

**ΑΛΕΞΑΝΔΡΕΙΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ  
ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ  
ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ  
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**Μελέτη μικροβιολογικών χαρακτηριστικών γαλακτικών βακτηρίων  
απομονωμένων από μαλακά ελληνικά τυριά ΠΟΠ**

**ΔΟΥΛΓΕΡΑΚΗΣ ΧΡΗΣΤΟΣ  
ΚΟΙΝΙΔΗΣ ΑΝΤΩΝΗΣ**

**ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2017**

Μελέτη μικροβιολογικών χαρακτηριστικών γαλακτικών βακτηρίων  
απομονωμένα από μαλακά ελληνικά τυριά ΠΟΠ

**Δουλγεράκης Χρήστος**

**Κοϊνίδης Αντώνης**

Υποβολή Πτυχιακής Διατριβής που αποτελεί μέρος των απαιτήσεων για  
την απονομή του Πτυχίου του Τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων του ΤΕΙ  
Θεσσαλονίκης

**Εισηγητής**

Λυκοτραφίτη Ελένη

Μελέτη μικροβιολογικών χαρακτηριστικών γαλακτικών βακτηρίων  
απομονωμένα από μαλακά ελληνικά τυριά ΠΟΠ

**Δουλγεράκης Χρήστος**

**Κοϊνίδης Αντώνης**

ΑΤΕΙ Θεσσαλονίκης, Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας και Τεχνολογίας  
Τροφίμων & Διατροφής, Τμήμα Τεχνολογίας Τροφίμων, 57400  
Θεσσαλονίκη Τ.Θ. 141

### **Περίληψη**

Προβιοτικά ονομάζονται οι ζωντανοί μικροοργανισμοί που όταν χορηγούνται σε επαρκείς ποσότητες παρέχουν ευεργετική επίδραση στη υγεία του ξενιστή. Τα πρεβιοτικά είναι τα άπεπτα συστατικά των τροφίμων που δρουν ευεργετικά στον οργανισμό ενεργοποιώντας επιλεκτικά την ανάπτυξη και τη δραστηριότητα προβιοτικών μικροοργανισμών που διαβίουν στην γαστρεντερική οδό. Τα συμβιωτικά είναι ο συνδυασμός των προβιοτικών με τα πρεβιοτικά. Στην παρούσα πτυχιακή μελετήθηκαν 24 στελέχη των γενών *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* και *Pediococcus* ως προς την ικανότητά τους να ζυμώνουν τέσσερις διαφορετικούς υδατάνθρακες (πρεβιοτικά), την αντιμικροβιακή δράση των μεταβολικών προϊόντων ορισμένων στελεχών σε διαφορετικά pH έναντι των παθογόνων μικροοργανισμών *Listeria monocytogenes* Scott A, *Salmonella typhimurium* DT193 και *Escherichia coli* O157:H7 NCTC 12900 και ορισμένες βιοχημικές ιδιότητες αυτών. Όλα τα στελέχη του *Lactobacillus pentosus* και τα είδη του γένους *Enterococcus* αναπτύχθηκαν καλύτερα σε ζωμό με προσθήκη γαλακτοολιγοσακχαριτών. Η χρήση υπερκείμενου υγρού όλων των παραπάνω στελεχών μετά τη ζύμωση συγκεκριμένων υδατανθράκων προκάλεσε την πλήρη αναστολή της

ανάπτυξης και των τριών παραπάνω παθογόνων. Εξαίρεση αποτελεί ο *Enterococcus faecalis* 12d-MRS που μείωσε σημαντικά ( $p < 0.05$ ) τον ρυθμό ανάπτυξης και καθυστέρησε τη λανθάνουσα φάση ανάπτυξης των *S. typhimurium* και *E. coli*. Ο *Enterococcus durans* 10a3a-M17 ήταν το μοναδικό στέλεχος που προκάλεσε πλήρη αναστολή της *Listeria monocytogenes* σε pH 6 σε αντίθεση με τα υπόλοιπα στελέχη που προκάλεσαν σημαντική ( $p < 0.05$ ) μείωση του ρυθμού ανάπτυξης και καθυστέρηση της λανθάνουσας φάσης ανάπτυξης των τριών παθογόνων. Αντιθέτως δεν παρατηρήθηκε σημαντική ( $p > 0.05$ ) μείωση του ρυθμού ανάπτυξης και καθυστέρηση της λανθάνουσας φάσης ανάπτυξης από τα μεταβολικά προϊόντα των *Leuconostoc mesenteroides* 6d-MRS, *L. rhamnosus* 5b-MRS, *L. pentosus* 14b-MRS και *L. paracasei* 10a1a-MRS M17 σε pH 6.

## Abstract

Probiotic is defined as live microbial feed additive that beneficially affects the host health. Prebiotic is indigestible fermented diet substrates that selectively stimulate the growth and activity of probiotic bacteria in gastrointestinal tract. Synbiotics is the combination of probiotics and prebiotics. In the current study twenty-four strains of the genes *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* and *Pediococcus* were studied concerning their ability to ferment four different carbohydrates (prebiotics), the antimicrobial activity of metabolic substances of some strains in different pH values against the pathogens *Listeria monocytogenes* Scott A, *Salmonella typhimurium* DT193 and *Escherichia coli* O157:H7 NCTC 12900 and some biochemical properties of them. All the strains of *Lactobacillus pentosus* and the species of the gene *Enterococcus* were grown better in broth containing galactooligosaccharides. The use of the supernatant liquid of all the above mentioned strains after the fermentation of specific carbohydrates had as a result the inhibition of all three pathogens. *Enterococcus faecalis* 12d-MRS was an exception that caused the significant ( $p < 0,05$ ) reduction of the growth rhythm and delayed the lag phase of *S. typhimurium* and *E. coli*. *Enterococcus durans* 10a3a-M17 was the only strain that showed inhibition of *Listeria monocytogenes* in pH=6 in contrast with the rest strains that caused a significant ( $p < 0,05$ ) reduction of the growth rhythm and delayed the lag phase of all three pathogens. On the contrary, a significant ( $p > 0,05$ ) decrease of the growth rhythm and delay of the lag phase was not observed from the metabolic products of *Leuconostoc mesenteroides* 6d-MRS, *L. rhamnosus* 5b-MRS, *L. pentosus* 14b-MRS and *L. paracasei* 10a1a-MRS M17 in pH=6.

## Πίνακας περιεχομένων

1. Εισαγωγή .....	1
1.1 Προβιοτικά .....	1
1.1.1 Αντιμικροβιακή δράση προβιοτικών .....	2
1.1.2 Γαλακτικά βακτήρια .....	4
1.1.1.1 Γένος <i>Lactobacillus</i> .....	5
1.1.1.2 Γένος <i>Enterococcus</i> .....	5
1.1.1.3 Γένος <i>Leuconostoc</i> .....	6
1.1.1.4 Γένος <i>Pediococcus</i> .....	7
1.2 Πρεβιοτικά.....	7
1.2.1 Γαλακτοολιγοσακχαρίτες (GOS).....	8
1.2.2 Φρουκτοολιγοσακχαρίτες (FOS) .....	9
1.3 Συμβιωτικά .....	9
1.4 Παθογόνοι μικροοργανισμοί .....	10
1.4.1 <i>Listeria</i> .....	10
1.4.1.1 Λιστερίωση .....	11
1.4.2 <i>Salmonella</i> .....	12
1.4.2.1 Σαλμονέλλωση .....	12
1.4.3 <i>Escherichia coli</i> .....	13
1.4.3.1 Εντεροαιμορραγική <i>E. coli</i> .....	13
Σκοπός της πτυχιακής εργασίας.....	14
2. Υλικά και μέθοδοι.....	15
2.1 Υποστρώματα.....	15
2.2 Όργανα .....	17

2.3 Μέθοδοι.....	18
2.3.1. Βιοχημικές δοκιμές.....	18
2.3.1.1. Δοκιμή της καταλάσης.....	18
2.3.1.2. Δοκιμή της οξειδάσης.....	18
2.3.1.3. Δοκιμή ζύμωσης της λακτόζης.....	19
2.3.1.4. Δοκιμή υδρόλυσης της καζεΐνης.....	19
2.3.1.5. Δοκιμή υδρόλυσης ζελατίνης.....	20
2.3.1.6 Δοκιμή της ινδόλης.....	20
2.3.2 Γαλακτικά βακτήρια.....	21
2.3.3 Υδατάνθρακες.....	21
2.3.4 Ανάπτυξη των γαλακτικών βακτηρίων σε διαφορετικούς υδατάνθρακες.....	21
2.3.5 Μεταβολικά προϊόντα.....	22
2.3.6 Παθογόνα βακτήρια.....	22
2.3.7 Αντιμικροβιακή δράση.....	23
2.3.8 Διερεύνηση αντιμικροβιακής δράσης.....	23
2.4 Στατιστική ανάλυση.....	24
3. Αποτελέσματα.....	25
3.1 Βιοχημικά χαρακτηριστικά στελεχών.....	26
3.2 Επιλογή βέλτιστου υδατάνθρακα για κάθε στέλεχος με βάση τον συνδυασμό μέγιστου ρυθμού ανάπτυξης ( $\mu_{max}$ ) και μικρότερης διάρκειας λανθάνουσας φάσης.....	28
3.3 Έλεγχος αντιμικροβιακής δράσης των μεταβολικών προϊόντων της ζύμωσης.....	33

3.3.1 Αντιμικροβιακή δράση των μεταβολικών προϊόντων σε ελεύθερο pH και σε pH 6.....	33
3.3.1.1 <i>Salmonella typhimurium</i> .....	34
3.3.1.2 <i>Escherichia coli</i> .....	37
3.3.1.3 <i>Listeria monocytogenes</i> .....	39
4. Συμπεράσματα .....	43
5.Προτάσεις για μελλοντική έρευνα .....	46
6. Βιβλιογραφία.....	47



## Πίνακες

Πίνακας 3.1 Ταυτότητα στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν .....	25
Πίνακας 3.1.2 Αποτελέσματα βιοχημικών δοκιμών των στελεχών που μελετήθηκαν.....	26
Πίνακας 3.2.3 Υπολογισμός μέγιστου ρυθμού ανάπτυξης ( $\mu_{max}$ ) και λανθάνουσας φάσης (h) των στελεχών σε διαφορετικούς υδατάνθρακες με τη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (580nm) .....	28
Πίνακας 3.2.4 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων ζύμωσης των στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν με διαφορετικούς υδατάνθρακες σε σχέση με τη γλυκόζη .....	31
Πίνακας 3.2.5 Μέτρηση του pH των στελεχών μετά τη ζύμωση συγκεκριμένων υδατανθράκων .....	32
Πίνακας 3.3.6 Μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης και λανθάνουσα φάση της <i>S. typhimurium</i> με προσθήκη υπερκείμενων υγρών των στελεχών που μελετήθηκαν σε ελεύθερο pH και σε pH 6 .....	34
Πίνακας 3.3.7 Μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης και λανθάνουσα φάση της <i>E. coli</i> με προσθήκη υπερκείμενων υγρών των στελεχών που μελετήθηκαν σε ελεύθερο pH και σε pH 6 .....	37
Πίνακας 3.3.8 Μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης και λανθάνουσα φάση της <i>L. monocytogenes</i> με προσθήκη υπερκείμενων υγρών των στελεχών που μελετήθηκαν σε ελεύθερο pH και σε pH 6 .....	39
Πίνακας 3.3.9 Σύγκριση της $\mu_{max}$ (t-test) των παθογόνων μικροοργανισμών παρουσία μεταβολικών προϊόντων των στελεχών σε pH 6 σε σχέση με τον εκάστοτε μάρτυρα .....	42
Πίνακας 3.3.10 Σύγκριση της $\mu_{max}$ (t-test) των παθογόνων μικροοργανισμών παρουσία μεταβολικών προϊόντων του στελέχους 12d-MRS <i>Enterococcus faecalis</i> σε ελεύθερο pH σε σχέση με τον εκάστοτε μάρτυρα.....	42

## Σχήματα

Σχήμα 1 Καμπύλη ανάπτυξης *S. typhimurium* χωρίς προσθήκη υπερκείμενου υγρού και με προσθήκη υπερκείμενου υγρού μεταβολικών προϊόντων του στελέχους 12d-MRS M17 *Enterococcus faecalis* σε ελεύθερο pH που αναπτύχθηκε σε ζωμό με γαλακτοολισακχαριτή (GOS Syrup).....36

Σχήμα 2 Καμπύλη ανάπτυξης *E. coli* χωρίς προσθήκη υπερκείμενου υγρού και με προσθήκη υπερκείμενου υγρού μεταβολικών προϊόντων του στελέχους 12d-MRS M17 *Enterococcus faecalis* σε ελεύθερο pH που αναπτύχθηκε σε ζωμό με γαλακτοολισακχαριτή (GOS Syrup).....38

Σχήμα 3 Καμπύλη ανάπτυξης *L. monocytogenes* χωρίς προσθήκη υπερκείμενου υγρού και με προσθήκη υπερκείμενου υγρού μεταβολικών προϊόντων του στελέχους 12d-MRS M17 *Enterococcus faecalis* σε ελεύθερο pH που αναπτύχθηκε σε ζωμό με γαλακτοολισακχαριτή (GOS Syrup).....40

Σχήμα 4 Καμπύλη ανάπτυξης *L.monocytogenes* χωρίς προσθήκη υπερκείμενου υγρού και με προσθήκη υπερκείμενου υγρού μεταβολικών προϊόντων των στελεχών 6d-MRS *Leuc. mesenteroides*, 5b-MRS *L. rhamnosus*, 14b-MRS *L. pentosus* και 10a1a-MRS M17 *L. paracasei* σε pH 6.....41

## Συντομεύσεις

Glu	Glucose
GOS	Galactooligosaccharides
FOS	Fructooligosaccharides
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>S. typhimurium</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
cfu	colony forming units
WHO/FAO	World Health Organization / Food and Agriculture Organization
CDC	Center for Disease Control and Prevention
EAEC	<i>Enteraggregative E. coli</i>
EHEC	<i>Enterohemorrhagic E. coli</i>
EIEC	<i>Enteroinvasive E. coli</i>
EPEC	<i>Enteropathogenic E. coli</i>
ETEC	<i>Enterotoxigenic E. coli</i>
DAEC	<i>Diffusely adherent E. coli</i>
Π.Ο.Π	Προστατευόμενη Ονομασία Προέλευσης
MRS	De man, Rogosa and Sharpe
GRAS	Generally Regarded as Safe

## 1. Εισαγωγή

### 1.1 Προβιοτικά

Σύμφωνα με τον WHO / FAO τα προβιοτικά είναι «ζωντανοί, μη παθογόνοι μικροοργανισμοί, οι οποίοι, όταν χορηγηθούν σε επαρκείς ποσότητες, επιφέρουν ευεργετικά αποτελέσματα στον οργανισμό που τα λαμβάνει» (FAO/WHO, 2002). Αυτοί επιζούν κατά τη διαδικασία της πέψης, προσκολλώνται στα τοιχώματα του εντέρου και έτσι διατηρούν την ισορροπία της εντερικής χλωρίδας και επηρεάζουν το ανοσοποιητικό σύστημα. Ανταγωνίζονται τα παθογόνα παρεμποδίζοντας τα να εγκατασταθούν, αφού καταλαμβάνουν τους υποδοχείς των κυττάρων του εντέρου και καταναλώνοντας τα θρεπτικά συστατικά που θα χρησιμοποιούσαν (Ciorba, 2012). Το 2012 η Αμερικανική Ακαδημία Παιδιατρικής Επιτροπής για την Διατροφή δήλωσε ως προβιοτικά, μικροοργανισμούς που παράγουν μικρά μοριακά μεταβολικά υποπροϊόντα τα οποία ασκούν ευεργετική ρυθμιστική επίδραση στις βιολογικές λειτουργίες του ξενιστή και μπορεί να λειτουργούν ως ανοσορυθμιστές (Hamasalim, 2016).

Η κατανάλωση τους παρέχει πολλά οφέλη.

- 1) Συμβάλλουν στην ομαλή λειτουργία του εντέρου διατηρώντας σε φυσιολογικά επίπεδα τη μικροχλωρίδα  $\sim 10^8$ - $10^{12}$ /g εντερικού περιεχομένου (Katouli, 2010)
- 2) Ρύθμιση και ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος.
- 3) Προστασία ενάντια των παθογόνων λόγω παρεμπόδισης της εγκατάστασης τους και λόγω της παραγωγής αντιμικροβιακών ουσιών (Tripathi & Giri, 2014).
- 4) Πιθανές αντικαρκινογόνες και αντιμεταλλαξιογόνες ιδιότητες.
- 5) Μείωση της πίεσης του αίματος.

- 6) Μείωση της χοληστερόλης.
- 7) Μείωση αλλεργικών συμπτωμάτων (Klaenhammer & Kullen, 1999).
- 8) Μείωση σοβαρότητας συμπτωμάτων λοιμώξεων (Παπαντωνίου, 2013).  
Περιλαμβάνουν είδη των γενών *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Propionibacterium*, *Bifidobacterium* αλλά και ορισμένες ζύμες της οικογένειας *Saccharomyces*.

Για να οριστεί ένας μικροοργανισμός ως προβιοτικό πρέπει μεταξύ άλλων να:

- 1) ασκεί ευεργετική δράση στον οργανισμό όταν καταναλώνεται
- 2) επιβιώνει το πέρασμα από το γαστρεντερικό σωλήνα και να μεταβολίζεται στο έντερο
- 3) μην είναι παθογόνος, τοξικός, αλλεργιογόνος, μεταλλαξιογόνος
- 4) έχει καλές οργανοληπτικές ιδιότητες κατά τη χρήση του σε τρόφιμα (Gibson *et al.*, 2010).
- 5) παρουσιάζει ανθεκτικότητα στα οξέα και άλατα της χολής, τα ένζυμα και το οξυγόνο
- 6) παράγει αντιμικροβιακές ουσίες.

### **1.1.1 Αντιμικροβιακή δράση προβιοτικών**

Οι όροι αντιμικροβιακός και ανταγωνιστικός αναφέρονται στην ικανότητα ενός είδους να αναστέλλει την ανάπτυξη ενός άλλου είδους. Υπάρχουν διάφοροι μηχανισμοί που τελικά επιφέρουν την ανταγωνιστική δράση μεταξύ δυο ειδών όπως ο ανταγωνιστικός αποκλεισμός, η τόνωση του ανοσοποιητικού συστήματος του οργανισμού-ξενιστή, η παραγωγή μορίων που προκαλούν αλλαγές στην έκφραση των γονιδίων, η παραγωγή οργανικών οξέων και η παραγωγή ουσιών όπως βακτηριοσίνες. Στα οργανικά οξέα περιλαμβάνονται κυρίως το γαλακτικό, οξικό, προπιονικό και βουτυρικό οξύ ενώ παράγονται επίσης ουσίες όπως το υπεροξειδίο του

υδρογόνου, το διοξείδιο του άνθρακα, το διακετύλιο (Sabina, 2016). Οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί χρησιμοποιούνται κυρίως σε όξινα τρόφιμα ( $\text{pH} < 5.5$ ) και έχουν ισχυρή αντιμικροβιακή δράση κάτω από την  $\text{pKa}$  τους (σταθερά διάστασης οξέος, ισχυρότητα οξέος σε διάλυμα). Τα γαλακτικά βακτήρια κατά την ανάπτυξη τους, ζυμώνουν διάφορους υδατάνθρακες παράγοντας οργανικά οξέα. Τα σημαντικότερα από αυτά είναι το οξικό και το γαλακτικό οξύ. Αυτά έχουν τιμή  $\text{pKa}$  4.5 και 4.8, αντίστοιχα. Αυτό σημαίνει ότι σε τιμές  $\text{pH}$  μικρότερες από αυτή δρουν αποτελεσματικά, αναστέλλοντας την ανάπτυξη ανεπιθύμητων παθογόνων βακτηρίων. Δρουν διαπερνώντας την κυτταρική μεμβράνη και εισέρχονται στο κυτταρόπλασμα. Υπάρχουν σε φορτισμένη και ουδέτερη (αδιάστατη) μορφή, μόνο τα αδιάστατα όμως μπορούν να εισέλθουν στο κύτταρο. Το  $\text{pH}$  στο οποίο οι συγκεντρώσεις των φορτισμένων και αδιάστατων οξέων είναι ίσες είναι η  $\text{pKa}$ . Σε χαμηλό  $\text{pH}$  το αδιάστατο οξύ διαπερνά τη μεμβράνη και δίσταται υπό την επίδραση του ουδέτερου κυτταροπλασματικού  $\text{pH}$ . Το  $\text{pH}$  μειώνεται λόγω απελευθέρωσης πρωτονίων και το κύτταρο χρησιμοποιεί την τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) για να τα αντλήσει έξω, να διατηρήσει ουδέτερο το  $\text{pH}$ , αλλά εξαντλεί την ενέργεια που απαιτείται για την ανάπτυξη (Montville & Matthews, 2005).

Οι βακτηριοσίνες συνθέτονται από τα ριβοσώματα και αποτελούν εξωκυτταρικά απελευθερώμενα αντιμικροβιακά πεπτίδια (όπως η γαλακτίνη, λακτινίνη, πεδιοϊκίνη, εντερκίνη, εντερολυσίνη και νισίνη) που παρουσιάζουν δραστηριότητα έναντι κοντινά σχετιζόμενων ειδών (Fisher & Phillips, 2009). Έχουν χαμηλό μοριακό βάρος, είναι κατιονικά, αμφίπολα μόρια, συνήθως με δομή τυχαίων σπειρών σε υδατικό περιβάλλον, με ελάχιστη ή μηδενική περιεκτικότητα σε κυστεΐνη, εύκολα διασπώσιμα από τα πρωτεολυτικά ένζυμα (κυρίως από τις πρωτεάσες) της γαστρεντερικής

οδού που τις καθιστά «ασφαλείς» (GRAS, Generaly Regarded As Safe) (Zacharof & Lovitt, 2012).

Η ονομασία τους προέρχεται από το όνομα του βακτηρίου από το οποίο παράγονται και διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τα βακτήρια ενάντια των οποίων δρουν, τις βιοχημικές τους ιδιότητες και το αν τα γονίδια τους βρίσκονται στο χρωμόσωμα ή σε πλασμίδιο. Αυτές που παράγονται από τα γαλακτικά βακτήρια, δρουν καταστρέφοντας την κυτταροπλασματική μεμβράνη δημιουργώντας πόρους. Αυτό προκαλεί, τελικά, γρήγορη εκροή σημαντικών για τη ζωτική λειτουργία του κυττάρου ενώσεων (Montville & Matthews, 2005).

Έρευνες έχουν δείξει ότι οι βακτηριοσίνες των Gram θετικών οργανισμών είναι κατά βάση αναποτελεσματικές εναντι των Gram αρνητικών παθογόνων. Αυτό οφείλεται στην παρουσία στην κυτταροπλασματική μεμβράνη ενός στρώματος λιποπολυσακχαριτών που δρα ως φράγμα. Αποτελεσματική δράση αυτών μπορεί να παρατηρηθεί σε συνδυασμό τους με χημικές ενώσεις (π.χ EDTA, κιτρικά, λακτοφερίνη), ή με κατεργασίες που εξασθενούν την εξωτερική μεμβράνη (π.χ οσμωτικό στρες, δονούμενα ηλεκτρικά πεδία, υψηλή υδροστατική πίεση) (Martin-Visscher *et al.*, 2011).

### **1.1.2 Γαλακτικά βακτήρια**

Αποτελούν μια ετερογενή ομάδα (ορισμένα γένη μπορεί να προέρχονται από κοινό πρόγονο, Papadimitriou *et al*, 2016) θετικών κατά Gram βακτηρίων (Zeidan A.A. *et al*, 2017) κοινώς γνωστά ως ωφέλιμα μέλη της μικροχλωρίδας ανθρώπου και ζώων (Vasquez A. *et al*, 2012), ενώ απομονώνονται κυρίως από γαλακτοκομικά και ζυμούμενα προϊόντα (Zeidan A.A. *et al*, 2017). Είναι κόκκοι και βάκιλλοι, ανερόβιοι ή μικροαερόφιλοι, ασπορογόνοι και οξυάντοχοι που παράγουν γαλακτικό οξύ ως το κύριο προϊόν ζύμωσης των υδατανθράκων. Μεταξύ άλλων

περιλαμβάνουν τα γένη *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* και *Pediococcus*. Συμμετέχουν αποτελεσματικά στην περίπλοκη ισορροπία της μικροχλωρίδας που είναι καθοριστικής σημασίας για τον οργανισμό. Πολλές φορές αυτό επιτυγχάνεται με την οξίνιση του περιβάλλοντος με τρόπο παρόμοιο με αυτόν στα ζυμούμενα προϊόντα. Μπορούν επίσης να διεγείρουν συγκεκριμένες δραστηριότητες του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή. Πρέπει να προέρχονται από ζυμώσεις τροφίμων και να απαντώνται στη φυσιολογική μικροχλωρίδα προκειμένου να μπορούν να χαρακτηριστούν ως προβιοτικά. Παρόλο που ορισμένα χαρακτηρίζονται ως GRAS, ορισμένα ανήκουν στην κατηγορία των δυνητικά παθογόνων (κυρίως είδη των γενών *Enterococcus* και *Streptococcus*) (Papadimitriou *et al*, 2016; Vasquez A. *et al*, 2012).

#### **1.1.1.1 Γένος *Lactobacillus***

Βακτήρια κυλινδρικά και λεπτά, μόνα ή σε αλυσίδες, θετικά κατά Gram, ακίνητα, ασπορογόνα και προαιρετικά αναερόβια. Αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες από 5 έως 50°C, με άριστο pH 5.5 – 5.8 και έχουν υψηλές θρεπτικές απαιτήσεις. Ζυμώνουν τους υδατάνθρακες προς οργανικά οξέα που ποικίλουν ανάλογα με το είδος του σακχάρου, είτε ομοζυμωτικά παράγοντας κυρίως γαλακτικό οξύ (>85%), είτε ετεροζυμωτικά (50% γαλακτικό) παράγοντας επίσης αιθανόλη και/ή οξικό οξύ και CO<sub>2</sub>, ενώ ορισμένα είδη παράγουν και διακετύλιο ή άλλα προϊόντα από τη διάσπαση οργανικών οξέων (Παπαντωνίου, 2013).

#### **1.1.1.2 Γένος *Enterococcus***

Συγκαταλέγονταν στο γένος *Streptococcus* μέχρι το 1984 όπου οι Schleifer & Kilper-Balz με τη χρήση DNA-DNA υβριδισμού και 16S-rRNA αλληλουχία ανακάλυψαν ότι τα είδη *faecium* και *faecalis* διαφέρουν. Ο



γαστρεντερικός σωλήνας αποτελεί τον πρωτεύοντα βιότοπο τους και μέχρι στιγμής έχουν αναγνωρισθεί 49 είδη (Zhong *et al.*, 2017).

Είναι Gram θετικοί κόκκοι, προαιρετικά αναερόβιοι, σε ζεύγη ή αλυσίδες, ακίνητοι, ασπορογόνοι, καταλάση και οξειδάση αρνητικοί.

Μεταβολίζουν τη γλυκόζη σε γαλακτικό οξύ ως κύριο προϊόν ζύμωσης (ομοζυμωτικοί). Διαφοροποιούνται από άλλους λόγω της ικανότητας ανάπτυξης τους σε 6.5% NaCl (ίσως και περισσότερο) και pH 9.6 (βέλτιστο 7.5). Αναπτύσσονται παρουσία 40% χολικών αλάτων υδρολύοντας την εσκουλίνη, σε θερμοκρασίες 5 έως 50°C (βέλτιστη 42.7°C) και είναι θερμοάντοχοι (60°C για 30 min) , ενώ είναι ανθεκτικοί και σε ορισμένα αντιβιοτικά [(μεταξύ άλλων τετρακυκλίνη και βανκομυκίνη) (Fisher & Phillips, 2009)].

Χρησιμοποιούνται ως προβιοτικοί παρόλο που δεν χαρακτηρίζονται ως GRAS, καθώς ορισμένα απομονωμένα είδη φαίνεται να είναι δυνητικά παθογόνα για τον άνθρωπο. Αποτελούν συνήθως δείκτες εντερικής ρύπανσης, χρησιμοποιούνται όμως σε ορισμένα τρόφιμα, όπως τυριά έχοντας σημαντικό ρόλο στην ωρίμανση και συμβάλλοντας στο τυπικό άρωμα και τη γεύση αυτών. Ορισμένα είδη απομονωμένα από γαλακτικά προϊόντα έχουν βρεθεί να παράγουν βακτηριοσίνες αναστέλλοντας αποτελεσματικά την ανάπτυξη παθογόνων όπως η *Listeria monocytogenes* και το *Vibrio cholerae* (Zhong *et al.*, 2017).

#### **1.1.1.3 Γένος *Leuconostoc***

Βακτήρια σφαιρικά ή φακοειδή, σε ζεύγη ή αλυσίδες, θετικά κατά Gram, προαιρετικά αναερόβια, με ειδικές απαιτήσεις σε παράγοντες ανάπτυξης, ετεροζυμωτικά, παράγουν δεξτράνη από τη σακχαρόζη. Αναπτύσσονται άριστα στους 20-30°C, με κατώτατο όριο τους 5°C, και σε pH 5.5 – 6.5. Διαφοροποιείται από τους άλλους κόκκους επειδή ζυμώνει τη γλυκόζη σε CO<sub>2</sub> και D(-) - γαλακτικό οξύ, σε αντίθεση με τους άλλους που παράγουν

L(+) ή DL - γαλακτικό και όχι αέριο. Περιλαμβάνει 9 είδη, με σημαντικότερα τα *mesenteroides*, *paramesenteroides* και *oenes*.

Σε συνδυασμό με άλλα γαλακτικά χρησιμοποιούνται ως καλλιέργειες εκκίνησης σε τυριά ή βούτυρο συμβάλλοντας στη διαμόρφωση των γευστικών χαρακτηριστικών, σε ζυμωμένα λαχανικά όπου ξεκινούν τη ζύμωση παράγοντας γαλακτικό οξύ. Όμως αποτελούν και αιτία αλλοίωσης προϊόντων κρέατος σε συντήρηση υπό ψύξη ακόμα και σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα (Παπαντωνίου, 2013).

#### **1.1.1.4 Γένος *Pediococcus***

Ανήκει στην οικογένεια των λακτοβακίλλων. Κύριο γνώρισμα τους που τους διαφοροποιεί είναι ο σχηματισμός τετράδων. Είναι κόκκοι θετικοί κατά Gram, αλατοανεκτικοί και αλόφιλοι που αναπτύσσονται σε συγκεντρώσεις NaCl από 4 – 18% (w/v). Χρησιμοποιούνται επωφελώς στα ζυμωμένα τρόφιμα, όπως ξυνολάχανο, τουρσί, αλλαντικά αλλά και γαλακτοκομικά ή ακόμα και σαν καλλιέργειες εκκίνησης υποδεέστερης σημασίας στη μύρα και το κρασί (Παπαντωνίου, 2013).

## **1.2 Πρεβιοτικά**

Αρχικά, σύμφωνα με τους Gibson & Roberfroid (1995) ως πρεβιοτικά ορίζονταν τα άπεπτα συστατικά της τροφής που δρουν ευεργετικά στον οργανισμό ενεργοποιώντας επιλεκτικά την ανάπτυξη ή/και δραστηριότητα ενός ή περισσότερων προβιοτικών μικροοργανισμών που αποικίζουν το έντερο. Η επιλεκτικότητα οφείλεται στην ικανότητα των προβιοτικών μικροοργανισμών να διασπών τα συστατικά αυτά, τα κυριότερα των οποίων είναι οι γαλακτοολιγосακχαρίτες (GOS), οι φρουκτοολιγосακχαρίτες (FOS) και η ινουλίνη (Schrezenmeir & De Vrese., 2001). Για να θεωρηθεί ένας υδατάνθρακας ως πρεβιοτικό θα πρέπει να αντέχει στην αποικοδόμηση ή υδρόλυση από τα οξέα στο στομάχι και να μην

απορροφάται κατά το πέρασμα του από το ανώτερο τμήμα της γαστρεντερικής οδού.

Επιπροσθέτως να διασπάται επιλεκτικά από συγκεκριμένες ομάδες βακτηρίων και να διεγείρει τη δραστηριότητα των προβιοτικών μικροοργανισμών στο παχύ έντερο. Τέλος, πρέπει να είναι ασφαλής και να εμποδίζει την ανάπτυξη των παθογόνων μικροβίων (Gibson *et al.*, 2004). Πλεόν, τα πρεβιοτικά ορίζονται ως επιλεκτικά ζυμούμενα συστατικά που επιτρέπουν συγκεκριμένες αλλαγές, στη σύσταση ή/και τη δραστηριότητα την γαστρεντερικής μικροχώραδας που προσφέρουν οφέλη στην υγεία και ευημερία του ξενιστή (Gibson *et al.*, 2004).

### **1.2.1 Γαλακτοολιγοσακχαρίτες (GOS)**

Οι γαλακτοολιγοσακχαρίτες είναι υψηλής διαλυτότητας, άπεπτοι υδατάνθρακες, ελαφρώς γλυκιάς γεύσης με γλυκύτητα 30-60% σε σχέση με τη ζάχαρη. Είναι ανθεκτικοί σε μακρόχρονη αποθήκευση υπό τις κατάλληλες συνθήκες, και παρουσιάζουν μεγάλη σταθερότητα στη θέρμανση και τα οξέα. Είναι αρκετά παχύρρευστοι, μειώνουν την ενεργότητα νερού, το σημείο πήξης και διατηρούν την υγρασία.

Αποτελούνται από αλυσίδα μονάδων γαλακτόζης που προκύπτουν μέσω διαδοχικών αντιδράσεων μεταγαλακτοζυλίωσης με μια τελική μονάδα γλυκόζης. Παράγονται με ενζυματική μετατροπή της λακτόζης από β-γαλακτοσιδάσες και η σύνθεση του κλάσματος τους ποικίλει στο μήκος της αλυσίδας και τον τύπο σύνδεσης μεταξύ των μονομερών μονάδων. Ο βαθμός πολυμερισμού μπορεί να ποικίλει, συνήθως κυμαίνεται από 2 έως 8 μονομερείς μονάδες, ανάλογα κυρίως με τον τύπο του χρησιμοποιούμενου ενζύμου και το βαθμό μετατροπής της λακτόζης (Mussato & Mancilha, 2007)

### **1.2.2 Φρουκτοολιγοσακχαρίτες (FOS)**

Είναι υδατοδιαλυτές, άπεπτες πρεβιοτικές ίνες, μέσης γλυκύτητας περίπου 65% της ζάχαρης και έχουν ποικίλες ιδιότητες και χρήσεις. Βρίσκονται σε τρόφιμα όπως κρεμμύδια, σκόρδα, σπαράγγια, μπανάνες και άλλα. Αποτελούνται από γραμμικές αλυσίδες μονάδων φρουκτόζης, μήκους 2 έως 60, ενωμένων με β-(2-1) γλυκοζιτικούς δεσμούς καταλήγοντας σε μια τερματική μονάδα γλυκόζης. Πρακτικά αυτό σημαίνει ότι δε μπορούν να υδρολυθούν από τις γλυκοσιδάσες του λεπτού εντέρου και φθάνουν στο παχύ έντερο άθικτα, όπου μεταβολίζονται σε μικρού μήκους αλυσίδες καρβοξυλικών οξέων, L-γαλακτικό, διοξείδιο του άνθρακα, οξυγόνο και άλλους μεταβολίτες. Παράγονται από υδρόλυση της ιουλίνης από ενδοϊνουλινάσες, ή συνθέτονται με τη βοήθεια β-φρουκτοφουρανοσιδασών (Lorenzoni *et al.*, 2014; Flores-Maltos *et al.*, 2014; [www.beneonews.com](http://www.beneonews.com))

### **1.3 Συμβιωτικά**

Τα συμβιωτικά ορίζονται ως διατροφικά συμπληρώματα προβιοτικών και πρεβιοτικών, που συνδυάζουν τις ωφέλιμες ιδιότητες αυτών και δρουν συνεργιστικά. Επηρεάζουν ευεργετικά τον ξενιστή βελτιώνοντας την επιβίωση και εγκατάσταση/ανάπτυξη ζωντανών μικροοργανισμών διατροφικών συμπληρωμάτων στο γαστρεντερικό σωλήνα (Hamasalim, 2016). Αυτό επιτυγχάνεται με την επιλεκτική διέγερση της ανάπτυξης ή/και ενεργοποίηση του μεταβολισμού ενός ή περισσότερων ωφέλιμων για την υγεία βακτηρίων (Pandey *et al.*, 2015). Σύμφωνα με τον FAO ο όρος συμβιωτικό έχει ισχύ μόνο στην περίπτωση που το όφελος στην υγεία είναι συνεργιστικό, αφού αυτός είναι και ο σκοπός της χρήσης τους, έτσι είναι και πιο αποτελεσματικό συγκριτικά με την ξεχωριστή δράση των συστατικών του (Hamasalim, 2016).

Η ανάγκη της χρήσης τους προήλθε από παρατηρήσεις που έδειξαν βελτίωση στην ικανότητα επιβίωσης των προβιοτικών κατά τη διέλευση τους από τον ανώτερο γαστρεντερικό σωλήνα. Τα πιο συνηθισμένα περιλαμβάνουν στελέχη των ειδών *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Saccharomyces boulardii* και *Bacillus coagulans* ως προβιοτικά, σε συνδυασμό με ολιγοσακχαρίτες (FOS, GOS), ιουλίνη ή πρεβιοτικά από φυσικές πηγές (σκόρδο, κρεμμύδι, σπαράγγια κ.λπ.). Τα συμβιωτικά θα πρέπει να περιέχουν τον προβιοτικό μικροοργανισμό σε υψηλή συγκέντρωση και θα πρέπει να μπορεί να επιβιώνει στις επικρατούσες συνθήκες μέχρι την κατανάλωση αλλά και τη λήξη του προϊόντος (Pandey *et al.*, 2015).

Στα προσφερόμενα από την κατανάλωση οφέλη στην υγεία περιλαμβάνονται:

- 1) αύξηση του αριθμού *Lactobacillus* και *Bifidobacterium* και ισορρόπηση της μικροβιοχλωρίδας του εντέρου
- 2) βελτίωση της λειτουργίας του στομάχου σε καρκινοπαθείς
- 3) βελτίωση της ανοσορυθμιστικής ικανότητας
- 4) αποτροπή βακτηριακής μετατόπισης και μείωση εμφάνισης ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων (Pandey *et al.*, 2015)

## **1.4 Παθογόνοι μικροοργανισμοί**

### **1.4.1 Listeria**

Ανήκει στην οικογένεια *Listeriaceae*, που περιλαμβάνει 17 είδη με τα *L. monocytogenes* και *L. ivanovii* να είναι παθογόνα για τον άνθρωπο και τα ζώα αντίστοιχα (Orsi & Wiedmann, 2016). Βρίσκονται στο έδαφος, σε ακάθαρτα νερά, σε απόβλητα, και σε τρόφιμα.

Τα στελέχη τους είδους *monocytogenes* είναι βακτήρια κυλινδρικά, μονά ή σε κοντές αλυσίδες, με περίτριχα μαστήγια που τους προσδίδουν μια τυπική κινητικότητα στους 20-25°C, ασπορογόνα. Θετικά στη χρώση Gram,

προαιρετικά αναερόβια, καταλάση θετικά και οξειδάση αρνητικά. Έχουν άριστη θερμοκρασία 30-37°C αλλά αναπτύσσονται από τους 0-50°C. Έχει άριστο pH ανάπτυξης 6-8 και όρια από 4.1 έως 9.6 (σε τιμές pH <4.3 τα κύτταρα επιβιώνουν αλλά δεν αναπτύσσονται). Αναπτύσσεται άριστα σε  $a_w > 0.97$ , πολύ καλά σε NaCl 10-12% (αλατοανεκτικό) και άρα αντέχει μέχρι  $a_w : 0.92$ . Τα οργανικά οξέα (οξικό, κιτρικό, γαλακτικό) σε ποσοστό 0.1% μπορούν να παρεμποδίσουν την ανάπτυξη της (Domenico, 2015, Montville & Matthews, 2005).

#### ***1.4.1.1 Λιστερίωση***

Όταν εισέλθει στον οργανισμό, κυρίως από την κατανάλωση μολυσμένης τροφής, περνά τελικά στο συκώτι και τον σπλήνα όπου οι περισσότερες πεθαίνουν. Αν επιβιώσουν είναι πιθανό να πολλαπλασιαστούν και παράγουν μια αιμολυσίνη, τη λιστεριολυσίνη A, στην οποία οφείλεται η μολυσματική ικανότητα του βακτηρίου και επιφέρει το θάνατο των κυττάρων (Παπαντωνίου, 2013).

Εμφανίζεται συχνότερα σε ευπαθή άτομα με αδύναμο ανοσοποιητικό σύστημα όπως οι έγκυες, τα νεογνά και οι ηλικιωμένοι. Στις ΗΠΑ, σύμφωνα με τον CDC, κάθε χρόνο σημειώνονται περίπου 1600 περιστατικά λιστερίωσης. Δεν είναι συχνή ασθένεια, όμως είναι δύσκολο να διαγνωσθεί και γι' αυτό το ποσοστό θνησιμότητας φθάνει το 20-30% ([www.cdc.gov](http://www.cdc.gov)). Τα πρώτα συμπτώματα είναι παρόμοια με αυτά μιας ήπιας γρίπης με εντερικές διαταραχές. Τα υγιή ενήλικα άτομα είναι ιδιαίτερα ανθεκτικά, ενώ στα ευαίσθητα συνήθως μετά το πέρας μιας βδομάδας εμφανίζεται βακτηριαιμία και μηνιγγίτιδα και τελικά μπορεί και θάνατος χωρίς την άμεση και κατάλληλη θεραπεία (Παπαντωνίου, 2013).

#### **1.4.2 Salmonella**

Το γένος *Salmonella* ανήκει στην οικογένεια Enterobacteriaceae. Αποτελεί εντερικό παράσιτο του ανθρώπου (ζωονόσος). Μεταφέρεται κυρίως με τα κόπρανα και διαβιεί στο έδαφος, σε ακάθαρτα νερά, απόβλητα. Σύμφωνα με τον WHO περιλαμβάνει 2 είδη, τα *Salmonella enterica* και *Salmonella bongori* με πάνω από 2500 ορότυπους.

Αποτελείται από ραβδόμορφα βακτήρια, συνήθως κινητά, αρνητικά κατά Gram, μη σπορογόνα και προαιρετικά αναερόβια. Αναπτύσσεται άριστα στους 37°C με όρια από 7° έως 45°C, όρια pH 4.5-9.5 με άριστο στο 6.5-7.5, σε  $a_w > 0.93$  και  $\text{NaCl} < 3$  (w/v). Καταβολίζει τη D-γλυκόζη και άλλους υδατάνθρακες με παραγωγή οξέος και αερίου, είναι αρνητική στην οξειδάση και καταλάση και χρησιμοποιεί κιτρικό οξύ ως πηγή άνθρακα (Montville & Matthews, 2005).

##### **1.4.2.1 Σαλμονέλλωση**

Είναι η ασθένεια που προκαλείται μετά την κατανάλωση τροφίμου μολυσμένου με ζωντανά βακτήρια. Αν καταφέρουν και φθάσουν στα επιθηλιακά κύτταρα των λαχνών, πολλαπλασιάζονται και μέσα στα μολυσμένα κύτταρα απελευθερώνεται η εντεροτοξίνη, μια ισχυρή ενδοτοξίνη λιποπολυσακχαριδικής φύσης. Τα πρώτα συμπτώματα εμφανίζονται μεταξύ 12 και 36 ωρών. Η ασθένεια συνήθως είναι ήπια και διαρκεί 1-4 μέρες με θνησιμότητα χαμηλότερη του 1%. Μετά την ίαση τα βακτήρια αποβάλλονται με τα κόπρανα μέσα σε λίγους μήνες. Σε μερικές περιπτώσεις όμως τα συμπτώματα μπορεί να είναι πιο σοβαρά, καθώς η λοίμωξη περνά μέσω του αίματος στο κυκλοφορικό σύστημα και χωρίς την απαραίτητη περίθαλψη μπορεί να επέλθει μέχρι και θάνατος του ασθενούς (συνήθως άτομα ευαίσθητων ομάδων).

Σύμφωνα με τον CDC κάθε χρόνο σημειώνονται περίπου 1.2 εκατομμύρια περιστατικά και περίπου 450 θάνατοι. Η ασθένεια μπορεί να προκληθεί

από τροφοδηλητηρίαση, είτε τυφοειδής ή παρατυφοειδής πυρετός που είναι και η πιο επικίνδυνη μορφή (Παπαντωνίου., 2013; [www.cdc.gov](http://www.cdc.gov)).

#### **1.4.3 Escherichia coli**

Είναι εντερικής προέλευσης, δυνητικά παθογόνος μικροοργανισμός που ανήκει στη φυσιολογική μικροχλωρίδα του ανθρώπινου οργανισμού. Με τα κόπρανα διασπείρεται στο περιβάλλον και μολύνει τα τρόφιμα, αποτελώντας βακτήριο δείκτη εντερικής ρύπανσης.

Ανήκει στην οικογένεια Enterobacteriaceae, είναι βακτήριο κυλινδρικό, αρνητικό κατά Gram, κινητό, προαιρετικά αναερόβιο, θερμοευαίσθητο και ζυμωτικό. Έχει άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης 30-37°C και όρια 10-50°C, ενώ μερικά στελέχη αναπτύσσονται στους 4°C ή ακόμη και σε συνθήκες κατάψυξης. Έχει ελάχιστο pH ανάπτυξης 4.4 και ελάχιστη τιμή  $a_w$  0.95.

Περιλαμβάνει έξι παθογόνους τύπους, τους EPEC (εντεροπαθογόνος), ETEC (εντεροτοξινογόνος), EIEC (εντεροδιεισδυτική), EHEC (εντεροαιμορραγική), DAEC (εντεροδιαχεόμενη) και EAEC (εντεροαθροιστική).

##### **1.4.3.1 Εντεροαιμορραγική *E. coli***

Μερικά στελέχη προκαλούν γαστρεντερίτιδες από την παραγωγή δυο βεροτοξινών (κυτοτοξίνες) που μοιάζουν με αυτή της *Shigella dysenteriae* και χαρακτηρίζονται ως Shiga toxin-producing *E. coli* ή STEC για συντομία. Ο πιο συχνά παρατηρούμενος και ο πιο μελετημένος ορότυπος είναι η O157:H7 που προκαλεί λοιμώξεις όπως η αιμορραγική κολίτιδα, η αιμολυτική ουρολοίμωξη και η θρομβοκυτοπενική ερυθρά και μπορεί να οδηγήσει και σε θάνατο.

Η λοιμογόνος δόση μπορεί να είναι και λιγότερο από 100 βακτηριακά κύτταρα, με τα πρώτα συμπτώματα να εμφανίζονται το πολύ σε 10 μέρες (συνήθως 3-4) και σταδιακά να χειροτερεύουν (Παπαντωνίου., 2013; [www.cdc.gov](http://www.cdc.gov)).



### **Σκοπός της πτυχιακής εργασίας**

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας ήταν η εξέταση μικροβιολογικών χαρακτηριστικών γαλακτικών βακτηρίων απομονωμένων από μαλακά Ελληνικά τυριά Π.Ο.Π. Μελετήθηκαν στελέχη *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* και *Pediococcus* ως προς τα βιοχημικά χαρακτηριστικά τους, η ανάπτυξή τους σε 5 διαφορετικούς υδατάνθρακες και η αντιμικροβιακή δράση σε διαφορετικά pH και υδατάνθρακες ενάντια, στη *S. typhimurium*, την *E. coli* και τη *L. monocytogenes*.

## 2. Υλικά και μέθοδοι

### 2.1 Υποστρώματα

Τα χημικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν της εταιρείας Merck (Darmstadt, Germany) ή της εταιρείας Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany) ενώ τα μικροβιολογικά υλικά ήταν της εταιρείας Lab M (Lancashire, UK). Τα υλικά και η προετοιμασία τους για τη διεξαγωγή των πειραμάτων ήταν τα ακόλουθα:

- de Man, Rogosa and Sharpe ζωμός (M.R.S Broth)
- de Man, Rogosa and Sharpe άγαρ (M.R.S Agar)
- T-MRS\*\* ζωμός (τροποποιημένος M.R.S ζωμός) που περιείχε: 10g Bacteriological peptone, 10g Meat Extract, 5g Yeast Extract, 5g Sodium acetate, 2g Ammonium hydrogen citrate, 2g Potassium Phosphate, 0.2g Magnesium Sulphate7-hydrate και 0.05g Manganese Sulphate/λίτρο απεσταγμένου νερού
- Peptone-Yeast Extract ζωμός (P.Y. Broth) που περιείχε: 5g bacteriological peptone, 5g tryptone, 10g Yeast Extract, 40mL salts solution (0.2g anhydrous CaCl<sub>2</sub>, 0.2g MgSO<sub>4</sub>, 1g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10g NaHCO<sub>3</sub>, 2g NaCl/λίτρο απεσταγμένου νερού), και 0.2mL διάλυμα βιταμίνης K1 (0.15 mL βιταμίνης K1 διαλυμένη σε 30mL 95% αιθανόλης).
- DSPY\*\* ζωμός [Τροποποιημένος PY ζωμός (Διπλής πυκνότητας)] που περιείχε: 10g bacteriological peptone, 10g tryptone, 20g Yeast Extract, 80mL salts solution (0.2g anhydrous CaCl<sub>2</sub>, 0.2g MgSO<sub>4</sub>, 1g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10g NaHCO<sub>3</sub>, 2g NaCl/λίτρο απεσταγμένου νερού), και 0.4mL διάλυμα βιταμίνης K1 (0.15 mL βιταμίνης K1 διαλυμένη σε 30mL 95% αιθανόλης).

- Plate Count Άγαρ
- Θρεπτικό άγαρ με 0.2% ζελατίνη (12g Peptone, 5g Beef Extract, 5g NaCl, 15g Microbiological Agar, 20g Zelandin/λίτρο απεσταγμένου νερού)
- Θρεπτικό άγαρ (10g Peptone, 3g Beef Extract, 5g NaCl, 15g Microbiological Agar/ λίτρο απεσταγμένο νερό) με προσθήκη 1% (w/v) αποβουτυρωμένη σκόνη γάλακτος
- Ζωμός Λακτόζης (15g Peptone, 10g Lactose, 20ml Δείκτη ερυθρό φαινόλης/λίτρο απεσταγμένο νερού)
- Ζωμός Τρυπτόνης-Ινδόλης (10g Tryptone/Casein Peptone, 5g NaCl/λίτρο απεσταγμένου νερού)
- Αντιδραστήριο Ινδόλης-Kovacs (5g p-Dimethylaminobenzaldehyde, 75ml Amyl ή butyl alcohol, 25ml concentrated HCl)
- Αντιδραστήριο Οξειδάσης (0.1g N-dimethyl-para-phenylene-diamine, 0.1g Hydrochloride, 10ml απεσταγμένο νερό)
- Αντιδραστήριο Καταλάσης (3ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 97ml απεσταγμένο νερό)
- Αντιδραστήριο Ζελατίνης (15g HgCl, 20ml HCl, 100ml απεσταγμένο νερό)
- Ringer's solution ¼ strength
- Αποστειρωμένα φίλτρα διήθησης για σύριγγα με άνοιγμα βροχίδας 0.2μm (Filtres Fiorini, France)

Η αποστείρωση όλων των υποστρωμάτων έγινε στους 121°C για 15 λεπτά πριν τη χρήση τους.

\*\*Το όνομα έχει δοθεί αυθαίρετα για λόγους εργαστηριακής ευκολίας.

## 2.2 Όργανα

Τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεκπεραίωση των πειραμάτων παρατίθενται παρακάτω :

- Bioscreen C (Oy Growth Curves Ab Ltd., Helsingfors, Finland).  
Το Bioscreen είναι ένα φασματοφωτόμετρο το οποίο μετρά απευθείας την ανάπτυξη των μικροοργανισμών μέσω της μεταβολής της οπτικής πυκνότητας (Η διαπερατότητα ενός μέσου σε μια δέσμη φωτονίων συγκεκριμένου μήκους κύματος) με την πάροδο του χρόνου. Το όργανο χρησιμοποιεί 2 πλάκες με 100 κυψελίδες η κάθε μια, αποστειρωμένες με ακτίνες γ. Οι μετρήσεις έγιναν στους 37°C με καταγραφή της τιμής της οπτικής πυκνότητας ανά μια ώρα από την αρχή ως το τέλος του πειράματος.
- Μικροφυγόκεντρος (5418, Eppendorf AG, Hamburg, Germany).  
Η φυγόκεντρος περιέχει 18 θέσεις οι οποίες δέχονται φιαλίδια Eppendorf όγκου 1.5ml.

Όλες οι πειραματικές διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν σε αποστειρωμένο περιβάλλον [Safety Cabinet Topsafe 1.2 (BIOAIR,Siziano, Italy)].

## **2.3 Μέθοδοι**

### **2.3.1. Βιοχημικές δοκιμές**

#### **2.3.1.1. Δοκιμή της καταλάσης**

Σκοπός της δοκιμής ήταν ο διαχωρισμός των βακτηρίων σε αυτά που παράγουν το ένζυμο καταλάση και σε αυτά που δεν το παράγουν.

Η καταλάση διασπά το υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) σε νερό και οξυγόνο. Το υπεροξείδιο είναι τοξικό για τα βακτήρια και η διάσπαση του από την καταλάση αποτελεί μηχανισμό προστασίας του κυττάρου.

Στο κέντρο αντικειμενοφόρου πλάκας τοποθετήθηκε σταγόνα 3% υπεροξειδίου του υδρογόνου. Με κρίκο μεταφέρθηκε ποσότητα αποικίας του βακτηρίου και ομογενοποιήθηκε ήπια στη σταγόνα του υπεροξειδίου. Έκλυση φυσαλίδων (παραγωγή  $O_2$ ) καταγράφηκε ως θετικό αποτέλεσμα για το βακτήριο. καμιά παραγωγή φυσαλίδων ως καταλάση αρνητικό.

#### **2.3.1.2. Δοκιμή της οξειδάσης**

Σκοπός της δοκιμής ήταν η διαφοροποίηση των βακτηρίων σε αυτά που παράγουν το ένζυμο οξειδάση, που καταλύει την οξείδωση ορισμένων αρωματικών αμινών και σε αυτά που δεν την παράγουν

Σε αντικειμενοφόρο πλάκα τοποθετήθηκε μικρό κομμάτι διηθητικού χαρτιού Whatman No 1 και διαβρέχτηκε με φρέσκο αντιδραστήριο οξειδάσης. Με κρίκο μεταφέρθηκε ποσότητα καλλιέργειας και εξαπλώθηκε στο χαρτί. Μετά από λίγα δευτερόλεπτα παρατήρηση ρόδινου έως καστανού χρώματος καταγράφηκε ως βακτήριο οξειδάση θετικό, ενώ αντίστοιχα, καμιά αλλαγή χρώματος ως βακτήριο οξειδάση αρνητικό.

#### **2.3.1.3. Δοκιμή ζύμωσης της λακτόζης**

Η μελέτη της ζύμωσης έγινε σε σωλήνες που περιείχαν πεπτονούχο νερό, δείκτη pH ερυθρό της φαινόλης (κόκκινο σε pH 8.4 και κίτρινο σε pH 6,8) και 1% (w/v) λακτόζη. Μέσα στον σωλήνα τοποθετήθηκε και ανεστραμμένο σωληνάκι Durham για τη διαπίστωση παραγωγής ή όχι αερίου.

Στους σωλήνες ενοφθαλμίστηκαν 10ml υγρής καλλιέργειας βακτηρίου, από ζωμό MRS, και επώαστηκαν στους 37°C για 48 ώρες. Τα βακτήρια που αποδομούν τη λακτόζη παράγουν οξύ, μειώνεται το pH και ο δείκτης αλλάζει το χρώμα του υποστρώματος από κόκκινο σε κίτρινο. Παρουσία φυσαλίδας στον ανεστραμμένο σωλήνα σημαίνει και παραγωγή αερίου. Τα βακτήρια που δεν αποδομούν το σάκχαρο, αναπτύσσονται χρησιμοποιώντας την πεπτόνη και απλά θολώνουν το υπόστρωμα χωρίς αλλαγή χρώματος.

#### **2.3.1.4. Δοκιμή υδρόλυσης της καζεΐνης**

Σκοπός της δοκιμής ήταν η διαφοροποίηση των βακτηρίων σε αυτά που παράγουν το ένζυμο καζεϊνάση, με το οποίο διασπών την πρωτεΐνη του γάλακτος, δηλαδή την καζεΐνη και σε αυτά που δεν το παράγουν.

Σε τρυβλίο με θρεπτικό άγαρ και 1% (w/v) αποβουτυρωμένη σκόνη γάλακτος ενοφθαλμίστηκαν 10ml υγρής καλλιέργειας βακτηρίου από MRS ζωμό. Τα τρυβλία επώαστηκαν στους 37°C για 48 ώρες. Το βακτήριο καταγράφηκε ως καζεϊνολυτικό όταν γύρω από την αποικία σχηματίστηκε διαυγής ζώνη μέσα στο λευκό, λόγω της καζεΐνης, υπόστρωμα. Καμία διαυγής ζώνη το βακτήριο καταγράφηκε ως μη καζεϊνολυτικό.

#### **2.3.1.5. Δοκιμή υδρόλυσης ζελατίνης**

Σκοπός της δοκιμής ήταν η διαφοροποίηση των βακτηρίων που παράγουν το ένζυμο ζελατινάση, με το οποίο υδρολύουν τη ζελατίνη και σε αυτά που δεν το παράγουν.

Σε τρυβλίο με θρεπτικό άγαρ και 0.4% (w/v) ζελατίνη ενοφθαλμίστηκαν 10μl υγρής καλλιέργειας βακτηρίου από MRS ζωμό και τα τρυβλία επώαστηκαν στους 37°C για 48 ώρες.

Μετά την επώαση η επιφάνεια καλύφθηκε με το αντιδραστήριο της ζελατίνης το οποίο αντιδρά με τη ζελατίνη και την κατακρημνίζει σε λευκό ίζημα.

Το βακτήριο καταγράφηκε ως ζελατινολυτικό, όταν γύρω από την αποικία σχηματίστηκε διαυγής ζώνη μέσα στο λευκό (λόγω του ιζήματος) υπόστρωμα. Καμία διαυγής ζώνη καταγράφηκε το βακτήριο ως μη ζελατινολυτικό.

#### **2.3.1.6 Δοκιμή της ινδόλης**

Σκοπός της δοκιμής ήταν η διαφοροποίηση των βακτηρίων σε αυτά που παράγουν το ένζυμο τρυπτοφανάση που διασπά το αμινοξύ τρυπτοφάνη με παραγωγή ινδόλης, και σε αυτά που δεν το παράγουν. Σε σωλήνα με Tryptone Broth ενοφθαλμίστηκαν 10μl καλλιέργειας βακτηρίου από MRS ζωμό και ακολούθησε επώαση στους 37°C για 48 ώρες. Μετά την επώαση προστέθηκαν σε κάθε σωλήνα 5 σταγόνες αντιδραστηρίου Kovacs. Παρατήρηση κόκκινου χρώματος στο δακτύλιο του αντιδραστηρίου καταγράφηκε ως βακτήριο ινδόλη θετικό, ενώ υποκίτρινου ή υποκαστανού δακτυλίου καταγράφηκε ως ινδόλη αρνητικό.

### **2.3.2 Γαλακτικά βακτήρια**

Τα στελέχη ενοφθαλμίστηκαν με τη μέθοδο της απομόνωσης σε τρυβλίο με MRS Agar. Στη συνέχεια ενοφθαλμίστηκαν σε σωλήνες με 9 ml MRS ζωμό και επώαστηκαν στους 37°C για 48 ώρες. Επίσης, τοποθετήθηκαν σε φιαλίδια Eppendorf που περιείχαν 1 ml διάλυμα γλυκερόλης/αποστειρωμένο H<sub>2</sub>O 15% (w/v), και αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη στους (-20°C).

### **2.3.3 Υδατάνθρακες**

Για το πείραμα χρησιμοποιήθηκαν οι γαλακτοολιγοσακχαρίτες Vivinal GOS Syrup (περιεκτικότητα 59% ολιγοσακχαρίτες, 19% γλυκόζη, 21% λακτόζη και 1% γαλακτόζη), FrieslandCampina Domo, Ολλανδία και GOS Powder [(περιεκτικότητα 69% ολιγοσακχαρίτες, 23% λακτόζη, 5% γλυκόζη και γαλακτόζη) FrieslandCampina Domo, Ολλανδία]. Χρησιμοποιήθηκαν επίσης οι φρουκτοολιγοσακχαρίτες Orafti<sup>®</sup> L95 syrup & Orafti<sup>®</sup> P95 powder (Beneo Orafti, Belgium).

Παρασκευάστηκαν διαλύματα 10% (w/v) τόσο για τους ολιγοσακχαρίτες όσο και για τη γλυκόζη (μη εκλεκτικός υδατάνθρακας ως αρνητικός μάρτυρας). Η αποστείρωση των διαλυμάτων έγινε με φίλτρα διήθησης πόρων 0.2 μm και αποθηκεύτηκαν στο ψυγείο.

### **2.3.4 Ανάπτυξη των γαλακτικών βακτηρίων σε διαφορετικούς υδατάνθρακες**

Σε σωλήνες που περιείχαν 9 ml TMRS ζωμό και 1 ml διαλύματος 10% (w/v) από κάθε υδατάνθρακα αντίστοιχα, ενοφθαλμίστηκαν 100 μl καλλιέργειας γαλακτικών βακτηρίων από MRS ζωμό. Οι σωλήνες επώαστηκαν για 48-72 ώρες στους 37°C. Έπειτα έγινε νέα επανασπορά τους με τον ίδιο τρόπο σε σωλήνες με TMRS ζωμό και επώαστηκαν στους 37°C για 24 ώρες.



Η ανάπτυξη των καλλιιεργειών παρατηρήθηκε με τη χρήση του Bioscreen και επιλέχθηκε για κάθε στέλεχος ο υδατάνθρακας που προκάλεσε την υψηλότερη τιμή οπτικής πυκνότητας σε σύντομο χρόνο. Στις κυψελίδες τοποθετήθηκαν 120 μl υποστρώματος TMRS και 30 μl καλλιέργειας γαλακτικών βακτηρίων.

### **2.3.5 Μεταβολικά προϊόντα**

Ποσότητα 100 μl καλλιέργειας γαλακτικών βακτηρίων 48-72 ωρών σε TMRS Broth με τον αντίστοιχο επιλεγμένο υδατάνθρακα για το κάθε στέλεχος, ενοφθαλμίστηκε σε σωλήνες με 9 ml TMRS ζωμό και 1ml (w/v) σάκχαρο και επώαστηκε για 24 ώρες. Στην συνέχεια όλη η ποσότητα διανεμήθηκε σε αποστειρωμένα φιαλίδια Eppendorf και ακολούθησε φυγοκέντρηση (15000 *rcf*, 5 min).

Το υπερκείμενο υγρό, που περιείχε τα μεταβολικά προϊόντα των καλλιιεργειών, αφαιρέθηκε από το φιαλίδιο. Έγινε μέτρηση και καταγραφή του pH του και ακολούθησε διήθηση όλης της ποσότητας με φίλτρο σύριγγας 0.2 μm. Το αποστειρωμένο υπερκείμενο υγρό τοποθετήθηκε στους 4°C.

### **2.3.6 Παθογόνα βακτήρια**

Τα παθογόνα βακτήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: *Escherichia coli* O157:H7 NCTC 12900 (VT- ), *Salmonella enterica* serotype *typhimurium* DT193 και *Listeria monocytogenes* Scott A.

Τα βακτήρια ενοφθαλμίστηκαν σε τρυβλία με PC Agar και σε σωλήνες με 9 ml PY Broth και 1 ml διαλύματος 10% (w/v) γλυκόζης και επώαστηκαν στους 37°C για 24 ώρες. 100 μL ενοφθαλμίστηκαν ξανά σε σωλήνες με 9 ml PY Broth και 1 ml διαλύματος 10% (w/v) γλυκόζης και επώαστηκαν στους 37°C για 24 ώρες.

Η διαδικασία επαναλήφθηκε 3 φορές για να υπάρχει συγκεκριμένη συγκέντρωση των παθογόνων μετά από 24 ώρες επώασης. Μετά από 24 ώρες, 1 ml από τις καλλιέργειες ενοφθαλμίστηκαν σε 8 ml DSPY με 1 ml διαλύματος 10% (w/v) γλυκόζης.

Οι καλλιέργειες χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα αντιμικροβιακής δράσης με τη χρήση του Bioscreen.

### **2.3.7 Αντιμικροβιακή δράση**

Για την εύρεση ύπαρξης αντιμικροβιακής δράσης χρησιμοποιήθηκε το Bioscreen. Στις κυψελίδες από τις αποστειρωμένες πλάκες τοποθετήθηκαν 120 μl διαλύματος DSPY με γλυκόζη (αναλογία 9:1), 150 μl υπερκείμενου υγρού (στο ελεύθερο pH) και 30 μl αραιωμένης καλλιέργειας από κάθε παθογόνο αντίστοιχα. Ο αριθμός των κυττάρων κατά τον εμβολιασμό τους ήταν 5.7 log cfu/ml για την *S. typhimurium*, 6.2 log cfu/ml για την *E. coli* και 5.6 log cfu/ml για την *L. monocytogenes*.

Το Bioscreen μετρούσε την οπτική πυκνότητα των δειγμάτων ανά μία ώρα για 24 ώρες στα 580nm. Κατά τη διάρκεια του πειράματος η θερμοκρασία του θαλάμου των δειγμάτων παρέμενε σταθερή στους 37°C.

### **2.3.8 Διερεύνηση αντιμικροβιακής δράσης**

Στα υπερκείμενα των παραπάνω δειγμάτων που παρουσιάστηκε αναστολή της ανάπτυξης των παθογόνων μικροοργανισμών προστέθηκε ποσότητα 1N NaOH ώστε να εξεταστεί αν η αντιμικροβιακή δράση αυτών οφειλόταν στο pH. Αυτό ρυθμίστηκε στο 6.0. Ο αριθμός των κυττάρων κατά τον εμβολιασμό τους ήταν 4.4 log cfu/ml για την *S. typhimurium*, 5.6 log cfu/ml για την *E. coli* και 5.3 log cfu/ml για την *L. monocytogenes*. Οι συνθήκες λειτουργίας του Bioscreen ήταν οι ίδιες που αναφέρονται και παραπάνω.

#### **2.4 Στατιστική ανάλυση**

Κάθε πειραματική διαδικασία έγινε εις τριπλούν και για τη στατιστική επεξεργασία των πειραματικών δεδομένων υπολογίστηκε ο μέσος όρος των τριών επαναλήψεων.

Επιπλέον, για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση της διακύμανσης με επίπεδο σημαντικότητας 0.05 και οι συγκρίσεις έγιναν με τη βοήθεια του προγράμματος Excel t-test.

### 3. Αποτελέσματα

Η ταυτότητα των βακτηρίων (Γένος/Είδος) καθώς και ο εργαστηριακός κωδικός τους παρατίθενται στον παρακάτω Πίνακα. Η ταυτοποίηση των στελεχών έγινε με μοριακές τεχνικές (αλληλούχηση 16s rRNA).

Πίνακας 3.1 Ταυτότητα στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν

ΚΩΔΙΚΟΣ	ΓΕΝΟΣ-ΕΙΔΟΣ
4a – MRS	<i>L. alimentarius</i>
4b – MRS	<i>L. alimentarius</i>
5a – MRS	<i>L. paracasei</i>
5b – MRS	<i>L. rhamnosus</i>
6d - MRS	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
7bi – MRS	<i>L. pentosus</i>
7bii – MRS	<i>L. paracasei</i>
9aiib – MRS	<i>L. plantarum</i>
9b – MRS	<i>L. gallinarum</i>
9b <sub>2</sub> – MRS	<i>L. gallinarum</i>
10a – MRS	<i>L. zeae</i>
10a <sub>1</sub> – MRS	<i>L. paracasei</i>
10a <sub>1a</sub> -MRS M17	<i>L. paracasei</i>
10a <sub>3a</sub> – M17	<i>Enterococcus durans</i>
11a <sub>1a</sub> – MRS	<i>Pediococcus parvulus</i>
11d <sub>1a3b</sub> – MRS	<i>L. pentosus</i>
12b – M17	<i>L. pentosus</i>
12d – MRS M17	<i>Enterococcus faecalis</i>
13d – MRS	<i>L. plantarum</i>
14 – MRS M17	<i>Enterococcus durans</i>
14b – MRS	<i>L. pentosus</i>
16c – MRS	<i>L. paracasei</i>
17a <sub>1c</sub> – MRS M17	<i>L. pentosus</i>
17a <sub>3</sub> – M17	Μη ταυτοποιημένο
18aiia – MRS M17	<i>Enterococcus hirae</i>
18c <sub>1a</sub> – MRS KF	<i>L. pentosus</i>
19c <sub>1b</sub> – MRS M17	<i>Enterococcus faecium</i>
19c <sub>2a</sub> -M17	Μη ταυτοποιημένο

### 3.1 Βιοχημικά χαρακτηριστικά στελεχών

Τα αποτελέσματα των βιοχημικών δοκιμών των στελεχών που μελετήθηκαν παρατίθενται στον Πίνακα 3.1.2.

Πίνακας 3.1.2 Αποτελέσματα βιοχημικών δοκιμών των στελεχών που μελετήθηκαν

Στέλεχος	Γένος-Είδος	ΚΑΤΑΛΑΣΗ/ ΟΞΕΙΔΑΣΗ/ ΚΑΖΕΪΝΗ/ ΖΕΛΑΤΙΝΗ	ΙΝΔΟΛΗ	ΛΑΚΤΟΖΗ
				ΧΡΩΜΑ/ ΑΕΡΙΟ
4a – MRS	<i>L. alimentarius</i>	-	-	+/+
4b – MRS	<i>L. alimentarius</i>	-	-	+/-
5a – MRS	<i>L. paracasei</i>	-	-	+/-
5b – MRS	<i>L. rhamnosus</i>	-	-	+/+
6d – MRS	<i>Leuc. mesenteroides</i>	-	-	+/-
7bi-MRS	<i>L. pentosus</i>	-	-	+/-
7bii – MRS	<i>L. paracasei</i>	-	-	+/+
9a <sub>ii</sub> b – MRS	<i>L. plantarum</i>	-	-	+/-
9b-MRS	<i>L. gallinarum</i>	-	-	+/+
9b <sub>2</sub> – MRS	<i>L. gallinarum</i>	-	-	+/-
10a -MRS	<i>L. zeae</i>	-	-	+/-
10a <sub>1</sub> – MRS	<i>L. paracasei</i>	-	-	+/-
10a <sub>1a</sub> -MRS	<i>L. paracasei</i>	-	-	+ /+
10a <sub>3a</sub> – M17	<i>Enterococcus durans</i>	-	+	+ /-
11a <sub>a</sub> – MRS	<i>Pediococcus parvulus</i>	-	+	+/-
11d <sub>1a3b</sub> – MRS	<i>L. pentosus</i>	-	-	+/-
12b – M17	<i>L. pentosus</i>	-	-	+/-
12d – MRS	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	+/-
13d – MRS	<i>L. plantarum</i>	-	-	+/-
14 – MRS M17	<i>Enterococcus durans</i>	-	+	+/-
14b – MRS	<i>L. pentosus</i>	-	-	+/-
16c – MRS	<i>L. paracasei</i>	-	-	+/-
17a <sub>1c</sub> – MRS	<i>L. pentosus</i>	-	-	+/-
17a <sub>3</sub> – M17	Μη ταυτοποιημένο	-	+	+/-
18a <sub>ii</sub> a – MRS	<i>Enterococcus hirae</i>	-	+	+/+
18c <sub>1a</sub> – MRS	<i>L. pentosus</i>	-	-	+/-
19c <sub>1b</sub> – MRS	<i>Enterococcus faecium</i>	-	+	+/+
19c <sub>2a</sub> -M17	Μη ταυτοποιημένο	-	+	+/+

(-): Αρνητικό αποτέλεσμα στη δοκιμή. (+): Θετικό αποτέλεσμα στη δοκιμή.

Αρχικά για το γένος *Enterococcus*, τα είδη *durans*, *faecium*, *faecalis*, *hirae* έχουν χαρακτηριστεί ως καταλάση, οξειδάση, ζελατινάση αρνητικά και λακτόζη θετικά. Ενώ για την ινδόλη ποικίλει ανάλογα με το είδος (Manero & Blanch, 1999; Παπαντωνίου 2013).

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια είναι αρνητικά στην καταλάση και στην οξειδάση. Τα γένη *Leuconostoc* και *Lactobacillus* είναι αρνητικά στην δοκιμή της ινδόλης. Επίσης σε όσα στελέχη δεν παράχθηκε αέριο κατά τη δοκιμή ζύμωσης της λακτόζης δρούν ομοζυμωτικά ενώ σε όσα παράχθηκε δρούν ετεροζυμωτικά.

### 3.2 Επιλογή βέλτιστου υδατάνθρακα για κάθε στέλεχος με βάση τον συνδυασμό μέγιστου ρυθμού ανάπτυξης ( $\mu_{max}$ ) και μικρότερης διάρκειας λανθάνουσας φάσης.

Πίνακας 3.2.3 Υπολογισμός μέγιστου ρυθμού ανάπτυξης ( $\mu_{max}$ ) και λανθάνουσας φάσης (h) των στελεχών σε διαφορετικούς υδατάνθρακες με τη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (580nm)

ΣΤΕΛΕΧΟΣ-ΓΕΝΟΣ-ΕΙΔΟΣ	Μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης ( $\mu_{max}$ )					Λανθάνουσα φάση ανάπτυξης (h)				
	GLU	L95	P95	GP	GS	GLU	L95	P95	GP	GS
5a-MRS- <i>L. paracasei</i>	0.013	0.011	0.009	0.015	0.119	3.0	6.0	12.3	7.0	2.0
5b-MRS- <i>L. rhamnosus</i>	0.265	0.243	0.067	0.233	0.258	4.0	6.0	4.3	5.3	5.0
6d-MRS- <i>Leuc. mesenteroides</i>	0.202	0.175	0.023	0.139	0.119	1.3	3.3	3.3	1.7	2.0
7bi-MRS- <i>L. pentosus</i>	0.083	0.066	0.094	0.049	0.143	2.0	3.3	3.0	4.3	2.3
7bii-MRS- <i>L. paracasei</i>	0.055	0.020	0.017	0.020	0.012	4.0	4.7	5.0	4.3	3.7
9aiib-MRS- <i>L. plantarum</i>	0.233	0.184	0.119	0.157	0.140	3.0	1.7	3.3	2.0	1.7
10a-MRS- <i>L. zeae</i>	0.257	0.188	0.100	0.268	0.259	1.0	1.3	1.0	1.3	1.0
10a1-MRS- <i>L. paracasei</i>	0.174	0.094	0.188	0.084	0.117	2.0	2.7	2.0	2.3	3.0
10a1a-MRS M17- <i>L. paracasei</i>	0.114	0.119	0.187	0.109	0.068	2.0	2.7	2.0	2.3	4.0
10a3a-M17- <i>Enterococcus durans</i>	0.200	0.134	0.196	0.077	0.116	2.0	3.0	2.3	2.3	3.0
11a1a-MRS- <i>Pediococcus parvulus</i>	0.002	0.191	0.001	0.186	0.182	24.0	10.3	24.0	7.7	8.0
11d1a3b-MRS- <i>L. pentosus</i>	0.288	0.106	0.028	0.116	0.116	1.7	2.7	3.7	2.3	1.7
12b-M17- <i>L. pentosus</i>	0.159	0.060	0.105	0.154	0.162	1.7	2.7	3.7	1.7	1.3
12d-MRS M17- <i>Enterococcus faecalis</i>	0.144	0.144	0.141	0.127	0.131	1.3	2.0	2.0	1.0	1.0
13d-MRS- <i>L. plantarum</i>	0.094	0.061	0.117	0.191	0.081	4.7	3.0	4.7	4.3	3.0
14-MRS M17- <i>Enterococcus durans</i>	0.118	0.06	0.047	0.079	0.158	3	4	3	4.3	1.7
14b-MRS- <i>L. pentosus</i>	0.164	0.134	0.063	0.170	0.183	4.3	2.7	4.0	2.7	2.0
16c-MRS- <i>L. paracasei</i>	0.138	0.111	0.120	0.076	0.090	4.0	3.3	3.7	5.3	4.3
17a1c-MRS M17- <i>L. pentosus</i>	0.159	0.114	0.065	0.182	0.211	5.7	4.3	5.3	3.7	4.3
17a3-M17-Μη ταυτοποιημένο	0.241	0.249	0.190	0.231	0.227	1.0	2.0	2.0	2.0	2.0
18aiia-MRS M17- <i>Enterococcus hirae</i>	0.268	0.252	0.185	0.251	0.235	1.7	2.3	2.0	1.7	1.7
18c1a-MRS KF- <i>L. pentosus</i>	0.163	0.076	0.022	0.181	0.173	3.3	5.3	4.7	4.0	2.7
19c1b-MRS M17- <i>Enterococcus faecium</i>	0.287	0.240	0.185	0.251	0.240	2.0	3.7	2.0	3.0	3.0
19c2a -M17-Μη ταυτοποιημένο	0.238	0.215	0.175	0.231	0.234	2.0	3.7	2.3	2.0	2.0

Το κίτρινο χρώμα υποδηλώνει τον συνδυασμό που επιλέχθηκε.

GLU: Glucose, L95, P95: FOS, GS: GOS Syrup, GP: GOS Powder

μmax: Ο μέσος όρος των τριών επαναλήψεων του μέγιστου ρυθμού ανάπτυξης ανα ώρα (μέσος όρος από δύο συνεχόμενες ώρες μετρήσεων οπτικής πυκνότητας) ανα στέλεχος και ανα υδατάνθρακα.

Λανθάνουσα φάση ανάπτυξης : Θεωρήθηκε η αύξηση του λόγου δύο συνεχόμενων μετρήσεων οπτικής πυκνότητας έως 15% από T=0 που υπολογίστηκε με την φόρμουλα  $IF(E6/E5 < A64; "λανθάνουσα \text{ φάση}"; "ανάπτυξη")$  (E5, E6: δύο συνεχόμενες μετρήσεις, A64: 1,15 (1+15%)), Έγινε ο μέσος όρος των τριών επαναλήψεων για το κάθε στέλεχος.

Επιλέχθηκε ο υδατάνθρακας GOS Syrup για τα παρακάτω στελέχη

- 5a – MRS *L. paracasei*
- 5b – MRS *L. rhamnosus*
- 7bi – MRS *L. pentosus*
- 7bii – MRS *L. paracasei*
- 10a3a – M17 *Enterococcus durans*
- 11d1a3b – MRS *L. pentosus*
- 12b – M17 *L. pentosus*
- 12d – MRS M17 *Enterococcus faecalis*
- 14 – MRS M17 *Enterococcus durans*
- 14b – MRS *L. pentosus*
- 18c1a – MRS KF *L. pentosus*
- 19c2a -M17 Μη ταυτοποιημένο

Επιλέχθηκε ο υδατάνθρακας GOS Powder για τα παρακάτω στελέχη

- 6d – MRS *Leuc. mesenteroides*
- 10a – MRS *L. zeae*
- 10a1a -MRS M17 *L. paracasei*
- 13d – MRS *L. plantarum*



Επιλέχθηκε ο υδατάνθρακας FOS L95 για τα παρακάτω στελέχη

- 10a1 – MRS *L. paracasei*
- 16c – MRS *L. paracasei*

Εξαίρεση αποτελούν τα παρακάτω τα οποία επιλέχθηκαν με επιπρόσθετα κριτήρια

- 9aiib – MRS *L. plantarum*- Επιλέχθηκε το GOS Syrup με επιπλέον κριτήριο την μέγιστη οπτική πυκνότητα στις 24 ώρες σε σχέση με το L95 (1.190 και 0.738 αντίστοιχα).
- 11a1a – MRS *Pediococcus parvulus*- Επιλέχθηκε το GOS Syrup με επιπλέον κριτήριο την μέγιστη οπτική πυκνότητα στις 24 ώρες σε σχέση με το GOS Powder (1.044 και 0.899 αντίστοιχα).
- 17a1c – MRS M17 *L. pentosus*- Επιλέχθηκε το GOS Syrup με επιπλέον κριτήριο την μέγιστη οπτική πυκνότητα στις 24 ώρες σε σχέση με το GOS Powder (1.132 και 1.012 αντίστοιχα).
- 17a3 – M17 Άγνωστο- Επιλέχθηκε το GOS Syrup με επιπλέον κριτήριο την μέγιστη οπτική πυκνότητα στις 24 ώρες σε σχέση με το L95 (1.046 και 0.712 αντίστοιχα).
- 18aiia – MRS M17 *Enterococcus hirae*-Επιλέχθηκε το GOS Syrup γιατί και η οπτική πυκνότητα και η λανθάνουσα φάση δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους (GOS Powder, GOS Syrup)
- 19c1b – MRS M17 *Enterococcus faecium*- Επιλέχθηκε το GOS Syrup γιατί και η οπτική πυκνότητα και η λανθάνουσα φάση δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους (GOS Powder, GOS Syrup)

Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 3.2.3 φαίνεται ότι όλα τα στελέχη του *L. pentosus*, τα είδη του γένους *Enterococcus* αναπτύχθηκαν καλύτερα σε

ζωμό TMRS με προσθήκη GOS Syrup. Επίσης, παρατηρήθηκαν καλύτερα αποτελέσματα για τα *Leuc. mesenteroides* και *Pediococcus parvulus* στους γαλακτοολιγοσακχαρίτες. Τέλος, ο *L. paracasei* παρουσίασε μεικτά αποτελέσματα.

Πίνακας 3.2.4 Στατιστική ανάλυση αποτελέσματος ζύμωσης των στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν με διαφορετικούς υδατάνθρακες σε σχέση με τη γλυκόζη

ΣΤΕΛΕΧΟΣ-ΓΕΝΟΣ ΕΙΔΟΣ	ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΑΣ			
	L95	P95	GP	GS
5a-MRS- <i>L. paracasei</i>	0.323±0,27	0.060±0,28	0.294±0,23	0.001±0,27
5b-MRS- <i>L. rhamnosus</i>	0.571±0,27	0.005±0,28	0.546±0,23	0.868±0,27
6d-MRS- <i>Leuc. mesenteroides</i>	0.289±0,27	0.000±0,28	0.002±0,23	0.001±0,27
7bi-MRS- <i>L. pentosus</i>	0.266±0,27	0.448±0,28	0.057±0,23	0.030±0,27
7bii-MRS- <i>L. paracasei</i>	0.045±0,27	0.036±0,28	0.047±0,23	0.024±0,27
9aiib-MRS- <i>L. plantarum</i>	0.031±0,27	0.000±0,28	0.000±0,23	0.000±0,27
10a-MRS- <i>L. zeae</i>	0.000±0,27	0.000±0,28	0.299±0,23	0.219±0,27
10a1-MRS- <i>L. paracasei</i>	0.174±0,27	0.800±0,28	0.126±0,23	0.345±0,27
10a1a-MRS M17- <i>L. paracasei</i>	0.868±0,27	0.025±0,28	0.808±0,23	0.054±0,27
10a3a-M17- <i>Enterococcus durans</i>	0.257±0,27	0.924±0,28	0.007±0,23	0.060±0,27
11a1a-MRS- <i>Pediococcus parvulus</i>	0.000±0,27	0.002±0,28	0.007±0,23	0.000±0,27
11d1a3b-MRS- <i>L. pentosus</i>	0.001±0,27	0.000±0,28	0.000±0,23	0.000±0,27
12b-M17- <i>L. pentosus</i>	0.000±0,27	0.041±0,28	0.538±0,23	0.495±0,27
12d-MRS M17- <i>Enterococcus faecalis</i>	1.000±0,27	0.639±0,28	0.054±0,23	0.130±0,27
13d-MRS- <i>L. plantarum</i>	0.465±0,27	0.588±0,28	0.083±0,23	0.744±0,27
14-MRS M17- <i>Enterococcus durans</i>	0.189±0,27	0.129±0,28	0.352±0,23	0.356±0,27
14b-MRS- <i>L. pentosus</i>	0.000±0,27	0.000±0,28	0.111±0,23	0.002±0,27
16c-MRS- <i>L. paracasei</i>	0.090±0,27	0.286±0,28	0.004±0,23	0.036±0,27
17a1c-MRS M17- <i>L. pentosus</i>	0.031±0,27	0.001±0,28	0.133±0,23	0.012±0,27
17a3-M17-Μη ταυτοποιημένο	0.184±0,27	0.000±0,28	0.048±0,23	0.016±0,27
18aiia-MRS M17- <i>Enterococcus hirae</i>	0.097±0,27	0.000±0,28	0.069±0,23	0.021±0,27
18c1a-MRS KF- <i>L. pentosus</i>	0.000±0,27	0.000±0,28	0.577±0,23	0.734±0,27
19c1b-MRS M17- <i>Enterococcus faecium</i>	0.013±0,27	0.000±0,28	0.013±0,23	0.001±0,27
19c2a -M17-Μη ταυτοποιημένο	0.029±0,27	0.001±0,28	0.487±0,23	0.561±0,27

Το αποτέλεσμα της ζύμωσης μεταφράζεται σε μείωση του pH του υποστρώματος το οποίο παρουσιάζεται στον πίνακα 3.2.5.

Πίνακας 3.2.5 Μέτρηση του pH των στελεχών μετά τη ζύμωση συγκεκριμένων υδατανθράκων

Στέλεχος-Γένος-Είδος	pH
5a-MRS- <i>L. paracasei</i>	4.55
5b-MRS- <i>L. rhamnosus</i>	4.69
6d-MRS- <i>Leuc. mesenteroides</i>	4.16
7bi-MRS- <i>L. pentosus</i>	4.05
7bii-MRS- <i>L. paracasei</i>	4.23
9aiib-MRS- <i>L. plantarum</i>	4.19
10a-MRS- <i>L. zeae</i>	4.68
10a1-MRS- <i>L. paracasei</i>	4.02
10a1a-MRS M17- <i>L. paracasei</i>	4.43
10a3a-M17- <i>Enterococcus durans</i>	4.26
11a1a-MRS- <i>Pediococcus parvulus</i>	4.38
11d1a3b-MRS- <i>L. pentosus</i>	4.20
12b-M17- <i>L. pentosus</i>	4.09
12d-MRS M17- <i>Enterococcus faecalis</i>	4.96
13d-MRS- <i>L. plantarum</i>	4.65
14-MRS M17- <i>Enterococcus durans</i>	4.85
14b-MRS- <i>L. pentosus</i>	4.42
16c-MRS- <i>L. paracasei</i>	3.98
17a1c-MRS M17- <i>L. pentosus</i>	4.25
17a3-M17-Μη ταυτοποιημένο	4.63
18aiia-MRS M17- <i>Enterococcus hirae</i>	4.64
18c1a-MRS KF- <i>L. pentosus</i>	4.34
19c1b-MRS M17- <i>Enterococcus faecium</i>	4.43
19c2a -M17-Μη ταυτοποιημένο	4.65

Μετά από επώαση 24 ωρών και απομόνωση του υπερκείμενου υγρού, το pH των μεταβολικών προϊόντων βρέθηκε να κυμαίνεται από 3.98 έως 4.96. Αναλυτικότερα οι 12d – MRS M17 *Enterococcus faecalis* και 14 – MRS M17 *Enterococcus durans* παρουσίασαν τη μικρότερη μείωση pH με τιμές 4.96 και 4.85 αντίστοιχα. Αντίθετα οι 10a1 – MRS *L. paracasei* και 16c – MRS *L. paracasei* παρουσίασαν τη μεγαλύτερη μείωση της τιμής του pH σε 4.02 και 3.98 αντίστοιχα.

### **3.3 Έλεγχος αντιμικροβιακής δράσης των μεταβολικών προϊόντων της ζύμωσης**

#### **3.3.1 Αντιμικροβιακή δράση των μεταβολικών προϊόντων σε ελεύθερο pH και σε pH 6**

### 3.3.1.1 *Salmonella typhimurium*

Πίνακας 3.3.6 Μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης και λανθάνουσα φάση της *S. typhimurium* με προσθήκη υπερκείμενων υγρών των στελεχών που μελετήθηκαν σε ελεύθερο pH και σε pH 6

Στέλεχος-Γένος-Είδος	Ελεύθερο pH		pH 6	
	μmax	Lag Phase (h)	μmax	Lag Phase (h)
<b>Μάρτυρας</b>	0.314	2	0.316	1
5a-MRS- <i>L. paracasei</i>	0.004	21	0.2	2
5b-MRS- <i>L. rhamnosus</i>	0.004	24	0.21	1.7
6d-MRS- <i>Leuc. mesenteroides</i>	0.003	24	0.165	2
7bi-MRS- <i>L. pentosus</i>		Επιλέχθηκε το 14b		
7bii-MRS- <i>L. paracasei</i>	0.003	24	-	-
9aiib-MRS- <i>L. plantarum</i>	0.001	24	0.154	2.7
10a-MRS- <i>L. zeae</i>	0.002	24	0.195	1.7
10a1-MRS- <i>L. paracasei</i>	0.002	24	0.171	1.3
10a1a-MRS M17- <i>L. paracasei</i>	0.002	24	0.171	1.3
10a3a-M17- <i>Enterococcus durans</i>	0.002	24	0.191	2
11a1a-MRS- <i>Pediococcus parvulus</i>	0.002	24	0.217	3
11d1a3b-MRS- <i>L. pentosus</i>	0.002	24	-	-
12b-M17- <i>L. pentosus</i>	0.002	24	-	-
12d-MRS M17- <i>Enterococcus faecalis</i>	0.101	10.7	-	-
13d-MRS- <i>L. plantarum</i>	0.017	17.3	0.167	1
14-MRS M17- <i>Enterococcus durans</i>	0.002	24	0.171	3
14b-MRS- <i>L. pentosus</i>	0.002	24	0.153	1.7
16c-MRS- <i>L. paracasei</i>	0.003	24	0.206	1.7
17a1c-MRS M17- <i>L. pentosus</i>	0.002	24	-	-
17a3-M17-Μη ταυτοποιημένο	0.002	24	-	-
18aiia-MRS M17- <i>Enterococcus hirae</i>	0.002	24	0.227	1.3
18c1a-MRS KF- <i>L. pentosus</i>	0.002	24	-	-
19c1b-MRS M17- <i>Enterococcus faecium</i>	0.002	24	0.221	2
19c2a -M17-Μη ταυτοποιημένο		Δεν υπήρχαν πληροφορίες		

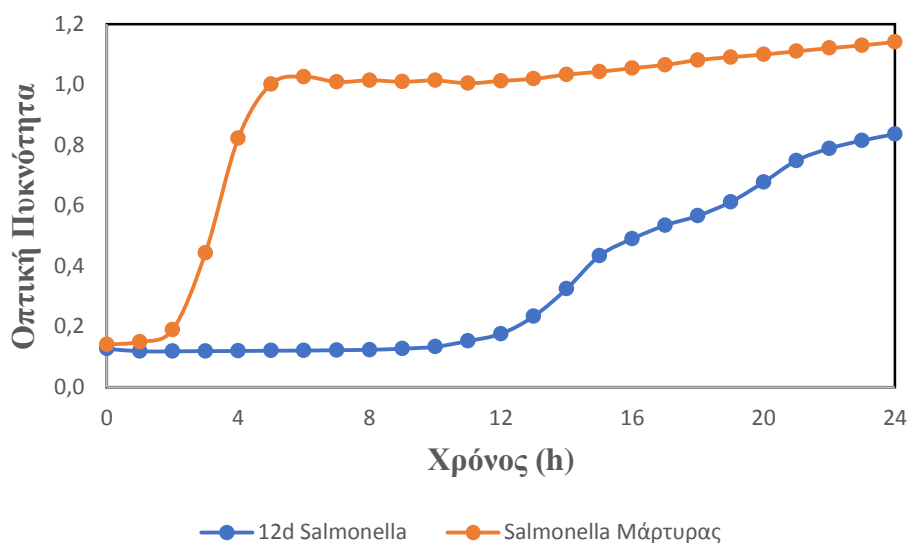
(-) Τα στελέχη αυτά δεν επιλέχθηκαν για διερεύνηση pH λόγω σημαντικού βαθμού συγγένειας (δηλαδή στελέχη με ίδια ταυτότητα π.χ 14b-MRS-*L. pentosus* – 18c1a-MRS KF-*L. pentosus*) με τα στελέχη που επιλέχθηκαν.

Μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης ( $\mu_{max}$ ): Ο μέσος όρος των τριών επαναλήψεων του μέγιστου ρυθμού ανάπτυξης ανα ώρα (μέσος όρος από δύο συνεχόμενες ώρες μετρήσεων οπτικής πυκνότητας) ανα στέλεχος και ανα υδατάνθρακα.

Λανθάνουσα φάση ανάπτυξης (Lag Phase) : Θεωρήθηκε η αύξηση του λόγου δύο συνεχόμενων μετρήσεων οπτικής πυκνότητας έως 15% από  $T=0$  που υπολογίστηκε με την φόρμουλα  $IF(E6/E5 < A64; "λανθάνουσα φάση"; "ανάπτυξη")$  (E5, E6 : δύο συνεχόμενες μετρήσεις , A64: 1,15 (1+15%)), Έγινε ο μέσος όρος των τριών επαναλήψεων για το κάθε στέλεχος.

Στο ελεύθερο χαμηλό pH των μεταβολικών προϊόντων παρατηρήθηκε πλήρης αναστολή της ανάπτυξης του παθογόνου μικροοργανισμού, που κυρίως οφείλεται στη παραγωγή οργανικών οξέων και πιθανή παρουσία αντιμικροβιακών ουσιών (π.χ  $CO_2$ ,  $H_2O_2$ , βακτηριοσίνες). Εξαίρεση αποτέλεσε μόνο το στέλεχος 12d – MRS M17 *Enterococcus faecalis*, το pH του οποίου είχε τιμή μεγαλύτερη της  $pK_a$  του γαλακτικού και οξικού οξέος ( $pH = 4,96 > 4,8 = pK_a$  γαλακτικού οξέος), γι' αυτό και παρατηρήθηκε ανάπτυξη του παθογόνου μικροοργανισμού.

Σε pH 6 υπήρξε καθυστέρηση της λανθάνουσας φάσης ανάπτυξης από 0.3-2 ώρες ανάλογα με το στέλεχος, καθώς επίσης και μείωση του μέγιστου ρυθμού ανάπτυξης κατά 0.1-0.2 σε σχέση με το μάρτυρα (*S. typhimurium* σε ζωμό με γλυκόζη, χωρίς την προσθήκη υπερκείμενου υγρού).



Σχήμα 1 Καμπύλη ανάπτυξης *S. typhimurium* χωρίς προσθήκη υπερκείμενου υγρού και με προσθήκη υπερκείμενου υγρού μεταβολικών προϊόντων του στελέχους 12d-MRS M17 *Enterococcus faecalis* σε ελεύθερο pH που αναπτύχθηκε σε ζωμό με γαλακτοολισακχαριτή (GOS Syrup)

Σύμφωνα με το σχήμα 1, παρατηρήθηκε ότι η λανθάνουσα φάση της *S. typhimurium* σε υπόστρωμα ζωμού με προσθήκη μεταβολικών προϊόντων του στελέχους 12d-MRS M17 *Enterococcus faecalis* καθυστέρησε σημαντικά κατά 8.7 ώρες σε σύγκριση με το μάρτυρα (ζωμός DSPY με γλυκόζη). Αυτό μπορεί να οφείλεται στη δράση των βακτηριοσινών, αν και δεν μελετήθηκε για επιβεβαίωση και στη δράση οργανικών οξέων αφού το pH είναι μεγαλύτερο από την pKa αυτών.

### 3.3.1.2 *Escherichia coli*

Πίνακας 3.3.7 Μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης και λανθάνουσα φάση της *E. coli* με προσθήκη υπερκείμενων υγρών των στελεχών που μελετήθηκαν σε ελεύθερο pH και σε pH 6

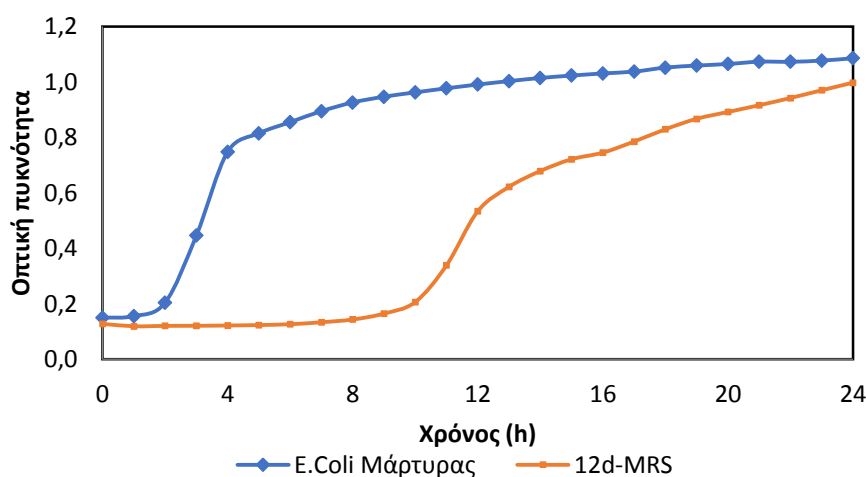
Στέλεχος-Γένος-Είδος	Ελεύθερο pH		pH 6	
	μmax	Lag Phase (h)	μmax	Lag Phase (h)
<b>Μάρτυρας</b>	<b>0.363</b>	<b>2</b>	<b>0.407</b>	<b>1</b>
5a-MRS- <i>L. paracasei</i>	0.008	15.7	0.28	2
5b-MRS- <i>L. rhamnosus</i>	0.007	23.3	0.28	2
6d-MRS- <i>Leuc. mesenteroides</i>	0.002	24	0.282	1.7
7bi-MRS- <i>L. pentosus</i>		επιλέχθηκε το 14b		
7bii-MRS- <i>L. paracasei</i>	0.007	23.3	-	-
9aiib-MRS- <i>L. plantarum</i>	0.001	24	0.243	2.7
10a-MRS- <i>L. zeae</i>	0.002	24	0.261	2
10a1-MRS- <i>L. paracasei</i>	0.002	24	-	-
10a1a-MRS M17- <i>L. paracasei</i>	0.002	24	0.28	1.3
10a3a-M17- <i>Enterococcus durans</i>	0.003	24	0.303	2
11a1a-MRS- <i>Pediococcus parvulus</i>	0.001	24	0.268	3
11d1a3b-MRS- <i>L. pentosus</i>	0.002	24	-	-
12b-M17- <i>L. pentosus</i>	0.002	24	-	-
12d-MRS M17- <i>Enterococcus faecalis</i>	0.169	7.7	-	-
13d-MRS- <i>L. plantarum</i>	0.004	23.3	0.269	1.7
14-MRS M17- <i>Enterococcus durans</i>	0.002	24	0.248	3
14b-MRS- <i>L. pentosus</i>	0.002	24	0.253	2
16c-MRS- <i>L. paracasei</i>	0.003	24	0.269	2
17a1c-MRS M17- <i>L. pentosus</i>	0.002	24	-	-
17a3-M17-Μη ταυτοποιημένο	0.002	24	-	-
18aiia-MRS M17- <i>Enterococcus hirae</i>	0.002	24	0.289	2
18c1a-MRS KF- <i>L. pentosus</i>	0.002	24	-	-
19c1b-MRS M17- <i>Enterococcus faecium</i>	0.002	24	0.293	2
19c2a -M17-Μη ταυτοποιημένο		δεν είχαμε πληροφορίες		

(-) Τα στελέχη αυτά δεν επιλέχθηκαν για διερεύνηση pH λόγω σημαντικού βαθμού συγγένειας (δηλαδή στελέχη με ίδια ταυτότητα π.χ 14b-MRS-*L. pentosus* – 18c1a-MRS KF-*L. pentosus*) με τα στελέχη που επιλέχθηκαν.



Μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης ( $\mu_{max}$ ) : Ο μέσος όρος των τριών επαναλήψεων του μέγιστου ρυθμού ανάπτυξης ανα ώρα (μέσος όρος από δύο συνεχόμενες ώρες μετρήσεων οπτικής πυκνότητας) ανα στέλεχος και ανα υδατάνθρακα.

Λανθάνουσα φάση ανάπτυξης (Lag Phase) : Θεωρήθηκε η αύξηση του λόγου δύο συνεχόμενων μετρήσεων οπτικής πυκνότητας έως 15% από  $T=0$  που υπολογίστηκε με την φόρμουλα  $IF(E6/ES5 < AS64; \text{"λανθάνουσα φάση"; "ανάπτυξη"})$  ( $E5, E6$  : δύο συνεχόμενες μετρήσεις ,  $A64: 1,15 (1+15\%)$ ), Έγινε ο μέσος όρος των τριών επαναλήψεων για το κάθε στέλεχος.



Σχήμα 2 Καμπύλη ανάπτυξης *E. coli* χωρίς προσθήκη υπερκείμενου υγρού και με προσθήκη υπερκείμενου υγρού μεταβολικών προϊόντων του στελέχους 12d-MRS *M17 Enterococcus faecalis* σε ελεύθερο pH που αναπτύχθηκε σε ζυμό με γαλακτοολισακχαριτή (GOS Syrup)

Αρχικά, ομοίως με τη *S. typhimurium*, η λανθάνουσα φάση ανάπτυξης της *E. coli* με προσθήκη μεταβολικών προϊόντων του στελέχους 12d-MRS *M17 Enterococcus faecalis* καθυστέρησε κατά 5.7 ώρες. Στο ελεύθερο pH υπήρξε πλήρης αναστολή της ανάπτυξης του παθογόνου μικροοργανισμού από όλα τα στελέχη εκτός του 12d-MRS *M17 Enterococcus faecalis*, ενώ σε pH 6 η λανθάνουσα φάση καθυστέρησε 0.7-2 ώρες ανάλογα με το στέλεχος. Τέλος, υπήρξε μείωση του μέγιστου ρυθμού ανάπτυξης κατά 0.1-0.17 ανάλογα με το στέλεχος σε σχέση με το μάρτυρα.

### 3.3.1.3 *Listeria monocytogenes*

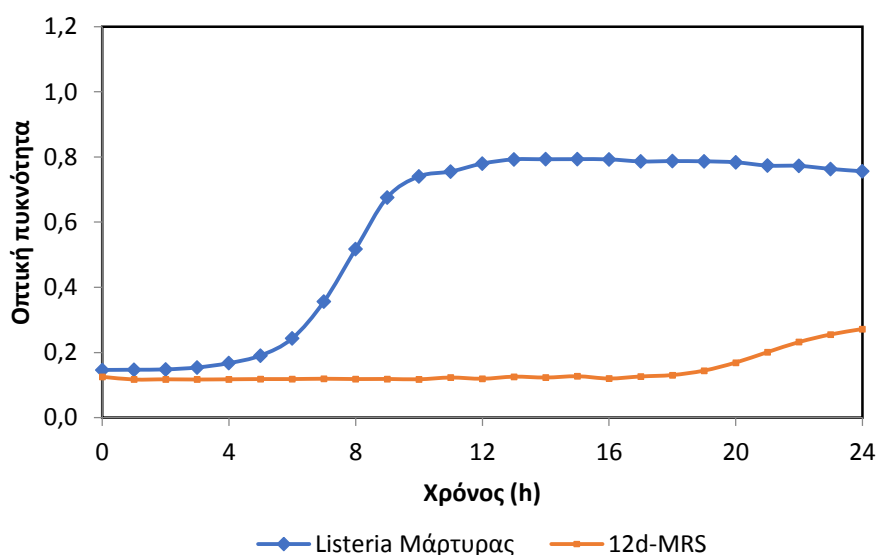
Πίνακας 3.3.8 Μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης και λανθάνουσα φάση της *L. monocytogenes* με προσθήκη υπερκείμενων υγρών των στελεχών που μελετήθηκαν σε ελεύθερο pH και σε pH 6

Στέλεχος-Γένος-Είδος	Ελεύθερο pH		pH 6	
	μmax	Lag Phase (h)	μmax	Lag Phase (h)
<b>Μάρτυρας</b>	<b>0.199</b>	<b>5</b>	<b>0.16</b>	<b>3.3</b>
5a-MRS- <i>L. paracasei</i>	0.005	19.3	0.083	4.3
5b-MRS- <i>L. rhamnosus</i>	0.003	24	0.14	5
6d-MRS- <i>Leuc. mesenteroides</i>	0.002	24	0.152	4
7bi-MRS- <i>L. pentosus</i>		επιλέχθηκε το 14b		
7bii-MRS- <i>L. paracasei</i>	0.003	24	-	-
9aiib-MRS- <i>L. plantarum</i>	0.001	24	0.05	6.7
10a-MRS- <i>L. zeae</i>	0.002	24	0.073	4
10a1-MRS- <i>L. paracasei</i>	0.002	24	-	-
10a1a-MRS M17- <i>L. paracasei</i>	0.002	24	0.116	4
10a3a-M17- <i>Enterococcus durans</i>	0.003	24	<b>0.011</b>	<b>10</b>
11a1a-MRS- <i>Pediococcus parvulus</i>	0.003	23.7	0.073	7
11d1a3b-MRS- <i>L. pentosus</i>	0.003	24	-	-
12b-M17- <i>L. pentosus</i>	0.002	24	-	-
12d-MRS M17- <i>Enterococcus faecalis</i>	0.033	21.7	-	-
13d-MRS- <i>L. plantarum</i>	0.004	23.3	<b>0.031</b>	<b>5.3</b>
14-MRS M17- <i>Enterococcus durans</i>	0.001	24	0.077	6.3
14b-MRS- <i>L. pentosus</i>	0.002	24	0.109	3.7
16c-MRS- <i>L. paracasei</i>	0.002	24	<b>0.033</b>	<b>8.3</b>
17a1c-MRS M17- <i>L. pentosus</i>	0.002	24	-	-
17a3-M17-Μη ταυτοποιημένο	0.034	18	-	-
18aiia-MRS M17- <i>Enterococcus hirae</i>	0.002	24	0.101	4
18c1a-MRS KF- <i>L. pentosus</i>	0.002	24	-	-
19c1b-MRS M17- <i>Enterococcus faecium</i>	0.002	24	0.101	4
19c2a -M17-Μη ταυτοποιημένο		δεν είχαμε πληροφορίες		

(-) Τα στελέχη αυτά δεν επιλέχθηκαν για διερεύνηση pH λόγω σημαντικού βαθμού συγγένειας (δηλαδή στελέχη με ίδια ταυτότητα π.χ 14b-MRS-*L. pentosus* – 18c1a-MRS KF-*L. pentosus*) με τα στελέχη που επιλέχθηκαν.

Μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης ( $\mu_{max}$ ): Ο μέσος όρος των τριών επαναλήψεων του μέγιστου ρυθμού ανάπτυξης ανα ώρα (μέσος όρος από δύο συνεχόμενες ώρες μετρήσεων οπτικής πυκνότητας) ανα στέλεχος και ανα υδατάνθρακα.

Λανθάνουσα φάση ανάπτυξης (Lag Phase) : Θεωρήθηκε η αύξηση του λόγου δύο συνεχόμενων μετρήσεων οπτικής πυκνότητας έως 15% από  $T=0$  που υπολογίστηκε με την φόρμουλα  $IF(E6/ES5 < AS64; "λανθάνουσα \text{ φάση}"; "ανάπτυξη")$  ( $E5, E6$  : δύο συνεχόμενες μετρήσεις ,  $A64$ : 1,15 (1+15%)), Έγινε ο μέσος όρος των τριών επαναλήψεων για το κάθε στέλεχος.

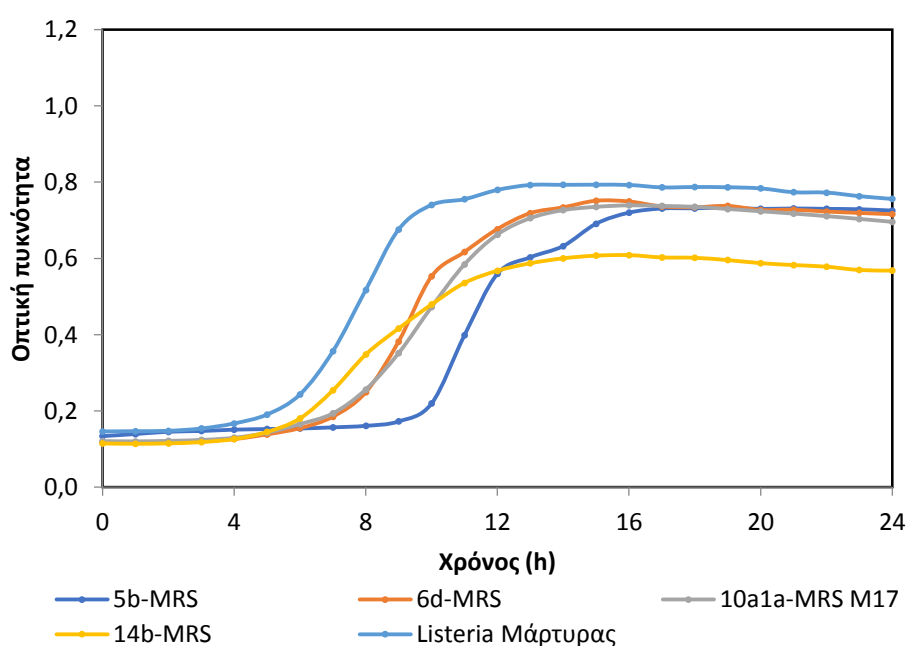


Σχήμα 3 Καμπύλη ανάπτυξης *L. monocytogenes* χωρίς προσθήκη υπερκείμενου υγρού και με προσθήκη υπερκείμενου υγρού μεταβολικών προϊόντων του στελέχους 12d-MRS *M17 Enterococcus faecalis* σε ελεύθερο pH που αναπτύχθηκε σε ζωμό με γαλακτοολισακχαριτή (GOS Syrup)

Σε αντίθεση με τα προηγούμενα αποτελέσματα, για τη *L. monocytogenes*, παρατηρήθηκε πλήρης αναστολή της ανάπτυξης στο ελεύθερο pH ακόμη

και με προσθήκη των μεταβολικών προϊόντων του στελέχους 12d-MRS M17 *Enterococcus faecalis*.

Σε pH 6 παρατηρήθηκε καθυστέρηση 0.7-6.7 ωρών στη διάρκεια της λανθάνουσας φάσης ανάπτυξης ανάλογα με το στέλεχος. Σημαντική μείωση ( $p < 0.05$ ) της  $\mu_{max}$  της *L. monocytogenes* παρατηρήθηκε σε όλα τα στελέχη σε ελεύθερο pH και σε pH 6, εξάριση αποτελούν τα 6d-MRS *Leuc. mesenteroides*, 5b-MRS *L. rhamnosus*, 14b-MRS *L. pentosus* και 10a1a-MRS M17 *L. paracasei* σε pH 6 σε σχέση με το μάρτυρα. Αυτό φαίνεται και από το σχήμα 4 με τις καμπύλες ανάπτυξης των 6d-MRS *Leuc. mesenteroides*, 5b-MRS *L. rhamnosus*, 14b-MRS *L. pentosus* και 10a1a-MRS M17 *L. paracasei* δεν διαφέρουν σημαντικά.



Σχήμα 4 Καμπύλη ανάπτυξης *L. monocytogenes* χωρίς προσθήκη υπερκείμενου υγρού και με προσθήκη υπερκείμενου υγρού μεταβολικών προϊόντων των στελεχών 6d-MRS *Leuc. mesenteroides*, 5b-MRS *L. rhamnosus*, 14b-MRS *L. pentosus* και 10a1a-MRS M17 *L. paracasei* σε pH 6.

Πίνακας 3.3.9 Σύγκριση της  $\mu_{max}$  (t-test) των παθογόνων μικροοργανισμών παρουσία μεταβολικών προϊόντων των στελεχών σε pH 6 σε σχέση με τον εκάστοτε μάρτυρα

Στέλεχος-Γένος-Είδος	t-test των παθογόνων μικροοργανισμών σε σχέση με τον μάρτυρα		
	<i>S. typhimurium</i>	<i>E. coli</i>	<i>L. monocytogenes</i>
5a-MRS- <i>L. paracasei</i>	0.000	0.000	0.002
5b-MRS- <i>L. rhamnosus</i>	0.000	0.000	0.605
6d-MRS- <i>Leuc. mesenteroides</i>	0.000	0.000	0.974
9aiib-MRS- <i>L. plantarum</i>	0.000	0.001	0.006
10a-MRS- <i>L. zaeae</i>	0.000	0.000	0.010
10a1a-MRS M17- <i>L. paracasei</i>	0.000	0.002	0.141
10a3a-M17- <i>Enterococcus durans</i>	0.000	0.011	0.003
11a1a-MRS- <i>Pediococcus parvulus</i>	0.000	0.000	0.010
13d-MRS- <i>L. plantarum</i>	0.000	0.004	0.003
14-MRS M17- <i>Enterococcus durans</i>	0.000	0.000	0.011
14b-MRS- <i>L. pentosus</i>	0.000	0.009	0.487
16c-MRS- <i>L. paracasei</i>	0.000	0.000	0.009
18aiia-MRS M17- <i>Enterococcus hirae</i>	0.000	0.001	0.032
19c1b-MRS M17- <i>Enterococcus faecium</i>	0.000	0.000	0.023

Πίνακας 3.3.10 Σύγκριση της  $\mu_{max}$  (t-test) των παθογόνων μικροοργανισμών παρουσία μεταβολικών προϊόντων του στελέχους 12d-MRS *Enterococcus faecalis* σε ελεύθερο pH σε σχέση με τον εκάστοτε μάρτυρα

ΣΤΕΛΕΧΟΣ-ΕΙΔΟΣ-ΓΕΝΟΣ	t-test των παθογόνων μικροοργανισμών σε σχέση με τον μάρτυρα		
	<i>S. typhimurium</i>	<i>E. coli</i>	<i>L. monocytogenes</i>
12d-MRS M17 <i>Enterococcus faecalis</i>	0.000	0.000	0.000

#### 4. Συμπεράσματα

Τα στελέχη αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα παρουσία υδατάνθρακα ο οποίος επιλέχθηκε κατόπιν δοκιμής 4 διαφορετικών υδατανθράκων για την εύρεση του βέλτιστου για το κάθε ένα έπειτα από στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων. Από τον Πίνακα 3.2.3 φάνηκε να υπάρχει κάποια προτίμηση στο είδος του υδατάνθρακα. Πιο συγκεκριμένα, όλα τα στελέχη του *L. pentosus* και τα είδη του γένους *Enterococcus* αναπτύχθηκαν καλύτερα σε ζυμό TMRS με προσθήκη GOS Syrup παρουσιάζοντας το συνδυασμό υψηλότερου μέγιστου ρυθμού ανάπτυξης και μικρότερης διάρκειας λανθάνουσας φάσης. Επίσης, παρατηρήθηκαν καλύτερα αποτελέσματα για τα *Leuc. mesenteroides* και *Pediococcus parvulus* στους γαλακτοολιγοσακχαρίτες, χωρίς να μπορούν να διεξαχθούν συμπεράσματα ως προς το είδος αυτού (GOS Syrup, GOS Powder). Τέλος, ο *L. paracasei* παρουσίασε μεικτά αποτελέσματα με βέλτιστη ανάπτυξη 3 στελεχών (5a-MRS, 7bii-MRS, 10a1a-MRS M17) σε GOS και 2 στελεχών (10a1-MRS και 16c-MRS) σε FOS καθιστώντας αδύνατη τη διεξαγωγή συμπεράσματος ως προς την προτίμηση σε κάποιο είδος.

Απο την ζύμωση του υδατάνθρακα παράχθηκαν οργανικά οξέα τα οποία μείωσαν το pH του υποστρώματος. Ο βαθμός μείωσης εξαρτάται από το είδος, την συγκέντρωση και την pKa του οξέος. Ειδικότερα υπήρξαν διαφορές στις τιμές pH των 13d-MRS *L. plantarum* και 9aiib-MRS *L. plantarum* 4.65 και 4.19. Αυτό οφείλεται στη ζύμωση διαφορετικού υδατάνθρακα και παραγωγή διαφορετικών μεταβολικών προϊόντων από τα ίδια στελέχη. Το ίδιο παρατηρήθηκε και για τους *L. paracasei* 10a1-MRS και 16c-MRS σε L95 όπου το pH έφτασε 4.02 και 3.98 αντίστοιχα ενώ στο 5a-MRS και 7bii σε GOS SYRUP το pH μειώθηκε σε 4.55 και 4.23 αντίστοιχα.

Αρχικά παρατηρήθηκε πλήρης αναστολή της ανάπτυξης των παθογόνων βακτηρίων *L. monocytogenes*, *S. typhimurium* και *E. coli* με τη προσθήκη των μεταβολικών προϊόντων των στελεχών που παράχθηκαν κατά την ανάπτυξη τους σε θρεπτικό ζυμό που περιείχε διάλυμα 10% (w/v) GOS Syrup, GOS Powder, L95 σε ελεύθερο pH. Το αποτέλεσμα αυτό οφείλεται στην παραγωγή οργανικών οξέων ως προϊόντα διάσπασης των υδατανθράκων και την ταυτόχρονη δυσκολία ανάπτυξης αυτών εξαιτίας του χαμηλού pH. Υπάρχει αυξημένη δράση των οξέων λόγω χαμηλού pH και της pKa τους, που είναι 4.5 και 4.8 για το οξικό και γαλακτικό οξύ αντίστοιχα. Εξαιρέση αποτελούν τα μεταβολικά προϊόντα του 12d-MRS (pH 4.96) που συντέλεσαν στην πλήρη αναστολή ανάπτυξης μόνο (p<0.05) της *L. monocytogenes* ενώ στην *S. typhimurium* και την *E. coli* υπήρξε καθυστέρηση της λανθάνουσας φάσης ανάπτυξης.

Μετά τη ρύθμιση του pH σε 6 παρατηρήθηκε πως η λανθάνουσα φάση ανάπτυξης και των τριών παθογόνων διήρκησε σημαντικά περισσότερο σε σχέση με τον μάρτυρα (p<0.05) κατά 0.3-6.7 ώρες (0,7-2 ώρες για την *E. coli*, 0.3-2 ώρες για την *S. typhimurium* και 0.7-6.7 ώρες για την *L. monocytogenes*) το οποίο έδειξε πως η *L. monocytogenes* είναι πιο ευαίσθητη στα μεταβολικά προϊόντα των στελεχών σε σχέση με τα άλλα δύο παθογόνα βακτήρια.

Για την *L. monocytogenes* που αναπτύχθηκε σε υπόστρωμα παρουσία των μεταβολικών προϊόντων των 10a<sub>3</sub>a- M17 *Enterococcus durans*, 13d-MRS *L. plantarum* και 16c-MRS *L. paracasei* σε pH 6 παρουσιάστηκε σημαντική μεταβολή (p<0.05) του μέγιστου ρυθμού ανάπτυξης και της λανθάνουσας φάσης ανάπτυξής της. Σε pH 6 η δράση των οργανικών οξέων που παράγονται είναι ασθενής λόγω χαμηλής pKa. Συνεπώς, η αντιμικροβιακή δραστηριότητα μπορεί να οφείλεται στην παρουσία

βακτηριοσινών ή/και άλλων ουσιών (υπεροξειδίο, διοξειδίο του άνθρακα κ.α.).

Σύμφωνα με τους Hennings *et al.*, (2015) στελέχη του *Enterococcus* βρέθηκαν πως παράγουν βακτηριοσίνες οι οποίες επηρέασαν την ανάπτυξη της *L. monocytogenes* με εξαίρεση 3 στελέχη. Συγκεκριμένα από τον *Enterococcus durans* παράχθηκε mundticin KS η οποία παρουσίασε αποτελεσματική αναστολή της *L. monocytogenes* 39-2. Αυτή είναι μια πιθανή εξήγηση για το στέλεχος 10a3a- M17 *Enterococcus durans* το οποίο ανέστειλε μόνο την ανάπτυξη της *L. monocytogenes* σε αντίθεση με αυτή της *S. typhimurium* και της *E. coli*. Μια από τις σημαντικότερες διαφορές μεταξύ των τριών αυτών παθογόνων είναι η διαφοροποίηση τους σε Gram θετικά (*L. monocytogenes*) και Gram αρνητικά (*S. typhimurium* και η *E. coli*).

Για τη *L. monocytogenes* σε αντίθεση με την *E. coli* και την *S. typhimurium* δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά ( $p > 0.05$ ) κατά την ανάπτυξη της με μεταβολικά προϊόντα των στελεχών 6d-MRS *Leuc. mesenteroides*, 5b-MRS *L. rhamnosus*, 14b-MRS *L. pentosus* και 10a1a-MRS M17 *L. paracasei* σε pH 6 όπως φαίνεται και στο (σχήμα 4). Το αποτέλεσμα αυτό οφείλεται πιθανότερα στην ανθεκτικότητα της *L. monocytogenes* στα μεταβολικά προϊόντα τους.



## 5.Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

Μελλοντικές μελέτες περιλαμβάνουν τη διερεύνηση των μεταβολικών προϊόντων που παράχθηκαν από τα στελέχη κατά την ανάπτυξη τους παρουσία υδατάνθρακα που αφορά τον μηχανισμό της αντιμικροβιακής δράσης. Επίσης η ευρύτερη διερεύνηση του pH ανάπτυξης των παθογόνων μικροοργανισμών παρουσία των μεταβολικών προϊόντων των στελεχών που μελετήθηκαν. Επιπλέον πειράματα θα μπορούσαν να διεξαχθούν για να μελετηθεί η αντιμικροβιακή δράση των μεταβολικών προϊόντων του 10a3a-M17 *Enterococcus durans* όσον αφορά την αναστολή ανάπτυξης της *Listeria monocytogenes* σε διαφορετικά pH.

## 6. Βιβλιογραφία

- Ciorba M.A. (2012). A Gastroenterologist's Guide to Probiotics. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, **10** (9), 960-968.
- Domenico M. (2015). Presence of *Listeria monocytogenes* in mediterranean-style dry fermented sausages. *Journal List (Foods)*, **4** (1), 34-50.
- FAO/WHO, 2002 Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food
- Fisher K. and Phillips C. (2009). The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology Society*. **155**, 1749-1757.
- Flores-Maltos D.A., Mussatto S.I., Contreras-Esquivel J.C., Rodriguez-Herrera R., Teixeira J.A. and Aguilar C.N., (2014). Biotechnological production and application of fructooligosaccharides, *Critical Reviews in Biotechnology*, **36** (2), 259-267.
- Gibson, G.R. & Roberfroid, M.B. (1995) Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*. **125**, 1401-1412.
- Gibson, G.R., Probert, H.M., van Loo, J.A.E., Rastall, R.A. and Roberfroid, M.B. (2004). Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews*, **17**, 259-275.

Gibson, G.R., Scott, K.P., Rastall, R.A., Tuohy, K.M., Hotchkiss, A., Dubert-Ferrandon, A., Gareau, M., Murphy, E.F., Saulnier, D., Loh, G., Macfarlane, S., Delzenne, N., Ringel, Y., Kozianowski, G., Dickmann, R., Lenoir-Wijnkook, I., Walker, C. and Buddington, R. (2010) Dietary prebiotics: current status and new definition. *Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods*, **7**, 1-19.

Hamasalin H.J. (2016). Synbiotic as Feed Additives Relating to Animal Health and Performance. *Advances in Microbiology*, **6**, 288-302.

Henning, C., Gautam, D., & Muriana, P. (2015). Identification of Multiple Bacteriocins in *Enterococcus* spp. Using an *Enterococcus*-Specific Bacteriocin PCR Array. *Microorganisms*, **3**(1), 1–16.

[http://www.beneonews.com/Background\\_Information/Products/Chicory/oligofructose/BENEO\\_OnePager\\_Orafti\\_R\\_\\_oligofructose\\_2012\\_1.pdf](http://www.beneonews.com/Background_Information/Products/Chicory/oligofructose/BENEO_OnePager_Orafti_R__oligofructose_2012_1.pdf)

<http://www.cdc.gov>

Katouli M. (2010). Population structure of gut *Escherichia coli* and its role in development of extra-intestinal infections. *Iranian Journal of Microbiology*, **2** (2), 59-72.

Klaenhammer T.R. & Kullen M.J. (1999). Selection and design of probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, **50**, 45-57.

Lorenzoni André S.G, Aydos LuizaF, Klein ManuelaP, Rodrigues Rafael C, Hertz Plinho F, (2014). Fructooligosaccharides synthesis by highly stable immobilized  $\beta$ -fructofuranosidase from *Aspergillus aculeatus*. *Carbohydrate Polymers*, **103**, 193-197.

Manero, A. and Blanch, A.R. (1999). Identification of Enterococcus spp. with a biochemical key. *Applied Environmental Microbiology* **65**, 4425–4430

Martin-Visscher L.A, Yoganathan S, Sit C.S, Lohans C.T & Vederas J.C., (2011). The activity of bacteriocins from *Carnobacterium maltaromaticum* UAL307 against Gram-negative bacteria in combination with EDTA treatment. *FEMS Microbiology Letters*, **317** (2), 152-159.

Montville T.J. & Matthews K.R. (2005). *Food microbiology*, Washington, DC, USA, ASM Press.

Mussatto S.I & Mancilha I.M, (2007). Non-digestible oligosaccharides: A review. *Carbohydrate Polymers*, **68**, 587-597.

Orsei R.H. & Wiedmann M. (2016). Characteristics and distribution of *Listeria spp.*, including *Listeria* species newly described since 2009. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **100**, 5237-5287.

Pandey K.R., Naik S.R., & Vakil B.V. (2015). Probiotics, prebiotics and synbiotics – a review. *Journal of Food Science and Technology*, **52** (12), 7577-7587.

Papadimitriou K, Alegria A, Bron P.A, De Angelis M, Gobbetti M, Kleerebezem M, Lemos J.A, Linares D.M, Ross P, Stanton C, Turrioni F, Van Sinderen D, Varmanen P, Ventura M, Zuniga M, Tsakalidou E, Kok J., (2016). Stress Physiology of Lactic Acid Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **80** (3), 837-890.

Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, London Ontario, Canada (2002), pp. 1-11, April 30 and May 1, 2002

Sabina F. (2016). Antimicrobial effect of probiotics against common pathogens. *Probiotics and Prebiotics in Human Nutrition and Health*, Dr. Venketeshwer Rao (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/63141. Available from: <https://www.intechopen.com/books/probiotics-and-prebiotics-in-human-nutrition-and-health/antimicrobial-effect-of-probiotics-against-common-pathogens>.

Schrezenmeir J. and De Vrese M. (2001). Probiotics, prebiotics, and synbiotics – approaching a definition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **73** (2), 361-364.

Schleifer, K.H., Kilpper-Balz, R., 1984. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **34**, 31–34.

Tripathi M.K. and Giri S.K. (2014). Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods*, **9**, 225-241.

Vasquez A, Forsgren E, Fries I, Paxton R.J, Flaberg E, Szekely L, Olofsson T.C., (2012). Symbionts as Major Modulators of Insect Health: Lactic Acid Bacteria and Honeybees. *PLoS ONE*, 7(3). e33188. doi:10.1371/journal.pone.0033188.

Zacharof M.P. and Lovitt R. (2012). Bacteriocins produced by lactic acid bacteria *APCBEE Procedia*, 2, 50-56.

Zeidan A.A, Poulsen V.K, Janzen T, Buldo P, Derkx P.M, Oregaard G, Neves A.R., (2017). Polysaccharide production by lactic acid bacteria: from genes to industrial applications. *FEMS Microbiology Reviews*, 41 (1), S168-S200.

Zhong Z., Zhang W., Song Y., Liu W., Xu H., Xi X., Menghe B., Zhang H., Sun Z. (2017). Comparative genomic analysis of the genus *Enterococcus*. *Microbiological Research*, 196, 95-105.

Παπαντωνίου Δ. (2013). Μικροβιολογία τροφίμων, Θεσσαλονίκη, Αλεξάνδρειο Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Θεσσαλονίκης.