

ΤΕΙ ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΥ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΚΑΙ
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

***«ΜΕΛΕΤΗ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ
LACTOBACILLUS CASEI ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗΣ ΤΟΥ
ΓΑΣΤΡΟΕΝΤΕΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ»***

ΦΟΙΤΗΤΡΙΑ: ΚΑΡΑΘΑΝΑΣΗ ΜΑΡΙΑ, ΑΜ: 2010111

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΚΑΝΔΥΛΗΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ

ΚΑΛΑΜΑΤΑ, 2016

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας του τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων και διατροφής του Τ.Ε.Ι Καλαμάτας. Θέμα της πτυχιακής ήταν η μελέτη της βιωσιμότητας ακινητοποιημένων κυττάρων *Lactobacillus casei* σε συνθήκες προσομοίωσης του γαστροεντερικού συστήματος.

Στην ολοκλήρωση της πτυχιακής αυτής βοήθησαν πολλοί άνθρωποι με τους οποίους είχα την τύχη να συναναστραφώ και να συνεργαστώ. Θα ήθελα λοιπόν να τους ευχαριστήσω για την υλική και ηθική υποστήριξη που μου παρείχαν.

Καταρχήν θέλω να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα μου, καθηγητή **κ. Παναγιώτη Κανδύλη**, για την καθοδήγηση και την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπο μου καθ' όλη την περίοδο της παραμονής μου στο Εργαστήριο. Η συμβολή του στην υλοποίηση της πτυχιακής, από την ανάθεση του θέματος μέχρι την ολοκλήρωση της, υπήρξε καθοριστική.

Τις θερμότερες μου ευχαριστίες θέλω επίσης να απευθύνω στους Καθηγητές μου **κ. Γεώργιο Ζακυνθινό** καθώς και **κ. Γεώργιο Καραγγελή**, για την επιστημονική και ανθρώπινη υποστήριξη του κατά τη διάρκεια της πτυχιακής μου εργασίας. Οι πολύτιμες συμβουλές, οι υποδείξεις, καθώς και το ενδιαφέρον του συνέβαλλαν στην τελική μορφή του κειμένου.

Τη γενική γραμματεία Τεχνολογίας τροφίμων και Διατροφής .

Τέλος, πολλές ευχαριστίες θέλω να εκφράσω στους γονείς μου και τα αδέρφια μου, για την απέραντη αγάπη και στήριξη τους που μου προσφέρουν. Οι αρχές που μου δίδαξαν και τα εφόδια που μου παρείχαν με βοήθησαν να γίνω καλύτερος άνθρωπος και να πραγματοποιήσω τα όνειρα μου.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	2
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
ABSTRACT	8
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	9
1. ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-	
ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΟΙ	
ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ.....	10
1.1. Ιστορική αναδρομή και πρωτοπόροι ερευνητές.....	10
1.2 Ορισμοί.....	11
1.3 Που συναντάμε τους προβιοτικούς οργανισμούς.....	12
1.3.1 Γάλα.....	12
1.3.2 Γιαούρτι.....	12
1.3.3 Τυρί.....	13
1.3.4 Κεφίρ.....	13
1.3.5 Dahi.....	13
1.3.6 Kumys.....	14
1.4 Κριτήρια επιλογής προβιοτικών μικροοργανισμών.....	14
1.5 Μηχανισμοί δράσης προβιοτικών.....	18
1.5.1. Ενίσχυση της λειτουργίας του επιθηλιακού φραγμού.....	20

1.5.2. Ρύθμιση της σύνθεσης της εντερικής μικροχλωρίδας.....	21
1.5.3. Ρύθμιση ανοσιακής απόκρισης.....	22
1.6 Προβιοτικοί μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται στο εμπόριο.....	23
1.7 Είδη μικροοργανισμών που χρησιμοποιούνται ως προβιοτικά (Shortt, 1999).....	23
1.8 Ασφάλεια των προβιοτικών	24
1.9 Παρενέργειες, κίνδυνοι και μειονεκτήματα της χρήσης προβιοτικών.....	26
1.10 Θετικές επιδράσεις των προβιοτικών μικροοργανισμών.....	27
1.11 Γαστρεντερικό σύστημα.....	29
1.12 Τα τμήματα του γαστρεντερικού συστήματος.....	29
1.13 Εντερική Χλωρίδα.....	33
1.14 Σύσταση εντερικής χλωρίδας.....	34
1.15 Παράγοντες που επηρεάζουν τον εντερικό μικροβιόκοσμο.....	39
1.16 Προβιοτικά και ασθένειες του πεπτικού συστήματος.....	41
1.16.1 Δυσανεξία στη λακτόζη.....	41
1.16.2 Οξεία γαστρεντερίτιδα.....	41
1.16.3 Καρκίνος του εντέρου.....	42
2. Τα στελέχη Lactobacillus ως προβιοτικοί μικροοργανισμοί.....	43
2.1. Το γένος Lactobacillus.....	43
2.2 Τα στελέχη Lactobacillus ως μέλη της φυσιολογικής εντερικής χλωρίδας.....	43
2.3 Μηχανισμοί δράσης των Lactobacillus.....	44
2.4 Ο ρόλος των χαρακτηριστικών της κυτταρικής επιφάνειας (cell surface traits) των Lactobacillus.....	45
2.5 Ικανότητα προσκόλλησης.....	45
2.6 Η ιδιότητα της αυτοσυσσωμάτωσης.....	46
3. Ακίνητοποίηση.....	46
3.1 Τεχνικές Ακίνητοποίησης.....	47
3.1.1 Προσκόλληση ή προσρόφιση σε επιφάνεια στερεού φορέα.....	48

3.1.2	Εγκλωβισμό σε πορώδες υλικό (entrapment).....	49
3.1.3	Συσσωμάτωση με κροκίδωση (cell flocculation).....	50
3.1.4	Μηχανική συγκράτηση βιοκαταλυτών σε ένα φορέα (encapsulation)	51
3.2	Πλεονεκτήματα χρήσης ακινητοποιημένων κυττάρων.....	51
3.3	Για να χρησιμοποιηθεί ένα υπόστρωμα ως φορέας ακινητοποίησης,πρέπει να τηρούνται ορισμένες προϋποθέσεις.....	52
3.4.1	Τα υλικά των υποστρωμάτων μπορούν να διακριθούν σε.....	54
3.5	Επίδραση της ακινητοποίησης στους μικροοργανισμούς.....	54
3.6	Περιληπτικές σημειώσεις	55
3.6.1	Ακινητοποίηση με αλγινικό άλας.....	56
3.6.2	Σκλήρυνση του gel (Hardening ή Curing).....	59
4.	Ξήρανση Μικροοργανισμών.....	61
4.1	Ξήρανση με ψεκασμό (spray drying).....	61
4.1.2	Λυοφιλίωση ή ξήρανση υπό κατάψυξη (Lyophilisation or freeze drying).....	63
4.1.3	Ψεκασμό με ψυχρό αέρα (spray cooling/chilling).....	65
4.1.4	Ξήρανση περιστρεφόμενος δίσκος (spinning disk).....	67
4.1.5	Θερμική (συν)εξώθηση ή εκβολή (extrusion).....	67
4.1.6	Επικάλυψη σε ρευστοποιημένη κλίνη (fluidized bed coating).....	67
4.1.7	Συγκρυστάλλωση με άλλα συστατικά (cocrystallization).....	69
4.1.8	Απορρόφηση (absorption).....	69
4.1.9	Εγκλεισμός σε λιποσώματα (liposome entrapment).....	70
4.1.10	Σχηματισμός συμπλόκων εγκλεισμού (inclusion complexation)...	70
4.1.11	Διαχωρισμός φάσεων (coacervation).....	71
5.	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	73
	ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	74

5.1 Ακίνητοποιημένα κύτταρα <i>L. casei</i> με τη μέθοδο της ξήρανσης με ψεκασμό.	74
6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	75
6.1 Επιβίωση των ακίνητοποιημένων κυττάρων <i>L. casei</i> σε συνθήκες προσομοίωσης γαστρικών υγρών.....	78
6.2 Επιβίωση σε προσομοιωμένο γαστρικό υγρό	78
6.3 Επιβίωση σε διαλύματα χολικών αλάτων.....	78
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	80
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	81

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η βιωσιμότητα των ακινητοποιημένων, με ξήρανση με ψεκασμό, κυττάρων *Lactobacillus casei* ATCC 393, σε συνθήκες προσομοίωσης του γαστρεντερικού συστήματος. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι σε συνθήκες προσομοίωσης γαστρικών υγρών και διαλυμάτων χολικών αλάτων, η ακινητοποίηση παρείχε σημαντική προστασία σε σχέση με τα ελεύθερα κύτταρα. Συγκεκριμένα ακόμα και μετά από 3 ώρες σε συνθήκες προσομοίωσης γαστρικών υγρών η μείωση της βιωσιμότητας ήταν μόνο 0,35 logcfu/g σε pH 3 και 1,59 logcfu/g σε pH 2. Στον αντίποδα η μείωση στα ελεύθερα κύτταρα ήταν 1,46 logcfu/g και 3,73 logcfu/g σε pH 3 και pH 2 αντίστοιχα. Η ίδια τάση παρατηρήθηκε και στην περίπτωση των διαλυμάτων χολικών αλάτων μετά από 6 ώρες. Σε όλες τις περιπτώσεις που μελετήθηκαν ο αριθμός των ζώντων ακινητοποιημένων κυττάρων του *Lactobacillus casei* παράμεινε σε αριθμούς μεγαλύτερους από 6 logcfu/g, που είναι σημαντικό για τον χαρακτηρισμό των προϊόντων ως προβιοτικά. Η ακινητοποίηση με την χρήση της ξήρανσης με ψεκασμό παρείχε σημαντική προστασία στα κύτταρα του *L. casei* σε όλες τις συνθήκες που μελετήθηκαν, ενώ παρήγαγε προϊόν ξηρό που καλύπτει τις ανάγκες της βιομηχανίας τροφίμων.

Λέξεις κλειδιά: *L. casei*, ξήρανση με ψεκασμό, γαλακτοκομικά προϊόντα, προβιοτικά

ABSTRACT

In the present study the survival of immobilized, using spray-drying, *Lactobacillus casei* ATCC 393 cells, was evaluated under simulated gastrointestinal conditions. The results showed that under simulated gastric juice and bile salts solutions, immobilization provided adequate protection of *L. casei* cells compared to free cells. More specifically even after 3 h in simulated gastric juice the reduction in viability was only 0.35 logcfu/g at pH 3 and 1.59 logcfu/g at pH 2. On the contrary the reduction of viability of free cells was 1.46 logcfu/g and 3.73 logcfu/g at pH 3 and 2 respectively. The same trend was observed at bile salts solutions even after 6 h. After all tested conditions the number of immobilized *L. casei* cells remained over 6 log cfu/g, which is important for the probiotic character of the final product. Microencapsulation by spray-drying provided a significant better protection of *L. casei* cells under all conditions studied, while produced a dried product which fulfill the demands of dairy industry.

Keywords: *L. casei*, spray-drying, dairy products, probiotic

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-

ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΟΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ

1.1. Ιστορική αναδρομή και πρωτοπόροι ερευνητές

Σύγχρονες μελέτες στον τομέα της υγείας προκάλεσαν την επανεξέταση του ρόλου των μικροοργανισμών στην υγεία του ξενιστή και προώθησαν την ιδέα της σκόπιμης διαμόρφωσης του εντερικού μικροβιόκοσμου για θεραπευτικούς σκοπούς. Ωστόσο, η ιδέα της καταστολής και αντικατάστασης των παθογόνων μέσω της δια του στόματος χορήγησης 'ωφέλιμων' βακτηρίων για τη βελτίωση της μικροβιακής ισορροπίας, της υγείας και της μακροζωίας δεν είναι καινοφανής, αλλά παρουσιάστηκε για πρώτη φορά σχεδόν έναν αιώνα νωρίτερα από τον Tissier (1906) και τον Metchnikoff.

Ο Νομπελίστας Ιλια Ιλιτς Μέτσνικοφ (1908), Ρώσος ζωολόγος, μικροβιολόγος ερευνητής του Ίδρυματος Παστέρ, των Παρισίων αναφέρει ότι, «η γήρανση του ανθρώπου, οφείλεται στην αυτοδηλητηρίαση του οργανισμού από διάφορους μικροβιολογικούς και τοξικούς παράγοντες οι οποίοι αναπτύσσονται κυρίως στο εσωτερικό των εντέρων». Με την επιμονή του σ' αυτήν την έρευνα απέδειξε πως η εντερική χλωρίδα αποτελείται από οξυ-γαλακτικά βακτήρια που ωφελούν.

Γνωρίζοντας ήδη, πως ορισμένοι λαοί που ζουν περισσότερο από τους άλλους έχουν ως βασική τροφή το γιαούρτι.(Έλληνες, Βούλγαροι, Ρώσοι), συνέδεσε το γιαούρτι (η ζύμωση του γιαουρτιού γίνεται από οξυ-γαλακτικά βακτήρια) με την καλή υγεία του εντέρου και το οποίο συνέστηνε επιμόνως ως το απαραίτητο διατροφικό προϊόν το οποίο θα συνοδεύει κάθε γεύμα. Ο Metchnikoff ανέπτυξε τη θεωρία της αυτό-αποτοξίνωσης του οργανισμού και την συνέδεσε με την κατανάλωση γιαουρτιού που περιέχει βακτήρια του γένους *Lactobacillus*.

Σημαντικές απέβησαν οι εργασίες του Henry Tissier, επίσης ερευνητή του

Ιδρύματος Παστέρ, ο οποίος απεμόνωσε το βακτήριο Bifidobacterium, από το μητρικό γάλα και το ονόμασε «Bacillus bifidus communis». Ο Tissier έδειξε ότι τα βακτήρια του γένους Bifidobacterium αποτελούν κυρίαρχα μέλη της εντερικής μικροχλωρίδας των βρεφών και πρότεινε τη χορήγηση τους για την αποκατάσταση της ισορροπίας της εντερικής μικροχλωρίδας και τη θεραπεία της διάρροιας. Η πρώτη εφαρμογή του προβιοτικού έγινε το 1917 κατά την διάρκεια του Α΄ Παγκοσμίου Πολέμου από τον Alfred Nissle, Γερμανό καθηγητή, ο οποίος εθεράπευσε με δικό του εργαστηριακό σκεύασμα προβιοτικών επιδημία εντεροκολίτιδας (δριμείας μορφής στο στρατόπεδο) από σαλμονέλωση και σιγκέλωση.

1.2 Ορισμοί

Ακολουθώντας τις παραπάνω αναφερόμενες εξελίξεις, το 1965, εισήχθη από τους Lilly και Stillwell ο όρος προβιοτικός (προ-βίος, προάγω τη ζωή) για να περιγράψει βακτήρια και σπόρια που χρησιμοποιούνται ως συμπληρώματα της διατροφής των ζώων και τα οποία θα μπορούσαν να περιορίσουν τη χρήση αντιβιοτικών ουσιών.

Ο Parker, όρισε τα προβιοτικά ως: «οργανισμοί και ουσίες οι οποίες συμβάλλουν στην ισορροπία της εντερικής μικροχλωρίδας». Το 1989 προτάθηκε από τον Roy Fuller ο ορισμός που σήμερα χρησιμοποιείται ευρέως :

"Προβιοτικό είναι ένα ζωντανό μικροβιακό συμπλήρωμα που έχει ευεργετικές επιπτώσεις στον οργανισμό για τη βελτίωση της εντερικής του μικροβιακής ισορροπίας". Ο ορισμός του Fuller' υπογραμμίζει την προϋπόθεση της βιωσιμότητας για το προβιοτικό και εισάγει την άποψη της ευεργετικής επίδρασης στον ξενιστή.

Έκτοτε, ο όρος προβιοτικός επαναδιατυπώθηκε αρκετές φορές για να καταλήξει σύμφωνα με τον Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας των Η.Π.Α και τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας σε μία γενικώς αποδεκτή αναθεώρηση που ορίζει ως προβιοτικούς τους 'ζωντανούς μικροοργανισμούς που ασκούν ευεργετική δράση στον ξενιστή, όταν χορηγηθούν σε κατάλληλες ποσότητες'. Συνεπώς: «Προβιοτικό είναι ένα σκεύασμα ή ένα προϊόν το οποίο περιέχει ζώντες, καθορισμένους μικροοργανισμούς σε επαρκείς ποσότητες, που μεταβάλλουν θετικά τη σύσταση της μικροχλωρίδας σε ένα τμήμα του ξενιστή, ασκώντας έτσι ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία του»

Ο παραπάνω ορισμός περιορίζει την ιδέα των προβιοτικών σε επιδράσεις που παράγονται από ζώντες μικροοργανισμούς και είναι εφαρμόσιμος ανεξάρτητα από την περιοχή δράσης των προβιοτικών και τη διαδρομή που ακολουθούν στο σώμα του

ξενιστή μετά τη χορήγησή τους. Συνεπώς, μπορεί να συμπεριλάβει περιοχές του σώματος όπως η στοματική κοιλότητα, το έντερο, ο κόλπος και το δέρμα. Στην περίπτωση των προβιοτικών τροφίμων, οι ευεργετικές για την υγεία επιδράσεις βασίζονται συνήθως στην τροποποίηση της γαστρεντερικής μικροχλωρίδας και συνεπώς βασίζονται στην επιβίωση κατά τη διάρκεια της διέλευσης από την πεπτική οδό. Η δυναμική δράση των προβιοτικών μπορεί να ενισχυθεί με τις παρακάτω μεθόδους :

- (α) την επιλογή των πλέον αποδοτικών στελεχών.
- (β) τον κατάλληλο χειρισμό του γένους.
- (γ) το συνδυασμό ενός αριθμού στελεχών και
- (δ) το συνδυασμό προβιοτικών και συνεργικά δρώντων συστατικών (πρεβιοτικών) .

1.3 Που συναντάμε τους προβιοτικούς οργανισμούς

Πηγές προβιοτικών αποτελούν τα γαλακτοκομικά που υπάρχουν στην διατροφή του ανθρώπου από την αρχαιότητα.

1.3.1Γάλα

Στη λιβυκή έρημο ανακαλύφθηκαν σε βράχους χαραγμένα σχέδια που έχουν γίνει το 9000πχ και απεικονίζουν λατρεία στις αγελάδες. Μερικά από τα παλαιότερα αρχεία προτείνουν την ανάπτυξη της γαλακτοπαραγωγής στην αρχαία Ινδία, την Μεσοποταμία και την Αίγυπτο απ' το 6000 πχ. Ένα γλυπτό στη μέση Ανατολή που χρονολογείται γύρω στο 2900-2460πχ δείχνει την ανάπτυξη ενός συστήματος επεξεργασίας γάλακτος, στο εργοστάσιο Teil Ubaid.(IDF,1984)

1.3.2Γιαούρτι

Ο Elie Metchnikoff υπέθεσε την έννοια προβιοτικών γύρω στο έτος 1900, όταν παρατήρησε ότι η μακρά, υγιή ζωή των Βούλγαρων αγροτών ήταν το αποτέλεσμα της κατανάλωσης γαλακτοκομικών προϊόντων ζύμωσης. Αργότερα διαπιστώθηκε ότι το γιαούρτι περιείχε τα

αναγκαία για την προστασία των οργανισμών του εντέρου από τις βλαβερές συνέπειες των άλλων επιβλαβών βακτηρίων. Το γιαούρτι παρασκευάζεται με την προσθήκη βακτηρίων στο γάλα, τα οποία έχουν πρωτεολυτική δραστικότητα.

Αποτέλεσμα αυτής της δραστηριότητας είναι η κατανομή της πρωτεΐνης του γάλακτος, η οποία είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη των βακτηρίων που προκαλεί την απελευθέρωση μικρών πεπτιδίων και αμινοξέων. Η πρωτεολυτική δράση δεν μεταβάλλει σημαντικά την θρεπτική αξία των πρωτεϊνών του γάλακτος.

1.3.3 Τυρί

Έγινε για πρώτη φορά κατά λάθος όταν ένας Άραβας έμπορος έβαλε μία ποσότητα γάλακτος σε μία σακούλα από το στομάχι ενός προβάτου και η πυτιά σε συνδυασμό με τη θερμότητα του ήλιου προκάλεσε το διαχωρισμό του γάλακτος σε τυρόπηγμα. Αυτό καταγράφεται στο 7000 π.Χ. . Περίπου το 1878 ο Hansen στη Δανία έταξε στο εμπόριο τη διαδικασία για την προετοιμασία της πυτιάς και στις αρχές του 1900 εισήγαγε στην αγορά καλλιέργειες για παραγωγή τυροκομικών. Αυτό έδωσε ώθηση στην παρασκευή τυριού (Storch, V., 1985). Πολλές ποικιλίες τυριών χρειάζονται παραπάνω από 6 μήνες για να ωριμάσουν με αποτέλεσμα την ανάπτυξη προβιοτικών. Ορισμένες ποικιλίες τυριών έχουν ερευνηθεί ως φορείς προβιοτικών μικροοργανισμών συμπεριλαμβανομένων cheddar, (Mahalakshmi, R. And Murthy, 2000,), λευκά αλμυρά, κατσικίσιο, crescenza (Gobbetti, M., et al. 1998.), παραδοσιακό cottage, kariesh, cunestrato pugliese (Edward R. Farnworth, Ph.D., 2003).

1.3.4 Κεφίρ

Παρασκευάστηκε αρχικά στις βόρειες πλαγιές του Καυκάσου. Παραδοσιακά φτιάχνεται με προσθήκη κόκκων κεφίρ στο γάλα. Το τελικό προϊόν έχει αυξημένη οξύτητα, υψηλή συγκέντρωση σε πολυσακχαρίτες και διοξείδιο του άνθρακα. Σήμερα παρασκευάζεται και καταναλώνεται κυρίως στην Ανατολική Ευρώπη, από τη δράση βακτηριδίων γαλακτικού οξέος, ζυμομυκήτων. (Koroleva, N.S. 1988, IDF 1991) Αυτό το μίγμα μικροοργανισμών παράγει ένα γαλακτοκομικό προϊόν με μοναδικές ιδιότητες, από γάλα προβατίνας, αγελάδας, αιγών και βουβαλιού (Edward R. Farnworth, Ph.D., 2003).

1.3.5 Dahi

Ένα μεγάλο μέρος των γαλακτοκομικών προϊόντων αναπτύχθηκαν από νομαδικές εκτροφές βοοειδών στην Ασία. Σχεδόν κάθε πολιτισμός έχει αναπτύξει ζύμωση κάποιου τύπου γάλακτος. Dahi ονομάζεται το δημοφιλές ινδικό προϊόν ζύμωσης που παρασκευάζεται από το γάλα βουβαλιού, το οποίο είναι ανάλογο με το απλό γιαούρτι σε εμφάνιση και συνοχή. (Yegna Narayan Aiyar, A.K., 2003)

1.3.6 Kumys

Παρασκευάζεται από φοράδες και καταναλώνεται ευρέως σε όλη την Ανατολική Ευρώπη και στις ασιατικές περιοχές. Η ονομασία προέρχεται από την φυλή Kumane που ζούσαν κατά μήκος του ποταμού Kumanestis ασιατικές στέπες. (Koroleva, N.S.1988)

1.4 Κριτήρια επιλογής προβιοτικών μικροοργανισμών

Οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί επιλέγονται συχνά με εμπειρικό τρόπο και περιλαμβάνουν στελέχη που απομονώνονται από ζυμωμένα, παραδοσιακά τρόφιμα και από την εντερική μικροχλωρίδα του ανθρώπου . Η πλειοψηφία των προβιοτικών μικροοργανισμών που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή προϊόντων για ανθρώπινη κατανάλωση, αποτελείται από στελέχη βακτηρίων του γαλακτικού οξέος που ανήκουν στα γένη *Lactobacillus* και *Bifidobacterium* . Τα στελέχη των παραπάνω γενών αποτελούν μέλη της εντερικής μικροχλωρίδας του ανθρώπου και των ζώων, ενώ ταυτόχρονα χρησιμοποιούνται ως καλλιέργειες εκκίνησης ζυμωμένων τροφίμων, επιδεικνύοντας έτσι μακροχρόνιο ιστορικό αποδεδειγμένης ασφαλούς κατανάλωσης. Διαφορετικά είδη προβιοτικών μικροοργανισμών καθώς και διαφορετικά στελέχη του ίδιου είδους, έχουν χαρακτηριστικές ιδιότητες οι οποίες επηρεάζουν σημαντικά την επιβίωσή τους στα τρόφιμα, τις ζυμωτικές και προβιοτικές τους ιδιότητες (Klaenhammer, 2001). Η επιλογή των κατάλληλων κάθε φορά στελεχών έχει ιδιαίτερη σημασία τόσο για την συμπεριφορά της καλλιέργειας όσο και για την εκδήλωση των προβιοτικών ιδιοτήτων της . Ωστόσο, η επιλογή των προβιοτικών μικροοργανισμών γίνεται όχι μόνο από στελέχη των γενών *Lactobacillus* και *Bifidobacterium*, αλλά και από ένα ευρύ φάσμα βακτηρίων του γαλακτικού οξέος και άλλων μικροοργανισμών. Για το λόγο αυτό, έχουν θεσπισθεί βασικά κριτήρια δράσης και ασφάλειας καθώς και τεχνολογικά κριτήρια τα οποία θα πρέπει να πληροί ένας μικροοργανισμός, για να χαρακτηριστεί ως προβιοτικός :

1. Ταυτοποίηση στο επίπεδο του γένους, του είδους και του στελέχους με

φαινοτυπικές και γενοτυπικές μεθόδους. Η ασφαλής χρήση, οι ιδιότητες και η αποτελεσματικότητα των προβιοτικών μικροοργανισμών συνιστούν γνωρίσματα συγκεκριμένων μικροβιακών στελεχών (strain specific), γεγονός που καθιστά αναγκαία τη διάκριση τους σε επίπεδο στελέχους.

Δεδομένου ότι οι συμβατικές φαινοτυπικές μέθοδοι παρουσιάζουν περιορισμούς ως προς την ακρίβεια, την επαναληψιμότητα και τη διακριτική τους ικανότητα, η σύγχρονη ερευνητική δραστηριότητα προτείνει το συνδυασμό διαφορετικών τεχνικών (πολυφασική ταξινόμηση) για το χαρακτηρισμό των προβιοτικών στελεχών. Για το λόγο αυτό, εφαρμόζεται ένας συνδυασμός αξιόπιστων φαινοτυπικών και γενοτυπικών μεθόδων ταυτοποίησης που προσδίδει σταθερή και σαφή ονομασία-προσδιορισμό στα

στελέχη που επιλέγονται για προβιοτική χρήση. Για την ταυτοποίηση σε επίπεδο γένους και είδους χρησιμοποιούνται διεθνώς αναγνωρισμένες γενοτυπικές μέθοδοι, όπως ο DNA-DNA υβριδισμός και η ανάλυση γονιδίων ριβοσωμικού RNA. Για τη διάκριση των προβιοτικών σε επίπεδο στελέχους χρησιμοποιείται η τεχνική του τυχαία

ενισχυμένου πολυμορφικού DNA (RAPD)-PCR καθώς και η ηλεκτροφόρηση πηκτής (γέλης) παλλόμενου πεδίου (PFGE), που θεωρείται η πλέον αξιόπιστη μέθοδος.

2. Ανθρώπινη προέλευση. Οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί που έχουν απομονωθεί από τον πεπτικό σωλήνα υγιούς ανθρώπου θεωρούνται ασφαλέστεροι για κατανάλωση και ταυτόχρονα αποτελεσματικότεροι στην αποίκιση του γαστρεντερικού σωλήνα.

3. Ασφάλεια για τον άνθρωπο. Απουσία παθογόνου και τοξικής δράσης που αποδεικνύεται μέσω πειραματικών δοκιμών (π.χ. έλεγχος σχηματισμού βιογενών αμινών, έλεγχος ικανότητας συγκόλλησης αιμοπεταλίων) και εμπειρικών διαδικασιών (π.χ. ιστορικό απουσίας βλαβερής επίδρασης στην υγεία των καταναλωτών).

4. Επιβίωση κατά τη διάρκεια της διέλευσης στο γαστρεντερικό σύστημα. Η

ικανότητα επιβίωσης επιδεικνύεται από την ανθεκτικότητα των μικροοργανισμών στο γαστρικό οξύ (χαμηλό pH), στα χολικά άλατα και στα πεπτικά ένζυμα.

5. Θετική επίδραση στη μικροβιακή χλωρίδα του εντέρου. Χαρακτηριστικές ιδιότητες των μικροοργανισμών, όπως η ικανότητα προσκόλλησης, ο πολλαπλασιασμός στις συνθήκες του εντερικού σωλήνα και η παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών, αποτελούν ένδειξη της ικανότητας των προβιοτικών στελεχών να αλληλεπιδρούν με την εντερική μικροχλωρίδα.

6. Ανοσοτροποποιητική δράση. Προβιοτικοί μικροοργανισμοί που έχουν την ικανότητα να τροποποιούν αποκρίσεις του ενδογενούς και επίκτητου ανοσιακού συστήματος.

7. Τεχνολογικά χαρακτηριστικά που αφορούν στην επιβίωση και σταθερότητα της καλλιέργειας των προβιοτικών κατά τα στάδια παρασκευής και συντήρησης του προϊόντος καθώς και στη βελτίωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του.

Συνοπτικά :

Καταλληλότητα

-Ασφάλεια, μη τοξικότητα, η παθογένεια, γενικά αναγνωρισμένο ως ασφαλές (GRAS)

-Προέλευση από τη φυσιολογική μικροχλωρίδα του οργανισμού

Τεχνολογική καταλληλότητα

- Επαρκής ανάπτυξη

-Επιβίωση πληθυσμού (10⁷ έως 10⁹

cfu/g)

Συντήρηση των επιθυμητών χαρακτηριστικών κατά την προετομασία και τη συντήρηση της καλλιέργειας

- Επιθυμητά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά στα τρόφιμα
- Διατήρηση φαινοτυπικών ιδιοτήτων

Αντοχή

- Ικανότητα επιβίωσης, ανάπτυξης και μεταβολικής δραστηριότητας σε συνθήκες in vino
- Αντοχή στα χολικά άλατα
- Αντοχή σε χαμηλό pH και σε συνθήκες στομαχιού (γαστρικό υγρό)
- Ικανότητα ανταγωνισμού με τη φυσιολογική μικροχλωρίδα, ανθεκτικότητα στις βακτηριοσίνες καθώς και στις αντικροβιακές ουσίες που παράγονται από τη
 - μικροχλωρίδα του εντέρου
- Ακίνητοποίηση στο επιθήλιο του εντέρου

Επίδραση στην υγεία

- Ικανότητα έκφρασης μίας ή περισσότερων κλινικά αποδεδειγμένων ευεργετικών για την υγεία ιδιοτήτων
- Ανταγωνισμός στους παθογόνους μικροοργανισμούς
- Παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών
- Αντικαρκινικές - αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες

- Διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος και παραγωγή βιοενεργών ενώσεων.

Ιδιαίτερα σημαντικό για την αποτελεσματικότητα του προβιοτικού μικροοργανισμού είναι το πέρασμά του από τον γαστρεντερικό σωλήνα. Κι αυτό επειδή το περιβάλλον του στομάχου, με την παρουσία του γαστρικού υγρού σαν άμυνα του οργανισμού στους μικροοργανισμούς, είναι πιθανόν να αποκλείσει τη μεταφορά των ζωντανών κυττάρων στο έντερο. Η προστασία και η επιβίωση της καλλιέργειας επιτυγχάνεται ως ένα βαθμό με την προσθήκη τους σε γαλακτοκομικά προϊόντα και με τη προσθήκη παραγόντων που εμποδίζουν τη μείωση του pH.

Οι τεχνολογικές ιδιότητες των βακτηρίων παίζουν εξίσου σημαντικό ρόλο στην παραγωγή των προβιοτικών τροφίμων (Saarela et al., 2000). Στα πλαίσια αυτά πρέπει να προσδίδουν τα επιθυμητά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά στο προϊόν, ικανοποιητικούς ρυθμούς ζύμωσης, υψηλή βιωσιμότητα, τόσο κατά τις μεθόδους ξήρανσής τους, όπως είναι η λυοφιλίωση, όσο και κατά την παραγωγή των τροφίμων. Επίσης πρέπει να παρουσιάζουν σταθερότητα στη μακρόχρονη αποθήκευσή τους (Grajek et al., 2005). Τα κριτήρια επιλογής που εξετάζουν την αντοχή των μικροοργανισμών, την ακινητοποίησή τους στο έντερο, τις αντικαρκινικές ιδιότητες και τη διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος, είναι ιδιαίτερα σύνθετα επειδή οι μηχανισμοί με τους οποίους οι μικροοργανισμοί εκφράζουν τις συγκεκριμένες ιδιότητες δεν έχουν μελετηθεί επαρκώς. Έτσι, είναι δύσκολο τη συγκεκριμένη χρονική στιγμή να οριστούν οι χαρακτήρες των προβιοτικών μικροοργανισμών που συνδέονται με τα παραπάνω κριτήρια. Η μελέτη των μηχανισμών που συνδέουν τα χαρακτηριστικά των μικροοργανισμών σε συνθήκες *in vitro* με την λειτουργικότητά τους σε συνθήκες *in vivo*, αποτελεί τον κύριο μελλοντικό τομέα έρευνας για τους προβιοτικούς μικροοργανισμούς (MattilaC Sandholm et al., 2002; Olejnik et al., 2003; Lewandowska et al., 2005)

1.5 Μηχανισμοί δράσης προβιοτικών

Η ευεργετική επίδραση των προβιοτικών σχετίζεται, άμεσα ή έμμεσα, με το γαστρεντερικό σωλήνα του ανθρώπου. Το γεγονός αυτό δεν οφείλεται μόνο στο ότι οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί των τροφίμων ή των θεραπευτικών σκευασμάτων χορηγούνται μέσω της στοματικής οδού, αλλά και στο ότι οι μηχανισμοί δράσης και η αποτελεσματικότητά τους βασίζονται συχνά στις αλληλεπιδράσεις τους με την εντερική μικροχλωρίδα και τα ανοσο-ικανά κύτταρα του εντερικού βλεννογόνου του ξενιστή.

Πίνακας 1 Είδη βακτηρίων που χρησιμοποιούνται ως προβιοτικά , σύμφωνα με την ελεγκτική αρχή παραγωγών γάλακτος και γιαουρτιού της Ε.Ε.

Lactobacilli	Bifidobacteria	Διάφορα γένη Μικροοργανισμών
<i>L. acidophilus</i> (LA-5)	<i>B. longum</i> (BB536)	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>L. crispatus</i> (<i>L. acidophilus</i> Gilliland)	<i>B. longum</i> (SP 07/3)	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>L. johnsonii</i> (LA1)	<i>B. bifidum</i> (MF 20/5)	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>L. gasser</i> (PA 16/8)	<i>B. infantis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
<i>L. (para)casei</i> (<i>L. casei</i>) "shirota", <i>L. casei</i> "defensis"	<i>B. animalis</i> (<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> BB-12)	<i>Propionibacteria</i> Spores of <i>Bacillus cereus</i> "toyoi"
<i>L. rhamnosus</i> (LGG)	<i>B. adolescentis</i>	<i>E. coli</i> ** (<i>E. coli</i> "Nissle 1917")
<i>L. reuteri</i>	<i>B. breve</i>	<i>Sporolactobac. Inulinus</i>
<i>L. plantarum</i> (299 and 299v)		<i>Saccharomyces boulardii</i>

Δεδομένου ότι οι μηχανισμοί δράσης των προβιοτικών παρουσιάζουν ποικιλομορφία και πολυπλοκότητα, τα διαφορετικά στελέχη των προβιοτικών επιδεικνύουν διαφορετικό τρόπο δράσης, εξαρτώμενο από το είδος των μορίων που εκφράζονται στην επιφάνεια των κυττάρων τους (γλυκολιπίδια, MAMP) ή εκκρίνονται από αυτά. Ειδικότερα, σύμφωνα με πρόσφατα δεδομένα, θεωρείται ότι οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί επιδρούν ευεργετικά στην υγεία μέσω:

- 1) της ενίσχυσης της λειτουργίας του επιθηλιακού φραγμού
- 2) της ρύθμισης της σύστασης της εντερικής μικροχλωρίδας και
- 3) της ρύθμισης των αποκρίσεων του ενδογενούς και επίκτητου ανοσιακού συστήματος.

Συγκεκριμένα τα προβιοτικά τρόφιμα πρέπει να είναι ασφαλή και να περιλαμβάνουν τον κατάλληλο αριθμό προβιοτικών μικροοργανισμών σε επαρκή ποσότητα την στιγμή της κατανάλωσης. Τότε παρέχουν μια σειρά από οφέλη για την υγεία, κυρίως μέσω της διατήρησης της φυσιολογικής εντερικής μικροχλωρίδας και την προστασία έναντι γαστρεντερικών παθογόνων (D' Aimmò, Modesto, & Biavati, 2007, Lourens-Hattingh & Viljoen, 2001), της ενίσχυσης του ανοσοποιητικού συστήματος (Gilliland, 1990), την μείωση του επιπέδου της χοληστερόλης στον ορό και της αρτηριακής πίεσης (Rasic, 2003) , της αντι-καρκινογόνου δράσης (Rasic2003), της βελτίωσης της χρησιμοποίησης των θρεπτικών ουσιών και της διατροφικής αξίας των τροφίμων (Lourens-Hattingh & Viljoen, 2001), διατήρηση της υγείας της εντερικής

χλωρίδας, στη διέγερση του ανοσοποιητικού τη σύνθεση βιταμινών και αντιμικροβιακών παραγόντων, διευκόλυνση στη πέψη των πρωτεϊνών. (Rafter, J.2003).

Κάθε είδος προβιοτικών βακτηρίων έχει διαφορετικά οφέλη για την υγεία. (Lee, Nomoto, Salminen, & Gorbach, 1999). Η ποσότητα που χρειάζεται να λαμβάνεται καθημερινά εξαρτάται από το είδος του προβιοτικού. Θεωρείται ότι στόχος είναι η κατανάλωση 10⁶ – 10⁷ CFU/g προϊόντος ανά ημέρα, ώστε να επωφεληθεί ο ξενιστής από τις ευεργετικές του ιδιότητες. (Krasaekoort, W., Bhandari, B., Deeth, H. 2003) Οι Mann και Sproerry(1974) ανακάλυψαν ότι τα επίπεδα της χοληστερόλης στον ορό του αίματος μειώνονται σημαντικά από το γιαούρτι που έχει υποστεί ζύμωση με άγρια στελέχη του Lactobacillus. Ο Heese (1975) διαπίστωσε μειωμένα επίπεδα της χοληστερόλης του ορού με την κατανάλωση βρεφικής φόρμουλας που περιέχει κύτταρα του Lactobacillus acidophilus.

Υποτίθεται ότι αυτά τα οφέλη μπορεί να προκύψουν από την ανάπτυξη και την δράση των προβιοτικών κατά την παρασκευή των τροφίμων, ενώ μερικά μπορεί να προκύψουν από την ανάπτυξη και τη δράση ορισμένων ειδών των προβιοτικών στην εντερική οδό (Rasic, 2003). Ο Stanton το 2005, ανέφερε ότι τα οφέλη για την υγεία από τα λειτουργικά τρόφιμα που έχουν υποστεί ζύμωση είναι είτε λόγω της προβιοτικής δράσης (μέσω της αλληλεπίδρασης των ζωντανών μικροοργανισμών με τον ξενιστή), ή έμμεσα λόγω βιογενών αποτελεσμάτων ως συνέπεια της αφομοίωσης των μικροβιακών μεταβολιτών που παράγονται κατά τη διαδικασία της ζύμωσης.

1.5.1. Ενίσχυση της λειτουργίας του επιθηλιακού φραγμού

Τα κύτταρα του εντερικού επιθηλίου συνδέονται πολύ στενά μεταξύ τους και σχηματίζουν έναν πολύπλοκο φραγμό που ονομάζεται εντερικός βλεννογόσιος φραγμός. Ο φραγμός αυτός παρεμποδίζει την είσοδο προς τη συστηματική κυκλοφορία των παθογόνων μικροοργανισμών, απώλεια ή μεταβολή της λειτουργίας του συνδέονται με την εκδήλωση “νόσου”. Συγκεκριμένα στελέχη προβιοτικών μικροοργανισμών επηρεάζουν τη λειτουργία του μηχανικού επιθηλιακού φραγμού μέσω της εκδήλωσης ποικίλων μηχανισμών, που σχετίζονται με τον τύπο των μορίων που εκφράζονται στην επιφάνεια των κυττάρων τους ή εκκρίνονται από αυτά. Οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί φαίνεται ότι ενισχύουν την ακεραιότητα του μηχανικού φραγμού των επιθηλιακών κυττάρων του ξενιστή ή επάγουν την επιδιόρθωση βλαβών

σε αυτά. Οι μοριακοί μηχανισμοί της παραπάνω δράσης των προβιοτικών περιλαμβάνουν:

- α) την παρεμπόδιση της δράσης φλεγμονωδών κυτταροκινών που θα μπορούσαν να προκαλέσουν βλάβες στις στενές συνδέσεις μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων,
- β) την επαγωγή της παραγωγής βλεννινών,
- γ) την παραγωγή λιπαρών οξέων βραχείας αλύσου (SCFAs) και τέλος,
- δ) την παραγωγή προστατευτικών κυτταροκινών (IL-6) που αναστέλλουν την απόπτωση των επιθηλιακών κυττάρων.

1.5.2. Ρύθμιση της σύνθεσης της εντερικής μικροχλωρίδας

Η διατήρηση της ισορροπίας της εντερικής μικροχλωρίδας ως προς τη σύσταση και τη χωροταξική της κατανομή, αποτελεί ένα σημαντικό παράγοντα για την υγεία του ξενιστή. Διαταραχές της εντερικής μικροχλωρίδας, όπως η μείωση του αριθμού των ωφέλιμων και η επικράτηση των παθογόνων μικροοργανισμών, σχετίζονται με την

εκδήλωση παθογόνων καταστάσεων, όπως οι φλεγμονώδεις και οι λοιμώδεις ασθένειες του εντέρου. Τα προβιοτικά αναστέλλουν την ανάπτυξη και δράση των παθογόνων μικροοργανισμών και επάγουν τη διατήρηση της ισορροπίας στην εντερική

χλωρίδα μέσω μηχανισμών στους οποίους συμπεριλαμβάνονται :

1. Η απευθείας αντιμικροβιακή δράση μέσω της παραγωγής αντιβακτηριακών ουσιών, όπως οι βακτηριοσίνες και τα οξέα.
2. Ο ανταγωνιστικός αποκλεισμός λόγω συναγωνισμού για τις ίδιες θέσεις σύνδεσης στα επιθηλιακά κύτταρα.
3. Η αναστολή της έκφρασης των γονιδίων που είναι υπεύθυνα για λοιμογόνους παράγοντες των παθογόνων.

4. Η ενίσχυση των αντιμικροβιακών ανοσιακών αποκρίσεων του εντερικού βλεννογόνου με την επαγωγή της παραγωγής sIgA, φλεγμονωδών και ρυθμιστικών κυτταροκινών.

1.5.3. Ρύθμιση ανοσιακής απόκρισης

Οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί αλληλεπιδρούν με το ανοσιακό σύστημα του ξενιστή μέσω ποικίλων μοριακών και κυτταρικών μηχανισμών. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές τροποποιούν τις αποκρίσεις του ανοσιακού συστήματος του ξενιστή και ρυθμίζουν την ισορροπία μεταξύ των φλεγμονωδών και αντι-φλεγμονωδών αποκρίσεων του, επάγοντας την εντερική ομοιόσταση. Οι μηχανισμοί της ανοσοτροποποιητικής δράσης των προβιοτικών δεν έχουν διασαφηνιστεί πλήρως. Ωστόσο, ένας μεγάλος αριθμός δεδομένων από in vitro και in vivo δοκιμές δείχνει ότι επιδεικνύουν ειδικές δράσεις στα κύτταρα του ενδογενούς και επίκτητου ανοσιακού συστήματος, όπως τα μακροφάγα, τα NK, τα δενδριτικά κύτταρα και τα T-ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα.

Ειδικότερα, όσον αφορά την επίδραση τους στα μακροφάγα, στελέχη προβιοτικών βακτηρίων αυξάνουν την φαγοκυτταρική τους ικανότητα ή επάγουν την παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου και φλεγμονωδών κυτταροκινών από αυτά, ενισχύοντας έτσι την αντική τους δράση. Συγκεκριμένοι προβιοτικοί μικροοργανισμοί επάγουν επίσης την ενεργοποίηση των NK στον άνθρωπο ή επιδρούν στη λειτουργία των δενδριτικών κυττάρων, είτε άμεσα μετά τη σύνδεσή τους σε αυτά είτε έμμεσα μέσω της παραγωγής κυτταροκινών από τα επιθηλιακά κύτταρα.

Η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ των ωφέλιμων και παθογόνων μικροοργανισμών καθώς και η απώλεια των μικροβίων της εντερικής χλωρίδας που προάγουν τη διαφοροποίηση των T-ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων μπορεί να οδηγήσει σε υπέρμετρη ανοσιακή απόκριση τύπου Th1 ή Th2 και στην εκδήλωση αυτοάνοσων νοσημάτων, φλεγμονωδών διαταραχών του εντέρου και αλλεργιών. Οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί είναι ικανοί να ρυθμίζουν τη λεπτή ισορροπία ανάμεσα στην απαραίτητη και υπερβολική απόκριση του ανοσιακού συστήματος τόσο τοπικά στους

βλεννογόνους του γαστρεντερικού, αναπνευστικού και ουρογεννητικού συστήματος, όσο και συστηματικά . Ο μηχανισμός της ρύθμισης βασίζεται στην αλληλεπίδραση των προβιοτικών με τους διαφορετικούς πληθυσμούς των δενδριτικών κυττάρων, τα οποία ελέγχουν άμεσα μέσω της παρουσίας των αντιγόνων στα T- λεμφοκύτταρα ή έμμεσα μέσω των κυτταροκίνων που παράγουν, τη διαφοροποίηση και ενεργοποίηση των T-ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων. Τα T-ρυθμιστικά κύτταρα με τη σειρά τους ρυθμίζουν, κυρίως μέσω της παραγωγής IL-10 και TGF-β, τις Th1 και Th2, ανοσοαποκρίσεις. Συνεπώς, στην περίπτωση των μικροβιακών επιμολύνσεων οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί ενισχύουν την Th1 ανοσοαπόκριση που σχετίζεται με την απελευθέρωση των φλεγμονωδών κυτταροκινών την αυξημένη φαγοκυτταρική ικανότητα και την ενεργοποίηση των NK κυττάρων. Επιπρόσθετα, στελέχη

προβιοτικών μικροοργανισμών επάγουν την παραγωγή αντι-φλεγμονωδών κυτταροκινών (IL-10, TGF-β) που καταστέλλουν την Th2 ανοσιακή απόκριση, η οποία σχετίζεται με αλλεργικές αντιδράσεις .

Οι έρευνες που αφορούν στους προβιοτικούς μικροοργανισμούς αποκαλύπτουν ότι αυτά επιδρούν σε ένα ευρύ φάσμα των λειτουργιών του ανοσιακού συστήματος μέσω ποικίλων μηχανισμών. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η δράση συγκεκριμένων στελεχών προβιοτικών πιθανά να οφείλεται όχι μόνο σε έναν, αλλά σε συνδυασμό διαφορετικών μηχανισμών.

1.6 Προβιοτικοί μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται στο εμπόριο

Αν και μια ευρεία ποικιλία από διάφορα είδη μικροοργανισμών θεωρούνται ως πιθανοί προβιοτικοί (Holzapfel, Haberer, Snel, Schillinger, & Huisin't Veld, 1998 Shah & Ravula, 2004) εκείνοι που χρησιμοποιούνται στα προβιοτικά τρόφιμα είναι κυρίως βακτηρίδια από την γένη Lactobacillus και Bifidobacterium. Ο κύριος λόγος είναι τόσο για την μακρά ιστορία ασφαλούς χρήσης τους κι επειδή τα μικρόβια του γένους Lactobacillus είναι κυρίαρχοι μικροοργανισμοί στο λεπτό έντερο και του γένους Bifidobacterium κυρίαρχοι στο παχύ έντερο.

1.7 Είδη μικροοργανισμών που χρησιμοποιούνται ως προβιοτικά (Shortt, 1999).

Οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί είναι συνήθως ανθρώπινης προέλευσης και δεν είναι παθογόνοι. Είναι απαραίτητο να διατηρούν τη ζωτικότητα τους κατά τη διάρκεια των τεχνολογικών διεργασιών που υφίσταται το τρόφιμο αλλά και κατά τη διάρκεια της

διέλευσής τους από το γαστρεντερικό σωλήνα. Επίσης, είναι επιθυμητή η ακινητοποίησή τους στο επιθήλιο του εντέρου, η ανταγωνιστική δράση έναντι των παθογόνων μικροοργανισμών καθώς και η ανθεκτικότητά τους σε αντιβιοτικές ουσίες. Οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί διατηρούνται ζωντανοί όταν βρίσκονται σε λυοφιλιωμένη μορφή καθώς και όταν εμβολιάζονται σε ζυμωμένα γαλακτοκομικά προϊόντα. Η περισσότερο αποδεκτή μορφή χορήγησης των προβιοτικών μικροοργανισμών από τους καταναλωτές είναι αυτοί να περιέχονται σε ζυμωμένα τρόφιμα και αναψυκτικά, όπως ζυμωμένα προϊόντα γάλακτος (Lee and Salminen, 1995). Εκτός των γαλακτοκομικών προϊόντων, εξετάζεται η προσθήκη προβιοτικών μικροοργανισμών σε τρόφιμα που δεν περιέχουν γάλα, όπως ειδικές τροφές για βρέφη, παιδικές τροφές, χυμοί φρούτων που έχουν υποστεί ζύμωση, ζυμωμένα προϊόντα σόγιας και προϊόντα με βάση τα δημητριακά, όπως ζυμωμένα προϊόντα βρώμης. Σήμερα, τα προβιοτικά προϊόντα διευρύνουν διαρκώς το μερίδιό τους στην αγορά, κυρίως στις ανεπτυγμένες χώρες της Ευρώπης, της Ιαπωνίας, της Αυστραλίας και της Αμερικής. Στην Ευρώπη, ο τομέας των γαλακτοκομικών καταλαμβάνει το μεγαλύτερο μέρος στην αγορά των προβιοτικών. Τα προϊόντα με τη μεγαλύτερη κατανάλωση είναι τα προβιοτικά γιαούρτια και τα προϊόντα γάλακτος που έχουν υποστεί ζύμωση. Μερικά από τα προβιοτικά τρόφιμα περιέχουν επιπλέον βιοενεργά συστατικά όπως φυτικές στανόλες και στερόλες που μειώνουν τα επίπεδα της χοληστερόλης (Hilliam, 1998).

1.8 Ασφάλεια των προβιοτικών

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB) παρουσιάζουν μια μακρόχρονη ιστορία ασφαλούς χρήσης αφού καταναλώνονται καθημερινά από τότε που οι άνθρωποι άρχισαν να χρησιμοποιούν το ζυμωμένο γάλα ως τρόφιμο. Ωστόσο η έννοια της ασφάλειας με τα σημερινά δεδομένα είναι περισσότερο πολύπλοκη. Έτσι, η ασφάλεια τους μελετήθηκε σε διάφορες κλινικές μελέτες, οι οποίες γενικά δεν έδειξαν επιβλαβείς επιδράσεις από λακτοβάκιλλους και *Bifidobacteria*. Στελέχη λακτοβακίλλων έχουν χορηγηθεί κατά τη διάρκεια κλινικών μελετών σε βρέφη, σε παιδιά με αλλεργία, σε υγιή παιδιά και σε ηλικιωμένα άτομα, χωρίς ποτέ να αναφερθούν παρενέργειες.

Σύμφωνα με τους Salminen et al., κάθε νέο προβιοτικό σκέυασμα πρέπει να πληροί τα ακόλουθα:

(1) Ο παραγωγός που βγάζει το προϊόν στο εμπόριο να έχει την απόλυτη ευθύνη για την ασφάλεια. Τα προβιοτικά τρόφιμα θα πρέπει να είναι τόσο ασφαλή όσο και τα υπόλοιπα τρόφιμα.

(2) Όταν το προβιοτικό τρόφιμο είναι νέας σύνθεσης, πρωτοεμφανιζόμενο στην αγορά,

θα πρέπει να λάβει την κατάλληλη νομοθετική έγκριση (κατευθυντήρια οδηγία της Ευρωπαϊκής Ένωσης για τα νεοφανή τρόφιμα).

(3) Όταν ένα στέλεχος παρουσιάζει μακροχρόνια ιστορία ασφαλούς χρήσης, θα είναι ασφαλές και ως προβιοτικό στέλεχος και δε θα θεωρηθεί ως νεοφανές τρόφιμο.

(4) Η καλύτερη δοκιμή για την ασφάλεια, είναι μια καλά τεκμηριωμένη πορεία ασφαλούς χρήσης - κατανάλωσης από τον άνθρωπο. Συνεπώς, όταν ένα στέλεχος ανήκει σε ένα είδος για το οποίο δεν έχει αναφερθεί ότι είναι παθογόνο, και για το οποίο άλλα στελέχη εμφανίζονται στην ιστορία ως ασφαλή, τότε πιθανόν το στέλεχος αυτό να είναι ασφαλές ως προβιοτικό στέλεχος και δε θα θεωρηθεί ως νεοφανές τρόφιμο.

(5) Όταν ένα στέλεχος ανήκει σε ένα είδος για το οποίο δεν έχουν αναφερθεί παθογόνα στελέχη αλλά δεν αναφέρεται στην ιστορία ως ασφαλές, μπορεί να είναι ασφαλές ως προβιοτικό στέλεχος αλλά θα πρέπει να θεωρηθεί νεοφανές τρόφιμο, και συνεπώς θα πρέπει να υποβληθεί στην αντίστοιχη αξιολόγηση.

(6) Όταν ένα νέο στέλεχος ανήκει σε ένα είδος το οποίο είναι γνωστό ότι περιέχει παθογόνα στελέχη, θα θεωρηθεί ως νεοφανές τρόφιμο.

(7) Για να περιγραφεί ένα προβιοτικό στέλεχος απαιτείται υψηλότατο επίπεδο ταξινόμησης. Σήμερα αυτό περιλαμβάνει υβριδισμό DNA-DNA και προσδιορισμό της αλληλουχίας του rRNA.

(8) Σε σχέση με την παράγραφο (1) στελέχη τα οποία μεταφέρουν μεταδιδόμενα γένη με αντιβιοτική αντίσταση, δηλαδή γένη με κωδικοποιημένες πρωτεΐνες οι οποίες απενεργοποιούν τα αντιβιοτικά, δεν θα πρέπει να κυκλοφορούν στο εμπόριο.

(9) Στελέχη τα οποία δεν έχουν ταξινομηθεί κανονικά, όπως δηλαδή περιγράφεται με βάση τις προσεγγίσεις που αναφέρονται μετά την παράγραφο (I), δε θα πρέπει να κυκλοφορούν στο εμπόριο. Τα στελέχη θα πρέπει να βρίσκονται αποθηκευμένα σε μια

διεθνώς αναγνωρισμένη συλλογή καλλιεργειών.

Τέλος, είναι άστοχο να επιτρέπεται η χρήση του όρου προβιοτικά, χωρίς την υπαρξη κατάλληλης κλινικής τεκμηρίωσης. Παρομοίως, είναι μη λειτουργικό για τα προϊόντα να μην έχουν τον κατάλληλο αριθμό ζώντων κυττάρων ως το τέλος της διάρκειας ζωής τους. Καθώς νέα προβιοτικά κάνουν την εμφάνισή τους, παράλληλα με γενετικά τροποποιημένους οργανισμούς (GMOs), και τα οποία προορίζονται για τη θεραπεία συγκεκριμένων ασθενειών, θα πρέπει να παρακολουθηθεί η πορεία τους για μεγάλο χρονικό διάστημα προκειμένου να διασφαλιστεί η ασφάλειά τους και στην περίπτωση των GMOs να έχουν το κατάλληλο περιβαλλοντικό περιεχόμενο. Θα πρέπει να διεξαχθούν περισσότερες κλινικές μελέτες, στις οποίες κατά προτίμηση θα πρέπει να γίνεται σύγκριση ενός προβιοτικού προϊόντος σε σχέση με ένα άλλο ή κατά το πρότυπο μιας συγκεκριμένης ιατρικής εφαρμογής. Με τον τρόπο αυτό θα προσδιοριστούν οι δυνατότητες αλλά και οι περιορισμοί των προβιοτικών .

1.9 Παρενέργειες, κίνδυνοι και μειονεκτήματα της χρήσης προβιοτικών

Γενικά μεταξύ των υγιών πληθυσμών, η κατανάλωση Bifidobacteria, λακτοβακίλλων και άλλων παραγόντων που χρησιμοποιούνται στα ζυμούμενα γαλακτοκομικά προϊόντα γίνεται χωρίς να υπάρχουν παρενέργειες. Μέχρι σήμερα, οι υπάρχουσες κλινικές μελέτες δεν οδήγησαν σε αποδείξεις κινδύνου καμιάς από αυτές τις περιπτώσεις. Όμως, ασθένειες με *S. bouardii* και *S. cerevisiae* φαίνεται ότι προκύπτουν σε ασθενείς με υποκείμενες διαταραχές. Ο *S. bouardii* έχει απομονωθεί από το αίμα τουλάχιστον δύο ασθενών .

Εδώ θα πρέπει να αναφερθεί ότι: (α) Όλες οι περιπτώσεις επιμόλυνσης με προβιοτικά που έχουν αναφερθεί μέχρι σήμερα παρατηρήθηκαν σε άτομα με υποκείμενες νόσους, κυρίως μηχανικές καρδιακές βαλβίδες για τις ενδοκαρδίτιδες και συνθήκες ανοσοκαταστολής σε άλλες περιπτώσεις.

(β) Δεν έχει παρατηρηθεί καμία περίπτωση επιμόλυνσης με προβιοτικά σε κατά τα άλλα υγιή άτομα ή έγκυες γυναίκες.

1.10 Θετικές επιδράσεις των προβιοτικών μικροοργανισμών

Ο ρόλος της εντερικής μικροχλωρίδας στην υγεία και την ανοχή στις ασθένειες είναι ιδιαίτερα σημαντικός. Κλινικές μελέτες με καλλιέργειες που έχουν εξεταστεί κατ'επανάληψη, έδωσαν αποτελέσματα που στηρίζουν την άποψη ότι οι προβιοτικοί 19 μικροοργανισμοί έχουν θετική επίδραση στη χλωρίδα του εντέρου, καθώς και ότι προσφέρουν προστασία έναντι των γαστρεντερικών λοιμώξεων και των φλεγμονών του εντέρου. Όμως, οι ευεργετικές επιδράσεις των προβιοτικών συχνά αμφισβητούνται, αν και ένα πλήθος κλινικών μελετών με τη χρήση συγκεκριμένων προβιοτικών μικροοργανισμών, αποδεικνύει αρκετές από αυτές (Shahani and Chandan, 1979; Oksanen et al., 1990; Siitonen et al., 1990; Isolauri et al., 1991; Nanji et al., 1994; Majamaa and Isolauri, 1997; Dunne et al., 1999; Lee et al., 2008). Για την εμφάνιση του ευεργετικού αποτελέσματος απαιτείται συγκεκριμένος αριθμός κυττάρων του προβιοτικού μικροοργανισμού. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, για την καθημερινή κατανάλωση προβιοτικών μικροοργανισμών ο προτεινόμενος αριθμός είναι 10^8 έως 10^9 κύτταρα/mL ή και 10^9 έως 10^{10} κύτταρα/mL όταν αναμένονται σημαντικές απώλειες ύστερα από την παραμονή στο περιβάλλον του στομάχου (Sanders and Huis in't Veld, 1999). Οι καλλιέργειες που περιέχουν προβιοτικούς μικροοργανισμούς επιδρούν τόσο στη μικροχλωρίδα όσο και στις μεταβολικές και ενζυμικές δραστηριότητες των παθογόνων μικροοργανισμών. Οι αλλαγές στη μικροχλωρίδα έχουν σχέση με τη μείωση της παραγωγής των προκαρκινικών ενζύμων καθώς και των καρκινογόνων ουσιών από τους μικροοργανισμούς του γαστρεντερικού σωλήνα. Επιπρόσθετα, οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί με την ακινητοποίηση στο επιθήλιο του εντέρου, τα κυτταρικά τους συστατικά και την επίδραση στη μικροχλωρίδα του εντέρου, βελτιώνουν τη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος στο γαστρεντερικό σωλήνα.

Το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού (*Helicobacter pylori*) εγκαθίσταται στο επιθήλιο του στομάχου και προκαλεί γαστρικές διαταραχές όπως γαστρίτιδα, έλκος και σε ορισμένες περιπτώσεις καρκινώματα (Gibson, 1998). Συγκεκριμένοι προβιοτικοί μικροοργανισμοί περιορίζουν τη δράση του ελικοβακτηριδίου του πυλωρού με την παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών. Αυτό συμβαίνει με τον ανταγωνισμό με το ελικοβακτηρίδιο και την ακινητοποίησή τους στο επιθήλιο του στομάχου. Σύμφωνα με τους Oh et al. (2002), συμβιωτική καλλιέργεια λακτοβακίλλων και ζυμών είχε θανατηφόρο αποτέλεσμα έναντι του *H. pylori*, όταν η καλλιέργεια εμβολιάστηκε σε αγελαδινό γάλα και σε άλλα υποστρώματα. Σύμφωνα με τους Salminen et al. (1998),

οι θετικές επιδράσεις των προβιοτικών μικροοργανισμών, η ακρίβεια των οποίων στηρίζεται σε τουλάχιστον δύο επιστημονικές εργασίες που έγιναν με αντικείμενο τον άνθρωπο, είναι η ανακούφιση των συμπτωμάτων της δυσανεξίας στη λακτόζη, ο περιορισμός της ενζυμικής δραστηριότητας των μη ωφέλιμων μικροοργανισμών του γαστρεντερικού σωλήνα και η ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος. Οι δοκιμές *in vitro* είναι ιδιαίτερα χρήσιμες για τη μελέτη

των υποψήφιων μικροοργανισμών για προβιοτική χρήση καθώς και για την κατανόηση των μηχανισμών των προβιοτικών δράσεων. Όμως, οι δοκιμές αυτές δεν επαρκούν για να γίνει πρόβλεψη της λειτουργικότητας του μικροοργανισμού στον ανθρώπινο οργανισμό (FAO/WHO, 2002).

Ιδιαίτερα σημαντική είναι η επίδραση των προβιοτικών μικροοργανισμών στον έλεγχο των λοιμώξεων του ουροποιητικού και του γεννητικού συστήματος από παθογόνους μικροοργανισμούς όπως *Candida*, *Trichomonas*, *Mycoplasma*, *Chlamydia* και *E. coli*. Ένα επιπλέον πλεονέκτημα για τη χρήση των προβιοτικών μικροοργανισμών στην πρόληψη αυτού του είδους των λοιμώξεων, είναι η απουσία εμφάνισης παρενεργειών από τη χορήγηση, καθώς και η πιθανή χρήση των μικροοργανισμών ως πρόσθετο σε συγκεκριμένα τρόφιμα (Rowland, 1999). Επιπλέον, προβιοτικοί μικροοργανισμοί επιδρούν προληπτικά και θεραπευτικά στη διάρροια (Rowland, 1999). Η δράση των προβιοτικών μικροοργανισμών έναντι της διάρροιας αποτελεί την πιο μελετημένη επίδραση στην υγεία που έγινε με κλινικές δοκιμές σε ανθρώπους. Προβιοτικοί μικροοργανισμοί όπως ο *L. rhamnosus* και ο *S. Boulardii* δρουν τόσο στην κοινή διάρροια, που προέρχεται από τη χρήση αντιβιοτικών και η οποία προκαλείται από διατάραξη της ισορροπίας της φυσιολογικής χλωρίδας του εντέρου, όσο και έναντι της διάρροιας που προκαλείται όταν το άτομο έχει μολυνθεί από παθογόνους μικροοργανισμούς (Elmer, 2001). Επίσης, η χρήση των προβιοτικών βοηθά στην πρόληψη της διάρροιας που εμφανίζεται σε παιδιά των αναπτυσσόμενων χωρών που δεν τρέφονται επαρκώς, αλλά και στην οξεία διάρροια προκαλώντας μείωση του χρόνου των διαρροϊκών επεισοδίων (Oberhelman et al., 1999).

Προβιοτικοί μικροοργανισμοί χρησιμοποιήθηκαν στη διατροφή των ζώων ως ενισχυτές ανάπτυξης, αντικαθιστώντας έτσι τις αντιβιοτικές ουσίες στο σιτηρέσιο των ζώων (Fuller, 1989). Η προσθήκη μικροοργανισμών στην τροφή των ζώων, όπως είναι τα στελέχη του γένους *Lactobacillus*, είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της ημερήσιας απόκτησης βάρους καθώς και τη βελτίωση του μεταβολισμού των συστατικών της τροφής (Baird, 1977). Στη διατροφή των ζώων, εκτός των στελεχών του είδους *Lactobacillus*, χρησιμοποιήθηκαν και στελέχη των ειδών *Saccharomyces* καθώς και *Clostridium* ως συμπληρώματα με προβιοτικές ιδιότητες. Τα βακτηριακά προβιοτικά πρόσθετα διατροφής είναι αποτελεσματικά σε πουλερικά, χοίρους και νεαρά βοοειδή, ενώ τα προβιοτικά πρόσθετα διατροφής που περιέχουν μύκητες έχουν καλύτερα αποτελέσματα σε ενήλικα μηρυκαστικά. Η έρευνα στον τομέα των προβιοτικών μικροοργανισμών συνεχίζεται και σύμφωνα με πρόσφατη μελέτη (Owehand et al., 2003) διερευνάται η χρήση των προβιοτικών μικροοργανισμών στο

δέρμα για την ανταγωνιστική απομάκρυνση διάφορων παθογόνων μικροοργανισμών που προσβάλλουν το δέρμα όπως είναι ο *S. aureus*, η *C. albicans* και ο *Malassezia furfur*.

1.11 Γαστρεντερικό σύστημα

Το γαστρεντερικό σύστημα είναι ένα από τα βασικότερα ανατομικά συστήματα του οργανισμού, τόσο του ανθρώπου όσο και των ζώων. Βασικός του ρόλος είναι η δίοδος, πέψη, χρήση και αποβολή της τροφής.

1.12 Τα τμήματα του γαστρεντερικού συστήματος

Στον άνθρωπο ξεκινά ουσιαστικά από το στόμα και καταλήγει στον πρωκτό. Περιλαμβάνει τα εξής τμήματα:

Στοματική κοιλότητα

Φάρυγγας

Οισοφάγος

Στόμαχος

Δωδεκαδάκτυλο (ενίοτε συμπεριλαμβάνεται στο λεπτό έντερο)

Λεπτό και Παχύ Έντερο

Στο γαστρεντερικό σύστημα τοποθετούνται και τα ακόλουθα όργανα (κυρίως διότι βρίσκονται στην κοιλία):

Σκωληκοειδής απόφυση

Ήπα

Χοληφόρο σύστημα

Πάγκρεας

Σπλήνας

Με τον όρο γαστρεντερικός σωλήνας ή πεπτικός σωλήνας εννοούμε το στομάχι, το λεπτό και το παχύ έντερο (ενίοτε και τον οισοφάγο).

Λειτουργία του γαστρεντερικού συστήματος

Η προετοιμασία

Η λειτουργία του γαστρεντερικού συστήματος ξεκινά λίγο πριν τη πρόσληψη τροφής. Όταν ο εγκέφαλος σχεδιάζει να φάει ο οργανισμός στο άμεσο μέλλον το γαστρεντερικό σύστημα ετοιμάζεται, οι αδένες προετοιμάζουν τις εκκρίσεις τους, ενώ οι σιελογόνοι τις αρχίζουν. Αφού η τροφή εξασφαλιστεί μπροστά στον οργανισμό εισέρχεται στο στόμα με δαγκωνιές, εκτός από τον άνθρωπο. Εκεί τα μπροστινά δόντια αποσπούν από την τροφή ένα κομμάτι ενώ τα πίσω τη συνθλίβουν με περιοδικές κινήσεις. Ταυτόχρονα, η τροφή αναδεύεται με το σάλιο που εκκρίνεται από τους σιελογόνους αδένες. Το σάλιο σκοτώνει μερικά μικρόβια, ξεκινά τη διαδικασία της πέψης μερικών βασικών συστατικών, διαδικασία η οποία συμμετέχει και στην αίσθηση της γεύσης, και λιπαίνει την τροφή για κατάποση. Η γεύση ταυτοποιεί τις θρεπτικές ουσίες και στέλνει τις πληροφορίες κατευθείαν στο στομάχι, του οποίου το νευρικό σύστημα ρυθμίζει κατάλληλα με ποιον τρόπο θα επεξεργαστεί την τροφή. Μία άλλη λειτουργία είναι ο έλεγχος της καταλληλότητας της τροφής, η οποία αν είναι επικίνδυνη ή μπαγιάτικη αποβάλλεται με συσπάσεις της γλώσσας και αν χρειαστεί του στομάχου. Με το μάσημα η τροφή παίρνει μορφή κατάλληλη για κατάποση, συμπαγής, μαλακή και ρευστή.

Η κατάποση

Ακολουθεί η κατάποση, η γλώσσα σπρώχνει τη μασημένη τροφή προς τα ενδότερα. Η μασημένη τροφή διοχετεύεται στον οισοφάγο. Στον άνθρωπο λόγω της ανατομίας του λαιμού του το στόμα οδηγεί στον οισοφάγο και στην τραχεία. Η επιγλωττίδα αναλαμβάνει να φράξει την τραχεία αποτρέποντας να οδηγηθεί εκεί η τροφή η οποία θα έπνιγε τον άνθρωπο. Αυτός είναι ο λόγος που συστήνεται να μη μιλάμε όταν τρώμε. Αν η τροφή έχει επεξεργαστεί σωστά θα κατέβει ομαλά στο στομάχι. Η διαδικασία της κατάποσης υποβοηθάται από μυϊκές συσπάσεις του οισοφάγου, είναι δυνατό ένας άνθρωπος να καταπιεί ανάποδα.

Στο στομάχι

Μετά από αυτό η τροφή φτάνει στο στομάχι και περνά από μια λεπτή μεμβράνη. Αυτή η μεμβράνη είναι υπεύθυνη για τη ροή του στομαχικού υγρού εκτός του στομαχίου προς τον οισοφάγο. Η μη φυσιολογική λειτουργία της μπορεί να οδηγήσει σε καούρες, ενώ αποδυναμώνεται με το κάπνισμα. Επιτρέπει τη ροή προς τον οισοφάγο στα ρεψίματα, δηλαδή απελευθέρωση αερίων που δημιουργήθηκαν κατά την πέψη στο στομάχι, και στον εμετό που συμβαίνει όταν το στομάχι κρίνει την τροφή αχώνευτη ή επικίνδυνη για την υγεία. Σε μερικά θηλαστικά η ροή της τροφής στον οισοφάγο επιτρέπεται και ανάποδα για αναμάσηση, η τροφή αποθηκεύεται σχεδόν αμάσητη στο στομάχι και όταν ο οργανισμός μπορεί να ασχοληθεί με τη σύνθλιψη της την επαναφέρει στο στόμα για περαιτέρω μάσηση, όπως στην αγελάδα.

Το στομάχι διασπά την τροφή μηχανικά και χημικά και την αποθηκεύει, δεδομένου ότι η χώνευση είναι πιο αργή και πιο ομαλή από άποψη ταχύτητας διαδικασία από την κατανάλωση τροφής. Στο στομάχι εκκρίνεται υδροχλωρικό οξύ, ένα πολύ δραστικό

οξύ που σκοτώνει όλα σχεδόν τα μικρόβια και πάρα πολλά κύτταρα του ίδιου του στομαχιού. Υπολογίζεται ότι περίπου 100000 κύτταρα την ημέρα πεθαίνουν στα εσωτερικά τοιχώματα του στομαχιού, ενώ δημιουργούνται άλλα τόσα για να τα αναπληρώσουν. Εκτός από το οξύ εκκρίνονται και πολλές άλλες ουσίες που συμβάλλουν συνολικά στη διάσπαση μερικών μακρομορίων. Ταυτόχρονα, το στομάχι συσπάται ασυνείδητα αναδεύοντας το στομαχικό υγρό και συμβάλλοντας στην περαιτέρω διάσπασης της τροφής, ώστε να γίνει σχεδόν υγρή. Η διαδικασία που θα ακολουθήσει το στομάχι (εκκρίσεις που θα γίνουν, ρυθμός συσπάσεων και άλλα) εξαρτώνται από την τροφή που καταναλώθηκε, σκοπός είναι η μέγιστη δυνατή απορρόφηση θρεπτικών ουσιών.

Στο έντερο

Αργότερα, η τροφή περνάει στο δωδεκαδάκτυλο, μέσω του σφιγκτήρα του πυλωρού. Καθώς διέρχεται από το δωδεκαδάκτυλο στο ρευστό εκκρίνονται η χολή και παγκρεατικά πεπτικά υγρά, τα οποία διασπών σε όσο το δυνατόν απλούστερες τις θρεπτικές ουσίες. Ακολουθεί το υπόλοιπο λεπτό έντερο. Η τροφή πλέον διασπασμένη διυλίζεται μέσα από τις πτυχώσεις του εντέρου τις λάχνες, και από εκεί περνάει στην πυλαία φλέβα. Ταυτόχρονα, στο έντερο υπάρχουν πολλά μικρόβια, τα οποία συμβιούν φυσιολογικά μέσα στο έντερο. Αυτά τα μικρόβια ελέγχονται από το ανοσοποιητικό σύστημα, ώστε να μην κινδυνεύσει ο οργανισμός. Ο ρόλος τους είναι να συνθέτουν θρεπτικές ουσίες που δε μπορεί ο οργανισμός, όπως η ερσέχια κόλλι η οποία παράγει τη βιταμίνη B12 στο ανθρώπινο έντερο, και να ανταγωνίζονται άλλους βλαβερούς οργανισμούς για τους οποίους ο οργανισμός δε μπορεί να αμυνθεί τόσο αποτελεσματικά. Η απορρόφηση της τροφής γίνεται σταδιακά κατά μήκος του εντέρου, περίπου εφτά μέτρα.

Οι ουσίες που μεταπήδησαν στην πυλαία φλέβα οδηγούνται κατευθείαν στο συκώτι, το οποίο ρυθμίζει την ποσότητα των θρεπτικών ουσιών στο αίμα, άρα και σε ολόκληρο τον οργανισμό. Για παράδειγμα ρυθμίζει τη γλυκόζη στο αίμα. Αποθηκεύει τις θρεπτικές ουσίες, τις επεξεργάζεται για να παράξει άλλες θρεπτικές ουσίες ή άλλες ορμόνες και εκκρίσεις, και αποθηκεύει κάποιες άλλες. Με αυτόν τον τρόπο το συκώτι συμβάλλει στη χημική ισορροπία του αίματος και γενικά του οργανισμού.

Ό,τι δε χωνεύεται στο λεπτό έντερο μεταπηδά στο παχύ με την ειλεοκολπική βαλβίδα. Στο παχύ έντερο γίνεται η απορρόφηση υγρών, όπως του νερού. Επιπλέον, το παχύ έντερο φιλοξενεί και αυτό πολλά μικρόβια. Τελικά, αυτά που μένουν στερεοποιούνται, γίνονται κόπρανα και οδηγούνται στο κόλον, όπου αποβάλλονται κατά βούλησιν. Είναι πιθανό σε ορισμένες περιπτώσεις να παραχθούν αέρια, κυρίως

από τα μικρόβια τα οποία αποβάλλονται και αυτά. Μαζί με τα κόπρανα αποβάλλονται και πολλά μικρόβια του εντέρου.

Το αποτέλεσμα

Τελικά, το σύστημα εξασφαλίζει στον οργανισμό από την τροφή του θρεπτικές ουσίες για αρκετό καιρό προκειμένου να ικανοποιήσει τις ανάγκες του. Ο μεταβολισμός δεν ολοκληρώνεται με το πεπτικό σύστημα, αλλά συνεχίζεται στο κάθε κύτταρο του οργανισμού με τη διαδικασία του καταβολισμού.

Συμπερασματικά :

Το γαστρεντερικό σύστημα αποτελεί ένα από τα πλέον βασικότερα και πολύπλοκα ανατομικά συστήματα του ανθρώπινου οργανισμού. Βασικός του ρόλος είναι η διόδος, 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.

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

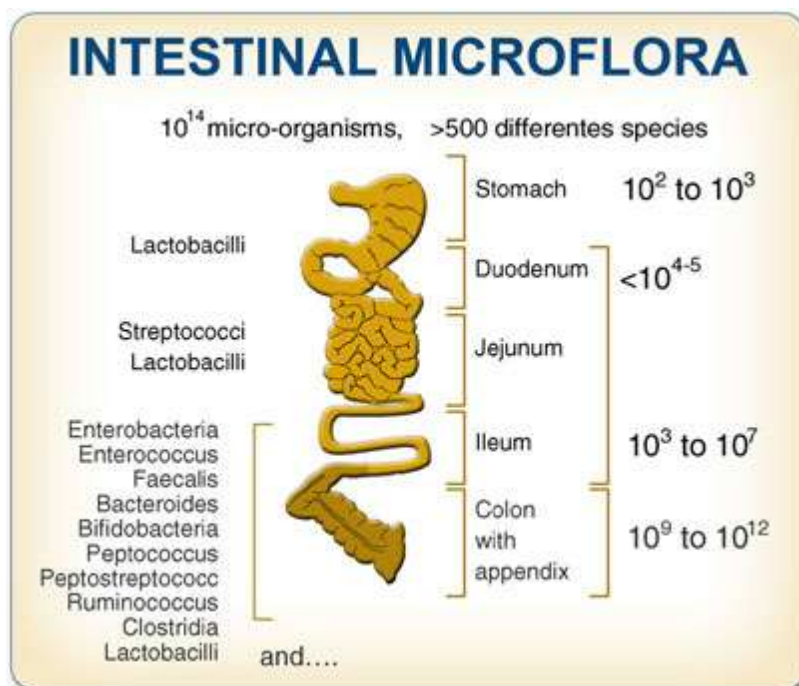
φυσιολογία τους, τη θνησιμότητα καθώς και την ικανότητα επιβίωσης και αναπαραγωγής τους, την ικανότητα να επικολλούνται στα τμήματα του εντερικού σωλήνα, τη διατροφική τους 'ευλυγισία' και την ανταγωνιστικότητα τους ως προς τα άλλα είδη. Γενικότερα όμως έχει αποδειχθεί ότι όσο η ηλικία αυξάνεται ή το άτομο νοσεί παρατηρείται αύξηση των βακτηρίων όπως η *Escherichia coli* και μείωση των *Bifidobacterium* (Holzapfel et al. 1998).

1.13 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 10¹⁴ ζωντανά βακτήρια, δέκα φορές τον αριθμό των ευκαρυωτικών κυττάρων σε όλους τους ιστούς του ανθρώπινου 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 10³ 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 10⁵ cfu/ml και περιλαμβάνει συνήθως *Lactobacilli* και *Streptococci*. Στον ειλεό ο πληθυσμός αυξάνεται περαιτέρω στα 10⁷ cfu/ml ενώ στο παχύ έντερο φτάνει στο μέγιστο 10¹² 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 Μικροβιακή αποίκηση του ανθρώπινου γαστρεντερικού σωλήνα (Holzapfel et al., 1998).

1.14 Σύσταση εντερικής χλωρίδας

Ποικίλες θέσεις στο σώμα του ανθρώπου αποικίζονται από ένα μεγάλο αριθμό μικροοργανισμών οι οποίοι στη συντριπτική τους πλειοψηφία είναι είδη βακτηρίων που σχηματίζουν πολύπλοκες κοινότητες. Έχει υπολογισθεί ότι ο αριθμός των μικροοργανισμών στον άνθρωπο είναι περίπου 10 φορές μεγαλύτερος (10¹⁴) από τον αντίστοιχο των ανθρώπινων κυττάρων και κατέχει βιομάζα μεγαλύτερη του 1 Kg. Η χλωρίδα του εντερικού σωλήνα συνιστά τη μεγαλύτερη και πολυπλοκότερη μικροβιακή κοινότητα στο σώμα που μαζί με τα κύτταρα του ανθρώπου-ξενιστή δομούν ένα πολυσύνθετο οικοσύστημα που λειτουργεί ως σύνολο και εκτελεί ποικίλες βιολογικές λειτουργίες.

Η εντερική χλωρίδα εκτελεί σημαντικές μεταβολικές διεργασίες που δεν έχει εξελίξει αυτόνομα ο οργανισμός του ανθρώπου. Φυσιολογικές λειτουργίες του σώματος, όπως η επεξεργασία των θρεπτικών συστατικών, η ωρίμανση του

ανοσολογικού συστήματος και η αντίσταση στους παθογόνους μικροοργανισμούς βασίζονται στις συμβιωτικές σχέσεις αλληλεξάρτησης με την εντερική χλωρίδα . Για το λόγο αυτό, οι σύγχρονες απόψεις προτείνουν ο οργανισμός του ανθρώπου να αναγνωρίζεται μαζί με τον ενδογενή μικροβιόκοσμο του ως ένας υπέρ-οργανισμός ή μετα-οργανισμός (metaorganism) με σύνθετο γονιδίωμα το οποίο θα μπορούσε να αναφέρεται ως ανθρώπινο μετα-γονιδίωμα (metagenome) .

Η σύσταση και η κατανομή της μικροβιακής χλωρίδας κατά μήκος του γαστρεντερικού σωλήνα εμφανίζει σημαντικές διαφοροποιήσεις που συνδέονται με τις φυσικοχημικές συνθήκες (pH, διαθεσιμότητα οξυγόνου, χρόνος διέλευσης της τροφής) των διαφορετικών ανατομικών θέσεων. Σύμφωνα με πρόσφατη φυλογενετική ανάλυση 45.000 βακτηριακών 16S rRNA που λήφθηκαν από 139 ενήλικες, η συντριπτική πλειοψηφία των βακτηρίων της εντερικής χλωρίδας (98% όλων των ειδών) περιορίζεται σε 4 φύλα: Firmicutes (64%), Bacteroidetes (23%), Proteobacteria (8%) και Actinobacteria (3%). Ωστόσο, στο χαμηλότερο επίπεδο ταξινόμησης των βακτηρίων παρατηρείται, σε αντίθεση με τον περιορισμένο αριθμό φύλων, μία 'έκρηξη' της ποικιλότητας τους. Μέχρι πρόσφατα, έχουν προσδιορισθεί 1.800 γένη και 16.000 είδη βακτηρίων. Το μεγαλύτερο μέρος της εντερικής χλωρίδας αποτελείται από αυτόχθονες μικροοργανισμούς που παρουσιάζουν σταθερότητα και αποικίζουν μόνιμα το γαστρεντερικό σωλήνα, ενώ σε μικρότερο ποσοστό ως περιστασιακά μέλη της μικροβιακής κοινότητας εμφανίζονται οι αλλόχθονες μικροοργανισμοί στους οποίους συγκαταλέγονται τα περισσότερα εντεροπαθογόνα βακτήρια.

Παρά το γεγονός ότι η σύνθεση της μικροβιακής κοινότητας του εντέρου διαφέρει σημαντικά, τα βασικά χαρακτηριστικά της εμφανίζονται όμοια μεταξύ των θηλαστικών. Η εγκατάσταση και η διατήρηση της εντερικής χλωρίδας αποτελεί μία πολύπλοκη διεργασία που ξεκινάει αμέσως μετά τη γέννηση του οργανισμού. Η μικροχλωρίδα του ενήλικου ατόμου αποτελεί ένα δυναμικό οικοσύστημα στο οποίο τόσο ο γενότυπος του ξενιστή, όσο και η ηλικία, ο τρόπος ζωής και η διατροφή αποτελούν καθοριστικό παράγοντα της διαμόρφωσης της μικροβιακής σύστασης και ποικιλότητας.

Η κολπική και γαστρεντερική μικροχλωρίδα της μητέρας καθώς και η επαφή με το περιβάλλον τροφοδοτούν, κατά τα αρχικά στάδια, τον εντερικό σωλήνα του

νεογέννητου με προαιρετικά αναερόβια μικροβιακά στελέχη (Staphylococcus, Streptococcus, Bifidobacterium και Enterobacteria). Ακολούθως, η εισαγωγή στερεάς τροφής στο διαιτολόγιο εξελίσσει τη σύσταση της εντερικής μικροχλωρίδας σε χαρακτηριστική ενήλικου ατόμου όπου το γένος Bacteroides κυριαρχεί αριθμητικά (~86%) ακολουθούμενο από το γένος Eubacterium, με ταυτόχρονη μείωση του ποσοστού των Bifidobacteria .

Ο υγιής άνθρωπος έχει στο γαστρεντερικό του σωλήνα μια μεγάλη ποικιλία από πληθυσμούς μικροοργανισμών. Στο στομάχι υπάρχουν λίγα μόνο οξυάντοχα είδη αλλά στο παχύ έντερο φιλοξενούνται περίπου 10¹² βακτήρια/g τα οποία ανήκουν σε 400-500 είδη, τουλάχιστον. Είναι χαρακτηριστικό πως ο αριθμός των προκαρυωτικών οργανισμών φτάνει περίπου στο σύνολο το 10¹⁴, δηλαδή σχεδόν 10 φορές περισσότερο από το σύνολο των ευκαρυωτικών κυττάρων του ανθρώπινου σώματος. Η μικροχλωρίδα αυτή είναι ένα πολύ σταθερό οικοσύστημα στο έντερο, με σταθερές συσχετίσεις των μικροβιακών ειδών, το οποίο μπορεί να επηρεαστεί μόνο από την διατροφή και την χρήση αντιβιοτικών. Οποιαδήποτε νέα αποικιακή χλωρίδα για να εγκατασταθεί στο έντερο θα πρέπει να ξεπεράσει το σύστημα άμυνας του γαστρεντερικού σωλήνα και να ανταγωνισθεί επιτυχώς την υπάρχουσα χλωρίδα του εντέρου, κυρίως ως προς τις θρεπτικές ουσίες (Ζερφυρίδης, 2001). Η φυσική χλωρίδα του εντέρου έχει πολλές ωφέλιμες επιδράσεις στην υγεία του ανθρώπου, άλλες αποδεδειγμένες και άλλες υποθετικές, όπως φαίνεται παρακάτω πίνακα.

Πίνακας : Αποδεδειγμένες και υποθετικές επιδράσεις της φυσικής χλωρίδας του εντέρου

Αποδεδειγμένες επιδράσεις

- Μεταβολισμός, θρέψη, προστασία
- Ζύμωση υδατανθράκων, αξιοποίηση πρωτεϊνών
- Μεταβολισμός λιγνάνης και ισοφλαβόνης

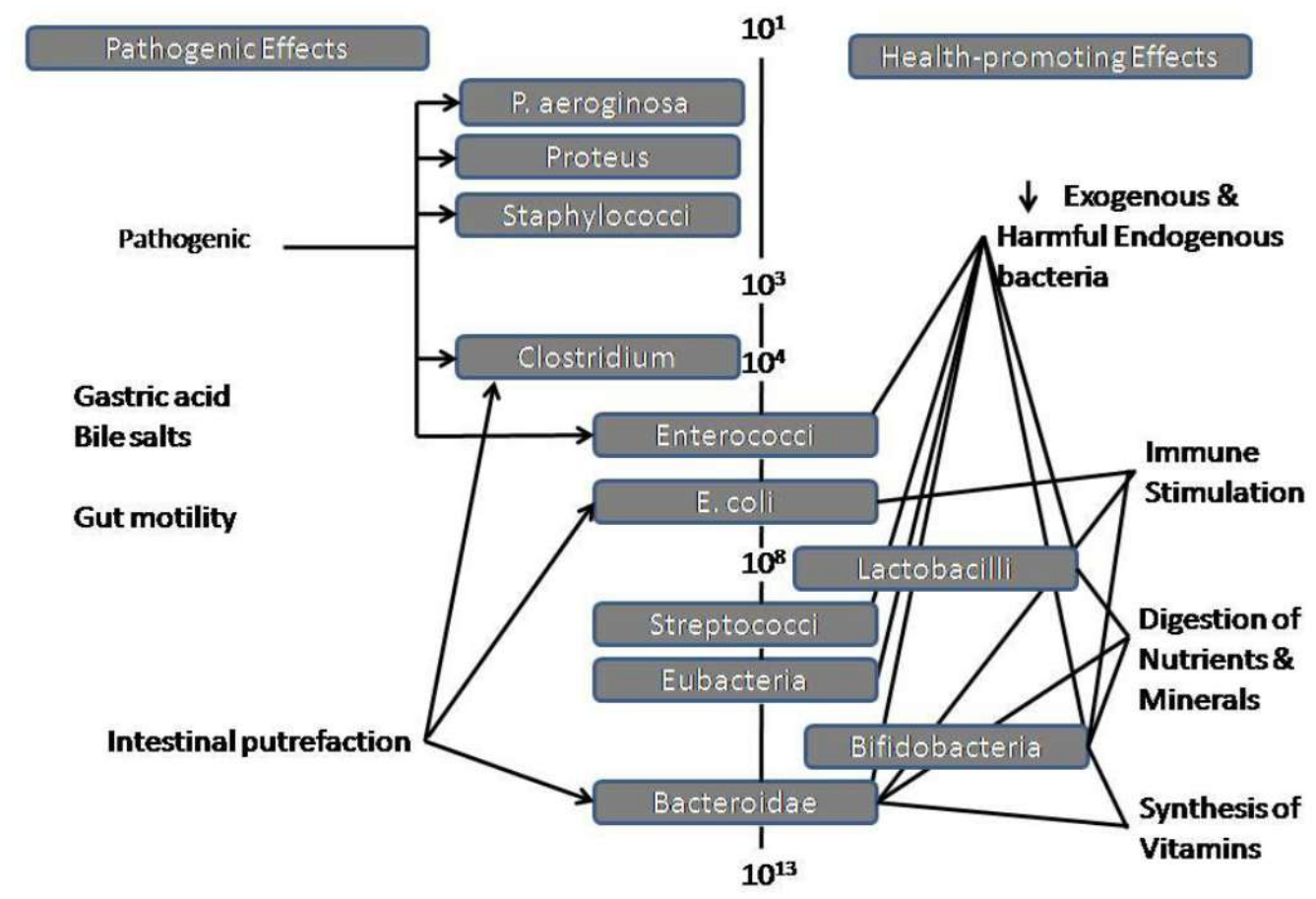
Υποθετικές επιδράσεις

- Μεταβολισμός χολικού οξέος και χοληστερίνης
- Παρεμπόδιση των παθογόνων βακτηρίων
- Σταθεροποίηση διαπερατότητας του βλεννογόνου

- Ρύθμιση πληθυσμιακών ισορροπιών του απευθυσμένου δια της παράγωγης λιπαρών οξέων βραχείας αλυσίδας
- Αποτοξίνωση καρκινογόνων
- Βακτηριοστατικές και βακτηριοκτόνες δράσεις
- Ρύθμιση τοπικού και διασυστηματικού ανοσοποιητικού συστήματος.

Ο ρόλος της εντερικής μικροχλωρίδας εντοπίζεται σε μία μεγάλη ποικιλία λειτουργιών όπως η πέψη μη-μεταβολίσιμων συστατικών της τροφής, η αντοχή στην αποίκηση από καινούργιους μικροοργανισμούς, πιθανά παθογόνους, η παραγωγή βιταμινών, η ανάπτυξη του βλεννογόνου, η επίδραση στο ανοσοποιητικό σύστημα και στην κινητικότητα του εντέρου (McFarlick, 2000). Ο ρόλος της εντερικής μικροχλωρίδας παρουσιάζεται στο παρακάτω σχήμα.

Σχήμα : Ο ρόλος της εντερικής μικροχλωρίδας στον ξενιστή



1.15 Παράγοντες που επηρεάζουν τον εντερικό μικροβιόκοσμο

Η σύσταση του εντερικού μικροβιόκοσμου είναι συγκεκριμένη για τον κάθε ξενιστή, εξελίσσεται καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής ενός ατόμου και είναι ευάλωτη σε πολλές ενδογενείς και εξωγενείς τροποποιήσεις (Sekirou, I. et al., 2010). Ορισμένοι από τους παράγοντες που την επηρεάζουν είναι η διατροφή, η ηλικία, ο γονότυπος του ξενιστή, το περιβάλλον και η έκθεση σε διάφορα βακτήρια, το στρες, η κατανάλωση προβιοτικών και πρεβιοτικών, οι κλινικές παρεμβάσεις με αντιβιοτικά φάρμακα και οι χειρουργικές επεμβάσεις(Dethlefsen, L. et al. 2006; Zhang, H, et al. , 2009).

Διατροφή

Ανάλογα το πρότυπο διατροφής, η σύσταση του εντερικού μικροβιόκοσμου μεταβάλλεται σημαντικά. Έχει φανεί ότι οι άνθρωποι που καταναλώνουν συχνότερα τρόφιμα από την ομάδα του κρέατος συγκριτικά με τους χορτοφάγους έχουν υψηλότερες συγκεντρώσεις ειδών του γένους *Bacteroides* και χαμηλότερες συγκεντρώσεις οξυγαλακτικών βακτηρίων και κολίμορφων βακτηρίων (Madigan, M.T. et al., 2007). Δίαιτα με υψηλό ποσοστό πρωτεΐνης και χαμηλό ποσοστό υδατανθράκων φάνηκε να μειώνει σημαντικά το σύνολο των παραγόμενων λιπαρών οξέων βραχέως αλύσου (SCFAs) και ιδιαίτερα την συγκέντρωση βουτυρικού οξέος στα κόπρανα των εθελοντών που ακολουθούσαν αυτή τη δίαιτα σε σύγκριση με τη συγκέντρωση αυτών στα κόπρανα άλλων εθελοντών που ακολουθούσαν δίαιτα πλούσια σε πρωτεΐνες/μέτρια σε υδατάνθρακες και δίαιτα διατήρησης σωματικού βάρους. Επίσης παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στις μετρήσεις των μικροβιακών πληθυσμών *Roseburia* spp., *Eubacterium rectale* (υποομάδα του συμπλέγματος XIVa) και *Bifidobacteria* όσο μειώνονταν οι υδατάνθρακες της διατροφής (Duncan, S.H et al., 2007).

Τα αποτελέσματα μίας έρευνας που έγινε με δείγματα αφροαμερικανών και καυκάσιων Αμερικανών έδειξαν ότι τα άτομα που καταλάωναν περισσότερες θερμίδες είχαν μικρότερο πληθυσμό κλωστριδίων. Επίσης ότι η κατανάλωση φυτικών ινών συσχετίζεται θετικά με τους πληθυσμούς οξυγαλακτικών βακτηρίων, οι οποίοι πιστεύεται ότι δρουν ευεργετικά για την υγεία του ξενιστή. Οι ίνες

των σιτηρών και των φρούτων αλλά όχι των οσπρίων συσχετίστηκαν με τα οξυγαλακτικά βακτήρια. Τα άτομα με μεγαλύτερη πρόσληψη ετεροκυκλικών αμινών

φάνηκαν να έχουν μεγαλύτερο πληθυσμό κλωστριδίων συμπλέγματος XIVa. Αυτές οι συγκρίσεις έγιναν με τα δεδομένα των μη λογαριθμημένων μετρούμενων πληθυσμών κάθε είδους μικροοργανισμών και ήταν στατιστικά σημαντικές ($p < 0.05$). Βέβαια, η στατιστική σημαντικότητα δεν παρέμεινε και μετά την μετατροπή σε λογαρίθμους των μετρούμενων μικροβιακών πληθυσμών (Mai, V et al., 2009).

Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε ποντίκια τα οποία τρέφονταν με δυτικού τύπου δίαιτα μέχρι να γίνουν παχύσαρκα βρέθηκε μία αύξηση πληθυσμού της Τάξης Mollicutes του φύλου Firmicutes, η οποία έγινε η επικρατέστερη στον εντερικό μικροβιόκοσμο των ποντικών. Παρατηρήθηκε επίσης ότι με διαιτητικούς χειρισμούς που απέβλεπαν στην απώλεια βάρους και στη μείωση λιπώδους ιστού μειώνονταν και οι πληθυσμοί της Τάξης Mollicutes (Turnabaugh, P.J, et al., 2008).

Διατροφή υψηλή σε απλά σάκχαρα προκαλεί αύξηση της δραστηριότητας του εντερικού μικροβιόκοσμου, μέσω της οποίας παράγονται τοξικά μεταβολικά προϊόντα όπως οξικό οξύ και αλκοόλη. Μειώνεται ο χρόνος διέλευσης της τροφής από το έντερο, το οποίο αυξάνει την έκθεση του εντερικού επιθηλίου σε δυνητικά τοξικά προϊόντα και επίσης αυξάνεται η συγκέντρωση των δευτερογενών χολικών οξέων που οδηγούν στην αύξηση των ευκαιριακών βακτηριακών ειδών που χρησιμοποιούν τα χολικά οξέα στο μεταβολισμό τους.

Φθορά του εντερικού επιθηλίου και της βλέννης που το προστατεύει παρατηρείται μετά από δίαιτα ανεπαρκή σε υδατάνθρακες. Η αυξημένη χρησιμοποίηση και η πρόκληση φθοράς του επιθηλίου έχει συνέπειες για τον ξενιστή καθώς μετά οδηγείται σε αυξημένη προσκόλληση εντερικών βακτηρίων, δημιουργία χρόνιας φλεγμονής και τελικά βλάβη του επιθηλίου (Salminen, S., et al., 1998; Hawrelak, J.A and S.P Myer, 2004).

Ηλικία

Ο αποικισμός του εντέρου ξεκινάει με τη γέννηση του ανθρώπου, όπου ο τρόπος γέννησης (φυσιολογικός τοκετός ή καισαρική) διαδραματίζει ρόλο στο ποιοί θα είναι οι πρώτοι μικροοργανισμοί που θα αναπτυχθούν στο έντερο του νεογνού. Οι πηγές από τις οποίες προέρχονται οι μικροοργανισμοί του εντερικού μικροβιόκοσμου

των νεογνών είναι ο κόλπος, το δέρμα και τα κόπρανα της μητέρας ενώ αν γίνει η γέννηση με καισαρική τομή τότε πηγές μπορεί να είναι τα μηχανήματα του νοσοκομείου, τα άλλα νεογνά, ο αέρας, το νοσηλευτικό προσωπικό και μάλιστα πιθανό είναι να επικρατήσουν αυτά τα περιβαλλοντικά βακτήρια έναντι των βακτηρίων που μεταδίδονται από τον μικροβιόκοσμο της μητέρας (Favier, C.F, et al., 2004). Οι μικροοργανισμοί των γενών Bifidobacterium και Lactobacillus εμφανίζονται μετά από 2-3 μέρες από τη γέννηση του νεογνού. Στα νεογνά που γεννιούνται με φυσιολογικό τοκετό κατά τους πρώτους 2-3 μήνες ζωής τους παρατηρείται ανάπτυξη των αναερόβιων βακτηρίων των ειδών Enterobacteriaceae, Streptococci Και Staphylococci στο έντερο τους. Αυτά τα είδη είναι δυνητικά παθογόνα και προέρχονται από το εξωτερικό περιβάλλον, αλλά πιστεύεται ότι

συμβάλλουν στη σύσταση ενός ωφέλιμου για την υγεία του ξενιστή μικροβιόκοσμου (Favier, C.F, et al., 2004). Στα νεογνά που γεννιούνται με καισαρική τομή παρατηρείται μειωμένος συνολικός πληθυσμός βακτηρίων συγκριτικά με τα νεογνά που γεννιούνται με φυσιολογικό τοκετό και επίσης το γένος *Bifidobacterium* αργεί να εμφανιστεί έως και τους πρώτους 6 μήνες ζωής του βρέφους (Favier, C.F, et al., 2004). Στη συνέχεια της ζωής του νεογνού πηγή μικροοργανισμών αποτελεί ο θηλασμός, οι αγκαλιές και τα φιλά που έτσι μεταδίδονται επιδερμικά, περιβαλλοντικά και στοματικά βακτήρια. Ο θηλασμός συμβάλει στη μετάδοση μικροοργανισμών καθώς το μητρικό γάλα έχει υπολογιστεί ότι περιέχει περισσότερους από 10⁹ μικροοργανισμούς/λίτρο στις υγιείς μητέρες. Τα είδη που έχουν για πηγή τη θηλή και το δέρμα της μητέρας και συναντούνται συχνότερα είναι τα *Staphylococci*, *Streptococci*, *Corynebacteria*, *Lactobacilli*, *Micrococci*, *Propionibacteria* και *Bifidobacterium*. Τα βρέφη που θηλάζουν και είχαν γεννηθεί με φυσιολογικό τοκετό έχουν ως επικρατές είδος στον εντερικό τους μικροβιόκοσμο το *Bifidobacterium* spp. ενώ τα βρέφη που τρέφονται με υποκατάστατο μητρικού γάλακτος έχουν πιο ετερογενή σύσταση εντερικού μικροβιόκοσμου (Morelli, L., 2008). Μεγαλώνοντας το άτομο τείνει να έχει στον εντερικό μικροβιόκοσμο του 2 φύλα μικροοργανισμών που επικρατούν και παραμένουν σταθερά, το φύλο *Bacteroidetes* και το φύλο *Firmicutes*, ενώ τα φύλα *Proteobacteria*, *Verrucocomicrobia*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria* και *Cyanobacteria* είναι παρόντα σε χαμηλότερους πληθυσμούς (Eckburg, P.B., et al., 2005).

Στην τρίτη ηλικία φαίνεται ότι επέρχεται μία μείωση στους πληθυσμούς των συνολικών αναερόβιων βακτηρίων και του είδους *Bifidobacterium* (O' Tool PW, C.M., 2010 ; Hopkins, M.J., et al., 2001) και ακόμα παρατηρείται ένα χαρακτηριστικό πρότυπο σύστασης μικροοργανισμών του φύλου *Firmicutes* στους ηλικιωμένους και τους εκατοχρονίτες σε σύγκριση με τους νεαρούς ενήλικες (O' Tool PW, C.M., 2012). Επίσης, σημειώνεται αύξηση των πληθυσμών *Enterobacteriaceae* και *E.coli* όπως και στις ενδοτοξίνες που παράγονται από τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια. Δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως αν αυτές οι αλλαγές του μικροβιόκοσμου γίνονται λόγω της παρόδου της ηλικίας εξ' ολοκλήρου ή συμβάλουν σε αυτό και οι αλλαγές των διατροφικών συνηθειών (O' Tool PW, C.M., 2010 ; Hopkins, M.J., et al., 2001). Τέλος, σε ηλικιωμένους έχουν βρεθεί μεγαλύτεροι πληθυσμοί του είδους *Clostridium difficile*, το οποίο σχετίζεται με αυξημένη συχνότητα νοσηλείας και χορήγησης αντιβιοτικών (Ljungberg, B., et al., 1990)

Στρες

Οι κύριες αλλαγές που επιφέρει το στρες στο γαστρεντερικό σύστημα είναι μεταβολή της κινητικότητας του εντέρου, αύξηση της αντίληψης των σπλάχνων, αλλαγές στις γαστρεντερικές εκκρίσεις, αύξηση της εντερικής διαπερατότητας, αρνητική επίδραση στην ικανότητα που έχει η βλέννα του εντέρου να αναγεννιέται και στην αιμάτωση του βλεννογόνου, αρνητική επίδραση στον εντερικό μικροβιόκοσμο (Konturek, P.C., et al., 2011). Το στρες μπορεί να αλλάξει τη σύσταση του εντερικού μικροβιόκοσμου επηρεάζοντας αρνητικά τους πληθυσμούς ωφέλιμων προβιοτικών βακτηρίων όπως

είναι τα γένη *Lactobacillus* spp. και *Bifidobacterium* spp. και θετικά την ανάπτυξη των δυνητικά παθογόνων. Το συναισθηματικό στρες μπορεί να αυξήσει την αποβολή των λακτοβακίλλων έως και 6 μέρες μετά το επεισόδιο. Η μείωση του πληθυσμού των λακτοβακίλλων καθιστά ευκολότερη την αποίκηση εξωγενών βακτηρίων στον εντερικό επιθήλιο (Hawrelak, J.A and S.P Myer, 2004) . Έχει παρατηρηθεί επίσης, ότι η νορεπινεφρίνη, νευροδιαβιβαστής που αυξάνεται στο αίμα με το στρες, αυξάνει την μολυσματικότητα των ειδών *E. coli* και *C. Jejuni* (Lyte, M.L., et al., 2011).

1.16 Προβιοτικά και ασθένειες του πεπτικού συστήματος

1.16.1 Δυσανεξία στη λακτόζη

Η δυσανεξία στη λακτόζη είναι μια πολύ συνηθισμένη κατάσταση που δεν μπορεί να θεωρηθεί ασθένεια, αλλά δημιουργεί προβλήματα όταν υπάρχει. Σε άτομα με έλλειψη β-γαλακτοζιδάσης, δεν γίνεται αφομοίωση της λακτόζης, γεγονός που οδηγεί σε διαταραχή του οσμωτικού φορτίου στο λεπτό έντερο που συνοδεύεται από έκκριση υγρών και πρόκληση διάρροιας (Ouwenhand και Salminen, 1998). Τα γαλακτοκομικά προϊόντα, όπως το τυρί και η γιαούρτη, δημιουργούν λιγότερα προβλήματα. Αφ' ενός μεν διότι ένα μέρος της λακτόζης του γάλακτος έχει ήδη ζυμωθεί κατά τη παρασκευή των προϊόντων αυτών, αφ' ετέρου δε γιατί κατά τη πέψη τα ίδια τα βακτήρια λύνονται και έτσι η β-γαλακτοζιδάση τους ελευθερώνεται στον πεπτικό σωλήνα. Επί πλέον, το αυξημένο ιξώδες των προϊόντων αυτών σε σχέση με το ίδιο το γάλα οδηγεί στην αύξηση του χρόνου διέλευσης της τροφής από το πεπτικό σωλήνα πράγμα που βοηθά στη πέψη της λακτόζης (Vesa et al. 2000).

1.16.2 Οξεία γαστρεντερίτιδα

Η οξεία γαστρεντερίτιδα μπορεί να είναι ιογενούς ή βακτηριακής προελεύσεως. Ο ιός rotavirus είναι μια από τις πιο κοινές αιτίες της ασθένειας αυτής. Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι συγκεκριμένα προβιοτικά στελέχη, όπως ο *L. rhamnosus*, ο *L. reuteri*, ο *L. casei*, και ο *B. lactis*, μπορούν να μειώσουν τη διάρκεια της διάρροιας και αυτό

αποδίδεται σε διάφορους μηχανισμούς. Μετά από θεραπεία με επιλεγμένα προβιοτικά παρατηρήθηκε αυξανόμενη παραγωγή αντισωμάτων IgA εναντίον του ιού rotavirus, η διαπερατότητα του εντερικού βλεννογόνου μειώνεται και η εντερική μικροχλωρίδα σταθεροποιείται και ρυθμίζεται (Ouwenhand et al., 2002).

1.16.3Καρκίνος του εντέρου

Τα γαλακτοβακτήρια ή προϊόντα τους μπορούν να αλληλεπιδράσουν απευθείας με καρκινικά κύτταρα σε καλλιέργειες και να παρεμποδίσουν τον πολλαπλασιασμό τους. Οι ακριβείς μηχανισμοί με τους οποίους τα γαλακτοβακτήρια μπορεί να παρεμποδίζουν το καρκίνο του εντέρου δεν είναι γνωστοί αλλά μέσω αυτών μπορεί να συμπεριλαμβάνονται η ενίσχυση της ανοσοαπόκρισης του ξενιστή, η δέσμευση και η αποικοδόμηση καρκινικών αντιγόνων, η ποιοτική ή ποσοτική τροποποίηση της φυσιολογικής χλωρίδας του εντέρου, η παραγωγή αντικαρκινικών ή αντιμεταλλαξιγόνων παραγόντων στο έντερο, η τροποποίηση της μεταβολικής δραστηριότητας της μικροβιολογικής χλωρίδας του εντέρου, η διαφοροποίηση βιοχημικών παραγόντων στο έντερο και η επίδραση στη φυσιολογία του ξενιστή (Redondo-Lopez et al. 1990).

2. Τα στελέχη Lactobacillus ως προβιοτικοί μικροοργανισμοί

2.1. Το γένος Lactobacillus

Τα Lactobacillus ανήκουν στην ομάδα των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος (lactic acid bacteria-LAB), μία ετερογενή ομάδα μικροοργανισμών που χρησιμοποιούν υδατάνθρακες ως πηγή ενέργειας και παράγουν γαλακτικό οξύ ως αποκλειστικό ή κύριο προϊόν των ζυμωτικών μεταβολικών διεργασιών τους. Τα βακτήρια του γένους Lactobacillus είναι Gram-θετικοί, κοκκιομορφοί ή ραβδόμορφοι, μη σπορογόνοι και προαιρετικά αναερόβιοι μικροοργανισμοί. Χρησιμοποιούνται ευρύτατα στην παρασκευή τροφίμων και το γεγονός τόσο του μακροχρόνιου ιστορικού της ασφαλούς χρήσης τους, όσο και η παρουσία τους στην εντερική μικροχλωρίδα του ανθρώπου, τα έχει καταστήσει γενικώς αποδεκτά ως ασφαλή. Το γένος περιλαμβάνει 106 είδη που εμφανίζουν ποικιλία βιοχημικών και φαινοτυπικών γνωρισμάτων και χαρακτηρίζονται από μεγάλη ετερογένεια. Η ταξινόμηση των στελεχών του γένους Lactobacillus στο επίπεδο του είδους εμφανίζεται περίπλοκη. Μέχρι πρόσφατα η διάκριση μεταξύ των ειδών των Lactobacillus πραγματοποιούνταν βάσει των φαινοτυπικών τους ιδιοτήτων (π.χ. πρότυπο ζύμωσης των υδατανθράκων, μορφολογία, ανάπτυξη σε συγκεκριμένες θερμοκρασίες) οι οποίες, αν και αναγνωρίζονται ως σημαντικά εργαλεία, παρουσιάζουν περιορισμούς ως προς την ακρίβεια, την επαναληψιμότητα και τη διακριτική τους ικανότητα.. Αν και οι σύγχρονες μοριακές μέθοδοι όπως ο DNA-DNA υβριδισμός, η ανάλυση γονιδίων ριβοσωμικού RNA, η RAPD-PCR και η PFGE ανάλυση παρέχουν αξιόπιστη ταξινόμηση και ταυτοποίηση των Lactobacillus στο επίπεδο του είδους και του στελέχους, η φυλογενετική δομή του γένους παραμένει ασαφής. Αυτό ισχύει ιδιαίτερα για την ομάδα του L. casei, η οποία περιλαμβάνει αρκετά προβιοτικά βακτήρια.

2.2 Τα στελέχη Lactobacillus ως μέλη της φυσιολογικής εντερικής χλωρίδας.

Ο μεταβολισμός και η φυσιολογία των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος αντανακλούν εξελκτικούς μηχανισμούς προσαρμογής σε περιβάλλοντα πλούσια σε θρεπτικά συστατικά και πηγές ενέργειας. Για αυτόν το λόγο, τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος, συμπεριλαμβανομένων των Lactobacillus, απαντώνται συνήθως σε τρόφιμα (γαλακτοκομικά προϊόντα, λαχανικά, χυμούς), σε φυτικά υλικά καθώς και στον αναπνευστικό, ουρογεννητικό και γαστρεντερικό σωλήνα των ζώων. Τα τελευταία χρόνια, τα είδη του γένους Lactobacillus που αποτελούν μέλη της

ανθρώπινης εντερικής χλωρίδας έχουν γίνει αντικείμενο έντονης ερευνητικής δραστηριότητας λόγω των ευεργετικών για την υγεία του ξενιστή ιδιοτήτων τους και της εμπορικής τους χρήσης σε προβιοτικά προϊόντα. Οι γαλακτοβάκιλλοι συναντώνται σε διάφορες θέσεις του γαστρεντερικού σωλήνα (στομάχι, λεπτό έντερο, παχύ έντερο) και συνήθως σε μικρούς αριθμούς μια και αποτελούν περίπου το 0,01% έως 0,6% του συνολικού αριθμού των μικροοργανισμών της γαστρεντερικής μικροχλωρίδας. Συγκριτικά με τη εντερική μικροχλωρίδα των ενήλικων ανθρώπων, η αντίστοιχη των βρεφών εμφανίζεται περισσότερο ασταθής. Ο αριθμός των *Lactobacillus* στα κόπρανα νεογέννητων προσδιορίστηκε σε περίπου 10⁵ CFU/g, ενώ σε βρέφη ενός μηνός ή μεγαλύτερα ο αριθμός τους κυμαίνεται από 10⁶ έως 10⁸ CFU/g κοπράνων. Με τη χρήση μοριακών τεχνικών έχουν ανιχνευθεί ως τώρα 17 είδη *Lactobacillus* που σχετίζονται με το γαστρεντερικό σωλήνα του ανθρώπου (Πίνακας 3). Ωστόσο, τα δεδομένα των ερευνών που αφορούν την προέλευση τους υποδεικνύουν ότι πολλά από τα παραπάνω είδη αποτελούν ετερόχθονα και όχι αυτόχθονα μέλη της μικροβιακής κοινότητας του εντέρου. Συγκεκριμένα, ως πρόσφατα, είδη όπως τα *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. delbrueckii*, *L. brevis*, *L. johnsonii*, *L. plantarum*, και *L. fermentum* δεν έχει παρατηρηθεί να σχηματίζουν σταθερούς πληθυσμούς στο έντερο. Τα περισσότερα από αυτά εμφανίζουν σταθερούς πληθυσμούς στη στοματική κοιλότητα και περιέχονται σε ζυμωμένα τρόφιμα, γεγονός που υποστηρίζει την παραπάνω άποψη.

2.3 Μηχανισμοί δράσης των *Lactobacillus*

Οι μηχανισμοί της ευεργετικής δράσης των *Lactobacillus* ανήκουν σε μία από τις παρακάτω, συχνά αλληλεπικαλυπτόμενες, κύριες κατηγορίες:

- 1) αναστολή των παθογόνων μικροοργανισμών και αποκατάσταση της ομοιόστασης της εντερικής χλωρίδας,
- 2) ενίσχυση της λειτουργίας του επιθηλιακού φραγμού και,
- 3) ρύθμιση της απόκρισης του ενδογενούς και επίκτητου ανοσιακού συστήματος.

Η ικανότητα των *Lactobacillus* να αναστέλλουν τους παθογόνους μικροοργανισμούς, είναι ευρέως γνωστή, μια και χρησιμοποιούνται εδώ και αιώνες για τη συντήρηση των τροφίμων για την αποτροπή των μικροβιακών αλλοιώσεων τους. Επίσης, τα τελευταία χρόνια, έχει διερευνηθεί εντατικά και έχει τεκμηριωθεί η ανοσοενισχυτική και ανοσορυθμιστική δράση των *Lactobacillus* καθώς και η ιδιότητα τους να ενισχύουν το βλεννογόνο εντερικό φραγμό ενάντια σε παθογόνους μικροοργανισμούς και τοξίνες. Οι προβιοτικές ιδιότητες των *Lactobacillus* χαρακτηρίζουν συγκεκριμένα στελέχη και δεν μπορούν να αποτελέσουν γενικευμένο γνώρισμα του γένους: διαφορετικά στελέχη παρουσιάζουν διαφορετικές προβιοτικές ιδιότητες που καθορίζονται από την ικανότητα τους να εκφράζουν συγκεκριμένα

επιφανειακά μόρια ή να εκκρίνουν πρωτεΐνες και μεταβολίτες που αλληλεπιδρούν άμεσα ή έμμεσα με τον ξενιστή.

Έτσι, αναγνωρίζονται συγκεκριμένοι μεταβολικοί και δομικοί παράγοντες-χαρακτηριστικά των *Lactobacillus* που σχετίζονται με τις προβιοτικές τους δράσεις και οι οποίοι εμπίπτουν σε δύο κύριες κατηγορίες, που συχνά είναι δύσκολο να διακριθούν: α) παράγοντες που καθορίζουν άμεσα τις ευεργετικές για την υγεία ιδιότητες των *Lactobacillus* (probiotic factors-προβιοτικοί παράγοντες) και β) παράγοντες που συνεισφέρουν στις ιδιότητες αυτές χωρίς οι ίδιοι να ασκούν άμεση επίδραση, αλλά επιτρέπουν την προσαρμογή των *Lactobacillus* προάγοντας την επιβίωση τους και τον αποικισμό του ξενιστή (adaptation factors-παράγοντες προσαρμογής)

2.4 Ο ρόλος των χαρακτηριστικών της κυτταρικής επιφάνειας (cell surface traits) των *Lactobacillus*.

Η ικανότητα προσκόλλησης των *Lactobacillus* καθώς και συγκεκριμένα δομικά και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της κυτταρικής τους επιφάνειας, όπως η ιδιότητα της αυτοσυσσωμάτωσης, η υδροφοβία, η παρουσία των πρωτεϊνών της κυτταρικής επιφανειακής στιβάδας και η παραγωγή εξωπολυσακχαριτών αναγνωρίζονται ως βασικοί παράγοντες που εμπλέκονται στην ανοσοτροποποιητική δράση των *Lactobacillus*.

2.5 Ικανότητα προσκόλλησης

Η ικανότητα της προσκόλλησης στα επιθηλιακά κύτταρα θεωρείται ότι αποτελεί μία σημαντική ιδιότητα των προβιοτικών μικροοργανισμών και ο χαρακτηρισμός αρκετών *Lactobacillus* ως υπογήφια προβιοτικά στελέχη βασίζεται σε αυτήν. Η αυξημένη ικανότητα προσκόλλησης θεωρείται ότι παρέχει στα βακτηριακά στελέχη μεγαλύτερες πιθανότητες επιβίωσης και αποικισμού στους βλεννογόνους του ξενιστή, διότι επάγει την τροποποίηση της ανοσοαπόκρισης και την προστασία των επιθηλιακών κυττάρων και ενισχύει τον αποκλεισμό των παθογόνων

μικροοργανισμών, διατηρώντας την ισορροπία της εντερικής μικροχλωρίδας. Η βακτηριακή προσκόλληση αποτελεί μία διαδικασία που επιτελείται σε πολλαπλά στάδια και στην οποία συμμετέχουν τόσο μη ειδικοί, όσο και ειδικοί υποδοχείς μορίων προσκόλλησης. Σύμφωνα με πρόσφατες έρευνες, η προσκόλληση των *Lactobacillus* στα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα εξαρτάται από πρωτεϊνικούς και υδατανθρακικούς παράγοντες της επιφανείας τους, όπως οι πρωτεΐνες της S-στιβάδας και οι εξωπολυσακχαρίτες (EPS). Η διαδικασία της προσκόλλησης περιλαμβάνει επίσης αντιστρεπτές και μη αντιστρεπτές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των βακτηριακών κυττάρων και της επιφάνειας προσκόλλησης. Το αρχικό και εν δυνάμει αντιστρέψιμο στάδιο της προσκόλλησης πραγματοποιείται μέσω πολύπλοκων φυσικοχημικών αλληλεπιδράσεων, οι οποίες καθορίζονται και από την υδροφοβία της επιφάνειας του βακτηριακού κυττάρου. Η ικανότητα προσκόλλησης των *Lactobacillus* φάνηκε σε *in vitro* πειραματικές δοκιμές σε Caco-2 ή HT-29 επιθηλιακά κύτταρα. Ωστόσο, στα περισσότερα φυσικά περιβάλλοντα τα προσκολλημένα βακτήρια οργανώνονται με τη μορφή πολυκύτταρων συσσωματωμάτων, δομές που αναγνωρίζονται ως βιομεμβράνες (biofilms), οι οποίες σχετίζονται με την προστατευτική δράση που ασκούν αυτά στον ουρογεννητικό και γαστρεντερικό σωλήνα του ανθρώπου.

2.6 Η ιδιότητα της αυτοσυσσωμάτωσης

Ορισμένα βακτηριακά στελέχη παρουσιάζουν την τάση να σχηματίζουν συσσωματώματα κατά την ανάπτυξή τους σε υγρά υποστρώματα. Η ιδιότητα αυτή παρατηρείται συχνά σε στελέχη του γένους *Lactobacillus*, συνδέεται θετικά με την αυξημένη ικανότητά τους να αποικίζουν τον γαστρεντερικό σωλήνα και να ρυθμίζουν την ισορροπία της εντερικής μικροχλωρίδας καθώς και με την ανοσοτροποποιητική τους δράση. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η ικανότητα της αυτοσυσσωμάτωσης συνδυάζεται και με αυξημένη *in vitro* ικανότητα προσκόλλησης.

3. Ακίνητοποίηση

Η ακίνητοποίηση είναι ένας γενικός όρος που χρησιμοποιείται για να περιγράψει την καθήλωση ενός βιοκαταλύτη μέσα ή πάνω σε στερεό φορέα. Οι ακίνητοποιημένοι βιοκαταλύτες αποτελούνται από το φορέα ακίνητοποίησης και τους βιοκαταλύτες. Ο όρος του βιοκαταλύτη έχει σχέση με βιολογικές δομές που εμφανίζουν ενζυμική δραστηριότητα. Μπορεί να είναι ένα απλό ένζυμο έως ένα ζωντανό κύτταρο με το σύνολο των ενζύμων του. Ο ακίνητοποιημένος βιοκαταλύτης έχει τα φυσικά χαρακτηριστικά του υποστρώματος, ενώ διατηρεί τη βασική βιοχημική

δραστηριότητα του ελεύθερου καταλύτη και βελτιώνει την αποδοτικότητα του . Αρκετές βιοτεχνολογικές διεργασίες βελτιώνονται από την τεχνολογία των ακινητοποιημένων βιοκαταλυτών και συνεπώς κατά καιρούς έχουν προταθεί διάφορες τεχνικές και διάφορα υποστρώματα.

Η ακινητοποίηση έγκειται στον εγκλωβισμό μιας βιολογικά ενεργής οντότητας εντός κατάλληλου υλικού με στόχο την βελτίωση της αποδοτικότητάς του, αύξηση του χρόνου ζωής του και την παραγωγή προϊόντων υψηλού επιπέδου, προσαρμοσμένων στις απαιτήσεις του καταναλωτικού κοινού. Η ακινητοποίηση έχει βρει εφαρμογή σε πολλά πεδία. Γενικά η ακινητοποίηση αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο και προσφέρει λύσεις σε πολλά προβλήματα σε τομείς και βιομηχανίες όπως για παράδειγμα της επιστήμης και τεχνολογίας τροφίμων, της διατροφής, της γεωργίας, κοσμετολογία, επεξεργασίας του νερού, στην φαρμακευτική και τέλος την ιατρική.

3.1 Τεχνικές Ακινητοποίησης

Η ακινητοποίηση μπορεί να γίνει με δύο τρόπους, παθητικά ή ενεργητικά.

Η παθητική ακινητοποίηση είναι εκείνη που επιτρέπει την προσκόλληση του μικροοργανισμού χωρίς την προεπεξεργασία του υποστρώματος ή του μικροοργανισμού ή του θρεπτικού μέσου. Γίνεται σε επιφάνειες αδρανών υλικών, όπως : γυαλί, νάιλον, πλαστικά, ενεργός άνθρακας, περλίτης, κλπ.

Η ενεργητική ακινητοποίηση γίνεται κατόπιν επεξεργασίας του υποστρώματος ή του μικροοργανισμού. Η μέθοδος αναγκάζει το μικροοργανισμό να ακινητοποιηθεί σε υλικά όπως αλγινικό άλας, καραγεννάνες, άγαρ, κ.α.

Υπάρχουν 4 βασικές κατηγορίες ακινητοποίησης κυττάρων και ενζύμων :

- α) Προσκόλληση ή προσρόφηση σε επιφάνεια στερεού φορέα
- β) Εγκλωβισμό σε πορώδες υλικό (entrapment)
- γ) Συσσωμάτωση με κροκίδωση (cell flocculation)
- δ) Μηχανική συγκράτηση βιοκαταλυτών σε ένα φορέα (encapsulation)

3.1.1 Προσκόλληση ή προσρόφηση σε επιφάνεια στερεού φορέα

Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται οι μέθοδοι ακινητοποίησης που αποσκοπούν στην ακινητοποίηση των κυττάρων στην επιφάνεια του υποστρώματος. Η ακινητοποίηση των κυττάρων στην επιφάνεια γίνεται είτε με φυσική προσκόλληση μέσω ηλεκτροστατιστικών δυνάμεων , είτε με συγκράτηση λόγω ομοιοπολικών δεσμών που αναπτύσσονται μεταξύ της κυτταρικής μεμβράνης και του υποστρώματος.

Το πάχος του κυτταρικού στρώματος ποικίλλει από μια στρώση κυττάρων μέχρι 1 mm ή και περισσότερο.

Τα συστήματα όπου τα κύτταρα ακινητοποιούνται με προσρόφηση σε μια επιφάνεια ή σε ένα φορέα είναι πολύ δημοφιλή λόγω της ευκολίας της ακινητοποίησης. Η δύναμη με την οποία τα κύτταρα ακινητοποιούνται σε ένα υπόστρωμα εξαρτάται από τον τύπο των κυττάρων και του υποστρώματος.

Τα ακινητοποιημένα κύτταρα αποκολλώνται εύκολα και καθίσταται έτσι, ένα είδος ισορροπίας μεταξύ των ακινητοποιημένων και των ελευθέρων κυττάρων, ακόμα και στα αρχικά στάδια της διεργασίας. Καθώς δεν υπάρχει κάποιο είδος μεμβράνης μεταξύ των κυττάρων και του διαλύματος, αυτός ο τύπος ακινητοποίησης δεν είναι κατάλληλος για διεργασίες όπου απαιτείται το προϊόν να είναι ελεύθερο κυττάρων. Το πάχος του φιλμ των κυττάρων που προσκολλώνται στο υπόστρωμα εξαρτάται από τη ροή της τροφοδοσίας, όταν έχουμε συνεχή διεργασία, με αποτέλεσμα να είναι εξαιρετικά δύσκολο να ελεγχθεί με ακρίβεια. Συνεπώς, το βιοφίλμ που σχηματίζεται είναι ανομοιογενές και εκτίθεται σε περιορισμούς που εξαρτώνται από τις ιδιότητες των θρεπτικών υλικών, καθώς και από το σχηματισμό καναλιών νερού στο στρώμα των κυττάρων μέσα στις εσωτερικές διόδους του φορέα

ακινητοποίησης. Ακόμα όμως και με αυτά τα μειονεκτήματα, το είδος αυτό της ακινητοποίησης χρησιμοποιείται συχνά στη βιομηχανία (KAREL et al 1989 FREEMAN and LILLY 1998).

Παραδείγματα στέρεων φορέων που χρησιμοποιούνται για αυτόν τον τύπο ακινητοποίησης είναι τα κυτταρινικά υλικά όπως το ξύλο και το πριονίδι καθώς και ανόργανα υλικά όπως η πορώδης πορσελάνη, το πορώδες γυαλί, η κίσηρη, ο περλίτης και η γ -αλουμίνα. Η ικανότητα προσρόφησης των στερεών φορέων, όπως το γυαλί ή η κυτταρίνη μπορεί να ενισχυθεί, ύστερα από την επεξεργασία τους με χιτοζάνη ή άλλα υλικά επικάλυψης.

3.2.2 Εγκλωβισμό σε πορώδες υλικό (entrapment)

Σύμφωνα με αυτή τη μέθοδο ακινητοποίησης, τα κύτταρα, είτε (α) αφήνονται να διεισδύσουν στο πορώδες υπόστρωμα μέχρι η κινητικότητά τους να παρεμποδιστεί από την παρουσία άλλων κυττάρων, είτε (β) το πορώδες υλικό σχηματίζεται *in situ* μέσα σε καλλιέργεια των κυττάρων που πρόκειται να ακινητοποιηθούν.

Και οι δύο μέθοδοι βασίζονται στον εγκλωβισμό των κυττάρων σε ένα άκαμπτο δίκτυο ώστε να μη διαχέονται στο περιβάλλον ενώ παράλληλα επιτρέπεται η συνεχής μεταφορά θρεπτικών ουσιών και μεταβολιτών.

Στην πρώτη περίπτωση, τα κύτταρα ακινητοποιούνται μέσα στο πορώδες υλικό και παρεμποδίζονται από τυχόν αποκόλλησή τους. Στη δεύτερη περίπτωση, το πολυμερές είτε ζελατινοποιείται απευθείας στο επιθυμητό σχήμα και μέγεθος, είτε ζελατινοποιείται σε μεγάλα τεμάχια, τα οποία στη συνέχεια τεμαχίζονται στις κατάλληλες διαστάσεις. Τα πιο συνήθη έχουν σχήμα χάντρας με διάμετρο 1-5 mm και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοκαταλύτες σε αντιδραστήρες πακεταρισμένης ή ρευστοποιημένης κλίνης. Η διατήρηση της κυτταρικής βιωσιμότητας επιτρέπει τη χρήση του βιοκαταλύτη σε αντιδράσεις πολλών σταδίων και σε αντιδράσεις που απαιτούν συνένζυμα. Έχει ευρεθεί ότι η ακινητοποίηση μικρού αριθμού κυττάρων στα πολυμερή και η ανάπτυξή τους στη συνέχεια μέσα στο

πολυμερές βελτιώνει την ποιότητα του βιοκαταλύτη (KAREL et al 1985).

Χαρακτηριστικά παραδείγματα υποστρωμάτων αυτών των περιπτώσεων

Είναι η παγίδευση μέσα σε πηκτώματα πολυσακχαριτών όπως αλγινικών (ADLERCREUTZ et al 1985, KLOOSTERMAN and LILLY

1986), κ- καραγεννάνης (PARA and BARATTI 1988), άγαρ , χιτοζάνης , πολυγαλακτουρονικού οξέος ή σε άλλα πολυμερή υλικά όπως η ζελατίνη και το κολλαγόνο .

Η ανάπτυξη των ακινητοποιημένων κυττάρων στο υλικό αυτό εξαρτάται από τουε περιορισμούς της διάχυσης που καθορίζονται από το πορώδες του υλικού και από την επίδραση της συσσωρευμένης βιομάζας. Στην περίπτωση των αλγινικών και της καραγεννάνης, η διείσδυση του οξυγόνου στα πολυμερή αποτελεί τον περιοριστικό παράγοντα στην ανάπτυξη των κυττάρων. Το εύρος αποτελεσματικής διείσδυσης του οξυγόνου έχει εκτιμηθεί 0.08-0.10 mm για την περίπτωση της καραγεννάνης (HUANG et al 1990) και 0.1-0.15 mm για τα σφαιρίδια των αλγινικών (OGBONNA et al 1991).

Αναπτύσσεται έτσι ένας ανομοιογενώς κατανομημένος κυτταρικός πληθυσμός και πιθανόν εκείνα τα κύτταρα που βρίσκονται κοντά στην επιφάνεια συμπεριφέρονται διαφορετικά σε σύγκριση με τα ελλιπώς τροφοδοτούμενα κύτταρα που βρίσκονται στο εσωτερικό του πολυμερούς, όπου βρίσκονται σε συνθήκες περιορισμένου ή καθόλου οξυγόνου (FREEMAN and LILLY 1998).

Ένα από τα προβλήματα του εγκλωβισμού σε πολυμερές πορώδες υλικό , όπως σε πήκτη πολυσακχαριτών , είναι η ικανότητα των κυττάρων που βρίσκονται στην εξωτερική επιφάνεια του στρώματος, να πολλαπλασιάζονται και να απελευθερώνονται. Για να αποφευχθεί το πρόβλημα αυτό έχουν δημιουργηθεί σφαιρίδια με δύο στρώσεις , μία εσωτερική η οποία περιέχει τα κύτταρα , και μία εξωτερική που τα συγκρατεί.

3.2.3 Συσσωμάτωση με κροκίδωση (cell flocculation)

Κροκίδωση των κυττάρων (cell flocculation) , ονομάζεται η συσσώρευση των κυττάρων ώστε να σχηματίσουν ένα μεγαλύτερο σωματίδιο , ή η ιδιότητα που έχουν τα κύτταρα να σχηματίζουν θρόμβους και να καθιζάνουν γρήγορα. Η κροκίδωση μπορεί να θεωρηθεί τεχνική ακινητοποίησης αφού το μεγάλο μέγεθος των συσσωμάττωματων τα καθιστά ικανά να χρησιμοποιηθούν σε βιοαντιδραστήρες που έχουν σχεδιαστεί για

ακίνητοποιημένα κύτταρα, όπως γεμισμένης στήλης (packed bed reactor), ρευστοποιημένης κλίνης (fluidised beds) και να εγκλωβιστούν σε αυτούς ακόμη και σε συστήματα συνεχούς λειτουργίας με ανάδευση (CSTR).

Η ικανότητα σχηματισμού των συσσωματωμάτων παρατηρείται κυρίως σε ζυμομύκητες. Ωστόσο σε κυτταρικές καλλιέργειες που δεν γίνεται κροκίδωση, μπορούν να χρησιμοποιηθούν τεχνητοί παράγοντες κροκίδωσης ώστε να προκληθεί η θρόμβωση.

Συσσωματώματα δημιουργούν κυρίως μύκητες και φυτικά κύτταρα. Η δημιουργία συσσωματωμάτων μικροοργανισμών οι οποίοι δε σχηματίζουν από μόνοι τους συσσωματώματα, μπορεί να επιτευχθεί με προσθήκη διάφορων αντιδραστηρίων τα οποία βοηθούν την όλη διεργασία (KAREL et al 1985).

Η κροκίδωση ζυμών είναι σημαντική για τη βιομηχανία παρασκευής μπύρας αφού επηρεάζει την παραγωγικότητα της ζύμωσης και την ποιότητα του προϊόντος. Επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες όπως η σύσταση του κυτταρικού τοιχώματος, το pH, το διαλυμένο οξυγόνο και η σύσταση του θρεπτικού μέσου.

3.2.4 Μηχανική συγκράτηση βιοκαταλυτών σε ένα φορέα (encapsulation)

Τέλος, η μηχανική συγκράτηση των βιοκαταλυτών μπορεί να επιτευχθεί με

-τη χρήση φίλτρων από μεμβράνες με μικρούς πόρους

-εγκλωβισμό των κυττάρων σε μικροκάψουλες και

-ακίνητοποίηση των βιοκαταλυτών σε μία επιφάνεια αλληλεπίδρασης δύο μη αναμειγνύομενων υγρών. Αυτός ο τύπος ακίνητοποίησης είναι ιδανικός όταν απαιτείται προϊόν ελεύθερων κυττάρων ή από κάποια μεγάλου μοριακού βάρους ουσία.

Αυτά τα πλεονεκτήματα βέβαια, αντισταθμίζονται από το γεγονός ότι είναι δύσκολη η επίτευξη της μηχανικής συγκράτησης των κυττάρων και ότι η μεταφορά των θρεπτικών ουσιών, ιδίως αυτών που δεν έχουν μεγάλη διαλυτότητα, από τον κύριο όγκο του διαλύματος στα κύτταρα, είναι προβληματική (KAREL et al 1985). Στην αγορά υπάρχουν μεμβράνες στις οποίες έχουν εγκλωβιστεί επιλεγμένα στελέχη ζυμών και μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην οινοποίηση.

3.3 Πλεονεκτήματα χρήσης ακινητοποιημένων κυττάρων.

Πολλά πλεονεκτήματα έχουν αποδοθεί τα τελευταία χρόνια στη χρήση ακινητοποιημένων κυττάρων, είτε ως ακινητοποιημένα ένζυμα, είτε ως συστήματα ολόκληρων ζωντανών κυττάρων για παραγωγή προϊόντων ζύμωσης. Το μεγαλύτερο ποσοστό της έρευνας ασχολείται με απλές εφαρμογές και προσπαθεί να αποδείξει τα πλεονεκτήματα των ακινητοποιημένων κυττάρων έναντι των παραδοσιακών ζυμώσεων με ελεύθερα κύτταρα. Μερικά από αυτά αναφέρονται παρακάτω:

- α) Βελτιωμένη απόδοση παραγωγής λόγω επαναχρησιμοποίησης του βιοκαταλύτη, ανακύκλωσης των ενζύμων και συνενζύμων, υψηλών ρυθμών αντίδρασης και απομάκρυνσης των αναστολέων από το σύστημα.
- β) Δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης του βιοκαταλύτη λόγω ακινητοποίησης του μικροοργανισμού στο φορέα.
- γ) Επιτάχυνση του ρυθμού ζύμωσης λόγω επίτευξης υψηλών συγκεντρώσεων βιομάζας και χρήση κυττάρων που δεν βρίσκονται στη φάση ανάπτυξης των κυττάρων.
- δ) Υψηλή παραγωγικότητα λόγω της δυνατότητας χρησιμοποίησης των βιοκαταλυτών σε συνεχείς διαδικασίες και απομάκρυνσης των προϊόντων και των ανεπιθύμητων μεταβολικών παραπροϊόντων που δρουν ως αναστολείς.
- ε) Διατήρηση σταθερών και ενεργών βιοκαταλυτών λόγω διαχωρισμού της ανάπτυξης των κυττάρων από την παραγωγή του προϊόντος εξ' αιτίας της ακινητοποίησης των κυττάρων σε κάποιο φορέα.
- στ) Βελτιωμένος έλεγχος της παραγωγικής διαδικασίας στα συστήματα συνεχούς ζύμωσης λόγω διαχωρισμού του προϊόντος και απομάκρυνσης των

αναστολέων.

ζ) Προϊόν απαλλαγμένο κυττάρων λόγω του φυσικού διαχωρισμού του βιοκαταλύτη από το προϊόν.

3.4 Για να χρησιμοποιηθεί ένα υπόστρωμα ως φορέας ακινητοποίησης, πρέπει να τηρούνται ορισμένες προϋποθέσεις:

α) Διατήρηση της ζωτικότητας των ακινητοποιημένων κυττάρων. Η βιολογική δράση των ακινητοποιημένων κυττάρων δεν πρέπει να μεταβάλλεται με την ακινητοποίηση.

β) Ο βιοκαταλύτης πρέπει να διατηρεί ικανοποιητική μηχανική, χημική και βιολογική σταθερότητα. Δεν πρέπει να είναι ευαίσθητος στη δράση ενζύμων, διαλυτών, μεταβολών της πίεσης ή δυνάμεων αποκοπής (shear force).

γ) Ο βιοκαταλύτης πρέπει να είναι ή να παρασκευάζεται από φθηνά υλικά και να υπόκειται εύκολα σε διαδικασίες ανάπτυξης βιομηχανικής κλίμακας (scale-up).

δ) Το πορώδες του βιοκαταλύτη πρέπει να είναι αμετάβλητο και ελεγχόμενο. Η ελεύθερη μετακίνηση των υποστρωμάτων, προϊόντων και αερίων είναι βασική για αποδοτική λειτουργία των ακινητοποιημένων κυττάρων

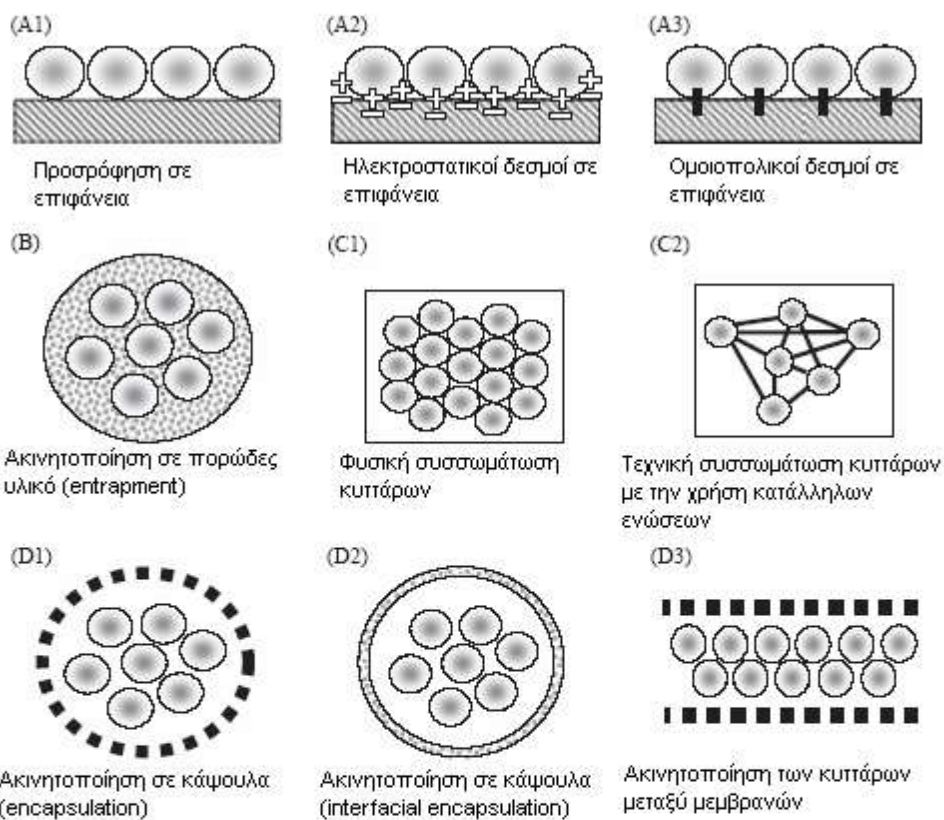
3.4.1 Τα υλικά των υποστρωμάτων μπορούν να διακριθούν σε :

- (α) οργανικά όπως τα άλατα του αλγινικού οξέος , η κ-καραγεννάνη και η χιτοζάνη.
- (β) Τα ανόργανα υποστρώματα όπως η κίσηρη, η γ-αλουμίνα και το γυαλί
- (γ) Τα φυσικά προϊόντα όπως η γλουτένη ,τα απολιγνισμένα κυτταρινούχα υλικά , το μήλο, το κυδώνι , το αγλάδι, οι σταφίδες και οι φλοιοί των πορτοκαλιών.
- (δ) Επίσης , μπορούν να χρησιμοποιηθούν συστήματα μεμβρανών.

3.5 Επίδραση της ακινητοποίησης στους μικροοργανισμούς.

Σε πολλές περιπτώσεις έχει αναφερθεί αλλαγή της μεταβολικής δραστηριότητας μικροοργανισμών κατά την ακινητοποίησή τους σε κάποιο φορέα. Οι πιθανοί λόγοι για αυτή την αλλαγή δεν είναι ακόμα σαφείς. Η αλλαγή αυτή είναι άμεσα συνδεδεμένη με το γεγονός ότι το μικροπεριβάλλον στο οποίο βρίσκονται τα ακινητοποιημένα κύτταρα συχνά διαφέρει από το περιβάλλον μιας καλλιέργειας ελευθέρων κυττάρων και αφορά κυρίως την αλλαγή της διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης, την αλλαγή της μορφολογίας του κυττάρου, την επίδραση της επιφανειακής τάσης και της οσμωτικής πίεσης στο μεταβολισμό του κυττάρου και την διάχυση των υποστρωμάτων και των προϊόντων από και προς το κύτταρο.

3.6 Περιληπτικές σημειώσεις



- a. Ακίνητοποίηση στην επιφάνεια στερεού φορέα
- b. Εγκλωβισμός σε πορώδες φορέα
- c. Συσσωμάτωση κυττάρων
- d. Συγκράτηση κυττάρων σε περιβάλλον με υγρό πυρήνα

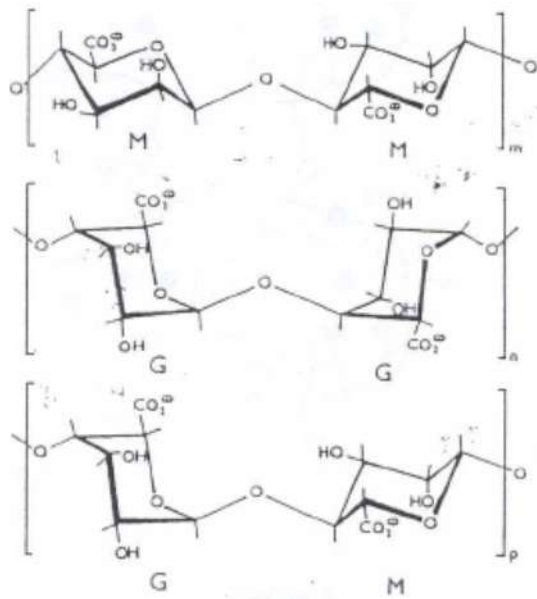
3.6.1 Ακίνητοποίηση με αλγινικό άλας

Το αλγινικό οξύ και τα άλατα του χρησιμοποιούνται ευρέως στην βιομηχανία λόγω της ιδιαίτερης κολλοειδούς της συμπεριφοράς. Για παράδειγμα χρησιμοποιείται ως γαλακτωματοποιητής, σταθεροποιητής και παράγοντας πήξης στη βιομηχανία των τροφίμων.

Το αλγινικό νάτριο είναι μια ουσία που κατατάσσεται ως GRAS (Generally Recognized as Safe) από τον FDA (US Food and Drug Administration) με αποτέλεσμα το αλγινικό νάτριο (όχι όμως άλλα άλατα του αλγινικού όπως για παράδειγμα αυτό του μαγνησίου) να μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παρασκευή τροφίμων. Τα αλγινικά άλατα προέρχονται από το αλγινικό οξύ που λαμβάνεται από τις καφέ άλγες όπου βρίσκεται στα κυτταρικά τοιχώματα και ως ενδοκυτταρικό συστατικό. Το αλγινικό είναι το πολυμερές που βρίσκεται σε μεγαλύτερη ποσότητα στο θαλάσσιο περιβάλλον, ενώ μετά την κυτταρίνη είναι το πιο συχνά ευρισκόμενο βιοπολυμερές στον κόσμο.

Το αλγινικό οξύ είναι γραμμικό, μη διακλαδιζόμενο πολυμερές που συντίθεται από δύο μονοσακχαρίτες τους 1,4-(β-D)-μανουρονικό οξύ (M) και 1,4-(α-L)-γουλουρονικό οξύ (G). Οι μονοσακχαρίτες αυτοί βρίσκονται σε διαφορετικές αναλογίες στο αλγινικό οξύ, ανάλογα με την πηγή προέλευσής του (θαλάσσια φύκη, φυτικό πλαγκτόν κ.α). Το αλγινικό οξύ και τα άλατά του είναι πολυσακχαρίτες που περιέχουν ομοπολυμερικά 'block' MM... και GG... αλλά και ανάμικτα 'block' που περιέχουν ακανόνιστες σειρές μονάδων μανουρονικού και γουλουρονικού οξέος.

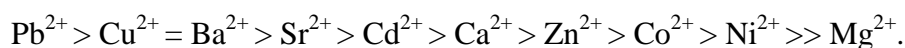
Παράδειγμα 'block' μανουρονικού – μανουρονικού οξέος, γουλουρονικού – γουλουρονικού οξέος και γουλουρονικού - μανουρονικού οξέος φαίνεται στο παρακάτω σχήμα α.



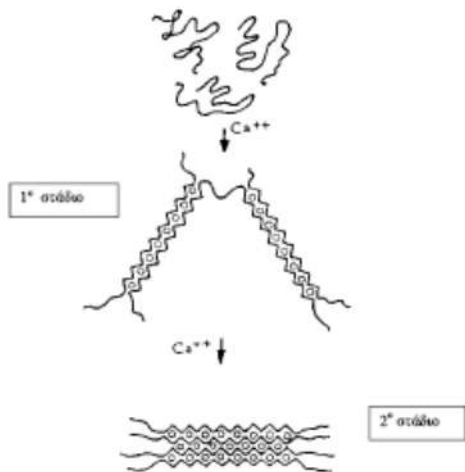
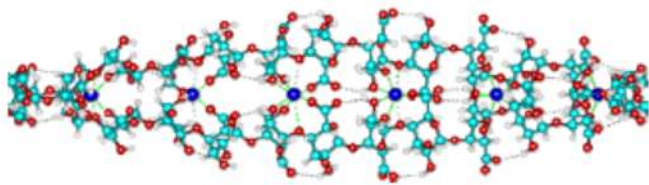
α. Δομή μανουρονικών, γουλουρονικών και ανάμικτων Block αλάτων αλγινικού (Clark & Ross-Murphy, 1987; Kennedy & Cabral, 1987)

Πρέπει να τονιστεί ότι η αναλογία γουλουρονικού/μανουρονικού διαφέρει από πηγή σε πηγή, από την εποχή παραλαβής και διαφέρει ακόμα σε μια μεμονωμένη άλγα.

Ο σχηματισμός του gel πραγματοποιείται όταν σε διάλυμα αλγινικού νάτριο εισαχθούν δισθενή κατιόντα όπως για παράδειγμα ιόντα ασβεστίου. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι κάθε μονάδα γουλουρονικού ή μανουρονικού οξέος περιέχει μια καρβοξυλομάδα η οποία σε ουδέτερο και όξινο pH είναι αρνητικά φορτισμένη καθιστώντας το αλγινικό ένα αρνητικά φορτισμένο πολυηλεκτρολύτη. Με την προσθήκη λοιπόν ενός δισθενούς κατιόντος για παράδειγμα Ca^{++} πραγματοποιείται αντικατάσταση των ιόντων Na^+ από ιόντα Ca^{++} που οδηγεί στο σχηματισμό του gel του οποίου τα ρεολογικά χαρακτηριστικά, το πορώδες και γενικά η μορφολογία του (για παράδειγμα οι εσωτερικές κοιλότητες που παρουσιάζει) εξαρτώνται από τον τύπο του αλγινικού άλατος δηλαδή την αναλογία M/G και το μοριακό του βάρος, την συγκέντρωση του αλγινικού άλατος, την συγκέντρωση του κατιόντος και τον τρόπο εισαγωγής του, την θερμοκρασία κατά την οποία σχηματίζεται το gel, πιθανές προσμίξεις άλλων ουσιών που μπορούν να επηρεάσουν την διαδικασία. Επίσης το είδος του κατιόντος που χρησιμοποιείται οδηγεί και σε διαφορετική δομή του δικτύου του παραγόμενου gel. Πρέπει να τονιστεί ότι τα διάφορα κατιόντα δημιουργούν gel με διαφορετική αντοχή. Σύμφωνα με την ικανότητα τους να σχηματίζουν ισχυρά gel τα κατιόντα της δεύτερης ομάδας του περιοδικού πίνακα κατατάσσονται στην ακόλουθη σειρά :



Τα ιόντα Ca^{++} ενώνονται μόνο με τα block του γουλουρονικού οξέος. Τα block του μανουρονικού οξέος δεν συνδέονται με τα ιόντα του ασβεστίου. Ο σχηματισμός του gel του αλγινικού ασβεστίου πραγματοποιείται σε δύο στάδια. Κατά το πρώτο στάδιο έχουμε ένα διμερισμό κατά μήκος των αλυσίδων του πολυμερούς και εν συνεχεία έχουμε συσσωμάτωση των πολυμερικών αλυσίδων σε μορφή δίπτυχης κορδέλας (σχήμα.β.). Δηλαδή τα ιόντα Ca^{++} που δεσμεύονται σ' αυτή τη διαδικασία τοποθετούνται μέσα στις ηλεκτραρνητικές κοιλότητες (λόγω των ατόμων οξυγόνου των καρβυλικών ομάδων, που συμμετέχουν σ' αυτή τη χημική ένωση) σαν αυγά μέσα σε κουτί αυγών. Αρχικά έχουμε δηλαδή ένωση δύο αλυσίδων η μια απέναντι στην άλλη, αλυσίδων αλάτων του γουλουρονικού οξέος που προνομιακά συνδέονται με τα δισθενή κατιόντα, συνήθως Ca^{++} , σε σχέση με τα blocks του μανουρονικού οξέος που παρουσιάζουν μια σταθερή πολυηλεκτρολυτική συμπεριφορά. Στη συνέχεια, υψηλότερες συσσωματώσεις, φαίνεται ότι συμβαίνουν κάτω από την επίδραση υψηλών συγκεντρώσεων Ca^{++} . Έτσι έχουμε ένα τρισδιάστατο αδρανές πολυμερές δίκτυο με σχετικά πλατιά διασυνδεδεμένα εμβόλιμα διαστήματα, το gel του αλγινικού ασβεστίου.

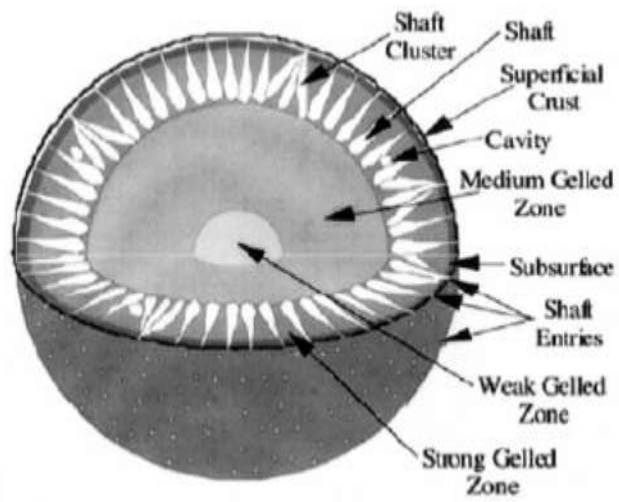


β. Σχηματισμός αλγινικού τζελ σε δύο στάδια (Πηγή Clark & Ross-Murphy 1987).

3.6.2 Σκλήρυνση του gel (Hardening ή Curing)

Τα gel αλγινικού ασβεστίου μετά την παρασκευή τους συνήθως εμβαπτίζονται ξανά σε διάλυμα CaCl_2 . Η διαδικασία αυτή έχει ως στόχο την δέσμευση των εναπομεινάντων block του γουλουρονικού οξέος με αποτέλεσμα τη μείωση του όγκου των παραγόμενων σφαιριδίων, την αύξηση της μηχανικής και χημικής τους αντοχής. Παρατηρείται μείωση του όγκου των σφαιριδίων μετά από 24 ώρες curing που φθάνει το 35%. Η μείωση του όγκου των σφαιριδίων κατά την εμβάπτισή τους σε διάλυμα χλωριούχου ασβεστίου λαμβάνει χώρα κυρίως κατά τα 5 πρώτα λεπτά της παραμονής των σφαιριδίων στο διάλυμα. Μετά από λίγες μέρες παραμονής στο ίδιο διάλυμα CaCl_2 παρατήρησαν ότι υπάρχει επιπλέον συρρίκνωση των σφαιριδίων η οποία όμως αντιπροσωπεύει μόνο το 1-2% της διαμέτρου που λήφθηκε μετά από 5 λεπτά παραμονής στο διάλυμα CaCl_2 . Επίσης έχει βρεθεί ότι η ταχύτητα ‘κορεσμού’ των σφαιριδίων του αλγινικού νατρίου σε ασβέστιο αυξάνει με την μείωση της συγκέντρωσης του αλγινικού νατρίου και την αύξηση της συγκέντρωσης των κατιόντων ασβεστίου, αντίθετα μικρότερη ταχύτητα επιτυγχάνεται με αύξηση της συγκέντρωσης του αλγινικού νατρίου και μείωση της συγκέντρωσης των κατιόντων ασβεστίου. Σύμφωνα με τα παραπάνω γίνεται κατανοητό ότι ο χρόνος που απαιτείται για τον αρχικό σχηματισμό του gel (gelation time) όσο και ο χρόνος που απαιτείται για την αύξηση της αντοχής μέσω της δέσμευσης των εναπομεινάντων block του γουλουρονικού οξέος (hardening) εξαρτώνται από πλήθος παραγόντων οι κυριότερες των οποίων είναι :

- α) Η συγκέντρωση του αλγινικού νατρίου
- β) Η συγκέντρωση του χλωριούχου ασβεστίου
- γ) Η αναλογία γουλουρονικού/μανουρονικό οξέος του αλγινικού άλατος και το μοριακό του βάρος
- δ) Η διάμετρος των σφαιριδίων



4. ΞΗΡΑΝΣΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

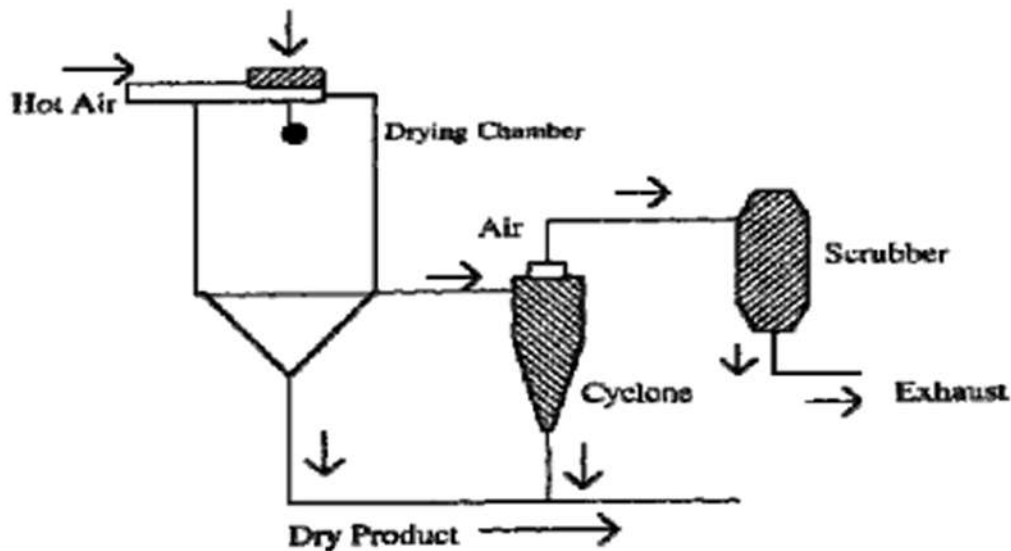
4.1 Ξήρανση με ψεκασμό (spray drying)

Η ξήρανσης με ψεκασμό είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος για την ξήρανση υδατικών ή οργανικών διαλυμάτων της βιομηχανίας τροφίμων καθώς είναι οικονομική, ευέλικτη και παράγει σωματίδια καλής ποιότητας (Dziezak, 1988). Στόχος αυτής της διαδικασίας είναι η παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων ακολουθώντας έναν απλό και συνεχή τρόπο επεξεργασίας (Ankaiharanmakrishnan, Rielly, και Stapley, 2007). Εφαρμόζεται κυρίως για την παρασκευή σκόνης γάλακτος ορού γάλακτος, παγωτού βουτύρου, τυριού και παιδικών τροφών με πρώτη ύλη το γάλα. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο για τη συντήρηση των τροφίμων όσο και ως απλή μέθοδος ταχείας ξήρανσης.

Γενικότερα, ο όρος ξήρανση (drying) στη βιομηχανία τροφίμων χρησιμοποιείται για τη διεργασία κατά την οποία η απομάκρυνση νερού από το τρόφιμο γίνεται με εξάτμιση. Η ξήρανση των περισσότερων τροφίμων γίνεται με θέρμανση. Οι θερμοκρασίες που συνήθως χρησιμοποιούνται στην τεχνική αυτή κυμαίνονται από 150 °C έως 220 °C, ενώ στη συνέχεια η θερμοκρασία πέφτει στους 50 – 80 °C. Επομένως είναι μία διεργασία στην οποία εμπλέκεται μεταφορά μάζας (νερού) από το τρόφιμο προς το περιβάλλον και μεταφορά θερμότητας από το μέσον θέρμανσης προς το τρόφιμο. Στην ξήρανση των τροφίμων ισχύουν οι βασικές αρχές που διέπουν την ξήρανση οποιουδήποτε άλλου προϊόντος. Οι ιδιαιτερότητες των τροφίμων σχετίζονται με το ρόλο του νερού σε αυτά και την ευαισθησία των συστατικών και των ποιοτικών χαρακτηριστικών τους στις θερμικές διεργασίες. Σε υγρά τρόφιμα, το υγρό διασκορπίζεται σε μικρά σταγονίδια τα οποία ξηραίνονται σε ρεύμα θερμού αέρα.

Πιο αναλυτικά, η διαδικασία ξεκινά με το σχηματισμό ενός υδατικού φορέα. Η ουσία ή το μείγμα ουσιών που θα υποστεί αυτή τη διαδικασία γαλακτοποιείται σε ένα φορέα και εισέρχεται στο θάλαμο της συσκευής με μεγάλη πίεση θερμού αέρα και ψεκάζεται από τον εκνεφωτή ή τον περιστρεφόμενο δίσκο της συσκευής (Jackson και Lee, 1991). Αυτό οδηγεί στην εξάτμιση του διαλύτη (νερό) και κατά συνέπεια στον σχηματισμό σφαιριδίων υγρού υλικού (σταγονίδια) τα οποία θερμαίνονται άμεσα. Το τυπικό σχήμα των παραγόμενων σωματιδίων είναι σφαιρικό, και το μέσο μέγεθος κυμαίνεται από 10 nm έως 100 nm (Fang και Bhandari, 2010). Ο χρόνος παραμονής στο θάλαμο ξήρανσης είναι 1-20 δευτερόλεπτα. Για το λόγο αυτό η ξήρανση με ψεκασμό θεωρείται ιδανική για τη διαχείριση μορίων, ασταθή σε υψηλές θερμοκρασίες (Vidhyalakshmi et al., 2009). Σημειώνεται ότι η το πυρηνικό υλικό και το υλικό του εξωτερικού καλύμματος θα πρέπει να βρίσκονται σε αναλογία 1:4

(Gibbs et al., 1999). Ο συνηθέστερος τύπος συσκευής ξηραντήρα αυτού του είδους είναι η open-cycle, co-current όπως απεικονίζεται στο παρακάτω σχήμα.



Πηγή:Barbosa-CanovaκαιVega-Mercado,1996

Σχήμα 3. Συσκευής ξηραντήρα τύπου open-cycle, co-current

Το κύριο πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι μπορεί να λειτουργήσει σε συνεχή βάση. Επιπλέον, μπορεί να εξασφαλίζει ξηρά προϊόντα με εξαιρετικά ποιοτικά χαρακτηριστικά δεδομένου ότι ο χρόνος παραμονής στον ξηραντήρα είναι μικρός και η διατήρηση του τροφίμου πραγματοποιείται σε θερμοκρασία όχι ψηλότερη από την θερμοκρασία υγρού θερμομέτρου του αέρα ξήρανσης. Ωστόσο, οι προκλήσεις που συνδέονται με το μικροεγκλεισμό των προβιοτικών με τη μέθοδο αυτή έγκειται στη μείωση της επιβίωσης των βακτηριακών κυττάρων εξαιτίας της ταυτόχρονης αφυδάτωσης και του θερμικού στρες (Anal και Singh, 2007, Lian, Hsiao, και Chou, 2002).

4.1.2 Λυοφιλίωση ή ξήρανση υπό κατάψυξη (Lyophilisation or freeze drying)

Η λυοφιλίωση ή αλλιώς ξήρανση υπό κατάψυξη, είναι μια ιδιαίτερα εξελιγμένη μέθοδος αφυδάτωσης τροφίμων που χρησιμοποιείται κυρίως για θερμο-ευαίσθητα συστατικά. Συνίσταται στην κατάψυξη του υπό ξήρανση υλικού και κατόπιν την εξάχνωση του σχηματισθέντος πάγου μέσα στο κατεψυγμένο υλικό, ώστε να παραχθεί το αφυδατωμένο προϊόν. Τα προϊόντα της είναι υψηλής ποιότητας, ανασυντίθενται εύκολα και έχουν μεγάλο χρόνο ζωής (Ezhilarasik et al., 2013). Τα πιο σημαντικά από αυτά είναι διατροφολογικά συστατικά, εμβόλια, αντιβιοτικά, στιγμιαίος καφές, λαχανικά, βότανα και μπαχαρικά, φρούτα για δημητριακά πρωινού, τρόφιμα για αστροναύτες, στιγμιαίες σούπες πολυτελείας, χημικά προϊόντα υψηλής αξίας και χρωστικές ουσίες.

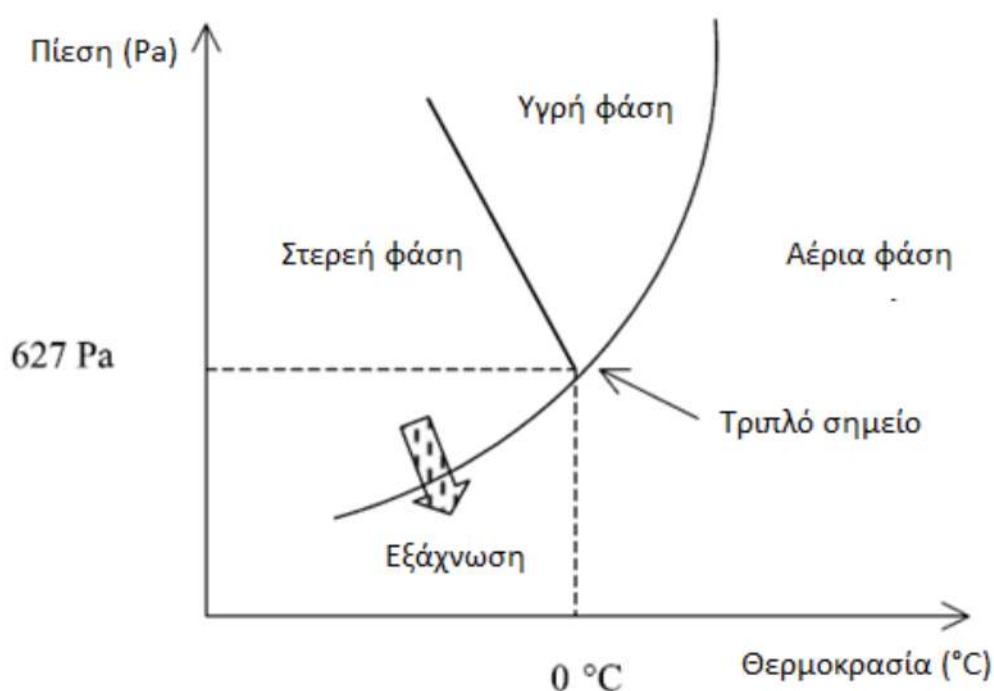
Η ξήρανση με κατάψυξη είναι μια πολύ-επίπεδη διαδικασία για τη σταθεροποίηση των συστατικών. Πραγματοποιείται με αρχική κατάψυξη του προς ξήρανση προϊόντος και στη συνέχεια αποδίδεται η κατάλληλη θερμότητα στις επιφάνειες αυτού με μειωμένη πίεση που οδηγεί σε εξάχνωση του πάγου. Για τη μείωση της πίεσης, αλλά και την απομάκρυνση των ήδη υπάρχοντων αερίων στο θάλαμο της λυοφιλίωσης, τίθεται σε λειτουργία μία αντλία κενού. Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει τρία στάδια (Labconco, 1992):

- Κατάψυξη, που προετοιμάζει το προϊόν για τη διαδικασία εξάχνωσης
- Πρωτογενή ξήρανση (main drying), στην οποία ο πάγος εξαχνώνεται χωρίς τήξη
- Δευτερογενή ξήρανση (secondary drying), στην οποία το μεγαλύτερο μέρος του δεσμευμένου νερού απομακρύνεται αφήνοντας ένα ξηρό προϊόν.

Δεδομένου ότι η διαδικασία της ψύξης είναι γρήγορη, σχηματίζονται μόνο μικροί κρύσταλλοι πάγου. Η αργή ψύξη θα σχημάτιζε πολύ μεγαλύτερους κρυστάλλους και θα μπορούσε να καταστρέψει τη δομή του προϊόντος, με την εισχώρηση των κρυστάλλων στα κυτταρικά τοιχώματα. Στο στάδιο της εφαρμογής κενού, η χαμηλή πίεση προστατεύει τα παγωμένα προϊόντα από το να λιώσουν και επιταχύνει το επόμενο στάδιο της διαδικασίας που είναι το πρωταρχικό στάδιο της ξήρανσης. Η εξάχνωση του πάγου διασφαλίζει ότι η δομή του προϊόντος παραμένει ανέπαφη. Κατά τη διάρκεια του πρώτου σταδίου της ξήρανσης, περίπου το 95% του νερού απομακρύνεται από το προϊόν. Στο δεύτερο στάδιο της ξήρανσης-που μερικές φορές

λαμβάνει χώρα σε υψηλότερες θερμοκρασίες-το νερό που είναι συνδεδεμένο με πρωτεΐνες και υδατάνθρακες μέσα στο προϊόν, επίσης, απομακρύνεται.

Η λυοφιλίωση βασίζεται στην εξάχνωση του πάγου, φαινόμενο που έχει ως αποτέλεσμα την απομάκρυνση το μεγαλύτερου μέρους του νερού που περιέχεται στα τρόφιμα. Η μετάβαση του νερού από τη στερεά στην αέρια κατάσταση, χωρίς να μετατραπεί σε υγρό είναι δυνατή μόνο σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες και πιέσεις. Όπως αποτυπώνεται στο παρακάτω σχήμα η καμπύλη εξάχνωσης βρίσκεται μεταξύ της στερεάς και της αέριας φάσης του νερού σε πολύ χαμηλές πιέσεις και θερμοκρασίες, κάτω από το τριπλό σημείο του νερού όπου συνυπάρχουν οι τρεις φάσεις του νερού (θερμοκρασία <math>< 0,01 \text{ }^\circ\text{C}</math> και πίεση 6,104 mbar ή 4.58 mmHg).



Πηγή: Barbosa Canovas et al., 2005

Σχήμα 4. Διάγραμμα φάσεων του καθαρού νερού

Η μέθοδος της λυοφιλίωσης πλεονεκτεί των υπόλοιπων μεθόδων αφυδάτωσης, καθώς έχει τα ακόλουθα πλεονεκτήματα:

- δεν καταστρέφει τα θρεπτικά συστατικά του τροφίμου και επιπλέον διατηρεί τα πτητικά αρωματικά συστατικά του,

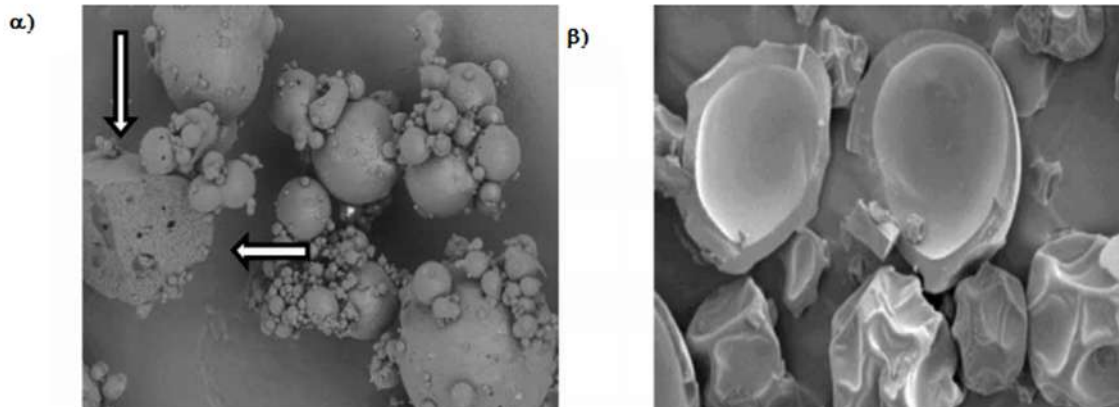
- συντηρεί καλύτερα τα χαρακτηριστικά της δομής και εμφάνισης, καθώς η συρρίκνωση είναι αμελητέα,
- τα δείγματα δεν αφρίζουν, δεν σκληραίνουν, δεν οξειδώνονται
- δεν υφίστανται καμία μεταβολή στη μικροβιοχλωρίδα τους κατά την επεξεργασία αυτή. (<http://nutrition.med.uoc.gr>).

Ωστόσο τα προϊόντα που προκύπτουν σε μορφή σκόνης όταν επαναενυδατώνονται είναι υδαρή και δεν επανέρχονται στην αρχική τους υφή. Επιπλέον μειονέκτημα αποτελούν το μεγάλο λειτουργικό κόστος, ο εξοπλισμός και οι υψηλές απαιτήσεις σε ενέργεια.

4.1.3 Ψεκασμό με ψυχρό αέρα (spray cooling/chilling)

Η ψύξη με ψεκασμό είναι μία μέθοδος που στοχεύει στην παραγωγή επικαλυμμένων λιπιδίων σε ενεργό μέσο (Kjaergaard 2001, Uhlemann et al 2002, Gouin 2004). Χρησιμοποιείται ευρέως για τον εγκλεισμό τόσο των οργανικών και ανόργανων αλάτων, όσο και δομικών συστατικών των τροφίμων, ενζύμων, αρωματικών συστατικών. Επιπλέον βρίσκει εφαρμογή στα λειτουργικά συστατικά για την αύξηση της σταθερότητας τους κατά τη θέρμανση και τη μετατροπή υγρών, υδρόφιλων συστατικών σε σκόνες.

Η διαδικασία αυτή είναι παρόμοια με την ξήρανση με ψεκασμό ως προς την παραγωγή ενός εναιωρήματος, γαλακτώματος ή διαλύματος. Παρόλα αυτά, οι βασικές διαφορές τους έγκεινται στη θερμοκρασία του αέρα που χρησιμοποιείται στον θάλαμο ξήρανσης και στο υλικό εξωτερικού καλύμματος που χρησιμοποιείται. Στην περίπτωση της ξήρανση με ψεκασμό χρησιμοποιεί θερμός αέρας για την εξάτμιση του διαλύτη. Αντιθέτως, στη μέθοδο της ψύξης με ψεκασμό χρησιμοποιείται κρύος αέρας χαμηλότερης θερμοκρασίας από τη θερμοκρασία πήξης των τετηγμένων λιποειδών ή κηρών που χρησιμοποιούνται ως εξωτερικά καλύμματα. Γενικά, το σημείο τήξης του λιπιδίου που χρησιμοποιείται είναι εύρους 34-42 °C (Zuidam και Nedovic, 2010). Όμως και στις δύο μεθόδους δεν σχηματίζονται οι μικροκάψουλες της γνωστής μορφής, αλλά αντ' αυτού παράγονται μικροσφαιρίδια τύπου μήτρας πυκνής και μαζικής μορφής κατά το ψεκασμό με ψυχρό αέρα και κοίλα κατά τη ξήρανση με ψεκασμό (Gouin, 2004).



Πηγή: Kiyomi Okuro et al, 2013

Σχήμα 5. Μικρογραφία ενός σπασμένου σωματιδίου που παράγεται α) κατά το ψεκάσμο με ψυχρό αέρα, β) κατά τη ξήρανση με ψεκάσμο.

Η μέθοδος αυτή θεωρείται η λιγότερο δαπανηρή μέθοδος ενθυλάκωσης και παρουσιάζει μερικά πλεονεκτήματα σε σχέση με τις άλλες. Επιπλέον, μπορεί να επεκτείνει το φάσμα των χρησιμοποιούμενων μητρών. Περαιτέρω, είναι δυνατόν να παράγει πολύ μικρά σωματίδια.

4.1.4 Ξήρανση περιστρεφόμενος δίσκος (spinning disk)

Η μέθοδος του περιστρεφόμενου δίσκου περιλαμβάνει αρχικά το σχηματισμό αιωρήματος του συστατικού που πρόκειται να ενθυλακωθεί σε διάλυμα του μέσου εγκλεισμού. Ακολουθεί το πέρασμα του αιωρήματος σε περιστρεφόμενο δίσκο σε συνθήκες που οδηγούν στο σχηματισμό ενός φιλμ που είναι πιο λεπτό από το πάχος του συστατικού που ενθυλακώνεται (Sparks και Jacobs, 1999). Το βασικό πλεονέκτημα αυτής της διαδικασίας είναι το χαμηλό κόστος και ο απλός εξοπλισμός που απαιτείται για τη δημιουργία του περιστρεφόμενου δίσκου.

4.1.5 Θερμική (συν)εξώθηση ή εκβολή (extrusion)

Η εξώθηση είναι άλλη μια φυσική μέθοδος μικροενθυλάκωσης που χρησιμοποιείται σχεδόν αποκλειστικά για την ενθυλάκωση πτητικών και ασταθών αρωματικών συστατικών των τροφίμων σε υδατάνθρακες που βρίσκονται στην υαλώδη κατάσταση (Poshadri και Arana, 2010). Ανάμεσα σε αυτά εμπεριέχονται χρώματα και ιδιαίτερα εφαρμογές ξηρών τροφών, όπως ποτών, κέικ, κοκτέιλ και μείγματα επιδόρπιων από ζελατίνη (Gibbs et al., 1999).

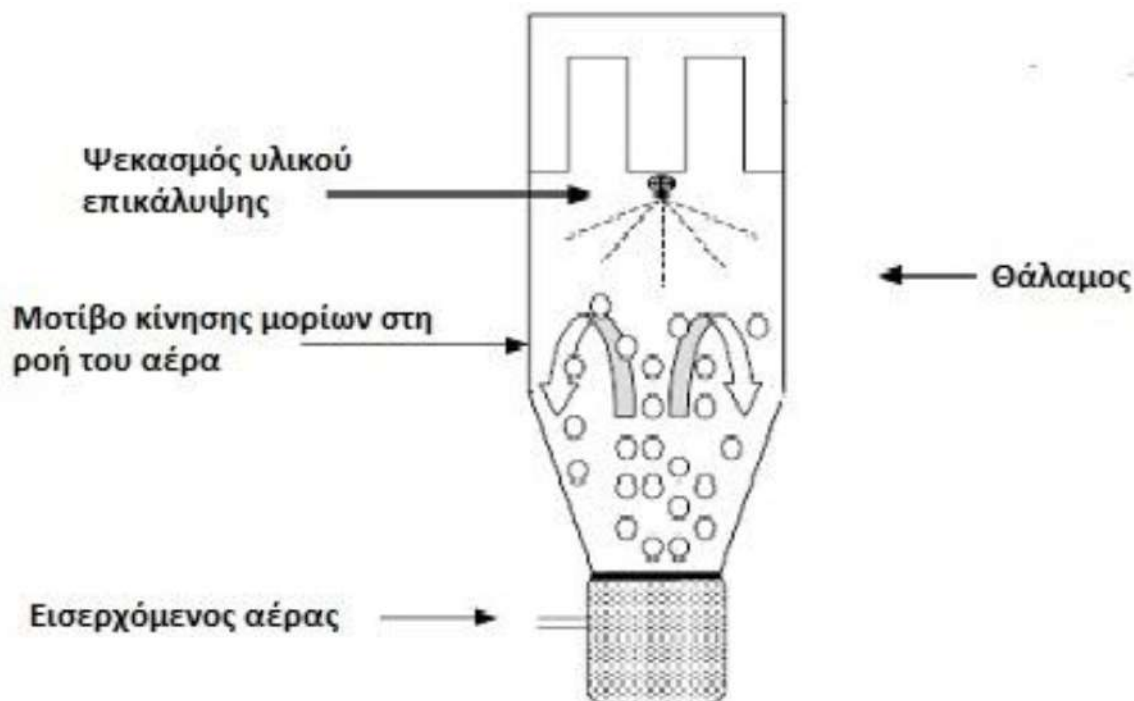
Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει την συσκευή εξώθησης, η οποία αποτελείται από μια συσκευή παραγωγής και συμπύκνωσης σταγονιδίων ώστε να ρεύσουν διαμέσου ενός στομίου ή καλουπιού υπό ελεγχόμενες συνθήκες (Vidhyalakshmi et al, 2009). Δεδομένου ότι το πυρηνικό υλικό είναι εντελώς απομονωμένο από το εξωτερικό κάλυμμα, δίνει καλή προστασία και βελτιώνει τη σταθερότητα.

Το βασικό πλεονέκτημα αυτής της διαδικασίας είναι η μεγάλη διάρκεια ζωής των παραγόμενων προϊόντων σε μόρια που είναι επιρρεπή στην οξείδωση. Με αυτόν τον τρόπο ο χρόνος ζωής ενός ενθυλακωμένου αρωματικού συστατικού μπορεί να φτάσει μέχρι και πέντε χρόνια. Από την άλλη πλευρά, ένα σημαντικό μειονέκτημα είναι το μεγάλο μέγεθος των σωματιδίων που προκύπτουν (500 - 1000 μm). Επιπλέον, υπάρχει περιορισμένος αριθμός υλικών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εξωτερικά καλύμματα για μικροενθυλάκωση με εξώθηση (Gouin, 2004).

4.1.6 Επικάλυψη σε ρευστοποιημένη κλίνη (fluidized bed coating)

Η μέθοδος της επικάλυψης σε ρευστοποιημένη κλίνη αποτελεί έναν τρόπο δημιουργίας μιας ομοιόμορφης στοιβάδας γύρω από στερεά σωματίδια. Τα στερεά σωματίδια προς ενθυλάκωση, παρασύρονται από τον πυθμένα του θαλάμου επικάλυψης προς το ανώτερο τμήμα του θαλάμου κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας (Dezarn, 1995). Ο αριθμός των παραγόμενων στερεών σωματιδίων καθορίζεται από τον χρόνο παραμονής τους στο θάλαμο. Οι βέλτιστες

τιμές λαμβάνονται όταν το μέγεθος σωματιδίων κυμαίνεται μεταξύ 50 και 500 nm. Ως μέσω ενθυλάκωσης μπορούν χρησιμοποιηθούν μια ποικιλία συστατικών όπως υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, λίπη, αιθανολικά διαλύματα συνθετικών πολυμερών και γαλακτοματοποιητές.



Πηγή: Barbosa Canovas et al., 2005

Σχήμα 6. Σχηματική απεικόνιση της επικάλυψης με ρευστοποιημένη κλίνη

Κατά τη μέθοδο της ρευστοποιημένης κλίνης σχηματίζεται μια στοιβάδα λίπους, η οποία παρέχει μεγαλύτερη προστασία στις μικροκάψουλες που έχουν υποστεί ξήρανση με ψεκασμό. Η διαδικασία αυτή βρίσκει εφαρμογή στη βιομηχανία τροφίμων σε εμπλουτισμένα τρόφιμα και διατροφικά μείγματα. Σε αυτά συγκαταλέγονται το κιτρικό οξύ, το γαλακτικό οξύ, το σορβικό οξύ, βιταμίνη C και το αλάτι που προστίθεται στα κρέατα (Gibbs et al, 1999).

4.1.7 Συγκρυστάλλωση με άλλα συστατικά (cocrystallization)

Η συγκρυστάλλωση είναι μια διαδικασία ενθυλάκωσης κατά την οποία η κρυσταλλική μορφή της σουκρόζης τροποποιείται με αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας πορώδους μήτρας όπου καθιστά δυνατή την ενσωμάτωση του πυρηνικού υλικού.

Πιο αναλυτικά, το σιρόπι σακχαρόζης συμπυκνώνεται σε υπέρκορο κατάσταση και διατηρείται σε υψηλή θερμοκρασία (> 120 οC) και χαμηλή υγρασία (95-97 ο Brix) ώστε να αποτραπεί η κρυστάλλωση. Στην συνέχεια καθορισμένη ποσότητα πυρηνικού υλικού προστίθεται στο συμπυκνωμένο σιρόπι με έντονη ανάδευση. Όταν το σιρόπι φθάνει στην θερμοκρασία που επιτυγχάνεται ο μετασχηματισμός και η κρυστάλλωση, εκπέμπεται ένα σημαντικό ποσό θερμότητας. Ωστόσο, η ανάδευση συνεχίζεται προκειμένου να προωθήσει και να επεκτείνει την κρυστάλλωση μέχρις ότου τα συσσωματώματα αποβάλλονται από το δοχείο. Τα προϊόντα ενθυλάκωσης στη συνέχεια ξηραίνονται στην επιθυμητή υγρασία εάν είναι απαραίτητο και κοσκινίζονται (Poshadri και Arama, 2010). Η συν-κρυστάλλωση εξαιτίας της σχετικής απλότητας της, μπορεί να εξελιχθεί σε μια οικονομική και ευέλικτη διαδικασία στο μέλλον (Madene et al., 2006).

Το κύριο πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η βελτιωμένη διαλυτότητα, ομοιογένεια, ικανότητα διασποράς, ενυδάτωση, αντισυσσωμάτωση, σταθερότητα και ρευστότητα των ενθυλακωμένων συστατικών (Fang και Bhandari, 2010).

4.1.8 Απορρόφηση (absorption)

Η μέθοδος της απορρόφηση αποτελεί τη λιγότερο ανεπτυγμένη μέθοδο ενθυλάκωσης και περιλαμβάνει συνήθως τη προσρόφηση αρωματικού συστατικού στην επιφάνεια του υποστρώματος. Σε συσκευασμένα τρόφιμα επιτρέπει την ελεγχόμενη απελευθέρωσή τους και στην περίπτωση που ανοιχτούν διατηρούν το επίπεδο του αρώματος σταθερό. Επιπλέον στο τομέα των τροφίμων βρίσκει εφαρμογή στην απομάκρυνση μη επιθυμητών συστατικών μέσω προσρόφησής τους σε κατάλληλα υποστρώματα. Στη μέθοδο αυτή σημαντική παράμετρος εκτίμησης είναι το πορώδες (Zeller et al., 1999)

4.1.9 Εγκλεισμός σε λιποσώματα (liposome entrapment)

Τα λιποσώματα αποτελούνται από τουλάχιστον ένα κυστίδιο και συντίθενται από λιπιδικές μεμβράνες, μίας ή δύο στοιβάδων. Οι στοιβάδες απαρτίζονται από λιπίδια όπως τα φωσφολιπίδια (λεκιθίνη) και η χοληστερόλη. Τα λιποσώματα αρχικά σχηματίζονται όταν τα λιπίδια διασπαρθούν σε ένα υδατικό μέσο και αργότερα εκτίθενται σε υψηλούς ρυθμούς διάτμησης. Ο υποκείμενος μηχανισμός της δημιουργίας των λιποσωμάτων στηρίζεται στις υδροφιλικές - υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στα λιπίδια και τα μόρια του νερού. Το πυρηνικό υλικό μπορεί είτε να εγκλειστεί στην κοιλότητα του λιποσώματος τη στιγμή του σχηματισμού του είτε να προσκολληθεί στην επιφάνειά του ή ενδομεμβρανικά. (Zuidam και Nedović, 2010). Το τυπικό μέγεθος ενός λιποσώματος είναι από 25 nm έως 10.000 nm. Η μέθοδος αυτή έχουν εφαρμοστεί κυρίως στη φαρμακευτική για τη μεταφορά φαρμάκων (Torchillin και Weissig 2003). Η χρήση της στα τρόφιμα είναι ιδιαίτερα περιορισμένη εξαιτίας της χαμηλής απόδοσης της ενθυλάκωσης, το υψηλό κόστος και της αυξημένης πιθανότητας «διαφυγής» υδατοδιαλυτών εγκλεισμένων μορίων κατά την αποθήκευση του προϊόντος (Zuidam et al. 2003).

4.1.10 Σχηματισμός συμπλόκων εγκλεισμού (inclusion complexation)

Ο όρος σύμπλοκο εγκλεισμού αναφέρεται στη δημιουργία συμπλόκου με τη συμμετοχή δύο συστατικών. Το πιο γνωστό παράδειγμα είναι η κυκλοδεξτρίνη (Hedges 1998, Szente και Szejtli 2004, Regiert, 2008). Οι κυκλοδεξτρίνες είναι κυκλικά ολιγομερή της γλυκόζης με 6, 7 ή 8 μονάδες γλυκόζης και ονομάζονται α-, β- και γ- κυκλοδεξτρίνες αντίστοιχα,

Η εσωτερική κοιλότητα των κυκλοδεξτρίνων είναι υδρόφοβη ενώ εξωτερικά το μόριο είναι υδρόφιλο. Συνεπώς οι κυκλοδεξτρίνες σχηματίζουν εύκολα σύμπλοκα με μια μεγάλη ποικιλία μορίων καθώς και ιόντα μορίων. Διατροφο-δραστικά συστατικά, τα οποία συνήθως είναι λιπόφιλα μπορούν εύκολα να εγκλεισθούν σε κυκλοδεξτρίνες (Bibby et al, 2000). Ο μηχανισμός περιλαμβάνει την αντικατάσταση μορίων νερού που συγκρατούνται στο κέντρο της κυκλοδεξτρίνης, από μόρια του εγκλειόμενου συστατικού. Η μέθοδος της συγκαταβύθισης είναι η περισσότερο χρησιμοποιούμενη εργαστηριακή μέθοδος για την παρασκευή συμπλόκων εγκλεισης των κυκλοδεξτρινών με βιοδραστικές ουσίες. Η βιοδραστική ουσία διαλύεται σε

κατάλληλο οργανικό διαλύτη (διαιθυλαιθέρα, χλωροφόρμιο, μεθανόλη κ.α.) και προστίθεται υπό ανάμιξη σε υδατικό διάλυμα κυκλοδεξτρίνης. Με την ψύξη του διαλύματος έχουμε τον σχηματισμό κρυστάλλων των συμπλόκων έγκλεισης. Οι σχηματιζόμενοι κρύσταλλοι εκπλένονται με διαιθυλαιθέρα ή κάποιον άλλον οργανικό διαλύτη και στη συνέχεια ξηραίνονται στους 50 οC μέχρι την παραγωγή κόνεως.

Άλλα χαρακτηριστικά παραδείγματα μοριακού εγκλεισμού μπορεί να είναι η παγίδευση των λιπιδίων από αμυλόζη και η χρήση ενός συνδέτη δέσμευσης πρωτεϊνών όπως είναι η β-λακτοσφαιρίνη (De Wolf και Brett, 2000). Το τροποποιημένο άμυλο ανήκει στην κατηγορία του ανθεκτικού άμυλου, δηλαδή είναι ανθεκτικό στην ενζυμική υδρόλυση του πραγματοποιείται στο λεπτό έντερο κατά την πέψη του, και μεταβολίζεται από την εντερική μικροχλωρίδα του παχέος εντέρου (Ai et al., 2013). Η β-λακτοσφαιρίνη μία μη-γλυκοζυλιωμένη λιποκαλίνη, είναι η βασική πρωτεΐνη του ορού του γάλακτος πολλών θηλαστικών, της οποίας η λειτουργικότητα συνδέεται με τη δέσμευση, προστασία και μεταφορά υψηλής αξίας υδρόφοβων βιομοριών.

4.1.11 Διαχωρισμός φάσεων (coacervation)

Η συσσωμάτωση είναι μία μέθοδος διαχωρισμού που περιλαμβάνει δύο υγρές φάσεις σε ένα κολλοειδές σύστημα (IUPAC, 1997). Για το λόγο αυτό η διαδικασία αυτή συχνά αποκαλείται και "διαχωρισμό φάσης". Θεωρείται μια πραγματική τεχνική μικροενθυλάκωσης, καθώς το πυρηνικό υλικό είναι ολοκληρωτικά εγκλωβισμένο από τη μήτρα και περιλαμβάνει την καταβύθιση ή διαχωρισμό της κολλοειδούς φάσης από την υδατική φάση (Dziezak, 1988, Bakan, 1973). Είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν τόσο απλές και όσο και πολύπλοκες μεθόδους συσσωμάτωσης.

Πιο αναλυτικά, η διαδικασία ξεκινά με ένα υδατικό κολλοειδές διάλυμα σε κατάλληλο διαλύτη. Σύμφωνα με τη φύση του κολλοειδούς, όταν οι περιβαλλοντικές συνθήκες αλλάζουν, όπως η τιμή του pH, η διαλυτότητα του κολλοειδούς μειώνεται και μεγάλο μέρος του διαχωρίζεται σε μια νέα φάση. Το αρχικό σύστημα μία φάσης μετατρέπεται σε δύο φάσεις, στο οποίο η μία είναι πλούσια και η άλλη είναι φτωχή σε συγκέντρωση κολλοειδούς. Η πλούσια-κολλοειδής φάση υπό τη μορφή υγρών σταγονιδίων ονομάζεται σταγονίδια συσσωματώματος. Η διαδικασία περιλαμβάνει τρία στάδια και πραγματοποιείται υπό συνεχή ανάδευση (Pagington, 1986, Kirby, 1991):

1. Σχηματισμός σταγονιδίων,
2. Εναπόθεση της επικάλυψης
3. Η στερεοποίηση του επιχρίσματος.

Κατά την μέθοδο αυτή χαρακτηρίζονται ως κατάλληλα συστήματα επικάλυψης γλιαδίνης, ηπαρίνη / ζελατίνη, καραγενάνη, χιτοζάνη, πρωτεΐνη σόγιας, πολυβινυλική αλκοόλη, ζελατίνη / καρβοξυμεθυλκυτταρίνη, β-λακτοσφαιρίνη / κόμμι ακακίας, και κόμμι γκουάρ / δεξτράνης είναι επίσης κατάλληλα για συσσωμάτωση μικροενθυλάκωση (Gouin, 2004).

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

5.ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

5.1 Ακίνητοποιημένα κύτταρα *L. casei* με τη μέθοδο της ξήρανσης με ψεκασμό.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το προβιοτικό στέλεχος *L. casei* ATCC 393 (DSMZ, Braunschweig, Germany). Η ακίνητοποίηση πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της ξήρανσης με ψεκασμό χρησιμοποιώντας μικρής κλίμακας ξηραντήρα με ψεκασμό (mini spray-dryer B290, Buchi, Switzerland), και αποβουτυρωμένο γάλα (200g/L). Τα ακίνητοποιημένα κύτταρα παρελήφθησαν για το πείραμα έτοιμα σε μορφή σκόνης.

Βιωσιμότητα ακίνητοποιημένων κυττάρων *L. casei* σε προσομοίωση γαστρικού υγρού και χολικών αλάτων

Το προσομοιωμένο γαστρικό διάλυμα με περιεκτικότητα 0,2% NaCl παρασκευάστηκε με διάλυση πεψίνης (3 g/L) σε αλατούχο διάλυμα (0,5% v/v) και ρυθμίζοντας το pH στο 2 ή 3 με διάλυμα 6 mol/L HCl. Δείγματα των 0,1 g του ακίνητοποιημένου *L. casei* και 0,1 mL από το ελεύθερο κυτταρικό εναιώρημα τοποθετήθηκαν χωριστά σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν 9,9 mL προσομοιωμένου γαστρικού διαλύματος και επώαστηκαν στους 37 °C. Στο τέλος, μετά από 0,5, 1, 2 και 3 ώρες έγινε η μελέτη της βιωσιμότητας των κυττάρων. Η ανοχή των ακίνητοποιημένων κυττάρων *L. casei* σε προσομοίωση χολικών αλάτων διεξήχθη με την ίδια διαδικασία που περιγράφηκε προηγουμένως αλλά χρησιμοποιήθηκαν 9,9 mL διαλύματος χολικών αλάτων που περιείχε 5 και 10 g/L. Δείγματα εις τριπλούν απομακρύνθηκαν μετά από επώαση για 0, 3 και 6 ώρες στους 37°C έγινε μελέτη της βιωσιμότητας με χρήση MRS agar.

Συγκεκριμένα για τη βιωσιμότητα το ομογενοποιημένο διάλυμα, αραιώνεται με διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις, σε σωλήνες με διάλυμα Ringer και στρώθηκαν τρυβλία petri με θρεπτικό MRS άγαρ που είναι εκλεκτικό για τον συγκεκριμένο μικροοργανισμό. Μόλις ολοκληρωθεί η διαδικασία, ακολουθεί η επώαση του τρυβλίου και συνεπώς η ανάπτυξη του *L. casei*, σε κλίβανο με ελεγχόμενη θερμοκρασία: στους 37°C για 48-72 ώρες. Τέλος, ακολουθεί η καταμέτρηση των χαρακτηριστικών αποικιών που αναπτύχθηκαν στο κάθε τρυβλίο. Μετρώνται >30 και <300 αποικίες.

6.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

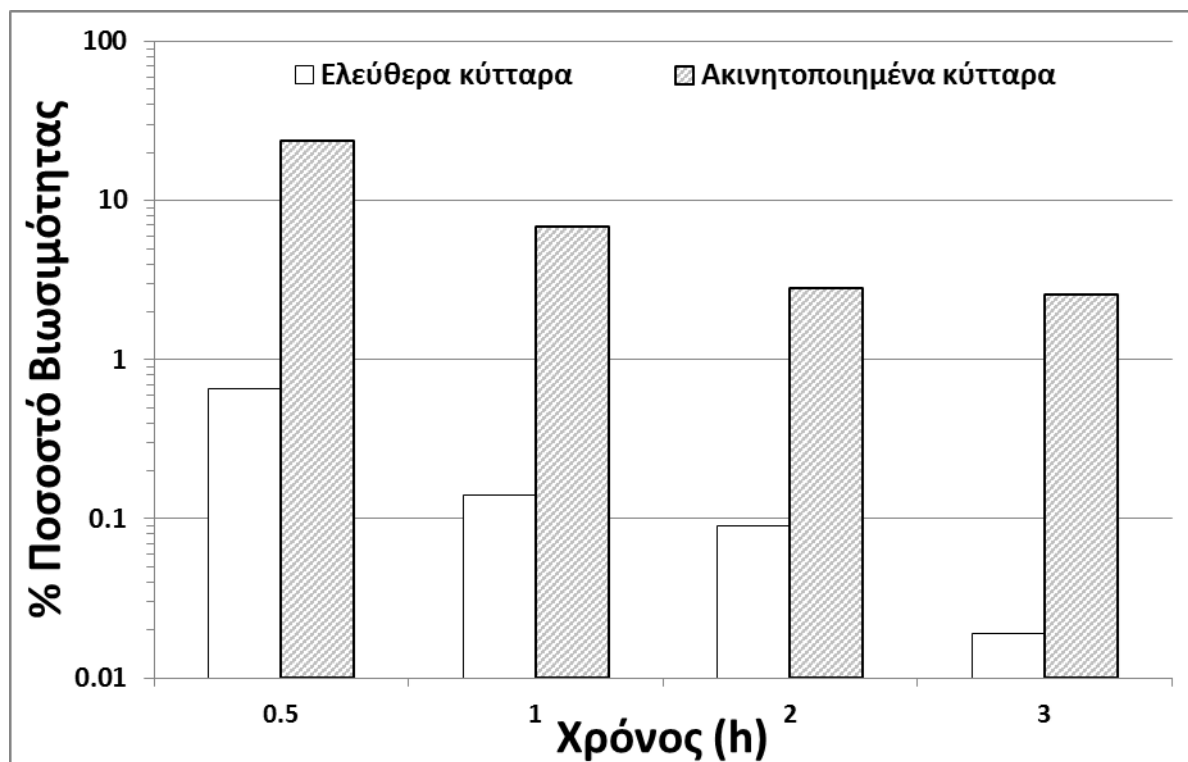
Πίνακας 1 Επίδραση του χρόνου έκθεσης σε συνθήκες προσομοίωσης γαστρικών υγρών (pH 2 και 3) στη βιωσιμότητα ελεύθερων και ακινητοποιημένων κυττάρων *L. casei*.

Βιωσιμότητα (logcfu/g)						
Ελεύθερα κύτταρα						
Χρόνος (h)		0	0.5	1	2	3
Συνθήκες γαστρικού υγρού	pH 2	9.31	7.13	6.44	6.26	5.58
		9.31	8.82	8.80	8.13	7.85
	pH 3					
Ακινητοποιημένα κύτταρα						
Χρόνος (h)		0	0.5	1	2	3
Συνθήκες γαστρικού υγρού	pH 2	9.05	8.43	7.89	7.50	7.46
		9.05	8.87	8.81	8.76	8.70
	pH 3					

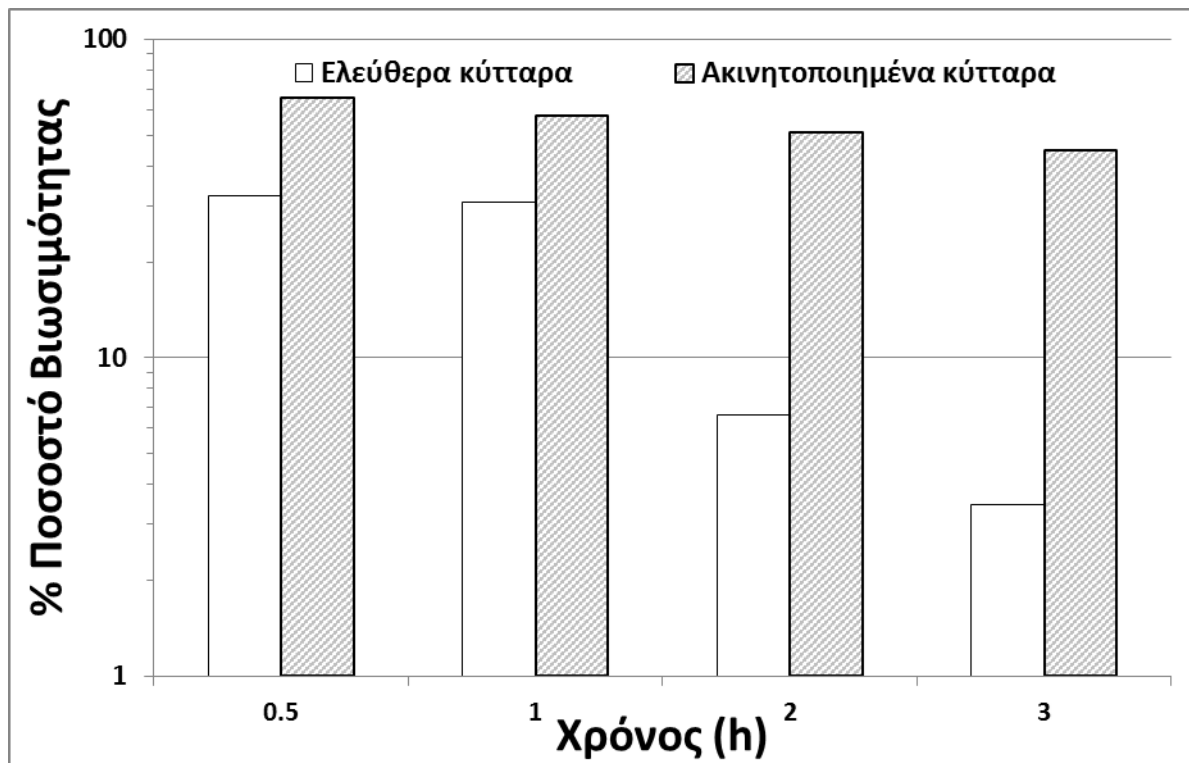
Πίνακας 2 Επίδραση του χρόνου έκθεσης σε διαλύματα χολικών αλάτων (0,5% και 1,0% w/v) στη βιωσιμότητα ελεύθερων και ακινητοποιημένων κυττάρων *L. casei*.

Ελεύθερα κύτταρα				
Χρόνος (h)		0	3	6
Διάλυμα χολικών αλάτων	0.5%	9.31	6.16	4.51
	1%	9.31	5.18	3.30

Ακίνητοποιημένα κύτταρα				
Χρόνος (h)		0	3	6
Διάλυμα	0.5%	9.05	7.50	6.80
χολικών αλάτων	1%	9.05	7.00	6.20



Σχήμα 1 Επίδραση του χρόνου έκθεσης σε συνθήκες προσομοίωσης γαστρικών υγρών με pH 2 στη βιωσιμότητα ελεύθερων και ακίνητοποιημένων κυττάρων L. casei.



Σχήμα 2 Επίδραση του χρόνου έκθεσης σε συνθήκες προσομοίωσης γαστρικών υγρών με pH 3 στη βιωσιμότητα ελεύθερων και ακίνητοποιημένων κυττάρων *L. casei*.

Ο μικροοργανισμός *L. casei* ATCC 393 έχει προταθεί για την παρασκευή διάφορων γαλακτοκομικών προϊόντων λόγω των εξαιρετικών τεχνολογικών ιδιοτήτων του και των οφελειών στην υγεία που συσχετίζονται με την κατανάλωσή τους. Παρόλα αυτά η ιδανική προβιοτική καλλιέργεια πρέπει να είναι διαθέσιμη σε ξηρή μορφή, έτσι ώστε να ικανοποιεί τις ανάγκες της βιομηχανίας τροφίμων, αλλά να είναι επίσης ικανή να επιβιώνει τις δύσκολες συνθήκες της ανθρώπινης γαστρεντερικής οδού (Kim et al., 2008). Για αυτό το λόγο στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα ακίνητοποιημένα με τη μέθοδο της ξήρανσης με ψεκασμό.

6.1 Επιβίωση των ακινητοποιημένων κυττάρων *L. casei* σε συνθήκες προσομοίωσης γαστρικών υγρών

Η επιτυχής ενσωμάτωση των προβιοτικών σε λειτουργικά γαλακτοκομικά προϊόντα καθορίζεται κυρίως από την ικανότητά τους να επιβιώσουν στις σκληρές συνθήκες και τις καταπονήσεις κατά τη διέλευσή τους μέσα από το γαστρεντερικό σωλήνα του ανθρώπου (Rajam et al., 2012; Li et al., 2011). Σύμφωνα με τα ευρήματα αυτά, στην παρούσα μελέτη προκειμένου να αξιολογηθεί η επίδραση της ακινητοποίησης στην επιβίωση του *L. casei* σε προσομοιωμένες γαστρεντερικές συνθήκες, δείγμα ελεύθερων κυττάρων *L. casei* χρησιμοποιήθηκε παράλληλα με τα ακινητοποιημένα κύτταρα.

6.2 Επιβίωση σε προσομοιωμένο γαστρικό υγρό

Η βιωσιμότητα των ακινητοποιημένων και ελεύθερων κυττάρων *L. casei* σε προσομοιωμένες γαστρικές συνθήκες αξιολογήθηκε και τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον πίνακα 1. Το μέσο είχε χαμηλές τιμές pH (2 και 3), και επίσης 0,3% πεψίνη. Τα ελεύθερα κύτταρα παρουσίασαν συνεχή μείωση της βιωσιμότητας, κάτι που δείχνει σαφώς την ανάγκη για προστασία μέσω ακινητοποίησης. Πιο συγκεκριμένα τα ελεύθερα κύτταρα μειώθηκαν κατά 1,46 log cfu / g σε pH 3 και κατά 3,73 log cfu / g σε pH 2. Αυτά τα αποτελέσματα είναι σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες με την ίδια καλλιέργεια, όπου η χαμηλή βιωσιμότητα των ελεύθερων κυττάρων του *L. casei* είχε αναφερθεί σε χαμηλές τιμές pH (Li et al., 2011; Sidira et al., 2010). Η χρήση της ακινητοποίησης παρέχει προστασία στα κύτταρα *L. casei*, δεδομένου ότι η μείωση της βιωσιμότητας τους ήταν μόνο 0,35 log cfu / g και 1,59 log cfu / g σε τιμές pH 3 και 2 αντίστοιχα. Τα σχήματα 1 και 2 παρουσιάζουν με σαφήνεια ότι η επιβίωση των ακινητοποιημένων κυττάρων *L. casei* ήταν σημαντικά καλύτερη από εκείνη των ελεύθερων κυττάρων σε προσομοιωμένο γαστρικό υγρό.

6.3 Επιβίωση σε διαλύματα χολικών αλάτων

Μία άλλη σημαντική ιδιότητα των πιθανών προβιοτικών βακτηρίων είναι η ικανότητά τους να επιβιώνουν σε συγκεντρώσεις χολικών αλάτων που παράγονται στο ανθρώπινο λεπτό έντερο και ώστε να μπορούν να εγκατασταθούν και να πολλαπλασιάζονται στο ανθρώπινο παχύ έντερο. Ως εκ τούτου, στην παρούσα μελέτη, η επίδραση της ακινητοποίησης στην επιβίωση του *L. casei* σε διάλυμα χολικών αλάτων (0,5% και 1%) αξιολογήθηκε και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 2. Η ακινητοποίηση επηρέασε σημαντικά τη βιωσιμότητα των κυττάρων *L. casei* σε διαλύματα χολικών αλάτων ακόμη και μετά από 6 ώρες. Πιο συγκεκριμένα τα ελεύθερα κύτταρα μετά από 3 ώρες παρουσίασαν 3,15 log cfu / g και 4,13 log cfu / g απώλεια σε 0,5% και 1% διαλύματα χολικών αλάτων, ενώ τα ακινητοποιημένα κύτταρα μόνο 1,55 log cfu / g και 2,05 log cfu / g αντίστοιχα. Το αποτέλεσμα ήταν περισσότερο εμφανές μετά από 6 ώρες παραμονής σε διάλυμα χολικών αλάτων 1% όπου η απώλεια για τα ελεύθερα κύτταρα ήταν 6,61 log cfu / g,

ενώ για τα ακινητοποιημένα κύτταρα η απώλεια ήταν μόνο 2,85 log cfu / g. Αυτά τα αποτελέσματα είναι παρόμοια με εκείνα προηγούμενης μελέτης, χρησιμοποιώντας κύτταρα *L. casei* εγκλωβισμένα σε μικροκάψουλες αλγινικών (Li et al., 2011), και καλύτερα από εκείνα που χρησιμοποίησαν ακινητοποιημένο *L. casei* σε κομμάτια μήλου (Sidira et al., 2010).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η ακινητοποίηση βελτιώνει την προστασία των κυττάρων *L. casei* κατά τις δυσμενείς συνθήκες του γαστρεντερικού σωλήνα. Η βιωσιμότητα σε γαστρικό υγρό και διαλύματα χολικών αλάτων τόσο των ελεύθερων όσο και των ακινητοποιημένων κυττάρων *L. casei* μειώθηκε σημαντικά, αλλά η ακινητοποίηση επέδειξε σημαντικά υψηλότερη προστασία του *L. casei* σε σύγκριση με τα ελεύθερα κύτταρα. Γενικώς, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης μπορεί να είναι χρήσιμα για την παροχή προβιοτικών καλλιιεργειών στο ανθρώπινο γαστρεντερικό σωλήνα μέσω της ενσωμάτωσή τους σε ζυμωμένα γαλακτοκομικά προϊόντα. Παρόλα αυτά πιο συστηματική μελέτη είναι απαραίτητη στον τομέα αυτό.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ελληνική

Τζανετάκης Ν., Λιτοπούλου-Τζανετάκη Ε. (2000) Μικροβιολογία και Υγιεινή Παραδοσιακών τυριών. Τεχνολογία Τροφίμων και Αειφορία Θεσσαλονίκη ΑΠΘ.

Ζερφυρίδης Γ. 2001. Τεχνολογία Προϊόντων Γάλακτος. Τομέας Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων, Τμήμα Γεωπονίας. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.

Ξενόγλωσση

1. Dal Bello, F., Walter, J., Hammes, W.P., Hertel, C. Increased complexity of the species composition of lactic acid bacteria in human feces revealed by alternative incubation condition. *Microbial Ecology* 2003;45, 455-463.
2. Mackie, R.I., Sghir, A., Gaskins, H.R. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *American Journal of Clinical Nutrition* 1999;69,1035S-1045S.
4. Walter, J. Ecological role of lactobacilli in the gastrointestinal tract: implications for fundamental and biomedical research. *Applied and Environmental Microbiology* 2008;74, 4985-4996.
5. Borchers, A.T., Selmi, C., Meyers, F.J., Keen, C.L., Gershwin, M.E. Probiotics and immunity. *Journal of Gastroenterology* 2009;44, 26-46.
6. Voltan, S., Castagliuolo, I., Elli, M., Longo, S., Brun, P., D'Inca, R., Porzionato, A., Macchi, V., Palu, G., Sturniolo, G.C., Morelli, L., Martines, D. Aggregating phenotype in *Lactobacillus crispatus* determines intestinal colonization and TLR2 and TLR4 modulation in murine colonic mucosa. *Clinical and Vaccine Immunology* 2007;14, 1138-1148.
7. Pelletier, C., Bouley, C., Cayuela, C., Bouttier, S., Bourlioux, P., Fontaine, M. Cell Surface Characteristics of *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus*

- paracasei subsp. paracasei, and *Lactobacillus rhamnosus* Strains. *Applied and Environmental Microbiology* 1997;63, 1725-1731.
8. Frece, J., Kos, B., Beganovic, J., Vukovic, S., Suskovic, J. In vivo testing of functional properties of three selected probiotic strains. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2005;21, 1401-1408.
9. Sengul, N., Aslim, B., Ucar, G., Yucel, N., Isik, S., Bozkurt, H., Sakaogullari, Z., Atalay, F. Effects of exopolysaccharide-producing probiotic strains on experimental colitis in rats. *Diseases of the Colon and Rectum* 2006;49, 250-258.
10. Kos, B., Suskovic, J., Vukovic, S., Simpraga, M., Frece, J., Matosic, S. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of Applied Microbiology* 2003;94, 981-987.
11. Juntunen, M., Kirjavainen, P., Ouwehand, A., Salminen, S., Isolauri, E. Adherence of Probiotic Bacteria to Human Intestinal Mucus in Healthy Infants and during Rotavirus Infection. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 2001;8, 293-296.
12. Servin, A., Coconnier, M. Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 2003;17, 741-754.
13. Del Re, B., Sgorbati, B., Miglioli, M., Palenzona, D. Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Letters in Applied Microbiology* 2000;31, 438-442.
14. Greene, J., Klaenhammer, T. Factors Involved in Adherence of Lactobacilli to Human Caco-2 Cells. *Applied and Environmental Microbiology* 1994;60, 4487-4494.
15. Schaer-Zammaretti, P., Ubbink, J. Imaging of lactic acid bacteria with AFM elasticity

and adhesion maps and their relationship to biological and structural data. *Ultramicroscopy* 2003;97, 199-208.

16. Branda, S.S., Vik, S., Friedman, L., Kolter, R. Biofilms: the matrix revisited. *Trends in Microbiology* 2005;13, 20-26.

17. Jones, S.E., Versalovic, J. Probiotic *Lactobacillus reuteri* biofilms produce antimicrobial and anti-inflammatory factors. *BMC Microbiology* 2009;9, 35.

18. Felis, G.E., Dellaglio, F. Taxonomy of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*. *Current Issues In Intestinal Microbiology* 2007;8, 44-61.