



ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ  
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ  
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

## ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Προβιοτικές ιδιότητες στελεχών λακτοβακίλλων  
απομονωμένων από κόκκους κεφίρ**

Μαναβάκη Μαλαματένια

**ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2014**

**Προβιοτικές ιδιότητες στελεχών λακτοβακίλλων  
απομονομένων από κόκκους κεφίρ**

Μαναβάκη Μαλαματένια

Αλεξάνδρειο Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Θεσσαλονίκης  
(ΑΤΕΙ), Τμήμα Τεχνολογίας Τροφίμων, 57400 Θεσσαλονίκη  
ΤΘ 141

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

Εισηγητής: Λυκοτραφίτη Ελένη

Εξεταστική επιτροπή: Παπαντωνίου Δημήτριος

Δημητρέλη Γεωργία

## Προβιοτικές ιδιότητες στελεχών λακτοβακίλλων απομονομένων από κόκκους κεφίρ

Μαναβάκη Μαλαματένια

Αλεξάνδρειο Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Θεσσαλονίκης  
(ΑΤΕΙ), Τμήμα Τεχνολογίας Τροφίμων, 57400 Θεσσαλονίκη  
ΤΘ 141

### Περίληψη

Σκοπός της πτυχιακής εργασίας ήταν η μελέτη στελεχών *Lactobacillus kefir* απομονωμένων από κόκκους κεφίρ, ως προς τις προβιοτικές τους ιδιότητες. Ειδικότερα μελετήθηκε η αντοχή των στελεχών σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις χολικών αλάτων, η ανάπτυξη τους σε διαφορετικό pH καθώς και η αντιμικροβιακή δράση τους έναντι συγκεκριμένων παθογόνων μικροοργανισμών. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στις δυο τιμές pH 2 και pH 3 παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση ( $p < 0.05$ ) του πληθυσμού του *Lactobacillus kefir* C<sub>1</sub>. Στο pH 2 από 8,1 log cfu/ml σε 15 λεπτά μειώθηκε κατά 6 log cfu/ml πέφτοντας κάτω από το όριο ανιχνευσιμότητας της τεχνικής. Στο pH 3 από 8,3 log cfu/ml σε 45 λεπτά μειώθηκε κατά 1,8 log cfu/ml ενώ σε 2 ώρες κατά 3,6 log cfu/ml. Παράλληλα δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική ( $p < 0,05$ ) μεταβολή στον πληθυσμό του στελέχους σε υπόστρωμα Phosphate Buffered Saline (PBS) με προσθήκη 0,4% (w/v) χολικών αλάτων και στο υπόστρωμα χωρίς χολικά άλατα (έλεγχος), καθώς ο πληθυσμός παρέμεινε σταθερός στους ~ 6,5 log cfu/ml κατά τη διάρκεια του πειράματος. Τέλος, αντιμικροβιακή δράση παρατηρήθηκε μόνο από τον *Lactobacillus kefir* F4Aa έναντι των παθογόνων *Salmonella enterica* serotype *Typhimurium* DT193 και *Listeria monocytogenes* Scott A ενώ όλα τα υπόλοιπα στελέχη δεν παρουσίασαν αντιμικροβιακή δράση.

## Abstract

The aim of the present dissertation was to investigate potential probiotic properties of *Lactobacillus kefir* strains, isolated from kefir grains. The capacity of *Lactobacillus kefir* C1 strain to survive under acidic condition and certain bovine bile salt concentration, was examined. Antimicrobial activity of *Lactobacillus kefir* strains against certain pathogenic bacteria was also investigated. The results showed that *L. kefir* C1 survived well at pH 3 but performed poorly at pH 2. At pH 2, the population of *L. kefir* C1 declined by 6 log cfu/ml in 15 minutes from a starting inoculum of 8,1 log cfu/ml. At pH 3, from a starting inoculum of 8,3 log cfu/ml, the population of *L. kefir* C1 was reduced by 1,8 log cfu/ml in 45 minutes and by 3,6 log cfu/ml after two hours of experiment. There was, no statistically ( $p < 0,05$ ) significant difference in the population of *L. kefir* C1 when inoculated in Phosphate Buffered Saline (PBS) containing 0,4% (w/v) bovine bile and PBS alone (control). The population remained stable at ~ 6,5 log cfu/ml for the duration of the experiment (6 h). Antimicrobial activity was observed when *L. kefir* F4Aa was used against *L. monocytogenes* and *Salmonella typhimurium*, whereas no inhibition was observed when the other *L. kefir* strains were tested against the same pathogens.

## Περιεχόμενα

1. Κεφίρ.....	7
1.1 Γενικά.....	7
1.2 Μικροβιοχλωρίδα κεφίρ.....	7
1.3 Παραγωγή και συντήρηση του.....	8
2. Ο γαστρεντερικός σωλήνας του ανθρώπου.....	9
2.1 Αποίκηση του γαστρεντερικού σωλήνα.....	9
2.2 Εντερική χλωρίδα.....	10
2.3 Ο ρόλος της χλωρίδας.....	12
3. Προβιοτικοί μικροοργανισμοί.....	14
3.1 Περιγραφή προβιοτικών.....	14
3.2 Κριτήρια επιλογής προβιοτικών.....	15
3.3 Οξυγαλακτικά βακτήρια και λακτοβάκιλλοι.....	17
3.4 Ευεργετικές ιδιότητες προβιοτικών.....	18
4. Παθογόνοι μικροοργανισμοί.....	21
4.1. <i>Escherichia coli</i> .....	21
4.1.1 Γενικά χαρακτηριστικά.....	21
4.1.2 Ταξινόμηση της <i>E. coli</i> .....	22
4.1.3 Ανάπτυξη της <i>E. coli</i> .....	22
4.2 <i>Listeria monocytogenes</i> .....	23
4.2.1 Γενικά χαρακτηριστικά.....	23
4.2.2 Ταξινόμηση της <i>L. monocytogenes</i> .....	24
4.2.3 Ανάπτυξη της <i>L. monocytogenes</i> .....	24
4.3 <i>Salmonella typhimurium</i> .....	25
4.3.1 Γενικά χαρακτηριστικά.....	25
4.3.2 Ταξινόμηση της <i>S. Typhimurium</i> .....	26
4.3.3 Ανάπτυξη της <i>S. typhimurium</i> .....	26

5. Αντιμικροβιακή δράση προβιοτικών .....	27
5.1 Αντιμικροβιακές ουσίες που παράγονται από τα βακτήρια .....	27
5.2 Βακτηριοσίνες και οξέα.....	28
6. Σκοπός της παρούσας πτυχιακής .....	31
7. Υλικά και μέθοδοι.....	32
7.1 Στελέχη.....	32
7.2 Υλικά .....	32
7.3 Προετοιμασία βακτηριακών στελεχών.....	33
7.3.1 Αντοχή στα χολικά άλατα.....	33
7.3.2 Αντοχή στην οξύτητα .....	34
7.3.3 Αντιμικροβιακή δράση .....	35
7.4 Στατιστική ανάλυση .....	36
8. Αποτελέσματα.....	37
8.1 Αντοχή του στελέχους <i>Lactobacillus kefir</i> C1 σε pH 2 και 3 .....	37
8.2 Αντοχή του στελέχους <i>Lactobacillus kefir</i> C1 σε χολικά άλατα .....	38
8.3 Αντιμικροβιακή δράση των στελεχών του <i>L. kefir</i> .....	39
8.3.1 Αντιμικροβιακή δράση του στελέχους <i>L. kefir</i> A4.....	40
8.3.2 Αντιμικροβιακή δράση του στελέχους <i>L. kefir</i> D1b1.....	42
8.3.3 Αντιμικροβιακή δράση του στελέχους <i>L. kefir</i> F4Aa.....	44
9. Συζήτηση.....	47
10. Προτάσεις για μελλοντική έρευνα .....	51
11. Βιβλιογραφία.....	52

## Συντμήσεις

**Cfu:** colony-forming unit

***E. coli:*** *Escherichia coli*

**GRAS:** generally recognized as safe

***L. kefir:*** *Lactobacillus kefir*

***L. gray:*** *Listeria gray*

***L. innocua:*** *Listeria innocua*

***L. ivanovii:*** *Listeria ivanovii*

***L. monocytogenes:*** *Listeria monocytogenes*

***L. seeliger:*** *Listeria seeliger*

***L. welshimer:*** *Listeria welshimer*

***S. enteritidis:*** *Salmonella enteritidis*

***S. paratyphi:*** *Salmonella paratyphi*

***S. typhi:*** *Salmonella typhi*

***S. typhimurium:*** *Salmonella Typhimurium*

# 1. Κεφίρ

## 1.1 Γενικά

Το κεφίρ είναι ένα φυσικό προβιοτικό γαλακτοκομικό προϊόν με μακράιωνη ιστορία. Ιδιαίτερα γνωστό και διαδεδομένο στις περιοχές του Καυκάσου όπου και καταναλωνόταν σε μεγάλες ποσότητες από τους κατοίκους. Λόγω των ευεργετικών του ιδιοτήτων η διάδοση του ήταν γρήγορη, ενώ η μαζική παραγωγή του ξεκίνησε στη δεκαετία του 30'. Πρόκειται για ένα υπόξινο λευκό ρόφημα το οποίο παράγεται από φρέσκο γάλα όταν σε αυτό προστεθεί ποσότητα νωπών κόκκων κεφίρ που θα προκαλέσουν τη ζύμωση της λακτόζης. (Gronnevik *et al.*, 2011)

## 1.2 Μικροβιοχλωρίδα κεφίρ

Οι κόκκοι του κεφίρ οπτικά δίνουν την εντύπωση σφουγγαριού ή μικρών συστάδων κουνουπιδιού. Αξιοσημείωτο γεγονός αποτελεί ότι η μικροβιοχλωρίδα του κεφίρ μπορεί να έχει διαφορετική σύσταση ανάλογα με την περιοχή προέλευσης του. Κυρίως όμως αποτελείται από, μια μάζα οξυγαλακτικών βακτηρίων, φιλικών για τον ανθρώπινο οργανισμό όπως *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, ζύμες όπως *Kluyveromyces*, *Candida* και *Saccharomyces* και ενός μοναδικού υδατοδιαλυτού πολυσακχαρίτη που ονομάζεται κεφιράνη. Το πλέγμα που δημιουργείται από την κεφιράνη περικλείει τα οξυγαλακτικά βακτηρια και τις ζύμες μαζί. (Puerari *et al.*, 2012) Ορισμένοι από τους παραπάνω μικροοργανισμούς εντάσσονται στην κατηγορία των προβιοτικών. Αποτελούν μια ομάδα ζωντανών οργανισμών όπου μακροχρόνιες και εμπειριστατωμένες έρευνες καταδεικνύουν τα πολλαπλά και ευεργετικά οφέλη τους.



### 1.3 Παραγωγή και συντήρηση του

Οι Gronnevik *et al.* (2011) αναφέρουν πως για την παραδοσιακή παραγωγή του κεφίρ αρχικά γίνεται η προσθήκη των κόκκων σε αγελαδινό γάλα. Η αναλογία γάλακτος και κόκκων είναι 1 προς 20. Στη συνέχεια το γάλα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου στους 18-20 °C για 20 ώρες προκειμένου να πραγματοποιηθεί η ζύμωση του γάλακτος. Τέλος το προϊόν που παράγεται περιέχει πολύ μικρή ποσότητα σε λακτόζη, αφού αυτή έχει υποστεί ζύμωση και τα προϊόντα μεταβολισμού των μικροοργανισμών. Οι κόκκοι εξάγονται από το γάλα με τη βοήθεια κόσκινου και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη ζύμωση καινούριας ποσότητας γάλακτος. Η υφή του είναι παχύρρευστη ενώ η γεύση του όξινη. Η συντήρηση του είναι μια εύκολη διαδικασία αφού γίνεται σε θερμοκρασίες 4±2 °C για 3 έως 4 εβδομάδες (Leite *et al.*, 2013) όπου και παρατηρείται σημαντική μείωση των ζωντανών μικροοργανισμών.

## 2. Ο γαστρεντερικός σωλήνας του ανθρώπου

Το γαστρεντερικό σύστημα αποτελεί ένα από τα πλέον βασικότερα και πολύπλοκα ανατομικά συστήματα του ανθρώπινου οργανισμού. Βασικός του ρόλος είναι η δίοδος, η πέψη, η χρήση και αποβολή της τροφής. Αποτελείται από τη στοματική κοιλότητα, το φάρυγγα, τον οισοφάγο και ακολουθούν το στομάχι, το δωδεκαδάκτυλο, το λεπτό και το παχύ έντερο. Τα τέσσερα τελευταία τμήματα συνθέτουν τον γαστρεντερικό σωλήνα. Με μία σειρά διαδικασιών που ξεκινούν από το στομάχι και τη διάσπαση των τροφών από το υδροχλωρικό οξύ, συνεχίζουν στο δωδεκαδάκτυλο με την έκκριση παγκρεατικών και χολικών υγρών και καταλήγουν στο λεπτό και παχύ έντερο όπου με την παρουσία της μικροβιοχλωρίδας ολοκληρώνεται η διαδικασία.

### 2.1 Αποίκηση του γαστρεντερικού σωλήνα

Από τη στιγμή της γέννησης ενός ανθρώπου ξεκινά η διαμόρφωση της εντερικής μικροβιοχλωρίδας του. Το πρώτο στάδιο κατά το οποίο το νεογέννητο έρχεται σε επαφή με μικροοργανισμούς αποτελεί ο τρόπος γέννησης του και αν αυτός επέρχεται με φυσιολογικό τοκετό ή όχι. Αρχικά κυριαρχούν γένη βακτηρίων όπως η *Escherichia* και ο *Streptococcus*. Το δεύτερο στάδιο κατά το οποίο συνεχίζει η διαμόρφωση αποτελεί ο επισιτισμός του. Βρέθηκε ότι νεογνά που τρεφόταν αποκλειστικά με μητρικό γάλα παρουσίασαν μεγάλη αύξηση σε *Bifidobacterium* και ταυτόχρονη μείωση σε *Escherichia coli* καθώς και *Streptococcus*, ενώ απών ήταν το *Clostridium* (Holzapfel *et al.* 1998). Ταυτόχρονα, σε νεογνά που τρεφόταν με φόρμουλες του εμπορίου η μικροβιοχλωρίδα ήταν πιο περίπλοκη με μεγάλους αριθμούς *Bacteroides*, *Clostridium* και *Streptococcus*. Το *Bifidobacterium* υπήρχε αλλά σε μικρότερα ποσοστά σε

σχέση με τα νεογνά που τρεφόταν αποκλειστικά με μητρικό γάλα. Είναι προφανές λοιπόν ότι η αποίκηση του γαστρεντερικού σωλήνα ξεκινά πολύ νωρίς και διαμορφώνεται ανάλογα με την τροφή που ο άνθρωπος καταναλώνει. Στη διαμόρφωση αυτή λαμβάνουν μέρος και άλλοι παράγοντες όπως αναφέρουν οι Holzapfel *et al.* (1998) που σχετίζονται από τη μια πλευρά με την κατάσταση της υγείας του ανθρώπου, την ηλικία του, το στρες, το περιβάλλον στο οποίο ζει και από την άλλη με παράγοντες που αφορούν τα ίδια τα μικροβιακά κύτταρα. Οι τελευταίοι εξαρτώνται από το pH και τις εκκρίσεις στο περιβάλλον των μικροοργανισμών, τη φυσιολογία τους, τη θνησιμότητα καθώς και την ικανότητα επιβίωσης και αναπαραγωγής τους, την ικανότητα να επικολλούνται στα τμήματα του εντερικού σωλήνα, τη διατροφική τους 'ευλυγισία' και την ανταγωνιστικότητα τους ως προς τα άλλα είδη. Γενικότερα όμως έχει αποδειχθεί ότι όσο η ηλικία αυξάνεται ή το άτομο νοσεί παρατηρείται αύξηση των βακτηρίων όπως η *Escherichia coli* και μείωση των *Bifidobacterium* (Holzapfel *et al.* 1998).

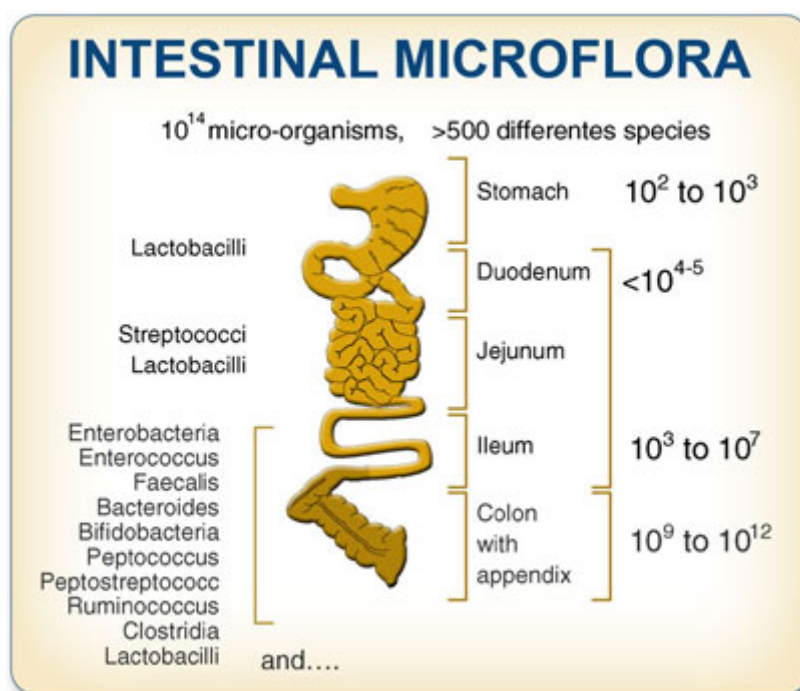
## 2.2 Εντερική χλωρίδα

Η εντερική χλωρίδα αποτελεί ένα ιδιαίτερα περίπλοκο και εύθραυστα ισορροπημένο σύστημα το οποίο μόνο τα τελευταία χρόνια έχει μελετηθεί ενδελεχώς. Οι γνώσεις για τις αλληλεπιδράσεις και τον ακριβή τρόπο λειτουργίας του παραμένουν ακόμα περιορισμένες. Οι έρευνες όμως που έχουν διεξαχθεί συγκλίνουν στο συμπέρασμα ότι παίζει αδιαμφισβήτητα ένα πολύ σημαντικό ρόλο στην κατάσταση της υγείας των ανθρώπων όπως επίσης και των ζώων. Το οικοσύστημα λοιπόν του εντερικού σωλήνα αποτελεί μία πολύ μεγάλη περιοχή που έρχεται σε επαφή με το περιβάλλον συγκρίνοντάς την με το υπόλοιπο σώμα. Η επιφάνεια που καταλαμβάνει υπολογίζεται γύρω στα 150-200 τετραγωνικά μέτρα, παρέχοντας έτσι τον

απαιτούμενο χώρο ώστε να πραγματοποιηθούν όλες οι διαδικασίες πέψης, ανάπτυξης και παραγωγής των μικροοργανισμών. (Holzapfel *et al.*, 1998). Οι Aureli *et al.*, (2011), σε μια πιο πρόσφατη μελέτη ανέφεραν ότι η επιθηλιακή επιφάνεια πάνω στην οποία αναπτύσσεται η εντερική χλωρίδα καταλαμβάνει 250-400 τετραγωνικά μέτρα κατατάσσοντας την έτσι στη δεύτερη μεγαλύτερη επιφάνεια στο ανθρώπινο σώμα μετά την επιφάνεια του αναπνευστικού συστήματος. Στην έρευνα που διεξήγαγαν οι Holzapfel *et al.*, (1998) αναφέρεται επίσης ότι η γαστρεντερική οδός ενός ενήλικου ανθρώπου φιλοξενεί  $10^{14}$  ζωντανά βακτήρια, δέκα φορές τον αριθμό των ευκαρυωτικών κυττάρων σε όλους τους ιστούς του ανθρωπίνου σώματος. Η χλωρίδα αυτή μαζί με το βλεννογόνο του εντέρου αποτελούν ένα είδος εμποδίου, δηλαδή ένα πολύ σημαντικό αμυντικό σύστημα ενάντια στους παθογόνους μικροοργανισμούς ή και στις επιβλαβείς ενώσεις μέσα στο έντερο ( Aureli *et al.*, 2011).

Η μικροβιακή αποίκηση του γαστρεντερικού σωλήνα διαφέρει από τμήμα σε τμήμα όπως γίνεται φανερό και στο **Σχήμα 2.1** και εκτιμάται ότι κατά προσέγγιση 500 διαφορετικά είδη αναπτύσσονται στο εσωτερικό του σωλήνα. Στην αρχή του εντερικού σωλήνα όπου και προηγείται η στοματική κοιλότητα το pH που επικρατεί είναι ουδέτερο. Στο στομάχι το pH κυμαίνεται από 2.5 ως 3.5 παράγοντας καταστροφικός για το πλήθος των μικροβίων. Οι πληθυσμοί τους φτάνουν μέχρι και τα  $10^3$  cfu/ml και αποτελούνται κυρίως από Gram-θετικά βακτήρια όπως *Lactobacilli*. Στο δωδεκαδάκτυλο όπου εκκρίνονται χολικά άλατα και παγκρεατικά υγρά καθώς και στο λεπτό έντερο παρατηρούμε μια μικρή αύξηση μικροοργανισμών μέχρι και  $10^5$  cfu/ml και περιλαμβάνει συνήθως *Lactobacilli* και *Streptococci*. Στον ειλέο ο πληθυσμός αυξάνεται περαιτέρω στα  $10^7$  cfu/ml ενώ στο παχύ έντερο φτάνει στο μέγιστο  $10^{12}$  cfu/ml. Σε αυτά τα τμήματα η χλωρίδα αποτελείται από *Lactobacilli*,

*Enterobacteriaceae, Bifidobacteria, Enterococcus, Peptococcus, Clostridia, Bacteroides* και πολλά άλλα (Holzapfel *et al.*, 1998).



**Σχήμα 2.1.** Μικροβιακή αποίκηση του ανθρώπινου γαστρεντερικού σωλήνα (Holzapfel *et al.*, 1998).

### 2.3 Ο ρόλος της χλωρίδας

Η εντερική μικροβιοχλωρίδα εκτελώντας πολυάριθμες φυσιολογικές λειτουργίες προσφέρει θετικά στη συνολική υγεία του ατόμου. Ως εκ τούτου η διατάραξη της ή η δυσλειτουργία της μπορεί να επιφέρει

αρνητικές επιπτώσεις. Τυπικά βακτηριακά είδη που αναπτύσσονται σε αυτό το περιβάλλον φαίνεται να μπορούν να:

- Διασπούν την τροφή παράγοντας ένζυμα που συμβάλλουν στο μεταβολισμό της
- Παράγουν λιπαρά οξέα μικρής αλυσίδας, κύριας σημασίας για την λειτουργία του πεπτικού συστήματος (Del Piano *et al.*, 2006)
- Παράγουν ορισμένες βιταμίνες του συμπλέγματος Β και Κ
- Ενεργοποιούν το ανοσοποιητικό σύστημα
- Αντιστέκονται στην αποίκηση του εντερικού σωλήνα από εξωτερικά παθογόνα βακτήρια (Aureli *et al.*, 2011)
- Μεταβολίζουν καρκινογόνες ενώσεις (Amara και Shibl, 2013)
- Παράγουν προστατευτικά ένζυμα (Holzapfel *et al.*, 1998)

Ιδιαίτερης σημασίας είναι ο ρόλος της χλωρίδας ως ενεργοποιητής του ανοσοποιητικού συστήματος και ως εμποδίου προς τους παθογόνους μικροοργανισμούς όσο αφορά την αποίκηση του εντέρου από αυτούς. Αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας του οργανισμού, αρκεί κανείς να λάβει υπόψη την τεράστια ποικιλία παθογόνων και όχι μόνο βακτηρίων, που φτάνουν στην εντερική περιοχή και δεν καταφέρνουν καν να εγκατασταθούν (Holzapfel *et al.*, 1998).

### 3. Προβιοτικοί μικροοργανισμοί

Τα οφέλη της μικροβιακής χλωρίδας του εντέρου είναι πολλαπλά. Πληθώρα επιστημονικών ερευνών επαλήθευσαν τις ικανότητες ζύμωσης και παραγωγής λιπαρών οξέων μικρής αλυσίδας, την ικανότητα διέγερσης του ανοσοποιητικού συστήματος και την προώθηση της καλής υγείας του ξενιστή (Tuohy *et al.*, 2005). Η γνώση της δράσης των μικροοργανισμών αυτών είναι γνωστή όπως και η πρακτική χρήση τους για ζύμωση τροφίμων και παραγωγή νέων προϊόντων, εδώ και αρκετούς αιώνες. Όσο περίεργο και αν φαίνεται η χρήση αυτών των μικροοργανισμών έχει τις ρίζες της βαθιά στο χρόνο όπου όπως αναφέρουν οι Amara και Shibl, (2013) είχαν χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή διαφόρων τύπων τυριών, γιαούρτης, ροφημάτων με ή χωρίς αλκοόλ και άλλων προϊόντων.

Παρόλα αυτά ο βραβευμένος με νόμπελ στην ιατρική το 1908, Ilya Iyich Metchnikoff υπήρξε ο πρώτος που ερεύνησε και εντόπισε το φαινόμενο αυτό που σήμερα ονομάζουμε προβιοτικούς μικροοργανισμούς. Συνδέοντας τη γνώση της ύπαρξης των 2 επικρατέστερων βακτηρίων στη γιαούρτη, *Lactobacillus bulgaricus* και *Streptococcus thermophilus*, και τις στατιστικές για την μακροβιότητα Βούλγαρων χωρικών που κατανάλωναν σε μεγάλες ποσότητες γιαούρτη κατέληξε στο συμπέρασμα ότι οι προβιοτικοί αυτοί μικροοργανισμοί προωθούσαν την καλή υγεία των ατόμων που τους κατανάλωναν (Amara και Shibl, 2013).

#### 3.1 Περιγραφή προβιοτικών

Ο σύγχρονος ορισμός όπως αυτός έχει καθιερωθεί από τον οργανισμό FAO/WHO ορίζει ως προβιοτικά τους ζωντανούς μικροοργανισμούς, που

όταν προσκολλούνται στον εντερικό σωλήνα σε επαρκείς ποσότητες, προσφέρουν οφέλη στον ξενιστή.

Διάφοροι τύποι βακτηρίων και ζυμών χρησιμοποιούνται σαν προβιοτικά με τα επικρατέστερα να αναφέρονται στην παρακάτω λίστα:

- I. *Lactobacillus: acidophilus, sporogenes, plantarum, rhamnosus, reuteri, fermentum, lactis, brevis, casei, paracasei*
- II. *Bifidobacterium: bifidum, infantis, longum, thermophilum, breve, lactis, animalis*
- III. *Streptococcus: lactis, cremoris, alivarius, thermophilis*
- IV. *Pediococcus*
- V. *Enterococcus*
- VI. *Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces boulardii, Aspergillus niger, Aspergillus oryzae* (Amara και Shibl, 2013).

### **3.2 Κριτήρια επιλογής προβιοτικών**

Με *in vitro* αλλά και *in vivo* έρευνες συγκεκριμένα κριτήρια καθιερώθηκαν προκειμένου ο προς εξέταση μικροοργανισμός να πιστοποιηθεί ως προβιοτικός. Οι προσεγγίσεις μέσω των οποίων εξετάζεται, χωρίζονται σε 3 κατηγορίες. Αρχικά τα γενικά χαρακτηριστικά του όπως η προέλευση, η καθαρότητα και ο χαρακτηρισμός του έχουν πρωταρχική σημασία. Το κάθε στέλεχος πρέπει να αναγνωρίζεται και να ταυτοποιείται ξεχωριστά με μοριακές μεθόδους (Gueïmonde και Salminen, 2006). Ιδιαίτερη και εκτενής μελέτη πραγματοποιήθηκε και στον τομέα της ασφάλειας του καταναλωτή κατά τη χρήση του μικροοργανισμού, καθώς θα πρέπει να



αποδειχθεί η μη τοξικότητα του, η μη παθογόνος ιδιότητα και γενικά η κατάταξη του στα τρόφιμα που θεωρούνται γενικά ασφαλή προς κατανάλωση (GRAS) (Klaenhammer και Kullen, 1999).

Η δεύτερη κατηγορία αφορά τη βιωσιμότητα και τη σταθερότητα του εξεταζόμενου μικροοργανισμού. Με τον όρο βιωσιμότητα εκφράζεται η ικανότητα του να πολλαπλασιάζεται σε μεγάλους αριθμούς μέσα στον εντερικό σωλήνα και εξίσου να παραμένει ζωντανός και να αναπτύσσεται, εντός του τροφίμου, σε δυσμενείς συνθήκες, όπως αυτές της επεξεργασίας τροφίμων (αφυδάτωση, κατάψυξη, αποθήκευση). Μέσα στα θεμιτά τεχνολογικά του χαρακτηριστικά συγκαταλέγεται φυσικά και η οργανοληπτική του ποιότητα καθώς ένα μη γευστικά αποδεκτό τρόφιμο δε θα μπορούσε ποτέ να παραχθεί σε βιομηχανική κλίμακα. Επιπλέον η γενετική σταθερότητα και η σταθερότητα των χαρακτηριστικών του μικροοργανισμού κατά την επεξεργασία του κρίθηκαν σημαντικοί παράγοντες για την επιλογή του όπως ανέφεραν οι Klaenhammer και Kullen, (1999).

Τέλος, στην κρισιμότερη κατηγορία συμπεριλαμβάνονται τα κριτήρια που αφορούν τα λειτουργικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά του. Σε αυτά συναντώνται η αντοχή σε χαμηλές τιμές pH, η αντοχή στα γαστρικά, παγκρεατικά υγρά και τα χολικά άλατα. Η προσήλωση στο εντερικό επιθήλιο, ο ανταγωνισμός προς τα παθογόνα βακτήρια και η διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος (Salminen *et al.*, 1998). Σύμφωνα με τους Klaenhammer και Kullen, (1999) σημαντική είναι η μεταβολική δραστηριότητα των μικροοργανισμών, η παραγωγή αντιμικροβιακών και αντικαρκινικών ουσιών και γενικότερα η επίδειξη ενός ή πολλών ευεργετικών επιδράσεων στην υγεία του καταναλωτή.

### 3.3 Οξυγαλακτικά βακτήρια και λακτοβάκιλλοι

Αναγνωρισμένη κατηγορία προβιοτικών οργανισμών αποτελούν τα οξυγαλακτικά βακτήρια. Τα βακτήρια αυτά παρουσιάζουν ευεργετικά οφέλη στον ξενιστή λόγω της φυσικής παρουσίας τους στον εντερικό σωλήνα και της προώθησης της καλής υγείας του ξενιστή. Σαν ομάδα η κατηγορία αυτή μελετήθηκε στις αρχές του 19<sup>ου</sup> αιώνα. Η επίδραση αυτών των μικροοργανισμών στα τρόφιμα κέρδισε άμεσα το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας και με την πολύτιμη βοήθεια του Pasteur το 1857 μελετήθηκε η οξυγαλακτική ζύμωση, ενώ το 1873 απομονώθηκαν οι πρώτες καλλιέργειες των οξυγαλακτικών βακτηρίων από τον Lister. Το 1890 μελετήθηκε η επίδραση των μικροοργανισμών αυτών στη ζύμωση του γάλακτος και μελετήθηκαν πολλές κατηγορίες τροφίμων όπου τα οξυγαλακτικά βακτήρια είχαν ζυμοτική δράση (Stiles και Holzapfel, 1997).

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια είναι Gram θετικά, αερόβια, καταλάση αρνητικά ραβδία ή κόκκοι που παράγουν γαλακτικό οξύ σαν βασικό προϊόν μεταβολισμού. Σαν κομμάτι των προβιοτικών επιδεικνύουν παρόμοια χαρακτηριστικά όπως η αντοχή σε χαμηλές τιμές pH και σε συγκεντρώσεις χολικών αλάτων, η εύκολη προσκόλληση στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου και η αναστολή των παθογόνων βακτηρίων (Xiaoming *et al.*, 2012). Τα πιο σημαντικά γένη οξυγαλακτικών βακτηρίων αποτελούν οι *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus* και *Bifidobacterium* (Klein *et al.*, 1998).

Οι Stiles και Holzapfel, (1997) ασχολήθηκαν με το πολύ μεγάλο και σημαντικό γένος των λακτοβακίλλων. Ανέφεραν ότι το γένος *Lactobacillus*

αποτελούν ζυμωτικοί, οξεοανθεκτικοί μικροοργανισμοί με πολύπλοκες θρεπτικές απαιτήσεις που χρησιμοποιούνται ως καλλιέργειες έναρξης για μια πληθώρα ζυμούμενων τροφίμων όπως τυριά, κρέατα, κρασιά, μπίρες και άλλα. Οι λακτοβάκιλλοι σύμφωνα με τους ίδιους συγγραφείς, χωρίζονται σε 3 κατηγορίες με βάση τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά τους. Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει, τους υποχρεωτικά ομοζυμωτικούς, που ζυμώνουν τη γλυκόζη αποκλειστικά σε γαλακτικό οξύ ενώ δεν ζυμώνουν τις πεντόζες και το γλυκονικό οξύ. Εδώ συγκαταλέγονται οι *Lactobacillus acidophilus*, *bulgaricus*, *delbrueckii*, *kefiranoferiens*, *kefirgranum* και άλλοι. Η δεύτερη κατηγορία είναι οι προαιρετικά ετεροζυμωτικοί λακτοβάκιλλοι που ζυμώνουν τις εξόζες σε γαλακτικό οξύ και παράγουν αέριο από το γλυκονικό οξύ αλλά όχι από τη γλυκόζη. Οι *Lactobacillus alimentarius*, *casei*, *paracasei*, *plantarum*, *rhamnosus* και άλλοι ανήκουν σε αυτή την κατηγορία. Ενώ η τρίτη κατηγορία είναι οι υποχρεωτικά ετεροζυμωτικοί λακτοβάκιλλοι που ζυμώνουν τις εξόζες σε γαλακτικό οξύ, οξικό οξύ, αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα. Επίσης παράγουν αέριο από τη ζύμωση της γλυκόζης. Αυτού του είδους λακτοβάκιλλοι είναι οι *brevis*, *fermentum*, *kefir*, *parakefir*, *reuteri*, *vaginalis* και άλλοι.

### **3.4 Ευεργετικές ιδιότητες προβιοτικών**

Πολλαπλοί μηχανισμοί δράσης έχουν αποδοθεί για να εξηγήσουν τα ευεργετικά οφέλη των προβιοτικών. Παρόλα αυτά οι γνώσεις μας βρίσκονται σε εμβρυικό στάδιο κυρίως λόγω της πολυπλοκότητας και της πολυπαραγοντικότητας που τους διέπουν. Παρακάτω αναφέρονται κάποια παραδείγματα των ιδιοτήτων αυτών.

Δυσανεξία στη λακτόζη: Οι Vaughan *et al.*, (1999) διαπίστωσαν ότι τα προβιοτικά έχουν την ικανότητα να ανακουφίζουν από τα συμπτώματα της δυσανεξίας στη λακτόζη λόγω του μηχανισμού ζύμωσης τους.

Αντιμικροβιακή δραστηριότητα έναντι σε παθογόνα βακτήρια: Ο Servin (2004), ασχολήθηκε με την αποίκηση του εντερικού σωλήνα από προβιοτικά τα οποία δρούσαν συνεργιστικά με την ενδογενή χλωρίδα και σχημάτιζαν εμπόδιο στην αποίκηση από τους παθογόνους μικροοργανισμούς. Ανέφερε συγκεκριμένα την ανταγωνιστική δράση των λακτοβακίλλων έναντι στη *Salmonella*, την *E. coli* και την *Listeria monocytogenes*.

Σε έρευνα των Amara και Shibl, (2013) διαπιστώθηκε ότι τα προβιοτικά παίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόληψη της διάρροιας μετά από τη λήψη αντιβιοτικών. Επίσης διάφορα στελέχη λακτοβάκιλλου είχαν χρησιμοποιηθεί προκειμένου να θεραπεύσουν τη διάρροια από τροφικές δηλητηριάσεις, σε παιδιά και ενήλικες. Ο τρόπος με τον οποίο πιθανολογείται πως λειτουργούν είναι ο ανταγωνισμός με τα παθογόνα και η αποτροπή των δεύτερων να προσηλωθούν στα επιθηλιακά κύτταρα.

Αναστολή του *Helicobacter pylori*: Υπήρχαν κάποιες ενδείξεις που σχετίζονται με την αναστολή και την αδρανοποίηση του *Helicobacter pylori*, βακτήριο που προκαλεί έλκος, γαστρίτιδα ακόμα και καρκίνο του εντέρου. Σε έρευνα των Aiba *et al*, (1998) ο *Lactobacillus salivarius* φαίνεται να έχει την ικανότητα να παράγει μεγάλες ποσότητες γαλακτικού οξέος που καθυστερούν την ανάπτυξη του.

Ευεργετικά οφέλη στην λειτουργία του εντέρου: Σε *in vivo* έρευνα των *Aureli et al.*, (2011) σχετικά με τη δυσκοιλιότητα, διαπιστώθηκε πως οι ασθενείς που τους χορηγήθηκε αγωγή με προβιοτικά είχαν βελτίωση στη συνολική λειτουργία του εντέρου ανεξαρτήτως της ηλικιακής κλίμακας της οποίας ανήκαν. Τα προβιοτικά συνεπώς συνέβαλλαν στη ρύθμιση της κινητικότητας του εντέρου.

## 4. Παθογόνοι μικροοργανισμοί

### 4.1. *Escherichia coli*

#### 4.1.1 Γενικά χαρακτηριστικά

Ο παθογόνος μικροοργανισμός *E. coli* περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1885 από τον γερμανικής καταγωγής ιατρό Theodor Escherich. Μέχρι το 1940 υπήρχε η αίσθηση ότι ο μικροοργανισμός αυτός δεν είναι παθογόνος για τους ανθρώπους αλλά μετά από μελέτες, πολλά κρούσματα διάρροιας συσχετίστηκαν με αυτόν. Η *E. coli*, όπως ανέφεραν οι Chaudhuri και Henderson (2012), παρουσιάζει 2 προφίλ. Το ένα σχετίζεται με την *E. coli* που φυσιολογικά απαντάται στη μικροβιοχλωρίδα του κατώτερου τμήματος του εντέρου του ανθρώπου και των ζώων ενώ το άλλο της προφίλ σχετίζεται με την παθογόνο πλευρά της και το πώς προκαλεί νοσηρότητα. Τα συμπτώματα της νόσου από αυτό το παθογόνο βακτήριο αναφέρθηκαν από τους Liu *et al.*, (2013). Παρατηρήθηκαν πυρετός, ναυτία, σπασμοί, μία ήπιας μορφής διάρροια ή δυσεντερία με την εμφάνιση αίματος στη βλέννα των κοπράνων του ασθενή (αιμορραγική κολίτιδα) και γενικοί πόνοι. Τα συμπτώματα εμφανίστηκαν μετά από 12 έως 72 ώρες μετά την κατανάλωση προσβεβλημένης τροφής και η ενδεδειγμένη θεραπεία ήταν συνήθως η ενυδάτωση του ασθενή και σε λίγες περιπτώσεις η χορήγηση αντιβιοτικών. Η διάρκεια της νόσου κυμαίνεται από 3 έως και 14 μέρες, στις βαριές περιπτώσεις (Μπαλατσούρας, 2006). Η διαρροϊκή *E. coli* μπορεί να κατηγοριοποιηθεί σε 6 κλάσεις σύμφωνα με τους Miyazaki *et al.*, (2010). Την εντεροπαθογόνο *E. coli* (EPEC), την εντεροτοξigenική *E. coli* (ETEC), την εντεροαιμοραγική *E. coli* (EHEC), την εντεροδιεισδυτική *E. coli* (EIEC), την διάχυτα προσκολλημένη *E. coli* (DAEC) και την εντεροσυσσωματική *E. coli* (EAggEC). Τα

εντεροτοξιγόνα στελέχη της, έχουν την ικανότητα να εκκρίνουν τοξίνες ευαίσθητες (LH) και τοξίνες ανθεκτικές (SH) στη θέρμανση, εκ των οποίων οι δεύτερες δεν αδρανοποιούνται ούτε με βρασμό στους 100<sup>0</sup>C για μία ώρα (Μπαλατσούρας, 2006).

#### **4.1.2 Ταξινόμηση της *E. coli***

Το βακτήριο ανήκει στην ευρύτερη τάξη των κολοβακτηριδίων και είναι Gram αρνητικό. Μορφολογικά εμφανίζεται σε ραβδία. Έχει ικανότητα ανάπτυξης σε υπόστρωμα με 6,5% αλάτι και εύρος pH 4,5 – 9. Είναι συνήθως κινητό και κάποια από τα βιοχημικά χαρακτηριστικά του είναι λακτόζη θετικό και ινδόλη θετικό (Chaudhuri και Henderson, 2012).

#### **4.1.3 Ανάπτυξη της *E. coli***

Η ανάπτυξη της *E. coli* έχει παρατηρηθεί σε διάφορες κατηγορίες τροφίμων καθώς και στο πόσιμο νερό. Οι Bellara *et al.*, (2000) ανέφεραν ότι το μικρόβιο μπορεί να παραμείνει σε μεγάλες συγκεντρώσεις σε προϊόντα όπως ψάρι, μαλακά τυριά, γαλακτοκομικά προϊόντα, κοτόπουλο, είδη ζαχαροπλαστικής καθώς και επεξεργασμένα κομμάτια κρέατος όπως ο κιμάς. Ο ρυθμός ανάπτυξής του είναι μεγάλος και αποτελεί ένα από τα πλέον συχνά αίτια παθογένειας στο σύγχρονο ανεπτυγμένο κόσμο με τους αριθμούς των τροφικών δηλητηριάσεων να έχουν διπλασιαστεί από το 1977 ως το 1997 και οι καταχωρημένες περιπτώσεις να αγγίζουν τις 94.000 στις Η.Π.Α. (Bellara *et al.*, 2000). Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης του σύμφωνα με τους Rattanabumrung *et al.*, (2012) είναι από τους 35-39 <sup>0</sup>C. Το βακτήριο μπορεί να αναπτυχθεί σε χαμηλότερες και υψηλότερες θερμοκρασίες αλλά με μικρότερους ρυθμούς ανάπτυξης.

## 4.2 *Listeria monocytogenes*

### 4.2.1 Γενικά χαρακτηριστικά

Το 1924 στο Cambridge το βακτήριο *L. monocytogenes* και η λιστερίωση αναγνωρίστηκαν εργαστηριακά σε πειραματόζωα. Έπειτα από λίγο καιρό έγινε κατανοητό ότι τα παραπάνω δεν αφορούσαν μόνο τα ζώα άλλα και τους ανθρώπους αφού τα πρώτα κρούσματα άρχισαν να εμφανίζονται το 1980 και να υπάρχουν αποδείξεις για μεταφορά του παθογόνου μέσω της τροφής. Από τις αρχές τις δεκαετίας του 80 λοιπόν το ενδιαφέρον για την *Listeria* δεν έχει κοπάσει αφού μέχρι και σήμερα αποτελεί πιθανό κίνδυνο για τη δημόσια υγεία (McLauchlin *et al.*, 2004). Ο μικροοργανισμός προσβάλλει όλες τις ομάδες των ανθρώπων και μπορεί να προκαλέσει μηνιγγίτιδα, εγκεφαλίτιδα και σηψαιμία. Η ασθένεια ονομάζεται λιστερίωση. Οι παράγοντες που είναι υπεύθυνοι για την παθογένεια είναι η λυστεριολυσίνη O, η ειδική φωσφορολιπάση της φωσφατιδυλο-ινοσοτόλης και η λεκιθινάση (Μπαλατσούρας, 2006). Τα συμπτώματα αναπτύσσονται μετά από 2-70 μέρες επώασης κατά τη διάρκεια των οποίων ο ασθενής υποφέρει από πονοκεφάλους, ζαλάδες και μη συντονισμό κινήσεων αφού η τοξίνη του μικροβίου εισβάλλει στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Χωρίς την κατάλληλη και άμεση θεραπεία το 20% των ασθενών θα πεθάνει, ενώ για όσους επιβιώσουν θα αντιμετωπίσουν μόνιμες νευρολογικές βλάβες. Στις εγκυμονούσες γυναίκες η *L. monocytogenes* οδηγεί σε αποβολή του εμβρύου, ενώ σε πιο ελαφριές περιπτώσεις σε γενετικές ανωμαλίες μετά τη γέννηση του μωρού ή και σε νοητική καθυστέρηση (Ryser, 2002). Οι 3 παράγοντες που καθορίζουν την προσβολή του ατόμου από την *Listeria* είναι η τροφή την οποία προσλαμβάνει, η δυνατότητα του στελέχους να προξενήσει ασθένεια και η κατάσταση του ανοσοποιητικού συστήματος του ατόμου (McLauchlin *et al.*, 2004).



#### 4.2.2 Ταξινόμηση της *L. monocytogenes*

Το γένος *Listeria* περιλαμβάνει 6 είδη τα οποία είναι: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii* και *L. grayi*. Είναι ένας Gram θετικός μικροοργανισμός, μη σπορογόνος, προαιρετικά αναερόβιος με ανάπτυξη σε 5 – 10% CO<sub>2</sub>, με χαρακτηριστικά κοντά ραβδία που συναντώνται μεμονωμένα ή σε μικρές αλυσίδες (Ryser, 2002). Σε θερμοκρασίες δωματίου παρουσιάζει μια τυπική κινητικότητα ορατή μικροσκοπικά. Ενώ οι αποικίες που σχηματίζει είναι μικρές, λείες και μπλέ- γκρί. Βιοχημικά παράγει καταλάση και ζυμώνει τη γλυκόζη σε οξέα χωρίς να παράγει αέριο.

#### 4.2.3 Ανάπτυξη της *L. monocytogenes*

Οι θρεπτικές απαιτήσεις της *Listeria* είναι οι τυπικές των Gram θετικών βακτηρίων, και αναπτύσσεται καλά σε πολλά κοινά υποστρώματα, (brain heart infusion, trypticase soy, tryptose broths). Η ανάπτυξη της ελάχιστα επηρεάζεται από τις διακυμάνσεις του pH αφού η περιοχή ανάπτυξης είναι από 4,3- 9,8. Το θερμοκρασιακό εύρος που μπορεί να επιβιώσει κυμαίνεται από 0,5- 45 °C. Ένα άλλο αξιοσημείωτο χαρακτηριστικό του γένους είναι η οσμοανθεκτικότητα του και η επιβίωση σε συγκεντρώσεις αλάτων έως και 20% σε συνδυασμό με μικρή ενεργότητα νερού (Warriner και Namvar, 2009). Το περιβάλλον στο οποίο απαντάται ποικίλει. Έχει απομονωθεί από ωμά λαχανικά, κρέατα συσκευασμένα υπό κενό, αλλαντικά και μισοβρασμένα λουκάνικα, γαλακτοκομικά προϊόντα όπως τυριά και παγωτά (Amado *et al.*, 2012).

### 4.3 *Salmonella typhimurium*

#### 4.3.1 Γενικά χαρακτηριστικά

Η σαλμονέλωση, ασθένεια που προκαλείται από το ομώνυμο στέλεχος, αποτελεί την πιο διαδεδομένη και κοινή ασθένεια που μεταδίδεται μέσω των τροφίμων και έχει σημαντικά ποσοστά θνησιμότητας (Sarinena *et al.*, 2013). Προκαλείται από την κατάποση ζωντανών μικροοργανισμών και εκδηλώνεται μετά από επώαση 8 - 24 ωρών. Καταπολεμάται πλήρως από τον ανθρώπινο οργανισμό σε διάστημα 2 - 5 ημερών συνήθως χωρίς την χορήγηση αντιβιοτικών, μόνο με ενυδάτωση του σώματος και λήψη ηλεκτρολυτών (Μπαλατσούρας, 2006). Είναι υπεύθυνη για το 31% των θανάτων που σχετίζονται με τροφικές δηλητηριάσεις στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής σύμφωνα με τους Carr *et al.*, (2007). Την πιο κοινότητα πηγή μόλυνσης αποτελούν τα ωμά ή μέτρια μαγειρεμένα φαγητά που περιέχουν αυγό, κρέας κοτόπουλου και άλλα παρεμφερή προϊόντα (Lopez *et al.*, 2012). Η *Salmonella* προκαλεί 4 κύριες ασθένειες: εντερικό πυρετό (τυφοειδή) που προκαλείται από τις *S. typhi* και *S. paratyphi*, εντεροκολίτιδα/ διάρροια όπου το παθογόνο αίτιο είναι οι *S. typhimurium* και *S. enteritidis*, βακτηραιμία και χρόνια ασυμπτωματική διάρροια (Sarinena *et al.*, 2013). Αξιοσημείωτο γεγονός αποτελεί ότι ορισμένα στελέχη του είδους παρουσιάζουν αντοχή στα αντιβιοτικά. Τέλος, ο Μπαλατσούρας (2006) αναφέρει ότι οι σαλμονέλλες που προκαλούν γαστρεντερίτιδες είναι επιρρεπείς στις αυξημένες θερμοκρασίες. Έτσι, μία ήπια θερμική επεξεργασία σε όλη τη μάζα του τροφίμου το καθιστά ακίνδυνο.

### 4.3.2 Ταξινόμηση της *S. Typhimurium*

Η *Salmonella* είναι ένα Gram αρνητικό παθογόνο βακτήριο, προαιρετικά αναερόβιο που ανήκει στην ομάδα των εντερικών βακτηρίων. Τα περισσότερα είδη είναι κινητά χρησιμοποιώντας είτε ένα μαστίγιο που βρίσκεται στο τέλος της ράβδου, είτε τις περίτριχες βλεφαρίδες (Lopez *et al.*, 2012).

### 4.3.3 Ανάπτυξη της *S. typhimurium*

Τα στελέχη *Salmonella* αναπτύσσονται σε ποικιλία θρεπτικών συστατικών και υποστρωμάτων. Δίνουν αποικίες διαμέτρου 2-3 χιλιοστών σε διάστημα 18-20 ωρών, ζυμώνουν την D-γλυκόζη και άλλους υδατάνθρακες παράγοντας αέριο και οξύ. Ζυμώνουν το κιτρικό οξύ και παράγουν υδρόθειο. Η *Salmonella* είναι μεσόφιλο βακτήριο και η άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης της κυμαίνεται μεταξύ των 35-37 °C, όμως γενικά αναπτύσσεται σε θερμοκρασία μεταξύ των 5-46 °C. Δεν επιζεί σε συνθήκες παστερίωσης και είναι ευαίσθητη σε pH μικρότερο του 5.5 (Monteville & Matthews, 2005).

## **5. Αντιμικροβιακή δράση προβιοτικών**

Η αντιμικροβιακή δράση των προβιοτικών αποτελεί ένα κομμάτι της συνολικότερης δράσης αναστολής των παθογόνων. Η δράση αυτή περιλαμβάνει τον ανταγωνιστικό αποκλεισμό των παθογόνων, τον ανταγωνισμό για θρεπτικά συστατικά, την τροποποίηση των τοξινών που παράγονται από τα παθογόνα βακτήρια, την ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος και φυσικά τη σύνθεση αντιμικροβιακών ουσιών (Rodriguez *et al.*, 2012). Πολλοί μηχανισμοί έχουν μελετηθεί σύμφωνα με τους οποίους οι *Lactobacillus* και τα *bifidobacteria* προάγουν την αντιμικροβιακή δράση. Η επικρατέστερη αιτιολογία είναι η παραγωγή ορισμένων αντιμικροβιακών ουσιών (Servin, 2004).

### **5.1 Αντιμικροβιακές ουσίες που παράγονται από τα βακτήρια**

Τα επίπεδα της παραγωγής των αντιμικροβιακών ουσιών εξαρτώνται από το είδος του μικροοργανισμού, τη χημική σύσταση του περιβάλλοντος στο οποίο αυτός αναπτύσσεται και τις φυσικές συνθήκες που επικρατούν κατά τη ζύμωση (Lindgren και Dobrogosz, 1990).

Οι αντιμικροβιακές αυτές ουσίες συνοψίζονται παρακάτω:

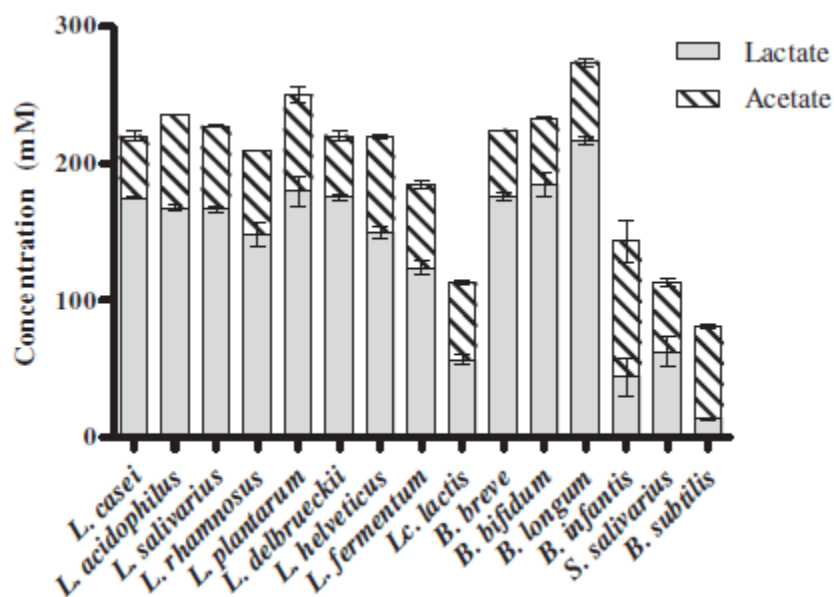
1. Οργανικά οξέα. Τα δύο κύρια μεταβολικά οξέα που παράγονται είναι το γαλακτικό και το οξικό οξύ (Sarinena *et al.*, 2012).
2. Το διοξείδιο του άνθρακα που παρεμποδίζει σε μεγάλες συγκεντρώσεις την ανάπτυξη ορισμένων μικροοργανισμών (Lindgren και Dobrogosz, 1990).

3. Το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) που προκαλεί μη αντιστρεπτές βλάβες στην ανάπτυξη των παθογόνων κυττάρων (Sarinena *et al.*, 2012). Παράδειγμα αναστολής των γονόκκοκων με παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου αναφέρει ο Servin (2004), από τους *Lactobacillus crispatus* και *jeuseonii* που βρίσκονται σε πληθώρα στο γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα.
4. Το διακετύλιο και η ακεταλδεύδη που δρουν ανασταλτικά στους Gram-αρνητικούς μικροοργανισμούς (Lindgren και Dobrogosz, 1990).
5. Μεταβολίτες μικρού μοριακού βάρους μη πρωτεϊνικής δομής που καθυστερούν την ανάπτυξη τους.
6. Μεταβολίτες πρωτεϊνικής φύσεως που χαρακτηρίζονται ως βακτηριοσίνες (Sarinena *et al.*, 2012).

## 5.2 Βακτηριοσίνες και οξέα

Με τον όρο βακτηριοσίνες αναφερόμαστε σε μεταβολίτες πρωτεϊνικής φύσης, σταθερές στη θερμότητα και ευαίσθητες σε ορισμένα πρωτεολυτικά ένζυμα. Οι βακτηριοσίνες που παράγονται από Gram- θετικά βακτήρια είναι πολύ αποτελεσματικές στην αναστολή παθογόνων και έχει διαπιστωθεί ότι λειτουργούν παρεμποδιστικά (Udhayashree *et al.*, 2012). Η πιο ευρέως γνωστή βακτηριοσίνη είναι η νισίνη. Παρόλα αυτά και άλλες βακτηριοσίνες όπως η πεδιοσίνη, η πλανταρισίνη και η λακτίνη έχουν εφαρμογή. Σε μελέτη των Allende *et al.*, (2007) η νισίνη, η πλανταρισίνη C και ένα κοκτεϊλ νισίνης- κοαγκουλίνης έδειξαν ανασταλτική δράση σε όλα τα στελέχη της *L. monocytogenes*. Με γνώμονα αυτές τις μελέτες η αξιολόγηση των συγκεκριμένων ουσιών ξεκίνησε να γίνεται από βιομηχανικής πλευράς. Από τη στιγμή που μπορούσαν να βρουν εφαρμογή

ως αντιμικροβιακοί παράγοντες εξετάστηκε η προσθήκη τους σε τρόφιμα ως συντηρητικά, εισάγοντας μία καινούρια τάση που θέλει να ξεφύγει από τα χημικά πρόσθετα στη συντήρηση των τροφίμων (Udhayashree *et al.*, 2012). Η αποτελεσματικότητα αναστολής των παθογόνων από τη νισίνη ή άλλες βακτηριοσύνες όπως τονίζουν οι Allende *et al.*, (2007) είναι συνδυασμός πολλών παραγόντων και εξαρτάται από τη χημική και φυσική σύσταση του τροφίμου. Άρα η χρήση τους πρέπει πρώτα να εφαρμοστεί σε κατάλληλα συστήματα τροφίμων προκειμένου να έχουμε αξιόπιστα αποτελέσματα. Ο Servin (2004) αναφέρει ότι μεγάλος αριθμός λακτοβακίλλων, με την παραγωγή μεταβολιτών όπως γαλακτικού και οξικού οξέος μειώνουν τις τιμές του pH και αναστέλλουν τους παθογόνους μικροοργανισμούς. Στο **Διάγραμμα 5.2.1** φαίνεται η παραγωγή γαλακτικού και οξικού οξέος από διαφορετικά γένη και είδη προβιοτικών μικροοργανισμών.



**Διάγραμμα 5.2.1.** Παραγωγή γαλακτικού και οξικού οξέος, από πιθανούς προβιοτικούς μικροοργανισμούς σε MRS ζωμό μετά από 24h (Sarinena *et al.*, 2012).

Έχει παρατηρηθεί μάλιστα ότι όσο πιο χαμηλό pH επιτυγχάνεται τόσο μεγαλύτερη είναι η αναστολή των παθογόνων (Sarinena *et al.*, 2012). Στην έρευνα των Sarinena *et al.*, (2012) αναφέρεται χαρακτηριστικά το παράδειγμα των *Lactobacillus* που σε χαμηλές τιμές pH ανέστειλαν ικανοποιητικά την προσκόλληση της *S. enterica* στα ανθρώπινα κύτταρα, ενώ όταν το pH ουδετεροποιήθηκε η προσβολή των κυττάρων από τη *S. enterica* ήταν αυξημένη. Άλλη έρευνα των Udhayashree *et al.*, (2012) αναφέρει ότι τα περισσότερα οξυγαλακτικά βακτηριακά στελέχη έδειξαν antimicrobιακή δράση στη συγκεκριμένη περιοχή pH από 4.0 – 5.0 και πως σε αυτές τις τιμές το εύρος της αναστολής ήταν μεγάλο απέναντι στους *S. typhi*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* και *E. coli*.

## 6. Σκοπός της παρούσας πτυχιακής

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη στελεχών *Lactobacillus kefir* απομονωμένων από κόκκους κεφίρ ως προς τις προβιοτικές τους ιδιότητες. Ειδικότερα μελετήθηκε η αντοχή των στελεχών σε συγκεκριμένη συγκέντρωση χολικών αλάτων, η ανάπτυξη τους σε διαφορετικό pH καθώς και η αντιμικροβιακή δράση τους έναντι συγκεκριμένων παθογόνων μικροοργανισμών.



## 7. Υλικά και μέθοδοι

### 7.1 Στελέχη

Τέσσερα στελέχη *Lactobacillus kefir* που εξετάστηκαν για τις προβιοτικές τους ιδιότητες απομονώθηκαν από κόκκους κεφίρ και αποθηκεύτηκαν σε συνθήκες κατάψυξης στους  $-20^{\circ}\text{C}$  σε Microbank<sup>TM</sup> cryovials (Pro-Lab Diagnostics, UK). Η ταυτοποίηση τους έγινε με μοριακές τεχνικές και οι αλληλουχίες τους κατατέθηκαν στην ηλεκτρονική βιβλιοθήκη GenBank όπου τους αποδόθηκε αριθμός ταυτοποίησης KC964539 έως KC9645542 και ο εργαστηριακός τους αριθμός που χρησιμοποιήθηκε ήταν C1, D1b1, A4 και F4A4 αντίστοιχα. Τα παθογόνα βακτήρια που χρησιμοποιήθηκαν περιλαμβάνουν, *Escherichia coli* O157:H7 NCTC 13126, *Salmonella enterica* serotype *Typhimurium* DT193 και *Listeria monocytogenes* Scott A.

### 7.2 Υλικά

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν σε όλες τις πειραματικές διαδικασίες περιλαμβάνουν:

- Ringers solution (Oxoid, UK)
- de Man Rogosa Sharpe άγαρ και ζωμός (LAB M, UK)
- Phosphate Buffered Saline (Sigma-Aldrich, Germany)
- Phosphate Buffered Saline (PBS, Germany)

- Ox-gall Powder (Sigma-Aldrich, Germany)
  
- Wilkens-Chalgren άγαρ (Oxoid, UK)
  
- Buffer γλυκίνης-HCl σε pH 2.2 και 3 που παρασκευάστηκαν με προσθήκη διαλύματος γλυκίνης συγκέντρωσης 0.2M και HCl συγκέντρωσης 0.2M και διαλύθηκαν σε διάλυμα 0.05M γλυκίνης με νερό
  
- Χλωροφόρμιο (Merck, Germany)

Όλα τα υλικά, εκτός του χλωροφορμίου, αποστειρώθηκαν στους 121<sup>0</sup>C για 15 λεπτά.

### **7.3 Προετοιμασία βακτηριακών στελεχών**

Προκειμένου τα στελέχη να ανακτήσουν τη ζωτικότητα τους πραγματοποιήθηκε ενοφθαλμισμός σε ζωμό MRS για τους λακτοβάκιλλους και επώαση στους 37<sup>0</sup>C για 48 ώρες ενώ για τα παθογόνα πραγματοποιήθηκε ενοφθαλμισμός σε ζωμό WC και επώαση στους 37<sup>0</sup>C για 24 ώρες.

#### **7.3.1 Αντοχή στα χολικά άλατα**

Ο *L. kefir* C1 ενοφθαλμίστηκε σε 10 ml MRS ζωμό και ακολούθησε επώαση στους 37<sup>0</sup>C για 48 h. Η συγκέντρωση των μικροβιακών κυττάρων ήταν της τάξης του 10<sup>7</sup> – 10<sup>8</sup> cfu/ml. Μετά την επώαση οι δοκιμαστικοί σωλήνες αναδεύτηκαν και ακολούθησε ο καθαρισμός των κυττάρων του *L. kefir* C1. Από κάθε δοκιμαστικό σωλήνα αφαιρέθηκε ποσότητα 1 ml και

τοποθετήθηκε σε αποστειρωμένα erpendorf tube που φυγοκεντρήθηκαν στις 3.500 rpm για 15 min (erpendorf Centrifuge 5418). Η διαδικασία επαναλήφθηκε τρεις φορές μετά από αφαίρεση του υπερκείμενου υγρού και συμπλήρωσης ίσης ποσότητας Ringers solution για τον καθαρισμό των βακτηριακών κυττάρων. Οι κάψουλες φυγοκέντρου αφού ανακινήθηκαν στο Vortex χρησιμοποιήθηκαν για να ενοφθαλμιστούν οι δοκιμαστικοί σωλήνες με 100 μl καθαρής καλλιέργειας, οι οποίοι περιείχαν 9,9 ml Phosphate-Buffered Saline και 9,9 ml Phosphate-Buffered Saline + 0,4% χολικά άλατα (Ox-gall). Μετά τον ενοφθαλμισμό οι δοκιμαστικοί σωλήνες μεταφέρθηκαν σε επωαστικό κλίβανο στους 37 °C. Δείγματα λήφθηκαν αμέσως μετά τον ενοφθαλμισμό και σε χρονικά διαστήματα 1,2,3,4,5 και 6 ωρών και μετά από τις κατάλληλες δεκαδικές αραιώσεις ενοφθαλμίστηκαν 100 μl σε τρυβλία επιστρωμένα με MRS άγαρ με την τεχνική της επιφανειακής εξάπλωσης. Τα τρυβλία επώαστηκαν στους 37 °C για 72 h και ακολούθησε καταμέτρηση των αποικιών.

### 7.3.2 Αντοχή στην οξύτητα

Από τις κάψουλες φυγοκέντρωσης ενοφθαλμίστηκαν με ποσότητα 1 ml MRS ζωμοί των 9 ml που το pH τους είχε προσαρμοστεί σε 2.2 και 3 με διάλυμα γλυκίνης HCl . Απευθείας μετά τον ενοφθαλμισμό οι δοκιμαστικοί σωλήνες με τα ενοφθαλμίσματα επώαστηκαν στους 37 °C. Από όλες τις αραιώσεις ενοφθαλμίστηκαν 100 μl σε τρυβλία επιστρωμένα με MRS άγαρ με την τεχνική της επιφανειακής εξάπλωσης. Ο πρώτος ενοφθαλμισμός πραγματοποιήθηκε σε χρόνο 0 και ακολούθησαν οι επόμενοι σε 15', 30', 45', 60' και 120'. Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε επωαστικό κλίβανο στους 37 °C για 72 ώρες και καταμετρήθηκαν μετά το πέρας αυτής της περιόδου.

### 7.3.3 Αντιμικροβιακή δράση

Μελετήθηκε η αντιμικροβιακή δράση των διαφορετικών στελεχών του *L. kefir* A4, D1b1, F4Aa. Αρχικά έγινε καθαρισμός των καλλιιεργειών για όλα τα στελέχη από τον MRS ζυμό όπως περιγράφηκε στην παραπάνω πειραματική διαδικασία (4.3.1). Από την καθαρή καλλιέργεια κάθε στελέχους 20 μl ενοφθαλμίστηκαν σε περιοχή 1cm x 2 cm στο κέντρο ενός τρυβλίου επιστρωμένου με Wilkens-Chalgren άγαρ. Τα τρυβλία επώαστηκαν στους 37 °C για 72 ώρες μέχρι να παρατηρηθεί ανάπτυξη των αποικιών των λακτοβάκιλλων. Κατόπιν, όλες οι αποικίες που είχαν αναπτυχθεί, αφαιρέθηκαν με τη βοήθεια αντικειμενοφόρου πλάκας και ταμπονάροντας την επιφάνεια του άγαρ με διηθητικό χαρτί. Προκειμένου να έχουμε πλήρη αδρανοποίηση των εναπομεινάντων κυττάρων τα τρυβλία αναποδογυρίστηκαν ανοιχτά σε διάτρητη σχάρα πάνω από ατμούς υγρού χλωροφορμίου, όπου και παρέμειναν για 1 ώρα. Τα τρυβλία αφέθηκαν για 30 min ανοιχτά, με σκοπό την εξάλειψη ατμών χλωροφορμίου. Ποσότητα 100μl από κάθε παθογόνο βακτήριο, ενοφθαλμίστηκε με την τεχνική της επιφανειακής εξάπλωσης στα τρυβλία τα οποία επώαστηκαν για 24 ώρες όπου και παρατηρήθηκε η ύπαρξη ή όχι αντιμικροβιακής ζώνης. Το ίδιο πείραμα επαναλήφθηκε εις διπλούν για όλα τα στελέχη λακτοβάκιλλου που αναφέρθηκαν παραπάνω, χρησιμοποιώντας κάθε φορά διαφορετικό παθογόνο μικροοργανισμό και διαφορετικό χρόνο επώασης.

Για κάθε πειραματική διαδικασία, έγιναν δύο πειράματα με δύο επαναλήψεις. Για τον υπολογισμό των βακτηρίων, χρησιμοποιήθηκε ο μέσος όρος των δύο επαναλήψεων από κάθε αραιώση. Η επιλογή του κατάλληλου τρυβλίου που χρησιμοποιήθηκε για την καταμέτρηση, έγινε με βάση τον αριθμό των αποικιών που αναπτύχθηκαν στο τρυβλίο. Ο αριθμός των αποικιών στα τρυβλία που επιλέχθηκαν ήταν μεταξύ 30 και 300.

#### **7.4 Στατιστική ανάλυση**

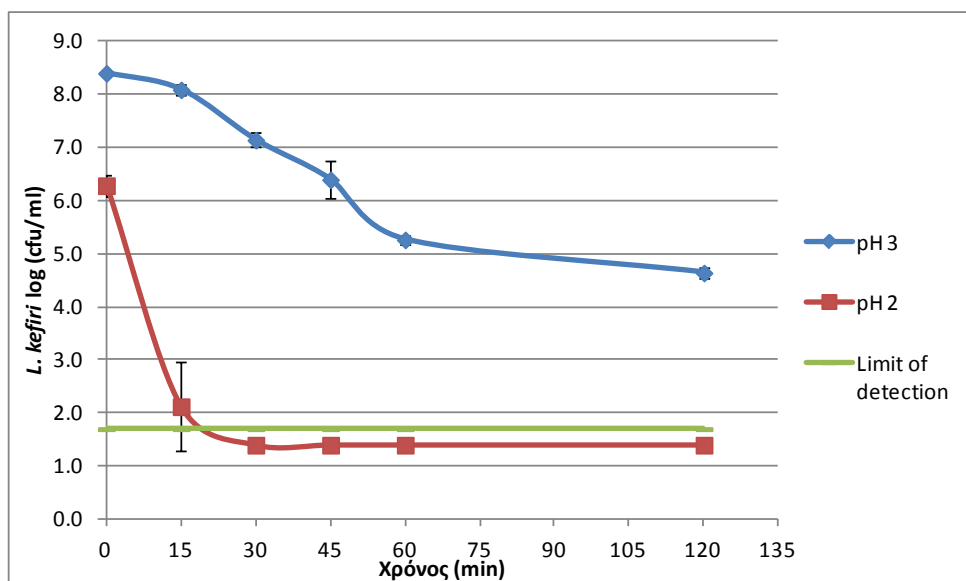
Για τη στατιστική επεξεργασία των πειραματικών δεδομένων και τον προσδιορισμό στατιστικά σημαντικών διαφορών μεταξύ των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε t- test με πιθανότητα λάθους 0.05%.

## 8. Αποτελέσματα

Μελετήθηκε η αντοχή του στελέχους *Lactobacillus kefir* C<sub>1</sub> κατά την παραμονή του σε όξινο pH 2 και 3 όπως και η αντοχή του σε ποσοστό 0,4% χολικών αλάτων. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε δεκαδικούς λογαρίθμους ( $\log_{10}$ cfu/ml).

### 8.1 Αντοχή του στελέχους *Lactobacillus kefir* C<sub>1</sub> σε pH 2 και 3

Στο παρακάτω σχήμα εμφανίζεται η επιβίωση του πληθυσμού του στελέχους *Lactobacillus kefir* C<sub>1</sub> σε όξινο pH 2 και 3 αντίστοιχα, για 2 ώρες.

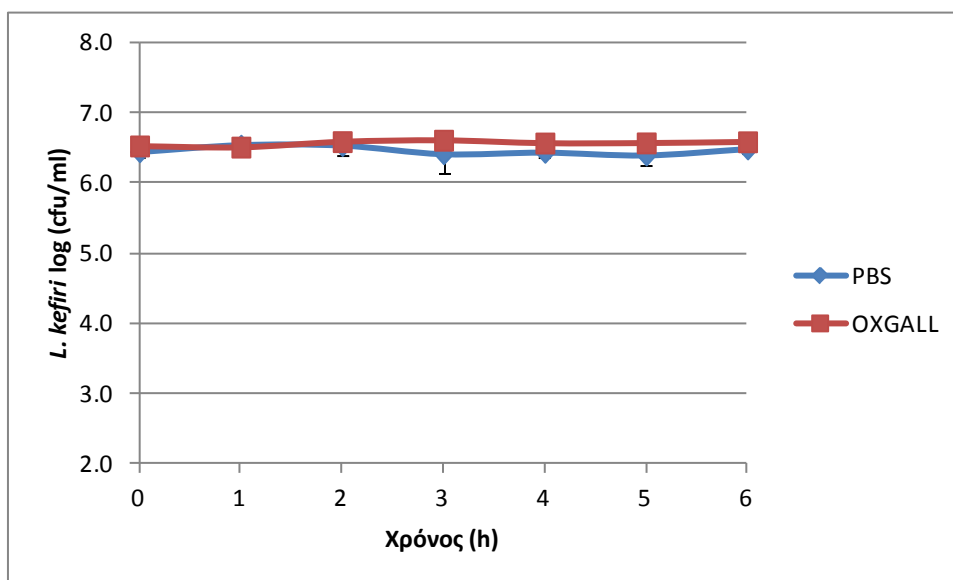


**Σχήμα 8.1** Διακύμανση του πληθυσμού του *Lactobacillus kefir* C<sub>1</sub> κατά την παραμονή του σε pH 2 και pH 3.

Συνολικά και στις δυο τιμές pH παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση ( $p < 0.05$ ) του πληθυσμού του *L. kefir* C<sub>1</sub> μετά από 45 λεπτά πειράματος σε σχέση με τον αρχικό πληθυσμό που ενοφθαμίστηκε. Σε pH 3, ο πληθυσμός αμέσως μετά τον εμβολιασμό ήταν 8,3 log cfu/ml ενώ μετά από 45 λεπτά πειράματος ο πληθυσμός μειώθηκε σε 6,5 log cfu/ml και μετά από δυο ώρες πειράματος 4,7 log cfu/ml. Αντίστοιχα στο pH 2, παρατηρείται και εδώ στατιστικά σημαντική ( $p < 0,05$ ) μείωση του πληθυσμού από 8.1 log cfu/ml (πληθυσμός εμβολιασμού) μειώνεται σε 6,3 log cfu/ml αμέσως μετά τον εμβολιασμό, ενώ μετά από 15 λεπτά πειράματος ο πληθυσμός του *L. kefir* C<sub>1</sub> μειώθηκε σε 2 log cfu/ml και πέφτει κάτω από το όριο ανιχνευσιμότητας της τεχνικής για την υπόλοιπη διάρκεια του πειράματος.

## **8.2 Αντοχή του στελέχους *Lactobacillus kefir* C1 σε χολικά άλατα**

Στο παρακάτω σχήμα εμφανίζεται η διακύμανση του πληθυσμού του στελέχους *L. kefir* C<sub>1</sub> όταν αυτό εξετάστηκε σε υπόστρωμα με 0,4% (w/v) χολικά άλατα για χρονική διάρκεια 6 ωρών.



**Σχήμα 8.2** Διακύμανση του πληθυσμού του *Lactobacillus kefir* C<sub>1</sub> κατά την παραμονή του σε 0,4% (w/v) χολικά άλατα για 6 ώρες.

Δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική ( $p < 0,05$ ) μεταβολή στον πληθυσμό του στελέχους. Ο πληθυσμός εκκίνησης διαμορφώθηκε περίπου στα 8.5 log cfu/ml. Κατά την επώαση του στελέχους σε υπόστρωμα με PBS ο πληθυσμός του *L. kefir* C<sub>1</sub> παρέμεινε σταθερός στους ~ 6,5 log cfu/ml τόσο στο μάρτυρα (PBS) όσο και στο υπόστρωμα με προσθήκη χολικών αλάτων 0,4% (w/v).

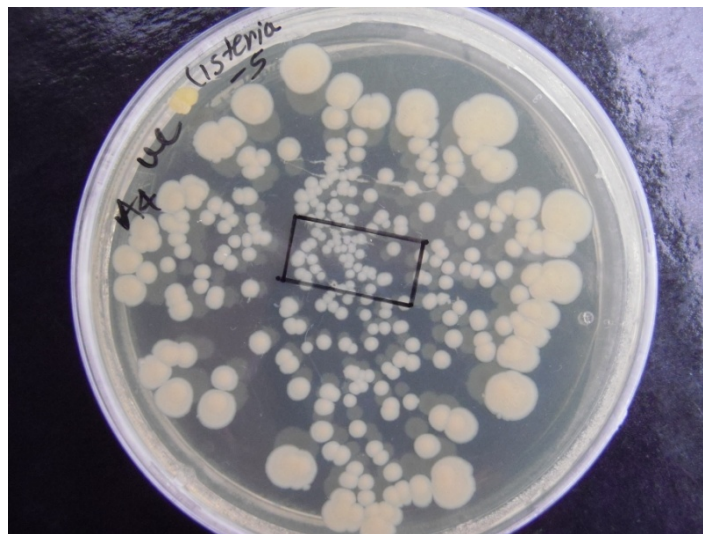
### 8.3 Αντιμικροβιακή δράση των στελεχών του *L. kefir*

Μελετήθηκε η αντιμικροβιακή δράση των στελεχών του *L. kefir* A4, D1b1, F4Aa απέναντι στα παθογόνα *E. coli* O157:H7 NCTC 13126, *S. enterica* serotype Typhimurium DT193 και *L. monocytogenes* Scott A.



### 8.3.1 Αντιμικροβιακή δράση του στελέχους *L. kefir* A4

Στις παρακάτω εικόνες φαίνεται ότι δεν παρατηρήθηκε ζώνη αναστολής από το στέλεχος *L. kefir* A4 σε κανέναν από τους τρεις παθογόνους μικροοργανισμούς που αναφέρθηκαν παραπάνω.



**Εικόνα 8.3.1.1** Αντιμικροβιακή δράση του *L. kefir* A4 έναντι *L. monocytogenes*.



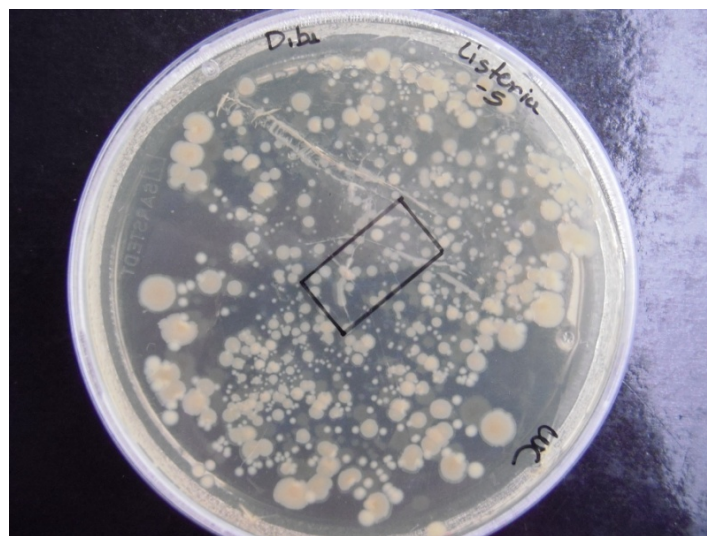
**Εικόνα 8.3.1.2** Αντιμικροβιακή δράση του *L. kefiri* A4 έναντι *E. coli*.



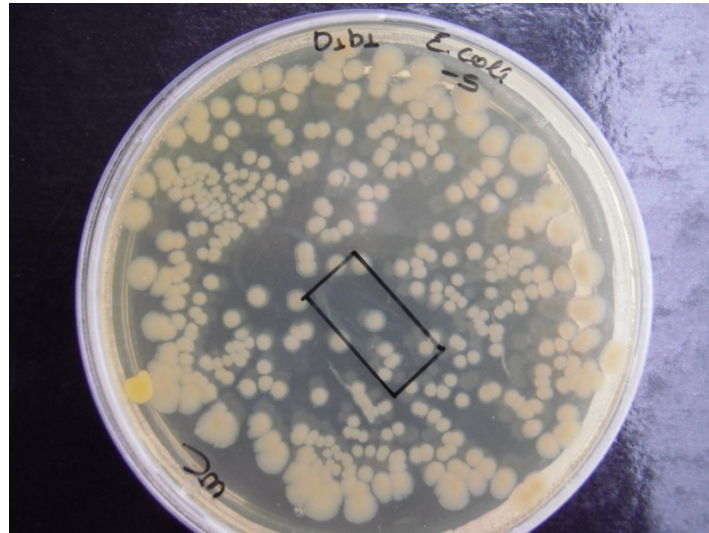
**Εικόνα 8.3.1.3** Αντιμικροβιακή δράση του *L. kefiri* A4 έναντι *S. typhimurium*.

### 8.3.2 Αντιμικροβιακή δράση του στελέχους *L. kefir* D1b1

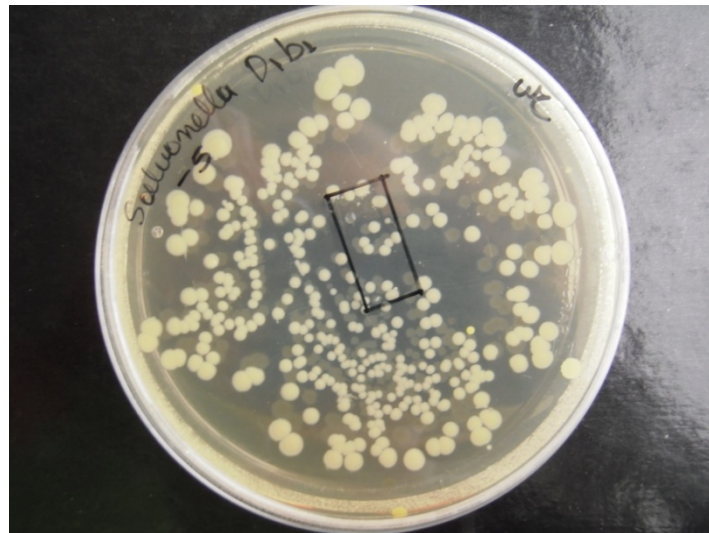
Στις παρακάτω εικόνες φαίνεται ότι δεν παρατηρήθηκε ζώνης αναστολής από το στέλεχος *L. kefir* D1b1 σε κανένα από τους τρεις παθογόνους μικροοργανισμούς που αναφέρθηκε παραπάνω.



**Εικόνα 8.3.2.1** Αντιμικροβιακή δράση του *L. kefir* D1b1 έναντι *L. monocytogenes*



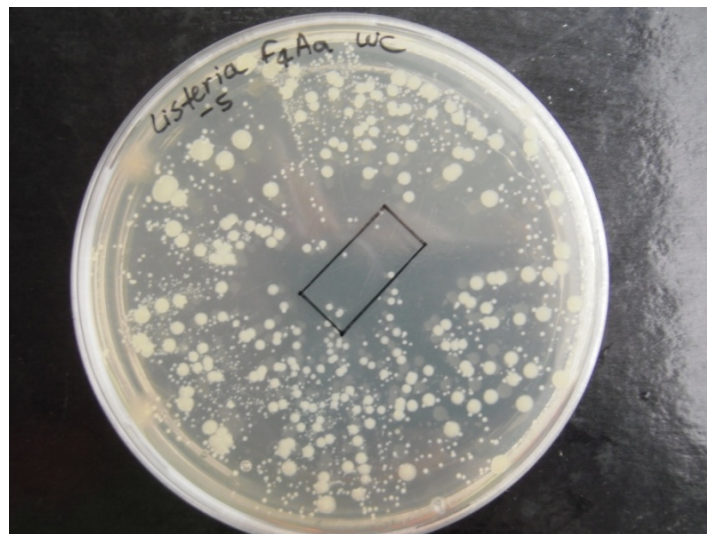
**Εικόνα 8.3.2.2** Αντιμικροβιακή δράση του *L. kefir* D1b1 έναντι *E. coli*



**Εικόνα 8.3.2.3** Αντιμικροβιακή δράση του *L. kefir* D1b1 έναντι *S. typhimurium*

### 8.3.3 Αντιμικροβιακή δράση του στελέχους *L. kefir* F4Aa

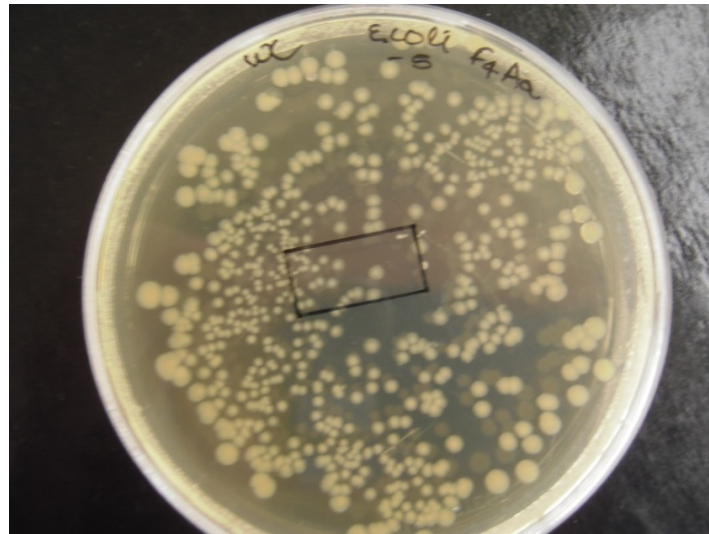
Στις παρακάτω εικόνες φαίνεται η αντιμικροβιακή δράση του στελέχους *L. kefir* D1b1.



**Εικόνα 8.3.3.1** Ζώνη αναστολής της *L. monocytogenes* από το *L. kefir* F4Aa.

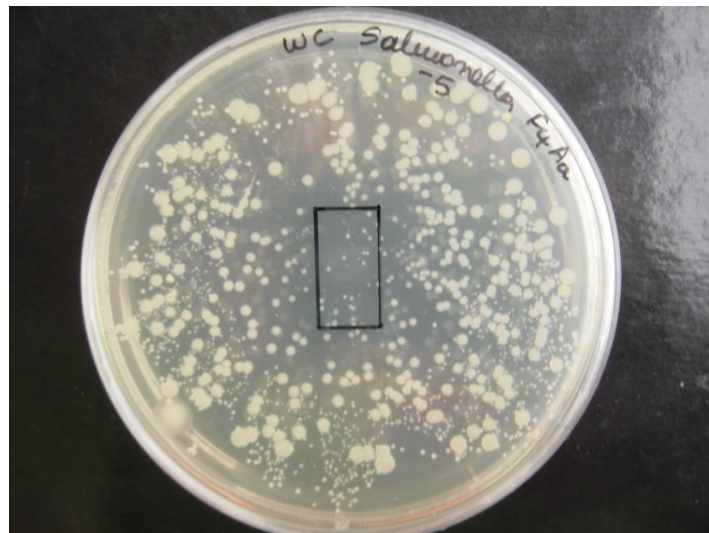
Στο συγκεκριμένο πείραμα παρατηρήθηκε αντιμικροβιακή δράση και αναστολή της ανάπτυξης της *L. monocytogenes* από το *L. kefir* F4Aa. Οι αποικίες στο κέντρο του τρυβλίου είναι πολύ μικρές και λίγες συμπεραίνοντας ότι υπάρχει αντιμικροβιακή ζώνη.





**Εικόνα 8.3.3.2** Αντιμικροβιακή δράση του *L. kefir* F4Aa έναντι *E. coli*

Δεν παρατηρήθηκε αντιμικροβιακή ζώνη και αναστολή ανάπτυξης της *E. coli*.



**Εικόνα 8.3.3.3** Ζώνη αναστολής της *S. typhimurium* από το *L. kefir* F4Aa.

Παρατηρήθηκε μία μικρή αναστολή της ανάπτυξης της *S. typhimurium* αφού στο κέντρο του τρυβλίου οι αποικίες είναι πιο λίγες και μικρότερες

συγκριτικά με την ανάπτυξη του παθογόνου μικροοργανισμού στην υπόλοιπη επιφάνεια του τρυβλίου.

## 9. Συζήτηση

Οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί έχουν την ικανότητα να βελτιώνουν και να προάγουν την υγεία του ανθρώπου παρουσιάζοντας οφέλη σε πολλούς τομείς της λειτουργίας του όπως το ανοσοποιητικό και γαστρεντερικό σύστημα. Το γεγονός αυτό, συνεπώς, έχει κεντρίσει το ενδιαφέρον και την έρευνα για την ανακάλυψη νέων μικροοργανισμών που παρουσιάζουν προβιοτικές ιδιότητες. Στις πλέον σημαντικές προβιοτικές ιδιότητες συγκαταλέγονται η αντοχή σε όξινο pH, η αντοχή σε συγκεκριμένα ποσοστά χολικών αλάτων και η αντιμικροβιακή δράση (Klaenhammer και Kullen, 1999).

Κατά την πειραματική διαδικασία, παρατηρήθηκε πολύ μικρή αντοχή του στελέχους *L. kefir* C1 σε όξινο pH. Σε pH 3, ο πληθυσμός μετά από δυο ώρες πειράματος ήταν 4,7 log cfu/ml. Αντίστοιχα στο pH 2, μετά από 15 λεπτά πειράματος ο πληθυσμός του *L. kefir* C<sub>1</sub> μειώθηκε σε 2 log cfu/ml και έπεσε κάτω από το όριο ανιχνευσιμότητας της τεχνικής.

Το pH στο στομάχι όπως είναι γνωστό, κυμαίνεται από 1,5, όταν ο άνθρωπος δεν έχει σιτιστεί, έως 4,5 μετά από ένα γεύμα και η πέψη καθώς και η παραμονή των τροφών εκεί μπορεί να διαρκέσει και 3 ώρες (Bao *et al.*, 2010). Οι Holzappel *et al.*, (1998) σε πείραμα που περιελάμβανε πιθανά προβιοτικά στελέχη, ανέφεραν για τον *L. johnsonii*, ότι ο πληθυσμός του διατηρήθηκε σε επίπεδα άνω των 7 log cfu/ml κατά τη διάρκεια του πειράματος. Σε άλλες μελέτες (Charteris *et al.*, 1998) ο *L. fermentum* κατάφερε να κρατήσει τον πληθυσμό του στα ίδια επίπεδα σε pH 3 για 2 ώρες ενώ στην έρευνα των Strompfona *et al.*, (2006) το στέλεχος *L. fermentum* AD1 σε pH 3.0 διατήρησε τον πληθυσμό του κατά 99.9% για την 1<sup>η</sup> ώρα, 94.7% για την 2<sup>η</sup> και 86.8% για την 3<sup>η</sup> ώρα. Επίσης για το pH 2, οι Pereira και Gibson (2002), ανέφεραν ότι το στέλεχος *L. fermentum*



KC5b έδειξε πολύ καλή βιωσιμότητα για 2 ώρες. Πιθανός τρόπος επιβίωσης των μικροοργανισμών στις παραπάνω έρευνες, εκτός φυσικά από την εκ φύσεως αντοχή στην οξύτητα, θεωρείται ο προστατευτικός ρόλος που έχει το τρόφιμο μέσα στο οποίο βρίσκεται ο προβιοτικός οργανισμός, το οποίο δημιουργεί ουσιαστικά υμένιο γύρω από αυτόν (Bao *et al.*, 2010).

Ο πληθυσμός του *L. kefir* C1 δεν επηρεάστηκε από την προσθήκη 0,4% w/v χολικών αλάτων, σε όλη τη διάρκεια του πειράματος (6 h). Ο μικροοργανισμός παρέμεινε ζωντανός σε επίπεδα 6,5 log cfu/ml. Οι μηχανισμοί με τους οποίους τα στελέχη επιβιώνουν στα χολικά άλατα, όπως επίσης και τα όρια αντοχής αυτών, είναι ασαφή και εξαρτώνται από το κάθε στέλεχος. Σαν μηχανισμός επιβίωσης εικάζεται η υδρολάση των χολικών αλάτων καθώς και η τροφή που έχει προστατευτικό ρόλο γύρω από τον μικροοργανισμό. Είναι γνωστό παρόλα αυτά, το γεγονός ότι τα χολικά άλατα αποδιοργανώνουν την κυτταρική μεμβράνη και αποτελούν τοξικό παράγοντα για τα ζωντανά κύτταρα. Οπότε η αντοχή των στελεχών *Lactobacillus* αποτελεί σημείο κλειδί για την ανάπτυξη του, καθώς τα στελέχη με ικανότητα μεταβολισμού των χολικών αλάτων μπορούν να επιβιώσουν και να δράσουν κατά την μεταφορά μέσω του γαστρεντερικού σωλήνα (Bao *et al.*, 2010).

Οι έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί υποβάλλουν τα υποψήφια προβιοτικά στελέχη σε συγκεντρώσεις 0,2- 0,4% w/v χολικών αλάτων και καταγράφουν την αντοχή τους. Οι Gardiner *et al.*, (2002) εξέτασαν το στέλεχος *L. fermentum* σε συγκεντρώσεις 0,3 – 0,5% w/v χολικών αλάτων και παρατήρησαν ότι δεν σημειώθηκε μείωση στη βιωσιμότητα του. Σε έρευνα των Del Piano *et al.*, (2006) εξετάστηκε η αντοχή προβιοτικών στελεχών *L. plantarum* σε 0,3% w/v χολικά άλατα και η βιωσιμότητα τους ανήλθε περίπου στο 80% ενώ το στέλεχος *L. fermentum* AD1 αναπτύχθηκε

σε παρουσία 1% χολικών αλάτων και τα ζωντανά κύτταρα μετά από 24 ώρες επώαση έφταναν σε ποσοστό 75.4% (Strompfona *et al.*, 2006). Στην ίδια έρευνα ο πληθυσμός του στελέχους *L. fermentum* SGM3 παρέμεινε ίδιος σε συγκέντρωση 0.3% χολικών αλάτων για 24 ώρες.

Έχοντας σα γνώμονα λοιπόν τις φυσιολογικές συγκεντρώσεις χολικών αλάτων στο ανθρώπινο σώμα, που κυμαίνονται από 1.5% ως 2% (w/v) την πρώτη ώρα της πέψης και μειώνονται γύρω στο 0.3% (w/v) μετέπειτα (Noriega *et al.*, 2004) και λαμβάνοντας υπόψη τις πρότερες έρευνες πάνω στο ίδιο αντικείμενο συμπεραίνουμε ότι υπάρχει ικανοποιητική αντοχή του στελέχους.

Τα αποτελέσματα της αντιμικροβιακή δράσης των στελεχών *L. kefir* A4, D1b1, έναντι των παθογόνων βακτηρίων *E. coli* O157:H7 NCTC 13126, *S. enterica* serotype *Typhimurium* DT193 και *L. monocytogenes* Scott A, δεν έδειξαν τη παρουσία κάποιου ανασταλτικού παράγοντα με τη συγκεκριμένη τεχνική. Μόνο στο στέλεχος *L. kefir* F4Aa παρατηρήθηκε αντιμικροβιακή δράση και αναστολή της ανάπτυξης της *L. monocytogenes* και της *S. Typhimurium* όχι όμως και της *E. coli*. Σε έρευνα των Udhayashree *et al.*, (2012) ο *L. fermentum* παρουσίασε αντιμικροβιακή δράση (ζώνες διάχυσης) έναντι των παθογόνων βακτηρίων *E. coli*, *S. aureus*, *B. cereus*, *S. typhi* χρησιμοποιώντας άλλη τεχνική (spot assay).

Τα αποτελέσματα ποικίλων ερευνών συγκλίνουν στο γεγονός ότι τα διάφορα στελέχη *Lactobacillus* χρησιμοποιούν πολλούς και διαφορετικούς μηχανισμούς αντιμικροβιακής δράσης. Παράγουν οργανικά οξέα όπως γαλακτικό, οξικό, προπιονικό στα οποία τα Gram - αρνητικά βακτήρια φαίνεται να είναι πιο ευαίσθητα. Επίσης παράγουν βακτηριοσίνες και παρόμοιες ουσίες που καθυστερούν τη φάση ανάπτυξης των παθογόνων και κυρίως των Gram – θετικών, υπεροξειδίου του υδρογόνου, μικρού

μοριακού βάρους πεπτίδια και ενώσεις όπως η ρετρίνη και ρετροκυκλίνη (Bao *et al.*, 2010).

Καταλήγοντας, όλα τα στελέχη που εξετάστηκαν παρουσίασαν υποσχόμενα προβιοτικά χαρακτηριστικά, όπως αντιμικροβιακή δράση, αντοχή σε όξινο περιβάλλον και στα χολικά άλατα, κατατάσσοντας τα σε δυνατούς υποψήφιους για περαιτέρω αξιολόγηση. Δοκιμές όμως πρέπει να διεξαχθούν σε πιο περίπλοκες και πραγματικές συνθήκες για να ξεκαθαριστεί αν τα εξεταζόμενα στελέχη διαθέτουν εκείνα τα τεχνολογικά χαρακτηριστικά που θα μας επιτρέψουν να τα συμπεριλάβουμε σαν προβιοτικά.

## 10. Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν στελέχη *Lactobacillus kefir* απομονωμένων από κόκκους κεφίρ ως προς τις προβιοτικές τους ιδιότητες. Ειδικότερα μελετήθηκε η αντοχή των στελεχών σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις χολικών αλάτων, η ανάπτυξη τους σε διαφορετικό pH καθώς και η αντιμικροβιακή δράση τους έναντι συγκεκριμένων παθογόνων μικροοργανισμών. Η παραπάνω έρευνα θα μπορούσε να συμπεριλάβει και άλλους παράγοντες προς εξέταση για τα προβιοτικά στελέχη όπως η ικανότητα προσκόλληση τους σε επιθηλιακά κύτταρα *in vitro*. Επίσης τα στελέχη θα μπορούσαν να υποβληθούν σε αληθινές συνθήκες επεξεργασίας τροφίμων προκειμένου να διαπιστωθεί η πρακτική εφαρμογή τους σε μελλοντική μαζική παραγωγή προϊόντος που θα τα εμπεριέχει. Μία άλλη πρόταση για μελλοντική έρευνα θα μπορούσε να είναι η εξέταση και άλλων στελεχών *Lactobacillus kefir*, καθώς και η έρευνα πάνω στον τομέα των πρεβιοτικών και πως αυτά δρουν συνεργιστικά μαζί με τους προβιοτικούς οργανισμούς. Τέλος, στη συγκεκριμένη εργασία εξετάζεται η αναστολή τριών παθογόνων βακτηρίων. Σε μια μελλοντική έρευνα η γκάμα αυτών θα μπορούσε να διευρυνθεί και να τεκμηριωθεί αν τα προβιοτικά στελέχη παρουσιάζουν αντιμικροβιακή δράση και να μελετηθεί ο μηχανισμός της αντιπαθογόνου δράσης τους.

## 11. Βιβλιογραφία

- Allende A., Martinez B., Selmaa V., Gila M., Suarez J., Rodriguez A. (2007). Growth and bacteriocin production by lactic acid bacteria in vegetable broth and their effectiveness at reducing *Listeria monocytogenes* in vitro and in fresh-cut lettuce. *Food Microbiology*, **24**, 759–766.
- Amado I., Fucinos C., Fajardo P., Guerra N., Pastrana L. (2012). Evaluation of two bacteriocin-producing probiotic lactic acid bacteria as inoculants for controlling *Listeria monocytogenes* in grass and maize silages. *Animal Feed Science and Technology*, **175**, 137– 149.
- Amara A., Shibl A. (2013). Role of Probiotics in health improvement, infection control and disease treatment and management. *Saudi Pharmaceutical Journal*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsps.2013.07.001>.
- Aureli P., Capurso L., Castellazzi A., Clerici M., Giovannini M., Morelli L., Poli A., Pregliasco F., Salvini F., Zuccotti G. (2011). Probiotics and health: An evidence-based review. *Pharmacological Research*, **63**, 366-376.
- Bao Y., Zhang Y., Zhang Y., Liu Y., Wanga S., Dong X., Wang Y., Zhang H. (2010). Screening of potential probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* isolated from traditional dairy products. *Food Control*, **21**, 695–701.
- Bellara S., McFarlane C., Thomas C., Fryer P. (2000). The growth of *Escherichia coli* in a food simulant during conduction cooling: combining

engineering and microbiological modelling. *Chemical Engineering Science*, **55**, 6085-6095.

Carr B., Weisbein J., Gaieski D. (2007). *Salmonella meningitis* in an immunocompetent adult. *The Journal of Emergency Medicine*, **40**, 267–270.

Charteris W., Kelly P., Morelli L., Collins K. (1997). Selective detection, enumeration and identification of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in mixed bacterial populations. *International Journal of Food Microbiology*, **35**, Pages 1-27.

Chaudhuri R., Henderson I. (2012). The evolution of the *Escherichia coli* phylogeny. *Infection, Genetics and Evolution*, **12**, 214–226.

Del Piano M., Morelli L., Strozzi G.P., Allesina S., Barba M., Deida F., Lorenzini P., Ballare M., Montino F., Orsello M., Sartori M., Garello E., Carmagnola S., Pagliarulo M., Capurso L. (2006). Probiotics: from research to consumer. *Digestive and Liver Disease*, **38**, 248-255.

FAO/WHO. Report of a Joint FAO/WHO expert consultation on guidelines for the evaluation of probiotics in food. London Ontario, Canada: World health organization and food and agriculture organization of United Nations; 2002.

Gardiner G., Heinemann C., Baroja M., Bruce A., Beuerman D., Madrenas J., Reid G. (2002). Oral administration of the probiotic combination *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *L. fermentum* RC-14

for human intestinal applications. *International Dairy Journal*, **12**, 191-196.

Gronnevik H., Falstad M., Narvhus J. (2011). Microbiological and chemical properties of Norwegian kefir during storage. *International Dairy Journal*, **21**, 601-606.

Gueimonde M., Salminen S. (2006). New methods for selecting and evaluating probiotics. *Digestive and Liver Disease*, **38**, 242-247.

Holzapfel W., Haberer P., Snel J., Schillinger U., Huis in't Veld J. (1998). Overview of gut flora and probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, **41**, 85-101.

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

Klein G., Pack A., Bonaparte C., Reuter G. (1998). Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, **41**, 103-125

Leite A., Leite D., Del Aguila E., Alvares T.S., Peixoto R.S., Miguel M.A.L., Silva J.T., Paschoalin V.M.P. (2013). Microbiological and chemical characteristics of Brazilian kefir during fermentation and storage processes. *American Dairy Science Association*, **96**, 4149–4159.

Likotrafiti Eleni, Development of Synbiotics with Antimicrobial Activity as Functional Food Ingredients for the Elderly, The University of Reading 2004.

Likotrafiti E., Tuohy K., Gibson G.R., Rastall R.A. (2013). Development of antimicrobial synbiotics using potentially-probiotic faecal isolates of *Lactobacillus fermentum* and *Bifidobacterium longum* *Anaerobe*, **20**, 5-13.

Lindgren S., Dobrogosz W. (1990). Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiology Reviews*, **87**, 149-164.

Liu X., Liu W., Zhang Q., Tian F., Wang G., Zhang H., Chen W. (2013). Screening of lactobacilli with antagonistic activity against enteroinvasive *Escherichia coli*. *Food Control*, **30**, 563-568.

López F., Pescaretti M., Morero R., Delgado M. (2012). *Salmonella Typhimurium* general virulence factors: A battle of David against Goliath? *Food Research International*, **45**, 842–851.

McLauchlin J., Mitchell R.T., Smerdon W.S., Jewell K. (2004). *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. *International Journal of Food Microbiology*, **92**, 15– 33.

Miyazaki Y., Kamiya S., Hanawa T., Fukuda M., Kawakami H., Takahashi H., Yokota H. (2010). Effect of probiotic bacterial strains of *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, and *Enterococcus* on enteroaggregative *Escherichia coli*.



*Japanese Society of Chemotherapy and the Japanese Association for Infectious Diseases*, **16**, 10–18.

Monteville T.J., Mathews K.R. (2005). Μικροβιολογία Τροφίμων. *Εκδόσεις Ιον*, 103-119.

Noriega L., Gueimonde M., Sanchez B., Margolles A., de los Reyes-Gavilan C. G. (2004). Effect of the adaptation to high bile salts concentrations on glycosidic activity, survival at low pH and cross-resistance to bile salts in *Bifidobacterium*. *International Journal of Food Microbiology*, **94**, 79–86.

Pereira D.I., Gibson G.R. (2002) Effects of consumption of probiotics and prebiotics on serum lipid levels in humans. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, **37**, 259-281.

Rattanabumrung O., Sangadkit V., Supanivatin P., Thipayarat A. (2012) Kinetics of *E. coli* colony area expansion and color development in Chromocult® Coliform Agar (CCA) under different incubation conditions. *Procedia Engineering*, **32**, 134 – 140.

Rodriguez E., Arque´s J., Rodriguez R., Peiroten A., Landete J., Medina M. (2012). Antimicrobial properties of probiotic strains isolated from breast-fed infants. *Journal of Functional Foods*, **4**, 542 –551.

Ryser E.T (2002). *Listeria monocytogenes*. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 155-165.

- Sariñena S., Barlow J., Costabile A., Gibson G., Rowland I. (2013). Antipathogenic activity of probiotics against *Salmonella Typhimurium* and *Clostridium difficile* in anaerobic batch culture systems: Is it due to synergies in probiotic mixtures or the specificity of single strains? *Anaerobe*, **24**, 60-65.
- Sariñena S., Barlow J., Costabile A., Gibson G., Rowland I. (2012). *In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of a range of probiotics against pathogens: Evidence for the effects of organic acids. *Anaerobe*, **18**, 530-538.
- Salminen S., Wright A., Morelli L., Marteau P., Brassart D., De Vos W., Fonden R., Saxelin M., Collins K., Mogensen G., Birkeland S., Mattila-Sandholm T. (1998). Demonstration of safety of probiotics – a review. *International Journal of Food Microbiology*, **44**, 93-106.
- Servin A. (2004). Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiology Reviews*, **28**, 405–440.
- Stiles M., Holzapfel W. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, **36**, 1-29.
- Strompfova V., Marcinakova M., Simonova M., Bogovic-Matijasic B., Laukova A. (2006). Application of potential probiotic *Lactobacillus fermentum* AD1 strain in healthy dogs. *Anaerobe*, **12**, 75–79.
- Tuohy K.M., Rouzaud G.C.M., Bruck W.M., Gibson G.R. (2005). Modulation of the Human Gut microflora Towards Improved Health Using

Prebiotics – Assessment of Efficacy. *Current Pharmaceutical Design*, **11**, 75-90.

Udhayashree N., Senbagam D., Senthilkumar B., Nithya K., Gurusamy R. (2012). Production of bacteriocin and their application in food products. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, **32**, 406-410.

Vaughan E., Mollet B., DeVos W. (1999). Functionality of probiotics and intestinal lactobacilli: light in the intestinal tract tunnel. *Current Opinion in Biotechnology*, **10**, 505–510.

Warriner K., Namvar A. (2009). What is the hysteria with *Listeria*? *Trends in Food Science & Technology*, **20**, 245-254.

Μπαλατσούρας Γ. (2006). Μικροβιολογία τροφίμων. Εκδόσεις Έμβρυο, σελ: 75-91.