

**ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ
ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ**

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Προβιοτικά, πρεβιοτικά, συμβιωτικά και υγεία. Εκτίμηση
της αποτελεσματικότητας των παραπάνω στην πρόληψη
ασθενειών»**



Όνομ/μο: Αθανασοπούλου Χριστίνα

A.M:2002001

Επιβλέπων καθηγητής: Βαρζάκας Θεόδωρος

ΚΑΛΑΜΑΤΑ, 2007

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	σελ.1
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	
ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΑ ΠΡΕΒΙΟΤΙΚΑ ΚΑΙ Η ΥΓΕΙΑ ΣΤΟ ΕΝΤΕΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ	
1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	σελ.2
1.2. ΙΣΤΟΡΙΑ ΤΗΣ ΚΑΘΟΡΙΣΜΕΝΗΣ ΕΝΝΟΙΑΣ ΤΩΝ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ	σελ.3
1.3 ΑΠΟ ΠΟΥ ΠΡΟΕΡΧΟΝΤΑΙ ΤΑ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ.....	σελ.8
1.4 ΚΑΘΟΡΙΖΟΝΤΑΣ ΤΗΝ ΕΝΝΟΙΑ ΠΡΕΒΙΟΤΙΚΑ	σελ.10
1.5 ΤΥΠΟΙ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΠΡΕΒΙΟΤΙΚΩΝ ΚΑΙ Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥΣ ΣΤΗΝ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ ΕΝΤΕΡΟΥ.....	σελ.11
1.6 ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΟΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ	σελ.14
ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ ΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ	σελ.14
1.6.1 Είδη που χρησιμοποιήθηκαν σαν προβιοτικές καλλιέργειες	σελ.24
1.7 ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ	σελ.25
1.8 ΕΠΙΒΙΩΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ	σελ.33
1.9. ΑΝΤΙΒΑΚΤΗΡΙΔΙΑΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ ΕΝΑΝΤΙΟΝ ΤΩΝ ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΣΒΑΛΛΟΥΝ ΤΟ ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ	σελ.35
1.9.1 Χορήγηση και κατανάλωση των προβιοτικών	σελ.38
1.9.2 Εστίαση των προβιοτικών	σελ.41
1.9.3 Χρήση των προβιοτικών σε τροφές, ασφαλείς χορηγήσεις	σελ.44
1.9.4.Προβιοτικά στελέχη με σχεδιασμένες ιδιότητες για την Υγεία	σελ.46
1.9.5 Επιθυμητές ιδιότητες για θεραπευτικά προβιοτικά	σελ.47
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	
ΠΡΕΒΙΟΤΙΚΑ	
2.1 ΠΡΕΒΙΟΤΙΚΑ	σελ.49
2.2 ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΓΑΛΑΚΤΟΒΑΚΙΛΛΩΝ: <i>HELICOBACTER PYLORI</i> : IN VITRO ΕΡΕΥΝΕΣ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΕΣ ΣΕ ΖΩΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ	σελ.50
2.2.1 <i>HELICOBACTER PYLORI</i> : κλινικά τεστ	σελ.56
2.3 <i>ESCHERICHIA COLI</i>	σελ.62
2.4. <i>Salmonella</i>	σελ.71
2.4.1 Άλλα παθογόνα βακτήρια	σελ.74
2.5 ΑΝΤΙΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΤΩΝ Bifidobacteria	σελ.76

2.6 ΖΩΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ	σελ.80
-------------------------	--------

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ

3.1.Η ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΤΗΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΠΡΕΒΙΟΤΙΚΩΝ ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΣΤΗΝ ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΥΓΕΙΑΣ ΤΟΥ ΕΝΤΕΡΟΥ	σελ.88
3.2.ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΤΑΣΕΙΣ	σελ.90
3.3.ΑΞΙΟΛΟΓΩΝΤΑΣ ΤΗΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ, ΠΡΕΒΙΟΤΙΚΩΝ, ΚΑΙ ΣΥΜΒΙΩΤΙΚΩΝ ΣΤΗΝ ΠΡΟΛΗΨΗ ΑΣΘΕΝΕΙΩΝ	σελ.92
3.3.1.Εισαγωγή: διαίτα και γαστρεντερικές παθήσεις	σελ.92
3.3.2.Οικονομική και ιατρική σημασία των προ-, πρε-, και συμβιωτικών	σελ.96
3.4.ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ, ΠΡΕΒΙΟΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΣΥΜΒΙΩΤΙΚΩΝ	σελ.97
3.5.ΘΕΜΑΤΑ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΣΤΗΝ ΧΡΗΣΗ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΠΡΕΒΙΟΤΙΚΩΝ Θέση GRAS (Γενικά αναγνωρίζονται ως ασφαλή)	σελ.99
3.6.ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΘΟΡΙΣΜΟΥ ΤΟΥ ΤΡΟΠΟΥ ΔΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑΣ	σελ.100

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΝΕΑ ΜΟΡΙΑΚΑ ΕΡΓΑΛΕΙΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΕΝΤΕΡΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΧΛΩΡΙΔΑΣ (ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ)

4.1 ΑΠΟΔΕΙΞΕΙΣ ΤΗΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΠΡΟ, ΠΡΕ, ΚΑΙ ΣΥΜΒΙΩΤΙΚΩΝ ΣΕ ΣΦΟΔΡΕΣ ΚΑΙ ΧΡΟΝΙΕΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ	σελ.102
4.1.1.Η διάρροια του ταξιδιώτη	σελ.102
4.1.2.Διάρροια σχετιζόμενη με τα αντιβιοτικά	σελ.103
4.1.3.Rotavirus διάρροια σε παιδιά	σελ.103
4.1.4.Νεκρωτική Εντεροκολίτιδα (NEK)	σελ.104
4.2 ΧΡΟΝΙΕΣ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ	σελ.105
4.2.1.Αυτιστικά Παιδιά	σελ.105
4.2.2.Ελκώδης Κολίτιδα (ΕΚ)	σελ.105
4.2.3.Καρκίνος του Παχέος εντέρου	σελ.107
4.2.4.Ευερέθιστο Εντερικό σύνδρομο	σελ.108
4.3 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ	σελ.109

4.4 ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΙΚΟΥ ΣΩΛΗΝΑ	σελ.109
4.5 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ	σελ.110
4.6 ΕΝΤΕΡΙΚΗ ΧΛΩΡΙΔΑ, ΣΗΜΑΝΤΙΚΟ ΟΡΓΑΝΟ ΣΤΗΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑ	σελ.112
4.7 ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗ ΣΕ ΕΝΤΕΡΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ	σελ.112

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ΣΥΜΒΙΩΤΙΚΑ

5.1 ΕΙΔΗ <i>Bifidobacterium</i>	σελ.114
---------------------------------------	---------

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ, ΠΡΕΒΙΟΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΣΥΜΒΙΩΤΙΚΩΝ

6.1.Γενικά	σελ.116
------------------	---------

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 ΣΤΑΘΕΡΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

7.1 ΠΡΟΛΗΨΗ ΑΣΘΕΝΕΙΩΝ	σελ.119
7.1.1.Αντιμετώπιση της διάρροιας	σελ.119
7.1.2.Χοληστερόλη	σελ.120
7.1.3.Αντικαρκινική δράση	σελ.121
7.1.4.Προβιοτικά και φλεγμονές	σελ.121
7.1.5.Παθήσεις του αναπνευστικού	σελ.121
7.1.6.Διατροφή	σελ.122
7.2 ΑΠΟΔΕΙΞΗ ΤΗΣ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΤΩΝ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ	σελ.123
7.3.ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΣΧΕΤΙΚΑ ΜΕ ΤΗΝ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΩΝ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΓΙΑ ΠΑΡΑΔΟΣΙΑΚΑ Ή ΠΡΩΤΟΤΥΠΑ ΤΡΟΦΙΜΑ	σελ.126

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	σελ.128
--------------------	---------

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	σελ.130
--------------------	---------

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η εργασία αυτή αναφέρεται στα προβιοτικά, τα πρεβιοτικά και τα συμβιωτικά βακτήρια, το ρόλο που παίζουν στη υγεία μας και πως συμβάλλουν στην πρόληψη ασθενειών. Τα προβιοτικά βακτήρια είναι τα ωφέλιμα βακτήρια στο εντερικό μας σύστημα ενώ τα πρεβιοτικά μαζί με τα πρεβιοτικά σχηματίζουν τα συμβιωτικά τα οποία ζουν με αρμονία στο εντερικό μας σύστημα. Έχουν γίνει αντικείμενο έρευνας τα τελευταία χρόνια κυρίως στο εξωτερικό και είναι απαραίτητα, γιατί είναι ζωντανοί οργανισμοί και βοηθούν σε χρόνια προβλήματα του πεπτικού συστήματος. Επιπλέον, τα πιο πολλά προϊόντα και κυρίως τα γαλακτοκομικά είναι εμπλουτισμένα με πρεβιοτικά που βοηθούν στην καλή λειτουργία του εντέρου και την ενίσχυση του ανοσοποιητικού μας συστήματος (*L.casei defensis*). Είναι γνωστό πως κάποια βακτήρια που υπάρχουν στο εντερικό μας σύστημα κάποιες φορές διαταράσσουν την μικροβιακή χλωρίδα, γι αυτό και παρουσιάζονται κάποια προβλήματα στον άνθρωπο που τον κάνουν και υποφέρει. Χάρη στα πρεβιοτικά και τα συμβιωτικά λοιπόν, προστατεύεται αυτή η μικροβιακή χλωρίδα και έτσι ο άνθρωπος προστατεύεται από διάφορες ασθένειες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΑ ΠΡΕΒΙΟΤΙΚΑ ΚΑΙ Η ΥΓΕΙΑ ΣΤΟ ΕΝΤΕΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

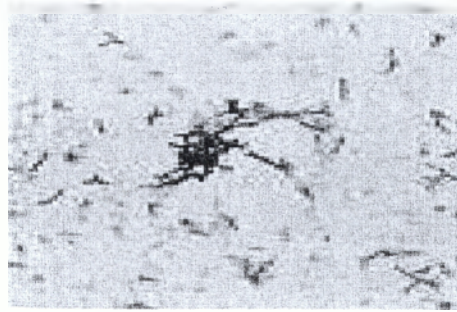
Ορίζοντας την έννοια προβιοτικά και πρεβιοτικά

Σήμερα, οι καταναλωτές είναι ενήμεροι σε αυξημένο ποσοστό, για την ανάγκη να διατηρήσουν την υγεία τους μέσα από την διατροφή, και για τον ρόλο της εντερικής χλωρίδας στην υγεία και τις ασθένειες. Η μικροβιακή χλωρίδα περιέχει περισσότερο από 500 είδη βακτηρίων και επιπλέον αποτελεί το 95% του συνολικού αριθμού των κυττάρων στο ανθρώπινο σώμα. Συνεισφέρει σημαντικά, στην αντίσταση του ξενιστή από μολυσματικές ασθένειες. Επίσης, αλλαγές στην σύνθεση της μικροβιακής χλωρίδας, συχνά συγχέονται με ασθένεια και μπορεί σε μερικές περιπτώσεις να είναι η αιτία πρόκλησης της νόσου. Γι' αυτό η επιστημονική έρευνα εστιάζει στους ρόλους της διατροφής, του στρες, της μειωμένης σωματικής δραστηριότητας, των περιβαλλοντικών παραγόντων, και των σύγχρονων ιατρικών πρακτικών (π.χ. η χρήση αντιβιοτικών ή χειρουργικής) στην ανθρώπινη υγεία. Συγκεκριμένα η αύξηση του πληθυσμού από άτομα μεγαλύτερης ηλικίας αυξάνει την πιθανότητα ασθένειας, η οποία μπορεί να προκλήθηκε από ανεπαρκή ή διαταραγμένη μικροβιακή χλωρίδα, όπως μολύνσεις γαστρεντερικού σωλήνα, δυσκοιλιότητα, ευερέθιστο εντερικό σύνδρομο, φλεγμονώδεις εντερικές ασθένειες (ασθένεια του Κρον και αιμορραγική κολίτιδα), υπερευαισθησία στις τροφές και αλλεργίες, αντιμετώπιση της διάρροιας με αντιβιοτικά, μικρή μικροβιακή υπερανάπτυξη στο εντερικό, καρδιαγγειακές παθήσεις και σίγουρα καρκίνος (π.χ. καρκίνος του παχέος εντέρου).

Επιπλέον, η αυξανόμενη ανάπτυξη των σύγχρονων ασθενειών, όπως νεοπλασμάτα, υπέρταση και HIV μόλυνση, έχει ακόμα μεγαλύτερο ενδιαφέρον. Επίσης, σοβαρό ενδιαφέρον έχει εκδηλωθεί σαν βαθμός της μικροβιακής ανθεκτικότητας σε ένα ευρύ φάσμα συνταγών φαρμάκων, και σε αντιβιοτικά τα οποία χορηγήθηκαν με λανθασμένη χρήση. Διαφωνώντας πλήρως με αυτές τις ιδέες, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (World health organisation, WHO), πρόσφατα πρότεινε την υλοποίηση εναλλακτικών στρατηγικών για έλεγχο των ασθενειών. Η εκμετάλευση του δυναμικού των προβιοτικών μικροοργανισμών με προληπτικές και θεραπευτικές ιδιότητες, υπόσχεται πολλά (Bengmark 1998, Naidu et al. 1999).

1.2. ΙΣΤΟΡΙΑ ΤΗΣ ΚΑΘΟΡΙΣΜΕΝΗΣ ΕΝΝΟΙΑΣ ΤΩΝ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ

Ένας ευεργετικός συσχετισμός των μικροοργανισμών με το ανθρώπινο σώμα διαπιστώθηκε πρόσφατα από τον Doberlein το 1892. Διαπίστωσε πως, τα κοιλικά βακτήρια παράγουν γαλακτικό οξύ από τα σάκχαρα και αναστέλλουν ή παρεμποδίζουν την ανάπτυξη των παθογόνων βακτηρίων. Τέτοια βακτήρια βρέθηκαν επίσης σε συνδυασμό με τα ζυμώμενα προϊόντα γάλακτος και τα οποία ελέγχθηκαν για τις ευεργετικές τους ιδιότητες στην υγεία από τον Metchnikoff το 1908. Το 1900, ο Moro απομόνωσε ένα βακτήριο γαλακτικού οξέος (*LAB*), με το όνομα *Lactobacillus acidophilus* (πρωτοονομάστηκε *Bacillus acidophilus*) από τα κόπρανα των βρεφών. Ο γαλακτοβάκιλλος *Lactobacillus acidophilus*, πράγματι βρίσκεται στο γαστρεντερικό σωλήνα των ανθρώπων και ζώων όπως επίσης και των βρεφών τα οποία λαμβάνουν πολύ γάλα, λακτόζη, ή διατροφή με δεξτράνη. Το 1901 ο Beijerinck (1901), ασχολήθηκε χωρίς με ταξινομικές έρευνες στο *LAB* και την ίδια χρονιά, ο Cahn μελέτησε την οικολογία του εντερικού συστήματος από κόπρανα βρεφών (Cahn, 1901). Το 1908, στην εργασία του με τον τίτλο «ο πρόλογος της ζωής», ο Metchnikoff υπονόησε ότι το *LAB* βρέθηκε σε βουλγαρικά γιαούρτια και έτσι ονόμασε τον βάκιλο βουλγαρικό και στην πορεία *Bacillus Bulgaricus* που είναι πιθανόν να είναι γνωστός ο οργανισμός ως *Lactobacillus Bulgaricus* και που τώρα ονομάζεται *L. Debrueckii subsp Bulgaricus* που είναι ο υπεύθυνος παράγοντας για τη αποδυνάμωση του εντερικού συστήματος και της γήρανσης. Επιπλέον, ο Metchnikoff επεσήμανε για πρώτη φορά την σημαντικότητα που έχουν οι *lactobacilli* στην ανθρώπινη υγεία και την μακροζωία. Παρόλα αυτά, θεώρησε ότι τα εντεροβακτήρια στο σύνολο τους είναι περισσότερο επιβλαβή παρά αβλαβή για την ανθρώπινη υγεία, και διαπίστωσε πως τα επιθυμητά αποτελέσματα μπορούν να αναμένονται μόνο από την υποκατάσταση των ζυμών του γιαουρτιού. Σ' αυτό το σημείο ο Metchnikoff, προώθησε το *LAB* και τον κύριο μεταβολίτη της ζύμωσης των σακχάρων πχ . το γαλακτικό οξύ. Γύρω στο 1906, ο Cohendy χορήγησε γάλα ξινισμένο με τον βουλγαρικό βάκιλλο σε ανθρώπους εκθέτοντας ζυμώσεις τύπου ενζυματικής αποσύνθεσης, ή σήψης σε μεικτή διατροφή και παρατήρησε μια μείωση στα προϊόντα σήψης (Cohendy 1906). Το 1906, ο Tissier ανέφερε κλινικές ευεργετικές επιδράσεις από την ρύθμιση της μικροβιακής χλωρίδας σε παιδιά με μολύνσεις στο έντερο μέσω της αντικατάστασης των παθογόνων βακτηρίων με *bifidobacteria* (Εικ. 1.1, 1.2) (εντεροβακτήρια). Επιπλέον, στις αρχές της δεκαετίας του 1920 οι Rettger and Cheshire ανακάλυψαν, πως το γάλα με *L.acidophilus* έχει θεραπευτικά αποτελέσματα.



Εικ. 1.1. *Bifidobacterium bifidum*:

Πηγή: <http://images.google.gr/images?hl=el&q=Bifidobacterium%20bifidum&ie=UTF-8&oe=UTF-8&um=1&sa=N&tab=wi>



Εικ. 1.2: κύτταρα *Bifidobacterium* στο παχύ έντερο.

Πηγή: <http://images.google.gr/images?hl=el&q=Bifidobacterium%20bifidum&ie=UTF-8&oe=UTF-8&um=1&sa=N&tab=wi>

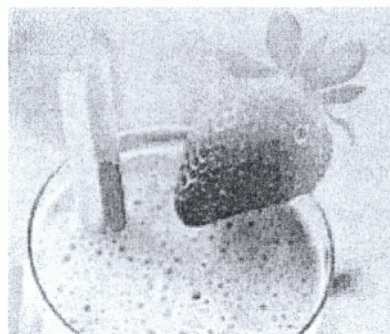
Πίστευαν, πως η ανάπτυξη και η δημιουργία αποικιών στο έντερο ήταν απαραίτητες για την αποτελεσματικότητα, και συνεπώς, υποστήριξε την χρήση απομονωμένων οργανισμών του εντερικού συστήματος (Rettger and Cheplin, 1921). Τελικά το 1930, ο *Shirota* ήταν ο πρώτος που καλλιέργησε ένα στέλεχος ωφέλιμων εντεροβακτηρίων, και το οποίο ήταν ικανό να φθάνει στα έντερα ζωντανό χωρίς να έχει καταστραφεί στο πεπτικό σύστημα. Αρχικά ονομάστηκε *L. acidophilus shirota* και αργότερα μετονομάστηκε σε *Lactobacillus casei Shirota* (Yabult 1999). Σε μόλις πέντε χρόνια, εφηύρε ένα προβιοτικό ρόφημα (Εικ. 1.3, 1.4) που περιέχει αυτό τον πληθυσμό με το όνομα *Yakult*. Λόγω αυτού και άλλων επιστημόνων οι οποίοι ασχολούνται με πειράματα καθώς και κλινικών, τα κριτήρια της επιστημονικής επιλογής για προβιοτικά, τέθηκαν την δεκαετία του 1950 αν και η θεώρηση, η ιδέα, δεν είχε οριστεί εκείνη την στιγμή. Η λέξη προβιοτικός, προέρχεται από την ελληνική λέξη

προ+βίος (για την ζωή) και χρησιμοποιήθηκε με πολλούς διαφορετικούς τρόπους τις τελευταίες δεκαετίες. Η έννοια αυτή, χρησιμοποιήθηκε αρχικά για να περιγράψει ενώσεις που παράχθηκαν από ένα πρωτόζωο το οποίο διέγειρε την ανάπτυξη ενός άλλου (Lilly and Stillwell, 1965).



Εικ. 1.3 προβιοτικά ροφήματα.

Πηγή: <http://www.foodproductdesign.com/articles/6a1annual1.html>



Εικόνα 1.4 προβιοτικό ρόφημα.

Πηγή: <http://www.foodproductdesign.com/articles/6a1annual1.html>

Στις αρχές του '70 του 20^{ου} αιώνα, ο Sperti (1971) βελτίωσε τον όρο ώστε να συμπεριλάβει δείγματα ιστού που προκαλούσαν μικροβιακή ανάπτυξη. Αν και ο Metchnikoff είχε ήδη θεωρήσει το 1907, ότι τα εντεροβακτήρια μπορούσαν να έχουν μια θετική επίδραση στην φυσιολογική μικροβιακή χλωρίδα του γαστρεντερικού σωλήνα. Η έννοια προβιοτικός, αρχικά χρησιμοποιήθηκε από τον Parker σε αυτό το περιεχόμενο (1974) για να περιγράψει τις ζωοτροφές, οι οποίες είχαν ένα θετικό αποτέλεσμα στον ξενιστή συνεισφέροντας έτσι στην ισορροπία της εντερικής

μικροβιακής χλωρίδας. Συνεπώς, η λέξη προβιοτικός χρησιμοποιήθηκε στους οργανισμούς και ουσίες, οι οποίοι συνεισφέρουν στην ισορροπία της μικροβιακής χλωρίδας. Ο Fuller (1989-1992), άλλαξε την αρχική έννοια των προβιοτικών για να τονίσει την σημασία των ζωντανών κυττάρων, σαν ένα απαραίτητο συστατικό ενός αποτελεσματικού προβιοτικού, και γι αυτό ορίστηκε προβιοτικό, ως ένα ζωντανό μικροβιακό συμπλήρωμα ζωοτροφής που επηρεάζει αποτελεσματικά το ζώο ξενιστή βελτιώνοντας την εντερική μικροβιακή ισορροπία. Αυτή η διαφορετική εκδοχή της έννοιας, τόνισε την ανάγκη του συμπληρώματος να συντεθεί από ζωντανούς μικροοργανισμούς, και από μη περιλαμβανόμενα αντιβιοτικά, χωρίς να επιτραπεί η χορηγησή του στα ζώα. Από την άλλη μεριά, αυτός ο ορισμός περιλάμβανε επίσης παραδοσιακά γιαούρτια, τα οποία παράγονται από ζυμωμένο γάλα το οποίο περιέχει τα στελέχη, *L. Debrueckii Bulgaricus* και *Streptococcus thermophilus*. Ο ορισμός του προβιοτικού περιορίστηκε στο να εστιάσει στην μικροβιακή χλωρίδα του εντερικού συστήματος του ανθρώπου το οποίο έχει ευεργετικές ιδιότητες για την υγεία (Havennar et al., 1992, Fuller and Gibson 1998, Klein et al., 1998, Rolfe 2000), ή διευρύνθηκε για να συμπεριλάβει και άλλα μικρόβια, ανθρώπους και ζώα όπως επίσης και μείγματα καλλιεργειών (Havenar and Huis in't Veld, 1992, Guarner and Scaafsma, 1998, Schrenmeir and Deverse, 2001). Μια πρώτη προσαρμογή του ορισμού έγινε από τους Havenaar et al., (1992) σύμφωνα με τους οποίους τα προβιοτικά ορίζονται ως μονές ή μεικτές καλλιέργειες ζωντανών μικροοργανισμών οι οποίες, όταν χορηγηθούν στον άνθρωπο ή το ζώο επηρεάζουν θετικά τον ξενιστή με το να βελτιώνουν τις ιδιότητες της ενδογενούς μικροβιακής χλωρίδας (Huis in't Veld and Havenaar, 1991, Elmer, 2001). Μια μικρή αλλαγή και πρόσφατα ευρέως αποδεκτή, είναι εκείνη των Havenaar and Huis in't Veld (1992) όπου τα προβιοτικά ορίστηκαν ως ζωντανοί οργανισμοί (LAB) και άλλα βακτήρια και ζύμες, τα οποία όταν προστέθηκαν σε ένα ζυμωμένο προϊόν ή όταν προστέθηκαν ως ξηρά κύτταρα, επιφέρουν ένα καλό αποτέλεσμα στην υγεία του ξενιστή διαμέσου της πρόσληψης τροφής, και βελτιώνουν τις ιδιότητες της ενδογενούς μικροβιακής χλωρίδας.

Ακόμη άλλες έννοιες, προσπάθησαν να συμπεριλάβουν ταυτόχρονα σχεδιασμούς και λειτουργικότητες των προβιοτικών, όπως αυτές που διατύπωσαν οι Guarner and Schaafsma (1998), ότι τα προβιοτικά είναι ζωντανοί μικροοργανισμοί, οι οποίοι διαμέσω της πρόσληψης σε συγκεκριμένους αριθμούς αποφέρουν ευεργετικές επιδράσεις πέρα από την βασική διατροφή, ενώ ο ορισμός των Salminen et al., (1998) υποστηρίζει, ότι τα προβιοτικά, είναι ζωντανά κύτταρα που υπάρχουν στον άνθρωπο

και τα οποία χρησιμοποιούνται, ως συμπληρώματα διατροφής ή ως φαρμακευτικά παρασκευάσματα τα οποία επιβιώνουν το πέρασμα από τον ανώτερο γαστρεντερικό σωλήνα, και αποκλειοποιούν σταδιακά το έντερο με την προσκόλληση στην βλέννα του εντερικού συστήματος, και παράλληλα είναι ευεργετικά στην υγεία. Τελικά οι ειδικοί του οργανισμού FAO/WHO (Food and Agricultural Organisation, Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας) όρισαν τα προβιοτικά, σαν ζωντανούς μικροοργανισμούς, οι οποίοι όταν καταναλώνονται σε επαρκείς ποσότητες σαν ένα μέρος της τροφής, προσφέρουν μια ευεργετική επίδραση στον ξενιστή (FAO/WHO, 2001). Θα έπρεπε να τονιστεί λοιπόν, ότι η ανθρώπινη προέλευση και η ικανότητα προσκόλλησης, δεν είναι πλέον απαραίτητες στο να θεωρηθεί ένα είδος προβιοτικό. Αυτό που είναι απαραίτητο, αφορά την ικανότητα να παραμένει ζωντανό στην στοχευμένη περιοχή και την ικανότητα να αναπτύσσεται στο ανθρώπινο σώμα το οποίο καθορίζει την αποτελεσματικότητά του, ή η ικανότητα να είναι ενεργό στο ανθρώπινο σώμα το οποίο καθορίζει την αποτελεσματικότητά του. Οι μετέπειτα ορισμοί, έχουν εξασφαλισμένα πλεονεκτήματα σε σχέση με τον αρχικό ορισμό της έννοιας προβιοτικός από τον Fuller στον οποίο 1) ένας μεγάλος αριθμός μικροβιακών πληθυσμών και τα γένη τους θεωρούνται προβιοτικά (πίνακας 1.1).

Πίνακας 1.1: Μικροοργανισμοί οι οποίοι βρίσκουν εφαρμογή σαν προβιοτικά κυρίως στους ανθρώπους

<i>Είδη Lactobacillus</i>	<i>Είδη bifidobacterium</i>	<i>Άλλα LAB(lactic acid bacteria)</i>	<i>«Μη γαλακτικά»</i>
<i>L.acidophilus</i>	<i>B.adolescentis</i>	<i>Ent.faecalis</i> ^a	<i>Bacillus cereus</i>
<i>L.amylovorus</i>	<i>B.animalis</i>	<i>Ent.faecium</i>	("toyoi") ^{a,c}
<i>(L.casei)</i>	<i>B.bifidum</i>	<i>Sporolactobacillus</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>L.crispatus</i>	<i>B.breve</i>	<i>Inulinus</i> ^a	<i>Nissle 1917</i> ^c
<i>L.delbrueckii subsp Bulgaricus</i> ^c	<i>B.infantis</i>		<i>Propionibacterium freudenreichii</i> ^{a,c}
<i>L.gallinarum</i> ^a	<i>B.lactis</i> ^b		<i>Saccharomyces cerevisiae(boulardii)</i> ^f
<i>L.gasseri</i>			
<i>L.johnsonii</i>			
<i>L.paracasei</i>			
<i>L.planiarum</i>			
<i>L.reuteri</i>			
<i>L.rhamnosus</i>			

^a κυρίως για ζώα

^b συνώνυμο του *B.animalis*

^c κυρίως σε φαρμακευτικά παρασκευάσματα.

Πηγή: τροποποιήθηκε από τον Holzapfel et al. (1998-2001).

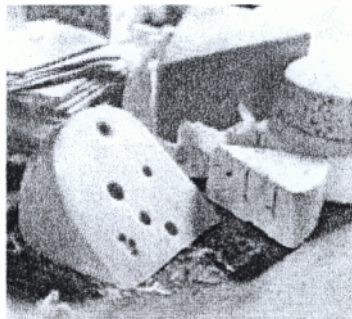
- 2) Δεν περιορίζουν τις προβιοτικές δραστηριότητες στην μικροβιακή χλωρίδα του παχέος εντέρου, αλλά επίσης και σε άλλες μικροβιακές περιοχές του εντέρου (στομάχι, λεπτό έντερο) και σε μικροβιακές περιοχές σε άλλα σημεία του σώματος (επιδερμίδα, τρήματα στα δόντια, προβλήματα του ουρογεννητικού συστήματος).
- 3) Δεν περιορίζουν τα ευεργετικά αποτελέσματα των προβιοτικών μέσα από την ιατρική στην μικροβιακή χλωρίδα, αλλά επίσης και τις ανοσοποιητικές παραμέτρους.
- 4) Μια επαρκής δόση με μικροοργανισμούς, πρέπει να παρέχεται ώστε να έχουμε το επιθυμητό αποτέλεσμα.
- 5) Το προβιοτικό, μπορεί να αποτελείται από περισσότερους του ενός μικροοργανισμούς
- 6) Τα προβιοτικά μπορούν να χορηγηθούν τόσο στον άνθρωπο όσο και στα ζώα.

Πρόσφατα σημαντικά θέματα συζήτησης, σχετίζονται με την ζωτικότητα των προβιοτικών στελεχών (νεκρά κύτταρα, ζωντανά που υπάρχουν στο έντερο, ζωντανά σε ενεργή φάση), την πλευρά της δραστηριότητας (τρήμμα δοντιού, ανώτερο γαστρεντερικό σύστημα, κατώτερο γαστρεντερικό, ουρογεννητική οδός, επιδερμίδα). την ποσότητα των κυττάρων που χρειάζονται για να έχουμε το συγκεκριμένο προβιοτικό αποτέλεσμα, το σχήμα πρόσληψης και τον φορέα (μονοί ή διάφοροι πληθυσμοί, βιομηχανικά προϊόντα, συμπληρώματα διατροφής, φαρμακευτικά παρασκευάσματα κα.). Επιπλέον, η έλλειψη των κατάλληλων βιολογικών σημαντών, ή και των τεχνολογιών που χρειάζονται ώστε να κρίνουν ή να υπολογίσουν κατευθείαν την παρουσία ή αποδοτικότητα των προβιοτικών στελεχών σε υγιείς ανθρώπους, κάνει τον αξιόπιστο ορισμό δύσκολο (Mercenier et al., 2003).

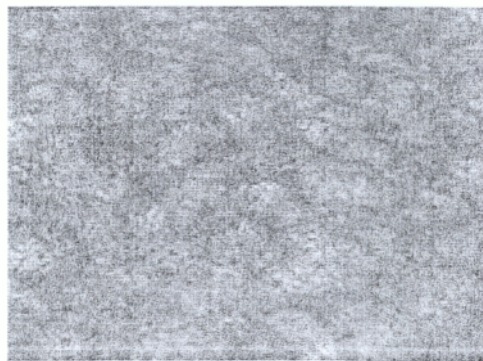
1.3 ΑΠΟ ΠΟΥ ΠΡΟΕΡΧΟΝΤΑΙ ΤΑ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ

Η επιλογή των στελεχών για προβιοτική χρήση, θα έπρεπε πάντα να ακολουθεί δύο βασικές αρχές: 1) την ασφάλεια του οργανισμού, και 2) την απόκτηση επιθυμητών χαρακτηριστικών για την χρήση την οποία αποσκοπείται. Στα εντερικά προβιοτικά ανήκουν μέλη των *Bifidobacterium* και *Lactobacillus*, (Εικ. 1.5) αφού αυτά τα δύο έχουν ένα μακροχρόνιο ιστορικό ασφαλούς χρήσης, και γενικώς αναγνωρίζονται ως ασφαλή (generally recognised as safe, GRAS). Επίσης, διευκολύνουν την ανάπτυξη του εντέρου, αφού το στέλεχος *Bifidobacterium* είναι κύριος ζωντανός μικροοργανισμός του μεγάλου εντέρου και ο *Lactobacillus* είναι ο κύριος ζωντανός

οργανισμός του μικρού εντέρου. Αρχικά στελέχη τα οποία χρησιμοποιούνται στα προβιοτικά, μπορεί να είναι απομονωμένα στον ανθρώπινο ή ζωικό ξενιστή ή σε μια συλλογή καλλιέργειας. Τα στελέχη συλλογής καλλιέργειας έχουν εκτεταμένα καλλιεργηθεί σε συστήματα ζυμώσεων (Εικ. 1.6), και γι αυτό είναι σχεδιασμένα έτσι ώστε να ταιριάζουν σε περιβάλλον in vitro. Παρόλα αυτά, όπως δηλώθηκε από τους Havenaar et al., (1992), η επιλογή από πού θα παρθεί ένα προβιοτικό στέλεχος, εξαρτάται από τον συγκεκριμένο σκοπό χρήσης του προβιοτικού.



Εικ.1.5 *Lactobacillus* Πηγή: http://en.wikipedia.org/wiki/Lactobacillus_casei



Εικ.1.6 Ζύμωση σε εξέλιξη

Πηγή: http://en.wikipedia.org/wiki/Fermentation_%28biochemistry%29

Για παράδειγμα, εάν η παροδική δραστηριότητα του προβιοτικού είναι απαραίτητη, όπως για την πέψη της λακτόζης, τότε δεν χρειάζεται το προβιοτικό να έχει χαρακτηριστικά τα οποία θα το καθιστούσαν ικανό να δημιουργήσει αποικίες στον

ξενιστή. Οι περισσότερες επιδράσεις των προβιοτικών στον GIT (Gastrointestinal tract) γαστρεντερικό σωλήνα θα μπορούσαν να ενισχυθούν αν το προβιοτικό ήταν ικανό να ανταγωνίζεται με την ενδογενή χλωρίδα. Αυτό απαιτεί μια πιο προσεκτική επιλογή στελεχών. Αν και όλα τα κριτήρια για αυτό τον σκοπό δεν είναι προς το παρόν γνωστά για οποιαδήποτε εντερικό οργανισμό υπάρχει ένα γενικό consensus το οποίο διατηρεί το κριτήριο το οποίο είναι σημαντικό. Η θεώρηση είναι, πως το προβιοτικό θα έπρεπε να προέρχεται από το ίδιο είδος ζώου, το οποίο προορίζεται να στοχεύσει (Kimaryo et al., 2002). Το εύλογο είναι, ότι το περιβάλλον των εντέρων σε διαφορετικά είδη ζώων, είναι αρκετά διαφορετικό τόσο που τα πιο ανταγωνιστικά βακτήρια στα είδη ξενιστών έχουν αποκτήσει συγκεκριμένα χαρακτηριστικά για επιβίωση σε αυτόν τον ξενιστή (Seki et al., 1978). Τα ανθρώπινα προβιοτικά θα έπρεπε να προέρχονται από ανθρώπινη πηγή, αν ο αντικειμενικός στόχος είναι να τροποποιούν αποτελεσματικά τους μικροβιακούς πληθυσμούς στις στοχευμένες περιοχές. Είναι αξιοσημείωτο ότι, όταν τα εμπορικά προβιοτικά χορηγούνται σε ανθρώπους κατά την διάρκεια των ελεγχόμενων μελετών σίτισης, το προβιοτικό μπορεί να ανιχνευθεί σε υψηλούς αριθμούς στα κόπρανα κατά την διάρκεια της περιόδου σίτισης, όμως αμέσως εξαφανίζεται ακολουθώντας την διακοπή σίτισης (Saxelin et al., 1999). Το ποσοστό μείωσης του προβιοτικού ακολουθώντας την σίτιση, είναι γενικά λιγότερο από μια εβδομάδα. Μερικά προβιοτικά, όπως ο *Lactobacillus rhamnosus GG* μπορεί σε μερικές περιπτώσεις να παραμείνει περισσότερο από μια εβδομάδα μετά τη σίτιση (Gardiner et al., 1998). Η έλλειψη ανίχνευσης της μετασίτισης με προβιοτικό δείχνει ότι, δεν είναι ικανό να ανταγωνίζεται πολύ καλά με τα ενδογενή στελέχη σαν κι αυτό των ειδών. Αυτό είναι αναμενόμενο, επειδή τα ενδογενή στελέχη είναι προσαρμοσμένα στο περιβάλλον τους την ώρα που το προβιοτικό στέλεχος μπορεί να μην έχει όλα τα χαρακτηριστικά που είναι απαραίτητα για να ανταγωνίζεται με αυτό το ενδογενές στέλεχος.

1.4 ΚΑΘΟΡΙΖΟΝΤΑΣ ΤΗΝ ΕΝΝΟΙΑ ΠΡΕΒΙΟΤΙΚΑ

Τα πρεβιοτικά, είναι συστατικά τροφών τα οποία δεν πέπτονται και επηρεάζουν αποτελεσματικά τον ξενιστή με το να ευνοούν την ανάπτυξη ή και την δραστηριότητα ενός αριθμού βακτηρίων στο παχύ έντερο (Gibson and Robertfroid, 1995). Επίσης, η προσέγγιση των προβιοτικών υποστηρίζει τον έλεγχο των μη βιώσιμων οντοτήτων και γιαυτό ξεπερνά, οποιαδήποτε άλλα προβλήματα βιωσιμότητας των προβιοτικών

στο ανώτερο εντερικό σύστημα. Επιπλέον, ένα προβιοτικό μπορεί να θεωρηθεί σαν κατάλληλο ευνοϊκό υπόστρωμα, το οποίο δυναμώνει αποτελεσματικά την μικροβιακή χλωρίδα του εντερικού συστήματος.

Παρόλα αυτά, διαφέρει από τις κλασσικές διαιτητικές ίνες στις οποίες επιλεκτικά ευνοεί την ανάπτυξη ή δραστηριότητα των ειδών *bifidobacteria*. Ο γενικός ορισμός διαιτητικών ινών, αναφέρεται στα εναπομείναντα φυτικά κύτταρα τα οποία είναι ανθεκτικά στην υδρόλυση από τα ανθρώπινα ένζυμα, και τα οποία ρυθμίζουν τους υδατάνθρακες και τον μεταβολισμό των λιπιδίων στον ξενιστή, (θετική επίρεια στην δυσκοιλιότητα, υπερλιπιδαιμία, διαβήτης, παχυσαρκία, ασθένεια εκκολπώματος) (Trowel 1972, Trowel et al 1976, Schweitzer and Wursch 1991). Τα συστατικά στοιχεία της ίνας δεν έχουν ζυμωθεί επιλεκτικά, ή δεν έχουν υποστεί ζύμωση καθόλου (Schweitzer and Burch 1991). Για να καταταχθεί στην κατηγορία σαν προβιοτικό, ένα συστατικό δεν θα πρέπει να έχει υδρολυθεί ούτε να έχει απορροφηθεί από το απώτερο μέρος του εντερικού συστήματος.

Να είναι σε θέση να προστατεύει την χλωρίδα του εντέρου, έτσι ώστε να έχουμε μια υγιή έκθεση μέσα από επιλεγμένες ζυμώσεις και να προκαλεί συστηματικές επιδράσεις οι οποίες είναι αποτελεσματικές για την υγεία του ξενιστή (Gibson and Robertfroid 1995, Robertfroid 1997, Van Loo 1998, Cummings et al 2001).

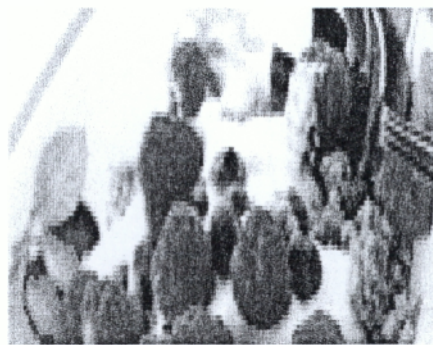
1.5 ΤΥΠΟΙ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΠΡΕΒΙΟΤΙΚΩΝ ΚΑΙ Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥΣ ΣΤΗΝ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ ΕΝΤΕΡΟΥ

Διαφορετικοί τύποι προϊόντων διατροφής, ή συμπληρώματα διατροφής, περιέχουν ζωτικούς μικροοργανισμούς με προβιοτικές ιδιότητες, οι οποίοι είναι εμπορικά διαθέσιμοι είτε σαν αναλώμενα ζυμωμένα προϊόντα ή σαν συγκεκριμένα σκευάσματα όπως σκόνες, ταμπλέτες ή κάψουλες. Μια γενική επισκόπηση στους μικροοργανισμούς που χρησιμοποιήθηκαν ή που ήταν να χρησιμοποιηθούν δίνεται στον Πίνακα 1.1. Εφόσον τα *LAB* (βακτήρια γαλακτικού οξέος), θεωρούνται υψίστης σημασίας με έμφαση στην ανθρώπινη διατροφή και την θρέψη, μόνο τα *LAB* στελέχη τα οποία μπορεί να είναι προφυλακτικού και θεραπευτικού δυναμικού θα αναφερθούν σε αυτό το κεφάλαιο. Αναρίθμητες έρευνες, αναφέρουν τις γενικές μη ουσιώδεις ιδιότητες των *LAB*, ζυμών και ζυμώμενων γαλακτοκομικών προϊόντων σε ζώα και ανθρώπους. Αυτές οι ιδιότητες, περιλαμβάνουν ευεργετικές επιδράσεις των προβιοτικών, οι οποίες επηρεάζουν την μικροβιακή οικολογία του ξενιστή, την πέψη

της τροφής, την δυσανεξία στην λακτόζη, τις περιπτώσεις διάρροιας (rotavirus διάρροια, διάρροια των ταξιδιωτών, διάρροια συσχετιζόμενη με το *Clostridium difficile* διάρροια συσχετιζόμενη με τα αντιβιοτικά), βλεννική ανοσολογική αντίδραση, φλεγμονές του εντερικού συστήματος, εντερικές μολύνσεις, γαστρίτιδα σχετιζόμενη με το βακτήριο *Helicobacter pylori* κολπίτιδα, αλλεργικά φαινόμενα, ατοπική δερματίτιδα, υψηλές συγκεντρώσεις χοληστερόλης στο αίμα, ενζυμική μικροβιακή δραστηριότητα στο έντερο και μετάλλαξη στα κόπρανα, αποτοξίνωση μετάλλων, ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων και καρκίνος (Dunne et al., 1999, Rolfe 2000, Saanendra 2000, 2001, Marteau et al., 2001-2002, Vander hoof 2001, Dunne and Shanahan 2002, Kaur et al., 2002, Mercenier et al., 2003). Πρόσφατα, ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία από τα προβιοτικά *LAB* θεωρούνται επιστημονικά αποδεδειγμένες για συγκεκριμένα στελέχη (Salminen et al., 1998, Naidu et al., 1999, Ouwehand et al., 1999b FAO/WHO 2001). Για την επιλογή και τον ορισμό του προβιοτικού *LAB* έχουν εισηγηθεί τα παρακάτω κριτήρια: (Havenaar and Huis in't Veld 1992, Huis in't Veld and Shortt 1996, Salminen et al 1996b, Charteris et al 1998, Collins et al 1998, Guarner and Scaasfsma 1998, Holzaphel et al 1998, Matilla-Sandholm et al., 1999, Ouwehand et al., 1999b, Dunne et al., 2001) ανθρώπινη προέλευση, μη παθογενική συμπεριφορά, ασφάλεια, ανθεκτικότητα, αντίσταση στην γαστρική οξύτητα και τοξικότητα χολής, επίρεια ή αλληλεπίδραση με τον εντερικό επιθηλιακό ιστό, ικανότητα να παραμένει μέσα στον γαστρεντερικό σωλήνα (προσωρινή τοποθέτηση στο εντερικό περιβάλλον), παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών και ουδέτερων ουσιών, αποδείξεις των επιθυμητών αποτελεσμάτων στην υγεία (ικανότητα να ρυθμίζει τις ανοσολογικές αντιδράσεις), ικανότητα να επηρεάζει μεταβολικές δραστηριότητες, (γαλακτική δραστηριότητα και παραγωγή βιταμινών) και αντίσταση σε τεχνολογικές προόδους (ζωτικότητα και δραστηριότητα στα μέσα μεταφοράς κατά την διάρκεια ζωής στο ράφι.). Επιπλέον, η εκδήλωση της προβιοτικής δραστηριότητας ενός σίγουρου *LAB* στελέχους απαιτεί καλά σχεδιασμένες, τυχαιοποιημένες ανθρώπινες έρευνες, εικονικά ελεγχόμενες (Guarner and Scaasfsma 1998).

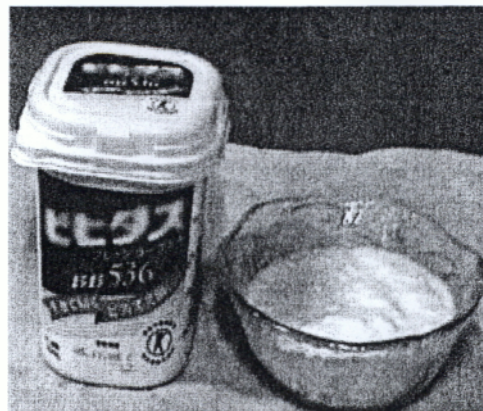
Αυτές οι απαιτήσεις είχαν επισημανθεί από πολλούς συγγραφείς (Salminen et al., 1996a, 1998, Berg 1998, Hamilton Miller and Gibson, 1999) όπως περιγράφεται παρακάτω: κάθε δυναμικό προβιοτικό στέλεχος, θα έπρεπε να έχει καταγραφεί και να αξιολογείται ανεξάρτητα μέσα από *in vitro*, ζωικές, κλινικές και επιδημιολογικές έρευνες. Η προέκταση των στοιχείων από κοντινά συγγενή στελέχη, δεν είναι

αποδεκτή. Μόνο τα καλά ορισμένα στελέχη, προϊόντα και πληθυσμιακές έρευνες θα έπρεπε να χρησιμοποιούνται σε δοκιμές. Όλες οι έρευνες σε ανθρώπους, θα έπρεπε να είναι με εγκαθιδρυμένα τελικά σημεία. Τα αποτελέσματα θα πρέπει να επιβεβαιωθούν από ανεξάρτητες ερευνητικές ομάδες, και η έρευνα θα πρέπει να δημοσιευτεί σε περιοδικά με κριτές. Ο οργανισμός FAO/WHO (2001) και οι ειδικοί του συνιστούν μια τελειοποίηση των πρόσφατων In vitro και in vivo τεστ, ώστε να προβλέπουν καλύτερα την ικανότητα των προβιοτικών μικροοργανισμών να λειτουργούν στους ανθρώπους. Σ' αυτό το κεφάλαιο, θα εστιάσουμε στις αντιμικροβιακές δραστηριότητες του προβιοτικού LAB και τους πιθανούς μηχανισμούς. Η αντίληψη ότι, συγκεκριμένες τροφές παρέχουν προστατευτικές λειτουργίες, ήταν μια παλαιά συντηρημένη αντίληψη των πληθυσμών, που καταναλώνουν ζυμώμενες τροφές όπως το γιασούρτι (Εικ. 1.7, 1.8).



Εικόνες 1.7, (προβιοτικό γιασούρτι με φρούτα)

Πηγή: <http://www.foodproductdesign.com/articles/6a1annual1.html>



Εικόνα 1.8 (γιασούρτι εμπλουτισμένο με προβιοτικά)

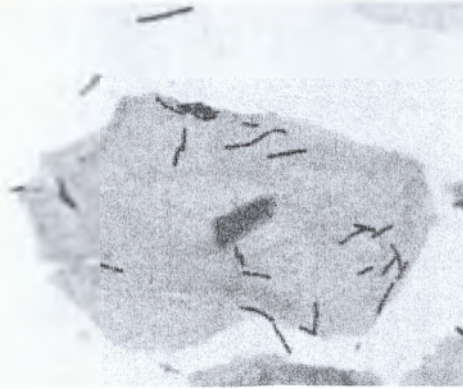
Πηγή: (<http://en.wikipedia.org/wiki/Yoghurt>)

Τέτοια προστασία του εντέρου σαν λειτουργία (εντερική υγεία), είναι καθορισμένη από τα ζωντανά βακτήρια και τα μεταβολικά τους προϊόντα. Τα οργανικά οξέα, μικρές αλυσίδες λιπαρών οξέων, υπεροξειδίο του υδρογόνου, αιθανόλη, CO₂, και διοξειδίο του άλας παραγόμενα από LAB, αποδυναμώνουν τα αντιμικροβιακά αποτελέσματα. Συνήθως, βακτηριοκίνες ή παρόμοιες πρωτεϊνικές ουσίες εμποδίζουν την συγκεκριμένη ανασταλτική δραστηριότητα εναντίον συγγενικών ειδών. Είναι εκτεταμένα μελετημένα αντιμικροβιακά τα οποία έχουν παραχθεί στο LAB (De Vuyst and Vandamme 1994, Jack et al., 1995, Nes et al., 1996, Cintas et al., 2001, Cleveland et al., 2001). Η παραγωγή των αντιμικροβιακών ουσιών από το LAB προβιοτικό, και /ή σαν αποτέλεσμα της ανάπτυξης των ωφέλιμων μικροοργανισμών σε ένα κατάλληλο πρεβιοτικό υπόστρωμα, όχι μόνο μπορεί να έχει σαν αποτέλεσμα την παθολογική αδράνεια του εντέρου και να σταθεροποιεί την μικροβιακή χλωρίδα του, αλλά μπορεί επίσης να προσδίδει μια σωστή σταθερότητα αποθήκευσης και διάρκεια ζωής στο ράφι τέτοιων λειτουργικών προϊόντων.

1.6 ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΟΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ

ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

Πιθανόν, η μεγαλύτερη καταγραφή των αποδεδειγμένων ευεργετικών αποτελεσμάτων στην υγεία και ασφαλούς χρήσης των προβιοτικών βακτηρίων, σε τρόφιμα έχει τεκμηριωθεί για το στέλεχος *L.casei Shirota* (Saxelin, et al., 1999) και κάποια στελέχη της ομάδας του *L. acidophilus*. Από τα τουλάχιστον 40 χρόνια στην Ιαπωνία και περισσότερο από 30 χρόνια στην Γερμανία, οι LAB καλλιέργειες ανθρώπινης προέλευσης έχουν χρησιμοποιηθεί στην παρασκευή των ζυμωμένων προϊόντων γάλακτος. Ζωτικά στελέχη και συγκεκριμένα των *Lactobacillus acidophilus* και *Bifidobacterium bifidum* στελεχών παρουσιάστηκαν στην Γερμανία κατά τα τέλη της δεκαετίας του 1960 σε γαλακτοκομικά προϊόντα εξαιτίας της αναμενόμενης προσαρμοστικότητας στο έντερο, και της αισθητικής ωφέλειας για παραγωγή ήπιων ξινισμένων γιαουρτιών. Στην Γερμανία, τέτοια προϊόντα έγιναν αρχικά γνωστά σαν ήπια γιαούρτια ή βιολογικά γιαούρτια, όπου στις Η.Π.Α αναπτύχθηκε το γάλα με το στέλεχος *acidophilus*. Οι λειτουργικές ιδιότητες και η ασφάλεια των συγκεκριμένων στελεχών του *L.casei/paracasei*, *L.rhamnosus*, *L.acidophilus* (Εικ. 1.9) και *L.johnsonii* έχουν εκτεταμένα μελετηθεί και είναι καλά τεκμηριωμένες (Fernandez et al., 2003.).

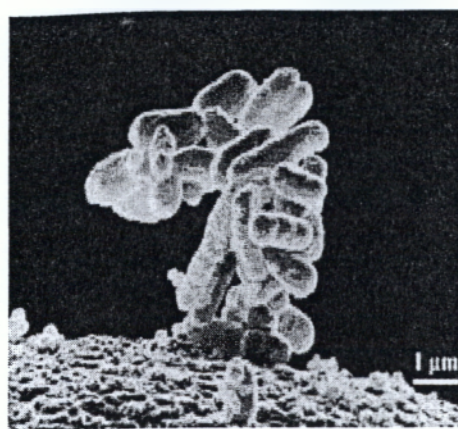


Εικόνα 1.9: Βακτήρια *Lactobacillus acidophilus* (γύρω από λεπιδώδη κολπικά επιθηλιακά κύτταρα Πηγή:wikipedia the free encyclopedia), και ([http://en.wikipedia.org/wiki/Lactobacillus acidophilus](http://en.wikipedia.org/wiki/Lactobacillus_acidophilus))

Ζωτικά προβιοτικά στελέχη με ευεργετικές λειτουργικές ιδιότητες έχουν προς το παρόν βρεθεί ανάμεσα σε ένα ευρύ και ποικίλο αριθμό μικροβιακών ειδών και γενών. Έχουν διατεθεί στην αγορά είτε ως ζυμωμένα (κυρίως τύπου γιαούρτια), εμπορεύσιμα είδη τροφής (food commodities) είτε σε λυοφιλή μορφή (διαλύονται εύκολα στο νερό). Τα περισσότερα στελέχη που έχουν χρησιμοποιηθεί πρόσφατα σαν προβιοτικά για τρόφιμα, για διατροφή, και για φαρμακευτικά σκευάσματα είναι μέλη του LAB (Πίνακας 1.1). Ο αριθμός των μη γαλακτικών στελεχών π.χ *Bacillus cereus* (*toyoi*), *B.clausii*, *B.pumilis*, *Escherichia coli* (Εικ. 1.10, 1.11) *Nissle 1919*, *Propionibacterium freudenreichii*, *P.jensenii*, *P.acidopropionichi*, *P.thoenii*, και *Sacharomyces cerevisiae* (*boulardii*), είναι επίσης διαθέσιμα στην αγορά κυρίως σαν φαρμακευτικά σκευάσματα και μερικά σαν συμπληρώματα διατροφής ζώων. (Boriello, et al., 2003) (Πίνακας 1.1).



Εικόνα. 1.10 (Βακτήριο *E.coli* ,πηγή: http://en.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli)



Εικόνα. 1.11 *E.coli*. http://en.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli

Με το 65%, τα προβιοτικά προϊόντα γάλακτος (κυρίως τύπου γιαουρτιού), (Εικ. 1.12) αντιπροσωπεύουν το μεγαλύτερο τμήμα αγοράς λειτουργικών τροφών στην Ευρώπη, όταν στην Ιαπωνία έχουν εκτιμηθεί πως περιλαμβάνουν το 75% των τροφών για συγκεκριμένη για την υγεία χρήση στην αγορά (FOSHU). Αρχικά τέθηκαν σε εφαρμογή από ένα διεθνές οργανωμένο σχέδιο ομάδας υπό την αιγίδα του τμήματος Επιστήμης και Εκπαίδευσης Ιαπωνίας, συγκεκριμένα μέτρα ρύθμισης λειτουργικών τροφών το 1984. Αυτό προκάλεσε την αρχή αναρίθμητων ακαδημαϊκών και βιομηχανικών ερευνών σε λειτουργικά τρόφιμα σε σχέση με την διατροφή και τις μαρτυρίες οι οποίες στηρίζονται σε λειτουργικούς ισχυρισμούς. Το τμήμα υγείας και ευημερίας, εγκαθίδρυσε μια πολιτική συγκεκριμένη στην FOSHU (αγορά για εξειδικευμένες χρήσεις υγείας), το 1993, από την οποία οι ισχυρισμοί υγείας κάποιων επιλεγμένων λειτουργικών τροφίμων είναι νόμιμα επιτρεπτές. Οι αναπτύξεις της επιστήμης των λειτουργικών τροφίμων, εστίασαν μεταξύ άλλων, στην ελαχιστοποίηση ανεπιθύμητων παραγόντων και στη μεγιστοποίηση επιθυμητών παραγόντων τροφίμων. Τρεις κύριες απαιτήσεις έπρεπε να τηρηθούν στην FOSHU (αγορά για καθορισμένες χρήσεις υγείας) για έγκριση, δηλαδή:

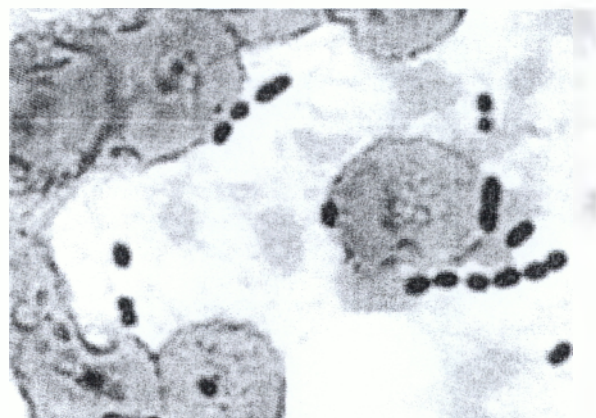
- ❖ επιστημονικές αποδείξεις στην αποτελεσματικότητα, περιλαμβάνοντας κλινικές δοκιμές,
- ❖ ασφάλεια κατανάλωσης
- ❖ αναλυτικός προσδιορισμός του αποτελεσματικού συστατικού



Εικ. 1.12 βρεφικό γιαούρτι nounou kid εμπλουτισμένο με προβιοτικά με πρεβιοτικά.
Πηγή:http://webserver.hypertech.gr/nounou/products.asp?categ_id=6&new_flg=0&product_id=48&actimg=img3

Στα τέλη του 1999, 167 αντικείμενα εγκρίθηκαν σαν FOSHU (αγορά εξειδικευμένων χρήσεων υγείας) σε σύγκριση με τον αυξανόμενο αριθμό 293 το 2002. Τον Απρίλιο του 2001, η κυβέρνηση της Ιαπωνίας σύστησε ένα καινούργιο ρυθμιστικό σύστημα (τροφές με υγιεινές απαιτήσεις) συμπεριλαμβάνοντας την FOSHU και τροφές με διαθρεπτικούς ισχυρισμούς υγείας (FNFC, foods with nutrient function claims). Οι περισσότερες περιγραφές των τροφών πέρα από το FOSHU σύστημα είναι παρόμοιες με την κατηγορία των ενισχυμένων απαιτήσεων λειτουργίας του Codex (1975, 2002-2003).

Τα προϊόντα λειτουργικών τροφίμων βασικά περιέχουν στελέχη της ομάδας (κυρίως του *L.acidophilus*), *L.crispatus*, και *L.johnsoni*, *L.casei/paracei*, και *Bifidobacterium spp.* Οι *Enterococci* (Εικ. 1.13), χρησιμοποιούνται σπάνια σε προβιοτικά γαλακτοκομικά προϊόντα (Forestier et al., 2001).



Εικ. 1.13 Μόλυνση με το βακτήριο *Enterococcus spp* σε πνευμονικό ιστό. Το βακτήριο αυτό είναι ένα γένος βακτηρίων γαλακτικού οξέος (lactic acid bacteria).
Πηγή: <http://en.wikipedia.org/wiki/Enterococcus>

Πληροφορίες των τυπικών ειδών *LAB* σχετιζόμενων με προβιοτικά γαλακτοκομικά προϊόντα στην Ευρωπαϊκή αγορά απεικονίζονται στον Πίνακα 1.1(βλέπε σελ 7). Τα προβλήματα τα οποία ακόμη αντιπαρατέθηκαν με την σωστή ταυτοποίηση αυτών των στελεχών είναι προφανή (βλέπετε επίσης Temmerman et al., 2001) και μπορεί (μεταξύ άλλων) να σχετίζονται με την χρήση αναξιόπιστων φαινοτυπικών μεθόδων (σύγκρινε επίσης τον Πίνακα 1.2 όσον αφορά την ομάδα *acidophilus*). Αν και φαινοτυπικά είναι δύσκολο να εκθέσουμε την ετερογεννητικότητα του *L.acidophilus*, ένα από τα πιο σημαντικά προβιοτικά είδη αναγνωρίστηκε την δεκαετία του 1960 από τον Reuter και άλλους ερευνητές (1980) οι οποίοι πρότειναν 4 διαφορετικούς βιολογικούς τύπους. Οι έρευνες υβριδισμού DNA-DNA που αναφέρθηκαν το 1980 (Brigidi, et al., 2001) επιβεβαίωσαν αυτή την ετερογεννητικότητα, έκαναν αναφορά για την ύπαρξη 6 διαφορετικών ομόλογων ομάδων (Πίνακας 1.3). Συνεπώς, μόνο στελέχη που ανήκουν σε όμοια ομάδα και δείχνουν ένα υψηλό βαθμό σχετικότητας DNA με τον τύπο στελέχους του *L. acidophilus* που παρέμεινε σε αυτά τα είδη όταν τα μέλη άλλων ομόλογων ομάδων είχαν κατηγοριοποιηθεί σαν ξεχωριστά είδη π.χ *L. amylovorus*, *L. gallinarum*, *L. crispatus*, *L. gasseri*, και *L. johnsonii*. Αν και ελέγχθηκαν ως διαφορετικά είδη είναι στενά συσχετιζόμενα μεταξύ τους και έχει θεωρηθεί πως ανήκουν σε ένα φυλογενετικό είδος ή κλάδο (Borruel et al., 2003.).

Πίνακας 1.2: Είδη γενικά παρόντα στο ανθρώπινο εντερικό σύστημα. Γνωστά στελέχη

Είδη γενικά παρόντα στο ανθρώπινο εντερικό σύστημα.	Διάστημα στελέχη
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	NCFM(USA)R0010 (Canada)La1 -(Europe)SBT-2062(Japan)
<i>L.casei</i>	Immunitass(Europe)
<i>L.rhamnosus</i>	<i>Shirota</i> (Japan)
<i>L.paracasei</i>	GG (Europe)
<i>L.salivarius</i>	R0052(Canada)
<i>L.johnsonii</i>	CRL 431(Europe)
<i>L.reuteri</i>	UCC118(Europe)
<i>L.crispatus</i>	LA1 (Europe)
<i>L.fermentum</i>	-
<i>L.gasseri</i>	-
<i>Bifidobacterium longum</i>	BB536(Japan)
<i>B.infantis</i>	Yakult(Japan)
<i>B.breve</i>	-
<i>B.bifidum</i>	-
<i>B.adolescentis</i>	-

<i>Enterococcus faecium</i>	Fargo 688(Europe)
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	-
<i>P.acidilactici</i>	-
<i>E.coli</i>	-

Πίνακας 1.3: βακτήρια γαλακτικού οξέος σε εμπορεύσιμα γαλακτοκομικά προϊόντα εμπλουτισμένα με προβιοτικά. Σύγκριση ανάμεσα σε διατροφικούς ισχυρισμούς ταυτότητας αποτελεσμάτων και εξακριβωμένων αποτελέσμάτων.

Όνομα προϊόντος	Παραγωγός/Διανομέας/ (Χώρα)	Ταυτότητα στελεχούς το οποίο θεωρείται πως υπάρχει στο προϊόν	Επιβεβαιωμένη ταυτότητα
ABC	Sobbecke(D)	<i>L.acidophilus, L.casei</i>	<i>L.acidophilus, L.paracasei</i>
Actimel	Danone(F)	<i>L.casei</i> Actimel("Immunitas")	<i>L.paracasei</i>
Andechser Bioaktiv	Bioland(D)	καλλιέργειες BIOGARDE	<i>L.johnsonii</i>
B'A Fruits	B'A France(F)	<i>Bifidobacterium</i> (ενεργό <i>bifidus</i>)	<i>S.thermophilus</i>
BI'AC	TMA(D)	<i>L.acidophilus, L.casei</i>	<i>L.acidophilus; L.paracasei</i> <i>spp.paracasei; S.thermophilus</i>
Biogarde plus(naturel)	Almhof(NL)	<i>L.acidophilus, L.casei, Bifidobacterium</i>	<i>L.acidophilus; S.thermophilus</i>
Bio Snac'	Danone(F)	<i>Bifidobacterium</i> , ζωντανές καλλιέργειες γιαουρτιού	<i>Lc.lactis subsp. lactis</i>
Biotic	Aldi(D)	<i>L.acidophilus</i> LA7	<i>L.acidophilus</i>
Do-filus	Arla(S)	<i>L.acidophilus</i>	<i>L.acidophilus</i>
Fitness Quark	Onken(D)	<i>L.acidophilus, Bifidobacterium</i>	<i>L.johnsonii, S.thermophilus</i>
Fysiq(Mona)	Campina(NL)	<i>L.acidophilus</i> Gilliland, <i>L.casei</i>	<i>L.crispatus, L.paracasei ssp. paracasei</i>
Gaio(Causido)	MD Foods A/S (DK)	<i>Enterococcus faecium, S.thermophilum</i>	<i>Enterococcus faecium, S.thermophilus</i>
Gefilus	Valio(FIN)	<i>Lactobacillus</i> GG, ζωντανή καλλιέργεια γιαουρτιού	<i>L.rhamnosus</i>
Kinderjoghurt mild	J.Bauer KG(D)	<i>L.acidophilus, L.bifidus</i>	<i>L.acidophilus, L.johnsonii, S.thermophilus</i>
Lc1	Nestle(D)	<i>L.acidophilus</i> LA-1	<i>L.johnsonii</i>
Probiotic LA-7-Plus	Bauer(D)	<i>L.acidophilus</i> LA-7	<i>L.acidophilus</i>
Procult Drink	Muller(D)	<i>B.longum</i> , ζωντανές καλλιέργειες γιαουρτιού	<i>L.acidophilus, S.thermophilus</i>
Naireen Pro 3+	Milchwerke Koln(D)	<i>L.acidophilus</i> LA-H3, <i>L.casei</i> LC-H2	ND
Primo	Zott(D)	<i>Bactolab</i> καλλιέργειες	<i>L.acidophilus</i>
Symbalance	Toni Lait(CH)	<i>L.acidophilus, L.casei, L.reuteri</i>	<i>L.acidophilus, L.paracasei, L.reuteri</i>
Vifit	Sudmilch(D)	<i>L.casei</i> GG	<i>L.rhamnosus, L.acidophilus</i>
Vifit Drink	Mona(NL)	<i>L.casei</i> GG, <i>L.acidophilus, B.bifidum</i>	<i>L.acidophilus, L.rhamnosus</i>

<i>Yakult</i>	Yakult, Europe/(D)	<i>L.casei Shirota</i>	<i>L.paracasei</i>
<i>Yogosan</i>	Lidl(D)	<i>L.casei</i>	<i>L.paracasei(casei)</i>

Σημείωση: CH=Ελβετία, D=Γερμανία, DK= Δανία, F=Γαλλία, FIN=Φιλανδία, NL= Ολλανδία, S= Σουηδία.

Η ακριβής ταυτοποίηση μελών της ομάδας *L. acidophilus*, είναι μια σημαντική βοήθεια εναντίον της ένδειξης καταγωγής και τυπικού ξενιστή των ειδών. Οι έρευνες ταυτοποίησης σε διάφορα ήπια γιαούρτια και πρωτότυπα προβιοτικά γιαουρτιού τύπου γαλακτοκομικών προϊόντων έδειξαν τα 26 απομονωμένα στελέχη *Lactobacillus* να αντιπροσωπεύουν τα *L.acidophilus*, *L.johnsonii*, *L.crispatus*, *L.casei*, *L.paracaei*, και *L.rhamnosus*, αποκαλύπτοντας πως μερικά στελέχη έπρεπε να αποταξινομηθούν. Μερικά στελέχη σχεδιασμένα όπως ο *L. acidophilus* φαινόταν να ανήκουν είτε στο είδος *L. Johnsonian* ή το *L.crispatus*. Τα περισσότερα στελέχη τα οποία σχεδιάστηκαν πρόσφατα, όπως το *L. casei* μπορεί στην πραγματικότητα να είναι μέλη είτε του *L. paracasei* είτε του *L. rhamnosus* (σύγκρινε επίσης Collins et al. (2001) και Dicks et al.(1995-1997). Ζωτικοί αριθμοί των *Lactobacilli* σε ήπια και διάφορα προβιοτικά γιαούρτια, εκτιμώντας ότι μερικά προϊόντα περιείχαν μόνο χαμηλούς αριθμούς *Lactobacillus* (Holzaphel et al., 2002). Ένα σημαντικό αλλά επίσης αμφιλεγόμενο θέμα αναφορικά με την ελάχιστη αποτελεσματική δόση των ζωτικών βακτηρίων από τα οποία επιβεβαιώθηκαν επιστημονικά ευεργετικά αποτελέσματα, είναι ακόμη υπό συζήτηση. Σχετικά με την ευρεία ποικιλία των προβιοτικών γιαουρτιών-τύπου γαλακτοκομικών προϊόντων στην αγορά, αυξανόμενη προσοχή έχει επίσης δοθεί σε τρόφιμα ως μεταφορείς για προβιοτικούς *Lactobacilli* και *Bifidobacteria*. Συγκεκριμένο ενδιαφέρον έχει εστιαστεί σε διαφορετικούς τύπους τυριού με προστιθέμενη λειτουργική αξία από την προσθήκη στελεχών πχ του *L. acidophilus*, *L. paracasei*, και είδη *Bifidobacterium* σε διαφορετικούς τύπους τυριών περιλαμβάνοντας το τυρί Cheddar, Tallaga, και Ras, και μαλακά τυριά. Επιπλέον η χρήση του *B. bifidum*, *L. acidophilus*, και *L. rhamnosus* GG έχει επίσης προταθεί για παγωτά και παγωμένα γαλακτοκομικά επιδόρπια με το στέλεχος *L. plantarum* 299v ή *Bifidobacteria* για ένα ζυμωμένο χυλό βρώμης και του *Bifidobacterium spp* για ζυμωμένα λουκάνικα και ζαμπόν. Ο Lee (2003), προτείνει πολλές παραδοσιακές ζυμωμένες τροφές οι οποίες θα έχουν λειτουργικές ιδιότητες έχοντας την επίδραση και των δύο από τα μικροβιακά στελέχη περιλαμβάνοντας (κυρίως *LAB*) και από

άλλα λειτουργικά στοιχεία είτε προερχόμενα από τα συστατικά ή διαμορφωμένα κατά την διάρκεια της ζύμωσης.

Πολλές πασίγνωστες παραδοσιακές ζυμωμένες τροφές μπορεί να θεωρηθούν ως παραδείγματα πχ Korean kimchi sauerkraut και ένας αριθμός από αφρικάνικα δημητριακά κουρκουτιού (πχ ogi and uji), Νιγηριανό garri και ασιατικές τροφές λαχανικών. Η υπόθεση αυτή υποστηρίζεται επίσης από τον Mollin, ο οποίος εστίασε στον ρόλο του *Lactobacillus plantarum* ως ένα εξαιρετικά ετερογενές είδος. Αμέτρητα προβιοτικά συμπληρώματα διατροφής (Εικ. 1.14, 1.15, 1.16) είναι διαθέσιμα στην αγορά συνηθέστερα κυρίως σε κάψουλες αλλά επίσης σε μορφή σκόνης και σε ταμπλέτες.



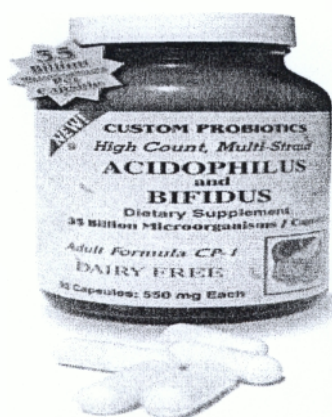
Εικόνα 1.14. προβιοτικό προϊόν Culturelle: Το προϊόν αυτό, βοηθά στην προώθηση της πεπτικής υγείας, την μείωση της δυσπεψίας του εντέρου και του στομάχου. Περιέχει το στέλεχος *Lactobacillus GG* το οποίο είναι κλινικά ερευνημένο και αποδεδειγμένα βελτιώνει την πεπτική υγεία.

Πηγή: <http://www.culturelle.com/>



Εικόνα 1.15.προβιοτικά διαιτητικά συμπληρώματα Floragen: τα προβιοτικά Floragen είναι πολύ αποτελεσματικά για την ανακούφιση παρενεργειών από αντιβιοτικά όπως η διάρροια και η κολίτιδα. Επίσης συμβάλλουν στην διατήρηση της υγείας του γαστρεντερικού συστήματος και την σωστή ισορροπία της κοιλιακής μικροβιακής χλωρίδας. Περιέχουν το στέλεχος *L.acidophilus*.

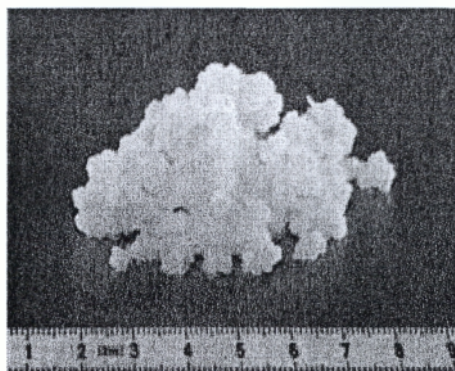
Πηγή: <http://www.florajen.com/>



Εικόνα. 1.16: Το προϊόν *custom probiotics*. Είναι ένα διαιτητικό συμπλήρωμα το οποίο περιέχει μίγματα από μονά στελέχη και πολυστελέχη *Acidophilus* και *Bifidus*. Κάθε κάψουλα περιέχει 35 δις προβιοτικά βακτήρια τα οποία είναι *L.acidophilus*, *L.rhamnosus*, *L.plantarum*, *B.longum* και *B.bifidum*.

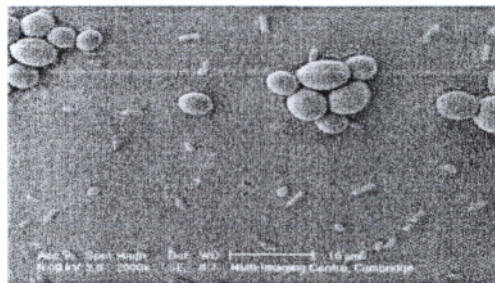
Πηγή: <http://www.customprobiotics.com/>

Όσο για τα προβιοτικά γαλακτοκομικά προϊόντα (Εικ. 1.17), διαμάχες υπάρχουν επίσης για μερικά προϊόντα μεταξύ διαφορετικών «ετικετών με διατροφικούς ισχυρισμούς». Σε σχέση με τα είδη *Lactobacillus* και *Bifidobacterium* τυπικών του προβιοτικού γαλακτοκομικού προϊόντος, τα μη γαλακτικά χορηγούνται μόνο σε μερικά προϊόντα πχ., *Bacillus* IP5832 (ταυτοποιημένο σαν *Bacillus cereus*) σε *Bactisubtil* (Synthelabo Belgium), *Saccharomyces cerevisiae* σε σύμπλεγμα *Bifidus* (Biover Belgium). Επιπλέον, τα στελέχη *Enterococcus faecium*, *L.reuteri*, και ακόμη *Pediococcus acidilacti* έχουν χρησιμοποιηθεί σε μερικά προϊόντα. Οι βιοθεραπευτική για κλινική χορήγηση βασίζεται επίσης σε επιλεγμένα προβιοτικά στελέχη κυρίως *LAB* αλλά μπορεί επίσης να περιλαμβάνει στελέχη *Escherichia coli* (πχ το στέλεχος *Nissle, 1919*), *Saccharomyces cerevisiae (boulardii)* (Εικ. 1.18) και επίσης έναν αριθμό του στελέχους *Enterococcus faecium* και *E. faecalis*. Το τελευταίο έχει αναγραφεί με το όνομα του «*symbioflor 1*».



Εικ.1.17 Κόκκοι kefir (Ζυμωμένο ρόφημα γάλακτος το οποίο προέρχεται από ανάμειξη αγελαδινού και κατσικίσιου γάλακτος με κόκκους από κομμάτια κεφίρ).

Πηγή:<http://en.wikipedia.org/wiki/Kefir>



Εικ. 1.18 Μια ηλεκτρονική μικρογραφία η οποία απεικονίζει την ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* (μεγάλα κύτταρα) τα οποία έχουν περικυκλωθεί από το βακτήριο *E.coli* (μικρότερα κύτταρα),

Πηγή: http://en.wikipedia.org/wiki/Saccharomyces_cerevisiae

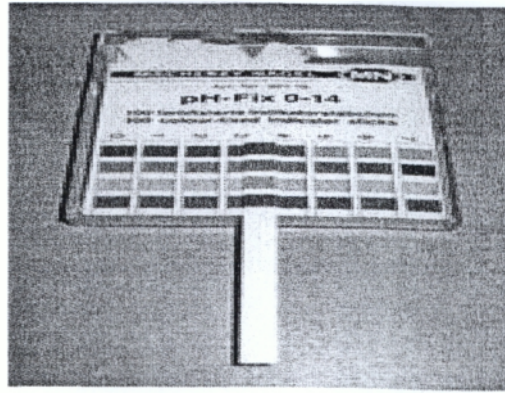
1.6.1 Είδη που χρησιμοποιήθηκαν σαν προβιοτικές καλλιέργειες

Στα προβιοτικά, που εστιάζουν στους ανθρώπους υπάρχουν διαφορετικά είδη στελεχών των γενικών ειδών *Lactobacillus* και *Bifidobacterium*. Ένας αρχικός λόγος για αυτό, είναι πως και τα δύο αυτά «γενικά» βρίσκονται και επικρατούν στο έντερο, και πιο συγκεκριμένα ο *Lactobacillus* στο μικρό έντερο και το *Bifidobacterium* στο μεγάλο έντερο. Από τους γαλακτοβακίλλους, το στέλεχος *L. acidophilus* είναι το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο προβιοτικό αφού έχει ένα μακρό ιστορικό έρευνας και χρήσης. Πολλά από τα είδη των άλλων γαλακτοβακίλλων υπάρχουν στην λίστα του Πίνακα 1.3 είναι στενά συσχετιζόμενα με το *L. acidophilus*. Αυτό το ιστορικό χρονολογείται από τις αρχές του 1900, όταν μια σημαντική έρευνα για την εντερική χλωρίδα επακολούθησε με την δουλειά του Metchnikoff σχετικά με ένα βακτήριο το οποίο παρήγαγε γαλακτικό οξύ, ονομαζόμενο *Bacillus bulgaricus* το οποίο βρέθηκε σε ένα επιδόρπιο γιαουρτιού. Όσο για το *L. acidophilus*, είναι ένα συγγενικό βακτήριο και ένας από τους κυρίαρχους οργανισμούς στον εντερικό σωλήνα, των θηλαζόμενων μωρών, γρήγορα πήρε την θέση του *L. bulgaricus* σαν προβιοτικό επιλογής στις ΗΠΑ (Haller et al., 2001). Έχει συμπληρώσει 100 χρόνια χρήσης στην ανθρώπινη διατροφή. Ακόμη ένα πολύ σημαντικό προβιοτικό *Lactobacillus* είναι το *L. casei*, αφού θεωρήθηκε πως ενισχύει σημαντικά το ανοσοποιητικό σύστημα περιλαμβάνοντας την ιντερλευκίνη και την ιντερφερόνη γ, και ενεργοποιεί την καρκινική δραστηριότητα (tumoricidal activity), όπως επίσης την διέγερση της παραγωγής της ανοσοσφαιρίνης A (Dunne et al., 2001). Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα την παρασκευή επιτυχημένων προβιοτικών οιοπνευματωδών ποτών (beverages) τα οποία απεικονίζονται στον Πίνακα 1.2 (βλέπε σελ 20). Θεωρήθηκε πως η ανοσολογική αντίδραση συμβαίνει, επειδή δημιουργούνται αποικίες στο μικρό έντερο σε κοντινή περιοχή των κηλίδων του Peyer's οι οποίες είναι πολύ ανοσοποιητικές. Πολλοί άλλοι γαλακτοβάκιλλοι, όπως επίσης και μερικά *bifidobacteria* φαίνονται πως διεγείρουν μια ενισχυμένη ανοσολογική αντίδραση (Dunne et al., 2001). Από τα *bifidobacteria*, το *B. longum* είναι το κυρίως επικρατέστερο στα ανθρώπινα έντερα και είναι ένα από τα λίγα είδη το οποίο τακτικά φιλοξενεί τα πλασμίδια (Hoogkamp et al., 1979). Είναι ένα πολύ ευρέως διαδεδομένο είδος το οποίο χρησιμοποιείται μεταξύ διαφορετικών ειδών *bifidobacterium* σε εμπορικά προβιοτικά για ανθρώπους (Clements et al., 1983). Πιο συγκεκριμένα, είναι από τα πιο συχνά αναφερόμενα είδη σχετιζόμενα με πολλές από τις ισχυρισμένες ευεργετικές ιδιότητες των *bifidobacteria*. Αυτά περιλαμβάνουν την πρόληψη από την πρόκληση διάρροιας σε ασθενείς που

τους είχε χορηγηθεί αντιβιοτικό, (Schwab et al., 1977) μείωση χοληστερόλης, (Conge et al., 1980), εξάλειψη των συμπτωμάτων δυσανεξίας στην λακτόζη, (Fuller et al., 1989), διέγερση του ανοσοποιητικού, (Havenaar et al., 1992,) και πρόληψη από τον καρκίνο (Salminen et al., 1998). Αυτό το είδος είναι το πρωταρχικά σχετιζόμενο με την πρόληψη καρκίνου και υπάρχουν αναφορές πως προστατεύει ενάντια στα πολλά διαφορετικά καρκινογόνα κύτταρα περιλαμβάνοντας τις μεθυλικές κινολίνες (quinolines) (Salminen et al., 1998), ετεροκυκλικές αμίνες (Guarner et al., 1998), νιτροζαμίνες, και αζομεθάνη (FUF0SE, 1999). Το στέλεχος *B. infantis*, το οποίο είναι το πιο κοντινό γενετικά συγγενές στο *B. longum*, αποικιοποιείται στο έντερο παιδιών.

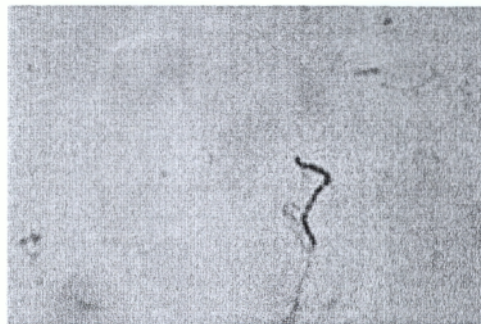
1.7 ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

Πρόσφατα τα πιο καλά μελετημένα προβιοτικά είναι κύρια στελέχη των *LAB* συγκεκριμένα *lactobacilli* και σε μεγαλύτερο βαθμό *bifidobacteria* (Charteris et al. 1997, Holzaphel et al. 1998-2001, Gommès and Malcata 1999). Τα *LAB*, είναι θετικά κατά Gram, μη σπορογόνα, αρνητικά στην καταλάση, αρνητικοί στην οξειδάση μικροοργανισμοί οι οποίοι είναι αεροανθεκτικοί, τρέφονται πολύ γρήγορα, είναι ανθεκτικοί στα οξέα και αυστηρά ζυμωτικοί. Πράγματι, το *LAB* αντιπροσωπεύει ένα είδος βακτηρίων, τα οποία μεταβολικά σχετίζονται με την ικανότητα τους να παράγουν γαλακτικό οξύ κατά την διάρκεια της ομογαλακτικής ζύμωσης ή της ετερογαλακτικής ζύμωσης των υδατανθράκων. Η οξική και ενζυματική διαδικασία, συνοδεύει την ανάπτυξη του *LAB* σχετικού με τις προσδιδόμενες ποιότητες, «κλειδί» της γεύσης, και περιεχόμενα ποικιλίας των ζυμώμενων τροφών και μέσων όρων. Πολλά μέλη του *LAB* απασχολούν σημαντικές θέσεις στο Gastrointestinal tract (GIT)-Γαστρεντερικό σωλήνα των ανθρώπων και ζώων. Πράγματι, βρέθηκαν σαν συμβιωτικοί μικροοργανισμοί του γαστρεντερικού σωλήνα, στην στοματική κοιλότητα και το θηλυκό ουρογεννητικό σύστημα των ζώων, και των ανθρώπων. Λόγω του χαμηλού pH (Εικ. 1.19) στο στομάχι, το μικροβιακό φορτίο είναι πολύ χαμηλό (10^3 cfu gr⁻¹).



Εικ. 1.19 Μετρητής pH με δείκτη χαρτιού. Πηγή: <http://el.wikipedia.org/wiki/PH>

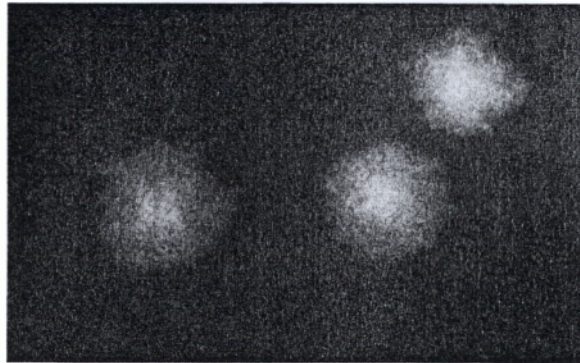
Ο πληθυσμός του στομάχου, αποτελείται από *LAB* όπως *lactobacilli*, *streptococci* (Εικ. 1.20) και ζύμες. Αυξανόμενοι πληθυσμοί των *Bifidobacteria*, Gram αρνητικά ικανά αερόβια βακτήρια, όπως τα *εντεροβακτήρια* και τα υποχρεωτικά αναερόβια βακτήρια όπως *Bacteroides* και *Fusobacterium*, εμφανίζονται στις πιο μακρινές περιοχές του μικρού εντέρου σε σχέση με το *LAB*. Οι αριθμοί αυξάνονται από 10^4 cfu gr^{-1} στην νήστιδα και σε 10^8 cfu gr^{-1} στον ιλεό.



Εικόνα 1.20. *Streptococcus*. Ο *Streptococcus* είναι ένα γένος των σφαιρικών Gram + βακτηρίων και μέλος των φύλων *Firmicutes*. Οι στρεπτόκοκκοι ανήκουν στα βακτήρια γαλακτικού οξέος. Πηγή: <http://en.wikipedia.org/wiki/Streptococcus>

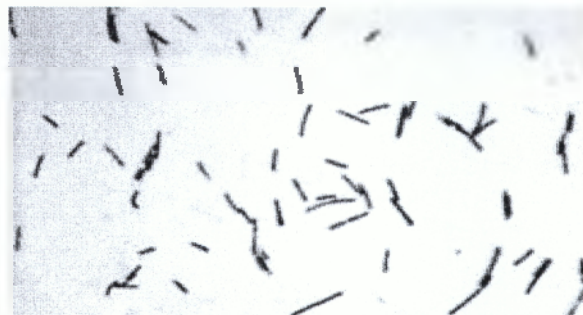
Το παχύ έντερο, περιέχει γύρω στα 10^{11} με 10^{12} cgu gr^{-1} και στο οποίο βρίσκονται περισσότερα από 300-500 είδη μαζί με αυστηρά αναερόβια (*Bacteroides*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium*) που είναι οι πιο επικρατέστερες ομάδες. Τα αυστηρά αναερόβια όπως *Clostridium* (Εικ. 1.21, 1.22) και τα πιο ικανά αερόβια, περιλαμβάνοντας *Lactobacilli* θεωρούνται λιγότερο σημαντικοί πληθυσμοί στο

έντερο. Πρακτικά, όλοι οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται σε προβιοτικά τρόφιμα ή συμπληρώματα τροφών είναι αντιπρόσωποι των γενικών *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, και *Enterococcus*. Απο τα 91 είδη, στελέχη των περισσότερων από 12 είδη των *Lactobacillus*, είναι προβιοτικά (Tannock 1999, Holzapfel et al., 1998).



Εικ. 1.21 Αποικίες του βακτηρίου *Clostridium difficile* σε ένα τρυβλίο με blood άγαρ.

Πηγή: http://en.wikipedia.org/wiki/Clostridium_difficile



Εικ. 1.22 : Μικροφωτογραφία του Gram θετικού βακίλου *Clostridium perfringens*.

Πηγή, http://en.wikipedia.org/wiki/Clostridium_perfringens

Από τα 31 *Bifidobacterium* είδη πρόσφατα γνωστά έχουν εντοπιστεί τα 11 σε κόπρανα ανθρώπων. Στελέχη που ανήκουν σε 5 είδη, είναι προβιοτικά (Tannock 1999). Δυστυχώς οι περισσότερες καλλιέργειες *LAB*, που χρησιμοποιούνται σε προβιοτικά προϊόντα, δεν έχουν τον κατάλληλο σχεδιασμό ειδών. Αυτή είναι η υπόθεση για στελέχη που ανήκουν στο *L. acidophilus* σύμπλεγμα, το *L. casei* σύμπλεγμα, και το *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium animalis* σύμπλεγμα

(Klein et al 1998). Επίσης, χαρακτηρισμός και έρευνα των μηχανισμών δράσης αυτών των μικροοργανισμών, βρίσκεται πίσω από τον χαρακτηρισμό και την έρευνα in vitro καθώς και των κλινικών αποτελεσμάτων (Reedy 1999, Overhand et al 1999b, Reid et al., 2001).

Lactobacilli

Οι ομοζυμωτικοί γαλακτοβάκิลλοι οι οποίοι είναι τυπικοί του ανθρώπινου ξενιστή, αντιπροσωπεύονται από 3 ομάδες 1) το σύμπλεγμα *Lactobacillus acidophilus*, (το οποίο ανήκει στην κατηγορία *Lactobacillus delbrueckii*, 2) το σύμπλεγμα *Lactobacillus salivarius*, (το οποίο ανήκει στην κατηγορία *L. salivarius*) και 3) το σύμπλεγμα *Lactobacillus casei* (το οποίο ανήκει στην κατηγορία *Lactobacillus plantarum* (Εικ. 1.23) (Klapphammer et al., 2002). Ο *Lactobacillus acidophilus*, θεωρείται ότι είναι το πιο πιθανό είδος για να πραγματοποιήσει τα βασικά κριτήρια τα οποία αναμένονται από μια μικροβιακή καλλιέργεια, όπως:

Επιβίωση διαμέσου του GIT (gastrointestinal tract) γαστρεντερικού σωλήνα, αντοχή στο οξύ, χολική αντοχή, και παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών. Είναι φαινομενικά δύσκολο για το στελέχος *L. acidophilus* να κρίνουμε την ετερογένεια που επιβεβαιώθηκε από DNA-RNA έρευνες υβριδικών μελετών οι οποίες αναφέρθηκαν το 1980 (Johnson et al., 1980, Lower et al., 1980). Αυτοί οι συγγραφείς πρότειναν 6 διαφορετικές DNA ομόλογες ομάδες.



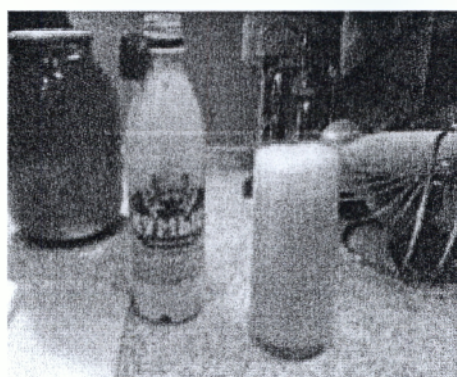
Εικ.1.23 *Lactobacillus plantarum* 299v

Πηγή:<http://images.google.gr/images?hl=el&q=Lactobacillus%20plantarum&ie=UTF-8&oe=UTF-8&um=1&sa=N&tab=wi>

Σαν συνέπεια, μόνο στελέχη που ανήκουν στην ομόλογη ομάδα η οποία έδειξε έναν υψηλό βαθμό DNA συγγένειας με τον *L. acidophilus*, ο οποίος παρέμενε σε αυτά τα είδη, όταν μέλη άλλων DNA ομόλογων ομάδων κατηγοριοποιήθηκαν σε ξεχωριστά είδη πχ *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus gallinarum*, *Lactobacillus gasser*,

crispatus, και *johnsonii*. Αν και αυτά εκτιμούνται ως ξεχωριστά είδη, είναι στενά συνδεδεμένα και έχουν θεωρηθεί πως ανήκουν σε ένα φυλογενετικό είδος ή κλάδο το επονομαζόμενο *L. acidophilus* σύμπλεγμα (Kjalhammer and Russel 2000.) Από τα 6 είδη σε αυτό το σύμπλεγμα, ο *L. acidophilus* συνεχίζει να είναι το βακτήριο που συχνά εμπλέκεται στο να παρέχει προβιοτικά αποτελέσματα, και παραμένει από τα είδη που βρίσκεται συνήθως σε τροφές, ή σε συμπληράματα τροφών που περιέχουν προβιοτικές καλλιέργειες. Αυτό το είδος περιγράφηκε πρώτη φορά από τον Moro(1900) σαν *Bacillus acidophilus* και ονομάστηκε πάλι από τους Hansen and Moquist (1970). Στις αρχές του 1930, παρασκευάσματα που περιείχαν τον *L. acidophilus* χρησιμοποιήθηκαν για να εξαλείψουν τα συμπτώματα της δυσκοιλιότητας (Reetger 1935). Επίσης *L. johnsonii* στελέχη, έχουν κυρίως απομονωθεί στα κόπρανα των ανθρώπων και ζώων. (Johnson et al., 1980, Fukazawa et al., 1992) υπονοώντας πως αυτά τα βακτήρια αποτελούν μέρος της φυσικής εντερικής χλωρίδας. Μαζί με άλλα είδη της ομάδας σχετικά με τα προβιοτικά με το όνομα *L. gasseri* περιγράφηκαν τα έτη 1980-1992.

Αυτός μπορεί να είναι ο λόγος, γιατί η ταυτοποίηση των στελεχών όπως το *L. acidophilus* ήταν συνηθισμένη και δεν δικαιολογούσε τις περισσότερες περιπτώσεις. (Klein et al., 1998). Επίσης, το *L. crispatus* που πρωτοπεριγράφηκε το 1953 χρησιμοποιήθηκε σαν προβιοτικό. Ο *Lactobacillus johnsonii* la1 (επίσημα *L. acidophilus* la1), είναι ένα αποκλειστικό στέλεχος της Nestle το οποίο έχει εκτεταμένα μελετηθεί για τις προβιοτικές του ιδιότητες. Ζυμωμένα προϊόντα του γάλακτος διατίθενται στην αγορά σε διάφορες συσκευασίες (Εικ. 1.24, 1.25).



Εικ. 1.24 Kumis: Ζυμωμένο ποτό το οποίο φτιάχνεται παραδοσιακά από γάλα αλόγου. Το Kumis είναι ένα γαλακτοκομικό προϊόν παρόμοιο με το κεφίρ αλλά παράγεται από μια υγρή αρχική καλλιέργεια σε αντίθεση με τους σπόρους κεφίρ. Πηγή: <http://en.wikipedia.org/wiki/Kumis>

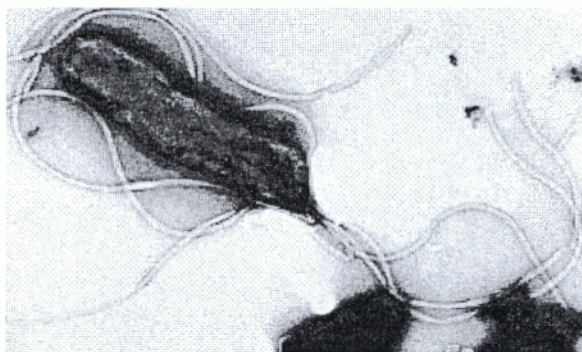


Εικόνα 1.25, *L.casei Shirota*. Το Yakult, είναι ένα προβιοτικού τύπου γιαούρτι το οποίο παρασκευάζεται με την ζύμωση λευκού γάλακτος και ζάχαρης με ένα ειδικό στέλεχος του βακτηρίου *Lactobacillus casei*. Επειδή το βακτήριο *L.casei shirota* βρίσκεται συνήθως στο πεπτικό σύστημα, το Yakult θεωρείται ευεργετικό για την υγεία του εντέρου. Έχει φυσική γεύση κίτρου.

Πηγή: <http://en.wikipedia.org/wiki/Yakult>

Το στέλεχος αυτό, ρυθμίζει την αντίδραση του ανοσοποιητικού συστήματος (Link – Amster et al 1994, Marteau et al., 1997, Pfeifer and Rosat 1998, Ponnet –Hughes et al., 1999, Haller et al., 2002), προσκολλάται στο ανθρώπινο εντερικό κύτταρο Caco-2 *in vitro* (σε *in vitro* αναλύσεις να προβλεφθεί ο ρυθμός απορρόφησης του υποψηφίου φαρμάκου απ΄τον φραγμό του επιθηλίου του εντέρου) (Granato et al., 1999), και δημιουργεί προσωρινά αποικίες στον ανθρώπινο Γαστρεντερικό Σωλήνα (GIT, Gastrointestinal Tract) (Pfeifers and Rossat 1998, Granato et al., 1999). Έχει αποδειχθεί ότι, το λιποτεϊκό οξύ από το τοίχωμα των βακτηριακών κυττάρων παίζει σημαντικό ρόλο στην προσκόλληση των *L. johnsonii Lal* κυττάρων σε ανθρακώδη κύτταρα του ασβεστίου (Granato et al., 1999 και το στέλεχος, μοιράζεται την εξειδίκευση της προσκόλλησης των υδατανθράκων με τα εντεροπαθογόνα βακτήρια (Neeser et al., 2000). Στην συνέχεια, το *L. johnsonii lal*, μειώνει την αντιβακτηριδιακή δραστηριότητα των Gram+ και Gram–παθογόνων βακτηρίων (Bennett et al., 1994, Bernet Camard et al., 1997, Perez et al., 2001), περιλαμβάνοντας το στέλεχος *H.pylori* (Michetti et al., 1999, Felley et al., 2001, Gottleland, and Cruchet 2003). Τελικά, το στέλεχος *L. johnsonii lal*, έχει επίσης μια δυναμική δραστηριότητα εναντίον πρωτόζωων που προκαλούν διάρροια όπως τα *Cryptosporidium parvum* και *Giardia intestinalis* (Perez et al., 2001, Foster et al., 2003). Το *L. gasseri*, φαίνεται πως αντιπροσωπεύει το κύριο ομοζυμωτικό είδος *Lactobacillus*, το οποίο καταλαμβάνει τον ανθρώπινο γαστρεντερικό σωλήνα. Το

Lactobacillus gasseri, δείχνει καλή επιβίωση στον γαστρεντερικό σωλήνα (Pedrosa et al., 1995, Fujiwara et al., 2001a), και έχει συσχετιστεί με μια ποικιλία από προβιοτικές δραστηριότητες και ρόλους, περιλαμβάνοντας μείωση των μεταλλαξογόνων ενζύμων στα κόπρανα (Pedrosa et al., 1995, Sreekumar and Hosono 1998). Επίσης, παρεμπόδιση του *H. pylori* (Εικ. 1.26) στελέχους (Sakamoto et al., 2001 και ανοσοδιέγερση (Kitasawa et al., 2002) περιγράφηκαν για το στέλεχος *L. gasseri*. Τελικά, πολλές βακτηριοκίνες έχουν απομονωθεί από καλλιέργειες στελεχών τα οποία απομονώθηκαν σε κόπρανα ανθρώπων (Toba et al., 1991, Hoh et al., 1995, Kawai et al., 2001).



Εικόνα 1.26, *Helicobacter pylori*. Το *Helicobacter pylori* είναι ένα βακτήριο το οποίο προσβάλλει την βλεννική γραμμή του στομάχου και του δωδεκαδαχτύλου. Πολλές περιπτώσεις πεπτικού έλκους, γαστρίτιδας, και δωδεκαχτυλίτιδας προκαλούνται από την προσβολή με *H. pylori*. παρόλα αυτά αυτοί που προσβάλλονται δεν εμφανίζουν κανένα σύμπτωμα της νόσου. Τα βακτήρια *Helicobacter pylori*, είναι οι μόνοι μικροοργανισμοί που μπορούν να αντέξουν στο οξικό περιβάλλον του στομάχου. Η ελικοειδής μορφή του (γι αυτό και το όνομα *Helicobacter*) έχει εξελιχτεί για να διαπεράσει και να αποικίσει την επένδυση βλέννας (Πηγή: http://en.wikipedia.org/wiki/Helicobacter_pylori).

Ο *Lactobacillus salivarius*, είναι ένα ακόμη ενδογενές μέλος του ανθρώπινου γαστρεντερικού σωλήνα (Holzaphel et al., 1998). Το καλύτερο παράδειγμα προβιοτικού, είναι πιθανόν το *L. salivarius subsp salivarius uc118*. Αυτό το στέλεχος, επιλέχθηκε από μια ποικιλία βακτηρίων απομονωμένων σε διαχωρισμένο ανθρώπινο ιλεό. Οι εξεταστικές μέθοδοι αποτελούνταν από τεστ ανθεκτικότητας στο γαστρικό οξύ, ανθεκτικότητα στο χολικό οξύ, προσκόλληση στα επιθηλιακά κύτταρα

του εντέρου (Εικ. 1.27), in vitro αντιμικροβιακή δραστηριότητα, επιβίωση διαμέσου του γαστρεντερικού σωλήνα των ποντικών και ανθρώπων, και το αποτέλεσμα της σίτισης σε ένα μοντέλο τρωκτικού (murine model) ενός προσβεβλημένου με φλεγμονή σωλήνα (Dunne et al., 1999).



Εικ.1.27 Επιθηλιακά κύτταρα σε καλλιέργεια χρωματισμένες για κερατίνη (κόκκινο), και DNA (πράσινο). Πηγή : <http://en.wikipedia.org/wiki/Epithelium>

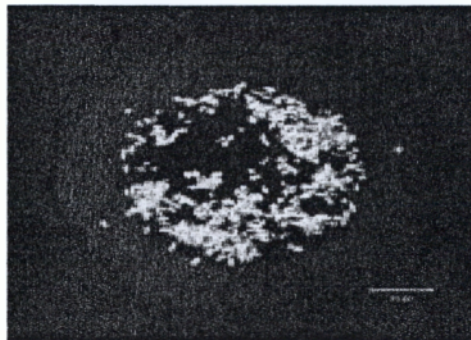
Επιπλέον, αυτό το στέλεχος παράγει την βακτηριοκτονίνη ABP118. (Flynn et al., 2002). Μέλη του είδους *L. casei*, μπορεί να είναι απομονωμένα από τις αναπαραγόμενες και εντερικές οδούς των ανθρώπων και ζώων (Holzaphel et al., 1998, Reuter et al., 2002). Αυτό το είδος επίσης, περιέχει τα είδη *L. zeae* και *L. rhamnosus*. Τα είδη *L. casei* ορίστηκαν με ένα φτωχό ορισμό και περιέχουν 5 υποείδη βασιζόμενα στο φαινοτυπικά χαρακτηριστικό με το όνομα *L. casei. subsp alactosus*, *L. casei subsp casei*, *L. casei subsp pseudoplantarum*, *L. casei subsp rhamnosus* και *L. casei subsp tolerans*. Βασισμένο στις έρευνες του ομόλογου DNA οι Collins et al., (1989) αποφάνθηκαν ότι, η πλειοψηφία των οργανισμών που σχεδίασε το *L.casei subsp casei* μαζί με το *L. casei subsp alactosus*, *L. casei pseudoplantarum* and *L. casei subsp tolerans* έδειξαν υψηλά επίπεδα των συγγενών DNA όμως ήταν ξεχωριστά από τον τύπο στελεχών του *L. casei subsp casei*. Πρότειναν, να δοθούν 3 υποείδη της ομόλογης ομάδας του *L. casei subsp paracei* και έπειτα του *L. paracei subsp.tolerans* και *L. rhamnosus*. Παρόλα αυτά βασιζόμενο σε DNA ομολογίες με άλλα είδη και στελέχη, το ονομαζόμενο είδος *L.paracasei* αμφισβητήθηκε ενώ το στέλεχος *L. casei* και τα είδη *L. zeae*, *L. casei* και *L. rhamnosus* (Dellalgio et al., 1991-1992, Dicks et al., 1996) εισηγήθηκαν για χρήση. Και τα *L. casei paracei* και *L. rhamnosus* είναι ενδογενή στελέχη που υπάρχουν στο ανθρώπινο GIT και έχουν

χρησιμοποιηθεί στα προβιοτικά για ανθρώπους και ζώα (Reuter et al 2002). Παραδείγματα, είναι τα στελέχη *L. rhamnosus* GG και *L. casei shirota*. Αυτά τα στελέχη, είναι πιθανόν τα πιο αναφερόμενα προβιοτικά στελέχη (Goldin 1998, and Yakult 1999). Επίσης, μερικά στελέχη του *Lactobacillus plantarum* έχουν εμπορευθεί σαν προβιοτικά. Ένα παράδειγμα είναι το *L. plantarum 299v*, που προσφέρει ποικίλα ευεργετικά αποτελέσματα στην υγεία του καταναλωτή (Adawi et al., 2001, Cummingham –Ruhdles et al., 2000, Goosens et al., 2003, Wult et al 2003). Επιπλέον, το γονίδιο του *L. plantarum WFC51*, ένα στέλεχος το οποίο είναι ικανό να επιβιώνει μέσα από το στομάχι και μπορεί να παραμένει για περισσότερες από 6 ημέρες στον ανθρώπινο γαστρεντερικό σωλήνα (Versa et al., 2000) έχει ολοκληρωτικά επιβεβαιωθεί (Kleereberem et al., 2003). Διαδοχή του γονιδίου, μπορεί να κάνει πιο εύκολη την μελλοντική έρευνα πάνω στα προβιοτικά στελέχη. Τελικά, μερικοί ετεροζυμωτικοί γαλακτοβάκิลλοι σαν ένα μέρος του φυσικού μικροβιακού πληθυσμού στον ανθρώπινο γαστρεντερικό σωλήνα έχουν ταυτοποιηθεί, και περιλαμβάνουν κυρίως το είδος *Lactobacillus reuteri* και σε έναν ασήμαντο βαθμό το *Lactobacillus oris* και το *Lactobacillus vaginalis* (Holzaphel et al., 1998). Το *Lactobacillus reuteri*, αποτελεί ένα ενδιαφέρον είδος ως αντιμικροβιακή ουσία (reuterin, reuterin, reuterin βακτηριοσίνες) το οποίο παράγει προβιοτικά και χρησιμοποιείται στην διατροφή των ζώων όπως επίσης και σε προϊόντα τύπου γιαουρτιού και σε φαρμακευτικά παρασκευάσματα (Klein et al., 1998, Rodriguez et al., 2003, Rosenfelt et al., 2003).

1.8 ΕΠΙΒΙΩΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

Τα περισσότερα προβιοτικά εμπορίου, έχουν ελεγχθεί in vitro για την αντίστασή 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 (Εικ. 1.28). 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).



Εικ.1.28 προβιοτικά βακτήρια.

Πηγή:<http://images.google.gr/images?hl=el&q=probiotic%20bacteria&ie=UTF-8&oe=UTF-8&um=1&sa=N&tab=wj>

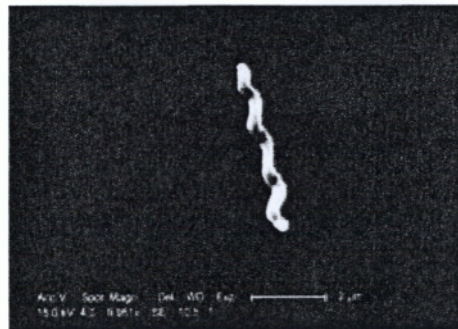
1.9. ΑΝΤΙΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ ΕΝΑΝΤΙΟΝ ΤΩΝ ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΣΒΑΛΛΟΥΝ ΤΟ ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Το κύριο παθογόνο στο ανώτερο εντερικό σύστημα, (γαστρεντερικός σωλήνας) είναι το *Helicobacter pylori* (Moblely et al., 2001, Actman and Suerbam 2001). Το *Helicobacter pylori*, είναι ένα σπειροειδές βακτήριο, το οποίο προσβάλλει το στομάχι στο 50% του πληθυσμού. Η μόλυνση οδηγεί σε γαστρίτιδα, και σε περίπου 10% αυτών που έχουν προσβληθεί, σε ανάπτυξη των γαστρικών ελκών. Επιπλέον, η αποσύνθεση των αποικιών του στομαχιού από αυτό το βακτήριο μπορεί να οδηγήσει σε γαστρικό καρκίνο, στο 1% περίπου των ανθρώπων που έχουν μολυνθεί. Το βακτήριο, μπορεί να εξοντωθεί από το ανθρώπινο στομάχι με την χορήγηση κοκτέιλ αντιβιοτικών και φαρμάκων που επηρεάζουν την οξύτητα του στομάχου, το οποίο οδηγεί σε θεραπεία των πεπτικών ελκών και συνεπή μείωση σε πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου. Προβλήματα, τα οποία μετρήθηκαν με την πρόσφατη εξόντωση του *H. pylori*, βρίσκονται σε ποσοστό αυξανόμενο της μείωσης αποτυχίας, κυρίως χάρη σε αυξανόμενα ποσοστά της αντίστασης του *H. pylori* σε χορηγούμενα αντιβιοτικά. Η χρήση των προβιοτικών, μπορεί να αποτελέσει μια ενδιαφέρουσα εναλλακτική για τα standards σε πολλαπλές αντιβιοτικές θεραπείες. Πολλά LAB, έχουν δείξει αναστολή του *H. pylori*. Παρόλα αυτά, η απαραίτητη βάση της αναστολής του *H. pylori* δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί. Το κατώτερο μέρος του γαστρεντερικού σωλήνα, μπορεί να μολυνθεί από άλλα παθογόνα όπως *Escherichia coli*, *Salmonella* (Εικ. 1.29), *Bacteroides fragilis*, *Campylobacter jejuni* (Εικ. 1.30), *C. difficile*, *C. perfringens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes* (Εικ. 1.31α, 1.31β), *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella dysenteriae* (Εικ. 1.32), *Shigella flexneri*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, και *Yersinia enterocolitica* (Berkes et al 2003). Η γαστρεντερίτιδα, μπορεί να προκληθεί από μια ποικιλία παθογόνων περιλαμβάνοντας τους rotavirus ιούς *E. coli*, *Campylobacter* (Εικ. 1.30) και *Salmonella*, χάρη στην υπερανάπτυξη των εντέρων (MC Daniel et al., 1995, Sansonetti and Phalipon 1999, Lu and Walker 2001).



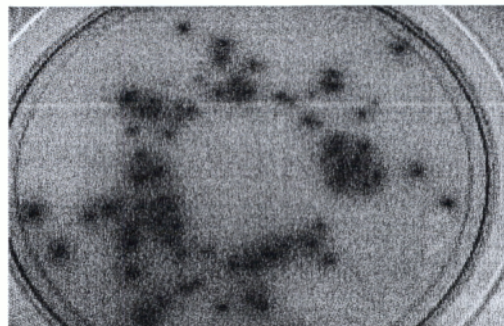
Εικ. 1.29: Αποικίες του βακτηρίου *Salmonella enterica Typhimorium* σε ένα εντερικό τρυβλίο άγαρ.

Πηγή , [http://www.wikipedia.org/wiki/Salmonella enterica](http://www.wikipedia.org/wiki/Salmonella_enterica)



Εικ. 1.30. Ηλεκτρονική μικρογραφία του στελέχους *Campylobacter jejuni*, η οποία απεικονίζει την χαρακτηριστική ραβδόμορφη καμπύλη του οργανισμού.

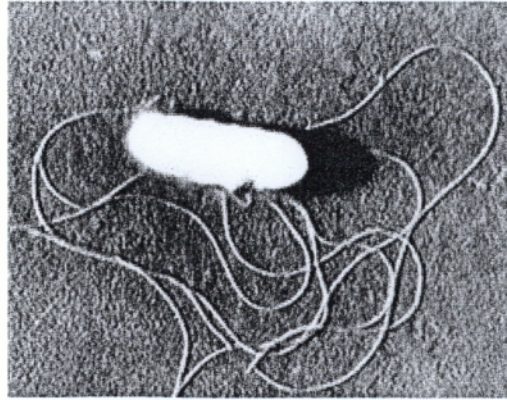
Πηγή: http://en.wikipedia.org/wiki/Campylobacter_jejuni



Εικόνα 1.31a., *Listeria monocytogenes*

Αποικίες του τυπικού στελέχους *Listeria monocytogenes* όπως εμφανίζονται όταν μεγαλώνουν(αναπτύσσονται) σε ένα επιλεκτικό στρώμα Άγαρ για *Listeria*.

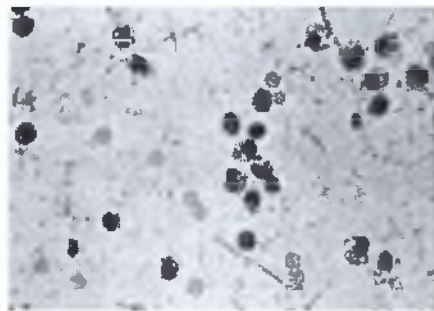
Πηγή: http://en.wikipedia.org/wiki/Listeria_monocytogenes



Εικόνα. 1.31b, *Listeria monocytogenes*.

Σκαναρισμένη ηλεκτρονική μικρογραφία του βακτηρίου *Listeria monocytogenes*

Πηγή: <http://en.wikipedia.org/wiki/Listeria>



Εικόνα 1.32, *Shigella spp.* Μικροφωτογραφία του βακτηρίου *Shigella spp.*, σε κόπρανα ανθρώπου.

Πηγή: <http://en.wikipedia.org/wiki/Shigella>

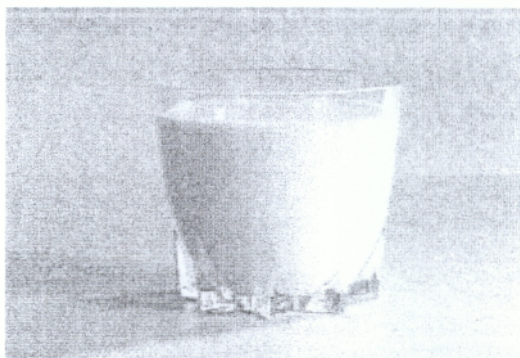
Τα εντεροπαθογόνα (E.Pec) και εντεροαιμορραγικά βακτήρια (E.Hec) *E.coli*, καθορίζουν την επίδραση τους στον ξενιστή κύτταρο με το να προσκολλούνται σε αυτό, και να εξαλείφουν τις βλάβες των κυττάρων του εντέρου. Αυτό, χαρακτηρίζεται από τοπικές καταστροφές των συνόρων των μικροβίων, οικεία βακτηριακή προσκόλληση, και κύρια κυτταροσκελετική αναδιάταξη. Τα προβιοτικά, μπορούν να παρεμβαίνουν στην παθογένεση των βακτηρίων αυτών με πολλούς μηχανισμούς, κατά συνέπεια προλαμβάνοντας και αλληλεπιδρώντας στην μόλυνση. Η *Salmonella enterica ser. Typhimorium* είναι ένα εντεροδυσεντερικό παθογόνο το οποίο προκαλεί

μολυσματική διάρροια. Σε ένα πρώτο βήμα, το βακτήριο θα έρθει σε επαφή με τα Μ κύτταρα της σύνδεσης του Payer.

Συνεπώς, θα περάσει το φράγμα του επιθηλίου με το να εισέλθει μέσω της διόδου στα Μ κύτταρα. Αργότερα, τα Μ κύτταρα θα καταστραφούν και τα βακτήρια θα εισβάλλουν στα υπόεπιθηλιακά μακροφάγα. Θα προκαλέσουν σε ένα ενισχυμένο μακροφάγο απόπτωση, και μια αντίδραση ανοσολογική και φλεγμονώδης. Είναι ένα πρόβλημα υγείας, το οποίο απασχολεί τον περισσότερο κόσμο, ανάμεσα σε παιδιά και νήπια. Σίγουρα, προβιοτικά έχουν βρεθεί να είναι χρήσιμα στο να προνοούν και να θεραπεύουν κάποιους τύπους βακτηρίων που προκαλούν διάρροια, λόγω της ικανότητας τους να μεταβάλλουν την δραστηριότητα της μικροβιακής χλωρίδας του εντερικού συστήματος και ανταγωνίζονται τα δυναμικά παθογόνα (βλέπε παρακάτω). Ο βασικός τους μηχανισμός δεν είναι γνωστός. Σ' αυτό το κεφάλαιο θα εστιάσουμε στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ προβιοτικών *Lactobacilli*, *E. coli* *Bifidobacteria* *Salmonella* και *H. pylori*, συγκεκριμένα με σεβασμό στην έκφραση των αντιμικροβιακών τους δραστηριοτήτων.

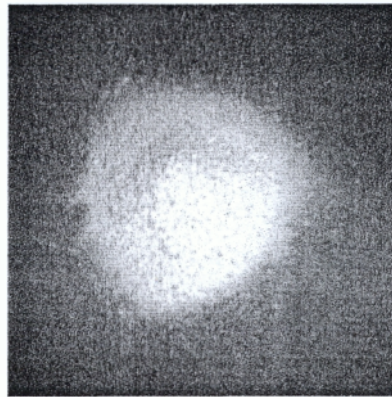
1.9.1 Χορήγηση και κατανάλωση των προβιοτικών

Ζωτικά στελέχη ειδικά της ομάδας του *Lactobacillus acidophilus* και του *Bifidobacterium bifidum* παρουσιάστηκαν σε γαλακτοκομικά προϊόντα στην Γερμανία κατά τα τέλη του 1960s εξαιτίας των αναμενόμενων προσαρμογών στο έντερο και τα αισθητηριακά οφέλη για ήπια παραγωγή ξινισμένων γιαουρτιών. Τέτοια προϊόντα έγιναν αρχικά γνωστά στην Γερμανία σαν ήπια γιαούρτια ή βιολογικά γιαούρτια όταν στις ΗΠΑ το γάλα που περιείχε το στέλεχος *L. acidophilus* ήταν πιο γνωστό (Εικ. 1.33, 1.34) (Holzaphel et al., 2001).



Εικόνα. 1.33 Γάλα αγελάδος εμπλουτισμένο με προβιοτικά και πρεβιοτικά.

Πηγή: <http://en.wikipedia.org/wiki/milk>



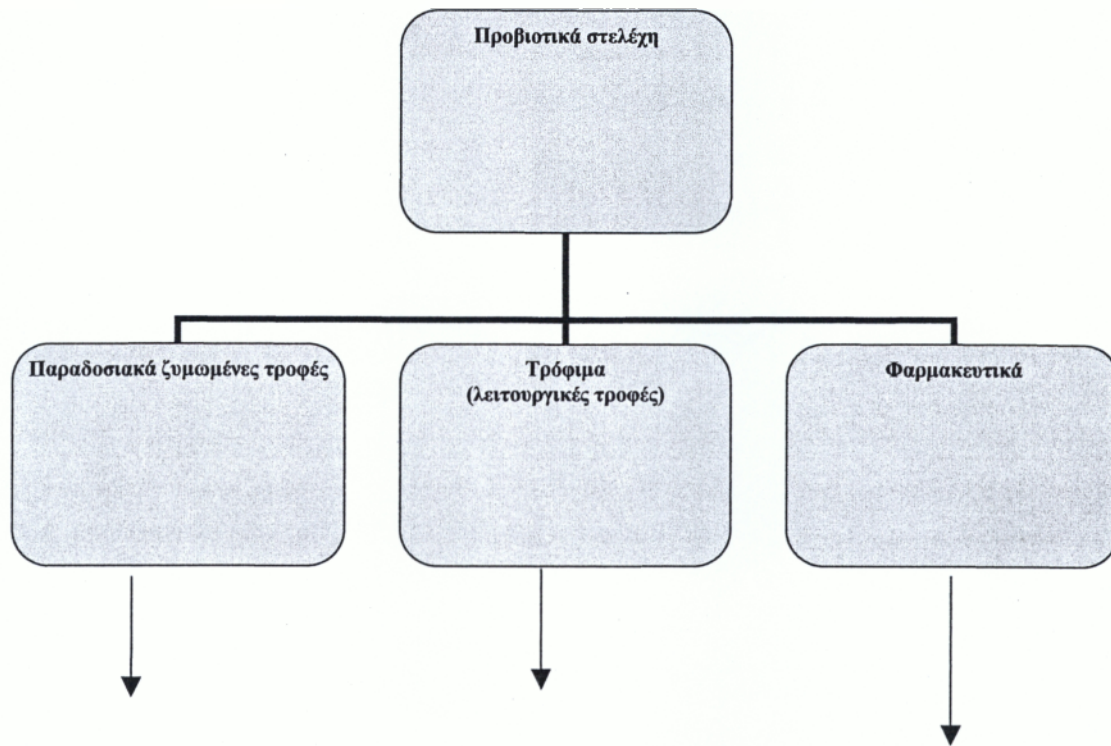
Εικόνα. 1.34 σκόνη γάλακτος.

Πηγή: http://en.wikipedia.org/wiki/Powdered_milk

Όπως απεικονίζεται στο Σχήμα 1.1, τα προβιοτικά είναι διαθέσιμα και μπορεί να χορηγούνται σε διαφορετικές μορφές, όπως να περιέχονται σε τροφές, κυρίως σε μια ζυμωμένη κατάσταση, σε φαρμακευτικά παρασκευάσματα κυρίως με μορφή κάψουλας ή σε μορφή μικροκάψουλας (microencapsulated). Τα προβιοτικά στελέχη μπορούν να είναι μη καθορισμένοι οργανισμοί από ζυμωμένες τροφές, οι οποίοι επιβιώνουν στο πέρασμα του εντέρου και μπορεί να επιφέρουν θετικά αποτελέσματα στον γαστρεντερικό σωλήνα (GIT). Αν οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί αποτελούν ένα συγκεκριμένο τμήμα της τροφής, καθορίζονται από το FUFOSÉ (Functional Foods in Europe, Λειτουργικά τρόφιμα στην Ευρώπη) σαν ζωντανά συστατικά μιας τροφής τα οποία επιφέρουν θετικά αποτελέσματα στην υγεία (Salminen et al., 1998b). Οι προβιοτικές τροφές, αποτελούν το 60 και 70% του συνόλου των λειτουργικών τροφών της αγοράς. Μια συνεχόμενη αύξηση, παρατηρείται ανάμεσα στα γαλακτοκομικού τύπου προβιοτικά τρόφιμα, αλλά ακόμη και στο σύνολο των μη γαλακτοκομικών προϊόντων, όπως τα ζυμώμενα κρέατα και λαχανικά καθώς και χυμούς φρούτων. Υπολογίζοντας την μεγάλη «γκάμα» των δυναμικών (ζυμώμενων) υποστρωμάτων και τις διαφορετικές συνθήκες κάτω από τις οποίες τα στελέχη *LAB* μπορεί να προκληθούν για λειτουργική παρουσίαση, μπορεί να θεωρηθεί πως η ανάπτυξη τροφίμων εναντίον νέων βασιζόμενων σε τροφές προβιοτικών θα προχωρήσουν περισσότερο στο μέλλον. Συνεπάγεται ότι το θετικό αυτό αποτέλεσμα πετυχαίνεται όταν η αναλογία των *Lactobacilli* και των *Bifidobacteria* στον εντερικό

πληθυσμό αυξάνει είτε με την αυξανόμενη πρόσληψη των τυπικών βακτηρίων του εντέρου (π.χ., ζυμώμενες τροφές ή αφυδατωμένες προετοιμασίες) ή εμμέσως, σαν αποτέλεσμα της διέγερσης των ενδογενών εντεροβακτηρίων που ανήκουν σε αυτές τις ομάδες. Οι *Lactobacilli* και τα *Bifidobacteria* που σχετίζονται με τον γαστρεντερικό σωλήνα, θεωρούνται γενικά ευεργετικά για τέτοια πράγματα, όπως συνεχιζόμενες διαταράξεις των βλεννών σχετιζόμενων με το ανοσοποιητικό σύστημα και των εγκατεστημένων πληθυσμών στο έντερο. Ένα βασικό χαρακτηριστικό της προβιοτικής καλλιέργειας, είναι πως ρυθμίζει την ισορροπία του πληθυσμού των βακτηρίων που υπάρχουν στο έντερο, π.χ., με ανταγωνισμό για επιθηλιακές πλευρές και θρεπτικές ουσίες, και επιπλέον με ρύθμιση της τιμής του pH. Άλλα χαρακτηριστικά, αναφέρονται στην υποστήριξη της απορρόφησης των θρεπτικών ουσιών και της σύνθεσης των βιταμινών όπως της ριβοφλαβίνης. Περαιτέρω σταθεροποίηση της μικροβιακής εντερικής χλωρίδας, σχετίζεται με την σύνθεση των φυσιολογικά θρεπτικών λιπαρών οξέων μικρής αλυσίδας (SCFAs) από τα οποία στηρίζονται οι βλέννες του εντέρου. Επιπλέον, οι προβιοτικές καλλιέργειες προτείνονται επίσης για την διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος.

Σχήμα 1. 1 : Χορήγηση των προβιοτικών σε διαφορετικές μορφές.



<p>Γαλακτικές ζυμωμένες τροφές φυτικής ή ζωικής προέλευσης και καταναλωμένα σε κατάσταση ωμή ή μισο επεξεργασμένη. Παρουσία των στελεχών LAB με:</p> <ul style="list-style-type: none"> - ικανότητα επιβίωσης περάσματος στο ανώτερο εντερικό σύστημα και - μια ή περισσότερες λειτουργικές ιδιότητες ευεργετικές για το γαστρεντερικό σύστημα. 	<p>Πρωτότυπες μορφές ζυμωμένων προϊόντων τα οποία περιέχουν ζωτικά βακτηριακά στελέχη επιλεγμένα για τις λειτουργικές ιδιότητες:</p> <ul style="list-style-type: none"> - προβιοτικά γιαούρτια και άλλα γαλακτοκομικά προϊόντα - ήπια προβιοτικά ζυμωμένα λουκάνικα - προβιοτικοί χυμοί φρούτων - τροφές βασισμένες σε δημητριακά οι οποίες περιέχουν ζωντανούς μικροοργανισμούς + πρεβιοτικά = συμβιωτικά - συμπληρώματα διατροφής (όπως κάψουλες, ταμπλέτες, ή σκόνης) 	<ul style="list-style-type: none"> - ζωτικοί μικροοργανισμοί επιλεγμένοι για τις λειτουργικές τους ιδιότητες και χορηγούμενα σε κάψουλες, ταμπλέτες, ή σαν λυοφιλοποιημένες σκόνης, συχνά σε μικροκάψουλα.
---	---	---

1.9.2 Εστίαση των προβιοτικών

Για να έχουν τα προβιοτικά το επιθυμητό αποτέλεσμα, πρέπει να θεωρηθούν ασφαλή στις στοχευόμενες περιοχές δράσης. Οι παραδοσιακές πλευρές στόχου για προβιοτικά, είναι στο ανώτερο και στο κατώτερο έντερο. Παρόλα αυτά, αξίζει να συμπεριλάβουμε μερικά από τα άλλα προβιοτικά στελέχη. Το *BLIS K12 Throat Guard*, εντοπίστηκε στην Νέα Ζηλανδία για τον έλεγχο των μολύνσεων από το

στελέχος *Streptococcus pyogenes* (στρεπτόκοκκοι που βρίσκονται στο λαιμό) σε παιδιά (Ouwehand, et al., 2002). Ένας άλλος στόχος είναι ο κόλπος για τον έλεγχο της κολπίτιδας, και τα στελέχη γαλακτοβακίλλων έχουν δείξει πως είναι οι υποσχόμενοι προβιοτικοί υποψήφιοι για αυτό το σκοπό (Rook, et al., 1998). Τελικά, κάποια τρέχουσα έρευνα, ερευνά στο δυναμικό των κύριων προβιοτικών βακτηρίων ώστε να αποτρέψει να προκύψουν φλεγμονές στις πληγές (Laiho et al., 2002). Τα προβιοτικά τα οποία εστιάζουν στο έντερο απαριθμούν προφανώς τα μεγαλύτερα εμπόδια, έτσι ώστε να διανεμηθούν στο κατάλληλο σημείο. Τα μεγαλύτερα εμπόδια, είναι οι όξινες συνθήκες του στομάχου, και η χολή του δωδεκαδάχτυλου. Πρόσφατα, τα προβιοτικά στελέχη τα οποία μπορούν να ξεπεράσουν απλά εμπόδια, παρατηρήθηκαν με μικροσκοπική εξέταση για στελέχη τα οποία προσαρμόστηκαν σε αυτές τις εντάσεις. Η προσαρμογή του οξέος είναι προβληματική για τα προβιοτικά τα οποία στοχεύουν στο μεγάλο έντερο, αφού αυτό είναι κανονικά ένα ενδιάμεσο μεγάλο περιβάλλον ουδέτερου pH. Μια πιο λογική προσέγγιση, είναι να επιλέξουμε ένα προβιοτικό βακτήριο βασιζόμενοι στα *in vivo* χαρακτηριστικά του και να αναπτύξουμε τεχνολογίες για την προστασία του *in vitro*, και κατά την διάρκεια της διακίνησης διαμέσου του στομάχου και του δωδεκαδάχτυλου. Έρευνες έχουν γίνει, χρησιμοποιώντας την τεχνολογία μικροπολλαπλασιασμού ώστε να προστατευθούν τα προβιοτικά βακτήρια κατά την διαδικασία, αποθήκευση, και διακίνηση διαμέσου προσομοιωμένων γαστρικών συνθηκών. Μερικές από αυτές τις έρευνες εστίασαν στα *Bifidobacteria*, τα οποία είναι τα βασικά προβιοτικά βακτήρια τα οποία εστιάζουν στο μεγάλο έντερο. Η μικροεγκύστωση (*micro encapsulation*), χρησιμοποιώντας το άλας αλγινικού οξέος ασβεστίου ή K-καραγεννάνη, έχουν αποδείξει πως προστατεύουν τα κύτταρα κατά την διαδικασία αποθήκευσης και διακίνησης διαμέσου των προσομοιωμένων γαστρικών συνθηκών (Kalliomaki et al., 2002). Παρόλα αυτά, η μικροεγκύστωση (*micro encapsulation*) χρησιμοποιώντας το οξικό φθαλικό άλας κυτταρίνης, προστάτευσε τα *Bifidobacteria* αρκετά εντυπωσιακά κατά την ξήρανση με ατμό (*spray drying*) και κατά την αλόγιστη έκθεση σε προσομοιωμένες γαστρικές συνθήκες (Rafter et al., 2002). Επιπλέον, αναπτύξεις στις τεχνολογίες όπως αυτές, θα περιλαμβάνουν επεξεργασίες τροφίμων ώστε να συγκεντρώσουν περισσότερα προβιοτικά χαρακτηριστικά για αποτελεσματικότητα *in vivo*, παρά στα χαρακτηριστικά τα οποία επιβιώνουν κατά την πορεία αποθήκευσης και διακίνησης του προβιοτικού διαμέσου του στομάχου και του δωδεκαδαχτύλου. Στις ΗΠΑ, τα προβιοτικά είναι διαθέσιμα στους καταναλωτές σε μερικά

γαλακτοκομικά προϊόντα και επίσης σε διαιτητικά συμπληρώματα. Η βιομηχανία τροφίμων, ρυθμίζεται αυστηρά από τον Οργανισμό τροφίμων και φαρμάκων (ΔΤΦ) (FDA) των ΗΠΑ, η οποία περιορίζει την εμπορία και δήλωση ετικετών που αφορούν τα προϊόντα. Πρόσφατα, ο FDA δεν έχει εγκρίνει κάποιους συγκεκριμένους ισχυρισμούς υγείας που αφορούν τα προβιοτικά τα οποία παρεμποδίζουν την εμπορία των προβιοτικών τροφών με την βιομηχανία τροφίμων. Εντούτοις, οι καταναλωτές γνωρίζουν όλο και περισσότερο για τις υγιεινές καλλιέργειες, και η λίστα των ετικετών φαίνεται σε μια αυξανόμενη αγορά θέσεων. Τα γαλακτοκομικά προϊόντα έχουν μια μακρά ιστορία ένωσης με καλλιέργειες και χορηγήσεις εκτός της θρέψης, όπως τοπικές χορηγήσεις για προβιοτικά. Αυτή η πρόσφατη έκρηξη στην έρευνα για προβιοτικά, θα μπορούσε να οδηγήσει κάποιον στην σκέψη πως τα προβιοτικά, είναι μια σχετικά καινούργια έννοια. Παρόλα αυτά, αυτή η έννοια αυτή υπάρχει εδώ και 100 χρόνια, από έρευνες *lactobacilli* σε ξινισμένα γάλατα από τον Ellie Metchnikoff (1845-1916) και στην θεραπεία της παιδικής διάρροιας με *bifidobacteria* από τον Tissier (1906). Η αναβίωση αυτή είναι κυρίως λόγω μιας καλύτερης κατανόησης των εντεροβακτηρίων και της επίδρασης τους στην υγεία του εντέρου. Διατηρώντας ή βελτιώνοντας την ανθρώπινη υγεία, δεν είναι ο μόνος στόχος των προβιοτικών. Τα ζώα της φάρμας αποτελούν επίσης ένα μεγάλο στόχο αφού οι έρευνες έχουν θέσει σε εφαρμογή τα προβιοτικά με πολλές θετικές ιδιότητες όπως ελάττωση των περιπτώσεων διάρροιας σε αγελάδες (Fuller et al., 1989), βελτιωμένη αύξηση βάρους και επαρκής τροφή για αγέλη βοδιών (Salminen et al., 1998), βελτιωμένο γάλα παραγόμενο από αγελάδα γάλακτος (Gibson, et al., 1995), συνεχόμενη αύξηση βάρους στα κοτόπουλα (Mitsuoka et al., 1992), έλεγχος της διάρροιας η οποία προκλήθηκε από τον απογαλακτισμό των γουρουνιών (post weaning diarrhea) (Gmeimer et al., 2002). Πρόσφατα, τα αντιβιοτικά περιλαμβάνονται σε πολλές ζωικές τροφές για πολλές από αυτές τις ευεργετικές τους ιδιότητες. Με την αυξανόμενη αντίσταση εναντίον της πρακτικής αυτής, και της αυξανόμενης γνώσης των ζωικών προβιοτικών, η αγορά αυτή θα μπορούσε να έχει ένα πολύ λαμπρό μέλλον. Αν και η αγορά για τα προβιοτικά στους ανθρώπους, είναι κάπως σημαντική στην Ευρώπη και την Ασία, και ειδικά στην Ιαπωνία, ξεκίνησε πρόσφατα λαμβάνοντας προσοχή από την βιομηχανία τροφίμων της Αμερικής (Havenaar et al., 1992). Το αυξανόμενο ενδιαφέρον των ΗΠΑ στον τομέα αυτό της αγοράς, είναι βασικό εξαιτίας του αυξανόμενου αριθμού των καταναλωτών που όλο και περισσότερο αντιλαμβάνονται πόσο σημαντική είναι η διατήρηση της υγείας τους στις ΗΠΑ και λόγω των πιθανών

ευεργετικών αποτελεσμάτων στην υγεία που σχετίζονται με τα προβιοτικά. Τα πιθανά αυτά ευεργετικά αποτελέσματα περιλαμβάνουν, αυξανόμενη αντίσταση στις μολύνσεις του γαστρεντερικού συστήματος, εξάλειψη της δυσκοιλιότητας, επανασύσταση μιας υγιούς εντερικής χλωρίδας ακολουθώντας αντιβιοτική ή χημικοθεραπευτική θεραπεία, διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος, μείωση του ορού χοληστερόλης, προφυλακτική για τους καρκίνους του εντέρου, και εξάλειψη των συμπτωμάτων δυσανεξίας στην λακτόζη. Η έλλειψη consensus στην επιστημονική συμφωνία, στο βαθμό των ευεργετικών ιδιοτήτων σχετιζόμενων με τα συγκεκριμένα προβιοτικά στελέχη, έχει μειώσει την ρυθμιστική αποδοχή οποιωνδήποτε λειτουργικών αξιώσεων μέχρι σήμερα. Παρόλα αυτά, με απτές αποδείξεις για συγκεκριμένες αξιώσεις σχετικά με την υγεία, αυτά μπορεί σύντομα να είναι εμπορεύσιμα επιταχύνοντας αυτή την εμπορία.

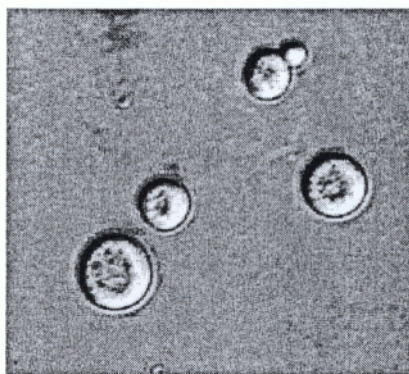
1.9.3 Χρήση των προβιοτικών σε τροφές, ασφαλείς χορηγήσεις

Η έννοια των προβιοτικών εξελίχθηκε από τότε που οι Lilly and Stillwell (1965) την χρησιμοποίησαν το 1965 για να αναφέρουν τις προαγόμενες για την υγεία ουσίες για τους μικροοργανισμούς. Υπάρχουν πολλοί ορισμοί για τον όρο *probiotic* όμως η πιο διαδεδομένη και αποδεκτή διατυπώθηκε από τον Fuller το 1989, σαν ένα ζωντανό μικροβιακό συμπλήρωμα το οποίο επηρεάζει θετικά τον ξενιστή βελτιώνοντας την μικροβιακή ισορροπία του εντέρου. Ο ορισμός αυτός παρόλα αυτά, περιορίζει τις ευεργετικές ιδιότητες των προβιοτικών στον οργανισμό που τα πέπτει. Ένας τρίτος ορισμός των προβιοτικών ο οποίος μπορεί να είναι πιο ευέλικτος, είναι αυτός που διατυπώθηκε από τον Scaafsma (1998) το 1996, ο οποίος είπε πως τα στοματικά προβιοτικά είναι ζωντανοί οργανισμοί, οι οποίοι κατά την πρόσληψη σε συγκεκριμένους αριθμούς επιφέρουν επιπτώσεις στην υγεία πέρα από την βασική κληρονομούμενη διατροφή. Σε αυτόν τον ορισμό, δεν είναι ξεκάθαρο ποιος προσλαμβάνει τα προβιοτικά και ποιος λαμβάνει τις επιπτώσεις στην υγεία. Το 1998, οι Zao et al., (1998) χρησιμοποίησαν τον όρο προβιοτικά βακτήρια για να αναφέρουν τα στελέχη του *Escherichia coli*, τα οποία δόθηκαν στις αγελάδες με σκοπό να μειώσουν την ορρώδη τύπου έκκριση O157:H7 στα κόπρανα. Όταν οι επιστήμονες, έψαχναν για ένα τελικό ευεργετικό ασφαλές τρόφιμο τρέφοντας αυτά τα στελέχη, η ευημερία του ξενιστή δεν βελτιώθηκε αφού ο *Escherichia coli* O157:H7 δεν είναι κανονικά ένα παθογόνο το οποίο βρίσκεται στις αγελάδες. Ερευνητές που

ασχολούνται με τον τομέα προβιοτικών που χορηγούνται στους ανθρώπους, διαφωνούν με την χρήση του ορισμού προβιοτικό σαν μια στρατηγική προ-συλλογιστικής ασφάλειας τροφίμου, όμως προτείνουμε πως η σημασία του όρου προβιοτικός θα μπορούσε να είναι μια επέκταση του Fuller, ως ακολούθως: «οι ζωντανοί μικροοργανισμοί προσλαμβάνόμενοι από το στόμα, επηρεάζουν θετικά τον ξενιστή και/ ή τον καταναλωτή ξενιστή βελτιώνοντας την μικροβιακή ισορροπία του εντέρου του ξενιστή».

Υπάρχουν άλλοι δύο όροι σχετικά με την χρήση των μικροβιακών καλλιιεργειών σε εκτρεφόμενα ζώα, με σκοπό την μείωση των τροφικών παθογόνων ή την βελτίωση του ανταγωνιστικού αποκλεισμού υγείας και των άμεσα ταϊσμένων μικροβιακών προϊόντων. Ο ανταγωνιστικός αποκλεισμός, (AA) σε μια ευρύτερη βιολογική έννοια, είναι η αρχή πως, εάν δύο είδη προσπαθήσουν να απασχολήσουν την ίδια οικολογική πλευρά, ένα ανώτερο είδος τελικά θα αναγκαστεί να αντικαταστήσει το κατώτερο (Holzapfel et al., 2001). Για την ασφάλεια της προ-συλλογιστικής τροφής, ο AA (ανταγωνιστικός αποκλεισμός) καθορίζεται σαν την χρήση των μικροβιακών καλλιιεργειών για την πρόληψη δημιουργίας αποικιών των παθογόνων (Sanders et al., 2001) ή να μετατοπίσει πληθυσμούς των παθογόνων βακτηρίων στο γαστρεντερικό σωλήνα των ζώων. Οι τυπικές AA (ανταγωνιστικές αποκλεισμού) καλλιέργειες, είναι ακαθόριστες καλλιέργειες μικροοργανισμών που παρατηρούνται σε υγιή ενήλικα ζώα, και χρησιμοποιούνται στον εμβολιασμό των νεαρών ζώων για να αποτρέψουν την αποικία παθογόνων. Σύμφωνα με το κέντρο κτηνιατρικών φαρμάκων (ΚΚΦ) των ΗΠΑ χορήγησης τροφών και φαρμάκων, τα προϊόντα ανταγωνιστικού αποκλεισμού δεν μπορούν να γενικά να αναγνωριστούν ως ασφαλείς (ΓΑΑ) ουσίες και θα έπρεπε να ρυθμιστούν σαν ζωικά φάρμακα. Η έννοια των άμεσα χορηγούμενων μικροβιακών προϊόντων (ATMP) (DFMPs, Directly-fed microbial products) είναι ένας όρος, ο οποίος διατυπώθηκε από (CVM) (ΚΚΦ, Κέντρο Κτηνιατρικών Φαρμάκων) με σκοπό την ταξινόμηση και ρύθμιση των προβιοτικών βακτηρίων για χρήση σε εκτρεφόμενα ζώα (Yeung, PSM Sanders Kitts Cano and Tong 2002). Τα άμεσα χορηγούμενα μικροβιακά προϊόντα (ATMP) (DFMPs, Directly-fed microbial products) ρυθμίζονται στις ΗΠΑ σαν τρόφιμα σύμφωνα με τον οδηγό πολιτικής συμμόρφωσης 689.100, όσο είναι καλά ορισμένοι μικροοργανισμοί που ανήκουν σε ένα από τα γενικά εγκεκριμένα από τον οργανισμό ένωσης των αμερικανικών ανώτερων υπαλλήλων ελέγχου ζωοτροφών (ΟΕΑΑΥΕΤ) (AAFCO, Association of American Feed control officials) (πχ., *Saccharomyces* (Εικ. 1.35), *Bacillus*, *Lactobacillus*,

Lactococcus, *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Pediococcus*) περιείχαν γνωστούς ζωτικούς αριθμούς. Τα άμεσα χορηγούμενα προϊόντα, (ATMP) (DFMP, Directly-fed microbial products) θα μπορέσουν να πωληθούν υπό αυτή την μορφή εφόσον δεν γίνεται καμία αξίωση υγείας ή δομών ή λειτουργίας για την χρήση τους. Αυτό το κεφάλαιο θα εστιάσει σε προβιοτικά παρασκευάσματα αποτελούμενο από καθορισμένους πληθυσμούς περιλαμβάνοντας τους ATMP (DFMP) και μη-ATMP (DFMP) μικροοργανισμούς. Θα περιλαμβάνει, ενότητες της χρήσης των προβιοτικών για σκοπούς μη τροφικής ασφάλειας σε εκτρεφόμενα ζώα, και τις πιο πρόσφατες χορηγήσεις για την μείωση των τροφικών παθογόνων.



Εικ. 1.35 *Saccharomyces*. Πηγή: <http://en.wikipedia.org/wiki/Saccharomyces>

1.9.4 Προβιοτικά στελέχη με σχεδιασμένες ιδιότητες για την Υγεία

Τα βακτήρια γαλακτικού οξέος (*LAB*) είναι πολύ γνωστά για την εκτεταμένη χρήση τους στην προετοιμασία των ζυμώμενων προϊόντων διατροφής. Επιπλέον, τα ευεργετικά αποτελέσματα στην υγεία τα οποία μπορεί να επιφέρουν στους ανθρώπους έχουν διερευνηθεί εντατικά κατά τον τελευταίο αιώνα. Παρόλα αυτά, οι μηχανισμοί οι οποίοι ενισχύουν τις ιδιότητες που προωθούν την υγεία σχετιζόμενων με το *LAB* παραμένουν ακόμη άγνωστοι και αυτό έχει εξασθενήσει τον λογικό σχεδιασμό των προβιοτικών μεθόδων εξέτασης με ακριβή αξιόπιστη αξία. Αυτό το σχέδιο, αποσκοπεί στην δημιουργία ενός συσχετισμού ανάμεσα στις *in vitro* εξετάσεις και μοντέλα ποντικών μιμούμενα σημαντικές εντερικές διαταραχές στους ανθρώπους, όπως η φλεγμονώδης ασθένεια του εντέρου, (*IBD*, inflammatory bowel disease), *Helicobacter pylori* και προσβολές από *rotavirus*. Όσο αυτές οι ασθένειες ανταποκρίνονται σε πρωτεύοντα δημόσια προβλήματα υγείας, μια δεύτερη γενιά προβιοτικών στελεχών με ενισχυμένες προφυλακτικές ή θεραπευτικές ιδιότητες θα

σχεδιαστούν στο πρόγραμμα. Τα σχεδιασμένα αυτά στελέχη, και τα ισογενή γονικά βακτήρια θα χρησιμοποιηθούν για την διαλεύκανση μηχανισμών που περιλαμβάνονται στην ανοσοτροποποιητική ικανότητα των ειδικευμένων στελεχών *Lactobacillus*.

Αντικειμενικός σκοπός αυτού του προγράμματος είναι να παρέχει γνώση σχετικά με τους μοριακούς παράγοντες που επηρεάζουν την ανοσοτροποποίηση, και την ανοσογενετικότητα των επιλεγμένων προβιοτικών γαλακτοβακίλλων, επιτρέποντας την αναπτυσσόμενη απομόνωση με ενισχυμένη προστατευτική ή θεραπευτική δράση. Οι επιδιώξεις των προτάσεων από την μία μεριά, έχουν σαν στόχο την διαλεύκανση μηχανισμών και την ταυτοποίηση των βασικών συστατικών της ανοσοτροποποιητικής ικανότητας των προβιοτικών γαλακτοβακίλλων, και από την άλλη μεριά να σχεδιάσουν μια δεύτερη γενιά προβιοτικών στελεχών με ενισχυμένες ιδιότητες ενάντια των διαταραχών του γαστρεντερικού σωλήνα.

1.9.5 Επιθυμητές ιδιότητες για θεραπευτικά προβιοτικά

Υπάρχουν αναρίθμητες έρευνες, οι οποίες επιδιώκουν να καθορίσουν τις παραμέτρους που χρειάζεται να χαρακτηρίσουν ένα υποψήφιο με δυνατότητα εκμετάλλευσης προβιοτικό, όμως η γενική παραδοχή φαίνεται να συμφωνεί στις ιδιότητες που απεικονίζονται στον Πίνακα 1.3(σελ 20). Η έρευνα που χρειάζεται να υποστηρίξει ένα προβιοτικό στέλεχος δεν είναι ασήμαντη. Οι Dunne et al., (2001) εξέτασαν πάνω από 1500 στελέχη πριν βρουν ένα μονό στέλεχος το οποίο είχε προβιοτική δυνατότητα εκμετάλλευσης. Οι Lee et al., ερεύνησαν 109 βακτήρια γαλακτικού οξέος απομονωμένα σε υγιή παιδιά και βρήκαν 8 στελέχη με δυνατότητα προβιοτικού. Οι McLean and Rosenstein βρήκαν μόνο 4 από τις 60 κολπικές απομονώσεις των στελεχών *Lactobacillus* ότι ήταν ανασταλτικές εναντίον των παθογόνων της βακτηριακής κολπίτιδας (Mclean et al., 2000). Το μονοπάτι της ανάπτυξης, περιλαμβάνει την αρχική απομόνωση και χαρακτηρισμό των προβιοτικών στελεχών, χρησιμοποιώντας αναλύσεις in vitro, πειράματα με ζωικά μοντέλα, ασφάλεια και έκταση χορήγησης της δόσης σε υγιείς ανθρώπινους εθελοντές και τελικό καθορισμό της επάρκειας σε ασθενείς με προδιάθεση για ασθένεια (McFarland et al., 1999).

Ιδιότητες κατασκευής

Τα προβιοτικά είναι προϊόντα τα οποία μοιράζονται παρόμοιες απαιτήσεις με άλλα εμπορευόμενα αγαθά κατασκευών στην αγορά. Γι'αυτό, η διαδικασία παραγωγής και κατασκευής προβιοτικών, θα έπρεπε να έχει στάνταρ πρωτόκολλα και διαδικασίες ποιοτικού ελέγχου. Για να είναι επιτυχές το αγαθό στην αγορά, τα προβιοτικά πρέπει να επιφέρουν κέρδος. Ευτυχώς, η παραγωγή των περισσότερων προβιοτικών είναι ευθεία και σχετικά ολιγοέξοδη, τουλάχιστον συγκρινόμενη με την κατασκευή φαρμάκων. Η παραγωγή μικροοργανισμών βασίζεται σε μια μακρά ιστορία διαδικασίας ζύμωσης και όχι στην προηγμένη τεχνολογία.

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-βασίζομενη 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 (Clements et al., 1983).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΠΡΕΒΙΟΤΙΚΑ

2.1 ΠΡΕΒΙΟΤΙΚΑ

Όποιο διαιτητικό συστατικό το οποίο φθάνει στο παχύ έντερο χωρίς να έχει υποστεί κάποια αλλαγή, πχ άπεπτοι υδρογονάνθρακες (από μικρές αλκοόλες ζάχαρης και δισακχαρίτες σε ολιγοσακχαρίτες και μεγάλα μόρια πολυσακχαριτών) μερικά πεπτίδια και πρωτεΐνες, όπως επίσης και κύρια λιπίδια είναι υποψήφια πρεβιοτικά. Τα πρεβιοτικά τα οποία έχουν αναπτυχθεί μέχρι στιγμής, είναι άπεπτοι ολιγοσακχαρίτες όπως: (NDOs) (Robertfroid 1997, Gibson και Fuller 2000) Οι φρουκτοολιγοσακχαρίτες (FOS), γαλακτοολιγοσακχαρίτες (GOS), μεταγαλακτοολιγοσακχαρίτες (TOS), ισομαλτοολιγοσακχαρίτες (IMO), ξυλοολιγοσακχαρίτες (XOS), γενετικοί ολιγοσακχαρίτες (GEO), ολιγοσακχαρίτες soya (SOS).

Συγκεκριμένα, άπεπτες φρουκτάνες τύπου ινουλίνης, πχ FOS και ινουλίνη, είναι γνωστές στην διαδικασία μιας συγκεκριμένης ζύμωσης σε μια περιοχή η οποία κυριαρχείται από τα *Bifidobacteria* (Wang and Gibson 2001, Mc Bain and Macfarlane 1997) και αναπαραγόμενα, απεικονίζουν πρεβιοτικά αποτελέσματα στους ανθρώπους (Gibson et al., 1995, Robertfroid et al., 1998, Bouhnik et al., 1999, Kruse et al., 1999, Harmsen et al., 2002). Πράγματι, υπάρχει μια γενική ιδέα ότι, η ινουλίνη και τα FOS, αλλάζουν την συνήθεια του εντερικού σωλήνα προκαλώντας αύξηση του μεγέθους των κοπράνων, την φυσιολογική κατάσταση συχνότητας των κοπράνων, το πρεβιοτικό αποτέλεσμα, η πρόκληση τροφής να αυξηθεί σε αριθμό και δραστηριότητα των *Bifidobacteria* και άλλα *LAB* στον γαστρεντερικό σωλήνα (GIT) (Van Ioo et al., 1999). Άλλοι υποστηρίζουν, ότι αυξάνεται η απορρόφηση του ασβεστίου, η ρύθμιση του μεταβολισμού των λιπιδίων και προληπτικά, αποτελέσματα εναντίον του καρκίνου του εντέρου (Robertfroid 1997, Gummings et al., 2001, Van Ioo and Jokers 2001, Buddinton et al., 2002). Η ινουλίνη και το FOS ηγούνται της αγοράς στην Ευρώπη και στις Η.Π.Α. Τα GOS, βρίσκονται επίσης στην αγορά (εμπόριο) της Η.Π.Α και Ευρώπης αλλά πρέπει να χρησιμοποιούνται ευρέως όπως οι φρουκτάνες. Σχεδόν όλα τα NDOs, (non-digestible oligosaccharites) άπεπτοι ολιγοσακχαρίτες υπάρχουν στην γιαπωνέζικη αγορά. Να αναφέρουμε πως υπάρχει

μόνο μια συγκρίσιμη μελέτη της διαδικασίας ζύμωσης εμπορεύσιμων πρεβιοτικών (Rycroft et al., 2001). Επισημαίνεται ότι, οι ολιγοσακχαρίτες διαφέρουν στα χαρακτηριστικά της ζύμωσης. Τα IMO (isomaltooligosaccharites), ισομαλτοολιγοσακχαρίτες, και GOS (galactooligosaccharites) γαλακτοολιγοσακχαρίτες, είναι πιο αποτελεσματικά, ώστε να αυξάνουν τους αριθμούς *Bifidobacteria* και γαλακτόζης όταν παράγουν το ελάχιστο αέριο. Είναι σημαντικό επίσης, πως η αντοχή του αμύλου ελαττώνει την φύση του πρεβιοτικού. Το ανθεκτικό άμυλο, είναι άμυλο που αντιστέκεται στην μικρή χώνευση του εντέρου, και εισέρχεται στο μεγάλο σωλήνα στους φυσιολογικούς ανθρώπους. Η ποσότητα του αμύλου που είναι ανθεκτικό, εξαρτάται από την πηγή. Θεωρείται ότι, το 10% του συνολικού διαιτητικού αμύλου μπορεί να διαφύγει από την πέψη στο ανθρώπινο μικρό έντερο. Αυτό το ανθεκτικό άμυλο μπορεί να συνεισφέρει σε παραγωγή μικρής αλυσίδας λιπαρών οξέων, αύξηση βάρους κοπράνων και μείωση του κοπρανώδους pH. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι, το ανθεκτικό άμυλο ευνοεί την παραγωγή βουτυρικού οξέος (Cummings and Macfarlane 1991). Το βουτυρικό οξύ είναι το προτιμώμενο υπόστρωμα για κύτταρα του παχέος εντέρου ακόμα και όταν ανταγωνίζονται το υπόστρωμα όπως η παρουσία γλυκόζης, και πιθανόν παρέχει προστασία εναντίον του καρκίνου του παχέος εντέρου (Silvi et al., 1999, Topping and Clifton 2001).

2.2 ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΓΑΛΑΚΤΟΒΑΚΙΛΛΩΝ:

***HELICOBACTER PYLORI*: IN VITRO ΕΡΕΥΝΕΣ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΕΣ ΣΕ ΖΩΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ**

Από το 1989, πολλοί ερευνητές έχουν μελετήσει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρεβιοτικών και *H. pylori in vitro* και σε ζωικά μοντέλα (Πίνακας 2.1). Το γαλακτικό οξύ, είναι ο κύριος τελικός μεταβολίτης του μεταβολισμού των υδατανθράκων των γαλακτοβακίλλων, και έχει μια ισχυρά ανασταλτική δραστηριότητα εναντίον του *H. pylori* (Bhetia et al 1989, Midolo et al., 1995, Aiba et al 1998, Lorca et al., 2001). Για παράδειγμα, ο Lorca et al., (2001) έδειξε ότι το *H. pylori* ήταν ευαίσθητο στο L-γαλακτικό οξύ σε συγκεντρώσεις από 60-100 mM. Μπορούσαν επίσης να δείξουν ότι, η μικροβιακή δραστηριότητα όπως παρατηρήθηκε σε 17 διαφορετικά είδη γαλακτοβακίλλων χάθηκε από την ουδετερότητα του pH. Οι Aiba et al., (1998),

ανακάλυψαν ότι ανάμεσα σε 3 στελέχη τα οποία υποβλήθηκαν σε τεστ, το *L. salivarius* ήταν το πιο ανασταλτικό και ταυτόχρονα παράγαγε την υψηλότερη ποσότητα γαλακτικού οξέος.

Πίνακας 2.1: Έρευνες in vitro και μοντέλα ζώων με προβιοτικούς γαλακτοβακίλλους εναντίον *Helicobacter pylori*.

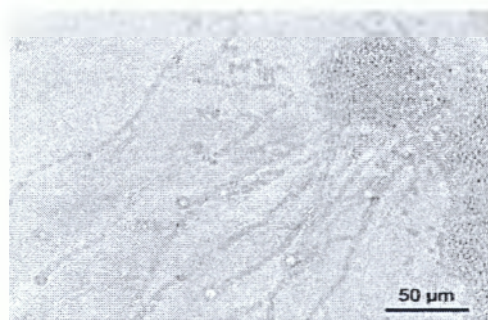
Μικροοργανισμοί	Τελικό σημείο	Αποτελέσματα	Παραπομπές
<i>L.paracei subsp paracei M3</i>	Καταστολή αποικίας του <i>H. pylori</i>	απομόνωση τύπου βακτηριοκίνης πρωτεϊναιικής ένωσης.	Atanassova et al (2003)
<i>L.casei Shirota</i>	Καταστολή αποικίας του <i>H. pylori</i>	Αναστολή του <i>H.pylori</i> από ζωντανά κύτταρα <i>L. casei</i>	Cats et al (2003)
<i>L.acidophilus DDS 1J</i>	Καταστολή αποικίας <i>H. pylori</i>	Αναστολή του <i>H. pylori</i> όταν αναπτύσσεται σε 1:1 αναλογία ή μεγαλύτερης με τον <i>L. acidophilus</i>	Chatterjee et al (2003)
<i>L.gasseri OLL2716</i>	Καταστολή ανάπτυξης, παραγωγή IL-8 από ανθρώπινα γαστρικά καρκινογόνα κύτταρα .δραστηριότητα in vivo.	Και τα ευαίσθητα στην κλαρινθομικίνη και τα ανθεκτικά <i>H.pylori</i> αναστάθηκαν σε καλλιέργειες και στα ποντίκια με <i>L.gasseri, IL-8</i> αντίδραση μειώθηκε.	Ushiyama et al (2003)
9 <i>L.reuteri</i> στελέχη	Αναστολή δέσμευσης σε γαγλιοτετραοσυλσεραμιδίνη Και σουλφαμιδίνη.	2 από τα 9 στελέχη <i>reuteri</i> δεσμεύτηκαν και ανέστειλαν την δέσμευση του <i>H. pylori</i> επίσης.	Mukai et al (2002)
17 <i>Lactobacilli</i>	Καταστολή αποικιών του <i>H. pylori</i> .Μείωση αριθμών κυττάρων ύστερα από επαφή.	Γαλακτικό οξύ-συσχετιζόμενη αναστολή του <i>H. pylori</i> . Βακτηριακό αποτέλεσμα της πρωτεϊναιικής ένωσης η οποία απελευθερώθηκε μετά από λύση κυττάρων από τον <i>L. acidophilus</i> .	Lorca et al (2001)
<i>L.casei ACA-DC6002</i>	Δραστηριότητα in vivo	Μείωση αποικιών και γαστρίτιδα.	Sgouras et al (2001)
<i>L.johnsonii la1, L.acidophilus La10</i>	Δραστηριότητα ουρεάσης .Καταστολή αποικιών <i>H.pylori</i> .	Αναστολή του <i>H. pylori</i> από την καλλιέργεια <i>L. johnsonii</i> και υπερκείμενο.	Michetti et al (1999)
<i>L.salivarius WB1004</i>	Δραστηριότητα in vivo	καταστολή του <i>H. pylori</i> σε ποντίκια διαμέσου παραγωγής γαλακτικού οξέος.	Aiba et al 1998

<i>L.acidophilus LB,L.rhamnosus GG.</i>	Μείωση του αριθμού κυττάρων ύστερα από επαφή .Δραστηριότητα ουρεάσης. Δραστηριότητα <i>in vitro</i> .	Καταστολή του <i>H. pylori</i> <i>in vitro</i> . Προστασία εναντίον μόλυνσης <i>in vitro</i> με τον <i>L.acidophilus LB</i> . Μείωση της δραστηριότητας <i>in vitro</i> και <i>in vivo</i> .	Coconnier et al (1998)
δβγαλακτικές αρχικές καλλιέργειες.	Καταστολή αποικιών του <i>H.pylori</i>	28 από τα 63 στελέχη ήταν ανασταλτικά. Τα οργανικά οξέα ήταν τουλάχιστο τμηματικά οι υπεύθυνοι παράγοντες.	Wendakoon et al (1998)
<i>L.salivarius WB1004</i>	Δραστηριότητα <i>in vitro</i>	Αναστολή της προσκόλλησης και αποικίας του <i>H.pylori</i> σε ποντίκια.	Kabir et al 1997
12LAB	Καταστολή αποικίας του <i>H.pylori</i> .	Αναστολή του <i>H.pylori</i> για 7 από τα 12 στελέχη και συσχετίστηκαν με την παραγωγή γαλακτικού οξέος.	Midolo et al 1995.
<i>L.acidophilus</i>	Μείωση του αριθμού κυττάρων ύστερα από επαφή.	Αναστολή του <i>H.pylori</i> πιθανόν λόγω του γαλακτικού οξέος.	Bhatia et al 1989.

Επιπλέον, το ίδιο στέλεχος ήταν ικανό για ολοκληρωτική αναστολή αποικιών του στομάχου από τον *H. Pylori* σε ποντίκια απαλλαγμένα από μικρόβια (Kabir et al., 1997). Παρόμοιες παρατηρήσεις, έγιναν, με το προβιοτικό στέλεχος *L. gasseri* OLL 2716. Αυτό το στέλεχος, ήταν ικανό να αναστέλλει πέρα από το *L. gasseri* και το στέλεχος *H. pylori* *in vitro* και στα ποντίκια. Επιπλέον, ανέστειλε την παραγωγή του Πι-8 μια προφλεγμονώδης κυτοκίνη, ελευθερωμένη από ανθρώπινα γαστρικά κύτταρα μολυσμένη με το *H. pylori*. Σε αντίθεση, οι ευαίσθητες κλαρινθομικίνες και οι ανθεκτικές στο *H. pylori*, αναστάλθηκαν και οι δύο σε *in vitro* πειράματα και σε ποντίκια. Σε δοκιμές(εξετάσεις) ποντικιών, το *H. pylori*, που είναι ανθεκτικό στην κλαρινθομικίνη, ήταν πιο επιρρεπές έναντι του *L. gasseri* OLL 2716 σε σχέση με τα ευαίσθητα στην κλαρινθομικίνη στελέχη. Παρόλα αυτά, κάποιος πρέπει να λάβει υπόψην του ότι, το στομάχι των ποντικιών που είναι απαλλαγμένα από μικρόβια, είναι τελείως διαφορετικό από αυτό του ανθρώπου. Στους ανθρώπους, η δημιουργία αποικιών στο στομάχι από τους γαλακτοβακίλλους είναι πολύ χαμηλή εξαιτίας του χαμηλού pH στο ανθρώπινο στομάχι, ενώ το pH στο στομάχι ποντικιών είναι υψηλότερο, και κυριαρχείται από πολλούς γαλακτοβακίλλους (Tannock 1999). Μερικές διαφορές σε ανταγωνιστική δραστηριότητα έναντι του *H. pylori* ανάμεσα σε στελέχη των γαλακτοβακίλλων, μπορεί να προκύψει, ότι δεν μπορούν να σχετιστούν με διαφορές στην παραγωγή γαλακτικού οξέος (Cocconnier et al., 1998, Wendakoon et al., 1998, Michetti et al., 1999, Lorca et al 2001). Σαν παράδειγμα, οι Michetti et al., 1999, σύγκριναν την αντιβακτηριακή δραστηριότητα δύο στελεχών, των *L. johnsonii*, *Lal* και *L. acidophilus la* 10. Αν και τα δύο στελέχη παρήγαγαν παρόμοιες ποσότητες γαλακτικού οξέος, το πρώτο έδειξε καθαρά αντιβακτηριακή δραστηριότητα, και το δεύτερο όχι. Γιαυτό τα αντιμικροβιακά εκτός από το γαλακτικό οξύ πρέπει επίσης να παραχθούν. Αυτή η παραγωγή των αντι-*pylori* ουσιών, ήταν εξαρτώμενο στέλεχος που του είχαν δοθεί με μεγάλες διαφορές σε αντιμικροβιακή δραστηριότητα ανάμεσα σε στελέχη (Michetti et al., 1999). Οι Lorca et al 2001, ανακάλυψαν μια πρωτεΐνωση από το *L. acidophilus* CRL 639 η οποία απελευθερώθηκε στην καλλιέργεια ανεπτυγμένη μετά την λύση των κυττάρων, και έδειξε μια δυνατή αντι-*pylori* δραστηριότητα. Η ανασταλτική δραστηριότητα, η οποία παράχθηκε από τον *L. johnsonii la1*, ήταν ανθεκτική στην ζέστη και ήταν διαλυτή, όμως χάθηκε όταν το pH του υπερκείμενου καλλιέργειας χωρίς κύτταρα (EFCS), αυξήθηκε σε pH=6.0 (Michetti et al., 1999). Παρόλα αυτά, μια πολύ ισχυρή ανασταλτική δραστηριότητα παρατηρήθηκε με τους CFCS της καλλιέργειας του *L. acidophilus* LB (Cocconnier et

al., 1998). Μια ώρα επαφής, ανάμεσα σε CFCS μιας καλλιέργειας του *L. acidophilus* LB και *H. pylori* κύτταρα, προκάλεσε μια μείωση του 5.5 log του *H. pylori*. Η αντιβακτηριακή δραστηριότητα, άντεχε την ζέστη στους 100° C για 1 ώρα. Στην ίδια έρευνα στους CFCS μιας καλλιέργειας του *L. rhamnosus* GG, παρατηρήθηκε μια μείωση του 2.5 log στην δίοδο του *H. pylori*. Μετά την θεραπεία με θερμοκρασία, η αντιβακτηριακή ικανότητα του *L. rhamnosus* GG χάθηκε. Όταν ποντίκια μολύνθηκαν με το στέλεχος *Helicobacter felis*, τους δόθηκε θεραπεία με CFCS της καλλιέργειας του *L. acidophilus* LB μια σημαντική μείωση της φλεγμονής, παρατηρήθηκε χωρίς εξάλειψη του παθογόνου, (Cocoppier et al., 1998) Οι Sgouras et al., 2001, ανακάλυψαν παρόμοια ευρήματα με το *L. casei* Aca -Dc6002 κατά την θεραπεία ποντικών μολυσμένων με το *H. pylori*, και οι αποικίες στο στομάχι αλλά και η σχετιζόμενη γαστρεντερίτιδα, μειώθηκαν σημαντικά με την παρουσία στελέχους προβιοτικών. Το ερώτημα, εάν οι βακτηριοκίνες μπορούν να περιλαμβάνονται στις παρατηρούμενες αντιμικροβιακές επιδράσεις των γαλακτοβακίλλων εναντίον του *H. pylori*, παραμένει αναπάντητο. Αν και η παραγωγή βακτηριοκινών οι οποίες είναι γενικά ενεργές μόνο εναντίον άλλων στενά σχετιζόμενων Gram θετικών βακτηρίων από *Lactobacilli*, είναι πολύ γνωστή, η δραστηριότητα in vivo ποτέ δεν φάνηκε. Μια ομάδα, ερεύνησε την επίδραση της νισίνης, ένα πολύ γνωστό γαλακτοβιοτικό, το οποίο παράχθηκε από τον *Lactococcus lactis*, εναντίον του *H. pylori* (Projan and Blackburn 1993). Ανακάλυψαν ότι, αυτή η βακτηριοκίνη δεν προκαλούσε καμία δραστηριότητα εναντίον του *H. pylori* όταν ελέγχθηκε. Παρόλα αυτά, όταν η νισίνη συνδυάστηκε με χηλοειδή φάρμακα τα οποία αλληλεπιδρούσαν με την κυτταρική μεμβράνη των Gram αρνητικών βακτηρίων, η νισίνη έδειξε ένα βακτηριακό αποτέλεσμα εναντίον του *H. pylori* μέσα σε λεπτά, ή δευτερόλεπτα. Γιαυτό, και η παραγωγή βακτηριοκινών μπορεί να παίζει ένα σημαντικό ρόλο στην αναστολή του *H. pylori* όταν συνδυάζεται με άλλες σκληρές συνθήκες, όπως και αυτές που συντελούνται στο στομάχι, π.χ. χαμηλό pH και στην παρουσία των πρωτεϊνών που παίρνουν μέρος στην άμυνα (defensins) (Hamanaka et al., 2001). Αυτές οι καταστάσεις In vitro, μπορεί να κάνουν τον *H. pylori* επιρρεπή σε βακτηριοκίνες από γαλακτοβακίλλους (Ganzle et al., 1999). Δυο πολύ πρόσφατες έρευνες, επισημαίνουν την δυναμικότητα των βακτηριοκινών σαν αντιδραστήριο του *H. pylori* (Atanassova et al., 2003, Ium et al., 2003). Η πρώτη έρευνα, περιγράφει ένα παραγόμενο στέλεχος βακτηριοκίνης, το *L. paracei* το οποίο αναστέλλει όχι μόνο τον *H. pylori*, αλλά ήταν επίσης ικανό να αναστέλλει τα στελέχη *Bacillus*, *Lactobacillus delbrueckii*, πολλά

είδη *Candida* (Εικ. 2.1), και *Saccharomyces cerevisiae* (Atanassona et al., 2003). Ένα άλλο έγγραφο, περιγράφει την αναστολή του *H. pylori* από αγνές βακτηριοκίνες. Οι γαλακτίνες, ειδικά αυτές που παράχθηκαν από είδη *Lactococcus*, παρουσιάζουν μια δραστηριότητα, η οποία ήταν πιο ισχυρή από αυτή των νιζικινών.



Εικ. 2.1 *Candida* Είναι ένα είδος ζύμης το οποίο προκαλεί μολύνσεις όπως καντιντίαση σε ζώα και ανθρώπους. Το πιο σημαντικό είδος είναι το *Candida albicans* το οποίο προκαλεί τις ασθένειες.

Πηγή: [http://en.wikipedia.org/wiki/Candida_\(genus\)](http://en.wikipedia.org/wiki/Candida_(genus))

Οι πεδιοκίνες, και λευκονίνες, που παρήχθησαν από τον *Pediococcus* και *Leuconostoc*, αντίστοιχα έδειξαν μια σχετικά χαμηλή ανασταλτική δραστηριότητα (Kim et al., 2003). Τελικά, επίσης ερευνήθηκε η αναστολή της δέσμευσης του *H. pylori* στα γλυκολίπδια, περιλαμβάνοντας την γαγλιοτετραοσυλκεριδίνη και σουλφατίδη, (Osawa et al., 2001, Mukon et al., 2002). Βρέθηκε ότι, από τα εννιά στελέχη του *L. reuteri* που ελέγχθηκαν, τα δύο μπορούσαν να σχετίζονται με αυτά των μορίων του α υποδοχέα. Στην συνέχεια, και τα δύο στελέχη ανέστειλαν επιτυχώς την δέσμευση του *H. pylori*. Επιπλέον, φάνηκε ότι, μια πρωτεΐνη με μάζα μορίου του 47k.Da που παρουσιάζεται στην εξαγωγική επιφάνεια του κυττάρου ήταν υπεύθυνη για αυτή την αναστολή.

2.2.1 *HELICOBACTER PYLORI*: κλινικά τεστ

Τα αποτελέσματα από πειράματα *in vitro* και πειράματα ζωικών μοντέλων, ενθάρρυναν τους ανθρώπους να ξεκινήσουν κλινικά τεστ για να ερευνήσουν την δυναμικότητα των ειδών του *Lactobacillus* ή των CFCS σαν βιοθεραπευτικά για θεραπεία των μολύνσεων του *H. pylori*. Οι *Lactobacilli*, που ήταν κυρίως

συνδυασμένοι με την πρότυπη τριπλή θεραπεία, τέθηκαν σε εφαρμογή για να καταπολεμήσουν τον *H. pylori* ώστε να μπορούν να βελτιώνουν την θεραπεία και την εκρίζωση μέσου όρου (eradication rates). Μια εκτεταμένη ματιά όλων των κλινικών τεστ μέχρι τώρα, δίνεται στον πίνακα 2.2.

Πίνακας 2.2. κλινικές δοκιμές με προβιοτικούς γαλακτοβακίλλους εναντίον των μολύνσεων του *Helicobacter pylori*

Θεραπευτικοί	Τελικό σημείο	Αποτελέσματα	Παραπομπές
Ζυμωμένο γάλα με <i>L. casei Shiroia</i> (εικόνα7)	UBT=τεστ αναπνοής ουρίας	Μικρή μη σημαντική μείωση της UBT αξίας	Cats et al 2003
Προβιοτική προετοιμασία η οποία περιέχει το <i>L.johnsonii la1</i> ή το <i>L. paracei ST11</i> το οποίο είτε είναι ζωντανό ή κατεστραμμένο μέσω θερμότητας	UBT= τεστ αναπνοής ουρίας	Μια σημαντική μείωση παρατηρήθηκε σε παιδιά που έλαβαν το ζωντανό είδος <i>L.johnsonii La1</i>	Cruchet et al 2003
<i>L.johnsonii La1</i> εμπορικά προϊόντα	UBT= τεστ αναπνοής ουρίας	Μια μείωση σε UBT αξίες σε ασύμπτωτους εθελοντές	Gottleland and Cruchet 2003.
Διαφορετικές προετοιμασίες προβιοτικών σε συνδυασμό με τριπλή θεραπεία.	Αντι- <i>H.pylori</i> παρενέργειες θεραπείας	Χαμηλό περιστατικό των παρενεργειών κατά την διάρκεια της θεραπείας. Καμία διαφορά ανάμεσα στις προβιοτικές προετοιμασίες .	Cremonini et al 2002
Γιαούρτι με ζωντανά <i>Lactobacillus, Bifidobacterium</i> σε συνδυασμό με τριπλή θεραπεία.	Κλίμακα εξάλειψης	Βελτίωση της κλίμακας εξάλειψης .Γρήγορη αποκατάσταση των επιπέδων <i>Bifidobacterium</i> σε κόπρανα μετά από θεραπεία.	Sheu et al 2002
Γιαούρτι το οποίο περιέχει <i>L.gasseri OLL2716</i>	UBT= τεστ αναπνοής ουρίας Πεπτιγόνα , αντιτετανικού ορού και κοπρανώδη <i>H. pylori</i> αντιγόνα	Μια μικρή μη σημαντική μείωση σε UBT αξίες σε μολυσμένα παιδιά.	Shimizu et al 2002
Ζυμωμένο γάλα στο οποίο έχει δοθεί το <i>Lactobacillus F19</i>	UBT= τεστ αναπνοής ουρίας	Καμία στατιστική διαφορά με την εικονικά ελεγχόμενη ομάδα	Sullivan et al 2002
<i>L.acidophilus, L.casei, L.</i> εμπορικό αρχικό(συνδυάζοντας 3 στελέχη).	Καταστολή του <i>H.pylori</i> in vitro , UBT in vivo	Όλα τα στελέχη ανέστειλαν την ανάπτυξη <i>H. pylori</i> in vitro.Καμία εξάλειψη σε ασθενείς με ένα γιαούρτι που συνδυάζει όλα τα 6 στελέχη	Wendakoon et al 2002
<i>L. rhamnosus</i> GG συνδυασμένο με τριπλή θεραπεία	Εξάλειψη και παρενέργειες	Καμία διαφορά σε εξάλειψη δεν παρατηρήθηκε. Βελτίωση των παρενεργειών και ανεκτικότητα θεραπείας.	Armuzzi et al 2001a
<i>L. rhamnosus</i> GG συνδυαζόμενος με τριπλή θεραπεία.	Αντιβιοτικά σχετιζόμενες παρενέργειες και εξάλειψη του <i>H. pylori</i> .	Καμία διαφορά σε εξάλειψη δεν παρατηρήθηκε ανάμεσα σε ομάδες .Βελτίωση των παρενεργειών και ανεκτικότητα θεραπείας.	Armuzzi et al 2001b
Ζυμωμένο γάλα με ζωντανούς <i>L. johnsonii La1</i>	Βακτηριακή πυκνότητα και γαστρική φλεγμονή.	Μια μείωση στην πυκνότητα του <i>H. pylori</i> , φλεγμονή και γαστρική δραστηριότητα .Ο <i>H. pylori</i> δεν εξαλείφθηκε .Καμία βελτίωση στην εξάλειψη όταν το <i>L. johnsonii</i> συνδυάστηκε με κλαρινθομικίνη.	Felley et al 2001

Γιαούρτι το οποίο περιέχει ζωντανό βακτήριο <i>L. gasseri</i> OLL 2716	UBT: πεψιγόνα αντιτετανικού ορού και βακτηριακή πυκνότητα	Μείωση στους αριθμούς του <i>H. pylori</i> , UBT αξίες, και γαστρική φλεγμονή που οφείλεται σε μύκητες.	Sakamoto et al 2001
Μη ενεργοποιημένη καλλιέργεια του <i>L. acidophilus</i> LB σε συνδυασμό με μια τριπλή θεραπεία.	Κλίμακα εξάλειψης	Μια σημαντική αύξηση στην κλίμακα εξάλειψης	Canducci et al 2000
<i>L. johnsonii</i> ορός γάλακτος-βασίζομενη υπέρ νηκτική καλλιέργεια	UBT: βακτηριακή πυκνότητα	Μια αναγραφόμενη μείωση στις αξίες UBT. Επιμονή της μόλυνσης του <i>H. pylori</i>	Michetti et al 1999
Ζωντανά κύτταρα <i>L. acidophilus</i>	Κλίμακα εξάλειψης	Στους 6 από τους 14 ασθενείς το <i>H. pylori</i> εξάλειφθηκε	Mrda et al 1998

Διαφορετικές έρευνες, αναφέρουν ότι μια καλλιέργεια *Lactobacillus*, ή CFCS, δεν είναι ποτέ επαρκής σαν θεραπευτική εφόσον η εξάλειψη του *H. pylori* δεν πραγματοποιήθηκε (Mirda et al., 1998, Michetti et al., 1999, Felley et al., 2001, Sakamoto et al., 2001, Wendakoon et al., 2002). Παρόλα αυτά, όταν ένα προβιοτικό συνδυάζεται με μια πρότυπη τριπλή θεραπεία, τα αποτελέσματα είναι διαφορετικά. Μια σημαντική αύξηση στο μέσο όρο εκκρίωσης, βρέθηκε με μια θερμοευαίσθητη καλλιέργεια του *L. acidophilus* LB (Anduci et al., 2000). Αυτό δείχνει ότι, το υπεύθυνο παράγωγο είχε ήδη παρουσιαστεί στο CFCS και ότι καμία de novo σύνδεση προέκυψε. Έρευνες in vitro, έδειξαν ήδη ότι τα CFCS μιας καλλιέργειας του *L. acidophilus* LB, εμφάνισαν μια δυνατή ανασταλτική δραστηριότητα εναντίον του *H. pylori* (Cocconnier et al 1998). Παρόμοια ευρήματα, έχουν εξασφαλιστεί με το προβιοτικό στέλεχος *L. johnsonii* Lal. Αυτό το στέλεχος επίσης, έδειξε καλή in vitro δραστηριότητα. Επιπλέον, η συμπλήρωση των CFCS της καλλιέργειας του *L. johnsonii* Lal ήταν επαρκής, ώστε να έχει ένα κατασταλτικό αποτέλεσμα in vivo (Michetti et al., 1999). Η καταστολή του *L. johnsonii* Lal, επίσης, μείωσε τις αξίες του τεστ αναπνοής ουρίας (UBT) σε ασυμπτωματικούς εθελοντές. (Gottleland and Ctuchet 2003) και παιδιά. Αυτό οδήγησε στην υπόθεση ότι, το αποτέλεσμα προκλήθηκε από μια εξωκυτταρική ένωση και τα ζωντανά κύτταρα δεν ήταν απαραίτητα. Σε αντίθεση, οι Cats et al., 2003 ανέφεραν σε αυτό ότι για ένα ολοκληρωμένο αποτέλεσμα, τα ζωντανά κύτταρα χρειαζόνταν. Παρόλα αυτά, αυτό φάνηκε στα in vitro και όχι στα in vivo πειράματα. Το LAB γιαούρτι, το οποίο περιλαμβάνει ένα στέλεχος *Lactobacillus* και ένα *Bifidobacterium*, έδειξε ασήμαντη αύξηση στο μέσο όρο εξάλειψης όταν συνδυάζει ένα προβιοτικό γιαούρτι (Εικ. 2.2),

με την πρότυπη τριπλή θεραπεία (Sheu et al., 2002). Επίσης, το ζυμωμένο γάλα το οποίο περιέχει το *L. johnsonii la1*, δεν έδειξε βελτίωση στο μέσο όρο εξαλείψεων της τριπλής θεραπείας (Felley et al., 2001), αν και το στέλεχος έδειξε βελτίωση στην φλεγμονή με *H. pylori* και σε in vitro και σε ανθρώπους όταν χορηγήθηκε μόνο (Michetti et al., 1999, Gottleland and Cruchet 2003). Το στέλεχος *Lactobacillus rhamnosus GG*, δεν έδειξε καμία βελτίωση του μέσου όρου εξαλείψεων ούτε σε συνδυασμό με την τριπλή θεραπεία. (Armuzzi et al., 2000a-2000b). Επιπλέον, το στέλεχος έδειξε να χαρακτηρίζεται από μέτρια *anti-pylori* δραστηριότητα in vitro (Cocconier et al., 1998). Παρόλα αυτά, ο *L. rhamnosus GG* και το *AB*, ελάττωσαν τις περιπτώσεις διάρροιας οι οποίες οφείλονταν σε αντιβιοτικά κατά την διάρκεια της *H. pylori* θεραπείας (Armuzzi et al., 2000a, 2000b, Cremonini et al., 2002, Shelvet et al., 2002), και γι αυτό μπορεί να βελτιώσει τον μέσο όρο καταστροφής του *H. pylori* από μια καλύτερη συμμόρφωση φαρμάκου (Sheu et al., 2002).



Εικόνα 2.2: παιδικό επιδόρπιο γιαουρτιού και γάλα ABG εμπλουτισμένα με probiotics και prebiotics για την σωστή ανάπτυξη του παιδιού.

Πηγή:http://www.kalimera.gr/xrhmatisthrio/NEA/cat_news/PREVIEW_newS_xrhmatisthrio.asp?news_data_id=118911&news_category_id=&category_id=67

Επίσης, για τον *L. paracei subsp paracosa*, οι UBT τιμές, δεν μειώθηκαν κατά την πρόσληψη τροφής ζυμωμένου γάλακτος, το οποίο περιέχει το προβιοτικό όταν δόθηκε σε ηλικιωμένους ανθρώπους οι οποίοι ήταν οροθετικοί για τον *H. pylori* (Sullivan et al., 2002). Αυτά τα στοιχεία δείχνουν ότι, οι επιδράσεις στον *H. pylori* εξαρτώνται από το στέλεχος. Αντιμαχόμενα αποτελέσματα, αναφέρθηκαν με το στέλεχος *L. gasseri OLL 2716*. Οι Sakamoto et al., 2001, αναφέρθηκαν σε μια αποτελεσματική μείωση του *H. pylori* και φλεγμονής γαστρικών μυκήτων σε

ενηλίκους, οι οποίοι μολύνθηκαν με *H. pylori*. Στην συνέχεια, ο *L. gasseri* OLL2716 είχε αποδειχτεί αποτελεσματικός στην μείωση των αριθμών *H. pylori* και σε in vitro πειράματα και σε ποντίκια (Πίνακας 2.3)(βλέπε παρακάτω).

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.3: In vitro έρευνες και ζωικά μοντέλα με προβιοτικούς γαλακτοβακίλλους εναντίον του στελέχους <i>Escherichia coli</i> .			
Είδη	Μοντέλα	Αποτελέσματα	Παραπομπές
<i>L. rhamnosus</i> ATCC 53103	Προσκόλληση σε Caco-2 κύτταρα και εισβολή σε κύτταρα ανθρακώδους ασβεστίου	Αναστολή της εισβολής αλλά όχι της προσκόλλησης εκτός από τις εξαιρετικές ικανότητες του <i>L. rhamnosus</i>	Hirano et al 2003
<i>L. plantarum</i> 299v, <i>L. rhamnosus</i> GG, <i>L. acidophilus</i> DDS-1	MUC3 βλενική έκφραση σε HT-29 κύτταρα .Αναστολή του δεσμού σε HT-29	Αυξημένη έκφραση βλενίνης MUC3 από τον <i>L. plantarum</i> 299v, και τον <i>L. rhamnosus</i> GG. Μειωμένη προσκόλληση του <i>E. coli</i> σε HT-29 κύτταρα από τα δύο ίδια στελέχη.	Mack et al 2003
<i>L. plantarum</i> 299v	Προσκόλληση σε T-84 κύτταρα .Ουδετερόφιλη μετανάστευση	Αναστολή της προσκόλλησης και μείωση του EPEC προκαλούμενου από ουδετερόφιλη μετανάστευση.	Michail and Abernathy 2003
<i>L. acidophilus</i> και <i>S. thermophilus</i>	Προσκόλληση, εισβολή: φυσιολογική δυσλειτουργία από τον <i>E. coli</i>	Ζωντανά κύτταρα ,αποτροπή προσκόλλησης και εισβολής παθογόνου.Επιπλέον αντενεργούσε πολλές επιδράσεις προκαλούμενες από το <i>E. coli</i> . Επιπλέον τα προβιοτικά μόνα τους αύξησαν την TEER*	Resta-Leneri and Barrett 2003
20 LAB είδη απομονώθηκαν στο τυρί.	Καλή ανάλυση διάρχυσης.	2 Είδη <i>L. paraceti</i> ήταν ανασταλτικά αποδίδοντας τις ενώσεις τύπου βακτηριοκίνης.	Caridi 2002
<i>L.crispatus</i> JCM 5810	Προσκόλληση σε matrigel ή ακινητοποιημένο πέταλο	Αναστολή της προσκόλλησης για τα κύτταρα <i>L. crispatus</i> και της πρωτεϊνης S-στρώματος .Δεν παρατηρήθηκε καμία αντιβακτηριδιακή δραστηριότητα.	Horie et al 2002
<i>L.acidophilus</i> LB	Επαφή με SCS* κατευθείαν ή σε Caco-2 κύτταρα	Μείωση της ζωτικότητας του παθογόνου με ευθεία επαφή και όταν προσκολλά σε Caco-2 κύτταρα. Προστασία εναντίον ζημιάς συνόρου ψήκτρας	Lievin-Le Moal et al 2002.
<i>L.plantarum</i> 299v	Πέρασμα μανιτόλης απέναντι από τον εντερικό τοίχο των αρουραίων.	Καμία επίδραση του <i>L. plantarum</i> 299v σε εντερική διαπερατότητα όταν δόθηκε μόνο σε αυτόν. Μια εβδομάδα προθεραπείας με τον <i>L. plantarum</i> 299v καταργώντας τον <i>E. coli</i> προκάλεσε αύξηση της διαπερατότητας του εντέρου.	Mangell et al 2002
<i>L. plantarum</i> 299v	Προσκόλληση σε Caco-2 κύτταρα. ISC *και TEER* άμεση επαφή.	Κανένας θάνατος από άμεση επαφή. Αναστολή της προσκόλλησηςκαι μείωση του αυξανόμενου ISC* όταν το <i>L. plantarum</i> προεπιβάστηκε.	Michail and Abernathy 2002
<i>L. rhamnosus</i> HN001(DR20)	Προσβολή ποντικίσου μοντέλου.	Μείωση μόλυνσης, μετακίνηση, νοσηρότητα .Ενισχυμένη χυμική και κυτταρική ανοσολογική αντίδραση.	Shu et al 2002
<i>L. casei</i> Shiota	Ποντικίσιο μοντέλο του UTI****	Αναστολή ανάπτυξης του <i>E. coli</i> στο ουρογεννητικό σύστημα.	Asahara et al 2001b
<i>L. rhamnosus</i> Lcr35	Προσκόλληση σε Caco-2	Αναστολή της προσκόλλησης και σε προ.και συν. ταχύ	Forestier et al 2001

	κύτταρα	επώαση πειραμάτων.	
<i>L. rhamnosus</i> HN001(DR20), <i>L. acidophilus</i> HN107, <i>L. johnsonii</i> Lal, <i>L. bulgaricus</i> LB	Καλή ανάλυση διάχυσης .Προσκόλληση σε , και εισβολή του HT-29 Caco-2 κυττάρων, , και HT-29, MTX κυττάρων.	Αντιμικροβιακή δραστηριότητα για <i>L. rhamnosus</i> HN001, <i>L. acidophilus</i> HNN017, και <i>L. johnsonii</i> Lal.	Gopal et al 2001
<i>L. rhamnosus</i> GG	Caco-2 κύτταρα	Αναστολή της μικροβιακής μετακίνησης.	Mattar et al 2001
<i>L. casei shirota</i>	Νεαρά κουνέλια καθαρά από παθογόνα.	Μειωμένη αποικία του γαστρεντερικού σωλήνα. Μειωμένο επίπεδο της τοξίνης Shiga. Αυξανόμενο επίπεδο του IgAs στο κόλον εναντίον των τοξινών Shiga και των κυττάρων <i>E. coli</i> .	Ogawa et al 2001 a.
<i>L. casei shirota</i> , <i>L. acidophilus</i> YIT0070, <i>L. brevis</i> YIT 0076	καλλιέργεια παρτίδων ζυμώσεων.	Αναστολή λόγω της ασυσχετίστης παραγωγής γαλακτικού οξέος.	Ogawa et al 2001 b
15 υπεροξειδίου του υδρογόνου παράγοντας στελέχη γαλακτοβακίλλων.	Προσκόλληση σε κοιλικά επιθηλιακά κύτταρα.	Στέλεχη <i>L. crispatus</i> ήταν τα πιο ανασταλτικά .Το <i>L. crispatus</i> 35 ήταν ικανό να μπλοκάρει την προσκόλληση του <i>E. coli</i> με 80, 54, και 21% με αποκλεισμό, ανταγωνισμό, και μετατόπιση, αντιστοίχως.	Osset et al 2001
14 προσκολλούμενα στελέχη <i>Lactobacillus</i> απομονώθηκαν από χοιρινό έντερο.	Προσκόλληση του μύκητα στο έντερο μικρών γουρουνιών.	6 από τα 14 στελέχη <i>Lactobacillus</i> ήταν ανασταλτικά. Αυτή η αναστολή μπορούσε να σχετιστεί με την παραγωγή γαλακτικού και ακετικού οξέος.	Jin et al 2000.
<i>L. plantarum</i> 299n, <i>L. Rhamnosus</i> GG.	Αναστολή της δέσμευσης σε HT-29 και Hep-2 κύτταρα από προβιοτικά και βλενίνες.	Μείωση της προσκόλλησης σε HT-29 κύτταρα από τον <i>L. plantarum</i> 299n και <i>L. rhamnosus</i> GG.Αύξηση του MUC2 και MUC3 mRNA επίπεδα με επώαση των HT-29 κυττάρων και <i>L. plantarum</i> 299n ή του υπερκείμενου του.	Mack et al 1999.
Είδη της ομάδας του <i>L. acidophilus</i> τα οποία απομονώθηκαν σε ανθρώπινα κόπρανα.	Καλή ανάλυση διάχυσης.	Το 74% των στελεχών που εξετάστηκαν παρήγαγαν βακτηριοκίνη .Κανένα από αυτά δεν ήταν ενεργό εναντίον του <i>E. coli</i> .	Itoh et al 1995
<i>L. fermentum</i> 104R	Προσκόλληση σε υδακό μύκητα γουρουνιού (adhesion to piglet ileal mucus).	Αναστολή της προσκόλλησης λόγω της παραγωγής μιας επιπλέον πρωτεϊναικής κυτταρικής ένωσης.	Blomberg et al 1993
<i>L. acidophilus</i> LB	Προσκόλληση σε Caco-2 κύτταρα.	Αναστολή της προσκόλλησης από ζωντανά και κύτταρα που θανατώνονται με την θερμότητα.	Chaviere et al 1992
<i>L. rhamnosus</i> GR-1, <i>L. acidophilus</i> 76	Καταστολή της ανάπτυξης των κυττάρων και επιβίωσης του <i>E. coli</i> σε τρυβλία και ούρα.	Ανασταλτική δραστηριότητα και των δύο στελεχών πιθανόν λόγω μιας ανασταλτικής ουσίας με μια υπολογιζόμενη μοριακή μάζα των 12 και 14 kDa.	McGroathy and Reid 1988.

<i>L. rhamnosus</i> GR-1	Αναστολή της ανάπτυξης με μια επίστρωση άγαρ	Παραγωγή μιας ανασταλτικής ουσίας συνδυασμένης με μια ικανότητα συσσωμάτωσης του <i>L. rhamnosus</i> με τον <i>E. coli</i> .	Reid et al 1988
<i>L. rhamnosus</i> GG	Καλή ανάλυση διάχυσης, ζωτικότητα ύστερα από άμεση επαφή με SCS*	Αναστολή του <i>E. coli</i> από τους SCS*.	Silva et al 1987.

*TEER: τρoνσεπιθηλιακή ηλεκτρική αντίσταση

SCS**: Υπερκείμενο καλλιέργειας, (spent culture supernatant)

ISC: Πρόσφατη κοντινή διαδρομή.

UTI***: μόλυνση ουρογεννητικού σωλήνα

Παρόλα αυτά, το *L. gasseri* OLL2716, δεν ήταν ικανό να μειώσει σημαντικά τις τιμές UBT σε μολυσμένα παιδιά, αν και δόθηκε μια υψηλότερη δόση ζυμωμένου γάλακτος (Shimizu et al., 2002). Αυτές οι διαφορές, μπορούν να εξηγηθούν από μια διαφορά στην ανοσοπαθogenέση του *H. pylori* σχετιζόμενης με γαστρεντερίτιδα και γαστρεντερική φλεγμονή ανάμεσα σε παιδιά και ενηλίκους.

2.3 ESCHERICHIA COLI

Οι πίνακες 2.4 και 2.5, δίνουν μια εκτεταμένη ματιά στις έρευνες in vitro οι οποίες διεξήχθησαν σε μια βακτηριακή ανάμειξη του γαλακτοβακίλλου με *E. coli*.

Πίνακας 2.4: Έρευνες στην αντιβακτηριακή δραστηριότητα in vitro των bifidobacteria.

Εξεταζόμενοι μικροοργανισμοί	Μοντέλα	Αποτελέσματα	Παραπομπές
Πολλά στελέχη <i>Bifidobacterium</i> απομονωμένα σε ανθρώπινα κόπρανα	Πειράματα ανάπτυξης με την παρουσία των CFCS και αναλύσεις κηλίδων Άγαρ με <i>Cl. difficile</i> , <i>E. coli</i> και <i>St. aureus</i>	Τα στελέχη <i>Bifidobacterium</i> έδειξαν αντιμικροβιακή δραστηριότητα εναντίον του <i>Cl. difficile</i> και <i>E.coli</i>	Lee et al 2003
<i>B. bifidum</i> Bb12	Αναλύσεις τρυβλίων και πειράματα καλλιέργειών με <i>S. enteritidis</i> , και <i>C. jejuni</i>	Ισχυρή αναστολή όλων των παθογόνων βακτηρίων	Fooks and Gibson 2002
<i>B. lactis</i>	Καλή ανάλυση διάχυσης, θανατηφόρες αναλύσεις και προσκόλληση σε ή εισβολή των Caco-2 κυττάρων, HT-29, και HT29-MTX γραμμές κυττάρων από το βακτήριο <i>E. coli</i>	Το βακτήριο <i>B. lactis</i> ανέστειλε ισχυρά την ανάπτυξη του <i>E.coli</i> και είχε ένα θανατηφόρο σημαντικό αποτέλεσμα εναντίον του παθογόνου. Το αντιεισβολικό αποτέλεσμα ήταν λιγότερο ξεχωριστό.	Gopal et al 2001
3 στελέχη <i>B. infantis</i>	Αναλύσεις χάρτινου δισκίου (paper disc) με <i>S. typhimorium</i> και <i>E. coli</i> ETEC	Ισχυρές ζώνες αναστολής παραγόμενες από 3 στελέχη <i>Bifidobacterium</i>	Rokiah et al 2000
5 στελέχη <i>Bifidobacterium</i>	Καλές αναλύσεις διάχυσης και ανάπτυξη των διαφορετικών παθογόνων βακτηρίων στην παρουσία	Αναστολή 11 παθογόνων βακτηρίων περιλαμβάνοντας το <i>E. coli</i>	Bruno and Shah 2000

	των CFCS		
13 στελέχη <i>Bifidobacterium</i> σε κόπρανα παιδιών	Εξουθενωτικές αναλύσεις με πολλά παθογόνα, προσκόλληση σε και ή εισβολή των Caco-2 κυττάρων από το βακτήριο <i>S. enterica ser typhimorium</i>	2 στελέχη έδειξαν ισχυρό θανατηφόρο αποτέλεσμα και ανέστειλαν την προσκόλληση και εισβολή σε Caco-2 κύτταρα.	Lievin et al 2000
10 στελέχη <i>Bifidobacterium</i> απομονώθηκαν σε ανθρώπινα κόπρανα	Ανάπτυξη του <i>H. pylori</i> στην παρουσία των CFCS και πειράματα συν καλλιέργειών.	5 στελέχη <i>Bifidobacterium</i> ανέστειλαν την ανάπτυξη <i>H. pylori</i> και <i>HP</i> δραστηριότητα ουρεάσης.	Bae et al 2000
2 στελέχη <i>B. bifidum</i> απομονώθηκαν σε κόπρανα παιδιών.	Προσκόλληση σε Caco-2 κύτταρα ή εισβολής σε Caco-2 κύτταρα από το <i>S. arizonae</i>	Όλα τα στελέχη <i>Bifidobacterium</i> ανέστειλαν την εισβολή του <i>S. arizonae</i> σε Caco-2 κύτταρα.	Bibiloni et al 1999
27 στελέχη <i>Bifidobacterium</i>	Αναλύσεις τρυβλίων με πολλούς Gram+ και Gram- δείκτες	12 στελέχη παρήγαγαν μεγάλες ζώνες αναστολής.	O'Riordan and Fitzgerald 1998
15 στελέχη <i>Bifidobacterium</i>	Πειράματα καλλιέργειών με 6 στελέχη <i>σαλμονέλα</i>	Όλα τα <i>Bifidobacterium</i> έδειξαν ανταγωνιστική δραστηριότητα εναντίον των παθογόνων. 3 στελέχη <i>Bifidobacterium</i> έδειξαν ισχυρή αντιμικροβιακή δραστηριότητα	Bielecka et al 1998
3 στελέχη <i>B. adolescentis</i> και ένα στέλεχος <i>B. bifidum</i>	Καλές αναλύσεις διάχυσης με τα βακτήρια <i>E. coli</i> , <i>S. typhosa</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>St. aureus</i> , <i>B. cereus</i> και <i>Sh. sonnei</i>	Τα 3 στελέχη <i>B. adolescentis</i> έδειξαν αντιμικροβιακή δραστηριότητα εναντίον των παθογόνων δεικτών.	Khedkar et al 1998
<i>Bifidobacterium spp</i>	Πειράματα καλλιέργειών με το βακτήριο <i>Cl. perfringens</i>	Μειωμένα ποσοστά ανάπτυξης του <i>Cl. perfringens</i>	Kullen et al 1998
5 στελέχη <i>Bifidobacterium bifidum</i>	Αναλύσεις κηλίδων άγαρ με πολλούς Gram+ και Gram- δείκτες	<i>B. bifidum</i> NCFB 1454 ανέστειλε πολλούς Gram+ /- δείκτες περιλαμβάνοντας το <i>Listeria spp</i>	Yildirim and Johnson 1998
8 στελέχη <i>Bifidobacterium</i> ανθρώπινης προέλευσης	Προσκόλληση του <i>E. coli</i> ETEC σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα.	Όλα τα <i>bifidobacteria</i> ανέστειλαν την προσκόλληση του <i>E. coli</i> σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα.	Fujiwara et al 1997
<i>B. bifidum</i>	Αναλύσεις τρυβλίων με πολλά παθογόνα	Αναστολή των διαφορετικών παθογόνων περιλαμβάνοντας τα είδη <i>E. coli</i> και <i>salmonella spp</i>	Keব্য 1995
5 στελέχη <i>Bifidobacterium</i>	Ανάπτυξη του <i>E. coli</i> στην παρουσία των CFCS	Ισχυρή αναστολή από όλα τα στελέχη <i>Bifidobacterium</i>	Ibrahim and Bezkovainy 1993
<i>B. infantis</i>	Αναλύσεις τρυβλίων, ανάπτυξη στην παρουσία των CFCS, καλλιέργειες με τα βακτήρια <i>E. coli</i> , <i>Cl. perfringens</i> , και <i>B. fragilis</i>	Αναστολή από όλα τα παθογόνα βακτήρια.	Gibson and Wang 1993
8 στελέχη <i>Bifidobacterium</i> προερχόμενα από ανθρώπινο οργανισμό	Προσκόλληση σε και/ή εισβολή των Caco-2 κυττάρων από διαφορετικά παθογόνα	Όλα τα στελέχη ανέστειλαν σε διαφορετικό βαθμό την προσκόλληση και εισβολή του <i>E. coli</i> (ETEC, DAEC, EPEC), <i>S. enterica ser Typhimorium</i> και <i>Y. pseudotuberculosis</i> σε Caco-2 κύτταρα	Bemet et al 1993
13 στελέχη <i>Bifidobacterium</i>	Καλές αναλύσεις διάχυσης εναντίον πολλών Gram+ /- δεικτών	Ένα στέλεχος <i>Bifidobacterium</i> ήταν ενεργό εναντίον πολλών Gram+ δεικτών περιλαμβάνοντας το βακτήριο <i>Clostridia spp.</i>	Meghtous et al 1990
<i>B. longum</i>	Αναλύσεις τρυβλίων με πολλά παθογόνα βακτήρια	Το βακτήριο <i>B. longum</i> ανέστειλε πολλά παθογόνα περιλαμβάνοντας το <i>E. coli</i> και <i>salmonella spp</i>	Kang et al 1989
<i>B. bifidum</i> NCD01452	Καλές αναλύσεις διάχυσης	Αναστολή του <i>E. coli</i> και του βακτηρίου <i>Micrococcus flavus</i>	Anand et al 1984a,b

Πίνακας 2.5. In vitro μελέτες και μελέτες που αφορούν ζωικά μοντέλα με προβιοτικούς γαλακτοβακίλλους οι οποίοι παρεμβαίνουν τόσο με *E. coli* όσο και με *Salmonella*

Είδος	Μοντέλο	Αποτελέσματα	Παραπομπές
<i>L.acidophilus</i> UO 001, <i>L.gasseri</i> UO 002.	Ανάπτυξη σε αναμειγμένη καλλιέργεια και προσκόλληση σε Caco-2 κύτταρα .	Ολοκληρωτική αναστολή του παθογόνου σε ένα αναμειγμένο πληθυσμό πιθανόν λόγω του γαλακτικού οξέος. Αναστολή της προσκόλλησης του <i>E. coli</i> από τον <i>L. gasseri</i> .	Fernandez et al 2003
<i>L. plantarum</i> 0407	καλλιεργητικά πειράματα	Ανταγωνιστική δραστηριότητα παρατηρήθηκε εναντίον του <i>E.coli</i> , <i>Salmonella</i> και <i>Clostridium</i> χάρη στην παραγωγή οργανικών οξέων.	Fooks and Gibson 2002.
<i>L. rhamnosus</i> GG και <i>L. casei</i> Shirota	Προσκόλληση σε Caco-2 κύτταρα	Αναστολή της προσκόλλησης πιθανόν από στερική ενυδάτωση στην περίπτωση του <i>L.rhamnosus</i> GG και με ανταγωνισμό για δέσμευση πλευρών των προσκολλητών στην περίπτωση του <i>L.casei shirota</i> .	Lee and Puong 2002
<i>L. Johnsonii</i> Lal, <i>L. acidophilus</i> La10	Παραγωγή των προφλεγμονωδών κυτοκινών με την παρουσία του ευδιάλυτου CD14 .	Λιποτικά οξέα από <i>Lactobacillus</i> ανέστειλε την προφλεγμονώδη ανοσολογική αντίδραση στον <i>E.coli</i> και <i>Salmonella</i> λιποπολυσακχαρίτες.	Vidal et al 2002
<i>L.crispatus</i> JCM 8779, <i>L.reuteri</i> JCM 1081	Προσκόλληση των Caco-2 κυττάρων . Άμεση επαφή με το παθογόνο και SCS*	Υψηλή μείωση του προσκολλητικού <i>Enterococcus faecalis</i> με τον <i>L. crispatus</i> JCM 8779, καμία μείωση του <i>E. coli</i> ή της <i>Salmonella</i> . Θανατηφόρο αποτέλεσμα του <i>E. faecalis</i> από <i>L.crispatus</i> SCS χάρη στην παρουσία μιας βακτηριοκίνης.	Todoriki et al 2001
<i>L. salivarius</i> UCC 118	Αναστολή της από μια επικάλυψη Άγαρ	Αναστολή τόσο του <i>E.coli</i> και <i>Salmonella</i> από επικαλυμμένες αποικίες. Ενεργή ένωση σε υπερκείμενο ήταν μόνο ενεργή εναντίον Gram-/+ στελεχών όχι εναντίον του <i>E.coli</i> και <i>Salmonella</i> .	Dunne et al 1999.
<i>L. rhamnosus</i> GG, <i>L. rhamnosus</i> LC-705, <i>L. rhamnosus</i> νέα εντερική απομόνωση, <i>L. johnsonii</i> Lal και <i>L. casei shirota</i>	S-κροσωπή ενδιάμεση προσκόλληση σε ανθρώπινο εντερικό μύκητα.	Μηδαμινή μείωση της προσκόλλησης του <i>E.coli</i> με τα τρία στελέχη <i>L.rhamnosus</i> .Σημαντική αναστολή της προσκόλλησης της <i>Salmonella</i> μαζί με <i>L.johnsonii</i> Lal και <i>L.casei shirota</i> .Αυξανόμενη προσκόλληση της <i>Salmonella</i> με τον <i>L.rhamnosus</i> GG και <i>L.rhamnosus</i> (εντερική απομόνωση)	Tuomola et al 1999.
<i>L. acidophilus</i> IBB 801	Αναστολή της ανάπτυξης με την τεχνική επίστρωσης Άγαρ.	SCS* ανέστειλε τόσο ένα <i>Salmonella</i> και ένα <i>E.coli</i> στέλεχος.	Zamfir et al 1999.
<i>L. acidophilus</i> LB	Ο χρόνος μειώνει τις έρευνες (επαφή ανάμεσα σε παθογόνα και SCS*	Μια εξτρακυτταρική ένωση διαφορετική από γαλακτικό οξύ ανέστειλε μια μεγάλη ποικιλία τόσο των Gram + όσο και των Gram - παθογόνων	Cocconier et al 1997
<i>L.paracei</i> B21060 και B21070, <i>L.acidophilus</i> B21190	καλλιέργεια και καλή ανάλυση διάχυσης.	Καμία αναστολή στην καλή ανάλυση διαχυτότητας. Ισχυρή αναστολή στα πειράματα καλλιέργειας.	Drago et al 1997

<i>L. Johnsoni</i> Lal	Προσκόλληση σε Caco-2 κύτταρα και εισβολή σε κύτταρα ανθρακώδους ασβεστίου	Αναστολή της κυτταρικής προσκόλλησης εισβολής.	Bernet et al 1994
103 <i>Lactobacillus</i> απομονώσεις	Κορυφή επίστρωσης Άγαρ του παθογόνου	Το 70% περίπου των στελεχών ήταν ανασταλτικά σε ένα τουλάχιστον από τα εξεταζόμενα παθογόνα (<i>Listeria</i> , <i>Salmonella</i> , και <i>E.coli</i>)	Chateau et al 1993
<i>L.acidophilus</i> LB	Προσκόλληση σε Caco-2 κύτταρα και εισβολή σε Caco-2 κύτταρα.	Το θανατωμένο με θερμότητα στέλεχος <i>L.acidophilus</i> προσκόλλησε καλά με τα Caco-2 κύτταρα και ανέστειλε την προσκόλληση πολλών εντεροπαθογόνων.	Cocconier et al 1993.

*SCS : Υπερκείμενο καλλιέργειας

Είχε αναφερθεί, ότι το *E. coli* αναστάλθηκε από γαλακτικό οξύ το οποίο παράχθηκε από προβιοτικούς γαλακτοβακίλλους (Gilliard and Speck 1971, Ogawa et al., 2001b, Jin et al., 2000, Fooks et Gibson 2002, Fernadez et al., 2003), αν και το *E.coli* κατέχει μια αντίσταση στο οξύ (Merrell and Camilli 2002). Εχει αποδειχτεί ότι μη σχετιζόμενο γαλακτικό οξύ αναστέλλει την ανάπτυξη του *E. coli* σε μια συγκέντρωση περίπου 2-11 Mm, και θανατώνει τα κύτταρα σε μια συγκέντρωση του 70mM ή περισσότερο (Merrelland Camilli 2002, Ostling and Lindgren 1993). Επιπλέον, το γαλακτικό οξύ διαπερνά την μεμβράνη του *E. coli* και *Salmonella*, σε μια συγκέντρωση του 5 mM σε pH=4.0. Αυτό το αποτέλεσμα, ήταν πιο ισχυρό από αυτό του υδροχλωρίου. Το γαλακτικό οξύ, ελευθέρωσε λιποπολυσακχαρίτες από την εξωτερική μεμβράνη αυτών των βακτηρίων, κάνοντας τα επιρρεπή σε άλλα αντιμικροβιακά, όπως οι βακτηριοκίνες (Alakomi et al., 2000). Πολλοί ερευνητές, έχουν αναφερθεί στην αναστολή της προσκόλλησης του *E. coli* σε γαστρεντερικά επιθηλιακά κύτταρα (Clavriere et al., 1992, Cocconier et al., 1993, Bernet et al., 1994, Mack et al., 1999,2003, Forester et al., 2001, Copal et al., 2001, Lievin le Moal et al., 2002, Michail and Abernathy 2002,2003, Fernadez et al., 2003, Rest-Lernet and Barrett 2003, και από την μετακίνηση τους (Mattar et al., 2001), χρησιμοποιώντας κυτταρικές γραμμές (Caco-2 κύτταρα, T-84, και HT-29). Επίσης, έχει αναφερθεί η αναστολή της προσκόλλησης σε βλεννίνες (Jin et al., 2000, Tuomola et al., 1999, Blomberg et al., 1993) και ανθρώπινα κολπικά κύτταρα (Osset et al., 2001). Οι Hirano et al. 2003, αναφέρθηκαν σε ένα στέλεχος του *L. rhamnosus*, το οποίο προσκόλλησε πολύ καλά σε Caco-2 κύτταρα, αλλά απέτυχε να αναστείλει την προσκόλληση του *E. coli*. Παρόλα αυτά, η εισβολή στην κυτταρική σειρά του

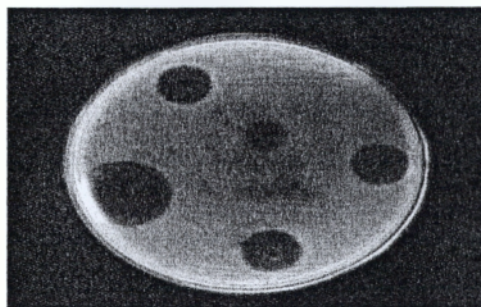
ανθρώπου από τον *E. coli*, αναστάλθηκε. Οι επιστήμονες θεώρησαν, πως μια ισχυρή αλληλεπίδραση ανάμεσα στον *L. rhamnosus* και τα κύτταρα του ξενιστή, προκάλεσε ενδοκυτταρικές καταστάσεις, οι οποίες ανέστειλαν την εσωτερίκευση του *E. coli*. Οι Horie et al. 2002, χρησιμοποίησαν ένα βασικό υμένα, σαν μοντέλο για βακτηριακή προσκόλληση. Τα βακτήρια *Salmonella* και *E. coli*, μπορούν να δεσμευτούν στις ολιγοστερεότυπες αλυσίδες του δικτύου του λεπτού υμένα, σε αυτές τις βασικές μεμβράνες (Kukkonen, 1993). Βρέθηκε ότι, το *L. crispatus* ανέστειλε την προσκόλληση του *E. coli*, από τα μέσα του s στρώματος πρωτεΐνης CbcA. Όταν, αυτό το στρώμα προστέθηκε, η προσκόλληση του *E. coli* αναστάλθηκε (Toba et al., 1995, Horie et al., 2002). Στην συνέχεια, βρέθηκε ότι το *L. johnsonii la1* μοιραζόταν τις ιδιαιτερότητες του δεσμευμένου υδατάνθρακα με τα εντεροπαθογόνα *Salmonella* και *E. coli* (Neeser et al., 2000). Αυτές οι έρευνες, υποστηρίζουν την υπόθεση της ανταγωνιστικής εξειδίκευσης, σαν μια πιθανή εξήγηση για την αναφερθείσα αναστολή της προσκόλλησης (Lee et al., 2000). Επιπλέον, το στέλεχος *L. fermentum 104R*, ήταν ικανό να αναστέλλει την προσκόλληση του *E. coli* σε μύκητα, με την παραγωγή μιας εξωκυτταρικής πρωτεϊνούχας ένωσης. (Blomberg et al., 1993). Επίσης, τα *L. casei Shirota*, *L. rhamnosus GG*, *L. rhamnosus LC-705* και *L. johnsonii La1*, όπως επίσης και ένα άλλο στέλεχος *L. rhamnosus*, το οποίο απομονώθηκε σε ανθρώπινα κόπρανα, ήταν ικανά να μειώσουν την S-κροσσωτή έμμεση προσκόλληση του *E. coli*, και την προσκόλληση της *Salmonella*, σε ανθρώπινες εντερικές γλυκοπρωτεΐνες, οι οποίες εκχυλίστηκαν από κόπρανα όπου απαρτίζουν ένα μοντέλο βλέννας. Οι Tuomola et al., 1999, Michail and Abernathy 2002-2003, ανέφεραν ένα ανασταλτικό αποτέλεσμα προσκόλλησης του *L. plantarum 299V*, το οποίο δεν σχετίστηκε με ένα θανατηφόρο αποτέλεσμα του βακτηρίου, και το οποίο ήταν ανεξάρτητο από εκκριτικές ενώσεις, εφόσον καμία δραστηριότητα δεν παρατηρήθηκε με τους CFCS μιας καλλιέργειας του *L. plantarum 299*. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν με τον *L. rhamnosus LCR 35* (Forestier et al., 2001). Αξιοσημείωτο είναι, ότι αυτό το στέλεχος ήταν ικανό να αναστείλει την προσκόλληση των Caco-2 κυττάρων όταν προστέθηκαν 30 λεπτά πριν, μαζί και 30 λεπτά μετά από μια πρόκληση με *Salmonella*, κανένα άμεσο θανατηφόρο αποτέλεσμα δεν παρατηρήθηκε με τους CFCS. Εναλλακτικά, η προσκόλληση σε εντερικά επιθηλιακά κύτταρα από τον *E. coli* μπορεί να αποτραπεί από ένα ευθύ θανατηφόρο αποτέλεσμα στο βακτήριο. Για παράδειγμα, Οι Lievin le Moal et al., 2002 βρήκαν ότι ένα διπλάσια συγκεντρωμένο CFCS μιας καλλιέργειας του *L. acidophilus LB*, μείωσε ζωτικούς

αριθμούς του *E. coli* με 2.5 log ενότητες, μέσα σε τρεις ώρες εκκόλαψης. Όταν το ίδιο υλικό, εφαρμόστηκε στο *E. coli* και ήρθε σε επαφή με τα Caco-2 κύτταρα, μια μείωση των 3log ενοτήτων παρατηρήθηκε μέσα στο ίδιο χρονικό διάστημα. Επιπλέον, ο Gopal et al., 2001 παρατήρησε ότι 2.5 φορές συγκεντρωμένοι CFCS μιας καλλιέργειας του *L. rhamnosus DR20*, *L. acidophilus HN107*, και *L. johnsonii Lal*, έδειξαν μια ισχυρή ανασταλτική δραστηριότητα του *E. coli*. Αυτή η ανασταλτική δραστηριότητα εν μέρει, χάθηκε κατά την ενζυμική θεραπεία με γαλακτική δυοδρογονάση, τρυψίνη, και πρωτεΐνάση κ. Οι επιστήμονες, συμπέραναν ότι η όλη αναστολή, ήταν λόγω της συννευεργετικής δράσης του γαλακτικού οξέος και ενός πρωτεϊνούχου παράγοντα. Στην συνέχεια, η συγκέντρωση CFCS σε καλλιέργειες αυτών των στελεχών συνείσφερε σε ένα ανασταλτικό αποτέλεσμα της προσκόλλησης και εισβολής των γαστρεντερικών επιθηλιακών κυττάρων από τον *E. coli*. Οι Todoriki et al., 2001, χρησιμοποίησαν δυο στελέχη γαλακτοβακίλλων που προσκολλούνταν ισχυρά σε Caco-2 κύτταρα. Παρόλα αυτά, όταν τα δύο αυτά τα δύο στελέχη ερευνήθηκαν για αναστολή της προσκόλλησης του *E. coli* ή της *Salmonella* και τα δύο στελέχη είχαν χαμηλή παρουσίαση.

Σε αντίθεση, η προσκόλληση του *Enterococcus faecalis*, αναστάλθηκε σημαντικά από το στέλεχος *L. crispatus*. Επιπλέον, αυτή η αναστολή της προσκόλλησης σχετίστηκε με μια πρωτεϊνούχα αντιβακτηριακή ένωση η οποία είναι εμφανής στους CFCS. Αυτά τα αποτελέσματα οδήγησαν τους επιστήμονες στην πεποίθηση ότι ο ανταγωνισμός για την προσκόλληση θέσεων ή στερικών εμποδίων, παίζει μόνο ένα μικρό ρόλο στην αναστολή προσκολλητικότητας, και ότι η αντιβακτηριδιακή δραστηριότητα, είναι υψίστης σημασίας. Μερικές φορές, είναι δύσκολο επομένως να διακρίνουμε ανάμεσα σε ένα άμεσο θανατηφόρο αποτέλεσμα από έναν μεταβολίτη, ο οποίος παρήχθη από το προβιοτικό LAB στέλεχος, και την απώλεια προσκόλλησης τους στα γαστρεντερικά κύτταρα. Πολλοί ερευνητές, έχουν παρατηρήσει ένα άμεσο θανατηφόρο αποτέλεσμα του γαλακτοβακίλλου που θα μπορούσε να αποδοθεί στην παραγωγή βακτηριοκινών ή βακτηριοκίνες τύπου ενώσεων. (Silva et al., 1987, Mc Groathy and Reid 1988, Reid et al., 1988, Chateau et al., 1993, Coconnier et al., 1997, Dunne et al., 1999, Gopal et al., 2001, Caridi 2002, Lievin le Moal 2002). Το στέλεχος *L. acidophilus LB* έχει αποδειχτεί, ότι αναστέλλει την προσκόλληση πολλών εντεροπαθογόνων Caco-2 κυττάρων (Coconnier et al., 1993, Chaviere et al 1992). Αυτή η αναστολή, συμβαίνει πιθανόν λόγω της μυστικότητας ενός αντιμικροβιακού σε μια μεσαία καλλιέργεια (Coconnier et al., 1997, Lievin Le Moal 2002). Ένα

στελέχος με ενδιαφέρουσες ιδιότητες, είναι το *L. salivarius subsp salivarius* UCC 118. Αυτό το στέλεχος, έδειξε καλή προσκόλληση στα Caco-2 κύτταρα και ήταν αντιμικροβιακό εναντίον του *Bacillus*, *Enterococcus*, *E. coli*, *Listeria*, *Pseudomonas*, *Salmonella* και *Staphylococcus* (Εικ. 2.3), αλλά όχι εναντίον του *Streptococcus* και των ειδών *Lactobacillus* με εξαίρεση το στέλεχος *L. fermentum*. Επίσης, οι CFCS μιας καλλιέργειας του στελέχους έκθεσαν την αντιβακτηριακή δραστηριότητα, αν και η δραστηριότητα εναντίον του *E. coli* και της *Salmonella* δεν μπορούσε να παραληφθεί στο υπερκείμενο υγρό (Dunne et al., 1999). Αργότερα, μια βακτηριοκίνη (ABP-118) η οποία παρουσιαζόταν στους CFCS, καθαρίστηκε και θεωρήθηκε υπεύθυνη για αναστολή του Gram+δείκτη (Flynn et al., 2002). Αν και οι βακτηριοκίνες από τους γαλακτοβακίλλους και LAB γενικά δεν είναι ενεργές εναντίον Gram-βακτηρίων, (De Vuyst and Vandamme 1994) δεν μπορεί να αποκλειστεί ότι οι βακτηριοκίνες από τους γαλακτοβακίλλους όπως ABP-118 μπορεί να παίζουν ρόλο στην αναφερθείσα αναστολή εναντίον του *E. coli* και της *Salmonella*. Για παράδειγμα, βρέθηκε ότι οι βακτηριοκίνες του LAB μπορεί να ανταγωνίζονται τα Gram αρνητικά βακτήρια κάτω από έντονες συνθήκες όπως το χαμηλό pH ή υψηλές συγκεντρώσεις άλατος (Ganzle et al., 1999, Alakomi et al., 2000). Το γαλακτικό οξύ, πέρα από την αντιμικροβιακή του ιδιότητα με το να ελαττώνει το pH, εκτελεί και άλλες λειτουργίες, όπως διαπερατότητα της εξωτερικής μεμβράνης των Gram αρνητικών βακτηρίων και μπορεί πιθανώς να δυναμώνει τα αποτελέσματα των βακτηριοκινών και άλλων αντιμικροβιακών ουσιών (Alakomi et al., 2000). Επιπλέον, έχει αποδειχτεί πως ορισμένες βακτηριοκίνες όπως η πεδιοκίνη PA-1, σακασίνη P, και κυρτοκίνη A, παραγόμενες από τα στελέχη *Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus sakei* και *Lactobacillus curvatus* αντίστοιχα, παρουσίαζαν μια ισχυρή συνεργία με το αντιμικροβιακό ευκαρυωτικό πεπτιδίο πλευροκιδίνη στην αναστολή του Gram-*E. coli* (Luders et al., 2003). Επιπλέον, το γαλακτοκομικό στέλεχος *L. acidophilus* IBB 801, παράγει μια βακτηριοκίνη η οποία πιθανώς να σχετίζεται με την αναστολή του στελέχους *Salmonella* και του *E. coli* (Lamfir et al., 1999). Επιπλέον, οι ενώσεις τύπου βακτηριοκίνης οι οποίες παρήχθησαν από τον *L. paracei subsp paracei* (Caridi 2002), *Enterococcus faecium* (Panter et al., 2002) και πολλοί άλλοι εντερόκοκκοι (Simonetta et al., 1997) έχουν αναφερθεί πως ανταγωνίζονται τα Gram-βακτήρια. Ο *Lactobacillus reuteri*, είναι ικανός να παράγει ρεουτερίνη και ρεουτερικυκλίνη. Η ρεουτερίνη, είναι ένα αντιμικροβιακό, το οποίο έχει ένα ευρύ ανασταλτικό φάσμα εναντίον Gram-βακτηρίων *E.coli*, *Salmonella*, και των Gram+

Clostridium, *Staphylococcus* (Εικ. 2.3) βακτηριακών ειδών τα οποία συνθέτονται από την γλυκερόλη (Talarico et al., 1998).



Εικ. 2.3. *Staphylococcus aureus*: τρυβλίο ανάλυσης αντιβιοτικών. Πηγή: <http://en.wikipedia.org/wiki/Antibiotic>

Η ρεουτερικυκλίνη, είναι ένα παραγόμενο τετραμετρικό οξύ το οποίο έχει ένα ευρύ ανασταλτικό αποτέλεσμα εναντίον των Gram +βακτηρίων (Ganzle et al 2000, Halzfel et al 2000) Τελικά στο παρελθόν, πολλές ενώσεις έχουν περιγραφεί ότι επιδεικνύουν τις αντιμικροβιακές ιδιότητες του *E. coli*. Παραδείγματα αποτελούν οι οξεολίνες (Hamdan and Mikolajak 1974) και οξεοφιλίνες (Shahami et al., 1977). Παρόλα αυτά, αυτές οι ενώσεις χαρακτηρίστηκαν με φτωχό ορισμό (De Vuyst and Vandamme 1994). Ένας άλλος μηχανισμός δράσης, είναι η ρύθμιση των φυσικών επιθηλιακών φραγμάτων από ένα προβιοτικό. Έχει αποδειχτεί ότι, η κολλώδης έκφραση του γονιδίου, μπορεί να δραστηριοποιηθεί από γαλακτοβακίλλους, και πως η αυξανόμενη παραγωγή μύκητα, συνεισφέρει στην αναστολή της προσκόλλησης του *E. coli*, (Mack et al., 1999-2003).

Οι Restei-Lenert and Barrett (2003), περιέγραψαν πως ένας συνδυασμός κυττάρων του ζωντανού στελέχους *S. thermophilus* και του *L. acidophilus*, αύξησε την μετεπιθηλιακή αντίσταση μονοακτίνων των Caco-2 κυττάρων. Επιπλέον, αυτό το προβιοτικό παρασκεύασμα, ανέστειλε την προσκόλληση και εισβολή από ένα εντεροδιεισδυτικό *E. coli*, όταν το προβιοτικό στέλεχος επώαστηκε πριν την μόλυνση. Πολλές φυσιολογικές δυσλειτουργίες, προκλήθηκαν από τον *E. coli*, σαν μια μείωση της μετεπιθηλιακής αντίστασης, μια αύξηση στην επιθηλιακή διαπερατότητα, μια διακοπή του κυτοσκελετού και σφιχτών διασταυρωμένων πρωτεϊνών, μια δυσλειτουργική μεταφορά ιόντων, και επανεργοποίηση του αυξητικού επιδερμικού παράγοντα υποδοχέα, επίσης προλήφθηκαν. Ένα ολικό ανασταλτικό αποτέλεσμα, μπορεί να διατηρηθεί μόνο με ζωντανά κύτταρα του *S. thermophilus* και του *L.*

acidophilus. Η αναστολή του *E. coli*, προκάλεσε αύξηση της εντερικής διαπερατότητας, και παρατηρήθηκε επίσης σε ποντίκια που τους είχε προηγουμένως δοθεί θεραπεία με *L. plantarum* 299v. Επιπλέον, αποδείχθηκε ότι το στέλεχος *L. rhamnosus* HN001 προστατεύει τα ποντίκια από μολύνσεις με *E. coli*, με το να διεγείρει την ανοσολογική αντίδραση (Shu and Gill 2002). Αυτοί οι ερευνητές, βρήκαν ένα αυξημένο επίπεδο του αντί-*E. coli*, το αντίσωμα IgA, όταν τα ποντίκια τρέφονταν με *L. rhamnosus* HN001. Επίσης, τα ποντίκια τα οποία εμβολιάστηκαν με *L. rhamnosus* HN001 εξέθεσαν μια υψηλότερα φαγοκυτταρική ικανότητα. Το ανασταλτικό αποτέλεσμα του *L. casei* Shirota, έχει κυρίως ερευνηθεί σε ζωικά μοντέλα (Ogawa et al., 2001a, Asahara et al., 2001b). Σε ένα νεαρό κουνέλι, ένας τύπος παραγόμενης τοξίνης Shiga από μόλυνση του *E. coli* παρατηρήθηκε ότι, το *L. casei* Shirota, μείωσε την σοβαρότητα της διάρροιας, τα επίπεδα αποικίας του *E. coli*, και ταυτόχρονα μείωσε τα επίπεδα της τοξίνης Shiga και ιστολογικής ζημίας. Από την άλλη μεριά τα ειδικευμένα αντισώματα (IgA) εναντίον του *E. coli* και τις δυο τοξίνες του αυξήθηκαν όταν στα κουνέλια δόθηκε καλλιέργεια *L. casei* Shirota. Υποθέτοντας ότι οι βελτιώσεις που παρατηρήθηκαν σε ομάδα την οποία χορηγήθηκε *L. casei* προκλήθηκαν από μια ενίσχυση της ανοσολογικής αντίδρασης (Ogawa et al., 2001a). Παρόμοια, βρέθηκε ότι το *L. casei* Shirota υπέστη μόλυνση με τον *E. coli*, σε ένα μολυσμένο ουρογεννητικό σωλήνα ποντικίου. Ένα σημαντικό αντιμικροβιακό αποτέλεσμα παρατηρήθηκε, και για ζωντανά και για νεκρά κύτταρα από ζέστη όταν τους χορηγήθηκε μια μόνο δόση σαν προ-θεραπεία ή μια πολλαπλή καθημερινή θεραπεία, κατά την περίοδο της μετα-μόλυνσης. Αυτό το αποτέλεσμα ήταν συγκεκριμένο για τον *L. casei* Shirota, και δεν μπορούσε να συσχετιστεί με την παραγωγή οργανικών οξέων ή μορίων. (Asahara et al., 2001b). Επιπλέον, το *L. casei* Shirota, έδειξε να προσκολλά *in vitro*, σε Caco-2 κύτταρα και να αναστείλει την προσκόλληση του *E. coli* και της *Salmonella* spp σε ανταγωνιστική αναστολή αποκλειστικότητα, και μετατόπιση πειραμάτων. Πιθανόν το *L. casei* Shirota, κατέχει δύο τύπους της επιφάνειας προσκολλητών, οι οποίοι μπορούν να ανταγωνίζονται με τους προσκολλητές της *Salmonella* και του *E. coli* για θέσεις υποδοχέων (Lee and Puong 2002). Έχει επίσης αποδειχθεί, ότι τα λιποτεϊκά οξέα από την κυτοπλασματική μεμβράνη των Gram+βακτηρίων μπορεί να ελέγξουν μια προφλεγμονώδη αντίδραση. Οι Ovidal et al., 2002, παρατήρησαν ότι οι λιποπολυσακχαρίτες από τον *E. coli* και την *Salmonella* ήταν ικανοί να προκαλέσουν μια προφλεγμονώδη αντίδραση των HT-29 κυττάρων στην παρουσία του διαλυτού CD14. Αυτό το φαινόμενο δεν

παρατηρήθηκε με τα λιποτεικά οξέα από τον *L. johnsonii* La1 και τον *L. acidophilus* La10. Σε αντίθεση, η παρουσία αυτών των κυτταρικών τοιχωμάτων, παραβλέπει την ρυθμιζόμενη θεώρηση των κυτοκινών που εμφανίζονται πριν τη φλεγμονή από τους λιποπολυσακχαρίτες από το εντεροπαθογόνο *E. coli* και *Salmonella*. Αν και πολλές κλινικές μελέτες αντιμετώπισαν το δυναμικό των προβιοτικών να προλαμβάνει ή να θεραπεύει τη διάρροια (Szajewska and Mrukowicz; Gismando et al., 1999) κανένα από αυτά δεν εστίασε πραγματικά στο αποτέλεσμα του *E. coli* κατά την προβιοτική θεραπεία. Οι Reid et al., 2003, μελέτησαν το αποτέλεσμα της στοματικής παροχής ενός συνδυασμού του *L. rhamnosus* GR1 και *L. fermentum* RC14 στην κολπική χλωρίδα υγιών γυναικών. Η ομάδα που έπαιρνε τα προβιοτικά έδειξε σημαντικά υψηλότερα ποσοστά των κολπικών γαλακτοβακίλλων και μικρότερες ποσότητες των κατηγοριών του *E. coli* από την ομάδα ελέγχου.

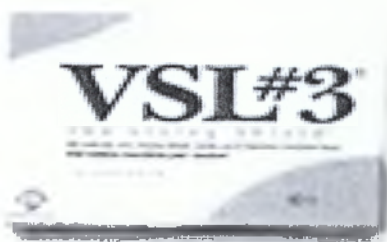
2.4. Salmonella

Έχει αποδειχτεί ότι οι γαλακτοβάκιλλοι αναστέλλουν την παθογένεια η οποία προκαλείται από σαλμονέλα με το να αλληλεπιδρά σε πολλά επίπεδα της διαδικασίας εισβολής (πίνακ. 2.5) (βλέπε σελ.66) Όσο για τον *H. pylori* και *E. coli* η Σαλμονέλα έχει αποδειχτεί ευαίσθητη προς τα οργανικά οξέα παραγόμενα από τους γαλακτοβακίλλους (Juven et al., 1991, Lehto and Salmimen 1997, Fooks and Gibson 2002, Fernandez et al., 2003).

Παρόλα αυτά, μερικοί γαλακτοβάκιλλοι παράγουν επίσης άλλους μεταβολίτες με ιδιότητες κατά της σαλμονέλα. Ο *L. acidophilus* LB, εκκρίνει μια ένωση στην υπερκείμενη καλλιέργεια με ένα ευρύ ανασταλτικό χρωματικό φάσμα συμπεριλαμβάνοντας την *Salmonella* (Cocconnier et al., 1997). Σαν συνέπεια, μια καλλιέργεια *L. acidophilus* LB ήταν ικανή να αναστείλει την προσκόλληση και εισβολή των ανθρώπινων γαστρεντερικών κυττάρων in vitro (Cocconnier et al., 1993-2000). Παρόμοια πειράματα διεξήχθησαν με το *L. johnsonii* La1 με συγκρινόμενο αποτέλεσμα (Bemet – Camard et al., 1997). Οι τελευταίοι ερευνητές ανέφεραν ότι το στέλεχος *L. Johnsonii* La1 παρήγαγε μια αντιμικροβιακή ενεργή ουσία εναντίον πολλών εντεροπαθογόνων συμπεριλαμβάνοντας την *Salmonella*. Αυτή η ένωση δεν ανέστειλε γαλακτοβακίλλους και τα *Bifidobacteria*. Η αντιβακτηριακή δραστηριότητα, ήταν άσχετη με την παραγωγή γαλακτικού οξέος και ήταν σχετικά μη

ευαίσθητη στα πρωτεολυτικά ένζυμα. Επιπλέον, το *L. johnsonii La1* ήταν ικανό να αναπτύξει την δραστηριότητα κατά της σαλμονέλα, σε συμβατικά και χωρίς μικρόβια ποντίκια. Μια σημαντική μείωση σε αριθμούς της σαλμονέλα στα κόπρανα παρατηρήθηκε σε συμβατικά ποντίκια που τους χορηγήθηκε *L. johnsonii la1*. Από την άλλη μεριά, ο συσχετισμός των ποντικίων απαλλαγμένων από μικρόβια με το *L. Johnsonii La1* δεν ήταν επαρκής να επιβιώσει μόλυνση με *Salmonella* αν και μια σημαντική προσπάθεια παρατηρήθηκε για επιβίωση. Οι Hudault et al., 1997, έδειξαν επιπλέον ότι μια καλλιέργεια με *L. rhamnosus GG* ή των CFCs ήταν ικανή να αναστέλλει την εισβολή από τον *S. typhimorium* των Caco-2 κυττάρων χωρίς να θανατώνει τα βακτήρια. Επιπλέον, η παροχή του *L. rhamnosus GG* σε συμβατικά ποντίκια μείωσε τους αριθμούς *Salmonella* που αναπτύσσονταν στα κόπρανα και καθυστέρησε την θνησιμότητα των μολυσμένων ποντικίων τα οποία ήταν απαλλαγμένα από μικρόβια. Η ζωτικότητα της Σαλμονέλα δεν επηρεάστηκε από την επαφή με τους CFCs μιας καλλιέργειας του *L. rhamnosus GG* αν και ο Silva et al 1987, ανέφερε νωρίτερα ότι ο *L. rhamnosus GG* παράγαγε μια αντιμικροβιακή ουσία διαφορετική από το γαλακτικό οξύ το οποίο θανάτωνε την *Salmonella*. Το γεγονός ότι η ζωτικότητα του στελέχους δεν ταυτοποιήθηκε, αλλά η δραστηριότητα μειώθηκε αφού η καλλιέργεια ουδετεροποιήθηκε στο pH=7 πρότεινε έναν μηχανισμό εξαρτώμενου pH (Lehto and Salmimen 1997). Ίσως το στέλεχος *L. rhamnosus GG* ανέστειλε την προσκόλληση της *Salmonella* στα γαστρεντερικά κύτταρα με την στερική ενυδάτωση (Lee and Puong 2002). Ο Gill et al., 2001 παρουσίασε μια από τις πιο πειστικές ζωικές μελέτες. Το 90% των συμβατικών ποντικίων τα οποία τράφηκαν με τον *L. rhamnosus HN001* επεβίωσε μονή δόση πρόκλησης *Salmonella whilst*, όταν μόνο το 7% των ελεγχόμενων ποντικίων επέζησε. Επιπλέον οι ερευνητές απέδειξαν ότι, τα αντισώματα της αντί -σαλμονέλα και της λευκοκυτταρικής φαγοκύτωσης αντιδρούν σημαντικά αυξημένα, και αριθμοί της *Salmonella* μετά-τοποθετούνται σε σπλαγχνικούς ιστούς μειωμένους λόγω χορήγησης προβιοτικών, υποθέτοντας ότι η ανοσολογική ενίσχυση μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο σε αποδεδειγμένη επιβίωση. Οι Valdez et al., 2001, ξεκίνησαν από μια αντίθετη ολοκληρωμένη άποψη. Ερεύνησαν πως το *LAB* μπορούσε να αναστείλει την απόπτωση σε μακροφάγους μολυσμένους με *Salmonella*. Η ικανότητα επιβίωσης από μακροφάγους και η πρόκληση της απόπτωσης τους, μπορεί να οδηγήσει σε μόλυνση βαθύτερων ιστών. Επιπλέον, αυτή η ικανότητα μπορεί να είναι ένα σημαντικό χαρακτηριστικό της παθογένειας των εντεροδιδυτικών παθογόνων όπως η *Salmonella* (Sansonetti and

Phalipon 1999, Valdez et al., 2001). Στελέχη του *S. thermophilus* και *L. delbrueckii subsp bulgaricus* μείωσαν την προκαλούμενη απόπτωση και το στέλεχος *L. delbrueckii subsp bulgaricus* ήταν το πιο αποτελεσματικό (Valdez et al., 2001). Επιπλέον, ήταν απαραίτητο τα κύτταρα να είναι ζωτικά, εφόσον τα νεκρά κύτταρα δεν είχαν κανένα αποτέλεσμα. Αυτές οι παρατηρήσεις μπορεί να σχετιστούν με μια αύξηση στην απελευθέρωση των σημαντικών οξειδωτικών, στα οποία μια αυξανόμενη παραγωγή παρατηρήθηκε με το *L. delbrueckii subsp bulgaricus*. Οι Madsen et al., 2001, μελέτησαν τις αλλαγές στην εντερική έκκριση κυτοκίνης στο λειτουργικό επιθηλιακό φράγμα και εισβολή από *salmonella* κατά την μεταχείριση με προβιοτικό παρασκεύασμα VSL#3 (Fig. 2.4) και IL-10 γονιδιακή ανεπάρκεια ποντικών και T-84 γαστρεντερικών επιθηλιακών κυττάρων.



Εικόνα. 2.4. Το προϊόν VSL#3 έχει σχεδιαστεί για τον διατροφικό έλεγχο της Ελκώδους κολίτιδας(Ulcerative colitis), τον έλεγχο του ενοχλητικού εντερικού συνδρόμου(Irritable Bowel Syndrome), και τον έλεγχο ειλεικής(αναφερόμενο στον ειλεό) επιφάνειας.

Πηγή: <http://www.vsl3.com/VSL3/default.asp>

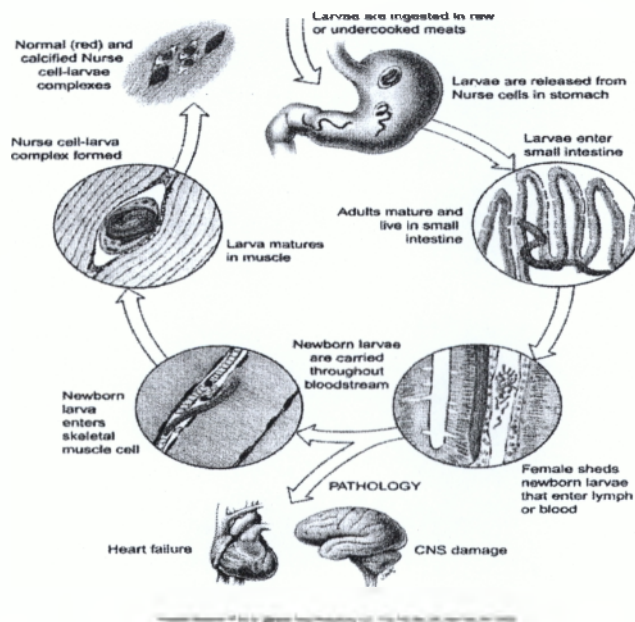
Το VSL#3 (Fig. 2.4) είναι και ένας συνδυασμός τριών στελεχών *bifidobacterium*, 4 στελέχη *Lactobacillus*, και ένα στέλεχος *S. thermophilus*. Ανακαλύφθηκε ότι, χειρίζοντας IL-10 σε ποντίκια τα οποία έχουν γονιδιακή ανεπάρκεια με VSL#3 οδηγούσε σε μια κανονική αποικία φυσιολογικής λειτουργίας, και ολοκληρωτικό φράγμα σε συνδυασμό με μειωμένη μυκητιακή έκκριση των προ φλεγμονωδών κυτοκινών, ιντερφερονών, και ένα παράγοντα νεοπλασματικής νέκρωσης. Το πείραμα *in vitro* με τα T-84 κύτταρα, αποκάλυψε πως, το λειτουργικό επιθηλιακό φράγμα και η αντίσταση σε εισβολή σαλμονέλας ενισχύθηκε από την θεραπεία με προβιοτικά (πραγμάτευση). Αυτό το αποτέλεσμα, μπορούσε να σχετιστεί με ένα ευδιάλυτο πρωτεϊνούχο παράγοντα σε μια μέτρια καλλιέργεια. Σχεδόν όλα τα αναφερόμενα αποτελέσματα είναι στελεχο-εξαρτώμενα. Πράγματι, δεν μπορούμε να εγυηθούμε

πως ένα κύριο στέλεχος *Lactobacillus* το οποίο δημιουργεί αποικίες στο έντερο θα αναπτύξει μια δραστηριότητα κατά της σαλμονέλα. Οι Filho-Lima et al., 2000, παρατήρησαν μια αντιμικροβιακή δραστηριότητα σε γονιδιακά ποντίκια μόνο όταν ένα στέλεχος *E.coli* χρησιμοποιήθηκε χωρίς το ελεγμένο στέλεχος *L. acidophilus*. Παρομοίως, στην έρευνα των Maia et al., 2001 η προστασία εναντίον του *S.enterica* σε γονιδιακά ποντίκια απέτυχε με το *L.acidophilus*, αν και παρατηρήθηκε μια μικρή αύξηση στο χρόνο επιβίωσης. Από την άλλη μεριά, ένα στέλεχος του *E. faecium* ήταν πιο επιτυχημένο. Με το πλευρικό στέλεχος, το 82% των ποντικιών επιβίωσε όταν όλα τα ποντίκια πέθαναν σε μια ομάδα ελέγχου ή στην ομάδα στην οποία χορηγήθηκε το *L. acidophilus*. Κλινικές μελέτες, οι οποίες εστιάζουν σε ασθένειες που σχετίζονται με σαλμονέλα δεν υπάρχουν. Παρόλα αυτά έχει γίνει αρκετή έρευνα για το αποτέλεσμα παρασκευάσματος του *Lactobacillus* για *Salmonella*, σε πουλερικά. Το *Salmonella*, υπάρχει στο έντερο του κοτόπουλου με ένα μη παθολογικό παραβιωτικό τρόπο, αλλά είναι βλαβερό για ανθρώπινη κατανάλωση. Το 1973 αποδείχθηκε, ότι δίνοντας στην εντερική χλωρίδα ενός κοτόπουλου ενήλικου, ελεύθερου από παθογόνα, και σε ένα νεοσσό (κοτοπουλάκι) την ευκαιρία και στα δύο την δυνατότητα να αποικιστούν από *Salmonella*, τα επίπεδα *Salmonella* που παρουσιάζονται στα κόπρανα αν αποικιστούν, θα μειώνονταν (Juven et al., 1991).

2.4.1 Άλλα παθογόνα βακτήρια

Παθογόνα εκτός των *H. pylori*, *E. coli*, και *Salmonella*, μπορεί να ανασταλούν από τα προβιοτικά είδη *Lactobacillus*. Αν και είναι εκτός του πεδίου αυτής της ενότητας μόνο ένα παράδειγμα μπορεί να δοθεί. Το *Lactobacillus casei* Shirota, έχει την ικανότητα να μειώνει τους αριθμούς του *L. monocytogenes* στο στομάχι, στα κόπρανα, στο τυφλό έντερο, την σπλήνα, και το συκώτι των ποντικιών που είναι ελεύθερα από παθογόνα. Πιθανόν, από μια αυξανόμενη κυτταρική ανοσολογική αντίδραση, όπως υπολογίστηκε με τον καθυστερών τύπο υπερευαισθησίας αντίδρασης εναντίον κυττάρων που είχαν καταστραφεί με θερμότητα (De Waard et al., 2002). Το ίδιο μοντέλο, χρησιμοποιήθηκε με το διεισδυτικό παράσιτο *Tricinella spiralis* (Εικ. 2.5). Ξανά πάλι, ο καθυστερών τύπος υπερευαισθησίας (Κ.Τ.Υ) αντίδρασης, είχε σημαντικά ενισχυθεί, παρόλα αυτά χωρίς την μείωση των αριθμών προνύμφης, αύξηση σε βάρος σώματος, ή ιστολογική αλλαγή (De Waard et al.,

2001). Αυτά τα αποτελέσματα οδήγησαν στην υπόθεση ότι η προμήθεια του *L. casei* *Shiota* μπορεί να ενισχύσει την ΤΗ1 κυτταρομεσολαβητική ανοσολογική αντίδραση.



Εικ. 2.5. Το βακτήριο *Trichinella spiralis* και ο κύκλος ζωής του (Πηγή: www.trichinella.org/bio_lifecycle.htm). Το βακτήριο αυτό περνάει από 6 στάδια:

- 1^ο) η προνύμφη εισέρχεται σε ωμά ή ακατέργαστα κρέατα.
- 2^ο) οι προνύμφες απελευθερώνονται από τα μητρικά κύτταρα στο στομάχι.
- 3^ο) οι προνύμφες εισέρχονται στο μικρό έντερο
- 4^ο) ωρίμανση των ενηλίκων και αποικία στο μικρό έντερο,
- 5^ο) τα θηλυκά διασκορπίζουν τις νεαρές προνύμφες οι οποίες περνούν στο αίμα ή στη λέμφο, οι νεαρές προνύμφες μεταφέρονται διαμέσου της κυκλοφορίας του αίματος, η νεαρή προνύμφη εισέρχεται στο κύτταρο σκελετικών μυών, γίνεται ωρίμανση της προνύμφης στον μυ, διαμόρφωση του συμπλέγματος του μητρικού κυττάρου της προνύμφης, Φυσιολογικά (κόκκινα) συμπλέγματα μητρικών κυττάρων προνύμφης και συμπλέγματα με αποθέματα ασβεστίου.
- 6^ο) παθολογία: καταστροφή ή ζημιά του CNS, κακή λειτουργία της καρδιάς(αποτυχία).

2.5 ΑΝΤΙΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΤΩΝ *Bifidobacteria*

Πειράματα *in vitro*

Η *in vitro* ανασταλτική δραστηριότητα των *Bifidobacteria* εναντίον παθογόνων βακτηρίων, έχει επεκταθεί σε πολλές αναφορές και ποικίλοι μηχανισμοί δράσης έχουν προταθεί. Μερικές αναφορές, δείχνουν την παραγωγή οργανικών οξέων, και συγκεκριμένα οξικού οξέος και παραγωγή γαλακτικού οξέος ως μόνους ανασταλτικούς παράγοντες. Για παράδειγμα, ανασταλτικά πειράματα ανάπτυξης με τον *E.coli* παρουσιάστηκαν παρουσία και των δύο ουδέτερων και μη ουδέτερων CFCS των *Bifidobacteria* καλλιεργειών. Η ανασταλτική δραστηριότητα πέντε στελεχών *Bifidobacterium* που ανήκουν σε διαφορετικά είδη ήταν εξαρτημένα του pH, και μπορούσαν να αναπαραχθούν από ένα μείγμα οργανικών οξέων (IBrahim and Bezkorovainy, 1993). Επιπλέον, 3 στελέχη *B. infantis* τα οποία έδειξαν ισχυρή ανασταλτική δραστηριότητα εναντίον *Salmonella typhimorium* και *E. coli* ETEC χρησιμοποιώντας εργασίες δίσκου χάρτινου σημαντικά μείωσαν τους παθογόνους αριθμούς κυττάρων όταν προστέθηκαν σε απογαλακτικές τροφές. Η παραγωγή του οξικού και γαλακτικού οξέος και το χαμηλό pH, προτάθηκαν σαν απαραίτητοι μηχανισμοί αυτής της αναστολής (Rokka et al., 2000). Πρόσφατα παρόμοια ευρήματα αναφέρθηκαν με τους CFCS των *Bifidobacteria* καλλιεργειών που ανέστειλλαν την ανάπτυξη 2 διαφορετικών παθογόνων σε καλά διάχυτες αναλύσεις στην παρουσία των δικών τους CFCS.

Όταν το CFCS ουδετεροποιήθηκε, δεν υπήρχε καμία ανασταλτική δραστηριότητα (Bruno and Shah, 2002). Επιπλέον οι Fooks and Gibson 2002, ανέφεραν την *in vitro* αναστολή των *S. enteritidis*, *E. coli*, και *C. jejuni* από τον *B. animalis* Bb112 σε συνδυασμό με υποκατάστατα πρεβιοτικών. Αναλύσεις τρυβλίων με CFCS, όπως επίσης και πειράματα συνκαλλιεργειών παρουσιάστηκαν και αποδείχτηκε, ότι το *B. animalis* Bb12 ανέστειλε ισχυρά τα 3 παθογόνα στελέχη και ότι το ανασταλτικό αποτέλεσμα ήταν σε σχέση με την παραγωγή οξικού και γαλακτικού οξέος και όχι απαραίτητα αποτέλεσμα χαμηλού pH. Η παραγωγή ενώσεων διαφορετικά από οργανικά οξέα, αναστέλλοντας ή χρησιμοποιώντας ένα θανατηφόρο αποτέλεσμα εναντίον παθογόνων, έχει επίσης αναφερθεί. Τα CFCS καλλιεργειών των 6 στελεχών *Bifidobacteria* έδειξαν ισχυρή ανασταλτική δραστηριότητα στον *Bacillus cereus*, *Salmonella typhosa*, *S. dysenteriae*, *E. coli*, *Micrococcus flavus*, *Stafylococcus aureus* και *Pseudomonas fluorescens* (Anand et al., 1984a). Παρόλα αυτά, η οξύτητα της

αναστολής ήταν εξαρτώμενη από τα στελέχη. Το *Bifidobacterium bifidum* NCDO1452, έδειξε την υψηλότερη δραστηριότητα. Ένας ανασταλτικός παράγοντας με το όνομα *bifidin* ήταν τμηματικά καθарός από εκχύλισμα μεθανόλης-ακετόνης (MA) και ήταν σταθερό στην θερμότητα και ενεργό εναντίον του *E. coli* και *M. flavus* σε τιμές pH ανάμεσα στο 4.8 και 5.5 (Anand et al., 1984b). Παρόμοια απεικονίστηκε από αναλύσεις τρυβλίων, αναλύσεις ορού σε σωλήνα και πειράματα καλλιέργειών, όπου ένα στέλεχος *B. infantis* είχε αντιμικροβιακή δραστηριότητα εναντίον *E. coli*, *C. perfigens*, και *B. fragilis* το οποίο δεν μπορούσε να σχετιστεί είτε για διαγωνισμό για υποκατάστατα ανάπτυξης ή σε ένα οξικό περιβάλλον (Gibson and Wary, 1993). Ο ανασταλτικός παράγοντας που παράχθηκε από τον *B. infantis* θα μπορούσε να συγκεντρωθεί από εκχύλισμα MA και ευρύτερο καθαρισμό των MA εκχυλισμάτων από φιλτράρισμα ζελέ, και επέφερε μια σειρά από δείγματα που εξέθεταν την αντιμικροβιακή δραστηριότητα. Ευρύτερες έρευνες με 8 στελέχη *Bifidobacterium* που ανήκουν σε διαφορετικά είδη, έδειξαν ότι τα εκχυλίσματα MA όλων των στελεχών έδειξαν αντιμικροβιακή δραστηριότητα εναντίον μιας ευρύτερης ποικιλίας παθογόνων βακτηρίων σε αναλύσεις τρυβλίων (Εικ. 2.6, 2.7, 2.8).



Εικ. 2.6. Τρυβλίο με Άγαρ. Ένα παράδειγμα μέτριας μικροβιακής ανάπτυξης. Συγκεκριμένα είναι ένα επιστρωμένο τρυβλίο. Οι βακτηριακές αποικίες είναι οι πορτοκαλί και οι οβάλ. Πηγή: http://en.wikipedia.org/wiki/Agar_plate



Εικ. 2.7. Τρυβλίο το οποίο έχει επιστρωθεί με μικροοργανισμούς (μέθοδος παράλληλων γραμμών)

Πηγή: http://en.wikipedia.org/wiki/Microbiological_culture



Εικ. 2.8: 4 τύποι τρυβλίων Άγαρ τα οποία απεικονίζουν διαφοροποιημένη ανάπτυξη εξαρτώμενη από το μεταβολισμό του βακτηρίου.

Πηγή: http://en.wikipedia.org/wiki/Agar_plate

Επιπλέον ένα στέλεχος *B. Bifidobacterium*, παρήγαγε μια αντιμικροβιακή ουσία εναντίον μιας μεγάλης ποικιλίας Gram-αρνητικών μετρητών περιλαμβάνοντας τα στελέχη *Salmonella spp* και *E. coli* (Kebarg, 1995). Η αντιμικροβιακή ένωση συγκεντρώθηκε και καθαρίστηκε τμηματικά από MA εκχύλισμα και χρωματογραφία. Ήταν πρωτεϊνούχο, σταθερό στην θερμότητα και ενεργό μόνο στο οξικό pH. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν από τους Lievin et al., 2000, οι οποίοι απομόνωσαν 13 στελέχη *Bifidobacterium* σε κόπρανα μικρών παιδιών τα οποία εξετάστηκαν μικροσκοπικά για αντιμικροβιακή δραστηριότητα εναντίον παθογόνων βακτηρίων. Χρησιμοποιώντας θανατηφόρες αναλύσεις, απεδείχθη ότι οι CFCS καλλιεργειών δύο στελεχών ασκούσαν υψηλή αντιμικροβιακή δραστηριότητα εναντίον των στελεχών *S. typhimorium*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, και *St. Aureus*. Ένα λιποφιλικό κύτταρο, το οποίο μπορούσε να εκχυλιστεί με ένα μείγμα

χλωροφορμίου–μεθανόλης, και μαζί με μια μοριακή μάζα, η οποία είχε υπολογιστεί σε λιγότερο από 3500 Da προτάθηκε να είναι υπεύθυνος ανασταλτικός παράγοντας. Οι O’Riordan and Fitzgerald (1998), εξέτασαν 27 στελέχη *Bifidobacteria* για παραγωγή αντιμικροβιακών ενώσεων, και ανακάλυψαν ότι η ανάπτυξη πολλών μετρητών στελεχών περιλαμβάνοντας τα Gram+και αρνητικά βακτήρια αναστάλθηκε γύρω από τις αποικίες 12 στελεχών *bifidobacterium*. Ο ανασταλτικός παράγοντας δεν μπορούσε να σχετιστεί μόνο με το χαμηλό pH και την παραγωγή οργανικού οξέος όπως οι ανασταλτικές ζώνες δεν εξαφανίστηκαν όταν χρησιμοποιήθηκαν ρυθμιστικά διαλύματα. Επιπλέον, η αναστολή των ειδών *Pseudomonas* εμφάνισε αστάθεια, υποστηρίζοντας ότι η ανασταλτική ένωση δεν παράχθηκε σαν μέρος μιας μεταβολικής διαδικασίας που μπορεί να προβαίνει σε ενέργειες.

Αν και ο ανασταλτικός παράγοντας δεν μπορούσε να απομονωθεί από CFCS όταν δύο ενεργά στελέχη *Bifidobacterium* χορηγήθηκαν σε ένα τυρί (cottage), βρέθηκε ανασταλτική δραστηριότητα στα στελέχη *Pseudomonas*. Παρόμοια στελέχη *Bifidobacterium*, βρέθηκαν να ασκούν μικροβιακή δραστηριότητα στα στελέχη *Salmonella spp* και *E. coli* (Kang et al., 1989, Bieleck et al., 1998, Khedkar et al., 1998,) *Clostridium spp* (Meghrouh et al., 1990, Kullen et al., 1998, Lee et al., 2003) και *H. pylori* (Bal et al., 2000) αλλά επίσης και στο πρωτοζωικό παράσιτο *C. parvum* που μεταδίδεται με το νερό. (Foster et al., 2003). Όλες οι αναφορές που αναφέρθηκαν παραπάνω απέτυχαν στον καθαρισμό της ανασταλτικής ουσίας, όσον αφορά την ομοιογένεια. Μόνο μια βακτηριοκίνη αναφερόμενη σαν bifidocin B παραγόμενη από τον *B. bifidum* NCFB 1454 περιγράφηκε μέχρι τώρα (Yildirim and Johnson, 1998). Η bifidocin B, ήταν ενεργή σε είδη *Listeria spp* *Enterococcus spp*, *Bacillus cereus*, και *Lactobacillus leuconostoc*, *Micrococcus*, και είδη *Pediococcus* χρησιμοποιώντας την ανάλυση τρυβλίων άγαρ. Παρόλα αυτά δεν ήταν ενεργή εναντίον (Gram negative indicators) κανενός δείκτη Gram αρνητικών βακτηρίων που εξετάστηκε. Τα παρασκευάσματα με bifidocin B ήταν σταθερά στην θερμότητα, σταθερά στις τιμές pH ανάμεσα στο 2 και το 12 και ευαίσθητα εναντίον πρωτεολυτικών ενζύμων. Η bifidocin B ανήκει στην ομάδα της τάξης IIa βακτηριοκινών του LAB (*lactic acid bacteria*), (Yildirim et al., 1999). Η αντιβακτηριακή δραστηριότητα in vitro των *Bifidobacteria* στα παθογόνα (Πίνακας 2.4), μπορεί να σχετιστεί επίσης με την παραγωγή ενώσεων, οι οποίες αναστέλλουν την προσκόλληση σε εισβολή ή και εισβολή των εντερικών επιθηλιακών κυττάρων από τα παθογόνα βακτήρια. Αυτό φάνηκε καθαρά για ένα στέλεχος *B. longum*. Οι

CFCS των καλλιέργειών των πολλών *Bifidobacteria* στελεχών σε ανθρώπινο οργανισμό (*B. longum*, *B. breve*, *B. bifidum* και *B. Infantis*, ανέστειλαν την προσκόλληση του παθογόνου στελέχους *E. coli* σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα. Απεδείχθη ότι, ένας ανασταλτικός παράγοντας ήταν ένα πρωτεϊνούχο μόριο (Fugiwara et al., 1997). Επιπλέον, έρευνες έδειξαν ότι το *B. longum* BL2928 παρήγαγε μια πρωτεΐνη με μια μοριακή μάζα των 104 kDa σχεδιασμένο BIF το οποίο προλάμβανε την προσκόλληση του *E. coli* (ETEC στέλεχος) στον γλυκολιπιδικό δεσμευμένο υποδοχέα γαγλιοτετρασυλσεραμιδίνη. (Fugiwara et al 1999). Επιπλέον, βρέθηκε ότι αυτή η ένωση ανέστειλε επίσης την προσκόλληση ενός *E. coli* ETEC στελέχους σε μια ανθρώπινη εντερική επιθηλιακή HCT-8 γραμμή κυττάρων (Fugiwara et al., 2001b). Ένα ενδιαφέρον σημείο ήταν τα παρόμοια αποτελέσματα τα οποία παρατηρήθηκαν σε άλλες έρευνες. Για παράδειγμα βρέθηκε πως τα *bifidobacteria* προκαλούσαν αναστολή της προσκόλλησης και εισβολής, ή εισβολής διαφορετικών παθογόνων βακτηρίων περιλαμβάνοντας το *E.coli* DAEC στέλεχος *S. typhimorium*, και *Yersinia pseudotuberculosis* (Bernet et al 1993, Lievin et al 2000) *Salmonella arizonae* (Bibiloni et al., 1999 και *Escherichia coli* ETEC στέλεχος (Gopal et al., 2001). Παρόλα αυτά, οι ανασταλτικές ουσίες δεν χαρακτηρίστηκαν. Τελικά μια αναφορά έδειξε, ότι οι CFCS μιας καλλιέργειας του *B. longum* διέγειραν τα μονοκυτταρικά-μακροφάγα κύτταρα (J774) σε φαγοκυτταρικά *S. typhimorium* κύτταρα (Hatcher et Labrecht 1993).

2.6 ΖΩΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ

Η αντιβακτηριακή δραστηριότητα των *Bifidobacteria* στελεχών έχει φανεί επίσης σε ζωικά μοντέλα. Πολλές ενώσεις έδειξαν πως η χορήγηση των *Bifidobacteria* σε ζώα απαιτούσε ένα προληπτικό ή θεραπευτικό αποτέλεσμα εναντίον πολλών μολύνσεων από παθογόνα βακτήρια (Πίνακας 2.5 σελ 66).

Σε πολλές αναφορές, η χορήγηση παρασκευασμάτων με *bifidobacteria* σε ζώα, οδηγούσε σε μια υπερανάπτυξη των *Bifidobacteria* στο έντερο, και καταστολή των παθογόνων βακτηρίων. Οι Asahara et al., 2001a, ανέφεραν μια μείωση στα κόπρανα από *S. typhimorium* LT-2 στα επίπεδα απέκκρισης σε ποντίκια, όταν το στέλεχος *B. breve* Yakult ή *Bifidobacterium pseudocatelatum* DSM 20439 εξετάστηκε στοματικά. Όταν τα *Bifidobacteria* χορηγήθηκαν μαζί με TOS, το αποτέλεσμα στα επίπεδα παθογόνου στα κόπρανα ποντικίου ήταν πιο ευδιάκριτο. Η παραγωγή οργανικών

οξέων και η ταπείνωση του pH από τα επικρατώντα *Bifidobacteria* ήταν οι κύριοι ανασταλτικοί παράγοντες. Επιπλέον, τα ζώα στα οποία είχε χορηγηθεί δόση με ένα ή περισσότερα στελέχη *Bifidobacterium* απομονωμένα σε ανθρώπινα κόπρανα, είχαν χαμηλότερα επίπεδα του κοπρανώδους *Salmonella* απ'ότι τα ζώα στην ελεγχόμενη ομάδα. (Henriksson and Conway 2001). Επιπλέον ο Lievin et al., 2000, έκανε αναφορά στην αναστολή της σαλμονέλα σε ποντίκια. Η χορήγηση των δύο *Bifidobacterium* στελεχών, τα οποία απομονώθηκαν σε κόπρανα παιδιών σε στείρα ποντίκια μολυσμένα με *S. typhimorium*, είχε σαν αποτέλεσμα την δημιουργία αποικίας στο GIT από δύο στελέχη *Bifidobacteria* και προστασία των ποντικιών εναντίον της θανατηφόρας μόλυνσης. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν για την αναστολή των *E. coli* στελεχών. Η χορήγηση του ζυμωμένου γάλακτος το οποίο περιείχε τα βακτήρια *B. breve*, *B. Bifidum* και *L. acidophilus* σε ποντίκια, ανέστειλε την υπερανάπτυξη του ενδογενούς *E. coli* (Asahara et al., 2001c). Τα αποτελέσματα έδειξαν, πως ο παρακάτω μηχανισμός ήταν η παραγωγή οξικού οξέος από τα *Bifidobacteria*. Επιπλέον, η χορήγηση του στελέχους *B. longum* σε ποντίκια απαλλαγμένα από ασθένειες παρέχει προστασία εναντίον της μόλυνσης *E. coli* (Fauge et al., 1984). Οι αριθμοί *E. Coli* στους πνεύμονες ενός 2 χρόνου κοτόπουλου μειώθηκαν, όταν οι CFCS μιας καλλιέργειας *B. thermophilum* εξετάστηκαν στοματικά (Kobayashi et al., 2002).

Η αναστολή μέσα από την παραγωγή οργανικών οξέων από στελέχη *Bifidobacterium* απεικονίστηκε σαν ένας μηχανισμός υπεύθυνος για το προληπτικό αποτέλεσμα της φλεγμονής στο έντερο σε ποντίκια σχετιζόμενα με στελέχη *Bact. vulgatus* απομονωμένα σε ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα. Είχε θεωρηθεί, ότι η πρόληψη είχε σαν αποτέλεσμα μια άμεση αναστολή του *Bact. vulgatus* στελέχους από τα *Bifidobacteria*, μέσα από την παραγωγή συγκεκριμένου σουκινικού οξέος στο τυφλό έντερο. Τελικά, η προστασία εναντίον μολύνσεων με *Clostridium* μέσα από την υπερανάπτυξη των *Bifidobacteria* έχει αναφερθεί σε γνωστοβιοτικά σκιουράκια (Butel et al., 1998) και ασηπτόβια ποντίκια. Η αντιμικροβιακή δραστηριότητα των *Bifidobacteria* σε ζωικά μοντέλα δεν σχετίζεται μόνο με την υπερανάπτυξη των *Bifidobacteria* και την παραγωγή οργανικών οξέων. Οι Romond et al., 1997b ανέφεραν πως, η χορήγηση από το στόμα σε ποντίκια των ελεύθερων κυττάρων, τυρόγαλο προερχόμενο από γάλα ζυμωμένο με στέλεχος *B. breve* από ανθρώπινο οργανισμό διέγειρε τα εντερικά *Bifidobacteria*, και μείωσε το *Bact. fragilis* στα κόπρανα ποντικιών, και το pH των εντέρων στα ποντίκια. Είχαν δείξει ότι το

ανασταλτικό αποτέλεσμα ήταν ανεξάρτητο της υπερανάπτυξης των *Bifidobacteria* και της μείωσης του pH. Όταν στα ποντίκια χορηγήθηκε δόση με 30-100 kDa και 100-300 kDa ελεύθερα κύτταρα κλάσμα τυρόγαλου παρατηρούμενου από υπερφιλτράρισμα των ελεύθερων κυττάρων τυρόγαλου, και αναλύθηκαν με SDS-PAGE. Παρόμοια αποτελέσματα, παρατηρήθηκαν πως αυτά τα κύτταρα τα ελεύθερα κλάσματα τυρόγαλου ήταν υπεύθυνα για το ρυθμιστικό αποτέλεσμα. Είχαν συνδεθεί αρχικά από γλυκοπρωτεΐνες και έδειξαν μια γαλακτοσιδασική δραστηριότητα. Επιπλέον, έρευνες παρουσιάστηκαν για να ερευνηθούν την φύση των ενεργών ουσιών (Mullie et al., 2002). Τα ελεύθερα κύτταρα τυρόγαλου, παρήχθησαν από το στέλεχος *B. breve* που αναφέρθηκε παραπάνω και συγκρίθηκαν με το μη ενεργό ελεύθερο κύτταρο τυρόγαλου ενός άλλου στελέχους *B. breve*. Καμία κύρια διαφορά δεν βρέθηκε, όσον αφορά τη σύνθεση πρωτεϊνών και ζάχαρης. Παρόλα αυτά, το μη ενεργό ελεύθερο κύτταρο τυρόγαλου εξέθεσε φτωχή γαλακτοσιδασική δραστηριότητα όπου το ενεργό ελεύθερο κύτταρο τυρόγαλου έδειξε υψηλή δραστηριότητα του ενζύμου. Επιπλέον, η ζέση ή οξείδωση των ελεύθερων κυττάρων τυρόγαλου είχε σαν αποτέλεσμα την απώλεια του ανασταλτικού αποτελέσματος στα ποντίκια. Μια θεραπεία με υδροχλωρική κυστεΐνη (μειωμένος παράγοντας) είχε σαν αποτέλεσμα την επαναφορά της δραστηριότητας. Τα ευρήματα έδειξαν ότι το γαλακτοσιδασικό ένζυμο ήταν η αληθινή ενεργή ουσία. Ανοσοτροποποιητικοί μηχανισμοί έχουν προταθεί επίσης. Στοματική χορήγηση του *B. lactis HN019*, σε ποντίκια προσβεβλημένα με *S. typhimorium* είχε σαν αποτέλεσμα τις κατώτερες κλίμακες νοσηρότητας και μείωσε την βακτηριακή μετατόπιση συγκρινόμενη με τους ελέγχους (Shu et al., 2000). Είχε θεωρηθεί ότι η ενίσχυση της ανοσίας του ξενιστή, έπαιξε ένα σημαντικό ρόλο σε αυτό το αποτέλεσμα σαν μεγαλύτερη φαγοκυτταρική αντίληψη των λευκοκυττάρων του αίματος, και περιτονελικής προετοιμασίας μακροφάγων, και παρατηρήθηκαν αντιδράσεις αυξανόμενων εντερικών IgA αντισωμάτων. Οι Shu and Gill 2001, ανέφεραν παρόμοια αποτελέσματα με το ίδιο το *Bifidobacterium* στέλεχος σε ποντίκια μολυσμένα με *E. coli*. Επιπλέον, θεραπεία ιογενούς διάρροιας σχετιζόμενη με rotaviruses και *E. coli* μολύνσεις χρησιμοποιώντας τον *B. lactis* είχε σαν αποτέλεσμα μια προστατευτική επίδραση σε μοντέλο μικρού γουρουνιού. Συγκρινόμενα με τους ελέγχους, νεαρά γουρούνια τα οποία έλαβαν το βακτήριο *B. lactis* έδειξαν χαμηλή σοβαρότητα της ιογενούς διάρροιας (Shu et al., 2001). Επίσης, χορήγηση από το στόμα σε συμβατικά ποντίκια ζυμωμένου γάλακτος με διαφορετικά στελέχη *Bifidobacterium* αύξησαν την κλίμακα

επιβίωσης μετά από μόλυνση με το βακτήριο *S. Typhimorium* (Silva et al., 1999). Η ανοσοτροποποίηση ξενιστή θεωρήθηκε σαν ένας προστατευτικός μηχανισμός, αφού οι αριθμοί των παθογόνων βακτηρίων δεν μειώθηκαν. Παρομοίως συγκεντρωμένες καλλιέργειες ενός *B. longum* στελέχους (Πίνακας 2.6), ανέστειλαν την βακτηριακή μετατόπιση όταν χορηγήθηκαν από το στόμα σε συγκεκριμένα ελεύθερα παθογόνα και γονίδια ελεύθερα σχετιζόμενα μόνο με *E. coli* (Suzuki et al., 1997). Τελικά οι Wagner et al., 1997 ανέφεραν ότι το στέλεχος *B. animalis* αύξανε το θεραπευτικό αποτέλεσμα σε καντιντίαση των ανοσοανεπαρκών ποντικών. Η χορήγηση από το στόμα των *B. Animalis*, είχε σαν αποτέλεσμα την επιβίωση ποντικών, μειωμένη συστηματική κυκλοφορία, αναστολή του *Candida albicans* στον τροφικό σωλήνα (alimentary tract), διέγερση των αντισωμάτων και κυτταρικά σχετιζόμενη ανοσία, και μειωμένη σοβαρότητα της ορογαστρικής καντιντίας. Η *in vivo* καταστολή του *Candida albicans* πρότεινε πως η παραγωγή των ανασταλτικών ενώσεων από το στέλεχος *Bifidobacterium* συμμετείχε σε βιοθεραπευτικό αποτέλεσμα. Παρόλα αυτά το αποτέλεσμα αυτό δεν ήταν πάντα σχετιζόμενο με την αναστολή του *Candida albicans* στο διατροφικό σωλήνα. Επιπλέον, η διέγερση του υποστηρικτικού ξενιστή θεωρήθηκε ως ο πιο σημαντικός παράγοντας μηχανισμού για την θεραπεία καντιντίας σε ποντίκια.

Πίνακας 2.6: Έρευνες ζωικών μοντέλων πάνω στην αναστολή των παθογόνων βακτηρίων από *Bifidobacteria*

Μικροοργανισμοί που εξετάστηκαν	Μοντέλα ζώων.	Αποτελέσματα	Παραπομπές
<i>B. breve</i> , <i>B. caelestinum</i> , και <i>B. longum</i>	Ποντίκια απαλλαγμένα από ασθένειες σχετιζόμενα με το βακτήριο <i>Bacteroides vulgatus</i>	Προστασία εναντίον της μόλυνσης του βακτηρίου <i>B. vulgatus</i>	Setoyama et al 2003
<i>B. breve</i> Yakult, <i>B. pseudoplantarum</i> , DSM 20439, <i>B. bifidum</i> , ATCC15696, <i>B. caelestinum</i> ATCC 27539T	Ειδικευμένα ποντίκια με ένα αντιβιοτικό το οποίο προκάλεσε μόλυνση του βακτηρίου <i>S. enterica ser. Typhimorium</i>	Σημαντική μείωση των αριθμών του βακτηρίου <i>Salmonella enterica ser. Typhimorium</i> στα κόπρανα ποντικών εφόσον τους είχαν χορηγηθεί τα βακτήρια <i>B. breve</i> και <i>B. pseudocaelestinum</i> .	Ashahara et al 2001a
3 στελέχη <i>Bifidobacterium</i> προερχόμενα από ανθρώπους	Ειδικευμένα ποντίκια απαλλαγμένα από ασθένειες μολύνθηκαν με το βακτήριο <i>S. typhimorium</i>	Μειωμένη ποσότητα κοπράνων προερχόμενη από το βακτήριο <i>S. typhimorium</i> και προστασία εναντίον της μόλυνσης.	Henriksson and Conway 2001
<i>B. breve</i> , <i>B. bifidum</i> , και <i>Lb. acidophilus</i>	Ειδικευμένα ποντίκια απαλλαγμένα από ασθένειες με ένα αντιβιοτικό προκαλούμενο μόλυνση του ενδογενούς <i>E. coli</i>	Αναστολή της υπερβολικής ανάπτυξης του ενδογενούς <i>E. coli</i>	Asahara et al 2001c
<i>B. lactis</i>	Ποντίκια μολυσμένα με <i>E. coli</i>	Μειωμένη σοβαρότητα της μόλυνσης με <i>E. coli</i>	Shu and Gill 2001
<i>B. lactis</i>	Γούρουνάκι με ιογενή διάρροια σχετιζόμενο με	Λιγότερη σοβαρότητα της ιογενούς διάρροιας.	Shu et al 2001

	rotavirus ιό και μόλυνση με <i>E.coli</i>		
2 στελέχη <i>Bifidobacterium</i> απομονωμένα σε ανθρώπινα κόπρανα	Στείρα ποντίκια μολυσμένα με το βακτήριο <i>S.enterica ser Typhimorium</i>	Δημιουργία αποικιών στο γαστρεντερικό σωλήνα και προστασία εναντίον της θανατηφόρας μόλυνσης.	Lievin et al 2000
<i>B.lactis</i>	Ποντίκια μολυσμένα με <i>S.typhimorium</i>	Χαμηλότερη νοσηρότητα (καχεξία) μειωμένη βακτηριακή μετατόπιση.	Shu et al 2000
<i>B.bifidum</i>	ασηπτόβια και συμβατικά ποντίκια μολυσμένα με <i>S.enteritis. subsp typhimorium</i>	Αυξημένα ποσοστά επιβίωσης στα συμβατικά ποντίκια.	Silva et al 1999
<i>B.breve</i>	Ειδικευμένα ποντίκια ελεύθερα από παθογόνα	Μειωμένα σπόρια κλωστηριδίων στα κόπρανα και αριθμοί <i>Bacteroides vulgatus</i> σε	Romond et al 1997a
<i>B.animalis</i>	Ανοσοανεπαρκή ποντίκια μολυσμένα με καντιντίαση	Σκόπιμα εκτεταμένη επιβίωση των ποντικών , μειωμένη συστηματική διάδοση και αναστολή του <i>Candida albicans</i> στον πεπτικό σωλήνα	Wagner et al 1997
<i>B.longum</i>	Αρουραίοι απαλλαγμένοι από ασθένειες μολύνθηκαν με το βακτήριο <i>E.coli</i>	Προστασία εναντίον της μόλυνσης με το βακτήριο <i>E.coli</i>	Faure et al 1984

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ

Αν και η ανασταλτική δραστηριότητα των *Bifidobacteria* εναντίον των παθογόνων βακτηρίων έχει καλά αποδειχθεί στα μοντέλα *in vitro* και στα ζωικά μοντέλα, μόνο μερικές έρευνες διερεύνησαν την επίδραση των προβιοτικών στους ανθρώπους. (Πίνακας 3.1).

Πίνακας 3.1: Έρευνες *in vitro* και ζωικά μοντέλα με προβιοτικούς γαλακτοβακίλλους εναντίον του βακτηρίου *Salmonella*.

Προβιοτικό	Μοντέλο	Αποτελέσματα	Παραπομπές
<i>L.rhamnosus HN001</i>	Μόλυνση των συμβατικών ποντικών	Αυξανόμενο ποσοστό επιβίωσης (90% vs 7%) μειωμένοι αριθμοί των μετατοπισμένων <i>Salmonella</i> αυξανόμενα εντερικά και ορού αντισώματα, και υψηλότερη λευκοκυτταρική φαγοκύτωση από προβιοτική πρόσληψη.	Gill et al 2001
VSL#3	Επιθηλιακή αντίσταση και διαπερατότητα των κυττάρων T _{H4} . Προστασία εναντίον προσβολών.	Αυξανόμενη αντίσταση και διαπερατότητα λόγω της έκκρισης μιας διαλυτής πρωτεΐνης. Μειωμένη προσκόλληση του <i>Salmonella</i> εξαιτίας ενός διαλυτού πρωτεϊνικού παράγοντα.	Madsen et al 2001
<i>Vitacanis, L.acidophilus</i>	Προσβολή των ασηπτόβιων ποντικών; Δραστηριότητα <i>in vitro</i> από επίστρωση Αγαρ	Δραστηριότητα <i>in vitro</i> στην <i>σαλμονέλα</i> . <i>In vivo</i> η <i>σαλμονέλα</i> παρατηρήθηκε σε παρόμοια επίπεδα σε εκείνα που συγκρίθηκαν με τους ελέγχους. Η επιβίωση ήταν μεγαλύτερη.	Maia et al 2001
<i>L. delbrueckii subsp Bulgaricus, S. thermophilus</i>	Απόπτωση των μολυσμένων μακροφάγων	Αναστολή απόπτωσης προκαλούμενη από προσβολή με <i>Salmonella</i> πιθανόν από ραγδαία οξειδωτική ελευθέρωση.	Valdez et al 2001
<i>L. acidophilus LB</i>	Προσβολή των Caco-2 κυττάρων.	SCS* χορηγούμενα Caco-2 κύτταρα ήταν λιγότερο προσβεβλημένα με <i>σαλμονέλα</i> . Οι SCS* μείωσαν τους αριθμούς των ενδοκυτταρικών <i>σαλμονέλα</i> μετά από το συμβάν της προσβολής.	C
<i>L. acidophilus UFV-H2b20</i> μαζί με το βακτήριο <i>Saccharomyces boulardii</i> και <i>E.coli</i>	Ποντικά μονό σχετιζόμενα με το προβιοτικό πριν από την προσβολή.	Κανένα αποτέλεσμα της αποικίας του <i>Salmonella</i> από προβιοτική θεραπεία.	Filho-Lima et al 2000
<i>L. johnsonii La1</i>	Ο χρόνος μειώνει (ελαττώνει) έρευνες <i>σαλμονέλα</i> με τους SCS. Προσκόλληση και εισβολή των Caco-2 κυττάρων. Μόλυνση των συμβατικών και υγιών ποντικών.	Αντιβακτηριακή δραστηριότητα παρατηρήθηκε εναντίον πολλών παθογόνων <i>In vitro</i> . Οι SCS επίσης ανέστειλαν την προσκόλληση και εισβολή από <i>σαλμονέλα</i> σε Caco-2 κύτταρα. Ο <i>Lactobacillus</i> έδειξε να είναι ενεργός εναντίον <i>salmonella in vivo</i> σε υγιή και συμβατικά ποντικά.	Bemet-Camard et al 1997
<i>L. rhamnosus GG</i>	Εισβολή των Caco-2 κυττάρων. Μόλυνση των συμβατικών και υγιών ποντικών	Αναστολή της προσκόλλησης σε Caco-2 κύτταρα από τους SCS χωρίς να τροποποιείται η ζωτικότητα της <i>σαλμονέλα</i> . Μειωμένοι αριθμοί κοπρανώδους <i>σαλμονέλα</i> σε συμβατικά μολυσμένα ζώα. Χρονική παράταση επιβίωσης σε μολυσμένα ποντικά που ήταν υγιή.	Hudault et al 1997
<i>L. rhamnosus GG</i>	Προσκόλληση σε Caco-2 κύτταρα	Καμία αναστολή της προσκόλλησης από προσκολλούμενα κύτταρα	Lehto and Salminen 1997

		<i>Lactobacillus</i> . Αναστολή της προσκόλλησης με SCS πολύ πιθανόν λόγω του γαλακτικού οξέος.	
--	--	---	--

SCS: υπερκείμενο καλλιέργειας.

Σε πολλές από τις έρευνες σχετικά με τους ανθρώπους χρησιμοποιήθηκαν στελέχη των ειδών *B. longum*. Ο αριθμός των βακτηρίων αυτών βρέθηκε να είναι πολύ μεγάλος στο έντερο των υγιών ανθρώπων. Οι Ballongue et al., 1993, ανέφεραν μια μείωση των βακτηρίων *Clostridium*, *Bacteroides*, και *coliform* στην χλωρίδα σε ενήλικες οι οποίοι κατανάλωναν γάλα ζυμωμένο με το βακτήριο *B. longum* BB536. Επίσης, φάνηκε ότι αυτό το στέλεχος ήταν ικανό να δημιουργεί αποικίες και να αναπτύσσεται στο μεγάλο έντερο. Όταν ένα στέλεχος *B. animalis* χρησιμοποιήθηκε δεν υπήρχε καμία επίδραση στα παθογόνα βακτήρια. Η χορήγηση στελέχους *B. longum* SBT 2928 από το στόμα, είχε σαν αποτέλεσμα μια ισχυρή επιμονή αυτού του στελέχους στο GIT (γαστρεντερικό σωλήνα gastrointestinal tract) των υγιών εθελοντών και μια σημαντική μείωση στον αριθμό των *Enterobacteriaceae* και *Clostridium spp* στα κόπρανα (Fujiwara et al., 2001c). Το αντιμολυσματικό αποτέλεσμα, ήταν συγκεκριμένο και ανεξάρτητο της παραγωγής οργανικών οξέων. Είχε προηγουμένως φανεί κατανοητό, πως αυτό το στέλεχος παράγει ένα πρωτεϊνούχο παράγοντα, ο οποίος αναστέλλει την δέσμευση του παθογόνου *E. coli* σε ανθρώπινα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα (Fujiwara et al., 1997). Παρομοίως, μια μείωση των *Coliform* βακτηρίων στα κόπρανα υγιών εθελοντών παρατηρήθηκε μετά από λήψη γιαουρτιού το οποίο περιείχε *Bifidobacteria* (Chen et al., 1999). Μια σημαντική πτώση των αριθμών *Clostridia* παρατηρήθηκε στα κόπρανα των υγιών εθελοντών μετά από χορήγηση του στελέχους *B. longum* σε λυοφιλική μορφή (Benno and Mitsuoka 1992). Σε μερικές έρευνες, παρατηρήθηκε πως η χορήγηση των στελεχών *B. longum* μαζί με αντιβιοτικά, παρείχε ένα προστατευτικό αποτέλεσμα εναντίον της αύξησης μερικών μολυσματικών βακτηρίων λόγω της χορήγησης αντιβιοτικών. Οι Colombel et al., το 1987, ανέφεραν πως η απορρόφηση γιαουρτιού απο το στόμα το οποίο περιέχει το βακτήριο *B. longum*, μείωσε τις γαστρεντερικές επιδράσεις που προκλήθηκαν από την ερυθρομικίνη, και μείωσε το επίπεδο των σπορίων *Clostridium* στα κόπρανα. Επιπλέον, παρατηρήθηκε πως η χορήγηση των στελεχών *B. longum* BB536, *L. acidophilus* NCFB 1748 και ολιγοφρουκτόζης κατά την διάρκεια χορήγησης της σεφροδοξίνης σε υγιείς εθελοντές, είχαν σαν αποτέλεσμα μια μείωση στους αριθμούς του *Cl. difficile* στα κόπρανα συγκεκριμένα με τα άτομα

που τους χορηγήθηκε μόνο το αντιβιοτικό (Ophage et al., 2000) (Πίνακας 3.2). Ενδιαφέρον είναι, να τονιστεί πως, οι θετικές αντιμικροβιακές ιδιότητες οι οποίες παρατηρήθηκαν όταν ελεύθερο-κύτταρο τυρόγαλου από το βακτήριο *B. breve* χορηγήθηκε σε υγιείς εθελοντές θεωρώντας ότι, η παρουσία των ζωτικών *Bifidobacteria* δεν απαιτείται απαραίτητα σε προβιοτικά παρασκευάσματα. Οι Romond et al., 1997a ανέφεραν πως η χορήγηση σε 10 υγιείς εθελοντές των ελεύθερων κυττάρων τυρόγαλου από το βακτήριο *B. breve*, οδήγησε σε μια αύξηση των *bifidobacteria*, και μια μείωση σημαντική των σπορίων *Clostridium* και τους αριθμούς κυττάρων του *Cl. perfringens* και του *Bact. fragilis* στα κόπρανα. Επιπλέον, το pH μειώθηκε. Σε εκτεταμένες έρευνες, το αποτέλεσμα των συγκεντρωμένων ελεύθερων κυττάρων τυρόγαλου του γάλακτος, ζυμώμενου με *B. Breve*, συγκρίθηκε με το αποτέλεσμα του εμπορεύσιμου γάλακτος ζυμώμενου με τα βακτήρια *B. breve* και *S. thermophilus* (Romond et al., 1998). Αυτό πάλι είχε σαν αποτέλεσμα σε μια αύξηση του *bifidobacteria* στα κόπρανα μαζί με μια μείωση του *Cl. perfringens* και του *Bact. fragilis*. Η μείωση και των δύο παθογόνων βακτηρίων, προέκυψε επίσης όταν χορηγήθηκε ζυμωμένο γάλα όμως καμία αύξηση των *Bifidobacteria* δεν υπήρξε. Αυτά τα ευρήματα έδειξαν πως το ανασταλτικό αποτέλεσμα συνέβη, πιθανόν λόγω παρουσίας των ενεργών ενώσεων στα ελεύθερα κύτταρα τυρόγαλου και πως η παρουσία του βακτηρίου *S. thermophilus* μπορούσε να αλλάξει τον μεταβολισμό των *Bifidobacteria* στο γάλα.

Πίνακας 3.2: Κλινικές δοκιμές σχετικά με την αναστολή των παθογόνων βακτηρίων από τα *bifidobacteria*:

Προβιοτική προετοιμασία	Δοκιμές	Αποτελέσματα	Παραπομπές
Λυοφιλική σκόνη του βακτηρίου <i>B.longum</i> SBT 2928	Χορήγηση από το στόμα σε υγιείς εθελοντές	Σημαντική μείωση του κοπρανώδους βακτηρίου <i>Clostridium spp</i> και <i>enterobacteriaceae</i>	Fujiwara et al 2001a
Ζυμωμένο γάλα το οποίο περιέχει τα βακτήρια <i>B.longum</i> BB536, <i>Lb.acidophilus</i> NCFB 1748 και ολιγοφρουκτόζη.	Χορήγηση από το στόμα σε υγιείς εθελοντές λαμβάνοντας ένα αντιβιοτικό.	Μειωμένος αριθμός των βακτηρίων <i>Cl.difficile</i>	Orrhage et al 2000
Γιαούρτι το οποίο περιέχει <i>Bifidobacteria</i>	Χορήγηση από το στόμα σε υγιείς εθελοντές	Μείωση των μορφών <i>E. coli</i> βακτηρίων στα κόπρανα	Chen et al 1999
Ελεύθερα κύτταρα τυρόγαλου από το <i>B. breve</i>	Χορήγηση από το στόμα σε υγιείς εθελοντές	Μείωση των κοπρανώδων σπορίων <i>clostridium</i> , <i>Cl.perfigens</i> , και <i>Bacteroides fragilis</i>	Romond et al 1997a
Γάλα ζυμωμένο με <i>B.longum</i> BB536, ή <i>B.animalis</i> βακτήρια	Χορήγηση από το στόμα σε υγιείς εθελοντές	Μειωμένοι αριθμοί <i>Clostridium spp</i> , <i>Bacteroides spp</i> , και η κολιβακτηρίων χλωρίδα στα κόπρανα ύστερα από γάλα ζυμωμένο με <i>B.longum</i> BB536	Ballonque et al 1993
<i>B.longum</i> σε λυοφιλική μορφή	Χορήγηση από το στόμα σε υγιείς εθελοντές	Μειωμένος αριθμός <i>Clostridium spp</i> στα κόπρανα	Benno and Mitsuoka 1992
Γιαούρτι το οποίο περιέχει ποσότητα βακτηρίου <i>B.longum</i>	Χορήγηση από το στόμα σε ασθενείς οι οποίοι λάβαναν αντιβιοτική θεραπεία.	Μειωμένο επίπεδο των σπορίων <i>κλωστηριδίου</i> στα κόπρανα	Colombel et al 1987

3.1 Η ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΤΗΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΠΡΕΒΙΟΤΙΚΩΝ ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΣΤΗΝ ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΥΓΕΙΑΣ ΤΟΥ ΕΝΤΕΡΟΥ

Διαπιστώνοντας την πολυπλοκότητα της παρούσας κατάστασης στην αγορά, και το γεγονός πως η επιτυχία ενός στελέχους από ένα σίγουρο *LAB* είδος σε μια κύρια χορήγηση δεν υπονοεί πως όλα τα συγγενή στελέχη των ειδών θα είναι ικανά να παράγουν μια συγκρινόμενη υγιή αντίδραση, είναι κατανοητό ότι η ταυτοποίηση των μικροοργανισμών στο επίπεδο μόνο των ειδών δεν θα παρείχε πλέον την διαφάνεια, η οποία απαιτείται από τον καταναλωτή, την βιομηχανία, τα νομοθετικά σώματα και τους υπεύθυνους επιστήμονες. Στελέχη τα οποία επιλέχθησαν για τις συγκεκριμένες λειτουργικές ιδιότητες πρέπει να χαρακτηριστούν σαφέστατα κοντά στο επίπεδο των ειδών. Μοριακές μέθοδοι αποτυπωμάτων παρείχαν αξιόπιστες και υψηλές διαχωριστικές λύσεις στις προκλήσεις αυτές (Holzaphel et al., 2001). Επιπλέον, γνωρίζοντας πως ο ανθρώπινος GIT (γαστρεντερικός σωλήνας), είναι ένα πολύπλοκο

και εχθρικό περιβάλλον, είναι πιο πιθανό πως οι επιδράσεις στην υγεία του εντέρου με προβιοτικά θα απαιτούν την εισαγωγή μιας ομάδας στελεχών. Π.χ πολλοί *Lactobacilli* ή/και *Bifidobacteria* ενός μονού προβιοτικού βακτηριακού στελέχους το οποίο επιτελείται αποτελεσματικά στο γαστρεντερικό σωλήνα μέσα από την *in vitro* επιλογή κριτηρίων (Duppe et al., 2001). Σε αυτή την περίπτωση θα ήταν γνωστό αν οι αλληλεπιδράσεις (ανταγωνιστικές ή συναγωνιστικές) θα συμβούν. Όσον αφορά τα πρεβιοτικά πολλά από τα πρόσφατα προϊόντα της γενιάς, δεν έχουν αναπτυχθεί με ειδικευμένους στόχους ή λειτουργίες στην σκέψη (Rastall and Maitin, 2002). Για παράδειγμα, τα ήδη υπάρχοντα πρεβιοτικά και φυσικά διαιτητικά στοιχεία ήδη τείνουν να αυξάνουν επιλεκτικά τους αριθμούς των κύριων ειδών εκτός από εκείνα που ανήκουν στα βακτήρια γαλακτικού οξέος, π.χ *Eubacterium*, *Roseburia* ή είδη *Ruminococcus* (Duncan et al., 2003). Επιπλέον, η γενιά των πρεβιοτικών που δρα στα είδη πέρα από το επίπεδο του γένους, προσφέρει περαιτέρω τελειοποίηση της προσέγγισης. Επιπλέον, τα πρεβιοτικά με δομές πρωτότυπες π.χ NDus με διαφορετικούς βαθμούς πολυμερισμού διακλάδωσης, ή διαλυτοποίησης, όπως επίσης φυκώδη πολυσακχαρίτη, και βακτήρια εξοπολυσακχαρίτη μπορεί να δρουν σε διαφορετικές πλευρές στο έντερο, και μπορεί να προκύπτουν διαφορετικά τελικά προϊόντα ή μια διαφορετική ποικιλία των μικρών αλυσίδων των λιπαρών οξέων διαμέσου της ζύμωσης. Για παράδειγμα, έχει γίνει αντιληπτό ότι οι μακριές αλυσίδες των ολιγοσακχαριτών μεταβολίζονται πιο αργά από τις μικρές αλυσίδες, έτσι ώστε η γρήγορη ζύμωση σακχάρων στο άμεσο παχύ έντερο, να μπορεί να επεκταθεί προς τις ακραίες περιοχές του παχέος εντέρου, όπου πολλές χρόνιες διαταραχές στο έντερο (σπαστική κολίτιδα, καρκίνος του παχέος εντέρου) έχουν αρχικά εντοπιστεί (Robertfroid 1997, 1998, Van der Meulen et al., 2004). Παρομοίως, τα επίπεδα του προπιονικού και βουτυρικού οξέος μπορεί να διαφέρουν σημαντικά. Τέτοια πρεβιοτικά, μπορεί να βρεθούν μέσα από εκτενή εξέταση μιας μεγάλης ποικιλίας πρωτότυπων υποκατάστατων ή παρασκευασμένων μέσω της σύνθεσης με (προβιοτικά) ένζυμα από μόνο και /ή ολιγοσακχαρίτες (Rastall and Maitin, 2002). Επιπλέον, πρεβιοτικά με ενισχυμένη αντοχή, είναι επιθυμητός πρωτότυπος τύπος των πρεβιοτικών. Δεδομένου λοιπόν, το δυναμικό των από βιομάζα προερχόμενων ολιγοσακχαριτών, και συγκεκριμένα κυτταρικά τοιχώματα φυτικών κυττάρων πολυσακχαριτών σαν πηγές των αρχικών προβιοτικών, έχουν αρχίσει να λαμβάνουν κάποια απαραίτητη προσοχή (Van Laere et al., 2000) Επιπλέον, πολλοί στόχοι μπορεί να προβλεφθούν ή οραματιστούν όπως: παιδιά, μεγαλύτερης ηλικίας

άνθρωποι, κύρια άτομα, και προβιοτικά (Rastall and Maitin, 2002). Τέτοιοι συγκεκριμένοι ολιγοσακχαρίτες, μπορεί να χρησιμοποιηθούν σε συνδυασμό με αποδεδειγμένα πρεβιοτικά για να ενισχύσουν την επιβίωση τους, π.χ όπως τα συμβιωτικά. Τέλος, τα πρεβιοτικά μπορούν να στοχεύσουν εναντίον της αντιπροσκολλητικής δραστηριότητας. Ο υποδοχέας ολιγοσακχαριτών, μιμείται (σαν μέρος ενός) πρεβιοτικού και μπορεί επιλεκτικά να προλαμβάνει την προσκόλληση των κύριων παθογόνων ειδών. Η χρήση των ολιγοσακχαριτών για να προλαμβάνουν την δέσμευση παθογόνων έχει αποτελέσει ενδιαφέρον σε ένα θεραπευτικό περιεχόμενο, κατά την διάρκεια της τελευταίας δεκαετίας (Zopf and Roth, 1996). Παρόλα αυτά, πολύ λίγα είναι γνωστά σχετικά με την δομική λειτουργία σχέσεων των πρεβιοτικών ολιγοσακχαριτών αν και πρόσφατα υπήρχε κάποιο ενδιαφέρον σε αυτή την περιοχή (Kaplan and Hutkins, 2000, 2003, Van Laere et al., 2000, Gopal et al., 2001, Perrin et al., 2001, Rastall and Maitin, 2002). Επίσης, η περαιτέρω ανάπτυξη των συμβιωτικών μπορεί να βελτιώσει την αποτελεσματικότητα όλων των πρεβιοτικών στελεχών και τα κατάλληλα υποστρώματα, τα οποία διεγείρουν την υγεία και συγκεκριμένα να φθάνουν ένα αυξανόμενο αριθμού λαμβανόμενων βακτηρίων φθάνοντας στο παχύ έντερο σε μια εφικτή μορφή. Παρόλα αυτά, λίγα είναι γνωστά για την αλληλεπίδραση ανάμεσα σε διαφορετικούς συνδυασμούς των προβιοτικών και πρεβιοτικών και την ανάπτυξη αποτελεσματικών συμβιωτικών. Επιπλέον, είναι απαραίτητο αυτές οι ενώσεις (στοιχεία) να αναπτυχθούν σαν ενεργά συστατικά των προϊόντων διατροφής τα οποία τελικά προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση, και συγκεκριμένα όταν το προβιοτικό πρεβιοτικό ή συμβιωτικό θεωρείται ένα συστατικό τροφής ή ένα συμπλήρωμα διατροφής.

3.2 ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΤΑΣΕΙΣ

Όσο ο αριθμός των βακτηρίων που είναι ανθεκτικά στα αντιβιοτικά, αυξάνεται με γρήγορο ρυθμό, τα προβιοτικά θεωρούνται τώρα σαν εναλλακτικά των αντιβιοτικών, και μπορεί να γίνουν ένα σημαντικό θέμα στην ιατρική του κοντινού μέλλοντος. Παρόλα αυτά, η εγκυρότητα μιας τέτοιας έννοιας πρέπει να αποδειχτεί. Επιπλέον, τα εργαλεία είναι απαραίτητα να ελέγχονται, και να προσδιορίζουν την *in vivo* παρουσίαση και αποτελεσματικότητα των προβιοτικών, πρεβιοτικών και συμβιωτικών. Εφόσον φαίνεται πως τα στοιχεία κυττάρων, ενζύμων, και μεταβολικών-ζυμωμένων προϊόντων τα οποία προέρχονται από προβιοτικά *LAB*,

μπορεί να συνεισφέρουν σε συγκεκριμένα ευεργετικά αποτελέσματα για την υγεία, ή ακόμη και να μεσολαβήσουν συγκεκριμένα ευεργετικά αποτελέσματα στην υγεία, μη βιώσιμα προβιοτικά μπορεί να είναι σημαντικά συγκεκριμένα, σαν βιοθεραπευτικά. Για παράδειγμα, όταν κύρια στοιχεία βρέθηκαν να είναι υπεύθυνα για ένα συγκεκριμένο παθογόνο, η αναστολή ή επανενεργοποίηση αυτών μπορεί να χρησιμοποιείται σαν θεραπευτικός παράγοντας. Επιπλέον, πολλές έρευνες έχουν δείξει πως τα μη ζωτικά προβιοτικά μπορούν να έχουν ευεργετικά αποτελέσματα, όπως άνοσο συντονισμό και δέσμευση καρκινογόνου στο έντερο του ζενιστή (Ouwehand and Salminen, 1998, Salminen et al., 1999, Mercenier et al., 2003). Σε αντίθεση, γενικά για την στοματική διευθέτηση, ζωτικά κύτταρα φαίνονται να είναι πιο αποτελεσματικά από τα θανατωμένα. Παρόλα αυτά, τα προκείμενα στοιχεία, δείχνουν πως καθώς οι ζωντανοί οργανισμοί μπορεί να είναι πιο απαραίτητοι/ αποτελεσματικοί για συγκεκριμένα αποτελέσματα, αβιοτικοί, μη ζωτικοί προβιοτικοί οργανισμοί ή κυτταρικές ενώσεις (στοιχεία κυτταρικών τοιχωμάτων, προϊόντα κυτταρολύσεως) ή κυτταρικοί μεταβολίτες (βακτηριοκίνες φαρμακευτικά με θρεπτικά στοιχεία) γι αυτό μπορεί να είναι αποτελεσματικό σε ειδικές καταστάσεις (Salminen et al., 1999). Είναι πιθανόν, ότι ο αβιοτικός ορισμός, αν γίνει αποδεκτός θα διευρύνει την υγεία και την θεραπευτική δυναμικότητα των προβιοτικών στο μέλλον. Επιπλέον, η χρήση των μη ζωτικών παρασκευασμάτων, θα προσέφερε οικονομικά και κοινωνικά πλεονεκτήματα, για παράδειγμα κάνοντας πιο άνετη την χρήση τους σε αναπτυσσόμενες χώρες. Επίσης, στο μέλλον μπορεί να γίνει πιθανή η έκθεση κύριων παραπόνων τα οποία αφορούν γαστρεντερικά θέματα, επιφυλακτικά μέσα από την επιλεκτική χρήση των προβιοτικών και /ή τον επιλεκτικό στόχο στα βακτήρια του εντέρου με πρεβιοτικά ή βιοθεραπευτικά.. Γιαυτό, εκτεταμένη έρευνα πρέπει να διεξαχθεί ώστε να διευκρινιστεί ο μηχανισμός δράσης των συγκεκριμένων προβιοτικών εναντίον συγκεκριμένων παθογόνων. Μπορεί επίσης να είναι λόγω ότι διαφορετικές περιοχές του GIT απαιτούν διαφορετικά προβιοτικά βακτήρια στελέχη ειδικευμένα σε ασθένειες), για παράδειγμα αναφερόμενες στην ιογενή διάρροια, και γαστρίτιδα η οποίες προκλήθηκαν από το βακτήριο *H. pylori*. Στην συνέχεια, το ίδιο προβιοτικό μπορεί να αναστέλλει διαφορετικά παθογόνα με διαφορετικούς μηχανισμούς. Εναλλακτικά, η γενετική μηχανική μπορεί να ενισχύσει την δραστηριότητα των προβιοτικών, με το να ενώνει την ικανότητα επιβίωσης στο γαστρεντερικό σύστημα, με την ικανότητα να παράγει μεταβολίτες οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για το προβιοτικό αποτέλεσμα., και επίσης με την ενίσχυση των

χαρακτηριστικών το οποίο θεωρείται απαραίτητο για τον λειτουργικό και *in vivo* ρόλο. Συμπεραίνοντας λοιπόν, θα έπρεπε να ενθυμόμαστε πως οι μελέτες ζώων και οι μελέτες *in vitro* δεν μπορούν να μεταφέρονται συχνά σε ανθρώπους. Το αποτέλεσμα *in vivo*, ή αποτέλεσμα που αφορά τα ζώα, δεν παρατηρείται απαραίτητα *in vivo* στους ανθρώπους. Γι αυτό οποιοδήποτε θέμα ασαφές, ή άλυτο μπορεί να διευκρινιστεί μόνο με καλά σχεδιασμένες και καλά ελεγχόμενες κλινικές δοκιμές (τυχαιοποιημένες, ελεγχόμενες με ψυχοφάρμακα, διπλές-τυφλές, εδραιωμένα τελικά σημεία, πολύκεντρα).

3.3 ΑΞΙΟΛΟΓΩΝΤΑΣ ΤΗΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ, ΠΡΕΒΙΟΤΙΚΩΝ, ΚΑΙ ΣΥΜΒΙΩΤΙΚΩΝ ΣΤΗΝ ΠΡΟΛΗΨΗ ΑΣΘΕΝΕΙΩΝ

3.3.1 Εισαγωγή: διαίτα και γαστρεντερικές παθήσεις

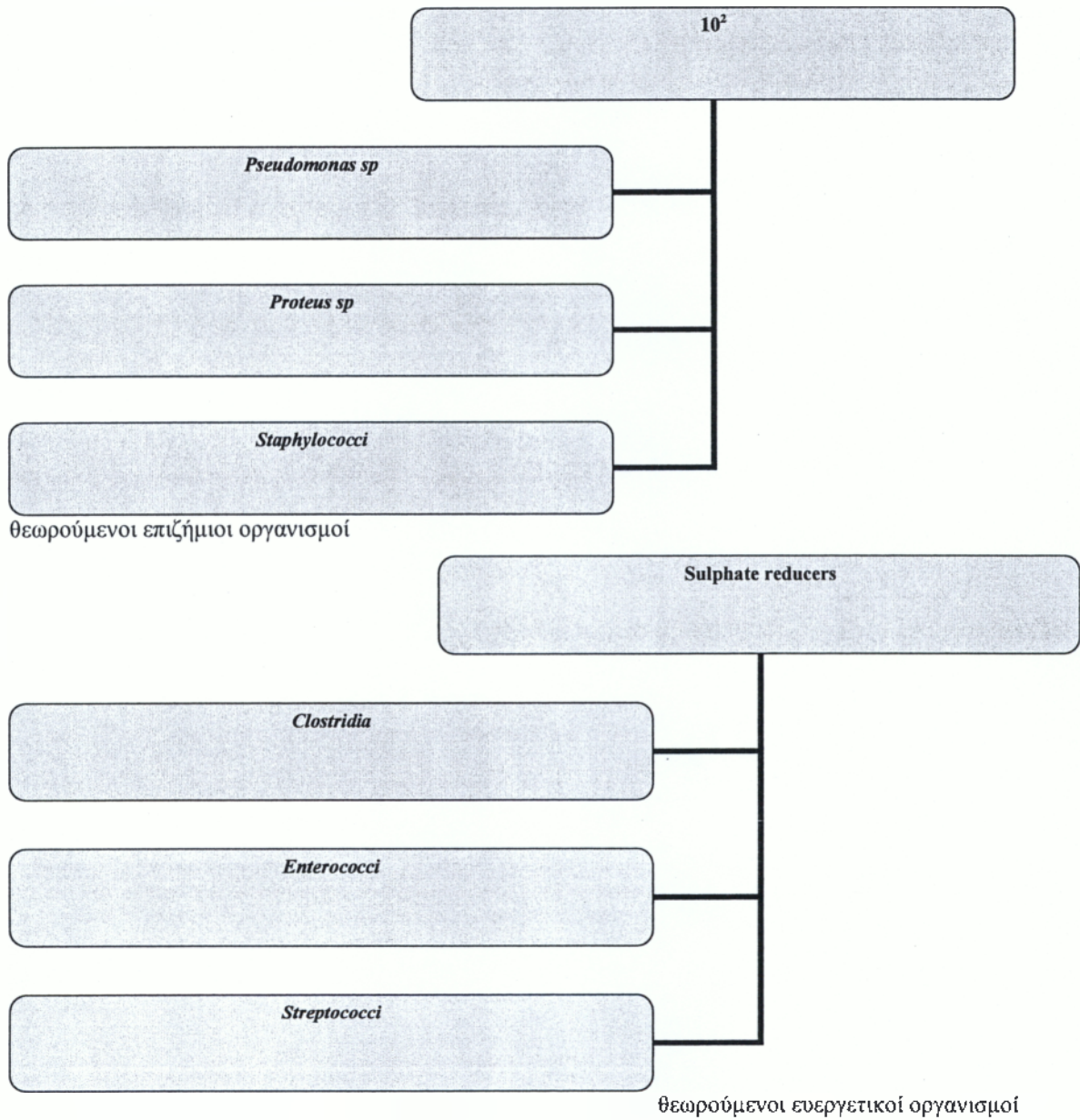
Οξείες προσβολές του γαστρεντερικού συστήματος βρίσκονται ανάμεσα στις πιο συνηθισμένες διαταραχές και αποτελούν ένα κύριο παράγοντα για την θεμελίωση της υγείας (health funding) στις αναπτυσσόμενες χώρες.. Τα συμπτώματα, μπορεί να ποικίλλουν από μια ήπια μικρής χρονικής διάρκειας δυσφορία, όπως, από μια απλή περίπτωση της τροφικής δηλητηρίασης, και σε καταστάσεις που η ζωή απειλείται, όπως ο καρκίνος του παχέος εντέρου. Για παράδειγμα, ο αριθμός των περιπτώσεων τροφικής δηλητηρίασης που αναφέρθηκε ετησίως στο Ηνωμένο βασίλειο, είναι γενικά μεγαλύτερος από 100.000 και τα βασικά προκύπτοντα περιστατικά μπορεί να είναι πολύ μεγαλύτερα, καθώς ο τεράστιος αριθμός περιπτώσεων παραμένει ακόμη άγνωστος (δεν έχει αναφερθεί). Επιπλέον, οι αιτιολογικοί παράγοντες της μόλυνσης παραμένουν πολύ συχνά ακαθόριστοι. Η διαίτα, είναι ένας από τους βασικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες που σχετίζονται με την έναρξη των ποικίλων γαστρεντερικών προσβολών. Ο καρκίνος του ορθού (Colo-rectal cancer, CRC) και οι ενοχλητικές παθήσεις του εντέρου (IBD) για παράδειγμα, έχουν κυρίως παρατηρηθεί σε Ευρώπη και Βόρειο Αμερική όπου ένας δυτικός τρόπος διατροφής κυριαρχεί. Η πρόληψη με βάση μια διατροφή που θα χειρίζεται ώστε να αντιμετωπίσει ή θα προλάβει τέτοιες διαταραχές, και άλλες συστηματικές διαταραχές, οι οποίες επηρεάζονται από την διατροφή, μπορεί να είναι εύκολα εφαρμόσιμη για τους καταναλωτές/ ασθενείς και αποτελεσματική οικονομικά για την θεμελίωση στην υγεία.

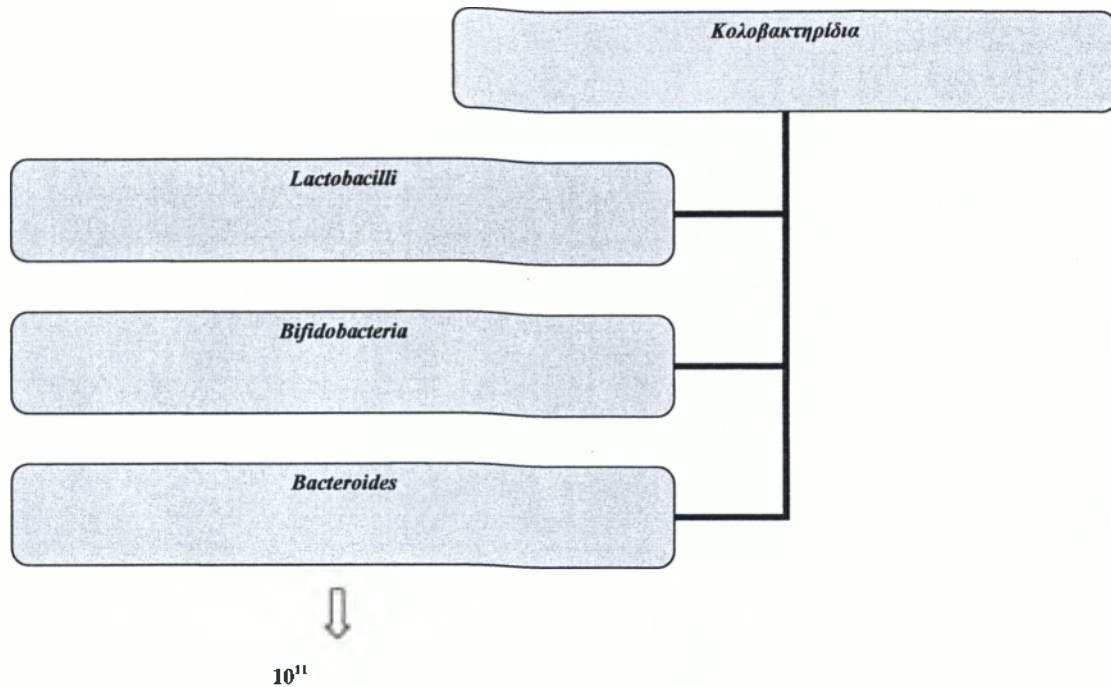
Η μικροβιακή χλωρίδα του εντέρου, παίζει έναν σημαντικό ρόλο στην υγεία του ξενιστή. Οι ζυμωτικές του ιδιότητες, επιτρέπουν την χρησιμότητα των υποστρωμάτων τα οποία δεν έχουν υποστεί ρήξη στο ανώτερο μέρος του εντερικού σωλήνα. Η απελευθέρωση των θρεπτικών στοιχείων στο μεγάλο έντερο αν και δευτερεύουσα στην διαδικασία της πέψης στο μικρό έντερο, καθορίζει την διατήρηση της ακεραιότητας του εντερικού συστήματος και την πρόσληψη των ιχνοστοιχείων όπως οι βιταμίνες Β και Κ. Η ζύμωση των άπεπτων υδατανθράκων και πρωτεϊνών, απελευθερώνει οργανικά οξέα όπως τα λιπαρά οξέα μικρής αλυσίδας (SCFA). Αυτά είναι γνωστά για την ευεργετικότητά τους, για την επιθηλιακή τους διάδοση και για τις βακτηριακές τους επιδράσεις σε δυναμικά παθογόνους οργανισμούς. Επιπλέον, ο γαστρεντερικός σωλήνας είναι το βασικό σύστημα το οποίο περιλαμβάνεται στην ανοσολογική αντίδραση, αφού είναι το πρώτο σημείο εισόδου των ξενοβιοτικών ενώσεων και ευκαιριακών παθογόνων.

Η μικροβιακή χλωρίδα του εντέρου, διεγείρει το ανοσοποιητικό σύστημα με ένα μη-φλεγμονώδη τρόπο κύριας (priming) αντίδρασης, σε πιθανή δημιουργία αποικιών των παθογόνων. Από την άλλη μεριά η απελευθέρωση των τοξινών ή δηλητηριωδών ενώσεων, σαν προϊόν της ζύμωσης από παθογόνα και από ενδογενή βακτήρια μπορεί να έχει επιβλαβείς συνέπειες. Για παράδειγμα, βακτήρια όπως το *Escherichia coli* ETEC, *Salmonella enteritidis*, και *Vibrio cholerae* παράγουν ενδοτοξίνες, οι οποίες προκαλούν σοβαρή ζημιά στις βλέννες του μικρού εντέρου, έχοντας σαν αποτέλεσμα την ενεργή έκκριση των ιόντων από τα βλεννολυτικά κύτταρα στον εντερικό σωλήνα. Συνεπώς, αυτό έχει σαν αποτέλεσμα, τις χρόνιες διάρροιες και αφυδάτωση του ασθενούς. Ακόμη ένα παράδειγμα, είναι η απελευθέρωση καρκινογόνων ενώσεων σαν συνέπεια των πρωτεολυτικών δραστηριοτήτων από ενδογενή βακτήρια, όπως βακτηριοειδή και ευβακτήρια (Carman et al., 1988, Van Tassell et al., 1982). Επιπλέον, η παραγωγή τοξικών αερίων όπως το H₂S από το θεικό άλας, μειώνοντας τα βακτήρια πιθανόν σχετίζεται με το IBD και με ελκωτική κολίτιδα. Η μικροβιακή χλωρίδα του εντέρου, είναι εξαιρετικά ποικιλότροπη και εξηγεί μια ολόκληρη σειρά λειτουργιών. Μέχρι σχετικά πρόσφατα, ήταν εξαιρετικά δύσκολο να υπολογίσουμε τέτοια ποικιλότητα, όμως η αφαίρεση των μοριακών τεχνικών έχει επιβεβαιώσει την παρουσία περίπου 500 βακτηριακών ειδών στην εντερική κοινότητα. Τα βακτηριακά κύτταρα, επικρατούν στο χαμηλότερο έντερο σε σημαντικούς αριθμούς ευκαρυωτικών κυττάρων που παρουσιάζονται στο σώμα. Σε αυτή την περιοχή, γενικά είδη κυρίως έχουν ταυτοποιηθεί, όμως στο επίπεδο των ειδών η γνώση σχετικά με

την δημιουργία αποικιών του εντερικού σωλήνα δεν είναι ακόμη ολοκληρωμένη (Σχήμα 3.1). Οι κύριες ομάδες μέσα στην εντερική περιοχή, προέρχονται συνήθως από τα βακτήρια *Bacteroides* spp., *Enterobacteria* ή *Clostridia* spp. Αυτοί οι πληθυσμοί είναι παρόντες σε υψηλούς αριθμούς του συνόλου της συμβιώσιμης μικροβιακής χλωρίδας, όμως είναι επίσης στενά σχετιζόμενο με τα παθογόνα στελέχη όπως το *Clostridium difficile* και *Escherichia coli*. Αυτοί οι πληθυσμοί μπορεί να σχετίζονται περαιτέρω με δυναμικά επιζήμια διαδικασία, επηρεάζοντας την υγεία του ξενιστή όπως αναφέραμε προηγουμένως. Από την άλλη μεριά τα *Bifidobacteria* και *Lactobacilli* θεωρούνται ευεργετικά στο σύνολο της μικροβιακής χλωρίδας και η διάδοσή τους είναι γενικά ένας καλός δείκτης για την προώθηση της υγείας. Για παράδειγμα, η μικροβιακή χλωρίδα του εντέρου των παιδιών που έχουν τραφεί με μητρικό γάλα, αποτελείται βασικά από *Bifidobacteria* (Favier et al., 2002). Η προστατευτική δράση των *Bifidobacteria* εναντίον των εντεροπαθογόνων έχει απεικονιστεί, και είναι απαραίτητη για την σύνθεση της γαστρεντερικής άμυνας του φράγματος του παιδιού και για την διέγερση των αρχικών ανοσολογικών αντιδράσεων (Sudo et al., 1997). Πρόσφατες έρευνες στρατηγικής έχουν χρησιμοποιηθεί σαν στόχο προς την βελτίωση της αντίστασης σε μολύνσεις και εξαλείφοντας καταστάσεις όπως το Ευερέθιστο Εντερικό Σύνδρομο (Irritable Bowel Syndrome IBS), Χρόνιες Διαταραχές του Εντέρου (IBD και CRC), δυσανεξία στην λακτόζη, τροφικές και τοπικές αλλεργίες, επαναλαμβανόμενη κολπική άφτρα, και μεταλλική βιοδιαθεσιμότητα. Είναι προφανές ότι δεν είναι όλα τα προβιοτικά και πρεβιοτικά ικανά να πετύχουν αυτούς τους στόχους. Παρόλα αυτά, υπάρχουν υποσχόμενες αποδείξεις πως κάποια επιτυχία μπορεί να επιτευχθεί. Γενικά περαιτέρω έρευνα και κλινικές δοκιμές θα έπρεπε να αποδείξουν την αποτελεσματικότητα αυτών των προσεγγίσεων.

Στο Σχήμα 3.1 απεικονίζεται η σύνθεση της γαστρεντερικής μικροβιακής χλωρίδας ενός ενήλικα. Οι αριθμοί είναι κοντινές συγκεντρώσεις της καθημίας βακτηριακής ομάδας ανά mililitre ενός δείγματος κοπράνων (Gibson and Robertfroid, 1995)





Σχήμα 3.1 Σύνθεση της γαστρεντερικής μικροβιακής χλωρίδας ενός ενήλικα (Gibson and Robertfroid, 1995)

3.3.2 Οικονομική και ιατρική σημασία των προ-, πρε-, και συμβιωτικών

Τα κόστη της φαρμακευτικής για ανθρώπινη χρήση έχουν αυξηθεί πολύ την τελευταία δεκαετία. Η μόδα ακολουθεί την εξέλιξη, σαν αποτέλεσμα της προηγούμενης αδιάκριτης χρήσης των αντιβιοτικών τα οποία οδήγησαν σε μια μείωση της δυναμικής τους, της επάρκειας, και ανάγκης των παθογόνων που είναι ανθεκτικά στα αντιβιοτικά. Παράλληλα, με την ανάπτυξη των φαρμάκων νέας γενιάς, εναλλακτικοί δρόμοι έχουν αναζητηθεί πρόσφατα όπως είδη λειτουργικών τροφίμων τα οποία μπορεί να προσφέρουν βελτίωση της υγείας, χωρίς την ανάγκη χορήγησης φαρμάκων. Οι δημόσιες και βιομηχανικές αντιλήψεις περί της σημασίας μικροβιολογίας του εντέρου στην υγεία του ανθρώπου και την διατροφή, οδήγησαν σε μια κύρια αύξηση στην ανάπτυξη και χορήγηση των προβιοτικών και πρεβιοτικών προϊόντων. Έχει εκτιμηθεί, πως πάνω από 1 εκατομμύριο καταναλωτές στο Ηνωμένο Βασίλειο κάθε μέρα, καταναλώνουν προβιοτικά. Η αξία της Ευρωπαϊκής Αγοράς υπολογίζεται σε πάνω από 1 δις ευρώ το χρόνο (Young 1998). Για την πλήρη αγοραστική αξία που πραγματοποιείται, εντούτοις είναι επιτακτικό πως οι διαιτητικές μορφές όπως προβιοτικά, πρεβιοτικά και συμβιωτικά βασίζονται πάνω σε ηχητικές

επιστημονικές αρχές οι οποίες παρέχουν αδιάψευστα στοιχεία πάνω στην επάρκεια και την λειτουργικότητα. Πρόσφατα στην Ευρώπη δεν υπάρχει κανένα νομικό κώλυμα για την παραγωγή πύλης για στοιχεία σχετικά με επιπτώσεις σε ανθρώπους πριν την προώθηση νέων προβιοτικών και πρεβιοτικών προϊόντων. Παρόλα αυτά, η χρήση των προβιοτικών και πρεβιοτικών στην στόχευση πληθυσμών, όπως σε παιδιά ή μεγαλύτερους ή σε περιπτώσεις ασθένειας, απαιτεί ένα επίπεδο έρευνας ίσο με αυτό της ανάπτυξης ενός νέου φαρμάκου. Οι καταναλωτές και οι νοσοκομειακοί γιατροί θα έπρεπε να είναι εξοπλισμένοι με μια αξιολόγηση φυσιολογικής, μικροβιακής και ασφαλούς πτυχής, ειδικά αν αυτά τα εργαλεία διαχείρισης είναι να χρησιμοποιηθούν σαν εναλλακτικά ή συμπληρωματικά σε παραδοσιακή θεραπεία με φάρμακα. Παρομοίως, η ανάπτυξη των συμβιωτικών προϊόντων (συνδυασμός των προβιοτικών και πρεβιοτικών απαιτεί συγκρίσιμα στοιχεία, ώστε να διαπιστώσουμε εάν ο συνδυασμός είναι επιπρόσθετης αξίας σχετικά με την πρόσληψη των πρόσθετων ενώσεων σε διαφορετική μορφή.

3.4 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ, ΠΡΕΒΙΟΤΙΚΩΝ, ΚΑΙ ΣΥΜΒΙΩΤΙΚΩΝ

Μια εκτεταμένη ματιά πάνω στο θέμα των προβιοτικών.

Πρόσφατοι ορισμοί, περιορίζουν των κατάταξη των προβιοτικών σε ζωντανούς οργανισμούς οι οποίοι κατά την λήψη, προκαλούν θετικές επιδράσεις στην ισορροπία του εντέρου του ξενιστή (Fuller, 1989). Στοιχεία τα οποία να υποστηρίζουν προφυλακτική δράση των χαρακτηριστικών προβιοτικών στελεχών όπως του *Lactobacillus rhamnosus* και *Lactobacillus fermentum* στον κόλπο (Reid et al., 2001) μπορεί να οδηγήσουν σε εκτεταμένο ορισμό της χρήσης τους για τοπική χορήγηση σε ιστούς εκτός από τον πεπτικό σωλήνα. Ένα επίμαχο θέμα, είναι η ανάγκη του προβιοτικού να είναι ενεργό (ζωντανό), όχι μόνο την ώρα της λήψης αλλά και την ώρα της δράσης κυρίως στον μεγάλο σωλήνα. Αυτό θέτει σε εφαρμογή, την αντίσταση του προβιοτικού στελέχους σε χημικές αλλαγές και εκκρίσεις, οι οποίες προκύπτουν κατά την διακίνηση διαμέσου του στομάχου και του ανώτερου εντέρου. Μερικές έρευνες έχουν δείξει, πως η διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος, θα μπορούσε να εκτιμηθεί από νεκρά προβιοτικά κύτταρα (Kaila et al., 1995; Ouwehand and Salminen, 1998). Αυτός ο παθητικός μηχανισμός αν και είναι επιθυμητός, είναι λιγότερο ισχυρός από τις προωθούμενες για την υγεία επιδράσεις, οι οποίες

αποσπάστηκαν από ζωντανούς οργανισμούς. Για παράδειγμα, τα ζωντανά προβιοτικά στελέχη μπορεί να προσκολλούνται πιο δυνατά στην εντερική βλέννα (Tuomola et al., 2000) ή να παράγουν βακτηριοκίνες εναντίον δυναμικών παθογόνων (Talarico et al., 1989). Όσο για ζωντανούς μικροοργανισμούς, τα προβιοτικά πρέπει να έχουν έναν αποδεδειγμένο ασφαλές ιστορικό. Έχει εισηγηθεί, πως τα στελέχη μπορούν να καταταχθούν σαν προβιοτικά όταν οι ευεργετικές επιδράσεις έχουν δημιουργηθεί in vivo (Reid et al., 2003). Αυτό βασίζεται στο γεγονός, ότι τα προβιοτικά χαρακτηριστικά είναι γενικώς ειδικευμένα για ένα στέλεχος και μπορεί να μην είναι εφαρμόσιμα σε όλα τα προβιοτικά (Jacobsen et al., 1999). Πρόσφατα, πολλοί από τους μικροοργανισμούς οι οποίοι ανταποκρίνονται στον ορισμό των προβιοτικών, stricto sensu προέρχονται από τα γένη *Bifidobacteria* και τους *Lactobacilli* (Πίνακας 3.3).

Πίνακας 3.3: Παραδείγματα βακτηριακών στελεχών τα οποία χρησιμοποιήθηκαν πρόσφατα σαν προβιοτικά στους ανθρώπους.

Βακτηριακά γένη	Στέλεχη
Είδη <i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus GG</i> <i>Lactobacillus reuteri</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus johnsonii</i> <i>Lactobacillus gasseri</i> <i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i> <i>Lactobacillus casei Shirota</i> <i>Lactobacillus rhamnosus</i> <i>Lactobacillus fermentum</i>
Είδη <i>Bifidobacterium</i>	<i>Bifidobacterium bifidum</i> <i>Bifidobacterium longum</i> <i>Bifidobacterium infantis</i> <i>Bifidobacterium lactis BB12</i>

3.5 ΘΕΜΑΤΑ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΣΤΗΝ ΧΡΗΣΗ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΠΡΕΒΙΟΤΙΚΩΝ

Θέση GRAS (Γενικά αναγνωρίζονται ως ασφαλή)

Τα ήδη υπάρχοντα προβιοτικά και πρεβιοτικά έχουν εγκριθεί σαν γενικά θεωρούμενα ασφαλή προϊόντα (θέση GRAS). Σε σχέση με τα άλλα νέα φάρμακα ή φαρμακευτικά είδη τα οποία έχουν εκτεταμένα εξεταστεί για ασφάλεια, υπάρχουν ελλείψεις στις αυστηρές εκθέσεις ασφάλειας των προβιοτικών και πρεβιοτικών. Η φυσική απόρροια των προβιοτικών ενώσεων σε συνηθισμένα καταναλωτικά τρόφιμα, και το μακρύ ιστορικό χρήσης του ζυμωμένου γάλακτος το οποίο περιέχει προβιοτικά βακτήρια, έχουν δικαιολογήσει μέχρι τώρα την απουσία της αξιολόγησης κινδύνου για αυτούς τους τύπους λειτουργικών τροφίμων. Με την ανάγκη λιγότερο γνωστών προβιοτικών μικροοργανισμών και τον σχεδιασμό λειτουργικών υδατανθράκων, τα πιθανά ρίσκα των προβιοτικών και πρεβιοτικών πρέπει να εξεταστούν πιο προσεκτικά. Το θεωρητικό ρίσκο, είναι η βακτηριαμία η οποία αναπτύσσεται είτε από υπερβολική ανάπτυξη των προβιοτικών μικροοργανισμών ή από εντερικούς πληθυσμούς, οι οποίοι ενισχύθηκαν από κατανάλωση πρεβιοτικών. Τα *Bifidobacteria* και οι *Lactobacilli* είναι ενδογενείς οργανισμοί της εντερικής μικροβιακής χλωρίδας, και επιπλέον οι κύριοι μικροοργανισμοί οι οποίοι στοχεύθηκαν με διαιτητικές στρατηγικές ελέγχου. Τα *Bifidobacteria* και οι *Lactobacilli* δεν είναι στενά σχετιζόμενα με τα αναγνωρισμένα παθογόνα βακτήρια στους ανθρώπους (Tuohy et al., 2003). Περιπτώσεις προσβολών (μολύνσεων) από *Lactobacillus*, είδη και *Bifidobacteria* έχουν σπάνια αναφερθεί σαν αποτέλεσμα ή σαν επιπλοκές των υπάρχοντων σοβαρών ιατρικών καταστάσεων (Borriello et al., 2003). Έχοντας λάβει την ασφαλή καταχώρηση χρήσης κυρίως παρατηρούμενη σε όλο τον κόσμο μια πρόσφατη επιτροπή ειδικών, έχει θεωρήσει πως το ρίσκο θανάτου από προβιοτικά γαλακτοβακίλλων ή *Bifidobacteria* είναι μηδαμινό (Borriello et al., 2003). Κατ'επέκταση, το ρίσκο της βακτηριαμίας με πρεβιοτικά είναι πιθανόν ακόμα χαμηλότερο. Συνεπώς, τα προβιοτικά, πρεβιοτικά και συμβιωτικά είναι διαιτητικά μέσα, και μέσα διεύθυνσης, τα οποία αναγνωρίζονται σαν άκακα και έχουν λίγες αντενδείξεις ή χρήσεις προφύλαξης. Παρόλα αυτά, υπάρχει μια ανάγκη για καθιέρωση των πρότυπων τυποποιημένων λειτουργικών διαδικασιών για την αξιολόγηση της ασφάλειας των νέων προβιοτικών και πρεβιοτικών. Μία συλλογή προβιοτικών στελεχών αναγνωρισμένη από την διεθνή αρχή χώρων ασφαλούς φύλαξης, θα επέτρεπε έναν πιο επαρκή έλεγχο σε όλο τον κόσμο και τον ορισμό των

πρότυπων ασφαλείας για ασυνήθιστα στελέχη (Reid et al., 2003). Για παράδειγμα, έχει θεωρηθεί, πως οι βάσεις δεδομένων που περιέχουν ένα μοριακό προφίλ και γονιδιακή ταυτοποίηση των καλά χαρακτηρισμένων προβιοτικών στελεχών πρέπει να είναι διαθέσιμες στην επιστημονική κοινότητα (Bottiglio et al., 2003). Αυτή η βάση δεδομένων θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σαν αναφορά όταν τα νέα στελέχη έχουν απομονωθεί. Οι ανθρώπινες δοκιμές σίτισης και κλινικές δοκιμές συγκρινόμενες με την φάση 2 ανάπτυξης ασυνήθιστων φαρμάκων, πρέπει επίσης να αναληφθούν για την εξάλειψη οποιασδήποτε δυσμενών αποτελεσμάτων των αναγκαίων προβιοτικών και πρεβιοτικών ενώσεων πριν την προώθησή τους στην αγορά.

3.6 ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΘΟΡΙΣΜΟΥ ΤΟΥ ΤΡΟΠΟΥ ΔΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

Συστήματα in vitro

Ποικίλα συστήματα μοντέλων *in vitro* έχουν επικυρωθεί και επιτρέπουν μια αναπαραγωγή των φυσικοχημικών γεγονότων, τα οποία βρέθηκαν σε διαφορετικά σημεία του γαστρεντερικού συστήματος. Διαθέσιμα μοντέλα, προέρχονται από ποικίλους βαθμούς πολυπλοκότητας από μονά σκηνικά ενζύμων σε μια υδατόπτωση των βιολογικών αντιδραστήρων, εξομοιώνοντας την φυσιολογική διαφορά ανάμεσα σε κάθε μέρος του παχέος εντέρου (Rummey and Rowland, 1992; Molly et al., 1994; Minekus et al., 1995; Macfarlane et al., 1998). Γενικά, η θερμοκρασία, το pH, η ενδεχόμενη οξειδοαναγωγή, και χρόνος διακίνησης ελέγχονται. Η αναπαραγωγή των επίμονων κινήσεων μπορεί να ποικίλλει, από αναταραχές, σε διαφοροποιημένες κινήσεις παλμού. Η γαστρεντερική έκκριση και απορρόφηση κατά την πέψη, παριστάνονται επίσης με μερικά μοντέλα (Minekus et al., 1995). Οι τελευταίες πρόοδοι στην περιοχή, είναι μοντέλα τα οποία παριστάνουν τον δεσμό των μικροβιακών κυττάρων σε μια τεχνητή εντερική μεμβράνη (αντιδραστήρας βιολογικού φιλμ) (Probert and Gibson, 2004). Τα μοντέλα *in vitro*, επιτρέπουν την έρευνα του ανθρώπινου εντερικού οικοσυστήματος σε ελεγχόμενες εργαστηριακές συνθήκες, διατηρώντας την ποικιλότητα της εντερικής μικροβιακής χλωρίδας. Οι ζυμωτικές δραστηριότητες μιας μεγαλύτερης διάταξης υποστρωμάτων, μπορούν να ελεγχθούν, επομένως αυτά τα μοντέλα έχουν αποδειχθεί χρήσιμα στα αρχικά βήματα ανάπτυξης νέων / αναγκαίων πρεβιοτικών και προβιοτικών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΝΕΑ ΜΟΡΙΑΚΑ ΕΡΓΑΛΕΙΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΕΝΤΕΡΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΧΛΩΡΙΔΑΣ (ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ)

Οι μοντέρνες μοριακές τεχνικές έχουν οδηγήσει σε μια πιθανότητα χαρακτηρισμού της ολοκληρωμένης εντερικής μικροβιακής χλωρίδας *in situ*. Έχει συμπεριλάβει τα ποιοτικά και ποσοτικά όργανα των φυλογενετικά σχετιζόμενων βακτηριακών οργάνων χωρίς την ανάγκη παραδοσιακών καλλιεργητικών τεχνικών οι οποίες επιλέγουν για αυτά τα βακτήρια τα οποία είναι καλλιεργήσιμα στο εργαστήριο (ζωτικά αλλά μη καλλιεργήσιμα, viable but not non-culturable (VBNC), ZAMK.

Η ανάλυση των 16s rRNA γονιδιακών προφίλ τα οποία παρατηρήθηκαν ευθέως στα κόπρανα, έχει επεκτείνει τους υπολογισμούς της ποικιλομορφίας των ειδών μέσα στην μικροβιακή χλωρίδα. Το 70% περίπου των κλώνων ανταποκρίνεται σε πρωτότυπες βακτηριακές καταγωγές, όπου η πλειοψηφία έπεσε σε 3 επικρατέστερα είδη: *Bacteroides spp.*, *Clostridium coccooides*, και το *Clostridium leptum* (Suau et al., 1999). Σε δοκιμές σίτισης, μια ομάδα του 16S r DNA γονιδίων σχεδιασμένων να στοχεύει τις πιο σημαντικές ομάδες βακτηρίων παρόντα στην εντερική μικροβιακή χλωρίδα, χορηγείται ώστε να ελέγχει τις αλλαγές σε αριθμούς βακτηρίων. Αυτές οι τεχνικές γνωστές σαν Κανονική Υβριδοποίηση Φθορισμού (ΦΚΥ, FISH, Fluorescence in situ Hybridization) επιτρέπουν τον ποσοτικό προσδιορισμό των μικροβιακών πληθυσμών. Με την αύξηση που αφορά την απομόνωση και ταυτοποίηση των πρωτότυπων βακτηριακών ειδών, παρόλα αυτά ο αριθμός των οργάνων (καθετήρων) που είναι διαθέσιμα, επεκτείνεται πολύ γρήγορα και έτσι είναι και ο αριθμός των ειδών που ελέγχεται. Με ένα αυξανόμενο επίπεδο ανάλυσης υπάρχει μια ανάγκη για υψηλές τεχνικές επιτρέποντας μια ολοκληρωμένη ανάλυση των αλλαγών αυτών ενώ συντηρείται η πληροφορία της μικροβιακής ποικιλότητας. Η ανάλυση της βακτηριακής κοινότητας, χρησιμοποιώντας το 16s rRNA τεχνικές γονιδιακών αποτυπωμάτων όπως την T/DGGE, επιτρέποντας μια ποιοτική ολόκληρη ανάλυση κοινότητας των δειγμάτων. Η T/GGE, διαχωρίζει τα PCR προϊόντα, σύμφωνα με την σειρά ποικιλότητας. Τα προφίλ που παρατηρήθηκαν μπορούν να ξεχωρίζουν μια αλλαγή σε ένα συγκεκριμένο είδος ή να ελέγχουν τις αλλαγές στην ποικιλομορφία σε σχέση με την χορήγηση ενός λειτουργικού τροφίμου ή ενός προβιοτικού. Άλλη μια προσέγγιση η οποία έχει αναπτυχθεί, είναι η ποσοτική

ανάλυση σε πραγματικό χρόνο PCR η οποία αν και είναι ακριβή, είναι λιγότερο χρονοβόρα από την FISH και τελικά θα είναι πιο εύρωστη στην ποσοτική ανάλυση βακτηριακών αριθμών (Matsuki et al., 2002). Ένας συνδυασμός δύο ποσοτικών και ποιοτικών μοριακών προσεγγίσεων, είναι εξαιρετικά χρήσιμος στην εξέλιξη της επάρκειας των πρεβιοτικών, προβιοτικών και συμβιωτικών, στην ενίσχυση της ανθρώπινης υγείας. Πέρα από τον έλεγχο των βακτηριακών αλλαγών ακολουθώντας την προβιοτική ή πρεβιοτική λήψη, υπάρχει μια ανάγκη να καταλάβουμε πως αυτές οι αλλαγές επηρεάζουν την έκφραση των γονιδίων στο μικροβιακό πληθυσμό και στο εντερικό επιθήλιο. Μόνο αυτό το είδος πληροφορίας θα μας οδηγήσει να καταλάβουμε τους μηχανισμούς όπου το προβιοτικό και πρεβιοτικό είναι αποτελεσματικά. Όλο και περισσότερα βακτηριακά γονίδια έχουν ενοποιηθεί και με την ταχύτερη ανάπτυξη της Τεχνολογίας μικροδιάταξης του DNA, crosstalk, (μεταγραφάσης (transcriptomics), και έκφρασης γονιδίων) ανάμεσα στα προβιοτικά και τα ανθρώπινα βλεννογόνα κύτταρα φαίνεται στον ορίζοντα. Τέτοια στοιχεία μπορούν συνεπώς να χρησιμοποιηθούν ώστε να προβλέπουν τις επιπτώσεις που θα έχουν τα προβιοτικά, πρεβιοτικά και συμβιωτικά στην υγεία του εντέρου.

4.1 ΑΠΟΔΕΙΞΕΙΣ ΤΗΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΠΡΟ, ΠΡΕ, ΚΑΙ ΣΥΜΒΙΩΤΙΚΩΝ ΣΕ ΣΦΟΔΡΕΣ ΚΑΙ ΧΡΟΝΙΕΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ

Οξείες ασθένειες (διαταραχές):

4.1.1 Η διάρροια των ταξιδιωτή

Προσπάθειες πρόληψης ή μείωσης της περίπτωσης να προκύψει η διάρροια του ταξιδιώτη, έχουν περιλάβει την πρόσληψη των προβιοτικών συντελεστών όπως *L. acidophilus*, *B. bifidum*, *L. bulgaricus*, *L. GG* (Black 1989; Hilton et al., 1997). Σε μια ελεγχόμενη εικονική έρευνα δύο ομάδων ιδιαίτερου ενδιαφέροντος ταξιδεύοντας σε δύο διαφορετικούς προσανατολισμούς διακοπών, ο *L.GG* απέδειξε ότι μείωσε επαρκώς το περιστατικό διάρροιας στην μία ομάδα, όμως δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλαγές στην δεύτερη ομάδα. Αιτιολογικοί παράγοντες που σχετίζονται με την έρευνα δεν αναγνωρίστηκαν, όμως φάνηκε να είναι διαφορετικοί και στις δύο πλευρές. Αυτό μπορεί να εξηγεί την αποτυχημένη προφυλακτική δράση. Ένα ειδικευμένο προβιοτικό, μπορεί να μην προκαλεί την εκδήλωση αντιπαθογονικών δραστηριοτήτων εναντίον μιας μεγάλης ποικιλίας παθογόνων. Η συνδυασμένη βιοθεραπεία, ή ένα συμβιωτικό προϊόν μπορεί να αυξήσει την επάρκεια της

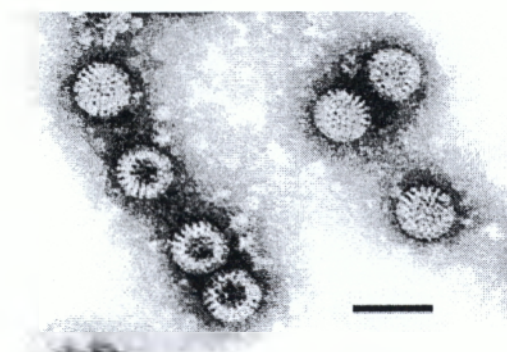
διαιτητικής στρατηγικής. Περισσότερες μελέτες λειτουργικής δομής, απαιτούνται να αναγνωρίσουν τα προβιοτικά ή πρεβιοτικά με αντιπαθογόνες δραστηριότητες.

4.1.2) διάρροια σχετιζόμενη με τα αντιβιοτικά

Η διάρροια συχνά προκύπτει σαν μια παρενέργεια μιας αντιβιοτικής θεραπείας. Η διατάραξη της μικροβιακής ισορροπίας προκαλεί μια εξασθένηση του φράγματος της φυσικής άμυνας εναντίον των παθογόνων. Τα ευκαιριακά παθογόνα όπως το *Clostridium difficile*, μπορούν να πολλαπλασιαστούν και να μια ψευδομεμβρανώδης κολίτιδα μπορεί να εμφανιστεί σαν επιπλοκή (Fooks and Gibson, 2002). Τα στελέχη *L.GG* και *B. longum* τα οποία λήφθηκαν μόνο, οδήγησαν σε μια σημαντική μείωση του επεισοδίου διάρροιας με ερυθρομυκίνη προκαλούμενη σε άτομα (Marteau et al., 2001). Ένας συνδυασμός του *L. acidophilus* και του *L. bulgaricus*, μείωσε επίσης το περιστατικό της διάρροιας η οποία προκλήθηκε από αμπικιλίνη, νεομυκίνη, και amoxillin- clavulanate (Witsell et al., 1995; Clements et al., 1983; Gotz et al 1979). Ένας συνδυασμός των βακτηρίων *B. longum* και *L. acidophilus*, χρησιμοποιήθηκε επίσης επιτυχώς για την πρόληψη της διάρροιας προκαλούμενης από κλυνδαμικίνη (clindamicin) (Nord et al., 1997).

4.1.3) rotavirus διάρροια σε παιδιά(rotavirus diarrhea in children)

Οι rotavirus ιοί (Εικ. 4.1) είναι μια συνηθισμένη αιτία γαστρεντερίτιδας στα παιδιά. Τα *L.GG* και *B. bifidum* έχουν χρησιμοποιηθεί σε κλινικές δοκιμές για την πρόληψη και την διασκόρπιση των rotavirus ιών (Isolarui et al., 1994; Saavedra et al., 1994). Το βακτήριο *L. GG*, έδειξε μια δραστική μείωση της διάρκειας της rotavirus διάρροιας σε πολλές μελέτες όπου το ίδιο προβιοτικό ήταν λιγότερο αποτελεσματικό στην διάρροια η οποία δεν σχετιζόταν με τους rotavirus ιούς (Marteau et al., 2001). Ο θεωρούμενος μηχανισμός δράσης είναι μια διέγερση της ανοσολογικής αντίδρασης ειδικευμένης σε rotavirus ιούς, και την ενίσχυση της βλεννικής ακεραιότητας.



Εικ. 4.1 Rotavirus. Οι ιοί rotavirus, είναι ένα είδος ιών που ανήκει στην οικογένεια Reoviridae. Έχουν ταυτοποιηθεί πολλές κύριες ομάδες, τρεις από τις οποίες (Ομάδα A B C) προσβάλλουν τους ανθρώπους με κύρια την ομάδα A η οποία είναι η πιο συνηθισμένη και ευρέως διαδεδομένη. Προκαλούν εμετό, και διάρροια και είναι η πιο συνηθισμένη αιτία σοβαρής ασθένειας σε παιδιά, σκοτώνοντας 600.000 άτομα κάθε χρόνο στις αναπτυσσόμενες χώρες (το έτος 2005). Νέα εμβόλια έχουν αποδειχτεί πως είναι ασφαλή και αποτελεσματικά το 2006.

Πηγή: <http://en.wikipedia.org/wiki/Rotavirus>

4.1.4) Νεκρωτική Εντεροκολίτιδα (NEK)

Η εντεροκολίτιδα, είναι μια γαστρεντερική διαταραχή του πρώιμου νεογνού στο οποίο δόθηκε εντατική φροντίδα από μονάδες (εντατικής φροντίδας), και έλαβε τροφή από το έντερο. Είναι άγνωστο το βακτήριο που προκαλεί την μόλυνση, όμως τα βακτήρια από την συμβιωτική μικροβιακή χλωρίδα όπως το *Clostridium difficile*, ή το *Clostridium butyricum*, μπορεί να σχετίζονται με την μόλυνση αυτή (Butel, 2003). Ο πληθυσμός των *Bifidobacteria* στον εντερικό σωλήνα των νεογνών τα οποία τράφηκαν εντερικά, είναι αφύσικα χαμηλός. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην χαμηλή, ανοσία και τις επιθυμητές συνθήκες για μετατόπιση των βακτηρίων στο συστηματικό περιβάλλον (Dai and Walker, 1999). Προληπτικά μέτρα εντατικών μονάδων, μείωσαν σημαντικά την εμφάνιση της NEK σε σύγκριση με τις ιστορικές ομάδες (Hoyos, 1999). Ζωικά μοντέλα της NEK, έχουν επίσης δείξει μία επίδραση του φρουκτοολιγοσακχαρίτη στην μείωση της νέκρωσης, και της εξέλκωσης. Επιπλέον, κλινικές δοκιμές είναι απαραίτητες για την επιβεβαίωση παρατηρήσεων στα ζώα και την στήριξη του μηχανισμού δράσης.

4.2 ΧΡΟΝΙΕΣ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ

4.2.1 Αυτιστικά Παιδιά

Η γαστρεντερίτιδα, συνήθως σχετίζεται με τις διαταραχές φάσματος αυτιστικών παιδιών. Έρευνες δειγμάτων κοπράνων από αυτιστικά παιδιά, έχουν επισημάνει μια μεταβολή της εντερικής μικροβιακής χλωρίδας (Finegold, 2002). Οι μικροβιακοί μεταβολίτες, οι οποίοι απελευθερώθηκαν στο έντερο παίζουν ένα ψυχοδιεγερτικό ρόλο στην αυτιστική παθολογία (Bingham, 2003). Η προβιοτική προσέγγιση, μπορεί να συνεισφέρει στην ανακούφιση των γαστρεντερικών συμπτωμάτων και να βοηθήσει στην σταθεροποίηση της εντερικής χλωρίδας των αυτιστικών. Κλινικές πρακτικές και φροντιστές των αυτιστικών ατόμων, έχουν αναφερθεί περιστασιακά σε μια βελτίωση των αυτιστικών συμπτωμάτων με την πρόσληψη προβιοτικών, όμως καμία κατάλληλη επιδημιολογική και τροφική δοκιμή είναι τώρα διαθέσιμη για την επιβεβαίωση αυτών των παρατηρήσεων (Bingham, 2003).

4.2.2 Ελκώδης Κολίτιδα (ΕΚ)

Η ελκώδης κολίτιδα, χαρακτηρίζεται από μια οξεία φλεγμονή του εντερικού σωλήνα χωρίς καμία συσχέτιση με μόλυνση. Τα άτομα επηρεάστηκαν από την εμπειρία της ασθένειας, με περιόδους υποτροπής και απαλλαγής σε όλη την διάρκεια της ζωής τους. Η τοποθεσία των κύριων συμπτωμάτων στο μεγάλο έντερο, υποβάλλει ένα σημείο, ανάμεσα στην τοπική μικροβιακή χλωρίδα, και την ασθένεια. Ζωικά μοντέλα θεωρούν, πως η φυσιολογική μικροβιακή χλωρίδα είναι απαραίτητη για να προκύψει ασθένεια όμως κανένας αιτιολογικός παράγοντας δεν αναγνωρίζεται ακόμη. Μια υπόθεση είναι, πως η ελκώδης κολίτιδα προκύπτει λόγω τμηματικής κατάρρευσης ανοχής στην συμβιωτική αποικιακή χλωρίδα (Macpherson et al., 1996). Πολλά παθογόνα έχουν ενοχοποιηθεί σαν παράγοντες αυτής της ασθένειας: *Escherichia coli* (Darfeuille-Michaud et al., 1998), βακτήρια που μειώνουν το θειικό άλας (Gibson et al., 1991), μυκοβακτήρια, ψευδομονάδες και είδη ελικοβακτηριδίων. Ο έλεγχος της ασθένειας, περιλαμβάνει βαριά αντιφλεγμονώδη φαρμακευτική αγωγή ή χειρουργική επέμβαση. Η χρήση των αντιβιοτικών είναι συχνά μη συνεπής. Ο χειρισμός της διατροφής σχετικά με την κολίτιδα, έδειξε μια βελτίωση τουλάχιστον στην διατήρηση των περιόδων απαλλαγής. Απρογραμμάτιστες κλινικές δοκιμές, έχουν επιβεβαιώσει πως η χρήση των προβιοτικών και των πρεβιοτικών μπορεί να είναι αποτελεσματική σε αυτή την παθολογία με το να παρατείνεται η μικροβιακή σύνθεση της περιοχής

απαλλαγής (Πίνακας 4.1). Οι μηχανισμοί δράσης των προβιοτικών και των πρεβιοτικών στην ελκώδη κολίτιδα, φαίνεται να είναι πολλαπλοί και πολύπλοκοι. Έρευνες σχετικά με προβιοτικά που αφορούν ζωικά μοντέλα με ελκώδη κολίτιδα, έχουν δείξει μια προβιοτική αλληλεπίδραση με τα colonoocytes, τα οποία οδηγούν σε μία πιθανή χαμηλή ρύθμιση της φλεγμονώδους αντίδρασης (Steidler et al., 2000). Τα πρεβιοτικά όπως το αναπτυσσόμενο κριθάρι είναι ένας εύκολος και επαρκής τρόπος διέγερσης της παραγωγής του βουτυρικού οξέος στην πλευρά της κολίτιδας. Το βουτυρικό οξύ παράγεται από την ζύμωση των αναπτυσσόμενων κριθαριών προωθεί τον πολλαπλασιασμό των colonoocytes, και αποκαθιστά την ακεραιότητα της εντερικής βλέννας των ζωικών μοντέλων λόγω της κολίτιδας (Kanauchi et al., 2001).

Πίνακας 4.1: Τυχαιοποιημένες κλινικές δοκιμές οι οποίες ελέγχουν την αποτελεσματικότητα των προβιοτικών και πρεβιοτικών παραγόντων σε ασθενείς οι οποίοι υποφέρουν από Ελκώδη Κολίτιδα.

Προβιοτική Θεραπεία	Τύποι δοκιμών	Υπολογιζόμενη αντίδραση	Παραπομπές
Προβιοτικό συμπλήρωμα VSL#3 <i>L.plantarum</i> , <i>B.breve</i> , <i>B.infantis</i> , <i>B.longum</i> , <i>S.thermophilus</i> <i>E.coli</i> (Nissle 1917)	Δοκιμή σίτισης Ελεγχόμενη δοκιμή ψυχοφαρμάκου	<ul style="list-style-type: none"> • Μακρόχρονη διατηρησιμότητα της υποχώρησης της κολίτιδας. • Αύξηση των κοπρανωδών αριθμών των <i>Bifidobacteria</i> και <i>Lactobacilli</i>. 	Gionchetti, 2003 Rembacken et al., 1999
<i>L.GG</i>	Δοκιμή σίτισης	Αύξηση της ανοσολογικής αντίδρασης	Malin et al., 1996
Αναπτυσσόμενο απόξεμα τροφίμων	Ελεγχόμενη δοκιμή ψυχοφαρμάκου	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Αύξηση της μικρής αλυσίδας παραγωγής λιπαρών οξέων ❖ Αύξηση των κοπρανωδών αριθμών των <i>Bifidobacteria</i> ❖ Διατήρηση της υποχώρησης κολίτιδας 	Bamba et al., 2002
Ίνα σιταριού και ισκάγκουλας	Μακροχρόνια διπλή τυφλή μελέτη σίτισης	Κανένα αποτέλεσμα θεραπείας σε κοπρανώδους αριθμούς των <i>Bifidobacteria</i> και των <i>Lactobacilli</i>	Edjerhamm et al., 1991

4.2.3 Καρκίνος του Παχέος εντέρου

Η ανθρώπινη μικροβιακή χλωρίδα, αποτελεί έναν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του καρκίνου του παχέος εντέρου. Τα μικροβιακά ένζυμα, τα οποία εκφράστηκαν από τα βακτήρια του *clostridium* και της ομάδας *Bacteroides*, είναι ικανά να μετατρέψουν τα διαιτητικά συστατικά στοιχεία σε γονοτοξικές (genotoxic) ή καρκινογόνες ενώσεις (Πίνακας 4.2). Τα προβιοτικά, θεωρούνται πως ενεργούν σαν προληπτικοί παράγοντες της καρκινογένεσης, με το να αναστέλλουν την δραστηριότητα αυτών των ενζύμων. Οι περισσότερες αποδείξεις των πειραμάτων *in vivo* βασίζονται σε ζωικά μοντέλα (Tuohy et al., 2003). Τρωκτικά τα οποία τράφηκαν με συμπληρώματα πολλών προβιοτικών στελεχών *Lactobacillus spp* και *Bifidobacterium spp*, είχαν λιγότερες ζημιές στο DNA και λιγότερα νεοπλάσματα από τις ομόλογες ομάδες οι οποίες τράφηκαν με ψυχοφάρμακα (Pool-Zobel et al., 1996). Μια επιδημιολογική έρευνα, ανέφερε έναν αρνητικό συσχετισμό ανάμεσα στην κατανάλωση των γαλακτοκομικών προβιοτικών και αποικιακών αδενωμάτων (Burns and Rowland, 2000). Προβιοτική επίδραση, είναι πιθανόν να συμβαίνει σε μια μακρά χρονική στιγμή. Αποτελέσματα προοπτικών ερευνών που να ερευνούν την μεγαλύτερη επίδραση των προβιοτικών εναντίον του καρκίνου του παχέος εντέρου, δεν υπάρχουν. Πρεβιοτικά όπως η ινουλίνη, φρουκτοολιγосακχαρίτες, λακτουλόζη, και γαλακτοολιγосακχαρίτες, έχουν δείξει αποτελεσματική προστασία στον καρκίνο του παχέος εντέρου σε ζωικά μοντέλα. Αποτελέσματα ανθρώπινων δοκιμών σίτισης, παρόλα αυτά είναι λιγότερο συνεπή(αμετάβλητα). Παράλληλα, τα ψυχοφάρμακα τα οποία έλεγχαν την μελέτη 20 εθελοντών, την χορήγηση λακτουλόζης στην μισή δόση (10g/μέρα) δεν επηρέαζαν σημαντικά το επίπεδο της κοπρανώδους γονιδιοτοξικότητας (Tuohy et al., 2002). Η παραγωγή βουτυρικού οξέος, ένας ισχυρός ρυθμιστής των επιθηλιακών κυττάρων είναι ένας από τους μηχανισμούς, οι οποίοι υπόκεινται σε προληπτικές επιδράσεις των προβιοτικών. Ένας συμβιωτικός μηχανισμός ο οποίος περιέχει *L. rhamnosus*, *B. bifidum* Bb12 και φρουκτοολιγосακχαρίτες έχει δείξει ενθαρρυντικά αποτελέσματα *in vitro* και σε ζωικά μοντέλα (Van Loo and Jonkers, 2001). Το συμβιωτικό έχει ελεγχθεί πρόσφατα σε μια τυχαίοποιημένη δοκιμή περιλαμβάνοντας ασθενείς που έχουν προσβληθεί με καρκίνο του παχέος εντέρου και άτομα μεμονωμένα σε υψηλό ρίσκο να αναπτύξουν καρκίνο του παχέος εντέρου (Synscan project).

Πίνακας 4.2:

Βακτηριακά ένζυμα τα οποία σχετίζονται με την παραγωγή καρκινογόνων ενώσεων.

Παραδείγματα ενζύμων που περιλαμβάνουν την ανάπτυξη του καρκίνου του παχέος εντέρου:
B-γλουκουρονιδάση
B- γλυκοσιδάση
Αζορεδουκτάση
Νιτρορεδουκτάση
ΙΟ Υδράση-Αφυδρογονάση
Νιτρικό/νιτρική ρεδουκτάση

4.2.4 Ευερέθιστο Εντερικό Σύνδρομο (Irritable bowel syndrome, IBS)

Το ευερέθιστο εντερικό σύνδρομο, καθορίζεται από μια ποικιλία συμπτωμάτων περιλαμβάνοντας κοιλιακό πόνο, αέρια (εντέρων), δυσπεψία, και διάρροια (Mercenier et al., 2003). Αντίθετα από το IBD (irritable bowel disease), το IBS (Ευερέθιστο Εντερικό Σύνδρομο irritable bowel syndrome), χαρακτηρίζεται από την απουσία εντερικής φλεγμονής ή παθολογία της εντερικής βλέννας. Το χρονικό στάδιο, προκύπτει ύστερα από γαστρεντερίτιδα ή από μια προετοιμασία με αντιβιοτικά. Οι γυναίκες από τις δυτικές χώρες είναι οι κύριες ομάδες που υποφέρουν από το σύνδρομο αυτό. Η επαναλαμβανόμενη αποικία των ζυμών από το βακτήριο *Candida albicans* και μια χαμηλή εξάπλωση των *Lactobacilli* και *Bifidobacteria* έχει παρατηρηθεί σε άτομα που υποφέρουν από το Ευερέθιστο Εντερικό Σύνδρομο (Smejkal et al., 2003). Τα προβιοτικά μπορεί να βοηθούν στην ανακούφιση ή εξάλειψη του συνδρόμου όμως η επίδραση είναι δύσκολο να υπολογιστεί in vivo. Τα βακτήρια *L. plantarum*299v, *L. GG* και *VSL#3* (είχαν εξεταστεί σε ξεχωριστές τυχαίες ελεγχόμενες από ψυχοφάρμακα δοκιμές, και αποτελέσματα τα οποία έδειξαν περιορισμένες επιδράσεις στο Ευερέθιστο Εντερικό Σύνδρομο (IBS, irritable bowel syndrome), (Kim et al., 2003; O'Sullivan and O'Morain, 2000). Η ανάπτυξη ενός συμβιωτικού προϊόντος μπορεί να είναι μια πιο ικανοποιητική στρατηγική στην διαχείριση του Ευερέθιστου Συνδρόμου Εντέρου, αφού επιτρέπει μια διπλή δράση στην κινητικότητα του εντέρου και την σύνθεση της εντερικής μικροβιακής χλωρίδας (Smejkal et al., 2003).

4.3 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Τα προβιοτικά, πρεβιοτικά, και συμβιωτικά προσφέρουν σημαντικές ευκαιρίες για την μείωση της επίδρασης ασθενειών που σχετίζονται με τρόφιμα. Μια καλή μορφή των αποδείξεων *in vivo* και *in vitro* υπάρχει τώρα. Ένας αυξανόμενος αριθμός καλά σχεδιασμένων κλινικών δοκιμών έχει επισημάνει θετική εξέλιξη εναντίον συγκεκριμένων καταστάσεων των ασθενειών. Όσο ο αριθμός των προβιοτικών, πρεβιοτικών, και συμβιωτικών υποψηφίων αυξάνεται, διεθνείς συντονισμένες δράσεις έχουν παρθεί, ώστε να εκθέσουν την αποτελεσματικότητά τους, να ανεβάσουν τα βιομηχανικά στάνταρ, και να ρυθμίσουν την χρήση τους στην καταναλωτική αγορά. Η χορήγηση των νέων αναπτυσσόμενων μοριακών τεχνικών στο πεδίο και την ανάπτυξη των φυσιολογικών βιοεπισημαντών, ανοίγει τους ορίζοντες εξέτασης για νέα προβιοτικά στελέχη και για την βελτίωση των στοχευόμενων πλευρών στο έντερο. Τα πολλαπλής λειτουργίας πρεβιοτικά, σχεδιασμένα με συγκεκριμένες αντί-προσκολλητικές ιδιότητες, μπορεί να αναστέλλουν το «δέσιμο» των ειδικευμένων παθογόνων στην εντερική βλέννα επιτρέποντας μια αυξανόμενη αντίδραση στην μόλυνση. Τα προβιοτικά που είναι σχεδιασμένα να κουβαλούν ειδικά ανοσοενισχυτικά μόρια, μπορεί να χρησιμοποιηθούν ως ξενιστές εμβολίων ή ως ρυθμιστές της ανοσολογικής αντίδρασης. Παρόλα αυτά, σε πολλές διαταραχές και ασθένειες, ο τρόπος δράσης των προβιοτικών και των πρεβιοτικών είναι ακόμη υποθετικός και υπό εξερεύνηση. Οι μελλοντικές έρευνες, θα χρειαστεί να αποδείξουν την αλληλεπίδραση ανάμεσα στα κύτταρα του ξενιστή και τους προβιοτικούς και πρεβιοτικούς παράγοντες. Η ταυτοποίηση των βακτηριακών μεταβολιτών, περιοχές υποδοχέων κυττάρων και γονίδια που ενεργοποιήθηκαν από τους προβιοτικούς και πρεβιοτικούς παράγοντες, θα παρέχουν μια ισχυρή βάση να εξακριβώσουν την ιδιαιτερότητα της δράσης και την αποτελεσματικότητά *in vivo*. Οι μακροχρόνιες και μεγάλης κλίμακας ανθρώπινες έρευνες που εξετάζουν τις μοριακές και κλινικές παραμέτρους θα έπρεπε να αναλάβουν να καθορίσουν την σχέση ανάμεσα στην διατήρηση μιας ευεργετικής μικροβιακής χλωρίδας και της υγείας του ανθρώπου.

4.4 ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΙΚΟΥ ΣΩΛΗΝΑ

Αυξανόμενοι μικροβιακοί πληθυσμοί έχουν βρεθεί στο γαστρεντερικό σύστημα, προερχόμενοι από ποικίλους αριθμούς βακτηρίων που σχετίζονται με τρόφιμα στον

οισοφάγο από 10^1 – σε 10^3 /ml (ή gr) στο στομάχι, 10^7 /ml στην νήστις (αποτελούμενο κυρίως από γαλακτοβακίλλους *Enterobacteriaceae* και *Streptococci*, 10^9 CFU/gr στον τελευταίο ειλεό, και ca. 5×10^{11} /gr στο ακραίο τμήμα του παχέος εντέρου. Πολλά μικρόβια που απομονώθηκαν από το δωδεκαδάχτυλο και την νήστις, θεωρούνται προσωρινά, και συγκεκριμένα την γρήγορη ροή γαστρικού χυμού: ενδογενής δημιουργία αποικιών είναι παρόλα αυτά πιθανό να προκύψει στα χαμηλότερα σημεία του ειλεού. Ο συνολικά εκτιμώμενος πληθυσμός των 10^{14} ζωτικών βακτηρίων στο γαστρεντερικό σύστημα των ενήλικων ανθρώπων, αντιπροσωπεύει περίπου 10 φορές περισσότερο από ότι όλα τα κύτταρα ιστού σωμάτων. Γι αυτό, ο μικροβιακός πληθυσμός αντιπροσωπεύει ένα τεράστιο μεταβολικό δυναμικό το οποίο όχι μόνο βοηθά στις διαδικασίες πέψης αλλά επίσης αλληλεπιδρά στην διαδικασία αποτοξίνωσης και την διαδικασία τοξίνωσης και κυρίως αποτελεί το κύριο τμήμα του ανθρώπινου ανοσοποιητικού συστήματος. Τα *Bacteroides* και τα Gram θετικά, τα γενικά αναερόβια *Eubacterium* και *Bifidobacterium* επικρατούν στο πυκνοκατοικημένο μεγάλο έντερο. Άλλες ομάδες όπως τα *Clostridia*, *Peptostreptococci*, *Streptococci*, και *Lactobacilli* επίσης παίζουν ένα σημαντικό ρόλο, π.χ. στην διατήρηση μιας σταθερής βλέννας στο έντερο και στην γενιά των SCFAs σε μια αποδοτική αναλογία. Ο ρόλος των γαλακτοβακίλλων μπορεί να είναι σημαντικός στα μικρά έντερα όπου αποτελούν μια υψηλότερη αναλογία του συνολικού πληθυσμού. Στους υγιείς ανθρώπους, οι γαλακτοβάκιλλοι είναι συνήθως παρόντες στην στοματική κοιλότητα (10^3 μέχρι 10^4 CFU/g), ο ειλεός (10^3 μέχρι 10^7 CFU/g), και στο παχύ έντερο (10^4 μέχρι 10^8 CFU/g) και είναι οι επικρατέστεροι μικροοργανισμοί στον κόλπο.

4.5 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Αναρίθμητες ευεργετικές λειτουργίες έχουν αναφερθεί για τα προβιοτικά βακτήρια:

- θρεπτικές ιδιότητες: 1) παραγωγή βιταμινών, διαθεσιμότητα μεταλλικών στοιχείων και ιχνοστοιχείων. 2) παραγωγή σημαντικών πεπτικών ενζύμων (π.χ. β-γαλακτοσιδάση). 3) παραγωγή της β-γαλακτοσιδάσης για εξάλειψη της δυσανεξίας στην λακτόζη.
- Φράγμα, αποκατάσταση, ανταγωνιστικές επιδράσεις εναντίον: 1) της μολυσματικής διάρροιας (διάρροια του ταξιδιώτη, οξεία ιογενής διάρροια των

παιδιών). 2) διάρροια σχετιζόμενη με τα αντιβιοτικά, και 3) διάρροια που σχετίζεται με την ακτινοβολία.

- Αποτελέσματα μείωσης της χοληστερόλης από: 1) αφομοίωση της χοληστερόλης, 2) τροποποίηση των υδρολυτικών δραστηριοτήτων του χολικού άλατος, 3) αντιοξειδωτικά αποτελέσματα.
- Διέγερση και βελτίωση του ανοσοποιητικού συστήματος, π.χ: 1) ενδυνάμωση της μη ειδικευμένης αντίστασης εναντίον της μόλυνσης, 2) αύξηση της φαγοκυτταρικής δραστηριότητας των λευκοκυττάρων, 3) αύξηση της παραγωγής αυξίνης, 4) ρύθμιση της Th1/Th2 ισορροπίας: πρόκληση της σύνθεσης κυτοκινών.
- Ενίσχυση της κινητικότητας του εντέρου, ανακούφιση από την δυσκοιλιότητα
- Μείωση των φλεγμονωδών ή αλλεργικών αντιδράσεων από: 1) αποκατάσταση της ομοιόστασης του ανοσοποιητικού συστήματος, 2) ρύθμιση της σύνθεσης κυτοκίνης.
- Προσκόλληση και αντίσταση στην δημιουργία αποικιών
- Αντικαρκινικές ιδιότητες στο παχύ έντερο από: 1) δέσιμο μεταλλαξιογόνου, 2) απενεργοποίηση των καρκινογόνων ή προκαρκινογόνων, ή πρόληψη της μορφής τους. 3) τροποποίηση των μεταβολικών δραστηριοτήτων των αποικιακών μικροβίων, 4) ανοσολογική απάντηση
- Διατήρηση της βλενώδους ακεραιότητας
- Αντιοξειδωτικές δραστηριότητες

Επιδράσεις όπως, η μείωση του επιπέδου ορρού χοληστερόλης, δεν έχουν τεκμηριωθεί πλήρως από ελεγχόμενο ψυχοφάρμακο, διπλές τυφλές, τυχαιοποιημένες κλινικές δοκιμές. Από την άλλη μεριά, επιδράσεις ειδικευμένων στελεχών των προβιοτικών γαλακτικών καλλιεργειών στο ανθρώπινο ανοσοποιητικό σύστημα και στην διάρροια είναι καλά τεκμηριωμένα, π.χ. για αλληλεπιδρώντες *rotavirus* ιούς ή διάρροια σχετιζόμενη με αντιβιοτικά με την χορήγηση στελεχών, όπως του *L.GG* στέλεχος του *L. rhamnosus*, και το στέλεχος *Shirota* του *L. Case* (*L. paracasei*). Θεραπευτική χρήση θεωρείται επίσης αποτελεσματική σε περιπτώσεις δυσανεξίας στην λακτόζη, Ευερέθιστο Εντερικό Σύνδρομο, καρκίνο του παχέος εντέρου, και προσβολή με το στέλεχος *Helicobacter pylori*. Πολύπλοκοι μηχανισμοί, όπως προσκολλητικές και ανοσοτροποποιητικές ιδιότητες των επιδρώντων στελεχών, είναι κύριες προκλήσεις οι οποίες πρέπει να λυθούν με εντατικές έρευνες. Προφανώς τα

προσκολλούντα προβιοτικά στελέχη μπορεί να αποικούν στον Γαστρεντερικό Σωλήνα, και γι αυτό να προκαλούν μια αύξηση στα επίπεδα αυξινών, έχοντας σαν αποτέλεσμα την ενίσχυση αντίδρασης του ορρού της αυξίνης στα παθογόνα όπως στο *Salmonella typhi*. Τέλος τα προβιοτικά θεωρούνται καινοτόμα εργαλεία για την εξάλειψη εντερικής φλεγμονής, να φέρουν σε φυσιολογικά επίπεδα την δυσλειτουργία της βλέννας του εντέρου, και να ρυθμίσουν την υπερευαισθησία.

4.6 ΕΝΤΕΡΙΚΗ ΧΛΩΡΙΔΑ, ΣΗΜΑΝΤΙΚΟ ΟΡΓΑΝΟ ΣΤΗΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑ

Ο ρόλος της εντερικής μικροβιακής χλωρίδας στην πέψη και στην απελευθέρωση των θρεπτικών στοιχείων:

Η εντερική χλωρίδα του ανθρώπου συνθέτεται από περίπου 10^{14} βακτηριακά κύτταρα 7, από τα οποία ανήκουν σε εκατοντάδες διαφορετικά είδη- τα περισσότερα από αυτά είναι πιθανώς ακόμη άγνωστα. Η μεταβολική δραστηριότητα της χλωρίδας είναι τόσο ποικιλόμορφη, όσο η χλωρίδα η ίδια. Τα βακτήρια μπορούν να ζυμώνουν ποικίλες ουσίες που ο ξενιστής δεν είναι ικανός να χωνέψει μόνος του (π.χ. πρεβιοτικά. Τα βακτήρια και τα προϊόντα ζύμωσης τους, επηρεάζουν την ανατομία, φυσιολογία, και ανοσολογία του ξενιστή (Gmeimer, et al., 2000). Ευεργετικές μεταβολικές δραστηριότητες των βακτηρίων του εντερικού συστήματος περιλαμβάνουν την σύνθεση των βιταμινών **B** και **K**, παραγωγή των λιπαρών οξέων της μικρής αλυσίδας (short- chain fatty acids, SCFAs) τα οποία αποτελούν πηγή ενέργειας των ιστών του ξενιστή (π.χ. βουτυρικό οξύ είναι μια προτιμώμενη ενεργειακή πηγή του εντερικού επιθηλίου), και μετατροπή των διαιτητικών καρκινογόνων σε μη ενεργές ενώσεις, και μετατροπή των προφαρμάκων (prodrugs) σε ενεργά φάρμακα (Shanahan et al., 2002).

4.7 ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗ ΣΕ ΕΝΤΕΡΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Είναι φανερό, ότι έχει δοθεί αρκετή έμφαση στην ικανότητα των προβιοτικών βακτηρίων να προσκολλούν στις διαθέσιμες γραμμές κυττάρων του ανθρώπου, όταν δεν υπάρχει κανένα αποδεικτικό στοιχείο, που να δείχνει πως, πράγματι προσκολλούνται σε κύτταρα *in vivo*. Ηλεκτρονικές μικρογραφίες, δείχνουν πως βακτήρια που προσκολλούν σε εντερικά κύτταρα μπορεί να καθοδηγούν σε λάθος κατεύθυνση, αφού η μεθοδολογία που χρησιμοποιείται για αυτή τη τεχνική,

αφυδατώνει το στρώμα της βλεννίνης. Τα βακτήρια στο στρώμα της βλεννίνης θα φαίνεται να συνδέονται στα επιθηλιακά κύτταρα σε ηλεκτρονικές μικρογραφίες. Παρόλα αυτά, οικολογικά στοιχεία από άλλους οργανισμούς του περιβάλλοντος, θα πρότειναν πως, για να επιβιώσουν και να ανταγωνίζονται με επιτυχία σε φυσικό οικοσύστημα, όπως το ανθρώπινο έντερο το οποίο είναι σε συνεχή αλληλουχία αλλαγών, ένα βακτήριο πρέπει να είναι ικανό να συνδέεται σε διαθέσιμες πλευρές σύνδεσης στο έντερο. Έρευνες έχουν δείξει, πως τα προβιοτικά βακτήρια μπορούν να συνδέονται με την βλενίνη, οπότε είναι εφικτό πως αυτό μπορεί να είναι επαρκές για την στήριξη των ειδών. Παρόλα αυτά πολλή έμφαση δεν θα έπρεπε να δίνεται στην σύνδεση των κυττάρων, μέχρι να αποδειχτεί πως η σύνδεση στα εντερικά κύτταρα εκτός από αυτή της βλεννίνης είναι σημαντική για την δημιουργία αποικιών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ΣΥΜΒΙΩΤΙΚΑ

Καθορισμός της έννοιας συμβιωτικά

Συμβιωτικά, ορίζονται τα μείγματα των προβιοτικών και πρεβιοτικών, τα οποία αποδεικνύουν την επιβίωση και εμφύτευση των ζωντανών μικροβιακών διαιτητικών συμπληρωμάτων στο ανώτερο εντερικό σύστημα, ή ευνοώντας την ανάπτυξη, ή ενεργοποιώντας μεταβολικά τα βακτήρια που είναι προωθητικά για την υγεία (θετικά) (Gibson and Robertfroid 1995, Lewis and Freeman 1998). Το τελικό αποτέλεσμα, θα έπρεπε να αποδεικνύει την επιβίωση των προβιοτικών στο οποίο έχει διαθέσιμο και συγκεκριμένο υπόστρωμα για την ζύμωση του, και επίσης οι αυξανόμενοι αριθμοί βακτηρίων φτάνουν και αποικούν στο παχύ έντερο, όπως επίσης και τα ατομικά πλεονεκτήματα που τα προβιοτικά μπορούν να προσφέρουν. Το συμβιωτικό έχει σαν στόχο, την διέγερση της ανάπτυξης /και την δραστηριότητα των ενδογενών *Bifidobacteria* και *Lactobacilli* με την χρήση των κατάλληλων υδατανθράκων σε συνδυασμό με το προβιοτικό στέλεχος. Τα πρεβιοτικά, ενισχύουν την ανάπτυξη των προβιοτικών στελεχών και των στοχευόμενων «πρόσσιτων οργανισμών».

5.1 ΕΙΔΗ *Bifidobacterium*

Τα είδη *Bifidobacterium*, είναι αναερόβια Gram+βακτήρια που παράγουν γαλακτικό και οξικό οξύ, και είναι ραβδοειδούς μορφής ή διακλαδιζόμενης ραβδοειδούς μορφής. Είναι παρόντα στην φυσιολογική χλωρίδα όμως είναι τα επικρατέστερα μέλη της εντερικής χλωρίδας των παιδιών που θηλάζονται με μητρικό γάλα. Τα *Bifidobacterium sp.* αναπτύσσονται καλά στο γάλα και υπάρχει ένα μεγάλο ενδιαφέρον στα *Bifidobacteria* που περιέχουν προβιοτικά στην μορφή των ζυμωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων. Σε 6 εθελοντές, χορηγήθηκε μια μονή δόση γάλακτος το οποίο περιείχε βακτήρια ή ήπιαν στείρο γάλα σε τυχαία σειρά. Συνολική ανάρρωση στον ειλέο, παρατηρήθηκε από την δόση με *L. acidophilus*, και *Bifidobacterium sp* που ήταν μεταξύ 1.5 και 37.5%. Συμπεράθηκε, ότι το *Bifidobacterium sp* δεν δημιουργεί αποικίες στο παχύ έντερο. Επίσης, συμπεράθηκε ότι, το μεγαλύτερο μέρος της καταστροφής του προβιοτικού, έγινε στο ανώτερο μέρος του γαστρεντερικού συστήματος. Οι Marteau et al., ανακάλυψαν, ότι το

Bifidobacterium animalis μείωνε τον χρόνο μετάβασης αποικιών στο παχύ έντερο στις υγιείς γυναίκες. Πολλά είδη *Bifidobacterium*, έχουν δείξει να προσκολλούν και να εκτοπίζουν επιλεγμένα παθογόνα από εντερικά κύτταρα *in vitro*. Αν και δεν υπάρχουν αποδεικτικά στοιχεία πολλαπλασιασμού των χορηγούμενων ειδών *Bifidobacteria*, αυτά τα προβιοτικά, έχουν ικανότητα να επιβιώνουν στο πέρασμα διαμέσου του γαστρεντερικού και μπορεί να επηρεάζουν θετικά τις εντερικές λειτουργίες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ, ΠΡΕΒΙΟΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΣΥΜΒΙΩΤΙΚΩΝ

Το να έχει ένα αποτέλεσμα που να οδηγεί σε ασθένεια ένα πιθανό παθογόνο, θα πρέπει να ξεπεράσει μια σειρά από εμπόδια. Το πρώτο εμπόδιο, αποτελείται από την προσκόλληση στο επιθήλιο του εντέρου του ξενιστή. Αυτό το πρώτο βήμα είναι πολύ σημαντικό, αλλιώς το παθογόνο ρέει εκτός του υγρού στην εντερική κοιλότητα και στον περιλτατισμό του εντέρου. (Lu and Walker 2001, Reid et al., 2001). Αφού προδεθεί το παθογόνο, μπορεί να ξεκινήσει να αναδιπλασιάζεται, και να δημιουργεί αποικίες στην επιφάνεια του επιθηλίου. Γιαυτό, πρέπει να αντισταθεί στις περιβαλλοντικές συνθήκες του εντέρου που παρήχθησαν από τον ξενιστή, το οποίο θα αλληλεπιδράσει στην οδό του ανοσοποιητικού συστήματος, και από τα άλλα μικρόβια τα οποία παρουσιάζονται στο έντερο, μια αλληλεπίδραση επίσης, αναφέρεται σαν αντίσταση αποικιών (αποτέλεσμα φράγματος). Αυτό είναι το φαινόμενο κατά το οποίο τα μικρόβια που ήδη παρουσιάζονται στο οικοσύστημα μειώνουν τις ιδιότητες (ανταγωνιστικές και διαγωνιστικές), που προλαμβάνουν ή ελαττώνουν τον αναδιπλασιασμό των νέων στελεχών (Tannock, 1999). Τρίτον, το παθογόνο, πρέπει να προκαλέσει το παθογενικό αποτέλεσμα στο έντερο όπως, διακοπή των σφιχτών ενώσεων των επιθηλιακών κυττάρων με την παραγωγή εντεροτοξινών, διακοπή της υγρής και ηλεκτρολυτικής απορρόφησης με διάρροια, έχοντας σαν αποτέλεσμα την χλωριούχο έκκριση και την πρόκληση φλεγμονής στους μύκητες του γαστρεντερικού σωλήνα (Berkes et al., 2003). Τα προβιοτικά μπορούν να παρεμβαίνουν σε κάθε ένα από αυτά τα βήματα, και έτσι προλαμβάνουν την μόλυνση και την παθογένεια. Πρώτα από όλα, τα παθογόνα και τα προβιοτικά, πρέπει να συναγωνίζονται για τα διαθέσιμα θρεπτικά συστατικά στο σωλήνα του εντέρου (Fuller and Gibson, 1997). Παρόλα αυτά, δίνοντας το σύμπλεγμα στο περιβάλλον που είναι πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά αυτού του οικοσυστήματος, θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι αυτή δεν είναι πραγματικά η υπόθεση. Επιπλέον, προσκόλληση των παθογόνων στο επιθήλιο και την βλέννα, θα μπορούσε να ανασταλλεί όπως και η εισβολή τους στο επιθήλιο (Servin and Coconnier, 2003). Τα προβιοτικά, μπορούν να μπλοκάρουν την επήρεια των παθογόνων στα επιθηλιακά κύτταρα με την στερική ενυδάτωση (Chan et al., 1985, Lee and Puong, 2002), με ανταγωνισμό για πλευρές

κυττάρων ξενιστή (Neeser et al., 2000) ή αλλάζοντας την παραγωγή του μύκητα του εντέρου (Bourlioux 1997, Mattar et al., 2002, Mullie et al., 2002, Mack et al., 2003) καθώς και με έκκριση των αντιπροσκολλητικών μορίων (Velraeds et al., 1996, Fugiwara et al., 1997, 1999-2001b). Επίσης, μπορούν ευθέως να παρεμβαίνουν με την ανάπτυξη και ακόμη να θανατώνουν το εισβάλλον παθογόνο, με την παραγωγή αντιμικροβιακών ενώσεων (ενότητα 2.2). Όλες αυτές οι λειτουργικότητες, θα συνεισφέρουν στην αντίσταση της δημιουργίας αποικιών ή στην δημιουργία φραγμάτων (εμποδίων). Η αναστολή των ενώσεων, οι οποίες παράγονται από γαλακτοβακίλλους είναι το γαλακτικό οξύ και τα οξέα της κοίλης επιφάνειας, (οξικό και φορμικό οξύ) τα οποία θα μειώσουν το pH εντερικού σωλήνα. Η παραγωγή οργανικών οξέων και συγκεκριμένα του ακετυλικού και το γαλακτικού οξέος από τα *bifidobacteria*, φαίνεται να είναι ο βασικότερος μηχανισμός της ανταγωνιστικής δραστηριότητας εναντίον των παθογόνων βακτηρίων (Ibrahim and Bezkovenny 1993, Asahara et al., 2001 a b, Bruno and Shah 2002, Rokian et al., 2000, Fooks and Gibson 2000, Setoyama et al., 2003).

Το ανεσταλθέν αποτέλεσμα των οργανικών οξέων, συμβαίνει κυρίως λόγω των ασυσχέτιστων μορίων, που μειώνουν το pH του κυτοπλάσματος. Αυτό το αποτέλεσμα, οδηγεί σε καταστροφή του δυναμικού της μεταφορικής μεμβράνης του πρωτονίου, και την απώλεια της ενεργούς μεταφοράς των θρεπτικών στοιχείων μέσα από την μεμβράνη, έχοντας σαν αποτέλεσμα το θάνατο των κυττάρων. Άλλοι κύριοι μεταβολίτες που μπορούν να παρεμβαίνουν μαζί με την ανάπτυξη άλλων βακτηρίων και παθογόνων, είναι: το υπεροξειδίο του υδρογόνου, το διοξειδίο του άνθρακα, (CO₂) και η διακετυλίνη, και συγκεκριμένα αντιμικροβιακές ενώσεις όπως η ρεουτερίνη (reuterin), ρεουτερυκυκλίνη (reutericyclin), και βακτηριοκίνες (bacteriocins) (Vanderbeigh 1993, De Vuyst and Vandamme 1994). Η ικανότητα να συνθέτει βακτηριοκίνες, είναι ευρέως διαδεδομένη ανάμεσα στους γαλακτοβακίλλους και τον ανθρώπινο γαστρεντερικό σωλήνα (Toba et al., 1991, Hoh et al., 1995, Kawai et al., 2001). Σε αντίθεση, η μόνη βακτηριοκίνη που παράχθηκε από ένα στέλεχος *Bifidobacteria* το οποίο έχει χαρακτηριστεί και εξαγνιστεί, είναι η *bifidocin B* η οποία παράγεται από *B. bifidum* στέλεχος και είναι ενεργή εναντίον του παθογόνου *Listeria spp* αλλά όχι εναντίον μόνο των Gram αρνητικών βακτηρίων στα διεξαχθέντα τεστ (Yildirim and Johnson, 1998, Yildirim et al., 1999). Παρόλα αυτά, οι βακτηριοκίνες του *LAB* είναι ενεργές μόνο εναντίον των Gram θετικών βακτηρίων, και η συχνότητα των γαστρεντερικών μολυσματικών διαταραχών, η οποία

προκαλείται από Gram θετικά βακτήρια είναι σχετικά χαμηλή, συγκρινόμενη με εκείνη των γαστρεντερικών μολύνσεων, οι οποίες προκλήθηκαν από Gram αρνητικά βακτήρια, τα οποία είναι ανθεκτικά στις βακτηριοκίνες. Επιπλέον, δίνοντας τους την πεπτιδική φύση, είναι ακόμη άγνωστο αν οι βακτηριοκίνες θα μπορούσαν να έχουν μια σημαντική δραστηριότητα στο έντερο όπου παρασιτικές πρωτεάσες, και πρωτεάσες που παράγονται μικροβιακά, είναι ενεργές. Παρόλα αυτά, είναι λογικό να υποθέτουμε ότι ο ξενιστής μπορεί να ελέγχει την παραγωγή τέτοιων ουσιών, και ότι η λειτουργικότητα των βακτηριοκινών μπορεί να είναι περιορισμένη σε τοπικές γωνίες. Μόνο μια έρευνα αναφέρει την παρουσία της βακτηριοκίνης στα κόπρανα των ασηπτόβιων αρουραίων μόνο συσχετιζόμενων με ένα στέλεχος *Ruminococcus gurgus*, το οποίο απαντάται στον άνθρωπο αναστέλλοντας πολλά είδη *Clostridium*, περιλαμβάνοντας το *Clostridium perfringens* (Romane et al., 1993). Η βακτηριοκίνη, πιθανόν να χρειάζεται την διαδικασία της τρυψίνης, ή την πρόκληση, για ανάπτυξη της μικροβιακής τους δραστηριότητας (Ramare et al., 1993, Dabard et al., 2001, Gomez et al., 2002). Επίσης, άλλες αντιμικροβιακές ενώσεις συχνά αναφερόμενες σαν βακτηριοκίνες τύπου ενώσεις μπορούν να παραχθούν από το *LAB* (De Vuyst and Vandamme 1994). Μπορούν να προκαλούν ευθεία ανασταλτικά αποτελέσματα εναντίον Gram αρνητικών παθογόνων βακτηρίων, όπως *Campylobacter*, *Escherichia coli* και *Salmonella* (Silva et al., 1987, Gibson and Wang 1994, Coconnier et al., 1997, Lievin et al., 2000). Τα προβιοτικά, μπορούν επίσης να προλαμβάνουν ασθένειες, με το να παρεμβαίνουν στο ξεκίνημα της ασθένειας για παράδειγμα μέσα από την μείωση των τοξικών ιδιοτήτων των δηλητηρίων του υποστρώματος, και την διέγερση της ανοσίας του μύκητα. Για παράδειγμα, η προσκόλληση της τοξίνης μπορεί να ανασταλεί από *S. Boulardi* (Pothoulakis et al., 1993, Brandevo et al., 1998). Τα προβιοτικά, μπορούν να ενισχύουν την συγκεκριμένη απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος σε ένα παθογόνο, με την ρύθμιση του ανοσοποιητικού και την βελτίωση της αντίστασης του ξενιστή ενάντια στο παθογόνο (De Kwaard et al., 2001-2002, Shuet et al., 2000-2001, Shu and Gill 2001). Επιπλέον, οι γαλακτοβάκιλλοι μπορεί να ρυθμίσουν την φλεγμονή, με το να τροποποιούν τον ιστό έκκρισης κυτοκίνης, από ένα προφλεγμονώδες (π.χ έκκριση της ιντερλευκίνης 8 ή LL8 σε ένα αντιφλεγμονώδες προφίλ (π.χ. έκκριση ιντερλευκίνης 10 ή IL10, Madsen et al., 2001 Mercenier et al., 2003).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

ΣΤΑΘΕΡΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Τα προβιοτικά είτε όταν πωλούνται σαν ξηρές καλλιέργειες, είτε σαν πρόσθετα σε τροφές, πρέπει να έχουν μια επαρκή διάρκεια ζωής στο ράφι, ώστε να ικανοποιούν τις υψηλές απαιτήσεις του καταναλωτή, σε μεγάλες συγκεντρώσεις και σε μια ζωντανή κοινωνία. Τα λυοφιλικά ή κατεψυγμένα παρασκευάσματα των προβιοτικών, έχουν το πλεονέκτημα της μεγάλης διάρκειας ζωής στο ράφι και δεν χρειάζονται κατάψυξη. Τα ξηράς μορφής παρασκευάσματα καλλιιεργειών του στελέχους *L. acidophilus* NCFM βρέθηκαν να είναι ζωτικά μέχρι και 8 μήνες (Gibson et al., 1995). Σταθερότητα του ίδιου στελέχους σε γιαούρτια ή άλλες τροφές, είναι επίσης εξαιρετική, όμως ο μεταφορέας τροφίμου συνήθως υποβιβάζεται πριν το προβιοτικό χάσει σημαντικά την ζωτικότητα του.

7.1 ΠΡΟΛΗΨΗ ΑΣΘΕΝΕΙΩΝ

Τα προβιοτικά βακτήρια έχουν ένα σημαντικό αριθμό επιδράσεων θετικών στην υγεία του ανθρώπου. Οι πιθανές θετικές επιδράσεις στην υγεία, περιλαμβάνουν την διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος, τη μείωση των επιπέδων της χοληστερόλης στο αίμα, και μια πιθανή προφυλακτική δράση έναντι του καρκίνου. Επιπλέον, υπάρχουν πολλές θετικές επιδράσεις όσον αφορά την πρόληψη ασθενειών:

7.1.1 Αντιμετώπιση της διάρροιας

Έχει αποδειχτεί πέρα από κάθε αμφιβολία η επίδραση των προβιοτικών στην αντιμετώπιση της διάρροιας. Αυτό γίνεται με την επίδρασή τους στο ανοσοποιητικό σύστημα. Επίσης προφυλάσσουν από μολύνσεις, επειδή ανταγωνίζονται με τους παθογόνους μικροοργανισμούς για να καταλάβουν θέση μέσα στην γαστρεντερική οδό και τα επιθηλιακά κύτταρα (Perdigon et al., 1995, Duffy et al., 1994). Η κατανάλωση *Lactobacillus GG*, μείωσε την διαρροϊκή φάση κατά μέσο όρο από 3.5-2.5 μέρες σε νοσηλεύόμενα παιδιά. (Fuller, 1993-1989, Lee, et al., 1993, 1995, 1996.) ή σε παιδιά που νοσηλεύτηκαν στο σπίτι (Majamaa, et al., 1995). Παραπέρα, οι

Isolauri και συνεργάτες (Isolauri, et al., 1995) έδειξαν ότι η ανοσολογική αντίδραση στον εμβολιασμό από το στόμα με ζωντανό στέλεχος *rotavirus*, ήταν καλύτερη σε παιδιά που πήραν συμπλήρωμα *Lactobacillus GG* συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. Ένα άλλο στέλεχος το οποίο εξετάστηκε για τις θεραπευτικές του ιδιότητες για την οξεία διάρροια ήταν και ο *Enterococcus* SF68, ή *Enterococcus faecium* SF68 ή *Streptococcus faecium* SF68. Σε μία μελέτη (Wunderlich et al., 1989), ασθενείς με οξεία διάρροια πήραν με τυχαία σειρά *Enterococcus* SF68/d ($n = 40$) ή placebo ($n = 38$). Μετά από 1 μέρα, 5 ασθενείς στην πειραματική ομάδα θεραπεύτηκαν έναντι κανενός στην ομάδα αναφοράς. Η ανάλυση έδειξε ότι, οι νεαρότεροι ασθενείς στην πειραματική ομάδα θεραπεύτηκαν πιο γρήγορα από τους ασθενείς στην ομάδα αναφοράς. Παρόμοια μελέτη στο Μπαγκλαντές, απέτυχε να αποδείξει την θεραπευτική ικανότητα του στελέχους σε άτομα με διάρροια λόγω χολέρας ή *Escherichia coli* ή άλλες άγνωστες αιτίες. Δύο μελέτες πραγματοποιήθηκαν για να διαπιστωθεί η θεραπευτική δράση του *Lactobacillus GG* σε άτομα που είχαν προσβληθεί περιοδικά με *Clostridium difficile* (Tankanow et al., 1990; Witsell et al., 1995). Το αποτέλεσμα της μόλυνσης είναι σοβαρή διάρροια και κολίτιδα. Το συμπέρασμα και των δύο μελετών ήταν ότι ο *Lactobacillus GG* θεράπευσε τα άτομα από την μόλυνση. Αρκετά στελέχη του *L. acidophilus* δοκιμάστηκαν σαν προφυλακτικό μέσο έναντι της διάρροιας που προκαλείται από τα αντιβιοτικά σε 2 μελέτες σε ασθενείς (Tankanow et al., 1990, Witsell et al., 1995) και 1 μελέτη σε υγιείς εθελοντές (Du Pont, 1993). Καμία από τις μελέτες δεν κατέληξε σε κάποιο θετικό αποτέλεσμα.

7.1.2 Χοληστερόλη

Εργαστηριακές μελέτες, έχουν δείξει ότι τα προβιοτικά βακτήρια μειώνουν το ποσοστό της χοληστερόλης μέσα στο μέσο το οποίο καλλιεργούνται. (Gilliland et al., 1985-1989). Τα αποτελέσματα των μελετών είναι αντιφατικά. Κύρια έχει μελετηθεί ο *L. acidophilus*. Οι Lin και συνεργάτες (Lin et al., 1989) πραγματοποίησαν μία πιλοτική μελέτη σε 23 άτομα που πήραν προβιοτικό συμπλήρωμα και με 15 άτομα που δεν πήραν προβιοτικό συμπλήρωμα σαν ομάδα αναφοράς. Σε 7 εβδομάδες η συγκέντρωση της χοληστερίνης είχε μειωθεί στην πειραματική ομάδα από 5,5 σε 5,3 mmol/L ενώ στην ομάδα αναφοράς είχε παραμείνει σταθερή στα 4.9 mmol/L. Σε 16 εβδομάδες η συγκέντρωση της χοληστερίνης ήταν 5.4 mmol/L (Tahri et al., 1995).

7.1.3 Αντικαρκινική δράση

Πολλές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι σήμερα για τον ρόλο των προβιοτικών στην πρόληψη και την αντιμετώπιση του καρκίνου. Τα προβιοτικά μπορεί να αναστέλλουν την ανάπτυξη βακτηριδίων που μετατρέπουν προκαρκινογόνα συστατικά σε καρκινογόνες ουσίες. Το αποτέλεσμα της δράσης είναι η μείωση της συγκέντρωσης καρκινογόνων συστατικών στο έντερο. Σε μελέτη με 48 ασθενείς με καρκίνο στην ουροδόχο κύστη τους χορηγήθηκε συμπλήρωμα *L. casei*. Μετά από 1 χρόνο χορήγησης συμπληρώματος οι όγκοι είχαν επανεμφανιστεί στην ομάδα ελέγχου σε ποσοστό 83% (19 από τους 23) ενώ στην ομάδα που πήρε το συμπλήρωμα το ποσοστό ήταν 57% (12 από τους 21) (Aso et al., 1992). Παρόμοια μελέτη πραγματοποιήθηκε σε 125 ασθενείς. Αυτοί ταξινομήθηκαν ανάλογα με τον αριθμό επανεμφάνισης των όγκων. Συμπερασματικά βραχύχρονες μελέτες δείχνουν ότι η πρόσληψη γαλακτοβάκκιων μπορεί να μειώσουν την απορρόφηση μεταλλαξιογόνων συστατικών από την πεπτική οδό. Αν αυτό βοηθά στην αποφυγή ή την μείωση του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου είναι κάτι που απαιτεί παραπέρα διερεύνηση.

7.1.4 Προβιοτικά και φλεγμονές

Τα προβιοτικά μπορεί ακόμα να είναι χρήσιμα στη θεραπεία και την πρόληψη πολλών φλεγμονωδών παθήσεων της γαστρεντερικής οδού. Στελέχη του *Lactobacillus reuteri* και *Lactobacillus plantarum* χρησιμοποιήθηκαν για να προφυλάξουν φλεγμονώδεις αλλαγές σχετιζόμενες με εντεροκολίτιδα σε ποντικούς (Mao et al., 1996). Η χορήγηση γαλακτοβάκκιων προκάλεσε μείωση της συγκέντρωσης στο έντερο μυελοπεροξυδάσης, η οποία σχετίζεται με φλεγμονές. Παράλληλα δε μείωσε την τοποθέτηση εντερικών μικροοργανισμών σε εκτός εντέρου τοποθεσίες. Είναι επίσης γνωστό ότι τα προβιοτικά είναι χρήσιμα στην θεραπεία φλεγμονών που σχετίζονται με αυξημένη ανάπτυξη των βακτηριδίων που βρίσκονται στο έντερο.

7.1.5 Παθήσεις του αναπνευστικού

Πρώιμα δεδομένα αρχίζουν σιγά σιγά να φανερώνουν ένα νέο πεδίο δράσης των προβιοτικών. Ο Guarino (1998), περιέγραψε σε μελέτη του μια σημαντική μείωση της σοβαρότητας της πνευμονίας σε παιδιά με κυστική ίνωση στα οποία είχε χορηγηθεί

συμπλήρωμα *Lactobacillus* GG συγκρινόμενα με ομάδα ελέγχου. Οι Ribeiro και Vanderhoof (1998), also έδειξαν ότι η χρησιμοποίηση προβιοτικών από παιδιά σε παιδικό σταθμό μείωσε την συχνότητα εμφάνισης αναπνευστικών παθήσεων.

7.1.6 Διατροφή

Ο ρόλος της διατροφής σήμερα είναι διαφορετικός απ' ό τι ήταν στο παρελθόν. Η επιστήμη των λειτουργικών τροφίμων υπολογίζει την δυνατότητα ενίσχυσης των τροφών με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά έτσι ώστε να βελτιωθεί η υγεία του ανθρώπου και να μειωθεί ο κίνδυνός εμφάνισης διάφορων παθήσεων. Ένα από τα πρώτα ερωτήματα που πρέπει να απαντηθούν είναι ποιος είναι ο καταλληλότερος τρόπος χορήγησης. Η συνήθης μορφή είναι αυτή της κάψουλας ή της προσθήκης στα τρόφιμα. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι υπάρχει ικανοποιητική χορήγηση προβιοτικών με την προσθήκη στην τροφή (Alander et al., 1999), (Alander et al., 1997). Απαιτούνται όμως παραπέρα μελέτες που να δείχνουν την ποσότητα ή την σωστή αναλογία προσθήκης προβιοτικών στα τρόφιμα για να επιτευχθεί ο στόχος τους δηλαδή η προφυλακτική ή θεραπευτική τους δράση. Σαν κύριο μέσο πρόσληψης των προβιοτικών χρησιμοποιούνται τα γαλακτοκομικά προϊόντα. Νέα προϊόντα με τους ειδικούς αυτούς μικροοργανισμούς εμφανίζονται στην αγορά. Σε αρκετές επίσης περιπτώσεις χρησιμοποιούνται παραδοσιακές ονομασίες προϊόντων.

Οι προϋποθέσεις που πρέπει να εκπληρώνουν οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται ως καλλιέργειες από τις βιομηχανίες γάλακτος στην παρασκευή γαλακτοκομικών προϊόντων, είναι ότι οι ίδιοι πρέπει να είναι ασφαλείς, να μην παράγουν τοξικές ουσίες και να προσδίδουν στα προϊόντα επιθυμητά ποιοτικά χαρακτηριστικά. Στους προβιοτικούς μικροοργανισμούς έχουν περιληφθεί μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται εύκολα στο γάλα, όπως οι παραδοσιακοί μικροοργανισμοί του γιαουρτιού *Streptococcus thermophilus* και *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*) και άλλοι που αναπτύσσονται λιγότερο εύκολα (*L. acidophilus*) ή περισσότερο δύσκολα (*Bifidobacteria*).

7.2 ΑΠΟΔΕΙΞΗ ΤΗΣ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΤΩΝ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ

Μια μεγάλη ποσότητα χρημάτων και ενέργειας μπορεί να ξοδευτεί στην αξιολόγηση του κινδύνου κάθε προβιοτικού στελέχους. Ένα χαμηλό ρίσκο, μπορεί να είναι αποδεκτό, όμως ο κίνδυνος του ωφέλιμου ποσοστού πρέπει να εξεταστεί προσεκτικά. Αυτό απαιτεί πληροφορίες, που αφορούν την αποτελεσματικότητα και την ασφάλεια του προϊόντος. Όταν πρωτότυπα στελέχη και «γενικά» επιλέγονται για προβιοτική χρήση, οι πρόσφατες διαδικασίες αξιολόγησης ασφάλειας περιγράφηκαν στην Ευρώπη (Huggett and Conzelman, 1997). Τα *LAB* βακτήρια (Πίνακας 7.1) επιδεικνύουν φυσική και αντιβιοτική ευαισθησία αλλά και ανθεκτικότητα. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά, δεν είναι τύπος μεταδιδόμενος, αλλά αντιπροσωπεύει ένα φυσικό είδος ή γένος με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά του οργανισμού.

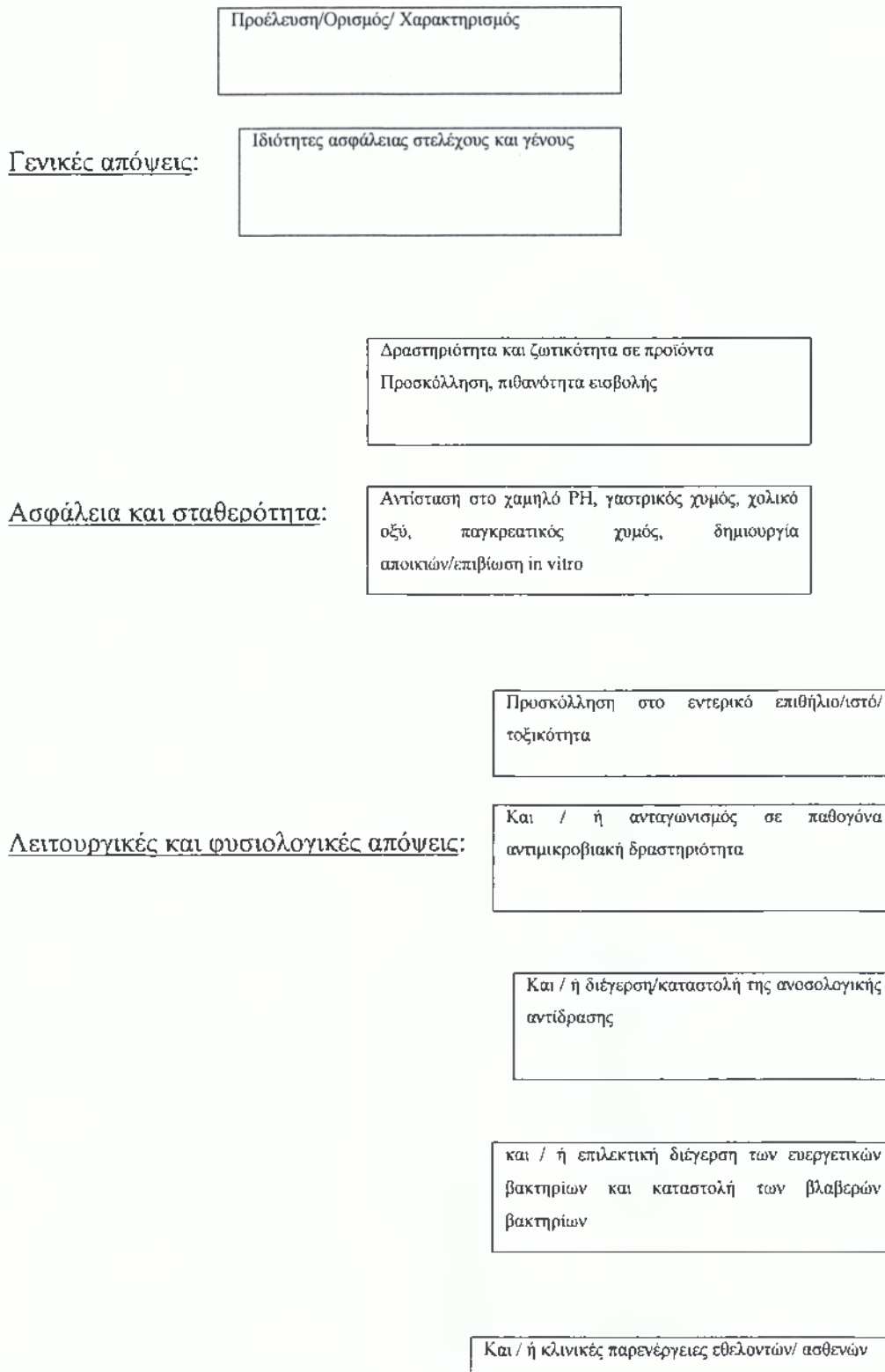
Πίνακας 7.1: Κατάταξη των προβιοτικών οργανισμών(Gasser, 1994; Donohue and Salminen, 1996a)

Οργανισμός	Πιθανότητα μόλυνσης (προσβολής)
<i>Lactobacillus</i>	Κυρίως μη παθογόνα, μερικές ευκαιριακές προσβολές(συνήθως σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς)
<i>Lactococcus</i>	Κυρίως μη παθογόνα
<i>Leuconostoc</i>	Κυρίως μη παθογόνα, μερικές απομονωμένες περιπτώσεις προσβολής
<i>Streptococcus</i>	Στοματικοί στρεπτόκοκκοι κυρίως μη παθογόνοι(περιλαμβάνοντας το είδος <i>S.themophilus</i>). μερικά μπορεί να προκαλέσουν ευκαιριακές μολύνσεις.
<i>Enterococcus</i>	Μερικά στελέχη είναι ευκαιριακά παθογόνα με αιμολυτική δραστηριότητα και ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά.
<i>Bifidobacterium</i>	Κυρίως μη παθογόνα, μερικές μεμονωμένες περιπτώσεις ανθρώπινης προσβολής
<i>Saccharomyces</i>	Κυρίως μη παθογόνα, μερικές απομονωμένες περιπτώσεις ανθρώπινης προσβολής.

Αυτές οι περιπτώσεις δεν αποτελούν καμία πιστοποίηση ασφάλειας (Σχήμα 7.2). Τα *LAB* βακτήρια (Πίνακας 7.2) και οι σχετιζόμενοι οργανισμοί (με εξαίρεση τους εντερόκοκκους, σπάνια σχετίζονται με μολύνσεις, και ακόμη σε μερικές περιπτώσεις υπάρχουν πολλά ασφαλή αντιβιοτικά διαθέσιμα σε αυτούς που είναι ευαίσθητοι. Αυτό περιλαμβάνει επίσης, και είδη και «γενικά», τα οποία είναι ανθεκτικά στην βακομυκίνη. Αν και τα πλασμίδια σχετίζονται με αντιβιοτικά τα οποία είναι ανθεκτικά, δεν είναι πολύ συνηθισμένα με το *LAB* και δεν προκύπτουν, ασφαλείς υπόνοιες για την ασφάλεια θα έπρεπε να ληφθούν υπόψη. Στελέχη τα οποία τρέφουν

τα πλασμίδια που είναι ανθεκτικά, δεν θα έπρεπε να χρησιμοποιηθούν είτε σαν προβιοτικά στους ανθρώπους είτε στα ζώα. Ελέγχοντας την ικανότητα ενός

Σχήμα 7.2: Κριτήρια επιλογής για προβιοτικά (Gasser, 1994; Donohue and Salminen, 1996a)



Πίνακας 7.2: Ασφαλείς έρευνες και αναφερόμενες επιδράσεις των πρόσφατων προβιοτικών στελεχών και γιαουρτιού-στελεχών(Alander et al., 1997; Donohue and Salminen, 1996b).

Προβιοτικό στέλεχος	Αναφερόμενη επίδραση	Ασφάλεια/ έρευνες in vitro/ ζωικές/ ανθρώπινες/ έρευνες
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NFCO 1748	Θεραπεία της δυσπεψίας, θεραπεία με ακτινοβολία, σχετιζόμενη με διάρροια, μείωση των ενζύμων στα κόπρανα	+
<i>Lactobacillus casei</i> Shirota	Σταθεροποίηση της εντερικής μικροβιακής χλωρίδας, πρόληψη των εντερικών ενοχλήσεων, θεραπεία του επιφανειακού καρκίνου ουροδόχου κύστης, μείωση των ενζύμων στα κόπρανα, ενίσχυση του ανοσοποιητικού, σταθεροποίηση της διαπερατότητας του εντέρου.	+
<i>Lactobacillus</i> GG (ACTT 53103)	Θεραπεία της σφοδρής ιογενούς και βακτηριακής διάρροιας σε παιδιά, πρόληψη της διάρροιας που οφείλεται σε αντιβιοτικά, ενίσχυση του ανοσοποιητικού, σταθεροποίηση της διαπερατότητας του εντέρου	+
<i>Lactobacillus acidophilus(johnsonii)</i> LC1	Ενίσχυση του ανοσοποιητικού, εμβόλιο, συντελεστής, σταθεροποίηση της εντερικής μικροβιακής χλωρίδας.	+
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Πρόληψη της διάρροιας προκαλούμενης από ρετροϊούς	+

προτεινόμενου προβιοτικού στελεχούς να δρα σαν δωρητής μιας συζυγούς αντιβιοτικής αντίστασης, τα γονίδια μπορεί να είναι μια συνετή προφύλαξη σε μερικές περιπτώσεις (και συγκεκριμένα στην περίπτωση της σίτισης των ζώων, όπου η χρήση των αντιβιοτικών σαν προωθητές ανάπτυξης προφανώς, δημιουργεί επιλεκτικό πλεονέκτημα για διάδοση των παραγόντων αντίστασης). Τα στελέχη εντεροκόκκων είναι φυσικοί επικρατούντες μικροοργανισμοί του γαστρεντερικού σωλήνα, και είναι παρόντες σε πολλές παραδοσιακά ζυμωμένες τροφές, χωρίς κανένα κίνδυνο. Παρόλα αυτά, η αδιάκριτη χρήση των αντιβιοτικών στην ιατρική και την κτηνιατρική, έχει δημιουργήσει μια κατάσταση όπου η διάδοση των ανθεκτικών πολυφαρμάκων από μεταφορείς εντεροκόκκων είναι πιθανή όπως διατυπώθηκε από τον Morelli et al., 1988. Η εντεροκοκκικά μεταδιδόμενη ανθεκτικότητα στην βακομυκίνη, θέτει ένα σημαντικό θέμα, και στην θεραπεία από προσβολές

εντερόκοκκων και στην περίπτωση όπου η αντίσταση μπορούσε να μεταφερθεί σε σταφυλόκοκκους ανθεκτικούς σε πολυφάρμακα. Παρόλα αυτά, κανένα στοιχείο σε κλινικές περιπτώσεις δεν έχει βρεθεί μέχρι τώρα. Είναι αυταπόδεικτο, πως κανένας εντερόκοκκος ο οποίος είναι ανθεκτικός στην βακομυκίνη, δεν θα έπρεπε να χρησιμοποιηθεί σαν προβιοτικό στους ανθρώπους ή σαν προβιοτικό στα ζώα. Τελικά θα έπρεπε να σημειωθεί, πως το ενδιαφέρον της μεταφερόμενης ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά είναι αποτέλεσμα ενός σημαντικότερου προβλήματος, το οποίο σχετίζεται γενικά με την κατάχρηση των αντιβιοτικών.

7.3 Προτάσεις σχετικά με την ασφάλεια των προβιοτικών καλλιεργειών για παραδοσιακά ή πρωτότυπα τρόφιμα:

Οι προτάσεις προσφέρουν ένα τρόπο αξιολόγησης τους και σιγουρεύουν την ασφάλεια των πρόσφατων προβιοτικών βακτηρίων: 1) Ο παραγωγός ο οποίος εμπορεύεται το προϊόν, φέρει την μεγαλύτερη ευθύνη για την προμήθεια ενός ασφαλούς τροφίμου. Οι προβιοτικές τροφές θα πρέπει να είναι τόσο ασφαλείς, όσο και οι άλλες τροφές. 2) όταν ένα προβιοτικό τρόφιμο αποδεικνύεται πως είναι κάτι πρωτότυπο θα αποτελέσει το θέμα της κατάλληλης νόμιμης έγκρισης (ΕΥ, επίσημη οδηγία για πρωτότυπα τρόφιμα). 3) όταν ένα στέλεχος έχει ένα μακρύ ιστορικό ασφαλούς χρήσης, θα είναι ασφαλές όσο ένα προβιοτικό στέλεχος και δεν θα αποτελεί πρωτότυπο τρόφιμο. 4) ο καλύτερος έλεγχος για την ασφάλεια τροφίμων είναι ένα καλά τεκμηριωμένο ιστορικό ασφαλούς χρήσης για ανθρώπινη κατανάλωση. Επιπλέον, όταν ένα στέλεχος ανήκει σε είδος όπου κανένα στέλεχος δεν είναι γνωστό για την παθογένεια τους και για τα οποία άλλα στελέχη έχουν περιγραφεί πως έχουν ένα μακρύ ιστορικό ασφαλούς χρήσης, είναι πιθανόν να είναι ασφαλές σαν ένα προβιοτικό στέλεχος και δεν θα έχει αποτέλεσμα σε ένα πρωτότυπο τρόφιμο. 5) όταν ένα στέλεχος ανήκει σε ένα είδος για το οποίο κανένα παθογονικό στέλεχος δεν είναι γνωστό, όμως δεν έχει μακρύ ιστορικό ασφαλούς χρήσης μπορεί να είναι ασφαλές σαν ένα προβιοτικό στέλεχος, όμως θα έπρεπε να θεωρείται πρωτότυπο τρόφιμο και επίσης να χειρίζεται παρόμοια. 6) τα στελέχη τα οποία μεταφέρουν γονίδια με ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά π.χ. γονίδια που περιέχουν κωδικοποιημένες πρωτεΐνες οι οποίες απενεργοποιούν τα αντιβιοτικά δεν θα έπρεπε να πωλούνται στην αγορά. 7) στελέχη τα οποία δεν έχουν περιγραφεί ταξινομικά χρησιμοποιώντας προσεγγίσεις σαν ενδείξεις, κάτω από (8) αυτές δεν θα έπρεπε να

εμπορεύονται. Στελέχη θα έπρεπε επίσης να κατατίθενται σε μια διεθνής αναγνωρισμένη συλλογή καλλιέργειας. 8) κατάλληλη πλευρά μέσου ταξινομικής έκφρασης είναι απαραίτητη ώστε να περιγράψει ένα προβιοτικό στέλεχος. Σήμερα αυτό περιλαμβάνει την υβριδοποίηση DNA-RNA, και τον καθορισμό ακολουθίας rRNA. Αυτός ο συλλογισμός, βρίσκει εφαρμογή στα μεταλλαξιγόνα στοιχεία ενός προβιοτικού στελέχους.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα προβιοτικά βακτήρια λοιπόν ορίζονται σαν μονές ή μικτές καλλιέργειες ζωντανών μικροοργανισμών, οι οποίες όταν χορηγηθούν στον άνθρωπο ή το ζώο επηρεάζουν θετικά τον ξενιστή βελτιώνοντας τις ιδιότητες της ενδογενούς μικροβιακής χλωρίδας (Huis in't Veld and Havenaar, 1991; Elmer, 2001). Ένας τροποποιημένος ορισμός και ευρέως διαδεδομένος είναι από τους Havenaar and Huis in't Veld (1992), όπου τα προβιοτικά, ορίζονται σαν ζωτικοί μικροοργανισμοί (*LAB* βακτήρια και άλλα βακτήρια ή ζύμες, χορηγημένα σε ένα ζυμωμένο προϊόν ή σαν στεγνά κύτταρα) τα οποία επιφέρουν ένα θετικό αποτέλεσμα στην υγεία του ξενιστή μέσω της λήψης, βελτιώνοντας τις ιδιότητες της ενδογενούς μικροβιακής χλωρίδας. Ένα άλλο είδος είναι τα πρεβιοτικά τα οποία ορίζονται σαν άπεπτα συστατικά τροφών που επηρεάζουν ευεργετικά τον ξενιστή με την επιλεκτική διέγερση της ανάπτυξης και της δραστηριότητας ενός περιορισμένου αριθμού βακτηρίων στο παχύ έντερο (Gibson and Robertfroid, 1995). Επιπλέον, η πρεβιοτική προσέγγιση, διεξάγει την χορήγηση των μη ζωτικών οντοτήτων, και για αυτό ξεπερνά οποιοδήποτε πρόβλημα ζωτικότητας των προβιοτικών στο ανώτερο γαστρεντερικό σωλήνα (GIT, gastrointestinal tract). Συμβιωτικά, είναι ένα μίγμα προβιοτικών και πρεβιοτικών τα οποία βελτιώνουν την επιβίωση και εμφύτευση των ζωντανών διαιτητικών συμπληρωμάτων στο γαστρεντερικό σωλήνα, είτε διεγείροντας την ανάπτυξη ή ενεργοποιώντας μεταβολικά τα βακτήρια που προωθούν την υγεία (Gibson and Robertfroid, 1995; Lewis and Freedman, 1998).

Το τελικό αποτέλεσμα των παραπάνω, θα ήταν η βελτίωση της επιβίωσης του προβιοτικού το οποίο έχει ένα εύκολο υπόστρωμα για την ζύμωση του, και επιπλέον αυξανόμενοι αριθμοί βακτηρίων που φθάνουν και επικρατούν στο παχύ έντερο, όπως επίσης και τα ατομικά πλεονεκτήματα που τα προβιοτικά πρεβιοτικά μπορεί να προσφέρουν. Αναρίθμητες έρευνες αναφέρουν ιδιότητες θετικές για την υγεία των *LAB* ζυμών, και ζυμωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων σε ανθρώπους και ζώα. Αυτές οι ιδιότητες περιλαμβάνουν τις ευεργετικές επιδράσεις στην μικροβιακή οικολογία του ξενιστή, την πέψη της τροφής, δυσανεξία στην λακτόζη, περιστατικό διάρροιας (διάρροια από ρετροιούς, διάρροια σχετιζόμενη με *Clostridium difficile*, διάρροια προκαλούμενη από αντιβιοτικά, βλεννική ανοσολογική αντίδραση, φλεγμονή του εντέρου, εντερικές μολύνσεις, γαστρίτιδα οφειλόμενη στο βακτήριο

Helicobacter pylori, κολίτιδα, αλλεργικές αντιδράσεις, ατοπική δερματίτιδα, συγκεντρώσεις χοληστερόλης στο αίμα, δραστηριότητα μικροβιακού ένζυμου στο έντερο, και μετάλλαξη των κοπράνων, αποτοξίνωση μετάλλων, καρκίνος, και ανάπτυξη όγκου (Dunne et al., 1999, Rolfe, 2000; Saavedra, 2000, 2001; Marteau et al., 2001, 2002; Vanderhoof, 2001; Dunne and Shanahan, 2002; Kaur et al., 2002, Mercenier et al., 2003).

BIBΛIOΓPAΦIA

- Achtman, M. and Suerbam, S. (2001), *Helicobacter pylori*: Molecular and cellular biology, Norfolk, Horizon Scientific Press.
- Adawi, D., Ahme, S. and Molin, G. (2001), "Effects of different probiotic strains of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* on bacterial translocation and liver injury in an acute liver injury model", *Int. J. Food Microbiol.*, 70, 213-220.
- Aiba, Y., Suzuki, N., Kabir, A.M.A., Takagi, A. and Koga, Y. (1998), "Lactic acid-mediated suppression of *Helicobacter pylori* by the oral administration of *Lactobacillus salivarius* as a probiotic in a gnotobiotic murine model", *Am. J. Gastroenterol.*, 93, 2097-2101.
- Alander M, Satokari R, Korpela R, et al. Persistence of colonization of human colonic mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus rhamnosus GG* after oral consumption. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 351-4.
- Alander M, Korpela R, Saxelin M, et al. Recovery of *Lactobacillus rhamnosus GG* from human colonic biopsies. *Lett Appl Microbiol* 1997; 24: 361-4.
- Alakomi, H.L., Skytta, E., Saarela, M., Matilla-Sandholm, T., Latva-Kala, K. and Helander, I.M.(2000), "Lactic acid permeabilizes gram negative bacteria by disrupting the outer membrane", *Appl. Environ. Microb.*, 66, 2001-2005.
- Anand, S.K., Sriniv Asan, R.A. and Rao, L.K (1984b), Antimicrobial activity associated with *Bifidobacterium bifidum- I'*, *Cult. Dairy Prod. J.*, 2, 21-22.
- Armuzzi, A., Cremonini, F., Bartlozzi, F., Canducci, F., Candelli, M., Ojetti, V., A. (2001a), "The effect of oral administration of *Lactobacillus GG* on antibiotic associated gastrointestinal side effects during *Helicobacter pylori* eradication therapy", *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 15, 163-169.
- Armuzzi, A., Cremonini, F., Ojetti, V., Bartolozzi, F., Canducci, F., Candelli, M., Santarelli, L., Cammarotta, G., De Lorenzo, A., Pola, P., Gasbarinni, G., and Gasbarinni, A., (2001b), Effect of *Lactobacillus GG* supplementation on antibiotic-associated gastrointestinal side effects during *Helicobacter pylori* eradication therapy: A pilot study, *Digestion*, 63, 1-7
- Aso Y, Akazan H, BLP study group. Prophylactic effect of a *Lactobacillus casei* preparation on the recurrence of superficial bladder cancer. *Urol Int* 1992; 49:125-9.
- Asahara, T., Nomoto, K., Shimizu, K., Watanuki, M., and Tanaka, R., (2001a), Increased resistance of mice to *Salmonella enterica serovar Typhimurium* infection by symbiotic administration of *Bifidobacteria* and transgalactosylated oligosaccharides", *J. Appl. Microbiol.*, 985-996
- ASahara, T., Nomoto, K., Watanuki, M., and Yokokura, T. (2001b), "Antimicrobial activity of intraurethrally administered probiotic *Lactobacillus casei* in a murine model of *Escherichia coli* urinary tract infection", *Antimicrob Agents Chemother.*, 45, 1751-1760.

- Asahara, T., Shimizu, K., K., Watanuki, M. and Tanaka, R.(2001c), "Antibacterial effect of fermented milk containing *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* against indigenous *Escherichia coli* infection in mice", *Microb. Ecol. Health and Dis.*, 13, 13-26.
- Aso Y, Alkazan H, BLP Study Group. Prophylactic preparation on the recurrence of superficial bladder cancer. *Urol Int* 1992;49: 125-9
- Atanassova, M., Choiset, Y., Dalgalarondo, M., Chobert, J.-M., Dousset, X., Ivanova, I. and Haertle, T. (2003), "Isolation and partial biochemical characterization of a proteinaceous anti-bacteria and anti-yeast compound produced by *Lactobacillus paracasei subsp paracasei* strain M3", *Int. J. Food Microbiol.*, 87, 63-73.
- Bae, E.A., Kim, D.H. and Han, M.J (2000), "Anti-*Helicobacter pylori* activity of *Bifidobacterium spp.*" *J.Microbiol Biotechn.*, 10, 532-534.
- Ballonque, J.(1998), *Bifidobacteria* and probiotic action', in Salminen, S. and von Wright, A., *Lactic acid bacteria- Microbiology and Functional aspects*, New York, Marcel Dekker, Inc., 519-587.
- Ballonque, Grill, J.P and Baratteologe, P. (1993), 'Effects of *Bifidobacterium* fermented milks on human intestinal flora' *Lait*, 73, 249-256.
- Bingham Mo (2003), Dietary intervention in autistic spectrum disorders, *Food Science and Technology Bulletin*, 8 May.
- Black FT (1989), Prophylactic efficacy of lactobacilli on traveller's diarrhea, *Travel Medicine*, 8, 1750-1753.
- Borriello SP, Hammes WP, Holzaphel W, Marteau P, Schrezenmeir J, Vaara M and Valtoren v (2003), Safety of probiotics that contain *Lactobacilli* or *Bifidobacteria*, *Clinical Infectious Disease*, 36, 775-780.
- Borruel, N Carol, M Casellas, F Antolin, M de Lara, F Espin, E et al., Increased mucosal tumor necrosis factor alpha production in Crohn's disease can be downregulated ex vivo by probiotic bacteria. *Gut*, 51(5): 659-664, 2002.
- Bouhnik Y, Flourie B, Riottot M, Bisetti N, Gailing Mf, Guibert A, Bornet F and Rambaud JC (1996), Effects of fructooligosaccharides ingestion on faecal bifidobacteria and selected metabolic indexes of colon carcinogenesis in healthy humans, *Nutrition and Cancer* 26, 21-29.
- Bouhnik Y, Vahedi K, Achour L, Attar A, Salfati J, Pochart P, Marteau P, Flourie B, Bornet F, and Rambaud JC (1999), Short chain fructooligosaccharide administration dose-dependantly increases fecal bifidobacteria in healthy humans, *Journal of Nutrition*, 129, 113-116.
- Beijerinck, M. (1901), "Sur les ferments de lactigue de l'industrie", *Arch Neeland des Sciences Exactes et Naturelles*, 6, 212-243.
- Bengmark, S. (1998), 'Ecological control of the gastrointestinal tract. The role of probiotic flora', *Gut*, 42, 2-7.
- Benno, Y. And Mitsuoka, T.(1992), Impact of *bifidobacterium longum* on human faecal microflora, *Microbiol. Immunol*, 36 683-694.
- Berg, R.D(1998), Probiotics, prebiotics or conbiotics? *Trends Microbiol.*, 6, 89-92

- Berkes, J., Viswanathan, V.K Savkovic, S.D and Hecht, G(2003), Intestinal epithelial responses to enteric pathogens: effects on the tight junction barrier, ion transport, and inflammation, *Gut*, 52, 439-451
- Bernet, M.F., Brassart, D., Neeser, J.R and Servin, A.L. (1993), Adhesion of human *bifidobacterial* strains to cultured human epithelial-cells and inhibition of enteropathogen-cell interactions, *Appl. Environ. Microb.*, 59 4121-4128.
- Bernet, M.F., Brassart, D., Neeser, J.R and Servin, A.L.(1994), *Lactobacillus acidophilus* La-1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria, *Gut*, 35, 483-489.
- Bernet-Camard, M.F., Lievin, V., Brassart, D., Neeser., Servin A.L. and Hudault's(1997), the human *lactobacillus acidophilus* strain LA1 secretes a non bacteriocin antibacterial substances active in vitro and in vivo, *Appl. Environ Microb.*, 63,2747-2753.
- Bhatia, S.J., Kochar, N.Abraham, P., Nair, N.G. and Mehta, A.P.(1989), *Lactobacillus acidophilus* inhibits growth of *Campylobacter pylori* in vitro, *J.Clin. Microbiol.*, 27, 2328-2330.
- Bibiloni, R.,Fernando, P. and De Antoni, G.L.(1999), Will a high adhering capacity in a probiotic strain guarantee exclusion of pathogens from intestinal epithelia, *Anaerobe*,5,519-524.
- Bielecka, M., Biedzucka, E., Smoragiewicz, W and Smieszek, M.(1998), Interaction of *bifidobacterium* and *salmonella* during associated growth, *Int. J. Food Microbiol*,45, 151-155.
- Blomberg, L., Henriksson, A. and Conway P.L (1993), Inhibition of adhesion *Escherichia coli* K88 to piglet ileal mucus by *Lactobacillus spp*, *Appl. Environ. Microb.*, 59, 34-39.
- Bourlioux, P. (1997), What is currently known about the molecular mechanisms of colonization resistance, *Anaerobe*, 3, 179-184.
- Brigidi, P Vitali, B Swennen, E Bazzonchi, G and Matteuzzi. Z Effects of probiotic administration upon the composition and enzymatic activity of human fecal microflora in patients with irritable bowel syndrome or functional diarrhea. *Res. Microbiol.*, 152:735-741, 2001
- Bruno, F.A and Shah, N.P. (2002), Inhibition of pathogenic and putrefactive microorganisms by *Bifidobacterium* sp. *Milchwissenschaft*,57 617-621.
- Buddington, K.K., Donahoo, J.B and Buddington, R.K.,(2002), Dietary oligofructose and inulin protect mice from enteric and systemic pathogens and tumor inducers, *J. Nutr.*, 132,472-477.
- Buddington, R.K., Williams, C.H., Chen, S.C and Witherly, S.A. (1996), Dietary supplement of neosugar alters the fecal flora and decreases activities of some reductive enzymes in human subjects, *A.m. J. Clin. Nutr.*, 63, 709-716.
- Butel, M.J., Roland, N., Hibert, A., Popot, F., Favre A., Tessedre, A.C., Bensaada, M., Rimbault, A. and Szylit, O.(1998), Clostridial pathogenicity in experimental necrotising enterocolitis in gnotobiotic quails and protective role of *bifidobacteria*, *J. Med Microbiol.*, 47,391-399.
- Butel MJ (2003), Usefulness of an experimental model of the infant gut, *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 37, 109-111.
- Butel MJ, Walligora-Dupriet A-J and Szylit O (2002), Oligofructose and experimental model of neonatal necrotising enterocolitis, *British Journal of Nutrition*, 87, S213-S219.

- Cahn, D.R. (1901), Über die nach Gram farbigen Bacillen des Säulingsstuhles, Centralblatt für Bacteriologie I Abteilung Originale, 30, 721-726
- Canducci, F., Armuzzi, A., Cremonini, F., Camarrota, G., Bartollogi, F., Pola, P., Gasbarinni, G. and Gasbarinni, A. (2000), A lyophilized and inactivated culture of *Lactobacillus acidophilus* increases *Helicobacter pylori* eradication rates, Aliment. Pharmacol. Ther., 14, 1625-1629.
- Caridi, A. (2002), Selection of *Escherichia coli*-inhibiting strains of *Lactobacillus paracasei subsp paracasei*, J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 29, 303-308.
- Chan, R.C., Reid, G., Irvin, R.T., Bruce, A.W. and Costerton, J.W. (1985), Competitive exclusion of uropathogens from human uroepithelial cells by *Lactobacillus* whole cells and cell wall fragments, Infect. Immun., 47, 84-89.
- Carman RJ, Van Tassell RL, Bashir M, Kingston DGI and Wilkins TD (1988), In vitro and in vivo metabolism of the dietary pyrolysis carcinogen, IQ, to a direct acting mutagen, 7-OHIQ, by human intestinal bacteria, In Hardie JM and Boriello SP, Anaerobes Today, Chichester, J Wiley, 224.
- Charpentier E, Gerbaud G, and Courvalin P (1994), Presence of the *Listeria* tetracycline resistance gene tet(S) in *Enterococcus faecalis*, Antimicrobial Agents Chemotherapy, 38, 2330-2335.
- Charteris, W.P., Kelly, P.M., Morelli, L. and Collins, J.K. (1997), Selective detection, enumeration, and identification of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in mixed bacterial populations, Int. J. Food Microbiol., 35, 1-27.
- Charteris, W.P., Kelly, P.M., Morelli, L. and Collins, J.K. (1998), Ingredient selection criteria for probiotic microorganisms in functional dairy foods, Int. J. Dairy Technol., 51, 123-136.
- Chateau, N., Castellanos, I. and Deschamps, A.M. (1993), Distribution of pathogen inhibition in the *Lactobacillus* isolates of a commercial probiotic consortium, J. Appl. Bacteriol., 74, 36-40.
- Chauviere, G., Coconnier, M.H., Kerneis, S., Darfeuille-Michaud, A., Joly, B. and Servin, A.L. (1992), Competitive exclusion of diarrheogenic *Escherichia coli* (ETEC) from human enterocyte like Caco₂ cells by heat killed *Lactobacillus*, FEMS, Microbiol. Lett., 91, 213-218.
- Chen, R.M., Wu, J.J., Lee, S.C., Huang, A.H. and Wu, H.M. (1999), Increase of intestinal *Bifidobacterium* and suppression of coliform bacteria with short-term yoghurt ingestion, Dairy Sci., 82, 2308-2314.
- Chen HL, LU YH, Lin JJ and Koly (2001), Effects of isomalto-oligosaccharides on bowel functions and indicators of nutritional status in constipated elderly men, Journal of American College of Nutrition, 20, 44-49.
- Chen TS and Chen PS (1989), Intestinal auto-intoxication: a medical leitmotif, Journal of Clinical Gastroenterology, 11, 434-441.
- Cintas, L.M., Casaus, M.P., Herranz, C., Nes, I.F. and Hernandez, P.E. (2001), Review Bacteriocins of *Lactic acid bacteria*, Food Sci. Technol. Int., 7, 281-305.
- Clements, ML, Levine, MM, Ristaino, PA, VE Daya, and Hughes. TP, Exogenous lactobacilli fed to man – their fate and ability to prevent diarrheal disease. Prog. Food. Nutr. Sci., 7:29-37, 1983
- Cleveland, J., Montville, T.J., Ness, I.F. and Chikindas, M.L. (2001), Bacteriocins safe natural antimicrobial for food preservation, Int. J. Food Microbiol., 71, 1-20.

- Coconnier M.H, Bernett, M.F., Kerneis, S., Chauviere, G., Fourniat, J. and Servin, A.L (1993), Inhibition of adhesion of enteroinvasive pathogens to human intestinal Caco2 cells by *Lactobacillus acidophilus* strain LB decreases bacterial invasion, FEMS Microbiol. Lett, 110,299-305.
- Coconnier, M.H., Lievin, V., BernetCamard, M.F., Hudault, S. and Servin, A.L.(1997), Antibacterial effect of the adhering human *Lactobacillus acidophilus* strain LB, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 41, 1046-1052.
- Coconnier, M.H., Lievin, V., Hemery, E. and Servin, A.L (1998), Antagonistic activity against *Helicobacter pylori* infection in vitro and in vivo by the human *Lactobacillus acidophilus* strain LB, *Appl. Environ. Microb.*, 64, 4573-4580.
- Coconnier, M.H., Lievin, V., Lorrot, M. and Servin, A.L (2000), Antagonistic activity of *Lactobacillus acidophilus* LB against intracellular *Salmonella enterica* serovar *typhimorium* infecting human enterocyte- like Caco-2/TC-7 cells, *Appl. Environ. Microb.*, 66, 1152-1157.
- Cohedy, M., (1906a), Essais d'acclimation microbienne dans la cative intestinale, C. R. Soc. Biol., 60, 364
- Cohedy, M. (1906b), Description du ferment lactique puissant capable de s'acclimater, dans l' intestine de l'homme , C.R. Soc. Biol., 6060, 558
- Collins M.D., Phillips, B.A and Zaroni, P.(1989), Deoxyribonucleic-acid homology studies of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* sp. Nov., *Int.J Syst. Bacteriol.*, 39, 105-108.
- Collins, J.K., Thorton,G. and Sullivan, G.O. (1998), Selection of probiotic strains for human applications, *Int. Dairy J.*, 8, 487-490.
- Colombel, J.F., Cotrot, A., Neut, C. and Romond, C.(1987), Yogurt with *Bifidobacterium longum* reduces erythromycin-induced gastrointestinal effects, *Lancet*, 2, 43.
- Conge, G.A Gouache, P, Desormeau-Bedot, JP Loisillier, F Lemonnier.D. Comparative effects of a diet enriched in live or heated yoghurt on the immune system of the mouse. *Reprod. Nutr. Dev.*, 20 (4A, 929-938, 1980
- Cremonini, F., Di Caro, S., Covino, M., Armuzzi, A., Gabrielli, M.,Santarelli, L., Nista, E.C., Cammarota, G., Gasbarinni, G.and Gasbarinni A.(2002), Effect of different probiotic preparations on Anti-*Helicobacter pylori* therapy-related side effects: A parallel group, triple, blind, placebo-controlled study, *A.m J. Gastroenterol.*, 97, 2744-2749.
- Crittenden R, Sipra K, Ojanene S, Tenkanen M, Fagerstrom R, Matto J Saarela M, Matilla-Sandholm T and Poutanen K (2002), In vitro fermentation of cereal, dietary fibre carbohydrates by probiotic and intestinal bacteria, *Journal of the Science Food and Agriculture*, 82, 781-789.
- Crittenden RG, Morris LF, Harvey ML, Tran LT Mitchell HL, and Playne MJ (2001), Selection of a *Bifidobacterium* strain to complement resistant starch in a symbiotic yogurt, *Journal of Applied Bacteriology*, 90, 268-278.
- Cruchet, S., Obregon, M.C., Salazar, G., Diaz. and Gottleland, M.(2003), Effect of the ingestion of a dietary product containing *Lactobacillus johnsonii* La1 on *Helicobacter pylori* colonization in children, *Nutrition*, 19, 716-721.
- Cummings, J.H. and MacFarlane, G.T.(1991), The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon, *J. Appl. Bacteriol.*, 70, 443-459

- Cummings, J.H., MacFarlane, G.T and Englyst, H.N (2001), *probiotic* digestion and fermentation, *Am. J. Clin. Nutr.*, 73, 415S-420S.
- Cummingham-Rundles, S., Ahrne, S., Bengmark, S., Johann-Liang, R., Marshall, F., Metakis, L., Califano, C., Dunn, A.M., Grasse, C., Hinds, G. and Cervia, J (2000), *Probiotics* and immune response, *Am J Gastroenterol.*, 95, S22-S25.
- Cummings, JH. And MacFarlane, G.T (1991), The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon, *Appl. Bacteriol.*, 70, 443-459.
- Cummings, J.H., MacFarlane, G.T. and Englyst T, H.N. (2001), Prebiotic digestion and fermentation, *Am. J. Clin. Nutr.*, 73, 415S-420S.
- Cummings Jh, MacFarlane GT and MacFarlane S (2003), Intestinal bacteria and ulcerative colitis, *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 4, 9-20.
- Dabard, J., Bridonneau, C., Philippe, C., Anglade, P., Molle, D., Nardi, M., Ladire, M., Girardin, H., Marcille, F., Gomez, A. and Fons, M. (2001), Ruminococcin A, a new lantibiotic produced by a *Ruminococcus gnavus* strain isolated from human feces, *Appl. Environ. Microb.*, 67, 4111-4118.
- Dabard, J., Bridonneau, C., Philippe, C., Anglade, P., Darfeuille –Michaud A, Neut C, Barnich N, Lederman E, Di Martino P, Desreumaux P, Gambiaez L, Joly, Cortot A and Colombel JF (1998), Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease, *Gastroenterology*, 115, 1405-1413.
- De Vuyst, L. and Vandamme, E.J (1994), *bacteriocins of lactic acid bacteria*, *Microbiology, Genetics and applications*, London, Blackie Academic and Professional.
- Dellaglio, F., Dicks, L.M.T., Du Toit, M. and Torianni, S.(1991), designation of ATCC334 in place of ATCC393 (NCDO 161) as the neotype strain of *Lactobacillus casei subsp. Casei* and rejection of the name *Lactobacillus paracasei* (Collins et al., 1989), *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 41, 340-342.
- Dellaglio, F., Felis G.E and Torianni, S. (2002) The status of the species *Lactobacillus casei* (Orla-Jensen 1916) Hansen and Lessel 1971 and *lactobacillus paracasei* Collins et al., 1989. Request for an opinion, *Int.J Syst. Evol. Microbiol.*, 52, 285-287.
- De Simone C, Rosati E, Moretti S, Salvadori B, Vesely R, Jirillo E. Probiotics and stimulation of the immune response. *Eur J Clin. Nutr* 1991;45:32-4
- De Simone C, Ciardi A, Grassi A, et al., Effect of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* on gut mucosa and peripheral blood B Lymphocytes. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1992; 14: 331-40.
- De Vuyst, L. and Vandamme, E.J. (1994), *Bacteriocins of lactic acid Bacteria*. *Microbiology, Genetics, and applications*, London, Blackie Academic and Professional.
- De Waard, R., Garssen, J., Snel, J., Bokken, G., Sako, T., In't Veld, J.H.J. and Vos, J.G (2001), Enhanced antigen-specific delayed-type hypersensitivity and immunoglobulin G2b responses after oral administration of viable *Lactobacillus casei* YIT9029 in Wistar and Brown Norway rats, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 8, 762-767.

- De Waard, R., Garssen, J., Bokken, G. and Vos, J.G. (2002), antagonistic activity of *Lactobacillus casei* strain Shirota against gastrointestinal *Listeria monocytogenes* infection in rats, *Int. J. Food Microbiol.*, 73, 93-100.
- Dicks, L.M.T., Duplessis, E.M, Dellaglio, F. and Lauer, E. (1996), Reclassification of *Lactobacillus casei subsp. Casei* ATCC 393 and *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 15820 as *Lactobacillus zeae* nom. Rev., designation of ATCC 334 as the neotype of *L.casei subsp. Casei* and rejection of the *Lactobacillus paracasei*, *Int. J.Syst. Bacteriol.*, 46, 337-340.
- Doberlein, A. (1892). Das Scheidensekret und seine Bedeutung fur das Puerperalfieber, *Centralblatt fur Bacteriologie*, 11, 699-700.
- Doberlein, A. (1982), Das Scheidensekret und seine Bedeutung fur das Puerperalfieber, *Centralblatt fur Bacteriologie*, 11, 699-700.
- Donett-Hugues, A., Rochat, F., Serrant, P., Aeschlimann, J.M. and Schiffrin, E.J. (1999), Modulation of nonspecific mechanisms of defense by lactic acid bacteria: Effective dose, *J. Dairy Sci.*, 82, 863-869.
- Duffy LC, Zielezny MA, Riepenhoff-Talty M, et al., Reduction of virus shedding by *B.bifidum* in experimentally induced MRV infection. *Dig Dis Sci* 1994; 39: 2334-40
- Duffy LC, Lielenzy MA, Riepenhoff-Ta;ty M, et al. Effectiveness of *Bifidobacterium bifidum* in mediating the clinical course of murine rotavirus diarrhea. *Pediatr Res* 1994;35:690-5
- Duncan, S.H., Scott, K.P., Ramsay, A.G., Harmsen, H.J.M., Welling, G.W., Stewart, C.S. and Glint, H.J. (2003), Effects of alternative dietary substrates on competition between human colonic bacteria in an anaerobic fermentor system, *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 1136-1142.
- Dunne, C, O' Mahony, L, Murphy, L, Thornton, G, Morrissey, D, O' Halloran, S et al. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vitro findings. *Am. J. Clin. Nutr.*, 73(suppl 2): 386S-392S, 2001
- Dunne, C. and Shanahan, F. (2002), the role of probiotics in the treatment of intestinal infections and inflammation, *Curr. Opin. In Gastroenterology*, 18, 40-45.
- Dunne, C., Murphy, L.Flynn, S., O' Mahony, L., O'Halloran, S. Feeney, D., Thornton, G., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., Quigley, E.M.M, O'Sullivan, G.C., Shanahan, F. and Collins, J.K. (1999), Probiotics from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials, *Anton. Van Leeuw.*, 76, 279-292
- Du Pont HL, Ericsson CD. Prevention and treatment of travelers diarrhea. *N Engl J Med* 1993; 328: 1821-7
- A Nissle. Weiteres uber die Mutaflorbehandlung unter besonderer Berucksichtigung der chronischen Ruhr. *Mnch. Med. Wochenschr.*, Nr. 25: 678-681, 1919.
- Edwards C, A., Rummey C, J., Davies M, Parett AM, Dore J, Martin F, Schmitt J, Stahl B, Norin, E, Midtvedt T, Rowland IR, Heavey PM,, Kohler H, Stocks B, and Schroten H (2003), A human flora-associated rat model of the breast fed infant gut, *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 37, 168-177
- Elmer GW, Surawicz CM, Mc Farland LV. Biotherapeutic agents. A neglected modality for the treatment and prevention of selected intestinal and vaginal infections. *JAMA* 1996; 275: 870-6.

- Fao/Who (2001), Joint Fao/Who Expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria, Cordoba, Argentina, October
- Forestier, C De Champs, C Vatoux, and B Joly. Probiotic activities of *Lactobacillus casei rhamnosus*: in vitro adherence to intestinal cells and antimicrobial properties. Res. Microbiol., 152:167-173, 2001
- Favier CF, Vaughan EE, De Vos WM and Akkermans AD (2002), Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates, Applied and Environmental Microbiology, 68, 219-226.
- Faure, G.C., Schellenberg, D.A., Bexter, A. and Wuerzner, H.P. (1984), Barrier effect of *Bifidobacterium longum* on a pathogenic *Escherichia coli* strain by gut colonization in the germ free rats, Z. Ernährungswiss., 23, 41-51.
- Felley, C.P, Corthesy-Theulaz, L., Rivero, J.L.B., Sipponen, P., Kaufmann, M., Bauerfeind, P., Wisel, P.H., Brassart, D., Pheiffer, A., Blum, A.L and Michetti, P (2001), Favourable effect of an acidified milk (LC-1) on *Helicobacter pylori* gastritis in man, Eur. J. Gastroenterol. Hepatol., 13, 25-29.
- Fernandez, M.F., Boris, S. and Barbes, C. (2003), Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract, J. Appl. Microbiol., 94, 449-455.
- Filho-Lima, J.V.M., Vieira, E.C and Nicoli, J.R. (2000), Antagonistic effect of *Lactobacillus acidophilus*, *Saccharomyces boulardii* and *Escherichia coli* combinations against experimental infections with *Shigella flexneri* and *Salmonella enteritidis subsp. Typhimorium* in gnotobiotic mice, J. Appl. Microbiol., 88, 365-370.
- Finegold SM (2002), Gastrointestinal microbiota studies in late-onset autism, Clinical Infectious Diseases, 35, S6-S16
- Flynn, S., Van Sinderen, D., Thornton, G.M., Holo, H., New, I.F, and Collins, J.K. (2002), Characterization of the genetic locus responsible for the production of ABP-118, a novel bacteriocin produced by the probiotic bacterium *Lactobacillus salivarius subsp salivarius* UCCI18, Microbiology-Sgm, 148, 973-984.
- Fooks LJ and Gibson GR (2002), Probiotics as modulators of the gut flora, British Journal of Nutrition, 88, S39-S49.
- FUFOSE Working Group. Scientific Concepts of functional foods in Europe Consensus Document. Br. J. Nutr., 81:S1-S27, 1999.
- Fujiwara, S., Hashiba, H., Hirota, T. and Forstner, J.F. (1997), Proteinaceous factor(s) in culture supernatant fluids of *bifidobacteria* which prevents the binding of enterotoxigenic *Escherichia coli* to gagliotetraosylceramide, Appl. Environ. Microbiol., 63, 506-512.
- Fujiwara, S., Hashiba, H., Hirota, T. and Forstner, J.F. (1999), Purification and characterization of a novel protein produced by *Bifidobacterium longum* SBT2928 that inhibits the binding of enterotoxigenic *Escherichia coli* Pb176 (CFA/II) to gagliotetraosylceramide, J. Appl. Microbiol., 86, 615-621.
- Fujiwara, S., Seto, Y., Kimura, A. and Hashiba, H. (2001a), Establishment of orally administered *Lactobacillus gasseri* SBT2055SR in the gastrointestinal tract of humans and its influence on intestinal microflora and metabolism, J. Appl. Microbiol., 90, 343-352.

- Fujiwara, S., Hashiba, H., Hirota, T. and Forstner, J.F. (2001b), Inhibition of the binding of enterotoxigenic *Escherichia coli* Pb176 to human intestinal epithelial cell line HCT-8 by an extracellular protein fraction containing B1F of *Bifidobacterium longum* SBT2928: suggestive evidence of blocking of the binding receptor gagliotetraosylceramide on the cell surface, *Int. J. Food Microbiol.*, 67, 97-106.
- Fujiwara, S., Seto, Y., Kimura, A. and Hashiba, H. (2001c), Intestinal transit of an orally administered streptomycin-rifampicin-resistant variant of *Bifidobacterium longum* SBT 2928: its long-term survival and effect on the intestinal microflora and metabolism, *J. Appl. Microbiol.*, 90, 43-52.
- Fuller, R. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.*, 66:365-378, 1989.
- Fuller, R. (1992), *Probiotics: the scientific basis*, London, Chapman & Hall.
- Fuller, R. (1999), Probiotics for farm animals, in Tannock, G., *Probiotics: a critical review*, Wyonham, Horizon Scientific Press, 15-22.
- Fuller R. Probiotic foods. Current use and future developments. *Int Food Inged* 1993;3:23-26.
- Fuller, R. and Gibson, G.R. (1997), Modification of the intestinal microflora using probiotics and prebiotics, *Scand. J. Gastroenterol.*, 32, 28-31.
- Fuller, R. and Gibson, G.R. (1998), Probiotics and prebiotics: microflora management for improved gut health, *Clin. Microbiol. Inf.*, 4, 477-480.
- Ganzle, M.G., Weber, S. and Hammes, W.P. (1999), Effect of ecological factors on the inhibitory spectrum and activity of bacteriocins, *Int. J. Food Microbiol.*, 46, 207-217.
- Ganzle, M.G., Holtzel, A., Walter, J., Jung, G. and Hammes, W.P. (2000), Characterization of reutericyclin produced by *Lactobacillus reuteri* LTH2584, *Appl. Environ. Microb.*, 66, 4325-4333
- Gardiner, G., RP Ross, JK Collins, G Fitzgerald, C Stanton. Development of a probiotic cheddar cheese containing human-delivered *Lactobacillus paracasei* strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64(6):2192-2199, 1998.
- Gibson, G.R. and Wang, X. (1994), Regulatory effects of *bifidobacteria* on the growth of other colonic bacteria, *J. Appl. Bacteriol.*, 77, 421-4220.
- Gibson, G.R., Beatty, E.R., Wang, X. and Cummings, J.H. (1995), Selective stimulation of *bifidobacteria* in the human colon by oligofructose and inulin, *Gastroenterology*, 108, 975-982.
- Gibson, G.R. and Robertfroid, M.B. (1995), Dietary modulation of the human colonic microbiota-introducing the concept of prebiotics, *J. Nutr.*, 125, 1401-1412.
- Gibson, G.R. and Fuller, R. (2000), Aspects of in vivo and in vitro research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use, *J. Nutr.*, 130, 391s-395s.
- Gionchetti P, (2003), Prophylaxis of pouchitis onset with probiotic therapy: a double-blind, placebo controlled trial, *Gastroenterology*, 124, 1202-1209.
- Gionchetti P, Rizzello F, Venturi A, and Massimo C (2000b), Probiotics in effective diarrhea and inflammatory bowel diseases, *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 15, 489-493.
- Gilliland SE, Nelson CR, Maxwell C. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl Environ Microbiol* 1985; 49: 377-81.

- Gill, H.S., Shu, Q., Lin, H., Rutherford, K.J. and Cross, M.L. (2001), Protection against translocating *Salmonella typhimorium* infection in mice by feeding the immunoenhancing probiotic *Lactobacillus rhamnosus* strain HN001, *Med. Microbiol. Immun.*, 190, 97-104.
- Gilliland, S.E. and Speck, M.L. (1977), Antagonistic action of *Lactobacillus acidophilus* toward intestinal and fooborne pathogens in associative cultures, *J. Food Prot.*, 40, 820-823
- Gilliland SE, Noh DO. Influence of bile salts on β galactosidase activity and cellular integrity of *Lactobacillus acidophilus*. *Animal Sci Res Rep* 1989: 257
- Gilliland SE, Walker DK. Cholesterol uptake by culture of *Lactobacillus acidophilus* used for nonfermented acidophilus milk. *Anim Sci Res Rep* 1989: 258-62
- Gismondo, M.R., Drago, L. and Lombardi, A. (1999), Review of probiotics available to modify gastrointestinal flora, *Int. J. Antimicrob. Ag.*, 12, 287-292
- Godin BR, Gorbach SL, Saxelin M, Barakat S, Gualtiere L Salminen S Survival of lactobacillus species (strain GG) in human gastrointestinal tract. *Dig Dis Sci* 1992; 37: 121-8.
- Gomes, M.P. and Malcata, X. (1999), *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus* biological biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics, *Trends Food Sci. Tech.*, 10, 139-157.
- Gomez, A., Ladire, M., Marcille, F. and Fons, M. (2002), Trypsin mediates growth phase-dependent transcriptional regulation of genes involved in biosynthesis of ruminococcin A, a lantibiotic produced by a *Ruminococcus gnavus* strain from a human intestinal microbiota, *J. Bacteriol.*, 184, 18-28.
- Goosens, D., Jonkers, D., Russel, M., Stobberinch, E., Van Der Bogaard, A. and Stockbrugger, R. (2003), The effect of *lactobacillus plantarum* 299v on the bacterial composition and metabolic activity in faeces of healthy volunteers a placebo-controlled study on the onset and duration of effects, *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 18, 495-505.
- Gopal, P.K., Prasad, J., Smart, J. and Gill, H.S. (2001), In vitro adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*, *Int. J. Food Microbiol.*, 67, 207-216.
- Gottleland, M. and Cruchet, S. (2003), Suppressive effect of frequent ingestion of *Lactobacillus johnsonii* La1 on *Helicobacter pylori* colonization in asymptomatic volunteers, *J. Antimicrob. Chemoth.*, 51, 1317-1319.
- Gmeimer, M Kneifel, W Kulbe KD Wouters R De Bover, P Nollet. L. Influence of a symbiotic mixture consisting of *Lactobacillus acidophilus* 74-2 and a fructooligosaccharide preparation on the microbial ecology sustained in a stimulation of the human intestinal microbial ecosystem (SHIME reactor). *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2000
- Granato, D., Perotti, F., Masserey, I., Rouvet, M., Golliard, M., Servin, A. and Brassart D. (1999), Cell surface-associated lipoteichoic acid acts as an adhesion factor for attachment of *Lactobacillus johnsonii* La1 to human enterocyte-like Caco-2 cells, *Appl. Environ Microb.*, 65, 1071-1077
- Guandalini S. Probiotics in the treatment of diarrhoeal disease in children. *Gastroenterol Intest* 1998; 11(suppl): 87-90
- Guarino A. Effects of probiotics in children with cystic fibrosis. *Gastroenterol Int* 1998; 11(suppl): 91.

- Ribeiro H, Vanderhoof JA. Reduction of diarrheal illness following administration of *Lactobacillus plantarum* 299v in a daycare facility. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1998; 26: 561
- Guarino A, Canani RB, Spagnuolo MI, Albano F, Di Benedetto L. Oral bacterial therapy reduces the duration of symptoms and of viral excretion in children with mild diarrhea. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1997; 25:516-9.
- Guarner, F, Schaafsma.GL, Probiotics. *Int J. Food Microbiol.*, 39, 237-238, 1998
- Haller, D Colbus, H Ganzle, M.G Scerenbacher, P Bode, C Hammes. W.P Metabolic and functional properties of lactic acid bacteria in the gastrointestinal ecosystem: a comparative in vitro study between bacteria of intestinal and fermented food origin. *Syst. Appl. Microbiol.*, 218-226, 2001
- Hamanaka, Y., Nakasima, M., Wada, A., Ito, M., Kurazono, H., Hojo, H., Nakahara, Y., Kohno, S., Hirayama, T. and Sekine, I. (2001), Expression of human β -defensin 2 (hBD-2) in *Helicobacter pylori* induced gastritis: antibacterial effect of hBD-2 against *Helicobacter pylori*, *Gut*, 49, 481-487
- Hansen, P.A. and Moquot, G. (1970), *Lactobacillus acidophilus* (Moro) comb.nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 20, 325-327.
- Havenaar R Ten Brink, B, JHJ Huis inn's Veld. Selection of strains for probiotic use: In: R Fuller, Ed., *Probiotics: The scientific basis*, Chapman& Hall, London, 1992, pp. 209-224.
- Havenaar, R. and Huis In't Veld, J. (1992), Probiotics: a general view, in Wood, B.J.B., *The lactic acid bacteria in health and disease*, Amsterdam, Elsevier Applied Science, 151-170.
- Havenaar, R., Ten Brick, B. and Huis In't Veld, J. (1992), Selection of strains for probiotic use, in Fuller, R., *Probiotics: The scientific basis*, London, Chapman and Hall, 209-224.
- Heller.KJ Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. *Am. J. Clin. Nutr.*, 73: 374s-379S, 2001
- Heyman M (2000), Effect of lactic acid bacteria on diarrheal diseases, *Journal of the American College of Nutrition* 19, 137S—146S.
- Hilton E, Kolakowsski P, Singer C, and Smith M (1997), Efficacy of *Lactobacillus* GG as a Diarrheal Preventive in Travellers, *Journal of Travel Medicine*, 4, 41-43
- Hirano, J., Yoshida, T., Sugiyama, T., Koide, N., Mori, I. and Yocochi, T. (2003), The effect of *Lactobacillus rhamnosus* on enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection of human intestinal cells in vitro, *Microb. and Immun.*, 47, 405-409
- Hitchcins AD, McDonough FEM. Prophylactic and therapeutic aspects of fermented milk. *Am J Clin Nutr* 1989; 49: 675-84
- Holtzel, A., Ganzle, M.G., Nicholson, G.J., Hammes, W.P. and Jung, G. (2000), The first low molecular weight antibiotic from lactic acid bacteria: reutericyclin, a new tetramic acid, *Angew. Chem-Int. Edit.*, 39, 2766-2768
- Holzaphel, WH Haberer P, Snel, J, Schillinger U, JHJ Huis n't Veld. Overview of gut flora and probiotics. *Int. J. Food Microbiol.*, 41: 85-101, 1998.
- Holzaphel WH, Schillinger.U, Introduction to pre and probiotics. *Food Res. Int.*, 35:109-116, 2002.
- Holzaphel, W.H., Haberer, P., Geisen, R., Bjorkroth, J. and Schillinger, U. (2001), Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition, *Am. J. Clin. Nutr.*, 73, 365s-373s.

- Holzappel, WH Schillinger. U. Introduction to prebiotics and probiotics. Food Res. Int., 35: 109-116, 2002.
- Holzappel, WH Haberer, P Geisen, R Bjorkroth J and Schillinger U Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. Am.J. Clin. Nutr., 73: 365S-373S, 2001 ME Sanders and TR Klaenhammer. The scientific basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM functionality as a probiotic. J. Dairy Sci., 84: 319-331, 2001 PSM Yeung, ME Sanders, CL Kitts, R Cano, and PS Tong, 2002
- Hoogkamp- JAA Korstanje, Linder, JCEM, Marcelis, JH, Den Dass-Slagt, H, De Vos. NM. Composition and ecology in the human intestinal flora. Antonie van Leeuwenhoek, 45, 35-40, 1979.
- Hoogkamp-Korstanje Jaa, Linder JGEM, Marcelis JH, Den Daas-Slagt H, De Vos, NM. Composition and ecology in the human intestinal flora. Antonie van Leeuwenhoek, 45, 35-40, 1979
- Hudault S, Lievin V, Bernet-Camard MF and Servin AL (1997), antagonistic activity exerted in vitro and in vivo by *Lactobacillus casei* (strain GG) against *Salmonella typhimorium* C5 infection, Applied and Environmental Microbiology, 63, 513-518.
- Hopkins MJ and MacFarlane GT (2003), Nondigestible oligosaccharides enhance bacterial colonization resistance against *Clostridium difficile* in vitro, Applied and Environmental Microbiology, 69, 1920-1927
- Huggett, A., Conzleman, C., 1997. EU regulation on novel foods: consequences for the food industry. Trends Food Sci. Technol. 8, 133-139.
- Huis In't Veld, J. and Havenaar, R. (1991), Probiotics and health in man and animal, J. Chem. Technol. Biot., 51, 562-567.
- Huis in't Veld JHJ, Havenaar R, Marteau P. Establishing a scientific basis for probiotic R&D. Trends Biotechnol 1994; 12: 6-8.
- Huis In't Veld, J. and Shortt, C. (1996), Selection criteria for probiotic microorganisms, International Symposium and Consortium of the Royal Society of Medicine, 6, 27-36.
- Ibrahim, S. and Bezkorovainy, A. (1993), Inhibition of *Escherichia coli* by *bifidobacteria*, J. Food Prot., 56, 713-715
- Isolauri E, Juntunen M, Rautanen T, Sillanauke P, Koivula T. A Human *Lactobacillus* strain (*Lactobacillus Casei* sp strain GG) promotes recovery from acute diarrhea In children. Pediatrics 1991; 88: 90-7.
- Isolauri E, Kaila M, Mykkanen H, Ling WH, Salminen S. Oral bacteriotherapy for viral gastroenteritis. Dig Dis Sci 1994; 39: 2595-600.
- Isolauri E, Joensuu, J, Suomalainen H, Luomala M, Vesikari T. Improved immunogenicity of oral D_xRRV reassortant rotavirus vaccine by *Lactobacillus casei* GG. Vaccine 1995; 13:310-2..
- Ito M, Degushi Y, Miyamori A, Matsumoto K and Kikuchi H (1995), Effects of administration of galactooligosaccharides on the human faecal microflora, stool weight and abdominal sensation, Microbial Ecology in Health and Disease, 3, 285-292.
- Jack, R.W., Tagg, J.R and Ray, B. (1995), Bacteriocins of Gram-positive bacteria, Microbiol. Rev., 59, 171-200.

- Jacobsen CN, Rosenfeldt Nielsen V, Hayford AE, Moller PL, Michaelsen KF, Perregaard A Sandstrom B, Tvde M, and Jacobsen M, (1999), 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*, 65, 4949-4956
- Jin, L.Z., Marquardt, R.R and Baidoo, S.K (2000), inhibition of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88, K99, and 987P by the *Lactobacillus* isolates from porcine intestine, *J. Sci. Food Agric.*, 80, 619-624.
- Juven, B.J., MeinersMann, R.J. and Stern, N.J. (1991), Antagonistic effects of *lactobacilli* and pediococci to control intestinal colonization by human enteropathogens in live poultry, *J. Appl. Bacteriol.*, 70, 95-103
- Kabir, A.M.A., Aiba, Y., Takagi, A., Kamiya, S., Miwa, T. and Koga, Y. (1997), Prevention of *Helicobacter pylori* infection by *lactobacilli* in a gnotobiotic murine model, *Gut*, 41, 49-55.
- Kaila M, Isolauri E, Virtanen E, Laine S, Arvilommi H. Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhea by a human *Lactobacillus* strain. *Pediatr Res* 1992; 32: 141-4
- Kaila M, Isolauri E, Saxelin M, Arvilomi H, Vesikari T. Viable versus inactivated *lactobacillus* strain GG in acute rotavirus diarrhea. *Arch Dis Child* 1995; 72:51-3.
- Kailasapathy K and Chin J (2000), Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp., *Immunology and Cell Biology*, 78, 80-88.
- Kalliomaki,M, Kirjavainen P Eerola E, Kero, P, Salminen, S, Isolauri E, distinct patterns of neonatal gut microflora in infants in whom atopy was and was not developing. *J Allergy Clin. Immunol.*, 107(1): 129-134, 2001
- JA Madden, JO Hunter. A review of the role of the gut microflora in irritable bowel syndrome and the effects of probiotics, 2002).
- Kang, K.H., Shin, H.J., Park, Y.H. and Lee, T.S. (1989), Studies on antibacterial substances produced by *lactic acid bacteria*: purification and some properties of antibacterial substance "Bifilong" produced by *bifidobacterium longum*, *Korean J. Dairy Sci.*, 11, 204-216
- Kanauchi O, Iwanaga T, Andoh A, Araki Y, Nakamura T, Mitsuyama K, Suzuki A, Hibi T and Bamba T (2001), Dietary fiber fraction of germinated barley foodstuff attenuated mucosal damage and diarrhea, and accelerated the repair of the colonic mucosa in an experimental colitis, *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 16, 160-168
- Kaplan, H. and Hutkins, R.W. (2000), Fermentation of fructooligo saccharides by *lactic acid bacteria* and *bifidobacteria*, *Appl. Environ. Microb.*, 66, 2682-2684.
- Kaplan, H. and Hutkins, R.W. (2003), Metabolism of fructooligosaccharides by *lactobacillus paracasei* 1195, *Appl. Environ. Microb.*, 69, 2217-2222
- Kaur, I.P., Chopra, K. and Saini, A. (2002), Probiotics: potential pharmaceutical applications, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 15, 1-9
- Kim, T.S., Hur, J.W., Yu, M.A., Chegh, C.I., Kim, K.N., HWang, J.K. and Pyun, Y.R. (2003), Antagonism of *Helicobacter pylori* by bacteriocins of lactic acid bacteria, *J. Food Prot.*, 66, 3-12.
- Kim HJ, Camilleri M, MCKinzie S, Lempke MB, Burton DD, Thomforde GGand Zinsmeister AR (2003), A randomized controlled trial of a probiotic, VSL#3, on gut transit and symptoms in diarrhea – predominant irritable bowel syndrome, *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 17, 895-904.

- Kimaryo, V.M., Massawe, G.A., Olasupo, N.A., WH Holzaphel. The use of a starter culture in the fermentation of cassava for the production of kinvunde, a traditional Tanzanian food product. *Int. J. Food Microbiol.*, 56(2-3):179-190, 2000). (C. Staudt. Wechselwirkungen von Bifidobakterien mit Darmepithelzellen und mit extrazellulären Matrix- und Plasmaproteinen. Department of Microbiology and Biotechnology, University of Ulm, Ulm, 2002
- KlaenHammer, T.R. and Russell, W.M. (2000), Species of the *Lactobacillus acidophilus* complex, in Robinson, R.K., Batt, C. and Patel, P.D., *Encyclopedia of food Microbiology*, San Diego, Academic press, 1151-1157.
- KlaenHammer, T., AlterMann, E., Arigoni, F., Bolotin, A., Breidt, F., Broadbent, J., Cano, R., Chaillou, S., Deutscher, J., Gasson, M., Van De Guchte, M., Guzzo, J., Hartke, A., Hawkins, T., Hols, P., Hutkins, R., Kleerebezem, M., Kok, J., Kuipers, O., Lubbers, M., Maguin, E., McKay, L., Mills, D., Nauta, A., Steele J., O'Sullivan, D., De Vos, W., Weimer, B., Zagorec, M. and Seizer, R. (2002), Discovering lactic acid bacteria by genomics, *Anton. Leeuw. Int. J. G.*, 82, 29-58.
- Kobayashi, C., Yokoyama, H., Ngyen, S.V., Hashi, T., Kuroki, M. and Kodama, Y. (2002), Enhancement of chicken resistance against *Escherichia coli* infection by oral administration of *bifidobacterium thermophilum* preparations, *Avian Dis.*, 46, 542-546
- Kruse, H.P., Kleesen, B. and Blaut, M. (1999), Effects of inulin on faecal *bifidobacteria* in human subjects, *Br. J. Nutr.*, 82, 375-382.
- Laiho, K., Ouwehand, A., Salminen, S., Isolauri, E. Inventing probiotic functional foods for patients with allergic disease. *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, 89(6 Suppl1): 75-82, 2002
- Lee, Y.K. and Puong, K.Y. (2002), Competition for adhesion between probiotics and human gastrointestinal pathogens in the presence of carbohydrate, *Br. J. Nutr.*, 88, S101-S108.
- Lee, Y.J., Yu, W.K. and Heo, T.R. (2003), Identification and screening for antimicrobial activity against *Clostridium difficile* of Bifidobacterium and *Lactobacillus* species isolated from healthy infant faeces, *Int. J. Antimicrob. Ag.*, 21, 340-346.
- Lee, Y.K., Lim, C.Y., Teng, W.L., Ouwehand, A.C., Tuomola, E.M. and Salminen, S. (2000), Quantitative approach in the study of adhesion of lactic acid bacteria to intestinal cells and their competition with enterobacteria, *Appl. Environ. Microb.*, 66, 3692-3697.
- Lee Y-K, Salminen S. The coming of age of probiotics. *Trends Food Sci Technol* 1995; 6:241-5
- Lewis, S.J. and Freedman, A.R. (1998), Review article: the use of biotherapeutic agents in the prevention and treatment of gastrointestinal disease, *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 12, 807-822.
- Lievin, V., Peiffer, I., Hudault, S., Rochat, F., Brassart, D., Neeser, J.R. and Servin, A.L. (2000), *Bifidobacterium* strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity, *Gut*, 47, 646-652.
- Lievin Le Moal, V., Amsellem, R., Servin, A.L. and Coconnier, M.H. (2002), *Lactobacillus acidophilus* (strain LB) from the resident adult human gastrointestinal microflora exerts activity against brush border damage promoted by a diarrhoeagenic *Escherichia coli* in human enterocyte-like cells, *Gut*, 50, 803-811.

- Lilly D. and Stilwell, R. (1965), Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms, *Science*, 147,747-748.
- Lin SY, Ayres JW, Winkler W, Sandine WE. *Lactobacillus* effects on cholesterol: in vitro and in vivo results. *J Dairy Res* 1989; 72: 2885-99
- Link-Amster H, Rochat F, Saudan KY, Mignot O, Aeschmann JM. Modulation of a specific humoral immune response and changes in intestinal flora mediated through fermented milk intake. *FEMS Immunol med Microbiol* 1994; 10:55-64
- Link-Amster, H., Rochat, F., Saudan, K.Y., Mignot, O. and Aeschmann, J.M. (1994), modulation of a specific humoral immune response and changes in intestinal flora mediated through fermented milk intake, *FEMS immunol. Med. Microb.*, 10, 55-63.
- Lorca, G.L., Wadstrom, T., De Valdez, G.F. and Ljungh, A. (2001), lactobacillus acidophilus autolysins inhibit *Helicobacter pylori* in vitro, *Curr. Microbiol.*, 42, 39-44.
- Luders, T., Birkemo, G.A., Fimland, G., Nissen-Meyer, J. and Nes, I.F. (2003), strong synergy between a eukaryotic antimicrobial peptide and bacteriocins from lactic acid bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 1797-1799
- Mack, D.R., Michail, S., Wei, S., McDougall, L. and Hollingsworth, M.A (1999), probiotics inhibit enteropathogenic *E.coli* adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression, *Am. J. Physiol.-Gastroint. Liver Physiol.*, 276, G941-G950.
- Mack, D.R., Ahrne, S., Hyde, L., Wei, S. and Hollingsworth, M.A. (2003), Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of *Lactobacillus* strains to intestinal epithelial cells in vitro, *Gut*, 52, 827-833.
- Madsen, K., Cornish, A., Soper, P., McKaigney, C., Jijon, H., Yachimec, C., Doyle, J., Jewell, L. and De Simone, C. (2001), probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function, *Gastroenterology*, 121, 580-591
- Maia, O.B., Duarte, R., Silva, A.M., Cara, D.C. and Nicoli, J.R. (2001), evaluation of the components of a commercial probiotic in gnotobiotic mice experimentally challenged with *salmonella enterica subsp. enterica ser typhimorium*, *Vet. Microbiol.*, 79, 183-189
- Majamaa M, Isolauri E, Saxelin M, Vesikari T. *Lactic acid bacteria* in the treatment of acute rotavirus gastroenteritis. *J Pediatr gastroenterol Nutr* 1995; 20:333-8
- Majamaa M, Isolauri E. Probiotics: a novel approach in the management of food allergy. *J Allergy clin Immunol* 1997; 99: 179-85
- Malin M, Suomalainen H, Saxelin M, Isolauri E. Promotion of IgA immune response in patients with Crohn's disease by oral bacteriotherapy with *Lactobacillus GG*. *Ann Nutr Metab* 1996; 40: 137-45.
- Mallett AK, Bearne CA, Rowland IR, Farthing MJG, Cole CB and Fuller R (1987), The use of rats associated with a human faecal flora as a model for studying the effects of diet in the human gut microflora, *Journal of Applied Bacteriology*, 63, 39-45
- Mao Y, Nobaek S, Kasravi B, et al. The effects of *Lactobacillus strains* and oat fiber on methotrexate-induced enterocolitis in rats. *Gastroenterology* 1996; 111: 334-44
- Mao Y, Nobaek S, Kasravi B, et al., The effects of *Lactobacillus strains* and oat fiber on methotrexate-induced enterocolitis in rats. *Gastroenterology* 1996; 111:334-44

- Marteau, P., Minekus, M., Havenaar, R. and Huis In't Veld, J.H.J. (1997), Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: Validation and the effects of bile, *J. Dairy Sci.*, 80, 1031-1037.
- Marteau, P.R., De Verse, M., Cellier, C.J. and Schrezenmeir, J. (2001), Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics, *Am. J. Clin. Nutr.*, 73, 430S-436S.
- Marteau, P., Seksik, P. and Jian, R. (2002), Probiotics and intestinal health effects: a clinical perspective, *Br.J. Nutr.*, 88, S51-S57.
- Matilla-Sandholm, T., Matto, J. and Saarela, M. (1999), Lactic acid bacteria with health claims – interactions and interference with gastrointestinal flora, *Int. Dairy J.*, 9, 25-35
- Matsuki T, Watanabe K, Fujimoto J, Mijamoto Y, Takada T, Matsumoto K, Ouaizu H and Tanaka R. (2002), Development of 16S rRNA-gene-targeted group-specific primers for the detection and identification of predominant bacteria in human feces, *Applied Environmental Microbiology*, 68, 5445-51.
- Mc Farland, L., Bernasconi, P., 1993. *Saccharomyces boulardii*: a review of an innovative biotherapeutic agent. *Microbial Ecol. Health Dis.*6, 157-171.
- Mc Farland LV, Elmer GW. Pharmaceutical probiotics for the treatment of anaerobic and other infections. *Anaerobe* 1997; 3: 73-8.
- McBain, A.J. and MacFarlane, G.T. (1997), investigations of bifidobacterial ecology and oligosaccharide metabolism in a three stage compound continuous culture system, *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.*, 222, 32-40.
- McDaniel, T.K., Jarvis, K.G., DonnetBerg, M.S. and Kaper J.B. (1995), a genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 90, 1664-1668.
- McFarland.LV Quality control and regulatory issues for biotherapeutic agents and infectious diseases(GW Elmer, McFarland,LV and Surawicz,CM Eds, Humana Press, Totowa, NJ, 1999, pp.159-193).
- MacFarlane GT, MACFarlane S and Gibson GR (1998), Validation of three stage compound continuous culture system for investigating the effect of retention time on the ecology and metabolism of bacteria in the human colon, *Microbial Ecology in Health and Disease*, 35, 180-187.
- McGroathy, J.A. and Reid, G. (1988), Detection of a *Lactobacillus* substance that inhibits *Escherichia coli*, *Can. J. Microbiol.*, 34, 974-978
- McLean NW and Rosenstein. IJ Characterization and selection of a *lactobacillus* species to recolonize the vagina of women with recurrent bacterial vaginosis. *J. Med. Microbiol.*, 49: 543-552, 2000
- Meghrou, J.,Euloge P., Junelles, A.M., Ballonque, J. and PetitDemange, H. (1990), screening of bifidobacterium strains for bacteriocin production, *Biotechnol.Lett.*, 12,, 575-580.
- Mercenier, A., Pavan, S. and Pot, B. (2003), probiotics as biotherapeutic agents: Present knowledge and future prospects, *Curr. Pharm. Design*, 9, 175-191.
- Metchnikoff, E. (1908), the prolongation of life: optimistic studied, New York, G.P Putmans sons.

- Michail S. and Abernathy, F. (2002) *Lactobacillus plantarum* reduces the in vitro secretory response of intestinal epithelial cells to enteropathogenic *Escherichia coli* infection, *J. Pediatr. Gastr. Nutr.*, 35, 350-355.
- Michail S. and Abernathy, F. (2003), *Lactobacillus plantarum* inhibits the intestinal epithelial migration of neutrophils induced by enteropathogenic *Escherichia coli*, *J. Pediatr. Gastr. Nutr.*, 36, 385-391.
- Michetti, P., Dorta, G., Wiesel, P.H., Brassart, D., Verdu, E., Herranz, M., Felley, C., Porta, N., Rouvet, M., Blum, A.L. and Corthesy-Theulaz, I. (1999), Effect of whey-based culture supernatant of *Lactobacillus acidophilus* (johnsonii) La1 on *Helicobacter pylori* infection in humans, *Digestion*, 60, 203-209.
- Midolo, P.D., Lambert, J.R., Hull, R., Luo, F. and Grayson, M.L. (1995), in vitro inhibition of *Helicobacter pylori* NCTC 11637 by organic acids and lactic acid bacteria, *J. Appl. Bacteriol.*, 79, 475-479.
- Minekus M, Marteau P, Havenaar R and Huis In't Veld JHJ (1995) A multicompartamental dynamic computer controlled model stimulating the stomach and small intestine, *ATLA*, 23, 197-209
- Mitsuoka, T The human gastrointestinal tract. In: BJB Wood, Ed., *The lactic acid bacteria in health and disease*. Elsevier Applied Science, London, UK, 1992, pp.69-114
- Mobley, H., Mendz, G. and Hazell, S. (2001), *Helicobacter pylori* –Physiology and genetics, Washington, D.C, ASM Press.
- Modler, H.W., McKellar, R.C and Yaguchi, M. (1990), *Bifidobacteria* and Bifidogenic Factors, *Can. J. Food Sc. Tech.*, 23, 29-41.
- Molly K, Vande Woestyne M, De Smet I and Verstraete W (1994), Validation of the simulator of the human intestinal microbial ecosystem (SHIME) reactor using microorganism –associated activities, *Microbial Ecology in Health and disease*, 7, 191-200.
- Morelli, L., Sarra, P.G., Botazzi, V., 1988. In vivo transfer of *pamβ1* from *Lactobacillus reuteri* to *Enterococcus faecalis*. *J. Appl. Bacteriol.* 65, 371-375.
- Morelli L (2000), In vitro selection of probiotic *Lactobacilli* : a critical appraisal, *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 1, 59-67
- Moreau, M Robertfroid, I Rowland. *Functional food science and gastrointestinal physiology and function*. *Br. J. Nutr.* 80, (Suppl.1) S 147-S171, 1998b
- Moro, E. (1900), *Über den Bacillus acidophilus n. spec. ein Beitrag zur Kenntnis den normalen Darbakterien des Säuglings*, *Jahrbuch für Kinderheilkunde*, 52, 38-55.
- Mrda, Z., Zivanovic, M., Rasic, J., Gajin, S., Somer, L., Trbojevic, S., Majoros, J. and Petrovic, Z. (1998), Therapy of *Helicobacter pylori* infection using *Lactobacillus acidophilus*, *Med. Pregl.*, 51, 343-345.
- Morishita, Y., Oowada, T., Ozaki, A. and Mizutani, T. (2002), Galactooligosaccharide in combination with *Bifidobacterium* and *Bacteroides* affects the population of *Clostridium perfringens* in the intestine of gnotobiotic mice, *Nutr. Res.*, 22 1333-1341.
- Mullie, C., Yazourh, A., Singer, E., Lecroix, F., Blareau, J.P., Romond, M.B and Romond, C. (2002), Partial characterization of *Bifidobacterium breve* C50 cell-free whey compounds inducing modifications to the intestinal microflora, *J. Dairy Sci.*, 85, 1383-1389

- Naidu, A.S., Bidlack, W.R. and Clemens, R.A. (1999), probiotic spectra and lactic acid bacteria(LAB), *Crit. Rev. Food Sci.*, 39, 13-126
- Neeser, J.R., Granato, D., Rouvet, M., Servin, A., Teneberg, S. and Karlsson, E.A. (2000), *Lactobacillus johnsonii* *Lal* shares carbohydrate-binding specificities with several enteropathogenic bacteria, *Glycobiology*, 10, 1193-1199.
- Nes, I.F., Diep, D.B., Havarstein, L.S., Brurberg, M.B., Eijsink, V. and Holo, H. (1996), Biosynthesis of bacteriocins in *lactic acid bacteria*, *Anton. Van Leeuw.*, 70, 113-128.
- Nomoto K, Miake S and Hashimoto S (1985), Augmentation of host resistance to *Listeria monocytogenes* infection by *Lactobacillus casei*, *Journal of Clinical Laboratory and Immunol*, 17, 91-97.
- O' Sallivan MG, Thornton G, O'Sullivan GC, Collins JK. Probiotic bacteria: myth or reality? *Trends Food Sci Technol* 1992; 3: 309-14.
- O'Sullivan MA and O' Murrain CA (2000), Bacterial supplementation in the irritable bowel syndrome. A randomized double-blind placebo-controlled crossover study, *Digestive Liver Disease*, 32, 294-301.
- Probert HM, Gibson GR, (2004), Development of a fermentation system to model sessile bacterial populations in the human colon, *Biofilms*, 1, 11-17
- Ogawa, M, Shimizu, K., Nomoto, K., Takahashi, M., Watanuki, M., Tanaka, R., Tanaka, T., Hamabata, T., Yamasaki, S. and Takeda, Y. (2001a), Protective effect of *Lactobacillus casei* strain Shirota on Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157H7 infection in infant rabbits, *Inf. Immun.*, 69, 1101-1108
- Oria-Jensen, S. (1924), La classification des bacteries lactiques, *Le Lait*, 4, 468-480.
- Okazaki K, Fujikawa S and Matsumoto N (1990), Effects of xylooligosaccharides on growth of bifidobacteria, *Journal of Japanese Society of Nutrition and Food Sciences*, 43, 395-401.
- Olano-Martin E, Gibson GR and Rastall R A (2002), Comparison of the in vitro bifidogenic properties of pectins and pectic-oligosaccharides, *Journal of Applied Microbiology*, 93, 505-511.
- Olano-Martin E, Mountzouris KC, Gibson GR and Rastall RA (2000), In vitro fermentability of dextran, oligodextran and maltodextrin by human gut bacteria, *British Journal of Nutrition*, 83, 247-255.
- Osset, J., Bartolome, R.M., Garcia, E. and Andreu, A. (2001), Assessment of the capacity of *Lactobacillus* to inhibit the growth of uropathogens and block their adhesion to vaginal epithelial cells, *J.Infect. Dis.*, 183, 485-491.
- Ouwehand, A.C. and Salminen, S.J. (1998), The health effects of cultured milk products with viable and non-viable bacteria, *Int. Dairy j.* 8, 749-758.
- Ouwehand, A.C., KirjaVainen, P.V., Gronlund, M., Isolauri, E. and Salminen, S. (1999a). Adhesion of probiotic microorganisms to intestinal mucus, *Int.Dairy J.*, 9, 623-630.
- Ouwehand, A.C. KirjaVainen, P.V., Shortt, C. and Salminen, S. (1999b), Probiotics: mechanisms and established effects, *Int. Dairy J.*, 9, 43-52.
- Ouwehand, A. Isolauri, E Salminen. S. The role of the intestinal microflora for the development of the immune system in early childhood. *Eur. J. Nutr.*, 41(suppl1): 132-137, 2002

- Pant AR, Graham SM, Allen SJ, et al. *Lactobacillus GG* and acute diarrhea in young children in the tropics. *J Trop Pediatr Gastroenterol Nutr* 1996;42:162-5.
- Parker, R.B. (1974), Probiotics: the other half of the antibiotics story, *Anim. Nutr. Health*, 29, 4-8
- Pedroza, M.C., Golner, B.B, Goldin, B.R, Barakat, S., Dallal, G.E. and Russell, R.M. (1995) Survival of yogurt containing organisms and *Lactobacillus gasseri* (ADH) and their effect on bacterial enzyme activity in the gastrointestinal tract of healthy and hypochlorhydric elderly subjects, *Am. J. Clin. Nutr.*, 61, 353-359
- Perdigon G, Alvarez S, Rachid M, Aguero G, Gobbato N. Immune stimulation by probiotics. *J Dairy Sci* 1995;78: 1597-606.
- Perez, P.F., Minnaard, J., Rouvet, M., Knabehans, C., Brassart, D., De Antoni, G.L and Schiffrin, E.J. (2001), Inhibition of *Giardia intestinalis* by extracellular factors from lactobacilli: an in vivo study, *Appl. Environ. Microb.*, 67, 5037-5042.
- Perrin S., Warchol, M., Grill, J.P. and Schneider, F., (2001), Fermentations of fructooligosaccharides and their components by *Bifidobacterium infantis* ATCC 15697 on batch culture in semi-synthetic medium, *J.appl. Microbiol.*, 90, 859-865.
- Pfeifer, A. and Rosat, J.P. (1998), Immunological effects of probiotic food, *Monatsschr. Kindrh.*, 146, S13-S20
- Probert H, Marie and Gibson GR (2002), Investigating the probiotic and gas –generating effects of selected carbohydrates on the human colonic microflora, *Letters in Applied Microbiology*, 35, 473-480.
- Rabiu, B.A., Jay, A.J., Gibson, G.R., and Rastall, R.A. (2001), Synthesis and fermentation properties of novel galacto-oligosaccharides by beta-galactosidases from *Bifidobacterium* species, *Appl. Environ. Microb.*, 67, 2526-2530.
- Rafter, J, *Lactic acid bacteria* and cancer: mechanistic perspective. *Br J Nutr.*, 88: S89-S94, 2002
- Ramare, F, Nicoli, J., Dabard, J., Corring, T., Ladire, M., GneuGneau, A.M. and Raibaud, P. (1993), Trypsin dependant production of an antibacterial substance by a human *Peptostreptococcus* strain in gnotobiotic rats and in vitro, *Appl. Environ. Microb.*, 59, 2876-2883
- Rastall RA and Gibson GR (2002), Prebiotic oligosaccharides: evaluation of biological activities and potential future developments, In Tannock GW, *Probiotics and prebiotics: where are we going?*, Wyomndham, Caister Academic Press, 107-148
- Rastall RA and Maitin V (2002), Prebiotics and synbiotics: towards the next generation, *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 490-496
- Reid, G., McGroathy, J.A., Angotti, R. and Cook, R.L. (1988), *Lactobacillus* inhibitor production against *Escherichia coli* and coaggregation ability with uropathogens, *Can. J. microbiol.*, 34, 344-351.
- Reid. G., Howard, J., and Gan, B.S. (2001), Can bacterial interference prevent infection? *Trends Microbiol.*, 9, 424-428.
- Reid, G., Charbonneau, D., Erb, J., Kochanowski, B., Beuerman, D., Pohner, R. and Bruce, A.W. (2003), Oral use of *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 AND *L.fermentum* RC-14 significantly alters vaginal flora: randomised, placebo-controlled trial in 64 healthy women, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 35, 131-134.

- Reid G, Bruce AW, Fraser, Heinmann c, Owen J and Henning B (2001), oral probiotics can resolve urogenital infections, *FEMS Immunology Medicine Microbiology*, 30, 49-52.
- Reid G, Sanders ME, Gaskins RH, Gibson GR, Mercennier A, Rastall RA, Robertfroid M, Rowland IR, Cherbut C and Klaenhammer T (2003), New scientific paradigms for probiotics and prebiotics, *Journal of Clinical Gastroenterology* ,37, 105-118
- Resta-Lenert, S. and Barrett, K.E. (2003), Live probiotics protect intestinal epithelial cells from the effects of infection with enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC), *Gut*, 52, 988-997.
- Rettger, L. and Cheplin, H.A. (1921), *Atreatise on the transformation of the intestinal flora with special reference to the implantation of Bacillus acidophilus*, London, Yale University Press.
- Rettger, L.F. (1935), *Lactobacillus acidophilus: its therapeutic application*, London, Yale, University Press.
- Reuter, G., Klein, G. and Goldberg, M. (2002) Identification of probiotic cultures in food samples, *Food Res. Int.*, 35, 117-124.
- Robertfroid, M.B. (1997), Health benefits of non-digestible oligosaccharides, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 427, 211-219
- Robertfroid, M.B., Van Loo, J.A. and Gibson, G.R (1998), The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products, *J. Nutr.*, 128, 11-19.
- Rodriguez, E., Arques, J.L., Rodriguez, R., Nunez, M. and Medina, M. (2003), Reuterin production by *lactobacilli* isolated from pig faeces and evaluation of probiotic traits, *Lett. Appl. Microbiol.*, 37, 259-263.
- Robertfroid M, Van Loo J, A.E and Gibson GR (1998), The bifidogenic game of chicory inulin and its hydrolysis products., *Journal of Nutrition*, 128, 11-19
- Rokiah, M.Y., Formuzul, H., Maznah, I. and Zaiton, H. (2000), isolation of *Bifidobacteria infantis* and its antagonistic activity against ETEC 0157 and *Salmonella typhimorium S-285* in weaning foods, *Asia Pacific. J. Clin. Nutr.*,9 130-135.
- Romond, M.B., Ais, A., Yazourh, A. and Romond, C. (1997a), Cell-free wheys from bifidobacteria fermented milks exert a regulatory effect on the intestinal microflora of mice and humans, *Anaerobe*, 3, 137-143.
- Romond, M.B., Haddou, Z., Mielcareck, C. and Romond, C. (1997b), Bifidobacteria and intestinal human health: regulatory effect of indigenous bifidobacteria on *Escherichia coli* intestinal colonisation, *Anaerobe*, 3, 131-136.
- Romond, M.B., Ais, A., Guillemot, F., Bounouader, R., Cortot, A. and Romond, C. (1998), Cell-free whey from milk fermented with bifidobacterium breve C50 used to modify the colonic microflora of healthy subjects , *J. dairy Sci.*, 81, 1229-1235.
- Rook, GA Stanford. JL Give us this day our daily germs. *Immunol. Today*,19(3): 113-116, 1998.
- Rosenfeldt, V., Benfeldt, E., Nielsen, S.D., Michaelsen, K.F., Jeppesen, D.L., Valerius, N.H. and Paerregaard, A. (2003), Effect of probiotic lactobacillus strains in children with atopic dermatitis, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 111, 389-395.
- Rumney CJ and Rowland IR (1992), In vivo and In vitro models of the human colonic flora, *Critical Reviews in food Science and Nutrition*, 31, 299-331

- Saavedra, J.(2000), Probiotics and infectious diarrhea, Am. J. Gastroenterol., 95, S16-S18.
- Saavedra, J.M. (2001), Clinical applications of probiotic agents, Am. J. Clin. Nutr., 73, 1147S-1151S.
- Saavedra JM, Bauman NA, Oung, I, Perman JA and Yolken RH (1994), feeding of Bifidobacterium bifidum and Streptococcus thermophilus to infants in hospital for prevention of diarrhea and Shedding of rotavirus, Lancet, 344, 8929.
- Sakamoto, I., Igarashi, M., Kimura, K., Takagi, A., Miwa, T. and Koga, Y. (2001), Suppressive effect of *Lactobacillus gasseri* OLL 2716 (LG21) on *Helicobacter pylori* infection in humans, J. Antimicrob. Chemoth., 47, 709-710
- Salminen S, Laine M, Von Wright A, Vuopio-Varkila J, Korhonen T, Matilla-Sandholm T. Development of selection criteria for probiotic strains to assess their potential in functional foods: a Nordic and European approach. Biosci Microflora 1996; 15: 61-7
- Salminen, S., Isolauri, E. and Salminen E. (1996a), Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges, Anton. Van Leeuw., 70, 347-358.
- Salminen, S Bouley, C, Boutron-Ruault, M-C, Cummings, JH, Franck, A, Gibson, GR, Isolauri, E, M-C, Salminen, S, Deighton, MA, Benno, Y, Gobarch. SL, *Lactic acid bacteria* in health and disease. In: S. Salminen, A Von Wright, Eds., Lactic acid Bacteria; Microbiology and functional aspects, 2nd ed., Marcel Dekker, New York, 1998b, pp. 211-253.
- Salminen S., Laine, M., Von Wright, A., Vuopio-Varkila, J., Korhonen, T. and Matilla-Sandholm, T. (1996b), Development of selection bacteria for probiotic strains to assess their potential in functional foods.: a Nordic and European approach, Bioscience Microflora, 15, 61-67.
- Salminen S., Bouley, C., Boutron-Ruault, M.C., Cummings, J.H., Franck, A., Gibson, G.R., Isolauri, E., Moreau, M.C., Robertfroid, M. and Rowland, I. (1998), Functional food science and gastrointestinal physiology and function, Br. J. Nutr., 80 Suppl I, S147-S171.
- Sanders ME. Summary of conclusions from a consensus panel of experts on health attributes of Lactic cultures: significance to fluid products containing cultures. J Dairy Sci 1993;76:1819-28.
- Sanders ME and Klaenhammer TR The scientific basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM functionality as a probiotic. J.Dairy Sci., 84: 319-331, 2001
- Sansonetti, P.J. and Phalipon, A. (1999), Probiotics: how should they be defined? Trends Food Sci. Tech., 10, 107-110.
- Saxelin, M., Valio-Limited. *Lactobacillus GG* and its health effects. LGG Summatim 1999 Valron, Helsinki, Finland.
- Saxelin M, Pessi T and Salminen S (1995), Fecal recovery following oral administration of *Lactobacillus GG* (AATC 53103) in gelatine capsules to healthy volunteers, International Journal of Food Microbiology, 25, 199-203.
- Schiffirin EJ, Rochat F, Link-Amster H, Aeshlimann JM and Donnet Hughes A (1995), Immune system stimulation by probiotics, Journal of Dairy Science, 78, 1597-1606.
- Schultsz C, Van Den Berg FM, Ten kate FW, Tytgat GN and Dankert J (1999), The intestinal mucus layer from patients with inflammatory bowel disease harbors high numbers of bacteria compared with controls, Gastroenterology, 117, 1089-1097.

- Schrezenmeir, J. and De Vrese, M. (2001), probiotics, prebiotics, and symbiotics-approaching a definition, *Am. J. Clin. Nutr.*, 73, 361S-364S
- Schriffin EJ, Rochat F, Link-Amster H, Aeschlimann JM, Donnet Hughes A. Immunomodulation of human blood cells following the ingestion of lactic acid bacteria. *J Dairy Sci* 1995; 78: 491-7.
- Schwab JH Modulation of the immune response by bacteria, In: D Schlessinger, Ed., *Microbiology*, 1977, American Society for Microbiology, Washington D.C., 1977, pp. 366-373.
- Schweizer, T.F. and Wursch, P. (1991), The physiological and nutritional importance of dietary fiber, *Experientia*, 47, 181-186
- Seki, M., M. Igarashi, Y. Fukuda, S. Shimamura, T. Kawashima, K. Ogasa. The effect of Bifidobacterium cultured milk on the regularity among an aged group. *J. Jpn. Soc. Nutr Food Sci.*, 34: 379-387, 1978.
- Servin, A.L. and Coconnier, M.H. (2003), Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens, *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, 17, 741-754.
- Setoyama, H., Imaoka, A., Ishikawa, H. and Umesaki, Y. (2003), Prevention of gut inflammation by *Bifidobacterium* in dextran sulfate-treated gnotobiotic mice associated with *Bacteroides* strains isolated from ulcerative colitis patients, *Microbes and Infection*, 5, 115-122.
- Shahani K., Vakil J.R. and Kilara, A. (1977), Natural antibiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* and *Bulgaricus*. II. Isolation of acidophilin from *L. acidophilus*, *Cult. Dairy Prod. J.*, 12, 8.
- Shau, B.S., Wu, J.J., Lo, C.Y., Wu, H.W., Chen, J.H., Lin, Y.S. and Lin, M.d. (2002), Impact of supplement with *Lactobacillus*- and *Bifidobacterium*-containing yogurt on triple therapy for *Helicobacter pylori* eradication, *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 16, 1669-1675.
- Shanahan. F. Probiotics and inflammatory bowel disease: from fads and fantasy to facts and future. *Br. J. Nutr.*, 88:S5-S9, 2002
- Shornikova A-V, Isolauri E, Bumakova L, Lukovnikova S, Vesikari T. A trial in the Karelian Republic of oral dehydration and *Lactobacillus GG* for treatment of acute diarrhea. *Acta Paediatr* 1997; 86: 460-5
- Shu, Q. and Gill, H.S. (2001), A dietary probiotic (*Bifidobacterium lactis* HN019) reduces the severity of *Escherichia coli* O157:H7 infection in mice, *Med. Microbiol. Immunol.*, 189, 147-152.
- Shu, Q., Lin, H., Rutherford, K.J., Fenwick, S.G., Prasad, J., Gopal, P.K. and Gill, H.S. (2000), Dietary *Bifidobacterium lactis* (HN019) enhances resistance to oral *Salmonella typhimorium* infection in mice, *Microbiol. Immunol.*, 44, 213-222
- Shu, Q. and Gill, H.S. (2002), Immune protection mediated by the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20™) against *Escherichia coli* O157:H7 infection in mice, *Fems Immunol. Med. Microbiol.*, 34, 59-64
- Shu, Q., Qu, F. and Gill, H.S. (2001), Probiotic treatment using *Bifidobacterium lactis* HN019 reduces weanling diarrhea associated with rotavirus and *Escherichia coli* infection in a piglet model, *J. Pediatr. Gastr. Nutr.*, 33, 171-177
- Sgouras, D.N., Maragkoudakis, P., Petraki, K., Martinez, B., Michopoulos, S., Tsakalidou, E., Kalatzopoulos, G. Mentis, A. (2001), Inhibition of *H. pylori* colonization and associated gastritis in the

- HpSS1 C57BL/6 mouse model via administration of the probiotic *Lactobacillus casei* ACA-DC6002, *Gut*, 49, 816.
- Silva, M., Jacobs, N.V., Deneke, C. and Gorbach, S.L. (1987), Antimicrobial substance from a human *Lactobacillus* strain, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 31, 1231-1233
- Silva, A.M., Bambilra, E.A., Oliveira, A.L., Souza, P.P., Gomes, D.A., Vieira, E.C. and Nicoli, J.R. (1999), Protective effect of bifidus milk on the experimental infection with *Salmonella enteritidis* subsp. *typhimorium* in conventional and gnotobiotic mice, *J. Appl. Microbiol.*, 86, 331-336.
- Silvi, S., Rumney, C.J., Cresci, A. and Rowland, I.R. (1999), Resistant starch modifies gut microflora and microbial metabolism in human flora-associated rats inoculated with faeces from Italian and UK donors, *J. Appl. Microbiol.*, 86, 521-530.
- Simonetta, A.C., Develasco, L.G.M. and Frison, L.N. (1997), Antibacterial activity of *enterococci* strains against *Vibrio cholerae*, *Lett. Appl. Microbiol.*, 24, 139-143
- Smejkal CW, Kolida S, Bingham M, Gibson GR and McCartney AL (2003), probiotics and prebiotics in female health, *Journal of British Menopause Society*, 9, 69-74
- Spanhaak S, Havenaar R, Schaafsma G. The effect of consumption of milk fermented by *Lactobacillus casei* strain *Shirota* on the intestinal microflora and immune parameters in humans. *Eur J Clin Nutr* 1998; 52: 1-9.
- Sperti, G. (1971), *Probiotics*, West Point, Avi Publishing.
- Sreekumar, O. and Hosono, A. (1998), Antimutagenicity and the influence of physical factors in binding *Lactobacillus gasseri* and *Bifidobacterium longum* cells to amino acid pyrolysates, *J. Dairy Sci.*, 81, 1508-1516.
- Sullivan, A., Bennet, R., Viitanen, M., Palmgren, A.-C and Nord, C.E. (2002), Influence of *Lactobacillus F19* on intestinal microflora in children and elderly persons and impact on *Helicobacter pylori* infections, *Microbial Ecol. In health and Disease*, S3, 17-21.
- Suzuki, T., Ito, K., Kaneko, T. and Suzuki, H. (1997), Inhibition of bacterial translocation from the gastrointestinal tract of mice by oral administration of a culture condensate of *Bifidobacterium longum*, *J. Vet. Med. Sci.*, 59, 665-669.
- Suau A, Bonnet R, Sutren M, Godon J-J, Gibson G, R., Collins m, D. and Dore J (1999), Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut, *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 4799-4807.
- Sudo N, Sawamura S, Tamaka k, Aiba Y, Kubo C, and Koga Y(1997), the requirement of intestinal bacterial flora for the development of an IgE production system.
- Szajewska, H., and Mukowicz. (2001), Probiotics in the treatment and prevention of acute infectious diarrhea in infants and children: A systematic review of published randomized, double-blind, placebo controlled trials, *J. Pediatr. Gastr. Nutr.*, 33, S17-S25
- Talarico, T.L., Casas, I.A., Chung, T.C. and Dobrogosz, W.J. (1988), Production and isolation of reuterin, a growth inhibitor produced by *Lactobacillus reuteri*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 32, 1854-1858.
- Tamime AY, Marshall VM, Robinson RK. Microbiological and Technological aspects of milks fermented by *bifidobacteria*. *J Dairy Res* 1995; 62: 151-87.

- Tannock, G. (1999), A fresh look at the intestinal microflora, in Tannock, G., Probiotics: A critical review Norflok, Horizon Scientific Press, 5-14.
- Tankanow RM, Ross MB, Ertel JJ, Dickinson DG, McCormick IS, Garfinkel JF. A double-blind, placebo-controlled study of the efficacy of Lactinex in the prophylaxis of amoxicillin-induced diarrhea. *Ann Pharmacol* 1990; 24: 382-4.
- Tahri K, Ballonque J, Scheider F. Effects of three strains of *bifidobacteria* on cholesterol. *Lett Appl Microbiol* 1995; 21: 149-51.
- Temmerman R., G. Huys, B. Pot and J. Swings (2001) Identification and antibiotic resistance of isolates from probiotic products. Abstracts of 101st ASM General Meeting C-289
- Tissier, H. (1906), Le traitement des infections intestinales par la methode de trasformation de la flore bacterienne de l'intestine, *C. R. Soc Biol.*, 60, 359-361.
- Toba, T., Yoshioka, S. and Itoh, T. (1991), Potential of *Lactobacillus gasseri* isolated from infant faeces to produce bacteriocin *Lett. Appl. Microbiol.*, 12, 228-231.
- Toba, T., Virkola, R., Westerlund, B. Bjorkman, Y., Sillanpaa, J., Vartio, T., Kalkkinen, N. and Korhonen, T.K. (1995), A collagen binding S-Layer protein in *Lactobacillus crispatus*, *Appl. Environ. Microb.*, 612467-2471.
- Todoriki, K., Mukai T., Sato, S. and Toba, T. (2001), Inhibition of adhesion of food -borne pathogens to Caco-2 cells by *Lactobacillus* strains, *J. Appl. Microbiol.*, 91, 154-159.
- Trowell, H. (1972), Ischemic heart disease and dietary fiber, *Am.J. Clin. Nutr.*, 25, 926-932
- Trowell, H., Southgate, D.A.T., Wolever, T.M.S., Leeds, A.R., Gassull, M.A and Jenkins, D.J.A. (1976), Dietary Fiber Redefined.
- Tuomola, E.M., Ouwehand, A.C. and Salminen, S.J. (1999), The effect of probiotic bacteria on the adhesion of pathogens to human intestinal mucus, *Fems Immunol. Med. Microbiol.*, 26, 137-142
- Van Laere, K.M., Hartemink, R., Bosveld, M., Schols, H.A. and Voragen, A.G. (2000), Fermentation of plant cell wall derived polysaccharides and their corresponding oligosaccharides by intestinal bacteria, *J. Agric. Food Chem.*, 48, 1644-1652.
- Vandenbergh, P.A. (1993), Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth, *Fems Microbiol. Rev.*, 12, 221-238.
- Vanderhoof, J.A. (2001), Probiotics: future directions, *Am. J. Nutr.*, 73, 1152s-1155s.
- Wagner, D., Pierson, C., Warner, T., Dohnalek, M., Farmer, J., Roberts, L., Hilty, M. and Balish, E. (1997), Biotherapeutic effects of probiotic bacteria on candidiasis in immunodeficient mice, *Inf. Immun.*, 65, 4165-4172.
- Wang, X. and Gibson, G.R. (1993), Effects of the in vitro fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large-intestine, *J.Appl. Bacteriol.*, 75, 373-380.
- Wendakoon, C.N., Fedio, W., Macleod, A. and Ozimek, L. (1998), In vitro inhibition of *Helicobacter pylori* by dairy starter cultures, *Milchwissenschaft*, 53, 499-502.
- Wendakoon, C.N., Thomson, A.B.R. and Ozimek, L. (2002), Lack of therapeutic effect of a specially designed yogurt for the eradication of *Helicobacter pylori* infection, *Digestion*, 65, 16-20.

Witsell DL, Garrett CG, Yabrough WG, Dorrestein SP, Drake AF, Weissler MC. Effect of lactobacillus acidophilus on antibiotic-associated gastrointestinal morbidity: a prospective randomized trial. J Otolaryngol 1995; 24: 230-3.

Wunderlich PF, Braun L, Fumagalli I, et al. Double-blind report on the efficacy of lactic acid producing Enterococcus SF68 in the prevention of antibiotic associated diarrhea and in the treatment of acute diarrhea. J Int Med Res 1989; 17: 333-8.

Wunderlich PF, Braun L, Fumagalli I, et al., Double-blind report on the efficacy of lactic acid-producing Enterococcus SF68 in the prevention of antibiotic-associated diarrhea and in the treatment of acute diarrhea. J Int Med Res 1989;17:333-8),

Yildirim and Johnson 1998 Characterization and antimicrobial spectrum of bifidocin-B, a bacteriocin produced by *Bifidobacterium bifidum* NCFB. 1454, J. Food. Prot., 61, 47-51.

Yeung, PSM Sanders ME Kitts, CL Cano R and Tong Ps 2002

Δ/νσεια Internet

ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΑ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗ, Μανωλαράκης Μανώλης.

PROEUHEALTH cluster <http://proeuhealth.vtt.fi>.

<http://www.foodproductdesign.com/articles/6a1annual1.html>

http://en.wikipedia.org/wiki/Lactobacillus_casei

http://en.wikipedia.org/wiki/Fermentation_%28biochemistry%29

<http://en.wikipedia.org/wiki/Yoghurt>

http://en.wikipedia.org/wiki/Lactobacillus_acidophilus

http://en.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli

http://webserver.hypertech.gr/nounou/products.asp?categ_id=6&new_file=0&product_id=48&actimg=img3

<http://en.wikipedia.org/wiki/Enterococcus>

<http://www.culturelle.com>

<http://www.florajen.com>

<http://www.customprobiotics.com>

<http://en.wikipedia.org/wiki/Kefir>

http://en.wikipedia.org/wiki/Saccharomyces_cerevisiae

<http://el.wikipedia.org/wiki/PH>

<http://en.wikipedia.org/wiki/Streptococcus>

http://wikipedia.org/wiki/Clostridium_difficile

<http://images.google.gr/images?hl=el&q=Lactobacillus%20plantarum&ie=UTF-8&oe=UTF-8&um=1&sa=N&tab=wi>

<http://en.wikipedia.org/wiki/kumis>

<http://en.wikipedia.org/wiki/Yakult>

http://en.wikipedia.org/wiki/Helicobacter_pylori