



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Διερεύνηση του προβιοτικού δυναμικού μικροοργανισμών απομονωμένων από ελληνικό μελισσόψωμο

Τσιμπονίδης Δημήτριος του Ιωάννη

Επιβλέπων καθηγητής: Μόσιαλος Δημήτριος

Λάρισα, Σεπτέμβριος 2024

Διερεύνηση του προβιοτικού δυναμικού μικροοργανισμών απομονωμένων από ελληνικό μελισσόψωμο

Investigation on the probiotic potential of microorganisms isolated from Greek bee bread

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

- **ΜΟΣΙΑΛΟΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ (επιβλέπων καθηγητής):**

Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

- **ΑΜΟΥΤΖΙΑΣ ΓΡΗΓΟΡΙΟΣ:**

Καθηγητής Βιοπληροφορικής με έμφαση στην Μικροβιολογία του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

- **ΠΑΤΕΡΑΚΗ ΧΡΥΣΑΝΘΗ:**

Επίκουρος Καθηγήτρια Μικροβιολογίας με έμφαση στη Βιοτεχνολογία του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η πτυχιακή αυτή εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Μικροβίων – Μοριακής Βακτηριολογίας – Ιολογίας, του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή κύριο Μόσιαλο Δημήτριο για την αποδοχή της ανάληψης επίβλεψης της εργασίας και την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος, καθώς και για την καθοδήγηση και την άμεση συνεργασία μας κατά την εκπόνηση της εργασίας.

Επίσης, για την συμμετοχή τους στην τριμελή επιτροπή θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή κύριο Αμούτζια Γρηγόριο και την καθηγήτρια κυρία Πατεράκη Χρυσάνθη, την οποία θα ήθελα να ευχαριστήσω και για την καθοδήγηση και βοήθεια στο χώρο του εργαστηρίου.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στον διδάκτορα κύριο Ασούτη Διδαρά Νικόλαο, για την πολύτιμη υλική και πνευματική συνεισφορά του, με την τεχνογνωσία που διαθέτει στο αντικείμενο και την συνεχή ανταπόκριση του στη διευκρίνιση και επίλυση οποιονδήποτε αποριών μου και εν γένει για την έμπρακτη υποστήριξη καθ' όλη την διάρκεια των πειραμάτων και της συγγραφής.

Τελειώνοντας, ευχαριστώ την οικογένεια μου για την υλική και συναισθηματική υποστήριξη κατά τη διάρκεια των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η γύρη που συλλέγεται από μέλισσες και εναποτίθεται σε κελιά της κηρήθρας, μαζί με μέλι, νέκταρ και αδενικές εκκρίσεις, υφίσταται ζύμωση από βακτήρια γαλακτικού οξέος και ζύμες για να παραχθεί μελισσόψωμο. Φυσικά ζυμωμένα προϊόντα, όπως το μελισσόψωμο, είναι γνωστό ότι περιέχουν προβιοτικά. Η αναζήτηση και εισαγωγή νέων προβιοτικών στελεχών, που είναι βιώσιμα στον γαστρεντερικό σωλήνα, εκτός από ασφαλή και αποτελεσματικά, αποτελεί βασική πρόκληση της μικροβιολογίας τροφίμων. Αυτή η εργασία είχε σαν στόχο να διερευνήσει το προβιοτικό δυναμικό και πιο συγκεκριμένα την βιωσιμότητα σε προσομοιωμένες συνθήκες γαστρεντερικού σωλήνα 9 στελεχών ζυμών, των ειδών *Zygosaccharomyces melis*, *Z. siamensis*, *Starmerella magnoliae* και 4 στελεχών βακτηρίων, των ειδών *Apilactobacillus kunkeei* και *Fructobacillus fructosus*, που απομονώθηκαν από ελληνικό μελισσόψωμο. Προσδιορίστηκε το προβιοτικό δυναμικό με *in vitro* δοκιμασίες, όπως έλεγχος αντοχής σε χολικά άλατα, για τις ζύμες και τα βακτήρια και επιπλέον έλεγχος αντοχής σε παγκρεατίνη για τις ζύμες. Τα βακτήρια δεν έδειξαν αντοχή σε χολικά άλατα, τέτοια ώστε να θεωρηθούν πιθανά προβιοτικά. 5 στελέχη των ζυμών, τα *Z. siamensis* (444A, 446, 447, 448, 449), έδειξαν υψηλή αντοχή στα χολικά και ικανοποιητική αντοχή στην παγκρεατίνη, ώστε να έχουν προοπτικές χρήσης ως προβιοτικά και να αξίζουν περαιτέρω διερεύνησης.

ABSTRACT

Bee collected pollen which is deposited in honeycomb cells, along with honey, nectar, and glandular secretions, undergoes fermentation by lactic acid bacteria and yeasts to produce bee bread. Naturally fermented products, such as bee bread, are known to contain probiotics. The research for and introduction of new probiotic strains that are viable in the gastrointestinal tract (GIT), in addition to being safe and effective, is a key challenge in food microbiology. This study aimed to investigate the probiotic potential and, more specifically, the viability under simulated gastrointestinal conditions of nine yeast strains belonging to the species *Zygosaccharomyces melis*, *Z. siamensis*, *Starmerella magnoliae*, and four bacterial strains belonging to the species *Apilactobacillus kunkeei* and *Fructobacillus fructosus*, which were isolated from Greek bee bread. The probiotic potential was assessed by *in vitro* assays, such as resistance to bile salts for both yeasts and bacteria and an additional resistance test to pancreatin for the yeasts. Bacteria did not exhibit significant resistance to bile salts in order to be considered potential probiotics. However, five *Z. siamensis* yeast strains (444A, 446, 447, 448, 449), demonstrated high resistance to bile salts and significant resistance to pancreatin, indicating probiotic potential thus warranting further investigation.

Πίνακας περιεχομένων

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4
ABSTRACT	5
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1.1 Μελισσόψωμο	8
Μελισσοκομικά προϊόντα.....	8
Προέλευση μελισσόψωμου	9
Θρεπτική αξία και χημική σύνθεση μελισσόψωμου	10
Βιολογικές ιδιότητες μελισσόψωμου	11
Αντιμικροβιακές ιδιότητες.....	11
Επίδραση σε μικροβίωμα ξενιστή.....	12
Συνεργιστική δράση με αντιβιοτικά.....	12
Αντιοξειδωτικές ιδιότητες	12
Διερεύνηση βιοσυνθετικού δυναμικού	12
Άλλα οφέλη για την υγεία	13
Μικροβίωμα μελισσόψωμου	13
Εξέλιξη και προσαρμογή μικροβιώματος.....	13
Βακτήρια γαλακτικού οξέος και ζύμωση.....	14
Φυλογενετική ταξινόμηση μικροοργανισμών μελισσόψωμου	14
Απόκτηση μελισσόψωμου.....	15
1.2 Προβιοτικά.....	15
1.2.1 Ιστορία προβιοτικών και ορισμός τους	15
1.2.2 Ιδιότητες προβιοτικών μικροοργανισμών	18
1.2.3 Ευεργετικές δράσεις προβιοτικών	22
1.2.4 Μηχανισμοί δράσης των προβιοτικών μικροοργανισμών	27
1.2.5 Ασφάλεια προβιοτικών.....	31
1.2.6 Προβιοτικοί μικροοργανισμοί.....	37
1.3 Προβιοτικές ιδιότητες προϊόντων της μέλισσας.....	38
Προβιοτικά από μέλισσα και μέλι.....	38
Προβιοτικές ιδιότητες μελισσόψωμου από την βιβλιογραφία.....	41
Πειραματική διαδικασία και σκοπός	41
ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ	42
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	44

ΣΥΖΗΤΗΣΗ	46
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	51

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Μελισσόψωμο

Μελισσοκομικά προϊόντα

Διάφορα προϊόντα της μέλισσας, όπως το μέλι, ο βασιλικός πολτός, η πρόπολη ή η γύρη των μελισσών, είναι γνωστά από την αρχαιότητα και χρησιμοποιούνται ευρέως για κατανάλωση λόγω της διατροφικής τους αξίας αλλά και για θεραπευτικούς σκοπούς. Ένα προϊόν που είναι λιγότερο γνωστό στο ευρύ κοινό είναι το μελισσόψωμο. Από την έρευνα, ωστόσο, των τελευταίων χρόνων προκύπτει ότι πρόκειται για ένα προϊόν που αξίζει της προσοχής λόγω των ποικίλων ευεργετικών ιδιοτήτων του για την υγεία αλλά και της περιεκτικότητας του σε απαραίτητα θρεπτικά και μικρό θρεπτικά συστατικά.

Η πλέον πλούσια σε ενέργεια τροφή, το μέλι, ανάλογα τον τύπο του, έχει δείξει αντικαρκινικές ιδιότητες και, *in vitro*, αντιβακτηριακή και αντιμυκητιακή δράση. Παράλληλα, εμφανίζει και αντιφλεγμονώδη δράση, παίζοντας έτσι ρόλο στην επούλωση πληγών ενώ ανάλογα με τη βοτανική του προέλευση εμφανίζει και αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Το μέλι, τέλος, θεωρείται και πρεβιοτική τροφή του ανθρώπινου μικροβιώματος (Didaras NA et al, 2020).

Η πρόπολη αποτελείται από ρητίνες που συλλέγονται από τις μέλισσες και στη συνέχεια αναμιγνύονται εντός της κυψέλης με σάλιο μέλισσας και κερί. Ο ρόλος της είναι η οχύρωση και προστασία της κυψέλης. Όσον αφορά τα οφέλη της στην υγεία του ανθρώπου, αυτά είναι πολλαπλά: αντιβακτηριακές, αντιμυκητιακές, αντιικές, αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις και αντικαρκινικές ιδιότητες (Didaras NA et al, 2020).

Ο βασιλικός πολτός, ο οποίος παράγεται από τους υποφαρυγγικούς αδένες νεαρών μελισσών, που ονομάζονται μέλισσες παραμάνες, αποτελεί την τροφή της μελλοντικής βασίλισσας μέλισσας. Όσον αφορά τις βιολογικές του ιδιότητες, αυτές συνίστανται σε αντιφλεγμονώδεις και ανοσοτροποποιητικές δράσεις καθώς και συμβολή κάποιων συστατικών του σε αντιμικροβιακή δράση κατά βακτηρίων, μυκήτων και ιών (Didaras NA et al, 2020).

Η γύρη που συλλέγεται από τις μέλισσες, όπως συμβαίνει και με το μελισσόψωμο, έχει σαν ιδιαίτερο χαρακτηριστικό την υψηλή θρεπτική της αξία. Παρέχει υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, απαραίτητα αμινοξέα, λιπαρά οξέα, βιταμίνες. Αποτελεί την μόνη πηγή πρωτεϊνών και λιπιδίων για την αποικία των μελισσών και την κυρία πηγή μακρο και μικροστοιχείων για τις μέλισσες. Θεωρείται λειτουργικό τρόφιμο λόγω της μεγάλης ποσότητας πολυφαινολικών που περιέχει και λόγω των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων της. Ενώ, ο χαρακτηρισμός ως λειτουργικό τρόφιμο ενισχύεται και από μια ποικιλία ενώσεων που περιέχει όπως προβιοτικά,

πρεβιοτικά, φυτικές ίνες, τριτερπένια, καροτενοειδή, οργανικά οξέα και άλλα. Το σύνολο αυτών των θρεπτικών συστατικών δικαιολογεί τις αντιοξειδωτικές, ηπατοπροστατευτικές, καρδιοπροστατευτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντικαρκινικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες που της αποδίδονται. Έτσι φτάνει να χρησιμοποιείται όλο και περισσότερο στην εναλλακτική ιατρική και τη μελισσοθεραπεία για ένα ευρύ φάσμα διαταραχών (Didaras NA et al, 2020).

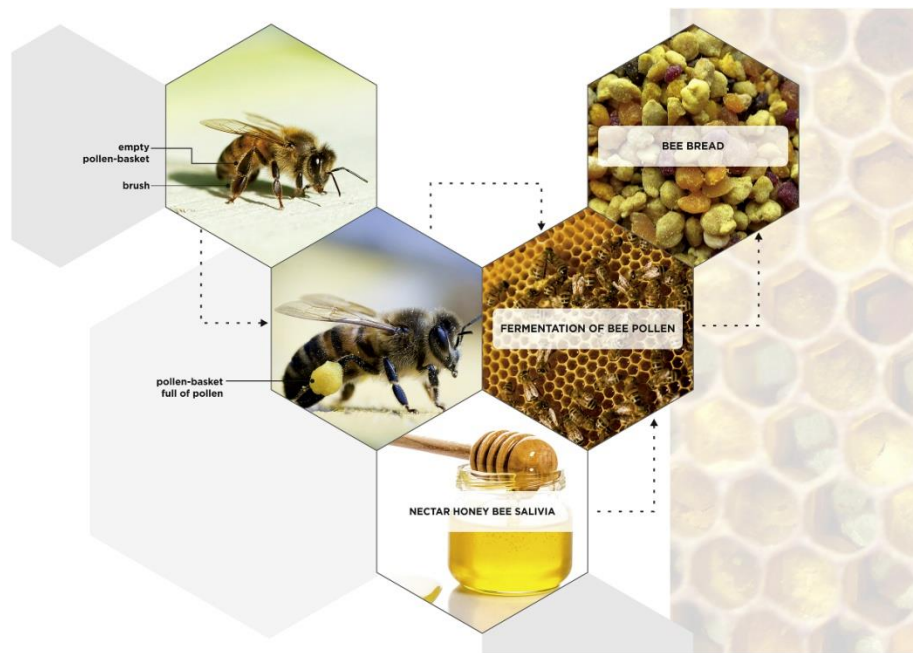
Προέλευση μελισσόψωμου

Ο σύγχρονος κόσμος κυριαρχείται από φαρμακευτικά σκευάσματα και συνθετικά συμπληρώματα διατροφής, ωστόσο η φύση συχνά παρέχει κρυμμένους θησαυρούς. Ένας τέτοιος είναι το μελισσόψωμο.



Εικόνα 1: Το μελισσόψωμο (πηγή: Kieliszek M et al, 2018)

Ο όρος μελισσόψωμο αναφέρεται στη γύρη που συλλέγεται από τις μέλισσες, ζυμώνεται και αποθηκεύεται στην κυψέλη. Οι μέλισσες τροφосуλλέκτες αδειάζουν τη γύρη που συλλέγουν πίσω στην κυψέλη απευθείας σε άδεια κελιά της κηρήθρας. Ακολούθως, οι μεσήλικες μέλισσες προσθέτουν μέλι και αδενικές εκκρίσεις στη γύρη των λουλουδιών μαζί με συγκομισμένο, από τροφосуλλέκτες, νέκταρ και συσκευάζουν το μίγμα στο κελί της κηρήθρας σπρώχνοντας το με το κεφάλι τους. Εντός της κηρήθρας υφίσταται ζύμωση σε στερεή κατάσταση από βακτήρια γαλακτικού οξέος και ζύμες. Με την παραγωγή γαλακτικού οξέος και την μείωση του pH αλλάζει το μικροβίωμα του μελισσόψωμου και ξεκινά η ωρίμανση του. Θεωρείται ότι η προ-πέψη των κόκκων γύρης, κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης, από τα ένζυμα που προστίθενται από τη μέλισσα καθώς και το μικροβίωμα του ίδιου του μελισσόψωμου, το διατηρούν και προάγουν τη θρεπτική του αξία. Το μελισσόψωμο αποτελεί την κύρια τροφή για τις προνύμφες μελισσών και για τις νεαρές μέλισσες που παράγουν βασιλικό πολτό (Didaras NA et al, 2020).



Εικόνα 2: Η διαδικασία παρασκευής του μελισσόψωμου (πηγή: Kieliszek M et al, 2018)

Θρεπτική αξία και χημική σύνθεση μελισσόψωμου

Έχει ενδιαφέρον η παρουσίαση της θρεπτικής αξίας του μελισσόψωμου σε συνάρτηση με τη μη ζυμωμένη γύρη. Σε αδρές γραμμές το μελισσόψωμο είναι πιο θρεπτικό, πιο πεπτικό και έχει πιο πλούσια χημική σύνθεση ενώ η ζύμωση έχει σαν αποτέλεσμα καλύτερη απορρόφηση του (Kieliszek M et al, 2018). Λόγω των συστατικών του και των αναλογιών τους, το μελισσόψωμο αποτελεί δυνητικό συμπλήρωμα βιταμινών και θρεπτικών συστατικών για τον ανθρώπινο οργανισμό.

Η σύνθεση του μελισσόψωμου βιοχημικά είναι παρόμοια με της γύρης, ωστόσο παρουσιάζει κάποιες διαφορές (Kieliszek M et al, 2018). Το μελισσόψωμο περιέχει ένζυμα όπως αμυλάσες, ιμπερτάση, τρανσφεράσες φωσφατάσης, οξειδάση γλυκόζης καθώς και ενζυμικούς συμπαράγοντες όπως βιοτίνη, γλουταθειόνη, NAD, νουκλεοτίδια. Επίσης, στο μελισσόψωμο έχουν διασπαστεί οι εξωτερικές στιβάδες σε σημαντικό ποσοστό γυρεοκόκκων και έτσι αυξάνεται η πεπτικότητά του σε σύγκριση με τη γύρη μελισσών. Το μελισσόψωμο περιέχει περίπου 30% πρωτεΐνη κατά μέσο όρο, ενώ αξιοσημείωτο είναι και το γεγονός ότι περιέχει μεγάλες ποσότητες (20%) από εύκολα αφομοιώσιμες πρωτεΐνες και απαραίτητα αμινοξέα όπως γλουταμινικό οξύ, ασπαρτικό οξύ, προλίνη, βαλίνη, αργινίνη, λευκίνη, ισολευκίνη, μεθειονίνη, ιστιδίνη, λυσίνη, φαινυλαλανίνη, τρυπτοφάνη, τυροσίνη, θρεονίνη, κυστεΐνη, γλυκίνη, σερίνη, αλανίνη. Σε σχέση με τη γύρη περιέχει περισσότερα σάκχαρα με κυριότερα τις φρουκτόζη, γλυκόζη, τρεχαλόζη και πολύ λιγότερο άμυλο. Το μελισσόψωμο είναι, παράλληλα, πλούσιο σε βιταμίνη K, κάτι που δεν παρατηρείται στη φρέσκια γύρη, καθώς και σε βιταμίνες του συμπλέγματος B. Στο μελισσόψωμο, η αναλογία ακόρεστων προς κορεσμένα λιπαρά οξέα είναι τέτοια που το καθιστά καλή πηγή ακόρεστων λιπαρών οξέων. Τα πολυακόρεστα

λιπαρά οξέα και ιδίως τα ωμέγα-3 είναι πολύ ευεργετικά για την ανθρώπινη υγεία αφού μειώνουν τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων και της χοληστερόλης στο αίμα. Όσον αφορά τα μέταλλα που περιέχει, τα κύρια είναι το κάλιο, ο φώσφορος, το ασβέστιο, το μαγνήσιο, ο σίδηρος, το νάτριο τα οποία είναι αυξημένα σε σχέση με τη γύρη, ενώ μόνο ο ψευδάργυρος και το μαγγάνιο είναι μειωμένα. Αυτές οι διαφοροποιήσεις στη σύνθεση και τη συγκέντρωση των συστατικών μεταξύ γύρης και μελισσόψωμου ενδεχομένως θα μπορούσαν να οφείλονται και σε μικροβιακό μεταβολισμό κατά τη ζύμωση.

Γενικά το μελισσόψωμο είναι πιο βιολογικά ενεργό και εύπεπτο λόγω της υψηλής περιεκτικότητας του σε εύπεπτα σάκχαρα, λίπος, μεταλλικά συστατικά και λόγω των μεγαλύτερων ποσοτήτων ελεύθερων αμινοξέων σε σύγκριση με τη γύρη. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η χημική σύνθεση του μελισσόψωμου ποικίλει από περιοχή σε περιοχή ανάλογα τη βοτανική προέλευση, την εποχική διακύμανση, τις κλιματικές συνθήκες.

Βιολογικές ιδιότητες μελισσόψωμου

Μπορεί το μελισσόψωμο να είναι το λιγότερο γνωστό προϊόν κυψέλης, ωστόσο παρουσιάζει έναν πλούτο βιολογικών ιδιοτήτων. Οι αντιμικροβιακές και αντιοξειδωτικές του ιδιότητες αλλά και τα περαιτέρω οφέλη του για την υγεία υποδεικνύουν τις δυνατότητες χαρακτηρισμού του ως λειτουργικού τροφίμου.

Αντιμικροβιακές ιδιότητες

Είναι αξιοπρόσεκτες οι αντιμικροβιακές ιδιότητες του μελισσόψωμου έναντι διαφόρων παθογόνων. Σε κάποιες μελέτες έχει δειχθεί μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα έναντι *Gram +* εν συγκρίσει με *Gram -* βακτήρια. Σε μελέτη που έγινε για τη διερεύνηση της αντιμικροβιακής δραστηριότητας δειγμάτων ελληνικού μελισσόψωμου (Didaras NA et al 2020), δοκιμάστηκαν και *Gram -* παθογόνα (*S. typhimurium*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* και ανθεκτικό στη μεθικιλίνη *S. aureus*) και όλα τα δείγματα έδειξαν βακτηριοστατική δράση, με το *S. aureus*, που είναι *Gram +*, να δείχνει τη μεγαλύτερη ευαισθησία. Σε μελέτη για την εξέταση της αντιμικροβιακής δραστηριότητας στελεχών *Apilactobacillus* και *Fructobacillus* φάνηκε υψηλή αποτελεσματικότητα αυτών κατά *Gram -* παθογόνων αλλά χαμηλότερη κατά του *S. aureus*, ενώ, από την άλλη, έχει φανεί ότι στελέχη *Bacillus* δρουν κυρίως κατά του *S. aureus* και λιγότερο κατά των *Gram -*. Αυτή η μεταβλητότητα μεταξύ της αντιμικροβιακής δράσης των δειγμάτων μελισσόψωμου μπορεί να εξαρτάται και από τη βοτανική προέλευση, τις διαδικασίες εκχύλισης και τα εκάστοτε στελέχη των μικροοργανισμών που εξετάζονται, ενώ και οι διαλυτές που χρησιμοποιούνται μπορεί να επηρεάσουν τις αντιμικροβιακές ιδιότητες.

Η αντιμικροβιακή δράση του μελισσόψωμου αποδίδεται, σε μεγάλο βαθμό, στη φυτοχημική του σύνθεση. Το μελισσόψωμο περιέχει ποικιλία φαινολικών ενώσεων, φλαβονοειδών και λιπαρών οξέων. Ενδεικτικά, περιέχει φλαβονοειδή, όπως η

κερσετίνη και η καμφερόλη που έχει φανεί ότι αναστέλλουν *Gram +* και *Gram -* στελέχη, με μια τάση να είναι περισσότερο αποτελεσματικά έναντι σε *Gram +* στελέχη. Άλλες δραστικές ενώσεις που περιέχει είναι το γαλλικό οξύ, το φερουλικό οξύ, το π-κουμαρικό οξύ. Τέτοιες ενώσεις είναι ικανές να διαρρήξουν βακτηριακές κυτταρικές μεμβράνες προκαλώντας τον κυτταρικό θάνατο των παθογόνων.

Επίδραση σε μικροβίωμα ξενιστή

Το μελισσόψωμο δεν έχει δείξει δυσμενείς επιδράσεις στο εντερικό μικροβίωμα ασκώντας τις αντιμικροβιακές του ιδιότητες. Λόγου χάρη, η κερσετίνη, μια φλαβονοειδής ένωση που υπάρχει στο μελισσόψωμο, δεν επηρεάζει προβιοτικά στελέχη όπως το *L. casei* αλλά μάλιστα αυξάνει ωφέλιμα βακτήρια όπως κάποια είδη *Lactobacillus* και *Bifidobacterium*, μειώνοντας, παράλληλα, τα παθογόνα όπως φάνηκε σε πείραμα που έγινε στο τυφλό κοτόπουλων. Έτσι φαίνεται μια μελλοντική προοπτική για στόχευση παθογόνων με ταυτόχρονη ενίσχυση του μικροβιώματος του καταναλωτή μέσω του μελισσόψωμου.

Συνεργιστική δράση με αντιβιοτικά

Μια άλλη αναδυόμενη προοπτική για την καταπολέμηση μιας μάστιγας της εποχής όπως είναι αυτή της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά είναι η πιθανή συνεργιστική δράση ενώσεων του μελισσόψωμου μαζί με αντιβιοτικά. Ενδεικτικά, η καμφερόλη που περιέχεται στο μελισσόψωμο μαζί με υδρόφιλες φθοροκινολόνες μπορεί να ενισχύσει την αντιμικροβιακή αποτελεσματικότητα έναντι του ανθεκτικού στη μεθικιλίνη *S. aureus*. Τέτοιες συνεργιστικές δράσεις μπορούν να έχουν ευνόητα ευεργετικά αποτελέσματα όπως η σημαντική μείωση των ελάχιστων ανασταλτικών συγκεντρώσεων (MICs) των αντιβιοτικών. Επακόλουθο αυτού είναι η πρόληψη ή η καθυστέρηση εμφάνισης μικροβιακής ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά.

Αντιοξειδωτικές ιδιότητες

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, το μελισσόψωμο έχει επιδείξει σταθερά υψηλή αντιοξειδωτική δράση. Αυτή η ιδιότητα αποδίδεται πάλι στην υψηλή περιεκτικότητα του σε φαινολικές ενώσεις, φλαβονοειδή και άλλα φυτοχημικά. Όσον αφορά δείγματα ελληνικού μελισσόψωμου, σε μελέτη που έγινε (Didaras NA et al 2021), αυτά επέδειξαν αξιοσημείωτη αντιοξειδωτική δράση με χαρακτηριστικό παράδειγμα δείγμα μελισσόψωμου μονοανθικής καστανιάς από το Άγιον Όρος. Αυτό έδειξε πολύ υψηλή αντιοξειδωτική δράση με IC₅₀ 0,18mg/gr στην ανάλυση DPPH και 0,38 mg/gr στην ανάλυση ABTS•+. Εν προκειμένω, αυτά τα αποτελέσματα αποδίδονται πιθανώς στην υψηλή περιεκτικότητα της γύρης του κάστανου σε φαινόλες, φλαβονοειδή και κυνουρενικό οξύ.

Διερεύνηση βιοσυνθετικού δυναμικού

Εσχάτως έχει εντατικοποιηθεί η διερεύνηση του βιοσυνθετικού δυναμικού παραγωγής ενζύμων από μικροοργανισμούς του μελισσόψωμου. Μελέτες (Asoutis Didaras N et al 2024) έχουν δείξει ότι, απομονωμένα από μελισσόψωμο, βακτήρια

παράγουν και εκκρίνουν κυτταρινάσες, αμυλάσες, πρωτεΐνάσες. Πρόσφατα καταδείχθηκε ότι εκκρίνουν και ημικυτταρινάσες. Γενικά, η παραγωγή ενζύμων (υπεροξειδάσες, λακκάσες) αποδόμησης της λιγνίνης, δηλαδή ενός πολύπλοκου πολυμερούς, από βακτήρια μελισσόψωμου μπορεί να σημαίνει και αποδόμηση της εξίνης, δηλαδή του εξωτερικού στρώματος των κόκκων γύρης. Έχει φανεί, επίσης, ότι οι κυτταρινάσες αποικοδομούν την ιντίνη, δηλαδή το εσωτερικό στρώμα των κόκκων γύρης, η οποία και αποτελείται από κυτταρίνη. Έτσι μπορεί να εξηγηθεί και η απελευθέρωση των θρεπτικών συστατικών και βιοδραστικών ενώσεων των κόκκων γύρης που πετυχαίνεται μετά τη ζύμωση της.

Άλλα οφέλη για την υγεία

Εκτός από τις αντιοξειδωτικές και αντιμικροβιακές του ιδιότητες, το μελισσόψωμο μπορεί να αναγνωριστεί και για κάποια περαιτέρω οφέλη του για την υγεία. Υποστηρίζει τη λειτουργία του ανοσοποιητικού, μειώνοντας τις αλλεργικές αντιδράσεις ενώ συμβάλλει και στην αποτοξίνωση του ήπατος. Παράλληλα, ενισχύει τη γνωστική λειτουργία, δηλαδή τη συγκέντρωση και τη μνήμη και η κατανάλωση του ενδείκνυται σε περιόδους αυξημένης πνευματικής προσπάθειας. Οι ευεργετικές του ιδιότητες για την υγεία επεκτείνονται και στη ρύθμιση των επιπέδων χοληστερόλης και στη μείωση του συνολικού περιεχομένου λιπιδίων, φανερώνοντας την αντιαθηροσκληρωματική του δράση. Ως αντιοξειδωτικό, έχει σαν αποτέλεσμα να εμφανίζει αντιγηραντικές και αντιαναιμικές επιπλέον ιδιότητες, ενώ η βιταμίνη Κ που περιέχει σε μεγάλες ποσότητες συμβάλλει δυνητικά στη θεραπεία και πρόληψη διαφόρων τύπων εξαγγείωσης. Γενικά, όλα αυτά τα οφέλη του για την υγεία το καθιστούν ιδανικό για τη χρησιμοποίηση του στη μελισσοθεραπεία, δηλαδή τη θεραπεία με προϊόντα μέλισσας ως ένα πολύτιμο συμπλήρωμα διατροφής (Kieliszek M et al, 2018).

Μικροβίωμα μελισσόψωμου

Το μελισσόψωμο, δηλαδή η ζυμωμένη γύρη που αναμειγνύεται με νέκταρ και εκκρίσεις μέλισσας σε κελιά της κηρήθρας, είναι βασική πηγή θρεπτικών στοιχείων για την αποικία των μελισσών και ιδίως για τους γόνους. Επομένως, το μικροβίωμα που εμπλέκεται σε αυτή τη ζύμωση και στην ενίσχυση της θρεπτικής αξίας που παρουσιάζει το μελισσόψωμο ως προϊόν, σε σχέση με τη γύρη, έχει ενδιαφέρον.

Εξέλιξη και προσαρμογή μικροβιώματος

Οι μέλισσες (*Apis mellifera*) εξελίχθηκαν από σαρκοφάγες σφήκες, κατά την Κρητιδική περίοδο, σε ένα είδος ικανό να χρησιμοποιεί τη γύρη, επιτρέποντας την προσαρμογή σε φυτοφάγα διατροφή. Το σύγχρονο μικροβίωμα του εντέρου των μελισσών, ωστόσο, διαφέρει από το προγονικό, εκείνης της περιόδου. Αυτό αποτελείται από εννέα ξεχωριστούς βακτηριακούς φυλλοτύπους. Σε ό, τι έχει να κάνει με το μελισσόψωμο τώρα, μόνο το 7% των ταξινομικών κατηγοριών σε επίπεδο είδους είναι κοινό μεταξύ εντέρου μέλισσας και μελισσόψωμου, γεγονός

που μπορεί να αποδοθεί στις διαδικασίες ζύμωσης και εν γένει ωρίμανσης του. (Didaras NA et al, 2020).

Βακτήρια γαλακτικού οξέος και ζύμωση

Βακτήρια γαλακτικού οξέος (LAB), όπως *Lactobacillus spp.* έχουν καθοριστικό ρόλο στη ζύμωση του μελισσόψωμου. Η έρευνα των Vasquez και Olofsson (2009) έδειξε ότι βακτήρια γαλακτικού οξέος από το στομάχι των μελισσών είναι ζωντανά σε μελισσόψωμο δύο εβδομάδων. Αυτό ενισχύει την πεποίθηση ότι τα βακτήρια γαλακτικού οξέος "εμβολιάζονται" από τις μέλισσες, μέσω "παλινδρόμησης" του νέκταρος και προσθήκης του στη συλλεγόμενη γύρη και θεωρούνται καλλιέργεια εκκίνησης της ζύμωσης της. Τα βακτήρια γαλακτικού οξέος παράγουν και αντιμικροβιακές ενώσεις που θα μπορούσαν να συμβάλλουν στη διατήρηση του μελισσόψωμου και την προστασία των μελισσών, των οποίων αποτελεί πηγή πολύτιμων θρεπτικών συστατικών, από ασθένειες. Η ισχυρή παρουσία των LAB φαίνεται και από την έρευνα των Asama et al (2015), όπου το *Lactobacillus* ήταν το κυρίαρχο γένος σε δείγματα μελισσόψωμου από την Ιαπωνία σε ποσοστό 83,9%, με πιο άφθονο είδος το *Lactobacillus kunkeei*.

Πρόσφατη μελέτη επιβεβαίωσε ότι κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης του μελισσόψωμου, η ποικιλότητα των μικροοργανισμών του αλλάζει καταλήγοντας σε μια σταθερή μικροβιακή κοινότητα. Κατά την ωρίμανση, δηλαδή κατά τη μετατροπή της συλλεγόμενης γύρης σε μελισσόψωμο, εντός της κυψέλης, η ταυτόχρονη μικροβιακή ανάπτυξη οδηγεί και σε αλλαγές στην παραγωγή μεταβολιτών, τη συγκέντρωση οξυγόνου, στη διαθεσιμότητα του νερού, των θρεπτικών με αποτέλεσμα να δημιουργείται ένα "δυναμικό" περιβάλλον. Έτσι είναι εύλογη η εικασία ότι αυτή η αλλαγή στη μικροβιακή ποικιλότητα οφείλεται στον ανταγωνισμό ή την προσαρμογή των μικροοργανισμών στις συνθήκες που δημιουργούνται κατά την ωρίμανση του μελισσόψωμου (Asoutis Didaras N et al, 2024).

Φυλογενετική ταξινόμηση μικροοργανισμών μελισσόψωμου

Η βιβλιογραφία έχει ασχοληθεί με την τοποθέτηση των βακτηρίων που περιλαμβάνονται στο μελισσόψωμο σε ταξινομικές κατηγορίες. Κατά τους Mattila et al (2012), σε δείγματα μελισσόψωμου που χρησιμοποίησαν, εντοπίστηκαν δύο βακτηριακά φύλα: Proteobacteria και Firmicutes, με πιο άφθονα γένη τα *Oneococcus*, *Paralactococcus*, *Shimazuella*, *Saccharibacter*. Ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι από τα 18 είδη που εντοπίστηκαν, τα 17 ήταν υποχρεωτικά ή προαιρετικά αναερόβια και περιελάμβαναν πολλά LAB. Η διερεύνηση της μικροβιακής ποικιλότητας του μελισσόψωμου από σειρά ερευνητών έδειξε επίσης ότι το κυρίαρχο φύλο είναι τα Proteobacteria. Ακολουθούν τα Firmicutes, Bacteroidetes (Asoutis Didaras N et al, 2024). Σύμφωνα με τους Donkersley et al (2018) τα Enterobacteriaceae αποτέλεσαν την οικογένεια με τη μεγαλύτερη αφθονία στο μελισσόψωμο ενώ παρουσίασαν και τα πιο κοινά γένη που ήταν:

Pseudomonas, Arsenophonus, Lactobacillus, Erwinia, Acinetobacter. 11 γένη βρέθηκαν σε όλα τα δείγματα που μελέτησαν, πράγμα που φανερώνει ότι ενδεχομένως να είναι μέλη του μικροβιώματος που αποτελεί τον πυρήνα του μελισσόψωμου.

Για την ταξινόμηση των μυκήτων που βρίσκονται στο μελισσόψωμο υπάρχει επίσης βιβλιογραφία. Έχει φανεί ότι το Ascomycota αποτελεί το πιο κύριο φύλο, με δεύτερο το Basidiomycota, ενώ οι κυριότερες ομοταξίες είναι οι Saccharomycetes και Sordariomycetes. Οι ερευνητές έδειξαν επίσης ότι ο *Zygosaccharomyces* είναι το πιο άφθονο γένος σε μελισσόψωμο 27 ημερών. Τέλος, η απομόνωση ζυμομυκήτων από δείγματα μελισσόψωμου 7 και 20 ημερών, δηλαδή φρέσκο και ώριμο μελισσόψωμο, αντίστοιχα, έδειξε ότι το *Starmerella apsis* ήταν το πιο κυρίαρχο είδος στο φρέσκο μελισσόψωμο ενώ το *Zygosaccharomyces spp* το κύριο γένος στο ώριμο μελισσόψωμο (Asoutis Didaras N et al, 2024).

Απόκτηση μελισσόψωμου

Η συλλογή του παραγόμενου μελισσόψωμου μπορεί να γίνει με φυσικό τρόπο (Kieliszek M et al, 2018).

Όσον αφορά την εξαγωγή του μελισσόψωμου, αυτή είναι δύσκολη τεχνικά, ιδίως αν μιλάμε για μεγάλες ποσότητες, που είναι το επιθυμητό. Πρέπει να σημειωθεί ότι εντός των κηρήθρων, το μελισσόψωμο είναι έντονα συμπυκνωμένο, σαν σκληρή και ξηρή μπάλα, φραγμένο εντός του κελιού της κηρήθρας από όπου, σύμφωνα με τη φυσική διαδικασία, πρέπει να εξαχθεί. Άλλο εμπόδιο στην εξαγωγή του μελισσόψωμου είναι τα υλικά που απομένουν από τα κουκούλια των προνυμφών μελισσών που κάνουν τραχιά την επιφάνεια. Η συλλογή του μελισσόψωμου διευκολύνεται και επιταχύνεται μέσω άλεσης των κηρήθρων στις οποίες υπάρχουν οι μεγαλύτερες ποσότητές του. Αξιομνημόνευτο είναι το γεγονός ότι, όταν το μελισσόψωμο προορίζεται για φαρμακευτική ή θεραπευτική χρήση, τότε πρέπει να συλλέγεται με το χέρι αφού έτσι μπορεί να επιτευχθεί μια, κατά το δυνατόν, μεγαλύτερη μικροβιολογική καθαρότητα.

Γίνεται κατανοητό ότι η απόκτηση του μελισσόψωμου, σε μεγάλες ποσότητες, παρουσιάζει δυσκολίες. Εμφανίζεται, έτσι, πρόσφορο έδαφος στην έρευνα σε ό, τι έχει να κάνει με την δυνατότητα εξαγωγής του από την κυψέλη με μεγαλύτερες αποδόσεις.

1.2 Προβιοτικά

1.2.1 Ιστορία προβιοτικών και ορισμός τους

Το ενδιαφέρον για τα προβιοτικά με το πέρασμα των χρόνων βαίνει αυξανόμενο, με τους επιστήμονες της εκάστοτε εποχής να ασχολούνται με τους ωφέλιμους αυτούς μικροοργανισμούς για την υγεία του ανθρώπου. Η αρχή της ιστορίας τους μπορεί να εντοπιστεί, τρόπον τινά, στους αρχαίους Έλληνες και Ρωμαίους, οποίοι

κατανάλωναν τρόφιμα που είχαν υποστεί ζύμωση, παρατηρώντας ότι αυτά είναι ωφέλιμα για την υγεία, χωρίς ωστόσο να διαθέτουν το επιστημονικό και πειραματικό υπόβαθρο ούτως ώστε να συσχετίσουν την αύξηση της θεραπευτικής αξίας των τροφίμων αυτών και γενικά τις ευεργεσίες τους για την υγεία με την περιεκτικότητά τους σε ωφέλιμα μικρόβια.

Κατά τα τέλη του 19ου αιώνα, αιώνα στον οποίο διαμορφώθηκε η έννοια της βιολογίας και αναπτύχθηκε η βιολογική γνώση και πριν ακόμη την εμφάνιση του όρου "προβιοτικά", η πρόοδος στους κλάδους της βιολογίας και εν προκειμένω της μικροβιολογίας, είχε σαν αποτέλεσμα την πρώτη επαφή με την αλληλεπίδραση των μικροοργανισμών με τον ανθρώπινο οργανισμό. Από το 1892 ακόμα, ο Γερμανός γυναικολόγος Albert Döderlein ανακάλυψε ότι στον κόλπο υγιών γυναικών υπάρχουν βακτήρια γαλακτικού οξέος (LAB) που διατηρούν την υγιεινή της περιοχής, παράγοντας γαλακτικό οξύ και μεταβολίζοντας σάκχαρα, με αποτέλεσμα την αναστολή ανάπτυξης παθογόνων μικροοργανισμών. Είχε προηγηθεί η αποκάλυψη από τον Παστέρ ότι για τις ζυμώσεις είναι υπεύθυνοι ζωντανοί μικροοργανισμοί.

Πρωτοπόρος, όσον αφορά τα προβιοτικά, υπήρξε ο Élie Metchnikoff. Το 1907 έφερε στην επιφάνεια το *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, ένα οξυγαλακτικό βακτήριο, η επίδραση του οποίου, στο μικροβίωμα του εντέρου, ήταν ότι οδηγεί σε εγκαθίδρυση ωφέλιμων βακτηρίων σε βάρος επιβλαβών. Για τον Metchnikoff, το ενδογενές μικροβίωμα ήταν επιβλαβές για την υγεία αφού οδηγούσε σε γήρανση. Πιο συγκεκριμένα, κατά αυτόν, πρωτεολυτικά μικρόβια παράγουν φαινόλες, ινδόλες, αμμωνία, δηλαδή τοξικές ουσίες, στο παχύ έντερο που οδηγούν στη λεγόμενη εντερική "αυτοοξειδωση" και στη συνέχεια σε γήρανση. Στο θεματικό πλαίσιο της εποχής ήταν γνωστό ότι το γάλα που ζυμώθηκε με βακτήρια γαλακτικού οξέος αναστέλλει την ανάπτυξη πρωτεολυτικών μικροοργανισμών λόγω χαμηλού pH, από τη ζύμωση λακτόζης. Παρατήρησε, λοιπόν, ότι αγρότες της υπαίθρου στη Βουλγαρία αλλά και στις ρωσικές Στέπες είχαν στη διατροφή τους τέτοιο γάλα και ζούσαν εύρωστα, οπότε συνέδεσε τη μακροζωία τους με την κατανάλωση τέτοιων ζυμωμένων προϊόντων. Ο συλλογισμός του ήταν ο εξής: αυξημένη κατανάλωση γάλακτος οδηγεί σε αποικισμό του εντέρου με βακτήρια γαλακτικού οξέος με αποτέλεσμα μείωση του pH και άρα μείωση πρωτεολυτικών βακτηρίων. Για την ιστορία, το σχετικό βιβλίο του "The prolongation of Life" τού απέφερε το Νόμπελ Ιατρικής το 1908.

Αξίες αναφοράς είναι και οι ανακαλύψεις των Henry Tissier και Minoru Shirota. Ο Tissier, Γάλλος παιδίατρος, το 1906, ασχολήθηκε με νήπια που θηλάζουν και διαπίστωσε ότι σε κόπρανα βρεφών με διάρροια υπήρχε πολύ μικρότερος αριθμός βακτηρίων που είχαν σχήμα όμοιο με το γράμμα Y σε σχέση με αυτά υγιών βρεφών. Ονόμασε αυτά τα βακτήρια Bifidobacteria, βασιζόμενος στην λατινική λέξη

"bifidum", που σημαίνει διχάλα και πρότεινε δυνητική χρήση αυτών για θεραπεία διάρροιας. Το 1930, από την άλλη, ο Ιάπωνας μικροβιολόγος Minoru Shirota αναζήτησε ένα βακτήριο που, αφού περνά από τον γαστρεντερικό σωλήνα, στη συνέχεια αποικίζει το ανθρώπινο έντερο. Έτσι, απομόνωσε το στέλεχος *Lactobacillus casei* Shirota, το οποίο λαμβάνοντας την εμπορική ονομασία "Yakult", κυκλοφορεί παγκόσμια μέχρι και σήμερα.

Τον 20ο αιώνα εμφανίστηκε ο όρος "προβιοτικό", ο ορισμός του, όμως, πέρασε από πολλά κύματα για να καταλήξει στη σημερινή του σημασία. Κάνοντας ετυμολογική ανάλυση του όρου, αυτός σημαίνει υπέρ της ζωής (πρό και βίος). Το 1953, ο Werner Kollath πρωτοχρησιμοποίησε τον όρο αναφερόμενος σε συμπληρώματα που μπορούν να θεραπεύσουν ασθενείς με υποσιτισμό. Έναν χρόνο αργότερα, ο Ferdinand Vergin χρησιμοποίησε τη λέξη "probiotika", κάνοντας αναφορά σε δραστικές ουσίες απαραίτητες για μια υγιή ανάπτυξη της ζωής. Στη συνέχεια, το 1965, οι Lilly και Stillwell μιλώντας για προβιοτικά εννοούσαν ουσίες που εκκρίνονται από πρωτόζωα και έχουν επιπτώσεις σε άλλους μικροοργανισμούς και, για την ακρίβεια, διεγείρουν την ανάπτυξη τους. Το 1971, ο Sperti επέκτεινε αυτόν τον ορισμό και σε εκχυλίσματα ιστών που διεγείρουν την ανάπτυξη μικροβίων. Ο Roy Parker, τρία χρόνια αργότερα, όρισε τα προβιοτικά ως συμπληρώματα, δηλαδή όχι μόνο μικροοργανισμοί, αλλά και άλλες ουσίες, που εξισορροπούν το εντερικό μικροβίωμα.

Ορόσημο για τον ορισμό των προβιοτικών που έχουμε σήμερα αποτέλεσε η συμβολή του Roy Fuller, το 1989, όπου ουσιαστικά η διαφορά του ορισμού του σε σχέση με αυτόν του Parker ήταν ότι μιλούσε για "διατροφικό συμπλήρωμα ζωντανών μικροοργανισμών που έχει ευεργετική επίδραση στην ισορροπία του εντερικού μικροβιώματος και κατ' επέκταση στον ξενιστή". Έτσι, υπογράμμισε τη ζωντανή φύση των προβιοτικών.

Ακολούθησαν αρκετές μικρές αναθεωρήσεις του ορισμού των προβιοτικών. Μεταξύ άλλων, το 1992, οι Havenaar et al μίλησαν για "ζωντανή καλλιέργεια, αποτελούμενη από ένα ή περισσότερα μικρόβια, που όταν χορηγηθεί σε ανθρώπους ή σε ζώα επηρεάζει ευεργετικά τον ξενιστή βελτιώνοντας τις ιδιότητες της εντερικής χλωρίδας". Το 1998 ο ορισμός πλησίασε παρά πολύ στη σημερινή του μορφή αφού σύμφωνα με τους Guarner και Shaafsma, προβιοτικά είναι "ζωντανοί μικροοργανισμοί που, όταν καταναλωθούν σε ικανές ποσότητες, επιφέρουν ευεργετικές επιδράσεις στον ξενιστή πέρα από αυτές της βασικής διατροφής". Οι Schrezenmeir και de Vrese, το 2001, τα όρισαν σαν "ένα σκεύασμα ή ένα προϊόν που περιέχει ζώντες, καθορισμένους μικροοργανισμούς σε επαρκείς αριθμούς, οι οποίοι μεταβάλλουν θετικά τη σύσταση του μικροβιώματος μέσω εμφύτευσης ή αποίκησης σε μια συγκεκριμένη περιοχή του ξενιστή, ασκώντας έτσι ευεργετικές δράσεις στην υγεία του". Η τελική διατύπωση του ισχύοντος, σήμερα, ορισμού

δόθηκε από FAO/WHO, την ίδια χρονιά ως: "προβιοτικοί είναι ζωντανοί μικροοργανισμοί οι οποίοι, όταν καταναλωθούν σε ικανές ποσότητες, επιφέρουν ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία του ξενιστή". Αξίζει να σημειωθεί και ο ορισμός των Del Piano et al, το 2006, όπου τα όρισαν σαν "ζωντανούς μικροοργανισμούς με αντοχή στις γαστρικές, χολικές και παγκρεατικές εκκρίσεις, προσκολλώνται στα επιθηλιακά κύτταρα και δημιουργούν αποικίες στο ανθρώπινο έντερο" δίνοντας στον ορισμό και κλινικά χαρακτηριστικά.

Είναι κατανοητό ότι ο ορισμός των προβιοτικών υποβλήθηκε σε αλλαγές στο πέρασμα των χρόνων μέχρι να φτάσει στη σημερινή του μορφή και λογική. Για να φτάσει από "ουσίες", "εκχυλίσματα ιστών" και "συμπληρώματα" σε αυτό που τελικά είναι, δηλαδή ζωντανοί μικροοργανισμοί που η κατανάλωση τους προσφέρει, υπό προϋποθέσεις, ευεργετικές επιδράσεις χρειάστηκε η ενασχόληση της επιστημονικής κοινότητας και η πρόοδος των αναλυτικών εργαλείων.

1.2.2 Ιδιότητες προβιοτικών μικροοργανισμών

Η αναζήτηση των καταναλωτών για λειτουργικά τρόφιμα που ωφελούν την υγεία βαίνει αυξανόμενη. Σε άμεση συνάρτηση με αυτό, η επιστημονική κοινότητα αναζητά τέτοιου είδους προϊόντα που θα ικανοποιήσουν αυτές τις αξιώσεις των καταναλωτών. Έτσι, μεταξύ άλλων, η έρευνα επικεντρώνεται και σε τροφές στις οποίες υπάρχουν προβιοτικοί μικροοργανισμοί. Ωστόσο, και με δεδομένο ότι οι μικροοργανισμοί που υπάρχουν στη φύση και δυνητικά θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στον τομέα των τροφίμων είναι αναρίθμητοι, υπάρχουν κάποια κοινώς αποδεκτά κριτήρια τα οποία πρέπει να πληροί κάποιος μικροοργανισμός ούτως ώστε να θεωρηθεί προβιοτικός. Υπενθυμίζεται ότι τα προβιοτικά ορίζονται σύμφωνα με τους FAO/WHO ως ζωντανοί μικροοργανισμοί που όταν ληφθούν σε κατάλληλες ποσότητες, προσφέρουν οφέλη στην υγεία του ξενιστή. Παρότι δεν υπάρχουν κάποια καθιερωμένα κριτήρια για τα προβιοτικά, σε γενικές γραμμές αυτά είναι όμοια με αυτά που αναφέρει η Διεθνής Επιστημονική Ένωση για Προβιοτικά και Πρεβιοτικά (ISAPP):

- 1) Ταυτοποιημένο στέλεχος
- 2) Ασφαλές στέλεχος, δηλαδή μη παθογόνο, δεν παράγει τοξίνη, μη ανθεκτικό σε αντιβιοτικά
- 3) Επιβίωση στον γαστρεντερικό σωλήνα, σε συνθήκες όξινου pH και παρουσία χολικών αλάτων στο έντερο
- 4) Ικανότητα προσκόλλησης στα επιθηλιακά κύτταρα
- 5) Ικανότητα να αλληλεπιδρά με το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή και με το εντερικό μικροβίωμά του και να το σταθεροποιεί

6) Κλινικές μελέτες των θετικών επιδράσεων στους ανθρώπους

7) Τεκμηρίωση των μηχανισμών δράσης

8) Βιωσιμότητα στο τρόφιμο/προϊόν κατά την αποθήκευση και μέχρι τη λήξη του.

Σύμφωνα με τους Anadón et al (2016), με άλλα λόγια, ένα προβιοτικό θα πρέπει να αποτελεί αυτόχθονα "κάτοικο" του εντέρου ενός υγιούς υποκειμένου, να επιβιώνει τόσο στο ανώτερο πεπτικό σύστημα όσο και στο κατώτερο όπου θα πολλαπλασιάζεται, να είναι ασφαλής η χορήγηση του σε άνθρωπο, να έχει αντιμικροβιακή δράση μέσω ενώσεων και, τέλος, να έχει ιδιότητες πρόσφυσης και αποίκησης ανθρωπίνων κυτταρικών σειρών.

Διερευνώντας αναλυτικότερα κάποια από τα παραπάνω κριτήρια, αρχικά, το προβιοτικό θα πρέπει να καταφέρει να επιβιώσει διερχόμενο από τον γαστρεντερικό σωλήνα. Εκεί θα συναντήσει μια σειρά αντίξων συνθηκών. Πρώτα θα πρέπει να διέλθει από το στομάχι, όπου θα εκτεθεί σε όξινες συνθήκες, δηλαδή σε $\text{pH} < 3$ και επίσης σε μεγάλες συγκεντρώσεις του ενζύμου πεψίνη (Wendel U, 2022), παράγοντες οι οποίοι μπορούν να καταστούν θανάσιμοι για τον μικροοργανισμό. Θα πρέπει εδώ να σημειωθεί ότι παράγοντες όπως η οξύτητα, ο όγκος γαστρικού υγρού και η χρονική διάρκεια που εκτίθενται σε όλα αυτά το προβιοτικό εξαρτώνται από τα τρόφιμα που έχουν καταναλωθεί προηγουμένως από το άτομο. Όταν στο στομάχι υπάρχει τροφή, τότε το προβιοτικό θα εκτεθεί σε ένα ιδιαίτερα όξινο περιβάλλον με pH 1-1,5, ενώ αν δεν υπάρχει στο στομάχι τροφή για χρονικό διάστημα μεγαλύτερο της μίας ώρας, τότε το pH είναι περίπου 4-4,5 (Morelli, 2000). Αξιοσημείωτος είναι και ο όγκος γαστρικού υγρού που εκκρίνεται καθημερινά και είναι της τάξεως των 2,5L περίπου και δυσχεραίνει την δυνατότητα επιβίωσης των προβιοτικών (Ζουμποπούλου, 2008). Παράλληλα, το αν θα καταφέρει να επιβιώσει μέσω του γαστρεντερικού σωλήνα εξαρτάται και από το στέλεχος του μικροοργανισμού αλλά και από τον τρόπο που χορηγείται το προβιοτικό, δηλαδή λόγου χάρη, αν είναι με μορφή κάψουλας ή σκόνης (Wendel U, 2022).

Η επόμενη δοκιμασία που θα πρέπει να περάσει ο μικροοργανισμός είναι να περάσει από τον δωδεκαδάκτυλο του λεπτού εντέρου όπου θα εκτεθεί στη χολή και κατ' επέκταση στο χολικό άλας (Wendel U, 2022). Η χολή, που εκκρίνεται κατά τη διαδικασία της πέψης, περιλαμβάνει χολικά οξέα, λεκιθίνη, χοληστερόλη, χολερυθρίνη, πρωτεΐνες και η λειτουργία της είναι να γαλακτωματοποιεί και να απορροφά το λίπος. Τα χολικά άλατα αποτελούν το 0,2-2% της χολής μετά τη λήψη τροφής, ενώ με πιο λιπαρά γεύματα, η συγκέντρωση της αυξάνεται (Ζουμποπούλου, 2008). Τα χολικά αποτελούν μεγαλύτερο εμπόδιο από το pH για ένα δυνάμει προβιοτικό, αφού δρουν ως απορρυπαντικό, με αποτέλεσμα την διατάραξη της κυτταρικής μεμβράνης (Wendel U, 2022). Πιο συγκεκριμένα,

αλλάζουν τη δομή των λιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης με επακόλουθο να επηρεάζεται η κυτταρική διαπερατότητα και άρα η βιωσιμότητα των μικροοργανισμών. Παράλληλα, επηρεάζεται και η αλληλεπίδραση της κυτταρικής μεμβράνης με το περιβάλλον της (Wendel U, 2022). Στελέχη που εκφράζουν την υδρολάση χολικών αλάτων, όπως είναι τα βακτήρια γαλακτικού οξέος (LAB), εμφανίζουν και μεγαλύτερη αντοχή στα χολικά. Παράλληλα, η ανθεκτικότητα των LAB στα χολικά μπορεί να επιτευχθεί και με ενεργή εκροή τους και με διαφοροποιήσεις στο κυτταρικό τοίχωμα και την κυτταρική μεμβράνη (Wendel U, 2022). Τέλος, στο λεπτό έντερο τα προβιοτικά εκτίθενται και σε παγκρεατίνη, η οποία αποτελείται από τα ένζυμα αμυλάση, θρυψίνη, και λιπάση, τα οποία μπορούν επίσης να καταστούν επιζήμια για τους μικροοργανισμούς (Wendel U, 2022), μέσω διαταραχής της κυτταρικής μεμβράνης και βλάβης στο DNA.

Ιδιότητες όπως ανθεκτικότητα σε όξινο pH και σε παρουσία χολικών αλάτων και παγκρεατίνης μπορούν να διερευνηθούν στο εργαστήριο, *in vitro*, με γρήγορες και μη κοστοβόρες μεθόδους. Τέτοια πειράματα θεωρούνται ιδανικά για τη διεύρυνση του προβιοτικού δυναμικού, ιδίως για τη διαλογή μικροοργανισμών μέσα από μια μεγάλη "δεξαμενή" όπου η επιλογή των προβιοτικών γίνεται σε επίπεδο στελέχους· στελέχη του ίδιου είδους πολλές φορές δεν έχουν προβιοτικές ιδιότητες. Ωστόσο, μόνο σε ένα βαθμό αυτές οι δοκιμασίες μιμούνται τις *in vivo* συνθήκες. Η παρατεταμένη έκθεση στα χολικά, όπως συμβαίνει στον οργανισμό μπορεί να είναι πιο επιβλαβής από μια σύντομη όπως συμβαίνει στις *in vitro* δοκιμασίες (Wendel U, 2022).

Η προσκόλληση των πιθανών προβιοτικών στα επιθηλιακά κύτταρα και το βλεννογόνο του εντέρου είναι μια άλλη βασική ιδιότητα που πρέπει να έχουν. Μέσω αυτής παρατείνεται ο χρόνος παραμονής τους στο έντερο, τούς δίνεται η δυνατότητα να το αποικίσουν και να ρυθμίσουν την αλληλεπίδραση επιθηλιακών με ανοσοποιητικά κύτταρα (Jensen et al 2012). Παράλληλα, μπορούν να εμποδίσουν έτσι, έμμεσα, τον αποικισμό του εντερικού βλεννογόνου από παθογόνα. Στελέχη μικροοργανισμών που είναι προβιοτικά μπορούν να προσδεθούν στα επιθηλιακά κύτταρα, εμποδίζοντας την πρόσδεση παθογόνων όπως *E. coli*, *Salmonella spp*, *H. pylori* και άλλων και άρα να τα προστατεύουν από πιθανή μόλυνση (Marco et al 2006). Ο ανταγωνιστικός αποκλεισμός από τα ενδογενή βακτήρια του εντέρου και κατ' επέκταση τα προβιοτικά έναντι των παθογόνων βασίζεται στον ανταγωνισμό για θρεπτικά συστατικά και για θέσεις προσκόλλησης. Ταυτόχρονα, οι μικροοργανισμοί μπορούν και μεταβάλλουν το περιβάλλον τους καθιστώντας το μη βιώσιμο για τους ανταγωνιστές τους. Μεταβολές στο pH, το οξειδοαναγωγικό δυναμικό αλλά και παραγωγή οξέων όπως γαλακτικό και οξικό είναι μερικά παραδείγματα μηχανισμών με τους οποίους το πετυχαίνουν (Harzallah και Belhadj, 2013). Επιπλέον, και η ισχυρή προσκόλληση του προβιοτικού στελέχους στα εντερικά κύτταρα μπορεί να εμποδίσει την έκφραση

παθογένεσης όπως έχει δειχθεί σε in vitro πειράματα· *L. rhamnosus* εναντίον του εντεροαιμορραγικού *E. coli* (Bermudez-Brito M et al, 2012). Τέλος, η προσκόλληση των προβιοτικών στο εντερικό επιθήλιο έχει καταδειχθεί ότι οδηγεί και σε ανοσοτροποποίηση (Bermudez-Brito M et al, 2012) και μείωση της χρονικής διάρκειας της διάρροιας.

Όσον αφορά την ικανότητα του προβιοτικού να σταθεροποιεί το εντερικό μικροβίωμα, αυτή επιτυγχάνεται από τα προβιοτικά, εκτός από τον ανταγωνιστικό αποκλεισμό των παθογόνων και με παραγωγή βακτηριοσινών, H_2O_2 και οργανικών οξέων (Ouwehand et al 2002) αλλά και επίσης με την ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή με αυξημένη παραγωγή αντισωμάτων και με ενεργοποίηση ανοσοκυττάρων για την εξόντωση παθογόνων ενώ προβιοτικά έχουν και αντιφλεγμονώδη δράση.

Το προβιοτικό πρέπει να είναι βιώσιμο, επίσης, μετά τις κατεργασίες παραγωγής του σχετικού προϊόντος ή τροφίμου από την επεξεργασία του έως την αποθήκευση και τη λήξη του. Θα πρέπει, επιπλέον, να διατηρεί τα ποιοτικά στάνταρ του και σε ζύμωση μεγάλης κλίμακας. Σε σχέση με την εργαστηριακή κατεργασία, σε μεγάλη κλίμακα υπάρχει διαφοροποίηση σε σύνθεση μέσου, pH, χρόνο καλλιέργειας που μπορεί να επηρεάσουν την αντοχή των κυττάρων (Wendel U, 2022). Αποτελούν, επιπλέον, πρόκληση η βιωσιμότητα των προβιοτικών μετά από ξήρανση με λυοφιλίωση ή ψεκασμό που μπορεί να οδηγήσει σε αλλοίωση της μεμβράνης και κυτταρικό θάνατο (Wendel U, 2022), η διατήρηση της αντιμικροβιακής τους δράσης (Coda et al 2013) και της δυνατότητας παραγωγής αντιμικροβιακών ουσιών (Messens et al 2002). Γενικά, στο τελικό προϊόν, όπου οι μικροοργανισμοί εκτίθενται σε πολλές καταπονήσεις, πρέπει να υπάρχει ένας υψηλός αριθμός ζωντανών προβιοτικών έως και την ημερομηνία λήξης του προϊόντος (Fasoli et al 2003).

Μεταξύ άλλων κριτηρίων, από τα βασικά που παρατέθηκαν και αναλύθηκαν, είναι και η δυνατότητα να υδρολύουν τη λακτόζη επιτρέποντας σε ανθρώπους με δυσανεξία σε αυτή να καταναλώνουν γαλακτοκομικά προϊόντα χωρίς γαστρεντερικά συμπτώματα (Collington et al 1990). Οι δυσανεκτικοί εμφανίζουν έλλειψη του ενζύμου λακτάση, που διασπά τη λακτόζη σε γλυκόζη και γαλακτόζη στο λεπτό έντερο και η λακτόζη δεν μεταβολίζεται ωθούμενη στο παχύ έντερο όπου και προκαλεί τα συμπτώματα. Εκτιμάται ότι στον ενήλικο πληθυσμό, το 70% έχει μια ανεπάρκεια στη λακτάση. Διάφορα στελέχη *Lactobacillus* παράγουν λακτάση σε υψηλά επίπεδα και γενικά τέτοια προβιοτικά κάνουν πιο ανεκτά τα γαλακτοκομικά προϊόντα.

Υπάρχουν και μερικές ακόμα αξιοσημείωτες ιδιότητες που πρέπει να πληρούν τα προβιοτικά. Για να υπάρξει κλινικό αποτέλεσμα απαιτείται να φτάνουν περίπου 10^6 CFU/ml ζωντανοί μικροοργανισμοί στο λεπτό έντερο και 10^8 CFU/g στο κόλον (Minelli και Benini, 2009). Επιπλέον, σύμφωνα με τους WHO/FAO, τα στελέχη των

προβιοτικών πρέπει να είναι ταυτοποιημένα, να μην έχουν λοιμογόνου δράση, να μην παράγουν εντεροτοξίνες, να μην έχουν αιμολυτική δραστηριότητα και να μην μεταφέρουν γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά. Τελικά, μετά τα *in vitro* πειράματα πρέπει να ακολουθήσουν *in vivo* σε ζώα και κλινικές δοκιμές αφού οι εργαστηριακές δοκιμές μιμούνται μόνο εν μέρει τον οργανισμό και είναι δύσκολη η μετάφραση των αποτελεσμάτων των πρώτων σε *in vivo* μοντέλο ζώο και στη συνέχεια σε ανθρώπινο μοντέλο και η εξαγωγή σίγουρων αποτελεσμάτων (FAO/WHO 2001).

1.2.3 Ευεργετικές δράσεις προβιοτικών

Στον ανθρώπινο οργανισμό, εκτός από τα δικά του κύτταρα υπάρχουν και κάποια τρισεκατομμύρια μικροοργανισμοί που συγκροτούν το μικροβίωμα του. Αυτοί ζουν στο εντέρο, το δέρμα, το στόμα, το αναπνευστικό σύστημα και αλλού με ποικίλους φυσιολογικούς ρόλους. Όσον αφορά το μικροβίωμα του εντέρου, αυτό περιλαμβάνει και προβιοτικούς μικροοργανισμούς και είναι καθοριστικό για τη διατήρηση της υγείας. Μια ανισορροπία στο εντερικό μικροβίωμα έχει συνδεθεί με δυσμενείς καταστάσεις όπως παχυσαρκία, διαβήτης, φλεγμονώδης νόσος του εντέρου, ακόμα και με διαταραχές ψυχικής υγείας, μέσω της επικοινωνίας άξονα εντέρου- εγκεφάλου. Καταλαβαίνει κανείς τη σημαντικότητα του είδους των μικροβίων που κατοικούν στο έντερο ούτως ώστε να εξασφαλίζεται η ισορροπία.

Οι ερευνητές έχουν προβεί σε χρησιμοποίηση προβιοτικών σε κλινικές δοκιμές που έδειξαν ότι η χρήση προβιοτικών επιδρά στις παθήσεις του εντέρου με οφέλη για την υγεία του ξενιστή μέσω αποκατάστασης της ισορροπίας του εντερικού μικροβιώματος. Παράλληλα, έχουν μια σειρά περαιτέρω ευεργετικών αποτελεσμάτων με δράση κατά παθογόνων μικροοργανισμών, αντιαλλεργική και αντικαρκινική δράση.

Στη συνέχεια παρατίθενται κάποιες ορισμένες, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, ευεργετικές δράσεις των προβιοτικών στην ανθρώπινη υγεία.

Δράση κατά της διάρροιας

Ίσως η πιο διάσημη δράση των προβιοτικών προς όφελος του ανθρώπου να είναι για την πρόληψη και τη θεραπεία πολλών ειδών διάρροιας. Κλινικές μελέτες τεκμηρίωσαν τα ευεργετικά αποτελέσματα προβιοτικών εναντίον της οξείας διάρροιας (Allen et al 2010). Θα πρέπει εδώ να τονιστεί ότι η εμφάνιση θεραπευτικών αποτελεσμάτων του εκάστοτε στελέχους σχετίζεται στενά με συγκεκριμένη μόλυνση του εντέρου, άρα, έτσι, πρέπει να κριθούν τυχόν αντιφατικά αποτελέσματα σε φαινομενικά παρόμοιες μελέτες. Οι Salari et al (2012) έδειξαν, σε κλινική μελέτη, ανακούφιση από τα συμπτώματα διάρροιας και πυρετού σε παιδιά μέσω προβιοτικών, πράγμα που δεν φάνηκε σε ενήλικες. Ο ροταϊός προκαλεί διάρροια. Σε κλινικές μελέτες (Szajewska H. et al 2011) φάνηκε ότι αυτή μειώθηκε σημαντικά σε παιδιά μέσω της χορήγησης του *Lactobacillus rhamnosus* GG.

Επιστήμονες παρατήρησαν ότι χορηγώντας *Bacillus mesentericus*, *Enterococcus faecalis*, *Clostridium butyricum* σε παιδιά που ταλαιπωρούνται από οξεία διάρροια, μειώνεται και η σοβαρότητα και η διάρκεια της διάρροιας σε σχέση με όταν χορηγείται placebo. Μείωση στη συχνότητα και τη διάρκεια διάρροιας, αυτή τη φορά σε υγιή παιδιά είχε και το στέλεχος *L. casei* DN-114 001 όταν χορηγήθηκε με γιαούρτι σε σχέση με απλό γιαούρτι (Pedone CA et al 2000).

Τα προβιοτικά δρουν και κατά της σχετιζόμενης με αντιβιοτικά διάρροιας. Η καθημερινή χορήγηση του *L. plantarum* 299n σε χρήστες αντιβιοτικών ανακούφισε από τα συμπτώματα και είχε θετική επιρροή στο διαταραγμένο εντερικό μικροβίωμα (Kaźmierczak-Siedlecka et al 2020). Το *L. rhamnosus* GG έχει φανεί ότι προλαμβάνει, από την άλλη, τέτοια διάρροια σε παιδιά ενώ ο *Saccharomyces boulardii* συμβάλλει στην πρόληψη της σε ενήλικες.

Παράλληλα, τα προβιοτικά έχουν δείξει στη βιβλιογραφία και δράση εναντίον της διάρροιας των ταξιδιωτών. Αυτή προκαλείται από βακτήρια όπως *E. coli* (ETEC), *Salmonella*, *Shigella* κατά κανόνα. Σε τουρίστες που επισκέφτηκαν την Τουρκία, η χορήγηση του *L. rhamnosus* GG μείωσε σχεδόν στο μισό τη συχνότητα διάρροιας, ενώ σε ταξιδιώτες στην Αίγυπτο η συγχορήγηση *L. acidophilus*, *B. bifidum*, *L. bulgaricus* και *S. thermophilus* μείωσε το ποσοστό των διαρροιών κατά 28% (Hilton E et al 1997).

Μόλυνση από *Helicobacter pylori*

Υπάρχουν ενδείξεις για χρήση προβιοτικών σε ανθρώπους που έχουν μολυνθεί με το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού. Το *Helicobacter pylori* έχει συσχετιστεί με έλκη στομάχου ή δωδεκαδακτύλου, γαστρίτιδα, ακόμα και με καρκίνο. Η λοίμωξη από αυτό αντιμετωπίζεται με συνδυασμό αντιβιοτικού (αμοξικιλίνη, κλαριθρομυκίνη), βισμούθιου και αναστολέα αντλίας πρωτονίων του στομάχου. Παρά την αποτελεσματικότητα της θεραπείας αυτής, υπάρχει ο κίνδυνος ανάπτυξης ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά εντός του μικροβιώματος του εντέρου όσων τα χρησιμοποιούν. Τα προβιοτικά έχουν δείξει, κυρίως *in vitro*, δράση εναντίον του ελικοβακτηριδίου, ενώ ακόμα τα αποτελέσματα κλινικών δοκιμών δεν είναι αρκετά σημαντικά (Malfertheiner et al 2012). *In vitro*, το προβιοτικό *Ligilactobacillus salivarius* παρήγαγε μεγάλες ποσότητες γαλακτικού οξέος που εμπόδισε την ανάπτυξη του ελικοβακτηριδίου (Aiba et al 1998). Το ίδιο είδος εμπόδισε και τον αποικισμό του ελικοβακτηριδίου στο επιθήλιο του στομάχου ποντικών, εκτός από *in vitro* μοντέλα (Aiba et al 1998). Η συγχορήγηση του προβιοτικού με αντιβιοτικά έχει δείξει πιο έμπρακτα αποτελέσματα σε αναστολή αποικισμού του *Helicobacter pylori* και μείωση των δυσάρεστων συμπτωμάτων *in vivo*.

Αντιαλλεργική δράση

Δεδομένα υπάρχουν για δράση των προβιοτικών έναντι αλλεργιών. Οι αλλεργίες, δηλαδή οι παθολογικές καταστάσεις που προκύπτουν μετά από απόκριση του

οργανισμού σε ένα αντιγόνο, αφορούν σήμερα σχεδόν το 50% του πληθυσμού στην Ευρώπη και τη Βόρεια Αμερική και αποδίδονται σε μια σειρά περιβαλλοντικών ουσιών. Για τη διαχείριση τους, η στόχευση του εντερικού μικροβιώματος έχει κριθεί ρεαλιστική επιλογή αφού ρυθμίζει την ανοσολογική και φλεγμονώδη απόκριση (Latif A et al 2023). Η κυριαρχία της απόκρισης των, ευαισθητοποιημένων σε αλλεργιογόνα, Th2 βοηθητικών λεμφοκυττάρων που παρατηρείται σε αλλεργικές ασθένειες (Latif A et al 2023), με τη δράση των προβιοτικών, έχει προταθεί ότι ανατρέπεται με αύξηση του λόγου Th1/Th2 ώστε να επέλθει ανοσολογική ισορροπία. Λακτοβάκιλλοι έχει φανεί ότι διεγείρουν τα Tregs, που ελέγχουν την υπερβολική απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος με εξισορρόπηση των Th1 και Th2, μέσω παραγωγής κυτοκινών και ρύθμισης της παραγωγής ανοσοσφαιρινών E, A, G (Latif A et al 2023).

Αντικαρκινικές επιδράσεις

Οι αντικαρκινικές ιδιότητες των προβιοτικών, μέσω διαφόρων μηχανισμών, έχουν αποδειχθεί. Ο καρκίνος παχέος εντέρου αποτελεί μια από τις συχνότερες αιτίες θανάτου και προάγεται από ουσίες της επεξεργασίας τροφίμων, μεταξύ άλλων. Ενδεικτικά από πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες (PAHs), αφλατοξίνες, ακρυλαμίδιο όπου, σε συνδυασμό με την απορρύθμιση μεταξύ βλαβών στο DNA και ικανότητας επιδιόρθωσης, τη χρονική διάρκεια εκθέσεις σε καρκινογόνες ουσίες και το γενετικό υπόβαθρο του οργανισμού, μπορούν να οδηγήσουν σε καρκινογένεση.

Τα προβιοτικά έχουν δείξει δράση τόσο εναντίον του καρκίνου του εντέρου όσο και άλλων καρκίνων (Latif A et al 2023). Το μικροβίωμα του εντέρου, εκτός από την ρύθμιση της θρεπτικής κατάστασης, καθορίζει και την ανοσοποιητική λειτουργία αφού όταν παθογόνοι παράγοντες υπερνικούν το φυσιολογικό ενδογενές μικροβίωμα, τότε προκαλείται φλεγμονή. Έτσι μπορούν να υπερεκφραστούν παράγοντες όπως TNF-α, IL-1, IL-6 που προάγουν, φυσιολογικά, την αγγειογένεση και έτσι να προκληθεί καρκίνος. Με άλλα λόγια, το αλλοιωμένο εντερικό μικροβίωμα προάγει την καρκινογένεση μέσω χρόνιας φλεγμονής και των επακόλουθων της. Τα προβιοτικά, μέσω των μεταβολιτών τους όπως είναι οι βακτηριοσίνες και τα οργανικά οξέα, αλληλεπιδρούν με μονοπάτια, όπως της φλεγμονής, του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της αγγειογένεσης και της απόπτωσης ενώ μέσω της παραγωγής λιπαρών οξέων βραχείας αλυσίδας (SCFAs), αποκλείουν παθογόνα που εμπλέκονται στην χρόνια φλεγμονή και εμποδίζουν έτσι την καρκινογένεση (Latif A et al 2023). Μεταξύ άλλων, ο *Saccharomyces boulardii* προκάλεσε, τόσο σε in vitro όσο και σε in vivo πειράματα, αναστολή της κινάσης που σχετίζεται με τον ERK1/2. Το μονοπάτι ERK1/2 συνδέεται με κυτταρική επιβίωση, πολλαπλασιασμό, διαφοροποίηση (Latif A et al 2023). Άλλο προβιοτικό, το *L. reuteri* ώθησε σε απόπτωση κύτταρα ανθρώπινης μυελοειδούς λευχαιμίας μέσω των μονοπατιών NF- kappa B και MAPK (Latif A et al 2023). Σε πειράματα σε

ανθρώπους, η συγχορήγηση κάποιων προβιοτικών κατάφερε να μειώσει τα επίπεδα αφλατοξίνης B1, ενός καρκινογόνου, στα κόπρανα (Kumar R et al 2017), ενώ η χορήγηση μίγματος *L. rhamnosus* LC705 με *Propionibacterium freudenreichii* ssp *shermanii* JS είχε σαν αποτέλεσμα ελαττωμένη δραστικότητα β- γλυκοσιδάσης, ενός ενζύμου των κοπράνων που δυνητικά μετατρέπει προκαρκινογόνα σε καρκινογόνα (Latif A et al 2023).

Τα προβιοτικά δρουν και κατά καρκίνων μη σχετιζόμενων με το γαστρεντερικό σύστημα. Στον καρκίνο του μαστού, η οδός του παράγοντα που επάγεται από υποξία, HIF, εμποδίζεται από υπερκείμενο καλλιέργειας λακτοβάκιλλων (Latif A et al 2023). Σε ό, τι έχει να κάνει με καρκίνο του δέρματος, κύτταρα HMV- 1 ακτινοβολήθηκαν με UVC και το προβιοτικό *Lactobacillus kefir* προκάλεσε μείωση των δραστικών ριζών οξυγόνου, μη σχηματισμό διμερών θυμίνης, μη απόπτωση και άρα διάσωση των κυττάρων. Έτσι, το προβιοτικό αυτό απέτρεψε δυσμενείς επιπτώσεις της υπερϊώδους ακτινοβολίας (Sharifi M et al 2017).

Παχυσαρκία και διαχείριση βάρους

Τα προβιοτικά έχουν δράση κατά της παχυσαρκίας ενώ έχουν συνδεθεί και με έλεγχο του βάρους. Η παχυσαρκία συνδέεται με χρόνια φλεγμονή (Oluwatobi VO et al 2024) και τα προβιοτικά μπορούν να την μειώσουν. Σε *in vivo* πειράματα σε παχύσαρκα ποντίκια, η χορήγηση του στελέχους *L. rhamnosus* PI60 οδήγησε σε αξιοσημείωτη απώλεια βάρους αλλά όχι και ενέργειας (Arora et al 2012).

Τα προβιοτικά, γενικά, συμβάλλουν στον έλεγχο του βάρους, μεταξύ άλλων, παράγοντας λιπαρά οξέα βραχείας αλυσίδας (SCFAs). Πιο αναλυτικά, αυτό συμβαίνει όταν ζυμώνουν φυτικές ίνες, τις οποίες χρησιμοποιούν ως πηγή ενέργειας με θετικό αντίκτυπο στις ορμόνες κορεσμού και αποθήκευσης λίπους και ελέγχοντας, εν τέλει, τον μεταβολισμό (Oluwatobi VO et al 2024). Συμμετέχουν, ταυτόχρονα, στη διάσπαση υδατανθράκων και λιπών που το σώμα δυσκολεύεται να επεξεργαστεί μόνο του, με αποτέλεσμα βελτιωμένη απορρόφηση θρεπτικών και ενέργειας από τις τροφές αυτές (Oluwatobi VO et al 2024). Εξασφαλίζοντας ένα πιο ισορροπημένο εντερικό μικροβίωμα, τα προβιοτικά έχουν συνδεθεί με αυτήν τους την ιδιότητα και με καλύτερη μεταβολική υγεία και μείωση πιθανότητας παχυσαρκίας (Oluwatobi et al 2024). Τέλος, και σε ό, τι έχει να κάνει με αντιδιαβητικές ιδιότητες των προβιοτικών, έχει τεκμηριωθεί ότι καθιστούν πιο ευαίσθητο τον οργανισμό στην ινσουλίνη όπου οι ευεργεσίες αυτής της καλύτερης χρήσης της συνοψίζονται στην καλύτερη διαχείριση των επιπέδων σακχάρου στο αίμα και βέβαια στον έλεγχο του βάρους (Oluwatobi VO et al 2024).

Μείωση χοληστερόλης

Τα προβιοτικά μπορούν να αξιοποιηθούν ως ένα δραστικό εργαλείο για την ελάττωση των επιπέδων χοληστερόλης που κυκλοφορούν στο αίμα. Είναι γνωστό ότι υψηλά επίπεδα της LDL χοληστερόλης, της "κακής" χοληστερόλης, συσχετίζονται

με υψηλό κίνδυνο καρδιαγγειακών παθήσεων (Oluwatobi VO et al 2024). Ο ένας τρόπος που μπορούν τα προβιοτικά να πετύχουν μείωση των επιπέδων χοληστερόλης στο αίμα είναι μέσω αναστολής της *de novo* σύνθεσης της και περιορισμού της απορρόφησής της από το έντερο μέσω αφομοίωσης και αποδόμησης (Latif A et al 2023). Ο άλλος τρόπος είναι μέσω της υδρολάσης χολικών αλάτων (BSH) που πολλά προβιοτικά κατέχουν και υδρολύει τα χολικά άλατα. Ως αποτέλεσμα, η επαναρρόφηση των χολικών οξέων μειώνεται και, τελικά, η ποσότητα της χοληστερόλης στο αίμα επίσης μειώνεται αφού το ήπαρ την αξιοποιεί για σύνθεση χολής (Oluwatobi VO et al 2024). Μέσω των λιπαρών οξέων βραχείας αλυσίδας που παράγονται στα προβιοτικά παρεμποδίζεται η σύνθεση χοληστερόλης από το ήπαρ και άρα υπάρχει μείωση των επιπέδων της (Oluwatobi VO et al 2024). Η βιβλιογραφία επανειλημμένως έχει καταδείξει ότι τα προβιοτικά μειώνουν τη χοληστερόλη. Ενδεικτικά, τα στελέχη *Levilactobacillus brevis* MT950194 και *L. brevis* MW365351 σε *in vitro* αλλά και *in vivo* μοντέλα μείωσαν τη χοληστερόλη, αυξάνοντας, παράλληλα, την απέκκριση της στα κόπρανα στο *in vivo* μοντέλο (Latif A et al 2023). Κλινική δοκιμή χορήγησης *L. acidophilus* σε άτομα με ήπια ή μέτρια υπερχοληστερολαιμία για 3 μήνες είχε ως αποτέλεσμα μείωση των επιπέδων LDL τους (Oluwatobi VO et al 2024).

Επίδραση σε παθήσεις του εντέρου

Η δυνατότητα που έχουν τα προβιοτικά για θεραπεία διαταραχών όπως οι φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου (IBD) και το σύνδρομο ευερέθιστου εντέρου έχει διερευνηθεί. Στις φλεγμονώδεις νόσους του εντέρου, με πιο κοινές τη νόσο του Crohn και την ιδιοπαθή ελκώδη κολίτιδα, παρατηρούνται αλλοιώσεις στα τοιχώματα του εντέρου, φλεγμονή στο βλεννογόνο και έλκος. Οι φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου είναι άγνωστης αιτίας, ωστόσο η παθογένεση τους συνδέεται συχνά με δυσβίωση, δηλαδή απώλεια της ισορροπίας του εντερικού μικροβιώματος (Latif A et al 2023). Έτσι, γεννήθηκε το ενδιαφέρον για χρήση προβιοτικών στη θεραπεία αυτών των ασθενειών, μέσω της ικανότητας αποκατάστασης της εντερικής ευβίωσης. Μελέτες στο πλαίσιο αυτό έδειξαν μείωση της συγκέντρωσης *Lactobacillus* σε βιοψίες παχέος εντέρου ασθενών με ελκώδη κολίτιδα και μείωση της συγκέντρωσης *Bifidobacteria* κοπράνων ασθενών με νόσο Crohn. Η λήψη, από τους τελευταίους, *L. rhamnosus* GG οδήγησε σε αύξηση απόκρισης της IgA στο έντερο, με ευεργετικά αποτελέσματα. Επιπλέον τα λιπαρά οξέα βραχείας αλυσίδας που δημιουργούνται μέσω ζύμωσης από τα προβιοτικά έχειδειχθεί ότι ελέγχουν τη φλεγμονή και συμβάλλουν στην εντερική υγεία (Oluwatobi VO et al 2024). Πάντως η αποτελεσματικότητα των προβιοτικών στις φλεγμονώδεις νόσους του εντέρου μένει να αποδειχθεί πλήρως ούτως ώστε να αποτελέσουν μια μελλοντική θεραπευτική επιλογή.

Το σύνδρομο ευερέθιστου εντέρου (IBS) είναι ένα σύνολο συμπτωμάτων, όπως κοιλιακό άλγος, φούσκωμα, διάρροια και δυσκοιλιότητα, όπου εμφανίζεται

απουσία κάποιας οργανικής νόσου. Διαγιγνώσκεται με αποκλεισμό άλλων παθήσεων όπως οι φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου, ενώ μπορεί να συνοδεύεται και με συμπτώματα που δεν εκφράζονται στο έντερο, όπως το άγχος και η κατάθλιψη. Ελλείψει καθιερωμένης θεραπευτικής αγωγής, η χρήση προβιοτικών παρουσιάζει ενδιαφέρον. Χορήγηση του στελέχους *Bifidobacterium infantis* 35624 σε ασθενείς με σύνδρομο ευερέθιστου εντέρου καλύπτει την ποιότητα ζωής και περιορίσει τα συμπτώματά τους, ενώ η λήψη του ίδιου προβιοτικού από γυναίκες με σύνδρομο ευερέθιστου εντέρου για 4 εβδομάδες μείωσε και πάλι τη συμπτωματολογία σε σχέση με το placebo, δείχνοντας τις προοπτικές χρήσης προβιοτικών έναντι του συνδρόμου ευερέθιστου εντέρου.

Άλλες επιδράσεις στην υγεία

Τα προβιοτικά έχουν εμφανίσει και άλλες θετικές επιδράσεις στην υγεία του ανθρώπου, μερικές από τις οποίες παρατίθενται στη συνέχεια. Αρχικά, στελέχη των γενών *Lactobacillus* και *Bifidobacterium* έχουν αποδεδειγμένα δράση κατά των παθογόνων βακτηρίων που προκαλούν ασθένειες της στοματικής κοιλότητας, όπως τερηδόνα, περιοδοντίτιδα, κακοσμία (Bananas et al 2013). Όσον αφορά τη συμβολή τους στη θεραπεία οστεοπόρωσης, το προβιοτικό στέλεχος *L. reuteri* ATCC 6475 χρησιμοποιήθηκε για τη θεραπεία ποντικών με πρωτοπαθή οστεοπόρωση, οι οποίοι υποβλήθηκαν επίσης και σε χειρουργική επέμβαση, με ενθαρρυντικά συνολικά αποτελέσματα (Collins FL et al 2017). Τέλος, τα προβιοτικά βοηθούν και στην επικοινωνία του άξονα εντέρου - εγκεφάλου, μέσω διαφόρων μηχανισμών (Oluwatobi VO et al 2024). Με αυτόν τον τρόπο, διάφορα στελέχη λακτοβάκιλλων έχουν δείξει και ευεργετικά αποτελέσματα στη θεραπεία γνωστικών διαταραχών που σχετίζονται με το Alzheimer, ενώ η δυνατότητα προβιοτικών μικροοργανισμών να ρυθμίζουν τον άξονα υποθάλαμος - υπόφυση - επινεφρίδια, ο οποίος ελέγχει την απόκριση στο στρες, μπορεί να περιορίσει τις επιπτώσεις του άγχους.

1.2.4 Μηχανισμοί δράσης των προβιοτικών μικροοργανισμών

Παρά το γεγονός ότι έχουν αποδειχθεί οφέλη για την υγεία από κατανάλωση προβιοτικών, οι μηχανισμοί δράσης τους, σε μοριακό επίπεδο, δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως. Πάντως δεν είναι λίγοι οι πιθανοί μηχανισμοί δράσης με τους οποίους τα προβιοτικά πετυχαίνουν τα ευεργετικά τους αποτελέσματα (FAO/WHO, 2001).

Μερικοί μηχανισμοί δράσης των προβιοτικών που έχουν προταθεί και αναλυθεί στη βιβλιογραφία είναι οι ακόλουθοι:

- Ενίσχυση επιθηλιακού φραγμού
- Ενισχυμένη προσκόλληση στο βλεννογόνο του εντέρου
- Ανταγωνιστικός αποκλεισμός παθογόνων μικροβίων
- Παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών
- Ανοσοτροποποιητική δράση

Ενίσχυση επιθηλιακού φραγμού

Η έρευνα για τη συνεισφορά των προβιοτικών στη λειτουργία και διατήρηση του επιθηλιακού φραγμού του εντέρου είναι εκτενής. Το επιθήλιο αλληλεπιδρά και συνδέεται μόνιμα με το εντερικό μικροβίωμα. Η άμυνα στον εντερικό φραγμό συγκροτείται από τη στιβάδα βλέννας, αντιμικροβιακά πεπτίδια, την IgA που εκκρίνεται, καθώς και από το σύμπλεγμα συναπτικής πρόσφυσης που περιορίζει την διαπερατότητα μεταξύ των κυττάρων (Bermudez-Brito M et al 2012). Είναι ευνόητο ότι η διατάραξη του φραγμού οδηγεί σε φλεγμονές και κατ' επέκταση σε διαταραχές του εντέρου (Bermudez-Brito M et al 2012). Ένας τρόπος που προβιοτικά έχουν συμβάλει στην ενίσχυση του φραγμού είναι μέσω της ενίσχυσης έκφρασης γονιδίων σχετικών με τη σηματοδότηση στεγανών συνδέσμων (Bermudez-Brito M et al 2012). Ενδεικτικά, λακτοβάκιλλοι εμπλέκονται στη ρύθμιση έκφρασης γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες κυτταρικής προσκόλλησης όπως η β-κατενίνη ή η E-καδερίνη σε ένα μοντέλο φραγμού (Bermudez-Brito M et al 2012). Προβιοτικά μπορούν, εκτός από το να ενισχύσουν τον φραγμό, να αποκαταστήσουν και τη λειτουργία του σε περίπτωση βλάβης. Χαρακτηριστικό παράδειγμα το *Escherichia coli* Nissle 1917 όπως παραιτήθηκε σε κύτταρα Caco-2 και T84 (Bermudez-Brito M et al 2012). Δεδομένων των αλλαγών στα επίπεδα προφλεφμονωδών κυτοκινών και της διαπερατότητας του εντέρου που παρατηρείται σε ασθένειες του (Bermudez-Brito M et al 2012), τα προβιοτικά προλαμβάνουν αυτήν την μεσολαβούμενη από κυτοκίνες βλάβη του επιθηλίου και η οποία συνδέεται με φλεγμονώδεις νόσους του εντέρου (Bermudez-Brito M et al 2012). Έτσι, τα προβιοτικά ενισχύουν τον φραγμό. Ο *L. rhamnosus* GG, για παράδειγμα, εκκρίνει τα πεπτίδια p40 και p75 που εμποδίζουν την σηματοδότηση που καθοδηγείται από κυτοκίνη και οδηγεί σε απόπτωση. Πιο συγκεκριμένα, η προ-αποπτωτική p38 αναστέλλεται από τα πεπτίδια αυτά μέσω ενεργοποίησης της πρωτεϊνικής κινάσης B (PKB/Akt) (Bermudez-Brito M et al 2012). Τέλος, οι βλεννίνες είναι γλυκοπρωτεΐνες της βλέννας του εντερικού επιθηλίου και είναι πολύ σημαντικές για τη διατήρηση της υγείας. Τα προβιοτικά διεγείρουν την παραγωγή βλεννινών (Latif A et al 2023) και συμβάλλουν και με αυτόν τον τρόπο στην ενίσχυση του φραγμού. Είδη λακτοβάκιλλων έχουν δείξει τέτοια αποτελέσματα σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές αλλά η προστατευτική τους δράση σε *in vivo* μοντέλα παραμένει αμφιλεγόμενη (Bermudez-Brito M et al 2012).

Ενισχυμένη προσκόλληση στον βλεννογόνο του εντέρου

Τα προβιοτικά μέσω της προσκόλλησης στον βλεννογόνο, αποικίζουν το έντερο του ξενιστή και αλληλεπιδρούν με αυτόν, ενώ ρυθμίζουν και το ανοσοποιητικό σύστημα και ανταγωνίζονται τα παθογόνα (Bermudez-Brito M et al 2012). Η αλληλεπίδραση μεταξύ βακτηρίων γαλακτικού οξέος και εντερικών επιθηλιακών κυττάρων και βλέννας μεσολαβείται από επιφανειακές πρωτεΐνες που τα πρώτα φέρουν. Τα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα εκκρίνουν τις γλυκοπρωτεΐνες βλεννίνες που λειτουργούν ενάντια στην προσκόλληση των παθογόνων. Σε αυτό το πλαίσιο, οι

επιφανειακοί παράγοντες των προβιοτικών έχουν συνδεθεί με ανταγωνιστικό αποκλεισμό παθογόνων από τη βλέννα (Bermudez-Brito M et al 2012). Επιφανειακή πρωτεΐνη *Lactobacillus* που μεσολαβεί στην προσκόλληση τους στο βλεννογόνο είναι η βλεννοδεσμευτική πρωτεΐνη MUB που παράγεται από τον *L. reuteri* (Bermudez-Brito M et al 2012). Άλλη τέτοια πρωτεΐνη είναι η MarA που συμμετέχει στη δέσμευση *L.reuteri* και *L. fermentum* στη βλέννα (Bermudez-Brito M et al 2012).

Τα προβιοτικά, παράλληλα, μέσω της προσκόλλησης τους στον βλεννογόνο, καθοδηγούν και την απελευθέρωση ντιφενσινών από τα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα. Οι ντιφενσίνες είναι πεπτιδία/πρωτεΐνες με ευρύ φάσμα αντιμικροβιακής δράσης που ενισχύουν τον φραγμό και ανήκουν στην πρώτη γραμμή άμυνας του ξενιστή σε επίθεση παθογόνων (Bermudez-Brito M et al 2012). Στην κατηγορία αυτών των πεπτιδίων εντάσσονται και ένζυμα που θανατώνουν βακτήρια διαταράσσοντας το κυτταρικό τους τοίχωμα ή την κυτταρική μεμβράνη, με αποτέλεσμα τη δημιουργία πόρων, τη λύση του κυττάρου και τον θάνατο του μικροοργανισμού (Bermudez-Brito M et al 2012).

Γενικά, δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως ο τρόπος με τον οποίο τα βακτήρια γαλακτικού οξέος προσκολλώνται στον βλεννογόνο. Η προσκόλληση τους μπορεί να γίνεται μέσω παθητικών δυνάμεων, ηλεκτροστατικών αλλά και υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων, μεταξύ άλλων. Χρειάζεται περαιτέρω έρευνα στο πεδίο της ανάλυσης συστατικών του βλεννογόνου και της λειτουργίας του, αλλά και όσον αφορά τις αλληλεπιδράσεις βλεννογόνου - μικροβιώματος και επιθηλίου με ανοσοποιητικό σύστημα (Bermudez-Brito M et al 2012).

Ανταγωνιστικός αποκλεισμός παθογόνων μικροβίων

Ο όρος ανταγωνιστικός αποκλεισμός επινοήθηκε από τον Greenberg, το 1969 και αναφέρεται σε μηχανισμούς με τους οποίους βακτήρια εμποδίζουν ή περιορίζουν την ανάπτυξη άλλου είδους βακτηρίων μέσω ανταγωνισμού για θέσεις βακτηριακών υποδοχέων και για θρεπτικά συστατικά. Αυτό το πετυχαίνουν μέσω παραγωγής αντιμικροβιακών ουσιών, διαμορφώνοντας ένα "εχθρικό" περιβάλλον (Bermudez-Brito M et al 2012). Μέσω της αλληλεπίδρασης επιφανειακών πρωτεϊνών - βλεννινών, τα προβιοτικά αποτρέπουν την προσκόλληση παθογόνων. Το πλεονέκτημά τους στον ανταγωνισμό είναι κάποιες ειδικές ιδιότητες συγκόλλησης (Bermudez-Brito M et al 2012). Χαρακτηριστικά, λακτοβάκιλλοι και bifidobacteria αποκλείουν παθογόνα όπως *E. coli*, *Salmonella*, *Helicobacter pylori*, *Listeria monocytogenes*, και ιούς όπως *Rotavirus*. Ο ανταγωνιστικός αποκλεισμός επιτυγχάνεται, μεταξύ άλλων, μέσω παραγωγής ουσιών και διέγερσης των εντερικών επιθηλιακών κυττάρων. Πρόκειται, ουσιαστικά, για ανταγωνισμό μεταξύ βακτηρίων για χώρο, δηλαδή σημεία προσκόλλησης και θρεπτικά. Επίσης, μπορεί να επιτευχθεί μέσω δημιουργίας ενός περιβάλλοντος που δεν είναι βιώσιμο για τους ανταγωνιστικούς μικροοργανισμούς, όπως με παραγωγή αντιμικροβιακών

ουσιών και πιο συγκεκριμένα οξέων, όπως το οξικό και το γαλακτικό. Τέλος, όπως τα παθογόνα έχουν ικανότητα να συνδεθούν σε υδατάνθρακες, έτσι και κάποια προβιοτικά όπως λακτοβάκιλλοι και *bifidobacteria* έχουν παρόμοιες ιδιότητες και άρα ανταγωνίζονται τα πρώτα για δέσμευση σε υποδοχείς των εντεροκυττάρων (Bermudez-Brito M et al 2012).

Παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών

Οι μηχανισμοί δράσης των προβιοτικών επεκτείνονται και στην παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών όπως είναι τα οργανικά οξέα και οι βακτηριοσίνες. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία οργανικά οξέα όπως οξικό οξύ και γαλακτικό οξύ είναι οι βασικότερες ενώσεις των προβιοτικών με αντιμικροβιακή δράση κατά *Gram* - παθογόνων (Bermudez-Brito M et al 2012). Τα οργανικά οξέα εισέρχονται στο βακτηριακό κύτταρο, στην αδιάσπαστη μορφή τους και εντός του διασπώνται, απελευθερώνοντας πρωτόνια. Η ενδοκυττάρια μείωση του pH που προκαλείται οδηγεί σε βλάβη και αυξημένη διαπερατότητα της μεμβράνης, με πιθανό τον θάνατο του παθογόνου μικροοργανισμού (Bermudez-Brito M et al 2012).

Οι βακτηριοσίνες, από την άλλη, είναι πεπτίδια που συντίθεται από *Gram* + βακτήρια, ιδίως βακτήρια γαλακτικού οξέος και παρά το στενό φάσμα δράσης που τις χαρακτηρίζει, δρουν και κατά παθογόνων των τροφίμων. Δρουν μέσω σχηματισμού πόρων και/ή με παρεμπόδιση σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος (Bermudez-Brito M et al 2012). Η σύνθεση βακτηριοσίνης εξασφαλίζει σε χρήσιμους μικροοργανισμούς ανταγωνιστικό πλεονέκτημα επιτρέποντας τους να αυξηθούν και εμποδίζοντας, παράλληλα, την αύξηση παθογόνων σε περιβάλλοντα που συνυπάρχουν μαζί τους, όπως το έντερο (Bermudez-Brito M et al 2012). Ενδεικτικά, το *L. acidophilus* παράγει την λακτασίνη B, το *Lactococcus lactis* την νισίνη και το *L. plantarum* την πλανταρισίνη. Όσον αφορά το γένος *Bifidobacterium*, είναι γνωστή μια βακτηριοσίνη, η μπιφιδοσίνη B, με δράση κατά *Gram* + παθογόνων (Bermudez-Brito M et al 2012). Από την άλλη, μόνο μία πρωτεΐνη, η BIF, παραγόμενη από *Bifidobacterium* έχει αναγνωριστεί ότι δρα κατά *Gram* αρνητικών παθογόνων, όπως *Salmonella typhimurium* και *E. coli* (Bermudez-Brito M et al 2012).

Επιπλέον, προβιοτικά παράγουν και μη συζευγμένα χολικά οξέα με πιο πετυχημένη δράση κατά των μικροβίων από τα χολικά άλατα του ξενιστή. Ωστόσο, δεν έχει ξεκαθαριστεί αν οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί εμφανίζουν αντοχή σε αυτά τα χολικά που οι ίδιοι παράγουν ή με ποιον τρόπο επιβιώνουν από αυτά (Bermudez-Brito M et al 2012). Άλλες αντιμικροβιακές ουσίες των προβιοτικών είναι τα λιπαρά οξέα βραχείας αλυσίδας (SCFAs) και το υπεροξείδιο του υδρογόνου (Latif A et al 2023). Τα SCFAs, συγκεκριμένα, έχουν και δράση κατά των μυκήτων και συντίθενται από λακτοβάκιλλους (Bermudez-Brito M et al 2012).

Ανοσοτροποποιητική δράση προβιοτικών

Τα προβιοτικά ρυθμίζουν την ανοσολογική απόκριση στο έντερο (Latif A et al 2023). Το ανοσοποιητικό σύστημα διακρίνεται σε έμφυτο ή φυσικό και επίκτητο ή προσαρμοστικό. Η επίκτητη ανοσία διακρίνεται σε χυμική και κυτταρική και στηρίζεται σε λεμφοκύτταρα, Β και Τ αντίστοιχα, που αναγνωρίζουν συγκεκριμένα αντιγόνα. Η φυσική ανοσία, από την άλλη, στηρίζεται σε κυτταροπλασματικούς υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων (Pattern Recognition Receptors, PRRs) όπως οι Toll-like Receptors (TLRs), C-type Lectin Receptors (CLRs) και οι NOD-like Receptors (NLRs). Κάποιοι PRRs αναγνωρίζουν παθογόνα μέσω μοριακών μοτίβων που υπάρχουν κατά κανόνα στα παθογόνα (Pathogen - associated molecular patterns, PAMPs) (Bermudez-Brito M et al 2012). Τα προβιοτικά αλληλεπιδρούν με εντερικά επιθηλιακά κύτταρα αλλά και με δενδροκύτταρα, τα οποία συμμετέχουν και στην φυσική και στην επίκτητη ανοσία. Γενικά, αυτά τα κύτταρα του ξενιστή έρχονται σε επαφή με μικρόβια του εντέρου μέσω των υποδοχέων αναγνώρισης προτύπων τους (Bermudez-Brito M et al 2012). Τα προβιοτικά επεκτείνουν την επιρροή τους, επηρεάζοντας τόσο τις φυσικές όσο και τις επίκτητες ανοσολογικές αποκρίσεις, ρυθμίζοντας με διάφορους τρόπους τη δραστηριότητα μακροφάγων, Β και Τ λεμφοκυττάρων προς όφελος του ξενιστή. Τέλος, αυξάνουν την παραγωγή αντιφλεγμονωδών κυτοκινών και, σε ορισμένες περιστάσεις, κατά την αλληλεπίδραση τους με εντερικά επιθηλιακά κύτταρα, προσελκύουν μονοκύτταρα και μακροφάγα (Latif A et al 2023).

1.2.5 Ασφάλεια προβιοτικών

Η ασφάλεια των προβιοτικών, ιδίως των καινούργιων στελεχών, πρέπει να αξιολογείται διεξοδικά προτού αυτά τα στελέχη διατεθούν στην αγορά και καταναλωθούν από τους ανθρώπους. Ζωντανοί μικροοργανισμοί, όπως τα προβιοτικά, φαινομενικά μπορεί να έχουν παρενέργειες όπως συστηματικές λοιμώξεις, μεταβολικές δυσλειτουργίες, παρενέργειες του ανοσοποιητικού συστήματος, μεταφορά γονιδίων αλλά, κυρίως, ευκαιριακές λοιμώξεις (Pradhan D et al 2020).

Ο οργανισμός ενός υγιούς ανθρώπου έχει αμυντικούς μηχανισμούς που στηρίζονται τόσο σε δομές και φυσική ανοσία, όπως δέρμα και βλεννογόνο, φαγοκύτταρα και συμπλήρωμα, όσο και σε πιο ειδικούς μηχανισμούς της επίκτητης ανοσίας όπως τα αντισώματα και τα κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα. Ο βλεννογόνος στο γαστρεντερικό σωλήνα, με το στρώμα βλέννας που τον περιβάλλει, ρυθμίζει το εντερικό μικροβίωμα ώστε να είναι φυσιολογικό και εμποδίζει μικροοργανισμούς να ξεφύγουν, εισβάλλοντας στην κυκλοφορία του αίματος. Ένας υποψήφιος παθογόνος, με σκοπό να μολύνει, θα πρέπει να φέρει λοιμογόνους παράγοντες που θα του επιτρέψουν να επιβιώσει στον γαστρεντερικό σωλήνα και να διαφύγει του αμυντικού συστήματος (Pradhan D et al 2020). Ενδεικτικά παραδείγματα τέτοιων παραγόντων είναι η ικανότητα υπέρμετρης αποικοδόμησης της βλεννίνης, η

κινητικότητα και η χημειοταξία, η ύπαρξη λιποπολυσακχαριτών, η διαβαθμισμένη ικανότητα προσκόλλησης και διαφυγής από τη στιβάδα βλεννίνης. Γενικά, πρέπει να σημειωθεί ότι για κανένα ζωντανό μικροοργανισμό δεν μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα πρόκλησης μόλυνσης (Pradhan D et al 2020). Ακόμα και αν πρόκειται για μικροοργανισμούς του ενδογενούς μικροβιώματος του εντέρου, σε περιπτώσεις ανοσοκαταστολής ή φλεγμονών που αυξάνουν τη διαπερατότητα, τότε αυτοί μπορούν να διαφύγουν από τους φραγμούς και να μπουν στην κυκλοφορία προκαλώντας μόλυνση. Αν συνυπολογιστεί η υψηλή συνιστώμενη δόση για να υπάρχουν τα ευεργετικά αποτελέσματα ενός προβιοτικού με τις επακόλουθες επιπτώσεις που θα είχε, αν τυχόν είχε και μολυσματικές ιδιότητες, γίνεται κατανοητό γιατί τα προβιοτικά πρέπει να είναι απόλυτα ασφαλή, χωρίς κινδύνους για τον καταναλωτή. Οπότε πρέπει πριν την χρήση τους από τους ανθρώπους, να υποβάλλονται σε σχολαστική αξιολόγηση για την απουσία παθογονικότητας ή μολυσματικής ιδιότητας.

Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται λοιμώξεις σχετικές με είδη προβιοτικών, όπως έχουν καταγραφεί από τη βιβλιογραφία.

Πίνακας 1: Λοιμώξεις που σχετίζονται με στελέχη προβιοτικών

Ασθένεια	Οργανισμός	βιβλιογραφικές αναφορές
AIDS	<i>L. casei</i>	Rogasi et al. (1998)
Κολονοσκόπηση	<i>L. rhamnosus</i>	Avlami et al. (2001)
Διαβήτης	<i>L. casei</i>	Chanet et al. (2007)
Ουρολιθίαση	<i>L. jensenii</i>	Chazan, Raz, Shental, Sprecher και Colodner (2008)
Λοίμωξη του ουροποιητικού συστήματος	<i>L. delbrueckii</i>	Darbro, Petroelje, και Doern (2009)
Ενδοκαρδίτιδα	<i>L. jensenii</i>	Suarez-Garcia et al. (2012)
Βακτηριαμία	<i>L. jensenii</i>	Rasul et al. (2012)
Πυελονεφρίτιδα	<i>L. delbrueckii</i>	DuPrey, McCrea, Rabinowitch και Azad (2012)
Ενδοκαρδίτιδα	<i>L. acidophilus</i>	Nishijima et al. (2012)
Χολοκυστίτιδα	<i>L. fermentum</i>	Chery, Dvoskin, Morato και Fahoum (2013)
Βακτηριαμία	<i>L. rhamnosus</i>	Vahabnezhad, Mochon, Wozniak και Ziring (2013)
Οδοντικό απόστημα/τερηδόνα	<i>Lactobacillus</i> spp.	Callaway et al. (2013)
Ενδοκαρδίτιδα	<i>Lactobacillus</i> spp.	Botro and Mukundan (2014)
Ενδοκαρδίτιδα	<i>L. paracasei</i>	Kato et al. (2016)
Βακτηριαμία	<i>Lactobacillus</i> spp.	Franko et al. (2017)

Βακτηριαίμια	<i>L. paracasei</i>	Pararajasingam & Uwagwu, 2017
Σηψαιμία	<i>L. rhamnosus</i> GG	Koyama et al. (2018)
Περιτονίτιδα	<i>L. paracasei</i>	Harding-Theobald και Maraj (2018)
Μηνιγγοεγκεφαλίτιδα	<i>L. plantarum</i>	Biesiada et al. (2018)

Πηγή: Pradhan D et al 2020

Προσεγγίσεις για αξιολόγηση ασφάλειας των προβιοτικών

Σήμερα δεν υπάρχει μια καθολικά αποδεκτή προσέγγιση για αξιολόγηση ασφάλειας των προβιοτικών που να στηρίζεται σε *in vitro* πειράματα, παρεμβάσεις σε ζώα και κλινικές δοκιμές σε ανθρώπους, αλλά διαφορετικοί ρυθμιστικοί φορείς κάνουν τις δικές τους συστάσεις. Αξία αναφοράς είναι τα τεκμήρια αναγνωρισμένης ασφαλείας της EFSA, σύμφωνα με τα οποία οι μικροοργανισμοί που καταναλώνονται πρέπει να είναι ταξινομημένοι, να υπάρχουν πειραματικές πληροφορίες για αυτούς, να μην είναι παθογόνοι, να ορίζεται η τελική τους χρήση. Κάποιες από τις κύριες μεθόδους αξιολόγησης ασφάλειας των προβιοτικών αναλύονται παρακάτω.

Ταυτοποίηση προβιοτικών στελεχών

Το πρώτο βήμα για την εκτίμηση της ασφάλειας ενός προβιοτικού είναι η ταυτοποίηση του, όχι μόνο σε επίπεδο είδους, αλλά και στελέχους γιατί οι ιδιότητες των προβιοτικών είναι ειδικές σε επίπεδο στελέχους. Αυτό είναι πολύ σημαντικό, καθώς στο παρελθόν σκευάσματα που κυκλοφόρησαν στην αγορά αποδείχθηκαν πλαστά, δηλαδή δεν υπήρχε ταύτιση μεταξύ του αναγραφόμενου στην ετικέτα και του περιεχομένου μικροοργανισμού. Κατά τους FAO/WHO, τα προβιοτικά πρέπει να αναγνωρίζονται με φαινοτυπικές μεθόδους σε συνδυασμό με μοριακές τεχνικές. Τέτοιες μοριακές τεχνικές που χρησιμοποιούνται είναι η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για προσδιορισμό τμήματος της αλληλουχίας του 16s rRNA γονιδίου αν μιλάμε για βακτήρια, ή της ITS περιοχής αν μιλάμε για ζύμες, τεχνικές αναγνώρισης γενετικής ταυτότητας (DNA fingerprinting), όπως η ριβοτυποποίηση (ribotyping) και η Ηλεκτροφόρηση Παλμικού Πεδίου (PFGE). Επιπλέον, ελέγχεται κάποιες φορές και η έκφραση housekeeping γονιδίων όπως *rpoA*, *recA*, *atpD*, *pheD* και άλλων.

Ύπαρξη γονιδίων ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά και μεταφορά της

Είναι θεμελιώδες ότι τα προβιοτικά δεν θα πρέπει να αποτελούν πηγή γονιδίων ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά. Πιο συγκεκριμένα, ο κίνδυνος προκύπτει όταν τα γονίδια αυτά μπορούν να μεταφερθούν σε άλλα βακτήρια. Για παράδειγμα, αν η ανθεκτικότητα είναι εγγενής στο γένος του μικροοργανισμού τότε κατά κανόνα

κωδικοποιείται χρωμοσωμικά και δεν υφίσταται κίνδυνος οριζόντιας μεταφοράς σε άλλο βακτήριο. Από την άλλη, αν η ανθεκτικότητα είναι επίκτητη σε κάποιο συγκεκριμένο στέλεχος και προκύπτει είτε από μεταλλάξεις είτε από μεταφορά πλασμιδίων ή άλλων μεταθετών στοιχείων που κωδικοποιούν τον μηχανισμό ανθεκτικότητας (Pradhan D et al 2020), τότε μπορεί να μεταφερθεί σε άλλα βακτήρια, όπως αυτά του μικροβιώματος του ξενιστή. Για τη φαινοτυπική αξιολόγηση της ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά, το στέλεχος ενδιαφέροντος υποβάλλεται σε έλεγχο της ευαισθησίας του σε κάποια, κλινικά σημαντικά, αντιβιοτικά και προσδιορίζεται η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) του για το κάθε ένα. Εκτός από αυτό, σύμφωνα με την EFSA (2018) πρέπει να ακολουθηθεί και γονοτυπική ανάλυση όσον αφορά τον έλεγχο για παρουσία γονιδίων που προσδίδουν ανθεκτικότητα των μικροοργανισμών σε αντιβιοτικά. Καταλήγοντας, ο προβληματισμός αφορά την εμφάνιση ανθεκτικότητας σε κλινικά σημαντικά αντιβιοτικά, η γενετική φύση και ο μηχανισμός της οποίας ανθεκτικότητας πρέπει να αποσαφηνιστεί. Τα στελέχη που είναι ικανά για μεταφορά ανθεκτικότητας φέρουν στο γονιδίωμα, εκτός από την ανθεκτικότητα και στοιχεία που μεσολαβούν στη μεταφορά της. Αυτά πρέπει να εξηγούνται, όπως και η φύση της ανθεκτικότητας γενικότερα. Ο αυξανόμενος εμπλουτισμός σε προβιοτικά στο Whole Genome Sequencing σε συνδυασμό με τις βάσεις δεδομένων μικροβιακής ανθεκτικότητας, όπως και το μειούμενο κόστος τεχνολογιών αλληλούχησης γονιδιώματος παρέχουν νέες δυνατότητες για τον εντοπισμό γονιδίων ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά και του συστήματος μεταφοράς τους (Pradhan D et al 2020).

Αποικοδόμηση της βλεννίνης

Οι γλυκοζυλιωμένες πρωτεΐνες, βλεννίνες, απελευθερώνονται από τα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου και αποτελούν δομικό συστατικό του στρώματος βλέννας του επιθηλίου παρέχοντας ένα φραγμό σε αυτό από εισβολή παθογόνων και από επιβλαβείς συνθήκες (Pradhan D et al 2020). Άρα, είναι ευνόητη η σημαντικότητα της διατήρησης της δομής της βλέννας στην άμυνα του επιθηλίου και έτσι πιθανή αποικοδόμηση της βλεννίνης από οποιονδήποτε μικροοργανισμό θα πρέπει να ελέγχεται. Βακτήρια του εντερικού μικροβιώματος έχουν τη βλέννα ως πηγή άνθρακα άρα ο έλεγχος δραστηριότητας αποικοδόμησης της βλεννίνης μπορεί να γίνει και *in vitro* με ανάπτυξη στελεχών με βλεννίνη ως μοναδική πηγή άνθρακα. Επίσης, το Whole Genome Sequencing μπορεί να βοηθήσει στην ανίχνευση γονιδίων αποικοδόμησης της. Τέλος, θα πρέπει να σημειωθεί ότι η δυνατότητα αποικοδόμησης βλεννίνης από μόνη της δεν θα πρέπει να θεωρείται ενδεικτική λοιμογόνου δραστηριότητας, αλλά αποτελεί κομμάτι μιας ευρύτερης ανάλυσης ασφαλείας των προβιοτικών.

Δυνατότητα πρόκλησης συσσώρευσης αιμοπεταλίων

Βακτήρια του γαστρεντερικού σωλήνα μπορούν να εισέλθουν στην κυκλοφορία του αίματος, σε άτομα που βρίσκονται σε ανοσοκαταστολή ή σε ΜΕΘ και να προκαλέσουν συσσώρευση αιμοπεταλίων ή σχηματισμό θρόμβου με επακόλουθο σηψαιμία ή λοιμώδη ενδοκαρδίτιδα. Όσον αφορά λακτοβάκιλλους έχει γίνει σειρά μελετών με αντικρουόμενα αποτελέσματα σε ό, τι έχει να κάνει με την ικανότητα συσσώρευσης αιμοπεταλίων (Pradhan D et al 2020), άρα θα πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στο στέλεχος του προβιοτικού που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί.

Αιμόλυση, βιογενείς αμίνες και άλλα επιβλαβή ένζυμα

Πολλά παθογόνα προκαλούν αιμόλυση μέσω αύξησης της διαθεσιμότητας σιδήρου για αυτά και πρόκλησης αναιμίας και οιδήματος στον ξενιστή (Pradhan D et al 2020). Η αιμόλυση διακρίνεται σε: α-αιμόλυση που το παραγόμενο από τον μικροοργανισμό H_2O_2 οξειδώνει την αιμοσφαιρίνη σε μεθαιμοσφαιρίνη, η οποία έχει πράσινο χρώμα, με αποτέλεσμα και η αποικία των μικροβίων να παίρνει πράσινο χρώμα. Διακρίνεται, επίσης, σε β-αιμόλυση που πρόκειται για πλήρη λύση των ερυθρών, η οποία δίνει απόχρωση ανοιχτή κίτρινη και διαφανή και γ-αιμόλυση όπου πρακτικά δεν συμβαίνει αιμόλυση. Διάφορες μελέτες σε λακτοβάκιλλους έχουν δείξει, ως επί το πλείστον, α-αιμολυτικό δυναμικό αλλά και β-αιμόλυση σε κάποια στελέχη (Pradhan D et al 2020).

Μια άλλη παράμετρος ασφάλειας που χρήζει διερεύνησης είναι ο σχηματισμός βιογενών αμινών. Αυτές είναι οργανικές ενώσεις με μία αμινομάδα, που μπορούν να παραχθούν εκτός από μικρόβια τροφίμων και *in situ* στο έντερο. Έτσι, παράγονται και από το μόνιμο εντερικό μικροβίωμα μέσω αποκαρβοξυλίωσης αμινοξέων, όπως ιστιδίνης και τυροσίνης, από τις αντίστοιχες αποκαρβοξυλάσες. Ισταμίνη, τυραμίνη, αλλά και πουτρεσκίνη και καδαβερίνη έχουν πιθανές τοξικότητες. Σε φυσιολογικά επίπεδα, οι βιογενείς αμίνες έχουν ευεργετικά αποτελέσματα σε πληθώρα βιολογικών λειτουργιών. Οι τοξικές επιδράσεις εμφανίζονται όταν βρίσκονται σε περίσσεια (Roe AL et al 2022). Υπάρχουν αρκετές αναφορές για συμμετοχή προβιοτικών στελεχών σε σχηματισμό βιογενών αμινών, άρα είναι απαραίτητη η διερεύνηση της, αξιοποιώντας Whole Genome Sequencing και PCR αλλά και μέσο διαλογής αποκαρβοξυλάσης σε συνδυασμό με HPLC (Roe AL et al 2022).

Τέλος, σύμφωνα με κάποιους ερευνητές, προτείνεται και η παρατήρηση για παρουσία ή μη δυνητικά επιβλαβών ενζύμων του μεταβολισμού, όπως β-γλυκοσιδάση, β-γλυκουρονιδάση, νιτρική ρεδοκτάση (Pradhan D et al 2020). Τέτοια ένζυμα δύνανται να μετατρέπουν συστατικά της τροφής ή βιολογικές εκκρίσεις σε ουσίες επιβλαβείς, έως και καρκινογόνες για τον ξενιστή.

Αξιολόγηση μολυσματικότητας και τοξικότητας

Το προβιοτικό, για να κριθεί ασφαλές, δεν θα πρέπει να είναι μολυσματικό ή να φέρει γονίδια τοξίνης που θα μπορούσαν να προκαλέσουν ασθένεια. Αρχικά, ελέγχεται το είδος του προβιοτικού αν είναι λοιμογόνο και τοξικογόνο και στη συνέχεια ελέγχεται το γονιδίωμα του για σχετικά γονίδια. Για παράδειγμα, σε εντερόκοκκους, στελέχη των οποίων χρησιμοποιούνται ως προβιοτικά, βρέθηκαν λοιμογόνοι παράγοντες, όπως αιμολυσίνη, ζελατινάση, δράση DNAάσης ή άλλα δομικά γονίδια όπως *ace*, *esp*, *asaI*, *cylI*. Έτσι, προτείνεται να ελέγχονται και κατά τα άλλα μη παθογόνα βακτήρια για γονίδια που σχετίζονται με μολυσματικότητα και τοξικότητα.

Το πρόβλημα είναι ότι η λοιμογόνος δράση ενός μικροοργανισμού πολλές φορές εξαρτάται από τη δυναμική του σχέση με τον ξενιστή (Roe AL et al 2022). Γονίδια σχετικά με αποικισμό, εισβολή και διαφυγή από τους αμυντικούς μηχανισμούς του ξενιστή θεωρούνται, γενικά, ενδεικτικά πιθανής λοιμογόνου δράσης. Το Pathosystems Resource Integration Center (PATRIC) είναι ένα σημαντικό βοήθημα στην αναγνώριση, στο γονιδίωμα μικροοργανισμών, διαφόρων λοιμογόνων παραγόντων, αφού συνδυάζει γονιδιωματικά και άλλα δεδομένα μαζί με εργαλεία ανάλυσης των παθογόνων.

Κλινικές δοκιμές σε ζώα και ανθρώπους

Οι κλινικές δοκιμές αφορούν στελέχη που δεν έχουν ιστορικό χρήσης και γίνονται για να εξεταστούν αφενός οι ευεργετικές δράσεις των προβιοτικών αλλά και αφετέρου τυχόν παρενέργειες (Pradhan D et al 2020). Όσον αφορά τις μελέτες σε ζώα, αυτές αφορούν τόσο υγιή, όσο και άρρωστα πειραματόζωα, με σκοπό να τεκμηριωθεί απόλυτα η ασφάλεια των προβιοτικών. Για την αξιολόγηση ασφάλειας ο Οργανισμός Οικονομικής Συνεργασίας και Ανάπτυξης προτείνει 14 μέρες εφάπαξ δόσης, που αντιστοιχεί σε δοκιμή οξείας τοξικότητας, 28 μέρες επαναλαμβανόμενης δόσης (υποξεία τοξικότητα), καθώς και 90 μέρες επαναλαμβανόμενης - υποχρόνιας - δόσης προβιοτικών που χορηγούνται από το στόμα. Έχει ενδιαφέρον, επίσης, και το ποιο ζώο επιλέγεται για τις *in vivo* δοκιμές αφού ο χοίρος, από τη μία, έχει πολλές φυσιολογικές, ανατομικές και μεταβολικές ομοιότητες με τον άνθρωπο αλλά τα τρωκτικά, από την άλλη, είναι πιο κοινά στις μελέτες τοξικότητας, ενώ και τα έντερα τους εμφανίζουν ομοιότητες της τάξης του 90% με τον άνθρωπο (Roe AL et al 2022).

Τέλος, τα προβιοτικά υπόκεινται και σε κλινικές δοκιμές σε ανθρώπους, υγιείς και ασθενείς. Αυτό γίνεται κυρίως για την επαλήθευση των οφελών που διατείνονται οι κατασκευαστές ότι προσφέρει το προϊόν τους στην ανθρώπινη υγεία. Οι περισσότερες από τις κλινικές δοκιμές που έχουν εκτελεστεί και δημοσιευτεί δεν έχουν αξιολογήσει αρκετά την ασφάλεια των προβιοτικών (Roe AL et al 2022). Μπορεί να μην προκύπτουν ανησυχητικά στοιχεία από κλινικές δοκιμές για

προβιοτικά, αλλά η βιβλιογραφία δεν ήταν σε θέση να δώσει οριστικές απαντήσεις σε ό, τι έχει να κάνει με την ασφάλεια των προβιοτικών σε μελέτες παρέμβασης.

1.2.6 Προβιοτικοί μικροοργανισμοί

Μπορεί οι μικροοργανισμοί που υπάρχουν στη φύση να είναι πάρα πολλοί, ωστόσο όταν μιλάμε για προβιοτικά, τότε αυτά που έχουν τεκμηριωμένες ευεργετικές δράσεις για την ανθρώπινη υγεία είναι κάποια στελέχη συγκεκριμένων γενών. Τα γένη αυτά είναι τα εξής: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Saccharomyces*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Bacillus*, *E. coli* (Fijan S, 2014). Στελέχη των γενών *Lactobacillus* και *Bifidobacterium* περιέχονται, ως επί το πλείστον, σε προβιοτικά τρόφιμα και είναι τα καλύτερα μελετημένα, έχοντας αναδειχθεί σαν "γενικά αναγνωρισμένα ως ασφαλή" και όντας τα βακτήρια που κυριαρχούν στο λεπτό (λακτοβάκιλλοι) και στο παχύ (*Bifidobacteria*) έντερο (Holzapfel, 2001).

Προβιοτικό γένος: *Lactobacillus*

Βακτήρια του γένους *Lactobacillus* είναι ραβδόμορφα, *Gram +*, προαιρετικά αναερόβια ή μικροαερόφιλα βακτήρια. Ανήκουν στα βακτήρια γαλακτικού οξέος (LAB), όπως και τα βακτήρια των γενών *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*. Μετατρέπουν σάκχαρα (εξόζες) σε γαλακτικό οξύ. Διαμορφώνουν, έτσι, ένα περιβάλλον πιο όξινο που εμποδίζει να αναπτυχθούν διάφορα επιβλαβή βακτήρια. Ως προβιοτικά συναντώνται είδη όπως: *Lactobacillus casei*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. paracasei*, *L. delbrueckii* subsp *bulgaricus*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. johnsonii*. Οι λακτοβάκιλλοι συγκεντρώνουν πολλές από τις βασικές ιδιότητες των προβιοτικών, ενώ εμφανίζουν και πολλές ευεργετικές ιδιότητες για την υγεία. Κατά κάποιους επιστήμονες είναι πιθανότερο οι λακτοβάκιλλοι να αποτελούν ενδογενείς "κατοίκους" της στοματικής κοιλότητας ή των ζυμωμένων τροφίμων παρά του ανθρώπινου εντέρου. Χρησιμοποιούνται στη ζύμωση προϊόντων όπως γιαούρτι, τυρί, κρασί, τουρσί (Fijan S, 2014).

Προβιοτικό γένος: *Bifidobacterium*

Στο γένος *Bifidobacterium* ανήκουν *Gram +*, μη κινητικά, αναερόβια βακτήρια. Απαντώνται στο γαστρεντερικό σωλήνα και τον κόλπο θηλαστικών, δηλαδή και των ανθρώπων (Fijan S, 2014). Έχουν ευέλικτους μηχανισμούς αντίστασης στα χολικά, πράγμα που καθιστά στελέχη τους χρήσιμα ως προβιοτικά. Στελέχη των ειδών *Bifidobacterium infantis*, *B. bifidum*, *B. animalis* subsp *animalis*, *B. animalis* subsp *lactis*, *B. adolescentis*, *B. longum*, *B. breve* χρησιμοποιούνται από εταιρίες ως προβιοτικά. Έχουν ποικίλα οφέλη για την υγεία του ξενιστή, δρώντας εναντίον, μεταξύ άλλων, της δυσκοιλιότητας, της διάρροιας από αντιβιοτικά, της διάρροιας των ταξιδιωτών (Fijan S, 2014).

Προβιοτικό γένος: *Saccharomyces*

Οι ζύμες του γένους *Saccharomyces* έχουν τυπικά στρογγυλό ή ωοειδές σχήμα. Διάφορα είδη του παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην επεξεργασία τροφίμων και στην ιατρική. Ο *Saccharomyces cerevisiae* αξιοποιείται στην αλκοολική ζύμωση ψωμιού, κρασιού και μπύρας, ενώ ο *Saccharomyces bayanus* στην ζύμωση κρασιού. Ο *Saccharomyces boulardii*, από την άλλη, κυκλοφορεί ως προβιοτικό, κυρίως για τη θεραπεία της διάρροιας ανεξαρτήτως αιτίας (Fijan S, 2014).

Προβιοτικό γένος: *Lactococcus*

Το γένος *Lactococcus* περιλαμβάνει *Gram +*, μη κινητικά βακτήρια που ανήκουν στην ομάδα βακτηρίων γαλακτικού οξέος και άρα ζυμώνουν τη γλυκόζη παράγοντας γαλακτικό οξύ. Αυτή τους η ιδιότητα αξιοποιείται στη γαλακτοβιομηχανία, για παρεμπόδιση της ανάπτυξης ανεπιθύμητων βακτηρίων στα προϊόντα. Το είδος *Lactococcus lactis* subsp *lactis* έχει κάποια προβιοτικά στελέχη (Fijan S, 2014).

Προβιοτικά γένη: *Streptococcus*, *Enterococcus*

Τα συγκεκριμένα γένη ανήκουν, επίσης, στην ομάδα LAB. Περιλαμβάνουν διάφορα παθογόνα είδη όπως *Streptococcus pneumoniae* και *Streptococcus pyogenes*, αλλά και είδη ανθεκτικά σε αντιβιοτικά, όπως ο *Enterococcus faecium*, που είναι ανθεκτικός στη βανκομυκίνη (Fijan S, 2014). Από την άλλη, είδη με προβιοτικές ιδιότητες των γενών αυτών είναι ο *Enterococcus durans* αλλά και ο *Streptococcus thermophilus* (Fijan S, 2014), που χρησιμοποιούνται και στην παραγωγή γιαουρτιού.

Προβιοτικό γένος: *Bacillus*

Το γένος *Bacillus* περιλαμβάνει *Gram +*, σπορογόνα, υποχρεωτικά αερόβια ή προαιρετικά αερόβια βακτήρια. Κάποια είδη του έχουν αναφερόμενες προβιοτικές ιδιότητες. Αυτά είναι οι: *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *B. coagulans*. Κάποια στελέχη του *B. cereus* αποτελούν τροφιμογενή παθογόνα, τοξικά για τον άνθρωπο, ενώ άλλα έχουν προβιοτική δράση (Fijan S, 2014). Έτσι, κρίνεται ζωτικής σημασίας η έγκυρη ταυτοποίηση των στελεχών.

Προβιοτικό γένος: *Escherichia*

Το γένος *Escherichia* περιλαμβάνει *Gram -*, προαιρετικά αναερόβια, ραβδόμορφα βακτήρια και περιέχει διάφορα παθογόνα όπως το στέλεχος *Escherichia coli* O157:H7. Περιλαμβάνει, όμως, και ένα διάσημο στέλεχος με προβιοτικές ιδιότητες, το *E. coli* Nissle 1917. Αυτό έχει, μεταξύ άλλων, δράση κατά των φλεγμονωδών νόσων του εντέρου και της δυσκοιλιότητας (Fijan S, 2014).

1.3 Προβιοτικές ιδιότητες προϊόντων της μέλισσας

Προβιοτικά από μέλισσα και μέλι

Η σχέση μεταξύ προβιοτικών και βελτίωσης της ποιότητας ζωής και υγείας έχει εμπεδωθεί σημαντικά, με αποτέλεσμα οι καταναλωτές να αναζητούν, όλο και περισσότερο τέτοιου είδους, λειτουργικά τρόφιμα, ώστε να τα εντάξουν στην

διατροφή τους και, ταυτόχρονα, οι ερευνητές να έχουν προχωρήσει σε βάθος μελέτες σχετικές και με το εντερικό μικροβίωμα των μελισσών, ούτως ώστε να εντοπίσουν προβιοτικές ιδιότητες. Αυτές μπορούν δυνητικά να αξιοποιηθούν για θεραπεία αφενός των ίδιων των μελισσών αλλά και σε άλλα ζώα και ανθρώπους (Suraiami Mustar, Nurliayana Ibrahim, 2022). Εκτός από το μικροβίωμα του εντέρου των μελισσών, η έρευνα έχει ασχοληθεί εκτενώς και με την απομόνωση προβιοτικών από το μέλι, το πιο διαδεδομένο και καταναλώσιμο προϊόν μέλισσας παγκοσμίως.

Τα περισσότερα προβιοτικά που εντοπίστηκαν σε μικροβίωμα εντέρου μελισσών, εντοπίστηκαν στο είδος *Apis mellifera*, λιγότερα εντοπίστηκαν στα είδη *A. cerana* και *A. dorsata*, ενώ τα προβιοτικά που απομονώθηκαν περιελάμβαναν, μεταξύ άλλων, *Bifidobacteria*, LAB, φρουκτοφιλικά LAB, ζυμομύκητες, *Bacillus* και άλλα. Τα *Bifidobacteria* που απομονώθηκαν από έντερο μέλισσας έχουν δείξει αντιμικροβιακή δράση έναντι του *Melisococcus plutonius*, φανερώνοντας ένα προβιοτικό δυναμικό στη μελισσοκομία (Suraiami Mustar, Nurliayana Ibrahim, 2022), αλλά ακόμα η προβιοτική τους δράση δεν έχει τεκμηριωθεί. Τα LAB είναι τα πιο συχνά απομονωμένα βακτήρια από το έντερο μέλισσας, όπως φαίνεται στη βιβλιογραφία. Είδη του γένους *Lactobacillus* όπως *L. plantarum*, *L. pentosus*, *L. fermentum* εντοπίστηκαν στο είδος *Apis dorsata* της Μαλαισίας, με τις ποσότητες του κάθε μέλους του εντερικού μικροβιώματος να εξαρτώνται από την εποχή, την προέλευση και τον όγκο του νέκταρ (Suraiami Mustar, Nurliayana Ibrahim, 2022). Άλλα είδη *Lactobacillus* που έχουν απομονωθεί από έντερο μέλισσας είναι ο *L. kunkeei*, από μέλισσα *Yigilca* αλλά και οι *L. plantarum* και *L. paraplantarum*, από την *A. mellifera*, με δράση κατά μικροβίων που αλλοιώνουν την τροφή και με αποικοδόμηση χολικών αλάτων (Suraiami Mustar, Nurliayana Ibrahim, 2022). Άλλα στελέχη *L. plantarum* (KX519413 και KX519414), που απομονώθηκαν από *A. cerana indica*, έδειξαν ικανότητες επιβίωσης σε περιβάλλον γαστρεντερικού σωλήνα με, επίσης, ιδιότητες παραγωγής βιοφίλμ, αυτοσυσσωμάτωσης, προσκόλλησης και αποικισμού εντέρου, γεγονός που δίνει στα στελέχη αυτά προοπτικές για χρήση ως προβιοτικά (Suraiami Mustar, Nurliayana Ibrahim, 2022). Άλλα γένη LAB που απομονώθηκαν από μέλισσες ήταν τα: *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*.

Μεταξύ άλλων, σε προηγούμενες μελέτες έχουν ανιχνευτεί σε έντερα μέλισσας και φρουκτοφιλικά LAB όπως ο *Fructobacillus fructosus* και ο *L. kunkeei*, στη μέλισσα *A. mellifera*. Τέτοια βακτήρια παρήγαγαν αντιμικροβιακές ουσίες, όπως οξέα, και έδρασαν κατά του παθογόνου των προνυμφών *Raenibacillus*, φανερώνοντας προβιοτικές ιδιότητες. Επιπλέον, παρουσίασαν επιβίωση σε περιβάλλον εντερικού σωλήνα, μη ανθεκτικότητα σε κλινικά σημαντικά αντιβιοτικά, υδροφοβικότητα, σχηματισμό βιοφίλμ και αναστολή πρόσφυσης παθογόνων στα τοιχώματα του

στομάχου. Άρα παρουσιάζουν περαιτέρω προοπτικές αξιοποίησης ως προβιοτικά (Suraiami Mustar, Nurliayana Ibrahim, 2022).

Από το εντερικό μικροβίωμα μελισσών έχουν απομονωθεί, τέλος, προβιοτικά βακτήρια του γένους *Bacillus*, αλλά και ζυμομύκητες. Η αλληλούχηση του γονιδιώματος δύο στελεχών του είδους *B. subtilis*, του MENO2 και του HMNig-2, που απομονώθηκαν από το εντερικό μικροβίωμα μέλισσας αλλά και από μέλι, έδειξε προβιοτικά στοιχεία. Άλλοι Βάκιλλοι που απομονώθηκαν από μέλισσες *A. mellifera* είναι των ειδών *B. licheniformis* και *Paenibacillus polymyxa*. Επίσης, από τέτοιες μέλισσες απομονώθηκαν και ζυμομύκητες, όπως *Wickerhamomyces anomalus*, *Lachancea thermotolerans* και *Zygosaccharomyces mellis*. Όλα αυτά έδειξαν ικανότητα επιβίωσης στις δοκιμές που προσομοιάζουν τον εντερικού σωλήνα, ενώ παρήγαγαν και αντιμικροβιακές ενώσεις (Suraiami Mustar, Nurliayana Ibrahim, 2022).

Από το έντερο μέλισσας, προβιοτικοί μικροοργανισμοί περνούν και στο μέλι, όταν η μέλισσα το παράγει. Η έρευνα των Tajabadi N et al (2013) ήταν η πρώτη που εντόπισε λακτοβάκιλλους όπως *L. kunkeei* και άλλους σε κηρήθρα, εν προκειμένω της μαλαισιανής μέλισσας *A. dorsata*, ανοίγοντας, ουσιαστικά, το δρόμο για τον εντοπισμό και απομόνωση προβιοτικών από την κηρήθρα. Άλλο είδος LAB που απομονώθηκε από μέλι *A. mellifera* είναι το *Leuconostoc mesenteroides*, με αντοχή στις αντίξοες συνθήκες του γαστρεντερικού σωλήνα, υδρόφοβη φύση και αντιμικροβιακή δράση κατά των *S. aureus* και *E. coli* (Suraiami Mustar, Nurliayana Ibrahim, 2022). Το 2012 οι Esawy et al απομόνωσαν από σπόρια που υπήρχαν σε μέλι, βακτήρια του γένους *Bacillus* που επιβίωσαν στις καθιερωμένες δοκιμασίες pH, χολικών, παγκρεατίνης και δεν προκαλούσαν αιμόλυση. Παράλληλα, εμφάνισαν και βιολογικές ιδιότητες, μεταξύ των οποίων και αντιμικροβιακές, γεγονός που τα καθιστά υποψήφια προβιοτικά. Το ίδιο ισχύει και για τα είδη *B. subtilis*, *B. brevis*, *B. megaterium*, *L. acidophilus* που συλλέχθηκαν από ιρανικό μέλι ενώ τα στελέχη *B. subtilis* και *B. megaterium* που εντοπίστηκαν, θεωρήθηκαν ασφαλή γιατί στο γονιδίωμα τους δεν βρέθηκαν γονίδια λοιμογόνου δράσης (Razmgah N et al 2017). Από φρεσκοσυλλεγμένο μέλι της *A. cerana indica* απομονώθηκε το είδος *Gluconobacter oxydans*, ένα Gram - βακτήριο οξικού οξέος, με προβιοτικό δυναμικό (Begum SB et al 2015). Εκτός από την επιβίωση στις προσομοιωμένες συνθήκες του γαστρεντερικού σωλήνα, εμφάνισε δυναμικό παραγωγής σιδηροφόρων, που υποστηρίζει την μικροβιακή ανάπτυξη, ενώ δεν προκαλούσε αιμόλυση, γεγονός που το καθιστά υποψήφιο προβιοτικό.

Από το μέλι, τέλος, απομονώνονται και ζύμες. Σε μελέτη απομονώθηκαν 106 στελέχη ζυμομύκητα από 3 δείγματα, όπου τα περισσότερα εμφάνισαν αντοχή στις γαστρεντερικές συνθήκες. Ορισμένα από αυτά είχαν υψηλό ποσοστό αυτοσυσσωμάτωσης γεγονός που δυνητικά σημαίνει αυξημένη προσκόλληση στον

εντερικό βλεννογόνο, αποικισμό και ανταγωνιστικό αποκλεισμό παθογόνων, ενώ έδειξαν ευελιξία όσον αφορά τα σάκχαρα που μπορούσαν να χρησιμοποιήσουν, συμπεριλαμβανομένων και εξοζών και πεντοζών. Επίσης, ο *S. cerevisiae* παρήγαγε και αντιμικροβιακές ενώσεις και πιο συγκεκριμένα οξέα. Τέτοιες ζύμες είναι υποψήφια προβιοτικά για την παραγωγή λειτουργικών τροφίμων και ζωοτροφών (Suraiami Mustar, Nurliayana Ibrahim, 2022).

Προβιοτικές ιδιότητες μελισσόψωμου από την βιβλιογραφία

Η έρευνα για προβιοτικά στο μελισσόψωμο είναι ένα αναδυόμενο πεδίο, με το οποίο πρόσφατα έχει αρχίσει να ασχολείται η εργαστηριακή έρευνα. Αυτό το φυσικό προϊόν κυψέλης είναι πλούσιο σε προβιοτικά, βακτήρια αλλά και μύκητες, που συμμετέχουν στη ζύμωση της γύρης. Έτσι είδη όπως *L. kunkeei* και γένη όπως *Bifidobacterium* έχουν εντοπιστεί σε μελισσόψωμο. Πρόσφατα, οι Toutiaee et al (2022) απομόνωσαν είδη Βάκιλλων από μελισσόψωμο *Apis mellifera*. Στελέχη των ειδών *B. subtilis* και *B. licheniformis* έδειξαν υψηλή ικανότητα αντοχής σε εντερικές συνθήκες, ενώ έδειξαν και υψηλή ανάπτυξη σε φαινόλη και υψηλή ικανότητα αυτοσυσσώματωσης, αντίστοιχα το καθένα. Ταυτόχρονα, δεν ανιχνεύθηκαν γονίδια λοιμογόνου δράσης. Όλα αυτά καθιστούν τα συγκεκριμένα στελέχη υποψήφια προβιοτικά με εμπορικό ενδιαφέρον. Τέλος, μια ευεργετική δράση των προβιοτικών είναι η μείωση της χοληστερόλης και το μελισσόψωμο, με βακτήρια του γένους *Lactobacillus* που περιέχει, έχει δείξει ότι μπορεί να την πετύχει (Bakour M et al 2020).

Πειραματική διαδικασία και σκοπός

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση του προβιοτικού δυναμικού, μέσω κάποιων δοκιμασιών, μικροοργανισμών που είχαν προηγουμένως απομονωθεί από ελληνικό μελισσόψωμο. Πιο συγκεκριμένα, 9 στελέχη ζυμών και 4 στελέχη βακτηρίων υποβλήθηκαν σε δοκιμασίες ελέγχου αντοχής σε *in vitro* συνθήκες παρόμοιες με αυτές του γαστρεντερικού σωλήνα, προκειμένου να διαπιστωθεί αν μπορούν να επιβιώσουν στις αντίξοες συνθήκες του και αν πληρούν ορισμένα κριτήρια ούτως ώστε να θεωρηθούν πιθανά προβιοτικά. Η παρούσα εργασία αφορά μέρος ενός ευρύτερου πειραματικού προγράμματος, σχετικού με το μελισσόψωμο, του Εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας Μικροβίων, της Σχολής Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Για αυτό τον λόγο κάποιες δοκιμασίες ελέγχου του προβιοτικού δυναμικού είχαν πραγματοποιηθεί σε προγενέστερο χρόνο. Εδώ, εκτελέστηκαν, για 7 εκ των 9 στελεχών ζυμών, η δοκιμασία αντοχής σε παρουσία χολικών αλάτων και, για το σύνολο των 9 στελεχών

ζυμών, η δοκιμασία αντοχής σε παρουσία παγκρεατίνης, ενώ για τα 4 στελέχη βακτηρίων ελέγχθηκε η αντοχή τους σε παρουσία χολικών αλάτων.

ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ

Ανακαλλιέργειες στελεχών βακτηρίων και ζυμών

Τα στελέχη των μικροοργανισμών υποβλήθηκαν σε ανακαλλιέργεια, ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Αυτό έγινε για τη διατήρηση της βιωσιμότητάς τους και την απόκτηση καθαρών απομονωμάτων στις πειραματικές διαδικασίες.

Όσον αφορά τις ζύμες, οι αποικίες του κάθε υπό μελέτη στελέχους μεταφέρθηκαν, σε ασηπτικές συνθήκες, από ένα τρυβλίο petri σε ένα νέο, με αποστειρωμένο θρεπτικό υλικό PDA (Potato Dextrose Agar) με τη βοήθεια αποστειρωμένων οδοντογλυφίδων. Η σύσταση του PDA ήταν η εξής: 24g/L Potato Dextrose Broth (Biolab Zrt, Budapest, Hungary), 15 g/L Bacteriological Agar (Biolab Zrt, Budapest, Hungary) σε απιονισμένο νερό. Όσον αφορά τα βακτήρια, ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία, με τη διαφορά ότι το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν PCA (Plate Count Agar, Standard Methods) και περιείχε 23,5g/L PCA (NEOGEN Culture Media, Lansing, Michigan) σε απιονισμένο νερό.

Δοκιμασία αντοχής των βακτηρίων παρουσία χολικών αλάτων (Oxgall)

Η δοκιμασία αντοχής των βακτηρίων σε χολικά άλατα πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τους Jacobsen CN et al (1999) με κάποιες τροποποιήσεις. Οι καλλιέργειες των βακτηριακών στελεχών προετοιμάστηκαν ως εξής: Σε errendorf των 2 ml τοποθετήθηκε 1,5ml καλλιέργειας από το κάθε υπό μελέτη στέλεχος σε θρεπτικό υλικό Nutrient Broth (Biolab Zrt, Budapest, Hungary). Ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 3.500 g για 10 λεπτά, απόρριψη του υπερκείμενου και επαναδιαλυτοποίηση σε 1,5 ml αποστειρωμένο PBS (Phosphate Buffered Saline) (Grisp, Lda., Porto, Portugal). Έπειτα, 1% v/v από το κάθε διάλυμα βακτηριακών κυττάρων προστέθηκε σε στείρο Nutrient Broth που περιείχε ή όχι 0,3% w/v oxgall (χολικά άλατα) (Bile salts mixture, BBL, Division of BioQuest, Cockeysville, Maryland, USA). Ακολούθησε επώαση σε μικροαερόφιλικές συνθήκες, όπου τα υπό μελέτη στελέχη τοποθετήθηκαν σε βάζο αναερόβιας καλλιέργειας AnaeroJar AG25 με φάκελο δημιουργίας μικροαερόφιλικών συνθηκών Campygen Atmosphere Generation system (Oxoid, Basingstoke, UK), για 3 ώρες στους 37°C. Με την ολοκλήρωση του χρονικού διαστήματος της επώασης, σε ασηπτικές συνθήκες, παρασκευάστηκαν υποδεκαπλάσιες αραιώσεις (έως 10^{-7}) από κάθε βακτηριακό στέλεχος σε PBS. Στη συνέχεια 100 μl από κάθε αραιώση 10^{-1} έως 10^{-7} κάθε δείγματος επιστρώθηκαν σε τρυβλία PCA (τρεις επαναλήψεις) και επώαστηκαν αερόβια σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 6 ημέρες. Μετά την επώαση, μετρήθηκαν οι αποικίες σε κάθε τρυβλίο και εκφράστηκαν ως cfu/ml. Η αντοχή στα

χολικά άλατα υπολογίστηκε συγκρίνοντας τον αριθμό των αποικιών μετά από έκθεση ή όχι σε χολικά άλατα.

Δοκιμασία αντοχής των ζυμών παρουσία χολικών αλάτων (Oxgall)

Η δοκιμασία αντοχής των ζυμών σε χολικά άλατα πραγματοποιήθηκε με παρόμοιο τρόπο. Οι καλλιέργειες των στελεχών των ζυμών προετοιμάστηκαν ως εξής: σε errendorf των 2 ml τοποθετήθηκε 1,5ml overnight καλλιέργειας από το κάθε υπό μελέτη στέλεχος σε θρεπτικό υλικό PDB (Potato Dextrose Broth). Ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 3.500 g για 10 λεπτά, απόρριψη του υπερκειμένου και επαναδιαλυτοποίηση σε 1,5 ml αποστειρωμένο PBS (Phosphate Buffered Saline) (Grisp, Lda., Porto, Portugal). Έπειτα, 1% v/v από το κάθε διάλυμα ζυμών προστέθηκε σε στείρο PDB που περιείχε ή όχι 0,3% w/v oxgall (χολικά άλατα) (Bile salts mixture, BBL, Division of BioQuest, Cockeysville, Maryland, USA). Ακολούθησε επώαση σε μικροαεροφιλικές συνθήκες, όπου τα υπό μελέτη στελέχη τοποθετήθηκαν σε βάζο αναερόβιας καλλιέργειας AnaeroJar AG25 με φάκελο δημιουργίας μικροαεροφιλικών συνθηκών Campygen Atmosphere Generation system (Oxoid, Basingstoke, UK), για 3 ώρες στους 37°C. Με την ολοκλήρωση του χρονικού διαστήματος της επώασης, σε ασηπτικές συνθήκες, παρασκευάστηκαν υποδεκαπλάσιες αραιώσεις (έως 10^{-7}) από κάθε στέλεχος ζύμης σε PBS. Στη συνέχεια 100 μl από κάθε αραιώση 10^{-1} έως 10^{-7} κάθε δείγματος επιστρώθηκαν σε τρυβλία PDA (τρεις επαναλήψεις) και επώαστηκαν αερόβια σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 4 ημέρες. Μετά την επώαση, μετρήθηκαν οι αποικίες σε κάθε τρυβλίο και εκφράστηκαν ως cfu/ml. Η αντοχή στα χολικά άλατα υπολογίστηκε συγκρίνοντας τον αριθμό των αποικιών μετά από έκθεση ή όχι σε χολικά άλατα.

Δοκιμασία αντοχής των ζυμών παρουσία παγκρεατίνης

Η αντοχή στα παγκρεατικά ένζυμα δοκιμάστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο των Rönkä et al. (2003) με τροποποιήσεις. Προετοιμάστηκε το διάλυμα δοκιμασίας σε παγκρεατίνη, με PBS που περιείχε 150 mM NaHCO_3 (BDH Analar, Poole, England) και 1,9 mg/ml παγκρεατίνης (Glenthams, Corsham, United Kingdom). Οι καλλιέργειες των στελεχών των ζυμών προετοιμάστηκαν ως εξής: σε errendorf των 2 ml τοποθετήθηκε 1,5ml overnight καλλιέργειας από το κάθε υπό μελέτη στέλεχος σε θρεπτικό υλικό PDB. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 3.500 g για 10 λεπτά, απόρριψη του υπερκειμένου και επαναδιαλυτοποίηση σε 1,5 ml αποστειρωμένο PBS (Phosphate Buffered Saline) (Grisp, Lda., Porto, Portugal). Έπειτα, 1% v/v από το κάθε διάλυμα ζυμών προστέθηκε σε διάλυμα δοκιμασίας ή σε σκέτο PBS που χρησίμευε ως μάρτυρας. Ακολούθησε επώαση σε μικροαεροφιλικές συνθήκες, όπου τα υπό μελέτη στελέχη τοποθετήθηκαν σε βάζο αναερόβιας καλλιέργειας AnaeroJar AG25 με φάκελο δημιουργίας μικροαεροφιλικών συνθηκών Campygen Atmosphere Generation system (Oxoid, Basingstoke, UK), για 3 ώρες στους 37°C. Με την ολοκλήρωση του χρονικού διαστήματος της επώασης, σε ασηπτικές συνθήκες, παρασκευάστηκαν υποδεκαπλάσιες αραιώσεις (έως 10^{-7}) από κάθε στέλεχος ζύμης σε PBS. Στη συνέχεια 100 μl από κάθε αραιώση 10^{-1} έως 10^{-7} κάθε δείγματος

επιστρώθηκαν σε τρυβλία PDA (τρεις επαναλήψεις) και επώαστηκαν αερόβια σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 4 ημέρες. Μετά την επώαση, μετρήθηκαν οι αποικίες σε κάθε τρυβλίο και εκφράστηκαν ως cfu/ml. Η αντοχή στην παγκρεατίνη υπολογίστηκε συγκρίνοντας τον αριθμό των αποικιών από το διάλυμα δοκιμασίας σε παγκρεατίνη και τον μάρτυρα.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Υποβλήθηκαν τα υπό μελέτη στελέχη των ζυμών σε δοκιμασία αντοχής σε παγκρεατίνη και συγκρίθηκαν οι συγκεντρώσεις των στελεχών που προστέθηκαν σε διάλυμα δοκιμασίας (παγκρεατίνης) και σε διάλυμα μάρτυρα, ούτως ώστε στη συνέχεια να προσδιοριστεί και ποσοτικά η αντοχή στην παγκρεατίνη. Στον πίνακα 2 παρουσιάζονται οι τιτλοδοτήσεις των καλλιιεργειών των στελεχών των ζυμών, όσον αφορά τη δοκιμασία αντοχής σε παγκρεατίνη. Όπως φαίνεται, στα στελέχη 440 και 337 δεν παρατηρήθηκε σχηματισμός αποικιών μετά από την κατεργασία με το διάλυμα παγκρεατίνης. Έτσι η επιβίωση των στελεχών αυτών ήταν μηδενική. Τα υπόλοιπα στελέχη εμφάνισαν όλα μειωμένη συγκέντρωση σε παρουσία παγκρεατίνης, ωστόσο σε αυτά παρατηρήθηκε επιβίωση. Μεταξύ αυτών των στελεχών, δηλαδή των 444A, 444B, 445, 446, 447, 448, 449, κάποια εμφάνισαν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στην παγκρεατίνη και άλλα μικρότερη. Τα στελέχη αυτά είχαν την ίδια αρχική συγκέντρωση, 1×10^7 CFU/ml. Τα στελέχη 444B και 445 είχαν την μικρότερη συγκέντρωση μετά την κατεργασία με παγκρεατίνη ενώ το στέλεχος 448 είχε την υψηλότερη επιβίωση με συγκέντρωση 4×10^6 CFU/ml.

Πίνακας 2: Επιβίωση των ζυμών μετά από την επώαση με παγκρεατίνη

7 στελέχη ζυμών, των ειδών *Z. siamensis* και *S. magnoliae*, εξετάστηκαν και για την αντοχή τους στα χολικά άλατα. Στον πίνακα 3 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της

SAMPLE	YEAST	Τιτλοδότηση καλλιέργειας μάρτυρα	Τιτλοδότηση μετά από την επώαση με παγκρετίνη	Ποσοστό επιβίωσης
440	<i>Z. melis</i>	4×10^7 CFU/ml	0	0%
444A	<i>Z. siamensis</i>	1×10^7 CFU/ml	1×10^6 CFU/ml	10%
444B	<i>Z. siamensis</i>	1×10^7 CFU/ml	3×10^5 CFU/ml	3%
445	<i>Z. siamensis</i>	1×10^7 CFU/ml	3×10^5 CFU/ml	3%
446	<i>Z. siamensis</i>	1×10^7 CFU/ml	1×10^6 CFU/ml	10%
447	<i>Z. siamensis</i>	1×10^7 CFU/ml	2×10^6 CFU/ml	20%
448	<i>Z. siamensis</i>	1×10^7 CFU/ml	4×10^6 CFU/ml	40%
449	<i>Z. siamensis</i>	1×10^7 CFU/ml	3×10^6 CFU/ml	30%
337	<i>S. magnoliae</i>	6×10^7 CFU/ml	0	0%

δοκιμασίας αυτής. Τα στελέχη 337 και 448 έδειξαν μείωση στην επιβίωση τους μετά την επώαση σε χολικά, άρα επέδειξαν και κάποια ευαισθησία σε αυτά, σε

διαφορετικό βαθμό το καθένα. Πιο συγκεκριμένα, το στέλεχος 337 έδειξε όχι ιδιαίτερα υψηλή επιβίωση σε χολικά (+) ενώ το 448 έδειξε αρκετά υψηλή (++). Διατήρηση σχεδόν του συνολικού αριθμού των αρχικών αποικιών μετά την επώαση παρουσία χολικών παρατηρήθηκε στα στελέχη 444A και 446. Τέλος, τα στελέχη 444A, 445, 446, 447, 449 ήταν αυτά που επέδειξαν πολύ υψηλή επιβίωση σε χολικά άλατα (+++).

Πίνακας 3: Επιβίωση των ζυμών μετά από την επώαση με χολικά άλατα

SAMPLE	YEAST	Τιτλοδότηση καλλιέργειας χωρίς επώαση σε χολικά άλατα	Ποσοτικοποίηση επιβίωσης μετά από την επώαση με χολικά άλατα
444A	<i>Z. siamensis</i>	1x10 ⁷ CFU/ml	+++ (υψηλή)
445	<i>Z. siamensis</i>	6x10 ⁷ CFU/ml	+++
446	<i>Z. siamensis</i>	1x10 ⁷ CFU/ml	+++
447	<i>Z. siamensis</i>	1x10 ⁷ CFU/ml	+++
448	<i>Z. siamensis</i>	2x10 ⁷ CFU/ml	++ (αρκετά υψηλή)
449	<i>Z. siamensis</i>	2x10 ⁷ CFU/ml	+++
337	<i>S. magnoliae</i>	8x10 ⁷ CFU/ml	+ (όχι ιδιαίτερα υψηλή)

Η δοκιμασία ελέγχου αντοχής στα χολικά άλατα πραγματοποιήθηκε και για 4 στελέχη βακτηρίων που απομονώθηκαν από μελισσόψωμο. Στον πίνακα 4 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα. Τα βακτήρια στελέχη 308 και 401 έδειξαν μηδενικά CFUs μετά την κατεργασία με χολικά, δηλαδή δεν επιβίωσαν. Τέλος, τα στελέχη 400 και 530, επίσης, έδειξαν μεγάλη μείωση CFUs μετά την κατεργασία με χολικά, με ποσοστά επιβίωσης μικρότερα του 1%.

Πίνακας 4: Επιβίωση των βακτηρίων μετά από την επώαση με χολικά άλατα

SAMPLE	BACTERIA	Τιτλοδότηση καλλιέργειας χωρίς επώαση σε χολικά άλατα	Τιτλοδότηση μετά από την επώαση με χολικά άλατα	Ποσοστό επιβίωσης
308	<i>A. kunkeei</i>	6x10 ⁷ CFU/ml	0	0%
400	<i>A. kunkeei</i>	1x10 ⁷ CFU/ml	3x10 ⁴ CFU/ml	0,3%
401	<i>F. fructosus</i>	6x10 ⁷ CFU/ml	0	0%
530	<i>A. kunkeei</i>	9x10 ⁷ CFU/ml	7x10 ⁵ CFU/ml	0,8%

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η διατροφή διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην ψυχοσωματική μας υγεία και ευεξία. Όσο περισσότερο εμπεδώνεται αυτό, τόσο θα αναζητούνται τρόφιμα και συμπληρώματα που θα έχουν ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία και τόσο η επιστημονική έρευνα θα εστιάζει σε αυτά. Τα τρόφιμα, όπως είναι γνωστό, δεν αποτελούν μόνο πηγή θρεπτικών μικρό και μακροστοιχείων. Στα τρόφιμα περιέχονται και μικροοργανισμοί, που μπορεί να είναι ωφέλιμοι ή παθογόνοι. Όταν είναι παθογόνοι όπως *Salmonella spp*, *Listeria monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* O157:H7, τότε, προφανώς, είναι ανεπιθύμητοι και επιδιώκεται μέσω διαφόρων μεθόδων η αναστολή της ανάπτυξης και η θανάτωση τους. Όταν, όμως, είναι δυνητικά ωφέλιμοι, δηλαδή ωφελούν την υγεία του ξενιστή, τότε καθίσταται πρόκληση η απομόνωση τους και ο έλεγχος αφενός της ασφάλειας τους και αφετέρου της ευεργετικής επίδρασης τους στην υγεία του καταναλωτή. Τέτοιοι μικροοργανισμοί είναι τα προβιοτικά όπου σύμφωνα με τους FAO/WHO είναι "ζωντανοί μικροοργανισμοί που, όταν καταναλωθούν σε ικανές ποσότητες, επιφέρουν ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία του ξενιστή".

Προβιοτικά συχνά περιέχονται σε φυσικά ή ελεγχόμενα ζυμωμένα προϊόντα. Η έρευνα μας αφορά την διερεύνηση του προβιοτικού δυναμικού μικροοργανισμών απομονωμένων από ελληνικό μελισσόψωμο. Το μελισσόψωμο αποτελεί ένα χαρακτηριστικό φυσικά ζυμωμένο προϊόν. Η γύρη που συλλέγεται από τις μέλισσες και εναποτίθεται στα κελιά της κηρήθρας, μαζί με μέλι, αδενικές εκκρίσεις και νέκταρ, υφίσταται ζύμωση από βακτήρια γαλακτικού οξέος (LAB) και ζύμες και βιομετατρέπεται σε ένα άλλο προϊόν, το μελισσόψωμο. Οι μικροοργανισμοί αυτοί προέρχονται από την ίδια τη γύρη αλλά και από την μέλισσα, όπου κατά την διαδικασία παραγωγής του μελισσόψωμου, τούς "εμβολιάζει".

Το μικροβίωμα του μελισσόψωμου και οι δυνητικές του επιδράσεις στην υγεία των ανθρώπων παρέμενε μέχρι πρόσφατα αρκετά αχαρτογράφητο. Σε αδρές γραμμές, τα σημαντικότερα ευρήματα της βιβλιογραφίας είναι η έντονη ανάπτυξη των LAB σε μελισσόψωμο που έχει ωριμάσει για δύο εβδομάδες και η οποία ανάπτυξη δεν παρατηρείται νωρίτερα (Vásquez, A., Olofsson, TC, 2009). Αυτό σε συνδυασμό με το γεγονός ότι κατά γενική ομολογία οι μύκητες έχουν ισχυρή παρουσία στο μελισσόψωμο έρχεται να καταδείξει τον ρόλο των LAB και ζυμομυκήτων στη ζύμωση της γύρης. Συνεχίζοντας για τα LAB, έχει φανεί ότι το *Lactobacillus* είναι το κυρίαρχο γένος και ο *Lactobacillus kunkeei* το πιο συχνά συναντούμενο είδος Λακτοβάκιλλων του μικροβιώματος του μελισσόψωμου. Θα πρέπει, επίσης, να αναφερθεί ότι τα κύρια είδη που απαντώνται στο μελισσόψωμο κατά την ωρίμανση του είναι ο *L. kunkeei* μαζί με τον *Fructobacillus fructosus*. Όσον αφορά τους μύκητες, το κυρίαρχο φύλο του μελισσόψωμου είναι το Ascomycota (Didaras NA et al 2020). Η έρευνα μας αφορούσε κάποιους από τους απομονωμένους μικροοργανισμούς μελισσόψωμου ελληνικής προέλευσης. Πιο συγκεκριμένα, 4

στελέχη βακτηρίων των ειδών *Apilactobacillus kunkeei* και *Fructobacillus fructosus* και 9 στελέχη ζυμών που ανήκαν στα είδη *Zygosaccharomyces mellis*, *Z. siamensis* και *Starmerella magnoliae*. Βακτήρια που απομονώθηκαν από μελισσόψωμο έχουν εξεταστεί από τη βιβλιογραφία και έχουν δείξει προβιοτικές ιδιότητες (Peřka, K et al 2023, Mohammad SM et al 2020). Από όσο είμαστε σε θέση να γνωρίζουμε, αυτή η εργασία είναι η πρώτη που διερευνά προβιοτικό δυναμικό ζυμών που απομονώθηκαν από μελισσόψωμο.

Για να χαρακτηριστεί ένας μικροοργανισμός προβιοτικός, σύμφωνα με κάποιους ερευνητές, θα πρέπει να αποτελεί αυτόχθονο κάτοικο του εντερικού μικροβιώματος ενός υγιούς ατόμου (Anadon et al 2016). Το εντερικό μικροβίωμα είναι καθοριστικό για τη διατήρηση της υγείας. Μια ανισορροπία στη σύνθεση του συνδέεται πολλές φορές με παθολογικές καταστάσεις, όπως παχυσαρκία, διαβήτης, IBD, ενώ μπορεί να έχει αντίκτυπο μέχρι και στην ψυχική υγεία. Τα προβιοτικά, μέσω της ενίσχυσης του επιθηλιακού φραγμού, της ενισχυμένης προσκόλλησης στον εντερικό βλεννογόνο, του ανταγωνιστικού αποκλεισμού παθογόνων, της παραγωγής αντιμικροβιακών ουσιών, αλλά και της ανοσοτροποποιητικής τους δράσης, είναι ικανά να προσφέρουν τα ευεργετικά τους αποτελέσματα έναντι των καταστάσεων που προαναφέρθηκαν, αλλά και ακόμα περισσότερων. Παρότι δεν υπάρχουν θεσπισμένες και συγκεκριμένες, *in vitro* και *in vivo* τεχνικές για τη διερεύνηση του προβιοτικού δυναμικού, σε γενικές γραμμές το πρωτόκολλο που ακολουθείται στις έρευνες εξετάζει κατά κανόνα: 1) την ασφάλεια, 2) τις ευεργετικές επιδράσεις για τον καταναλωτή και 3) τον έλεγχο της επιβίωσης των προβιοτικών στις αντίξοες συνθήκες του γαστρεντερικού σωλήνα. Η ασφάλεια συνήθως εξετάζεται, προκαταρκτικά, μέσω του ελέγχου απουσίας γονιδίων ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά και του ελέγχου αιμολυτικής δραστηριότητας. Οι ευεργετικές επιδράσεις έχουν να κάνουν με το στέλεχος, ωστόσο κυρίως ελέγχεται η αντιμικροβιακή δραστηριότητα και η συγκόλληση με τα παθογόνα. Η επιβίωση στις συνθήκες του γαστρεντερικού σωλήνα εξετάζεται μέσω της αξιολόγησης της βιωσιμότητας των μικροοργανισμών παρουσία χολικών αλάτων, παγκρεατίνης, όξινου pH, που προσομοιάζει το γαστρικό υγρό, της ικανότητας προσκόλλησης σε επιθήλιο και της ικανότητας αυτοσυσσωμάτωσης.

Η παρούσα εργασία αφορά τον τρίτο άξονα και πιο συγκεκριμένα εξετάστηκε, *in vitro*, η βιωσιμότητα μικροοργανισμών, που απομονώθηκαν από μελισσόψωμο, σε παρουσία χολικών αλάτων και παγκρεατίνης, που θεωρούνται καλός δείκτης για την επιβίωση ενός προβιοτικού στελέχους στον γαστρεντερικό σωλήνα. Κάθε δυνητικό προβιοτικό στέλεχος οφείλει να ανέχεται αυτές τις συνθήκες προκειμένου να παρέχει τα ευεργετικά του αποτελέσματα στον ξενιστή.

Πρέπει να σημειωθεί ότι οι *in vitro* αυτές δοκιμασίες δεν μπορούν να μιμηθούν σε απόλυτο βαθμό τις *in situ* συνθήκες στον γαστρεντερικό σωλήνα, αλλά δεν παύουν

να είναι σχετικά αξιόπιστα εργαλεία για μια προκαταρκτική διαλογή υποψήφιων στελεχών από μεγάλες "δεξαμενές" μικροοργανισμών. Αυτό συμβαίνει γιατί δίνουν τη δυνατότητα διερεύνησης της απόκρισης μεγάλου αριθμού στελεχών σε μια προβιοτική δοκιμασία, απλοποιώντας και επιταχύνοντας σε μεγάλο βαθμό τις διαδικασίες από ό,τι θα συνέβαινε σε *in vivo* μοντέλο. Άλλωστε, η αξιοποίηση *in vivo* πειραμάτων για ένα αρχικό έλεγχο προβιοτικών ιδιοτήτων θα απαιτούσε, εκτός από αυξημένο κόστος και περισσότερο χρόνο για έγκριση και εκτέλεση. Γι' αυτό και η διενέργεια *in vitro* δοκιμασιών για τη διερεύνηση προβιοτικού δυναμικού στελεχών που κάποια από τα οποία ακολούθως θα προκριθούν για *in vivo* πειράματα κρίνεται ως μια ορθή επιλογή.

Τα χολικά άλατα σχηματίζονται στο ήπαρ από χοληστερόλη και τα αμινοξέα γλυκίνη και ταυρίνη, στη συνέχεια αποθηκεύονται και συμπυκνώνονται στη χοληδόχο κύστη και εκκρίνονται στο λεπτό έντερο μετά τη λήψη τροφής. Εκεί, τα χολικά άλατα έχουν σημαντικό ρόλο στην πέψη και πιο συγκεκριμένα στη γαλακτωματοποίηση των λιπών της τροφής. Με τη δράση τους απειλούν την ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης και άρα την βιωσιμότητα των μικροοργανισμών που εμπεριέχονται στις τροφές. Η ικανότητα αντοχής σε χολικά εξετάζεται σε μια συγκέντρωση τους, της τάξεως του 0,3% γιατί είναι μια συγκέντρωση που συνήθως απαντάται στο ανθρώπινο έντερο. Άλλες μελέτες (Ζουμποπούλου, 2008) υποστηρίζουν ότι η συγκέντρωση της χολής σε χολικά αλλάζει ανάλογα τη σύνθεση της τροφής, όπου σε πιο λιπαρά γεύματα αυξάνεται. Πάντως, στην πλειονότητα των μελετών για τη δοκιμασία ελέγχου αντοχής σε χολικά, χρησιμοποιείται συγκέντρωση 0,3% w/v. Γι' αυτό και εδώ προτιμήθηκε αυτή η συγκέντρωση. Όσον αφορά τις ζύμες (πίνακας 3), τα στελέχη 444A, 445, 446, 447, 449, του είδους *Z. siamensis*, εμφάνισαν όλα υψηλή επιβίωση (+++) σε χολικά, επομένως έδειξαν να ανταπεξέρχονται σε αυτόν τον στρεσογόνο παράγοντα. Τα στελέχη 448 (*Z. siamensis*) και 337 (*S. magnoliae*) παρουσίασαν επιβίωση αρκετά υψηλή (++) και όχι ιδιαίτερα υψηλή (+), αντίστοιχα, μετά την κατεργασία με χολικά, υποδεικνύοντας χαμηλότερη αντίσταση σε αυτά, σε διαφορετικό βαθμό το καθένα. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι, εφόσον στελέχη που ταυτοποιήθηκαν ότι ανήκουν στο ίδιο είδος έδειξαν μεγάλες διακυμάνσεις μετά τη σχετική ποσοτικοποίηση της επιβίωσης τους σε χολικά, η αντοχή των ζυμών σε χολικά στο πείραμα μας κρίνεται ως ειδική σε επίπεδο στελέχους.

Όσον αφορά τα βακτήρια, αυτά έδειξαν μηδενικά ή πολύ χαμηλά ποσοστά επιβίωσης σε χολικά. Αρχικά, τα στελέχη 308 (*Apilactobacillus kunkeei*) και 401 (*Fructobacillus fructosus*) έδειξαν μηδενική αντοχή σε χολικά, ενώ το 400 (*A. kunkeei*) σχεδόν μηδενική (0,3% επιβίωση). Το στέλεχος 530 (*A. kunkeei*), που είχε την μεγαλύτερη αντοχή από τα εξεταζόμενα βακτήρια, δεν έφτασε το 1%, έχοντας το πολύ μικρό ποσοστό επιβίωσης 0,8%. Πάντως, στελέχη του είδους *F. fructosus*, έχουν προηγουμένως απομονωθεί από άλλους ερευνητές από μελισσόψωμο διαφορετικής βοτανικής προέλευσης και εξετάστηκαν για το προβιοτικό τους

δυναμικό, δείχνοντας αυξημένη αντοχή στα χολικά άλατα σε σχέση με εμάς (Mohammad SM et al, 2020). Όμως, στην περίπτωση των στελεχών που εξετάστηκαν εδώ, η ταυτοποίηση των στελεχών είχε γίνει μέσω της 16S rRNA γονιδίου και όχι με αλληλούχηση ολοκλήρου του γονιδιώματος που θα είχε μεγαλύτερη αξιοπιστία για την ταξινόμηση τους. Ωστόσο, δεν αποκλείεται το στέλεχος 401 να ανήκει πράγματι σε αυτό το είδος και απλώς να αποκρίνεται κατά αυτόν τον τρόπο στα χολικά.

Τα παγκρεατικά ένζυμα, γνωστά και ως παγκρεατίνη, περιλαμβάνουν την λιπάση, την αμυλάση, την θρυψίνη και την χυμοθρυψίνη και εκκρίνονται στο λεπτό έντερο, μέσω του παγκρεατικού πόρου, διαδραματίζοντας έναν βασικό ρόλο στην πέψη των θρεπτικών συστατικών των τροφίμων. Τα ένζυμα αυτά μπορούν, επίσης, να απειλήσουν την κυτταρική μεμβράνη και το DNA των μικροοργανισμών, για αυτό και παρατηρείται σε μελέτες να συμπεριλαμβάνουν τη δοκιμασία αντοχής σε αυτά ως ένα ακόμα κριτήριο για την επιλογή υποψηφίων προβιοτικών (Salminen et al 1998). Στην εργασία μας παρατηρούμε ότι η αντοχή είναι ειδική σε επίπεδο στελέχους, αφού στελέχη *Z. siamensis* έδειξαν διαφορετικούς βαθμούς αντοχής στην παγκρεατίνη (πίνακας 2) με ποσοστά από 3% (444B και 445) μέχρι 40% (448). Τα στελέχη των ειδών *Z. melis* (440) και *S. magnoliae* (337) δεν επιβίωσαν μετά τη δοκιμασία, δείχνοντας παντελή έλλειψη αντοχής στην παγκρεατίνη, στο πειραματικό πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε. Τα στελέχη αυτά, όπως και τα άλλα (444B και 445) που είχαν πολύ χαμηλό ποσοστό επιβίωσης, δεν δείχνουν ικανά, με βάση αυτόν τον προκαταρκτικό *in vitro* έλεγχο, να επιβιώσουν από τη δράση των παγκρεατικών ενζύμων, άρα, συμπεραίνουμε ότι είναι ακατάλληλα για προβιοτικά. Τα στελέχη, από την άλλη, 448 και 449, με τα μεγαλύτερα ποσοστά επιβίωσης (40 και 30%, αντίστοιχα) πιθανώς να διαθέτουν μηχανισμούς που τους προσδίδουν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στην πρωτεολυτική δραστηριότητα στο λεπτό έντερο.

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η επώαση και στις δύο δοκιμασίες, σε παγκρεατίνη και χολικά για 3 ώρες, έγινε σε μικροαερόφιλες συνθήκες, που προσομοιάζουν αυτές του γαστρεντερικού σωλήνα και υπογραμμίζουν τη σημασία που έχει τα προβιοτικά στελέχη να επιβιώνουν σε τέτοια περιβάλλοντα.

Συνοψίζοντας, τα βακτήρια που δοκιμάστηκαν, όπως και κάποια στελέχη ζυμών κρίνονται ακατάλληλα ως υποψήφια προβιοτικά, αφού δεν μπορούν να αντέξουν τις συνθήκες του γαστρεντερικού σωλήνα στην *in vitro* προσομοίωση. Πρέπει να αναφερθεί ότι, για κάποιους ερευνητές (Bao et al 2010), για να θεωρηθούν πιθανά προβιοτικά οι μικροοργανισμοί, πρέπει να έχουν επιβίωση, μετά την έκθεση σε χολικά άλατα, σε ένα ποσοστό που ξεπερνά το 80%. Ωστόσο, αυτά τα όρια είναι αυθαίρετα τοποθετημένα και δεν υπάρχει πλήρης συναίνεση από όλη την επιστημονική κοινότητα. Για την αντοχή στην παγκρεατίνη, από την άλλη, δεν υπάρχει στη βιβλιογραφία κάποιο πρότυπο ποσοστού επιβίωσης των

μικροοργανισμών σε αυτή, για τον προσδιορισμό του προβιοτικού δυναμικού. Σύμφωνα με τους Minelli και Benini (2009), για να υπάρξει κλινικό αποτέλεσμα των δυνάμει προβιοτικών, 10^6 CFU/ml ζωντανοί μικροοργανισμοί πρέπει να επιβιώσουν στο λεπτό έντερο. Γενικά, δεν υπάρχουν απολύτως αποδεκτά κριτήρια για να χαρακτηριστεί ένας μικροοργανισμός δυνάμει προβιοτικός μετά την υποβολή του σε *in vitro* δοκιμασίες που προσομοιάζουν τον γαστρεντερικό σωλήνα. Στην παρούσα εργασία, παρατηρώντας τον πίνακα 5, εφόσον υπάρχει επιβίωση και στις δύο δοκιμασίες, η οποία, ωστόσο, δεν μπορεί να αποδοθεί σε πειραματικό σφάλμα, όπως είναι ποσοστά της τάξης του 3%, δεν μπορούμε να αποκλείσουμε το προβιοτικό δυναμικό των μικροοργανισμών. Ένα ποσοστό επιβίωσης 3% όμως, είναι μεταβλητό ανάλογα με τις συνθήκες και λαμβάνοντας υπόψη ότι έχουμε *in vitro* συνθήκες, σε ένα *in vivo* μοντέλο πιθανότατα μεταφράζεται σε μη επιβίωση. Άρα τα στελέχη 444A, 446, 447, 448, 449, του είδους *Z. siamensis*, με ποσοστά επιβίωσης στην παγκρεατίνη από 10% έως 40% και με αρκετά υψηλή (++) μέχρι πολύ υψηλή (+++) επιβίωση στα χολικά, έχουν δυναμικό χρήσης ως προβιοτικά και αξίζουν περαιτέρω διερεύνησης όσον αφορά τα ευεργετικά τους αποτελέσματα στον άνθρωπο.

Πίνακας 5: Αποτελέσματα επιβίωσης ζυμών σε παγκρεατίνη και χολικά άλατα

SAMPLE	YEAST	Ποσοστό επιβίωσης μετά την επώαση με παγκρεατίνη	Ποσοτικοποίηση επιβίωσης μετά την επώαση με χολικά άλατα
440	<i>Z. melis</i>	0%	Δεν αναπτύχθηκε
444A	<i>Z. siamensis</i>	10%	+++
444B	<i>Z. siamensis</i>	3%	Δεν αναπτύχθηκε
445	<i>Z. siamensis</i>	3%	+++
446	<i>Z. siamensis</i>	10%	+++
447	<i>Z. siamensis</i>	20%	+++
448	<i>Z. siamensis</i>	40%	++
449	<i>Z. siamensis</i>	30%	+++
337	<i>S. magnoliae</i>	0%	+

Θα πρέπει να αναφερθεί, σε ό, τι έχει να κάνει με τους μικροοργανισμούς που δεν διατήρησαν τη βιωσιμότητα τους στις δοκιμασίες που έγιναν, πως υπάρχουν και κάποιες μέθοδοι που μπορούν να αυξήσουν την επιβίωση στον γαστρεντερικό σωλήνα, κατά τα άλλα, δυνητικά προβιοτικών στελεχών. Τέτοιες προστατευτικές στρατηγικές περιλαμβάνουν την ενθυλάκωση των κυττάρων σε προστατευτικά περιβλήματα από χιτοζάνη ή ζελατίνη, την προσθήκη προστατευτικών παραγόντων και τη χρήση διαφόρων "φορέων". Μικροενθυλάκωση προβιοτικών ζυμών, όπως του είδους *S. cerevisiae* var. *boulardii*, έχει αναφερθεί πως εξασφαλίζει την επιβίωση των μικροοργανισμών, χωρίς να επηρεάζει άλλες επιθυμητές ιδιότητες που οφείλουν να έχουν τα προβιοτικά, όπως υδροφοβία, συσσωμάτωση και σχηματισμό βιοφίλμ (Staniszewski και Kordowska-Wiater, 2021).

Καταλήγοντας, η διερεύνηση και τεκμηρίωση προβιοτικών ιδιοτήτων στο μελισσόψωμο μπορεί, εκτός από το να αυξήσει την προστιθέμενη αξία του ίδιου του προϊόντος, αλλά και να οδηγήσει και σε χρησιμοποίηση των προβιοτικών μικροοργανισμών του είτε ως συμπλήρωμα για ζώα ή και ανθρώπους είτε προσθέτωντας τα σε διάφορα τρόφιμα ή ποτά, καθιστώντας τα, με διάφορους τρόπους, πιο υγιεινά ως φορείς προβιοτικών. Πάντως, είναι προφανές ότι οι *in vitro* έρευνες αντιπροσωπεύουν μόνο έναν προκαταρκτικό έλεγχο για προβιοτικές ιδιότητες και πρέπει να διεξαχθούν και *in vivo* πειράματα για την αξιολόγηση των ευεργετικών αποτελεσμάτων και της ασφάλειας των μικροοργανισμών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Aiba, Y., Suzuki, N., Kabir, A. M. ., Takagi, A., & 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. *The American Journal of Gastroenterology*, 93(11), 2097–2 101.
2. Allen S.J., Martinez E.G., Gregorio G.V., Dans L.F. (2010). Probiotics for treating acute infectious diarrhoea. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, CD003048
3. Anadón A., Martínez-Larrañaga M.R., Ares I. and Martínez M.A. (2016). Probiotics: Safety and Toxicity Considerations. In: Gupta R.C. ed. *Nutraceuticals efficacy, safety and toxicity*. Hopkinsville, KY, USA: Elsevier, pp. 777-796.
4. Arora T. Singh S., Sharma R J. (2012). Probiotics: Interaction with gut microbiome and antiobesity potential. *Nutrition*, 29, pp. 591–596.

5. Asama, T.; Arima, T.H.; Gomi, T.; Keishi, T.; Tani, H.; Kimura, Y.; Tatefuji, T.; Hashimoto, K. *Lactobacillus kunkeei* YB38 from honeybee products enhances IgA production in healthy adults. *J. Appl. Microbiol.* 2015, 119, 818–826.
6. Asoutis Didaras N, Karaïskou I, Nikolaidis M, Siaperopoulou C, Georgi I, Tsadila C, Karatasou K, Amoutzias GD, Mossialos D. Contribution of Microbiota to Bioactivity Exerted by Bee Bread. *Pharmaceuticals*. 2024; 17(6):761. <https://doi.org/10.3390/ph17060761>
7. Bakour M, Laaroussi H, Ousaid D, El Ghouzi A, Es-Safi I, Mechchate H, Lyoussi B. Bee Bread as a Promising Source of Bioactive Molecules and Functional Properties: An Up-To-Date Review. *Antibiotics (Basel)*. 2022 Feb 5;11(2):203. doi: 10.3390/antibiotics11020203. PMID: 35203806; PMCID: PMC8868279.
8. Banas J., Popp E. T. (2013). Recovery of viable bacteria from probiotic products that target oral health. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 5, pp. 227–231.
9. Bao, Y., Zhang, Y., Zhang, Y., Liu, Y., Wang, S., Dong, X., Wang, Y., & Zhang, H. (2010). Screening of potential probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* isolated from traditional dairy products. *Food Control*, 21(5), 695–701. doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.10.010
10. Begum S.B., Roobia R.R., Karthikeyan M., Murugappan R. Validation of nutraceutical properties of honey and probiotic potential of its innate microflora. *LWT-Food Sci. Technol.* 2015;60:743–750. doi: 10.1016/j.lwt.2014.10.024.
11. Bermudez-Brito M, Plaza-Díaz J, Muñoz-Quezada S, Gómez-Llorente C, Gil A. Probiotic mechanisms of action. *Ann Nutr Metab.* 2012;61(2):160-74. doi: 10.1159/000342079. Epub 2012 Oct 2. PMID: 23037511.
12. Binda S, Hill C, Johansen E, Obis D, Pot B, Sanders ME, Tremblay A, Ouwehand AC. Criteria to Qualify Microorganisms as "Probiotic" in Foods and Dietary Supplements. *Front Microbiol.* 2020 Jul 24;11:1662. doi: 10.3389/fmicb.2020.01662. PMID: 32793153; PMCID: PMC7394020.
13. Coda R., Rizzello C.G., Di Cagno R., Trani A., Cardinali G., Gobbetti M. (2013) . Antifungal activity of *Meyerozyma guilliermondii*: identification of active compounds synthesized during dough fermentation and their effect on long-term storage of wheat bread, *Food Microbiology*, 33, pp. 243-251.
14. Collington G.K., Parker D.S., Armstrong D.G. (1990). The influence of inclusion of either an antibiotic or a probiotic in the diet on the development of digestive enzyme activity in the pig, *British Journal of Nutrition*, 64, pp. 59-70.
15. Collins, Fraser L., Naiomy D. Rios-Arce, Jonathan D. Schepper, Narayanan Parameswaran, and Laura R. McCabe. "The Potential of Probiotics as a Therapy for Osteoporosis." *Microbiology Spectrum* 5, no. 4 (August 2017).
16. Del Piano, M., Morelli, L., Strozzi, G. P., Allesina, S., Barba, M., Deidda, F., ... Capurso, L. (2006). Probiotics: from research to consumer. *Digestive and Liver Disease*, 38, S248–S255.
17. Detry, R.; Simon-Delso, N.; Bruneau, E.; Daniel, H.M. Specialisation of Yeast Genera in Different Phases of Bee Bread Maturation. *Microorganisms* 2020, 8, 1789.
18. Didaras NA, Kafantaris I, Dimitriou TG, Mitsagga C, Karatasou K, Giavasis I, Stagos D, Amoutzias GD, Hatjina F, Mossialos D. Biological Properties of Bee Bread Collected from Apiaries Located across Greece. *Antibiotics (Basel)*. 2021 May 10;10(5):555. doi: 10.3390/antibiotics10050555. PMID: 34068740; PMCID: PMC8151309.
19. Didaras NA, Karatasou K, Dimitriou TG, Amoutzias GD, Mossialos D. Antimicrobial Activity of Bee-Collected Pollen and Beebread: State of the Art and Future Perspectives. *Antibiotics*. 2020; 9(11):811. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9110811>

20. Diwas Pradhan, Rashmi H. Mallappa, Sunita Grover, Comprehensive approaches for assessing the safety of probiotic bacteria, Food Control, Volume 108, 2020, 106872, ISSN 0956-7135, <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106872>.
21. Donkersley, P.; Rhodes, G.; Pickup, R.; Jones, K.; Wilson, K. Bacterial communities associated with honeybee food stores are correlated with land use. Ecol. Evol. 2018, 8, 4743–4756.
22. EFSA Guidance on the characterisation of microorganisms used as feed additives or as production organisms EFSA J., 16 (3) (2018), p. 5206, 10.2903/j.efsa.2018.5206
23. EFSA Qualified presumption of safety (QPS). European food safety authority (EFSA) Available at: <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/qualified-presumption-safety-qps> (2021),
24. Esawy M.A., Awad G.E.A., Ahmed E.F., Daniai E.N., Mansour N.M. Evaluation of honey as a new reservoir for probiotic bacteria. Adv. Food Sci. 2012;34:72–81.
25. FAO/WHO Guidelines for the evaluation of probiotics in food report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food World Health Organization, London Ontario, Canada (2002)
26. Fasoli S., Marzotto M., Rizzotti L., Rossi F., Dellaglio F., Torriani S. (2003). Bacterial composition of commercial probiotic products as evaluated by PCR-DGGE analysis, International Journal of Food Microbiology, 82, pp. 59-70.
27. Fijan S. Microorganisms with claimed probiotic properties: an overview of recent literature. Int J Environ Res Public Health. 2014 May 5;11(5):4745-67. doi: 10.3390/ijerph110504745. PMID: 24859749; PMCID: PMC4053917.
28. Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization (FAO/WHO). (2001). *Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria*. Report of a joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Córdoba, Argentina. Available at: <http://www.fao.org/3/a-a0512e.pdf>.
29. Guarner F., Schaafsma G.J., (1998). Probiotics, International Journal of Food Microbiology , 39, pp. 237- 238
30. Han S, Lu Y, Xie J, Fei Y, Zheng G, Wang Z, Liu J, Lv L, Ling Z, Berglund B, Yao M, Li L. Probiotic Gastrointestinal Transit and Colonization After Oral Administration: A Long Journey. Front Cell Infect Microbiol. 2021 Mar 10;11:609722. doi: 10.3389/fcimb.2021.609722. PMID: 33791234; PMCID: PMC8006270.
31. Harzallah D. and Belhadj H. (2013). Lactic Acid Bacteria as Probiotics: Characteristics, Selection Criteria and Role in Immunomodulation of Human GI Muccosal Barrier. In: Kongo M. ed. Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes, Algeria: InTech. pp. 197-216
32. Havenaar R., Brink B. T., Jos H. J. Huis In 't Veld. (1992). Selection of strains for probiotic use. In: Fuller R. ed. Probiotics The scientific basis. Netherlands: Springer. pp. 209-224.
33. Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C., & Sanders, M. E. (2014). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology, 11(8), 506-514. DOI: 10.1038/nrgastro.2014.66
34. Holzapfel WH, Haberer P, Geisen R, Björkroth J, Schillinger U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. Am J Clin Nutr. 2001 Feb;73(2 Suppl):365S-373S. doi: 10.1093/ajcn/73.2.365s. PMID: 11157343.
35. Jacobsen CN, Rosenfeldt Nielsen V, Hayford AE, Møller PL, Michaelsen KF, Paerregaard A, Sandström B, Tvede M, Jakobsen M. 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. *Appl Environ Microbiol.* 1999 Nov;65(11):4949-56. doi: 10.1128/AEM.65.11.4949-4956.1999. PMID: 10543808; PMCID: PMC91666.
36. Jensen H., Stine G., Kristine N., Lars A. (2012). In vitro testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria, *International Journal of Food Microbiology*, 153, pp. 216-222.
 37. Kaźmierczak-Siedlecka K, Dąca A, Folwarski M, Witkowski JM, Bryl E, Makarewicz W. The role of *Lactobacillus plantarum* 299v in supporting treatment of selected diseases. *Cent Eur J Immunol.* 2020;45(4):488-493. doi: 10.5114/ceji.2020.101515. Epub 2021 Jan 25. PMID: 33613097; PMCID: PMC7882405.
 38. Kumar, R., Dhanda, S. Mechanistic Insight of Probiotics Derived Anticancer Pharmaceuticals: A Road Forward for Cancer Therapeutics, *Nutrition and Cancer*, 69(3), 375-380, 2017
 39. Latif A, Shehzad A, Niazi S, Zahid A, Ashraf W, Iqbal MW, Rehman A, Riaz T, Aadil RM, Khan IM, Özogul F, Rocha JM, Esatbeyoglu T, Korma SA. Probiotics: mechanism of action, health benefits and their application in food industries. *Front Microbiol.* 2023 Aug 17;14:1216674. doi: 10.3389/fmicb.2023.1216674. Erratum in: *Front Microbiol.* 2024 Feb 14;15:1378225. doi: 10.3389/fmicb.2024.1378225. PMID: 37664108; PMCID: PMC10470842.
 40. Malfertheiner P., Megraud F., O'Morain C.A., Atherton J., Axon A.T., Bazzoli F., Gensini G.F., Gisbert J.P., Graham D.Y., Rokkas T., El-Omar E.M., Kuipers E.J. (2012). Management of *Helicobacter pylori* infection—the Maastricht IV/Florence Consensus Report. *Gut*, 61, pp. 646–664.
 41. Marco M.L., Pavan S., Kleerebezem M. (2006). Towards understanding molecular modes of probiotic action. *Current Opinion in Biotechnology*, 17, pp. 204-210
 42. Marek Kieliszek, Kamil Piwowarek, Anna M. Kot, Stanisław Błażej, Anna Chlebowska-Śmigiel, Iwona Wolska, Pollen and bee bread as new health-oriented products: A review, *Trends in Food Science & Technology*, Volume 71, 2018, Pages 170-180, ISSN 0924-2244, <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.10.021>.
 43. Mattila, H.R.; Rios, D.; Walker-Sperling, V.E.; Roeselers, G.; Newton, I.L.G. Characterization of the active microbiotas associated with honey bees reveals healthier and broader communities when colonies are genetically diverse. *PLoS ONE* 2012, 7, e32962.
 44. Medical Academic. The Story of Probiotics. <https://www.medicalacademic.co.za/news/the-story-of-probiotics/>
 45. Meryem Bakour, Ângela Fernandes, Lillian Barros, Marina Sokovic, Isabel C.F.R. Ferreira, Badiâa Iyousi, Bee bread as a functional product: Chemical composition and bioactive properties, *LWT*, Volume 109, 2019, Pages 276-282, ISSN 0023-6438, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.02.008>.
 46. Messens W., Neysens P., Vansieleghem W., Vanderhoeven J., De Vuyst L. (2002). Modeling growth and bacteriocin production by *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 in response to temperature and pH values used for sourdough fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, pp. 1431–1435.
 47. Minelli, E. B., and Benini, A. (2009). Relationship between number of bacteria and their probiotic effects. *Microb. Ecol. Health D* 20, 180–183. doi: 10.1080/08910600802408095
 48. Morelli L. (2000). In vitro selection of probiotic lactobacilli: a critical appraisal. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 1, pp. 57-69.
 49. Mustar S, Ibrahim N. A Sweeter Pill to Swallow: A Review of Honey Bees and Honey as a Source of Probiotic and Prebiotic Products. *Foods.* 2022 Jul 15;11(14):2102. doi: 10.3390/foods11142102. PMID: 35885345; PMCID: PMC9324438.
 50. Oluwatobi Victoria Obayomi, Abiola Folakemi Olaniran, Stephen Olugbemiga Owa, Unveiling the role of functional foods with emphasis on prebiotics and probiotics in human health: A review, *Journal of Functional Foods*, Volume 119, 2024, 106337, ISSN 1756-4646, <https://doi.org/10.1016/j.jff.2024.106337>.

51. Ouwehand, A. C., Salminen, S., & Isolauri, E. (2002). Probiotics: an overview of beneficial effects. *Lactic acid bacteria: genetics, metabolism, and applications*, 279- 289.
52. Pedone CA, Arnaud CC, Postaire ER, Bouley CF, Reinert P. Multicentric study of the effect of milk fermented by *Lactobacillus casei* on the incidence of diarrhoea. *Int J Clin Pract*. 2000 Nov;54(9):568-71. PMID: 11220983.
53. Peřka, K., Hafeez, A.B., Worobo, R.W. et al. Probiotic potential of *Bacillus* Isolates from Polish Bee Pollen and Bee Bread. *Probiotics & Antimicro. Prot.* (2023). <https://doi.org/10.1007/s12602-023-10157-4>
54. Razmgah N., Mořgani N., Torshizi M. Probiotic potential and virulence traits of *Bacillus* and *Lactobacillus* species isolated from local honey sample in Iran. *J. Pharm. Biol. Sci.* 2017;11:87–95.
55. Roe AL, Boyte ME, Elkins CA, Goldman VS, Heimbach J, Madden E, Oketch-Rabah H, Sanders ME, Sirois J, Smith A. Considerations for determining safety of probiotics: A USP perspective. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2022 Dec;136:105266. doi: 10.1016/j.yrtph.2022.105266. Epub 2022 Oct 4. PMID: 36206977; PMCID: PMC10292223.
56. Rönkä E, Malinen E, Saarela M, Rinta-Koski M, Aarnikunnas J, Palva A. Probiotic and milk technological properties of *Lactobacillus brevis*. *Int J Food Microbiol*. 2003 May 25;83(1):63-74. doi: 10.1016/s0168-1605(02)00315-x. PMID: 12672593.
57. S. Salminen, A. von Wright, L. Morelli et al., “Demonstration of safety of probiotics—a review,” *International Journal of Food Microbiology*, vol. 44, no. 1-2, pp. 93–106, 1998.
58. Salari P., Nikfar S., Abdollahi M. (2012). A meta-analysis and systematic review on the effect of probiotics in acute diarrhea. *Inflammation and Allergy Drug Targets* , 11, pp. 3-14.
59. Salma Malihah Mohammad , Nor-Khaizura Mahmud-Ab-Rashid & Norhasnida Zawawi (2020): Probiotic properties of bacteria isolated from bee bread of stingless bee *Heterotrigona itama* , *Journal of Apicultural Research*
60. Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, Chen W; Fungal Barcoding Consortium; Fungal Barcoding Consortium Author List. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Apr 17;109(16):6241-6. doi: 10.1073/pnas.1117018109. Epub 2012 Mar 27. PMID: 22454494; PMCID: PMC3341068.
61. Schrezenmeir J., de Vrese M. (2001). Probiotics, prebiotics, and synbiotics – approaching a definition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73, pp. 361–364.
62. Sharifi, M., Moridnia, A., Mortazavi, D., Salehi, M., Bagheri, M., Sheikhi, A. Kefir: a powerful probiotics with anticancer properties, *Medical Oncology*, 34(11), 2017
63. Stanisławski A, Kordowska-Wiater M. Probiotic and Potentially Probiotic Yeasts- Characteristics and Food Application. *Foods*. 2021 Jun 7;10(6):1306. doi: 10.3390/foods10061306. PMID: 34200217; PMCID: PMC8228341.
64. Szajewska H., Wanke M., Patro B. (2011). Meta-analysis: the effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG supplementation for the prevention of healthcare-associated diarrhoea in children. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 34, pp. 1079-1087.
65. Tajabadi N, Mardan M, Saari N, Mustafa S, Bahreini R, Manap MY. Identification of *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus fermentum* from honey stomach of honeybee. *Braz J Microbiol*. 2014 Jan 15;44(3):717-22. doi: 10.1590/s1517-83822013000300008. PMID: 24516438; PMCID: PMC3910179.
66. Todoriki K, Mukai T, Sato S, Toba T: Inhibition of adhesion of food-borne pathogens to Caco-2 cells by *Lactobacillus* strains. *J Appl Microbiol* 2001;91:154–159.
67. Toutiaee S, Mořgani N, Harzandi N, Moharrami M, Mokhberosafa L. In vitro probiotic and safety attributes of *Bacillus* spp. isolated from beebread, honey samples and digestive tract

- of honeybees *Apis mellifera*. *Lett Appl Microbiol*. 2022 May;74(5):656-665. doi: 10.1111/lam.13650. Epub 2022 Jan 17. PMID: 35000212.
68. Vásquez, A.; Olofsson, T.C. The lactic acid bacteria involved in the production of bee pollen and bee bread. *J. Apic. Res.* 2009, 48, 189–195.
 69. Wendel U. Assessing Viability and Stress Tolerance of Probiotics-A Review. *Front Microbiol*. 2022 Jan 27;12:818468. doi: 10.3389/fmicb.2021.818468. PMID: 35154042; PMCID: PMC8829321.
 70. Ζουμποπούλου Γ. (2008) Προβιοτικές ιδιότητες οξυγαλακτικών βακτηρίων. In vitro και in vivo μελέτη της αντιμικροβιακής και ανοσορυθμιστικής τους δράσης. Διδακτορική Διατριβή, Αθήνα