

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Μελέτη προβιοτικού δυναμικού μικροβιακών στελεχών, απομονωμένων από ζυμούμενο γάλα, προέλευσης Νησιών Fiji.

Μεταπτυχιακός Φοιτητής:
Γιώργος Ν. Πολεμικός

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια:
Έφη Τσακαλίδου, Καθηγήτρια ΓΠΑ

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:
Έφη Τσακαλίδου, Καθηγήτρια ΓΠΑ
Γεώργιος-Ιωάννης Νυχάς, Καθηγητής ΓΠΑ
Ελευθέριος Δροσινός, Καθηγητής ΓΠΑ

Αθήνα, 2019

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

**Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου.
Πρόγραμμα μεταπτυχιακών σπουδών: Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων και
Διατροφής.
Εργαστήριο Γαλακτοκομίας**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Μελέτη προβιοτικού δυναμικού μικροβιακών στελεχών, απομονωμένων από ζυμούμενο γάλα, προέλευσης Νησιών Fiji.

Study of probiotic potential of strains of microbial isolates from fermented milk from Fiji Islands.

Μεταπτυχιακός Φοιτητής:

Γιώργος Ν. Πολεμικός

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια:

Έφη Τσακαλίδου, Καθηγήτρια ΓΠΑ

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Έφη Τσακαλίδου, Καθηγήτρια ΓΠΑ

Γεώργιος-Ιωάννης Νυχάς, Καθηγητής ΓΠΑ

Ελευθέριος Δροσινός, Καθηγητής ΓΠΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ:

1. Εισαγωγή: Προβιοτικά Τρόφιμα.....	5
1.1 Η ιστορία των προβιοτικών.....	5
1.2 Πώς ορίζονται τα προβιοτικά;	6
1.3 Χαρακτηριστικά προβιοτικών οξυγαλακτικών βακτηρίων.....	9
2. Μηχανισμοί δράσης προβιοτικών μικροοργανισμών.....	11
2.1 Παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών.....	11
2.2 Παραγωγή ευεργετικών ουσιών.....	13
2.3 Ανταγωνιστικός αποκλεισμός παθογόνων μικροοργανισμών.....	13
2.4 Αυξημένη προσκόλληση στον εντερικό βλεννογόνο.....	14
2.5 Ενίσχυση επιθηλιακού φραγμού.....	18
2.6 Προβιοτικά και ανοσοποιητικό σύστημα.....	20
2.7 Ζυμούμενα προϊόντα γάλακτος.....	22
2.8 Θεραπευτική αξία ζυμούμενου γάλακτος.....	29
2.9 Τύποι παραδοσιακού ζυμούμενου γάλακτος.....	30
2.10 Γιαούρτι.....	37
2.11 Τεχνολογία παρασκευής γιαουρτιού.....	38
2.12 Νομοθεσία για το γιαούρτι.....	40
2.13 Γιαούρτι και πιθανές προβιοτικές επιδράσεις.....	41
3. Σκοπός πειράματος.....	47
4. Υλικά και μέθοδοι	48
4.1 Απομόνωση βακτηρίων και ζυμών από το γάλα.....	48
4.2 Απομόνωση βακτηριακού DNA.....	51
4.3 Απομόνωση DNA ζυμών.....	53
4.4 Ομαδοποίηση βακτηριακών στελεχών με τη μέθοδο Rep-PCR	53
4.5 Ομαδοποίηση των στελεχών των ζυμών με Rep-PCR.....	56
4.6 Ταυτοποίηση των βακτηριακών στελεχών με αλληλούχηση του γονιδίου 16S rDNA.....	56
4.7 Ταυτοποίηση ζυμών με ITS PCR.....	57
4.8 Ανίχνευση αντιμικροβιακής δράσης.....	60
4.9 Ικανότητα επιβίωσης σε συνθήκες χαμηλού pH.....	62
4.10 Ικανότητα υδρόλθωσης χολικών αλάτων.....	63
4.11 Ικανότητα προσκόλλησης στο κολαγόνο.....	64
4.12 Ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά.....	65
5. Αποτελέσματα και συζήτηση.....	66
5.1 Ομαδοποίηση βακτηριακών στελεχών με την rep-PCR μέθοδο.....	67

5.2 Ταυτοποίηση βακτηρίων με την αλληλουχηση του 16S rRNA.....	70
5.3 Rep- PCR ζυμών.....	71
5.4 ITS PCR.....	79
5.5 Ταυτοποίηση βακτηρίων και ζυμών.....	74
5.6 Αντιμικροβιακή δράση βακτηρίων.....	77
5.7 Επιβίωση σε συνθήκες χαμηλού pH.....	81
5.8 Ικανότητα υδρόλυσης χολικών αλάτων.....	85
5.9 Ικανότητα προσκόλλησης στο κολλαγόνο.....	87
5.10 Ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά.....	89
5.11 Συμπεράσματα.....	91

Ευχαριστίες:

Με την ολοκλήρωση της παρούσας διπλωματικής μελέτης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όσους συνέβαλαν στην εκπόνησή της.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου, κα. Έφη Τσακαλίδου για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και την καθοδήγηση καθ'όλη την διάρκεια της μελέτης.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τους καθηγητές του ΓΠΑ, κ. Δροσινό και κ. Νυχά, που δέχθηκαν να είναι μέλη της τριμελούς επιτροπής και αφιέρωσαν χρόνο στην αξιολόγηση αυτής της μελέτης.

Ευχαριστώ θερμά την Δρ. Ράνια Αναστασίου για την τεράστια συνεισφορά της στην σωστή διεκπεραίωση των πειραμάτων, καθώς και την Δρ. Μαρίνα Γεωργαλάκη και την Δρ. Γεωργία Ζουμποπούλου για την συνεχή υποστήριξή τους στα εργαστηριακά πειράματα.

Περίληψη

Η γαστρεντερική οδός λειτουργεί και ως φραγμός σε αντιγόνα των μικροοργανισμών και των τροφίμων. Η ιδιότητα αυτή έχει ως προϋπόθεση την ύπαρξη μιας ισχυρής αυτόχθονης μικροχλωρίδας. Το γεγονός αυτό καθιστά αναγκαία την κατανάλωση τροφίμων που περιέχουν τους ωφέλιμους μικροοργανισμούς, σε επαρκείς ποσότητες. Οι εν λόγω μικροοργανισμοί χαρακτηρίζονται ως προβιοτικοί όταν ικανοποιούν ορισμένα κριτήρια. Ένα από αυτά είναι η αντιμικροβιακή τους δράση έναντι παθογόνων μικροοργανισμών ή άλλων μικροοργανισμών που θα μπορούσαν να διαταράξουν τη φυσιολογική μικροχλωρίδα του γαστρεντερικού συστήματος κατά την εγκατάστασή τους. Απαραίτητη επίσης είναι η επιβίωσή τους στο όξινο pH (pH=2) που επικρατεί στην περιοχή, καθώς και η ικανότητα προσκόλλησης στο επιθήλιο του γαστρεντερικού ώστε να μπορέσουν να εγκατασταθούν. Είναι ιδιαίτερα σημαντικό οι μικροοργανισμοί να έχουν ικανότητα υδρόλυσης χολικών αλάτων, μια ιδιότητα που σχετίζεται με τη μείωση της σύνθεσης της χοληστερόλης και επομένως των καρδιαγγειακών νοσημάτων αλλά και να μην παρουσιάζουν ανθεκτικότητα έναντι συγκεκριμένων αντιβιοτικών, καθώς θα μπορούσαν να μεταβιβάσουν τα γονίδια ανθεκτικότητας σε άλλους παθογόνους μικροοργανισμούς. Στη συγκεκριμένη μελέτη εξετάστηκαν τα παραπάνω κριτήρια σε 32 στελέχη βακτηρίων μεταξύ των οποίων τα 21 στελέχη ήταν *Lactobacillus plantarum*/ *Lactobacillus paraplantarum*/ *Lactobacillus pentosus*, 1 *Enterococcus gallinarum*/*Enterococcus casseliflavus*, 1 *Enterococcus faecalis*, 2 *Lactococcus lactis*, 4 *Leuconostoc lactis*, 1 *Leuconostoc holzapfelii*, 1 *Enterococcus faecium*/ *Enterococcus durans*, 1 *Lactobacillus paracasei*/ *Lactobacillus casei*/ *Lactobacillus zae*. Από όλα αυτά μόνο μερικά παρουσίασαν ικανοποιητικά αποτελέσματα ώστε να χαρακτηριστούν ως πιθανά προβιοτικά στελέχη. Τα στελέχη με τέτοιες ιδιότητες ήταν 5 στελέχη των ειδών *Lactobacillus plantarum*/ *Lactobacillus paraplantarum*/ *Lactobacillus pentosus*, και 1 του είδους *Leuconostoc lactis*.

Λέξεις κλειδιά: Προβιοτικό δυναμικό, ταυτοποίηση

Abstract

The gastrointestinal tract also acts as a barrier to the antigens of microorganisms and food. This property assumes the existence of strong independent microflora. Hence, the consumption of food containing these beneficial microorganisms in sufficient quantities becomes necessary. The aforesaid microorganisms are characterized as probiotics upon fulfilling certain criteria, such as their antimicrobial activity against pathogenic or other microorganisms, which could disturb the normal gastrointestinal microflora once installed. Their ability to survive in an acidic pH (pH = 2) which is prevalent in the area, is also necessary for their survival, as well as their ability to adhere to the gastrointestinal epithelium to enable their settlement. It is especially important that these microorganisms have the ability to hydrolyze bile salts -a property associated with the reduction of cholesterol synthesis and, thus, of cardiovascular diseases, whilst not being resistant against certain antibiotics, as they could transfer resistance genes to other pathogenic microorganisms. The current study examined the above criteria in 32 strains of bacteria; Namely, the 21 strains of *Lactobacillus plantarum* / *Lactobacillus paraplantarum* / *Lactobacillus pentosus*, 1 *Enterococcus gallinarum* / *Enterococcus casseliflavus*, 1 *Enterococcus faecalis*, 2 *Lactococcus lactis*, 4 *Leuconostoc lactis*, 1 *Leuconostoc holzapfelii*, 1 *Enterococcus faecium* / *Enterococcus durans*, 1 *Lactobacillus paracasei* / *Lactobacillus casei* / *Lactobacillus zae*. Results yielded satisfactory properties for inclusion in probiotic strains for the following: 5 strains of *Lactobacillus plantarum* / *Lactobacillus paraplantarum* / *Lactobacillus pentosus* and 1 strain of *Leuconostoc lactis*.

Key words: Probiotic potential, identification

Κεφάλαιο 1

Προβιοτικά Τρόφιμα

1.1. Η ιστορία των προβιοτικών

Μια ευεργετική συσχέτιση των μικροοργανισμών στον άνθρωπο ως ξενιστή πιθανότατα προτάθηκε αρχικά από τον Döderlein το 1892, ο οποίος πρότεινε ότι τα κοιλικά βακτήρια παρήγαγαν γαλακτικό οξύ μεταβολίζοντας σάκχαρα, οδηγώντας έτσι στην πρόληψη ή την αναστολή της ανάπτυξης παθογόνων βακτηρίων. Επιπλέον, οξυγαλακτικά βακτήρια (lactic acid bacteria, LAB) βρέθηκαν και σε ζυμούμενα γαλακτοκομικά προϊόντα και υποστηρίχθηκε ότι έχουν ευεργετική επίδραση στην υγεία (Metchnikoff, 1908). Ο Metchnikoff θεωρούσε ότι η μακροζωία των φυλετικά χαρακτηρισμένων ως "Καυκάσιων" ανθρώπων συνδέεται με την υψηλή κατανάλωση ζυμώμενων γαλακτοκομικών προϊόντων. Ωστόσο, σε αντίθεση με τις ισχύουσες σημερινές ερμηνείες, ο Metchnikoff πρότεινε ότι τα μικρόβια του εντέρου ήταν επιβλαβή για την ανθρώπινη υγεία και υποστήριξε ότι η υποκατάσταση της εντερικής μικροχλωρίδας από βακτήρια που βρίσκονται στο γιαούρτι θα μπορούσε πράγματι να είναι επωφελής για τον άνθρωπο. Σε αυτό το πλαίσιο, τα LAB και ο κύριος μεταβολίτης τους στη ζύμωση των σακχάρων, δηλαδή το γαλακτικό οξύ, προωθήθηκαν ιδιαίτερα από τον Metchnikoff. Οι πρώτες ταξινομικές μελέτες και μελέτες οικολογίας κοπράνων για τα LAB διεξήχθησαν από: τους Moro (1900), και από τους Beijerinck (1901) και Cahn (1901) στις αρχές του 20^{ου} αιώνα.

1.2. Πώς ορίζονται τα προβιοτικά;

Αρχικά, ως προβιοτικοί ορίζονται «οι μικροοργανισμοί που προάγουν την ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών» (Lilly et al., 1965). Τα προβιοτικά, σύμφωνα με ένα μεταγενέστερο ορισμό τους, αναφέρονται σε βιώσιμους μικροοργανισμούς που προάγουν ή υποστηρίζουν μια ευεργετική ισορροπία του αυτόχθονου μικροβιακού πληθυσμού της γαστρεντερικής οδού (Gastrointestinal Tract, GT). Τέτοιοι μικροοργανισμοί δεν είναι απαραίτητως αυτόχθονοι στην γαστρεντερική οδό, αλλά πρέπει να έχουν μεταξύ άλλων ιδιοτήτων «[...] ευεργετική επίδραση στη γενική και υγειονομική κατάσταση του ανθρώπου και των ζώων» (Parker, 1974· Fuller, 1989).

Τα τελευταία χρόνια τα προβιοτικά έχουν οριστεί με μεγαλύτερη ακρίβεια ως «μονές ή μικτές καλλιέργειες ζωντανών μικροοργανισμών οι οποίες, όταν εφαρμόζονται σε ζώα ή ανθρώπους, επηρεάζουν ευεργετικά τον ξενιστή βελτιώνοντας τις ιδιότητες της αυτόχθονης μικροχλωρίδας» (Havenaar, 1992). Όσον αφορά τα τρόφιμα, τα προβιοτικά θεωρούνται ως «ζωντανοί μικροοργανισμοί

σε τρόφιμα ή συμπληρώματα διατροφής που στοχεύουν στη βελτίωση της υγείας των ανθρώπων και των ζώων» (Salminen, 1998). Σύμφωνα με αυτούς τους ορισμούς, ένας εντυπωσιακός αριθμός μικροβιακών ειδών και γενών θεωρούνται ως προβιοτικά (βλ. Πίνακα 1). Ωστόσο, τα στελέχη που ταξινομούνται ως οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB) θεωρούνται ιδιαίτερα σημαντικά όσον αφορά τα τρόφιμα και τη διατροφή, λόγω των ιδιαίτερων συνθηκών που επικρατούν στα τρόφιμα.

Πίνακας 1. Μικροοργανισμοί που θεωρούνται προβιοτικοί (Wilhelm et al., 2001)

<i>Lactobacillus</i> species	<i>Bifido-bacterium</i> species	Lactic acid bacteria (other)	Nonlactic acid bacteria & fungi
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Bacillus cereus</i> var. <i>toyoi</i>
<i>L. amylovorus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Escherichia coli</i> strain nissle
<i>L. casei</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. breve</i>	<i>Leuconstoc mesenteroides</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>L. delbrueckii</i> spp.	<i>B. infantis</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>

<i>Lactobacillus</i> species	<i>Bifido-bacterium</i> species	Lactic acid bacteria (other)	Nonlactic acid bacteria & fungi
<i>L. bulgaricus</i>	<i>B. lactis5</i>	<i>Sporolactobacillus inulinus</i>	
<i>L. gallinarum</i>	<i>B. longum</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	
<i>L. gasseri</i>			
<i>L. johnsonii</i>			
<i>L. paracasei</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. rhamnosus</i>			

Επιπλέον των παραπάνω ορισμών, και λαμβάνοντας υπόψη διάφορα επιχειρήματα, ιδιαίτερα τη διάκριση των συνηθισμένων καλλιεργειών γιαουρτιού και των προϊόντων που περιέχουν προβιοτικές καλλιέργειες, έχει προταθεί και ο ακόλουθος ορισμός ως ο πληρέστερος του όρου προβιοτικό που δίνουν οι Havenaar και Huis (Havenaar et al., 1992) για τα προβιοτικά τρόφιμα: «Σκεύασμα ή προϊόν που περιέχει βιώσιμους, καθορισμένους μικροοργανισμούς σε επαρκείς αριθμούς, οι οποίοι μεταβάλλουν τη μικροχλωρίδα (με εμφύτευση ή αποικισμό) σε ένα διαμέρισμα του ξενιστή και που ασκούν επωφελείς επιπτώσεις στην υγεία σε αυτόν τον ξενιστή». Η αιτιολογία της αναθεώρησης (Jurgen et al., 2001) του ορισμού των Havenaar και Huis προκύπτει από τα εξής:

- I. Την ανάγκη να περιληφθούν προϊόντα επιπλέον των μικροοργανισμών ή σκευασμάτων μικροοργανισμών.
- II. Την απαίτηση επαρκών μικροβιακών αριθμών για την άσκηση ευεργετικών επιδράσεων στην υγεία.

- III. Την προτίμηση της φράσης «μεταβολή της μικροχλωρίδας» σε σχέση με τη «βελτίωση των ιδιοτήτων της ... μικροχλωρίδας», διότι οι βέλτιστες ιδιότητες της αυτόχθονης μικροχλωρίδας δεν έχουν καθοριστεί μέχρι τώρα και η απόδειξη του οφέλους μπορεί να αποδειχθεί μόνο από τις επιπτώσεις στην υγεία.
- IV. Ο ορισμός του όρου *αυτόχθονη μικροχλωρίδα* αναφέρεται στο «συνηθισμένο σύνθετο μίγμα βακτηριακού πληθυσμού που αποικίζει μια δεδομένη περιοχή στον ξενιστή που δεν έχει επηρεαστεί από ιατρική ή πειραματική επέμβαση ή από ασθένεια» (Freter, 1992) και τη χρήση του για να αποικίσει και να περιγράψει βακτηριακό πληθυσμό που καθιερώνεται σε μέγεθος με την πάροδο του χρόνου χωρίς την ανάγκη για περιοδική επανεισαγωγή των βακτηρίων με επαναλαμβανόμενες στοματικές δόσεις ή με άλλα μέσα (Jurgen et al., 2001).

Τελικά, ο επίσημος ορισμός της FAO/WHO που ορίστηκε το 2000 για τα προβιοτικά, και ισχύει ως σήμερα είναι ο εξής: *“live microorganisms that, when administered in adequate amounts, confer a health benefit on the host”* (μτφ. «ζωντανοί μικροοργανισμοί, οι οποίοι όταν χορηγούνται σε επαρκείς ποσότητες, αποφέρουν όφελος στην υγεία του ξενιστή», Colin et al., 2014).

1.3. Χαρακτηριστικά προβιοτικών οξυγαλακτικών βακτηρίων

Γενικά, τα οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB) και κατ' επέκταση τα οξυγαλακτικά προβιοτικά βακτήρια, που είναι τα σημαντικότερα είδη προβιοτικών για τα τρόφιμα, είναι θετικά κατά Gram, μη σπορογόνα, αρνητικά στην καταλάση, και στερούνται κυτοχρωμάτων. Επίσης, είναι προαιρετικά αναερόβιοι και αεροανθεκτικοί, ανεκτικοί σε χαμηλό pH και υποχρεωτικά ζυμωτικοί μικροοργανισμοί. Το γαλακτικό οξύ που παράγουν είναι το κύριο προϊόν της ζύμωσης των σακχάρων (Axelsson, 1998). Ορισμένα είδη χαρακτηρίζονται από διαφοροποιήσεις σε σχέση με τα υπόλοιπα, καθώς μπορούν να συνθέσουν καταλάση ή κυτοχρώματα σε μέσα (υποστρώματα) που περιέχουν αίμη ή σχετικές ενώσεις (Whittenbury, 1964· Wolf et al., 1991· Meisel et al., 1994). Για το λόγο αυτό, η παραγωγή μη-αιμικής καταλάσης (ψευδοκαταλάσης), από κάποιους γαλακτοβάκιλλους μπορεί επίσης να προκαλέσει δυσκολία στην σωστή ταυτοποίηση των LAB (Engesser et al., 1994).

Σε μια αρχική προσέγγιση, ο Orla-Jensen (1919) υποδιαίρεσε τα LAB στα γένη *Betabacterium*, *Thermobacterium*, *Streptobacterium*, *Streptococcus*, *Betacoccus*, *Tetracoccus* και *Microbacterium* με βάση τα μορφολογικά και φαινοτυπικά χαρακτηριστικά τους (βλ. Πίνακα 2).

Πίνακας 2. Ειδοποιές διαφορές μεταξύ των οξυγαλακτικών βακτηρίων και η σύγκριση με την τρέχουσα ταξινόμηση (Wilhelm et al., 2001).

Γένος (αρχική ονομασία)	Σχήμα	Κατα-λάση	Μείωση Νιτρω-δών	Ζύμωση	Τρέχουσα ονομασία γένους
<i>Betabacterium</i>	Ραβδοειδές	-	-	Ετεροζυμωτικό	<i>Lactobacillus</i>
					<i>Weissella</i>
<i>Thermo-bacterium</i>	Ραβδοειδές	-	-	Ομοζυμωτικό	<i>Lactobacillus</i>
<i>Strepto-bacterium</i>	Ραβδοειδές	-	-	Ετεροζυμωτικό & Ομοζυμωτικό	<i>Lactobacillus</i>
					<i>Carno-bacterium</i>
<i>Streptococcus</i>	Κόκκος	-	-	Ομοζυμωτικό	<i>Streptococcus</i>
					<i>Enterococcus</i>
					<i>Lactococcus</i>
					<i>Vagococcus</i>
<i>Betacoccus</i>	Κόκκος	-	-	Ετεροζυμωτικό	<i>Leuconostoc</i>
					<i>Oenococcus</i>
					<i>Weissella</i>

Γένος (αρχική ονομασία)	Σχήμα	Κατα-λάση	Μείωση Νιτρω-δών	Ζύμωση	Τρέχουσα ονομασία γένους
<i>Microbacterium</i>	Ραβδοειδές	+	+	Ομοζυμωτικό	<i>Brochothrix</i>
<i>Tetracoccus</i>	Κόκκος	+3	+	Ομοζυμωτικό	<i>Pediococcus</i>
					<i>Tetragenococcus</i>

Σήμερα, ισχύει μόνο η ονομασία *Streptococcus*, ενώ τα γένη *Enterococcus*, *Lactococcus* και *Vagococcus* έχουν διαχωριστεί από το αρχικό γένος *Streptococcus* (Schleifer et al., 1984). Με εξαίρεση τον *Streptococcus thermophilus*, το γένος *Streptococcus* περιλαμβάνει κυρίως παθογόνους στρεπτόκοκκους, σε σύγκριση με τα βιοτεχνολογικά σημαντικά είδη του γένους *Lactococcus*, τα οποία γενικά θεωρούνται μη παθογόνα και ασφαλή για τα τρόφιμα και τα γένη του *Enterococcus sp.*, τα οποία ανάλογα με το είδος, εμπλέκονται είτε σε ευκαιριακές μολύνσεις, είτε στις ζυμώσεις των τροφίμων, είτε ακόμα λειτουργούν και ως προβιοτικά (*Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*).

Τέτοιες ταξινομικές γνώσεις ενός στελέχους μπορούν επομένως να δώσουν μια ένδειξη της προέλευσης, του οικοτόπου και της φυσιολογίας του στελέχους και να έχουν σημαντικές συνέπειες για την επιλογή νέων στελεχών, για εφαρμογή στη ζύμωση τροφίμων ή για χρήση ως προβιοτικό (Wilhelm et al., 2001).

Σήμερα μερικά από τα σημαντικότερα είδη οξυγαλακτικών βακτηρίων για τα τρόφιμα είναι ο *Lactobacillus acidophilus* (για καλλιέργειες γιαουρτιού), ο *Lactococcus lactis* (παραγωγή νισίνης), ο *Leuconocstoc mesenderoides* (πολυμερισμός γλυκόζης) και ο *Streptococcus thermophilus* (για καλλιέργειες γιαουρτιού) (Keweloh, 2013).

Κεφάλαιο 2

Μηχανισμοί δράσης προβιοτικών

Οι κυριότερες κατηγορίες προβιοτικών που χρησιμοποιούνται από τον άνθρωπο για τις ευεργετικές τους ιδιότητες είναι τα οξυγαλακτικά βακτήρια και τα Bifidobacteria. Προκειμένου η προβιοτική τους δράση να έχει "ορατά" αποτελέσματα, είναι απαραίτητο, να προσλαμβάνονται σε επαρκείς ποσότητες.

Αν και τα προβιοτικά αποτελούν ένα σημαντικό δυναμικό για την θεραπευτική αντιμετώπιση πλήθους ασθενειών, οι μηχανισμοί δράσης δεν είναι πλήρως αποσαφηνισμένοι. Αρκετοί είναι οι σημαντικοί μηχανισμοί που βρίσκονται πίσω από τις ανταγωνιστικές επιδράσεις των προβιοτικών μικροοργανισμών σε διάφορους άλλους μικροοργανισμούς και περιλαμβάνουν τους εξής:

Τροποποίηση της μικροχλωρίδας του εντέρου, ανταγωνιστική δράση (έναντι των παθογόνων), προσκόλληση στο βλεννογόνο και το επιθήλιο του εντέρου, ενίσχυση του επιθηλιακού φραγμού του εντέρου και ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος, ώστε να επιφέρει το πλεονέκτημα της ετοιμότητας στον ξενιστή έναντι πιθανής προσβολής από παθογόνους μικροοργανισμούς (Bermudes et al., 2012).

2.1 Παραγωγή αντιμικροβιακών ενώσεων

Ένας από τους προτεινόμενους μηχανισμούς που εμπλέκεται στα οφέλη για την υγεία που προσφέρουν τα προβιοτικά, περιλαμβάνει τον σχηματισμό LMW (Low Molecule Weight) ενώσεων (<1,000 Da), όπως είναι τα οργανικά οξέα, καθώς και την παραγωγή αντιβακτηριακών ενώσεων πρωτεϊνικής φύσεως που ονομάζονται βακτηριοσίνες (> 1,000 Da). Τα οργανικά οξέα, ιδιαίτερα το οξικό οξύ και το γαλακτικό οξύ, έχουν ισχυρή ανασταλτική επίδραση έναντι Gram-αρνητικών βακτηρίων και έχουν θεωρηθεί ως οι κύριες αντιμικροβιακές ενώσεις που ευθύνονται για την ανασταλτική δράση των προβιοτικών έναντι των παθογόνων. Κάθε ασθενές οργανικό οξύ εισέρχεται στο βακτηριακό κύτταρο και διασπάται μέσα στο κυτταρόπλασμα του. Η ενδεχόμενη μείωση του ενδοκυτταρικού pH ή η ενδοκυτταρική συσσώρευση της ιονισμένης μορφής του οργανικού οξέος μπορεί να οδηγήσει στο θάνατο του παθογόνου.

Πολλά προβιοτικά οξυγαλακτικά βακτήρια παράγουν αντιβακτηριακά πεπτίδια, συμπεριλαμβανομένων βακτηριοσινών και μικρών αντιμικροβιακών ουσιών (anti-microbial

proteins, AMPs). Οι βακτηριοσίνες που παράγονται από τα Gram-θετικά βακτήρια (συνήθως τα LAB, συμπεριλαμβανομένης της λακτασίνης Β από τον *L. acidophilus*, της πλανταρισίνης από τον *L. plantarum* και της νισίνης από τον *Lactococcus lactis*) έχουν ένα στενό φάσμα δραστηριότητας και δρουν μόνο έναντι στενά συγγενικών βακτηρίων, αλλά μερικές βακτηριοσίνες είναι επίσης δραστικές έναντι των παθογόνων που μεταδίδονται από τρόφιμα. Οι συνήθεις μηχανισμοί θανάτωσης μέσω της δράσης της βακτηριοσίνης περιλαμβάνουν την καταστροφή κυττάρων-στόχων με σχηματισμό πόρων ή και την αναστολή της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος. Για παράδειγμα, η νισίνη σχηματίζει ένα σύμπλοκο με το πρόδρομο μόριο βιοσύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος, το λιπίδιο II, αναστέλλοντας έτσι τη βιοσύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος των σπορίων βακίλλων. Στη συνέχεια, το σύμπλοκο συσσωματώνει και ενσωματώνει πεπτίδια για να σχηματίσει έναν πόρο στη βακτηριακή μεμβράνη. Αρκετές μελέτες έχουν αποκαλύψει ότι, η παραγωγή βακτηριοσίνης προσδίδει στα στελέχη ανταγωνιστικό πλεονέκτημα σε ένα σύνθετο μικροβιακό περιβάλλον, ως συνέπεια της αντιμικροβιακής τους δραστηριότητας. Η παραγωγή βακτηριοσίνης μπορεί να επιτρέψει την επικράτηση και αύξηση του επιπολασμού των στελεχών που την παράγουν παράλληλα με την άμεση αναστολή της ανάπτυξης των παθογόνων εντός της γαστρεντερικής οδού.

Ορισμένες ειδικές αντιβακτηριακές ενώσεις έχουν περιγραφεί για αρκετά στελέχη του γένους *Bifidobacterium* και έχει επίσης περιγραφεί μια μοναδική βακτηριοσίνη, η bifodocin Β, η οποία παράγεται από το *B. bifidum* NCFB 1454 και είναι δραστική έναντι Gram-θετικών βακτηρίων.

Τέλος, είναι γεγονός, το ότι ορισμένα στελέχη προβιοτικών παράγουν μεταβολίτες που εμποδίζουν την ανάπτυξη τόσο των μυκήτων, όσο και άλλων ειδών βακτηρίων. Ερευνητές έχουν αναφέρει ότι, στελέχη του γένους *Lactobacillus* μπορεί να παράγουν αντιμυκητιακές ουσίες, όπως βενζοϊκό οξύ, μεθυλοδαντοΐνη, μεβαλονο-λακτόνη (methylhydantoin, mevalonolactone) και λιπαρά οξέα βραχείας αλυσίδας (Bermudes et al., 2012).

2.2 Παραγωγή ευεργετικών ενώσεων

Τα εντερικά βακτήρια παράγουν επίσης, μια ποικιλία από λιπαρά οξέα που προάγουν την υγεία. Ορισμένα στελέχη των γενών *Bifidobacterium* και *Lactobacillus* έχει αποδειχθεί ότι παράγουν συζευγμένο λινολεϊκό οξύ (CLA, Conjugated linoleic acid), γνωστό κυρίως για τις αντικαρκινικές και λιποτροπικές του ιδιότητες. Μια επίδραση κατά της παχυσαρκίας του *Lb. plantarum*, ο οποίος παράγει CLA έχει παρατηρηθεί σε παχύσαρκα ποντίκια (παχυσαρκία προκαλούμενη από την διατροφή). Πρόσφατα, η ικανότητα τροποποίησης της σύνθεσης λιπαρών οξέων του ήπατος και του λιπώδους ιστού του ξενιστή μετά από στοματική χορήγηση στελεχών των γενών *Bifidobacterium* και των *Lactobacillus* (που επίσης παράγουν CLA) έχει αποδειχθεί από μελέτες σε ποντίκια, με ό,τι ευεργετική επίδραση αυτό συνεπάγεται. Επίσης, τα προβιοτικά βακτήρια είναι ικανά να παράγουν τα αποκαλούμενα αποσυζευγμένα χολικά οξέα, από τα χολικά άλατα που παράγει ο ξενιστής. Τα αποσυζευγμένα χολικά οξέα παρουσιάζουν ισχυρότερη αντιμικροβιακή δράση σε σύγκριση με εκείνη των χολικών αλάτων που συντίθενται από τον ξενιστή-οργανισμό. Απομένει να διασαφηνιστεί πώς τα προβιοτικά προστατεύονται από τους δικούς τους βακτηριοκτόνους μεταβολίτες ή αν είναι σε κάποιο βαθμό ανθεκτικά στα αποσυζευγμένα χολικά οξέα κερδίζοντας ανταγωνιστικό πλεονέκτημα έναντι των μη-ανθεκτικών παθογόνων (Bermudes et al., 2012).

2.3 Ανταγωνιστικός αποκλεισμός παθογόνων μικροοργανισμών

Οι μηχανισμοί που χρησιμοποιούνται από τα προβιοτικά για την εξάλειψη ή τη μείωση της ανάπτυξης ενός άλλου είδους μικροοργανισμού ποικίλλουν. Σε αυτούς συμπεριλαμβάνεται η δημιουργία εχθρικής μικρο-οικολογίας, η εξάλειψη διαθέσιμων θέσεων υποδοχέων των βακτηρίων, η παραγωγή και η έκκριση αντιμικροβιακών ενώσεων και επιλεκτικών μεταβολιτών, καθώς και η ανταγωνιστική εξάντληση των βασικών θρεπτικών συστατικών.

Οι ειδικές ιδιότητες προσκόλλησης των προβιοτικών, λόγω της αλληλεπίδρασης μεταξύ επιφανειακών πρωτεϊνών και βλεννινών, είναι ικανές να αναστείλουν τον αποικισμό παθογόνων βακτηρίων με αποτέλεσμα, την ανταγωνιστική δράση από ορισμένα στελέχη προβιοτικών κατά της προσκόλλησης των παθογόνων του γαστρεντερικού συστήματος. Τα γένη *Lactobacillus* και *Bifidobacterium* έχει αναφερθεί ότι αναστέλλουν ένα ευρύ φάσμα

παθογόνων από προσκόλληση στον εντερικό βλεννογόνο, συμπεριλαμβανομένων των *E. coli*, *Salmonella sp.*, *Helicobacter pylori*, *Listeria monocytogenes* και *Rotavirus*. Ο αποκλεισμός αυτός προκύπτει ως αποτέλεσμα διαφορετικών μηχανισμών και ιδιοτήτων των προβιοτικών για την αναστολή της πρόσφυσης των παθογόνων, συμπεριλαμβανομένης της παραγωγής ουσιών και της διέγερσης των εντερικών επιθηλιακών κυττάρων (IEC, Intestinal Epithelium Cells). Ο ανταγωνιστικός αποκλεισμός από τα εντερικά βακτήρια βασίζεται σε μια αλληλεπίδραση βακτηρίου προς βακτήριο που διαμεσολαβείται από τον ανταγωνισμό για τα διαθέσιμα θρεπτικά συστατικά και για τις διαθέσιμες θέσεις πρόσφυσης στον εντερικό βλεννογόνο. Για να αποκτήσουν ένα επιπλέον ανταγωνιστικό πλεονέκτημα, τα βακτήρια μπορούν επίσης να τροποποιήσουν το περιβάλλον τους για να το κάνουν δυσμενές για τους ανταγωνιστές τους. Η παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών, όπως το γαλακτικό και το οξικό οξύ, είναι ένα κλασικό παράδειγμα αυτού του τύπου περιβαλλοντικής τροποποίησης. Ορισμένα στελέχη των γενών *Lactobacillus* και *Bifidobacterium* μοιράζονται εξειδικευμένες θέσεις πρόσδεσης με μερικά εντεροπαθογόνα, γεγονός που καθιστά δυνατή την ανταγωνιστικότητα των στελεχών με συγκεκριμένα παθογόνα. Γενικότερα, τα προβιοτικά στελέχη είναι ικανά να αναστείλουν την προσκόλληση των παθογόνων βακτηρίων μέσω στερεοχημικής παρεμπόδισης στους υποδοχείς τους (Bermudes et al., 2012).

2.4 Αυξημένη προσκόλληση στον εντερικό βλεννογόνο

Η προσκόλληση στον εντερικό βλεννογόνο αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για τον αποικισμό των προβιοτικών στελεχών και είναι πολύ σημαντική για την αλληλεπίδραση μεταξύ των προβιοτικών στελεχών και του ξενιστή. Η προσκόλληση προβιοτικών στον εντερικό βλεννογόνο είναι σημαντική και για έναν επιπλέον λόγο: τη διαμόρφωση του ανοσοποιητικού συστήματος και τον ανταγωνισμό κατά της εγκατάστασης παθογόνων.

Έτσι, η προσκόλληση αποτελεί ένα από τα κύρια κριτήρια επιλογής για την αναζήτηση νέων προβιοτικών στελεχών και επιπλέον σχετίζεται άμεσα με ορισμένες ευεργετικές επιδράσεις των προβιοτικών. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια παρουσιάζουν διάφορες επιφανειακές αλληλεπιδράσεις με τα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα (IEC) και την βλέννα. Τα IEC εκκρίνουν βλεννίνη, η οποία είναι ένα σύνθετο μίγμα γλυκοπρωτεϊνών. Η βλεννίνη αποτελεί το κύριο συστατικό του βλεννογόνου και παρεμποδίζει την πρόσφυση των

παθογόνων βακτηρίων. Επιπλέον, περιέχει λιπίδια, ελεύθερες πρωτεΐνες, ανοσοσφαιρίνες και άλατα. Αυτή η συγκεκριμένη αλληλεπίδραση δείχνει πιθανή συσχέτιση μεταξύ των επιφανειακών πρωτεϊνών των προβιοτικών βακτηρίων και του ανταγωνιστικού αποκλεισμού των παθογόνων χάρη στην βλέννα που παράγεται από τον βλεννογόνο. Αρκετές πρωτεΐνες που παράγουν στελέχη του γένους *Lactobacillus* έχει αποδειχθεί ότι προάγουν την ικανότητα πρόσδεσης στο βλεννογόνο και τα βακτήρια εμφανίζουν επιφανειακές προσκολλητίνες που μεσολαβούν στην προσκόλληση στο βλεννογόνο στρώμα. Αυτή η διαδικασία προκαλείται κυρίως από πρωτεΐνες, αν και οι ομάδες σακχάρων και τα λιποτειχοϊκά οξέα (lipoteichoicacids) εμπλέκονται σε ένα βαθμό. Το πιο καλά μελετημένο παράδειγμα των βακτηριακών προσκολλητινών στόχευσης βλέννας, είναι το MUB (mucus binding protein/πρωτεΐνη δέσμησης βλέννας) που παράγεται από στελέχη του *Lactobacillus reuteri*. Οι πρωτεΐνες που παίζουν ρόλο στον φαινότυπο της προσκόλλησης του βλεννογόνου των γαλακτοβάκιλλων εκκρίνονται σε μεγαλύτερο βαθμό και, είτε αγγιστρώνονται στη μεμβράνη μέσω ενός τμήματος λιπιδίου, είτε ενσωματώνονται εξολοκλήρου στο κυτταρικό τοίχωμα. Η συμμετοχή επιφανειακών πρωτεϊνών στην αλληλεπίδραση με το ανθρώπινο πλασμινογόνο και τα εντεροκύτταρα έχει αναφερθεί σε δύο από τα γνωστότερα προβιοτικά, το *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* και το *Bifidobacterium bifidum*, αντίστοιχα. Υπό ορισμένες συνθήκες, αυτές οι πρωτεΐνες μπορεί να παίζουν ένα ρόλο στη διευκόλυνση του αποικισμού του ανθρώπινου εντέρου μέσω αποικοδόμησης της εξωκυτταρικής μήτρας των κυττάρων ή με διευκόλυνση της στενής επαφής με το επιθήλιο. Η MarA, μια πρωτεΐνη που προάγει τη συγκόλληση του βλεννογόνου, έχει αναφερθεί ότι διαμεσολαβεί στη σύνδεση του *L. reuteri* και του *L. fermentum* με τη βλέννα. Τα προβιοτικά, όπως ο *L. plantarum*, έχουν αναφερθεί ότι επάγουν την MUC2 και την MUC3 βλεννίνη και αναστέλλουν την προσκόλληση των εντεροπαθογόνων *E. coli*. Αυτές οι παρατηρήσεις υποδεικνύουν ότι τα ενισχυμένα βλεννώδη στρώματα και ο γλυκοκάλυκας (glycocalyx) που επικαλύπτουν το εντερικό επιθήλιο, καθώς και η κατοχή θέσεων μικροβιακής σύνδεσης από τα *Lactobacillus* spp., παρέχουν προστασία από την εισβολή παθογόνων.

Οι Collado και συνεργάτες (2007) αξιολόγησαν την πρόσφυση στελεχών του είδους *Bifidobacterium longum* και του είδους *Bifidobacterium catenulatum* στην ανθρώπινη εντερική βλέννα και συνέκριναν τα αποτελέσματα με αυτά των πειραμάτων ελέγχου που διεξήχθησαν με άλλα, ευαίσθητα στα οξέα, στελέχη. Αναφέρουν ότι σε 2/4 των περιπτώσεων, τα ανθεκτικά στο οξύ στελέχη παρουσίασαν μεγαλύτερη ικανότητα προσκόλλησης στην

ανθρώπινη εντερική βλέννα απ' ότι τα ευαίσθητα. Η ικανότητα των bifidobacteria να αναστέλλουν την προσκόλληση των παθογόνων στο βλεννογόνο δεν βελτιώνεται απλά και μόνο με την απόκτηση αντοχής στα οξέα. Γενικά, όμως, η αυξημένη αντοχή σε οξέα στα bifidobacteria, μπορεί πράγματι να είναι μια λογική ένδειξη για την αρχική επιλογή στελεχών, τα οποία να έχουν τα βασικά προαπαιτούμενα, όπως αυξημένη σταθερότητα και βελτιωμένες ιδιότητες προσκόλλησης επιφανειακά, φαινόμενα που αυξάνουν την πιθανότητα λειτουργικότητάς τους ως προβιοτικά, εναντίον ορισμένων παθογόνων. Το μίγμα των προβιοτικών και του VSL3 (μίγμα που περιέχει ορισμένα είδη *Lactobacillus*) έχει αναφερθεί, ότι αυξάνει τη σύνθεση των βλεννινών της κυτταρικής επιφάνειας (επιθηλιακά κύτταρα) και προωθεί την έκφραση γονιδίων βλεννίνης κατά τέτοιον τρόπο που επηρεάζεται από την πρόσφυση των βακτηριακών κυττάρων στο εντερικό επιθήλιο.

Τα προβιοτικά προκαλούν επίσης ποιοτικές (επιθυμητές) αλλοιώσεις των εντερικών βλεννινών (πρωτεϊνών) που εμποδίζουν τελικά τη σύνδεση των παθογόνων με το βλεννογόνο. Το βακτηριακό συστατικό που εμπλέκεται στην πρόσφυση των στελεχών LB και BG2FO4 του είδους *L. acidophilus* στο βλεννογόνο είναι ανθεκτικό στην πρωτεάση και σχετίζεται με την βακτηριακή επιφάνεια. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι, το βακτηριακό αυτό συστατικό αποικοδομείται δίνοντας ένα αντιμικροβιακό πεπτίδιο, το οποίο προσδίδει αντιμικροβιακές ιδιότητες στον ξενιστή και παρέχει ένα παράδειγμα του τρόπου με τον οποίο οι μεγάλες επιφανειακές πρωτεΐνες μπορούν να εμφανίσουν εξελικτικά ευεργετικά πλειοτροπικά αποτελέσματα.

Τα προβιοτικά στελέχη μπορούν επίσης να προκαλέσουν την απελευθέρωση αμυντικών συστατικών από τα επιθηλιακά κύτταρα. Αυτά είναι μικρά πεπτίδια ή πρωτεΐνες και είναι δραστικά έναντι των βακτηρίων, μυκήτων και ιών. Επιπλέον, αυτά τα μικρά πεπτίδια/πρωτεΐνες σταθεροποιούν τη λειτουργία του φραγμού του εντέρου. Παρατηρήσεις έδειξαν ότι, σε απόκριση της προσβολής από παθογόνα βακτήρια, ο ξενιστής εμπλέκει την πρώτη γραμμή χημικής άμυνας αυξάνοντας την παραγωγή αντιμικροβιακών πρωτεϊνών (AMP), όπως α- και β-defensins, cathelicidins, C-τύπου lectins και ριβονουκλεάσες. Πολλές AMPs είναι ένζυμα που θανατώνουν βακτήρια προκαλώντας ενζυμική αποδιάταξη του κυτταρικού τοιχώματος ή ακόμα και μη ενζυμική διάσπαση της βακτηριακής μεμβράνης. Τα ένζυμα που εκφράζονται από κύτταρα τύπου Paneth (τα οποία είναι ένας από τους κύριους κυτταρικούς τύπους του επιθηλίου του λεπτού εντέρου, μαζί με τα κύτταρα Goblet, τα εντεροκύτταρα και τα εντεροενδοκρινικά κύτταρα) είναι αυτά που προσβάλλουν τις

βακτηριακές μεμβράνες. Η λυσοζύμη υδρολύει γλυκοζιτικούς δεσμούς της πεπτιδογλυκάνης του τοιχώματος και η φωσφολιπάση αντιστοιχώς, τα φωσφολιπίδια της βακτηριακής μεμβράνης. Οι defensins (αμυνοσίνες) περιλαμβάνουν μία κυρίαρχη οικογένεια πεπτιδίων που διαταράσσουν τη μεμβράνη στα σπονδυλωτά. Η αλληλεπίδραση τους με τη βακτηριακή μεμβράνη δεν είναι εξειδικευμένη και κυρίως συνδέεται με ανιονικές φωσφολιπιδικές ομάδες της επιφάνειας της μεμβράνης μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Αυτή η αλληλεπίδραση δημιουργεί πόρους κατάλληλους για το μέγεθος των αμυνοσινών στη βακτηριακή μεμβράνη διαταράσσοντας την ακεραιότητα της μεμβράνης και προάγοντας τη λύση των μικροοργανισμών. Οι cathelicidins είναι συνήθως κατιονικά, α -ελικοειδή πεπτίδια που συνδέονται με τις μεμβράνες των βακτηρίων μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων και, όπως και οι αμυνοσίνες, οδηγούν στην διάσπαση της μεμβράνης.

Η διαδικασία μικροβιακής προσκόλλησης των οξυγαλακτικών βακτηρίων περιλαμβάνει επίσης ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, στερεοχημικές δυνάμεις, λιποτειχοϊκά οξέα και άλλες πιο ειδικές δομές που καλύπτονται από λεκτίνες. Έχει χαρακτηριστεί μια ευρεία ποικιλία μορίων που μεσολαβούν στην πρόσφυση των παθογόνων βακτηρίων. Ωστόσο, η κατανόηση όλων των παραγόντων που συνδέονται με την πρόσφυση στελεχών του γένους *Lactobacillus* είναι εξαιρετικά περιορισμένη. Απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για την αναγνώριση και ανάλυση της λειτουργικής δράσης διαφόρων συστατικών των στρωμάτων του βλεννογόνου καθώς και των σύνθετων αλληλεπιδράσεων των στρωμάτων του βλεννογόνου, των μικροοργανισμών όπως των προβιοτικών και των επιθηλιακών κυττάρων με υποκείμενα συγγενή και προσαρμοστικά ανοσοποιητικά συστήματα (Bermudes et al., 2012).

2.5 Ενίσχυση επιθηλιακού φραγμού

Πιο αναλυτικά, η ενίσχυση του επιθηλιακού φραγμού αποτελεί έναν από τους μηχανισμούς δράσης των προβιοτικών δεδομένου ότι, το εντερικό επιθήλιο είναι σε συνεχή επαφή με το περιεχόμενο του εντερικού αυλού και κατ' επέκταση με τους παθογόνους μικροοργανισμούς. Εκτός αυτού, ο επιθηλιακός φραγμός προστατεύει τον οργανισμό από το περιβάλλον γενικότερα. Αυτό επιτυγχάνεται από ένα σύνολο αμυντικών μηχανισμών, όπως το βλεννογόνο στρώμα, τα αντιμικροβιακά πεπτίδια, το εκκριτικό IgA και το σύμπλεγμα επιθηλιακής πρόσφυσης. Αυτό το σύστημα σε περίπτωση που διαταραχθεί λειτουργικά παύει να προστατεύει τον οργανισμό και εφόσον βρίσκεται υπό συνεχόμενη απειλή, τα βακτηριακά κύτταρα και τα τροφιμογενή αντιγόνα μπορούν να φτάσουν στον υποβλεννογόνο και να προκαλέσουν φλεγμονώδεις αποκρίσεις, με αποτέλεσμα πολλές φορές εντερικές διαταραχές όπως, φλεγμονώδεις παθήσεις του εντέρου. Το γεγονός ότι, τα μη παθογόνα και ιδιαίτερα τα προβιοτικά συμβάλλουν στην διατήρηση και την λειτουργικότητα αυτού του φραγμού οδήγησε στην συστηματική μελέτη αυτών των μηχανισμών. Σε αρκετές από αυτές έχει διαπιστωθεί ότι, τα προβιοτικά ενισχύουν την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται σε μια στενή σηματοδότηση των συνδέσεων και αυτό έχει ως αποτέλεσμα, την ενίσχυση του εντερικού φραγμού. Πιο συγκεκριμένα, τα είδη του γένους *Lactobacillus* διαμορφώνουν τη ρύθμιση αρκετών γονιδίων που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες σύνδεσης της πρόσφυσης όπως την E-cadherin και β-catenin σε ένα μοντέλο φραγμού T84. Επιπλέον, η εγκατάσταση και ανάπτυξη στελεχών του γένους *Lactobacillus* επηρεάζει τη φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών σύνδεσης της πρόσφυσης και την αφθονία ισομερών της πρωτεϊνικής Κινάσης C (Protein Kinase C / PKC), όπως η PKCδ, μεταβάλλοντας θετικά την λειτουργία του επιθηλιακού φραγμού. Επίσης, πρόσφατες μελέτες καταδεικνύουν ότι τα προβιοτικά εκτός της ενίσχυσης του επιθηλιακού φραγμού συμβάλλουν και στην επιδιόρθωση της λειτουργίας του μετά από βλάβη, που αφορά τα κύτταρα τύπου T84 και Caco-2, μετά από διατάραξή του από το εντεροπαθογόνο *E. coli*. Αυτό εξηγείται από την αυξημένη έκφραση και ανακατανομή των πρωτεϊνών των ζωνών (ZO-2) και PKC με αποτέλεσμα την ανακατασκευή του συμπλέγματος στενών συνδέσεων. Το μίγμα προβιοτικών VSL3, που περιέχει το στέλεχος *Lactobacillus casei* DN-114001, προστατεύει με τον ίδιο μηχανισμό την λειτουργία του εντερικού φραγμού. Ειδικά το μίγμα VSL3 προστατεύει το επιθηλιακό φραγμό και αυξάνει την έκφραση των πρωτεϊνών σύνδεσης ενεργοποιώντας

τις οδούς σηματοδότησης p38 και της εξωκυτταρικής ρύθμισης της κινάσης (Bermudes et al., 2012).

Μια αλληλεπίδραση μεταξύ των επιπέδων προφλεγμονωδών κυτταροκινών και της διαπερατότητας του εντέρου έχει περιγραφεί σε έναν αριθμό εντερικών ασθενειών. Χρησιμοποιώντας προβιοτικά, η πρόληψη της προκαλούμενης από κυτταροκίνες, επιθηλιακής βλάβης, η οποία είναι χαρακτηριστική της φλεγμονώδους νόσου του εντέρου, μπορεί επίσης να συμβάλει στην ενίσχυση του φραγμού του βλεννογόνου.

Δύο απομονωμένα και καθαρισμένα πεπτίδια που εκκρίνονται από τον *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG), τα οποία ονομάζονται p40 και p75, έχουν πρόσφατα αποδειχθεί ότι προλαμβάνουν την επαγόμενη από κυτταροκίνη απόπτωση κυττάρων ενεργοποιώντας την αντι-αποπτωτική πρωτεϊνική κινάση B (PKB / Akt) σε φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη -3'-κινάση και αναστέλλοντας την προ-αποπτωτική κινάση πρωτεΐνης ενεργοποιημένη με p38 / μιτογόνο MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases, MAPK). Τα αποδεικτικά στοιχεία ότι τα p40 και p75 είναι υπεύθυνα για τα αποτελέσματα αυτά προέρχονται από την παρατήρηση ότι η αντι-αποπτωτική λειτουργία καταργείται όταν τα p40- και p75-ειδικά αντισώματα προστίθενται *in vitro* σε επιθηλιακά κύτταρα ποντικών και ανθρώπων ή σε μοσχεύματα που προέρχονται από ποντικούς. Άλλα πεπτίδια χαμηλού μοριακού βάρους (LMW, Low Molecular Weight) που εκκρίνονται από τον LGG επάγουν την έκφραση πρωτεϊνών θερμικού σοκ και ενεργοποιούν το MAPK.

Οι γλυκοπρωτεΐνες βλέννας (βλεννίνες) είναι μείζονα μακρομοριακά συστατικά της επιθηλιακής βλέννας που εμπλέκονται στην υγεία. Τα προβιοτικά μπορεί να προάγουν την έκκριση της βλεννογόνου ως έναν μηχανισμό για τη βελτίωση της λειτουργίας των φραγμών και τον αποκλεισμό των παθογόνων παραγόντων όπως τα παθογόνα βακτήρια. Αρκετά είδη του γένους *Lactobacillus* αυξάνουν την έκφραση βλεννίνης σε ανθρώπινες εντερικές κυτταρικές σειρές. Ωστόσο, αυτό το προστατευτικό αποτέλεσμα εξαρτάται από την προσκόλληση του *Lactobacillus* στην κυτταρική μονοστιβάδα, η οποία πιθανότατα δεν συμβαίνει *in vivo*. Αντίστροφα, μια άλλη ομάδα έχει δείξει ότι το εκχύλισμα κυττάρων του *Lactobacillus acidophilus* A4 είναι επαρκές για να αυξήσει την έκφραση του *MUC2* (Mucin 2) σε κύτταρα HT29 ανεξάρτητα από την πρόσδεση. Επιπροσθέτως, το VSL3, που περιέχει ορισμένα είδη *Lactobacillus*, αυξάνει την έκφραση των *MUC2*, *MUC3* και *MUC5AC* σε κύτταρα HT29. Οι μελέτες *in vivo* είναι λιγότερο συνεπείς, διότι δεν έχουν πραγματοποιηθεί συστηματικά. Ποντίκια στα οποία δόθηκε VSL3 ημερησίως

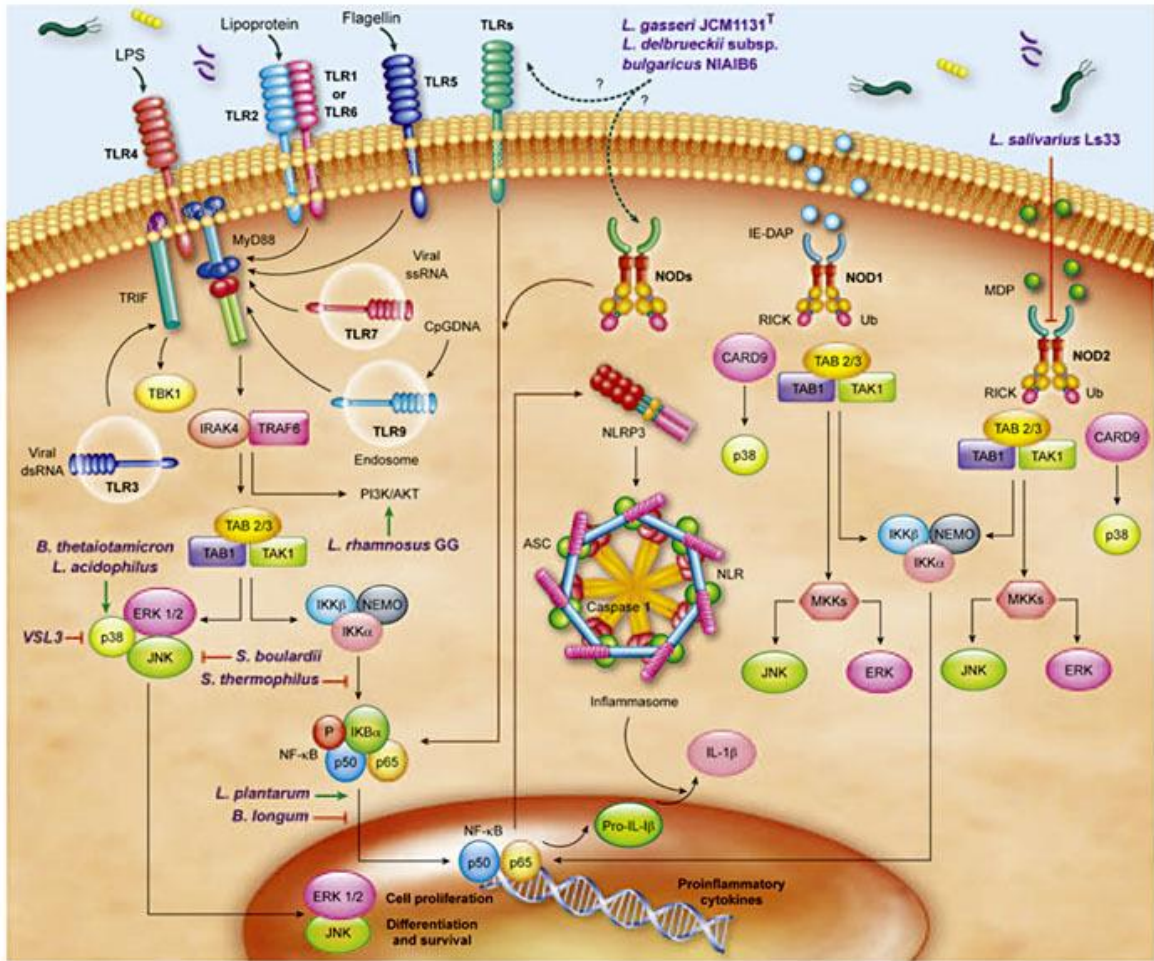
για 14 ημέρες φάνηκε να μην παρουσιάζουν αλλοιωμένη έκφραση βλεννίνης ή διαφορετικό πάχος στρώματος βλενογόνου. Αντιστρόφως, οι αρουραίοι που έλαβαν VSL3 σε παρόμοια ημερήσια δόση για 7 ημέρες είχαν 60 φορές πολλαπλάσια αύξηση στην έκφραση *MUC2* και μία συνακόλουθη αύξηση στην έκκριση βλεννίνης. Ως εκ τούτου, η παραγωγή βλεννογονικών πρωτεϊνών μπορεί να αυξηθεί από τα προβιοτικά *in vivo*, αλλά απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για να καταλήξουν σε οριστική δήλωση (Bermudes et al., 2012).

2.6 Προβιοτικά και ανοσοποιητικό σύστημα

Είναι γνωστό ότι τα προβιοτικά βακτήρια μπορούν να ασκήσουν ανοσορυθμιστική δράση. Αυτά τα βακτήρια έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με επιθηλιακά και δενδριτικά κύτταρα (DCs, Dendritic Cells) και με μονοκύτταρα / μακροφάγα και λεμφοκύτταρα. Το ανοσοποιητικό σύστημα μπορεί να διακριθεί μεταξύ των εγγενών και των προσαρμοστικών συστημάτων (δηλαδή επίκτητης ανοσίας). Η προσαρμοστική ανοσοαπόκριση εξαρτάται από τα Β και Τ λεμφοκύτταρα, τα οποία είναι εξειδικευμένα για συγκεκριμένα αντιγόνα. Αντίθετα, το έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα ανταποκρίνεται σε κοινές δομές που ονομάζονται *παθογόνα μοριακά πρότυπα* (PAMPs Pathogen Molecular Patterns) που μοιράζονται τα περισσότερα παθογόνα. Η πρωταρχική απόκριση σε παθογόνους παράγοντες ενεργοποιείται από υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων (PRRs, pattern recognition receptors), οι οποίοι δεσμεύουν PAMPs. Τα καλύτερα μελετημένα PRRs (pattern recognition receptors), είναι υποδοχείς τύπου “διοδίων”(TLRs, toll-like receptors).

Επιπλέον, οι εξωκυτταρικοί υποδοχείς λεκτίνης τύπου C (C-LRs, C-type lectin receptors) και οι υποδοχείς τύπου NOD (nucleotide-binding oligomerization), οι οποίοι περιέχουν ενδοκυτταρικό νουκλεοτίδιο που δεσμεύουν ολιγομερή (NOD) είναι γνωστό ότι μεταδίδουν σήματα κατά την αλληλεπίδραση με βακτήρια.

Είναι γεγονός ότι τα κύτταρα-ξενιστές που αλληλεπιδρούν περισσότερο με τα προβιοτικά είναι τα IECs. Επιπλέον, τα προβιοτικά μπορούν να αντιμετωπίσουν τα DCs, τα οποία έχουν σημαντικό ρόλο στην έμφυτη και στην προσαρμοστική ανοσία. Και τα δύο (IECs και DCs) μπορούν να αλληλεπιδράσουν και να ανταποκριθούν σε μικροοργανισμούς του εντέρου μέσω των PRRs (Bermudes et al., 2012).



Εικόνα 1. Αλληλεπίδραση των προβιοτικών με το ανοσοποιητικό σύστημα που σχετίζεται με το έντερο.

ASC = πρωτεΐνη που συνδέεται με την απόπτωση που περιέχει δείκτη CARD, CARD9 = πρωτεΐνη (9) που περιέχει περιοχή πρόσληψης κασπάσης, *B. Thetaiotamicron* = *Bacteroides Thetaiotamicron*, ERK = εξωκυτταρική ρυθμιζόμενη κινάση, IE-DAP = D-gamma-glutamyl-meso-DAP. , IKK = IκB κινάση., IRAK4 = κινάση 4 που σχετίζεται με τον υποδοχέα IL-1, JNK = Jun N-τερματική κινάση, MDP = διπεπτίδιο muramyl, MKK= μιτογονικός ενεργοποιημένη κινάση κινάση, NEMO = NF-κB βασικός διαμορφωτής, TAB 1/2/3 = δεσμευτικές πρωτεΐνες TAK, TAK1 = εξαρτώμενη από την ουβικιτίνη κινάση των MKK και IKK, TBK1 = κινάση 1, πρωτεΐνης σερίνης / θρεονίνης, TRAF6 = παράγοντας 6 που σχετίζεται με τον υποδοχέα TNF, Ub = ουβικιτίνη ubiquitin.

2.7 Ζυμούμενα προϊόντα γάλακτος

Πολλά από τα γνωστά γαλακτοκομικά τρόφιμα που καταναλώνουμε στις μέρες μας δεν θα υπήρχαν χωρίς τη δράση των μικροοργανισμών σε αυτά (Πίνακας 3). Ο λόγος είναι ότι χάρη σε συγκεκριμένους μικροοργανισμούς πραγματοποιούνται βιοχημικές διεργασίες, οι οποίες μετατρέπουν την πρώτη ύλη και συγκεκριμένα το γάλα, σε ένα τελικό προϊόν όπως το γιαούρτι, το ξινόγαλο, τα τυριά, και άλλα.

Επιπλέον της νέας χημικής σύστασης των τελικών προϊόντων σε σχέση με το γάλα, κάποιοι από τους μικροοργανισμούς αυτούς προσδίδουν στα τρόφιμα και ευεργετικές για τον άνθρωπο που τα καταναλώνει, ιδιότητες. Αυτοί οι μικροοργανισμοί ονομάζονται προβιοτικοί. Συνεπώς το διπλό όφελος που μπορεί να αποφέρει στον άνθρωπο μια ζύμωση, φέρει τα ζυμούμενα τρόφιμα και συγκεκριμένα τα γαλακτοκομικά, στο επίκεντρο της παρούσας μελέτης.

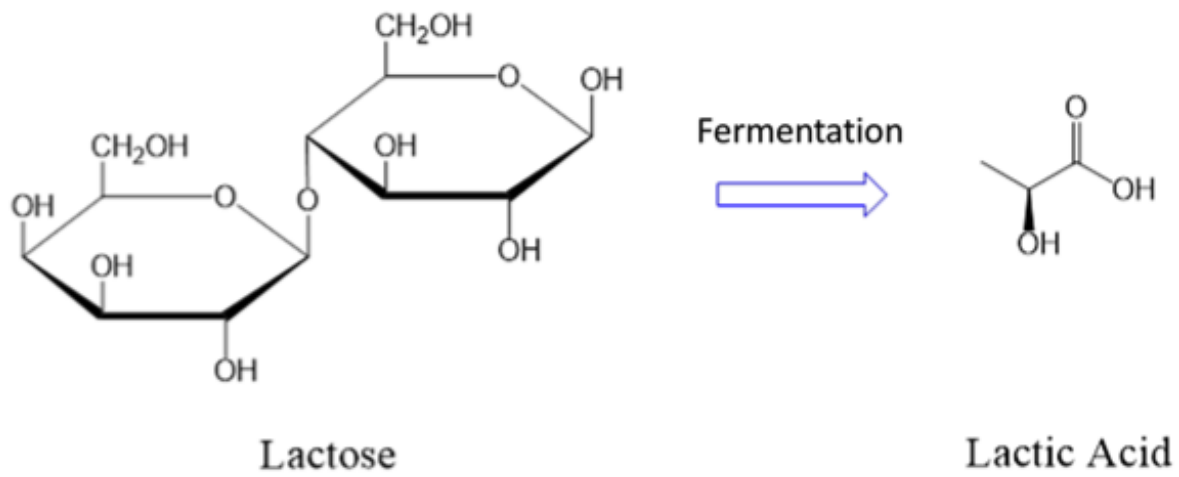
Τα ζυμούμενα γαλακτοκομικά προϊόντα λοιπόν, αποτελούν μια ομάδα τροφίμων που έχει ως χαρακτηριστικό γνώρισμα ότι για την επίτευξη της ζύμωσης χρησιμοποιούνται επιλεγμένα (από τεχνολογικής και υγειονομικής πλευράς) οξυγαλακτικά βακτήρια, τα οποία παράγουν σε σημαντικές ποσότητες γαλακτικό οξύ, προκαλώντας διάφορες φυσικοχημικές μεταβολές και επιπλέον μπορεί να προσδίδουν και άλλες επιθυμητές ιδιότητες, όπως προβιοτική δράση. Η προβιοτική δράση αυτής της κατηγορίας μικροοργανισμών (LAB) είναι ιδιαίτερα σημαντική για τον άνθρωπο διότι πρόκειται για τα πιο ανθεκτικά είδη προβιοτικών μικροοργανισμών, δεδομένου ότι οι συνθήκες των τροφίμων, συμπεριλαμβανομένης της δράσης του πεπτικού συστήματος είναι ιδιαίτερα δυσμενείς για τα περισσότερα βακτήρια. Τα γένη αυτών των βακτηρίων που χρησιμοποιούνται συνηθέστερα στις ζυμώσεις των γαλακτοκομικών τροφίμων είναι τα εξής: **Lactococcus**, **Streptococcus**, **Leuconostoc**, **Pediococcus**, **Lactobacillus**, και **Enterococcus**. Συνολικά υπάρχουν 12 γένη οξυγαλακτικών βακτηρίων, και όλα έχουν την ικανότητα να καταβολίζουν τους υδατάνθρακες (σάκχαρα-λακτόζη) παράγοντας γαλακτικό οξύ (Σχήμα 2) σε σημαντικές ποσότητες, ωστόσο δεν χρησιμοποιούνται όλα στα τρόφιμα, για διάφορους λόγους, κυρίως τεχνολογικούς (Keweloh, 2013).

Οι λειτουργικές ιδιότητες των μικροοργανισμών στα ζυμωμένα τρόφιμα περιλαμβάνουν προβιοτικές, αντιμικροβιακές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες, καθώς επίσης και την παραγωγή πεπτιδίων, την ινωδολυτική δράση, την παραγωγή πολυ-γλουταμινικού οξέος, την αποικοδόμηση αντιπηκτικών ενώσεων και άλλα. Όλα αυτά αποτελούν σημαντικό

κριτήριο για την επιλογή της εναρκτήριας καλλιέργειας σε ένα λειτουργικό ζυμούμενο γαλακτοκομικό προϊόν (Tamang et al., 2016).

Ο αρχικός σκοπός της ζύμωσης του γάλακτος ήταν η παράταση της διάρκειας ζωής του. Με αυτό προέκυψαν πολλά πλεονεκτήματα, όπως η βελτιωμένη γεύση και αφομοίωση, καθώς και η δημιουργία μιας ευρείας ποικιλίας προϊόντων. Ιστορικά η ζύμωση του γάλακτος μπορεί να ανιχνευθεί γύρω στο 10.000 π.Χ. Είναι πιθανό ότι η ζύμωση αρχικά προέκυψε αυθόρμητα από την αυτόχθονη μικροχλωρίδα που προϋπήρχε στο γάλα. Από εύνοια της τύχης, τα βακτήρια ήταν των γενών *Lactococcus* και *Lactobacillus* που κατά κανόνα καταστέλλουν αποτελεσματικά την ανάπτυξη αλλοιογόνων και παθογόνων μικροοργανισμών για τον άνθρωπο. Η εξελικτική πορεία αυτών των προϊόντων καθορίστηκε πιθανότατα από το κλίμα της εκάστοτε περιοχής από την οποία προήλθαν. Αξίζει να σημειωθεί ότι η θερμόφιλη ζύμωση γαλακτικού οξέος ευνοείται προφανώς από τις υψηλές θερμοκρασίες, όπως αυτές των υποτροπικών κλιμάτων. Υπάρχει και η ζύμωση γαλακτικού οξέος που διενεργείται από μεσόφιλα βακτήρια η οποία συμβαίνει αντίστοιχα σε πιο χαμηλές θερμοκρασίες και επομένως αυτές οι ζυμώσεις πραγματοποιούνται κατά κανόνα σε βόρειες χώρες, όπως οι Σκανδιναβικές.

Σήμερα οι ζυμώσεις ελέγχονται με τον εμβολιασμό του γάλακτος με συγκεκριμένες καλλιέργειες εκκίνησης αλλά και με ελεγχόμενες συνθήκες επεξεργασίας γενικότερα. Ορισμένα από τα γνωστότερα γαλακτοκομικά προϊόντα που έχουν υποστεί ζύμωση είναι: "acidophilus milk" (γάλα ζυμούμενο με καλλιέργεια του είδους *Lactobacillus acidophilus*), "sour cream" (κρέμα γάλακτος όπου έχουν αναπτυχθεί είδη του γένους *Lactococcus* όπως *L. cremoris*, *L. lactis* και *L. lactis* biovar *diacetylactis*), "cultured buttermilk" (ζυμούμενο βουτυρόγαλο με στελέχη των ειδών *Lactococcus lactis* και *Leuconostoc citrovorum*), "kefir" (κεφίρ, ζυμούμενο γάλα κεντρικής Ασίας και Ρωσίας, ελαφρώς αλκοολούχο, και ανθρακούχο προϊόν, που ζυμώνεται από τα είδη: *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus kefirianofaciens*, *Lactococcus lactis* και κάποια είδη του γένους *Leuconostoc*, και "folk yoghurt" (προέλευσης Θιβέτ, παρόμοιο με το κεφίρ) "koumiss" (ζυμουμένο ανθρακούχο και αλκοολούχο γάλα της Κεντρικής Ασίας), "filmjölk" (Σουηδικό ζυμούμενο ανθρακούχο γάλα), και "viiili" (Φινλανδικό ζυμούμενο γάλα).



Εικόνα 2. Βασικό μεταβολικό μονοπάτι ζύμωσης της γλυκόζης σε γαλακτικό οξύ. (Πηγή: Διαδίκτυο).

Πίνακας 3. Αναλυτικός πίνακας με είδη ζυμούμενων γαλακτοκομικών τροφίμων (Yoga et al., 2018)

Products	Raw materials	Country	Microbiota	Bacteriocin producers	Probiotic Strains	Ref.
Airag/ Chigee	Mare's milk	Mongolia	<i>Lactococcus garvieae</i> , <i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> , <i>Streptococcus</i> <i>parauberis</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Leuconostoc</i> <i>mesenteroides</i> and <i>Leuconostoc</i> <i>pseudomesenteroides</i>	<i>Enterococcus</i> <i>durans</i>	-	20, 21
Amasi and mafi	Cow's milk	South Africa, Zimbabwe	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Leu. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> , <i>Leu. citreum</i> , <i>Leu. lactis</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> and <i>Lb. plantarum</i>	-	-	14, 22
Amasi/ hodzeko/ mukaka wakakora	Cow's milk	Zimbabwe	LAB (<i>Lb. helveticus</i> , <i>Lb.</i> <i>plantarum</i> , <i>Lb.</i> <i>delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Lb. casei</i> subsp. <i>casei</i> and <i>Lb. casei</i> subsp. <i>pseudopplantarum</i>) Yeasts (<i>Saccharomyces</i> <i>cerevisiae</i> , <i>Candida</i> <i>lusitaniae</i> , <i>C. colliculosa</i> , <i>S. dairenensis</i> , <i>Dekera</i> <i>bruxillensis</i> , <i>C.</i> <i>lipolytica</i> , <i>C. tropicalis</i>)	<i>Lb. plantarum</i> AMA-K	-	22-24
Dadih/ dadiah (yoghurt- like)	Buffalo milk	West Sumatra, Indonesia	LAB (<i>Streptococcus</i> <i>faecalis</i> subsp. <i>liquefaciens</i> , <i>S. cremoris</i> , <i>S. lactis</i> subsp. <i>diacetylactis</i> , <i>S. lactis</i> , <i>Leuconostoc</i> <i>paramesenteroides</i> , <i>Lb.</i> <i>casei</i> subsp. <i>casei</i> and <i>Lb. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> , <i>Lb.</i> <i>paramesenteroides</i> , <i>Lb.</i> <i>rhamnosus</i> , <i>Lb.</i> <i>plantarum</i> , <i>Lb.</i> <i>paracasei</i> , <i>Lb.</i> <i>pseudomesenteroides</i> , <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>); yeasts (<i>Endomyces lactis</i> , <i>Pichia jadinii</i> , <i>Candida</i> <i>stellimalicola</i>), others (<i>Micrococcus varians</i> , <i>Staphylococcus</i> <i>saprophyticus</i> , <i>Bacillus</i> <i>cereus</i> var. <i>mycoides</i> and <i>Acetobacter cerevisiae</i>)	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> (IS-10285 & IS-16183), <i>Lb.</i> <i>brevis</i> IS- 26958, <i>Lb.</i> <i>casei</i> IS-7257 and <i>Lb.</i> <i>plantarum</i> S130	<i>Lb.</i> <i>plantarum</i> IS-10506, <i>E.</i> <i>faecium</i> IS- 27526, <i>Lb.</i> <i>plantarum</i> S130	12, 13, 25-29
Dahi (yoghurt- like)	Cow's and buffalo milk or mixture	India, Pakistan	<i>Streptococcus bovis</i> , <i>Lb.</i> <i>fermentum</i> , <i>Lb.</i> <i>delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lb.</i> <i>delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i> , <i>E.</i> <i>faecium</i> , <i>S. thermophilus</i> , <i>Leu. mesenteroides</i> ssp.	<i>Streptococcus</i> <i>bovis</i> J2 40-2, <i>Lc. lactis</i> CM1	<i>Lb.</i> <i>acidophilu</i> sLA 02, <i>Lb.</i> <i>delbruecki</i> <i>i</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	11, 30-34

Πίνακας 4. Αναλυτικός πίνακας με είδη ζυμούμενων γαλακτοκομικών τροφίμων (Yoga et al., 2018)

Products	Raw materials	Country	Microbiota	Bacteriocin producers	Probiotic Strains	Ref.
			<i>marxianus</i> , <i>Kazahtan uiosporus</i> and <i>Candida ethanolica</i>).			
Suusac	Camel milk	Kenya	LAB (<i>Lb. curvatus</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. salivarius</i> , <i>Lc. raffinolactis</i> and <i>Leu. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>); yeasts (<i>Candida krusei</i> , <i>Geotrichum penicillatum</i> and <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>)	-	-	47
Tarag (yogurt-like)	Cow's milk/camel milk/yak milk/goat milk	Mongolia	LAB (<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lb. helveticus</i> , and <i>S. thermophilus</i>), yeasts (<i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Issatchenkia orientalis</i> , and <i>Kazachstania unispora</i>)	-	<i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. paracasei</i>	48,49
Gioddu	Sheep or goat milk	Sardinia	<i>Lb. paracasei</i> , <i>Lb. plantarum</i> and <i>Lb. reuteri</i>	<i>Lb. paracasei</i> O1b46As2, O1b46As3, and O1o45As2	<i>Lb. reuteri</i> , <i>Lb. paracasei</i> , <i>Lb. plantarum</i>	50
Jben	Cow's or goat milk	Morocco	<i>Lc. lactis</i>	<i>Lc. lactis</i> CCMM/IAV/BK2	-	51
Sameel	Sheep/goat/cow/camel milk	Saudi Arabia	LAB (<i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. pentosus</i> , <i>Lc. lactis</i> ssp <i>lactis</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. salivarius</i> , <i>Lb. paracasei</i> ssp <i>paracasei</i>) Yeast (<i>C. lusitania</i> , <i>Cryptococcus laurentii</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>C. kefy</i>)	-	-	53
Koumiss	Mare's milk	Central Asia (Mongolia, China)	LAB (<i>Lb. casei</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. helveticus</i>) Yeast (<i>C. pararugosa</i> , <i>Dekkera anomala</i> ,	<i>Lb. plantarum</i> IMAU10116, <i>Lb. fermentum</i> SM-7	<i>Lb. casei</i> Zhang, <i>Lb. fermentum</i> SM-7	51-53

Πίνακας 5. Αναλυτικός πίνακας με είδη ζυμούμενων γαλακτοκομικών τροφίμων (Yoga et al., 2018)

Products	Raw materials	Country	Microbiota	Bacteriocin producers	Probiotic Strains	Ref.
			<i>mesenteroides</i> , <i>Leu. mesenteroides</i> ssp. <i>dextranicum</i> , <i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> , <i>Lb. raffinolactis</i> and <i>Pediococcus</i> . <i>Pentosaceus</i>		M3 40-3	
Dangke (cheese-like)	Buffalo milk	Makasar, Indonesia	LAB (<i>Lactobacillus</i> spp.),	-	-	35-38
Kule naoto	Cow's milk	Maasai, Kenya	<i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. paracasei</i> and <i>Lb. acidophilus</i>	-	<i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. fermentum</i>	9,39
Kurut	Yak milk	Qinghai, China	LAB (<i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. minor</i> , <i>Lb. curvatus</i>), and yeasts	-	<i>Lb. acidophilus</i> E2, <i>Lb. casei</i> G12	40,41
Raïb	Cow's milk	Morocco	<i>Lc. lactis</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>E. faecalis</i>	<i>Lactococcus lactis</i> , <i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i>	-	42
Rob	Cow's milk	Sudan	LAB (<i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lc. lactis</i> and <i>Streptococcus salivarius</i>); yeasts (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> and <i>Candida kefir</i>)	-	<i>Lc. lactis</i> , <i>Lb. delbrecukii</i> , <i>E. faecium</i>	43,44
Sethemi	Cow's milk	South Africa	LAB (lactobacilli, leuconostocs and lactococci), yeasts (<i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Cryptococcus curvatus</i> , <i>Cryptococcus humicola</i> and <i>Kluyveromyces marxianus</i>)	-	-	45
Shubat	Camel milk	China	LAB (<i>Lb. sakei</i> , <i>E. faecium</i> , <i>Lb. helveticus</i> , <i>Leu. lactis</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>Lb. brevis</i> and <i>Weissella hellenica</i>), yeasts (<i>Kluyveromyces</i>	-	-	46

Πίνακας 6. Αναλυτικός πίνακας με είδη ζυμούμενων γαλακτοκομικών τροφίμων (Yoga et al., 2018)

Products	Raw materials	Country	Microbiota	Bacteriocin producers	Probiotic Strains	Ref.
			<i>Geotricum sp.</i> , <i>Issatchekia orientalis</i> , <i>Kazachstania unispora</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Pichia deserticola</i> , <i>P. fermentans</i> , <i>P. manshurica</i> , <i>P. membranaefaciens</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>Torulaspota delbruekii</i>).			
Nunu	Cow's milk		LAB (<i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Leu. mesenteroides</i> , <i>Lb. helveticus</i> , <i>E. faecium</i> , <i>E. italicus</i> , <i>Weissella confusa</i> , <i>Lactococcus spp.</i>) Yeast (<i>C. parapsilosis</i> , <i>C. rugosa</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>Galactomyces geotrichum</i> , <i>P. kudriavzenii</i> , <i>S. cerevisiae</i>)			56
Chhu	Cow's milk, yak milk	India (Sikkim Himalaya)	LAB (<i>Lb. alimentarius</i> , <i>Lb. farciminis</i> , <i>Lb. salivarius</i> , <i>Lb. bifementans</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>) Yeast (<i>S. crataegensis</i> , <i>C. castelli</i>)	-	-	57

Περισσότερες λεπτομέρειες σχετικά με το γιαούρτι και το ζυμούμενο γάλα που είναι τα κυριότερα προβιοτικά γαλακτοκομικά προϊόντα θα συζητηθούν στη συνέχεια ωστόσο σε γενικές γραμμές, τα προϊόντα γάλακτος που έχουν υποστεί ζύμωση μπορούν να ταξινομηθούν στις εξής κατηγορίες:

1. Όξινα προϊόντα ζυμούμενου γάλακτος.
2. Αλκοολούχα προϊόντα ζυμούμενου γάλακτος.
3. Ανθρακούχα προϊόντα ζυμούμενου γάλακτος.
4. Συνδυασμοί κάποιων εξ αυτών.

Σε αυτές τις κατηγορίες γαλακτοκομικών προϊόντων, η κατανάλωση γίνεται όσο είναι φρέσκα και σε συνδυασμό με κάποια μέθοδο συντήρησης όπως η ψύξη. Κατά κανόνα, περιέχουν ζωντανά τα βακτήρια της εναρκτήριας καλλιέργειας, συμπεριλαμβανομένων και

των προβιοτικών στελεχών (U.S. National Dairy Council, Canadian Dairy Commission, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, International Dairy Foods Association).

2.8 Θεραπευτική αξία ζυμούμενου γάλακτος

Παραδοσιακά, τα ζυμούμενα γαλακτοκομικά προϊόντα θεωρούνται ιδιαίτερα ωφέλιμα για την ανθρώπινη υγεία. Επιπλέον, οι επιστημονικές έρευνες που πραγματοποιήθηκαν από τις αρχές του 20^{ου} αιώνα έως και σήμερα, βοήθησαν στο να κατανοηθεί καλύτερα ο ρόλος τους στην ανθρώπινη φυσιολογία αλλά και να μπορεί κανείς να προσδιορίσει με μεγαλύτερη ακρίβεια το όφελος που παρέχεται από αυτά, αλλά και τον βαθμό στον οποίο επωφελείται ο οργανισμός. Όσον αφορά τις επιστημονικές έρευνες που αναδεικνύουν αυτά τα οφέλη, αυτές αναφέρονται πολύ συχνά σε τρόφιμα που περιέχουν κυρίως 2 είδη μικροοργανισμών, το *L. acidophilus* και το *Bifidobacterium* spp. Πιο συγκεκριμένα, οι θεραπευτικές επιδράσεις στην υγεία σχετίζονται κυρίως με την αντιμετώπιση ουρολοιμώξεων, δυσκοιλιότητας, διάρροιας (διαφόρων αιτιολογιών), αποτροπή της υπερχοληστερολαιμίας, προστασία έναντι του καρκίνου στο κόλον και στην κύστη, καθώς και πρόληψη της οστεοπόρωσης. Ορισμένα άλλα πλεονεκτήματα που προσδίδουν αυτά τα τρόφιμα είναι η διατήρηση της ισορροπίας της μικροχλωρίδας του εντέρου, η βελτίωση του ανοσοποιητικού συστήματος, η μείωση της λακτόζης με όφελος για τα άτομα με δυσανεξία σε αυτή, η μείωση των επιπέδων χοληστερόλης στον ορό, η πρόληψη διάφορων τύπων καρκίνου και τέλος, η αύξηση της διατροφικής αξίας των τροφών.

2.9 Τύποι παραδοσιακών ζυμούμενου γάλακτος

Κεφίρ

Το κεφίρ αποτελεί ίσως το γνωστότερο είδος ζυμούμενου γάλακτος και καταναλώνεται κυρίως από λαούς της κεντρικής Ασίας και της Ρωσίας. Κάθε γεωγραφική περιοχή έχει τον δικό της τύπο κεφίρ, ωστόσο δεν υπάρχουν ουσιαστικές διαφορές μεταξύ τους. Σε κάθε περίπτωση πρόκειται για ένα ανθρακούχο τρόφιμο με μικρή περιεκτικότητα σε αιθανόλη, που έχει υφή γιαουρτιού, ελαφρώς πιο λεπτόρρευστη. Όσοι λαοί το καταναλώνουν παραδοσιακά έχουν παρατηρήσει μεταξύ άλλων πλεονεκτημάτων, την αύξηση του προσδόκιμου ζωής, αλλά και την βελτίωση της υγείας γενικότερα. Αυτό έχει επιβεβαιωθεί και από αρκετές στατιστικές μελέτες. Μία από τις περιοχές που εξετάστηκε στατιστικά ο πληθυσμός της είναι το Θιβέτ, καθώς το κεφίρ αποτελεί εθνικό παραδοσιακό τρόφιμο στην περιοχή αυτή. Στο Θιβέτ παρατηρήθηκε, αύξηση του προσδόκιμου ζωής σε άτομα που καταναλώνουν συστηματικά κεφίρ, γεγονός που τεκμηριώθηκε επιστημονικά, καθώς έχει διαπιστωθεί ανοσορυθμιστική αντιμικροβιακή και αντιπολλαπλασιαστική (αντικαρκινική) δράση.

Οι κόκκοι κεφίρ του Θιβέτ περιέχουν μια σύνθετη μικροβιακή κοινότητα αποτελούμενη από οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB) (*Lactobacillus*, *Lactococcus* και *Leuconostoc*) και ζυμομύκητες (*Saccharomyces*, *Kluyveromyces* και *Torula*). Διάφορα είδη του γένους *Lactobacillus* που έχουν απομονωθεί από τους σπόρους κεφίρ περιλαμβάνουν το *Lactobacillus acidophilus*, το *Lactobacillus plantarum* και το *Lactobacillus kefiranofaciens*. Αξίζει να σημειωθεί ότι η επιβίωση των μικροοργανισμών που περιέχονται στο κεφίρ εντός του ανθρώπινου γαστρεντερικού συστήματος είναι πολύ υψηλή (Zheng et al., 2013).

Folk yoghurt

Στις υπό ανάπτυξη χώρες, στις οποίες ούτε καν η θεραπεία με αντιβίωση δεν είναι τις περισσότερες φορές εφικτή, οι εναλλακτικές λύσεις για την αντιμετώπιση του *Helicobacter pylori* εστιάζονται σχεδόν αποκλειστικά για τους περισσότερους, σε πιο οικονομικές και παραδοσιακές μεθόδους. Για παράδειγμα στο Θιβέτ χρησιμοποιείται εδώ και αιώνες ένα ζυμούμενο γαλακτοκομικό τρόφιμο στο οποίο έχει παρατηρηθεί η θετική του επίδραση στην εξέλιξη παθήσεων του γαστρεντερικού όπως η απλή δυσφορία ή ορισμένοι καρκίνοι του γαστρεντερικού συστήματος.

Στο πείραμα των Oh και συνεργατών (2002) αρχικά απομονώθηκαν μικροοργανισμοί από το “folk yoghurt” και αναπτύχθηκαν στην βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης τόσο σε αερόβιες όσο και σε αναερόβιες συνθήκες. Αφού απομονώθηκε το γενετικό τους υλικό ακολούθησαν οι διαδικασίες ταυτοποίησής τους με ανάλυση της αλληλουχίας του ριβοσωμικού DNA. Δύο από τα προϊόντα απομόνωσης ταυτοποιήθηκαν ως *Lactobacillus crispatus* και άλλα δυο ως *Lactobacillus kefir* ή *Lactobacillus ferintoshensis*, ενώ όσον αφορά τις ζύμες ταυτοποιήθηκαν 2 είδη, η *Issatchenkia orientalis* και η *Kluuyveromyces lactis*. Αυτός ο συνδυασμός ζυμομυκήτων και οξυγαλακτικών βακτηρίων είναι παρόμοιος με του παραδοσιακού Τουρκικού γιαουρτιού, του κεφίρ, το οποίο περιέχει και αυτό ένα μίγμα ζυμομυκήτων και μερικά οξυγαλακτικά βακτήρια και έχει προταθεί ότι προσφέρει μια ποικιλία γαστροεντερικών οφέλη για την υγεία, συμπεριλαμβανομένης της πρόληψης μορφών καρκίνου, μέσω ενισχυμένης κυτταρικής ανοσίας. Το ενδιαφέρον για αυτό το παραδοσιακό γιαούρτι του Θιβέτ προέρχεται από το γεγονός ότι σκοτώνει γρήγορα το *H. pylori*, *in vitro*. Τόσο η ζύμη όσο και τα βακτήρια του γαλακτοκομικού αυτού ροφήματος παρουσιάζουν αντιμικροβιακή δράση 99% και 100% αντίστοιχα κατά του *H. pylori* με πολύ ελπιδοφόρα για τους πάσχοντες, προοπτική (Oh et al., 2002).

Filmjölk

Το filmjölk είναι ένα παραδοσιακό γαλακτοκομικό προϊόν που έχει υποστεί ζύμωση (fermented milk product), με προέλευση τη Σουηδία. Αποτελεί ένα ιδιαίτερα δημοφιλές γαλακτοκομικό προϊόν στην ευρύτερη περιοχή της Σκανδιναβίας όπου καταναλώνεται συχνά από πολλούς με το πρωινό και το μεσημεριανό. Παρασκευάζεται κατά τη ζύμωση του αγελαδινού γάλακτος από μια ποικιλία βακτηρίων συμπεριλαμβανομένων των ειδών *Lactococcus lactis* και *Leuconostoc mesenteroides*. Γνωστή εταιρία γαλακτοκομικών (Arla Foods®) που παρασκευάζει το συγκεκριμένο είδος ζυμούμενου γάλακτος χρησιμοποιεί για την παρασκευή του filmjölk στελέχη των ειδών *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* biovar. *diacetylactis* και *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*.

Γενικότερα τα παραδοσιακά ζυμούμενα γάλατα των Σκανδιναβικών χωρών ζυμώνονται σε χαμηλές θερμοκρασίες από μεσόφιλα βακτήρια όπως αυτά που προαναφέρθηκαν. Τα βακτήρια αυτά μεταβολίζουν τη λακτόζη σε γαλακτικό οξύ σε

σημαντικό βαθμό, γεγονός που συνεπάγεται αποδοχή από μεγαλύτερο μέρος του πληθυσμού που έχει δυσανεξία στη λακτόζη, σε σχέση και με άλλα γαλακτοκομικά προϊόντα, στα οποία η λακτόζη μειώνεται αλλά όχι σε ικανοποιητικό βαθμό (<30%). Το γαλακτικό οξύ προσδίδει οξύτητα στην γεύση και από βιοχημικής πλευράς προκαλεί την πήξη των πρωτεϊνών στο γάλα, κυρίως της καζεΐνης, με αποτέλεσμα την δημιουργία ενός πιο παχύρρευστου τελικού προϊόντος με “πλούσια” υφή. Τα βακτήρια που χρησιμοποιούνται παράγουν επίσης μικροποσότητες διακετυλίου, μια χημική ένωση που δίνει βουτυρώδη γεύση και είναι ικανή στο να δώσει μια χαρακτηριστική τελική γεύση στο συγκεκριμένο προϊόν. Το filmjölk είναι η εκσυγχρονισμένη εκδοχή του παραδοσιακού surmjölk το οποίο έχει τις ρίζες του από την εποχή των βίκινγκς δηλαδή πάνω από 1.000 έτη πριν.

Συγκριτικά με άλλα ζυμούμενα γάλατα, το filmjölk θυμίζει στην συνεκτικότητα (υφή) το καλλιεργημένο βουτυρόγαλα και το κεφίρ, ενώ έχει ήπια και ελαφρώς όξινη γεύση που οφείλεται στο γαλακτικό οξύ, το διακετύλιο, και το διοξείδιο του άνθρακα που παράγουν τα βακτήρια της εναρκτήριας καλλιέργειας. Έχει διάρκεια ζωής περίπου 10-14 ημερών σε θερμοκρασία ψύξης. (Kosikowski et al., 1997)

Dadih

Πρόκειται για ένα δημοφιλές προϊόν ζυμούμενου γάλακτος στην Δυτική Σουμάτρα της Ινδονησίας. Η ζύμωση είναι φυσική (δηλαδή χωρίς προσθήκη εναρκτήριας καλλιέργειας) και εκτελείται με τον παραδοσιακό τρόπο έως και σήμερα, με το γάλα που χρησιμοποιείται να είναι απαστερίωτο γάλα βούβαλου. Η ζύμωση πραγματοποιείται εντελώς αυθόρμητα σε περιβάλλον που η θερμοκρασία είναι γύρω στους 13°C. Το αποτέλεσμα είναι ένα προϊόν που μοιάζει με γιαούρτι, καθώς έχει μαλακή και κρεμώδη υφή. Χρησιμοποιούνται σωλήνες μπαμπού σαν δοχεία και η επώαση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 2-3 μέρες. Η χημική του σύσταση είναι 84% νερό, 6% πρωτεΐνη, 5,4% λίπος και 3,3% υδατάνθρακες. Το pH είναι περίπου στο 3,4 (Kosikowski et al., 1997).

Tarag

Το γαλακτοκομικό αυτό προϊόν αποτελεί ένα αρχαίο προϊόν της Μογγολίας της Κίνας. Παραδοσιακά παραγόταν με οποιοδήποτε είδος διαθέσιμου γάλακτος και συνήθως γάλακτος προερχόμενου από οικόσιτα ζώα όπως αγελάδες, κατσίκες, καμήλες, ή γιακ (είδος βουβαλιού της περιοχής). Η συνήθης διαδικασία βασιζόταν στην φυσική ζύμωση όπου για καλούπια χρησιμοποιούταν ένας δερμάτινος σάκος και η επώαση πραγματοποιούταν σε θερμοκρασία

περιβάλλοντος (15-20°C) για τουλάχιστον 2 ημέρες. Το τελικό προϊόν έχει ξινή γεύση και περιέχει και ποσότητα αιθανόλης, αρκετή ώστε κανείς να την αντιληφθεί. Κυρίαρχα είδη στην ζύμωση είναι ο *Lactobacillus helveticus*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* και *Lactobacillus casei* ενώ σε άλλες περιπτώσεις έχει βρεθεί ότι κυρίαρχα είδη LAB είναι ο *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, ο *L. helveticus* και *Streptococcus thermophilus*, ενώ τα κυρίαρχα είδη ζυμών είναι ο *Saccharomyces cerevisiae*, ο *Issatchenkia orientalis* και ο *Kazachstania unispora* (Kosikowski et al., 1997).

Amasi

Αυτό το Αφρικανικής προέλευσης ζυμούμενο γάλα αποτελεί ένα γνωστό παραδοσιακό τρόφιμο της Ζιμπάμπουε αλλά και άλλων χωρών της Νοτίου Αφρικής. Η διαδικασία που ισχύει και ως σήμερα περιλαμβάνει ζύμωση απαστερίωτου αγελαδινού γάλακτος σε πήλινα δοχεία για 2-3 μέρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Όταν το μίγμα πήξει αποστραγγίζεται για να διαχωριστεί ο ορός και να αποκτήσει πλούσια υφή. Όσον αφορά την γεύση του, αυτή χαρακτηρίζεται από ήπια ξινή γεύση (pH 3,6-4,2) και πλούσια αρώματα. Κυρίαρχα είδη σε αυτό τον τύπο γιαουρτιού είναι ο *Leuconostoc* spp. (*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*, *Leuconostoc citreum* και *Leuconostoc lactis*), *Lactococcus* spp. (*Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*) και *Lactobacillus* spp. (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* και *Lactobacillus plantarum*). Βρέθηκε επίσης μια βακτηριοσίνη, που παράγεται από τον *Lactobacillus plantarum*. Οι κύριες ζύμες που κυριαρχούν είναι οι *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida lusitaniae*, *Candida coliculosa* και *Saccharomyces dairenensis* (Kosikowski et al., 1997).

Kule Naoto

Ένα ακόμα παραδοσιακό γαλακτοκομικό προϊόν της Αφρικής που παράγεται στην Κένυα. Σε αυτήν την περίπτωση το απαστερίωτο αγελαδινό γάλα ζυμώνεται σε ένα δοχείο κατασκευασμένο από ξηρούς καρπούς γεγονός που διαφοροποιεί το τελικό προϊόν σε σχέση με άλλα. Μοιάζει πολύ με γιαούρτι ή φρέσκο τυρί στη συνοχή του ενώ το άρωμά του εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό από την οξύτητά του και συγκεκριμένα όταν η οξύτητα είναι

εως 4,5 τότε είναι αποδεκτό για κατανάλωση. Τα LAB που έχουν απομονωθεί από αυτό το προϊόν είναι οι *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus paracasei* και *Lactobacillus acidophilus*(Kosikowski et al., 1997).

Kurut

Είναι ιδιαίτερα δημοφιλές στο Θιβέτ της Κίνας και όπως και στις περισσότερες περιπτώσεις παρασκευάζεται από απαστερίωτο γάλα με φυσική ζύμωση στους 10-15 ° C για 7-8 ημέρες. Μετά το πέρας της ζύμωσης μπορεί να καταναλωθεί ως έχει ή να υποστεί περαιτέρω επεξεργασία προς παραγωγή ζυμούμενου βουτύτρου ή ενός είδους τυριού, του "cula". Μοιάζει πολύ με το κεφίρ που επίσης αποτελεί παραδοσιακό προϊόν του Θιβέτ και επομένως η γεύση του είναι και σε αυτή τη περίπτωση ξινή και αλκοολούχα. Αν και αρχικά τα κυρίαρχα LAB που απομονώθηκαν ήταν τα *Lactobacillus fermentum* και *Lactobacillus casei* αργότερα διαπιστώθηκε ότι το *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* και *Streptococcus thermophilus* ήταν τα πιο συχνά απομονωμένα στελέχη. Από την παρουσία ζυμών οι *Kluveromyces marxianus*, *Saccharomyces cerevisiae* και *Pichia fermentans* χαρακτηρίστηκαν ως τα κυρίαρχα είδη (Kosikowski et al., 1997).

Raib & Jben

Ένα είδος γιαουρτιού με τυριού αποτελούν τα raib & jben, που καταναλώνονται στο Μαρόκο. Η επώαση του απαστερίωτου γάλακτος προέλευσης – συνήθως από αγελάδες και άλλα οικόσιτα ζώα – γίνεται στους 15-20°C για 1-3 μέρες, ανάλογα και με την εποχή. Όταν πήξει το μίγμα και διαχωριστεί από τον ορό, αυτό αποτελεί το raib. Η αποστράγγιση γίνεται με ένα ύφασμα και όταν προστεθεί αλάτι στην αφυδατωμένη μάζα το προϊόν λέγεται jben. Η οξύτητα κυμαίνεται από 4,2 ως 4,1. Στο raib όσο και στο jben κυρίαρχο γένος LAB βρέθηκε ότι είναι το γένος *Streptococcus*, το *Lactobacillus*, και το *Leuconostoc*. Διαπιστώθηκε όμως και η παρουσία κολοβακτηρίων, γεγονός που δικαιολογείται από την χρήση απαστερίωτου γάλακτος και από τις κακές συνθήκες υγιεινής γενικότερα (Kosikowski et al., 1997).

Sethemi

Ένα ακόμα ζυμούμενο γάλα της Νοτίου Αφρικής που παρασκευάζεται με βάση τις ίδιες παραδοσιακές αρχές και διεργασίες και με τα υπόλοιπα αυτής της κατηγορίας. Ωστόσο τα κυρίαρχα LAB δεν έχουν εξακριβωθεί ακόμα (Kosikowski et al., 1997).

Suusac

Γαλακτοκομικό προϊόν της Κένυας όπως και το *kule naoto* που προαναφέρθηκε. Παρασκευάζεται από απαστερίωτο γάλα καμήλας και υπόκειται σε αυθόρμητη ζύμωση. Ιδιαίτερο χαρακτηριστικό αυτής της ζύμωσης είναι είναι το κάπνισμα του δοχείου στο οποίο αυτή θα πραγματοποιηθεί αμέσως μετά. Η ζύμωση διαρκεί 1-2 μέρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (26-29°C). Το προϊόν που προκύπτει διαφέρει από όσα αναφέρθηκαν έως τώρα καθώς στα αρώματα προστίθενται και αυτά του καπνού, ενώ η έχει έντονο λευκό χρώμα με λιγότερο από το συνηθισμένο κρεμώδη υφή και αρκετά έντονη οξύτητα. Τα κυρίαρχα LAB σε αυτό το προϊόν είναι ο *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* και ο *Lactobacillus plantarum* και από ζύμες κυρίαρχο είδος είναι η *Candida krusei* (Kosikowski et al., 1997).

Nunu

Άλλη μια περίπτωση φυσικής ζύμωσης απαστερίωτου αγελαδινού γάλακτος. Παράγεται στην Γκάνα της Αφρικής αλλά και σε άλλες περιοχές της Δυτικής Αφρικής. Η επώαση διαρκεί 1-2 μέρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, και στην συνέχεια απομονώνεται το τυρόπηγμα. Συνήθως καταναλώνεται μόνο του ή με φρούτα. το *Lactobacillus fermentum* ήταν τα πιο συχνά απομονωμένο είδος LAB που επικρατούσε κατά την διάρκεια της ζύμωσης. Τα άλλα απομονωμένα είδη LAB ήταν τα *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus helveticus*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus italicus*, *Weissella confusa* και *Lactococcus* spp. Τα στελέχη ζύμης που προσδιορίστηκαν σε αυτή τη μελέτη ήταν *Candida rugosa*, *Candida parapolosis*, *Candida tropicalis*, *Galactomyces geotrichum*, *Pichia kudriavzevii* και *Saccharomyces cerevisiae* με το *P. kudriavzevii* και το *S. cerevisiae* ως τα 2 κυρίαρχα είδη ζυμών (Kosikowski et al., 1997).

Dahi

Ένα από τα γνωστότερα ζυμούμενα γάλατα παγκοσμίως είναι το *Dahi*, προέλευσης Νοτίου Ασίας όπως την Ινδία και το Μπαγκλαντές. Ως πρώτη ύλη χρησιμοποιείται αγελαδινό, βουβαλίσιο ή κατσικίσιο γάλα, ή ακόμη και συνδυασμοί εξ αυτών. Μοιάζει στην υφή με το γιαούρτι αλλά στην πραγματικότητα είναι πολύ διαφορετικό εξαιτίας της διαφορετικής γεύσης. Για την παρασκευή του το γάλα θερμαίνεται ώστε να συμπυκνωθεί μειώνοντας τον

όγκο του κατά 15-20%. Όταν η θερμοκρασία γίνει κατάλληλη προστίθεται η εναρκτήρια καλλιέργεια και μετά το μίγμα μπαίνει σε πήλινα καλούπια σκεπασμένα με ύφασμα. Το τελικό προϊόν έχει καφέ χρώμα και καραμελωμένη γεύση εξαιτίας της δράσης των μεταβολιτών του διακετυλίου από το σύνολο των λακτόκοκκων που υπάρχουν στο γάλα. Κυρίαρχα στελέχη LAB είναι ο *Streptococcus bovi*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* και *L. lactis* subsp. *diacetylactis*, αλλά ανιχνεύονται και άλλα γνωστά γένη όπως *Lactobacillus*, *Pediococcus* και *Weissella* (Kosikowski et al., 1997).

Airag/Koumiss

Πρόκειται επίσης για πολύ γνωστό ζυμούμενο γαλακτοκομικό προϊόν που παρασκευάζεται κυρίως στην περιοχή της Μογγολίας, του Καζακστάν και του Κιργιστάν, καθώς και στην ευρύτερη περιοχή της Κεντρικής Ασίας και σε ορισμένες περιοχές της Ρωσίας. Γίνεται από απαστερίωτο γάλα καμήλας, και η ζύμωση για να πραγματοποιηθεί απαιτεί μέρος από μια προηγούμενη ζύμωση (back slopping). Έχει ήπια γεύση αλκοόλ και γενικά χαρακτηρίζεται ως όξινο. Κυρίαρχα LAB είναι ο *Lactobacillus helveticus* και ο *Lactobacillus kefiranofaciens*, ενώ κυρίαρχη ζύμη είναι ο *Kluyveromyces marxianus*. Σχετικά με ένα νέο είδος *Bifidobacteria* που απομονώθηκε από αυτό το προϊόν προτάθηκε η ονομασία του ως *Bifidobacteria mongoliense* (Kosikowski et al. 1997).

Rob

Γαλακτοκομικό προϊόν προέλευσης του Σουδάν, που δημιουργείται έπειτα από φυσική ζύμωση. Η παράδοση λέει ότι το πλεόνασμα γάλακτος κάθε οικογένειας τοποθετούταν σε συγκεκριμένα δοχεία είτε από δέρμα κασίκας είτε από δοχείο κατασκευασμένο από αποξηραμένα φρούτα (του είδους *Lagenaria reucantha*) και αφηνόταν για επώαση ολονύκτια σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Μπορεί να μην είναι γνωστά πολλά στοιχεία για αυτό το προϊόν, μπορεί όμως εύκολα να αντιληφθεί κανείς τον βασικό του ρόλο, καθώς το πλεόνασμα του γάλακτος υπό άλλες συνθήκες θα απορριπτόταν ως ακατάλληλο για κατανάλωση. Με αυτόν τον τρόπο παρατείνεται η διάρκεια ζωής του για μερικές μέρες,

γεγονός σημαντικό για πολυμελείς οικογένειες (λ.χ. με παιδιά), χαμηλού εισοδήματος (Kosikowski et al., 1997).

Shubat

Ένα δημοφιλές ζυμούμενο γάλα καμήλας στις περιοχές του Καζακστάν, της Μογγολίας, του Ουζμπεκιστάν, του Τουρκμενιστάν και περιοχών της Ρωσίας είναι το *Shubat*. Παρασκευάζεται με τη μέθοδο back slopping, δηλαδή προστίθεται μέρος μιας παλαιότερης ζύμωσης έτσι ώστε να ενισχυθεί επιλεκτικά με τους κατάλληλους μικροοργανισμούς. Το αποτέλεσμα είναι ένα λεπτόρευστο γιαούρτι που περιέχει διοξείδιο του άνθρακα και έχει αρκετά χαμηλό pH, περίπου 3,8. Στο Καζακστάν κυριάρχησε η άποψη ότι το γάλα έχει θεραπευτικές ιδιότητες έναντι συγκεκριμένων ασθενειών και έτσι χορηγούταν σε ασθενείς με φυματίωση με άγνωστα όμως αποτελέσματα. Αυτό που είναι γνωστό είναι η μικροχλωρίδα αυτού του προϊόντος και συγκεκριμένα τα σημαντικά LAB που απομονώθηκαν ανήκουν στα γένη *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconstoc*, *Enterococcus* και *Weissella*, με το *Lactobacillus sakei* και τον *Enterococcus faecium* να αποτελούν τα κυρίαρχα είδη LAB. Όσον αφορά τους ζυμομήκυτες, ο *Kluyveromyces marxianus*, βρέθηκε ότι επικρατεί σε πληθυσμό (Kosikowski et al., 1997).

2.10 Γιαούρτι

Το γιαούρτι είναι ένα γαλακτοκομικό προϊόν που παρασκευάζεται από παστεριωμένο γάλα, το οποίο πρέπει να είναι καλής ποιότητας, ειδικά όσον αφορά τα υπολείμματα αντιβιοτικών, καθώς σε μια πιθανή παρουσία τους, η ζύμωση πιθανόν να μην επιτευχθεί αποτελεσματικά. Το γάλα λοιπόν, αποτελεί την πρώτη ύλη η οποία περιέχει πρωτεΐνες (καζεΐνες και πρωτεΐνες ορού), λίπη, υδατάνθρακες (λακτόζη) και νερό (87%). Αρχικά προστίθεται στο γάλα ποσότητα 10^6 - 10^7 κύτταρα οξυγαλακτικών βακτηρίων (εναρκτήρια καλλιέργεια) και συγκεκριμένα των ειδών *Streptococcus thermophilus* και *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Ο συνδυασμός των δυο αυτών ειδών είναι αξιοσημείωτος καθώς παρατηρείται ένα φαινόμενο συνεργιστικής δράσης, κατά το οποίο ο ένας μικροοργανισμός ευνοεί την ανάπτυξη του άλλου· τελικά, αναπτύσσονται και οι δύο καλύτερα, μαζί, απ' ότι θα αναπτυσσόταν ο καθένας μόνος του, με αποτέλεσμα και οι επιθυμητές ουσίες που παράγονται να είναι πολύ περισσότερες. Στην πρώτη φάση ο

Streptococcus thermophilus (που αναπτύσσεται πρώτος) παράγει μυρμηκικό οξύ το οποίο, με τη σειρά του, προκαλεί διέγερση στην ανάπτυξη του *Lactobacillus bulgaricus*. Αυτός με τη σειρά του, λόγω του ότι διαθέτει συγκεκριμένα εξωκυτταρικά ένζυμα (πρωτεϊνάσες), μπορεί να υδρολύσει τις καζεΐνες απελευθερώνοντας από αυτές αμινοξέα, απαραίτητα για την ανάπτυξη του *Streptococcus thermophilus*, τα οποία ο ίδιος δεν θα μπορούσε να συνθέσει. Κατά αυτόν τον τρόπο ο ένας μικροοργανισμός ευνοεί τον άλλο, προκαλώντας την αυξημένη παραγωγή επιθυμητών προϊόντων της ζύμωσης. Πέρα από την "συνεργασία" τους, ο αντικειμενικός σκοπός της ζύμωσης είναι η παραγωγή συγκεκριμένων συστατικών, καθώς και της πήξης, ώστε να έχει την γνωστή υφή γιαουρτιού. Συνεπώς, και οι δυο είναι απαραίτητοι για την επίτευξη της ζύμωσης του γιαουρτιού.

Είναι γνωστό επίσης ότι τα οξυγαλακτικά βακτήρια μπορούν να παράγουν ένα σύνολο αντιμικροβιακών ενώσεων, ικανών να επηρεάσουν τόσο τα στελέχη του ίδιου είδους, όσο και παθογόνα βακτήρια που θα μπορούσαν να αναπτυχθούν υπό συγκεκριμένες συνθήκες στο γιαούρτι. Μερικές από αυτές τις ενώσεις είναι μεταβολίτες του οξυγόνου (όπως υπεροξειδίο του υδρογόνου και ελεύθερες ρίζες) που εμφανίζουν βακτηριοστατική ή βακτηριοκτόνο δράση έναντι της μη-γαλακτικής χλωρίδας. Εμφανίζουν, δηλαδή, ανταγωνιστική δράση έναντι άλλων μικροοργανισμών που είτε είναι παθογόνοι είτε απλώς ανεπιθύμητοι (π.χ. αλλοιογόνοι) (Rawson et al., 1997· Beshkova et al., 1998· Frederic et al., 2004).

2.11 Τεχνολογία παρασκευής γιαουρτιού

Όσον αφορά την μικροπαρασκευή γιαουρτιού, ο Heineman, το 1921, περιέγραψε ότι το γιαούρτι προκύπτει από τον βρασμό του γάλακτος σε χαμηλή θερμοκρασία προκειμένου να συμπυκνωθεί κατά 50 με 75% σε σχέση με τον αρχικό όγκο του γάλακτος. Στην συνέχεια ψύχεται στους 45 με 50°C και προστίθεται μικρή ποσότητα από μια προηγούμενη ζύμωση γιαουρτιού ώστε να εμβολιαστεί με αρκετή ποσότητα οξυγαλακτικών βακτηρίων. Το μίγμα αφήνεται σκεπασμένο σε πήλινα σκεύη ώστε να ζυμωθεί για 10-12 ώρες τουλάχιστον προτού καταναλωθεί. Κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1920 και του 1930 το γιαούρτι χαρακτηριζόταν από φτωχή γεύση λόγω της έντονης οξύτητας του προϊόντος.

Στις σύγχρονες μεθόδους παρασκευής γιαουρτιού, το γάλα αρχικά ομογενοποιείται και στην συνέχεια παστεριώνεται συνήθως με την μέθοδο HTST (high temperature short time) στους 72°C για 15 sec. Στην συνέχεια ψύχεται στους 40 έως 45 °C προκειμένου να αναμιχθεί

με την εναρκτήρια καλλιέργεια χωρίς να την θανατώσει. Η εναρκτήρια καλλιέργεια αποτελείται από τον *Streptococcus thermophilus* και *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*,. Όσον αφορά την λιποπεριεκτικότητα του γιαουρτιού, υπάρχουν 3 κατηγορίες: γιαούρτι με λιπαρά <0,5, 1 ή 3,25%, γεγονός που εξαρτάται από την περιεκτικότητα λίπους του γάλακτος που χρησιμοποιείται. Επίσης η συνολική περιεκτικότητα στερεών τυπικά κυμαίνεται από 12 έως 15% και αυτό ρυθμίζεται από την προσθήκη γάλακτος σε σκόνη (dry milk, αφυδατωμένο γάλα). Το ενοφθαλμισμένο με την εναρκτήρια καλλιέργεια μίγμα γιαουρτιού συνηθίζεται να αντλείται άμεσα σε μια δεξαμενή μέσω της οποίας θα πληρωθούν τα κύπελλα που προορίζονται για το εμπόριο. Όταν γίνει η πλήρωση των κυπέλλων αυτά σφραγίζονται και μεταφέρονται σε μια αίθουσα επώασης στους 32 °C για 10-20 ώρες μέχρις ότου το pH να πέσει στο 4,5 και στην συνέχεια ψύχονται. Αντί της μεθόδου αυτής μπορεί να πραγματοποιηθεί ζύμωση στη αρχική δεξαμενή μέχρι να επιτευχθεί το pH 4,5 και τα κύπελλα να πληρωθούν με γιαούρτι, να σφραγιστούν και να ψυχθούν απευθείας στους 20°C (Argana et al. 2017).

Όπως προαναφέρθηκε, η συμβιωτική δράση των *Streptococcus thermophilus* και *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, είναι ιδιαίτερα σημαντική για την επίτευξη της ζύμωσης τόσο του γιαουρτιού όσο και άλλων γαλακτοκομικών προϊόντων και παρατηρήθηκε αρχικά το 1921 από τον Orla-Jensen (Orla-Jensen, 1921). Το 1950, οι Pette και Lolkema (Pette & Lolkema, 1950) περιέγραψαν βιοχημικά αυτή την συμβίωση. Αργότερα, το 1966 οι Jankov και Stoyanov (Jankov & Stoyanov, 1966). παρατήρησαν ότι όχι μόνο δεν είναι όλα τα στελέχη *L. bulgaricus* και *S. thermophilus* συμβιωτικά αλλά, αντιθέτως, εμφανίζουν ανταγωνιστική δράση στην πλειοψηφία τους. Σε ένα σύνολο 442 οξυγαλακτικών βακτηρίων απομονωμένων από γάλα βρέθηκαν 6 στελέχη *L. bulgaricus* εκ των οποίων μόνο 2 ήταν κατάλληλα για ζύμωση (λόγω συμβατότητας στην συμβίωση με τον *Streptococcus thermophilus*). Τα κατάλληλα στελέχη, λοιπόν, εκτιμήθηκε ότι πρέπει να χρησιμοποιούνται σε αναλογία 2:1 έως 1:5 (*L. bulgaricus* προς *S. thermophilus*) (Argana et al., 2017).

Άλλη μια συμβιωτική σχέση μεταξύ αυτών των μικροοργανισμών φαίνεται από την παραγωγή ακεταλδεΐδης (αρωματικής ένωσης) στο γιαούρτι, καθώς παράγεται μεγαλύτερη τελική ποσότητα όταν υπάρχει αναλογία 1:1 μεταξύ των 2 μικροοργανισμών σε σχέση με το άθροισμα της ποσότητας που παράγει ο καθένας ξεχωριστά (Argana et al., 2017).

2.12 Νομοθεσία για το γιαούρτι

Στην Ελληνική νομοθεσία (άρθρο 82 του Κώδικα Τροφίμων και Ποτών, έκδοση 2^η, Αύγουστος 2016) το γιαούρτι ορίζεται ως εξής: Είναι 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 ζυμώμενο προϊόν να περιέχει τουλάχιστον 10^7 cfu/g προϊόντος μέχρι την προτεινόμενη ημερομηνία ανάλωσης του.

- ⇒ Ως πρώτη ύλη του γιαουρτιού χρησιμοποιείται το γάλα όπως αυτό ορίζεται στον Κανονισμό (ΕΚ) 1308/2013 (Παράρτημα VII, μέρος III, παράγραφος 1).
- ⇒ Η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη στο γιαούρτι από αγελαδινό ή γίδινο γάλα πρέπει να είναι τουλάχιστον 3,2% και από πρόβειο γάλα τουλάχιστον 5,5%. Σε περίπτωση χρήσης μιγμάτων γάλακτος η ελάχιστη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη υπολογίζεται από την αναλογία των ειδών του γάλακτος.
- ⇒ Κατά την παρασκευή του γιαουρτιού πέραν της πρώτης ύλης επιτρέπεται μόνο η προσθήκη κρέμας γάλακτος για τη ρύθμιση της περιεκτικότητας σε λιπαρές ουσίες και η προσθήκη πρωτεϊνών γάλακτος για τεχνολογικούς λόγους ρύθμισης του Στερεού Υπολείμματος Άνευ Λίπους (ΣΥΑΛ), του ίδιου ζώου, υπό την προϋπόθεση ότι η αύξηση του ΣΥΑΛ στο γιαούρτι δεν θα ξεπερνά το ΣΥΑΛ του γάλακτος που χρησιμοποιήθηκε κατά 4 μονάδες.
- ⇒ Στην περίπτωση που χρησιμοποιηθούν για την ζύμωση και άλλοι μικροοργανισμοί πέραν την χαρακτηριστικής καλλιέργειας του γιαουρτιού, τότε μπορούν να αναγραφούν στην επισήμανση αρκεί ο πληθυσμός τους να είναι τουλάχιστον 10^6 cfu/g προϊόντος κατά την ημερομηνία ανάλωσης.
- ⇒ Ως στραγγιστό γιαούρτι ορίζεται το προϊόν που λαμβάνεται από το γιαούρτι μετά από αποστράγγιση μέρους του ορού μετά την πήξη και αποτελείται τουλάχιστον από 5,6% πρωτεΐνες για το αγελαδινό γάλα, και κατά 8% τουλάχιστον για το πρόβειο γάλα. Εάν το γιαούρτι αποτελείται από μίγματα γάλακτος, τότε τα ποσοστά καθορίζονται κατ'αναλογία.
- ⇒ Ως παραδοσιακό γιαούρτι ορίζεται το γιαούρτι που:

- Παρασκευάζεται με την παραδοσιακή μέθοδο, ώστε να δημιουργείται πέτσα στην επιφάνειά του.
- Δημιουργείται απλά και μόνο από την πήξη νωπού ή παστεριωμένου γάλακτος, το οποίο δεν έχει υποστεί τροποποιήσεις εκτός της ρύθμισης της λιποπεριεκτικότητάς του, προκειμένου να είναι εφικτή η δημιουργία της πέτσας.

⇒ Στην επισήμανση του γιαουρτιού περιλαμβάνονται πληροφορίες σχετικά με το είδος του ζώου από το οποίο προήλθε το γάλα ή τις αναλογίες εάν προέρχεται από διαφορετικού είδους ζώα. Επίσης αναφέρεται η μέθοδος επεξεργασίας του γάλακτος, καθώς και η επί τις εκατό λιποπεριεκτικότητά του.

2.13 Γιαούρτι και πιθανές προβιοτικές δράσεις

Ένα μεγάλο ζήτημα που αφορά τα γιαούρτια τόσο τα παραδοσιακά όσο και τα βιομηχανοποιημένα, είναι η πιθανή ευεργετική επίδραση των δύο βασικών ειδών ζύμωσης που προαναφέρθηκαν, στην ανθρώπινη μικροχλωρίδα έτσι ώστε να χαρακτηριστεί το γιαούρτι προβιοτικό τρόφιμο. Σε έρευνα των Campo και συνεργατών (2005) που πραγματοποιήθηκε σε 114 υγιείς εθελοντές του Νοσοκομείου *Universitario Ramón y Cajal* της Μαδρίτης καταναλώθηκαν και οι δύο τύποι γιαουρτιού (παραδοσιακά και τυποποιημένα) με σκοπό να διαπιστωθεί το κατά πόσο επιβιώνουν αυτά τα στελέχη εντός του γαστρεντερικού συστήματος, γεγονός που αποτελεί βασική προϋπόθεση ώστε να χαρακτηριστούν προβιοτικά και κατ' επέκταση το γιαούρτι να χαρακτηριστεί προβιοτικό τρόφιμο. Τα αποτελέσματα έδειξαν μια σαφή εικόνα ως προς την μη ανθεκτικότητα αυτών των βακτηρίων εντός του οργανισμού των εθελοντών, και ειδικά αυτών που προήλθαν από τυποποιημένα γιαούρτια, σε ποσοστό 98%, και αυτών που προήλθαν από παραδοσιακά σε ποσοστό 90%. Σύμφωνα με τους ισχυρισμούς της έρευνας και σε συνδυασμό με την νομοθεσία για τα προβιοτικά, το γιαούρτι δεν φαίνεται να αποτελεί προβιοτικό τρόφιμο εφόσον τα κύτταρα δεν επιβιώνουν, ωστόσο αξίζει να σημειωθεί ότι ακόμη και τα νεκρά κύτταρα των βακτηρίων αυτών θα μπορούσαν να προκαλέσουν διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος με αποτέλεσμα την απόκτηση εγρήγορσης σε πιθανούς

μελλοντικούς κινδύνους από παθογόνα βακτήρια, σε μικρότερο βαθμό όμως από ότι εάν ήταν ζωντανά.

Συντρέχουν, λοιπόν, βάσιμοι λόγοι για την παραγωγή βελτιωμένων τροφίμων, όσον αφορά τις συνθήκες στις οποίες βρίσκονται τα προβιοτικά καθώς και οι ίδιοι οι πληθυσμοί αυτών, οι οποίοι είναι απαραίτητο να μην πέφτουν κάτω από ένα ελάχιστο όριο. Το χαμηλό pH είναι ένας σημαντικός παράγοντας περιορισμού της ανάπτυξης και της σταθερότητας των προβιοτικών βακτηρίων. Το μοριακό οξυγόνο είναι επίσης επιβλαβές για την ανάπτυξη και την επιβίωση των περισσότερων προβιοτικών, ειδικά κατά τη διάρκεια της περιόδου αποθήκευσης ενός τροφίμου, όπως το γιαούρτι.

Ως λύση, έχει εφαρμοστεί η διαδικασία του μικροεγκλεισμού που στοχεύει στην αυξημένη βιωσιμότητα των προβιοτικών στα ζυμούμενα τρόφιμα όπως είναι το γιαούρτι. Γενικότερα, έχει δοθεί μεγάλη έμφαση στην προστασία των μικροοργανισμών με τη βοήθεια της τεχνικής της μικροενθυλάκωσης, με την προσθήκη διαφορετικών προστατευτικών μέσων και με τη μεταβολή των συνθηκών επεξεργασίας και αποθήκευσης, με αρκετά θετικά αποτελέσματα. Ως εναλλακτική οικονομική λύση όμως, θα μπορούσαν επίσης να χρησιμοποιηθούν κάποιες από τις γνωστές αντιοξειδωτικές ενώσεις, για τον περιορισμό των αρνητικών επιδράσεων της έκθεσης των προβιοτικών βακτηρίων σε οξυγόνο ώστε να αποτραπεί η καταστροφή τους ή η μείωση του πληθυσμού τους (Beshkova et al., 1998).

Σε κάθε περίπτωση οι περισσότερες μελέτες των προβιοτικών τροφίμων έχουν εστιάσει στο γιαούρτι ως το κατεξοχήν ισχυρότερο προβιοτικό τρόφιμο και για το λόγο αυτό υπάρχει πλήθος μελετών με αλληλοσυγκρουόμενα πολλές φορές αποτελέσματα. Πάραυτα είναι γεγονός ότι η κατανάλωση γιαουρτιού έχει συνδεθεί με μειωμένα ποσοστά εμφάνισης καρκίνου και καθώς η αναζήτηση βιοδραστικών πεπτιδίων εντείνεται λόγω των κινδύνων που συνδέονται με τη χρήση των αντίστοιχων συνθετικών φαρμάκων για την αντιμετώπισή του, η απελευθέρωση πεπτιδίων από τα οξυγαλακτικά βακτήρια και τα προβιοτικά που βρίσκονται στο γιαούρτι έχει έρθει στο επίκεντρο. Μια σχετική με αυτό το ζήτημα μελέτη (Sah et al., 2014) διεξήχθη για να διαπιστωθεί η πρωτεολυτική δράση του *Lactobacillus acidophilus* (ATCC® 4356™) του *Lactobacillus casei* (ATCC® 393™) και του *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* (ATOO® BAA52™) σε γιαούρτι. Τα πεπτίδια διαχωρίστηκαν με φυγοκέντρηση υψηλής ταχύτητας και δοκιμάστηκαν για αντιοξειδωτικές και αντιμεταλλαξιγόνες ιδιοτητες. Ο βαθμός πρωτεόλυσης συσχετίστηκε σε μεγάλο βαθμό με

αυτές τις βιοδραστικότητάς τους. Τα απελευθερωμένα πεπτίδια έδειξαν υψηλή δραστηριότητα έναντι ελευθέρων ριζών και ισχυρή αντιμεταλλαξιγόνο δράση. Επομένως διακρίνονται 3 χαρακτηριστικά στο γιαούρτι:

1. Στο προβιοτικό γιαούρτι είχαν παραραχθεί πεπτίδια υψηλού αντιοξειδωτικού και αντιμεταλλαξιόγνου δυναμικού.
2. Ο βαθμός υδρόλυσης συσχετίζεται με την αντιοξειδωτική δραστικότητα του πεπτιδικού εκχυλίσματος.
3. Ο βαθμός υδρόλυσης συσχετίζεται με την αντιμεταλλαξιγόνο δράση του πεπτιδικού εκχυλίσματος.

Αυτά τα προβιοτικά ενίσχυσαν την παραγωγή βιοδραστικών πεπτιδίων και θα μπορούσαν ενδεχομένως να εφαρμοστούν εμπορικά σε νέα προϊόντα εκτός από το γιαούρτι ή την παραγωγή νέων αντικαρκινικών πεπτιδίων έτοιμων προς χρήση (Sah et al., 2014).

Μια πιο πρόσφατη μελέτη των Haghheha και συνεργατών (2015) επικεντρώθηκε στην εύρεση στελεχών *Lactobacillus* απομονωμένων από γαλακτοκομικά προϊόντα προέλευσης πρόβειου γάλακτος (γιαούρτι και πρωτόγαλα), με προβιοτικές ιδιότητες, όπως αντικαρκινική δράση. Συνολικά, 100 δείγματα (γιαούρτι και πρωτόγαλα) συλλέχθηκαν τυχαία και απομονώθηκαν 125 οξυγαλακτικά βακτήρια. Από αυτά ταυτοποιήθηκαν 17 στελέχη *Lactobacillus* που ανήκουν σε πέντε είδη (*L. delbrueckii*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. paracasei* και *L. casei*). Τα στελέχη *L. plantarum* 17C και 13C, τα οποία απομονώθηκαν από πρωτόγαλα, και κατέδειξαν αξιοσημείωτα αποτελέσματα, όπως η αντοχή σε χαμηλό pH και υψηλές συγκεντρώσεις χολικών αλάτων, ευαισθησία στα αντιβιοτικά και καλή αντιμικροβιακή δραστηριότητα, και ευλόγως χαρακτηρίστηκαν ως πιθανά προβιοτικά. Επτά στελέχη του γένους *L. plantarum* (1C, 5C, 12C, 13C, 17C, 7M και 40M), τα πιο ανθεκτικά στην προσομοίωση πέψης (δηλαδή αντοχή σε χαμηλό pH και χολικά άλατα), εξετάστηκαν περαιτέρω για να αξιολογήσουν την ικανότητά τους να προσκολλώνται σε ανθρώπινα εντερικά κύτταρα (Caco-2). Ο *L. plantarum* 17C ήταν το καλύτερο στέλεχος όσον αφορά την προσκόλληση στα εντερικά κύτταρα. Η αξιολόγηση της βιοενεργής δράσης του *L. plantarum* 17C έδειξε αντικαρκινική επίδραση μέσω επαγωγής της απόπτωσης σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα (HT-29) και αμελητέων παρενεργειών σε μία ανθρώπινη επιθηλιακή φυσιολογική (μη προσβεβλημένη απο καρκίνο) κυτταρική γραμμή (FHs 74). Οι μεταβολίτες που

παράγονται από αυτό το στέλεχος μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εναλλακτικές φαρμακευτικές ενώσεις με ευνοϊκούς θεραπευτικούς δείκτες καθώς είναι αποτελεσματικές έναντι αυτών των τύπων καρκίνου χωρίς να είναι κυτταροτοξικές έναντι των φυσιολογικών κυττάρων των ανθρώπων.

Σε άλλη σχετική έρευνα των Wang και συν. (2004), μελετήθηκε η αντιμικροβιακή δράση των *Lactobacillus acidophilus* (La5) και *Bifidobacterium lactis* (Bb12) *in vitro*, έναντι του *Helicobacter pylori*, αλλά και η επίδραση γιαουρτιού που τα περιέχει, σε 59 ασυμπτωματικούς φορείς του βακτηρίου αυτού.

Όσον αφορά την *in vitro* μέθοδο, το *H. pylori* απομονώθηκε από δείγματα της γαστρικής βιοψίας 8 ασθενών η οποίες περιλάμβαναν 2 καρκίνους του στομάχου, 2 γαστρικά έλκη, 3 έλκη δωδεκαδάκτυλου και 1 περίπτωση γαστρίτιδας. Αρχικά εξετάστηκε η αντιμικροβιακή δράση του καθενός από τα La5 και Bb12 ξεχωριστά, μετρώντας την ζώνη διαύγασής τους σε τρυβλία ανεπτυγμένα με *H.pylori*. Αυτό που διαπιστώθηκε είναι ότι το Bb12 άσκησε *in vitro* ανασταλτική επίδραση έναντι του *H. pylori* ενώ το La5 δεν έδειξε κάποιο θετικό αποτέλεσμα. Η μέθοδος επαναλήφθηκε με τα La5 και Bb12 ως μίγμα, εμβολιασμένο σε γιαούρτι και το αναποτελεσματικό αρχικά La5, εξετάσθηκε ξεχωριστά σε άλλο γιαούρτι. Τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν την αρχική εκτίμηση για τη δραστηριότητα του ενός μόνο εκ των δύο στελεχών έναντι του *H. pylori*, *in vitro*.

Πίνακας 7. Σύνοψη δοκιμών των προβιοτικών έναντι του *Helicobacter pylori* (Wang et al., 2004).

Table 1

Summary of trials using probiotics with *Helicobacter pylori* eradication treatment (2012 to date)

Treatment (oral administration)	Probiotic(s) (oral administration)	Region	Eradication rates		% side effects	Probiotic(s) efficacy	Ref.
			Intention to treat	Per protocol			
Esomeprazole 20 mg, levofloxacin 500 mg, amoxicillin 1 g, all <i>bid</i> , 7 d	10 ⁸ CFU <i>Lactobacillus reuteri</i> , during therapy + further 7 d	Italy	80% (36/45)	80% (36/45)	66.7	Significant increase of eradication rates and reduction of side effects (nausea and diarrhea)	[44]
	Control		62.2% (28/45)	62.2% (28/45)	100.0		
Esomeprazole 20 mg and amoxicillin 1 g, both <i>bid</i> , 5 d; then esomeprazole 20 mg, clarithromycin 500 mg, tinidazole 500 mg, all <i>bid</i> , 5 d (sequential therapy)	10 ⁹ CFU <i>L. Acidophilus</i> , 10 ⁹ CFU <i>L. bulgaricus</i> , 5 × 10 ⁸ CFU <i>Bifidobacterium bifidum</i> , 10 ⁹ CFU <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>bid</i> , during therapy	Italy	89% (65/73)	92.9% (65/70)	39.7	Eradication rates unaffected; significant decrease of side effects (metallic taste, abdominal/epigastric pain, diarrhea). Addition of lactoferrin did not influence the results achieved with probiotics	[45]
	Probiotics as above + 200 mg lactoferrin		88.5% (69/78)	93.2% (69/74)	38.5		
	Control		88.2% (67/76)	94.4% (67/71)	65.8		

1. Η συγκέντρωση των διαφόρων τύπων των προβιοτικών σκευασμάτων ήταν 10⁸ cfu/mL.
2. Σημαντική παρουσία αποικιών του *H. pylori*, $\eta = 3$.
3. Σε μία περίπτωση δεν υπήρχαν αποικίες του *H. pylori*.
4. Μια περίπτωση με σχεδόν πλήρη απουσία των αποικιών του *H. pylori*.

Στην συνέχεια της έρευνας οι 59 εθελοντές (αφού μετρήθηκαν τα επίπεδα συγκέντρωσης του *H. pylori*, ο βαθμός της γαστρίτιδας και τα φλεγμονώδη επίπεδα του στομάχου) έλαβαν γιαούρτι με 10⁷ κύτταρα ανά mL των στελεχών La5 και Bb12, από δύο φορές την ημέρα μετά από κάποιο γεύμα για σύνολο 6 εβδομάδων. Έντεκα επιπλέον εθελοντές-φορείς υποβλήθηκαν σε θεραπεία με εικονικό φάρμακο, ως άτομα ελέγχου. Τα βακτηριακά φορτία του *H. pylori* προσδιορίστηκαν με τη χρήση της C-urea breath test (UBT), η οποία διεξήχθη πριν την έναρξη της επέμβασης καθώς και 4 και 8 εβδομάδες μετά την έναρξή της.

Τα αποτελέσματα, που θεωρήθηκαν στατιστικώς πολύ αξιόπιστα, έδειξαν ότι η χορήγηση του γιαουρτιού με μίγμα των La5 και Bβ12, μείωσε σημαντικά την UBT του *H. pylori* μετά από 6 εβδομάδες εναλλακτικής θεραπείας. Αξίζει να σημειωθεί ότι, τα γιαούρτια του εμπορίου έχουν υποστεί ζύμωση με την προσθήκη *Lactobacillus bulgaricus* και *Streptococcus thermophilus*, δύο οξυγαλακτικά βακτήρια με μικρή αντοχή σε όξινο περιβάλλον και στα χολικά άλατα. Αντιθέτως, τα δύο βακτήρια της παραπάνω μελέτης έχουν μεγαλύτερη αντοχή στο όξινο pH, συγκεκριμένα αντέχουν έως και pH=3, και αντοχή στα χολικά άλατα σε συγκέντρωση 2-8%. Κατά συνέπεια, η βιωσιμότητα των προβιοτικών στελεχών καθορίζει απόλυτα την επίδρασή τους ή μη στον ανθρώπινο οργανισμό.(Wang *et al.*, 2004).

Κεφάλαιο 3

Σκοπός πειράματος

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η απομόνωση βακτηρίων και ζυμών από γάλα προέλευσης νησιών Fiji, η ταυτοποίησή τους, καθώς και η περαιτέρω μελέτη τους προκειμένου να διαπιστωθούν τυχόν αντιμικροβιακές και προβιοτικές ιδιότητες.

Κεφάλαιο 4

Υλικά και μέθοδοι

4.1 Απομόνωση βακτηρίων και ζυμών από το γάλα

Τα στελέχη που εξετάσθηκαν στην παρούσα μελέτη είχαν απομονωθεί από γάλα προέλευσης νησιών Φίτζι. Συγκεκριμένα καθαρίστηκαν και συντηρήθηκαν αποικίες από βακτήρια και ζύμες, (Πίνακας 8). Αρχικά απομονώθηκαν με μικροβιολογικές μεθόδους τα στελέχη από το γάλα. Για την ανάπτυξη των βακίλλων χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υπόστρωμα MRS (BioKar Diagnostics, Beauvais, France), ενώ για την ανάπτυξη των κόκκων χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υπόστρωμα M17 (BioKar). Οι ζύμες αναπτύχθηκαν σε υγρό θρεπτικό μέσο που περιείχε 5 g/L Yeast Extract και 20 g/L γλυκόζη. Όλα τα στελέχη επωάζονταν, πριν από κάθε πειραματική διαδικασία, για 24h έως 48h και η θερμοκρασία ανάπτυξης καθορίστηκε από το είδος του στελέχους.

Με βάση τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των αποικιών τους τα υπό εξέταση στελέχη διακρίθηκαν στις κατηγορίες του Πίνακα 8, που σκολουθεί. Στην συνέχεια αποθηκεύτηκαν σε διάλυμα γλυκερόλης σε βαθιά κατάψυξη (-80°C).

Πίνακας 8. Μορφολογία και κωδικές ονομασίες στελεχών				
	Colony morphology	ISOLATE number	Cell morphology	ACA-DC number
1	Circular, off-white opaque, medium-sized colony	FjM1-1a	bacilli	1460
2		FjM1-1b	bacilli	1461
3	Circular, off-white opaque, medium-sized colony	FjM1-2a	bacilli	1462
4		FjM1-2b	bacilli	1463
5	Circular, opaque, medium-sized colony	FjM1-3	bacilli	1464
6	Circular, opaque, medium-sized colony	FjM1-4a	bacilli	1465
7		FjM1-4b	bacilli	1466
8	Circular, opaque, medium-sized colony	FjM1-5a	bacilli	1467
9		FjM1-5b	bacilli	1468
10	Circular, off-white opaque, medium-sized colony	FjM2-1	bacilli	1469
11	Circular, opaque, medium-sized colony	FjM2-4	bacilli	1470
12	Circular, opaque, medium-sized colony	FjM2-5	bacilli	1471
13	Circular, opaque, large-sized colony	FjM3-1	yeast	5298
14	Circular, opaque, small-sized colony	FjM3-2	bacilli	1472
15	Circular, opaque, small-sized colony	FjM3-3	bacilli	1473
16	Rough, opaque, large-sized colony	FjM3-4	cocci	1474
17	Circular, opaque, large-sized colony	FjM3-5	cocci	1475
18	Circular, small-sized colony	FjM4-1a	cocci	1476
19		FjM4-1b	cocci	1477

20	Circular, small-sized colony	FjM4-2	cocci	1478
21	Circular, small-sized colony	FjM4-3	cocci	1479
22	Circular, small-sized colony	FjM4-4	cocci	1480
23	Circular, small-sized colony	FjM4-5	bacilli	1481
24	Circular, opaque, medium-sized colony	FjM5-1	bacilli	1482
25	Circular, small-sized colony	FjM5-2	cocci	1483
26	Circular, off-white opaque, medium-sized colony	FjM5-4a	bacilli	1484
27		FjM5-4b	cocci	1485
28	Circular, off-white opaque, large-sized colony	FjM5-5	bacilli	1486
29	Circular, tiny colony	FjM6-1	bacilli	1487
30	Circular, tiny colony	FjM6-2	bacilli	1488
31	Circular, tiny colony	FjM6-3	bacilli	1489
32	Circular, tiny colony	FjM6-4	bacilli	1490
33	Circular, tiny colony	FjM6-5	bacilli	1491
34	Small-sized fried-egg colony	FjM7-1	yeasts	5293
35	Circular, tiny colony	FjM7-2	yeasts	5294
36	Circular, opaque, large-sized colony	FjM7-3	yeasts	5295
37	Small-sized fried-egg colony	FjM7-4	yeasts	5296
38	Circular, tiny colony	FjM7-5	yeasts	5297

4.2 Απομόνωση βακτηριακού DNA

Για την απομόνωση του γενωμικού DNA από τα βακτηριακά στελέχη χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο των Pitcher et al. (1989) μερικώς τροποποιημένο. Η μέθοδος που ακολουθήθηκε στηρίζεται στη χρήση θειοκυανιούχου γουανιδίνης (GES), ενός ισχυρού αποδιατακτικού παράγοντα, με στόχο την απομόνωση υψηλής ποιότητας και καθαρότητας DNA. Τα στάδια της διαδικασίας απομόνωσης περιγράφονται αναλυτικά παρακάτω:

1. Εμβολιασμός υγρού θρεπτικού υποστρώματος από vial (1% v/v). Επώαση καλλιέργειας για 24-48 h.
2. 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. Επιλέγεται 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.
3. Απόχυση του υπερκείμενου και 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).
4. Απόχυση του υπερκείμενου και επαναιώρηση των κυττάρων σε 1 mL PBS. Θέρμανση στους 65 °C για 10 min με σκοπό την αποδιάταξη μέρους των πρωτεϊνών. Ακολουθεί φυγοκέντρηση (10.000 rpm/ 1 min/ 25 °C) και πλήρης απομάκρυνση του υπερκείμενου.
5. Στο ίζημα των κυττάρων προστίθενται 100 μl λυσοζύμης (50 mg/ml, Sigma-Aldrich, St. Louis, 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. Ακολουθεί επώαση στους 37 °C για 30 min με περιοδική ανάδευση των εppendorfs ανά 10 min. Μετά τη λύση των κυττάρων και για αποφυγή αποικοδόμησης του DNA, ο χειρισμός των δειγμάτων πρέπει να γίνεται με ήπιες κινήσεις.
6. Μεταφορά των δειγμάτων σε απαγωγό. Σε κάθε δείγμα προστίθενται 0,5 ml αντιδραστηρίου GES (5 M Guanidium thiocyanate, 100 mM EDTA, 0,5% v/v Sarcosyl) και ακολουθεί ήπια ανάδευση και ψύξη σε πάγο για 5 min.

7. Στη συνέχεια προστίθενται 0,25 ml παγωμένου διαλύματος οξικού αμμωνίου (7,5 M) και μετά από ήπια ανάδευση τα δείγματα παραμένουν στον πάγο για 10 min.
8. Προσθήκη 0,5 ml χλωροφορμίου και ήπια ανάδευση ώστε να αναμειχθούν οι δύο φάσεις. Φυγοκέντρηση σε παγωμένη φυγόκεντρο (13.000 rpm / 2 min/ 4° C). Προσεκτική μεταφορά υπερκειμένου σε καθαρό erpendorf και αποφυγή λήψης των πρωτεϊνών της μεσόφασης. Σε περίπτωση που οι φάσεις δεν είναι καλά διαχωρισμένες η φυγοκέντρηση επαναλαμβάνεται.
9. Προσθήκη 0,54 του όγκου παγωμένης ισοπροπανόλης και ήπια ανάδευση μέχρι να κατακρημνιστεί το DNA.
10. Φυγοκέντρηση (6.500 rpm/ 1 min/ 4° C) και απόχυση του υπερκείμενου.
11. Προσθήκη 0,7 ml παγωμένης αιθανόλης (70%) και ανάδευση για επαναιώρηση του ιζήματος ώστε να απομακρυνθούν τα άλατα. Φυγοκέντρηση (11.000 rpm/ 3 min/4° C) και απόχυση υπερκείμενου. Πλύσιμο με αιθανόλη συνολικά 3 φορές.
12. 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 να στεγνώσει το ίζημα.
13. Ακολουθεί διαλυτοποίηση του DNA σε 30 μl TE buffer (10mmol/L Tris-HCl, 1mmol/L EDTA, pH 8).
14. Τοποθέτηση των δειγμάτων στους 37° C για 24 ώρες και κατόπιν στους 4° C.

Εν συνεχεία, προσδιορίστηκε η συγκέντρωση και η καθαρότητα του απομονωμένου DNA. Οι μετρήσεις αυτές πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση φασματοφωτομέτρου μικροποσοτήτων (Quawell Q5000 UV-Vis Spectrophotometer, Quawell Technology Inc., San Jose, USA) και του προγράμματος Q5000 V6.0.3, για την προβολή των δεδομένων σε ηλεκτρονικό υπολογιστή. Η φωτομέτρηση για το DNA έγινε σε μήκος κύματος 260nm και από την τιμή της οπτικής απορρόφησης (Optical Density) υπολογίστηκε αυτόματα η συγκέντρωση αυτού. Όσον αφορά στην καθαρότητα, έγινε παράλληλη μέτρηση του δείγματος στα 280 nm, για έλεγχο της περιεκτικότητας του δείγματος σε πρωτεΐνες, με τον λόγο 260/280. Όταν ο λόγος είναι ανάμεσα στις τιμές 1.8-2, τότε το δείγμα θεωρείται καθαρό. Αντίθετα, όταν ο λόγος είναι μικρότερος από 1.8 τότε πιθανότατα υπάρχουν προσμίξεις πρωτεϊνών στο δείγμα. Ένα δεύτερο μέτρο καθαρότητας νουκλεϊνικών οξέων αποτελεί ο λόγος 260/230. Σε δείγματα υψηλής καθαρότητας από σάκχαρα, ο συγκεκριμένος λόγος κυμάνθηκε μεταξύ 1,8

και 2,2. Μετά τη φωτομέτρηση, τα δείγματα αραιώθηκαν έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση όλων των δειγμάτων να είναι ίδια και ίση με 25 ng/μL, σύμφωνα με το πρωτόκολλο της rep-PCR που ακολουθήθηκε.

4.3 Απομόνωση DNA ζυμών

Για την απομόνωση του DNA των ζυμών (Kopsahelis et al., 2009) τα αποθηκευμένα στην κατάψυξη κύτταρα, αναζωογονήθηκαν με εμβολιασμό σε θρεπτικό μέσο και επωάστηκαν για 24 ώρες. Αρχικά πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στα 8000g για 1 λεπτό, επαναιωρήθηκαν σε 500μL 1M sorbitol, 0.1M Na₂EDTA (pH 7.5) και μεταφέρθηκαν σε μικροσωληνάκια erpendorf (όγκου 1.5mL). Το κυτταρικό εναιώρημα επωάστηκε για 2 ώρες στους 37 °C μετά την προσθήκη 200U (20μL) λυτικάσης (Lyticase), (Sigma-Aldrich, Poole, UK). Ακολούθησε φυγοκεντρηση για 1min και το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 0.5mL 50mM Tris-Cl (pH 7.4), 20mM Na₂EDTA και 5μL 20% SDS. Το ίζημα επωάστηκε για 30min στους 65 °C. Μετά την προσθήκη 0.2 mL 5M οξικού καλίου (potassium acetate), το μίγμα τοποθετήθηκε σε πάγο για μία ώρα. Στην συνέχεια το μίγμα φυγοκεντρήθηκε για 5min (8000g) και το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε ένα νέο erpendorf. Προστέθηκε όγκος ισοπροπανόλης (100%), ίσος με του υπερκειμένου που απορρίφθηκε, και μετά από επώαση 5min, το παρασκεύασμα φυγοκεντρήθηκε εν συντομία. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα ξηράνθηκε στον αέρα και διαλυτοποιήθηκε σε 20μL αποστειρωμένο νερό. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε φωτομέτρηση (UV-Vs Spectrophotometer Q5000, Quawell) για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης και της καθαρότητας του DNA. Όσα δείγματα χρειάστηκε να διορθωθούν, αραιώθηκαν έτσι ώστε η τελική συγκέντρωσή τους να είναι ίση με 60 ng/μL, σύμφωνα με το πρωτόκολλο της REP-PCR (Kopsahelis et al., 2009).

4.4 Ομαδοποίηση βακτηριακών στελεχών με τη μέθοδο Rep-PCR (Reperitive Element Palindromic - Polymerase Chain Reaction)

Το γεγονός ότι στο χρωμοσωμικό και στο πλασμιδιακό DNA υπάρχουν επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, χαρακτηριστικές για κάθε είδος μικροοργανισμού, μας δίνει την δυνατότητα στο να πραγματοποιηθεί ομαδοποίηση των μικροοργανισμών με την μέθοδο rep-PCR η οποία στοχεύει στην ενίσχυση αυτών των περιοχών ώστε να δημιουργηθεί ένα πιο ξεκάθαρο γονιδιακό αποτύπωμα. Αυτό το αποτύπωμα θα μας επιτρέψει με χρήση

υπολογιστικών προγραμμάτων την ομαδοποίηση σε κοινά γένη ή είδη, ώστε στην συνέχεια αντιπροσωπευτικά δείγματα από κάθε ομάδα να διερευνηθούν περαιτέρω και να ταυτοποιηθούν, προδίδοντας έτσι την ταυτότητα ολόκληρης της ομάδας στην οποία ανήκουν.

Για την ομαδοποίηση των βακτηρικών στελεχών εφαρμόστηκε η τεχνική της rep-PCR. Η τεχνική αυτή εφαρμόστηκε για όλα τα απομονωμένα βακτηριακά στελέχη με τον εκκινητή BOXAIR (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') και το OneTaq-quick load 2x Mastermix with standard buffer (New England Biolabs, Massachusetts, USA), και με σταθερές ποσότητες αντιδραστηρίων για κάθε αντίδραση (βλ. Πίνακα 9). Οι συνθήκες που επιλέχθηκαν για τις αντιδράσεις στον θερμικό κυκλοποιητή (SimplyAmp, Applied Biosystems) ήταν οι εξής: 2 min στους 92 °C, 30 κύκλοι με 30 sec στους 92 °C, 2 min στους 40 °C, 3 min στους 72 °C. Με το πέρας των 30 κύκλων, ακολούθησαν 15 min στους 72 °C.

Πίνακας 9. Αντιδραστήρια Rep-PCR βακτηρίων.

Αντιδραστήριο	Ποσότητα ανά αντίδραση
OneTaq-quick load 2x Mastermix with standard buffer (New England Biolabs, UK)	12,5 μL
DNA template	1μL (25 ng/μL)
Boxair, primer 10pmol/μL	0,5μL
ddH ₂ O	10,5 μL
Τελικός όγκος	25 μL
Boxair	(5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3')

Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της rep PCR έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Alves *et al.* (2005). Τα προϊόντα της rep-PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτική αгарόζης και χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω υλικά:

- Ρυθμιστικό διάλυμα (Running buffer) TAE (Tris-acetate-EDTA):
40 mM Tris, 1 mM EDTA (pH 8,0), 20 mM acetic acid
- Αγαρόζη 1,2% w/v (Sigma-Aldrich)
- Βρωμιούχο αιθίδιο (Sigma-Aldrich)
- Μάρτυρας μοριακών μαζών 1 kb DNA Ladder, Invitrogen, California, USA)

Παρακάτω περιγράφεται η διαδικασία παρασκευής πηκτής αγαρόζης και φόρτωσης δειγμάτων προς ηλεκτροφόρηση:

1. Διαλυτοποίηση της σκόνης αγαρόζης (1,2% w/v, Sigma-Aldrich) στο διάλυμα TAE (Tris-Acetate-EDTA, 40 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0, 20 mM acetic acid) με θέρμανση μέχρι να βράσει.
2. Προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου (τελική συγκέντρωση 0,5 µg/ml) πριν την στερεοποίηση της αγαρόζης και μεταφορά του μείγματος σε κατάλληλο καλούπι προς στερεοποίηση.
3. Τοποθέτηση πλαστικής "χτένας" σε απόσταση περίπου 2 cm από την άκρη του καλουπιού, κάθετα βυθισμένη στο υγρό, έτσι ώστε μετά την στερεοποίηση της πηκτής να δημιουργηθούν τα κατάλληλα "πηγαδάκια", στα οποία θα τοποθετηθούν τα προς διαχωρισμό δείγματα DNA.
4. Μετά την στερεοποίηση, η αγαρόζη τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και προστίθεται διάλυμα ηλεκτροφόρησης TAE 1x, σε τόση ποσότητα ώστε να βρίσκεται πλήρως βυθισμένη σε αυτό.
5. Τα δείγματα προστίθενται στα πηγαδάκια με τη χρήση πιπέτας (18µl). Στο αρχικό και στο τελευταίο πηγαδάκι, προστίθενται 4 µl από τον μάρτυρα μοριακών μαζών (1 kb DNA Ladder, Invitrogen, California, USA).
6. Στη συνέχεια, η πηκτή της αγαρόζης ηλεκτροφορήθηκε στην δεξαμενή ηλεκτροφόρησης στα 60 V για 140 min.

Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης γίνονται ορατά με τη βοήθεια μιας συσκευής που εκπέμπει υπεριώδη ακτινοβολία (High Performance Ultraviolet Transilluminator, Ultra-Violet Products, UK) ώστε να δούμε με ευκρίνεια τις ζώνες που έχουν δημιουργηθεί. Εάν η απομόνωση DNA είναι επιτυχής, τα τμήματα DNA που έχουν ενισχυθεί διακρίνονται ως πορτοκαλί ζώνες, λόγω του φθορισμού που παρουσιάζει το βρωμιούχο αιθίδιο όταν εκτίθεται σε υπεριώδη ακτινοβολία. Η συσκευή εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας συνδέεται με ειδική ψηφιακή φωτογραφική μηχανή και έτσι η πηκτική αγαρόζης φωτογραφίζεται άμεσα. Παράλληλα συνδέεται και με ηλεκτρονικό υπολογιστή. Έτσι, με τη βοήθεια ενός ειδικού λογισμικού προγράμματος (Doc-IT 2.4.0.2, Syngene, Cambridge, UK) γίνεται εφικτή η αποθήκευση και η επεξεργασία των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης. Για την ομαδοποίηση των στελεχών, οι φωτογραφίες της πηκτικής αγαρόζης

υπέστησαν επεξεργασία με το πρόγραμμα BioNumerics (Applied Maths NV). Το πρόγραμμα αυτό συγκρίνει τις ζώνες στα ηλεκτροφορητικά προφίλ των στελεχών, μεταξύ των στελεχών αλλά και με το μάρτυρα μοριακών μαζών (1kb ladder). Από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων προκύπτει ένα δενδρόγραμμα, στο οποίο τα στελέχη ομαδοποιούνται με βάση τα ποσοστά ομοιότητας των ηλεκτροφορητικών προφίλ τους. Έπειτα επιλέξαμε τα στελέχη με ποσοστά ομοιότητας περίπου >80% και τα ομαδοποιήσαμε περαιτέρω, ώστε ένα τυχαίο στέλεχος από κάθε ομάδα να ταυτοποιηθεί.

4.5 Ομαδοποίηση των στελεχών των ζυμών με τη μέθοδο Rep-PCR

Τα δείγματα DNA των ζυμών υποβλήθηκαν σε ενίσχυση συγκεκριμένων τμημάτων του γενετικού υλικού, με την μέθοδο Rep-PCR, που πραγματοποιήθηκε σε θερμικό κυκλοποιητή (SimpliAmp™ Thermal Cycler, Thermofisher Scientific, US).

Πίνακας 10. Αντιδραστήρια Rep-PCR ζυμών.

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

4.6 Ταυτοποίηση των βακτηριακών στελεχών με βάση την αλληλούχηση του γονιδίου 16S rDNA

Για την βακτηριακή ταξινόμηση σε επίπεδο είδους, ενισχύθηκαν οι αλληλουχίες του γονιδίου 16S rDNA. Αυτό έγινε διότι το συγκεκριμένο γονίδιο αποτελεί τον καλύτερο δείκτη για ταξινομικούς χαρακτηρισμούς μεταξύ βακτηρίων. Όλα τα βακτήρια έχουν το συγκεκριμένο γονίδιο με διαφορετική ανά είδος αλληλουχία νουκλεοτιδίων. Η αλληλουχία βάσεων κάθε γνωστού είδους είναι γνωστή και αποθηκευμένη σε βάσεις δεδομένων οπότε η σύγκριση της αλληλουχίας του γονιδίου του υπό μελέτη βακτηρίου οδηγεί στην ταυτοποίησή του εφόσον ανήκει σε κάποιο από αυτά. Ο λόγος που θεωρείται η καλύτερη

μέθοδος ταυτοποίησης είναι ότι το γονίδιο αυτό διατηρεί αναλλοίωτη την αλληλουχία του κατά την διάρκεια της εξέλιξης σε αντίθεση με άλλες μεταλλάξεις που μπορούν αν συμβούν και έτσι τα αποτελέσματα θεωρούνται πολύ ασφαλή ακόμα και όταν υπάρχουν πολύ μικρές διαφορές στην αλληλουχία που θεωρητικά υποδεικνύουν διαφορετικό είδος. Αξίζει να αναφερθεί ότι το μέγεθος αυτού του γονιδίου δεν ξεπερνά τα 1500bp, οπότε η αλληλούχισή του γίνεται αρκετά γρήγορα και με μικρότερο κόστος από την αλληλούχιση άλλων μεγαλύτερων γονιδίων

Το DNA των επιλεγμένων βακτηριακών στελεχών ενισχύθηκε με την 16S PCR, με τους εκκινητές 16S F (5'- GGA GAG TTA GAT CTT GGC TCA G -3') και 16S R (5'- AGA AAG GAG GTG ATC CAG CC -3') (VBC-Biotech, Wien, Austria) (Ntougias et al., 2006).

Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν οι ακόλουθες: 2 min στους 94 °C, 30 s στους 56°C, 1 min και 20 s στους 72 °C. Με το πέρας των 30 κύκλων, ακολούθησε παραμονή για 5 min στους 72 °C. Στον Πίνακα 11 αναφέρονται αναλυτικά τα αντιδραστήρια και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση.

Πίνακας 11. Αντιδραστήρια για την ενίσχυση της γονιδιακής περιοχής του 16S rDNA.

Αντιδραστήριο	Ποσότητα ανα αντίδραση
Taq ReadyMix	25 µL
DNA template	1 µL (200 ng/µL)
Primer F (10 pmol/µL)	1 µL
Primer R (10 pmol/µL)	1 µL
ddH ₂ O	22 µL
Τελικός όγκος	50 µL
16S-F	5'-GGAGAGTTAGATCTTGGCTCAG-3'
16S-R	5'- AGA AAG GAG GTG ATC CAG CC -3'

Πριν σταλούν τα προϊόντα της PCR για αλληλούχιση, έγινε καθαρισμός προκειμένου να απομακρυνθούν τα υπολείμματα των εκκινητών, των δεοξυνουκλεοτιδίων, των μη ειδικών προϊόντων μικρού μοριακού μεγέθους και του ρυθμιστικού διαλύματος. Ο καθαρισμός

πραγματοποιήθηκε με το Nucleospin gel and PCR clean-up (Macherey-Nagel, Duren, Germany). Η διαδικασία καθαρισμού στηρίζεται στο γεγονός ότι τα νουκλεϊκά οξέα προσδένονται σε στήλη χαλαζία (PCR Clean-up Column), σε περιβάλλον υψηλής ιοντικής ισχύος και χαμηλού pH που δημιουργείται από την προσθήκη χαστροπικού παράγοντα, ενώ η έκλυση του DNA γίνεται με νερό ή με ρυθμιστικό διάλυμα TE σε pH 8,3. Η διαδικασία έγινε σε θερμοκρασία δωματίου και περιλάμβανε τα εξής στάδια:

1. Προσθήκη διπλάσιου όγκου διαλύματος πρόσδεσης NT1 (Binding Buffer) στο φιαλίδιο με το προϊόν της PCR.
2. Μετάγγιση του διαλύματος στη στήλη χαλαζία για πρόσδεση του DNA σε αυτή και φυγοκέντρηση της στήλης (11.000 rpm/ 1 min/ 25 °C).
3. Απόρριψη του διηθήματος.
4. Προσθήκη στη στήλη 700 μl αλκοολούχου διαλύματος NT3 για καθαρισμό της μεμβράνης χαλαζία και φυγοκέντρηση (11.000 rpm/ 1 min/ 25 °C).
5. Η φυγοκέντρηση της στήλης επαναλαμβάνεται (μέγιστη ταχύτητα σε θερμοκρασία δωματίου) για να απομακρυνθεί όλη η ποσότητα του NT3.
6. Επώαση σε κλίβανο στους 37 °C για 2 min για εξάτμιση της αιθανόλης.
7. Τοποθέτηση στήλης σε καθαρό φιαλίδιο και προσθήκη 16 μl από το διάλυμα έκλυσης NE (5mM Tris-HCl, pH 8,5) στη στήλη. Το DNA εκλύεται κάτω από της χαμηλής ιοντικής ισχύος συνθήκες και το ελαφρώς αλκαλικό pH του NE. Επώαση για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση της στήλης (11.000 rpm/ 2 min/ 25 °C).
8. Το διήθημα περιέχει, πλέον, το καθαρό προϊόν και φυλάσσεται στους -20 °C.

Μετά την ενίσχυση του γονιδίου, τα καθαρισμένα προϊόντα της PCR στάλθηκαν τα δείγματα σε εξωτερικό εργαστήριο (Eurofin Genomics, Austria) για την αλληλούχισή τους.

Μετά την αλληλούχισή, η ταυτοποίηση των αλληλουχιών 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) (<http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST/>).

4.7 Ταυτοποίηση ζυμών με βάση την αλληλούχιση της περιοχής ITS PCR

Η ITS περιοχή είναι μια μη μεταγραφόμενη περιοχή του ριβοσωμικού DNA των ζυμών και βρίσκεται ανάμεσα σε 2 γονίδια που κωδικοποιούν ριβοσωμικό RNA. Κάθε ITS περιοχή βρίσκεται ανάμεσα στα αντίστοιχα γονίδια που την χαρακτηρίζουν, όπως για παράδειγμα η ITS1 βρίσκεται ανάμεσα στα γονίδια του 16S και του 5S rRNA και χρησιμοποιείται στην ταυτοποίηση των ζυμών.

Ο λόγος που πραγματοποιείται η ITS PCR είναι για να επιτευχθεί εκλεκτική ενίσχυση μια συγκεκριμένης αλληλουχίας του DNA των υπό μελέτη ζυμών, για να γίνει αλληλούχισή της και με αυτόν τον τρόπο να ταυτοποιηθούν.

Η ITS PCR πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Korabeca et al. (2007).

Πίνακας 12. Αντιδραστήρια ITS PCR

Αντιδραστήριο	Ποσότητα ανά αντίδραση
OneTaq-quick load 2x Mastermix with standard buffer (New England Biolabs, UK)	25 μ L
DNA template	1 μ L (200 ng/ μ L)
ITS1 (10 μ mol/ μ L)	2 μ L
ITS4 (10 μ mol/ μ L)	2 μ L
ddH ₂ O	20 μ L
Τελικός όγκος	50 μL
ITS1	5' -TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'
ITS4	5' - TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

Τα δείγματα προς ενίσχυση τοποθετήθηκαν στη συσκευή PCR. Η διαδικασία έγινε με θέρμανση αρχικά στους 95 ° C για 15min, ακολουθούμενη από 35 κύκλους των:

- 1) 94 °C για 1min (στάδιο μετουσίωσης)
- 2) 55,5 ° C για 2min (στάδιο "annealing")
- 3) 72 ° C για 2min (στάδιο επιμήκυνσης)

με τελική επιμήκυνση στους 72 ° C για 10min.

Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της ITS-PCR προκειμένου να επιβεβαιωθεί η επιτυχία της και μετά πραγματοποιήθηκε καθαρισμός και αποστολή σε εξωτερικό εργαστήριο (Eurofin Genomics, Austria) για αλληλούχιση του DNA.

4.8 Ανίχνευση αντιμικροβιακής δράσης

Τα βακτηριακά στελέχη που απομονώθηκαν από το γάλα προέλευσης νησιών Fiji, εξετάστηκαν για να διαπιστωθεί η παραγωγή βακτηριοσινών με την μέθοδο διάχυσης σε θρεπτικό μέσο με άγαρ, εμβολιασμένο με μικροοργανισμούς-στόχους, παθογόνους ή δυνητικά παθογόνους και οξυγαλακτικά βακτήρια. Δεδομένου ότι οι βακτηριοσίνες που παράγουν οι μικροοργανισμοί αποτελούν εξωκυτταρικά συστατικά, η συλλογή τους έγινε με φυγοκέντρηση. Επίσης είναι γεγονός ότι μια βακτηριοσίνη μπορεί να παραχθεί ή να μην παραχθεί, ανάλογα με το θρεπτικό υπόστρωμα στο οποίο αναπτύσσεται ο μικροοργανισμός. Για το λόγο αυτό, κάθε βακτήριο αναπτύχθηκε αρχικά σε δύο θρεπτικά μέσα, το ένα εκ των οποίων MRS ή M17, αναλόγως εάν πρόκειται για βάκιλλο ή κόκκο και το δεύτερο εργαστηριακό γάλα συγκέντρωσης 10% (Skimmed Milk, Oxoid, UK) με προσθήκη εκχυλίσματος ζύμης 0,3% w/v (Yeast Extract, Biokar, France). Η επώαση διήρκεσε 24-48 ώρες σε θερμοκρασία 30°C ή 37°C αναλόγως με την ιδανική θερμοκρασία ανάπτυξης κάθε στελέχους. Για την απομόνωση των εξωκυτταρικών συστατικών συμπεριλαμβανομένων των βακτηριοσινών, οι καλλιέργειες φυγοκεντρήθηκαν στα 10000rpm για 15min, στους 25°C. Μετά την φυγοκέντρηση το υπερκείμενο (άνω φάση) συλλέχθηκε σε erpendorf και πραγματοποιήθηκε ρύθμιση του pH (με NaOH) ώστε να είναι ουδέτερο και να μην επηρεαστούν τα αποτελέσματα από αυτόν τον παράγοντα. Μετά το πέρας της διαδικασίας τα υπερκείμενα αποθηκεύτηκαν στους -20°C.

Στην συνέχεια αναπτύχθηκαν και οι μικροοργανισμοί στόχοι, ο κάθε ένας εκ των οποίων με βάση τις ξεχωριστές ανάγκες που τον χαρακτηρίζουν. Ο εμβολιασμός με τα στελέχη-στόχους ήταν 1% v/v σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο και η επώαση που ακολούθησε διήρκεσε 24 ώρες σε κατάλληλη θερμοκρασία. Από την ανεπτυγμένη καλλιέργεια προστέθηκε σε θρεπτικό υλικό με άγαρ (1,3% w/v), εμβόλιο 0,1% v/v και πραγματοποιήθηκαν στρώσεις σε τρυβλία. Αφού αυτά στερεοποιήθηκαν ανοίχθηκαν μικρές οπές με την χρήση αποστειρωμένων πιπετών τύπου Pasteur, υπό ασηπτικές συνθήκες. Σε κάθε οπή τοποθετήθηκε ποσότητα υπερκειμένου 50μL. Στην συνέχεια ακολούθησε επώαση των τρυβλίων για 24 ώρες σε θερμοκρασίες ανάπτυξης κατάλληλης για κάθε μικροοργανισμό-στόχο. Μετά τις 24 ώρες παρατηρήθηκαν και μετρήθηκαν οι ζώνες διαύγασης όπου αυτές δημιουργήθηκαν. Η μέτρηση έγινε με ακρίβεια, με τη χρήση χάρακα. Οι μικροοργανισμοί στόχοι καθώς και οι λεπτομέρειες για την ανάπτυξή τους αναφέρονται στον Πίνακα 12.

Πίνακας 12. Μικροοργανισμοί Στόχοι

Target Strain	Growth medium	Temperature	Gram staining	Biohazard group
Pathogens - food related				
<i>Escherichia coli</i> CFA-I	BHI	37°C	-	2
<i>Escherichia coli</i> C1845	BHI	37°C	-	2
<i>Salmonella typhimurium</i> SL1344	BHI	37°C	-	2
<i>Klebsiella oxytoca</i> FMCC B-197	BHI	37°C	-	2
<i>Yersinia enterocolitica</i> FMCC B-89	BHI	37°C	-	2
<i>Yersinia enterocolitica</i> FMCC B-90	BHI	37°C	-	2
<i>Bacillus cereus</i> LMG 6923 ^T	BHI	30°C	+	2
<i>Bacillus subtilis</i> FMCC B-109	BHI	30°C	+	1
<i>Listeria innocua</i> LMG 11387 ^T	BHI	30°C	+	1
<i>Listeria innocua</i> LMG 13568	BHI	30°C	+	1
<i>Listeria welshimeri</i> 15008	BHI	30°C	+	1
Pathogens - human gastrointestinal or/and respiratory tract				
<i>Streptococcus agalactiae</i> LMG 14694 ^T	BHI	37°C	+	2
<i>Streptococcus anginosus</i> LMG 14502 ^T	BHI	37°C	+	2
<i>Streptococcus pneumoniae</i> LMG 14545 ^T	BHI	37°C	+	2
<i>Streptococcus pyogenes</i> LMG 21599 ^T	BHI	37°C	+	2
Pathogens and opportunistic pathogens - oral cavity				
<i>Streptococcus gordonii</i> LMG 14518 ^T	BHI	37°C	+	1
<i>Streptococcus mutans</i> LMG 14558 ^T	BHI	37°C	+	1
<i>Streptococcus oralis</i> LMG 14532 ^T	BHI	37°C	+	2
<i>Streptococcus salivarius</i> LMG 11489 ^T	BHI	37°C	+	1
<i>Streptococcus sanguinis</i> DSM 20068	BHI	37°C	+	1
<i>Streptococcus sobrinus</i> LMG 14641 ^T	BHI	37°C	+	1
<i>Staphylococcus aureus</i> DSM 21705	BHI	37°C	+	2
Pathogens – wounds				
<i>Enterococcus faecalis</i> LMG 11396	BHI	37°C	+	2
<i>Staphylococcus aureus</i> LMG 8064	BHI	37°C	+	2
LAB strains				
<i>Lactobacillus sakei</i> ACA-DC 2313	MRS	30°C	+	1
<i>Lactococcus lactis</i> LMG 6890 ^T	M17	30°C	+	1
<i>Streptococcus thermophilus</i> ACA-DC 4	M17	37°C	+	1

4.9 Επιβίωση στελεχών σε συνθήκες χαμηλού pH

Έγιναν δοκιμές για να εξεταστεί η αντοχή των βακτηριακών στελεχών σε χαμηλό pH, καθώς αυτή η ιδιότητα αποτελεί βασική προϋπόθεση για την επιβίωσή τους εντός του οργανισμού. Αρχικά τα κύτταρα ανανεώθηκαν από την κατάψυξη στην οποία ήταν αποθηκευμένα, σε θρεπτικό μέσο MRS ή M17 και σε θερμοκρασία 30 °C ή 37°C ανάλογα πάντα με τις ανάγκες του κάθε μικροοργανισμού. Η ανανέωση ήταν διπλή ώστε να αντιμετωπιστεί το στρες στο οποίο υπόκεινται τα κύτταρα κατά την κατάψυξη και απόψυξη. Όταν ολοκληρώθηκε και η επαναληπτική ανανέωση, ποσότητα 1 ml από την καλλιέργεια κάθε στελέχους μεταφέρθηκε σε καθαρό Eppendorf και φυγοκεντρήθηκε για 3min στα 12000g. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος PBS (0,8% w/v NaCl, 0,02% w/v KCl, 0,144% w/v Na₂HPO₄, 0,024% w/v KH₂PO₄ pH 7,3). Ακολούθησε νέα φυγοκέντρωση και επαναιώρηση αυτή τη φορά σε 1 ml PBS με pH 2,5. Αμέσως μετά την επαναιώρηση σε PBS, pH 2,5 μεταφέρθηκαν 100μl από το εναιώρημα σε νέο Eppendorf που περιείχε 900μl ρυθμιστικού διαλύματος πεπτόνης (χρόνος 0, t=0), ενώ παράλληλα τα εναπομείναντα κύτταρα επωάστηκαν για 2h (t=2) (χρονικό διάστημα που αντιστοιχεί στον χρόνο που η τροφή παραμένει στο στομάχι) στους 37°C, θερμοκρασία που αντιπροσωπεύει την θερμοκρασία του ανθρώπινου οργανισμού. Στη συνέχεια στα 2 δείγματα (t=0 και t=2) έγιναν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις με μέσο αραιώσης το ρυθμιστικό διάλυμα πεπτόνης (Lab M, UK) έως την 10⁻⁷ συγκέντρωση και τοποθετείται σε τρυβλία ποσότητα 100 μl προσθέτωντας κατάλληλο θρεπτικό μέσο (MRS ή M17). Τα τρυβλία επωάστηκαν για 48h στους 30 °C ή 37°C, ανάλογα με το εξεταζόμενο στελεχος. Έτσι κάθε στέλεχος έχει επωαστεί για 2 ώρες σε pH 2,5 και έχει αναπτυχθεί σε τρυβλίο και ταυτόχρονα το ίδιο στέλεχος έχει αναπτυχθεί σε άλλο τρυβλίο χωρίς να έχει προηγηθεί έκθεσή του σε χαμηλό pH, γεγονός που επιτρέπει την σύγκριση την επιβίωσης των βακτηρίων που μας ενδιαφέρουν μεταξύ των 2 αυτών καταστάσεων. Επομένως όσο πιο μικρή η πληθυσμιακή διαφορά μεταξύ των 2 καταστάσεων τόσο πιο επιθυμητή είναι, καθώς αυτό σημαίνει αντοχή στο χαμηλό pH. Τα αποτελέσματα του συγκεκριμένου πειράματος παρουσιάζονται αναλυτικά σε επόμενη ενότητα αυτού του κεφαλαίου.

4.10 Ικανότητα υδρόλυσης χολικών αλάτων

Το ένζυμο BSH (Bile Salt Hydrolase, Υδρολάση των Χολικών Αλάτων) των μικροοργανισμών, επηρεάζει το δυναμικό τους στο να διαφοροποιούν τη φυσιολογία του ξενιστή τους. Είναι γνωστό ότι το ένζυμο αυτό επηρεάζει τα επίπεδα της χοληστερόλης του ορού, καθώς εμπλέκεται στο μεταβολισμό της χοληστερόλης και αποτελεί βασικό κριτήριο για την επιλογή προβιοτικών μικροοργανισμών με ικανότητα μείωσης της χοληστερόλης. Θεωρητικά, τα στελέχη με ενεργότητα BSH μπορούν να παρουσιάζουν ανταγωνιστική δράση έναντι παθογόνων, καθώς τα χολικά οξέα που ελευθερώνονται έχουν υψηλότερη παρεμποδιστική δράση από αυτή των αντίστοιχων χολικών αλάτων. Υδρόλυση είναι η διάσπαση των χημικών δεσμών με την προσθήκη μορίων νερού.

Σε αυτό το στάδιο λοιπόν εξετάσθηκε η ικανότητα υδρόλυσης των χολικών αλάτων από τα υπό μελέτη βακτηριακά στελέχη. Καλλιέργειες των υπο μελέτη στελεχών προστέθηκαν επιφανειακά σε ποσότητα 10 μl σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα MRS και MRS εμπλουτισμένο με 0,5% (w/v) ταυροδεοξυχολικό οξύ (TDCA, Sigma).

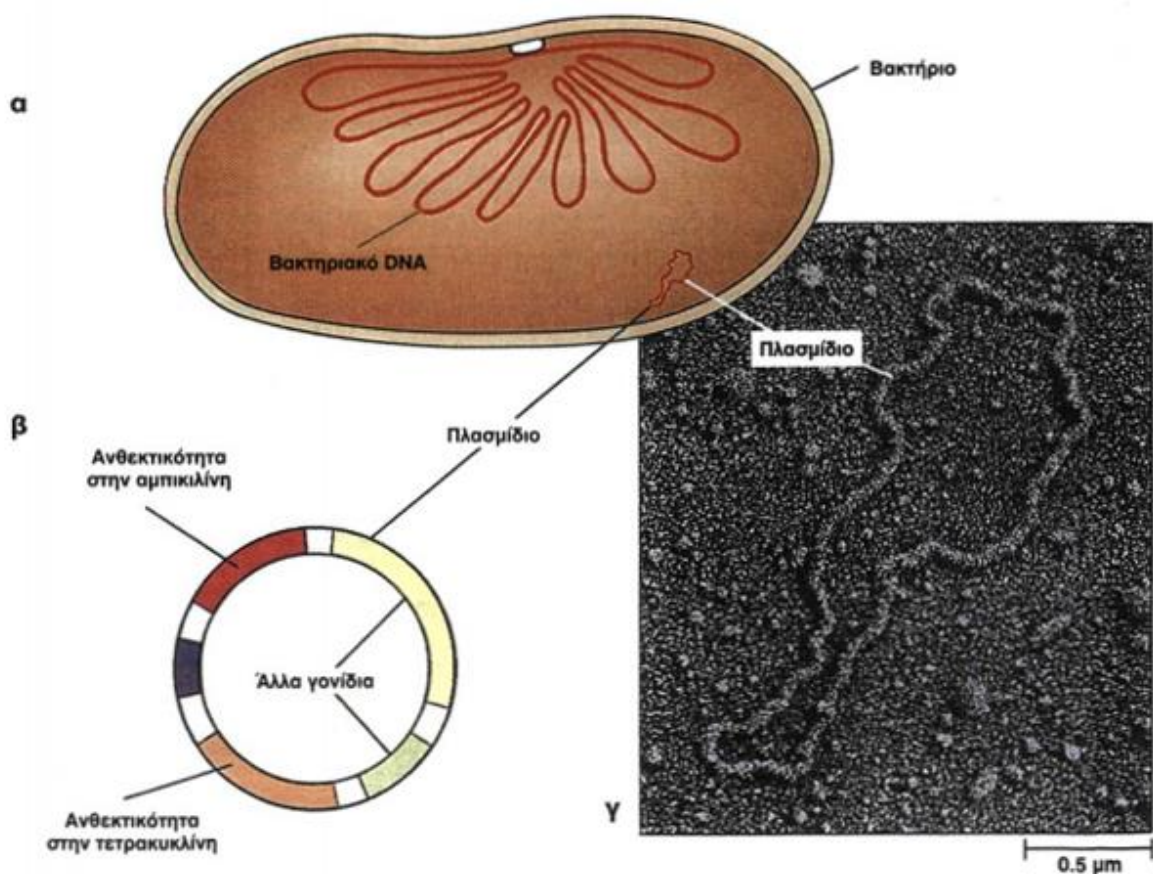
Στη συνέχεια επώασθηκαν για 48h σε αναερόβιες συνθήκες και σε κατάλληλη θερμοκρασία. Με το πέρας της επώασης εξετάστηκε η ικανότητα υδρόλυσης μέσω οπτικής παρατήρησης της μορφολογίας των αποικιών λευκών γραμμικών σχηματισμών και συγκρίθηκαν με τα αντίστοιχα τρυβλία που δεν περιείχαν χολικά άλατα ώστε να διασφαλιστεί η εγκυρότητα των αποτελεσμάτων. Τα εν λόγω αποτελέσματα της εξέτασης αναλύονται σε επόμενη ενότητα.

4.11 Ικανότητα πρόσδεσης σε κολλαγόνο

Η συγκεκριμένη δοκιμή πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο (Tram *et al*, 2013). Χρησιμοποιήθηκαν τρυβλία μικροτιτλοδότησης 96 κυψελών επικαλυμμένων με κολλαγόνο τύπου I (cell culture microplate, 96 well , code: 655950, Greiner bio-one, Germany). Οι καλλιέργειες ανανεώθηκαν δυο φορές για 24h, σε MRS ή M17 στους 30 ή 37 °C. Οι φρέσκιες καλλιέργειες (1% v/v εμβόλιο) τοποθετήθηκαν (100 µL) εντός των κυψελών του πλακιδίου κολλαγόνου και επωάστηκαν για 24 h στους 30 ή 37 °C. Έτσι δόθηκε χρόνος να προσδεθούν στο κολλαγόνο, εφόσον έχουν την ικανότητα. Στη συνέχεια, απομακρύνθηκε το υπερκείμενο από κάθε κυψέλη και ακολούθησε έκπλυση (3 φορές) με 150 µL διαλύματος Ringer. Στη συνέχεια, σε κάθε κυψέλη τοποθετήθηκαν 100 µL διαλύματος χρωστικής crystal violet (0,05% v/v) για 15 min. Ακολούθησε απομάκρυνση του διαλύματος crystal violet και έκπλυση των κυψελών με Ringer μέχρι το διάλυμα της έκπλυσης να είναι άχρωμο (5 πλυσίματα). Τέλος, σε κάθε κυψέλη τοποθετήθηκαν 100 µL διαλύματος [SDS (10% v/v) και αιθανόλη (10% v/v)] για 5 min και έπειτα, 90 µl του διαλύματος αυτού μεταφέρθηκαν σε νέο τρυβλίο μικροτιτλοδότησης ώστε να μετρηθεί η οπτική πυκνότητα στα 600 nm (OD600) ως ένδειξη του πληθυσμού των βακτηριακών κυττάρων που είχαν προσδεθεί σε κάθε κυψέλη.

4.12 Ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά

Ένα πολύ βασικό κριτήριο ασφάλειας για την επιλογή προβιοτικών στελεχών είναι η ανθεκτικότητάς τους έναντι διαφορετικών ειδών αντιβιοτικών. Όταν ένα βακτήριο παρουσιάζει ανθεκτικότητα αυτό οφείλεται στην ύπαρξη και έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων ανθεκτικότητας (Εικόνα 2) που μπορούν να μεταφερθούν σε παθογόνα βακτήρια με αποτέλεσμα να δημιουργούνται ανθεκτικά παθογόνα στελέχη, με προφανείς συνέπειες.



Εικόνα 3. Απεικόνιση θέσης του γονιδίου ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη σε βακτηριακό κύτταρο.

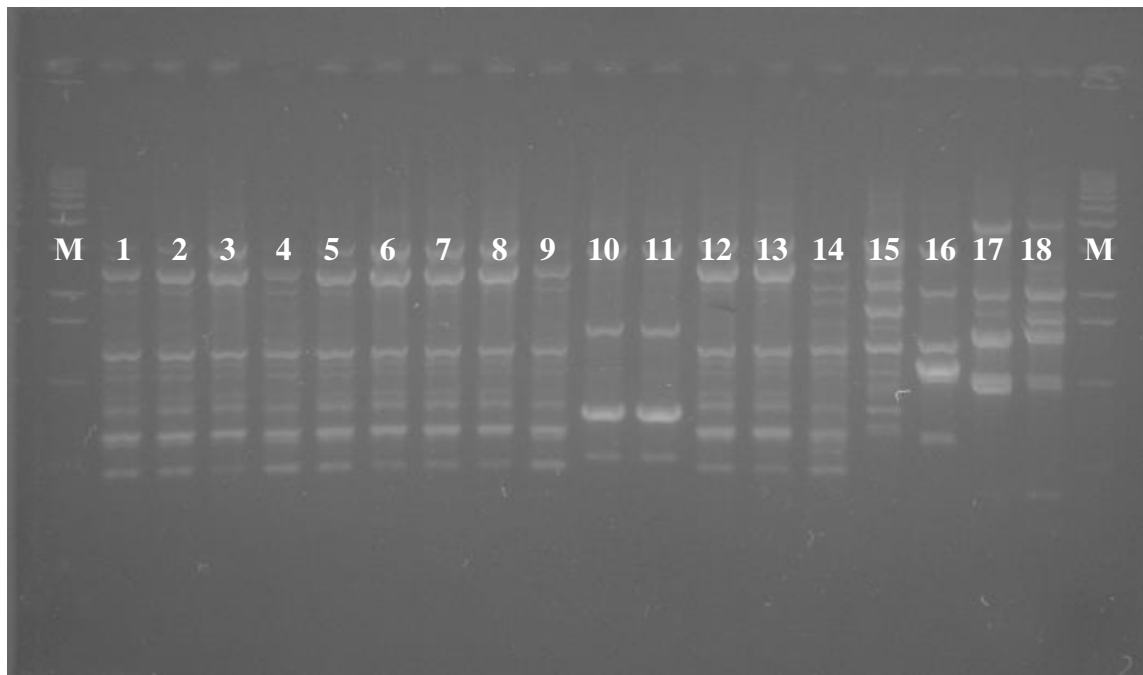
Στο τελευταίο στάδιο του πειράματος, εξετάστηκε η ανθεκτικότητα των υπό μελέτη βακτηρίων έναντι 8 διαφορετικών αντιβιοτικών (Ampicillin, Vancomycin, Gentamycin, Kanamycin, Streptomycin, Erythromycin, Tetracyclin, Chloramphenicol). Τα αντιβιοτικά αραιώθηκαν σε dH₂O ή διάλυμα 30% αιθανόλης (Erythromycin & Chloramphenicol), ώστε η τελική τους συγκέντρωση εκφρασμένη σε mg/ml να είναι: 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512 και 1024. Τα βακτήρια ανανεώθηκαν από την βαθιά κατάψυξη σε MRS ή M17 και σε κατάλληλη θερμοκρασία, για 24 ώρες. Στην συνέχεια τα θρεπτικά υλικά τοποθετήθηκαν σε “well polystyrene suspension culture plates (ThermoFisher Scientific, USA)” για την επιτόπια

ανάπτυξη των κυττάρων, οι αντίστοιχοι διαλύτες κάθε αντιβιοτικού, και τα αντιβιοτικά με δυαδική αραιώση από τη μεγαλύτερη προς τη μικρότερη συγκέντρωση, καθώς και τυφλό δείγμα (δηλαδή χωρίς αντιβιοτικό) για κάθε ένα στέλεχος. Η φρέσκια καλλιέργεια αραιώθηκε πρώτα κατά 1/10 και προστέθηκαν 20μL αραιωμένης καλλιέργειας σε κάθε συγκέντρωση αντιβιοτικού και τυφλού δείγματος.. Η ανάπτυξη των βακτηρίων μετρήθηκε με βάση την απορρόφηση μήκους κύματος φωτός στα 610nm σε ειδικό φασματοφωτόμετρο (ELISA (Sunrise, Tecan, Austria). Τα μέγιστα δυνατά όρια ανάπτυξης για κάθε αντιβιοτικό και για συγκεκριμένη συγκέντρωση του αντιβιοτικού αυτού καθορίζονται από την EFSA και με βάση αυτά, καθορίζεται το εάν ένα στέλεχος είναι γενικά ανθεκτικό ή όχι σε κάποιο αντιβιοτικό (EFSA journal 2012).

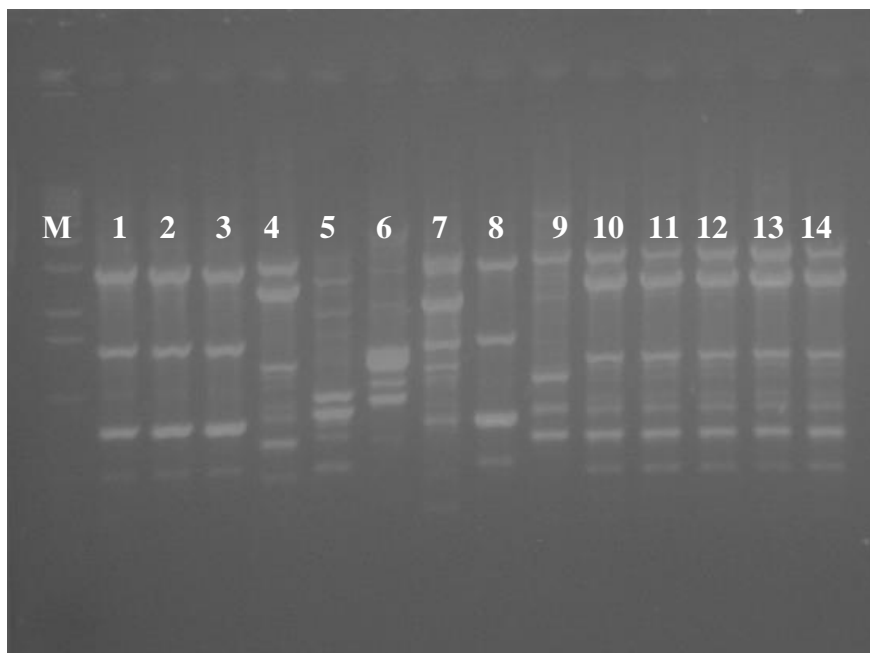
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Αποτελέσματα και Συζήτηση

5.1 Ομαδοποίηση βακτηριακών στελεχών με την rep-PCR μέθοδο

Η μέθοδος αυτή αποσκοπεί στην ενίσχυση ορισμένων επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών του χρωμοσωμικού και πλασμιδιακού DNA, με την χρήση κατάλληλων εκκινήτων, προκειμένου με την ηλεκτροφόρηση που ακολουθεί πάντα μια PCR για να σχηματιστεί ένα χαρακτηριστικό γενετικό αποτύπωμα, δηλαδή ένα αποτύπωμα επιτρέπει την ομαδοποίηση του μικροοργανισμού σε επίπεδο γένους μιας ποικιλίας μικροοργανισμών.



Εικόνα 4 . Ηλεκτροφόρηση προϊόντων της REP-PCR των βακτηρίων με τα εξής ACA-DC numbers: 1) 1460, 2) 1461, 3) 1462, 4) 1463, 5) 1464, 6) 1465, 7) 1466, 8) 1467, 9) 1468, 10) 1469, 11) 1470, 12) 1471, 13) 1472, 14) 1473, 15) 1474, 16) 1475, 17) 1476, 18) 1477, καθώς και 2 μάρτυρες μοριακών μαζών 1kb στις 2 ακραίες θέσεις M (DNA ladder, Invitrogen, California USA).

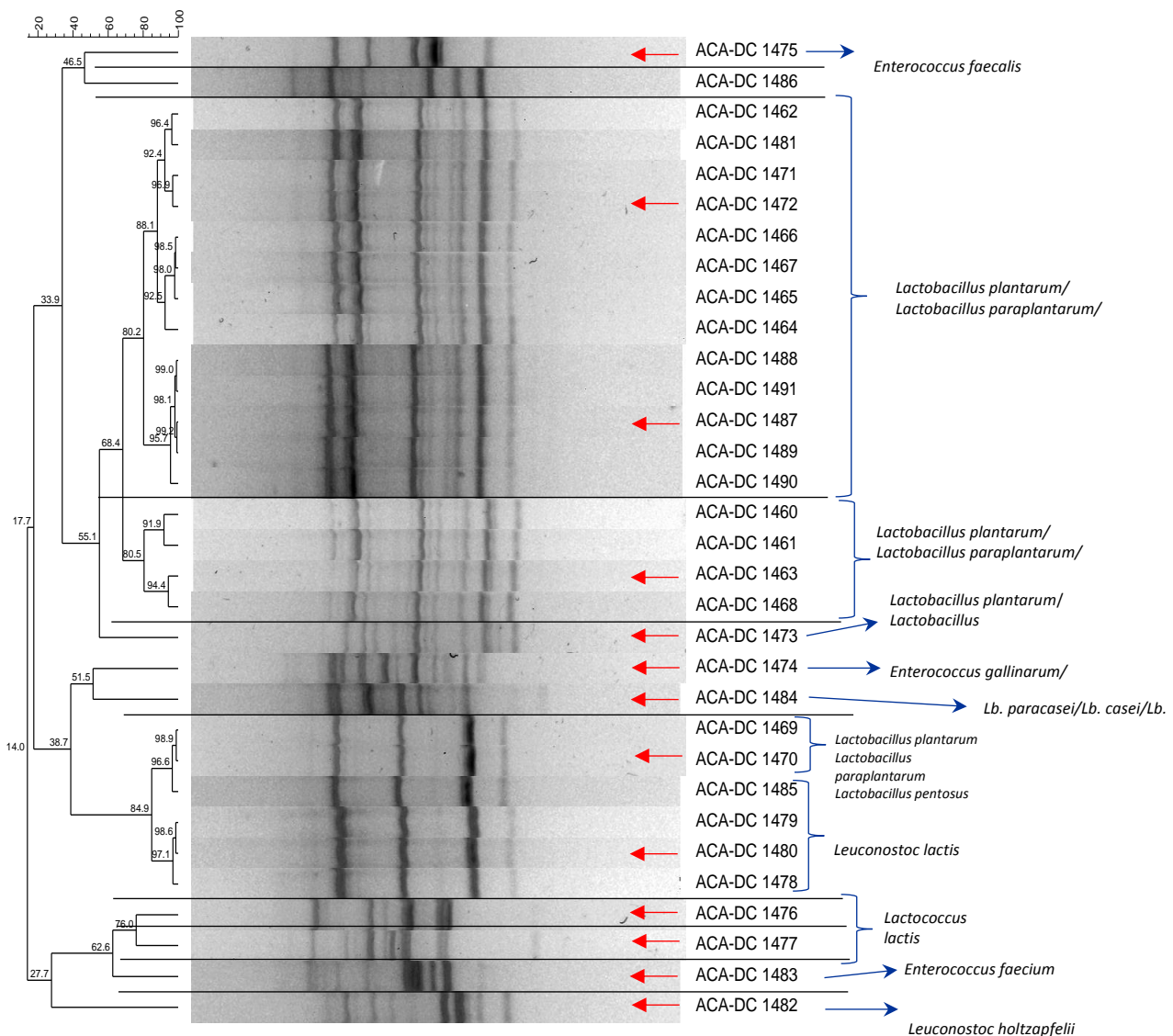


Εικόνα 5. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων της REP-PCR των βακτηρίων με τα εξής ACA-DC:

1) 1478, 2) 1479, 3) 1480, 4) 1481, 5) 1482, 6) 1483, 7) 1484, 8) 1485, 9) 1486, 10) 1487, 11) 1488, 12) 1489, 13) 1490, 14) 1491

καθώς και ένας μάρτυρας μοριακών μαζών (M) 1kb (*DNA ladder, Invitrogen, California USA*).

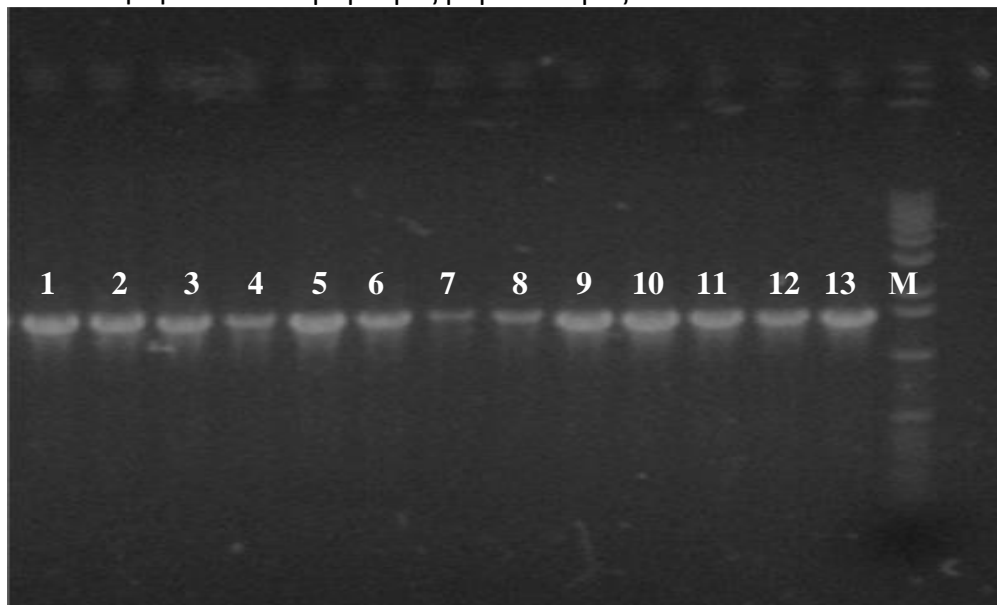
Μέσω της επεξεργασίας των παραπάνω αποτελεσμάτων με το πρόγραμμα Bionumerics, δημιουργήθηκε το παρακάτω δενδρόγραμμα το οποίο ομαδοποιεί τα γενετικά αποτυπώματα που σχηματίστηκαν κατά την ηλεκτροφόρηση, και αναλόγως τον βαθμό ομοιότητας υπολογίζει αλγοριθμικά ένα ποσοστό ομοιότητας μεταξύ κάθε στελέχους. Έτσι, όταν η ομοιότητα ξεπερνά το 80% θεωρείται ασφαλής η ταξινόμηση στην ίδια ομάδα, δηλαδή πρόκειται κατά πάσα πιθανότητα για το ίδιο είδος βακτηρίων.



Εικόνα 6. Δενδρόγραμμα της ανάλυσης βακτηριακών στελεχών, με βάση τα ποσοστά ομοιότητας των ηλεκτροφορητικών τους προφίλ, όπως αυτά λήφθηκαν με τη μέθοδο rep-PCR. Τα στελέχη που επιλέχθηκαν για την μέθοδο 16S RNA PCR ήταν τα εξής: ACA-DC 1475, ACA-DC 1463, ACA-DC 1472, ACA-DC 1487, ACA-DC 1473, ACA-DC 1484, ACA-DC 1474, ACA-DC 1470, ACA-DC 1480, ACA-DC 1476, ACA-DC 1477, ACA-DC 1483, ACA-DC 1482

5.2 Ταυτοποίηση βακτηρίων με την αλληλουχία του 16S rRNA

Στην παρακάτω εικόνα διακρίνονται οι ζώνες που διαμορφώθηκαν από την ενίσχυση του γονιδίου 16S rDNA. Τα στελέχη επιλέχθηκαν ως εξής: Από την ομαδοποίηση των βακτηρίων με την μέθοδο Rep-PCR και με το δενδρόγραμμα που δημιουργήθηκε από το πρόγραμμα bioNumerics επιλέχθηκε ένα στέλεχος από κάθε ομάδα στελεχών με όμοιο γενετικό αποτύπωμα. Το ελάχιστο απαιτούμενο ποσοστό ομοιότητας για θεωρηθεί ότι 2 ή περισσότερα στελέχη ανήκουν στο ίδιο είδος είναι 80%. Κατά τον τρόπο αυτό εκπροσωπείται όλη η ομάδα, με την τελική ταυτοποίηση. Συνεπώς τα στελέχη που επιλέχθηκαν ως τα αντιπροσωπευτικότερα της κάθε ομάδας ήταν τα εξής: ACA-DC 1475, ACA-DC 1463, ACA-DC 1472, ACA-DC 1487, ACA-DC 1473, ACA-DC 1484, ACA-DC 1474, ACA-DC 1470, ACA-DC 1480, ACA-DC 1476, ACA-DC 1477, ACA-DC 1483 και ACA-DC 1482. Επίσης στα δυο άκρα του gel τοποθετήθηκαν οι δυο μάρτυρες μοριακών μαζών.

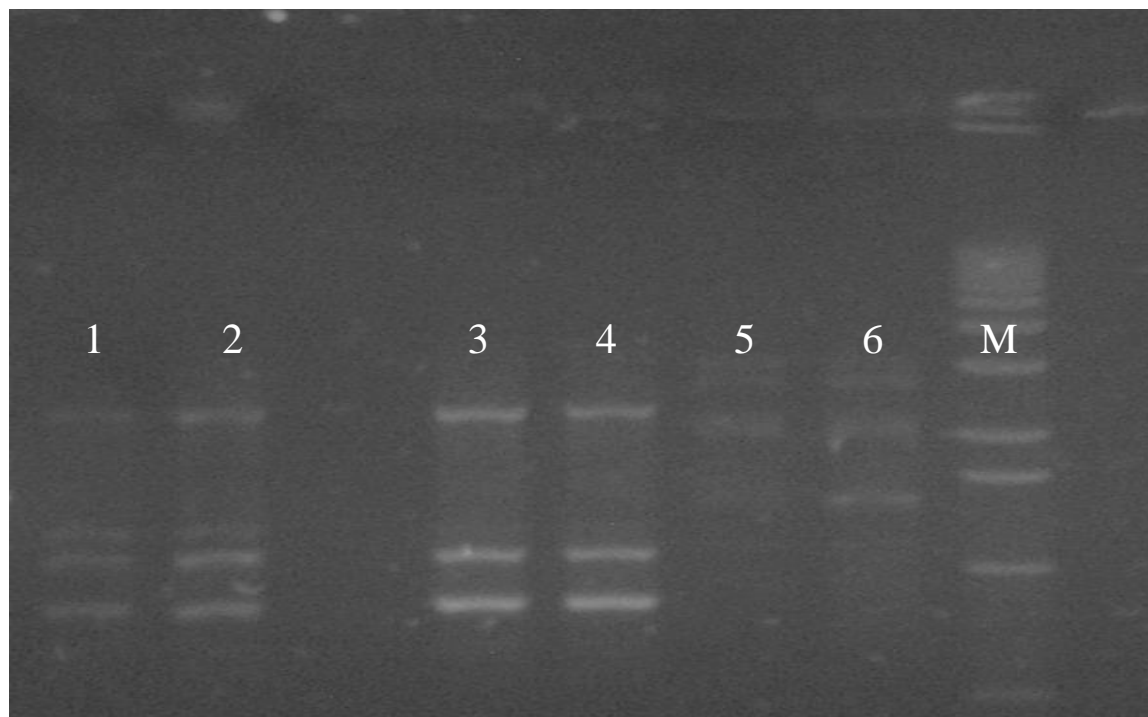


Εικόνα 7. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων της PCR του 16S rDNA γονιδίου των βακτηρίων: 1)ACA-DC 1475, 2)ACA-DC 1463, 3)ACA-DC 1472, 4)ACA-DC 1487, 5)ACA-DC 1473, 6)ACA-DC 1484, 7)ACA-DC 1474, 8)ACA-DC 1470, 9)ACA-DC 1480, 10)ACA-DC 1476, 11)ACA-DC 1477, 12)ACA-DC 1483, 13)ACA-DC 1482 και ένας μάρτυρας μοριακών μαζών 1kb (M).

Η ταυτοποίηση των αλληλουχιών 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) (<http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST/>).

5.3 Rep- PCR ζυμών

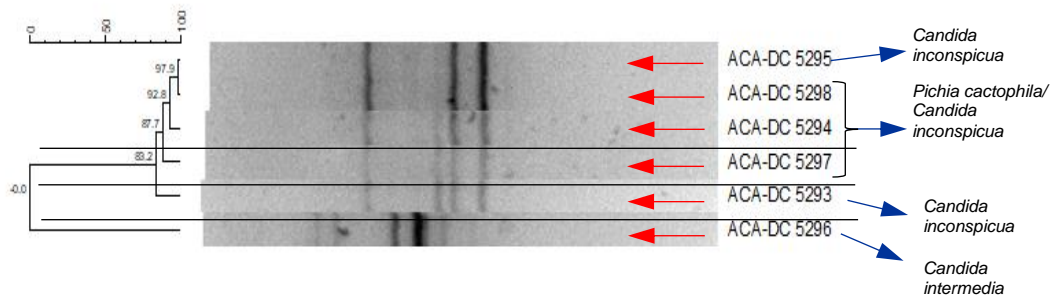
Η ομαδοποίηση των ζυμών έγινε με βάση την παρακάτω φωτογραφία της ηλεκτροφόρησης του rep PCR. Όσον αφορά το στέλεχος ACA-DC 5293 (*Candida inconspicua*, δείχνει όμοιο με το στέλεχος ACA-DC 5295 (*Candida inconspicua*). Οι ζύμες ACA-DC 5297, ACA-DC 5298 επίσης μοιάζουν σε μεγάλο βαθμό και ανήκουν στα είδη *Pichia cactophila/Candida inconspicua*).



Εικόνα 8. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων της REP-PCR για τις ζύμες:

- 1) ACA-DC 5293, 2) ACA-DC 5294, 3) ACA-DC 5295, 4) ACA-DC 5296, 5) ACA-DC 5297, 6) ACA-DC 5298 και απεικόνιση του μάρτυρα μοριακών μαζών δεξιά (M= 1kb).

Μέσω της επεξεργασίας των παραπάνω αποτελεσμάτων με το πρόγραμμα Bionumerics, δημιουργήθηκε το παρακάτω δενδρόγραμμα το οποίο ομαδοποιεί τα γενετικά αποτυπώματα που σχηματίστηκαν κατά την ηλεκτροφόρηση, και αναλόγως τον βαθμό ομοιότητας υπολογίζει αλγοριθμικά ένα ποσοστό ομοιότητας μεταξύ κάθε στελέχους. Έτσι, όταν η ομοιότητα ξεπερνά το 80% θεωρείται ασφαλής η ταξινόμηση στην ίδια ομάδα, δηλαδή πρόκειται κατά πάσα πιθανότητα για το ίδιο είδος ζυμών.

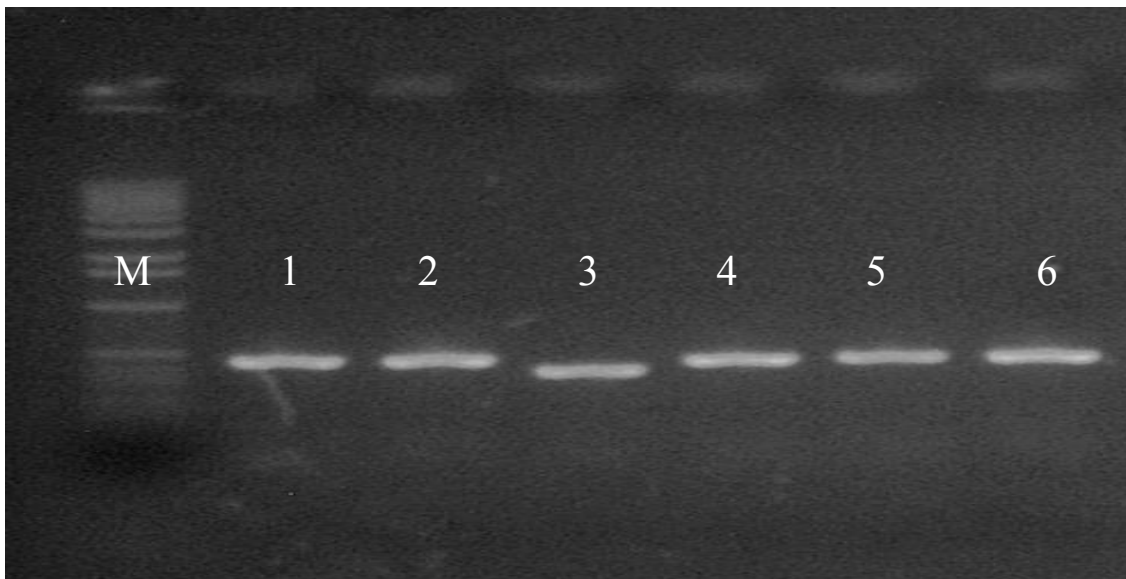


Εικόνα 9. Δενδρόγραμμα της ανάλυσης των στελεχών των ζυμών, με βάση τα ποσοστά ομοιότητας των ηλεκτροφορητικών τους προφίλ, όπως αυτά λήφθηκαν με τη μέθοδο rep-PCR.

5.4 ITS PCR

Η Η ITS περιοχή είναι μια μη μεταγραφόμενη περιοχή του ριβοσωμικού DNA των ζυμών και βρίσκεται ανάμεσα σε 2 γονίδια που κωδικοποιούν ριβοσωμικό RNA. Κάθε ITS περιοχή βρίσκεται ανάμεσα στα αντίστοιχα γονίδια που την χαρακτηρίζουν, όπως για παράδειγμα η ITS1 βρίσκεται ανάμεσα στα γονίδια του 16S και του 5S rRNA και χρησιμοποιείται στην ταυτοποίηση των ζυμών.

Ο λόγος που πραγματοποιείται η ITS PCR είναι για να επιτευχθεί εκλεκτική ενίσχυση μια συγκεκριμένης αλληλουχίας του DNA των υπό μελέτη ζυμών, για να γίνει αλληλούχισή της και με αυτόν τον τρόπο να ταυτοποιηθούν. Σε αυτή τη περίπτωση επιλέχθηκαν όλα τα στελέχη που υποβλήθηκαν σε Rep-PCR. Αυτό που παρατηρείται είναι το ίδιο μοτίβο ζωνών με ελάχιστη απόκλιση στην ζώνη 3 (στέλεχος ACA-DC 5296). Στην συνέχεια τα δείγματα στάλθηκαν σε εξωτερικό εργαστήριο (Eurofin Genomics, Austria) προκειμένου να γίνει αλληλούχιση του DNA και με αυτόν τον τρόπο να ταυτοποιηθούν.



Εικόνα 10. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων ITS-PCR των ζυμών:

1)ACA-DC 5293, 2) ACA-DC 5294, 3) ACA-DC 5295, 4) ACA-DC 5296, 5) ACA-DC 5297, 6) ACA-DC 5298.

5.5 Ταυτοποίηση βακτηρίων και ζυμών

Όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα, 3 ζύμες ταυτοποιήθηκαν ως *Pichia cactophila/Candida inconspicua*, άλλες 2 ως *Candida inconspicua* και μία ως *Candida intermedia* από ένα σύνολο 6 ζυμών. Όσον αφορά την ταυτοποίηση των βακτηρίων, συνολικά απομονώθηκαν 32 στελέχη και αυτά ταυτοποιήθηκαν ως εξής:

- Τα 21 ως *Lactobacillus plantarum/Lactobacillus paraplantarum/Lactobacillus pentosus*
- 1 ως *Lactobacillus paracasei/Lactobacillus casei/Lactobacillus zeae*
- 1 ως *Enterococcus gallinarum/ Enterococcus casseliflavus*
- 1 ως *Enterococcus faecalis*
- 2 ως *Lactococcus lactis*
- 4 ως *Leuconostoc lactis*
- 1 ως *Leuconostoc holzapfelii*
- 1 ως *Enterococcus faecium/Enterococcus durans*

Πίνακας 13. Ταυτοποίηση και μορφολογία μικροοργανισμών

Ομάδα	Απομονωμένα στελέχη	ACA-DC number	Ταυτοποίηση στελεχών
Thermophilic lactobacilli	FjM1-1a	1460	<i>Lactobacillus plantarum/ Lactobacillus paraplantarum/ Lactobacillus pentosus</i>
	FjM1-1b	1461	<i>Lactobacillus plantarum/ Lactobacillus paraplantarum/ Lactobacillus pentosus</i>
	FjM1-2a	1462	<i>Lactobacillus plantarum/ Lactobacillus paraplantarum/ Lactobacillus pentosus</i>
	FjM1-2b	1463	<i>Lactobacillus plantarum/ Lactobacillus paraplantarum/ Lactobacillus pentosus</i>
	FjM1-3	1464	<i>Lactobacillus plantarum/ Lactobacillus paraplantarum/ Lactobacillus pentosus</i>
	FjM1-4a	1465	<i>Lactobacillus plantarum/ Lactobacillus paraplantarum/ Lactobacillus pentosus</i>
	FjM1-4b	1466	<i>Lactobacillus plantarum/ Lactobacillus paraplantarum/ Lactobacillus pentosus</i>
	FjM1-5a	1467	<i>Lactobacillus plantarum/ Lactobacillus paraplantarum/ Lactobacillus pentosus</i>
	FjM1-5b	1468	<i>Lactobacillus plantarum/ Lactobacillus paraplantarum/ Lactobacillus pentosus</i>
	Mesophilic lactobacilli	FjM2-1	1469
FjM2-4		1470	<i>Lactobacillus plantarum/ Lactobacillus paraplantarum/ Lactobacillus pentosus</i>
FjM2-5		1471	<i>Lactobacillus plantarum/ Lactobacillus paraplantarum/ Lactobacillus pentosus</i>
Thermophilic cocci	FjM3-1	5298	<i>Pichia cactophila/Candida inconspicua</i>
	FjM3-2	1472	<i>Lactobacillus plantarum/ Lactobacillus paraplantarum/ Lactobacillus pentosus</i>
	FjM3-3	1473	<i>Lactobacillus plantarum/ Lactobacillus paraplantarum/ Lactobacillus pentosus</i>
	FjM3-4	1474	<i>Enterococcus gallinarum/ Enterococcus casseliflavus</i>
	FjM3-5	1475	<i>Enterococcus faecalis</i>
Mesophilic cocci	FjM4-1a	1476	<i>Lactococcus lactis</i>
	FjM4-1b	1477	<i>Lactococcus lactis</i>
	FjM4-2	1478	<i>Leuconostoc lactis</i>
	FjM4-3	1479	<i>Leuconostoc lactis</i>
	FjM4-4	1480	<i>Leuconostoc lactis</i>
	FjM4-5	1481	<i>Lactobacillus plantarum/ Lactobacillus paraplantarum/ Lactobacillus pentosus</i>

NSLAB	FjM5-1	1482	<i>Leuconostoc holzapfelii</i>
	FjM5-2	1483	<i>Enterococcus faecium/ Enterococcus durans</i>
	FjM5-4a	1484	<i>Lactobacillus paracasei/ Lactobacillus casei/ Lactobacillus zeae</i>
	FjM5-4b	1485	<i>Leuconostoc lactis</i>
	FjM5-5	1486	<i>Lactobacillus plantarum/ Lactobacillus paraplantarum/ Lactobacillus pentosus</i>
Enterococci	FjM6-1	1487	<i>Lactobacillus plantarum/ Lactobacillus paraplantarum/ Lactobacillus pentosus</i>
	FjM6-2	1488	<i>Lactobacillus plantarum/ Lactobacillus paraplantarum/ Lactobacillus pentosus</i>
	FjM6-3	1489	<i>Lactobacillus plantarum/ Lactobacillus paraplantarum/ Lactobacillus pentosus</i>
	FjM6-4	1490	<i>Lactobacillus plantarum/ Lactobacillus paraplantarum/ Lactobacillus pentosus</i>
	FjM6-5	1491	<i>Lactobacillus plantarum/ Lactobacillus paraplantarum/ Lactobacillus pentosus</i>
Yeasts and Moulds	FjM7-1	5293	<i>Candida inconspicua</i>
	FjM7-2	5294	<i>Pichia cactophila/Candida inconspicua</i>
	FjM7-3	5295	<i>Candida inconspicua</i>
	FjM7-4	5296	<i>Candida intermedia</i>
	FjM7-5	5297	<i>Pichia cactophila/Candida inconspicua</i>

5.6 Αντιμικροβιακή δράση βακτηρίων

Η αντιμικροβιακή δράση των βακτηρίων έναντι συγκεκριμένων παθογόνων μικροοργανισμών προσδίδει σε αυτά μια ιδιότητα ιδιαίτερα χρήσιμη για τον άνθρωπο που τα καταναλώνει. Για το λόγο αυτό ως μικροοργανισμοί-στόχοι έχουν επιλεγεί γνωστοί παθογόνοι και άλλοι μικροοργανισμοί οι οποίοι έρχονται συχνά σε επαφή με τον άνθρωπο ή συμβιώνουν ελεγχόμενα αλλά όχι πάντα με αυτόν. Επομένως μια λύση για τον έλεγχο του πληθυσμού τους, αφού είναι αδύνατος ο ολοκληρωτικός αποκλεισμός τους, είναι ο εποικισμός από αυτά τα επωφελή βακτήρια.

Τα συνολικά αντιβακτηριακά αποτελέσματα περιγράφονται στον Πίνακα 14, καθώς η χρήση του είναι απαραίτητη λόγω του όγκου δεδομένων και της ανάγκης για άμεση σύγκριση μεταξύ των ζωνών διαύγασης (αντιμικροβιακό δυναμικό).

Πίνακας 14. Αντιμικροβιακή δράση έναντι παθογόνων μικροοργανισμών

Θρεπτικό μέσο: Broth/Milk & Yeast Extract)	ACA-DC	IDENTIFICATION (16S rDNA PCR)	<i>Streptococcus pneumoniae</i> LMG 14545T	<i>Yersinia enterocolytica</i> FMCC B-90	<i>Yersinia enterocolitica</i> FMCC B-89	<i>Streptococcus gordonii</i> LMG 14518T	<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Salmonella typhimurium</i> SL1344
1-4a (M&Y.E.)	1465	<i>Lb. plantarum</i> <i>Lb. paraplantarum</i> <i>Lb. pentosus</i>	No Inhibition	No Inhibition	15mm θολή	No Inhibition	No Inhibition	No Inhibition
1-4b (Broth)	1466	<i>Lb. plantarum</i> <i>Lb. paraplantarum</i> <i>Lb. pentosus</i>	No Inhibition	9mm Θολή	No Inhibition	No Inhibition	No Inhibition	No Inhibition
1-5a (Broth)	1467	<i>Lb. plantarum</i> <i>Lb. paraplantarum</i> <i>Lb. pentosus</i>	No Inhibition	9mm Θολή	No Inhibition	No Inhibition	No Inhibition	No Inhibition
1-5b (Broth)	1468	<i>Lb. plantarum</i> <i>Lb. paraplantarum</i> <i>Lb. pentosus</i>	No Inhibition	9mm Θολή	No Inhibition	No Inhibition	No Inhibition	No Inhibition
2-1 (Broth)	1469	<i>Lb. plantarum</i> <i>Lb. paraplantarum</i> <i>Lb. pentosus</i>	No Inhibition	No Inhibition	No Inhibition	No Inhibition	No Inhibition	10mm θολή
2-1 (M&Y.E.)	1469	<i>Lb. plantarum</i> <i>Lb. paraplantarum</i> <i>Lb. pentosus</i>	No Inhibition	No Inhibition	15mm Θολή	No Inhibition	No Inhibition	7mm διαυγής
2-4 (Broth)	1470	<i>Lb. plantarum</i> <i>Lb. paraplantarum</i> <i>Lb. pentosus</i>	No Inhibition	No Inhibition	No Inhibition	No Inhibition	9mm διαυγής	No Inhibition
2-4 (M&Y.E.)	1470	<i>Lb. plantarum</i> <i>Lb. paraplantarum</i> <i>Lb. pentosus</i>	No Inhibition	No Inhibition	15mm θολή	No Inhibition	No Inhibition	No Inhibition

2-5 (M&Y.E.)	1471	<i>Lb. plantarum</i> <i>Lb.paraplantarum</i> <i>Lb. pentosus</i>	No Inhibition	No Inhibition	15mm θολή	No Inhibition	No Inhibition	No Inhibition
3-3 (M&Y.E.)	1473	<i>Lb. plantarum</i> <i>Lb.paraplantarum</i> <i>Lb. pentosus</i>	No Inhibition	No Inhibition	15mm θολή	No Inhibition	No Inhibition	No Inhibition
3-4 (M&Y.E.)	1473	<i>Enterococcus gallinarum</i> <i>Enterococcus casseliflavus</i>	No Inhibition	No Inhibition	15mm διαυγής ζώνη	No Inhibition	No Inhibition	No Inhibition
4-1a (Broth)	1476	<i>Lactococcus lactis cremoris</i> / <i>L.lactis hordniae</i> / <i>L. lactis Tructae</i>	No Inhibition	No Inhibition	No Inhibition	No Inhibition	No Inhibition	7mm θολή
4-2 (Broth)	1478	<i>Leuconostoc lactis</i>	No Inhibition	9mm θολή	No Inhibition	No Inhibition	8mm διαυγής	No Inhibition
4-3 (Broth)	1479	<i>Leuconostoc lactis</i>	No Inhibition	No Inhibition	No Inhibition	No Inhibition	9mm διαυγής	No Inhibition
4-4 (Broth)	1480	<i>Leuconostoc lactis</i>	No Inhibition	9mm θολή	No Inhibition	No Inhibition	7mm διαυγής	No Inhibition
4-5 (Broth)	1481	<i>Lb. plantarum</i> <i>Lb.paraplantarum</i> <i>Lb. pentosus</i>	No Inhibition	9mm θολή	No Inhibition	No Inhibition	7mm διαυγής	No Inhibition

5-1 (Broth)	1482	<i>Leuconostoc holzapfelii</i>	No Inhibition	9mm θολή	No Inhibition	No Inhibition	8mm διαυγής	No Inhibition
5-2 (Broth)	1483	<i>Enterococcus faecium</i> <i>Enterococcus durans</i>	No Inhibition	9mm θολή	No Inhibition	No Inhibition	8mm διαυγής	No Inhibition
5-4a (Broth)	1484	<i>Lactobacillus paracasei</i> <i>L. casei</i> <i>L. zeae</i>	No Inhibition	9mm θολή	No Inhibition	No Inhibition	10mm διαυγής	No Inhibition
5-4a (M&Y.E.)	1484	<i>L.paracasei</i> <i>L. casei</i> <i>L. zeae</i>	No Inhibition	No Inhibition	15mm θολή	No Inhibition	No Inhibition	No Inhibition
5-4b (Broth)	1485	<i>Leuconostoc lactis</i>	5mm θολή	No Inhibition	No Inhibition	No Inhibition	Οριακή ζώνη	No Inhibition
5-4b (M&Y.E.)	1485	<i>Leuconostoc lactis</i>	No Inhibition	No Inhibition	15mm θολή	No Inhibition	No Inhibition	No Inhibition
5-5 (Broth)	1486	<i>Lb. plantarum</i> <i>Lb.paraplantarum</i> <i>Lb. pentosus</i>	5mm θολή	No Inhibition	No Inhibition	No Inhibition	7mm διαυγής	No Inhibition
5-5 (M&Y.E.)	1486	<i>Lb. plantarum</i> <i>Lb.paraplantarum</i> <i>Lb. pentosus</i>	No Inhibition	No Inhibition	15mm θολή	No Inhibition	No Inhibition	No Inhibition
6-1 (Broth)	1487	<i>Lb. plantarum</i> <i>Lb.paraplantarum</i> <i>Lb. pentosus</i>	3mm θολή	No Inhibition	No Inhibition	10mm διαυγής	9mm διαυγής	No Inhibition
6-2 (Broth)	1488	<i>Lb. plantarum</i> <i>Lb.paraplantarum</i>	2mm θολή	No Inhibition	No Inhibition	10mm διαυγής	9mm διαυγής	No Inhibition

		<i>Lb. pentosus</i>						
6-3 (Broth)	1489	<i>Lb. plantarum</i> <i>Lb. paraplantarum</i> <i>Lb. pentosus</i>	2mm θολή	No Inhibition	No Inhibition	10mm διαυγής	9mm διαυγής	No Inhibition
6-3 (M&Y.E.)	1489	<i>Lb. plantarum</i> <i>Lb. paraplantarum</i> <i>Lb. pentosus</i>	No Inhibition	No Inhibition	15mm θολή	No Inhibition	No Inhibition	No Inhibition
6-4 (Broth)	1490	<i>Lb. plantarum</i> <i>Lb. paraplantarum</i> <i>Lb. pentosus</i>	5mm θολή	No Inhibition	No Inhibition	10mm διαυγής	No Inhibition	No Inhibition
6-4 (M&Y.E.)	1490	<i>Lb. plantarum</i> <i>Lb. paraplantarum</i> <i>Lb. pentosus</i>	No Inhibition	No Inhibition	15mm θολή	No Inhibition	No Inhibition	No Inhibition
6-5 (Broth)	1491	<i>Lb. plantarum</i> <i>Lb. paraplantarum</i> <i>Lb. pentosus</i>	3mm θολή	No Inhibition	No Inhibition	No Inhibition	No Inhibition	No Inhibition
6-5 (M&Y.E.)	1491	<i>Lb. plantarum</i> <i>Lb. paraplantarum</i> <i>Lb. pentosus</i>	No Inhibition	No Inhibition	15mm θολή	No Inhibition	No Inhibition	No Inhibition

Αυτό που παρατηρείται είναι ότι από τους 27 μικροοργανισμούς στόχους μόνο οι 6 έχουν παρεμποδιστεί από κάποιο από τα υπό μελέτη βακτήρια. Είναι γεγονός το ότι η αντιμικροβιακή δράση των περισσότερων βακτηρίων δεν παρουσιάζεται απαραίτητα και στα δυο θρεπτικά μέσα (Milk & Broth). Επίσης δεν είναι όλες οι ζώνες διαύγασης το ίδιο ευδιάκριτες γεγονός ανεξάρτητο από το μέγεθός τους, δηλαδή μπορεί μια ζώνη να είναι μεγάλης διαμέτρου αλλά όχι πολύ καθαρή γεγονός που απαιτεί περαιτέρω μελέτη.

Πιο συγκεκριμένα στην βιβλιογραφία υπάρχουν δεδομένα σχετικά με αντιμικροβιακή δράση των ειδών *L. plantarum*, *L. paraplantarum*, *L. pentosus* και *Leuconostoc lactis* έναντι *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, και ορισμένων ειδών *Listeria* σε αντίθεση με τα στελέχη αυτής της μελέτης όπου δεν παρουσιάζουν κανένα αντιμικροβιακό αποτέλεσμα (Harris, L., et al. 1989, Wang, L., et al. 2018).

Ωστόσο σε αρκετές μελέτες επιβεβαιώνεται η αντιμικροβιακή δράση των ειδών *L. plantarum*, *L. paraplantarum*, *L. pentosus* και *Leuconostoc lactis*, έναντι *Streptococcus pneumoniae*, *Yershinia enterocolitica*, *Streptococcus gordonii*, και *Salmonella typhimurium* SL1344 (Larsen, A., et al. 1993, Hernandez, D., et al. 2005, Montejo-Prieto, S., et al. 2015).

5.7 Επιβίωση σε συνθήκες χαμηλού pH

Ένας κρίσιμος παράγοντας για την περαιτέρω διερεύνηση ενός υποψήφιου προβιοτικού στελέχους είναι η αντοχή του σε χαμηλό pH, όπως άλλωστε υπάρχει στο ανθρώπινο γαστρεντερικό σύστημα του ανθρώπου, για το οποίο προορίζεται. Στον παρακάτω πίνακα περιλαμβάνονται όλα τα αποτελέσματα για κάθε στέλεχος, και συγκεκριμένα τον πληθυσμό τους μετά από 48h ανάπτυξης σε στερεό θρεπτικό μέσο, μετά από 2ωρη έκθεσή τους σε χαμηλό pH (2,5), καθώς και επώαση για 48h χωρίς προηγούμενη έκθεση σε χαμηλό pH, έτσι ώστε να γίνει σύγκριση της επίδρασης του όξινου αυτού περιβάλλοντος σε κάθε στέλεχος. Ένα αποδεκτό όριο πτώσης του πληθυσμού ενός στελέχους είναι της τάξης των 2 λογαριθμικών κύκλων, ενώ περαιτέρω μείωση θέτει αμφιβολίες, αν και δεν αποκλείει εντελώς, τον χαρακτηρισμό του ως προβιοτικό στέλεχος (λαμβάνοντας φυσικά υπόψη και άλλες προϋποθέσεις). Στην τελευταία στήλη λοιπόν, αναγράφεται η πτώση του πληθυσμού, εκφρασμένη σε λογαριθμικούς κύκλους, και αποτελεί την πιο σημαντική πληροφορία. Έτσι όσο μικρότερος είναι αυτός ο αριθμός, τόσο πιο ανθεκτικό σε χαμηλό pH είναι και το αντίστοιχο στέλεχος. Συνεπώς τα στελέχη με τα εξής ACA-DC: 1460, 1461, 1462, 1463, 1464, 1472, 1478, 1480, 1481, 1483, 1484, 1486, 1489, 1490, εμφάνισαν αρκετή αντοχή στην έκθεσή τους για 2 ώρες σε pH 2,5 όπως φαίνεται στον παρακάτω

πίνακα. Όλα τα υπόλοιπα (18) εμφάνισαν ευαισθησία σε pH 2,5. Αυτό που παρατηρείται είναι ότι από τα 21 στελέχη *Lactobacillus plantarum*/*Lactobacillus paraplantarum*/*Lactobacillus pentosus* τα 10 μόνο εμφάνισαν αντοχή, ενώ και τα 3 υπό εξέταση *Leuconostoc lactis* επιβίωσαν στο χαμηλό pH. Αντοχή εμφάνισε και το μοναδικό στέλεχος *Enterococcus faecium*/*durans*.

Τα είδη *Enterococcus gallinarum*/*Enterococcus casseliflavus*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc holzapfelii*, *Lactobacillus paracasei*/*Lactobacillus casei*/*Lactobacillus zeae* δεν είχαν ανθεκτικότητα.

Όπως παρατηρείται και στην βιβλιογραφία η διαφοροποίηση στην αντοχή σε χαμηλό pH μεταξύ διαφορετικών στελεχών *Lactobacillus plantarum*/*Lactobacillus paraplantarum*/*Lactobacillus pentosus* είναι σύνηθες φαινόμενο καθώς εξαρτάται από το κάθε στέλεχος. Ως είδη όμως γενικότερα, είναι συχνά ανθεκτικά καθώς στην βιβλιογραφία συναντώνται συχνά μελέτες που αφορούν διάφορα στελέχη και από διαφορετικά τρόφιμα που εμφανίζουν αυτού του είδους την ανθεκτικότητα (Mc Donald, L., et al. 1989, Cebeci, A., et al. 2003, Pennacchia C., et al. 2004)

Όσον αφορά τα είδη *Leuconostoc lactis* από τα οποία 3 από τα 4 συνολικά στελέχη, εμφάνισαν αντοχή στο χαμηλό pH, αυτό επιβεβαιώνεται και από άλλες μελέτες όπου παρατηρείται η αντοχή του σε όξινες τιμές pH (Sanchez, C., et al. 2008, Liu, S., 2016)

Πίνακας 15. Αντοχή βακτηριακών στελεχών σε χαμηλό pH.

ACA-DC number	Στελέχη	ΔLog	SD (Τυπική απόκλιση, Standard Deviation)
1460	<i>Lactobacillus plantarum/ paraplantarum/ pentosus</i>	1,61	0,558
1461	<i>Lactobacillus plantarum/ paraplantarum/ pentosus</i>	1,02	0,085
1462	<i>Lactobacillus plantarum/ paraplantarum/ pentosus</i>	1,33	0,745
1463	<i>Lactobacillus plantarum/ paraplantarum/ pentosus</i>	0,21	0,106
1464	<i>Lactobacillus plantarum/ paraplantarum/ pentosus</i>	1,32	0,009
1465	<i>Lactobacillus plantarum/ paraplantarum/ pentosus</i>	2,39	0,163
1466	<i>Lactobacillus plantarum/ paraplantarum/ pentosus</i>	2,35	0,120
1467	<i>Lactobacillus plantarum/ paraplantarum/ pentosus</i>	2,18	0,116
1468	<i>Lactobacillus plantarum/ paraplantarum/ pentosus</i>	2,19	0,301
1469	<i>Lactobacillus plantarum/ paraplantarum/ pentosus</i>	2,3	0
1470	<i>Lactobacillus plantarum/ paraplantarum/ pentosus</i>	2,74	0
1471	<i>Lactobacillus plantarum/ paraplantarum/ pentosus</i>	2,71	0,005
1472	<i>Lactobacillus plantarum/ paraplantarum/ pentosus</i>	1,54	0,027
1473	<i>Lactobacillus plantarum/ paraplantarum/ pentosus</i>	3,33	0,526
1474	<i>Enterococcus gallinarum</i> <i>Enterococcus casseliflavus</i>	3,46	0,641
1475	<i>Enterococcus faecalis</i>	2,3	0,071
1476	<i>Lactococcus lactis</i>	3,95	0,031

1477	<i>Lactococcus lactis</i>	3,31	0,186
1478	<i>Leuconostoc lactis</i>	1,28	0,064
1479	<i>Leuconostoc lactis</i>	2,95	0,099
1480	<i>Leuconostoc lactis</i>	1,73	0,332
1481	<i>Lactobacillus plantarum/ paraplantarum/ pentosus</i>	0,67	0,045
1482	<i>Leuconostoc holzapfelii</i>	2,25	0,030
1483	<i>Enterococcus faecium/ durans</i>	0,72	0,441
1484	<i>Lactobacillus paracasei/ casei/ zeae</i>	0	0
1485	<i>Leuconostoc lactis</i>	2,39	0,017
1486	<i>Lactobacillus plantarum/ paraplantarum/ pentosus</i>	0,76	0,101
1487	<i>Lactobacillus plantarum/ paraplantarum/ pentosus</i>	3,22	0,264
1488	<i>Lactobacillus plantarum/ paraplantarum/ pentosus</i>	2,39	0,464
1489	<i>Lactobacillus plantarum/ paraplantarum/ pentosus</i>	0,35	0,092
1490	<i>Lactobacillus plantarum/ paraplantarum/ pentosus</i>	1,96	0,075
1491	<i>Lactobacillus plantarum/ paraplantarum/ pentosus</i>	2,04	0,205

5.8 Ικανότητα υδρόλυσης χολικών αλάτων

Μετά την ολοκλήρωση της 48ωρης επώασης έγινε παρατήρηση της μορφολογίας των αποικιών των στελεχών στα τρυβλία MRS ή M17 με ταυροδεοξυχολικό οξύ σε σχέση με τις αποικίες που σχημάτιζαν τα ίδια στελέχη στα τρυβλία MRS ή M17 χωρίς ταυροδεοξυχολικό οξύ οποία αποτελούσαν τα τυφλά δείγματα. Παρατηρήθηκε η παρουσία των χαρακτηριστικών ζωνών υδρόλυσης του ταυροδεοξυχολικού οξέος γύρω από τις σχηματιζόμενες αποικίες σε όλα τα στελέχη ώστε να διαπιστωθεί ποια είχαν αυτή την ικανότητα.

Σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα, από τα 21 στελέχη *Lactobacillus plantarum* τα 19 εμφάνισαν αυτή τη δυνατότητα. Τα υπόλοιπα που παρουσίασαν αυτή την ικανότητα ανήκαν στα είδη *Enterococcus gallinarum/Enterococcus casseliflavus* (ACA-DC 1490), *Enterococcus faecalis* (ACA-DC 1491) και *Lactobacillus casei* (ACA-DC 1484).

Πίνακας 16. Ικανότητα υδρόλυσης χολικών αλάτων.

ACA-DC number	Στέλεχος	Ικανότητα υδρόλυσης χολικών αλάτων	ACA-DC number	Στέλεχος	Ικανότητα υδρόλυσης χολικών αλάτων
1460	<i>Lactobacillus plantarum/ paraplantarum/ pentosus</i>	ναι	1476	<i>Lactococcus lactis</i>	όχι
1461	<i>L.plantarum/ paraplantarum/ pentosus</i>	ναι	1477	<i>Lactococcus lactis</i>	όχι
1462	<i>L.plantarum/ paraplantarum/ pentosus</i>	ναι	1478	<i>Leuconostoc lactis</i>	όχι
1463	<i>L.plantarum/ paraplantarum/ pentosus</i>	ναι	1479	<i>Leuconostoc lactis</i>	όχι
1464	<i>L.plantarum/ paraplantarum/ pentosus</i>	ναι	1480	<i>Leuconostoc lactis</i>	όχι
1465	<i>L.plantarum/ paraplantarum/ pentosus</i>	ναι	1481	<i>Lactobacillus plantarum/ paraplantarum/ pentosus</i>	ναι
1466	<i>L.plantarum/ paraplantarum/ pentosus</i>	ναι	1482	<i>Leuconostoc holzapfelii</i>	όχι
1467	<i>L.plantarum/ paraplantarum/ pentosus</i>	ναι	1483	<i>Enterococcus faecium/ durans</i>	ναι
1468	<i>L.plantarum/ paraplantarum/ pentosus</i>	ναι	1484	<i>Lactobacillus paracasei/ casei/ zae</i>	ναι
1469	<i>L.plantarum/ paraplantarum/ pentosus</i>	όχι	1485	<i>Leuconostoc lactis</i>	όχι
1470	<i>L.plantarum/ paraplantarum/ pentosus</i>	όχι	1486	<i>L.plantarum/ paraplantarum/ pentosus</i>	ναι
1471	<i>L.plantarum/ paraplantarum/ pentosus</i>	ναι	1487	<i>L.plantarum/ paraplantarum/ pentosus</i>	ναι
1472	<i>L.plantarum/ paraplantarum/ pentosus</i>	ναι	1488	<i>L.plantarum/ paraplantarum/ pentosus</i>	ναι
1473	<i>L.plantarum/ paraplantarum/ pentosus</i>	ναι	1489	<i>L.plantarum/ paraplantarum/ pentosus</i>	ναι
1474	<i>Enterococcus gallinarum Enterococcus casseliflavus</i>	ναι	1490	<i>L.plantarum/ paraplantarum/ pentosus</i>	ναι
1475	<i>Enterococcus faecalis</i>	ναι	1491	<i>L.plantarum/ paraplantarum/ pentosus</i>	ναι

Στη βιβλιογραφία παρατηρήθηκε ικανότητα υδρόλυσης χολικών αλάτων από αρκετά στελέχη των ειδών *Lactobacillus plantarum/paraplantarum/pentosus*, γεγονός που παρατηρείται επιβεβαιώνουν συγκεκριμένα πειράματα, ωστόσο αυτό εξαρτάται και από το εκάστοτε στέλεχος καθώς δεν είναι απαραίτητως όλα τα στελέχη αυτών των ειδών ικανά στο να πραγματοποιήσουν τη συγκεκριμένη υδρόλυση γι'αυτό και υπήρχαν και μερικά αρνητικά αποτελέσματα (Cebeci, 2003, Begley; 2006; Nguyen, 2007).

Τα υπο μελέτη στελέχη του είδους *Leuconostoc lactis* ήταν όλα αρνητικά στην υδρόλυση, γεγονός που παρατηρείται και σε άλλα πειράματα που περιγράφονται στην βιβλιογραφία. Κατά συνέπεια το αποτέλεσμα ήταν αναμενόμενο σε αυτήν την περίπτωση μικροοργανισμών.

Όσον αφορά τα 2 στελέχη του είδους *Lactococcus lactis*, για τα οποία διαπιστώθηκε ότι δεν εμφανίζουν ικανότητα υδρόλυσης, αυτό φαίνεται και από διάφορες πηγές ότι είναι συχνό φαινόμενο (Tanaka, 1999; El-Jeni, 2016).

5.9 Ικανότητα πρόσδεσης στο κολλαγόνο

Τα μόνα στελέχη βακτηρίων που εμφάνισαν εξαιρετική ικανότητα προσκόλλησης στο κολλαγόνο ήταν τα ACA-DC: 1462, 1485, 1490, ενώ ικανοποιητική ικανότητα προσκόλλησης παρουσίασαν τα ACA-DC: 1460, 1470, 1471, 1472, 1473, 1474, 1488 και 1489.

(Πίνακας 17). Τα περισσότερα στελέχη ανήκαν στα είδη *Lactobacillus plantarum/paraplantarum/pentosus* αυτό αποτελεί μια αναμενόμενη ιδιότητα καθώς αυτό επιβεβαιώνεται από αρκετές πηγές στην βιβλιογραφία. Όπως συμβαίνει και στα υπόλοιπα αποτελέσματα των πειραμάτων, δεν είναι όλα τα στελέχη ενός είδους ικανά να εμφανίσουν μια προβιοτική ιδιότητα καθώς αυτό εξαρτάται κυρίως από το κάθε στέλεχος ξεχωριστά. Αυτή η διαφοροποίηση παρατηρείται σε όλες σχεδόν τις έρευνες μεταξύ στελεχών του ίδιου είδους (Yadav et al., 2013). Όσον αφορά τα υπόλοιπα είδη ικανότητα προσκόλλησης εμφάνισαν μόνο ένα στέλεχος του είδους *Leuconostoc lactis* και ένα των ειδών *Enterococcus gallinarum/Enterococcus casseliflavus*. Στην παρούσα μελέτη δεν φάνηκε να έχει αυτήν την ικανότητα κανένα από τα υπόλοιπα είδη. Κατά συνέπεια, με τα αποτελέσματα αυτού του πειράματος το πεδίο ξεκαθαρίζει όσον αφορά τα πιο ελπιδοφόρα (για το προβιοτικό τους δυναμικό) στελέχη, και μένει να καθοριστεί ποια από αυτά είναι ακίνδυνα για την δημόσια υγεία.

Πίνακας 17. Στελέχη με ικανότητα προσκόλλησης στο κολλαγόνο

ACA-DC number	Στέλεχος	Μέση τιμή οπτικής απορρόφησης	ACA-DC number	Στέλεχος	Μέση τιμή οπτικής απορρόφησης
1460	<i>Lactobacillus plantarum/ paraplantarum/ pentosus</i>	0,602	1476	<i>Lactococcus lactis</i>	0,093
1461	<i>L.plantarum/ paraplantarum/ pentosus</i>	0,535	1477	<i>Lactococcus lactis</i>	0,079
1462	<i>L.plantarum/ paraplantarum/ pentosus</i>	1,087	1478	<i>Leuconostoc lactis</i>	0,117
1463	<i>L.plantarum/ paraplantarum/ pentosus</i>	0,551	1479	<i>Leuconostoc lactis</i>	0,192
1464	<i>L.plantarum/ paraplantarum/ pentosus</i>	0,46	1480	<i>Leuconostoc lactis</i>	0,259
1465	<i>L.plantarum/ paraplantarum/ pentosus</i>	0,479	1481	<i>Lactobacillus plantarum/ paraplantarum/ pentosus</i>	0,417
1466	<i>L.plantarum/ paraplantarum/ pentosus</i>	0,468	1482	<i>Leuconostoc holzapfelii</i>	0,481
1467	<i>L.plantarum/ paraplantarum/ pentosus</i>	0,49	1483	<i>Enterococcus faecium/ durans</i>	0,072
1468	<i>L.plantarum/ paraplantarum/ pentosus</i>	0,99	1484	<i>Lactobacillus paracasei/ casei/ zeae</i>	0,09
1469	<i>L.plantarum/ paraplantarum/ pentosus</i>	0,54	1485	<i>Leuconostoc lactis</i>	1,291
1470	<i>L.plantarum/ paraplantarum/ pentosus</i>	0,617	1486	<i>L.plantarum/ paraplantarum/ pentosus</i>	0,464
1471	<i>L.plantarum/ paraplantarum/ pentosus</i>	0,623	1487	<i>L.plantarum/ paraplantarum/ pentosus</i>	0,297
1472	<i>L.plantarum/ paraplantarum/ pentosus</i>	0,639	1488	<i>L.plantarum/ paraplantarum/ pentosus</i>	0,615
1473	<i>L.plantarum/ paraplantarum/ pentosus</i>	0,622	1489	<i>L.plantarum/ paraplantarum/ pentosus</i>	0,874
1474	<i>Enterococcus gallinarum</i> <i>Enterococcus casseliflavus</i>	0,8	1490	<i>L.plantarum/ paraplantarum/ pentosus</i>	1.029
1475	<i>Enterococcus faecalis</i>	0,15	1491	<i>L.plantarum/ paraplantarum/ pentosus</i>	0,888

5.10 Ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά

Η ανθεκτικότητα των μικροοργανισμών σε ορισμένα αντιβιοτικά θα μπορούσε να δημιουργήσει θέματα ασφαλείας όταν αυτά καταναλώνονται μέσω της τροφής και για το λόγο αυτό απαιτείται η διερεύνηση του κατά πόσο έντονη είναι η ανθεκτικότητά τους και έναντι ποιών αντιβιοτικών. Τα στελέχη που δεν εμφάνισαν ανθεκτικότητα σε κανένα αντιβιοτικό, ήταν τα εξής: ACA-DC 1470, ACA-DC 1476, ACA-DC 1477, ACA-DC 1478, ACA-DC 1479, ACA-DC 1480. Για αυτά τα είδη (*L.plantarum* *L. paraplantarum* *L.pentosus*, *Lactococcus lactis* και *Leuconostoc lactis*) στη βιβλιογραφία (Temmerman, 2003; Cebeci, 2003) αναφέρεται ότι το *Lactococcus lactis* ότι παρουσιάζει συχνά ευαισθησία σε όλα τα γνωστά αντιβιοτικά και επομένως είναι ασφαλές σχετικά με αυτό το ζήτημα. Στον παρακάτω πίνακα φαίνεται η συνολική εικόνα σχετικά με την ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά των υπό μελέτη βακτηριακών στελεχών).

Πίνακας 18. Ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά (όπου: V= Vancomycin, G=Gentamycin, S= Streptomycin, K= Kanamycin, E= Erythromycin, C= Chloramphenicol) .

ACA-DC number	Είδος	Ανθεκτικότητα στα εξής αντιβιοτικά
1460	<i>L.plantarum/paraplantarum/pentosus</i>	V, G, K
1461	<i>L.plantarum/paraplantarum/pentosus</i>	V, G, K, E
1462	<i>L.plantarum/paraplantarum/pentosus</i>	V, G, K
1463	<i>L.plantarum/paraplantarum/pentosus</i>	V, G, K
1464	<i>L.plantarum/paraplantarum/pentosus</i>	V, G, K
1465	<i>L.plantarum/paraplantarum/pentosus</i>	V, G, K
1466	<i>L.plantarum/paraplantarum/pentosus</i>	V, G, K
1467	<i>L.plantarum/paraplantarum/pentosus</i>	V, G, K
1468	<i>L.plantarum/paraplantarum/pentosus</i>	V, G, K
1469	<i>L.plantarum/paraplantarum/pentosus</i>	K

1470	<i>L.plantarum/paraplantarum/pentosus</i>	Δεν παρουσιάζει ανθεκτικότητα
1471	<i>L.plantarum/paraplantarum/pentosus</i>	V, G, K
1472	<i>L.plantarum/paraplantarum/pentosus</i>	V, G, K
1473	<i>L.plantarum/paraplantarum/pentosus</i>	V, G, K, C
1474	<i>Enterococcus gallinarum</i> <i>Enterococcus casseliflavus</i>	G
1475	<i>Enterococcus faecalis</i>	G, S
1476	<i>Lactococcus lactis</i>	Δεν παρουσιάζει ανθεκτικότητα
1477	<i>Lactococcus lactis</i>	Δεν παρουσιάζει ανθεκτικότητα
1478	<i>Leuconostoc lactis</i>	Δεν παρουσιάζει ανθεκτικότητα
1479	<i>Leuconostoc lactis</i>	Δεν παρουσιάζει ανθεκτικότητα
1480	<i>Leuconostoc lactis</i>	Δεν παρουσιάζει ανθεκτικότητα
1481	<i>L.plantarum/paraplantarum/pentosus</i>	V, G, K
1482	<i>Leuconostoc holzapfelii</i>	V
1483	<i>Enterococcus faecium/durans</i>	E
1484	<i>Lactobacillus paracasei/casei/zeae</i>	V
1485	<i>Leuconostoc lactis</i>	V
1486	<i>L.plantarum/paraplantarum/pentosus</i>	V
1487	<i>L.plantarum/paraplantarum/pentosus</i>	V, G, K
1488	<i>L.plantarum/paraplantarum/pentosus</i>	V, G, K
1489	<i>L.plantarum/paraplantarum/pentosus</i>	V, G, K
1490	<i>L.plantarum/paraplantarum/pentosus</i>	V, G, K
1491	<i>L.plantarum/paraplantarum/pentosus</i>	V, G, K

5.11 Συμπεράσματα

Με οδηγό πάντα τις βιβλιογραφικές πηγές και σύμφωνα με τα αποτελέσματα των πειραμάτων, μπορεί να διαπιστωθεί αρχικά το συμπέρασμα ότι οι περισσότεροι από τους υπό μελέτη μικροοργανισμούς παρουσιάζουν κάποιο ευεργετικό αποτέλεσμα. Οι μικροοργανισμοί που εμφάνισαν ένα πιο ξεκάθαρο προβιοτικό δυναμικό και διακρίθηκαν στα παραπάνω πειράματα για τις ευεργετικές τους ιδιότητες είναι τα 3 στελέχη (ACA-DC: 1489, 1490 και 1462) των ειδών *Lb. plantarum/ paraplantarum/ pentosusta*. Αυτά τα στελέχη εμφάνισαν το πληρέστερο προβιοτικό δυναμικό, με ικανότητα πρόσδεσης στο κολλαγόνο, αντοχή σε pH 2,5 για 2h, ικανότητα υδρόλυσης χολικών αλάτων αλλά και αντιμικροβιακή δράση για τα 2 στελέχη: ACA-DC 1489 και 1490. Το ACA-DC 1489 συγκεκριμένα, εμφάνισε αντιμικροβιακή δράση έναντι των στελεχών: *Yersinia enterocolitica* FMCC B-89, *Streptococcus pneumoniae* LMG 14545T, *Streptococcus gordonii* LMG 14518T και *Streptococcus thermophilus*, ενώ το ACA-DC 1490 έναντι: *Streptococcus pneumoniae* LMG 14545T, *Yersinia enterocolitica* FMCC B-89, *Streptococcus gordonii* LMG 14518T.

Τα στελέχη που ακολουθούν στην σειρά κατάταξης με βάση την πληρότητα του προβιοτικού τους δυναμικού είναι τα εξής: ACA-DC: 1468 (*Lb. plantarum/paraplantarum/pentosus*), 1485 (*Leuconostoc lactis*), 1491 (*Lb. plantarum/paraplantarum/pentosus*). Αυτά τα στελέχη εμφάνισαν ικανότητα πρόσδεσης στο κολλαγόνο, αλλά μέτρια αντοχή στο χαμηλό pH για 2h. Ωστόσο και τα 3 εμφάνισαν αντιμικροβιακή δράση, ενώ 2 από τα 3 (ACA-DC 1468 και 1491) είχαν ικανότητα υδρόλυσης χολικών αλάτων.

Η ικανότητα πρόσδεσης στο κολλαγόνο είναι απαραίτητη προκειμένου ένα στέλεχος να έχει πιθανότητα να χαρακτηριστεί ως προβιοτικό. Το τελευταίο στέλεχος της μελέτης με αυτή την ικανότητα, είναι το ACA-DC 1474 (*Enterococcus gallinarum/Enterococcus casseliflavus*). Ωστόσο δεν έχει ιδιαίτερη αντοχή στο χαμηλό pH, ικανότητα υδρόλυσης χολικών αλάτων και αντιμικροβιακή δράση έναντι των υπό μελέτη παθογόνων βακτηρίων.

Όλα τα στελέχη που έχουν την ικανότητα πρόσδεσης στο κολλαγόνο εμφάνισαν ανθεκτικότητα σε κάποια από τα αντιβιοτικά. Οπότε μένει να διερευνηθεί εάν τα

γονίδια που ευθύνονται για αυτήν την ιδιότητα βρίσκονται στο χρωμοσωμικό ή στο πλασμιδιακό DNA, καθώς από αυτό εξαρτάται η επικινδυνότητα μεταβίβασης των γονιδίων αυτών στην φυσική μικροχλωρίδα του οργανισμού ή ακόμα χειρότερα σε δυνητικά παθογόνους μικροοργανισμούς που έχουν ως ενδιαίτημα το γαστρεντερικό σύστημα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aryana *et al.* (2017). "A 100 year review: Yogurt and other cultured dairy products". *Journal of Dairy Science*. Dec; 100(12):9987-10013. doi: 10.3168/jds.2017-12981
- ArlaFoods®. https://web.archive.org/web/20070808011041/http://www.arla.se/Default_17791.aspx?SelectedMenuItem=17372
- Axelsson, L. (1998). "Lactic acid bacteria: classification and physiology". *Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects* (2nd ed). New York: Marcel Dekker Inc, 1998:1-72.
- Beijerinck, M. (1901). Lactic acid bacteria of the industry. *Arch Nederland des Sciences Extractes et Naturalles*. 1901;6:212-243.
- Bermudes, M. *et al.* (2012). Probiotics mechanisms of action. *Annals of Nutrition And Metabolism*. 2012; 61:160-174 <https://doi.org/10.1159/000342079>
- Beshkova, D. *et al.* (1998). "Production of Amino Acids by Yogurt Bacteria" *Biotechnology progress*, 14(6), 963-965. doi: 10.1021/bp980082j
- Begley, M., *et al.* (2006). Bile Salt Hydrolase Activity in Probiotics. *Applied and Environmental Microbiology*. 10.1128/AEM.72.3.1729-1738.2006
- Cahn, D.R. (1901). Bacilli of infant stools stainable according to Gram. *Centralblatt für Bakteriologie I. Abteilung Originale*. 1901; 30:721-726.
- Campo, R. *et al.* (2005). "Scarce Evidence of Yogurt Lactic Acid Bacteria in Human Feces after Daily Yogurt Consumption by Healthy Volunteers". *Applied and Environmental Microbiology*, 71(1), 547-549.
- Canadian dairy commission <http://www.milkingredients.ca/index-eng.php?id=180>

- Cheese: Cheese Ripening. University of Guelph, Department of Dairy Science and Technology. <https://www.uoguelph.ca/foodscience/book-page/ripening-and-packaging>
- Collado, M., et al. (2007). Role of commercial probiotic strains against human pathogen adhesion to intestinal mucus. *Letters in Applied Microbiology*, 45(4), 454-460.
- Colin, H., Francisco, J., Gregor, R., Glenn, R. G., Danien, J. M., Bruno, P., Lorenzo, M., Roberto, B. C., Harry J. F., Seppo, S., Philip C. C., Mary E. C. (2014). "The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic". *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 11 506-514 : <https://www.nature.com/articles/nrgastro.2014.66>
- Collins, MD., Ash, C., Farrow, JAE., Wallbanks, S., Williams, AM. (1989). "16S ribosomal ribonucleic acid sequence analysis of lactococci and related taxa. Description of *Vagococcus fluvialis* gen nov, sp. Nov. *J Appl Bacteriol* 1989; 67: 453-60.
- Cebeci, A., et al. 2003. Properties of potential probiotics *Lactobacillus plantarum* strains. *Food microbiology* 20(5), p.511-518. [https://doi.org/10.1016/S0740-0020\(02\)00174-0](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(02)00174-0)
- Gevers, D., Huys, G., Swings, J. (2001) Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiology Letters*, Volume 205, Issue 1, 1 November 2001, Pages 31–36. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10921.x>
- Doderlein, A. (1892). Thevaginaltransudateanditssignificanceforchildbedfever. *Centralblattfür bacteriologie*. 1892;11:699-700.
- Engesser, D.M., Hammes, WP. (1994). "Non-heme catalase activity of lactic acid bacteria" *Syst Appl Microbiol* 1994; 79: 763-776.
- El-Jeni, R., et al. (2016). In vitro probiotic profiling of novel *Enterococcus faecium* and *Leuconostoc mesenteroides* from Tunisian freshwater fishes. *Canadian Journal of Microbiology*, 62(1): p.60-71 <https://doi.org/10.1139/cjm-2015-0481>
- Folk Oh, Y. et al. (2002). Yoghurt kills *Helicobacter pylori*. *Journal of applied microbiology*, 93(6):1083-1888. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01779.x>
- Frederic, L., Luc, V. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science and Technology*, 15(2) 67-68.
- Freter, R. (1992). "Factors affecting the microecology of the gut" *Probiotics, the scientific basis*. London: Chapman & Hall, 1992:111-144.

- Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *J appl bacterial*, 1989; 66: 365-378.
- Georgalaki, M., *et al.* (2002). Macedocin, a Food-Grade Lantibiotic Produced by *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198. *Applied and environmental microbiology*.
- Pitcher, D., Saunders, N., & Owen, R. (1989). Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Letters in Applied Microbiology*, April 1989, 8 (4), 151-156. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1989.tb00262.x>
- J.W. Pette, H. Lolkema Yoghurt. 1. Symbiosis and antibiosis in mixed cultures of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* *Nederlandsch Melk- en Zuiveltijdschrift*, 4 (1950), pp. 197-208
- Haghhena, B. *et al.* (2015) Bioactivity characterization of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *Microbiology Open*, 4(5) 803-813.
- Havenaar, R., & Huis, V. (1992). 'Probiotics: a general view. In: *Lactic acid bacteria in health and disease*, vol 1. Amsterdam: Elsevier Applied Science Publishers.
- Havenaar, R., & Ten, B. (1992). 'Selection of strains for probiotic use" *Probiotics: the scientific basis*. London: Chapman and Hall, 1992:209-224.
- Harris, L., *et al.* (1989). Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria Against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 52 (6), 384-387.
<https://doi.org/10.4315/0362-028X-52.6.384>
- Hernandez, D., *et al.* (2005). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: initial characterization of plantaricin TF711, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF711.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02576.x>
- International Dairy Foods Association (1998). *Milk Facts*. Washington, D.C.: International Dairy Foods Association, October 1998.
- Jurgen, S., & Michael, V. (2001). Probiotics, prebiotics, and synbiotics — approaching a definition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2), 361-364:
<https://doi.org/10.1093/ajcn/73.2.361s>
- J. Jankov, I.V. Stoyanov (1966). Study on the thermophilic lactobacilli in milk for yoghurt production. *Proc. XVII Int. Dairy Congr., Section F5*. Munich, Germany, Verlag Th. Mann GmbH, Hildesheim, Germany (1966), pp. 677-680.
- Keweloh, H. (2013). *Μικροβιολογία και υγιεινή τροφίμων: Θεωρία και πράξη*. Αθήνα: Εκδόσεις Ίων. (σσ. 156-171).

- Kopsahelis, N., *et al.* (2009). Molecular characterization and molasses fermentation performance of a wild yeast strain operating in an extremely wide temperature range. *Biosource technology*, 100(2009) 4854-4862
- Kosikowski, F.V., & Mistry, V.V. (1997). *Cheese and Fermented Milk Foods*. Vol. 1. Origins and Principles (3rd edition). Brooktondale, N.Y.: F.V. Kosikowski and Associates.
- Larsen, A., *et al.* (1993). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from sour doughs: purification and characterization of bavaricin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus bavaricus* MI401. *Journal of Applied Bacteriology* banner. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1993.tb02755.x>
- Lilly, DM., Stillwell, RH. (1965). Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. *Science*.1965; 147:747-748.
- Liu, S. (2016). Lactic Acid Bacteria: *Leuconostoc* spp. Reference module in food science. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.00859-3>
- McDonald, L., *et al.* (1990). Acid tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(7), 2120-2124. <https://aem.asm.org/content/aem/56/7/2120.full.pdf>
- Meisel, J., Wolf, G., & Hammes, WP. (1994). "Heme-dependent cytochrome formation in *Lactobacillus maltaromicus*". *Syst Appl Microbiol* 1994; 17:20-23.
- Metchnikoff, E. (1908). *Prolongation of life*. New York: Putnam.
- Moro, E. (1900). A contribution to the knowledge of the normal intestinal bacteria of infants. *Jahrbuch für Kinderheilkunde*. 1900; 52:38-55.
- Montijo, S., *et al.* (2015). A *Lactobacillus plantarum* strain isolated from kefir protects against intestinal infection with *Yersinia enterocolitica* O9 and modulates immunity in mice. *Res. Microbiol.* 166(8):626-32, [10.1016/j.resmic.2015.07.010](https://doi.org/10.1016/j.resmic.2015.07.010)
- National Dairy Council
<https://web.archive.org/web/20060925143021/http://www.nationaldairyCouncil.org/NationalDairyCouncil/Nutrition/Products/otherPage1.htm>
- Nguyen, T., *et al.* (2007). Characterization of *Lactobacillus plantarum* PH04, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects. *International Journal Of Food Microbiology*. 113(3). 358-361. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.08.015>
- Orla-Jensen, S. (1919). "The lactic acid bacteria" Copenhagen: Anhr Fred Host and Son.
- Parker, R.B. (1974). Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Anim Nutr Health*.

1974;29:4-8.

Orla-Jensen, S. 1921. Dairy Bacteriology. Translated by P. S. Arup. P. Blakiston's Son & Co., Philadelphia, PA.

Patrick, F. (1999). Cheese: chemistry, physics and microbiology, Vol1. Springer. doi: 10.1128/AEM.68.12.5891-5903.2002

Pennacchia, C. (2004). Selection of Lactobacillus strains from fermented sausages for their potential use as probiotics. Meat science. 67(2), p.309-317 <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2003.11.003>

Rawson, H. et al. (1997). "Effect of 'ropy' strains of Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus and Streptococcus thermophilus on rheology of stirred yogurt" International journal of food science and technology" 32 (3), 213-220 DOI: 10.1046/j.1365-2621.1997.00395.x

Ruggiero, P. (2014). Use of probiotics in the fight against Helicobacter pylori. World journal of gastrointestinal pathophysiology, 2014, Nov15; 5(4): 384–391 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4231502/>

Richard, C., & Guttman, A.J. (2004). "Poland–Scheraga Models and the DNA Denaturation Transition." *Journal of Statistical Physics* 115.3/4 (2004): 925-47. Web

Sah, B. et al. (2014). Effect of probiotics on antioxidant and antimutagenic activities of crude peptide extract from yogurt. Food chemistry (2014) 156, pp 264-270 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.105>

Salminen, S., Deighton, M.A., Benno, Y., & Gorbach, S.L. (1998). "Lactic acid bacteria in health and disease" Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects (2nd ed). New York: Marcel Dekker Inc, 1998:211-253.

Schleifer, K.H., & Kilpper-Balz, R. (1984). "Transfer of streptococcus faecalis and Streptococcus faecium to the genus Enterococcus nom rev as Enterococcus faecalis comp nov and Enterococcus faecium comp nov, Int J Syst Bacteriol 1984;34:31-34.

Sanchez, C. (2008). Contribution of Citrate Metabolism to the Growth of Lactococcus lactis CRL264 at Low pH. Applied and Environmental Microbiology. 74(4): 1136–1144. [10.1128/AEM.01061-07](https://doi.org/10.1128/AEM.01061-07)

Tamang, J. et al. (2016) Functional properties of microorganisms in fermented foods. Frontiers in microbiology <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00578>

- Tamime, A.Y. (2006). Fermented milks. Society of dairy technology. Blackwell science (1st Edition).
- Tanaka, H., et al. (1999). Screening of Lactic Acid Bacteria for Bile Salt Hydrolase Activity. *Journal of dairy science*. 82 (12): p.2530-2535 [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(99\)75506-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75506-2)
- Tripathi, M., & Giri, S. (2014). Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods*, 9, 225-241
- Temmerman, R. et al. (2003). Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *International journal of food microbiology*. 81 (1), p 1-10 [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00162-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00162-9)
- U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Code of Federal Regulations, Title 21, Part 131, Subpart B, Milk and Cream. Washington, D.C.: U.S. Government Printing Office, April 1998, pp. 276-294
- Wang, Y. et al. (2004). Effects of ingesting Lactobacillus and Bifidobacterium containing yogurt, in subjects with colonized Helicobacter pylori. *American Journal of Clinical Nutrition*, 80(3), 737-41. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15321816>
- Wang, L., et al. Antibacterial activity of Lactobacillus plantarum isolated from Tibetan yaks. *Microb. Pathog.* Feb (150), p.293-298 [10.1016/j.micpath.2017.12.077](https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.12.077)
- Whittenbury, R. (1964). "Hydrogen peroxide formation and catalase activity in the lactic acid bacteria" *J Gen Microbiol* 1964;35:13-26.
- Wilhelm, H. H., Petra, H., Rolf, G., Johanna, B., Ulrich, S. (2001). "Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition". *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2) 365-373: <https://doi.org/10.1093/ajcn/73.2.365s>
- Wolf, G., Strahl, A., Meisel, J., & Hammes, W.P. (1991). "Heme-dependent catalase activity of lactobacilli" *Int J Food Microbiol* 1991;12:133-40
- Yadav, A. et al. (2013). Role of surface layer collagen binding protein from indigenous Lactobacillus plantarum 91 in adhesion and its anti-adhesion potential against gut pathogen. *Microbiological research*. 168(10) p. 639-645 <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.05.003>
- Zheng, Y. et al. (2013). Probiotic properties of Lactobacillus strains isolated from Tibetan Kefir grains. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069868>

