



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

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

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Επίδραση των γλυκαντικών στην ανάπτυξη του παθογόνου μικροοργανισμού
Listeria monocytogenes και του προβιοτικού *Lactobacillus pentosus*

Χρυσούλα Α. Δήμου

Επιβλέπων καθηγητής:

Γεώργιος-Ιωάννης Νυχάς, Καθηγητής ΓΠΑ

**ΑΘΗΝΑ
2022**

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

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Επίδραση των γλυκαντικών στην ανάπτυξη του παθογόνου μικροοργανισμού
Listeria monocytogenes και του προβιοτικού *Lactobacillus pentosus*

Effect of sweeteners on the growth of the pathogenic microorganism *Listeria*
monocytogenes and the probiotic *Lactobacillus pentosus*

Χρυσούλα Α. Δήμου

Εξεταστική Επιτροπή:

Γεώργιος-Ιωάννης Νυχάς, Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)

Ευστάθιος Πανάγου, Καθηγητής ΓΠΑ

Κύρου Ιωάννης, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ

Επίδραση των γλυκαντικών στην ανάπτυξη του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* και του προβιοτικού *Lactobacillus pentosus*

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

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η διαρκής αύξηση των περιστατικών παχυσαρκίας, καθώς και η συνεχόμενη ευαισθητοποίηση των καταναλωτών σε θέματα υγείας που σχετίζονται με την υπερκατανάλωση της ζάχαρης, έχουν οδηγήσει στην αντικατάσταση της επιτραπέζιας ζάχαρης με μια ευρεία γκάμα γλυκαντικών. Έτσι, έχει αυξηθεί η κατανάλωση τροφίμων που περιέχουν γλυκαντικά χαμηλής θερμιδικής αξίας ή μη θερμιδικά γλυκαντικά. Τα γλυκαντικά αυτά δίνουν τη δυνατότητα στο τρόφιμο που προστίθενται να μην διατηρούν την γλυκύτητά τους αλλά ταυτόχρονα να έχουν μειωμένο θερμιδικό περιεχόμενο. Ωστόσο, η αντικατάσταση της ζάχαρης με γλυκαντικά μπορεί να αλλάξει τις χαρακτηριστικές ιδιότητες των τροφίμων και να επηρεάσει τη δυναμική των βακτηρίων και τη μικροβιολογική ασφάλεια του τροφίμου. Πολλές μελέτες αναφέρουν την επίδραση των γλυκαντικών στην μικροβιολογική ασφάλεια του τροφίμου.

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να αξιολογηθεί η επίδραση των γλυκαντικών στην μικροβιολογική ανάπτυξη και στην γονιδιακή έκφραση ενός παθογόνου βακτηρίου της *Listeria monocytogenes* και ενός γαλακτικού προβιοτικού βακτηρίου του *Lactobacillus pentosus*. Συγκεκριμένα, τα βακτηριακά στελέχη εμβολιάστηκαν με κυτταρικό πληθυσμό 10^2 CFU/ml, σε θρεπτικό ζωμό με γλυκόζη ή με τα επιλεγμένα γλυκαντικά, στις συγκεντρώσεις 2,5% και 10% w/v. Οι γλυκαντικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν είναι έξι γλυκαντικά ευρέως χρησιμοποιούμενα στη βιομηχανία τροφίμων. Οι εμβολιασμένοι ζωμοί επώαστηκαν στις ιδανικές συνθήκες και η βακτηριακή τους ανάπτυξη προσδιορίστηκε με χρόνους ανίχνευσης απορρόφησης και περιγράφηκε μέσω προσδιορισμού των εξής παραμέτρων: 1) Tdet (ο χρόνος ανίχνευσης ο οποίος απαιτείται για να παρατηρηθούν αλλαγές στην οπτική πυκνότητα του μέσου ανάπτυξης), 2) MSrODC (η μέγιστη κλίση των αλλαγών στην οπτική πυκνότητα) και 3) το εμβαδόν (περιοχή) κάτω από την καμπύλη οπτικής πυκνότητας/χρόνου. Στα αποτελέσματα που προέκυψαν πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση (ANOVA) για να διαπιστωθεί αν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των παραγόντων. Επίσης, κατά τη διάρκεια της επώασης, συλλέχθηκαν δείγματα που προέρχονταν από διαφορετικές φάσεις ανάπτυξης και υποβλήθηκαν σε ανάλυση γονιδιακής έκφρασης μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης με αντίστροφη μεταγραφή σε πραγματικό χρόνο (RT-PCR). Πιο συγκεκριμένα, το ολικό RNA εξήχθη από τα δείγματα αυτά και προσδιορίστηκε η έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στην παθογένεια, την αίσθηση απαρτίας, τον σχηματισμό βιοϋμενίων και άλλα χαρακτηριστικά.

Ποικίλα ευρήματα παρατηρήθηκαν σχετικά με τη συμπεριφορά των εξεταζόμενων βακτηρίων στις διάφορες συνθήκες που υποβλήθηκαν (γλυκόζη έναντι γλυκαντικών και στις δύο συγκεντρώσεις) και η ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης οδήγησε σε σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τις γενετικές τους αποκρίσεις.

Συνολικά, οι έρευνες που έχουν γίνει ως τώρα για τις πιθανές επιδράσεις των γλυκαντικών στην ανάπτυξη των βακτηρίων στα τρόφιμα είναι ελάχιστες, και για το λόγο αυτό πρέπει να γίνουν περαιτέρω αναλυτικές μελέτες για τη διασφάλιση της καλύτερης ασφάλειας και ποιότητας των τροφίμων.

Επιστημονική περιοχή: Μικροβιολογία Τροφίμων

Λέξεις-κλειδιά: Γλυκαντικά, βακτήρια, γονίδια, γονιδιακή έκφραση, μέθοδος οπτικής πυκνότητας

Effect of sweeteners on the growth of the pathogenic microorganism *Listeria monocytogenes* and the probiotic *Lactobacillus pentosus*

*M.Sc. Food Safety & Quality Management Systems
Department of Food Science & Human Nutrition
Laboratory of Food Microbiology*

ABSTRACT

The continuous increase in the incidence of obesity, as well as the continuous consumer awareness of health issues related to the overconsumption of sugar, has led to the replacement of table sugar with a wide range of sweeteners. This has resulted in an increase in the consumption of foods containing low-calorie or non-caloric sweeteners. These sweeteners make the food, that are added into, capable to retain its sweetness and at the same time to have a reduced caloric content. However, replacing sugar with sweeteners may alter the characteristic properties of food and affect its bacterial dynamics and microbiological safety. Few studies have focused on the effect of sweeteners on the microbiological safety of food.

The aim of the present study was to evaluate the effect of sweeteners on the microbiological growth and gene expression of a pathogenic bacterium *Listeria monocytogenes* and a lactic probiotic bacterium *Lactobacillus pentosus*. Specifically, bacterial strains were inoculated with a cell population of 10^2 CFU/ml, in nutrient broth with glucose or with the selected sweeteners, in concentrations 2.5% or 10% w/v. The sweeteners used are six sweeteners widely used in the food industry. The inoculated broths were incubated under ideal conditions and their bacterial growth was determined by absorbance detection times and described by determining the following parameters: 1) Tdet (the detection time required to observe changes in the optical density of the growth medium), 2) MSrODC (the maximum incline of the optical density changes) and 3) the area under the optical density/time curve. The data were then examined by a statistical analysis (ANOVA), to determine if there are statistically significant differences between the factors. Also, during incubation, samples from different growth phases were collected and subjected to gene expression analysis by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). More specifically, total RNA was extracted from these samples and the expression of genes involved in pathogenesis, quorum sensing, biofilm formation and other characteristics was determined.

A variety of findings were observed regarding the behavior of the examined bacteria under the different conditions they were subjected to (glucose versus sweeteners at different concentrations) and genomic analysis led to important information about their genetic responses.

Overall, the research done so far on the possible effects of sweeteners on the growth of bacteria in food is very weak, and therefore further detailed studies are needed to ensure the optimal food safety and quality.

Scientific area: Food Microbiology

Keywords: Sweeteners, bacteria, genes, gene expression, optical density method

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Πρώτα από όλα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέπων της πτυχιακής μου μελέτης Καθηγητή κ. Γεώργιο-Ιωάννη Νυχά, για την εμπιστοσύνη προς το πρόσωπό μου, την καθοδήγησή του και την θέληση να βοηθήσει και να δώσει λύση στα ερωτήματα και τα προβλήματά μου. Οι συμβουλές του οδήγησαν στο να αναπτύξω και να εξελίξω τις γνώσεις μου και το ενδιαφέρον μου σε αυτό το ερευνητικό πεδίο.

Ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω και στα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής, τον κ. Πανάγου Ευστάθιο και τον κ. Κύρου Ιωάννη που αφιέρωσαν χρόνο στη μελέτη της μεταπτυχιακής μου εργασίας και έδωσαν το παρόν στην παρουσίαση αυτής.

Επίσης, θα ήθελα ιδιαίτερα να ευχαριστήσω την μεταδιδάκτορα Δρ. Μάνθου που οργάνωσε όλη την ομάδα, προγραμματίσει τις ενέργειές και τα βήματα του πειράματος, μας καθοδήγησε σχετικά με τις μικροβιολογικές αναλύσεις και τις μοριακές τεχνικές καθώς και με τη συγγραφή της πτυχιακής αυτής μελέτης.

Θα ήθελα να εκφράσω ένα μεγάλο ευχαριστώ και στο προσωπικό του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, κα. Τρυφίνοπούλου Πασχαλίτσα και κ. Αναστάσιο Σταματίου για την καθοδήγηση και τις συμβουλές τους σχετικά με την ομαλή λειτουργία του εργαστηρίου.

Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τις μεταδιδάκτορες Δρ. Φέγγου Λένια και Δρ. Λύτου Αναστασία και τις υποψήφιες διδάκτορες, Σπυρέλλη Ευγενία και Σχοινά Ειρήνη για την διαρκή υποστήριξή τους, τη βοήθειά τους και τις διορθώσεις και παρατηρήσεις τους με σκοπό να γίνομαι καλύτερη στο αντικείμενό μου και να μάθω με σωστό και ουσιαστικό τρόπο τις μικροβιολογικές τεχνικές.

Ακόμη, ευχαριστώ όλους τους προπτυχιακούς και μεταπτυχιακούς φοιτητές και φίλους για το εξαιρετικό κλίμα που δημιουργήσαμε στο εργαστήριο και για την αρμονική συνεργασία που πετύχαμε.

Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ ανήκει στους δικούς μου αφανείς ήρωες που με στήριζαν και με ενθάρρυναν σε όλη την πειραματική διαδικασία. Η καθημερινή υπενθύμιση της οικογένειάς μου και των φίλων μου για το ποια είμαι και τι έχω πετύχει μου έδινε δύναμη να συνεχίσω να προσπαθώ και να μην παρεκκλίνω από τους στόχους μου και τα όνειρά μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΙΝΑΚΑΣ ΜΕ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	8
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.1 Γλυκαντικά.....	9
1.2 Ταξινόμηση γλυκαντικών	10
1.2.1 Θρεπτικά - Μη θρεπτικά γλυκαντικά	10
1.2.2. Φυσικά - Συνθετικά γλυκαντικά.....	13
2. ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΓΛΥΚΑΝΤΙΚΩΝ.....	27
2.1 Το γένος Listeria.....	27
2.1.1 Βασικά χαρακτηριστικά.....	27
2.1.2 Λιστερίωση	27
2.1.3 Μεταβολισμός και Φυσιολογία.....	28
2.1.4 Ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίων	28
2.1.5 Γονίδια Listeria.....	29
2.2 Οξυγαλακτικά βακτήρια.....	32
2.2.1 Φυσιολογία των οξυγαλακτικών βακτηρίων.....	32
2.2.2. Το γένος Lactobacillus.....	34
2.2.3 Lactobacillus pentosus.....	35
2.2.4 Γλυκαντικά και μικροχλωρίδα του εντέρου.....	36
3. ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΕΣ - ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ.....	37
3.1 Οπτική Πυκνότητα (Optical Density, OD).....	37
3.2 Μικροβιακή καμπύλη ανάπτυξης.....	38
3.2.1 Οι φάσεις της καμπύλης ανάπτυξης	40
3.3 Αλυσιδωτή αντίδραση Πολυμεράσης Αντίστροφης Μεταγραφής (Real Time RT-PCR).....	42
ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	47
4. ΥΛΙΚΑ - ΜΕΘΟΔΟΙ	48
4.1 Ανανέωση / Έλεγχος καθαρότητας.....	48
4.2 Προετοιμασία Γλυκαντικών.....	49
4.2.1 Φιλτράρισμα γλυκαντικών	49
4.3 Οπτική πυκνότητα (OD) – Προσδιορισμός της κινητικής ανάπτυξης.....	50
4.3.1 Εμβολιασμός πλάκας μικροτιτλοδότησης (microplate).....	50
4.3.2 Υπολογισμός παραμέτρων ανάπτυξης και Στατιστική ανάλυση δεδομένων (ANOVA)....	52
4.4 Μελέτη μικροβιολογικής αύξησης μέσω πρότυπης καμπύλης.....	54
4.5 Μοριακές τεχνικές – Έκφραση Γονιδίων.....	56

4.5.1 Απομόνωση RNA (RNA extraction)	56
4.5.2 Μετατροπή του RNA σε cDNA.....	57
4.5.3 Real Time PCR.....	58
5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ	59
5.1 Κινητική ανάπτυξης των μικροοργανισμών μέσω μελέτης οπτικής πυκνότητας (OD)	59
5.1.1. <i>Listeria monocytogenes</i>	59
5.1.2 <i>Lactobacillus pentosus</i>	62
5.2 Προσδιορισμός ανάπτυξης μικροοργανισμών με τη μέθοδο τρυβλίων	66
5.2.1. <i>Listeria monocytogenes</i>	66
5.2.2 <i>Lactobacillus pentosus</i>	69
5.3 Αποτελέσματα ανάλυσης RNA για <i>Listeria monocytogenes</i>	71
6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	74
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	76

ΠΙΝΑΚΑΣ ΜΕ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ΣΔΤ2	Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου 2
SCF	Επιστημονική Επιτροπή Τροφίμων (Scientific Committee on Food)
FAO	Διεθνής Οργάνωση Τροφίμων και Γεωργίας (Food & Agriculture Organization)
WHO	Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (World Health Organization)
FDA	Οργανισμός Ελέγχου Φαρμάκων και Τροφίμων (Food and Drug Administration)
JEFCA	Κοινή επιτροπή εμπειρογνομόνων FAO/WHO για τα πρόσθετα τροφίμων (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives)
EFSA	Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (The European Food Safety Authority)
ADI	Αποδεκτή Τιμή Ημερήσιας Πρόσληψης (Acceptable Daily Intake)
NOAEL	Επίπεδο μη παρατηρούμενων δυσμενών επιπτώσεων (No-observed-adverse-effect level)
NS	Θρεπτικά Γλυκαντικά (Nutritive Sweeteners)
NNS	Μη θρεπτικά Γλυκαντικά (Non Nutritive Sweeteners)
GRAS	Γενικά αναγνωρισμένο ως ασφαλές (Generally recognized as safe)
LAB	Βακτήρια Γαλακτικού Οξέος (Lactic Acid Bacteria)
OD	Οπτική Πυκνότητα (Optical Density)
PCR	Αλυσιδωτή αντίδραση Πολυεράσης (Polymerase Chain Reaction)
TSA	Tryptone Soy Agar
NB	Nutrient Broth

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γλυκαντικά

Η ανθρωπότητα βιώνει τον κόσμο και τα ερεθίσματα μέσα από τις πέντε πρωταρχικές αισθήσεις (Mooradian et al., 2017). Όσον αφορά την αίσθηση της γεύσης, είναι γενικά γνωστό ότι τα παιδιά ήδη από τη βρεφική ηλικία προτιμούν τη γλυκιά γεύση σε σχέση με τις άλλες βασικές γεύσεις, και παρόλο που αυτό μπορεί να αλλάξει με την ηλικία, η γλυκιά γεύση συνεχίζει να είναι μία από τις πιο αγαπητές γεύσεις για την ανθρωπότητα, που προτιμάται σε σχέση με την ξινή και την πικρή γεύση (Mooradian et al., 2017). Η γλυκύτητα είναι ένα χαρακτηριστικό των τροφίμων και των ποτών που ο άνθρωπος αντιλαμβάνεται μέσω των υποδοχέων της γεύσης και συνδέεται με το αίσθημα της ευχαρίστησης και της ευτυχίας (Magnuson, et.al., 2021). Επίσης, η γλυκόζη απαιτείται από τον οργανισμό ως μία από τις κύριες πηγές καυσίμου για τον κυτταρικό μεταβολισμό. Παρόλο που η πρόσληψη ζάχαρης είναι μια ανάγκη έμφυτη από τον οργανισμό, πρόσφατα δεδομένα έχουν δείξει ότι η πρόσληψη ζάχαρης υπερβαίνει τις συστάσεις (Magnuson, et.al., 2021).

Με τη ραγδαία αύξηση των εύκολα διαθέσιμων επιλογών για τρόφιμα με υψηλή περιεκτικότητα σε θερμίδες και χαμηλή θρεπτική αξία, τα ποσοστά παχυσαρκίας συνεχίζουν να αυξάνονται και φτάνουν διαστάσεις επιδημίας (Kahler, 2020). Η υπερβολική κατανάλωση ζάχαρης έχει καταστεί σημαντικό ζήτημα για τη δημόσια υγεία λόγω των δυσμενών επιπτώσεων στην υγεία και τις μεταβολικές συνέπειες που επιφέρει, όπως η παχυσαρκία, η αντίσταση στην ινσουλίνη, το μεταβολικό σύνδρομο, τα καρδιαγγειακά νοσήματα και τον διαβήτη τύπου 2 (ΣΔΤ2) (Plaza-Dias, et.al., 2020). Στην αρχή του αιώνα, ο αριθμός των ατόμων με ΣΔΤ2 σε παγκόσμιο επίπεδο υπολογιζόταν σε 171 εκατομμύρια. Αυτός ο αριθμός αναμένεται να διπλασιαστεί μέχρι το έτος 2030. Ενώ τα ακριβή αίτια του διαβήτη δεν έχουν ακόμη κατανοηθεί πλήρως, η διατήρηση ενός φυσιολογικού σωματικού βάρους (δείκτης μάζας σώματος < 30) έχει κεντρική σημασία για την πρόληψη και τη θεραπεία του ΣΔΤ2. Τα σάκχαρα αποτελούν τον βασικό ένοχο για τις αρνητικές επιπτώσεις στην υγεία, μιας και αποτελούν μια τεράστια πηγή κρυμμένων θερμίδων και δεν παρέχουν αίσθημα κορεσμού. Η συσχέτιση μεταξύ της ζάχαρης και της ανάπτυξης παχυσαρκίας και ΣΔΤ2 είναι ευρέως αποδεκτή και έχει αποτελέσει σημαντικό στοιχείο η επιθυμία για περιορισμό της πρόσληψης ζάχαρης (Kahler, 2020).

Ένας τρόπος για τη μείωση της πρόσληψης ζάχαρης και κατ' επέκταση της θερμιδικής πρόσληψης είναι η μείωση ή η εξάλειψη της χρήσης της επιτραπέζιας ζάχαρης (Carocho, et.al., 2017). Για να μειωθεί η πρόσληψή της, εμφανίστηκαν τα γλυκαντικά τη δεκαετία του 1800, τα οποία αντικατέστησαν τη ζάχαρη και από τότε έχουν κάνει μεγάλη πρόοδο (Carocho, et.al., 2017). Σε αναζήτηση της γευστικής ικανοποίησης ταυτόχρονα με τη μείωση των θερμίδων, η αγορά νέων τροφίμων συνεχίζει να αυξάνεται και οι κατασκευαστές έχουν ανταποκριθεί σε αυτή την ανάγκη με την παραγωγή και την εμπορία ποικίλων γλυκαντικών ουσιών (Kahler, 2020).

Όλα τα γλυκαντικά που επιτρέπονται για χρήση σε τρόφιμα στην ΕΕ έχουν υποβληθεί σε εκτενή εξέταση για πιθανές τοξικολογικές επιπτώσεις, πριν γίνει αποδεκτή η ασφάλεια της χρήσης τους. Η ασφάλειά τους έχει αξιολογηθεί από τις εθνικές αρχές, από την Επιστημονική Επιτροπή Τροφίμων (SCF) της ΕΕ και από την Κοινή Επιτροπή Εμπειρογνομόνων του Οργανισμού Τροφίμων και Γεωργίας (FAO) καθώς και του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO) για τα Πρόσθετα Τροφίμων (JECFA). Για να

διασφαλιστεί η ασφάλεια των γλυκαντικών, θεσπίστηκε μέσα από τη νομοθεσία ένα όριο κατανάλωσης, το οποίο είναι μια αποδεκτή τιμή ημερήσιας πρόσληψης ενός γλυκαντικού (ADI). Αυτές οι προσλήψεις (ADI) καθορίζονται από τα επίπεδα που δεν παρατηρούνται δυσμενείς επιπτώσεις (No observed Adverse Effect Level, NOAEL). Η ADI εκφράζεται με βάση το σωματικό βάρος και ορίζεται ως η ποσότητα πρόσθετου τροφίμου που μπορεί να καταναλώνεται καθημερινά κατά τη διάρκεια της ζωής χωρίς σημαντικό κίνδυνο για την υγεία (World Health Organization, 2004). Δεν είναι όριο μεταξύ ασφαλούς και μη ασφαλούς, αλλά μια υπολογισμένη τιμή που προκύπτει διαιρώντας το NOAEL με έναν παράγοντα ασφαλείας. Το NOAEL είναι ένα πολύ χαμηλό ημερήσιο επίπεδο πρόσληψης ώστε να προκαλέσει επιπτώσεις. Συνεπώς, το ADI είναι ένα ασφαλές επίπεδο ημερήσιας πρόσληψης για όλους (Magnuson et. al., 2016).

Οι προσλήψεις μπορεί να μεταβάλλονται με την πάροδο του χρόνου, λόγω των μεταβαλλόμενων προτύπων χρήσης των γλυκαντικών και της πρόσληψης τροφής, με αποτέλεσμα η αξιολόγηση του κινδύνου να πρέπει να πραγματοποιείται σε τακτά χρονικά διαστήματα, ακόμη και αν τα βασικά δεδομένα ασφαλείας και ο χαρακτηρισμός κινδύνου μπορεί να μην έχουν αλλάξει (Mortensen, 2016). Παρά την κυβερνητική έγκριση και τη διαβεβαίωση για την ασφάλεια των γλυκαντικών, οι καταναλωτές παραμένουν επιφυλακτικοί για τα γλυκαντικά και υπάρχουν γενικά ανησυχίες σχετικά με την μακροπρόθεσμη ασφαλείά τους (Kahler, 2020).

1.2 Ταξινόμηση γλυκαντικών

Τα γλυκαντικά είναι πρόσθετα τροφίμων, τα οποία μιμούνται την επίδραση της ζάχαρης στη γεύση και γι' αυτό το λόγο ονομάζονται υποκατάστατα της ζάχαρης (Chattopadhyay et.al, 2011). Οι καταναλωτές συχνά επιλέγουν τρόφιμα τα οποία αποτελούνται από γλυκαντικά χαμηλών θερμίδων επειδή επιθυμούν τη γεύση της γλυκύτητας χωρίς ωστόσο να καταναλώνουν πρόσθετες θερμίδες. Η διατροφική επιλογή που παρέχει ένα τέτοιο προϊόν μπορεί να είναι ιδιαίτερα χρήσιμη στη διαχείριση της παχυσαρκίας και του σακχαρώδη διαβήτη (Chattopadhyay et.al, 2011).

Τα γλυκαντικά μπορούν να ταξινομηθούν με βάση τις εγγενείς ιδιότητες ή την προέλευση και ορισμένες από τις πιο κοινές ταξινομήσεις είναι από την άποψη της θρεπτικής τους αξίας, της γλυκαντικής τους δύναμης και την προέλευσή τους. Έτσι, μπορούν να διαχωριστούν βάση της θρεπτικής τους αξίας και γλυκαντικής τους δύναμης σε θρεπτικά γλυκαντικά (Nutritive Sweeteners, NS) και σε μη θρεπτικά γλυκαντικά ή υψηλής έντασης γλυκαντικά (Non-Nutritive Sweeteners (NNS) or High Intense Sweeteners(HISs)), καθώς επίσης και βάση της προέλευσής τους σε συνθετικά και φυσικής προέλευσης γλυκαντικά. Η πρώτη είναι μια ταξινόμηση που χρησιμοποιείται από διοικητικούς φορείς όπως η Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων της Ευρωπαϊκής Ένωσης (EFSA), ενώ ο διαχωρισμός σε φυσικά και συνθετικά γλυκαντικά δεν χρησιμοποιείται από αυτούς τους οργανισμούς και βασίζεται αποκλειστικά στην προέλευση του γλυκαντικού (Carocho et al., 2017).

1.2.1 Θρεπτικά - Μη θρεπτικά γλυκαντικά

Στην ομάδα των NS ανήκουν τα απλά σάκχαρα (μονοσακχαρίτες) με κυριότερο παράδειγμα την γλυκόζη με μοριακό τύπο $C_6H_{12}O_6$.

Η γλυκόζη έχει κεντρικό ρόλο στην κατανάλωση ενέργειας (Nakrani, et. al., 2021). Οι υδατάνθρακες, τα λιπίδια και οι πρωτεΐνες διασπώνται τελικά σε γλυκόζη, η οποία στη συνέχεια χρησιμεύει ως το πρωταρχικό μεταβολικό καύσιμο των θηλαστικών. Μετά από ένα γεύμα, παρατηρείται αύξηση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα, η οποία αυξάνει ταυτόχρονα την έκκριση ινσουλίνης από το πάγκρεας. Η ινσουλίνη προκαλεί την εναπόθεση της γλυκόζης, που δεν χρειάζεται άμεσα, στο ήπαρ ώστε να υπάρχει αποθηκευμένο ως γλυκογόνο. Στη συνέχεια, κατά τη διάρκεια των επόμενων ωρών, όταν η συγκέντρωση γλυκόζης στο αίμα πέφτει, το ήπαρ απελευθερώνει γλυκόζη πίσω στο αίμα, μειώνοντας τις διακυμάνσεις που δημιουργήθηκαν και διατηρώντας μια ισορροπία μεταξύ των επιπέδων γλυκόζης στον ορό και στο ήπαρ (Nakrani, et. al., 2021). Ο ΣΔΤ2 προκύπτει όταν τα βήτα κύτταρα του παγκρέατος δεν μπορούν να παράγουν αρκετή ινσουλίνη για να καλύψουν τις μεταβολικές ανάγκες. Συνεπώς, η περίσσεια γλυκόζης δεν καταφέρνει να αποθηκευτεί ικανοποιητικά στο ήπαρ με αποτέλεσμα να κυκλοφορεί στον ορό του αίματος. Αυτά τα άτομα λοιπόν πρέπει να δίνουν ιδιαίτερη προσοχή στην ποσότητα ζάχαρης που καταναλώνουν (Nakrani, et. al., 2021).

Η γλυκόζη, η φρουκτόζη και η γαλακτόζη είναι οι κυριότεροι μονοσακχαρίτες με γλυκιά γεύση που συναντώνται στα τρόφιμα και τα ποτά (Edwards, et. al., 2016). Αυτά τα σάκχαρα μπορούν να συνδυαστούν χημικά μεταξύ τους για να σχηματίσουν δισακχαρίτες που απαντούν στη φύση, π.χ. σακχαρόζη (φρουκτόζη + γλυκόζη), λακτόζη (γλυκόζη + γαλακτόζη) και μαλτόζη (γλυκόζη + γλυκόζη), και είναι επίσης τα δομικά στοιχεία ενός μεγάλου φάσματος ολιγο- και πολυσακχαριτών, π.χ. άμυλο, μαλτοδεξτρίνες και φρουκτάνες. Η γλυκόζη και η φρουκτόζη είναι επίσης τα κύρια συστατικά του σιροπιού καλαμποκιού με υψηλή περιεκτικότητα σε φρουκτόζη (HFCS) και της επιτραπέζιας ζάχαρης (σακχαρόζη), τα οποία είναι τα πιο κοινές γλυκαντικές ουσίες που χρησιμοποιούνται σήμερα (Edwards, et. al., 2016).

Η ισομαλτουλόζη, η τρεαλόζη και οι πολυόλες περιλαμβάνονται επίσης σε αυτή την ταξινόμηση (Carocho et. al., 2017). Μερικά παραδείγματα πολυολών είναι η ερυθριτόλη, η σορβιτόλη, η μανιτόλη και η ξυλιτόλη. Οι πολυόλες (δηλ. οι αλκοόλες σακχάρου) είναι παράγωγα σακχαριτών που απαντώνται φυσικά στα φρούτα, τα λαχανικά και σε ορισμένα τρόφιμα που έχουν υποστεί ζύμωση και μπορούν να παρασκευαστούν χημικά με υδρογόνωση μονο - ή δισακχαριτών. Σε σύγκριση με τα σάκχαρα, οι πολυόλες απορροφώνται ελάχιστα και επομένως παρέχουν λιγότερες θερμίδες και χαμηλότερες γλυκαιμικές αποκρίσεις, συνεπώς αυτά τις καθιστούν δημοφιλή για χρήση ως γλυκαντικά σε τρόφιμα για διαβητικούς και σε χαμηλών θερμίδων τρόφιμα και ποτά. Οι πολυόλες χρησιμοποιούνται συχνά σε συνδυασμό με τα NNS, αλλά σε αντίθεση με αυτά οι πολυόλες έχουν σχετικά χαμηλότερο δείκτη γλυκύτητας, γεγονός που τους επιτρέπει να χρησιμοποιούνται σε μεγαλύτερες ποσότητες, δηλαδή ως χύμα γλυκαντικό (Carocho et. al., 2017).

Τα NS συνήθως υδρολύονται σε μεμονωμένους μονοσακχαρίτες στο λεπτό έντερο και στη συνέχεια απορροφώνται και μεταβολίζονται για να αποδώσουν διαιτητική ενέργεια (Edwards, et.al., 2016). Για σκοπούς επισήμανσης, τα περισσότερα σάκχαρα θεωρούνται ότι παρέχουν 4 kcal/g. Οι κύριες ανησυχίες για την υγεία γύρω από τα σάκχαρα και τα πλούσια σε ζάχαρη προϊόντα είναι οι καρκινογόνες ιδιότητές τους και ότι η υπερβολική πρόσληψη τους μπορεί να συμβάλλει σε ένα θετικό ενεργειακό ισοζύγιο. Άλλες ασθένειες και διαταραχές σχετίζονται επίσης με την κατανάλωση ζάχαρης, μεταξύ αυτών είναι οι καρδιαγγειακές παθήσεις (στεφανιαία), ο διαβήτης τύπου II, μεταβολικό σύνδρομο, υπερτριγλυκεριδαιμία, αντίσταση στην ινσουλίνη, καρκίνος (μαστού, παχέος εντέρου),

παχυσαρκία, παιδική παχυσαρκία, υπέρταση και νεφρικές παθήσεις (Edwards, et.al., 2016).

Από την άλλη πλευρά, τα NNS, έχουν αμελητέα θερμιδική συνεισφορά και ταυτόχρονα υψηλή γλυκαντική ικανότητα, καθώς χρησιμοποιούνται σε μικρές ποσότητες στα τρόφιμα, κάτι που τα καθιστά μια οικονομική επιλογή, μιας και μόνο μικρές ποσότητες από αυτά απαιτούνται για την ικανοποίηση της γλυκιάς απαίτησης (Edwards, et.al., 2016). Συνεπώς, δεν παρέχουν σχεδόν καθόλου μεταβολική ενέργεια όταν χρησιμοποιούνται ως υποκατάστατο ζάχαρης. Τα περισσότερα μη θεραπευτικά γλυκαντικά συντίθενται χημικά. Γενικά, δεν είναι καρκινογόνα και δεν προκαλούν γλυκαιμική απόκριση, με αποτέλεσμα να χρησιμοποιούνται ευρέως σε υποθερμιδικές δίαιτες, σε ασθενείς με διαβήτη και άλλες ειδικές περιπτώσεις όπου η θερμιδική πρόσληψη πρέπει να ελέγχεται. Τα μη θεραπευτικά γλυκαντικά που είναι σήμερα εγκεκριμένα για χρήση στην Ευρωπαϊκή Ένωση είναι η ασπαρτάμη (E951), η σακχαρίνη (E954) και η ακεσουλφάμη-K (E950), το κυκλαμικό (E952), η νεοεσπεριδίνη DC (E959), η σουκραλόζη (E955), η θαυματίνη (E957) και επίσης οι πρόσφατα εγκεκριμένοι γλυκοζίτες στεβιόλης (E960) (Edwards, et.al., 2016).

Υπάρχουν περιορισμένα δεδομένα σχετικά με τη χρήση των NNS σε επίπεδο πληθυσμού και δεν είναι ξεκάθαρο ακόμα αν η χρήση των μη θεραπευτικών γλυκαντικών έχει ευεργετικές ή αρνητικές επιπτώσεις στην παχυσαρκία. Παρόλο που οι καταναλωτές επιλέγουν τα NNS για να μειώσουν τη συνολική θερμιδική πρόσληψη, τα δεδομένα υποδηλώνουν ότι τα NNS δεν χρησιμοποιούνται για να αντικαταστήσουν τα προστιθέμενα σάκχαρα, αλλά μάλλον τα συμπληρώνουν. Έχει προταθεί ότι τα NNS προκαλούν ένα διφορούμενο ψυχοβιολογικό σήμα που οδηγεί σε αυξημένη όρεξη και συνεπώς σε πρόσληψη ενέργειας. Υπάρχει επίσης κάποια ανησυχία ότι η εξοικείωση με την υψηλή γλυκύτητα των NNS μπορεί να ενθαρρύνει την εξάρτηση από τα γλυκά τρόφιμα και συνεπώς από τη ζάχαρη, οδηγώντας σε αυξημένη ενεργειακή πρόσληψη (Carocho, et.al., 2017).

Υπάρχουν περιορισμοί στην ποσότητα των NNS που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στα τρόφιμα χωρίς να επηρεαστεί αρνητικά αντίκτυπο στην ποιότητα του προϊόντος (Edward et al., 2016). Για παράδειγμα, τα NNS μπορεί να είναι ασταθή κάτω από ορισμένες συνθήκες επεξεργασίας και να έχουν ανεπιθύμητες οργανοληπτικές ιδιότητες. Υπάρχουν επίσης περιορισμοί στην ποσότητα των NNS που μπορούν να καταναλωθούν με ασφάλεια (π.χ. τα όρια αποδεκτής ημερήσιας πρόσληψης συνήθως δεν υπερβαίνουν τα 0,3-3 g NNS/ημέρα για έναν ενήλικα 75 kg, ανάλογα με το NNS). Επειδή τα περισσότερα NNS είναι τεχνητά και δεν πέπτονται στο λεπτό έντερο και εισέρχονται στο παχύ έντερο, έχουν εκφραστεί ανησυχίες σχετικά με τις επιπτώσεις τους στο μικροβιόκοσμο του εντέρου (Edward et al., 2016). Τα NNS μπορεί επίσης να είναι ακατάλληλα για ορισμένες ομάδες καταναλωτών, όπως για παράδειγμα όσοι πάσχουν από φαινυλκετονουρία που πρέπει να αποφεύγουν την ασπαρτάμη.

Συνολικά, παρά την αρχική απήχηση των γλυκαντικών υλών με χαμηλές θερμίδες, η συντριπτική πλειοψηφία των καταναλωτών δεν χρησιμοποιεί NNS και τα NS εξακολουθούν να είναι μακράν η κύρια πηγή γλυκιάς γεύσης στη διατροφή. Αν και η αύξηση διαθεσιμότητας των βιομηχανικών προϊόντων που περιέχουν NNS μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της χρήσης τους, φαίνεται πιθανό ότι τα NS θα συνεχίσουν να είναι η κύρια πηγή γλυκύτητας για τα επόμενα χρόνια (Edward et al., 2016).

1.2.2. Φυσικά - Συνθετικά γλυκαντικά

Η άλλη ταξινόμηση, διαχωρίζει τα γλυκαντικά με βάση τη φύση ή την προέλευσή τους, η οποία μπορεί να είναι είτε συνθετική είτε φυσική.

1.2.2.1 Φυσικά γλυκαντικά

Η ζήτηση για γλυκαντικές ουσίες χωρίς θερμίδες και φυσικής προέλευσης έχει αυξηθεί δραματικά την τελευταία δεκαετία, επειδή οι καταναλωτές προσέχουν περισσότερο την υγεία τους. Οι έρευνες για τους καταναλωτές έχουν αποκαλύψει ότι οι καταναλωτές γνωρίζουν όλο και περισσότερο τα πρόσθετα τροφίμων και προτιμούν συχνότερα τα φυσικά πρόσθετα από τα τεχνητά τους ανάλογα. Μερικά από τα πιο κοινά φυσικά γλυκαντικά είναι η σακχαρόζη, οι γλυκοζίτες στεβιόλης, η θαυματίνη, η ερυθριτόλη. Παρακάτω θα γίνει αναφορά στα φυσικά γλυκαντικά που χρησιμοποιήθηκαν στην πειραματική διαδικασία.

Στέβια (Stevia, E960)

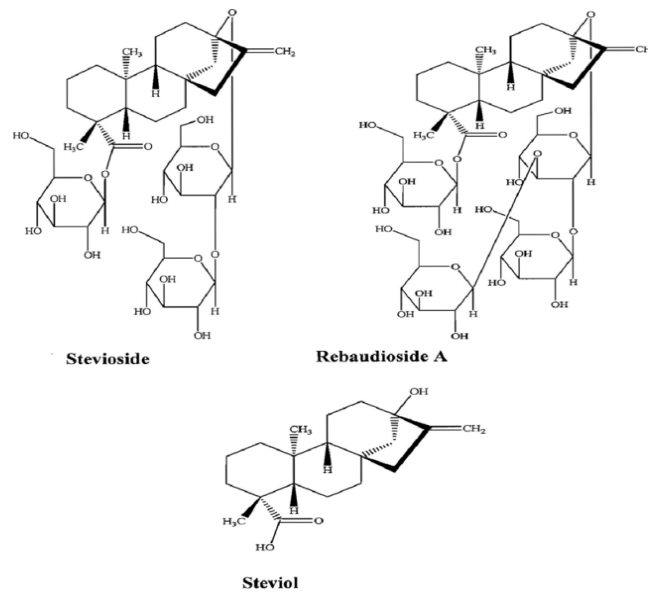
Η *Stevia rebaudiana* Bertoni (E960) με μοριακό τύπο $C_{38}H_{60}O_{18}$ είναι ένας μικρός πολυετής θάμνος της οικογένειας Asteraceae (Compositae) που είναι ενδημικό φυτό της Παραγουάης, της Βραζιλίας και της Αργεντινής (Lagan, 2011). Τα φύλλα του φυτού αυτού χρησιμοποιούνται από τους ιθαγενείς εδώ και πολλούς αιώνες σε φάρμακα αλλά και για να προσδίδουν γλυκιά γεύση σε ροφήματα όπως το maté, ένα πράσινο τσάι από βότανα. Το φυτό στέβια καλλιεργείται σήμερα εμπορικά στην Αργεντινή, τη Βραζιλία, την Κολομβία, την Παραγουάη, την Κίνα, την Ιαπωνία, τη Μαλαισία, τη Νότια Κορέα, το Βιετνάμ, το Ισραήλ, την Αυστραλία, την Κένυα και τις Ηνωμένες Πολιτείες (Samuel, et al. 2018). Μέχρι στιγμής, πάνω από 200 είδη στέβιας υπάρχουν σε όλο τον κόσμο, αλλά η *Stevia rebaudiana* είναι το μόνο είδος με γλυκιά γεύση. Η στέβια ονομάζεται επίσης και φύλλο μελιού, φύλλο καραμέλας ή γλυκό φύλλο και η γλυκιά γεύση της οφείλεται στην παρουσία γλυκοζιτών στεβιόλης και στη χημική τους δομή, που έχουν 100-300 φορές μεγαλύτερη γλυκύτητα από τη σακχαρόζη (Ahmad et. al., 2020). Είναι μια λευκή, άοσμη και κρυσταλλική σκόνη, η οποία παραλαμβάνεται με εκχύλιση από τα φύλλα του φυτού, και στη συνέχεια γίνεται συμπύκνωση, καθαρισμός και ξήρανση αυτής με ψεκασμό (Lagan, 2011).

Τα φύλλα του *S. rebaudiana* περιέχουν περισσότερους από 30 διαφορετικούς γλυκοζίτες στεβιόλης, από τα οποία η στεβιοσίδη και η ρεμπαουδιοσίδη A είναι παρούσες σε υψηλότερα επίπεδα και είναι τα κύρια γλυκά συστατικά της στέβιας (Olsson et al., 2016). Η στεβιοσίδη είναι ένας διτερπενικός γλυκοζίτης που αποτελείται από τρία μόρια γλυκόζης και ένα τμήμα γλυκόνης, τη στεβιόλη. Η περιεκτικότητα σε στεβιοσίδη είναι από 4 % έως 13 % όλων των γλυκοζιτών της στέβιας. Η ρεμπαουδιοσίδη A είναι ένας άλλος γλυκοζίτης διτερπενίου στεβιόλης, της οποίας το ποσοστό γλυκύτητας κυμαίνεται από 30 % έως 40 %, που είναι περίπου 180-400 φορές πιο γλυκό από τη ζάχαρη. Συνολικά, οι πιο γνωστές ενώσεις που έχουν απομονωθεί από τα φύλλα της στέβιας είναι οι γλυκοζίτες, η στεβιοσίδη, και διάφοροι τύποι ρεμπαουδιοσιδών (από A έως F) (Olsson et al., 2016).

Οι ιδιότητες της στέβιας έχουν μελετηθεί για πάνω από 100 χρόνια. Κατά την πέψη, οι γλυκοσίδες στεβιόλης μεταβολίζονται από τα βακτήρια του παχέος εντέρου,

μετατρέποντάς τα από στεβιόλη σε γλυκουρονίδια στεβιόλης για να απεκκριθούν τελικά μέσω των ούρων (Peteliuk et.al., 2021). Από πλευράς θερμιδικής συνεισφοράς, είναι αμελητέα (NNS), επομένως ασφαλής για διαβητικούς ασθενείς. Παλαιότερες και τρέχουσες μελέτες επιβεβαιώνουν την ασφάλεια των σκευασμάτων από φύλλα στέβιας, καθώς επίσης διαπιστώνουν όλο και περισσότερα οφέλη από την κατανάλωσή της για την ανθρώπινη υγεία, όπως οι αντιδιαβητικές, οι αντιυπερτασικές ιδιότητές της, η συμβολή της στην παχυσαρκία, το μεταβολικό σύνδρομο και τις φλεγμονές και οι αντιοξειδωτικές και αντικαρκινικές ιδιότητες (Peteliuk et.al., 2021).

Αρκετές έρευνες έχουν φανερώσει τη σταθερότητα της στεβιοσίδης και της ρεμπαουδιοσίδης A σε θερμοκρασία δωματίου, ουδέτερο pH και σε συνθήκες ηλιακού φωτός. Αυτές οι γλυκαντικές ουσίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε συνθήκες pH που κυμαίνονται από 2 έως 10 και σε θερμοκρασίες έως και 200 °C, γεγονός που καθιστά τη στέβια κατάλληλη για χρήση σε μαγειρεμένα τρόφιμα. (Gonzales et. Al, 2014).



Εικόνα 1.1: Χημική δομή της στεβιόλης, της στεβιοσίδης και της ρεμπαουδιοσίδης Α (Carakostas, et.al, 2008)

Παρά την παγκόσμια χρήση της, το φυτό δεν έχει διερευνηθεί εκτενώς ώστε να διασφαλιστεί η ασφαλής χρήση του στον άνθρωπο. Παρ' όλα αυτά, η μακροχρόνια παραδοσιακή χρήση του από τους Παραγουανούς για πάνω από 1500 χρόνια αποτελεί διαχρονικό μάρτυρα για την ασφάλειά του. Οι στεβιοσίδες χρησιμοποιούνται σε μεγάλες ποσότητες στην Ιαπωνία για περισσότερα από 20 χρόνια χωρίς να έχουν αναφερθεί παρενέργειες. Η ασφάλεια της στέβιας οφείλεται επίσης σε μεγάλο βαθμό στο γεγονός ότι οι γλυκοζίτες στεβιόλης απορροφώνται ελάχιστα στο στομάχι και στο ανώτερο έντερο. Κατά την 69η συνεδρίαση του 2008, η Κοινή Επιτροπή Εμπειρογνομόνων FAO/WHO για τα Πρόσθετα Τροφίμων (JECFA), στην ανασκόπηση των γλυκοζιτών στεβιόλης καθόρισε μια Αποδεκτή Ημερήσια Πρόσληψη (ADI) 4 mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα, εκφρασμένη σε ισοδύναμα στεβιόλης. Το 2010, η EFSA διεξήγαγε μια γενική αξιολόγηση ασφάλειας για την έγκριση των γλυκοσιδίων στεβιόλης ως γλυκαντικού σε τρόφιμα και για χρήση ως ενισχυτικού γεύσης. Η EFSA έθεσε επίσης μια ADI 4 mg/kg σωματικού βάρους. Στην Ευρώπη, οι γλυκοσίδες στεβιόλης έχουν εγκριθεί για ποικίλες χρήσεις σε τρόφιμα, ποτά και γλυκαντικά επιτραπέζιων σύμφωνα με το Παράρτημα II του Κανονισμού 1333/2008. Στις Ηνωμένες Πολιτείες, η στέβια αναγνωρίζεται γενικά ως ασφαλής (Generally Recognized as Safe, GRAS) από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (Food and Drug Administration, FDA) για χρήση ως γλυκαντικό γενικής χρήσης σε τρόφιμα και ποτά (International Sweeteners Association, 2015).

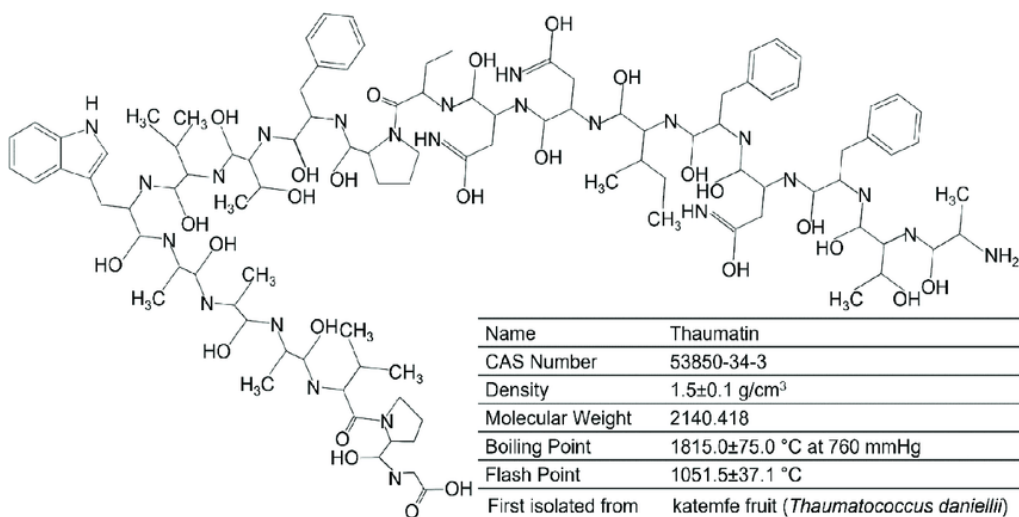
Πολλοί ερευνητές έχουν αντικαταστήσει μερικώς ή/και πλήρως τη σακχαρόζη με στέβια σε προϊόντα αρτοποιίας, όπως μπισκότα, κέικ, μάφιν, κρέμες. Η στέβια μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί ως υποκατάστατο σακχαρόζης στο γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα και σε διάφορα ποτά, όπως ποτά με βάση τα φρούτα, χυμοί φρούτων, αναψυκτικά, ανθρακούχα ποτά, λειτουργικοί χυμοί φρούτων. Μια άλλη πολύ σημαντική αγορά είναι τα υποπροϊόντα της στέβιας. Τα υπολείμματα που αποτελούνται από τα υπολείμματα του φυτού στέβια μετά τη συγκομιδή των καλύτερων φύλλων για τσάι ή για εκχύλιση μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παρασκευή υποπροϊόντων (Ahmad, et al., 2020).

Θαυματίνη (Thaumatococin, E957)

Η θαυματίνη είναι ένα μείγμα από έντονα γλυκές πρωτεΐνες που εκχυλίζεται με νερό από τα αγκάθια του φρούτου της δυτικής Αφρικής, *Thaumatococcus Daniellii* (katemfe) μαζί με μικρές ποσότητες φυτικών συστατικών (Tiefenbacher, 2017). Πέντε ισομορφές της πρωτεΐνης έχουν βρεθεί στο φρούτο και ονομάζονται θαυματίνη I, II, III, a και b, οι οποίες είναι όλες γλυκές. Η θαυματίνη I και II είναι οι κύριες μορφές. Η κάθε μία αποτελείται από μια μοναδική πολυπεπτιδική αλυσίδα 207 αμινοξέων και διαφέρουν μόνο σε τέσσερα αμινοξέα (Fry, 2012). Το μοριακό της βάρος είναι 22.000 (BeMiller, 2019).

Πρόκειται για μια άοσμη, σε χρώμα κρέμας σκόνη, που λειτουργεί κυρίως ως ενισχυτικό γεύσης και ως γλυκαντικό υψηλής έντασης. Η θαυματίνη έχει περίπου 2000 φορές πιο γλυκιά γεύση από τη σακχαρόζη. Τα κύρια χαρακτηριστικά της είναι η αργή έναρξη της γλυκύτητας, η γλυκιά επίγευση γλυκόριζας που αφήνει και η διαλυτότητά της στο νερό (Tiefenbacher, 2017). Η θαυματίνη ενισχύει την απόκριση σε ορισμένες γεύσεις και επιπλέον, μειώνει τις αρνητικές νότες που σχετίζονται με αυτές. Δρα συνεργιστικά με ενισχυτικά αλμυρής γεύσης (γλουταμινικό μονονάτριο και 5'-νουκλεοτίδια) και επίσης, καλύπτει τις πικρές, δυσάρεστες γεύσεις των ιόντων νατρίου, καλίου και σιδήρου. Λόγω της γλυκιάς γεύσης γλυκόριζας που έχει, η χρήση της ως γλυκαντικό συνήθως γίνεται σε πολύ μικρές ποσότητες και δρα συνεργιστικά με άλλα γλυκαντικά, επιτρέποντας σημαντική μείωση στην ποσότητα του γλυκαντικού που χρησιμοποιείται (BeMiller, 2019). Είναι θερμοσταθερή στους 70°C, αλλά χάνει τη γλυκύτητά της σε υψηλότερη θερμοκρασία. Επίσης, τα διαλύματα θαυματίνης είναι σταθερά σε ένα ευρύ φάσμα pH (2.5-10) (Zeece, 2020).

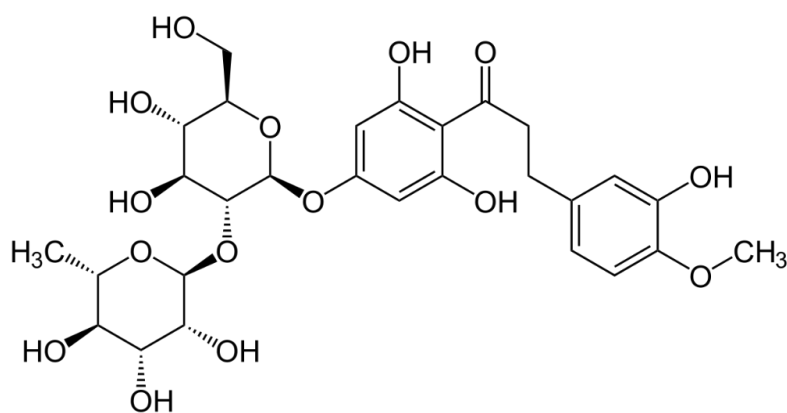
Μεταβολίζεται από τον οργανισμό όπως συμβαίνει και με τις υπόλοιπες διατροφικές πρωτεΐνες (International Sweeteners Association, 2015). Είναι μη τοξική και είναι εγκεκριμένο ως GRAS στην Ευρωπαϊκή Ένωση και στις ΗΠΑ. Η συνεισφορά της στην πρωτεϊνική πρόσληψη είναι ασήμαντη και γι' αυτό ο φορέας JEFCA το 1985 όρισε ότι δεν έχει ADI. Πιο συγκεκριμένα όρισε το αποδεκτό επίπεδο ημερήσιας πρόσληψης ως μη καθορισμένο για την θαυματίνη, κάτι που σημαίνει ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί σύμφωνα με την καλή παρασκευαστική πρακτική (Good Manufacturing Practice, GMP). Συνολικά, η θαυματίνη έχει αξιολογηθεί τόσο από τη Μικτή Επιτροπή Εμπειρογνομόνων FAO/WHO για τα πρόσθετα τροφίμων (JECFA) (1985), όσο και από SCF της Ευρωπαϊκής Επιτροπής (1988) και την EFSA. Η JECFA όρισε μια ADI "μη καθορισμένη" για την θαυματίνη, πράγμα που σημαίνει ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί σύμφωνα με την καλή παρασκευαστική πρακτική (Good Manufacturing Practice, GMP) (International Sweeteners Association, 2015).



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

Νεοεσπεριδίνη (Neohesperidin, E959)

Η διυδροχαλκόνη νεοεσπεριδίνης (NHDC, E959) είναι ένα έντονο ημιφυσικό γλυκαντικό, το οποίο προέρχεται από το δέρμα των ανώριμων καρπών του *Citrus aurantium* L (πικρό πορτοκάλι). Όταν εκχυλίζεται, η νεοεσπεριδίνη η οποία είναι φλαβόνη, με την υδρόλυση γίνεται διυδροχαλκόνη (Baines and Seal, 2012). Άλλη μέθοδος για τη λήψη διυδροχαλκόνης νεοεσπεριδίνης είναι μέσω της σύνθεσης της ναρινγενίνης, που εξάγεται από τον καρπό του *Citrus paradise* Macfad (γκρέιπφρουτ). Είναι ένα χαμηλών θερμίδων γλυκαντικό το οποίο είναι 1500-1800 φορές πιο γλυκό από τη σακχαρόζη. Ο μοριακός τύπος της είναι $C_{28}H_{36}O_{15}$ και εμφανίζει μια υπόλευκη κρυσταλλική σκόνη (EFSA, 2011). Κατά την κατάποση της νεοεσπεριδίνης, η εντερική χλωρίδα την μεταβολίζει, και αποδίδει ίδια ή παρόμοια προϊόντα διάσπασης με τα φυσικά της ανάλογα (International Sweetness Association, 2018).



Εικόνα 1.3: Χημική δομή της νεοεσπεριδίνης DC (Wikimedia Commons, 2008)

Πρόκειται για ένα γλυκαντικό πολύ υγροσκοπικό και σταθερό σε υψηλές θερμοκρασίες, όπως για παράδειγμα κατά την παστερίωση. Αν και ελάχιστα διαλυτή στο νερό σε θερμοκρασία δωματίου, είναι εξαιρετικά διαλυτή σε ζεστό νερό (Carocho et. al., 2017). Σχετικά με τη γλυκύτητά της χαρακτηρίζεται από αργή έναρξη της γλυκύτητας και από ελαφρώς πικρές και δροσερές γεύσεις γλυκόριζας. Αυτό απαιτεί μικρές ποσότητες του γλυκαντικού αυτού για την επίτευξη της επιθυμητής γλυκύτητας. Επίσης έχει ως χαρακτηριστικό να τροποποιεί και ταυτόχρονα να ενισχύει τη γεύση καθώς μια από τις λειτουργίες της όταν χρησιμοποιείται με άλλα γλυκαντικά είναι να καλύπτει τις ανεπιθύμητες γεύσεις τους (Lagan, 2011). Όλα αυτά τα χαρακτηριστικά την καθιστούν ιδιαίτερα χρήσιμο στη βιομηχανία τροφίμων.

Όσον αφορά την ασφάλειά της, αξιολογήθηκε στην Ευρωπαϊκή Ένωση το 1988 από την SCF της Ευρωπαϊκής Επιτροπής και ορίστηκε ως ADI τα 0-5 mg/kg σωματικού βάρους. Το 1994 κατάφερε να εγκριθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση, ωστόσο όμως όχι από τις ΗΠΑ.

Η νεοεσπερίδινη, όπως φαίνεται στο παράρτημα II του ευρωπαϊκού κανονισμού 1333/2008 (International Sweetness Association, 2018), χρησιμοποιείται για την πύκνωση υγρών τροφίμων, οπότε έχει εκτεταμένη χρήση σε παγωτά, γλυκά, τσίχλες, γάλα, ποτά με γεύση νερού, μπίρες, σνακ, τρόφιμα ζαχαροπλαστικής, σουπές, συμπληρώματα διατροφής αλλά και ως επιτραπέζιο γλυκαντικό (Pandey & Upadhyay, 2012). Επίσης, μελέτες έχουν αποδείξει ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί καταλλήλως από διαβητικούς ενώ παράλληλα έχει συνεργικές επιδράσεις στο προφίλ της γεύσης και της γλυκύτητας με ακεσουλφάμη K, ασπαρτάμη, σακχαρίνη, κυκλαμικό οξύ, σουκραλόζη και πολυόλες (Lagan, 2011).

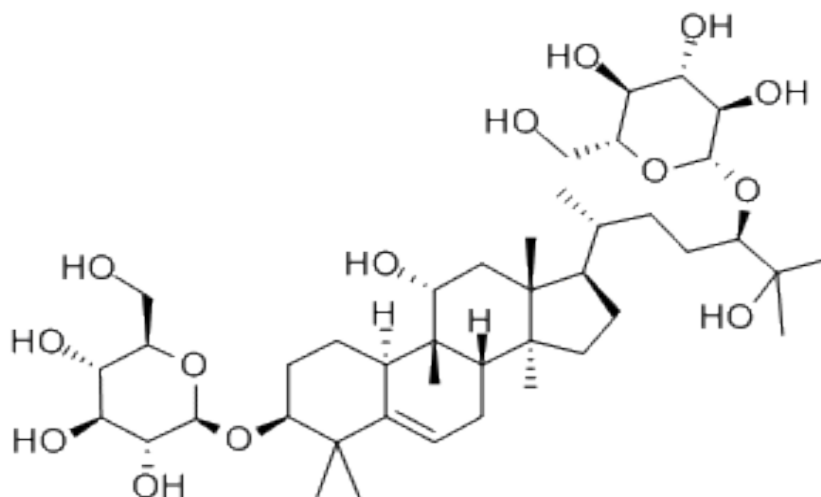
Μογροσίδη (Mogroside)

Το φυτό *Siraitia grosvenorii* (Swingle), κοινώς γνωστό ως Monk fruit ή Luo Han Guo, είναι ένα ποώδες πολυετές φυτό που ανήκει στην οικογένεια Cucurbitaceae και κατάγεται από τα νότια τμήματα της Κίνας (Gong et al., 2019). Ο καρπός του περιέχει έναν γλυκό, σαρκώδη και βρώσιμο πολτό που χρησιμοποιείται ευρέως στην παραδοσιακή κινεζική ιατρική για περισσότερα από 300 χρόνια για τη θεραπεία της πνευμονικής συμφόρησης, του κρυολογήματος και του πονόλαιμου (Li et al., 2014).

Σύμφωνα με τις τρέχουσες μελέτες, πάνω από 100 ενώσεις έχουν απομονωθεί από το Luo Han Guo, συμπεριλαμβανομένων 2 πολυσακχαριτών, 19 αμινοξέων, 7 φλαβονοειδών και τουλάχιστον 46 τριτερπενίων. Στα εκχυλίσματα Luo Han Guo, η μογροσίδη V (MogV) είναι το πιο άφθονο γλυκαντικό συστατικό, το οποίο αποτελεί το κύριο συστατικό των αποξηραμένων φρούτων Luo Han Guo μαζί με την μογροσίδη IV (MogIV). Η μογροσίδη V παρουσιάζει πολλαπλές φαρμακολογικές ιδιότητες, όπως αντιοξειδωτικά οφέλη, υπογλυκαιμικές επιδράσεις και ανοσολογικές επιδράσεις. Επίσης έχει αντιβηχικές επιδράσεις και συμβάλει στη μείωση των πτυέλων. Προσφέρει προστασία του ήπατος και παρουσιάζει επίσης αντιμικροβιακές ιδιότητες (Li et al., 2021). Μετά από *in vitro* αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας στη μογροσίδη V αποκαλύφθηκε ισχυρή ικανότητα δέσμευσης ελεύθερων ριζών οξυγόνου, κάτι που φανερώνει την ικανότητα εξουδετέρωσης του οξειδωτικού στρες που προκαλείται από τον διαβήτη, την υπερλιπιδαιμία και άλλα μεταβολικά νοσήματα (Suzuki et al., 2007).

Το εκχύλισμα από το Monk fruit έχει εκτιμηθεί ότι είναι περίπου 300 φορές πιο γλυκό από τη σακχαρόζη και είναι από τον FDA γενικά αναγνωρισμένο ως ασφαλές (GRAS)

(Shivani, et al., 2018). Δεν υπάρχουν περιορισμοί στην κατανάλωση του φρούτου ή των εκχυλισμάτων του μιας και η μογροσίδη V έχει αναφερθεί ότι δεν είναι μεταλλαξιγόνος ουσία. Από το 2016, στην Ευρωπαϊκή Ένωση δεν υπάρχει η έγκριση του γλυκαντικού επειδή είναι υπό διερεύνηση ακόμα εάν οι μογροσίδες πρέπει να εγκριθούν ως γλυκαντικές ουσίες ή όχι. Οι αποφάσεις αναμένονται τα επόμενα χρόνια (Izawa et.al, 2010).



Εικόνα 1.4: Χημική δομή της μογροσίδης

1.2.2.2 Συνθετικά (τεχνητά) γλυκαντικά

Τα τεχνητά γλυκαντικά γίνονται όλο και πιο δημοφιλή ως εναλλακτική λύση στη ζάχαρη. Η αυξημένη συχνότητα εμφάνισης της παχυσαρκίας, του διαβήτη και του μεταβολικού συνδρόμου, σε συνδυασμό με την αυξημένη ευαισθητοποίηση των καταναλωτών, έχει οδηγήσει σε μια κλίση προς τη χρήση τεχνητών γλυκαντικών υλών χαμηλών θερμίδων. Αυτά τα τεχνητά γλυκαντικά παρέχουν πιο έντονη γλυκύτητα και καθόλου ή λίγες θερμίδες ανά γραμμάριο και χρησιμοποιούνται σε ποτά, διαιτητικά προϊόντα, φάρμακα, ακόμη και σε στοματικά διαλύματα.

Το εκτεταμένο μάρκετινγκ έχει οδηγήσει σε υπερβολική χρήση των τεχνητών γλυκαντικών από τον πληθυσμό. Ένας μεγάλος αριθμός διαβητικών ασθενών επιλέγει επίσης αυτά τα γλυκαντικά, που δεν έχουν ζάχαρη ως υποκατάστατο της ζάχαρης στη διατροφή τους (Sharma et. al., 2016).

Έξι από αυτά τα τεχνητά γλυκαντικά υψηλής έντασης έχουν εγκριθεί από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) ως πρόσθετα τροφίμων στις Ηνωμένες Πολιτείες, τα οποία είναι η σακχαρίνη, ασπαρτάμη, η ακεσουλφάμη-Κ (Ace-K), η νεοτάμη, η σουκραλόζη και η αντβαντάμη (Mooradian, 2017).

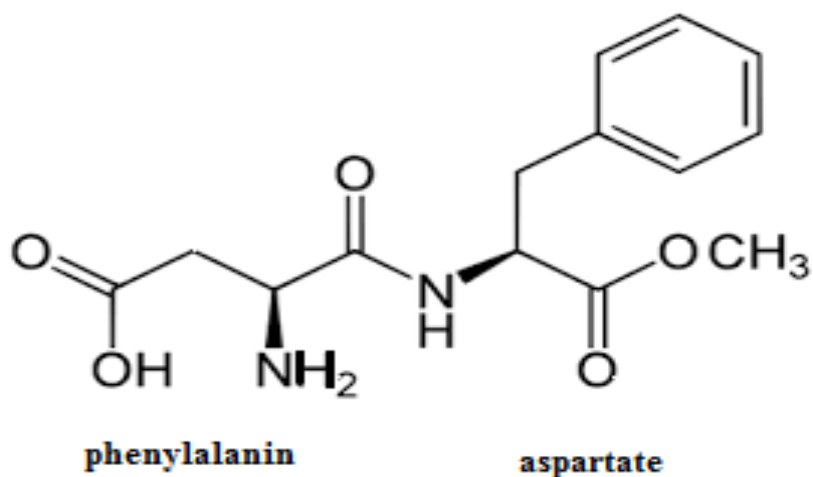
Παρακάτω θα γίνει αναφορά στα τεχνητά γλυκαντικά που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας.

Ασπαρτάμη (Aspartame, E 951)

Η ασπαρτάμη πρόκειται για ένα τεχνητό, μη θερμιδικό γλυκαντικό που ανακαλύφθηκε από τον James Schlatter το 1965, στα πλαίσια μιας έρευνας για φάρμακα κατά του έλκους.

Μετά τα αρχικά εμπόδια στη νομιμοποίηση της ασπαρτάμης ως πρόσθετο τροφίμων, η παραγωγή της άρχισε σε μεγάλη κλίμακα το 1981. Το γεγονός ότι είναι περίπου 200 φορές πιο γλυκιά από τη ζάχαρη καθώς και η μηδενική θερμιδική της αξία την κάνουν ιδιαίτερα ελκυστική ως γλυκαντικό. Σχετικά με το προφίλ γεύσης της, η γλυκιά της γεύση αργεί να εμφανιστεί και συνήθως αφήνει μια παρατεταμένη γλυκιά επίγευση (Czarneka et.al., 2021).

Η ασπαρτάμη, με μοριακό τύπο $C_{14}H_{18}N_2O_5$ (Cao et. al., 2020), αποτελείται από δύο αμινοξέα, την L-φαινυλαλανίνη και το L-ασπαρτικό οξύ (Mooradian, 2017). Υδρολύεται και απορροφάται στον γαστρεντερικό σωλήνα μέσω της δράσης εστεράσης και πεπτιδασών. Η πέψη απελευθερώνει μεθανόλη (10%), ασπαρτικό οξύ (40%) και φαινυλαλανίνη (50%) τα οποία είναι απορροφήσιμα από τον εντερικό βλεννογόνο (Butchko et al., 2002). Αυτοί οι μεταβολίτες μπορεί να είναι επιβλαβείς σε υψηλές δόσεις και ως εκ τούτου η παρατεταμένη κατανάλωση ασπαρτάμης μπορεί να αποτελεί παράγοντα κινδύνου (Czarneka et.al., 2021). Μιας και θεωρείται πηγή φαινυλαλανίνης, δεν συνιστάται η χρήση της σε άτομα με φαινυλκετονουρία (PKU) (Shankar et al., 2013). Σύμφωνα με τον κανονισμό της ΕΕ αριθ. 1169/2011, στα τρόφιμα που γίνεται χρήση ασπαρτάμης πρέπει να γίνεται εμφανής αναφορά το πεδίο «περιέχει ασπαρτάμη ή πηγή φαινυλαλανίνης». Ωστόσο, η ασπαρτάμη και τα προϊόντα πέψης της δεν φτάνουν ποτέ στο έντερο, οπότε η ασπαρτάμη δεν μπορεί να επηρεάσει άμεσα την μικροχλωρίδα του εντέρου (Magnuson, et.al., 2021).



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

Πρόκειται για μια λευκή, κρυσταλλική, υγροσκοπική, σκόνη με διαλυτότητα 1% σε νερό στους 25°C, δηλαδή με μια εξαιρετικά χαμηλή διαλυτότητα (Carocho, et.al., 2017), καθώς αποσυντίθεται πριν λιώσει. Ωστόσο, με την αύξηση ή τη μείωση του pH καθώς και με την αύξηση της θερμοκρασίας, η διαλυτότητά της αυξάνεται. Είναι πιο σταθερή σε pH γύρω στο 4,3. Σε έντονα όξινα ή αλκαλικά περιβάλλοντα, μπορεί η ασπαρτάμη να υδρολυθεί σε μεθανόλη και σε πιο ακραία περιβάλλοντα, υδρολύονται και οι πεπτιδικοί δεσμοί, δίνοντας αμινοξέα (Mooradian, et.al., 2017). Σε αυξημένη θερμοκρασία και ψηλές τιμές pH η ασπαρτάμη υφίσταται αντιδράσεις Maillard, γεγονός που την καθιστά μη επιθυμητή ως γλυκαντικό για χρήση ψησίματος σε υψηλές θερμοκρασίες.

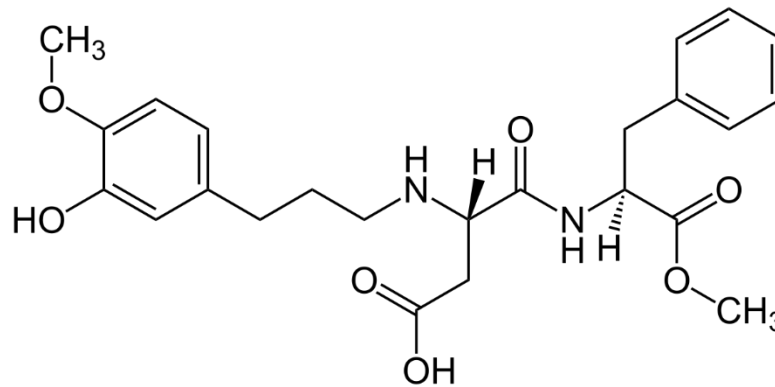
Χρησιμοποιείται σε πλήθος τροφίμων και ποτών χαμηλών και μειωμένων θερμίδων, με σκοπό να τους προσδώσει γλυκύτητα, συμπεριλαμβανομένου και του επιτραπέζιου γλυκαντικού χαμηλών θερμίδων, καθώς επίσης και σε αναψυκτικά, τσίχλες, δημητριακά πρωινού, επιδόρπια, γιαούρτια και άλλα ξηρά προϊόντα (Chattopadhyay, et.al, 2014).

Σχετικά με την ασφάλειά της, η ασπαρτάμη έχει αξιολογηθεί το 1981 από τη Μικτή Επιτροπή Εμπειρογνώμωνων FAO/WHO για τα πρόσθετα τροφίμων (JECFA). Στην Ευρωπαϊκή Ένωση, η ασφάλεια της ασπαρτάμης αξιολογήθηκε ξανά από τους εμπειρογνώμονες της EFSA τον Δεκέμβριο του 2013. Το ADI που ορίστηκε από την JECFA και επιβεβαιώθηκε εκ νέου από την EFSA και τον FDA είναι 0-40 mg/ kg σωματικού βάρους για την Ευρώπη και 50 mg/kg σωματικού βάρους για τις ΗΠΑ, τόσο για ενήλικες όσο και για παιδιά (Czarneka et.al., 2021). Στην Ευρωπαϊκή Ένωση, η ασπαρτάμη 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 (Advantame, E 969)

Η αντβαντάμη είναι το πιο πρόσφατα εγκεκριμένο συνθετικό γλυκαντικό χαμηλών θερμίδων. Πρόκειται για ένα N-υποκατεστημένο παράγωγο της ασπαρτάμης το οποίο παρασκευάζεται από ασπαρτάμη και βανιλίνη. Ωστόσο, σε αντίθεση με την ασπαρτάμη, μπορεί να καταναλωθεί από άτομα με φαινυλκετονουρία (Basson, et al., 2021). Η ασπαρτάμη έχει μοριακό τύπο $C_{24}H_{30}N_2O_7$, και είναι μια λευκή, υποκίτρινη σκόνη που εμφανίζει 20.000 - 37.000 φορές πιο μεγάλη γλυκύτητα σε σχέση με τη σακχαρόζη (Warrington, et al., 2011). Έχει μια αρκετά καθαρή γλυκιά γεύση και είναι κάπως πιο ξινή και πικρή. Χρησιμοποιείται ως ενισχυτικό γεύσης, καθώς και σε διάφορα τρόφιμα και ποτά όπως σε τσίχλες, γαλακτοκομικά, γιαούρτια, μη αλκοολούχα ποτά, παγωμένο τσάι, καφέ, ροφήματα σε σκόνη (Otabe et al., 2011).

Όσον αφορά τη σταθερότητά της, είναι ικανή να αντέξει τις υψηλές θερμοκρασίες και να προστεθεί σε προϊόντα χαμηλού pH. Το γεγονός ότι είναι σταθερή σε αυξημένη θερμότητα, σημαίνει ότι μπορεί να παραμένει γλυκιά ακόμα και όταν χρησιμοποιείται σε υψηλές θερμοκρασίες κατά το ψήσιμο, καθιστώντας την κατάλληλη ως υποκατάστατο ζάχαρης σε αρτοποιήματα (FDA, 2018).



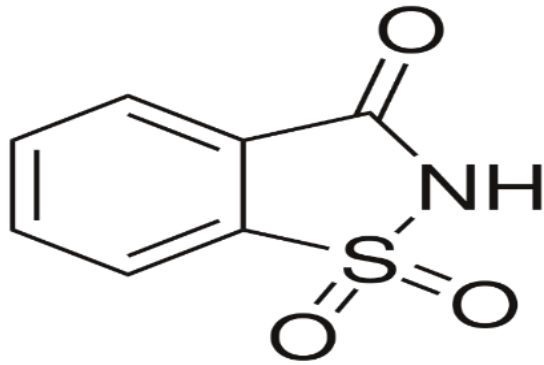
Εικόνα 1.6: Χημική δομή της αντβαντάμης (Wikipedia)

Σχετικά με την ασφάλεια της αντβαντάμης, πολλές μελέτες αποδεικνύουν την ασφάλειά της για χρήση ως γλυκαντικό και ενισχυτικό γεύσης. Έχει αξιολογηθεί και έχει λάβει θετική αξιολόγηση για την ασφάλειά της από την κοινή επιτροπή εμπειρογνομόνων των φορέων FAO/WHO για την ασφάλεια των γλυκαντικών (JECFA) και από την Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA) το 2013. Πιο συγκεκριμένα, τον Ιούλιο του 2013, οι ειδικοί της EFSA όρισαν την αντβαντάμη ως μη τοξικό ή καρκινογόνο και ότι δεν υπάρχουν κίνδυνοι στη χρήση του ως πρόσθετο τροφίμων (Carocho, et al., 2017). Το 2014 ο FDA αξιολόγησε την αντβαντάμη ως ασφαλές γλυκαντικό γενικής χρήσης και ενισχυτικό γεύσης στα τρόφιμα στις ΗΠΑ. Το ανώτατο επίπεδο ασφαλούς χρήσης της αντβαντάμης που ορίστηκε από τους φορείς JECFA και EFSA είναι 0-5 mg/kg σωματικού βάρους (International Sweetness Association, 2018).

Σακχαρίνη (Saccharin, E954)

Η σακχαρίνη πρόκειται για ένα συμπυκνωμένο ετεροκυκλικό ο-σουλφοβενζιμίδιο και είναι το παλαιότερο τεχνητό γλυκαντικό το οποίο ανακαλύφθηκε το 1879. Η ένωση αυτή παρασκευάζεται μέσω της αντίδρασης του ανθρακικού μεθυλίου με νιτρώδες οξύ, διοξείδιο του θείου, χλώριο και αμμωνία, δίνοντας σακχαρίνη. Είναι περίπου 300 με 500 φορές πιο γλυκιά από τη σακχαρόζη και θεωρείται ένα από τα πιο σημαντικά και ευρέως χρησιμοποιούμενα γλυκαντικά παγκοσμίως (Azeez et al., 2019).

Έχει μοριακό τύπο C₇H₅NO₃S και είναι ένα υδατοδιαλυτό οξύ με pKa 1,8. Είναι σταθερή σε χαμηλά pH και ανθεκτική σε υψηλές θερμοκρασίες, καθιστώντας την ιδανική για τα διάφορα στάδια στην παραγωγή τροφίμων αλλά και για χρήση της σε προϊόντα μεγάλης διάρκειας. Χαρακτηρίζεται από γλυκιά γεύση με ταυτόχρονα ελαφρά όξινες νότες, οπότε συνδυάζεται με ασπαρτάμη και κυκλαμικά για καλύτερη απόδοση της γλυκύτητας (Carocho, et.al., 2017).



Εικόνα 1.7: Χημική δομή της σακχαρίνης (Azeez et al., 2019)

Η σταθερότητα της σακχαρίνης στο ουδέτερο εύρος του pH και δεδομένου ότι η γλυκαντική της ισχύ δεν μειώνεται όταν θερμαίνεται, την καθιστούν σημαντικό υποψήφιο ως πρόσθετο γλυκαντικό σε προϊόντα χωρίς ζάχαρη και χαμηλών θερμίδων (Azeez et al., 2019). Επομένως, το φάσμα εφαρμογών της είναι μεγάλο. Χρησιμοποιείται σε αναψυκτικά, χυμούς φρούτων, επεξεργασμένα φρούτα, κονσερβοποιημένα φρούτα, ζελατίνες, μαρμελάδες, ψημένα τρόφιμα, γαρνιτούρες, σάλτσες, επιδόρπια, καραμέλες, σίγλες και ως επιτραπέζιο γλυκαντικό (Carocho, et al., 2017).

Άλλες μορφές σακχαρίνης που καταναλώνονται περιλαμβάνουν την σακχαρίνη ασβεστίου, την σακχαρίνη καλίου και την όξινη σακχαρίνη. Η σακχαρίνη νατρίου είναι η πιο χρησιμοποιούμενη μορφή λόγω της μεγαλύτερης γευστικότητάς, της υψηλής διαλυτότητας, της σταθερότητας και του χαμηλού κόστους παραγωγής της (O'Mullane et al., 2014).

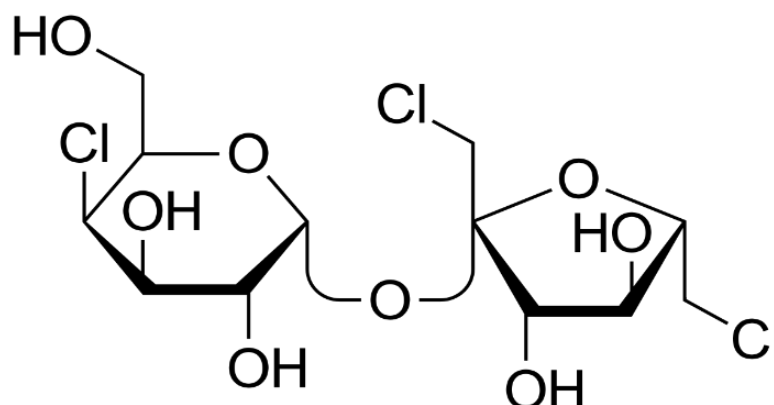
Σχετικά με τον μεταβολισμό της σακχαρίνης, απορροφάται αργά, απεκκρίνεται ταχέως από τα νεφρά και δεν μεταβολίζεται. Έχει αξιολογηθεί από ανεξάρτητους εμπειρογνώμονες της Μικτής Επιτροπής Εμπειρογνώμωνων FAO/WHO για τα πρόσθετα τροφίμων (JECFA) το 1993, από την SCF της Ευρωπαϊκής Επιτροπής το 1995, την EFSA, τον FDA και από τον ομοσπονδιακό οργανισμό του Υπουργείου Υγείας και Ανθρωπίνων Υπηρεσιών της ΗΠΑ (DHHS), και θεωρούν την σακχαρίνη ασφαλή γλυκαντική ουσία (Azeez et al., 2019). Το ανώτατο επίπεδο ασφαλούς πρόσληψης (ADI) που ορίζεται τόσο από την JECFA όσο και από την SCF είναι 5 mg/kg σωματικού βάρους. Σύμφωνα με το Παράρτημα II του Κανονισμού 1333/2008, στην Ευρωπαϊκή ένωση η σακχαρίνη έχει εγκριθεί ως γλυκαντικό για ποικίλες χρήσεις σε τρόφιμα, ποτά και επιτραπέζια γλυκαντικά (International Sweeteners Association, 2018).

Σουκραλόζη (Sucralose, E 955)

Η σουκραλόζη ανακαλύφθηκε το 1976 και είναι ένα συνθετικό έντονο γλυκαντικό με γλυκύτητα 320-1000 φορές πιο έντονη από τη σακχαρόζη, γεγονός που σημαίνει ότι μπορεί να προστεθεί σε πολύ μικρές ποσότητες στα τρόφιμα και τα ποτά με σκοπό να τα γλυκάνει (International Sweeteners Association, 2018).

Δομικά, η σουκραλόζη είναι ένας υποκατεστημένος δισακχαρίτης, παρόμοιος με τη σακχαρόζη, και προέρχεται από υποκατάσταση 3 ομάδων υδροξυλίου με 3 άτομα χλωρίου στις θέσεις 4,10,60. Ο μοριακός της τύπος είναι C₁₂H₁₉Cl₃O₈ (Magnuson et al., 2017). Έχει

μορφή λευκής κρυσταλλικής σκόνης με μια ευχάριστη γλυκιά γεύση και το προφίλ της έντασης της βρίσκεται πολύ κοντά στη σακχαρόζη (Agora et al., 2009).



Εικόνα 1.8: Χημική δομή της σουκραλόζης (Wikipedia)

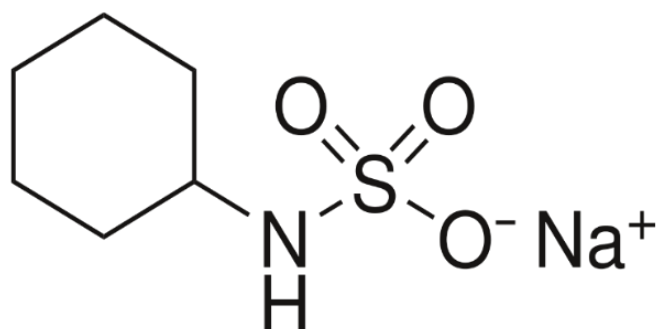
Η παρουσία των πολλαπλών ομάδων υδροξυλίου στη σουκραλόζη την καθιστά, όπως και τη ζάχαρη, υδρόφιλη και όχι λιπόφιλη ένωση. Η σουκραλόζη είναι εξαιρετικά σταθερή στις περιοχές θερμοκρασιών και pH που απαντώνται στην επεξεργασία τροφίμων και ποτών και, μέχρι σήμερα, καμία μελέτη δεν έχει καταδείξει την ανάπτυξη πολλών περιστατικών είτε διάσπασης είτε θερμικών παραπροϊόντων. Επίσης χαρακτηρίζεται από υψηλή γλυκαντική ισχύ, μη αντιδραστικότητα στα συστήματα τροφίμων, χαμηλό ιξώδες και μη επίδραση στο χρώμα των τροφίμων (Magnuson et al., 2017). Όλα αυτά τα χαρακτηριστικά την καθιστούν κατάλληλη για χρήση ως μη θερμιδική γλυκαντική ουσία για μια μεγάλη ποικιλία προϊόντων, όπως ποτά, αρτοσκευάσματα, δημητριακά πρωινού, επιδόρπια, μαρμελάδες και ζελέ και άλλα. Επίσης δεν μεταβολίζεται για ενέργεια στο σώμα, και συνεπώς δεν συνεισφέρει σε θερμίδες και δεν επηρεάζει τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα (Magnuson, et;al., 2021).

Η σουκραλόζη έχει αξιολογηθεί σε διεθνές επίπεδο, το 1990 από ανεξάρτητους εμπειρογνώμονες ασφάλειας της Μικτής Επιτροπής Εμπειρογνωμόνων FAO/WHO για τα πρόσθετα τροφίμων (JECFA), το 2000 από την SCF της Ευρωπαϊκής Επιτροπής και από την EFSA. Το ADI που ορίζεται από το JECFA και το SCF είναι 0-15 mg/kg σωματικού βάρους. Στην ΕΕ, σύμφωνα με το παράρτημα II του κανονισμού 1333/2008, η σουκραλόζη έχει εγκριθεί για ποικίλες χρήσεις σε τρόφιμα, ποτά και γλυκαντικά επιτραπέζιων ουσιών. Στις Ηνωμένες Πολιτείες, η σουκραλόζη έχει εγκριθεί ως «γλυκαντικό γενικής χρήσης στα τρόφιμα» από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (FDA), για χρήση σε τρόφιμα, ποτά και επιτραπέζια γλυκαντικά σε επίπεδα GMP (Good manufacture Practices) (International Sweeteners Association, 2018).

Κυκλαμικό (Cyclamate, E 952)

Το κυκλαμικό είναι 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 (Borr et al., 1986). Τα κυκλαμικά άλατα είναι λευκές, κρυσταλλικές σκόνες που έχουν απόλυτα ουδέτερο pH και κάποια 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 συνηθισμένα μείγματα με σακχαρίνη, ακεσουλφάμη K ή ασπαρτάμη. Ο μοριακός της τύπος είναι C₆H₁₂NNaO₃S.



Εικόνα 1.9: Χημική δομή του 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. Σε διεθνές επίπεδο, το κυκλαμικό οξύ έχει αξιολογηθεί από τους επιστημονικούς εμπειρογνώμονες της Μικτής Επιτροπής Εμπειρογνώμωνων FAO/WHO για τα πρόσθετα τροφίμων (JECFA) (1982), από την Επιστημονική Επιτροπή Τροφίμων (SCF) της Ευρωπαϊκής Επιτροπής (2000) και από την Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA). Το 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. Το κυκλαμικό είναι εγκεκριμένο για ποικίλες χρήσεις σε τρόφιμα, ποτά και γλυκαντικά επιτραπέζιων ουσιών στην ΕΕ σύμφωνα με το Παράρτημα II του Κανονισμού 1333/2008. Μια αναφορά για την επανέγκριση του κυκλαμικού είναι επί του παρόντος υπό εξέταση από τον FDA στις Ηνωμένες Πολιτείες (International Sweeteners Association, 2018).

Πίνακας 1.1: Συγκριτικός πίνακας της σχετικής γλυκύτητας των γλυκαντικών του πειράματος σε σχέση με τη γλυκύτητα της σουκρόζης και της γλυκόζης.

Όνομασία Γλυκαντικού	Σχετική γλυκύτητα προς σουκρόζη (min - max)	Σχετική γλυκύτητα προς γλυκόζη (min - max)	Πηγή
Stevia RebA	40-300	66.8-501	Lagan et al., 2011
Saccharin	300 – 500	501 – 835	Lagan et al., 2011
Aspartame	150 – 200	250.5 – 334	Lagan et al., 2011
Sucralose	600 – 1000	1002 – 1670	Lagan et al., 2011

Thaumatococin	1000 – 2000	1670 – 3340	Lagan et al., 2011
Mogrosin	250	417,5	Lagan et al., 2011
Advantame	37000	61790	Otabe et al., 2011
NHDC	1000 – 1800	1670 – 3006	EFSA, 2011
Cyclamate	30	50,1	Lagan et al., 2011

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

Γλυκαντικό	ADI σύμφωνα με τον FDA (mg/kg)	ADI σύμφωνα με τις SCF/EFSA (mg/kg)
Ακεσουλφάμη Κ	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 οριστεί	Δεν έχει οριστεί

2. ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΓΛΥΚΑΝΤΙΚΩΝ

2.1 Το γένος *Listeria*

2.1.1 Βασικά χαρακτηριστικά

Το γένος *Listeria* περιλαμβάνει 17 αναγνωρισμένα είδη μικρών ραβδόμορφων Gram θετικών βακτηρίων (Orsi and Wiedmann, 2016). Μόνο δύο από αυτά τα είδη, το *L. monocytogenes* και το *L. ivanovii*, θεωρούνται παθογόνα. Το *L. monocytogenes* είναι ένας Gram θετικός βάκιλος που δεν σχηματίζει σπόρια. Πρόκειται για ένα πολύ σημαντικό ανθρώπινο τροφογενές παθογόνο και η τρίτη κυριότερη αιτία θανάτου από τροφογενή αίτια, μιας και είναι υπεύθυνο για την πρόκληση μολύνσεων με υψηλή ποσοστό θνησιμότητας στους ηλικιωμένους, στις εγκύους, στα νεογνά και στους ανοσοκατεσταλμένους. Τα κρούσματα ανθρώπινων ασθενειών και οι επιδημίες που προκαλούνται από αυτόν τον οργανισμό έχουν σημαντικό οικονομικό αντίκτυπο για την κοινωνία και τη βιομηχανία τροφίμων (Orsi and Wiedmann, 2016).

Το γένος *L. monocytogenes* είναι παρόν παντού στη φύση και έχει απομονωθεί από μεγάλο φάσμα τροφίμων. Συνεπώς, παραμένει πρόκληση η καταστολή της ανάπτυξης της *Listeria* σε έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα (RTE) ή ελάχιστα επεξεργασμένα τρόφιμα που υποστηρίζουν την ανάπτυξη της *Listeria* (Ryser, 2021). Οι μέθοδοι ανίχνευσης με βάση το DNA και οι μοριακές μέθοδοι αποτελούν σημαντικούς τρόπους παρακολούθησης της μόλυνσης από *L. monocytogenes* σε όλη την αλυσίδα τροφίμων έτοιμων προς κατανάλωση. Επίσης, οι συνδυασμοί παρεμβάσεων όπως ο έλεγχος και η απολύμανση των επιφανειών που έρχονται σε επαφή με τα τρόφιμα, ο έλεγχος του χρόνου αποθήκευσης και της θερμοκρασίας, η χρήση αναστολέων ανάπτυξης στα τρόφιμα που υποστηρίζουν την ανάπτυξη του *L. Monocytogenes*, ελαχιστοποιούν την μόλυνση από το γένος *L. monocytogenes* στην αλυσίδα τροφίμων. Επιπλέον, η πιο αποτελεσματική κατανόηση της οικολογίας και της βιολογίας του *L. monocytogenes*, θα κάνει πιο εύκολο τον έλεγχο αυτού του σημαντικού τροφογενούς παθογόνου (Ryser, 2021).

2.1.2 Λιστερίωση

Η λιστερίωση είναι μια σπάνια αλλά δυνητικά σοβαρή λοίμωξη που προκαλείται από το γένος *Listeria monocytogenes* (Milian and Cifre, 2014). Η κύρια οδός μετάδοσης είναι μέσω της κατανάλωσης μολυσμένων τροφίμων. Προϊόντα όπως το νωπό γάλα, το μαλακό τυρί που παράγεται από νωπό γάλα, τα προϊόντα νωπού κρέατος και οι σαλάτες ενοχοποιούνται συχνά ως πηγή στελεχών *Listeria*. Ωστόσο, η λοίμωξη μπορεί επίσης να μεταδοθεί, απευθείας από μολυσμένα ζώα στον άνθρωπο, καθώς και μεταξύ των ανθρώπων, αν και αυτά τα ενδεχόμενα είναι πολύ σπάνια. Επίσης, στις νεογνικές λοιμώξεις, το *L. monocytogenes* μπορεί να μεταδοθεί από τη μητέρα στο παιδί. Το βακτήριο είναι ιδιαίτερα ικανό στην πρόκληση τροφογενών ασθενειών, επειδή επιβιώνει σε τεχνολογίες επεξεργασίας τροφίμων με όξινες ή αλμυρές συνθήκες και, σε αντίθεση με πολλά παθογόνα, μπορεί να συνεχίσει να πολλαπλασιάζεται αργά σε χαμηλές

θερμοκρασίες, επιτρέποντας την ανάπτυξη ακόμη και σε προϊόντα ψύξης. Τα τελευταία χρόνια έχει αναφερθεί αύξηση του ποσοστού της λιστερίωσης σε διάφορες ευρωπαϊκές χώρες (Milian and Cifre, 2014).

Το γένος *L. monocytogenes* προκαλεί δύο μορφές λιστερίωσης, την μη επεμβατική γαστρεντερική λιστερίωση και την επεμβατική λιστερίωση. Σε άτομα με γερό ανοσοποιητικό, η μη επεμβατική λιστερίωση αναπτύσσεται ως τυπική εμπύρετη γαστρεντερίτιδα. Σε ανοσοκατεσταλμένους όμως ενήλικες, όπως οι ηλικιωμένοι και οι ασθενείς που λαμβάνουν ανοσοκατασταλτικούς παράγοντες, η λιστερίωση μπορεί να εκδηλωθεί ως σηψαιμία, μηνιγγίτιδα, εγκεφαλίτιδα. Η λιστερίωση μπορεί επίσης να αποκτηθεί από το έμβρυο από τη μολυσμένη μητέρα μέσω του πλακούντα και μπορεί να οδηγήσει σε έκτρωση, γέννηση νεκρού εμβρύου ή βρέφους με γενικευμένη λοίμωξη, σήψη ή μηνιγγίτιδα.

Η λιστερίωση διαγιγνώσκεται με θετική καλλιέργεια από μια κανονικά αποστειρωμένη περιοχή. Το γένος *L. monocytogenes* μπορεί εύκολα να καλλιεργηθεί από κλινικά δείγματα, όπως αίμα, εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY), αμνιακό υγρό, πλακούντα, μηκόνιο, λόγια, γαστρικές πλύσεις ή δείγμα από τα αυτιά από νεογέννητα, με απευθείας επίστρωση του υλικού σε πλάκες από άγαρ αίματος και επώαση κατά τη διάρκεια της νύχτας στους 35°C σε ατμόσφαιρα περιβάλλοντος. Η PCR είναι η μόνη εξέταση που χρησιμοποιείται για την ταχεία ανίχνευση της *L. monocytogenes* σε κλινικά δείγματα (Allerberger and Wagner, 2010).

2.1.3 Μεταβολισμός και Φυσιολογία

Τα μέλη του γένους *Listeria* είναι γενικά αερόβια ή προαιρετικά αναερόβια, θετικά στην καταλάση και αρνητικά στην οξειδάση. Γενικά, τα στελέχη *Listeria* αναπτύσσονται μεταξύ 1°C και 45°C υπό αερόβιες και προαιρετικά αναερόβιες συνθήκες. Η βέλτιστη ανάπτυξη τους παρατηρείται σε θερμοκρασία μεταξύ 30 και 37°C. Η ανάπτυξη μπορεί επίσης να λάβει χώρα μεταξύ pH 6 και pH 9 ή σε θρεπτικό ζωμό συμπληρωμένο με έως και 10% (w/v) NaCl. Είναι ενδοκυτταρικό παθογόνο και διαμένει στο κυτοσόλιο, όπου πολλαπλασιάζεται, μολύνοντας τον ξενιστή (Harris et al., 2019).

Η *Listeria monocytogenes* μπορεί να χρησιμοποιήσει μόνο ορισμένες πηγές άνθρακα για ενέργεια με τη γλυκόζη να είναι η προτιμώμενη πηγή ενέργειας για το βακτήριο. Ωστόσο, στην περίπτωση που η γλυκόζη δεν είναι άμεσα διαθέσιμη, αναζητά εναλλακτικές πηγές ενέργειας. Σε αναερόβια περιβάλλοντα, έχει παρατηρηθεί ότι η πεντόζη και η εξόζη υποστηρίζουν την ανάπτυξη της *L. monocytogenes*, ενώ η μαλτόζη και η λακτόζη τείνουν να υποστηρίζουν περισσότερο την αερόβια ανάπτυξη. Η γλυκοζαμίνη και η N-ακετυλογλυκοζαμίνη υποστηρίζουν και οι δύο την ανάπτυξη τόσο σε αερόβια όσο και αναερόβια περιβάλλοντα (Roberts, et.al., 2020).

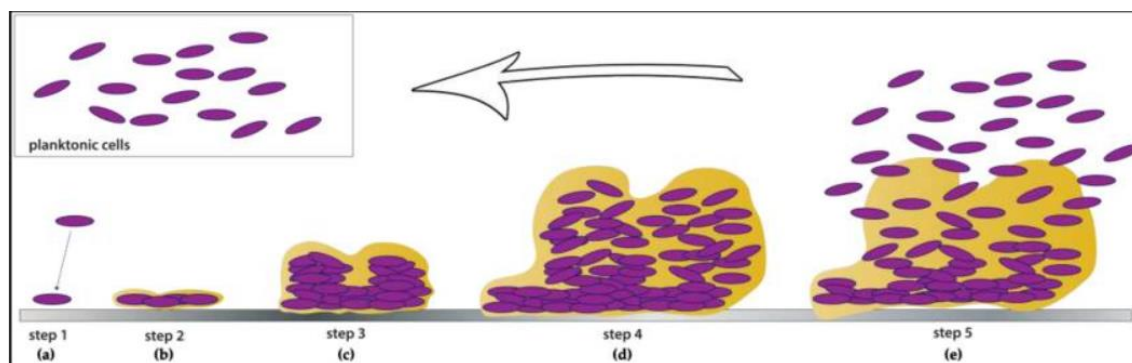
2.1.4 Ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίων

Αυτό το τροφογενές παθογόνο είναι γνωστό ότι σχηματίζει βιοϋμένια, τα οποία είναι δομημένες κοινότητες βακτηριακών κυττάρων ενσωματωμένες σε μια αυτοπαραγόμενη μάζα από εξωκυτταρικές πολυμερικές ουσίες (EPSs), που χαρακτηρίζονται από έναν τροποποιημένο φαινότυπο και γονιδιακή έκφραση, και είναι υπεύθυνες για την

προσκόλληση σε επιφάνειες και για την συνοχή του βιοϋμενίου. Τα EPSs προσδίδουν επίσης διάφορα άλλα χαρακτηριστικά στο βιοϋμένιο, όπως είναι η πολυπλοκότητα της δομής του και η μεγαλύτερη αντοχή στην απομάκρυνση και την καταστροφή των αντιμικροβιακών παραγόντων. Λόγω της δομής τους, τα κύτταρα εντός βιοϋμενίου πράγματι είναι πιο ανθεκτικά στα βιοκτόνα και στις συνθήκες καταπόνησης (συμπεριλαμβανομένου του καθαρισμού και της απολύμανσης / απολύμανσης) (Γιαουρίσ et al., 2013).

Το γένος *L. Monocytogenes* σχηματίζει βιοϋμένια σε διάφορες επιφάνειες που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων, όπως ο ανοξείδωτος χάλυβας, το πολυστυρένιο και το γυαλί, αποτελώντας σοβαρή ανησυχία για την ασφάλεια των τροφίμων, επειδή αποτελεί πηγή μόλυνσης. Έχει διαπιστωθεί ότι επιμένει ακόμη και για αρκετά χρόνια στις βιομηχανίες τροφίμων, κάτι που θα μπορούσε να προκαλέσει επαναλαμβανόμενη διασταυρούμενη μόλυνση των τροφίμων.

Επιπλέον, στο τελευταίο στάδιο ανάπτυξης του βιοϋμενίου, τα μικροβιακά κύτταρα είναι σε θέση να αποκολληθούν από το βιοϋμένιο και να διασκορπιστούν στο περιβάλλον (στην πλαγκτονική μορφή), αποτελώντας μια πιθανή πηγή μόλυνσης (Colagiorgi et al., 2017).



Εικόνα 2.1: Σχηματική αναπαράσταση των σταδίων ανάπτυξης του βιοϋμενίου. (Colagiorgi et. Al., 2017)

2.1.5 Γονίδια *Listeria*

Εξετάστηκε επίσης, η έκφραση των γονιδίων κατά την ανάπτυξη της *Listeria* στα γλυκαντικά του πειράματος. Κάποια από τα γονίδια της *L. monocytogenes* που μελετήθηκαν είναι τα παρακάτω.

Μικροοργανισμός	Γονίδιο	Λειτουργία
<i>L.monocytogenes</i>	16s rRNA	“House-keeping gene”
	Hly	Παραγωγή λιστεριολυσίνης (Lysteriolysin production)
	Agr	Αίσθημα απαρτίας (Quorum sensing)

Γονίδιο 16s

Το ριβόσωμα είναι ένα σωματίδιο του κυττάρου το οποίο αποτελείται από ένα σύμπλοκο υπομονάδων πρωτεϊνών και RNAs. Συναντάται σε ευκαρυωτικά και προκαρυωτικά κύτταρα και παίζει σημαντικό ρόλο στην διαδικασία της πρωτεϊνικής σύνθεσης (μετάφραση). Αποτελείται από τη μικρή και τη μεγάλη ριβοσωμική υπομονάδα, οι οποίες σε ένα λειτουργικό ριβόσωμα συνεργάζονται μεταξύ τους, αλλά η κάθε μία έχει ανεξάρτητο και ειδικό ρόλο στη μετάφραση του mRNA (Watson et al., 2008).

Κάθε υπομονάδα περιέχει ένα ή περισσότερα ριβοσωμικά RNA (rRNA), τα οποία απαντούν σε μεγάλο αριθμό αντιγράφων στο γονιδίωμα των κυττάρων, καθώς και μια πληθώρα ριβοσωμικών πρωτεϊνών. Το μέγεθος των ριβοσωμικών RNAs εκφράζεται και σε μονάδες S. Στα βακτήρια, η μικρή ριβοσωμική υπομονάδα περιέχει ένα μόριο 16S rRNA το οποίο είναι παρόν σε όλα τα προκαρυωτικά κύτταρα, ενώ η μεγάλη υπομονάδα περιέχει ένα μόριο 23S και ένα μόριο 5S. Τα γονίδια που κωδικοποιούν συστατικά των ριβοσωμάτων είναι συντηρημένα, δηλαδή έχουν αλλάξει ελάχιστα με την πάροδο του χρόνου και της εξέλιξης, καθώς επιτελούν σημαντικό και απαραίτητο ρόλο στη μετάφραση των πρωτεϊνών, ενώ χαρακτηρίζονται και ως “housekeeping genes” (Watson et al., 2008).

Το 16S rRNA συμμετέχει ενεργά στην έναρξη της μετάφρασης. Κοντά στο 3' άκρο του 16S rRNA βρίσκεται μια αλληλουχία που είναι συμπληρωματική με την αλληλουχία Shine-Dalgarno η οποία βρίσκεται λίγες βάσεις πριν το κωδικόνιο έναρξης στο mRNA. Η δημιουργία της δίκλωνης περιοχής μεταξύ των δύο μορίων RNA προσδίδει σταθερότητα στο σύμπλοκο έναρξης της μετάφρασης (Σχοινά, 2019).

Το γονίδιο του 16S rRNA αποτελεί ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο εργαλείο για την αναγνώριση και ταξινόμηση των βακτηρίων. Καταρχήν, το μήκος του είναι σχετικά μικρό και περιορίζεται περίπου στα 1500 ζεύγη βάσεων. Δεύτερον, η αλληλουχία του μπορεί να καταταμηθεί σε 10 περιοχές συντηρημένες μεταξύ των βακτηρίων (conserved regions), οι οποίες όμως διαχωρίζουν 9 υπερμετάβλητες περιοχές (hypervariable regions). Τρίτον, οι γονιδιακές αλληλουχίες που είναι εγγεγραμμένες σε δημόσια αποθετήρια (databases) συνεχώς αυξάνονται, καθώς η αλληλουχία αυτού του γονιδίου αποτελεί πληροφορία κλειδί για την αναγνώριση και ταξινόμηση βακτηριακών οργανισμών και απαιτείται για την καταχώριση σε αποθετήρια παγκόσμιας εμβέλειας (Σχοινά, 2019).

Γονίδιο hly

Το θετικό κατά Gram βακτήριο *Listeria monocytogenes* είναι ο αιτιολογικός παράγοντας της λιστερίωσης, μιας εξαιρετικά θανατηφόρας ευκαιριακής τροφογενής λοίμωξης. Οι έγκυες, τα νεογνά, οι ηλικιωμένοι και οι εξασθενημένοι ή ανοσοκατεσταλμένοι ασθενείς προσβάλλονται κατά κύριο λόγο, αν και η νόσος μπορεί να αναπτυχθεί και σε φυσιολογικά άτομα (Kargar and Ghasemi, 2009).

Το σύμπλεγμα γονιδίων ιογένειας *prfA* (*pVGC*) είναι η κύρια νησίδα παθογένειας στη *Listeria monocytogenes*, που περιλαμβάνει τα γονίδια *prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA* και *plcB* (Behari and Youngman, 1998). Τα γονίδια *pVGC* διευκολύνουν την ενδοκυτταρική ανάπτυξη και εξάπλωση του βακτηρίου στον ξενιστή και αποτελούνται από το *hly*, το οποίο καταλαμβάνει την κεντρική θέση στον τόπο, ένα οπερόνιο λεκιθινάσης που περιλαμβάνει τα γονίδια *mpl*, *actA* και *plcB*, το οποίο μεταγράφεται με τον ίδιο προσανατολισμό με το *hly*, και το οπερόνιο *plcA-prfA* το οποίο μεταγράφεται με την αντίστροφη κατεύθυνση από

το *hly*. Το γονίδιο *prfA* κωδικοποιεί την πρωτεΐνη PrfA, η οποία απαιτείται για τη μεταγραφή της *pVGC*. Η λιστεριολυσίνη O (LLO) που κωδικοποιείται από το γονίδιο *hly* είναι μια τοξίνη που σχηματίζει πόρο και μεσολαβεί για τη λύση των φαγοκυτταρικών κενών που περιέχουν τα βακτήρια, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση βακτηριακών κυττάρων στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή. Τα *picA* και *picB* συνεργικά με την LLO μεσολαβούν στην διαφυγή του παθογόνου από τα μονομεμβρανικά και διπλά μεμβρανικά δεσμευμένα κενά. Μετά τη λύση, η ενδοκυτταρική κινητικότητα και η εξάπλωση από κύτταρο σε κύτταρο διαμεσολαβούνται από την επιφανειακή πρωτεΐνη ακτίνη A (ActA) μέσω πολυμερισμού της ακτίνης. Το *mpl* κωδικοποιεί μια μεταλλοπρωτεΐνωση ψευδαργύρου που απαιτείται για την ενεργοποίηση της PC-PLC προκειμένου να ξεκινήσει ένας νέος κύκλος μόλυνσης (Poimenidou et al., 2018). Το γονίδιο που θα μελετηθεί στην παρούσα μελέτη είναι το γονίδιο *hly*.

Γονίδιο *agr*

Προκειμένου να αντέχουν στις αλλαγές του περιβάλλοντός τους, τα βακτήρια έχουν αναπτύξει μηχανισμούς για να αντιλαμβάνονται τις αλλαγές στο περιβάλλον τους, να ενσωματώνουν τα σήματα αυτά και να προσαρμόζουν τη φυσιολογία τους ώστε να ευδοκιμούν στις μεταβαλλόμενες συνθήκες. Μεταξύ αυτών των μηχανισμών, η ικανότητα τους να ανταλλάσσουν πληροφορίες μεταξύ των κυττάρων τους αποτελεί ένα μεγάλο ενδιαφέροντος για τους μικροβιολόγους τις τελευταίες δεκαετίες. Το φαινόμενο αυτό που αναφέρεται ως επικοινωνία κυττάρου-κυττάρου (Quorum Sensing), περιλαμβάνει τη σύνθεση μικρών μορίων σήματος, τα οποία μπορούν να γίνουν αντιληπτά από τον βακτηριακό πληθυσμό που βρίσκεται κοντά και να προκαλέσουν ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης.

Διάφορα συστήματα επικοινωνίας έχουν μελετηθεί εκτενώς στα θετικά κατά Gram βακτήρια, ένα από αυτά είναι και το σύστημα *agr* που περιγράφηκε για πρώτη φορά στον *Staphylococcus aureus*. Σημαντικές προσαρμοστικές αποκρίσεις ρυθμίζονται μέσω του *agr*. Σε αυτές περιλαμβάνονται η ιογένεση και ο σχηματισμός βιομενίου. Το γονίδιο *agr* μπορεί να συμμετέχει σε ένα πολύπλοκο ρυθμιστικό δίκτυο υπεύθυνο για το συντονισμό της γονιδιακής έκφρασης για τη βέλτιστη προσαρμογή της *Listeria monocytogenes* και της *Listeria sp.* στις περιβαλλοντικές συνθήκες.

Τα τέσσερα γονίδια του συστήματος *agr* (ABCD) αντιπροσωπεύονται στο γονιδίωμα της *Listeria* και έχουν παρόμοια οργάνωση με το οπερόνιο *agrBDCA* του *Staphylococcus* (Garmyn et al., 2009).

Η ανάπτυξη και η ωρίμανση του βιομενίου απαιτεί πολύπλοκους κυτταρικούς μηχανισμούς στους οποίους εμπλέκεται η επικοινωνία κυττάρων-κυττάρων. Ο ρόλος του συστήματος *agr* κατά την ανάπτυξη του βιομενίου είναι σύνθετος. Εξαρτάται από τις υδροδυναμικές συνθήκες της πειραματικής διάταξης. Υπό στατικές συνθήκες η έκφραση *agr* μειώνει την προσκόλληση των κυττάρων στην επιφάνεια, ενώ υπό τυρβώδεις δυναμικές συνθήκες η έκφραση *agr* μπορεί να επηρεάσει την ωρίμανση του βιομενίου (Rieu et al., 2007).

Το βακτήριο *L. monocytogenes*, τα τέσσερα γονίδια (*agrB*, *agrD*, *agrC* και *agrA*) του τύπου *agr* είναι οργανωμένα ως οπερόνιο. Κωδικοποιούν την κινάση ιστιδίνης δύο συστατικών *AgrC* και τον ρυθμιστή απόκρισης *AgrA*, ένα πρόδρομο πεπτίδιο *AgrD* και την *AgrB*. Στο βακτήριο *L. monocytogenes*, η λειτουργία του *agr* μπορεί να είναι παροδική κατά τη

διάρκεια του σχηματισμού βιουμενίου. Το σύστημα agr θα μπορούσε επίσης να ρυθμίζει την έκφραση πρωτεϊνών που είναι απαραίτητες για την ικανότητα προσκόλλησης σε αβιοτικές επιφάνειες χωρίς να εμπλέκεται μόλις τα κύτταρα προσκολληθούν στην επιφάνεια. Το σύστημα agr του *L. monocytogenes* διαφέρει από τα ομόλογα συστήματα, καθώς η μεταγραφική επεξεργασία συμβαίνει στο σημείο έναρξης της μεταγραφής και εντός του μεταγράφου πλήρους μήκους (Dunn and Stabb, 2007).

Η θέση του agr εκφράζει δύο πρωταρχικά αποκλίνοντα μετάγραφα. Το RNAII κωδικοποιεί ένα σύστημα δύο συνιστωσών, το AgrA/AgrC, το οποίο αναγνωρίζει το εκκρινόμενο από το agrD κωδικοποιημένο οκταπεπτίδιο (AIP), και το AgrB, το οποίο θεωρείται ότι δρα στη μεταμεταφραστική επεξεργασία και έκκριση του AIP. Το δεύτερο σημαντικότερο μετάγραφο, το RNAIII, δρα ως το μόριο-εκτελεστής του τόπου agr. Τέλος, ένα τρίτο, σύντομο μετάγραφο, το RNAI, έχει επίσης περιγραφεί ότι κωδικοποιεί το AgrA. Με τη συσσώρευση επαρκών ποσοτήτων AIP στο μέσο ανάπτυξης, η σηματοδότηση μέσω AgrA/AgrC αυξάνει τη μεταγραφή τόσο του RNAII όσο και του RNAIII, με αποτέλεσμα την καθοδική ρύθμιση των πρωτεϊνών της εκθετικής φάσης, όπως η πρωτεΐνη A που συνδέεται με την κυτταρική επιφάνεια, και την αυξημένη έκφραση των μετεκθετικών εκκρινόμενων πρωτεϊνών, όπως οι εντεροτοξίνες B, C και D, που εμπλέκονται στη βακτηριακή μολυσματικότητα (Autret et al., 2003).

2.2 Οξυγαλακτικά βακτήρια

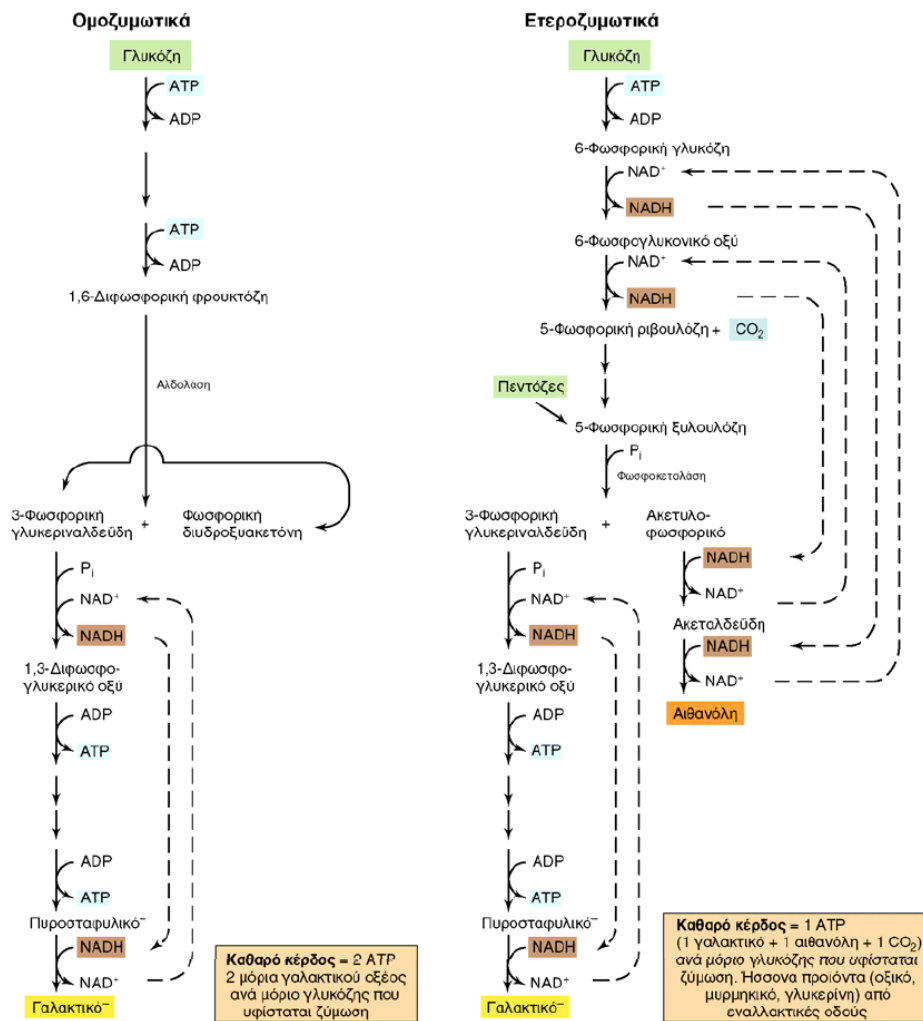
Τα τελευταία χρόνια όλο και μεγαλύτερο ενδιαφέρον δίνεται στον μεταβολισμό των οξυγαλακτικών βακτηρίων. Πρόκειται για ένα είδος μικροοργανισμών που μπορούν να ζυμώσουν υδατάνθρακες για να παράγουν γαλακτικό οξύ και χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιομηχανία ζυμούμενων τροφίμων. Τα τελευταία χρόνια, με τον εξαιρετικό τους ρόλο στη βιομηχανία τροφίμων αλλά και τις προβιοτικές τους λειτουργίες, που προάγουν την υγεία, έχουν προκαλέσει μεγάλη ενδιαφέρον. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια μπορούν να αποδημήσουν μακρομοριακές ουσίες στα τρόφιμα, συμπεριλαμβανομένης της αποδόμησης των δύσπεπτων πολυσακχαριτών και παράγουν επίσης μια ποικιλία προϊόντων, όπως λιπαρά οξέα μικρής αλυσίδας, αμίνες, βακτηριοσίνες και βιταμίνες κατά τη διάρκεια του μεταβολισμού. Λόγω των χαρακτηριστικών αυτών, στην βιομηχανία τροφίμων, από τη μία πλευρά χρησιμοποιούνται για τη βελτίωση της γεύσης των ζυμούμενων τροφίμων, την αύξηση της θρεπτικής αξίας των τροφίμων, τη μείωση των επιβλαβών ουσιών, την αύξηση της διάρκειας ζωής στο ράφι και πολλά άλλα, και από την άλλη πλευρά μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως προβιοτικά για την προαγωγή της υγείας στον οργανισμό (Wang, et. al., 2021). Ωστόσο, κάποια γένη περιέχουν στελέχη παθογόνα για τον ανθρώπινο οργανισμό (*Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, κλπ.)

2.2.1 Φυσιολογία των οξυγαλακτικών βακτηρίων

Τα βακτήρια γαλακτικού οξέος (LAB) είναι μια ομάδα προαιρετικά αναερόβιων Gram-θετικών βακτηρίων με κοινά μορφολογικά και μεταβολικά χαρακτηριστικά. Πρόκειται για μη σπορογόνους βάκιλους ή κόκκους, που πλειονότητά τους δεν είναι ικανά για κίνηση, με εξαίρεση μεμονωμένες περιπτώσεις βακίλων που φέρουν περίτριχα μαστίγια. Είναι

αρνητικά στην καταλάση με υψηλή ανοχή σε χαμηλό pH. Τα LAB είναι από τα πιο σημαντικά μικρόβια που χρησιμοποιούνται στις ζυμώσεις τροφίμων, καθώς και στην ενίσχυση της γεύσης και της υφής των ζυμωμένων τροφίμων (Mokoena P.M., 2017).

Το βέλτιστο όριο ανάπτυξης για τους LAB είναι σε pH 5,5-5,8 και η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης μεταξύ 30-40 °C. Στην αλκαλική περιοχή ο ρυθμός ανάπτυξής τους μειώνεται σημαντικά. Οι μικροοργανισμοί έχουν πολύπλοκες διατροφικές απαιτήσεις σε αμινοξέα, πεπτίδια, νουκλεοτιδικές βάσεις, πουρίνες, πυριμιδίνες, βιταμίνες, μέταλλα, λιπαρά οξέα και υδατάνθρακες (Pfeiler and Klaenhammer, 2007). Κατηγοριοποιούνται σε ομοζυμωτικούς και ετεροζυμωτικούς μικροοργανισμούς, με βάση τα προϊόντα των ζυμωμένων υδατανθράκων. Οι ομοζυμωτικοί LAB παράγουν κυρίως γαλακτικό οξύ από σάκχαρα, ενώ οι ετεροζυμωτικοί LAB παράγουν γαλακτικό οξύ, οξικό οξύ ή αλκοόλη και διοξείδιο του άνθρακα (Mokoena P.M., 2017). Τα ομοζυμωτικά βακτήρια διαθέτουν αλδολάση και διασπάνε την διφωσφορική φρουκτόζη προς φωσφορική τριόζη (γλυκερυναλδεύδη) και να γίνει η γλυκόλυση. Αντίθετα, τα ετεροζυμωτικά βακτήρια δε διαθέτουν την αλδολάση και συνεπώς δεν είναι ικανά να διασπάσουν τη διφωσφορική φρουκτόζη προς φωσφορική τριόζη (γλυκόλυση). Συνεπώς, οξειδώνουν την 6-φωσφορική γλυκόζη προς 6-φωσφογλυκονικό οξύ και στη συνέχεια αποκαρβοξυλιώνουν το οξύ προς φωσφορική πεντόζη δημιουργώντας 1 μόριο NADH. Η πεντόζη διασπάται σε φωσφορική τριόζη και ακέτυλο-φωσφορικό οξύ με τη βοήθεια μιας κετολάσης. 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 NADH που έχει δημιουργηθεί και μετατρέπεται κατόπιν σε αιθανόλη δίχως να παράγεται ATP. Λόγω αυτής της διαδικασίας, τα ετεροζυμωτικά βακτήρια παράγουν μόνο 1 mol ATP από γλυκόζη. Αντιθέτως, τα ομοζυμωτικά βακτήρια παράγουν 2 mol ATP. Επίσης, επειδή τα ετεροζυμωτικά βακτήρια αποκαρβοξυλιώνουν το 6-φωσφο-γλυκονικό οξύ, παράγουν CO₂ ως προϊόν ζύμωσης, ενώ τα ομοζυμωτικά παράγουν ελάχιστο ή καθόλου CO₂ (Brock, 2003).



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

2.2.2. Το γένος *Lactobacillus*

Το γένος *Lactobacillus* είναι μέλος της οικογένειας *Lactobacillaceae*. Περιλαμβάνει μέχρι 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).

Είναι βακτήρια ψυχρόφιλα, ραβδόμορφα, μη σποριογόνα, και μη κινητικά. Χαρακτηρίζονται ως Gram θετικά, προαιρετικά αναερόβια και δεν περιέχουν το ένζυμο καταλάση. Τα ομοζυμωτικά *Lactobacillus* spp. βακτήρια ζυμώνουν τα σάκχαρα προς γαλακτικό οξύ (περισσότερο από 90%) και δεν παράγουν αέρια. Από την άλλη πλευρά, τα ετεροζυμωτικά είδη, ζυμώνουν τα σάκχαρα (γλυκόζη) προς γαλακτικό οξύ και άλλες ουσίες όπως το οξικό οξύ και παράγουν CO₂. Η παραγωγή αερίου είναι τακτικά η αιτία για την αλλοίωση των τροφίμων. Τα περισσότερα είδη *Lactobacillus* spp. απαιτούν ενεργότητα

νερού (Aw) άνω του 0,95 για να ζυμώσουν ουσίες όπως τα σάκχαρα. Μία Aw κάτω από 0,95 περιορίζει σοβαρά την ανάπτυξη, ενώ η ανάπτυξη σταματά εντελώς σε Aw κάτω από 0,92. Για την ανάπτυξη απαιτείται pH πάνω από 3,2 (Feiner, 2006).

Οι γαλακτοβάκλιοι εντοπίζονται συνήθως σε ποικίλα περιβάλλοντα πλούσια σε υδατάνθρακες, συμπεριλαμβανομένων και των γαλακτοκομικών, από τα οποία προήλθε και η ονομασία τους, καθώς επίσης και σε φυτά ή υλικά φυτικής προέλευσης και σε ζυμούμενα ή αλλοιωμένα τρόφιμα (Ibrahim and Ouwehand, 2019). Τα είδη *Lactobacillus* spp. είναι συνήθως η αιτία του ξινίσματος στα προϊόντα κρέατος. Ορισμένα στελέχη ετεροζυμωτικών *Lactobacillus* spp. σχηματίζουν επίσης H₂O₂. Το H₂O₂ που προέρχεται από τους *Lb. viridescens* και *Lb. curvatus* προκαλεί την οξειδωση της χρωστικής ουσίας μυοσφαιρίνης, με αποτέλεσμα ένα γκριζοπράσινο ή ακόμη και κίτρινο ή λευκό χρώμα σε ένα προϊόν κρέατος ή σε συσκευασμένο νωπό κρέας. Το H₂O₂ σχηματίζεται μόνο παρουσία O₂. Ωστόσο, αποχρωματισμός όπως το πρασίνισμα μπορεί επίσης να εμφανιστεί σε κρέας συσκευασμένο σε κενό, εάν το υλικό συσκευασίας είναι ελαττωματικό και διαπερατό στο O₂. Η παρουσία του *Lb. brevis* μπορεί επίσης να προκαλέσει το σχηματισμό CO₂ στο εσωτερικό της συσκευασίας.

Οι *Lactobacillus* spp., εκτός του ότι αποτελούν μέρος της φυσικής μικροχλωρίδας του κρέατος ή εισάγονται λόγω μόλυνσης, μπορούν επίσης να προστεθούν σκόπιμα στα προϊόντα κρέατος κατά την παρασκευή τους. Διάφορα είδη *Lactobacillus* προστίθενται ως καλλιέργειες εκκίνησης στο σαλάμι. Οι *Lactobacillus* spp. δρουν επίσης ως ανταγωνιστική μικροχλωρίδα στο κρέας και τα προϊόντα κρέατος, παρατείνοντας τη διάρκεια ζωής τους, ανταγωνιζόμενοι παθογόνους μικροοργανισμούς όπως το *L. monocytogenes* και μην επιτρέποντάς τους να αναπτυχθούν υπερβολικά (Feiner, 2006).

2.2.3 *Lactobacillus pentosus*

Το βακτήριο *Lactobacillus pentosus* είναι ένα gram θετικό, ραβδόμορφο, μη σποριογόνο βακτήριο, αερόβιο ή μικροαερόφιλο. Έχει έντονο προβιοτικό προφίλ και χρησιμοποιείται κυρίως ως καλλιέργεια εκκίνησης για την διαδικασία των ζυμώσεων. Ορισμένα στελέχη του *L. pentosus* ασκούν προβιοτικές ιδιότητες, βελτιώνουν την ανοσία του βλεννογόνου και δημιουργούν αντίσταση έναντι βακτηριακών λοιμώξεων (Aarti, et.al., 2016). Ο *L. pentosus* έχει φανεί ότι έχει αντιμυκητιασική δράση και αναστέλλει την ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών. Επίσης, αναστέλλει την ανάπτυξη της σαλμονέλας, αναστέλλει τη βλάβη που προκαλείται από την εισβολή των εντερικών επιθηλιακών κυττάρων και βελτιώνει την ανοσολογική λειτουργία του ξενιστή. Ακόμη πιο σημαντικό είναι ότι το *L. pentosus* επάγει τα κύτταρα Tr1 για να αναστείλει τη συστηματική φλεγμονή. Επιπλέον, επιδιορθώνει τις βλάβες του εντερικού φραγμού προωθώντας την έκφραση των πρωτεϊνών στενής σύνδεσης. Ως εκ τούτου, το *L. pentosus* διαδραματίζει απαραίτητο ρόλο στην εντερική υγεία. Ο *Lactobacillus pentosus* έχει την ευεργετική λειτουργία της ρύθμισης του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή και παίζει απαραίτητο ρόλο στην εντερική υγεία (Ma, et.al., 2020).

Σχετικά με τη συμπεριφορά του, έχει εμφανίσει διάφορες αποκρίσεις σε ορισμένους παράγοντες καταπόνησης όπως το θερμικό σοκ (συγκεκριμένα, 55°C για 10 λεπτά), χολή (0,5% oxgall), οξειδωτικό στρες (0,1% H₂O₂), χαμηλή τιμή pH (2,5), αιθανόλη (10%), αλάτι (7,5% NaCl) και απορρυπαντικό (0.05% sodium dodecyl sulfate) (Parente et al., 2010).

2.2.4 Γλυκαντικά και μικροχλωρίδα του εντέρου

Υπάρχουν πάνω από 100 τρισεκατομμύρια μικρόβια στο έντερο, τα οποία κωδικοποιούν πολλά περισσότερα μοναδικά γονίδια από ότι το ανθρώπινο γονιδίωμα. Το μικροβίωμα του εντέρου βρίσκεται σε άμεση γειτνίαση με το εντερικό επιθήλιο, με αποτέλεσμα τα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου να εκτίθενται σε ποικίλες αντιγονικές ουσίες τόσο από τα συστατικά της διατροφής όσο και από τις δραστηριότητες του εντερικού μικροβιόκοσμου. Η διατροφή είναι ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που διαμορφώνει τον εντερικό μικροβιόκοσμο. Μελέτες δείχνουν ότι τα πρόσθετα, που συνήθως χρησιμοποιούνται για τη βελτίωση της γεύσης, της εμφάνισης και της μακροζωίας των τροφίμων και των ποτών, έχουν αντίκτυπο στη σύνθεση και τη λειτουργία των βακτηρίων του εντέρου. Υπάρχει τεκμηριωμένη σχέση μεταξύ των διαιτητικών προσθέτων και της απορρύθμισης του μικροβιόκοσμου και των επακόλουθων επιπτώσεων στην υγεία του εντέρου (Shil and Chichger, 2021).

Τα τεχνητά γλυκαντικά είναι ένα από τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα πρόσθετα τροφίμων στον κόσμο. Ωστόσο, τα οφέλη των τεχνητών γλυκαντικών για την υγεία έχουν αμφισβητηθεί τα τελευταία χρόνια. Έχει αναφερθεί ότι η κατανάλωση τεχνητών γλυκαντικών υλών μπορεί να μειώσει την ποικιλομορφία του εντερικού μικροβιώματος και να διαταράξουν το μεταβολισμό της γλυκόζης, με αποτέλεσμα τη δυσανεξία στη γλυκόζη (Suez et al., 2014). Η κύρια διαφορά της ζάχαρης με τα τεχνητά γλυκαντικά είναι η μεταβολική τους ικανότητα, καθώς τα γλυκαντικά δεν απορροφώνται από το έντερο αλλά μεταβολίζονται από τη μικροβιακή χλωρίδα του εντέρου και αποβάλλονται από το ανθρώπινο σώμα μέσω κοπράνων και ούρων (Chattopadhyay et.al, 2014). Οι κοινώς χρησιμοποιούμενες τεχνητές γλυκαντικές ουσίες που έχουν εγκριθεί από τον WHO/FAO για χρήση στα τρόφιμα περιλαμβάνουν την ακεσουλφάμη, την ασπαρτάμη, την σακχαρίνη, τη σουκραλόζη, το κυκλαμικό και τη νεοτάμη. Αυτά τα τεχνητά γλυκαντικά έχουν ξεχωριστή αποδεκτή ημερήσια πρόσληψη, μοναδικό μεταβολισμό αλλά και διαφορετικές επιδράσεις στον εντερικό μικροβιόκοσμο του εντέρου (Cao, 2020).

Σημαντικές μελέτες έχουν δημοσιευθεί σχετικά με τα γλυκαντικά και τη μικροχλωρίδα του εντέρου, και καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι ορισμένα γλυκαντικά χαμηλών θερμίδων διαταράσσουν τη μικροχλωρίδα του εντέρου τόσο σε ποντίκια όσο και σε ανθρώπους, χρησιμοποιώντας διάφορες πειραματικές μεθόδους και μοντέλα παρεμβάσεων. Παράλληλα φαίνεται ότι οι επιδράσεις των γλυκαντικών χαμηλών θερμίδων μπορεί να είναι σωρευτικές με την πάροδο του χρόνου. Άλλες πειραματικές δοκιμές και κλινικές μελέτες δείχνουν ότι μόνο η σακχαρίνη και η σουκραλόζη μπορούν να μεταβάλουν τον εντερικό πληθυσμό, ενώ από τα θρεπτικά γλυκαντικά, μόνο τα εκχυλίσματα στέβιας φαίνεται να επηρεάζουν τον εντερικό μικροβιόκοσμο (Nettleton et al., 2016). Μετά την κατανάλωση γλυκαντικών, πολυάριθμοι προφλεγμονώδεις παράγοντες απελευθερώνονται από τα βακτήρια του εντέρου, οι οποίοι σχετίζονται και με άλλες καταστάσεις μεταβολικών ασθενειών όπως ο διαβήτης και η παχυσαρκία. Στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου, πρόσφατες μελέτες μας καταδεικνύουν ότι η έκθεση σε τεχνητά γλυκαντικά αυξάνει την απόπτωση και τη διαπερατότητα σε όλο το εντερικό επιθήλιο που σχετίζεται με φλεγμονώδη διαρροή του εντέρου (Suez et al., 2014).

Ωστόσο, ο μηχανισμός με τον οποίο τα γλυκαντικά χαμηλών θερμίδων επηρεάζουν τη μικροχλωρίδα του εντέρου και συμβάλλουν στην παθογένεια παρέμεινε ακόμη συγκεκαλυμμένος. Περαιτέρω μελέτες απαιτούνται για να διεξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα, σχετικά με την επίδραση του κάθε γλυκαντικού στην ανθρώπινη υγεία.

3. ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΕΣ - ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

3.1 Οπτική Πυκνότητα (Optical Density, OD)

Η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD) των βακτηριακών καλλιιεργειών είναι μια κοινή τεχνική που χρησιμοποιείται ευρέως σε ερευνητικά και κλινικά εργαστήρια, καθώς παρέχει μια γρήγορη και οικονομική μέθοδο προσαρμογής μικροβιακών εναιωρημάτων σε καθορισμένες συγκεντρώσεις. Είναι μια μέθοδος ποσοτικοποίησης της μικροβιακής ανάπτυξης σε σχέση με τη θολερότητα ενός εμβολίου, δηλαδή την οπτική πυκνότητά του. Η μέτρηση στην ουσία βασίζεται στην ποσότητα του φωτός που σκεδάζεται από την καλλιέργεια και όχι στην ποσότητα του φωτός που απορροφάται. Γίνεται η παραδοχή ότι ο αριθμός των μικροβίων μέσα σε οποιοδήποτε εναιώρημα είναι ευθέως ανάλογος της θολερότητας της καλλιέργειας και ως εκ τούτου, η αραίωση σε μια καθορισμένη οπτική πυκνότητα αντιπροσωπεύει μια συγκεκριμένη μικροβιακή συγκέντρωση (Brown, 2022). Οι ερευνητές βασίζονται κυρίως σε φασματοφωτόμετρα για να κάνουν αυτές τις μετρήσεις. Ωστόσο, τα φασματοφωτόμετρα δεν είναι βελτιστοποιημένα για μετρήσεις σκέδασης του φωτός και γι' αυτό συνήθως προκύπτουν διαφορές στη μετρούμενη απορρόφηση μεταξύ των οργάνων.

Εφόσον οι μετρήσεις βασίζονται στην ποσότητα του φωτός που σκεδάζεται, συνεπώς η τιμή της OD εξαρτάται από το μήκος κύματος φωτός που φτάνει στην καλλιέργεια. Θεωρητικά, μπορεί να επιλεγεί οποιοδήποτε μήκος κύματος για τις μετρήσεις αυτές αρκεί να παραμείνει σταθερό για όλες τις επόμενες μετρήσεις. Ωστόσο, στην πράξη, οι μετρήσεις OD των καλλιιεργειών των μικροοργανισμών εκτελούνται γενικά στα 600 nm. Τα 600 nm είναι ένα βολικό μήκος κύματος δεδομένου ότι είναι εύκολη η διαθεσιμότητα φίλτρων στην αγορά και εύκολη η ανίχνευση της σκέδασης φωτός, μιας και τα μεγαλύτερα μήκη κύματος δημιουργούν μικρότερη σκέδαση (Jethra, 1993). Οι μετρήσεις OD συνδέονται στενά με το οπτικό σύστημα που επιλέγεται καθώς και τη γεωμετρία του συστήματος (π.χ. η περιοχή και η ευαισθησία του ανιχνευτή, η απόσταση μεταξύ του δείγματος και του ανιχνευτή, κλπ.). Συνεπώς, από αυτό προκύπτει ότι τα φασματοφωτόμετρα με διαφορετικές οπτικές γεωμετρίες δίνουν διαφορετικές τιμές OD για την ίδια καλλιέργεια. Αν και οι περισσότερες βιοτεχνολογικές εφαρμογές εξακολουθούν να βασίζονται σε μετρήσεις OD, οι ερευνητές έχουν αρχίσει να δείχνουν αυξημένο ενδιαφέρον για εναλλακτικές μεθόδους που προσφέρουν μεγαλύτερη επαναληψιμότητα στην παρακολούθηση της βακτηριακής ανάπτυξης, αν και οι περισσότεροι εξακολουθούν να βασίζονται σε μετρήσεις OD.

Οι μετρήσεις OD παρουσιάζουν κάποιους περιορισμούς που σχετίζονται με το γεγονός ότι δεν λαμβάνονται υπόψη στις μετρήσεις η διαφορετικότητα της μορφολογίας των κυττάρων στον κάθε παράγοντα, τα νεκρά κύτταρα που υπάρχουν τα οποία υπολογίζονται στο συνολικό αριθμό καθώς και η πιθανή οξειδωση του υλικού (διαφορά χρωματισμού εξαιτίας των υλικών). Η οξειδωση του υλικού αντιμετωπίζεται με την χρήση τυφλών κελιών (ελέγχου- controls, κενά - blanks, τα οποία έχουν υλικό αλλά δεν εμβολιάζονται με τον μικροοργανισμό που μελετάται).

Οι βακτηριακές καλλιέργειες ιδανικά αναπτύσσονται εκθετικά και η OD αυξάνεται όχι ως συνάρτηση της ίδιας της OD αλλά ως συνάρτηση του $\ln(OD)$. Ο ρυθμός ανάπτυξης των

βακτηρίων είναι η αλλαγή στον αριθμό των κυττάρων ανά λεπτό, την οποία την υπολογίζουμε ως τη μεταβολή της OD ανά λεπτό (Hall et.al, 2014).

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

όπου:

N: ο αριθμός των κελιών τη στιγμή *t*,

***α*:** πρώτη τάξης σταθερός ρυθμός ανάπτυξης.

Το *α* είναι σε αντίστροφες μονάδες χρόνου, οπότε αν το *t* εκφράζεται σε λεπτά (min) τότε ο ρυθμός ανάπτυξης εκφράζεται σε min^{-1} .

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

Όταν $t_0 = 0$ και $t = t$, τότε προκύπτει:

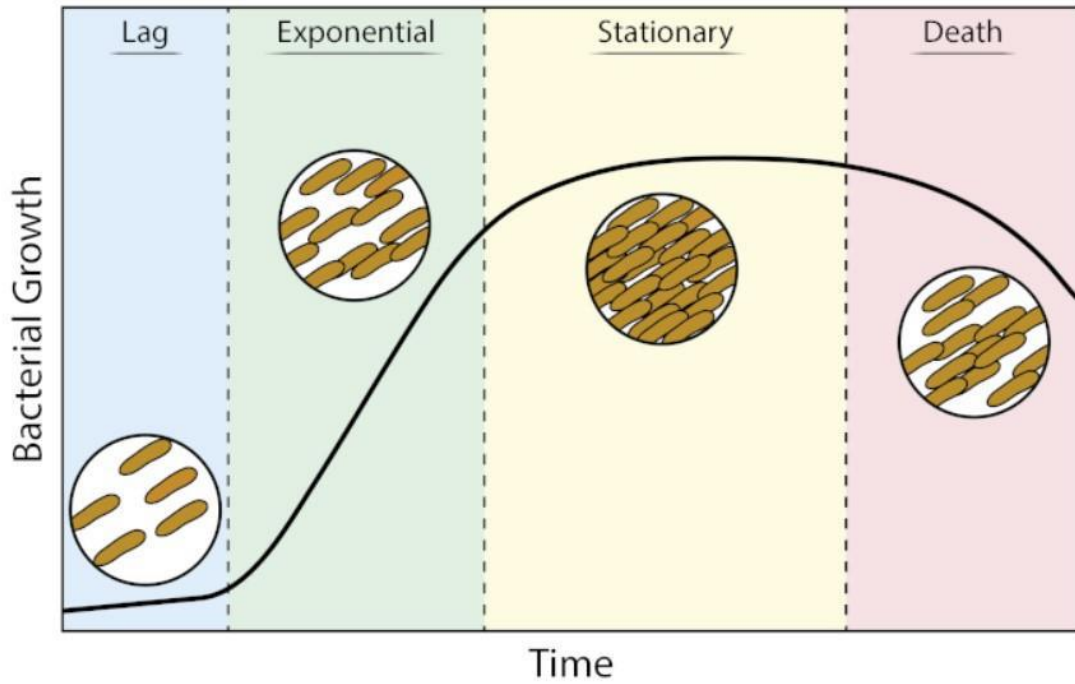
$$\ln\left(\frac{Nt}{N_0}\right) = \alpha * (t-t_0) \quad (3)$$

όπου *α*: η κλίση του ln (N) προς το *t*.

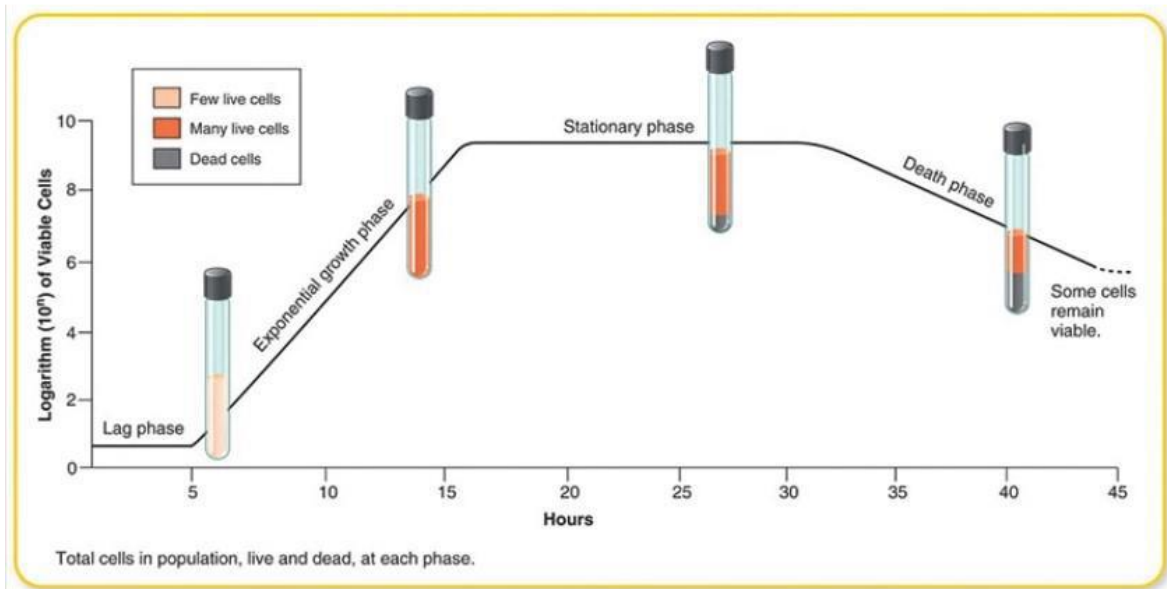
3.2 Μικροβιακή καμπύλη ανάπτυξης

Στην ιατρική και τη βιομηχανία τροφίμων, ο βακτηριακός αποικισμός σε επιφάνειες αποτελεί κοινή αιτία λοιμώξεων και σοβαρών ασθενειών. Σημαντικό ποσοστό του εξοπλισμού της βιομηχανίας τροφίμων και των ιατρικών συσκευών γίνεται το επίκεντρο μολύνσεων από βιοϋμένια, προκαλώντας θανατηφόρες ασθένειες. Συνεπώς, διάφορα μοντέλα ανάπτυξης μικροβίων καθώς και οι συνθήκες ανάπτυξής τους έχουν μελετηθεί εκτενώς (Wang et al., 2015). Μάλιστα, η μικροβιακή ανάπτυξη έχει περιγραφεί και με ένα πλήθος μαθηματικών μοντέλων (Lopez et al., 2004).

Τα μοντέλα αυτά στους τομείς την μικροβιολογίας και της ασφάλειας των τροφίμων περιγράφουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών ως ένα κλειστό περιβάλλον-βιότοπο, όπου όλες οι πηγές που διατηρούν σε ζωή τους μικροοργανισμούς είναι μη ανανεώσιμες και πεπερασμένες και οι μεταβολίτες που εκκρίνονται από τα κύτταρα δεν αποβάλλονται. Η ανάπτυξη των μικροοργανισμών σε ένα τέτοιο κλειστό σύστημα, χαρακτηρίζεται τέσσερις ευδιάκριτες φάσεις από τις οποίες περνάνε τα κύτταρα των μικροοργανισμών (Εικόνα 3.1 και εικόνα 3.2).



Εικόνα 3.1: Φάσεις βακτηριακής ανάπτυξης

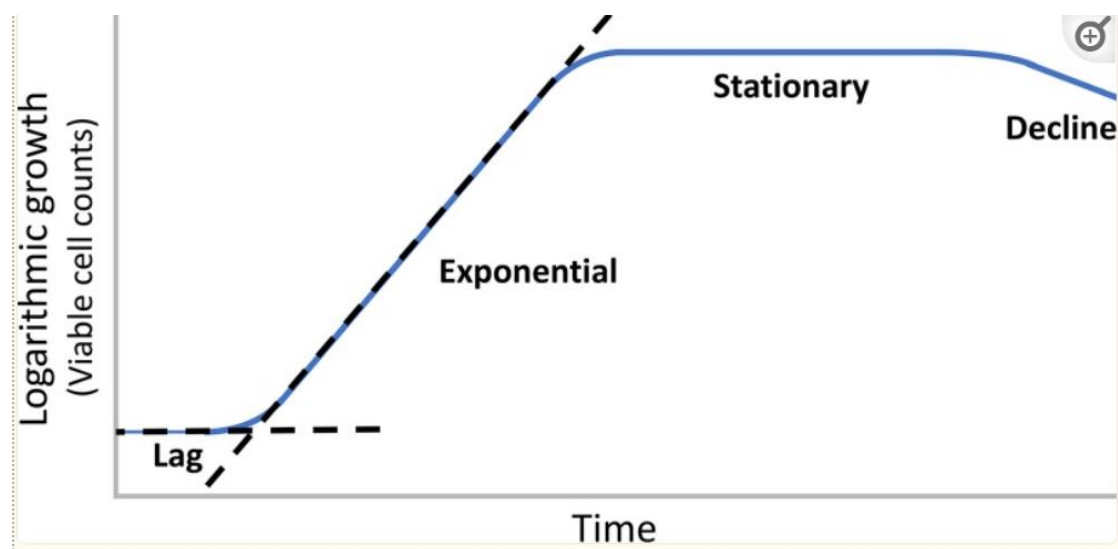


Εικόνα 3.2: Αριθμός κυττάρων στον πληθυσμό σε κάθε φάση ανάπτυξης, ζωντανά και νεκρά

3.2.1 Οι φάσεις της καμπύλης ανάπτυξης

Φάση προσαρμογής (Lag phase)

Το φαινόμενο της βακτηριακής φάσης της προσαρμογής περιγράφηκε για πρώτη φορά στα τέλη του 19ου αιώνα, όταν η "λανθάνουσα περίοδος" περιγράφηκε σε μελέτες σχετικά με τις επιδράσεις της θερμοκρασίας στη *Salmonella enterica* serovar Typhi. Αργότερα, το 1949, ο Monod περιέγραψε τη φάση προσαρμογής ως μια διαδικασία εξισορρόπησης που ελέγχεται από έναν άγνωστο ρυθμιστικό μηχανισμό (Rolfe et al., 2012). Το 1972, οι Buchanan και Solberg (1972) περιέγραψαν την φάση υστέρησης ως το χρόνο που απαιτείται για να αυξηθεί η αρχική πυκνότητα του πληθυσμού στο διπλάσιο. Το 1975, ο Pirt όρισε την φάση προσαρμογής ως μια μεταβατική περίοδο κατά την οποία ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης αυξάνεται στη μέγιστη τιμή που χαρακτηρίζει το περιβάλλον καλλιέργειας. Δεδομένης της τυπικής σιγμοειδούς μορφής της καμπύλης ανάπτυξης (φυσικός λογάριθμος της κυτταρικής πυκνότητας σε συνάρτηση με τον χρόνο) που παρατηρείται σε ένα σταθερό περιβάλλον, η διάρκεια της φάσης προσαρμογής λ μπορεί να ποσοτικοποιηθεί ως ο χρόνος που προκύπτει από την προέκταση της εφαπτομένης στο εκθετικό τμήμα της καμπύλης ανάπτυξης, πίσω στο επίπεδο του εμβολίου. Αυτός ο ορισμός είναι σήμερα ο πιο διαδεδομένος, όμως δεν είναι πάντα εφαρμόσιμος σε χρονικά μεταβαλλόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες, όπου η φάση υστέρησης και η εκθετική φάση ανάπτυξης μπορεί να είναι λιγότερο διακριτές (Swinnen et al., 2004). Παρά τα τόσα χρόνια έρευνας, η φάση προσαρμογής είναι η πιο ανεπαρκώς κατανοητή φάση ανάπτυξης, κυρίως λόγω της έλλειψης δεδομένων της φυσιολογίας και των μοριακών διεργασιών (Rolfe et al., 2012).



Εικόνα 3.3: Ένα αντιπροσωπευτικό διάγραμμα ανάπτυξης μιας βακτηριακής καλλιέργειας. Το σημείο στο οποίο διασταυρώνονται οι διακεκομμένες γραμμές είναι το κοινώς καθορισμένο τελικό σημείο της περιόδου υστέρησης για μια βακτηριακή καλλιέργεια (Bertranda, 2019).

Μετά τον εμβολιασμό ενός υγρού ζωμού καλλιέργειας, ο πολλαπλασιασμός των βακτηρίων δεν αρχίζει αμέσως. Χρειάζεται κάποιος χρόνος για να πολλαπλασιαστούν. Ο χρόνος μεταξύ του εμβολιασμού και της έναρξης του πολλαπλασιασμού είναι γνωστός ως φάση προσαρμογής. Στη φάση αυτή, τα εμβολιασμένα βακτήρια εγκλιματίζονται στο περιβάλλον, ενεργοποιούν διάφορα ένζυμα και προσαρμόζονται στη θερμοκρασία του περιβάλλοντος και στις ατμοσφαιρικές συνθήκες. Κατά τη διάρκεια αυτής της φάσης, παρατηρείται αύξηση του μεγέθους των βακτηρίων, αλλά δεν υπάρχει αξιόλογη αύξηση του αριθμού των βακτηριακών κυττάρων. Πρόκειται για μια δυναμική, οργανωμένη, προσαρμοστική και εξελικτική διαδικασία που προστατεύει τα βακτήρια από απειλές, προάγει την αναπαραγωγική ικανότητά τους και έχει ευρεία σημασία για τη μελέτη της βακτηριακής εξέλιξης, της αλληλεπίδρασης μεταξύ ξενιστή και παθογόνου, της ανοχής στα αντιβιοτικά, της περιβαλλοντικής βιολογίας, της μοριακής μικροβιολογίας και της ασφάλειας των τροφίμων. Η διάρκεια της φάσης υστέρησης ποικίλλει ανάλογα με το βακτηριακό είδος, τη φύση του μέσου καλλιέργειας, τη θερμοκρασία επώασης, τον όγκο του εμβολίου κ.λπ. Μπορεί να κυμαίνεται από μία ώρα έως αρκετές ημέρες (Bartranda, 2019).

Εκθετική ή λογαριθμική φάση ανάπτυξης (Exponential or Log phase)

Μετά την φάση προσαρμογής ακολουθεί η εκθετική φάση κατά την οποία οι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται και πολλαπλασιάζονται με έναν μέγιστο σταθερό ρυθμό, για τα δεδομένα της καλλιέργειας, ο οποίος μπορεί να προσδιοριστεί πειραματικά σε προκαθορισμένα χρονικά διαστήματα. Στην φάση αυτή η αύξηση της συγκέντρωσης της βιομάζας είναι ανάλογη της αρχικής συγκέντρωσης της βιομάζας. Επειδή κάθε κύτταρο διαιρείται σε διαφορετική χρονική στιγμή από τα υπόλοιπα, η μορφή της καμπύλης ανάπτυξης είναι ομαλή χωρίς να παρατηρείται απότομη αύξηση. Χαρακτηρίζεται από έναν μέσο ρυθμό ανάπτυξης k , ο οποίος αντιστοιχεί στον αριθμό των γενεών ή στην μονάδα του χρόνου. Η λογαριθμική φάση είναι πάντα σύντομη σε διάρκεια, εκτός εάν διατηρείται η ταχέως διαιρούμενη καλλιέργεια με συνεχή προσθήκη θρεπτικών ουσιών και συνεχή απομάκρυνση των παραπροϊόντων (Engelkirk et al., 2011)

Στατική φάση (Stationary phase)

Καθώς τα θρεπτικά συστατικά του υγρού μέσου καταναλώνονται και η συγκέντρωση των τοξικών αποβλήτων από τα βακτήρια συσσωρεύονται, ο ρυθμός διαίρεσης επιβραδύνεται, έτσι ώστε ο αριθμός των βακτηρίων που διαιρούνται να ισούται με τον αριθμό των βακτηρίων που πεθαίνουν. Το αποτέλεσμα είναι η στάσιμη φάση. 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 στη στατική φάση για πολλούς λόγους. Ένας από αυτούς τους λόγους είναι η έλλειψη σημαντικών θρεπτικών υλικών από το μέσο καλλιέργειας ή η μείωση ενός σημαντικού παράγοντα θρέψης από το μέσο.

Στις περιπτώσεις αερόβιας καλλιέργειας το διαλυμένο οξυγόνο αποτελεί περιοριστικό παράγοντα για την ανάπτυξη, διότι μετά από κάποια στιγμή δεν επαρκεί για να

διατηρήσει την μικροβιακή καλλιέργεια σε ρυθμούς εκθετικής ανάπτυξης. Ένας άλλος παράγοντας που μπορεί να σταματήσει την ανάπτυξη είναι η συσσώρευση «τοξικών» μεταβολικών προϊόντων στο μέσο ανάπτυξης (εξωτοξίνες). Για παράδειγμα, οι στρεπτόκοκκοι μπορεί να παράγουν μεγάλες ποσότητες γαλακτικού οξέος το οποίο μειώνει το pH του διαλύματος με αποτέλεσμα να σταματήσει η περαιτέρω ανάπτυξη. Επίσης, βακτήρια με ικανότητα σχηματισμού ενδοσπορίων καταφεύγουν σε αυτό το μέσο προστασίας ως αντίδραση στο αντίξοο περιβάλλον (Engelkirk et al., 2011).

Φάση θανάτου (Death phase)

Η διαρκής μείωση των θρεπτικών συστατικών και η αύξηση τοξικών αποβλήτων στο μέσο ανάπτυξης οδηγούν την καλλιέργεια στη φάση θανάτου. Η καλλιέργεια μπορεί να πεθάνει τελείως ή κάποιοι μικροοργανισμοί μπορεί να συνεχίσουν να επιβιώνουν για μήνες, όπως για παράδειγμα τα σποριογόνα βακτήρια. Ο θάνατος, όπως και η ανάπτυξη των κυττάρων, είναι συνήθως λογαριθμικός. Αυτό σημαίνει πως σταθερό ποσοστό κυττάρων νεκρώνεται κάθε ώρα. Σε αυτή τη φάση μπορεί ορισμένα κύτταρα να μετατραπούν σε εκφυλισμένες μορφές. Επίσης άλλα μπορεί να πάρουν διάφορα σχήματα, να γίνουν μακριές νηματώδεις ράβδοι ή διακλαδισμένες ή σφαιρικές μορφές που είναι δύσκολο να αναγνωριστούν. Μπορεί επίσης να αναπτυχθούν χωρίς κυτταρικό τοίχωμα και αναφέρονται ως πρωτοπλάστες ή σφαιροπλάστες. Όλες αυτές οι περίπλοκες μορφές όταν εμβολιαστούν σε ένα φρέσκο θρεπτικό μέσο, συνήθως επανέρχονται στο αρχικό σχήμα των υγιών βακτηρίων (Engelkirk et al., 2011).

3.3 Αλυσιδωτή αντίδραση Πολυμεράσης Αντίστροφης Μεταγραφής (Real Time RT-PCR)

Τα τελευταία χρόνια, η προσέγγιση της μελέτης της μικροβιακής βιοποικιλότητας έχει αλλάξει δραματικά. Με την πρόοδο της μοριακής βιολογίας αναπτύχθηκε μια νέα σειρά τεχνικών που μπορούν να βοηθήσουν στην κατανόηση της μικροβιακής πολυπλοκότητας. Συνεπώς, οι παραδοσιακές μικροβιολογικές τεχνικές που βασίζονται στην καλλιέργεια και στην απομόνωση, υποστηρίζονται από νέες μεθόδους που βασίζονται στην ανάλυση των νουκλεϊκών οξέων για την ανίχνευση και τον χαρακτηρισμό των μικροοργανισμών (Cocolin et al., 2008). Οι τεχνικές μοριακής βιολογίας χρησιμοποιούνται όλο και πιο συχνά στην ανίχνευση δομών παθογόνων βακτηρίων στα τρόφιμα, που δεν μπορούν να ανιχνευτούν με συμβατικές μεθόδους που απαιτούν χρόνο και κόστος. Αυτές οι μοριακές τεχνικές έχουν αναπτυχθεί για την ταχεία ανίχνευση των παθογόνων και ορισμένες από αυτές είναι η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR) και η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (real time PCR). Η εφεύρεση της PCR από τον Kary Mullis το 1984 θεωρήθηκε επανάσταση στην επιστήμη. Η RT PCR, αποτελεί ένα κοινό εργαλείο για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό του προφίλ έκφρασης επιλεγμένων γονιδίων (Deerak et al., 2007). Έχει το πλεονέκτημα ότι είναι αποδοτική σε γρήγορο χρόνο, μειώνει τα ανθρώπινα σφάλματα, είναι εξειδικευμένη και σε σχέση με άλλες συμβατικές τεχνικές είναι πιο αποτελεσματική και οικονομική (Law et al., 2015). Είναι πολύ σημαντική, ιδιαίτερα στη βιομηχανία τροφίμων, καθώς μπορεί και ανιχνεύει άμεσα την παρουσία παθογόνων στα τρόφιμα, ακόμη και σε χαμηλά επίπεδα πληθυσμών.

Η PCR βασίζεται στη μέθοδο της αντιγραφής του DNA. Συγκεκριμένα, ανιχνεύει ειδικές αλληλουχίες DNA ή RNA στον παθογόνο στόχο, μέσω της υβριδοποίησης της αλληλουχίας του νουκλεϊκού οξέος του παθογόνου στόχου σε ένα συνθετικό ολιγονουκλεοτίδιο που είναι συμπληρωματικό της αλληλουχίας στόχου (Zhao et al., 2013). Με το ένζυμο πολυμεράση DNA, το οποίο αντιγράφει το γενετικό υλικό, η PCR επιτρέπει τη σύνθεση συγκεκριμένων θραυσμάτων DNA. Στη θέση που επιλέγεται να αρχίσει η σύνθεση, το μικρό θραύσμα (εκκινητής-primer) συνδέεται με έναν από τους κλώνους DNA στη συγκεκριμένη θέση, και το ένζυμο της πολυμεράσης συνθέτει μια συμπληρωματική αλληλουχία DNA. Ο ρόλος των εκκινητών είναι να περιορίζουν την αλληλουχία που θα πρέπει να πολλαπλασιαστεί, με σκοπό την ενίσχυση αυτής της αλληλουχίας με δισεκατομμύρια αντίγραφα (Mullis, 1990).

Τα τελευταία χρόνια, η Real Time PCR έχει εμφανιστεί ως μια μεγάλη καινοτομία και διαδραματίζει συνεχώς αυξανόμενο ρόλο στην έρευνα. Θεωρείται μια γρήγορη μέθοδος, με ακρίβεια και λεπτομέρεια στην ποσοτικοποίηση των νουκλεϊκών οξέων και δίνει ποιοτικά και ποσοτικά αποτελέσματα. Στα πλεονεκτήματά της περιλαμβάνονται η ευκολία ποσοτικοποίησης, η μεγαλύτερη ευαισθησία, η ακρίβεια, η ταχύτερη ανάλυση και ο χαμηλότερος κίνδυνος διασταυρούμενης επιμόλυνσης σε σχέση με την κλασική μέθοδο PCR (Valones et al., 2009). Πρόκειται για μια παραλλαγή της κλασικής PCR, με τη διαφορά ότι δεν απαιτείται ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης για να ανιχνευτούν τα προϊόντα PCR (Law et al., 2015). Η βασική καινοτομία της Real Time-PCR είναι ότι το παραγόμενο προϊόν μετράται με την ολοκλήρωση κάθε κύκλου μέσω φθορίζουσών χρωστικών που αποδίδουν αυξανόμενο σήμα απευθείας ανάλογο με τον αριθμό των παραγόμενων μορίων. Στα φθορίζοντα μόρια, ανήκουν χρωστικές που συνδέονται σε δίκλωνο DNA, ή μοριακές ετικέτες προσδεμένες σε PCR εκκινητές. Τα δεδομένα που συλλέγονται κατά την εκθετική φάση της αντίδρασης βοηθούν στον προσδιορισμό της αρχικής ποσότητας του στόχου και καθιστούν αυτή τη μέθοδο ποσοτική. Εάν μια συγκεκριμένη αλληλουχία είναι άφθονη σε κάποιο δείγμα, η ενίσχυση παρατηρείται νωρίτερα, δηλαδή σε μικρότερο αριθμό κύκλων. Συνεπώς, με την τεχνολογία της Real-Time PCR είναι εφικτή η παρακολούθηση της αντίδρασης όσο αυτή εξελίσσεται, γεγονός που δικαιολογεί και την ευρεία χρήση της για την ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης.

Παρόλα τα θετικά της μεθόδου, υπάρχουν κάποια βασικά μειονεκτήματα που την χαρακτηρίζουν. Στα κυριότερα μειονεκτήματά της περιλαμβάνονται ο ακριβός εξοπλισμός και τα αντιδραστήρια, καθώς και το γεγονός ότι όταν γίνεται χρήση της στη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης μπορεί να μην υπάρχει πάντα αντιστοιχία μεταξύ του μετρούμενου mRNA και της ποσότητας της πρωτεΐνης που τελικά παράγεται.

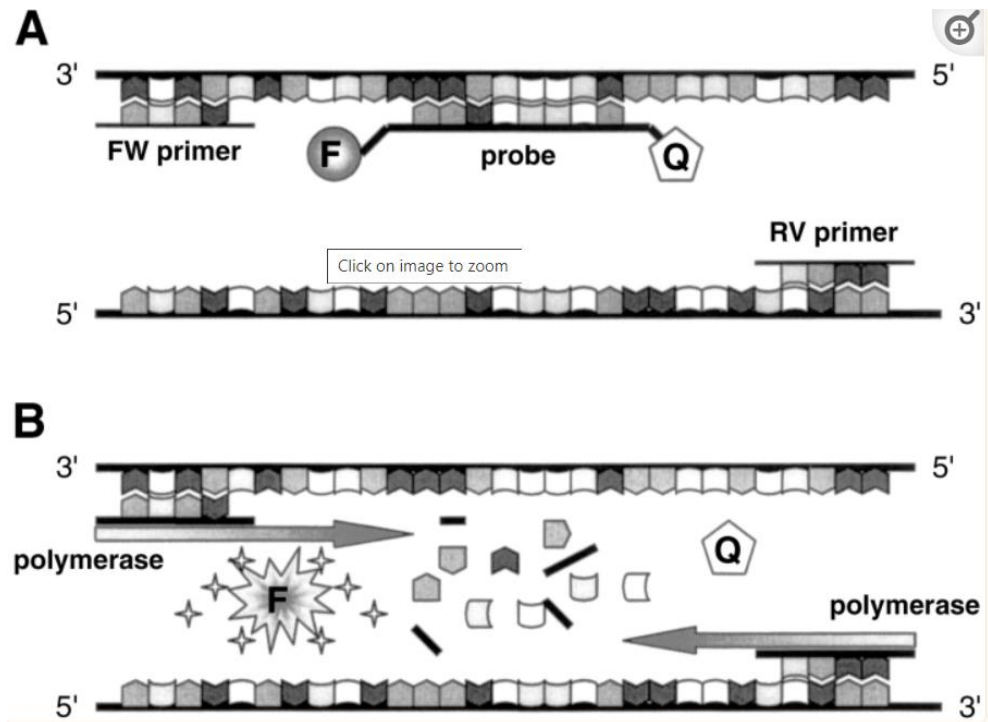
Σχετικά με τη διαδικασία της PCR, ως μητρικό μόριο χρησιμοποιείται ένα mRNA και με τη χρήση των κατάλληλων μορίων εκκινητών και του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφή δημιουργείται ο συμπληρωματικός κλώνος DNA (cDNA). Στη συνέχεια, το ένζυμο RNAση αποικοδομεί το μόριο mRNA και απομένει ο συμπληρωματικός κλώνος DNA που λειτουργεί ως το μητρικό μόριο στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης που ακολουθεί (Παραμυθιώτης, 2010).

Εάν εκτελείται μια αντίδραση ενός σταδίου, το RNA χρησιμοποιείται ως πρότυπο για την ανάλυση PCR σε πραγματικό χρόνο και λαμβάνει χώρα η αντίστροφη μεταγραφή κατά τη διάρκεια της ανάλυσης. Ωστόσο, εάν εκτελείται αντίδραση δύο σταδίων, το cDNA αρχικά συντίθεται και στη συνέχεια χρησιμοποιείται ως εκμαγείο για την PCR. Η PCR σε πραγματικό χρόνο απαιτεί ένα οπτικό σύστημα για να συλλάβει τον φθορισμό και έναν υπολογιστή με ένα ικανό λογισμικό να καταγράφει τα δεδομένα και να εκτελεί την τελική

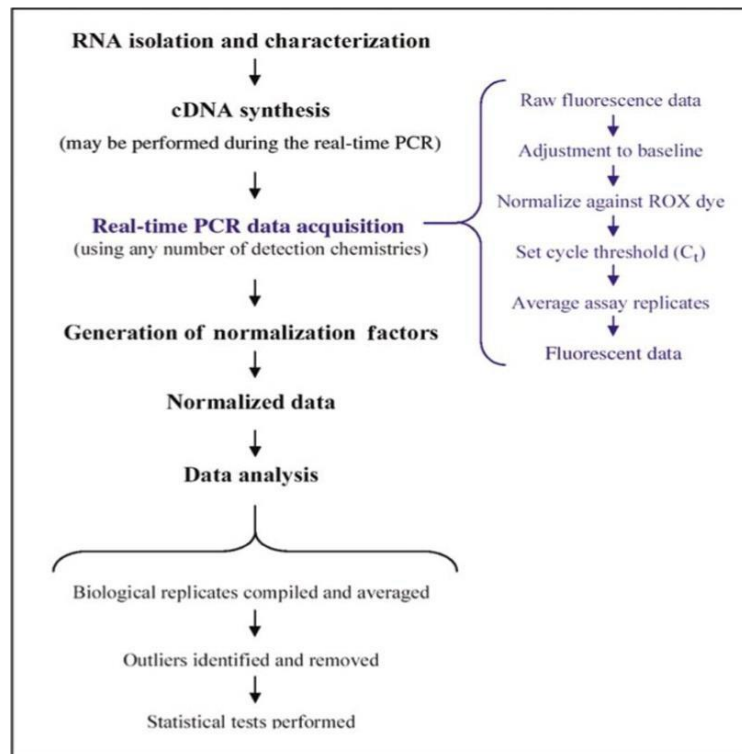
ανάλυση της αντίδρασης. Η εκπομπή φθορισμού δημιουργεί ένα σήμα το οποίο αυξάνεται σε αναλογία με την ποσότητα των προϊόντων PCR. Οι τιμές φθορισμού καταγράφονται κατά τη διάρκεια κάθε κύκλου και αντιπροσωπεύουν την ποσότητα του ενισχυμένου προϊόντος (Kubista et.al, 2006).

Οι μετρήσεις για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων της αντίδρασης PCR αφορούν την εκθετική φάση της αντίδρασης. Σημαντική παράμετρος για την ποσοτικοποίηση αποτελεί η τιμή Ct (threshold cycle). Είναι ο αριθμός των κύκλων της αντίδρασης που απαιτούνται ώστε η τιμή του παρατηρούμενου φθορισμού να προσεγγίζει ένα συγκεκριμένο όριο (threshold). Η τιμή Ct είναι αντιστρόφως ανάλογη της αρχικής ποσότητας του υποστρώματος, δηλαδή όσο μικρότερη είναι η τιμή Ct τόσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση του αρχικού υποστρώματος (Kubista et al., 2006).

Προκειμένου να εξασφαλιστεί η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων, πραγματοποιείται κανονικοποίηση με τη χρήση κατάλληλων γονιδίων «κυτταρικής οικονομίας» (housekeeping genes), τα οποία εκφράζονται θεωρητικά στα ίδια επίπεδα σε όλα τα κύτταρα του οργανισμού, ανεξαρτήτως πειραματικών συνθηκών. Με τον τρόπο αυτό κανονικοποιούνται διαφορές μεταξύ των διαφορετικών δειγμάτων cDNA που οφείλονται σε τεχνικούς και όχι σε βιολογικούς παράγοντες. Τα γονίδια αναφοράς είναι ένας εσωτερικός έλεγχος αντίδρασης που έχουν αλληλουχίες διαφορετικές από τον στόχο. Για να θεωρηθεί ένα γονίδιο αξιόπιστο γονίδιο αναφοράς πρέπει να πληροί διάφορα σημαντικά κριτήρια. Το πιο σημαντικό είναι ότι το επίπεδο έκφρασής του να μην επηρεάζεται από πειραματικούς παράγοντες. Επίσης, θα πρέπει να παρουσιάζει ελάχιστη μεταβλητότητα στην έκφρασή του μεταξύ ιστών και φυσιολογικών καταστάσεων του οργανισμού. Φαίνεται ότι την τέλεια εκπλήρωση αυτών των προϋποθέσεων αποτελούν τα γονίδια του βασικού μεταβολισμού (τα λεγόμενα Housekeeping Genes-HKGs), τα οποία εφόσον συμμετέχουν σε διαδικασίες απαραίτητες για την επιβίωση των κυττάρων, πρέπει εξ ορισμού να εκφράζονται σε σταθερό και μη ρυθμιζόμενο σταθερό επίπεδο και μάλιστα ήταν τα πρώτα που εξετάστηκαν ως γονίδια αναφοράς (Kozera and Rapacz, 2013).



Εικόνα 3.4: Α: Εκκινητές και ανιχνευτής συνδέονται με το γονίδιο-στόχο. Δεν παρατηρείται εκπομπή φθορισμού επειδή ο ανιχνευτής είναι ακόμη άθικτος. Β: Κατά τη διάρκεια της φάσης επέκτασης της αντίδρασης PCR, ο ανιχνευτής διασπάται από τη δραστικότητα της 5'-3' εξωνουκλεάσης της Taq πολυμεράσης, επιτρέποντας την εκπομπή φθορισμού.



Εικόνα 3.5: Διαδικασία Real Time PCR (Wong et al., 2005)

ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Ο όλο αυξανόμενος επιπολασμός της παχυσαρκίας σε συνδυασμό με την ευαισθητοποίηση των καταναλωτών για θέματα υγείας, έχουν οδηγήσει σε συνεχή αύξηση της κατανάλωσης τροφίμων χαμηλής ή μηδενικής θερμιδικής αξίας, τα οποία περιέχουν γλυκαντικές ουσίες. Η υποκατάσταση της ζάχαρης στα τρόφιμα έχει φανεί ότι επηρεάζει την ανάπτυξη των βακτηρίων και συνεπώς τις χαρακτηριστικές ιδιότητες των τροφίμων στα οποία προστίθενται. Ωστόσο, η επίδραση των γλυκαντικών στην λειτουργικότητα και την ασφάλεια των τροφίμων δεν έχει μελετηθεί αρκετά.

Η παρούσα μελέτη εστιάζει στην επίδραση διαφόρων κοινών γλυκαντικών στην ασφάλεια και λειτουργικότητα των τροφίμων. Συγκεκριμένα μελετήθηκε η μικροβιολογική ανάπτυξη του παθογόνου βακτηρίου *Listeria monocytogenes* και του οξυγαλακτικού προβιοτικού βακτηρίου *Lactobacillus pentosus*, παρουσία γλυκόζης και διαφόρων γλυκαντικών. Η ανάπτυξη των βακτηρίων αυτών μελετήθηκε μέσω της μεθόδου της οπτικής πυκνότητας (OD), και περιγράφηκε και ποσοτικά, με τον προσδιορισμό των κινητικών παραμέτρων.

Επίσης, υποβλήθηκαν και σε έλεγχο της γονιδιακής τους έκφρασης, ώστε να εξαχθεί συμπέρασμα για την γενετική τους λειτουργία. Διάφορα γονίδια επιλέχθηκαν που σχετίζονταν με την παθογένεια και την αίσθηση απαρτίας. Η έκφραση των γονιδίων αυτών μελετήθηκε με την τεχνική της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης Αντίστροφης Μεταγραφής σε πραγματικό χρόνο (RT-PCR), λαμβάνοντας δείγματα από επιλεγμένα χρονικά σημεία της καμπύλης ανάπτυξης των βακτηρίων.

Συνολικά, η μελέτη αυτή είναι μέρος του Ευρωπαϊκού προγράμματος «SWEET» και είχε ως σκοπό να εξετάσει την επίδραση διαφόρων γλυκαντικών στην μικροβιακή ανάπτυξη των επιλεγμένων βακτηρίων καθώς και τη γονιδιακή τους απόκριση.

4. ΥΛΙΚΑ - ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1 Ανανέωση / Έλεγχος καθαρότητας

Σχετικά με την συλλογή των στελεχών *Listeria monocytogenes* και *Lactobacillus pentosus* που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια του πειράματος, αυτή προήλθε από την τράπεζα των μικροοργανισμών του εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας τροφίμων του ΓΠΑ (Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιερά Οδός 75, Αθήνα), στην οποία βρίσκονταν αποθηκευμένες στην κατάψυξη (-80 °C) οι καλλιέργειες αυτών των στελεχών.

Προκειμένου να χρησιμοποιηθούν αυτοί οι μικροοργανισμοί στους εμβολιασμούς που πραγματοποιήθηκαν στο πείραμα, έπρεπε αρχικά να γίνεται μια πρώτη ανανέωσή τους. Συγκεκριμένα, πάρθηκε 1 ml από τα κύτταρα του παθογόνου στελέχους *Listeria Monocytogenes* της τράπεζας και έγινε έγχυση αυτής της ποσότητας σε δοκιμαστικό σωλήνα με 9 ml θρεπτικό ζωμό Tryptone Soy Broth (TSB, Lab M Limited) σε αναλογία 1 προς 10. Αντίστοιχη διαδικασία ακολουθήθηκε και με τα κύτταρα του οξυγαλακτικού βακτηρίου *Lactobacillus pentosus*, όπου έγινε έγχυση σε θρεπτικό ζωμό Man Rogosa and Sharpe Broth (MRS broth, Biolife - No 401729) πάλι σε αναλογία 1 προς 10. Στη συνέχεια οι δοκιμαστικοί σωλήνες με τους μικροοργανισμούς επώαστηκαν στους 37°C για 24 ώρες. Επίσης δημιουργήθηκαν και τρυβλία εργασίας, με θρεπτικά μέσα Tryptone Soy Agar (TSA, Biolife Italiana S.r.l, Milan) και MRS Agar (Lab M Limited), αντίστοιχα για την *Listeria* και το *L.pentosus*, τα οποίες ανανεώνονταν ανά δύο εβδομάδες.

Πίνακας 4.1. Στελέχη βακτηρίων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη

Κωδικός	Μικροοργανισμός	Προσδιορισμός	Συνθήκες ανάπτυξης
B-281	<i>Lactobacillus pentosus</i>	674	MRS medium, 30°C
B-128	<i>Listeria monocytogenes</i>	21085	Trypticase soy medium, 37°C

Ύστερα από την επώαση της πρώτης ανανέωσης, οι καλλιέργειες τοποθετήθηκαν στο ψυγείο για μελλοντική χρήση. Κάθε φορά που έπρεπε να γίνει εμβολιασμός για τις ανάγκες του πειράματος, γινόταν δεύτερη ανανέωση. Συγκεκριμένα, στην παρούσα μελέτη, από τα κύτταρα της 1ης ανανέωσης, σε θάλαμο νηματικής ροής υπό ασηπτικές συνθήκες, πάρθηκε ποσότητα 100 μl και μεταφέρθηκε σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε 9 ml υγρό θρεπτικό υπόστρωμα TSB για το είδος *Listeria* και υγρό θρεπτικό υπόστρωμα MRS για το είδος *Lactobacillus*. Η δεύτερη ανανέωση επώαστηκε στους 37°C για 18 ώρες και μετά έγινε χρήση της στον εμβολιασμό.

Για να διασφαλιστεί η καθαρότητα των ανανεώσεων που χρησιμοποιήθηκαν στους εμβολιασμούς, πραγματοποιήθηκε γραμμική (streaking) και επιφανειακή (spreading) επίστρωση σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό (TSA για την *Listeria monocytogenes* και MRS για το *Lactobacillus pentosus*), σε θάλαμο νηματικής ροής. Συγκεκριμένα, στα τρυβλία με το θρεπτικό υπόστρωμα, εξαπλώθηκαν με αποστειρωμένο κρίκο μικροβιακά κύτταρα απευθείας από την δεύτερη ανανέωση, καθώς επίσης επιστρώθηκαν και επιφανειακά με αποστειρωμένο τριγωνάκι 0.1 ml από τις δεκαδικές αραιώσεις 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} . Τα τρυβλία αυτά στη συνέχεια επώαστηκαν στους 37°C για 48 ώρες για την *L.monocytogenes* και στους 30°C για 72 ώρες για το *L.pentosus*.

4.2 Προετοιμασία Γλυκαντικών

Για τον υπολογισμό της απαραίτητης ποσότητας για την προετοιμασία των γλυκαντικών χρησιμοποιήθηκε ο πίνακας της σχετικής γλυκύτητας των γλυκαντικών σε σχέση με τη σουκρόζη, που αναλύθηκε στο κεφάλαιο 1 της Εισαγωγής (πίνακας 1.1). Στην παρούσα μελέτη μελετήθηκαν τα γλυκαντικά (γλυκόζη και γλυκαντικά) σε συγκεντρώσεις 2,5% και 10%. Για την παρασκευή των συγκεντρώσεων αυτών πραγματοποιήθηκε αρχικά ζύγιση της απαιτούμενης ποσότητάς των γλυκαντικών σε ζυγό ακριβείας με την χρήση κωνικής φιάλης και στη συνέχεια συμπληρώθηκε με την απαραίτητη ποσότητα θρεπτικού υλικού. Στην περίπτωση του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*, η κωνική φιάλη συμπληρώθηκε με Nutrient Broth χωρίς γλυκόζη, ενώ στην περίπτωση του οξυγαλακτικού βακτηρίου *Lactobacillus pentosus* συμπληρώθηκε με MRS Broth.



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

4.2.1 Φιλτράρισμα γλυκαντικών

Αφού προετοιμάστηκαν οι απαραίτητες ποσότητες των γλυκαντικών, ακολούθησε το φιλτράρισμα αυτών με διπλή διήθηση (1° και 2° φιλτράρισμα) μέσω φίλτρου με διάμετρο πόρων $0,22\ \mu\text{m}$, ώστε να αποφευχθεί η μικροβιακή επιμόλυνση αυτών. Η ποσότητα των

γλυκαντικών που παρασκευάστηκε μεταφέρθηκε σε falcon των 50 ml. Στη συνέχεια με τη χρήση σύριγγας και φίλτρου διήθησης, φιλτραρίστηκε η μισή ποσότητα (25 ml). Συγκεκριμένα, με τη σύριγγα πάρθηκε η απαραίτητη ποσότητα (περίπου 3 ml τη φορά), αφαιρέθηκε η βελόνα, συνδέθηκε η σύριγγα με το φίλτρο και έγινε σιγά σιγά η απόσταξη των 25 ml σε καινούργιο αποστειρωμένο falcon. Το ίδιο έγινε και με την άλλη μισή ποσότητα που έχει απομείνει στο αρχικό falcon. Σε κάθε 25 ml έγινε αλλαγή στο φίλτρο. Στην περίπτωση που είχαμε 100 ml, έγινε επανάληψη 4 φορές συνολικά το πρώτο φιλτράρισμα. Αφού έγινε το 1^ο φιλτράρισμα, από τα falcon αυτά με τις φιλτραρισμένες ποσότητες των 25 ml των γλυκαντικών ξεκίνησε το 2^ο φιλτράρισμα. Τα πρώτα 25 ml φιλτραρίστηκαν ακριβώς με το ίδιο τρόπο (όπως στο 1^ο φιλτράρισμα) σε νέο falcon. Τα υπόλοιπα 25 ml φιλτραρίστηκαν σε vial των 2 ml. Στη περίπτωση των 100 ml γλυκαντικού, έγινε 3 φορές το 2^ο φιλτράρισμα σε falcon και 1 φορά σε vial των 2 ml.

4.3 Οπτική πυκνότητα (OD) – Προσδιορισμός της κινητικής ανάπτυξης

Ένας τρόπος για τον προσδιορισμό της κινητικής ανάπτυξης των μικροοργανισμών του πειράματος, ήταν μέσω υπολογισμού της OD, με ειδικό μηχάνημα μέτρησης της OD. Στο μηχάνημα αυτό εισάγονται ειδικές πλάκες (microplates) στις οποίες έχει γίνει εμβολιασμός με τους μικροοργανισμούς. Αυτές οι πλάκες παραμένουν για κάποιο χρονικό διάστημα στο μηχάνημα μέχρι να ολοκληρωθούν οι μετρήσεις. Για να ξεκινήσει το μηχάνημα αυτό τις μετρήσεις, πρέπει η θερμοκρασία του να φτάσει τους 37°C και αφού ξεκινήσει λαμβάνει μετρήσεις με συχνότητα 10 λεπτά. Ως εναρκτήριο επίπεδο πληθυσμού κυττάρων ορίστηκαν τα 10² cfu/mL, ενώ ως ανώτατο πληθυσμιακό όριο τα 10⁹ cfu/mL. Το microplate που εμβολιάστηκε με *Listeria monocytogenes* παρέμεινε στο μηχάνημα για 24 ώρες, ενώ το microplate με *Lactobacillus pentosus* έμεινε στο μηχάνημα για 96 ώρες (4 ημέρες). Αφού περάσει ο χρόνος παραμονής των microplates στο μηχάνημα, εξάγονται τα δεδομένα μέσω του προγράμματος GEN5 Software.



Εικόνα 4.2: Μηχάνημα μέτρησης της οπτικής πυκνότητας

4.3.1 Εμβολιασμός πλάκας μικροτιλοδότησης (microplate)

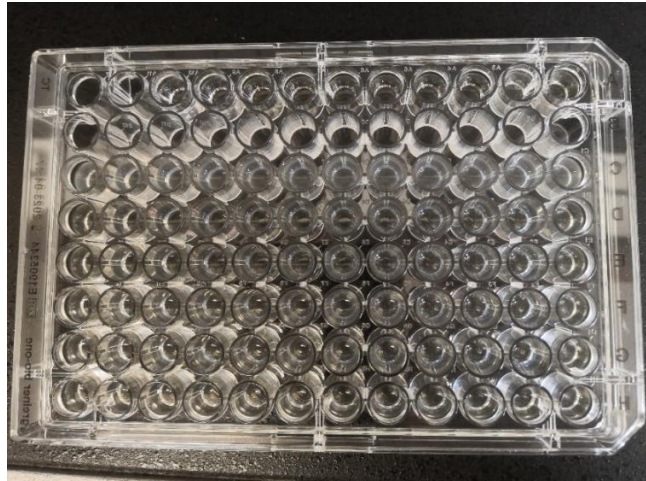
Αρχικά έγινε η συλλογή και η προετοιμασία όλων των υλικών που απαιτούνταν για τον εμβολιασμό των πλακών. Η πρώτη διαδικασία ήταν η δημιουργία των δειγμάτων των γλυκαντικών στις απαιτούμενες συγκεντρώσεις. Σε άδεια αποστειρωμένα φιαλίδια (Eppendorf) των 2 ml καταγράφηκε επάνω τους η συγκέντρωση που μελετήθηκε κάθε

φορά (2,5% ή 10%) καθώς και το όνομα του γλυκαντικού που προστέθηκε στο microplate, και στη συνέχεια αυτά τοποθετήθηκαν σε στατό. Επίσης, τοποθετήθηκαν στο στατό και σωλήνες φυγοκέντρησης (falcon) των 50 ml με τα υποστρώματα (NB για τη *Listeria Monocytogenes* (B-128) και MRS για το *Lactobacillus pentosus*(B-281)) καθώς και ένα σωληνάκι με διάλυμα Ringer (LABM - LAB100Z). Στη συνέχεια, τοποθετήθηκαν στα erpendorfs συγκεκριμένες ποσότητες υγρού υποστρώματος και γλυκαντικών, ανάλογα με την αρχική συγκέντρωση των γλυκαντικών. Η αντβαντάμη (ADV) χαρακτηρίζεται από υψηλότερη συγκέντρωση (70%) σε σχέση με τα άλλα γλυκαντικά, οπότε οι ποσότητες του υγρού υποστρώματος και του γλυκαντικού που προστέθηκαν στο erpendorf ήταν διαφορετικές από αυτές των υπολοίπων γλυκαντικών. Μόλις όλα τα δείγματα των γλυκαντικών στα erpendorf παρασκευάστηκαν, αναδεύτηκαν με vortex.

Όταν η διαδικασία της προετοιμασίας ολοκληρώθηκε, ξεκίνησε η διαδικασία της φόρτωσης της πλάκας (microplate). Με πολυπιπέτα μεταβλητού όγκου, μεταφέρθηκε ποσότητα 180 ml από κάθε γλυκαντικό στα κελιά της πλάκας, βάση του σχεδιαγράμματος που σχηματίστηκε κατά την προετοιμασία.

Μετά την φόρτωση της απαιτούμενης ποσότητας του κάθε γλυκαντικού στα κελιά, παρασκευάστηκε το εμβόλιο. Συγκεκριμένα, από την 2^η ανανέωση των μικροοργανισμών που ήδη είχαν επωαστεί τις απαραίτητες ώρες στις σωστές θερμοκρασίες, πάρθηκε 1 ml από αυτήν την ανανέωση σε θάλαμο νηματικής ροής και προστέθηκε σε δοκιμαστικό σωλήνα με 9 ml Ringer. Αυτή πρόκειται για την πρώτη αραιώση και στη συνέχεια ακολούθησαν άλλες 6 διαδοχικές αραιώσεις (συνολικά έγιναν οι αραιώσεις από 10^{-1} έως 10^{-7}). Από την αραιώση 10^{-6} λήφθηκε με πιπέτα ποσότητα εμβολίου 20 ml και τοποθετήθηκε ασηπτικά και με ακρίβεια στα κελιά με τα γλυκαντικά. Στα κελιά ελέγχου (blank-control), αντί να προστεθεί ο απαραίτητος μικροοργανισμός, προστέθηκε 20 μl διαλύματος Ringer.

Αφού ολοκληρώθηκε και ο εμβολιασμός των κελιών, έγινε ένας γρήγορος έλεγχος ότι τα κελιά είχαν ίδια ποσότητα συνολικού δείγματος, εφαρμόστηκε ένα αυτοκόλλητο προστασίας και το πλαστικό κάλυμμα και τοποθετήθηκε η πλάκα στο μηχάνημα μέτρησης της οπτικής πυκνότητας.



Εικόνα 4.3: Ενδεικτική πλάκα μικροτιτλοδότησης (microplate)

Η διαδικασία αυτή οδήγησε στον προσδιορισμό του μέγιστου ειδικού ρυθμού αύξησης (μ_{max}) του κάθε στελέχους για το κάθε είδος και συγκέντρωση γλυκαντικού. Ο μέγιστος ρυθμός ειδικής αύξησης υπολογίστηκε με τις μετρήσεις της οπτικής πυκνότητας (OD) από τους χρόνους ανίχνευσης της μεταβολής της απορρόφησης (detection times, DTs), των διαδοχικών αραιώσεων των καλλιεργειών.

Χρησιμοποιώντας την προσέγγιση των δεκαδικών αραιώσεων, οι χρόνοι ανίχνευσης DTS (h) από τις πέντε διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις της καλλιέργειας του κάθε στελέχους σχεδιάστηκαν έναντι του φυσικού λογαρίθμου της αρχικής βακτηριακής συγκέντρωσης ($\ln cfu / well$), και οι τιμές μ_{max} υπολογίστηκαν με γραμμική παλινδρόμηση σύμφωνα με την ακόλουθη εξίσωση:

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

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

Οι συγκεντρώσεις (2.5% και 10%) που μελετήθηκαν με το μηχάνημα της οπτικής πυκνότητας μελετήθηκαν και με τη μέθοδο των τρυβλίων με σκοπό να επαληθευτούν οι φάσεις μικροβιακής ανάπτυξης των δύο μικροοργανισμών. Αυτό έγινε διότι κατά την επεξεργασία των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από την μέθοδο μέτρησης της οπτικής πυκνότητας (OD), παρατηρήθηκε ότι τα αποτελέσματα αυτά δεν συμπίπτουν απόλυτα με την μικροβιακή ανάπτυξη του κάθε μικροοργανισμού που μελετήθηκε.

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 (λ) και μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης (μ_{max})) για τον παθογόνο μικροοργανισμό *Listeria monocytogenes* και το οξυγαλακτικό βακτήριο *Lactobacillus pentosus*, σύμφωνα με το ευρέως χρησιμοποιούμενο πρωτογενές μοντέλο μικροβιακής ανάπτυξης, το μηχανιστικό μοντέλο των Baranyi και Roberts (1994). Οι εξισώσεις που περιλαμβάνει το μοντέλο αυτό παρατίθενται παρακάτω:

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

όπου:

T	Ο χρόνος t σε ώρες
y (t)	Ο πληθυσμός τη χρονική στιγμή t
y₀	Ο αρχικός πληθυσμός
μ_{max}	Ο μέγιστος αριθμός αύξησης
y_{max}	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

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

όπου,

N	Παράμετρος που χαρακτηρίζει τον ρυθμό αύξησης του κρίσιμου υποστρώματος, θεωρείται ίση με μ _{max}
h₀	Παράμετρος που χαρακτηρίζει το έργο που απαιτείται για να προσαρμοστούν οι μικροοργανισμοί στο νέο περιβάλλον

Στην παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη, το μοντέλο αυτό αναπτύχθηκε μέσω ενός πρόσθετου προγράμματος του Excel (DMfit), με το οποίο υπολογίζονται εύκολα οι κινητικές παράμετροι ανάπτυξης στις διάφορες συνθήκες που μελετήθηκαν στο πείραμα.

Αφού ολοκληρώθηκε η διαδικασία των μετρήσεων στο μηχάνημα της οπτικής πυκνότητας, ακολούθησε η συγκέντρωση των δεδομένων με σκοπό την στατιστική τους ανάλυση και συγκεκριμένα με την ανάλυση διασποράς με έναν παράγοντα (One-Way ANOVA). Για την πραγματοποίηση αυτής της στατιστικής ανάλυσης χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Statgraphics (Ink, Statgraphics Technologies).

One-Way ANOVA

Για τη στατιστική ανάλυση της επίδρασης των κατηγορικών παραγόντων έγινε μια ανάλυση διακύμανσης και συγκεκριμένα ανάλυση διασποράς με ένα παράγοντα. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για να προσδιοριστεί αν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων όρων (means), των διαμέσων (medians) και των τυπικών αποκλίσεων (standard deviation) δύο ή περισσότερων ανεξάρτητων (μη συνδεδεμένων) ομάδων. Ανάλογα με το είδος της ανάλυσης που γίνεται κάθε φορά, προσδιορίζονται είτε οι παράγοντες που παίζουν σημαντικό ρόλο στην απόκριση είτε το μέρος της μεταβλητότητας που αποδίδεται στον κάθε παράγοντα.

Η στατιστική ανάλυση ANOVA δείχνει αν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα δεδομένα (Pvalue ≤ 0.05), όταν γίνεται η σύγκριση των μέσων.

Για να πραγματοποιηθεί η στατιστική ανάλυση ANOVA, απαιτούνται 3 προϋποθέσεις. Πρώτον τα δεδομένα πρέπει να ακολουθούν κανονική κατανομή (normal distribution). Δεύτερον τα δεδομένα πρέπει να έχουν ίδιες διακυμάνσεις (equal variances). Και τρίτον να υπάρχουν ανεξάρτητες παρατηρήσεις (independent observations), η οποία προϋπόθεση τηρείται πάντα. Με το variance test ελέγχω αν τηρείται η δεύτερη προϋπόθεση. Αν $p > 0.05$ τότε τηρείται η δεύτερη συνθήκη. Αν $p < 0.05$ τότε δεν τηρείται η δεύτερη συνθήκη και γίνονται τα Welch test, Robust test και στη συνέχεια Game-Howell Post Hoc, ώστε οι στατιστικές διαφορές να είναι σημαντικές για όλες τις δοκιμές ($P \leq 0,05$). Αν δεν τηρείται η πρώτη συνθήκη πραγματοποιείται το test Kruskal-Wallis. Η ανάλυση μεταξύ ποιων συγκεκριμένων παραγόντων υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά πραγματοποιείται με τα multiple range tests.

4.4 Μελέτη μικροβιολογικής αύξησης μέσω πρότυπης καμπύλης

Η μικροβιολογική αύξηση των μικροοργανισμών του πειράματος μελετήθηκε επίσης μέσω σχεδιασμού πρότυπων καμπυλών ανάπτυξης με απαρίθμηση του πληθυσμού των μικροοργανισμών στα διάφορα σημεία ανάπτυξης που επιλέχθηκαν.

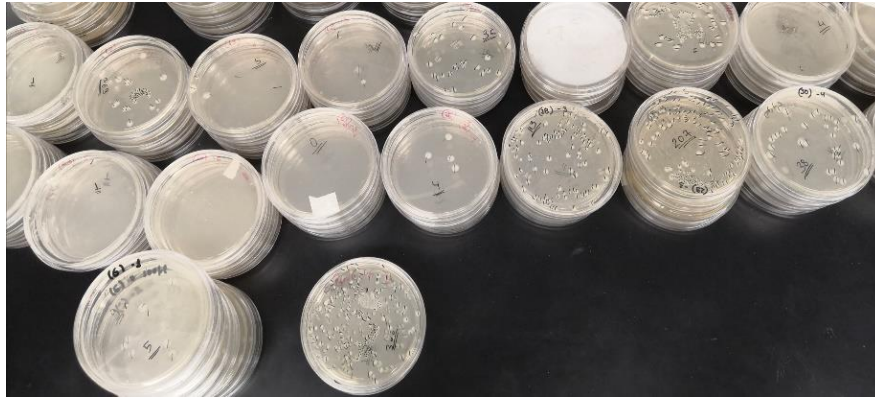
Η κινητική αύξησης του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* και του γαλακτικού βακτηρίου *Lactobacillus pentosus* μελετήθηκε με βάση την συμπεριφορά ανάπτυξης των μικροοργανισμών παρουσία θρεπτικού υποστρώματος και γλυκόζης ή κάποιου γλυκαντικού που παρατηρήθηκε μεγάλη απόκλιση σε σχέση με την μέτρηση οπτικής πυκνότητας. Πιο συγκεκριμένα μελετήθηκε η κινητική αύξησης του παθογόνου μικροοργανισμού σε υπόστρωμα NB (glucose free - Nutrient Broth) με παρουσία γλυκόζης ή γλυκαντικού (2.5% ή 10% w/v) ή απουσία γλυκόζης ή γλυκαντικού. Η κινητική αύξησης του γαλακτικού βακτηρίου μελετήθηκε σε υπόστρωμα MRS (glucose free - MRS) στις ίδιες συγκεντρώσεις γλυκόζης. Μετά την παρασκευή των μέσω ανάπτυξης στα falcon, αποστειρώθηκαν και μετρήθηκε το pH τους ώστε να έχει την επιθυμητή τιμή. Στα θρεπτικά υποστρώματα με συγκέντρωση γλυκόζης 10% παρατηρήθηκε ότι το pH ήταν πολύ χαμηλό μετά την αποστείρωση σε σχέση με το επιθυμητό ($pH = 7$). Γι' αυτό το λόγο προστέθηκαν με ασηπτικές συνθήκες, σταγόνες KOH για την αύξηση του pH στο επιθυμητό επίπεδο.

Μετά την προετοιμασία των θρεπτικών υποστρωμάτων ακολούθησε ο εμβολιασμός τους με τους μικροοργανισμούς του πειράματος. Συγκεκριμένα, είχε ήδη γίνει δεύτερη ανανέωση των μικροοργανισμών, από την οποία έγιναν διαδοχικές 7 αραιώσεις. Από την αραιώση 10^{-6} πάρθηκε ποσότητα με την οποία έγινε ο εμβολιασμός των θρεπτικών υποστρωμάτων (συγκεκριμένα πάρθηκε ποσότητα 1/10 της συνολικής ποσότητας του τελικού διαλύματος). Τα falcon με τα εμβολιασμένα πλέον υποστρώματα επωάστηκαν στους 37°C για τις απαιτούμενες ώρες.

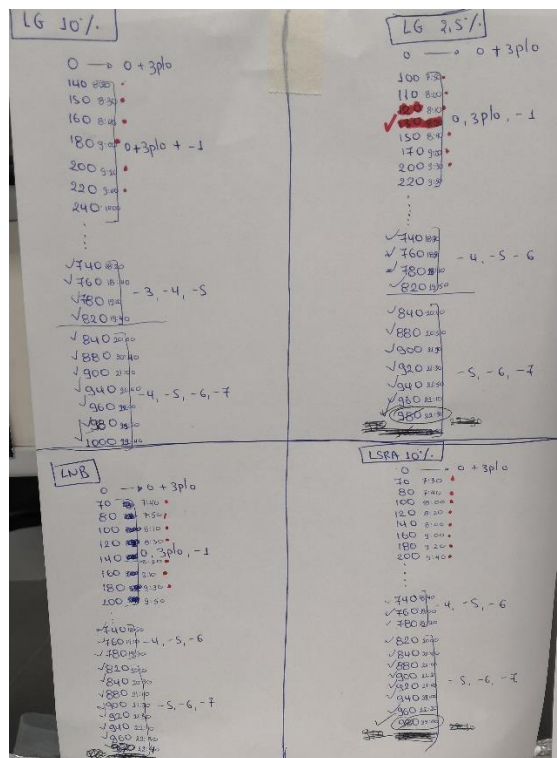
Μετά την επώαση ακολούθησε δειγματοληψία και επίστρωση ποσότητας των μικροοργανισμών σε τρυβλία ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Συγκεκριμένα, κάθε στιγμή της δειγματοληψίας πραγματοποιούνταν διαδοχικές αραιώσεις και γινόταν η επίστρωση στα τρυβλία από την απαιτούμενη αραιώση. Αρχικά, τις πρώτες ώρες οι δειγματοληψίες γινότουσαν ανά 10-20 λεπτά, ώστε να προκύψει ξεκάθαρο αποτέλεσμα και να αποτυπωθούν όσο καλύτερα η φάση προσαρμογής και η εκθετική φάση ανάπτυξης. Τις επόμενες ώρες οι δειγματοληψίες γινότουσαν ανά 30-60 λεπτά, μιας και οι μικροοργανισμοί ήταν ήδη στην εκθετική φάση και άρχιζαν να μπαίνουν στην στατική φάση. Τα τρυβλία για την ανάπτυξη της *Listeria monocytogenes* με TSA υπόστρωμα

επώστηκαν στους 37°C για 48 ώρες, ενώ τα τρυβλία με *Lactobacillus pentosus* και υπόστρωμα MRS επώστηκαν στους 30°C για 72 ώρες.

Αφού ολοκληρώθηκε η επώσσή τους, έγινε καταμέτρηση των αποικιών τους την κάθε χρονική στιγμή που είχε γίνει δειγματοληψία και οι αποικίες αυτές μεταφράστηκαν σε log cfu / mL.



Εικόνα 4.4: Καταμέτρηση τρυβλίων μετά την επώσσή τους



Εικόνα 4.5: Σημεία δειγματοληψίας για δημιουργία πρότυπων καμπυλών

4.5 Μοριακές τεχνικές – Έκφραση Γονιδίων

4.5.1 Απομόνωση RNA (RNA extraction)

Με σκοπό την απομόνωση του RNA από τον παθογόνο μικροοργανισμό *Listeria monocytogenes*, έγινε χρήση του πρωτοκόλλου που περιλαμβάνεται στο εμπορικό κιτ Monarch® Total RNA Miniprep (New England Biolabs® U.S).

Πριν ξεκινήσει η διαδικασία, είχε προηγηθεί ήδη η λήψη δειγμάτων για την απομόνωση RNA από μικροβιολογικά σημεία (χρόνοι) που είχαν επιλεγεί για τη *Listeria* 2.5% (πχ σημεία για γλυκόζη: 0, 100, 450, 880 και για γλυκαντικά: 0, 70, 100, 450, 840, 880) και για τη *Listeria* 10% (σημεία για γλυκόζη: 0, 140, 160, 540, 940, 1000 και για γλυκαντικά: 0, 100, 450, 840, 880). Τα δείγματα αυτά συλλέχτηκαν σε erpendorf του 1 mL τα οποία αποθηκεύτηκαν στους -80°C.

Κατά τη διαδικασία της απομόνωσης του RNA, τα erpendorf μεταφέρονται από τους -80°C σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά στις 8000 στροφές στους 4°C, ώστε να διαχωριστεί η βιομάζα από το υπερκείμενο. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε με χρήση πιπέτας και προστέθηκε 1 mL Ringer. Μετά ξαναέγινε φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες και απομακρύνθηκε πάλι το υπερκείμενο. Προστέθηκε 1 mL από το αντιδραστήριο σταθεροποίησης DNA/RNA Protection Reagent του κιτ και τα erpendorf αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

Πιο αναλυτικά, αρχικά υπολογίστηκε η ποσότητα του αντιδραστηρίου Reagent που απαιτείται για την προσθήκη στα δείγματα και γίνεται αραιώση της ποσότητας 2X προς 1X με προσθήκη νερού. Στη συνέχεια, πάρθηκαν τα δείγματα από την κατάψυξη και έγινε λύση των κυττάρων με συσκευή υπερήχων. Πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρησή τους στα 16.000g για 2 λεπτά στους 22°C και το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε καθαρό erpendorf, στο οποίο προστέθηκε διάλυμα RNA Lysis buffer σε ίσο όγκο και έγινε ανάδευση με vortex. Από αυτά καινούργια δείγματα πάρθηκαν 800 μL και προστέθηκαν σε στήλες αφαίρεσης GDNA οι οποίες είχαν φίλτρα επάνω τους. Οι στήλες φυγοκεντρήθηκαν στα 16.000g για 30 δευτερόλεπτα, ώστε να συλλεχθεί το μεγαλύτερο μέρος του GDNA και στη συνέχεια απορρίφθηκαν. Στα δείγματα που φιλτραρίστηκαν και περιείχαν πλέον μικρές ποσότητες RNA προστέθηκε ίσος όγκος αιθανόλης 95% και αναδεύτηκαν με πιπέτα. Αυτά μεταφέρθηκαν σε καινούργιες στήλες συλλογής εφοδιασμένες με φίλτρο. Έγινε φυγοκέντρησή τους πάλι για 2 λεπτά στα 16.000g στους 22°C και απορρίφθηκε το υπερκείμενο. Προστέθηκε ίσος όγκος διαλύματος buffer wash για να γίνει πλύση των κυττάρων, φυγοκεντρήθηκαν ξανά και απομακρύνθηκε το υπερκείμενο. Σε ένα άλλο erpendorf φτιάχνω ένα διάλυμα με 75 μL DNase buffer 5 μL DNase 1, το οποίο έπαιξε ρόλο στην ενζυματική απομάκρυνση του υπολειπόμενου GDNA. Από αυτή την ποσότητα μεταφέρθηκε με πιπέτα ορισμένη ποσότητα στα δείγματα που φυγοκεντρήθηκαν και αυτά παρέμεινα σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά. Μετά, προστέθηκαν 500 μL priming buffer (ρυθμιστικό διάλυμα) και έγινε φυγοκέντρησή τους για 30 δευτερόλεπτα και απομακρύνθηκε το υπερκείμενο. Στη συνέχεια προστέθηκαν 500 μL RNA wash buffer, έγινε ξανά φυγοκέντρηση και απορρίφθηκε το υπερκείμενο. Προστέθηκαν ξανά άλλα 500 μL wash buffer και έγινε φυγοκέντρηση για 2 λεπτά. Στη συνέχεια, τα φίλτρα που συγκρατούσαν τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε καθαρά erpendorf και προστέθηκαν 30-100 μL νερό και έγινε φυγοκέντρησή τους για 30 δευτερόλεπτα. Τα τελικά δείγματα RNA τοποθετήθηκαν καθόλη τη διαδικασία απομόνωσης RNA σε πάγο και στο τέλος στους -

20°C για λιγότερο από μια βδομάδα με σκοπό τη βραχυπρόθεσμη χρήση τους ή στους -80°C με σκοπό την μακροχρόνια χρήση τους.

Τα δείγματα αυτά φωτομετρήθηκαν, και υπολογίστηκαν οι λόγοι A260/A280 και A260/A230 και από αυτούς τους λόγους οι τιμές των A230 A260, A280.



Εικόνα 4.6: Eppendorfs με τη βιομάζα των κυττάρων από τα διάφορα χρονικά σημεία



Εικόνα 4.7 και 4.8: Απεικόνιση της διαδικασίας των μοριακών τεχνικών

4.5.2 Μετατροπή του RNA σε cDNA

Για τη μετατροπή του RNA σε cDNA, έγινε χρήση του πρωτοκόλλου LunaScript RT SuperMix μέσω μιας σειράς διαδικασιών RT-qPCR δύο σταδίων. Έτσι συντέθηκε ο πρώτος κλώνος cDNA, ο οποίος αποθηκεύτηκε στους -20°C μέχρι την στιγμή που θα γινόταν η επεξεργασία του.

4.5.3 Real Time PCR

Η αντίδραση της Real Time PCR έγινε με τη χρήση microplate 96 κελιών με το σύστημα ανίχνευσης StepOnePlus (Applied Biosystems) χρησιμοποιώντας δίκλωνο παράγοντα φθορισμού SYBR green για ανίχνευση προϊόντος. Σε κάθε κελί προστέθηκε Luna Universal qPCR master mix (New England Biolabs, US), 250 nM από κάθε εκκινητή για το κάθε γονίδιο και 1 μL πρότυπο διάλυμα. Στο microplate υπήρχαν και δείγματα αναφοράς (control-έλεγχος χωρίς RNA) με σκοπό την ανίχνευση πιθανής μόλυνσης. Τα δείγματα αυτά (NoRT PCR) χρησιμοποιήθηκαν για να διαπιστωθεί η παρουσία γενετικού υλικού και το δείγμα RT PCR για να εξακριβωθεί η καθαρότητα των master mix. Στη συνέχεια ξεκίνησε η διαδικασία της PCR αντίδρασης αρχικά στους 95°C για 60 sec, ακολουθούμενη από 40 κύκλους στους 95°C για 15 sec και στους 60°C για 30 sec.

Με τις καμπύλες τήξης οι οποίες προέκυψαν ύστερα από θέρμανση των δειγμάτων 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, διαπιστώθηκε η εξειδίκευση της διαδικασίας της real time PCR. Με τη χρήση του λογισμικού StepOne 2.1 (Applied Biosystems), αναλύθηκαν οι καμπύλες τήξης. Για την κάθε περίπτωση αναλύθηκαν τρία τεχνικά αντίγραφα και κανονικοποιήθηκαν έναντι των housekeeping γονιδίων (16S Rrna για τη Listeria).

Σχετικά με την ανάλυση και επεξεργασία των δεδομένων, έγινε χρήση της συγκριτικής μεθόδου Ct (2-ΔΔCt) για την αξιολόγηση των αλλαγών στα επίπεδα έκφρασης mRNA μεταξύ του μάρτυρα (γλυκόζη) και των γλυκαντικών, όπου:

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

Συνολικά, 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 (Desroche et al. 2005).

Πίνακας 4.2: Γονίδια που μελετήθηκαν με Real Time PCR και οι αντίστοιχοι εκκινητές τους

Γονίδιο	Forward Primer	Reverse Primer	Primer Source
Hly	TCTCCGCCTGCAAGTCCTA	TCGATTTTCATCCGCGTGTT	Upadhaya et al., 2012
agrA	CGGGTACTTGCCTGTATGAA	TGAATAGTTGGCGCTGTCTC	Pieta et al., 2014
16S rRNA	TGGCGGACGGGTGAGTA	CCGGAGTTATCCCCAACTTACA	Upadhaya et al., 2012

5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5.1 Κινητική ανάπτυξης των μικροοργανισμών μέσω μελέτης οπτικής πυκνότητας (OD)

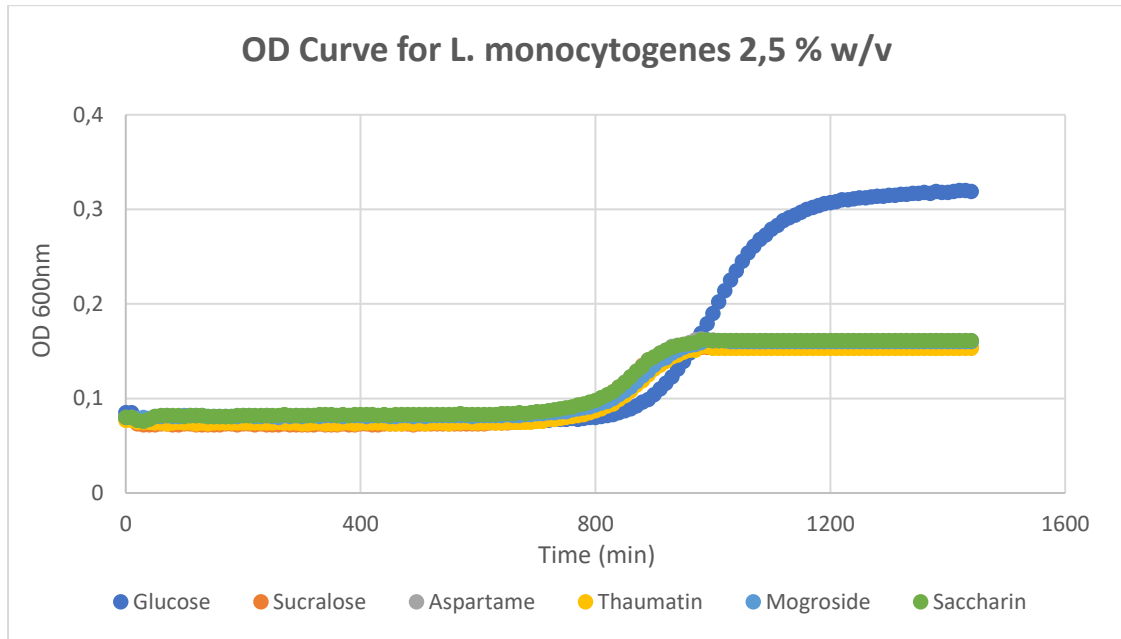
Ύστερα από το πέρας της διαδικασίας μέτρησης της OD με το μηχάνημα OD, συλλέχτηκε ένα μεγάλο εύρος δεδομένων από το λογισμικό τα οποία περάστηκαν στο υπολογιστή και επεξεργάστηκαν με την πρόσθετη λειτουργία του Excel (DmFit). Μέσω των πειραματικών αυτών δεδομένων προέκυψαν καμπύλες ανάπτυξης για τον παθογόνο μικροοργανισμό *Listeria monocytogenes* και για το γαλακτικό βακτήριο *Lactobacillus pentosus*. Με το μοντέλο ανάπτυξης Baranyi και Roberts προέκυψαν από τις καμπύλες ανάπτυξης οι παρακάτω κινητικοί παράμετροι ανάπτυξης.

- 1) T_{det}: είναι ο χρόνος (σε λεπτά) που απαιτείται για να προκύψουν αλλαγές της οπτικής πυκνότητας στο μέσο ανάπτυξης
- 2) MSrODC: είναι η μέγιστη κλίση (ρυθμός αλλαγών οπτικής πυκνότητας) (min^{-1}). Είναι στην ουσία η αλλαγή της κλίσης της σιγμοειδούς καμπύλης κατά την εκθετική φάση.

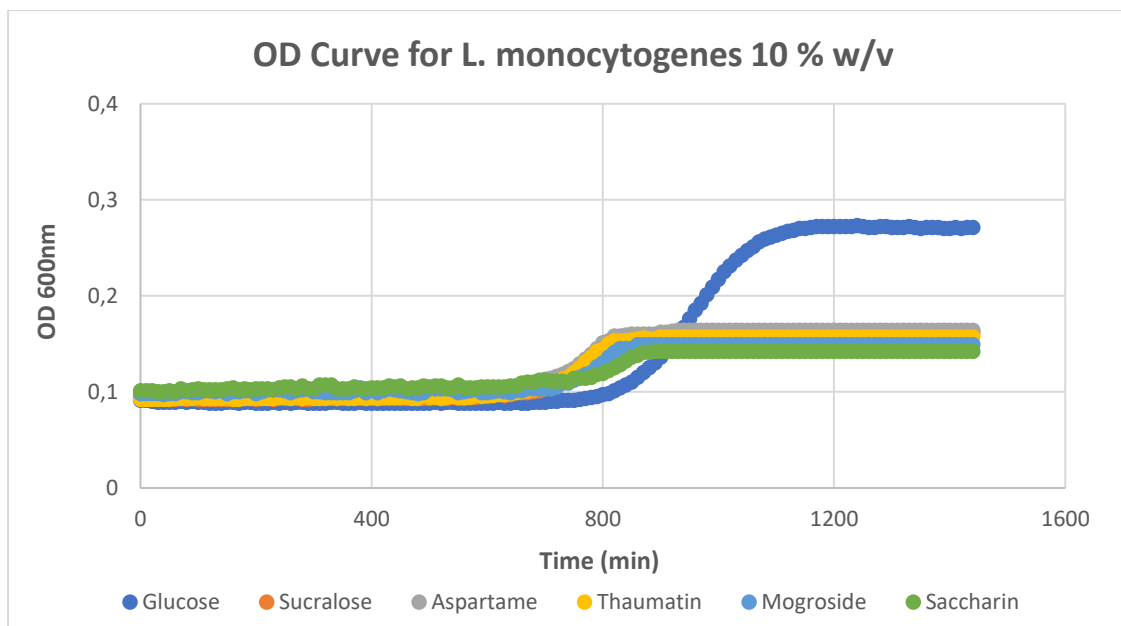
Με τον υπολογισμό του εμβαδού του χώρου κάτω από την καμπύλη οπτικής πυκνότητας-χρόνου με τη χρήση του τραπεζοειδή κανόνα υπολογίστηκε η παράμετρος Area μέσω της οποίας υπολογίστηκε έμμεσα η μικροβιακή δραστηριότητα (Chorianopoulos et al., 2006; Lambert and Pearson, 2000).

5.1.1. *Listeria monocytogenes*

Σε κάθε πλάκα εμβολιασμού (microplate) για τη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας, έγινε χρήση 6 η περισσότερων κελιών για την κάθε περίπτωση, δεδομένου ότι η μέθοδος χαρακτηρίζεται από υψηλή μεταβλητότητα. Οπότε για την κάθε περίπτωση έγινε ανάλυση περισσότερων από 6 επαναλήψεων και προέκυψαν οι καμπύλες τους. Το μηχάνημα μέτρησης της οπτικής πυκνότητας έπαιρνε μετρήσεις ανά 10 λεπτά για 24 ώρες για τον μικροοργανισμό *Listeria monocytogenes*. Για τις συγκεντρώσεις 2.5% και 10% που μελετήθηκαν, τα αποτελέσματα απεικονίζονται στα γραφήματα παρακάτω.



Γράφημα 5.1: Καμπύλες οπτικής πυκνότητας για *Listeria monocytogenes* 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 *Listeria monocytogenes* που αναπτύχθηκε σε θρεπτικό ζωμό συμπληρωμένο με τα επιλεγμένα γλυκαντικά και τη γλυκόζη (control) σε συγκέντρωση 10% w/v.

Από τα γραφήματα 5.1 και 5.2 φαίνεται ότι η *L. monocytogenes* έχει σημαντικά μεγαλύτερη ανάπτυξη στην γλυκόζη από ότι στα υπόλοιπα γλυκαντικά στη συγκέντρωση 2.5 % w/v. Το ίδιο παρατηρείται και στη συγκέντρωση 10 %, με την ανάπτυξη στη γλυκόζη

να είναι ελαφρώς μειωμένη από την αντίστοιχη στη συγκέντρωση 2.5 % αλλά και πάλι σημαντικά αυξημένη σε σχέση με τα υπόλοιπα γλυκαντικά. Η εκθετική φάση για τη γλυκόζη στη συγκέντρωση 2.5 %, φαίνεται να ξεκινάει στην χρονική στιγμή 850. Η ίδια χρονική στιγμή παρατηρείται και για τη γλυκόζη στη συγκέντρωση 10 %. Αυτό δείχνει ότι η συγκέντρωση της γλυκόζης δεν επηρεάζει την φάση προσαρμογής του συγκεκριμένου μικροοργανισμού. Επίσης, φαίνεται ότι στη συγκέντρωση 2.5 %, η μέγιστη πυκνότητα πληθυσμού παρατηρείται στο σημείο 0.32, ενώ στη συγκέντρωση 10 %, η μέγιστη πυκνότητα παρατηρείται στο σημείο 0.28. Από αυτό προκύπτει ότι η μεγαλύτερη συγκέντρωση γλυκόζης φαίνεται να επηρεάζει αρνητικά την ανάπτυξη του μικροοργανισμού *L. monocytogenes*. Όσον αφορά τα υπόλοιπα γλυκαντικά, ο μικροοργανισμός παρουσιάζει την ίδια ανάπτυξη τόσο σε 2.5 % συγκέντρωση όσο και σε 10 % και η μέγιστη πυκνότητα φτάνει στα ίδια επίπεδα και στις δύο συγκεντρώσεις. Από αυτό προκύπτει το συμπέρασμα ότι η συμπεριφορά του μικροοργανισμού είναι παρόμοια σε όλα τα γλυκαντικά που μελετήθηκαν χωρίς σημαντικές διαφορές.

Πίνακας 5.1: Επίδραση της προσθήκης γλυκόζης και γλυκαντικών σε συγκεντρώσεις 2.5% και 10% w/v, στην κινητική ανάπτυξης της *L. monocytogenes*.

Microorganism	Concentration	Kinetic parameters	Glucose	Aspartame	Saccharin	Sucralose	Mogroside	Advantame	Neohesperidin DC	Thaumatococin	Cyclamate	Stevia RA
<i>Listeria monocytogenes</i>	2.5% w/v	Area	139.7 ± 19.7 ^a	66.5 ± 6.0 ^b	53.3 ± 8.4 ^b	58.7 ± 10.4 ^b	38.9 ± 3.9 ^b	69.9 ± 10.2 ^b	53.2 ± 23.8 ^b	58.1 ± 10.5 ^b	50.7 ± 4.8 ^b	66.5 ± 6.0 ^b
		Tdet	850.7 ± 31.0 ^a	766.4 ± 26.3 ^b	760.7 ± 16.5 ^b	762.5 ± 15.9 ^b	762.3 ± 25.8 ^b	656.8 ± 20.2 ^b	653.8 ± 12.1 ^b	662.3 ± 15.5 ^b	669.4 ± 11.5 ^b	766.4 ± 16.3 ^b
		MSrODC	0.218 ± 0.005 ^a	0.067 ± 0.002 ^b	0.067 ± 0.002 ^b	0.064 ± 0.002 ^b	0.066 ± 0.001 ^b	0.067 ± 0.003 ^b	0.064 ± 0.004 ^b	0.067 ± 0.003 ^b	0.068 ± 0.002 ^b	0.067 ± 0.002 ^b
	10% w/v	Area	95.8 ± 4.9 ^a	54.4 ± 10.1 ^b	24.5 ± 6.9 ^b	55.6 ± 10.1 ^b	37.1 ± 7.5 ^b	36.1 ± 8.3 ^b	29.0 ± 6.9 ^b	53.4 ± 7.8 ^b	55.1 ± 10.3 ^b	66.7 ± 4.56 ^b
		Tdet	831.4 ± 12.9 ^a	673.1 ± 21.5 ^b	761.8 ± 20.0 ^b	696.3 ± 21.9 ^b	673.9 ± 24.0 ^b	716.8 ± 13.7 ^b	811.5 ± 19.3 ^a	699.6 ± 17.8 ^b	678.5 ± 24.8 ^b	759.9 ± 18.6 ^b
		MSrODC	0.169 ± 0.011 ^a	0.055 ± 0.004 ^b	0.038 ± 0.002 ^b	0.058 ± 0.002 ^b	0.038 ± 0.012 ^b	0.043 ± 0.002 ^b	0.043 ± 0.013 ^b	0.058 ± 0.023 ^b	0.070 ± 0.017 ^b	0.0580 ± 0.02 ^b

Στον πίνακα 5.1 φαίνονται τα αποτελέσματα από την στατιστική ανάλυση ANOVA για τον προσδιορισμό στατιστικά σημαντικών διαφορών (Pvalue < 0,05) μεταξύ των κινητικών παραμέτρων, για όλες τις περιπτώσεις γλυκόζης και γλυκαντικών και για τις δύο συγκεντρώσεις. Οι παράμετροι εκφράζονται με μέσους όρους (Mean) και τυπικές αποκλίσεις (±, Standard deviation), έχοντας ως εκθέτες τα γράμματα a και b. Τα γράμματα αυτά δείχνουν τη στατιστική σημαντικότητα μεταξύ της γλυκόζης (control) και των γλυκαντικών. Εάν η γλυκόζη δεν έχει στατιστικά σημαντικές διαφορές με κάποιο από τα υπόλοιπα γλυκαντικά, τότε στις τιμές του το γλυκαντικό θα έχει τον εκθέτη «a». Στην περίπτωση που υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά με κάποιο γλυκαντικό, τότε το γλυκαντικό θα έχει τον εκθέτη «b».

Στην περίπτωση της συγκέντρωσης 2.5% w/v φαίνεται ότι στην παράμετρο «Area» παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ της γλυκόζης και των υπόλοιπων γλυκαντικών. Αυτό φαίνεται από το γεγονός ότι η γλυκόζη έχει πολύ μεγαλύτερο εμβαδόν από ότι τα υπόλοιπα γλυκαντικά. Η μεγαλύτερη διαφορά παρατηρείται μεταξύ της γλυκόζης και της Μογροσίδης (Area: 139.7 ± 19.7 και Area: 38.9 ± 3.9 αντίστοιχα). Σχετικά με την παράμετρο «MSrODC», πάλι η γλυκόζη παρουσιάζει την μεγαλύτερη τιμή σε σχέση με τα υπόλοιπα γλυκαντικά. Πιο συγκεκριμένα η παράμετρος αυτή είναι μεγαλύτερη στη γλυκόζη σε σχέση με τα άλλα γλυκαντικά που παρουσιάζουν κοντινές τιμές, ωστόσο δεν είναι αρκετά υψηλή, ώστε να θεωρηθεί πολύ σημαντική. Όσον αφορά την παράμετρο «Tdet» (LP, lag phase) και εδώ παρατηρήθηκαν αρκετά μεγαλύτερες τιμές στην γλυκόζη σε

σχέση με τα υπόλοιπα γλυκαντικά, με τις μεγαλύτερες διαφορές να παρατηρούνται μεταξύ γλυκόζης και των γλυκαντικών αντβαντάμη, νεοεσπεριδίνη, θαυματίνη και κυκλαμικό. Ωστόσο αυτές οι διαφορές δεν είναι πολύ μεγάλες σε σχέση με τα υπόλοιπα γλυκαντικά. Συνολικά, για τον παθογόνο μικροοργανισμό *L. monocytogenes*, σε όλες τις παραμέτρους οι τιμές στη γλυκόζη είναι πολύ υψηλότερες σε σχέση με τα υπόλοιπα γλυκαντικά, γεγονός που υποδηλώνει ότι ο μικροοργανισμός αναπτύσσεται καλύτερα παρουσία γλυκόζης.

Στη περίπτωση της συγκέντρωσης 10% w/v, στην παράμετρο «Area» και εδώ η γλυκόζη εμφανίζει την υψηλότερη τιμή και μάλιστα με μεγάλη διαφορά σε σχέση με τα υπόλοιπα γλυκαντικά. Οι μεγαλύτερες διαφορές παρατηρούνται μεταξύ γλυκόζης και των γλυκαντικών σακχαρίνη και νεοεσπεριδίνη (Area: 95.8 ± 4.9 , Area: 24.5 ± 6.9 και Area: 29.0 ± 6.9 αντίστοιχα). Σχετικά με την παράμετρο «MSrODC», η γλυκόζη παρουσιάζει επίσης μεγαλύτερη τιμή σε σχέση με τα υπόλοιπα γλυκαντικά και συγκεκριμένα τις μεγαλύτερες διαφορές τις έχει με τα γλυκαντικά μογροσίδη, σουκραλόζη και κυκλαμικό. Όσον αφορά την παράμετρο «Tdet» (LP, lag phase) επίσης παρατηρήθηκαν διαφορές, με την γλυκόζη να εμφανίζει τη μεγαλύτερη τιμή από τα υπόλοιπα γλυκαντικά. Μάλιστα όλες οι τιμές στα γλυκαντικά ήταν στατιστικά σημαντικές. Οι μεγαλύτερες διαφορές παρατηρήθηκαν μεταξύ της γλυκόζης και των γλυκαντικών σακχαρίνη και μογροσίδη (Tdet: 0.169 ± 0.011 , Tdet: 0.038 ± 0.002 , Tdet: 0.038 ± 0.012 αντίστοιχα). Και εδώ συνολικά, η γλυκόζη σε όλες τις παραμέτρους παρουσιάζει τις μεγαλύτερες τιμές.

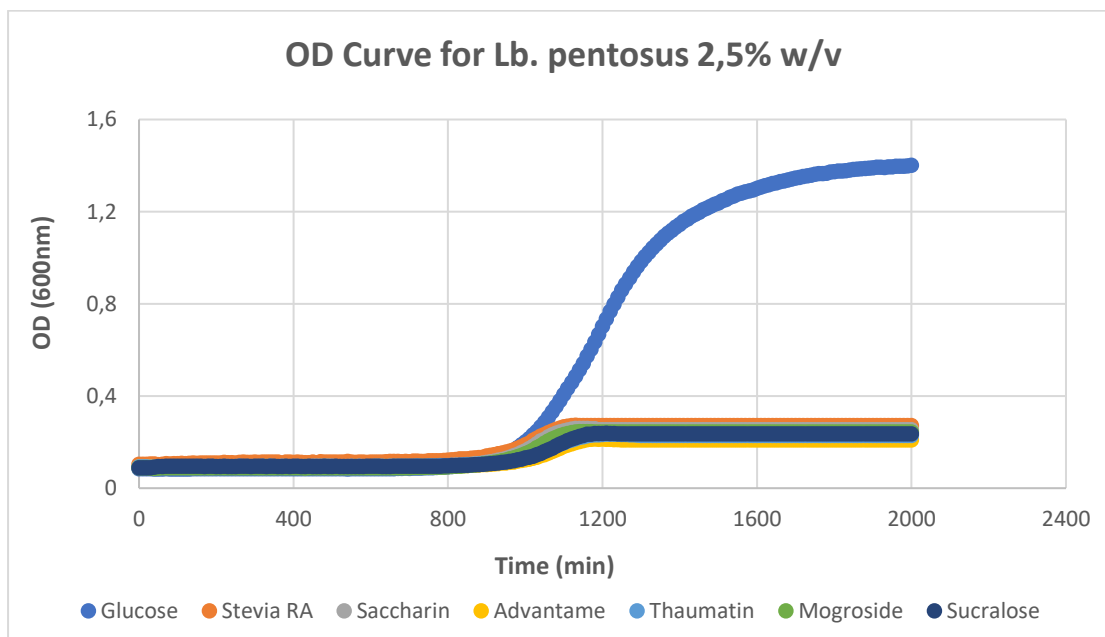
Συγκριτικά με τις δύο συγκεντρώσεις, η γλυκόζη σε όλες τις παραμέτρους εμφανίζει με μια γενικότερη εκτίμηση μεγαλύτερες τιμές σε σχέση με τα υπόλοιπα γλυκαντικά όπως φάνηκε από τον πίνακα. Στη συγκέντρωση 10% η συνολική ανάπτυξη του μικροοργανισμού είναι μικρότερη σε σχέση με τη συγκέντρωση 2.5 %, κάτι που υποδηλώνει ότι η αυξημένη συγκέντρωση γλυκόζης δεν ευνοεί τόσο την ανάπτυξή του. Σχετικά με την φάση προσαρμογής, οι τιμές είναι πολύ κοντά και στις δύο συγκεντρώσεις. Επίσης και στην παράμετρο «Tdet» προέκυψαν παρόμοιες τιμές τόσο για τη γλυκόζη αλλά και τα γλυκαντικά και στις δύο συγκεντρώσεις.

Συμπερασματικά, μεταξύ των δύο συγκεντρώσεων των γλυκαντικών (2.5% και 10%) δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές στην ανάπτυξη της *L. Monocytogenes*. Αυτό συμβαίνει διότι βρίσκονται σε πολύ μικρές ποσότητες στο μέσο ανάπτυξης μιας και υπολογίζονται βάση της σχετικής γλυκύτητας σε σχέση με τη γλυκόζη. Ο κυριότερος παράγοντας που επηρεάζει την ανάπτυξη της *L. Monocytogenes* είναι η παρουσία ή η απουσία της γλυκόζης στο μέσο ανάπτυξης και σε τι συγκεντρώσεις βρίσκεται. Παίρνοντας αυτό ως δεδομένο, αν αφαιρεθεί η γλυκόζη από το μέσο ανάπτυξης και προστεθούν οι υπολογισμένες συγκεντρώσεις των γλυκαντικών βάση σχετικής γλυκύτητας, ο παθογόνος μικροοργανισμός δεν αναπτυσσόταν τόσο καλά, γεγονός που αποτελεί πλεονέκτημα στην προσπάθεια αντικατάστασης της γλυκόζης με τα γλυκαντικά.

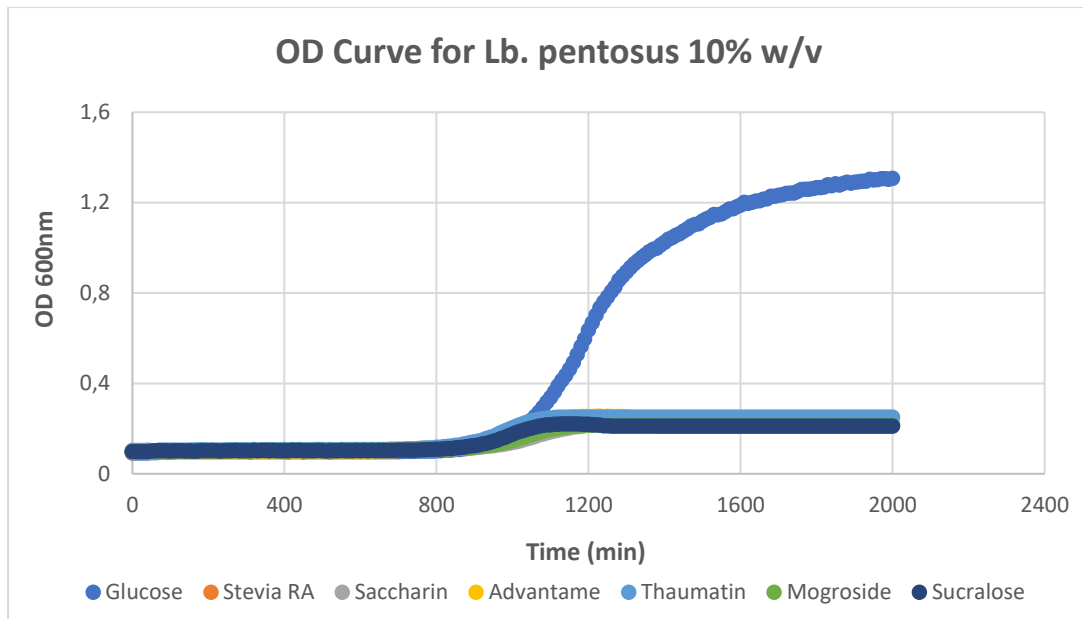
5.1.2 *Lactobacillus pentosus*

Για το γαλακτικό βακτήριο *Lactobacillus pentosus* ακολουθήθηκε η ίδια πειραματική διαδικασία για τη μελέτη της ανάπτυξής του σε συνάρτηση με προσθήκη γλυκόζης και των εξεταζόμενων γλυκαντικών, που αναλύθηκε και για τον παθογόνο μικροοργανισμό *Listeria monocytogenes*. Το μηχάνημα μέτρησης της οπτικής πυκνότητας έπαιρνε μετρήσεις ανά 10 λεπτά για 96 ώρες για τον μικροοργανισμό *Lactobacillus pentosus*. Για τις

συγκεντρώσεις 2.5% και 10% που μελετήθηκαν, τα αποτελέσματα απεικονίζονται στα γραφήματα παρακάτω.



Γράφημα 5.3: Καμπύλες οπτικής πυκνότητας για *Lactobacillus pentosus* 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 *Lactobacillus pentosus* που αναπτύχθηκε σε θρεπτικό ζωμό συμπληρωμένο με τα επιλεγμένα γλυκαντικά και τη γλυκόζη (control) σε συγκέντρωση 10% w/v.

Από τα γραφήματα 5.3 και 5.4 προκύπτει ότι το βακτήριο *Lactobacillus pentosus* παρουσιάζει μεγαλύτερη ανάπτυξη όταν στο θρεπτικό μέσο υπάρχει γλυκόζη σε σχέση με το όταν υπάρχουν γλυκαντικά. Αυτό ισχύει και για την συγκέντρωση 2.5% αλλά και για τη συγκέντρωση 10%. Η εκθετική φάση για τη γλυκόζη στη συγκέντρωση 2.5 %, φαίνεται να ξεκινάει στην χρονική στιγμή 1000. Η ίδια χρονική στιγμή παρατηρείται και για τη γλυκόζη στη συγκέντρωση 10 %. Αυτό δείχνει ότι η συγκέντρωση της γλυκόζης δεν επηρεάζει την φάση προσαρμογής του συγκεκριμένου μικροοργανισμού.

Επίσης, παρατηρώντας τα δύο γραφήματα, φαίνεται ότι στην περίπτωση της συγκέντρωσης 2.5% η ανάπτυξη του μικροοργανισμού είναι μεγαλύτερη σε σχέση με τη συγκέντρωση του μικροοργανισμού στη συγκέντρωση 10%. Πιο συγκεκριμένα, η μέγιστη πυκνότητα πληθυσμού στη συγκέντρωση 2.5% φτάνει στο σημείο «1.45», ενώ στη συγκέντρωση 10% φτάνει στο σημείο «1.3». Από αυτό συμπεραίνουμε ότι η αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο μέσο ανάπτυξης δεν επιφέρει απαραίτητα και αύξηση στον ρυθμό ανάπτυξης του μικροοργανισμού. Όσον αφορά τα υπόλοιπα γλυκαντικά, ο μικροοργανισμός παρουσιάζει την ίδια ανάπτυξη τόσο σε 2.5 % συγκέντρωση όσο και σε 10 % και η μέγιστη πυκνότητα φτάνει περίπου στα ίδια επίπεδα και στις δύο συγκεντρώσεις. Προκύπτει λοιπόν ότι η συμπεριφορά του μικροοργανισμού είναι παρόμοια σε όλα τα γλυκαντικά που μελετήθηκαν χωρίς σημαντικές διαφορές.

Πίνακας 5.2: Επίδραση της προσθήκης γλυκόζης και γλυκαντικών σε συγκεντρώσεις 2.5% και 10% w/v, στην κινητική ανάπτυξης του *Lactobacillus pentosus*.

Microorganism	Concentration	Kinetic parameters	Glucose	Stevia Reb A	Saccharin	Sucralose	Acesulfame	Thaumatococin	Cyclamate	Advantame	Mogroside	Neohesperidin	
<i>Lactobacillus pentosus</i>	2.5% w/v	Area	1017.2 ± 58.4 ^a	153.2 ± 22.9 ^b	122.9 ± 12.8 ^b	118.4 ± 15.5 ^b	115.6 ± 10.2 ^b	102.2 ± 14.1 ^b	94.5 ± 8.8 ^b	114.6 ± 11.7 ^b	123.7 ± 7.1 ^b	126.4 ± 19.6 ^b	
		T _{det}	985.6 ± 17.3 ^a	879.0 ± 14.2 ^b	894.5 ± 14.6 ^b	924.8 ± 25.5 ^b	945.0 ± 20.0 ^b	944.8 ± 32.0 ^b	937.8 ± 12.4 ^b	955.4 ± 22.9 ^b	920.7 ± 20.3 ^b	937.5 ± 28.0 ^b	
		MSrODC	0.545 ± 0.04 ^a	0.109 ± 0.004 ^b	0.099 ± 0.014 ^b	0.088 ± 0.011 ^b	0.100 ± 0.016 ^b	0.083 ± 0.008 ^b	0.008 ± 0.008 ^b	0.085 ± 0.012 ^b	0.094 ± 0.015 ^b	0.098 ± 0.011 ^b	
	10% w/v	Area	964.1 ± 35.0 ^a	110.1 ± 5.9 ^b	109.3 ± 10.5 ^b	112.3 ± 14.0 ^b	104.5 ± 3.1 ^b	137.1 ± 20.9 ^b	103.9 ± 17.2 ^b	122.2 ± 15.1 ^b	122.5 ± 13.9 ^b	116.9 ± 12.2 ^b	
		T _{det}	1018.8 ± 27.7 ^a	848.0 ± 8.3 ^b	878.3 ± 21.3 ^b	905.1 ± 35 ^b	897.7 ± 18.4 ^b	844.6 ± 24.9 ^b	892.7 ± 6.0 ^b	895.7 ± 25.2 ^b	892.5 ± 5.6 ^b	899.3 ± 24.2 ^b	
		MSrODC	0.552 ± 0.028 ^a	0.071 ± 0.01 ^b	0.074 ± 0.014 ^b	0.076 ± 0.01 ^b	0.069 ± 0.004 ^b	0.084 ± 0.015 ^b	0.072 ± 0.004 ^b	0.084 ± 0.005 ^b	0.07 ± 0.01 ^b	0.073 ± 0.01 ^b	

Στον παραπάνω πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης για τον προσδιορισμό της στατιστικής σημαντικότητας (Pvalue < 0.05) των κινητικών παραμέτρων μεταξύ της γλυκόζης και των διάφορων γλυκαντικών και στις δύο συγκεντρώσεις (2.5% και 10%). Στην περίπτωση 2.5%, παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές σε όλες τις παραμέτρους μεταξύ της γλυκόζης και των υπόλοιπων γλυκαντικών. Πιο συγκεκριμένα, οι στατιστικές διαφορές ανάμεσα στη γλυκόζη και στα γλυκαντικά στην παράμετρο «Area», είναι σημαντικές, με την γλυκόζη να παρουσιάζει το μεγαλύτερο εμβαδόν. Η μεγαλύτερη διαφορά παρατηρείται μεταξύ τη γλυκόζης και του γλυκαντικού κυκλαμικό με τιμές Area: 1017.2 ± 58.4 και Area: 94.5 ± 8.8 αντίστοιχα. Στην περίπτωση της παραμέτρου MSrODC, πάλι η γλυκόζη την μεγαλύτερη τιμή σε σχέση με τα γλυκαντικά. Η μεγαλύτερη διαφορά παρατηρείται ανάμεσα στη γλυκόζη και το γλυκαντικό κυκλαμικό (0.545 ± 0.04 και 0.008 ± 0.008 αντίστοιχα). Όσον αφορά την παράμετρο «Tdet», και εδώ παρατηρούνται διαφορές μεταξύ της γλυκόζης και των γλυκαντικών, ωστόσο όχι τόσο μεγάλες, με την γλυκόζη να εμφανίζει την μεγαλύτερη φάση προσαρμογής. Η μεγαλύτερη διαφορά παρατηρείται ανάμεσα στη γλυκόζη και την στέβια RA με Tdet: 985.6 ± 17.3 και 879 ± 14.6 αντίστοιχα. Από τα αποτελέσματα του πίνακα φαίνεται λοιπόν ότι η ανάπτυξη του μικροοργανισμού είναι κατά πολύ μεγαλύτερη στη γλυκόζη σε σχέση με τα γλυκαντικά.

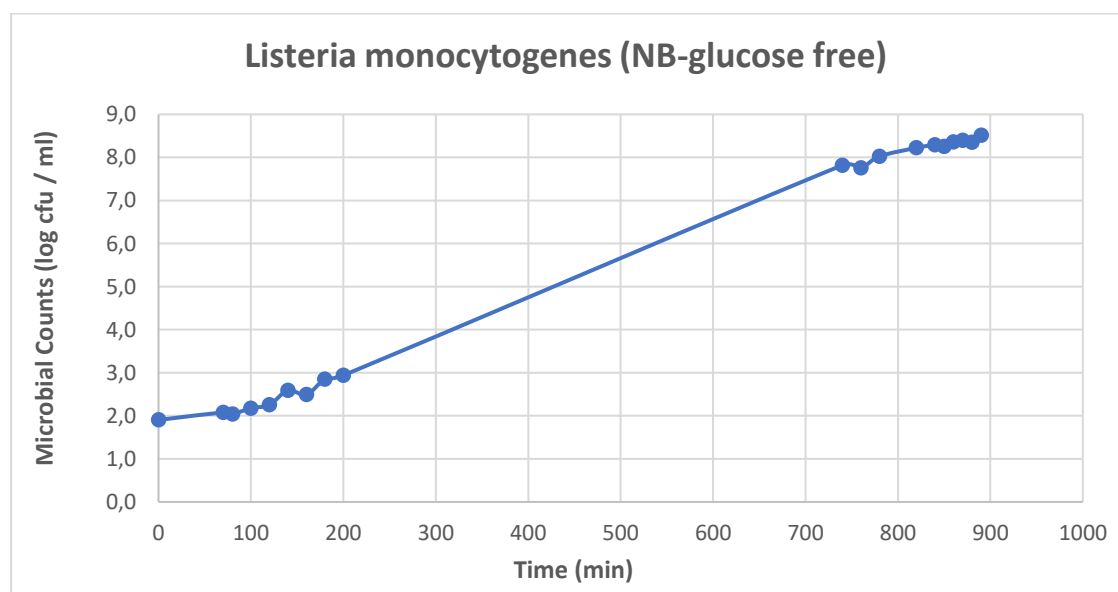
Στην περίπτωση της συγκέντρωσης 10%, παρατηρούνται παρόμοια αποτελέσματα. Όλοι οι παράμετροι εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές, με την γλυκόζη να έχει τις μεγαλύτερες τιμές. Πιο συγκεκριμένα, υπάρχουν στατικά σημαντικές διαφορές μεταξύ γλυκόζης και υπολοίπων γλυκαντικών στην παράμετρο «Area», και η γλυκόζη έχει το μεγαλύτερο εμβαδόν. Η μεγαλύτερη διαφορά παρατηρείται ανάμεσα στην γλυκόζη και στην ακεσουλφάμη με τιμές Area: 964.1 ± 35 και Area: 104.5 ± 3.1 αντίστοιχα. Το ίδιο συμβαίνει και με την παράμετρο «MSrODC», όπου η γλυκόζη εμφανίζει τη μεγαλύτερη τιμή από τα γλυκαντικά. Η μεγαλύτερη διαφορά παρατηρείται μεταξύ της γλυκόζης (MSrODC: 0.552 ± 0.028) και της ακεσουλφάμης (MSrODC: 0.069 ± 0.004). Σχετικά με την παράμετρο «Tdet», και εδώ παρατηρούνται διαφορές μεταξύ της γλυκόζης και των γλυκαντικών, όχι όμως τόσο μεγάλες όσο στις άλλες παραμέτρους. Η γλυκόζη λοιπόν εμφανίζει την μεγαλύτερη φάση προσαρμογής. Η μεγαλύτερη διαφορά παρατηρείται ανάμεσα στη γλυκόζη και την θαυματίνη με Tdet: 1018.8 ± 27.7 και 879 ± 14.6 αντίστοιχα. Συμπερασματικά, όπως και στη συγκέντρωση 2.5% έτσι και στη συγκέντρωση 10%, η γλυκόζη εμφανίζει τις μεγαλύτερες τιμές σε όλες τις παραμέτρους. Στη γλυκόζη το γαλακτικό βακτήριο παρουσιάζει την μεγαλύτερη ανάπτυξη σε σχέση με τα γλυκαντικά.

Συνολικά, και στις δύο συγκεντρώσεις παρουσιάζονται παρόμοιες τάσεις σε όλες τις παραμέτρους στις οποίες φάνηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Πιο συγκεκριμένα στη γλυκόζη εμφανίζεται η μεγαλύτερη μικροβιακή ανάπτυξη, η οποία είναι πολύ κοντά και στις δύο συγκεντρώσεις, κάτι που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η μεγαλύτερη συκέντρωση γλυκόζης δεν επηρεάζει την ανάπτυξη. Επίσης στις δύο συγκεντρώσεις παρατηρήθηκε μεγαλύτερη φάση προσαρμογής στη γλυκόζη σε σχέση με τα υπόλοιπα γλυκαντικά. Το γεγονός ότι η γλυκόζη εμφάνισε τη μεγαλύτερη τιμή σε όλες τις παραμέτρους και στις δύο συγκεντρώσεις υποδηλώνει ότι το προβιοτικό βακτήριο αναπτύσσεται καλύτερα παρουσία γλυκόζης. Αυτό όμως δεν αποτελεί πλεονέκτημα της προσπάθειας αντικατάστασης γλυκόζης με συγκεκριμένα γλυκαντικά για το παρόν βακτήριο, μιας και η ανάπτυξη του δεν θα ευνοηθεί και συνεπώς δεν θα μπορέσει να δώσει τόσο αποτελεσματικά το λειτουργικό χαρακτήρα και τα προβιοτικά οφέλη στο τρόφιμο.

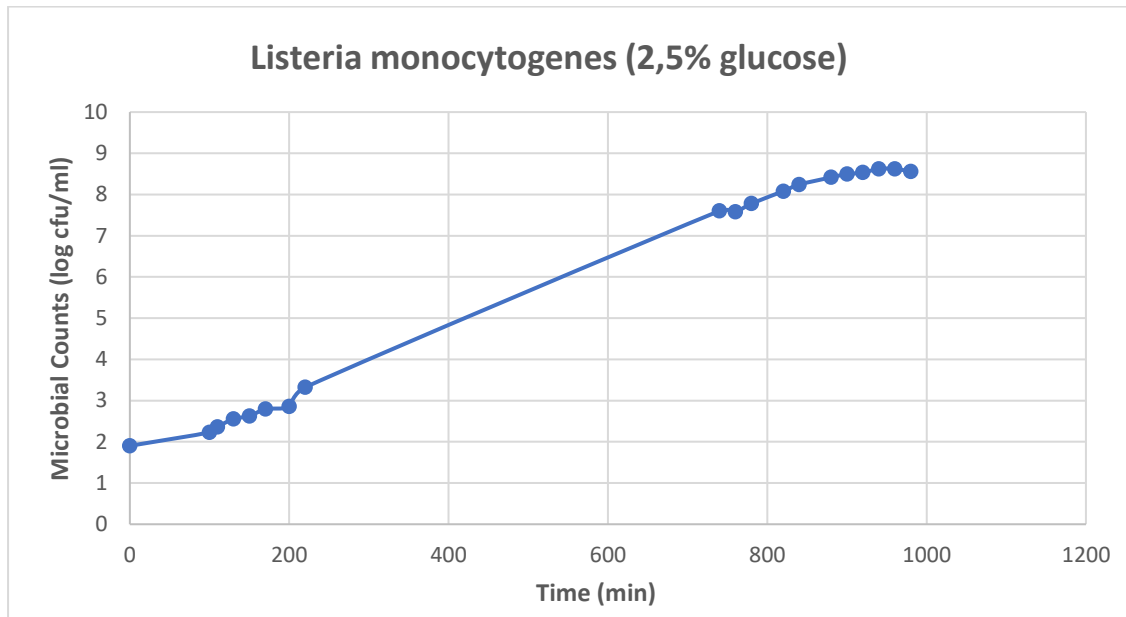
5.2 Προσδιορισμός ανάπτυξης μικροοργανισμών με τη μέθοδο τρυβλίων

5.2.1. *Listeria monocytogenes*

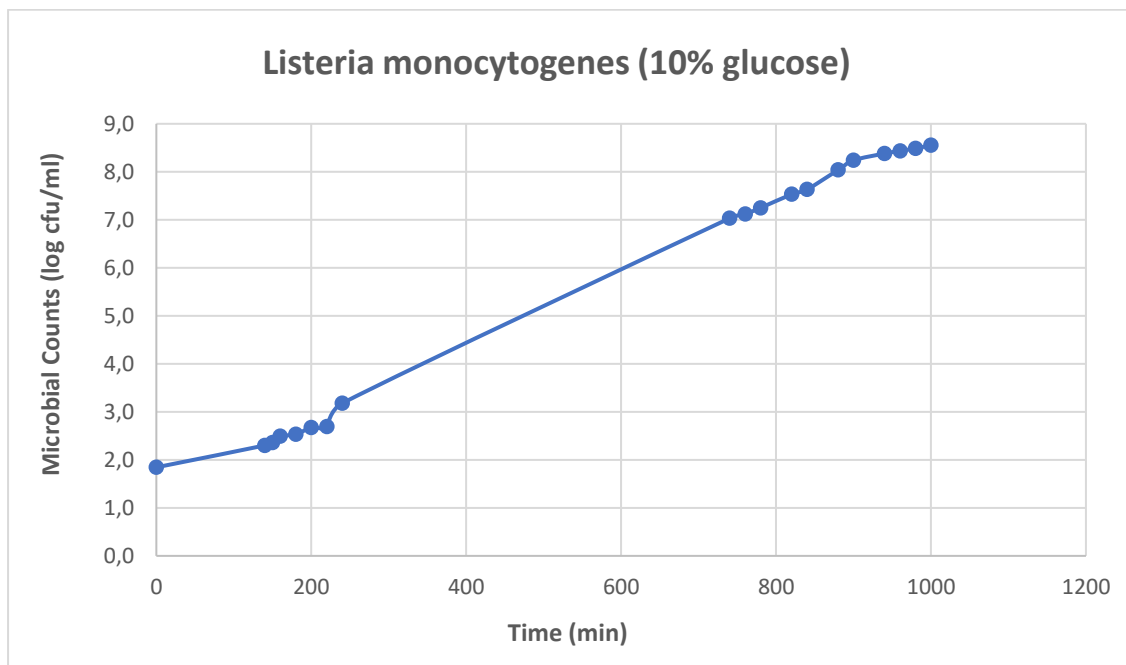
Όταν πραγματοποιήθηκε η μέθοδος της οπτικής πυκνότητας OD για τον μικροοργανισμό *L.monocytogenes*, παρατηρήθηκε μια δεύτερη ανάπτυξη, η οποία αρχίζει αμέσως μετά από την πρώτη στατική φάση. Αυτό πιθανόν παρατηρήθηκε λόγω παραγωγής κάποιου μεταβολικού προϊόντος που επηρεάζει την καμπύλη ανάπτυξης και δημιουργεί μια εκθετική φάση. Προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι οι φάσεις ανάπτυξης που προέκυψαν κατά την μέθοδο μέτρησης της οπτικής πυκνότητας καθώς και οι καμπύλες ανάπτυξης είναι σωστές, μελετήθηκε η ανάπτυξη των μικροοργανισμών και με τη μέθοδο των τρυβλίων. Στα γραφήματα παρακάτω απεικονίζονται τα αποτελέσματα.



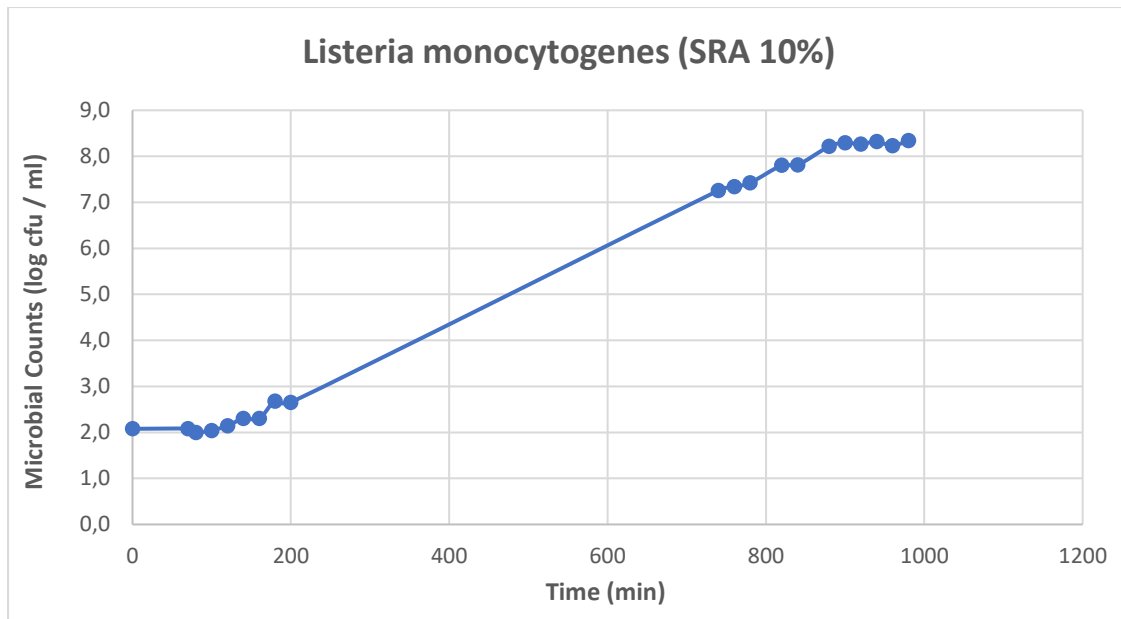
Γράφημα 5.5: Ανάπτυξη του *L. monocytogenes* σε Nutrient Broth χωρίς γλυκόζη, με τη μέθοδο των τρυβλίων.



Γράφημα 5.6: Ανάπτυξη του *L. monocytogenes* σε 2.5% w/v γλυκόζη, με τη μέθοδο των τρυβλίων.



Γράφημα 5.7: Ανάπτυξη του *L. monocytogenes* σε 10% w/v γλυκόζη, με τη μέθοδο των τρυβλίων.



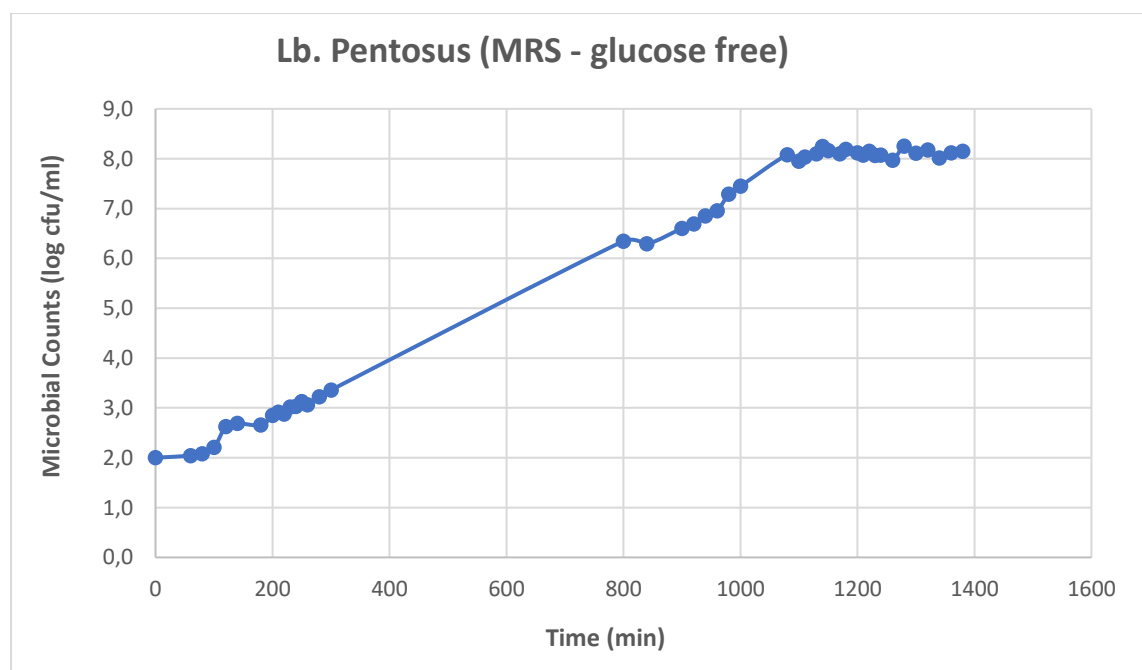
Γράφημα 5.8: Ανάπτυξη του *L. monocytogenes* σε 2.5% w/v γλυκόζη, με τη μέθοδο των τρυβλίων.

Σύμφωνα με τις καμπύλες βακτηριακής ανάπτυξης που φαίνονται παραπάνω, εμφανίζονται 5 διακριτές φάσεις. Η φάση προσαρμογής (lag phase), η προσαρμογή πριν από την έναρξη της εκθετικής ανάπτυξης (early exponential phase), η εκθετική φάση (exponential phase), στην οποία η κυτταρική διαίρεση προχωρά με σταθερό ρυθμό, η τελευταία φάση πριν ξεκινήσει η στατική φάση (late exponential phase), και η στατική φάση. Μετά την στατική φάση σταματάνε τα βακτήρια να αναπαράγονται, λόγω ανάπτυξης δυσμενών συνθηκών. Στα γραφήματα παραπάνω, παρατηρείται ότι μετά τα 900-1000 min τα σημεία της στατικής έχουν αφαιρεθεί, λόγω του ότι η διπλή ανάπτυξη που παρουσιάζεται ύστερα από αυτό το σημείο, προκύπτει από σφάλμα στην μέθοδο της OD. Οι πιθανοί παράγοντες που συμβαίνει αυτό είναι ίσως τα νεκρά κύτταρα που υπολογίζονται μαζί με τα ζωντανά, η διαφορετική μορφολογία του κάθε κυττάρου, κάποια οξείδωση του υλικού που να επηρεάζει την ανάπτυξη και πολλοί άλλοι παράγοντες.

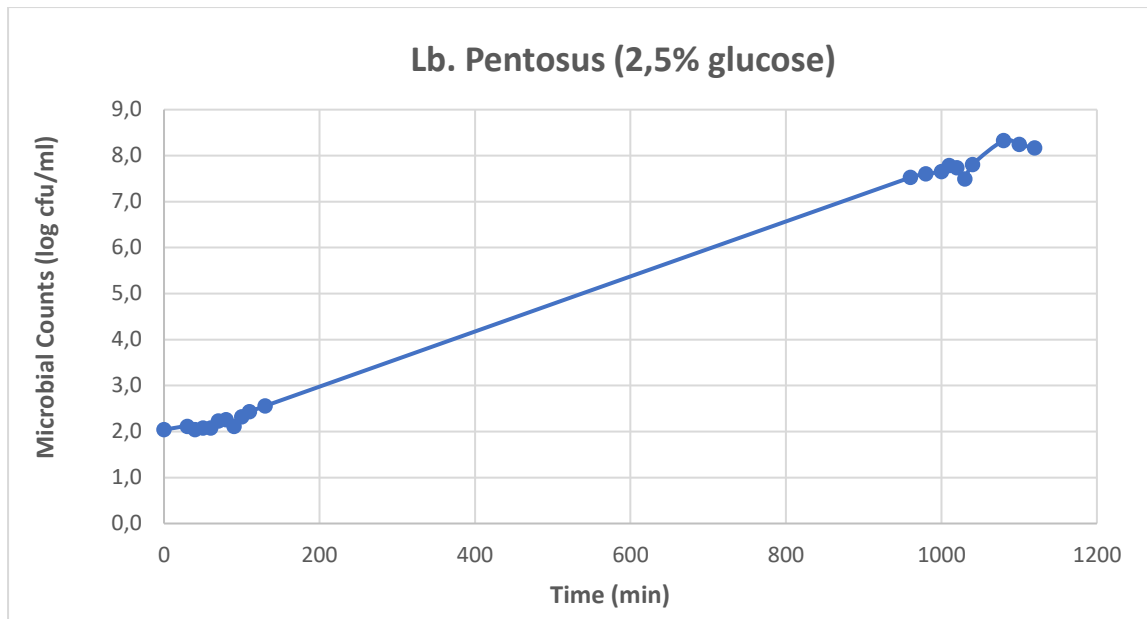
Από τα παραπάνω διαγράμματα προκύπτει ότι η lag phase έχει σχεδόν την ίδια διάρκεια σε όλα τα διαγράμματα, με λίγο μεγαλύτερη διάρκεια στο διάγραμμα 10% γλυκόζης. Αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι όταν αυξάνεται η συγκέντρωση των σακχάρων (γλυκόζης), δημιουργείται αύξηση του ιξώδους με αποτέλεσμα οι μικροοργανισμοί να έχουν να αντιμετωπίσουν συνθήκες αντίξοες, μειώνοντας έτσι την ικανότητά τους για αναπαραγωγή. Όσον αφορά την εκθετική φάση, η διάρκειά της φαίνεται σχεδόν ίδια σε όλα τα διαγράμματα. Μελετώντας την ανάπτυξη του μικροοργανισμού στο γλυκαντικό στέβια RA 10% (SRA 10%) παρατηρήθηκε ότι είχε παρόμοια κινητική ανάπτυξης με του Nutrient broth (NB). Αυτό γιατί η στέβια, όπως και όλα τα γλυκαντικά, δεν περιέχουν υδατάνθρακες, και συνεπώς δεν αποτελούν πηγή άνθρακα για τη *Listeria*. Αντίθετα, η γλυκόζη είναι βασική πηγή υδατάνθρακα για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Γι' αυτό παρατηρούνται αρκετές ομοιότητες τόσο στην καμπύλη της στέβια αλλά και στην καμπύλη με NB χωρίς γλυκόζη και στην φάση προσαρμογής και στην εκθετική φάση. Συνεπώς, στις ποσότητες που προστίθενται τα γλυκαντικά, δεν είναι ικανά να επιδράσουν στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού όπως η γλυκόζη, αντιθέτως επιδρούν μόνο στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, στην αίσθηση της γλυκύτητας.

5.2.2 *Lactobacillus pentosus*

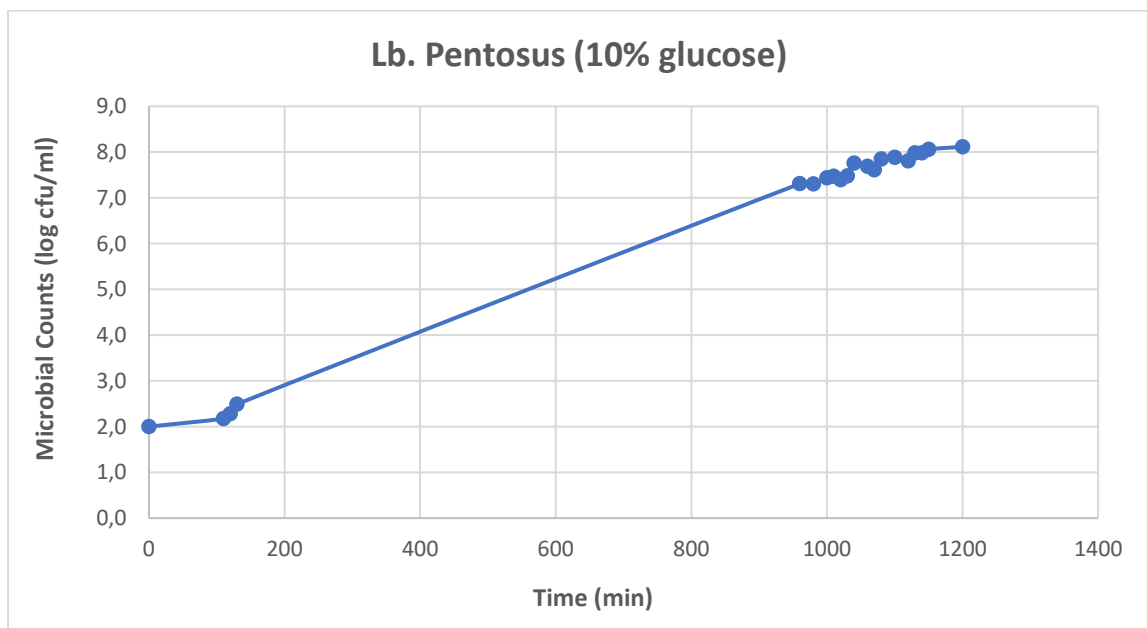
Όπως και στην *Listeria monocytogenes*, έτσι και στον μικροοργανισμό *Lactobacillus pentosus*, δημιουργήθηκαν πρότυπες καμπύλες με σκοπό να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα της μεθόδου οπτικής πυκνότητας. Για την επιβεβαίωση αυτή χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των τρυβλίων, ώστε να τακτοποιηθεί ότι οι φάσεις ανάπτυξης στις πρότυπες καμπύλες συμπίπτουν με τα αποτελέσματα της μεθόδου OD. Στα γραφήματα παρακάτω φαίνονται οι καμπύλες ανάπτυξης του μικροοργανισμού *Lactobacillus pentosus*, σε θρεπτικό υπόστρωμα MRS χωρίς γλυκόζη, σε MRS με 2,5% γλυκόζη και σε MRS με 10% γλυκόζη.



Γράφημα 5.9: Ανάπτυξη του *Lactobacillus pentosus* σε MRS υπόστρωμα χωρίς γλυκόζη, με τη μέθοδο των τρυβλίων.



Γράφημα 5.10 Ανάπτυξη του *Lactobacillus pentosus* σε MRS υπόστρωμα με 2,5% γλυκόζη, με τη μέθοδο των τρυβλίων.



Γράφημα 5.11: Ανάπτυξη του *Lactobacillus pentosus* σε MRS υπόστρωμα με 10% γλυκόζη, με τη μέθοδο των τρυβλίων.

Στην περίπτωση του γραφήματος με το υπόστρωμα MRS χωρίς γλυκόζη, η εκθετική φάση φαίνεται να ξεκινάει περίπου στο σημείο 120 min και να τελειώνει περίπου στα 1100 min. Στην περίπτωση της συγκέντρωσης 2,5% γλυκόζη, η εκθετική ξεκινάει πάλι κοντά στα 120 min και ολοκληρώνεται στα 1050. Τέλος, στην περίπτωση της συγκέντρωσης 10% γλυκόζης η αρχή της εκθετικής φάσης είναι στο σημείο περίπου 120 min και το τέλος της στο σημείο 1170 min. Ο μεγαλύτερος χρόνος εκθετικής φάσης παρατηρείται στην περίπτωση της συγκέντρωσης 10% γλυκόζης. Οπότε όσο μεγαλύτερη η συγκέντρωση της γλυκόζης στο

υπόστρωμα, τόσο αυξάνεται και ο ρυθμός ανάπτυξης του γαλακτικού βακτηρίου. Συνεπώς, σε αντίθεση με την *L.monocytogenes*, η μεγαλύτερη συγκέντρωση γλυκόζης (10%) δεν επιδρά αρνητικά στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Όσον αφορά την φάση προσαρμογής, παραμένει σχεδόν ίδια και στις τρεις περιπτώσεις. Συμπεραίνουμε λοιπόν, ότι η μείωση της γλυκόζης δίνει χαμηλότερη ανάπτυξη του γαλακτικού βακτηρίου, οπότε η αντικατάστασή της με κάποιο γλυκαντικό, ίσως επηρεάσει τη λειτουργικότητα και τις προβιοτικές ιδιότητες του βακτηρίου και δεν αναπτυχθεί αρκετά.

5.3 Αποτελέσματα ανάλυσης RNA για *Listeria monocytogenes*

Από τις παραπάνω πρότυπες καμπύλες ανάπτυξης του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria* (Γράφημα 5.6 και Γράφημα 5.7), επιλέχθηκαν τα πιο κατάλληλα χρονικά σημεία στην καμπύλη ανάπτυξης (zero time, early exponential, late exponential). Συγκεκριμένα, στις χρονικές αυτές στιγμές πάρθηκε δείγμα για τις περιπτώσεις 2.5% και 10% γλυκόζης και 2.5% και 10% σε γλυκαντικό και τα δείγματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για ανάλυση RNA. Τα χρονικά σημεία αυτά καθώς και τα αποτελέσματα της ανάλυσης για τον παθογόνο μικροοργανισμό, παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες.

Πίνακας 5.3: Χρονικά σημεία (min) στα οποία έγινε συλλογή δείγματος RNA από *Listeria monocytogenes*

Microorganism	Concentrations	Cases	Zero time	Early exponential	Late exponential
Listeria monocytogenes	2.5%	Glucose	0	100	880
		Sweeteners	0	100	880
	10%	Glucose	0	140	940
		Sweeteners	0	100	880

Πίνακας 5.4: Σχετικά επίπεδα γονιδιακής έκφρασης του βακτηρίου *L. monocytogenes*

MO	Concentration	Sweeteners	Genes	Relative fold change		
				0h	EE	LE
<i>Listeria monocytogenes</i>	2.5% w/v	Stevia Reb A	Hly	ne*	Ne	7.0 (4.4 to 11.1)
			AgrA	ne	Ne	1.1 (0.7 to 1.8)
		Saccharin	Hly	ne	Ne	6.6 (5.7 to 7.5)
			AgrA	ne	Ne	1.5 (0.9 to 2.7)
	10% w/v	Stevia Reb A	Hly	ne	Ne	2.3 (1.9 to 2.6)
			AgrA	ne	Ne	he**
		Saccharin	Hly	ne	Ne	3.8 (2.7 to 5.4)
			AgrA	ne	Ne	he

ne*: no expression, he**: highly expressed since there is no expression for the control (glucose)

Από τα αποτελέσματα του πίνακα 5.4, προέκυψε το συμπέρασμα ότι τα γονίδια στις χρονικές φάσεις 0h και EE δεν εκφράστηκαν. Αυτό δείχνει πιθανόν μια αδράνεια των συγκεκριμένων γονιδίων να εκφραστούν. Προκειμένου να εκφραστούν τα γονίδια πρέπει να υπάρχει μια κινητήρια δύναμη που θα τα ενεργοποιήσει. Σε περίπτωση που δεν υπάρχει αυτή η δύναμη λόγω ύπαρξης παρεμποδιστικών παραγόντων (πχ έλλειψη πηγή άνθρακα, ύπαρξη μεταβολικών προϊόντων που αλλάζουν το pH, ύπαρξη μικροοργανισμών που ανταγωνίζονται τον μικροοργανισμό που εξετάζεται), τότε τα γονίδια δεν μπορούν να εκφραστούν. Στην προκειμένη περίπτωση, τα γλυκαντικά δεν αποτέλεσαν παράγοντα κινητήριο για την ενεργοποίηση των γονιδίων στις αρχικές ώρες ανάπτυξης.

Όπως φαίνεται στον πίνακα 5.5, από την τιμή fold change καταλαβαίνουμε ότι ένα γονίδιο μπορεί να εκφράζει τάση προς το κάτω (υποέκφραση), έχοντας αρνητικό πρόσημο (-), ή να έχει τάση προς τα πάνω (υπερέκφραση), έχοντας θετικό πρόσημο (+). Τιμές πάνω από 2 (υπερέκφραση) δείχνουν ότι το γονίδιο είναι σημαντικό και εκφράστηκε, ενώ τιμές κάτω του -2 δείχνουν στατιστικά σημαντική υποέκφραση του γονιδίου. Από τον πίνακα φαίνεται ότι στη φάση LE (Late exponential), για τον μικροοργανισμό *L.monocytogenes*, στη συγκέντρωση 2,5%, και τα δύο γονίδια (hly, agr) εκφράζονται περισσότερο στα γλυκαντικά στέβια RA και σακχαρίνη από ότι στη γλυκόζη (control). Και στα δύο γλυκαντικά το γονίδιο hly για την παθογένεια εκφράζεται περισσότερο στα γλυκαντικά από ότι στη γλυκόζη (control). Υπάρχει συνεπώς μια τάση παθογένειας μεγαλύτερη στα γλυκαντικά με σημαντική υπερέκφραση του γονιδίου. Σχετικά με το γονίδιο agr για το αίσθημα απαρτίας πάλι και στα δύο γλυκαντικά το γονίδιο εκφράζεται περισσότερο στα γλυκαντικά από ότι στη γλυκόζη. Ωστόσο δεν θεωρείται σημαντική υπερέκφραση δεδομένου ότι οι τιμές δεν ξεπερνούν την τιμή 2. Όσον αφορά τη συγκέντρωση 10%, όλα τα γονίδια υπερεκφράζονται στα γλυκαντικά σε σχέση με τη γλυκόζη. Μάλιστα το γονίδιο agr και στα δύο γλυκαντικά υπερεκφράζεται τόσο πολύ σε σημείο που δεν υπάρχει έκφραση στη γλυκόζη (control).

Συμπερασματικά, η αντικατάσταση της γλυκόζης με γλυκαντικά, φαίνεται να επηρεάζει την έκφραση μιας σειράς γονιδίων που συνδέονται με την παθογένεια του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*. Τα αποτελέσματα σαν σύνολο δείχνουν ότι υπάρχει μια τάση παθογένειας προς τα πάνω στα γλυκαντικά σε σχέση με τη γλυκόζη. Δεν μπορούμε ωστόσο να καταλήξουμε σε σαφή συμπεράσματα για την έννοια των συγκεκριμένων αποτελεσμάτων δεδομένου του μικρού αριθμού επαναλήψεων που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Περαιτέρω μελέτες είναι ανάγκη να διεξαχθούν για να αποσαφηνιστεί η συμπεριφορά των γονιδίων σε περιβάλλον με γλυκαντικά και να μεταφραστεί αυτό σε κίνδυνο ως προς τους καταναλωτές.

6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα τελευταία χρόνια η όλο αυξανόμενη ανησυχία και ευαισθητοποίηση των καταναλωτών σε θέματα υγείας, έχουν οδηγήσει σε αύξηση της κατανάλωσης γλυκαντικών ουσιών από τον πληθυσμό. Η βιομηχανία τροφίμων έχει στρέψει το ενδιαφέρον της σε παραγωγή προϊόντων χαμηλών θερμίδων και με λιγότερη ζάχαρη, κάνοντας εκτεταμένη χρήση υποκατάστατων ζάχαρης. Δεδομένου του τεράστιου οφέλους της αντικατάστασης της ζάχαρης στα τρόφιμα, θεωρείται πολύ σημαντική η εξέταση της αντικατάστασης αυτής στην μικροβιακή ανάπτυξη τόσο των προβιοτικών βακτηρίων, όσο και βακτηρίων με σημαντική παθογόνα δράση, που πιθανόν να βρεθούν σε προϊόντα του εμπορίου. Συνεπώς, σκοπός της εργασίας αυτής ήταν η μελέτη της επίδρασης της αντικατάστασης της γλυκόζης από γλυκαντικά στην μικροβιακή ανάπτυξη ενός παθογόνου βακτηρίου, της *Listeria monocytogenes* και ενός οξυγαλακτικού βακτηρίου το *Lactobacillus pentosus*. Η μελέτη αυτή έγινε σε δύο συγκεντρώσεις, στην 2.5% και στην 10%.

Από τα αποτελέσματα της μεθόδου μέτρησης της οπτικής πυκνότητας, φάνηκε ότι υπήρχαν διαφορές στην ανάπτυξη του παθογόνου *Listeria monocytogenes*, μεταξύ των δύο συγκεντρώσεων. Στην περίπτωση της συγκέντρωσης 2.5% παρατηρήθηκε μεγαλύτερη ανάπτυξη στην γλυκόζη σε σχέση με τα υπόλοιπα γλυκαντικά. Οι τιμές «Area» και «MSrODC» ήταν αρκετά μεγαλύτερες στην γλυκόζη, ενώ αντίθετα η τιμή «Tdet» δεν είχε μεγάλες διαφορές μεταξύ γλυκόζης και γλυκαντικών. Στην συγκέντρωση 10% πάλι η γλυκόζη εμφάνισε τη μεγαλύτερη ανάπτυξη, με την τιμή «Area» να είχε την μεγαλύτερη τιμή για την γλυκόζη, ωστόσο η τιμή αυτή ήταν μικρότερη από τη συγκέντρωση 2.5%. Σχετικά με τις παραμέτρους «MSrODC» και «Tdet», παρατηρήθηκαν υψηλότερες τιμές στην γλυκόζη, ωστόσο συνολικά οι τιμές ήταν μειωμένες σε σχέση με τις τιμές της συγκέντρωσης 2.5%. Συνολικά, προκύπτει ως συμπέρασμα ότι ο μικροοργανισμός και στις δύο συγκεντρώσεις αναπτύχθηκε καλύτερα παρουσία γλυκόζης σε σχέση με τα γλυκαντικά. Επίσης, η ανάπτυξη του μικροοργανισμού φάνηκε μεγαλύτερη στην συγκέντρωση 2.5%, κάτι που υποδηλώνει ότι όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της γλυκόζης, δεν ευνοείται τόσο η ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Σε περίπτωση λοιπόν που ένα τρόφιμο είναι επιμολυσμένο με *Listeria monocytogenes*, μια πιθανή ενίσχυση του τροφίμου με μεγαλύτερη συγκέντρωση γλυκόζης θα επέφερε μεγαλύτερη ασφάλεια στον καταναλωτή από ένα τρόφιμο με μικρή συγκέντρωση γλυκόζης. Όσον αφορά τα γλυκαντικά μεταξύ τους, και στις δύο συγκεντρώσεις δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεγάλες στις τιμές τους, το οποίο οφείλεται στο γεγονός ότι προστέθηκαν σε πολύ μικρές ποσότητες στο μέσο ανάπτυξης. Ο κυριότερος παράγοντας που επηρεάζει την ανάπτυξη της *L. Monocytogenes* είναι η παρουσία ή η απουσία της γλυκόζης στο μέσο ανάπτυξης και σε τι συγκεντρώσεις βρίσκεται. Συνεπώς, αν αφαιρεθεί η γλυκόζη από το μέσο ανάπτυξης και προστεθούν υπολογισμένες συγκεντρώσεις των γλυκαντικών, αυτό θα οδηγήσει σε ένα δυσμενές περιβάλλον για την ανάπτυξη του παθογόνου μικροοργανισμού, γεγονός που αποτελεί πλεονέκτημα στην προσπάθεια αντικατάστασης της γλυκόζης με τα γλυκαντικά. Όσον αφορά το προβιοτικό βακτήριο *Lactobacillus pentosus*, και στις δύο συγκεντρώσεις η μεγαλύτερη ανάπτυξη παρατηρήθηκε στη γλυκόζη, με μια πολύ μεγάλη διαφορά σε σχέση με τις τιμές των γλυκαντικών. Συνεπώς, η αντικατάσταση της γλυκόζης με γλυκαντικές ουσίες σε ένα τρόφιμο, πιθανόν να μην αποτελέσει ευνοϊκή ενέργεια για την ανάπτυξη του συγκεκριμένου βακτηρίου και ως αποτέλεσμα της προσθήκης των ευεργετικών ιδιοτήτων του και της λειτουργικότητάς του στα τρόφιμα.

Και για τους δύο μικροοργανισμούς, θα πρέπει να ελεγχθεί περαιτέρω με πολλές νέες μελέτες η επίδραση των γλυκαντικών αυτών στην ανάπτυξή τους και να εξεταστεί σε διάφορες συγκεντρώσεις και με προσθήκη επιπλέον παρεμποδιστικών παραγόντων όπως μείωση της θερμοκρασίας, μείωση του pH. Για την *Listeria monocytogenes* φάνηκε ότι είναι πιο ευαίσθητη στις αλλαγές της συγκέντρωσης της γλυκόζης, σε αντίθεση με το *Lactobacillus reuteri* που δεν είχε ιδιαίτερες διαφορές μεταξύ των δύο συγκεντρώσεων. Είναι μεγάλης σημασίας, η περαιτέρω μελέτη της επίδρασης των γλυκαντικών και σε άλλα ευεργετικά βακτήρια, μιας και τα αποτελέσματα τέτοιων μελετών θα ήταν πολύ χρήσιμα στην παραγωγή τροφίμων με χαμηλό θερμιδικό περιεχόμενο και ταυτόχρονες ευεργετικές λειτουργίες για την υγεία.

Όσον αφορά τον γονιδιακό έλεγχο για τον παθογόνο μικροοργανισμό *Listeria monocytogenes*, παρατηρήθηκε στα γλυκαντικά και για τις δύο συγκεντρώσεις μια τάση παθογένειας προς τα πάνω, δεδομένου ότι τα γονίδια εκφράζονταν περισσότερο στα γλυκαντικά σε σχέση με τη γλυκόζη. Δεν μπορεί να διεξαχθεί ένα σαφές συμπέρασμα για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων αυτών καθώς οι επαναλήψεις που πραγματοποιήθηκαν ήταν πολύ λίγες για να οδηγήσουν σε ένα ξεκάθαρο αποτέλεσμα. Το μόνο βέβαιο είναι ότι η αντικατάσταση της γλυκόζης με γλυκαντικά, επηρεάζει την έκφραση μιας σειράς γονιδίων της *Listeria* που σχετίζονται με την παθογένεια.

Συνολικά, η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε με εξέταση των μικροοργανισμών σε θρεπτικά υποστρώματα, συνεπώς δεν μπορεί να διεξαχθεί ένα ολοκληρωμένο συμπέρασμα για την συμπεριφορά τους σε ένα τρόφιμο. Πρέπει να γίνουν περαιτέρω μελέτες σε πραγματικά προϊόντα διατροφής ώστε να εξακριβωθεί η επίδραση των γλυκαντικών στα βακτήρια που μπορεί να υπάρξουν στα τρόφιμα και να διασφαλιστεί η ασφάλειά τους σε συνδυασμό και με άλλους παρεμποδιστικούς παράγοντες που προστίθενται στα τρόφιμα. Ωστόσο είναι ξεκάθαρο ότι η επίδραση της αντικατάστασης της γλυκόζης με αυτά τα γλυκαντικά στην μικροβιακή ανάπτυξη δεν πρέπει να παραμεληθεί και είναι μεγάλης σημαντικότητας.

Η επίδραση των γλυκαντικών στην μικροβιακή ανάπτυξη πέρα από το ότι πρέπει να μελετηθεί σε διαφορετικά θρεπτικά μέσα, πρέπει να διερευνηθεί και σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις αλλά και πιο πολύπλοκα συστήματα, ώστε να προκύψει ένα πιο βέβαιο συμπέρασμα για την ασφάλεια των τροφίμων του εμπορίου. Δεδομένου ότι η *Listeria* είναι ένα ψυχότροφο βακτήριο που μπορεί να αναπτυχθεί και σε θερμοκρασίες ψύξης (4°C), πρέπει να ληφθεί υπόψη η μικροβιακή ανάπτυξη σε προϊόντα ζαχαρούχα, όπως κρέμες, παγωτά, επιδόρπια, που αποθηκεύονται σε τέτοιες θερμοκρασίες και να μελετηθούν ιδιαίτερα οι συνθήκες αυτές.

Κάτι ακόμα που είναι σημαντικό να μελετηθεί είναι η πρωτεϊνική και η μεταγραφική ανάλυση, ώστε να εξακριβωθεί ποιοι τύποι πρωτεϊνών/γονιδίων εκφράζονται στις συνθήκες αυτές και αν αυτή η έκφραση σχετίζεται με την βακτηριακή ανάπτυξη, αναστολή ή ενίσχυσή της.

Συνολικά, η μελέτη αυτή αποτελεί μια βάση για το μεγάλης βαρύτητας ζήτημα της ασφάλειας των τροφίμων και θα αποτελέσει συνέχεια για περαιτέρω μελέτη σχετικά με την ανάπτυξη των βακτηρίων και τον μεταβολισμό τους υπό την επίδραση των γλυκαντικών. Η περαιτέρω μελέτη θα οδηγήσει σε σαφή αποτελέσματα για τη συμπεριφορά διαφόρων βακτηρίων τόσο παθογόνων όσο και προβιοτικών ευεργετικών βακτηρίων, ενισχύοντας έτσι την διάθεση στο εμπόριο τροφίμων με λειτουργικές ιδιότητες και τεχνολογικό ενδιαφέρον τα οποία συνάδουν με τις απαιτήσεις για την ασφάλεια και προστασία της υγείας του καταναλωτή.

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

A. Ελληνική

1. Παραμυθιώτης, Σ. (2010). *Μοριακή βιοτεχνολογία τροφίμων. Πανεπιστημιακές σημειώσεις*, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 24-25
2. Σχοινά, Γ.Ε. (2019). *Μελέτη της δημιουργίας βιοϋμενίων σε μεταλλική επιφάνεια, σε κλειστό σύστημα μεσογειακής ιχθυοκαλλιέργειας* Μεταπτυχιακή διατριβή, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 15-16

B. Ξενόγλωσση

1. Aarti, C., Khusro, A., Arasu, M.V., Agastian, P., Al-Dhabi, N.A., (2016). *Biological potency and characterization of antibacterial substances produced by Lactobacillus pentosus isolated from Hentak, a fermented fish product of North-East India*, Springerplus, 5(1), 1743
2. Ahmad, J., Khan, I., Blundell, R., Azzopardi, J., Mahomoodally, M.F., (2020). *Stevia rebaudiana Bertoni: an updated review of its health benefits, industrial applications and safety*, Trends in Food Science & Technology, 100, 177-189
3. Allerberger, F., and Wagner, M., (2010). *Listeriosis: a resurgent foodborne infection*, Clinical Microbiology and Infection, 16 (1), 16-23
4. 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
5. Arora, S., Singh, V. P., Sharma, V., Wadhwa, B. K., George, V., Singh, A. K., and Sharma, G. S., (2009). *Analysis of sucralose and its storage stability in burfi*, Journal of Food Science and Technology, 46, 114-117
6. Autret, N., Reynaud, C., Dubail, I., Berche, P., Charbit, A., (2003). *Identification of the agr Locus of Listeria monocytogenes: Role in Bacterial Virulence*, Infection and Immunity, 71(8), 4463
7. Azeez, O.H., Alkass, S.U., Persike D.S., (2019). *Long term saccharin consumption and increased risk of obesity, diabetes, hepatic dysfunction, and renal impairment in rats*, Medicina, 55 (10), 681
8. Baines, D., and Seal, R., (2012). *Natural Food Additives*, Ingredients and Flavourings
9. Basson, A.R., Rodriguez-Palacios, A., Comineli, F., (2021). *Artificial Sweeteners: History and New Concepts on Inflammation*, Frontiers in Nutrition, 668
10. Behari, J., and Youngman, P., (1998). *Regulation of hly Expression in Listeria monocytogenes by Carbon Sources and pH Occurs through Separate Mechanisms Mediated by PrfA*, Infection and Immunity, 66 (8), 3635

11. BeMiller, J.N., (2019). *Carbohydrate and Noncarbohydrate Sweeteners*, Carbohydrate Chemistry for Food Scientists, 371-399
12. Bertranda, R.L., (2019). *Lag Phase Is a Dynamic, Organized, Adaptive, and Evolvable Period That Prepares Bacteria for Cell Division*, Journal of Bacteriology, 201(7)
13. Bopp, B.A., Sonders, R.C., and Kesterson, J.W., (1986). *Toxicological aspects of cyclamate and cyclohexylamine*, Critical Reviews in Toxicology 16 (3), 213-306
14. 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
15. Brown, H.L., (2022). *Microbial Growth*, Encyclopedia of Infection and Immunity, 324-335
16. 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., et.al., (2002). *Aspartame: review of safety*, Regulatory toxicology and pharmacology: RTP 35 (2), 1-3
17. 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 and technology, 99, 295-310
18. Carakostas, M. C., Curry, L. L., Boileau, A. C., and 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 (7), 1-10
19. Carocho, M., Morales, P., and 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
20. Chattopadhyay, S., Raychaudhuri U., Chakraborty R., (2011). *Artificial sweeteners-a review*, Journal of Food Science and Technology 51 (4), 611-621
21. Chattopadhyay, S., Raychaudhuri, U., and Chakraborty, R., (2014). *Artificial sweeteners - a review*, Journal of Food Science and Technology 51(4), 611-621.
22. Cocolin, L., Dolci, P., & Rantsiou, K. (2008). *Molecular methods for identification of microorganisms in traditional meat products*. In *Meat Biotechnology* (pp. 91-127). Springer, New York, NY.
23. Colagiorgi, A., Bruini, I., Di Ciccio, P.A., Zanardi, E., Ghidini, S., Ianieri, A., (2017). *Listeria monocytogenes Biofilms in the Wonderland of Food Industry, Pathogens*, 6 (3)
24. Czarnecka, K., Pilarz, A., Rogut, A., Maj, P., Szymańska, J., Olejnik, L., Szymański, P., (2021). *Aspartame-True or False? Narrative Review of Safety Analysis of General Use in Products*, Nutrients, 13 (6)
25. Deepak, S.A., Kottopalli, K.R., Rakwal, R., Oros, G., Rangappa, K.S., Iwahashi, H., Masuo, Y., Agrawal, G.K., (2007). *Real-Time PCR: Revolutionizing Detection and Expression Analysis of Genes*. Current Genomics, 8(4), 234

26. Dunn, A., and Stabb, E., (2007). *Beyond quorum sensing: the complexities of prokaryotic parliamentary procedures*, Analytical and bioanalytical chemistry, 387(2), 391-398
27. Edwards, C.H., Rossi, M., Corpe, C.P., Butterworth, P.J., Ellis, P.R., (2016). *The role of sugars and sweeteners in food, diet and health: Alternatives for the future*, Trends in Food Science and Technology, 56, 158-166
28. 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.
29. Feiner, G., (2006). *The microbiology of specific bacteria*. Meat Products Handbook, 595-615
30. Fry, J.C., (2012). *Natural low-calorie sweeteners*, Natural Food Additives, Ingredients and Flavourings, 41-75
31. Garmyn, D., Gal, L., Lemaitre, J.P, Hartmann, A., Piveteau, P., (2009). *Communication and Autoinduction in the species Listeria monocytogenes*, Taylor, and Francis online, 2 (4), 371-374
32. Giaouris, E., Heir, E., Hebraud, M., Chorianopoulos, N., Langsrud, S., et.al., (2014). *Attachment and biofilm formation by foodborne bacteria in meat processing environments: causes, implications, role of bacterial interactions and control by alternative novel methods*, Meat science, 97 (3), 298-309
33. Gong, X., Chen, N., Ren, K., Jia, J., Wei, K., Zhang, L., Lv, Y., Wang, J., and Li, M., (2019). *The Fruits of Siraitia grosvenorii: A Review of a Chinese Food-Medicine*, Frontiers in Pharmacology 10, 1400
34. González, C., Tapia, M., Pérez, E., Pallet, D., Dornier, M., (2014). *Main properties of steviol glycosides and their potential in the food industry: a review*, Fruits, 69 (2), 127-141
35. Hall, B. G., Acar, H., Nandipati, A., Barlow, M. (2014). *Growth rates made easy*, Molecular Biology and Evolution 31(1), 232-238
36. Harris, J., Paul, O., Park, Si H., White, S.J., Budachetri ,K., et.al., (2019). *Oxygen deprivation influences the survival of Listeria monocytogenes in gerbils*, Translational Animal Science, 3 (1), 304-314
37. Ibrahim, F., Ouwehand, C.A., In: Vinderola, G., Salminen, S., von Wright, A., Ouwehand, A. (Eds.), (2019). *Lactic Acid Bacteria*. Microbiological and Functional Aspects, Fifth edition. CRC Press, Taylor & Francis Group, New York, 47-56.
38. Isawa, K., Amino, Y., Kohmura, M., Ueda, Y., Kuroda, M., (2010). *Human-Environment Interactions-Taste*, Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology, 4, 631-671
39. Jethra, R. (1993). *The role of motility as a virulence factor in bacteria*, international journal of medical microbiology: IJMM 291(8), 605-614
40. Kahler, E. (2020). *The effect of natural alternative sweeteners lucuma, yacon, and monk fruit on the growth of probiotic lactic acid bacteria*, Abertay University
41. Kargar, M., and Ghasemi, A., (2009). *Role of Listeria monocytogenes hlyA gene isolated from fresh cheese in human habitual abortion in Marvdasht*, Iranian Journal of Clinical Infectious

Diseases, 4 (4), 214-218

42. Kozera, B., and Rapacz, M., (2013). Reference genes in real-time PCR, *Journal of Applied Genetics*, 54(4), 391
43. 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
44. 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
45. Li, C., Lin, L.M., Sui, F., Wang, Z.M., Huo, H.R., Dai, L., Jiang, T.L., (2014). *Chemistry and pharmacology of *Siraitia grosvenorii*: A review*, *Chinese Journal of Natural Medicines*, 12(2), 89-102
46. 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
47. Lohner, S., Toews, I., and Meerpohl, J., (2017). *Health outcomes of non-nutritive sweeteners: analysis of the research landscape*, *Nutrition Journal*
48. Ma, Y., Hu, C., Yan, W., Jiang, H., Liu, G., (2020). *Lactobacillus pentosus increases the abundance of Akkermansia and affects the serum metabolome to alleviate DSS-Induced Colitis in murine model*, *Front. Cell Dev. Biol.*
49. Magnuson, B.A., Roberts, A., Nestmann, E.R., (2017). *Critical review of the current literature on the safety of sucralose*, *Food and Chemical Toxicology*, 106, 324-355
50. Magnuson, B.A., Caracostas, M.C., Moore, N.H., Poulos, S.P., and Renwick, A.G., (2021). *Biological fate of low-calorie sweeteners*, *Nutr Rev*, 74 (11), 670-689
51. Milian, A.H., and Cifre, A.P., (2014). *What is new in listeriosis?*, *Biomed research international*
52. Mokoena, M.P., (2017). *Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins: Classification, Biosynthesis and Applications against Uropathogens: A Mini-Review*, *Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry*, 22(8)
53. 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
54. 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
55. Mortensen, A., (2016). *Sweeteners permitted in the European Union: safety aspects*, Department of Toxicology and Risk Assessment, Danish Institute for Food and Veterinary Research
56. Mullis, K. B. (1990). *Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction*, *Annales De Biologie Clinique* 48(8), 579-582

57. Nakrani, M.N., Wineland, R.H., Anjum, F., (2021). *Physiology, Glucose Metabolism*, StatPearls
58. 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
59. Olsson, K., Carlsen, S., Semmler, A., Simon, E., Mikkelsen, M.D., and Moller, B.L., (2016). *Microbial production of next generation stevia sweeteners*, *Microbial Cell factories*, 15 (207)
60. O' Mullane, M., Fields, B., and Stanley, G., (2014). *Food Additives: Sweeteners*, Yasmine Motarjemi, ed., Academic Press, Waltham, 477--484
61. Orsi, R.H., and Wiedmann, M., (2016), *Characteristics and distribution of Listeria spp., including Listeria species newly described since 2009*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100 (12), 273-287
62. Otabe, A., Fujieda, T., Masuyama, T., Ubukata, K., and 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 (1), 2-7
63. Pandey, R., and Upadhyay, S., (2012), *Food Additive Book*, Chapter 1, 1-30
64. 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
65. Peteliuk, V., Rybchuk, L., Bayliak, M., Storrey, K.B., Lushchak, O., (2021). *Natural sweetener Stevia rebaudiana: Functionalities, health benefits and potential risks*, *EXCLI Journal*, 20, 1412
66. Pfeiler, E.A., and Klaenhammer, T.R., (2007). *The genomics of lactic acid bacteria*, *Trends in microbiology*, 15(12), 546-553
67. Plaza-Diaz, J., Pastor-Villaescusa, B., Rueda-Robles, A., Abadia-Molina, F., and 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), 11-53
68. Poimenidou, S.V., Dalmaso, M., Papadimitriou, K., Fox, E.M., Skandamis, P.N., Jordan, K., (2018). *Virulence gene sequencing highlights similarities and differences in sequences in Listeria monocytogenes serotype 1/2a and 4b strains of clinical and food origin from 3 different geographic locations*, *Frontiers in Microbiology*, 9 (JUN), 1103
69. Rieu, A., Wiedmann, S., Garmyn, D., Piveteau, P., Guzzo, J., (2007). *Agr System of Listeria monocytogenes EGD-e: Role in Adherence and Differential Expression Pattern*, *ASM Journals, Applied and Environmental Microbiology*, 73(19)
70. Rolfe, M.D., Rice, C.J., Lucchini, S., Pin, C., et.al., (2012). *Lag Phase Is a Distinct Growth Phase That Prepares Bacteria for Exponential Growth and Involves Transient Metal Accumulation*, *ASM-Journals, Journal of microbiology*, 194(3)
71. Ryser, E.T., (2021). *Listeria*, *Foodborne Infections and Intoxications*, 201-220

72. Samuel, P., Ayoob, K.T., Magnuson, B.A., Wölwer-Rieck, U., Jeppesen, P.B., Rogers, P.A., Rowland, I., Mathews, R., (2018). *Stevia Leaf to Stevia Sweetener: Exploring Its Science, Benefits, and Future Potential*, The Journal of Nutrition, 148 (7), 1186-1205
73. Shankar, P., Ahuja, S., Sriram, K., (2013). *Non-nutritive sweeteners: Review and update*, Nutrition, 29 (11-12), 1293-1299
74. Sharma, A., Amarnath, S., Thulasimani, M., Ramaswamy, S., (2016). *Artificial sweeteners as a sugar substitute: Are they really safe?*, Indian Journal of Pharmacology, 48 (3), 237
75. Shil, A., Chichger, H., (2021). *Artificial Sweeteners Negatively Regulate Pathogenic Characteristics of Two Model Gut Bacteria, E. coli and E. faecalis*. International journal of molecular science, 15(22), 5228
76. Shivani, Thakur B.K., Mallikarjun C.P., Majahan M., Kapoor P., et. al., (2018). *Introduction, adaptation and characterization of monk fruit (Siraitia grosvenorii): a non-caloric new natural sweetener*, Scientific Reports, 11 (1), 1-13
77. Suez, J., Korem, T., Zeevi, D., Zilberman-Schapira, G., Thaiss, C. A., et.al., (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.
78. Suzuki, Y. A., Tomoda, M., Murata, Y., Inui, H., Sugiura, M., and 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
79. Swinnen, I.A.M., Bernaerts, K., Dens, A.H., Geeraerd, J.F., (2004). *Predictive modelling of the microbial lag phase: a review*, International Journal of Food Microbiology, 94(2), 137-159
80. Tiefenbacher, K., (2017). *Technology of Main Ingredients-Sweeteners and Lipids*, Wafer and Waffle, 123-255
81. 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
82. Wang, L., Fan, D., Chen, W., Terentjev, E.M., (2015). *Bacterial growth, detachment, and cell size control on polyethylene terephthalate surfaces*, Scientific Reports, 5(1), 1-11
83. Wang, Y., Wu, J., Lv, M., Shao, Zhen, Hungwe, M., et.al., (2021). *Metabolism Characteristics of Lactic Acid Bacteria and the Expanding Applications in Food Industry*, Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 9, 612285
84. Warrington, S., Lee, C., Otabe, A., Narita, T., Polnjak, O., Pirags, V., Krievins, D., (2011). *Acute and multiple dose studies to determine the safety, tolerability, and pharmacokinetic profile of advantame in healthy volunteers*, Food and Chemical Toxicology, 49 (1), 77-83
85. Watson, J.D., Baker, T. A., Bell, P., Gann,A., Levine, M., & Losick, R., (2008). *Molecular biology of the gene* Pearson Education
86. Wong, M.L., and Medrano, J. F. (2005). *Real-time PCR for mRNA quantitation*, BioTechniques 39(1), 75-85

87. Zeece, M., (2020). *Flavors*, Introduction to the Chemistry of Food, 213-250

88. 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

Γ. Αναφορές Ιστού

<https://www.who.int>

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

<https://www.fda.gov>

<https://www.bacterio.net>