

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΥ
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΜΕΛΕΤΗ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΩΝ
ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΩΝ ΑΠΟ ΕΛΛΗΝΙΚΑ
ΠΑΡΑΔΟΣΙΑΚΑ ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ
ΤΣΙΑΒΑΛΟΣ ΣΤΑΥΡΟΣ

ΚΑΛΑΜΑΤΑ
2018

«ΔΗΛΩΣΗ ΜΗ ΛΟΓΟΚΛΟΠΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΗΨΗΣ ΠΡΟΣΩΠΙΚΗΣ ΕΥΘΥΝΗΣ

Με πλήρη επίγνωση των συνεπειών του νόμου περί πνευματικών δικαιωμάτων, δηλώνω ενυπογράφως ότι είμαι αποκλειστικός συγγραφέας της παρούσας Πτυχιακής Εργασίας, για την ολοκλήρωση της οποίας κάθε βοήθεια είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται λεπτομερώς στην εργασία αυτή. Έχω αναφέρει πλήρως και με σαφείς αναφορές, όλες τις πηγές χρήσης δεδομένων, απόψεων, θέσεων και προτάσεων, ιδεών και λεκτικών αναφορών, είτε κατά κυριολεξία είτε βάσει επιστημονικής παράφρασης. Αναλαμβάνω την προσωπική και ατομική ευθύνη ότι σε περίπτωση αποτυχίας στην υλοποίηση των ανωτέρω δηλωθέντων στοιχείων, είμαι υπόλογος έναντι λογοκλοπής, γεγονός που σημαίνει αποτυχία στην Πτυχιακή μου Εργασία και κατά συνέπεια αποτυχία απόκτησης του Τίτλου Σπουδών, πέραν των λοιπών συνεπειών του νόμου περί πνευματικών δικαιωμάτων. Δηλώνω, συνεπώς, ότι αυτή η Πτυχιακή Εργασία προετοιμάστηκε και ολοκληρώθηκε από εμένα προσωπικά και αποκλειστικά και ότι, αναλαμβάνω πλήρως όλες τις συνέπειες του νόμου στην περίπτωση κατά την οποία αποδειχθεί, διαχρονικά, ότι η εργασία αυτή ή τμήμα της δεν μου ανήκει διότι είναι προϊόν λογοκλοπής άλλης πνευματικής ιδιοκτησίας.

Όνομα & Επώνυμο Συγγραφέα (Με Κεφαλαία):

ΣΤΑΥΡΟΣ ΤΣΙΑΒΑΛΟΣ

Υπογραφή (Ολογράφως, χωρίς μονογραφή):



Ημερομηνία (Ημέρα – Μήνας – Έτος):

14/05/2018

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	6
1.1 ΓΕΝΙΚΆ ΓΙΑ ΤΑ ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΆ ΒΑΚΤΗΡΙΑ	6
1.2 ΙΣΤΟΡΙΑ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΚΑΙ ΟΡΙΣΜΟΣ ΑΥΤΩΝ.....	11
1.3 ΓΕΝΗ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ	13
1.4 ΙΔΙΌΤΗΤΕΣ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ.....	15
1.5 ΕΥΕΡΓΕΤΙΚΕΣ ΔΡΆΣΕΙΣ ΤΩΝ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ.....	20
1.5.1 Δράση κατά της μολυσματικής διάρροιας.....	21
1.5.2 Δράση κατά της νόσου του Crohn.....	21
1.5.3 Δράση κατά των αλλεργιών.....	22
1.5.4 Δράση κατά του ελικοβακτηριδίου του πυλωρού.....	22
1.5.5 Δράση κατά της παχυσαρκίας.....	23
1.5.6 Δράση κατά των ασθενειών της στοματικής κοιλότητας	23
1.6 ΠΙΘΑΝΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ	24
1.7 ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΑ ΚΑΙ Η ΘΕΣΗ ΤΟΥΣ ΣΤΗΝ ΠΑΓΚΟΣΜΙΑ ΑΓΟΡΑ	25
1.8 ΑΣΦΆΛΕΙΑ ΤΩΝ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ	29
2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	31
2.1 ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΚΑΙ ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ	31
2.2 ΚΑΤΑΜΕΤΡΗΣΗ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΤΩΝ ΑΠΟΙΚΙΩΝ.....	34
2.3 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΣΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΧΟΛΙΚΩΝ ΑΛΑΤΩΝ.....	35
2.4 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΣΕ ΧΑΜΗΛΗ ΤΙΜΗ ΡΗ.....	35
3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	37
3.1 <i>IN VITRO</i> ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΟΥ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ ΤΩΝ ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ	37
3.1.1 Αντοχή των μικροβιακών στελεχών σε συνθήκες χαμηλού pH.....	37
3.1.2 Επιβίωση στελεχών παρουσία χολικών αλάτων.....	41
4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ.....	43
5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	44
5.1 ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	44
5.2 ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	51

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά, ευχαριστώ από καρδιάς την καθηγήτριά μου Μαρίνα Παπαδέλλη για όλη την υπομονή και την στήριξη που μου έδειξε τόσο κατά την εκπόνηση όσο και κατά τη συγγραφή της μελέτης, όπως επίσης και για την κατανόησή της, τις ευκαιρίες που μου έδωσε αλλά και για την καθοδήγησή της.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω ιδιαίτερος την Καθηγήτρια του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών (Γ.Π.Α.) Έφη Τσακαλίδου που μου έδωσε την ευκαιρία να πραγματοποιήσω την πτυχιακή μου μελέτη στο εργαστήριο Γαλακτοκομίας του Γ.Π.Α. Τα πειράματα που έλαβαν χώρα στη μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκαν με την υλικοτεχνική υποδομή αλλά και την τεχνογνωσία αυτού του εργαστηρίου και για το λόγο αυτό ευχαριστώ θερμά τόσο την κ. Τσακαλίδου όσο και τα μέλη της επιστημονικής της ομάδας, με τα οποία είχα μια άψογη συνεργασία. Ιδιαίτερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά και ειλικρινά τις Δρ. Μαρίνα Γεωργαλάκη και Δρ. Ράνια Αναστασίου για όλη την προθυμία, βοήθεια και το ενδιαφέρον που έδειξαν όλο αυτό το διάστημα της παραμονής μου στο εργαστήριο. Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Δρ. Γεωργία Ζουμποπούλου για όλη τη βοήθεια που μου παρείχε και για την υπομονή της να απαντά στις αμέτρητες ερωτήσεις μου πάντα με το χαμόγελό της. Χωρίς τις παραπάνω αυτή η μελέτη θα ήταν πολύ δυσκολότερη για εμένα. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τις υποψήφιες διδάκτορες του εργαστηρίου, Βούλα Αλεξανδράκη και Μαρία Κάζου, αλλά και όλους τους εν καιρώ φοιτητές που γνώρισα στο χώρο του εργαστηρίου για το καλό κλίμα και την άριστη συνεργασία που είχαμε.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Λόγω της αυξανόμενης ζήτησης των προβιοτικών προϊόντων τα τελευταία χρόνια, όλο και περισσότερες μελέτες διεξάγονται γύρω από τους προβιοτικούς μικροοργανισμούς και τα οφέλη τους.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν οι προβιοτικές ιδιότητες 42 οξυγαλακτικών βακτηρίων τα οποία είχαν απομονωθεί από διαφορετικά γαλακτοκομικά προϊόντα (γιαούρτια, ξινογάλατα κ.ά.). Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν *in vitro* δύο προβιοτικές ιδιότητες: η ικανότητα ανάπτυξης σε όξινο περιβάλλον (pH 2.5) και η ικανότητα ανάπτυξης σε περιβάλλον παρουσία χολικών αλάτων (1% w/v).

Μόλις δύο στελέχη *Lactobacillus plantarum* από τους συνολικά 15 βακίλους που εξετάστηκαν ξεχώρισαν για την αντοχή τους σε χαμηλό pH ενώ από τους εξεταζόμενους κόκκους, ενθαρρυντικά αποτελέσματα όσον αφορά αυτή την προβιοτική ιδιότητα έδωσαν δύο στελέχη *Pediococcus pentosaceus*.

Από την άλλη μεριά, σχεδόν όλα τα στελέχη επιβίωσαν παρουσία χολικών αλάτων 1% (w/v) σε pH 8, με δύο μόνο εξαιρέσεις: τα στελέχη *Enterococcus durans* 10 και *Enterococcus faecium* 1. Ως γενική παρατήρηση, όλα τα στελέχη εκτός των δύο παραπάνω δεν μεταβάλλανε τον αρχικό τους πληθυσμό για περισσότερους από έναν δεκαδικό λογάριθμο.

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γενικά για τα οξυγαλακτικά βακτήρια

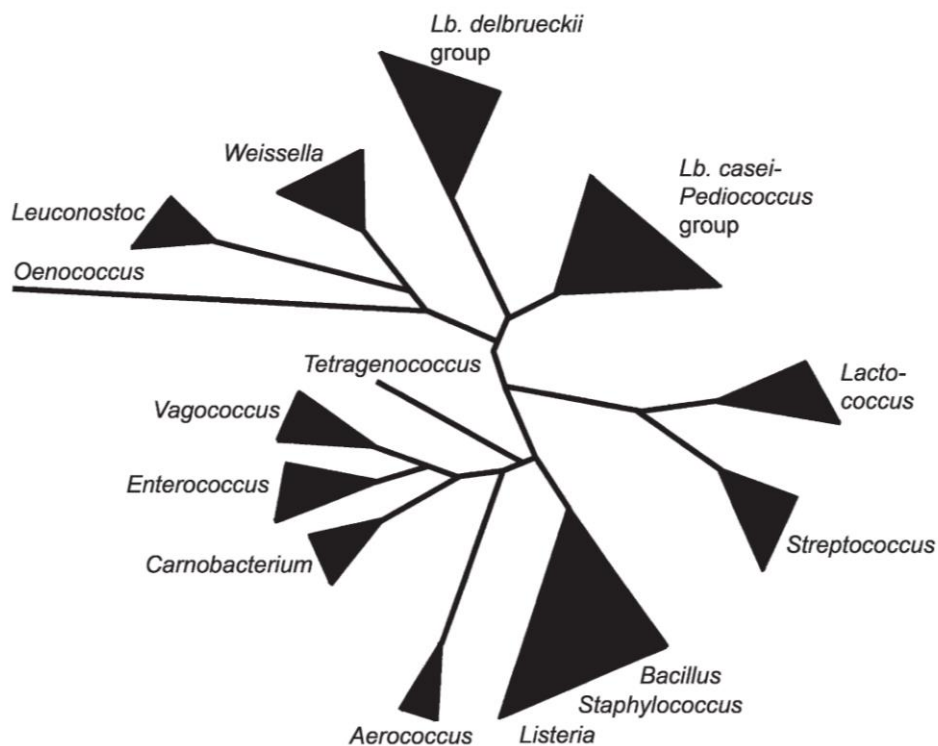
Τα οξυγαλακτικά βακτήρια (Lactic Acid Bacteria, LAB) αποτελούν αναγνωρισμένη κατηγορία προβιοτικών οργανισμών. Τα βακτήρια αυτά παρουσιάζουν ευεργετικά οφέλη για τον ανθρώπινο οργανισμό λόγω της φυσικής παρουσίας τους στον εντερικό σωλήνα και της συμβολής τους στην καλή υγεία του ξενιστή (Marco *et al.* 2006, Ζουμποπούλου 2008).

Το 1873, δέκα χρόνια μετά τη μελέτη της οξυγαλακτικής ζύμωσης από τον Luis Pasteur, η πρώτη οξυγαλακτική καλλιέργεια ("*Bacterium Lactis*") απομονώθηκε από τον J. Lister. Οι εναρκτήριοι καλλιέργειες για τυριά και ξινογάλατα εμφανίστηκαν το 1890 παρότι τα ζυμούμενα προϊόντα χρησιμοποιούνταν από τους ανθρώπους για πάνω από 5000 χρόνια (Ζουμποπούλου 2008, König and Fröhlich 2009).

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια ανήκουν σε μια ομάδα ωφέλιμων βακτηρίων τα οποία πήραν το όνομά τους από το γαλακτικό οξύ που παράγουν ως κύριο τελικό προϊόν της ζύμωσης της λακτόζης. Ορίζονται ως ζωντανά κύτταρα, προκαρυωτικά, ετερότροφα και χημειο-οργανοτροφικά, δηλαδή απαιτούν ως πηγή ενέργειας πολύπλοκα οργανικά μόρια. Εμφανίζουν ένα παχύ στρώμα πεπτιδογλυκάνης και το μέγεθός του κυμαίνεται μεταξύ 30 και 100 nm. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια είναι αρνητικά στην καταλάση ενώ δεν είναι σε θέση να πραγματοποιήσουν αντιδράσεις οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, στις οποίες εμπλέκονται κυτοχρώματα. Πιο συγκεκριμένα, δεν πραγματοποιείται ο κύκλος του Krebs και η αναπνευστική αλυσίδα. Η παραγωγή ενέργειας στα βακτήρια αυτά γίνεται μέσω του μηχανισμού φωσφορυλίωσης του υποστρώματος. Σε γενικές γραμμές, έχουν περιορισμένες βιοσυνθετικές ικανότητες και πολύπλοκες διατροφικές απαιτήσεις, συμπεριλαμβανομένων ορισμένων αμινοξέων, βιταμινών, πουρινών και πυριμιδινών καθώς και ορισμένων πεπτιδίων (Ζουμποπούλου 2008, König and Fröhlich 2009).

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια αποτελούν μία μικροβιακή ομάδα μεγίστης σημασίας για την παραγωγή προϊόντων ζύμωσης με πρώτη ύλη το γάλα, το κρέας, τα λαχανικά και τα δημητριακά, λόγω της οξίνισης που επιφέρουν, η οποία έχει ως τελικό αποτέλεσμα την αύξηση του χρόνου ζωής των προϊόντων. Συμβάλλουν επίσης στη συντήρηση του προϊόντος, λόγω ανταγωνισμού με τους αλλοιωγόνους και παθογόνους μικροοργανισμούς των τροφίμων, κυρίως λόγω της παραγωγής γαλακτικού οξέος, οξικού οξέος, αλκοόλης, CO₂, H₂O₂ και βακτηριοσινών.

Παρόλο που πολλά γένη βακτηρίων παράγουν γαλακτικό οξύ ως κύριο ή δευτερεύον τελικό προϊόν της ζύμωσης, ο όρος Οξυγαλακτικά Βακτήρια αναφέρεται αποκλειστικά στην τάξη *Lactobacillales*, η οποία περιλαμβάνει τα γένη *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella*, *Bacillus staphylococcus* και *Aerococcus* (Todar 2004, Fröhlich and König 2009).



Εικόνα 1. Σχηματική απεικόνιση του φυλλογενετικού δέντρου των οξυγαλακτικών βακτηρίων (Fröhlich and König 2009).

Τα βακτήρια του γένους *Lactobacillus* παίζουν σημαντικό ρόλο στη βιομηχανία τροφίμων διότι συμβάλλουν στη γεύση, την υφή και τη θρεπτική αξία των προϊόντων. Στους ανθρώπους οι λακτοβάκιλοι είναι συμβιωτικοί και ανήκουν στη φυσική μικροχλωρίδα του ανθρώπινου οργανισμού (Španová *et al.* 2015).

Στον **Πίνακα 1** που ακολουθεί παρουσιάζονται οι κυριότεροι μικροοργανισμοί που απομονώθηκαν από διάφορα ελληνικά τυριά. Στα τυριά αυτά μελετήθηκε η δευτερεύουσα οξυγαλακτική χλωρίδα που δεν προέρχεται από την καλλιέργεια εκκίνησης (non starter lactic acid bacteria).

Πίνακας 1. Οξυγαλακτικά βακτήρια που έχουν απομονωθεί από διάφορα ελληνικά τυριά

Είδος τυριού	Είδη οξυγαλακτικών βακτηρίων
Φέτα	<i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lb. paracasei</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. rhamnosus</i> , <i>Lb. Coryneformis</i> , <i>Lb. curvatus</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. buchneri</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>E. durans</i> , <i>Pediococcus pentosaceus</i> , <i>P. acidilactici</i> , <i>Leuconostoc lactis</i> , <i>L. paramesenteroides</i> , <i>L. dextranicum</i>
Τελεμές	<i>Lb. casei</i> , <i>Lb. paracasei</i> , <i>Lb.coryneformi,s</i> <i>Lb. plantatum</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>L. mesenteroides</i> , <i>L. paramesenteroides</i> , <i>L. dextranicum</i> , <i>L. lactis</i> , <i>E. faecium</i>
Κεφαλοτύρι	<i>L. lactis</i> , <i>L. mesenteroides</i> , <i>L. paramesenteroides</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i> , <i>E. durans</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. buchneri</i> , <i>Pediococcus sp.</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>L. lactis</i>
Τουλουμίσιο	16 βακτήρια με επικρατούντα <i>E. faecium</i> , <i>Lb. plantarum</i> και <i>Lb.brevis</i>
Ξινοτύρι	11 γαλακτικά βακτήρια με επικρατούντα <i>E. faecalis</i> και <i>Lb. plantarum</i>
Κοπανιστή	15 είδη γαλακτικών βακτηρίων με επικρατέστερα <i>Lb. plantarum</i> και <i>Lb. casei</i>

Είδος τυριού	Είδη οξυγαλακτικών βακτηρίων
Μπάτζος (πρόβειο)	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>E.</i> <i>faecalis</i> , <i>E. faecium</i> , <i>E. durans</i>
Κρασοτύρι	14 γαλακτικά βακτήρια με κυρίαρχα είδη τα <i>Lb. plantarum</i> και <i>E. faecium</i>
Λευκό τυρί άλμης από κατσικίσιο γάλα	<i>Lactobacillus</i> (10 είδη), <i>Enterococcus</i> (3 είδη), <i>Leuconostoc</i> (5 είδη), <i>Lactococcus</i> (1 είδος)
Ανεβατό	<i>L.lactis</i> , <i>L. raffinolactis</i> , <i>L. mesenteroides</i> , <i>L.</i> <i>dextranicum</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb.</i> <i>viridescens</i> , <i>Lb. coryneformis</i>
Μανούρι	Διάφορα γαλακτικά βακτήρια (15 είδη) με επικρατέστερα <i>Lb. brevis</i> , <i>L.</i> <i>mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> και <i>Weissella paramesenteroides</i>
Κατίκι Δομοκού	Διάφορα γαλακτικά βακτήρια (14 είδη) με επικρατέστερα <i>E. durans</i>

Πηγή: Σαββαΐδης 2012

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν και ως εναρκτήριες καλλιέργειες δηλαδή για τον απευθείας εμβολιασμό τροφίμων με μικροοργανισμούς, προκειμένου να επιτευχθούν προβλέψιμες και επιθυμητές αλλαγές στο τελικό προϊόν. Αυτές οι αλλαγές μπορούν να περιλαμβάνουν την αυξημένη συντηρησιμότητα, τη βελτιωμένη θρεπτική αξία, τις τροποποιημένες οργανοληπτικές ιδιότητες και την αύξηση της οικονομικής αξίας του παραγόμενου προϊόντος. Παρά το γεγονός ότι πολλά ζυμούμενα προϊόντα μπορούν να παρασκευαστούν χωρίς εναρκτήριες καλλιέργειες, η προσθήκη μικροοργανισμών σε μορφή εναρκτήριας καλλιέργειας, προσδίδει μια βάση για τη διασφάλιση προϊόντος σταθερής ποιότητας (Durso *et al.* 2003). Στον **πίνακα 2** παρουσιάζονται παραδείγματα οξυγαλακτικών βακτηρίων που χρησιμοποιούνται ως εναρκτήριες καλλιέργειες στην παραγωγή διαφόρων τροφίμων.

Πίνακας 2. Οξυγαλακτικά βακτήρια που χρησιμοποιούνται ως εναρκτήριες καλλιέργειες στην παραγωγή τροφίμων

Μικροοργανισμός	Τρόφιμα-Προϊόντα
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Τυριά, ζυμούμενα προϊόντα γάλακτος
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	Τυριά, ζυμούμενα προϊόντα γάλακτος
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>	Τυριά, ζυμούμενα προϊόντα γάλακτος
<i>Lb. helveticus</i>	Τυριά, ζυμούμενα προϊόντα γάλακτος
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	Τυριά, γιαούρτι
<i>Lb. sanfranciscensis</i>	Ψωμιά μαγιάς
<i>Lb. casei</i>	Τυριά, ζυμούμενα προϊόντα γάλακτος
<i>Lb. sakei</i>	Λουκάνικα
<i>Lb. plantarum</i>	Λουκάνικα, ζυμούμενα λαχανικά
<i>Lb. curvatus</i>	Λουκάνικα
<i>Lb. sanfrancisco</i>	Ψωμιά μαγιάς
<i>St. thermophilus</i>	Τυριά, γιαούρτια
<i>P. acidilactici</i>	Λουκάνικα, ζυμούμενα λαχανικά
<i>P. pentosaceus</i>	Λουκάνικα
<i>P. halophilus</i>	Σάλτσες σόγιας
<i>Oenococcus oeni</i>	Κρασιά
<i>L. lactis</i>	Τυριά, ζυμούμενα προϊόντα γάλακτος
<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	Τυριά, ζυμούμενα προϊόντα γάλακτος, ζυμούμενα λαχανικά

Πηγή: Durso *et al.* 2003

1.2 Ιστορία προβιοτικών μικροοργανισμών και ορισμός αυτών

Οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί έχουν συγκεντρώσει τεράστιο ενδιαφέρον από τον επιστημονικό κόσμο με αποτέλεσμα να πραγματοποιηθούν πάρα πολλές μελέτες γύρω από αυτούς. Αποτελέσματα μια πληθώρας μελετών σχετικών με τα προβιοτικά περιλαμβάνονται στην εργασία ανασκόπησης της σχετικής βιβλιογραφίας των FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) και WHO (World Health Organization) (FAO/WHO 2001).

Από το 1892 κιόλας, ο γυναικολόγος Albert Döderlein αναφέρθηκε στην ευεργετική επίδραση μιας ομάδας μικροοργανισμών στον ανθρώπινο οργανισμό. Σύμφωνα με την παρατήρησή του, τα κολπικά βακτήρια (vaginal bacteria) παράγουν γαλακτικό οξύ κατά το μεταβολισμό των σακχάρων, εμποδίζοντας έτσι την ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών στον κόλπο. Αυτή του η ανακάλυψη προηγήθηκε αυτής του Ρώσου επιστήμονα [Ellie Metchnikoff \(1907\)](#), ο οποίος μέσα από το ενδιαφέρον του για τα ζυμούμενα γαλακτοκομικά προϊόντα, ανέδειξε ένα οξυγαλακτικό βακτήριο το οποίο σήμερα είναι γνωστό ως *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* και υποστήριξε ότι τροποποιεί τη μικροβιακή εντεροχλωρίδα και αντικαθιστά τα επιβλαβή βακτήρια με ωφέλιμα. Λόγω αυτής της ανακάλυψης, έγραψε το βιβλίο του “*The Prolongation of Life*” που του απέδωσε το Νόμπελ Ιατρικής το 1908. Η έρευνά του βασίστηκε στην επίδραση που είχε η γιαούρτη και το Βουλγαρικό βουτυρόγαλα στους Βαλκανικούς λαούς οι οποίοι είχαν μακροζωία και ευεξία. Επειδή όμως τα στοιχεία του δεν ήταν καθαρά επιστημονικά, συνάντησε δυσπιστία από την επιστημονική κοινότητα παρότι ο απλός λαός τα έκανε αποδεκτά. Την ίδια χρονιά, οι μελέτες των Herter και Kendall απέδειξαν ότι τα βακτήρια που χρησιμοποιούνταν για την παρασκευή γιαούρτης, όπως στελέχη του *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* δεν αποικίζουν το ανθρώπινο έντερο, ενισχύοντας τη δυσπιστία για την έρευνα του Metchnikoff αλλά και το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας λόγω του ευεργετικού αποτελέσματος της γιαούρτης στον ανθρώπινο οργανισμό ([Ζουμποπούλου 2008](#)).

Το 1906 ο Γάλλος παιδίατρος Henry Tissier, παρατήρησε ότι στα κόπρανα βρεφών με διάρροια υπήρχε μικρός πληθυσμός βακτηρίων που είχαν σχήμα παρόμοιο με αυτό του γράμματος ύψιλον. Αντιθέτως, στα υγιή βρέφη ο πληθυσμός ήταν πολύ μεγαλύτερος. Έτσι λοιπόν συμπέρανε ότι τα βακτήρια αυτά θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την καταπολέμηση της διάρροιας. Σήμερα το όνομα αυτών των βακτηρίων είναι *Bifidobacterium* από τη λατινική λέξη *bifidum* που σημαίνει διχάλα. Εν τέλει το 1930, ο Minoru Shirota, Ιάπωνας επιστήμονας, στράφηκε προς την ανεύρεση ενός βακτηρίου το οποίο να καταφέρνει

να αποικεί στο ανθρώπινο έντερο. Η έρευνά του ήταν επιτυχής αφού απομόνωσε το γνωστό σήμερα *Lb. casei* Shirota όπου και χρησιμοποίησε μέχρι το 1935 για να παράγει ζυμώμενο γάλα, το οποίο πωλείται μέχρι και σήμερα από την εταιρία Yakult. Το University College of London όμως το 2014 αμφισβήτησε τη δράση του με την εταιρία να υπεραμύνεται (Ζουμποπούλου 2008, Fredua-Agyeman and Gaisford 2014).

Ο όρος «προβιοτικός» χρησιμοποιήθηκε πρώτη φορά από τους [Lilley και Stillwell το 1965](#) για την περιγραφή ουσιών παραγόμενες από πρωτόζωα, οι οποίες προάγουν την ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών. Ο [George Sperti \(1971\)](#) πρόσθεσε στον παραπάνω ορισμό και τα δείγματα ιστών τα οποία είχαν επίδραση στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Τρία χρόνια αργότερα ο όρος «προβιοτικός» χρησιμοποιήθηκε για την περιγραφή συμπληρωμάτων διατροφής των ζώων, τα οποία βοηθούσαν στην ισορροπία της μικροβιακής χλωρίδας του εντέρου ([Parker 1974](#)). Ο [Roy Fuller \(1989\)](#) επαναπροσδιόρισε τον ορισμό σε «διατροφικό συμπλήρωμα ζωντανών μικροβίων που επηρεάζει ευεργετικά τον ξενιστή βελτιώνοντας την εντερική του ισορροπία». Ύστερα ο ορισμός επαναδιατυπώθηκε και πάλι σε «ζωντανή καλλιέργεια, αποτελούμενη από ένα ή περισσότερα μικρόβια, η οποία όταν χορηγηθεί σε ανθρώπους ή σε ζώα, επηρεάζει ευεργετικά τον ξενιστή βελτιώνοντας τις ιδιότητες της εντερικής χλωρίδας» ([Havenaar et al. 1992](#)).

Λίγο καιρό μετά, ο όρος αλλάζει και πάλι έννοια και περιγράφεται ως «ζωντανοί μικροοργανισμοί, οι οποίοι όταν καταναλωθούν σε ικανές ποσότητες, επιφέρουν ευεργετικές επιδράσεις στον ξενιστή πέρα από αυτές της βασικής διατροφής» ([Guarner and Shaafsma 1998](#)). Τρία χρόνια μετά οι [Schrezenmeir και de Vrese \(2001\)](#), όρισαν το προβιοτικό ως «ένα σκεύασμα ή ένα προϊόν που περιέχει ζώντες, καθορισμένους μικροοργανισμούς σε επαρκείς αριθμούς, οι οποίοι μεταβάλλουν θετικά τη σύσταση της μικροχλωρίδας μέσω εμφύτευσης ή αποίκισης σε μια συγκεκριμένη περιοχή του ξενιστή, ασκώντας έτσι ευεργετικές δράσεις στην υγεία του». Η τελική διατύπωση η οποία είναι σε ισχύ έως και σήμερα, έχει δοθεί από τον FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organization) το 2001 και σύμφωνα με αυτόν, προβιοτικοί είναι «ζωντανοί μικροοργανισμοί, οι οποίοι όταν καταναλωθούν σε ικανές ποσότητες επιφέρουν ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία του ξενιστή».

Εν κατακλείδι, ανά τα χρόνια ο ορισμός «προβιοτικός» υφίσταται αλλαγές ώστε να εστιάζει περισσότερο σε ζωντανούς μικροοργανισμούς, οι οποίοι προσφέρουν ευεργετικά αποτελέσματα στην υγεία του ανθρώπου εάν χορηγηθούν σε ικανούς πληθυσμούς.

1.3 Γένη προβιοτικών μικροοργανισμών

Παρά το γεγονός ότι ο αριθμός των μικροοργανισμών στη φύση είναι πολύ μεγάλος, σχετικά λίγα είναι τα στελέχη τα οποία ανταποκρίνονται στα πρότυπα της επιστημονικής κοινότητας και έχουν κλινικά αποδειχθεί ως προβιοτικά. Ο μεγαλύτερος αριθμός προβιοτικών ανήκει κυρίως στα γένη *Lactobacillus* και *Bifidobacterium*. Όμως υπάρχουν και άλλα βακτήρια αλλά και ζύμες με προβιοτικές ιδιότητες με τα πιο κοινά να είναι τα ακόλουθα (Mercenier *et al.* 2003, Seth and Maulik 2011):

- **Οξυγαλακτικά βακτήρια (βλέπε παράγραφο 1.1):**
 - **Προβιοτικό γένος:** *Lactobacillus*, **Είδη:** *Lb. acidophilus*, *Lb. amylovorus*, *Lb. brevis*, *Lb. bulgaricus*, *Lb. casei*, *Lb. cellobiosus*, *Lb. crispatus*, *Lb. curvatus*, *Lb. delbrueckii* spp. *bulgaricus*, *Lb. fermentum*, *Lb. gallinarum*, *Lb. helveticus*, *Lb. johnsonii*, *Lb. lactis*, *Lb. paracasei*, *Lb. plantarum*, *Lb. reuteri*, *Lb. rhamnosus*
 - **Προβιοτικό γένος:** *Streptococcus*, **Είδη:** *St. salivaris* spp. *thermophilus*
 - **Προβιοτικό γένος:** *Lactococcus*, **Είδη:** *L. lactis cremoris*
 - **Προβιοτικό γένος:** *Leuconostoc*, **Είδη:** *L. mesenteroides*
 - **Προβιοτικό γένος:** *Pediococcus* , **Είδη:** *P. pentosaceus*, *P. acidilactici*
 - **Προβιοτικό γένος:** *Enterococcus* spp., **Είδη:** *E. faecalis*, *E. faecium*
- ***Bifidobacteria***

Το *Bifidobacterium* είναι ένα γένος θετικών κατά Gram, αναερόβιων βακτηρίων. Τα βακτήρια αυτά απαντώνται στην γαστρεντερική οδό, στον κόλπο και στη στοματική κοιλότητα των θηλαστικών, συμπεριλαμβανομένων και των ανθρώπων. Τα *Bifidobacteria* είναι ένα από τα σημαντικότερα γένη βακτηρίων που συνθέτουν τη χλωρίδα του παχέος εντέρου στα θηλαστικά (Schell *et al.* 2002, Mayo *et al.* 2010). Ζυμώνουν τα σάκχαρα με κύριο προϊόν το γαλακτικό οξύ. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε για την παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων, είτε για την παράταση της εμπορικής ζωής υπό ψύξη γατόψαρου (από 3 μέρες σε 6) (Kim *et al.* 1995), είτε για την παρεμπόδιση παθογόνων βακτηρίων μέσω του ενοφθαλμισμού τους (λόγω παραγωγής γαλακτικού οξέος και μετατροπής του δισθενή σιδήρου σε τρισθενή) (Kot *et al.* 1995, Μπαλατσούρας 2006).

- **Προβιοτικό γένος:** *Bifidobacterium*, **Είδη:** *B. adolescentis*, *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. essensis*, *B. infantis*, *B. laterosporum*, *B. thermophilum*, *B. longum*

- ***Propionibacteria***

Το *Propionibacterium* είναι ένα ραβδόμορφο, θετικό κατά Gram γένος βακτηρίων, που συνθέτει προπιονικό οξύ. Στην γαλακτοκομία το στέλεχος *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* χρησιμοποιείται κυρίως για παραγωγή τυριών τύπου emmental διότι δημιουργεί τις χαρακτηριστικές οπές (λόγω παραγωγής CO₂) και αποδίδει τα συγκεκριμένα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά.

- **Προβιοτικό γένος:** *Propionibacterium*, **Είδη:** *P. acidipropionici*, *P. freudenreichii*, *P. jensenii*, *P. thoenii*

- **Σπορογόνα βακτήρια**

Τα κύτταρα των σπορογόνων βακτηρίων είναι ραβδία, θετικά κατά Gram στις πρώτες φάσεις της ανάπτυξής τους και αρνητικά αργότερα. Παρουσιάζουν είτε αυστηρά οξειδωτικό είτε αυστηρά ζυμωτικό μεταβολισμό. Βρίσκονται κυρίως στο έδαφος και συνήθως είναι ανεπιθύμητα λόγω των αλλοιώσεων που προκαλούν στα τρόφιμα (Μπαλατσούρας 2006).

- **Προβιοτικό γένος:** *Bacillus*, **Είδη:** *B. alcalophilus*, *B. cereus*, *B. clausii*, *B. coagulans*, *B. subtilis*

- **Ζύμες**

Τα κύτταρα είναι σφαιρικά, ωοειδή αλλά και επιμήκη στα πρώτα στάδια της ζωής τους. Το σπουδαιότερο είδος είναι το *Saccharomyces cerevisiae*, το οποίο είναι υπεύθυνο για την αλκοολική ζύμωση υπό βιομηχανικές συνθήκες δηλαδή για την ζύμωση του οινογλεύκου, του βυνογλεύκου και του ζυμαριού αρτοποιίας (Μπαλατσούρας 2006). Το προβιοτικό είδος *S. boulardii* χρησιμοποιείται κυρίως για την θεραπεία διάρροιας αλλά και για αρκετές άλλες ασθένειες.

- **Προβιοτικό γένος:** *Saccharomyces*, **Είδη:** *S. boulardii*

1.4 Ιδιότητες προβιοτικών μικροοργανισμών

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει αυξημένο ενδιαφέρον από τους καταναλωτές για τα τρόφιμα που συμβάλλουν στην υγεία και την ευεξία. Όπως έχει σημειωθεί από τον πατέρα της ιατρικής Ιπποκράτη, «η τροφή είναι το φάρμακό σου και το φάρμακό σου η τροφή σου». Ως αποτέλεσμα, όλο και περισσότερες ερευνητικές προσπάθειες στρέφονται στην ανεύρεση νέων προϊόντων που θα καλύπτουν την ανάγκη αυτή. Μια τέτοια κατηγορία προϊόντων είναι και τα τρόφιμα που περιέχουν μικροοργανισμούς με προβιοτικές ιδιότητες. Επειδή όμως δεν είναι όλοι οι μικροοργανισμοί στη φύση κατάλληλοι και ασφαλείς να χρησιμοποιηθούν στην παραγωγή τροφίμων, υπάρχει η ανάγκη θέσπισης κάποιων κριτηρίων ώστε να διαχωρίζονται ποιοι από αυτούς είναι.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί και παραπάνω, τα προβιοτικά είναι ζωντανοί μικροοργανισμοί οι οποίοι όταν ληφθούν σε κατάλληλες ποσότητες, έχουν οφέλη για την υγεία του καταναλωτή (FAO/WHO 2001). Παρότι φαντάζει απίθανο να υπάρξει κάποιο προβιοτικό όπου να ικανοποιεί όλα τα κριτήρια που θα αναφερθούν παρακάτω, οι Przemyslaw Jan Tomasik και Piotr Tomasik (2003) καθιέρωσαν τα ακόλουθα κριτήρια ως απαραίτητα προκειμένου ένα μικροοργανισμός να θεωρηθεί προβιοτικός:

- 1) Να μπορεί να επιβιώνει κατά τη διέλευση μέσα από το γαστρεντερικό σωλήνα σε συνθήκες χαμηλού pH και σε επαφή με τη χολή
- 2) Να μπορεί να προσκολληθεί στα επιθηλιακά κύτταρα
- 3) Να μπορεί να σταθεροποιεί την εντερική μικροχλωρίδα
- 4) Να μην είναι παθογόνος
- 5) Να μπορεί να επιβιώνει στα τρόφιμα και να έχει τη δυνατότητα να υποστεί λυοφιλίωση για την παραγωγή φαρμακευτικών παρασκευασμάτων
- 6) Να έχει γρήγορο πολλαπλασιασμό είτε με προσωρινό είτε με μόνιμο αποικισμό στο γαστρεντερικό σωλήνα

Η πιο πρόσφατη τοποθέτηση για τα παραπάνω κριτήρια είναι αυτή των Anadón *et al.* (2016) όπου ισχυρίζονται ότι για να θεωρηθεί ένα στέλεχος προβιοτικό θα πρέπει να αποτελεί αυτόχθονο κάτοικο μιας υγιούς εντερικής οδού, να έχει την ικανότητα να επιβιώνει στο ανώτερο πεπτικό σύστημα, να είναι ικανό να επιβιώνει και να πολλαπλασιάζεται στο έντερο

(ανθεκτικό παρουσία οξέων και χολής), να είναι ασφαλές για κατανάλωση από τον άνθρωπο, να παράγει αντιμικροβιακές ουσίες (π.χ. βακτηριοσίνες) και να έχει την ικανότητα να προσκολλάται και να αποικίζει σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές.

Αναλύοντας καθένα από τα παραπάνω έξι κριτήρια και ξεκινώντας από το πρώτο, λόγω έκκρισης γαστρικού υγρού στο στομάχι, μειώνεται η τιμή του pH. Ως αποτέλεσμα, ο εκάστοτε μικροοργανισμός εκτίθεται σε όξινο περιβάλλον με pH 1-1.5, στην περίπτωση που υπάρχει τροφή εκείνη τη στιγμή στο στομάχι, έως και 4-4.5 εάν δεν υπάρχει, για περίπου μιάμιση ώρα (Morelli 2000, Succì 2005). Η τροφή μεταβάλλει το προφίλ του pH στο οποίο εκτίθεται το κάθε στέλεχος, προβιοτικό ή μη. Ενώ το τρόφιμο αρχικά μπορεί να εκθέτει το στέλεχος σε ήπιες όξινες συνθήκες, κατά τη διάρκεια της πέψης μέρος του χορηγούμενου προβιοτικού πληθυσμού μπορεί να εκτεθεί σε περισσότερο όξινες συνθήκες αλλά και για περισσότερο χρόνο και έτσι να μην καταφέρει τελικά να επιβιώσει και να αναπτυχθεί. Περίπου 2.5 l γαστρικού υγρού εκκρίνονται στο ανθρώπινο πεπτικό σύστημα κάθε μέρα κάνοντας δυσμενείς τις συνθήκες επιβίωσης για τους μικροοργανισμούς (Ζουμποπούλου 2008, Jensen *et al.* 2012). Πολλοί προβιοτικοί μικροοργανισμοί έχουν επιλεγεί για την μεγάλη τους αντοχή σε αυτές τις συνθήκες και νέες μεθοδολογίες επιτρέπουν την ενθλάκωση προβιοτικών στελεχών ώστε να υπάρχει μεγαλύτερη πιθανότητα να επιβιώσουν (Vanderplas *et al.* 2015).

Η χολή όπως και το χαμηλό pH είναι ένας παρεμποδιστικός παράγοντας για την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των προβιοτικών στον ανθρώπινο οργανισμό. Εκκρίνεται στο λεπτό έντερο κατά τη διαδικασία της πέψης και παίζει σημαντικό ρόλο στην γαλακτωματοποίηση του λίπους και στην απορρόφησή του. Είναι ένα υδατικό διάλυμα που αποτελείται κυρίως από συζευγμένα χολικά οξέα (περίπου 50%), φωσφολιπίδια, χοληστερόλη και μπιλιβερδίνη. Η συγκέντρωση των χολικών αλάτων στη χολή συνήθως κυμαίνεται μεταξύ 0.2 και 2% μετά από την κατάποση της τροφής, και είναι υψηλότερη όταν η τροφή έχει αυξημένη συγκέντρωση λίπους (Ζουμποπούλου 2008, Bustos *et al.* 2015). Τα χολικά οξέα αλλάζουν τη δομή της κυτταρικής μεμβράνης των μικροοργανισμών, η οποία αποτελείται κυρίως από λιπίδια και λιπαρά οξέα και αυτό έχει ως συνέπεια να επηρεάζεται η κυτταρική διαπερατότητα και κατά συνέπεια η βιωσιμότητα των κυττάρων. Επίσης επηρεάζεται η αλληλεπίδραση της κυτταρικής μεμβράνης με το περιβάλλον (Succì *et al.* 2005). Επιπλέον, τα χολικά οξέα μπορεί να προκαλέσουν αλλαγές στην τριτοταγή δομή των πρωτεϊνών, οξειδωτική βλάβη στο DNA και RNA και επιπλέον να δημιουργήσουν ενδοκυτταρική οξίνιση (Bustos *et al.* 2015).

Οι δυο παραπάνω ιδιότητες των πιθανά προβιοτικών μικροοργανισμών, δηλαδή η αντοχή σε χαμηλό pH και η αντοχή στην παρουσία χολικών αλάτων, μελετώνται σχετικά γρήγορα και με χαμηλό κόστος στο εργαστήριο με *in vitro* μεθόδους. Ακόμα και αν τα *in vitro* πειράματα μπορούν μόνο εν μέρει να μιμηθούν τις πραγματικές *in vivo* συνθήκες, θεωρούνται αρκετά αξιόπιστες μέθοδοι αξιολόγησης του προβιοτικού δυναμικού ενός μικροοργανισμού ειδικά για τη σύγκριση και επιλογή μικροβιακών στελεχών μέσα από μεγάλες συλλογές (Španova *et al.* 2015). Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφερθεί ότι στις περισσότερες μελέτες η επιλογή προβιοτικών μικροοργανισμών γίνεται σε επίπεδο στελέχους, λόγω του ότι παρατηρούνται διαφορές ακόμα και ανάμεσα σε στελέχη που ανήκουν στο ίδιο είδος (Schrezenmeir and De Vrese 2001).

Όσον αφορά την ικανότητα πρόσδεσης των προβιοτικών στα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα και τη βλεννογόνο του εντέρου, θεωρείται ότι είναι επιθυμητό χαρακτηριστικό ενός προβιοτικού μικροοργανισμού, καθώς και το να μπορεί να αυξήσει το χρόνο παραμονής του στο έντερο. Με τον τρόπο αυτό αναστέλλουν τον αποικισμό παθογόνων μικροοργανισμών στα επιθηλιακά κύτταρα αλλά και αυξάνεται η αλληλεπίδραση των επιθηλιακών κυττάρων με τα ανοσοποιητικά κύτταρα (Jensen *et al.* 2012). Πιο συγκεκριμένα, εντεροπαθογόνοι μικροοργανισμοί όπως το *Escherichia coli* προσδένονται στα επιθηλιακά κύτταρα του ξενιστή μέσω υποδοχέων μαννόζης. Προβιοτικά στελέχη με παρόμοιες δυνατότητες πρόσδεσης θα μπορούσαν να αναστείλουν την πρόσδεση και τον αποικισμό παθογόνων σε αυτές τις θέσεις δέσμευσης και έτσι να προστατεύσουν τον ξενιστή έναντι της μόλυνσης (Marco *et al.* 2006). Τα προβιοτικά βακτήρια μπορούν επίσης να ανταγωνίζονται τα παθογόνα βακτήρια μειώνοντας το pH στις εσωτερικές μεμβράνες των μεμβρανόκλειστων οργανιδίων (luminal pH) των κυττάρων, με την παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών και άλλων ουσιών που συμβάλλουν στην άμυνα του οργανισμού. Ένας από τους μηχανισμούς με τους οποίους η χλωρίδα του εντέρου αντιστέκεται στον αποικισμό από παθογόνα βακτήρια, είναι η παραγωγή ενός φυσιολογικού περιοριστικού περιβάλλοντος, όσον αφορά το pH, το οξειδοαναγωγικό δυναμικό, και την παραγωγή υδρόθειου (Harzallah and Belhadj 2013). Έχει αποδειχθεί ότι μετά από κατάποση προβιοτικών βακτηρίων από ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα σημειώθηκε μείωση του luminal pH. Επίσης θετικά αποτελέσματα σημειώθηκαν και σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε ποντίκια μολυσμένα με Shiga τοξίνη από το στέλεχος *E. coli* O157:H7 όπου το προβιοτικό *Bifidobacterium* λόγω μεγάλης παραγωγής γαλακτικού οξέος, κατάφερε και μείωσε το luminal pH. Η μείωση αυτή συνδέθηκε με την αυξημένη επιβίωση των πειραματόζωων (Ng *et al.* 2009).

Πιθανές βλάβες στον εντερικό επιθηλιακό ιστό σχετίζονται με διάφορες γαστρεντερικές παθήσεις και πρόσφατες μελέτες παρουσιάζουν ενθαρρυντικά αποτελέσματα μέσω της θεραπείας με προβιοτικά (Mennigen and Bruewer 2009). Η πρόσδεση των προβιοτικών στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου έχει συσχετισθεί με πρόκληση ανοσολογικής απόκρισης, αλλά και με μείωση της διάρκειας της διάρροιας. Ωστόσο, οι προβιοτικές ιδιότητες, συμπεριλαμβανομένης και της ικανότητας πρόσδεσης του προβιοτικού μπορεί να τροποποιηθούν λόγω της βιομηχανικής επεξεργασίας του τροφίμου (Tuomola *et al.* 2001).

Όσον αφορά το τρίτο κριτήριο, τα προβιοτικά αλληλεπιδρούν με την μικροχλωρίδα του εντέρου βοηθώντας στη διατήρηση της μικροβιακής ισορροπίας και την άμυνα του οργανισμού έναντι των παθογόνων μικροοργανισμών.

Ακόμη, οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί θα πρέπει να αντέχουν στις συνθήκες που δημιουργούνται κατά την εφαρμογή της τεχνολογίας παραγωγής του σχετικού προϊόντος-τροφίμου (π.χ. θερμοκρασία – οξυγόνο) όπως επίσης να μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε τεχνολογικά μοντέλα μεγάλης κλίμακας (Banan *et al.* 2015). Ειδικά στα ζυμούμενα τρόφιμα, οι ιδιότητες των προβιοτικών που αποκτούν ιδιαίτερο τεχνολογικό ενδιαφέρον είναι ο ρυθμός ανάπτυξης τους και ο ρυθμός οξίνισης του υποστρώματος (Coda *et al.* 2010), η παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών (Messens and De Vuyst 2002), η αντιμυκητιακή τους δράση (Coda *et al.* 2013) και η παραγωγή εξωπολυσακχαριτών (π.χ. γλυκάνη και φρουκτάνη) (Galle and Arendt 2014). Επιπλέον σε κάθε παραγόμενο προβιοτικό προϊόν, ζυμούμενο ή όχι, βασική προϋπόθεση είναι να περιέχεται εν ζώη αρκετά μεγάλος πληθυσμός του προβιοτικού στελέχους, μέχρι και την αναγραφόμενη ημερομηνία λήξεως (Fasoli *et al.* 2003).

Πέρα από τα παραπάνω έξι κριτήρια τα οποία αποτελούν βασικές προϋποθέσεις προκειμένου να χαρακτηριστεί ένας μικροοργανισμός ως προβιοτικός, υπάρχουν και άλλα τα οποία έχουν τεχνολογικό ενδιαφέρον για την παραγωγή ενός τροφίμου με προβιοτικές ιδιότητες ή σχετίζονται με τη θρεπτική αξία και την συμβολή στην υγεία.

Πιο συγκεκριμένα, η χρήση προβιοτικών μικροοργανισμών πολλές φορές βελτιώνει τη θρεπτική αξία των παραγόμενων προϊόντων προσδίδοντας έξτρα όφελος για την υγεία του καταναλωτή όπως επίσης και αύξηση στη προστιθέμενη αξία του εκάστοτε προϊόντος. Όσον αφορά τις ιδιότητες που σχετίζονται με τη θρεπτική αξία του παραγόμενου τροφίμου, τόσο η ικανότητα αποικοδόμησης αντι-θρεπτικών παραγόντων (antinutrients, δηλαδή παραγόντων που παρεμποδίζουν την απορρόφηση θρεπτικών συστατικών π.χ. φυτικό οξύ) όσο και η

αυξημένη διαθεσιμότητα λειτουργικών συστατικών (π.χ. διαλυτές φυτικές ίνες, διαλυτές αραβοξυλάνες, ελεύθερα φαινολικά οξέα και βιοενεργά πεπτίδια) είναι επιθυμητές (Katina and Poutanen 2013).

Άλλη επιθυμητή ιδιότητα των προβιοτικών είναι η ικανότητά τους να υδρολύουν τη λακτόζη ώστε τα άτομα με δυσανεξία σε αυτό το σάκχαρο να μπορούν να καταναλώσουν το εκάστοτε προϊόν (Collington *et al.* 1990) Ανεπάρκεια στο ένζυμο λακτάση (β-γαλακτοζιδάση) σημαίνει μειωμένη συγκέντρωση του ενζύμου στη βλεννογόνο του λεπτού εντέρου. Η δυσανεξία στη λακτόζη είναι ένα πρόβλημα για το 70% περίπου του παγκόσμιου πληθυσμού. Η λακτόζη σε αυτές τις περιπτώσεις δεν υδρολύεται και δεν απορροφάται οπότε δρα οσμωτικά. Ωστόσο, όταν η λακτόζη προσλαμβάνεται μαζί με μικροοργανισμούς που παράγουν λακτάση (όπως ο *Lactobacillus acidophilus*, *L. bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* κ.ά.) τότε η διάσπαση της λακτόζης διευκολύνεται με επακόλουθη ελάττωση των συμπτωμάτων της δυσανεξίας. Γενικά, προτείνεται η προσθήκη 10^6 - 10^7 cfu ζωντανών προβιοτικών βακτηριών ανά ml ή g τροφής προκειμένου να εκδηλωθούν τα οφέλη των προβιοτικών για την υγεία του καταναλωτή (Argyri *et al.* 2013). Επιπλέον, τα προβιοτικά για κατανάλωση δε θα πρέπει να προκαλούν ασθένεια στον άνθρωπο, δε θα πρέπει να είναι σε θέση να εξελιχθούν σε παθογόνα διατηρώντας σταθερό το φαινότυπο και το γονότυπό τους, θα πρέπει να είναι σταθερά εναντίον των ενζύμων, να μην είναι τοξικά, αλλεργιογόνα ή μεταλλαξιογόνα, όπως επίσης και να μην μεταφέρουν γενετικό υλικό υπεύθυνο για την αντοχή σε αντιβιοτικά (Mattila and Saarela 2000, Parvez *et al.* 2006, Tumola *et al.* 2001, Banan *et al.* 2015).

Τέλος, τα προβιοτικά στελέχη πρέπει να είναι μεταβολικά ενεργά μέσα στην εντερική οδό και βιολογικά αποτελεσματικά έναντι των παθογόνων (Korbekandi *et al.* 2011). Πρωταρχικός ρόλος της επιστημονικής κοινότητας είναι η υγεία και η ασφάλεια του καταναλωτή. Ως εκ τούτου, αν και η αρχική επιλογή των ανθεκτικών προβιοτικών στελεχών προς παραγωγή προϊόντων έχει γίνει με όλα τα παραπάνω κριτήρια, η τελική επιλογή στελεχών γίνεται με βάση συνδυασμό αποτελεσμάτων *in vivo* και *in vitro* μελετών αφού τα μέχρι στιγμής υπάρχοντα *in vitro* πειράματα δεν θεωρείται ότι επαρκούν για την εξαγωγή ασφαλούς συμπεράσματος (FAO/WHO 2001). Επομένως, είναι σημαντικό να λάβουν χώρα και κλινικές δοκιμές προκειμένου να χαρακτηριστεί ένας μικροοργανισμός και κατ' επέκταση το παραγόμενο τρόφιμο-προϊόν, ως προβιοτικό (Lee and Salminen 2009, Ventura and Perozzi 2011).

1.5 Ευεργετικές δράσεις των προβιοτικών μικροοργανισμών

Ο ανθρώπινος οργανισμός δεν αποτελείται μόνο από τα δικά του κύτταρα, αλλά και από 100 τρισεκατομμύρια μικρόβια, το λεγόμενο μικροβίωμα (microbiome). Πρόκειται για βακτήρια που κατοικούν στον γαστρεντερικό σωλήνα και συνιστούν την εντερική χλωρίδα. Πάνω από 400 είδη μικροοργανισμών βρίσκονται στην εντερική χλωρίδα του ανθρώπου. Ανάμεσα σε αυτά και προβιοτικοί μικροοργανισμοί, κυρίως βακτήρια του γένους *Bifidobacterium* και του γένους *Lactobacillus* (Ζουμποπούλου 2008).

Τα μικρόβια της εντερικής χλωρίδας όχι μόνο δεν είναι αδρανή, αλλά ρυθμίζουν καθημερινές λειτουργίες του σώματος. Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, μπορεί να ευθύνονται για την εκδήλωση διαβήτη τύπου δύο, να πυροδοτούν το άσθμα, το έκζεμα και τον αυτισμό καθώς και αυτοάνοσα νοσήματα όπως η σκλήρυνση κατά πλάκας. Έχει λοιπόν μεγάλη σημασία το είδος των βακτηρίων που κατοικούν στην εντερική χλωρίδα.

Κλινικές μελέτες με προβιοτικές καλλιέργειες, έδωσαν αποτελέσματα που στηρίζουν την άποψη ότι οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί έχουν θετική επίδραση στην μικροχλωρίδα 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, Isolauri *et al.* 1991, Nanji *et al.* 1994, Isolauri and Majamaa 1997, Dunne *et al.* 1999, Lee *et al.* 2008). Οι προβιοτικές καλλιέργειες επιδρούν τόσο στη μικροχλωρίδα όσο και στις μεταβολικές και ενζυμικές δραστηριότητες των παθογόνων μικροοργανισμών. Οι αλλαγές στη μικροχλωρίδα προκαλούν αλλαγές στην παραγωγή προκαρκινικών ενζύμων και καρκινογόνων ουσιών από τους μικροοργανισμούς του γαστρεντερικού σωλήνα. Επιπροσθέτως, οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί με την πρόσδεσή τους στο επιθήλιο του εντέρου, τα κυτταρικά τους συστατικά και την επίδραση στη μικροχλωρίδα του εντέρου, βελτιώνουν τη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος στο γαστρεντερικό σωλήνα.

Παρακάτω αναφέρονται μερικές από τις πιθανές ευεργετικές δράσεις των προβιοτικών.

1.5.1 Δράση κατά της μολυσματικής διάρροιας

Μια από τις πρώτες συστάσεις για τη χρήση προβιοτικών ήταν για τη θεραπεία και / ή την πρόληψη της διάρροιας. Οι συντάκτες μιας μελέτης 63 κλινικών δοκιμών ανέφεραν σημαντικό όφελος από τη χρήση προβιοτικών για την αντιμετώπιση της οξείας διάρροιας (Allen *et al.* 2010). Παρ'όλα αυτά, τα αποτελέσματα είναι αρκετά μεταβλητά ανάμεσα στις μελέτες, διότι η δράση ενός συγκεκριμένου στελέχους σε μια δεδομένη εντεροπαθολογία διαφέρει από άλλα παρόμοια περιστατικά, οπότε καθιστά δύσκολη τη σύγκριση και τη σωστή αξιολόγηση των μελετών.

Οι συντάκτες μιας άλλης πρόσφατης κλινικής μελέτης, αναφέρουν ότι η χορήγηση προβιοτικών δεν είχε θετική επίδραση στην αντιμετώπιση της διάρροιας σε ενήλικες, ωστόσο στα παιδιά, παρατηρήθηκε μείωση της διάρκειας της διάρροιας και του πυρετού, χωρίς όμως να επηρεαστεί η διάρκεια της νοσηλείας τους (Salari *et al.* 2012). Ένα από τα πιο ενδιαφέροντα αποτελέσματα της μελέτης αυτής ήταν η μείωση της διάρροιας από το ροτοϊό (rota virus). Το προβιοτικό *Lb. GG* προκάλεσε μια σημαντική μείωση της διάρροιας του ροτοϊού όταν εφαρμόστηκε σε τρεις τυχαιοποιημένες ελεγχόμενες δοκιμές σε περισσότερα από 1000 παιδιά (Szajewska H *et al.* 2011). Τα πιο αποτελεσματικά στελέχη για την αντιμετώπιση της μολυσματικής διάρροιας φαίνεται να είναι τα *B. lactis*, *Lb. GG*, καθώς και οι ζυμομύκητες *S. boulardii* (Goldenberg *et al.* 2013).

1.5.2 Δράση κατά της νόσου του Crohn

Η νόσος του Crohn (γνωστή και ως ελκώδης κολίτιδα, Inflammatory Bowel Disease) είναι χρόνια ασθένεια άγνωστης αιτίας, η οποία εμφανίζεται όλο και συχνότερα τις τελευταίες δεκαετίες στις ανεπτυγμένες χώρες. Οι ασθενείς παρουσιάζουν εξελκώσεις (δηλαδή αλλοιώσεις και βλάβες) στο λεπτό έντερο ή στη βλεννογόνο του παχέος εντέρου και εναλλασσόμενες περιόδους έξαρσης και ύφεσης. Μερικοί ερευνητές συνδέουν την ασθένεια αυτή με γενετική προδιάθεση, με δυσβίωση του εντέρου και με μείωση της μικροβιακής ποικιλότητας. Η αιτία όμως μένει να καθοριστεί (Sha *et al.* 2013). Αυτή η πιθανή σχέση μεταξύ της μικροχλωρίδας και της φλεγμονής της βλεννογόνου έθεσε ένα αυξανόμενο ενδιαφέρον για την χορήγηση προβιοτικών σε ασθενείς που πάσχουν από αυτή την ασθένεια, ως συμπλήρωμα στη συνήθη θεραπεία, αλλά η αποτελεσματικότητα των προβιοτικών δεν έχει αποδειχθεί (Meijer *et al.* 2011). Έτσι, ακόμα κι αν είναι δύσκολο να προταθεί μέχρι σήμερα προβιοτική θεραπεία για την αντιμετώπιση της νόσου, η προσέγγιση αυτή έχει ενδιαφέρον αλλά απαιτεί περαιτέρω μελέτες, συμπεριλαμβανομένης της διερεύνησης των σχέσεων μεταξύ

μικροχλωρίδας και ασθενειών που πρόσφατα έχουν συσχετιστεί με τη νόσο του Crohn όπως το *Faecalibacterium prausnitzii* (Butel 2014).

1.5.3 Δράση κατά των αλλεργιών

Η αύξηση του αριθμού των ατόμων με συμπτώματα οποιασδήποτε αλλεργίας στις βιομηχανικές χώρες, εξηγήθηκε από τη θεωρία της υγιεινής του Frederick Irving Herzberg. Ο Herzberg υποστήριξε ότι οι αλλαγές στη σύσταση της εντερικής μικροχλωρίδας των ασθενών συσχετίζονταν με τις συνθήκες υγιεινής του εργασιακού τους χώρου, τις θεραπείες με αντιβιοτικά στην πρώιμη παιδική ηλικία τους και την ανεπαρκή ωρίμανση του ανοσοποιητικού τους συστήματος (Okada *et al.* 2010). Αυτή η θεωρία υποστηρίζεται από επιδημιολογικές μελέτες που αποδεικνύουν διαφορές μικροχλωρίδας μεταξύ αλλεργικών και μη αλλεργικών παιδιών (Okada *et al.* 2010). Δυστυχώς όμως υπάρχουν αντιφατικά αποτελέσματα μεταξύ των μελετών με συνέπεια να μην συστήνεται η λήψη προβιοτικών για την πρόληψη των αλλεργιών (Okada *et al.* 2010). Οι διαφορές των μελετών περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων: το είδος -ως προς την ηλικία- του πληθυσμού που μελετήθηκε, τον τύπο της αλλεργίας, το στάδιο αυτής, ο αριθμός των ασθενών που συμπεριλήφθηκαν, τα προβιοτικά που δοκιμάστηκαν, ο συνδυασμός διαφορετικών ειδών προβιοτικών μικροοργανισμών, ή ακόμα και οι δόσεις που χορηγήθηκαν (Ozdemir *et al.* 2010).

Παρ' όλα αυτά, τα αποτελέσματα ορισμένων μελετών αποδεικνύουν την αποτελεσματικότητα των προβιοτικών για την πρόληψη κάποιας αλλεργικής ασθένειας, πιο συχνά σε οικογένειες υψηλού κινδύνου, που δικαιολογούν περαιτέρω πειραματική έρευνα και κλινικές δοκιμές, με έμφαση στην επιλογή του στελέχους που θα χορηγηθεί (Okada *et al.* 2010).

1.5.4 Δράση κατά του ελικοβακτηριδίου του πυλωρού

Μερικοί συγγραφείς έχουν αναφέρει την πιθανή συμβολή των προβιοτικών για ασθένειες που οφείλονται στο βακτήριο *Helicobacter pylori*, όπως γαστρικά έλκη και μερικούς γαστρικούς καρκίνους. Όμως τα αποτελέσματα των κλινικών δοκιμών σε ανθρώπους, με διάφορα στελέχη, διάφορες δόσεις και ένα μικρό αριθμό ασθενών, δεν είναι αρκετά σημαντικά έως τώρα για τη χρήση προβιοτικών στη διαχείριση της συγκεκριμένης μόλυνσης (Malfetheriner *et al.* 2012). Υπάρχουν ωστόσο, ενθαρρυντικά αποτελέσματα από τη χορήγηση της ζύμης *S. boulardii* σε συνδυασμό με τη συνήθη θεραπεία που περιλαμβάνει τη χρήση τριπλού αντιβιοτικού (Szajewska *et al.* 2010).

1.5.5 Δράση κατά της παχυσαρκίας

Οι [Arora et al. \(2012\)](#) αναφέρουν ότι η χορήγηση του *L. rhamnosus* PL60 σε υπέρβαρα ποντίκια είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική απώλεια βάρους η οποία δεν συνοδευόταν από αντίστοιχη απώλεια ενέργειας. Οι ερευνητές απέδωσαν το φαινόμενο στην παραγωγή συζευγμένου λινελαϊκού οξέος (CLA) από το προβιοτικά βακτήρια και υποστηρίζουν ότι δεν υπάρχει αντίστοιχη δράση στον ανθρώπινο οργανισμό, παρά μόνο σε πειραματόζωα. Ο *Lb. plantarum* PL62 παράγει και αυτός CLA και βρέθηκε ότι μειώνει το σωματικό βάρος μειώνοντας το λίπος στην επιδιδύμιδα, στη βουβωνική περιοχή, στο εσωτερικό των εντέρων αλλά και γύρω από τα νεφρά ([Arora et al. 2012](#)).

1.5.6 Δράση κατά των ασθενειών της στοματικής κοιλότητας

Το ανθρώπινο στόμα φιλοξενεί διάφορες ομάδες μικροοργανισμών όπως για παράδειγμα μύκητες, πρωτόζωα, αρχαία και βακτήρια. Η ισορροπία και η αλληλεπίδραση των παραπάνω ομάδων μπορεί πολύ εύκολα να διαταραχθεί με αποτέλεσμα να επικρατήσουν τα παθογόνα βακτήρια τα οποία μπορούν να προκαλέσουν κοινές ασθένειες της στοματικής κοιλότητας όπως η τερηδόνα, η κακοσμία και η περιοδοντίτιδα ([Elavarasu et al. 2012](#), [Wade et al. 2013](#)). Ωστόσο η χρήση των προβιοτικών έχει αποδειχθεί αποτελεσματική μέθοδος για την καταπολέμηση των στοματικών ασθενειών παρόλο που τα στοιχεία για την περιοδοντίτιδα είναι λιγότερα από αυτά της τερηδόνας ([Bowen et al. 2013](#)). Τα προβιοτικά που έχουν αποδείξει την ευεργετική τους δράση ενάντια στις ασθένειες του στόματος από παθογόνα βακτήρια περιλαμβάνουν στελέχη από τα γένη *Lactobacillus* αλλά και *Bifidobacterium* ([Banas et al. 2013](#)). Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι αυτό του *Lactobacillus reuteri* αφού περιόρισε την εμφάνιση συμπτωμάτων ουλίτιδας και αιμοραγίας των ούλων ([Vivekananda et al. 2010](#)). Αρκετές μελέτες έδειξαν ότι στελέχη *Lactobacillus* μπορούν επίσης να περιορίσουν-καταπολεμήσουν τα στελέχη του *Streptococcus mutans* που προκαλούν την ασθένεια της τερηδόνας ([Haukioja et al. 2010](#), [Anilkumar et al. 2012](#), [Bizzini et al. 2012](#)).

Ευεργετική δράση στην περιοχή του στόματος έχει δείξει επίσης και ο *Streptococcus salivarius* K12 παράγοντας βακτηριοσίνες ενάντια σε παθογόνους μικροοργανισμούς όπως οι *S. pyogenes* και *S. pneumoniae*, προστατεύοντας έτσι τον ανθρώπινο οργανισμό από ασθένειες όπως υποτροπιάζουσα φαρυγγίτιδα, ωτίτιδα, αμυγδαλίτιδα και πνευμονία ([Di Pierro et al. 2013](#), [2014](#)). Επίσης έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να μειώσει την εμφάνιση της πλάκας και τα επίπεδα του *S. mutans* σε ασθενείς ([Burton et al. 2013](#)).

Τέλος, στελέχη όπως τα *S. uberis* και *S. oralis* παρεμποδίζουν τα παθογόνα βακτήρια που είναι υπεύθυνα για την περιοδοντίτιδα (Hillman *et al.* 2009).

1.6 Πιθανοί μηχανισμοί δράσης των προβιοτικών μικροοργανισμών

Η πρώτη ερευνητική προσπάθεια με σκοπό την κατανόηση των μηχανισμών δράσης των προβιοτικών μικροοργανισμών, συνδέθηκε με την δυσλειτουργία του πεπτικού συστήματος λόγω διαταραχών στην μικροχλωρίδα του εντέρου (Anadón *et al.* 2016).

Αν και είναι γνωστό ότι ορισμένα προβιοτικά μπορούν να επιφέρουν ευεργετικά αποτελέσματα, λίγα είναι γνωστά σχετικά με τους μοριακούς μηχανισμούς δράσης τους και δεν έχουν κατανοηθεί πλήρως. Υπάρχουν αρκετοί πιθανοί μηχανισμοί δράσης με τους οποίους οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί προσφέρουν οφέλη για την υγεία του ξενιστή (FAO/WHO 2001). Οι μηχανισμοί αυτοί μπορεί να διαφέρουν από το ένα προβιοτικό στο άλλο και μπορεί να είναι ένας συνδυασμός γεγονότων. Ο συνδυασμός αυτός θα μπορούσε να περιλαμβάνει την παραγωγή ενός ή περισσότερων ενζύμων ή μεταβολιτών που δρουν απευθείας στους μικροοργανισμούς. Σε άλλες περιπτώσεις το προβιοτικό μπορεί να διεγείρει τον οργανισμό να προκαλέσει ο ίδιος τα ευεργετικά για αυτόν αποτελέσματα (Andersson *et al.* 2001, FAO/WHO 2001).

Μερικοί πιθανοί μηχανισμοί δράσης των προβιοτικών βακτηρίων που έχουν προταθεί είναι οι ακόλουθοι (Saier and Mansour 2005, Blazenka *et al.* 2007, Jensen *et al.* 2012, Anadón *et al.* 2016):

- (i) Η παραγωγή τελικών προϊόντων όπως π.χ. οργανικά οξέα που μπορούν να απορροφηθούν από τον ξενιστή, λόγω της αναερόβιας ζύμωσης των υδατανθράκων. Αυτά τα προϊόντα, είναι σε θέση να επηρεάσουν την ανθρώπινη διάθεση, τα επίπεδα ενέργειας ακόμη και τις νοητικές ικανότητες.
- (ii) Η αποτελεσματική τους δράση έναντι παθογόνων μικροοργανισμών.
- (iii) Η τροποποίηση του επιθηλιακού ιστού.
- (iv) Η διέγερση της ανοσοαπόκρισης του ξενιστή λόγω παραγωγής ειδικών πολυσακχαριστών.

- (v) Η ενεργοποίηση φυσικών φονικών κυττάρων, μακροφάγων και της φαγοκυττάρωσης.
- (vi) Η αύξηση του αριθμού κυττάρων που εκκρίνουν τα αντιγόνα IgA, IgG, IgM.
- (vii) Η αύξηση έκκρισης IgA σε ορό και εντερικό βλεννογόνο.
- (viii) Η αύξηση παραγωγής εντερικής βλέννης.
- (ix) Η μείωση της διαπερατότητας του εντερικού βλεννογόνου.
- (x) Η τροποποίηση της φλεγμονώδους αντίδρασης στον εντερικό βλεννογόνο.

1.7 Προβιοτικά και η θέση τους στην παγκόσμια αγορά

Τα προβιοτικά συναντώνται σε διάφορες μορφές στην αγορά: είτε ως μορφή κάψουλας ή/και ταμπλέτας, είτε περιέχονται σε διάφορα τρόφιμα που κυκλοφορούν στην αγορά, όπως είναι το προβιοτικό γιαούρτι, το ξινόγαλα, το προβιοτικό παγωτό, το προβιοτικό τυρί, οι μπάρες δημητριακών κ.ά. Επίσης, τα ευεργετικά οφέλη των προβιοτικών στην υγεία του καταναλωτή έχουν βοηθήσει στην εμπορική ανάπτυξη των προϊόντων που τα περιέχουν.

Τα προβιοτικά προϊόντα υπάγονται στην κατηγορία των λειτουργικών τροφίμων. Σύμφωνα με τον Υπηρεσία/Διεύθυνση Τροφίμων και Φαρμάκων των Η.Π.Α. (Food and Drug Administration, FDA 2004), ως λειτουργικά τρόφιμα ορίζονται τα τρόφιμα ή τα θρεπτικά συστατικά τα οποία δίδουν σημαντικές φυσιολογικές αλλαγές στον καταναλωτή και η δράση τους είναι ξεχωριστή και διακριτή από τον ρόλο τους ως θρεπτικά συστατικά. Τα προβιοτικά αντιπροσωπεύουν ένα σημαντικό μερίδιο (60-70%) της αγοράς των λειτουργικών τροφίμων (Holzapfel 2006). Παγκοσμίως, η ζήτηση για κατανάλωση των λειτουργικών τροφίμων αυξάνεται μέρα με τη μέρα, λόγω της αυξανόμενης ευαισθητοποίησης των καταναλωτών σχετικά με την επίδραση της διατροφής στην υγεία. Κατά το έτος 2000, η παγκόσμια αγορά για τα λειτουργικά τρόφιμα ανέρχεται στα 33 δισεκατομμύρια \$ και μέχρι το 2010 τα έσοδα αυξήθηκαν στα 167 δισεκατομμύρια \$ ενώ οι προβλέψεις για το 2018 εκτοξεύουν τα έσοδα στα 37.9 δισεκατομμύρια \$. Η Κίνα και η Ιαπωνία κυριαρχούν στην αγορά των προβιοτικών, και σημειώνουν σημαντική αύξηση στις πωλήσεις τέτοιων προϊόντων. Προβιοτικά του γένους *Lactobacillus* έχουν το μεγαλύτερο μερίδιο πωλήσεων αφού αντιπροσωπεύουν το 61,9% των συνολικών πωλήσεων προβιοτικών για το 2007 (Food Processing 2009).

Αρκετά προβιοτικά βακτήρια ανθρώπινης προέλευσης όπως οι *Lb. rhamnosus GG*, *Lb. casei strain Shirota* και *Lb. acidophilus LA-1* αξιοποιούνται εμπορικά. Ωστόσο, τα είδη που ανήκουν στα γένη *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Saccharomyces* και *Propionibacterium* θεωρούνται επίσης προβιοτικά. Πολλοί καταναλωτές, οργανώσεις καταναλωτών, καθώς και μέλη της επιστημονικής κοινότητας όμως, είναι ακόμα δύσπιστοι για την αποτελεσματικότητα αυτών των προϊόντων και τους ισχυρισμούς υγείας τους.

Τα προβιοτικά στελέχη που χρησιμοποιούνται στο εμπόριο είναι τα βακτήρια, οι μύκητες και οι ζύμες. Επίσης, πολύ συχνά βρίσκουμε εμπορικά προϊόντα με μίξεις αυτών με τα στελέχη των γενών *Lactobacillus sp.* ή *Bifidobacterium sp.* Σήμερα, οι μίξεις πολλών ειδών προβιοτικών γίνονται ολοένα και πιο δημοφιλείς σε σύγκριση με μεμονωμένα προβιοτικά στελέχη καθώς μπορούν να δρουν συνεργιστικά με αποτέλεσμα να πετυχαίνουν μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα. Τα προβιοτικά παρασκευάσματα διατίθενται στην αγορά στις εξής μορφές: σκόνη, υγρή μορφή, γέλη, πάστα, κόκκοι, κάψουλες, δισκία ή/και φακελάκια (Sharma 2014). Ειδικά για ανθρώπινη κατανάλωση, η διάθεση των προβιοτικών γίνεται με τρεις διαφορετικούς τρόπους: 1) συμπύκνωμα καλλιέργειας που προστίθεται στα τρόφιμα (σε σκόνη ή σε μορφή βαθιάς κατάψυξης), 2) προβιοτικά τρόφιμα (που έχουν υποστεί ζύμωση ή όχι), και 3) συμπληρώματα διατροφής (φαρμακευτικά προϊόντα σε μορφή σκόνης, κάψουλας ή ταμπλέτας) (Tannis 2008). Ακολουθεί ο πίνακας 3 με τα περισσότερα στελέχη που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία σήμερα μαζί με τις εταιρείες που τα αξιοποιούν.

Πίνακας 3. Προβιοτικά στελέχη που κυκλοφορούν στην αγορά

Εμπορικά προβιοτικά στελέχη	Εταιρεία παραγωγής
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCRM	Rhodia Inc. (Madison, Wis.)
<i>Lb. acidophilus</i> DDS-1	Nebraska cultures
<i>Lb. acidophilus</i> SBT-2062	Snow Brand Milk Products Co., ltd. (Tokyo, Japan)
<i>Lb. acidophilus</i> LA-1 (Το στέλεχος LA-5 πωλήθηκε στην Ευρώπη)	Chr. Hansen, Inc. (Milwaukee, Wis.)
<i>Lb. casei strain Shirota</i>	Yakult (Tokyo, Japan)
<i>Lb. casei Immunitas</i>	Danone (Paris, France)
<i>Lb. fermentans</i> RC-14	Urex Biotech (London, Ontario, Canada)
<i>Lb. johnsonii</i> La1	Nestle (Lansanne, Switzerland)
<i>Lb. plantarum</i> 299V	Probio AB (Lund, Sweden)
<i>Lb. reuteri</i> SD2112	Biogia (Raleigh, N.C.)
<i>Lb. rhamnosus</i> GG	Valio Dairy (Helsinki, Finland)
<i>Lb. rhamnosus</i> GR-1™	Urex Biotech (London, Ontario, Canada)
<i>Lb. rhamnosus</i> 271	Robio AB (Lund, Sweden)
<i>Lb. rhamnosus</i> LB 21	Essum AB (Umea, Sweden)
<i>Lb. salivarius</i> UCC118	University College (Cork, Ireland)
<i>Lb. lactis</i> L1A	Essum AB (Umea, Sweden)
<i>Lb. acidophilus</i> NCFM ^R	Danisco (Madison WI)
<i>Lb. rhamnosus</i> GG (“LGG”)	Valio Dairy (Helsinki, Finland)
<i>Lb. rhamnosus</i> R0011, <i>Lb. acidophilus</i> R0052	Institute Rosell (Montreal, Canada)
<i>Lb. casei</i> DN 114001	Danone (Paris, France)
<i>Lb. acidophilus</i> LB	Lacteol Laboratory (Houdan, France)
<i>Lb. paracasei</i> F19	Medi pharm (Des Moines, Iowa)
<i>Lb. reuteri</i> RC-14™	Chr. Hansen (Milwaukee WI)
<i>B. lactis</i> Bb-12	Chr. Hansen (Milwaukee WI)
<i>B. longum</i> BB536	Morianga Milk Industry Co. Ltd. (Zama city, Japan)
<i>B. longum</i> SBT-2928	Snow Brand Milk Products Co. Ltd. (Tokyo, Japan)
<i>B. breve</i> strain Yakult	Yakult (Tokyo, Japan)
<i>B. animalis</i> DN173010	Activia, Danone
<i>B. animalis</i> subsp. <i>Lactis</i> Bb-12	Chr. Hansen
<i>B. infantis</i> 35624	Align, Procter & Gamble

Εμπορικά προβιοτικά στελέχη	Εταιρεία παραγωγής
<i>B. lactis</i> HN019 (DR10)	Howaru Bifido, Danisco
<i>E. LAB SF 68</i>	Bioflorin, Cerbions-Pharma
<i>Escherichia coli</i> Nissile 1917	Mutaflor, Ardeypharm
<i>L. lactis</i> L1A	Normejerier
<i>Lb. reuteri</i> ATCC 55730	Biogia Biologics
<i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 53013 (LGG)	Vifit, Valio
<i>B. lactis</i> HN019 ονομαζόμενο ως DR10™, και <i>Lb. rhamnosus</i> HN001 ονομαζόμενο ως DR20™	New Zealand
<i>Lb. casei</i> DN 014001	France Danone
<i>Lb. delbruekii</i>	Japan Meiji Milk Products, Tokyo
<i>S. boulardii</i>	USA Biocodex, Seattle
<i>B. longum</i> BB536	Japan Morinaga Milk Industry
<i>S. boulardii</i>	Biocodex (Creswell OR)
<i>Lb. fermentum</i> VR1003 (PCC)	Probiomics (Eveleigh, Australia)
<i>Lb. acidophilus</i> LA-5	Chr. Hansen (Milwaukee, WI)
<i>Lb. paracasei</i> CRI. 431	Chr. Hansen (Milwaukee, WI)
<i>B. lactis</i> Bb-12	Nestle (Glandale, CA)

Πηγή: Sharma *et al.* 2014

1.8 Ασφάλεια των προβιοτικών

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια παρουσιάζουν μια μακροχρόνια ιστορία ασφαλούς χρήσης αφού καταναλώνονται καθημερινά από τότε που οι άνθρωποι άρχισαν να χρησιμοποιούν το ζυμώμενο γάλα ως τρόφιμο. Η ασφάλεια με τα σημερινά δεδομένα όμως έχει πολυπλοκότερη έννοια. Ως αποτέλεσμα, κρίνεται απαραίτητο να μελετηθεί η ασφάλεια των οξυγαλακτικών βακτηρίων με διάφορες κλινικές μελέτες.

Ιστορικά στοιχεία δείχνουν ότι γενικώς οι γαλακτοβάκιλλοι και τα *Bifidobacteria* είναι ασφαλή για ανθρώπινη χρήση. Έχει προταθεί ότι η ανθρώπινη προέλευση ενός στελέχους επιβεβαιώνει την κανονική συμβιωτική φύση του και ως εκ τούτου, την ασφάλειά του. Ωστόσο, παραμένει δύσκολο να καθοριστεί η προέλευση ενός βακτηριακού είδους, καθώς τα βρέφη γεννιούνται με αποστειρωμένο εντερικό σύστημα (Leory *et al.* 2008). Στον **πίνακα 4** που ακολουθεί παρουσιάζεται η πιθανή παθογένεια έξι γενών προβιοτικών μικροοργανισμών.

Πίνακας 4. Πιθανή παθογένεια προβιοτικών μικροοργανισμών

Γένος	Πιθανή παθογένεια
<i>Lactobacillus</i>	Κυρίως μη παθογόνα, περιστασιακές λοιμώξεις (συνήθως σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς)
<i>Lactococcus</i>	Κυρίως μη παθογόνα
<i>Leuconostoc</i>	Κυρίως μη παθογόνα, μεμονωμένες περιπτώσεις λοιμώξεων
<i>Streptococcus</i>	Είδος <i>Streptococcus thermophilus</i> : Κυρίως μη παθογόνα Στοματικοί στρεπτόκοκκοι : μερικές περιστασιακές λοιμώξεις
<i>Enterococcus</i>	Ορισμένα στελέχη είναι περιστασιακά παθογόνα με αιμολυτική δραστηριότητα και ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά
<i>Bifidobacterium</i>	Κυρίως μη παθογόνα, μεμονωμένες περιπτώσεις λοιμώξεων
<i>Saccharomyces</i>	Κυρίως μη παθογόνα, μεμονωμένες περιπτώσεις λοιμώξεων

Πηγή: Ζουμποπούλου 2008

Για να διασφαλιστεί λοιπόν η υγεία των καταναλωτών και να λάβει άδεια πώλησης κάθε νέο προβιοτικό σκεύασμα, θα πρέπει να πληρεί τις ακόλουθες προϋποθέσεις (Salminen *et al.* 1998):

- i. 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.
- ii. Σε σχέση με την παράγραφο (i), στελέχη τα οποία μεταφέρουν αντιβιοτική αντίσταση, δηλαδή χρησιμοποιούν κωδικοποιημένες πρωτεΐνες οι οποίες απενεργοποιούν τα αντιβιοτικά, δεν θα πρέπει να κυκλοφορούν στο εμπόριο.
- iii. Όταν ένα στέλεχος παρουσιάζει μακροχρόνια ιστορία ασφαλούς χρήσης, θα είναι ασφαλές και ως προβιοτικό στέλεχος και δε θα θεωρηθεί ως νεοφανές τρόφιμο.
- iv. Όταν το προβιοτικό τρόφιμο είναι νέας σύνθεσης, πρωτοεμφανιζόμενο στην αγορά, θα πρέπει να λάβει την κατάλληλη νομοθετική έγκριση (εκάστοτε κατευθυντήρια οδηγία της Ευρωπαϊκής Ένωσης για τα νεοφανή τρόφιμα).
- v. Για να περιγραφεί ένα προβιοτικό στέλεχος απαιτείται υψηλότατο επίπεδο ταξινόμησης. Σήμερα αυτό περιλαμβάνει υβριδισμό DNA-DNA και προσδιορισμό της αλληλουχίας του rRNA.
- vi. 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 περιλαμβάνει παθογόνα στελέχη και εμφανίζεται στην ιστορία ως ασφαλές, τότε πιθανόν το στέλεχος αυτό να είναι ασφαλές ως προβιοτικό στέλεχος. Επομένως το τρόφιμο-προϊόν που θα περιέχει το προβιοτικό στέλεχος δε θα θεωρηθεί νεοφανές. Στην περίπτωση που ένα νέο στέλεχος ανήκει σε ένα είδος το οποίο είναι γνωστό ότι περιέχει παθογόνα στελέχη, θα θεωρηθεί ως νεοφανές τρόφιμο.
- vii. Ο παραγωγός έχει την απόλυτη ευθύνη για την ασφάλεια του εκάστοτε προϊόντος που βγάζει στην αγορά. Τα προβιοτικά τρόφιμα θα πρέπει να είναι τόσο ασφαλή όσο και τα υπόλοιπα τρόφιμα.

- viii. 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 καλλιιεργειών. Τέλος, είναι άστοχο να επιτρέπεται η χρήση του όρου προβιοτικά, χωρίς την ύπαρξη κατάλληλης κλινικής τεκμηρίωσης

Τέλος, για την αξιολόγηση της ασφάλειας των προβιοτικών μικροοργανισμών και των προϊόντων που σχετίζονται με αυτούς, οι οργανισμοί FAO/WHO έχουν διατυπώσει κατευθυντήριες γραμμές, συνιστώντας ότι τα προβιοτικά στελέχη θα πρέπει να αξιολογούνται για έναν αριθμό παραμέτρων, συμπεριλαμβανομένων των προτύπων ευαισθησίας στα αντιβιοτικά, την παραγωγή τοξινών, των μεταβολικών και αιμολυτικών δραστηριοτήτων και της μολυσματικότητας σε ανοσοκατεσταλμένα ζώα (Leory *et al.* 2008).

2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Εξεταζόμενα βακτηριακά στελέχη και θρεπτικά υποστρώματα

Τα 42 βακτηριακά στελέχη που μελετήθηκαν στην παρούσα μελέτη βρίσκονταν στο Εργαστήριο Γαλακτοκομίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, και είχαν απομονωθεί από παραδοσιακά Ελληνικά γαλακτοκομικά προϊόντα στο παρελθόν. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκαν 27 στελέχη κόκκων (από τα οποία 23 ανήκαν στο γένος *Enterococcus*, τρία στο γένος *Pediococcus* και ένα στο γένος *Lactococcus*) και 15 στελέχη βακίλων (από τα οποία τα 13 ανήκαν στο γένος *Lactobacillus* και δύο δεν έχουν ακόμη ταυτοποιηθεί σε επίπεδο γένους). Στον **πίνακα 5** παρουσιάζονται τα βακτηριακά στελέχη που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία καθώς και η προέλευσή τους.

Πίνακας 5. Βακτηριακά στελέχη που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία και η προέλευσή τους.

A/A	Βακτηριακά στελέχη*	Προέλευση
Βάκιλοι		
1	<i>Lb. paracasei</i> -5	Καλαθάκι Λήμνου
2	<i>Lb. paracasei</i> -625	Ξινόγαλα Ελασσόνας
3	<i>Lb. paracasei</i> -13	Καλαθάκι Λήμνου
4	<i>Lb. brevis</i> -73	Μελίχλωρο Λήμνου
5	<i>Lb. delbruckii</i> subsp. <i>lactis</i> -312	Γιαούρτι Κορίνθου
6	<i>Lb. plantarum</i> -612a	Ξινόγαλα Ελασσόνας
7	<i>Lb. plantarum</i> -613a	Ξινόγαλα Ελασσόνας
8	<i>Lb. plantarum</i> -612b	Ξινόγαλα Ελασσόνας
9	<i>Lb. plantarum</i> -613b	Ξινόγαλα Ελασσόνας
10	<i>Lb. plantarum</i> -614	Ξινόγαλα Ελασσόνας
11	<i>Lb. plantarum</i> -914	Ξινόγαλα Μαρκόπουλου
12	<i>Lb. plantarum</i> -735	Ξινόγαλα Μεγάρων
13	<i>Lb. plantarum</i> -824	Ξινόγαλα Σουλίου
14	Μη ταυτοποιημένος βάκιλος-912	Ξινόγαλα Μαρκόπουλου
15	Μη ταυτοποιημένος βάκιλος-913	Ξινόγαλα Μαρκόπουλου
Εντερόκοκκοι και λοιποί κόκκοι		
1	<i>E. faecium</i> -1	Καλαθάκι Λήμνου
2	<i>E. durans</i> -10	Καλαθάκι Λήμνου
3	<i>E. faecium</i> -14	Μελίχλωρο Λήμνου
4	<i>E. faecium</i> -31	Μελίχλωρο Λήμνου
5	<i>E. gilvus</i> -47	Καλαθάκι Λήμνου

A/A	Βακτηριακά στελέχη*	Προέλευση
6	<i>E. faecium</i> -49	Μελίχλωρο Λήμνου
7	<i>E. faecium</i> -33	Καλαθάκι Λήμνου
8	<i>E. durans</i> -86	Μελίχλωρο Λήμνου
9	<i>E. faecium</i> -87	Καλαθάκι Λήμνου
10	<i>E. faecium</i> -88	Καλαθάκι Λήμνου
11	<i>E. faecalis</i> -95	Καλαθάκι Λήμνου
12	<i>E. hiraе</i> -100	Καλαθάκι Λήμνου
13	<i>E. faecium</i> -109	Μελίχλωρο Λήμνου
14	<i>E. faecium</i> -110	Μελίχλωρο Λήμνου
15	<i>E. durans</i> -8	Καλαθάκι Λήμνου
16	<i>E. pseudoavium</i> -27	Μελίχλωρο Λήμνου
17	<i>E. faecium</i> -42	Καλαθάκι Λήμνου
18	<i>E. durans</i> -62	Μελίχλωρο Λήμνου
19	<i>E. faecium</i> -433	Γιαούρτι Λήμνου
20	<i>E. faecalis</i> -513	Ξινόγαλα Αγελαδινό
21	<i>E. faecalis</i> -531	Ξινόγαλα Αγελαδινό
22	<i>E. faecium</i> -813	Ξινόγαλα Σουλίου
23	<i>E. pseudoavium</i> -28	Μελίχλωρο Λήμνου
24	<i>P. pentosaceus</i> -68	Μελίχλωρο Λήμνου
25	<i>P. acidilactici</i> -37	Καλαθάκι Λήμνου
26	<i>P. pentosaceus</i> -90	Καλαθάκι Λήμνου
27	<i>L. garvieae</i> -94	Καλαθάκι Λήμνου

* Ο αριθμός που συνοδεύει το όνομα του είδους αναφέρεται στον κωδικό αριθμό που δόθηκε σε κάθε στέλεχος όταν αυτό αρχικά απομονώθηκε.

Για την ανάπτυξη των βακίλων χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υπόστρωμα MRS (Biokar, France), ενώ για την ανάπτυξη των κόκκων χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υπόστρωμα M17 (Biokar, France) και η θερμοκρασία επώασης ήταν 30 ή 37 °C ανάλογα με το στέλεχος. Στην περίπτωση καλλιέργειών σε στερεά θρεπτικά υποστρώματα προστέθηκε άγαρ (1.5% w/v) στο αντίστοιχο υγρό θρεπτικό υπόστρωμα και ο εμβολιασμός πραγματοποιήθηκε με ενσωμάτωση.

2.2 Καταμέτρηση μικροβιακού πληθυσμού με τη μέθοδο μέτρησης των αποικιών

Για την καταμέτρηση του μικροβιακού πληθυσμού εφαρμόστηκε η μέθοδος μέτρησης των αποικιών σύμφωνα με τα ακόλουθα: Αρχικά μεταφέρθηκαν 100 μl καλλιέργειας από κάθε δείγμα σε αποστειρωμένο σωλήνα τύπου erpendorf που περιείχε 900 μl αποστειρωμένου διαλύματος peptone water (LabM, Bury, UK) επιτυγχάνοντας έτσι την πρώτη αραιώση του δείγματος 1:10 ή αλλιώς 10^{-1} . Ακολούθησε ανάδευση και μεταφορά 100 μl από το erpendorf με την αραιώση 10^{-1} σε ένα νέο erpendorf που περιείχε πάλι 900 μl αποστειρωμένου διαλύματος peptone water, επιτυγχάνοντας έτσι την 10^{-2} αραιώση του δείγματος. Με τον ίδιο τρόπο δημιουργήθηκαν οι αραιώσεις 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} και 10^{-7} .

Στην συνέχεια ακολούθησε εμβολιασμός των αραιωμένων δειγμάτων σε θρεπτικό υπόστρωμα MRS ή M17 ανάλογα τον μικροοργανισμό. Ο εμβολιασμός έγινε με τη μέθοδο της ενσωμάτωσης χρησιμοποιώντας 100 μl από τις επιλεγμένες δεκαδικές αραιώσεις. Ακολούθησε επώαση στους 30 ή 37 °C για 48 h. Μετά το τέλος της επώασης έγινε καταμέτρηση των αποικιών που αναπτύχθηκαν και υπολογισμός του αντίστοιχου μικροβιακού πληθυσμού εκφρασμένου σε cfu μικροοργανισμών/ml καλλιέργειας (όπου cfu, colony forming units). Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε σε διπλή επανάληψη.

2.3 Μελέτη της αντοχής των μικροοργανισμών στην παρουσία χολικών αλάτων

Προκειμένου να αξιολογηθεί η αντοχή των υπό μελέτη μικροβιακών στελεχών στην παρουσία χολικών αλάτων εφαρμόστηκε η ακόλουθη μεθοδολογία: Κάθε μικροβιακή καλλιέργεια ανανεώθηκε δύο φορές στο κατάλληλο θρεπτικό υλικό (MRS ή M17). Κύτταρα από 5 ml καλλιέργειας (24 ωρών ανάπτυξης) συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση (12000 rpm, 5 min, 30 °C). Ακολούθησε μια πλύση τους με ρυθμιστικό διάλυμα PBS-pH 7.3 και τελικά επαναιωρήθηκαν σε 1 ml διαλύματος PBS-pH 8 που περιείχε 1% (w/v) Bile Salts (Oxoid, England) και ακολούθησε επώαση στους 37 °C για 3 h. Οι συνθήκες αυτές προσομοιάζουν στις συνθήκες παραμονής της τροφής στο έντερο (θερμοκρασία του ανθρώπινου σώματος και χρόνος παραμονής). Ακολούθησε καταμέτρηση των μικροβιακών κυττάρων με τη μέθοδο μέτρησης των αποικιών όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 2.2.

2.4 Μελέτη της αντοχής των μικροοργανισμών σε χαμηλή τιμή pH

Προκειμένου να αξιολογηθεί η αντοχή των υπό μελέτη μικροβιακών στελεχών στην παρουσία χαμηλής τιμής pH εφαρμόστηκε η ακόλουθη μεθοδολογία: Κάθε μικροβιακή καλλιέργεια ανανεώθηκε δύο φορές στο κατάλληλο θρεπτικό υλικό (MRS ή M17 Biokar, France). Κύτταρα από 5 ml καλλιέργειας (24 ωρών ανάπτυξης) συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση (12000 rpm, 5 min, 30 °C). Ακολούθησε μια πλύση τους με ρυθμιστικό διάλυμα PBS-pH 7.3 και τελικά επαναιωρήθηκαν σε διάλυμα PBS-pH 2.5 και ακολούθησε επώαση στους 37 °C για 2 h. Οι συνθήκες αυτές προσομοιάζουν στις συνθήκες παραμονής της τροφής στο στομάχι (θερμοκρασία του ανθρώπινου σώματος και χρόνος παραμονής). Ακολούθησε καταμέτρηση των μικροβιακών κυττάρων με τη μέθοδο μέτρησης των αποικιών όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 2.2.

Ακολουθεί ο **Πίνακας 6** με τη σύσταση όλων των θρεπτικών υλικών και διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.

Πίνακας 6. Σύσταση θρεπτικών υλικών και διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία

Θρεπτικά υλικά - Διαλύματα	Σύσταση (g / l)
MRS	(Polypeptone 10, Meat extract 10, Yeast extract 5, Glucose 20, Tween 80 1.08, Dipotassium phosphate 2, Sodium acetate 5, Ammonium citrate 2, Magnesium sulfate 0.2, Manganese sulfate 0.05)
M17	Tryptone 2.5, Peptic digest of meat 2.5, Pepaic digest of soybean meal 5, Yeast extract 2.5, Meat extract 5, Lactose 5, Sodium glycerophosphate 19, Magnesium sulfate 0.25, Ascorbic acid 0.5
PBS Buffer	K ₂ HPO ₄ 1.41 (10 mM), KH ₂ PO ₄ 0.259 (1.8 mM), NaCl 8 (137 mM). Το pH ρυθμίστηκε στην κατάλληλη κάθε φορά τιμή (τιμή 2.5 με προσθήκη 6N HCL ή τιμή 8.0 με προσθήκη 6N NaOH)
PBS Buffer + Bile Salts	1% w/v Bile Salts (SIGMA) σε PBS Buffer pH 8.0.
Buffered Peptone Water	(Enzymatic digest of casein 10.0, Sodium Chloride 5.0, Disodium hydrogen phosphate (anhydrous) 3.6, Potassium dihydrogen phosphate 1.5)

3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 *In vitro* μελέτη του προβιοτικού δυναμικού των οξυγαλακτικών βακτηρίων

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μελέτη της αντοχής που παρουσιάζουν τα 42 οξυγαλακτικά βακτήρια της παρούσας εργασίας, σε συνθήκες χαμηλού pH (pH 2.5) καθώς και παρουσία χολικών αλάτων (1% w/v, pH 8.0) συνοψίζονται στους Πίνακες 7 και 8. Ακολουθεί ανάλυση αυτών των αποτελεσμάτων για κάθε κατηγορία ξεχωριστά.

3.1.1 Αντοχή των μικροβιακών στελεχών σε συνθήκες χαμηλού pH

Στον Πίνακα 7 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μελέτη της αντοχής των υπό εξέταση στελεχών σε συνθήκες χαμηλού pH (τιμή pH 2.5 για 2 ώρες). Οι τιμές που παρουσιάζονται είναι ο μέσος όρος των δύο επαναλήψεων.

Πίνακας 7. Επιβίωση των υπό εξέταση βακτηριακών στελεχών σε pH 2.5 για 2 ώρες

A/A	Βακτηριακά στελέχη	log cfu/ml pH 2.5 (0h)	log cfu/ml pH 2.5 (2h)	Δlog cfu/ml pH 2.5
1	<i>Lb. brevis</i> -73	9.48	5.11	4.37
2	<i>Lb.delbruckii lactis</i> -312	8.51	5.80	2.71
3	<i>Lb.paracasei</i> -625	8.80	5.69	3.11
4	<i>Lb.paracasei</i> -5	8.73	5.11	3.62
5	<i>Lb.paracasei</i> -13	8.80	5.35	3.45
6	<i>Lb.plantarum</i> -614	8.85	7.16	1.69
7	<i>Lb.plantarum</i> -735	8.92	6.54	2.38
8	<i>Lb.plantarum</i> -824	8.97	6.14	2.83
9	<i>Lb. plantarum</i> -914	9.14	6.65	2.49
10	<i>Lb.plantarum</i> -612a	8.73	6.00	2.73
11	<i>Lb. plantarum</i> -613a	9.07	<4	>5.07
12	<i>Lb.plantarum</i> -612b	8.60	6.15	2.45
13	<i>Lb. plantarum</i> -613b	9.21	8.03	1.18
14	Μη ταυτοποιημένος βάκιλος-912	9.09	5.39	3.70
15	Μη ταυτοποιημένος βάκιλος-913	8.90	6.13	2.77
16	<i>E. faecium</i> -433	9.33	6.28	3.05
17	<i>E. faecalis</i> -531	8.48	4.81	3.67

A/A	Βακτηριακό στελέχη	log cfu/ml pH 2.5 (0h)	log cfu/ml pH 2.5 (2h)	Δlog cfu/ml pH 2.5
18	<i>E. faecium</i> -87	8.99	6.55	2.44
19	<i>E. durans</i> -10	9.07	5.96	3.11
20	<i>E. durans</i> -86	8.64	6.67	1.97
21	<i>E. durans</i> -8	9.22	5.83	3.39
22	<i>E. durans</i> -62	9.17	5.00	4.17
23	<i>E. faecalis</i> -95	9.12	6.68	2.44
24	<i>E. faecalis</i> -513	8.76	6.30	2.46
25	<i>E. faecium</i> -1	9.17	5.73	3.44
26	<i>E. faecium</i> -14	9.13	5.99	3.13
27	<i>E. faecium</i> -31	9.07	6.07	3
28	<i>E. faecium</i> -33	8.51	5.60	2.91
29	<i>E. faecium</i> -49	9.26	6.35	2.91
30	<i>E. faecium</i> -88	9.10	5.63	3.47
31	<i>E. faecium</i> -109	9.11	6.26	2.85
32	<i>E. faecium</i> -110	8.71	5.54	3.17
33	<i>E. faecium</i> -42	8.08	6.14	1.94
34	<i>E. faecium</i> -813	9.17	5.99	3.18
35	<i>E. gilvus</i> -47	8.32	5.04	3.28
36	<i>E. hirae</i> -100	9.37	6.55	2.82
37	<i>E. pseudoavium</i> -27	8.83	5.15	3.68
38	<i>E. pseudoavium</i> -28	8.98	<4	>4.98
39	<i>L. garvieae</i> -94	8.65	5.32	3.33
40	<i>P. acidilactia</i> -37	8.32	<4	>4.32
41	<i>P. pentosaceus</i> -68	5.70	5.08	0.62
42	<i>P. pentosaceus</i> -90	6.04	4.73	1.31

Όλα τα υπό εξέταση στελέχη παρουσίασαν σχετικά ίδιο αρχικό πληθυσμό, ο οποίος κυμαινόταν μεταξύ 8-9 log cfu/ml. Κατά την επώασή τους σε τιμή pH 2.5 για 2 h, παρουσίασαν παρόμοια μείωση του πληθυσμού τους, που κυμάνθηκε κυρίως μεταξύ 2-3.5 log cfu/ml. Οι 6 από τους 15 βακίλους εμφάνισαν μεγάλη ευαισθησία, με τη μείωση του πληθυσμού τους να ξεπερνά τους 3 log cfu/ml. Πιο συγκεκριμένα, τα έξι αυτά στελέχη που έδειξαν τη μεγαλύτερη μείωση στον πληθυσμό τους ήταν τα *Lb. paracasei*-5, *Lb. paracasei*-13 και *Lb. paracasei*-625, *Lb. plantarum*-613a, *Lb. brevis*-73 και ο μη ταυτοποιημένος βάκιλος-912. Αντιθέτως, δύο στελέχη *Lb. plantarum*, τα *Lb. plantarum*-614 και *Lb. plantarum*-613b, ξεχώρισαν για την αυξημένη τους αντοχή, εφόσον επήλθε μείωση στον πληθυσμό τους μικρότερη από 2 log cfu/ml. Όσον αφορά στους εντερόκοκκους, 13 από τους 23 παρουσίασαν μείωση του πληθυσμού μεγαλύτερη από 3 log cfu/ml. Αυτοί ήταν οι *E. faecalis*-531, *E. durans*-8, *E. durans*-10, *E. durans*-62, *E. faecium*-14, *E. faecium*-433, *E. faecium*-1, *E. faecium*-88, *E. faecium*-110, *E. faecium*-813, *E. gilvus*-47, *E. pseudoavium*-27 και *E. pseudoavium*-28. Ωστόσο, από αυτά τα 13 στελέχη δεν ξεχώρισε κάποιο για την αυξημένη του αντοχή στο χαμηλό pH. Από την κατηγορία των «λοιπών κόκκων» ξεχώρισαν τα δύο στελέχη *P. pentosaceus*, διότι παρουσίασαν πολύ μεγάλη αντοχή, με το ένα από αυτά μάλιστα, (το *P. pentosaceus*-68) να υφίσταται μείωση στον πληθυσμό του μικρότερη από έναν log cfu/ml.

Η επιβίωση των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε χαμηλό pH, ως ένδειξη του προβιοτικού τους δυναμικού, αποτέλεσε αντικείμενο μελέτης για πολλούς ερευνητές. Οι [Maragkoudakis et al. \(2006\)](#) παρατήρησαν την ανθεκτικότητα των *Lb. plantarum* ACA-DC 108 και ACA-DC 109 σε πολύ όξινες συνθήκες καθώς επιβίωσαν ακόμη και σε τιμή pH 1 για 1 h. Επίσης, δυο χρόνια αργότερα, η [Ζουμποπούλου \(2008\)](#) παρατήρησε πως δύο στελέχη *Lb. plantarum* (ACA-DC 287 και ACA-DC 2350) ήταν ιδιαίτερα ανθεκτικά στο χαμηλό pH καθώς παρατηρήθηκε μικρή μείωση (<1.5 log cfu/ml) στον πληθυσμό τους ακόμα και μετά από 3 h επώασης σε τιμή pH 2.5. Ακόμη, οι [Jensen et al. \(2012\)](#) βρήκαν στελέχη του είδους *Lb. plantarum* (WCFS1, NC8, MF1298 και AD2) με σημαντική ανθεκτικότητα σε χαμηλές τιμές pH (pH 3, 3 h, Δlog ≈ 1.5). Τα αποτελέσματα των παραπάνω ερευνητών για τα στελέχη του είδους *Lb. plantarum* συνάδουν με αυτά της παρούσας εργασίας. Σύμφωνα με τον **πίνακα 7**, πραγματοποιήθηκε μείωση πληθυσμού του στελέχους *Lb. plantarum*-613 κατά 1.18 log cfu/ml και μείωση πληθυσμού του *Lb. plantarum*-614 κατά 1.69 log cfu/ml. Οι [Maragoudakis et al. \(2006\)](#) ανέδειξαν, επίσης, και 2 στελέχη *Lb. paracasei* για την αντοχή τους σε πολύ χαμηλό pH, τα *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* ACA-DC 119 και ACA-DC 3345 (pH 1, 1 h, Δlog ≈ 4). Όμως, τα στελέχη του ίδιου είδους που μελετήθηκαν στα πλαίσια της παρούσας εργασίας δεν

έδωσαν το ίδιο ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Κανένα από τα τρία στελέχη *Lb. paracasei* δεν κατάφερε να επιβιώσει σε τιμή pH 2.5 καθώς σημειώθηκε πτώση του πληθυσμού τους κατά $\approx 3.3 \log \text{ cfu/ml}$.

Ως γενική εικόνα, οι εντερόκοκκοι έδειξαν αρκετά μεγάλη ευαισθησία σε τιμή pH 2.5, σε σχέση με τους λακτοβακίλους. Συγκεκριμένα ποσοστό αυτών, ίσο με 56.5%, παρουσίασαν μείωση του πληθυσμού τους μεγαλύτερη από $3 \log \text{ cfu/ml}$. Από την άλλη πλευρά, το ποσοστό των λακτοβακίλων που ο πληθυσμός τους ελαττώθηκε περισσότερο από $3 \log \text{ cfu/ml}$ δεν ξεπέρασε το 40%. Γενικά οι εντερόκοκκοι θεωρούνται μικροοργανισμοί ευαίσθητοι στο χαμηλό pH. Οι Gardin *et al.* (2001) απέδειξαν ότι το pH είναι ο μεγαλύτερος περιοριστικός παράγοντας για την ανάπτυξη των εντερόκοκκων, με τη θερμοκρασία και την συγκέντρωση αλάτων να ακολουθούν.

Ωστόσο, η αυξημένη ευαισθησία που επέδειξαν οι εντερόκοκκοι που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία, θα μπορούσε σε έναν βαθμό να αποδοθεί και στο γεγονός ότι χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υλικό M17 για την ανάπτυξή τους. Σύμφωνα με τους Morandi (2005) και τους Fisher and Phillips (2009) οι εντερόκοκκοι αναπτύσσονται σε σχετικά μεγάλο εύρος τιμών pH και θερμοκρασίας (εύρος pH 4.5-10, εύρος θερμοκρασίας 5-50 °C). Οι βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης για αυτούς, είναι οι 42.7 °C χρησιμοποιώντας Brain Heart Infusion (pH 7.2 ± 0.2) ως θρεπτικό υπόστρωμα και υπό αναερόβιες συνθήκες (Van den Berghe *et al.* 2006). Στην συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκε M17 ως θρεπτικό υπόστρωμα για τους εντερόκοκκους και όλα τα στελέχη επώαστηκαν στους 30 ή 37 °C. Τέλος, από την κατηγορία των «λοιπών κόκκων» ξεχώρισαν τα δύο από τα τρία στελέχη *P. pentosaceus*. Αν και δεν σημείωσαν παρόμοια τιμή αρχικού πληθυσμού με τα υπόλοιπα στελέχη της μελέτης ($\approx 6 \log \text{ cfu/ml}$), ωστόσο, κατάφεραν να διατηρήσουν την τιμή αυτή ακόμη και μετά το πέρας της δώρης επώασης σε τιμή pH 2.5 σε πολύ ικανοποιητικό σημείο. Πιο συγκεκριμένα, ο πληθυσμός του στελέχους *P. pentosaceus*-68 μειώθηκε κατά $0.62 \log \text{ cfu/ml}$ και ο πληθυσμός του στελέχους *P. pentosaceus*-90 κατά $1.31 \log \text{ cfu/ml}$. Συγκριτικά με άλλες μελέτες τα αποτελέσματα για την αντοχή του είδους σε χαμηλές τιμές pH είναι ενθαρρυντικά, εφόσον πολύ μεγάλη αντοχή έχει δείξει το στέλεχος *P. pentosaceus* Q3 (pH 3, 3h, $\Delta \log 0.05$) (Jensen *et al.* 2012) και τα στελέχη *P. pentosaceus* CIAL 16, CIAL 49, CIAL 85 και CIAL 86 (προερχόμενα από οίνο) (pH 1.8, 1 h, $\Delta \log \approx 1$) (García-Ruiz *et al.* 2014).

3.1.2 Επιβίωση στελεχών παρουσία χολικών αλάτων

Στον **πίνακα 8** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μελέτη της αντοχής των υπό εξέταση στελεχών παρουσία χολικών αλάτων [1% (w/v) Bile Salts σε pH 8 για 3 h]. Οι τιμές που παρουσιάζονται είναι ο μέσος όρος των δύο επαναλήψεων.

Πίνακας 8. Επιβίωση στελεχών παρουσία χολικών αλάτων

A/A	Βακτηριακά στελέχη	log cfu/ml BS 1%(w/v) pH 8 (0h)	log cfu/ml BS 1%(w/v) pH 8 (3h)	Δlog cfu/ml BS 1% (w/v) pH 8
1	<i>Lb. brevis</i> -73	9.37	9.41	-0.04
2	<i>Lb. delbruckii lactis</i> -312	7.56	6.60	0.96
3	<i>Lb.paracasei</i> -625	8.71	8.74	-0.03
4	<i>Lb.paracasei</i> -5	8.77	8.93	-0.16
5	<i>Lb.paracasei</i> -13	8.63	8.62	0.01
6	<i>Lb.plantarum</i> -614	8.88	8.59	0.29
7	<i>Lb.plantarum</i> -735	8.69	8.70	-0.01
8	<i>Lb.plantarum</i> -824	8.75	8.58	0.17
9	<i>Lb. plantarum</i> -914	9.01	8.97	0.04
10	<i>Lb.plantarum</i> -612a	8.74	8.61	0.13
11	<i>Lb. plantarum</i> -613a	9.07	8.88	0.19
12	<i>Lb.plantarum</i> -612b	8.71	8.59	0.12
13	<i>Lb. plantarum</i> -613b	9.18	9.10	0.08
14	Μη ταυτοποιημένος βάκιλος-912	8.99	8.90	0.09
15	Μη ταυτοποιημένος βάκιλος-913	8.99	8.87	0.12
16	<i>E. faecium</i> -433	9.15	9.17	-0.02
17	<i>E. faecalis</i> -531	8.83	8.91	-0.08
18	<i>E. faecium</i> -87	9.01	9.02	-0.01
19	<i>E. durans</i> -10	9.78	10.91	-1.13
20	<i>E. durans</i> -86	9.07	9.10	-0.03
21	<i>E. durans</i> -8	9.04	9.15	-0.11
22	<i>E. durans</i> -62	9.22	9.36	-0.14
23	<i>E. faecalis</i> -95	9.20	9.25	-0.05
24	<i>E. faecalis</i> -513	9.22	9.31	-0.09
25	<i>E. faecium</i> -1	8.73	10.96	-2.23
26	<i>E. faecium</i> -14	9.19	9.97	-0.78

A/A	Βακτηριακά στελέχη	log cfu/ml BS 1%(w/v) pH 8 (0h)	log cfu/ml BS 1%(w/v) pH 8 (3h)	Δlog cfu/ml BS 1% (w/v) pH 8
27	<i>E. faecium</i> -31	9.16	9.08	0.08
28	<i>E. faecium</i> -33	8.91	8.94	-0.03
29	<i>E. faecium</i> -49	9.99	9.17	0.82
30	<i>E. faecium</i> -88	9.15	9.18	-0.03
31	<i>E. faecium</i> -109	9.15	9.26	-0.11
32	<i>E. faecium</i> -110	8.79	8.71	0.08
33	<i>E. faecium</i> -42	9.00	9.13	-0.13
34	<i>E. faecium</i> -813	9.17	9.10	0.07
35	<i>E. gilvus</i> -47	9.60	8.72	0.88
36	<i>E. hirae</i> -100	9.34	9.41	-0.07
37	<i>E. pseudoavium</i> -27	8.95	9.01	-0.06
38	<i>E. pseudoavium</i> -28	9.21	9.18	0.03
39	<i>L. garvieae</i> -94	9.27	7.97	1.30
40	<i>P. acidilactici</i> -37	8.36	8.55	-0.19
41	<i>P. pentosaceus</i> -68	8.95	8.16	0.79
42	<i>P. pentosaceus</i> -90	8.38	8.40	-0.02

Από τον **πίνακα 8** προκύπτει ότι όλα τα υπό εξέταση στελέχη επέδειξαν παρόμοια αντοχή όταν επώαστηκαν για 3 h παρουσία χολικών αλάτων (1% w/v) και pH 8. Όσον αφορά στους βακίλους, και τα εννέα στελέχη *Lb. plantarum* κατάφεραν να διατηρήσουν υψηλή βιωσιμότητα, αφού είχαν αρχικό πληθυσμό $\approx 9 \log \text{ cfu/ml}$ που παρέμεινε σταθερός μετά το πέρας της τριώρης επώασης. Γενικότερα, πολλές μελέτες στη διεθνή βιβλιογραφία καταλήγουν στο συμπέρασμα πως στελέχη του *Lb. plantarum* είναι ανθεκτικά στην παρουσία χολικών αλάτων [0.5% (w/v) BS, 4h, <1 Δlog] (Argyri *et al.* 2013, Papamanoli *et al.* 2003, Ζουμποπούλου 2008). Τα αποτελέσματα που προέκυψαν για τα τρία στελέχη *Lb. paracasei* ήταν παρόμοια με αυτά των *Lb. plantarum* αφού και σε αυτά δεν υπήρξε σημαντική διακύμανση στον αρχικό και τελικό τους πληθυσμό (Δlog <0.2). Στελέχη *Lb. paracasei* βρέθηκαν και σε άλλες μελέτες εξίσου ανθεκτικά με τα *Lb. plantarum* [0.3% (w/v) BS, 4h, Δlog <1] (Maragoudakis *et al.* 2006). Υψηλή ανθεκτικότητα παρατηρήθηκε επίσης στο στέλεχος *Lb. brevis*-73 (Δlog <0.1) και στα μη ταυτοποιημένα στελέχη βακίλων (Δlog <0.2).

Η μόνη διαφορά αρχικού και τελικού πληθυσμού που πλησίασε την τιμή 1, ήταν του *Lb. delbruckii lactis* (0.96 log cfu/ml).

Στην περίπτωση των εντερόκοκκων, 21 από τα 23 στελέχη σημείωσαν αυξημένη βιωσιμότητα, με τον τελικό πληθυσμό τους να κυμαίνεται στις τιμές του αρχικού. Σύμφωνα με τους Gardin *et al.* (2001) η παρουσία χολικών αλάτων δεν θεωρείται σημαντικός περιοριστικός παράγοντας για την ανάπτυξη των εντεροκόκκων. Το στέλεχος *E. durans*-10 παρουσίασε αύξηση του τελικού του πληθυσμού κατά 1.13 log cfu/ml, ενώ το στέλεχος *E. faecium*-1, κατά 2.23 log cfu/ml. Το αποτέλεσμα αυτό πιθανώς αποτελεί πειραματικό σφάλμα.

Όπως και οι παραπάνω κατηγορίες, έτσι και η κατηγορία των «λοιπών κόκκων» περιλαμβάνει στελέχη με αυξημένη αντοχή στην παρουσία χολικών αλάτων. Από τα τέσσερα στελέχη της κατηγορίας, την μεγαλύτερη αντοχή έδειξαν τα στελέχη *P. acidilactici*-37, *P. pentosaceus*-68 και *P. pentosaceus*-90 κρατώντας σχεδόν αμετάβλητο τον αρχικό τους πληθυσμό ($\Delta \log < 1$). Αξίζει να σημειωθεί ότι τα στελέχη *P. pentosaceus*-68 και *P. pentosaceus*-90 επέδειξαν αυξημένη αντοχή τόσο σε χαμηλή τιμή pH όσο και στην παρουσία χολικών αλάτων. Τέλος, το στέλεχος με την μεγαλύτερη ευαισθησία στην παρουσία χολικών αλάτων ήταν το *L. garvieae*-94 για το οποίο παρατηρήθηκε μείωση του πληθυσμού κατά 1.3 log cfu/ml.

4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Στην παρούσα εργασία εξετάστηκαν 42 οξυγαλακτικά βακτήρια για δύο προβιοτικές ιδιότητες: για την αντοχή τους σε χαμηλή τιμή pH (τιμή 2.5) και για την αντοχή τους στην παρουσία χολικών αλάτων 1 % (w/v). Από τα 42 στελέχη, αυτά που έδειξαν ιδιαίτερη αντοχή και στους δύο παρεμποδιστικούς παράγοντες ήταν δύο βάκιλοι (*Lb. plantarum*-613b και *Lb. plantarum*-614, και οι δύο απομονωμένοι από ξινόγαλα) και δύο κόκκοι (*P. pentosaceus*-68 απομονωμένος από μελίχλωρο Λήμνου και *P. pentosaceus*-90 απομονωμένος από καλαθάκι Λήμνου). Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας όμως, δεν είναι αρκετά για τον χαρακτηρισμό των τεσσάρων αυτών στελεχών ως προβιοτικά, εφόσον δύο μόνο προβιοτικές ιδιότητες δεν είναι αρκετές. Τα αποτελέσματα θα συνεκτιμηθούν μαζί με τα αποτελέσματα της μελέτης επιπλέον προβιοτικών ιδιοτήτων αυτών των βακτηρίων που πρόκειται να πραγματοποιηθούν στο Εργαστήριο Γαλακτοκομίας του ΓΠΑ στο άμεσο μέλλον.

5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

5.1 ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Allen S.J., Martinez E.G., Gregorio G.V., Dans L.F. (2010). Probiotics for treating acute infectious diarrhoea. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, CD003048

Anadón A., Martínez-Larrañaga M.R., Ares I. and Martínez M.A. (2016). Probiotics: Safety and Toxicity Considerations. In: Gupta R.C. ed. *Nutraceuticals efficacy, safety and toxicity*. Hopkinsville, KY, USA: Elsevier, pp. 777-796.

Andersson H, Asp N-G, Bruce A, Roos S, Wadstrom T, Wold A.E. (2001). Health effects of probiotics and prebiotics: A literature review on human studies. *Scandinavian Journal of Nutrition*, 45, pp. 58-75.

Anilkumar K., Monisha A. (2012). Role of friendly bacteria in oral health – a short review. *Oral Health Preventive Denistry*, 10, pp. 3–8.

Argyri A.A., Zoumpopoulou G., Karatzas K. A. G., Tsakalidou E., Nychas G.J.E, Panagou E. Z., Tassou C.C, (2013). Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests. *Food Microbiology*, 33, pp. 282-291.

Arora T. Singh S., Sharma R J. (2012). Probiotics: Interaction with gut microbiome and antiobesity potential. *Nutrition*, 29, pp. 591–596.

Banas J., Popp E. T. (2013). Recovery of viable bacteria from probiotic products that target oral health. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 5, pp. 227–231.

Bizzini B., Pizzo G., Scapagnini G., Nuzzo D., Vasto S. (2012). Probiotics and Oral Health. *Current Pharmaceutical Design*, 18, pp. 5522–5531.

Kos B., Šušković J., Beganović J., Gjuračić K., Frece J., Iannaccone C., Canganella F. (2008) Characterization of the three selected probiotic strains for the application in food industry. *World journal of microbiology and biotechnology*, 24, pp. 699–707.

Bowen D. M. (2013). Probiotics and oral health, *International Journal of Dental Hygiene*, 87, pp. 5–9.

Burton J., Drummond B., Chilcott C., Tagg J., Thomson W., Hale J., Wescombe P. (2013). Influence of the probiotic *Streptococcus salivarius* strain M18 on indices of dental health in children: a randomized double-blind, placebo-controlled trial, *Journal of Medical Microbiology*, 62, pp. 875–884.

Bustos A. Y., Graciela Font de Valdez , Raya R., André Martinho de Almeida, Fadda S, Taranto M.P. (2015). Proteomic analysis of the probiotic *Lactobacillus reuteri* CRL1098 reveals novel tolerance biomarkers to bile acid-induced stress, *Food Research International*, 77, pp. 599–607.

Butel M.-J. (2014). Probiotics, gut microbiota and health, *Médecine et maladies infectieuses*, pp. 1–8.

Coda R., Rizzello C.G., Gobbetti M. (2010). Use of sourdough fermentation and pseudo-cereals and leguminous flours for the making of a functional bread enriched of gamma-aminobutyric acid (GABA). *International Journal of Food Microbiology* , 137, pp. 236-245.

Coda R., Rizzello C.G., Di Cagno R., Trani A., Cardinali G., Gobbetti M. (2013) . Antifungal activity of *Meyerozyma guilliermondii*: identification of active compounds synthesized during dough fermentation and their effect on long-term storage of wheat bread, *Food Microbiology*, 33, pp. 243-251.

Collington G.K., Parker D.S., Armstrong D.G. (1990). The influence of inclusion of either an antibiotic or a probiotic in the diet on the development of digestive enzyme activity in the pig, *British Journal of Nutrition*, 64, pp. 59-70.

Di Pierro F., Adami T., Rapacioli G., Giardini N., Streitberger C., Clinical evaluation of the oral probiotic *Streptococcus salivarius* K12 in the pre-vention of recurrent pharyngitis and/or tonsillitis caused by *Streptococcus pyogenes* in adults, *Expert Opinion in Biological Therapy*, 13, pp. 339–343.

Di Pierro F., Colombo M., Zanvit A., Risso P., Rottoli A. (2014). Use of *Streptococcus salivarius* K12 in the prevention of streptococcal and viral pharyngotonsillitis in children, *Drug Healthcare Patient Safety*, 6, pp. 15–20.

Dunne C., Murphy L., Flynn S., O’Mahony L., O’Halloran S., Feeney M., Morrissey D., Thornton G., Fitzgerald G., Daly C., Kiely B., Quigley E. M. M., O’Sullivan G. C., Shanahan F., Kevin J. (1999). Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76, pp. 279-292.

Durso L., R. Hutkins (2003). Starter Cultures. In: Caballero B., Finglas P. and Toldrá F. eds. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. USA: Academic Press pp. 5583-5593

Elavarasu S., Jayapalan P., Murugan T. (2012). Bugs that debugs: probiotics, *Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences*, 4, pp. 319-322.

FAO (Food and Agricultural Organization)/WHO (World Health Organization), 2002. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food

Food Processing (2009). Modest growth for global probiotic market, 2009. Available from. <http://www.foodprocessing.com/articles/2008/383.html>

Fredua-Agyeman M., Gaisford S. (2015). Comparative survival of commercial probiotic formulations: tests in biorelevant gastric fluids and real-time measurements using microcalorimetry, *Beneficial Microbes*, 6, pp. 141-151.

Fröhlich J. and König H. (2009). Lactic Acid Bacteria. In: Fröhlich J., König H., Uden G. eds. *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. Mainz: Springer. pp 3-29.

Fasoli S., Marzotto M., Rizzotti L., Rossi F., Dellaglio F., Torriani S. (2003). Bacterial composition of commercial probiotic products as evaluated by PCR-DGGE analysis, *International Journal of Food Microbiology*, 82, pp. 59-70.

Fuller R. (1989). Probiotics in man and animals, *Journal of Applied Bacteriology*, 66, pp. 365-378.

Galle S., Arendt E.K. (2014). Exopolysaccharides from sourdough lactic acid bacteria, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54, pp. 891-901.

García-Ruiz A., González D. L., Esteban-Fernández A., Requena T., Bartolomé B., Moreno Arribas M. V. (2014). Assessment of probiotic properties in lactic acid bacteria isolated from wine. *Food Microbiology*, 44, pp. 220-225.

Gardin, F., Martuscelli, M., Caruso, M. C., Galgano, F., Crudele, M. A., Favati, F., Guerzoni, M. E. & Suzzi, G. (2001). Effects of pH, temperature and NaCl concentration on the growth kinetics, proteolytic activity and biogenic amine production of *Enterococcus faecalis*, *International Journal of Food Microbiology*, 64, pp. 105–117.

Goldenberg J.Z., Ma S.S., Saxton J.D., Martzen M.R., Vandvik P.O., Thorlund K., Guyatt G.H., Johnston B.C. (2013). Probiotics for the prevention of *Clostridium difficile* associated diarrhea in adults and children, *Cochrane Database of Systematic Reviews*, CD006095.

Guarner F., Schaafsma G.J., (1998). Probiotics, *International Journal of Food Microbiology* , 39, pp. 237- 238

Harzallah D. and Belhadj H. (2013). Lactic Acid Bacteria as Probiotics: Characteristics, Selection Criteria and Role in Immunomodulation of Human GI Mucosal Barrier. In: Kongo M. ed. *Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes*, Algeria: InTech. pp. 197-216

Havenaar R., Brink B. T., Jos H. J. Huis In 't Veld. (1992). Selection of strains for probiotic use. In: Fuller R. ed. *Probiotics The scientific basis*. Netherlands: Springer. pp. 209-224.

Haukioja A. (2010). Probiotics and oral health, *European Journal of Dentistry*, 4, pp. 348–355.

Hillman J., McDonnell E., Hillman C., Zahradnik R. T., Soni M. G. (2009). Safety assessment of ProBiora3, a probiotic mouthwash: subchronic toxicity study in rats, *International Journal of Toxicology*, 28, pp. 357–367.

Holzapfel W.H. (2006). Introduction to Prebiotics and Probiotics. In: Goktepe I., Juneja V.K., Ahmedna M. ed. *Probiotics in Food Safety and Human Health*. New York CRC Press, Taylor & Francis Group, LLC. pp 1-35.

Isolauri E., Juntunen M., Rautanen T., Sillanauke P., Koivula T. (1991). A human *Lactobacillus* strain (*Lactobacillus casei* sp strain GG) promotes recovery from acute diarrhea in children, *Pediatrics*, 88, pp. 90-97.

Isolauri E., Majamaa H., Arvola T., Rantala I., Virtanen E., Arvilommi H. (1993). *Lactobacillus casei* strain GG reverses increased intestinal permeability induced by cow milk in suckling rats, *Gastroenterology*, 105, pp. 1643–1650.

Jensen H., Stine G., Kristine N., Lars A. (2012). In vitro testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria, *International Journal of Food Microbiology*, 153, pp. 216-222.

Katina K., Poutanen K. (2013). Nutritional Aspects of Cereal Fermentation with Lactic Acid Bacteria and Yeast. In: Gobbetti M., Gänzle M. eds. *Handbook on Sourdough Biotechnology*. New York: Springer Science and Business Media. pp. 229-242.

Kim C. R., Hearnberger J. O., Vickery A. P., White C. H., Marshall L. (1995). Sodium acetate and bifidobacteria increase shelf life of refrigerated catfish fillets, *Journal of Food Science*, 60, pp. 25-27.

Korbekandi H., Mortazavian A. M., Irvani S. (2011). Technology and stability of probiotic in fermented milks. In: Shah N., Cruz A. G., Faria J. A. F. eds. *In Probiotic and Prebiotic Foods: Technology, Stability and Benefits to the human health*. New York: Nova Science Publishers. pp. 131-169.

Kot E., Furmanov D., Berzkorovainy A. (1995). Accumulation of iron in lactic acid bacteria, *Journal of Food Science*, 60, pp. 547-550.

Lee J., Seto D., Bielory L. (2008). Meta- analysis of clinical trials of probiotics for prevention and treatment of pediatric atopic dermatitis. *Journal of Allergy Clinical Immunology*, 121, pp. 116-121.

Lee Y. K., Salminen S. (2009). *Handbook of probiotics and prebiotics* (Second edition). New Jersey, Canada: JohnWiley & Sons, Inc.

Leroy F., Gwen F., Luc de Vuyst (2008). Latest Developments in Probiotics. In: Toldrá F. ed. *Meat Biotechnology*. New York: Springer. pp. 217-229.

Lilly D., Stillwell R. (1965). Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science*, 147, pp. 747-748.

Malfertheiner P., Megraud F., O'Morain C.A., Atherton J., Axon A.T., Bazzoli F., Gensini G.F., Gisbert J.P., Graham D.Y., Rokkas T., El-Omar E.M., Kuipers E.J. (2012). Management of *Helicobacter pylori* infection—the Maastricht IV/Florence Consensus Report. *Gut*, 61, pp. 646–664.

Maragkoudakis A. P., Zoumpopoulou G., Miaris C., Kalantzopoulos G., Bruno Pot, Effie Tsakalidou (2006). Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *International Dairy Journal*, 16, pp. 189-199.

Marco M.L., Pavan S., Kleerebezem M. (2006). Towards understanding molecular modes of probiotic action. *Current Opinion in Biotechnology*, 17, pp. 204-210

Mattila T., Saarela M. (2000). Probiotic functional foods. In: Williams, Gibson R.G. eds. *Functional foods*. New York: CRC Press LLC. pp. 287–313.

Mayo B., Aleksandrak-Piekarczyk T., Fernández M., Kowalczyk M., Álvarez-Martín P. Bardowski J. (2010). Updates in the Metabolism of Lactic Acid Bacteria. In: Mozzi F., Raya R.R., Vignolo G.M. eds. *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications*. Oxford, UK: Wiley-Blackwell. pp. 3-34.

Meijer B.J., Dieleman L.A. (2011). Probiotics in the treatment of human inflammatory bowel diseases: update 2011. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 45, pp. 139–144.

Mennigen R., Bruewer M. (2009). Effect of probiotics on intestinal barrier function. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1165, pp. 183-189.

Mercenier A., Pavan S., Pot B. (2003). Probiotics as biotherapeutic agents: Present knowledge and future prospects, *Current Pharmaceutical Design*, 9, pp. 175-191.

Messens W., Neysens P., Vansieleghe W., Vanderhoeven J., De Vuyst L. (2002). Modeling growth and bacteriocin production by *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 in response to temperature and pH values used for sourdough fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, pp. 1431–1435.

Morelli L. (2000). *In vitro* selection of probiotic lactobacilli: a critical appraisal. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 1, pp. 57-69.

Nanji A.A., Khettry U., Sadrzadeh S.M. (1994). *Lactobacillus* feeding reduces endotoxemia and severity of experimental alcoholic liver (disease). *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 205, pp. 243-247.

Ng S.C., Hart A.L., Kamm M.A., Stagg A.J., Knight S.C. (2009). Mechanisms of action of probiotics: recent advances. *Inflammatory Bowel Disease*, 15, pp. 300-310.

Okada H., Kuhn C., Feillet H., Bach J.F. (2010). The ‘hygiene hypothesis’ for autoimmune and allergic diseases: an update. *Clinical and Experimental Immunology*, 160, pp 1-9.

Oksanen P.J., Salminen S., Saxelin M., Hämäläinen P., Ihantola-Vormisto A., Muurasniemi-Isoviita L., Nikkari S., Oksanen T., Pörsti I., Salminen E., et al. (1990). Prevention of travellers' diarrhoea by *Lactobacillus* GG yoghurt in prevention of antibiotic-associated diarrhea. *Annals of Medicine*, 22, pp. 57-59.

Ozdemir O. (2010). Various effects of different probiotic strains in allergic disorders: an update from laboratory and clinical data. *Clinical and Experimental Immunology*, 160, pp. 295–304.

Papamanoli E., N. Tzanetakis, E. Litopoulou-Tzanetaki, P. Kotsekidou (2003). Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. *Meat Science*, 65, pp. 859–867.

Parker, R.B. (1974) Probiotics, the other half of the antibiotics story. *Animal Nutrition and Health*, 29, pp. 4-8.

Parvez S., Malik K.A., Kang S.A., Kim, H.Y. (2006). Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal of Applied Microbiology*, 100, pp. 1171–1185.

Reid G. (2001). Probiotic agents to protect the urogenital tract against infection. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73, pp. 437-443.

Saier M.H., Mansour N.M. (2005). Probiotics and prebiotics in human. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 10, pp. 22–25.

Salari P., Nikfar S., Abdollahi M. (2012). A meta-analysis and systematic review on the effect of probiotics in acute diarrhea. *Inflammation and Allergy Drug Targets*, 11, pp. 3-14.

Salminen S., Bouley C., Boutron-Ruault M.C., Cummings J.H., Franck A., Gibson G.R. Isolauri E., Moreau M.C., Roberfroid M., Rowland I. (1998). Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *The British Journal of Nutrition*, 80, pp. 147-171.

Schell M., Karmirantzou M., Snel B., Vilanova D., Berger B., Pessi G., Zwahlen M.C., Desiere F., Bork P., Delley M., Pridmore D.R., Arigoni F. (2002). The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, pp. 14422-14427.

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

Seth S.D., Maulik M. (2011). Probiotics a pharmacologist's perspective. In: Balakrish N.G., Yoshifumi T. eds. *Probiotic Foods in Health and Disease*. New York: CRC Press, Taylor & Francis Group. pp. 41–47.

Sha S., Xu B., Wang X., Zhang Y., Wang H., Kong X., Zhu H., Wu K. (2013). The biodiversity and composition of the dominant fecal microbiota in patients with inflammatory bowel disease. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 75, pp. 245-251.

Shahani K.M., Chandan R.C. (1979). Nutritional and healthful aspects of cultured and culture-containing dairy foods. *Journal of Dairy Science*, 62, pp. 1685-1694.

Sharma P., Tomar S.H., Goswami P., Sangwan V., Singh R. (2014) Antibiotic resistance among commercially available probiotics. *Food Research International*, 57, pp. 176-195.

Španová A., Dráb V., Turková K., Špano M., Burdychová R., Šedo O., Šrutkova D., Rada V., Rittich B. (2015). Selection of potential probiotic *Lactobacillus* strains of human origin for use in dairy industry. *European Food Research and Technology*, 241, pp. 861-869.

Sperti G. S. (1971). *Probiotics*. Conn: AVI.

Succi M., Tremonte P., Reale A., Sorrentino E., Grazia L., Pacifico S., Coppola R. (2005). Bile salt and acid tolerance of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. *FEMS Microbiology Letters*, 244, pp. 129-137.

Szajewska H., Horvath A., Piwowarczyk A. (2010). Meta-analysis: the effects of *Saccharomyces boulardii* supplementation on *Helicobacter pylori* eradication rates and side effects during treatment. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 32, pp. 1069-1079.

Szajewska H., Wanke M., Patro B. (2011). Meta-analysis: the effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG supplementation for the prevention of healthcare-associated diarrhoea in children. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 34, pp. 1079-1087.

Tannis A. (2008). Probiotic rescue: How you can use probiotics to fight cholesterol, cancer superbugs, digestive complaints and more. Canada: John Wiley & Sons. pp. 241–269.

Todar K. (2004). The Good, the Bad, and the Deadly. (*SCIENCE Magazine-- Vol 304: p. 1421*) Διαθεσιμο στην ιστοσελίδα: <http://textbookofbacteriology.net/lactics.html>

Tomasik P. J., Tomasik P. (2003). Probiotics and Prebiotics. *Cereal Chemistry Journal*, 80, pp. 113-117.

Tuomola E., Crittenden R., Playne M., Isolauri E., Salminen S. (2001). Quality assurance criteria for probiotic bacteria. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73, pp. 393-398.

Vandenplas Y., Huysb G., Daubec G. (2015). Probiotics: an update. *Jornal de Pediatria*, 91, pp 6-21.

Van den Berghe, E., De Winter, T. & De Vuyst, L. (2006). Enterocin A production by *Enterococcus faecium* FAIR-E 406 is characterised by a temperature- and pH-dependent switch-off

mechanism when growth is limited due to nutrient depletion. *International Journal of Food Microbiology*, 107, pp. 159–170.

Ventura, M., Perozzi G. (2011). Introduction to the special issue “Probiotic bacteria and human gut microbiota”. *Genes and Nutrition*, 6, pp. 203-204.

Vinderola C. G., J. A. Reinheimer, 2003. Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative “in vitro” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Research International*, 36, pp. 895-904

Vivekananda M.R., Vandana K.L., Bhat K.G. (2010). Effect of the probiotic *Lactobacilli reuteri* (Prodentis) in the management of periodontal disease: a preliminary randomized clinical trial. *Journal of Oral Microbiology*, 2, pp. 1-9.

Wade W.G. (2013). The oral microbiome in health and disease, *Pharmacological Research*, 69, pp. 137–143.

5.2 ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ζουμποπούλου Γ. (2008) Προβιοτικές ιδιότητες οξυγαλακτικών βακτηρίων. In vitro και in vivo μελέτη της αντιμικροβιακής και ανοσορυθμιστικής τους δράσης. Διδακτορική Διατριβή, Αθήνα

Μπαλατσούρας Γ. (2006) *Μικροβιολογία Τροφίμων*. Αθήνα: Έμβρυο

Σαββαΐδης Ι. (2012) Γενική Μικροβιολογία. ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΑ - ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΥΓΕΙΑ. Έκδοση Α, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων. Διαθέσιμο από τη δικτυακή διεύθυνση:
<http://ecourse.uoi.gr/course/view.php?id=1151>