



**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ  
& ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

**Μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία**

Επίδραση διαφόρων γλυκαντικών  
στην ανάπτυξη του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* Enteritidis  
και του προβιοτικού *Lactobacillus plantarum*

**Βαρβάρα Ε. Πετροπούλεα**

Επιβλέπων καθηγητής:  
Γεώργιος-Ιωάννης Νυχάς, Καθηγητής ΓΠΑ

**ΑΘΗΝΑ  
2022**

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

**Μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία**

Επίδραση διαφόρων γλυκαντικών  
στην ανάπτυξη του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* Enteritidis  
και του προβιοτικού *Lactobacillus plantarum*

Impact of various sweeteners  
on the growth of the pathogenic microorganism *Salmonella* Enteritidis  
and the probiotic *Lactobacillus plantarum*

**Βαρβάρα Ε. Πετροπούλεα**

Εξεταστική Επιτροπή:

Γεώργιος-Ιωάννης Νυχάς, Καθηγητής ΓΠΑ (Επιβλέπων)

Ευστάθιος Πανάγου, Καθηγητής ΓΠΑ

Αιμιλία Παπακωνσταντίνου, Επίκουρη Καθηγήτρια ΓΠΑ

## **Επίδραση διαφόρων γλυκαντικών στην ανάπτυξη του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella Enteritidis* και του προβιοτικού *Lactobacillus plantarum***

ΠΜΣ: Συστήματα Διαχείρισης Ποιότητας & Ασφάλειας Τροφίμων  
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου  
Εργαστήριο Μικροβιολογίας Τροφίμων

### **ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

Ο αυξανόμενος επιπολασμός της παχυσαρκίας και των διαφόρων μεταβολικών ασθενειών παγκοσμίως έχει αποδοθεί εν μέρει στην υπερβολική κατανάλωση ζάχαρης. Τα γλυκαντικά αποτελούν πλέον ένα δημοφιλές υποκατάστατο ζάχαρης, επιτρέποντας σε μια ποικιλία προϊόντων διατροφής να διατηρήσουν τη γευστικότητά τους με παράλληλη μείωση του θερμιδικού περιεχομένου. Ωστόσο, έχει αναφερθεί ότι η υποκατάσταση ζάχαρης μπορεί να επηρεάσει τη μικροβιακή ασφάλεια των τροφίμων. Ο στόχος αυτής της μελέτης ήταν να αξιολογήσει την πιθανή επίδραση της προσθήκης ποικίλων γλυκαντικών στην πλαγκτονική συμπεριφορά ανάπτυξης των *Lactiplantibacillus plantarum* και *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis*. Συγκεκριμένα, έξι γλυκαντικά με ευρεία χρήση στη βιομηχανία τροφίμων αξιολογήθηκαν.

Τα βακτηριακά στελέχη εμβολιάστηκαν με πληθυσμό κυττάρων περίπου  $10^2$  CFU/mL σε θρεπτικό ζωμό συμπληρωμένο με i) τα επιλεγμένα γλυκαντικά και ii) γλυκόζη (μάρτυρας). Οι συγκεντρώσεις διαφορετικών γλυκαντικών αξιολογήθηκαν με βάση την ισοδυναμία γλυκύτητάς τους σε σύγκριση με 2.5 και 10% w/v γλυκόζη. Η βακτηριακή ανάπτυξη προσδιορίστηκε μέσω χρόνων ανίχνευσης απορρόφησης και περιεγράφηκε ποσοτικά, μέσω της εκτίμησης των ακόλουθων κινητικών παραμέτρων: i) του χρόνου ανίχνευσης ( $T_{det}$ ) που απαιτείται για να πραγματοποιηθούν αλλαγές στην οπτική πυκνότητα στο μέσο ανάπτυξης, ii) της μέγιστης κλίσης (ρυθμός) των αλλαγών οπτικής πυκνότητας (MSrODC) και της περιοχής (εμβαδόν) κάτω από την καμπύλη οπτικής πυκνότητας/χρόνου. Πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση (ANOVA) για τον προσδιορισμό τυχόν σημαντικών διαφορών μεταξύ των προαναφερθέντων χειρισμών. Συμπερασματικά, η *Salmonella Enteritidis* είχε υψηλότερη ανάπτυξη σε ζωμό με γλυκόζη ως προς την «Περιοχή» και το «MSrODC» στη συγκέντρωση 2.5% w/v, σε αντίθεση με τη συγκέντρωση 10% w/v που επιβραδύνεται η ανάπτυξη του παθογόνου στη γλυκόζη, η οποία έχει τη μεγαλύτερη τιμή « $T_{det}$ » σε σχέση με τα εξεταζόμενα γλυκαντικά. Στην περίπτωση του *Lactiplantibacillus plantarum*, και οι τρεις παράμετροι εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές και για τις δύο συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν, με το βακτήριο να είχε υψηλότερη ανάπτυξη σε γλυκόζη, με μεγαλύτερη φάση προσαρμογής και χαμηλότερο μέγιστο ρυθμό ανάπτυξης και εμβαδόν στα γλυκαντικά. Συνολικά, η επίδραση της προσθήκης γλυκαντικών θα πρέπει να μελετηθεί διεξοδικά για να εξασφαλιστεί η βέλτιστη ασφάλεια των τροφίμων.

**Επιστημονική περιοχή:** Μικροβιολογία Τροφίμων

**Λέξεις-κλειδιά:** γλυκαντικά, υποκατάστατα ζάχαρης, γονίδια, γονιδιακή έκφραση, βακτήρια, οπτική πυκνότητα

## **Effect of various sweeteners on the growth of the pathogenic microorganism *Salmonella* Enteritidis and the probiotic *Lactobacillus plantarum***

*MSc: Food Quality Control & Hygiene  
Department of Food Science & Human Nutrition  
Laboratory of Food Microbiology*

### **ABSTRACT**

The increasing prevalence of obesity and various metabolic diseases worldwide, has been partially attributed to the excessive consumption of sugar. Sweeteners have become a popular sugar substitute, allowing a variety of food products to retain their palatability with parallel reduction of the caloric content. However, it has been reported that sugar replacement may affect the microbial food safety. The aim of this study was to assess the potential effect of sweeteners addition on the planktonic growth behavior of *Lactobacillus plantarum* and *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. Six, commonly used in food industry, sweeteners were tested. The bacterial strains were inoculated with a cell population of about  $10^2$  CFU/mL in nutrient broth supplemented with i) the selected sweeteners and ii) glucose (control). Different sweeteners concentrations were evaluated based on their sweetness equivalence as compared to 2.5 and 10% w/v glucose. Bacterial growth was monitored by means of absorbance detection times, and was quantitatively described, through the estimation of the following kinetic parameters: i) the detection time ( $T_{det}$ ) needed for optical density changes to occur in the growth medium, ii) the maximum slope (rate) of optical density changes (MSrODC) and the “Area” under the optical density/time curve. Statistical analysis (ANOVA) was performed to determine any significant differences between the abovementioned treatments. In conclusion, *Salmonella* Enteritidis had significantly higher growth in glucose broth in terms of «Area» and «MSrODC» at the 2.5% w/v concentration, in contrast to the 10% w/v, where the growth of the pathogen slows down in the case of glucose, that has the highest « $T_{det}$ » value among the tested sweeteners. In the case of *Lactiplantibacillus plantarum*, all three parameters showed statistically significant differences for both concentrations studied, with the bacterium having a higher growth in glucose, with longer adaptation phase and a lower maximum growth rate and area in sweeteners. To conclude, the effect of sweeteners addition should be studied thoroughly to ensure optimal food safety.

**Scientific area:** Food Microbiology

**Keywords:** sweeteners, sugar substitutes, genes, gene expression, bacteria, optical density

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

*Κατ' αρχήν, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα της παρούσας μελέτης Καθηγητή κ. Γεώργιο-Ιωάννη Νυχά, για την καθοδήγηση, την αρμονική συνεργασία και κυρίως τη διάθεσή του να αφιερώνει χρόνο ακούγοντας τις ανησυχίες και δίνοντας λύση στα προβλήματά μου. Οι συμβουλές του συμβάλλουν καταλυτικά στην εξέλιξή μου ως επιστήμονα.*

*Ευχαριστίες να εκφράσω και στα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής, κ. Ευστάθιο Πανάγου, Καθηγητή ΓΠΑ και στην κα. Αιμιλία Παπακωνσταντίνου, Επίκουρη Καθηγήτρια ΓΠΑ.*

*Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τη μεταδιδάκτορα, Δρ. Μάνθου Εβίτα, για τη σημαντική βοήθειά της στο εργαστήριο, τον προγραμματισμό των ενεργειών, τις μικροβιολογικές και φυσικοχημικές αναλύσεις και την απαραίτητη καθοδήγησή της στις μοριακές τεχνικές, καθώς και για τις συμβουλές της πάνω σε βασικά ζητήματα της συγγραφής της παρούσας μελέτης.*

*Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω, στο προσωπικό του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, κ. Αναστάσιο Σταματίου και κα. Τρυφίνοπούλου Πασχαλίτσα για την άριστη συνεργασία καθ' όλη της διάρκειας εκπόνησης της μελέτης.*

*Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τις μεταδιδάκτορες του εργαστηρίου, Δρ. Φέγγου Λένια και Δρ. Λύτου Αναστασία, τις υποψήφιες διδάκτορες, Σπυρέλλη Ευγενία και Σχοινά Ειρήνη για την υποστήριξη, την υπομονή, τις εύστοχες παρατηρήσεις και για τη βοήθειά τους στην εκμάθηση βασικών μικροβιολογικών και μοριακών τεχνικών. Κυρίως, όμως, τις ευχαριστώ διότι κατάφεραν μέσα από εποικοδομητικές συζητήσεις να με κάνουν καλύτερη επιστήμονα.*

*Ακόμη, ευχαριστώ όλους τους προπτυχιακούς και μεταπτυχιακούς φοιτητές για το ευχάριστο και φιλικό κλίμα στο εργαστήριο.*

*Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ ανήκει στην οικογένειά μου. Η έμπρακτη και καθημερινή υπενθύμιση της εμπιστοσύνης τους ήταν και είναι το μεγαλύτερο εφόδιο, η κινητήρια δύναμη ώστε να διεκδικώ με αξιώσεις τις φιλοδοξίες μου.*

*Πετροπούλεα Βαρβάρα,  
Αύγουστος 2022*

---

Με την άδειά μου η παρούσα εργασία ελέγχθηκε από λογισμικό ανίχνευσης κειμενικής ομοιότητας που διαθέτει το Πανεπιστήμιο

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	<b>8</b>
1.1 ΓΛΥΚΑΝΤΙΚΑ .....	8
1.1.1 Κατηγορίες γλυκαντικών.....	9
1.1.2 Φυσικά γλυκαντικά .....	10
1.1.3 Τεχνητά γλυκαντικά.....	15
1.2 ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ .....	20
<b>2. ΜΙΚΡΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΓΛΥΚΑΝΤΙΚΩΝ</b> .....	<b>22</b>
2.1 Το ΓΕΝΟΣ SALMONELLA .....	22
2.1.1 Ταξινόμική θέση.....	22
2.1.2 Μεταβολισμός & Φυσιολογία.....	23
2.1.3 <i>Salmonella Enteritidis</i> .....	23
2.1.4 Σαλμονέλωση.....	24
2.1.5 Γονίδια σαλμονέλας.....	25
2.2 ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ .....	28
2.2.3 Χαρακτηριστικά της φυσιολογίας .....	28
2.2.4 Το γένος <i>Lactobacillus</i> .....	30
2.2.3 <i>Lactiplantibacillus plantarum (Lactobacillus plantarum)</i> .....	31
2.3 ΜΙΚΡΟΧΛΩΡΙΔΑ ΤΟΥ ΕΝΤΕΡΟΥ ΚΑΙ ΓΛΥΚΑΝΤΙΚΑ .....	32
<b>3. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ-ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	<b>34</b>
3.1 ΟΠΤΙΚΗ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑ (OPTICAL DENSITY, OD).....	34
3.2 ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΚΑΜΠΥΛΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ .....	35
3.2.1 Διακριτές περιοχές καμπύλης .....	36
3.3 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗΣ (REAL TIME RT-PCR).....	38
<b>ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ</b> .....	<b>42</b>
<b>4. ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	<b>43</b>
4.1 ΑΝΑΝΕΩΣΗ / ΈΛΕΓΧΟΣ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ .....	43
4.2 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΓΛΥΚΑΝΤΙΚΩΝ .....	44
4.2.1 Φιλτράρισμα γλυκαντικών.....	44
4.3 ΟΠΤΙΚΗ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑ (OD) – ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ .....	45
4.3.1 Εμβολιασμός πλάκας μικροτιτλοδότησης ( <i>microplate</i> ).....	45
4.3.2 Υπολογισμός παραμέτρων ανάπτυξης και Στατιστική ανάλυση δεδομένων (ANOVA) ....	47
4.4 ΜΕΘΟΔΟΣ ΤΩΝ ΤΡΥΒΛΙΩΝ .....	49
4.5 ΈΛΕΓΧΟΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ .....	50
4.5.1 Απομόνωση RNA ( <i>RNA extraction</i> ) .....	50
4.5.2 Μετατροπή RNA σε cDNA ( <i>σύνθεση cDNA</i> ).....	52
4.5.3 <i>Real Time PCR</i> .....	53
<b>5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b> .....	<b>54</b>
5.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΜΕΣΩ ΟΠΤΙΚΗΣ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑΣ (OD).....	54
5.1.1 <i>Salmonella Enteritidis</i> .....	54
5.1.2 <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> .....	59

5.2	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ ΤΩΝ ΤΡΥΒΛΙΩΝ .....	63
5.2.1	<i>Salmonella Enteritidis</i> .....	63
5.2.2	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> .....	65
5.3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ RNA ΓΙΑ <i>SALMONELLA</i> ENTERITIDIS.....	68
<b>6.</b>	<b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b> .....	<b>71</b>
<b>7.</b>	<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	<b>73</b>

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 Γλυκαντικά

Η προτίμηση στη γλυκιά γεύση έχει τις ρίζες της στα ανθρώπινα γονίδια και αποτελεί έναν πιθανό μηχανισμό επιβίωσης που χρησιμοποιείται από τη βρεφική ηλικία, με σκοπό να κατευθύνει τον οργανισμό προς θρεπτικά τρόφιμα όπως τα φρούτα ή το μητρικό γάλα. Η ζάχαρη παρέχει αυτή την επιθυμητή αίσθηση, ενώ παράλληλα είναι σημαντική καθώς αποτελεί ένα βασικό «καύσιμο» του οργανισμού. Η σταθερή, ταχεία αύξηση των εύκολα προσβάσιμων επιλογών σε τρόφιμα χαμηλής διατροφικής αξίας με υψηλή περιεκτικότητα σε θερμίδες (Kahler, 2020), οδήγησε στην υπερβολική κατανάλωση ζάχαρης προκαλώντας ανησυχίες για τη δημόσια υγεία. Παρά τις πρώιμες προειδοποιήσεις για τον αντίκτυπο που έχει αυτή η τάση στην υγεία με μεταβολικές συνέπειες όπως η παχυσαρκία, η αντίσταση στην ινσουλίνη, το μεταβολικό σύνδρομο, οι καρδιαγγειακές παθήσεις και ο διαβήτης τύπου 2 (Plaza-Diaz, 2020), τα παγκόσμια ποσοστά παχυσαρκίας έχουν πλέον αποκτήσει διαστάσεις επιδημίας.

Ήδη από το 1800, σε μια προσπάθεια περιορισμού της κατανάλωσης υδατανθράκων, εμφανίστηκαν ως εναλλακτική λύση τα γλυκαντικά (Plaza-Diaz, 2020). Με τον όρο γλυκαντικές ουσίες ή γλυκαντικά χαρακτηρίζονται οι πρόσθετες ουσίες φυσικής ή συνθετικής προέλευσης που χρησιμοποιούνται είτε για να προσδώσουν γλυκιά γεύση στα τρόφιμα, είτε ως επιτραπέζια γλυκαντικά (Carocho, 2017). Σήμερα, οι έρευνες δείχνουν ότι οι άνθρωποι ανησυχούν για το αυξημένο βάρος και τις επιπτώσεις του στην υγεία, με αποτέλεσμα όλο και περισσότερα άτομα να καταβάλλουν συντονισμένη προσπάθεια είτε να διατηρήσουν είτε να χάσουν βάρος επιλέγοντας τρόφιμα που συμμορφώνονται με τις διατροφικές συστάσεις (Chattopadhyay et al., 2014) αλλά ταυτόχρονα δίνουν την ικανοποίηση γλυκιάς γεύσης μαζί με μείωση θερμίδων (Kahler, 2020).

Αυτή η ροπή ώθησε τη βιομηχανία τροφίμων να ανταποκριθεί κατάλληλα ανακαλύπτοντας, παράγοντας και εμπορευματοποιώντας διάφορες μορφές εναλλακτικών γλυκαντικών (π.χ. τεχνητά γλυκαντικά). Επειδή όμως, παρά τα προαναφερθέντα οφέλη, η υπέρμετρη κατανάλωση ορισμένων δύναται να προκαλέσει παρενέργειες (π.χ. ασπαρτάμη), θεσπίστηκαν αποδεκτές τιμές ημερήσιας πρόσληψης (Acceptable Daily Intake, ADI).

Παρά τις διεθνείς κυβερνητικές εγκρίσεις και τη διασφάλιση της ασφάλειας, οι καταναλωτές παραμένουν δύσπιστοι για τα γλυκαντικά και εκφράζουν ανησυχίες για τη μακροπρόθεσμη κατανάλωσή τους (Kahler, 2020). Οι έρευνες στο συγκεκριμένο θέμα είναι ακόμα σε αρχικό στάδιο, καθώς οι επιδημιολογικές μελέτες χρειάζονται χρόνο για να αποσαφηνίσουν τις επιπτώσεις της παρατεταμένης χρήσης γλυκαντικών στον οργανισμό των ανθρώπων και τη συσχέτισή τους με χρόνια νοσήματα.



### 1.1.1 Κατηγορίες γλυκαντικών

Οι οργανοληπτικές ιδιότητες των τροφίμων περιλαμβάνουν την υφή, την εμφάνιση, τη μυρωδιά και τη γεύση. Τα γλυκαντικά είναι πρόσθετα τροφίμων, τα οποία μιμούνται την επίδραση της ζάχαρης στη γεύση και ως εκ τούτου ονομάζονται υποκατάστατα ζάχαρης. Μπορούν να ταξινομηθούν βάσει εγγενών ιδιοτήτων ή προέλευσης. Μερικές από τις πιο κοινές ταξινομήσεις είναι ως προς τη θρεπτική τους αξία, τη γλυκαντική τους δύναμη και την προέλευσή τους. Μία από τις πιο συχνές κατηγοριοποιήσεις είναι οι εξής (Mouradian, 2017):

1. Θρεπτικά γλυκαντικά (Nutritive Sweeteners, NS)
2. Ολιγοθερμικά γλυκαντικά ή έντονης γλυκύτητας (Non-Nutritive Sweeteners (NNS) / High-Intense Sweeteners (HISs) )

Η εν λόγω κατηγοριοποίηση χρησιμοποιείται από κυβερνητικούς φορείς όπως η Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (European Food Safety Authority, EFSA). Στην ομάδα των θρεπτικών γλυκαντικών ανήκουν τα απλά σάκχαρα, με σημαντικότερο τη γλυκόζη, που είναι ο πιο άφθονος μονοσακχαρίτης, με μοριακό τύπο  $C_6H_{12}O_6$ . Πρόκειται για τον υδατάνθρακα που αποτελεί το σημαντικότερο υπόστρωμα του μεταβολισμού των κυττάρων και εξυπηρετεί τη μεταφορά ενέργειας στο σώμα.

Η γλυκόζη απορροφάται εύκολα από το έντερο. Ποσότητες γλυκόζης που δεν χρειάζονται άμεσα για ενέργεια αποθηκεύονται ως γλυκογόνο στο ήπαρ. Ο υγιής οργανισμός προσπαθεί να διατηρήσει ένα σταθερό επίπεδο γλυκόζης στο αίμα και στον ορό, με την έκκριση ινσουλίνης για να μειώσει το πολύ υψηλό επίπεδο και κινητοποίηση της γλυκόζης από το γλυκογόνο του ήπατος εάν τα επίπεδα πέσουν κάτω από το φυσιολογικό. Καθώς ο μεταβολισμός της εξαρτάται από την ινσουλίνη και δεδομένου ότι διαβητικοί τύπου I στερούνται ινσουλίνης και διαβητικοί τύπου II έχουν ανεπαρκή απελευθέρωση ινσουλίνης, θα πρέπει να αποφεύγεται η κατανάλωση μεγάλων ποσοτήτων χωρίς επαρκή φαρμακευτική αγωγή (Lipinski, 2016).

Η γλυκόζη, η φρουκτόζη και η γαλακτόζη είναι οι κύριοι μονοσακχαρίτες με γλυκιά γεύση που απαντώνται στα τρόφιμα και τα ποτά. Αυτά τα σάκχαρα μπορούν να συνδυαστούν χημικά για να σχηματίσουν φυσικούς δισακχαρίτες (π.χ. σακχαρόζη, λακτόζη, μαλτόζη) και μια μεγάλη ποικιλία ολίγο- και πολυσακχαριτών (π.χ. άμυλο, μαλτοδεξτρίνες και φρουκτάνες). Επιπρόσθετα, η επιτραπέζια ζάχαρη (σακχαρόζη) αποτελείται από ένα μόριο γλυκόζης στο οποίο ο άνθρακας αλδεϋδης ενώνεται με την κετόνη της φρουκτόζης.

Τα έντονα γλυκαντικά είναι αυτά που παρουσιάζουν υψηλή γλυκαντική ισχύ, υψηλότερη από τη σακχαρόζη, επομένως είναι απαραίτητα μόνο σε πολύ χαμηλές δόσεις για την επίτευξη έντονης γλυκύτητας. Η θερμιδική τους συνεισφορά είναι επίσης πολύ χαμηλή ή σχεδόν μηδενική, δεν πυροδοτούν γλυκαιμική απόκριση και επομένως χρησιμοποιούνται εκτενώς σε υποθερμιδικές δίαιτες, σε ασθενείς με διαβήτη και σε άλλες περιπτώσεις όπου η πρόσληψη θερμίδων πρέπει να ελέγχεται. Μεταξύ άλλων, τα πιο

αξιοσημείωτα είναι η ακεσουλφάμη K (E950), η ασπαρτάμη (E951), τα κυκλαμικά (E952), η σακχαρίνη (E954), η σουκραλόζη (E955) και η νεοτάμη (E961).

Αν και η προαναφερθείσα κατηγοριοποίηση οριοθετεί ικανοποιητικά το εύρος των διαθέσιμων γλυκαντικών, η διάκριση μεταξύ φυσικών και τεχνητών βασίζεται αποκλειστικά στην προέλευση και δύναται να αποσαφηνίσει ουσιαστικά τις διαφορές και τις ομοιότητες. Επομένως:

### **1.1.2 Φυσικά γλυκαντικά**

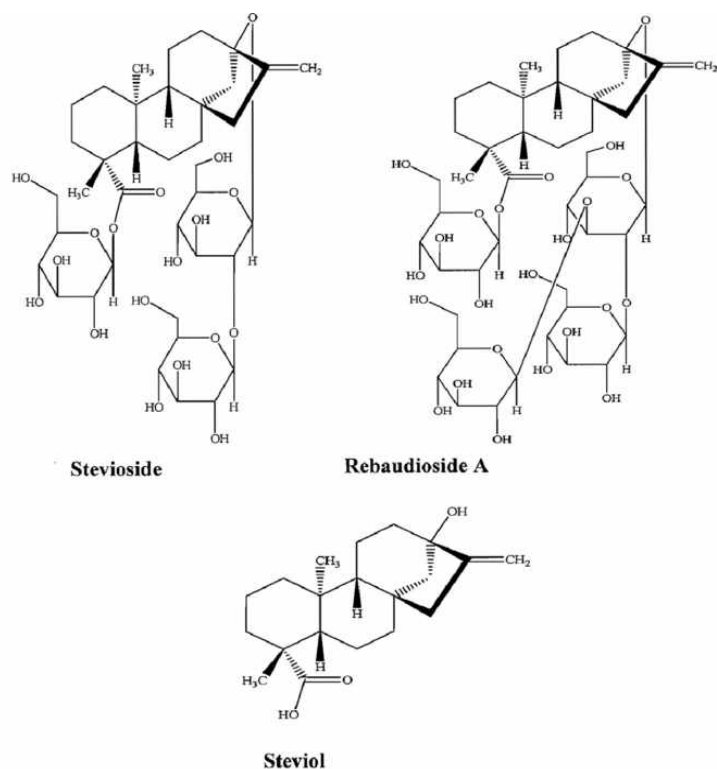
Τα τελευταία χρόνια αυξάνεται η χρήση φυσικών γλυκαντικών, κυρίως λόγω της ζήτησης από τους καταναλωτές. Παρόλο που οργανισμοί όπως η EFSA ή ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (Food and Drug Administration, FDA) δεν διαφοροποιούν τα γλυκαντικά ως συνθετικά ή φυσικά, εμπεριέχονται όλα τα γλυκαντικά που ρυθμίζονται από την κανονιστική ρύθμιση 1129/2011 της ΕΕ. Τα πιο κοινά φυσικά γλυκαντικά είναι οι γλυκοσίδες στεβιόλης (E960), η θωματίνη (E957) και η νεοεσπεριδίνη διυδροχαλκόνη (E959). Παρακάτω θα αναλυθούν όσα γλυκαντικά χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία.

#### **Στέβια (E 960)**

Η στεβιοσίδη (E960) με μοριακό τύπο  $C_{38}H_{60}O_{18}$ , είναι μια έντονη μη θρεπτική γλυκαντική ουσία που εξάγεται από τα φύλλα *Stevia rebaudiana* Bertoni, ένα γλυκό φυτό της οικογένειας *Asteraceae* (Carocho, 2017) που βρίσκεται στη βορειοανατολική Παραγουάη. Πρόκειται για μια λευκή, κρυσταλλική και άοσμη σκόνη, η οποία παραλαμβάνεται με εκχύλιση από τα φύλλα του φυτού, ακολουθούμενη από περαιτέρω συμπύκνωση, καθαρισμό και ξήρανση με ψεκασμό (Lagan, 2011). Τα φύλλα περιέχουν μεγάλη ποσότητα δευτερογενών μεταβολιτών με ένα ευρύ φάσμα σημαντικών βιολογικών δράσεων, κοινώς γνωστών ως γλυκοσίδες στεβιόλης, οι οποίοι οφείλονται για την γλυκαντική δύναμη της στέβια ενώ μεταξύ τους διαφέρουν ως προς τη μοριακή τους διαμόρφωση, τη δύναμη της γλυκύτητας και το γευστικό τους προφίλ. Μελέτες επιβεβαιώνουν ότι η στέβια είναι 200 έως 300 φορές πιο γλυκιά από τη σακχαρόζη (International Sweeteners Association, 2015).

Οι γλυκοσίδες είναι ενώσεις που περιέχουν ένα μόριο υδατάνθρακα συνδεδεμένο με μια μη-υδατανθρακική μονάδα (αγλυκόνη) (Lemus-Mondaca et.al, 2012). Οι γλυκοσίδες στεβιόλης (steviol glycosides) αποτελούνται από μείγματα διαφορετικών ενώσεων, δηλαδή στεβιοσίδη (5-10%), ρεμπαουδιοσίδη Α (2-5%), ρεμπαουδιοσίδη C (1%), δουλκοσίδη Α (0,5%), ρεμπαουδιοσίδη D, E και F (0,2%) (Momtazi Borojeni et al., 2016). Μεταξύ αυτών, οι κύριες ενώσεις που ενδιαφέρουν είναι οι διτερπενοειδή γλυκοσίδες τύπου ent-kaurene που εξάγονται από τα φύλλα αυτού του φυτού ως μη τοξικά, θερμικά σταθερά, χαμηλών θερμίδων φυσικά γλυκαντικά. Αυτές είναι η στεβιοσίδη και η ρεμπαουδιοσίδη Α, οι οποίες θεωρούνται από τις πιο σημαντικότερες γλυκαντικές ενώσεις, όντας θερμοανθεκτικές ακόμη και σε θερμοκρασίες έως και 200°C,

γεγονός που τις καθιστά κατάλληλες για χρήση στη μαγειρική. Προκαταρκτικά πειράματα συμπεραίνουν ότι οι γευστικοί υποδοχείς της γλώσσας αντιδρούν στους γλυκοσίδες και μεταφέρουν την αίσθηση της γλυκιάς γεύσης και την παρατεταμένη πικρή επίγευση μέσω άμεσης ενεργοποίησης των γλυκών και πικρών υποδοχέων (Hellfritsch et.al, 2012).



**Εικόνα 1.1.** Χημική δομή στεβιοσίδης, ρεμπαουδιοσίδης A, στεβιόλης (Carakostas et al., 2008)

Κατά την πέψη, οι γλυκοσίδες στεβιόλης καταβολίζονται από τα βακτήρια του παχέος εντέρου σε γλυκουρονίδια στεβιόλης, για να απεκκριθούν τελικά μέσω των ούρων. Γενικά, η στέβια έχει τουλάχιστον το 95% του συνόλου των επτά ονομασμένων γλυκοσιδών στεβιόλης (Lagan, 2011). Εκτός από την ασφαλή χρήση της από διαβητικούς ασθενείς και τη μηδενική θερμιδική της συνεισφορά, αποδίδονται επιπρόσθετες ιδιότητες, όπως αντιφλεγμονώδη και διουρητικά αποτελέσματα, στις ενώσεις που αποτελούν το μείγμα. Εμπορικά, οι χρήσεις της στέβιας περιλαμβάνουν την παραγωγή παγωτών, γιαουρτιών, κέικ, σαλτσών, ποτών, αρτοσκευασμάτων, μπαχαρικών και υπό τη μορφή επιτραπέζιας γλυκαντικής ουσίας (Carocho et al., 2017).

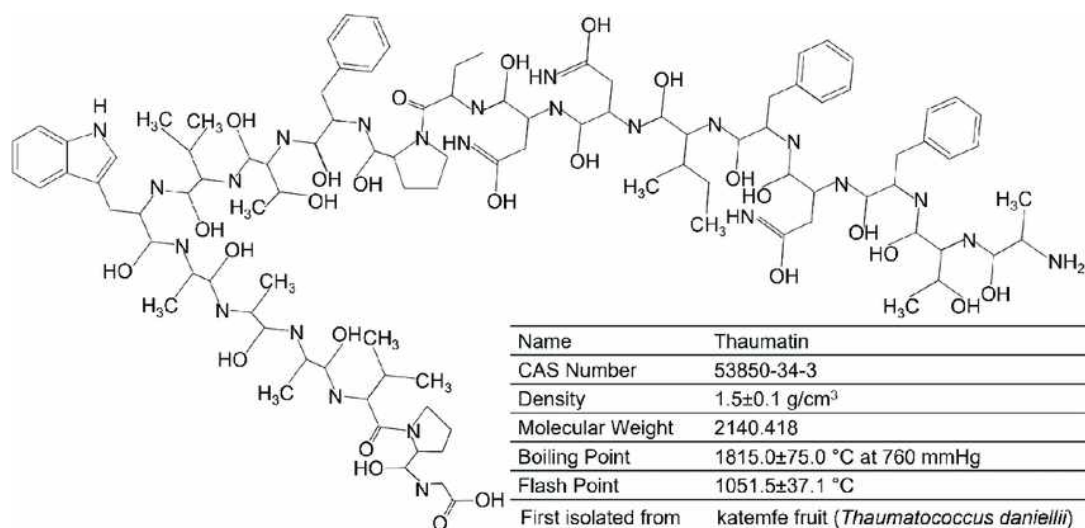
Τον Ιούνιο του 2008 η Μικτή Επιτροπή Εμπειρογνομόνων της Διεθνούς Οργάνωσης Τροφίμων και Γεωργίας (Food and Agriculture Organization, FAO) και του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (World Health Organization, WHO) για τα Πρόσθετα Τροφίμων (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, JECFA) αξιολόγησε την ασφάλεια των γλυκοσιδών στεβιόλης και καθόρισε μια «Αποδεκτή Ημερήσια Πρόσληψη» (ADI) ύψους 4 mg/kg σωματικού βάρους (εκφρασμένη ως στεβιόλη). Το 2010, η EFSA κινούμενη στο ίδιο πλαίσιο υιοθέτησε αυτό το ημερήσιο όριο. Στην Ευρώπη, οι γλυκοσίδες στεβιόλης έχουν εγκριθεί για ποικίλες χρήσεις σε τρόφιμα, ποτά

και γλυκαντικά επιτραπέζιων ουσιών σύμφωνα με το Παράρτημα II του Κανονισμού 1333/2008. Στις Ηνωμένες Πολιτείες, η στέβια που περιέχει τουλάχιστον 95% ρεμπαουδιοσίδη Α αναγνωρίζεται γενικά ως ασφαλής (Generally recognized as safe, GRAS) από τον FDA για χρήση ως γλυκαντικό σε τρόφιμα και ποτά (International Sweeteners Association, 2015).

### **Θαυματίνη (E 957)**

Η θαυματίνη αποτελείται από ένα μείγμα πρωτεϊνών χαμηλών θερμίδων, κυρίως από τη θαυματίνη I και II, οι οποίες τροποποιούν τη γεύση (FDA, 1984) και εξάγονται από το τροπικό φυτό *Thaumatococcus danielli* (Benth) στην Αφρική (Baines and Seal, 2012). Εκχυλίζεται με νερό από τα αγκάθια του φυτού μαζί με μικρές ποσότητες φυτικών συστατικών. Είναι μια άοσμη, λευκή-μπεζ σκόνη, διαλυτή στο νερό και λειτουργεί κυρίως ως ενισχυτικό γεύσης σε τρόφιμα και συμπληρώματα (EFSA, 2015). Τα γευστικά χαρακτηριστικά της είναι η αργή έναρξη της γλυκύτητας και η γλυκιά επίγευση (Lagan, 2011).

Η εμπορική παραγωγή ξεκίνησε τη δεκαετία του 1970 από την εταιρεία Tate & Lyle στο Ηνωμένο Βασίλειο με την επωνυμία «Talin».



**Εικόνα 1.2.** Χημική δομή θαυματίνης (Bilal et al., 2022)

Η θερμική μετουσίωση των θαυματινών οδηγεί σε απώλεια γλυκύτητας, υποδηλώνοντας ότι η τριτοταγής δομή της πρωτεΐνης ενεργοποιεί τη ρύθμιση της γεύσης (Kaneko et. al, 2001). Αν και υπάρχουν αρκετά παραδείγματα γλυκών πρωτεϊνών, η θαυματίνη είναι το πιο διαδεδομένο παράδειγμα γλυκαντικών με βάση τις πρωτεΐνες. Στο φυτό αυτές οι πρωτεΐνες επιδεικνύουν αντιμικροβιακές και προστατευτικές λειτουργίες, ενώ μπορεί να είναι 2000 έως 3000 φορές ισχυρότερες από τη σακχαρόζη ως προς τη γλυκύτητα (Carocho, 2017).

Μεταβολίζεται από τον οργανισμό όπως κάθε άλλη διατροφική πρωτεΐνη (International Sweeteners Association, 2015). Από πλευράς σταθερότητας, έχει υψηλή αντοχή στη θερμότητα και το όξινο pH, ενώ είναι πολύ διαλυτή στο νερό. Λόγω της

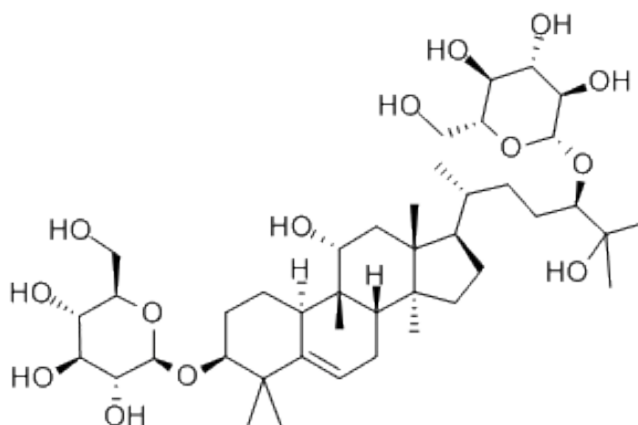
έντονης γλυκύτητάς της, οι ποσότητες που χρησιμοποιούνται είναι αρκετά μικρές ώστε να ταξινομείται ως μη θρεπτική γλυκαντική ουσία (Carocho, 2017).

Ως γλυκαντικό είναι μη τοξικό, ενώ είναι και εγκεκριμένο ως GRAS τόσο στην Ευρωπαϊκή Ένωση (από το 1984) όσο και στις ΗΠΑ. Οι σουπές, οι σάλτσες, τα επεξεργασμένα λαχανικά και τα προϊόντα που προέρχονται από αυγά είναι τα κύρια τρόφιμα στα οποία χρησιμοποιείται (Carocho, 2017). Η JECFA δεν έχει καθορίσει αυστηρά το αποδεκτό επίπεδο ημερήσιας πρόσληψης, πράγμα που σημαίνει ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί σύμφωνα με την «Καλή Παρασκευαστική Πρακτική» (Good Manufacturing Practice, GMP).

### Μογροσίδη

Ο καρπός του φυτού *Siraitia grosvenorii*, γνωστός και ως Luo Han Guo (φρούτο του μοναχού), καλλιεργείται σε πολυετή αμπέλια στην Ασία για περισσότερα από 200 χρόνια (Gong et al., 2019). Το εκχύλισμα τους είναι σχεδόν 300 φορές πιο γλυκό από τη σακχαρόζη (Izawa et.al, 2010) και η έντονη αυτή γλυκύτητα προέρχεται από ουσίες που συλλογικά ονομάζονται τριτερπενικά γλυκοσίδια (Kahler, 2020) χωρίς να αυξάνουν τη γλυκόζη στο αίμα (Pandey & Chauhan, 2019).

Από αυτές, η «Μογροσίδη V» χαρακτηρίζεται από τη μεγαλύτερη αφθονία. Ένα συμπυκνωμένο εκχύλισμα μογροσίδης συνήθως έχει μορφή κρεμώδους λευκής υδατοδιαλυτής σκόνης, με γλυκιά γεύση και δροσερή επίγευση (Lagan, 2011). Συνολικά, ο καρπός περιέχει σάκχαρα (φρουκτόζη και γλυκόζη), αλλά μέσα από μια διαδικασία εκχύλισης νερού, διήθησης και επιλεκτικής συγκέντρωσης απομονώνονται οι γλυκοσίδες. Ανάλογα με τη διαδικασία παρασκευής, τα εμπορικά διαθέσιμα προϊόντα έχουν ποικίλες συγκεντρώσεις από «Μογροσίδη V» (Kahler, 2020).



**Εικόνα 1.3.** Χημική δομή μογροσίδης ([Wikipedia](#))

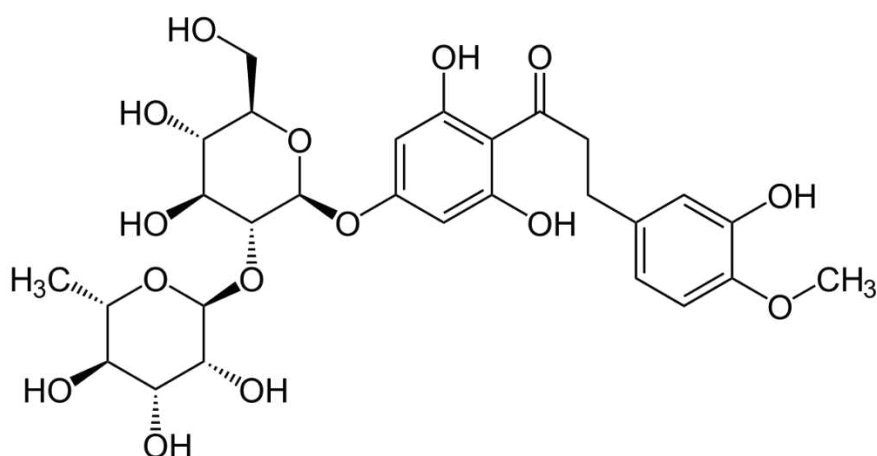
Εκτός από τη χρήση της ως φυσικό γλυκαντικό, εκτιμάται ιδιαίτερα στην παραδοσιακή Κινεζική Ιατρική ως χρήσιμο φάρμακο για παθήσεις που απαιτούν δροσιστικές ιδιότητες, όπως πονόλαιμος και βήχας (Li et al., 2014). Επίσης, χρησιμοποιείται ως πρόσθετο για ποτά και καραμέλες στην Ιαπωνία και τις Ηνωμένες

Πολιτείες (Izawa et al., 2010). Η in vitro αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας της «Μογροσίδης V» αποκάλυψε ισχυρή δραστηριότητα δέσμευσης ελεύθερων ριζών οξυγόνου, υποδεικνύοντας την ικανότητα εξουδετέρωσης του οξειδωτικού στρες που προκαλείται από τον διαβήτη (Suzuki et al., 2007). Επιπλέον, μελέτες έχουν δείξει ότι η χορήγηση του εκχυλίσματος μπορεί να συμβάλει στην πρόληψη των διαβητικών επιπλοκών που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες και την υπερλιπιδαιμία (Qi et al., 2008).

Οι μογροσίδες ταξινομούνται από τον FDA ως προϊόν GRAS. Δεν υπάρχουν περιορισμοί στην κατανάλωση του καρπού ή των εκχυλισμάτων του καθώς αναφέρεται ως μη-μεταλλαξιόγonos ουσία (Izawa et al., 2010). Στην Ευρωπαϊκή Ένωση έχει ανακληθεί η έγκριση του γλυκαντικού από το 2016, καθώς διερευνάται ακόμη η καταλληλότητά τους ως γλυκαντικές ουσίες.

### **Νεοεσπεριδίνη Διυδρογαλκόνη (E 959)**

Πρόκειται για ένα έντονο ημιφυσικό γλυκαντικό που προέρχεται από το δέρμα των ανώριμων καρπών του *Citrus aurantium* (πικρό πορτοκάλι) ή λαμβάνεται από τη ναρινγίνη, το κύριο φλαβονοειδές του *Citrus paradisi* (γκρέιπφρουτ). Όταν εκχυλίζεται, η νεοεσπεριδίνη (φλαβόνη) μετατρέπεται με την υδρόλυση σε διυδρογαλκόνη (Baines and Seal, 2012). Είναι ένα χαμηλών θερμίδων γλυκαντικό και ενισχυτικό γεύσης με 1500-1800 φορές πιο ισχυρή γλυκύτητα από τη σακχαρόζη. Ενώ δεν έχει ακόμη βρεθεί στη φύση, εμφανίζονται δομικά σχετικά φλαβονοειδή και οι αντίστοιχες διυδρογαλκόνες τους σε πολλά φυτά. Κατά την κατάποση, μεταβολίζεται από την εντερική χλωρίδα αποδίδοντας τα ίδια ή παρόμοια προϊόντα διάσπασης με τα φυσικά της ανάλογα (International Sweetness Association, 2018).



**Εικόνα 1.4.** Χημική δομή νεοεσπεριδίνης DC ([Wikimedia Commons, 2008](#))

Η «Νεοεσπεριδίνη DC» έχει μορφή λευκής σκόνης. Γευστικά χαρακτηρίζεται από σταδιακή απελευθέρωση της γλυκύτητας, με ελαφρώς πικρές και δροσερές νότες γλυκόριζας. Έχει την ικανότητα να καλύπτει τις ανεπιθύμητες γεύσεις άλλων γλυκαντικών, όταν χρησιμοποιούνται συνδυαστικά (Lagan, 2011). Ο μοριακός τύπος της

είναι  $C_{28}H_{36}O_{15}$  (EFSA, 2011) και ως γλυκαντικό είναι σταθερό σε υψηλές θερμοκρασίες παστερίωσης. Αν και είναι ελάχιστα διαλυτή στο νερό σε θερμοκρασία δωματίου, το γεγονός ότι απαιτούνται εξαιρετικά χαμηλές ποσότητες σε συνδυασμό με την αυξημένη διαλυτότητά της στο ζεστό νερό, την καθιστούν λειτουργική στη βιομηχανία των τροφίμων (Carocho, 2017).

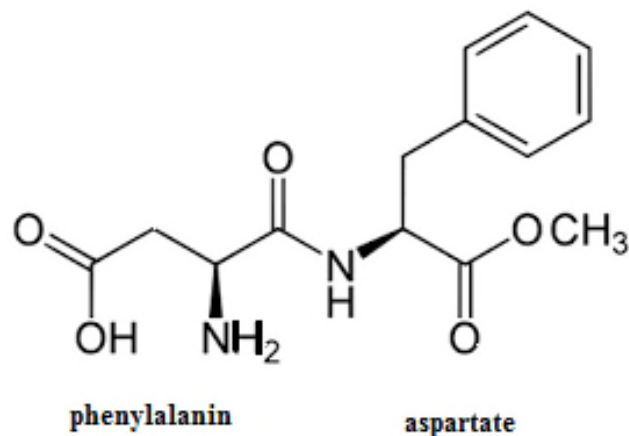
Στην Ευρώπη, η ασφάλεια της αξιολογήθηκε το 1988 από την Επιστημονική Επιτροπή για τα τρόφιμα (Scientific Committee on Food, SCF) της Ευρωπαϊκής Επιτροπής και ορίστηκαν ως ADI τα 0-5 mg/kg σωματικού βάρους. Εν τέλει εγκρίθηκε το 1994, όχι ωστόσο και στις Η.Π.Α. Αυτό το γλυκαντικό χρησιμεύει για την πύκνωση υγρών τροφίμων, επομένως χρησιμοποιείται ευρέως σε παγωτά, τσίχλες, επιδόρπια, γάλα, σνακ, τρόφιμα ζαχαροπλαστικής, μύρα, σούπες, συμπληρώματα διατροφής και ως επιτραπέζιο γλυκαντικό (Pandey & Upadhyay, 2012) σύμφωνα με το Παράρτημα II του Κανονισμού 1333/2008 (International Sweetness Association, 2018). Παράλληλα, έχει αποδειχθεί ότι είναι κατάλληλο για διαβητικούς με σημαντικές συνεργικές επιδράσεις στο προφίλ γλυκύτητας και γεύσης με ακεσουλφάμη K, ασπαρτάμη, σακχαρίνη, κυκλαμικό οξύ, σουκραλόζη και πολυόλες (Lagan, 2011).

### 1.1.3 Τεχνητά γλυκαντικά

Τα γλυκαντικά αυτής της κατηγορίας συνήθως παράγονται με χημική σύνθεση και μπορούν να προστεθούν στα τρόφιμα μόνο σε ποσότητες που είναι απαραίτητες για να αντικαταστήσουν πλήρως ή εν μέρει τη γλυκύτητα που παρέχουν τα σάκχαρα (Food Standards, 2018). Κάποια από αυτά τα γλυκαντικά όπως η : σακχαρίνη, ασπαρτάμη, ακεσουλφάμη κάλιο (Ace-K), σουκραλόζη, νεοτάμη και αντβαντάμη είναι εγκεκριμένα από τον FDA ως πρόσθετα τροφίμων στις Ηνωμένες Πολιτείες αλλά και στην Ευρωπαϊκή Ένωση (Mooradian, 2017). Παρακάτω θα αναλυθούν τα γλυκαντικά που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία.

#### Ασπαρτάμη (E 951)

Η ασπαρτάμη ανακαλύφθηκε το 1965 από τον James Schlatter και αποτελεί ένα τεχνητό, μη θερμιδικό γλυκαντικό. Αποτελείται από δύο αμινοξέα (δομικά στοιχεία πρωτεϊνών), τη φαινυλαλανίνη και το ασπαρτικό οξύ, και ουσιαστικά είναι ο μεθυλεστερας του διπεπτιδίου των φυσικών αυτών αμινοξέων (Mooradian, 2017). Το μεγαλύτερο μέρος της ασπαρτάμης υδρολύεται πλήρως σε φαινυλαλανίνη, μεθανόλη και ασπαρτικό οξύ στο έντερο και απορροφάται στο λεπτό έντερο (Butchko et al., 2002). Ούτε η ασπαρτάμη ούτε τα προϊόντα πέψης της φτάνουν ποτέ στο κόλον. Έτσι, η ίδια η ασπαρτάμη δεν μπορεί να επηρεάσει άμεσα τη μικροχλωρίδα του εντέρου (Magnuson, 2021). Ο μοριακός τύπος της είναι  $C_{14}H_{18}N_2O_5$  (Cao, 2020).



**Εικόνα 1.5.** Χημική δομή ασπαρτάμης (Amchra et al., 2018)

Η ασπαρτάμη είναι μια λευκή, υγροσκοπική, κρυσταλλική σκόνη με διαλυτότητα στο νερό 1% στους 25°C (Carocho, 2017), καθώς αποσυντίθεται πριν λιώσει. Η διαλυτότητα της όμως αυξάνεται με υψηλότερο ή χαμηλότερο pH καθώς και με αυξημένη θερμοκρασία. Η σταθερότητα βελτιστοποιείται σε τιμές pH κοντά στο 4,3. Κάτω από έντονα όξινες ή αλκαλικές μπορεί να δημιουργήσει μεθανόλη με υδρόλυση, ενώ κάτω από πιο ακραίες συνθήκες οι πεπτιδικοί δεσμοί υδρολύονται επίσης αποδίδοντας αυτούσια τα ελεύθερα αμινοξέα (Moogradian, 2017). Όπως πολλά άλλα πεπτίδια, η ασπαρτάμη υδρολύεται στα αμινοξέα που την αποτελούν υπό συνθήκες αυξημένης θερμοκρασίας με παράλληλες αντιδράσεις μη-ενζυμικής αμαύρωσης (Maillard). Επομένως, είναι ανεπιθύμητη ως γλυκαντικό ψησίματος. Η σχετική γλυκύτητα σε τέτοια τρόφιμα είναι περίπου 180–200 φορές ισχυρότερη από τη σακχαρόζη. Στο προφίλ γλυκύτητας, η γλυκύτητα του πυρήνα της ασπαρτάμης είναι παρόμοια με τη σακχαρόζη αλλά υπάρχει μια πιο μακροχρόνια, παρατεταμένη γλυκιά επίγευση (Lagan, 2011).

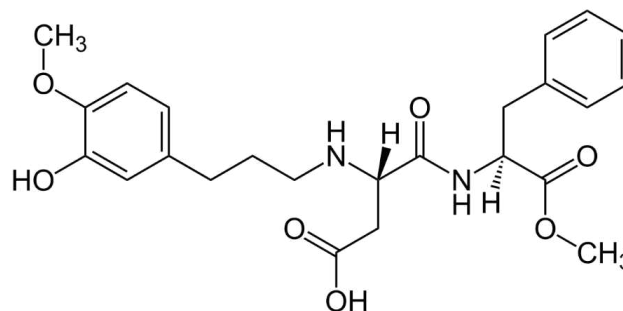
Χρησιμοποιείται σε μεγάλη ποικιλία τροφών και ποτών με χαμηλό θερμιδικό φορτίο, καθώς και σε τσίχλες, αναψυκτικά, γιαούρτια, επιδόρπια, δημητριακά πρωινού και άλλα ξηρά προϊόντα (Chattopadhyay et al., 2014). Ωστόσο, θεωρείται πηγή φαινυλαλανίνης επομένως δεν συνιστάται για άτομα με φαινυλκετονουρία (Shankar et al., 2013). Σύμφωνα με τον κανονισμό της ΕΕ αριθ. 1169/2011, όλα τα τρόφιμα που χρησιμοποιούν ασπαρτάμη πρέπει να έχουν μια διακριτή επισήμανση με τον όρο: «περιέχει ασπαρτάμη (πηγή φαινυλαλανίνης)». Διάφορες επιστημονικές έρευνες κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οι επιδράσεις της ασπαρτάμης είναι πιθανό να αποδοθούν στη μεθανόλη ή στους μεταβολίτες της (Heber, 2004).

Σε διεθνές επίπεδο, η ασπαρτάμη έχει αξιολογηθεί από ανεξάρτητους εμπειρογνώμονες ασφάλειας της Μικτής Επιτροπής Εμπειρογνομώνων FAO/WHO για τα πρόσθετα τροφίμων (1981). Στην ΕΕ, η ασφάλεια της ασπαρτάμης επαναξιολογήθηκε από τους εμπειρογνώμονες της Ευρωπαϊκής Αρχής για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA) τον Δεκέμβριο του 2013. Η αποδεκτή ημερήσια πρόσληψη (ADI) για την ασπαρτάμη που ορίστηκε από την JECFA και επιβεβαιώθηκε εκ νέου από την EFSA είναι 0-40 mg/kg σωματικού βάρους. Έχει εγκριθεί για ποικίλες χρήσεις σε τρόφιμα, ποτά και επιτραπέζια γλυκαντικά σύμφωνα με το Παράρτημα II του Κανονισμού 1333/2008 (International Sweetness Association, 2018).



### Αντβαντάμη (E 969)

Η αντβαντάμη είναι ένα γλυκαντικό χαμηλών θερμίδων που βασίζεται σε αμινοξέα και λαμβάνεται μέσω χημικής σύνθεσης από ασπαρτάμη και ισοβανιλίνη. Είναι πηγή φαινυλαλανίνης και παρόλο που προέρχεται από την ασπαρτάμη, έχει πολύ διαφορετική δομή (Carocho, 2017). Παραλαμβάνεται ως λευκή-κίτρινη σκόνη και έχει γλυκαντική δύναμη περίπου 20.000-37000 φορές μεγαλύτερη από εκείνη της σακχαρόζης (International Sweetness Association, 2018). Χαρακτηρίζεται από καθαρή γλυκιά γεύση, ελαφρώς πικρή και όξινη. Έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία σε καφέ, παγωμένο τσάι, σκευάσματα ροφημάτων σε σκόνη, τσίχλες, γιαούρτι, γαλακτοκομικά, μη αλκοολούχα ποτά και επίσης ως ενισχυτικό γεύσης (Otabe et al., 2011). Αναφορικά με τη σταθερότητα, μπορεί να αντέξει τις υψηλές θερμοκρασίες και να χρησιμοποιηθεί σε προϊόντα χαμηλού pH. Κατά συνέπεια, διατηρεί το γλυκό της χαρακτήρα ακόμα και όταν χρησιμοποιείται σε υψηλές θερμοκρασίες κατά το ψήσιμο, καθιστώντας τη κατάλληλη ως υποκατάστατο ζάχαρης σε αρτοσκευάσματα (FDA, 2018). Ο μοριακός τύπος της είναι  $C_{24}H_{30}N_2O_7$ .



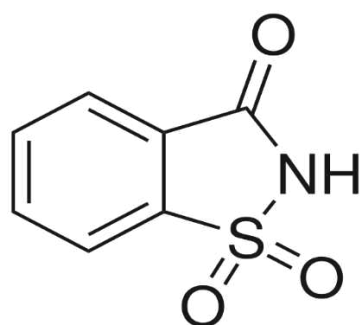
**Εικόνα 1.6.** Χημική δομή αντβαντάμης ([Wikipedia](#))

Εκτεταμένες μελέτες επιβεβαιώνουν την ασφάλεια της αντβαντάμης για χρήση ως γλυκαντικό και ενισχυτικό γεύσης. Αξιολογήθηκε και έλαβε έγκριση από την JECFA και από την EFSA το 2013. Συγκεκριμένα, τον Ιούλιο του 2013, ορίστηκε ως μη τοξική ή καρκινογόνος χωρίς να απορρέουν κίνδυνοι από την κατανάλωσή της. Το 2014, ο FDA την αξιολόγησε με τη σειρά του ως ασφαλές γλυκαντικό γενικής χρήσης και ενισχυτικό γεύσης στα τρόφιμα. Η ADI για την αντβαντάμη ορίζεται από 0-5 mg/kg σωματικού βάρους (International Sweetness Association, 2018).

### Σακχαρίνη (E 954)

Η σακχαρίνη είναι ένα συμπυκνωμένο ετεροκυκλικό ο-σουλφοβενζιμίδιο και παρασκευάζεται με χημική σύνθεση (O'Mullane et al., 2014). Αποτέλεσε το πρώτο έντονο γλυκαντικό, ανακαλύφθηκε το 1878 και πλέον παράγεται σε βιομηχανική κλίμακα μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται «Maumee», εξαιτίας της εταιρείας που την ανέπτυξε (Maumee Chemical Company). Η ένωση της σακχαρίνης είναι σταθερή σε χαμηλό pH και ανθίσταται στις υψηλές θερμοκρασίες, γεγονός που την καθιστά ιδανική

γλυκαντική ουσία για χρήση σε όλα τα στάδια παραγωγής τροφίμων και για προϊόντα μεγάλης διάρκειας. Έχει ελαφρά όξινη, γλυκιά γεύση γι' αυτό συνδυάζεται συνήθως με κυκλαμικά και ασπαρτάμη (Carocho, 2017). Ο μοριακός τύπος της είναι  $C_7H_5NO_3S$ .



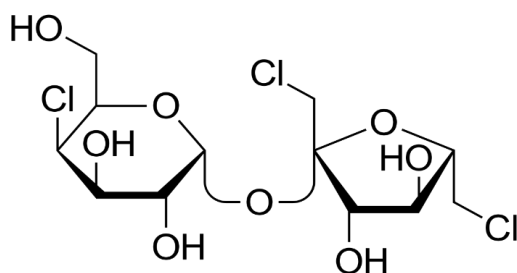
**Εικόνα 1.7.** Χημική δομή σακχαρίνης ([Wikipedia](#))

Χρησιμοποιείται ευρέως σε χυμούς φρούτων, επεξεργασμένα φρούτα, ζελατίνες, μαρμελάδες, σάλτσες, επιδόρπια, τσίγλες και ως επιτραπέζιο γλυκαντικό (Carocho, 2017). Η σχετική γλυκύτητα της φθάνει έως και 300-500 φορές υψηλότερα από τη σακχαρόζη (International Sweeteners Association, 2018). Ως πιο κοινή παραλλαγή επισημαίνεται η σακχαρίνη νατρίου λόγω της υψηλής διαλυτότητάς, της σταθερότητας και του χαμηλού κόστους παραγωγής της. Στη βιβλιογραφία, ο όρος «σακχαρίνη» χρησιμοποιείται μερικές φορές με μια γενική έννοια για να συμπεριλάβει τόσο τη σακχαρίνη όσο και τα άλατά της (O'Mullane et al., 2014).

Η σακχαρίνη απορροφάται αργά, απεκκρίνεται ταχέως αμετάβλητη από τα νεφρά και δεν μεταβολίζεται. Έχει αξιολογηθεί επιτυχώς από την επιτροπή JECFA (1993), από την Επιστημονική Επιτροπή Τροφίμων της Ευρωπαϊκής Επιτροπής (1995) και την EFSA. Η ADI που ορίζεται τόσο από την JECFA όσο και από την SCF είναι 5 mg/kg σωματικού βάρους. Στην ΕΕ, η σακχαρίνη έχει εγκριθεί ως γλυκαντικό για ποικίλες χρήσεις σε τρόφιμα, ποτά και επιτραπέζια γλυκαντικά σύμφωνα με το Παράρτημα II του Κανονισμού 1333/2008 (International Sweeteners Association, 2018).

### **Σουκραλόζη (E 955)**

Η σουκραλόζη ανακαλύφθηκε το 1976 ως ένα συνθετικό έντονο γλυκαντικό που προέρχεται από την υποκατάσταση τριών υδροξυλομάδων της σακχαρόζης (Chattopadhyay et al., 2014). Είναι περίπου 320–1000 φορές πιο γλυκιά από τη σακχαρόζη, πράγμα που σημαίνει ότι η προσθήκη πολύ μικρών ποσοτήτων μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να αντικαταστήσει τη ζάχαρη σε τρόφιμα και τα ποτά. Δομικά, είναι παρόμοια με τη σακχαρόζη και παράγεται αντικαθιστώντας τις ομάδες υδροξυλίου αυτής στις θέσεις 4, 10 και 60 με χλώριο. (Magnuson, 2021). Ο μοριακός τύπος της είναι:  $C_{12}H_{19}Cl_3O_8$ .



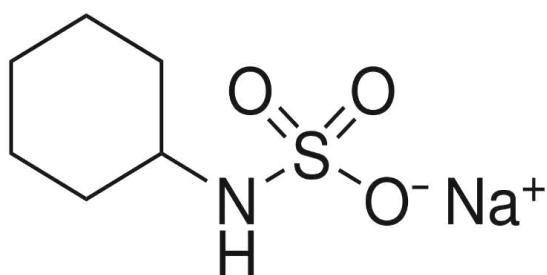
**Εικόνα 1.8.** Χημική δομή σουκραλόζης ([Wikipedia](#))

Πρόκειται για μια εξαιρετικά υδατοδιαλυτή ένωση, αδιάλυτη στα έλαια, η οποία είναι σταθερή σε υψηλές θερμοκρασίες και μεταβολές στο pH. Κατά συνέπεια, αναγνωρίζεται ως ιδανική γλυκαντική ουσία για χρήση σε ποτά και τρόφιμα, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που υποβάλλονται σε θερμική επεξεργασία (π.χ. αρτοσκευάσματα). Διατίθεται σε μορφή λευκής κρυσταλλικής σκόνης, έχει ευχάριστη γλυκιά γεύση και το προφίλ ποιότητας και χρονικής έντασης ταυτίζεται με αυτό της σακχαρόζης (Agora et al., 2009). Απελευθερώνει μόρια HCl όταν αποθηκεύεται σε υψηλή θερμοκρασία (Chattopadhyay et al., 2014). Επίσης, δεν μεταβολίζεται για ενέργεια από το σώμα, άρα δεν συνεισφέρει σε θερμίδες και δεν επηρεάζει τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα (Magnuson, 2021).

Διεθνώς, η σουκραλόζη έχει αξιολογηθεί επιτυχώς από την επιτροπή JECFA (1990), από την Επιστημονική Επιτροπή Τροφίμων της Ευρωπαϊκής Επιτροπής (2000) και την EFSA. Η ADI που ορίζεται τόσο από την JECFA όσο και από την SCF είναι 0-15 mg/kg σωματικού βάρους. Στην ΕΕ, έχει εγκριθεί ως γλυκαντικό για ποικίλες χρήσεις σε τρόφιμα, ποτά και επιτραπέζια γλυκαντικά σύμφωνα με το Παράρτημα II του Κανονισμού 1333/2008. Στις Ηνωμένες Πολιτείες, έχει εγκριθεί ως «γλυκαντικό γενικής χρήσης στα τρόφιμα» από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (FDA).

### **Κυκλαμικό οξύ (E 952)**

Το κυκλαμικό οξύ αφορά ένα άλας του κυκλοεξυλοσουλφαμικού οξέος που ανακαλύφθηκε το 1937 και είναι 30-50 φορές πιο γλυκό από τη σακχαρόζη. Το κυκλαμικό νάτριο χρησιμοποιείται ως μη θρεπτικό γλυκαντικό και το ανάλογο άλας ασβεστίου χρησιμοποιείται ειδικά σε δίαιτες χαμηλής περιεκτικότητας σε νάτριο. Έχει πικρή γεύση, αλλά έχει καλή συνέργεια γλυκύτητας με τη ζαχαρίνη. Είναι διαλυτό στο νερό και η διαλυτότητά του μπορεί να αυξηθεί με την παρασκευή του άλατος νατρίου ή ασβεστίου (Borpp et al., 1986). Τα κυκλαμικά άλατα διατίθενται ως λευκές, κρυσταλλικές σκόνης που έχουν απόλυτα ουδέτερο pH και μερική θερμική σταθερότητα στην επεξεργασία τροφίμων. Η κύρια εφαρμογή είναι σε συνδυασμό με σακχαρίνη για ποτά και επιτραπέζια γλυκαντικά. Στο προφίλ γλυκύτητας υπάρχουν κάποιες πικρές και αλμυρές πλευρικές γεύσεις του κυκλαμικού, οι οποίες καλύπτονται αρκετά καλά στα συνήθη μείγματα με σακχαρίνη, ακεσουλάμη K ή ασπαρτάμη. Ο μοριακός του τύπος είναι  $C_6H_{12}NNaO_3S$ .



**Εικόνα 1.9.** Χημική δομή κυκλαμικού νατρίου ([Wikimedia Commons, 2009](#))

Το κυκλαμικό μεταβολίζεται σε περιορισμένο βαθμό από τα βακτήρια στο κατώτερο έντερο, από ορισμένα άτομα με περιορισμένη απορρόφηση από τον οργανισμό, και απεκκρίνεται αμετάβλητο από τα νεφρά.

Διεθνώς, έχει αξιολογηθεί επιτυχώς από την επιτροπή JECFA (1982), από την Επιστημονική Επιτροπή Τροφίμων της Ευρωπαϊκής Επιτροπής (2000) και την EFSA. Η ADI για το κυκλαμικό έχει οριστεί στα 11 mg/kg σωματικού βάρους από την JECFA και στα 7 mg/kg σωματικού βάρους από την SCF. Στην ΕΕ, έχει εγκριθεί ως γλυκαντικό για ποικίλες χρήσεις σε τρόφιμα, ποτά και επιτραπέζια γλυκαντικά σύμφωνα με το Παράρτημα II του Κανονισμού 1333/2008.

**Πίνακας 1.1.** Σύγκριση της γλυκύτητας των γλυκαντικών του πειράματος με τη σουκρόζη και τη γλυκόζη:

Γλυκαντικά	Σχετική γλυκύτητα προς σουκρόζη (min – max)	Σχετική γλυκύτητα προς γλυκόζη (min – max)	Πηγή
Stevia Reb A	40 - 300	66,8 - 501	Jagan et al., 2011
Aspartame	150 - 200	250,5 - 334	Jagan et al., 2011
Saccharin	300 - 500	501 - 835	Jagan et al., 2011
Sucralose	600 - 1000	1002 - 1670	Jagan et al., 2011
Thaumatococin	1000 - 2000	1670 - 3340	Jagan et al., 2011
Mogrosin	250	417,5	Jagan et al., 2011
Advantame	37000	61790	Otake et al., 2011
NHDC	1000 - 1800	1670 - 3006	EFSA, 2011
Cyclamate	30	50,1	Jagan et al., 2011

## 1.2 Τοξικότητα

Ανεξάρτητα από το εάν μία ουσία έχει εγκριθεί για χρήση ως πρόσθετο τροφίμων ή εάν γενικά αναγνωρίζεται ως ασφαλής (Generally Recognized As Safe, GRAS), οι επιστήμονες πρέπει να επιβεβαιώσουν πως πληροί όλες τις πρωτογενείς και δευτερογενείς συνθήκες ασφαλείας. Αυτό το πρότυπο ασφαλείας ορίζεται στους

κανονισμούς του FDA (Food and Drug Administration, 2015), ο οποίος έχει την αρμοδιότητα να περιορίσει τη μορφή ενός πρόσθετου τροφίμων σε παρασκευασμένα τρόφιμα ή ως επιτραπέζιο γλυκαντικό.

Τα επίπεδα που δεν παρατηρούνται δυσμενείς επιπτώσεις (No Observed Adverse Effect Level, NOAEL) χρησιμοποιούνται για τον καθορισμό αποδεκτών ημερήσιων προσλήψεων (Acceptable Daily Intake, ADI) με κατάλληλους παράγοντες ασφαλείας. Το ADI υπολογίζεται σύμφωνα με την τρέχουσα έρευνα ασφαλείας και ορίζεται ως η ποσότητα ενός πρόσθετου τροφίμων, εκφραζόμενη με βάση το σωματικό βάρος, που μπορεί να καταναλώνεται καθημερινά κατά τη διάρκεια της ζωής χωρίς σημαντικό κίνδυνο για την υγεία (World Health Organization, 2004).

Δεν είναι ένα όριο μεταξύ ασφαλούς και μη ασφαλούς. Είναι μια υπολογισμένη τιμή, που προκύπτει διαιρώντας το NOAEL που παρατηρείται σε τοξικολογικές μελέτες με έναν παράγοντα ασφαλείας. Το NOAEL είναι ένα ημερήσιο επίπεδο πρόσληψης που είναι πολύ χαμηλό για να προκαλέσει βιολογικές επιπτώσεις. Επομένως, το ADI είναι ένα επίπεδο ημερήσιας πρόσληψης που θεωρείται ασφαλές για όλους, συμπεριλαμβανομένων εκείνων με την υψηλότερη πιθανή έκθεση σε ένα συστατικό (Magnuson, 2021).

Γλυκαντικό	ADI σύμφωνα με τον FDA (mg/kg)	ADI σύμφωνα με τις SCF/EFSA (mg/kg)
Ακεσουλφάμη K	15	9
Αντβαντάμη	32,8	5
Ασπαρτάμη	50	40
Κυκλαμικό οξύ	Δεν έχει εγκριθεί	7
Μογροσίδη	Δεν έχει οριστεί	Δεν έχει οριστεί
Νεοεσπεριδίνη DC	Δεν έχει εγκριθεί	5
Νεοτάμη	0,3	2
Σακχαρίνη	15	5
Σουκραλόζη	5	15
Γλυκοσίδες στεβιόλης	4	4
Θαυματίνη	Δεν έχει εγκριθεί	Δεν έχει οριστεί

**Πίνακας 1.2.** Αποδεκτή ημερήσια πρόσληψη (Lohner et al., 2017)

## 2. ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΓΛΥΚΑΝΤΙΚΩΝ

### 2.1 Το γένος *Salmonella*

Σε μια κλασική προσέγγιση, τα μέλη του γένους *Salmonella* ορίζονται ως αρνητικά κατά Gram βακτήρια, με κοινά μορφολογικά, μεταβολικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά. Είναι προαιρετικά αναερόβιοι βάκιλλοι, οι οποίοι δε σχηματίζουν σπόρια. Κατά μέσο όρο έχουν μήκος 2-5 mm και πλάτος 0,8-1,5 mm. Η ιδανική θερμοκρασία ανάπτυξής τους είναι κοντά στους 37°C (αποδεκτό εύρος ανάπτυξης από 5-45°C) και η ιδανική τιμή pH ανάπτυξης είναι γύρω στο 7,0 (εύρος ανάπτυξης από 4,0-9,0).

Η κινητικότητα, υποβοηθούμενη από περιτριχοειδή μαστίγια, αποτελεί ένα θεμελιώδες κριτήριο προσδιορισμού. Ωστόσο, έχει απομονωθεί μεγάλος αριθμός μη-κινητικών στελεχών από κλινικά περιβάλλοντα. Τα σωματικά και μαστιγιακά αντιγόνα συσχετίζουν στενά τους ορότυπους της *Salmonella* μεταξύ τους, με πολλά στελέχη να παρουσιάζουν παραλλαγή (Percival and Williams, 2014).

Η σαλμονέλα προκαλεί κυρίως εντερίτιδα και ασθένειες που μοιάζουν με τύφο.

#### 2.1.1 Ταξινομική θέση

Η *Salmonella* είναι ένα εντερικό παθογόνο που ανήκει στην οικογένεια Enterobacteriaceae. Αποτελείται από δύο μόνο είδη, τη *Salmonella enterica* και τη *Salmonella bongori*. Το πρώτο είδος χωρίζεται σε έξι υποείδη με περίπου 2500 ορότυπους, το σημαντικότερο από τα οποία είναι το *S. enterica* subsp. *enterica* (subspecies I) και που περιλαμβάνει τους τυφοειδείς και παρατυφοειδείς βάκιλλους. Μέλη των άλλων πέντε υποειδών (II-VI) απαντώνται στο φυσικό περιβάλλον και είναι κατά κύριο λόγο παράσιτα των ψυχρόαιμων ζώων. Η *Salmonella bongori* έχει 22 ορότυπους (Grimont and Weill, 2007).

Διαθέτει δύο ομάδες αντιγόνων: ένα βλεφαριδικό (H αντιγόνο) και έναν θερμοσταθερό πολυσακχαρίτη, γνωστόν ως σωματικό (O αντιγόνο). Μερικές σαλμονέλες παράγουν μια επιφάνεια πολυσακχαρίτη, με χαρακτηριστικότερο παράδειγμα τη *S. typhi* όπου το αντιγόνο Vi είναι απαραίτητο για την αναγνώρισή της. Η αντιγονική δομή οποιασδήποτε σαλμονέλας εκφράζεται ως μια αντιγονική φόρμουλα αποτελούμενη από τρία μέρη. Αυτά τα συστατικά είναι:

- Τα αντιγόνα O (λιποπολυσακχαρίτης του κυτταρικού τοιχώματος)
- Τα αντιγόνα H φάσης 1 (πρωτεϊνικής σύστασης)
- Τα αντιγόνα H φάσης 2 (πρωτεϊνικής σύστασης)

Αυτό το σχήμα, που αναπτύχθηκε από τον White (1929) και τροποποιήθηκε από τον Kaufmann, τοποθετεί τις *Salmonellae* σε 30 ομάδες.

Η πρωταρχική αναγνώριση των ειδών σαλμονέλας περιελάμβανε μια περιγραφή της ασθένειας που προκάλεσε ή τον ξενιστή με τον οποίο συσχετίστηκε ο ορότυπος, προσέγγιση που οδήγησε σε μεγάλα προβλήματα. Αυτές οι αστοχίες ξεπεράστηκαν με την εισαγωγή ενός νέου συστήματος, στο οποίο κάθε νέος τύπος σαλμονέλας πήρε το όνομά του από το μέρος στο οποίο απομονώθηκε για πρώτη φορά. Ο πρώτος δημοσιευμένος πίνακας περιείχε 20 περίπου ορότυπους, πλήθος που αυξήθηκε σε 2399 το 1995 (Poroff et al., 1995).

Με την εισαγωγή πιο σύγχρονων ταξινομικών τεχνικών (Le Minor et al., 1982a; Le Minor et al., 1982b) προτάθηκε ότι όλοι οι ορότυποι ανήκαν πιθανώς σε μία ομάδα DNA-υβριδισμού, εντός της οποίας τακτοποιήθηκαν επτά υποομάδες (*S. enterica* subsp. *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae*, *bongori* and *indica*).

### 2.1.2 Μεταβολισμός & Φυσιολογία

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, τα βακτήρια του γένους *Salmonella* είναι προαιρετικά αναερόβια και θετικά στην καταλάση, αρνητικά στην οξειδάση ενώ ζυμώνουν τη γλυκόζη, τη μαννιτόλη και τη σορβιτόλη προς παραγωγή αποκλειστικά οξέος, ή οξέος και αερίων. Ενώ το είδος *S. arizonae* είναι σε θέση να ζυμώσει τη λακτόζη, αποτελεί την εξαίρεση και όχι τον κανόνα. Σαν ομάδα έχουν την ικανότητα να ζυμώνουν τη σακχαρόζη, χωρίς ωστόσο να σχηματίζουν ινδόλη. Επίσης, δεν υδρολύουν την ουρία ούτε απαμινώνουν τη φαινυλαλανίνη, όμως συνήθως σχηματίζουν H<sub>2</sub>S σε άγαρ σιδήρου τριπλού σακχάρου (TSI Agar) και μπορούν να αξιοποιήσουν κιτρικό οξύ ως μοναδική πηγή άνθρακα.

Όλα τα είδη σχηματίζουν αποκαρβοξυλάσες λυσίνης και ορνιθίνης, εκτός από τα είδη *S. paratyphi* A και *S. typhi*. Ακόμη, αποδίδουν αρνητικό Voges-Proskauer και θετικό ερυθρό του μεθυλίου και δεν παράγουν οξειδίο του κυτοχρώματος.

### 2.1.3 *Salmonella* Enteritidis

(Πηγή: Batt & Tortorello, 2014)

Υψηλά επίπεδα ενεργότητας ύδατος ( $a_w$  πάνω από 0,93) προάγουν την επιβίωση και την ανάπτυξη του συγκεκριμένου είδους, τόσο σε τρόφιμα όσο και σε βιότοπους, ωστόσο υπάρχουν στοιχεία που επιβεβαιώνουν την επιβίωσή του και για εκτεταμένο διάστημα μετά από διεργασίες ξήρανσης. Αντίθετα, αυτό το παθογόνο είναι χαρακτηριστικά ευαίσθητο στη θερμότητα και έτσι καταστρέφεται εύκολα με σχολαστικό μαγείρεμα ή παστερίωση.

Η *Salmonella* Enteritidis έχει χαμηλές διατροφικές απαιτήσεις, με αποτέλεσμα τα μέσα καλλιέργειας που παρέχουν πηγές άνθρακα και αζώτου να μπορούν να υποστηρίξουν την ανάπτυξη. Στα περισσότερα στερεά υποστρώματα οι αποικίες έχουν διάμετρο 2-4 mm, είναι στρογγυλές με λείες άκρες, ελαφρώς ανασηκωμένες και γυαλιστερές. Μεταβολικά, ζυμώνει γλυκόζη προς παραγωγή οξέων και αερίων,

γαλακτιτόλη, μαννιτόλη και μαλτόζη, όμως όχι λακτόζη, σακχαρόζη, μηλονικό οξύ ή σαλικίνη.

Πρόκειται για έναν συχνά αναφερόμενο παράγοντα τροφιμογενούς ζωονοσογόνους λοίμωξης που μεταδίδεται από τα πουλερικά στον άνθρωπο. Διάφοροι ξενιστές ασπόνδυλων και σπονδυλωτών, ωστόσο, χρησιμεύουν ως φυσικές «δεξαμενές» συμπεριλαμβανομένων των εντόμων, ερπετών, άγριων πτηνών και τρωκτικών. Νεοεκκολαφθέντα κοτόπουλα είναι πολύ ευαίσθητα σε λοίμωξη πριν αποκτήσουν μια πλήρη και προστατευτική εντερική μικροχλωρίδα από το ενδιαίτημά τους, η οποία αποκλείει ανταγωνιστικά τον αποικισμό της *S. Enteritidis*. Νεοσσοί που εκτέθηκαν κατά την πρώτη εβδομάδα ζωής αποδείχθηκε όταν παρέμειναν μολυσμένοι για πολλούς μήνες. Παρόλα αυτά, το συγκεκριμένο παθογόνο είδος είναι ιδιαίτερα επεμβατικό σε όλες τις ηλικιακές ομάδες καθώς η εισβολή μέσω του εντερικού επιθηλίου προκαλεί διάχυτη συστηματική λοίμωξη και αποικισμό σε ποικίλα εσωτερικά όργανα.

Μείζονος σημασίας για τη δημόσια υγεία αποτελούν ευρήματα που συσχετίζουν αρκετούς παράγοντας λοιμογόνου δράσης με την παθογόνο συμπεριφορά σε κοτόπουλα. Τόσο οι ενδοτοξίνες, όσο και οι εξωτοξίνες παίζουν σημαντικό ρόλο. Συγκεκριμένα, η ενδοτοξίνη που εμπλέκεται με τον λιποπολυσακχαρίτη του κυτταρικού τοιχώματος (LPS) ενισχύει την αντίσταση στην επίθεση και την πέψη από τα φαγοκύτταρα του ξενιστή. Η ικανότητα ολοκληρωμένης σύνθεσης LPS είναι απαραίτητη για την επεμβατικότητα. Θερμικά ασταθείς, πρωτεϊνούχες εξωτοξίνες εμπλέκονται επίσης στη λοιμογόνο δύναμη της *S. Enteritidis*. Η κυτταροτοξίνη αναστέλλει την πρωτεϊνική σύνθεση και προκαλεί δομική βλάβη στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου. Επιπλέον, υπάρχουν ενδείξεις ότι τα μαστίγια που διαθέτει το βακτήριο έχουν την ικανότητα να προσκολληθούν στο έντερο και να εισβάλλουν σε εσωτερικά όργανα.

#### **2.1.4 Σαλμονέλωση**

Ως σαλμονέλωση ορίζεται μια τροφιμογενής ασθένεια που προκαλεί εντερίτιδα ή, πιο κρίσιμα, τυφοειδή πυρετό. Στην τελευταία έκθεση του Ευρωπαϊκού Κέντρου Πρόληψης και Ελέγχου Νόσων (ECDC, 2015), αναγνωρίστηκε ως ο συχνότερα ανιχνευμένος αιτιολογικός παράγοντας στις τροφιμογενείς επιδημίες που αναφέρθηκαν (22.5% των συνολικών κρουσμάτων), με 82.000 καταγεγραμμένες ανθρώπινες περιπτώσεις. Επιπλέον, η EFSA (2014) εκτίμησε ότι η συνολική οικονομική επιβάρυνση της ανθρώπινης σαλμονέλωσης θα μπορούσε να φτάσει τα 3 δισεκατομμύρια ευρώ ετησίως, αναδεικνύοντας τις πολυδιάστατες συνέπειες τόσο υγειονομικά όσο και οικονομικά. Γενικότερα, η *Salmonella* είναι ένας από τους παθογόνους μικροοργανισμούς που μπορούν εύκολα να μολύνουν μια σειρά προϊόντων διατροφής και μπορούν επίσης να επιμείνουν και να αυξηθούν σε οποιοδήποτε σημείο από την παραγωγή έως την κατανάλωση (Domenech et al., 2015).



### 2.1.5 Γονίδια σαλμονέλας

Μικροοργανισμός	Γονίδιο	Λειτουργία
<i>Salmonella enterica</i> serovar Enteritidis	<i>sdiA</i>	Αίσθημα απαρτίας (Quorum sensing)
	<i>sipA</i>	Πρωτεΐνη κυτταρικής εισβολής (Cell invasion protein)
	<i>flhD</i>	Ρυθμιστής βιοσύνθεσης μαστιγίων (Regulator of flagellar biosynthesis)

#### Γονίδιο *sdiA*

Αρκετά είδη του γένους *Salmonella* παραμένουν η κύρια αιτία γαστρεντερικών λοιμώξεων. Συγκεκριμένα, στην ΕΕ η *Salmonella enterica* Typhimurium και η *Salmonella enterica* Enteritidis είναι από τους συχνότερα απομονωμένους ορότυπους (Dourou et al., 2011). Η παθογένεια εξαρτάται κυρίως από τους παράγοντες λοιμογόνου δράσης της που ελέγχονται από χρωμοσωμικούς ή πλασμιδικούς καθοριστικούς συντελεστές (Swamy et al., 1996). Σε δυσμενή περιβάλλοντα η σαλμονέλα είναι ικανή να σχηματίζει βιοϋμένια (biofilm), τα οποία της επιτρέπουν να επιβιώσει και να εξαπλωθεί μακριά από τον ξενιστή (Janssens et al., 2008). Τόσο η παραγωγή βιοϋμενίων όσο και η παθογένεια ελέγχονται και ρυθμίζονται από τα λεγόμενα συστήματα «αίσθησης απαρτίας» (Quorum Sensing, QS) (Halatsi et al., 2006; Williams, 2006).

Το «QS» αφορά την παραγωγή διάχυτων μορίων σηματοδότησης χαμηλού μοριακού βάρους που ονομάζονται αυτοεπαγωγείς (Auto-Inducers, AI). Όταν επιτυγχάνεται ένα κρίσιμο επίπεδο τέτοιων μορίων, οι μικροοργανισμοί που αναγνωρίζουν το σήμα αισθάνονται την «απαρτία» βακτηρίων και κατά συνέπεια ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων υπέρ της επιβίωσης του πληθυσμού (Federle and Bassler, 2003; Smith et al., 2004).

Σε πολλά αρνητικά κατά Gram βακτήρια η ανίχνευση απαρτίας σηματοδοτείται από μόρια τύπου λακτόνης ακυλομοσερίνης (AHLs) που γενικά ονομάζονται «αυτοεπαγωγέας-1» (AI-1). Οι πρωτεΐνες της οικογένειας LuxI χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση μορίου AHL και οι πρωτεΐνες της οικογένειας LuxR για τη σύνδεση του AHL και τη ρύθμιση της μεταγραφής. Τα AHL παράγονται εντός του κυττάρου από βακτηριακές συνθάσες AHL (ένζυμα τύπου LuxI) και μεταφέρονται στο εξωτερικό περιβάλλον. Καθώς ο αριθμός των βακτηρίων αυξάνεται, αυξάνεται και η εξωτερική συγκέντρωση των AHL. Όταν τα AHL φτάσουν σε ένα επίπεδο κατωφλίου, τα μόρια εισέρχονται ξανά στα κύτταρα και συνδέονται με τις πρωτεΐνες των υποδοχέων τους (πρωτεΐνες τύπου LuxR). Το σύμπλεγμα AHL-LuxR σχηματίζει διμερή ή πολυμερή και δεσμεύει το DNA σε συγκεκριμένες αλληλουχίες προαγωγών γονιδίων που ακολουθούνται από ενεργοποίηση ή καταστολή της μεταγραφής του γονιδίου στόχου (Williams, 2007). Τα γονίδια που ρυθμίζονται από την ανίχνευση απαρτίας συχνά

κωδικοποιούν λειτουργίες που είναι πιο αποτελεσματικές όταν μια ομάδα βακτηρίων συνεργάζεται (π.χ. σχηματισμός βιοϋμενίων, αλληλεπιδράσεις ξενιστή) (Sabag-Daigle et al., 2015).

Η σαλμονέλα δεν διαθέτει LuxI και επομένως δεν παράγει AHL. Ωστόσο, περιέχει έναν υποδοχέα της οικογένειας LuxR (κατασταλτικός αναστολέας κυτταρικής διαίρεσης), γνωστό ως sdiA, ο οποίος μπορεί να δεσμεύσει τα AHLs που παράγονται από άλλα βακτηριακά είδη και έτσι επιτρέπει την ανίχνευση σημάτων από τα διάφορα μικρόβια με σκοπό την ρύθμιση της γονιδιακής μεταγραφής. Το χρωμοσωμικό γονίδιο sdiA δύναται να χρησιμοποιηθεί ως βάση ενός συστήματος ανίχνευσης αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) για τη σαλμονέλα (Smith et al., 2011). Ρυθμίζει δύο ειδικούς «τόπους» (τόπος ορίζεται ως μια συγκεκριμένη, σταθερή θέση σε ένα χρωμόσωμα όπου βρίσκεται ένα συγκεκριμένο γονίδιο ή γενετικός δείκτης) που πιθανώς εμπλέκονται με την εντερική επιβίωση ή αποικισμό (Turki et al., 2014).

Ειδικότερα, ρυθμίζει το γονίδιο srcE (γονίδιο E) και την ενεργοποίηση του γονιδίου rck (αντίσταση στην θανάτωση) όταν υπάρχουν εξωγενή AHLs. Η πρωτεΐνη rck συμμετέχει στη λοιμογόνο δράση της σαλμονέλας, καθώς προκαλεί αντίσταση στη θανάτωση και επιτρέπει την προσκόλληση και την εισβολή στα επιθηλιακά κύτταρα (Smith et al., 2011).

### Γονίδιο sipA

Η ικανότητα εισόδου και επιβίωσης στα κύτταρα-ξενιστές είναι απαραίτητη προϋπόθεση για τη λοιμογόνο δράση της σαλμονέλας. Η εισβολή στα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα είναι ένα σημαντικό πρώιμο γεγονός στην παθογένεσή της και προκαλείται από την παροχή μιας σειράς πρωτεϊνών βακτηριακής λοιμογόνου δράσης (invasion proteins), συμπεριλαμβανομένων των sipA, sipB, sipC, sipD. Αυτές εξάγονται κατά μήκος του βακτηριακού κυτταρικού περιβλήματος και μεταφέρονται στη πλασματική μεμβράνη των κυττάρων-ξενιστών ή στο κυτταρόπλασμα, από όπου διεγείρουν τις κυτταροσκελετικές αναδιατάξεις στο σημείο της βακτηριακής επαφής (McGhie et al., 2004). Έτσι, προκύπτει η εσωτερίκευση του παθογόνου σε ένα κενοτόπιο προς σύνδεση με τη μεμβράνη (Finlay and Cossart, 1997).

Ειδικότερα, το γονίδιο sipA αφορά μια πρωτεΐνη ικανή να δεσμεύει την ακτίνη στον κυτταροσκελετό του κυττάρου ξενιστή. Διεγείρει τον πολυμερισμό της ακτίνης, εξουδετερώνει τις αποσταθεροποιητικές πρωτεΐνες της F-ακτίνης και παράλληλα ενισχύει τη δραστηριότητα της sipC, η οποία συναπαιτείται για την επίτευξη αποτελεσματικής βακτηριακής εσωτερίκευσης. In vitro, σχηματίζει ένα σύμπλεγμα με την πρωτεΐνη T-πλαστίνη του κυττάρου ξενιστή, αυξάνοντας τη δέσμευση ακτίνης. Αναστέλλει τον κατευθυνόμενο από ADF/κοφιλίνη αποπολυμερισμό, τόσο αποτρέποντας τη δέσμευση του ADF και της κοφιλίνης όσο και την εκτόπισή τους από την F-ακτίνη.

Ο πολυμερισμός της ακτίνης είναι απαραίτητος για την είσοδο στα κύτταρα της σαλμονέλας. Οι εστίες πυρήνωσης της ακτίνης επάγονται κάτω από τα εισβάλλοντα βακτήρια και ξεκινούν τη δημιουργία υπομεμβρανωδών νημάτων ακτίνης (F-ακτίνη), τα

οποία με τη σειρά τους συμπυκνώνονται για να σχηματίσουν ενδοκυτταρικά δίκτυα. Η κεντρική διαμόρφωση του κυτταροσκελετού κατά την έναρξη αυτής της διαδικασίας κατευθύνεται από δύο πρωτεΐνες εισβολής σαλμονέλας, τις SipC και SipA (Hayward and Koronakis, 1999). Αν και η sipC είναι απαραίτητη για την εσωτερίκευση του παθογόνου (Kaniga et al., 1995), η sipA δεν είναι απαραίτητη αλλά ενισχύει την αποτελεσματικότητα της διαδικασίας εισόδου (Zhou et al., 1999a).

Οι sipC και sipA αλληλεπιδρούν άμεσα με την ακτίνη και μπορούν να ρυθμίσουν τη δυναμική της ανεξάρτητα, είτε επιταχύνοντας τη συναρμολόγηση του νήματος είτε αναστέλλοντας την αποσυναρμολόγηση, αντίστοιχα. (Hayward and Koronakis, 1999).

Αρκετές μελέτες έχουν οδηγήσει στην ταυτοποίηση γονιδίων που απαιτούνται για την παθογένεση της σαλμονέλας. Πολλά από αυτά τα μολυσματικά γονίδια και οπερόνια βρίσκονται σε μεγάλα γενετικά στοιχεία του χρωμοσώματος, γνωστά ως «νησίδες παθογένειας» (Pathogenicity Islands, PAIs). Τουλάχιστον πέντε νησίδες παθογένειας έχουν εντοπιστεί στη σαλμονέλα (Mills et al., 1995; Ochman et al., 1996, Galán και Curtiss, 1989) Το νησί I (SPI-1) απαιτείται για την είσοδο της σαλμονέλας στα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα του ξενιστή (Higashide et al., 2002).

Το SPI-1 κωδικοποιεί συστήματα έκκρισης και μετατόπισης πρωτεΐνης τύπου III. Τουλάχιστον 13 πρωτεΐνες που χορηγούνται από το σύστημα έκκρισης τύπου III SPI-1 έχουν ταυτοποιηθεί, εκ των οποίων και οι sipA και sipC. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας μόλυνσης αυτές οι πρωτεΐνες πιστεύεται ότι μετατοπίζονται στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου ξενιστή, όπου εμπλέκουν συστατικά του κυττάρου ξενιστή για να προωθήσουν την βακτηριακή πρόσληψη (Galán and Zhou, 2000).

### **Γονίδιο flhD**

Ένας από τους παράγοντες λοιμογόνου δράσης που εμπλέκονται στην αρχική φάση της διαδικασίας μόλυνσης είναι τα μαστίγια. Τα μαστίγια είναι μακριά ελικοειδή, περιστρεφόμενα «εξαρθήματα» που βρίσκονται στην επιφάνεια του βακτηριακού κυττάρου και του επιτρέπουν να κολυμπάει σε υγρά και να μετακινείται πάνω σε στερεές επιφάνειες (Das et al., 2018). Η κινητικότητα των μαστιγίων απαιτείται για τον αποικισμό της σαλμονέλας (Josenhans and Suerbaum, 2002). Μαζί με τη χημειοταξία (κίνηση κυττάρων ή οργανισμών ως απάντηση σε χημικά από τα οποία τα κύτταρα προσελκύνονται ή απωθούνται) και τις κινητικές πρωτεΐνες που βοηθούν το βακτήριο να αισθανθεί το περιβάλλον και να κινηθεί προς την κατάλληλη κατεύθυνση (Das et al., 2018), αποτελούν ένα από τα κρίσιμα χαρακτηριστικά με τα οποία τα εν λόγω βακτήρια επιβιώνουν σε μια μεγάλη ποικιλία περιβαλλόντων (Soutourina and Bertin, 2003).

Υπάρχει ένας αριθμός γονιδίων που είναι άμεσα υπεύθυνα για την δομή και τη συναρμολόγηση των βακτηριακών μαστιγίων και της ομαλής λειτουργίας τους στη χημειοταξία. Ο χαρακτηρισμός τους οδήγησε στην ανακάλυψη ότι ο ρυθμιστής αποτελείται από μια ιεραρχία συντονισμένα μεταγραφόμενων γονιδίων (Kutsukake et al., 1990). Τα δομικά γονίδια εκχωρούνται σε τρεις κλάσεις πρώιμης, μέσης και όψιμης

διαμόρφωσης ανάλογα με το πότε τα «προϊόντα» τους χρειάζονται (Chilcott and Hughes, 2000). Με άλλα λόγια, οι υπεύθυνοι για την έκφραση των μαστιγωδών γονιδίων προαγωγείς κατατάσσονται σε τρεις τάξεις (Τάξη 1, Τάξη 2, Τάξη 3) σύμφωνα με την χρονική τους έκφραση μετά την επαγωγή του ρυθμιστή (Karlinsey et al., 2000).

Στην κορυφή της μεταγραφικής ιεραρχίας βρίσκεται το κύριο οπερόνιο των μαστιγίων, επονομαζόμενο ως *flhDC*, από το οποίο ελέγχεται η θεμελιώδης απόφαση για την παραγωγή μαστιγίων. Το συγκεκριμένο οπερόνιο εκφράζεται από αυτό που ορίζεται ως προαγωγέας «Τάξης 1». Ένας αριθμός ευρέων ρυθμιστικών σημάτων επηρεάζει τη μεταγραφή του *flhDC*, ο οποίος έχει αποδειχθεί πως περιέχει έξι διαφορετικές εναρκτήριες τοποθεσίες μεταγραφής (Yanagihara et al., 1999).

Οι πρωτεΐνες *flhD* και *flhC* σχηματίζουν ένα ετεροπολυμερές σύμπλοκο (*flhD<sub>2</sub>C<sub>2</sub>*) που δρα ως μεταγραφικός ενεργοποιητής ώστε να προάγει την  $\sigma^{70}$ -εξαρτώμενη μεταγραφή από τους προαγωγείς μαστιγίων «Τάξης 2» (Liu and Matsumura, 1996). Οι προαγωγείς «Τάξης 2» κατευθύνουν τη μεταγραφή των γονιδίων μέσης διαμόρφωσης που απαιτούνται για τη συναρμολόγηση της δομής άγκιστρου-βασικού σώματος (HBB – hook/basal body). Το σύμπλεγμα *flhDC* δρα επίσης προκειμένου να κατασταλεί αυτόματα η μεταγραφή του προαγωγέα «Τάξης 1» (Kutsukake, 1997).

## 2.2 Οξυγαλακτικά βακτήρια

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια έχουν παραδοσιακά συσχετιστεί με τις ζυμώσεις τροφίμων και, γενικά, θεωρούνται ευεργετικοί μικροοργανισμοί. Ορισμένα στελέχη, μάλιστα, έχει αποδειχθεί πως προάγουν την υγεία (προβιοτικά). Ωστόσο, κάποια γένη (*Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Carnobacterium* etc.) περιέχουν είδη ή στελέχη αναγνωρισμένα ως παθογόνα για τον άνθρωπο.

### 2.2.3 Χαρακτηριστικά της φυσιολογίας

Σύμφωνα με τον Orla-Jansen (1942), τα LAB ορίζονται ως ένα σύνολο θετικών κατά Gram βακτηρίων, με κοινά μορφολογικά, μεταβολικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά. Είναι βάκιλοι και κόκκοι μη-σπορογόνοι, οι οποίοι παράγουν γαλακτικό οξύ ως ένα από τα κύρια προϊόντα ζύμωσης των υδατανθράκων και των ανώτερων αλκοολών (Axelsson, 2004; Stiles and Holzapfel, 1997). Ορισμένα στελέχη LAB θεωρούνται επίσης πιθανά προβιοτικά και πολλά διατίθενται στο εμπόριο σε προβιοτικά παρασκευάσματα ή/και προϊόντα.

Τα μέλη της ομάδας αυτής δε διαθέτουν πορφυρίνες και κυτοχρώματα, δεν εκτελούν οξειδωτική φωσφορυλίωση και κατά συνέπεια αποκτούν ενέργεια μόνο με φωσφορυλίωση σε επίπεδο υποστρώματος (Law, 1997). Ανήκουν στα προαιρετικά αναερόβια βακτήρια και είναι αρνητικά στη δοκιμή της καταλάσης.

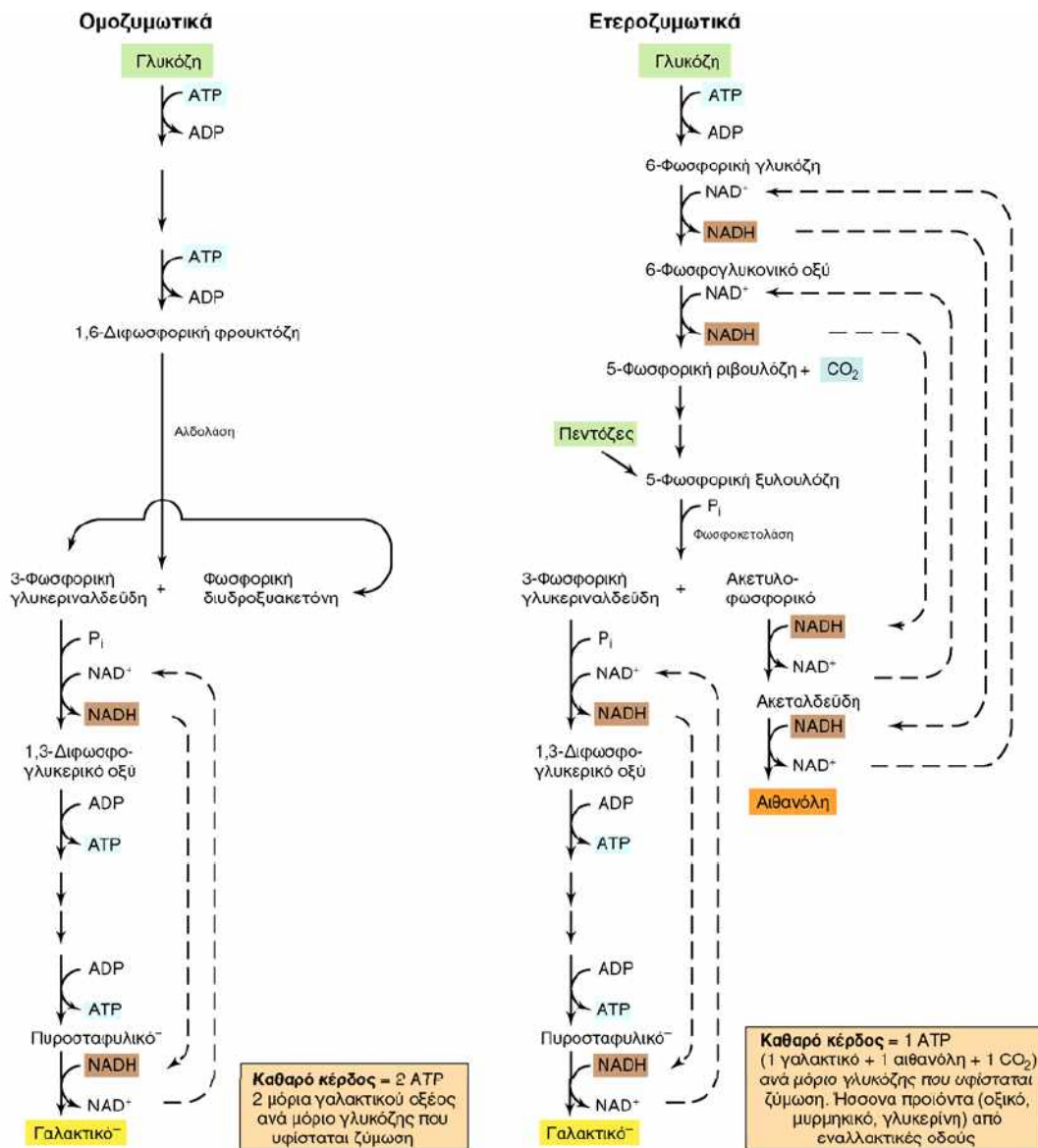
Τα περισσότερα οξυγαλακτικά βακτήρια παίρνουν ενέργεια μόνο από το μεταβολισμό σακχάρων και αναγκαστικά περιορίζονται σε ενδαιτήματα όπου υπάρχουν σάκχαρα. Συνήθως διαθέτουν περιορισμένες βιοσυνθετικές ικανότητες, ενώ οι σύνθετες

διατροφικές απαιτήσεις τους περιλαμβάνουν αμινοξέα, πουρίνες και πυριμιδίνες (Pfeiler and Klaenhammer, 2007). Στην πλειονότητά τους δεν είναι ικανά για κίνηση, με εξαίρεση μεμονωμένες περιπτώσεις βακίλων που φέρουν περίτριχα μαστίγια. Η αναλογία G+C (γουανίνη + κυτοσίνη) στο μόριο του DNA τους είναι μικρότερη του 50 mol% (Wood and Holzapfel, 1995).

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια έχουν βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης μεταξύ 30-40 °C. Είναι ανθεκτικά στα οξέα (έχει σημειωθεί ανάπτυξη ορισμένων ειδών ακόμα και σε pH 3,5) αν και έχουν βέλτιστη τιμή ανάπτυξης στην περιοχή τιμών από 5,0 μέχρι 7,0. Στην αλκαλική περιοχή τιμών pH ο ρυθμός ανάπτυξής τους μειώνεται σημαντικά (Tannock, 1999).

Μια σημαντική διαφορά μεταξύ των διάφορων υποομάδων των οξυγαλακτικών βακτηρίων αφορά στη φύση των προϊόντων που σχηματίζονται από τη ζύμωση των σακχάρων. Η μία ομάδα που ονομάζεται «ομοζυμωτική», παράγει ένα και μόνο προϊόν ζύμωσης, το γαλακτικό οξύ, ενώ η άλλη ομάδα που ονομάζεται «ετεροζυμωτική», παράγει εκτός από γαλακτικό οξύ και αιθανόλη, οξικό οξύ και διοξειδίο του άνθρακα (Σχήμα 2.1). Επειδή τα ετεροζυμωτικά βακτήρια δε διαθέτουν αλδολάση, δεν μπορούν να διασπάσουν τη δις-φωσφορική φρουκτόζη προς φωσφορική τριόζη (γλυκόλυση). Αντίθετα, οξειδώνουν την 6-φωσφορική γλυκόζη προς 6-φωσφογλυκονικό οξύ και κατόπιν το αποκαρβοξυλιώνουν προς φωσφορική πεντόζη, η οποία διασπάται σε φωσφορική τριόζη και ακέτυλο-φωσφορικό οξύ με τη βοήθεια του ενζύμου φωσφοκετολάση.

Στα ετεροζυμωτικά βακτήρια, η φωσφορική τριόζη μετατρέπεται τελικά σε γαλακτικό οξύ με την παραγωγή 1 mol τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP), ενώ το ακέτυλο-φωσφορικό οξύ προσλαμβάνει ηλεκτρόνια από το νικοτινάμιδο-αδένινο-δινουκλεοτίδιο (NADH) που δημιουργείται κατά την παραγωγή της φωσφορικής πεντόζης και μετατρέπεται κατόπιν σε αιθανόλη δίχως να παράγεται ATP. Εξαιτίας αυτού, τα ετεροζυμωτικά βακτήρια παράγουν μόνο 1 mol ATP από γλυκόζη αντί των 2 mol που παράγουν τα ομοζυμωτικά. Επειδή τα ετεροζυμωτικά βακτήρια αποκαρβοξυλιώνουν το 6-φωσφο-γλυκονικό οξύ, παράγουν CO<sub>2</sub> ως προϊόν ζύμωσης, ενώ τα ομοζυμωτικά παράγουν ελάχιστο ή καθόλου CO<sub>2</sub>.



**Σχήμα 2.1.** Η ζύμωση της γλυκόζης από ομοζυμωτικά και ετεροζυμωτικά οξυγαλακτικά βακτήρια. Δεν συντίθεται ATP από αντιδράσεις που οδηγούν στο σχηματισμό αιθανόλης. Παρουσία οξυγόνου, πολλά ετεροζυμωτικά οξυγαλακτικά βακτήρια έχουν την ικανότητα αναγωγής του οξυγόνου με NADH (μέσω φλαβινοενζύμων, ως ενδιάμεσων), σχηματίζοντας νερό. Τότε παράγεται οξικό οξύ αντί της αιθανόλης, και έτσι είναι δυνατή η παραγωγή ενός επιπλέον μορίου ATP (Brock, 2003).

## 2.2.4 Το γένος *Lactobacillus*

Τα μέλη του γένους *Lactobacillus* είναι προαιρετικά αναερόβια, ραβδόμορφα, θετικά κατά Gram βακτήρια. Ο μεταβολισμός τους είναι συνήθως ταξινομημένος ως υποχρεωτικά ομοζυμωτικός ή προαιρετικά/υποχρεωτικά ετεροζυμωτικός.

Οι γαλακτοβάκιλοι εντοπίζονται συνήθως σε ποικίλα περιβάλλοντα πλούσια σε υδατάνθρακες και λοιπά θρεπτικά συστατικά, συμπεριλαμβανομένων και των γαλακτοκομικών, από τα οποία προήλθε και η ονομασία τους, καθώς επίσης και σε φυτά

ή υλικά φυτικής προέλευσης, σε ανθρωπογενείς οικότοπους και σε ζυμούμενα ή αλλοιωμένα τρόφιμα. Η πολλαπλότητα των ενδαιτημάτων των γαλακτοβακίλων αντανάκλαται στην ποικιλομορφία και την ετερογενή φυλογονία του γένους (Ibrahim and Ouwehand, 2019). Το γένος περιλαμβάνει σήμερα 315 είδη (LPSN 2021), μεταξύ των οποίων ανήκουν ορισμένα πιο διαδεδομένα είδη όπως ο *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. brevis*, *L. backii*, *L. harbinensis*, *L. plantarum* και *L. salivarius*. (Morovic, 2016).

Το φυλογενετικό δέντρο του γένους *Lactobacillus* είναι πολύπλοκο και διαπερνάται από άλλα γένη όπως τα *Leuconostoc*, *Oenococcus* και *Pediococcus*, όλα μέλη της τάξης *Lactobacillales* (Zheng et al., 2015).

### 2.2.3 *Lactiplantibacillus plantarum* (*Lactobacillus plantarum*)

Πρόκειται για ένα ραβδόμορφο, προαιρετικά ετεροζυμωτικό λακτοβάκιλλο που εντοπίζεται σε πολλά ενδαιτήματα με ευρείες εφαρμογές, κυρίως λόγω του προβιοτικού προφίλ του. Έχει βρεθεί σε μεγάλη ποικιλία ζυμωμένων τροφίμων και αποτελεί μέρος της φυσιολογικής μικροχλωρίδας του ανθρώπου και διαφόρων ζωικών οργανισμών.

Αρχικά, ονομάστηκε ως *Streptobacterium plantarum* το 1919 και μετονομάστηκε σε *L. plantarum* από τον Pederson (1936), ο οποίος περιέγραψε αυτό το είδος λόγω ορισμένων βιοχημικών και μορφολογικών χαρακτηριστικών. Πιο συγκεκριμένα, ζυμώνει συνήθως εξόξες μέσω της μεταβολικής οδού EMP με αποτέλεσμα το σχηματισμό D- και L- γαλακτικών οξέων. Επιπλέον, οι πεντόζες ζυμώνονται για να σχηματίσουν γαλακτικό και οξικό οξύ παρουσία επαγωγίμης φωσφοκετολάσης (Todorov et al., 2010).

Τα είδη *L. plantarum*, *L. pentosus* και *L. paraplantarum* συνδέονται στενά γονοτυπικά και εμφανίζουν παρόμοιους φαινοτύπους, για αυτό και γίνεται συχνά λάθος ως προς την διάκρισή τους. Η γενετική ετερογένεια της ομάδας *L. plantarum* έχει αποδειχθεί από τους Dellaglio et al. (1975) με βάση τα δεδομένα υβριδισμού DNA-DNA. Ορολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι τα περισσότερα στελέχη του *L. plantarum* ανήκουν στην ορολογική ομάδα B, καθώς περιέχουν ριβιτόλη και τειχοϊκό οξύ στα κυτταρικά τους τοιχώματα (Sharpe, 1955; Knox and Wicken, 1972).

Ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός ζυμώνει υδατάνθρακες όπως αμυγδαλίνη, κελλοβιόζη, εσκουλίνη, μαννιτόλη, μελιβιόζη, ραφινόζη, ριβόζη, σορβιτόλη και σουκρόζη σε ποσοστό μεγαλύτερο του 90%, ενώ αραβινόζη και ξυλόζη μεταξύ 11% και 89% (Vos et al., 2011). Ανιχνευτές ζάχαρης έχουν δείξει ότι η ζύμωση των σακχάρων είναι κυρίως ομογαλακτική με μερική ετερογαλακτική δραστηριότητα (παραγωγή οξικού οξέος). Οργανικά οξέα όπως το μηλικό, το οξικό και η αιθανόλη μπορούν να μεταβολιστούν εν μέρει με αποτέλεσμα την παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα (CO<sub>2</sub>), γαλακτικού και οξικού οξέος (Plumed-Ferrer et al., 2008).

Ως προς τη συμπεριφορά του, έχει παρουσιάσει ποικίλες αποκρίσεις σε ορισμένους παράγοντες καταπόνησης όπως το θερμικό σοκ (55°C για 10 λεπτά), χολή (0,5% oxgall<sup>®</sup>), οξειδωτικό στρες (0,1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), χαμηλή τιμή pH (2.5), αιθανόλη (10%), αλάτι (7,5% NaCl) και απορρυπαντικό (0.05% sodium dodecyl sulfate) (Parente et al., 2010).

Οι βακτηριοσίνες είναι βιολογικά ενεργές πρωτεΐνες που παρουσιάζουν βακτηριοκτόνο δράση έναντι ειδών που σχετίζονται στενά με το στέλεχος παραγωγής και μπορεί να βοηθήσουν στη μείωση της χρήσης χημικών συντηρητικών και την προαγωγή φυσικών παρεμβάσεων στη βιομηχανία τροφίμων (Todorov, 2009). Αρκετές βακτηριοσίνες του *L. plantarum* (οι περισσότερες ονομάζονται «plantaricins») έχουν χαρακτηριστεί μερικώς και μόνο σε ορισμένες από αυτές η αλληλουχία αμινοξέων τους έχει ολοκληρωθεί (Todorov, 2009).

### **2.3 Μικροχλωρίδα του εντέρου και γλυκαντικά**

Οι ευεργετικές επιδράσεις των γλυκαντικών στην υγεία έχουν αμφισβητηθεί τα τελευταία χρόνια, καθώς αναφορές επισημαίνουν ότι η κατανάλωσή τους μπορεί να μειώσει την ποικιλομορφία του μικροβιώματος του εντέρου και να βλάψει το μεταβολισμό της γλυκόζης οδηγώντας σε επίκτητη δυσανεξία (Suez et al., 2014). Η μεταβολική ικανότητα είναι η κύρια διαφορά της κοινής ζάχαρης με τις εμπορικές γλυκαντικές ουσίες, καθώς τα γλυκαντικά κυρίως δεν απορροφώνται από το έντερο αλλά μεταβολίζονται από τη μικροβιακή του χλωρίδα του και αποβάλλονται από το ανθρώπινο σώμα μέσω κοπράνων και ούρων. Κατά συνέπεια, συμβάλλουν ελάχιστα έως καθόλου στην πρόσληψη θερμίδων (Chattopadhyay et.al, 2014).

Σημαντικά αποτελέσματα δημοσιεύθηκαν το 2014 σχετικά με τα γλυκαντικά και τη μικροχλωρίδα του εντέρου, όταν οι Suez et al. κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι ορισμένες γλυκαντικές ουσίες μπορεί να επηρεάσουν το ανθρώπινο μικροβίωμα. Συγκεκριμένα, η έρευνα έδειξε ότι γλυκαντικά χαμηλών θερμίδων διαταράσσουν τη μικροχλωρίδα του εντέρου τόσο σε ποντίκια όσο και σε ανθρώπους χρησιμοποιώντας διάφορα μοντέλα και πειραματικές παρεμβάσεις (Suez et.al, 2014). Αυτά τα αποτελέσματα σε συνδυασμό με παλαιότερες μελέτες παρατήρησης και επιδημιολογικές μελέτες υποδηλώνουν ότι οι επιδράσεις των γλυκαντικών χαμηλών θερμίδων μπορεί να είναι ανεπαίσθητες και να συσσωρεύονται με την πάροδο του χρόνου. Με άλλα λόγια, αυτές οι επιδράσεις είναι πιθανό να χάνονται σε βραχυπρόθεσμες τυχαιοποιημένες ελεγχόμενες δοκιμές, μελέτες τύπου παρέμβασης ή όταν συγκρίνονται άμεσα με την κατανάλωση ζαχαρούχων ποτών (Nettleton, 2016).

Επιπλέον, το 2019, εξετάστηκαν οι επιδράσεις των γλυκαντικών στη μικροχλωρίδα του εντέρου λαμβάνοντας υπόψη τόσο πειραματικές μελέτες, όσο και κλινικές δοκιμές, και προέκυψε ότι μεταξύ των γλυκαντικών χωρίς θερμίδες, μόνο η σακχαρίνη και η σουκραλόζη μετατοπίζουν τους πληθυσμούς της μικροχλωρίδας του εντέρου, αν και χρειάζονται περισσότερες ανθρώπινες μελέτες για ασφαλή συμπεράσματα. Στα θρεπτικά γλυκαντικά, μόνο τα εκχυλίσματα στέβιας φαίνεται να επηρεάζουν τη σύνθεση της μικροχλωρίδας του εντέρου.

Προς το παρόν, δεν είναι γνωστοί οι ακριβείς μηχανισμοί με τους οποίους οι γλυκαντικές ουσίες χαμηλών θερμίδων διαταράσσουν τη μικροχλωρίδα του εντέρου. Στο μέλλον, απαιτούνται μελέτες που να αξιολογούν κάθε μεμονωμένο γλυκαντικό και τον αντίκτυπό τους στην υγεία και τις καταστάσεις μεταβολικών ασθενειών, καθώς τα κοινώς χρησιμοποιούμενα τεχνητά γλυκαντικά που έχουν εγκριθεί από τον WHO/FAO για χρήση



σε τρόφιμα όπως η ασπαρτάμη, σακχαρίνη, σουκραλόζη και κυκλαμικό έχουν το δικό τους μοναδικό μεταβολισμό (Cao, 2020).

Αν και ποικίλες επιδράσεις υγείας διαφόρων γλυκαντικών έχουν μελετηθεί διεξοδικά (π.χ τοξικότητα, αλλεργιογένεση), δεν έχουν εξακριβωθεί πιθανές έμμεσες επιδράσεις της χρήσης τους στην ασφάλεια και τη λειτουργικότητα των τροφίμων. Έχει αναφερθεί ότι η μερική ή ολική υποκατάσταση ζάχαρης μπορεί να αλλάξει τη χαρακτηριστική φόρμουλα και τις ιδιότητες των προϊόντων διατροφής και να επηρεάσει το δυναμικό ανάπτυξης των γαλακτικών βακτηρίων με προβιοτικό προφίλ καθώς και των παθογόνων βακτηρίων των τροφίμων, αλλά τα διαθέσιμα ερευνητικά δεδομένα είναι περιορισμένα (Lobete et al., 2017).

### 3. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ-ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 3.1 Οπτική Πυκνότητα (Optical Density, OD)

Οι μετρήσεις οπτικής πυκνότητας (OD) μικροβιακών υγρών καλλιιεργειών είναι μια καθιερωμένη τεχνική που χρησιμοποιείται στη βιοτεχνολογία για ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών (Monod, 1949), συμπεριλαμβανομένων των δοκιμών αντιμικροβιακής ευαισθησίας (AST) και ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC), καθώς και στην παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών. Εφόσον τέτοιες μετρήσεις βασίζονται στην ποσότητα φωτός που σκεδάζεται από την καλλιέργεια, η τιμή OD εξαρτάται από το μήκος κύματος φωτός που φτάνει στην καλλιέργεια. Θεωρητικά, θα μπορούσε να επιλεγεί οποιοδήποτε μήκος κύματος αρκεί να παραμείνει σταθερό για όλες τις μετρήσεις. Στην πράξη, οι μετρήσεις OD των καλλιιεργειών μικροοργανισμών γενικά εκτελούνται στα 600 nm. Αυτό επιτρέπει την αποφυγή οποιουδήποτε μήκους κύματος που αντιστοιχεί στην απορρόφηση μορίων στο μέσο ή στο εσωτερικό των βακτηρίων (π.χ. 230 nm και 260 – 280 nm για πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα, αντίστοιχα). Επιπλέον, τα 600 nm είναι ένας καλός συμβιβασμός μεταξύ της εύκολης διαθεσιμότητας φίλτρων στην αγορά και της εύκολης ανίχνευσης της σκέδασης φωτός, καθώς τα μεγαλύτερα μήκη κύματος δημιουργούν μικρότερη σκέδαση (Jethra, 1993). Οι μετρήσεις OD εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από το οπτικό σύστημα που χρησιμοποιείται και τη γεωμετρία του (π.χ. περιοχή και ευαισθησία του ανιχνευτή, απόσταση μεταξύ δείγματος και ανιχνευτή, κ.λπ.). Κατά συνέπεια, αποδεικνύεται ότι τα φασματοφωτόμετρα με διαφορετικές οπτικές διαμορφώσεις δίνουν διαφορετικές τιμές OD για την ίδια καλλιέργεια. Αν και οι περισσότερες βιοτεχνολογικές εφαρμογές εξακολουθούν να βασίζονται σε μετρήσεις OD, οι ερευνητές δείχνουν αυξημένο ενδιαφέρον για εναλλακτικές μεθόδους που προσφέρουν αναλυτική αναπαραγωγικότητα και επαναληψιμότητα για την παρακολούθηση της βακτηριακής ανάπτυξης και της απόκρισης στις χημικές ουσίες.

Στην ιδανική περίπτωση, οι βακτηριακές καλλιιεργειες αναπτύσσονται εκθετικά και η OD αυξάνεται ως συνάρτηση του  $\ln(OD)$ , όχι της ίδιας της OD. Ο ρυθμός ανάπτυξης είναι η αλλαγή στον αριθμό των κυττάρων ανά λεπτό, την οποία υπολογίζουμε ως τη μεταβολή της OD ανά λεπτό. Ωστόσο, η στιγμιαία αλλαγή είναι συνάρτηση του αριθμού των κυττάρων που υπάρχουν σε κάθε δεδομένη στιγμή (Hall et.al, 2014):

$$\frac{dN}{dt} = \alpha * N \quad (1)$$

όπου:

$N$  είναι ο αριθμός των κελιών τη στιγμή  $t$ ,

$\alpha$  είναι η πρώτης τάξης σταθερός ρυθμός ανάπτυξης.

Το  $\alpha$  είναι σε αντίστροφες μονάδες χρόνου, οπότε αν το  $t$  είναι σε λεπτά (min) ο ρυθμός ανάπτυξης είναι  $min^{-1}$ .

$$\frac{dN}{N} = \alpha * t \quad (2)$$

Όταν αυτό ενσωματωθεί από  $t_0 = 0$  και  $t = t$ , η σχέση γίνεται:

$$\ln \left( \frac{Nt}{N0} \right) = \alpha * (t-t_0) \quad (3)$$

όπου:

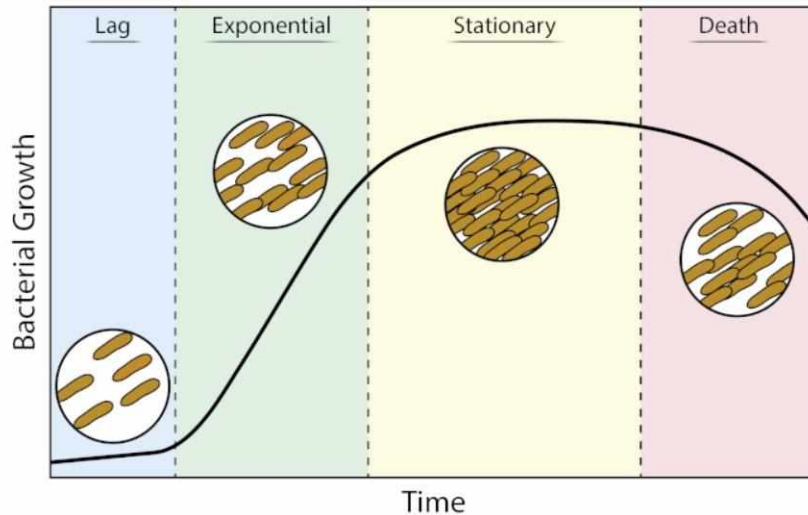
$\alpha$  είναι η κλίση του  $\ln(N)$  έναντι του  $t$ .

Κάποιοι από τους περιορισμούς που υπάρχουν σχετικά με τις μετρήσεις OD αφορούν το γεγονός ότι δεν λαμβάνεται υπόψιν η διαφορετικότητα της μορφολογίας των κυττάρων στον κάθε παράγοντα, τα νεκρά κύτταρα που υπολογίζονται στο σύνολο και η πιθανή οξειδωση του υλικού (διαφορά χρωματισμού εξαιτίας των υλικών). Η οξειδωση του υλικού αντιμετωπίζεται με την χρήση τυφλών κελιών (control, blanks, υλικό χωρίς τον εμβολιασμό με μικροοργανισμό).

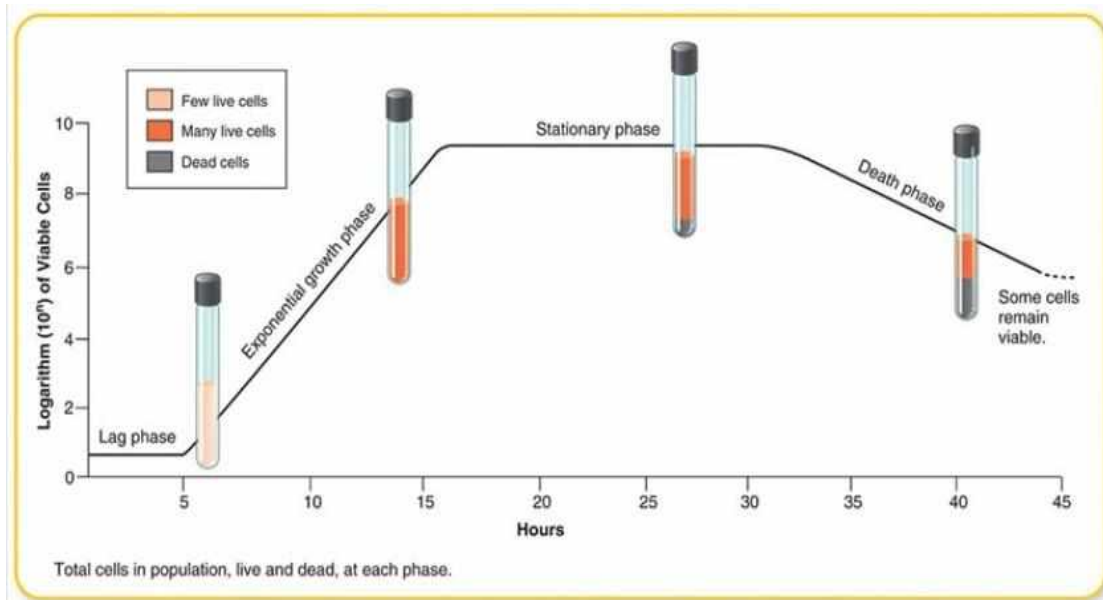
### 3.2 Μικροβιακή καμπύλη ανάπτυξης

Η μικροβιακή ανάπτυξη αποτελεί την πιο κοινή αιτία, τόσο αλλοίωσης των τροφίμων, όσο και τροφιμογενούς παθογένειας σε περίπτωση που εμπλέκονται παθογόνοι μικροοργανισμοί. Κατά συνέπεια, μοντέλα ανάπτυξης μικροβίων με τα αίτια και τις συνθήκες που μεταβάλλουν την εξέλιξή τους έχουν μελετηθεί εκτενώς.

Ακόμη, η μικροβιακή ανάπτυξη έχει περιγραφεί και με μια σειρά μαθηματικών μοντέλων. Οι ιδιότητές τους και τα ποσοστά επιτυχημένης πρόβλεψης είναι αντικείμενο συζήτησης σε ερευνητικά άρθρα, εκθέσεις και κεφάλαια βιβλίων (McKellar and Lu, 2004; Lopez et al., 2004; Peleg, 2006; van Boekel, 2009). Σε γενικές γραμμές, τα μοντέλα στο πεδίο της «ποιότητας και ασφάλειας τροφίμων» περιγράφουν και προβλέπουν τη μικροβιακή ανάπτυξη σε ένα προσεγγιστικά «κλειστό βιότοπο». Σε ένα, θεωρητικά, τέλεια κλειστό περιβάλλον όλες οι πηγές που διατηρούν τη ζωή είναι πεπερασμένες και μη-ανανεώσιμες, ενώ οι μεταβολίτες που εκκρίνονται από τα ζωντανά κύτταρα και τα κύτταρα που έχουν πεθάνει δεν αποβάλλονται. Αυτή η ιδιότητα έρχεται σε αντίθεση με μια διεργασία συνεχούς ζύμωσης, για παράδειγμα, όπου οι πόροι αναπληρώνονται συνεχώς και οι μεταβολίτες ή τα κύτταρα συλλέγονται και αφαιρούνται. Η τυπική ανάπτυξη σε έναν κλειστό βιότοπο χαρακτηρίζεται από τέσσερα ευδιάκριτα στάδια, όπως αυτά φαίνονται στα «Σχήματα 3.1 και 3.2».



**Σχήμα 3.1.** Βακτηριακή φάση ανάπτυξης.



**Σχήμα 3.2.** Σύνολο κυττάρων σε πληθυσμό, ζώντα και νεκρά, σε κάθε φάση.

### 3.2.1 Διακριτές περιοχές καμπύλης

(Πηγές: Engelkirk et al., 2011; Parija, 2012; JoVE Science Database, 2019)

#### Φάση προσαρμογής (Lag phase)

Όταν οι μικροοργανισμοί προστίθενται σε νέο θρεπτικό μέσο, συνήθως δεν παρατηρείται αύξηση του αριθμού τους για κάποιο χρονικό διάστημα. Το στάδιο αυτό ονομάζεται φάση προσαρμογής. Αν και τα κύτταρα στην φάση αυτή δεν διαιρούνται και δεν υπάρχει πληθυσμιακή αύξηση, ωστόσο παρατηρείται μικρή αύξηση μεγέθους με παράλληλη σύνθεση νέων συστατικών. Το στάδιο αυτό πριν την έναρξη της διαδικασίας

διαίρεσης των κυττάρων είναι απαραίτητο για διάφορους λόγους, όπως για παράδειγμα η προσαρμογή στην διαφορετική σύσταση του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας, η ανάγκη ανάπτυξης ενζύμων για τον μεταβολισμό των στοιχείων που τους παρέχονται κλπ. Η διάρκεια της φάσης προσαρμογής (από λίγες ώρες έως κάποιες μέρες), εξαρτάται από την «κατάσταση» στην οποία βρίσκονται τα κύτταρα, την φύση και την θερμοκρασία του θρεπτικού μέσου, τον όγκο του εμβολίου (δηλαδή της πυκνής καλλιέργειας που χρησιμοποιήθηκε για τον εμβολιασμό του θρεπτικού υλικού) κ.λπ. Όταν το εμβόλιο προέρχεται από καλλιέργεια που βρίσκεται στην εκθετική φάση ανάπτυξης και η σύνθεση του μέσου καλλιέργειας είναι όμοια με αυτή του εμβολίου τότε η φάση προσαρμογής είναι μικρότερη σε διάρκεια.

### **Φάση εκθετικής ανάπτυξης (Exponential or Log phase)**

Κατά την διάρκεια της εκθετικής φάσης ανάπτυξης οι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται και πολλαπλασιάζονται με έναν μέγιστο, για τα δεδομένα της καλλιέργειας, σταθερό ρυθμό, ο οποίος μπορεί να προσδιοριστεί πειραματικά σε προκαθορισμένα χρονικά διαστήματα. Επειδή κάθε κύτταρο διαιρείται σε διαφορετική χρονική στιγμή, η μορφή της καμπύλης ανάπτυξης είναι ομαλή χωρίς να παρατηρείται απότομη βηματική αύξηση και χαρακτηρίζεται από ένα μέσο ρυθμό ανάπτυξης  $k$  (αντιστοιχεί στον αριθμό των γενεών  $n$  στην μονάδα του χρόνου). Η λογαριθμική φάση είναι πάντα σύντομη, εκτός εάν η ταχέως διαιρούμενη καλλιέργεια διατηρείται με συνεχή προσθήκη θρεπτικών ουσιών και συχνή απομάκρυνση των παραπροϊόντων.

### **Φάση στασιμότητας (Stationary phase)**

Μετά το πέρας της εκθετικής φάσης η ανάπτυξη των κυττάρων σταματά και η καμπύλη γίνεται οριζόντια. Στην φάση στασιμότητας ο πληθυσμός των ζωντανών κυττάρων παραμένει σταθερός, με εξισορρόπηση των ρυθμών ανάπτυξης και θανάτου. Η φάση στασιμότητας παρατηρείται στην βακτηριακή ανάπτυξη όταν ο πληθυσμός των κυττάρων είναι περίπου  $10^9$  ανά mL, ενώ στα πρωτόζωα και στα φύκη η τιμή αυτή φθάνει περίπου  $10^6$  ανά mL. Στην παρούσα κατάσταση η καλλιέργεια παρουσιάζει την καλύτερη πληθυσμιακή πυκνότητα.

Ο μικροβιακός πληθυσμός εισέρχεται στην φάση στασιμότητας για διάφορους λόγους. Ένας προφανής λόγος είναι η έλλειψη σημαντικών θρεπτικών από το μέσο καλλιέργειας ή η μείωση ενός σημαντικού θρεπτικού παράγοντα. Στις περιπτώσεις αερόβιας καλλιέργειας το διαλυμένο οξυγόνο είναι ο περιοριστικός παράγοντας, διότι μετά από κάποια στιγμή δεν επαρκεί για να διατηρήσει την μικροβιακή καλλιέργεια σε ρυθμούς εκθετικής ανάπτυξης. Η ανάπτυξη των κυττάρων δύναται επίσης να σταματήσει λόγω της συσσώρευσης «τοξικών» μεταβολικών προϊόντων στο μέσο ανάπτυξης (εξωτοξίνες). Για παράδειγμα, οι στρεπτόκοκκοι μπορεί να παράγουν μεγάλες ποσότητες γαλακτικού οξέος με αποτέλεσμα να μειωθεί το pH του διαλύματος και να σταματήσει η περαιτέρω ανάπτυξη. Επίσης, βακτήρια με ικανότητα σχηματισμού ενδοσπορίων καταφεύγουν σε αυτό το μέσο προστασίας ως αντίδραση στο αντίξοο περιβάλλον.

### **Φάση θανάτου (Death phase)**

Η μείωση των θρεπτικών παραγόντων και η αύξηση «τοξικών» συστατικών και αυτολυτικών ενζύμων στο μέσο ανάπτυξης οδηγούν την καλλιέργεια στη φάση θανάτου. Ο θάνατος των κυττάρων, όπως και η ανάπτυξη, είναι συνήθως λογαριθμικός. Αυτό σημαίνει πως σταθερό ποσοστό κυττάρων νεκρώνεται κάθε ώρα. Εκφυλισμένες μορφές είναι κοινές σε αυτό το σημείο. Ορισμένα κύτταρα παίρνουν διάφορα σχήματα, γίνονται μακριές νηματώδεις ράβδοι ή διακλαδισμένες ή σφαιρικές μορφές που είναι δύσκολο να αναγνωριστούν. Μπορεί ακόμη να αναπτυχθούν χωρίς κυτταρικό τοίχωμα και αναφέρονται ως πρωτοπλάστες / σφαιροπλάστες. Όταν αυτές οι περίπλοκες μορφές εμβολιάζονται σε ένα φρέσκο θρεπτικό μέσο, συνήθως επανέρχονται στο αρχικό σχήμα των υγιών βακτηρίων.

### **3.3 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Αντίστροφης Μεταγραφής (Real Time RT-PCR)**

Επί του παρόντος στη μικροβιολογία οι τεχνικές μοριακής βιολογίας χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο για την ανίχνευση δομών παθογόνων βακτηρίων στα τρόφιμα, προκειμένου να ενισχυθεί η διάγνωση των ασθενειών λόγω των μη βιώσιμων ή μη καλλιεργητικών οργανισμών που δεν μπορούν να ανιχνευθούν με συμβατικές μεθόδους, όντας χρονοβόρες και απαιτητικές. Ως εκ τούτου, έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι για την ταχεία ανίχνευση τροφικών παθογόνων. Κάποιες από αυτές τις διαγνωστικές τεχνικές είναι: αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR), αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (RT-PCR), ισοθερμική ενίσχυση με τη μεσολάβηση βρόχου (loop-mediated isothermal amplification, LAMP), βιοαισθητήρες (biosensors), ενίσχυση βασισμένη στην αλληλουχία νουκλεϊκού οξέος (Nucleic Acid Sequence Based amplification, NASBA), τυχαίο ενισχυμένο πολυμορφικό DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD), πολυμορφισμός μήκους θραύσματος (amplified fragment length polymorphism, AFLP) και πολυμορφισμός μήκους θραύσματος περιορισμού (restriction fragment length polymorphism, RFLP) (Ahmed and Abdallah, 2021).

Οι μοριακές μέθοδοι βασίζονται στη βασική χημεία της αντιγραφής του DNA. Συγκεκριμένα, λειτουργούν με ανίχνευση ειδικών αλληλουχιών DNA ή RNA στον παθογόνο στόχο. Αυτό γίνεται με την υβριδοποίηση της αλληλουχίας του νουκλεϊκού οξέος-στόχου σε ένα συνθετικό ολιγονουκλεοτίδιο (ανιχνευτές ή εκκινητές) που είναι συμπληρωματικό της αλληλουχίας στόχου (Zhao et al., 2013). Ανιχνεύουν τα συγκεκριμένα γονίδια στα παθογόνα-στόχους, αποτρέποντας έτσι τα εσφαλμένα ερμηνευμένα αποτελέσματα. Πλεονεκτούν καθώς είναι αποδοτικές σε γρήγορο χρόνο, μειώνουν τα ανθρώπινα σφάλματα, είναι ειδικευμένες και σε σχέση με τις συμβατικές τεχνικές είναι πιο φθηνές και αποτελεσματικές (Law et al., 2015). Είναι σημαντικές,

ιδιαίτερα στη βιομηχανία τροφίμων, καθώς ανιχνεύουν άμεσα την παρουσία παθογόνων σε ακατέργαστα και επεξεργασμένα τρόφιμα, ακόμη και σε χαμηλά επίπεδα πληθυσμών.

Μεταξύ αυτών των μεθόδων, η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) αποτελεί τη βάση για πολλές μοριακές τεχνικές (Adzitey et al., 2013). Η PCR επιτρέπει την *in vitro* σύνθεση νουκλεϊνικών οξέων μέσω των οποίων ένα τμήμα DNA μπορεί να αναπαραχθεί ειδικά με ημι-συντηρητικό τρόπο. Πιο συγκεκριμένα, επιτρέπει τη σύνθεση συγκεκριμένων θραυσμάτων DNA χρησιμοποιώντας ένα ένζυμο πολυμεράσης DNA, το οποίο συμμετέχει στην αντιγραφή του κυτταρικού γενετικού υλικού. Αυτό το ένζυμο συνθέτει μια συμπληρωματική αλληλουχία του DNA, καθώς ένα μικρό θραύσμα (εκκινητής) συνδέεται με έναν από τους κλώνους DNA στη συγκεκριμένη θέση που επιλέγεται για να ξεκινήσει η σύνθεση. Οι εκκινητές περιορίζουν την αλληλουχία που πρέπει να αναπαραχθεί και το αποτέλεσμα είναι η ενίσχυση μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA με δισεκατομμύρια αντίγραφα (Mullis, 1990).

Μαζί με τις συμβατικές τεχνικές PCR, η PCR σε πραγματικό χρόνο (Real Time PCR) έχει αναδειχθεί ως τεχνολογική καινοτομία και διαδραματίζει συνεχώς αυξανόμενο ρόλο στην κλινική διάγνωση και τα ερευνητικά εργαστήρια. Λόγω της ικανότητάς της να παράγει τόσο ποιοτικά όσο και ποσοτικά αποτελέσματα, θεωρείται μια γρήγορη και ακριβής τεχνική (Valones et al., 2009).

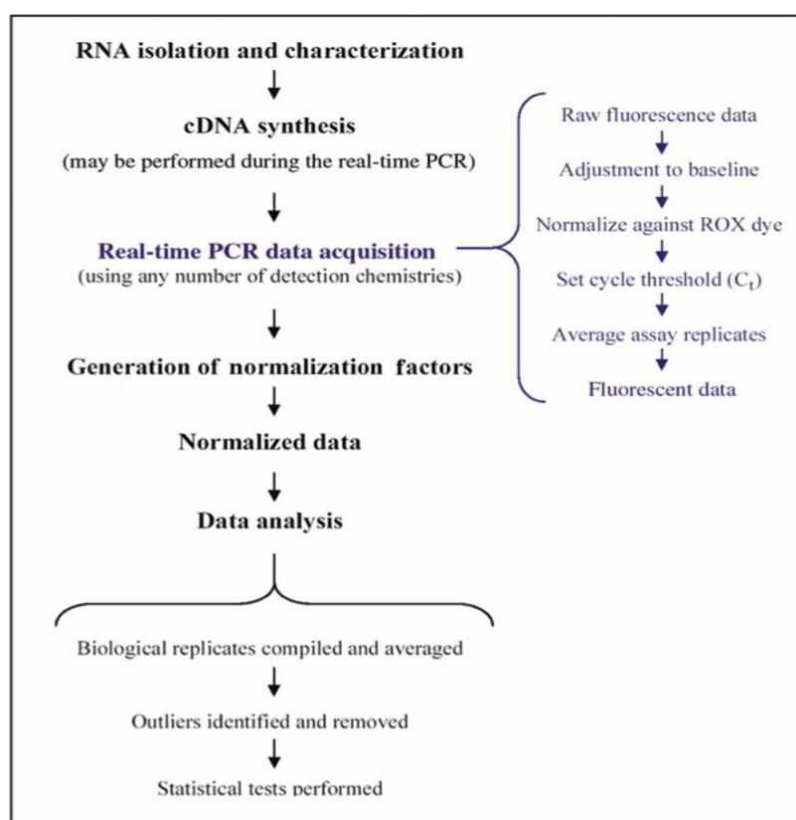
Η τεχνική Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης-Αντίστροφης Μεταγραφής (RT-PCR) είναι παραλλαγή της «κλασικής» αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Παραμυθιώτης, 2010). Η διαφορά της έγκειται στο ότι δεν απαιτεί ηλεκτροφόρηση πηκτής αгарόζης για την ανίχνευση προϊόντων PCR. Αντιθέτως, είναι σε θέση να παρακολουθεί συνεχώς το σχηματισμό προϊόντων PCR σε ολόκληρη την αντίδραση μετρώντας το φθορίζον σήμα (φθορογόνους ανιχνευτές που «ανάβουν») που παράγεται από συγκεκριμένους διπλούς επισημασμένους ανιχνευτές ή παρεμβαλλόμενες χρωστικές (Law et al., 2015). Η PCR σε πραγματικό χρόνο επιτρέπει την ακριβή ποσοτικοποίηση αυτών των νουκλεϊνικών οξέων με μεγαλύτερη αναπαραγωγιμότητα. Αυτή η τεχνική παρέχει μια ευαίσθητη μέθοδο για την ακριβή ποσοτικοποίηση των μεμονωμένων ειδών, η οποία θα μπορούσε να είναι πολύ σημαντική για τη διάγνωση παθογόνων και γενετικών παθήσεων. Τα πλεονεκτήματα περιλαμβάνουν την ευκολία ποσοτικοποίησης, την μεγαλύτερη ευαισθησία, την αναπαραγωγιμότητα και την ακρίβεια, την ταχεία ανάλυση, τον καλύτερο έλεγχο της ποιότητας στη διαδικασία και τον χαμηλότερο κίνδυνο μόλυνσης (Morillo et al., 2003).

Υπάρχουν πολλά οφέλη από τη χρήση της RT-PCR σε πραγματικό χρόνο έναντι άλλων μεθόδων για την ποσοτικοποίηση της γονιδιακής έκφρασης, όντας ενδεδειγμένη τεχνική για τη ποσοτικοποίηση DNA και RNA. Είναι ένα απλό, γρήγορο, κλειστό και αυτοματοποιημένο σύστημα ενίσχυσης που είναι υπεύθυνο για τη μείωση του κινδύνου διασταυρούμενης μόλυνσης που είναι χαρακτηριστικό της συμβατικής PCR (Shokoples et al., 2009).

Έχει την ικανότητα να παράγει ποσοτικά δεδομένα με ακριβές δυναμικό εύρος 7 έως 8 λογαρίθμων και δεν απαιτεί χειρισμό μετά την ενίσχυση. Επιπλέον, οι αναλύσεις PCR σε πραγματικό χρόνο μπορούν να ανιχνεύσουν αξιόπιστα διαφορές γονιδιακής έκφρασης

έως και 23% μεταξύ των δειγμάτων και έχουν χαμηλότερους συντελεστές διακύμανσης. Η PCR πραγματικού χρόνου μπορεί επίσης να κάνει διάκριση μεταξύ αγγελιαφόρων RNA (mRNAs) με σχεδόν πανομοιότυπες αλληλουχίες και μπορεί να είναι σχετικά υψηλής απόδοσης δεδομένου του κατάλληλου εξοπλισμού.

Στα κυριότερα μειονεκτήματά της εντοπίζονται ο ακριβός εξοπλισμός και τα αντιδραστήρια (Wong et al., 2005), ενώ είναι πιθανόν όταν χρησιμοποιείται για την μελέτη της γονιδιακής έκφρασης να μην υπάρχει πάντα αντιστοιχία μεταξύ του μετρούμενου mRNA και της ποσότητας της πρωτεΐνης που τελικά παράγεται (Παραμυθιώτης, 2010).



**Εικόνα 3.1.** Διαδικασία RT-PCR (Wong et.al, 2005)

Κατά τη πραγματοποίησή της, ως μητρικό μόριο χρησιμοποιείται mRNA και με τη χρήση των κατάλληλων μορίων εκκινήτων (oligo-dT) και του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση δημιουργείται ο συμπληρωματικός κλώνος DNA (cDNA). Στη συνέχεια, ακολουθεί κατεργασία με το ένζυμο RNAση H, το οποίο αποικοδομεί το μόριο mRNA και απομένει ο συμπληρωματικός κλώνος DNA που λειτουργεί ως το μητρικό μόριο στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης που ακολουθεί (Παραμυθιώτης, 2010).

Πιο λεπτομερώς, το RNA αρχικά απομονώνεται και χαρακτηρίζεται ως προς την ποσότητα και την ακεραιότητα. Εάν εκτελείται μια αντίδραση ενός σταδίου, το RNA χρησιμοποιείται ως πρότυπο για την ανάλυση PCR σε πραγματικό χρόνο και λαμβάνει χώρα αντίστροφη μεταγραφή κατά τη διάρκεια της ανάλυσης. Κατά τη διάρκεια μιας



αντίδρασης δύο σταδίων, το cDNA αρχικά συντίθεται και στη συνέχεια χρησιμοποιείται ως εκμαγείο PCR. Για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων με πολλαπλά διαχειριστικά γονίδια (housekeeping genes), πρέπει να υπολογιστεί ένας παράγοντας κανονικοποίησης για κάθε μεμονωμένο δείγμα. Η διαίρεση των δεδομένων φθορισμού με τον συντελεστή κανονικοποίησης δίνει τα επεξεργασμένα δεδομένα, τα οποία διέπονται από στατιστική ανάλυση (Wong et.al, 2005).

Η PCR σε πραγματικό χρόνο απαιτεί έναν θερμοκυκλιστή με ένα οπτικό σύστημα για να συλλάβει φθορισμό και έναν υπολογιστή με λογισμικό ικανό να καταγράφει τα δεδομένα και να εκτελέσει την τελική ανάλυση της αντίδρασης. Η εκπομπή φθορισμού δημιουργεί ένα σήμα που αυξάνεται σε άμεση αναλογία με την ποσότητα των προϊόντων PCR. Οι τιμές φθορισμού καταγράφονται κατά τη διάρκεια κάθε κύκλου και αντιπροσωπεύουν την ποσότητα του ενισχυμένου προϊόντος. Τα φθορίζοντα σύνθετα υλικά είναι Sybr® Green και Taqman® (Kubista et.al, 2006).

## ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Οι τρέχουσες διατροφικές συστάσεις μαζί με την αναδυόμενη ευαισθητοποίηση για την υγεία των καταναλωτών έχουν οδηγήσει σε αυξανόμενη κατανάλωση τροφίμων με περιεκτικότητα σε γλυκαντικά χαμηλής ή μηδενικής θερμιδικής αξίας. Ενώ έχει αναφερθεί ότι η υποκατάσταση της ζάχαρης μπορεί να αλλάξει τις χαρακτηριστικές ιδιότητες των προϊόντων τροφίμων και να επηρεάσει τη δυναμική ανάπτυξης των βακτηρίων τους, οι πιθανές επιπτώσεις της προσθήκης γλυκαντικών στην ασφάλεια και τη λειτουργικότητα των τροφίμων δεν έχουν εξακριβωθεί.

Η συγκεκριμένη μελέτη παρουσιάζει την πιθανή επίδραση διαφόρων γλυκαντικών σε αυτές τις πτυχές ποιότητας των τροφίμων. Μελετήθηκε η συμπεριφορά της πλαγκτονικής ανάπτυξης του τροφιμογενούς παθογόνου βακτηρίου *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, καθώς και ενός στελέχους *Lactiplantibacillus plantarum* με προβιοτική δυναμική παρουσία διαφόρων γλυκαντικών. Η ανάπτυξη των επιλεγμένων βακτηρίων προσδιορίστηκε μέσω οπτικής πυκνότητας (Optical Density – OD) και περιγράφηκε επίσης ποσοτικά, μέσω του υπολογισμού των κινητικών της παραμέτρων. Με στόχο τη διερεύνηση της γενετικής βάσης, επιλεγμένες περιπτώσεις υποβλήθηκαν σε στοχευμένη ανάλυση γονιδιακής έκφρασης. Γονίδια που εμπλέκονται με το «αίσθημα απαρτίας» (Quorum Sensing), τη λοιμογόνο δράση και την έκφραση μαστιγίων κίνησης του παθογόνου βακτηρίου επιλέχθηκαν σύμφωνα με τη διαθέσιμη επιστημονική βιβλιογραφία. Τα σχετικά επίπεδα έκφρασης των επιλεγμένων γονιδίων σε συγκεκριμένες φάσεις ανάπτυξης προσδιορίστηκαν χρησιμοποιώντας την τεχνική Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης Αντίστροφης Μεταγραφής σε πραγματικό χρόνο (real time, RT-PCR).

Εν συντομία, σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης εντός του προγράμματος «SWEET» ήταν να αξιολογήσει την επίδραση των γλυκαντικών στην μικροβιακή ανάπτυξη και στην απόκριση γονιδιακής έκφρασης συγκεκριμένων παθογόνων και προβιοτικών βακτηρίων.

## 4. ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ

### 4.1 Ανανέωση / Έλεγχος καθαρότητας

Τα επιλεγμένα στελέχη *Salmonella enteritidis* και *Lactobacillus plantarum* προήλθαν από την τράπεζα μικροοργανισμών του εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΓΠΑ, Ιερά Οδός 75, Αθήνα, Ελλάδα). Οι καλλιέργειες των στελεχών υπήρχαν σε απόθεμα (stock cultures) και ήταν αποθηκευμένες υπό κατάψυξη (-80 °C). Στα πλαίσια της 1<sup>ης</sup> ανανέωσης, τα κύτταρα του παθογόνου στελέχους *Salmonella Enteritidis* ανακτήθηκαν σε θρεπτικό ζωμό Tryptone Soy Broth (TSB, Lab M Limited) και του οξυγαλακτικού βακτηρίου *Lactobacillus plantarum* σε de Man Rogosa and Sharpe (MRS broth, Biolife - No 401729), με επώαση στους 37°C για 24 ώρες. Έπειτα, δημιουργήθηκαν καλλιέργειες εργασίας (working cultures) σε τρυβλία Tryptone Soy Agar (TSA, Biolife Italiana S.r.l, Milan, Italy) και MRS agar (Lab M Limited), αντίστοιχα, οι οποίες ανανεώνονταν ανά δύο εβδομάδες.

Κωδικός	Μικροοργανισμός	Προσδιορισμός	Πηγή απομόνωσης	Συνθήκες ανάπτυξης
B-282	<i>Lactobacillus plantarum</i>	697	Ζύμωση μαύρης ελιάς, Ελλάδα	MRS medium, 30°C
B-287	<i>Salmonella enteritidis</i>	WT	-	Trypticase soy medium, 37°C

**Πίνακας 4.1.** Βακτηριακά στελέχη τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

Από τη βιομάζα της 1<sup>ης</sup> ανανέωσης πραγματοποιήθηκε η 2<sup>η</sup> ανανέωση, σε θάλαμο νηματικής ροής υπό ασηπτικές συνθήκες με μεταφορά ποσότητας 100 µL καλλιέργειας σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν 9 mL υγρό θρεπτικό υπόστρωμα TSB για το είδος *Salmonella* και υγρό θρεπτικό υπόστρωμα MRS για το είδος *Lactobacillus*. Το διάστημα επώασης μεταξύ 1<sup>ης</sup> και 2<sup>ης</sup> ανανέωσης ορίστηκε να είναι 18 ώρες.

Για τον έλεγχο της καθαρότητας των καλλιεργειών εφαρμόστηκαν οι τεχνικές της γραμμικής (streaking) και επιφανειακής (spreading) εξάπλωσης ξανά σε θάλαμο νηματικής ροής. Πιο αναλυτικά, σε τρυβλία με στέρεο υπόστρωμα TSA για τη *Salmonella Enteritidis* και MRS για τον *Lactobacillus plantarum*, εξαπλώθηκε μικροβιακό υλικό γραμμικά με αποστειρωμένο κρίκο απευθείας από τη 2<sup>η</sup> ανανέωση, ενώ εξαπλώθηκε και επιφανειακά ποσότητα 0,1 mL με αποστειρωμένο τριγωνάκι από τις δεκαδικές αραιώσεις 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-7</sup>.

## 4.2 Προετοιμασία γλυκαντικών

Για τον υπολογισμό των γλυκαντικών χρησιμοποιήθηκε ο Πίνακας 1.1 (σύγκριση γλυκύτητας των γλυκαντικών του πειράματος με τη σουκρόζη και τη γλυκόζη) που παρουσιάζεται στο κεφάλαιο της Εισαγωγής.

Για την μελέτη των γλυκαντικών (γλυκόζη και γλυκαντικά) σε συγκεντρώσεις 2.5% και 10%, πραγματοποιήθηκε ζύγιση της απαιτούμενης ποσότητάς τους σε ζυγό ακριβείας με την χρήση κωνικής φιάλης, στην οποία έπειτα συμπληρώθηκε η απαραίτητη ποσότητα θρεπτικού υλικού. Για την μελέτη του παθογόνου είδους *Salmonella Enteritidis* προστέθηκε Nutrient Broth άνευ γλυκόζης, ενώ για την μελέτη του οξυγαλακτικού βακτηρίου *Lactobacillus plantarum* προστέθηκε MRS broth.



**Εικόνα 4.1.** Υγρά υποστρώματα Nutrient Broth (αριστερά) και MRS Broth (δεξιά)

### 4.2.1 Φιλτράρισμα γλυκαντικών

Προκειμένου να αποφευχθεί μικροβιακή παρουσία εντός των υποστρωμάτων (NB, MRS), τα υγρά μέσα ανάπτυξης με τα γλυκαντικά αποστειρώθηκαν μέσω διπλής διήθησης (1<sup>η</sup> και 2<sup>η</sup> φίλτρανση) από φίλτρο διαμέτρου πόρων 0,22 μm. Αφού ζυγίστηκαν οι απαραίτητες ποσότητες για κάθε γλυκαντικό, για την πρώτη φίλτρανση, τοποθετήθηκε η συνολική ποσότητα του γλυκαντικού σε falcons των 50 mL. Με τη χρήση σύριγγας και φίλτρου διήθησης πραγματοποιήθηκε φίλτρανση της μισής ποσότητας (25 ml). Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε για την υπόλοιπη ποσότητα. Στην περίπτωση των 100 mL η διαδικασία εκτελέστηκε 4 φορές αντίστοιχα.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η 2<sup>η</sup> φίλτρανση από τα φιαλίδια με τις ποσότητες των 25 mL. Τα πρώτα 25 mL διηθήθηκαν ακριβώς με το ίδιο τρόπο της 1<sup>ης</sup> φίλτρανσης σε καινούρια αποστειρωμένα falcons. Τα υπόλοιπα 25 mL διηθήθηκαν σε vials των 2 mL. Στη περίπτωση των 100 mL γλυκαντικού, η 2<sup>η</sup> φίλτρανση εκτελέστηκε 3 φορές σε falcons και 1 φορά σε vials.

### 4.3 Οπτική πυκνότητα (OD) – Κινητική ανάπτυξης

Προκειμένου το μηχάνημα προσδιορισμού οπτικής πυκνότητας να βρεθεί στις κατάλληλες συνθήκες λειτουργίας (37°C) για την εισαγωγή των πλακών (microplates), απαραίτητη ήταν η προετοιμασία του λίγη ώρα πριν την έναρξη της διαδικασίας. Η καταγραφή των μετρήσεων πραγματοποιήθηκε με συχνότητα δέκα λεπτών και ως εναρκτήριο επίπεδο πληθυσμού κυττάρων ορίστηκαν τα  $10^2$  cfu/mL, ενώ ως ανώτατο πληθυσμιακό όριο τα  $10^9$  cfu/mL. Το microplate που αφορούσε το βακτήριο *Salmonella* Enteritidis επώαστηκε εντός του μηχανήματος για 24 ώρες, ενώ στην περίπτωση του *Lactobacillus plantarum* επώαστηκε για 4 μέρες (96 ώρες). Για την καταγραφή και την αξιολόγηση των δεδομένων αξιοποιήθηκε το λογισμικό GEN5 Software.

#### 4.3.1 Εμβολιασμός πλάκας μικροτιλοδότησης (microplate)

Αρχικά, τα χωρίς γλυκόζη υγρά υποστρώματα NB και MRS για *Salmonella* Enteritidis (B-287) και *Lactobacillus plantarum* (B-282) αντίστοιχα, τοποθετήθηκαν σε σωλήνες φυγοκέντρησης (falcons) των 50 mL. Έπειτα, συγκεκριμένες ποσότητες υγρού υποστρώματος και γλυκαντικών τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα μικροφιαλίδια (ependorfs) χωρητικότητας 2 mL για κάθε συγκέντρωση (2.5% ή 10%). Η advantame (ADV) χαρακτηρίζεται από υψηλότερες συγκεντρώσεις συγκριτικά με τα υπόλοιπα γλυκαντικά (70%).

Κατά την παρασκευή, κάθε δείγμα αναδεύτηκε με την χρήση αναδευτήρα (vortex). Για την μεταφορά των δειγμάτων στις πλάκες μικροτιλοδότησης λήφθηκε - με πολυπιπέτα μεταβλητού όγκου-ποσότητα 180  $\mu$ L από κάθε γλυκαντικό και τοποθετήθηκε στα απαραίτητα κελιά σύμφωνα με το σχεδιάγραμμα. Στις θέσεις δειγμάτων ελέγχου (Blank - Control) τοποθετήθηκαν επίσης 180  $\mu$ L από κάθε γλυκαντικό, όμως αντί του εμβολιασμού με τον απαραίτητο μικροοργανισμό προστέθηκαν 20  $\mu$ L διαλύματος Ringer (LABM - LAB100Z).

Μετά την φόρτωση της απαιτούμενης ποσότητας διαλύματος γλυκαντικού σε κάθε επιμέρους κελί, ασηπτικά και με ακρίβεια, ξεκίνησε η διαδικασία τοποθέτησης του εμβολίου.

Για το εμβόλιο παρασκευάστηκε διάλυμα Ringer και τοποθετήθηκε ποσότητα 9 mL σε δοκιμαστικούς σωλήνες, οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν για τις δεκαδικές αραιώσεις. Ειδικότερα, μετά από την πραγματοποίηση αραιώσεων της  $2^{15}$  ανανέωσης από  $10^{-1}$  έως  $10^{-7}$  σε θάλαμο νηματικής ροής, λήφθηκε με τη βοήθεια πολυπιπέτας ποσότητα ίση με 20  $\mu$ L εμβολίου ανά θέση από την αραιώση  $10^{-6}$  και τοποθετήθηκε στο κατάλληλο κελί (εκτός των κελιών ελέγχου).

Πριν την τοποθέτηση της πλάκας στο μηχάνημα προσδιορισμού οπτικής πυκνότητας, προηγήθηκε έλεγχος ώστε να επιβεβαιωθεί ότι τα κελιά διέθεταν ίση ποσότητα διαυγούς δείγματος χωρίς ενδείξεις θολερότητας. Αφού αξιολογήθηκε επιτυχώς, εφαρμόστηκε ειδικό αυτοκόλλητο προστασίας των κελιών και πλαστικό κάλυμμα στο επάνω μέρος της πλάκας.



**Εικόνα 4.2.** Ενδεικτική πλάκα μικροτιλοδότησης (microplate)

Η ορθή διεξαγωγή και ολοκλήρωση της διεργασίας οδήγησε στον προσδιορισμό του μέγιστου ειδικού ρυθμού αύξησης ( $\mu_{\max}$ ) του κάθε στελέχους σε κάθε συνθήκη ανάπτυξης (είδος και συγκέντρωση γλυκαντικού). Πρόκειται για ένα αποτέλεσμα που εκτιμήθηκε με μετρήσεις οπτικής πυκνότητας (OD) από τους χρόνους ανίχνευσης της μεταβολής της απορρόφησης (detection times, DTs) των διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων των καλλιιεργειών (Dalgaard and Koutsoumanis, 2001). Χρησιμοποιώντας την προσέγγιση των δεκαδικών αραιώσεων, η οποία έχει αποδειχθεί ότι παρέχει ακριβείς εκτιμήσεις των τιμών  $\mu_{\max}$  (Dalgaard and Koutsoumanis, 2001; Lindqvist, 2006), οι DTS (h) από τις πέντε διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις της καλλιέργειας του κάθε στελέχους σχεδιάστηκε έναντι του φυσικού λογαρίθμου της αρχικής βακτηριακής συγκέντρωσης ( $\ln$  cfu / well), και οι τιμές  $\mu_{\max}$  προσδιορίστηκαν με γραμμική παλινδρόμηση σύμφωνα με την ακόλουθη εξίσωση:

$$\ln(N_i) = k - \mu_{\max} * DT_i$$

όπου ως DT ορίζεται ο χρόνος που απαιτείται για ορισμένη αύξηση της απορρόφησης (οπτικής πυκνότητας).

### 4.3.2 Υπολογισμός παραμέτρων ανάπτυξης και Στατιστική ανάλυση δεδομένων (ANOVA)

Με βάση τα μικροβιολογικά δεδομένα του πειράματος προσδιορίστηκαν οι κινητικές παράμετροι αύξησης - φάση προσαρμογής ( $\lambda$ ) και μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης ( $\mu_{\max}$ ) - για το οξυγαλακτικό βακτήριο *Lactobacillus plantarum* και το παθογόνο βακτήριο *Salmonella Enteritidis*, σύμφωνα με ένα από τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα πρωτογενή μοντέλα μικροβιακής ανάπτυξης, το μηχανιστικό μοντέλο των Baranyi και Roberts (1994). Οι εξισώσεις παρατίθενται ακολούθως:

$$y(t) = y_0 + \mu_{\max} * A(t) - \frac{1}{m} \ln\left(1 + \frac{e^{m\mu_{\max}A(t)} - 1}{e^{m(y_{\max} - y_0)}}\right) \quad (1)$$

Όπου:

Συντελεστής	Έννοια
(t)	Ο χρόνος t σε ώρες (hours)
y(t)	Ο πληθυσμός τη χρονική στιγμή t
y <sub>0</sub>	Ο αρχικός πληθυσμός
$\mu_{\max}$	Ο μέγιστος αριθμός αύξησης
y <sub>max</sub>	Ο μέγιστος πληθυσμός του μικροοργανισμού
m	Συντελεστής Richards, δείχνει την μεταβολή από την εκθετική φάση στην στατική φάση της καμπύλης (καμπυλότητα πριν τη στατική φάση)
A(t)	Παράμετρος καθυστέρησης, δίνεται από τη σχέση της εξίσωσης (2)

$$A(t) = t + \frac{\ln(e^{-\mu_{\max}t} + e^{-h_0} - e^{-vt-h_0})}{\mu_{\max}} \quad (2)$$

Όπου:

Συντελεστής	Έννοια
$v$	Παράμετρος που χαρακτηρίζει τον ρυθμό αύξησης του κρίσιμου υποστρώματος, θεωρείται ίση με $\mu_{max}$
$h_0$	Παράμετρος που χαρακτηρίζει το έργο που απαιτείται για να προσαρμοστούν οι μικροοργανισμοί στο νέο περιβάλλον

Στην παρούσα μελέτη, το μοντέλο αναπτύχθηκε μέσω ενός πρόσθετου προγράμματος του Excel (DMfit) για τον εύκολο υπολογισμό των κινητικών παραμέτρων ανάπτυξης σε διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης.

Έπειτα από την απόρριψη του microplate από το μηχάνημα προσδιορισμού οπτικής πυκνότητας, ακολούθησε η συλλογή των δεδομένων σε ηλεκτρονική μορφή για περαιτέρω στατιστική ανάλυση μέσω της «ανάλυσης διασποράς με έναν παράγοντα» (One-Way ANOVA). Για την εκτέλεση της ανάλυσης αξιοποιήθηκε το λογισμικό STATGRAPHICS (Ink, Statgraphics Technologies).

### **One-Way ANOVA**

Μια σημαντική τεχνική για την ανάλυση της επίδρασης κατηγορικών παραγόντων σε μια απόκριση είναι η εκτέλεση μιας «Ανάλυσης Διακύμανσης». Η ανάλυση διασποράς με έναν παράγοντα αποσυνθέτει τη μεταβλητότητα στη μεταβλητή απόκρισης μεταξύ των διαφορετικών παραγόντων και χρησιμοποιείται όταν τα δεδομένα χωρίζονται σε ομάδες σύμφωνα με έναν μόνο παράγοντα. Ανάλογα με τον τύπο της ανάλυσης, μπορεί να είναι σημαντικό να προσδιοριστεί: (α) ποιοι παράγοντες έχουν σημαντική επίδραση στην απόκριση και/ή (β) πόσο μεγάλο μέρος της μεταβλητότητας στη μεταβλητή απόκρισης αποδίδεται σε κάθε παράγοντα.

Παρέχονται στατιστικές δοκιμές για τη σύγκριση των μέσων (means), των διαμέσων (medians) και των τυπικών αποκλίσεων των ομάδων (standard deviation). Κατά τη σύγκριση των μέσων, η ανάλυση ANOVA δείχνει εάν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα δεδομένα ( $P_{value} \leq 0.05$ ). Εάν αυτό δεν είναι εφικτό για τον λόγο ότι κάποια συνθήκη δεν πληρείται, χρησιμοποιούνται δοκιμές πολλαπλού εύρους, όπως η διαδικασία HSD (Honestly Significant Difference Post Hoc Test) του Tukey. Για δείγματα ίσου μεγέθους, σημαντικές διαφορές ομάδων μπορούν να προσδιοριστούν εξετάζοντας το διάγραμμα μέσων και προσδιορίζοντας εκείνα τα διαστήματα που δεν επικαλύπτονται.

Για την πραγματοποίηση της ανάλυσης ANOVA, απαιτούνται 3 προϋποθέσεις:

- (1) Τα δεδομένα να ακολουθούν κανονική κατανομή (normal distribution)
- (2) Τα δεδομένα να έχουν ίδιες διακυμάνσεις (equal variances)
- (3) Να υπάρχουν ανεξάρτητες παρατηρήσεις (independent observations)



Εάν δεν πληρείται η συνθήκη (2) αλλά πληρείται η συνθήκη (1), τότε πραγματοποιείται Welch Test, Robust Test και έπειτα Game-Howell Post Hoc προκειμένου να εντοπιστούν σημαντικές διαφορές ( $P \leq 0,05$  για όλες τις δοκιμές). Στην περίπτωση που δεν πληρείται καμία από τις δύο, πραγματοποιείται Kruskal–Wallis Test.

#### 4.4 Μέθοδος των Τρυβλίων

Για την έναρξη του πειράματος θεωρείται χρήσιμη η εφαρμογή αρκετών διαδοχικών αραιώσεων προκειμένου να μελετηθεί η συμπεριφορά των επιλεγμένων βακτηρίων μέσω πρότυπων καμπυλών και να αποφευχθούν πιθανά κενά ως προς την απαρτίωση του μικροβιακού φορτίου.

Η κινητική αύξησης των *Salmonella* Enteritidis και *Lactobacillus plantarum* αξιολογήθηκε με την προσθήκη γλυκαντικών και συγκριτικά με την αντίστοιχη συμπεριφορά αύξησης παρουσία ίδιων συγκεντρώσεων γλυκόζης. Πιο συγκεκριμένα, αξιολογήθηκε η αύξηση του παθογόνου σε NB glucose-free υγρό υπόστρωμα με απουσία (0% w/v) η παρουσία (2.5% ή 10% w/v) του καθενός γλυκαντικού, ενώ του οξυγαλακτικού σε MRS glucose-free broth. Επίσης, μετρήθηκαν οι τιμές pH των μέσων ανάπτυξης μετά την αποστείρωση τους και κατόπιν προσθήκης των διαλυμάτων γλυκαντικών, ούτως ώστε να επιβεβαιωθεί ότι δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ των εξεταζόμενων μεταχειρίσεων. Σε δείγματα με 10% γλυκαντικών, προστέθηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες και ύστερα από την αποστείρωσή τους, σταγόνες ΚΟΗ κανονικότητας 1N για την αύξηση του pH στο επιθυμητό (περίπου 7).

Αφού προετοιμάστηκαν τα θρεπτικά υποστρώματα με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις γλυκαντικών, ακολούθησε ο εμβολιασμός τους με τον απαραίτητο όγκο του κάθε μικροοργανισμού (1/10 του συνολικού δείγματος) από την  $10^{-6}$  αραιώση της  $2^{15}$  ανανέωσης. Οι εμβολιασμένοι ζωμοί επωάστηκαν στους  $37^{\circ}\text{C}$  για το απαιτούμενο εκάστοτε χρονικό διάστημα. Αρχικά, γινόταν δειγματοληψία ανά 10-20 λεπτά κατά την πρώτη ημέρα του πειράματος με σκοπό να υπάρχει σαφής εικόνα της φάσης προσαρμογής και της εκθετικής φάσης ανάπτυξης του μικροοργανισμού. Στη συνέχεια, οι δειγματοληψίες και οι μικροβιολογικές αναλύσεις πραγματοποιούνταν ανά 30-60 λεπτά, δεδομένου ότι ο μικροοργανισμός βρισκόταν ήδη στην εκθετική φάση ανάπτυξης πλησιάζοντας στην στατική φάση. Οι μικροβιολογικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με την μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων μέσω δοκιμαστικών σωλήνων με 9 mL διαλύματος Ringer και έπειτα με επιφανειακή επίστρωση 100  $\mu\text{L}$  από την αντίστοιχη αραιώση σε τρυβλία. Τα TSA τρυβλία επωάστηκαν στους  $37^{\circ}\text{C}$  για 48 ώρες, ενώ τα MRS τρυβλία στους  $30^{\circ}\text{C}$  για 72 ώρες. Μετά την προσεκτική καταμέτρηση των σχηματιζόμενων αποικιών στα τρυβλία, τα μικροβιολογικά δεδομένα μεταφράστηκαν σε  $\log \text{cfu/mL}$ .

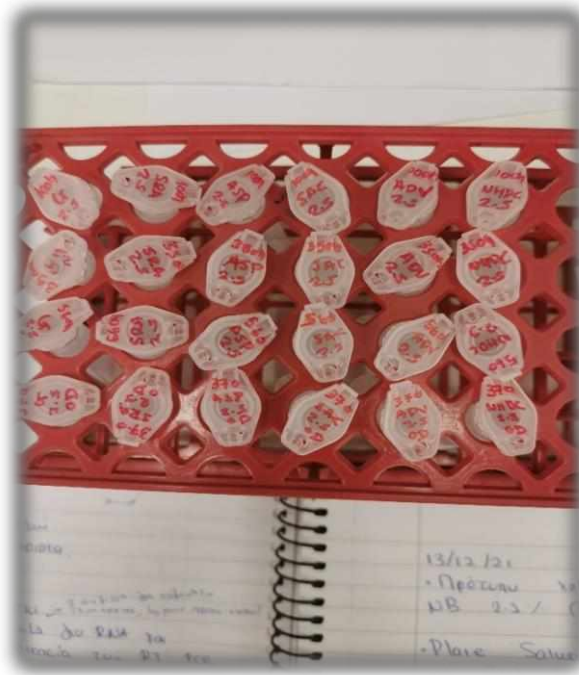


**Εικόνα 4.3.** Τρυβλία μετά την ολοκλήρωση του κύκλου επώασης

## 4.5 Έλεγχος έκφρασης γονιδίων

### 4.5.1 Απομόνωση RNA (RNA extraction)

Για την απομόνωση του RNA εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο που περιγράφεται στο εμπορικό σκεύασμα Monarch® Total RNA Miniprep Kit (New England Biolabs® U.S). Πριν την διαδικασία αυτή, στα δείγματα (κύτταρα *Salmonella* με συγκεντρώσεις γλυκαντικών 2.5% και 10%) πραγματοποιήθηκε η διαδικασία παραλαβής και καθαρισμού των κυττάρων (διαχωρισμός βιομάζας με απομάκρυνση υπερκείμενου). Συγκεκριμένα, κάθε δείγμα τοποθετήθηκε σε eppendorfs του 1 mL και φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά, με την φυγόκεντρο ρυθμισμένη στις 8000 στροφές και στους 4°C. Έπειτα, το υπερκείμενο απορρίφθηκε με την χρήση πιπέτας και στη θέση του προστέθηκε απαραίτητη ποσότητα Ringer. Η φυγοκέντρωση πραγματοποιήθηκε για δεύτερη φορά στις ίδιες συνθήκες και αφού ολοκληρώθηκε, απομακρύνθηκε εκ νέου το υπερκείμενο με τον ίδιο τρόπο. Η «καθαρή» πλέον βιομάζα κυττάρων, μετά τη συγκομιδή, καταψύχθηκε στους -80°C για μεταγενέστερη χρήση ή αποθηκεύτηκε σε αντιδραστήριο σταθεροποίησης DNA/RNA Protection Reagent (περιλαμβάνεται στο kit).

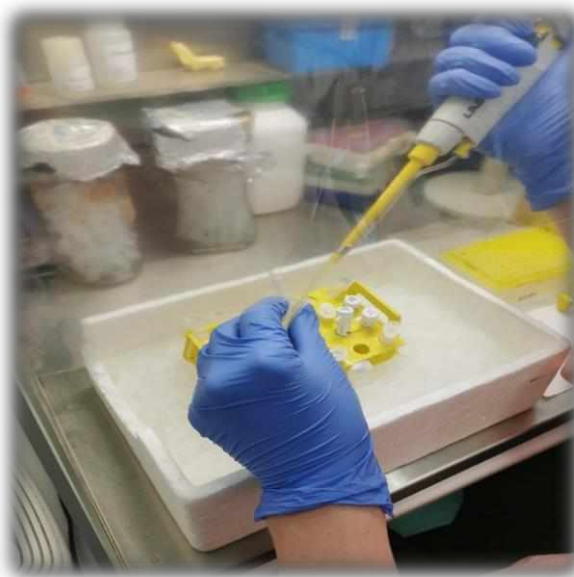


**Εικόνα 4.4.** Eppendorfs με τη βιομάζα κυττάρων

Αναλυτικότερα, αρχικά προσδιορίζεται η ποσότητα 1X DNA/RNA Protection Reagent που απαιτείται για προσθήκη στο δείγμα και έπειτα προετοιμάζεται το δείγμα 1X αραιώνοντας το απόθεμα 2X με νερό χωρίς νουκλεάση.

Στα δείγματα έγινε λύση κυττάρων μηχανικά χρησιμοποιώντας συσκευή υπερήχων. Το κάθε προϊόν λύσης μεταφέρθηκε σε RNA-free μικροφιαλίδιο (eppendorf). Πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στα 16.000g για 2 λεπτά. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε καθαρό μικροφιαλίδιο, στο οποίο προστέθηκε ίσος όγκος διαλύματος RNA Lysis Buffer και αναδεύτηκε ελαφρώς σε vortex. Για την δέσμευση και έκλυση του RNA (Binding and Elution) όλα τα επόμενα βήματα φυγοκέντρησης εκτελέστηκαν στα 16.000g για 30 δευτερόλεπτα.

Από τα νέα δείγματα, μεταφέρθηκαν έως και 800  $\mu$ L από το κάθε ένα σε στήλη αφαίρεσης gDNA (εφοδιασμένη με σωλήνα συλλογής). Οι στήλες φυγοκεντρήθηκαν προκειμένου να αφαιρεθεί το μεγαλύτερο μέρος του gDNA και έπειτα απορρίφθηκαν. Στο flow-through προϊόν (το προϊόν που περνάει μέσα από το φίλτρο) που περιέχει θραύσματα RNA, προστέθηκε ίσος όγκος αιθανόλης ( $\geq 95\%$ ), αναδεύτηκε καλά μέσω πιπέτας και μεταφέρθηκε σε στήλη καθαρισμού RNA εφοδιασμένη με σωλήνα συλλογής (RNA Purification column). Το δείγμα φυγοκεντρήθηκε ξανά και απορρίφθηκε το flow-through προϊόν.



**Εικόνα 4.5.** Ανάδευση με χρήση πιπέτας

Προκειμένου να επιτευχθεί η ενζυματική απομάκρυνση του υπολειπόμενου gDNA, πραγματοποιήθηκε χειρισμός με DNase I. Κατά αυτή τη διαδικασία, στο δείγμα προστίθενται 500  $\mu$ L διαλύματος RNA Wash Buffer, φυγοκεντρείται και απομακρύνεται το flow-through. Σε ένα RNase-free eppendorf συνδυάζονται 5  $\mu$ L DNase I με 75  $\mu$ L ρυθμιστικού διαλύματος DNase I Reaction Buffer, το διάλυμα μεταφέρεται με πιπέτα απευθείας στην κορυφή της στήλης και ύστερα ακολουθεί επώασή του για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, προστίθενται 500  $\mu$ L ρυθμιστικού διαλύματος RNA Priming Buffer και πραγματοποιείται φυγοκέντρηση με απομάκρυνσή του. Ακολουθεί προσθήκη 500  $\mu$ L διαλύματος RNA Wash Buffer με φυγοκέντρηση και απομάκρυνση του flow-through. Προστίθενται άλλα 500  $\mu$ L RNA Wash Buffer και πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 2 λεπτά. Κατόπιν, οι στήλες που συγκρατούν τα δείγματα μεταφέρονται σε νέο tube και προστίθενται 30-100  $\mu$ l νερού χωρίς νουκλεάση απευθείας στο κέντρο της στήλης, με φυγοκέντρηση 30 δευτερολέπτων. Τα τελικά δείγματα RNA τοποθετούνται σε πάγο κατά την διαδικασία απομόνωσης RNA και τελικά στους  $-20^{\circ}\text{C}$  για βραχυπρόθεσμη αποθήκευση (λιγότερο από 1 εβδομάδα) ή στους  $-80^{\circ}\text{C}$  για μακροχρόνια αποθήκευση.

#### **4.5.2 Μετατροπή RNA σε cDNA (σύνθεση cDNA)**

Εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο LunaScript RT SuperMix για τη σύνθεση πρώτου κλώνου cDNA στο πλαίσιο μιας ακολουθίας διαδικασιών RT-qPCR δύο σταδίων. Το cDNA αποθηκεύτηκε στους  $-20^{\circ}\text{C}$  μέχρι τη στιγμή επεξεργασίας.

### 4.5.3 Real Time PCR

Η αντίδραση της Real Time PCR πραγματοποιήθηκε σε 96 well plates με το σύστημα ανίχνευσης StepOnePlus (Applied Biosystems) χρησιμοποιώντας δίκλωνο παράγοντα φθορισμού SYBR green για ανίχνευση προϊόντος. Κάθε well (βοθρείο) περιείχε Luna Universal qPCR Master Mix (New England Biolabs, U.S.), 250 nM από κάθε εκκινήτη για το αντίστοιχο γονίδιο (Πίνακας 4.6) και 1  $\mu$ L πρότυπου (template). Η διαδικασία της αντίδρασης PCR ξεκίνησε στους 95°C για 60 sec, ακολουθούμενη από 40 κύκλους στους 95°C για 15 sec και στους 60°C για 30 sec. Συμπεριλήφθηκαν τα δείγματα αναφοράς της PCR (control) για την ανίχνευση πιθανής μόλυνσης (έλεγχος χωρίς RNA). Το δείγμα αναφοράς NoRT PCR χρησιμοποιήθηκε για την εξακρίβωση της αποκλειστικής παρουσίας γενετικού υλικού και το RT PCR για να διαπιστωθεί η καθαρότητα των Master Mix.

Η εξειδίκευση της διαδικασίας PCR διαπιστώθηκε με τις καμπύλες τήξης (melting curves) οι οποίες δημιουργήθηκαν από θέρμανση των δειγμάτων πρώτα στους 95°C και στη συνέχεια ψύξη τους στους 60°C και αργή θέρμανση στους 1,8°C / λεπτό έως 95°C για ανίχνευση πράσινου φθορισμού SYBR. Τα προφίλ καμπύλης τήξης αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό StepOne 2.1 (Applied Biosystems). Τρία τεχνικά αντίγραφα αναλύθηκαν για κάθε περίπτωση και κανονικοποιήθηκαν έναντι των ενδογενών μαρτύρων, γνωστά και ως housekeeping γονίδια (16S rRNA για παθογόνα).

**Πίνακας 4.6.** Γονίδια-στόχοι που αναλύθηκαν με Real Time PCR και οι εκκινήτες

Γονίδιο	Forward Primer	Reverse Primer	Primer Source
<i>sdiA</i>	AATATCGCTTCGTACCAC	GTAGGTAACGAGGAGCAG	Turki et al., 2014
<i>sipA</i>	TCTGCTTTTTCCACCATCA	AGATAAACTGCCTGACCCTAA AATTC	Kollanoor et al., 2014
<i>flhD</i>	CGTTTGATCGTCCAGGACAA	TGTTTGCCATCTCTTCGTTGAT	Kollanoor et al., 2014
<i>16S rRNA</i>	CGTGTTGTGAAATGTTGGGTAA	CCGCTGGCAACAAAGGATAA	

Όσον αφορά την ανάλυση δεδομένων, χρησιμοποιήθηκε η συγκριτική μέθοδος Ct ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) για την αξιολόγηση των σχετικών αλλαγών στα επίπεδα έκφρασης mRNA μεταξύ του μάρτυρα (γλυκόζη) και των γλυκαντικών, όπου:

$$DDCt = (Ct_{\text{target}} - Ct_{\text{reference}})_{\text{test}} - (Ct_{\text{target}} - Ct_{\text{reference}})_{\text{control}} \text{ (Livak and Schmittgen, 2001).}$$

Σύμφωνα με τους Desroche et al. (2005), ένα γονίδιο μπορεί να θεωρηθεί ότι υπερεκφράζεται όταν η τιμή σχετικής έκφρασης (τιμή fold change) είναι υψηλότερη από δύο, αλλά ρυθμίζεται σημαντικά προς τα κάτω όταν τιμή σχετικής έκφρασης είναι χαμηλότερη από μείον δύο.

## 5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### 5.1 Προσδιορισμός ανάπτυξης των μικροοργανισμών μέσω οπτικής πυκνότητας (OD)

Χρησιμοποιώντας την τεχνική της μέτρησης οπτικής πυκνότητας, συλλέχθηκαν αρκετά πειραματικά δεδομένα και ελήφθησαν καμπύλες ανάπτυξης των *S. Enteritidis* και *Lb. plantarum*. Το μοντέλο των Baranyi και Roberts (1994) προσαρμόστηκε στις καμπύλες ανάπτυξης και ελήφθησαν οι προκύπτουσες παράμετροι ανάπτυξης με το αντίστοιχο τυπικό σφάλμα. Στο κεφάλαιο αυτό παρουσιάζεται και συζητείται η επίδραση των νέων γλυκαντικών στην ανάπτυξη αυτών των δύο μικροοργανισμών σε συγκεντρώσεις 2.5% w/v και 10% w/v. Οι περιπτώσεις που μελετώνται επαναλαμβάνονται χρησιμοποιώντας τη μέθοδο των τρυβλίων για την επαλήθευση των φάσεων της μικροβιακής ανάπτυξης του κάθε εξεταζόμενου μικροοργανισμού, καθώς κατά τη διαδικασία πραγματοποίησης και επεξεργασίας αποτελεσμάτων της OD, προέκυψαν κάποια βασικά μειονεκτήματα που αφορούν τις καμπύλες ανάπτυξης και που δείχνουν ότι τα αποτελέσματα της μεθόδου OD δεν συμπίπτουν απόλυτα στη μικροβιακή ανάπτυξη των εξεταζόμενων μικροοργανισμών.

Τα δεδομένα από τις καμπύλες οπτικής πυκνότητας που προέκυψαν χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των ακόλουθων κινητικών παραμέτρων μέσω του μοντέλου των Baranyi και Roberts (1994) με τη βοήθεια του λογισμικού DMFit.

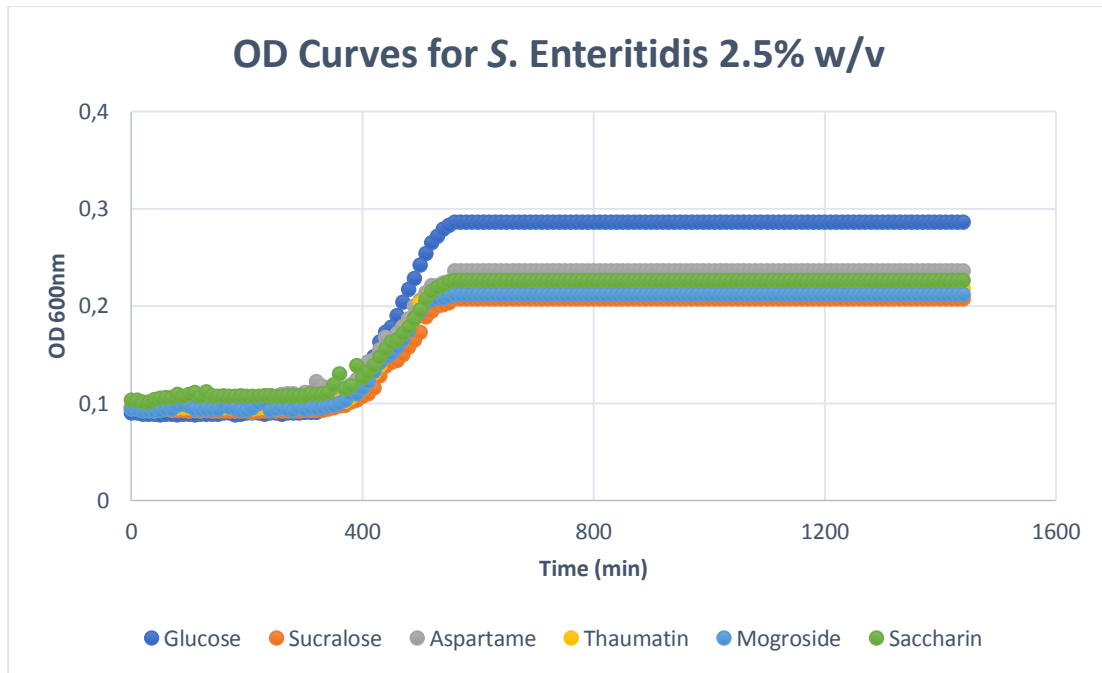
- i)  $T_{det}$  : η ισοδύναμη φάση προσαρμογής (lag phase), που στην συγκεκριμένη περίπτωση αντιπροσωπεύει τον χρόνο (min) που απαιτείται για να συμβούν αλλαγές οπτικής πυκνότητας στο μέσο ανάπτυξης.
- ii)  $MSrODC$ : Μέγιστη κλίση (ρυθμός) αλλαγών οπτικής πυκνότητας ( $min^{-1}$ ) που αντιπροσωπεύει την αλλαγή της κλίσης της εκθετικής φάσης της σιμοειδούς καμπύλης σε οπτική πυκνότητα, όπως προσδιορίζεται με την προσαρμογή των καμπυλών οπτικής πυκνότητας με το λογισμικό DMFit

Η μικροβιακή δραστηριότητα προσδιορίστηκε επίσης, έμμεσα με τον υπολογισμό της παραμέτρου **Area** (εμβαδόν) που αντιπροσωπεύει την περιοχή κάτω από την καμπύλη οπτικής πυκνότητας/χρόνου χρησιμοποιώντας τον τραπεζοειδή κανόνα (Chorianopoulos et al., 2006; Lambert and Pearson, 2000).

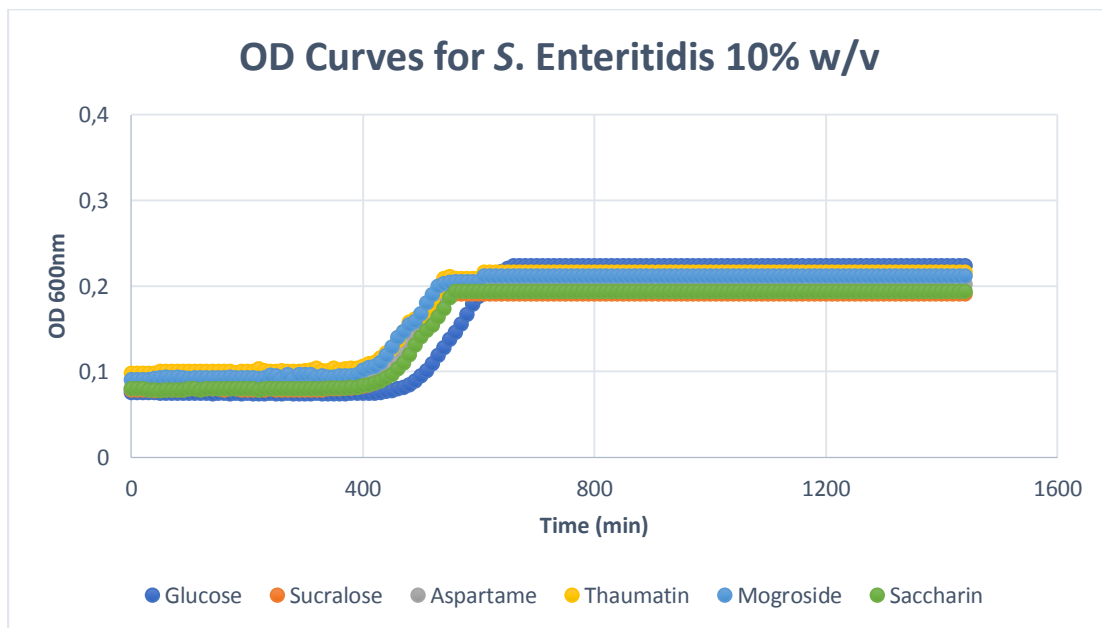
#### 5.1.1 *Salmonella* Enteritidis

Δεδομένου ότι η μέθοδος χαρακτηρίζεται από την υψηλή μεταβλητότητα των μετρήσεων, περισσότερες από 6 επαναλήψεις από κάθε περίπτωση αναλύθηκαν στην ίδια μικροπλακέτα. Για κάθε περίπτωση, οι μετρήσεις οπτικής πυκνότητας πραγματοποιήθηκαν κάθε 10 λεπτά, για 24 και 48 ώρες για *S. Enteritidis*.

Η γραφική απεικόνιση των αποτελεσμάτων παραθέτεται στα Γραφήματα «5.1-5.2».



**Γράφημα 5.1** Καμπύλες οπτικής πυκνότητας για *Salmonella* Enteritidis που αναπτύχθηκε σε θρεπτικό ζωμό συμπληρωμένο με τα επιλεγμένα γλυκαντικά και τη γλυκόζη (control) σε συγκέντρωση 2.5% w/v.



**Γράφημα 5.2.** Καμπύλες οπτικής πυκνότητας για *Salmonella* Enteritidis που αναπτύχθηκε σε θρεπτικό ζωμό συμπληρωμένο με τα επιλεγμένα γλυκαντικά και τη γλυκόζη (control) σε συγκέντρωση 10% w/v.

Όπως παρουσιάζεται στα «Γραφήματα 5.1-5.2», η *S. Enteritidis* έχει μεγαλύτερη ανάπτυξη στη γλυκόζη σε σχέση με τα υπόλοιπα γλυκαντικά στη περίπτωση της συγκέντρωσης 2.5% w/v, σε αντίθεση με τη περίπτωση της συγκέντρωσης 10% w/v

οπου επιβραδύνεται η ανάπτυξη του παθογόνου στη γλυκόζη, και δείχνει καλύτερη ανάπτυξη σε κάποια από τα γλυκαντικά. Με μία πρώτη ματιά, διακρίνεται ότι στη συγκέντρωση γλυκόζης 2.5% w/v, η αρχή της εκθετικής φάσης ξεκινάει περίπου στα «350 min» ενώ στο 10% w/v ξεκινάει περίπου στο χρονικό σημείο «450 min», γεγονός που σημαίνει ότι στη μικρότερη συγκέντρωση υπάρχει μικρότερη φάση προσαρμογής, με διαφορά περίπου 2 ωρών από τη φάση προσαρμογής της μεγαλύτερης συγκέντρωσης. Επιπλέον, στο 2.5% w/v η μέγιστη τιμή πυκνότητας πληθυσμού εμφανίζεται στο σημείο «0.286» που είναι μεγαλύτερο σε σχέση με τη μέγιστη τιμή πληθυσμού στην περίπτωση συγκέντρωσης 10% w/v, που βρίσκεται στο σημείο «0.224». Επομένως διαπιστώνεται ότι η μεγαλύτερη ποσότητα γλυκόζης είναι πιθανόν να επηρεάζει αρνητικά την ανάπτυξη της *S. Enteritidis*.

**Πίνακας 5.1.** Επίδραση της προσθήκης των υπό μελέτη γλυκαντικών σε συγκεντρώσεις 2.5 και 10% w/v ισοδυναμίας γλυκύτητας γλυκόζης, στο μέσο ανάπτυξης, στην κινητική της *S. Enteritidis*

Microorganism	Concentration	Kinetic parameters	Glucose	Aspartame	Saccharin	Sucralose	Mogroside	Advantame	Neohesperidin DC	Thaumatococin	Cyclamate	Stevia RA
<i>Salmonella Enteritidis</i>	2.5% w/v	Area	180.5 ± 14.1 <sup>a</sup>	143.1 ± 12.1 <sup>b</sup>	140.5 ± 12.9 <sup>b</sup>	110.4 ± 19.4 <sup>b</sup>	137.1 ± 19.0 <sup>b</sup>	132.9 ± 14.4 <sup>b</sup>	130.9 ± 14.8 <sup>b</sup>	141.4 ± 13.2 <sup>b</sup>	135.2 ± 14.7 <sup>b</sup>	141.5 ± 14.6 <sup>b</sup>
		Tdet	373.4 ± 5.9 <sup>a</sup>	374.5 ± 6.9 <sup>a</sup>	374.7 ± 13.5 <sup>a</sup>	380.6 ± 8.5 <sup>a</sup>	376.6 ± 11.4 <sup>a</sup>	379.4 ± 4.3 <sup>a</sup>	371.7 ± 17.7 <sup>a</sup>	376.2 ± 11.4 <sup>a</sup>	384.6 ± 7.9 <sup>a</sup>	360.3 ± 4.6 <sup>a</sup>
		MSrODC	0.166 ± 0.011 <sup>a</sup>	0.122 ± 0.010 <sup>b</sup>	0.115 ± 0.010 <sup>b</sup>	0.130 ± 0.014 <sup>b</sup>	0.119 ± 0.008 <sup>b</sup>	0.124 ± 0.009 <sup>b</sup>	0.128 ± 0.015 <sup>b</sup>	0.134 ± 0.014 <sup>b</sup>	0.130 ± 0.019 <sup>b</sup>	0.126 ± 0.010 <sup>b</sup>
	10% w/v	Area	118.0 ± 9.6 <sup>a</sup>	109.9 ± 7.4 <sup>a</sup>	101.6 ± 11.8 <sup>a</sup>	113.1 ± 7.5 <sup>a</sup>	123.0 ± 9.3 <sup>a</sup>	125.3 ± 2.0 <sup>a</sup>	123.0 ± 7.5 <sup>a</sup>	109.6 ± 10.2 <sup>a</sup>	119.0 ± 6.9 <sup>a</sup>	115.9 ± 7.9 <sup>a</sup>
		Tdet	453.4 ± 8.2 <sup>a</sup>	408.2 ± 11.0 <sup>b</sup>	412.6 ± 8.1 <sup>b</sup>	406.7 ± 11.5 <sup>b</sup>	407.0 ± 7.1 <sup>b</sup>	400.5 ± 4.0 <sup>b</sup>	399.8 ± 7.3 <sup>b</sup>	404.5 ± 11.4 <sup>b</sup>	396.9 ± 8.01 <sup>b</sup>	409.3 ± 8.1 <sup>b</sup>
		MSrODC	0.125 ± 0.006 <sup>a</sup>	0.132 ± 0.009 <sup>a</sup>	0.120 ± 0.007 <sup>a</sup>	0.120 ± 0.005 <sup>a</sup>	0.128 ± 0.010 <sup>a</sup>	0.127 ± 0.005 <sup>a</sup>	0.136 ± 0.007 <sup>a</sup>	0.129 ± 0.014 <sup>a</sup>	0.126 ± 0.008 <sup>a</sup>	0.124 ± 0.003 <sup>a</sup>

Στον πίνακα «Πίνακα 5.1» παρατίθενται τα αποτελέσματα για τον προσδιορισμό στατιστικά σημαντικών διαφορών ( $P_{\text{value}} < 0,05$ ) των κινητικών παραμέτρων, μεταξύ των διαφορετικών περιπτώσεων. Οι μέσες τιμές με διαφορετικά γράμματα (a, b) εντός των σειρών υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $P_{\text{value}} < 0,05$ ) μεταξύ του control (γλυκόζη) και κάθε γλυκαντικού. Για παράδειγμα εάν η γλυκόζη (a) δεν έχει στατιστική σημαντική διαφορά με κάποιο γλυκαντικό, το γλυκαντικό θα έχει τον εκθέτη «a». Εάν έχει στατιστική σημαντική διαφορά, τότε το γλυκαντικό συμβολίζεται με τον εκθέτη «b». Οι τιμές εκφράζονται ως Μέσος Όρος (Mean) ± Τυπική Απόκλιση (Standard Deviation).

Στην πειραματική περίπτωση της συγκέντρωσης 2.5% w/v (βλ. Πίνακα 5.1) παρατηρείται ότι στην παράμετρο «Area» υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στη γλυκόζη (έχει μεγαλύτερο εμβαδόν) και τα υπόλοιπα γλυκαντικά, με εντονότερες τις διαφορές με τη σουκραλόζη και νεοεσπεριδίνη DC. Ποσοτικά, η μεγαλύτερη διαφορά βρίσκεται μεταξύ της γλυκόζης με Area: 180.5 ± 14.1 και της σουκραλόζης με Area: 110.4 ± 19.4. Όσον αφορά τη παράμετρο «MSrODC», η γλυκόζη έχει τη μεγαλύτερη τιμή και έχει στατιστικά σημαντικές διαφορές με όλα τα γλυκαντικά, κυρίως όμως με τη σακχαρίνη, τη μογροσίδη, την ασπαρτάμη και την αντβαντάμη. Η μεγαλύτερη διαφορά βρίσκεται μεταξύ της γλυκόζης με MSrODC: 0.166 ± 0.011 και της σακχαρίνης με MSrODC: 0.115 ± 0.010.



Σχετικά με τη στέβια RA, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, Οι Li et al. (2014) παρουσίασαν μια μελέτη στην οποία εξετάστηκε η επίδραση του γλυκαντικού στέβια «Reb A» στην ανάπτυξη πολλών βακτηρίων, συμπεριλαμβανομένου του *S. Typhimurium*. Ωστόσο, αναφέρθηκε μικρή επίδραση στην ανάπτυξη αυτού του βακτηρίου. Επιβεβαιώνοντας τα αποτελέσματα, οι Lobete et al, (2017) στους 20 °C δεν παρατήρησαν διαφορές στην ανάπτυξη του *S. Typhimurium* στα μέσα με διαφορετικές συγκεντρώσεις στέβιας (3, 9 και 15% w/v).

Ωστόσο, όσον αναφορά το « $T_{det}$ » (lag phase, LP) καταγράφηκαν διαφορές μεταξύ της γλυκόζης και των γλυκαντικών, με την σουκραλόζη, την αντβαντάμη και το κυκλαμικό να έχουν μεγαλύτερες τιμές σε σχέση με τη γλυκόζη. Όμως, οι διαφορές αυτές δεν θεωρούνται σημαντικές. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, οι Cuevas et al. (2010) υποστηρίζουν ότι το υψηλό τυπικό σφάλμα που σχετίζεται με τις διάρκειες της φάσης προσαρμογής (lag phase) πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν.

Συνολικά, συμπεραίνεται ότι στην περίπτωση της *S. Enteritidis*, οι παράμετροι «Area» και «MSrODC» ήταν σημαντικά υψηλότερες σε γλυκόζη 2.5%w/v σε σύγκριση με την ισοδύναμη συγκέντρωση γλυκαντικών, υποδηλώνοντας καλύτερη ανάπτυξη του παθογόνου στη γλυκόζη.

Στη περίπτωση της υψηλότερης συγκέντρωσης 10% w/v, η παράμετρος «Area» καθώς και το «MSrODC» δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των γλυκαντικών και της γλυκόζης. Συγκεκριμένα για την παράμετρο «Area», μεγαλύτερο εμβαδόν από τη γλυκόζη έχουν κυρίως η αντβαντάμη και η μογροσίδη, ενώ στη περίπτωση του «MSrODC», οι μεγαλύτερες τιμές υπάρχουν στην νεοεσπεριδίνη DC, στην αντβαντάμη και στη μογροσίδη. Όμως, οι διαφορές αυτές σύμφωνα με τη στατιστική ανάλυση δεν είναι στατιστικά σημαντικές. Από την άλλη πλευρά, το « $T_{det}$ » της γλυκόζης είχε στατιστικά σημαντικές διαφορές με τα υπόλοιπα γλυκαντικά και πιο συγκεκριμένα, η lag phase της γλυκόζης είναι μεγαλύτερη σε σχέση με την lag phase των υπόλοιπων γλυκαντικών. Οι μεγαλύτερες διαφορές ήταν μεταξύ της γλυκόζης και της αντβαντάμης, του κυκλαμικού και της νεοεσπεριδίνης DC, με την πιο σημαντική να είναι του κυκλαμικού με  $T_{det}$ :  $396.9 \pm 8.01$  και της γλυκόζης:  $453.4 \pm 8.2$ . Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, το αποτέλεσμα αυτό είναι αποδεκτό και αναμενόμενο καθώς η ζάχαρη, παρά την υψηλή συγκέντρωση (10%) στην οποία βρίσκεται, συνήθως ελαττώνει το ρυθμό αύξησης του μικροοργανισμού ενώ παράλληλα αυξάνει την φάση προσαρμογής (Batalla, 2015).

Σε μια απόπειρα γενικότερης εκτίμησης, στην περίπτωση της *S. Enteritidis*, η δυναμική ανάπτυξης διαφέρει μεταξύ των δύο συγκεντρώσεων. Η συνολική ανάπτυξη ήταν υψηλότερη στη γλυκόζη για 2.5% w/v, ενώ δεν παρατηρήθηκαν διαφορές για τη φάση προσαρμογής ( $T_{det}$ ) μεταξύ της γλυκόζης και των γλυκαντικών. Αντίθετα, η υψηλότερη συγκέντρωση επηρέασε διαφορετικά την ανάπτυξη του παθογόνου, αφού μόνο η παράμετρος « $T_{det}$ » ήταν σημαντικά υψηλότερη σε γλυκόζη. Αυξάνοντας στο 10% w/v τη συγκέντρωσή της γλυκόζης, η ενισχυμένη ποσότητά στο θρεπτικό υπόστρωμα τείνει να δυσκολεύει τον μικροοργανισμό, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, δικαιολογώντας τη μεγάλη διαφορά του « $T_{det}$ » μεταξύ γλυκόζης και των υπόλοιπων γλυκαντικών.

Οι Lobete et al., (2017), πραγματοποίησαν πείραμα τους 20 °C όπου λήφθηκαν τυπικές σιμοειδείς καμπύλες για όλες τις συνθήκες που δοκιμάστηκαν, δηλαδή μεταξύ των τριών συγκεντρώσεων ζάχαρης (3, 9 και 15% (w/v) σε TSB. Τα αποτελέσματα

έδειξαν μόνο μικρές διαφορές μεταξύ των τριών περιπτώσεων, ως προς το μέγιστο ρυθμό ανάπτυξης, με μια χαμηλότερη τιμή  $\mu_{max}$  να χαρακτηρίζει την ανάπτυξη του *S. Typhimurium* με 15% (w/v) TS (Table Sugar). Αυτή η ελαφρώς πιο αργή ανάπτυξη μπορεί να είναι συνέπεια της χαμηλότερης ενεργότητας νερού των μέσων. Το φαινόμενο αυτό έχει περιγραφεί προηγουμένως από τους Brocklehurst et al. (1995), οι οποίοι μελέτησαν την ανάπτυξη του *S. Typhimurium* στους 20 °C σε TSB, με φθίνουσες τιμές του  $a_w$  από 0,992 σε 0,919, με προσθήκη σακχαρόζης. Το εύρος συγκέντρωσης που χρησιμοποιήθηκε ήταν από 0 έως 50% (w/v) σακχαρόζη και η χαμηλότερη συγκέντρωση σακχαρόζης που παρουσίαζε βραδύτερο ρυθμό ανάπτυξης ήταν 15% (w/v).

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, οι μελέτες που έχουν δείξει ότι τα γλυκαντικά επηρεάζουν την ανάπτυξη των παθογόνων μικροοργανισμών όπως της *S. Typhimurium*, χρησιμοποιούν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αυτών, που δεν σχετίζονται με τον υπολογισμό γλυκύτητας σε σχέση με την γλυκόζη, όπως στην παρούσα μελέτη. Για παράδειγμα η Batalha (2015), συμπέρανε πως η αύξηση της συγκέντρωσης γλυκαντικού σε μέσο φαίνεται να αυξάνει τη διάρκεια της φάσης προσαρμογής του μικροοργανισμού. Ωστόσο, ανεξάρτητα από τη δομή του μέσου, η παρουσία ζάχαρης προκαλεί τη μεγαλύτερη φάση προσαρμογής της σαλμονέλας σε σχέση με τα γλυκαντικά, που πιθανώς οφείλεται στη μείωση ενεργότητας νερού που προκαλεί.

Συμπερασματικά, λόγω ότι οι συγκεντρώσεις (25% w/v και 10% w/v) των γλυκαντικών στην παρούσα εργασία υπολογίζονται με βάση τη σχετική γλυκύτητα σε σχέση με την γλυκόζη, δεν παρουσιάζονται μεγάλες διαφορές μεταξύ των δύο συγκεντρώσεων και δεν επηρεάζουν σημαντικά την ανάπτυξη της *S. Enteritidis*, καθώς βρίσκονται σε μικρές ποσότητες. Ο βασικός παράγοντας που επηρεάζει την ανάπτυξη του συγκεκριμένου παθογόνου είναι η παρουσία ή η απουσία γλυκόζης. Με βάση αυτά τα δεδομένα, αφαιρώντας τη γλυκόζη από το μέσο και προσθέτοντας τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις των γλυκαντικών με βάση τη σχετική γλυκύτητα (κυρίως στο 2.5%), η *S. Enteritidis* δεν θα μπορούσε να έχει καλή ανάπτυξη, γεγονός που θα βοηθούσε στο επιχείρημα αντικατάστασης της γλυκόζης με γλυκαντικά.

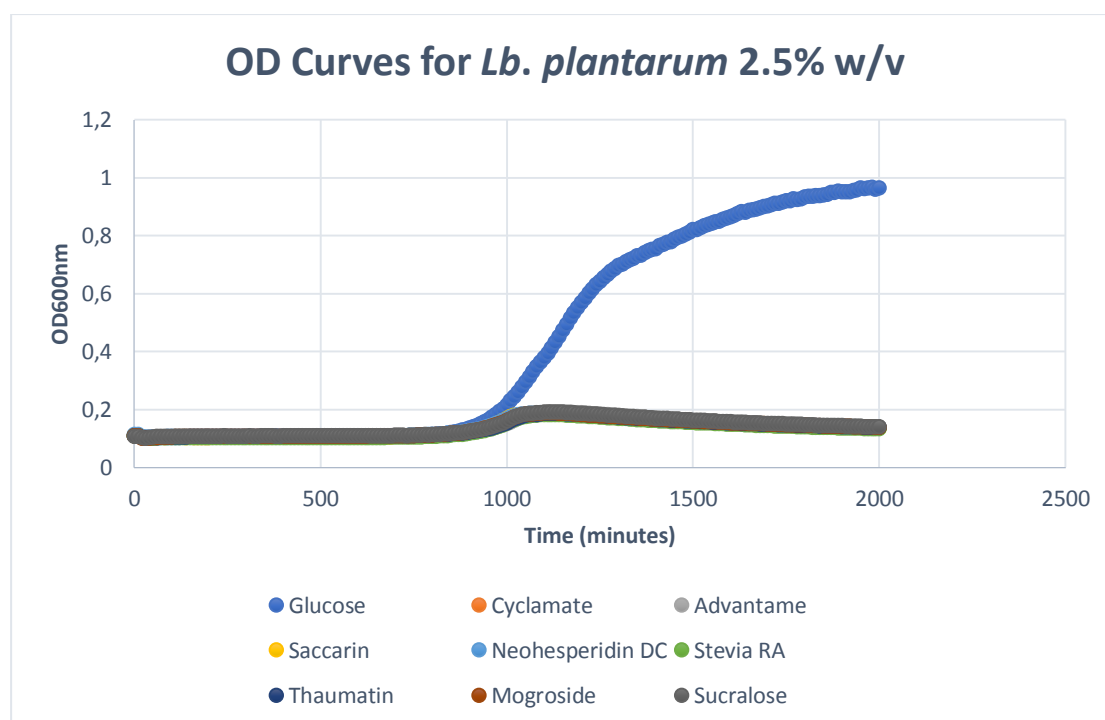
**Πίνακας 5.2.** Επίδραση της προσθήκης κάποιων δοκιμασμένων γλυκαντικών και σκέτου Nutrient Broth σε συγκεντρώσεις 2.5 και 10% w/v ισοδυναμίας γλυκύτητας γλυκόζης στην κινητική της *S. Enteritidis*

Microorganism	Concentration	Kinetic parameters	Glucose	Aspartame	Saccharin	Sucralose	Mogroside	Advantame	Nutrient Broth
<i>Salmonella</i> Enteritidis	2.5% w/v	Area	180.5 ± 14.1 <sup>a</sup>	143.1 ± 12.1 <sup>b</sup>	140.5 ± 12.9 <sup>b</sup>	110.4 ± 19.4 <sup>b</sup>	137.1 ± 19.0 <sup>b</sup>	132.9 ± 14.4 <sup>b</sup>	140.5 ± 14.7 <sup>b</sup>
		Tdet	373.4 ± 5.9 <sup>a</sup>	374.5 ± 6.9 <sup>a</sup>	374.7 ± 13.5 <sup>a</sup>	380.6 ± 8.5 <sup>a</sup>	376.6 ± 11.4 <sup>a</sup>	379.4 ± 4.3 <sup>a</sup>	374.9 ± 5.9 <sup>a</sup>
		MSrODC	0.166 ± 0.011 <sup>a</sup>	0.122 ± 0.010 <sup>b</sup>	0.115 ± 0.010 <sup>b</sup>	0.130 ± 0.014 <sup>b</sup>	0.119 ± 0.008 <sup>b</sup>	0.124 ± 0.009 <sup>b</sup>	0.127 ± 0.009 <sup>b</sup>
	10% w/v	Area	118.0 ± 9.6 <sup>a</sup>	109.9 ± 7.4 <sup>a</sup>	101.6 ± 11.8 <sup>a</sup>	113.1 ± 7.5 <sup>a</sup>	123.0 ± 9.3 <sup>a</sup>	125.3 ± 2.0 <sup>a</sup>	114.7 ± 7.6 <sup>a</sup>
		Tdet	453.4 ± 8.2 <sup>a</sup>	408.2 ± 11.0 <sup>b</sup>	412.6 ± 8.1 <sup>b</sup>	406.7 ± 11.5 <sup>b</sup>	407.0 ± 7.1 <sup>b</sup>	400.5 ± 4.0 <sup>b</sup>	401.6 ± 7.0 <sup>b</sup>
		MSrODC	0.125 ± 0.006 <sup>a</sup>	0.132 ± 0.009 <sup>a</sup>	0.120 ± 0.007 <sup>a</sup>	0.120 ± 0.005 <sup>a</sup>	0.128 ± 0.010 <sup>a</sup>	0.127 ± 0.005 <sup>a</sup>	0.125 ± 0.010 <sup>a</sup>

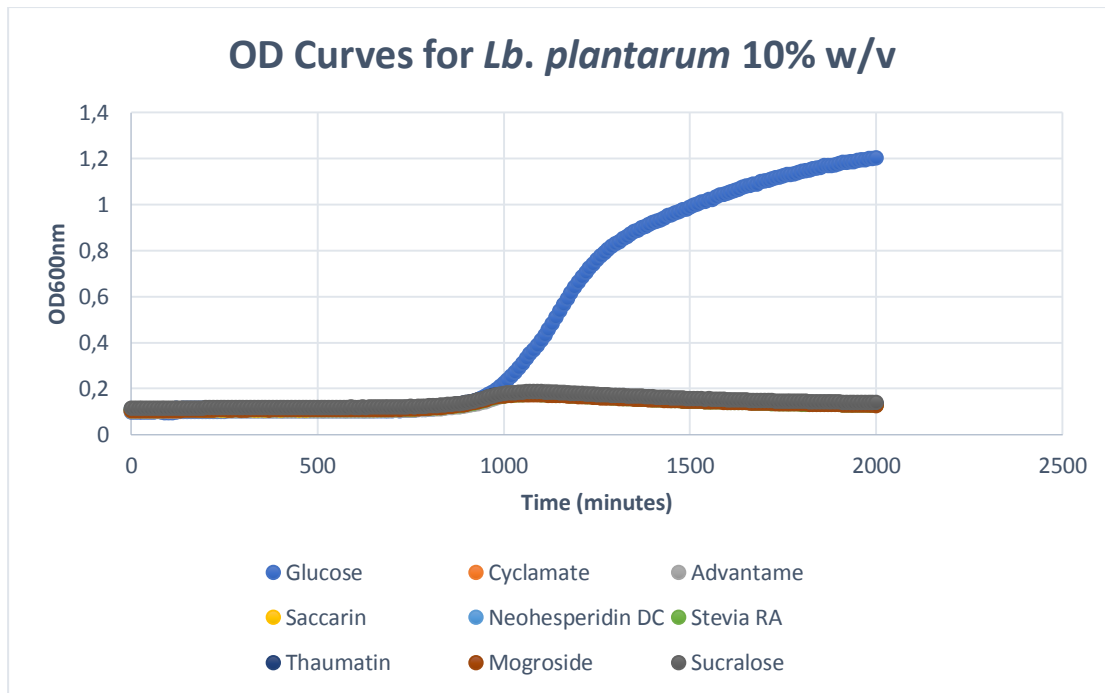
Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι και στις δύο περιπτώσεις συγκεντρώσεων, δοκιμάστηκε στο microplate εμβολιασμός με τον παθογόνο μικροοργανισμό σε σκέτο Nutrient Broth άνευ γλυκόζης και έπειτα ακολούθησε στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων για την ενίσχυση αυτών και προκειμένου να σημειωθεί τυχόν διαφορά μεταξύ του Nutrient Broth χωρίς γλυκόζη και των γλυκαντικών του πειράματος. Παρατηρήθηκε, όπως φαίνεται και στον «Πίνακα 5.2», ότι το σκέτο θρεπτικό υπόστρωμα δεν είχε σημαντικές διαφορές με τα γλυκαντικά. Συμπερασματικά, ο παράγοντας που επηρεάζει τον παθογόνο μικροοργανισμό είναι κατά κύριο λόγο η γλυκόζη και οι συγκεντρώσεις στις οποίες βρίσκεται.

### 5.1.2 *Lactiplantibacillus plantarum*

Η πειραματική διαδικασία για την μελέτη του προφίλ ανάπτυξης του *Lb. plantarum* σε σχέση με τη γλυκόζη και τα εξεταζόμενα γλυκαντικά περιλαμβάνει τα ίδια βήματα με αυτά που χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη του παθογόνου *S. Enteritidis*. Οι μετρήσεις οπτικής πυκνότητας πραγματοποιήθηκαν κάθε 10 λεπτά για συνολικά 96 ώρες. Παρακάτω εμφανίζεται η γραφική απεικόνιση των αποτελεσμάτων της OD, στα «Γραφήματα 5.7-5.8»:



**Γράφημα 5.3** Καμπύλες οπτικής πυκνότητας για *Lactiplantibacillus plantarum* που αναπτύχθηκε σε θρεπτικό ζωμό συμπληρωμένο με τα επιλεγμένα γλυκαντικά και τη γλυκόζη (control) σε συγκέντρωση 2.5% w/v.



**Γράφημα 5.4.** Καμπύλες οπτικής πυκνότητας για *Lactiplantibacillus plantarum* που αναπτύχθηκε σε θρεπτικό ζωμό συμπληρωμένο με τα επιλεγμένα γλυκαντικά και τη γλυκόζη (control) σε συγκέντρωση 10% w/v.

Όπως παρατηρείται στα «Γραφήματα 5.3-5.4», το οξυγαλακτικό βακτήριο *Lb. plantarum* έχει μεγαλύτερη ανάπτυξη στη γλυκόζη σε σχέση με τα υπόλοιπα γλυκαντικά στη περίπτωση της συγκέντρωσης 2.5% w/v αλλά στη περίπτωση της συγκέντρωσης 10% w/v. Συγκρίνοντας τα δύο γραφήματα, διακρίνεται ότι στην περίπτωση της συγκέντρωσης γλυκόζης 10% w/v υπάρχει μεγαλύτερη ανάπτυξη από την περίπτωση μικρότερης συγκέντρωσης γλυκόζης, καθώς στο 2.5% w/v η μέγιστη τιμή πυκνότητας πληθυσμού εμφανίζεται στο σημείο «0.965» που είναι μικρότερο σε σχέση με τη μέγιστη τιμή πυκνότητας πληθυσμού στην περίπτωση συγκέντρωσης 10% w/v, που βρίσκεται στο σημείο «1.2». Επομένως διαπιστώνεται ότι η αύξηση της συγκέντρωσης γλυκόζης στο θρεπτικό υλικό, αυξάνει και το ρυθμός ανάπτυξης του *Lb. plantarum*.

**Πίνακας 5.3.** Επίδραση της προσθήκης των δοκιμασμένων γλυκαντικών σε συγκεντρώσεις 2.5 και 10% w/v ισοδυναμίας γλυκύτητας γλυκόζης, στο μέσο ανάπτυξης, στην κινητική του *Lb. plantarum*

Microorganism	Concentration	Kinetic parameters	Glucose	Stevia Reb A	Saccharin	Sucralose	Thaumatococin	Cyclamate	Advantame	Mogroside
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	2.5% w/v	Area	675.4±40.47 <sup>a</sup>	69.1±8.084 <sup>b</sup>	77.2±12.9 <sup>b</sup>	90.5±9.6 <sup>b</sup>	77.5±11.4 <sup>b</sup>	70.7±8.061 <sup>b</sup>	88.4±14.7 <sup>b</sup>	87.1±12.3 <sup>b</sup>
		T <sub>det</sub>	946.65±14.4 <sup>a</sup>	882.4±18.1 <sup>b</sup>	862.3±7.7 <sup>b</sup>	879.8±14.3 <sup>b</sup>	883.3±12.8 <sup>b</sup>	879.9±16.5 <sup>b</sup>	896.6±17.2 <sup>b</sup>	872.9±12.7 <sup>b</sup>
		MSrODC	0.317 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.061 ± 0.004 <sup>b</sup>	0.062 ± 0.002 <sup>b</sup>	0.062 ± 0.002 <sup>b</sup>	0.057 ± 0.002 <sup>b</sup>	0.062 ± 0.003 <sup>b</sup>	0.065 ± 0.001 <sup>b</sup>	0.067 ± 0.002 <sup>b</sup>
	10% w/v	Area	824.7±26.3 <sup>a</sup>	60.9±7.7 <sup>b</sup>	68.4±11.2 <sup>b</sup>	62.3±9.7 <sup>b</sup>	63.5±12.1 <sup>b</sup>	74.7±13.3 <sup>b</sup>	73.35±9.3 <sup>b</sup>	70.8±2.9 <sup>b</sup>
		T <sub>det</sub>	958.85±11 <sup>a</sup>	848.0 ± 8.3 <sup>b</sup>	878.3 ± 21.3 <sup>b</sup>	905.1 ± 35 <sup>b</sup>	844.6 ± 24.9 <sup>b</sup>	827.2±16.5 <sup>b</sup>	895.7 ± 25.2 <sup>b</sup>	892.5 ± 5.6 <sup>b</sup>
		MSrODC	0.369 ± 0.002 <sup>a</sup>	0.049 ± 0.001 <sup>b</sup>	0.050 ± 0.001 <sup>b</sup>	0.049 ± 0.001 <sup>b</sup>	0.049 ± 0.002 <sup>b</sup>	0.072 ± 0.004 <sup>b</sup>	0.049 ± 0.001 <sup>b</sup>	0.048 ± 0.001 <sup>b</sup>

Έπειτα από την ολοκλήρωση της στατιστικής ανάλυσης στατιστική ανάλυση για τον προσδιορισμό τυχόν σημαντικών διαφορών ( $P_{value} < 0,05$ ) των κινητικών παραμέτρων μεταξύ των διαφορετικών περιπτώσεων, όπως φαίνεται και στον «Πίνακα 5.3», στην πειραματική περίπτωση της συγκέντρωσης 2.5% w/v, παρατηρείται ότι σε όλες τις παραμέτρους υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με τη γλυκόζη και τα γλυκαντικά. Πιο συγκεκριμένα, στην παράμετρο «Area» υπάρχουν σημαντικές στατιστικές διαφορές ανάμεσα στη γλυκόζη, η οποία έχει το μεγαλύτερο εμβαδόν, και σε όλα τα υπόλοιπα γλυκαντικά που μελετήθηκαν. Οι πιο έντονες διαφορές παρατηρήθηκαν με τα γλυκαντικά: στέβια, κυκλαμικό και σακχαρίνη, με την με πιο μεγάλη ανάμεσα στη γλυκόζη με Area:  $675.4 \pm 40.47$  και στη στέβια RA με Area:  $69.1 \pm 8.084$ . Επίσης μεγάλες στατιστικές διαφορές παρατηρούνται και στην περίπτωση του «MSrODC», όπου η γλυκόζη έχει τη μεγαλύτερη τιμή από τα υπόλοιπα γλυκαντικά, με την μεγαλύτερη διαφορά να υπάρχει ανάμεσα στη γλυκόζη με MSrODC:  $0.137 \pm 0.02$  και την θωματίνη με MSrODC:  $0.057 \pm 0.002$ . Μικρότερες διαφορές αλλά επίσης στατιστικά σημαντικές, παρατηρούνται στη παράμετρο «T<sub>det</sub>», με την γλυκόζη να έχει τη μεγαλύτερη lag phase σε σχέση με τα υπόλοιπα γλυκαντικά. Η μεγαλύτερη διαφορά βρίσκεται ανάμεσα στη γλυκόζη με T<sub>det</sub>:  $946.65 \pm 14.4$  και στην σακχαρίνη με T<sub>det</sub>:  $862.3 \pm 7.7$ . Από τα δεδομένα αυτά σε συνδυασμό με το «Γράφημα 5.7» που φαίνεται η ανάπτυξη του μικροοργανισμού σε συγκέντρωση 2.5% w/v, συμπεραίνεται ότι η ανάπτυξη του μικροοργανισμού είναι με διαφορά μεγαλύτερη στη γλυκόζη σε σχέση με τα εξεταζόμενα γλυκαντικά, κυρίως με τη σακχαρίνη και τη στέβια.

Παρόμοια αποτελέσματα εμφανίζονται και στη συγκέντρωση 10% w/v, καθώς σε όλες τις παραμέτρους εμφανίζονται στατιστικά σημαντικές διαφορές. Στην περίπτωση της παραμέτρου «Area» υπάρχουν σημαντικές στατιστικές διαφορές ανάμεσα στη γλυκόζη, η οποία έχει το μεγαλύτερο εμβαδόν, και σε όλα τα υπόλοιπα γλυκαντικά που μελετήθηκαν. Οι πιο έντονες διαφορές παρατηρήθηκαν με τα γλυκαντικά: στέβια, σουκραλόζη και σακχαρίνη, με την με πιο μεγάλη ανάμεσα στη γλυκόζη με Area:  $824.7 \pm 26.3$  και στη στέβια RA με Area:  $60.9 \pm 7.7$ . Επίσης μεγάλες στατιστικές διαφορές παρατηρούνται και στην περίπτωση του «MSrODC», όπου η γλυκόζη έχει τη μεγαλύτερη τιμή από τα υπόλοιπα γλυκαντικά, με την μεγαλύτερη διαφορά να υπάρχει ανάμεσα στη γλυκόζη με MSrODC:  $0.369 \pm 0.002$  και τη μογροσίδη με MSrODC:  $0.048 \pm 0.001$ .

Μικρότερες διαφορές αλλά επίσης στατιστικά σημαντικές διαφορές παρατηρούνται στη παράμετρο « $T_{det}$ », με την γλυκόζη να έχει τη μεγαλύτερη lag phase σε σχέση με τα υπόλοιπα γλυκαντικά, κυρίως με το κυκλαμικό, τη στέβια και τη σακχαρίνη. Η μεγαλύτερη διαφορά βρίσκεται ανάμεσα στη γλυκόζη με  $T_{det}$ :  $958.85 \pm 11$  και στο κυκλαμικό με  $T_{det}$ :  $827.2 \pm 16.5$ . Ως αποτέλεσμα, παρατηρώντας τον «Πίνακα 5.3» σε συνδυασμό με το «Γράφημα 5.4» που φαίνεται η ανάπτυξη του μικροοργανισμού σε συγκέντρωση 10% w/v, υπάρχει καθαρά μεγαλύτερη ανάπτυξη στη γλυκόζη σε σχέση με τα γλυκαντικά, όπως και στην περίπτωση του 2.5% w/v. Μια πιθανή υπόθεση στο γεγονός ότι υπάρχει σημαντική ανάπτυξη του μικροοργανισμού και στο 10% w/v παρόλο που η συγκέντρωση της γλυκόζης είναι κατά μεγάλο ποσοστό αυξημένη, είναι το γεγονός ότι τα γαλακτικά βακτήρια δεν επηρεάζονται με την αύξηση της γλυκόζης και συνεχίζουν να αυξάνονται.

Όσον αφορά τη δυναμική ανάπτυξης του *Lb.plantarum* στο σύνολό της, παρουσιάζονται παρόμοιες τάσεις για τις τρεις παραμέτρους που εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές και για τις δύο συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν. Συγκεκριμένα, το βακτήριο είχε συνολικά υψηλότερη ανάπτυξη σε γλυκόζη, με τη φάση προσαρμογής να είναι μεγαλύτερη, ενώ αντίθετα, τη μέγιστη κλίση αλλαγών οπτικής πυκνότητας και το εμβαδόν να είναι χαμηλότερη στα γλυκαντικά, κυρίως τη σακχαρίνη και τη στέβια RA. Οι Weber και Hekmat (2013) επισημάνουν ότι οι γλυκοσίδες στεβιόλης αναφέρονται ως κατάλληλα γλυκαντικά για το προβιοτικό γιαούρτι καθώς δεν επηρεάζουν την ανάπτυξη των στελεχών του *Lactobacillus*. Επιπλέον ανέφεραν ότι τα στελέχη *Lactobacilli* είναι ανθεκτικά στη βακτηριοκτόνο δράση του εκχυλίσματος στέβια, δεδομένο που πιθανόν ενισχύει την περίπτωση εφαρμογή της στέβιας ως ευεργετική για την πρόληψη της ταχείας ανάπτυξης παθογόνων βακτηρίων.

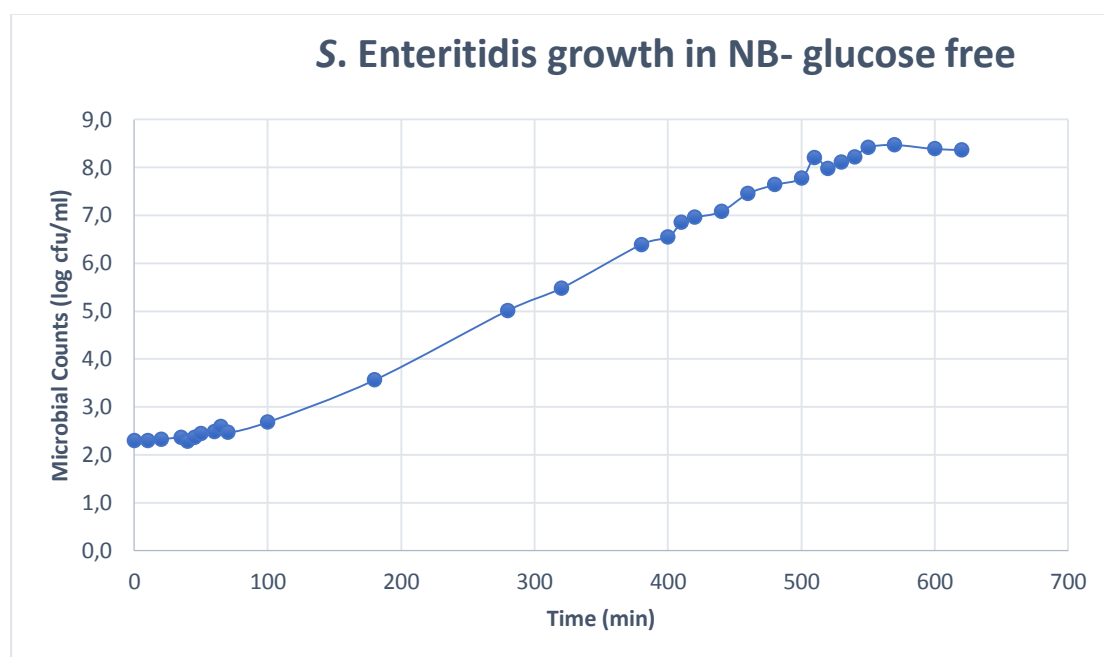
Σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, σε πείραμα που πραγματοποιήθηκε από τους Davoodi et al. (2016), μελετήθηκε η ανάπτυξη των γαλακτικών βακτηρίων *Lact. plantarum*, *Lact.casei* και *Lact.brevis*, σε βασικό μέσο MRS με προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων γλυκόζης, σακχαρόζης, φύλλου στέβιας και στεβιοσίδης (20, 10, 5 και 2.5 g l<sup>-1</sup>) και με pH ρυθμισμένο στο 6,2. Σε αυτή τη μελέτη, η μέγιστη ανάπτυξη και παραγωγή γαλακτικού οξέος του *Lact. brevis*, *Lact. plantarum* και *Lact.casei* λήφθηκε σε υψηλή συγκέντρωση σακχαρόζης (10 g l<sup>-1</sup>), γεγονός που στηρίζεται από βιβλιογραφία (Rose et al. 1952) που αναφέρει πως μερικά LAB χρησιμοποιούν την πηγή άνθρακα του δισακχαρίτη πιο εύκολα από τον μονοσακχαρίτη. Παρόλα αυτά, και σε αυτήν την μελέτη αποδείχθηκε ότι μεταξύ των τεσσάρων άλλων πηγών άνθρακα που ερευνήθηκαν, η ελάχιστη βακτηριακή ανάπτυξη τριών στελεχών επιτεύχθηκε σε μέσο που περιέχει φύλλο στέβιας και στεβιοσίδα.

## 5.2 Προσδιορισμός ανάπτυξης των μικροοργανισμών με την μέθοδο των τρυβλίων

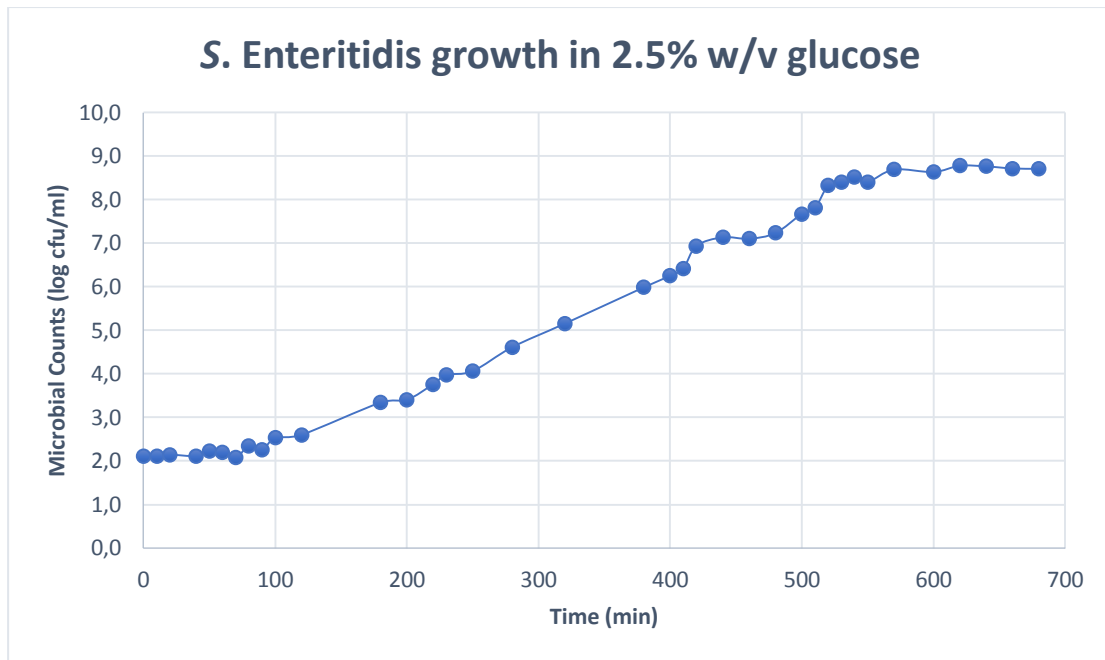
### 5.2.1 *Salmonella* Enteritidis

Κατά τη πραγματοποίηση της μεθόδου OD στην περίπτωση της *S. Enteritidis*, παρατηρείται μια διπλή ανάπτυξη, όπου η δεύτερη καμπύλη ανάπτυξης αρχίζει έπειτα από την αρχική στατική φάση. Το γεγονός αυτό πιθανόν να οφείλεται σε κάποιο μεταβολικό προϊόν που παράγεται και επηρεάζει την καμπύλη ανάπτυξης, μεταφράζοντας την σαν εκθετική φάση. Για αυτό τον λόγο χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των τρυβλίων, προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι οι φάσεις ανάπτυξης και η καμπύλη ανάπτυξης είναι ορθές και ότι η δεύτερη εκθετική φάση αφορά σφάλμα μεθόδου.

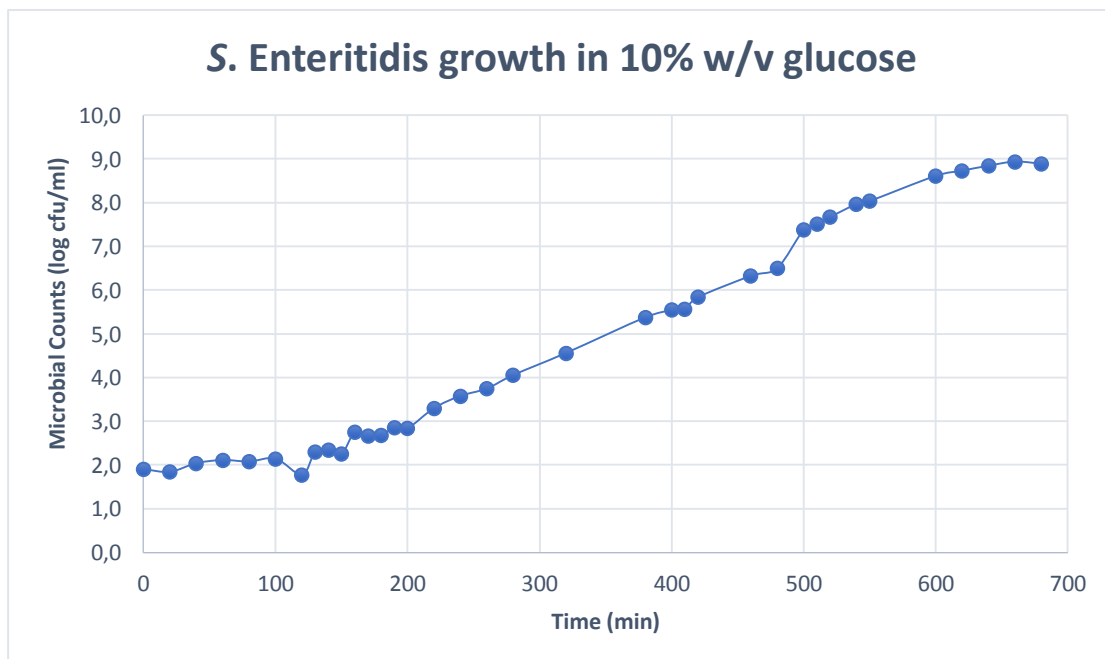
Παρακάτω παρουσιάζεται η γραφική απεικόνιση των αποτελεσμάτων στα Γραφήματα «5.3-5.4-5.5».



**Γράφημα 5.5.** Αντιπροσωπευτικό γράφημα που απεικονίζει την τυπική ανάπτυξη της *S. Enteritidis* σε Nutrient Broth χωρίς γλυκόζη, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο των τρυβλίων.



**Γράφημα 5.6.** Αντιπροσωπευτικό γράφημα που απεικονίζει την τυπική ανάπτυξη της *S. Enteritidis* σε 2.5% w/v γλυκόζη, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο των τρυβλίων.



**Γράφημα 5.7.** Αντιπροσωπευτικό γράφημα που απεικονίζει την τυπική ανάπτυξη της *S. Enteritidis* σε 10% w/v γλυκόζη, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο των τρυβλίων.

Κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας, στις αντιπροσωπευτικές καμπύλες βακτηριακής ανάπτυξης που παρουσιάζονται παραπάνω, εμφανίζονται οι εξής διακριτές φάσεις ανάπτυξης: η φάση προσαρμογής (lag phase), η προσαρμογή πριν από την έναρξη της εκθετικής ανάπτυξης (early exponential phase) η εκθετική φάση (exponential phase) όπου η κυτταρική διαίρεση προχωρά με σταθερό ρυθμό, το τελευταίο σημείο της



εκθετικής πριν ξεκινήσει η στατική φάση (late exponential phase), και η στατική φάση. Κατόπιν της στατικής φάσης, οι συνθήκες γίνονται δυσμενείς για την ανάπτυξη των βακτηρίων, αυτά σταματούν να αναπαράγονται. Στις καμπύλες των «Γραφημάτων 5.5-5.6-5.7» η στατική φάση έπειτα από τα 700 min έχει αφαιρεθεί, καθώς ύστερα από συσχέτιση με τα αποτελέσματα της OD, μας οδηγεί στο συμπέρασμα πως η διπλή ανάπτυξη που παρουσιαζόταν έπειτα από αυτό το σημείο, προκαλείται από σφάλμα της μεθόδου OD. Πιο συγκεκριμένα πιθανώς, δεν λαμβάνονται υπόψιν:

- i) τη διαφορετικότητα της μορφολογίας του κυττάρου στο κάθε παράγοντα
- ii) τα νεκρά κύτταρα τα οποία υπολογίζονται πιθανόν μαζί με τα ζωντανά
- iii) κάποια πιθανή οξειδωση του υλικού

Συγκρίνοντας τα παραπάνω διαγράμματα, η μεγαλύτερη lag phase βρίσκεται στο 10% w/v γλυκόζης. Το γεγονός αυτό είναι κατά ισχυρισμόν ορθό, δεδομένου ότι, αυξάνοντας τη συγκέντρωση σακχάρων (και πιθανόν των γλυκαντικών όπως της στέβιας), προκαλείται αύξηση του ιξώδους του διαλύματος, με αποτέλεσμα παράλληλη ενίσχυση οσμωτικών πιέσεων. Κατά συνέπεια, οι μικροοργανισμοί καλούνται να ανταπεξέλθουν σε συνθήκες που απέχουν από το πλαγκτονικό τους περιβάλλον, ελαττώνοντας αναπόφευκτα τις μεταβολικές και αναπαραγωγικές διεργασίες.

Από την άλλη, η μικρότερη εκθετική φάση βρίσκεται στο σκέτο Nutrient Broth. Σημαντικό να αναφερθεί είναι το γεγονός ότι μελετώντας κάποια από τα γλυκαντικά που χρησιμοποιήθηκαν με τη μέθοδο αυτή, στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις, όπως το γλυκαντικό στέβια RA 10% w/v (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται), παρατηρήθηκε ότι είχαν παρόμοια κινητική με αυτή του Nutrient Broth. Η θεμελιώδης διαφορά μεταξύ των γλυκαντικών (στη συγκεκριμένη περίπτωση της στέβιας) και της καθαρής γλυκόζης είναι ότι τα πρώτα δεν περιέχουν υδατάνθρακες, δηλαδή δεν αποτελούν πηγή άνθρακα, σε αντίθεση με την γλυκόζη που αντιπροσωπεύει την κύρια πηγή υδατάνθρακα στη σαλμονέλα. Το δεδομένο αυτό, συμπεραίνεται από το γεγονός ότι μέχρι το χρονικό σημείο 70 min καμπύλες ανάπτυξης με Glucose-free NB και SRA 10% είναι σε σταθερή και παρόμοια κατάσταση (lag phase). Στα 90-100 mins ξεκινάει και στις δυο περιπτώσεις η εκθετική ανάπτυξη, ενώ και τα σημεία «late exponential» είναι αρκετά κοντά μεταξύ των δύο, στα 570 min και στην 580 min αντίστοιχα. Αυτό βασίζεται πιθανώς στο γεγονός ότι οι ποσότητες των γλυκαντικών είναι τόσο μικρές, με αποτέλεσμα να προσδίδουν μόνο οργανοληπτικά την αίσθηση γλυκύτητας, χωρίς να επιδρούν όπως η γλυκόζη.

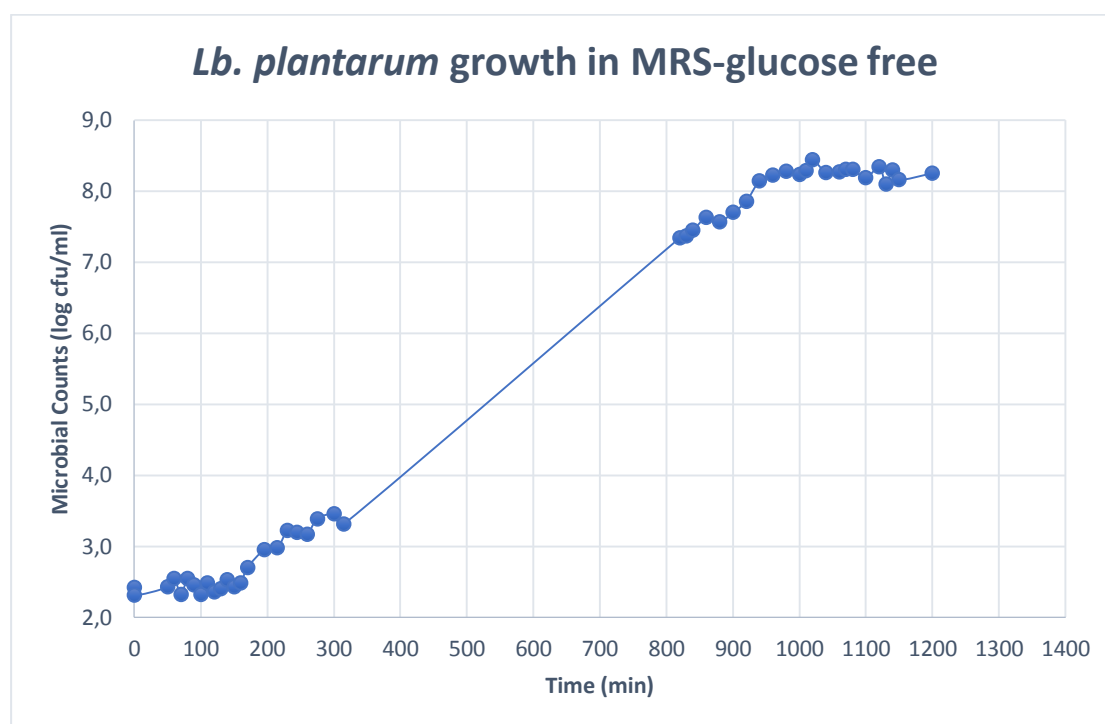
### **5.2.2 *Lactiplantibacillus plantarum***

Η ανάπτυξη του *Lb.plantarum* εξετάστηκε μέσω δημιουργίας πρότυπων καμπυλών όπως και στη περίπτωση της *S. Enteritidis*, με σκοπό το συσχέτισμό με τα αποτελέσματα της OD. Προκειμένου να εφαρμοστεί το μοντέλο Baranyi και Roberts (1994), στη διαδικασία DMFit, και έπειτα από συσχέτιση αποτελεσμάτων, η φάση θανάτωσης του *Lb.plantarum* έπειτα από την στατική φάση, παραλείπεται για την στατιστική ανάλυση ώστε να υπολογιστεί η παράμετρος «MSrODC».

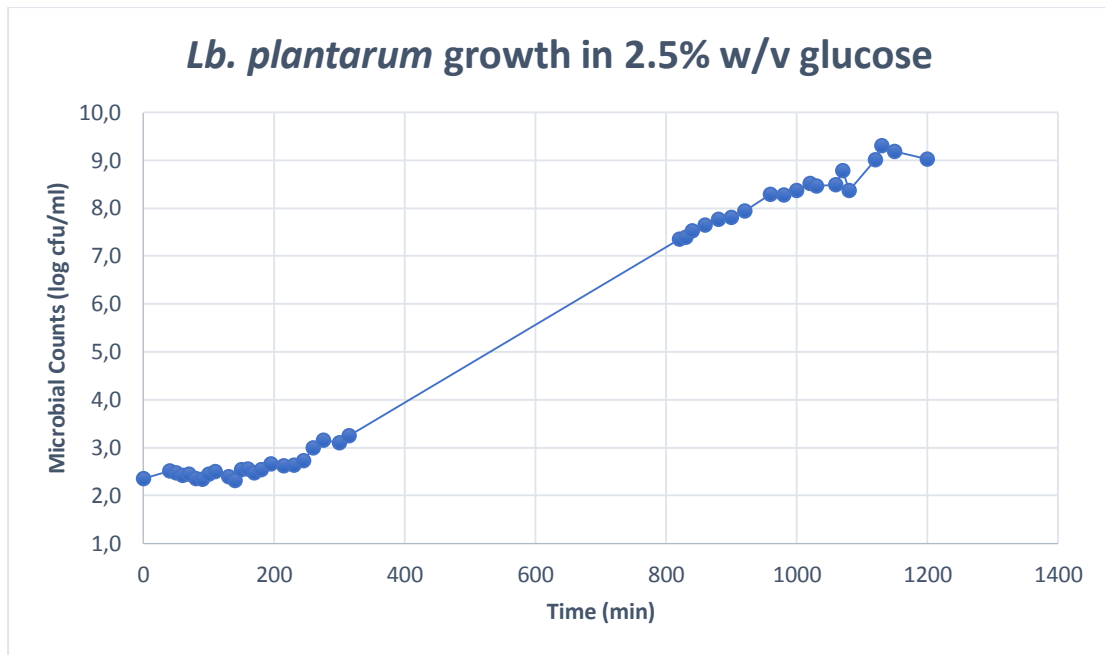
Όπως και στην περίπτωση της *S.Enteritidis*, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των

τρουβλίων για την δημιουργία πρότυπων καμπυλών του γαλακτικού βακτηρίου, προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι οι φάσεις ανάπτυξης και η καμπύλη ανάπτυξης συμπίπτουν με τα γραφικά αποτελέσματα της διαδικασίας OD. Παρακάτω εμφανίζονται οι γραφικές παραστάσεις του μικροοργανισμού *Lb.plantarum* που απεικονίζουν την δυναμική ανάπτυξής του με σκέτο θρεπτικό υλικό MRS χωρίς γλυκόζη, με MRS 2.5% w/v γλυκόζη και με MRS 10% w/v γλυκόζης.

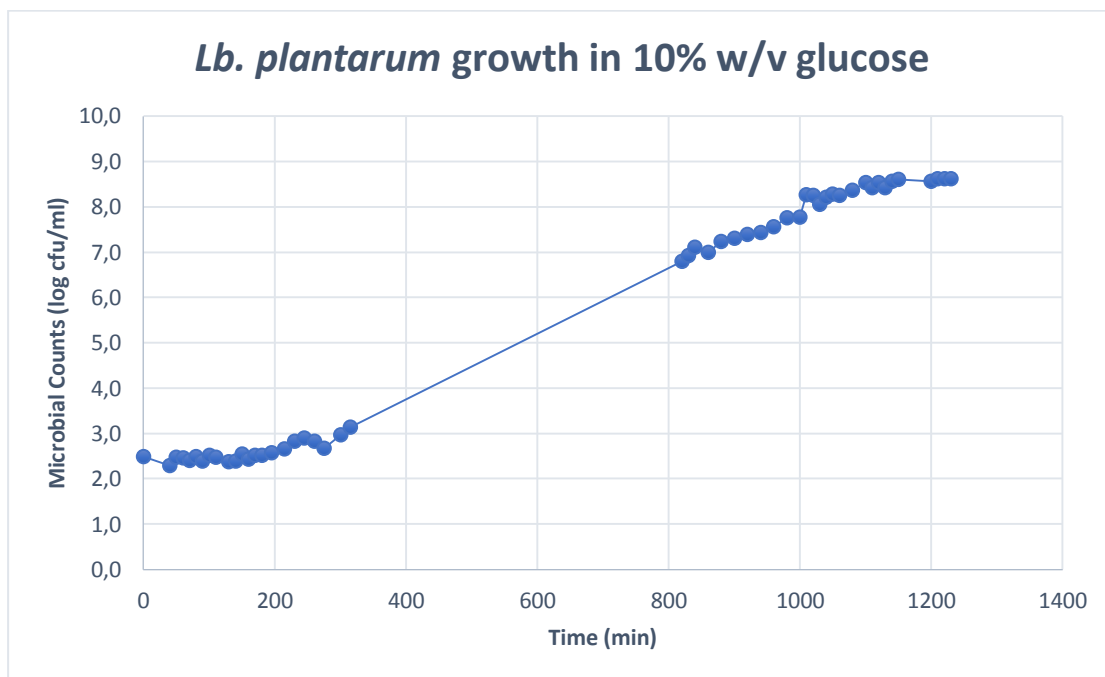
Παρακάτω εμφανίζεται η γραφική απεικόνιση των αποτελεσμάτων της OD, στα «Γραφήματα 5.7-5.8»:



**Γράφημα 5.8.** Αντιπροσωπευτικό γράφημα που απεικονίζει την τυπική ανάπτυξη του *Lb. Plantarum* σε θρεπτικό υλικό MRS χωρίς γλυκόζη, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο των τρουβλίων.



**Γράφημα 5.9.** Αντιπροσωπευτικό γράφημα που απεικονίζει την τυπική ανάπτυξη του *Lb. Plantarum* σε 2.5% w/v γλυκόζη, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο των τρυβλίων.



**Γράφημα 5.10.** Αντιπροσωπευτικό γράφημα που απεικονίζει την τυπική ανάπτυξη του *Lb. Plantarum* σε 10% w/v γλυκόζη, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο των τρυβλίων.

Παρατηρώντας το «Γράφημα 5.8», παρουσιάζεται μία αντιπροσωπευτική καμπύλη ανάπτυξης του γαλακτικού βακτηρίου, με την αρχή της εκθετικής φάσης να εμφανίζεται κοντά στο σημείο 160 min και με το τέλος της περίπου στο σημείο 980 min. Στην περίπτωση της συγκέντρωσης 2.5% w/v γλυκόζης (Γράφημα 5.9), η αρχή της εκθετικής φάσης βρίσκεται στο σημείο 150 min, ενώ το τέλος της εκθετικής εμφανίζεται κοντά στο σημείο 1130 min. Στο «Γράφημα 5.10» που απεικονίζεται η ανάπτυξη του *Lb.plantarum* σε συγκέντρωση γλυκόζης 10%w/v, η αρχή της εκθετικής βρίσκεται περίπου στο σημείο 160 min και το τέλος της φάσης αυτής περίπου στο σημείο 1150 min. Συγκρίνοντας και τα 3 διαγράμματα, η αρχή της εκθετικής φάσης του βακτηρίου παρουσιάζεται και στις 3 περιπτώσεις σχεδόν στο ίδιο σημείο, περίπου στα 150-160 λεπτά. Η μεγαλύτερος χρόνος εκθετικής φάσης βρίσκεται στη συγκέντρωση 10% w/v γλυκόζης, ενώ αντίθετα η μικρότερη στην περίπτωση του MRS χωρίς γλυκόζη. Από αυτά τα δεδομένα συμπεραίνεται ότι όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της γλυκόζης στο θρεπτικό υλικό, τόσο αυξάνεται και ο ρυθμός ανάπτυξης του *Lb.plantarum*. Αυτό σημαίνει ότι η μεγάλη ποσότητα γλυκόζης (10% w/v), σε αντίθεση με τη περίπτωση της *S. Enteritidis*, δεν επηρεάζει αρνητικά και δεν αναστέλλει την ανάπτυξη του μικροοργανισμού, ενώ παράλληλα η lag phase παραμένει σταθερή με ή χωρίς τη γλυκόζη. Παρόμοια αποτελέσματα βρέθηκαν και στην μελέτη των Davoodi et al, (2016), όπου αποδείχθηκε ότι η βακτηριακή ανάπτυξη γαλακτικών βακτηρίων αυξάνεται με την αύξηση της πηγής άνθρακα.

Συμπερασματικά, η μείωση της γλυκόζης στο μέσο, επιφέρει χαμηλότερη ανάπτυξη του οξυγαλακτικού βακτηρίου. Επομένως, η αντικατάσταση της με κάποιο γλυκαντικό, πιθανόν να μην επιφέρει την επιθυμητή ανάπτυξη και επιπροσθέτως την ενίσχυση της προβιοτικής τάσης του γαλακτικού βακτηρίου σε ένα τρόφιμο, καθώς θα μειώσει τη λειτουργικότητά του.

### **5.3 Αποτελέσματα ανάλυσης RNA για *Salmonella* Enteritidis**

Μελετώντας τις παραπάνω καμπύλες από το «Γράφημα 5.6» και από το «Γράφημα 5.7», επιλέχθηκαν τα καταλληλότερα χρονικά σημεία (zero time, early exponential, late exponential) για τις περιπτώσεις 2.5% και 10% γλυκόζης, όπως και 2.5% και 10% σε γλυκαντικό, με σκοπό την συλλογή δείγματος για RNA ανάλυση. Τα σημεία αυτά εμφανίζονται ακολούθως στον «Πίνακα 5.4». Έπειτα από τη συνολική ανάλυση RNA και για τον παθογόνο μικροοργανισμό *S. Enteritidis*, τα τελικά αποτελέσματα παρουσιάζονται στον «Πίνακα 5.5»

**Πίνακας 5.4.** Χρονικά σημεία (λεπτά) που επιλέχθηκαν με τη χρήση πρότυπων καμπυλών για τη συλλογή δείγματος RNA από *S. Enteritidis*.

Microorganism	Concentrations	Cases	Zero time	Early exponential	Late exponential
<i>S. Enteritidis</i>	2.5%	<i>Glucose</i>	0	100	560
		<i>Sweeteners</i>	0	100	560
	10%	<i>Glucose</i>	0	150	660
		<i>Sweeteners</i>	0	100	560

**Πίνακας 5.5.** Σχετικά επίπεδα γονιδιακής έκφρασης του βακτηρίου *S. Enteritidis*

MO	Concentration	Sweeteners	Genes	Relative fold change		
				0h	EE	LE
<i>S. Enteritidis</i>	2.5% w/v	Stevia Reb A	<i>sdiA</i>	ne	ne	-1.2 (-1.3 to -1.1)
			<i>sipA</i>	ne	ne	-1.3 (-1.5 to -1.0)
			<i>flhD</i>	ne	ne	0.8 (0.4 to 0.7)
		Saccharin	<i>sdiA</i>	ne	ne	-3.4 (-4.4 to -2.6)
			<i>sipA</i>	ne	ne	-3.4 (4.1 to -2.8)
			<i>flhD</i>	ne	ne	1.3 (0.3 to 0.6)
	10% w/v	Aspartame	<i>sdiA</i>	ne	ne	-1.3 (-1.4 to -1.2)
			<i>sipA</i>	ne	ne	-0.8 (-1.1 to -0.7)
			<i>flhD</i>	ne	ne	0.6 (0.6 to 0.8)
		Stevia Reb A	<i>sdiA</i>	ne	ne	-2.1 (-3.0 to -1.5)
			<i>sipA</i>	ne	ne	-1.4 (-1.7 to -1.2)
			Saccharin	<i>sdiA</i>	ne	ne
<i>sipA</i>	ne	ne		-1.9 (-2.5 to -1.4)		

\*ne: no expression

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον «Πίνακα 5.5» τα γονίδια που μελετήθηκαν στην 0h και στη φάση EE (Early Exponential), δεν εκφράστηκαν. Παρόλα αυτά το γονίδιο 16S rRNA (housekeeping, reference gene), εκφράστηκε και στις δυο περιπτώσεις, γεγονός που σημαίνει ότι τα εξεταζόμενα γονίδια ήταν αδρανή και δεν εκφράστηκαν. Αυτό μπορεί να συμβαίνει γιατί προκειμένου να ενεργοποιηθούν και επομένως να εκφραστούν, θα πρέπει να υπάρχει μια κινητήρια δύναμη. Για παράδειγμα, στη φάση LE (Late Exponential) μπορεί να υπάρξει έλλειψη πηγών άνθρακα, παραγωγή μεταβολικών προϊόντων που επηρεάζουν το pH του δείγματος ή και ανταγωνιστική συμβίωση για τον εξεταζόμενο μικροοργανισμό. Έτσι, είναι εφικτό να διαμορφωθούν συνθήκες ιδανικές για να εκφραστεί το επιθυμητό γονίδιο. Πιθανόν, στη συγκεκριμένη περίπτωση τα γλυκαντικά δεν αποτελούν τρόπο ενεργοποίησής της έκφρασης των γονιδίων στις αρχικές ώρες.

Με βάση με την μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της έκφρασης γονιδίων που αναφέρθηκε παραπάνω, η τιμή (fold change) μπορεί να εκφράζει τάση προς τα κάτω, ή αλλιώς υποέκφραση έχοντας αρνητικό πρόσημο (-), και τάση προς τα πάνω ή αλλιώς υπερέκφραση, με θετικό πρόσημο (+). Οι τιμές πάνω από 2 (upregulation) σημαίνει ότι είναι σημαντικό και ότι εκφράστηκε, σε αντίθεση με τις τιμές μικρότερες του -2 που σημαίνει στατιστικά σημαντική υποέκφραση (downregulation). Όπως παρατηρείται στον πίνακα σχετικά με τη φάση late exponential, στη περίπτωση της *S. Enteritidis* παρατηρήθηκε τάση προς τα πάνω (+) για το γονίδιο *flhD*, δηλαδή ότι το γονίδιο αυτό εκφράζεται περισσότερο στο γλυκαντικό Stevia RA από ότι στο control (γλυκόζη). Αυτό μπορεί να θεωρηθεί αρνητικό για την παθογένεια της *S. Enteritidis* στη στέβια, αλλά λόγω του ότι η τιμή είναι «0.8», η παρατήρηση δεν θεωρείται σημαντική.

Από την άλλη πλευρά, τα γονίδια για παθογένεια *sdiA* και ανίχνευσης απαρτίας *sipA*, τείνουν να υποκεφράζονται στα γλυκαντικά, δηλαδή τα γονίδια αυτά εκφράζονται περισσότερο στη γλυκόζη από ότι στα γλυκαντικά. Εφόσον η μελέτη ασχολείται με την παθογένεια, στη προκειμένη περίπτωση, το γεγονός αυτό σημαίνει ότι τα γονίδια παθογένειας της σαλμονέλας εκφράζονται λιγότερο στα γλυκαντικά από ότι στη γλυκόζη, αποτέλεσμα που μπορεί ενισχύσει την περίπτωση αντικατάστασης της γλυκόζης με γλυκαντικά όπως τη σακχαρίνη, την ασπαρτάμη και τη στέβια.

Η προς τα κάτω ρύθμιση (υποέκφραση) ήταν στατιστικά σημαντική και για τα *sdiA* και *sipA* με τιμή -3.4 στο 2.5% w/v σακχαρίνης. Η τιμή αυτή εκφράζει ότι η παθογένεια και η ανίχνευση απαρτίας της *S. Enteritidis* είναι μικρότερη στα γλυκαντικά σε σχέση με την γλυκόζη. Στην περίπτωση της συγκέντρωσης 10% w/v, παρατηρήθηκε υποέκφραση στο γονίδιο *sdiA* σε 10% σακχαρίνης με τιμή -3.0 και σε 10% στέβια *RebA* με τιμή -2.1. Και τα δύο αποτελέσματα είναι σημαντικά και υποδεικνύουν έκφραση του γονιδίου.

Συμπερασματικά, κάποια από τα γλυκαντικά φαίνεται να επηρεάζουν ορισμένα γονίδια στην φυσιολογία της *S. Enteritidis*, με σημαντικά αποτελέσματα να παρατηρούνται κυρίως στην περίπτωση της σακχαρίνης. Τα αποτελέσματα σε σύνολο δείχνουν ότι στην περίπτωση που τα γονίδια παθογένειας της *S. Enteritidis* εκφράζονται, η τάση αυτή εμφανίζεται περισσότερο στη γλυκόζη σε σχέση με τα γλυκαντικά που εξετάστηκαν.

\

## 6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Αναμφισβήτητα, τα τελευταία χρόνια έχει αυξηθεί η κατανάλωση γλυκαντικών ουσιών από όλες τις κοινωνικές ομάδες. Η τάση των καταναλωτών για υγιεινή και χαμηλή σε θερμίδες δίαιτα δημιούργησε την ανάγκη στις βιομηχανίες τροφίμων για παραγωγή προϊόντων με υποκατάστατα ζάχαρης. Λαμβάνοντας υπόψη τον υψηλό υγειονομικό αντίκτυπο της χρήσης γλυκαντικών ως υποκατάστατων ζάχαρης, έχει καταστεί υψίστης σημασίας να διερευνηθεί η επίδραση αυτών των προσθέτων σε βακτήρια με προβιοτικό προφίλ αλλά και στα τροφιμογενή βακτήρια που προκαλούν ανησυχία, όπως ο παθογόνος μικροοργανισμός *S. Enteritidis* που είναι πιθανόν να βρεθεί σε εμπορικά προϊόντα γλυκαντικών.

Ο απώτερος στόχος που έπρεπε να επιτευχθεί στην παρούσα εργασία ήταν να μελετηθεί εάν η αντικατάσταση της γλυκόζης από ένα εναλλακτικό γλυκαντικό, θα είχε αντίκτυπο στη μικροβιακή ανάπτυξη, μελετώντας την ανάπτυξη δύο βακτηρίων: του τροφιμογενή παθογόνου *Salmonella* Enteritidis και του οξυγαλακτικού βακτηρίου *Lactiplantibacillus plantarum*. Αυτή η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε δύο συγκεντρώσεις, στο 2.5% w/v και στο 10% w/v, οι οποίες στην περίπτωση των εξεταζόμενων γλυκαντικών αφορούν την γλυκύτητα που προσδίδουν σε σχέση με τη γλυκόζη.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μεθόδου μέτρησης οπτικής πυκνότητας (OD), στην περίπτωση της *S. Enteritidis* στους 37°C, η δυναμική ανάπτυξης διέφερε μεταξύ των δύο συγκεντρώσεων που εξετάστηκαν. Η συνολική ανάπτυξη ήταν υψηλότερη στη γλυκόζη για 2.5% w/v, με την παράμετρο «MSrODC» να είναι μεγαλύτερος σε αυτή την περίπτωση, ενώ δεν παρατηρήθηκαν διαφορές για «T<sub>det</sub>» μεταξύ της γλυκόζης και των γλυκαντικών. Αντίθετα, η υψηλότερη συγκέντρωση 10% w/v επηρέασε διαφορετικά την ανάπτυξη του παθογόνου, αφού η παράμετρος «T<sub>det</sub>» ήταν σημαντικά υψηλότερη σε γλυκόζη και η τιμή της κινητικής παράμετρου «MSrODC» μειωμένη σε σχέση με τα υπόλοιπα γλυκαντικά. Αυτό σημαίνει ότι σε περίπτωση επιμόλυνσης με *S. Enteritidis* ενός τροφίμου που περιέχει αυτό το ποσοστό (ή πιθανόν μεγαλύτερο) σε γλυκόζη, ενδεχομένως να επιτυγχάνεται ενισχυμένη ασφάλεια για τον καταναλωτή σε σχέση με τρόφιμα που δεν την περιέχουν. Σε αντίθεση με την γλυκόζη, οι γλυκοσίδες στεβιόλης και τα υπόλοιπα γλυκαντικά του πειράματος δεν σημείωσαν καμία σημαντική επίδραση στον ρυθμό ανάπτυξης του παθογόνου μικροοργανισμού, λόγω των μικρών ποσοτήτων τους, κυρίως στη περίπτωση του 2.5% w/v. Πιθανώς, η προσθήκη αυτής της ποσότητας γλυκαντικών σε συνδυασμό με απουσία της γλυκόζης, θα μπορούσε να επιφέρει ένα δυσμενές περιβάλλον για την ανάπτυξη της *S. Enteritidis*, γεγονός που θα βοηθούσε θετικά στην προσπάθεια αντικατάστασής της σε τρόφιμα του εμπορίου. Παρόλα αυτά, η επίδραση αυτών των γλυκαντικών θα πρέπει να ελεγχθεί περαιτέρω με μελλοντικές μελέτες σε παθογόνους μικροοργανισμούς, με εξέταση περισσότερων συγκεντρώσεων σε συνδυασμό με χαμηλές θερμοκρασίες και επιπλέον εμπόδια όπως η μείωση του pH.

Σχετικά με το προβιοτικό βακτήριο *Lb.plantarum*, τα αποτελέσματα που ελήφθησαν από το ίδιο πείραμα, έδειξε ότι κανένα από τα γλυκαντικά πέραν της γλυκόζης, δεν φάνηκε να έχει κάποια αξιοσημείωτη επίδραση στην κινητική παράμετρο «MSrODC» του βακτηρίου σε καμία από τις συγκεντρώσεις που ερευνήθηκαν. Επομένως, η αντικατάσταση της γλυκόζης με γλυκαντικά σε ένα τρόφιμο, είναι πιθανόν να μην χαρακτηριστεί ευνοϊκή για την ανάπτυξη του γαλακτικού βακτηρίου, γεγονός που θα έχει

αρνητικές επιπτώσεις στην λειτουργικότητα αυτού του τροφίμου. Η *S. Enteritidis*, όντας ένα Gram-αρνητικό βακτήριο, έδειξε ότι είναι πιο ευάλωτη σε αυτές τις αλλαγές, επομένως λιγότερο ανθεκτικό σε αυτές τις αλλαγές των μέσων από ένα Gram-θετικό βακτήριο όπως το *Lb. plantarum*. Ωστόσο, χρειάζεται περαιτέρω έρευνα προκειμένου να μπορεί κανείς να καταλήξει σε ασφαλή συμπεράσματα σε σχέση με τα παραπάνω, τόσο σε σχέση με τα παθογόνα βακτήρια *S. Enteritidis* όσο και με το οξυγαλακτικό βακτήριο *Lb. Plantarum*, με προβιοτικό δυναμικό. Είναι σημαντικό να αξιολογηθεί η επίδραση των γλυκαντικών στη συμπεριφορά ανάπτυξης και άλλων ευεργετικών βακτηρίων, καθώς τέτοιου είδους αποτελέσματα θα ήταν ιδιαίτερος χρήσιμα για την παραγωγή τροφίμων χαμηλής θερμιδικής αξίας με ευεργετικές ιδιότητες για την ανθρώπινη υγεία.

Όσον αναφορά τον έλεγχο έκφρασης των γονιδίων στο παθογόνο *S. Enteritidis*, τα γονίδια για παθογένεια (*sdiA*) και ανίχνευση απαρτίας (*sipA*) έτειναν να ρυθμίζονται προς τα κάτω στα γλυκαντικά, γεγονός που εκφράζει μικρότερη τάση παθογένειας του βακτηρίου στα γλυκαντικά από ότι στη γλυκόζη, αλλά σημαντικά αποτελέσματα παρατηρήθηκαν μόνο για την περίπτωση της σακχαρίνης.

Συνολικά, η υποκατάσταση γλυκόζης με γλυκαντικά εμπορίου δεν επηρέασε σημαντικά την ανάπτυξη των παθογόνων και την έκφραση των γονιδίων. Η έρευνα δεν πρέπει να επικεντρωθεί μόνο στην αποκάλυψη της μικροβιακής δυναμικής και λειτουργιών σε δομημένα μέσα, αλλά και σε πραγματικά προϊόντα διατροφής. Ως εκ τούτου, απαιτείται περαιτέρω και εκτενής έρευνα σχετικά με την επίδραση των γλυκαντικών στα βακτήρια που σχετίζονται με τα τρόφιμα για να διασφαλιστεί η βέλτιστη ασφάλεια των τροφίμων. Η παρούσα μελέτη είναι ένα βήμα προς τα εμπρός για την εκπόνηση πιο αξιόπιστων μοντέλων τροφίμων που επιτρέπουν τον αποτελεσματικό σχεδιασμό συστημάτων διασφάλισης της ασφάλειας των τροφίμων και τονίζει ότι η επίδραση της αντικατάστασης της γλυκόζης από αυτά τα νέα γλυκαντικά στη μικροβιακή ανάπτυξη δεν μπορεί να παραμεληθεί. Θα πρέπει να πραγματοποιηθούν περαιτέρω πειράματα για την παροχή περισσότερων πληροφοριών για το παρόν θέμα. Ο αντίκτυπος αυτών των γλυκαντικών στον μεταβολισμό των παθογόνων θα ήταν επίσης ενδιαφέρον να κατανοηθεί. Στη συνέχεια, η μεταγραφική και πρωτεϊνική ανάλυση θα διευκρινίσει ποιοι τύποι γονιδίων/πρωτεϊνών εκφράζονται υπό αυτές τις συνθήκες και εάν αυτές οι αποκρίσεις σχετίζονται με την αναστολή ή την ενίσχυση της βακτηριακής ανάπτυξης. Η βιωσιμότητα της σαλμονέλας σε χαμηλές θερμοκρασίες παραμένει πρόβλημα στη συντήρηση των τροφίμων και στις μεγάλες μεταφορές, επομένως θα πρέπει επίσης να ληφθεί υπόψη η μικροβιακή ανάπτυξη σε θερμοκρασίες ψύξης (4°C), καθώς πολλά ζαχαρούχα προϊόντα διατροφής, όπως παγωτά ή κρεμώδη επιδόρπια, αποθηκεύονται υπό αυτές τις συνθήκες. Τέλος, ως συμπληρωματική μελέτη, η επίδραση αυτών των γλυκαντικών θα πρέπει να ελεγχθεί με διαφορετικά θρεπτικά μέσα και μικρότερες αναλογίες γλυκαντικών. Η πολυπλοκότητα των συστημάτων που μελετήθηκαν θα πρέπει να αυξηθεί για να αποκτηθούν πιο αξιόπιστες προβλέψεις ανάπτυξης στα τρόφιμα εμπορίου και αξιόπιστα μοντέλα τροφίμων.

Τα ευρήματα της μελέτης θα μπορούσαν να αποτελέσουν τη βάση για περαιτέρω έρευνα σχετικά με τον μεταβολισμό των γλυκαντικών από βακτήρια, τόσο παθογόνων όσο και ευεργετικών βακτηρίων με διατροφικό (προβιοτικά βακτήρια) ή/και τεχνολογικό ενδιαφέρον για την παραγωγή ζυμωμένων τροφίμων χαμηλής θερμιδικής αξίας.



## 7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### A. Ελληνική

Παραμυθιώτης, Σ. (2010). Μοριακή βιοτεχνολογία τροφίμων. Πανεπιστημιακές σημειώσεις, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 24-25

### B. Ξενόγλωσση

Adzitey, F.; Huda, N. & Ali, G. R. R. (2013), 'Molecular techniques for detecting and typing of bacteria, advantages and application to foodborne pathogens isolated from ducks', *3 Biotech* **3**(2), 97--107.

Ahmed, S. & Abdallah, S. (2021), 'Application of Molecular diagnostics in Microbiology: a Review'.

Amchra, F.; Faiz, C.; Chaouqi, S.; Khiraoui, A.; Benhmimou, A.; Guedira, M. & Guedira, T. (2018), 'Effect of Stevia rebaudiana, sucrose and aspartame on human health: A comprehensive review', *Journal of Medicinal Plants Studies* **102**, 102--108.

Arora, S.; Singh, V. P.; Sharma, V.; Wadhwa, B. K.; George, V.; Singh, A. K. & Sharma, G. S. (2009), 'Analysis of sucralose and its storage stability in burfi', *Journal of Food Science and Technology* **46**, 114--117.

Axelsson, L. (2004), Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology'Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects', pp. 1--66.

Baines, D. & Seal, R. (2012), *Natural Food Additives, Ingredients and Flavourings*.

Baines, D. (2012), 1 - Defining the term 'natural' in the context of food products, *in* David Baines & Richard Seal, ed., , Woodhead Publishing, , pp. 1--22.

Batalha, M. A. (2015), Effect of novel sweeteners on the growth dynamics of Salmonella Typhimurium and Listeria monocytogenes in heterogeneous structured systems, *in*.

Batt A.C., & Tortorello M-L. (2014). Encyclopedia of food microbiology. Edited by Academic press.2nd Edition, (V3), 343-344

Bilal, M.; Ji, L.; Xu, S.; Zhang, Y.; Iqbal, H. & Cheng, H. (2022), 'Bioprospecting and biotechnological insights into sweet-tasting proteins by microbial hosts—a review', *Bioengineered* **13**, 9815--9828.

Bopp, B. A.; Sonders, R. C. & Kesterson, J. W. (1986), 'Toxicological aspects of cyclamate and cyclohexylamine', *Critical Reviews in Toxicology* **16**(3), 213--306.

Brock, T. D., Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (2003). Brock biology of microorganisms. Upper Saddle River (NJ): Prentice-Hall, 12, 465-466

Butchko, H. H.; Stargel, W. W.; Comer, C. P.; Mayhew, D. A.; Benninger, C.; Blackburn, G. L.; de Sonneville, L. M. J.; Geha, R. S.; Hertelendy, Z.; Koestner, A.; Leon, A. S.; Liepa, G. U.; McMartin, K. E.; Mendenhall, C. L.; Munro, I. C.; Novotny, E. J.; Renwick, A. G.; Schiffman, S. S.; Schomer, D. L.; Shaywitz, B. A.; Spiers, P. A.; Tephly, T. R.; Thomas, J. A. & Trefz, F. K. (2002), 'Aspartame: review of safety', *Regulatory toxicology and pharmacology: RTP* **35**(2 Pt 2), S1--93.

Cao, Y.; Liu, H.; Qin, N.; Ren, X.; Zhu, B. & Xia, X. (2020), 'Impact of food additives on the composition and function of gut microbiota: A review', *Trends in Food Science & Technology* **99**, 295--310.

Carakostas, M. C.; Curry, L. L.; Boileau, A. C. & Brusick, D. J. (2008), 'Overview: the history, technical function and safety of rebaudioside A, a naturally occurring steviol glycoside, for use in food and beverages', *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association* **46 Suppl 7**, S1--S10.

Carocho, M.; Morales, P. & Ferreira, I. C. F. R. (2017), 'Sweeteners as food additives in the XXI century: A review of what is known, and what is to come', *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association* **107**(Pt A), 302--317.

Carocho, M.; Morales, P. & Ferreira, I. C. F. R. (2017), 'Sweeteners as food additives in the XXI century: A review of what is known, and what is to come', *Food and Chemical Toxicology* **107**, 302--317.

Chattopadhyay, S.; Raychaudhuri, U. & Chakraborty, R. (2014), 'Artificial sweeteners - a review', *Journal of Food Science and Technology* **51**(4), 611--621.

Chilcott, G. S. & Hughes, K. T. (2000), 'Coupling of Flagellar Gene Expression to Flagellar Assembly in Salmonella enterica Serovar Typhimurium and Escherichia coli', *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **64**(4), 694--708.

Chilcott, G. S., & Hughes, K. T. (1998). The type III secretion determinants of the flagellar anti- transcription factor, FlgM, extend from the amino- terminus into the anti- $\sigma$ 28 domain. *Molecular microbiology*, 30(5), 1029-1040.

Consortium, H. M. P. (2012), 'Structure, function and diversity of the healthy human microbiome', *Nature* **486**(7402), 207--214.

Dalgaard, P. & Koutsoumanis, K. (2001), 'Comparison of maximum specific growth rates and lag times estimated from absorbance and viable count data by different mathematical models', *Journal of Microbiological Methods* **43**(3), 183--196.

Das, C.; Mokashi, C.; Mande, S. S. & Saini, S. (2018), 'Dynamics and Control of Flagella Assembly in Salmonella typhimurium', *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **8**, 36.

Davoodi, S.; Behbahani, M.; Shirani, E. & Mohabatkar, H. (2016), 'Influence of Sucrose, Glucose, Stevia Leaf and Stevioside on the Growth and Lactic Acid Production by

Lactobacillus plantarum, Lactobacillus brevis and Lactobacillus casei', *Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science* **40**.

Dellaglio, F., Bottazzi V., Vescovo, M. 1975. Deoxyribonucleic Acid Homology Among Lactobacillus Species of the Subgenus Streptobacterium Orla-Jensen. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 25, 160-172.

Desroche, N.; Beltramo, C. & Guzzo, J. (2005), 'Determination of an internal control to apply reverse transcription quantitative PCR to study stress response in the lactic acid bacterium Oenococcus oeni', *Journal of Microbiological Methods* **60**(3), 325--333.

Domenech, E.; Jimenez, A.; Perez, R.; Ferrus, M. & Escriche, I. (2015), 'Risk characterization of antimicrobial resistance of Salmonella in meat products', *Food Control* **57**.

Dourou, D.; Ammor, M. S.; Skandamis, P. N. & Nychas, G.-J. E. (2011), 'Growth of Salmonella enteritidis and Salmonella typhimurium in the presence of quorum sensing signalling compounds produced by spoilage and pathogenic bacteria', *Food Microbiology* **28**(5), 1011--1018.

Engelkirk, P. G., Duben-Engelkirk, J. L., & Burton, G. R. W. (2011). *Burton's microbiology for the health sciences*. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.

Federle, M. J. & Bassler, B. L. (2003), 'Interspecies communication in bacteria', *The Journal of Clinical Investigation* **112**(9), 1291--1299.

Finlay, B. B. & Cossart, P. (1997), 'Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens', *Science (New York, N.Y.)* **276**(5313), 718--725.

Galan, J. E. & Curtiss, R. (1989), 'Cloning and molecular characterization of genes whose products allow Salmonella typhimurium to penetrate tissue culture cells.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**(16), 6383--6387.

Galan, J. E. & Zhou, D. (2000), 'Striking a balance: modulation of the actin cytoskeleton by Salmonella', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**(16), 8754--8761.

Gong, X.; Chen, N.; Ren, K.; Jia, J.; Wei, K.; Zhang, L.; Lv, Y.; Wang, J. & Li, M. (2019), 'The Fruits of Siraitia grosvenorii: A Review of a Chinese Food-Medicine', *Frontiers in Pharmacology* **10**, 1400.

Grimont, P.A.D., Weill, F.X., 2007. Antigenic formulae of the Salmonella serovars. In: WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella, Institut Pasteur, ninth ed. Paris, France.

Halatsi, K.; Oikonomou, I.; Lambiri, M.; Mandilara, G.; Vatopoulos, A. & Kyriacou, A. (2006), 'PCR detection of Salmonella spp. using primers targeting the quorum sensing gene sdiA', *FEMS microbiology letters* **259**(2), 201--207.

Hall, B. G.; Acar, H.; Nandipati, A. & Barlow, M. (2014), 'Growth rates made easy',

*Molecular Biology and Evolution* **31**(1), 232--238.

Hayward, R. D. & Koronakis, V. (1999), 'Direct nucleation and bundling of actin by the SipC protein of invasive Salmonella', *The EMBO journal* **18**(18), 4926--4934.

Heber, D. (2004), 'Vegetables, fruits and phytoestrogens in the prevention of diseases', *Journal of Postgraduate Medicine* **50**(2), 145--149.

Hellfritsch, C.; Brockhoff, A.; Stahler, F.; Meyerhof, W. & Hofmann, T. (2012), 'Human psychometric and taste receptor responses to steviol glycosides', *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **60**(27), 6782--6793.

Higashide, W.; Dai, S.; Hombs, V. P. & Zhou, D. (2002), 'Involvement of SipA in modulating actin dynamics during Salmonella invasion into cultured epithelial cells', *Cellular Microbiology* **4**(6), 357--365.

Ibrahim, F., & Ouwehand, C.A. (2019) In: Vinderola, G., Salminen, S., von Wright, A., Ouwehand, A. (Eds.), *Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Functional Aspects*, Fifth edition. CRC Press, Taylor & Francis Group, New York, 47-56.

Izawa, K.; Amino, Y.; Kohmura, M.; Ueda, Y. & Kuroda, M. (2010), 4.16 - Human-Environment Interactions – Taste, in Hung-Wen (Ben) Liu & Lew Mander, ed., Elsevier, Oxford, pp. 631--671.

Janssens, J. C. A.; Steenackers, H.; Robijns, S.; Gellens, E.; Levin, J.; Zhao, H.; Hermans, K.; De Coster, D.; Verhoeven, T. L.; Marchal, K.; Vanderleyden, J.; De Vos, D. E. & De Keersmaecker, S. C. J. (2008), 'Brominated furanones inhibit biofilm formation by Salmonella enterica serovar Typhimurium', *Applied and Environmental Microbiology* **74**(21), 6639--6648.

Jethra, R. (1993), 'Turbidity measurement', *ISA Transactions* **32**(4), 397--405.

Josenhans, C. & Suerbaum, S. (2002), 'The role of motility as a virulence factor in bacteria', *International journal of medical microbiology: IJMM* **291**(8), 605--614.

JoVE Science Education Database. Environmental Microbiology. Bacterial Growth Curve Analysis and its Environmental Applications. JoVE, Cambridge, MA, (2019).

Kahler, E. (2020), 'The effect of natural alternative sweeteners lucuma, yacon, and monk fruit on the growth of probiotic lactic acid bacteria', *Abertay University*.

Kahler, E. (2020), 'The effect of natural alternative sweeteners lucuma, yacon, and monk fruit on the growth of probiotic lactic acid bacteria', *Abertay University*.

Kaneko, R. & Kitabatake, N. (2001), 'Structure-Sweetness Relationship in Thaumatin: Importance of Lysine Residues', *Chemical senses* **26**, 167--77.

Kaniga, K.; Tucker, S.; Trollinger, D. & Galan, J. E. (1995), 'Homologs of the Shigella IpaB and IpaC invasins are required for Salmonella typhimurium entry into cultured epithelial cells', *Journal of Bacteriology* **177**(14), 3965--3971.

Karlinsey, J. E., Tanaka, S., Bettenworth, V., Yamaguchi, S., Boos, W., Aizawa, S. I., & Hughes, K. T. (2000). Completion of the hook–basal body complex of the *Salmonella typhimurium* flagellum is coupled to FlgM secretion and fliC transcription. *Molecular microbiology*, 37(5), 1220-1231.

Knox, K.W., Wicken, A.J., 1972. Serological Studies on the Teichoic Acids of *Lactobacillus plantarum*. *Infection and Immunity*. 6, 43-49.

Kollanoor Johny, A.; Frye, J. G.; Donoghue, A.; Donoghue, D. J.; Porwollik, S.; McClelland, M. & Venkitanarayanan, K. (2017), 'Gene Expression Response of *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis Phage Type 8 to Subinhibitory Concentrations of the Plant-Derived Compounds Trans-Cinnamaldehyde and Eugenol', *Frontiers in Microbiology* 8, 1828.

Kubista, M.; Andrade, J. M.; Bengtsson, M.; Forootan, A.; Jonak, J.; Lind, K.; Sindelka, R.; Sjoback, R.; Sjogreen, B.; Strombom, L.; Stahlberg, A. & Zoric, N. (2006), 'The real-time polymerase chain reaction', *Molecular Aspects of Medicine* 27(2-3), 95--125.

Kutsukake, K. (1997). Autogenous and global control of the flagellar master operon, flhD, in *Salmonella typhimurium*. *Molecular and General Genetics MGG*, 254(4), 440-448.

Kutsukake, K., Ohya, Y., & Iino, T. (1990). Transcriptional analysis of the flagellar regulon of *Salmonella typhimurium*. *Journal of bacteriology*, 172(2), 741-747.

Law, J. & Haandrikman, A. (1997), 'Proteolytic enzymes of lactic acid bacteria', *International Dairy Journal* 7(1), 1--11.

Law, J. W.-F.; Ab Mutalib, N.-S.; Chan, K.-G. & Lee, L.-H. (2015), 'Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations', *Frontiers in Microbiology* 5, 770.

Le Minor, L., Veron, M., Popoff, M., 1982a. Taxonomie des *Salmonella*. *Ann. Microbiol. (Paris)* 133B, 223–243.

Le Minor, L., Veron, M., Popoff, M., 1982b. A proposal for *Salmonella* nomenclature. *Ann. Microbiol. (Paris)* 133 (2), 245–254.

Lemus-Mondaca, R.; Vega-Galvez, A.; Zura-Bravo, L. & Ah-Hen, K. (2012), 'Stevia rebaudiana Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects', *Food Chemistry* 132(3), 1121--1132.

Lianou, A. & Koutsoumanis, K. P. (2011), 'Effect of the growth environment on the strain variability of *Salmonella enterica* kinetic behavior', *Food Microbiology* 28(4), 828--837.

Lindqvist, B. H. (2006), 'On the Statistical Modeling and Analysis of Repairable Systems', *Statistical Science* 21(4).

Lipinski, G.-W. (2006), Reduced-calorie sweeteners and caloric alternatives'Optimising Sweet Taste in Foods', pp. 252--280.

- Liu, X., & Matsumura, P. (1996). Differential regulation of multiple overlapping promoters in flagellar class II operons in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology*, 21(3), 613-620.
- Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. (2001), 'Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method', *Methods (San Diego, Calif.)* **25**(4), 402--408.
- Lobete, M. M.; Baka, M.; Noriega, E.; Jookan, E.; Monballiu, A.; de Beurme, S.; Meesschaert, B. & Van Impe, J. F. (2017), 'Stevia-based sweeteners as a promising alternative to table sugar: The effect on *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Typhimurium* growth dynamics', *International Journal of Food Microbiology* 245, 38--52.
- Lohner, S.; Toews, I. & Meerpohl, J. (2017), 'Health outcomes of non-nutritive sweeteners: analysis of the research landscape', *Nutrition Journal*.
- Lopez, S., Prieto, M., Dijkstra, J., and Dhanoa, M. S. (2004). Statistical evaluation of mathematical models for microbial growth. *Int. J. Food Microbiol.*96: 289--300.
- Magnuson, B. A.; Carakostas, M. C.; Moore, N. H.; Poulos, S. P. & Renwick, A. G. (2016), 'Biological fate of low-calorie sweeteners', *Nutrition Reviews* **74**(11), 670--689.
- McGhie, E. J.; Hayward, R. D. & Koronakis, V. (2001), 'Cooperation between actin-binding proteins of invasive *Salmonella*: SipA potentiates SipC nucleation and bundling of actin', *The EMBO Journal* **20**(9), 2131--2139.
- McGhie, E. J.; Hayward, R. D. & Koronakis, V. (2004), 'Control of Actin Turnover by a *Salmonella* Invasion Protein', *Molecular Cell* **13**(4), 497--510.
- McKellar, R. and X. Lu. (Eds.) (2004). *Modeling Microbial Responses on Foods*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Mills, D. M.; Bajaj, V. & Lee, C. A. (1995), 'A 40 kb chromosomal fragment encoding *Salmonella typhimurium* invasion genes is absent from the corresponding region of the *Escherichia coli* K-12 chromosome', *Molecular Microbiology* **15**(4), 749--759.
- Momtazi-Borojeni, A. A.; Esmaili, S.-A.; Abdollahi, E. & Sahebkar, A. (2017), 'A Review on the Pharmacology and Toxicology of Steviol Glycosides Extracted from *Stevia rebaudiana*', *Current Pharmaceutical Design* **23**(11), 1616--1622.
- Monod, J. (1949), 'The Growth of Bacterial Cultures', *Annual Review of Microbiology* **3**(1), 371--394.
- Mooradian, A. D.; Smith, M. & Tokuda, M. (2017), 'The role of artificial and natural sweeteners in reducing the consumption of table sugar: A narrative review', *Clinical nutrition ESPEN* **18**, 1--8.
- Morillo, J. M.; Lau, L.; Sanz, M.; Herrera, D. & Silva, A. (2003), 'Quantitative real-time PCR based on single copy gene sequence for detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*', *Journal of Periodontal Research* **38**(5), 518--524.

Morovic, W., Hibberd, A. A., Zabel, B., Barrangou, R., & Stahl, B. (2016). Genotyping by PCR and high-throughput sequencing of commercial probiotic products reveals composition biases. *Frontiers in microbiology*, 7, 1747.

Mullis, K. B. (1990), 'Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction', *Annales De Biologie Clinique* **48**(8), 579--582.

Nettleton, J. E.; Reimer, R. A. & Shearer, J. (2016), 'Reshaping the gut microbiota: Impact of low calorie sweeteners and the link to insulin resistance?', *Physiology & Behavior* **164**(Pt B), 488--493.

O'Mullane, M.; Fields, B. & Stanley, G. (2014), Food Additives: Sweeteners, in Yasmine Motarjemi, ed., , Academic Press, Waltham, pp. 477--484.

Otabe, A.; Fujieda, T. & Masuyama, T. (2011), 'Evaluation of the teratogenic potential of N-[N-[3-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl) propyl]- $\alpha$ -aspartyl]-l-phenylalanine 1-methyl ester, monohydrate (advantame) in the rat and rabbit', *Food and Chemical Toxicology* **49**, S60--S69.

Otabe, A.; Fujieda, T.; Masuyama, T.; Ubukata, K. & Lee, C. (2011), 'Advantame – An overview of the toxicity data', *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* **49** Suppl 1, S2--7.

Pandey, A. K. & Chauhan, O. (2020), 'Monk fruit (*Siraitia grosvenorii*) - health aspects and food applications'

Pandey, R. & Upadhyay, S. (2012), Food Additive, pp. 1--30.

Parente, E., Ciocia, F., Ricciardi, A., Zotta, T., Felis, G.E., Torriani, S., 2010. Diversity of stress tolerance in *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus paraplantarum*: A multivariate screening study. *International Journal of Food Microbiology*. 144, 270-279.

Parija S.C. (2012). Textbook of Microbiology & Immunology.(2 ed.). India: Elsevier India.

Pedraza, L.; Alvarez, B.; Pedroza, R.; Romo, R.; Guevara, M.; Arreola, S.; Sanchez, E. & Toribio-Cuaya, H. (2016), *GROWTH OF LACTIC ACID BACTERIA IN THE PRESENCE OF SWEETENERS AND AN EMULSIFIER*.

Peleg, M. (2006). Advanced Quantitative Microbiology for Food and Biosystems: Models for Predicting Growth and Inactivation. CRC Press, Boca Raton,FL.

Percival, S. L., & Williams, D. W. (2014). Salmonella. *Microbiology of Waterborne Diseases*, 209--222. doi:10.1016/b978-0-12-415846-7.00010-x

Pfeiler, E. A. & Klaenhammer, T. R. (2007), 'The genomics of lactic acid bacteria', *Trends in Microbiology* **15**(12), 546--553.

Plaza-Diaz, J.; Pastor-Villaescusa, B.; Rueda-Robles, A.; Abadia-Molina, F. & Ruiz-

Ojeda, F. J. (2020), 'Plausible Biological Interactions of Low- and Non-Calorie Sweeteners with the Intestinal Microbiota: An Update of Recent Studies', *Nutrients* **12**(4), E1153.

Plumed-Ferrer, C., Koistinen, K.M., Tolonen, T.L., Lehesranta, S.J., Kärenlampi, S.O., Mäkimattila, E., Joutsjoki, V., Virtanen, V., von Wright, A. (2008). Comparative Study of Sugar Fermentation and Protein Expression Patterns of Two *Lactobacillus plantarum* Strains Grown in Three Different Media. *Applied and Environmental Microbiology*. 74, 5349-5358.

Popoff, M.Y., Bockemuhl, J., Hickman-Brenner, F.W., 1995. Supplement 1994 (no. 38) to the Kauffmann-White scheme. *Res. Microbiol.* 146, 799–803.

Qi, X.-Y.; Chen, W.-J.; Zhang, L.-Q. & Xie, B.-J. (2008), 'Mogrosides extract from *Siraitia grosvenori* scavenges free radicals in vitro and lowers oxidative stress, serum glucose, and lipid levels in alloxan-induced diabetic mice', *Nutrition Research (New York, N.Y.)* **28**(4), 278--284.

Rose, C. S.; Feldbaum, E. P.; Norris, R. F. & Gyorgy, P. (1952), 'Toxicity of Autoclaved Cystine for *Lactobacillus bifidus*.', *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **81**(3), 709--712.

Sabag-Daigle, A.; Dyszel, J. L.; Gonzalez, J. F.; Ali, M. M. & Ahmer, B. M. M. (2015), 'Identification of *sdiA*-regulated genes in a mouse commensal strain of *Enterobacter cloacae*', *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **5**.

Shankar, P.; Ahuja, S. & Sriram, K. (2013), 'Non-nutritive sweeteners: Review and update', *Nutrition* **29**(11), 1293--1299.

Sharpe, M.E., 1955. A Serological Classification of Lactobacilli. *Journal of General Microbiology*. 12, 107-122.

Shokoples, S. E.; Ndao, M.; Kowalewska-Grochowska, K. & Yanow, S. K. (2009), 'Multiplexed Real-Time PCR Assay for Discrimination of Plasmodium Species with Improved Sensitivity for Mixed Infections', *Journal of Clinical Microbiology* **47**(4), 975--980.

Smith, J. L.; Fratamico, P. M. & Novak, J. S. (2004), 'Quorum sensing: a primer for food microbiologists', *Journal of Food Protection* **67**(5), 1053--1070.

Smith, J. L.; Fratamico, P. M. & Yan, X. (2011), 'Eavesdropping by Bacteria: The Role of *SdiA* in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Quorum Sensing', *Foodborne Pathogens and Disease* **8**(2), 169--178.

Soutourina, O. & Bertin, P. (2003), 'Soutourina OA, Bertin PN.. Regulation cascade of flagellar expression in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 27: 505-523', *FEMS microbiology reviews* **27**, 505--23.

Stiles, M. E. & Holzapfel, W. H. (1997), 'Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy', *International Journal of Food Microbiology* **36**(1), 1--29.

Suez, J.; Korem, T.; Zeevi, D.; Zilberman-Schapira, G.; Thaiss, C. A.; Maza, O.; Israeli,



- D.; Zmora, N.; Gilad, S.; Weinberger, A.; Kuperman, Y.; Harmelin, A.; Kolodkin-Gal, I.; Suzuki, Y. A.; Tomoda, M.; Murata, Y.; Inui, H.; Sugiura, M. & Nakano, Y. (2007), 'Antidiabetic effect of long-term supplementation with *Siraitia grosvenori* on the spontaneously diabetic Goto–Kakizaki rat', *British Journal of Nutrition* **97**(4), 770--775.
- Swamy, S.; Barnhart, H.; Lee, M. & Dreesen, D. (1996), 'Virulence determinants invA and spvC in *Salmonellae* isolated from poultry products, wastewater, and human sources', *Applied and environmental microbiology* **62**, 3768--71.
- Tannock, G. W. (1999), 'Analysis of the intestinal microflora: a renaissance', *Antonie Van Leeuwenhoek* **76**(1-4), 265--278.
- Tiefenbacher, K. F. (2017), Chapter Three - Technology of Main Ingredients—Sweeteners and Lipids, in Karl F. Tiefenbacher, ed., Academic Press, , pp. 123--225.
- Todorov, S.D., 2009. Bacteriocins from *Lactobacillus plantarum* production, genetic organization and mode of action: produção, organização genética e modo de ação. *Brazilian Journal of Microbiology*. 40, 209-221.
- Todorov, S.D., Ho, P., Vaz-Velho, M., Dicks, L.M.T. 2010. Characterization of bacteriocins produced by two strains of *Lactobacillus plantarum* isolated from Beloura and Chouriço, traditional pork products from Portugal. *Meat Science*. 84, 334-343.
- Turki, Y.; Mehr, I.; Ouzari, H.; Khessairi, A. & Hassen, A. (2014), 'Molecular typing, antibiotic resistance, virulence gene and biofilm formation of different *Salmonella enterica* serotypes', *The Journal of General and Applied Microbiology* **60**(4), 123--130.
- Valones, M. A. A.; Guimaraes, R. L.; Brandao, L. A. C.; de Souza, P. R. E.; de Albuquerque Tavares Carvalho, A. & Crovela, S. (2009), 'Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: a review', *Brazilian Journal of Microbiology* **40**(1), 1--11.
- Van Boekel, M. A.J.S. (2009). *Kinetic Modeling of Reactions in Foods*. (Food Science and Technology). CRC Press, Boca Raton, FL.
- Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., ... & Whitman, W. B. (Eds.). (2011). *Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume 3: The Firmicutes (Vol. 3)*. Springer Science & Business Media.
- Weber, A. & Hekmat, S. (2013), 'The Effect of *Stevia rebaudiana* on the Growth and Survival of *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and Sensory Properties of Probiotic Yogurt', *Journal of Food Research* **2**(2), p136.
- Whitehouse, C. R.; Boullata, J. & McCauley, L. A. (2008), 'The potential toxicity of artificial sweeteners', *AAOHN journal: official journal of the American Association of Occupational Health Nurses* **56**(6), 251--259; quiz 260--261.
- Williams, P. (2006), 'Quorum sensing', *International journal of medical microbiology: IJMM* **296**(2-3), 57--59.
- Williams, P. (2007), 'Quorum sensing, communication and cross-kingdom signalling in

the bacterial world', *Microbiology (Reading, England)* **153**(Pt 12), 3923--3938.

Wong, M. L. & Medrano, J. F. (2005), 'Real-time PCR for mRNA quantitation', *BioTechniques* **39**(1), 75--85.

Wood, B. J. B., & Holzapel, W.H. (1995). The Genera of Lactic Acid Bacteria. Springer Science & Business Media Dordrecht, 1-54

Yanagihara, S., Iyoda, S., Ohnishi, K., Iino, T., & Kutsukake, K. (1999). Structure and transcriptional control of the flagellar master operon of *Salmonella typhimurium*. *Genes & genetic systems*, **74**(3), 105-111.

Zhao, X.; Lin, C.-W.; Wang, J. & Oh, D.-H. (2013), 'Advances in Rapid Detection Methods for Foodborne Pathogens', *Journal of microbiology and biotechnology* **24**.

Zheng, J.; Ruan, L.; Sun, M. & Ganzle, M. (2015), 'A Genomic View of Lactobacilli and Pediococci Demonstrates that Phylogeny Matches Ecology and Physiology', *Applied and Environmental Microbiology* **81**(20), 7233--7243.

Zhou, D.; Mooseker, M. S. & Galan, J. E. (1999), 'Role of the *S. typhimurium* actin-binding protein SipA in bacterial internalization', *Science (New York, N.Y.)* **283**(5410), 2092--2095.

'EUR-Lex - 31994L0035 - EL', *Επίσημη Εφημερίδα αριθ. L 237 της 10/09/1994 σ. 0003 - 0012; Φινλανδική ειδική έκδοση: Κεφάλαιο 13 τόμος 27 σ.; Σουηδική ειδική έκδοση: Κεφάλαιο 13 τόμος 27 σ. 0005 ; , OPOCE.*

### **C. Αναφορές Ιστού**

<https://www.sweeteners.org/safety-regulation/>

(24/06/2022)

<https://www.fda.gov/food/food-additives-petitions/additional-info/r/mation-about-high-intensity-sweeteners-permitted-use-food-united-states>

(18/06/2022)