



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

### ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Προβιοτικές ιδιότητες των *Lactobacillus kefiri* απομονωμένου από κόκκους  
κεφίρ και δημιουργία αντιμικροβιακών συμβιωτικών

### ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ:

«ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΩΣΗΣ  
ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΣΤΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ»

ΒΑΛΑΒΑΝΗ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2014

Προβιοτικές ιδιότητες του *Lactobacillus kefiri* απομονωμένου από κόκκους  
κεφίρ και δημιουργία αντιμικροβιακών συμβιωτικών

Βαλαβάνη Παρασκευή

Υποβολή Μεταπτυχιακής Διατριβής που αποτελεί μέρος των απαιτήσεων για  
την απονομή του Μεταπτυχιακού Διπλώματος του Τμήματος Τεχνολογίας  
Τροφίμων του ΑΤΕΙ Θεσσαλονίκης.

Δεκέμβριος 2014

Λυκοτραφίτη Ελένη

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Φτάνοντας στο τέλος της εκπόνησης της μεταπτυχιακής μου εργασίας θα  
ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον υπεύθυνο του μεταπτυχιακού προγράμματος  
κ. Ραφαηλίδη Στέλιο για την αμέριστη συμπαράσταση και την ένθερμη  
ενδυνάμωση που μου προσέφερε όλο αυτό το διάστημα.

Οπωσδήποτε θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου κ.  
Λυκοτραφίτη Ελένη για την επιστημονική καθοδήγηση της καθώς και για την  
υπομονή της καθ' όλη την διάρκεια της ερευνητικής αυτής προσπάθειας.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου που με κουράγιο και  
υπομονή μου έδωσαν την απαραίτητη ηθική συμπαράσταση για την  
ολοκλήρωση αυτής της εργασίας καθώς και τους φίλους μου για την  
πολύπλευρη στήριξη τους και την κατανόηση που έδειξαν το χρονικό  
διάστημα της εκπόνησης της μεταπτυχιακής μου εργασίας.

## **ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

Τα προβιοτικά είναι ζωντανοί μικροοργανισμοί που όταν καταναλώνονται σε επαρκείς ποσότητες προσφέρουν οφέλη στον ξενιστή. Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται ως προβιοτικά ανήκουν κυρίως στα γένη *Lactobacillus* και *Bifidobacterium*. Τα πρεβιοτικά είναι τα άπεπτα συστατικά της τροφής που διεγείρουν επιλεκτικά ένα συγκεκριμένο αριθμό βακτηρίων στο έντερο με ευεργετική επίδραση στην υγεία του ξενιστή. Τα συμβιωτικά είναι μίγματα προβιοτικών και πρεβιοτικών που συνδυάζουν τις ωφέλιμες δραστηριότητες τους. Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν οι προβιοτικές ιδιότητες του στελέχους *Lactobacillus kefiri* B6, απομονωμένου από κόκκους κεφίρ, καθώς και η ανάπτυξή του σε διαφορετικά πρεβιοτικά. Μελετήθηκε επίσης η αντιμικροβιακή δράση των συμβιωτικών ενάντια σε δύο παθογόνους μικροοργανισμούς, την *Escherichia coli* και την *Listeria monocytogenes*. Το στέλεχος, *Lactobacillus kefiri* B6, ήταν ανθεκτικό σε συγκέντρωση χολικών αλάτων 0,4% (w/v) αλλά έδειξε μέτρια ανθεκτικότητα σε όξινο περιβάλλον. Αναπτύχθηκε καλά σε υπόστρωμα με προσθήκη πρεβιοτικών ινών [δυο φρουκτοολιγοσακχαρίτες, γαλακτοολιγοσακχαρίτη (GOS) και λακτουλόζη] και παρατηρήθηκε σημαντική μείωση του πληθυσμού της *Listeria*

*monocytogenes* με την προσθήκη GOS ενώ δεν παρατηρήθηκε σημαντική μεταβολή του πληθυσμού της *Escherichia coli*.

Τα δεδομένα έδειξαν ότι η παραγωγή οξέος δεν ήταν ο μοναδικός λόγος της αναστολής ανάπτυξης της *Listeria monocytogenes* καθώς παρόμοια πτώση στο pH παρατηρήθηκε και σε άλλα πρεβιοτικά χωρίς το αντίστοιχο αποτέλεσμα.

## **ABSTRACT**

Probiotics are live microorganisms which when administered in adequate amounts confer a health benefit on the host. Microorganisms that are used as probiotics are lactobacilli and bifidobacteria.

Prebiotics are non digestible food ingredients which selectively stimulate the growth and/or activity of beneficial microorganisms which are present in the gut thus conferring benefit(s) upon host health. A combination of a probiotic and a prebiotic is known as a synbiotic. In the present study, the probiotic properties of *Lactobacillus kefiri* B6, isolated from kefir cocci, were evaluated as well as its ability to grow in different prebiotics. The antimicrobial properties of the synbiotics against two pathogens, *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*, were also examined.

The strain was fully resistant to bile at 0.4% (w/v) but showed only moderate resistance to acid. It grew well on media supplemented with prebiotic compounds (two fructooligosaccharides, galactooligosaccharide (GOS) and lactulose) and significant inactivation of *Listeria monocytogenes* was observed when GOS was added to the co-culture medium, whereas *Escherichia coli* was not significantly affected.

The data suggested that acidification was not the sole cause of the inactivation, as similar decreases in pH with other prebiotics did not result in comparable inactivation of *L. monocytogenes*.

## **ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ**

<b>1</b>	<b>ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Το Γαστρεντερικό Σύστημα.....</b>	<b>1</b>
1.1.1	Ανατομία του γαστρεντερικού συστήματος.....	1
1.1.2	Η διαδικασία της πέψης .....	2
1.1.3	Η μικροχλωρίδα του πεπτικού συστήματος.....	3
1.1.4	Μικροβιακή χλωρίδα και ζύμωση στο παχύ έντερο .....	5
<b>1.2</b>	<b>Το Κεφίρ.....</b>	<b>7</b>
1.2.1	Προέλευση .....	7
1.2.2	Κόκκοι κεφίρ .....	8
1.2.3	Μικροχλωρίδα των κόκκων .....	10
1.2.4	Παραγωγική διαδικασία κεφίρ.....	11
<b>1.3</b>	<b>Προβιοτικά.....</b>	<b>12</b>
1.3.1	Ορισμός και προέλευση .....	12
1.3.2	Επιλογή προβιοτικών.....	14
1.3.3	Ευεργετικά οφέλη .....	15
1.3.4	Μηχανισμός δράσης προβιοτικών .....	17
<b>1.4</b>	<b>Πρεβιοτικά .....</b>	<b>18</b>
1.4.1	Ορισμός πρεβιοτικών .....	18
1.4.2	Κριτήρια ένταξης.....	19
1.4.3	Φρουκτοολιγοσακχαρίτες (FOS) .....	20
1.4.4	Γαλακτοολιγοσακχαρίτες (GOS) .....	21
1.4.5	Λακτουλόζη.....	22
<b>1.5</b>	<b>Συμβιωτικά.....</b>	<b>22</b>
<b>1.6</b>	<b><i>Escherichia coli</i> .....</b>	<b>24</b>

1.6.1	Ταξινόμηση .....	25
1.6.2	Μετάδοση νοσήματος .....	25
1.6.3	Παθογένεια .....	26
1.6.4	Κρούσματα .....	26
1.7	<i>Listeria monocytogenes</i> .....	27
1.7.1	Ταξινόμηση και βασικά χαρακτηριστικά .....	27
1.7.2	Λιστερίωση .....	29
1.7.3	Κρούσματα .....	31
2	ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ .....	33
3	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	34
3.1	Στελέχη .....	34
3.2	Αντοχή σε Όξινο Περιβάλλον .....	34
3.3	Αντοχή στα Χολικά Άλατα .....	35
3.4	Υδατάνθρακες .....	36
3.4.1	Προσδιορισμός του ρυθμού ανάπτυξης με διαφορετικούς υδατάνθρακες .....	37
3.5	Αντιμικροβιακή Δραστηριότητα Συμβιωτικών .....	38
3.6	Στατιστική Ανάλυση .....	39
4	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	40
4.1	Αντοχή σε Χολικά Άλατα και Οξέα .....	40
4.2	Προσδιορισμός του Ρυθμού Ανάπτυξης σε Διαφορετικά Υποστρώματα Υδατανθράκων .....	42
4.3	Ανταγωνισμός Μεταξύ των Συμβιωτικών και των Παθογόνων .....	45
5	ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	56
6	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	65

## **ΕΙΚΟΝΕΣ**

Εικόνα 1. Κυριότερα βακτηριακά φύλα κατά μήκος του γαστρεντερικού σωλήνα και  
οι συγκεντρώσεις τους ..... 5

Εικόνα 2. Κόκκοι κεφίρ ....., 9

## **ΣΧΗΜΑΤΑ**

Σχήμα 1. Διακύμανση του πληθυσμού του *Lb. kefiri* B6 κατά την παραμονή του σε pH  
2 και pH 3. .... 41

Σχήμα 2. Διακύμανση του πληθυσμού του *Lb. kefiri* B6 κατά την παραμονή του σε  
PBS με 0,4% (w/v) συγκέντρωση χολικών αλάτων και σε PBS χωρίς χολικά άλατα  
(μάρτυρα) σε σχέση με τονχρόνο έκθεσης. .... 42

Σχήμα 3. Ανάπτυξη της *L. monocytogenes* σε PY ζωμό με προσθήκη 1% (w/v)  
πρεβιοτικού Synergy 1 σε καθαρή καλλιέργεια και σε μικτή καλλιέργεια με τον *Lb.*  
*kefiri* B6. .... 46

Σχήμα 4. Ανάπτυξη της *L. monocytogenes* σε PY ζωμό με προσθήκη 1% (w/v)  
πρεβιοτικού GOS σε καθαρή καλλιέργεια και σε μικτή καλλιέργεια με τον *Lb. kefiri*  
B6. .... 47

Σχήμα 5. Ανάπτυξη της *L. monocytogenes* σε PY ζωμό με προσθήκη 1% (w/v)  
πρεβιοτικού Lactulose σε καθαρή καλλιέργεια και σε μικτή καλλιέργεια με τον *Lb.*  
*kefiri* B6. .... 49

Σχήμα 6. Ανάπτυξη της *L. monocytogenes* σε PY ζωμό με προσθήκη 1% (w/v)  
πρεβιοτικού Raftilose P95 σε καθαρή καλλιέργεια και σε μικτή καλλιέργεια με τον  
*Lb. kefiri* B6. .... 50

Σχήμα 7. Ανάπτυξη της *E. coli* σε PY ζωμό με προσθήκη 1% (w/v) πρεβιοτικού  
Synergy 1 σε καθαρή καλλιέργεια και σε μικτή καλλιέργεια με τον *Lb. kefiri* B6. ... 51

Σχήμα 8. Ανάπτυξη της *E. coli* σε PY ζωμό με προσθήκη 1% (w/v) πρεβιοτικού GOS  
σε καθαρή καλλιέργεια και σε μικτή καλλιέργεια με τον *Lb. kefiri* B6.. .... 52

Σχήμα 9. Ανάπτυξη της *E. coli* σε PY ζωμό με προσθήκη 1% (w/v) πρεβιοτικού Lactulose σε καθαρή καλλιέργεια και σε μικτή καλλιέργεια με τον *Lb. kefiri* B6. .... 53

Σχήμα 10. Ανάπτυξη της *E. coli* σε PY ζωμό με προσθήκη 1% (w/v) πρεβιοτικού Raftilose P95 σε καθαρή καλλιέργεια και σε μικτή καλλιέργεια με τον *Lb. kefiri* B6.54

## ΠΙΝΑΚΑΣ

Πίνακας 1. Ανάπτυξη της *Listeria monocytogenes* Scott A, *Escherichia coli* O157:H7 και *Lactobacillus kefiri* B6 σε διαφορετικούς υδατάνθρακες. .... 44

## **ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ**

cfu	Colony forming units
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EHEC	Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i>
EHSG	European Helicobacter Study Group
FOS	Fructooligosaccharides
GOS	Galactooligosaccharides
GRAS	Generally Recognized As Safe
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HUS	Hemolytic uremic syndrome
IMO	Isomaltooligosaccharides
Lb.	Lactobacillus
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
LLO	Listeriolysin O
PY	Peptone Yeast
PBS	Phosphate buffered saline
rcf	Relative centrifugal force
SCFA	Short Chain Fatty Acid
sc-FOS	Short Chain FOS

STEC                    Shiga toxin *Escherichia coli*

VTEC                    Verocytotoxigenic *Escherichia coli*

# **1 ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

## **1.1 Το Γαστρεντερικό Σύστημα**

Το γαστρεντερικό σύστημα είναι ένα από τα πολυπλοκότερα και σημαντικότερα συστήματα του ανθρώπινου οργανισμού. Η βασικότερη λειτουργία του είναι η διέλευση της τροφής και έπειτα η πέψη που θα οδηγήσει στην απορρόφηση των σημαντικότερων στοιχείων ή/και στην απόρριψη των άπεπτων ή μη απαραίτητων συστατικών (Goodman, 2010).

### **1.1.1 Ανατομία του γαστρεντερικού συστήματος**

Το γαστρεντερικό σύστημα του ανθρώπου αποτελείται από τον οισοφάγο, το στομάχι, το παχύ και το λεπτό έντερο. Το παχύ έντερο διαχωρίζεται σε τρία τμήματα: το τυφλό, το κόλον και το απευθυνμένο. Το κόλον επίσης χωρίζεται σε τέσσερα τμήματα: το ανιόν, το εγκάρσιο, το κατιόν και το σιγμοειδές.

Επίσης στο γαστρεντερικό σύστημα συγκαταλέγονται το ήπαρ, η χολή, το πάγκρεας και οι σιελογόνοι αδένες, τα οποία είναι βασικά λειτουργικά όργανα (Marchesi, 2011).

### **1.1.2 Η διαδικασία της πέψης**

Αρχικά η πέψη ξεκινάει στο στόμα με τους σιελογόνους αδένες, οι οποίοι εκκρίνουν διάφορα ένζυμα όπως την αμυλάση η οποία είναι απαραίτητη για τη διάσπαση των υδατανθράκων (Nater *et al.*, 2006). Η αμυλάση επίσης εκκρίνεται στα παγκρεατικά και εντερικά υγρά. Στο στομάχι, στο πάγκρεας και στα εντερικά υγρά εντοπίζονται και άλλα ένζυμα, όπως η πρωτεάση. Η πρωτεάση ανήκει στην ομάδα των πρωτεολυντικών ενζύμων και είναι υπεύθυνη για τη διάσπαση των πρωτεΐνων.

Άλλα ένζυμα που επίσης ανήκουν στην κατηγορία αυτή είναι η θρυψίνη, η πεψίνη, η παγκρεατίνη και η χυμοθρυψίνη. Για τη διάσπαση των λιπών απαραίτητα ένζυμα είναι οι λιπάσες. Οι λιπάσες λειτουργούν διασπώντας τα λιπίδια σε γλυκερόλες και λιπαρά οξέα. Στην κατηγορία των λιπασών ανήκει η παγκρεατική λιπάση η οποία εκκρίνεται από το πάγκρεας και δρα στο λεπτό έντερο. Ενεργοποιείται από άλατα και χολικά οξέα ώστε να πραγματοποιήσει την υδρόλυση των λιπών που υπάρχουν στις τροφές και μεταφέρονται στον οργανισμό (Guerra *et al.*, 2012; Whitcomb and Lowe, 2007).

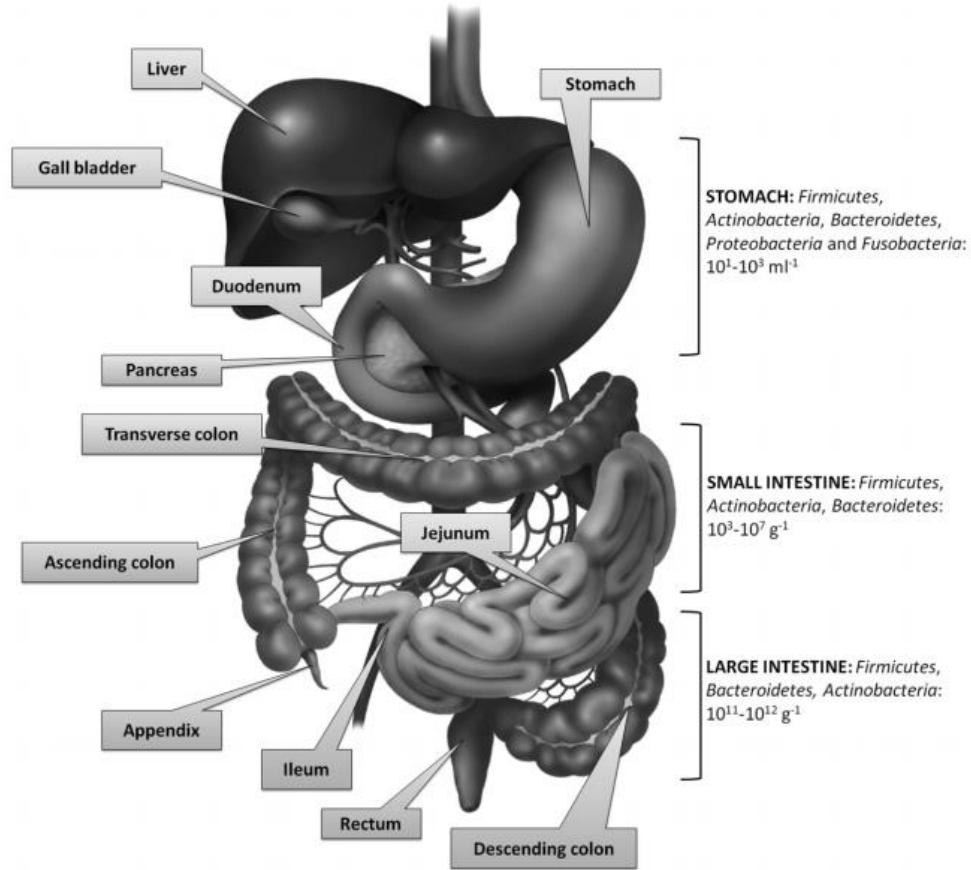
### **1.1.3 Η μικροχλωρίδα του πεπτικού συστήματος**

Η φυσιολογική μικροχλωρίδα ενός ανθρώπου διαμορφώνεται κατά τη διάρκεια της γέννησης του και προέρχεται κυρίως από το εξωτερικό του περιβάλλον (Ley *et al.*, 2006).

Η μικροβιακή αποίκηση του γαστρεντερικού σωλήνα του ανθρώπου θα μπορούσε να χωριστεί σε τρία βασικά στάδια από τη γέννηση του και έπειτα. Το πρώτο στάδιο κατά το οποίο αναπτύσσεται η εντερική χλωρίδα είναι αυτό της γέννησης και των πρώτων ωρών. Σημαντικό ρόλο στο στάδιο αυτό παίζει η μέθοδος τοκετού (φυσιολογικός τοκετός ή καισαρική τομή). Το δεύτερο στάδιο περιλαμβάνει τον επισιτισμό του νεογνού. Έχει αποδειχθεί ότι η μικροχλωρίδα των νεογνών εξαρτάται ιδιαίτερα από το είδος του γάλακτος κατά τους πρώτους μήνες. Η μικροχλωρίδα νεογνών που θηλάζουν είναι λιγότερο πολύπλοκη αφού το 90% του βακτηριακού πληθυσμού αποτελείται από *Bifidobacterium* σε αντίθεση με νεογνά που τρέφονται με παιδικές φόρμουλες και η μικροβιακή τους χλωρίδα τείνει να μοιάζει με αυτή ενός ενήλικα αφού αποκίζεται από περισσότερα βακτηριακά είδη όπως, *enterococci*, *bifidobacteria*, *bacteroides*, *clostridia* και *streptococci*. Κατά το τρίτο στάδιο της ανάπτυξης της μικροβιακής χλωρίδας έρχεται ο απογαλακτισμός και η εισαγωγή στερεών τροφών στη δίαιτα του βρέφους (Mackie *et al.*, 1999).

Σε αντίθεση με τα βρέφη, η μικροχλωρίδα ενός ενήλικα έχει σύνθετη σύσταση και διαφοροποιείται μεταξύ ατόμων. Εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως είναι η διατροφή, η ηλικία, το περιβάλλον ή ακόμα και το άγχος ή οι ορμονικές αλλαγές, η χρήση αντιβιοτικών καθώς και άλλες αλλαγές σχετικά με τον ξενιστή (McFarland, 2000).

Κατά μήκος της γαστρεντερικής οδού η σύνθεση της μικροχλωρίδας ποικίλλει. Στο στομάχι και το λεπτό έντερο φιλοξενούνται σχετικά χαμηλοί πληθυσμοί μικροοργανισμών καθώς εκκρίνονται γαστρικά υγρά και επιθετικοί εντερικοί χυμοί από το πάγκρεας και την χολή με αποτέλεσμα το περιβάλλον να είναι όξινο (περίπου pH 2.5-3.5) και άρα μη φιλικό για τους περισσότερους μικροοργανισμούς, καθώς επίσης και λόγω του γρήγορου χρόνου διέλευσης της τροφής (Berg, 1996). Συνεχίζοντας προς το παχύ έντερο ο πληθυσμός των βακτηρίων αυξάνεται λόγω χαμηλής περισταλτικότητας και χαμηλού οξειδοαναγωγικού δυναμικού ( $10^8$  cfu/g) (Mackie *et al.*, 1999). Η μικροχλωρίδα στο παχύ έντερο είναι αρκετά σύνθετη όμως σχετικά σταθερή, ο πληθυσμός της κυμαίνεται μεταξύ  $10^{11}$ - $10^{12}$  cfu/g και αποκίζουν περισσότερο από 400 είδη (Wang *et al.*, 1996). Παρακάτω στην **Εικόνα 1.** φαίνονται τα κυριότερα βακτηριακά φύλα και οι συγκεντρώσεις τους κατά μήκος του γαστρεντερικού σωλήνα.



**Εικόνα 1.** Κυριότερα βακτηριακά φύλα κατά μήκος του γαστρεντερικού σωλήνα και οι συγκεντρώσεις τους (Marchesi, 2011)

#### 1.1.4 Μικροβιακή χλωρίδα και ζύμωση στο παχύ έντερο

Οι μικροοργανισμοί του παχέος εντέρου διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην πεπτική διαδικασία και συμβάλλουν σημαντικά στην ομοιόσταση του εντέρου. Η κυριότερη από τις μεταβολικές δραστηριότητες των μικροοργανισμών του

παχέος εντέρου συνδέεται με την διάσπαση των πρωτεΐνών και των υδατανθράκων. Από τη διαδικασία αυτή, παράγονται λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου (SCFA) όπως είναι το οξικό, το προπιονικό και βουτυρικό. Η πλειοψηφία των SCFA απορροφάται από το έντερο και μεταβολίζεται σε διάφορους ιστούς, συμβάλλοντας με αυτό τον τρόπο στις καθημερινές ανάγκες ενέργειας του οργανισμού (MacFarlane & MacFarlane, 2012). Το βουτυρικό οξύ χρησιμοποιείται κυρίως από τα εντεροκύτταρα και γενικά θεωρείται μεταβολίτης υγείας. Ο κύριος ρόλος του είναι να τροφοδοτεί τα εντεροκύτταρα με ενέργεια, και μπορεί να καλύψει έως και 70% των ενεργειακών τους αναγκών, συμβάλλοντας έτσι στην ανάπτυξη και τη διαφοροποίησή τους (Hamer *et al.*, 2008). Αντίθετα, τα άλλα δύο λιπαρά οξέα, προπιονικό και οξικό, μπορούν από το έντερο και μέσω της πυλαίας κυκλοφορίας να μεταβούν στο ήπαρ. Το οξικό οξύ μπορεί να συμβάλει στο μεταβολισμό των λιπιδίων και της χοληστερόλης με την ενεργοποίηση της κυτταροπλασματικής συνθετάσης του ακετυλό–συννενζύμου A, ενώ το προπιονικό πιθανό να αναστέλλει τη λιπογένεση που προκαλείται από το οξικό οξύ, όπως έχει φανεί από πειράματα σε ηπατικά κύτταρα ποντικών (Wolever *et al.*, 1997). Στο τυφλό και στο ανιόν κόλον, η ζύμωση είναι έντονη, με αποτέλεσμα την υψηλή παραγωγή SCFA, χαμηλές τιμές pH και γρήγορη βακτηριακή ανάπτυξη. Αντίθετα, στο κατιόν και σιγμοειδές παχύ έντερο, η διαθεσιμότητα

υδατανθράκων μειώνεται, το pH είναι σχεδόν ουδέτερο και πραγματοποιείται κυρίως διάσπαση πρωτεΐνών, ενώ ο βακτηριακός πληθυσμός είναι σχεδόν στάσιμος (Guarner and Malagelada, 2003).

Κατά τη βακτηριακή ζύμωση στο παχύ έντερο παράγονται επίσης αέρια. Σε μεγαλύτερες ποσότητες παράγονται υδρογόνο ( $H_2$ ) και διοξείδιο του άνθρακα ( $CO_2$ ) ενώ σε μικρότερες ποσότητες άζωτο ( $N_2$ ) και μεθάνιο (Gasbarrini *et al.*, 2008).

## 1.2 Το Κεφίρ

### 1.2.1 Προέλευση

Το κεφίρ είναι ένα παραδοσιακό γαλακτοκομικό ρόφημα, γνωστό από τη Μέση Ανατολή. Προέρχεται από τον Καύκασο της πρώην Σοβιετικής Ένωσης και καταναλώνεται εδώ και χιλιάδες χρόνια. Η λέξη κεφίρ κατά πάσα πιθανότητα προέρχεται από την τούρκικη λέξη «keyif» που σημαίνει ευχαρίστηση, εξαιτίας της συνολικής ευχάριστης αίσθησης και ευημερίας που προκαλείται από την κατανάλωση του (Koroleva 1988).

Το ρόφημα προκύπτει από τη δράση οξυγαλακτικών βακτηρίων, οξικών βακτηρίων και ζυμών στο γάλα. Το συγκεκριμένο μγμα μικροοργανισμών

προσφέρει στο ζυμούμενο ρόφημα μοναδικές ιδιότητες, αφού διαφέρει από άλλα ζυμούμενα γαλακτοκομικά προϊόντα που μεταβολίζονται από ένα ή από μερικά μόνο είδη μικροοργανισμών (Leite *et al.*, 2012).

### **1.2.2 Κόκκοι κεφίρ**

Το κεφίρ παράγεται με την προσθήκη μιας σύνθετης καλλιέργειας στο γάλα. Η καλλιέργεια που χρησιμοποιείται είναι οι κόκκοι κεφίρ. Οι κόκκοι αυτοί είναι μια μάζα που αποτελείται από βακτήρια και ζύμες ενσωματωμένα σε ένα σύνθετο πλέγμα πρωτεΐνών και πολυσακχαριτών. Από τους σημαντικότερους πολυσακχαρίτες είναι η κεφιράνη η οποία εκτιμάται ότι έχει αντιμικροβιακές, αντιμυκητιακές και αντικαρκινικές ιδιότητες (Rodrigues *et al.*, 2005). Η κεφιράνη είναι ένας πολυσακχαρίτης που παρατηρήθηκε πρώτη φορά από τους La Riviere *et al.*, (1967) μελετώντας τη δομή των κόκκων. Σύμφωνα με τους συγγραφείς η κεφιράνη είναι ένας υδατοδιάλυτος πολυσακχαρίτης που περιέχει ίσες ποσότητες γλυκόζης και γαλακτόζης. Η μοναδική πηγή κεφιράνης φαίνεται να είναι οι κόκκοι κεφίρ και πολλοί ασχολήθηκαν με τη μελέτη των βακτηρίων που την παράγουν. Σύμφωνα με τους παραπάνω συγγραφείς ο *Lb. brevis* είναι ένας από τους μικροοργανισμούς που παράγουν κεφιράνη. Αργότερα ταυτοποιήθηκαν και άλλοι μικροοργανισμοί υπεύθυνοι

για την παραγωγή κεφιράνης όπως ο *Lb. kefir* (Kandler and Kunath, 1983), ο *Lb. kefiranofaciens* (Toba *et al.*, 1986), ο *Lb. kefirgramum* και ο *Lb. parakefir* (Takizawa *et al.*, 1994).

Οι κεφιρόκοκκοι μοιάζουν μορφολογικά με κουνουπίδι, είναι ελαστικοί με ακανόνιστο σχήμα και έχουν παχύρευστη και σταθερή υφή. Το χρώμα τους είναι λευκό-υποκίτρινο και το μέγεθος τους κυμαίνεται μεταξύ 0.3-3εκ. (Farnworth and Mainville, 2008). Στην **Εικόνα 2.** φαίνεται μια φωτογραφία των κόκκων.



**Εικόνα 2.** Κόκκοι κεφίρ

### **1.2.3 Μικροχλωρίδα των κόκκων**

Οπως αναφέρθηκε παραπάνω οι κόκκοι απαρτίζονται από οξυγαλακτικά βακτήρια, ζύμες και οξικά βακτήρια. Σύμφωνα με έρευνες έχει διαπιστωθεί ότι η ανάπτυξη κάποιων λακτοβακτηρίων ενισχύεται με την παρουσία ζυμών.

Παρατηρήθηκε ότι η μικτή καλλιέργεια των παραπάνω μικροοργανισμών μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή μεγαλύτερης ποσότητας γαλακτικού οξέος, γλυκερόλης και αιθανόλης (Farnworth, 2008). Είναι φανερός λοιπόν ο συμβιωτικός χαρακτήρας αυτών των μικροοργανισμών αφού τα βακτήρια αναπτύσσονται χρησιμοποιώντας βιταμίνες, αμινοξέα και άλλους βασικούς παράγοντες ανάπτυξης που παράγονται από τις ζύμες καθώς και οι ζύμες χρησιμοποιούν ως πηγές ενέργειας κάποια από τα τελικά προϊόντα που παράγονται από τα βακτήρια (Viljoen, 2001).

Η σύνθετη μικροχλωρίδα και η συμβιωτική σχέση στην οποία αναπτύσσονται οι μικροοργανισμοί κάνει αρκετά δύσκολη την ταυτοποίηση και τη μελέτη των κεφιρόκοκκων. Κλασσικές μικροβιολογικές τεχνικές αλλά και μοριακές τεχνικές έχουν χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση τους. Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης καθώς και άλλες τεχνικές υβριδισμού είναι κάποιες από αυτές.

Σύμφωνα με μία μελέτη των Leite *et al.* (2012) σε δείγμα κεφίρ μετά τη ζύμωση βρέθηκαν οξυγαλακτικά βακτήρια σε επίπεδα 10 log, οξικά βακτήρια σε επίπεδα 7,8 log και ζύμες σε επίπεδα 6 log. Κάποια από τα βακτήρια που απομονώθηκαν είναι ο *Lb. kefirano faciens*, ο *Lb. kefiri*, ο *Lb. parakefir* καθώς και η ζύμη *Saccharomyces cerevisiae*.

#### **1.2.4 Παραγωγική διαδικασία κεφίρ**

Υπάρχουν διάφορες τεχνικές παρασκευής κεφίρ. Οι πιο κοινές είναι η παραδοσιακή μέθοδος και η μέθοδος που χρησιμοποιούν οι βιομηχανίες. Τα τελευταία χρόνια οι επιστήμονες που ασχολούνται με τα τρόφιμα μελετούν νέες μοντέρνες τεχνικές ώστε να επιτύχουν κεφίρ με τα ίδια χαρακτηριστικά που έχει το κεφίρ που παράγεται με τον παραδοσιακό τρόπο. Για την παρασκευή του μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφοροι τύποι γάλακτος. Εκτός από το αγελαδινό μπορεί να χρησιμοποιηθεί γάλα κατσικίσιο, πρόβειο ή βουβαλίσιο καθώς επίσης γάλα σόγιας, καρύδας ή ρυζιού. Επίσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί γάλα παστεριωμένο ή μη, πλήρες, άπαχο ή χαμηλής λιποπεριεκτικότητας.

Η παραδοσιακή μέθοδος παραγωγής κεφίρ πραγματοποιείται με την προσθήκη κόκκων απευθείας σε παστεριωμένο και κρύο γάλα. Κατά τη διάρκεια της

ζύμωσης η θερμοκρασία και ο χρόνος δεν είναι αυστηρά ελεγχόμενος.

Ποσότητα κόκκων περίπου 2-10% ζυμώνουν το γάλα για περίπου 24 ώρες σε θερμοκρασία 20-25°C. Εάν οι κόκκοι αφεθούν περισσότερες ώρες, το ρόφημα έχει πιο όξινη γεύση λόγω έντονης παραγωγής οξέων. Οι κεφιρόκοκκοι στη συνέχεια διαχωρίζονται με κόσκινο και μπορούν να επαναχρησιμοποιηθούν για νέα ζύμωση ή μπορούν να διατηρηθούν σε γάλα για μερικές μέρες (1 έως 7) (Farnworth, 2008). Έπειτα το κεφίρ αποθηκεύεται σε συνθήκες ψύξης και είναι έτοιμο για κατανάλωση.

## 1.3 Προβιοτικά

### 1.3.1 Ορισμός και προέλευση

Η λέξη προβιοτικά προέρχεται από την λατινική λέξη "pro" που σημαίνει "για" και την ελληνική λέξη "βίος" δηλαδή "ζωή" (για τη ζωή). Έχουν δοθεί αρκετοί ορισμοί μέχρι σήμερα, όμως έχει επικρατήσει και είναι ευρέως διαδεδομένος και αποδεκτός ο ορισμός που δόθηκε από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας και τον Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας (FAO/WHO, 2002): ζωντανοί μικροοργανισμοί που όταν χορηγηθούν σε αρκετή ποσότητα, προσφέρουν ωφέλιμες ιδιότητες στον καταναλωτή.

Πρώτος που ασχολήθηκε με τη θετική επίδραση που ασκούν κάποιοι μικροοργανισμοί στον ανθρώπινο οργανισμό ήταν ο Eli Metchnikoff το 1907. Ο Ρώσος βιολόγος και νικητής βραβείου Νόμπελ που εργάστηκε στις αρχές του 20αιώνα στο Ινστιτούτο Παστέρ είχε μιλήσει για την εξάρτηση των εντερικών μικροβίων από τα τρόφιμα και τη δυνατότητα λήψης μέτρων για την τροποποίηση της χλωρίδας στο σώμα και την αντικατάσταση των επιβλαβών βακτηρίων με ωφέλιμα. Το ίδιο περίπου διάστημα (1906) ένας Γάλλος παιδίατρος, ο Henry Tissier είχε κάποιες παρατηρήσεις σχετικά με τα κόπρανα παιδιών με διάρροια και τα κόπρανα υγιών παιδιών. Παρατήρησε λοιπόν πως τα κόπρανα των παιδιών με διάρροια είχαν έλλειψη κάποιων βακτηρίων, των γνωστών σήμερα *Bifidobacterium* σε αντίθεση με τα παιδιά που ήταν υγιή και είχαν άφθονα βακτήρια αυτού του γένους. Πρότεινε λοιπόν ότι αυτά τα βακτήρια θα μπορούσαν να βοηθήσουν τους ασθενείς με διάρροια αν αποκαταστηθεί η εντερική τους χλωρίδα (Kunz, 2012). Οι μελέτες του Eli Metchnikoff και του Henry Tissier ήταν οι πρώτες επιστημονικές προτάσεις για τη χρήση των προβιοτικών ακόμη και αν η λέξη δεν είχε χρησιμοποιηθεί μέχρι τότε. Τις τελευταίες τρεις δεκαετίες, οι έρευνες έχουν πολλαπλασιαστεί και με τη χρήση μοριακών μεθόδων έχουν γίνει σημαντικές πρόοδοι στον χαρακτηρισμό των προβιοτικών, την κατανόηση του μηχανισμού δράσης τους καθώς και τις επιπτώσεις που έχουν στην υγεία.

### **1.3.2 Επιλογή προβιοτικών**

Τα επιθυμητά χαρακτηριστικά για την επιλογή των προβιοτικών είναι πολλά.

Αρχικά οι μικροοργανισμοί πρέπει να πληρούν κάποιες προϋποθέσεις καταλληλότητας. Πρέπει να μπορούν να ταυτοποιηθούν και να ταξινομηθούν, να είναι ανθρώπινης προέλευσης και πρέπει απαραίτητα να είναι ασφαλή. Να ανήκουν δηλαδή στην κατηγορία GRAS (Generally Regarded As Safe), να είναι μη τοξικά και μη παθογόνα (Klaenhammer & Kullen, 1999). Από τεχνολογικής πλευράς πρέπει να είναι γενετικώς σταθερά και να επιδέχονται μαζική παραγωγή και αποθήκευση καθώς και να διατηρούν τη βιωσιμότητα τους στα τρόφιμα ή στα συμπληρώματα που θα χρησιμοποιηθούν (Salminen *et al*, 1998). Βασικό κριτήριο επίσης αποτελεί η ανταγωνιστικότητα και η ανθεκτικότητα των οργανισμών που θα χρησιμοποιηθούν. Πρέπει οι μικροοργανισμοί να μπορούν να μείνουν ζωντανοί από τη λήψη τους μέχρι να φτάσουν στο γαστρεντερικό σωλήνα. Όταν φτάσουν στο παχύ έντερο πρέπει να έχουν επιβιώσει από τα ένζυμα τις σιελογόνου, τα οξέα του στομάχου καθώς και από τα χολικά άλατα και τα παγκρεατικά ένζυμα που θα συναντήσουν (Del Piano *et al*, 2006). Τέλος για να χαρακτηριστεί ένας μικροοργανισμός ως προβιοτικός πρέπει να μπορεί να ανταγωνιστεί την υπάρχουσα μικροχλωρίδα ώστε να αποικήσει στο πεπτικό σύστημα του ανθρώπου και να παρέχει στον ξενιστή μια ή περισσότερες τεκμηριωμένες

κλινικά ευεργετικές ιδιότητες (Aureli *et al*, 2011). Να έχει ανοσοδιεγερτική, ανοσοτροποποιητική και αντικαρκινική δράση και να μπορεί να παράγει αντιμικροβιακές ουσίες (βακτηριοσίνες, υπεροξείδια του υδρογόνου, οργανικά οξέα) και βιοενεργές ενώσεις (ένζυμα, πεπτίδια)(Klaenhammer & Kullen, 1999).

### 1.3.3 Ευεργετικά οφέλη

Πολλές μελέτες έχουν αποδείξει την αποτελεσματικότητα κάποιων προβιοτικών απέναντι σε ορισμένες λοιμώδεις νόσους καθώς και σε λειτουργικές διαταραχές. Σημαντικό ρόλο φαίνεται να παίζει ο *Lactobacillus rhamnosus* GG στην πρόληψη της διάρροιας που προκαλείται από το *Clostridium difficile* έπειτα από χορήγηση αντιβιοτικής θεραπείας (Kyne and Kelly, 2001) καθώς επίσης έχει συνδεθεί και με την αποτελεσματικότητά του κατά της διάρροιας των ταξιδιωτών (Hilton *et al*, 1977). Η χρήση των προβιοτικών όμως δεν επικεντρώνεται μόνο σε θεραπείες κατά της διάρροιας. Οι Tong *et al.*, το 2007 κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι τα προβιοτικά μπορούν να παίζουν σημαντικό ρόλο στην μείωση των παρενεργειών σε ασθενείς που πάσχουν από το *Helicobacter pylori*. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα προβιοτικά έχουν αναγνωρισθεί ως συμπληρωματική θεραπεία της λοιμωξης από το συγκεκριμένο βακτήριο από την Ευρωπαϊκή ομάδα μελέτης του

ελικοβακτηρίου (EHSG-European Helicobacter Study Group) σύμφωνα με το Maastricht III Consensus Report (Malfertheiner *et al.*, 2007). Επιπροσθέτως, ο *Lb. acidophilus* έχει αποδειχθεί ότι μειώνει τα επίπεδα της χοληστερόλης του ορού (Mann and Spoerry, 1974) ενώ ο *Lb. helveticus* έχει συσχετισθεί με τη μείωση της συστολικής και διαστολικής αρτηριακής πίεσης (Hata *et al.*, 1996). Κλινικά συμπτώματα όπως το σύνδρομο του ευερέθιστου εντέρου ή η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου φαίνεται επίσης να ανακουφίζονται με τη χρήση κάποιων προβιοτικών (Jonkers and Stockbrügger, 2003) ενώ σε μελέτη των Reid *et al.*, (2003), δύο στελέχη λακτοβακτηρίων έδειξαν θετική επίδραση βελτιώνοντας σημαντικά την κολπική χλωρίδα σε γυναίκες με προβλήματα κολπίτιδας. Ωστόσο ορισμένα προβιοτικά φαίνεται πως έχουν ακόμη και αντικαρκινική δράση. Οι μηχανισμοί δράσης της αντικαρκινικής τους δραστηριότητας επικεντρώνονται στην διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος, στην αναστολή των κολονικών ενζύμων και τον έλεγχο της ανάπτυξης δυνητικά επιβλαβών βακτηρίων καθώς και στην αλληλεπίδραση τους με τα κολονοκύτταρα (Commane *et al.*, 2005). Σε ανθρώπινες κλινικές δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν, διαπιστώθηκε ότι η κατανάλωση *Lb. casei* (τρείς φορές την ημέρα για 1 έτος) αύξησε το διάστημα χωρίς υποτροπές μεταξύ των ατόμων με καρκίνο της ουροδόχου κύστης (Aso & Akazam 1992).

### **1.3.4 Μηχανισμός δράσης προβιοτικών**

Υπάρχουν διαφορετικοί μηχανισμοί δράσης των προβιοτικών έναντι εντερικών παθήσεων και υπάρχουν σημαντικές διαφορές της δράσης τους, όχι μόνο μεταξύ των προβιοτικών ειδών, αλλά και μεταξύ ορισμένων στελεχών.

Οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί έχουν την ικανότητα να ανταγωνίζονται και να αντικαθιστούν τη μικροβιακή χλωρίδα παράγοντας αντιμικροβιακές ουσίες (Commane *et al.*, 2005). Οι σημαντικότερες αντιμικροβιακές ουσίες που παράγουν είναι οι βακτηριοσίνες, οι οποίες έχουν αντιμικροβιακές ιδιότητες σε ένα στενό φάσμα αναστέλλοντας συγγενικά προς το παράγωγο στέλεχος είδη. Οι βακτηριοσίνες είναι πρωτεΐνικής φύσεως μεταβολίτες και χωρίζονται σε κατηγορίες ανάλογα με την δομή τους, το μοριακό τους βάρος και την θερμοανεκτικότητα τους. Η παραγωγή τους εξαρτάται από τις συνθήκες που επικρατούν στο περιβάλλον ανάπτυξης όπως είναι το pH, η θερμοκρασία και τα θρεπτικά συστατικά (Μεταξόπουλος *et al.*, 2003). Στις αντιμικροβιακές ουσίες που παράγονται από τους προβιοτικούς μικροοργανισμούς ανήκουν επίσης και τα οργανικά οξέα όπως το γαλακτικό και το οξικό, καθώς επίσης και το υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) (Garotte *et al.*, 2000). Επιπροσθέτως παράγονται και άλλες ουσίες σε μικρότερο βαθμό όπως το διακετύλιο και η ακεταλδεϋδη, οι οποίες έχουν επίσης χαρακτηριστεί ως αντιμικροβιακές (Helander *et al.*, 1997).

Παράλληλα οι μικροοργανισμοί έχουν την ικανότητα να προσκολλώνται στη βλεννογόνο περιορίζοντας έτσι την διαθεσιμότητα θρεπτικών στοιχείων σε άλλα βακτήρια. Με αυτόν τον τρόπο ενισχύεται η ανάπτυξη των προβιοτικών βακτηρίων και περιορίζεται η ανάπτυξη των παθογόνων. Πολλοί προβιοτικοί οργανισμοί μπορούν και ενισχύουν την λειτουργία του επιθηλιακού φραγμού προλαμβάνοντας και επιδιορθώνοντας τις βλάβες της βλεννογόνου που μπορεί να προκαλούνται από τροφικά αντιγόνα, διάφορα φάρμακα και από εντερικά παθογόνα. Αυτό συμβαίνει με μηχανισμούς δράσης που περιλαμβάνουν την επαγωγή της παραγωγής βλεννινών, αύξηση της διεπιθηλιακής αντίστασης καθώς και αποτροπή της απόπτωσης των εντερικών επιθηλιακών κυττάρων. Επιπλέον οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην καταστολή της φλεγμονής του εντέρου και στη διαμόρφωση του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή (O' Hara and Shanahan, 2006).

## 1.4 Πρεβιοτικά

### 1.4.1 Ορισμός πρεβιοτικών

Τα πρεβιοτικά έχουν οριστεί από τους Gibson and Roberfroid (1995) ως "μη αφομοιώσιμα συστατικά τροφίμων που επηρεάζουν ευεργετικά τον ξενιστή

διεγείροντας επιλεκτικά την ανάπτυξη ή/και τη δραστικότητα ενός ή περιορισμένου αριθμού βακτηρίων στο παχύ έντερο".

#### **1.4.2 Κριτήρια ένταξης**

Για να συμπεριληφθεί ένα συστατικό τροφίμου στην κατηγορία των πρεβιοτικών πρέπει να πληροί κάποια κριτήρια. Αρχικά δεν πρέπει να υδρολύεται καθώς και να μην απορροφάται στο ανώτερο τμήμα του πεπτικού συστήματος. Επίσης πρέπει να ζυμώνεται επιλεκτικά από ένα ή περιορισμένο αριθμό ωφέλιμων βακτηρίων του παχέος εντέρου, να τροποποιεί την εντερική μικροχλωρίδα προς μια πιο υγιή σύνθεση και να δρα ευνοϊκά στην υγεία του ξενιστή (Gibson *et al.*, 2004).

Ορισμένοι υδατάνθρακες (ολιγοσακχαρίτες και πολυσακχαρίτες) που πληρούν τα κριτήρια των πρεβιοτικών έχουν απομονωθεί από διάφορες φυσικές πηγές όπως κρεμμύδια, σκόρδο, πράσα, ραδίκια, αγκινάρες και μπανάνες σε μεγάλη κλίμακα και με τη χρήση διάφορων τεχνολογιών είναι εμπορικά διαθέσιμοι.

Υπάρχουν πολλοί πρεβιοτικοί υδατάνθρακες στο εμπόριο μερικοί από αυτούς είναι οι φρουκτοολιγοσακχαρίτες (FOS), οι γαλακτοολιγοσακχαρίτες (GOS), η λακτουλόζη, οι ξυλοολιγοσακχαρίτες (XOS) και οι ισομαλτο-ολιγοσακχαρίτες (IMO).

### **1.4.3 Φρουκτοολιγοσακχαρίτες (FOS)**

Οι φρουκτοολιγοσακχαρίτες είναι άπεπτοι υδατάνθρακες και βρίσκονται σε διάφορες ποσότητες σε κάποια τρόφιμα όπως τα κρεμμύδια, τα σπαράγγια, οι αγκινάρες, το σιτάρι και το μέλι. Η χημική τους δομή ορίζεται από μία αλυσίδα με μονάδες φρουκτόζης συνδεδεμένες μεταξύ τους με β-(2-1) γλυκοζιτικούς δεσμούς που καταλήγει σε μια τερματική μονάδα γλυκόζης, που σημαίνει ότι δε μπορεί να υδρολυθεί από τα πεπτικά ένζυμα τα οποία είναι ειδικά για αλυσίδες με α-γλυκοζιτικούς δεσμούς. Το μήκος της αλυσίδας κυμαίνεται μεταξύ 2-60. Υπάρχουν τρεις κατηγορίες FOS και κάθε μία είναι ξεχωριστή δομικά. Η ινουλίνη που έχει βαθμό πολυμερισμού που κυμαίνεται από 2 έως 60 μονομερή φρουκτόζης, με μέσο όρο περίπου 12 μόρια. Η ολιγοφρουκτόζη που παράγεται από την ενζυματική υδρόλυση της ινουλίνης και ορίζεται ως κλάσμα ολιγοσακχαριτών με βαθμό πολυμερισμού μικρότερο από 20, ωστόσο τα προϊόντα που κυκλοφορούν στο εμπόριο τείνουν να έχουν μέση τιμή 9 (Gibson and Roberfroid 1995). Τέλος υπάρχει και η κατηγορία των φρουκτοολιγοσακχαριτών μικρής αλύσου sc-FOS (short chain FOS), που ορίζονται ως ένα μίγμα αλυσίδων φρουκτόζης με μια τερματική μονάδα γλυκόζης και έχουν μέγιστο αριθμό μορίων 5-9. Τα τελευταία χρόνια η χρήση των πρεβιοτικών αυξάνεται σε προϊόντα διατροφής και στις παιδικές φόρμουλες, λόγω της πρεβιοτικής τους δράσης να διεγείρουν την ανάπτυξη

των προβιοτικών μικροοργανισμών στην εντερική μικροχλωρίδα. Η κατανάλωση τους έχει συνδεθεί με αύξηση της συχνότητας των αποθέσεων. Δόση 4-15g ημερησίως σε υγιή άτομα μειώνει την δυσκοιλιότητα που είναι ένα από τα αυξανόμενα προβλήματα σε σύγχρονες κοινωνίες καθώς και στα νεογνά τους πρώτους μήνες της ζωής τους (Sabater-Molina *et al.*, 2009).

#### **1.4.4 Γαλακτοολιγοσακχαρίτες (GOS)**

Οι γαλακτοολιγοσακχαρίτες σχηματίζονται κυρίως από την ενζυματική κατεργασία της λακτόζης από το ένζυμο β-γαλακτοσιδάση. Συνήθως έχουν βαθμό πολυμερισμού μεταξύ 2-10 με μία τερματική μονάδα γλυκόζης.

Παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τη σταθερότητα τους στις υψηλές θερμοκρασίες και σε όξινο περιβάλλον (Macfarlane *et al.*, 2008). Για την παραγωγή εμπορικά διαθέσιμων GOS συνήθως χρησιμοποιούνται συμπυκνώματα ορού γάλατος που παράγονται ως υποπροϊόντα σε γαλακτοκομικές βιομηχανίες. Οι GOS που κυκλοφορούν στο εμπόριο είναι μίγματα λακτόζης, γλυκόζης και γαλακτόζης και περιέχουν συνήθως περισσότερο από 55% ολιγοσακχαρίτες. Έχουν υψηλή διαλυτότητα και μία σχετική γλυκύτητα περίπου 35% της σακχαρόζης. Μειώνουν τη δραστικότητα του νερού και το σημείο πήξης, και παρουσιάζουν καλές δυνατότητες συγκράτησης υγρασίας. Η κατανάλωση τους έχει συνδεθεί με τόνωση του

μεταβολισμού των υδατανθράκων στα βακτήρια του παχέος εντέρου, αύξηση της βακτηριακής μάζας και παραγωγή SCFA και αερίων. Είναι γλυκαντική πηγή χαμηλής θερμιδικής αξίας και ανακουφίζουν από τα προβλήματα δυσκοιλιότητας ενώ βελτιώνουν την βιοδιαθεσιμότητα σε ασβέστιο (Angus *et al.*, 2007).

#### **1.4.5 Λακτουλόζη**

Η λακτουλόζη είναι ένας σύνθετος δισακχαρίτης που αποτελείται από γαλακτόζη και φρουκτόζη με μορφή β (1,4)-γαλακτοσιδο-φρουκτόζη (Zokaee *et al.*, 2002). Η λακτουλόζη ζυμώνεται στο παχύ έντερο από τα βακτήρια επιδρώντας στην αλλαγή της βακτηριακής σύνθεσης και στη μεταβολική δραστηριότητα της μικροχλωρίδας του εντέρου (Bouhnik *et al.*, 2004). Με κατανάλωση 20-60 g ανά ημέρα λακτουλόζης για 12 εβδομάδες, οι Henegouwen *et al.* (1987) παρατήρησαν αναστολή ορισμένων καρκινικών δεικτών που σχετίζονται με το παχύ έντερο.

### **1.5 Συμβιωτικά**

Τα συμβιωτικά ορίζονται ως μίγματα προβιοτικών και πρεβιοτικών, τα οποία συνδυάζουν τις ωφέλιμες ιδιότητες των προβιοτικών μικροοργανισμών και

των πρεβιοτικών ευνοώντας την ανάπτυξη και την ευημερία των ζωντανών οργανισμών του γαστρεντερικού σωλήνα (Gibson and Roberfroid, 1995). Τα τελευταία χρόνια αναπτύσσεται όλο και περισσότερο ο κλάδος τους και υπάρχει έντονο ενδιαφέρον από αρκετούς μελετητές. Το 2004 σύμφωνα με μια μελέτη, 20 άτομα που υπέφεραν από ηπατική εγκεφαλοπάθεια, ακολούθησαν θεραπεία 30 ημερών χρησιμοποιώντας ως συμπλήρωμα διατροφής, μίγμα σε φακελάκια που περιείχε ποσότητα  $10^{10}$  cfu/ ανά φακελάκι τους μικροοργανισμούς, *Pediococcus pentoseceus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lb. paracasei* και *Lb. plantarum*, καθώς και 10 g βιοδραστικών ινών (2,5 g  $\beta$ -γλυκάνες, 2,5 g ινουλίνη, 2,5 g πηκτίνη και 2,5 g ανθεκτικού αμύλου). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στα κόπρανα των ασθενών που ακολούθησαν την θεραπεία μειώθηκαν οι πληθυσμοί *E. coli* και *Staphylococcus* ssp. με αποτέλεσμα η σύνθεση τους να είναι όμοια με αυτή των υγιών ανθρώπων και επίσης αυξήθηκε ο αριθμός κάποιων *Lactobacillus* ssp (Liu *et al.*, 2004). Οι Rafter *et al.* (2007) βρήκαν ότι η κατανάλωση ενός συμβιωτικού (*Lactobacillus* και *Bifidobacterium*) εμπλουτισμένου με ολιγοφρουκτόζη, μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο της εμφάνισης ή επαναεμφάνισης του καρκίνου του παχέος εντέρου. Πιο συγκεκριμένα, σε 37 ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου και σε 47 ασθενείς με πολύποδες του παχέος εντέρου που ακολούθησαν τη θεραπεία, βρέθηκαν ικανοποιητικά αποτελέσματα που

σχετίζονται με μείωση της διάδοσης των καρκινικών κυττάρων στο έντερο καθώς και με βελτίωση της λειτουργίας του επιθηλιακού φραγμού στους ασθενείς με πολύποδες.

## 1.6 *Escherichia coli*

Η *E. coli* ανήκει στην κατηγορία των βακτηρίων που αποτελούν φυσιολογική χλωρίδα του εντερικού σωλήνα των ανθρώπων, συνήθως χωρίς να αποτελούν κίνδυνο, ενώ παράλληλα παίζουν ουσιαστικό ρόλο στη διατήρηση της ίδιας της ζωής αφού συμμετέχουν επίσης στην πέψη και στην αποδόμηση της τροφής. Η *E. coli* συναντάται και σε παθογόνο μορφή με αποτέλεσμα να προκαλεί νοσηρότητα σε κάποιες περιπτώσεις. Γι' αυτό το λόγο η ανίχνευση και η καταμέτρηση των κυττάρων της χρησιμοποιείται στην υγιεινή των τροφίμων ως βασικός δείκτης υγιεινής. Η παρουσία της σε ένα τρόφιμο υποδηλώνει ότι το τρόφιμο αυτό έχει έρθει σε επαφή με εντερικό περιεχόμενο και κατά συνέπεια φανερώνει τις κακές συνθήκες υγιεινής και επεξεργασίας που αυξάνουν σημαντικά τις πιθανότητες παρουσίας και παθογόνων μικροβίων στο υπό εξέταση τρόφιμο. Ένα τρόφιμο ή νερό θεωρείται κατάλληλο για κατανάλωση όταν ο αριθμός των κυττάρων *E. coli* βρίσκεται μέσα στα επιτρεπτά όρια που επιβάλλονται από τη νομοθεσία (Ζδράγκας, 2011,).

### **1.6.1 Ταξινόμηση**

Η *E. coli* είναι ένας μικροοργανισμός που ανήκει στην ευρύτερη τάξη των κολοβακτηριδίων. Είναι Gram (-) αρνητικό, ραβδόμορφο, μη σπορογόνο, καταλάση θετικό και οξειδάση αρνητικό. Μπορεί να αναπτυχθεί σε ένα εύρος pH από 4,5 έως 9 και ως βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης ορίζεται από 35-39 °C. Σε χαμηλότερες ή υψηλότερες θερμοκρασίες υπάρχει επίσης ανάπτυξη του μικροοργανισμού αλλά με μικρότερο ρυθμό.

### **1.6.2 Μετάδοση νοσήματος**

Η μετάδοση του νοσήματος μπορεί να γίνει μέσω της κατάποσης ή ακόμα και μέσω της επαφής μολυσμένου νερού (θάλασσες, ποτάμια, λίμνες, πισίνες) ή μέσω της κατανάλωσης μολυσμένου τροφίμου όπως ωμό ή όχι καλά ψημένο κρέας, ωμά φρούτα και λαχανικά, γαλακτοκομικά προϊόντα (Erickson *et al.*, 2007). Αποτελεί συχνό φαινόμενο η μετάδοση του νοσήματος από τρόφιμα που έχουν μολυνθεί κατά τη διάρκεια της προετοιμασίας τους από μολυσμένα άτομα που δεν τηρούν τους κανόνες ορθής υγιεινής. Επιπλέον η μετάδοση της λοίμωξης μπορεί να συμβεί μέσω επαφής με βοοειδή ή τα περιττώματα τους κυρίως σε αγροτικές περιοχές (Chapman *et al.*, 1993) και επίσης από άνθρωπο

σε άνθρωπο μέσω άμεσης επαφής με τα κόπρανα μολυσμένου ατόμου (έλλειψη χρήσης κανόνων ορών υγιεινής) (Nataro and Kaper, 1998).

### **1.6.3 Παθογένεια**

Σύμφωνα με το κέντρο ελέγχου και πρόληψης νοσημάτων (Center for Disease Control and Prevention) η *E. coli* αποτελείται από διάφορα στελέχη. Κάποια από αυτά μπορεί να είναι δυνητικά παθογόνα. Τα παθογόνα στελέχη κατηγοριοποιούνται σε παθότυπους και όσοι σχετίζονται με διάρροιες αναφέρονται ως διαρροϊκοί παθότυποι και χωρίζονται σε έξι ομάδες. Η πιο συχνά απομονωμένη και υπεύθυνη ομάδα στελεχών για τροφολοιμώξεις είναι η Shiga toxin *E. coli* (STEC) που παράγει τη Shiga τοξίνη και μπορεί να αναφέρεται και ως Verotoxin *E. coli* (VTEC) ή ως Enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC). Ο πιο συνηθισμένος ορότυπος αυτής της ομάδας είναι ο O157:H7 και είναι ο ορότυπος που έχει και την μεγαλύτερη θνησιμότητα. Οι άλλες πέντε ομάδες είναι η Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), η Enteropathogenic *E. coli* (EPEC), η Enteroaggregative *E. coli* (EAEC), η Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) και η Diffusely adherent *E. coli* (DAEC) ([www.cdc.gov/ecoli](http://www.cdc.gov/ecoli)).

### **1.6.4 Κρούσματα**

Κάθε χρόνο καταγράφονται επιδημίες που προκαλούνται από διάφορους

παθότυπους *E. coli*. Μέχρι σήμερα για το έτος 2014 έχουν ήδη καταγραφεί σε κάποιες πολιτείες της Αμερικής 12 κρούσματα που σχετίζονται με τον ορότυπο VTEC 0157:H7 και με κατανάλωση όχι καλά ψημένου μοσχαρίσιου κιμά. Το 58% των κρουσμάτων νοσηλεύτηκαν, χωρίς όμως να καταγραφεί κάποιος θάνατος και κανείς δεν εκδήλωσε αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο (HUS). Επίσης σε έξι πολιτείες καταγράφηκαν και άλλα κρούσματα τα οποία συνδέονται με τον ορότυπο VTEC 0121 και με κατανάλωση ωμών φύτρων.

Γενικότερα στην Αμερική καταγράφονται αρκετά συχνά κρούσματα τα οποία συνήθως αφορούν τον ορότυπο VTEC 0157:H7 και κυρίως συνδέονται με την κατανάλωση ακατέργαστων λαχανικών. Μεγάλο ξέσπασμα καταγράφηκε στην Ευρώπη και συγκεκριμένα στην Γερμανία το 2011. Ο υπεύθυνος για το ξέσπασμα ορότυπος ήταν ο O104:H4, ο οποίος είναι εξαιρετικά σπάνιος και φέρει γενετικό υλικό από διάφορους τύπους *E.coli*. Η επιδημία συνδέθηκε με κατανάλωση ακατέργαστων φύτρων. Αναφέρθηκαν 32 θάνατοι και 852 άτομα ανέπτυξαν HUS ([www.cdc.gov/ecoli](http://www.cdc.gov/ecoli)).

## ***1.7 Listeria monocytogenes***

### **1.7.1 Ταξινόμηση και βασικά χαρακτηριστικά**

Το γένος *Listeria* αποτελείται από 7 είδη (*L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L.*

*seeligeri*, *L.innocua*, *L. welshimeri*, *L. martii*, και *L. grayi*) εκ των οποίων τα δύο είναι παθογόνα. Η *L. ivanovii* που μπορεί να προκαλέσει νοσηρότητα κυρίως σε ζώα και σε σπάνιες περιπτώσεις στον άνθρωπο και η *L. monocytogenes* η οποία προκαλεί νοσηρότητα σε ανθρώπους και ζώα ([www.cdc.gov/listeria](http://www.cdc.gov/listeria))

Η *L. monocytogenes* είναι ένας θετικός κατά Gram βάκιλος και απαντάται υπό μορφή μεμονωμένων κυττάρων ή αλυσίδων μικρού μήκους διαστάσεων. Είναι μη σπορογόνο βακτήριο και παρουσιάζει ικανότητα κίνησης σε θερμοκρασία δωματίου (20°-25°C) λόγω των περίτριχων βλεφαρίδων που διαθέτει, ενώ στερείται κίνησης σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 30°C (Peel *et al.*, 1988).

Η *L. monocytogenes* είναι καταλάση θετική, και οξειδάση αρνητική. Είναι ένας αρκετά διαδεδομένος μικροοργανισμός στο περιβάλλον και αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες από -0,4 °C έως και 45 °C, ενώ βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης είναι μεταξύ 30 °C και 37 °C. Παρουσιάζει μια ιδιαίτερη αντοχή σε παράγοντες που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο των βακτηρίων όπως για παράδειγμα αντοχή σε όξινο περιβάλλον και σε περιβάλλον με υψηλή αλατότητα (Warriner και Namvar, 2009). Αναπτύσσεται σε ένα εύρος pH από 5 έως 10 με βέλτιστο από 7 έως 8, αν και έχει βρεθεί ότι μπορεί να επιζήσει ακόμη και σε pH 4.4 (Leverentz, 2003). Σημαντικό ρόλο βέβαια φαίνεται να παίζει ο τύπος του οξέος σε συνδυασμό με την θερμοκρασία. Οργανικά οξέα

όπως το κιτρικό, το οξικό και το λακτικό παρουσιάζουν αντιμικροβιακές ιδιότητες που σχετίζονται όχι μόνο με την πτώση του pH αλλά και με τον βαθμό διάσπασης τους. Σύμφωνα με μία έρευνα των Buchanan *et al.*, (1993) ανασταλτικές ιδιότητες φαίνεται να έχουν στην αδιάσπαστη μορφή τους. Σύμφωνα με τα παραπάνω γίνετε φανερό πως η ανάπτυξη της *L. monocytogenes* ευνοείται σε συνθήκες συντήρησης τροφίμων με αποτέλεσμα να μολύνει συχνά τα τρόφιμα (Farber and Peterkin, 1991). Έχει απομονωθεί κατά καιρούς από γαλακτοκομικά τρόφιμα (Griffiths, 1989), κρέας (Giovannacci *et al.*, 1999), λαχανικά και θαλασσινά (Farber and Peterkin, 1991) καθώς επίσης και από αρκετά επεξεργασμένα τρόφιμα.

### 1.7.2 Λιστερίωση

Η *L. monocytogenes* είναι ο υπεύθυνος μικροοργανισμός που προκαλεί την αρκετά διαδεδομένη ασθένεια λιστερίωση. Η λιστερίωση είναι μια νόσος που μπορεί να αποβεί αρκετά σοβαρή έως και μοιραία προκαλώντας μηνιγγίτιδα, εγκεφαλίτιδά ή σηψαιμία σε ευπαθής ομάδες όπως είναι τα βρέφη και οι ηλικιωμένοι. Επίσης σοβαρά προβλήματα μπορεί να προκαλέσει στους καρκινοπαθείς, στους διαβητικούς, σε άτομα που χρειάζονται αιμοκάθαρση καθώς επίσης και σε άτομα που έχουν κάνει μεταμόσχευση ή σε άτομα που πάσχουν από τον ιό της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV). Αρκετά

σοβαρές επιπλοκές όμως μπορεί να προκαλέσει στα έμβρυα σε γυναίκες κατά την περίοδο κύησης. Οι εγκυμονούσες δε διατρέχουν σοβαρό κίνδυνο, ίσως κάποια ήπια γρίπη όμως κατά την διάρκεια του τρίτου τριμήνου της εγκυμοσύνης είναι πιθανό να μεταδοθεί η ασθένεια στο έμβρυο μέσω του πλακούντα. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε αποβολή, σε πρόωρο τοκετό, σε σοβαρή λοίμωξη του νεογέννητου ή ακόμα και σε γέννηση νεκρού νεογνού (Swaminathan and Gerner-Smidt, 2007).

Γενικότερα η λιστερίωση είναι μια νόσος που εμφανίζεται σποραδικά και τα ξεσπάσματα προκαλούνται συνήθως από μολυσμένα τρόφιμα. Τα τελευταία χρόνια όμως υπάρχει μια ανησυχητική αύξηση των κρουσμάτων και αυτό αποδίδεται είτε σε πραγματική αύξηση είτε στην καλύτερη ανίχνευση και διάγνωση της ασθένειας λόγω καλύτερης τεχνολογίας.

Τα συμπτώματα της ασθένειας ποικίλλουν και συνήθως είναι ήπια όπως μυαλγίες και πυρετός αν και κάποιες φορές επηρεάζεται το γαστρεντερικό σύστημα προκαλώντας ναυτία ή διάρροιες. Σε μεγαλύτερο βαθμό μπορεί να προκαλέσει κεφαλαλγία, σπασμούς ή και έλλειψη ισορροπίας (Say and Bennett, 2005). Ο σημαντικότερος παράγοντας τοξικότητας από το συγκεκριμένο στέλεχος είναι η παράγωγη μιας τοξίνης που ονομάζεται λιστεριολυσίνη (listeriolysin O, LLO). Η LLO είναι μια β-αιμολυσίνη μοριακού βάρους 58 kDa που επιτρέπει στο βακτήριο να επιζήσει στα

φαγοκύτταρα αποδομώντας την διπλή λιπώδη μεμβράνη τους, και επιτρέποντας έτσι την ανάπτυξη του βακτηρίου ενδοκυτταρικά (Birmingham *et al.*, 2008).

Υπάρχουν 13 διαφορετικοί ορότυποι του στελέχους *L. monocytogenes* που μπορούν να προκαλέσουν λιστερίωση στον ανθρώπινο οργανισμό όμως οι συνηθέστεροι που έχουν καταγραφεί κατά καιρούς και δημιούργησαν σοβαρά ξεσπάσματα είναι οι 1/2a, 1/2b και ο 4b.

### 1.7.3 Κρούσματα

Σύμφωνα με το κέντρο ελέγχου και πρόληψης νοσημάτων εκτιμάται ότι προκαλούνται περίπου 1600 νοσήματα και 260 θανάτοι ετησίως στην Αμερική λόγω της λιστερίωσης.

Μέχρι σήμερα το 2014 σε δυο πολιτείες έχουν καταγραφεί ήδη 8 κρούσματα από κατανάλωση προϊόντων τυριού και το ένα από αυτά ήταν θανατηφόρο. Το 2013 σε έξι πολιτείες καταγράφηκαν 6 κρούσματα που σχετίζονται με κατανάλωση τυριού και το ένα από αυτά οδήγησε σε θάνατο ενώ το 2012 αναφέρθηκαν 22 κρούσματα σε δεκατέσσερις πολιτείες εκ των οποίων τα 4 ήταν θανατηφόρα και συνδέθηκαν με κατανάλωση τυριού τύπου ανθότυρο ([www.cdc.gov/listeria](http://www.cdc.gov/listeria))

Στο παρελθόν υπάρχουν πολλές καταγραφές από επιδημίες που έχουν ξεσπάσει

ανά τον κόσμο. εγάλο ξέσπασμα θεωρήθηκε στην Φινλανδία το 1998-1999 από την κατανάλωση βουτύρου σε κάποιες πτέρυγες νοσοκομείου, όπου για πρώτη φορά υπεύθυνος ορότυπος φάνηκε πως ήταν ο 3a. Μολύνθηκαν 25 άτομα και τα 6 δεν επιβίωσαν (Lyytikäinen *et al.*, 2000). Στην Ιταλία το 1993 και το 1997 καταγράφηκαν επιδημίες με 39 και 1556 κρούσματα αντίστοιχα χωρίς Όμως κανέναν θάνατο. Το 1993 η επιδημία προκλήθηκε από ριζοσαλάτα ενώ το 1997 από σαλάτα καλαμποκιού (Chen *et al.*, 2011). Από σοκολατούχο γάλα το 1994 στο Ιλινόις, 45 άτομα εμφάνισαν συμπτώματα γαστρεντερίτιδας με διάρροια και πυρετό. Κανένα δεν οδηγήθηκε στον θάνατο, ενώ αργότερα από ελέγχους έγινε φανερό πως το γάλα επιμολύνθηκε από διαρροή της δεξαμενής. Υπεύθυνος ορότυπος ήταν ο 1/2b (Dalton *et al.*, 1997). Στη Μασαχουσέτη το 1983 μολύνθηκαν 42 ενήλικες καθώς επίσης καταγράφηκαν και 7 προγεννητικές περιπτώσεις, από τον ίδιο ορότυπο και συνδέθηκαν με την κατανάλωση παστεριωμένου γάλατος. Από τα 49 κρούσματα, τα 14 ήταν θανατηφόρα (Fleming *et al.*, 1985). Στον Καναδά το 1980 καταγράφηκαν 41 κρούσματα εκ των οποίων τα 18 ήταν θανατηφόρα και τα 34 αφορούσαν προγεννητικές περιπτώσεις. Η επιδημία συνδέθηκε με κατανάλωση ωμών λαχανικών και ο υπεύθυνος ορότυπος ήταν ο 4b (Schlech and Acheson, 1983).

## **2 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ**

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η εξέταση στελέχους *Lb. kefiri* B6 που απομονώθηκε από κόκκους κεφίρ ως προς τις προβιοτικές του ικανότητες. Επίσης εξετάστηκε ο συμβιωτικός χαρακτήρας του σε μικτή καλλιέργεια μαζί με τα πρεβιοτικά Synergy 1, GOS, Lactulose και Raftilose P95 ως προς τις αντιμικροβιακές του ιδιότητες ενάντια σε δύο παθογόνα στελέχη. Τα παθογόνα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η *Escherichia coli* και η *Listeria monocytogenes*.

### **3 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

#### **3.1 Στελέχη**

Ο *Lactobacillus kefiri* B6 απομονώθηκε από κόκκους κεφίρ και ταυτοποιήθηκε μοριακά. Η αλληλουχία του κατατέθηκε στην ηλεκτρονική βιβλιοθήκη Gen Bank και ο αριθμός αναφοράς που του αποδόθηκε ήταν *Lactobacillus kefiri* KC964538. Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν επίσης τα παθογόνα βακτήρια, *Escherichia coli* O157:H7 NCTC 12900 (VT<sup>-</sup>) και *Listeria monocytogenes* Scott A. Οι καλλιέργειες διατηρήθηκαν στους -70 °C χρησιμοποιώντας Microbank™ cryovials (Pro-Lab Diagnostics, UK) μέχρις ότου χρησιμοποιηθούν.

#### **3.2 Αντοχή σε Όξινο Περιβάλλον**

Το πείραμα διεξήχθη όπως περιγράφεται από τους Likotrafiti *et al.*, (2013) με μικρές τροποποιήσεις. Εν συντομίᾳ, ο *Lb. kefiri* B6 καλλιεργήθηκε σε MRS άγαρ και επωάστηκε αεροβίως στους 37 °C για 48 h. Μια αποικία εμβολιάστηκε σε MRS ζωμό και επωάστηκε κάτω από τις ίδιες συνθήκες όπως περιγράφεται παραπάνω. Ποσότητα 1ml από τον ζωμό ξεπλύθηκε τρεις φορές με φυγοκέντριση (3000 rcf, 15 min, Eppendorf Centrifuge 5418) με διάλυμα Ringer's. Τα καθαρά κύτταρα που έμειναν διαλύθηκαν σε 1ml διαλύματος

Ringer's, σε τελική συγκέντρωση  $10^9$  cfu/ml, και εμβολιάστηκαν σε 9 ml διαλύματος γλυκίνης – υδροχλωρικού οξέως (HCl) προσαρμοσμένο σε pH 3 και 2.2. Το pH ενός διαλύματος 0.05 M γλυκίνης (Sigma-Aldrich, Poole, UK) σε απιονισμένο νερό προσαρμόστηκε με 0.2 M HCl (Sigma-Aldrich, Poole, UK). Τα διαλύματα επωάστηκαν για 2 h στους 37 °C και δείγματα 1ml λαμβάνονταν σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα (πριν τον εμβολιασμό, 15, 30, 45, 60 και 120 λεπτά) αραιώθηκαν δεκαδικά σε διάλυμα Ringer's. Έπειτα 100 μl επιστρώθηκαν σε τρυβλία με MRS ágar και επωάστηκαν στους 37 °C για 48 h. Ακολούθησε καταμέτρηση των αποικιών.

### **3.3 Αντοχή στα Χολικά Άλατα**

Ομοίως το πείραμα διεξήχθη όπως περιγράφεται από Likotrafiti *et al.*, (2013) με κάποιες μικρές τροποποιήσεις. Εν συντομίᾳ, ο *Lb. kefiri* B6 καλλιεργήθηκε, ξεπλύθηκε και ενυδατώθηκε όπως περιγράφεται παραπάνω. Ποσότητα 100 μl εμβολιάστηκε σε 9.9 ml PBS, pH 7.3 (Sigma-Aldrich, Poole, UK) και σε 9.9 ml PBS που περιείχε 0.4% (w/v) χολικά άλατα (Oxgall, Sigma-Aldrich, Poole, UK) και επωάστηκαν στους 37 °C για 6 h. Ποσότητα 1 ml από το δείγμα αραιώθηκε δεκαδικά σε διάλυμα Ringer's και 100 μl επιστρώθηκαν σε τρυβλία με MRS ágar, σε συγκεκριμένες χρονικές περιόδους (πριν και αμέσως μετά

τον εμβολιασμό, 1, 2, 3, 4, 5 και 6 h). Τα τρυβλία επωάστηκαν στους 37 °C για 48 h και οι αποικίες μετρήθηκαν μετά από αυτή τη περίοδο.

### 3.4 Υδατάνθρακες

Πέντε εμπορικά διαθέσιμοι υδατάνθρακες με πρεβιοτικές ιδιότητες εξετάστηκαν ως προς την ικανότητα τους να ενισχύσουν την ανάπτυξη και/ή την δραστηριότητα του *Lb. kefiri* B6. Οι υδατάνθρακες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι φρουκτοολιγοσακχαρίτες [FOS, Raftilose®P95 (93.2 % ολιγοσακχαρίτες, Beneo-Oralfti, Belgium, DP 2-8)], γαλακτοολιγοσακχαρίτες [GOS, Vivinal®, (59% ολιγοσακχαρίτες, 19% γλυκόζη, 21% λακτόζη, 1 % γαλακτόζη), FrieslandCampina Domo, Ολλανδία], λακτουλόζη (TCI, Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., Τόκυο, Ιαπωνία) και Synergy 1 (92% ινουλίνη, Beneo-Oralfti, Belgium, DP 2-8) και η γλυκόζη χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας. Όλα τα πρεβιοτικά λήφθηκαν σε μορφή σκόνης με εξαίρεση το GOS που ήταν σιρόπι. Αραιώθηκαν κατάλληλα με αποσταγμένο νερό, αποστειρώθηκαν με διήθηση και αποθηκεύτηκαν στους 4 °C για πέντε ημέρες.

### **3.4.1 Προσδιορισμός του ρυθμού ανάπτυξης με διαφορετικούς υδατάνθρακες**

Κάθε ένα από τα βακτηριακά στελέχη επιστρώθηκε σε τρυβλία με MRS άγαρ για τον *Lb. kefiri* B6 και σε Wilkins-Chalgren άγαρ (WC, Oxoid, Basingstoke, UK) για την *E. coli* και την *L.monocytogenes* και επωάστηκαν στους 37 °C για 48 h. Μία αποικία από κάθε τρυβλίο χρησιμοποιήθηκε για τον ενοφθαλμισμό 9 ml αποστειρωμένου ζωμού (121 °C for 15 min) Peptone-Yeast extract (PY, pH 7.2). Ο ζωμός PY παρασκευάστηκε χρησιμοποιώντας: 5 g πεπτονούχο νερό, 5 g τρυπτόνη, 10 g εκχύλισμα ζυμών, 40 ml διάλυμα αλάτων [(0.2 g άνυδρο CaCl<sub>2</sub>, 0.2 g MgSO<sub>4</sub>, 1 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 g NaHCO<sub>3</sub>, 2 g NaCl σε 1 L αποσταγμένο νερό) Merck, Darmstadt, Germany] και 0.2 ml διαλύματος βιταμίνης K<sub>1</sub> [0.15 ml βιταμίνη K<sub>1</sub> διαλυμένη σε 30 ml αιθανόλης 95% (Sigma-Aldrich, Poole, UK)]. Ποσότητα 1 ml από διάλυμα 10% (w/v) του κατάλληλου αποστειρωμένου με φίλτρο υδατάνθρακα προστέθηκε σε κάθε ζωμό και επωάστηκε στους 37 °C για 24 h. Έπειτα ποσότητα 200 μl καλλιέργειας μεταφέρθηκε σε 18 ml αποστειρωμένου ζωμού PY που περιείχε 2 ml διαλύματος 10% (w/v) του κάθε υδατάνθρακα και τοποθετήθηκε σε αναδευόμενο επωαστικό κλίβανο. Δείγματα 1 ml λαμβάνονταν σε συγκεκριμένες χρονικές περιόδους (0, 2, 3, 4, 5, 6, 8 και 24 h) και η ανάπτυξη

τους μετρήθηκε μέσω της οπτικής πυκνότητας σε φασματοφωτόμετρο στα 660 nm (Helios Alpha, Loughborough, UK). Κάθε δείγμα εξετάστηκε εις τριπλούν.

### 3.5 Αντιμικροβιακή Δραστηριότητα Συμβιωτικών

Τα βακτηριακά στελέχη προετοιμάστηκαν όπως περιγράφεται παραπάνω.

Ποσότητα 100 μl από τον *Lb. kefiri* B6 και από κάθε παθογόνο αντίστοιχα (*E. coli* και *L. monocytogenes*) μεταφέρθηκαν σε 90 ml αποστειρωμένου ζωμού PY που περιείχε 10 ml διαλύματος 10% (w/v) από τον κάθε αποστειρωμένο με φίλτρο υδατάνθρακα και τοποθετήθηκαν σε αναδευόμενο επωαστικό κλίβανο στους 37 °C για 24 h. Η ανάπτυξη προσδιορίστηκε με την αρίθμηση των αποικιών σε εκλεκτικά στερεά υποστρώματα σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα (0, 4, 8, 12, 24 h). Ποσότητες 1 ml λήφθηκαν, αραιώθηκαν δεκαδικά σε διάλυμα Ringer's και 100 μl επιστρώθηκαν σε MRS ágar για τον *L. kefiri* B6, σε Sorbitol MacConkey (Lab M, Heywood, UK) για την *E. coli* και σε Oxford Listeria Selective ágar (Merck, Darmstadt, Germany) για την *L. monocytogenes*. Παράλληλα, 100 μl από κάθε παθογόνο εμβολιαστήκαν σε 90 ml αποστειρωμένου ζωμού PY που περιείχε 10 ml διαλύματος 10% (w/v) από τον κάθε αποστειρωμένο με φίλτρο υδατάνθρακα και χρησιμοποιήθηκαν ως

μάρτυρες. Διατηρήθηκαν κάτω από τις ίδιες συνθήκες. Όλα τα τρυβλία επωάστηκαν στους 37 °C. Τα τρυβλία με MRS και Oxford Listeria Selective άγαρ επωάστηκαν για 48h ενώ τα τρυβλία με Sorbitol MacConkey άγαρ επωάστηκαν για 24 h. Ποσότητα 1ml λαμβάνονταν από κάθε δείγμα στα συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα για μέτρηση του pH.

### **3.6 Στατιστική Ανάλυση**

Για κάθε πειραματική διαδικασία, έγιναν δύο πειράματα με δύο επαναλήψεις εκτός αν αναφέρεται διαφορετικά. Για τον υπολογισμό των βακτηρίων, χρησιμοποιήθηκε ο μέσος όρος των δύο επαναλήψεων από κάθε αραίωση. Η επιλογή του κατάλληλου τρυβλίου που χρησιμοποιήθηκε για την καταμέτρηση, έγινε με βάση τον αριθμό των αποικιών στο τρυβλίο. Ο αριθμός των αποικιών στα τρυβλία που επιλέχθηκαν ήταν μεταξύ 30 και 300. Οι μικροβιολογικές μετρήσεις μετατράπηκαν σε λογαρίθμους και υπολογίστηκαν οι μέσες τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις. Τα δεδομένα των μικροβιολογικών αναλύσεων αξιολογήθηκαν με Microsoft Office Excel 2007 για τον προσδιορισμό διαφορών σε επίπεδο σημαντικότητας  $p<0.05$  και  $p<0.01$ .

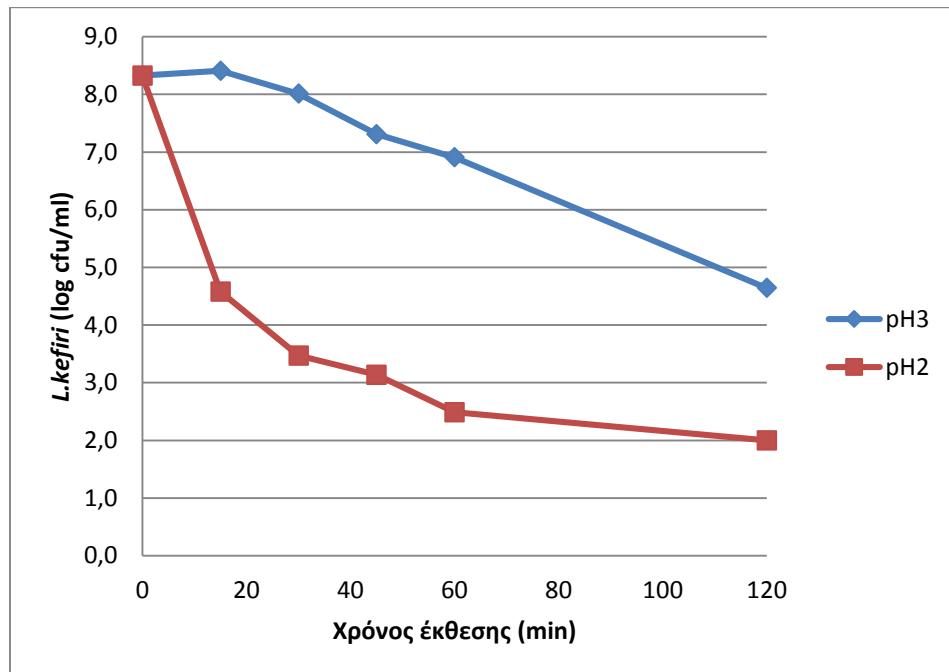
## **4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

### **4.1 Αντοχή σε Χολικά Άλατα και Οξέα**

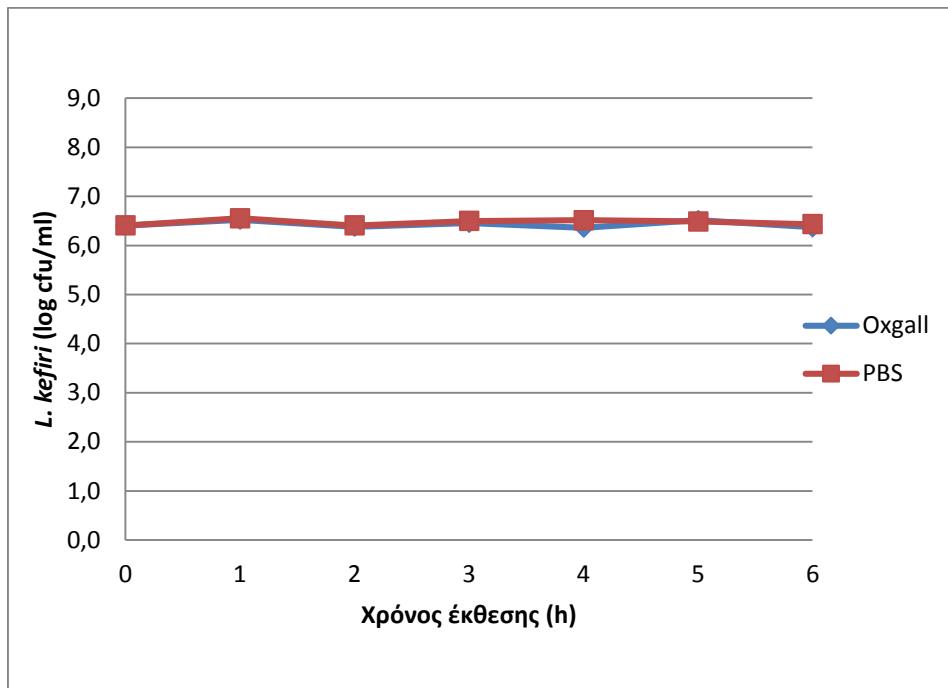
Ο *Lb. kefīri* B6 εξετάστηκε *in vitro* για την ικανότητα επιβίωσης του στην έκθεση σε οξέα και χολικά άλατα. Στο πείραμα για την αντοχή του στα οξέα, το μικροβιακό φορτίο του *Lb. kefīri* άρχισε να μειώνεται σταδιακά κατά τη διάρκεια 120 λεπτών σε pH 3. Παρατηρήθηκε σημαντική ( $P<0.05$ ) μείωση του πληθυσμού του *Lb. kefīri* σε σχέση με τον χρόνο 0 μετά από 45 λεπτά πειράματος. Μετά από 120 λεπτά πειράματος ο πληθυσμός του *Lb. kefīri* μειώθηκε κατά 3.7 log cfu/ml σε σχέση με τον αρχικό εμβολιασμό που ήταν 8.3 log cfu/ml. Στο pH 2 παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική ( $P<0.05$ ) μείωση του πληθυσμού του *Lb. kefīri* κατά 3.7 log cfu/ml μετά από 15 λεπτά πειράματος σε σχέση με τον χρόνο 0 που έγινε ο εμβολιασμός και ο πληθυσμός του *Lb. kefīri* ήταν 8.3 log cfu/ml. Στα υπόλοιπα 105 λεπτά πειράματος η μείωση ήταν σταδιακή με μείωση του πληθυσμού του *Lb. kefīri* κατά 6.3 log cfu/ml σε σχέση με τον αρχικό εμβολιασμό. Η διαφορά του βακτηριακού πληθυσμού μεταξύ pH 2 και pH 3 ήταν σημαντική ( $P<0.05$ ) σε όλα τα χρονικά σημεία.

Ο πληθυσμός του *Lb. kefīri* δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά ( $P<0.05$ ) όταν εμβολιάστηκε σε PBS με προσθήκη 0,4% (w/v) χολικών αλάτων σε σχέση με το μάρτυρα (PBS χωρίς προσθήκη χολικών αλάτων). Ο

πληθυσμός παρέμεινε σε 6.4 log cfu/ml σε όλη τη διάρκεια του πειράματος (6 ώρες). Στο παρακάτω σχήμα δίνονται τα αποτελέσματα της επιβίωσης του *Lb.kefiri* κατά την παραμονή του σε όξινο περιβάλλον σε pH 2 και pH 3.



**Σχήμα 1.** Διακύμανση του πληθυσμού του *Lb.kefiri* B6 κατά την παραμονή του σε pH 2 και pH 3.



**Σχήμα 2.. Διακύμανση του πληθυσμού του *Lb.kefiri* B6 κατά την παραμονή του σε PBS με 0,4% (w/v) συγκέντρωση χολικών αλάτων και σε PBS χωρίς χολικά άλατα (μάρτυρα) σε σχέση με τονχρόνο έκθεσης.**

#### 4.2 Προσδιορισμός του Ρυθμού Ανάπτυξης σε Διαφορετικά Υποστρώματα Υδατανθράκων

Ο ρυθμός ανάπτυξης του *Lb. kefiri* B6, της *L. monocytogenes* και της *E. coli* O157:H7 σε υπόστρωμα με προσθήκη διαφορετικών υδατανθράκων φαίνεται στον **Πίνακα 1.** Στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $P<0.01$ ) στην ανάπτυξη της

*L. monocytogenes* και του *Lb. kefiri* B6 στα διαφορετικά υποστρώματα παρατηρήθηκαν σε μεμονωμένα χρονικά σημεία, αλλά δεν ήταν σταθερά σε όλα τα χρονικά σημεία σημειώνοντας ότι το συνολικό ποσοστό της ανάπτυξης δεν διέφερε μεταξύ υδατανθράκων. Η ανάπτυξη και των δυο παθογόνων βακτηρίων ήταν σημαντικά ( $P<0.01$ ) μειωμένη στα περισσότερα χρονικά σημεία μεταξύ της 1-8 ώρες όταν καλλιεργήθηκαν με λακτουλόζη σε σχέση με τη γλυκόζη. Παρόλα αυτά μετά από 24 ώρες οι καλλιέργειες και των δυο παθογόνων με όλα τα πρεβιοτικά έδειξαν μεγαλύτερη οπτική πυκνότητα από ότι οι έλεγχοι με γλυκόζη. Αυτή η διαφορά δεν παρατηρήθηκε στις καλλιέργειες με GOS. Κατά τις πρώτες 8 ώρες πειράματος η ανάπτυξη του *Lb. kefiri* B6 σε GOS και Raftilose P95 δε διέφερε σημαντικά από αυτή σε γλυκόζη. Η ανάπτυξη σε Synergy 1 και λακτουλόζη ήταν χαμηλότερη από αυτή σε γλυκόζη τις πρώτες 4 ώρες πειράματος ενώ μετά από αυτό το χρονικό σημείο ήταν υψηλότερη σε σχέση με τη γλυκόζη και για το υπόλοιπο του πειράματος. Μετά από 24 ώρες πειράματος οι καλλιέργειες με Synergy 1, GOS και λακτουλόζη έδειξαν σημαντικά μεγαλύτερη απορρόφηση σε σχέση με τη γλυκόζη.

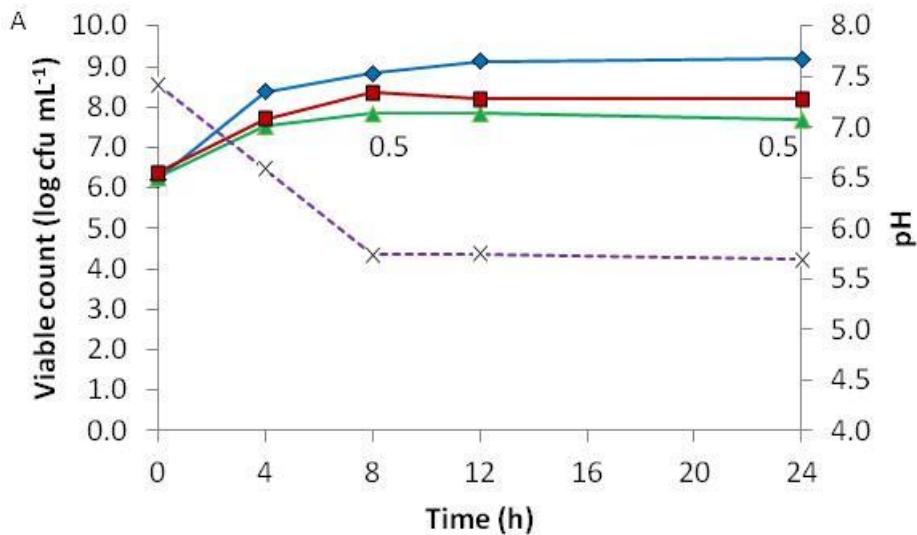
**Πίνακας 1.** Ανάπτυξη της *Listeria monocytogenes* Scott A, *Escherichia coli* O157:H7 και *Lactobacillus kefiri* B6 σε διαφορετικούς υδατάνθρακες. Μέσοι όροι (n=3) απορρόφησης σε 660 nm. Τα μικρά γράμματα δείχνουν σημαντικές (P<0.01) διαφορές μεταξύ των υδατανθράκων για τον ίδιο οργανισμό και χρονικό σημείο.

Time (h)	Carbohydrate	<i>L. monocytogenes</i>	<i>E. coli</i>	<i>L. kefiri</i> B6
0	Synergy	0.03 a	0.02 a	0.02 a
	GOS	0.01 a	0.01 a	0.02 a
	Lactulose	0.02 a	0.02 a	0.01 a
	P95	0.02 a	0.01 a	0.02 a
	Glucose	0.02 a	0.01 a	0.02 a
2	Synergy	0.20 a	0.31 a	0.10 a
	GOS	0.18 a	0.22 a	0.10 a
	Lactulose	0.22 ab	0.23 a	0.09 a
	P95	0.28 b	0.25 a	0.10 a
	Glucose	0.16 a	0.27 a	0.11 a
3	Synergy	0.61 ab	0.63 a	0.32 a
	GOS	0.56 a	0.56 b	0.35 a
	Lactulose	0.56 ab	0.50 c	0.23 b
	P95	0.71 b	0.56 abc	0.34 a
	Glucose	0.54 ab	0.63 ab	0.36 a
4	Synergy	0.96 ab	0.82 ab	0.65 ac
	GOS	0.91 a	0.81 a	0.97 b
	Lactulose	0.80 b	0.70 b	0.58 c
	P95	0.95 ab	0.76 ab	0.75 c
	Glucose	0.91 ab	0.86 a	0.99 bc
5	Synergy	1.08 ab	0.89 a	1.19 a
	GOS	1.01 a	0.88 ab	1.02 ab
	Lactulose	0.89 b	0.73 b	1.21 ab
	P95	1.02 a	0.83 a	1.15 ab
	Glucose	1.02 ab	0.91 a	1.08 b
6	Synergy	1.18 ab	0.94 ac	1.19 a
	GOS	1.06 ab	0.91 a	1.06 a
	Lactulose	0.99 a	0.76 b	1.30 a
	P95	1.13 ab	0.89 ac	1.16 a
	Glucose	1.11 b	0.96 c	1.06 a
8	Synergy	1.36 a	1.05 a	1.20 a
	GOS	1.27 a	0.98 b	1.09 ac
	Lactulose	1.21 a	0.86 c	1.39 b
	P95	1.37 a	1.05 ab	1.16 ac
	Glucose	1.24 a	1.01 ab	1.08 c
24	Synergy	2.07 ab	1.56 ab	1.16 a
	GOS	1.53 ac	1.38 a	1.27 b
	Lactulose	2.00 b	1.59 b	1.34 b
	P95	2.00 b	1.60 ab	1.07 c
	Glucose	1.26 c	1.05 c	1.02 c

### **4.3 Ανταγωνισμός Μεταξύ των Συμβιωτικών και των Παθογόνων**

Η ανάπτυξη της *L. monocytogenes* και της *E. coli* σε καθαρή καλλιέργεια και σε μικτή καλλιέργεια (co-culture) μαζί με τον *Lb. kefiri* B6 χρησιμοποιώντας τέσσερα διαφορετικά πρεβιοτικά ως υποστρώματα φαίνεται στα παρακάτω σχήματα. Η συνολική αύξηση του πληθυσμού του *Lb. kefiri* B6 κυμάνθηκε από 2.7 έως 3.4 log cfu/ml. Διαφορές μεταξύ της ανάπτυξης των παθογόνων σε καθαρή καλλιέργεια και σε μεικτή καλλιέργεια εξετάστηκαν και θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές ( $P<0.05$ ) αν η μεταβολή του πληθυσμού ήταν ίση και μεγαλύτερη από 0.5 log cfu/ml.

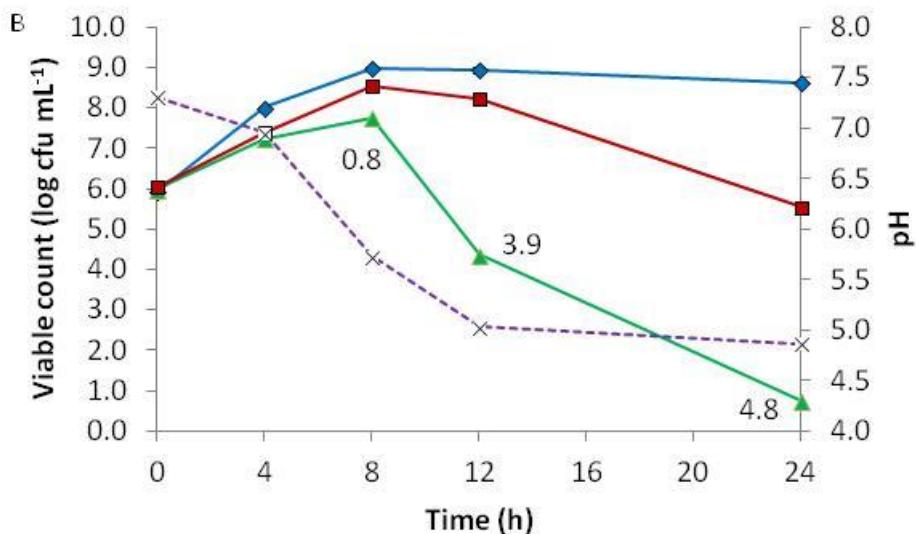
Στην καλλιέργεια που χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα το πρεβιοτικό Synergy 1 (**Σχήμα 3**) ο πληθυσμός της *L. monocytogenes* ήταν οριακά χαμηλότερος (0.5 cfu/ml) στα χρονικά σημεία 8 και 24h όταν καλλιεργήθηκε μαζί με τον *Lb. kefiri* B6 σε σχέση με την ανάπτυξη της σε καθαρή καλλιέργεια (control). Και στις δύο καλλιέργειες ο πληθυσμός της *L. monocytogenes*, έφτασε στη μέγιστη ανάπτυξη μετά από 8 ώρες και δε μειώθηκε μετέπειτα. Το pH στην αρχή του πειράματος ήταν 7.4 και μετά από 8 ώρες μειώθηκε στο 5.7 όπου και παρέμεινε για όλη την υπόλοιπη διάρκεια του πειράματος.



**Σχήμα 3.** Ανάπτυξη της *L. monocytogenes* σε PY ζωμό με προσθήκη 1% (w/v) πρεβιοτικού Synergy 1 σε καθαρή καλλιέργεια ■ και σε μικτή καλλιέργεια ▲ με τον *Lb. kefiri* B6 ♦. Η τιμή του pH συμβολίζεται με διακεκομμένες γραμμές.

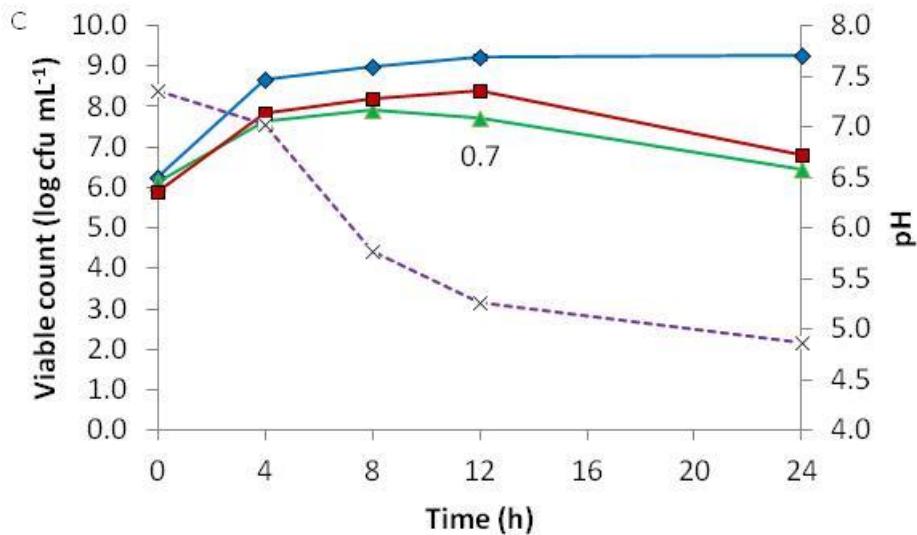
Αρκετά μεγάλη διαφορά παρατηρήθηκε όταν η *L. monocytogenes* καλλιεργήθηκε χρησιμοποιώντας ως πρεβιοτικό το GOS (**Σχήμα 4**). Στη μικτή καλλιέργεια η *L. monocytogenes* αυξήθηκε από 6.0 log cfu/ml σε 7.7 log cfu/ml μετά από 8 ώρες πειράματος και μειώθηκε σε 0.8 log cfu/ml μετά από 24 ώρες πειράματος. Μικρότερη μείωση παρατηρήθηκε στην καθαρή καλλιέργεια, που έφτασε στο μέγιστο πληθυσμό 8.5 log cfu/ml σε 8 ώρες και

έπειτα μειώθηκε σε 5.6 log cfu/ml μετά από 24 ώρες. Στις δυο καλλιέργειες παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά ( $P<0.05$ ) στις μετρήσεις από τις 8 ώρες και μέχρι το τέλος του πειράματος. Το pH στην έναρξη του πειράματος ήταν περίπου 7 ενώ μετά από 8 ώρες πειράματος μειώθηκε σε 5.6 και μετά από 24 ώρες μειώθηκε περίπου στο 5.



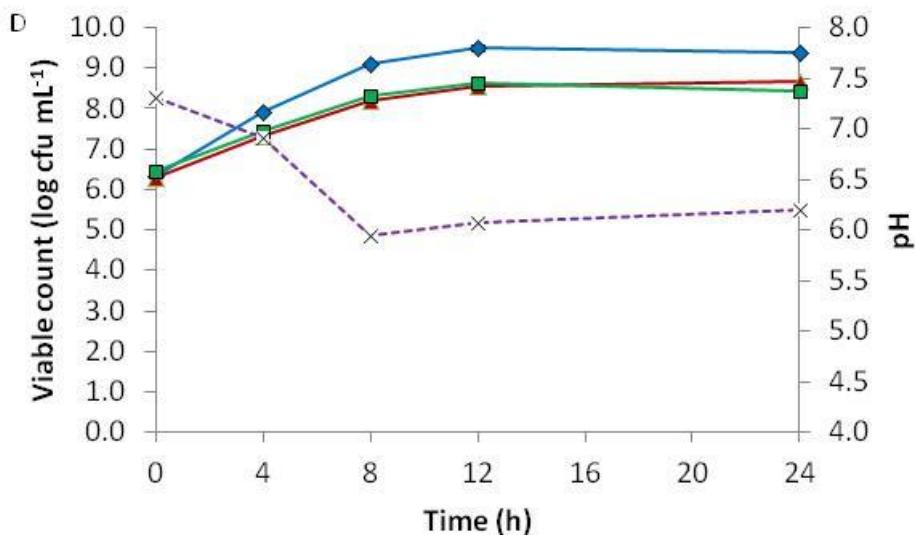
**Σχήμα 4.** Ανάπτυξη της *L. monocytogenes* σε PY ζωμό με προσθήκη 1% (w/v) πρεβιοτικού GOS σε καθαρή καλλιέργεια ■ και σε μικτή καλλιέργεια ▲ με τον *Lb. kefiri* B6 ♦. Η τιμή του pH συμβολίζεται με διακεκομμένες γραμμές.

Όταν χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα το πρεβιοτικό lactulose ο πληθυσμός της *L. monocytogenes* μειώθηκε από 24 ώρες πειράματος αφού έφτασε στο μέγιστο πληθυσμό μετά από 8 ή 12 ώρες πειράματος. Αυτή η μείωση ξεκίνησε νωρίτερα στη μικτή καλλιέργεια, με αποτέλεσμα μια διαφορά της τάξης των 0.7 log cfu/ml μεταξύ του πληθυσμού της καθαρής και της μικτής καλλιέργειας στις 12 ώρες (**Σχήμα 5**). Το pH μειώθηκε σταδιακά καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος και μετά από 24 ώρες η τιμή του μειώθηκε σε pH 4.9.



**Σχήμα 5.** Ανάπτυξη της *L. monocytogenes* σε PY ζωμό με προσθήκη 1% (w/v) πρεβιοτικού Lactulose σε καθαρή καλλιέργεια ■ και σε μικτή καλλιέργεια ▲ με τον *Lb. kefiri* B6 ◆. Η τιμή του pH συμβολίζεται με διακεκομμένες γραμμές.

Δεν παρατηρήθηκε καμία αλλαγή στην ανάπτυξη της *L. monocytogenes* μεταξύ καθαρής και μικτής καλλιέργειας, όταν χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα το πρεβιοτικό Raftilose P95 (**Σχήμα 6**).

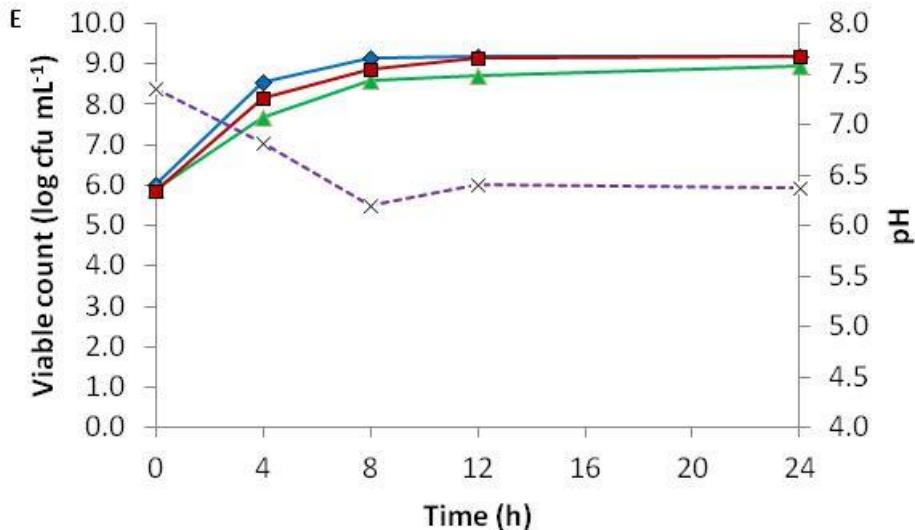


**Σχήμα 6.** Ανάπτυξη της *L. monocytogenes* σε PY ζωμό με προσθήκη 1% (w/v) πρεβιοτικού Raftilose P95 σε καθαρή καλλιέργεια ■ και σε μικτή καλλιέργεια ▲ με τον *Lb. kefiri* B6 ♦. Η τιμή του pH συμβολίζεται με διακεκομμένες γραμμές.

Η ανάπτυξη της *E. coli* σε μικτή καλλιέργεια, δεν επηρεάστηκε ιδιαίτερα από την παρουσία διαφορετικών πρεβιοτικών.

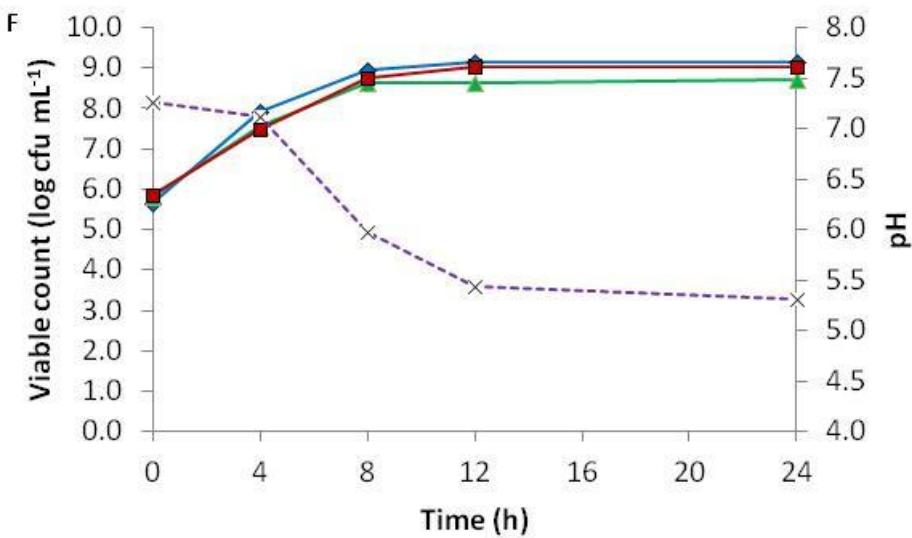
Στο **Σχήμα 7** φαίνεται η ανάπτυξη της *E. coli* σε καθαρή και μικτή καλλιέργεια με τον *Lb. kefiri* B6 σε θρεπτικό υπόστρωμα εμπλουτισμένο με το πρεβιοτικό Synergy 1. Υπάρχει μια μικρή διαφορά στην ανάπτυξη της *E. coli* σε καθαρή καλλιέργεια που ανέρχεται σε 8.7 log cfu/ml μέγιστη ανάπτυξη

μετά από 12 ώρες, συγκριτικά με την ανάπτυξη της σε καθαρή καλλιέργεια που ανέρχεται σε 9,1 log cfu/ml μέγιστη ανάπτυξη στο ίδιο χρονικό διάστημα. Η ανάπτυξη του *Lb. kefiri* B6 είναι παρόμοια με αυτή του παθογόνου μικροοργανισμού. Το pH στην αρχή του πειράματος ήταν 7.4 ενώ μετά από 24 ώρες πειράματος μειώθηκε κατά μία μονάδα στο 6.4.



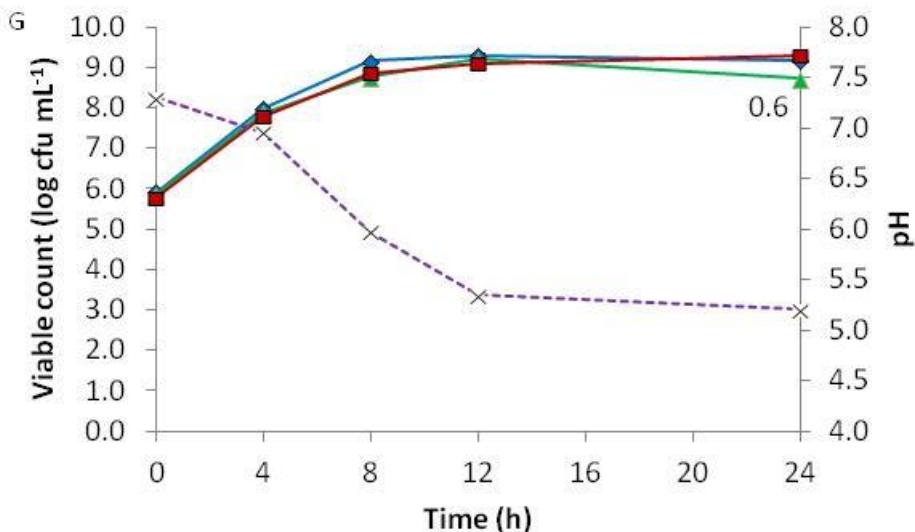
**Σχήμα 7.** Ανάπτυξη της *E. coli* σε PY ζωμό με προσθήκη 1% (w/v) πρεβιοτικού Synergy 1 σε καθαρή καλλιέργεια ■ και σε μικτή καλλιέργεια ▲ με τον *Lb. kefiri* B6 ♦. Η τιμή του pH συμβολίζεται με διακεκομμένες γραμμές.

Τα αποτελέσματα είναι παρόμοια όταν χρησιμοποιήθηκε ως πρεβιοτικό το GOS (**Σχήμα 8**). Η μέγιστη ανάπτυξη της *E. coli* σε μικτή καλλιέργεια είναι σχετικά χαμηλότερη συγκριτικά με την καθαρή καλλιέργεια, και περίπου ίδια με την ανάπτυξη του *Lb. kefiri B6*. Η διαφορά που παρατηρείται σε αυτή την καλλιέργεια είναι στις τιμές του pH, που στην αρχή του πειράματος ήταν 7.3 ενώ στο τέλος μειώθηκε κατά δύο μονάδες φτάνοντας το 5.3.



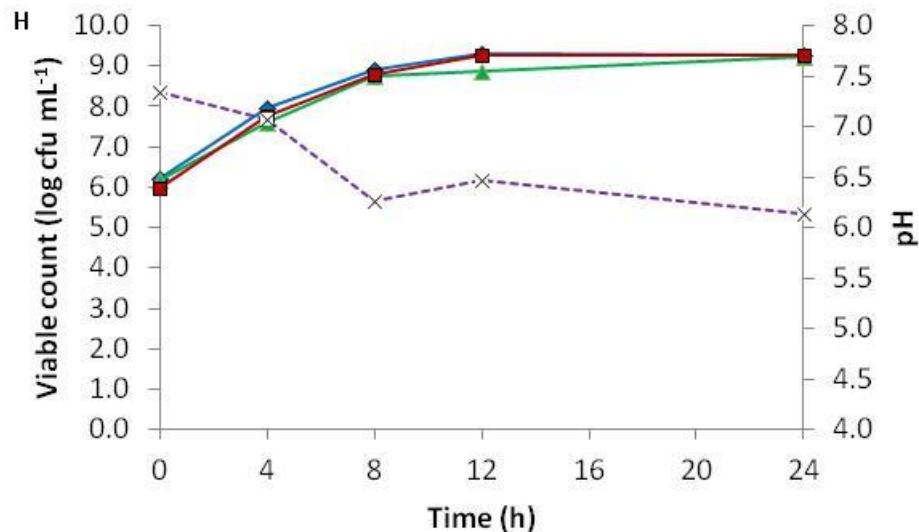
**Σχήμα 8.** Ανάπτυξη της *E. coli* σε PY ζωμό με προσθήκη 1% (w/v) πρεβιοτικού GOS σε καθαρή καλλιέργεια ■ και σε μικτή καλλιέργεια ▲ με τον *Lb. kefiri B6* ♦. Η τιμή του pH συμβολίζεται με διακεκομμένες γραμμές.

Στη μικτή καλλιέργεια που χρησιμοποιήθηκε η Lactulose (**Σχήμα 9**) η ανάπτυξη των μικροοργανισμών είναι παρόμοια για την *E. coli* συγκριτικά με την ανάπτυξη που παρουσίασε σε καθαρή καλλιέργεια. Σημαντική μείωση του pH παρατηρήθηκε μετά από 24 ώρες (5.2) σε σχέση με την έναρξη του πειράματος (7.3).



**Σχήμα 9.** Ανάπτυξη της *E. coli* σε PY ζωμό με προσθήκη 1% (w/v) πρεβιοτικού Lactulose σε καθαρή καλλιέργεια ■ και σε μικτή καλλιέργεια ▲ με τον *Lb. kefiri* B6 ♦. Η τιμή του pH συμβολίζεται με διακεκομμένες γραμμές.

Η ανάπτυξη της *E. coli* δεν επηρεάστηκε από την παρουσία του πρεβιοτικού Raftilose P95 και του *Lb. kefiri B6* σε σχέση με τον έλεγχο. Όπως φαίνεται και στο **Σχήμα 10**, η διαφορά της ανάπτυξης της *E. coli* μεταξύ καθαρής καλλιέργειας και μικτής είναι  $0,4 \log \text{cfu/ml}$ . Η ανάπτυξη του *Lb. kefiri B6* ήταν παρόμοια, ενώ το pH μειώθηκε κατά μία μονάδα μετά από 24 ώρες.



**Σχήμα 10.** Ανάπτυξη της *E. coli* σε PY ζωμό με προσθήκη 1% (w/v) πρεβιοτικού Raftilose P95 σε καθαρή καλλιέργεια ■ και σε μικτή καλλιέργεια ▲ με τον *Lb. kefiri B6* ♦. Η τιμή του pH συμβολίζεται με διακεκομμένες γραμμές.

Η αλλαγή στις τιμές του pH κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των καλλιεργειών διέφερε ανάλογα με τον υδατάνθρακα που χρησιμοποιήθηκε. Όταν χρησιμοποιήθηκε το Synergy 1 και το Raftilose P95, το pH έπεσε τις πρώτες 8 ώρες και μετά σταθεροποιήθηκε, ενώ όταν χρησιμοποιήθηκαν GOS και lactulose η πτώση συνεχίστηκε μέχρι και τις και τις 12 ώρες. Οι χαμηλότερες τιμές που καταγράφηκαν ήταν pH 5.7 για το Synergy 1, 4.9 για το GOS και την lactulose, 5.9 για την Raftilose P95.

## 5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σκοπός αυτής της διατριβής ήταν η μελέτη του στελέχους *Lb. kefiri* B6, απομονωμένου από κόκκους κεφίρ, ως προς τις προβιοτικές και αντιμικροβιακές του ιδιότητες και η δημιουργία ενός συμβιωτικού, επιλέγοντας τον πρεβιοτικό που ενίσχυε την καλύτερη ανάπτυξη του προβιοτικού, με ενισχυμένη αντιμικροβιακή δράση.

Έχουν γίνει αρκετές έρευνες όσον αφορά την επιβίωση διαφορετικών στελεχών *Lactobacillus*, σε διαφορετικές τιμές pH αλλά από όσο γνωρίζουμε δεν υπάρχουν τέτοια δεδομένα συγκεκριμένα για τον *Lb. kefiri*. Πολλές από τις έρευνες που έχουν γίνει όσον αφορά την ανθεκτικότητα σε όξινο περιβάλλον χρησιμοποιούν διαφορετικές συγκεντρώσεις, χρόνο έκθεσης και πειρατικά μοντέλα, που κάνουν δύσκολη τη σύγκριση των αποτελεσμάτων των διαφορετικών υπό μελέτη προβιοτικών μικροοργανισμών όσον αφορά την ανθεκτικότητά τους σε οξέα. Η επιβίωση των μικροοργανισμών κατά τη διέλευση τους από το στομάχι εξαρτάται από την αντοχή τους στα γαστρικά υγρά. Λόγω εκκρίσεων υδροχλωρικού οξέος, η τιμή στο pH του στομάχου είναι περίπου 0.9, κατά τη διάρκεια όμως κατανάλωσης τροφής αυτή η τιμή ανεβαίνει περίπου στο 3, αν και εξαρτάται από το είδος του τροφίμου. Η

διάρκεια παραμονής του τροφίμου στο στομάχι είναι περίπου 2 έως 4 ώρες (Erkkila and Petaja, 2000). Η ικανότητα των προβιοτικών μικροοργανισμών να επιζούν μετά την διέλευση τους από τον εντερικό σωλήνα ποικίλλει και εξαρτάται από τα βακτηριακά στελέχη (Vinderola and Reinheimer, 2003).

Η ανθεκτικότητα σε όξινο περιβάλλον επηρεάζεται από τις συνθήκες καλλιέργειας των κυττάρων καθώς και τη φάση ανάπτυξής τους πριν χρησιμοποιηθούν σε πειράματα μελέτης σε όξινο περιβάλλον (Ampatzoglou *et al.*, 2010)

Οι Succi *et al.*, (2005) εξέτασαν την επιβίωση στελεχών του *Lb. rhamnosus* σε pH 2 και 3 και παρατήρησαν απώλειες στη βιωσιμότητα μετά από 2 ώρες έκθεσης της τάξης των 2-3 log cfu/ml σε pH 3 και 4-7 log cfu/ml σε pH 2 ανάλογα με το στέλεχος. Οι Bujnakova *et al.*, (2013) εξέτασαν την ικανότητα 20 στελεχών *Lactobacillus* να επιζήσουν σε pH 2.5 για 4 ώρες. Παρατήρησαν μείωση των πληθυσμών που κυμαινόταν από 0.9 εώς 3.5 log cfu/ ml.

Οι Xanthopoulos *et al.*; (2000), αναφέρουν ότι από 20 στελέχη *Lactobacillus* που απομόνωσαν από τα κόπρανα νεογνών, μόνο τρία στελέχη *Lb.paracasei* και ένα *Lb.rhamnosus* έμειναν σχεδόν ανεπηρέαστα από το χαμηλό pH. Σε εργασία που έγινε για την αντοχή των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε χαμηλό pH, απομονωμένων από λουκάνικα, αναφέρθηκε πως μόνο ένα στέλεχος *Lb.*

*curvatus* και δύο στελέχη *Pediococcus* spp άντεξαν σε pH 3 (Erkkila and Petaja, 2000). Καλή αντοχή σε όξινο περιβάλλον έδειξε στέλεχος του *Lb. fermentum*. Σε έρευνα που έγινε από τους Likotrafiti *et al.*, (2013), ο πληθυσμός στελέχους *Lb. fermentum* παρέμεινε σταθερός σε pH 3 για 2 ώρες, ενώ σε έρευνα των Pereira και Gibson (2002) αναφέρθηκε καλή αντίσταση και επιβίωση στελέχους *Lb. fermentum* σε pH 2 για 2 ώρες.

Οι παραπάνω έρευνες δείχνουν ότι ο *Lb. kefiri* B6 που εξετάστηκε στη παρούσα διατριβή έδειξε αντοχή σε όξινο περιβάλλον αλλά δεν θα χαρακτηριζόταν ως οξεάντοχος. Αυτό είναι ένα μειονέκτημα για ένα δυνητικό προβιοτικό αλλά η *in vitro* μελέτη της ανθεκτικότητας σε οξέα μπορεί να μας δώσει εν μέρει δεδομένα σχετικά με την ικανότητα των βακτηρίων που καταναλώνουμε μέσω της τροφής να επιζήσουν τα όξινα υγρά στο στομάχι. Μια σημαντική παράμετρος είναι το τρόφιμο με το οποίο θα καταναλωθούν αυτά τα βακτήρια. Ορισμένα συστατικά των τροφίμων όπως τα λίπη, μπορούν να προστατεύσουν τα ζωντανά βακτήρια από τα οξέα του στομάχου (Conway *et al.*, 1987). Αυτό το προστατευτικό αποτέλεσμα μπορεί να ενισχυθεί με εφαρμογές και τεχνολογίες ενθυλάκωσης (Chávarri *et al.*, 2010).

Ο *Lb. kefiri* B6 έδειξε ότι ήταν ανθεκτικός στη συγκέντρωση 0.4% (w/v) Oxgall (~ 5.6 mM συζευγμένα χολικά οξέα). Αυτή η συγκέντρωση χολικών

αλάτων είναι μεγαλύτερη από αυτή που υπάρχει στο λεπτό έντερο [2.8 – 4.0 mM σύμφωνα με τους Corzo and Gilliland (1999)], άρα το συγκεκριμένο στέλεχος δεν θα επηρεαζόταν από την παρουσία χολικών αλάτων *in vivo* εκτός αν άλλοι συνεργιστικοί παράγοντες, όπως πεπτικά ένζυμα, επηρέαζαν την ευαισθησία των βακτηρίων.

Αρκετές έρευνες έχουν γίνει για την αντοχή των μικροοργανισμών στα χολικά άλατα, όχι μόνο γιατί είναι από τα σημαντικότερα κριτήρια για να χαρακτηριστούν ως προβιοτικά αλλά επειδή παρουσιάζονται διαφορές στην ανάπτυξη και στην αντίσταση μεταξύ ειδών και στελεχών (Vinderola and Reinheimer, 2003).

Ο ρυθμός ανάπτυξης των βακτηρίων δεν επηρεάστηκε γενικότερα από την αντικατάσταση της γλυκόζης με πρεβιοτικά στο ζωμό καλλιέργειας. Πολλοί λακτοβάκιλοι αναπτύσσονται ελάχιστα απουσία υδατάνθρακα (Goderska *et al.*, 2008) και το υπό μελέτη στέλεχος εμφάνισε ελάχιστη ανάπτυξη ή και καθόλου στο ζωμό καλλιέργειας χωρίς υδατάνθρακα. Αυτό δείχνει ότι ο *Lb. kefiri* B6 μεταβόλισε/διέσπασε τουλάχιστον μέρος από τους υπό εξέταση υδατάνθρακες. Πρέπει να επισημανθεί ότι όλοι οι ολιγοσακχαρίτες που εξετάστηκαν περιείχαν προσμίξεις από μονοσακχαρίτες και δισακχαρίτες. Στην περίπτωση των φρουκτοολιγοσακχαριτών Synergy 1 και Raftilose P95 οι

μόνο- / δισακχαρίτες (γλυκόζη, φρουκτόζη, σουκρόζη) περιέχονταν σε ποσοστό <10% στο αρχικό προϊόν, άρα η συγκέντρωσή τους ήταν <0.1% στο ζωμό καλλιέργειας. Ακόμα και αν αυτή η συγκέντρωση των απλών σακχάρων υποστήριζε μερική ανάπτυξη του *Lb. kefiri* B6, εάν δεν ήταν ικανό να υδρολύει τις ολιγομερείς μορφές, το γεγονός ότι ο οργανισμός αναπτύχθηκε εξίσου καλά μετά από 5 ώρες στα πρεβιοτικά όσο και σε 1% γλυκόζη υποδηλώνει ότι ο *Lb. kefiri* B6 μεταβόλισε τους ολιγοσακχαρίτες. Το GOS είχε μεγαλύτερο ποσοστό απλών σακχάρων, περίπου 40% κυρίως γλυκόζη και λακτόζη, τα οποία όπως φαίνεται από τον Πίνακα 1 υποστηρίζουν την ανάπτυξη του *Lb. kefiri* B6 σε καθαρή καλλιέργεια σε αυτή τη συγκέντρωση.

Η ανάπτυξη του *Lb. kefiri* B6 σε GOS δεν έχει μελετηθεί αρκετά για αυτό και είναι δύσκολο να βρεθούν πληροφορίες από την υπάρχουνσα βιβλιογραφία. Σύμφωνα με τον Hutzkins (2006), ο *Lb. kefiri* είναι γαλακτόζη-αρνητικός αλλά η παρούσα μελέτη έδειξε το αντίθετο. Η λακτουλόζη ήταν >98% καθαρή σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή, άρα οποιοσδήποτε άλλος υδατάνθρακας που υπήρχε ως πρόσμιξη, υπήρχε σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση για να επηρεάσει την ανάπτυξη των βακτηρίων. Και οι δύο παθογόνοι μικροοργανισμοί *L. monocytogenes* και *E. coli*, αναπτύχθηκαν εξίσου καλά στο ζωμό καλλιέργειας χωρίς υδατάνθρακα, μεταβολίζοντας την πεπτόνη και άλλες οργανικές ενώσεις. Ως αποτέλεσμα αυτού του γεγονότος, η

ικανότητά τους να μεταβολίζουν τον υπό εξέταση υδατάνθρακα μπορεί να ‘καλύπτεται’ σε μεγάλο βαθμό.

Η παραγωγή οξέων από τη μικτή καλλιέργεια του *Lb. kefiri* B6 είτε με τη *L. monocytogenes* είτε με την *E. coli* ήταν ποικίλη και εξαρτιόταν σε μεγάλο βαθμό από τον εκάστοτε υδατάνθρακα υπό εξέταση. Το τελικό pH ήταν υψηλότερο στις μικτές καλλιέργειες με τους δύο υδατάνθρακες με βάση τη φρουκτόζη (Synergy 1 and Raftilose P95) σε σχέση με αυτές που περιείχαν GOS και λακτουλόζη. Οι παράγοντες που προκάλεσαν την αλλαγή στο pH μπορεί να οφείλονται στην ποσότητα του υδατάνθρακα στη μικτή καλλιέργεια που ζυμώθηκε από τα δυο βακτήρια και την σύνθεση του μίγματος των οργανικών οξέων που παράχθηκαν. Ο *L. kefiri* είναι ετεροζυμωτικό βακτήριο αλλά δεν υπάρχουν δεδομένα όσον αφορά το ζυμωτικό προφίλ του σε σχέση ανάλογα με την πηγή υδατάνθρακα. Παρόλα αυτά, σε πειράματα με ένα άλλο ετεροζυμωτικό λακτοβάκιλο, οι Calderon *et al.*, (2003) παρατήρησαν ότι κατά την ανάπτυξη του *Lb. fermentum* σε φρουκτόζη η παραγωγή του γαλακτικού οξέος ήταν μικρότερη από εκείνη σε γλυκόζη ή σουκρόζη. Υπήρχε και παραγωγή οξικού οξέος αλλά επειδή είναι πιο ασθενές οξύ (pKa 4.76 σε σύγκριση με 3.86 για το γαλακτικό οξύ) είναι λιγότερο πιθανό να επηρεάσει σημαντικά το pH παρουσία γαλακτικού οξέος. Σε αντίθεση, οι Srinivas *et al.*, (1990) παρατήρησαν μεγαλύτερη παραγωγή οξέος από τον *Lb. acidophilus*

όταν καλλιεργήθηκε με γλυκόζη και φρουκτόζη και σημαντικά μικρότερη όταν καλλιεργήθηκε με σουκρόζη, λακτόζη και γαλακτόζη. Παρόμοια επιρροή της πηγής υδατάνθρακα στα τελικά προϊόντα της ζύμωσης μπορεί να εξηγήσει εν μέρει τις διαφορετικές τιμές pH που παρατηρήθηκαν με το *Lb. kefiri* B6 στη παρούσα εργασία. Τα υπόλοιπα βακτήρια της μικτής καλλιέργειας (*L. monocytogenes* ή *E. coli*) παράγουν επίσης οργανικά οξέα από τη ζύμωση των υδατανθράκων. Η *L. monocytogenes* παράγει κυρίως γαλακτικό οξύ ή μείγμα οξικού και γαλακτικού οξέος, ανάλογα με τη διαθεσιμότητα του οξυγόνου (Romick *et al.*, 1996), ενώ η *E. coli* παράγει οξικό, μυρμηκικό και γαλακτικό οξύ (Lee *et al.*, 2005).

Η ανασταλτική επίδραση της μικτής καλλιέργειας του *Lb. kefiri* B6 ενάντια στη *L. monocytogenes* ήταν οριακά σημαντική ή απούσα όταν χρησιμοποιήθηκαν ως πηγή υδατάνθρακα το Synergy 1, η λακτουλόζη και το Raftilose P95. Ωστόσο με το GOS παρατηρήθηκε μια σημαντική πτώση της *L. monocytogenes*. Το pH μειώθηκε περίπου στο 5 μετά από 12 ώρες πειράματος, μια τιμή που είναι πιθανό να αναστείλει την ανάπτυξη της *L. monocytogenes*: η μικρότερη τιμή pH ανάπτυξης της *L. monocytogenes* είναι περίπου 4.5 χρησιμοποιώντας υδροχλωρικό οξύ αντί για οργανικά οξέα (Koutsoumanis *et al.*, 2004). Παρόλα αυτά είναι απίθανο ότι η μείωση του πληθυσμού της *L. monocytogenes* οφείλεται μόνο στην πτώση του pH και στην αντίστοιχη

παραγωγή οργανικών οξέων. Παρόμοια επίδραση δεν παρατηρήθηκε στη λακτουλόζη παρόλο που το προφίλ οξίνισης ήταν παρόμοιο (αν και η σύνθεση των οργανικών οξέων μπορεί και να διαφέρει). Αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι άλλοι αντιμικροβιακοί παράγοντες εκτός από τα οργανικά οξέα ήταν ενεργοί στη μικτή καλλιέργεια. Ένα τέτοιο στοιχείο είναι η κεφιράνη, ένας πολυσακχαρίτης αποτελούμενος από γαλακτόζη και γλυκόζη που παράγεται από τον *Lb. kefiri*, *Lb. kefirano faciens* και ένα μικρό αριθμό άλλων βακτηρίων που υπάρχουν στο κεφίρ (Zajšek *et al.*, 2013). Η κεφιράνη έχει αντιμικροβιακές ιδιότητες τόσο ενάντια στα Gram θετικά όσο και στα Gram αρνητικά βακτήρια, διαταράσσοντας την ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης (Barbosa *et al.*, 2011). Ο *Lb. kefiri* δεν έχει αναφερθεί να παράγει βακτηριοσίνες. Η αντιμικροβιακή δράση παρατηρήθηκε μόνο όταν το GOS προστέθηκε στη καλλιέργεια και όχι η λακτουλόζη ή οι φρουκτοολιγοσακχαρίτες. Το υπόστρωμα ανάπτυξης επηρεάζει σημαντικά την παραγωγή εξοπολυσακχαριτών από τα βακτήρια. Οι Zajšek *et al.*, (2013) παρατήρησαν ότι η προσθήκη λακτόζης (5%) στο υπόστρωμα ανάπτυξης, αύξησε σημαντικά την παραγωγή κεφιράνης σε μικτή καλλιέργεια βακτηρίων σε κεφιρόκοκκους.

Η ανάπτυξη της *E. coli* δεν επηρεάστηκε στη μικτή καλλιέργεια από τον *Lb. kefiri* B6 και τα πρεβιοτικά, με εξαίρεση μια μικρή διαφορά σε ένα χρονικό

σημείο όταν χρησιμοποιήθηκε η λακτουλόζη. Η *E. coli* είναι αρκετά ανθεκτική σε όξινες συνθήκες: ο ρυθμός ανάπτυξης μειώνεται σημαντικά (αλλά δεν σταματάει) σε τιμή pH 4.5 απουσία γαλακτικού οξέος, και αυξάνεται σε περίπου pH 5.5 παρουσία 100 mM γαλακτικού οξέος (Presser *et al.*, 1997). Στην παρούσα μελέτη το pH δεν μειώθηκε κάτω από το 6 μέχρι και τις 8 ώρες πειράματος, δηλαδή η *E. coli* είχε ήδη εισέλθει στη στάσιμη φάση.

Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι ο *Lb. kefiri* B6 έχει δυνατότητες ως προβιοτικό καθώς είναι ανθεκτικός στα χολικά άλατα και εμφανίζει αντιπαθογόνο δράση, αν και το τελευταίο συμβαίνει μόνο σε συγκεκριμένα υποστρώματα. Το στέλεχος είναι λιγότερο ανθεκτικό σε όξινο περιβάλλον που θα ήταν επιθυμητό για ένα δυνητικά προβιοτικό, αλλά αυτό μπορεί να ενισχυθεί με τεχνολογίες ενθυλάκωσης ή μέσω του κατάλληλου τροφίμου. Το στέλεχος αναπτύχθηκε καλά σε μια σειρά από πρεβιοτικά που βοηθάει στη δημιουργία συνβιοτικών συνδυασμών.

## **6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

- Ampatzoglou, A., Schurr, B., Deepika, G., Sasitorn, B., & Charalampopoulos, D. (2010). Influence of fermentation on the acid tolerance and freeze drying survival of *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Biochemical Engineering Journal*, 52, 65-70.
- Angus F., Smart S. and Shortt C (2007). Prebiotic Ingredients with Emphasis on Galacto-oligosaccharides and Fructo-oligosaccharides. In: Dr Adnan Tamine, Blackwell Publishing Ltd, Probiotic Diary Products, pp 120-133.
- Aso Y. and Akazam H. (1992). Prophylactic effect of a *Lactobacillus casei* preparation on the recurrence of superficial bladder cancer. *Urologia Internationalis* 49, 125–129.
- Aureli P., Capurso L., Castelazzi A.M., Clerici M., Giovannini M., Morelli L., Poli A., Pregliasco F., Salvini F., Zuccotti G.V. (2011). Probiotics and health: An evidence-based review. *Pharmacological Research* 63, 366–376.
- Barbosa, A.F., Santos, P.G., Lucho, A.M.S. & Schneedorf, J.M. (2011). Kefiran can disrupt the cell membrane through induced pore formation. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 653, 61-66.

Berg R. D. (1996). The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends in Microbiology* Vol 4, Issue 11, 430–435.

Birmingham C.L., Canadien V., Kaniuk N.A., Steinberg B.E., Higgins D.E., Brumell J.H. (2008). Listeriolysin O allows *Listeria monocytogenes* replication in macrophage vacuoles. *Nature* 451, 350-354.

Bouhnik A., Attar A., Joly F.A., Riottot M., Dyard F., Flourié B. (2004).

Lactulose ingestion increases faecal bifidobacterial counts: A randomised double-blind study in healthy humans. *European Journal of Clinical Nutrition* 58, 462-466.

Buchanan R.L., Golden M.H. and Whitingl R.C. (1993). Differentiation of the effects of pH and lactic or acetic acid concentration on the kinetics of *Listeria monocytogenes* inactivation. *Journal of Food Protection* Vol. 56, No.6, 474-478.

Bujnakova D., Strakova, E., & Kmet, V. (2014). *In vitro* evaluation of the safety and probiotic properties of *Lactobacilli* isolated from chicken and calves. *Anaerobe*, 29, 118-127.

Calderon, M., Loiseau, G., & Guyot, J.P. (2003). Fermentation by *Lactobacillus fermentum* OgiE1 of different combinations of carbohydrates

- occurring naturally in cereals: consequences on growth energetic and  $\alpha$ -amylase production. *International Journal of Food Microbiology*, 80, 161-169.
- Chapman P.A., Siddons C.A., Wright D.J., Norman P., Fox J. and. Crick E. (1993). Cattle as a possible source of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 infections in man. *Epidemiology and Infection*, Vol. 111, Issue 3, 439-448.
- Chávarri, M., Marañón, I., Ares, R., Ibáñez, F. C., Marzo, F., & del Carmen Villarán, M. (2010). Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 142, 185-189.
- Chen Y., Strain E.A., Allard M. and Brown E.W (2011). Genome sequences of *Listeria monocytogenes* strains J1816 and J1-220, associated with human outbreaks. *Journal of Bacteriology*, Vol. 193, No. 13, 3424-3425.
- Commane D., Hughes R., Shortt C., Rowland I. (2005). The potential involved in the anti-carcinogenic action of probiotics. *Mutation Research*, 591, 276-289.
- Conway, P.L., Gorbach, S.L., & Goldin, B.R. (1987). Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *Journal of Dairy Science*, 70, 1-12.

- Corzo, G., & Gilliland, S.E. (1999). Bile salt hydrolysate activity of three strains of *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Dairy Science*, 82, 472-480.
- Dalton C.B., Austin C.C, Sobel J., Hayes P.S., Biff W.F., Graves L.M., Swaminathan B., Proctor M.E., Griffin P.M (1997). An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. *The New England Journal of Medicine*, Vol 336, 100-106.
- Del Piano M., Morelli L., Strozzi G.P., Allesina S., Barba M., Deidda F., Lorenzini P., Ballave M., Montino F. Orsello M., Sartori M., Garello E., Carmagnola S., Pagliarulo M., Capurso L. (2006). Probiotics: from research to consumer. *Digestive and Liver Disease*, Vol. 38, Suppl. 2, 248–255.
- Erickson, Marilyn C., Doyle and Michael P. (2007). Food as vehicle for transmission of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Journal of Food Protection*, Number 10, 2228-2449.
- Erkkila S. and Petaja E. (2000). Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. *Meat Science*, Vol 55, 297-300.
- FAO/WHO 2002. Report of a Joint FAO/WHO expert consultation on guidelines for the evaluation of probiotics in food. World Health Organization and Food and Agriculture Organization of United Nations. London, Ontario,

Canada (<http://www.fda.gov/ohrms/dockets/dockets/95s0316/95s-0316-rpt0282-tab-03-ref-19-joint-faowho-vol219.pdf>).

Farber J.M. and Peterkin P. (1991). *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiological Reviews*, 55, 476–511.

Farnworth E.R. and Mainville I. Kefir (2008). A fermented milk product. Handbook of fermented functional foods, In: Edward R. Farnworth, Handbook of fermented functional foods, CRC Press Taylor and Francis Group LLC, pp. 89-127.

Fleming D.W., Cochi S.L., MacDonald K.L., Brondum J., Hayes P.S., Plikaytis B.D., Holmes M.B., Audurier A., Broome C.V., Reingold A.L.(1985). Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis *New England Journal of Medicine*, Vol. 14, No. 312 (7), 404-407.

Garrote G.L., Abraham A.G. and De Antoni G.L. (2000). Inhibitory power of kefir: the ratio of organic acids. *Journal of Food Protection*, 63, 364-369.

Gasbarrini A., Lauritano E.C., Garcovich M., Sparano L., Gasbarrini G. (2008). New insights into the pathophysiology of IBS: intestinal microflora, gas production and gut motility. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 12, Suppl 1, 111-117.

Gibson G.R. and Roberfroid M.B. (1995). Dietary modulation of the human colonie microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*, 125, 1401-1412.

Gibson G.R., Probert H.M., J.Van Loo, Rastall R.A. and Roberfroid M.B. (2004). Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews*, 17, 259–275.

Giovanacci I., Ragimbeau C., Querquiner S., Salvat G., Vendeuvre J.L., Carlier V. et al. (1999). *Listeria monocytogenes* in pork slaughtering and cutting plants. Use of RAPD, PFGE and PCR-REA for tracing and molecular epidemiology. *International Journal of Food Microbiology*, 53, 127-140.

Goderska, K., Nowak, J., & Czarnecki, Z. (2008). Comparison of the growth of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* species in media supplemented with selected saccharides including prebiotics. *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria*, 7, 5-20.

Goodman B.E. (2010). Insights into digestion and absorption of major nutrients in humans. *Advances in Physiology Education*, Vol 34, No 2, 44-53.

Griffiths M.W. (1989). *Listeria monocytogenes*: its importance in the dairy industry. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 47, 133–158.

Guarner F. and Malagelada J.-R. (2003). Gut flora in health and disease. *The Lancet*, Vol 361, Issue 9356, 512-519.

Guerra A., Etienne-Mesmin L., Livrelli V., Denis S., Blanquet-Diot S., Alric M. (2012). Revelance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. *Trends in Biotechnology*, Vol 30, Issue 11, 591-600.

Hamer H.M., Jonkers D., Venema K., Vanhoutvin S., Troost F.J. and Brummer R-J (2008). Review article: the role of butyrate on colonic function. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, Vol 27, Issue 2, 104–119.

Hata Y., Yamamoto M., Ohni M., Nakajima K., Nakamura Y., Takano T. (1996). A placebo-controlled study of the effect of sour milk on blood pressure in hypertensive subjects. *American Journal of Clinical Nutrition*, 64(5), 767-771.

Helander I.M., von Wright A. and Mattila-Sandholm T.M. (1997). Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria. *Trends in Food Science and Technology*. Vol 8, 146-150.

Henegouwen G.P van Berge, S.D. van Werf and Ruben A.T. (1987). Effect of long term lactulose ingestion on secondary bile salt metabolism in man: potential protective effect of lactulose in colonic carcinogenesis. *Gut*, Vol 28, Issue 6, 675-680.

Hilton E, Kolakowski P, Singer C, Smith M (1977). Efficacy of *Lactobacillus* GG as a diarrheal preventive in travelers. *Journal of Travel and Medicine*, Vol. 4, 41-43.

<http://www.cdc.gov/ecoli>

<http://www.cdc.gov/listeria>

Hutkins, R. W. (2006). Microbiology and Technology of Fermented Foods. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell.

Jonkers D. and Stockbrügger R. (2003). Probiotics and inflammatory bowel disease. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 96(4), 167–171.

Kandler O. and Kunath P. (1983). *Lactobacillus kefir* sp. nov., A component of the microflora of kefir. *Systematic and Applied Microbiology*, 4, 286–294.

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

Koroleva N.S. (1988.) Technology of kefir and kumys. *IDF Bulletin*, 227, 96-100.

Koutsoumanis, K.P., Kendall, P.A., & Sofos, J.N. (2004). A comparative study on growth limits of *Listeria monocytogenes* as affected by temperature, pH and  $a_w$  when grown in suspension or on a solid surface. *Food Microbiology*, 21, 415-422.

Kunz C. (2012). Historical aspects of human milk oligosaccharides. *Advances in Nutrition*, Vol 3, 430-439.

Kyne L. and Kelly C.P. (2001). Recurrent *Clostridium difficile* diarrhoea. *Gut*, 49, 152–153.

La Riviere J.W.M., Kooiman P., Schmidt K. (1967). Kefiran, a novel polysaccharide produced in the kefir grains by *Lactobacillus brevis*. Vol 59, Issue 1-3, pp 269-278.

Lee, S. J., Lee, D. Y., Kim, T. Y., Kim, B. H., Lee, J., & Lee, S. Y. (2005). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for enhanced production of succinic acid, based on genome comparison and in silico gene knockout simulation. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 7880-7887.

Leite A.M.O., Mayo B., Rachid C.T.C.C, Peixoto R.S., Silva J.T, Paschoalin V.M.F and Delgado S. (2012). Assessment of the microbial diversity of Brazilian kefir grains by PCR-DGGE and pyrosequencing analysis, *Food Microbiology*, Vol 31, Issue 2, 215-221.

Leverenz B., Conway W. S., Camp M.J., Janisiewicz W. J., Abuladze T., Yang M., Saftner R. and Sulakvelidze A. (2003). Biocontrol of *Listeria monocytogenes* on fresh-cut produce by treatment with lytic bacteriophages

and a bacteriocin. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 69, No.8, 4519-4526.

Ley R.E., Turnbaugh P.J., Samuel K. & Gordon J.I. (2006). Microbial ecology: Human gut microbes associated with obesity. *Nature* 444, 1022-1023.

Likotrafiti E., Tuohy K.M., Gibson G.R. and Rastall R.A. (2013).

Development of antimicrobial synbiotics using potentially-probiotic faecal isolates of *Lactobacillus fermentum* and *Bifidobacterium longum*. *Anaerobe*, Vol 20, 5-13.

Liu Q., Ping D.Z., Ha D.K., Bengmark S., Kurtovic J.A και Riordan S.M. (2004). Synbiotic modulation of gut flora: Effect on minimal hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis. *Hepatology*, Vol. 39, Issue 5, 1441-1449.

Lyytikäinen O., Autio T., Maijala R., Ruutu P., Honkanen-Buzalski T., Miettinen M., Hatakka M., Mikkola J., Anttila Veli-Jukka, Johansson T., Rantala L., Aalto T., Korkeala H., Siitionen A. (2000). An outbreak of *Listeria monocytogenes* serotype 3a infections from butter in Finland. *The Journal of Infections Diseases*, Vol. 181, Issue 5, 1838-1841.

Macfarlane G.T and Macfarlane S. (2012). Bacteria, colonic fermentation and gastrointestinal health. *Journal of AOAC International*, Vol 95, No 1, 50-60.

- Macfarlane G.T., Steed H., Macfarlane S. (2008). Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 104, Issue 2, 305–344.
- Mackie R.I., Sghir A. and Gaskins H.R. (1999). Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *American Journal of Clinical Nutrition*, Vol. 69, No. 5, 1035-1045.
- Malfertheiner P., Megraud F., O'Morani C., Bazzoli F., El-Omar E., Graham D., Hunt R, Rokkas T., Vakil N., Kuipers E.J., The European Helicobacter Study Group (EHSG) (2007). Current concepts in the management of Helicobacter pylori infection: The Maastricht III Consensus Report. *Gut*, 56, 772–781.
- Mann G.V. and Spoerry A. (1974). Studies of surfactant and cholesterolemia in the maasai. *American Journal of Clinical Nutrition*, Vol. 27, No. 5, 464-469.
- Marchesi J. R. (2011). Human distal gut microbiome. *Environmental Microbiology*, Vol 13, Issue 12, 3088-3102.
- McFarland L.V. (2000). Normal flora: diversity and fuctions. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 12, 193-207.
- Nataro J.P and Kaper J.B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, Vol. 11, No 1, 142-201.

- Nater U.M., La Marca R., Florin L., Moses A., Langhans W., Koller M.M., Ehlert U. (2006). Stress-induced changes in human salivary alpha-amylase activity—associations with adrenergic activity. *Psychoneuroendocrinology*, Vol 31, Issue 1, 49-58.
- O'Hara A.M. and Shanahan F. (2007). Mechanisms of action of probiotics in intestinal diseases. *The Scientific World Journal*, 7, 31–46.
- Peel M., Donachie W., and Shaw A. (1988). Temperature-dependent expression of flagella of *Listeria monocytogenes* studied by electron microscopy, SDS-PAGE. *Journal of General Microbiology*, 134 (8), 2171-2178.
- Pereira D.J. and Gibson G.R (2002). Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from the human gut. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol 68, 4689-4693.
- Presser, K. A., Ratkowsky, D. A., & Ross, T. (1997). Modelling the growth rate of *Escherichia coli* as a function of pH and lactic acid concentration. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 2355-2360.
- Rafter J., Bennett M., Caderni G., Clune Y., Hughes R., Karlsson P.C., Klinder A., O'Riordan M., O' Sullivan G.C., Pool-Zobel B., Rechkemmer G., Roller M., Rowland I., Salvadori M., Thijs H., Van Loo J., Watzl B. και Collins J.K.

(2007). Dietary synbiotics reduce cancer risk factors in polypectomized and colon cancer patients. *American Journal of Clinical Nutrition*, Vol 85, No 2, 488-496.

Reid G., Charbonneau D., Erb J., Kochanowski B., Beuerman D., Poehner R., Bruce A.W. (2003). Oral use of *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *Lactobacillus fermentum* RC-14 significantly alters vagina flora: randomized, placebo-controlled trial in 64 healthy women. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, Vol.35, Issue 2, 131-134.

Rodrigues L.K, Caputo L.R.G., Carvalho J.C.T., Evangelista J., Schneedorf J.M. (2005). Antimicrobial and healing activity of kefir and kefiran extract. *International Journal of Antimicrobial Agents*, Vol.25, Issue 5, 404-408.

Romick, T.L., Fleming, H.P., & McFeeters, R.F. (1996). Aerobic and anaerobic metabolism of *Listeria monocytogenes* in defined glucose medium. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 304-307.

Sabater-Molina M., Larqué E., Torrell F., Zamora S. (2009) Dietary fructooligosaccharides and potential benefits on health. *Journal of Physiology and Biochemistry*, Vol. 65, Issue 3, 315-328.

Salminen S., Atte von Wright, Morelli L., Marteau P., Brassarte D., de Vos W.M, Fonden R., Saxelin M., Collins K., Mogensen G., Birkeland S.-E.,

- Mattila-Sandholm T. (1998). Demonstration of safety of probiotics- a review. *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 44, 93–106.
- Say T.O. and Bennett L. (2005). Gastroenteritis due to *Listeria monocytogenes*. *Clinical and Infectious Diseases*, Vol 40, Issue 9, 1327-1332.
- Schlech W.F. and Acheson D. (2000). Foodborne listeriosis. *Clinical and Infectious Diseases*, Vol. 31, No.3, 770-775.
- Srinivas, D., Mital, B.K., & Garg, S.K. (1990). Utilization of sugars by *Lactobacillus acidophilus* strains. *International Journal of Food Microbiology*, 10, 51-58.
- 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, 129-137.
- Swaminathan B. and Gerner-Smidt P. (2007). The epidemiology of human listeriosis. *Microbes and Infection*, Vol 9. Issue 10, 1236–1243.
- Takizawa S., Kojima S., Tamura S., Fujinaga S., Benno Y. and Nakase T. (1994) *Lactobacillus kefirnogranum* sp. nov. and *Lactobacillus parakefir* sp. nov., two new species from kefir grains. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44, 435–439.

Toba T., Abe S., Arihara K. and Adachi S. (1986). A medium for the isolation of capsular bacteria from kefir grains. *Agriculture and Biological Chemistry*, Vol. 50, 2673–2674.

Tong J.L., Ran Z.H., Shen J., Zhang X.C., Xiao S.D. (2007). Meta-analysis: effect of supplementation with probiotics on eradication rates and adverse events during *Helicobacter pylori* eradication therapy. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, Vol. 25, 155–168.

Vilijoen B.C. (2001). The interaction between yeasts and bacteria in dairy environments. *International Journal of Food Microbiology*, Vol 69, Issue 1-2, 37-44.

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

Wang R.F., Cao W.W., Cerniglia C.E. (1996). PCR detection and quantitation of predominant anaerobic bacteria in human and animal fecal samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 62 (4), 1242-1247

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

Whitcomb D.C., Lowe M.E. (2007). Human pancreatic digestive enzymes.

*Digestive Diseases and Science*, Vol 52, Issue 1, 1-17.

Wolever T.M.S., Josse R.G., Leiter L.A. and Chiasson J.-L. (1997). Time of day and glucose tolerance status affect serum short-chain fatty concentrations in humans. *Metabolism*, Vol 46, Issue 7, 805-811.

Xanthopoulos V., Litopoulou-Tzanetaki E. και Tzanetakis N. (2000).

Characterization of *Lactobacillus* isolates from infants faeces as dietary adjuncts. *Food Microbiology*, Vol 17, 205-215.

Zajšek, K., Goršek, A., & Kolar, M. (2013). Cultivating conditions effects on kefiran production by the mixed culture of lactic acid bacteria imbedded within kefir grains. *Food Chemistry*, 139, 970-977.

Zokaee F., Kaghazchi T., Zare A., Soleimani M. (2002). Isomerization of lactose to lactulose - study and comparison of three catalytic systems. *Process Biochemistry*, Vol 37, 629–635.

Ζδράγκας Α. (2011). Πρόσφατη τροφιμογενής επιδημία στην Ευρώπη από *E. coli*. Εμπειρία από το παρελθόν και πιθανά μελλοντικά ενδεχόμενα. ΕΘΙΑΓΕ Τεύχος 44, σελ 4-7.

Μεταξόπουλος Ι., Ματαράγκας Μ., Δροσινός ΕΧ.(2003) Βακτηριοσίνες των οξυγαλακτικών βακτηρίων και εφαρμογή τους στα τρόφιμα ως

βιοσυντηρητικών (II) Περιοδικό της ελληνικής κτηνιατρικής εταιρείας 54 (1),  
σελ 69-77.