beauvais, France) για να γίνει επίστρωση σε τετράγωνα τρυβλία. Όταν το άγαρ στερεοποιήθηκε

ανοίχθηκαν οπές, με τη χρήση ανάστροφης αποστειρωμένης πιπέτας Pasteur, σε κάθε μία από τις οποίες προστέθηκαν 50 µL από κάθε υπερκείμενο καλλιέργειας. Τα τρυβλία επωάστηκαν για 24 h στην κατάλληλη θερμοκρασία (Πίνακας 6) για την ανάπτυξη των στελεχών-στόχων. Έγινε έλεγχος των τρυβλίων για τη δημιουργία ή μη, ζωνών διάλυσης και μετρήθηκαν οι διάμετροι των παρατηρηθεισών ζωνών.

Πίνακας 6. Στελέχη-στόχοι για τη μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης των βακτηριακών στελεχών.

Στέλεχος-Στόχος	Θρεπτικό μέσο	Θερμοκρασία °C	Ομάδα βιολογικού κινδύνου
Παθογόνα – τροφιμογενή			
<i>Escherichia coli</i> CFA-I	BHI	37	2
<i>Escherichia coli</i> C1845	BHI	37	2
<i>Salmonella typhimurium</i> SL1344	BHI	37	2
<i>Klebsiella oxytoca</i> FMCC B-197	BHI	37	2
<i>Yersinia enterocolitica</i> FMCC B-89	BHI	37	2
<i>Yersinia enterocolitica</i> FMCC B-90	BHI	37	2
<i>Bacillus cereus</i> LMG 6923 ^T	TSB	30	2
<i>Bacillus subtilis</i> FMCC B-109	TSB	30	1
<i>Listeria innocua</i> LMG 11387 ^T	BHI	30	1
<i>Listeria innocua</i> LMG 13568	BHI	30	1
<i>Listeria welshimeri</i> 15008	BHI	30	1
Παθογόνα – ανθρώπινη γαστρεντερική ή/και αναπνευστική οδός			
<i>Streptococcus agalactiae</i> LMG 14694 ^T	BHI	37	2
<i>Streptococcus anginosus</i> LMG 14502 ^T	BHI	37	2
<i>Streptococcus pneumoniae</i> LMG 14545 ^T	BHI	37	2
<i>Streptococcus pyogenes</i> LMG 21599 ^T	BHI	37	2
Παθογόνα και ευκαιριακά παθογόνα – στοματική κοιλότητα			
<i>Streptococcus gordonii</i> LMG 14518 ^T	BHI	37	1 or 2
<i>Streptococcus mutans</i> LMG 14558 ^T	BHI	37	1 or 2
<i>Streptococcus oralis</i> LMG 14532 ^T	BHI	37	2
<i>Streptococcus salivarius</i> LMG 11489 ^T	BHI	37	1
<i>Streptococcus sanguinis</i> DSM 20068	BHI	37	1
<i>Streptococcus sobrinus</i> LMG 14641 ^T	BHI	37	1
<i>Staphylococcus aureus</i> DSM 21705	BHI	37	2
Παθογόνα – απομονωμένα από τραύματα			
<i>Enterococcus faecalis</i> LMG 11396	BHI	37	2
<i>Staphylococcus aureus</i> LMG 8064	BHI	37	2
Οξυγαλακτικά στελέχη			
<i>Lactobacillus sakei</i> ACA-DC 2313	MRS	30	1
<i>Lactococcus lactis</i> LMG 6890 ^T	M17	30	1
<i>Streptococcus thermophilus</i> ACA-DC 4	M17	37	1

4.2.2 Έλεγχος ανθεκτικότητας σε χαμηλό pH

Η δοκιμή της ανθεκτικότητας των βακτηριακών στελεχών σε pH 2,5 έγινε μιμούμενη το όξινο περιβάλλον του στομάχου, το οποίο οφείλεται στην παρουσία HCl στο γαστρικό υγρό (Papadimitriou et al., 2015). Ο έλεγχος έγινε σε δύο χρονικά σημεία, στις 0 και 2 h. Πραγματοποιήθηκαν δύο επαναλήψεις για κάθε στέλεχος.

- Εμβολιασμός των συντηρημένων στους -80 °C βακτηριακών στελεχών (εμβόλιο 1% v/v) σε θρεπτικό υπόστρωμα MRS (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) και επώαση στους 37 °C για 24 h
- 2^{ος} εμβολιασμός των βακτηριακών στελεχών (εμβόλιο 1% v/v) σε θρεπτικό υπόστρωμα MRS και επώαση στους 37 °C για 24 h
- Μεταφορά των καλλιέργειών (1 ml) σε σωληνάρια τύπου Eppendorf, φυγοκέντρηση (12000 rpm, 3 min, 20 °C) και απόχυση υπερκειμένου.
- Επαναιώρηση των κυττάρων σε 1 ml PBS pH 7.3, φυγοκέντρηση (12000 rpm, 3 min, 20 °C) και απόχυση υπερκειμένου
- Επαναιώρηση κυττάρων σε 1 ml PBS pH 2.5. Λαμβάνεται το δείγμα των 0 h με μεταφορά 100 μl του εναιωρήματος σε Eppendorf που περιέχει 900 μl Peptone Water (Lab M, Lancashire, UK)
- Τα υπόλοιπα 900μl του εναιωρήματος της κάθε καλλιέργειας επωάζονται στους 37 °C για 2 h λαμβάνοντας υπόψη τη θερμοκρασία στον ανθρώπινο οργανισμό αλλά και το χρόνο που η τροφή παραμένει στο στομάχι

Πραγματοποιήθηκαν δεκαδικές αραιώσεις σε Eppendorf με Peptone Water (100 μl καλλιέργειας & 900 μl Peptone Water) ως την -7 για την καταμέτρηση του πληθυσμού στις 0h, και ως την -6 για τις 2h. Για τις 0h έγινε ενσωμάτωση των αραιώσεων -6, -7 σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα MRS, ενώ για τις 2h ενσωμάτωση των αραιώσεων -4, -5, -6 σε αντίστοιχα τρυβλία. Ακολούθησε επώαση για 48 h στους 37 °C και καταμέτρηση των αποικιών των βακτηρίων στα τρυβλία.

4.2.3 Έλεγχος ικανότητας υδρόλυσης χολικών αλάτων

Ο έλεγχος της ικανότητας των βακτηριακών στελεχών να υδρολύουν χολικά άλατα συγκέντρωσης 0.5 % w/v πραγματοποιήθηκε με το εξής πρωτόκολλο:

- Εμβολιασμός των συντηρημένων στους -80 °C βακτηριακών στελεχών (εμβόλιο 1% v/v) σε θρεπτικό υπόστρωμα MRS Broth (Biokar Diagnostics, Beauvais, France)
- Επώαση στους 37 °C για 24 h
- 2^{ος} εμβολιασμός των βακτηριακών στελεχών (εμβόλιο 1% v/v) σε θρεπτικό υπόστρωμα MRS Broth
- Προετοιμασία τρυβλίων με θρεπτικό υπόστρωμα MRS και με θρεπτικό υπόστρωμα MRS εμπλουτισμένο με 0.5% (w/v) ταυροδεοξυχολικό οξύ (TDCA, Sigma-Aldrich)
- Εμβολιασμός όλων των τρυβλίων με τα στελέχη των βακτηρίων (10 μl από κάθε καλλιέργεια).

- Επώαση στους 37 °C για 48 h σε αναερόβιες συνθήκες (σύστημα GasPak Plus, Beckton Dickinson)

Με την ολοκλήρωση της επώασης έγινε παρατήρηση της μορφολογίας των σχηματισμένων αποικιών των στελεχών στα τρυβλία με MRS άγαρ - TDCA σε σχέση με τις αποικίες στα τρυβλία με MRS άγαρ (χωρίς TDCA). Καταγράφηκε η παρουσία, ή μη, αποικιών έντονου άσπρου χρώματος από την παραγωγή δυσδιάλυτου χολικού οξέως.

4.2.4 Έλεγχος ικανότητας πρόσδεσης σε κολλαγόνο

Για την *in vitro* δοκιμή της πρόσδεσης των στελεχών των βακτηρίων σε κολλαγόνο ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα (Tram et al., 2013):

- Εμβολιασμός των συντηρημένων στους -80 °C βακτηριακών στελεχών (εμβόλιο 1% v/v) σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα MRS Broth (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) και επώαση στους 37 °C για 24 h
- Εμβολιασμός της καλλιέργειας των βακτηρίων σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα MRS broth 2 % v/v
- Μεταφορά 100μl της καλλιέργειας με πολυκάναλη πιπέτα σε πλακίδιο μικροτιτλοδότησης που περιέχει κολλαγόνο (Collagen Type I CELLCOAT, Greiner Bio-One International) και επώαση στους 37 °C για 24 h
- Απομάκρυνση της καλλιέργειας από το πλακίδιο μικροτιτλοδότησης με τη χρήση πολυκάναλης πιπέτας (>100 μl)
- Έκπλυση του πλακιδίου μικροτιτλοδότησης 2 φορές με πυκνό Ringer ½ strength (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) (150 μl/ πλύσιμο)
- Χρώση με 100 μl Crystal Violet 0.05 % w/v και αναμονή 15 min
- Απομάκρυνση της χρωστικής με τη χρήση πολυκάναλης πιπέτας
- Έκπλυση του πλακιδίου μικροτιτλοδότησης 3 φορές με πυκνό Ringer ½ strength (150 μl / πλύσιμο)
- Προσθήκη 100 μl MBDS (10 % w/v SDS, 40 % v/v ethanol σε dH₂O), αναμονή 5 min και μεταφορά 90 μl σε νέο πλακίδιο μικροτιτλοδότησης

Τέλος, τα πλακίδια μικροτιτλοδότησης τοποθετήθηκαν στο φωτόμετρο Elisa (Sunrise, Tecan, Austria) για τη μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 600 nm (OD₆₀₀) ως ένδειξη του πληθυσμού των βακτηριακών κυττάρων που είχαν προσδεθεί σε κάθε κυψέλη.

4.3 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ

4.3.1 Έλεγχος ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά

Όπως αναφέρθηκε στο Κεφάλαιο Α – Παράγραφος 1.2.1, για να χαρακτηριστεί και να χρησιμοποιηθεί ένα μικροβιακό στέλεχος ως προβιοτικό θα πρέπει να χαρακτηρίζεται ασφαλές για τον ανθρώπινο οργανισμό. Μία από τις ιδιότητες των μικροοργανισμών που μελετώνται είναι η ανθεκτικότητα που εμφανίζουν σε αντιβιοτικά. Στα πλαίσια αυτά πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο έλεγχος της ανθεκτικότητας των απομονωθέντων βακτηριακών στελεχών έναντι οκτώ αντιβιοτικών βάσει των οδηγιών της Ευρωπαϊκής Αρχής Ασφάλειας Τροφίμων (European Food Safety Authority, EFSA) (EFSA, 2012).

- Χρησιμοποιήθηκαν τα αντιβιοτικά: Αμπικιλίνη, Βανκομυκίνη, Γενταμυκίνη, Καναμυκίνη, Στρεπτομυκίνη, Ερυθρομυκίνη, Τετρακυκλίνη και Χλωραμφενικόλη
- Σε συγκεντρώσεις: 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512 και 1024 $\mu\text{g/ml}$, για τον προσδιορισμό της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) των αντιβιοτικών για κάθε ένα στέλεχος. Η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση αναφέρεται στην ελάχιστη συγκέντρωση αντιβιοτικού που αναστέλλει την ορατή βακτηριακή ανάπτυξη μετά την επώαση.

Συνοπτικά χρησιμοποιήθηκε το εξής πρωτόκολλο:

Σε τρυβλία μικροτιτλοδότησης προστέθηκαν 20 μl των καλλιιεργειών των στελεχών ($8-9 \log \text{cfu/ml}$), αραιωμένων 1:10 σε MRS (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) σε όλες τις κυψέλες του τρυβλίου καθώς και 20 μl από την $\times 10$ απαιτούμενη συγκέντρωση του εκάστοτε αντιβιοτικού. Εν συνεχεία οι κυψέλες πληρώθηκαν μέχρι τελικού όγκου 200 μL με την προσθήκη 160 μl υγρού θρεπτικού υποστρώματος MRS (Biokar Diagnostics, Beauvais, France).

Κατ' αυτόν τον τρόπο η τελική συγκέντρωση της καλλιέργειας σε κάθε κυψελίδα ήταν 10^6-10^7cfu/ml .

Τα τρυβλία επώαστηκαν για 24 h στους 37°C .

Σε κάθε ένα τρυβλίο μικροτιτλοδότησης εξετάστηκε ένα αντιβιοτικό. Όταν ολοκληρώθηκε η επώαση, μετρήθηκε η οπτική πυκνότητα στα 610 nm σε φωτόμετρο Elisa (Sunrise, Tecan, Austria) και εξετάστηκε κάθε κυψέλη για την ύπαρξη ή όχι ανάπτυξης. Η ελάχιστη συγκέντρωση που επιτύγχανε την πλήρη αναστολή της ανάπτυξης της εκαστοτε καλλιέργειας αποτέλεσε την MIC (Minimum Inhibitory Concentration) για το συγκεκριμένο αντιβιοτικό.

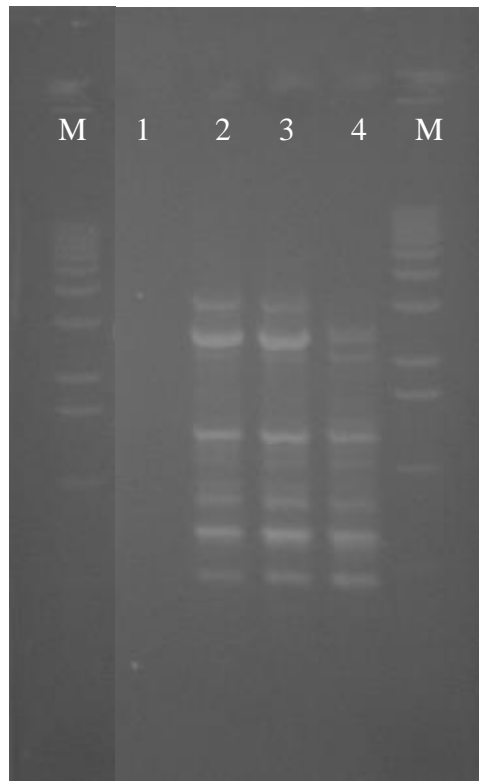
Η τελευταία στήλη του τρυβλίου η οποία δεν περιείχε αντιβιοτικό, χρησιμοποιήθηκε ως τιμή σύγκρισης για τον έλεγχο της εγκυρότητας των αποτελεσμάτων.

5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

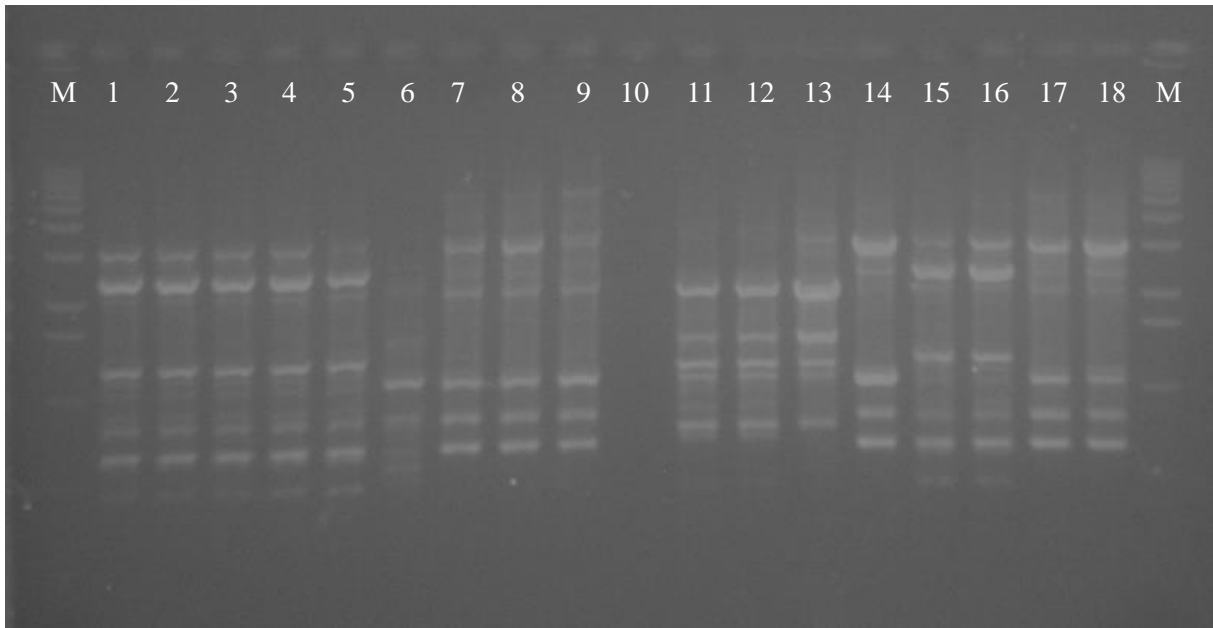
5.1 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

5.1.1 Ομαδοποίηση στελεχών βακτηρίων με τη μέθοδο *rep-PCR*

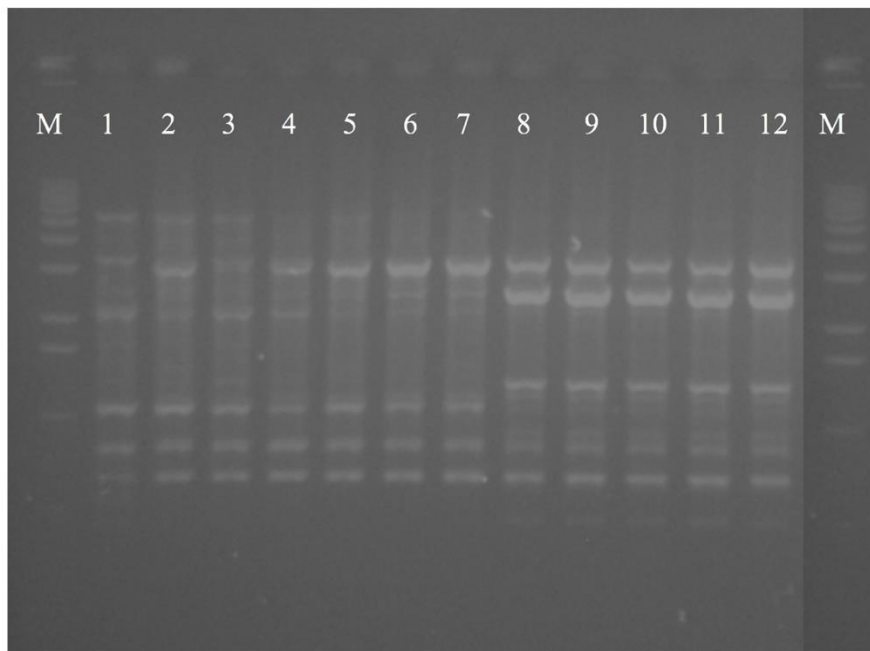
Με την ολοκλήρωση της διαδικασίας της *rep-PCR*, όπου ενισχύθηκαν συγκεκριμένα τμήματα DNA των στελεχών των βακτηρίων (βλ. 4.1.5), ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αντίδρασης σε πηκτή αγαρόζης τα αποτελέσματα της οποίας φαίνονται στις κάτωθι Εικόνες.



Εικόνα 2. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της *rep-PCR* για τα απομονωθέντα βακτήρια. Gel 1. , 1-FJY1-1a, 2- FJY1-1b, 3- FJY1-2, 4- FJY1-3a. M: Μάρτυρας μοριακών μαζών 1kb (DNA ladder, Invitrogen, California, USA).

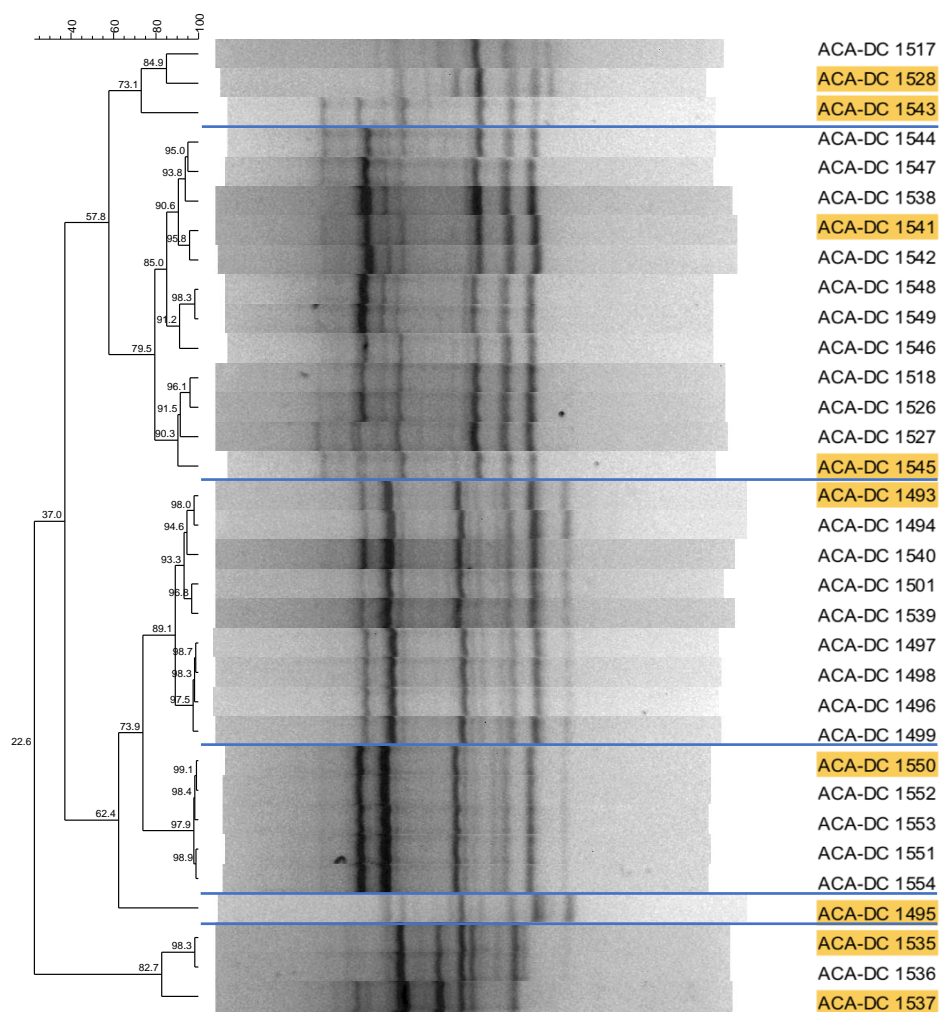


Εικόνα 3. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της rep-PCR για τα απομονωθέντα βακτήρια. Gel 2. 1- FJY1-3b, 2- FJY1-4a, 3- FJY1-4b, 4- FJY1-5a, 5- FJY1-5b, 6- FJY2-1a, 7- FJY2-2, 8- FJY2-3a, 9- FJY2-4a, 10- FJY2-5, 11- FJY3-1, 12- FJY3-2, 13- FJY3-3a, 14- FJY3-3b, 15- FJY3-4, 16- FJY3-5, 17 FJY4-1, 18- FJY4-2. M: Μάρτυρας μοριακών μαζών 1kb (DNA ladder, Invitrogen, California, USA).



Εικόνα 4. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της rep-PCR για τα απομονωθέντα βακτήρια. Gel 3. 1- FJY4-3, 2- FJY4-4, 3- FJY4-5, 4- FJY5-2, 5- FJY5-3, 6- FJY5-4, 7- FJY5-5, 8- FJY6-1, 9- FJY6-2, 10- FJY6-3, 11- FJY6-4, 12- FJY6-5. M: Μάρτυρας μοριακών μαζών 1kb (DNA ladder, Invitrogen, California, USA).

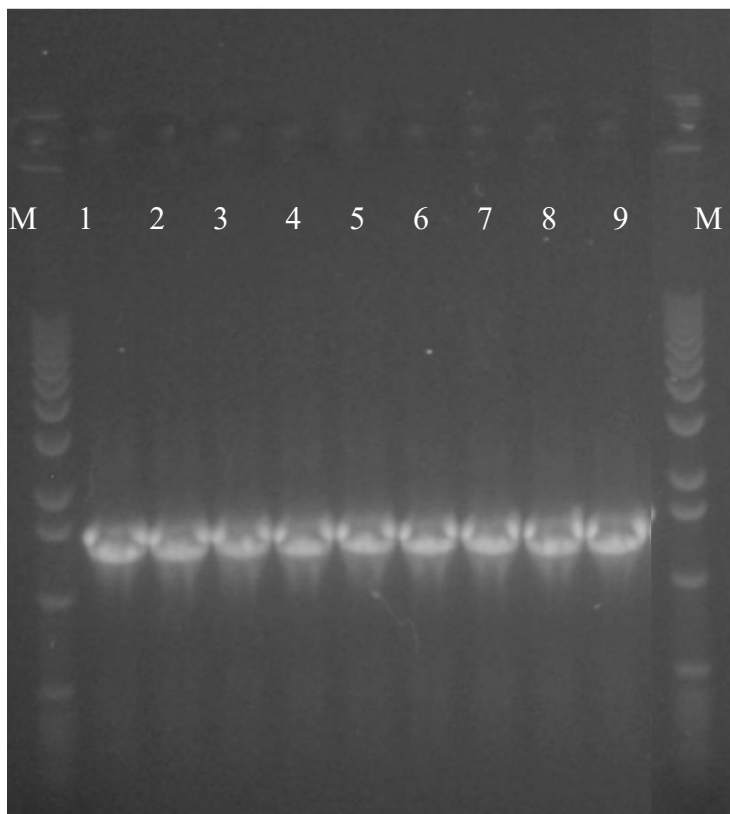
Για την ταυτοποίηση των στελεχών των βακτηρίων έγινε επεξεργασία των φωτογραφιών της ηλεκτροφόρησης με το πρόγραμμα BioNumerics (Applied Maths NV). Από τα αποτελέσματα του προγράμματος προέκυψε ένα δενδρόγραμμα (Δενδρόγραμμα 1) όπου τα στελέχη ομαδοποιήθηκαν με βάση τα ποσοστά ομοιότητας των ηλεκτροφορητικών τους προφίλ. Στελέχη με ποσοστά ομοιότητας περίπου >80% θεωρήθηκε ότι αποτελούν μια ομάδα. Από κάθε ομάδα επιλέχθηκαν ενδεικτικά κάποια στελέχη για να πραγματοποιηθεί στη συνέχεια η αλληλούχηση του γονιδίου 16S rRNA, προκειμένου να γίνει η ταυτοποίησή τους.



Δενδρόγραμμα 1. Δενδρόγραμμα rpo-PCR των στελεχών των βακτηρίων. Με μπλε διαχωρίζονται οι ομάδες και με κίτρινο επισημαίνονται τα στελέχη που επελέγησαν για αλληλούχηση του γονιδίου 16S rRNA.

5.1.2 Ταυτοποίηση στελεχών βακτηρίων με την αλληλούχηση του γονιδίου 16S rRNA

Για την ταυτοποίηση των βακτηριακών στελεχών ακολουθήθηκε η μέθοδος της αλληλούχησης του γονιδίου 16S rRNA (βλ. 4.1.3). Με την ολοκλήρωση της διαδικασίας της ενίσχυσης του γονιδίου 16S έγινε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αντίδρασης PCR σε πηκτή αгарόζης τα αποτελέσματα της οποίας φαίνονται στην Εικόνα 5.



Εικόνα 5. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της 16S PCR για τα επιλεγμένα βακτήρια. 1- FjY1-1b, 2- FjY1-3a, 3- FjY2-5, 4- FjY3-1, 5- FjY3-3a, 6- FjY4-1, 7- FjY4-3, 8- FjY4-5, 9- FjY6-1. M: Μάρτυρας μοριακών μαζών 1kb (DNA ladder, Invitrogen, California, USA)

Κατά την επεξεργασία με το πρόγραμμα BioNumerics τα στελέχη είχαν μεγάλα ποσοστά ομοιότητας (>90%) και δεν ήταν δυνατός ο διαχωρισμός τους σε ένα είδος. Γι' αυτό, όπως φαίνεται στον Πίνακα 7, τοποθετήθηκαν σε ομάδες των 3 ειδών. Η εικόνα αυτή συμβαδίζει με τα βιβλιογραφικά δεδομένα όπου αναφέρεται πως τα είδη *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paraplantarum* και *Lactobacillus pentosus* εμφανίζουν μεγάλη φαινοτυπική και γενοτυπική ομοιότητα (Siezen et al., 2010; Parente et al., 2010) όπως και τα είδη *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus casei* και *Lactobacillus zeae* (Smokvina et al., 2010; Hill et al., 2018).

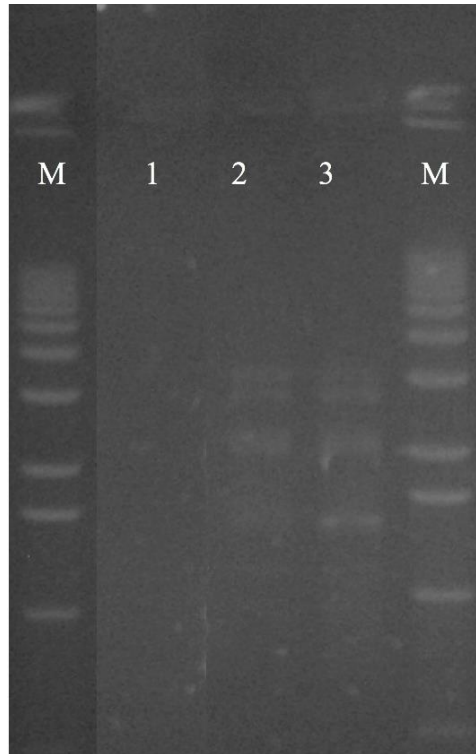
Πίνακας 7. Ταυτοποίηση στελεχών βακτηρίων από το δείγμα του ζυμωμένου γάλακτος μετά την αλληλούχηση του γονιδίου 16S rRNA. **Επισημαίνονται αυτά που επελέγησαν για αλληλούχηση του γονιδίου 16S rRNA.**

Θρεπτικό υπόστρωμα απομόνωσης	Στέλεχος	Μορφολογία κυττάρων	ACA-DC Number	Ταυτοποίηση
MRS	FjY1-1a	βάκιλλος	1492	<i>L. plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>
	FjY1-1b	βάκιλλος	1493	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>
	FjY1-2	βάκιλλος	1494	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>
	FjY1-3a	βάκιλλος	1495	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>
	FjY1-3b	βάκιλλος	1496	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>
	FjY1-4a	βάκιλλος	1497	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>
	FjY1-4b	βάκιλλος	1498	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>
	FjY1-5a	βάκιλλος	1499	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>
	FjY1-5b	βάκιλλος	1501	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>
	FjY2-1a	βάκιλλος	1517	Δεν ταυτοποιήθηκε
	FjY2-1b	Gram (-) βάκιλλος	-	-
	FjY2-2	βάκιλλος	1518	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>
	FjY2-3a	βάκιλλος	1526	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>
	FjY2-3b	Gram (-) βάκιλλος	-	-
	FjY2-4a	βάκιλλος	1527	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>
	FjY2-4b	Gram (-) βάκιλλος	-	-
	FjY2-5	βάκιλλος	1528	Δεν ταυτοποιήθηκε
	M17	FjY3-1	βάκιλλος	1535
FjY3-2		βάκιλλος	1536	<i>L.paracasei/ L.casei/ L.zeae</i>
FjY3-3a		βάκιλλος	1537	<i>L. paracasei/ L. casei/ L.zeae</i>
FjY3-3b		βάκιλλος	1538	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>
FjY3-4		βάκιλλος	1539	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>
FjY3-5		βάκιλλος	1540	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>
FjY4-1		βάκιλλος	1541	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>
FjY4-2		βάκιλλος	1542	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>
FjY4-3		βάκιλλος	1543	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>

	FjY4-4	βάκιλλος	1544	<i>L.plantarum/</i> <i>L.paraplantarum/ L.pentosus</i>
	FjY4-5	βάκιλλος	1545	<i>L.plantarum/</i> <i>L.paraplantarum/ L.pentosus</i>
ROGOSA	FjY5-1	Δεν αναπτύχθηκε	-	-
	FjY5-2	βάκιλλος	1546	<i>L.plantarum/</i> <i>L.paraplantarum/ L.pentosus</i>
	FjY5-3	βάκιλλος	1547	<i>L.plantarum/</i> <i>L.paraplantarum/ L.pentosus</i>
	FjY5-4	βάκιλλος	1548	<i>L.plantarum/</i> <i>L.paraplantarum L.pentosus</i>
	FjY5-5	βάκιλλος	1549	<i>L.plantarum/</i> <i>L.paraplantarum/ L.pentosus</i>
KAA	FjY6-1	βάκιλλος	1550	<i>L.plantarum/</i> <i>L.paraplantarum/ L.pentosus</i>
	FjY6-2	βάκιλλος	1551	<i>L.plantarum/</i> <i>L.paraplantarum/ L.pentosus</i>
	FjY6-3	βάκιλλος	1552	<i>L.plantarum/</i> <i>L.paraplantarum/ L.pentosus</i>
	FjY6-4	βάκιλλος	1553	<i>L.plantarum/</i> <i>L.paraplantarum/ L.pentosus</i>
	FjY6-5	βάκιλλος	1554	<i>L.plantarum/</i> <i>L.paraplantarum/ L.pentosus</i>

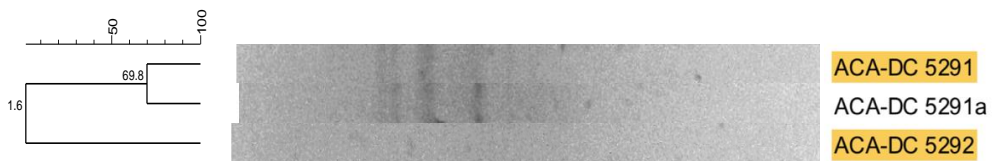
5.1.3 Ομαδοποίηση στελεχών ζυμών με τη μέθοδο rep-PCR

Με την ολοκλήρωση της διαδικασίας της rep-PCR, όπου ενισχύθηκαν συγκεκριμένα τμήματα DNA των στελεχών των ζυμών (βλ. 4.1.2), ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αντίδρασης σε πηκτική αγαρόζη τα αποτελέσματα της οποίας φαίνονται στην Εικόνα 6.



Εικόνα 6. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της *rep*-PCR για τις απομονωθείσες ζύμες. 1- FjY7-2, 2 - FjY7-1 μμ, 3 - FjY7-1 M, M: Μάρτυρας μοριακών μαζών 1kb (DNA ladder, Invitrogen, California, USA).

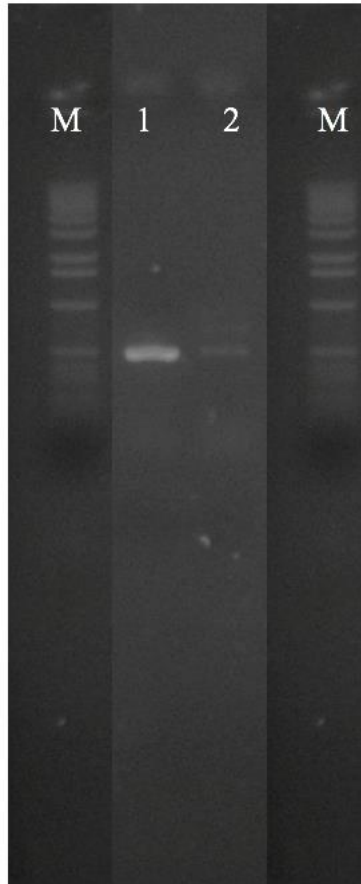
Για την ομαδοποίηση των στελεχών των ζυμών έγινε επεξεργασία των φωτογραφιών της ηλεκτροφόρησης με το πρόγραμμα BioNumerics (Applied Maths NV). Από τα αποτελέσματα του προγράμματος προέκυψε ένα δενδρόγραμμα (Δενδρόγραμμα 2) όπου τα στελέχη ομαδοποιήθηκαν με βάση τα ποσοστά ομοιότητας των ηλεκτροφορητικών τους προφίλ. Στελέχη με ποσοστά ομοιότητας περίπου >80% θεωρήθηκε ότι αποτελούν μια ομάδα. Από κάθε ομάδα επιλέχθηκαν ενδεικτικά κάποια στελέχη για να πραγματοποιηθεί στη συνέχεια η ITS PCR προκειμένου να γίνει η ταυτοποίησή τους.



Δενδρόγραμμα 2. Δενδρόγραμμα *rep*-PCR των στελεχών των ζυμών. Επισημαίνονται αυτά που επελέγησαν για ITS PCR.

5.1.4 Ταυτοποίηση στελεχών ζυμών με τη μέθοδο αλληλούχησης της περιοχής ITS

Για την ταυτοποίηση των στελεχών των ζυμών ακολουθήθηκε η μέθοδος της αλληλούχησης αλληλούχησης της περιοχής ITS (βλ. 4.1.6). Με την ολοκλήρωση της διαδικασίας της αλληλούχησης της περιοχής ITS έγινε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αντίδρασης PCR σε πηκτή αγαρόζης τα αποτελέσματα της οποίας φαίνονται στην Εικόνα 7.



Εικόνα 7. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της ITS-PCR για τις απομονωθείσες ζύμες. 1 - FjY7-2, 2 - FjY7-1 M. M: Μάρτυρας μοριακών μαζών 1kb (DNA ladder, Invitrogen, California, USA).

Πίνακας 8. Αποτελέσματα απομόνωσης- ανάπτυξης- ταυτοποίησης στελεχών ζυμών από το δείγμα του ζυμωμένου γάλακτος μετά την ITS-PCR. Αναγράφονται και οι αποικίες που δεν αναπτύχθηκαν σε υγρό θρεπτικό μέσο.

Θρεπτικό υπόστρωμα απομόνωσης	Στέλεχος	Μορφολογία κυττάρων	ACA-DC Number	Ταυτοποίηση
YGC	FjY7-1	Ζύμη	5291	Δεν ταυτοποιήθηκε
	FjY7-2	Ζύμη	5292	<i>Candida inconspicua</i>
	FjY7-3	Δεν αναπτύχθηκε	-	-
	FjY7-4	Δεν αναπτύχθηκε	-	-
	FjY7-5	Δεν αναπτύχθηκε	-	-

Συνολικά απομονώθηκαν 34 βακτηριακά στελέχη εκ των οποίων: 29 ταυτοποιήθηκαν ως *Lactobacillus plantarum*/ *Lactobacillus paraplantarum*/ *Lactobacillus pentosus*, 3 ως *Lactobacillus paracasei*/ *Lactobacillus casei*/ *Lactobacillus zeae* και 2 που δεν ταυτοποιήθηκαν. Απομονώθηκαν ακόμη 2 στελέχη ζυμών, 1 ως *Candida inconspicua* και 1 που δεν ταυτοποιήθηκε.

Πίνακας 9. Αποτελέσματα απομόνωσης- ανάπτυξης- ταυτοποίησης μικροβιακών στελεχών από το δείγμα του ζυμωμένου γάλακτος.

	Αριθμός στελεχών
Βακτήρια	34
<i>Lactobacillus plantarum</i> / <i>Lactobacillus paraplantarum</i> / <i>Lactobacillus pentosus</i>	29
<i>Lactobacillus paracasei</i> / <i>Lactobacillus casei</i> / <i>Lactobacillus zeae</i>	3
Δεν ταυτοποιήθηκε	2
Ζύμες	2
<i>Candida inconspicua</i>	1
Δεν ταυτοποιήθηκε	1

Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν εν μέρει με τη βιβλιογραφία, όπου στελέχη του γένους *Lactobacillus* αναφέρονται μεταξύ των πιο συχνά χρησιμοποιημένων οξυγαλακτικών βακτηρίων ως εναρκτήριες καλλιέργειες σε προϊόντα ζύμωσης του γάλακτος, αλλά και ως φυσική μικροχλωρίδα του νωπού γάλακτος (βλ. Κεφάλαιο Α – Παράγραφος 1.1.1). Συγκεκριμένα, οι *Lactobacillus plantarum* & *Lactobacillus casei* αναφέρονται ως μη εναρκτήριες καλλιέργειες (Non Starter Lactic Acid Bacteria - NSLAB), οι οποίες ανευρίσκονται σε νωπό γάλα (Settanni and Moschetti, 2010). Υπάρχουν όμως και περιπτώσεις όπου στελέχη του είδους *Lactobacillus plantarum* (RoushanZadeh et al., 2014) και του *Lactobacillus casei* (Turgay and Erbilir 2006) απομονώθηκαν από γιαούρτη.

Η *Candida inconspicua* ανήκει στο γένος *Candida* το οποίο έχει καταγραφεί ως αλλοιωγόνος μύκητας σε γαλακτοκομικά προϊόντα (Garnier et al., 2017) όπως πχ σε τυρί Mozzarella (Minervini et al., 2001) αλλά και σε συνεκτική γιαούρτη (Rohm et al., 1990).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η απουσία *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* και *Streptococcus thermophilus* τα οποία, όπως αναφέρθηκε και στο Κεφάλαιο Α, αποτελούν καλλιέργειες εκκίνησης για την παραγωγή γιαούρτης. Ενδέχεται ο πληθυσμός των εν λόγω μικροοργανισμών να ήταν πολύ μικρός, ή και μηδενικός, όταν το δείγμα από τα νησιά Fiji έφτασε στο εργαστήριο. Ακόμη, ίσως οι συγκεκριμένες αποικίες να μην επελέγησαν κατά την απομόνωση που προηγήθηκε των εργασιών της παρούσας Διπλωματικής μελέτης.

5.2 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΟΥ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ

5.2.1 Έλεγχος αντιμικροβιακής δράσης βακτηρίων

Από τα βακτηριακά στελέχη που εξετάστηκαν ως προς την παραγωγή βακτηριοσινών με τη μέθοδο διάχυσης υπερκειμένου στο άγαρ (Well Diffusion Assay, WDA) (βλ. 4.2.1), μόνο ένα στέλεχος παρουσίασε σαφή αντιμικροβιακή δράση δημιουργώντας ζώνη διαύγασης έναντι των επιλεγμένων στελεχών-στόχων. Ακόμη, φάνηκε πως το MRS ήταν πιο αποτελεσματικό από το Milk Yeast Extract ως μέσο ανάπτυξης. Αναλυτικά τα αποτελέσματα της δοκιμής παρουσιάζονται στον Πίνακα 10.

Πίνακας 10. Αντιμικροβιακή δράση των απομονωθέντων βακτηριακών στελεχών. Αναγράφονται η διάμετρος και τα χαρακτηριστικά των ζωνών που παρατηρήθηκαν καθώς και το μέσο στο οποίο αναπτύχθηκαν τα οξυγαλακτικά στελέχη. Δεν αναγράφονται στελέχη τα οποία δεν σχημάτισαν ζώνες.

Στέλεχος	ACA-DC Number	Είδος	Μέσο ανάπτυξης	/Παρεμποδιστική δράση εκφρασμένη σε mm / Στελέχη-στόχοι			
				<i>Escherichia coli</i> C1845	<i>Streptococcus pneumoniae</i> LMG 14545T	<i>Streptococcus gordonii</i> LMG 14518T	<i>Streptococcus thermophilus</i> ACA-DC 4
FjY2-1a	1517		MRS		7 (θολή)		9 (θολή)
FjY2-2	1518	<i>L. plantarum</i> / <i>L. paraplantarum</i> / <i>L. pentosus</i>	MRS		7 (θολή)		
FjY2-3a	1526	<i>L. plantarum</i> / <i>L. paraplantarum</i> / <i>L. pentosus</i>	MRS		7 (θολή)		
FjY2-4a	1527	<i>L. plantarum</i> / <i>L. paraplantarum</i> / <i>L. pentosus</i>	MRS		7 (θολή)		10 (διαυγής)
FjY2-5	1528	<i>L. plantarum</i> / <i>L. paraplantarum</i> / <i>L. pentosus</i>	MRS		7 (θολή)		
FjY3-2	1536	<i>L. paracasei</i> / <i>L. casei</i> / <i>L. zeae</i>	MYE	9 (θολή)			

FjY3-3b	1538	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>	MRS				9 (θολή)
FjY3-4	1539	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>	MRS		7 (θολή)		
FjY3-5	1540	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>	MRS		7 (θολή)		
FjY4-1	1541	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>	MRS		7 (θολή)		8 (θολή)
FjY4-2	1542	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>	MRS				9 (θολή)
FjY4-3	1543	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>	MRS				9 (θολή)
FjY4-4	1544	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>	MRS			10 (θολή)	
FjY5-2	1546	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>	MRS			10 (θολή)	
FjY5-3	1547	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>	MRS			10 (θολή)	
FjY5-4	1548	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>	MRS			10 (θολή)	
FjY5-5	1549	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>	MRS			10 (θολή)	
FjY6-1	1550	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>	MRS	9 (θολή)		10 (θολή)	
FjY6-2	1551	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>	MRS			10 (θολή)	
FjY6-3	1552	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>	MRS			10 (θολή)	
FjY6-4	1553	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>	MRS			10 (θολή)	

Το στέλεχος FjY2-4a που παρουσίασε σαφή αντιμικροβιακή δράση έναντι του *Streptococcus thermophilus*, ανήκει στην ομάδα των *Lactobacillus plantarum*/*Lactobacillus paraplantarum*/*Lactobacillus pentosus* στελέχη των οποίων είναι καταγεγραμμένα στη βιβλιογραφία ως στελέχη που παράγουν βακτηριοσίνες (Todoron, 2009; Zimina et al., 2017). Οι Xie και An μελέτησαν την πιθανή αντιμικροβιακή δράση στελέχους *Lactobacillus plantarum* απομονωμένου από Κούμεις, και βρήκαν πως η πεδιοσίνη που παρήγαγε το στέλεχος παρεμπόδιζε την ανάπτυξη στελέχους *Streptococcus thermophilus* (Xie and An, 2011). Στη βιβλιογραφία υπάρχουν επίσης αναφορές και για αντιμικροβιακή δράση στελεχών του *Lactobacillus paracasei*, τα οποία απομονώθηκαν για παράδειγμα από λευκό τυρί (Lozo et al., 2004) και από σκλήρο

παραδοσιακό (Tolinacki et al., 2010), αποτελέσματα που δεν ταυτίζονται με τα ευρήματα της παρούσας ερευνητικής εργασίας.

Η αντιμικροβιακή δράση που παρατηρήθηκε έναντι των τεσσάρων μικροοργανισμών είναι ένας ενθαρρυντικός παράγοντας για πιθανή εφαρμογή τους εναλλακτικά των αντιβιοτικών, στα πλαίσια των εργασιών της επιστημονικής κοινότητας για την αντιμετώπιση του προβλήματος της ανθεκτικότητας.

Ικανότητα ανάπτυξης και επιβίωσης των εξεταζόμενων βακτηρίων στο ανθρώπινο πεπτικό σύστημα

Όπως αναφέρθηκε στο Κεφάλαιο Α – Παράγραφος 1.2.1, στο ανθρώπινο πεπτικό σύστημα επικρατούν συνθήκες αντίξοες για την ανάπτυξη και την επιβίωση μικροοργανισμών. Για να χαρακτηριστούν μικροβιακά στελέχη ως προβιοτικά, πρέπει να μην επηρεάζονται αρνητικά από το περιβάλλον του πεπτικού συστήματος. Στα πλαίσια αυτά έγιναν *in vitro* δοκιμές για: την ανθεκτικότητα των βακτηριακών στελεχών σε χαμηλό pH, την ικανότητα υδρόλυσης χολικών αλάτων καθώς και για την ικανότητα πρόσδεσης σε κολλαγόνο.

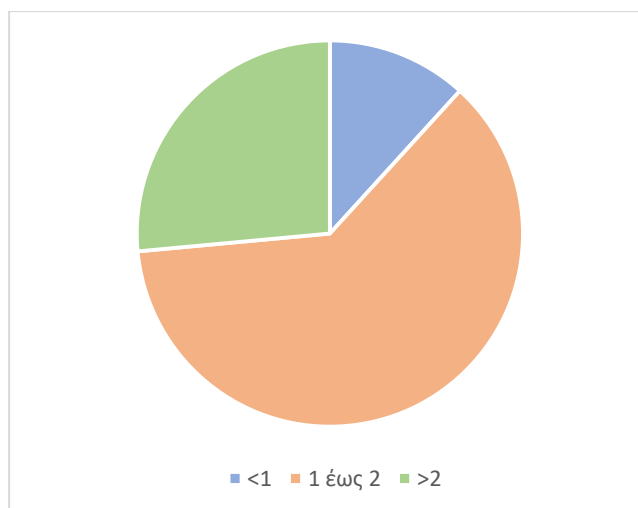
5.2.2 Έλεγχος ανθεκτικότητας σε χαμηλό pH

Στο ανθρώπινο στομάχι επικρατεί όξινο περιβάλλον με το pH να κυμαίνεται μεταξύ 1 και 4-5, τιμή που καθορίζεται από την πρόσληψη τροφής και άλλους παράγοντες (βλ. Κεφάλαιο Α' - Παράγραφος 1.2.1). Για παράδειγμα, αμέσως μετά από ένα γεύμα το pH μπορεί να είναι στο 2 ενώ μετά την πέψη της τροφής να γίνει 4 ή 5. Συνήθως βρίσκεται ανάμεσα στο 2-3 και γι' αυτό επιλέχθηκε το 2,5 για την πραγματοποίηση του πειράματος (Papadimitriou et al., 2015).

Πίνακας 11. Επιβίωση των στελεχών των βακτηρίων σε συνθήκες χαμηλού pH

Στέλεχος	ACA-DC Number	Είδος	ΔLog cfu/mL pH 2,5	Τυπική απόκλιση
FjY1-1a	1492	<i>L. plantarum/ L. paraplantarum/ L. pentosus</i>	0,84	0,32
FjY1-1b	1493	<i>L. plantarum/ L. paraplantarum/ L. pentosus</i>	0,96	0,07
FjY1-2	1494	<i>L. plantarum/ L. paraplantarum/ L. pentosus</i>	0,44	0,05
FjY1-3a	1495	<i>L. plantarum/ L. paraplantarum/ L. pentosus</i>	2,72	0,02
FjY1-3b	1496	<i>L. plantarum/ L. paraplantarum/ L. pentosus</i>	2,63	0,21
FjY1-4a	1497	<i>L. plantarum/ L. paraplantarum/ L. pentosus</i>	0,78	0,15
FjY1-4b	1498	<i>L. plantarum/ L. paraplantarum/ L. pentosus</i>	2,25	0,32
FjY1-5a	1499	<i>L. plantarum/ L. paraplantarum/ L. pentosus</i>	2,26	0,11
FjY1-5b	1501	<i>L. plantarum/ L. paraplantarum/ L. pentosus</i>	2,73	0,13
FjY2-1a	1517	Δεν ταυτοποιήθηκε	1,63	0,14
FjY2-2	1518	<i>L. plantarum/ L. paraplantarum/ L. pentosus</i>	2,02	0,04
FjY2-3a	1526	<i>L. plantarum/ L. paraplantarum/ L. pentosus</i>	1,95	0,13
FjY2-4a	1527	<i>L. plantarum/ L. paraplantarum/ L. pentosus</i>	1,57	0,40
FjY2-5	1528	Δεν ταυτοποιήθηκε	1,23	0,28
FjY3-1	1535	<i>L. paracasei/ L. casei/ L. zeae</i>	1,74	0,02
FjY3-2	1536	<i>L. paracasei/ L. casei/ L. zeae</i>	2,18	0,06

FjY3-3a	1537	<i>L. paracasei/ L. casei/ L. zeae</i>	2,04	0,33
FjY3-3b	1538	<i>L. plantarum/ L. paraplantarum/ L. pentosus</i>	1,63	0
FjY3-4	1539	<i>L. plantarum/ L. paraplantarum/ L. pentosus</i>	2,09	0,02
FjY3-5	1540	<i>L. plantarum/ L. paraplantarum/ L. pentosus</i>	1,57	0,39
FjY4-1	1541	<i>L. plantarum/ L. paraplantarum/ L. pentosus</i>	1,27	0,10
FjY4-2	1542	<i>L. plantarum/ L. paraplantarum/ L. pentosus</i>	1,43	0,09
FjY4-3	1543	<i>L. plantarum/ L. paraplantarum/ L. pentosus</i>	1,13	0,05
FjY4-4	1544	<i>L. plantarum/ L. paraplantarum/ L. pentosus</i>	1,39	0,05
FjY4-5	1545	<i>L. plantarum/ L. paraplantarum/ L. pentosus</i>	1,34	0,07
FjY5-2	1546	<i>L. plantarum/ L. paraplantarum/ L. pentosus</i>	1,03	0,04
FjY5-3	1547	<i>L. plantarum/ L. paraplantarum/ L. pentosus</i>	1,10	0,28
FjY5-4	1548	<i>L. plantarum/ L. paraplantarum/ L. pentosus</i>	1,30	0,06
FjY5-5	1549	<i>L. plantarum/ L. paraplantarum/ L. pentosus</i>	1	0,05
FjY6-1	1550	<i>L. plantarum/ L. paraplantarum/ L. pentosus</i>	1,28	0,04
FjY6-2	1551	<i>L. plantarum/ L. paraplantarum/ L. pentosus</i>	1,48	0,07
FjY6-3	1552	<i>L. plantarum/ L. paraplantarum/ L. pentosus</i>	1,46	0,37
FjY6-4	1553	<i>L. plantarum/ L. paraplantarum/ L. pentosus</i>	1,73	0,37
FjY6-5	1554	<i>L. plantarum/ L. paraplantarum/ L. pentosus</i>	1,51	0,16



Σχήμα 1: Βιωσιμότητα ($\Delta \log$ cfu/ml) των στελεχών των βακτηρίων σε pH 2,5 για 2h

Με βάση τα αποτελέσματα του Πίνακα 11, τα στελέχη κατανεμήθηκαν σε τρεις κατηγορίες: Στελέχη με $\Delta \log$ cfu/ml < 1 , με $\Delta \log$ cfu/ml από 1 έως 2 και με $\Delta \log$ cfu/ml > 2 . Όπως διακρίνεται στο Σχήμα 1 τα περισσότερα στελέχη έχουν $\Delta \log$ cfu/ml 1 έως 2 και ανήκουν στην ομάδα των *Lactobacillus plantarum/ Lactobacillus paraplantarum/ Lactobacillus pentosus* (FjY2-3a, FjY2-4a, FjY3-3b, FjY3-5, FjY4-1, FjY4-2, FjY4-3, FjY4-4, FjY4-5, FjY5-2, FjY5-3, FjY5-4, FjY5-5, FjY6-1, FjY6-2, FjY6-3, FjY6-4, FjY6-5) αλλά και στην ομάδα των *Lactobacillus paracasei/ Lactobacillus casei/ Lactobacillus zeae* (FjY3-1). Στην ίδια κατηγορία εντάσσονται και τα στελέχη FjY2-1a και FjY2-5 τα οποία δεν έχουν ταυτοποιηθεί. Ανθεκτικότερα στο χαμηλό pH βρέθηκαν τα στελέχη με $\Delta \log$ cfu/ml < 1 τα οποία εντάσσονται στην ομάδα των *Lactobacillus plantarum/ Lactobacillus paraplantarum/ Lactobacillus pentosus* (FjY1-1a, FjY1-1b, FjY1-2, FjY1-4a) ενώ τη μικρότερη βιωσιμότητα παρουσίασαν τα στελέχη με $\Delta \log$ cfu/ml > 2 που ανήκουν στην ομάδα των *Lactobacillus plantarum/ Lactobacillus paraplantarum/ Lactobacillus pentosus* (FjY1-3a, FjY1-3b, FjY1-4b, FjY1-5a, FjY1-5b,

FjY2-2, FjY3-4) και των *Lactobacillus paracasei*/ *Lactobacillus casei*/ *Lactobacillus zeae* (FjY3-2, FjY3-3a).

Στελέχη γαλακτοβακκίλων έχουν μελετηθεί από την επιστημονική κοινότητα ως προς τη βιωσιμότητα τους σε χαμηλό pH, στα πλαίσια της διερεύνησης του προβιοτικού τους δυναμικού, και τα αποτελέσματα έχουν δείξει πως μπορούν να επιβιώνουν σε αυτές τις συνθήκες. Για παράδειγμα, στελέχη *Lactobacillus plantarum* και *Lactobacillus paracasei* που απομονώθηκαν από ελληνικά παραδοσιακά γαλακτοκομικά προϊόντα, παρουσίασαν ανθεκτικότητα σε pH 2,5 (Zoumproulou et al., 2017) ενώ ανθεκτικά ήταν και στελέχη *Lactobacillus plantarum* που εξέτασαν οι Šeme et al. (Šeme et al., 2014).

5.2.3 Έλεγχος ικανότητας υδρόλυσης χολικών αλάτων

Εκτός από το χαμηλό pH, και τα χολικά άλατα μπορεί να αποτελέσουν εμπόδιο για την επιβίωση των μικροβιακών στελεχών στο ανθρώπινο λεπτό έντερο. Περισσότερες λεπτομέρειες για τα χολικά άλατα και τη δράση των βακτηρίων της εντερικής χλωρίδας αναφέρονται στο Κεφάλαιο Α' - Παράγραφος 1.2.1.

Όταν ολοκληρώθηκε η επώαση (βλ. 4.2.3), ακολούθησε σύγκριση της μορφολογίας των αποικιών των στελεχών στα τρυβλία με MRS άγαρ - TDCA με τις αποικίες στα τρυβλία με MRS άγαρ (άνευ TDCA). Παρατηρήθηκε η δημιουργία, ή μη, αποικιών έντονου άσπρου χρώματος από την παραγωγή δυσδιάλυτου χολικού οξέως. (Πίνακας 12).



Εικόνα 8. Υδρόλυση χολικών αλάτων για τα στελέχη FjY1-1a, FjY1-1b, FjY1-2, FjY1-3a, FjY1-3b, FjY1-4a, FjY1-4b, FjY1-5a και FjY1-5b. Τρυβλίο με MRS άγαρ αριστερά και τρυβλίο με MRS άγαρ – TDCA δεξιά, μετά τις 48h επώασης στους 37 °C σε αναερόβιες συνθήκες. Εμφανής η δημιουργία αποικιών έντονου άσπρου χρώματος από την παραγωγή δυσδιάλυτου χολικού οξέως στο τρυβλίο MRS – TDCA που βρίσκεται στα δεξιά.

Πίνακας 12. Υδρόλυση χολικών αλάτων. Με (+) σημειώνονται τα στελέχη για τα οποία παρατηρήθηκε η δημιουργία ζωνών υδρόλυσης του ταυροδεοξυχολικού οξέος άσπρου χρώματος και με (-) τα στελέχη για τα οποία δεν παρατηρήθηκε η δημιουργία ζωνών υδρόλυσης του ταυροδεοξυχολικού οξέος άσπρου χρώματος.

Στέλεχος	ACA-DC Number	Είδος	Υδρόλυση Χολικών αλάτων
FjY1-1a	1492	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>	(+)
FjY1-1b	1493	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>	(+)
FjY1-2	1494	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>	(+)
FjY1-3a	1495	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>	(+)
FjY1-3b	1496	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>	(+)
FjY1-4a	1497	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>	(+)
FjY1-4b	1498	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>	(+)
FjY1-5a	1499	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>	(+)
FjY1-5b	1501	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>	(+)
FjY2-1a	1517	Δεν ταυτοποιήθηκε	(-)
FjY2-2	1518	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>	(-)
FjY2-3a	1526	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>	(-)
FjY2-4a	1527	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>	(-)
FjY2-5	1528	Δεν ταυτοποιήθηκε	(-)
FjY3-1	1535	<i>L.paracasei/ L.casei/ L.zae</i>	(-)
FjY3-2	1536	<i>L.paracasei/ L.casei/ L.zae</i>	(-)
FjY3-3a	1537	<i>L.paracasei/ L.casei/ L.zae</i>	(-)
FjY3-3b	1538	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>	(-)
FjY3-4	1539	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>	(+)
FjY3-5	1540	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>	(+)
FjY4-1	1541	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>	(-)
FjY4-2	1542	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>	(-)
FjY4-3	1543	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>	(-)
FjY4-4	1544	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>	(-)
FjY4-5	1545	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>	(-)
FjY5-2	1546	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>	(-)
FjY5-3	1547	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>	(-)
FjY5-4	1548	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>	(-)
FjY5-5	1549	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>	(-)
FjY6-1	1550	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>	(+)
FjY6-2	1551	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>	(+)
FjY6-3	1552	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>	(+)
FjY6-4	1553	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>	(+)
FjY6-5	1554	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>	(+)

Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα της δοκιμής, θετικά στον έλεγχο της ικανότητας υδρόλυσης χολικών αλάτων βρέθηκαν στελέχη της ομάδας των *Lactobacillus plantarum/ Lactobacillus paraplantarum/ Lactobacillus pentosus* (FjY1-1a, FjY1-1b, FjY1-2, FjY1-3a, FjY1-3b, FjY1-4a, FjY1-4b, FjY1-5a, FjY1-5b, FjY3-4, FjY3-5, FjY6-1, FjY6-2, FjY6-3, FjY6-4, FjY6-5) και όχι των *Lactobacillus paracasei/ Lactobacillus casei/ Lactobacillus zae* (FjY3-1, FjY3-2, FjY3-3a). Βάσει και των αποτελεσμάτων της δοκιμής για τη βιωσιμότητα των στελεχών σε συνθήκες χαμηλού pH (βλ. 5.2.2), φαίνεται πως τα στελέχη της ομάδας των *Lactobacillus paracasei/ Lactobacillus casei/*

Lactobacillus zeae δυσκολεύονται να προσαρμοστούν στο στρεσογόνο περιβάλλον του ανθρώπινου πεπτικού συστήματος.

Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν εν μέρει με όσα αναφέρονται στη βιβλιογραφία, αφού στελέχη και των 6 απομονωθέντων ειδών του γένους *Lactobacillus* είναι αναγνωρισμένα ως προβιοτικά (Jacouton et al., 2017). Το γεγονός αυτό υπογραμμίζει τη σημασία της επιλογής προβιοτικών μικροοργανισμών όχι μόνο σε επίπεδο είδους αλλά και στελέχους.

5.2.4 Έλεγχος ικανότητας πρόσδεσης σε κολλαγόνο

Η ικανότητα πρόσδεσης των στελεχών των βακτηρίων στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου είναι μία ακόμη ιδιότητα που εξετάζεται ως προς τον έλεγχο των προβιοτικών τους χαρακτηριστικών. Η προσκόλληση στο εντερικό επιθήλιο είναι ιδιαίτερα σημαντική για τον αποικισμό του γαστρεντερικού σωλήνα αφού κατ' αυτόν τον τρόπο παρατείνεται ο χρόνος δράσης των βακτηρίων και των απορρεουσών ευεργετικών ιδιοτήτων για τον ανθρώπινο οργανισμό (Bermudez-Brito et al., 2012; Ghezziel et al., 2018).

Τα επιλεγμένα στελέχη των βακτηρίων ελέγχθησαν *in vitro* ως προς την ικανότητα πρόσδεσης τους σε κολλαγόνο. Το κολλαγόνο είναι η κύρια δομική πρωτεΐνη του ανθρώπινου οργανισμού και κύριο συστατικό του εξωκυττάριου χώρου (extracellular matrix), ο οποίος περιβάλλει τα κύτταρα και ταυτόχρονα υποστηρίζει την ανάπτυξή τους εντός των ιστών. Επηρεάζει σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες, όπως η αναγνώριση μεταξύ των κυττάρων, η κυτταρική προσκόλληση και ο πολλαπλασιασμός (Frantz et al., 2010).

Τα πλακίδια μικροτιτλοδότησης με κολλαγόνο (βλ. 4.2.4) τοποθετήθηκαν σε φωτόμετρο Elisa (Sunrise, Tecan, Austria) για τον έλεγχο της οπτικής απορρόφησης. Για μεγαλύτερη ακρίβεια στα αποτελέσματα, για κάθε στέλεχος έγιναν 3 μετρήσεις και κατεγράφησαν οι μέσοι όροι των τιμών.

Η επιθυμητή τιμή της οπτικής απορρόφησης για να θεωρηθεί ότι έχουν την ικανότητα πρόσδεσης σε κολλαγόνο, είναι περίπου το 1. Τα αποτελέσματα της δοκιμής παρουσιάζονται παρακάτω, στον Πίνακα 13.

Πίνακας 13. Ικανότητα πρόσδεσης των βακτηριακών στελεχών στο κολλαγόνο.

Στέλεχος	ACA-DC Number	Είδος	Μέση τιμή οπτικής απορρόφησης	Τυπική απόκλιση
FjY1-1a	1492	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>	0,11	0,03
FjY1-1b	1493	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>	0,12	0,05
FjY1-2	1494	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>	0,13	0,09
FjY1-3a	1495	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>	0,75	0,17
FjY1-3b	1496	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>	0,26	0,04
FjY1-4a	1497	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>	0,94	0,24
FjY1-4b	1498	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>	0,43	0,02
FjY1-5a	1499	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>	0,90	0,20
FjY1-5b	1501	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>	0,62	0,47
FjY2-1a	1517	Δεν ταυτοποιήθηκε	0,15	0,04
FjY2-2	1518	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>	0,09	0,00
FjY2-3a	1526	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>	0,17	0,04
FjY2-4a	1527	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>	0,28	0,11
FjY2-5	1528	Δεν ταυτοποιήθηκε	0,24	0,05
FjY3-1	1535	<i>L.paracasei/ L.casei/ L.zeeae</i>	0,42	0,03
FjY3-2	1536	<i>L.paracasei/ L.casei/ L.zeeae</i>	0,65	0,08
FjY3-3a	1537	<i>L.paracasei/ L.casei/ L.zeeae</i>	0,20	0,01
FjY3-3b	1538	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>	0,10	0,02
FjY3-4	1539	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>	0,14	0,06
FjY3-5	1540	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>	0,21	0,09
FjY4-1	1541	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>	0,27	0,08
FjY4-2	1542	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>	0,37	0,03
FjY4-3	1543	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>	0,29	0,03
FjY4-4	1544	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>	0,18	0,06
FjY4-5	1545	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>	0,26	0,08
FjY5-2	1546	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>	0,11	0,02
FjY5-3	1547	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>	0,09	0,03
FjY5-4	1548	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>	0,16	0,06
FjY5-5	1549	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>	0,84	0,43
FjY6-1	1550	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>	0,98	0,58
FjY6-2	1551	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>	1,15	0,08
FjY6-3	1552	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>	1,00	0,40
FjY6-4	1553	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>	1,06	0,08
FjY6-5	1554	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>	0,92	0,28

Τα στελέχη των οποίων οι τιμές οπτικής απορρόφησης υποδηλώνουν ικανότητα πρόσδεσης σε κολλαγόνο ανήκουν στην ταυτοποιημένη ομάδα των *Lactobacillus plantarum/ Lactobacillus paraplantarum/ Lactobacillus pentosus* (FjY1-3a, FjY1-4a, FjY1-5a, FjY5-5, FjY6-1, FjY6-2, FjY6-3, FjY6-4, FjY6-5).

Οι συγκεκριμένοι γαλακτοβάκιλλοι έχουν αναγνωρισθεί ως προβιοτικοί μικροοργανισμοί (βλ. Κεφάλαιο Α), παρουσιάζοντας δηλαδή την ιδιότητα της

προσκόλλησης και τη δυνατότητα του αποικισμού του εντερικού σωλήνα. Συγκεκριμένα για παράδειγμα, σε παρεμφερή δοκιμασία πρόσδεσης σε κολλαγόνο, στελέχη του γένους *Lactobacillus* ανταποκρίθηκαν θετικά (Ζουμπρούλου et al., 2017). Η συγκεκριμένη μέθοδος όμως δεν είναι η μοναδική που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο της ικανότητας πρόσδεσης των βακτηρίων σε κολλαγόνο. Οι Mukherjee & Ramesh (2015) για τον ίδιο σκοπό χρησιμοποίησαν κυτταρομετρία ροής, μία τεχνική που επιτρέπει τη μελέτη κυτταρικών πληθυσμών μέσω ανάλυσης της σκεδασης του φωτός από τα κύτταρα, καθώς και της εκπομπής φθορισμού από αυτά, με τη χρήση ειδικού οργάνου. Οι ίδιοι για πιο αξιόπιστα αποτελέσματα, εκτός από το κολλαγόνο, χρησιμοποίησαν και μυκίνη, έναν ολιγοσακχαρίτη που περιέχεται στη βλέννα που καλύπτει το γαστρεντερικό επιθήλιο.

Όπως στις δοκιμές για τη βιωσιμότητα σε χαμηλό pH (βλ. 5.2.2) και για την ικανότητα υδρόλυσης χολικών αλάτων (βλ. 5.2.3), και σε αυτόν τον έλεγχο τα στελέχη της ομάδας των *Lactobacillus paracasei/ Lactobacillus casei/ Lactobacillus zeae* (FjY3-1, FjY3-2, FjY3-3a) δεν ανταποκρίθηκαν θετικά. Υπάρχουν συνεπώς ενδείξεις πως εκτός της δυσκολίας επιβίωσης στο πεπτικό σύστημα, δεν έχουν και την ικανότητα πρόσδεσης σε κολλαγόνο - και συνεπώς στον εντερικό σωλήνα - παρά το ότι ανήκουν σε αναγνωρισμένα ως προβιοτικά είδη.

5.3 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ

Με την ολοκλήρωση της διερεύνησης του προβιοτικού δυναμικού των στελεχών των βακτηρίων, τα οποία απομονώθηκαν από το δείγμα του ζυμωμένου γάλακτος, ακολούθησε διερεύνηση της ασφάλειάς τους.

5.3.1 Έλεγχος ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά

Ένα μείζον θέμα που απασχολεί την επιστημονική κοινότητα στη σημερινή εποχή είναι η αποτελεσματικότητα των αντιβιοτικών σκευασμάτων έναντι παθογόνων μικροοργανισμών. Η άσκοπη αλλά και αλόγιστη χρήση επι σειρά ετών των φαρμάκων αυτών, σε ανθρώπους και ζώα, έχει επιφέρει την ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών καθιστώντας δηλαδή δύσκολη κάποιες φορές την αντιμετώπιση βακτηριακών λοιμώξεων.

Στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία τα στελέχη των βακτηρίων που ελέγχθησαν ως προς την ανθεκτικότητά τους σε οκτώ αντιβιοτικά (Αμπικιλίνη, Βανκομυκίνη, Γενταμυκίνη, Καναμυκίνη, Στρεπτομυκίνη, Ερυθρομυκίνη, Τετρακυκλίνη και Χλωραμφενικόλη) χαρακτηρίστηκαν ως ευαίσθητα ή μη, βάσει των οδηγιών της Ευρωπαϊκής Αρχής Ασφάλειας Τροφίμων (EFSA, 2012).

Πίνακας 14. Ανθεκτικότητα στελεχών σε αντιβιοτικά. Αναγράφεται η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) όπως ορίζεται για τις δύο ταυτοποιημένες ομάδες των βακτηριακών στελεχών (EFSA, 2012). *n.r = not required

Αντιβιοτικό	Είδος		Μη ταυτοποιημένα στελέχη
	<i>L.plantarum/</i> <i>L.paraplantarum/</i> <i>L.pentosus</i>	<i>L. paracasei/ L. casei/</i> <i>L.zeae</i>	
Αριθμός ανθεκτικών στελεχών			
Αμπικιλίνη (MIC: <i>Plantarum</i> = 2, <i>Paracasei</i> = 4)	4	-	-
Βανκομυκίνη (MIC: <i>Plantarum</i> & <i>Paracasei</i> = n.r)	29	3	2
Γενταμυκίνη (MIC: <i>Plantarum</i> = 16, <i>Paracasei</i> = 32)	23	2	1
Καναμυκίνη (MIC: <i>Plantarum</i> & <i>Paracasei</i> = 64)	24	3	2
Στρεπτομυκίνη (MIC: <i>Plantarum</i> n.r, <i>Paracasei</i> = 64)	-	1	-
Ερυθρομυκίνη (MIC: <i>Plantarum</i> & <i>Paracasei</i> = 1)	1	-	-
Τετρακυκλίνη (MIC: <i>Plantarum</i> = 32, <i>Paracasei</i> = 4)	1	1	1
Χλωραμφενικόλη (MIC: <i>Plantarum</i> = 8 & <i>Paracasei</i> = 4)	3	2	-

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 14 και παρακάτω στο Σχήμα 2, σε όλα τα εξεταζόμενα αντιβιοτικά εμφανίστηκε ανθεκτικότητα. Τα περισσότερα στελέχη βρέθηκαν ανθεκτικά στη Βανκομυκίνη ενώ μόλις ένα στέλεχος ήταν ανθεκτικό στη Στρεπτομυκίνη και την Ερυθρομυκίνη. Ακόμη, ανθεκτικά σε αντιβιοτικά φάνηκαν στελέχη που ανήκουν και στην ομάδα των *Lactobacillus plantarum/ Lactobacillus paraplantarum/ Lactobacillus pentosus* και σε αυτή των *Lactobacillus paracasei/ Lactobacillus casei/ Lactobacillus zeae*.

Συγκεκριμένα, η ανθεκτικότητα των στελεχών των βακτηρίων στα αντιβιοτικά καταγράφηκε ως εξής:

- Στελέχη ανθεκτικά στην Αμπικιλίνη: FjY6-1, FjY6-2, FjY6-4 και FjY6-5 (*Lactobacillus plantarum/ Lactobacillus paraplantarum/ Lactobacillus pentosus*).
- Στελέχη ανθεκτικά στη Βανκομυκίνη: FjY1-1a, FjY1-1b, FjY1-2, FjY1-3a, FjY1-3b, FjY1-4a, FjY1-4b, FjY1-5a, FjY1-5b, FjY2-2, FjY2-3a, FjY2-4a, FjY3-3b, FjY3-4, FjY3-5, FjY4-1, FjY4-2, FjY4-3, FjY4-4, FjY4-5, FjY5-2, FjY5-3, FjY5-4, FjY5-5, FjY6-1, FjY6-2, FjY6-3, FjY6-4, FjY6-5 (*Lactobacillus plantarum/ Lactobacillus paraplantarum/ Lactobacillus pentosus*), FjY3-1, FjY3-2, FjY3-3a (*Lactobacillus paracasei/ Lactobacillus casei/ Lactobacillus zeae*) καθώς και τα μη ταυτοποιημένα FjY2-1a, FjY2-5.
- Στελέχη ανθεκτικά στη Γενταμυκίνη: FjY1-1a, FjY1-1b, FjY1-2, FjY1-3a, FjY1-3b, FjY1-4a, FjY1-4b, FjY1-5a, FjY1-5b, FjY2-2, FjY2-3a, FjY2-4a, FjY3-3b, FjY3-4, FjY3-5, FjY4-1, FjY4-3, FjY4-4, FjY6-1, FjY6-2, FjY6-3, FjY6-4, FjY6-5 (*Lactobacillus plantarum/ Lactobacillus*

paraplantarum/ Lactobacillus pentosus), FjY3-1, FjY3-2 (*Lactobacillus paracasei/ Lactobacillus casei/ Lactobacillus zeae*) καθώς και το μη ταυτοποιημένο FjY2-1a.

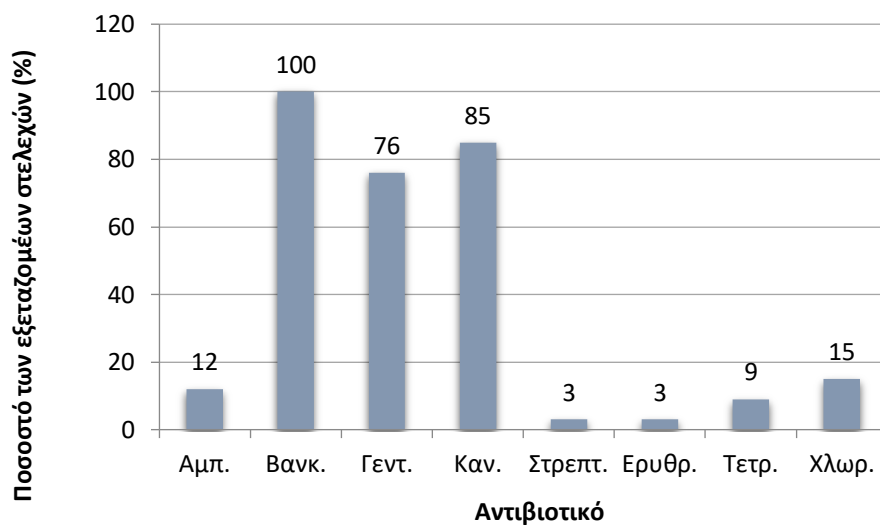
- Στελέχη ανθεκτικά στην Καναμυκίνη: FjY1-1a, FjY1-1b, FjY1-2, FjY1-3a, FjY1-3b, FjY1-4a, FjY1-4b, FjY1-5a, FjY1-5b, FjY2-2, FjY2-3a, FjY2-4a FjY3-3b, FjY3-4, FjY3-5, FjY4-1, FjY4-2, FjY4-3, FjY4-4, FjY4-5, FjY5-2, FjY5-3, FjY5-4, FjY5-5, FjY6-1, FjY6-2, FjY6-3, FjY6-4, FjY6-5 (*Lactobacillus plantarum/ Lactobacillus paraplantarum/ Lactobacillus pentosus*), FjY3-1, FjY3-2, FjY3-3a (*Lactobacillus paracasei/ Lactobacillus casei/ Lactobacillus zeae*) καθώς και τα μη ταυτοποιημένα FjY2-1a, FjY2-5.
- Στέλεχος ανθεκτικό στη Στρεπτομυκίνη: FjY3-2 (*Lactobacillus paracasei/ Lactobacillus casei/ Lactobacillus zeae*)
- Στέλεχος ανθεκτικό στην ερυθρομυκίνη: FjY1-1a (*Lactobacillus plantarum/ Lactobacillus paraplantarum/ Lactobacillus pentosus*)
- Στελέχη ανθεκτικά στην Τετρακυκλίνη: FjY4-2 (*Lactobacillus plantarum/ Lactobacillus paraplantarum/ Lactobacillus pentosus*), FjY3-3a (*Lactobacillus paracasei/ Lactobacillus casei/ Lactobacillus zeae*) καθώς και το μη ταυτοποιημένο FjY2-1a.
- Στελέχη ανθεκτικά στη Χλωραμφενικόλη: FjY2-2, FjY4-2, FjY6-1 (*Lactobacillus plantarum/ Lactobacillus paraplantarum/ Lactobacillus pentosus*) και FjY3-1, FjY3-3a (*Lactobacillus paracasei/ Lactobacillus casei/ Lactobacillus zeae*).

Στον Πίνακα 15 κάθε γράμμα δηλώνει ανθεκτικότητα των στελεχών στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό. Όπου A = Ampicillin (Αμπικιλίνη), V = Vancomycin (Βανκομυκίνη), G = Gentamycin (Γενταμυκίνη), K = Kanamycin (Καναμυκίνη), S = Streptomycin (Στρεπτομυκίνη), E = Erythromycin (Ερυθρομυκίνη), T = Tetracycline (Τετρακυκλίνη) και C = Chloramphenicol (Χλωραμφαινικόλη).

Πίνακας 15. Αναλυτικά αποτελέσματα ελέγχου ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά.

Στέλεχος	ACA-DC number	Είδος	Ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά
FjY1-1a	1492	<i>L. plantarum/paraplantarum/ pentosus</i>	V, G, K, E
FjY1-1b	1493	<i>L. plantarum/paraplantarum/ pentosus</i>	V, G, K
FjY1-2	1494	<i>L. plantarum/paraplantarum/ pentosus</i>	V, G, K
FjY1-3a	1495	<i>L. plantarum/paraplantarum/ pentosus</i>	V, G, K
FjY1-3b	1496	<i>L. plantarum/paraplantarum/ pentosus</i>	V, G, K
FjY1-4a	1497	<i>L. plantarum/paraplantarum/ pentosus</i>	V, G, K
FjY1-4b	1498	<i>L. plantarum/paraplantarum/ pentosus</i>	V, G, K
FjY1-5a	1499	<i>L. plantarum/paraplantarum/ pentosus</i>	V, G, K
FjY1-5b	1501	<i>L. plantarum/paraplantarum/ pentosus</i>	V, G, K
FjY2-1a	1517	<i>L. plantarum/paraplantarum/ pentosus</i>	V, G, K, T

FjY2-2	1518	<i>L. plantarum/paraplantarum/ pentosus</i>	V, G, K, C
FjY2-3a	1526	<i>L. plantarum/paraplantarum/ pentosus</i>	V, G, K
FjY2-4a	1527	<i>L. plantarum/paraplantarum/ pentosus</i>	V, G, K
FjY2-5	1528	<i>L. plantarum/paraplantarum/ pentosus</i>	V, K
FjY3-1	1535	<i>L. paracasei/casei/zeae</i>	V, G, K, C
FjY3-2	1536	<i>L. paracasei/casei/zeae</i>	V, G, K, S
FjY3-3a	1537	<i>L. paracasei/casei/zeae</i>	V, K, T, C
FjY3-3b	1538	<i>L. plantarum/paraplantarum/ pentosus</i>	V, G, K
FjY3-4	1539	<i>L. plantarum/paraplantarum/ pentosus</i>	V, G, K
FjY3-5	1540	<i>L. plantarum/paraplantarum/ pentosus</i>	V, G, K
FjY4-1	1541	<i>L. plantarum/paraplantarum/ pentosus</i>	V, G, K
FjY4-2	1542	<i>L. plantarum/paraplantarum/ pentosus</i>	V, K, T, C
FjY4-3	1543	<i>L. plantarum/paraplantarum/ pentosus</i>	V, G, K
FjY4-4	1544	<i>L. plantarum/paraplantarum/ pentosus</i>	V, G, K
FjY4-5	1545	<i>L. plantarum/paraplantarum/ pentosus</i>	V
FjY5-2	1546	<i>L. plantarum/paraplantarum/ pentosus</i>	V
FjY5-3	1547	<i>L. plantarum/paraplantarum/ pentosus</i>	V
FjY5-4	1548	<i>L. plantarum/paraplantarum/ pentosus</i>	V
FjY5-5	1549	<i>L. plantarum/paraplantarum/ pentosus</i>	V
FjY6-1	1550	<i>L. plantarum/paraplantarum/ pentosus</i>	A, V, G, K, C
FjY6-2	1551	<i>L. plantarum/paraplantarum/ pentosus</i>	A, V, G, K
FjY6-3	1552	<i>L. plantarum/paraplantarum/ pentosus</i>	V, G, K
FjY6-4	1553	<i>L. plantarum/paraplantarum/ pentosus</i>	A, V, G, K
FjY6-5	1554	<i>L. plantarum/paraplantarum/ pentosus</i>	A, V, G, K



Σχήμα 2. Ποσοστιαία απεικόνιση της ανθεκτικότητας των στελεχών σε αντιβιοτικά

Τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη έχουν δύο διαφορετικούς τρόπους δράσης. Επιδρούν στα βακτήρια είτε παρεμποδίζοντας τη σύνθεση των κυτταρικών τους τοιχωμάτων είτε αναστέλλοντας την πρωτεϊνοσύνθεση. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν η Αμπικιλίνη και η Βανκομυκίνη ενώ στη δεύτερη η Γενταμυκίνη, η Καναμυκίνη, η Στρεπτομυκίνη, η Ερυθρομυκίνη, η Τετρακυκλίνη και η Χλωραμφενικόλη (Gueimonde et al., 2013).

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, στελέχη των *Lactobacillus plantarum* και *Lactobacillus paracasei* παρουσιάζουν ανθεκτικότητα έναντι της Βανκομυκίνης (Chang et al., 2009; Argyri et al., 2013) ενώ είναι ευαίσθητα στην Τετρακυκλίνη και τη Χλωραμφενικόλη (Maragkoudakis et al., 2006; Gueimonde et al., 2013). Ακόμη, στελέχη γαλακτοβακίλλων εμφανίζουν ανθεκτικότητα στις αμινογλυκοσίδες, ομάδα αντιμικροβιακών ουσιών στην οποία ανήκουν μεταξύ άλλων η Γενταμυκίνη και η Καναμυκίνη (Argyri et al., 2013; Gueimonde et al., 2013). Στα αμινογλυκοζιδια ανήκει και η Στρεπτομυκίνη η οποία φαίνεται πως είναι αποτελεσματική έναντι στελεχών *Lactobacillus plantarum* και *Lactobacillus paracasei* αν και στην περίπτωση των *Lactobacillus paracasei* έχουν καταγραφεί και ανθεκτικά στελέχη (Klare et al., 2007). Τέλος, αναφορικά με την Αμπικιλίνη και την Ερυθρομυκίνη, στελέχη των *Lactobacillus plantarum* και *Lactobacillus paracasei* χαρακτηρίζονται ως ευαίσθητα (Argyri et al., 2013; Georgieva et al., 2015). Τα βιβλιογραφικά δεδομένα ταιριάζουν με τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης πειραματικής διαδικασίας που παρουσιάστηκαν στον Πίνακα 14.

Όπως αναφέρθηκε στην αρχή της παραγράφου, στη σημερινή εποχή η ανθεκτικότητα των μικροοργανισμών σε αντιμικροβιακές ουσίες, και συγκεκριμένα σε αντιβιοτικά, αποτελεί αντικείμενο προβληματισμού και μελέτης των επιστημόνων και των αρμόδιων φορέων. Στη διαδικασία σχεδιασμού και ανάπτυξης νέων προϊόντων σημαντικότερα είναι τα κριτήρια που ορίζονται ώστε τα προϊόντα αυτά να είναι ασφαλή για τον ανθρώπινο οργανισμό. Εν προκειμένω, δε θα ήταν συνετό να προταθεί για χρήση ως προβιοτικό ένα στέλεχος το οποίο θα εμφάνιζε υψηλή ανθεκτικότητα στα υπάρχοντα αντιβιοτικά. Όλα τα στελέχη που εξετάστηκαν παρουσίασαν ευαισθησία σε ορισμένα

αντιβιοτικά. Για το λόγο αυτό θεωρείται πως η χρησιμοποίηση των στελεχών αυτών δε συνιστά κίνδυνο ως προς την ανθεκτικότητα.

Συγκεντρωτικά αποτελέσματα όλων των δοκιμών που πραγματοποιήθηκαν

Τα αποτελέσματα όλων των *in vitro* ελέγχων που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική μελέτη συνοψίζονται στην επόμενη σελίδα, στον Πίνακα 16.

Για τον έλεγχο της αντιμικροβιακής δράσης αναγράφεται μόνο το στέλεχος που παρουσίασε καθαρή ζώνη διάχυσης. Με (+) αναγράφονται τα στελέχη που ανταποκρίθηκαν θετικά στις δοκιμές ικανότητας υδρόλυσης χολικών αλάτων και πρόσδεσης σε κολλαγόνο. Με (-) χαρακτηρίζονται τα στελέχη που είχαν αντίστοιχα αρνητικά αποτελέσματα. Για τα αντιβιοτικά κάθε γράμμα δηλώνει ανθεκτικότητα των στελεχών στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό.

Πίνακας 16. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα όλων των δοκιμών που πραγματοποιήθηκαν.

Στέλεχος	ACA-DC Number	Είδος	Αντιμικροβιακή δράση	Χαμηλό pH	Χολικά άλατα	Κολλαγόνο	Αντιβιοτικά (ανθεκτικότητα)
FjY1-1a	1492	<i>L.plantarum</i> / <i>L.paraplantarum</i> / <i>L.pentosus</i>	-	Πολύ ανθεκτικό	(+)	(-)	V, G, K, E
FjY1-1b	1493	<i>L.plantarum</i> / <i>L.paraplantarum</i> / <i>L.pentosus</i>	-	Πολύ ανθεκτικό	(+)	(-)	V, G, K
FjY1-2	1494	<i>L.plantarum</i> / <i>L.paraplantarum</i> / <i>L.pentosus</i>	-	Πολύ ανθεκτικό	(+)	(-)	V, G, K
FjY1-3a	1495	<i>L.plantarum</i> / <i>L.paraplantarum</i> / <i>L.pentosus</i>	-	Ευαίσθητο	(+)	(+)	V, G, K
FjY1-3b	1496	<i>L.plantarum</i> / <i>L.paraplantarum</i> / <i>L.pentosus</i>	-	Ευαίσθητο	(+)	(-)	V, G, K
FjY1-4a	1497	<i>L.plantarum</i> / <i>L.paraplantarum</i> / <i>L.pentosus</i>	-	Πολύ ανθεκτικό	(+)	(+)	V, G, K
FjY1-4b	1498	<i>L.plantarum</i> / <i>L.paraplantarum</i> / <i>L.pentosus</i>	-	Ευαίσθητο	(+)	(-)	V, G, K
FjY1-5a	1499	<i>L.plantarum</i> / <i>L.paraplantarum</i> / <i>L.pentosus</i>	-	Ευαίσθητο	(+)	(+)	V, G, K
FjY1-5b	1501	<i>L.plantarum</i> / <i>L.paraplantarum</i> / <i>L.pentosus</i>	-	Ευαίσθητο	(+)	(-)	V, G, K
FjY2-1a	1517	Δεν ταυτοποιήθηκε	-	Ανθεκτικό	(-)	(-)	V, G, K, T
FjY2-2	1518	<i>L.plantarum</i> / <i>L.paraplantarum</i> / <i>L.pentosus</i>	-	Ευαίσθητο	(-)	(-)	V, G, K, C

FjY2-3a	1526	<i>L.plantarum/</i> <i>L.paraplantarum/</i> <i>L.pentosus</i>	-	Ανθεκτικό	(-)	(-)	V, G, K
FjY2-4a	1527	<i>L.plantarum/</i> <i>L.paraplantarum/</i> <i>L.pentosus</i>	Έναντι του <i>Str. thermophilus</i> ACA-DC 4	Ανθεκτικό	(-)	(-)	V, G, K
FjY2-5	1528	Δεν ταυτοποιήθηκε	-	Ανθεκτικό	(-)	(-)	V, K
FjY3-1	1535	<i>L.paracasei/</i> <i>L.casei/</i> <i>L.zeae</i>	-	Ανθεκτικό	(-)	(-)	V, G, K, C
FjY3-2	1536	<i>L.paracasei/</i> <i>L.casei/</i> <i>L.zeae</i>	-	Ευαίσθητο	(-)	(-)	V, G, K, S
FjY3-3a	1537	<i>L.paracasei/L.casei/</i> <i>L.zeae</i>	-	Ευαίσθητο	(-)	(-)	V, K, T, C
FjY3-3b	1538	<i>L.plantarum/</i> <i>L.paraplantarum/</i> <i>L.pentosus</i>	-	Ανθεκτικό	(-)	(-)	V, G, K
FjY3-4	1539	<i>L.plantarum/</i> <i>L.paraplantarum/</i> <i>L.pentosus</i>	-	Ευαίσθητο	(-)	(-)	V, G, K
FjY3-5	1540	<i>L.plantarum/</i> <i>L.paraplantarum/</i> <i>L.pentosus</i>	-	Ανθεκτικό	(-)	(-)	V, G, K
FjY4-1	1541	<i>L.plantarum/</i> <i>L.paraplantarum/</i> <i>L.pentosus</i>	-	Ανθεκτικό	(-)	(-)	V, G, K
FjY4-2	1542	<i>L.plantarum/</i> <i>L.paraplantarum/</i> <i>L.pentosus</i>	-	Ανθεκτικό	(-)	(-)	V, K, T, C
FjY4-3	1543	<i>L.plantarum/</i> <i>L.paraplantarum/</i> <i>L.pentosus</i>	-	Ανθεκτικό	(-)	(-)	V, G, K
FjY4-4	1544	<i>L.plantarum/</i> <i>L.paraplantarum/</i> <i>L.pentosus</i>	-	Ανθεκτικό	(-)	(-)	V, G, K
FjY4-5	1545	<i>L.plantarum/</i> <i>L.paraplantarum/</i> <i>L.pentosus</i>	-	Ανθεκτικό	(-)	(-)	V
FjY5-2	1546	<i>L.plantarum/</i> <i>L.paraplantarum/</i> <i>L.pentosus</i>	-	Ανθεκτικό	(-)	(-)	V
FjY5-3	1547	<i>L.plantarum/</i> <i>L.paraplantarum/</i> <i>L.pentosus</i>	-	Ανθεκτικό	(-)	(-)	V
FjY5-4	1548	<i>L.plantarum/</i> <i>L.paraplantarum/</i> <i>L.pentosus</i>	-	Ανθεκτικό	(-)	(-)	V
FjY5-5	1549	<i>L.plantarum/</i> <i>L.paraplantarum/</i> <i>L.pentosus</i>	-	Ανθεκτικό	(-)	(+)	V
FjY6-1	1550	<i>L.plantarum/</i> <i>L.paraplantarum/</i> <i>L.pentosus</i>	-	Ανθεκτικό	(+)	(+)	A, V, G, K, C
FjY6-2	1551	<i>L.plantarum/</i> <i>L.paraplantarum/</i> <i>L.pentosus</i>	-	Ανθεκτικό	(+)	(+)	A, V, G, K

FjY6-3	1552	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>	-	Ανθεκτικό	(+)	(+)	V, G, K
FjY6-4	1553	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>	-	Ανθεκτικό	(+)	(+)	A, V, G, K
FjY6-5	1554	<i>L.plantarum/ L.paraplantarum/ L.pentosus</i>	-	Ανθεκτικό	(+)	(+)	A, V, G, K

Δ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη αντικείμενο έρευνας αποτέλεσε το μικροβίωμα δείγματος γιαούρτης που παρασκευάστηκε στα Νησιά Fiji. Αρχικά, έγινε η ταυτοποίηση των απομονωθέντων στελεχών βακτηρίων και ζυμών του δείγματος και ακολούθησαν η εξέταση του προβιοτικού δυναμικού καθώς και της ασφάλειας των βακτηριακών στελεχών.

Αναφορικά με τη διερεύνηση του προβιοτικού δυναμικού των στελεχών των βακτηρίων:

- Από τον έλεγχο της αντιμικροβιακής δράσης προέκυψε πως μόνο ένα στέλεχος της ομάδας των *Lactobacillus plantarum/ Lactobacillus paraplantarum/ Lactobacillus pentosus* παρουσίασε σαφή αντιμικροβιακή δράση, συγκεκριμένα έναντι του *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 4.
- Από τον έλεγχο της ανθεκτικότητας σε χαμηλό pH προέκυψε πως τα περισσότερα στελέχη (73,5%) ήταν ανθεκτικά στο pH 2.5 μετά την παραμονή τους σε αυτό για χρονικό διάστημα 2 ωρών. Μεταξύ αυτών στελέχη και των δύο ομάδων (*Lactobacillus plantarum/ Lactobacillus paraplantarum/ Lactobacillus pentosus* και *Lactobacillus paracasei/ Lactobacillus casei/ Lactobacillus zeae*).
- Από τον έλεγχο της υδρόλυσης χολικών αλάτων προέκυψε πως περίπου τα μισά στελέχη της ομάδας των *Lactobacillus plantarum/ Lactobacillus paraplantarum/ Lactobacillus pentosus* (48,3%) ήταν δυνατόν να επιφέρουν την υδρόλυση των χολικών αλάτων. Αρνητική ήταν η δοκιμασία για όλα τα στελέχη της ομάδας των *Lactobacillus plantarum/ Lactobacillus paraplantarum/ Lactobacillus pentosus*.
- Από τον έλεγχο της ικανότητας πρόσδεσης σε κολλαγόνο προέκυψε πως και σε αυτήν την περίπτωση μόνο στελέχη της ομάδας των *Lactobacillus plantarum/ Lactobacillus paraplantarum/ Lactobacillus pentosus* ανταποκρίθηκαν θετικά στη δοκιμασία και συγκεκριμένα το 31% των στελεχών της ομάδας αυτής.

Αναφορικά με τη διερεύνηση της ασφάλειας των στελεχών των βακτηρίων:

- Από τον έλεγχο της ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά προέκυψε πως στελέχη και των δύο ομάδων (*Lactobacillus plantarum/ Lactobacillus paraplantarum/ Lactobacillus pentosus, Lactobacillus paracasei/ Lactobacillus casei/ Lactobacillus zeae*) παρουσίασαν ανθεκτικότητα. Η μεγαλύτερη ανθεκτικότητα παρατηρήθηκε στα αντιβιοτικά Βανκομυκίνη, Γενταμυκίνη και Καναμυκίνη ενώ η μικρότερη στις Αμπικιλίνη, Στρεπτομυκίνη, Ερυθρομυκίνη, Τετρακυκλίνη και Χλωραμφενικόλη. Δεν υπήρξε κανένα στέλεχος που να μη βρέθηκε ανθεκτικό σε κάποιο από τα αντιβιοτικά αυτά.

Βάσει των ανωτέρω αποτελεσμάτων, φαίνεται πως στελέχη της ομάδας των *Lactobacillus plantarum/ Lactobacillus paraplantarum/ Lactobacillus pentosus* που εξετάστηκαν, διαθέτουν σημαντικές προβιοτικές ιδιότητες. Προτείνεται η πραγματοποίηση *in vivo* δοκιμών σε ζωικά μοντέλα ώστε να επιβεβαιωθεί το προβιοτικό τους δυναμικό και ενδεχομένως να μπορούν να χρησιμοποιηθούν μελλοντικά ως προβιοτικές καλλιέργειες. Η περαιτέρω διερεύνηση του προβιοτικού τους δυναμικού πρέπει να γίνει συναξιολογώντας παράλληλα την ασφάλειά τους για τον ανθρώπινο οργανισμό.

E. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Ahtesh, F. B., Stojanovska, L., & Apostolopoulos, V. (2018). Processing and sensory characteristics of a fermented low-fat skim milk drink containing bioactive antihypertensive peptides, a functional milk product. *International Journal of Dairy Technology*, 71, 230-239.
2. Ahtesh, F. B., Stojanovska, L., Mathai, M. L., Apostolopoulos, V., & Mishra, V. K. (2016). Proteolytic and angiotensin-converting enzyme-inhibitory activities of selected probiotic bacteria. *International journal of food science & technology*, 51(4), 865-874.
3. Aktypis, A., Kalantzopoulos, G., Huis In't Veld, J. H. J., & Ten Brink, B. (1998). Purification and characterization of thermophilin T, a novel bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0040. *Journal of applied Microbiology*, 84(4), 568-576.
4. Alegría, Á., Delgado, S., Flórez, A. B., & Mayo, B. (2013). Identification, typing, and functional characterization of *Leuconostoc* spp. strains from traditional, starter-free cheeses. *Dairy Science & Technology*, 93(6), 657-673.
5. Anastasiou, R., Georgalaki, M., Manolopoulou, E., Kandarakis, I., De Vuyst, L., & Tsakalidou, E. (2007). The performance of *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198 as starter culture in Kasserli cheese production. *International dairy journal*, 17(3), 208-217.
6. Antonsson, M., Molin, G., & Ardö, Y. (2003). *Lactobacillus* strains isolated from Danbo cheese as adjunct cultures in a cheese model system. *International Journal of Food Microbiology*, 85(1-2), 159-169.
7. Aponte, M., Fusco, V., Andolfi, R., & Coppola, S. (2008). Lactic acid bacteria occurring during manufacture and ripening of Provolone del Monaco cheese: Detection by different analytical approaches. *International Dairy Journal*, 18(4), 403-413.
8. Argyri, A. A., Zoumpopoulou, G., Karatzas, K. A. G., Tsakalidou, E., Nychas, G. J. E., Panagou, E. Z., & Tassou, C. C. (2013). Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests. *Food microbiology*, 33(2), 282-291.
9. Azad, M., Kalam, A., Sarker, M., Li, T., & Yin, J. (2018). Probiotic Species in the Modulation of Gut Microbiota: An Overview. *BioMed research international*, 2018.
10. Babel, F. J. (1953). The role of fungi in cheese ripening. *Economic Botany*, 7(1), 27-42.
11. Beresford, T. P., Fitzsimons, N. A., Brennan, N. L., & Cogan, T. M. (2001). Recent advances in cheese microbiology. *International dairy journal*, 11(4-7), 259-274.
12. Buchanan, R. E., & Gibbons, N. E. (1974). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* 8th Ed Williams and Wilkins Co. *Baltimore, USA*.
13. Bermudez-Brito, M., Plaza-Díaz, J., Muñoz-Quezada, S., Gómez-Llorente, C., & Gil, A. (2012). Probiotic mechanisms of action. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 61(2), 160-174.
14. Betts, G. (2006). Other spoilage bacteria. In *Food spoilage microorganisms* (pp. 668-693).

15. Bikash, C., Ghosh, T., Sienkiewicz, T., & Krenkel, K. (2000). *Brevibacterium linens*-a useful enzyme producer for cheese: a review. *Milchwissenschaft*, 55(11), 628-632.
16. Björkroth, J., Dicks, L. M., Endo, A., & Holzapfel, W. H. (2014). The genus *Leuconostoc*. *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy*, 391-404.
17. Bolotin, A., Wincker, P., Mauger, S., Jaillon, O., Malarme, K., Weissenbach, J., ... & Sorokin, A. (2001). The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome research*, 11(5), 731-753.
18. Brunner, J. R., Webb, B. H., Johnson, A. H., & Alford, J. A. (1974). *Fundamentals of Dairy Chemistry*. by BH Webb, AH Johnson and JA Alford, the Avi Pub. Co., Inc., Westport, Connecticut, 474.
19. Callon, C., Duthoit, F., Delbès, C., Ferrand, M., Le Frileux, Y., De Crémoux, R., & Montel, M. C. (2007). Stability of microbial communities in goat milk during a lactation year: molecular approaches. *Systematic and applied microbiology*, 30(7), 547-560.
20. Castillo, N. A., Perdigón, G., & de LeBlanc, A. D. M. (2011). Oral administration of a probiotic *Lactobacillus* modulates cytokine production and TLR expression improving the immune response against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in mice. *BMC microbiology*, 11(1), 177.
21. Chand, D., Avinash, V. S., Yadav, Y., Pundle, A. V., Suresh, C. G., & Ramasamy, S. (2017). Molecular features of bile salt hydrolases and relevance in human health. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1861(1), 2981-2991
22. Chang, L. I. U., Zhang, Z. Y., Ke, D. O. N. G., Jian-Ping, Y. U. A. N., & Xiao-Kui, G. U. O. (2009). Antibiotic resistance of probiotic strains of lactic acid bacteria isolated from marketed foods and drugs. *Biomedical and Environmental Sciences*, 22(5), 401-412.
23. Chen, Z. F., Ai, L. Y., Wang, J. L., Ren, L. L., Yu, Y. N., Xu, J., ... & Ma, X. (2015). Probiotics *Clostridium butyricum* and *Bacillus subtilis* ameliorate intestinal tumorigenesis. *Future microbiology*, 10(9), 1433-1445.
24. Corsetti, A., Lavermicocca, P., Morea, M., Baruzzi, F., Tosti, N., & Gobbetti, M. (2001). Phenotypic and molecular identification and clustering of lactic acid bacteria and yeasts from wheat (species *Triticum durum* and *Triticum aestivum*) sourdoughs of Southern Italy. *International journal of food microbiology*, 64(1-2), 95-104.
25. Courtin, P., & Rul, F. (2004). Interactions between microorganisms in a simple ecosystem: yogurt bacteria as a study model. *Le Lait*, 84(1-2), 125-134.
26. Crittenden, R. G., Martinez, N. R., & Playne, M. J. (2003). Synthesis and utilisation of folate by yoghurt starter cultures and probiotic bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 80(3), 217-222.
27. Cryan, J. F. (2016). Stress and the microbiota-gut-brain axis: an evolving concept in psychiatry.
28. Cryan, J. F., & Dinan, T. G. (2012). Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nature reviews neuroscience*, 13(10), 701.
29. da Silva-Filho, E. A., Dos Santos, S. K. B., do Monte Resende, A., De Moraes, J. O. F., De Moraes, M. A., & Simões, D. A. (2005). Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 88(1), 13-23.

30. da Silva-Filho, E. A., Dos Santos, S. K. B., do Monte Resende, A., De Moraes, J. O. F., De Moraes, M. A., & Simões, D. A. (2005). Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 88(1), 13-23.
31. De Vuyst, L., & Tsakalidou, E. (2008). *Streptococcus macedonicus*, a multi-functional and promising species for dairy fermentations. *International dairy journal*, 18(5), 476-485.
32. Delgado, S., Rachid, C. T., Fernández, E., Rychlik, T., Alegría, Á., Peixoto, R. S., & Mayo, B. (2013). Diversity of thermophilic bacteria in raw, pasteurized and selectively-cultured milk, as assessed by culturing, PCR-DGGE and pyrosequencing. *Food microbiology*, 36(1), 103-111.
33. Derzelle, S., Bolotin, A., Mistou, M. Y., & Rul, F. (2005). Proteome analysis of *Streptococcus thermophilus* grown in milk reveals pyruvate formate-lyase as the major upregulated protein. *Applied and environmental microbiology*, 71(12), 8597-8605.
34. Dhaisne, A., Guellerin, M., Laroute, V., Laguerre, S., Cocaign-Bousquet, M., Le Bourgeois, P., & Loubiere, P. (2013). Genotypic and phenotypic analysis of dairy *Lactococcus lactis* biodiversity in milk: Volatile Organic Compounds as discriminating markers. *Applied and environmental microbiology*, AEM-01018.
35. Donelli, G., Vuotto, C., & Mastromarino, P. (2013). Phenotyping and genotyping are both essential to identify and classify a probiotic microorganism. *Microbial ecology in health and disease*, 24(1), 20105.
36. Dong, J. Y., Zhang, L., He, K., & Qin, L. Q. (2011). Dairy consumption and risk of breast cancer: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Breast cancer research and treatment*, 127(1), 23-31.
37. Driessen, F. M., Kingma, F., & Stadhouders, J. (1982). Evidence that *Lactobacillus bulgaricus* in yogurt is stimulated by carbon dioxide produced by *Streptococcus thermophilus*. *Netherlands Milk and Dairy Journal (Netherlands)*.
38. Eales, J., Lenoir-Wijnkoop, I., King, S., Wood, H., Kok, F. J., Shamir, R., ... & Atkinson, R. L. (2016). Is consuming yoghurt associated with weight management outcomes? Results from a systematic review. *International Journal of Obesity*, 40(5).
39. El Kafsi, H., Binesse, J., Loux, V., Buratti, J., Boudebbouze, S., Dervyn, R., ... & Moumen, B. (2014). *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* and ssp. *bulgaricus*: a chronicle of evolution in action. *BMC genomics*, 15(1), 407.
40. EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). (2012). Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. *EFSA Journal*, 10(6), 2740.
41. Falentin, H., Deutsch, S. M., Loux, V., Hammani, A., Buratti, J., Parayre, S., ... & Le Loir, Y. (2016). Permanent draft genome sequence of the probiotic strain *Propionibacterium freudenreichii* CIRM-BIA 129 (ITG P20). *Standards in genomic sciences*, 11(1), 6.
42. FAO/WHO, 1977a. Code of principles concerning milk and milk products. Draft standard for yoghurt and sweetened yoghurt. (Standard noA – 11a, Step 7).
43. Fernandes, C. F., & Shakani, K. M. (1990). Anticarcinogenic and immunological properties of dietary lactobacilli. *Journal of Food Protection*, 53(8), 704-710.
44. Fijan, S. (2014). Microorganisms with claimed probiotic properties: an overview of recent literature. *International journal of environmental research and public health*, 11(5), 4745-4767.

45. Fleet, G. H. (1990). Yeasts in dairy products. *Journal of applied bacteriology*, 68(3), 199-211.
46. Flint, S., Brooks, J., Bremer, P., Walker, K., & Hausman, E. (2002). The resistance to heat of thermo-resistant streptococci attached to stainless steel in the presence of milk. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 28(3), 134-136.
47. Flórez, A. B., Campedelli, I., Delgado, S., Alegría, Á., Salvetti, E., Felis, G. E., ... & Torriani, S. (2016). Antibiotic susceptibility profiles of dairy *Leuconostoc*, analysis of the genetic basis of atypical resistances and transfer of genes in vitro and in a food matrix. *PloS one*, 11(1), e0145203.
48. Frantz, C., Stewart, K. M., & Weaver, V. M. (2010). The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci*, 123(24), 4195-4200.
49. Franz, C. M., Huch, M., Abriouel, H., Holzapfel, W., & Galvez, A. (2011). Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *International journal of food microbiology*, 151(2), 125-140.
50. Frisvad, J. C., Smedsgaard, J., Larsen, T. O., & Samson, R. A. (2004). Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. *Stud. Mycol*, 49, 201-241.
51. Fuller, R., AFRC., (1989). "Probiotics in man and animals." *Journal of applied bacteriology* 66(5), 365-378.
52. Garnier, L., Valence, F., Pawtowski, A., Auhustsinava-Galerie, L., Frotté, N., Baroncelli, R., ... & Mounier, J. (2017). Diversity of spoilage fungi associated with various French dairy products. *International journal of food microbiology*, 241, 191-197.
53. Gaya P, Babin M, Medina M, Nunez M. (1999). Diversity among lacto- cocci isolated from ewes' raw milk and cheese. *J. Appl. Microbiol.* 87:849 – 855.
54. Georgalaki, M. D., Van den Berghe, E., Kritikos, D., Devreese, B., Van Beumen, J., Kalantzopoulos, G., ... & Tsakalidou, E. (2002). Macedocin, a food-grade lantibiotic produced by *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(12), 5891-5903.
55. Georgalaki, M., Zoumpopoulou, G., Mavrogonatou, E., Van Driessche, G., Alexandraki, V., Anastasiou, R., ... & Devreese, B. (2017). Evaluation of the antihypertensive angiotensin-converting enzyme inhibitory (ACE-I) activity and other probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from traditional Greek dairy products. *International Dairy Journal*, 75, 10-21.
56. Georgieva, R., Yocheva, L., Tserovska, L., Zhelezova, G., Stefanova, N., Atanasova, A., ... & Karaivanova, E. (2015). Antimicrobial activity and antibiotic susceptibility of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* spp. intended for use as starter and probiotic cultures. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 29(1), 84-91.
57. Gheziel, C., Russo, P., Arena, M. P., Spano, G., Ouzari, H. I., Kheroua, O., ... & Capozzi, V. (2018). Evaluating the Probiotic Potential of *Lactobacillus plantarum* Strains from Algerian Infant Feces: Towards the Design of Probiotic Starter Cultures Tailored for Developing Countries. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 1-11.
58. Giraffa, G. (2014). *Lactobacillus helveticus*: importance in food and health. *Frontiers in microbiology*, 5, 338.
59. Gobbetti, M., De Angelis, M., Di Cagno, R., Mancini, L., & Fox, P. F. (2015). Pros and cons for using non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) as secondary/adjunct starters for cheese ripening. *Trends in Food Science & Technology*, 45(2), 167-178.

60. Goldstein, E. J., Tyrrell, K. L., & Citron, D. M. (2015). Lactobacillus species: taxonomic complexity and controversial susceptibilities. *Clinical Infectious Diseases*, 60(suppl_2), S98-S107.
61. Goldstein, E. J., Tyrrell, K. L., & Citron, D. M. (2015). Lactobacillus species: taxonomic complexity and controversial susceptibilities. *Clinical Infectious Diseases*, 60(suppl_2), S98-S107.
62. Gonzalez, C. J., Encinas, J. P., Garcia-López, M. L., & Otero, A. (2000). Characterization and identification of lactic acid bacteria from freshwater fishes. *Food Microbiology*, 17(4), 383-391.
63. Gu, C. T., Wang, F., Li, C. Y., Liu, F., & Huo, G. C. (2012). *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *suonicum* subsp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 62(7), 1548-1551.
64. Gueimonde, M., Sánchez, B., de los Reyes-Gavilán, C. G., & Margolles, A. (2013). Antibiotic resistance in probiotic bacteria. *Frontiers in microbiology*, 4, 202.
65. Gurses, M., & Erdogan, A. (2006). Identification of lactic acid bacteria isolated from Tulum cheese during ripening period. *International Journal of Food Properties*, 9(3), 551-557.
66. Gürtler, V., & Stanisich, V. A. (1996). New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology*, 142(1), 3-16.
67. Hammes, W. P., & Vogel, R. F. (1995). The genus *Lactobacillus*. In *The genera of lactic acid bacteria* (pp. 19-54). Springer, Boston, MA.
68. Hayashi, A., Kimura, M., Nakamura, Y., & Yasui, H. (2009). Anti-atopic dermatitis effects and the mechanism of lactic acid bacteria isolated from Mongolian fermented milk. *Journal of dairy research*, 76(2), 158-164.
69. Heineman, P. G. (1920). Orla-Jensen's Classification of Lactic Acid Bacteria. *Journal of Dairy Science*, 3(2), 143-155.
70. Hemme, D., & Foucaud-Scheunemann, C. (2004). *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. *International Dairy Journal*, 14(6), 467-494.
71. Hiett, K. L., & Seal, B. S. (2009). Use of repetitive element palindromic PCR (rep-PCR) for the epidemiologic discrimination of foodborne pathogens. In *Molecular Epidemiology of Microorganisms* (pp. 49-58). Humana Press, Totowa, NJ.
72. Hill, D., Sugrue, I., Tobin, C., Hill, C., Stanton, C., & Ross, R. P. (2018). The *Lactobacillus casei* group: history and health related applications. *Frontiers in microbiology*, 9.
73. International Dairy Federation, 1969. Compositional standards for fermented milks. International standard FIL-IDF. 47:1969. Brussels, Belgium
74. Iweriebor, B. C., Gaqavu, S., Obi, L. C., Nwodo, U. U., & Okoh, A. I. (2015). Antibiotic susceptibilities of *Enterococcus* species isolated from hospital and domestic wastewater effluents in Alice, Eastern Cape Province of South Africa. *International journal of environmental research and public health*, 12(4), 4231-4246.
75. J.A. Narvhus, L. Axelsson, in *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (Second Edition), 2003. "Lactic Acid Bacteria".
76. Jacouton, E., Chain, F., Sokol, H., Langella, P., & Bermudez-Humaran, L. G. (2017). Probiotic strain *Lactobacillus casei* BL23 prevents colitis-associated colorectal cancer. *Frontiers in immunology*, 8, 1553.
77. Janik, R., Thomason, L. A., Stanisiz, A. M., Forsythe, P., Bienenstock, J., & Stanisiz, G. J. (2016). Magnetic resonance spectroscopy reveals oral *Lactobacillus*

- promotion of increases in brain GABA, N-acetyl aspartate and glutamate. *Neuroimage*, 125, 988-995.
78. Joerger, M. C., & Klaenhammer, T. R. (1986). Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. *Journal of bacteriology*, 167(2), 439-446.
 79. Joint FAO/WHO Working Group, & Joint FAO/WHO Working Group. (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food. *London: World Health Organization, ON, Canada: Food and Agriculture Organization*.
 80. Kato-Kataoka, A., Nishida, K., Takada, M., Kawai, M., Kikuchi-Hayakawa, H., Suda, K., ... & Kushi, A. (2016). Fermented milk containing *Lactobacillus casei* strain Shirota preserves the diversity of the gut microbiota and relieves abdominal dysfunction in healthy medical students exposed to academic stress. *Applied and environmental microbiology*, AEM-04134.
 81. Khalid, K. (2011). An overview of lactic acid bacteria. *International journal of Biosciences*, 1(3), 1-13.
 82. Kim, J., Lee, B. S., Kim, B., Na, I., Lee, J., Lee, J. Y., ... & Ahn, K. (2017). Identification of atopic dermatitis phenotypes with good responses to probiotics (*Lactobacillus plantarum* CJLP133) in children. *Beneficial microbes*, 8(5), 755-761.
 83. Kim, M., & Chun, J. (2014). 16S rRNA gene-based identification of bacteria and archaea using the EzTaxon server. In *Methods in Microbiology* (Vol. 41, pp. 61-74). Academic Press.
 84. Kim, W. S., Ren, J., & Dunn, N. W. (1999). Differentiation of *Lactococcus lactis* subspecies *lactis* and subspecies *cremoris* strains by their adaptive response to stresses. *FEMS Microbiology Letters*, 171(1), 57-65.
 85. Kimoto, H., Nomura, M., & Suzuki, I. (1999). Growth energetics of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* in cometabolism of citrate and glucose. *International dairy journal*, 9(12), 857-863.
 86. Kopsahelis, N., Nisiotou, A., Kourkoutas, Y., Panas, P., Nychas, G. J. E., & Kanellaki, M. (2009). Molecular characterization and molasses fermentation performance of a wild yeast strain operating in an extremely wide temperature range. *Bioresource technology*, 100(20), 4854-4862.
 87. Klare, I., Konstabel, C., Werner, G., Huys, G., Vankerckhoven, V., Kahlmeter, G., ... & Goossens, H. (2007). Antimicrobial susceptibilities of *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Lactococcus* human isolates and cultures intended for probiotic or nutritional use. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 59(5), 900-912.
 88. Korabecna, M. (2007). The variability in the fungal ribosomal DNA (ITS1, ITS2, and 5.8 S rRNA gene): its biological meaning and application in medical mycology. *Communicating current research and educational topics and trends in applied microbiology*, 2, 783-787.
 89. Kozaki, M., Uchimura, T., & Okada, S. (1992). Experimental manual of lactic acid bacteria. *Asakurasyoten, Tokyo, Japan*, 34-37.
 90. Kristoffersen, S. M., Ravnum, S., Tourasse, N. J., Økstad, O. A., Kolstø, A. B., & Davies, W. (2007). Low concentrations of bile salts induce stress responses and reduce motility in *Bacillus cereus* ATCC 14570. *Journal of bacteriology*, 189(14), 5302-5313.
 91. Kwon, H. K., Lee, C. G., So, J. S., Chae, C. S., Hwang, J. S., Sahoo, A., ... & Im, S. H. (2010). Generation of regulatory dendritic cells and CD4⁺ Foxp3⁺ T cells by probiotics administration suppresses immune disorders. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(5), 2159-2164.

92. Larpin-Laborde, S., Imran, M., Bonaïti, C., Bora, N., Gelsomino, R., Goerges, S., ... & Swings, J. (2011). Surface microbial consortia from Livarot, a French smear-ripened cheese. *Canadian journal of microbiology*, 57(8), 651-660.
93. Lederberg, J., & McCray, A. T. (2001). Ome SweetOmics--A Genealogical Treasury of Words. *The Scientist*, 15(7), 8-8.
94. Lee, A., Lee, Y. J., Yoo, H. J., Kim, M., Chang, Y., Lee, D. S., & Lee, J. H. (2017). Consumption of dairy yogurt containing *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei*, *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* and heat-treated *Lactobacillus plantarum* improves immune function including natural killer cell activity. *Nutrients*, 9(6), 558.
95. Lee, J. H., & O'Sullivan, D. J. (2010). Genomic insights into bifidobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(3), 378-416.
96. Lee, Y. J., Lee, A., Yoo, H. J., Kim, M., Noh, G. M., & Lee, J. H. (2018). Supplementation with the probiotic strain *Weissella cibaria* JW15 enhances natural killer cell activity in nondiabetic subjects. *Journal of Functional Foods*, 48, 153-158.
97. Leite, A. M. D. O., Miguel, M. A. L., Peixoto, R. S., Rosado, A. S., Silva, J. T., & Paschoalin, V. M. F. (2013). Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(2), 341-349.
98. Lilly, D. M., & Stillwell, R. H. (1965). Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science*, 147(3659), 747-748.
99. Liu, W., Bao, Q., Qing, M., Chen, X., Sun, T., Li, M., ... & Zhang, H. (2012). Isolation and identification of lactic acid bacteria from Tarag in Eastern Inner Mongolia of China by 16S rRNA sequences and DGGE analysis. *Microbiological research*, 167(2), 110-115.
100. Lozo, J., Vukasinovic, M., Strahinic, I., & Topisirovic, L. (2004). Characterization and antimicrobial activity of bacteriocin 217 produced by natural isolate *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGBUK2-16. *Journal of food protection*, 67(12), 2727-2734.
101. Maldonado Galdeano, M. C., Dumit, L., María, J., Thieblemont, N., Carmuega, E., Weill, R., & Perdigon, G. D. V. (2015). Stimulation of innate immune cells induced by probiotics: participation of toll-like receptors.
102. Maragkoudakis, P. A., Zoumpopoulou, G., Miaris, C., Kalantzopoulos, G., Pot, B., & Tsakalidou, E. (2006). Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *International Dairy Journal*, 16(3), 189-199.
103. McCann, S. E., Hays, J., Baumgart, C. W., Weiss, E. H., Yao, S., & Ambrosone, C. B. (2017). Usual Consumption of Specific Dairy Foods Is Associated with Breast Cancer in the Roswell Park Cancer Institute Data Bank and BioRepository1. *Current Developments in Nutrition*, 1(3), e000422.
104. Mentis, A. & Gypas, F. (2013). Human enteric microbiome: Its role in health and disease. *Archives of Hellenic Medicine/Arheia Ellenikes Iatrikes*, 30(3).
105. Messaoudi, M., Lalonde, R., Violle, N., Javelot, H., Desor, D., Nejdi, A., ... & Cazaubiel, J. M. (2011). Assessment of psychotropic-like properties of a probiotic formulation (*Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175) in rats and human subjects. *British Journal of Nutrition*, 105(5), 755-764.
106. Messaoudi, M., Violle, N., Bisson, J. F., Desor, D., Javelot, H., & Rougeot, C. (2011). Beneficial psychological effects of a probiotic formulation (*Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175) in healthy human volunteers. *Gut microbes*, 2(4), 256-261.

107. Meydani, S. N., & Ha, W. K. (2000). Immunologic effects of yogurt-. *The American journal of clinical nutrition*, 71(4), 861-872.
108. Mikov, M. M., Stojančević, M. P., & Bojić, G. M. (2014). Probiotics as a promising treatment for inflammatory bowel disease. *Hospital Pharmacology-International Multidisciplinary Journal*, 1(1), 52-60.
109. Minervini, F., Montagna, M. T., Spilotros, G., Monaci, L., Santacroce, M. P., & Visconti, A. (2001). Survey on mycoflora of cow and buffalo dairy products from Southern Italy. *International journal of food microbiology*, 69(1-2), 141-1
110. Miquel, S., Martin, R., Rossi, O., Bermudez-Humaran, L. G., Chatel, J. M., Sokol, H., ... & Langella, P. (2013). Faecalibacterium prausnitzii and human intestinal health. *Current opinion in microbiology*, 16(3), 255-261.
111. Morandi, S., Brasca, M., Alfieri, P., Lodi, R., & Tamburini, A. (2005). Influence of pH and temperature on the growth of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Le Lait*, 85(3), 181-192.
112. Moreno, M. F., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., & De Vuyst, L. (2006). The role and application of enterococci in food and health. *International journal of food microbiology*, 106(1), 1-24.
113. Mounier, J., Coton, M., Irlinger, F., Landaud, S., & Bonnarme, P. (2017). Smear-ripened cheeses. In *Cheese (Fourth Edition)* (pp. 955-996).
114. Mukherjee, S., & Ramesh, A. (2015). Bacteriocin-producing strains of *Lactobacillus plantarum* inhibit adhesion of *Staphylococcus aureus* to extracellular matrix: quantitative insight and implications in antibacterial therapy. *Journal of medical microbiology*, 64(12), 1514-1526.
115. Nieto-Arribas, P., Seseña, S., Poveda, J. M., Palop, L., & Cabezas, L. (2010). Genotypic and technological characterization of *Leuconostoc* isolates to be used as adjunct starters in Manchego cheese manufacture. *Food Microbiology*, 27(1), 85-93.
116. Nole, K. L. B., Yim, E., & Keri, J. E. (2014). Probiotics and prebiotics in dermatology. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 71(4), 814-821.
117. Nova, E., Wärnberg, J., Gómez-Martínez, S., Díaz, L. E., Romeo, J., & Marcos, A. (2007). Immunomodulatory effects of probiotics in different stages of life. *British Journal of Nutrition*, 98(S1), S90-S95.
118. Ntougias, S., Zervakis, G. I., Ehaliotis, C., Kavroulakis, N., & Papadopoulou, K. K. (2006). Ecophysiology and molecular phylogeny of bacteria isolated from alkaline two-phase olive mill wastes. *Research in microbiology*, 157(4), 376-385.
119. Osadchiy, V., Martin, C. R., & Mayer, E. A. (2018). The Gut-Brain Axis and the Microbiome: Mechanisms and Clinical Implications. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*.
120. Pacini, F., Cariolato, D., Andrighetto, C., & Lombardi, A. (2006). Occurrence of *Streptococcus macedonicus* in Italian cheeses. *FEMS microbiology letters*, 261(1), 69-73.
121. Pala, V., Sieri, S., Berrino, F., Vineis, P., Sacerdote, C., Palli, D., ... & Giurdanella, M. C. (2011). Yogurt consumption and risk of colorectal cancer in the Italian European prospective investigation into cancer and nutrition cohort. *International journal of cancer*, 129(11), 2712-2719.
122. Papadimitriou, K., Alegría, Á., Bron, P. A., De Angelis, M., Gobbetti, M., Kleerebezem, M., ... & Turróni, F. (2016). Stress physiology of lactic acid bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(3), 837-890.

123. Papadimitriou, K., Zoumpopoulou, G., Foligné, B., Alexandraki, V., Kazou, M., Pot, B., & Tsakalidou, E. (2015). Discovering probiotic microorganisms: in vitro, in vivo, genetic and omics approaches. *Frontiers in microbiology*, 6, 58.
124. Papadopoulou, O. S., & Chorianopoulos, N. G. (2016). Production of a Functional Fresh Cheese Enriched with the Probiotic Strain Lb. Plantarum T571 Isolated From Traditional Greek Product. *Current Research in Nutrition and Food Science Journal*, 4(Special Issue Nutrition in Conference October 2016), 169-181.
125. Parente, E., Ciocia, F., Ricciardi, A., Zotta, T., Felis, G. E., & Torriani, S. (2010). Diversity of stress tolerance in *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus paraplantarum*: a multivariate screening study. *International journal of food microbiology*, 144(2), 270-279.
126. Park, K. M., & Cifelli, C. J. (2013). Dairy and blood pressure: a fresh look at the evidence. *Nutrition reviews*, 71(3), 149-157.
127. Pascal, M., Perez-Gordo, M., Caballero, T., Escribese, M. M., Longo, M. N. L., Luengo, O., ... & Labrador, M. (2018). Microbiome and allergic diseases. *Frontiers in immunology*, 9.
128. Pedersen, T. B., Kot, W. P., Hansen, L. H., Sørensen, S. J., Broadbent, J. R., Vogensen, F. K., & Ardö, Y. (2014). Genome sequences of two *Leuconostoc pseudomesenteroides* strains isolated from danish dairy starter cultures. *Genome announcements*, 2(3), e00484-14.
129. Pidot, S. J., Gao, W., Buultjens, A. H., Monk, I. R., Guerillot, R., Carter, G. P., ... & Mahony, A. A. (2018). Increasing tolerance of hospital *Enterococcus faecium* to handwash alcohols. *Science Translational Medicine*, 10(452), eaar6115.
130. Pitt, J. I. (2000). Toxigenic fungi and mycotoxins. *British medical bulletin*, 56(1), 184-192.
131. Pot, B., Felis, G. E., De Bruyne, K., Tsakalidou, E., Papadimitriou, K., Leisner, J., & Vandamme, P. (2014). The genus *Lactobacillus*. *Lactic acid bacteria: biodiversity and taxonomy*, 1, 288-289.
132. Pot, B., Ludwig, W., Kersters, K., & Schleifer, K. H. (1994). Taxonomy of lactic acid bacteria. In *Bacteriocins of lactic acid bacteria* (pp. 13-90). Springer, Boston, MA
133. Poupard, J. A., Husain, I. N. T. I. S. A. R., & Norris, R. F. (1973). Biology of the bifidobacteria. *Bacteriological reviews*, 37(2), 136.
134. Rabah, H., Rosa do Carmo, F. L., & Jan, G. (2017). Dairy propionibacteria: versatile probiotics. *Microorganisms*, 5(2), 24.
135. Rantsiou, K., Urso, R., Dolci, P., Comi, G., & Cocolin, L. (2008). Microflora of Feta cheese from four Greek manufacturers. *International Journal of Food Microbiology*, 126(1-2), 36-42.
136. Rattray, F. P., & Fox, P. F. (1999). Aspects of Enzymology and Biochemical Properties of *Brevibacterium linens* Relevant to Cheese Ripening: A Review 1. *Journal of Dairy Science*, 82(5), 891-909.
137. Rice, B. H. (2014). Dairy and cardiovascular disease: a review of recent observational research. *Current nutrition reports*, 3(2), 130-138.
138. Rioux, K. P., Madsen, K. L., & Fedorak, R. N. (2005). The role of enteric microflora in inflammatory bowel disease: human and animal studies with probiotics and prebiotics. *Gastroenterology Clinics*, 34(3), 465-482.
139. Rohm, H., Lechner, F., & Lehner, M. (1990). Microflora of Austrian natural-set yogurt. *Journal of Food Protection*, 53(6), 478-480.

140. Roostita, R., & Fleet, G. H. (1996). Growth of yeasts in milk and associated changes to milk composition. *International journal of food microbiology*, 31(1-3), 205-219.
141. RoushanZadeh, S., Eskandari, M. H., Shekarforoush, S. S., & Hosseini, A. (2014). Phenotypic and genotypic diversity of dominant lactic acid bacteria isolated from traditional yoghurts produced by tribes of Iran. *Iranian journal of veterinary research*, 15(4), 347.
142. Schaafsma, G. (2008). Lactose and lactose derivatives as bioactive ingredients in human nutrition. *International Dairy Journal*, 18(5), 458-465.
143. Schleifer, K. H., Kraus, J., Dvorak, C., Kilpper-Bälz, R., Collins, M. D., & Fischer, W. (1985). Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 6(2), 183-195.
144. Šeme, H., Gjuračić, K., Kos, B., Fujs, Š., Štempelj, M., Petković, H., ... & Kosec, G. (2014). Acid resistance and response to pH-induced stress in two *Lactobacillus plantarum* strains with probiotic potential. *Beneficial microbes*, 6(3), 369-379.
145. Settanni, L., & Moschetti, G. (2010). Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food Microbiology*, 27(6), 691-697.
146. Siezen, R. J., Tzeneva, V. A., Castioni, A., Wels, M., Phan, H. T., Rademaker, J. L., ... & van Hylckama Vlieg, J. E. (2010). Phenotypic and genomic diversity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from various environmental niches. *Environmental Microbiology*, 12(3), 758-773.
147. Smokvina, T., Wels, M., Polka, J., Chervaux, C., Brisse, S., Boekhorst, J., ... & Siezen, R. J. (2013). *Lactobacillus paracasei* comparative genomics: towards species pan-genome definition and exploitation of diversity. *PloS one*, 8(7), e68731.
148. Sturino, J. M., & Klaenhammer, T. R. (2004). Bacteriophage defense systems and strategies for lactic acid bacteria. *Advances in applied microbiology*, 56, 332-378.
149. Sun, Z., Harris, H. M., McCann, A., Guo, C., Argimón, S., Zhang, W., ... & Liu, W. (2015). Expanding the biotechnology potential of lactobacilli through comparative genomics of 213 strains and associated genera. *Nature communications*, 6, 8322.
150. Šušković, J., Kos, B., Beganović, J., Pavunc, A. L., Habjanič, K., & Matošić, S. (2010). Antimicrobial Activity--The Most Important Property of Probiotic and Starter Lactic Acid Bacteria. *Food Technology & Biotechnology*, 48(3).
151. Švec, C., and Franz, C.M.A.P., 2014. The genus *Enterococcus*. In Holzappel, W. H., & Wood, B. J. (Eds.). (2014). *Lactic acid bacteria: biodiversity and taxonomy*. John Wiley & Sons, pp. 175-211.
152. Sybesma, W., Starrenburg, M., Tijsseling, L., Hoefnagel, M. H., & Hugenholtz, J. (2003). Effects of cultivation conditions on folate production by lactic acid bacteria. *Applied and environmental microbiology*, 69(8), 4542-4548.
153. Tannock, G. W. (1999). Probiotics: a critical review. *J Antimicrob Chemother*, 43(1), 849-52.
154. Thakur, N., Rokana, N., & Panwar, H. (2016). Probiotics: Selection criteria, safety and role in health and. *Journal of Innovative Biology January*, 3(1), 259-270.
155. Thierry, A., Deutsch, S.-M., Falentin, H., Dalmaso, M., Cousin, F.J., Jan, G. (2011). New insights into physiology and metabolism of *Propioni- bacterium freudenreichii*. *Int. J. Food Microbiol.* 149, 19–27.

156. Thirabunyanon, M., & Hongwittayakorn, P. (2013). Potential probiotic lactic acid bacteria of human origin induce antiproliferation of colon cancer cells via synergic actions in adhesion to cancer cells and short-chain fatty acid bioproduction. *Applied biochemistry and biotechnology*, 169(2), 511-525.
157. Thushara, R. M., Gangadaran, S., Solati, Z., & Moghadasian, M. H. (2016). Cardiovascular benefits of probiotics: a review of experimental and clinical studies. *Food & function*, 7(2), 632-642.
158. Tissier. (1900). Recherchers Sur La Flora Intestinale Normale et Pathologique Du Nourisson. Ph.D. thesis, University of Paris, Paris
159. Todorov, S. D. (2009). Bacteriocins from *Lactobacillus plantarum* production, genetic organization and mode of action: produção, organização genética e modo de ação. *Brazilian journal of microbiology*, 40(2), 209-221.
160. Tolinacki, M., Kojic, M., Lozo, J. E. L. E. N. A., Terzic-Vidojevic, A., Topisirovic, L., & Fira, D. (2010). Characterization of the bacteriocin-producing strain *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGUB9. *Arch Biol Sci*, 62(4), 889-899.
161. Tram, G., Korolik, V., & Day, C. J. (2013). MBDS solvent: An improved method for assessment of biofilms. *Advances in Applied Microbiology*, 3, 200e204.
162. Tsakalidou, E., Zoidou, E., Pot, B., Wassill, L., Ludwig, W., Devriese, L. A., ... & Kersters, K. (1998). Identification of streptococci from Greek Kasseri cheese and description of *Streptococcus macedonicus* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 48(2), 519-527.
163. Turgay, Ö., & Erbilir, F. (2006). Isolation and characterization of *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus casei* from various foods. *Turkish Journal of Biology*, 30(1), 39-44.
164. Turrone, F., Duranti, S., Bottacini, F., Guglielmetti, S., Van Sinderen, D., & Ventura, M. (2014). *Bifidobacterium bifidum* as an example of a specialized human gut commensal. *Frontiers in microbiology*, 5, 437.
165. Veerappan, G. R., Betteridge, J., & Young, P. E. (2012). Probiotics for the treatment of inflammatory bowel disease. *Current gastroenterology reports*, 14(4), 324-333.
166. Vernile, A., Giammanco, G., Spano, G., Beresford, T. P., Fox, P. F., & Massa, S. (2008). Genotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from traditional Pecorino Siciliano cheese. *Dairy Science and Technology*, 88(6), 619-629.
167. Versalovic, J., Koeuth, T., & Lupski, R. (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic acids research*, 19(24), 6823-6831.
168. Vihavainen, E. J., & Björkroth, K. J. (2007). Spoilage of value-added, high-oxygen modified-atmosphere packaged raw beef steaks by *Leuconostoc gasicomitatum* and *Leuconostoc gelidum*. *International journal of food microbiology*, 119(3), 340-345.
169. Watanabe, T., Hamada, K., Tategaki, A., Kishida, H., Tanaka, H., Kitano, M., & Miyamoto, T. (2009). Oral administration of lactic acid bacteria isolated from traditional South Asian fermented milk Dahi inhibits the development of atopic dermatitis in NC/Nga mice. *Journal of nutritional science and vitaminology*, 55(3), 271-278.
170. Weerkamp, A. H., Klijn, N., Neeter, R., & Smit, G. (1996). Properties of mesophilic lactic acid bacteria from raw milk and naturally fermented raw milk products. *Netherlands Milk and Dairy Journal (Netherlands)*.

171. Wegkamp, A., Starrenburg, M., de Vos, W. M., Hugenholtz, J., & Sybesma, W. (2004). Transformation of folate-consuming *Lactobacillus gasseri* into a folate producer. *Applied and environmental microbiology*, 70(5), 3146-3148.
172. Woo, P. C. Y., Lau, S. K. P., Teng, J. L. L., Tse, H., & Yuen, K. Y. (2008). Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clinical Microbiology and Infection*, 14(10), 908-934.
173. Xie, Y., An, H., Hao, Y., Qin, Q., Huang, Y., Luo, Y., & Zhang, L. (2011). Characterization of an anti-*Listeria* bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LB-B1 isolated from koumiss, a traditionally fermented dairy product from China. *Food Control*, 22(7), 1027-1031.
174. Xu, N., Fan, W., Zhou, X., Liu, Y., Ma, P., Qi, S., & Gu, B. (2018). Probiotics decrease depressive behaviors induced by constipation via activating the AKT signaling pathway. *Metabolic Brain Disease*, 1-9.
175. Xu, S., Liu, T., Radji, C. A. I., Yang, J., & Chen, L. (2016). Isolation, identification, and evaluation of new lactic acid bacteria strains with both cellular antioxidant and bile salt hydrolase activities in vitro. *Journal of food protection*, 79(11), 1919-1928.
176. Yan, F., & Polk, D. B. (2011). Probiotics and immune health. *Current opinion in gastroenterology*, 27(6), 496.
177. Yang, S. C., Lin, C. H., Sung, C. T., & Fang, J. Y. (2014). Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. *Frontiers in microbiology*, 5, 241.
178. Zimina, M. I., Gazieva, A. F., Pozo-Dengra, J., Noskova, S. Y., & Prosekov, A. Y. (2017). Determination of the intensity of bacteriocin production by strains of lactic acid bacteria and their effectiveness. *Foods and Raw materials*, 5(1).
179. Zhang, Y. J., Li, S., Gan, R. Y., Zhou, T., Xu, D. P., & Li, H. B. (2015). Impacts of gut bacteria on human health and diseases. *International journal of molecular sciences*, 16(4), 7493-7519.
180. Zoumpoulou, G., Tzouvanou, A., Mavrogonatou, E., Alexandraki, V., Georgalaki, M., Anastasiou, R., ... & Papadimitriou, K. (2017). Probiotic features of lactic acid bacteria isolated from a diverse pool of traditional Greek dairy products regarding specific strain-host interactions. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 1-10.
181. Morris Jr, J. G., & Potter, M. (2013). *Foodborne infections and intoxications*. Academic Press.
182. Krzyściak, W., Pluskwa, K. K., Jurczak, A., & Kościelniak, D. (2013). The pathogenicity of the *Streptococcus* genus. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 32(11), 1361-1376.

Ιστοσελίδες

www.ncbi.nlm.gov/BLAST

www.clal.it/en/index.php

www.onlinebiologynotes.com

<http://textbookofbacteriology.net/index.html>

Ελληνική βιβλιογραφία

- Καμιναρίδης Σ. & Μοάτσου Γ. (2009). Γαλακτοκομία. Εκδόσεις Έμβρυο, Αθήνα.
- Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1881/2006 της Επιτροπής της 19ης Δεκεμβρίου 2006 για καθορισμό μέγιστων επιτρεπτών επιπέδων για ορισμένες ουσίες οι οποίες επιμολύνουν τα τρόφιμα. Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης, L 364:5-24
- Κώδικας Τροφίμων και Ποτών, αντικατάσταση άρθρου 82 Υπουργική Απόφαση 106/2016 - ΦΕΚ 2457/Β/9-8-2016. ΜΕΡΟΣ Α΄, ΤΡΟΦΙΜΑ ΚΑΙ ΠΟΤΑ ΙΧ. Γάλα, αυγά και προϊόντα από αυτά
- Κώδικας Τροφίμων και Ποτών, ΜΕΡΟΣ Α΄, ΤΡΟΦΙΜΑ ΚΑΙ ΠΟΤΑ ΙΧ. Γάλα, αυγά και προϊόντα από αυτά. Άρθρο 84. Ρυζόγαλο - Κρέμα - Επιδόρπια με βάση το γάλα.
- Μάντης Αντώνιος, Παπαγεωργίου Δημήτριος, Φλετούρης Δημήτριος, Αγγελίδης Απόστολος (2015). Υγιεινή και Τεχνολογία του Γάλακτος και των Προϊόντων του, εκδόσεις Αφοί Κυριακίδη.

Z. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

1. Εικόνες

Κεφάλαιο Γ:

- Εικόνα 1. Παράδειγμα χρήσης του φωτόμετρου. Σελ 34
- Εικόνα 2. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της rep-PCR για τα απομονωθέντα βακτήρια. Gel 1. Σελ. 46
- Εικόνα 3. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της rep-PCR για τα απομονωθέντα βακτήρια. Gel 2. Σελ. 47
- Εικόνα 4. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της rep-PCR για τα απομονωθέντα βακτήρια. Gel 3. Σελ. 47
- Εικόνα 5. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της 16S PCR για τα απομονωθέντα βακτήρια. Σελ. 49
- Εικόνα 6. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της rep-PCR για τις απομονωθείσες ζύμες. Σελ. 52
- Εικόνα 7. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της ITS-PCR για τις απομονωθείσες ζύμες. Σελ. 53
- Εικόνα 8. Υδρόλυση χολικών αλάτων για τα στελέχη FjY1-1a, FjY1-1b, FjY1-2, FjY1-3a, FjY1-3b, FjY1-4a, FjY1-4b, FjY1-5a και FjY1-5b. Σελ. 59

2. Σχήματα

Κεφάλαιο Α:

- Σχήμα 1. Διάκριση των οξυγαλακτικών βακτηρίων βάσει της μορφής των κυττάρων, τη ζύμωση της λακτόζης και τη βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης. Σελ. 13
- Σχήμα 2. Προπιονική ζύμωση. Σελ. 14
- Σχήμα 3. Ομογαλακτική ζύμωση, μονοπάτι Embden-Meyerhof. Σελ. 22
- Σχήμα 4. Ετερογαλακτική ζύμωση, οδός φωσφορικών πεντοζών. Σελ. 23
- Σχήμα 5. Η κατανομή της παραγωγής όξινων ζυμωμένων προϊόντων γάλακτος στην Ε.Ε. το διάστημα Ιανουάριος-Ιούλιος 2018. Σελ. 24
- Σχήμα 6. Προϊόντα ζύμωσης του γάλακτος σε κατηγορίες βάσει της ζύμωσης και των μικροοργανισμών. Σελ. 25
- Σχήμα 7. Διάγραμμα ροής παραγωγής βιομηχανικού γιαουρτιού. Σελ. 27
- Σχήμα 8. Διάγραμμα ροής παραγωγής παραδοσιακής γιαούρτης. Σελ. 28

Κεφάλαιο Γ:

- Σχήμα 1: Βιωσιμότητα ($\Delta \log \text{cfu/ml}$) των στελεχών των βακτηρίων σε pH 2,5 για 2h. Σελ. 58
- Σχήμα 2. Ποσοστιαία απεικόνιση της ανθεκτικότητας των στελεχών σε αντιβιοτικά. Σελ. 67

3. Πίνακες

Κεφάλαιο Α:

- Πίνακας 1. Μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται ως προβιοτικές καλλιέργειες. Σελ. 17

Κεφάλαιο Γ:

- Πίνακας 1. Στελέχη βακτηρίων και ζυμών που απομονώθηκαν από γιαούρτη που παρασκευάστηκε στα νησιά Fiji. Σελ. 31
- Πίνακας 2. Αντιδραστήρια, ποσότητες & εκκινητής rep-PCR. Σελ. 35
- Πίνακας 3. Αντιδραστήρια, ποσότητες & εκκινητές 16S PCR. Σελ. 36
- Πίνακας 4. Αντιδραστήρια, ποσότητες & εκκινητής rep-PCR για τις ζύμες. Σελ. 39
- Πίνακας 5. Αντιδραστήρια, ποσότητες & εκκινητής ITS-PCR. Σελ. 40
- Πίνακας 6. Στελέχη-στόχοι για τη μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης των βακτηριακών στελεχών. Σελ. 42
- Πίνακας 7. Αποτελέσματα απομόνωσης- ανάπτυξης- ταυτοποίησης στελεχών βακτηρίων από το δείγμα του ζυμωμένου γάλακτος μετά τη 16S PCR. Σελ. 50
- Πίνακας 8. Αποτελέσματα απομόνωσης- ανάπτυξης- ταυτοποίησης στελεχών ζυμών από το δείγμα του ζυμωμένου γάλακτος μετά την ITS-PCR. Σελ. 54
- Πίνακας 9. Αποτελέσματα απομόνωσης- ανάπτυξης- ταυτοποίησης μικροβιακών στελεχών από το δείγμα του ζυμωμένου γάλακτος. Σελ. 54
- Πίνακας 10. Αντιμικροβιακή δράση των απομονωθέντων βακτηριακών στελεχών. Σελ. 55
- Πίνακας 11. Επιβίωση των στελεχών των βακτηρίων σε συνθήκες χαμηλού pH. Σελ. 57

- Πίνακας 12. Υδρόλυση χολικών αλάτων. Σελ. 60
- Πίνακας 13. Ικανότητα πρόσδεσης των βακτηριακών στελεχών στο κολλαγόνο. Σελ. 62
- Πίνακας 14. Ανθεκτικότητα στελεχών σε αντιβιοτικά. Σελ. 64
- Πίνακας 15. Αναλυτικά αποτελέσματα ελέγχου ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά. Σελ. 65
- Πίνακας 16. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα όλων των δοκιμών που πραγματοποιήθηκαν. Σελ. 68

4. Δενδρογράμματα

Κεφάλαιο Γ:

- Δενδρόγραμμα 1. Δενδρόγραμμα *ger*-PCR των στελεχών των βακτηρίων. Σελ. 48
- Δενδρόγραμμα 2. Δενδρόγραμμα *ger*-PCR των στελεχών των ζυμών. Σελ. 52