

Ο ρόλος και οι εφαρμογές
των οξυγαλακτικών βακτηρίων
στα τρόφιμα και την υγεία

(III)

ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΑ

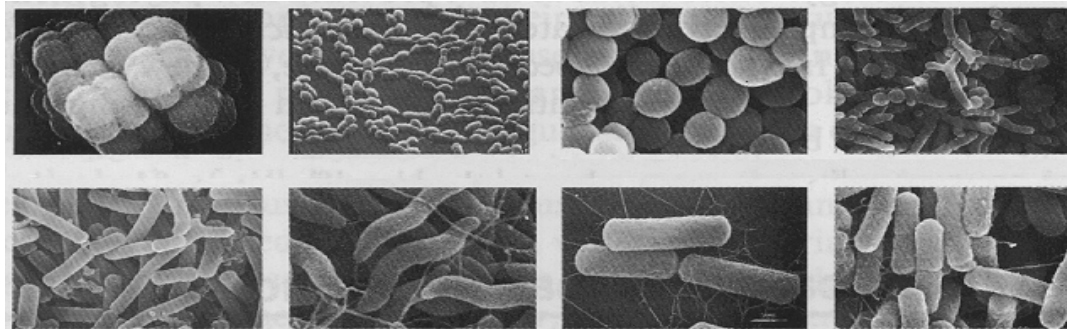
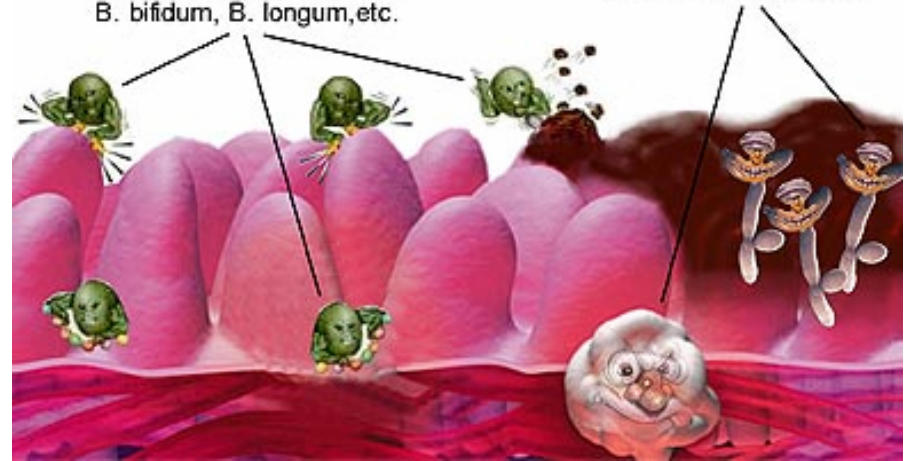


Friendly Bacteria

L. acidophilus, *L. salivarius*,
L. casei, *S. thermophilus*,
B. bifidum, *B. longum*, etc.

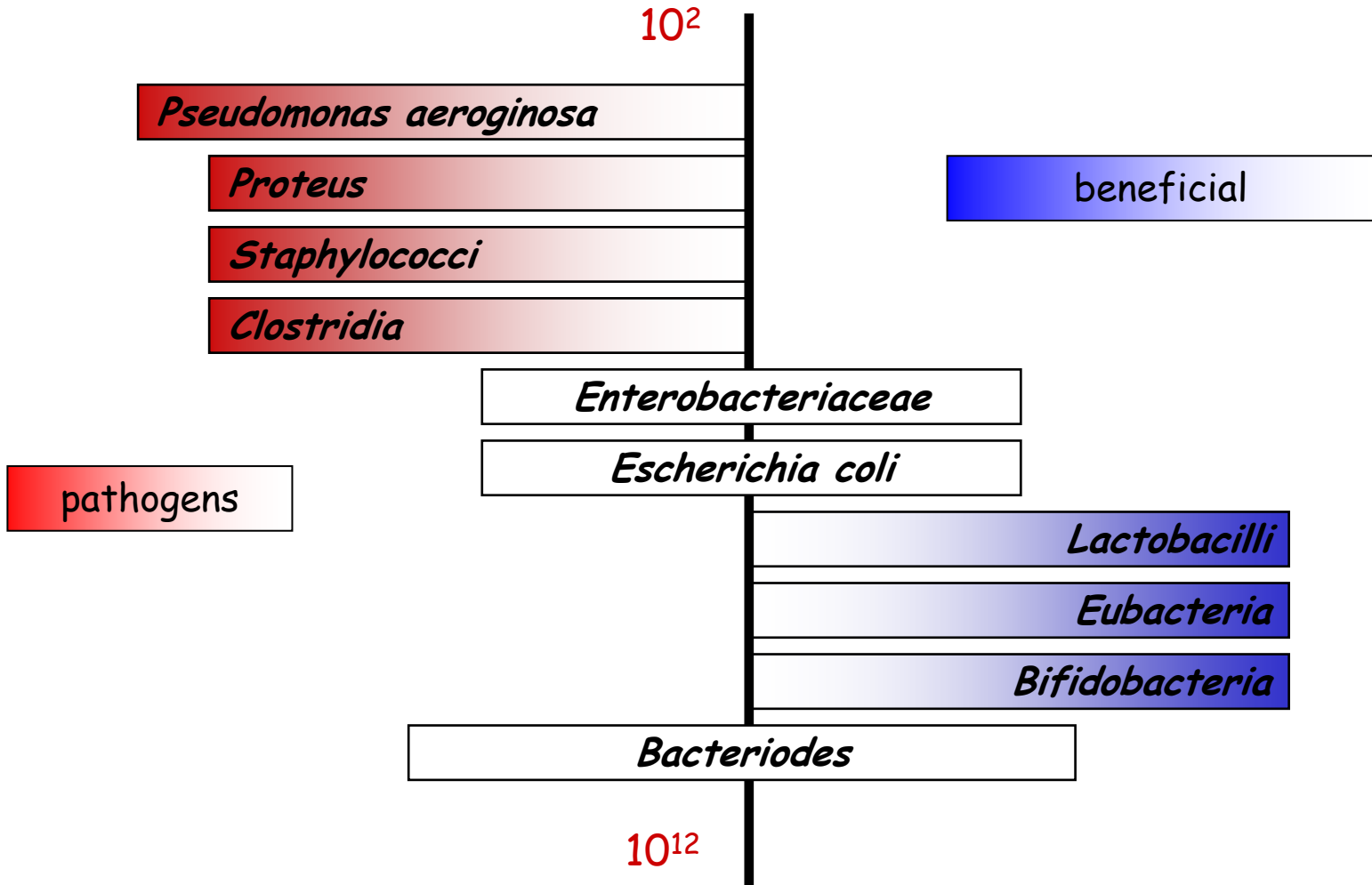
Unfriendly Bacteria

Pathogenic bacteria, such as
Candida albicans, etc.



Human gut flora

> 10^{14} cells & > 400 different species



Literature facts

Before 1990

22 articles on probiotics

After 1990

~ 3800 articles

Market facts

✓ Probiotics

- EU market volume > 1000 million kg in 2006
- sales of > 1.2 billion EURO

✓ Prebiotics

- EU market dominated by inulin-type fructans and FOS
- sales of 90 million EURO in 2004
- expected to grow to 180 million EURO by 2010

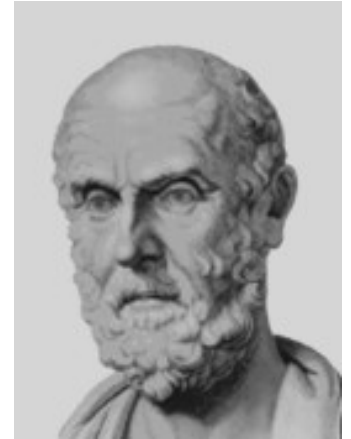
Commonly used probiotic strains

Company	Strain
Valio Dairy, Finland	<i>Lb. rhamnosus GG</i>
Probi, Lund, Sweden	<i>Lb. plantarum 299V</i> <i>Lb. rhamnosus 271</i>
Danone, Le Plessis-Robinson, France	<i>Lb. paracasei DN014 001</i>
Yakult, Tokyo, Japan	<i>Lb. casei Shirota</i> <i>B. breve strain Yakult</i>
Morinaga Milk Industry Co., Ltd., Zama City, Japan	<i>B. longum BB536</i>
Snow Brand Milk Products, Tokyo, Japan	<i>Lb. acidophilus SBT-2062</i> <i>B. longum SBT-2928</i>
Rhodia, Madison, Wisconsin USA	<i>Lb. acidophilus NCFM™</i>
Chr. Hansens, Milwaukee, Wisconsin, USA	<i>Lb. casei CRL 431</i>
Biocodex, Inc., Seattle, Washington USA	<i>Saccharomyces boulardii</i>
Urex Biotech Inc., Ontario, Canada	<i>Lb. acidophilus GR-1 & RC-14</i>

The pioneers

"Let your food be your medicine and your medicine your food"

Hippocrates



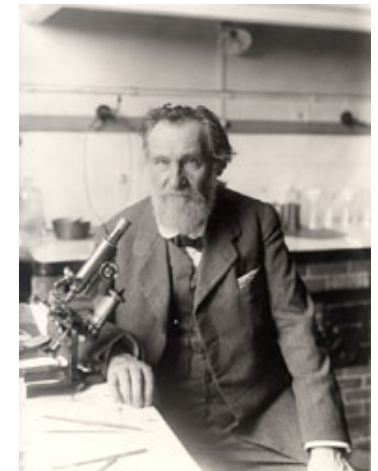
"Bifidobacteria for a balanced and healthy intestinal flora"

Henry Tissier



"Consumption of lactobacilli for longevity without ageing"

Elie Metchnikoff



The definitions

"Substances produced by protozoa and stimulate the growth of other organisms"

Lilley & Stillwell, 1965

"Animal feed supplements having a beneficial effect on the host by contributing to its intestinal microbial balance"

Parker, 1974

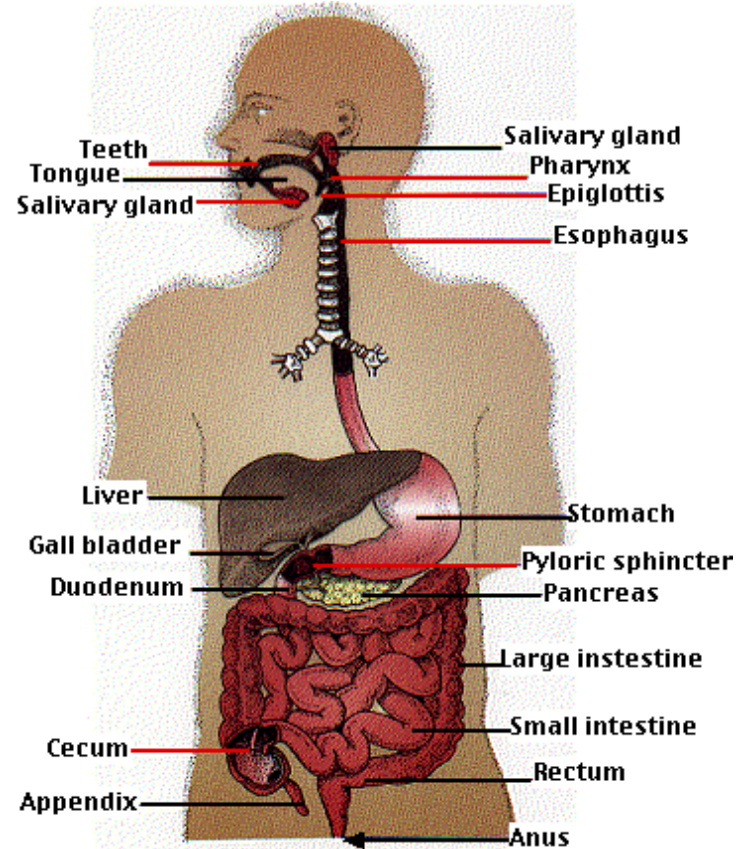
"Live microorganisms that, when consumed in an adequate amount as part of the food, confer a health benefit on the host"

FAO / WHO Experts , 2001

Οι ορισμοί

✓ Οι ορισμοί δεν προϋποθέτουν αποίκηση των
προβιοτικών στον ανθρώπινο πεπτικό σωλήνα

✓ Οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί μπορούν να
δράσουν είτε τοπικά είτε κατά τη διάβαση τους μέσα
από τον πεπτικό σωλήνα

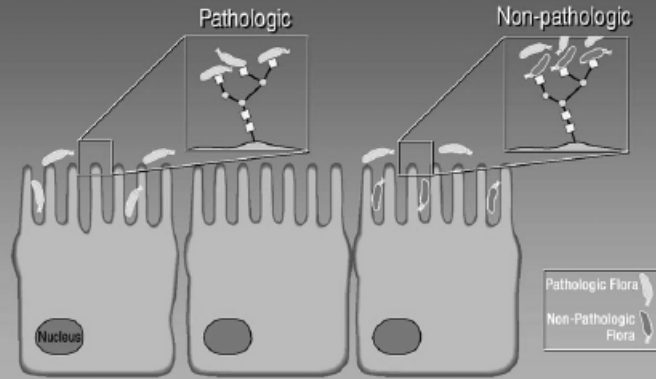


Οι ορισμοί

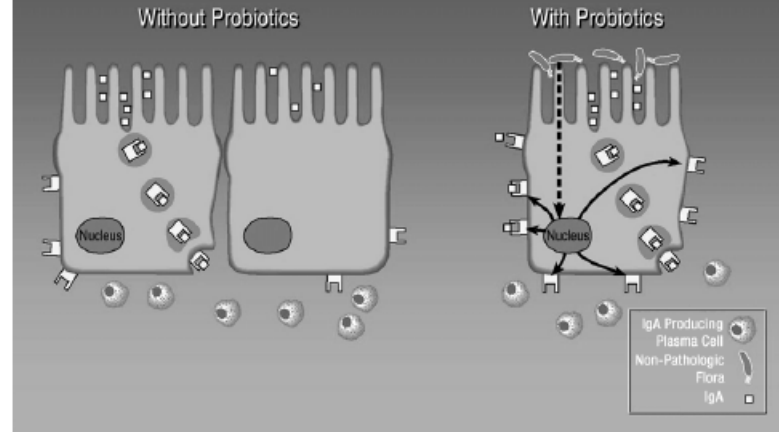
- ✓ Οι ορισμοί προϋποθέτει ότι οι μικροοργανισμοί πρέπει να είναι ζωντανοί,
όχι παστεριωμένοι, η άλλως πως απενεργοποιημένοι
- ✓ Είναι γενικά αποδεκτό ότι πρέπει να γίνεται λήψη τουλάχιστον
 10^9 κυττάρων την ημέρα
- ✓ Τα ευεργετικά αποτελέσματα στην υγεία πρέπει να αποδεικνύονται
με καλά τεκμηριωμένες κλινικές μελέτες

The modes of action

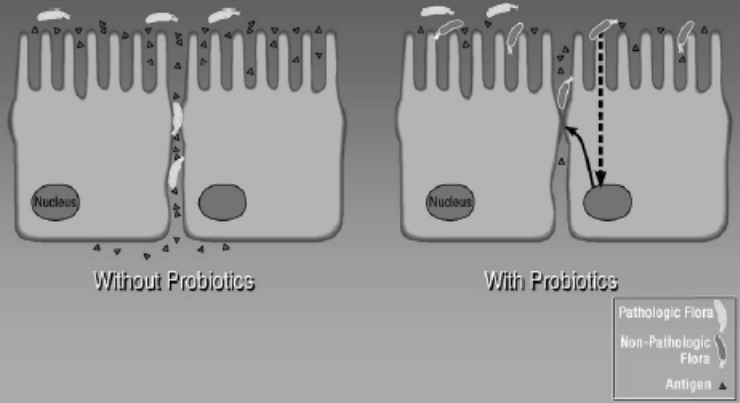
A) Inhibition of adherence



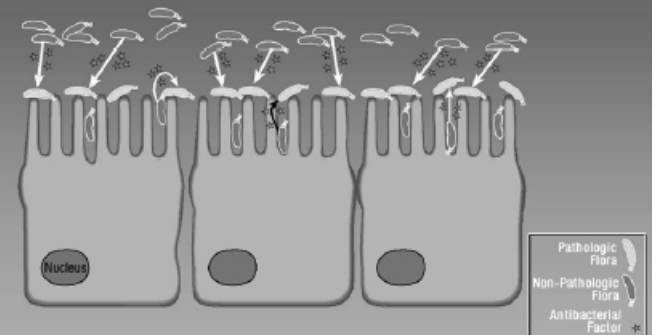
B) Enhanced sIgA



C) Strengthen tight junction

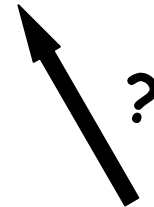
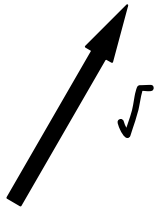


D) Antibacterial substances



What can probiotics do ?

- ✓ Alleviate or prevent diverse GI tract disorders
- ✓ Food allergy reduction
- ✓ Inhibit the mutagenicity of intestinal contents
- ✓ Reduce the incidence of intestinal tumors
- ✓ Cholesterol lowering effect



In vitro experiments

Animal trials

Clinical trials

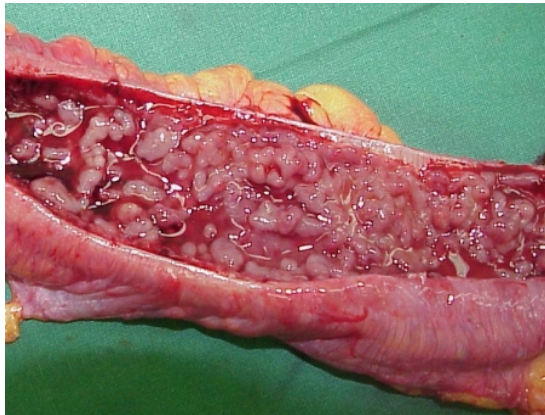
Προβιοτικά και ασθένειες του πεπτικού



Δυσανεξία στη λακτόζη

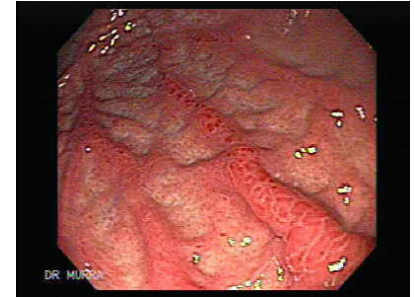


Ασθένεια του Crohn

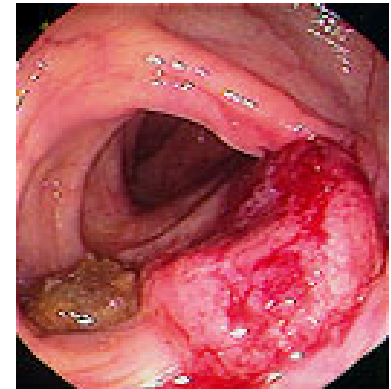


Ελκώδης κολίτιδα

Ιδιοπαθή φλεγμονώδη νοσήματα του εντέρου (IBD)



Οξεία γαστρεντερίτιδα



Καρκίνος εντέρου

Προβιοτικά του μέλλοντος

✓ Επιλογή προβιοτικών για συγκεκριμένες ομάδες - στόχους

- ηλικιακές ομάδες
- συγκεκριμένες ασθένειες

✓ Μη ζωντανά προβιοτικά

- άμβλυση της δυσανεξίας στη λακτόζη
- μείωση του χρόνου σε διάρροιες από rotavirus

Προβιοτικά του μέλλοντος

✓ Νέες εφαρμογές

- Στοματική κοιλότητα
- Αναπνευστικό σύστημα
- Ουρογεννητικό σύστημα
- Επιδερμίδα

Προβιοτικά του μέλλοντος

Στοματική κοιλότητα

- ✓ Χρήση προβιοτικών για την καταπολέμηση των στρεπτόκοκκων mutans (υπεύθυνοι για τερηδόνα, περιοδοντίτιδα)

Αναπνευστικό σύστημα

- ✓ Διαθέτει φυσιολογική μικροχλωρίδα

Lactobacillus

Streptococcus pneumoniae

Προβιοτικά του μέλλοντος

Ουρογεννητικό σύστημα

Υγιές ουρογεννητικό σύστημα

μεγάλοι πληθυσμοί γαλακτοβακίλλων, pH<5

Λοιμώξεις γεννητικού

Trichomonas, Candida,

Gardnerella vaginalis, Mycoplasma hominis

Λοιμώξεις ουροποιητικού

E. coli, Candida, Chlamydia

Χορήγηση προβιοτικών

μέσω της στοματικής οδού

ενδοκολπικά

έμφαση στη πρόληψη παρά στη θεραπεία

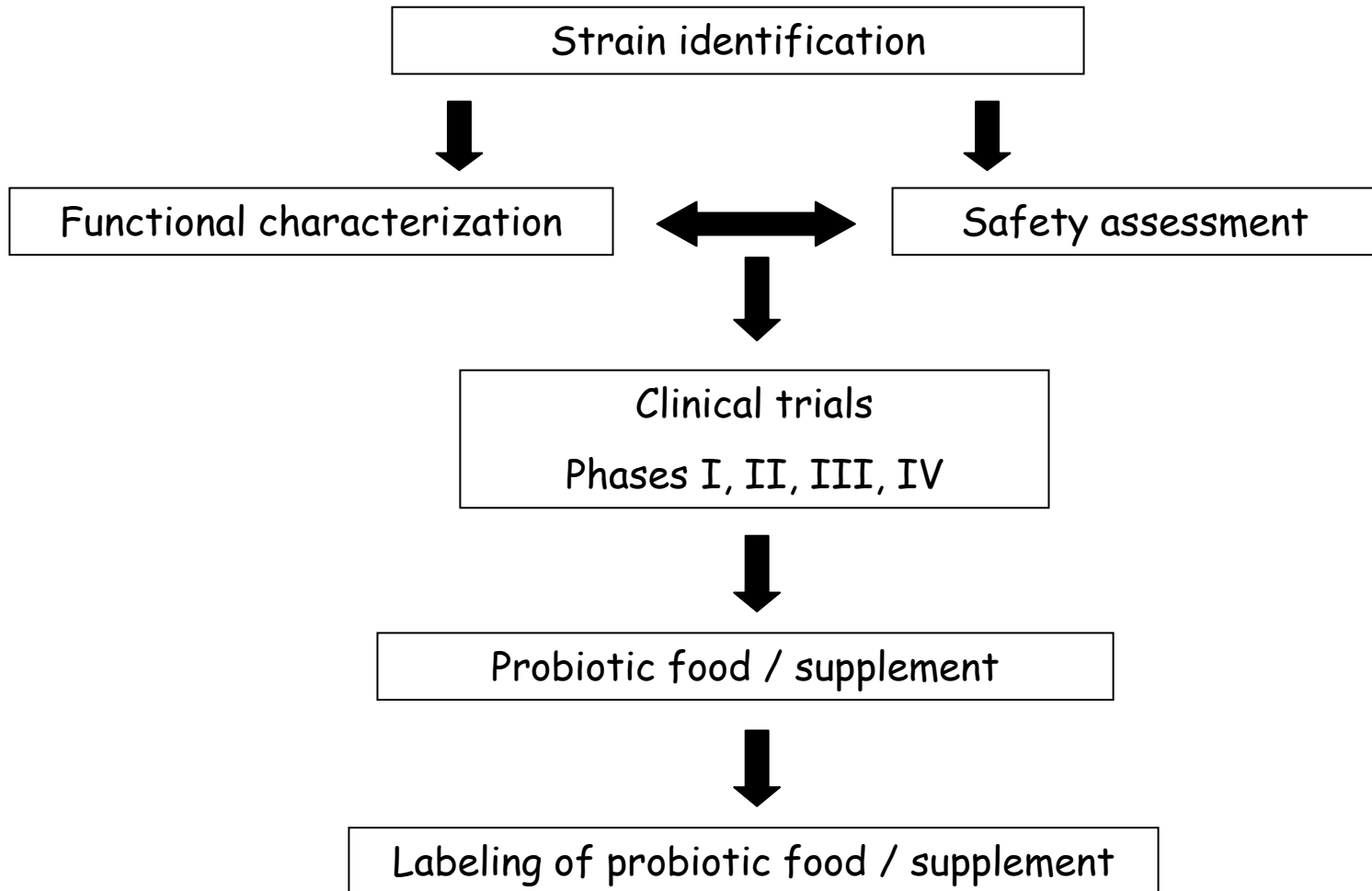
Προβιοτικά του μέλλοντος

Επιδερμίδα

- ✓ Διαθέτει φυσιολογική μικροχλωρίδα,
διαφορετική ανάλογα με το σημείο του σώματος
- ✓ Συνήθη γένη *Propionibacterium*
Staphylococcus
Micrococcus
Corynebacterium
Malassazia (ζύμη)
- ✓ Κάποια είδη των γενών αυτών είναι παθογόνα

Guidelines for the Evaluation of Probiotics for Food Use

(FAO / WHO Experts)



EU Regulation 1924/2006; valid since 1 July 2007

Κριτήρια επιλογής και αξιολόγησης

✓ Ταυτοποίηση στελέχους

Σε επίπεδο είδους

Μέθοδος αναφοράς

Υβριδισμός DNA-DNA

Εναλλακτικά

Αλληλούχηση 16S rRNA σε συνδυασμό με φαινοτυπικές δοκιμές (π.χ. ζύμωση σακχάρων)

Σε επίπεδο στελέχους

PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis)

RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA)

Ανίχνευση πλασμιδίων

Ιδιάζον φαινοτυπικό χαρακτηριστικό

✓ Κατάθεση σε διεθνή τράπεζα

Κριτήρια επιλογής και αξιολόγησης

- ✓ Έλεγχος λειτουργικότητας

In vitro δοκιμές

Αντοχή στην οξύτητα του στομάχου

Αντοχή στα χολικά άλατα

Αντιμικροβιακή δράση έναντι παθογόνων

Προσκόλληση στο βλεννογόνο

Παρεμπόδιση της προσκόλλησης παθογόνων

Υδρόλυση χολικών αλάτων

Δοκιμές σε ζώα

Κριτήρια επιλογής και αξιολόγησης

- ✓ Έλεγχος ασφάλειας

Οξυγαλακτικά βακτήρια & Bifidobacteria

GRAS (*Generally Recognized As Safe*)

Ευκαιριακά παθογόνα (*Lactobacillus, Enterococcus*)

In vitro δοκιμές

Αντοχή σε αντιβιοτικά

Αιμολυτική δράση

Παραγωγή τοξινών

Κριτήρια επιλογής και αξιολόγησης

✓ Έλεγχος ασφάλειας

- Πειράματα με ζώα

- Αξιολόγηση παρενεργειών σε ανθρώπους

- Επιδημιολογική παρακολούθηση περιστατικών υγείας στους καταναλωτές

Κριτήρια επιλογής και αξιολόγησης

✓ Κλινικές δοκιμές

Φάση I Ασφάλεια

Φάση II Δραστικότητα

(DBPC, σύγκριση με placebo, καταγραφή παρενεργειών)

Φάση III Αποτελεσματικότητα

(σύγκριση με την τυπική θεραπεία)

Φάση IV Παρακολούθηση - Επιτήρηση

Κλινικές δοκιμές από περισσότερες της μιας ερευνητικές ομάδες

Κριτήρια επιλογής και αξιολόγησης

- ✓ Επισήμανση τροφίμου η σκευάσματος
 - Στέλεχος
 - Ελάχιστος αριθμός ζωντανών κυττάρων στο τέλος του χρόνου ζωής
 - Ισχυρισμοί υγείας
 - Κατάλληλες συνθήκες συντήρησης
 - Κέντρο επικοινωνίας για την ενημέρωση του καταναλωτή

The example of *Lactobacillus casei* Shirota

- περιέχεται στο ζυμωμένο γάλα Yakult (Ιαπωνία)

- μελέτες με πειραματόζωα του αποδίδουν

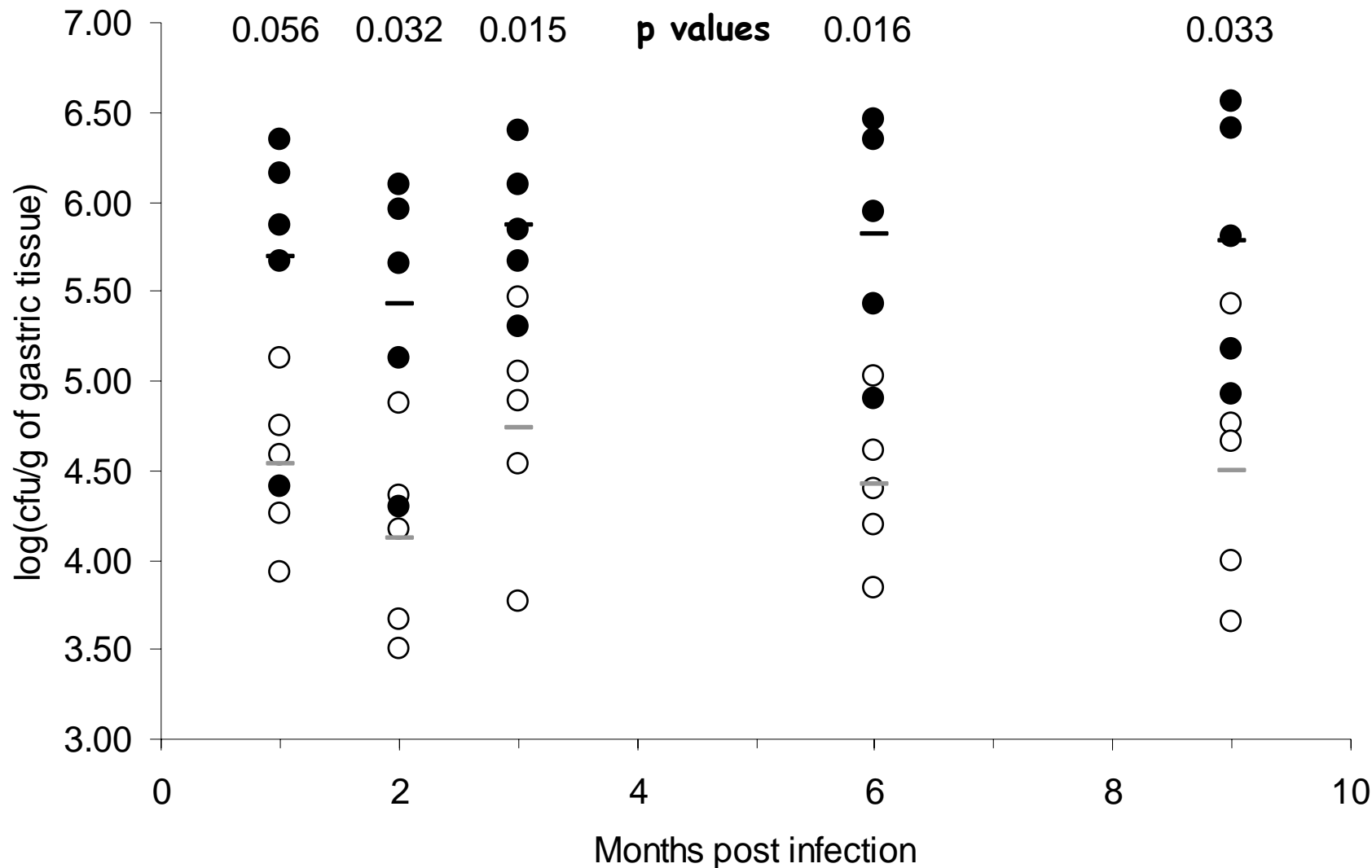
αντιμικροβιακή δράση

ανοσορυθμιστική δράση

αντικαρκινική δράση

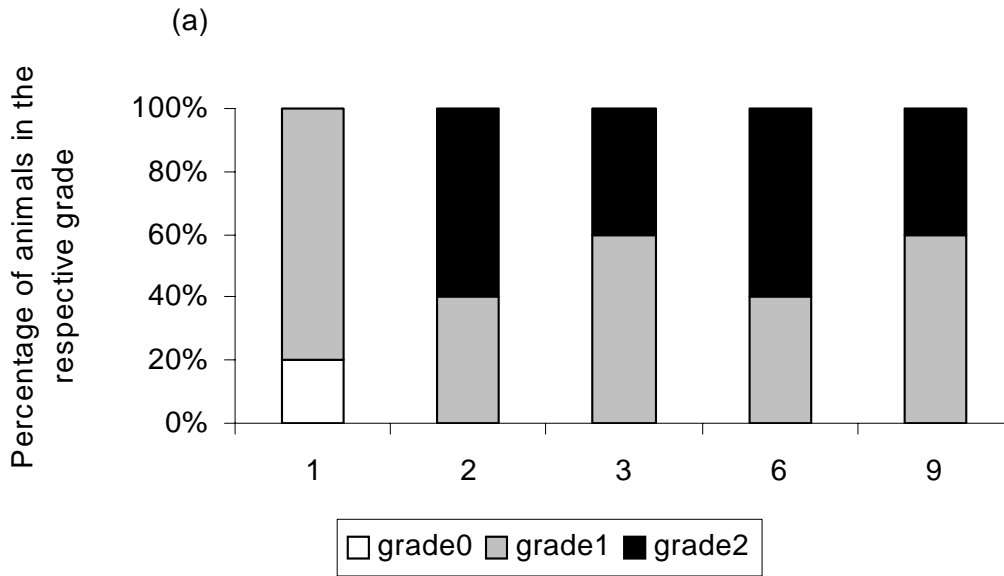
Lactobacillus casei Shirota (LcS) έναντι του *H. pylori*

- Θηλυκά ποντίκια C57BL/6 (SPF), ηλικίας 6 εβδομάδων
- Επιμόλυνση με *H. pylori* SS1
- Καθημερινή χορήγηση LcS (10^8 cfu/ml) με το πόσιμο νερό (~ 6.0 ml ημερησίως)
- Ομάδες: Hp⁻ LcS⁻, Hp⁺ LcS⁻, Hp⁺ LcS⁻, Hp⁺ LcS⁺
- Χρονικά σημεία ελέγχου: 1, 2, 3, 6 και 9 μήνες
- Δείγματα: 5 ποντίκια ανά ομάδα, ανά χρονικό σημείο
- Έλεγχος αποικισμού: καλλιέργεια, PCR, ιστολογικά, ανοσολογικά
- Έλεγχος γαστρίτιδας: ιστολογικά (Sydney system)



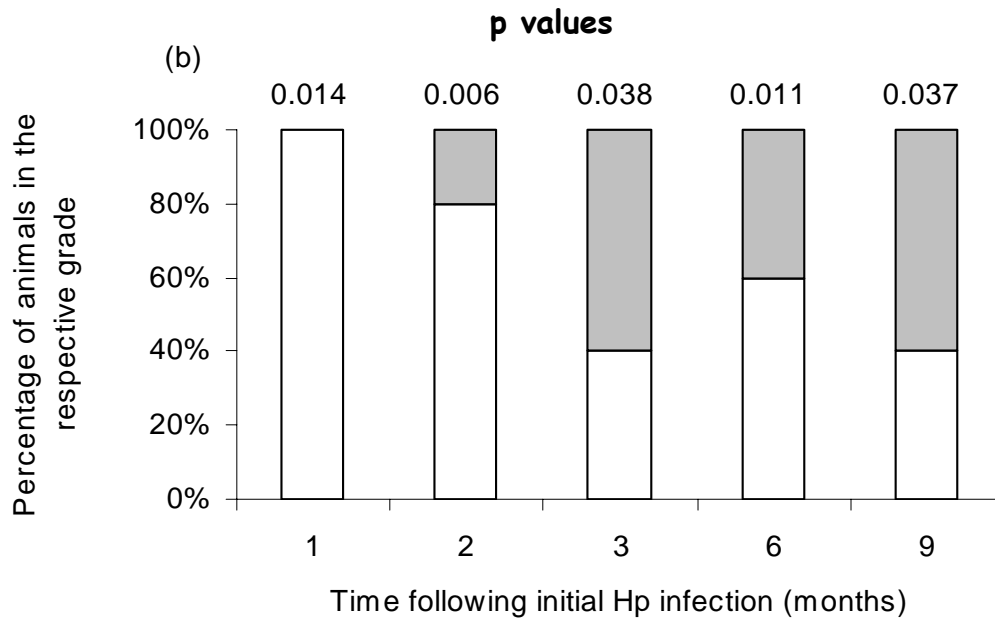
***H. pylori* colonization of gastric mucosa**

(●) control group; (○) study group; black lines = mean values, control group; gray lines = mean values, study group; Mann Whitney test, significant difference $p < 0.05$



H. pylori associated chronic gastritis in the antrum

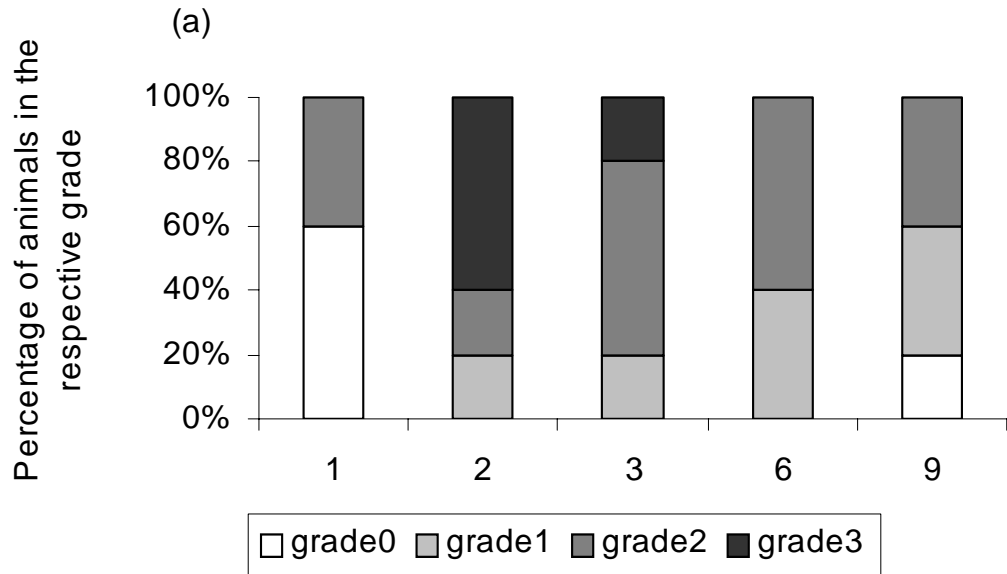
(a): control group



(b): study group

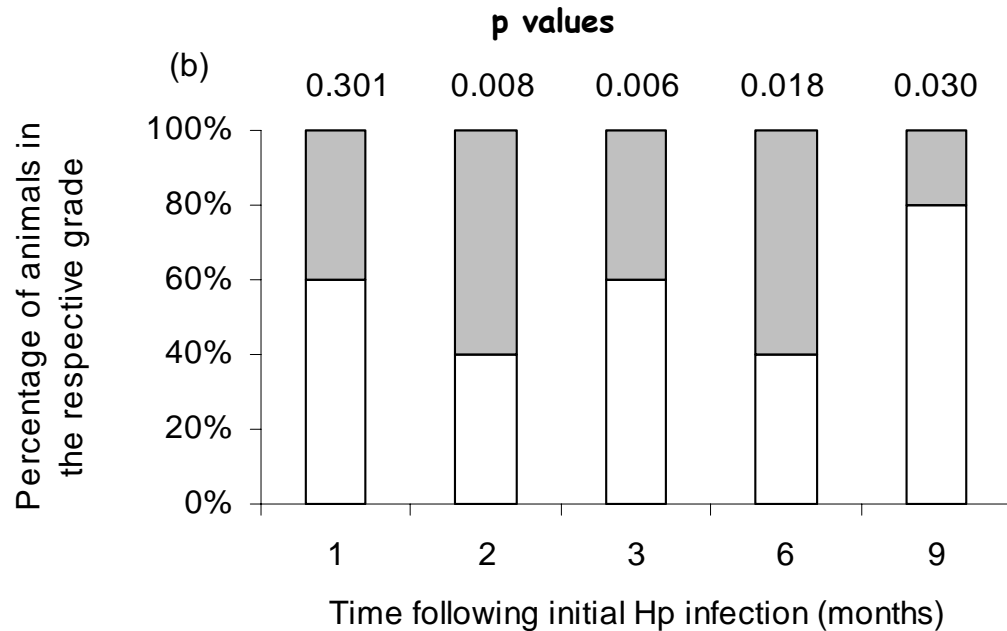
Bars: % of samples in each histological grade (0, 1, 2)

p values: Wilcoxon rank sum test



H. pylori associated active gastritis in the antrum

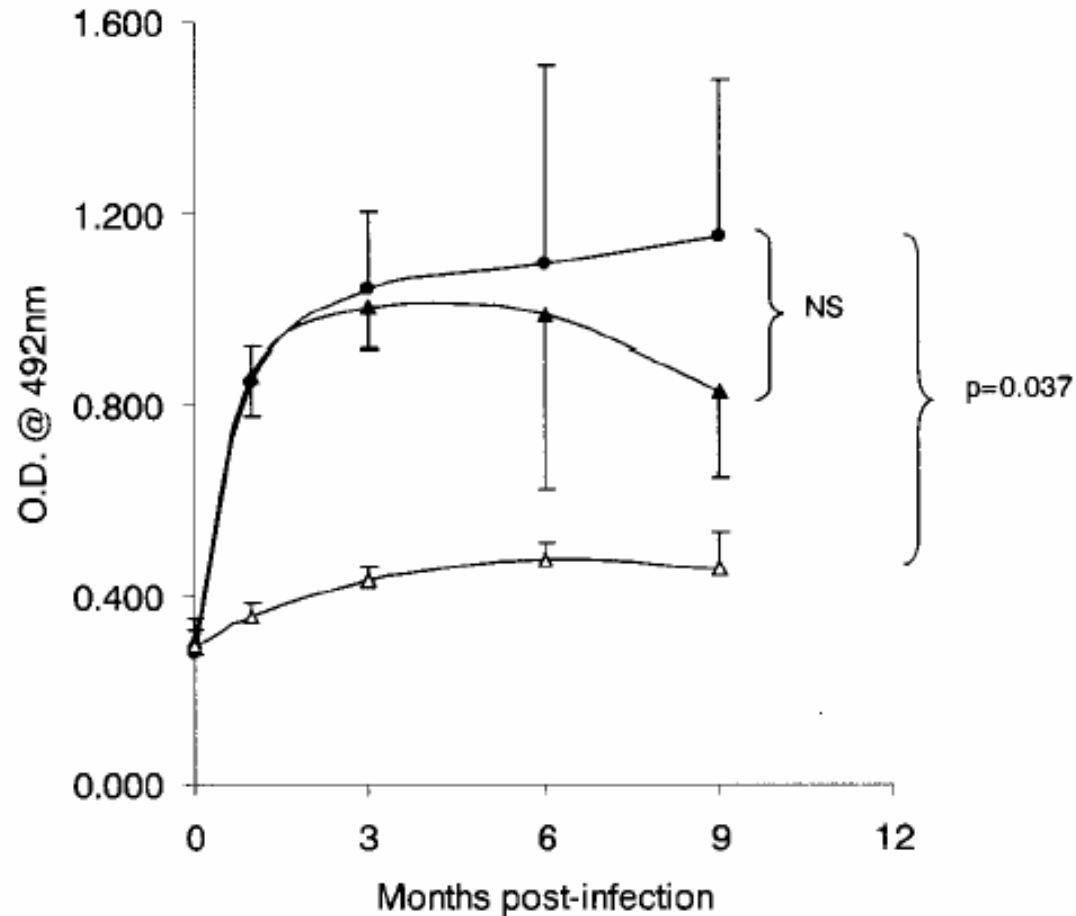
(a): control group



(b): study group

Bars: % of samples in each histological grade (0, 1, 2, 3)

p values: Wilcoxon rank sum test



Total IgG response to *H. pylori* infection in C57BL/6 mice

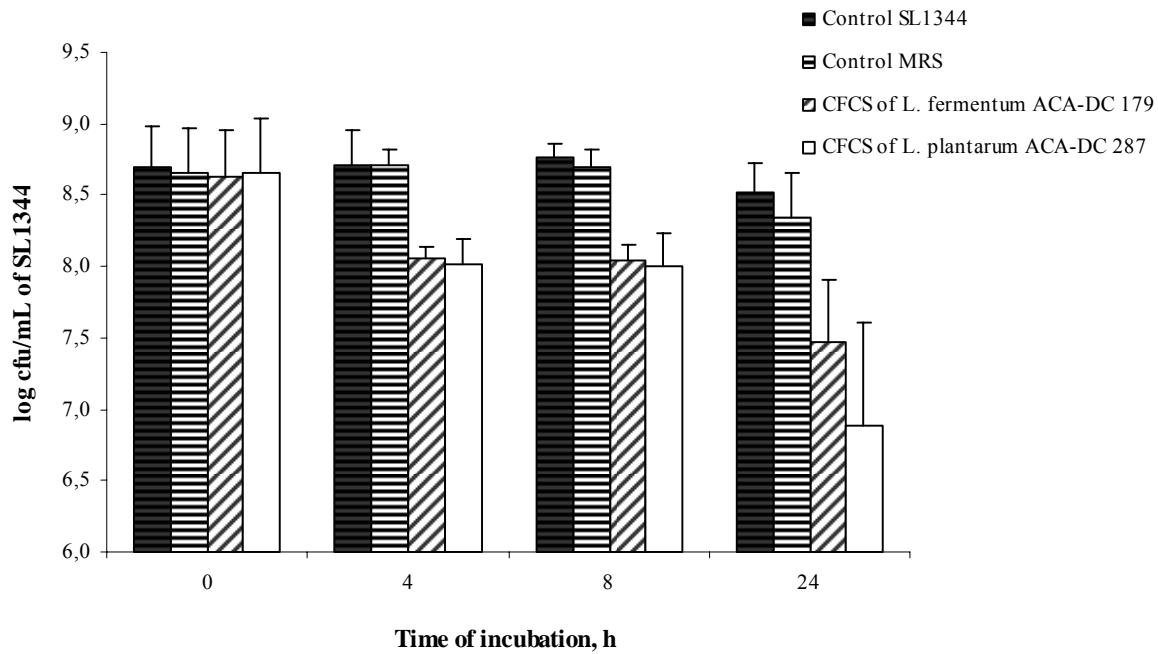
Serum samples collected at 0, 1, 2, 3, 6 and 9 months post-infection and assayed for anti-IgG *H. pylori* antibodies by ELISA

No significant difference between the control group (●) and the study group (▲)

△: The *L. casei* Shirota group

The example of *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179

- *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 (Kasseri cheese)
activity against *Salmonella* serovar Typhimurium
- *Lactobacillus plantarum* ACA-DC 287 (Xynotiri cheese)
activity against *Salmonella* serovar Typhimurium
- *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198 (Kasseri cheese)
produces the anticlostridium lantibiotic macedocin



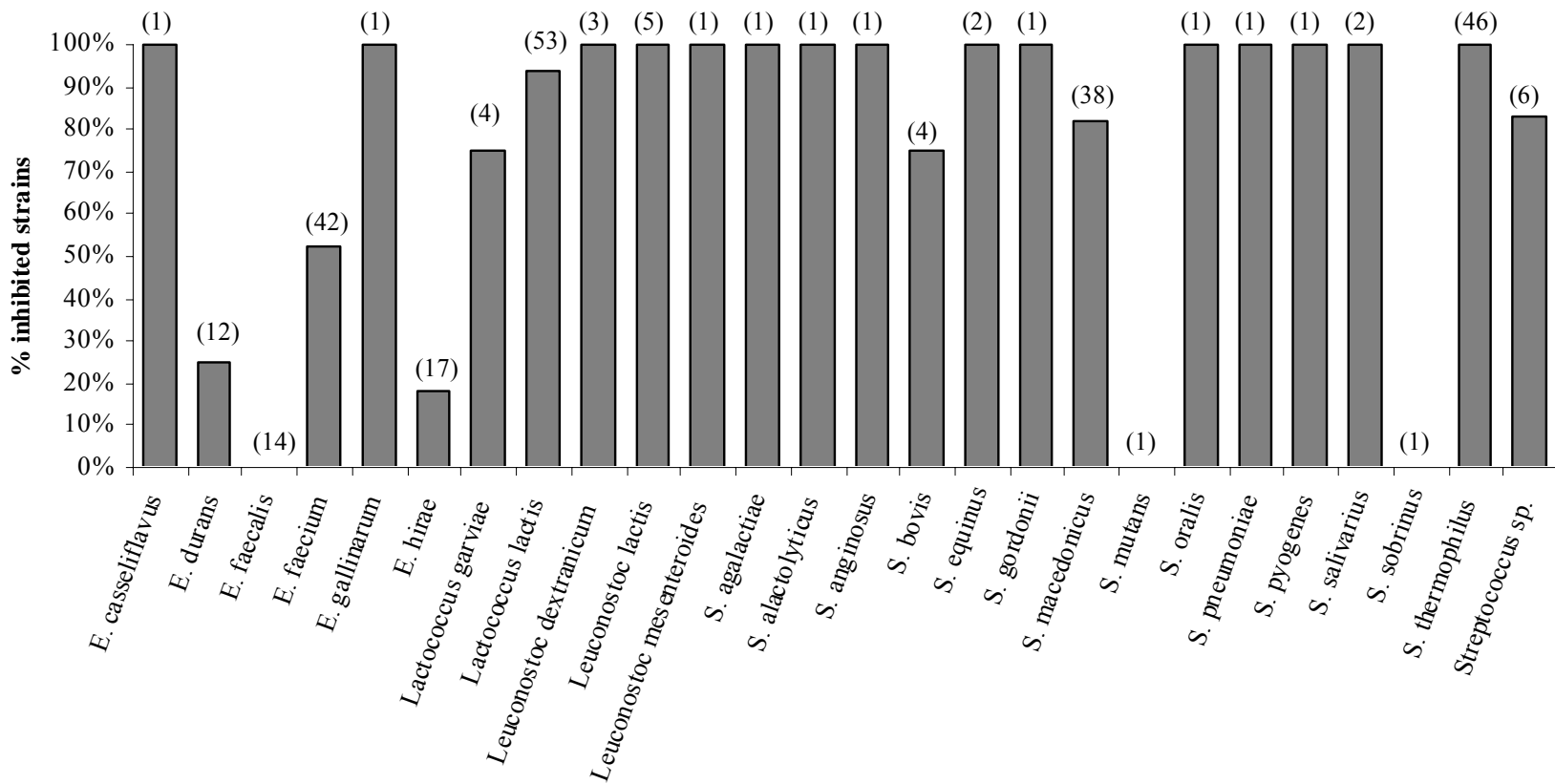
Anti-salmonella activity of
L. fermentum ACA-DC 179 &
L. plantarum ACA-DC 287



Macedocin detection in cheese samples

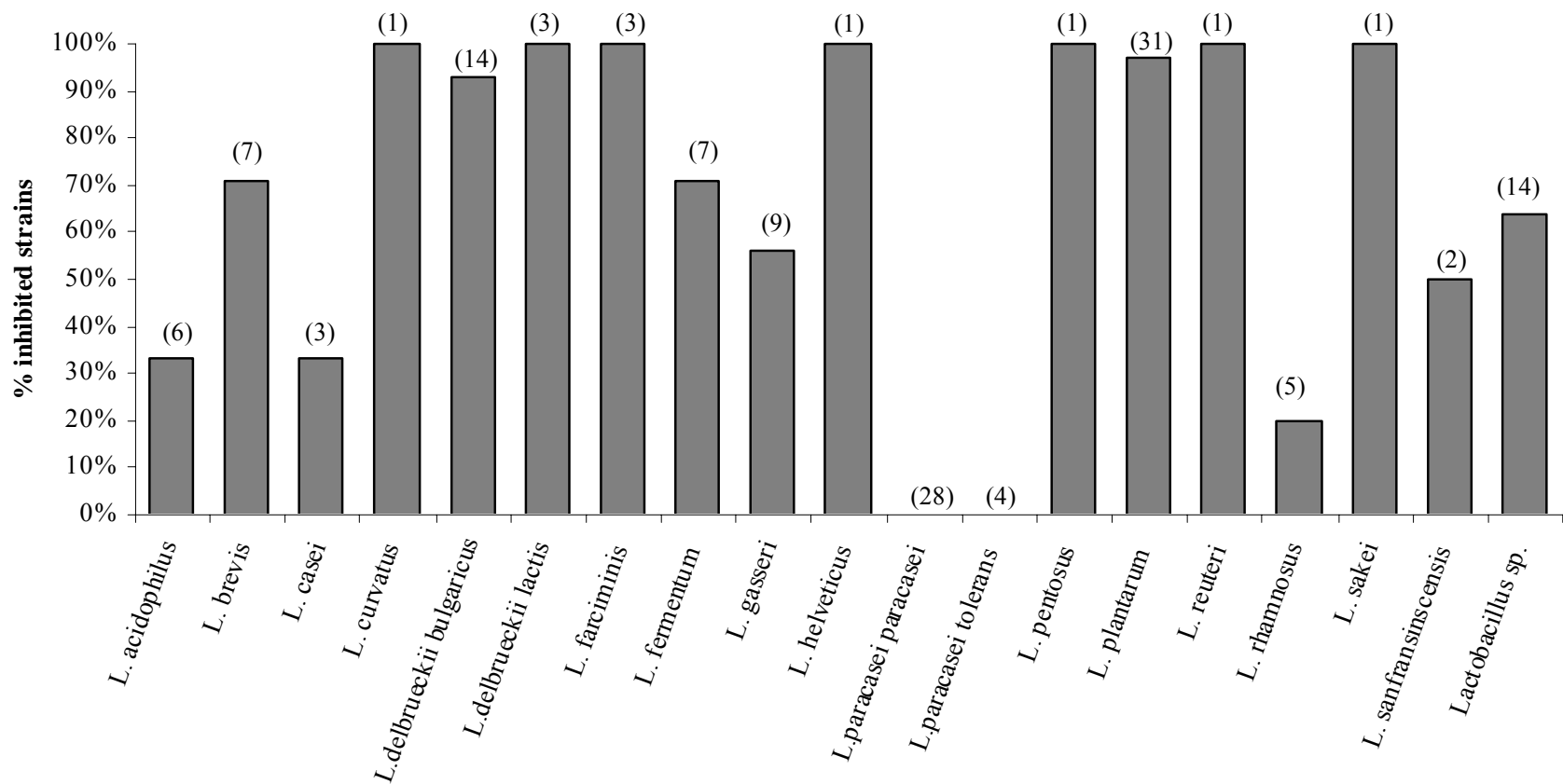
Probiotic potential

1. Antimicrobial activity (broad spectrum)
2. Survival through the *GI* tract
3. Antibiotic resistance & haemolysis
4. Immunomodulatory properties
5. Animal trials



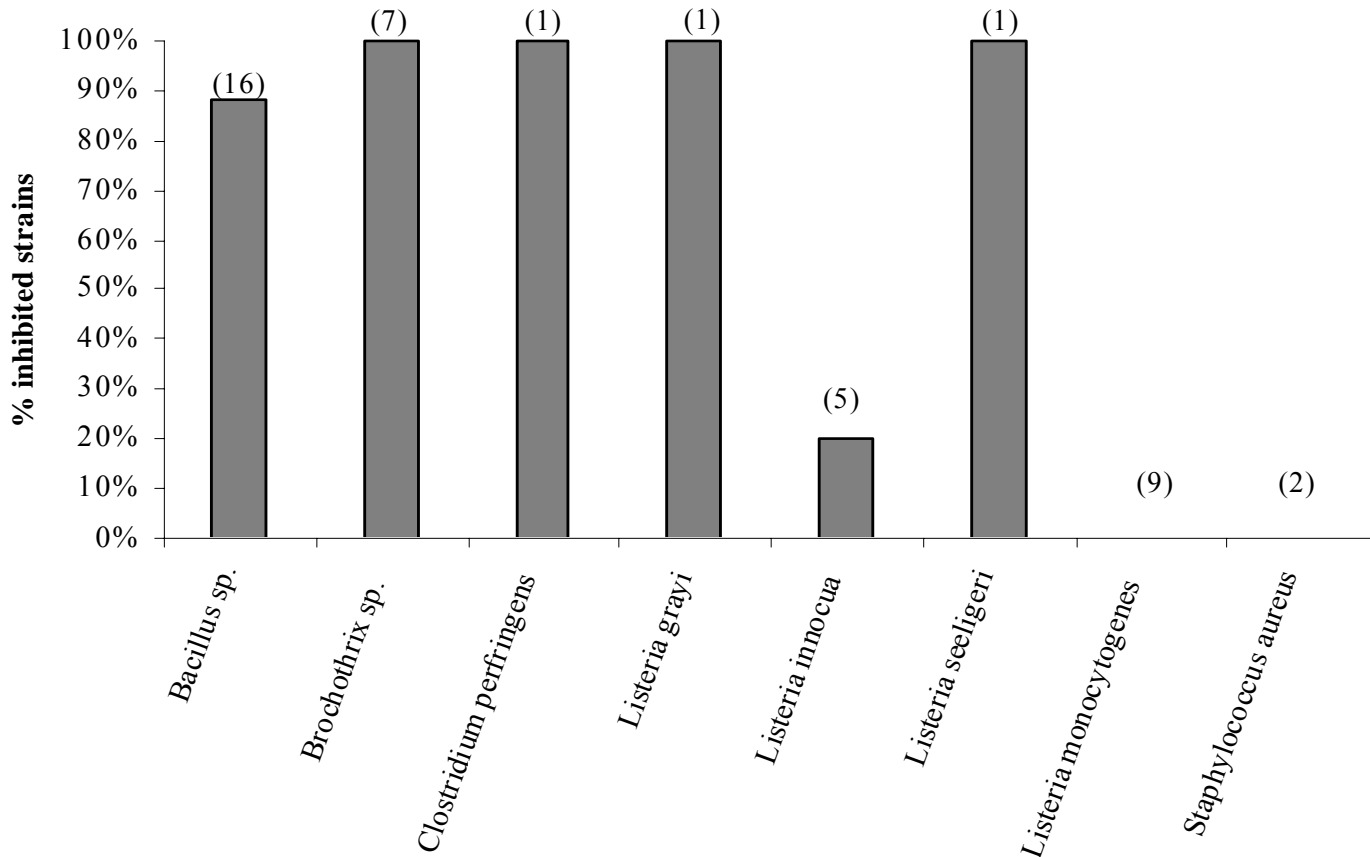
Antimicrobial activity of the CFCS (SM+YE, pH 6.5)

of *S. macedonicus* ACA-DC 198 against 260 LAB cocci (WDA)



Antimicrobial activity of the CFCS (SM+YE, pH 6.5)

of *S. macedonicus* ACA-DC 198 against 141 *Lactobacillus* strains (WDA)



Antimicrobial activity of the CFCS (SM+YE, pH 6.5)

of *S. macedonicus* ACA-DC 198

against 42 Gram⁺ food spoilage & pathogenic bacteria (WDA)

Antimicrobial activity of CFCs of *L. fermentum* ACA-DC 179 (MRS, pH 6.5) and *S. macedonicus* ACA-DC 198 (SM+YE, pH 6.5) against streptococci (WDA)

Target strain	Inhibition (diameter, mm±SD)	
	<i>L. fermentum</i> ACA-DC 179	<i>S. macedonicus</i> ACA-DC 198
<i>S. agalactiae</i> LMG 14694T	-	7.7±0.58
<i>S. anginosus</i> LMG 14502T	-	8.7±1.53
<i>S. bovis</i> LMG 8518T	-	7.7±0.58
<i>S. equinus</i> LMG 14897T	-	10.0±1.00
<i>S. gordonii</i> LMG 14518T	-	10.0±0.00
<i>S. mutans</i> LMG 14558T	-	-
<i>S. oralis</i> LMG 14532T	7.0±0.00	9.3±1.15
<i>S. pneumoniae</i> LMG 14545T	7.0±0.00	12.7±0.58
<i>S. pyogenes</i> LMG 21599T	-	13.0±1.00
<i>S. salivarius</i> LMG 11489T	-	5.7±1.15
<i>S. sobrinus</i> LMG 14641T	-	-
<i>S. thermophilus</i> LMG 6896T	-	14.7±1.53
<i>S. thermophilus</i> ACA-DC 27	14.0±0.58	16.0±1.15
<i>S. thermophilus</i> ACA-DC 40	11.0±1.00	16.0±1.00
<i>S. thermophilus</i> ACA-DC 1502a	12.0±1.00	16.0±0.58

Survival of strains at pH 2.5, expressed in log cfu mL⁻¹

Strain	log cfu mL ⁻¹ ± SD				
	0 h	0.5 h	1 h	2 h	3 h
<i>L. fermentum</i> ACA-DC 179	9.1±0.15	9.0±0.17	8.0±0.53	4.9±1.51	4.0±1.49
<i>L. plantarum</i> ACA-DC 287	9.7±0.10	9.5±0.13	9.3±0.11	8.7±0.82	8.2±0.78
<i>S. macedonicus</i> ACA-DC 198	8.8±0.22	3.8±0.92	0.0±0.00	0.0±0.00	0.0±0.00

All strains survived in the presence of bile salts (up to 2% w/v)!

Antibiotic resistance of strains expressed in MICs ($\mu\text{g mL}^{-1}$) values

Strain	MICs ($\mu\text{g mL}^{-1}$) ^a							
	BAC	CHL	CLO	PEN	STR	TEIC	TET	VAN
<i>L. fermentum</i> ACA-DC 179	8	8	4	<2	64	>64	8	>64
<i>L. plantarum</i> ACA-DC 287	>64	16	>64	16	>64	>64	16	>64
<i>S. macedonicus</i> ACA-DC 198	4	8	<2	<2	>64	<2	<2	<2

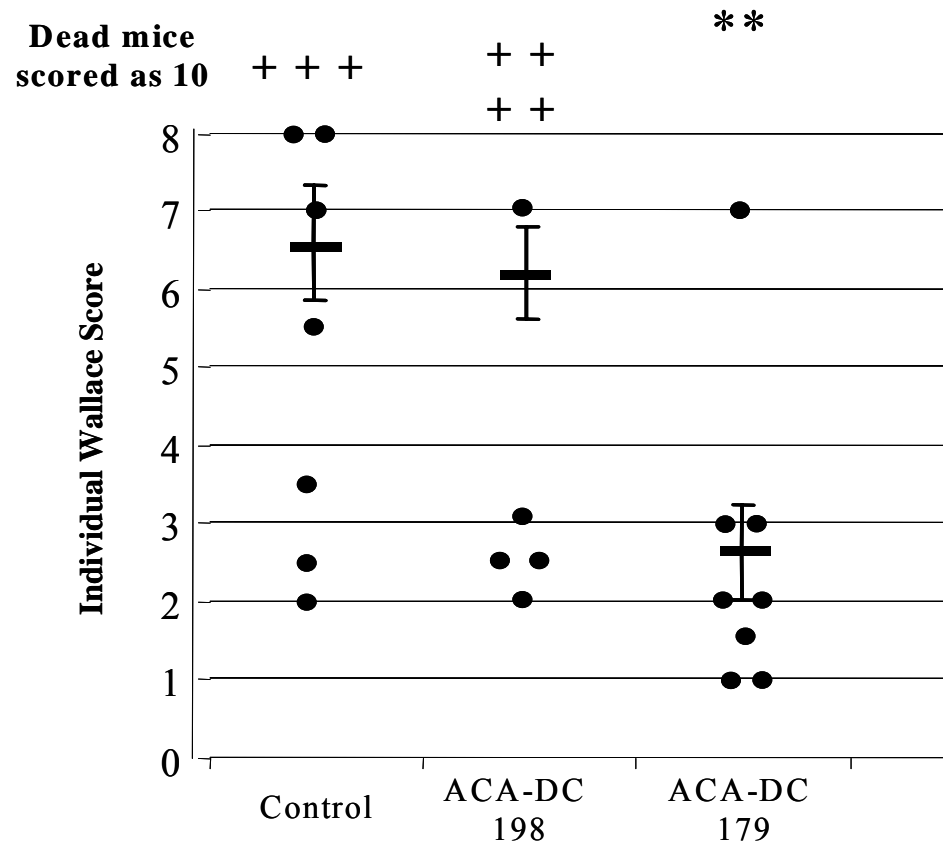
None of the strains haemolytic !

Cytokine secretion levels from human PBMCs stimulated with the strains

PBMCs stimulation experiments were performed twice per blood donor (n=7).

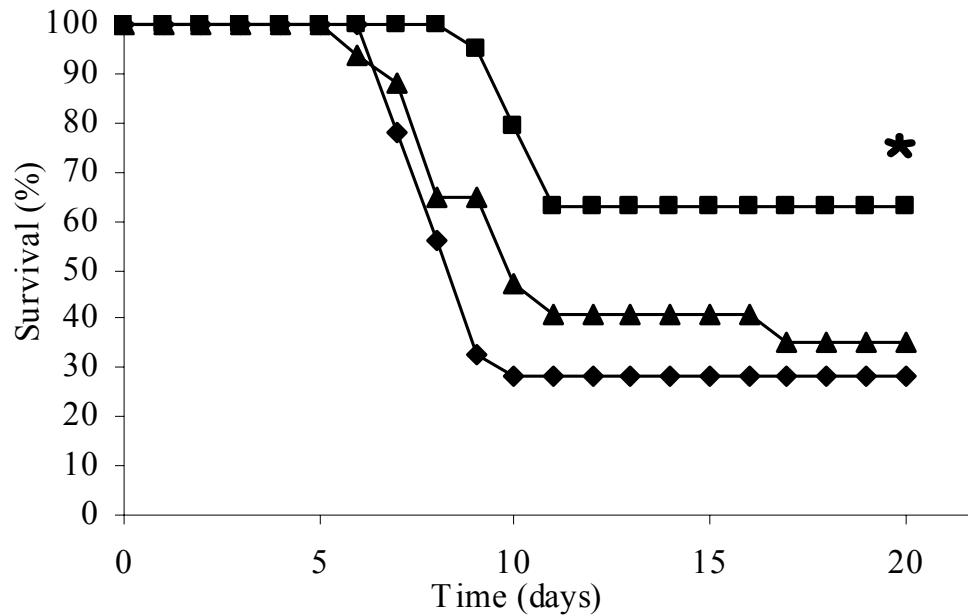
Cytokine determination was performed in duplicate.

Strain	pg mL ⁻¹ ± SEM				
	IL-10	IL-12	TNF- α	IFN- γ	IL-10/IL-12
Unstimulated control	13±1	9±2	1±0	3±2	1±0
<i>L. fermentum</i> ACA-DC 179	2815±1018	10±3	3579±1467	115±75	141±51
<i>L. plantarum</i> ACA-DC 287	1498±430	153±51	19307±7466	28694±18439	25±10
<i>S. macedonicus</i> ACA-DC 198	777±153	337±67	36721±11680	37684±13569	4±1



Administration of *L. fermentum* ACA-DC 179 and *S. macedonicus* ACA-DC 198 on acute colitis induced in BALB/c mice by intrarectal administration of TNBS

LAB (10^8 cfu) were administrated intragastrically once daily for 5 days before intrarectal TNBS administration. Animals were sacrificed 48 h after TNBS administration. Wallace inflammation scores are presented individually for every mouse (ten mice per group). Results are means \pm SEM. Significant differences ($P < 0.05$, **) are indicated in comparison with the TNBS control group.



Survival of BALB/c mice challenged with *Salmonella* serovar Typhimurium C5 and not treated with lactobacilli (▲), treated with *L. fermentum* ACA-DC 179 (■) and treated with *L. plantarum* ACA-DC 287 (◆)

S. typhimurium C5 was given once by intragastric gavage at 5×10^4 cfu per mouse; Lactobacilli were administered once daily also by intragastric gavage for 5 days before infection with *Salmonella*. Results are from one representative experiment (18-20 mice per group). Significant differences ($P < 0.05$, *) are indicated in comparison with the control group challenged with *Salmonella* serovar Typhimurium C5 and not treated with lactobacilli.

Conclusion

Lactobacillus fermentum ACA-DC 179

A promising

Probiotic culture

Protective culture