



Σχολή Επιστημών Τροφίμων
Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ *BIFIDOBACTERIUM* ΣΕ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΑ
ΤΡΟΦΙΜΑ: ΠΡΟΣΦΑΤΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

ΔΗΜΗΤΡΑΚΟΠΟΥΛΟΥ ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ

ΑΜ: 18684048

ΕΠΙΒΛΕΠΟΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΣΠΗΛΙΩΤΗΣ ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2023



Σχολή Επιστημών Τροφίμων
Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

**APPLICATIONS OF THE GENUS *BIFIDOBACTERIUM* IN
PROBIOTIC FOODS: RECENT DATA**

DIMITRAKOPOYLOY ANASTASIA

SUPERVISOR: SPILIOTIS VASILIOS

ATHENS 2023

Έγινε δεκτή

Οι υπογράφοντες δηλώνουμε ότι έχουμε εξετάσει τη πτυχιακή εργασία με τίτλο «Εφαρμογές του γένους *Bifidobacterium* σε προβιοτικά τρόφιμα: πρόσφατα δεδομένα» που παρουσιάστηκε από την Δημητρακοπούλου Αναστασία και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.

α/α	Όνοματεπώνυμο	Βαθμίδα/ Ιδιότητα	Ψηφιακή Υπογραφή
1.	Σπηλιώτης Βασίλειος	Καθηγητής Επιβλέπον	
2.	Ανθμία- Αικατερίνη Μπατρίνου	Επίκουρη Καθηγήτρια Μέλος	
3.	Σπυρίδων Κοντελές	Επίκουρος Καθηγητής Μέλος	

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο/η κάτωθι υπογεγραμμένος/η Δημητρακοπούλου Αναστασία του Κωνσταντίνου με αριθμό μητρώου 18684048 φοιτητής/τρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

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

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

Ο/Η Δηλών/ούσα

Δημητρακοπούλου Αναστασία



ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το γένος *Bifidobacterium* αποτελεί ένα γένος με μεγάλο ερευνητικό και εμπορικό ενδιαφέρον. Το ενδιαφέρον αυτό βασίζεται στις προβιοτικές ιδιότητες κάποιων στελεχών του καθώς και στα πολλαπλά πιθανά οφέλη που παρουσιάζουν στην υγεία του ανθρώπου. Σήμερα, γίνεται χρήση αυτών για τη παραγωγή προβιοτικών τροφίμων, κυρίως για τη παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων, και πραγματοποιούνται έρευνες για τη χρήση τους στη παραγωγή περισσότερων προβιοτικών προϊόντων. Η ζήτηση για νέα προϊόντα αυξάνεται καθώς αυξάνεται και η επίγνωση των πιθανών οφελών που προσφέρουν τα τρόφιμα εμπλουτισμένα με *Bifidobacteria* στον καταναλωτή. Η παρούσα πτυχιακή εργασία παρουσιάζει τα γενικά χαρακτηριστικά του γένους *Bifidobacterium*, τα κύρια είδη του χρησιμοποιούνται ως προβιοτικά από τη βιομηχανία τροφίμων καθώς επίσης γίνεται αναφορά σε πρόσφατες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί για την εφαρμογή τους σε προϊόντα τροφίμων. Επιπλέον, γίνεται αναφορά στις τρέχουσες εφαρμογές των *Bifidobacteria* σε γαλακτοκομικά προϊόντα καθώς και στις πιθανές ευεργετικές ιδιότητες του γένους για την υγεία. Πιο αναλυτικά, στο κεφάλαιο 1 γίνεται ανάλυση των προβιοτικών βακτηρίων, των κριτηρίων επιλογής τους, του μηχανισμού δράσης τους καθώς και οι εφαρμογές τους σε τρόφιμα και οι πιθανές θετικές επιδράσεις τους στην υγεία του ανθρώπου. Στο κεφάλαιο 2 αναφέρονται τα γενικά χαρακτηριστικά του γένους *Bifidobacterium*, όπως είναι η μορφολογία των βακτηρίων και η ευαισθησία και ανθεκτικότητά τους σε φυσικοχημικούς παράγοντες, οι πηγές εύρεσης των βακτηρίων στον άνθρωπο και το περιβάλλον καθώς και ο τρόπος μεταβολισμού των υδατανθράκων από αυτά. Στη συνέχεια, στο κεφάλαιο 3 αναφέρονται τα κύρια είδη που χρησιμοποιούνται ως προβιοτικά, μελέτες που έχουν πρόσφατα πραγματοποιηθεί για την εφαρμογή τους σε διάφορα προϊόντα τροφίμων καθώς και τα προϊόντα που υπάρχουν στην αγορά και είναι εμπλουτισμένα με *Bifidobacteria*. Τέλος, στο κεφάλαιο 4 αναφέρονται ορισμένες από τις θετικές επιδράσεις των προβιοτικών στελεχών στην υγεία του ανθρώπου.

ABSTRACT

The genus *Bifidobacterium* is a genus of great research and commercial interest. This interest is based on the probiotic properties of some of its strains as well as the multiple possible effects they present on human health. Today, these are used to produce probiotic foods, mainly for the production of dairy products, and research is being done to use them in the production of more products. The demand for new products rises with the awareness of the potential benefits that foods enriched with *Bifidobacteria* offer to the consumer. This thesis presents the general characteristics of the genus *Bifidobacterium*, its main species that are used as probiotics by the food industry, as well as referring to recent studies that have been carried out for their application in food products. In addition, current applications of *Bifidobacteria* in dairy products as well as potential health benefits of the genus are discussed. In more detail, chapter 2 analyzes probiotic bacteria, their selection criteria, their mechanism of action as well as their applications in food and their possible positive effects on human health. In chapter 3, the general characteristics of the genus *Bifidobacterium* are mentioned, such as the morphology of the bacteria and their sensitivity and resistance to physicochemical factors, the sources of finding the bacteria in humans and the environment, as well as the way they metabolize carbohydrates. Then, chapter 4 lists the main species used as probiotics, studies that have recently been carried out on their application in various food products as well as the products on the market that are enriched with *Bifidobacteria*. Finally, chapter 5 lists some of the positive effects of the probiotic strains on human health.

Πίνακας περιεχομένων

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
ABSTRACT.....	6
Κατάλογος Πινάκων.....	9
Κατάλογος Εικόνων.....	9
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	11
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1- Τα προβιοτικά τρόφιμα.....	13
1.1 Εισαγωγή.....	14
1.2 Ορισμός.....	14
1.3 Η ιστορία των προβιοτικών τροφίμων.....	15
1.4 Τα προβιοτικά βακτήρια.....	15
1.5 Κριτήρια επιλογής προβιοτικών βακτηρίων.....	17
1.6 Μηχανισμός δράσης των προβιοτικών βακτηρίων.....	19
1.7 Παραδείγματα προβιοτικών τροφίμων.....	20
1.7.1 Γιαούρτι.....	20
1.7.2 Προβιοτικό γάλα.....	20
1.7.3 Φέτα.....	20
1.7.4 Κεφίρ.....	21
1.8 Ενδεχόμενες ευεργετικές δράσεις στην υγεία του ανθρώπου.....	21
1.8.1 Θεραπεία και πρόληψη διάρροιας- δυσανεξία στη λακτόζη.....	21
1.8.2 Αντικαρκινική δράση.....	21
1.8.3 Διαβήτης- παχυσαρκία.....	22
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2- Το γένος Bifidobacterium.....	22
2.1 Ιστορικά στοιχεία.....	23
2.2 Χαρακτηριστικά του γένους Bifidobacterium.....	23
2.2.1 Μορφολογία.....	23
2.2.2 Καλλιέργεια.....	27
2.2.3 Ταξινόμηση.....	27
2.3 Ευαισθησία- Ανθεκτικότητα σε φυσικοχημικούς παράγοντες.....	28
2.3.1 Επίδραση της θερμοκρασίας.....	28
2.3.2 Επίδραση του pH.....	29

2.3.3 Επίδραση του οξυγόνου	29
2.4 Πηγές <i>Bifidobacterium</i>	29
2.4.1 Άνθρωπος	30
2.4.2 Ζώα- Περιβάλλον	30
2.5 Μεταβολισμός υδατανθράκων- Η οδός “bifid shunt”	33
2.6 Παραγωγή εξωπολυσακχαριτών	35
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3- Εφαρμογές του γένους <i>Bifidobacterium</i> σε προβιοτικά τρόφιμα.....	36
3.1 Εισαγωγή.....	37
3.2 Τα κύρια είδη <i>Bifidobacterium</i> που χρησιμοποιούνται για τη παραγωγή τροφίμων	37
3.2.1 Το <i>Bifidobacterium longum</i>	37
3.2.2 Το <i>Bifidobacterium breve</i>	39
3.2.3 Το <i>Bifidobacterium animalis</i>	41
3.2.4 Το <i>Bifidobacterium bifidum</i>	42
3.3 Εφαρμογες των <i>bifidobacteria</i> σε προβιοτικά προϊόντα.....	43
3.3.1 Γιαούρτι.....	43
3.3.2 Γάλα	45
3.3.2.1 Κατσικίσιο γάλα	46
3.3.2.2 Γάλα καμήλας	46
3.3.3 Κεφίρ.....	47
3.3.4 Προϊόντα με βάση το φυτικό γάλα.....	48
3.3.5 Φρουτοχυμοί	50
3.3.6 Προϊόντα κρέατος	51
3.4 Προβιοτικά προϊόντα στην αγορά που περιέχουν <i>Bifidobacterium</i>	52
3.4.1 <i>Bifidus</i> yoghurt.....	52
3.4.2 <i>Bifidus</i> milk.....	52
3.4.3 <i>Acidophilus bifidus</i> milk (AB milk)	52
3.4.4 <i>Bifighurt</i>	53
3.4.5 Bio yoghurt (AB yoghurt)	53
3.4.6 Παγωτό.....	54
3.4.7 Τυριά	54
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4-Πιθανές θετικές επιδράσεις των προβιοτικών στελεχών του γένους <i>Bifidobacterium</i>	54
4.1 Καταπολέμηση της παχυσαρκίας	55

4.2 Χρήση ως αντικαρκινικά	56
4.3 Καταπολέμηση της δυσανεξίας στη λακτόζη	56
4.4 Θεραπεία και πρόληψη διάρροιας.....	57
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	58
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	59

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1: Μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται ως προβιοτικοί (Frakolaki, Giannou, et al. 2020).....	16
Πίνακας 2 Κριτήρια επιλογής προβιοτικών βακτηρίων σε εμπορικές εφαρμογές (Shah, 2006; Morelli, 2007).....	18
Πίνακας 3 Προέλευση κάποιων ειδών Bifidobacteria, (Κωνσταντίνου, 2018).....	31

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1 Προβιοτικό γιαούρτι Activia (activia.gr).....	19
Εικόνα 2 Low fat 1% Acidophilus milk της εταιρίας Smith Brothers Farms (smithbrothersfarms.com).....	19
Εικόνα 3 Lactose Free Probiotic Kefir Yoghurt της εταιρίας Table of plenty (tableofplenty.com).....	20
Εικόνα 4 Επιδράσεις προβιοτικών μικροοργανισμών στην υγεία του ανθρώπου (Plessas, et al., 2012).....	21
Εικόνα 5 Συσσωματωμένη συστάδα κυττάρων Bifidobacterium RBL67 σε υγρή καλλιέργεια MRS-C μετά από 24 ώρες ανάπτυξης στους 37°C (Leo Meile, 2007).....	23
Εικόνα 6 Η μορφολογία των στελεχών DSM 10140 (<i>B. animalis</i> subspp. <i>lactis</i>) και DSM 20083 (<i>B. adolescentis</i>) υπό διαφορετικές συγκεντρώσεις αλάτων (Dhanashree, 2017).....	24
Εικόνα 7 Η μορφολογία των στελεχών DSM 10140 (<i>B. animalis</i> subspp. <i>lactis</i>), DSM 20083 (<i>B. adolescentis</i>) όταν καλλιεργούνται για διαφορετικά χρονικά διαστήματα (Dhanashree, 2017).....	24
Εικόνα 8 Η μορφολογία των στελεχών DSM 10140 (<i>B. animalis</i> subspp. <i>lactis</i>), DSM 20083 (<i>B. adolescentis</i>) υπό διαφορετικές συνθήκες pH (Dhanashree, 2017).....	25
Εικόνα 9 Σχηματισμός αποικίας Bifidobacterium lactis σε υπόστρωμα MRS (κυρτές, κυκλικές, γαλακτόλευκες αποικίες, 1 έως 2 mm με ολόκληρα άκρα και λεία επιφάνεια) (WenjunLiu, 2020).....	26
Εικόνα 10 Σχηματισμός αποικίας Bifidobacterium longum σε υπόστρωμα TSA (1,5–3,0 mm, αδιαφάνες/γυαλιστερό, λευκό) (Hülya Demir).....	26
Εικόνα 11 Σχηματισμός αποικίας Bifidobacterium animalis σε υπόστρωμα MRSA (1,5 mm, λεία, γυαλιστερή, λευκή) (Hülya Demir).....	26
Εικόνα 12 Μεταβολισμός γλυκόζης μέσω της οδού «bifid shunt»- σύντομη αντίδραση (Ryuichiro Suzuki 2010).....	32

Εικόνα 13 Μεταβολισμός γλυκόζης μέσω της οδού «bifid shunt»- αναλυτική αντίδραση (P.H.P.Prasanna 2014).....	33
Εικόνα 14 Μεταβολισμός της λακτόζης σε γλυκόζη και γαλακτόζη από τη β-γαλακτοσιδάση (www.biology.uoc.gr).....	34
Εικόνα 15 Το <i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i> σε θρεπτικό υπόστρωμα MRS,(Li Zhao 2021).....	36
Εικόνα 16 Παιδιατρικές ασθένειες στις οποίες έχει επιτευχθεί βελτίωση των συμπτωμάτων με τη χορήγηση στελεχών <i>B. breve</i> (Probiotics and Prebiotics in Pediatrics 2018).....	38
Εικόνα 17 Σε θρεπτικό υπόστρωμα MRSA το <i>Bifidobacterium animalis</i> σχηματίζει αποικίες 1,5mm, λείες, γυαλιστερές και λευκές (Hülya Demir).....	40

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Από την ανακάλυψή τους το 1899, τα *bifidobacteria* αποτελούν συχνό αντικείμενο μελέτης λόγω των πιθανών πλεονεκτημάτων που μπορεί να προσφέρει η ενσωμάτωσή τους σε τρόφιμα στην υγεία του καταναλωτή. Τα βακτήρια του γένους *Bifidobacterium* είναι θετικά κατά Gram, κυρίως αναερόβια και μη σπορογόνα και μέχρι σήμερα στο γένος συμπεριλαμβάνονται περισσότερα από 70 είδη. Από την αρχή της ζωής του ανθρώπου κατοικούν στο πεπτικό του σύστημα ως κύρια συστατικά της ανθρώπινης μικροχλωρίδας και προτείνεται ότι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ανθρώπινης υγείας.

Είναι γνωστό ότι στο γένος *Bifidobacterium* συμπεριλαμβάνονται είδη με προβιοτικές ιδιότητες που χρησιμοποιούνται από την βιομηχανία τροφίμων για τη παραγωγή προβιοτικών τροφίμων. Το ενδιαφέρον για τα προβιοτικά τρόφιμα έχει αυξηθεί λόγω των πολλαπλών υποτιθέμενων θετικών επιδράσεων στην υγεία. Έτσι πραγματοποιούνται πολλές έρευνες για την ενσωμάτωση των προβιοτικών ειδών *Bifidobacterium* σε τέτοια τρόφιμα, όπως είναι τα *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium animalis* και *Bifidobacterium bifidum*.

Από τις έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι σήμερα, έχει γίνει κατανοητό ότι οι έντονες διατροφικές απαιτήσεις του είδους και η αυξημένη ευαισθησία του σε παράγοντες όπως η θερμοκρασία, η οξύτητα και η παρουσία οξυγόνου αποτελούν σημαντικά εμπόδια για την ανάπτυξη τροφίμων. Συγκεκριμένα, τα περισσότερα είδη εμφανίζουν μειωμένη βιωσιμότητα σε πολλά τρόφιμα με αποτέλεσμα να μην επαρκεί ο αριθμός των κυττάρων τους ώστε αυτά να θεωρούνται προβιοτικά.

Έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί με σκοπό την εύρεση εναλλακτικών μεθόδων ενσωμάτωσης, όπως είναι η μικροενθυλάκωση, έχουν αποδώσει αρκετά θετικά αποτελέσματα που υποδεικνύουν πως η πραγματοποίηση περισσότερων ερευνών μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη προϊόντων με ικανοποιητικό αριθμό κυττάρων μέχρι το πέρας της περιόδου κατανάλωσής τους. Επιπλέον, το ενδιαφέρον για αυτά ολοένα και αυξάνεται αφού οι έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί συνδέουν τη κατανάλωση τροφίμων εμπλουτισμένων με *bifidobacteria* με πολλά οφέλη προς την υγεία όπως είναι η καταπολέμηση της

παχυσαρκίας, η καταπολέμηση της δυσανεξίας στη λακτόζη, η πρόληψη μορφών καρκίνου, η θεραπεία και πρόληψη διάρροιας κ.α.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Τα προβιοτικά τρόφιμα

1.1 Εισαγωγή

Είναι γνωστό ότι τα προβιοτικά αποτελούν μία από τις σημαντικότερες κατηγορίες των λειτουργικών τροφίμων. Λειτουργικά θεωρούνται τα τρόφιμα τα οποία, πέραν της φυσικής διατροφικής τους αξίας, έχουν υποστεί τροποποιήσεις με σκοπό την άσκηση επιπλέον ευεργετικής δράσης στην υγεία του καταναλωτή. Μερικά παραδείγματα λειτουργικών τροφίμων είναι τα γαλακτοκομικά, τα οποία περιέχουν ενεργές καλλιέργειες βακτηρίων και οι τροφές ενισχυμένες με άλλα διατροφικά συστατικά όπως αντιοξειδωτικές ουσίες και ασβέστιο. Σήμερα, τα προβιοτικά τρόφιμα κατέχουν μεγάλο μερίδιο της παγκόσμιας αγοράς τροφίμων καθώς και το μεγαλύτερο ποσοστό πωλήσεων μεταξύ των λειτουργικών τροφίμων, στην Ευρώπη. Όμως, παρά τις γνωστές ευεργετικές ιδιότητες των προβιοτικών και την εκτεταμένη χρήση τους παγκοσμίως, εξακολουθούν να υπάρχουν πολλά κενά σχετικά με τα οφέλη των προβιοτικών στην υγεία των ανθρώπων. Για τον λόγο αυτό υπάρχει ακόμα έντονη ανάγκη για έρευνα πάνω στα ήδη υπάρχοντα καθώς και σε νέα υποψήφια στελέχη προβιοτικών βακτηρίων.

1.2 Ορισμός

Προβιοτικά τρόφιμα, ονομάζονται τα τρόφιμα που περιέχουν προβιοτικά βακτήρια, δηλαδή, ζωντανούς μικροοργανισμούς, κυρίως βακτήρια του γαλακτικού οξέος (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*). Ετυμολογικά, ο όρος «προβιοτικό» προέρχεται από τη σύνθεση των λέξεων «προ-» που σημαίνει για και «βίος» που σημαίνει «ζωή». Πρόκειται, λοιπόν, για συστατικά που είναι υπέρ της ζωής. Η εισαγωγή της λέξης προβιοτικά έγινε από τον Γερμανό επιστήμονα Werner Kollath το 1953. Όρισε ως προβιοτικά τις «δραστικές ουσίες που είναι απαραίτητες για μια υγιή ανάπτυξη της ζωής». Ο ορισμός έχει αναδιατυπωθεί έτσι ώστε να είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των ερευνών σχετικά με τα οφέλη των προβιοτικών. Σήμερα, ύστερα από έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί τόσο σε ζώα όσο και σε ανθρώπους, μία γενικώς αποδεκτή αναθεώρηση του ορισμού είναι εκείνη υιοθετήθηκε από διαβούλευση των οργανισμών FAO και WHO το 2001 και χαρακτηρίζει τα προβιοτικά βακτήρια ως «ζωντανούς μικροοργανισμούς οι οποίοι,

όταν χορηγούνται σε επαρκείς ποσότητες, επιφέρουν οφέλη στην υγεία του οργανισμού» (FAO/WHO 2001). Όσον αφορά τα τρόφιμα, έχει προκύψει ένας ακόμα πιο εξειδικευμένος ορισμός. Σύμφωνα με αυτόν, τα προβιοτικά βακτήρια αναφέρονται ως «ζωντανοί μικροοργανισμοί, οι οποίοι όταν καταναλώνονται σε επαρκείς ποσότητες ως μέρος ενός τροφίμου, επιφέρουν οφέλη στην υγεία του οργανισμού» (Pineiro and Stanton 2007).

1.3 Η ιστορία των προβιοτικών τροφίμων

Θεωρείται ότι τα προβιοτικά τρόφιμα χρησιμοποιούνται από τον άνθρωπο και ως μέρος της διατροφής του αλλά και για ιατρικούς σκοπούς από την αρχαιότητα. Πολλά αρχαιολογικά ευρήματα υποδηλώνουν πως αρκετοί πολιτισμοί είχαν αναπτύξει ζύμωση τροφίμων ή ποτών σε χώρες όπως η Ελλάδα, η Ιταλία, η Ινδία, η Κίνα και άλλες. Η παραγωγή και κατανάλωση προβιοτικών τροφίμων όμως συνέβαινε αυθαίρετα χωρίς την γνώση της ύπαρξης των προβιοτικών μικροοργανισμών. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, ο όρος «προβιοτικά» αναφέρθηκε πρώτα από τον Ρώσο νομπελίστα Elie Metchnikoff το 1953 ο οποίος συνέδεσε την τακτική κατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων που έχουν υποστεί ζύμωση, όπως το γιαούρτι, από κατοίκους της Βουλγαρίας, με την μακροζωία. Στη συνέχεια, το 1965 ο όρος χρησιμοποιήθηκε από τους Lilly και Stillwell για να περιγράψει ουσίες που εκκρίνονται από έναν οργανισμό και διεγείρουν την ανάπτυξη ενός άλλου. Το 1992 ο Fuller όρισε ως προβιοτικά «ένα ζωντανό μικροβιακό συμπλήρωμα τροφής που επηρεάζει ευεργετικά το ζώο ξενιστή βελτιώνοντας την εντερική μικροβιακή του ισορροπία». Στα τέλη του 19ου αιώνα έρευνες απέδειξαν την διαφορά στη μικροχλωρίδα του γαστρεντερικού σωλήνα μεταξύ υγιών ατόμων και ασθενών. Μέσω έρευνας που ακολούθησε, αποδείχθηκε ότι η μικροχλωρίδα αυτή μπορεί να αποκατασταθεί μέσω της πρόσληψης μικροοργανισμών οι οποίοι χαρακτηρίστηκαν ως προβιοτικοί.

1.4 Τα προβιοτικά βακτήρια

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, ο σύγχρονος ορισμός που έχει καθιερωθεί από τον οργανισμό FAO/WHO περιγράφει τα προβιοτικά ως «ζωντανούς μικροοργανισμούς οι οποίοι, όταν χορηγούνται σε επαρκείς ποσότητες, επιφέρουν οφέλη στην υγεία του οργανισμού». Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται ως προβιοτικά

μπορούν να αντιπροσωπεύουν διαφορετικούς τύπους όπως βακτήρια, ζύμες και μούχλες (Amara, 2015). Υπάρχει μεγάλη ποικιλία ειδών και γενών που μπορούν να χαρακτηριστούν ως προβιοτικά όμως, οι πιο διαδεδομένοι μικροοργανισμοί ανήκουν στα γένη *Lactobacillus* και *Bifidobacterium*. Πρόκειται για θετικά κατά Gram βακτήρια τα οποία έχουν χαρακτηριστεί ως GRAS (Generally Recognized As Safe) και είναι κυρίαρχοι κάτοικοι του ανθρώπινου εντέρου έντερο (*Lactobacillus* στο λεπτό έντερο και *Bifidobacterium* στο παχύ έντερο).

Τα στελέχη των γενών *Lactobacillus* και *Bifidobacterium* παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές ως προς την επιβίωση κατά την επεξεργασία και ανάπτυξη προϊόντων τροφίμων. Συγκεκριμένα, τα στελέχη του γένους *Lactobacillus* παρουσιάζουν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα σε χαμηλότερες τιμές pH και προσαρμοστικότητα στο γάλα και άλλα υποστρώματα τροφίμων καθιστώντας τα τεχνολογικά κατάλληλα για εφαρμογές τροφίμων συγκριτικά με στελέχη του γένους *Bifidobacterium*.

Τα οφέλη και οι ιδιότητες των προβιοτικών μικροοργανισμών όμως, εξαρτώνται κατά μεγάλο ποσοστό από το στέλεχος και όχι μόνο από το γένος του. Είναι γνωστό ότι κάθε στέλεχος παρουσιάζει κάποια μοναδικά χαρακτηριστικά που το διαφοροποιούν από άλλα στελέχη του ίδιου γένους. Για παράδειγμα, πειραματικά έχει αποδειχθεί ότι τα στελέχη *B. animalis* είναι πιο ανθεκτικά στα οξέα από τα στελέχη άλλων ειδών *Bifidobacterium* (Mättö et al., 2004).

Προβιοτικές ιδιότητες έχουν αποδοθεί και σε μικροοργανισμούς των γενών *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* και σε μη γαλακτικά βακτήρια ή ζύμες όπως *Bacillus* και *Saccharomyces*.

Γένος	Στελέχη
<i>Lactobacillus</i> sp.	<i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. amylovorus</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. 'caucasicus'</i> = <i>Lb. kefiri</i> , <i>Lb. crispatus</i> , <i>Lb. cellobiosus</i> , <i>Lb. curvatus</i> , <i>Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> , <i>Lb. delbrueckii ssp. delbrueckii</i> , <i>Lb. delbrueckii ssp. lactis</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. gallinarum</i> , <i>Lb. gasseri</i> , <i>Lb. helveticus</i> , <i>Lb. johnsonii</i> , <i>Lb. paracasei</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. reuteri</i> , <i>Lb. rhamnosus</i> , <i>Lb. sakei</i> , <i>Lb. salivarius</i> , <i>Lb. sporogenes</i> = <i>Bc. Coagulans</i>
<i>Bifidobacterium</i> sp.	<i>B. adoloscensis</i> , <i>B. animalis</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. thermophilum</i> , <i>B. lactis</i> , <i>B. longum ssp. infantis</i> , <i>B. longum ssp. longum</i>
<i>Enterococcus</i> sp.	<i>Ent. Faecalis</i> , <i>Ent. Faecium</i>
<i>Streptococcus</i> sp.	<i>S. cremoris</i> , <i>S. diacetylactis</i> , <i>S. intermedius</i> , <i>S. macedonicus</i> , <i>S. mitis</i> , <i>S. salivarius</i> , <i>S. sanguis</i> , <i>S. thermophilus</i>
<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bc. cereus</i> , <i>Bc. clausii</i> , <i>Bc. coagulans</i> , <i>Bc. licheniformis</i> , <i>Bc. mesentericus</i> , <i>Bc. subtilis</i>
Άλλα γαλακτικά βακτήρια	<i>Lactococcus lactis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>Pediococcus pentosaceus</i>
Άλλα βακτήρια	<i>Clostridium butyricum</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Propionibacterium freudenreichii</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae subsp. cerevisiae</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae subsp. boulardii</i>

Πίνακας 1 Μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται ως προβιοτικοί (Frakolaki, Giannou, et al. 2020)

1.5 Κριτήρια επιλογής προβιοτικών βακτηρίων

Είναι γνωστό ότι τα προβιοτικά αποτελούν αντικείμενο ερευνών παγκοσμίως, λόγω του αυξημένου ενδιαφέροντος από πλευράς των καταναλωτών και της χρήσης τους από τους επαγγελματίες υγείας. Έτσι είναι ωφέλιμο να προσδιοριστούν τα κριτήρια που απαιτούνται για την ορθή χρήση του όρου «προβιοτικό». Σύμφωνα με τη Διεθνή Επιστημονική Ένωση Προβιοτικών και Πρεβιοτικών (International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics, ISAPP), κάθε βακτηριακό στέλεχος, προκειμένου να χαρακτηριστεί προβιοτικό και να επιλεγεί για σχετική εφαρμογή πρέπει να είναι επαρκώς χαρακτηρισμένο, ασφαλές για την προβλεπόμενη χρήση

και να υποστηρίζεται από τουλάχιστον μία κλινική μελέτη σε ανθρώπους που να έχει διεξαχθεί με βάση ευρέως αποδεκτά επιστημονικά πρότυπα (ISAPP 2018).

Αρχικά, πρέπει να τεκμηριωθεί από τους κατασκευαστές προβιοτικών ότι το προβιοτικό είναι ασφαλές για χρήση σε τρόφιμα και συμπληρώματα διατροφής, μέσω ιστορικών ή πειραματικών δεδομένων. Ένα προβιοτικό στέλεχος πρέπει να συμμορφώνεται με τις απαιτήσεις ασφαλείας που ορίζονται από την εθνική/περιφερειακή ρυθμιστική αρχή (Binda et al. 2020).

Ορισμένα σημαντικά κριτήρια είναι να είναι ανθρώπινης προέλευσης, να παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στην οξύτητα των γαστρικών υγρών, τη χολή που εκκρίνεται στο ανώτερο πεπτικό σύστημα, και τα παγκρεατικά ένζυμα, ώστε να μπορούν να φτάσουν και να δράσουν στο λεπτό έντερο. Επιπλέον, πρέπει να είναι ικανά να προσκολλώνται στα εντερικά τοιχώματα και να έχουν, εάν είναι δυνατόν, αντιμεταλλαξιογόνες και αντικαρκινικές ιδιότητες (Frakolaki, Giannou, et al. 2020;).

Τέλος, τα προβιοτικά πρέπει να καλύπτουν ορισμένα τεχνολογικά κριτήρια.

Ορισμένα από αυτά είναι, η δυνατότητα παραγωγής τους σε μεγάλη κλίμακα, η ανθεκτικότητά τους σε αναερόβιες συνθήκες, η ενσωμάτωσή τους σε προϊόντα χωρίς την αρνητική επίδραση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών τους και η διατήρηση του προβιοτικού βακτηριακού φορτίου σε υψηλά και σταθερά επίπεδα.

Γενικά	Ιδιότητες
Κριτήρια ασφάλειας	<ul style="list-style-type: none"> - Προέλευση - Παθογένεια και μολυσματικότητα - Λοιμογόννοι παράγοντες: τοξικότητα, μεταβολική δραστηριότητα και τις εγγενείς ιδιότητες, π.χ. αντοχή στα αντιβιοτικά
Τεχνολογικά κριτήρια	<ul style="list-style-type: none"> - Γενετικά σταθερά στελέχη - Επιθυμητή επιβίωση κατά την επεξεργασία και τη συντήρηση - Καλές οργανοληπτικές ιδιότητες - Αντίσταση σε βακτηριοφάγους - Δυνατότητα παραγωγής σε μεγάλη κλίμακα
Λειτουργικά κριτήρια	<ul style="list-style-type: none"> - Ανθεκτικότητα στο γαστρικό οξύ - Ανθεκτικότητα στη χολή - Προσκόλληση στο βλεννογόνο του εντέρου - Τεκμηριωμένα οφέλη για την υγεία
Επιθυμητά φυσιολογικά κριτήρια	<ul style="list-style-type: none"> - Ρύθμιση της ανοσολογικής αντίδρασης - Ανταγωνιστική δραστηριότητα έναντι γαστρεντερικών παθογόνων, π.χ. <i>Helicobacter pylori</i>, <i>Candida albicans</i> - Μεταβολισμός χοληστερόλης - Μεταβολισμός λακτόζης - Αντιμεταλλαξιόνες και αντικαρκινικές ιδιότητες

Πίνακας 2 Κριτήρια επιλογής προβιοτικών βακτηρίων σε εμπορικές εφαρμογές (Shah, 2006; Morelli, 2007)

1.6 Μηχανισμός δράσης των προβιοτικών βακτηρίων

Οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί έχουν επιδείξει πολλές θεραπευτικές δυνατότητες έναντι μεγάλης ποικιλίας ασθενειών, χωρίς όμως να έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως οι μηχανισμοί δράσης τους. Ένας από τους μηχανισμούς αυτούς είναι η ικανότητά τους να δρουν ανταγωνιστικά ενάντια σε άλλους παθογόνους μικροοργανισμούς μέσω της παραγωγής αντιμικροβιακών ουσιών όπως βακτηριοσύνες και οργανικά οξέα (γαλακτικό οξύ, οξικό οξύ). Επιπλέον, μπορούν να προσκολλώνται στη βλεννογόνο περιορίζοντας τη διαθεσιμότητα σε θρεπτικά συστατικά σε άλλους μικροοργανισμούς. Επίσης, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ενίσχυση του

επιθηλιακού φραγμού και την ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή.

1.7 Παραδείγματα προβιοτικών τροφίμων

1.7.1 Γιαούρτι

Το γιαούρτι παρασκευάζεται συνήθως με τον εμβολιασμό παστεριωμένου γάλακτος με τα βακτήρια *Streptococcus thermophilus* και *Lactobacillus bulgaricus*. Μετά την ζύμωση, μπορεί να ακολουθήσει θερμική επεξεργασία η οποία σκοτώνει τα βακτήρια που προσδίδουν στο γιαούρτι τις προβιοτικές του ιδιότητες. Επομένως, δεν περιέχουν όλα τα γιαούρτια προβιοτικά συστατικά. Ένα παράδειγμα προβιοτικού γιαουρτιού που είναι δημοφιλές στην αγορά είναι το γιαούρτι Activia της εταιρίας Danone.



Εικόνα 1 Προβιοτικό γιαούρτι Activia (activia.gr)

1.7.2 Προβιοτικό γάλα

Μία καλή πηγή προβιοτικών αποτελεί το γάλα που καλλιεργείται με *Lactobacillus acidophilus*, γνωστό και ως “Acidophilus milk”. Σε ορισμένες χώρες, οι γιατροί συνιστούν το γάλα αυτό σε ασθενείς με διάφορες διαταραχές του γαστρεντερικού σωλήνα, όπως δυσκοιλιότητα, μη ελκώδης κολίτιδα και διάρροια.



Εικόνα 2 Low fat 1% Acidophilus milk της εταιρίας Smith Brothers Farms (smithbrothersfarms.com)

1.7.3 Φέτα

Η φέτα αποτελεί πολύ καλή πηγή προβιοτικών. Με επικρατέστερο είδος ανάμεσα στη μικροχλωρίδα της το προβιοτικό *Lactobacillus plantarum*, είναι προφανές ότι σε αυτή αποδίδονται πολλά προβιοτικά οφέλη. Σε αυτή έχουν βρεθεί και άλλα είδη λακτοβάκιλλων όπως είναι τα παρακάτω: *L. casei*, *L. paracasei subsp. paracasei*, *L. paracasei subsp. tolerans*, *L. plantarum*, *L. curvatus*, *L. Confusus* και *L. Brevis* (Litopoulou-Tzanetaki & Tzanetakakis, 2011).

1.7.4 Κεφίρ

Το κεφίρ είναι ένα μοναδικό γαλακτοκομικό προϊόν που έχει υποστεί ζύμωση. Τα προβιοτικά βακτήρια που περιλαμβάνει το ρόφημα αυτό είναι *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lactococcus lactis* και είδη *Leuconostoc*. Λόγω των ισχυριζόμενων πλεονεκτημάτων του για την υγεία του ανθρώπου, αποτελεί πολύ δημοφιλές και σημαντικό προβιοτικό προϊόν και οι έρευνες πάνω σε αυτό έχουν αυξηθεί. Ορισμένα από τα πλεονεκτήματα αυτά είναι η μείωση των συμπτωμάτων δυσανεξίας στη λακτόζη, τόνωση του ανοσοποιητικού συστήματος, μείωση της χοληστερόλης και αντιμεταλλαξιογόνες και αντικαρκινογόνες ιδιότητες.



Εικόνα 3 Lactose Free Probiotic Kefir Yoghurt της εταιρίας Table of plenty (tableofplenty.com)

1.8 Ενδεχόμενες ευεργετικές δράσεις στην υγεία του ανθρώπου

1.8.1 Θεραπεία και πρόληψη διάρροιας- δυσανεξία στη λακτόζη

Έχει αποδειχθεί ότι τα προβιοτικά μπορούν να λειτουργήσουν είτε θεραπευτικά είτε προληπτικά ενάντια στη διάρροια. Η θεραπευτικές επιδράσεις τους βασίζονται στη παραγωγή λακτάσης που έχει ως αποτέλεσμα την ανακούφιση συμπτωμάτων δυσανεξίας στη λακτόζη, στην ανακούφιση της δυσκοιλιότητας, τη θεραπεία της κολίτιδας και τόνωση της γαστρεντερικής ανοσίας. Επιπλέον, χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία της διάρροιας σε νήπια και κατά της διάρροιας των ταξιδιωτών κυρίως στις αναπτυσσόμενες χώρες. Παραδείγματα προβιοτικών που χρησιμοποιούνται για την θεραπεία της είναι τα είδη *Lactobacillus GG*, *Lactobacillus reuteri*, *S. Boulardii* και *Bifidobacteria spp.*

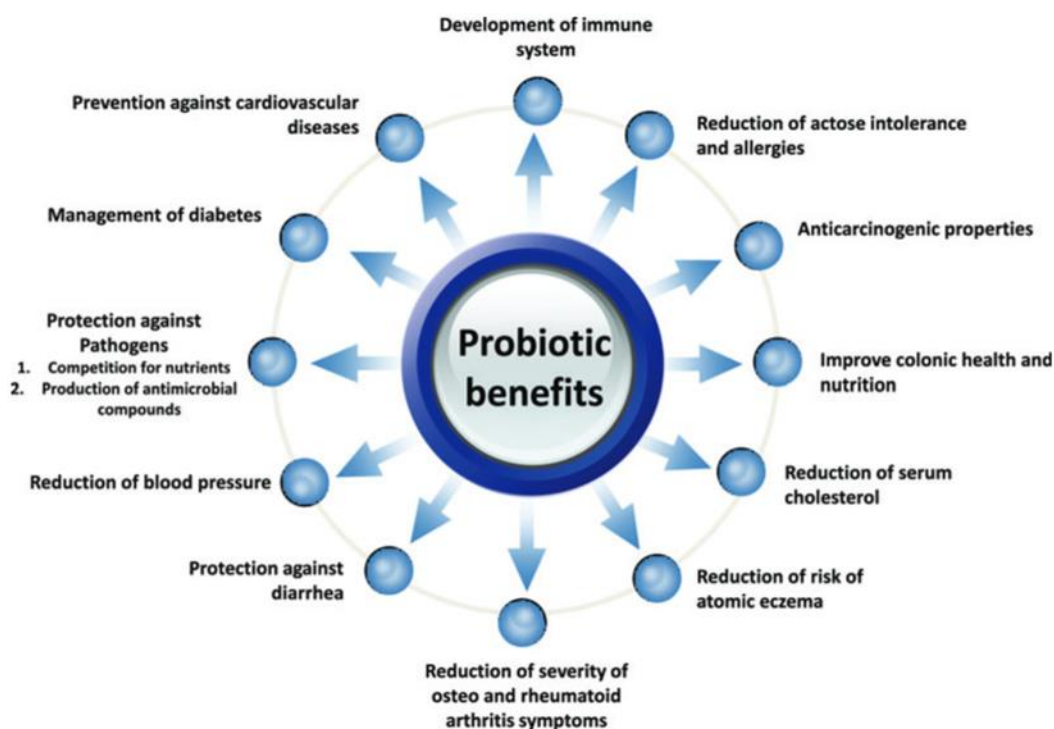
1.8.2 Αντικαρκινική δράση

Η φυσιολογική εντερική χλωρίδα μπορεί να επηρεάσει την καρκινογένεση μέσω της παραγωγής ενζύμων. Έρευνα σε ποντίκια έχει δείξει πως τα βακτηριακά ένζυμα αυτά καταστέλλονται με την χορήγηση του προβιοτικού βακτηρίου *Lactobacillus GG* (Drisko et al., 2003). Επίσης, έχει αποδειχθεί πως, σε ανθρώπους, το επίπεδο των

ενζύμων αυτών έχει μειωθεί με τη χορήγηση συμπληρωμάτων *Lactobacillus acidophilus* και *L. Casei* (Lidbeck et al., 1991).

1.8.3 Διαβήτης- παχυσαρκία

Μελέτες σε ζώα και ανθρώπους έχουν προτείνει ότι η χλωρίδα του εντέρου επηρεάζει την αύξηση του βάρους και την αντίσταση στην ινσουλίνη (Ley et al., 2006 Turnbaugh et al., 2006). Τα προβιοτικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ρυθμιστές της χλωρίδας του εντέρου για την πρόληψη και τη θεραπεία του διαβήτη και της παχυσαρκίας. Μελέτη έδειξε πως το προβιοτικό γιαούρτι dahi καταστέλλει δραματικά την αντίσταση στην ινσουλίνη που προκαλείται από τη διατροφή μέσω της ενίσχυσης του αντιοξειδωτικού συστήματος (Yadav et al., 2008). Επειδή όμως, οι περισσότερες μελέτες που έχουν δείξει πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα έχουν πραγματοποιηθεί σε ζώα ενώ οι μελέτες πάνω σε ανθρώπους με σημαντικά αποτελέσματα είναι πολύ λίγες, είναι σημαντική η διεξαγωγή περισσότερων μελετών.



Εικόνα 4 Επιδράσεις προβιοτικών μικροοργανισμών στην υγεία του ανθρώπου (Plessas, et al., 2012)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Το γένος *Bifidobacterium*

2.1 Ιστορικά στοιχεία

Βακτήρια του γένους *Bifidobacterium* χρησιμοποιούνται ευρέως, σήμερα, για την παραγωγή βιολειτουργικών τροφίμων και συγκεκριμένα προβιοτικών τροφίμων. Η ανακάλυψή τους έγινε πρώτη φορά από τον Henri Tissier, έναν Γάλλο παιδίατρο στο Ινστιτούτο Παστέρ στο Παρίσι το 1899. Ο Tissier απομόνωσε ένα ραβδοειδές, Gram θετικό βακτήριο από την εντερική μικροχλωρίδα βρεφών που θήλαζαν. Σε αυτό απέδωσε την ονομασία *Bacillus bifidus communis*. Σήμερα, το βακτήριο που απομονώθηκε από τον Tissier αναφέρεται ως *Bifidobacterium bifidum* Ti. Αργότερα, ο βραβευμένος με Νόμπελ, βιολόγος Elie Metchnikoff ενσωμάτωσε τα βακτήρια που ανακαλύφθηκαν από τον Tissier στις θεωρίες του για τη μακροζωία. Υποστήριζε ότι η βελτίωση της υγείας και η μακροζωία μπορούν να είναι αποτέλεσμα της κατανάλωσης γαλακτοβάκιλλων και άλλων βακτηρίων που περιέχονται σε προϊόντα που έχουν υποστεί γαλακτική ζύμωση, όπως το γιαούρτι, το κεφίρ και το ξινόγαλο.

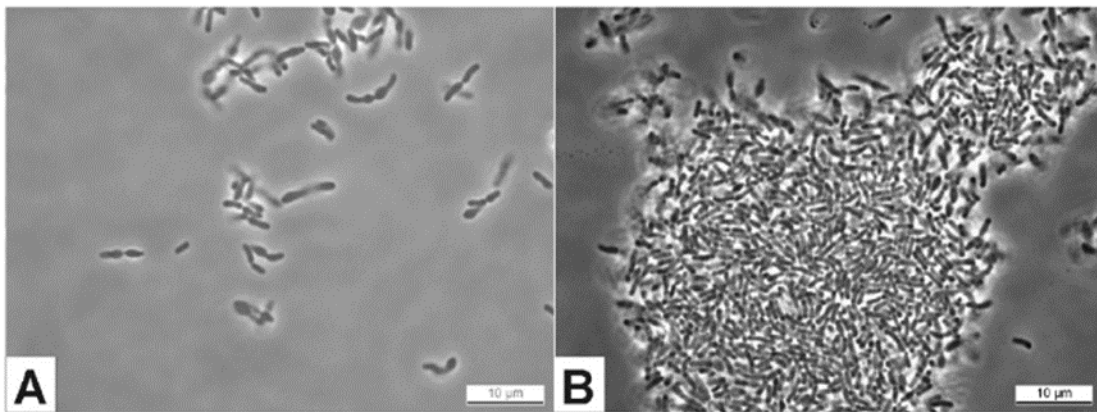
Κατά τη διάρκεια του 20ου αιώνα, τα είδη του γένους *Bifidobacterium* ταξινομούσαν σε πάνω από 10 διαφορετικά γένη. Μερικά από τα ονόματα γενών ήταν *Bacillus*, *Tisseria*, *Lactobacillus* και *Bifidobacterium*. Στη συνέχεια, ταξινομήθηκαν ως μέλη του γένους *Lactobacillus* εξαιτίας των παρόμοιων μορφολογικών χαρακτηριστικών που μοιράζονται με τους γαλακτοβάκιλλους. Πρόσφατα το γένος *Bifidobacterium* έχει αναγνωριστεί ως διαφορετικό από το γένος *Lactobacillus*. Άλλα ονόματα γενών στα οποία είχαν αποδοθεί τα είδη αυτά ήταν *Bacteroides*, *Bacterium*, *Nocardia*, *Actynomices*, *Actinobacterium*, *Cohnistreptothrix* και *Corynebacterium*.

2.2 Χαρακτηριστικά του γένους *Bifidobacterium*

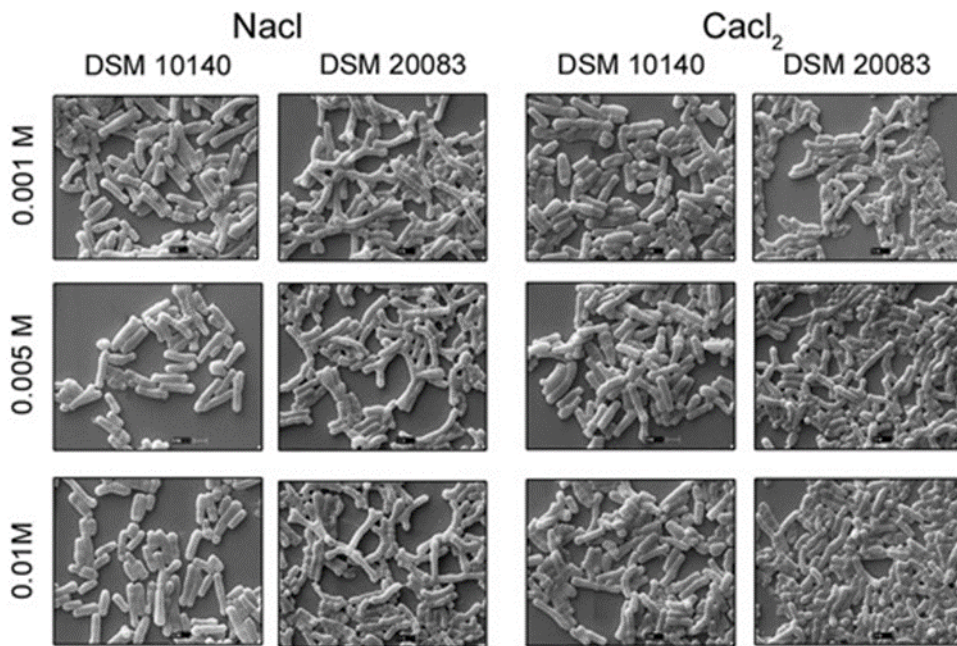
2.2.1 Μορφολογία

Το *Bifidobacterium* είναι ένα γένος θετικών κατά Gram, μη σπορογόνων, χωρίς μηχανισμό κίνησης βακτηρίων. Τα βακτήρια αυτά είναι γνωστά για την ιδιαίτερη

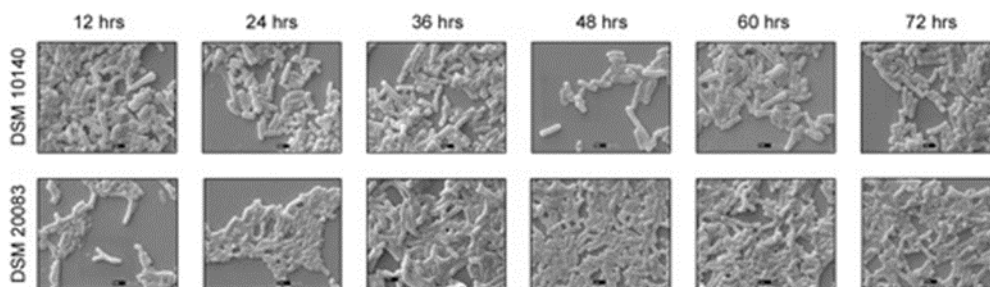
κυτταρική μορφολογία τους καθώς το γένος περιλαμβάνει είδη με δικό τους διαφορετικό σχήμα. Συγκεκριμένα, μπορούν να εμφανιστούν ως λεπτά μικρού μήκους με αιχμηρά άκρα, κοκκοειδή, επιμήκη, με μικρά κοιλώματα ή προεξοχές και με πολλαπλές διακλαδώσεις και διογκώσεις στο ένα ή και στα δύο άκρα του κυττάρου. Σε ορισμένα είδη τα κύτταρα σχηματίζουν συσσωματώματα ή διατάσσονται σε σχήμα V, κυρίως όταν αναπτύσσονται υπό δυσμενείς συνθήκες. Επιπλέον, η κυτταρική μορφολογία επηρεάζεται από τις καλλιεργητικές συνθήκες. Ο τρόπος διάταξης των συσσωματωμάτων σε συγκεκριμένο υπόστρωμα είναι χαρακτηριστικό του κάθε είδους και βοηθά για τη ταυτοποίησή τους. Στα περισσότερα είδη, μεγαλύτερη σημασία για τη κατάταξη έχει ο σχηματισμός που δημιουργείται από την αλληλουχία των κυττάρων, παρά το ίδιο το κυτταρικό σχήμα (Σπηλιώτης, 2014). Όπως απεικονίζεται παρακάτω, στις εικόνες 2,3 και 4, τα βακτήρια τα οποία καλλιεργήθηκαν υπό διαφορετικές συνθήκες διατήρησαν το χαρακτηριστικό σχήμα τους (Το *B. adolescentis* το δισχιδές σχήμα V και το *B. animalis* το σχήμα ράβδου), όμως η αλληλουχία των κυττάρων αλλάζει με την αλλαγή των συνθηκών. Τέλος, τα κύτταρα έχουν διάμετρο από 0,5μm έως 1,3μm και μήκος από 1,5μm έως 8,0μm.



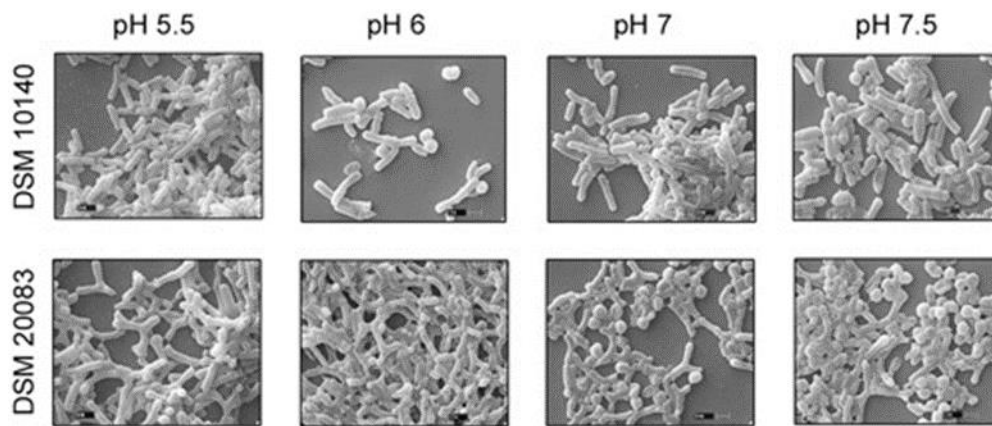
Εικόνα 5 Συσσωματωμένη συστάδα κυττάρων *Bifidobacterium* RBL67 σε υγρή καλλιέργεια MRS-C μετά από 24 ώρες ανάπτυξης στους 37°C (Leo Meile, 2007)



Εικόνα 6 Η μορφολογία των στελεχών DSM 10140 (*B. animalis subspp. lactis*) και DSM 20083 (*B. adolescentis*) υπό διαφορετικές συγκεντρώσεις αλάτων. (Dhanashree, 2017)



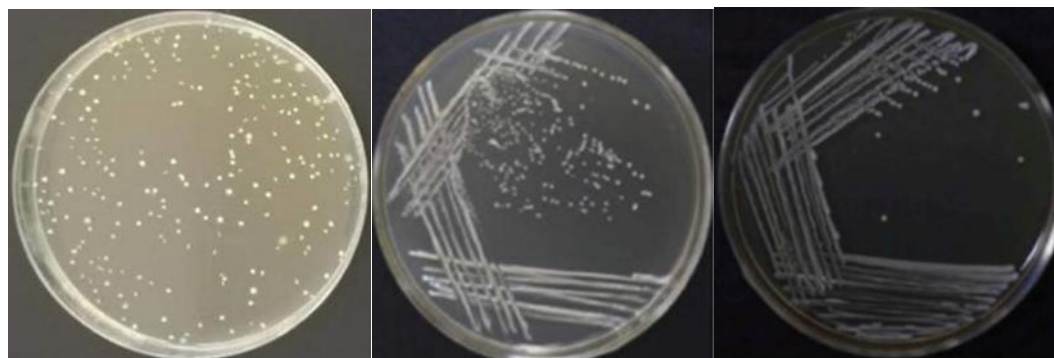
Εικόνα 7 Η μορφολογία των στελεχών DSM 10140 (*B. animalis subspp. lactis*), DSM 20083 (*B. adolescentis*) όταν καλλιεργούνται για διαφορετικά χρονικά διαστήματα (Dhanashree, 2017)



Εικόνα 8 Η μορφολογία των στελεχών *DSM 10140* (*B. animalis* subspp. *lactis*), *DSM 20083* (*B. adolescentis*) υπό διαφορετικές συνθήκες pH (*Dhanashree, 2017*)

2.2.2 Καλλιέργεια

Η καλλιέργεια των βακτηρίων του γένους *Bifidobacterium* συνήθως γίνεται στα θρεπτικά υποστρώματα TPY (trypticase, rhytone, yeast) και MRS (Mam-Ragosa-Sharp). Στο υπόστρωμα TPY τα διάφορα είδη παρουσιάζουν πάντα συγκεκριμένη κυττατική μορφολογία (Σπηλιώτης, 2014). Σε διαφορετικά υποστρώματα, όμως, τα χαρακτηριστικά της αποικίας κάθε είδους μπορούν να είναι διαφορετικά.



Εικόνα 9 Σχηματισμός αποικίας *Bifidobacterium lactis* σε υπόστρωμα MRS (κυρτές, κυκλικές, γαλακτόλευκες αποικίες, 1 έως 2 mm με ολόκληρα άκρα και λεία επιφάνεια) (WenjunLiu, 2020)

Εικόνα 1 Σχηματισμός αποικίας *Bifidobacterium longum* σε υπόστρωμα TSA (1,5–3,0 mm, αδιαφανές/γυαλιστερό, λευκό) (Hülya Demir)

Εικόνα 11 Σχηματισμός αποικίας *Bifidobacterium animalis* σε υπόστρωμα MRS (1,5 mm, λεία, γυαλιστερή, λευκή) (Hülya Demir)

2.2.3 Ταξινόμηση

Για πολλά χρόνια τα *bifidobacteria* περιλαμβάνονταν στο γένος *Lactobacillus* εξαιτίας πολλών κοινών μορφολογικών χαρακτηριστικών που μοιράζονται. Σε στερεά θρεπτικά υποστρώματα, οι αποικίες των *bifidobacteria* μοιάζουν πολύ με εκείνες των γαλακτοβάκιλλων. Ωστόσο, διαχωρίστηκαν διότι δεν σχετίζονται στενά με κανένα από τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος που χρησιμοποιούνται στην παραγωγή τροφίμων που έχουν υποστεί ζύμωση. Ένα αξιοσημείωτο παράδειγμα για τη διάκριση των *bifidobacteria* από τους γαλακτοβάκιλλους είναι η χαρακτηριστική ύπαρξη του ενζύμου φρουκτόζη-6-φωσφορική φωσφοκετολάση (F6PPK). Τα *bifidobacteria* έχουν αυτό το ένζυμο, οι γαλακτοβάκιλλοι όμως όχι. Το 1900, ο Tissier πρότεινε την ένταξη του *Bacillus bifidus* (σήμερα γνωστό ως *Bifidobacterium bifidum*) στην οικογένεια *Lactobacillaceae*. Στη συνέχεια, όμως, τα *bifidobacteria* αναταξινομήθηκαν και ορίστηκε το γένος *Bifidobacterium* στην 8η έκδοση του Bergey's Manual of Determinative Bacteriology χρησιμοποιώντας το ίδιο όνομα που αρχικά υιοθετήθηκε από τον Orla-Jensen. Το γένος τότε, περιελάμβανε

οκτώ είδη και περιλαμβανόταν στην οικογένεια των *Actinomycetaceae* της τάξης *Actinomycetales*.

Σήμερα, η ταξινόμηση του είδους είναι η εξής:

- Βασίλειο: *Bacteria*
- Φύλο: *Actinobacteria*
- Κλάση: *Actinomycetia*
- Τάξη: *Bifidobacteriales*
- Οικογένεια: *Bifidobacteriaceae*
- Γένος: *Bifidobacterium*

Το γένος *Bifidobacterium*, το οποίο είναι μέλος της οικογένειας *Bifidobacteriaceae* και της τάξης των *Bifidobacteriales*, ανήκει στο φύλο *Actinobacteria*, μίας από τις μεγαλύτερες βακτηριακές ταξινομικές ομάδες. Στα ακτινοβακτήρια περιλαμβάνονται θετικοί κατά Gram μικροοργανισμοί με υψηλή περιεκτικότητα σε G + C DNA που κυμαίνεται μεταξύ 51 και 70%. Στο φύλο αυτό περιλαμβάνεται μεγάλος αριθμός ειδών διαφορετικών μορφολογιών και μεταβολικών ιδιοτήτων. Μεταξύ αυτών είναι και το γένος *Bifidobacterium*. Άλλα γένη που ανήκουν στην οικογένεια *Bifidobacteriaceae* είναι τα *Aeriscardovia*, *Falcivibrio*, *Gardnerella*, *Parascardovia* και *Scardovia*.

2.3 Ευαισθησία- Ανθεκτικότητα σε φυσικοχημικούς παράγοντες

2.3.1 Επίδραση της θερμοκρασίας

Τα *bifidobacteria* είναι μεσόφιλοι μικροοργανισμοί με άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης του 37-41 °C εκτός από το *Bifidobacterium mongoliense*, το οποίο εμφανίζει βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης 30°C. Η ελάχιστη θερμοκρασία ανάπτυξης είναι 25–28 °C με εξαίρεση τα *Bifidobacterium mongoliense* και *Bifidobacterium psychraerophilum*, τα οποία μπορούν να αναπτυχθούν στους 15°C και 8°C, αντίστοιχα και η μέγιστη είναι 43–45 °C με εξαίρεση το *Bifidobacterium thermacidophilum*, το οποίο εμφανίζει μέγιστη θερμοκρασία ανάπτυξης 49,5°C. Τα

περισσότερα στελέχη *Bifidobacterium* που προέρχονται από ανθρώπους έχει αναφερθεί ότι αναπτύσσονται βέλτιστα σε θερμοκρασία 36–38 °C, ενώ τα ζωικά στελέχη αναπτύσσονται βέλτιστα στους 41–43 °C (Dong, Xin, Jian, Liu, & Ling, 2000).

2.3.2 Επίδραση του pH

Το βέλτιστο pH για την ανάπτυξη των *bifidobacteria* είναι 6,5–7,0. Σε pH μικρότερου του 4,5-5,0 και μεγαλύτερου του 8,0-8,5 δεν παρατηρείται ανάπτυξη με εξαίρεση το *Bifidobacterium thermacidophilum*, το οποίο μπορεί να αναπτυχθεί σε pH 4,5 και τα στελέχη *Bifidobacterium lactis* και *Bifidobacterium animalis* που μπορούν να αναπτυχθούν ακόμη και σε pH 3,5.

2.3.3 Επίδραση του οξυγόνου

Τα *Bifidobacteria* περιγράφονται κυρίως ως αυστηρά αναερόβια, μερικά από αυτά όμως μπορούν να αναπτυχθούν υπό μικροαερόφιλες συνθήκες. Η τοξικότητα του οξυγόνου οφείλεται κυρίως στη παραγωγή H_2O_2 , και άλλων δραστικών ριζών οξυγόνου, από την NADPH-οξειδάση. Η ευαισθησία διαφέρει από είδος σε είδος. Έτσι, τα *Bifidobacteria* μπορούν να ταξινομηθούν σε τέσσερις ομάδες: υπερευαίσθητα σε O_2 (5% ευαίσθητα στο O_2), ευαίσθητα στο O_2 (10% ευαίσθητα στο O_2), ανθεκτικά στο O_2 (21% ανεκτικά), και υπερανεκτικά O_2 (μικροαερόφιλά) (Kunifusa Tanaka, 2018). Τα στελέχη που εμφανίζουν ανθεκτικότητα διαθέτουν σύμπλεγμα ενζύμων που βοηθούν στην αποτοξίνωση από το H_2O_2 .

2.4 Πηγές *Bifidobacterium*

Τα *bifidobacteria* έχουν αυστηρές απαιτήσεις σε θρεπτικά συστατικά με αποτέλεσμα να αναπτύσσονται ελάχιστα σε περιβάλλοντα έξω από το έντερο ζώων και ανθρώπων. Ορισμένα είδη πιστεύεται πως είναι αυστηρά ανθρώπινης προέλευσης, ενώ άλλα έχει προτεθεί ότι συνδέονται αποκλειστικά με περιττώματα ζώων (Regina Lamendella, 2008). Γενικά, τα *bifidobacteria* θα μπορούσαν να κατηγοριοποιηθούν σε δύο ομάδες με βάση τη προέλευσή τους. Συγκεκριμένα, τα είδη που απαντώνται φυσικά στον ανθρώπινο γαστρεντερικό σωλήνα αναφέρονται ως Human-Residential Bifidobacteria (HRB), ενώ άλλα είδη που είναι οι φυσικοί κάτοικοι των ζώων ή του περιβάλλοντος ως non-HRB (Chyn Boon Wong, 2020).

2.4.1 Άνθρωπος

Τα μέλη του γένους *Bifidobacterium* μπορούν να περιγραφούν ως μερικά από τα πιο κοινά καθώς και ωφέλημα βακτήρια στον εντερικό σωλήνα του ανθρώπου.

Κατοικούν φυσικά στον γαστρεντερικό σωλήνα σε όλα τα στάδια της ηλικίας.

Ωστόσο, ο πληθυσμός τους μειώνεται με τον απογαλακτισμό και την ηλικία.

Τα *Bifidobacteria* ανθρώπινης προέλευσης (HRB) μπορούν να διαχωριστούν σε δύο υποκατηγορίες, τα HRB βρεφικού τύπου και τα HRB ενήλικου τύπου. Τα κυρίαρχα είδη στο έντερο βρεφών είναι τα *B. breve*, *B. longum subsp. infantis*, *B. longum subsp. longum* και *B. bifidum* ενώ τα *B. adolescentis*, *B. catenulatum*, *B. pseudocatenulatum*, *B. longum subsp. longum* είναι τα κυρίαρχα είδη στο έντερο των ενηλίκων. Ωστόσο, η διαίρεση αυτή δεν είναι απόλυτη αφού ορισμένα είδη, όπως είναι το *B. longum subsp. longum* εντοπίζονται τόσο στο έντερο βρεφών, όσο και στον ενηλίκων.

Στη βρεφική ηλικία, τα *Bifidobacteria* καλύπτουν πολύ μεγάλο ποσοστό της εντερικής μικροχλωρίδας. Στο στάδιο του θηλασμού προέρχονται κυρίως από το μητρικό γάλα το οποίο είναι πλούσιο σε *Bifidobacteria*. Στη συνέχεια, με τη πρόσληψη στερεάς τροφής και την ενηλικίωση, ο πληθυσμός τους μειώνεται σταδιακά με την ηλικία και αλλάζει σε επίπεδο είδους. Παρά, όμως, την μείωση του πληθυσμού, εξακολουθούν να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην υγεία του ανθρώπου. Ειδικότερα, τα *Bifidobacteria* που επικρατούν στο έντερο ενηλίκων ανθρώπων, φαίνεται να διευκολύνουν το μεταβολισμό σύνθετων υδατανθράκων, για το μεταβολισμό των οποίων δεν διατίθενται ένζυμα από το έντερο ή από άλλα βακτήρια.

2.4.2 Ζώα- Περιβάλλον

Τα είδη *Bifidobacterium* μη ανθρώπινης προέλευσης αναφέρονται ως non-HRB.

Περιλαμβάνουν τα *B. animalis subsp. animalis*, *B. animalis subsp. lactis*, *B.*

thermophilum, *B. pseudolongum* κ.α. Ορισμένα από αυτά, παρουσιάζουν

προσαρμογή, αποκλειστικά στο έντερο ενός συγκεκριμένου ζώου. Για παράδειγμα,

τα είδη *B. magnum* και *B. cuniculi* έχουν εντοπιστεί σε κόπρانا κουνελιού, τα είδη

B. pullorum και *B. gallinarum* στο έντερο κοτόπουλου και *B. longum subsp. suis* στα

κόπρανα χοιριδίων. Ο διαχωρισμός αυτός, έχει προτεθεί ότι σχετίζεται με το περιβάλλον, τη διατροφή, την ηλικία και το είδος ζώων- ξενιστών. Επιπλέον, τα *Bifidobacteria* εντοπίζονται και σε άλλα περιβάλλοντα εκτός του εντέρου όπως λύματα και προϊόντα διατροφής. Συγκεκριμένα, το *B. animalis subsp. lactis*, το οποίο προέρχεται και απομονώνεται από έντερο ζώων και συνήθως ενσωματώνεται σε γαλακτοκομικά προϊόντα, έχει εντοπιστεί επίσης και στα ανθρώπινα κόπρανα. Η ανίχνευσή του μπορεί να οφείλεται στην κατανάλωση τέτοιων προϊόντων, ακόμα και αν δεν αποτελεί μέρος του μικροβιώματος του ανθρώπινου εντέρου. Γενικά, η ταυτοποίηση των *Bifidobacteria* σε αυτά τα περιβάλλοντα μπορεί να συνδεθεί με μόλυνση ζωικής ή ανθρώπινης εντερικής προέλευσης.

Είδη	Προέλευση
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	Εντερικό σύστημα ενηλίκων
<i>Bifidobacterium animalis subsp. animalis</i>	Ζωικά κόπρανα
<i>Bifidobacterium animalis subsp. lactis</i>	Γιαούρτι
<i>Bifidobacterium asteroides</i>	Επιγάστριο μελισσών
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Βρεφικά κόπρανα
<i>Bifidobacterium breve</i>	Βρεφικά κόπρανα
<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	Εντερικό σύστημα ενηλίκων
<i>Bifidobacterium coryneforme</i>	Επιγάστριο μελισσών
<i>Bifidobacterium cuniculi</i>	Κόπρανα κονίκλων
<i>Bifidobacterium gallicum</i>	Ανθρώπινα κόπρανα
<i>Bifidobacterium gallinarum</i>	Εντερικό σύστημα κοτόπουλων
<i>Bifidobacterium indicum</i>	Επιγάστριο μελισσών
<i>Bifidobacterium longum biotype longum</i>	Εντερικό σύστημα ενηλίκων
<i>Bifidobacterium longum biotype infantis</i>	Εντερικό σύστημα βρεφών
<i>Bifidobacterium magnum</i>	Κόπρανα κονίκλων
<i>Bifidobacterium merycicum</i>	Προστόμαχος βοοειδών
<i>Bifidobacterium minimum</i>	Υγρά απόβλητα
<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	Βρεφικά κόπρανα
<i>Bifidobacterium pseudolongum subsp. Pseudolongum</i>	Κόπρανα χοίρων
<i>Bifidobacterium pseudolongum subsp. globosum</i>	Προστόμαχος βοοειδών
<i>Bifidobacterium psychraerophilum</i>	Κόπρανα χοίρων
<i>Bifidobacterium pullorum</i>	Εντερικό σύστημα κοτόπουλων
<i>Bifidobacterium ruminantium</i>	Προστόμαχος βοοειδών
<i>Bifidobacterium scardovii</i>	Ανθρώπινο αίμα
<i>Bifidobacterium subtile</i>	Υγρά απόβλητα
<i>Bifidobacterium thermacidophilum subsp. Thermacidophilum</i>	Λύματα
<i>Bifidobacterium thermacidophilum subsp. Porcinum</i>	Κόπρανα χοίρων
<i>Bifidobacterium thermophilum</i>	Κόπρανα χοίρων

Πίνακας 3 Προέλευση κάποιων ειδών *Bifidobacteria*, (Κωνσταντίνου, 2018)

2.5 Μεταβολισμός υδατανθράκων- Η οδός “bifid shunt”

Τα *Bifidobacteria* είναι σακχαρολυτικοί μικροοργανισμοί που παράγουν οξικό και γαλακτικό οξύ από την ζύμωση της γλυκόζης, της γαλακτόζης και της φρουκτόζης, χωρίς να παράγουν διοξείδιο του άνθρακα, εκτός από τη περίπτωση του γλουκονικού οξέος. Με τα παραπάνω προϊόντα, παράγονται και μικρές ποσότητες φορμικού και ηλεκτρικού οξέος και αιθανόλης, ενώ δεν παράγονται βουτυρικό και προπιονικό οξύ (Σπηλιώτης, 2014). Ορισμένα είδη μπορούν να ζυμώσουν τη λακτόζη και να αναπτυχθούν στο γάλα. Επιπλέον, έρευνα έχει δείξει ότι το *B. bifidum* μπορεί να παράγει β-γαλακτοσιδάση χρησιμοποιώντας την λακτόζη. Αναφέρεται επίσης ότι το *B. animalis DN-173 010* μπορεί να αναπτύσσεται στο γάλα χρησιμοποιώντας τη λακτόζη ως υπόστρωμα (Van der Meulen, Avonts, & De Vuyst, 2004).

Τα *bifidobacteria* μεταβολίζουν μη αφομοιώσιμους ολιγοσακχαρίτες (εξόζες) στο παχύ έντερο χρησιμοποιώντας την οδό «bifid shunt» (Εικόνες 12, 13).

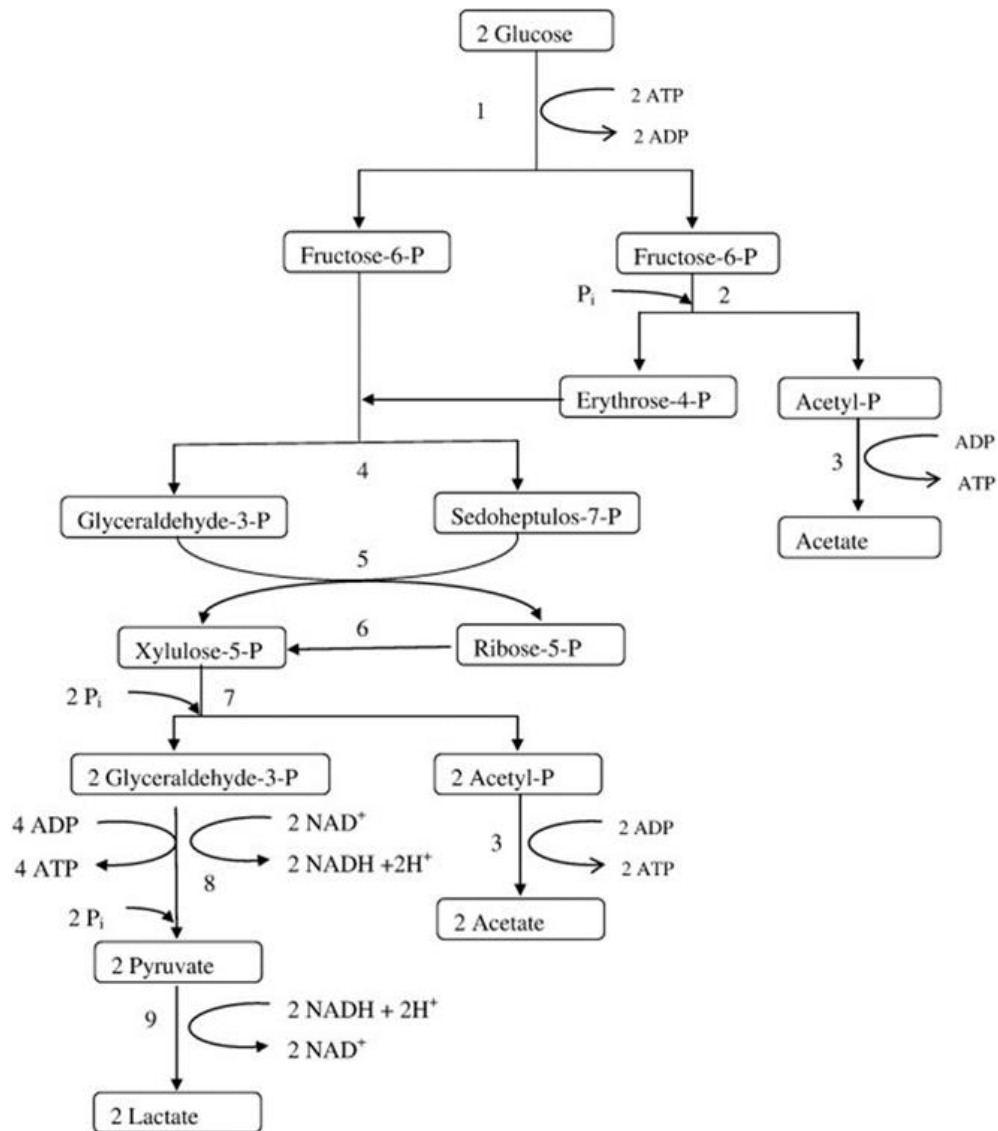


Εικόνα 12 Μεταβολισμός γλυκόζης μέσω της οδού «bifid shunt»- σύντομη αντίδραση (Ryuichiro Suzuki 2010)

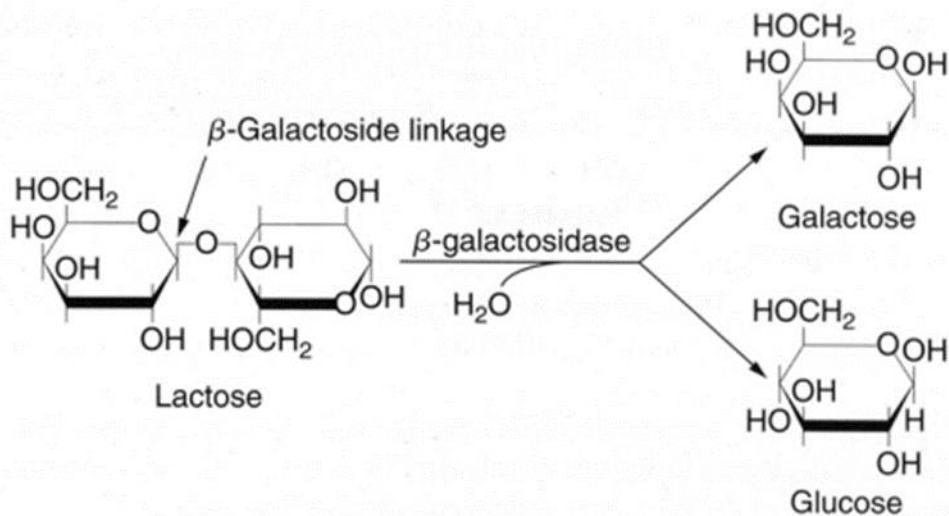
Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό τους είναι η ύπαρξη του ενζύμου F6PPK, το οποίο υπάρχει ενδοκυτταρικά, και μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως μέσο ταυτοποίησής τους από άλλα βακτήρια όπως οι γαλακτοβάκιλλοι.

Αρχικά, η γλυκόζη μετατρέπεται σε 6-φωσφορική φρουκτόζη και 6-φωσφορική γλυκόζη. Η φωσφοκετολάση της 6-φωσφορικής φρουκτόζης διασπά τη 6-φωσφορική φρουκτόζη σε 4-φωσφορική ερυθρόζη και φωσφορικό ακετυλεστέρα. Η 4-φωσφορική ερυθρόζη αντιδρά με ένα άλλο μόριο 6-φωσφορικής φρουκτόζης μέσω ενός πολύπλοκου μηχανισμού για να δώσει 3-φωσφορική γλυκεραλδεΐδη και περισσότερο φωσφορικό ακετυλεστέρα. Η 3-φωσφορική γλυκεραλδεΐδη μετατρέπεται σε γαλακτικό οξύ ενώ ο φωσφορικός ακετυλεστέρας σε οξικό οξύ. Επομένως, θεωρητικά, μέσω της οδού «bifid shunt», παράγονται 2 mol γαλακτικού και 3 mol οξικού οξέος από τη ζύμωση 2 mol γλυκόζης. Επιπλέον, η οδός «bifid shunt» αποδίδει 5 μόρια ATP για κάθε 2 μόρια γλυκόζης. Ωστόσο, κατά τη διάρκεια του μεταβολισμού της λακτόζης, αρχικά διασπάται σε γλυκόζη και γαλακτόζη από

τη β-γαλακτοσιδάση και στη συνέχεια η γαλακτόζη μετατρέπεται σε 6- φωσφορική φρουκτόζη μέσω της οδού Leloir στην κύρια οδό του μεταβολισμού της γλυκόζης. Προτείνεται επίσης ότι οι αναλογίες των τελικών προϊόντων ζύμωσης ποικίλλουν σημαντικά από το ένα στέλεχος στο άλλο και επίσης εξαρτώνται από την πηγή άνθρακα που χρησιμοποιείται (P.H.P.Prasanna 2014).



Εικόνα 13 Μεταβολισμός γλυκόζης μέσω της οδού «bifid shunt»- αναλυτική αντίδραση (P.H.P.Prasanna 2014)



Εικόνα 14 Μεταβολισμός της λακτόζης σε γλυκόζη και γαλακτόζη από τη β -γαλακτοσιδάση (www.biology.uoc.gr)

2.6 Παραγωγή εξωπολυσακχαριτών

Οι εξωπολυσακχαρίτες (EPS) είναι μεγάλα πολυμερή υψηλού μοριακού βάρους που εκκρίνονται από μικροοργανισμούς. Τα βασικά συστατικά τους είναι οι υδατάνθρακες και οι πρωτεΐνες μαζί με τα νουκλεϊκά οξέα, τα λιπίδια και άλλα κυτταρικά συστατικά. Πολλά είδη μικροοργανισμών, είναι γνωστό ότι παράγουν EPS, όπως θετικά και αρνητικά κατά Gram βακτήρια, μύκητες, Αρχαία κ.α. Περιβάλλουν την κυτταρική επιφάνεια των μικροοργανισμών και έχει αποδειχθεί πως μπορούν να έχουν θετικό αντίκτυπο στην υγεία του ανθρώπου λόγω της δράσης τους ως αντιφλεγμονώδη, αντιοξειδωτικά και αντικαρκινικά. Για το λόγο αυτό έχουν χρησιμοποιηθεί κυρίως σε προϊόντα διατροφής και φαρμακευτικά, ιατρικά και καλλυντικά προϊόντα καθώς και ως γαλακτωματοποιητές και παράγοντες πάχυνσης στο τομέα τροφίμων. Υπάρχει έντονη εστίαση ενδιαφέροντος στον τομέα των EPS που παράγονται από προβιοτικά βακτήρια όπως είναι τα *bifidobacteria* και οι γαλακτοβάκιλλοι. Μεταξύ άλλων, ορισμένα από τα πιθανά πλεονεκτήματα των EPS που παράγονται από προβιοτικά βακτήρια είναι η αναστολή της δραστηριότητας παθογόνων μικροοργανισμών μέσω της μείωσης της προσκόλλησης των κυττάρων και η διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος.

Όπως πολλά άλλα βακτήρια, τα *bifidobacteria* παράγουν EPS, σε μικρότερο όμως βαθμό. Ορισμένα είδη που παράγουν EPS είναι τα *B. animalis*, *B. breve*, *B. longum*, *B. bifidum*, *B.*

infantis, *B. pseudocatenuatum* και *B. adolescentis*. Ωστόσο, οι πληροφορίες σχετικά με τις φυσικοχημικές, ρεολογικές και γαλακτωματοποιητικές ιδιότητές τους δεν επαρκούν για την χρήση τους στον τομέα των τροφίμων. Μελέτες έχουν δείξει πως οι ευεργετικές δράσεις τους μπορεί να σχετίζονται με την ενίσχυση της βακτηριακής προσκόλλησης. In vitro έρευνα έδειξε ότι ορισμένα *bifidobacteria* που παράγουν EPS μπόρεσαν να αυξήσουν την προσκόλλησή τους. Το χαρακτηριστικό αυτό υποδεικνύει πως θα μπορούσαν να υπάρξουν στενότερες αλληλεπιδράσεις μεταξύ βακτηρίων και εντερικής βλεννογόνου. Επιπλέον, ο σχηματισμός βιοφίλμ θα μπορούσε να έχει θετικές επιδράσεις στην επιβίωση των *bifidobacteria* υπό τις δυσμενείς συνθήκες του γαστρεντερικού σωλήνα με αποτέλεσμα την αύξηση του βακτηριακού πληθυσμού. Μελέτη σε αρουραίους έδειξε πως μετά την από στόματος χορήγηση στελεχών *bifidobacteria* που παράγουν EPS ο συνολικός πληθυσμός των *bifidobacteria* αυξήθηκε σημαντικά και ήταν σε θέση να τροποποιήσει την εντερική μικροχλωρίδα. Η παραγωγή EPS είναι ένα σχετικά νέο χαρακτηριστικό στο γένος *Bifidobacterium* και οι μηχανισμοί δράσεις τους παραμένουν ασαφείς. Επομένως, υπάρχει ανάγκη για περισσότερη έρευνα πάνω στα EPS που παράγονται από τα *bifidobacteria*.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Εφαρμογές του γένους *Bifidobacterium* σε προβιοτικά τρόφιμα

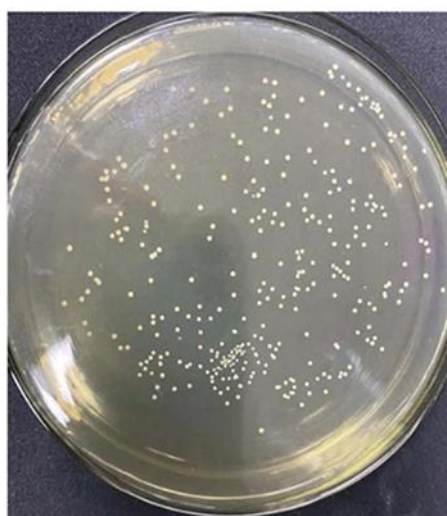
3.1 Εισαγωγή

Το γένος *Bifidobacterium* έχει αποδειχθεί εξαιρετικά χρήσιμο για την βιομηχανία τροφίμων με αυξανόμενο εμπορικό ενδιαφέρον. Τα κύρια είδη που χρησιμοποιούνται από τη βιομηχανία για τη παραγωγή τροφίμων είναι τα *B. longum*, *B. breve*, *B. animalis* και *B. bifidum*. Τα πιθανά πλεονεκτήματα για την υγεία που παρουσιάζει η κατανάλωση τροφίμων που περιέχουν τα προβιοτικά αυτά βακτήρια έχει ως αποτέλεσμα την πραγματοποίηση πολλών μελετών για την ανάπτυξη νέων προϊόντων. Η ευαισθησία του γένους όμως στις διάφορες συνθήκες επεξεργασίας και αποθήκευσης αποτελεί εμπόδιο για την ενσωμάτωση των κυττάρων χωρίς την χρήση κάποιας εναλλακτικής μεθόδου όπως είναι η μικροενθυλάκωση. Παρόλες τις δυσκολίες όμως έχουν καταφέρει να αναπτυχθούν πολλά προβιοτικά προϊόντα που φιλοξενούν τα *Bifidobacteria*, κυρίως γαλακτοκομικά.

3.2 Τα κύρια είδη *Bifidobacterium* που χρησιμοποιούνται για τη παραγωγή τροφίμων

3.2.1 Το *Bifidobacterium longum*

Το *Bifidobacterium longum* είναι ένα από τα 80 είδη που ανήκουν στο γένος *Bifidobacterium*. Έχει σχήμα ράβδου και είναι αναερόβιο, μπορεί όμως να αναπτυχθεί και σε μικροαερόφιλο περιβάλλον. Κατά την ανάπτυξή του υπό αναερόβιες συνθήκες σε θρεπτικό υπόστρωμα MRS το στέλεχος σχηματίζει κυκλικές, με λεία και γυαλιστερή επιφάνεια και κυρτό σχήμα αποικίες όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 15.



Εικόνα 15 Το *B. longum* subsp. *longum* σε θρεπτικό υπόστρωμα MRS, (Li Zhao 2021)

Το *B. longum* αποικίζει στον ανθρώπινα γαστρεντερικό σωλήνα και τον κόλπο. Στον γαστρεντερικό σωλήνα βρεφών, ειδικά εκείνων που θηλάζουν, μαζί με άλλα είδη *Bifidobacterium*, κυριαρχούν καλύπτοντας ένα πολύ μεγάλο ποσοστό των βακτηρίων του της τάξης του 90%. Στον γαστρεντερικό σωλήνα όμως ενός ενήλικου ανθρώπου, το ποσοστό αυτό μειώνεται σταδιακά με την ηλικία εξαιτίας του ανταγωνιστικού χαρακτήρα άλλων βακτηρίων που καταλήγουν να κυριαρχούν σε αυτόν φτάνοντας έτσι στο 3% του συνολικού ποσοστού του περιβάλλοντος. Όμως, ακόμα και αν καλύπτουν μικρό ποσοστό του πληθυσμού, τα στελέχη *B. longum*, καθώς και άλλα στελέχη *Bifidobacterium* παίζουν σημαντικό ρόλο στην ορθή λειτουργία του γαστρεντερικού σωλήνα καθώς τα προϊόντα που παράγονται μέσω της οδού "bifid shunt", όπως είναι το γαλακτικό οξύ, βελτιώνουν την εντερική άμυνα εμποδίζοντας την ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών. Επιπλέον, αποτελέσματα ερευνών απέδειξαν ότι ορισμένα στελέχη του *B. longum* παρουσιάζουν υψηλή ανοχή στο γαστρικό οξύ και τα χολικά οξέα. Η ανοχή αυτή στην έκθεση σε χαμηλές τιμές pH τα καθιστά ικανά να επιβιώσουν στον γαστρεντερικό σωλήνα καθώς και να αποικίσουν στο κατώτατο λεπτό και παχύ έντερο. Η ικανότητα της αποίκησης του στο παχύ έντερο θα μπορούσε να αποδοθεί στην ύπαρξη κροσσών και ενός επιφανειακού πολυσακχαρίτη συνδεδεμένου με τεϊχοϊκά οξέα, στοιχεία που πιστεύεται πως βοηθούν στην ισχυρή προσκόλληση του στην επιφάνεια του παχέος εντέρου.

Το *B. longum*, συγκεκριμένα το υποείδος *longum* BB536 το οποίο ορίζεται ως BB536, παρά την ανάγκη για περισσότερη έρευνα, αποτελεί ένα από τα πολύ χρήσιμα προβιοτικά στελέχη που χρησιμοποιούνται στην Τεχνολογία Τροφίμων σήμερα. Έχει αποδειχθεί πως είναι εξαιρετικά σταθερό σε διάφορα προϊόντα τροφίμων όπως φόρμουλα σε σκόνη, γιαούρτι και γάλα που έχει υποστεί ζύμωση εμφανίζοντας σταθερότητα κατά την αποθήκευση των προϊόντων που το περιέχουν. Το προβιοτικό αυτό στέλεχος είναι ανθρώπινης προέλευσης με αποδεδειγμένο και ασφαλές ιστορικό κατά την χρήση του και εμφανίζει κλινική αποτελεσματικότητα. Η ευεργετική του δράση στην υγεία του ανθρώπινου εντέρου πιθανώς να βασίζεται στην τροποποίηση του μικροβιώματος του εντέρου. Το BB536 δρα σε συντονισμό με τη μικροχλωρίδα του εντέρου για τη ρύθμιση της ομοιόστασης του ξενιστή, τη

βελτίωση της γαστρεντερικής υγείας και την ανακούφιση από αλλεργικές διαταραχές. Δεδομένων αυτών των γεγονότων, το *BB536* μπορεί να χρησιμεύσει ως χρήσιμος και άξιος υποψήφιος στη θεραπεία και διαχείριση της ανθρώπινης υγείας (Chyn BoonWong, Toshitaka Odamaki, Jin-zhongXiao, 2019).

3.2.2 Το *Bifidobacterium breve*

Το *B. breve* είναι αναερόβιο σε σχήμα ράβδου και σχηματίζει διακλαδώσεις με τα γειτονικά κύτταρα. Μεταξύ των διάφορων ειδών *Bifidobacterium*, το *B. breve* κατοικεί κυρίως στο έντερο νεογνών που θηλάζουν. Τα στελέχη του όμως εντοπίζονται και στον κόλπο υγείων γυναικών. Έχει έντονη παρουσία στο ανθρώπινο γάλα και τα βακτήρια προστατεύουν το βρέφος από λοιμώξεις και συμβάλλουν στην ενίσχυση του ανοσοποιητικού του συστήματος. Όπως και τα άλλα είδη του γένους, το *B. breve* διαθέτει ένζυμα για τον μεταβολισμό διάφορων υδατανθράκων, χρήσιμα για την προσαρμογή του σε ανταγωνιστικά περιβάλλοντα με μεταβαλλόμενες διατροφικές συνθήκες καθιστώντας το εξαιρετικά προσαρμοστικό, χαρακτηριστικό σημαντικό για τα προβιοτικά βακτήρια. Υπάρχει όμως ανάγκη για έρευνα του είδους καθώς πολλές από τις προβιοτικές του ιδιότητες παραμένουν υποθετικές

Το *Bifidobacterium breve* αποτελεί ένα εξαιρετικά σημαντικό είδος του γένους *Bifidobacterium* εξαιτίας των προβιοτικών του ιδιοτήτων. Έρευνες έχουν αποδείξει την αποτελεσματικότητά του στη διαχείριση διάφορων διαταραχών και ασθενειών. Συγκεκριμένα, μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε ποντίκια, έδειξε πως η από του στόματος χορήγηση *B. breve* A1 οδήγησε στη βελτίωση της γνωστικής δυσλειτουργίας και κατέστειλε

την έκφραση των γονιδίων που προκαλούν φλεγμονή. Επιπλέον, έρευνες για την διαχείριση της κατάθλιψης έδειξαν πως το *Bifidobacterium breve* CCFM1025

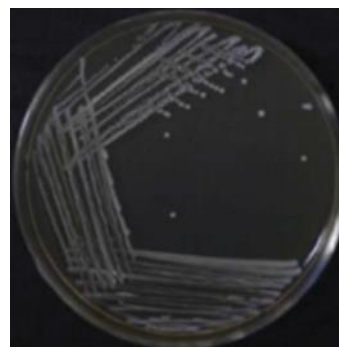


Εικόνα 16 Παιδιατρικές ασθένειες στις οποίες έχει επιτευχθεί βελτίωση των συμπτωμάτων με τη χορήγηση στελεχών *B. breve* (*Probiotics and Prebiotics in Pediatrics 2018*)

παρουσιάζει σημαντικές αντικαταθλιπτικές επιδράσεις μέσω της αποκατάστασης μικροβιακών ανωμαλιών του εντέρου οι οποίες είχαν προέλθει από στρες. Επιπλέον, το είδος αυτό έχει έντονη παρουσία στον παιδιατρικό τομέα. Σε πολλές περιπτώσεις γίνεται χρήση των στελεχών, κυρίως μεμονωμένα αλλά και σε συνδυασμό με άλλα είδη *Bifidobacterium* ή στελέχη *Lactobacillus*, και για θεραπευτικούς αλλά και για προληπτικούς σκοπούς. Σπουδαίο παράδειγμα αποτελεί το στέλεχος *M-16V*. Είναι εξαιρετικά χρήσιμο ως προβιοτικό καθώς εμφανίζει ισχυρή ικανότητα προσκόλλησης και σταθερότητα ως πρόσθετο σε προϊόντα όπως φόρμουλα σε σκόνη. Έχει αξιολογηθεί ως προς την ασφάλεια και πληροί τα πρότυπα ασφαλείας που ορίζονται από τον Οργανισμό FAO/WHO για την αξιολόγηση των μικροβίων για χρήση προβιοτικών σε τρόφιμα. Έχει χαρακτηριστεί ως GRAS (Generally Recognized as Safe) για χρήση σε τρόφιμα αλλά και βρέφη. Από το 2016 συμπεριλαμβάνεται και στον κατάλογο των εγκεκριμένων προβιοτικών στελεχών για βρεφική τροφή στην Κίνα. Η αξιολόγησή του ως προς την ασφάλεια έχει δείξει πως είναι μη παθογόνο, μη τοξικογόνο, μη αιμολυτικό και μη ανθεκτικό στα αντιβιοτικά προβιοτικό βακτήριο που δεν περιέχει πλασμίδια και δεν εμφανίζει επιβλαβείς μεταβολικές δραστηριότητες. Έρευνες έχουν αποδείξει την αποτελεσματικότητά του στην μείωση του κινδύνου ανάπτυξης νεκρωτικής εντεροκολίτιδας (NEC), ασθένειας που παραμένει η κύρια αιτία θανάτου από γαστρεντερική νόσο σε βρέφη. Τα *bifidobacteria*, κατά τη διάρκεια της πρώιμης ζωής, είναι απαραίτητα για τη φυσιολογική ανάπτυξη της γαστρεντερικής οδού. Η έλλειψή τους έχει συνδεθεί με την ανάπτυξη NEC. Είναι πιθανό ότι το *M-16V* μπορεί δυνητικά να μειώσει τον κίνδυνο ανάπτυξης NEC σε πρόωρα βρέφη, προωθώντας την ανάπτυξη *bifidobacteria*. Επιπλέον, ακόμη και αν οι μηχανισμοί δράσης του δεν είναι απόλυτα κατανοητοί, το *M-16V* έχει αποδειχθεί ότι ασκεί ανοσορυθμιστική δράση και αντιφλεγμονώδη ικανότητα, *in vitro*, ενάντια αλλεργικών αντιδράσεων. Συμπερασματικά, αν και οι γνώσεις πάνω στους μηχανισμούς δράσης του *M-16V* δεν είναι ισχυρές, έχει καταστεί σαφές ότι μπορεί να τροποποιεί τη μικροχλωρίδα του εντέρου, ικανότητα που το καθιστά πολλά υποσχόμενο ως θεραπευτικό μέσο δυσμενών καταστάσεων που σχετίζονται με την υγεία βρεφών.

3.2.3 Το *Bifidobacterium animalis*

Το *Bifidobacterium animalis* είναι αναερόβιο βακτήριο σχήματος ράβδου. Σε θρεπτικό υπόστρωμα MRSA σχηματίζει αποικίες μεγέθους 1,5 mm, λείες, γυαλιστερές και λευκές όπως απεικονίζονται στην Εικόνα 17. Στελέχη του χρησιμοποιούνται από τη βιομηχανία τροφίμων ως προβιοτικά, κυρίως για τη παραγωγή προβιοτικών γαλακτοκομικών προϊόντων.



Εικόνα 17 Σε θρεπτικό υπόστρωμα MRSA το *Bifidobacterium animalis* σχηματίζει αποικίες 1,5mm, λείες, γυαλιστερές και λευκές (Hülya Demir)

Βρίσκεται κυρίως στο παχύ έντερο θηλαστικών όπου, μέσω του σχηματισμού γαλακτικού οξέος, επιτρέπει την υδρόλυση της λακτόζης και άλλων σύνθετων σακχάρων.

Επιπλέον, κατά μήκος της μεμβράνης του βακτηρίου υπάρχουν σάκχαρα τα οποία πιστεύεται ότι είναι ικανά να αλληλοεπιδρούν με τη βλεννογόνο του παχέος εντέρου και το βοηθούν να ρυθμίζει τις βιολογικές και φυσιολογικές λειτουργίες του γαστρεντερικού σωλήνα. In vitro έρευνα έδειξε πως το *B. animalis* είναι ικανό να προστατέψει τα εντερικά κύτταρα από τη φλεγμονή που προκαλείται από το *ETEC K88* (*Enterotoxigenic Escherichia coli*) μειώνοντας εν μέρει την προσκόλληση του παθογόνου (Marianna Roselli, 2007).

Ένα από τα κύρια υποείδη του γένους *Bifidobacterium* που χρησιμοποιούνται ως προβιοτικά είναι το *Bifidobacterium animalis subsp. lactis*, ή αλλιώς *B. lactis*. Είχε ταξινομηθεί ως είδος αλλά αργότερα αποδείχθηκε ότι δεν πληρούσε τα κριτήρια για ένα είδος και αντ' αυτού συμπεριλήφθηκε στο *Bifidobacterium animalis* ως υποείδος. Για πολλά χρόνια, χρησιμοποιείται από τη βιομηχανία τροφίμων για τη παραγωγή προϊόντων που έχουν υποστεί ζύμωση. Συγκεκριμένα, ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο στέλεχος είναι το *Bifidobacterium animalis subsp. lactis Bb12* το οποίο εφαρμόζεται κυρίως για τη παρασκευή γαλακτοκομικών προϊόντων και παρασκευασμάτων για βρέφη. Αρκετές κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι το *Bifidobacterium Bb-12*, μόνο του ή σε συνδυασμό με άλλα προβιοτικά, σχετίζεται με την αύξηση του πληθυσμού των ωφέλιμων βακτηρίων και μείωση δυνητικά παθογόνων βακτηρίων (Katarzyna Szajnar, 2020).

Το στέλεχος αυτό παρουσιάζει πολλά χαρακτηριστικά που το καθιστούν χρήσιμο για τη παραγωγή προϊόντων που έχουν υποστεί ζύμωση. Συγκεκριμένα, παρουσιάζει υψηλή ανοχή στο οξυγόνο, στο γαστρικό οξύ, στη χολή, δεν έχει αρνητικές επιπτώσεις στην εμφάνιση, τη γεύση ή την υφή του τελικού προϊόντος και μπορεί να επιβιώσει σε αυτό μέχρι την κατανάλωση. Συμπερασματικά, το *Bb-12* αποτελεί ένα πολύ χρήσιμο στέλεχος για τη βιομηχανία τροφίμων ως προβιοτικό, αφού παρουσιάζει ανοχή υπό δύσκολες συνθήκες αποθήκευσης και υπό τις συνθήκες του γαστρεντερικού σωλήνα καθώς επίσης δεν επηρεάζει τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των τελικών προϊόντων.

3.2.4 Το *Bifidobacterium bifidum*

Το *Bifidobacterium bifidum* είναι ένας κοινός αποικιστής του εντέρου θηλαστικών, συμπεριλαμβανομένων των ανθρώπων. Συγκεκριμένα, αποτελεί ένα από τα τρία κυρίαρχα είδη του γένους στο έντερο υγιών βρεφών που θηλάζουν. Τα στελέχη του *B. bifidum* υποστηρίζεται ότι ασκούν βασικό ρόλο στην εξέλιξη και την ωρίμανση του ανοσοποιητικού συστήματος του ανθρώπου, το οποίο είναι ακόμη μη ανεπτυγμένο μετά τη γέννηση (Francesca Turrone, 2014). Χρησιμοποιείται ευρέως από την βιομηχανία τροφίμων για την παραγωγή προβιοτικών γαλακτοκομικών προϊόντων λόγω των ευεργετικών ιδιοτήτων των στελεχών του.

Ένα αξιοσημείωτο χαρακτηριστικό κάποιων στελεχών του είναι η ικανότητα εντοπισμού και ανταγωνισμού παθογόνων μικροοργανισμών στο έντερο. Συγκεκριμένα, πειράματα *in vitro* έχουν δείξει ότι τα κύτταρα *B. bifidum* PRL2010 αναστέλλουν έντονα την προσκόλληση εντεροπαθογόνων, συμπεριλαμβανομένων των *Escherichia coli* και *Cronobacter sakazakii*, τα οποία συχνά εμπλέκονται σε σοβαρές γαστρεντερικές παθήσεις στα βρέφη (Francesca Turrone, 2019).

Η κατανάλωση προϊόντων που περιέχουν *B. bifidum* συνδέεται με πολλά πιθανά οφέλη για την υγεία. Για παράδειγμα, έχει προτεθεί ότι μπορεί να συμβάλλει στην ανακούφιση από τα συμπτώματα του συνδρόμου ευερέθιστου εντέρου και της λειτουργικής δυσπεψίας. Συγκεκριμένα, έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε ανθρώπους, έδειξε ότι η καθημερινή λήψη γάλακτος που έχει υποστεί ζύμωση που περιέχει *B. bifidum* YIT 10347 κατάφερε να οδηγήσει σε ανακούφιση των

συμπτωμάτων. Προτείνεται ότι ορισμένα οφέλη του *B. bifidum* YIT 10347 στο στομάχι ίσως βασίζονται στην αυξημένη ικανότητά του να προσκολλάται στα επιθηλιακά κύτταρα και στη παραγωγή ορμονών που ρυθμίζουν τις γαστρικές λειτουργίες (A. Gomi, 2015).

3.3 Εφαρμογές των *bifidobacteria* σε προβιοτικά προϊόντα

3.3.1 Γιαούρτι

Τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος είναι η κύρια οικογένεια βακτηρίων που συμμετέχει στη διαδικασία ζύμωσης γαλακτοκομικών προϊόντων, όπως το γιαούρτι. Το γιαούρτι συνήθως παρασκευάζεται από τον εμβολιασμό γάλακτος με καλλιέργεια *Streptococcus thermophilus* και *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, καθώς και άλλα προβιοτικά στελέχη. Είναι γνωστό ότι τα *bifidobacteria* είναι πολύ χρήσιμα για τον άνθρωπο ως προβιοτικά. Για τον λόγο αυτό έχει πραγματοποιηθεί μεγάλη προσπάθεια από τη βιομηχανία τροφίμων για την ενσωμάτωσή τους σε προϊόντα όπως το γιαούρτι.

Τα βασικά προβλήματα που προκύπτουν κατά τη παραγωγή προβιοτικού γιαουρτιού είναι η μείωση της βιωσιμότητας των προβιοτικών βακτηρίων κατά την επεξεργασία και τη περίοδο αποθήκευσης, ο υψηλότερος χρόνος επώασης σε σχέση με το συμβατικό γιαούρτι και οι οργανοληπτικές διαφορές που μπορεί να προκύψουν. Τα προβιοτικά βακτήρια στο γιαούρτι, ώστε να θεωρηθεί προβιοτικό, πρέπει να περιέχονται σε ποσότητες μεγαλύτερες του 1×10^9 cfu ανά μερίδα μέχρι το χρόνο κατανάλωσης (Colin Hill, 2014). Από τους ερευνητές της βιομηχανίας τροφίμων, πραγματοποιείται αναζήτηση του τρόπου ελαχιστοποίησης της προβιοτικής απώλειας. Η βιωσιμότητα επηρεάζεται κυρίως από το pH και τη παρουσία οξυγόνου. Το ιδανικό pH για τη βέλτιστη ανάπτυξη των ειδών *bifidobacteria* κυμαίνεται μεταξύ 5,50-6,09 (Tripathi & Giri, 2014). Ο κύριος λόγος μείωσης της βιωσιμότητας είναι η παραγωγή οξέων από τις καλλιέργειες εκκίνησης που έχει ως αποτέλεσμα την μείωση του pH του προϊόντος κατά την αποθήκευσή του και την μείωση του πληθυσμού των προβιοτικών βακτηρίων. Επιπλέον, τα *bifidobacteria* αναγνωρίζονται ως αναερόβια με υψηλή ευαισθησία στο οξυγόνο βακτήρια. Το οξυγόνο μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή τοξικών μεταβολιτών

από τα βακτηριακά κύτταρα και κατά συνέπεια στο κυτταρικό θάνατο. Οι διαδικασίες παραγωγής γιαουρτιού, όπως είναι η ανάδευση και ανάμειξη, εισάγουν υψηλά επίπεδα οξυγόνου στο τελικό προϊόν με αποτέλεσμα την μείωση του πληθυσμού των προβιοτικών βακτηρίων όπως είναι τα *bifidobacteria*. Επιπλέον, σημαντικό ρόλο στα επίπεδα οξυγόνου του προϊόντος διαδραματίζει η συσκευασία του. Είναι εξαιρετικά σημαντική η επιλογή κατάλληλων υλικών συσκευασίας με μικρή διαπερατότητα στο οξυγόνο όπως είναι η γυάλινη συσκευασία, σε αντίθεση με την πλαστική συσκευασία.

Άλλες συνθήκες που μπορούν να επηρεάσουν την βιωσιμότητα είναι η θερμοκρασία και ο χρόνος ζύμωσης καθώς και οι συνθήκες που επικρατούν κατά την αποθήκευση. Η θερμοκρασία ζύμωσης θεωρείται κρίσιμος παράγοντας για την παραγωγή προβιοτικού γιαουρτιού με επαρκείς ποσότητες προβιοτικών βακτηρίων. Η ιδανική θερμοκρασία για την ανάπτυξη των περισσότερων προβιοτικών βακτηρίων κυμαίνεται μεταξύ 37°C και 43 °C. Προφανώς, θερμοκρασίες υψηλότερες από 45 °C σε κάποιο στάδιο επεξεργασίας έχουν αρνητικές επιπτώσεις στην ανάπτυξη των προβιοτικών και στη βιωσιμότητά τους. Έτσι, για να διατηρηθούν τα προβιοτικά, απαιτούνται ειδικές συνθήκες όπως η μικρότερη διάρκεια ζύμωσης σε συνδυασμό με υψηλότερες θερμοκρασίες. Προτείνεται επίσης η προσθήκη της καλλιέργειας προβιοτικών μετά το στάδιο της παστερίωσης του γάλακτος. Σχετικά με τον χρόνο και τη θερμοκρασία αποθήκευσης, έρευνες έχουν δείξει ότι τα *bifidobacteria* παρουσιάζουν υψηλή ευαισθησία σε χαμηλότερες θερμοκρασίες ψύξης. Έτσι, ο πληθυσμός τους μειώνεται όταν το προϊόν αποθηκεύεται σε θερμοκρασίες μικρότερες των 2 °C για μεγάλα χρονικά διαστήματα, αλλά παρουσιάζουν μέγιστη επιβίωση στους 8 °C.

Εξαιτίας των πολλαπλών υποτιθέμενων θετικών επιδράσεων του *Bifidobacterium* στην υγεία του ανθρώπου πραγματοποιούνται έρευνες πάνω σε εναλλακτικές μεθόδους που θα οδηγήσουν στην βελτίωση των συνθηκών ανάπτυξης προβιοτικού γιαουρτιού. Για παράδειγμα, έρευνα πραγματοποιήθηκε πάνω σε διαφορετικά γιαούρτια bifidus παρουσία διαφορετικών μορφών οξυγόνου όπως το οξυγόνο υπό τη μορφή του υδροξειδίου του σιδήρου ($\text{Fe}(\text{OH})_3$), εντός της συσκευασίας του γιαουρτιού. Η έρευνα αυτή έδειξε ότι η ενσωμάτωση διαφορετικών μορφών

οξυγόνου στα γιαούρτια bifidus εμφάνισε αξιοσημείωτα αποτελέσματα ως προς την επιβίωση προβιοτικών μικροοργανισμών, αφού οι βιώσιμοι αριθμοί *B. lactis* και *B. longum* ήταν πολύ μεγαλύτεροι. Σε άλλη μελέτη, έγινε παρασκευή σφαιριδίων που περιείχαν τις καλλιέργειες *B. breve*, χρησιμοποιώντας ως υλικό ενθυλάκωσης το LMP (Lipid Multi-Particulates). Τα σφαιρίδια αυτά δοκιμάστηκαν υπό συνθήκες παρόμοιες με εκείνες που επικρατούν στον γαστρεντερικό σωλήνα. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως ο πληθυσμός των ενθυλακωμένων καλλιεργειών μειώθηκε πολύ λιγότερο σε σχέση με των μη ενθυλακωμένων. Επιπλέον, σε γιαούρτι, η ενθυλάκωση του *B. breve* σε LMP αύξησε τη σταθερότητα του κατά την αποθήκευση στους 4°C. Συμπερασματικά, η ενθυλάκωση αποτελεί καλή εναλλακτική λύση για την παραγωγή προβιοτικού γιαουρτιού με υψηλά επίπεδα προβιοτικών βακτηρίων όπως είναι το *B. breve*, όμως, περισσότερη έρευνα πάνω στη βελτίωση των συνθηκών ανάπτυξης προβιοτικού γιαουρτιού απαιτούνται.

3.3.2 Γάλα

Πολλά είδη προβιοτικών βακτηρίων έχουν ενσωματωθεί στο γάλα που έχει υποστεί ζύμωση, συμπεριλαμβανομένων των *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus rhamnosus* και *Lactobacillus acidophilus*. Η ενσωμάτωσή τους εμφανίζει προοπτικές ως προς τη βελτίωση της θρεπτικής αξίας καθώς και των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του τελικού προϊόντος όπως είναι η γεύση, η υφή και η εμφάνισή του. Επομένως, το γάλα είναι ικανό να φιλοξενήσει επιτυχώς προβιοτικά βακτήρια όπως είναι τα *bifidobacteria*.

Για πολλά χρόνια, το αγελαδινό γάλα αποτελεί μέρος της ανθρώπινης διατροφής και χρησιμοποιείται ως φορέας προβιοτικών. Όμως, η αυξανόμενη εμφάνιση δυσανεξίας στη λακτόζη, οι περιβαλλοντικές ανησυχίες καθώς και οι αλλεργίες στις πρωτεΐνες του αγελαδινού γάλακτος έχουν οδηγήσει στην αναζήτηση εναλλακτικών λύσεων. Έρευνες πραγματοποιούνται στο κατσικίσιο γάλα, το γάλα καμήλας καθώς και σε άλλα ροφήματα για να διαπιστωθεί εάν είναι ικανά να φιλοξενήσουν προβιοτικά βακτήρια. Επιπλέον, σκοπός τους είναι η ανάπτυξη νέων προβιοτικών προϊόντων που δεν έχουν βάση το αγελαδινό γάλα ώστε να αποφευχθούν τα παραπάνω προβλήματα.

3.3.2.1 Κατσικίσιο γάλα

Τα τελευταία χρόνια, η ανάπτυξη προβιοτικού κατσικίσιου γάλακτος μελετάται όλο και περισσότερο αφού η κατανάλωσή του έχει συσχετιστεί με ευεργετικές αλλαγές στην εντερική χλωρίδα οι οποίες συμβάλλουν και στη μείωση της γαστρεντερικής δυσφορίας. Αρκετές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί από ερευνητές σχετικά με τη βιωσιμότητα καθώς και τις θετικές επιδράσεις των *bifidobacteria* ως πρόσθετα σε ροφήματα κατσικίσιου γάλακτος. Για παράδειγμα, έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε ρόφημα κατσικίσιου γάλακτος, που παρασκευάστηκε χρησιμοποιώντας τους μικροοργανισμούς *S.thermophilus TA-40*, *B. animalis BB-12* και *L. rhamnosus Lr-32*, έδειξε πως η βιωσιμότητα του *B. animalis BB-12* μειώθηκε μόνο κατά έναν λογαριθμικό κύκλο κατά τη διάρκεια 21 ημερών αποθήκευσης. Επιπλέον, υπάρχουν λίγες μελέτες σχετικά με τον μεταβολισμό οργανικών οξέων. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι, κατσικίσιο γάλα στο οποίο έχουν προστεθεί *bifidobacteria* εμφάνισε σημαντικά υψηλότερη περιεκτικότητα σε οξικό οξύ σε σχέση με κατσικίσιο γάλα στο οποίο δεν έγινε προσθήκη *bifidobacteria*. Αυτό θα μπορούσε να είναι αποτέλεσμα της οδού «bifid shunt» που πραγματοποιείται από αυτά. Αυτό θα μπορούσε να φανεί ιδιαίτερα χρήσιμο για τη βιομηχανία τροφίμων καθώς το οξικό οξύ είναι αναμφισβήτητο πως είναι ιδιαίτερα ωφέλιμο για τον άνθρωπο. Περεταίρω έρευνες όμως είναι απαραίτητες για να διαπιστωθούν τα παραπάνω.

3.3.2.2 Γάλα καμήλας

Το γάλα καμήλας έχει πολλές θρεπτικές και θεραπευτικές ιδιότητες λόγω των οποίων κερδίζει το ενδιαφέρον των καταναλωτών τα τελευταία χρόνια. Σε πολλές χώρες καταναλώνεται ως ωμό ή σε μορφή ζύμωσης. Μελέτη αποκάλυψε ότι είναι πλούσιο σε βακτήρια του γαλακτικού οξέος αλλά και σε *bifidobacteria*. Συγκεκριμένα, από 35 δείγματα (*LAB* και *Bifidobacterium*) τα οκτώ παρουσίασαν εμφάνιση παρόμοια με *bifidobacteria*. Έτσι, έγιναν τεστ για να παρατηρηθούν τα μορφολογικά, μικροσκοπικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά τους. Τα περισσότερα από τα προϊόντα που απομονώθηκαν σχημάτισαν λευκές έως υπόλευκες, γυαλιστερές στρογγυλές αποικίες σε υπόστρωμα MRS. Επιπλέον, τα επιλεγμένα στελέχη ήταν όλα θετικά κατά Gram, σε σχήμα ράβδου (V ή Y), αρνητικά σε καταλάση, μη κινητικά και μη σπορογόνα. Ορισμένα από αυτά έδειξαν υψηλή

ανοχή υπό συνθήκες παρόμοιες με εκείνες του γαστρεντερικού σωλήνα με αυξημένη βιωσιμότητα μετά από 24 ώρες. Όλα τα παραπάνω χαρακτηριστικά υποδεικνύουν πως το γάλα καμήλας θα μπορούσε να είναι φορέας αρκετών προβιοτικών στελεχών *Bifidobacterium* όμως, είναι απαραίτητα να πραγματοποιηθούν περισσότερες έρευνας που να υποστηρίζουν αυτό τον ισχυρισμό. Σχετικά με το ζυμωμένο γάλα καμήλας, έρευνα πραγματοποιήθηκε σε αρουραίους που πάσχουν από υπερχοληστερολαιμία. Η έρευνα αυτή έδειξε πως, σε σχέση με το αγελαδινό γάλα, το γάλα καμήλας ζυμωμένο με *B. longum* BB536 προκαλεί πολλές μεταβολικές βελτιώσεις όπως είναι η μείωση του κινδύνου δυσλιπιδαιμίας στους αρουραίους. Έτσι, είναι προφανές ότι μέσω περισσότερων ερευνών, σε ζώα και ανθρώπους, μπορούν να αποκαλυφθούν περισσότερες δυνατότητες του γάλακτος καμήλας ως φορέα προβιοτικών βακτηρίων και συγκεκριμένα του γένους *Bifidobacterium*.

3.3.3 Κεφίρ

Είναι γνωστό ότι το κεφίρ φιλοξενεί μία πολύ μεγάλη ποικιλία μικροοργανισμών οι οποίοι προσφέρουν σε αυτό τις ευεργετικές προς τον άνθρωπο ιδιότητες. Το κεφίρ παράγεται από τη ζυμωτική δραστηριότητα των κόκκων του κεφίρ. Οι μικροοργανισμοί στους κόκκους πολλαπλασιάζονται στο γάλα και παράγουν γαλακτικό οξύ και άλλες ενώσεις, προκαλώντας φυσικοχημικές αλλαγές με τη ζύμωση. Αρκετές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί ώστε να προσδιοριστεί με ακρίβεια η σύνθεση της μικροχλωρίδας του κεφίρ και έχει αποδειχθεί ότι αυτή ποικίλει ανάλογα με τους γεωγραφικούς, κλιματικούς και πολιτισμικούς παράγοντες (Carla P. Vieira, 2021). Έτσι, το τελικό προϊόν εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την προέλευση των κόκκων. Οι κόκκοι περιέχουν κυρίως βακτήρια των γενών *Lactobacillus*, *Lactococcus* και *Leuconostoc*. Σε μερικές περιπτώσεις έχουν ταυτοποιηθεί *bifidobacteria* σε κεφίρ αλλά σε πολύ μικρό ποσοστό. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην κακή αντοχή τους στις συνθήκες του προϊόντος δεδομένο που υποδηλώνει ότι μία εναλλακτική μέθοδος ενσωμάτωσης, όπως είναι η ενθυλάκωση, θα ήταν απαραίτητη ώστε να χρησιμοποιηθεί ως φορέας των προβιοτικών στελεχών του (Alan J. Marsh, 2013).

Υπάρχουν πολλές αναφορές και έρευνες για τις ευεργετικές επιδράσεις που μπορεί να έχει το κεφίρ στον άνθρωπο, όπως είναι οι αντιβακτηριακές (Zacconi et al. 2003) και οι αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες (R.S. Hamida, 2021). Έτσι, παρόλο που θεωρείται προβιοτικό τρόφιμο η προσθήκη *bifidobacteria* μπορεί να αυξήσει κατά πολύ μεγάλο ποσοστό τα οφέλη του προς τον καταναλωτή.

Ένα από τα μεγαλύτερα προβλήματα που παρουσιάζονται κατά την ενσωμάτωση των *bifidobacteria* στο κεφίρ είναι το μικρό ποσοστό βιωσιμότητας εξαιτίας της ευαισθησίας τους στις συνθήκες αποθήκευσης και στο pH του προϊόντος. Το τελικό προϊόν έχει όξινο pH (περίπου 4,6) (Mohamed A. Farag, 2020) και διατηρείται σε θερμοκρασίες ψυγείου. Επομένως, η μικροενθυλάκωση των *bifidobacteria* μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα διατήρηση υψηλού αριθμού βακτηρίων στο τελικό προϊόν. Συγκεκριμένα, έρευνα που πραγματοποιήθηκε με μικροενθυλάκωση *B. animalis* sp. *lactis* BB12 σε σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου έδειξε πως η ενθυλάκωση αύξησε κατά 250 φορές την αντοχή των βακτηρίων στη νισίνη (αντιβακτηριακό πεπτίδιο που παράγεται από βακτήρια εκκίνησης του κεφίρ) και βελτίωσε τη βιωσιμότητά τους κατά τη διάρκεια 28 ημερών στο ψυγείο. Ωστόσο, δεν συνιστάται η αποθήκευση του προϊόντος για περισσότερες από 14 ημέρες εάν πρέπει να διατηρηθούν οι μετρήσεις άνω των 10^6 cfu/mL. Επιπλέον, η ενθυλάκωση βελτίωσε την επιβίωση των βακτηρίων προσομοιωμένο περιβάλλον γαστρικού υγρού. Έτσι, οι μικροοργανισμοί εμφανίζουν ικανοποιητική βιωσιμότητα στο προϊόν κατά την αποθήκευση και γίνεται πιο εύκολη η διέλευσή τους από το στομάχι και στη συνέχεια ο αποικισμός τους στο έντερο.

3.3.4 Προϊόντα με βάση το φυτικό γάλα

Τα προϊόντα φυτικής προέλευσης που έχουν υποστεί ζύμωση, όπως είναι το φυτικό γάλα, είναι ένα καλό υποκατάστατο των γαλακτοκομικών προϊόντων τα οποία δε μπορούν να καταναλωθούν από άτομα με δυσανεξία στη λακτόζη ή τροφικές αλλεργίες. Το φυτικό γάλα παρουσιάζεται πλέον ως μία φιλική προς την υγεία του ανθρώπου εναλλακτική λύση. Είναι ένα καλό υποκατάστατο των γαλακτοκομικών προϊόντων τα οποία δε μπορούν να καταναλωθούν από άτομα με δυσανεξία στη λακτόζη ή τροφικές αλλεργίες. Συγκριτικά με το αγελαδινό γάλα, το φυτικό γάλα διαφέρει σημαντικά ως προς τη σύνθεσή του. Το αγελαδινό γάλα διαθέτει

χαρακτηριστικά που ενισχύουν τη βιοδιαθεσιμότητα και απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών σε αντίθεση με το φυτικό γάλα. Τα περισσότερα ροφήματα με βάση το φυτικό γάλα παρασκευάζονται με αυθόρμητη ζύμωση με αποτέλεσμα τη παραγωγή προϊόντων με μικρότερη διάρκεια ζωής καθώς και με ποιοτικές διαφορές από τον έναν παραγωγό στον άλλο. Για την επίλυση του παραπάνω προβλήματος ερευνητές μελετούν τη χρήση καλλιεργειών εκκίνησης. Η χρήση καλλιεργειών εκκίνησης που απομονώθηκαν από γαλακτοκομικά προϊόντα έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη δυσάρεστων οσμών. Έτσι, για την ανάπτυξη προβιοτικών ροφημάτων με βάση το φυτικό γάλα, με τα καλύτερα δυνατά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, είναι προτιμότερο να χρησιμοποιούνται καλλιέργειες εκκίνησης που απομονώθηκαν από φυτικές πηγές, αν και αυτό δεν είναι πάντα εφικτό.

Είναι γνωστό ότι, τα προβιοτικά που θα χρησιμοποιηθούν για τη ζύμωση φυτικών προϊόντων, πρέπει να έχουν την ικανότητα να αντέχουν υπό τις συνθήκες επεξεργασίας και αποθήκευσης αυτών. Ωστόσο, τα περισσότερα κοινά χρησιμοποιούμενα προβιοτικά έχουν απομονωθεί από γαλακτοκομικά με αποτέλεσμα να μην μπορούν να επιβιώσουν και να πολλαπλασιαστούν υπό τις συνθήκες που επικρατούν στα vegan γάλατα. Συνήθως τα προϊόντα αυτά υστερούν σε σχέση με τα γαλακτοκομικά λόγω μικρότερης διαθεσιμότητας θρεπτικών συστατικών και δυσμενούς pH. Παρόλα αυτά, μελέτες έχουν δείξει ότι πολλά φυτικά προϊόντα μπορούν να υποστηρίξουν την προβιοτική ανάπτυξη και διατηρούν ικανοποιητική βιωσιμότητα σε όλη τη διάρκεια της ζύμωσης και της αποθήκευσης. Μία τεχνική που έχει προταθεί ως αποτελεσματική για τη βελτίωση της βιωσιμότητας των προβιοτικών κατά τη ζύμωση και την αποθήκευση είναι η μικροενθλάκωση των προβιοτικών καλλιεργειών.

Μεταξύ άλλων, τα προϊόντα που έχουν μελετηθεί ως προς τη προβιοτική ανάπτυξη και εμφανίζουν πολλές προοπτικές είναι το φαγόπυρο, η σόγια και το κάσιους. Συγκεκριμένα, το φαγόπυρο, λόγω της υψηλής θρεπτικής αξίας του, μπορεί να αποτελέσει ιδανική βάση για τον πολλαπλασιασμό προβιοτικών βακτηρίων. Μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε γάλα από φαγόπυρο, το οποίο ζυμώθηκε με *Bifidobacterium animalis subsp. lactis BB-12*, έδειξε υψηλή βακτηριακή επιβίωση υπό συνθήκες ψύξης, ακόμα και μετά από 28 ημέρες αποθήκευσης. Το αποτέλεσμα

αυτό δείχνει ότι το φαγόπυρο μπορεί να χαρακτηριστεί ως καλό ζυμωτικό μέσο για τα *bifidobacteria* και μπορεί να είναι μια καλή εναλλακτική λύση για την ανάπτυξη προβιοτικών προϊόντων. Σχετικά με το κάσιους, η θρεπτική αξία του το καθιστά ικανό να φιλοξενήσει προβιοτικούς μικροοργανισμούς. Μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε γάλα ζυμωμένο με *Bifidobacterium animalis BB-12* έδειξε ικανοποιητική βιωσιμότητα μετά από 30 ημέρες στους 4°C καθώς και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά ελάχιστα επηρεασμένα από αυτό. Σχετικά με τη σόγια, το γάλα σόγιας έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να φιλοξενήσει προβιοτικούς μικροοργανισμούς και έχει πολλά πλεονεκτήματα έναντι των γαλακτοκομικών. Σχετικά με τα *bifidobacteria*, μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε γάλα σόγιας ζυμωμένο με *bifidobacteria* έδειξαν ικανοποιητικά αποτελέσματα. Συγκεκριμένα, γάλα ζυμωμένο με *B. animalis B94* έδειξε, μετά από 28 μέρες αποθήκευσης, παρουσία ινουλίνης, αύξηση βακτηριακού πληθυσμού κατά ένα λογαριθμικό κύκλο. Επιπλέον, η κατανάλωση προϊόντων με βάση το γάλα σόγιας παρουσιάζει προοπτικές ως θεραπευτικό μέσο. Μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε παχύσαρκους αρουραίους έδειξε πως η τακτική κατανάλωση προϊόντος με βάση το γάλα σόγιας, που έχει υποστεί ζύμωση με *Bifidobacterium longum ATCC 15707* και *Lactobacillus helveticus 416*, βοήθησε στη ρύθμιση του βάρους και στη μείωση του βαθμού υπερτροφίας των λιποκυττάρων. Συμπερασματικά, τα προϊόντα με βάση το γάλα σόγιας εμπλουτισμένα με *bifidobacteria*, θα μπορούσαν να αποτελούν καλές εναλλακτικές λύσεις έναντι στα γαλακτοκομικά προϊόντα, αφού παρουσιάζουν προοπτικές και ενάντια σε προβλήματα υγείας. Για τον λόγο αυτό είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθούν περισσότερες μελέτες.

3.3.5 Φρουτοχυμοί

Εξαιτίας της χημικής τους σύνθεσης, οι φρουτοχυμοί δεν αποτελούν ιδανικό περιβάλλον για την ανάπτυξη και επιβίωση των *bifidobacteria*. Συγκεκριμένα, τα χαμηλά pH μπορούν να μειώσουν κατά μεγάλο ποσοστό τον μικροβιακό πληθυσμό με αποτέλεσμα το τελικό προϊόν να έχει συγκεντρώσεις πολύ μικρότερες από την συνιστάμενη ποσότητα ($>10^7$ cfu/ml). Για τον λόγο αυτό, αναζητούνται εναλλακτικοί τρόποι για την ανάπτυξη προβιοτικών φρουτοχυμών. Μελέτη έδειξε πως η ενθυλάκωση καλλιεργειών *B. longum* με σφαιρίδια από αλγινικό οξύ και πηκτίνη

επικαλυμμένα με χιτοζάνη ή ζελατίνη βελτίωσε δραματικά την βιωσιμότητα σε χυμό ροδιού και cranberry κατά τη διάρκεια 6 εβδομάδων αποθήκευσης σε συνθήκες ψύξης, σε σύγκριση με τα ελεύθερα κύτταρα. Τα σφαιρίδια ήταν σε θέση να προστατεύσουν τους μικροοργανισμούς από τις αντιμικροβιακές ενώσεις που περιέχονται και στους δύο χυμούς. Βέβαια, μετά την αποθήκευσή τους για 6 εβδομάδες, τα σφαιρίδια ήταν αρκετά μαλακά. Το ζήτημα αυτό πρέπει να αντιμετωπιστεί προκειμένου να αυξηθεί η μηχανική σταθερότητα των σφαιριδίων. Μελέτες σε άλλους φρουτοχυμούς έχουν πραγματοποιηθεί, όμως δεν έχουν δείξει πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα για τα *bifidobacteria*. Ακόμη και αν έχουν αναπτυχθεί προϊόντα με βάση τον φρουτοχυμό που φέρουν προβιοτικά, η μελέτη πάνω στα *bifidobacteria* είναι περιορισμένη. Η κατανάλωσή φρουτοχυμών είναι πολύ συχνή και πιστή από τους καταναλωτές και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εναλλακτική από εκείνους που δεν μπορούν να καταναλώσουν γαλακτοκομικά. Επομένως, ο συνδυασμός τους με τις ευεργετικές επιδράσεις των προβιοτικών στελεχών του γένους *Bifidobacterium* θα μπορούσε να είναι πολύ χρήσιμος για την βιομηχανία τροφίμων.

3.3.6 Προϊόντα κρέατος

Τα τελευταία χρόνια έχει αυξηθεί το ενδιαφέρον για την ενσωμάτωση προβιοτικών βακτηρίων σε προϊόντα κρέατος που έχουν υποστεί ζύμωση, όπως τα ξηρά λουκάνικα που έχουν υποστεί ζύμωση ή το ιταλικό σαλάμι. Το κύριο πρόβλημα που εμφανίζεται κατά τη παραγωγή τους είναι η επιβίωση των προβιοτικών κυττάρων υπό τις αντίξοες συνθήκες που επικρατούν στα προϊόντα αυτά, όπως το χαμηλό pH και τα χαμηλά επίπεδα δραστηριότητας νερού και η υψηλή περιεκτικότητα σε άλατα. Σχετικά με τα *bifidobacteria*, έχει αναφερθεί πολύ χαμηλή βιωσιμότητα των βακτηρίων σε λουκάνικα όταν αυτά ενσωματώθηκαν χωρίς ενθυλάκωση (Brenda de Oliveira Gomes, 2021). Έτσι, έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί για την εφαρμογή εναλλακτικών μεθόδων ενσωμάτωσης των *bifidobacteria* σε τέτοια προϊόντα ώστε να αποκτήσουν τις ευεργετικές και προβιοτικές τους ιδιότητες.

Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν με τη προσθήκη μικροενθυλακωμένων βακτηρίων *Bifidobacterium animalis ssp. lactis BB-12* σε ιταλικό σαλάμι είχαν όλες εξίσου θετικά αποτελέσματα ως προς τη βιωσιμότητα των κυττάρων και τα

οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος. Συγκεκριμένα, ο αριθμός των βιώσιμων κυττάρων ήταν επαρκής για να θεωρηθεί το προϊόν προβιοτικό για 45 ημέρες. Επιπλέον το προϊόν ήταν αποδεκτό από τους καταναλωτές αφού δεν επηρεάστηκαν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του. Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν πως η μικροενθυλάκωση των *bifidobacteria* αποτελεί μία χρήσιμη εναλλακτική μέθοδο για την ανάπτυξη προβιοτικών προϊόντων κρέατος (Talita Aparecida Ferreira de Campos 2022, Brenda de Oliveira Gomes, 2021).

3.4 Προβιοτικά προϊόντα στην αγορά που περιέχουν *Bifidobacterium*

3.4.1 Bifidus yoghurt

Το γιαούρτι με ονομασία Bifidus yoghurt παράγεται από ενεργές καλλιέργειες κυρίως των μικροοργανισμών *B. bifidum*, *B. longum*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* και *Lactobacillus acidophilus*.

Πρωτοεμφανίστηκε το 1979 όταν έγινε η παραγωγή του από την εταιρία Morinaga Milk Industry Company . Το γιαούρτι αυτό παράγεται από μια μικτή καλλιέργεια εκκίνησης με *B. bifidum* ή *B. longum* και *S. thermophilus* και *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* με ή χωρίς *L. acidophilus*.

3.4.2 Bifidus milk

Το γάλα Bifidus κυκλοφόρησε επίσης από την εταιρία Morinaga Milk Industry Company στην Ιαπωνία το 1977. Περιέχει κυρίως τα προβιοτικά βακτήρια *B. bifidum* και *B. longum*. Η παραγωγή του γίνεται με τον εμβολιασμό θερμικά επεξεργασμένου αγελαδινού γάλακτος με κατεψυγμένη καλλιέργεια *B. bifidum* και *B. longum* και αφήνεται να ζυμωθεί έως ότου ληφθεί ένα pH περίπου 4,5. Στο τέλος της ζύμωσης, το προϊόν αποθηκεύεται σε θερμοκρασία μικρότερης των 10 °C και συσκευάζεται. Το τελικό προϊόν έχει χαρακτηριστικό άρωμα και ελαφρώς όξινη γεύση. Επιπλέον, έχει αναλογία γαλακτικού προς οξικό οξύ 2:3 και μέσο αριθμό προβιοτικών βακτηρίων 10^8 - 10^9 cfu ανά ml προϊόντος.

3.4.3 Acidophilus bifidus milk (AB milk)

Το γάλα AB είναι μη ζυμωμένο γάλα, το οποίο παράγεται με την προσθήκη συμπυκνωμένων προβιοτικών βακτηρίων σε εντατικά θερμικά επεξεργασμένο γάλα (Heller, 2001). Το γάλα εμπλουτίζεται με πρωτεΐνες πριν από την τυποποίηση και

την ομογενοποίηση του λίπους. Αρχικά, υποβάλλεται σε θερμική επεξεργασία στους 75 °C για 15 δευτερόλεπτα (σε πλακοειδή εναλλάκτη θερμότητας) ή στους 85 °C για 30 λεπτά (σε δεξαμενή) . Στη συνέχεια, το γάλα ψύχεται στους 37 °C και ενοφθαλμίζονται κατεψυγμένες καλλιέργειες *L. acidophilus* και *B. bifidum*. Η ζύμωση διεξάγεται μέχρι να επιτευχθεί pH 4,5–4,6 (μετά από περίπου 16 ώρες). Το γάλα που έχει υποστεί ζύμωση στη συνέχεια ψύχεται σε θερμοκρασία μικρότερη των 10 °C. Το τελικό προϊόν έχει χαρακτηριστικό άρωμα και ελαφρώς όξινη γεύση και περιέχει και τα δύο βακτήρια σε επίπεδα περίπου 10⁸-10⁹cfu ανά ml προϊόντος. Η διάρκεια ζωής του είναι περίπου 20 ημέρες (Heller, 2001).

3.4.4 Bifighurt

Το Bifighurt είναι παρόμοιο με το γάλα ή το γιαούρτι bifidus, ωστόσο, η μεικτή καλλιέργεια εκκίνησης αποτελείται από *B. longum* CKL 1969 ή DSM 2054 και *S. thermophilus*. Για την παραγωγή του, το γάλα θερμαίνεται στους 75 °C για 15 δευτερόλεπτα (σε πλακοειδή εναλλάκτη θερμότητας) ή στους 85 °C για 30 λεπτά (σε δεξαμενή). Στη συνέχεια εμβολιάζεται και η ζύμωση πραγματοποιείται στους 42 °C και το pH του τελικού προϊόντος είναι 4,7. Το τελικό προϊόν έχει ήπια όξινη γεύση. Περιέχει γαλακτικό οξύ σε επίπεδο 95%, και έχει επίσης γλοιώδη υφή (Gürakan et al., 2009).

3.4.5 Bio yoghurt (AB yoghurt)

Το βιο- γιαούρτι είναι προϊόν γιαουρτιού που έχει αναδιαμορφωθεί ώστε να περιέχει AB-καλλιέργειες (ζωντανά στελέχη *L. acidophilus* και είδη *Bifidobacterium*) πέρα από τους συμβατικούς μικροοργανισμούς του γιαουρτιού, *S. thermophilus* και *L. Bulgaricus*. Η παραγωγή του παρουσιάζει πολλά κοινά στοιχεία με την μέθοδο επεξεργασίας του παραδοσιακού γιαουρτιού, με εξαίρεση την ενσωμάτωση ζωντανών προβιοτικών καλλιεργειών σε κάποιο στάδιο της επεξεργασίας. Συγκεκριμένα, θερμικά επεξεργασμένο, ομογενοποιημένο γάλα ,με αυξημένη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη, εμβολιάζεται με συμβατική καλλιέργεια εκκίνησης και επωάζεται στους 45°C για 3,5 ώρες ή στους 37°C για 9 ώρες. Η προβιοτική καλλιέργεια μπορεί να προστεθεί ταυτόχρονα με τις συμβατικές καλλιέργειες ή μετά την ζύμωση όταν το προϊόν έχει ψυχθεί στους 4°C πριν από τη συσκευασία.

3.4.6 Παγωτό

Το προβιοτικό παγωτό παράγεται με ζωντανές προβιοτικέν καλλιέργειες *Lactobacillus acidophilus* LA-5, *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* BB-12 και *Propionibacterium jensenii* 702. Τα συστατικά που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη παραγωγή του, πέρα από το γάλα, μπορούν να είναι λίπος, γλυκαντικά ή ζάχαρη, σκόνη γάλακτος, πρωτεΐνη ορού γάλακτος, νερό, σταθεροποιητές, αρωματικούς παράγοντες, γαλακτωματοποιητές, χρωστικές κ.α. Λόγω της περιεκτικότητάς του σε πρωτεΐνες γάλακτος, λίπος και λακτόζη, το παγωτό είναι εξαιρετικό προϊόν για την διατήρηση και ανάπτυξη προβιοτικών καλλιεργειών. Για την παραγωγή του, το υγρό γάλα αρχικά θερμαίνεται στους 40–45 °C και αναμιγνύεται με τα στερεά συστατικά. Στη συνέχεια, το μείγμα ομογενοποιείται στους 75 °C περίπου και ακολουθεί θέρμανση στους 85 °C για 30 λεπτά και ψύξη στους 2 °C. Το μείγμα ωριμάζει για 8 ώρες και τότε μπορεί να προστεθεί η προβιοτική καλλιέργεια. Αυτή μπορεί να προστεθεί σε διαφορετικές μορφές. Συνήθως, μέρος του γάλακτος (10–30%) εμβολιάζεται με τη προβιοτική καλλιέργεια και ακολουθεί ζύμωση στους 37 °C για 1 με 12 ώρες και προσθήκη του στο μείγμα των συστατικών πριν τη κατάψυξη.

3.4.7 Τυριά

Τα προβιοτικά τυριά μπορούν με επιτυχία να φιλοξενήσουν προβιοτικούς μικροοργανισμούς. Αυτό βασίζεται στην υψηλή περιεκτικότητά τους σε λιπαρά, τα οποία προστατεύουν τα βακτηριακά κύτταρα κατά την αποθήκευση, και λόγω των σχεδόν αναερόβιων συνθηκών που δημιουργούν οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται για την ωρίμανσή τους, το οποίο ευνοεί την επιβίωση και ανάπτυξη των *bifidobacteria*. Τα προβιοτικά τυριά, συνήθως, περιέχουν βακτήρια όπως *B. bifidum*, *B. longum*, *Streptococcus thermophilus* και *Lactobacillus delbrueckii ssp. Bulgaricus*. Τα στάδια και οι συνθήκες επεξεργασίας, καθώς και το στάδιο προσθήκης της προβιοτικής καλλιέργειας αλλάζουν ανάλογα με τον τύπο του τυριού. Ένα προβιοτικό τυρί στην αγορά που περιέχει *bifidobacteria* είναι το Canestrato Pugliese το οποίο παράγεται με καλλιέργεια *Bifidobacterium bifidum* Bb02, *Bifidobacterium longum* Bb46 ή και τα δύο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Πιθανές θετικές επιδράσεις των προβιοτικών στελεχών του γένους *Bifidobacterium*

4.1 Καταπολέμηση της παχυσαρκίας

Μελέτες έχουν δείξει πως αρκετά προβιοτικά στελέχη, συμπεριλαμβανομένων στελεχών του γένους *Bifidobacterium*, μπορούν να έχουν θετικά αποτελέσματα κατά της παχυσαρκίας στον άνθρωπο. Είναι γνωστό ότι η παχυσαρκία είναι μία από τις πιο διαδεδομένες, χρόνιες ασθένειες παγκοσμίως και συμβάλλει σημαντικά στην αυξημένη συχνότητα σοβαρών χρόνιων ασθενειών όπως ο διαβήτης τύπου 2, οι καρδιαγγειακές παθήσεις, ορισμένες μορφές καρκίνου κ.α. Αρκετές στρατηγικές χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία της όπως είναι ο έλεγχος της διατροφής, η άσκηση και η χειρουργική επέμβαση. Πολλές φορές όμως, οι παραπάνω στρατηγικές δεν αποδεικνύονται αποτελεσματικές. Μελέτες έχουν δείξει ότι η παχυσαρκία μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγή σύνθεσης της μικροχλωρίδας του εντέρου, επομένως η τροποποίηση της με τη χρήση προβιοτικών, όπως τα *bifidobacteria*, μπορεί να είναι μια νέα στρατηγική για τη θεραπεία της.

Έρευνες που πραγματοποιήθηκαν σε παχύσαρκους ανθρώπου και ζώα έδειξαν ότι η χορήγηση προβιοτικών στελεχών *Bifidobacterium* μπορεί να οδηγήσει στην αποκατάσταση της εντερικής μικροχλωρίδας, συμβάλλοντας έτσι στη ρύθμιση του βάρους. Συγκεκριμένα, η κατανάλωση *Bifidobacterium animalis subsp. lactis 420* (*B420*) από παχύσαρκους ανθρώπου είχε ως αποτέλεσμα τη ρύθμιση της μικροχλωρίδας του εντέρου αυξάνοντας τα επίπεδα ωφέλιμων μικροβίων, όπως τα *Lactobacillus spp.* (A.A. Hibberd, 2018). Επιπλέον, έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε παχύσαρκους αρουραίους είχε εξίσου θετικά αποτελέσματα. Η χορήγηση *B. pseudocatenulatum* CECT 7765 αύξησε τον συνολικό αριθμό των *Bifidobacterium spp.* και μείωσε των *Enterobacteriaceae* (Paola Gauffin Cano, 2013).

Συμπερασματικά, τα *bifidobacteria* παρουσιάζουν πολλές προοπτικές ως εργαλεία για τη καταπολέμηση της παχυσαρκίας. Όμως, είναι αναγκαίο να πραγματοποιηθούν περαιτέρω μελέτες για να αξιολογηθεί ο τρόπος με τον οποίο η χορήγηση αυτών των τροποποιεί τη μικροχλωρίδα του εντέρου και δρα κατά της

παχυσαρκίας έτσι ώστε να μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως συμπληρώματα διατροφής για τη καταπολέμησή της.

4.2 Χρήση ως αντικαρκινικά

Τα τελευταία χρόνια έχει αυξηθεί το ενδιαφέρον για τη χρήση προβιοτικών ως συμπληρώματα για τη πρόληψη ή θεραπεία του καρκίνου του εντέρου. Οι περισσότερες έρευνες περιορίζονται σε δοκιμές in-vitro ή σε ζώα και ο τρόπος δράσης τους δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητός. Τα αποτελέσματα όμως είναι θετικά και δείχνουν πως τα προβιοτικά θα μπορούσαν να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στην πρόληψη και θεραπεία του καρκίνου.

Ορισμένες μελέτες έχουν εξετάσει την ικανότητα των *bifidobacteria* στη πρόληψη του καρκίνου, κυρίως σε δείγματα ποντικών. Αν και τα αποτελέσματα είναι σχετικά ικανοποιητικά, πολλές έρευνες δεν έχουν καταφέρει να αποδείξουν τα οφέλη ή τον τρόπο δράσης τους. Ωστόσο, μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε καρκινοπαθείς ποντικούς έδειξε ότι, σε γενικές γραμμές, η χρήση στελεχών *Bifidobacterium* θα μπορούσε να θεωρηθεί κατάλληλο συμπλήρωμα διατροφής για τη θεραπεία και την πρόληψη του καρκίνου του παχέος εντέρου (Asadollahi Parisa, 2020).

Η έλλειψη δοκιμών σε ανθρώπους με πειστικά αποτελέσματα μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η περαιτέρω έρευνα είναι απαραίτητη για να γίνουν κατανοητοί οι τρόποι δράσεις των *bifidobacteria* ενάντια στο καρκίνο ώστε να είναι δυνατή η χρήση τους ως αντικαρκινικά.

4.3 Καταπολέμηση της δυσανεξίας στη λακτόζη

Η δυσανεξία στη λακτόζη επηρεάζει ένα τεράστιο μέρος του πληθυσμού. Είναι αποτέλεσμα μη αφομοίωσης της λακτόζης εξαιτίας της μειωμένης δραστηριότητας του ενζύμου λακτάση. Προτείνεται ότι η τροποποίηση της εντερικής μικροχλωρίδας μπορεί να έχει θετική επίδραση στη καταπολέμηση της δυσανεξίας στη λακτόζη. Η ρύθμισή της μπορεί να επιτευχθεί μέσω της χορήγησης συμπληρωμάτων ή με τη κατανάλωση τροφίμων εμπλουτισμένων με τα κατάλληλα προβιοτικά στελέχη. Τα προβιοτικά στελέχη του γένους *Bifidobacterium* είναι πολύ δημοφιλή ως συμπληρώματα διατροφής. Για το λόγο αυτό έρευνες πραγματοποιούνται για να

αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητά τους στη καταπολέμηση της δυσανεξίας στη λακτόζη.

Έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε ανθρώπου με δυσανεξία στη λακτόζη έδειξε ότι η κατανάλωση προβιοτικού γιαουρτιού, εμπλουτισμένο με προβιοτικά στελέχη *Bifidobacterium*, είχε ως αποτέλεσμα την μείωση ορισμένων συμπτωμάτων, όπως είναι το φούσκωμα (Seyed Jalil Masoumi, 2021). Επιπλέον, ακόμα μία μελέτη έδειξε ότι η χορήγηση συμπληρώματος, σε μορφή κάψουλας, *B. longum* καθώς και η κατανάλωση γιαουρτιού εμπλουτισμένο με *B. animalis* οδήγησε στην ανακούφιση των συμπτωμάτων καθώς και στη τροποποίηση της εντερικής μικροχλωρίδας, αυξάνοντας τον πληθυσμό των *bifidobacteria* και άλλων ευεργετικών βακτηρίων.

Επομένως, τα προβιοτικά στελέχη του γένους εμφανίζουν πολλές προοπτικές για την ανακούφιση των συμπτωμάτων της δυσανεξίας στη λακτόζη. Ο τρόπος δράσης τους όμως δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητός.

4.4 Θεραπεία και πρόληψη διάρροιας

Μία από τις πιο σημαντικές ευεργετικές δράσεις των προβιοτικών είναι η θεραπεία και η πρόληψη της διάρροιας. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιούνται συχνά για τη θεραπεία της οξείας παιδικής διάρροιας και έχει αναφερθεί ότι μειώνουν σημαντικά τη διάρκεια της διάρροιας και του πυρετού στα παιδιά. Στα πιο κοινά στελέχη που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία της διάρροιας συμπεριλαμβάνονται τα *B. bifidum* και *B. longum*. Οι πιθανοί μηχανισμοί μέσω των οποίων τα προβιοτικά ασκούν τη δράση τους είναι η παραγωγή αντιμικροβιακών παραγόντων και η μείωση της προσκόλλησης των παθογόνων μικροοργανισμών στο έντερο.

Πολλές έρευνες που πραγματοποιήθηκαν σε παιδιά και ενήλικες μπορούν να υποστηρίξουν ότι τα *bifidobacteria* είναι πολύ αποτελεσματικά ενάντια στη διάρροια. Συγκεκριμένα, έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε παιδιά με οξεία διάρροια, έδειξε ότι η κατανάλωση φόρμουλας γάλακτος εμπλουτισμένη με *Bifidobacterium lactis* μείωσε σημαντικά τη συχνότητα, τη διάρκεια της διάρροιας και την παραμονή στο νοσοκομείο (Neveen Helmy Abou El-Soud, 2015). Επιπλέον, έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε ποντικούς, έδειξε πως το *B. breve FHNQ23M3* και το *B. bifidum FSDJN705* θα μπορούσαν να ανακουφίσουν τα συμπτώματα της

διάρροιας που προκλήθηκε από την *ETEC* (*Enterotoxigenic E. coli*). Η *ETEC* είναι η κύρια αιτία πρόκλησης της διάρροιας των ταξιδιωτών σε αναπτυσσόμενες χώρες. Επομένως, η αυξημένη αποτελεσματικότητά των *bifidobacteria* ενάντια σε αυτή υποδεικνύει ότι είναι πολύ σημαντικά για τη καταπολέμηση της.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από την παραπάνω βιβλιογραφική ανασκόπηση έγινε κατανοητό πως το γένος *Bifidobacterium* αποτελεί ένα εξαιρετικά χρήσιμο εργαλείο για την βιομηχανία τροφίμων. Τα προβιοτικά τρόφιμα είναι πολύ δημοφιλή λόγω των ευεργετικών ιδιοτήτων τους και ο συνδυασμός τους με τα προβιοτικά στελέχη του γένους *Bifidobacterium* αποτελεί σημαντικό βήμα προς την ανάπτυξη προβιοτικών προϊόντων. Έως σήμερα έχουν αναπτυχθεί πολλά προϊόντα τροφίμων με πολλαπλά οφέλη στην υγεία του ανθρώπου εμπλουτισμένα με προβιοτικά στελέχη του γένους, υπάρχει όμως ανάγκη για την ενσωμάτωσή τους σε περισσότερα. Ωστόσο, οι αυστηρές διατροφικές απαιτήσεις τους σε συνδυασμό με την έντονη ευαισθησία τους στις διάφορες μεθόδους επεξεργασίας και αποθήκευσης τροφίμων αποτελούν κάποια από τα σημαντικότερα εμπόδια που παρουσιάζονται κατά την προσπάθεια ανάπτυξης νέων προβιοτικών προϊόντων. Αυτό έχει οδηγήσει στην αναζήτηση νέων εναλλακτικών μεθόδων ενσωμάτωσής των βακτηρίων σε αυτά, όπως είναι η μικροενθλάκωση. Πολλές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί πάνω στην ανάπτυξη νέων προϊόντων, καθώς και στα οφέλη των *bifidobacteria* στην υγεία του ανθρώπου, έχουν αποδώσει πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα. Υπάρχει όμως ακόμα έντονη ανάγκη για περισσότερη έρευνα σε ζώα και ανθρώπους ώστε να γίνουν περισσότερα κατανοητοί οι τρόποι δράσεις καθώς και να βελτιωθεί η βιωσιμότητα των κυττάρων στα διάφορα προϊόντα που επιχειρούνται να ενσωματωθούν. Οι έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι σήμερα έχουν αποδείξει πως τα προβιοτικά στελέχη *Bifidobacterium* εμφανίζουν πολλές προοπτικές και η πραγματοποίηση περισσότερων ερευνών θα μπορούσε να είναι πολύ χρήσιμη για την ανάπτυξη νέων προϊόντων με αξιοσημείωτα οφέλη για τον άνθρωπο.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- A.A. Amara et al., Role of Probiotics in health improvement, infection control and disease treatment and management, Saudi Pharmaceut. J., (2015)
- A.A. Amara, A. Shibl, Role of Probiotics in health improvement, infection control and disease treatment and management, Saudi Pharmaceut. J., 23 (2015), pp. 107-114, 10.1016/j.jsps.2013.07.001
- A.A. Hibberd, et al. Probiotic or synbiotic alters the gut microbiota and metabolism in a randomised controlled trial of weight management in overweight adults, *Benef. Microbes*, 10 (2) (2019), pp. 121-135
- A.G. Da Cruz, F.C.A. Buriti, C.H.B. de Souza, J.A.F. Faria, S.M.I. Saad, Probiotic cheese: Health benefits, technological and stability aspects, *Trends in Food Science & Technology*, 20 (2009), pp. 344-354
- Alan C. Logan, Martin Katzman, Major depressive disorder: probiotics may be an adjuvant therapy, *Medical Hypotheses*, Volume 64, Issue 3, 2005, Pages 533-538, ISSN 0306-9877, <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2004.08.019>.
- Amal Bakr Shori, Application of Bifidobacterium spp in beverages and dairy food products: an overview of survival during refrigerated storage, *Food Science and Technology*, Volume: 42, 2022, <https://doi.org/10.1590/fst.41520>
- B. BIAVATI, M. VESCOVO, S. TORRIANI, V. BOTTAZZI, Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications, *Annals of Microbiology*, 50, 117-131 (2000)
- Barka EA, Vatsa P, Sanchez L, Gaveau-Vaillant N, Jacquard C, Meier-Kolthoff JP, Klenk HP, Clément C, Ouhdouch Y, van Wezel GP. Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2015 Nov 25;80(1):1-43. doi: 10.1128/MMBR.00019-15. Erratum in: *Microbiol Mol Biol Rev.* 2016 Nov 9;80(4):iii. PMID: 26609051; PMCID: PMC4711186.
- Bermudez-Brito M, Plaza-Díaz J, Muñoz-Quezada S, Gómez-Llorente C, Gil A: Probiotic Mechanisms of Action. *Ann Nutr Metab* 2012;61:160-174. doi: 10.1159/000342079

- Bermudez-Brito M, Plaza-Díaz J, Muñoz-Quezada S, Gómez-Llorente C, Gil A: Probiotic Mechanisms of Action. *Ann Nutr Metab* 2012;61:160-174. doi: 10.1159/000342079
- Bhawna Chugh, Afaf Kamal-Eldin, Bioactive compounds produced by probiotics in food products, *Current Opinion in Food Science*, Volume 32, 2020, Pages 76-82, ISSN 2214-7993, <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.02.003>.
- Binda S, Hill C, Johansen E, Obis D, Pot B, Sanders ME, Tremblay A and Ouwehand AC (2020) Criteria to Qualify Microorganisms as “Probiotic” in Foods and Dietary Supplements. *Front. Microbiol.* 11:1662. doi: 10.3389/fmicb.2020.01662
- Boesten R, Schuren F, Ben Amor K, Haarman M, Knol J, de Vos WM. Bifidobacterium population analysis in the infant gut by direct mapping of genomic hybridization patterns: potential for monitoring temporal development and effects of dietary regimens. *Microb Biotechnol.* 2011 May;4(3):417-27. doi: 10.1111/j.1751-7915.2010.00216.x. Epub 2010 Oct 26. PMID: 21375714; PMCID: PMC3818999.
- Bourrie, Benjamin & Willing, Benjamin & Cotter, Paul. (2016). The Microbiota and Health Promoting Characteristics of the Fermented Beverage Kefir. *Frontiers in Microbiology*. 7. 10.3389/fmicb.2016.00647.
- Bozzi Cionci N, Baffoni L, Gaggia F, Di Gioia D. Therapeutic Microbiology: The Role of *Bifidobacterium breve* as Food Supplement for the Prevention/Treatment of Paediatric Diseases. *Nutrients.* 2018; 10(11):1723. <https://doi.org/10.3390/nu10111723>
- C.B. Wong, T. Odamaki, J. Xiao, Beneficial effects of *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* BB536 on human health: modulation of gut microbiome as the principal action, *J. Funct. Foods*, 54 (2019), pp. 506-519, 10.1016/j.jff.2019.02.002
- Calinoiu, Lavinia-Florina & Vodnar, Dan & Precup, Gabriela. (2016). A Review: The Probiotic Bacteria Viability under Different Conditions. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Food Science and Technology.* 73. 55. 10.15835/buasvmcn-fst:12448.

- Cano, P.G., Santacruz, A., Trejo, F.M. and Sanz, Y. (2013), Bifidobacterium CECT 7765 improves metabolic and immunological alterations associated with obesity in high-fat diet-fed mice. *Obesity*, 21: 2310-2321. <https://doi.org/10.1002/oby.20330>
- Carla P. Vieira, Anisio Iuri L. S. Rosario, Carini A. Lelis, Bruna Samara S. Rekowsky, Anna Paula A. Carvalho, Denes Kaic A. Rosário, Thaísa A. Elias, Marion P. Costa, Debora Foguel, Carlos A. Conte-Junior, "Bioactive Compounds from Kefir and Their Potential Benefits on Health: A Systematic Review and Meta-Analysis", *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2021, Article ID 9081738, 34 pages, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/9081738>
- Chen Y-T, Hsu A-H, Chiou S-Y, Lin Y-C, Lin J-S. AB-Kefir Reduced Body Weight and Ameliorated Inflammation in Adipose Tissue of Obese Mice Fed a High-Fat Diet, but Not a High-Sucrose Diet. *Nutrients*. 2021; 13(7):2182. <https://doi.org/10.3390/nu13072182>
- Chyn Boon Wong, Toshitaka Odamaki, Jin-zhong Xiao Insights into the reason of Human-Residential Bifidobacteria (HRB) being the natural inhabitants of the human gut and their potential health-promoting benefits, , *FEMS Microbiology Reviews*, Volume 44, Issue 3, May 2020, Pages 369–385, <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa010>
- Dallas G. Hoover, BIFIDOBACTERIUM, *Encyclopedia of Food Microbiology*, 1999, Pages 210-217, ISBN 9780122270703, <https://doi.org/10.1006/rwfm.1999.0170>.
- David J. Hackam, Chhinder P. Sodhi, Toll-Like Receptor–Mediated Intestinal Inflammatory Imbalance in the Pathogenesis of Necrotizing Enterocolitis, *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, Volume 6, Issue 2, 2018, Pages 229-238.e1, ISSN 2352-345X, <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2018.04.001>.
- de Oliveira Gomes, B., de Mesquita Oliveira, C., de Marins, A. R., Gomes, R. G., & Feihmann, A. C. (2021). Application of microencapsulated probiotic Bifidobacterium animalis ssp. lactis BB-12 in Italian salami. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45, e15841. <https://doi.org/10.1111/jfpp.15841>

- Demir, Hülya. (2020). Comparison of traditional and commercial kefir microorganism compositions and inhibitory effects on certain pathogens. *International Journal of Food Properties*. 23. 375-386, DOI:10.1080/10942912.2020.1733599
- Demir, Hülya. (2020). Comparison of traditional and commercial kefir microorganism compositions and inhibitory effects on certain pathogens. *International Journal of Food Properties*. 23. 375-386. 10.1080/10942912.2020.1733599.
- Devika, N.T., Raman, K. Deciphering the metabolic capabilities of Bifidobacteria using genome-scale metabolic models. *Sci Rep* 9, 18222 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54696-9>
- Dhanashree, Rajashekharan S, Krishnaswamy B and Kammara R (2017) Bifid Shape Is Intrinsic to Bifidobacterium adolescentis. *Front. Microbiol.* 8:478. doi: 10.3389/fmicb.2017.00478
- Dhanashree, Rajashekharan S, Krishnaswamy B, Kammara R. Bifid Shape Is Intrinsic to Bifidobacterium adolescentis. *Front Microbiol.* 2017 Mar 21;8:478. doi: 10.3389/fmicb.2017.00478. PMID: 28377762; PMCID: PMC5359755.
- Drisko JA, Giles CK, Bischoff BJ. Probiotics in health maintenance and disease prevention. *Altern Med Rev.* 2003 May;8(2):143-55. PMID: 12777160.
- Edward R. Farnworth, 2003, *Handbook of Fermented Functional Foods*
- El-Soud NH, Said RN, Mosallam DS, Barakat NA, Sabry MA. Bifidobacterium lactis in Treatment of Children with Acute Diarrhea. A Randomized Double Blind Controlled Trial. *Open Access Maced J Med Sci.* 2015 Sep 15;3(3):403-7. doi: 10.3889/oamjms.2015.088. Epub 2015 Aug 7. PMID: 27275258; PMCID: PMC4877827.
- El-Zahar KM, Hassan MFY, Al-Qaba SF. Protective Effect of Fermented Camel Milk Containing Bifidobacterium longum BB536 on Blood Lipid Profile in Hypercholesterolemic Rats. *J Nutr Metab.* 2021 Oct 29;2021:1557945. doi: 10.1155/2021/1557945. PMID: 34745660; PMCID: PMC8570886.

- Fang, D., Shi, D., Lv, L. et al. Bifidobacterium pseudocatenulatum LI09 and Bifidobacterium catenulatum LI10 attenuate D-galactosamine-induced liver injury by modifying the gut microbiota. *Sci Rep* 7, 8770 (2017). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09395-8>
- Garrido D, Ruiz-Moyano S, Jimenez-Espinoza R, Eom HJ, Block DE, Mills DA. Utilization of galactooligosaccharides by Bifidobacterium longum subsp. infantis isolates. *Food Microbiol.* 2013 Apr;33(2):262-70. doi: 10.1016/j.fm.2012.10.003. Epub 2012 Oct 22. PMID: 23200660; PMCID: PMC3593662.
- Gasbarrini, Giovanni MD, PhD*; Bonvicini, Fiorenza MD†; Gramenzi, Annagiulia MD†. Probiotics History. *Journal of Clinical Gastroenterology* 50():p S116-S119, November/December 2016. | DOI: 10.1097/MCG.0000000000000697
- GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, F., AZAOLA, A., GUTIÉRREZ-LÓPEZ, G.F. and HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, H. (2010), Viability of microencapsulated Bifidobacterium animalis ssp. lactis BB12 in kefir during refrigerated storage. *International Journal of Dairy Technology*, 63: 431-436. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2010.00604.x>
- Guo-Ping Sheng, Han-Qing Yu, Xiao-Yan Li, Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: A review, *Biotechnology Advances*, Volume 28, Issue 6, 2010, Pages 882-894, ISSN 0734-9750, <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.08.001>.
- Gupta V, Garg R. Probiotics. *Indian J Med Microbiol.* 2009 Jul-Sep;27(3):202-9. doi: 10.4103/0255-0857.53201. PMID: 19584499.
- Health benefits of fermented milk containing Bifidobacterium bifidum YIT 10347 on gastric symptoms in adults, *J. Dairy Sci.*, 98 (2015), pp. 2277-2283 <https://doi.org/10.3168/jds.2014-9158>
- Henna-Maria Uusitupa ,Pia Rasinkangas,Markus J. Lehtinen,Sanna M. Mäkelä,Kaisa Airaksinen ,Heli Anglenius,Arthur C. Ouwehand and Johanna Maukonen, Bifidobacterium animalis subsp. lactis 420 for Metabolic Health: Review of the Research, *Nutrients* 2020, 12(4), 892; <https://doi.org/10.3390/nu12040892>

- Hidalgo-Cantabrana Claudio, Sánchez Borja, Milani Christian, Ventura Marco, Margolles Abelardo, Ruas-Madiedo Patricia, Genomic Overview and Biological Functions of Exopolysaccharide Biosynthesis in *Bifidobacterium* spp, 2014, Applied and Environmental Microbiology, doi: 10.1128/AEM.02977-13
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G. et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 11, 506–514 (2014). <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
- I.S. Surono, A. Hosono, FERMENTED MILKS | Types and Standards of Identity, Editor(s): John W. Fuquay, Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition), Academic Press, 2011, Pages 470-476, ISBN 9780123744074, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00180-1>.
- Investigation of the factors influencing the survival of *Bifidobacterium longum* in model acidic solutions and fruit juices, *Food Chemistry*, Volume 129, Issue 3, 2011, Pages 1037-1044, ISSN 0308-8146, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.071>.
- J. Bezawada, N.V. Hoang, T.T. More, S. Yan, N. Tyagi, R.D. Tyagi, R.Y. Surampalli, Production of extracellular polymeric substances (EPS) by *Serratia* sp.1 using wastewater sludge as raw material and flocculation activity of the EPS produced, *Journal of Environmental Management*, Volume 128, 2013, Pages 83-91, ISSN 0301-4797, <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.04.039>.
- J.A. Tur, M.M. Bibiloni, Functional Foods, Editor(s): Benjamin Caballero, Paul M. Finglas, Fidel Toldrá, Encyclopedia of Food and Health, Academic Press, 2016, Pages 157-161, ISBN 9780123849533, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00340-8>.
- Ju-Hoon Lee, Daniel J. O'Sullivan, Genomic Insights into *Bifidobacteria*, September 2010, DOI: <https://doi.org/10.1128/MMBR.00004-10>
- Juliana de Carvalho Marchesin, Larissa Sbaglia Celiberto, Allan Botinhon Orlando, Alexandra Ivo de Medeiros, Roseli Aparecida Pinto, José Antônio Sampaio

Zuanon, Luis Carlos Spolidorio, Andrey dos Santos, Maria Pía Taranto, Daniela Cardoso Umbelino Cavallini, A soy-based probiotic drink modulates the microbiota and reduces body weight gain in diet-induced obese mice, *Journal of Functional Foods*, Volume 48, 2018, Pages 302-313, ISSN 1756-4646, <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.07.010>.

· Jungersen M, Wind A, Johansen E, Christensen JE, Stuer-Lauridsen B, Eskesen D. The Science behind the Probiotic Strain *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12(®). *Microorganisms*. 2014 Mar 28;2(2):92-110. doi: 10.3390/microorganisms2020092

· Jungersen M, Wind A, Johansen E, Christensen JE, Stuer-Lauridsen B, Eskesen D. The Science behind the Probiotic Strain *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12(®). *Microorganisms*. 2014 Mar 28;2(2):92-110. doi: 10.3390/microorganisms2020092. PMID: 27682233; PMCID: PMC5029483.

· K. Adhikari, A. Mustapha, I. U. Grun, and L. Fernando, Viability of Microencapsulated *Bifidobacteria* in Set Yogurt During Refrigerated Storage, *Journal of Dairy Science* Vol. 83, No. 9, 2000

· Katarzyna Szajnar, Agata Znamierowska & Piotr Kuźniar, Sensory and textural properties of fermented milk with viability of *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* Bb-12 and increased calcium concentration, *International Journal of Food Properties*

· Kato, K., Odamaki, T., Mitsuyama, E. et al. Age-Related Changes in the Composition of Gut *Bifidobacterium* Species. *Curr Microbiol* 74, 987–995 (2017). <https://doi.org/10.1007/s00284-017-1272-4>

· Katoh T, Ojima MN, Sakanaka M, Ashida H, Gotoh A, Katayama T. Enzymatic Adaptation of *Bifidobacterium bifidum* to Host Glycans, Viewed from Glycoside Hydrolyases and Carbohydrate-Binding Modules. *Microorganisms*. 2020; 8(4):481., <https://doi.org/10.3390/microorganisms8040481>

· Kim DH, Jeong D, Kim H, Kang IB, Chon JW, Song KY, Seo KH. Antimicrobial Activity of Kefir against Various Food Pathogens and Spoilage Bacteria. *Korean J Food*

Sci Anim Resour. 2016;36(6):787-790. doi: 10.5851/kosfa.2016.36.6.787. Epub 2016 Dec 31. PMID: 28115890; PMCID: PMC5243963.

· Kowalska E, Ziarno M. Characterization of Buckwheat Beverages Fermented with Lactic Acid Bacterial Cultures and Bifidobacteria. *Foods*. 2020; 9(12):1771. <https://doi.org/10.3390/foods9121771>

· L. Morelli, In vitro assessment of probiotic bacteria: from survival to functionality, *Int. Dairy J*, 17 (2007), pp. 1278-1283, 10.1016/j.idairyj.2007.01.015

· Laura Maria BRUNO, Janice Ribeiro LIMA2, Nédio Jair WURLITZER, Thalita Cavalcante RODRIGUES, Non-dairy cashew nut milk as a matrix to deliver probiotic bacteria, July-Sept 2020, <https://doi.org/10.1590/fst.14219>

· Laure C. Roger¹, Adele Costabile¹, Diane T. Holland¹, Lesley Hoyles^{1,2}, Anne L. McCartney¹, Examination of faecal Bifidobacterium populations in breast- and formula-fed infants during the first 18 months of life. *Microbiology Volume 156, Issue 11, November 2010*, <https://doi.org/10.1099/mic.0.043224-0>

· Laursen, M.F., Sakanaka, M., von Burg, N. et al. Bifidobacterium species associated with breastfeeding produce aromatic lactic acids in the infant gut. *Nat Microbiol* 6, 1367–1382 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41564-021-00970-4>

· Ley, R., Turnbaugh, P., Klein, S. et al. Human gut microbes associated with obesity. *Nature* 444, 1022–1023 (2006). <https://doi.org/10.1038/4441022a>

· Li Zhao, Song Wang, Jiahuan Dong, Jialu Shi, Jiaqi Guan, Deyu Liu, Fei Liu, Bailiang Li and Guicheng Huo, Identification, Characterization, and Antioxidant Potential of Bifidobacterium longum subsp. longum Strains Isolated From Feces of Healthy Infants, November 2021, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.756519>

· Liu, J., Li, W., Yao, C. et al. Comparative genomic analysis revealed genetic divergence between Bifidobacterium catenulatum subspecies present in infant versus adult guts. *BMC Microbiol* 22, 158 (2022). <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02573-3>

- Liu, J., Li, W., Yao, C. et al. Comparative genomic analysis revealed genetic divergence between *Bifidobacterium catenulatum* subspecies present in infant versus adult guts. *BMC Microbiol* 22, 158 (2022). <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02573-3>
- M. Sharma, A. Wasan, R.K. Sharma, Recent developments in probiotics: An emphasis on *Bifidobacterium*, *Food Biosci.*, 41 (2021), Article 100993, <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.100993>
- M. Sharma, A. Wasan, R.K. Sharma, Recent developments in probiotics: An emphasis on *Bifidobacterium*, *Food Bioscience*, 41 (March) (2021), Article 100993, [10.1016/j.fbio.2021.100993](https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.100993)
- M.K. Tripathi, S.K. Giri, Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage, *Journal of Functional Foods*, Volume 9, 2014, Pages 225-241, ISSN 1756-4646, <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.04.030>.
- Mackowiak PA. Recycling metchnikoff: probiotics, the intestinal microbiome and the quest for long life. *Front Public Health*. 2013 Nov 13;1:52. doi: [10.3389/fpubh.2013.00052](https://doi.org/10.3389/fpubh.2013.00052). PMID: 24350221; PMCID: PMC3859987.
- Maria Saarela, Ilkka Virkajärvi, Hanna-Leena Alakomi, Pia Sigvart-Mattila, Jaana Mättö, Stability and functionality of freeze-dried probiotic *Bifidobacterium* cells during storage in juice and milk, *International Dairy Journal*, Volume 16, Issue 12, 2006, Pages 1477-1482, ISSN 0958-6946, <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.12.007>.
- Marsh AJ, O'Sullivan O, Hill C, Ross RP, Cotter PD (2013) Sequencing-Based Analysis of the Bacterial and Fungal Composition of Kefir Grains and Milks from Multiple Sources. *PLoS ONE* 8(7): e69371. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069371>
- Martins, F.S., Silva, A.A., Vieira, A.T. et al. Comparative study of *Bifidobacterium animalis*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus casei* and *Saccharomyces boulardii* probiotic properties. *Arch Microbiol* 191, 623–630 (2009). <https://doi.org/10.1007/s00203-009-0491-x>

- Masoumi, SJ, Mehrabani, D, Saberifiroozi, M, Fattahi, MR, Moradi, F, Najafi, M. The effect of yogurt fortified with *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* sp. probiotic in patients with lactose intolerance. *Food Sci Nutr*. 2021; 9: 1704– 1711. <https://doi.org/10.1002/fsn3.2145>
- Mättö, J., Malinen, E., Suihko, M.-.-L., Alander, M., Palva, A. and Saarela, M. (2004), Genetic heterogeneity and functional properties of intestinal bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 97: 459-470. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02340.x>
- Mengyang Li, Yunxiang Jin, Yawei Wang, Li Meng, Na Zhang, Ying Sun, Jingfei Hao, Qi Fu, Qingshen Sun, Preparation of *Bifidobacterium breve* encapsulated in low methoxyl pectin beads and its effects on yogurt quality, *Journal of Dairy Science*, Volume 102, Issue 6, 2019, Pages 4832-4843, ISSN 0022-0302, <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15597>.
- Mikiyasu Sakanaka ,Aina Gotoh ,Keisuke Yoshida ,Toshitaka Odamaki,Hiroka Koguchi ,Jin-zhong Xiao,Motomitsu Kitaoka and Takane Katayama,Varied Pathways of Infant Gut-Associated *Bifidobacterium* to Assimilate Human Milk Oligosaccharides: Prevalence of the Gene Set and Its Correlation with *Bifidobacteria*-Rich Microbiota Formation, , *Nutrients* 2020, 12(1), 71; <https://doi.org/10.3390/nu12010071>
- Mohammed, Samar & Alwendawi, Shadan & M.Muhammad, Samar. (2014). In vitro evaluation of inhibitory activity of enteric *Bifidobacterium* isolates against Shiga toxin producing *E. coli* (STEC) O157:H7. 10.13140/RG.2.2.16184.80648.
- N.M. Meybodi, A.M. Mortazavian, M. Arab, A. Nematollahi, Probiotic viability in yoghurt: A review of influential factors *International Dairy Journal*, 109 (2020), Article 104793
- Nan Shang, Rihua Xu, Pinglan Li, Structure characterization of an exopolysaccharide produced by *Bifidobacterium animalis* RH, *Carbohydrate Polymers*, Volume 91, Issue 1, 2013, Pages 128-134, ISSN 0144-8617, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.08.012>.

- Nazli Turkmen, Ceren Akal, Barbaros Özer, Probiotic dairy-based beverages: A review, *Journal of Functional Foods*, Volume 53, 2019, Pages 62-75, ISSN 1756-4646, <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.12.004>.
- Nurul H. Khan, Darren R. Korber, Nicholas H. Low, Michael T. Nickerson, Development of extrusion-based legume protein isolate–alginate capsules for the protection and delivery of the acid sensitive probiotic, *Bifidobacterium adolescentis*, *Food Research International*, Volume 54, Issue 1, 2013, Pages 730-737, ISSN 0963-9969, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.08.017>.
- Oelschlaeger, 2010, T.A. Oelschlaeger, Mechanisms of probiotic actions—a review, *Int. J. Med. Microbiol.*, 300 (2010), pp. 57-62
- P.H.P. Prasanna, A.S. Grandison, D. Charalampopoulos, Bifidobacteria in milk products: An overview of physiological and biochemical properties, exopolysaccharide production, selection criteria of milk products and health benefits, *Food Res. Int.*, 55 (2014), pp. 247-262, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.11.013>
- Palmira De Bellis, Angelo Sisto, Paola Lavermicocca, Probiotic bacteria and plant-based matrices: An association with improved health-promoting features, *Journal of Functional Foods*, Volume 87, 2021, 104821, ISSN 1756-4646, <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104821>.
- Paola Lavermicocca, Francesca Valerio, Stella Lisa Lonigro, Maria De Angelis, Lorenzo Morelli, Maria Luisa Callegari, Carlo G. Rizzello, Angelo Visconti, Study of Adhesion and Survival of Lactobacilli and Bifidobacteria on Table Olives with the Aim of Formulating a New Probiotic Food, *Applied and Environmental Microbiology*, volume 71, no. 8, pages 4233-4240, 2005, doi:10.1128/AEM.71.8.4233-4240.2005
- Pärtty A, Kalliomäki M, Endo A, Salminen S, Isolauri E (2012) Compositional Development of Bifidobacterium and Lactobacillus Microbiota Is Linked with Crying and Fussing in Early Infancy. *PLoS ONE* 7(3): e32495. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032495>
- Patricia López, Deva C. Monteserín, Miguel Gueimonde, Clara G. de los Reyes-Gavilán, Abelardo Margolles, Ana Suárez, Patricia Ruas-Madiedo,

Exopolysaccharide-producing *Bifidobacterium* strains elicit different in vitro responses upon interaction with human cells, *Food Research International*, Volume 46, Issue 1, 2012, Pages 99-107, ISSN 0963-9969, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.11.020>.

· Peijun Tian, Kenneth J. O'Riordan, Yuan-kun Lee, Gang Wang, Jianxin Zhao, Hao Zhang, John F. Cryan, Wei Chen, Towards a psychobiotic therapy for depression: *Bifidobacterium breve* CCFM1025 reverses chronic stress-induced depressive symptoms and gut microbial abnormalities in mice, *Neurobiology of Stress*, Volume 12, 2020, 100216, ISSN 2352-2895, <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2020.100216>.

· Pimentel, T.C., de Oliveira, L.I.G., de Souza, R.C. and Magnani, M. (2022), Probiotic ice cream: A literature overview of the technological and sensory aspects and health properties. *Int J Dairy Technol*, 75: 59-76. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12821>

· R.S. Hamida, A. Shami, M.A. Ali, Z.N. Almohawes, A.E. Mohammed, M.M. Bin-Meferij, Kefir: a protective dietary supplementation against viral infection, *Biomed Pharmacother*, 133 (2021), Article 110974

· Roel Van der Meulen , Lazlo Avonts , and Luc De Vuyst, Short Fractions of Oligofructose Are Preferentially Metabolized by *Bifidobacterium animalis* DN-173 010, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 70, No. 4, 2004, DOI:<https://doi.org/10.1128/AEM.70.4.1923-1930.2004>

· Rosanna Inturri, Antonio Molinaro, Flaviana Di Lorenzo, Giovanna Blandino, Barbara Tomasello, Claudio Hidalgo-Cantabrana, Cristina De Castro, Patricia Ruas-Madiedo, Chemical and biological properties of the novel exopolysaccharide produced by a probiotic strain of *Bifidobacterium longum*, *Carbohydrate Polymers*, Volume 174, 2017, Pages 1172-1180, ISSN 0144-8617, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.07.039>.

· Roselli, M., Finamore, A., Britti, M., & Mengheri, E. (2006). Probiotic bacteria *Bifidobacterium animalis* MB5 and *Lactobacillus rhamnosus* GG protect intestinal Caco-2 cells from the inflammation-associated response induced by enterotoxigenic

Escherichia coli K88. British Journal of Nutrition, 95(6), 1177-1184.
doi:10.1079/BJN20051681

· Sabikhi L, Kumar MH, Mathur BN. Bifidobacterium bifidum in probiotic Edam cheese: influence on cheese ripening. J Food Sci Technol. 2014 Dec;51(12):3902-9. doi: 10.1007/s13197-013-0945-7. Epub 2013 Feb 10. PMID: 25477659; PMCID: PMC4252454.

· Sahar Norouzbeigi, Leily Vahid-Dastjerdi, Reza Yekta, Mehdi Farhoodi, Amir M. Mortazavian, Effects of using different O₂ scavengers on the qualitative attributes of bifidus yogurt during refrigerated storage, Food Research International, Volume 140, 2021, 109953, ISSN 0963-9969, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109953>.

· Sanders, M.E., Merenstein, D., Merrifield, C.A. and Hutkins, R. (2018), Probiotics for human use. Nutr Bull, 43: 212-225. <https://doi.org/10.1111/nbu.12334>

· Dimitris Charalampopoulos, Influence of encapsulation and coating materials on the survival of *Lactobacillus plantarum* and *Bifidobacterium longum* in fruit juices, Food Research International, Volume 53, Issue 1, 2013, Pages 304-311, ISSN 0963-9969, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.04.019>.

· Shuai Guo, Meixuan Chen, Ting Wu, Kailong Liu, Heping Zhang, Jicheng Wang, Probiotic *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* Probio-M8 improves the properties and organic acid metabolism of fermented goat milk, Journal of Dairy Science, Volume 105, Issue 12, 2022, Pages 9426-9438, ISSN 0022-0302, <https://doi.org/10.3168/jds.2022-22003>.

· Stojanov S, Berlec A, Štrukelj B. The Influence of Probiotics on the Firmicutes/Bacteroidetes Ratio in the Treatment of Obesity and Inflammatory Bowel disease. Microorganisms. 2020; 8(11):1715. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111715>

· Suzuki, Ryuichiro et al. Crystal Structures of Phosphoketolase, Journal of Biological Chemistry, Volume 285, Issue 44, 34279 – 34287, DOI:<https://doi.org/10.1074/jbc.M110.156281>

- Tabbers MM, de Milliano I, Roseboom MG, Benninga MA. Is *Bifidobacterium breve* effective in the treatment of childhood constipation? Results from a pilot study. *Nutr J*. 2011 Feb 23;10:19. doi: 10.1186/1475-2891-10-19. PMID: 21345213; PMCID: PMC3048518.
- Takumi Satoh, Mitsunori Todoroki, Kazuya Kobayashi, Youichi Niimura, Shinji Kawasaki, Purified thioredoxin reductase from O₂-sensitive *Bifidobacterium bifidum* degrades H₂O₂ by interacting with alkyl hydroperoxide reductase, *Anaerobe*, Volume 57, 2019, Pages 45-54, ISSN 1075-9964, <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2019.03.012>.
- Talita Aparecida Ferreira de Campos, Annecler Rech de Marins, Natallya Marques da Silva, Marcos Antonio Matiucci, Iza Catarini dos Santos, Claudete Regina Alcalde, Maria Luiza Rodrigues de Souza, Raquel Guttierres Gomes, Andresa Carla Feihmann, Effect of the addition of the probiotic *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* (BB-12) in free and microencapsulated form and the prebiotic inulin to synbiotic dry coppa, *Food Research International*, Volume 158, 2022, 111544, ISSN 0963-9969, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111544>.
- Tanaka, K., Satoh, T., Kitahara, J. et al. O₂-inducible H₂O₂-forming NADPH oxidase is responsible for the hyper O₂ sensitivity of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*. *Sci Rep* 8, 10750 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29030-4>
- Thitaram, S.N., Siragusa, G.R. and Hinton, A., Jr (2005), *Bifidobacterium*-selective isolation and enumeration from chicken caeca by a modified oligosaccharide antibiotic-selective agar medium. *Letters in Applied Microbiology*, 41: 355-360. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2005.01765.x>
- Tripathi and Giri, 2014, M.K. Tripathi, S.K. Giri, Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage, *Journal of Functional Foods*, 9(1) (2014), pp. 225-241
- Turrone F, Duranti S, Milani C, Lugli GA, van Sinderen D, Ventura M. *Bifidobacterium bifidum*: A Key Member of the Early Human Gut Microbiota. *Microorganisms*. 2019; 7(11):544. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7110544>

- Turrone F, Duranti S, Milani C, Lugli GA, van Sinderen D, Ventura M., Bifidobacterium bifidum: A Key Member of the Early Human Gut Microbiota. Microorganisms. 2019; 7(11):544., <https://doi.org/10.3390/microorganisms7110544>
- Turrone F, Taverniti V, Ruas-Madiedo P, Duranti S, Guglielmetti S, Lugli GA, Gioiosa L, Palanza P, Margolles A, van Sinderen D, Ventura M. Bifidobacterium bifidum PRL2010 modulates the host innate immune response. Appl Environ Microbiol. 2014 Jan;80(2):730-40. doi: 10.1128/AEM.03313-13. Epub 2013 Nov 15. PMID: 24242237; PMCID: PMC3911076.
- Van der Meulen R, Avonts L, De Vuyst L. Short fractions of oligofructose are preferentially metabolized by Bifidobacterium animalis DN-173 010. Appl Environ Microbiol. 2004 Apr;70(4):1923-30. doi: 10.1128/AEM.70.4.1923-1930.2004. PMID: 15066781; PMCID: PMC383053.
- von Ah, Ueli & Mozzetti, Valeria & Lacroix, Christophe & Kheadr, Ehab & Fliss, Ismail & Meile, Leo. (2007). Classification of a moderately oxygen-tolerant isolate from baby faeces as Bifidobacterium thermophilum. BMC microbiology. 7. 79. 10.1186/1471-2180-7-79.
- Wang B, Kong Q, Cui S, Li X, Gu Z, Zhao J, Zhang H, Chen W, Wang G. Bifidobacterium adolescentis Isolated from Different Hosts Modifies the Intestinal Microbiota and Displays Differential Metabolic and Immunomodulatory Properties in Mice Fed a High-Fat Diet. Nutrients. 2021; 13(3):1017. <https://doi.org/10.3390/nu13031017>
- Wenjun Liu, Meixuan Chen, Lana Duo, Jicheng Wang, Shuai Guo, Haotian Sun, Bilige Menghe, Heping Zhang, Characterization of potentially probiotic lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from human colostrum, Journal of Dairy Science, Volume 103, Issue 5, 2020, Pages 4013-4025, ISSN 0022-0302, <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17602>.
- Wong CB, Iwabuchi N, Xiao J-z. Exploring the Science behind Bifidobacterium breve M-16V in Infant Health. Nutrients. 2019; 11(8):1724. <https://doi.org/10.3390/nu11081724>

- Xiao, J.Z. et al. Effects of Milk Products Fermented by *Bifidobacterium longum* on Blood Lipids in Rats and Healthy Adult Male Volunteers, *Journal of Dairy Science*, Volume 86, Issue 7, 2452 – 2461, DOI:[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73839-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73839-9)
- Yadav, H., Jain, S., & Sinha, P. (2008). Oral administration of dahi containing probiotic *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* delayed the progression of streptozotocin-induced diabetes in rats. *Journal of Dairy Research*, 75(2), 189-195. doi:10.1017/S0022029908003129
- Yasmin I, Saeed M, Khan WA, Khaliq A, Chughtai MFJ, Iqbal R, Tehseen S, Naz S, Liaqat A, Mehmood T, Ahsan S, Tanweer S. In Vitro Probiotic Potential and Safety Evaluation (Hemolytic, Cytotoxic Activity) of *Bifidobacterium* Strains Isolated from Raw Camel Milk. *Microorganisms*. 2020; 8(3):354. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030354>
- Yin YN, Yu QF, Fu N, Liu XW, Lu FG. Effects of four *Bifidobacteria* on obesity in high-fat diet induced rats. *World J Gastroenterol*. 2010 Jul 21;16(27):3394-401. doi: 10.3748/wjg.v16.i27.3394. PMID: 20632441; PMCID: PMC2904885.
- Zhao L, Wang S, Dong J, Shi J, Guan J, Liu D, Liu F, Li B and Huo G (2021) Identification, Characterization, and Antioxidant Potential of *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* Strains Isolated From Feces of Healthy Infants. *Front. Microbiol*. 12:756519. doi: 10.3389/fmicb.2021.756519
- Zhong Y, Huang CY, He T, Harmsen HM. [Effect of probiotics and yogurt on colonic microflora in subjects with lactose intolerance]. *Wei Sheng yan jiu = Journal of Hygiene Research*. 2006 Sep;35(5):587-591. PMID: 17086711.
- Κωνσταντίνου, Α. (2018). ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΣ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΚΑΙ ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΥ ΣΕ ΓΙΑΟΥΡΤΙ. ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΤΟΜΕΑΣ ΙV: ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ.

- Ν. Παπαγαλάνης, Οξειδωτικό στρες και ενδογενές αντιοξειδωτικό σύστημα, Ι. Δραστικές ρίζες οξυγόνου, Ελληνική Νεφρολογία 2014; 26 (3): 151 - 194

<https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.04.005>

- ΣΠΗΛΙΩΤΗΣ ΒΑΣΙΛΗΣ, ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ, ΔΙΣΙΓΜΑ ΕΚΔΟΣΕΙΣ, Νοε 2014

ΠΗΓΕΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

- [HTTPS://ACTIVIA.GR/](https://activia.gr/)
- [HTTPS://WWW.SMITHBROTHERSFARMS.COM/](https://www.smithbrothersfarms.com/)
- [HTTPS://WWW.TABLEOFPLENTY.COM.AU/PRODUCT/PROBIOTIC-KEFIR-LACTOSE-FREE/](https://www.tableofplenty.com.au/product/probiotic-kefir-lactose-free/)
- Plessas, S., Bosnea, L., Alexopoulos, A. and Bezirtzoglou, E. (2012), Potential effects of probiotics in cheese and yogurt production: A review. Eng. Life Sci., 12: 433-440. <https://doi.org/10.1002/elsc.201100122>
- von Ah, Ueli & Mozzetti, Valeria & Lacroix, Christophe & Kheadr, Ehab & Fliss, Ismail & Meile, Leo. (2007). Classification of a moderately oxygen-tolerant isolate from baby faeces as Bifidobacterium thermophilum. BMC microbiology. 7. 79. 10.1186/1471-2180-7-79.
- DHANASHREE, RAJASHEKHARAN S, KRISHNASWAMY B AND KAMMARA R (2017) BIFID SHAPE IS INTRINSIC TO BIFIDOBACTERIUM ADOLESCENTIS. FRONT. MICROBIOL. 8:478. DOI: 10.3389/FMICB.2017.00478
- WENJUN LIU, MEIXUAN CHEN, LANA DUO, JICHENG WANG, SHUAI GUO, HAOTIAN SUN, BILIGE MENGHE, HEPING ZHANG, CHARACTERIZATION OF POTENTIALLY PROBIOTIC LACTIC ACID BACTERIA AND BIFIDOBACTERIA ISOLATED FROM HUMAN COLOSTRUM, JOURNAL OF DAIRY SCIENCE, VOLUME 103, ISSUE 5, 2020, PAGES 4013-4025, ISSN 0022-0302, [HTTPS://DOI.ORG/10.3168/JDS.2019-17602](https://doi.org/10.3168/JDS.2019-17602).

· Hulya Demir (2020) Comparison of traditional and commercial kefir, microorganism compositions and inhibitory effects on certain pathogens, International Journal of, Food Properties, 23:1, 375-386, DOI: 10.1080/10942912.2020.1733599

· www.biology.uoc.gr

· P.H.P. PRASANNA, A.S. GRANDISON, D. CHARALAMPOPOULOS, BIFIDOBACTERIA IN MILK PRODUCTS: AN OVERVIEW OF PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL PROPERTIES, EXOPOLYSACCHARIDE PRODUCTION, SELECTION CRITERIA OF MILK PRODUCTS AND HEALTH BENEFITS, FOOD RES. INT., 55 (2014), PP. 247-262, [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.FOODRES.2013.11.013](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.11.013)