



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ

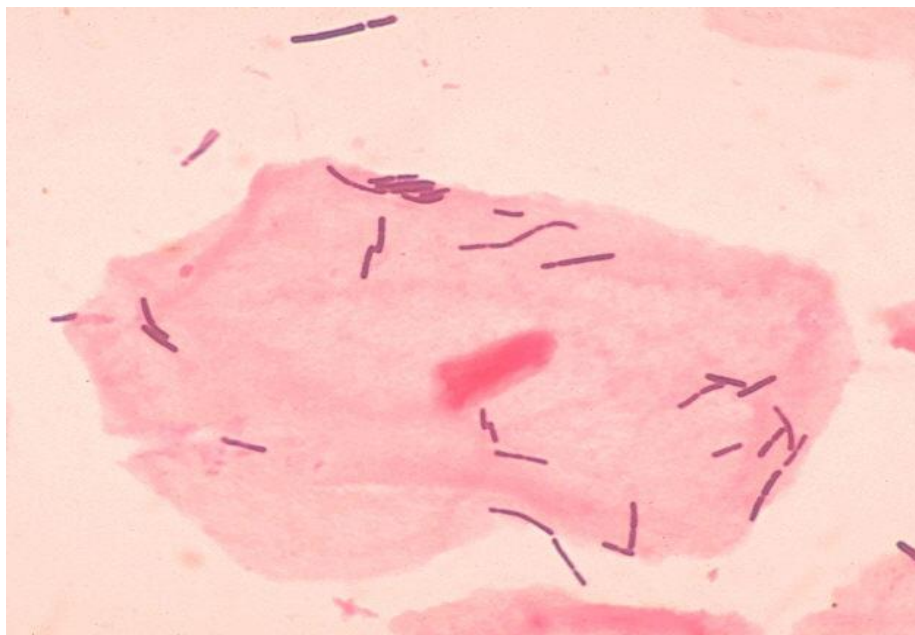
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΘΕΜΑ :

Ανίχνευση Δευτερογενών Μεταβολιτών του γένους *Lactobacillus spp*



Φοιτήτριες: Λουκογιαννάκη Άννα – Χριστίνα, Σαγώνα Δήμητρα

Εισηγητής : Αναπληρώτρια καθηγήτρια, Χούχουλα Δήμητρα

ΑΘΗΝΑ 2022



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Ανίχνευση Δευτερογενών Μεταβολιτών του γένους *Lactobacillus* spp

Εξεταστική επιτροπή

1.ΧΟΥΧΟΥΛΑ ΔΗΜΗΤΡΑ

2.ΜΠΑΤΡΙΝΟΥ ΑΝΘΙΜΙΑ

3.ΖΟΥΜΠΟΥΛΑΚΗΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Οι κάτωθι υπογεγραμμένοι Λουκογιαννάκη Άννα Χριστίνα του Ελευθέριου με αριθμό μητρώου 14348 και η Σαγώνα Δήμητρα του Ευθυμίου με αριθμό μητρώου 14501 φοιτήτριες του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας τροφίμων, δηλώνουμε υπεύθυνα ότι:

«Είμαστε συγγραφείς αυτής της πτυχιακής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχαμε για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες κάναμε χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνουμε ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από εμάς αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μας, όσο και του Ιδρύματος.

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μας ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μας».

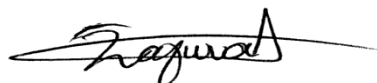
Η Δηλούσα

Λουκογιαννάκη Άννα Χριστίνα



Η Δηλούσα

Σαγώνα Δήμητρα



Περίληψη

Η παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματεύεται την Ανίχνευση Δευτερογενών Μεταβολιτών του γένους *Lactobacillus spp.*

Αρχικά παρουσιάζεται ο μικροοργανισμός *Lactobacillus spp.* Πιο συγκεκριμένα, αναφέρονται θεωρητικά στοιχεία και χαρακτηριστικά των γαλακτικών βακτηρίων, τα οφέλη τους, οι καλλιέργειες εκκίνησης τους καθώς και πιο συγκεκριμένα στοιχεία για τον ίδιο τον λακτοβάκιλλο. Έπειτα, αναλύονται οι δευτερογενείς μεταβολίτες του γαλακτοβάκιλλου. Ειδικότερα, γίνεται εκτενής ανάλυση της δράσης τους, των τρόπων και μεθόδων ανίχνευσης τους καθώς και εφαρμογές αυτών στην καθημερινή ζωή των ανθρώπων. Βασικό κομμάτι της εργασίας αυτής αποτελεί η πιο ειδική ανάλυση του μικροοργανισμού *Lactobacillus spp.*, βασιζόμενοι σε ειδικές και εστιασμένες εφαρμογές, δράσεις και μεθόδους απομόνωσης αυτού. Τέλος, αναλύονται οι αντιμικροβιακές ιδιότητες του παραπάνω μικροοργανισμού και η ανθεκτικότητα του στα αντιβιοτικά στηριζόμενοι πάντα σε έγκυρες επιστημονικές και εξακριβωμένες μελέτες.

Τέλος, το γενικό συμπέρασμα που προκύπτει από την συγκεκριμένη εργασία είναι ότι ο μικροοργανισμός *Lactobacillus spp.* έχει πολλά οφέλη και μεγάλη χρησιμότητα σε πολλούς τομείς αλλά ακόμα υπάρχει περιθώριο για την συνέχιση της επιστημονικής έρευνας και αναζήτησης.

Abstract

The present dissertation examines the Detection of Secondary Metabolites of the genus *Lactobacillus spp.*

Initially, the microorganism *Lactobacillus spp* is presented. More specifically, data and characteristics of lactic acid bacteria are reported, their benefits, their functional starter cultures and more specific data for lactobacilli. The lactobacilli secondary metabolites are then analyzed. In particular, there is an extensive analysis of their actions, ways and methods of detecting them as well as their applications in people's daily lives. A key part of this work is the most specific analysis of the microorganism *Lactobacillus spp*, based on specific and focused applications, actions and methods of its isolation. Finally, the antimicrobial properties of the above microorganism and its resistance to antibiotics are analyzed, always based on valid scientific and verified studies.

To conclude, the general conclusion that emerges from this work is that the microorganism *Lactobacillus spp* has many benefits and great utility in many areas but there is still room for further scientific research and research.

Πρόλογος

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής στο Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων κατά το ακαδημαϊκό έτος 2021-2022 και αφορά την Ανίχνευση Δευτερογενών Μεταβολιτών του γένους *Lactobacillus spp.*

Θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε από καρδιάς, την επιβλέπουσα καθηγήτρια μας, την κα. Χούχουλα Δήμητρα, Καθηγήτρια του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, η οποία μας εμπιστεύθηκε αναθέτοντας μας το συγκεκριμένο θέμα, για τη στήριξη σε όλη τη διάρκεια εκπόνησης αυτής της εργασίας, δίνοντας μας θάρρος για πρωτοβουλίες, συμβουλές και λύσεις σε οποιοδήποτε πρόβλημα προέκυπτε προκειμένου να στεφθεί με επιτυχία η εργασία αυτή.

Επίσης ευχαριστούμε θερμά την υποψήφια Διδάκτορα κα. Βουγιουκλάκη Δέσποινα από το Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, για τη βοήθεια, την υπομονή, τη συμπαράσταση και την άμεση επίλυση των οποιοδήποτε ζητημάτων προέκυπταν.

Θεωρούμε απαραίτητο να εκφράσουμε την εκτίμηση μας στα μέλη της Τριμελούς Επιτροπής που δέχθηκαν να συμμετάσχουν σε αυτή.

Περιεχόμενα

Περίληψη	ii
Abstract.....	v
Πρόλογος	vi
Περιεχόμενα.....	vii
Πίνακας Εικόνων.....	ix
Πίνακας Πινάκων	x
Πίνακας Διαγραμμάτων	xi
1 Κεφάλαιο: Εισαγωγή.....	12
1.1 Γαλακτικά Βακτήρια	12
1.1.1 Ορισμός γαλακτικών βακτηρίων	12
1.1.2 Οφέλη γαλακτικών βακτηρίων	13
1.1.3 Καλλιέργειες εκκίνησης	17
1.2 <i>Lactobacillus spp.</i>	18
1.3 Οφέλη <i>Lactobacillus spp.</i>	19
2 Κεφάλαιο: Δευτερογενείς μεταβολίτες	20
2.1 Ανίχνευση δευτερογενών μεταβολιτών.....	21
2.2 Αντιμικροβιακή και Αντιμυκητιακή Δράση Μεταβολιτών.....	27
2.2.1 Αποτελέσματα μελετών για την αντιμικροβιακή δράση των δευτερογενών μεταβολιτών	28
2.3 Εφαρμογές μικροβιακών δευτερογενών μεταβολιτών	32
2.3.1 Αντιβιοτικά	33
2.3.2 Αντικαρκινικοί παράγοντες	39
2.3.3 Φαρμακολογικοί και διατροφικοί παράγοντες	42
2.3.4 Ένζυμα και αναστολείς ενζύμων	42
2.3.5 Γεωργικά και ζωικά προϊόντα.....	43
3 Κεφάλαιο: <i>Lactobacillus spp.</i> - Χαρακτηριστικά και Μέθοδοι απομόνωσης	45
3.1 Γενικά Χαρακτηριστικά του <i>Lactobacillus spp.</i>	45
3.2 Τρόποι-Μέθοδοι-Παραδείγματα απομόνωσης πρωτεϊνών από <i>Lactobacillus spp.</i>	56
4 Κεφάλαιο: Αντιμικροβιακές Ιδιότητες και Ανθεκτικότητα στα Αντιβιοτικά	76
5 Κεφάλαιο: Συμπεράσματα – Προτάσεις για το μέλλον	86
5.1 Συμπεράσματα	86
5.2 Προτάσεις για το μέλλον	86

Βιβλιογραφικές Αναφορές.....87

Πίνακας Εικόνων

Εικόνα 1 : Γαλακτικά βακτήρια (htt3)	12
Εικόνα 2 : Ευεργετικοί και παθογόνοι μικροοργανισμοί στο μικροβίωμα του εντέρου (htt) .	16
Εικόνα 3 : Πηγές στις οποίες εντοπίζονται πρεβιοτικά (πάνω) και προβιοτικά (κάτω) (htt1) .	17
Εικόνα 4 : Μορφές γαλακτοβάκιλλου εντερικό σύστημα (htt2)	19
Εικόνα 5 : Παραγωγή αντιβιοτικών ανάλογα με την προέλευση τους (Hassan M. Awad, 2013)	37
Εικόνα 6 : Μεταβολισμός γλυκόζης από <i>Lactobacillus</i> spp	45
Εικόνα 7 : Μεταβολικά μονοπάτια ομοζυμωτικών (αριστερά) και ετεροζυμωτικών (δεξιά) για βακτήρια γαλακτικού οξέος (José Aníbal Mora-Villalobos J. M.-Z.-G.-S.-W.-G., 2020).....	47
Εικόνα 8 : Παρουσίαση των βασικών ουσιών που απομονώνονται από ένα γαλακτικό βακτήριο (Jesper Magnusson, 2003)	47
Εικόνα 9 : Τρισδιάστατη δομή πυροσταφυλικής κινάσης (Jesper Magnusson, 2003)	48
Εικόνα 10 : Μεταβολισμός μηλικού οξέος.....	49
Εικόνα 11 : Μεταβολισμός κιτρικού οξέος	49
Εικόνα 12 : Μεταβολισμός τρυγικού οξέος.....	49
Εικόνα 13 : Μεταβολισμός γλυκόζης (Fermented and vegetables - Bacteria Fermentations, n.d.).....	50
Εικόνα 14 : Υγρή χρωματογραφία	57
Εικόνα 15 : Σύστημα υγρής χρωματογραφίας (César Aquiles Lázaro de la Torre, 2014).....	57
Εικόνα 16 : Αέρια χρωματογραφία	58
Εικόνα 17 : Αέρια χρωματογραφία (Microbe Notes, χ.χ.)	58
Εικόνα 18 : Αρχή φασματοσκοπία μάζας (Bronkhorst, n.d.)	59
Εικόνα 19 : Απεικόνιση MS-LC	60
Εικόνα 20 : Απεικόνιση φασματομέτρου μάζα σε συνδυασμό με αέριο χρωματογράφο	61
Εικόνα 21 : Ζώνη αναστολής τριών στελεχών <i>Lactobacillus</i> στο <i>Pseudomonas aeruginosa</i> και <i>Bacillus subtilis</i>	68
Εικόνα 22 : Απεικόνιση τριών στελεχών λακτοβάκιλλων (Scott N. Dean, 2019).....	71
Εικόνα 23 : Πρωτεϊνική σύνθεση <i>Lactobacillus</i> MVs (Scott N. Dean, 2019).....	72
Εικόνα 24 : Δράση αντιβιοτικών <i>Lactobacillus</i> spp (Vanessa Liévin-Le Moala, 2014).....	80

Πίνακας Πινάκων

Πίνακας 1 : Κλινικά αποτελέσματα για τον ρόλο των προβιοτικών (Ana M Valdes, 2018) ...	15
Πίνακας 2 : Ανίχνευση αντιμυκητιακών μεταβολίτων του <i>L. rhamnosus</i> CIRM-BIA1952 (Lucille Garniera, 2020)	22
Πίνακας 3 : Ανίχνευση αντιμυκητιακών μεταβολητών του <i>L. casei</i> AST18 (Hongjuan Li, 2012)	23
Πίνακας 4 : Προσέγγιση μίας νέας εφαρμογής για την ταυτοποίηση αντιμυκητιακών ενώσεων που παράγονται από καλλιέργειες βακτηρίων γαλακτικού οξέος (Brid Brosnan, 2014)	24
Πίνακας 5 : Ανασκόπηση για ζυμώσεις με βακτήρια γαλακτικού οξέος πολλαπλών προϊόντων (José Aníbal Mora-Villalobos J. M.-Z.-G.-S.-W.-G., 2020)	25
Πίνακας 6 : Ετήσια κόστη αντιβιοτικών (Hassan M. Awad, 2013).....	34
Πίνακας 7 : Αναμενόμενος αριθμός μεταβολιτών ανάλογα με την προέλευση (Hassan M. Awad, 2013).....	35

Πίνακας Διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1 : HPLC σε δείγματα έπειτα από την ζύμωση τους σε <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Bifidobacterium breve</i> , <i>Bifidobacterium infantis</i> και μίγμα αυτών στους 37.0 °C (Dan Cristian Vodnar, 2010)	53
Διάγραμμα 2 : Δακτυλικό αποτύπωμα FTIR των <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Bifidobacterium breve</i> , <i>Bifidobacterium infantis</i> και μίγμα αυτών σε νερό (Dan Cristian Vodnar, 2010)	54
Διάγραμμα 3 : Αφθονία <i>Lactobacillus spp</i> στην περίπτωση απόκτησης ή μη του μικροοργανισμού MDRO (Rafael Araos, 2016).....	83

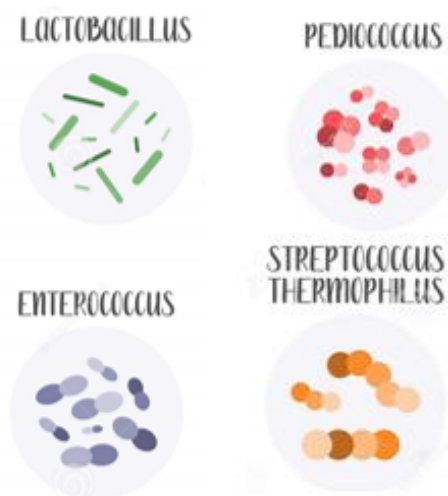
1 Κεφάλαιο: Εισαγωγή

1.1 Γαλακτικά Βακτήρια

1.1.1 Ορισμός γαλακτικών βακτηρίων

Τα γαλακτικά βακτήρια (Lactic Acid Bacteria, LAB), αποτελούν μία ομάδα βακτηρίων τα οποία διαθέτουν μορφολογικές μεταβολικές και φυλογενετικές ομοιότητες. Πρόκειται για gram θετικά βακτήρια τα οποία δεν σχηματίζουν σπόρους, είναι προαιρετικά αναερόβια, ανθεκτικά σε οξέα ($\text{pH} < 4.5$), έχουν σχήμα κόκκων ή ράβδων (βάκιλλων) και μέσω ζύμωσης υδατανθράκων, όπως γλυκόζης, παράγουν γαλακτικό οξύ ως κύριο τελικό προϊόν. (Fischer & Thines, 2017; Khalisanni, 2011) Μάλιστα, αξίζει να αναφερθεί πως η πρώτη καλλιέργεια γαλακτικών βακτηρίων μελετήθηκε από τον J. Lister το 1873. Τα γαλακτικά βακτήρια εντοπίζονται κυρίως σε περιβάλλον με πλούσια σε θρεπτικά συστατικά όπως είναι τρόφιμα σαν το γάλα, το κρέας και τα λαχανικά. Ωστόσο, ορισμένα μπορεί να εντοπιστούν και στη χλωρίδα του εντέρου των θηλαστικών. (Fischer & Thines, 2017)

Η ταξινόμηση των γαλακτικών βακτηριακών γενών βασίστηκε στη μορφολογία τους, στον τρόπο ζύμωσης της γλυκόζης, στην ανάπτυξή τους σε καθορισμένες θερμοκρασίες, στη σύνθεση του παραγόμενου γαλακτικού οξέος, την ικανότητα να αναπτύσσονται σε υψηλή συγκέντρωση άλατος και στην ανεκτικότητά τους σε οξέα. Τα γένη γαλακτικών βακτηρίων είναι τα ακόλουθα: γαλακτοβάκιλλοι (*Lactobacillus*), πεδιόκοκκοι (*Pediococcus*), στρεπτόκοκκοι (*Streptococcus*) και εντερόκοκκοι (*Enterococcus*) (Εικόνα 1).



Εικόνα 1 : Γαλακτικά βακτήρια ([htt3](#))

Τα LAB δεν διαθέτουν την ικανότητα να συνθέσουν κυτοχρώματα και σαν αποτέλεσμα δεν μπορούν να σχηματίσουν ATP από τη δημιουργία μίας βαθμίδας πρωτονίου (protongradient). Ωστόσο, μπορούν να αποκτήσουν ATP κατά τη ζύμωση σακχάρων. Μιας και δεν απαιτούν οξυγόνο για την παραγωγή ενέργειας, τα γαλακτικά βακτήρια αναπτύσσονται κάτω από αναερόβιες συνθήκες, εντούτοις μπορούν να αναπτυχθούν και παρουσία οξυγόνου και γι' αυτό χαρακτηρίζονται ως προαιρετικά αναερόβιοι μικροοργανισμοί. Μάλιστα, οι υπεροξειδάσες που διαθέτουν τα προστατεύουν από τα παραπροϊόντα του οξυγόνου όπως το H₂O₂.(Fischer & Thines, 2017; Khalisanni, 2011)

1.1.2 Οφέλη γαλακτικών βακτηρίων

Στη σύγχρονη εποχή είναι δυνατή η διατήρηση της καλής υγείας του ανθρώπου μέσω της τροφής του και επίσης η ερευνητική δραστηριότητα τείνει να αναζητά όσο το δυνατόν φυσικά προϊόντα για τη θεραπεία ασθενειών. Κάτι τέτοιο μπορεί να επιτευχθεί παρακολουθώντας την επίδραση που έχουν διάφορα μικρόβια και μεταβολίτες στον οργανισμό.

Τα προβιοτικά είναι ζωντανοί βακτηριακοί μικροοργανισμοί οι οποίοι όταν χορηγούνται σε κατάλληλες ποσότητες λειτουργούν ευεργετικά για τον ξενιστή. Τα γαλακτικά βακτήρια κυρίως του γένους *Bifidobacterium* και *Lactobacillus* χρησιμοποιούνται συχνά ως προβιοτικοί οργανισμοί και συμπεριλαμβάνονται σε πληθώρα προϊόντων όπως σε τρόφιμα, συμπληρώματα διατροφής και φάρμακα. Μάλιστα, τα LAB χαρακτηρίζονται ως GRAS (generally recognized as safe) δηλαδή ασφαλή για χρήση σε τρόφιμα. Τα προβιοτικά συμβάλουν στην καλή λειτουργία της χλωρίδας του εντέρου, στην ανοσορύθμιση και στην παραγωγή βιοδραστικών συστατικών.

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, τα LAB έχουν ποικίλες ευεργετικές επιδράσεις. Πιο συγκεκριμένα, συμβάλλουν στην πρόληψη ουρογεννητικών λοιμώξεων, στον έλεγχο των φλεγμονωδών παθήσεων του εντέρου, στις ανοσοτροποποιητικές λειτουργίες, στον έλεγχο της χοληστερόλης του ορού και στην πρόληψη ορισμένων τύπων καρκίνου. Επιπροσθέτως, είναι συνεχώς αυξανόμενος ο αριθμός των μελετών, *in vivo* και *in vitro*, οι οποίες καταλήγουν και παρέχουν στοιχεία ως προς την θετική επίδραση των LAB σε καρκίνους του παχέος εντέρου, της ουροδόχου κύστης, του ήπατος, του μαστού και του στομάχου. Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί ότι διάφορα είδη LAB που χρησιμοποιούνται ως καλλιέργειες εκκίνησης κατά την διαδικασία της ζύμωσης τροφίμων, μπορούν να λειτουργήσουν ως πηγή για γονίδια τα οποία να είναι ανθεκτικά στα αντιβιοτικά με τη πιθανότητα να μεταφερθούν σε

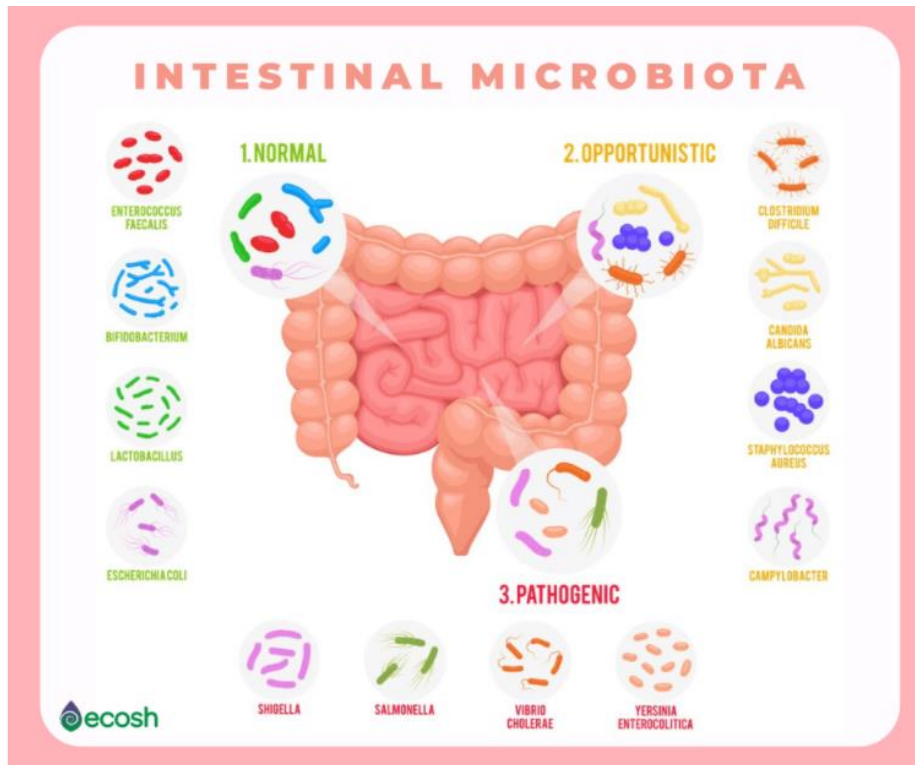
ανθρώπους, ζώα και παθογόνα μικρόβια μέσω της τροφικής αλυσίδας. Αυτό οδηγεί στο γεγονός ότι η αντίσταση στα αντιβιοτικά ανησυχεί την επιστημονική κοινότητα και αποτελεί ένα μεγάλο θέμα ασφάλειας όταν η αντίσταση είναι μεταβιβάσιμη, ειδικά σε παθογόνα βακτήρια. (Li-Oon Chuah, 2019)

Πιο ειδικά, τα προβιοτικά χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση μίας ευρείας ποικιλίας γαστρεντερικών ασθενειών, όπως η λοιμώδης διάρροια, το σύνδρομο ευερέθιστου εντέρου και η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου. Το οξικό, το σουκινικό και το γαλακτικό οξύ που παράγονται από τους γαλακτοβάκιλλους μειώνουν το pH του εντέρου και ως εκ τούτου παρεμποδίζουν την ανάπτυξη των παθογόνων μικροοργανισμών που βρίσκονται εκεί. Τα LAB παρουσιάζουν διάφορες ιδιότητες που τα καθιστούν χρήσιμα για την αντιμετώπιση λοιμογόνων ασθενειών όπως οξέων λοιμώξεων του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος, των πνευμονικών παροξύνσεων σε παιδιά με κυστική ίνωση και του εκζέματος. Μία τέτοια ιδιότητα είναι η παραγωγή αντιμικροβιακών ενώσεων χαμηλού μοριακού βάρους, των βακτηριοκυνών. Οι βακτηριοκύνες είναι μικρές πρωτεΐνες οι οποίες παράγονται από βακτήρια και έχουν τοξική δράση σε άλλα βακτήρια. Ο σχηματισμός γαλακτικού οξέος και υπεροξειδίου του υδρογόνου (παραπροϊόν του μεταβολισμού των γαλακτοβάκιλλων) είναι ωφέλιμος για τον έλεγχο της ανάπτυξης άλλων πιθανώς παθογόνων βακτηρίων. (Karami et al., 2017) Στον Πίνακα 1, παρουσιάζονται τα κλινικά αποτελέσματα που αφορούν την επίδραση των προβιοτικών. Αρχικά, σύμφωνα με την μελέτη του Goldenberg et al (2015), το αντιβιοτικό που συνδέεται με την διάρροια στα παιδιά παρουσίασε μέτρια μείωση του συμπτώματος κατά 55%. Έπειτα, τα προβιοτικά σχετικά με την πρόληψη της λοίμωξης του ανώτερου αναπνευστικού, είχαν αρκετά καλύτερη επίδοση σε σχέση με τα εικονικά φάρμακα. Σύμφωνα με Akbari et al (2016), αξιοσημείωτη ήταν η μείωση της γλυκόζης αίματος νηστείας σε σύγκριση με το εικονικό φάρμακο και σημειώθηκε και μείωση στην HbA1c. Τέλος, έπειτα από έρευνα των Mallace and Milev (2017), κατέληξαν ότι παρόλο που δεν κατέστη δυνατή η ποσοτική ανάλυση, οι περισσότερες μελέτες έδειξαν θετικά αποτελέσματα ως προς τον περιορισμό και την ανακούφιση των συμπτωμάτων της κατάθλιψης, γεγονός αρκετά ενθαρρυντικό.

Πίνακας 1 : Κλινικά αποτελέσματα για τον ρόλο των προβιοτικών (Ana M Valdes, 2018)

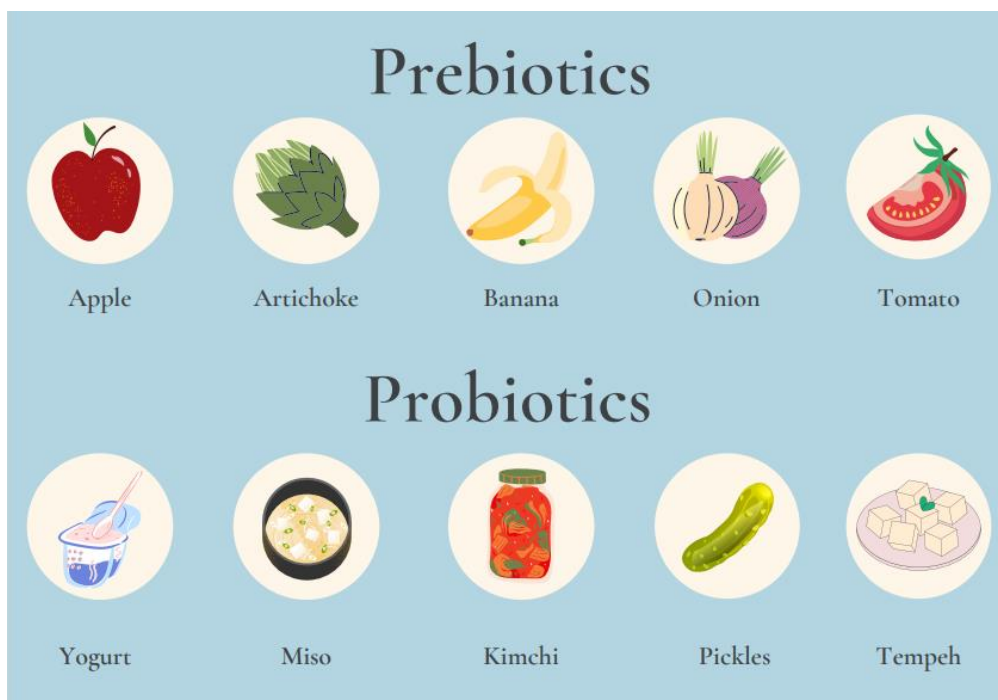
Αποτελέσματα	Αναφορά	Συμπεράσματα
Αντιβιοτικό που συνδέεται με την διάρροια στα παιδιά	Goldenberg et al (2015)	Μέτρια ένδειξη μείωσης της επίπτωσης διάρροιας που σχετίζεται με αντιβιοτικά στο προβιοτικό v- ομάδα ελέγχου (55%)
Προβιοτικά για πρόληψη της λοίμωξης του ανώτερου αναπνευστικού	Hao et al (2015)	Είχαν καλύτερη επίδοση σε σχέση με τα εικονικά φάρμακα ως προς την μείωση των λοιμώξεων του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος
Διαβήτης τύπου 2	Akbari et al (2016)	Σημειώθηκε σημαντική μείωση της γλυκόζης αίματος νηστείας σε σύγκριση με το εικονικό φάρμακο. Σημαντική μείωση παρατηρήθηκε και στην HbA1c παρατηρήθηκε
Μείωση της ολικής χοληστερόλης και της LDL	Wu et al (2017)	Η κατανάλωση γαλακτοβάκιλλων μείωσε σημαντικά την ολική χοληστερόλη κατά 0,26 mmol/L και LDL-C κατά 0,23 mmol/L
Συμπτώματα κατάθλιψης	Mallace and Milev (2017)	Δεν έγινε ποσοτική ανάλυση, αλλά οι περισσότερες μελέτες έδειξαν θετικά αποτελέσματα, και το συμπέρασμα είναι ότι τα προβιοτικά ανακουφίζουν τα συμπτώματα της κατάθλιψης

Οι γαλακτοβάκιλλοι χρησιμοποιούνται επίσης ευρέως στην βιομηχανία τροφίμων όπως κατά τη ζύμωση που πραγματοποιείται για την παραγωγή γιαουρτιού. Εκτός από το ότι με τη ζύμωση παράγονται οξέα τα οποία μειώνουν το pH και έτσι εμποδίζουν την ανάπτυξη των παθογόνων, ενισχύουν την θρεπτική αξία των τροφίμων. Αυτό συμβαίνει διότι τα βακτήρια αυτά προκαλούν αύξηση της παραγωγής αμινοξέων, βιταμινών και μετάλλων. (Karami et al., 2017; Slover, 2008) Τα προβιοτικά φαίνεται επίσης να βελτιώνουν τις καρδιομεταβολικές παραμέτρους και να μειώνουν τη συγκέντρωση της δραστικής πρωτεΐνης C στον ορό σε ασθενείς με διαβήτη τύπου 2. (Valdes et al., 2018) Για να μπορέσουν τα βακτήρια αυτά να προκαλέσουν θετικές επιδράσεις στην υγεία του ξενιστή, πρέπει να λαμβάνονται σε μία δόση της τάξης των 5 δισεκατομμυρίων CFU/ημέρα, για μία περίοδο τουλάχιστον 5 ημερών (Vinderola et al. 2019).



Εικόνα 2 : Ευεργετικοί και παθογόνοι μικροοργανισμοί στο μικροβίωμα του εντέρου (htt)

Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί η διαφορά μεταξύ πρεβιοτικών και προβιοτικών. Τα προβιοτικά όπως προαναφέρθηκε είναι ζωντανοί βακτηριακοί μικροοργανισμοί και εντοπίζονται στις καλλιέργειες που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή γιαουρτιού για παράδειγμα ή στις πίκλες (Εικόνα 3). Τα πρεβιοτικά είναι διαιτητικές ίνες που προέρχονται από διάφορα φρούτα και λαχανικά (Εικόνα 3), υδατανθρακικά πολυμερή δηλαδή που αποτελούνται από τρις ή περισσότερες μονάδες μονομερών και καθίστανται ανθεκτικά στα ένζυμα που βοηθούν στην πέψη, και γι' αυτό δεν μπορούν ούτε να υδρολυθούν ούτε να απορροφηθούν από το λεπτό έντερο. Ωστόσο, αποτελούν τροφή των μικροοργανισμών που υπάρχουν στο έντερο. (Valdes et al., 2018)



Εικόνα 3 : Πηγές στις οποίες εντοπίζονται преβιοτικά (πάνω) και προβιοτικά (κάτω) (htt1)

1.1.3 Καλλιέργειες εκκίνησης

Μια καλλιέργεια εκκίνησης μπορεί να οριστεί ως ένα μικροβιακό παρασκεύασμα μεγάλου αριθμού κυττάρων ενός τουλάχιστον μικροοργανισμού που θα προστεθεί σε μια πρώτη ύλη για να παραχθεί ένα τρόφιμο επιταχύνοντας και καθοδηγώντας τη διαδικασία ζύμωσης. Η ομάδα των γαλακτικών βακτηρίων κατέχει πρωτεύον ρόλο σε αυτή τη διαδικασία καθώς προκαλούν ταχεία οξίνιση της πρώτης ύλης μέσω της παραγωγής οργανικών οξέων με κυρίαρχο το γαλακτικό οξύ. Επίσης, σχηματίζεται οξικό οξύ, αιθανόλη, αρωματικές ενώσεις, βακτηριοσίνες, εξωπολυσακχαρίτες και πολλά ένζυμα κάτι το οποίο είναι ιδιαίτερα σημαντικό. Οι λειτουργικές καλλιέργειες εκκίνησης διαθέτουν τουλάχιστον μία εγγενή λειτουργική ιδιότητα. Έτσι, μπορούν να συμβάλουν στην ενίσχυση της διάρκειας ζωής των τροφίμων, στην ασφάλειά τους, προσφέρουν ένα ή περισσότερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (υφή, γεύση), ακόμη και τεχνολογικά αλλά και διατροφικά πλεονεκτήματα. (Leroy & De Vuyst, 2004)

Η εφαρμογή προσεκτικά επιλεγμένων στελεχών ως καλλιέργειες εκκίνησης σε διαδικασίες ζύμωσης μπορεί να βοηθήσει στην επίτευξη άμεσης έκφρασης της επιθυμητής ιδιότητας, διατηρώντας ένα φυσικό και υγιεινό προϊόν. Παραδείγματα είναι τα LAB που είναι ικανά να παράγουν αντιμικροβιακές ουσίες, γλυκαντικές ουσίες, αρωματικές ενώσεις, χρήσιμα ένζυμα ή θρεπτικά συστατικά ή τα LAB με ιδιότητες που προάγουν την υγεία, τα λεγόμενα προβιοτικά στελέχη που έχουν αναφερθεί εκτενώς παραπάνω. Αυτό αντιπροσωπεύει έναν

τρόπο αντικατάστασης των χημικών πρόσθετων με φυσικές ενώσεις, παρέχοντας ταυτόχρονα στον καταναλωτή νέα, ελκυστικά προϊόντα διατροφής. Μάλιστα από τα LAB, το γένος *Lactococcus lactis* ήταν για πολύ καιρό το επικρατέστερο γαλακτικό βακτήριο, λόγω της εκτεταμένης χρήσης του στην παραγωγή τυριού. Πλέον, μεγάλη αναγνωρισιμότητα έχει και το είδος *Streptococcus thermophilus*, το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως για την παραγωγή γιαουρτιού και του τυριού mozzarella. (Li et al., 2020)

1.2 *Lactobacillus spp*

Το γένος *Lactobacillus spp*, όπως αναφέρθηκε στην Υποενότητα 1.1.1, είναι ένα γένος γαλακτικού βακτηρίου και μέχρι και σήμερα έχουν ανακαλυφθεί πάνω από 260 φυλογενετικές σχέσεις. Πιο συγκεκριμένα, φυλογενετικές σχέσεις, είναι η διαδικασία κατά την οποία μέσω της αμινοξικής αλληλουχίας ορισμένων πρωτεϊνών ή των αντίστοιχων γονιδίων, προσδιορίζονται οι εξελικτικές σχέσεις των οργανισμών. Κατά την διαδικασία αυτή, δηλαδή κατά την εκτίμηση των φυλογεννητικών σχέσεων, εξετάζονται και συγκρίνονται αντίστοιχα γονίδια ή ομόλογες πρωτεΐνες. Αυτό αναφέρεται, καθώς αυτό δείχνει την ανάγκη για ανίχνευση και την απομόνωση του συγκεκριμένου βακτηρίου που θα αναλυθεί στις παρακάτω ενότητες. Ειδικότερα, το *Lactobacillus spp*, είναι ένα θετικό κατά Gram βακτήριο, είναι αναερόβιο και προαιρετικά αναερόβιο, επιβιώνει σε όξινο περιβάλλον και τα θρεπτικά συστατικά που απαιτεί για την επιβίωση του είναι υδατάνθρακες, βιταμίνες, αμινοξέα και πεπτίδια. Επίσης, είναι σφαιρικού σχήματος, σχηματίζει μικρού μήκους αλυσίδες, είναι χαμηλό σε G+C και δεν σχηματίζει σπόρους. (Wood, 1995) Ανήκει στην ευρύτερη οικογένεια των LAB βακτηρίων, όπως προαναφέρθηκε. Είναι ένα βακτήριο που συμμετέχει σε ζυμώσεις, και χρησιμοποιώντας την γλυκόζη ως πηγή άνθρακα, μπορεί να παράξει πάνω από 85 % γαλακτικό οξύ, CO₂ και αιθανόλη σε ίσες αντίστοιχα ποσότητες. Επιπροσθέτως, υπάρχει πιθανότητα να παράξει διάφορα μεταβολικά προϊόντα (κιτρικό, μηλικό, νιτρώδες κλπ.), τα οποία μπορεί να αποτελέσουν πηγές ενέργειας. Πολλά στελέχη του συγκεκριμένου γένους είναι αυτά που τα βρίσκουμε στα πιο σημαντικά βακτήρια στον τομέα της μικροβιολογίας τροφίμων και της ανθρώπινης διατροφής, λόγω της συμβολής τους στην παραγωγή ζυμωμένων προϊόντων και την χρήση τους ως προβιοτικά. (Morten Danielsen, 2003)

1.3 Οφέλη *Lactobacillus spp*

Το *Lactobacillus spp*, βρίσκεται φυσιολογικά στον ανθρώπινο οργανισμό. Πιο συγκεκριμένα, εντοπίζονται στο γαστρεντερικό και στο ουροποιητικό σύστημα του ανθρώπου και αποτελεί βασικό συστατικό για την ορθή λειτουργία του οργανισμού. Το συγκεκριμένο γένος, συμβάλλει στην σωστή πέψη, διάσπαση των τροφίμων, στην απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών και βοηθά στην πρόληψη ασθενειών. Ειδικότερα, τοξίνες είναι πιθανόν να δημιουργηθούν από λανθασμένη ζύμωση από τυχόν ύπαρξη άλλων βακτηρίων, με αποτέλεσμα την διατάραξη του ανθρώπινου συστήματος. (Patten D.A., 2015) Σε αυτή την περίπτωση τα προβιοτικά, τα οποία περιέχουν το *L.spp*, έχουν την ικανότητα να αναπλάθουν το πεπτικό μας σύστημα με «καλά» μικρόβια τα οποία θα αδρανοποιήσουν τα βλαβερά. Συμπερασματικά τα ωφέλιμα μικρόβια ζυμώνουν σωστά το φαγητό και βελτιώνουν την υγεία. Επιπλέον, προστίθενται σε τρόφιμα όπως γιαούρτι, γάλα και εμπεριέχονται σε αρκετά συμπληρώματα διατροφής. Γίνεται χρήση των συγκεκριμένων βακτηρίων και από ανθρώπους που παρουσιάζουν: προβλήματα χώνεψης, σύνδρομο ευερέθιστου εντέρου, κολικοί βρεφών και για αρκετές άλλες παθήσεις που σχετίζονται με το έντερο και το στομάχι. (Christine M.Slover, 2008)



Εικόνα 4: Μορφές γαλακτοβάκιλλου εντερικό σύστημα (*htt2*)

2 Κεφάλαιο: Δευτερογενείς μεταβολίτες

Δευτερογενείς μεταβολίτες ονομάζονται οργανικές ενώσεις με ετερογενή χημική δομή και βιολογική δράση, οι οποίες παράγονται από μικροοργανισμούς μετά την φάση της ραγδαίας ανάπτυξής τους. Οι τρεις βασικές δομικές μονάδες των δευτερογενών μεταβολιτών είναι οι φαινολικές ενώσεις, οι αλκαλοειδής και τα τερπένια. Οι φαινολικές ενώσεις μπορεί να είναι φλαβονοειδή, σαλικυλικό οξύ, λυγνίνη κτλ. και προκύπτουν διαμέσου Μεταβολισμού υδατανράθρακων. Τα αλκαλοειδή όπως γλυκοσινολικά, κυανογενείς γλυκοσίδες κτλ, μέσω μεταβολισμού αζώτου. Και τα τερπένια, για παράδειγμα λιμονοειδή, σαπωνίνες, τα οποία μπορούν να παραχθούν μέσω του μεταβολισμού λιπαρών οξέων. (Hartmann, 1996) Επιπλέον, είναι προϊόντα χαμηλής μοριακής μάζας δευτερογενούς μεταβολισμού. Έχουν ασυνήθιστες δομές και η παραγωγή τους προκύπτει από ενδοκυτταρικά ενδιάμεσα (αμινοξέα, σάκχαρα, λιπαρά οξέα κ.λπ.), τα οποία συμπυκνώνονται σε πιο σύνθετες δομές μέσω καθορισμένων βιοχημικών οδών. Οι προαναφερθείσες ενώσεις δεν είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη και για αυτόν ακριβώς τον λόγο αναφερόμαστε σε αυτές με τον όρο δευτερογενείς σε αντίθεση με τους βασικούς μεταβολίτες όπως είναι τα σάκχαρα, οι πρωτεΐνες, τα λιπαρά οξέα και τα νουκλεοτίδια. Περιλαμβάνουν αντιβιοτικά, αντικαρκινικούς παράγοντες, φάρμακα μείωσης της χοληστερόλης, ανοσοκατασταλτικά, αντιελμινθικούς παράγοντες και άλλα αντιπαρασιτικά, βιο-εντομοκτόνα. (S. Sanchez, 2011)

Παρόλο που τα αντιβιοτικά είναι οι πιο διαδεδομένοι δευτερογενείς μεταβολίτες, τις τελευταίες δεκαετίες υπάρχει ταχύτατη έρευνα νέων ενώσεων χρήσιμων σε διάφορα βιομηχανικά πεδία, ειδικά όσον αφορά τη φαρμακοβιομηχανία, τη βιομηχανία καλλυντικών, τροφίμων και γεωργίας. Η χρήση των μικροβιακών δευτερογενών μεταβολιτών γίνεται ευρεία και αφορά κυρίως την αντιμετώπιση ασθενειών που προηγουμένως θεραπεύονταν από συνθετικά φάρμακα. (Olga Mosunova, 2021) Στην σημερινή εποχή, η παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών αποτελεί ένα αρκετά σημαντικό και περιζήτητο ερευνητικό πεδίο για οργανικούς χημικούς, μοριακούς βιολόγους και βιοπληροφορικούς. Ενδεικτικά η χρήση τους εντοπίζεται σε αντιφλεγμονώδη, στην αντιμετώπιση της υπότασης, στην καταπολέμηση όγκων, χοληστερίνης και παρασίτων. Νέοι μικροβιακοί μεταβολίτες χρησιμοποιούνται ευρέως σε γεωργικό επίπεδο μαζί με σημαντικά ζιζανιοκτόνα, εντομοκτόνα, ρυθμιστές ανάπτυξης των φυτών καθώς και με άλλα βιομηχανικά προϊόντα όπως χρωστικές και επιφανειοδραστικές ουσίες. (Καραμανώλη, 2007)

Αυξανόμενο ενδιαφέρον έχει σημειωθεί το τελευταίο διάστημα σχετικά με τις προβιοτικές επιδράσεις που ασκούνται από μικροβιακούς μεταβολίτες γνωστούς ως βιοενεργοί μεταβιοτικοί μεταβολίτες (PM). Αυτό συμβαίνει καθώς οι μεταβολίτες αυτοί συμβάλλουν στην διατήρηση της υγείας του εντέρου, τη θεραπεία ασθενειών του εντέρου και την ενίσχυση της έμφυτης ανοσίας. Τα PM μπορεί να είναι διαλυτοί ή εκκρινόμενοι παράγοντες, μεταβολίτες, βακτηριοσίνες και υπερκείμενο χωρίς κύτταρα με αποτελεσματικότητα ανάλογη αυτής των ζωντανών προβιοτικών που σχετίζονται σε μεγάλο βαθμό με το *Lactobacilli*. Μερικοί επιστήμονες έχουν συνοψίσει τον ρόλο των μεταβιοτικών στη διατήρηση της υγείας του παχέος εντέρου και προτείνεται ότι τα μεταβιοτικά μπορούν να είναι μια ασφαλέστερη εναλλακτική λύση σε σύγκριση με τα ζωντανά βακτήρια. Προτείνεται η περαιτέρω χρήση των μεταβιοτικών για τη βελτίωση της ποιότητας ζωής των ασθενών στο μεταγενέστερο στάδιο του καρκίνου του παχέος εντέρου και τη χρήση του μεταβιοτικού στη θεραπεία και την πρόληψη ασθενειών που σχετίζονται με το έντερο, όπως η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου. (Li-Oon Chuah, 2019)

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες των γαλακτικών βακτηρίων χρησιμοποιούνται για την διατήρηση των τροφίμων ώστε να αντικαταστήσουν τα μέχρι πρότινος ευρέως χρησιμοποιούμενα συνθετικά συντηρητικά. Στους δευτερογενείς μεταβολίτες των LAB συγκαταλέγονται οι βακτηριοκύνες, τα οργανικά οξέα και τα πεπτίδια. Έχει αποδειχθεί μάλιστα πως αυτές οι ενώσεις μπορούν να ελέγξουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών κυρίως των μυκήτων που προκαλούν αλλοίωση στα τρόφιμα. (Belal J. Muhialdin, 2016)

2.1 Ανίχνευση δευτερογενών μεταβολιτών

Από την προηγούμενη ενότητα γίνεται αντιληπτή η σημαντικότητα των δευτερογενών μεταβολιτών. Επίσης βασικό για την σωστή χρήση αυτών, αποτελεί η ανίχνευση των μεταβολιτών αυτών, γεγονός που δεν είναι εύκολο και εξαρτάται από την πρώτη ύλη. Εξαιτίας αυτού του γεγονότος, θα παρουσιαστούν στην συνέχεια συγκεκριμένες επιστημονικές μελέτες για τον τρόπο και τις μεθόδους ανίχνευσης των ουσιών που αναφέρθηκαν.

Αρχικά, στην επιστημονική έρευνα των Lucille Garniera και Marine Penland etc. το 2020 στην Γαλλία (Lucille Garniera, 2020), απομονώθηκε το στέλεχος *Lactobacillus rhamnosus* CIRM-BIA1952 από ένα ανασυσταθέν γάλα 10.0 % χαμηλής θερμοκρασίας συμπληρωμένο με 45.0 % άνυδρο λίπος γάλακτος. Για κάθε πείραμα αναλύθηκαν τρία βιολογικά αντίγραφα του *L. rhamnosus* CIRM-BIA1952. Για να επιτευχθεί αυτό χρησιμοποιήθηκαν διάφορες

αναλυτικές μέθοδοι, αρχικά οι συμβατικές, όπως είναι η υγρή χρωματογραφία (LC) και η αέρια χρωματογραφία (GC), ο συνδυασμός αέριας χρωματογραφίας – φασματομετρία μάζας (GC-MS), υγρή χρωματογραφία – χρόνος πτήσης τετραπόλου (LC-QToF) και νάνο υγρή χρωματογραφία – φασματομετρία μάζας/ φασματομετρία μάζας (nano-LC-MS/MS). Οι παραπάνω μέθοδοι εφαρμόστηκαν για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των αντιμυκητιακών μεταβολιτών, συμπεριλαμβανομένων 56.0 οργανικών και λιπαρών οξέων (με στοχευμένη προσέγγιση) και πτητικές ενώσεις και πεπτίδια (με μη στοχευμένη προσέγγιση). Τα αποτελέσματα των παραπάνω πειραμάτων, παρουσιάζονται στον Πίνακα 2, όπου στην αριστερή στήλη φαίνονται διάφορα αντιμυκητιακά συστατικά και στην αριστερή στήλη παρουσιάζεται με το σύμβολο «+», αν ανιχνεύθηκε το συστατικό στο στέλεχος *Lactobacillus rhamnosus* CIRM-BIA1952, και με «-» αν δεν ανιχνεύθηκε. Αξίζει να σημειωθεί, ότι ανιχνεύθηκε αιθανικό οξύ, βενζοϊκό οξύ, βουτανιοϊκό οξύ, αλλά δεν βρέθηκε αραχιδονικό οξύ και λινελαϊκό οξύ.

Πίνακας 2 : Ανίχνευση αντιμυκητιακών μεταβολιτών του *L. rhamnosus* CIRM-BIA1952 (Lucille Garniera, 2020)

Antifungal compounds	<i>L. rhamnosus</i> CIRM-BIA1952
Ethanoic acid	+
Propanoic acid	+
Benzoic acid	+
2-Hydroxybenzoic acid (salicylic acid)	+
3-Phenylpropanoic acid (hydrocinnamic acid)	+
Butanedioic acid (succinic acid)	+
Butyric acid	+
Caprylic acid	+
Lauric acid	+
Myristic acid	+
Palmitic acid	+
Palmitoleic acid	+
Stearic acid	+

Arachidic acid	-
Linoleic acid	-
Mevalonolactone	+

Στην συνέχεια, ακολουθεί η έρευνα των Hongjuan Li, Lu Liu, Shuwen Zhang, Wenming Cui και Jiaping Lv το 2012. (Hongjuan Li, 2012). Ειδικότερα, οι παραπάνω επιστήμονες αυτοί ασχολήθηκαν με το στέλεχος *Lactobacillus casei* AST18, στο οποίο ανιχνεύθηκαν οι αντιμυκητιασικές ενώσεις του διηθήματος κυτταρικής καλλιέργειας άνευ κυττάρων. Επιπλέον, παρασκευάστηκαν οι ενώσεις αυτές με υπερδιήθηση και ημι-διαχωριστική υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης και στη συνέχεια έγινε προσδιορισμός με αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας. Στον Πίνακα 3 παρακάτω, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής, κατά την οποία ανιχνεύθηκαν στο *Lactobacillus casei* AST18 λακτικό οξύ, τρυγικό οξύ, κιτρικό οξύ και οξικό οξύ.

Πίνακας 3 : Ανίχνευση αντιμυκητιακών μεταβολητών του *L. casei* AST18 (Hongjuan Li, 2012)

Antifungal Compounds	<i>L. casei</i> AST18
Lactic acid	+
Tartaric acid	+
Citric acid	+
Acetic acid	+

Η επόμενη μελέτη είναι των Brid Brosnan, Aidan Coffey, Elke K.Arendt και Ambrose Fureya το 2014 στην Ιρλανδία. Πιο συγκεκριμένα ασχολήθηκαν με τον ποσοτικό προσδιορισμό των αντιμυκητιασικών ενώσεων χαμηλής, μέσης και υψηλής συγκέντρωσης, διασφαλίζοντας ότι ταυτοποιούνται τόσο γνωστές όσο και άγνωστες ενώσεις. Στην μελέτη αυτή αναφέρουν την πρώτη εφαρμογή της μεθόδου QuEChERS, όπου το όνομα της οποίας προέρχεται από τα αρχικά των λέξεων Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged και Safe (γρήγορη, εύκολη, φθηνή, αποτελεσματική, ανθεκτική και ασφαλής). Η συγκεκριμένη μέθοδος χρησιμεύει στην εξαγωγή φυσικών αντιμυκητιακών μεταβολιτών σε καλλιέργειες γαλακτικών βακτηρίων. Η μέθοδος QuEChERS είναι μια γρήγορη, απλή τεχνική προετοιμασίας δειγμάτων που απαιτεί ελάχιστα βήματα. Συνίσταται από την λήψη ενός δείγματος και στην εκτέλεση εκχύλισης/ διαχωρισμού ανακινώντας με οργανικό διαλύτη. Συνηθέστερα χρησιμοποιείται το

ακετονιτρίλιο, αλλά καλές εναλλακτικές αποτελεί ο αιθυλεστέρας και η ακετόνη. Επίσης προστίθεται χλωριούχο νάτριο για την μείωση των πολικών παρεμβολών και το άνυδρο θεικό μαγνήσιο βοηθά στην διευκόλυνση του διαχωρισμού του διαλύτη και βελτιώνει την ανάκτηση των πολικών αναλυτών. Το οργανικό στρώμα έπειτα μεταφέρεται με σκοπό να γίνει διασκορπιστική εκχύλιση στερεάς φάσης για την απομάκρυνση τυχόν παρεμβολών μήτρας από το δείγμα. Η ανάλυση των στελεχών που επιλέχθηκαν για την έρευνα αυτή έγινε με σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης με ανίχνευση υπεριώδους ακτινοβολίας/ διάταξης διόδων (HPLC - UV/ DAD) και η επιβεβαίωση των ταυτοποιημένων ενώσεων πραγματοποιήθηκε με ανάλυση σε φασματογράφο υγρής χρωματογραφίας γραμμικής ιονοπαγίδας τετραπόλου Orbitrap υβριδικού μετασχηματισμού Fourier με φασματογράφο μάζας (LC- FTMS). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 4, όπου στην αριστερή στήλη φαίνονται οι ενώσεις που μας ενδιαφέρουν και στις άλλες δύο στήλης αναγράφεται με «+» η ανίχνευση της ένωσης στο αντίστοιχο στέλεχος και με «-» η μη ανίχνευση. Και στα δύο στελέχη βρέθηκε 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ και καφεϊκό οξύ, ενώ σε κανένα από τα δύο δεν βρέθηκε σαλικυλικό οξύ.

Πίνακας 4 : Προσέγγιση μίας νέας εφαρμογής για την ταυτοποίηση αντιμυκητιακών ενώσεων που παράγονται από καλλιέργειες βακτηρίων γαλακτικού οξέος (Brid Brosnan, 2014)

Antifungal Compounds	<i>Lactobacillus amylovorus</i> A	<i>Lactobacillus plantarum</i> B
4-Hydrobenzoic acid	+	+
Hydrocinnamic acid	+	-
Caffeic acid	+	+
Phenyllactic acid	+	+
p-Coumaric acid	+	+
Benzoic acid	+	+
Salicylic acid	-	-

Πίνακας 5 : Ανασκόπηση για ζυμώσεις με βακτήρια γαλακτικού οξέος πολλαπλών προϊόντων (José Aníbal Mora-Villalobos J. M.-Z.-G.-S.-W.-G., 2020)

Antifungal Compounds	<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>casei</i> LC-10	<i>Lactobacillus sanfrancisco</i> CB1	<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC	<i>Lactobacillus plantarum</i> VTT E-78076	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain 21B
2-pyrrolidone-5-carboxylic acid (Pyroglutamic acid- PCA)	+				
Caproic acid		+			
Exopoly-saccharides			+		
Mevalonic acid Mevalonolactone				+	
Phenyl lactic					+
p-hydroxyphenyl acetic acid					+

Ο παραπάνω Πίνακας 5, συστάθηκε από τον συνδυασμό ποικίλων μελετών και παρουσιάζει τα δευτερογενή μεταβολικά προϊόντα που ανιχνευθήκαν στα αντίστοιχα στελέχη του *Lactobacillus*. (José Aníbal Mora-Villalobos J. M.-Z.-G.-S.-W.-G., 2020) Αρχικά, στην πρώτη έρευνα, εξετάστηκε η παραγωγή ενός κυκλικού αμινοξέος, PCA, από βακτηριακά στελέχη γαλακτικού οξέος. Επιπλέον, αξιολογήθηκε η αντιμικροβιακή δράση του PCA έναντι διαφόρων αλλοιωμένων μικροβίων. Όλα τα στελέχη ελήφθησαν από το Κέντρο Έρευνας και Ανάπτυξης, Valio Ltd., στο Ελσίνκι στην Φινλανδία. Οι καλλιέργειες διατηρήθηκαν σε υγρά μέσα στους 4.0 °C με μηνιαίες ανακαλλιέργειες. Τα βακτήρια ανακαλλιεργούνταν δύο φορές πριν από τη χρήση. Στην επόμενη μελέτη, ελέγχθηκε η δράση κατά της μούχλας 232.0 στελεχών γαλακτοβάκιλλων προζυμιού και ταυτοποιήθηκαν οι ανασταλτικές ενώσεις που παράγονται από τον *Lactobacillus sanfrancisco* CB1. Τα στελέχη *Lactobacillus* καλλιεργήθηκαν σε ζωμό υδρόλυσης αλεύρων σίτου (wheat flour hydrolysate-WFH) και σε pH ίσο με 6.0 (M. Gobbetti, 1994), στους 30.0 °C για 48.0 ώρες (τυπικές συνθήκες). Τα υπερκείμενα που προέκυψαν χωρίς κύτταρα με φυγοκέντρηση (7000.0 g για 10.0 λεπτά), διηθήθηκαν μέσω φίλτρου μεγέθους πόρων 0.22 μm (Nucleopore, Costar). Ο ζωμός WFH, λόγω της χημικής σύνθεσης που είναι παρόμοια με εκείνη του αλεύρου σίτου, επιλέχθηκε για να προσεγγίσει τις πραγματικές συνθήκες ζύμωσης του προζυμιού. Το υπερκείμενο χωρίς κύτταρα *Lb. sanfrancisco* CB1 βακτήριο αναλύθηκε με ένα ολοκληρωμένο σύστημα εγχυτήρα καθαρισμού και παγίδευσης (Chrompack, Middelburg, Κάτω Χώρες) σε συνδυασμό με αέριο χρωματογράφο υψηλής ανάλυσης και εκλεκτικό ανιχνευτής μάζας

(5890.0 series II-HP) και ανιχνευτή επιλεκτικής μάζας A HP (MSD 5971) (Hewlett Packard, Palo Alto, Calif. USA) (PTI-HRGC-MSD) (Damiani P., 1996). Το καπροϊκό οξύ ήταν το πιο ανασταλτικό οργανικό οξύ που παρήγαγε ο γαλακτοβάκιλλος *Lb. sanfrancisco* CBI και η βασική ένωση του μείγματος κατά της μούχλας. Στην συνέχεια, στόχος της τρίτης εργασίας ήταν η προώθηση της απόδοσης των εξωκυτταρικών πολυμερών ουσιών (EPS) από τον *Lactobacillus acidophilus* μέσω της διαλογής των μεταλλαγμένων στελεχών και της βελτιστοποίησης των παραμέτρων ζύμωσης καθώς και των συνθηκών εκχύλισης για βιομηχανική εφαρμογή. Ο *L. acidophilus* ATCC που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη ως αρχικό στέλεχος ελήφθη από το Ινστιτούτο Μικροβιολογίας της Κινεζικής Ακαδημίας Επιστημών στο Πεκίνο στην Κίνα. Τα αρχικά στελέχη αποθηκεύτηκαν στους -80.0 °C και επωάστηκαν στους 37.0 °C για 24.0 ώρες σε ζυμό MRS για ενεργοποίηση. Ακολουθεί η τέταρτη, όπου αντικείμενό της ήταν ο χαρακτηρισμός και η ταυτοποίηση των αντιμικροβιακών ενώσεων χαμηλής μοριακής μάζας που παράγονται από το *Lactobacillus plantarum* VTT E-78076. Ο συγκεκριμένος γαλακτοβάκιλλος απομονώθηκε αρχικά από μύρα, αλλά για την μελέτη οι οργανισμοί που χρησιμοποιηθήκαν ελήφθησαν από τη VTT Culture συλλογή. Ο *Lactobacillus plantarum* καλλιεργήθηκε σε ζυμό MRS (Oxoid) στους 30.0 °C για 72.0 ώρες. Η καλλιέργεια φυγοκεντρήθηκε στα 3000.0 g για 10.0 λεπτά και το υπερκείμενο υγρό διηθήθηκε μέσω φίλτρου μεγέθους πόρων 45.0 mm (Millex-HA, Millipore, S.A., Molsheim, Γαλλία). Το αποστειρωμένο διήθημα αποθηκεύτηκε στους 4.0 °C. Νέοι τύποι αντιμικροβιακών ενώσεων ταυτοποιήθηκαν στο διήθημα καλλιέργειας του *Lactobacillus plantarum* VTT E-78076. Ανιχνεύθηκε δραστηριότητα στο παράγωγο χαμηλής μοριακής μάζας που διαχωρίστηκε με χρωματογραφία γέλης. Χαρακτηριστικές ενώσεις από αυτό το παράγωγο ταυτοποιήθηκαν με ανάλυση αέριας χρωματογραφίας/ φασματομετρία μάζας (GC/MS) και η ταυτοποίηση επιβεβαιώθηκε με τη χρήση καθαρών εμπορικών ενώσεων αναφοράς σε πανομοιότυπους χρωματογράφους και σε αντιμικροβιακές δοκιμές. Στην τελευταία εργασία, μελετήθηκε η αντιμυκητιακή δράση διαφόρων γαλακτικών βακτηρίων του προζυμιού και επιλέχθηκε ο *Lactobacillus plantarum* 21B, επειδή παρουσίασε ένα πολύ ευρύ φάσμα ανασταλτικής δράσης έναντι μυκήτων που απομονώθηκαν από προϊόντα αρτοποιίας. Νέες αντιμυκητιακές ενώσεις έχουν εντοπιστεί και η παραγωγή τους χαρακτηρίστηκε και το επιλεγμένο στέλεχος χρησιμοποιήθηκε σε προζύμι για την παραγωγή ψωμιού. Μετά από εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα, προπαρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας πηκτής πυριτίου και φασματοσκοπικές αναλύσεις, ταυτοποιήθηκαν νέες αντιμυκητιακές ενώσεις, όπως το φαινυλακτικό και το 4-υδροξυφαινυλακτικό οξύ, στο διήθημα της καλλιέργειας του *L. plantarum* 21B.

2.2 Αντιμικροβιακή και Αντιμυκητιακή Δράση Μεταβολίτων

Ένα αρκετά σημαντικό πρόβλημα στην βιομηχανία των τροφίμων και όχι μόνο, είναι ο έλεγχος των μυκητιακών και μικροβιακών αλλοιώσεων. Αρχικά, η μυκητιακή αλλοίωση οδηγεί στην καταστροφή και αλλοίωση μεγάλου αριθμού τροφίμων, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα αρνητικές περιβαλλοντικές επιπτώσεις καθώς αυτά απορρίπτονται στο περιβάλλον. Επιπλέον, αξιοσημείωτες είναι και οι αρνητικές οικονομικές επιπτώσεις, γιατί είναι αρκετά ζημιολόγο να απορρίπτονται προϊόντα. Βασικό επίσης αποτελεί το γεγονός ότι αν ένα προϊόν αλλοιωθεί και το δει ο καταναλωτής, τότε αυτό μπορεί να δράσει αρνητικά στην αξιοπιστία της εταιρείας και του προϊόντος. καθώς επίσης μπορεί να επηρεάσει την εικόνα του προϊόντος στα μάτια του καταναλωτή (Hocking, 2009). Οι πιο διαδεδομένοι μύκητες, οι οποίοι εμπλέκονται στην αλλοίωση γαλακτοκομικών προϊόντων ανήκουν στο γένος *Penicillium* spp, *Mucor* spp και *Cladosporium* spp. Από την άλλη πλευρά, οι κοινώς γνωστές μούχλες που έχουν το ίδιο αποτέλεσμα με τους μύκητες παραπάνω είναι *Candida* spp, *Kluyveromyces* spp. Τέλος, στο πλαίσιο των όσο αφορά τους ζυμομύκητων είναι *Yarrowia* spp. (Lucille Garnier, 2017)

Στην σημερινή εποχή, έχουν βρεθεί πολλές μέθοδοι για την πρόληψη τέτοιων καταστάσεων. Ειδικότερα, χρησιμοποιούνται διάφορες προληπτικές και ελεγκτικές μέθοδοι, γνωστές και ως τεχνολογίες εμποδίων, για την πρόληψη της μόλυνσης των τροφίμων κατά την διάρκεια της διαδικασίας της παρασκευής τους, αλλά και για την αναστολή ή την επιβράδυνση της ανάπτυξης των μυκητιακών αλλοιώσεων. Οι μέθοδοι αυτοί, οι οποίοι μπορεί να είναι και συνδυαστικοί, περιλαμβάνουν για παράδειγμα καλές πρακτικές σχετικά με την παραγωγή, ή συμβάλλουν στο να ακολουθούνται ορθά τα πρωτόκολλα υγιεινής, εφαρμογή του συστήματος HACCP (Ανάλυση Κινδύνου και Κρίσιμα Σημεία Ελέγχου). Βασικό σημείο αποτελεί το σωστό φιλτράρισμα του αέρα πριν εισαχθεί στην καλλιέργεια, καθώς και η συσκευασία να γίνεται υπό ασηπτικές συνθήκες. Δεν θα μπορούσε να παραλειφθεί η επιμελής τήρηση του πρωτοκόλλου κατά την διάρκεια θερμικών κατεργασιών, κατά την συντήρηση/ψύξη και αλάτισμα/ συντήρηση σε άλμη. Πέραν αυτού, διάφορα χημικά συντηρητικά μπορούν να είναι χρήσιμα για την παράταση της διάρκειας ζωής του αναλώσιμου προϊόντος στο ράφι του σημείου πώλησης του, πάντα σύμφωνα και με γνώμονα τις σχετικές νομοθετικές πράξεις. (Lucille Garnier, 2017) Παρόλα αυτά, έχει σημειωθεί αυξανόμενη τάση από τους καταναλωτές να αναζητούν προϊόντα χωρίς να έχει γίνει προσθήκη χημικών συντηρητικών. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, να χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο φυσικές

εναλλακτικές λύσεις για την συντήρηση των αγαθών, όπως για παράδειγμα είναι η βιοσυντήρηση.

Ο όρος βιοσυντήρηση, ορίζεται ως η χρήση μικροοργανισμών ή των μεταβολικών προϊόντων τους για την παράταση της διάρκειας ζωής τους και την αύξηση της ασφάλειας των τροφίμων ως προς τον ανθρώπινο οργανισμό. Τα βακτήρια, οι ζύμες ή οι βακτηριοφάγοι θα μπορούσαν να εξαλείψουν την ανάπτυξη ανεπιθύμητων μικροβίων αλλοίωσης, καθώς και να αδρανοποιήσουν ή να καταστείλουν τα παθογόνα βακτήρια που μεταδίδονται με τα τρόφιμα, όπως η Salmonella, η Listeria, το Campylobacter, η E. coli, ο Staphylococcus κ.λπ. Τα γαλακτικά βακτήρια (LAB), τα προπιονικά βακτήρια και οι μύκητες είναι καλοί υποψήφιοι για την εφαρμογή της βιοσυντήρησης, καθώς, όπως έχει αποδειχθεί, δεν αποτελούν κίνδυνο για τον ανθρώπινο οργανισμό και μπορεί χωρίς φόβο να καταναλωθούν από αυτόν. Τα βακτήρια γαλακτικού οξέος είναι οι πιο μελετημένοι παράγοντες βιοσυντήρησης, που συμβάλλουν ως προστατευτικές καλλιέργειες στην ασφάλεια των τροφίμων και φυσικά στη διάρκεια ζωής τους. Αυτοί οι μικροοργανισμοί είναι ικανοί να παράγουν ένα αρκετά μεγάλο φάσμα χημικών ενώσεων όπως για παράδειγμα οργανικά οξέα, λιπαρά οξέα (Jesper Magnusson, 2003) κυκλικά διπεπτίδια (Katrin Ström, 2002) και πρωτεϊνικές ενώσεις. (Carlo Giuseppe Rizzello, 2011) Οι συγκεκριμένες παραγόμενες χημικές ενώσεις είναι πιθανό να εμπλέκονται σε αντιμικροβιακές δραστηριότητες, δρώντας συνεργατικά με άλλες. (Emily Crowley, 2013) (Marcia Leyva Salas, 2017) Ωστόσο, υπάρχει αυξανόμενο ενδιαφέρον για τις πολυλειτουργικές καλλιέργειες, όπως είναι οι καλλιέργειες εκκίνησης/προσθήκης/προβιοτικές/προστατευτικές καλλιέργειες, οι οποίες μπορούν να βελτιώσουν τα οργανοληπτικά και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά, δηλαδή τις τεχνολογικές ιδιότητες και να βελτιώσουν τις λειτουργικές ιδιότητες των τροφίμων, δηλαδή τις προβιοτικές και τις πρεβιοτικές.

2.2.1 Αποτελέσματα μελετών για την αντιμικροβιακή δράση των δευτερογενών μεταβολιτών

Σε συνέχεια της παραπάνω ενότητας, θα παρουσιαστούν ορισμένες μελέτες και τα αποτελέσματά τους, τα οποία θα πιστοποιήσουν τα όσα αναφέρθηκαν.

Η πρώτη μελέτη είναι των Argus Cezar da Rocha Neto, Marcelo Maraschin, Robson Marcelo Di Piero (Argus Cezarda Rocha Neto, 2015). Η παρούσα μελέτη έχει ως στόχο να εκτιμηθεί η επίδραση του σαλικυλικού οξέος (SA) κατά του *Penicillium expansum*, χαρακτηρίζοντας τους μηχανισμούς δράσης του. Η αντιμικροβιακή δράση προσδιορίστηκε με την έκθεση

κονιδίων σε διάλυμα 2.5 mM SA, για διάρκεια 0.0 έως 120.0 m, ακολουθούμενη από επώαση. Η επίδραση του pH στην αποτελεσματικότητα του SA κατά του *Penicillium expansum* εκτιμήθηκε τόσο in vitro όσο και in situ. Οι μηχανισμοί δράσης διερευνήθηκαν μέσω δοκιμών φθορισμού, μέτρησης της διαρροής πρωτεϊνών, βλάβης λιπιδίων και ηλεκτρονικής μικροσκοπίας μετάδοσης. Το SA ήταν ικανό να αναστείλει το 90.0% της βλάστησης του μύκητα αφού παρέλθουν 30.0 λεπτά, προκαλώντας βλάβη στην πλασματική μεμβράνη των κονιδίων και οδηγώντας σε διαρροή πρωτεϊνών έως και 3.2 μg διαλυμένης πρωτεΐνης ανά g μυκηλίου. Το pH του διαλύματος του SA επηρέασε την αντιμικροβιακή δράση αυτού του δευτερογενούς μεταβολίτη, ο οποίος ανέστειλε τη βλάστηση του *Penicillium expansum* και την εμφάνιση μπλε μούχλας στα μήλα σε διαλύματα με pH ίσο με 3.0, κατά 100.0%, χάνοντας σταδιακά τη δράση του σε υψηλότερα pH.

Η δεύτερη επιστημονική μελέτη που έγινε από τους Gökçe Polat Yemiş, Franco Pagotto, Susan Bach και Pasqal Delaquis το 2011, οι οποίοι ασχολήθηκαν με την επίδραση της βανιλίνης, της αιθυλοβανιλίνης και του βανιλικού οξέος στην ανάπτυξη και την αντοχή στη θερμότητα των ειδών *Cronobacter*. (Gökçe Polat Yemiş, 2011) Τα συντηρητικά αυτά, θα μπορούσαν να αποτελέσουν μέρος μιας αποτελεσματικής στρατηγικής παρέμβασης για τον έλεγχο των ειδών *Cronobacter* στα τρόφιμα, αλλά δυστυχώς μέχρι σήμερα έχουν εντοπιστεί λίγες ενώσεις με τις επιθυμητές αντιμικροβιακές ιδιότητες. Για τον σκοπό αυτό, έχει εξεταστεί η αντιβακτηριακή δραστηριότητα της βανιλίνης, της αιθυλοβανιλίνης και του βανιλικού οξέος έναντι επτά ειδών *Cronobacter* spp. σε ζωμό τρυπτικής σόγιας τέταρτης αντοχής με εκχύλισμα ζύμης 5.0 g/L (Tryptic Soy Broth with Yeast Extract, TSBYE) ρυθμισμένο σε pH : 5.0, 6.0 και 7.0 στους 10.0, 21.0 και 37.0°C αντίστοιχα. Όλες οι ενώσεις παρουσίασαν βακτηριοστατική και βακτηριοκτόνο δράση ανάλογα με το pH και τη θερμοκρασία. Οι ελάχιστες ανασταλτικές συγκεντρώσεις (Minimum Inhibitory Concentrations, MICs) της βανιλίνης και της αιθυλοβανιλίνης αυξήθηκαν σταθερά με τη μείωση του pH και της θερμοκρασίας, αλλά το βανιλικό οξύ είχε μικρή δραστηριότητα σε τιμές pH ίσες με 6.0 και 7.0. Οι ελάχιστες ανασταλτικές συγκεντρώσεις για όλες τις θερμοκρασίες, τις τιμές του pH και τα βακτηριακά στελέχη που εξετάστηκαν ήταν 2.0 mg/mL αιθυλοβανιλίνης, 3.0 mg/mL βανιλίνης και 0,8 mg/mL βανιλικού οξέος. Οι ελάχιστες βακτηριοκτόνες συγκεντρώσεις (Minimum Bacteriocidal Concentrations, MBCs) επηρεάστηκαν επίσης από το pH, αν και χρειάστηκαν σημαντικά υψηλότερες συγκεντρώσεις για την αδρανοποίηση των βακτηρίων στους 21.0 °C από ό,τι στους 10.0 ή 37.0 °C. Οι καμπύλες επιβίωσης για τα στελέχη *Cronobacter sakazakii* στις ελάχιστες βακτηριοκτόνες συγκεντρώσεις κάθε ένωσης αποκάλυψαν ότι όλες οι επεξεργασίες οδήγησαν σε άμεση

απώλεια της βιωσιμότητας των κυττάρων στους 37.0 °C. Οι μετρήσεις της πρόσληψης ιωδιούχου προπιδίου έδειξαν ότι οι κυτταρικές μεμβράνες καταστράφηκαν από την έκθεση και στις τρεις ενώσεις. Η θερμική αντοχή του *Cronocacter sakazakii* εξετάστηκε στους 58.0 °C σε τρυπτικό ζωμό σόγιας με εκχύλισμα ζύμης (TSBYE) συμπληρωμένο με ελάχιστες βακτηριοκτόνες συγκεντρώσεις κάθε ένωσης σε pH 5.0 και 6.0. Οι D- τιμές σε pH 5.0 μειώθηκαν από 14.56 ± 0.6 λεπτά σε 0.93 ± 0.01 , 0.63 ± 0.01 και 0.98 ± 0.02 λεπτά για τη βανιλίνη, την αιθυλοβανιλίνη και το βανιλικό οξύ, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η βανιλίνη, η αιθυλική βανιλίνη και το βανιλικό οξύ μπορεί να είναι χρήσιμα για τον έλεγχο του *Cronobacter* spp. στα τρόφιμα κατά την προετοιμασία και την αποθήκευση.

Στην τρίτη μελέτη που παρουσιάζεται στην συγκεκριμένη εργασία είναι των Weidong Qian, Yuting Fu , Miao Liu , Ting Wang , Jianing Zhang, Min Yang, Zhaohuan Sun, Xiang Li και του Yongdong Li το 2019. (Weidong Qian, 2019) Οι παραπάνω επιστήμονες μελέτησαν την *in vitro* αντιβακτηριακή δράση και τον μηχανισμό του βανιλικού οξέος έναντι του ανθεκτικού στις καρβαπενέμες *Enterobacter cloacae*. Το βανιλικό οξύ (Vanillic Acid, VA) είναι ένας αρωματικός παράγοντας που βρίσκεται σε βρώσιμα φυτά και φρούτα. Μερικές πρόσφατες μελέτες έδειξαν την ισχυρή αντιβακτηριακή δράση του VA, έναντι διαφόρων παθογόνων μικροοργανισμών. Παρόλα αυτά, ελάχιστες αναφέρθηκαν στην επίδραση του VA στο ανθεκτικό στις καρβαπενέμες *Enterobacter cloacae* (Carbapenem Resistant *Enterobacter Cloacae*, CREC). Σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης ήταν να εκτιμηθεί *in vitro* η αντιμικροβιακή και αντιβιοφιλική δράση της VA έναντι του CREC. Επιπλέον, προσδιορίστηκαν οι ελάχιστες ανασταλτικές συγκεντρώσεις (Minimum Inhibitory Concentrations, MIC) του VA έναντι του CREC μέσω της μεθόδου διάχυσης βαθμίδα. Επιπλέον, διευκρινίστηκε ο αντιβακτηριακός τρόπος δράσης της VA έναντι της CREC, η οποία επιτεύχθηκε μέσω της μέτρησης των μεταβολών στην ενδοκυτταρική συγκέντρωση τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP), του ενδοκυτταρικού pH (pH_{in}), του δυναμικού της κυτταρικής μεμβράνης και της ακεραιότητας της μεμβράνης. Επιπροσθέτως, ο σχηματισμός αντιβιομεμβράνης της VA μετρήθηκε με δοκιμασία κρυσταλλικού ιώδους και απεικονίστηκε με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης εκπομπής πεδίου (FESEM) και με συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης με λέιζερ (CLSM). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η MIC του VA κατά του *E. cloacae* ήταν 600 μg/mL. Το VA έδειξε ότι είναι ικανό να αναστέλλει την ανάπτυξη του CREC και να καταστρέφει την ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης του CREC, όπως επιβεβαιώνεται από τη μείωση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης ATP, του pH_{in} και του δυναμικού της μεμβράνης, καθώς και από τη διακριτή μεταβολή της κυτταρικής

μορφολογίας. Επιπλέον, τα αποτελέσματα χρώσης με κρυσταλλικό ιώδες, FESEM και CLSM έδειξαν ότι η VA εμφάνισε ισχυρά ανασταλτικά αποτελέσματα στο σχηματισμό βιοφίλμ του CREC και αδρανοποίησε τα κύτταρα CREC που σχετίζονται με βιοφίλμ. Τα ευρήματα αυτά αποκάλυψαν ότι η VA παρουσιάζει ισχυρή αντιβακτηριακή δράση έναντι της CREC και, συνεπώς, έχει τη δυνατότητα να αξιοποιηθεί ως φυσικό συντηρητικό για τον έλεγχο των λοιμώξεων που σχετίζονται με την CREC.

Η τέταρτη επιστημονική μελέτη που αξίζει να αναφερθεί είναι των Kumar S Venkitanarayanan, Chia-min Lin, Hannalore Bailey και Michael P Doyle το 2002. (Kumar S Venkitanarayanan, 2002) Ο στόχος αυτής της μελέτης ήταν η ανάπτυξη μιας πρακτικής και αποτελεσματικής μεθόδου για την αδρανοποίηση ή και τη σημαντική μείωση των *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Enteritidis και *Listeria monocytogenes*, τα οποία περιέχονται σε μήλα, πορτοκάλια και ντομάτες. Πιο συγκεκριμένα, τα μήλα, τα πορτοκάλια και οι ντομάτες εμβολιάστηκαν με πέντε μίγματα στελεχών *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Enteritidis και *L. monocytogenes* κοντά στο άκρο του στελέχους και στην συνέχεια βυθίστηκαν σε αποστειρωμένο απιονισμένο νερό που περιείχε 1.5% γαλακτικό οξύ συν 1.5% υπεροξείδιο του υδρογόνου για 15.0 λεπτά στους 40.0 °C. Τα εμβολιασμένα δείγματα που υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με αποστειρωμένο απιονισμένο νερό στην ίδια θερμοκρασία και για την ίδια διάρκεια χρησίμευσαν ως δείγματα ελέγχου. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η επεξεργασία των μήλων, των πορτοκαλιών και των ντοματών με 1.5% γαλακτικό οξύ και 1.5% υπεροξείδιο του υδρογόνου στους 40.0 °C για 15.0 λεπτά μπορεί να μειώσει αποτελεσματικά τους πληθυσμούς των *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Enteritidis και *L. monocytogenes* πάνω από 5.0 log CFU ανά φρούτο. Παρόλο που το πλύσιμο των μήλων, των πορτοκαλιών και των ντοματών με απιονισμένο νερό μείωσε τα *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Enteritidis και *L. monocytogenes* κατά περίπου 1.5 έως 2.0 log CFU ανά φρούτο, ένας σημαντικός πληθυσμός των παθογόνων επιβίωσε στο νερό πλύσης. Επίσης, δεν παρατηρήσαμε καμία οπτική διαφορά μεταξύ των μήλων που υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με 1.5% γαλακτικό οξύ και 1.5% υπεροξείδιο του υδρογόνου για 15.0 λεπτά στους 40.0 °C και των μη επεξεργασμένων μήλων κατά τη διάρκεια των προκαταρκτικών δοκιμών. Μια εκτεταμένη οργανοληπτική μελέτη που διεξήχθη για τον προσδιορισμό της αποδοχής από τους καταναλωτές των μήλων που υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με το χημικό διάλυμα πλύσης, αποκάλυψε ότι τα οργανοληπτικά και ποιοτικά χαρακτηριστικά των μήλων δεν επηρεάστηκαν αρνητικά από την επεξεργασία και οι συμμετέχοντες στην επιτροπή δεν μπόρεσαν να αντιληφθούν σημαντικές διαφορές ($P > 0.05$) μεταξύ των μήλων που υποβλήθηκαν σε επεξεργασία και των μήλων ελέγχου.

Οι Pussadee Tangwatcharin και Praparorn Khopaibool διερεύνησαν μέσω της μελέτης τους το 2012 (Pussadee Tangwatcharin, 2012), τις *in vitro* δραστηριότητες του παρθένου ελαίου καρύδας, του λαουρικού οξέος και της μονολαουρίνης σε συνδυασμό με γαλακτικό οξύ έναντι δύο στελεχών του *Staphylococcus aureus*, ATCC 25923 και ενός απομονωμένου στελέχους από σφάγιο χοίρου, με τον προσδιορισμό του δείκτη κλασματικής βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης (Fractional Bactericidal Concentration Index, FBCCI), τη μέθοδο time-kill, καθώς και με την ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης και διέλευσης. Οι ελάχιστες βακτηριοκτόνες συγκεντρώσεις (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) του λαουρικού οξέος, της μονολαουρίνης και του γαλακτικού οξέος ήταν 3.2 mg/mL, 0.1 mg/mL και 0.4% (v/v), αντίστοιχα. Οι επιδράσεις των συνδυασμών λαουρικό οξύ, του γαλακτικού οξέος και της μονολαουρίνης με το γαλακτικό οξύ ήταν σε συνεργασία έναντι και των δύο στελεχών, παρουσιάζοντας δείκτες κλασματικής βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης 0.25 και 0.63, αντίστοιχα. Σε μελέτες χρονικής εξόντωσης, οι συνδυασμοί λαουρικού οξέος και μονολαουρίνης με γαλακτικού οξέος που προστέθηκαν στις ελάχιστες ανασταλτικές συγκεντρώσεις τους, σημειώθηκε ότι παρήγαγαν βακτηριοκτόνο δράση. Η επαγωγή στρες σε μη καταπονημένα κύτταρα εξαρτήθηκε από τον τύπο και τη συγκέντρωση του αντιμικροβιακού. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα την απώλεια και την αλλαγή του κυτταροπλάσματος και της μεμβράνης στα κύτταρα του βακτηρίου. Αντίθετα, το παρθένο έλαιο καρύδας (10.0 %) δεν ήταν δραστικό έναντι του *S. aureus*. Ο αριθμός των βακτηρίων που βρέθηκε σε χοιρινό φιλέτο που υποβλήθηκε σε επεξεργασία μόνο με λαουρικό οξύ και μονολαουρίνη ήταν σημαντικά υψηλότερος ($p < 0.05$) σε σχέση με εκείνα που υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με τα δύο λιπίδια σε συνδυασμό με γαλακτικό οξύ σε υπο-ανασταλτικές συγκεντρώσεις. Το χρώμα, η οσμή και η συνολική αποδοχή των χοιρινών φιλέτων επηρεάστηκαν αρνητικά από την επεξεργασία με τα τρία λιπίδια και το γαλακτικό οξύ μόνο, αλλά όταν χρησιμοποιήθηκαν συνδυασμοί των παραγόντων η αισθητηριακή ποιότητα ήταν αποδεκτή.

2.3 Εφαρμογές μικροβιακών δευτερογενών μεταβολιτών

Όπως έχει αναφερθεί εκτενώς στις παραπάνω ενότητες, οι δευτερογενείς μεταβολίτες είναι αρκετά σημαντικοί. Αυτό συμβαίνει γιατί συμβάλλουν στην καλύτερη λειτουργία πολλών διεργασιών εντός του ανθρώπινου οργανισμού καθώς και στο περιβάλλον του γύρω του. Δεν θα μπορούσαν να παραλειφθούν από την συγκεκριμένη εργασία οι εφαρμογές των μεταβολιτών αυτών. Αρχικά, θα αναφερθούν τα αντιβιοτικά, τα οποία είναι από την

σημαντικότερη εφαρμογή των δευτερογενών μεταβολιτών και η ανακάλυψη τους αποτέλεσε επανάσταση στην ροή της ιστορίας. Έπειτα, θα παρουσιαστεί η εφαρμογή τους στους αντικαρκινικούς παράγοντες, στους φαρμακολογικούς και στους διατροφικούς παράγοντες, στα ένζυμα και στους αναστολείς ενζύμων και τέλος στα γεωργικά και ζωικά προϊόντα. Όλοι είναι πολύ βασικοί τομείς ανάπτυξης των αντίστοιχων επιστημονικών πεδίων.

2.3.1 Αντιβιοτικά

Αρχικά, η λέξη αντιβιοτικό, προέρχεται από τα ελληνικά συνθετικά ‘αντί’ και ‘βίος’(ζωή), και συνθέτετε έτσι η λέξη «αντιβιοτικό». Έχει ανακαλυφθεί ότι στην Κίνα χρησιμοποιήθηκαν για πρώτη φορά αντιβιοτικά, ενώ οι Αιγύπτιοι και οι Έλληνες χρησιμοποιούσαν καλούπια και φυτά με στόχο την θεραπεία των ανθρώπων από ποικίλες λοιμώξεις. Ωστόσο, αυτό δεν σημαίνει ότι ένα αντιβιοτικό είναι ένας νέος βιολογικός παράγοντας, είναι απλώς ένα κοινό μικροβιακό προϊόν που ανήκει σε μια μεγαλύτερη ομάδα αντι-ικών, αντιμυκητιασικών και αντιπαρασιτικών φαρμάκων. Από όλα τα μικροβιακά προϊόντα που παράγονται στο εμπόριο, τα αντιβιοτικά είναι τα πιο σημαντικά. Σύμφωνα με ιστορικά δεδομένα, το πρώτο αντιβιοτικό που παρασκευάστηκε, χρησιμοποιήθηκε για την μείωση και τον έλεγχο διάφορων λοιμώξεων. Ενώ, στην σημερινή εποχή, τα αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται για ποικίλους θεραπευτικούς σκοπούς, όπως είναι ευρέως γνωστό σε όλους. Τα τελευταία 30 χρόνια, λαμβάνει χώρα μεγάλος αριθμός μελετών σχετικά με μικροοργανισμούς για την παραγωγή αντιβιοτικών. Το μεγαλύτερο ποσοστό των μελετών, περιλαμβάνει μύκητες, οι οποίοι παράγουν ποικίλα φυσικά συστατικά με πολλές δομές. Ειδικότερα, έχουν ανακαλυφθεί πάνω από 400 πεπτίδια με αντιβιοτικές δράσεις προερχόμενα από πηγές όπως φυτά, έντομα και βακτήρια. Πιο συγκεκριμένα, περίπου 7000 αντιβιοτικά παράγονται σήμερα μέσω μικροβιακής ζύμωσης. Τα αντιβιοτικά, αποτελούν έναν από τους πιο μελετημένους δευτερογενείς μεταβολίτες, και κατέχει ιδιαίτερης σημασίας θέση στον ιατρικό και φαρμακευτικό κλάδο. (Hassan M. Awad, 2013) Αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι έχουν εμφανιστεί πολλά αντιβιοτικά, τα οποία είναι ανθεκτικά σε αρκετά παθογόνα βακτήρια, και υπάρχει η τάση να αυξάνεται με αρκετά μεγάλο ρυθμό το ποσοστό αυτών. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να οδηγείται η ανθρωπότητα στον συνεχώς αυξανόμενο κίνδυνο της αύξησης του αριθμού των μολυσματικών ασθενειών. Επομένως αποτελεί επιτακτική ανάγκη η ανακάλυψη νέων φαρμάκων, τα οποία να είναι αποτελεσματικά στα παθογόνα ανθεκτικά στα αντιβιοτικά και ευκαιριακά παθογόνα.

Γενικά, τα αντιβιοτικά είναι σύνθετες χημικές ουσίες, οι οποίες παράγονται από μικροοργανισμούς ως δευτερογενείς μεταβολίτες. Αυτά τα αντιβιοτικά αντιδρούν με τα βακτήρια του περιβάλλοντος, για παράδειγμα μέσα στο έντερο ενός ανθρώπινου οργανισμού, και είτε αναστέλλουν την ανάπτυξη του βακτηρίου είτε το θανατώνουν. Αυτή είναι μια τεχνική αυτοσυντήρησης, η οποία χρησιμοποιείται από πολλά άλλα μικρόβια με στόχο την επιβίωση τους. Τόσο τα συνθετικά όσο και τα ημισυνθετικά αντιβιοτικά μπορούν να οριστούν με αυτόν τον τρόπο. Βασικό είναι ότι σε αυτόν τον ορισμό δεν περιλαμβάνονται τα φυτά και οι παράγωγες ενώσεις από αυτά. Αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι τα υλικά αυτά θεωρούνται περισσότερο ως χημειοθεραπευτικοί παράγοντες και επομένως ονομάζονται ως «αντιμικροβιακά». Παρόλα αυτά έχουν το ίδιο αποτέλεσμα, δηλαδή την αναστολή ή τον θάνατο παθογόνων βακτηρίων. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι βακτηριοστατικές ενώσεις που δεν σκοτώνουν τα βακτηριακά κύτταρα, μπορεί να δώσουν περισσότερο χρόνο στον οργανισμό-ξενιστή να αναπτύξει το ανοσοποιητικό του σύστημα και να καταπολεμήσει μόνο του την μόλυνση. Οι πιο σημαντικές ομάδες αντιβιοτικών είναι κυρίως πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες, αζιθρομυκίνη κ.α.. Αξιοσημείωτη είναι παγκόσμιες πωλήσεις των αντιβιοτικών, οι οποίες ανέρχονται στα περίπου 4,2 δισεκατομμύρια δολάρια τον χρόνο. Στον Πίνακα 6, παρουσιάζονται τα ετήσια κόστη των πιο βασικών αντιβιοτικών. Παρατηρείται ότι το μεγαλύτερο ποσό κατέχουν οι κεφαλοσπορίνες και είναι \$ billion 10.0 /y, και μετά οι πενικιλίνη στα \$ billion 6.0 /y.

Πίνακας 6 : Ετήσια κόστη αντιβιοτικών (Hassan M. Awad, 2013)

Αντιβιοτικό	Κόστος (\$ billion/y)
Κεφαλοσπορίνες	10.0
Πενικιλίνη	6.0
Αζιθρομυκίνη	1.5
Κλαριθρομυκίνη	1.2

Ένα παράδειγμα δευτερογενούς μεταβολίτη στον τομέα των αντιβιοτικών αποτελεί η πενικιλίνη. Ειδικότερα, η πενικιλίνη ανακαλύφθηκε το 1928 από τον Alexander Fleming, σε ένα εργαστήριο του St. Mary Hospital, στο Λονδίνο, αλλά παρασκευάστηκε πρώτη φορά σε εργοστασιακή κλίμακα το 1946 στην Ολλανδία. Η σημαντική αυτή ανακάλυψη, άλλαξε την ροή της ιστορίας και είχε βασικό και άμεσο αντίκτυπο στην ποιότητα ζωής των ανθρώπων. Επιπλέον, άλλαξε τις διαδικασίες παρασκευής των φαρμάκων και γενικά μετατράπηκε μετά από αυτήν την ανακάλυψη όλη η φαρμακοβιομηχανία. Εξαιτίας όλων των παραπάνω, δόθηκε το Νόμπελ Ιατρικής και Φυσιολογίας το 1945 στον Fleming, Chain, Chain και στον Florey. Βασισμένοι πολλοί επιστήμονες στην τεχνική της ανακάλυψης της πενικιλίνης,

ανακαλύφθηκαν πολλά αντιβιοτικά όπως : στρεπτομυκίνη, χλωραμφενικόλη, ερυθρομυκίνη, βανκομυκίνη κ.α. (Gaynes, 2017)

Αξιοσημείωτη είναι μια αρκετά κοινή αλλά σημαντική ιδιότητα των περισσότερων ισχυρών αντιβιοτικών, η δράση τους ως διεγερτικά ανάπτυξης. Πιο συγκεκριμένα, πολλά αντιβιοτικά σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, δρουν ως διεγερτικά ανάπτυξης. Για παράδειγμα, οι ακτινομύκητες παράγουν περίπου το 75% όλων των ανωτέρων περιγραφόμενων αντιβιοτικών. Οι *Streptomyces* παράγουν περίπου το 75% όλων των ακτινομυκικών δευτερογενών μεταβολιτών. Πάνω από 180 δευτερογενής μεταβολίτες παράγονται από τα στελέχη *Streptomyces hygrosopicus*. (Hassan M. Awad, 2013)

Μέχρι σήμερα, πάνω από 10.000 ενώσεις έχουν απομονωθεί από διαφορετικά είδη ακτινομύκητες όπου το 34% είναι από στρεπτομυκίνη. Η στρεπτομυκίνη παράγει περίπου το 74% όλων των ακτινομυκικών, κατά προσέγγιση 7.600 ενώσεις. Στον Πίνακα 7, παρουσιάζεται ο κατά προσέγγιση αναμενόμενος αριθμός μεταβολιτών από τις αντίστοιχες πηγές. Όντως, τον μεγαλύτερο αριθμό τον κατέχουν οι ακτινομύκητες με 10100, και πιο συγκεκριμένα οι στρεπτομυκίνες. Μετά ακολουθούν οι μύκητες με 8600 και τέλος τα βακτήρια με 3800. Προφανώς, οι αριθμοί αυτοί είναι προσεγγιστική και εμπεριέχουν ένα αρκετά μεγάλο σφάλμα και αβεβαιότητα. Παρόλα αυτά, είναι μια αντιπροσωπευτική πρώτη εικόνα. (Hassan M. Awad, 2013)

Πίνακας 7 : Αναμενόμενος αριθμός μεταβολιτών ανάλογα με την προέλευση (Hassan M. Awad, 2013)

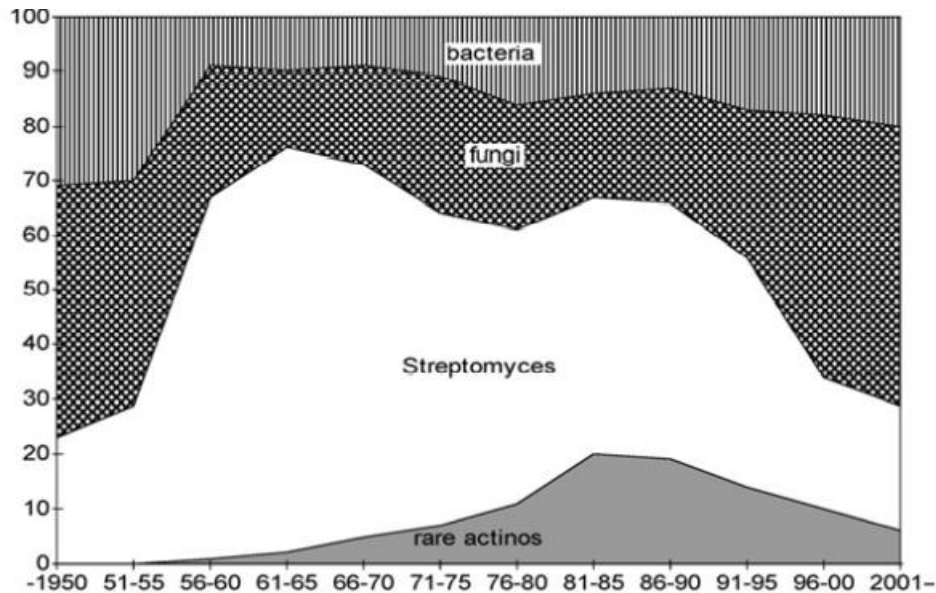
Πηγή	Αντιβιοτικά	Βιοενεργά/Αντιβιοτικά μεταβολιτών	Συνολικά
Βακτήρια	2900	1680	3800
<i>Eubacteriales</i>	2170	1150	2750
<i>Bacillus sp.</i>	795	300	860
<i>Pseudomonas sp</i>	610	370	795
<i>Myxobacter</i>	400	140	410
<i>Cyanobacter</i>	300	420	640
Actinomycetales	8700	3800	10100
<i>Streptomyces sp</i>	6550	3000	7630
<i>Rare actinos</i>	2250	800	2470
Μύκητες	4900	6000	8600
<i>Microscopic fungi</i>	3770	4750	6450
<i>Penicillium</i>	1000	1400	1950
<i>Aspergillus</i>			
<i>Basidiomycetes</i>	1050	1150	2000
<i>Yeasts</i>	105	70	140
<i>Slime moulds</i>	30	25	60

Μία ακόμα αξιοσημείωτη ιδιότητα/παρατήρηση που δεν θα μπορούσε να παραλειφθεί είναι ότι ένας μικροβιακός τύπος μπορεί να παράγει πολλούς και διαφορετικούς μεταβολίτες. Βασικό παράδειγμα αποτελούν ο *Streptomyces griseus* και ο *Bacillus subtilis*. Αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι, τόσο ο *Streptomyces griseus* όσο και ο *Bacillus subtilis* μπορούν παράξουν πάνω από 50 διαφορετικούς τύπους βιοδραστικών μικροβιακών δευτερογενών μεταβολιτών, οι οποίοι μπορούν να περιλαμβάνουν αντιβιοτικά, αλκαλοειδή ερυσίνης, ναφθαλίνα, νουκλεοσίδες, πεπτίδια, φαιναζίνες, κινολόνες, τερπενοειδή και πολλά άλλα. Τα αντιβιοτικά τα οποία παράγονται από μικροβιακή ζύμωση σε μικροβιακά γένη που κατοικούν στο έδαφος, υφίστανται μορφολογική διαφοροποίηση. Για παράδειγμα, Η πενικιλίνη παράγεται μόνο μετά την ολοκλήρωση της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης του κυττάρου. Ενώ, η κύρια παραγωγή του δευτερογενή μεταβολίτη, παρουσιάζεται κατά τη διάρκεια της στατικής φάσης της ανάπτυξης του του κυττάρου. (Hassan M. Awad, 2013)

Βασικό κομμάτι τα έρευνας της επιστημονικής κοινότητας την σημερινή εποχή αποτελεί η βελτίωση της βιομηχανικής παραγωγής των αντιβιοτικών. Ειδικότερα, για να το πετύχουν αυτό οι επιστήμονες, προσπαθούν να κατανοήσουν την φυσιολογία πίσω από την μικροβιακή παραγωγή, τα μονοπάτια τα οποία ακολουθούν καθώς και το πώς μπορούν να ελέγξουν τις μεθόδους ανάπτυξης. Πριν μερικό διάστημα, έχουν λάβει χώρα σε παγκόσμιο επίπεδο πολλές επιστημονικές έρευνες σχετικά με την αποσαφήνιση στο μοριακό επίπεδο και την κατανόηση όσον τον δυνατόν περισσότερων ρυθμιστικών μηχανισμών, οι οποίοι εμπλέκονται στον έλεγχο της βιοσύνθεσης των αντιβιοτικών. Οι περισσότεροι επιστήμονες βασίστηκαν σε αντιβιοτικά που παράγονται από μύκητες και αντιμύκητες. Οι έρευνες έδειξαν ότι παρόλο που τα βακτήρια, οι μύκητες, τα φύκια, τα κοράλλια, τα σφουγγάρια, τα φυτά και τα κατώτερα ζώα είναι μεταξύ των πιο διαδεδομένων μικροοργανισμών οι οποίοι βιοσυνθέτουν αντιβιοτικές ενώσεις, οι περισσότεροι δευτερογενείς μεταβολίτες στην πραγματικότητα βιοσυντίθενται από νηματώδεις μικροοργανισμούς όπως ακτινομύκητες (περίπου 75%) και μούχλα (17%). Όταν απομονώνονται από τη φύση, περίπου το 40% των νηματωδών μυκήτων και οι ακτινομυκητές μπορούν να παράξουν αντιβιοτικά. Επιπροσθέτως, όπως φαίνεται και στην *Εικόνα 5*, το μεγαλύτερο ποσοστό της παραγωγής δευτερογενών μεταβολιτών αποτελεί η στρεπτομυκίνη. Ειδικότερα, επιστημονικές πηγές αναφέρουν ότι οι στρεπτομυκίνες μπορούν να παράξουν πάνω από 180 διαφορετικά είδη δευτερογενών μεταβολιτών.

Πολλά φαρμακευτικά προϊόντα, ιδιαίτερα τα αντιμολυσματικά, περιλαμβάνουν περίπου 62.0 % αντιβακτηριακά, 13.0 % ορούς, ανοσοσφαιρίνες και εμβόλια, 12.0 % αντι-ικά, 7.0 % αντιμυκητιακά και 6.0 % μη HIV αντιικά. Υπάρχουν πάνω από 160.0 αντιβιοτικά. Ο

μικροοργανισμός *Streptomyces hygrosopicus* έχει ανακαλυφθεί ότι παράγει πάνω από 200.0 αντιβιοτικά, ο *Streptomyces griseus* πάνω από 40.0 αντιβιοτικά και ο *Bacillus subtilis* περισσότερες από 60 ενώσεις, οι οποίες συνεισφέρουν σημαντικά στην αγορά αντιβιοτικών. (Ramassamy Vijayakumar, 2018)



Εικόνα 5 : Παραγωγή αντιβιοτικών ανάλογα με την προέλευση τους (Hassan M. Awad, 2013)

Οι στρεπτομύκητες κατέχουν μία από τις πρώτες θέσεις όσον αφορά την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών επειδή από αυτούς παράγεται περίπου το 45-55% των εκτιμώμενων 10.000 αρχαιοθετημένων αντιβιοτικών. Επιπλέον βασικό χαρακτηριστικό αυτών είναι ότι διαθέτουν ένα μεγάλο εύρος βιολογικών δραστηριοτήτων και δράσεων, όπως για παράδειγμα αντιβακτηριδιακή δράση γιατί περιέχουν στρεπτομυκίνη, τετρακυκλίνη, χλωραμφενικόλη, αντιμυκητιακή καθώς έχουν νυστατίνη, αντιική δράση εξαιτίας της τουνικαμυκίνης, αντιπαρασιτική δράση λόγω της αβερμεετίνης, ανοσοκατασταλτική επίδραση από την ραπαμυκίνη, κατά του καρκίνου αφού περιέχουν ακτινομυκίνη, μιτομυκίνη C, ανθρακυκλίνες και διαβητογόνο εξαιτίας της βαφιλομυκίνης και της στρεπτοζοτοκίνη. Επιπλέον, εκτός από αυτά, έχουν απομονωθεί αρκετά αντιβιοτικά από διαφορετικά στελέχη *Bacillus*, βακιλλομυκίνες και βακιλλένια. (Hassan M. Awad, 2013)

Η βιομηχανία βιοτεχνολογίας αξιοποιεί όσο τον δυνατόν περισσότερο τις μεταβολικές δραστηριότητες διαφόρων οργανισμών με στόχο την παραγωγή ποικίλων ενώσεων, οι οποίες θα έχουν τις κατάλληλες και επιθυμητές ιδιότητες για τις αντίστοιχες διαφορετικές

βιομηχανίες. Για τον σκοπό αυτό, έχουν εφαρμοστεί δύο μέθοδοι: βελτιστοποίηση της διαδικασίας της ζύμωσης και την βελτιστοποίηση των στελεχών. Όμως, η διαδικασίες αυτές δυσκολεύουν καθώς οι δευτερογενείς μεταβολίτες είναι πολύ ευαίσθητοι σε οποιαδήποτε αλλαγή του περιβάλλοντος στο οποίο βρίσκονται. Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα αποτελεί η *in vitro* παραγωγή των περισσότερων αντιβιοτικών, η οποία εξαρτάται από τη σύνθεση του μέσου καλλιέργειας στο οποίο αναπτύσσεται ο οργανισμός παραγωγής. Επιπροσθέτως, ένας ακόμα παράγοντας που επηρεάζει την παραγωγή των αντιβιοτικών, είναι η διαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών. Ειδικότερα, έχει διαπιστωθεί ότι σε πολλά πειράματα ζύμωσης ο περιορισμός ή απουσία πηγών άνθρακα και φωσφόρου, μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της παραγωγής των αντιβιοτικών. Δεν θα μπορούσε να παραλειφθεί η σημαντικότητα της ύπαρξης του νατρίου για την ανάπτυξη τους. Παρόλο που έχουν βρεθεί όλα αυτά τα δεδομένα, ακόμα και στην σημερινή εποχή δεν έχει κατανοηθεί πλήρως ο μηχανισμός ανάπτυξης των αντιβιοτικών. (Hassan M. Awad, 2013)

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω υπάρχουν τα φυσικά, τα ημισυνθετικά και τα συνθετικά αντιβιοτικά. Αρχικά, τα φυσικά αντιβιοτικά, τα οποία σε πολλές πηγές αναφέρονται και ως ομοιοπαθητικά, προέρχονται από 100% φυσικούς παράγοντες όπως είναι οι μύκητες. Τα αντιβιοτικά αυτά μπορούν να λαμβάνονται από τον ανθρώπινο οργανισμό σε καθημερινή βάση χωρίς να παρουσιάζουν κάποιο ανεπιθύμητο. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αυτών είναι το μέλι και η εχινάτσια, αγαθά τα οποία περιέχουν αντιβιοτικά. Έχει διαπιστωθεί ότι η κατανάλωση ίσης ποσότητας μελιού και κανέλας, μπορεί να θεραπεύσει δερματικές μολύνσεις, τσιμπήματα εντόμων και εκζέματα. Επιπλέον, το φύλλο της ελιάς μπορεί να θεραπεύσει πολυάριθμες μολύνσεις από βακτήρια, παράσιτα και μύκητες, και είναι κάτι που χρησιμοποιείται πολύ κατά το πέρασμα των χρόνων. Δεν θα μπορούσε να παραληφθεί το άγριο λουλακί, το οποίο έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία της βρογχίτιδας, του πονόλαιμου, των στοματικών πληγών, της αμυγδαλίτιδας, και των πρησμένων αδένων. (Hassan M. Awad, 2013) Η δεύτερη κατηγορία είναι τα ημισυνθετικά αντιβιοτικά. Τα ημισυνθετικά αντιβιοτικά είναι χημικές τροποποιημένες παραλλαγές των φυσικών αντιβιοτικών. Τα συγκεκριμένα αντιβιοτικά μετατρέπονται για διάφορους λόγους, για παράδειγμα με σκοπό να αυξηθεί η αποτελεσματικότητά τους, να μειώσουν ή να εξαφανίσουν τις ανεπιθύμητες επιπτώσεις ή για να αλλάξουν το εύρος μικροβίων που είναι ευαίσθητα σε αυτά. Ένα παράδειγμα τέτοιων αντιβιοτικών είναι η αμπικιλίνη. Οι πρώτες ύλες για την σύνθεση των ημισυνθετικών αντιβιοτικών είναι ενώσεις που απομονώνονται από φυσικές πηγές όπως για παράδειγμα φυτά ή βακτήρια ή κυτταρικές καλλιέργειες, οι οποίες έχουν μεγάλα και πολύπλοκα μόρια. Σε αντίθεση με τα συνθετικά αντιβιοτικά, τα

ημισυνθετικά αντιβιοτικά, δεν χρησιμοποιούνται πετροχημικά δομικά συστατικά για την κατασκευή τους. Τέλος, τα συνθετικά αντιβιοτικά προέκυψαν από την ανάγκη των ανθρώπων για την θεραπεία ασθενειών και μολύνσεων, οι οποίες δεν μπορούσαν να θεραπευτούν με τα ήδη υπάρχον. Σε αυτό συνέβαλε η πρόοδος της ιατρικής επιστήμης, η οποία οδήγησε στην ανάπτυξη των συνθετικών αντιβιοτικών, όπως είναι το Linezolid και οι σουλφοναμίδες. Τα αντιβιοτικά αυτά, έχουν ανοίξει νέους δρόμους στη θεραπεία των ανθεκτικών λοιμώξεων στα παρελθοντικά φάρμακα. Τα αντιβιοτικά αυτά σχεδιάζονται και παράγονται σε εργαστήρια, και αποτελούν συνήθως την μοναδική βιώσιμη επιλογή για τους ασθενείς που πάσχουν από επίμονες βακτηριακές λοιμώξεις. Βασικό χαρακτηριστικό τους είναι ότι καταστρέφουν τη διαδικασία πρωτεϊνών σύνθεσης πριν προλάβει να ξεκινήσει, γεγονός που είναι αρκετά κρίσιμο για την αναπαραγωγή και συμβάλλει στον έλεγχο της επιβίωσης των βακτηρίων. (Hassan M. Awad, 2013)

2.3.2 Αντικαρκινικοί παράγοντες

Αρχικά, ο καρκίνος αποτελεί την κύρια αιτία θανάτου στην σημερινή εποχή, μετά φυσικά από τα καρδιαγγειακά νοσήματα. Η συχνότητα εμφάνισης καρκίνου αυξάνεται με την ηλικία του ανθρώπου, και πιο συγκεκριμένα περίπου πάνω 75.0 % των περιπτώσεων είναι σε ηλικίες άνω των 55 ετών. Ο αριθμός των εκτιμώμενων περιπτώσεων καρκίνου στις ΗΠΑ το 2019 είναι 268,600.0 για καρκίνους του μαστού, 228,150.0 για καρκίνους του πνεύμονα, 174,650.0 για καρκίνους του προστάτη, 145,600.0 για καρκίνους του παχέος εντέρου και 73,820.0 για καρκίνους του παχέος εντέρου και του νεφρού. Ο καρκίνος είναι μια κληρονομική ή σποραδική σύνθετη γενετική ασθένεια που οφείλεται σε διάφορες τροποποιήσεις στο γονιδιακές εκφράσεις. Αυτές οι τροποποιήσεις μπορεί να είναι με τη μορφή σημειακών μεταλλάξεων, εισαγωγών, διαγραφών, μεταθέσεων και μετατόπισης με αποτέλεσμα τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό, που είναι το χαρακτηριστικό γνώρισμα του καρκίνου. Εδώ και πολλές δεκαετίες, πάρα πολλοί επιστήμονες έχουν ασχοληθεί, έχουν μελετήσει και έχουν συνθέσει ένα μεγάλο αριθμό φαρμάκων, με στόχο την πρόληψη και την θεραπεία του καρκίνου. Ωστόσο, οι δυσάρεστες συστηματικές δυσμενείς επιπτώσεις τους στους ασθενείς, η ταχεία ανάπτυξη αντοχής στα φάρμακα και το υψηλό κόστος θεραπείας είναι μερικά από τα μειονεκτήματα που τα καθιστούν αναποτελεσματικά στη διαχείριση και τον περιορισμό του καρκίνου. Ως αποτέλεσμα, παρά την πρόοδο στην ανάπτυξη συνθετικών ογκογόνων φαρμάκων, οι καρκινοπαθείς εξαρτώνται όλο και περισσότερο από εναλλακτικά φάρμακα για θεραπεία λόγω της ασφάλειας, της διαθεσιμότητας, της οικονομικής προσιτότητας, των ελάχιστων αρνητικών επιπτώσεων και των λιγότερων πιθανοτήτων για την ανάπτυξη αντοχής

του καρκίνου στα φάρμακα. Τα φυτά αποτελούν από τους αρχαίους χρόνους πηγή και πρώτη ύλη για την ανάπτυξη φαρμάκων και μέχρι και σήμερα παραμένουν μια σημαντική πηγή φαρμάκων, κυρίως στις αναπτυσσόμενες χώρες λόγω των πλεονεκτημάτων τους έναντι των εμπορικών συνθετικών φαρμάκων. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO), έχει αναφέρει ότι περίπου το 80.0 % του παγκόσμιου πληθυσμού, εξακολουθεί να βασίζεται στον φυτικό τρόπο θεραπείας και όχι στα συμβατικά συνθετικά φάρμακα. Ως εκ τούτου, οι μελετητές επιστήμονες του καρκίνου έχουν επικεντρώσει την προσοχή τους περισσότερο στα φυσικά προϊόντα ως εναλλακτική πηγή ελέγχου και θεραπείας του καρκίνου. Περίπου το 60.0 % των συνταγογραφούμενων αντικαρκινικών φαρμάκων που χρησιμοποιούνται στις μέρες μας, είναι παράγωγα φυτικών μεταβολιτών. Αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι τα φυτά παράγουν μεγάλη πληθώρα δευτερογενών μεταβολιτών, και είναι σε θέση να αποτελέσουν πηγή για την βιομηχανική παραγωγή αντικαρκινικών φαρμάκων. Μεγάλος αριθμός φαρμακευτικών πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένης της αλβουμίνης και της ταλιγλουκεράσης άλφα παράγονται, χρησιμοποιώντας κυτταροκαλλιέργειες καρότου, καπνού και ρυζιού. Πιο συγκεκριμένα, η καλλιέργεια ρυζιού μπορεί να αποτελέσει πηγή δευτερογενών μεταβολιτών με αντικαρκινική δράση. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες δεν είναι απαραίτητοι για την ανάπτυξη και την ανάπτυξη των φυτών, αλλά έχουν σημαντικές βοηθητικές δραστηριότητες. Για παράδειγμα βοηθούν το φυτό στο να αμύνεται στα φυτοφάγα, να αναστέλλει την ανάπτυξη των ανταγωνιστικών φυτών, στα βακτηριακά και μυκητιακά παθογόνα και βοηθούν στην επικονίαση. Αυτές οι ιδιότητες βοηθούν επίσης στην πρόληψη του καρκίνου. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών ομαδοποιούνται σε αλκαλοειδή, τερπενοειδή, πολυφαινόλες και φλαβονοειδή με βάση τη δομή τους όπως έχει αναφερθεί και σε προηγούμενη ενότητα. Στους δευτερογενείς μεταβολίτες που ανιχνεύονται στα φυτά και ιδιαίτερα στο ρύζι είναι η βινμπλαστίνη, η βινκριστίνη και η καμπτοθεκίνη. Επίσης, τα τερπενοειδή που περιέχονται, περιλαμβάνουν λυκοπένιο και γ-τοκοφερόλη. Επιπλέον, οι πολυφαινόλες περιλαμβάνουν ετοποσίδη, ρεσβερατρόλη, κουρκουμίνη και επιγαλλοκατεχίνη (EGCG). Τέλος, τα φλαβονοειδή περιλαμβάνουν απιγενίνη, γενιστεΐνη και καμπφερόλη. Οι παραπάνω βιοδραστικές ενώσεις έχουν αντικαρκινικές ιδιότητες, γιατί είτε ανεξάρτητα είτε συνεργιστικά με άλλες ενώσεις, συμβάλλουν στην ρύθμιση των μεταβολικών και σηματοδοτικών μονοπατιών, στην αναστολή των ενζύμων ζωτικής σημασίας για την εξέλιξη του καρκίνου, στην αγγειογένεση, στην συγκέντρωση μικροσωληνίσκων και στην επαγωγή της απόπτωσης. Η απόπτωση που αναφέρθηκε στην προηγούμενη πρόταση είναι ένας ενεργειακά εξαρτώμενος προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, ο οποίος διατηρεί την ομοιοστατική ισορροπία μεταξύ του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και του κυτταρικού

θανάτου. Αρκετά φυτά και φυτικά εκχυλίσματα μελετώνται καθημερινά με σκοπό να ανακαλυφθούν οι αντιπολλαπλασιαστικές τους ιδιότητες και πολλά από αυτά εμφανίζουν πιθανή ικανότητα να αναστέλλουν την ανάπτυξη και την εξέλιξη του καρκίνου. (Wusirika RAMAKRISHNA, 2021)

Ένα από τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα ενός καρκινικού κυττάρου είναι ο ανεξέλεγκτος ρυθμός πολλαπλασιασμού του γιατί το καρκινικό κύτταρο αλλάζει συνεχώς τη φυσιολογία του για να καλύψει τις διατροφικές και ενεργειακές απαιτήσεις. Αυτές οι αλλαγές έχουν τη μορφή τροποποιήσεων στα μεταβολικά μονοπάτια, στα μονοπάτια σηματοδότησης και στην ρύθμιση των ενζύμων. Ειδικότερα, μερικά από τα πιο βασικά και συνηθισμένα στοιχεία αυτών των αλλοιωμένων μεταβολικών οδών είναι η γλυκόζη, η γλουταμίνη, το οξυγόνο και η τριφωσφορική αδενοσίνη, κοινώς ATP. Αυτές οι μεταβολικές μεταβολές εστιάζουν κυρίως στην αυξημένη παραγωγή της ATP, στη σύνθεση των μακρομορίων, τα οποία απαιτούνται για την κυτταρική εξέλιξη και στη ρύθμιση κατάλληλης οξειδοαναγωγικής κατάστασης. Επιπλέον, αν τα κυτταρικά κύτταρα βρεθούν σε περιβάλλον με έλλειψη θρεπτικών συστατικών και ενέργειας, τότε αυτά είναι σε θέση να διαμορφώνουν τις οδούς τους και να συνεχίζουν τον πολλαπλασιασμό τους. Συνεπώς, από τα παραπάνω προκύπτει το συμπέρασμα ότι για την θεραπεία του καρκίνου, πρέπει να κατανοηθούν και προβλεφθούν οι χαρακτηριστικές αλλαγές στα μεταβολικά μονοπάτια. Αλλά δεν είναι εύκολο αυτό καθώς βασικό ρόλο παίζει το εξής πρόβλημα κατά τον έλεγχο του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, ότι πρέπει να διαφοροποιηθούν τα καρκινικά από τα φυσιολογικά. Σε αυτό το σημείο αναφέρεται ότι έχουν ανακαλυφθεί πολυάριθμα μονοπάτια και διαδικασίες σηματοδότησης του καρκίνου που ρυθμίζονται ειδικά στα καρκινικά κύτταρα και στον μετασχηματισμό τους. Αν και είναι γνωστός κατασταλτικός όγκος, το P53 εμπλέκεται επίσης στη ρύθμιση του γλυκολυτικού φαινοτύπου στον καρκίνο ενεργοποιώντας το ένζυμο εξοκινάση 2, και με αυτόν τον τρόπο ενισχύει τη σύνθεση μακρομορίων στον καρκίνο μέσω της οδού της φωσφορικής πεντόζης. Πολλοί φυτικοί μεταβολίτες όπως η κουρκουμίνη, η ρεσβερατρόλη και η κερσετίνη προκαλούν απόπτωση μέσω της οδού που εξαρτάται από το P53. Επιπροσθέτως, η φλαβονοειδή όπως η κερσετίνη, η γενιστεΐνη και η φλαβοπιριδόλη έχει αναφερθεί σε πολυάριθμες μελέτες ότι αναστέλλουν τις κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες (CDKs). Επίσης, οι ανθοκυανίνες αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό του καρκίνου εμποδίζοντας την εξέλιξη μέσω του κυτταρικού κύκλου στοχεύοντας τα P53, P21, κυκλίνη D και κυκλίνη A. Όλα τα παραπάνω είναι δευτερογενή συστατικά και όπως συμπεραίνουμε κατέχουν σημαντική θέση στην προσπάθεια για την πρόληψη και θεραπεία του καρκίνου. (Wusirika RAMAKRISHNA, 2021)

2.3.3 Φαρμακολογικοί και διατροφικοί παράγοντες

Όπως έχει αναφερθεί εκτενώς σε παραπάνω ενότητες, οι δευτερογενείς μεταβολίτες κατέχουν ιδιαίτερη θέση στην φαρμακολογία και στα τρόφιμα. Αυτό συμβαίνει καθώς χρησιμοποιούνται ως συστατικά σε πολλά φάρμακα, όπως αντιβιοτικά που αναλύθηκαν στην *Υποενότητα 2.3.1*, έχουν αντικαρκινικό ρόλο και αν απομονωθούν από τις κατάλληλες πρώτες ύλες, οι μεταβολίτες αυτοί συμβάλλουν σημαντικά στην αντιμετώπιση αυτής της ασθένειας. Επίσης, πολλοί μεταβολίτες διαφόρων προβιοτικών βακτηρίων αποτελούν φάρμακα, τα οποία βοηθούν στην αντιμετώπιση της παχυσαρκίας και στον έλεγχο του σωματικού βάρους, στη κατακράτηση υγρών, συμβάλλουν στην βελτίωση του ενεργειακού μεταβολισμού και της ευαισθησίας της ινσουλίνης. Επιπλέον, δρουν ως φυσικά συντηρητικά τροφίμων, μία συνεχώς αυξανόμενη τάση της βιομηχανίας των τροφίμων. Αυτό συμβαίνει γιατί εμποδίζουν την οξείδωση των τροφίμων, παρέχουν πολύτιμα θρεπτικά συστατικά όπως έχει αναφερθεί. Όλα αυτά καθιστούν σημαντικούς τους δευτερογενείς μεταβολίτες. (Ramassamy Vijayakumar, 2018)

2.3.4 Ένζυμα και αναστολείς ενζύμων

Αρχικά, ένζυμα είναι μόρια τα οποία βοηθούν στο να γίνει ταχύτερα ή όχι μια χημική αντίδραση. Πιο αναλυτικά, τα ένζυμα μπορούν να αυξήσουν τον ρυθμό που λαμβάνει χώρα μια χημική αντίδραση μέσα στον ανθρώπινο οργανισμό ή σε ένα ζωικό ή φυτικό οργανισμό, αλλά αντίστοιχα και να τον μειώσουν. Όμως, πρέπει να τονιστεί ότι αυτά μπορούν να επηρεάσουν μόνο τον ρυθμό και όχι αν μπορεί να γίνει η συγκεκριμένη αντίδραση ή όχι. Ο τρόπος που δρουν τα ένζυμα είναι ότι παρέχουν στα αντιδρώντα τις αντιδράσεις μια επιφάνεια για να λάβει χώρα αυτή. Με αυτόν τον τρόπο αυξάνεται η πιθανότητα εύρεσης των αντιδρώντων, και συνεπώς έτσι ο ρυθμός της ενδιαφερόμενης αντίδρασης. Βέβαια, πρέπει να σημειωθεί, ότι υπάρχουν πολύ τρόποι για να συμβεί αυτό, καθώς επίσης και ο τρόπος με τον οποίο θα προσκολληθούν τα αντιδρώντα πάνω στα ένζυμα. Ο τρόπος αυτός ποικίλλει, και μπορεί να εξαρτάται από τις συνθήκες που επικρατούν, όπως πίεση και θερμοκρασία, γεωμετρικά και φυσικά μικροσκοπικά και μακροσκοπικά χαρακτηριστικά των εμπλεκόμενων ουσιών. Τα παραπάνω οδηγούν στο συμπέρασμα, ότι τα ένζυμα είναι χαρακτηριστικά για κάθε συνδυασμό ουσιών που αντιδρούν μεταξύ τους και δύσκολα ένα ένζυμο δύσκολα δρα με τον ίδιο τρόπο σε διαφορετική αντίδραση. Τα ένζυμα κατέχουν ξεχωριστή θέση στην αγορά, καθώς κάθε χρόνο οι πωλήσεις τους ανέρχονται στα US \$ 2.3 billion γιατί έχουν εφαρμογές σε πολλούς και διαφορετικούς τομείς, όπως υλικά καθαρισμού κατά 27 %, στα

τρόφιμα αποτελώντας το 27.0 %, τροφές ζώων και γεωργία κατά 16.0 %, 10.0 % σε κλωστοϋφαντουργικά προϊόντα και 10.0 % σε χημικά, πούλπες και χαρτί. Αξιοσημείωτο γεγονός αποτελεί η πρωτεϊνάση σουτιλιλίνη, η οποία χρησιμοποιείται ευρέως στην παραγωγή απορρυπαντικών και ετήσιες πωλήσεις της ανέρχονται στα \$ 200.0 million. Ακολουθεί η νιτριλάση και η φυτάση, των οποίων η ετήσια μέση παραγωγή είναι 30,000.0 tons και αξίζουν περίπου \$ 315.0 million. Όμως, τα ένζυμα είναι πρωτογενείς μεταβολίτες και οι είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη και την αναπαραγωγή των οργανισμών. Η συγκεκριμένη εργασία όμως, έχει ως θέμα τους δευτερογενείς μεταβολίτες, οι οποίοι σχετίζονται με τα ένζυμα. Ειδικότερα, δρουν ως παρεμποδιστές/αναστολείς ενζύμων, δηλαδή είτε προσκολλώνται πάνω σε αυτά οι δραστικές ουσίες οπότε δεν γίνεται η χημική αντίδραση, είτε προσκολλώνται πάνω στα ενεργά κέντρα των αντιδρώντων και με αυτόν τον τρόπο τα αντιδρώντα δεν βρίσκουν σημείο να κολλήσουν και έτσι δεν τελείται η αντίδραση. Η αναστολή ενός ενζύμου βοηθά στον έλεγχο των χημικών αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα σε μια παθολογική κατάσταση. Επειδή, κάθε ένωση που αναστέλλει τη δραστηριότητα ενός ενζύμου, μπορεί να αποτελέσει ένα φάρμακο, τότε και οι αναστολείς ενζύμων μπορούν να χαρακτηριστούν ως φάρμακα. Η αναστολή ενός ενζύμου έχει ως αποτέλεσμα το υπόστρωμα του ενζύμου να μην μετατρέπεται προς προϊόντα με αποτέλεσμα να ελέγχονται τα μεταβολικά προϊόντα της δραστηριότητας του ενζύμου. Η επιλογή του ενζύμου που θα χρησιμοποιηθεί για την μελέτη και την ανάπτυξη φαρμάκων αποτελεί ένα μείζον δύσκολο πρόβλημα στον επιστημονικό κλάδο. Οι βασικότεροι ενζυμικοί αναστολείς είναι το κλαβουλανικό οξύ, β-λακταμάσες, γλυκοσιδάσες, αμυλάσες και λιπάσες. Αξίζει να αναφερθεί ότι οι αμυλάσες αποτρέπουν την απορρόφηση του αμύλου, το οποίο πολλές φορές προκαλεί αύξηση του σωματικού βάρους του ανθρώπινου οργανισμού. (Ramassamy Vijayakumar, 2018)

2.3.5 Γεωργικά και ζωικά προϊόντα

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες έχουν μεγάλη εφαρμογή στον γεωργικό κλάδο και στον τομέα της προστασίας της υγείας των ζώων. Αρχικά, δύο βασικοί δευτερογενείς μεταβολίτες, όπως είναι η κασουγαμυκίνη και οι πολυοξίνες χρησιμοποιούνται ως βιοπαρασιτοκτόνα. Η νικκομυκίνη και οι σπινοςίνες, οι οποίες παράγονται από το βακτήριο *Bacillus thuringiensis*, χρησιμοποιούνται ως βιολογικά εντομοκτόνα. Στην συνέχεια, ως βιολογικά ζιζανιοκτόνα δρα ο bialaphos, ενώ από την άλλη πλευρά η ιβερμεκτίνη και η ντοραμεκτίνη δρουν ως αντιελμινθικά και ως ενδοκτόνα ή παρασιτοκτόνα, δηλαδή ουσίες κατά των σκουληκιών, των ψειρών και των ακάρεων. Τέλος, οι φυτικές ορμόνες όπως είναι οι γιβερελλίνες

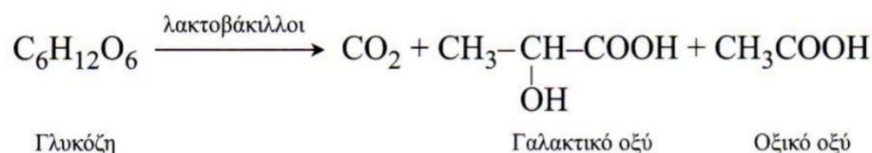
χαρακτηρίζονται ως ρυθμιστές ανάπτυξης είναι αυτή είναι η πιο κοινή τους εφαρμογή.
(Ramassamy Vijayakumar, 2018)

3 Κεφάλαιο: *Lactobacillus spp* - Χαρακτηριστικά και Μέθοδοι απομόνωσης

3.1 Γενικά Χαρακτηριστικά του *Lactobacillus spp*

Το διάστημα των τελευταίων χρόνων, όπως έχει αναφερθεί και στις προηγούμενες ενότητες, έχει σημειωθεί μεγάλη ανάπτυξη και αύξηση της χρήσης των ανανεώσιμων και βιώσιμων ενεργειακών, χημικών και φυσικών πόρων. Αυτό συμβαίνει καθώς υπάρχει μεγάλη έλλειψη ορυκτών πόρων και ταυτόχρονα έχει επιβαρυνθεί το φυσικό περιβάλλον, αφού καθημερινά σημειώνονται ακραίες καιρικές συνθήκες που βλάπτουν την φύση και τα έμβια όντα. Για αυτόν τον λόγο, η βιομηχανική βιοτεχνολογία είναι ένας αναπτυσσόμενος επιστημονικός κλάδος, δίνοντας ιδιαίτερη βαρύτητα στην εφαρμογή μικροοργανισμών με στόχο την παραγωγή ενέργειας και χημικών ουσιών χρησιμοποιώντας μη χημικές πηγές ως υποστρώματα. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η χρήση κυτταρίνης και ημικυτταρίνης από ζαχαροκάλαμο για την παραγωγή χημικών ουσιών προστιθέμενης αξίας. (José Aníbal Mora-Villalobos J. M.-Z.-G.-G., 2020) Στην ενότητα αυτή, θα εξειδικευτεί στον μικροοργανισμό *Lactobacillus spp*, έναν μικροοργανισμό που έχει αναφερθεί στην *Ενότητα 1.3*, παραπάνω στην συγκεκριμένη εργασία.

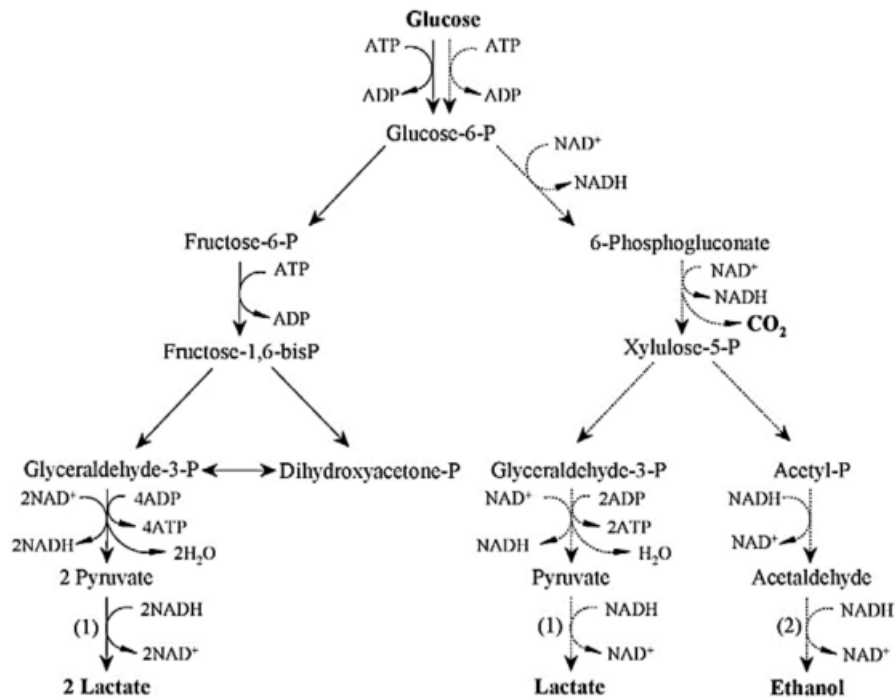
Ο μικροοργανισμός *Lactobacillus spp* συμβάλλει στον μεταβολισμό πολλών χημικών ουσιών. Βασική εφαρμογή, αποτελεί ο μεταβολισμός της ζάχαρης από τον μικροοργανισμό *Lactobacillus spp*. Σε αυτό το σημείο, ορθό είναι να αναφερθεί το τί είναι η ζάχαρη. Ζάχαρη, ή αλλιώς σακχαρόζη ορίζεται ο υδρογονάνθρακας με χημικό τύπο $C_{12}H_{22}O_{11}$. Ο δισακχαρίτης αυτός, αποτελείται από δύο μονοσακχαρίτες, την γλυκόζη $C_6H_{12}O_6$ και την φρουκτόζη. Στην *Εικόνα 6*, παρουσιάζεται η αντίδραση της διάσπασης της γλυκόζης από τον *Lactobacillus* σε μίγμα διαλυτών σακχάρων, του γαλακτικού οξέος και του οξικού.



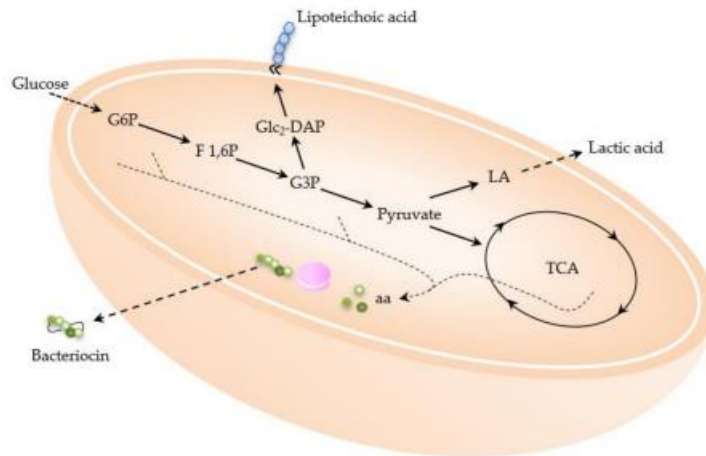
Εικόνα 6 : Μεταβολισμός γλυκόζης από *Lactobacillus spp*

Ο *Lactobacillus spp*, είναι ένα βακτήριο γαλακτικού οξέος, όπου τα βακτήρια αυτής της κατηγορίας (LAB), έχουν ποικίλες δυνατότητας εξαιτίας της ποικιλομορφίας τους, και γι'

αυτό τον λόγο είναι αρκετά διαδεδομένα και χρησιμοποιούνται σε μεγάλο βαθμό στην ανάπτυξη ολοκληρωμένων βιοδυληστηρίων. Ειδικότερα, το συγκεκριμένο βακτήριο χαρακτηρίζεται από την παραγωγή γαλακτικού οξέος (Lactic Acid), καθώς αποτελεί το κύριο τελικό μεταβολικό προϊόν της ζύμωσης υδατανθράκων. Δεδομένης της έλλειψης ενός λειτουργικού αναπνευστικού συστήματος, το βακτήριο λαμβάνει ενέργεια μέσω του επιπέδου του υποστρώματος φωσφορυλίωση ακολουθώντας δύο μεταβολικές οδούς για ζύμωση εξόζης, δηλαδή ομοζυμωτική και ετεροζυμωτική. Όπως παρουσιάζεται στην *Εικόνα 7*, η αριστερή οδός βασίζεται στη γλυκόλυση με την παραγωγή κυρίως του γαλακτικού οξέος, και η δεξιά οδός, γνωστή και ως οδός φωσφορικής πεντόζης, χαρακτηρίζεται για την παραγωγή CO₂ και αιθανόλης. (José Aníbal Mora-Villalobos J. M.-Z.-G.-S.-W.-G., 2020) Τα βακτήρια γαλακτικού οξέος που χρησιμοποιούνται κυρίως σε διάφορες διεργασίες ζύμωσης, μπορούν να είναι σε στερεά ή και σε υγρή μορφή. Η δεύτερη κατάσταση της ύλης, δηλαδή η υγρή μορφή, είναι περισσότερο μελετημένη και έχει εφαρμοστεί ευρέως σε βιομηχανική κλίμακα. Πιο ειδικά, οι διεργασίες αυτές στοχεύουν στην απομόνωση οργανικών οξέων (κυρίως γαλακτικού οξέος), αιθανόλης, βιοδραστικών πεπτιδίων κα. Μετά την διεργασία της ζύμωσης, ακολουθούν τα βήματα της απομόνωσης και του καθαρισμού, με στόχο την εξαγωγή αυτών των ενώσεων από το υπερκείμενο ή τη φάση της βιομάζας. Ωστόσο, εκτός από τα υπερκείμενα προϊόντα, χρησιμοποιούνται παραδοσιακά σε διαδικασίες ζύμωσης ενός προϊόντος, μπορεί επίσης να έχει προβιοτικό δυναμικό. Έτσι, η απομόνωση και η περαιτέρω χρήση τους, λαμβάνοντας υπόψη μια προσέγγιση διαδικασίας πολλαπλών προϊόντων, θα μπορούσε να προσθέσει πρόσθετη αξία στο προϊόν. Η *Εικόνα 8*, παρουσιάζει μερικές από τις πιο σημαντικές ενώσεις που περιέχουν τα γαλακτικά βακτήρια και απομονώνονται συνήθως από αυτά. Βασικά εξωκυτταρικά προϊόντα είναι το γαλακτικό οξύ (Lactic Acid) και οι βακτηριοσίνες, οι οποίες συντίθενται και απεκκρίνονται από το κύτταρο. Βασικό επίσης είναι και το λιποτεϊχοϊκό οξύ (LTA), το οποίο συσσωρεύεται στα κυτταρικά τοιχώματα του μικροοργανισμού.



Εικόνα 7 : Μεταβολικά μονοπάτια ομοζυμοτικών (αριστερά) και ετεροζυμοτικών (δεξιά) για βακτήρια γαλακτικού οξέος (José Aníbal Mora-Villalobos J. M.-Z.-G.-S.-W.-G., 2020)



Εικόνα 8 : Παρουσίαση των βασικών ουσιών που απομονώνονται από ένα γαλακτικό βακτήριο (Jesper Magnusson, 2003)

Η απλότητα και συγχρόνως η αποτελεσματικότητα του μεταβολισμού του *Lactobacillus*, το οποίο μετατρέπει τα σάκχαρα μέσω της γλυκολυτικής (ομοζυμοτικής) οδού σε πυροσταφυλικό οξύ, παράγοντας με αυτόν τον τρόπο ενέργεια κυρίως μέσω φωσφορυλίωσης. Ο έλεγχος της διεργασίας της γλυκόλυσης στον *Lactobacillus*, έχει αποτελέσει αντικείμενο εντατικής επιστημονικής έρευνας σε όλον τον κόσμο. Βασικά γλυκολυτικά ένζυμα είναι τα

εξής : πυροσταφυλική κινάση (PK), φωσφοφρουκτοκινάση, 1,6-δισφωφορική αλδολάση φρουκτόζης, αφυδρογονάση 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης (GAPDH) και φρουκτόζη. (Ana Rute Neves, 2005)

Το ένζυμο πυροσταφυλική κινάση, είναι ένα βασικό ένζυμο, το οποίο παίρνει μέρος στο τελευταίο στάδιο της διεργασίας της γλυκόλυσης. Πιο ειδικά, καταλύει τη μεταφορά μιας φωσφορικής ομάδας από φωσφοενολοπυρουβικό (PEP) σε διφωσφορική αδενοσίνη (ADP), δίνοντας ένα μόριο πυροσταφυλικού και ένα μόριο ATP. Στην *Εικόνα 9*, παρουσιάζεται η τρισδιάστατη δομή του παραπάνω ενζύμου. (Jesper Magnusson, 2003)

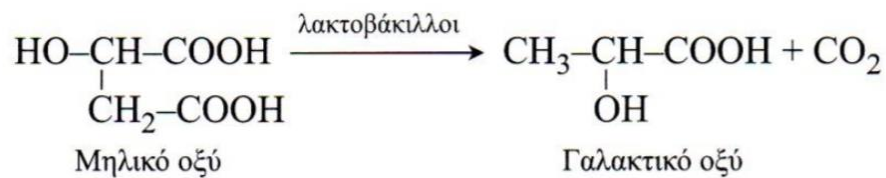


Εικόνα 9 : Τρισδιάστατη δομή πυροσταφυλικής κινάσης (Jesper Magnusson, 2003)

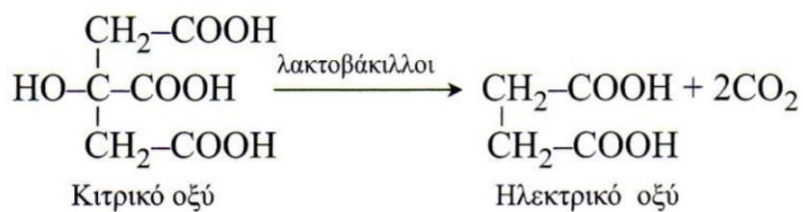
Στην συνέχεια, το ένζυμο Η φωσφοφρουκτοκινάση (PFK), είναι αρκετά βασικό ένζυμο στο μονοπάτι Embden-Meyerhof. Επιπλέον, είναι πολλές κληρονομικές ασθένειες στους ανθρώπινους οργανισμούς, οφείλονται σε δυσλειτουργίες και λάθος έκφραση αυτού του ενζύμου. Αρκετά βασική και συχνή ασθένεια είναι η ασθένεια αποθήκευσης γλυκογόνου τύπου VII (GSD-VII). (J. Jerry Kaneko, 2008)

Αξίζει να αναφερθούν ορισμένες αρκετά σημαντικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα οι λακτοβάκιλλοι και οι οποίοι βοηθούν στον μεταβολισμό διάφορων οργανικών οξέων. Στην *Εικόνα 10*, φαίνεται ο μεταβολισμός του μηλικού οξέος σε γαλακτικό οξύ μέσω ενός λακτοβάκιλλου. Η διεργασία αυτή έχει εφαρμογή κατά την διάρκεια της ωρίμανσης των κρασιών. Στην *Εικόνα 11*, παρουσιάζεται η χημική αντίδραση την μετατροπής του κιτρικού οξέος σε ηλεκτρικό οξύ. Και τέλος, στην *Εικόνα 12*, παρουσιάζεται ο μεταβολισμός του τρυγικού οξέος σε γαλακτικό οξύ και CO₂, μέσω ζύμωσης του αντίστοιχου βάκιλλου. (Jesper

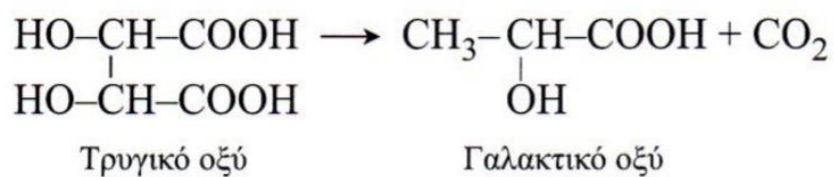
Magnusson, 2003) Στην *Εικόνα 13*, συνοψίζεται η διεργασία του μεταβολισμού της γλυκόζης, και παρουσιάζονται τα βασικά προϊόντα της διεργασίας αυτής. (Fermented and vegetables - Bacteria Fermentations, χ.χ.)



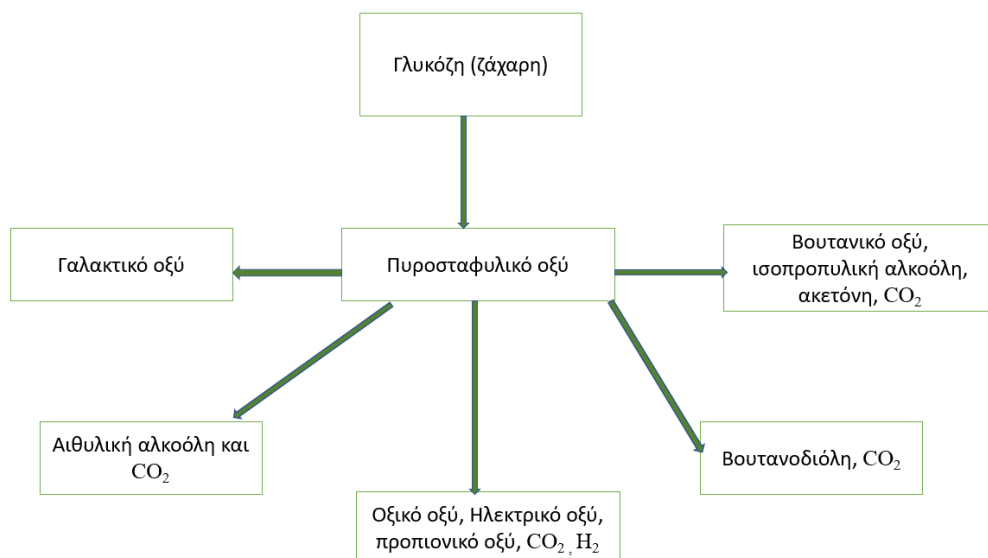
Εικόνα 10 : Μεταβολισμός μηλικού οξέος



Εικόνα 11 : Μεταβολισμός κιτρικού οξέος



Εικόνα 12 : Μεταβολισμός τρυγικού οξέος



Εικόνα 13 : Μεταβολισμός γλυκόζης (Fermented and vegetables - Bacteria Fermentations, n.d.)

Όμως, υπάρχουν και μερικά αρνητικά και εμπόδια στην παραγωγή του γαλακτικού οξέος από το βακτήριο του *Lactobacillus spp.* Αυτό συμβαίνει εξαιτίας του γεγονότος ότι τα βακτήρια πολλές φορές χρειάζονται αρκετά πολύπλοκα και εξεζητημένα θρεπτικά συστατικά στο υπόστρωμα τους για να αναπαραχθούν. Επίσης, οι θερμοκρασίες που λαμβάνει χώρα η διεργασία της ζύμωσης είναι λίγο χαμηλότερες σχετικά με άλλους μικροοργανισμούς, δηλαδή είναι χαμηλότερες από 45.0 °C και πάνω. Οι χαμηλές θερμοκρασίες ζύμωσης είναι ένα αρνητικό στοιχείο πολλές φορές, καθώς αυξάνει τον κίνδυνο μόλυνσης της καλλιέργειας και στην πρόληψη της ταυτόχρονης σακχαροποίησης αμυλώδους ή κυτταρινικής βιομάζας και μετατροπής σε σάκχαρα από ένζυμα αμυλάσες και ζύμωση σακχάρων και λιγνοκυτταρινικής βιομάζας. Όλα αυτά, οδηγούν σε μία παραγωγική διαδικασία με αυξημένο κόστος παραγωγής και χαμηλή παραγωγικότητα. Η χαμηλή παραγωγικότητα οφείλεται στο ότι στο αρχικό στάδιο παράγεται αμυλάση, η οποία παρατείνει την φάση της καθυστέρησης και έτσι με αυτόν τον τρόπο μειώνεται στην συνέχεια η φάση ανάπτυξης. (Hashemi, 2020)

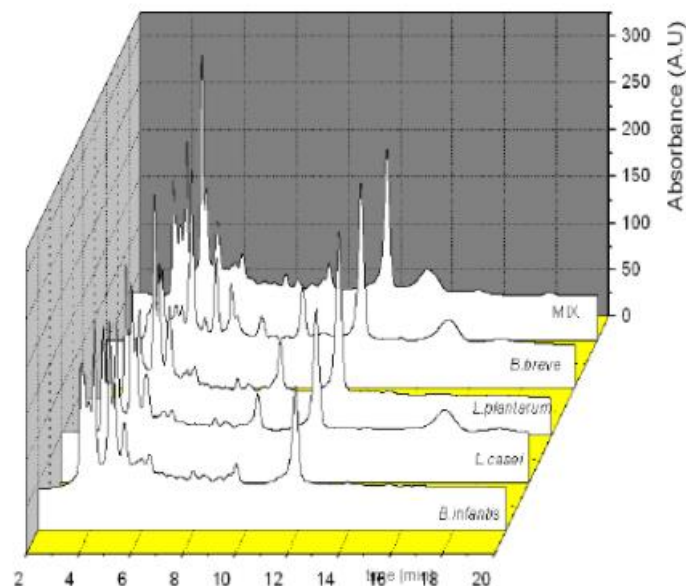
Ένα ακόμα προϊόν της ζύμωσης του *Lactobacillus bulgaricus* Lb-12 που αξίζει να αναφερθεί, είναι η παραγωγή οπτικά καθαρό D-γαλακτικό οξέος. Πιο ειδικά, λαμβάνει χώρα η διεργασία της ζύμωσης, έπειτα η κρυστάλλωση του D-γαλακτικού οξέος και τέλος ακολουθεί η εκχύλιση του προϊόντος με βουτανόλη. Η απόδοση της διαδικασίας αυτής για την παραγωγή D-γαλακτικού οξέος ανέρχεται στο 72.0 % και το ποσοστό της καθαρότητας είναι μεγαλύτερη από 99.0 %. (Villadsen, 1995)

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα προβιοτικά είναι μικροοργανισμοί, όπως ένας από αυτούς είναι και ο *Lactobacillus* που μας ενδιαφέρει σε αυτήν την εργασία, οι οποίοι προσφέρουν αρκετά οφέλη στον ξενιστή τους όταν αυτά καταναλώνονται. (Food and Agriculture Organization of the United States (FAO), 2002) Ειδικότερα, το στέλεχος *Lactobacillus casei* (LC-1), που βρίσκεται κυρίως σε γαλακτοκομικά προϊόντα και προϊόντα κρέατος, έχει συσχετιστεί με ευεργετικές επιδράσεις, όπως είναι η τόνωση του ανοσοποιητικού συστήματος και η ανακούφιση από τα συμπτώματα της νόσου του Crohn. Επιπλέον, το συγκεκριμένο στέλεχος έχει αρκετά καλές επιδόσεις επιβίωσης σε καταστάσεις στρες, όπως για παράδειγμα καταστάσεις αφυδάτωσης και αποθήκευσης σε χαμηλές θερμοκρασίες. Εξαιτίας αυτού και λόγω του ότι η βιομηχανία τροφίμων αναζητά προϊόντα που να ανταποκρίνονται σε αυτές τις προσδοκίες, η εισαγωγή προβιοτικών καλλιεργειών στα γαλακτοκομικά προϊόντα εξακολουθεί να αποτελεί πρόκληση στο τμήμα των λειτουργικών τροφίμων, καθώς η βιωσιμότητα των προβιοτικών προϊόντων στη μήτρα τροφίμων εξαρτάται από το στέλεχος που χρησιμοποιείται και τους εγγενείς και εξωγενείς παράγοντες του ίδιου του τρόφιμου. Οι φυτικές ίνες των τροφίμων, αποτελούνται από μη αμυλούχους πολυσακχαρίτες, συμπεριλαμβανομένης της κυτταρίνης, της ημικυτταρίνης, της πηκτίνης, των β-γλυκανών, και της λιγνίνης. Επιπλέον, τα φρούτα, τα λαχανικά, τα δημητριακά και τα όσπρια είναι τα τρόφιμα που είναι τα πιο πλούσια σε αυτά τα συστατικά. Πολλοί επιστήμονες αναφέρουν ότι, εάν καταναλωθούν στις προτεινόμενες ποσότητες, οι φυτικές ίνες μπορούν να βοηθήσουν στον έλεγχο του βάρους, στη μείωση της αρτηριακής πίεσης και στη βελτίωση των επιπέδων χοληστερόλης ορού και της εντερικής λειτουργίας. Όσον αφορά τον *Lactobacillus casei* (LC-1), είναι βασικό να γνωρίζουμε το πώς επιβιώνει όταν προσκολλάται σε πρεβιοτικές φυτικές ίνες καθώς και την προστατευτική επίδραση των φυτικών ινών και σακχάρων όταν έχει ξηραθεί υπό κενό. Μία έρευνα των Karla Guergoletto, Marciane Magnani, Juca Abramo Barrera San Martin και Célia Guadalupe Tardeli Andrade, σχετικά με την εφαρμογή του LC-1 όταν αυτό προσκολλάτε σε πίτουρο βρόμης ως συν βιοτική τροφή, κάτω από προσομοιωμένες γαστρεντερικές συνθήκες. Σε προκαταρκτικές δοκιμές, μετά την ξήρανση, η επιβίωση του LC-1 ήταν χαμηλότερη σε ίνες με pH ≤ 4.5 σε σχέση με εκείνες με pH ≥ 5.7 . Επομένως, το pH ρυθμίστηκε στο 5.5-6.0 με ένα κορεσμένο διάλυμα διττανθρακικού νατρίου πριν από την αξιολόγηση της διαδικασίας ξήρανσης των ινών, με εξαίρεση το πίτουρο βρόμης (pH = 5.8). Επίσης, μελετήθηκε η παραγωγή EPS (Expandede Polystyrene-Διογκωμένη πολυστερίνη), η οποία συνδέεται με τη διαθεσιμότητα θρεπτικών ουσιών. Στην παρούσα μελέτη, το LC-1 παράγαγε EPS κατά την αφυδάτωση του, το οποίο δρα ως προστατευτικό μηχανισμό υπό συνθήκες στρες. Γι' αυτό το EPS μπορεί να λειτουργήσει ως

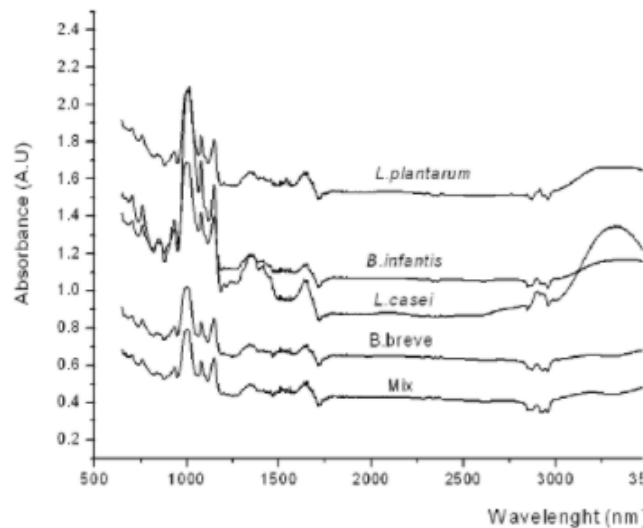
προστατευτική ουσία για τα κύτταρα γαλακτοβακίλλων έναντι της αφυδάτωσης και να τα βοηθήσει να προσκολληθούν στις ίνες. Επιπροσθέτως, βασικό αποτελεί η επίδραση της σακχαρόζης και της τρεαλόζης στη βιωσιμότητα του LC-1 που έχει προσκολληθεί σε ίνες. Αν και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η βιωσιμότητα του LC-1 αυξήθηκε στο πίτουρο βρόμης με αυξανόμενες συγκεντρώσεις τρεαλόζης και σακχαρόζης, δεν πραγματοποιήθηκαν δοκιμές παρακολούθησης, καθώς ο αριθμός των βιώσιμων κυττάρων που ελήφθησαν ανά γραμμάριο προϊόντος αντιστοιχούσε στις απαιτήσεις για ένα προβιοτικό προϊόν. Ακολουθούν οι δοκιμές αποθήκευσης, οι οποίες πραγματοποιήθηκαν με αλεύρι πράσινης μπανάνας και πίτουρο βρόμης με προσθήκη τρεαλόζης συγκέντρωσης 0.4 M. Η βιωσιμότητα του LC-1 που προσκολλήθηκε στο αλεύρι πράσινης μπανάνας ήταν χαμηλότερη σε σύγκριση με το πίτουρο βρόμης κατά την αποθήκευση σε όλες τις θερμοκρασίες που δοκιμάστηκαν, 10.0 °C, 25.0 °C και 40.0 °C. Ειδικότερα, περίπου το 7.0 % των λιπιδίων του πίτουρου βρόμης, προστατεύουν τα κύτταρα κατά την αποθήκευση τους, γεγονός που μπορεί να οφείλεται στις χαμηλότερες τιμές που παρατηρούνται σε σχέση με το αλεύρι πράσινης μπανάνας, το οποίο έχει χαμηλότερη περιεκτικότητα σε λιπίδια, δηλαδή 1.0 %. Συνεπώς, αυτή η μελέτη έδειξε ότι το αλεύρι πράσινης μπανάνας και το πίτουρο βρόμης είναι οι πιο υποσχόμενες ίνες για την πρόσφυση και την επιβίωση του LC-1, έπειτα από την ξήρανση υπό κενό στους 45.0 °C. Παρόλα αυτά, και η σακχαρόζη με την τρεαλόζη επηρεάζουν την επιβίωση των προβιοτικών κατά την ξήρανση, όπως εξετάστηκε σε μια χρονική περίοδο αποθήκευσης των 28 ημερών. Στο χρονικό διάστημα αυτό, οι ίνες που δεν είχαν σάκχαρα, είχαν την υψηλότερη βιωσιμότητα. Οι ίνες πίτουρου βρόμης παρείχαν τη μεγαλύτερη σταθερότητα στο LC-1. Επιπλέον, προστάτευε τους μικροοργανισμούς σε προσομοιωμένες γαστρεντερικές καταστάσεις. Το πίτουρο προβιοτικών είχε αισθητικές διαφορές μόνο σε σχέση με το πίτουρο βρόμης, αλλά ήταν ακόμα καλά αποδεκτό από τους πιθανούς καταναλωτές. (Karla Guergoletto, 2010)

Στην συνέχεια, θα παρουσιαστεί ο χαρακτηρισμός μέσω HPLC του σχηματισμού του γαλακτικού οξέος και δακτυλικό αποτύπωμα FTIR (Fourier Transformation Infrared spectroscopy) – Φασματοσκοπία Υπερύθρου Μετασχηματισμού Fourier των προβιοτικών βακτηρίων κατά τη διάρκεια των διαδικασιών ζύμωσης. Η FTIR μπορεί να αποτυπώσει τα βακτήρια και να τα ταυτοποιήσει μέσω συγκεκριμένων δείκτες που βρίσκονται στα 900.0 – 1,300.0 cm^{-1} για τους υδατάνθρακες και πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα από DNA βακτηρίων, και 1,300.0 – 1,900.0 cm^{-1} για τις τεντωτικές δονήσεις και ένα μεγάλο εύρος ζώνης για το νερό στα 3,100.0 – 3,700.0 cm^{-1} . Η υγρή χρωματογραφία HPLC, έδειξε ότι ο *Lactobacillus plantarum* πέτυχε συγκέντρωση γαλακτικού οξέος, έπειτα από 78.0 ώρες ζύμωσης κοντά στα

6.08 g*L⁻¹, ο *Bifidobacterium infantis* 7.09 g*L⁻¹, *Lactobacillus casei* 6.16 g*L⁻¹, *Bifidobacterium breve* 1.7 g*L⁻¹ ,ενώ μίγμα αυτών 7.12 g*L⁻¹. Στην Διάγραμμα 1, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την διεργασία της HPLC σε δείγματα των παραπάνω μικροοργανισμών και μίγμα αυτών στους 37.0 °C για 78.0 ώρες. Η μέγιστη καμπύλη εμφανίστηκε στο γαλακτικό οξύ στα 7.127 g*L⁻¹ στο μίγμα βακτηρίων και μετά ο *Lactobacillus casei* στα 6.16 g*L⁻¹. Η FTIR των προβιοτικών βακτηρίων κατά τη διάρκεια των διαδικασιών ζύμωσης μπόρεσε να αποτυπώσει τα βακτήρια που εντοπίζουν συγκεκριμένους δείκτες για προβιοτικά που βρίσκονται στα 2,845.0 και 2,929.0 cm⁻¹ και μια κορυφή απορρόφησης στα 1,127.0 cm⁻¹ για το γαλακτικό οξύ. Τα συγκεκριμένα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 2. (Dan Cristian Vodnar, 2010)



Διάγραμμα 1 : HPLC σε δείγματα έπειτα από την ζύμωση τους σε *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis* και μίγμα αυτών στους 37.0 °C (Dan Cristian Vodnar, 2010)



Διάγραμμα 2 : Δακτυλικό αποτύπωμα FTIR των *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis* και μίγμα αυτών σε νερό (Dan Cristian Vodnar, 2010)

Στο σημείο αυτό, θα αναλυθεί η εξειδίκευση του υποστρώματος υδρολάσης του χολικού άλατος του *Lactobacillus*, το οποίο διέπει την ικανότητα των βακτηρίων και τον αποικισμό του ξενιστή. Πιο συγκεκριμένα, τα χολικά οξέα (BAs), είναι ένα σύνολο μεταβολιτών, τα οποία συντίθενται από τον ξενιστή και έχουν ως στόχο να διαμορφώσουν την φυσιολογία του και τον μεταβολισμό του. Αναλυτικότερα, τα χολικά άλατα διέρχονται από τον γαστρεντερικό σωλήνα, υποβάλλονται σε μία πληθώρα χημικές αντιδράσεις όπου μέσα από αυτές μετασχηματίζονται αυτά και κωδικοποιούν τα γύρω βακτήρια. Οι υδραλάσεις του χολικού οξέος, διασπούν την συζευγμένη γλυκίνη (2-αμινοαιθανοϊκό οξύ) και την ταυρίνη των παραπάνω οξέων. Αυτό αναφέρεται καθώς οι προβιοτικοί λάκτοβάκιλλοι έχουν αρκετά μεγάλο αριθμό χολικών οξέων, αλλά ειδικά για την καλλιέργεια τους μέσω καλλιέργεια των *Lactobacillus* είναι ένας επιστημονικός τομέας που ερευνάτε ακόμα και στις μέρες μας καθώς δεν έχει γίνει εντελώς κατανοητός ο αποικισμός τους. (Matthew H Matthew H Foley, 2011)

Μέσω της υδρόλυσης γλυκοσυζευγμάτων φυτικών μεταβολιτών, οι δραστηριότητες της β-γλυκοσιδάσης του *Lactobacillus*, συμβάλλουν σημαντικά στις διαιτητικές και αισθητηριακές ιδιότητες των ζυμωμένων τροφίμων. Ειδικότερα, η απογλυκοζυλίωση μπορεί να απελευθερώσει ενώσεις οι οποίες να βελτιώνουν την γεύση ή το άρωμα των τροφίμων από γλυκοζυλιωμένες πρόδρομες ουσίες και αυξάνει τη βιοδιαθεσιμότητα των φυτικών μεταβολιτών που προάγουν την υγεία καθώς και των διαιτητικών τοξινών. Η δράση της β-D-γλυκοσιδάσης παίζει σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση με τον ανθρώπινο ξενιστή, καθώς οι β-γλυκοσιδάσες απελευθερώνουν ένα ευρύ φάσμα φυτικών δευτερογενών μεταβολιτών από τους β-D-γλυκοζυλιωμένους πρόδρομους τους. Αυξάνει επίσης τη βιοδιαθεσιμότητα των

αντιοξειδωτικών φυτικών μεταβολιτών που συμβάλλουν στην βελτίωση της υγείας των ανθρώπων. Πιο συγκεκριμένα, οι της β-D-γλυκοσιδάσες, αφαιρούν τα υπολείμματα του γλυκοπυρανοσυλίου από το μη αναγωγικό άκρο των β-D-γλυκοσίδων, καταλύοντας έτσι την υδρόλυση του γλυκοσιδικού δεσμού. Παρόλα αυτά, έχουν διαπιστωθεί αρκετές αρνητικές επιπτώσεις στην υγεία των ανθρώπινων οργανισμών καθώς προκαλούνται από την αυξημένη βιοδιαθεσιμότητα διαφόρων διατροφικών τοξινών και ξενοβιοτικών. Και τέλος, οι β-γλυκοσιδάσες παίζουν ρόλο στον μεταβολισμό των υδατανθράκων των ωφέλιμων αλλά και των παθογόνων γαλακτικών οξέων. (Herbert Michlmayr, 2014)

3.2 Τρόποι-Μέθοδοι-Παραδείγματα απομόνωσης πρωτεϊνών από *Lactobacillus spp*

Για να μπορέσουν να φανούν χρήσιμα όλες οι παραπάνω ουσίες που βρίσκονται στον *Lactobacillus spp*, πρέπει πρώτα να απομονωθεί ο μικροοργανισμός, και στην συνέχεια να ακολουθήσει η αξιοποίηση του, η οποία μπορεί να είναι η εξαγωγή και απομόνωση περαιτέρω ουσιών, ή η αυτοτελής χρήση του. Για να συμβούν τα παραπάνω, υπάρχουν πολλοί μέθοδοι. Η βασική και πιο διαδεδομένη είναι η χρωματογραφία.

Αρχικά, χρωματογραφία ορίζεται ως η διεργασία η οποία διαχωρίζει ένα μίγμα στα επιμέρους συστατικά του. Με το όρο να διαχωριστεί ένα μίγμα, μπορεί να σημαίνει πολλές φορές και την πιστοποίηση ύπαρξης ουσιών στο εν λόγω μίγμα. Τα βασικά βήματα της διεργασίας αυτής είναι η διάλυση του επιθυμητού μίγματος σε μία κατάλληλη ουσία. Το καινούργιο αυτό μίγμα, αποτελείται από δύο φάσης, την κινητή φάση, συνήθως είναι ο διαλύτης και την στατική φάση, που περιέχεται εκεί η επιθυμητή ουσία. (Scientific, n.d.) Ανάλογα με την ουσία που αποτελεί την κινητή φάση και την στατική φάση, υπάρχουν κατηγορίες χρωματογραφικών μεθόδων. Οπότε αναλόγως με κάθε φορά το μίγμα, χρησιμοποιείται και διαφορετική μέθοδος διαχωρισμού. Μερικές από τις πιο κοινές και διαδεδομένες μεθόδους χρωματογραφίας είναι οι παρακάτω.

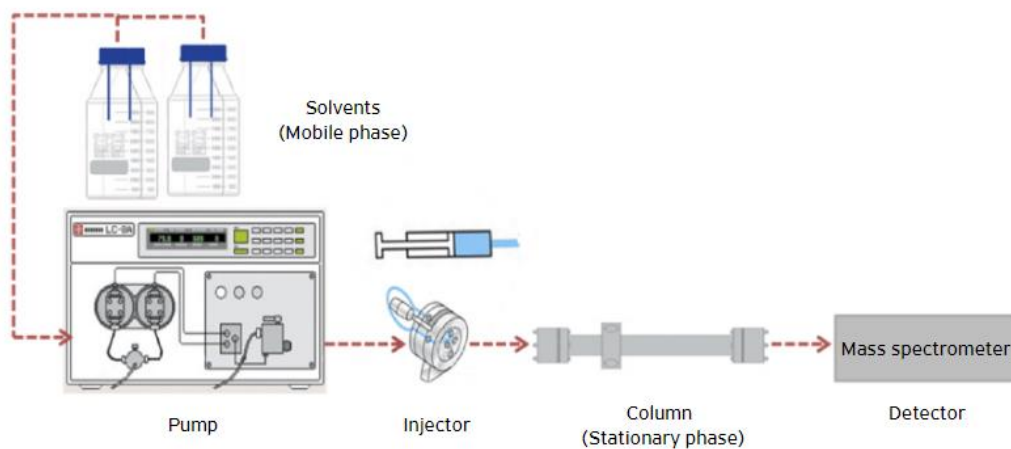
- **Υγρή χρωματογραφία (LC)**

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η χρωματογραφία σαν μέθοδος χρησιμοποιείται με στόχο να διαχωρίσει ή να για να απομονώσει πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα ή μικρά μόρια από σύνθετα μίγματα. Η υγρή χρωματογραφία (liquid chromatography) είναι μια τεχνική διαχωρισμού όπου η κινητή φάση που χρησιμοποιείται είναι υγρή και ο διαχωρισμός μπορεί να γίνει είτε σε στήλη είτε σε απλή επιφάνεια. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για αναλυτικές ή προπαρασκευαστικές εφαρμογές. Ο διαχωρισμός βασίζεται στις διαφορές των φυσικών ιδιοτήτων των διαχωριζόμενων συστατικών, όπως για παράδειγμα το σημείο ζέσεως, η πολικότητα, το μέγεθος μορίων κλπ. ή διαφορετικά, η διαδικασία της υγρής χρωματογραφίας βασίζεται στην αρχή της συγγένειας των μορίων με την κινητή φάση. Οι διαφορές αυτές διαφοροποιούν την φυσικοχημική συγγένεια κάθε συστατικού προς τις δύο φάσεις. Η κινητή φάση, καθώς διέρχεται μέσα από την στατική φάση, μετατοπίζει τις διαφορετικές ουσίες με διαφορετικές ταχύτητες και έτσι μπορούμε να προσδιορίσουμε τις ενώσεις που μας ενδιαφέρουν. Πιο συγκεκριμένα, αν τα συστατικά που πρόκειται να διαχωριστούν έχουν μεγαλύτερη συγγένεια με την κινητή φάση, τα μόρια κινούνται μαζί με την κινητή φάση και βγαίνουν από τη στήλη γρηγορότερα. Από την άλλη πλευρά, αν τα συστατικά έχουν

χαμηλότερο βαθμό αλληλεπίδρασης με την κινητή φάση, τα μόρια κινούνται αργά και έτσι βγαίνουν αργότερα από τη στήλη. Συνεπώς, αν δύο μόρια σε ένα μείγμα έχουν διαφορετικές πολικότητες και η κινητή φάση είναι διαφορετικής πολικότητας, τα δύο μόρια θα κινούνται με διαφορετικές ταχύτητες μέσω της στατικής φάσης. (Microbe Notes, n.d.) Στις *Εικόνες 14* και *15*, παρουσιάζεται σχηματικά η διεργασία της υγρής χρωματογραφίας που αναλύθηκε.



Εικόνα 14 : Υγρή χρωματογραφία

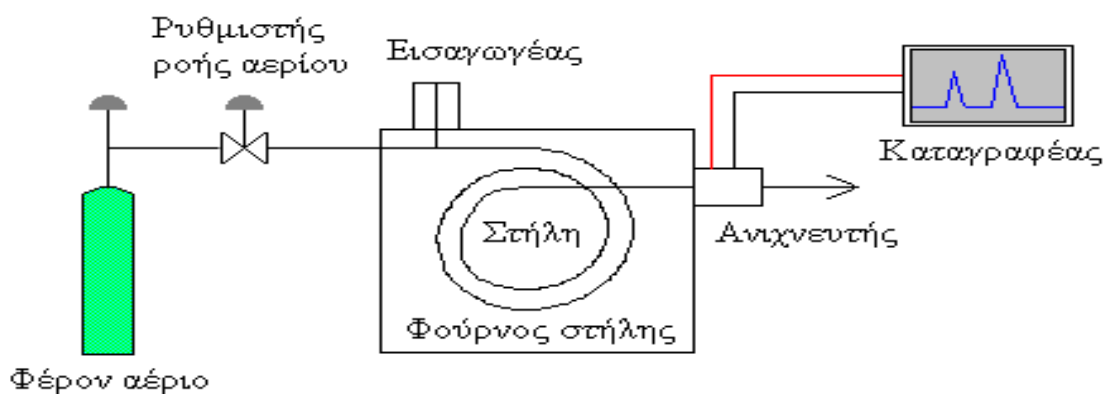


Εικόνα 15 : Σύστημα υγρής χρωματογραφίας (César Aquiles Lázaro de la Torre, 2014)

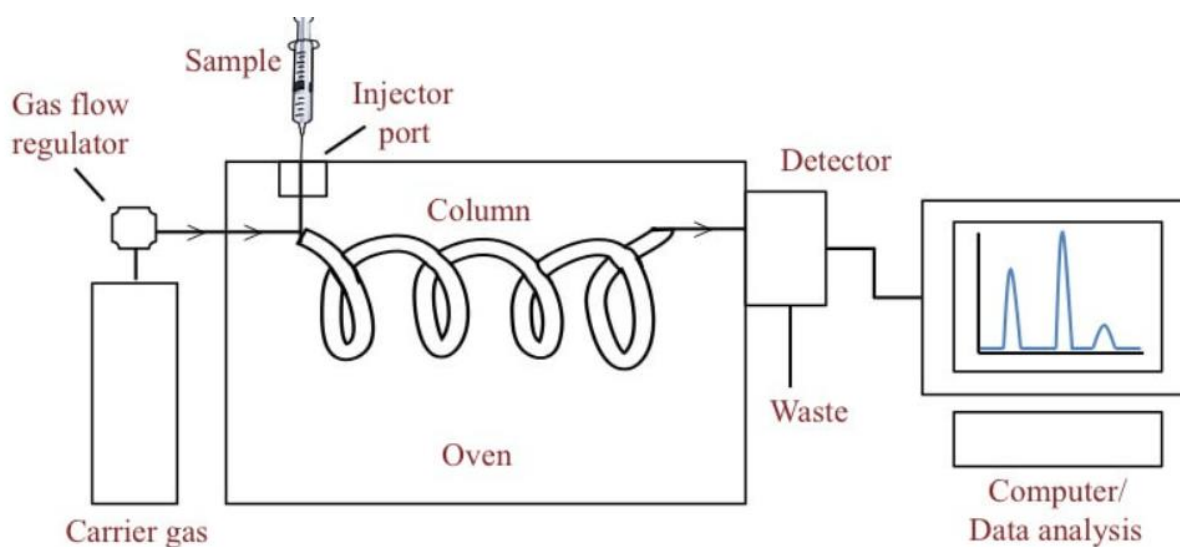
- **Αέρια Χρωματογραφία (GC)**

Η αέρια χρωματογραφία (Gas chromatography, GC) είναι μια τεχνική διαχωρισμού στην οποία τα μόρια διαχωρίζονται με βάση τον χρόνο κατακράτησης τους και ανάλογα με τη συγγένεια των μορίων με τη στατική φάση. Οι ενώσεις που αναλύονται πρέπει να είναι ή να καθίστανται πτητικές χωρίς να διασπώνται. Ο διαχωρισμός στην αέρια χρωματογραφία οφείλεται σε δύο ιδιότητες των ουσιών, το σημείο ζέσεως και τη φυσικοχημική τους

συγγένεια με τη στατική φάση. Η αέρια χρωματογραφία βασίζεται στην αρχή ότι τα συστατικά που έχουν υψηλότερη συγγένεια με τη στατική φάση έχουν μεγαλύτερο χρόνο συγκράτησης καθώς χρειάζονται περισσότερο χρόνο για να βγουν από τη στήλη. Ωστόσο, τα συστατικά που έχουν μεγαλύτερη συγγένεια με τη στατική φάση έχουν λιγότερο χρόνο συγκράτησης καθώς κινούνται μαζί με την κινητή φάση. Η κινητή φάση είναι ένα αέριο, ονομάζεται φέρον αέριο, και συνήθως είναι το αδρανές αέριο ήλιο, που μεταφέρει το δείγμα μέσω της στήλης. Το δείγμα μόλις εγχυθεί μετατρέπεται στο στάδιο ατμού στη συνέχεια διέρχεται μέσω ενός ανιχνευτή για να προσδιοριστεί ο χρόνος κατακράτησης. Οι επιμέρους ουσίες συλλέγονται χωριστά καθώς εξέρχονται από τη στατική φάση σε διαφορετικούς χρόνους. (Microbe Notes, χ.χ.) Στην *Εικόνα 16* και *Εικόνα 17*, παρουσιάζεται σχηματικά η παραπάνω μέθοδος που αναλύθηκε.



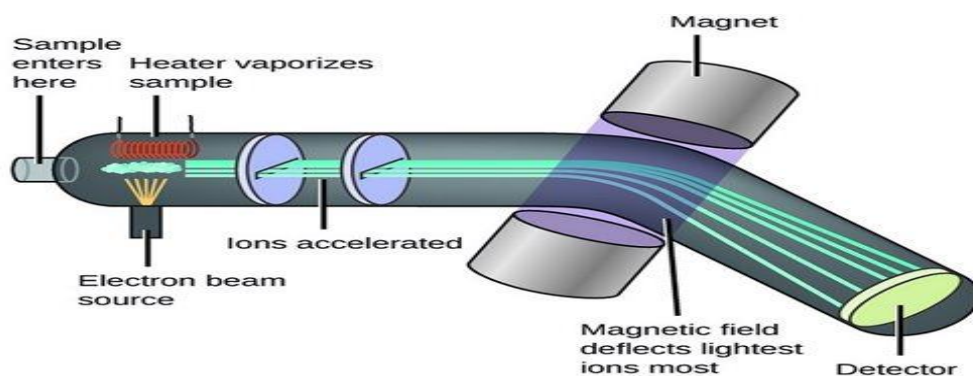
Εικόνα 16 : Αέρια χρωματογραφία



Εικόνα 17 : Αέρια χρωματογραφία (Microbe Notes, χ.χ.)

- **Φασματοσκοπία Μάζας**

Η φασματοσκοπία μάζας είναι μία μέθοδος, η οποία μετρά τον λόγο μάζας προς το φορτίο (m/z) ενός ή περισσότερων μορίων που υπάρχουν σε ένα επιθυμητό μίγμα. Πιο συγκεκριμένα, η βασική αρχή της φασματοσκοπίας μάζας είναι να δημιουργεί ιόντα είτε από ανόργανες είτε από οργανικές ενώσεις με οποιαδήποτε κατάλληλη μέθοδο, να διαχωρίζει αυτά τα ιόντα με την αναλογία μάζας προς φορτίο (m/z) και να τα ανιχνεύει ποιοτικά και ποσοτικά με αντίστοιχα m/z . Η αναλυόμενη ουσία μπορεί να ιονιστεί θερμικά, από ηλεκτρικά πεδία ή με πρόσκρουση ενεργητικών ηλεκτρονίων, ιόντων ή φωτονίων. Επίσης, αυτές οι μετρήσεις, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον υπολογισμό του ακριβούς μοριακού βάρους των συστατικών του δείγματος. Τυπικά, τα φασματόμετρα μάζας μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αναγνώριση άγνωστων ενώσεων/μιγμάτων. Αυτό επιτυγχάνεται μέσα από τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους, τον ποσοτικό προσδιορισμό γνωστών ενώσεων και για τον προσδιορισμό της δομής και των χημικών ιδιοτήτων των επιμέρους μορίων. Βασικό είναι να γνωρίζει κάποιος, ότι ένα βασικό φασματόμετρο μάζας αποτελείται από τουλάχιστον τρία συστατικά, μία πηγή ιονισμού, έναν αναλυτή μάζας και ένα σύστημα ανίχνευσης ιόντων. (DGMS, n.d.)

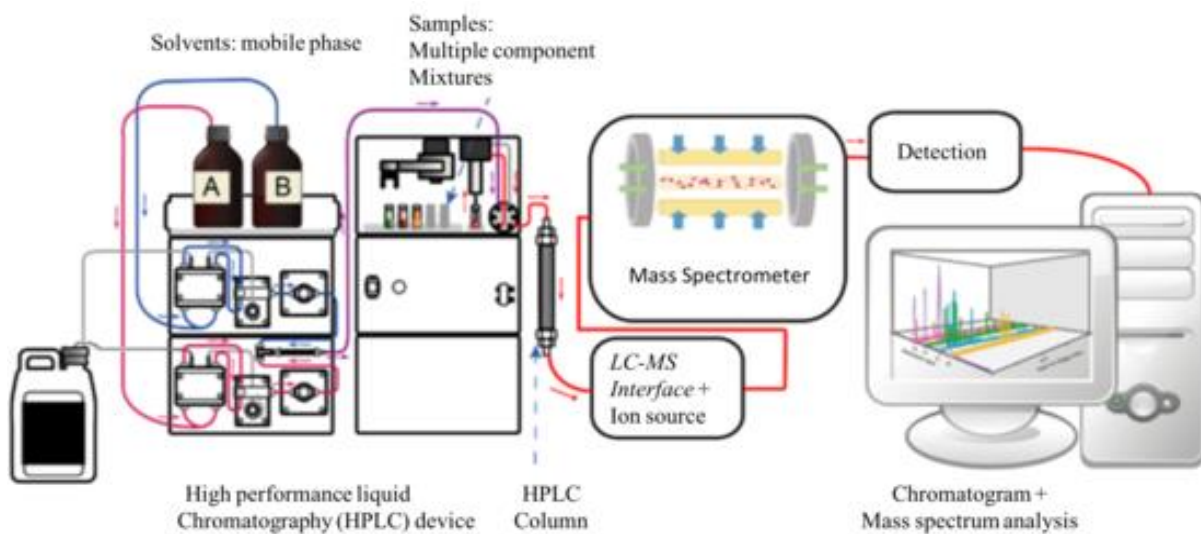


Εικόνα 18 : Αρχή φασματοσκοπία μάζας (Bronkhorst, n.d.)

- **Φασματοσκοπία Μάζας και Υγρή Χρωματογραφία (MS-LC)**

Ο συνδυασμός της φασματοσκοπίας μάζας και της υγρής χρωματογραφίας, παρέχει μια αναλυτική χημική μέθοδο, η οποία συνδυάζει την ικανότητα του φυσικού διαχωρισμού της υγρής χρωματογραφίας και την ικανότητα ανάλυσης μάζας της φασματοσκοπίας μάζας. Ο συνδυασμός των μεθόδων αυτών είναι γνωστός σε χημικές αναλύσεις, καθώς οι μεμονωμένες ιδιότητες των δύο μεθόδων βελτιώνονται συνεργατικά. Από την μία πλευρά, η υγρή

χρωματογραφία διαχωρίζει μίγματα με πολλαπλές ενώσεις, από την άλλη πλευρά η φασματοσκοπία μάζας παρέχει την ανατομική ταυτότητα των μεμονωμένων ενώσεων με υψηλή μοριακή ορθότητα και ακριβής ανίχνευση. Ειδικότερα, με την LC, ο διαχωρισμός των συστατικών του δείγματος βασίζεται στις αλληλεπιδράσεις των ενώσεων με την κινητή και τη στατική φάση και ο βαθμός διαχωρισμού της ένωσης σχετίζεται με τη συγγένεια κάθε ένωσης για την κινητή φάση. Με την MS, οι ενώσεις εκλύονται από τη στήλη, διαλύονται στην αέρια φάση και ιονίζονται σε πηγή ιονισμού και στη συνέχεια εισάγονται στο φασματόμετρο μάζας για ανάλυση μάζας. Συνδυάζοντας λοιπόν τις δύο αυτές μεθόδους μπορούν να αναλυθούν βιοχημικές, οργανικές και ανόργανες χημικές ουσίες που συνήθως βρίσκονται σε σύνθετα δείγματα περιβαλλοντολογικής ή βιολογικής προέλευσης. Στα σύνθετα μίγματα που αναλύονται προηγείται μία μέθοδος διαχωρισμού, στην προκειμένη η υγρή χρωματογραφία και στην συνέχεια συνδέεται το φασματόμετρο μάζας, όπως αυτό παρουσιάζεται στην *Εικόνα 19*. (Pitt, 2009)

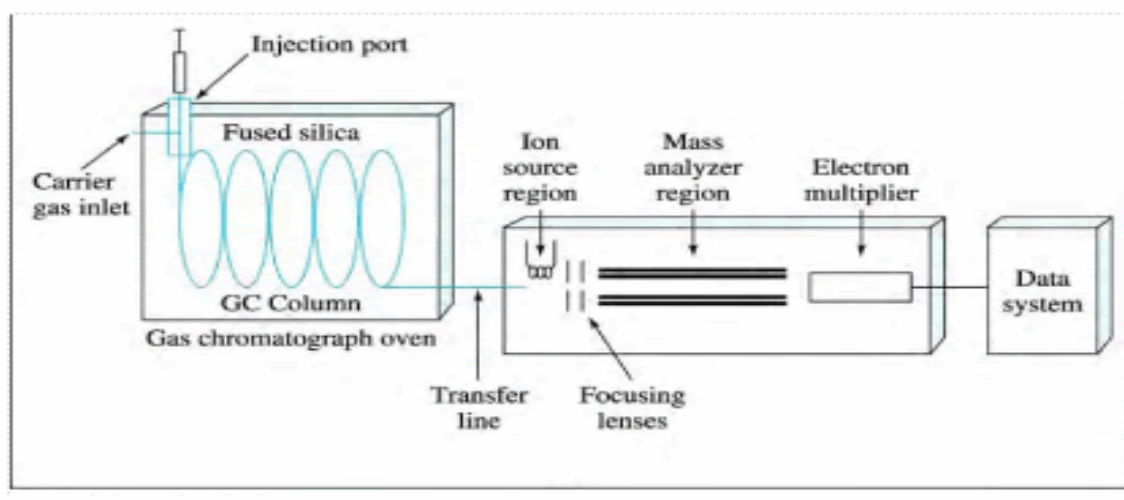


Εικόνα 19 : Απεικόνιση MS-LC

- **Φασματοσκοπία Μάζας και Αέρια Χρωματογραφία (MS-GC)**

Ο συνδυασμός της αέριας χρωματογραφίας και της φασματοσκοπίας μάζας είναι μία συνδυαστική μέθοδος, η οποία προσφέρει την ταυτοποίηση ενώσεων οι οποίες έχουν χαμηλή ανιχνευσιμότητα και επίσης είναι δυνατό να γίνει ποσοτικός προσδιορισμός. Με την τεχνική αυτή μπορούν να αναλυθούν υγρά, στερεά και αέρια δείγματα αλλά ως επί το πλείστον η χρήση της είναι περιορισμένη σε πτητικές και ημι-πτητικές ενώσεις. Τρόφιμα και ποτά

περιέχουν πολυάριθμες αρωματικές ενώσεις, κάποιες που είναι φυσικά συστατικά των ωμών υλικών και άλλες που σχηματίζονται κατά την διάρκεια της επεξεργασίας. Η ανάλυση ξεκινά με τον αέριο χρωματογράφο, όπου το δείγμα εξατμίζεται αποτελεσματικά στην αέρια φάση και διαχωρίζεται στα διάφορα συστατικά του χρησιμοποιώντας μια τριχοειδή στήλη επικαλυμμένη με μια στατική (υγρή ή στερεή) φάση. Οι ενώσεις προωθούνται από ένα αδρανές αέριο φορέα όπως ήλιο, υδρογόνο ή άζωτο. Καθώς τα συστατικά του μείγματος διαχωρίζονται, κάθε ένωση εκλύεται από τη στήλη σε διαφορετικό χρόνο με βάση το σημείο βρασμού και την πολικότητά της. Ο χρόνος έκλυσης αναφέρεται ως χρόνος κατακράτησης μιας ένωσης. Το GC έχει την ικανότητα να αναλύει πολύπλοκα μείγματα ή εκχυλίσματα δειγμάτων που περιέχουν εκατοντάδες ενώσεις. Τα τελικά στάδια της διαδικασίας περιλαμβάνουν ανίχνευση και ανάλυση ιόντων, με κατακερματισμένα ιόντα να εμφανίζονται ως συνάρτηση των αναλογιών m/z τους. Οι περιοχές αιχμής, εν τω μεταξύ, είναι ανάλογες με την ποσότητα της αντίστοιχης ένωσης. Όταν ένα σύνθετο δείγμα διαχωρίζεται με GC-MS, θα παράγει πολλές διαφορετικές κορυφές στο αέριο χρωματογράφημα και κάθε κορυφή δημιουργεί ένα μοναδικό φάσμα μάζας που χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση της ένωσης. Χρησιμοποιώντας εκτεταμένες εμπορικά διαθέσιμες βιβλιοθήκες φασμάτων μάζας, μπορούν να αναγνωριστούν και να ποσοτικοποιηθούν άγνωστες ενώσεις. Όλα αυτά παρουσιάζονται στην *Εικόνα 20*. Ο συνδυασμός λοιπόν των δύο αυτών μεθόδων χρησιμοποιείται ευρέως για την ανάλυση αυτών των ενώσεων που μπορεί να είναι εστέρες, λιπαρά οξέα, αλκοόλες, αλδεΐδες, τερπένια κ.α. Επίσης είναι χρήσιμο για τον εντοπισμό και την μέτρηση ρύπων από απόβλητα ή τον εντοπισμό νοθείας π.χ ανίχνευση παρασιτοκτόνων, τα οποία ίσως είναι βλαβερά. Τα παραπάνω ελέγχονται συνήθως από κυβερνητικές υπηρεσίες. (ThermoFisher Scientific, n.d.)



Εικόνα 20 : Απεικόνιση φασματομέτρου μάζα σε συνδυασμό με αέριο χρωματογράφο

Όλες λοιπόν οι παραπάνω μέθοδοι, χρησιμοποιούνται σε καθημερινή βάση από πολλές επιστήμονες σε επιστημονικό αλλά και βιομηχανικό επίπεδο για να απομονώσουν πρωτεΐνες και άλλα συστατικά από τον μικροοργανισμό *Lactobacillus spp* που παρουσιάζονται τα πιο σημαντικά παρακάτω.

Όπως έχει αναφερθεί και σε προηγούμενες ενότητες, τα οφέλη των προβιοτικών είναι πολλά. Βασικά παραδείγματα και εφαρμογές αποτελεί η βελτιωμένη πρόσληψη θρεπτικών ουσιών από τα τρόφιμα, η ανάπτυξη και η πρόληψη διαφόρων γαστρεντερικών διαταραχών. Επιπλέον, τα προβιοτικά σύμφωνα με αρκετές έρευνες, έχουν την ικανότητα να αναστείλουν οποιοδήποτε παθογόνο μικροοργανισμό που είτε υπάρχει ήδη εκεί είτε μπορεί να εισβάλει αργότερα. Ο *Lactobacillus spp*, είναι ο πιο ευρέως διαδεδομένος μικροοργανισμός για την απομόνωση προβιοτικών, επειδή παρουσιάζει ποικίλες δραστηριότητες, συμπεριλαμβανομένης της αναστολής των επιβλαβών εντερικών παθογόνων ουσιών και ενισχύει την ευεργετική μικροχλωρίδα του εντέρου. Πιο συγκεκριμένα, αυτός ο μικροοργανισμός, όπως και πολλοί άλλοι γαλακτοβάκιλλοι, διασφαλίζουν την ασφάλεια και παρατείνουν τη διάρκεια ζωής διαφόρων προϊόντων, και αυτό το πετυχαίνουν μέσω της έκκρισης αντιμικροβιακών ενώσεων όπως βακτηριοσίνες, οργανικά οξέα και υπεροξειδίου του υδρογόνου. Οι βακτηριοσίνες, αποτελούν μια ετερογενή ομάδα αντιμικροβιακών ουσιών πρωτεϊνικής φύσεως, οι οποίες ποικίλλουν όσον αφορά το αντιμικροβιακό φάσμα και τον τρόπο δράσης, το μοριακό βάρος (MB), τη γενετική τους προέλευση και τις βιοχημικές τους ιδιότητες. Η σημαντική σημασία των βακτηριοσινών αποδίδεται στην ενδεχόμενη εφαρμογή τους ως φυσικών συντηρητικών των τροφίμων, με σκοπό την αντικατάσταση ή μείωση των συντηρητικών, των οποίων ορισμένες κατηγορίες θεωρούνται επικίνδυνες για την υγεία των καταναλωτών. Οι βακτηριοσίνες των γαλακτικών βακτηρίων, συνεπώς και του *Lactobacillus spp*, δεν θεωρούνται επικίνδυνες ουσίες λόγω της προέλευσης τους και συγκαταλέγονται στις λεγόμενες GRAS (Generally Regarded As Safe) ουσίες και έτσι μπορούν να προστεθούν ή να παραχθούν μέσα στη μάζα του τροφίμου χωρίς ιδιαίτερους περιορισμούς με στόχο να δράσουν ως φυσικά συντηρητικά. Επιπλέον, οι βακτηριοσίνες οι οποίες παράγονται από τα Gram (+) βακτήρια, όπως είναι και ο *Lactobacillus spp*, είναι ουσίες οι οποίες παρουσιάζουν ενεργά βιολογικά πρωτεϊνικά τμήματα (πεπτίδια) και τα οποία παρουσιάζουν αντιμικροβιακές ιδιότητες. Δεύτερον, έχουν μικρό MB, το οποίο ποικίλλει σημαντικά μεταξύ τους, όπως συμβαίνει και στο αντιμικροβιακό φάσμα. (Yogesh Kumar Negi C. P., 2018)

Τα γηγενή φύλλα του παραδοσιακού τσαγιού Miang, τα οποία έχουν υποστεί ζύμωση, είναι αρκετά διαδεδομένα εδώ και αιώνες στην περιοχή της Βόρειας Ταϊλάνδης. Τα φύλλα αυτά φιλοξενούν έναν αρκετά μεγάλο αριθμό ωφέλιμων προβιοτικών βακτηρίων. Συνολικά 133.0 γλακτοβάκυλοι έχουν απομονωθεί από το Miang και έχουν αξιολογηθεί για έντονο προβιοτικό χαρακτήρα. Μεταξύ αυτών, 5 στελέχη έδειξαν υψηλή ανοχή στο περιβάλλον που επικρατεί στην χολή και τις όξινες συνθήκες και επιλέχθηκαν για περαιτέρω αξιολόγηση. Επίσης, όλα τα επιλεγμένα στελέχη έδειξαν ανασταλτική δράση έναντι ανθρώπινων παθογόνων, συμπεριλαμβανομένων των *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* και *Salmonella ser.* Αξιοσημείωτο επιπλέον είναι, ότι πολλοί ερευνητές έχουν διενεργήσει πολλές αναλύσεις αλληλουχιών νουκλεοτιδίων του γονιδίου 16S rRNA, και έχουν διαπιστώσει ότι 3 απομονώσεις ταυτοποιήθηκαν ως *Lactobacillus pentosus*. Τα υπόλοιπα ήταν τα *L. plantarum* και *Pediococcus pentosaceus*. Και τα 5 στελέχη παρουσιάζουν υψηλό ποσοστό επιβίωσης άνω του 90.0 %, όταν αυτά εκτίθενται σε προσομοιωμένες γαστρεντερικές καταστάσεις. Επιπλέον, παρουσιάζουν ευαισθησία σε αντιβιοτικά όπως είναι για παράδειγμα η ερυθρομυκίνη, η τετρακυκλίνη και η γενταμυκίνη, αλλά από την άλλη πλευρά είναι ανθεκτικά στη βανκομυκίνη, στη στρεπτομυκίνη και στην πολυμυκίνη. Επιπλέον, τα παραπάνω στελέχη εμφανίζουν διαφορετικούς βαθμούς υδροφοβικότητας της κυτταρικής επιφάνειας, περίπου της τάξης των 58.3 % έως 92.9 % και αυτοσυσσωμάτωσης 38.9 % έως 46.0 %. Δεν θα μπορούσε να παραλειφθεί η αντιοξειδωτική δράση αυτών βρέθηκαν επίσης σε επιλεγμένα στελέχη LAB και που αντικατοπτρίζεται στις δραστηριότητες σάρωσης DPPH βιώσιμων κυττάρων και των υπερκείμενων καλλιιεργειών τους χωρίς κύτταρα (CFCS). Μεταξύ των παραπάνω πέντε στελεχών από τα γηγενή φύλλα του παραδοσιακού τσαγιού Miang, το *L. pentosus* A14-6 συγκεκριμένα, έχει το μεγαλύτερο προβιοτικό δυναμικό, με κυτταρικά αντιοξειδωτικά χαρακτηριστικά που υποστηρίζουν τη σκοπιμότητα της εφαρμογής του σε διάφορα προϊόντα διατροφής ή ως στοχευμένα στην ανάπτυξη συνβιωτικών θρεπτικών ουσιών. Παρόλα αυτά, αξίζει να τονιστεί ότι για την ασφάλεια των καταναλωτών, οι λειτουργικές ιδιότητες αυτών των στελεχών θα πρέπει να αξιολογηθούν περαιτέρω για να επιβεβαιωθούν οι ευεργετικές για την υγεία ιδιότητές τους, σε in vivo μοντέλα. (Kridsada Unban, 2021)

Έχει βρεθεί ότι τα καλαμπόκια έχουν μεγάλη περιεκτικότητα σε βακτήρια γαλακτικού οξέος. Πιο συγκεκριμένα, τα LAB μπορούν να απομονωθούν και χαρακτηριστούν έπειτα από την ξήρανση και τον ψεκασμό των ενσιρωμένων καλαμποκιών. (Η διαδικασία της ενσίρωσης, είναι η διαδικασία διατήρησης των ζωοτροφών σε χλωρή κατάσταση. Πιο συγκεκριμένα, τα κτηνοτροφικά φυτά, όπως είναι στην συγκεκριμένη περίπτωση το καλαμπόκι, αφού

συγκομιστούν, στο κατάλληλο στάδιο κόβονται σε μικρά τεμάχια και στη συνέχεια συγκεντρώνονται σε ειδικές κατασκευές τους σιρούς, όπου μετά ακολουθούν ορισμένες απλές κατεργασίες προκειμένου να παραχθεί το ενσίρωμα το οποίο είναι έτοιμο μετά από 35.0 έως 40.0 ημέρες.) Ο ψεκάσμος γίνεται για να ενισχυθεί η διαδικασία της ζύμωσης. Έντεκα στελέχη λακτοβάκιλλων χαρακτηρίστηκαν σχετικά με την κινητική ανάπτυξής τους, την ικανότητα ανάπτυξης του σε φυτικό μέσο, την παραγωγή οργανικών οξέων και την ικανότητα ανοχής τους στη θερμική καταπόνηση. Τρία στελέχη, ο *Lactobacillus plantarum* Ls71, ο *Pediococcus acidilactici* Ls72 και ο *Lactobacillus buchneri* Ls141, επιλέχθηκαν και χαρακτηρίστηκαν σχετικά με την ικανότητα τους να αναπτύσσονται ως μεμονωμένα στελέχη ή όντας σε θρεπτικό μέσο MRS και VMB, για να επιβιώνουν στη διαδικασία της ξήρανσης με ψύξη και ψεκάσμο. Σχετικά με την διαδικασία της απομόνωσης, δείγματα ενσιρώσεων αραβοσίτου που έχουν υποστεί αυθόρμητη ζύμωση μετά από 7.0, 14.0, και 21.0 ημέρες ενσίρωσης. Κάθε δείγμα αναμείχθηκε με 90.0 mL πεπτόνης νερού (0.1% w/v), ομογενοποιήθηκε, αραιώθηκε και επιστρώθηκε σε επιφάνεια MRS (de Man, Rogose και Sharpe), χολή MRS, MRS-LP και άγαρ M17. Οι πλάκες επώαστηκαν αερόβια (ή αναερόβια, MRS-LP) στους 34.0 °C για 72.0 ώρες. Είκοσι δύο αποικίες που παρουσίαζαν τυπική μορφολογία LAB, απομονώθηκαν και καθαρίστηκαν για αντίδραση χρώσης κατά Gram, κινητικότητα, δραστηριότητα καταλάσης και παραγωγή αερίου. Τα υποθετικά προϊόντα απομόνωσης LAB καταψύχθηκαν σε ζυμό MRS που προστέθηκε με 20.0 % v/v γλυκερόλη στους -20.0 °C και στους -70.0 °C. Το *L. buchneri* Ls141 έδειξε την υψηλότερη ικανότητα ανάπτυξης και παρήγαγε την υψηλότερη ποσότητα οξικού οξέος, ενώ το *L. plantarum* Ls71 παρήγαγε τις υψηλότερες ποσότητες γαλακτικού οξέος. Το *P. acidilactici* Ls72 ήταν το πιο ανθεκτικό στη θερμότητα στέλεχος. Τα τρία στελέχη άντεξαν ικανοποιητικά τόσο τον ψεκάσμο όσο και την λυοφιλίωση. Μετά από 4 ημέρες ζύμωσης, όλα τα δείγματα έφτασαν σε τιμή pH περίπου 3.7 έως 3.8. Ένα σημαντικό χαμηλότερο κυτταρικό φορτίο νηματωδών μυκήτων και ζυμομυκήτων και υψηλότερη συγκέντρωση ολικού LAB παρατηρήθηκε μετά από 30.0 ημέρες ζύμωσης. Μεγαλύτερη ποσότητα οξικού οξέος, ακατέργαστης πρωτεΐνης, τέφρας και αζώτου αμμωνίας, και ολικό άζωτο ανιχνεύθηκε στα εμβολιασμένα ενσιρωμένα καλαμπόκια. Σημαντική μείωση των νηματοειδών μυκήτων και ζυμομυκήτων παρατηρήθηκε επίσης σε εμβολιασμένα ενσιρωμένα καλαμπόκια μετά από 50.0 ημέρες ζύμωσης. Η αερόβια σταθερότητα βελτιώθηκε σημαντικά στα εμβολιασμένα ενσιρωμένα καλαμπόκια αφού η θερμοκρασία παρέμεινε σταθερή μετά από 16.0. Αντίθετα, παρατηρήθηκε αύξηση 5.0 °C στα δείγματα ελέγχου μετά από 1.0 ημέρα. Τα επιλεγμένα στελέχη μπόρεσαν να επιταχύνουν τη διαδικασία ζύμωσης, να ελέγξουν νηματοειδείς μύκητες και ζυμομύκητες, να βελτιώσουν

ορισμένες θρεπτικές και χημικές παραμέτρους της ενσίρωσης και να βελτιώσουν την αερόβια σταθερότητα τους. (Patricia Burns, 2018)

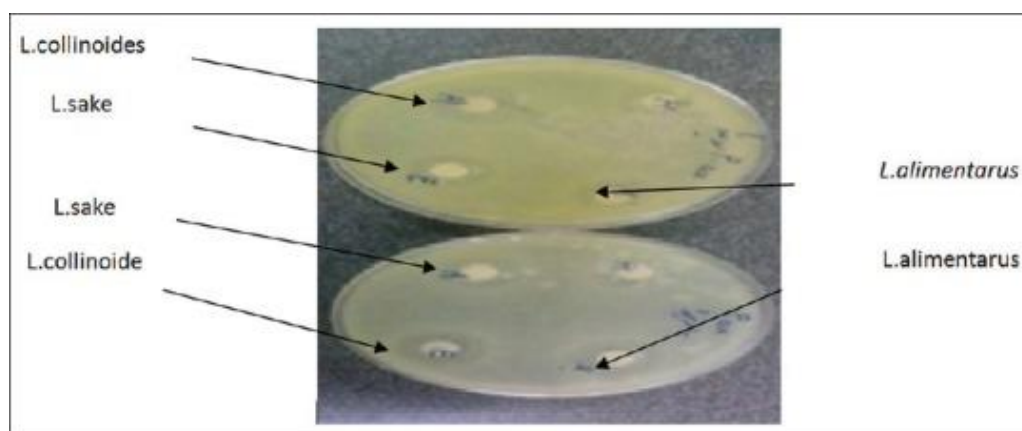
Μία ακόμα σημαντική εφαρμογή του *Lactobacillus spp*, είναι στην πτηνοτροφική βιομηχανία. Πιο συγκεκριμένα, η χρήση του *Lactobacillus spp* ως προβιοτικό έχει αποδειχθεί ότι συμβάλλει τόσο στη βελτίωση των δεικτών παραγωγής των πτηνών, όσο και στην προστασία του εντέρου από τον αποικισμό παθογόνων βακτηρίων. Ένα βασικό χαρακτηριστικό για την επιλογή συγκεκριμένου στελέχους *Lactobacillus spp*, είναι η ικανότητα προσρόφησης του. Αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι, όταν το στέλεχος έχει μεγάλη ικανότητα προσρόφησης, τότε εμποδίζεται η άμεση αποβολή του από τον οργανισμό ξενιστή, και με αυτόν τον τρόπο του δίνεται η δυνατότητα να δράσει. Βασικό για την κατανόηση αυτής της διεργασίας, αποτελεί η απομόνωση, αναγνώριση και ο χαρακτηρισμός *in vitro* και *in vivo* προσκόλλημένων στελεχών *Lactobacillus* απομωνωμένα από πτηνά. Στην επιστημονική έρευνα των Ticiania Silva Rocha, Ana Angelita Sampaio Baptista, Tais Cremasco Donato, Elisane Lenita Milbradt, Adriano Sakai Okamoto και Raphael Lucio Andreatti Filho (Ticiania Silva Rocha, 2014), ο *Lactobacillus spp* αναγνωρίστηκε με PCR (Μοριακή Μέθοδος Ανίχνευσης), και στην συνέχεια μέσω διαδικασίας *in vitro* με κυτταρική μήτρα BMM (Basement Membrane Matrix) και *in vivo* με ενοφθαλμισμό σε πτηνά μιας ημέρας ελέγχθηκε η αλληλουχία, τα στελέχη και η ικανότητα προσκόλλησής τους. Τα σημεία από τα πτηνά όπου συλλέχθηκαν δείγματα είναι το δωδεκαδάκτυλο, η νήστιδα, ο ειλεός και το τυφλό του εντέρου και συλλέχθηκαν 1.0, 4.0, 12.0 και 24.0 ώρες μετά τον εμβολιασμό. Ειδικότερα, έξι πτηνά ανά ομάδα υποβλήθηκαν σε ανθρώπινη ευθανασία με εξάρθρωση του τραχήλου της μήτρας, έπειτα συλλέχθηκαν κρανιακά τμήματα ενός εκατοστού του δωδεκαδακτύλου, της νήστιδας, του ειλεού και του τυφλού. Όλα τα ορατά υπολείμματα αφαιρέθηκαν προσεκτικά για να αποφευχθεί η πιθανώς καταστροφή του εντερικού βλεννογόνου. Τα θραύσματα τα οποία συλλέχθηκαν, καταψύχθηκαν αμέσως μέσω βύθισης σε υγρό άζωτο και αποθηκεύτηκαν στους -80.0 °C μέχρι την ιστολογική παρασκευή. Οι αντικειμενοφόρες πλάκες προστατεύτηκαν από το φως και αποθηκεύτηκαν στους -20 °C μέχρι την ανάλυση. Από τα στελέχη που βρέθηκαν, 123.0 ήταν συμβατά με το γένος *Lactobacillus*, και στη συνέχεια υποβλήθηκαν σε PCR όπου μόνο 73.0 στελέχη ήταν θετικά. Τα ευρήματα έδειξαν την μεγαλύτερη προσκόλληση στελεχών στο τυφλό του εντέρου και σημαντική συσχέτιση μεταξύ *in vitro* και *in vivo* αποτελεσμάτων. Συνήχθη το συμπέρασμα ότι η χρήση BMM αντιπροσωπεύει μια σημαντική τεχνική για τη διαλογή του *Lactobacillus* για επακόλουθη *in vivo* αξιολόγηση, η οποία αποδείχθηκε αποτελεσματική στον εντοπισμό της βακτηριακής προσκόλλησης στην εντερική οδό. (Ticiania Silva Rocha, 2014)

Οι παραδοσιακές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τη μελέτη μικροβιακών κοινοτήτων, όπως τα μορφολογικά και φυσιολογικά τους χαρακτηριστικά, το προφίλ των πρωτεϊνών τους, τα πρότυπα ζύμωσης υδατανθράκων και οι μετρήσεις σε επιλεκτικά μέσα, είναι χρονοβόρες και συχνά παράγουν αμφιλεγόμενα αποτελέσματα. Για την επίτευξη αξιόπιστης και ταχείας αναγνώρισης βακτηριακών ειδών, εφαρμόζονται ολοένα και περισσότερο μοριακές μέθοδοι όπως ο προσδιορισμός αλληλουχίας γονιδίου 16S rRNA PCR, ο προσδιορισμός αλληλουχίας μεταγονιδιώματος και η ηλεκτροφόρηση με βαθμίδωση πηκτής μετουσίωσης (DGGE). Η PCR γενικά θεωρείται ότι είναι μια γρήγορη, ευαίσθητη και εξοικονομεί χρόνο μέθοδο για την ανίχνευση βακτηριακών ειδών. Η ακρίβεια της PCR καθορίζεται από την ειδικότητα των ζευγών εκκινητών που χρησιμοποιούνται. Πιο ειδικά, η αλληλουχία 16S rRNA χρησιμοποιείται συνήθως για την ταυτοποίηση βακτηρίων, συμπεριλαμβανομένης φυσικά της ταυτοποίησης των ειδών που απασχολούν την συγκεκριμένη εργασία, *Lactobacillus*. (Eiseul Kim, 2020). Το γονίδιο 16S rRNA θεωρείται γονίδιο δείκτης για βακτηριακή γονοτυπική ανάλυση και είναι χρήσιμο για την ακριβή ταυτοποίηση βακτηρίων. Οι μελέτες που επικεντρώνονται στην ταυτοποίηση του *Lactobacillus*, έχουν χρησιμοποιήσει κυρίως μοριακή ανάλυση με βάση την PCR με ζεύγος εκκινητών που στοχεύουν μεταβλητές περιοχές των αλληλουχιών γονιδίου 16S rRNA. Ωστόσο, για στενά συγγενικά είδη όπως τα μέλη των ομάδων *L. casei*, *L. sakei*, *L. plantarum* και *L. acidophilus*, καθένα από τα οποία έχει ομοιότητα γονιδίου 16S rRNA μεγαλύτερη από 98.0 %, μόνο τα ειδικά για είδη ζεύγη εκκινητών PCR θα μπορούσαν να διαφοροποιήσουν επαρκώς τα είδη αυτά. Μία προτεινόμενη διαδικασία PCR ανίχνευσης είναι η παρακάτω. Οι συγκεκριμένες αναλύσεις PCR επιτρέπουν σε κάθε ζεύγος εκκινητών να τρέχει ανεξάρτητα για να καλύψει κάθε πλήρη ανάλυση χρησιμοποιώντας ένα ζεύγος εκκινητών σε κάθε πηγή και για 37 πηγές. Οι αναλύσεις PCR πραγματοποιήθηκαν στο 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) και ρυθμίζοντας τα δείγματα στις ακόλουθες συνθήκες: 95.0 °C για 2.0 λεπτά, ακολουθούμενο από 30.0 κύκλους των 95.0 °C για 5.0 s και 60 °C για 30 s. Τα δεδομένα της καμπύλης τήξης δημιουργήθηκαν χρησιμοποιώντας 1 κύκλο 95.0 °C για 15 s, 60 °C για 1.0 λεπτό, 95.0 °C για 30.0 s και 60.0 °C για 15.0 s. Το μείγμα ενίσχυσης με τελικό όγκο 20.0 μL για δοκιμές PCR σε πραγματικό χρόνο περιελάβανε 2X LeGene SB-Green Real-Time PCR Master Mix (LeGene Biosciences, San Diego, CA, USA), DNA προτύπου και ζεύγη εκκινητών για συγκεκριμένα είδη σε βέλτιστες συγκεντρώσεις. Για την αξιολόγηση της αναλυτικής ακρίβειας των προσδιορισμών PCR, κατασκευάστηκε μια τυπική καμπύλη χρησιμοποιώντας σειριακές αραιώσεις (50.0 έως 0.005 ng) γονιδιωματικού DNA από στελέχη αναφοράς *Lactobacillus* εις τριπλούν. Οι ειδικότητες των ζευγών εκκινητών ειδικών

για το είδος δοκιμάστηκαν χρησιμοποιώντας 20.0 ng DNA που εκχυλίστηκε από 37.0 στελέχη αναφοράς *Lactobacillus*. Οι ενισχύσεις PCR της IPC επιβεβαιώθηκαν επίσης με 37.0 στελέχη αναφοράς *Lactobacillus*. Τα αποτελέσματα της PCR επιβεβαιώθηκαν χρησιμοποιώντας 7500 Software V2.3 (Applied Biosystems). (Eiseul Kim, 2020)

Το ενδιαφέρον πολλών επιστημόνων έχει προσελκύσει η απομόνωση αντιβακτηριδιακής πρωτεΐνης από *Lactobacillus spp.* και παρασκευή προβιοτικού από το τυρόπηγμα. Η μελέτη των Yogesh Kumar Negi, Chitra Pandey, Neha Saxena, Sonika Sharma, F. C. Garg και του S. K. Garg είχε ως στόχο να απομονώσει ανταγωνιστικούς γαλακτοβάκιλλους και τα μόρια που είναι υπεύθυνα για την ανταγωνιστική τους ικανότητα από το τυρόπηγμα. Αξιολόγησαν επίσης, την παρασκευή προβιοτικού τυροπήγματος και η ικανότητα των επιλεγμένων γαλακτοβακίλλων να καταστέλλουν τους παθογόνους μικροοργανισμούς σε αυτό. Και τα 116 απομονωμένα στελέχη ταυτοποιήθηκαν ως *Lactobacillus spp.* βασίζομενοι σε μορφολογικές, βιοχημικές και αναλύσεις πήξεις. Πέντε από αυτούς τους γαλακτοβάκιλλους (Lb-17, Lb-33, Lb-108, Lb-112 και Lb-N3) βρέθηκαν να είναι οι πιο πολλά υποσχόμενοι σχετικά με την ικανότητα τους να αναστέλλουν όλους τους παθογόνους μικροοργανισμούς της δοκιμής. Οι παθόγονοι αυτοί μικροοργανισμοί είναι οι εξής: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi* και *Shigeege sonnei*). Τα υπερκείμενα της καλλιέργειας χωρίς κύτταρα αυτών των πέντε γαλακτοβακίλλων, καταγράφηκαν ως θερμοανεκτικά όταν υποβλήθηκαν σε θερμική επεξεργασία στους 100.0 °C για 20.0 λεπτά. Η απώλεια της δραστηριότητας μετά την επεξεργασία με πρωτεάση έδειξε την πρωτεϊνική φύση του αντιμικροβιακού μορίου που υπάρχει στα υπερκείμενα της καλλιέργειας. Η ενεργή πρωτεΐνη, 19 kDa, η οποία παράγεται από γαλακτοβάκιλλους, επιβεβαιώθηκε μέσω της δοεργασίας SDS-PAGE ακολουθούμενη από μέθοδο επικάλυψης με άγαρ. Η δοκιμασία ευαισθησίας στα αντιβιοτικά αποκάλυψε ότι τα επιλεγμένα απομονωμένα στελέχη *Lactobacillus spp.*, ήταν ανθεκτικά στη μεθικιλίνη και τη βανκομυκίνη. Το προβιοτικό τυρόπηγμα που παρασκευάστηκε με χρήση Lb-108 και Lb-N3 βρέθηκε ότι είναι ανώτερο από τα υπόλοιπα τρία προϊόντα απομόνωσης με βάση οργανοληπτικές δοκιμές και διάρκεια ζωής. Πλήρης αναστολή όλων των δοκιμαστικών παθογόνων στο τυρόπηγμα φάνηκε από τα Lb-108 και Lb-N3. Το φάσμα αναστολής, η παραγωγή θερμοσταθερής πρωτεΐνης και η παρασκευή ποιοτικού τυροπήγματος προτείνουν τα Lb-108 και Lb-N3 ως υποσχόμενους υποψηφίους για την παρασκευή προβιοτικού τυροπήγματος. (Yogesh Kumar Negi C. P., 2018)

Τα προβιοτικά όπως οι γαλακτοβακίλλοι που ενδιαφέρουν την συγκεκριμένη εργασία, εμποδίζουν την ανάπτυξη ενός μεγάλου φάσματος παθογόνων μικροοργανισμών των ένβιων οργανισμών. Ο στόχος αυτής της μελέτης των Sahar Karami, Mohammad Roayaei, Hosna Hamzavi, Mahmoud Bahmani, Hassan Hassanzad-Azar, Mahmoodnia Leila, και του Mahmoud Rafieian-Koraei (Sahar Karami, 2017) ήταν η αξιολόγηση της ανταγωνιστικής επίδρασης απομονωμένων γαλακτοβακίλλων από τοπικά γαλακτοκομικά προϊόντα έναντι τριών τυπικών στελεχών *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* και *Pseudomonas aeruginosa*. Πιο γενικά, η αντιμικροβιακή δράση, δηλαδή τα χολικά άλατα και η ανοχή στα οξέα είναι τρία σημαντικά χαρακτηριστικά για τον έλεγχο του προβιοτικού δυναμικού των βακτηρίων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ιατρικά φάρμακα. Οι βακτηριοσίνες όπως έχουν ήδη αναφερθεί, είναι πρωτεϊνικές ενώσεις με ικανότητα αναστολής της ανάπτυξης ευαίσθητων παθογόνων βακτηρίων και έχουν διαφορετικό σύστημα αποικοδόμησης στο πεπτικό σύστημα σε σχέση με τα αντιβιοτικά. Από αυτά παρασκευάζονται και αντιμικροβιακές ενώσεις με στόχο να ανταγωνίζονται και να αναστέλλουν πολλούς παθογόνους μικροοργανισμούς. Επιπλέον, τέτοιες ενώσεις μπορεί να επηρεάσουν το μεταβολισμό ή και τις τοξίνες των παθογόνων βακτηρίων. Τα αποτελέσματα τα οποία ελήφθησαν έδειξαν ότι μόνο τρία στελέχη απομονωμένων γαλακτοβακίλλων τοπικών δειγμάτων γαλακτοκομικών, είχαν ανασταλτικές επιδράσεις σε παθογόνα που δεν είχαν μελετηθεί, συμπεριλαμβανομένων των *Lactobacillus alimentarius*, *Lactobacillus sake* και *Lactobacillus collinoides*. Και τα τρία στελέχη εμφάνισαν μέτρια δραστικότητα με ζώνη αναστολής μικρότερη από 15.0 mm, και εκτός από τα *L. collinoides* και *L. alimentarius* που είχαν σχετικά ισχυρή δράση με ζώνη αναστολής μεγαλύτερη από 15.0 mm έναντι των *P. aeruginosa* και *B. subtilis*, αντίστοιχα. Οι ζώνες αναστολής παρουσιάζονται στην *Εικόνα 21*.



Εικόνα 21 : Ζώνη αναστολής τριών στελεχών *Lactobacillus* στο *Pseudomonas aeruginosa* και *Bacillus subtilis*

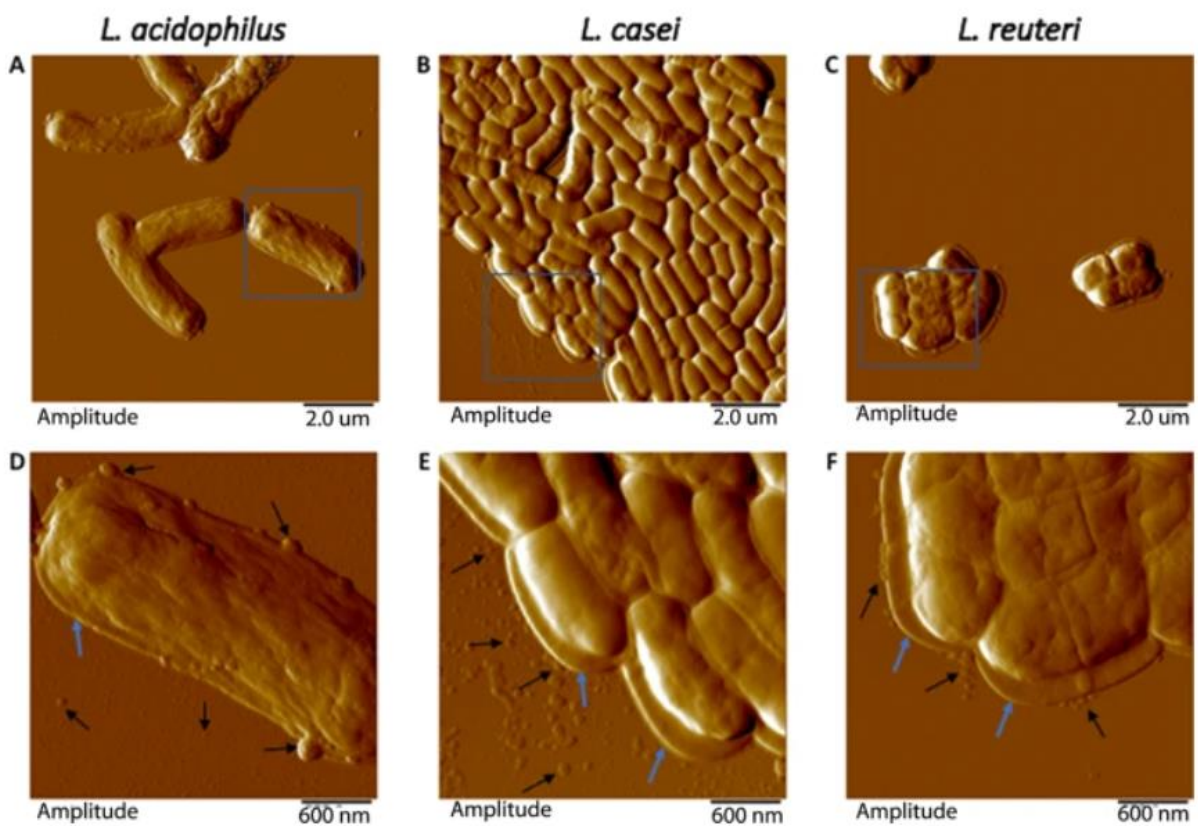
Ζώνη αναστολής τριών στελεχών (Sahar Karami, 2017)

Δεδομένων των αποτελεσμάτων αυτής της μελέτης, οι ανταγωνιστικές επιδράσεις των παραγόμενων ουσιών από τα βακτήρια σε ένα ευρύ φάσμα μικροοργανισμών έχουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση των τροφίμων και στην ανθρώπινη υγεία. Αυτά τα βακτήρια μπορούν να αναπτυχθούν για την παραγωγή διαφόρων ειδών τροφίμων και φαρμακευτικών προϊόντων. Μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή νέων λειτουργικών τροφίμων. Επομένως, η αυξανόμενη χρήση γαλακτοκομικών προϊόντων που περιέχουν προβιοτικά, η αναγνώριση και η παραγωγή τροφών που περιέχουν τους υψηλότερους και αποτελεσματικότερους γαλακτοβάκιλλους συνιστάται στην καθημερινή διατροφή. (Sahar Karami, 2017)

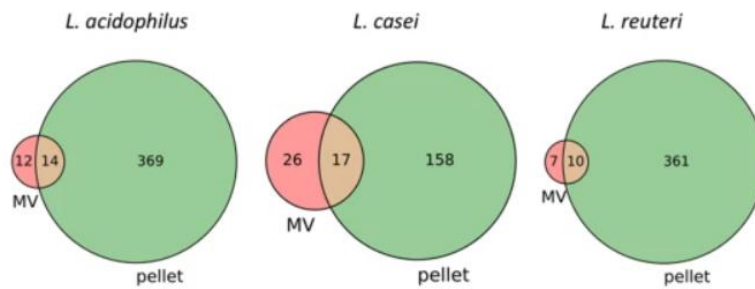
Στην συνέχεια, βασικό ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας, έχει προκαλέσει και έχει απασχολήσει η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός μεμβρανικών κυστιδίων, τα οποία προέρχονται από *Lactobacillus spp.* Οι συνεχείς προσπάθειες στην έρευνα κυστιδίων έχουν δείξει ότι αυτά τα βιολογικά νανοσωματίδια έχουν κρίσιμο ρόλο στην κυτταρική λειτουργία και την αλληλεπίδραση της κοινότητας. Το γεγονός αυτό, δεν περιορίζεται σε κάποιο συγκεκριμένο βακτηριακό είδος, αλλά τα κυστίδια μεμβράνης από θετικά κατά Gram βακτήρια (MVs), τα εξωσώματα από ευκαρυωτικά κύτταρα και τα βακτηριακά κυστίδια εξωτερικής μεμβράνης OMVs έχει αποδειχθεί και είναι ευρέως αποδεκτό ότι έχουν ένα εντυπωσιακό εύρος εξωκυτταρικής λειτουργίας. Τα OMVs βακτήρια κατά Gram αρνητικά, τα οποία είναι από τα πιο μελετημένα κυστίδια, έχει αποδειχθεί ότι μεταφέρουν ένα ευρύ φάσμα φορτίου, συμπεριλαμβανομένων παραγόντων λοιμογόνου δράσης, νουκλεϊκών οξέων, σημάτων ανίχνευσης απαρτίας, τοξινών, ανοσοτροποποιητικών παραγόντων, προσκολλητινών, χηλικών μορίων και παράγοντες δέσμευσης θρεπτικών ουσιών. Ως επέκταση του φορτίου που μεταφέρουν, τα OMV έχουν συσχετιστεί με την κυτταροτοξικότητα, την εισβολή των κυττάρων-ξενιστών, τη σύντηξη μεμβράνης, την παραγωγή βιοφίλμ και την παροχή ποικίλων πολύπλοκων και απλών βιομορίων. Αυτή η ποικιλομορφία σύνθεσης και λειτουργίας υποδηλώνει ότι τα OMV και άλλα κυστίδια έχουν τη δυνατότητα να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στα μικροβιώματα στα οποία παράγονται. Τα θετικά κατά Gram και τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια διαφέρουν σημαντικά στην οργάνωση της μεμβράνης τους και των στιβάδων πεπτιδογλυκάνης. Το γεγονός αυτό συμβάλλει στην παραγωγή μεμβρανικών κυστιδίων. Στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια, τα OMV σχηματίζονται στην εξωτερική μεμβράνη, τραβώντας συστατικά του περιπλάσματος είτε παθητικά είτε μέσω κάποιου μηχανισμού που δεν έχει ακόμη εξηγηθεί πριν απελευθερωθούν στο περιβάλλον. Πολλοί επιστήμονες θεωρούν ότι τα θετικά κατά Gram βακτήρια δεν παράγουν κυστίδια μεμβράνης λόγω του παχύ κυτταρικού τους τοιχώματος, το

οποίο θεωρείται δυνητικά ανυπέρβλητο εμπόδιο για την απελευθέρωση των κυστιδίων. Ωστόσο, αυτό καταρρίφθηκε όταν μερικοί επιστήμονες απομονώθηκαν και χαρακτηρίστηκαν MVs από το βακτήριο *Staphylococcus aureus*. Παρόμοια με τα OMV των Gram-αρνητικών βακτηρίων, τα MVs του *S. aureus* κυμαίνονταν σε μέγεθος από 20.0-100.0 nm και αποδείχθηκε ότι περιέχουν πολλές πρωτεΐνες κρίσιμες για την επιβίωση και την παθογένεση του βακτηρίου. Μετά από αυτές τις μελέτες, τα MVs έχουν απομονωθεί από πολλά άλλα θετικά κατά Gram βακτήρια, συμπεριλαμβανομένων των *Streptomyces lividans*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus plantarum* και *Lactobacillus reuteri*. Πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει ότι τόσο το *L. plantarum* WCFS116 όσο και το *L. reuteri* DSM 1793817 παράγουν κυστιδία μεμβράνης, αλλά είναι επί του παρόντος άγνωστο εάν αυτό είναι ένα ευρέως διατηρημένο φαινόμενο εντός του γένους. Στην επιστημονική μελέτη των Scott N. Dean, Dagmar H. Leary, Claretta J. Sullivan, Eunkeu Oh και Scott A. Walper, εξετάστηκαν τα τρία είδη *Lactobacillus spp*, *L. acidophilus* ATCC 53544, *L. casei* ATCC 393, και *L. reuteri* ATCC 23272, σε ένα όψιμο λογαριθμικό στάδιο ανάπτυξης για 60 ώρες όπως προσδιορίζεται από την καμπύλη ανάπτυξης για κάθε δείγμα. Ενώ εξετάστηκαν επίσης προηγούμενα χρονικά σημεία που αντιστοιχούσαν σε πρώιμο και μέσο log (20 και 40 ώρες, αντίστοιχα), αυτά τα δείγματα δεν απέδωσαν επαρκή MV για συνεπή πρωτεομική ανάλυση. Επομένως, αποτελέσματα πάρθηκαν μόνο από την ανάλυση με το χρονικό διάστημα των 60 ωρών. (Scott N. Dean, 2019) Οι εικόνες των γονικών βακτηρίων και τόσο του εκκολαπτόμενου όσο και του απελευθερωμένου MV καταγράφηκαν χρησιμοποιώντας μικροσκοπία ατομικής δύναμης (AFM) οι οποίες παρουσιάζονται στην *Εικόνα 22*. Αυτή η μέθοδος απεικόνισης επιλέχθηκε για να ελαχιστοποιήσει τις αλλαγές στις κυτταρικές δομές και στα ίδια τα κυστιδία. Η εύκολη προετοιμασία του δείγματος για AFM, η οποία δεν απαιτεί συνθήκες κενού ή επίστρωση χρυσού όπως απαιτείται για την ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM), προσδιορίστηκε ως η καλύτερη μέθοδος απεικόνισης, καθώς τα MV δεν θα είχαν το στρώμα πεπτιδογλυκάνης που προσδίδει ακαμψία στα γονικά κύτταρα. Σε όλες τις περιπτώσεις, παρατηρήθηκαν σφαιρικά σωματίδια κοντά στα βακτήρια όπως μπορεί να διαπιστώσει κάποιος στην *Εικόνα 22*. Τα κυστιδία που παράγονται φαίνεται να είναι δομές κλειστής μεμβράνης, που κυμαίνονται σε μέγεθος από 10-300 nm. Αυτές οι μετρήσεις ήταν συνεπείς για καθένα από τα τρία είδη και συγκρίσιμες με τα MV/OMV από άλλα χαρακτηρισμένα Gram-αρνητικά και Gram-θετικά βακτήρια. Ειδικότερα, με βάση την *Εικόνα 22*, στην οποία παρουσιάζονται εικόνες πλάτους αντιπροσωπευτικής μικροσκοπίας ατομικής δύναμης (AFM) των βακίλλων και των σχετικών μεμβρανικών κυστιδίων τους. Από τις εικόνες A έως C, παρατηρείται ότι εκτός από το ότι έχει λιγότερες συσχετίσεις από

κύτταρο σε κύτταρο, η μορφολογία του *L. acidophilus* ποικίλλει σημαντικά σε σχέση με το μήκος του κυττάρου και την τραχύτητα της επιφάνειας σε σύγκριση με το *L. casei* και το *L. reuteri*. Ενώ στις εικόνες D έως F, οι οποίες αντιστοιχούν σε έξι μικρότερες σαρώσεις των αντιστοιχών ένθετων στο A έως C, δείχνουν ότι τα κυστίδια είτε συνδέονται είτε βρίσκονται κοντά στα κύτταρα, σήμανση με μαύρα βέλη. Δεδομένου ότι η πεπτιδογλυκάνη είναι κυλινδρική και το άκαμπτο τμήμα του κυττάρου, συμβάλλει στο ύψος των κυττάρων στις εικόνες AFM. Αυτά τα είδη *Lactobacillus* έχουν συνήθως ένα πρόσθετο υλικό που τα περιβάλλει, σήμανση με μπλε βέλη. Αν και πιθανότατα κρύβεται από γειτονικά κύτταρα, το υλικό είναι καθαρά ορατό σε απομονωμένα ή περιμετρικά κελιά. (Scott N. Dean, 2019)



Εικόνα 22 : Απεικόνιση τριών στελεχών λακτοβάκιλλων (Scott N. Dean, 2019)



Εικόνα 23 : Πρωτεϊνική σύνθεση *Lactobacillus* MVs (Scott N. Dean, 2019)

Επίσης, αρκετά σημαντικός είναι ο έλεγχος των προβιοτικών δραστηριοτήτων 47 στελεχών *Lactobacillus spp.* με τεχνικές *in vitro*, καθώς και η αξιολόγηση της ικανότητας του αποικισμού πέντε επιλεγμένων στελεχών σε ανθρώπινους οργανισμούς. Ειδικότερα, ερευνήθηκε το προβιοτικό δυναμικό 47 επιλεγμένων στελεχών *Lactobacillus spp.* Τα στελέχη εξετάστηκαν για αντοχή σε pH 2.5 και 0.3 % oxgall, η προσκόλλησή τους σε κύτταρα CaCO₂ και αντιμικροβιακές δραστηριότητες έναντι εντερικών παθογόνων βακτηρίων σε συστήματα μοντέλων. Από τα αποτελέσματα που ελήφθησαν σε *in vitro* μελέτη, επιλέχθηκαν πέντε στελέχη, τα οποία είναι το *Lactobacillus rhamnosus* 19070-2, το *L. reuteri* DSM 12246, το *L. rhamnosus* LGG, το *L. delbrueckii* subsp.lactis CHCC 2329 και το *L. casei* subsp.alactus CHCC 31 *in vivo* μελέτες. Η ημερήσια κατανάλωση από 12 υγιείς εθελοντές ανθρώπους, δύο δόσεων 10¹⁰ λυοφιλοποιημένων βακτηρίων των επιλεγμένων στελεχών για 18 ημέρες ακολουθήθηκε από περίοδο έκπλυσης 17 ημερών. Δείγματα κοπράνων λήφθηκαν τις ημέρες 0 και 18 και κατά τη διάρκεια της περιόδου έκπλυσης στις ημέρες 5 και 11. Τα απομονωμένα στελέχη γαλακτοβάκιλλων αναγνωρίστηκαν αρχικά με API 50CHL και εσωτερικά μεταγραφέντα spacer PCR και οι ταυτότητές τους επιβεβαιώθηκαν με ανάλυση ενζύμου περιορισμού σε συνδυασμό με γέλη παλμικού πεδίου ηλεκτροφόρηση. Μεταξύ των ελεγμένων στελεχών, τα *L. rhamnosus* 19070-2, *L. reuteri* DSM 12246 και *L. rhamnosus* LGG εντοπίστηκαν συχνότερα σε δείγματα κοπράνων και βρέθηκαν σε 10, 8 και 7 από τα 12 δείγματα που δοκιμάστηκαν κατά την περίοδο παρέμβασης, αντίστοιχα, ενώ οι επανααπομονώσεις ήταν λιγότερο συχνές στην περίοδο έκπλυσης. Τα βακτήρια απομονώθηκαν εκ νέου σε συγκεντρώσεις από 105 έως 108 κύτταρα / g περιττωμάτων. Η επιβίωση και η εκ νέου απομόνωση των βακτηρίων *in vivo* φάνηκε να συνδέεται με την

ανοχή στο pH, την πρόσφυση και τις αντιμικροβιακές ιδιότητες in vitro. (C. N. Jacobsen, 2020)

Αξίζει να σημειωθεί η σημαντική επίδραση των πολυφαινολών σε μικροοργανισμούς που κατοικούν στον ανθρώπινο γαστρεντερικό σωλήνα. Αυτά είναι κυρίως βακτήρια που ανήκουν στο γένος *Lactobacillus* και σε παθογόνους μικροοργανισμούς που ταξινομούνται ως οι πιο συνηθισμένες πηγές μόλυνσης των τροφίμων. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών έχουν την ικανότητα να ρυθμίζουν την ανάπτυξη πολλών μικροοργανισμών. Λόγω των μεταβολικών αλλαγών που προκαλούνται από την παρουσία τους στο περιβάλλον, πολλοί παθογόνοι μικροοργανισμοί δεν μπορούν να αναπτυχθούν, γεγονός που με τη σειρά του προκαλεί σημαντική μείωση του παθογόνου δυναμικού τους. Αυτές οι διαδικασίες περιλαμβάνουν κυρίως την πρόκληση ρήξεων στην κυτταρική μεμβράνη και τη διαταραχή της κυτταρικής αναπνοής. Συχνά, η έλλειψη ακεραιότητας των κυτταρικών μεμβρανών οδηγεί επίσης σε διαταραχή της ενδοκυτταρικής ομοιόστασης και διαρροή κυτταρικών συστατικών, όπως πρωτεΐνες, μόρια ATP ή ενδοκυτταρικά ιόντα. Οι αυτοοξειδωτικές πολυφαινόλες δρουν επίσης ως προοξειδωτικές ουσίες. Το υπεροξειδίο του υδρογόνου που σχηματίζεται κατά τη διαδικασία οξείδωσης πολυφαινολικών ενώσεων δρα ως βακτηριοκτόνος ουσία και αυτό συμβαίνει με την επαγωγή θραύσεων του DNA. Όσον αφορά τη μικροχλωρίδα του εντέρου, οι πολυφαινόλες θεωρούνται πρεβιοτικές ουσίες που αυξάνουν τον αριθμό των συμπαθητικών βακτηρίων. Μπορούν να επηρεάσουν θετικά την ανάπτυξη των βακτηρίων *Lactobacillus*, τα οποία έχουν την ικανότητα να μεταβολίζουν άπεπτα αντιοξειδωτικά στην πεπτική οδό των ανθρώπων και των ζώων. Ανάλογα με το pH του παρόντος περιβάλλοντος και την παρουσία ιόντων, οι φυτικές πολυφαινόλες στον ανθρώπινο πεπτικό σωλήνα μπορούν να δράσουν ως ουσίες με αντιοξειδωτικό δυναμικό ή να γίνουν προοξειδωτικές. Έτσι, ο συνδυασμός λειτουργικών τροφίμων με πολυφαινόλες και βακτήρια *Lactobacillus* όχι μόνο προστατεύει τα τρόφιμα από την ανάπτυξη ανεπιθύμητων και παθογόνων μικροβίων, αλλά έχει επίσης θετική επίδραση στην ανθρώπινη υγεία. Επιπλέον, σε πολλές επιστημονικές μελέτες έχει βρεθεί ότι υπάρχει πιθανότητα αλλαγών στο γονιδίωμα των βακτηρίων *Lactobacillus* όταν επιδράσουν πολυφαινόλες. Επιπροσθέτως, βασική είναι και η επίδραση του *Lactobacillus spp* στις αντιμικροβιακές ιδιότητες των πολυφαινολών. Τέλος, τα βακτήρια του γένους *Lactobacillus spp* μέσω των ενζυμικών ικανοτήτων τους μπορούν να επηρεάσουν τον μετασχηματισμό πολυφαινολικών ενώσεων. Συνεπώς, λόγω της ιδιαιτερότητας του μεταβολισμού των φυτικών ενώσεων που περιέχονται στα τρόφιμα, τα βακτήρια γαλακτικού οξέος μπορούν να βοηθήσουν τον οργανισμό ξενιστή να αφομοιώσει ενώσεις που επιδεικνύουν αντιοξειδωτική δράση, αποκτώντας συχνά

πρόσβαση σε ουσίες που επιδεικνύουν προβιοτικό δυναμικό. Επιπλέον, παρουσία πολυφαινολών, τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος εξασφαλίζουν υψηλότερες συγκεντρώσεις γαλακτικού οξέος, το οποίο σταθεροποιεί ταυτόχρονα τις φυτοενώσεις. Ένας συνδυασμός σωστά επιλεγμένων πολυφαινολών και βακτηρίων *Lactobacillus spp* στη μήτρα τροφίμων καθιστά δυνατή την παραγωγή τροφής που επιδεικνύει υψηλό λειτουργικό δυναμικό. Με βάση τα παραπάνω, πολλοί επιστήμονες αλλά και η παγκόσμια βιομηχανία βρίσκονται σε κατάσταση εξέλιξης των τροφίμων που επιδεικνύει υψηλές διατροφικές δυνατότητες και διασφαλίζει μικροβιολογική ασφάλεια. (Lidia Piekarska-Radzik, 2020)

Επίσης, το πολυφωσφορικό είναι ένα πολυμερές φωσφορικών υπολειμμάτων που συντίθεται και σε ορισμένες περιπτώσεις συσσωρεύεται από μικροοργανισμούς, όπου παίζει κρίσιμους φυσιολογικούς ρόλους, όπως είναι η συμμετοχή του στην απόκριση σε διατροφικές αυστηρότητες και περιβαλλοντικές πιέσεις. Ο μεταβολισμός του πολυφωσφορικού έχει λάβει ελάχιστη προσοχή στον *Lactobacillus*, ένα γένος βακτηρίων γαλακτικού οξέος που σχετίζονται με την παραγωγή τροφίμων και την υγεία των ανθρώπων και των ζώων. Έχει βρεθεί από μεγάλο αριθμό επιστημονικών μελετών ότι μεταξύ 34 στελεχών *Lactobacillus*, 18 από αυτά συσσωρεύσαν ενδοκυτταρικούς κόκκους πολυφορφορικού, όπως αποκαλύφθηκε από ειδική χρώση και ηλεκτρονική μικροσκοπία. Η συσσώρευση πολυφοσφορικού εξαρτάται γενικά από την παρουσία αυξημένων συγκεντρώσεων φωσφορικών στο μέσο καλλιέργειας και συσχετίζεται με την παρουσία γονιδίων πολυφωσφορικής κίνησης-ppk στα γονιδιώματα. Το γονίδιο ppk από τον *Lactobacillus* εμφανίζει μια γενετική διάταξη στην οποία πλαισιώνεται από δύο γονίδια που κωδικοποιούν τις εξωπολυφωσφατάσες της οικογένειας Ppx-GppA. Η λειτουργικότητα ppk επιβεβαιώνεται από τη διακοπή της στο στέλεχος *Lactobacillus casei* BL23. Το κατασκευασμένο μετάλλαγμα ppk έχει δείξει σε πολλές μελέτες ότι υπάρχει έλλειψη ενδοκυτταρικών κόκκων πολυ-P και δραστική μείωση της σύνθεσης πολυ-P. Η αντίσταση σε διάφορες τάσεις έχει δοκιμαστεί στο στέλεχος με διαταραχή ppk, το οποίο έχει παρουσιάσει μειωμένη ανάπτυξη σε συνθήκες υψηλού αλατιού ή χαμηλού pH και αυξημένη ευαισθησία στο οξειδωτικό στρες. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η συσσώρευση πολυ-P είναι χαρακτηριστικό ορισμένων στελεχών γαλακτοβακίλλων και μπορεί επομένως να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στη φυσιολογία αυτών των μικροοργανισμών. (Cristina Alcántara, 2014)

Τέλος, η ενδογλυκανάση δρα ως βελτιωτικός παράγοντας στην ανάπτυξη ομοζυμωτικών *Lactobacillus spp* σε ενσιλάξεις. Η ενδογλυκανάση, είναι ένα σημαντικό συστατικό των κυτταρινασών, και χρησιμοποιείται ευρέως ως πρόσθετα στην ενσίρωση των κτηνοτροφικών

καλλιιεργειών. Ωστόσο, ο λεπτομερής ρόλος του είναι ασαφής στις ενσιώσεις. Στην επιστημονική μελέτη των Susu Zhang, Zhenshang Xu, Ting Wang, και Jian Kong (Susu Zhang, 2019) μελετήθηκαν δύο ενδογλυκανάσες, Cel5 και Cel9, που παράγονται από το στέλεχος *Paenibacillus panacisoli* SDMCC050309, που είχαν απομονωθεί προηγουμένως από ενσιωμένο καλαμπόκι, και στην συνέχεια αναγνωρίστηκαν στις καλλιέργειες με απορρόφηση μικροκρυσταλλικής κυτταρίνης σε συνδυασμό με ανάλυση ζυμογραφήματος. Αφού εκφράστηκαν ετερόλογα σε *Escherichia coli* DE3 και καθαρίστηκαν, αυτές οι δύο πρωτεΐνες χαρακτηρίστηκαν βιοχημικά. Το Cel5 ήταν 61 kDa και έδειξε μέγιστη δραστηριότητα σε pH ίσο με 7.0 και 45.0 ° C, ενώ η μέγιστη δραστηριότητα ήταν σε pH ίσο με 8.0 και 65.0 ° C για Cel9 με μέγεθος 97 kDa. Και οι δύο θα μπορούσαν να αποικοδομήσουν την καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη σε κυτταρολιγοςακχαρίτες, στους οποίους η κυτταροβιόζη και η κελλοτριόζη θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως υποστρώματα για την ανάπτυξη ομοζυμωτικών στελεχών *Lactobacillus planarum* CGMCC6888 και *L. farciminis* CCTCC AB2016237, αλλά όχι για το DMCC500C50C50C, αλλά όχι για το κυτταρικό γονίδιο 5000C. Επομένως, το εξαγόμενο συμπέρασμα είναι ότι η προστιθέμενη ενδογλυκανάση συμβάλλει στην ενίσχυση της ανάπτυξης ομοζυμωτικών βακτηρίων γαλακτικού οξέος για υψηλό επίπεδο παραγωγής γαλακτικού οξέος στα ενσιώματα.

4 Κεφάλαιο: Αντιμικροβιακές Ιδιότητες και Ανθεκτικότητα στα Αντιβιοτικά

Όπως έχει ήδη αναφερθεί στις προηγούμενες ενότητες, ο μικροοργανισμός *Lactobacillus spp*, ο οποίος ανήκει στην κατηγορία των γαλακτικών βακτηρίων, έχει πολλές και διαφορετικές ιδιότητες. Ένας από τους λόγους που συμβαίνει αυτό είναι γιατί ο μικροοργανισμός αυτός παράγει μεγάλο αριθμό βακτηριοσίνων όπως αυτό αναφέρθηκε και αναλύθηκε στην Υποενότητα 3.2. Οι βακτηριοσίνες είναι μικρά, ριβοσωματικά συντιθέμενα πεπτίδια με αντιμικροβιακές ιδιότητες, οι οποίες έχουν μελετηθεί από μεγάλο αριθμό επιστημόνων. Δεδομένων των αντιμικροβιακών τους ιδιοτήτων, ορισμένες βακτηριοσίνες όπως η νισίνη και η πεδιοκίνη χρησιμοποιούνται και ως συντηρητικά σε προϊόντα διατροφής για την αναστολή της ανάπτυξης αλλοιώσεων και παθογόνων μικροοργανισμών. Επιπλέον, οι βακτηριοσίνες πιστεύεται ότι συμβάλλουν στην ανταγωνιστικότητα του κύτταρα παραγωγής. Ο γενικός αντιμικροβιακός μηχανισμός των βακτηριοσινών βασίζεται στη διάσπαση του κυττάρου μεμβράνης είτε μέσω σχηματισμού πόρων είτε μέσω «απορρυπαντικού αποτελέσματος», όπως στην περίπτωση της νισίνης. Τα μόρια των βακτηριοσινών εμφανίζουν μεγάλη σταθερότητα στη θερμότητα, σε χαμηλό pH, σε ασθενή οργανικά οξέα, σε συνθήκες ψύξης και κατάψυξης, σε άλατα και ένζυμα και ως εκ τούτου είναι πιθανοί παράγοντες για εφαρμογή στα συστήματα συντήρησης τροφίμων. Η ειδοποιός διαφορά των βακτηριοσινών σε σχέση με τα αντιβιοτικά, τα οποία αποτελούν δευτερογενείς μεταβολίτες, είναι ότι συντίθενται στο ριβόσωμα. Επίσης, παρουσιάζουν περιορισμένο φάσμα δράσης, ενώ τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή τους και το σύστημα ανοσίας συνήθως οργανώνονται σε οπερόνια. Οι περισσότερες βακτηριοσίνες εμφανίζουν αντιμικροβιακή δράση έναντι συγγενών ειδών βακτηρίων ως προς το παραγωγό στέλεχος και αυτός είναι ο λόγος που εικάζεται πως αυτά τα πεπτίδια βοηθούν τα στελέχη που τα παράγουν στον συναγωνισμό για την επιβίωση τους μέσα στην οικολογική τους θέση. Παρόλα αυτά υπάρχουν και βακτηριοσίνες με ευρύτερο φάσμα δράσης, όπως η νισίνη που παράγεται από το *Lactococcus lactis*, η οποία είναι δραστική έναντι πολυάριθμων Gram+ μικροοργανισμών δεικτών. (Lucy H. Deegan, 2006) (Chi-Chung Chen, 2019)

Ο αυξανόμενος παγκόσμιος πληθυσμός οδηγεί σε αυξημένη ζήτηση για τρόφιμα, όπου αντιμικροβιακά, όπως αντιβιοτικά και μυκητοκτόνα, τα οποία χρησιμοποιούνται συχνά για τη θεραπεία λοιμώξεων εκτός από τους ανθρώπους αλλά και σε ζώα παραγωγής τροφίμων, καθώς και στις αντίστοιχες καλλιέργειες τους, για την πρόληψη ασθενειών. Όμως, η

ενεργητική αντίσταση στα αντιβιοτικά είναι μια αναδυόμενη παγκόσμια ανησυχία που μπορεί να θέσει σε κίνδυνο την αποτελεσματικότητα των παραγόντων που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία μολυσματικών ασθενειών. Σχετικά με τα γαλακτικά βακτήρια που απασχολούν την συγκεκριμένη εργασία και πιο συγκεκριμένα τον *Lactobacillus spp*, αυτά είναι ικανά να αναστέλλουν την ανάπτυξη αλλοιώσεων και παθογόνων βακτηρίων με βάση τον γύρω ανταγωνισμό για θρεπτικά συστατικά και κόγχες πρόσφυσης λόγω της μεγάλης ανοχής τους σε οξύ και της ικανότητάς τους να προσαρμόζονται στις αλλαγές οξειδοαναγωγής στο περιβάλλον. Επίσης, όπως έχει ήδη αναφερθεί σε προηγούμενες ενότητες, τα παραπάνω βακτήρια είναι ικανά να παράγουν αντιμικροβιακούς μεταβολίτες όπως είναι το γαλακτικό και το οξικό οξύ, η αιθανόλη, το υπεροξειδίο του υδρογόνου, το διακετύλιο, τα αντιμυκητιακά, τα αντιμικροβιακά πεπτίδια, τα οποία είναι γνωστά ως βακτηριοσίνες που αναλύθηκαν στην προηγούμενη παράγραφο και άλλες αντιβακτηριακές πρωτεΐνες όπως υδρογλυκανικές πρωτεΐνες, η οποία είναι ικανή να διασπάσει το κυτταρικό τοίχωμα της πεπτιδογλυκάνης των Gram-θετικών αλλά και Gram-αρνητικών βακτηρίων. Επίσης, τα βακτήρια αυτά θεωρούνται φυσικά ανθεκτικά σε πολλά αντιβιοτικά και μπορεί να έχουν τη δυνατότητα να αποκτήσουν αντοχή και σε άλλα αντιμικροβιακά ή να διαδώσουν την αντοχή σε παθογόνα που υπάρχουν στο γαστρεντερικό σωλήνα των ζώων και των ανθρώπων. Για παράδειγμα, έρευνες έχουν δείξει ότι ο απομονώσεις του *Lactobacillus plantarum* διαθέτει τα γονίδια *aaadA* και *ant(6)* που σχετίζονται με την αντίσταση στη στρεπτομυκίνη και η υπερβολική έκθεση σε αυτό το αντιβιοτικό αύξησε δραματικά την ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) και αύξησε μια διασταυρούμενη αντοχή σε άλλα αντιβιοτικά της ίδιας κατηγορίας. Επιπλέον, αντίστοιχη σε αντίστοιχη μελέτη έχει αναφερθεί υψηλή συχνότητα εμφάνισης γαλακτοβάκιλλων ανθεκτικών στη βανκομυκίνη κατά 58 %, 10.8 % στην ερυθρομυκίνη, 4.3 % στην τετρακυκλίνη, 48 % στη γενταμυκίνη και 26 % στη σιπροφλοξασίνη. Τα παραπάνω πειράματα έγιναν πάνω γαλακτοκομικά προϊόντα τα οποία έχουν υποστεί πρώτα ζύμωση. (By Yenizey M. Álvarez-Cisneros, 2018)

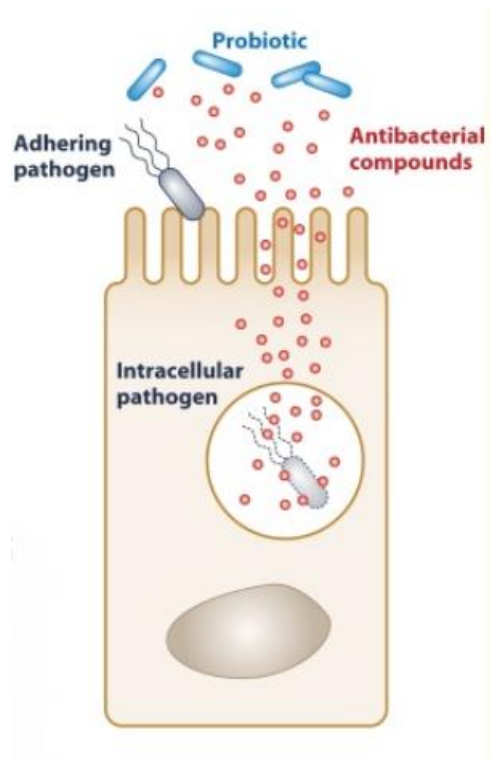
Σύμφωνα με τα παραπάνω και πάντα με γνώμονα και οδηγό τις επιστημονικές μελέτες και έρευνες, καλό είναι να αναφερθούν και να παρουσιαστούν ορισμένα παραδείγματα, ή πιο ορθά ορισμένες εφαρμογές και πιο χειροπιαστά παραδείγματα των όσων αναλύθηκαν.

Αρχικά, το πιο διαδομένο και γνωστό σημείο που έχουν αποικίσει πληθώρα βακτηρίων και μικροβιακά είδη είναι η γαστρεντερική οδός. Τα μόνιμα μικρόβια που ζουν και υπάρχουν εκεί, παίζουν ευεργετικό ρόλο ρυθμίζοντας το εντερικό ανοσοποιητικό σύστημα, διεγείροντας την ωρίμανση των ιστών του ξενιστή και παίζουν διάφορους ρόλους στη

διατροφή και στην αντίσταση του ξενιστή σε γαστρικά και εντερικά βακτηριακά παθογόνα. Οι μηχανισμοί με τους οποίους τα μόνιμα μικροβιακά είδη καταπολεμούν τα γαστρεντερικά παθογόνα είναι πολύπλοκοι και περιλαμβάνουν ανταγωνιστικές μεταβολικές αλληλεπιδράσεις και την παραγωγή αντιμικροβιακών μορίων. Η ανθρώπινη εντερική μικροχλωρίδα είναι μια πηγή από την οποία έχουν συχνά απομονωθεί μεγάλος αριθμός προβιοτικών στελεχών *Lactobacillus spp.* Έξι στελέχη προβιοτικών *Lactobacillus spp.*, τα οποία έχουν απομονωθεί από την ανθρώπινη εντερική μικροχλωρίδα, έχουν χαρακτηριστεί ως καλά. Με τον όρο καλά, εννοείται σχετικά με τις πιθανές αντιμικροβιακές τους επιδράσεις έναντι των κύριων γαστρικών και εντερικών βακτηριακών παθογόνων και του ροταϊού. Οπότε είναι βασικό να είναι γνωστές οι αντιβακτηριακές δραστηριότητες, συμπεριλαμβανομένων των δραστηριοτήτων που μοιάζουν με αντιβιοτικά και ρυθμίζουν τα κύτταρα, και τα θεραπευτικά αποτελέσματα που έχουν αποδειχθεί σε καλά διεξαχθείσες, ελεγχόμενες με εικονικό φάρμακο, τυχαιοποιημένες κλινικές δοκιμές αυτών των προβιοτικών στελεχών *Lactobacillus spp.* Αξίζει να σημειωθεί ότι, σύμφωνα με τα δεδομένα του σήμερα, πολλοί επιστήμονες έχουν αναφέρει και υποστηρίζουν ότι για τις αντιμικροβιακές δραστηριότητες που υποστηρίζονται από τα μόρια που εκκρίνονται από τέτοια προβιοτικά στελέχη *Lactobacillus spp.*, υποδηλώνουν ότι αποτελούν μια πολλά υποσχόμενη νέα πηγή για την ανάπτυξη καινοτόμων αντι-μολυσματικών παραγόντων που δρουν αυλικά και ενδοκυτταρικά στη γαστρεντερική οδό. Πιο συγκεκριμένα, η σύνθεση της μικροχλωρίδας του ανθρώπινου στομάχου έχει ένα χαμηλό επίπεδο μόνιμων βακτηρίων. Οι πέντε κύριες φυλές που έχουν εντοπιστεί έπαιτε από επιστημονικές μελέτες είναι οι *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria* και *Bacteroidetes*. Τα κυρίαρχα γένη στα *Firmicutes* είναι οι *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Veillonella*, *Staphylococcus* και *Bacillus*. Τα είδη γαλακτοβάκιλλων που έχουν εντοπιστεί στη γαστρική μικροχλωρίδα είναι τα *L. antri*, *L. gastricus*, *L. kalixensis*, *L. reuteri*, *L. ultunensis*, *L. plantarum*, *L. salivarius*, *L. fermentum* και *L. gasseri*. Το έντερο ενός ενήλικα ανθρώπου, έχει υπολογιστεί ότι περιέχει τρισεκατομμύρια μικρόβια, συμπεριλαμβανομένων εκατοντάδων ειδών και χιλιάδων υποειδών, τα οποία εμφανίζουν διαφορές που σχετίζονται με την ηλικία και τη γεωγραφία και κατανέμονται ως συνάρτηση της εντερικής θέσης. Έχουν μια κυρίως συμβιωτική σχέση με τον ξενιστή τους. Τα στελέχη του *Lactobacillus spp.* που έχουν απομονωθεί από την ανθρώπινη εντερική μικροχλωρίδα, εμφανίζουν αντιβακτηριδιακές δραστηριότητες ως αποτέλεσμα της παραγωγής μεταβολιτών όπως γαλακτικό οξύ, βακτηριοσίνες, ενώσεις μη βακτηριοκίνης, τα οποία ορίζονται ως ευαίσθητα σε πρωτεολυτικά ένζυμα αλλά δεν μπορούν να κατακρημνιστούν με 80% κορεσμένο μη θειικό μοριακό αμμώνιο και θειικό άλας του

προκαλούμενου αμμωνίου. Επίσης, ασκούν άμεση βακτηριοκτόνο δράση και μειώνουν την έκφραση των παραγόντων λοιμογόνου δράσης των εντεροιογενών παθογόνων, ρυθμίζουν τις επιβλαβείς επιδράσεις αυτών των παραγόντων στη δομή, τον μηχανισμό και τη λειτουργία των εντερικών κυττάρων του ξενιστή. Επιπλέον, ουσίες που παράγονται από προβιοτικά στελέχη *Lactobacillus*, συμπεριλαμβανομένων των συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος και των εκκρινόμενων μορίων, έχουν αναφερθεί ότι εμφανίζουν ανοσοτροποποιητικές δραστηριότητες, κυρίως σε *in vitro* πειράματα. Μεγάλος αριθμός μελετών δείχνουν τις ανοσοτροποποιητικές επιδράσεις των προβιοτικών βασίζονται κυρίως σε μοντέλα *in vitro* κυτταροκαλλιέργειας. Πρόσφατα έχουν αναφερθεί θετικά αποτελέσματα σε μοντέλα *in vivo*, αλλά επί του παρόντος δεν υπάρχει πειστική κλινική απόδειξη ανοσοδιεγερτικής δράσης που προκαλείται από προβιοτικά σε ανθρώπους. Ένας μεγάλος αριθμός στελεχών *Lactobacillus* έχει απομονωθεί από εντερική μικροχλωρίδα ανθρώπου και ζώων και οι ιδιότητες αυτών των στελεχών, συμπεριλαμβανομένης της προσκόλλησής τους σε καλλιεργημένα επιθηλιακά κύτταρα ή βλέννα, και οι ανασταλτικές τους δραστηριότητες, έχουν αναφερθεί κυρίως από *in vitro* πειράματα. Μόνο έξι στελέχη *Lactobacillus* που απομονώθηκαν από την ανθρώπινη εντερική μικροχλωρίδα έχει αποδειχθεί σαφώς ότι έχουν προβιοτικές αντιμικροβιακές και αντιροταϊκές ιδιότητες σε ένα ολοκληρωμένο σύνολο πειραμάτων *in vitro* και *in vivo* και τυχαιοποιημένων ελεγχόμενων δοκιμών. Αυτά τα προβιοτικά στελέχη είναι ο *L. rhamnosus* στέλεχος GG (ATCC 53103), ο *L. casei* στέλεχος Shirota YIT9029, ο *L. acidophilus* στέλεχος LB, ο *L. johnsonii* NCC 533 (CNCM I-1225), ο *L. casei* DN -114 001 (CNCM I-1518) και ο *L. reuteri* DSM 17938. Πιο ειδικά, ο *L. acidophilus* στέλεχος LB αναγνωρίστηκε ιστορικά με βάση τις βιοχημικές και μεταβολικές δραστηριότητές του, αλλά η μετέπειτα μοριακή έρευνα επαναταξινόμησε την ταυτότητα αυτού του στελέχους ως συμβιωτική καλλιέργεια του *L. fermentum* και του *L. delbrueckii*. Άλλα προβιοτικά στελέχη *Lactobacillus* έχουν απομονωθεί από την ανθρώπινη εντερική μικροχλωρίδα. Σε αυτά περιλαμβάνεται το στέλεχος *L. acidophilus* NCFM, ο *L. plantarum* 299v (DSM 6595) και ο *L. fermentum* ME-3 (DSM 14241). Αξίζει να σημειωθεί ότι αυτά τα προβιοτικά στελέχη έχουν δοκιμαστεί πειραματικά μόνο *in vitro* έναντι γαστρεντερικών παθογόνων και σε μοντέλα λοιμώξεων ζώων ή έχουν δοκιμαστεί πειραματικά για άλλες προβιοτικές επιδράσεις. Σημειώθηκε ότι δεν έχουν υπάρξει για αυτά τα στελέχη σε καταστάσεις ανθρώπινης μόλυνσης, αλλά αρκετά από αυτά τα στελέχη έχουν δοκιμαστεί θεραπευτικά σε ανθρώπους για άλλες προβιοτικές επιδράσεις. Επιπλέον, σημειώθηκε ότι τα προβιοτικά *L. rhamnosus* R0011 (CNCM I-1720) και *L. helveticus* R0052 (CNCM I-1722) στελέχη που απομονώθηκαν από καλλιέργειες γάλακτος έχει αποδειχθεί ότι παρουσιάζουν τόσο πειραματικά όσο και κλινικά αντι-μολυσματικά

αποτελέσματα. Ένα πρόβλημα στην εντερική αντιβιοτική θεραπεία είναι η αναποτελεσματικότητα των αντιβιοτικών ενάντια στα εντεροδιηθητικά βακτηριακά παθογόνα που έχουν ήδη εισέλθει στα εντερικά κύτταρα του ξενιστή και έχουν εγκατασταθεί στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου και στα ενδοκυτταρικά κενοτόπια. Κατά συνέπεια, η παρατήρηση ότι μια ένωση που εκκρίνεται από τον *L. acidophilus* LB ήταν ικανή να σκοτώσει το *S. Typhimurium* που κατοικεί στα ενδοκυτταρικά κενοτόπια που βρίσκονται εντός των κυττάρων που μοιάζουν με εντεροκύτταρα. Στην *Εικόνα 24*, παρουσιάζεται σχηματικά το πώς τα προβιοτικά απελευθερώνουν τα αντιμικροβιακά συστατικά όπως είναι βακτηριοσίνες και με αυτόν τον τρόπο εμποδίζουν τα παθογόνα βακτήρια ή μύκητες να απορροφηθούν από άλλα κύτταρα του οργανισμού. Παρόλα αυτά, υπάρχει μέλλον και αρκετά έντονο επιστημονικό ενδιαφέρον για την πλήρης κατανόηση της δράσης των βακτηρίων όπως είναι ο *Lactobacillus spp* στην ανθρώπινη εντερική μικροχλωρίδα και πιο ειδικά τα προβιοτικά στους γαστρεντερικούς αντι-μολυσματικούς βιοθεραπευτικούς παράγοντες. (Vanessa Liévin-Le Moala, 2014)

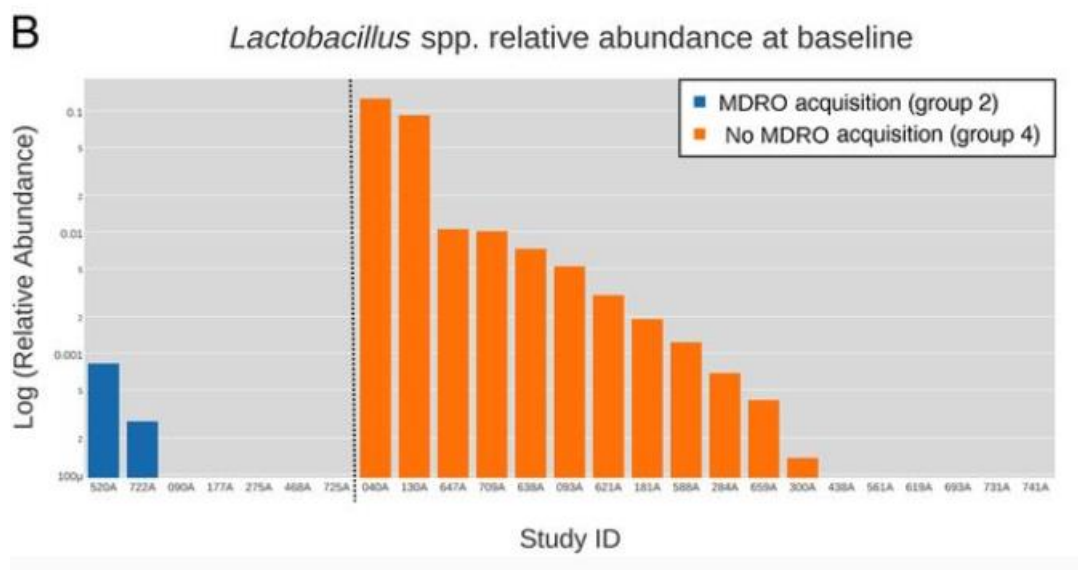


Εικόνα 24 : Δράση αντιβιοτικών Lactobacillus spp (Vanessa Liévin-Le Moala, 2014)

Ένα γεγονός που αξίζει να αναφερθεί είναι η εμφάνιση και η διάδοση των πολυανθεκτικών οργανισμών, γνωστά και ως MDROs, τα οποία αποτελούν μία ευρέως αναγνωρισμένη παγκόσμια απειλή για την υγεία όλων των έμβιων οργανισμών. Σε σύγκριση με τις λοιμώξεις που προκαλούνται από ευαίσθητα στα αντιμικροβιακά βακτήρια, αυτές που προκαλούνται από MDRO συνδέονται με 2 έως 5 φορές υψηλότερα ποσοστά θνησιμότητας και συμβάλλουν σε σημαντική οικονομική επιβάρυνση της δημόσιας και ιδιωτικής υγείας. Παρά τη συνεχιζόμενη εφαρμογή των στρατηγικών ελέγχου των λοιμώξεων, τα ποσοστά των MDROs συνεχίζουν να αυξάνονται, υποδεικνύοντας με τον τρόπο αυτό ότι χρειάζονται νέες προσεγγίσεις για τον περιορισμό της απόκτησης και της διάδοσης τους. Πιο συγκεκριμένα, το ανθρώπινο μικροβίωμα παίζει σημαντικό ρόλο στην προστασία του ξενιστή από τον αποικισμό με εξωγενή παθογόνα βακτήρια. Αυτή η αντίσταση στον αποικισμό διαταράσσεται από την έκθεση σε αντιμικροβιακά, έναν κύριο παράγοντα κινδύνου για την απόκτηση των MDRO. Οι πρόοδοι στις τεχνολογίες αλληλούχισης και στα βιοπληροφορικά εργαλεία επέτρεψαν λεπτομερείς αναλύσεις του μικροβιώματος και άρχισαν να αποκαλύπτουν τη συμβολή συγκεκριμένων μικροβιακών πληθυσμών στην απόκτηση παθογόνων όπως το *Clostridium difficile* και οι ανθεκτικοί στη βανκομυκίνη εντερόκοκκοι. Η επανεισαγωγή συγκεκριμένων μικροβιακών πληθυσμών έχει επίσης συσχετιστεί με την προστασία από τον αποικισμό με παθογόνα βακτήρια. Η κατανόηση των ειδικών χαρακτηριστικών της μικροβιακής κοινότητας που μπορεί να προδιαθέτουν ή ακόμα και να αποτρέψουν την απόκτηση MDRO μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη νέων στρατηγικών ελέγχου μεγάλου αριθμού λοιμώξεων. Σύμφωνα με την επιστημονική μελέτη των Rafael Araos, Albert K. Tai, Graham M. Snyder, Martin J. Blaser, και Erika M. C. D'Agata (Rafael Araos, 2016) , διεξήχθη το εξής πείραμα. Ασθενείς εισήχθησαν σε 5 γενικούς ιατροχειρουργικούς ορόφους σε ένα κέντρο τριτοβάθμιας φροντίδας, ταξινομήθηκαν σύμφωνα με την ενδονοσοκομειακή αντιμικροβιακή έκθεση και την κατάσταση αποικισμού MDRO. Εντός 48 ωρών από την εισαγωγή στο νοσοκομείο και κατά την έξοδο, ελήφθησαν δείγματα ορθικού επιχρίσματος και συγκρίθηκαν με δείγματα από μια εξωτερική ομάδα ελέγχου υγιών ατόμων από την κοινότητα. Έπειτα, εξήχθη DNA από δείγματα, πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση επόμενης γενιάς και αξιολογήθηκαν η δομή της μικροβιακής κοινότητας και τα ταξινομικά χαρακτηριστικά, συγκρίνοντας αυτούς που απέκτησαν MDRO και αυτούς που δεν είχαν, και τους εξωτερικούς ελέγχους. Ειδικότερα, τα άτομα ταξινομήθηκαν σε 4 ομάδες, σύμφωνα με την ενδονοσοκομειακή αντιμικροβιακή έκθεση και την κατάσταση MDRO. Η ομάδα 1 περιελάμβανε ασθενείς που δεν εκτέθηκαν σε αντιμικροβιακά κατά τη διάρκεια της νοσηλείας τους και δεν αποικίστηκαν με MDROs είτε κατά την έναρξη είτε στην

παρακολούθηση. Ομάδα 2, ασθενείς που εκτέθηκαν σε αντιμικροβιακά στους οποίους το MDRO ανακτήθηκε κατά την παρακολούθηση αλλά όχι κατά την έναρξη. Ομάδα 3, ασθενείς που εκτέθηκαν σε αντιμικροβιακά που αποικίστηκαν με MDRO στην έναρξη, ανεξάρτητα από την κατάσταση αποικισμού MDRO κατά την παρακολούθηση. Και τέλος στην ομάδα 4, ασθενείς που εκτέθηκαν σε αντιμικροβιακά που δεν είχαν MDROs είτε κατά την έναρξη είτε κατά την παρακολούθηση. Για να συγκρίνουν οι επιστήμονες το μικροβίωμα των κοπράνων των υποκειμένων της μελέτης μας με αυτό των ατόμων στην κοινότητα, συμπεριλήφθηκε επίσης μια ομάδα εξωτερικού ελέγχου ανρθώπων. Αυτή η ομάδα αποτελούνταν από υγιή άτομα άνω των 50 ετών. Τα δεδομένα για αυτούς τους ασθενείς ελήφθησαν από τη βάση δεδομένων Human Microbiome Project. Οι δημοσίως διαθέσιμες αλληλουχίες περιοχής V4 του βακτηριακού 16S ριβοσωμικού γονιδίου RNA (rRNA) ελήφθησαν από τον διακομιστή MG-RAST. Τα δείγματα ελήφθησαν χρησιμοποιώντας ένα αποστειρωμένο μάκτρο με διπλή άκρη που εισήχθη 0.5-1 cm στον πρωκτό και υποβλήθηκαν σε επεξεργασία εντός 1 έως 2 ωρών μετά τη συλλογή. Η ταυτοποίηση MDRO πραγματοποιήθηκε τόσο σε δείγματα επιχρίσματος αρχικής γραμμής όσο και σε δείγματα παρακολούθησης, χρησιμοποιώντας το πρώτο άκρο του στυλεού. Το δεύτερο άκρο τοποθετήθηκε σε ένα φιαλίδιο που περιείχε 20.0 % γλυκερίνη και αποθηκεύτηκε στους -80.0 °C για το επόμενο προφίλ μικροβιακής κοινότητας των βασικών δειγμάτων επιχρίσματος. Η ταυτοποίηση των MDRO και η δοκιμή αντιμικροβιακής ευαισθησίας διεξήχθη όπως περιγράφεται αλλού, σύμφωνα με τις μεθόδους του Ινστιτούτου Κλινικών και Εργαστηριακών Προτύπων. Το DNA εξήχθη από τα βασικά δείγματα με βήματα ενζυματικής πέψης και χτυπήματος σφαιριδίων, ακολουθούμενη από τη χρήση του QIAamp Stool DNA Mini Kit, σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Μετά τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του εξαγόμενου DNA από το Nanodrop, δημιουργήθηκαν αμπλικόνια γονιδίου 16S rRNA με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, η γνωστή σε όλους PCR, με ένα σετ εκκινητών με γραμμικό κώδικα που στοχεύει στη μεταβλητή περιοχή V4. Οι αντιδράσεις PCR πραγματοποιήθηκαν 3 φορές και στη συνέχεια συγκεντρώθηκαν. Επαναλήφθηκαν αντιδράσεις που δεν απέδωσαν αμπλικόνια. Η συγκέντρωση DNA κάθε επιτυχημένης PCR προσδιορίστηκε με μια ανάλυση Quanti-iT, σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή. Στη συνέχεια, τα αμπλικόνια συγκεντρώθηκαν σε ισομοριακές συγκεντρώσεις, καθαρίστηκαν χρησιμοποιώντας σφαιρίδια Agencourt Ampure XP και αναλύθηκαν σε αλληλουχία σε έναν Illumina MiSeq Sequencer στο κέντρο πυρήνων του πανεπιστημίου Tufts, χρησιμοποιώντας ένα πρωτόκολλο ζευγοποιημένου άκρου-250-βάσης ζευγών συγχωνεύσεων, με αναγνώσεις περιγράφεται αλλού. Η ανάλυση χαρακτηριστικών που ήταν διαφορετικά άφθονα μεταξύ ασθενών που απέκτησαν MDROs

και εκείνων που δεν απέκτησαν, έδειξε ότι οι ασθενείς που παρέμειναν χωρίς αποικισμό με MDRO κατά τη διάρκεια της νοσηλείας τους είχαν στατιστικά σημαντικό και βιολογικά σταθερό **υψηλότερο** *Lactobacillus spp.* αφθονία σε σύγκριση με την ομάδα που απέκτησε MDRO. Επειδή προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η σχετική αφθονία των *Lactobacillus spp.* σε υγιή άτομα είναι 0.01 %, με 10πλάσια αύξηση εάν εκτεθούν σε αντιμικροβιακά, χρησιμοποιήθηκε σχετική αφθονία 0.1 % για να κατηγοριοποιήσουμε τους ασθενείς σε ομάδες υψηλής ή χαμηλής αφθονίας *Lactobacillus spp.* Σύμφωνα με αυτήν την ταξινόμηση, η αναλογία κινδύνου για παραμονή μη αποικισμού με MDROs μεταξύ ασθενών με υψηλή αφθονία γαλακτοβακίλλων (μεγαλύτερης του 0.1 %) ήταν 1.78 με ακρίβεια 95 % και διάστημα εμπιστοσύνης, 1.09 έως 2.91. Τα παραπάνω αποτελέσματα παρουσιάζονται και σχηματικά στο *Διάγραμμα 3*, όπου διακρίνεται εύκολα η μεγάλη διαφορά σε αφθονία του *Lactobacillus spp.*



Διάγραμμα 3 : Αφθονία Lactobacillus spp στην περίπτωση απόκτησης ή μη του μικροοργανισμού MDRO (Rafael Araos, 2016)

Ένα ακόμα βασικό στοιχείο είναι ότι οι ζύμες έχουν σημαντικό αντίκτυπο στη μόλυνση και την απώλεια των τροφίμων. Έχει εφαρμόσει πολλοί επιστημόνες/ερευνητές τα βακτήρια του γένους *Lactobacillus* ως φυσικά βιοσυντηρητικά. Ειδικότερα, αντικαντιδικά στελέχη βακτηρίων επιλέχθηκαν σε μία έρευνα μεταξύ 60 στελεχών βακτηρίων που αναπτύχθηκαν, τα οποία ήταν το καθένα με εννέα πολυόλες ή γαλακτοζυλπολυόλες. Οι πολυόλες και οι γαλακτοζυλοπολυόλες μπορούν να δράσουν ως πρεβιοτικά για τα βακτήρια του γαλακτικού

οξέος και μπορούν να ενισχύσουν σημαντικά τις αντιμυκητιακές ιδιότητες των βακτηρίων επηρεάζοντας με αυτόν τον τρόπο το μεταβολισμό τους. Οι γαλακτοζυλοπολυόλες βελτιώνουν σημαντικά την αντικαντιδική δράση των περισσότερων από τα βακτήρια που εξετάστηκαν. Με βάση τη διαλογή, επιλέχθηκαν τα πιο πολλά υποσχόμενα στελέχη βακτηρίων και οι μεταβολίτες τους, τόσο πρωτογενείς όσο και δευτερογενείς, και η ενζυματική τους δραστηριότητα χαρακτηρίστηκαν παρουσία πολυολών και γαλακτοζυλο πολυολών. Η ποιοτική και ποσοτική περιεκτικότητα των βακτηριακών μεταβολιτών εξαρτιόταν τόσο από το βακτηριακό στέλεχος όσο και από τον τύπο του μέσου καλλιέργειας. Ανιχνεύθηκε επίσης, μια μεγάλη ποικιλία αντιμυκητιασικών παραγόμενων από βακτήρια, όπως λιπαρά οξέα, υδροξυλιπαρά οξέα και άλλα πολλά όξινα προϊόντα με πιθανή ανταγωνιστική δράση όπως είναι το φαινυλλακτικό οξύ και το υδροξυφαινυλλακτικό οξύ. Τα βακτήρια παρήγαγαν υψηλή συγκέντρωση φαινυλλακτικού οξέος παρουσία γαλακτοζυλο πολυολών έως και 84.3 mg/L. Αυτό το εύρημα θα μπορούσε να υποδηλώνει ότι αυτός ο μεταβολίτης μπορεί να έχει σημαντικό αντίκτυπο στις αντιμυκητιακές ιδιότητες των γαλακτοβακίλλων κατά της ζύμης. Οι γαλακτοσουλπολυόλες επηρεάζουν τα ένζυμα που εμπλέκονται στη σύνθεση λιπαρών οξέων και υδροξυλιωμένων λιπαρών οξέων όπως την λιπάση εστεράση, την όξινη φωσφατάση και την α-γλυκοσιδάση. Ο μηχανισμός της αντιμυκητιακής δράσης των γαλακτοβακίλλων μπορεί να βασίζεται στη συνεργική δράση των πρωτογενών και δευτερογενών μεταβολιτών τους, ιδιαίτερα του φαινυλλακτικού οξέος. (Lidia Lipinska-Zubrycka, 2020)

Οι λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος, είναι οι πιο συχνές βακτηριακές λοιμώξεις που παρατηρούνται στην κοινότητα, ειδικά μεταξύ των γυναικών. Η ευρεία χρήση αντιβιοτικών οδήγησε στην παγκοσμίως αυξημένη εμφάνιση απομονώσεων ανθεκτικών μικροοργανισμών στο *E. coli*. Μια πολλά υποσχόμενη μη αντιβιοτική προσέγγιση είναι η χρήση προβιοτικών στελεχών γαλακτοβακίλλων και πιο συγκεκριμένα του *Lactobacillus spp*. Τα προϊόντα που περιέχουν *Lactobacillus spp*, μπορούν να αποτρέψουν τις υποτροπιάζουσες λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος στις γυναίκες. Σε μία επιστημονική μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά στελέχη γαλακτοβακίλλων είτε σε σκεύασμα από το στόμα είτε σε υπόθετα και έδειξαν ποικίλη αποτελεσματικότητα στην πρόληψη των υποτροπιάζοντων ουρολοιμώξεων. Χρησιμοποιώντας ένα μοντέλο τυχαίων επιδράσεων, ο ομαδοποιημένος λόγος κινδύνου τουλάχιστον ενός επαναλαμβανόμενου επεισοδίου ουρολοιμώξεως κατά τη διάρκεια ολόκληρης της διάρκειας της μελέτης ήταν 0.684 ανάλυση ανά πρωτόκολλο. Ωστόσο, οι βασικοί περιορισμοί περιλαμβάνουν τη σημαντική μεταβλητότητα μεταξύ των μελετών και την περιορισμένη διάρκεια παρακολούθησης των περισσότερων μελετών. Η υπόθεσή σχετικά

με τις χημειοπροληπτικές επιδράσεις των προβιοτικών για τις ουρολοιμώξεις είναι εύλογη και υποστηρίζεται από τα τρέχοντα δεδομένα. Ο *Lactobacillus rhamnosus* GR1 και ο *Lactobacillus reuteri* RC14 ήταν τα πιο συχνά μελετημένα στελέχη γαλακτοβακίλλων. Απαιτούνται περαιτέρω και πιο ισχυρές τυχαιοποιημένες ελεγχόμενες δοκιμές με τυποποιημένα στελέχη γαλακτοβακίλλων και σκευάσματα για την επιβεβαίωση των επιδράσεων. (Qin Xiang Ng, 2018)

Ένα τελευταίο πείραμα που αξίζει να αναφερθεί καθώς έχει ιδιαίτερη επιστημονική και ερευνητική σημασία, είναι μία έρευνα που διεξήχθη για τον χαρακτηρισμό πιθανών *Lactobacillus spp*, τα οποία να απομονώνονται από το μητρικό γάλα και τα περιττώματα των βρεφών για τη λήψη νέων και ειδικών προβιοτικών στελεχών. Σε αυτή τη μελέτη (Sadia Afrin, 2021), επτά ανερχόμενα στελέχη ταυτοποιήθηκαν ως *Lactobacillus spp*, με βάση τα μορφολογικά χαρακτηριστικά και τις βιοχημικές τους ιδιότητες. Μεταξύ αυτών, μόνο ένα αναγνωρίστηκε ως *Lactobacillus oris*. Η μελέτη διερεύνησε περαιτέρω το προϊόν απομόνωσης μέσω δοκιμών δυναμικότητας προβιοτικών, όπως ανοχή σε pH και χολής, δοκιμή ανοχής σε NaCl, ανοχή γαστρικού υγρού, αντιοξειδωτική δράση, αντοχή στο υδρογόνο, μείωση νιτρικού νατρίου, αντιμικροβιακή δράση και τεστ ευαισθησίας στα αντιβιοτικά. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το στέλεχος είναι ένα πιθανό προβιοτικό με βάση την προβιοτική ικανότητα. Το αναγνωρισμένο στέλεχος ήταν πιο ανθεκτικό σε οξύ και διατήρησε περίπου 80 % βιωσιμότητα για έως και 4 ώρες σε pH 1.0 και 2.0. Το προϊόν απομόνωσης έδειξε ανοχή σε συγκέντρωση χολής έως και 1.50 % και γαστρικό υγρό και ήταν σε θέση να αυξήσει συγκεντρώσεις NaCl σε 1 % έως 6 %. Ο *Lactobacillus oris* έδειξε αντοχή στα περισσότερα αντιβιοτικά καθώς και ανταγωνιστική δράση έναντι του ελεγχόμενου παθογόνου, καλές αντιοξειδωτικές ιδιότητες, μείωση του νιτρικού νατρίου και του H₂O₂. Το προϊόν απομόνωσης εμφάνισε καλές ιδιότητες εντερικής προσκόλλησης του επιθηλίου. Επιπλέον, το στέλεχος έδειξε πολλά υποσχόμενες ιδιότητες μείωσης της χοληστερόλης με βάση το επίπεδο χοληστερόλης. Αυτό το παρόν αποτέλεσμα δείχνει ότι το *L. oris* έχει ανώτερες προβιοτικές ιδιότητες και μπορεί να θεωρηθεί ως πιθανός υποψήφιος προβιοτικός.

5 Κεφάλαιο: Συμπεράσματα – Προτάσεις για το μέλλον

5.1 Συμπεράσματα

Ο *Lactobacillus spp* είναι ένας μικροοργανισμός με αρκετά μεγάλο επιστημονικό και όχι μόνο ενδιαφέρον. Βρίσκεται φυσικά σε πολλά προϊόντα που χρησιμοποιεί ένας μέσος άνθρωπος καθημερινά και επιπλέον εντοπίζεται ακόμα και μέσα στον ίδιο τον άνθρωπο. Μεγάλη προσοχή έχει δοθεί στον πιθανό ρόλο τους ως προβιοτικά, ως αντικαρκινικοί, φαρμακολογικοί και διατροφικοί παράγοντες, ως ένζυμα και αναστολείς ενζύμων και ως γεωργικά και ζωικά προϊόντα. Επίσης, όπως αναφέρθηκαν και παρουσιάστηκαν πολλές μελέτες, ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός και πιο ειδικά οι δευτερογενείς μεταβολίτες του μπορούν να συμβάλλουν στην πρόληψη ποικίλων ασθενειών και διαταραχών. Είναι αρκετά σημαντικό το πλήθος των δράσεων που αναφέρθηκαν και αναλύθηκαν στην συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία γιατί όχι μόνο είναι μεγάλος ο όγκος της δράσης του, αλλά εντοπίζεται σε θεματικές ενότητες που είναι αρκετά μείζονες στην σημερινή εποχή. Ένα αντιπροσωπευτικό παράδειγμα αποτελεί ο μεταβολισμός της ζάχαρης, αλλά αναλύονται και πολλά ακόμα με πιο εξειδικευμένες και εντοπισμένες λειτουργίες. Συνεπώς, ο *Lactobacillus spp* και πιο συγκεκριμένα οι δευτερογενείς μεταβολίτες του που αυτοί έχουν την μεγαλύτερη αξία και για αυτούς αναφέρουμε όλα τα παραπάνω, αξίζει να απομονώνονται, να μελετώνται και να εξελίσσονται.

5.2 Προτάσεις για το μέλλον

Μερικές προτάσεις για το μέλλον είναι ο εξής :

- Διεξαγωγή πειραμάτων για εξακρίβωση και περαιτέρω μελέτη των στελεχών του *Lactobacillus spp*
- Οικονομική μελέτη της χρήσης του συγκεκριμένου μικροοργανισμού
- Σύγκριση της δράσης και της αποτελεσματικότητας αυτού του μικροοργανισμού έναντι άλλων σε πειραματικό και όχι μόνο επίπεδο
- Κατανόηση σε μεγαλύτερο ποσοστό του μηχανισμού του και πρόβλεψη αυτού
- Βελτίωση των μεθόδων απομόνωσης ως προς τον ποιοτικό, οικονομικό και χρονικό τομέα
- Πιθανή βελτίωση της απόδοσης του μικροοργανισμού με πιθανή παρουσία άλλου

Βιβλιογραφικές Αναφορές

- Fischer, J., & Thines, E. (2017). Secondary metabolites of fungal vine pathogens. In *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. https://doi.org/10.1007/978-3-319-60021-5_7
- Karami, S., Roayaei, M., Hamzavi, H., Bahmani, M., Hassanzad-Azar, H., Leila, M., & Rafieian-Kopaei, M. (2017). Isolation and identification of probiotic *Lactobacillus* from local dairy and evaluating their antagonistic effect on pathogens. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, 7(3), 137. https://doi.org/10.4103/jphi.jphi_8_17
- Khalisanni, K. (2011). An overview of lactic acid bacteria. *International Journal of Biosciences (IJB)*, 1(3), 1–13.
- Leroy, F., & De Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science and Technology*, 15(2), 67–78. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.09.004>
- Li, W., Ren, M., Duo, L., Li, J., Wang, S., Sun, Y., Li, M., Ren, W., Hou, Q., Yu, J., Sun, Z., & Sun, T. (2020). Fermentation Characteristics of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Isolated From Naturally Fermented Dairy Products and Screening of Potential Starter Isolates. *Frontiers in Microbiology*, 11(August), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01794>
- Muhialdin, B. J., Hassan, Z., Bakar, F. A., & Saari, N. (2016). Identification of antifungal peptides produced by *Lactobacillus plantarum* IS10 grown in the MR
- (χ.χ.). Ανάκτηση από <https://ecosh.com/probiotics-40-health-benefits-of-probiotics-and-20-top-probiotic-foods/>
- (χ.χ.). Ανάκτηση από <https://homebase.org/operation-healthhome/nutrition-gut-health-series-the-difference-between-probiotics-and-prebiotics/>
- (χ.χ.). Ανάκτηση από <https://www.alamy.com/bacteria-found-in-human-digestive-system-computer-illustration-the-bacteria-are-helicobacter-pylori-enterococcus-faecalis-lactobacillus-spp-and-bifidobacterium-spp-lactobacillus-and-bifidobacterium-are-normal-flora-and-have-beneficia>
- (χ.χ.). Ανάκτηση από <https://www.dreamstime.com/probiotics-lactic-acid-bacteria-good-bacteria-microorganisms-gut-intestinal-flora-health-microbiome-probiotics-lactic-image187624884>
- Ana M Valdes, J. W. (2018). Role of the gut microbiota in nutrition and health. *BMJ*.

- Ana Rute Neves, W. A. (2005, Αύγουστος 1). Overview on sugar metabolism and its control in *Lactococcus lactis* — The input from in vivo NMR. *FEMS Microbiology*.
- Argus Cezarda Rocha Neto, M. M. (2015, ΔΕΚΕΜΒΡΙΟΣ). Antifungal activity of salicylic acid against *Penicillium expansum* and its possible mechanisms of action. *International Journal of Food Microbiology*.
- Belal J. Muhialdin, Z. H. (2016, ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ). Identification of antifungal peptides produced by *Lactobacillus plantarum* IS10 grown in the MRS broth. *Food Control*.
- Brid Brosnan, A. C. (2014, NOVEMBER). The QuEChERS approach in a novel application for the identification of antifungal compounds produced by lactic acid bacteria cultures. *Talanta*.
- Bronkhorst. (χ.χ.). Ανάκτηση από <https://www.bronkhorst.com/int/blog-1/mass-spectrometry-and-mass-flow-control-a-closer-look-at-them/>
- By Yenizey M. Álvarez-Cisneros, E. P.-A. (2018, Ιούλιος 5). Antibiotic Resistance in Lactic Acid Bacteria. *IntechOpen* .
- C. N. Jacobsen, V. R. (2020, Δεκέμβριος 17). Screening of Probiotic Activities of Forty-Seven Strains of *Lactobacillus* spp. by In Vitro Techniques and Evaluation of the Colonization Ability of Five Selected Strains in Humans. *Applied and Environmental Microbiology*.
- Carlo Giuseppe Rizzello, A. C. (2011). Antifungal activity of sourdough fermented wheat germ used as an ingredient for bread making. *FOOD CHEMISTRY*.
- César Aquiles Lázaro de la Torre, J. E. (2014, Νοέμβριος). Chromatographic detection of nitrofurans in foods of animal origin. *Food Safety*.
- Chi-Chung Chen, C.-C. L.-L.-Y.-S.-C.-C.-J. (2019, Απρίλιος 18). Antimicrobial Activity of *Lactobacillus* Species Against Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. *frontiers in Microbiology*.
- Christine M. Slover, L. D. (2008, February 15). *Lactobacillus*: a Review. *Clinical Microbiology Newsletter*, σ. 23.
- Cristina Alcántara, A. B. (2014, Φεβρουάριος 2014). Accumulation of Polyphosphate in *Lactobacillus* spp. and Its Involvement in Stress Resistance. *Applied and Environmental Microbiology*.
- Damiani P., G. i. (1996). The Sourdough Microflora. Characterization of Hetero- and Homofermentative Lactic Acid Bacteria, Yeasts and Their Interactions on the Basis of the Volatile Compounds Produced. *LWT - Food Science and Technology*.
- Dan Cristian Vodnar, P. A. (2010). HPLC Characterization of Lactic Acid Formation and FTIR Fingerprint of Probiotic Bacteria during Fermentation Processes. *National Botanic Cluj Napoca*.

- DGMS. (χ.χ.). Ανάκτηση από <https://dgms.eu/en/about-dgms/this-is-mass-spectrometry/basic-principle-of-mass-spectrometry/>
- Eiseul Kim, S.-M. Y. (2020, Απρίλιος). Design of PCR assays to specifically detect and identify 37 *Lactobacillus* species in a single 96 well plate. *BMC Microbiology*.
- Emily Crowley, F. D. (2013). Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. *Nature Reviews Clinical Oncology*.
- Fermented and vegetables - Bacteria Fermentations*. (χ.χ.). Ανάκτηση από <https://www.fao.org/3/x0560e/x0560e10.htm>
- Food and Agriculture Organization of the United States (FAO)*. (2002). Ανάκτηση από <https://www.fao.org/food-safety/en/>
- Gaynes, R. (2017). The Discovery of Penicillin—New Insights After More Than 75 Years of Clinical Use. *EMERGING INFECTIONS DISEASES*.
- Gökçe Polat Yemiş, F. P. (2011). Effect of vanillin, ethyl vanillin, and vanillic acid on the growth and heat resistance of *Cronobacter* species. *National Library of Medicine*.
- Hartmann, T. (1996). *Diversity and variability of plant secondary metabolism: a mechanistic view*. spinger.
- Hashemi, E. A. (2020, Οκτώβριος 10). Lactic acid production – producing microorganisms and substrates sources-state of art. *Heliyon*.
- Hassan M. Awad, K. S. (2013). Antibiotics as Microbial Secondary Metabolites: Production and Application. *Sciences & Engineering*.
- Herbert Michlmayr, W. K. (2014, Μάρτιος 1). β -Glucosidase activities of lactic acid bacteria: mechanisms, impact on fermented food and human health. *OXFORD ACADEMIC*.
- Hocking, J. I. (2009). Fungi and Food Spoilage. *SPRINGER LINK*.
- Hongjuan Li, L. L. (2012, ΜΑΥ). Identification of Antifungal Compounds Produced by *Lactobacillus casei* AST18. *SpringerLink*.
- J. Jerry Kaneko, J. W. (2008). *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. Elsevier.
- Jesper Magnusson, K. S. (2003, ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ). Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *OXFORD ACADEMY*.
- José Aníbal Mora-Villalobos, J. M.-Z.-G.-G. (2020, Φεβρουάριος 10). Multi-Product Lactic Acid Bacteria Fermentations:. *MDPI*.
- José Aníbal Mora-Villalobos, J. M.-Z.-G.-S.-W.-G. (2020, ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ). Multi-Product Lactic Acid Bacteria Fermentations: A Review. *MDPI*.

- Karla Guergoletto, M. M. (2010, Απρίλιος). Survival of *Lactobacillus casei* (LC-1) adhered to prebiotic vegetal fibers. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, σσ. 415-421.
- Katrin Ström, J. S. (2002). *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 Produces the Antifungal Cyclic Dipeptides Cyclo(1-Phe-1-Pro) and Cyclo(1-Phe-trans-4-OH-1-Pro) and 3-Phenyllactic Acid. *ASM Journals* .
- Kridsada Unban, W. C. (2021, Σεπτέμβριος 16). Bacteria Isolated from Indigenous Fermented Tea Leaves (Miang) of North Thailand and Promising Application in Synbiotic Formulation. *MDPI*.
- Kumar S Venkitanarayanan, C.-m. L. (2002). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis*, and *Listeria monocytogenes* on apples, oranges, and tomatoes by lactic acid with hydrogen peroxide. *Journal for Food Protection*.
- Lidia Lipinska-Zubrycka, R. K. (2020, Νοέμβριος). Anticandidal activity of *Lactobacillus* spp. in the presence of galactosyl polyols. *Microbiological Research*.
- Lidia Piekarska-Radzik, E. K. (2020, Σεπτέμβριος 9). Mutual influence of polyphenols and *Lactobacillus* spp. bacteria in food: a review. *Springer Link*.
- Li-Oon Chuah, H. L. (2019, JUNE 3). Postbiotic metabolites produced by *Lactobacillus plantarum* strains exert selective cytotoxicity effects on cancer cells. *BMC*.
- Lucille Garnier, F. V. (2017). Diversity and Control of Spoilage Fungi in Dairy Products: An Update. *MDPI*.
- Lucille Garniera, M. P.-B. (2020, JUNE). Antifungal activity of fermented dairy ingredients: Identification of antifungal compounds. *International Journal of Food Microbiology*.
- Lucy H. Deegan, P. C. (2006, Σεπτέμβριος). Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *International Dairy Journal*.
- M. Gobetti, A. C. (1994). The sourdough microflora. Interactions between lactic acid bacteria and yeasts: metabolism of carbohydrates. *Applied Microbial and Cell Physiology*.
- Marcia Leyva Salas, J. M. (2017). Antifungal Microbial Agents for Food Biopreservation—A Review. *MDPI*.
- Matthew H Matthew H Foley, S. O. (2011, Φεβρουάριος 9). *Lactobacillus* bile salt hydrolase substrate specificity governs bacterial fitness and host colonization. *PNAS*.
- Microbe Notes*. (χ.χ.). Ανάκτηση από <https://microbenotes.com/types-of-chromatography/>
- Morten Danielsen, A. (2003, Απρίλιος 15). Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *International Journal of Food Microbiology*, σ. 10.

- Olga Mosunova, J. C. (2021). The Biosynthesis of Fungal Secondary Metabolites: From Fundamentals to Biotechnological Applications. *Encyclopedia of Mycology*.
- Patricia Burns, M. F. (2018, Νοέμβριος 28). Isolation, Characterization and Performance of Autochthonous Spray Dried Lactic Acid Bacteria in Maize Micro and Bucket-Silos. *Food Microbiology*.
- Patten D.A., L. A. (2015, August 1). Lactobacillus-produced exopolysaccharides and their potential health benefits: a review. *Beneficial Microbes*, σ. 457.
- Pitt, J. J. (2009, Φεβρουάριος). Principles and Applications of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Clinical Biochemistry. *The clinical Biochemist Reviews*.
- Pussadee Tangwatcharin, P. K. (2012, JULY). Activity of virgin coconut oil, lauric acid or monolaurin in combination with lactic acid against Staphylococcus aureus. *National Library of Medicine*.
- Qin Xiang Ng, C. P.-S. (2018, Μαιος). Use of Lactobacillus spp. to prevent recurrent urinary tract infections in females. *Medical Hypotheses*.
- Rafael Araos, A. K. (2016, Οκτώβριος 1). Predominance of Lactobacillus spp. Among Patients Who Do Not Acquire Multidrug-Resistant Organisms. *oxford Academic*.
- Ramassamy Vijayakumar, S. S. (2018). *Secondary metabolites-Sources and applications*. London: IntechOpen limited.
- S. Sanchez, A. D. (2011). Scientific Fundamentals of Biotechnology. *Comprehensive Biotechnology*.
- Sadia Afrin, S. A. (2021, Μάρτιος 4). The Prospects of Lactobacillus oris as a Potential Probiotic With Cholesterol-Reducing Property From Mother's Milk. *frontiers in Nutrition*.
- Sahar Karami, M. R.-A.-K. (2017, Νοέμβριος 3). Isolation and identification of probiotic Lactobacillus from local dairy and evaluating their antagonistic effect on pathogens. *INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICAL INVESTIGATION*.
- Scientific, T. (χ.χ.). *ThermoFisher Scientific*. Ανάκτηση από ThermoFisher Scientific: <https://www.thermofisher.com/blog/ask-a-scientist/what-is-chromatography/>
- Scott N. Dean, D. H. (2019, Ιανουάριος 29). Isolation and characterization of Lactobacillus-derived membrane vesicles. *Scientific reports*.
- Susu Zhang, Z. X. (2019, Απρίλιος 10). Endoglucanase improve the growth of homofermentative Lactobacillus spp. in ensilages. *Journal of Biotechnology*.
- ThermoFisher Scientific*. (χ.χ.). Ανάκτηση από <https://www.thermofisher.com/gr/en/home/industrial/mass-spectrometry/mass->

spectrometry-learning-center/gas-chromatography-mass-spectrometry-gc-ms-information.html

- Ticiansia Silva Rocha, A. A. (2014, Σεπτέμβριος). Identification and adhesion profile of *Lactobacillus* spp. strains isolated from poultry. *Veterinary Microbiology*.
- Vanessa Liévin-Le Moala, A. L. (2014, Απρίλιος 27). Anti-Infective Activities of *Lactobacillus* Strains in the Human Intestinal Microbiota: from Probiotics to Gastrointestinal Anti-Infectious Biotherapeutic Agents. *American Society for Microbiology*.
- Villadsen, S. B. (1995). Production of optically pure D-lactate by *Lactobacillus bulgaricus* and purification by crystallisation and liquid/liquid extraction. *Springer Link*.
- Weidong Qian, Y. F. (2019). In Vitro Antibacterial Activity and Mechanism of Vanillic Acid against Carbapenem-Resistant *Enterobacter cloacae*. *MDPI*.
- Wood, A. W. (1995). *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. Spinger.
- Wusirika RAMAKRISHNA, A. K. (2021, Ιανουάριος). Anticancer Activities of Plant Secondary Metabolites: Rice Callus Suspension Culture as a New Paradigm. *Rice Science*.
- Yogesh Kumar Negi, C. P. (2018, Μάρτιος 8). Isolation of antibacterial protein from *Lactobacillus* spp. and preparation of probiotic curd. *Springer Link*.
- Yogesh Kumar Negi, C. P. (2018, Μάρτιος 20). Isolation of antibacterial protein from *Lactobacillus* spp. and preparation of probiotic curd. *Journal of Food and Technology*.
S broth. *Food Control*, 59, 27–30. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.05.022>
- Slover, C. M. (2008). *Lactobacillus*: a Review. *Clinical Microbiology Newsletter*, 30(4), 23–27. <https://doi.org/10.1016/j.clinmicnews.2008.01.006>
- Valdes, A. M., Walter, J., Segal, E., & Spector, T. D. (2018). Role of the gut microbiota in nutrition and health. *BMJ (Online)*, 361, 36–44. <https://doi.org/10.1136/bmj.k2179>