



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΔΡΑΣΗ ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ
ΑΠΟ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΑ ΤΟΥ ΕΜΠΟΡΙΟΥ

ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΗ: ΜΑΥΡΟΚΕΦΑΛΙΔΟΥ ΗΛΙΑΝΑ ΝΟΝΑ

ΟΝΟΜΑ ΕΙΣΗΓΗΤΗ: ΔΗΜΗΤΡΑ ΧΟΥΧΟΥΛΑ

Δήλωση περί λογοκλοπής/Copyright

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

Όνομα και Επώνυμο Συγγραφέα:

Ηλιάνα Νόνα Μαυροκεφαλίδου



Εξεταστική Επιτοπή

Χούγουλα Δήμητρα

Μπαντρίνου Ανθιμία

Αντωνόπουλος Διονύσιος

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλλαν με οποιοδήποτε τρόπο στην ολοκλήρωση της. Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέποντα κα Χούχουλα Δήμητρα, αναπληρώτρια καθηγήτρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής για την ανάθεση του θέματος της πτυχιακής αυτής μελέτης. Οι πολύτιμες γνώσεις, παρατηρήσεις και η ηθική της υποστήριξη υπήρξαν καθοριστικά στοιχεία καθ' όλη τη διεξαγωγή της παρούσας μελέτης. Με εισήγαγε στον επιστημονικό τρόπο σκέψης, παρέχοντας μου έτσι τις βάσεις για το μέλλον. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Δέσποινα Βουγιουκλάκη για την ευρύτερη συμβολή της στη διεκπεραίωση της μελέτης καθώς και για τη σημαντική βοήθεια και τη συνεχή καθοδήγηση που μου παρείχε κατά τη διενέργεια του πειραματικού μέρους της μελέτης.

ΑΦΙΕΡΩΣΕΙΣ

Θα ήθελα να αφιερώσω την πτυχιακή μου εργασία στην Δέσποινα Βουγιουκλάκη, που χάρη στη στήριξη και συνεχή συμβολή της, ήρθα σε πρώτη επαφή με τον ξεχωριστό κόσμο της επιστήμης, κλείνοντας τον πρώτο κύκλο των σπουδών μου με σημαντικά εφόδια για το μέλλον μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία, εκπονήθηκε στο πολυδύναμο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας της σχολής Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής. Τα πειράματα εκτελέστηκαν κατά τη διάρκεια του εαρινού εξαμήνου του ακαδημαϊκού έτους 2021-2022. Αποτελεί μία έρευνα σχετικά με τη δράση των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε προβιοτικά σκευάσματα του εμπορίου. Αρχικά η μελέτη εστιάζει στα χαρακτηριστικά γνωρίσματα των προβιοτικών. Παρουσιάζεται αναλυτικά ο ορισμός τους καθώς και οι μορφές τους. Γίνεται αρχικά μια γενική περιγραφή στον τρόπο δράσης τους. Στη συνέχεια η μελέτη επικεντρώνεται κυρίως στην ταυτοποίηση των βακτηρίων που υπάρχουν στο κάθε χάπι σε σύγκριση με τα αντίστοιχα που αναγράφονται στην εκάστοτε συσκευασία. Στο σημείο αυτό διακρίνονται και καταγράφονται εκείνα που πράγματι εμπεριέχονται που μπορεί να μην αναγράφεται η παρουσία μερικών από αυτά στο χάπι. Επίσης μπορεί να απουσιάζουν βακτήρια που πρακτικά θα αναμενόταν η ύπαρξή τους λόγω της αναφοράς τους στη συσκευασία. Έπειτα γίνεται έλεγχος της επιβίωσής τους σε συνθήκες στομάχου όπου δεν είναι πάντοτε δυνατή και συνεπώς δεν επιτυγχάνεται η επιθυμητή τους δράση όπου εκτυλίσσεται στο έντερο.

Περιεχόμενα

Εισαγωγή.....	9
1. Ιστορικά στοιχεία.....	10
2. Ορισμός των προβιοτικών οργανισμών	12
Σχετικές μελέτες για τα προβιοτικά	14
Ασφάλεια κατανάλωσης των προβιοτικών	14
Δράση προβιοτικών στον οργανισμό.....	16
Ιδιότητες προβιοτικών μικροοργανισμών.....	19
Ευεργετικές δράσεις των προβιοτικών μικροοργανισμών.....	20
3. Προσθήκη των προβιοτικών στην διατροφή.....	22
4. Ζύμωση	24
5. Οξυγαλακτικά βακτήρια	25
Ο ρόλος των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος στα ζυμούμενα τρόφιμα.....	26
Φυσιολογία των οξυγαλακτικών βακτηρίων	26
Ταξινόμηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων.....	27
6. ΕΠΙΒΙΩΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ.....	28
Ταυτοποίηση στελέχους	29
Προβιοτικά και η θέση τους στην παγκόσμια αγορά	29
7. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΜΕΡΟΥΣ	31
ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟΥ DNA.....	31
Μηχανική καταπόνηση του DNA.....	32
ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (POLYMERASE CHAIN REACTION, PCR)	33
Διαδικασία της PCR.....	34
Συστατικά της PCR.....	36
Απόδοση της PCR.....	40
Ανίχνευση και ταυτοποίηση του προϊόντος της PCR.....	41
ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ ΤΗΣ PCR.....	41
Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζης	42
Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης 1,8%.....	43
ΕΓΓΡΑΣΤΗΡΙΑΚΟ ΜΕΡΟΣ	45
Διαδικασία ταυτοποίησης των βακτηρίων στα προβιοτικά:	45

Παρασκευή συνθετικού θρεπτικού ανάπτυξης (στερεή και υγρή καλλιέργεια)	46
8. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	47
Απομόνωση των γαλακτικών βακτηρίων	52
Η διαδικασία της απομόνωσης ξεκινάει ως εξής :	52
Διαδικασία PCR για το κάθε δείγμα :	53
9. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ:	Error! Bookmark not defined.
Πειραματική διαδικασία προσομοίωσης συνθηκών στομάχου	58
Παρασκευή γαστρικού υγρού	58
10. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	62
11. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	63

Εισαγωγή

Η πιο συνήθης χρήση των προβιοτικών βακτηρίων στα προβιοτικά σκευάσματα του εμπορίου σε μορφή χαπιών απαντάται σε συνδυασμό τις περισσότερες φορές με κάποια φαρμακευτική αντιβίωση για προστασία της εντερικής χλωρίδας. Τα προβιοτικά μπορούν να οριστούν ως ζωντανά μικροβιακά συμπληρώματα τα οποία μπορούν να βελτιώσουν την ισορροπία του μικροβιακού φορτίου των μικροοργανισμών που απαντώνται στο γαστρεντερικό σύστημα (Fuller, 1992).

Η επωφελής επίδραση των προβιοτικών αποδίδεται στην παραγωγή οξέων, στην ανταγωνιστική δράση τους με παθογόνους μικροοργανισμούς και στην ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος. Τα οφέλη των προβιοτικών περιλαμβάνουν τον έλεγχο των επιπέδων χοληστερόλης, την πρόληψη της εντερικής μόλυνσης από παθογόνους μικροοργανισμούς, τη βελτίωση της πέψης της λακτόζης σε άτομα που εμφανίζουν δυσανεξία στη λακτόζη και η αντικαρκινική δράση. Τα υψηλά επίπεδα βιωσιμότητας και δραστηριότητας των προβιοτικών βακτηρίων, θεωρούνται απαραίτητα για τη βέλτιστη λειτουργικότητά τους.

Επιπλέον, η ικανότητα των μικροοργανισμών να επιβιώνουν και να πολλαπλασιάζονται εντός του ξενιστή επηρεάζει έντονα τα προβιοτικά τους οφέλη. Τα βακτήρια που περιέχονται σε ένα φαρμακευτικό σκεύασμα πρέπει να παραμένουν μεταβολικά σταθερά και δραστικά, και να είναι ικανά να επιβιώνουν κατά τη διέλευση μέσω του ανώτερου πεπτικού σωλήνα σε επαρκείς αριθμούς, προκειμένου να έχουν ευεργετικά αποτελέσματα στον οργανισμό του ξενιστή. Μελέτες έχουν δείξει ότι ορισμένα προβιοτικά στελέχη, ιδίως το *Bifidobacterium* spp., δεν έχουν την ικανότητα να επιβιώσουν σε έντονα όξινες συνθήκες, όπως το γαστρεντερικό σύστημα του ανθρώπου.

1. Ιστορικά στοιχεία

Η έννοια της χορήγησης μικροοργανισμών, προκειμένου να αποφέρει ένα θετικό όφελος για την υγεία ξεκίνησε πριν από έναν αιώνα όταν ο Metchnikoff (ρώσος επιστήμονας, βραβευμένος με Νόμπελ και καθηγητής στο Πανεπιστήμιο της Φρανκφούρτης) θεώρησε ότι η υγεία θα μπορούσε να ενισχυθεί, και επίσης η αδυναμία θα μπορούσε να καθυστερήσει, από το χειρισμό του εντερικού μικροβίου με βακτήρια φιλικά προς τον ξενιστή που βρίσκονται στο γιαούρτι (Fijan, 2014).

Στα τέλη του 19ου αιώνα, ο μικροβιολόγος εντόπισε μικροφυτρώση στο γαστρεντερικό σωλήνα ενός υγιούς ατόμου που διέφερε από εκείνους που έπασχαν από μία νόσο. Αυτή η ευεργετική μικρο-χλωρίδα που βρέθηκε στην γαστρεντερική (GI) οδό ονομάστηκε προβιοτικό. Το προβιοτικό αποδείχθηκε ότι ασκεί επιρροές που προάγουν την υγεία στον άνθρωπο και τα ζώα (Alam, 2015).

Η πρώτη κλινική δοκιμή πραγματοποιήθηκε τη δεκαετία του 1930 σχετικά με την επίδραση των προβιοτικών στη δυσκοιλιότητα. Στη δεκαετία του 1950, ένα προβιοτικό προϊόν έλαβε την άδεια από το Υπουργείο των Ηνωμένων Πολιτειών ως φάρμακο για την αγωγή της επιδερμίδας (*Escherichia coli*). Κατά τον τελευταίο αιώνα, υπάρχουν διάφοροι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν για την ικανότητά τους να προλαμβάνουν και να θεραπεύουν ασθένειες, που συνδέονται με τον όρο προβιοτικά.

Η ανακάλυψη από τους Mann και Sporerig (1974) ότι οι άνθρωποι οι οποίοι έπιναν γιαούρτι που έχει υποστεί ζύμωση με άγρια στελέχη του *Lactobacillus* sp. είχαν πολύ χαμηλές τιμές για τη χοληστερόλη του ορού αίματος άνοιξε ένα νέο χώρο μελέτης.

Οι Harrison et al., (1975) ανέφεραν ότι προστέθηκαν κύτταρα του *Lactobacillus acidophilus* ως βρεφική συνταγή που μειώνει τα επίπεδα της χοληστερόλης στον ορό. Οι Gill και Guarner (2004), προχώρησαν στον έλεγχο των επιπέδων χοληστερόλης στον ορό σε ενήλικες.

Το 1994, η Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας θεωρεί ότι τα προβιοτικά συμβάλουν στο ανοσοποιητικό σύστημα όταν χρησιμοποιούνται συνήθως αντιβιοτικά. Η χρήση προβιοτικών σε συνδυασμό με τα αντιβιοτικά ονομάζεται μικροβιακή θεραπεία παρεμβολών (Parvez et al., 2006). Επιπροσθέτως, ο Metchnikoff υποθέτει ότι τα

βακτηρίδια γαλακτικού οξέος (LAB) προσφέρουν στην υγεία οφέλη ικανά να προωθήσουν τη μακροζωία.

Πρότεινε ότι η "εντερική αυτοαναγωγή" και η προκύπτουσα γήρανση θα μπορούσε να κατασταλεί με τροποποίηση μικροβίων του εντέρου και την αντικατάσταση πρωτεολυτικών μικροβίων όπως το *Clostridium* που παράγουν τοξικές ουσίες, συμπεριλαμβανομένων φαινολών, ινδολών και αμμωνίας από την πέψη των πρωτεϊνών με χρήσιμα μικρόβια. Έχει αναπτύξει μια δίαιτα με γάλα που έχει υποστεί ζύμωση με το βακτήριο που ονομάζεται "βουλγαρικό βακίλλιο" (Guarner et al., 2011).

Ωστόσο τα οφέλη τους για την υγεία χρονολογούνται μόνο από τις αρχές του περασμένου αιώνα, όταν ο Metchnikoff επέστησε την προσοχή στις δυσμενείς επιπτώσεις της μικροχλωρίδας του εντέρου στον ξενιστή, και πρότεινε ότι η κατάποση γάλακτος που έχει υποστεί ζύμωση βελτίωσε αυτή τη λεγόμενη αυτο-δηλητηρίαση (Anuradha and Rajeshwari, 2005).

Πιο αναλυτικά, ο όρος προβιοτικό, που σημαίνει "για τη ζωή", προέρχεται από την ελληνική γλώσσα. Χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τον Lilly και το Stillwell το 1965 για να περιγράψουν ουσίες που εκκρίνονται από έναν μικροοργανισμό που διεγείρει την ανάπτυξη ενός άλλου και, ως εκ τούτου, συγκρίθηκε με τον όρο αντιβιοτικό.

Ο όρος προβιοτικό εφαρμόστηκε στη συνέχεια σε άλλους οργανισμούς άτομα και κέρδισε ένα γενικότερο νόημα. Το 1971 ο Sperti εφάρμοσε τον όρο στα εκχυλίσματα ιστών που διεγείρουν την μικροβιακή ανάπτυξη. Ο Parker ήταν ο πρώτος που χρησιμοποίησε τον όρο προβιοτικό με την έννοια που χρησιμοποιείται σήμερα. Συγκεκριμένα, όρισε τα προβιοτικά ως οργανισμούς και ουσίες που συμβάλλουν στην εντερική μικροβιακή ισορροπία, γεγονός που στις μέρες μας αποδεχθήκαμε από τον ορισμό του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (ΠΟΥ) (Georgieva et al., 2014). Ωστόσο, το 1989 ο Fuller τα χαρακτήρισε ως ζωντανά μικροβιακά συμπληρώματα διατροφής που επηρεάζουν επωφελώς το ξενιστή με τη βελτίωση της μικροβιακής ισορροπίας (Anuradha & Rajeshwari, 2005).

2. Ορισμός των προβιοτικών οργανισμών

Ο όρος «προβιοτικό» θα πρέπει να χρησιμοποιείται μόνο για προϊόντα που πληρούν τα επιστημονικά κριτήρια. Τα προϊόντα που περιέχουν επαρκή δόση ζωντανών μικροβίων που έχουν τεκμηριωθεί σε μελέτες στόχου-ξενιστή προσφέρουν όφελος για την υγεία. Τα προβιοτικά πρέπει να αναγνωρίζονται στο επίπεδο της τάσης, πρέπει να χαρακτηρίζονται για το συγκεκριμένο στόχο για την υγεία και πρέπει να διαμορφωθούν σε προϊόντα που χρησιμοποιούν στελέχη και δόσεις που αποδεικνύονται αποτελεσματικά. Αρκετά χαρακτηριστικά συνήθως θεωρούνται απαραίτητα για τα προβιοτικά, όπως η ανθρώπινη προέλευση και η ικανότητα για τη βελτίωση της ισορροπίας της εντερικής μικροβιοτικής (Sanders, 2008).

Πιο συγκεκριμένα, τα προβιοτικά ορίζονται ως ζωντανοί μικροοργανισμοί, οι οποίοι όταν χορηγούνται σε επαρκείς ποσότητες, προσφέρουν όφελος για την υγεία. Τα οφέλη για την υγεία προσδίδονται από συγκεκριμένα προβιοτικά στελέχη των ακόλουθων γενών: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Saccharomyces*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Bacillus*, *Escherichia coli*. Η ανθρώπινη μικροχλωρίδα κερδίζει σήμερα μεγάλη προσοχή και η έρευνα έχει ήδη αποδείξει ότι η μεταβολή αυτής της μικροβιοτικής μπορεί να έχει μεγάλη εμβέλεια. Μία από τις πιθανές οδούς για τη διόρθωση της δυσβολίας είναι η κατανάλωση προβιοτικών (Fijan, 2014). Τα προβιοτικά ως ζωντανοί μικροοργανισμοί, όταν λαμβάνονται από το στόμα, ωφελούν την υγεία βελτιώνοντας την ισορροπία των βακτηρίων στα έντερα. Αυτοί οι μικροοργανισμοί είναι συχνότερα βακτηρίδια, αλλά περιλαμβάνουν και άλλα είδη 10 οργανισμών όπως ζύμη.

Τα προβιοτικά είναι παρόμοια ή τα ίδια με τα "καλά βακτήρια" που υπάρχουν ήδη στο σώμα, ιδιαίτερα εκείνα του εντέρου. Η φυσιολογική ανθρώπινη εντερική οδός περιέχει 300-1.000 διαφορετικά είδη βακτηριακών ειδών με περίπου 10¹⁴ μεμονωμένα βακτηρίδια.

Σύμφωνα με την ΠΟΥ, τα προβιοτικά είναι «ζωντανοί μικροοργανισμοί οι οποίοι, όταν χορηγούνται σε επαρκείς ποσότητες, αποφέρουν όφελος για την υγεία υποδοχής» (Georgieva et al., 2014). Η επιλογή των στελεχών για προβιοτική χρήση εξαρτάται από το πόσο ασφαλή είναι για την υγεία και από τις δυνατότητές τους να αποφέρουν όφελος για τον άνθρωπο. Τα προβιοτικά των τροφίμων θα πρέπει να

επιβιώσουν μέχρι να φτάσουν στο τμήμα της γαστρεντερικής οδού όπου ασκούν το επιδιωκόμενο αποτέλεσμα. Για παράδειγμα, τα προβιοτικά που ενεργούν στο κόλον, πρέπει να αντιστέκονται στα σιαλικά ένζυμα, στα οξέα του στομάχου, στις χολικές εκκρίσεις και στα ένζυμα του λεπτού εντέρου, καθώς και στις μεταβολές του pH και στο χημικό περιβάλλον άλλων τροφίμων και ποτών που θα συναντήσουν κατά τη διάρκεια της διέλευσής τους κατά μήκος του γαστρεντερικού σωλήνα.

Επιπλέον, πρέπει να μπορούν να ανταγωνίζονται τη μικροβιακή χλωρίδα. Τέλος, ένα επιλεγμένο στέλεχος πρέπει να πληροί ορισμένες τεχνολογικές απαιτήσεις, όπως η καλλιέργεια σε μεγάλη κλίμακα, η γενετική σταθερότητα και η διατήρηση της βιωσιμότητας του στα πλαίσια ενός προϊόντος διατροφής ή ενός συμπληρώματος. Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα προβιοτικά σε τρόφιμα είναι είδη από τα γένη *Lactobacillus* και *Bifidobacterium*. Επίσης έχουν χρησιμοποιηθεί ζυμομύκητες όπως ο *Saccharomyces* spp (ILSI,2013).

Ο διεθνώς αποδεκτός ορισμός των προβιοτικών στηρίζεται στο ότι αφορούν ζωντανούς μικροοργανισμούς που, όταν χορηγούνται σε επαρκείς ποσότητες, προσφέρουν όφελος στην λειτουργία του οργανισμού. Άλλοι ορισμοί που προωθήθηκαν κατά τη διάρκεια των ετών περιορίζονταν στον καθορισμό μηχανισμών, τόπου δράσης, μορφή παράδοσης. Τα προβιοτικά φαίνεται ότι ασκούν ευρύ φάσμα επιδράσεων. Ο μηχανισμός της δράσης των προβιοτικών (π.χ. εντερική μικροχλωρίδα ή ενίσχυση της ανοσολογικής λειτουργίας) εξαιρέθηκε από τον ορισμό για να συμπεριλάβει αποτελέσματα λόγω νέων μηχανισμών και να επιτρέψει την εφαρμογή του όρου πριν από την επιβεβαίωση του μηχανισμού. Τα φυσιολογικά οφέλη έχουν αποδοθεί σε νεκρούς μικροοργανισμούς. Επιπλέον, ορισμένοι μηχανισμοί (όπως η χορήγηση ορισμένων ενζύμων στο έντερο) μπορεί να μην απαιτούν ζωντανά κύτταρα. Ωστόσο, ανεξάρτητα της λειτουργικότητας, τα νεκρά μικρόβια δεν είναι προβιοτικά (Sanders, 2008).

Σχετικές μελέτες για τα προβιοτικά

Σε μία μελέτη υποστηρίζεται ότι σύμφωνα με τον ορισμό των προβιοτικών υιοθετείται επίσης από τη Διεθνή Επιστημονική Ένωση Προβιοτικών και Πρεβιοτικών (ISAPP) και χρησιμοποιείται στις περισσότερες επιστημονικές δημοσιεύσεις. Ωστόσο, ο ορισμός αυτός δεν γίνεται αποδεκτός από την Ευρωπαϊκή Ασφάλεια Τροφίμων (EFSA) ή την αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA). Σήμερα, επιμένουν ότι ο ισχυρισμός υγείας που περιλαμβάνεται στον ορισμό δεν είναι μετρήσιμος λόγω του γεγονότος ότι οι εμπορικές αγορές υπερέβησαν την ικανότητα της επιστήμης να τεκμηριώσει τα αποδεικτικά στοιχεία. Σαν συνέπεια, δεν έχουν εγκριθεί τεκμηριωμένοι ισχυρισμοί υγείας για οποιοδήποτε προβιοτικό στις Η.Π.Α.. Ωστόσο, οι ισχυρισμοί υγείας, όπως η θεραπεία των ασθενειών που χρησιμοποιούν προβιοτικά, είναι μετρήσιμοι και μπορούν να αποδειχθούν με παρόμοιο είδος μελετών όπως και για τα φάρμακα (Fijan, 2014).

Ασφάλεια κατανάλωσης των προβιοτικών

Πολλοί προβιοτικοί οργανισμοί ανήκουν σε γένη με χαρακτηριστική λειτουργική ομάδα βακτηρίων γνωστών ως βακτήρια γαλακτικού οξέος, τα οποία έχουν καταναλωθεί με ασφάλεια για πολλά χρόνια και ως τέτοια θεωρούνται ασφαλή συστατικά στην παραγωγή τροφίμων. Για να θεωρηθεί ένα προβιοτικό ασφαλές, η Ευρωπαϊκή Ένωση δημιούργησε ένα σύστημα για την εκτίμηση της ασφάλειας, το «Ειδικό τεκμήριο ασφάλειας» (Qualified Presumption of Safety - QPS). Με το σύστημα αυτό μπορεί να γίνει μια αξιολόγηση ασφαλείας για επιλεγμένες ομάδες μικροοργανισμών από μια καθορισμένη ταξινομική ομάδα (π.χ. γένος ή ομάδα συναφών ειδών) με βάση τέσσερις πυλώνες πληροφοριών (ταυτότητα, σώμα γνώσης, πιθανή παθογένεια και τελική χρήση). Εάν η ταξινομική ομάδα και ο χαρακτηρισμός δεν δημιουργούν ανησυχίες σχετικά με την ασφάλεια ή εάν μπορεί να οριστούν και να αποκλειστούν τυχόν ανησυχίες σχετικά με την ασφάλεια, ο μικροοργανισμός μπορεί να λάβει καθεστώς QPS. Η περαιτέρω εκτίμηση της ασφάλειας περιορίζεται σε δοκιμές αντοχής στα αντιβιοτικά. Εάν ένα μικρόβιο δεν καλύπτεται από το QPS, τότε είναι πιθανό να απαιτηθεί μια συνολική εκτίμηση της ασφάλειας πριν να μπορέσει να χρησιμοποιηθεί στα τρόφιμα (ILSI, 2013).

Τα προβιοτικά για κατανάλωση δε θα πρέπει να προκαλούν ασθένεια στον άνθρωπο, δε θα πρέπει να είναι σε θέση να εξελιχθούν σε παθογόνα διατηρώντας σταθερό το φαινότυπο και το γονότυπό τους, θα πρέπει να είναι σταθερά εναντίον των ενζύμων, να μην είναι τοξικά, αλλεργιογόνα ή μεταλλαξιογόνα, όπως επίσης και να μην μεταφέρουν γενετικό υλικό υπεύθυνο για την αντοχή σε αντιβιοτικά (Mattila and Saarela 2000, Parvez et al. 2006, Tumola et al. 2001, Banan et al. 2015).

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

Εικόνα 1. Προβιοτικά Σκευάσματα Εμπορίου



Εικόνα 2 Προβιοτικά Σκευάσματα Εμπορίου



Δράση προβιοτικών στον οργανισμό

Η πιο πρόσφατη τοποθέτηση για τα παραπάνω κριτήρια είναι αυτή των Anadón et al. (2016) όπου ισχυρίζονται ότι για να θεωρηθεί ένα στέλεχος προβιοτικό θα πρέπει να αποτελεί αυτόχθονο κάτοικο μιας υγιούς εντερικής οδού, να έχει την ικανότητα να επιβιώνει στο ανώτερο πεπτικό σύστημα, να είναι ικανό να επιβιώνει και να πολλαπλασιάζεται στο έντερο (ανθεκτικό παρουσία οξέων και χολής), να είναι ασφαλές για κατανάλωση από τον άνθρωπο, να παράγει αντιμικροβιακές ουσίες (π.χ. βακτηριοσίνες) και να έχει την ικανότητα να προσκολλάται και να αποικίζει σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές.

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

Πολλοί προβιοτικοί μικροοργανισμοί έχουν επιλεγεί για την μεγάλη τους αντοχή σε αυτές τις συνθήκες και νέες μεθοδολογίες επιτρέπουν την ενθυλάκωση προβιοτικών στελεχών ώστε να υπάρχει μεγαλύτερη πιθανότητα να επιβιώσουν (Vanderplas et al. 2015). Η χολή όπως και το χαμηλό pH είναι ένας παρεμποδιστικός παράγοντας για την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των προβιοτικών στον ανθρώπινο οργανισμό. Εκκρίνεται στο λεπτό έντερο κατά τη διαδικασία της πέψης και παίζει σημαντικό ρόλο στην γαλακτωματοποίηση του λίπους και στην απορρόφησή του. Είναι ένα υδατικό διάλυμα που αποτελείται κυρίως από συζευγμένα χολικά οξέα (περίπου 50%), φωσφολιπίδια, χοληστερόλη και μπιλιβερδίνη. Η συγκέντρωση των χολικών αλάτων στη χολή συνήθως κυμαίνεται μεταξύ 0.2 και 2% μετά από την

κατάποση της τροφής, και είναι υψηλότερη όταν η τροφή έχει αυξημένη συγκέντρωση λίπους (Ζουμποπούλου 2008, Bustos et al. 2015).

Τα χολικά οξέα αλλάζουν τη δομή της κυτταρικής μεμβράνης των μικροοργανισμών, η οποία αποτελείται κυρίως από λιπίδια και λιπαρά οξέα και αυτό έχει ως συνέπεια να επηρεάζεται η κυτταρική διαπερατότητα και κατά συνέπεια η βιωσιμότητα των κυττάρων. Επίσης επηρεάζεται η αλληλεπίδραση της κυτταρικής μεμβράνης με το περιβάλλον (Succi et al. 2005). Επιπλέον, τα χολικά οξέα μπορεί να προκαλέσουν αλλαγές στην τριτοταγή δομή των πρωτεϊνών, οξειδωτική βλάβη στο DNA και RNA και επιπλέον να δημιουργήσουν ενδοκυτταρική οξίνιση (Bustos et al. 2015).

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

Όσον αφορά την ικανότητα πρόσδεσης των προβιοτικών στα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα και τη βλεννογόνο του εντέρου, θεωρείται ότι είναι επιθυμητό χαρακτηριστικό ενός προβιοτικού μικροοργανισμού, καθώς και το να μπορεί να αυξήσει το χρόνο παραμονής του στο έντερο. Με τον τρόπο αυτό αναστέλλουν τον αποικισμό παθογόνων μικροοργανισμών στα επιθηλιακά κύτταρα αλλά και αυξάνεται η αλληλεπίδραση των επιθηλιακών κυττάρων με τα ανοσοποιητικά κύτταρα (Jensen et al. 2012). Πιο συγκεκριμένα, εντεροπαθογόνοι μικροοργανισμοί όπως το *Escherichia coli* προσδένονται στα επιθηλιακά κύτταρα του ξενιστή μέσω υποδοχέων μαννόζης. Προβιοτικά στελέχη με παρόμοιες δυνατότητες πρόσδεσης θα μπορούσαν να αναστείλουν την πρόσδεση και τον αποικισμό παθογόνων σε αυτές τις θέσεις δέσμευσης και έτσι να προστατεύσουν τον ξενιστή έναντι της μόλυνσης (Marco et al.

2006). Τα προβιοτικά βακτήρια μπορούν επίσης να ανταγωνίζονται τα παθογόνα βακτήρια μειώνοντας το pH στις εσωτερικές μεμβράνες των μεμβρανόκλειστων οργανιδίων (luminal pH) των κυττάρου, με την παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών και άλλων ουσιών που συμβάλλουν στην άμυνα του οργανισμού.

Ένας από τους μηχανισμούς με τους οποίους η χλωρίδα του εντέρου αντιστέκεται στον αποικισμό από παθογόνα βακτήρια, είναι η παραγωγή ενός φυσιολογικού περιοριστικού περιβάλλοντος, όσον αφορά το pH, το οξειδοαναγωγικό δυναμικό, και την παραγωγή υδρόθειου (Harzallah and Belhadj 2013).

Έχει αποδειχθεί ότι μετά από κατάποση προβιοτικών βακτηρίων από ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα σημειώθηκε μείωση του luminal pH. Επίσης θετικά αποτελέσματα σημειώθηκαν και σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε ποντίκια μολυσμένα με Shiga τοξίνη από το στέλεχος *E. coli* O157:H7 όπου το προβιοτικό *Bifidobacterium* λόγω μεγάλης παραγωγής γαλακτικού οξέος, κατάφερε και μείωσε το luminal pH. Η μείωση αυτή συνδέθηκε με την αυξημένη επιβίωση των πειραματόζωων (Ng et al. 2009).

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

Όσον αφορά το τρίτο κριτήριο, τα προβιοτικά αλληλεπιδρούν με την μικροχλωρίδα του εντέρου βοηθώντας στη διατήρηση της μικροβιακής ισορροπίας και την άμυνα του οργανισμού έναντι των παθογόνων μικροοργανισμών. Ακόμη, οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί θα πρέπει να αντέχουν στις συνθήκες που δημιουργούνται κατά την εφαρμογή της τεχνολογίας παραγωγής του σχετικού προϊόντος-τροφίμου (π.χ. θερμοκρασία – οξύγονο) όπως επίσης να μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε τεχνολογικά μοντέλα μεγάλης κλίμακας (Banan et al. 2015). Ειδικά στα ζυμούμενα τρόφιμα, οι ιδιότητες των προβιοτικών που αποκτούν ιδιαίτερο τεχνολογικό ενδιαφέρον είναι ο ρυθμός ανάπτυξής τους και ο ρυθμός οξίνισης του υποστρώματος (Coda et al. 2010), η παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών (Messens and

De Vuyst 2002), η αντιμυκητιακή τους δράση (Coda et al. 2013) και η παραγωγή εξωπολυσακχαριτών (π.χ. γλυκάνη και φρουκτάνη) (Galle and Arendt 2014).

Επιπλέον σε κάθε παραγόμενο προβιοτικό προϊόν, ζυμούμενο ή όχι, βασική προϋπόθεση είναι να περιέχεται εν ζώή αρκετά μεγάλος πληθυσμός του προβιοτικού στελέχους, μέχρι και την αναγραφόμενη ημερομηνία λήξεως (Fasoli et al. 2003). Πέρα από τα παραπάνω έξι κριτήρια τα οποία αποτελούν βασικές προϋποθέσεις προκειμένου να χαρακτηριστεί ένας μικροοργανισμός ως προβιοτικός, υπάρχουν και άλλα τα οποία έχουν τεχνολογικό ενδιαφέρον για την παραγωγή ενός τροφίμου με προβιοτικές ιδιότητες ή σχετίζονται με τη θρεπτική αξία και την συμβολή στην υγεία.

Ιδιότητες προβιοτικών μικροοργανισμών

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει αυξημένο ενδιαφέρον από τους καταναλωτές για τα τρόφιμα που συμβάλλουν στην υγεία και την ευεξία. Όπως έχει σημειωθεί από τον πατέρα της ιατρικής Ιπποκράτη, «η τροφή είναι το φάρμακό σου και το φάρμακό σου η τροφή σου». Ως αποτέλεσμα, όλο και περισσότερες ερευνητικές προσπάθειες στρέφονται στην ανεύρεση νέων προϊόντων που θα καλύπτουν την ανάγκη αυτή. Μια τέτοια κατηγορία προϊόντων είναι και τα τρόφιμα που περιέχουν μικροοργανισμούς με προβιοτικές ιδιότητες.

Επειδή όμως δεν είναι όλοι οι μικροοργανισμοί στη φύση κατάλληλοι και ασφαλείς να χρησιμοποιηθούν στην παραγωγή τροφίμων, υπάρχει η ανάγκη θέσπισης κάποιων κριτηρίων ώστε να διαχωρίζονται ποιοι από αυτούς είναι. Όπως έχει ήδη αναφερθεί και παραπάνω, τα προβιοτικά είναι ζωντανοί μικροοργανισμοί οι οποίοι όταν ληφθούν σε κατάλληλες ποσότητες, έχουν οφέλη για την υγεία του καταναλωτή (FAO/WHO 2001). Παρότι φαντάζει απίθανο να υπάρξει κάποιο προβιοτικό όπου να ικανοποιεί όλα τα κριτήρια που θα αναφερθούν παρακάτω, οι Przemyslaw Jan Tomasik και Piotr Tomasik (2003) καθιέρωσαν τα ακόλουθα κριτήρια ως απαραίτητα προκειμένου ένα μικροοργανισμός να θεωρηθεί προβιοτικός:

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

Ευεργετικές δράσεις των προβιοτικών μικροοργανισμών

Είναι γνωστό ότι τα λεγόμενα προβιοτικά όταν καταναλωθούν σε κατάλληλες ποσότητες μπορούν να δράσουν ευεργετικά στην υγεία του ανθρώπου. Τα οφέλη που έχουν προταθεί πως προκύπτουν από την κατανάλωση τους είναι πολλά και μπορεί να είναι γενικά (π.χ. ρύθμιση της δραστηριότητας του εντέρου) ή στοχευμένα (π.χ. ανταγωνιστική δράση έναντι παθογόνων μικροοργανισμών της γαστρεντερικής οδού, όπως τα *Clostridium difficile*, *Campylobacter jejuni* και *Helicobacter pylori*).

Η μεγάλη πλειοψηφία των προβιοτικών οργανισμών ανήκει στα οξυγαλακτικά βακτήρια και κυρίως στα είδη του γένους *Lactobacillus* και του γένους *Bifidobacterium*. Το αποτέλεσμα της συσχέτισης των οξυγαλακτικών βακτηρίων τόσο με τα τρόφιμα που έχουν υποστεί ζύμωση, όσο και με τους προβιοτικούς οργανισμούς που δρουν ευεργετικά στην υγεία, προκαλεί όλο και μεγαλύτερο ενδιαφέρον στην επιστημονική κοινότητα, στις βιομηχανίες και στους καταναλωτές γενικότερα. Η δράση τους στις ζυμώσεις των τροφίμων είναι γνωστή εδώ και χιλιάδες χρόνια, ενώ η απόδειξη της ύπαρξής τους αρκετά πιο πρόσφατα (ο Joseph Lister το 1878 κατάφερε να απομονώσει το πρώτο βακτήριο που ήταν υπεύθυνο για την οξίνιση του γάλακτος).

Αντιθέτως, η ανάπτυξη των «λειτουργικών» τροφίμων τα οποία παράγονται με τη χρήση προβιοτικών οξυγαλακτικών βακτηρίων παρατηρείται μόνο τα τελευταία χρόνια, με τη ζήτησή τους να είναι αρκετά μεγάλη.

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

Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, μπορεί να ευθύνονται για την εκδήλωση διαβήτη τύπου δύο, να πυροδοτούν το άσθμα, το έκζεμα και τον αυτισμό καθώς και αυτοάνοσα νοσήματα όπως η σκλήρυνση κατά πλάκας. Έχει λοιπόν μεγάλη σημασία το είδος των βακτηρίων που κατοικούν στην εντερική χλωρίδα. Κλινικές μελέτες με προβιοτικές καλλιέργειες, έδωσαν αποτελέσματα που στηρίζουν την άποψη ότι οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί έχουν θετική επίδραση στην μικροχλωρίδα του εντέρου, καθώς και ότι προσφέρουν προστασία έναντι των γαστρεντερικών λοιμώξεων και των φλεγμονών του εντέρου.

Όμως, οι ευεργετικές επιδράσεις των προβιοτικών συχνά αμφισβητούνται, αν και ένα πλήθος κλινικών μελετών με τη χρήση συγκεκριμένων προβιοτικών μικροοργανισμών αποδεικνύει αρκετές από αυτές (Shahani and Chandan 1979, Oksanen et al. 1990, Isolauri et al. 1991, Nanji et al. 1994, Isolauri and Majamaa 1997, Dunne et al. 1999, Lee et al. 2008). Οι προβιοτικές καλλιέργειες επιδρούν τόσο στη μικροχλωρίδα όσο και στις μεταβολικές και ενζυμικές δραστηριότητες των παθογόνων μικροοργανισμών.

Οι αλλαγές στη μικροχλωρίδα προκαλούν αλλαγές στην παραγωγή προκαρκινικών ενζύμων και καρκινογόνων ουσιών από τους μικροοργανισμούς του γαστρεντερικού σωλήνα. Επιπροσθέτως, οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί με την πρόσδεσή τους στο επιθήλιο του εντέρου, τα κυτταρικά τους συστατικά και την επίδραση στη μικροχλωρίδα του εντέρου, βελτιώνουν τη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος στο γαστρεντερικό σωλήνα.

3. Προσθήκη των προβιοτικών στην διατροφή

Οι προβιοτικοί οργανισμοί χρησιμοποιούνται σε ποικίλα τρόφιμα, η κύρια κατηγορία των οποίων είναι τα γαλακτοκομικά προϊόντα, αλλά είναι επίσης παρόντα ως συμπληρώματα διατροφής σε μορφή κάψουλας ή δισκίου. Δεδομένου ότι η βιωσιμότητα είναι μια βασική ιδιότητα ενός προβιοτικού, το τελικό προϊόν πρέπει να περιέχει επαρκή ποσότητα ζωντανών προβιοτικών έως το τέλος της διάρκειας ζωής του. Ένας υγειονομικής φύσεως ισχυρισμός για την προσθήκη προβιοτικών σε τρόφιμα ή συμπληρώματα διατροφής πρέπει να γίνεται μόνο εάν υπάρχουν τεκμηριωμένα οφέλη βασισμένα σε δοκιμές σε ανθρώπους, καλής ποιότητας που διεξάγονται σχετικά με το προϊόν διατροφής το περιέχον το συγκεκριμένο στέλεχος που αποτελεί το αντικείμενο της αξιώσεως και με τη χρήση σχετικών τελικών σημείων.

Αυτές οι μελέτες θα πρέπει επίσης να είναι σε θέση να αποδείξουν την ασφαλή, αποτελεσματική δόση του προβιοτικού οργανισμού στα τρόφιμα (ILSI, 2013). Η νομοθεσία για την ασφάλεια των τροφίμων και η ρύθμιση των ισχυρισμών υγείας για τα τρόφιμα ποικίλλει ανάλογα με τη χώρα ή την περιοχή και οι τυχόν αξιώσεις σχετικά με εμπορικά προϊόντα που περιέχουν προβιοτικά πρέπει να τηρούν τις απαιτήσεις αυτής. Πιο συγκεκριμένα, η χρήση προβιοτικών μικροοργανισμών πολλές φορές βελτιώνει τη θρεπτική αξία των παραγόμενων προϊόντων προσδίδοντας έξτρα όφελος για την υγεία του καταναλωτή όπως επίσης και αύξηση στη προστιθέμενη αξία του εκάστοτε προϊόντος.

Όσον αφορά τις ιδιότητες που σχετίζονται με τη θρεπτική αξία του παραγόμενου τροφίμου, τόσο η ικανότητα αποικοδόμησης αντι-θρεπτικών παραγόντων (antinutrients, δηλαδή παραγόντων που παρεμποδίζουν την απορρόφηση θρεπτικών συστατικών π.χ. φυτικό οξύ) όσο και η αυξημένη διαθεσιμότητα λειτουργικών συστατικών (π.χ. διαλυτές φυτικές ίνες, διαλυτές αραβοξυλάνες, ελεύθερα φαινολικά οξέα και βιοενεργά πεπτίδια) είναι επιθυμητές (Katina and Routanen 2013).

Άλλη επιθυμητή ιδιότητα των προβιοτικών είναι η ικανότητά τους να υδρολύουν τη λακτόζη ώστε τα άτομα με δυσανεξία σε αυτό το σάκχαρο να μπορούν να καταναλώσουν το εκάστοτε προϊόν (Collington et al. 1990) Ανεπάρκεια στο ένζυμο λακτάση (β-γαλακτοζιδάση) σημαίνει μειωμένη συγκέντρωση του ενζύμου στη

βλεννογόνο του λεπτού εντέρου. Η δυσανεξία στη λακτόζη είναι ένα πρόβλημα για το 70% περίπου του παγκόσμιου πληθυσμού. Η λακτόζη σε αυτές τις περιπτώσεις δεν υδρολύεται και δεν απορροφάται οπότε δρα ως μωτικά.

Ωστόσο, όταν η λακτόζη προσλαμβάνεται μαζί με μικροοργανισμούς που παράγουν λακτάση (όπως ο *Lactobacillus acidophilus*, *L. bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* κ.ά.) τότε η διάσπαση της λακτόζης διευκολύνεται με επακόλουθη ελάττωση των συμπτωμάτων της δυσανεξίας. Γενικά, προτείνεται η προσθήκη 10⁶-10⁷ cfu ζωντανών προβιοτικών βακτηριών ανά ml ή g τροφής προκειμένου να εκδηλωθούν τα οφέλη των προβιοτικών για την υγεία του καταναλωτή (Argyri et al. 2013).

4. Ζύμωση

Η ζύμωση είναι ένας από τους παλαιότερους τρόπους που χρησιμοποίησαν οι άνθρωποι για να παράγουν και τη συντήρηση τροφίμων και ποτών. Ο όρος «ζύμωση» προσδιορίζει την αποικοδόμηση των υδατανθράκων από διάφορους μικροοργανισμούς και την παραγωγή ενέργειας από αυτούς σε αναερόβιες συνθήκες. Η διαδικασία αυτής της ζύμωσης των σακχάρων παράγει συνήθως οξέα, CO₂, αρωματικές ουσίες όπως ακεταλδεΐδη, διακετύλιο, κλπ.

Ωστόσο, σήμερα, ο όρος χρησιμοποιείται για να αποδώσει την αποικοδόμηση των υδατανθράκων, καθώς και άλλων ουσιών, υπό αναερόβιες, αλλά και αερόβιες συνθήκες, π.χ. τη διάσπαση πρωτεϊνών (πρωτεόλυση) και λιπιδίων (λιπόλυση) που προκαλούν οι μικροοργανισμοί κατά την ανάπτυξή τους στα ζυμούμενα τρόφιμα.

Γενικότερα, οτιδήποτε (τρόφιμο ή διάλυμα) έχει σάκχαρα και λίγα ακόμη θρεπτικά συστατικά για την ανάπτυξη μικροοργανισμών (πηγές αζώτου, άλατα K, Na, Ca, Fe, S, κλπ) μπορεί να ζυμωθεί εφόσον έχει και αρκετή υγρασία.

5. Οξυγαλακτικά βακτήρια

Από τα αρχαία χρόνια, τα οξυγαλακτικά βακτήρια είχαν ένα σημαντικό αντίκτυπο στον τρόπο ζωής μας, στον πολιτισμό αλλά και στις παραδόσεις μας. Τα τελευταία χρόνια, δεδομένης της διεύρυνσης της γνώσης μας γύρω από το χώρο των τροφίμων, η οικονομική σημασία που απέκτησαν είναι μεγάλης. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια παίζουν σημαντικό ρόλο στην παραγωγή των τροφίμων που υπόκεινται στη διαδικασία της ζύμωσης.

Από άποψη ποιότητας εξασφαλίζουν τη σωστή υφή και το κατάλληλο άρωμα για τα παραπάνω τρόφιμα, ενώ αποτελούν βιολογικά συντηρητικά, καθώς προκαλούν γρήγορη μείωση του pH των προϊόντων παράγοντας γαλακτικό οξύ. Επιπλέον, τα βακτήρια αυτά παράγουν διάφορες αντιμικροβιακές ενώσεις, όπως το οξικό οξύ, το διοξείδιο του άνθρακα, το υπεροξείδιο του υδρογόνου, την αιθανόλη καθώς και κάποιες βακτηριοσίνες.

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια διαθέτουν ένα μακρύ και ασφαλές ιστορικό Εφαρμογής στα τρόφιμα. Είναι τα πιο σημαντικά βακτήρια διαφόρων τροφίμων ζύμωσης όπως γαλακτοκομικά προϊόντα, ζυμούμενα λαχανικά, ζυμούμενα δημητριακά, ζυμούμενα προϊόντα κρέατος και το κρασί. Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται στις παραπάνω ζυμώσεις πρέπει να χαρακτηρίζονται από κάποιες προϋποθέσεις, είτε αυτές αφορούν στην ασφάλεια της διαδικασίας, είτε στην απόδοση που το χαρακτηρίζει.

Τα κριτήρια επιλογής των κατάλληλων μικροοργανισμών εξαρτώνται τόσο από τα χαρακτηριστικά της πρώτης ύλης, όσο και από τον τύπο και τις επιθυμητές ιδιότητες που θέλουμε να έχει το τελικό προϊόν. Κάποια από τα οξυγαλακτικά βακτήρια έχουν χαρακτηριστεί και ως προβιοτικοί μικροοργανισμοί.

Ο ρόλος των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος στα ζυμούμενα τρόφιμα

Στα γαλακτικά βακτήρια περιλαμβάνονται τα γένη *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*. Στα ομοζυμωτικά γαλακτικά βακτήρια η γλυκόζη μετατρέπεται σε γαλακτικό οξύ σε τιμές μεγαλύτερες της τάξης του 85% ενώ στα ετεροζυμωτικά η μετατροπή της γλυκόζης σε γαλακτικό οξύ αγγίζει το 50%. Επίσης παράγονται και άλλα στοιχεία όπως είναι η αιθανόλη, το οξικό οξύ και η γλυκερόλη (Κοτζεκίδου-Ρούκα2000).

Φυσιολογία των οξυγαλακτικών βακτηρίων

Το 1942 ο Orla-Jensen περιέγραψε τα οξυγαλακτικά βακτήρια ως Gram θετικούς, μη σπορογόνους οργανισμούς (έχουν σχήμα ραβδίων ή κόκκων) που ζυμώνουν τους υδατάνθρακες και τις ανώτερες αλκοόλες και παράγουν κυρίως γαλακτικό οξύ . Στις μέρες μας γνωρίζουμε ότι τα οξυγαλακτικά βακτήρια δεν διαθέτουν κυτόχρωμα και είναι μη αερόβιοι, αλλά αεροανθεκτικοί μικροοργανισμοί. Στην πλειοψηφία τους δεν είναι ικανοί για κίνηση, ενώ η αναλογία G+C (γουανίνης + κυτοσίνης) στο χρωμόσωμα τους δεν ξεπερνάει το 55%. Έχουν βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης μεταξύ 30-40°C και παρουσιάζουν ανθεκτικότητα σε οξέα. Χρησιμοποιούν τη γλυκόζη και τη λακτόζη ως πηγές άνθρακα για την παραγωγή είτε ενός και μόνου προϊόντος ζύμωσης (γαλακτικό οξύ) και γι' αυτό ονομάζονται ομοζυμωτικά βακτήρια, είτε περισσότερων προϊόντων ζυμώσεως (γαλακτικό οξύ, CO₂, αιθανόλη) και ονομάζονται ετεροζυμωτικά βακτήρια.

Ταξινόμηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια ανήκουν στην τάξη Lactobacillales της κλάσης Bacilli του φύλλου Firmicutes. Για πολλές δεκαετίες, η ταξινόμησή τους βασιζόταν στα μορφολογικά και φαινοτυπικά τους χαρακτηριστικά. Παρόλα αυτά, η συνεχής ανακάλυψη νέων γονιδίων 16S rDNA και ο ταυτόχρονος εμπλουτισμός των βάσεων δεδομένων προκάλεσε μεγάλες αλλαγές στην ταξινόμηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων.

Με τα δεδομένα που έχουμε μέχρι σήμερα, τα οξυγαλακτικά βακτήρια χωρίζονται σε έξι οικογένειες και αποτελούνται από 40 γένη. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια που σχετίζονται με τα τρόφιμα ανήκουν κατά κύριο λόγο στα γένη Streptococcus, Lactococcus, Enterococcus, Lactobacillus, Leuconostoc, Pediococcus, Weissella, Oenococcus, Carnobacterium και Tetragenococcus. Τα γένη Streptococcus, Lactococcus και Enterococcus αρχικά περιλαμβάνονταν σε ένα γένος, το οποίο είχε το όνομα Streptococcus. Η ομαδοποίηση αυτή είχε γίνει με κριτήρια που βασίζονταν στη φυσιολογία, στη μορφολογία και στα βιοχημικά χαρακτηριστικά αυτών των βακτηρίων. Παρόλα αυτά, το 1984 προτάθηκε, με βάση μοριακά κριτήρια πλέον, πως τα είδη Streptococcus faecalis και Streptococcus faecium θα ήταν πιο σωστό να μεταφερθούν στο γένος Enterococcus και να ονομάζονται Enterococcus faecalis και Enterococcus faecium. Το όνομα Enterococcus είχε αναφερθεί για πρώτη φορά το 1899 από τον Thiercelin για να περιγράψει τα βακτήρια τα οποία έχουν εντερική προέλευση.

Από το 1984 και μετά, το συγκεκριμένο όνομα χαρακτηρίζει ένα γένος βακτηρίων. Ένα χρόνο αργότερα, το 1985, επίσης με μοριακά δεδομένα, βρέθηκε ότι τόσο ο Streptococcus lactis όσο και οι Streptococcus garvieae, Streptococcus plantarum και Streptococcus raffinolactis, λόγω του γεγονότος ότι σχετίζονταν περισσότερο μεταξύ τους σε σχέση με τους άλλους στρεπτόκοκκους, έπρεπε να μεταφερθούν σε ένα νέο γένος με το όνομα «Lactococcus» και να ονομάζονται πλέον Lactococcus lactis, Lactococcus garvieae, Lactococcus plantarum και Lactococcus raffinolactis. Η κατάταξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων είναι υπό συνεχή εξέλιξη. Τα είδη που έχουν περιγραφεί είναι πάρα πολλά, ενώ η απομόνωση νέων στελεχών με διαφορετικά χαρακτηριστικά είναι μια συνεχής διαδικασία.

6. ΕΠΙΒΙΩΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

Τα περισσότερα προβιοτικά εμπορίου, έχουν ελεγχθεί *in vitro* για την αντίσταση τους στο γαστρικό οξύ και στα άλατα της χολής, όμως λίγα στοιχεία είναι διαθέσιμα σχετικά με την επιβίωση *in situ* (Morelli, 2000; Fernandez et al., 2003). Η επιβίωση ποικίλλει σημαντικά ανάμεσα σε στελέχη που ανήκουν στην ίδια ομάδα. Τα στελέχη *Lactobacillus* για παράδειγμα, γενικά επιβιώνουν καλά *in vitro* με την παρουσία του οξικού pH και του χολικού οξέος, επιβεβαιώνοντας την ισχυρή δυναμικότητά τους σαν προβιοτικά (Fernandez et al., 2003). Τα ειδικά αυτά χαρακτηριστικά, μπορεί παρόλα αυτά να μην είναι επαρκή να καθορίσουν την επιβίωση *in situ*.

Το περιβάλλον από το οποίο το προβιοτικό στέλεχος προέρχεται, μπορεί επίσης να επηρεάζει τις πιθανότητες επιβίωσης. Σε μια έρευνα *in vitro* συγκρίναμε την επιβίωση 47 στελεχών του *Lactobacillus* spp. Τα στελέχη που απομονώθηκαν στο ανθρώπινο έντερο, βρέθηκαν να παρουσιάζουν καλύτερη επιβίωση από τα προβιοτικά στελέχη που απομονώθηκαν σε τρόφιμα ή γαλακτοκομικά προϊόντα (Jacobsen et al., 1999). Συνεπώς, 5 στελέχη που επιλέχθηκαν από την μικροσκοπική εξέταση *in vitro* μελετήθηκαν σε ένα τροφικό πείραμα. Τα ευρήματα, επιβεβαίωσαν πως τα εντερικά στελέχη *L. rhamnosus*, *L. reuteri*, και *L. GG* παρέμεναν στο έντερο σε μεγάλους αριθμούς από τα γαλακτοκομικά στελέχη *L. casei* subsp. *Alactus* (και *L. delbrueckii* subsp. *lactis* (Jacobsen et al., 1999). Ο καθορισμός της επιβίωσης *in vivo* απαιτεί διευκρίνιση.

Συχνά, υπάρχει σύγχυση ανάμεσα στις παροδικές, επίμονες ή αποικιακές επιδράσεις των μελετημένων στελεχών. Γαστρικό οξύ, χολικά άλατα και παγκρεατικές εκκρίσεις είναι φράγματα ενάντια σε μακρόχρονη παραμονή του προβιοτικού. Επιμέρους ιδιότητες, μπορεί παρόλα αυτά να είναι απαραίτητες για αποτελεσματικό ανταγωνισμό των προβιοτικών στελεχών εναντίον της ποικιλομορφίας της ενδογενούς μικροβιακής χλωρίδας. Κυτταρικός δεσμός και αντιμικροβιακές δραστηριότητες των προβιοτικών υποψηφίων, μπορεί να συνεισφέρουν σημαντικά στην βακτηριακή επιβίωση *in vivo*.

Τελικά ο σχεδιασμός των συμβιωτικών θα έπρεπε να βελτιώνει την επιβίωση των προβιοτικών στελεχών σαν την παρουσία των πρεβιοτικών ενώσεων που

επηρεάζει θετικά τον αριθμό των βιώσιμων κυττάρων κατά την προετοιμασία. Ανθεκτικό άμυλο, βρέθηκε να ενισχύει την επιβίωση του στελέχους *Bifidobacterium lactis* σε γαστρικό και εντερικό περιεχόμενο (Crittenden et al., 2001). Ένας συνδυασμός των φρουκτοολιγοσακχαριτών και του στελέχους *Lactobacillus acidophilus* αύξησε την παραμονή του προβιοτικού σε ένα μοντέλο *in vitro* του ανθρώπινου εντέρου (Gmeiner et al., 2000).

Ταυτοποίηση στελέχους

Το προβιοτικό στέλεχος θα έπρεπε να έχει ευδιάκριτα χαρακτηριστικά, τα οποία επιτρέπουν τον ταξινομικό ορισμό και ταυτοποίηση του προβιοτικού στελέχους από τα άλλα μέλη των ειδών (Holzapfel et al., 2001-2002). Πρόσφατες μέθοδοι βασίζονται σε μοριακές τεχνικές, (αλυσίδα πολυμεράσεων αντίδραση-βασιζόμενη ή άλλες γονοτυπικές μεθόδους), μονοπάτια ζύμωσης υδατανθράκων, βιότυπος ή ομολογία DNA και RNA ομαδοποίησης (Heller et al., 2001). Η ταυτοποίηση στελέχους είναι σημαντική για ποιοτικό έλεγχο και για διαφορές σε κλινική επάρκεια για διαφορετικά στελέχη των προβιοτικών.

Προβιοτικά και η θέση τους στην παγκόσμια αγορά

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

Τα προβιοτικά προϊόντα υπάγονται στην κατηγορία των λειτουργικών τροφίμων. Σύμφωνα με τον Υπηρεσία/Διεύθυνση Τροφίμων και Φαρμάκων των Η.Π.Α. (Food and Drug Administration, FDA 2004), ως λειτουργικά τρόφιμα ορίζονται τα τρόφιμα ή τα θρεπτικά συστατικά τα οποία δίδουν σημαντικές φυσιολογικές αλλαγές στον καταναλωτή και η δράση τους είναι ξεχωριστή και διακριτή από τον ρόλο τους ως θρεπτικά συστατικά.

Τα προβιοτικά αντιπροσωπεύουν ένα σημαντικό μερίδιο (60-70%) της αγοράς των λειτουργικών τροφίμων (Holzapfel 2006). Παγκοσμίως, η ζήτηση για κατανάλωση των λειτουργικών τροφίμων αυξάνεται μέρα με τη μέρα, λόγω της αυξανόμενης ευαισθητοποίησης των καταναλωτών σχετικά με την επίδραση της διατροφής στην υγεία.

Κατά το έτος 2000, η παγκόσμια αγορά για τα λειτουργικά τρόφιμα ανέρχεται στα 33 δισεκατομμύρια \$ και μέχρι το 2010 τα έσοδα αυξήθηκαν στα 167 δισεκατομμύρια \$ ενώ οι προβλέψεις για το 2018 εκτοξεύουν τα έσοδα στα 37.9 δισεκατομμύρια \$. Η Κίνα και η Ιαπωνία κυριαρχούν στην αγορά των προβιοτικών, και σημειώνουν σημαντική αύξηση στις πωλήσεις τέτοιων προϊόντων.

Προβιοτικά του γένους *Lactobacillus* έχουν το μεγαλύτερο μερίδιο πωλήσεων αφού αντιπροσωπεύουν το 61,9% των συνολικών πωλήσεων προβιοτικών για το 2007 (Food Processing 2009). Αρκετά προβιοτικά βακτήρια ανθρώπινης προέλευσης όπως οι *Lb. rhamnosus* GG, *Lb. casei* strain Shirota και *Lb. acidophilus* LA-1 αξιοποιούνται εμπορικά.

Ωστόσο, τα είδη που ανήκουν στα γένη *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Saccharomyces* και *Propionibacterium* θεωρούνται επίσης προβιοτικά. Πολλοί καταναλωτές, οργανώσεις καταναλωτών, καθώς και μέλη της επιστημονικής κοινότητας όμως, είναι ακόμα δύσπιστοι για την αποτελεσματικότητα αυτών των προϊόντων και τους ισχυρισμούς υγείας τους.

Τα προβιοτικά στελέχη που χρησιμοποιούνται στο εμπόριο είναι τα βακτήρια, οι μύκητες και οι ζύμες. Επίσης, πολύ συχνά βρίσκουμε εμπορικά προϊόντα με μίξεις αυτών με τα στελέχη των γενών *Lactobacillus* sp. ή *Bifidobacterium* sp. Σήμερα, οι μίξεις πολλών ειδών προβιοτικών γίνονται ολοένα και πιο δημοφιλείς σε σύγκριση με μεμονωμένα προβιοτικά στελέχη καθώς μπορούν να δρουν συνεργιστικά με αποτέλεσμα να πετυχαίνουν μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα.

Τα προβιοτικά παρασκευάσματα διατίθενται στην αγορά στις εξής μορφές: σκόνη, υγρή μορφή, γέλη, πάστα, κόκκοι, κάψουλες, δισκία ή/και φακελάκια (Sharma 2014).

Ειδικά για ανθρώπινη κατανάλωση, η διάθεση των προβιοτικών γίνεται με τρεις διαφορετικούς τρόπους:

1. συμπύκνωμα καλλιέργειας που προστίθεται στα τρόφιμα (σε σκόνη ή σε μορφή βαθιάς κατάψυξης),
2. προβιοτικά τρόφιμα (που έχουν υποστεί ζύμωση ή όχι), και
3. συμπληρώματα διατροφής (φαρμακευτικά προϊόντα σε μορφή σκόνης, κάψουλας ή ταμπλέτας) (Tannis 2008).

7. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΜΕΡΟΥΣ

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟΥ DNA

Η απομόνωση μιας άθικτης δομής ευκαρυωτικού χρωμοσωματικού DNA είναι πολύ δύσκολη λόγω του μεγάλου μεγέθους και της εύθραυστης φύσης του. Διάφορες μέθοδοι απομόνωσης αναπτύχθηκαν για να δώσουν DNA σε μια βιολογικώς ενεργή μορφή, αλλά αυτό δεν σημαίνει ότι είναι εντελώς άθικτο. Αυτές οι μέθοδοι δίνουν DNA το οποίο είναι σταθερό, υψηλού μοριακού βάρους και σχετικά καθαρό, αναφορικά με RNA και πρωτεΐνες.

Ο σχεδιασμός μίας διαδικασίας απομόνωσης DNA απαιτεί πολύ καλή γνώση της χημικής σταθερότητας του DNA, όπως επίσης και της κατάστασής του στο κυτταρικό περιβάλλον. Οι πειραματικές παράμετροι οι οποίες θα πρέπει να ληφθούν υπ' όψη, καθώς και οι επιδράσεις τους στη δομή του άθικτου DNA είναι οι εξής:

pH

α) Οι υδρογονικοί δεσμοί μεταξύ των συμπληρωματικών βάσεων είναι σταθεροί μεταξύ pH 4 και 10.

β) Οι φωσφοδιεστερικοί δεσμοί στο σκελετό του DNA είναι σταθεροί μεταξύ pH 3 και 12.

γ) Οι N-γλυκοζιτικοί δεσμοί των πουρινικών βάσεων (A, G) υδρολύονται σε τιμές pH < 3.

Θερμοκρασία

α) Υπάρχει σημαντική διακύμανση της θερμοκλής σταθερότητας των υδρογονικών δεσμών στη διπλή έλικα, αλλά τα περισσότερα DNA αρχίζουν να τήκονται στην περιοχή των 80-90 °C.

β) Οι φωσφοδιεστερικοί δεσμοί και οι N-γλυκοζιτικοί δεσμοί είναι σταθεροί μέχρι τους 100°C.

Ιοντική ισχύς

Το DNA είναι περισσότερο σταθερό και διαλυτό σε διαλύματα αλάτων. Συγκεντρώσεις άλατος μικρότερες των 50 mM εξασθενούν τους υδρογονοδεσμούς μεταξύ των συμπληρωματικών αλυσίδων.

Κυτταρικές συνθήκες

α) Πριν ελευθερωθεί το DNA, το κυτταρικό τοίχωμα του βακτηρίου πρέπει να λυθεί. Η ευκολία με την οποία θραύεται το κυτταρικό τοίχωμα διαφέρει από οργανισμό σε οργανισμό. Σε ορισμένες περιπτώσεις απαιτείται παρατεταμένη σύνθλιψη ή κατεργασία με υπερήχους, ενώ σε άλλες περιπτώσεις απαιτείται ενζυμική υδρόλυση του κυτταρικού τοιχώματος.

β) Διάφορα ένζυμα που υπάρχουν στο κύτταρο μπορεί να συμβάλλουν στην αποικοδόμηση του DNA, αλλά η μεγαλύτερη καταστροφή γίνεται από τις δεοξυριβονουκλεάσες. Αυτά τα ένζυμα καταλύουν την υδρόλυση των φωσφοδιεστερικών δεσμών.

γ) Όσον αφορά το DNA των ευκαριωτικών κυττάρων, αυτό βρίσκεται ως σύμπλοκο με ειδικές βασικές πρωτεΐνες που λέγονται ιστόνες και πρέπει να απομακρυνθούν από το DNA κατά τη διαδικασία της εκχύλισης του.

Μηχανική καταπόνηση του DNA

Κατά τη διαδικασία της απομόνωσης θα πρέπει πάντα να γίνονται ήπιοι χειρισμοί. Η ανακίνηση, η ανάδευση καθώς και διάφορες άλλες διαδικασίες μπορεί να προκαλέσουν σπάσιμο των αλυσίδων του DNA. Οι διαδικασίες αυτές συνήθως

δεν αλλοιώνουν τη δευτεροταγή δομή του DNA, αλλά μειώνουν το μήκος των μορίων (λόγω θραύσης).

ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (POLYMERASE CHAIN REACTION, PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR) είναι μια πολύ απλή τεχνική που όμως αποτελεί βασικό εργαλείο της Μοριακής Βιολογίας, έχει συμβάλει τα μέγιστα στην ανάπτυξη της γονιδιακής και ευρύτερης βιολογικής έρευνας και έχει βρει πληθώρα εφαρμογών.

Η PCR μιμείται τη διαδικασία της αντιγραφής του DNA και με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνει την *in vitro* παραγωγή πολυάριθμων (χιλιάδων ή εκατομμυρίων) αντιγράφων μιας συγκεκριμένης DNA περιοχής, π.χ. ενός γονιδίου, σε σύντομο χρονικό διάστημα και μάλιστα από μια αρχική ποσότητα DNA που μπορεί να είναι τόσο λίγη όσο ένα και μόνο μόριο DNA.

Οποιαδήποτε περιοχή οποιουδήποτε τμήματος DNA μπορεί να επιλεγεί για ενίσχυση με τη συγκεκριμένη τεχνική, αρκεί μόνο να είναι γνωστές οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες στα δύο άκρα της περιοχής ενδιαφέροντος. Κάτι τέτοιο είναι απαραίτητο καθώς προκειμένου να πραγματοποιηθεί μια αντίδραση PCR είναι αναγκαία η ύπαρξη δύο μικρών, χημικά παραγόμενων, ολιγονουκλεοτιδικών αλληλουχιών που θα υβριδοποιηθούν στο μόριο του DNA στα δύο άκρα της περιοχής ενδιαφέροντος. Αυτά τα ολιγονουκλεοτιδικά μόρια που ονομάζονται εκκίνητες (primers), διαμεσολαβούν την εκκίνηση της διαδικασίας σύνθεσης του DNA αλλά και οριοθετούν την περιοχή που θα ενισχυθεί.

Η τεχνική της PCR αναπτύχθηκε από τον Kary Mullis το 1983, ο οποίος το 1993 τιμήθηκε με το Νόμπελ Χημείας. Πρόκειται για μία τεχνική απλή, φθηνή, εύκολη, αξιόπιστη, ειδική και ευαίσθητη, η οποία έχει βρει πληθώρα εφαρμογών σε πολλά επιστημονικά πεδία, όπως στην ενίσχυση και απομόνωση συγκεκριμένων τμημάτων DNA, στην κλωνοποίηση γονιδίων, στην κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση γονιδίων,

στη σάρωση μετασηματισμένων βακτηριακών αποικιών, στο γενετικό αποτύπωμα (genetic fingerprinting) με ευρεία εφαρμογή στην εγκληματολογία για την αναγνώριση ενόχων, στην ανάλυση πολυμορφισμών του DNA, στην ανίχνευση γονιδιακών μεταλλάξεων, στην ανάπτυξη ιατρικών γενετικών τεστ (π.χ. η ανίχνευση του ιού HIV), στον προγεννητικό έλεγχο, στον έλεγχο πατρότητας, σε εφαρμογές στην παλαιοντολογία από ίχνη DNA που μπορεί να βρεθούν από απολιθώματα κ. ά. Ενδεικτικό της ευρείας χρήσης της μεθόδου είναι και το γεγονός ότι έχουν πλέον αναπτυχθεί πάνω από 30 διαφορετικές παραλλαγές της.

Διαδικασία της PCR

Η τεχνική της PCR βασίζεται στην ικανότητα της δίκλωνης αλυσίδας του DNA, διαδοχικά και ελεγχόμενα, να αποδιατάσσεται και να επανασυντίθεται βάσει της συμπληρωματικότητας των αζωτούχων βάσεων. Η πραγματοποίηση μιας αντίδρασης PCR περιλαμβάνει την ανάμιξη των εξής απλών συστατικών: του DNA υποστρώματος που χρησιμεύει ως μήτρα για την περιοχή ενδιαφέροντος που θέλουμε να ενισχύσουμε, των δύο ειδικών εναρκτήριων εκκινήτων, του μίγματος των ελεύθερων τριφωσφορικών δέοξυριβονουκλεοτιδίων (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), της DNA πολυμεράσης και ιόντων Mg^{2+} που είναι απαραίτητα για τη δράση του ενζύμου, συνοδευόμενα από το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα, το οποίο ρυθμίζει το ιοντικό περιβάλλον της αντίδρασης ώστε να είναι το βέλτιστο για τη λειτουργία της DNA πολυμεράσης.

Το πρώτο βήμα της PCR περιλαμβάνει τη θέρμανση της αντίδρασης στους $95^{\circ}C$ ώστε να αποδιαταχθούν οι δύο έλικες του DNA (φάση αποδιάταξης, denaturation). Η φάση αυτή διαρκεί συνήθως 30 – 45 δευτερόλεπτα. Στη συνέχεια η αντίδραση ψύχεται στους $50 - 65^{\circ}C$ για περίπου $\frac{1}{2} - 1$ λεπτό, ώστε οι εκκινήτες να υβριδοποιηθούν στις συμπληρωματικές τους περιοχές στις δύο αλυσίδες του DNA, στο 3' άκρο της περιοχής που θέλουμε να πολλαπλασιάσουμε (φάση υβριδοποίησης, annealing). Η θερμοκρασία και ο χρόνος της φάσης αυτής εξαρτάται από το μήκος, τη νουκλεοτιδική αλληλουχία και τη συγκέντρωση του ζεύγους των εκκινήτων.

Η γενική αρχή που ακολουθείται είναι η θερμοκρασία υβριδοποίησης να ρυθμίζεται $5^{\circ}C$ χαμηλότερα από το σημείο τήξης (T_m , θα εξηγηθεί εκτενέστερα στη συνέχεια) των εκκινήτων. Γενικά, αύξηση της θερμοκρασίας υβριδοποίησης ευνοεί την

ειδικότητα του τελικού προϊόντος καθώς μειώνεται η μη ειδική δέσμευση των εκκινητών.

Ακολουθεί η φάση της επιμήκυνσης / σύνθεσης (elongation / extension), που πραγματοποιείται συνήθως στους 72°C για περίπου ½ - 2 λεπτά, κατά την οποία η DNA πολυμεράση προσδένεται στους εκκινητές και προσθέτει σταδιακά ελεύθερα νουκλεοτίδια ώστε να συνθέσει τη συμπληρωματική αλυσίδα του DNA με κατεύθυνση 5' - 3'. Καθώς η DNA πολυμεράση δεν μπορεί να αρχίσει την de novo σύνθεση μιας καινούριας αλυσίδας DNA, οι εκκινητές παρέχουν το απαραίτητο 3' προεξέχων άκρο ώστε να αρχίσει η σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας.

Στη θερμοκρασία των 72°C η DNA πολυμεράση έχει βέλτιστη απόδοση. Ο χρόνος της φάσης επιμήκυνσης εξαρτάται από το μήκος της αλληλουχίας-στόχου και το είδος της DNA πολυμεράσης που χρησιμοποιείται. Γενικά, επιμήκυνση για 1 λεπτό στους 72°C αρκεί για τη σύνθεση ενός μορίου DNA-στόχου μήκους 2000 νουκλεοτιδίων. Υπό βέλτιστες συνθήκες, στο τέλος αυτής της φάσης θα υπάρχουν τα διπλάσια μόρια DNA από αυτά που υπήρχαν στην αρχή.

Οι τρεις αυτές φάσεις επαναλαμβάνονται αρκετές φορές (συνήθως για 25 – 35 κύκλους) ώστε να παραχθεί αρκετή ποσότητα από την επιθυμητή αλληλουχία DNA. Ο αριθμός των κύκλων μιας αντίδρασης PCR εξαρτάται κυρίως από τη συγκέντρωση των μορίων-στόχων που υπάρχουν αρχικά στην αντίδραση.

Μετά από τον δεύτερο κύκλο της PCR αντίδρασης έχουν παραχθεί τέσσερα μόρια DNA που περιέχουν τόσο την περιοχή που μας ενδιαφέρει όσο και γειτονικές. Μετά από τον τρίτο κύκλο της PCR επιτυγχάνεται η παραγωγή των δύο πρώτων τμημάτων DNA που περιέχουν αποκλειστικά την περιοχή που θέλουμε να ενισχύσουμε.

Στους επόμενους κύκλους η παραγωγή τέτοιων τμημάτων DNA αυξάνεται εκθετικά με αποτέλεσμα μετά από 1-2 ώρες αντίδρασης να υπάρχουν εκατομμύρια αντίγραφα της επιθυμητής αλληλουχίας-στόχου. Μια αντίδραση PCR πραγματοποιείται σε ειδικά μηχανήματα που λέγονται θερμοκοιτιές, οι οποίοι φέρουν ειδική θερμαινόμενη πλάκα που επιτρέπει τη γρήγορη και ακριβή εναλλαγή των θερμοκρασιών.

Συστατικά της PCR

Όλα τα συστατικά της PCR πρέπει να είναι υψηλής καθαρότητας για αποφυγή επιμολύνσεων.

1. Μήτρα DNA

Είναι το DNA που περιέχει την αλληλουχία που θέλουμε να ενισχύσουμε. Το αρχικό αυτό DNA μπορεί να είναι απομονωμένο γονιδιωματικό, πλασμιδιακό, ιϊκό κ.λ.π DNA. Είναι πάντως απαραίτητο το αρχικό DNA να είναι καθαρό, δηλαδή να μην έχει προσμίξεις από άλλα κυτταρικά συστατικά ή οργανικούς διαλύτες που χρησιμοποιούνται κατά την απομόνωσή του, και να μην είναι αποικοδομημένο. Για τους λόγους αυτούς είναι καλό, πριν χρησιμοποιήσετε το DNA που απομονώσατε σε μια αντίδραση PCR, να ελέγξετε την ποιότητα και την ποσότητά του με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης και μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στα 260 nm. Η ποσότητα DNA που χρησιμοποιείται σε μία PCR κυμαίνεται από 10 – 50 ng ενώ πρέπει να έχουμε υπόψη ότι χρησιμοποίηση μεγάλης ποσότητας αρχικής μήτρας DNA μπορεί να αναστείλει την αντίδραση.

2. Ρυθμιστικό διάλυμα

Το ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) μιας αντίδρασης PCR ρυθμίζει το pH και το ιοντικό περιβάλλον της αντίδρασης ώστε να είναι το βέλτιστο για τη λειτουργία της DNA πολυμεράσης. Το pH ρυθμίζεται στο ~8,5 από την παρουσία Tris-HCl στο ρυθμιστικό διάλυμα ενώ η ιοντική ισχύς παρέχεται από ιόντα K^+ ή Na^+ .

3. Ιόντα Mg^{2+}

Είναι σημαντικό για μια αντίδραση PCR να περιέχει την κατάλληλη συγκέντρωση ιόντων Mg^{2+} καθώς είναι απαραίτητα για τη δράση της DNA πολυμεράσης. Τα ιόντα Mg^{2+} σχηματίζουν σύμπλοκα με τα dNTPs και σταθεροποιούν τις αλληλεπιδράσεις της DNA πολυμεράσης με το DNA και τα dNTPs. Συνήθως βρίσκονται στην αντίδραση σε συγκεντρώσεις 1,5 – 2,0 mM ενώ υψηλότερες

συγκεντρώσεις ιόντων Mg^{2+} αυξάνουν και το σχηματισμό μη ειδικών προϊόντων.

4. Τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια

Τα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια [deoxyriboNucleotide Triphosphates (dNTPs): dATP, dTTP, dGTP, dCTP) παρέχονται στην αντίδραση PCR ως μίγμα όπου το κάθε ελεύθερο νουκλεοτίδιο έχει συγκέντρωση 0,2 mM. Αυξάνοντας τη συγκέντρωση των dNTPs αυξάνεται και η πιθανότητα εισαγωγής λανθασμένου νουκλεοτιδίου.

5. Ειδικό ζεύγος εκκινητών

Οι εκκινητές είναι πολύ σημαντικοί για την επιτυχία μια αντίδρασης PCR καθώς εξασφαλίζουν την ειδικότητά της. Παράγονται συνθετικά ως μικρού μήκους μονόκλιωνα ολιγονουκλεοτίδια και χρησιμοποιούνται συνήθως σε συγκεντρώσεις 0,4 – 0,6 μM , ενώ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις μπορεί να οδηγήσουν σε σχηματισμό μη ειδικών προϊόντων. Οι εκκινητές οριοθετούν το τμήμα DNA που θέλουμε να ενισχύσουμε και επιπλέον κατευθύνουν το σημείο έναρξης της αντιγραφής, καθώς όπως είπαμε προσφέρουν το 3' προεξέχων άκρο που χρειάζεται η DNA πολυμεράση για να προσδεθεί στο DNA και να αρχίσει την αντιγραφή. Η υβριδοποίησή τους γίνεται με βάση τη συμπληρωματικότητα των βάσεων, σχηματίζοντας 3 δεσμούς υδρογόνου μεταξύ G – C και 2 δεσμούς υδρογόνου μεταξύ A –T. Συνήθως τους ονομάζουμε πρόσθιο και ανάστροφο εκκινητή, με τον ένα να υβριδοποιείται στην περιοχή που βρίσκεται στην 3' κατεύθυνση της αλληλουχίας-στόχου στη μια αλυσίδα του DNA και τον άλλο στην 3' κατεύθυνση της αλληλουχίας-στόχου στην άλλη αλυσίδα του DNA.

Κατά το σχεδιασμό τους συνήθως προσπαθούμε να ικανοποιήσουμε τα παρακάτω κριτήρια:

- Εξειδίκευση. Οι εκκινητές πρέπει να είναι ειδικοί για τις αλληλουχίες που πλαισιώνουν την περιοχή-στόχο.
- Μέγεθος 17–30 νουκλεοτίδια.

- Η περιεκτικότητα σε GC να είναι περίπου 50%. Αν κάτι τέτοιο δεν είναι εφικτό, τότε είναι επιθυμητό οι εκκινητές να έχουν μεγαλύτερο μήκος ώστε να μην έχουν χαμηλό σημείο τήξης.
- Η θερμοκρασία τήξης (T_m) των εκκινητών πρέπει να είναι κατάλληλη για θερμοκρασία υβριδοποίησης 50 - 65°C. Η θερμοκρασία τήξης είναι η θερμοκρασία στην οποία το 50% των μορίων DNA βρίσκεται σε μονόκλωνη μορφή και υπολογίζεται από τον εξής τύπο $T_m = 4 \times (G+C) + 2 \times (A+T)$. Από τη θερμοκρασία που προκύπτει από τον παραπάνω κανόνα και αφαιρώντας 5°C υπολογίζουμε τη θερμοκρασία της φάσης υβριδοποίησης. Οι θερμοκρασίες τήξης των δύο εκκινητών πρέπει επίσης να είναι παρόμοιες.
- Να μην υπάρχουν πολλές επαναλήψεις G-C στα άκρα τους καθώς μπορεί να υβριδοποιηθούν μη ειδικά σε περιοχές του DNA πλούσιες σε GC.
- Να μην περιέχουν παλίνδρομες αλληλουχίες.
- Να μην είναι συμπληρωματικοί μεταξύ τους.

Υπάρχουν πλέον εξειδικευμένα διαδικτυακά εργαλεία που βοηθούν στο σωστό σχεδιασμό των εκκινητών (π.χ. primer-blast, www.ncbi.nlm.nih.gov).

6. DNA πολυμεράση

Η ενίσχυση του DNA γίνεται συνήθως από το ένζυμο DNA πολυμεράση I του βακτηρίου *Thermus aquaticus* (Taq πολυμεράση). Ο οργανισμός αυτός ανακαλύφθηκε στις θερμοπηγές του πάρκου Yellowstone και επομένως πολλά από τα ένζυμα που περιέχει, συμπεριλαμβανομένης της DNA πολυμεράσης I, είναι θερμοανθεκτικά.

Η ανθεκτικότητα της συγκεκριμένης DNA πολυμεράσης στις υψηλές θερμοκρασίες που απαιτούνται για την αποδιάταξη της δίκλωνης αλυσίδας του DNA την έχει καταστήσει πολύτιμη για τις αντιδράσεις PCR και έχει επιτρέψει την αυτοματοποίηση της μεθόδου, καθώς μέχρι την ανακάλυψή της χρησιμοποιούνταν μη θερμοανθεκτικές DNA πολυμεράσες, οι οποίες ανανεώνονταν σε κάθε κύκλο της αντίδρασης.

Η Taq πολυμεράση έχει βέλτιστη ενεργότητα επιμήκυνσης στους 75°C – 80°C αλλά συνήθως επιλέγουμε να πραγματοποιήσουμε τη φάση επιμήκυνσης στους 72°C γιατί

σε αυτή τη θερμοκρασία γίνονται λιγότερα λάθη. Η DNA πολυμεράση επιμηκώνει και τους δύο εκκινητές προς την κατεύθυνση της αλληλουχίας-στόχου καθώς η σύνθεση του DNA γίνεται σε κατεύθυνση 5' προς 3'. Η Taq πολυμεράση προσθέτει περίπου 80 – 90 νουκλεοτίδια / δευτερόλεπτο στους 72°C.

Πίνακας 1.1 Εκκινητές ενίσχυσης τμήματος εξωνίου του *L.gasseri*.

Εκκινητής	Αλληλουχία
Gasseri-F	5'-TCA AGA GCT GTT AAG GCT GT -3'
Gasseri-R	5'-CTA TCG CTT CAA GTG CTT TC-3'

Πίνακας 1.2 Εκκινητές ενίσχυσης τμήματος εξωνίου του *L.plantarum*.

Εκκινητής	Αλληλουχία
Plantarum-F	5'-GAA GAT TTG CCC ATC GGT G-3'
Plantarum-R	5'-CGT TTG ATG GTA GCG TTG C -3'

Πίνακας 1.3 Εκκινητές ενίσχυσης τμήματος εξωνίου του *L.acidophilus*.

Εκκινητής	Αλληλουχία
Acidophilus-F	5'-CCT TTC TAA GGA AGC GAA GGA T-3'
Acidophilus-R	5'-ACG CTT GGT ATT CCA AAT CGC -3'

Πίνακας 1.4 Εκκινητές ενίσχυσης τμήματος εξωνίου του *L.reuteri*.

Εκκινητής	Αλληλουχία
Reuteri-F	5'-GAT TGA CGA TGG ATC ACC AGT-3'
Reuteri-R	5'-CAT CCC AGA GTG ATA GCC AA-3'

Πίνακας 1.5 Εκκινητές ενίσχυσης τμήματος εξωνίου του *L.rhamnosus*.

Εκκινητής	Αλληλουχία
Rhamnosus-F	5'-GCC GAT CGT TGA CGT TAG TTG -3'
Rhamnosus-R	5'-CAG CGG TTA TGC GAT GCG AAT-3'

Πίνακας 1.6 Εκκινιτές ενίσχυσης τμήματος εξωνίου του *S.thermophilus*.

Εκκινιτής	Αλληλουχία
S.thermophilus-F	5'-CAC TAT GCT CAG AAT ACA -3'
S.thermophilus-R	5'-CGA ACA GCA TTG ATG TTA-3'

Απόδοση της PCR

Αναφέρθηκε προηγουμένως ότι θεωρητικά και υπό βέλτιστες συνθήκες, στο τέλος κάθε κύκλου μιας αντίδρασης PCR θα υπάρχουν τα διπλάσια μόρια DNA από αυτά που υπήρχαν στην αρχή.

Ο εκθετικός αυτός ρυθμός αύξησης των προϊόντων της PCR αποδίδεται από τον παρακάτω τύπο $N = 2t \times (N_0)$ όπου N = ο αριθμός των αντιγράφων της αλληλουχίας στόχου μετά από t κύκλους $t=0$ αριθμός των κύκλων της αντίδρασης N_0 = ο αριθμός των αρχικών μορίων DNA.

Στην πραγματικότητα ο παραπάνω τύπος δεν ισχύει για όλη τη διάρκεια της αντίδρασης της PCR καθώς υπάρχουν και περιοριστικοί παράγοντες που επηρεάζουν την πορεία της αντίδρασης. Είναι εμφανές ότι μια αντίδραση PCR μπορεί να διακριθεί σε τρία διαφορετικά στάδια. Κατά το πρώτο εκθετικό στάδιο, όλα τα αντιδραστήρια βρίσκονται σε περίσσεια, η αντίδραση είναι πολύ αποτελεσματική και η ποσότητα του DNA διπλασιάζεται σε κάθε κύκλο. Στη γραμμική φάση ο ρυθμός της αντίδρασης μειώνεται καθώς αρχίζει να ελαττώνεται η συγκέντρωση συστατικών όπως τα dNTPs και οι εκκινιτές, και η DNA πολυμεράση αρχίζει να χάνει τη δραστηριότητά της. Στο τέλος η αντίδραση φτάνει σε πλατώ, καθώς τα συστατικά της αντίδρασης έχουν εξαντληθεί και δεν παράγονται πια άλλα προϊόντα.

Ανίχνευση και ταυτοποίηση του προϊόντος της PCR

Για να γίνει ορατό το προϊόν της αντίδρασης και να επιβεβαιωθεί η ειδικότητα του, δηλαδή να διαπιστωθεί αν περιέχονται σε αυτό οι αναμενόμενες αλληλουχίες βάσεων του DNA-προτύπου, χρησιμοποιούνται διάφορες μέθοδοι, όπως:

α) Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος σε πηκτή αγαρόζης και στη συνέχεια χρώση του με τη φθορίζουσα χρωστική βρωμιούχο 3,8-διαμινο-5-αιθυλ-6-φαινυλφαινανθριδίνιο (ethidium bromide). Με τον τρόπο αυτό προσδιορίζεται το μέγεθος του προϊόντος, το οποίο πρέπει να είναι ίδιο με εκείνο του DNA-προτύπου.

β) Ανίχνευση του προϊόντος με χρωματομετρική μέθοδο, π.χ., μέθοδος DIANA (Detect Immobilized Amplified Nucleic Acid)¹¹, μέθοδος CODAF (Colorimetric Detection of Amplicons on Filter)¹², μέθοδος τύπου ELISA¹³ κ.λπ.

γ) Μοριακός υβριδισμός.

δ) Μέθοδος εξακρίβωσης της αλληλουχίας βάσεων (sequencing).

ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ ΤΗΣ PCR

Η "αχίλλειος πτέρνα" της μεθόδου είναι η μεγάλη ευαισθησία της, με συνέπεια την πιθανή λήψη ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων. Αιτία των αποτελεσμάτων αυτών είναι η τυχαία μεταφορά απειροελάχιστης ποσότητας εξωγενούς νουκλεϊκού οξέος από ένα δείγμα σε άλλο με τα εργαλεία, τον αέρα ή τα αντιδραστήρια. Το εξωγενές νουκλεϊκό οξύ μπορεί να προέρχεται ακόμη και από το δέρμα των χεριών του εκτελεστή της μεθόδου.

Το νουκλεϊκό αυτό οξύ μπορεί να χρησίμευει ως μήτρα κατά την αντιγραφή, αντί του επιθυμητού πρότυπου. Ο κίνδυνος τέτοιας "μόλυνσης" είναι ακόμη μεγαλύτερος σε περίπτωση που εφαρμόζεται διπλή PCR. Για την αποφυγή της

"μόλυνσης" των δειγμάτων λαμβάνοντας διάφορα μέτρα, τα οποία αναφέρονται από τους Wright και Wynford-Thomas 15.

Περισσότερες λεπτομέρειες σχετικά με τη βασική μεθοδολογία της PCR, τις παραλλαγές της και τις παραμέτρους που επηρεάζουν την ειδικότητα της και την απόδοση της σε προϊόν αναφέρονται σε διάφορα εγχειρίδια, στα οποία μπορεί κάνεις ακόμη να βρει βασικές εφαρμογές της μεθόδου στη γενετική, στην ιατρική, στην ιατροδικαστική και σε διάφορα άλλα πεδία έρευνας.

Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης είναι η ευρύτερα χρησιμοποιούμενη μέθοδος διαχωρισμού, χαρακτηρισμού και απομόνωσης τμημάτων DNA. Τα νουκλεϊκά οξέα μετακινούνται στο πήκτωμα αгарόζης μέσω της επίδρασης ηλεκτρικού πεδίου, ανάλογα με το μοριακό τους μέγεθος. Πιο συγκεκριμένα, τα νουκλεϊκά οξέα που είναι αρνητικά φορτισμένα σε ουδέτερο pH, λόγω των φωσφορικών ομάδων που υπάρχουν στον φωσφοδιεστερικό σκελετό, μετακινούνται προς την άνοδο με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη προς το μέγεθος τους (τα μικρότερα μόρια κινούνται γρηγορότερα σε σχέση με τα μεγαλύτερα). Έτσι, επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των μορίων. Η συγκέντρωση της αгарόζης καθορίζει το μέγεθος των πόρων που θα σχηματιστούν στο πήκτωμα (Campbell and Reece, 2010). Καθώς κινούνται, τα μόρια DNA σχηματίζουν χαρακτηριστικές ζώνες σε διαφορετικές περιοχές στο πήκτωμα αгарόζης. Οι ζώνες δεν είναι ορατές κατά την πορεία της ηλεκτροφόρησης. Για να γίνουν ορατές, χρειάζεται η προσθήκη στο πήκτωμα αгарόζης μιας χρωστικής που δεσμεύεται στα μόρια του DNA (EtBr) και φθορίζει όταν θα εκτεθεί στο μηχάνημα της υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) (Campbell and Reece, 2010). Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης χρησιμοποιείται και για τον ποσοτικό προσδιορισμό δειγμάτων DNA σε συγκριτικά με κάποιον ποσοτικοποιημένο μαρτυρά (ladder), ο οποίος περιέχει κομμάτια DNA γνωστού μεγέθους και συγκέντρωσης), για τον προσδιορισμό της ποιότητας και της καθαρότητας του DNA και για τη σύγκριση ποσοτήτων δειγμάτων DNA ή RNA μεταξύ τους (Campbell and Reece, 2010). Η ποσοτικοποίηση στηρίζεται στην οπτική εκτίμηση του φθορισμού που παράγεται από

τα μόρια του EtBr υπό UV φως. Το EtBr έχει την ικανότητα να ενσωματώνεται στα νουκλεϊκά οξέα σε ποσότητα ανάλογη της συγκέντρωσης τους. Με αυτόν τρόπο μέσω της σύγκρισης του φθορισμού που εκπέμπεται από τα άγνωστα δείγματα με τον φθορισμό που εκπέμπει το δείγμα γνωστής συγκέντρωσης και μεγέθους (σύγκριση της έντασης της ζώνης του υπό εξέταση μορίου DNA σε σχέση με την ένταση των ζωνών του DNA αναφοράς), επιτυγχάνουμε την ποσοτικοποίηση των αγνώστων δειγμάτων (Campbell and Reece, 2010).

Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης 1,8%

§ Ζυγίζονται 1,8g αγαρόζης, τοποθετούνται σε κωνική φιάλη των 500 ml και προστίθενται 10 ml TBE και 80 ml απεσταγμένο νερό.

§ Τοποθετείται σε φούρνο μικροκυμάτων την κωνική φιάλη και την αφήνουμε μέχρι να λιώσει η αγαρόζη και να δημιουργηθεί ένα διαφανές διάλυμα.

§ Αφήνεται το διάλυμα να κρυώσει μέχρι τους 60 °C και προσθέτουμε 10ml βρωμιούχο αιθίδιο (Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι ισχυρό μεταλλαξογόνο και μέτρια τοξικό. Απαραίτητη η χρήση γαντιών όταν χρησιμοποιούνται διαλύματα που περιέχουν αυτή την χρωστική)

§ Τοποθετούμε το πλαστικό χτενάκι πάνω από τον πλαστικό δίσκο, ώστε όταν προστεθεί το διάλυμα της αγαρόζης να σχηματιστούν πηγαδάκια. Το διάλυμα της αγαρόζης τοποθετείται προσεκτικά μέσα στο δίσκο ώστε να μην δημιουργούνται φυσαλίδες.

§ Ο δίσκος τοποθετείται στο ψυγείο έως ότου πήξει για περίπου 20 λεπτά, αφαιρούμε την χτένα και τοποθετούμε τον δίσκο μέσα στη συσκευή της ηλεκτροφόρησης.

§ Με τη βοήθεια πιπέτας φορτώνουμε σε κάθε εγκοπή της πηκτής αγαρόζης 15 μl, κατά σειρά από τα δείγματα και 7 μl ladder. Στο πρώτο πηγαδάκι φορτώνουμε μίγμα της χρωστικής με το DNA του θετικού μαρτύρα.

§ Κλείνουμε τη συσκευή και επιλέγουμε τη φορά του πεδίου, έτσι ώστε το DNA να μετακινείται προς την άνοδο (+). Η ηλεκτροφόρηση γίνεται υπό σταθερή τάση 170 V για 20 min.

§ Κλείνουμε το ρεύμα, βγάζουμε την πηκτή και το εξετάζουμε κάτω από U.V. φως. Βγάζουμε φωτογραφίες. Η φωτογράφιση των προϊόντων της ηλεκτροφόρησης γίνεται με χρήση ψηφιακής κάμερας, η οποία είναι συνδεδεμένη με ηλεκτρονικό υπολογιστή, οπότε είναι δυνατή η επεξεργασία της με χρήση ειδικού λογισμικού προγράμματος.

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟ ΜΕΡΟΣ

Επιλέχθηκαν 10 προβιοτικά του εμπορίου, για εξέταση των προβιοτικών τους ιδιοτήτων σύμφωνα με τη δράση των βακτηρίων που υπάρχουν στο καθένα. Κύριος στόχος της παρούσας ανάλυσης είναι ο έλεγχος της ύπαρξης στα εν λόγω σκευάσματα, των αντίστοιχων οξυγαλακτικών βακτηρίων που αναγράφονται στη κάθε συσκευασία. Ακόμα πραγματοποιείται ανίχνευση για πιθανή ύπαρξη βακτηρίων που δεν επισημαίνεται η παρουσία τους στο φάρμακο. Στη συνέχεια, αφού εντοπιστούν και ταυτοποιηθούν τα οξυγαλακτικά βακτήρια και ο αριθμός τους, που αποτελούνται τα προβιοτικά μας, σειρά έχει ο πρακτικός έλεγχος για τη βιωσιμότητά τους σε συνθήκες στομάχου (όξινες – PH=1-2) .

Διαδικασία ταυτοποίησης των βακτηρίων στα προβιοτικά:

Δημιουργούνται αρχικά δείγματα για τα 10 προβιοτικά που θα ασχοληθούμε. Θρυμματίζονται τα χάπια μέσα σε σωληνάκια που περιέχουν υγρό θρεπτικό υπόστρωμα MRS που παρασκευάσαμε, το οποίο είναι εκλεκτικό για τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος όπου και μελετάμε. Αφού τοποθετηθούν στον κλίβανο για επώαση, αφήνονται εκεί για τουλάχιστον ένα 24ωρο ώστε να υπάρξει ανάπτυξη. Όταν παρατηρηθεί θόλωμα (ανάπτυξη), με μία πιπέτα λαμβάνονται 100μl από το κάθε δείγμα και γίνεται επίστρωση σε τρυβλία για εκ νέου ανάπτυξη και δημιουργία αποικιών.

Τα τρυβλία επωάζονται αντίστοιχα στον κλίβανο για άλλο ένα 24ωρο. Σε αυτό το σημείο εάν υπάρχει δυσκολία ανάπτυξης , δηλαδή δεν δημιουργούνται ορατές αποικίες, πολύ πιθανό να αναφερόμαστε σε αναερόβια βακτήρια, και συνεπώς είναι ανάγκη να φτιάξουμε τις κατάλληλες συνθήκες όπου θα ευνοήσουν στον πολλαπλασιασμό τους. Όταν έχουν διευθετηθεί οι παράγοντες αυτοί και έχουμε το επιθυμητό αποτέλεσμα ανάπτυξης των βακτηρίων, επιλέγονται κάποιες αποικίες από το κάθε τρυβίο, και γίνεται πάλι επίστρωση σε καινούρια τρυβλία. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται για άλλους δύο με τρεις κύκλους ανάπτυξης.

Οι επιπλέον καλλιέργειες μας βοηθάνε στον διαχωρισμό των βακτηρίων που μας ενδιαφέρουν από τυγχόν επιμολύνσεις. Στη συνέχεια αφού έχει προηγηθεί η παραπάνω διαδικασία, σειρά έχει η απομόνωση DNA από μία επιλεγμένη αποικία από

το κάθε τρυβλίο ξεχωριστά. Με αυτό τον τρόπο μπορούμε να εξασφαλίσουμε όσο το δυνατόν πιο καθαρό DNA από τα οξυγαλακτικά βακτήρια. Το απομονωμένο DNA αποθηκεύεται στην κατάψυξη για τις μελλοντικές αναλύσεις που θα γίνουν.

Παρασκευή συνθετικού θρεπτικού ανάπτυξης (στερεή και υγρή καλλιέργεια)

Για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των βακτηρίων ώστε να μπορούμε να τα μελετήσουμε και να τα ταυτοποιήσουμε χρησιμοποιήθηκε MRS άγαρ, ένα θρεπτικό υλικό όπου αποτελεί εκλεκτικό μέσο καλλιέργειας όπου έχει σχεδιαστεί για να ευνοεί την πλούσια ανάπτυξη των Lactobacilli για εργαστηριακή μελέτη. Περιέχει οξικό νάτριο, το οποίο καταστέλλει την ανάπτυξη πολλών ανταγωνιστικών βακτηρίων (αν και κάποιοι άλλοι Lactobacillales, όπως ο Leuconostoc και ο Pediococcus, μπορεί να αναπτυχθούν). Αυτό το μέσο έχει ένα καθαρό καφέ χρώμα.

Αρχικά, η ανάπτυξη γίνεται σε υγρή καλλιέργεια δηλαδή χρησιμοποιούμε σκεύασμα MRS Broth , το οποίο κατείχε την ίδια σύσταση με το MRS Agar εκτός από το άγαρ. Για την παραγωγή του, σε δοκιμαστικό σωλήνα του 1L μετράω 500ml απιονισμένο νερό. Έπειτα ζυγίζω 26g σκόνης MRS και το μεταφέρω σε μπουκάλι μαζί με το νερό για ανάδευση. Το μεταφέρω στο φούρνο μικροκυμάτων έως ότου λιώσει η σκόνη και με μία γυάλινη ράβδο διαλύω τυχόν σβόλους που έχουν δημιουργηθεί. Ακολουθεί αποστείρωση σε αυτόκαυστο για 15 min στους 121°C (πίεση 1,5-2 atm).

8. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Συσκευές

- ο Αναλυτικός ζυγός
- ο Συσκευή ηλεκτροφόρησης
- ο Τροφοδοτικό ηλεκτροφόρησης
- ο Φυγόκεντρος
- ο Αυτόματες ρυθμιζόμενες μικροπιπέτες- PIPETMAN GILSON Classic (20μl,200μl)
- ο Συσκευή με λάμπα UV
- ο Φασματοφωτόμετρο
- ο Θερμομπλόκ
- ο Θερμοκυκλοποιητής
- ο Συσκευή Vortex
- ο Φούρνος μικροκυμάτων

Υλικά

- ο Κωνική φιάλη των 250 μl
- ο Ογκομετρικοί κύλινδροι των 100 ml
- ο Πλαστικά eppendorf των 1.5 ml
- ο Πλαστικά tips
- ο PCR tubes
- ο PCR plates
- ο Γάντια
- ο Αγαρόζη
- ο Δείγματα DNA

ο Μάρτυρας μοριακών μεγεθών (ladder DNA 50,100 bp)

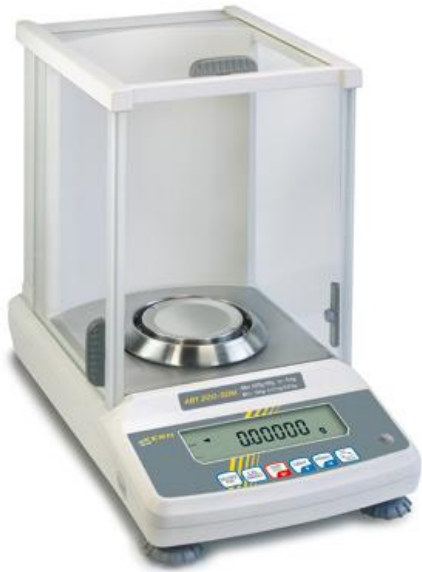
Διαλύματα

ο Ρυθμιστικό διάλυμα TBE 10x

ο Διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) 10 mg/ml

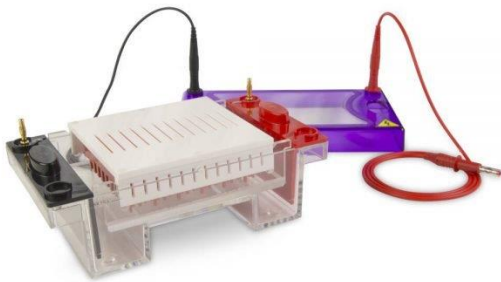
ο Υγρό ηλεκτροφόρησης (για την παρασκευή 300 ml διαλύματος προσθέτουμε 30ml

TBE και 270 ml απεσταγμένο νερό)



Εικόνα 3

Μοντέλο	Precisa-202A
Εταιρία	Precisa
Χώρα Προέλευσης	Γερμανία



Εικόνα 4

Μοντέλο	MultiSUB Midi-96
Εταιρία	Clever Scientific
Χώρα Προέλευσης	Ηνωμένο Βασίλειο



Εικόνα 5

Μοντέλο	Lively 300V Power Supply, MP-310
Εταιρία	Major Science
Χώρα προέλευσης	Η.Π.Α



Μοντέλο	SL 16 Centrifuge
Εταιρία	Thermo Scientific™
Χώρα Προέλευσης	Ελλάδα

Εικόνα 6



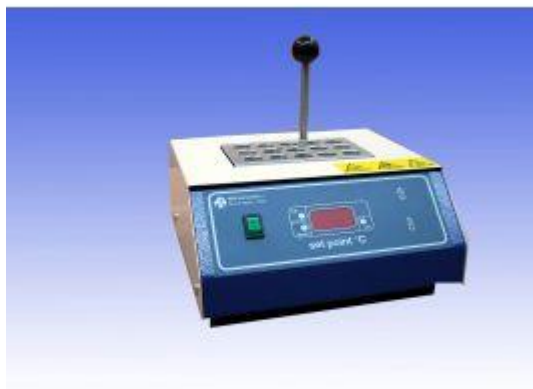
Μοντέλο	MiniBis Pro
Εταιρία	Bio Imaging Systems
Χώρα Προέλευσης	Ισραήλ

Εικόνα 7



Μοντέλο	Epoch™ Microplate Spectrophotometer
Εταιρία	Biotek
Χώρα Προέλευσης	Η.Π.Α

Εικόνα 8



Μοντέλο	M503-HBD
Εταιρία	Artiglass
Χώρα Προέλευσης	Ιταλία

Εικόνα 9



Μοντέλο	Veriti Dx Thermal Cycler
Εταιρία	Thermo Fisher Scientific
Χώρα Προέλευσης	Αυστρία

Εικόνα 10



Μοντέλο	Vortex V-1 plus
Εταιρία	Biosan
Χώρα Προέλευσης	Λετονία

Εικόνα 11

Απομόνωση των γαλακτικών βακτηρίων

Σε σωληνάκια που περιέχουν θρεπτικό broth, τοποθετώ τα δισκία αφού πρώτα τα έχω θρυμματίσει σε σκόνη, και έπειτα τα μεταφέρω στο stomacher για να γίνει ανάδευση. Τα δείγματα είναι έτοιμα για επώαση στον κλίβανο όπου μένουν για τουλάχιστον 24h. Μετά την επώαση παρατηρείται θολερότητα γεγονός που υποδεικνύει μεγάλη ανάπτυξη.

Ακολουθεί καλλιέργεια σε τρυβλία με θρεπτικό MRS agar αυτή τη φορά. Με μία πιπέτα παίρνω 100μl από κάθε σωληνάκι και επιστρώνω στα τρυβλία αντίστοιχα για το κάθε δείγμα. Επίσης μπαίνουν στον κλίβανο για εκ νέου ανάπτυξη και δημιουργία αποικιών (επώαση στους 30°C για 3 μέρες). Στη συνέχεια, απομονώθηκαν μονήρεις αποικίες γαλακτικών βακτηρίων με τη βοήθεια στυλεού.

Η διαδικασία της απομόνωσης ξεκινάει ως εξής :

Αρχικά, πραγματοποιείται απομόνωση DNA απευθείας από τον θρεπτικό ζωμό (υγρή καλλιέργεια). Μία ποσότητα από το κάθε δείγμα που βρίσκονται στα σωληνάκια μεταφέρεται σε ependorff και έπειτα τοποθετούνται στη φυγόκεντρο για 10 min.

Γίνεται διαχωρισμός των δύο φάσεων όπου και απορρίπτεται το υπερκείμενο υγρό που βρίσκεται πάνω, κρατώντας μόνο τη σκόνη που μένει στον πάτο. Εκεί υπάρχουν τα κύτταρα που μας ενδιαφέρουν.

Ακολουθεί προσθήκη 100μl νερό, 3μl πρωτεϊνάση και 100 μl Lysis Buffer. Αναδεύονται στο vortex. Τοποθετούνται στη συνέχεια στο θερμομπλόκ όπου θερμαίνεται τα δείγματα στους 56°C για 10 min. Αφού ζεσταθούν, γίνεται προσθήκη 400μl Blinding Buffer, μεταφέρονται σε στήλες και ύστερα στη φυγόκεντρο πάλι για 1 min. Το διήθημα πετιέται – βρίσκεται στο εξωτερικό σωληνάκι. Προστίθενται 500μl Wash Buffer και μπαίνουν στην φυγόκεντρο.

Επαναλαμβάνεται η διαδικασία με απόρριψη του διηθήματος, προσθήκη 500μL και ξανά αφαίρεση του διηθήματος. Έπειτα γίνεται dry silica αυτή τη φορά (καμία προσθήκη στα δείγματα). Τα δείγματα προ ζεσταίνονται στους 60°C και προστίθενται 100μl Elution Buffer (αποδεσμεύει το DNA από τη στήλη). Πραγματοποιείται μια τελευταία φυγοκέντριση όπου το υγρό διήθημα δεν πετιέται καθώς εκεί βρίσκεται το DNA. Το εν λόγω υγρό μεταφέρεται σε καθαρά ependorh και συντηρείται στην κατάψυξη.

Για τον έλεγχο της καθαρότητας και ποσότητας του DNA που απομονώθηκε, χρησιμοποιείται το epoch, όπου γίνεται φωτομέτρηση των δειγμάτων. Πριν γίνει η φωτομέτρηση η πλάκα καθαρίζεται με ισοπροπανόλη. Ακολουθεί η φωτομέτρηση των δειγμάτων όπου δίνεται ιδιαίτερη προσοχή ώστε η φυσαλίδα να βρίσκεται ακριβώς στο σημάδι. Τα αποτελέσματα δείχνουν ικανοποιητική καθαρότητα και ποσότητα DNA.

Διαδικασία PCR για το κάθε δείγμα :

1^η δοκιμή PCR: για τα δείγματα 1, 2, 3, 4 για έλεγχο ύπαρξης *Lactobacillus reuteri*

Αποτελέσματα: θετικό για τα 1,2,3 και αγνό για το 4

2^η δοκιμή PCR: για τα δείγματα 1,2,3,4 για έλεγχο ύπαρξης *Lactobacillus acidophilus*

Αποτελέσματα: θετικό για τα 3,4 και αρνητικό για τα 1,2

3^η δοκιμή PCR (multiplex) : για τα δείγματα 1,3 για έλεγχο ύπαρξης *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus gasseri* και *Lactobacillus plantarum*

Αποτελέσματα: ύπαρξη και των Lactobacillus plantarum και Lactobacillus gasseri (δεν αναγράφεται στη συσκευασία) στο 3 και κανένα από αυτά στο 1 (αναμενόμενο καθώς κανένα από αυτά δεν αναγράφεται ότι υπάρχει στο σκεύασμα).

4^η δοκιμή PCR (multiplex) : για τα δείγματα 1,3 για έλεγχο ύπαρξης *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Streptococcus thermophilus*

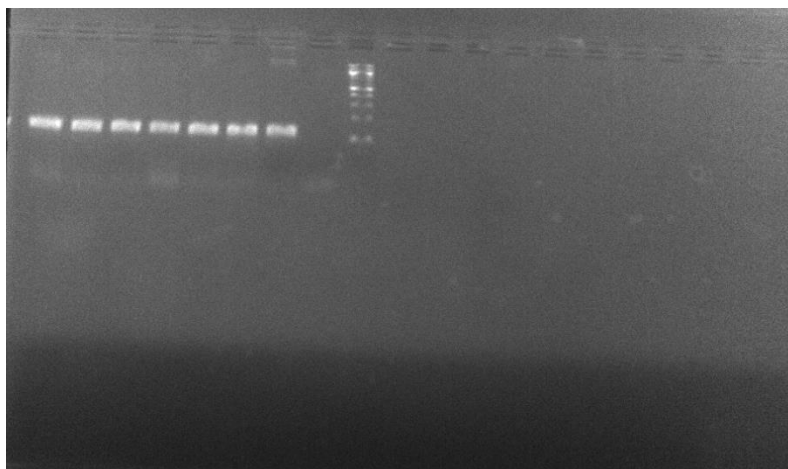
Αποτελέσματα: ύπαρξη μόνο Lactobacillus rhamnosus στο 1, αρνητικό για Lactobacillus acidophilus (αναγράφεται ότι υπάρχει στη συσκευασία) και το 3 βγήκε θετικό για Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus rhamnosus και αρνητικό για Streptococcus thermophilus (αναγράφεται η ύπαρξή του).

5^η δοκιμή PCR (multiplex) : για τα δείγματα 1,2,3,4,6,7,8,9,10 για έλεγχο ύπαρξης *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus reuteri* και *Lactobacillus plantarum*

Πίνακας 2 Αποτελέσματα PCR

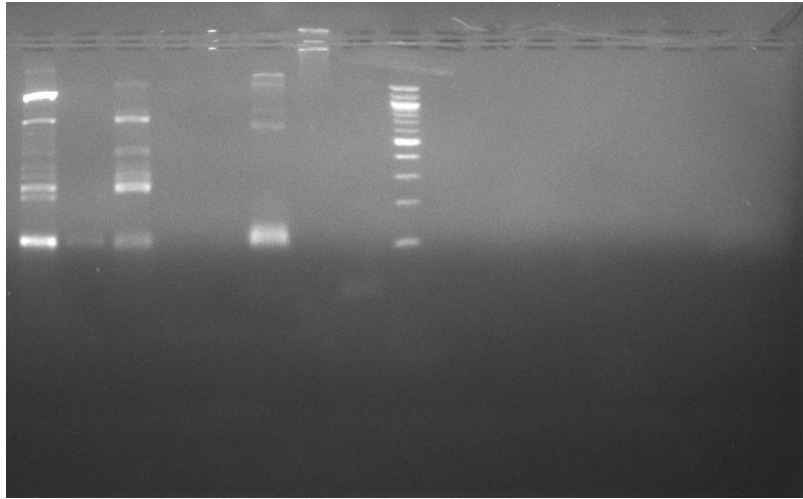
ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΑ		PCR
1	Lactobacillus acidophilus	-
	Lactobacillus rhamnosus	+
	Lactobacillus casei	
2	Lactobacillus reuteri	+
3	Lactobacillus acidophilus	+
	Lactobacillus rhamnosus	+
	Streptococcus thermophiles	-
	Lactobacillus plantarum	+
3	Lactobacillus gasseri	-
5	Lactobacillus acidophilus	+
6	Lactobacillus acidophilus	+
	Lactobacillus plantarum	+
7	Lactobacillus reuteri	+
8	Lactobacillus crispatus	
	Lactobacillus reuteri	+
	Lactobacillus acidophilus	+
	Lactobacillus rhamnosus	+
	Lactobacillus gasseri	-
9	Lactobacillus acidophilus	+
	Lactobacillus plantarum	-
10	Lactobacillus rhamnosus	+

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Εικόνα 12.1 Αποτελέσματα ανάλυσης PCR απομονωμένων αποικειών από καλλιέργειες προβιοτικών που αναγράφεται ότι εμπεριέχουν Lactobacillus rhamnosus (3,6,8,10) για ανίχνευση ύπαρξής του σε πηκτή αγαρόζης 3% w/v με χρώση βρωμιούχου αιθιδίου. Στην ηλεκτροφόρηση διακρίνεται η παρουσία του L.rhamnosus στα σημεία που εμφανίζεται μονή ζώνη στις 1100 βάσεις.

- 1- DNA απομονωμένης αποικίας από καλλιέργεια του προβιοτικού 3
- 2- DNA απομονωμένης αποικίας από καλλιέργεια του προβιοτικού 6
- 3- DNA διαφορετικής απομονωμένης αποικίας από καλλιέργεια του προβιοτικού 6
- 4- DNA απομονωμένης αποικίας από καλλιέργεια του προβιοτικού 8
- 5- DNA διαφορετικής απομονωμένης αποικίας από καλλιέργεια του προβιοτικού 8
- 6- DNA απομονωμένης αποικίας από καλλιέργεια του προβιοτικού 10
- 7- DNA απομονωμένης αποικίας από καθαρή καλλιέργεια Lactobacillus rhamnosus
- 8- Negative control
- 9- Ladder



Εικόνα 12.2 Αποτελέσματα ανάλυσης multiplex PCR απομονωμένων καλλιιεργειών των προβιοτικών που αναγράφεται ότι εμπεριέχουν *Lactobacillus acidophilus* και *Lactobacillus plantarum* (3,5,6,8,9) για ανίχνευση ύπαρξής τους σε πηκτή αγαρόζης 3% w/v με χρώση βρωμιούχου αιθιδίου. Στην ηλεκτροφόρηση διακρίνεται η παρουσία του *L.acidophilus* στα σημεία που εμφανίζεται μονή ζώνη στις 129 βάσεις, και του *L.plantarum* στα σημεία που εμφανίζεται μονή ζώνη στις 950 βάσεις.

- 1- DNA απομονωμένης αποικίας από καλλιέργεια του προβιοτικού 3
- 2- DNA απομονωμένης αποικίας από καλλιέργεια του προβιοτικού 5
- 3- DNA απομονωμένης αποικίας από καλλιέργεια του προβιοτικού 6
- 4- DNA απομονωμένης αποικίας από καλλιέργεια του προβιοτικού 8
- 5- DNA απομονωμένης αποικίας από καλλιέργεια του προβιοτικού 9
- 6- DNA απομονωμένης αποικίας από καθαρή καλλιέργεια *Lactobacillus acidophilus*
- 7- DNA απομονωμένης αποικίας από καθαρή καλλιέργεια *Lactobacillus plantarum*
- 8- Negative control
- 9- Ladder

Πειραματική διαδικασία προσομοίωσης συνθηκών στομάχου

Τελικό στάδιο της παρούσας ερευνητικής πτυχιακής εργασίας είναι η δημιουργία και αναπαράσταση συνθηκών στομάχου ώστε να παρατηρήσουμε όσο το δυνατόν καλύτερα κάθε στάδιο της πέψης των προβιοτικών σκευασμάτων που χορηγούνται στον καταναλωτή.

Το στάδιο αυτό πραγματοποιείται με σκοπό την εξακρίβωση και τον εντοπισμό των βακτηρίων που επιβιώνουν στις ισχυρά όξινες συνθήκες που υπάρχουν στο στομάχι, καθώς και τη οξυγαλακτική τους δράση με τον πολλαπλασιασμό τους.

Αρχικά, πρώτο βήμα αυτού του πειράματος, αποτελεί η δημιουργία του υγρού που βρίσκεται στον ανθρώπινο στόμαχο δηλαδή το γαστρικό υγρό.

Παρασκευή γαστρικού υγρού

Προκειμένου να παρασκευαστεί στο εργαστήριο γαστρικό υγρό που να προσομοιάζει το πραγματικό ανθρώπινο γαστρικό υγρό, στηριχθήκαμε στο πρωτόκολλο των M.J.Ferrua και R.P.Sigh (2015).

- 1) Σε αναλυτικό ζυγό ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων ζυγίστηκαν : 0,1094g πεψίνης, 0,1532g γαστρικής βλεννίνης (mucin) της εταιρίας SIGMA και 0,8154g NaCl (χλωριούχου νατρίου) και τοποθετήθηκαν σε κωνική φιάλη
- 2) Οι ποσότητες αυτές διαλύθηκαν σε 100 ml απεσταγμένου νερού
- 3) Στη συνέχεια, το PH του διαλύματος ρυθμίστηκε στο 2,3 με προσθήκη μικρής ποσότητας διαλύματος HCL 2M (11,41ml) ,που παρασκευάστηκε με αραιώση πυκνού διαλύματος HCL 37% 10M. Η παρασκευή του αραιότερου διαλύματος HCL έγινε στα 150ml όπου χρησιμοποιήθηκαν 15ml HCL και 135ml απεσταγμένου νερού.
- 4) Για τον εντοπισμό του PH του παραγόμενου διαλύματος χρησιμοποιήθηκε πεχαμετρικό χαρτί καθώς και πεχάμετρο για πιο ακριβή αποτελέσματα.

Αφού έχει παραχθεί το γαστρικό υγρό, για προσομοίωση των συνθηκών του στομάχου, ακολουθεί η προσθήκη κάθε προβιοτικού ξεχωριστά σε μια ποσότητα του εν λόγω υγρού, σε θερμοκρασία σώματος δηλαδή 37°C.

Λαμβάνονται δέκα falcon, καθώς τόσα είναι και τα προβιοτικά που μελετώνται, και έπειτα τοποθετείται θρυμματισμένο (σε μορφή σκόνης) ένα δισκίο στο κάθε ένα

ξεχωριστά. Έπειτα προστίθενται 25ml γαστρικού υγρού σε όλα τα falcon. Μεταφέρονται στη συνέχεια σε υδατόλουτρο που είναι ρυθμισμένο στους 37°C για παραμονή τους σε αυτές τις συνθήκες για 4 ώρες. Ύστερα από 4 ώρες αφαιρούνται από το υδατόλουτρο και λαμβάνεται μια μικρή ποσότητα από όλα τα προβιοτικά (100μl) η οποία επιστρώνεται σε τρυβλία, όπου θα ακολουθήσει επώαση για 2 ημέρες. Ύστερα από δύο ημέρες λαμβάνονται τα αποτελέσματα των καλλιεργειών των προβιοτικών μετά την προσθήκη τους στο γαστρικό υγρό.

Πίνακας 3 ποτελεσμάτων καλλιεργειών

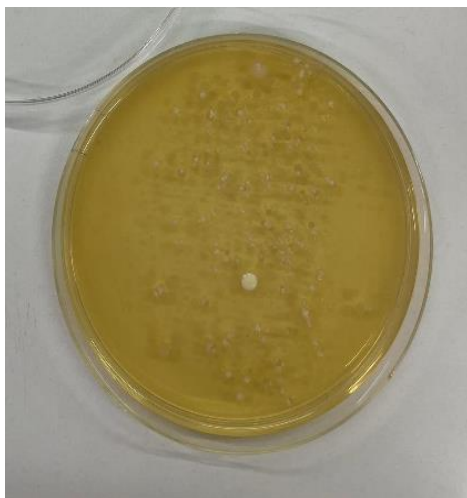
ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΑ	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ
1	-
2	-
3	-
4	Μικρή ανάπτυξη
5	Πολύ μικρή ανάπτυξη
6	-
7	-
8	Μικρή ανάπτυξη
9	-
10	-

ΓΑΣΤΡΙΚΟ ΥΓΡΟ – ΦΩΤΟΓΡΦΙΑ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ



Εικόνα 13.1 γαστρικό υγρό σε ογκομετρική φιάλη 1L

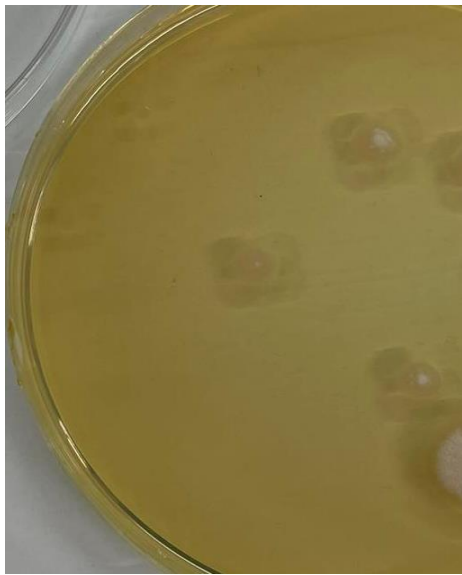
Εικόνες των προβιοτικών που αναπτύχθηκαν μετά την προθήκη και παραμονή τους στο γαστρικό υγρό



Εικόνα 13.2 ανάπτυξη προβιοτικού 2



Εικόνα 13.3 ανάπτυξη προβιοτικού 2



Εικόνα 13.4 ανάπτυξη προβιοτικού 2

9. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκαν πειράματα με στόχο τη μελέτη της δράσης διαφόρων προβιοτικών σκευασμάτων του εμπορίου όταν καταναλωθούν από τον άνθρωπο. Ως γνωστόν, τα προβιοτικά στην τεχνητή του μορφή δηλαδή ως χάπι, συνηθίζεται να λαμβάνεται συνδυαστικά με κάποια φαρμακευτική αγωγή, εξασφαλίζοντας έτσι με αυτό τον τρόπο την προστασία της εντερικής χλωρίδας. Ωστόσο, ύστερα από πολύωρες και χρονοβόρες διαδικασίες ανάλυσης της των εν λόγω φαρμακευτικών συμπληρωμάτων, αποδुकνύεται η μη αποτελεσματικότητά τους, καθώς τα βακτήρια που εμπεριέχονται (μιλώντας για βακτήρια του γαλακτικού οξέος), αδυνατούν να επιβιώσουν ύστερα από την πέψη τους στις συνθήκες του στομάχου, και κατ' επέκταση να μην καταφθάνουν ποτέ στη περιοχή του εντέρου παρά μονάχα ελάχιστη ποσότητα αυτών, που κρίνεται αναποτελεσματική. Η ευεργετική δράση των προβιοτικών πιθανόν να οφείλεται και στη συνεργιστική δράση και με άλλα θρεπτικά συστατικά (αντιοξειδωτικά, βιταμίνες, μέταλλα). Είναι προφανές λοιπόν ότι απαιτούνται περισσότερες κλινικές και επιδημιολογικές μελέτες ώστε να διερευνηθούν με μεγαλύτερη σαφήνεια οι ενδεχόμενοι μηχανισμοί δράσης διαφόρων φαρμακευτικών παρασκευασμάτων που εμπεριέχουν προβιοτικά στη σύσταση του σώματος. Μπορεί να εξαχθεί λοιπόν ένα ασφαλές και εύλογο συμπέρασμα όσον αφορά την μερίδα των ανθρώπων που επιλέγουν την κατανάλωση προβιοτικών ως χάπι για προληπτικούς λόγους. Είναι ασφαλώς μία καλύτερη επιλογή όπως και πιο υγιεινή να λαμβάνει κανείς τις ευεργετικές ιδιότητες των προβιοτικών οργανισμών από τρόφιμα όπως για παράδειγμα γιαούρτι, κεφίρ, ξινόγαλα, μαύρες-πράσινες ελιές κλπ. Η αποτελεσματικότητα των προβιοτικών βακτηρίων ενισχύεται όταν αυτά προσλαμβάνονται με τρόφιμα. Το είδος του τροφίμου παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του αποικισμού των μικροοργανισμών στο γαστρεντερικό σωλήνα του ανθρώπου.

10. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Κώδικας Τροφίμων, Ποτών και Αντικειμένων Κοινής Χρήσης, (2009), Μέρος Α, Άρθρο 80, Έκδοση 4.
2. Μάντης, Α.Ι., (2000), Υγιεινή και τεχνολογία του γάλακτος και των προϊόντων του. Κυριακίδης.
3. Albertini, B., Vitali, B., Passerini, N., Cruciani, F., Di Sabatino, M., Rodriguez, L., Brigidi, P., (2010), Development of microparticulate systems for intestinal delivery of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis*, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, Volume 40, Issue 4, Pages 359-366.
4. Anal, Anil & Singh, Harjinder, (2007), Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science & Technology*. 18. 240-251.
5. Anjani, K., Iyer, C., Kailasapathy, K., (2004), Survival of co-encapsulated complementary probiotics and prebiotics in yoghurt. *Milchwissenschaft* 59:396–399
6. Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M., & Scher, J. (2011), Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering*, 104(4), 467483.
7. Champagne, C.P., Fustier, P., (2007), Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Food Biotechnology*, 18, 184-190.
8. Champagne, C. P., & Kailasapathy, K. (2008), Encapsulation of probiotics. *Delivery and Controlled Release of Bioactives in Foods and Nutraceuticals*,

344–369.

9. Champagne, C.P., Ross, R.P., Saarela, M., Hansen, K.F., Charalampopoulos, D., (2011), Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices, *International Journal of Food Microbiology*, Volume 149, Issue 3, Pages 185-193.

10. Chandan, R.C., (2006), Milk composition, physical and processing characteristics. *Manufacturing yogurt and fermented milks*.

11. Chávarri, M., Marañón, I., Ares, R., Ibáñez, F.C., Marzo, F., Villarán, M.C., (2010), Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions, *International Journal of Food Microbiology*, Volume 142, Issues 1–2, Pages 185-189.

12. Chen, M.J., & Chen, K.N., (2007), Applications of Probiotic Encapsulation in Dairy Products, in *Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems* (ed J. M. Lakkis), Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA.

13. Collins English Dictionary, (2012)

14. Cook, M.T., Tzortzis, G., Charalampopoulos, D., Khutoryanskiy, V.V., (2012), Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery, *Journal of Controlled Release*, Volume 162, Issue 1, Pages 56-67.

15. De Prisco, A., Mauriello, G., (2016), Probiotication of foods: A focus on microencapsulation tool, *Trends in Food Science & Technology*, Volume 48, Pages 27-39.

16. Ding, W.K., Shah, N.P., (2007), Acid, bile, and heat tolerance of free and microencapsulated probiotic bacteria. *Journal of Food Science*