



ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Αξιολόγηση οξυγαλακτικών καλλιεργειών με ή χωρίς
εγκλεισμό για την παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων**

THESIS

**Evaluation of lactic acid cultures with or without
encapsulation for the production of dairy products**

ΑΝΔΡΕΟΥ ΕΛΕΝΑ & ΓΡΑΜΜΑΤΙΚΟΥ ΕΙΡΗΝΗ
ANDREOU ELENA GRAMMATIKOU EIRINI



ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ / NAME OF THE SUPERVISOR:
ΣΠΗΛΙΩΤΗΣ ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ / SPILIOTIS VASILEIOS

ΑΙΓΑΛΕΩ / AIGALEO 2023

Έγινε δεκτή

Οι υπογράφωντες δηλώνουμε ότι έχουμε εξετάσει την πτυχιακή εργασία με τίτλο «Αξιολόγηση οξυγαλακτικών καλλιεργειών με ή χωρίς εγκλεισμό για την παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων» που παρουσιάστηκε από την Ανδρέου Έλενα και την Γραμματικού Ειρήνη και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.

Όνοματεπώνυμο	Ιδιότητα	Ψηφιακή υπογραφή
Σπηλιώτης Βασίλειος	Επιβλέπων καθηγητής	
Μπατρίνου Ανθιμιά- Αικατερίνη	Μέλος επιτροπής	
Κοντελής Σπυρίδων	Μέλος επιτροπής	

Δήλωση περί λογοκλοπής / Copyright

Έχοντας πλήρη επίγνωση των συνεπειών του νόμου περί πνευματικής ιδιοκτησίας, δηλώνουμε ότι είμαστε αποκλειστικοί συγγραφείς της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Δηλώνουμε, επίσης, ότι αναλαμβάνουμε όλες τις συνέπειες, όπως αυτές νομίμως ορίζονται, στην περίπτωση που διαπιστωθεί διαχρονικά ότι η εργασία μας αυτή ή τμήμα αυτής αποτελεί προϊόν λογοκλοπής.

Ανδρέου Έλενα



Γραμματικού Ειρήνη



Πρόλογος

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε κατά το ακαδημαϊκό έτος 2021-2022, στο εργαστήριο Μικροβιολογίας Τροφίμων στα πλαίσια της φοίτησής μας στο Τμήμα «Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων» του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής. Αποτελεί μέρος συνεργασίας μεταξύ ακαδημαϊκών ιδρυμάτων και εταιρειών από την Κίνα και την Ελλάδα στα πλαίσια του προγράμματος «ProbiYo».

Θεωρούμε υποχρέωσή μας να ευχαριστήσουμε τον επιβλέποντα καθηγητή Σπηλιώτη Βασίλειο για την πολύτιμη καθοδήγηση του.

Ευχαριστούμε ιδιαίτερα την εργαστηριακή τεχνικό Ανδρούλα Παναγή, διότι με τις τεχνικές μικροβιολογικές γνώσεις που μας προσέφερε, έγινε δυνατή η διεξαγωγή αυτής της πτυχιακής εργασίας.

Την επίκουρο καθηγήτρια Μπατρίνου Ανθιμία - Αικατερίνη για τις χρήσιμες συμβουλές της.

Την υποψήφια διδάκτορα Πυροβόλου Κατερίνα για την συμβολή της στην ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας.

Επιπλέον, θέλουμε να ευχαριστήσουμε την εταιρεία ΓΙΩΤΗΣ Α.Ε για την παροχή των προς ανάλυση δειγμάτων και τους προπτυχιακούς φοιτητές του τμήματος Χημικών Μηχανικών του ΕΜΠ για την πραγματοποίηση της διαδικασίας του εγκλεισμού.

Οφείλουμε να αφιερώσουμε την πτυχιακή μας εργασία στους γονείς μας που μας συμπαραστάθηκαν ανελλιπώς κατά τη φοίτησή μας στο ΠΑ.Δ.Α. Ένα τελευταίο, αλλά όχι λιγότερο ένθερμο ευχαριστώ, οφείλουμε στους φίλους μας που ήταν παρόντες σε όλη τη διάρκεια των ακαδημαϊκών μας σπουδών.

Περίληψη

Στη παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκαν τα οξυγαλακτικά βακτήρια, οι εφαρμογές τους στην βιομηχανία τροφίμων και οι προβιοτικές τους ιδιότητες. Αξιολογήθηκαν εμπορικές καλλιέργειες, λυοφιλιωμένων και εγκλεισμένων στελεχών, για την βιωσιμότητα και την βιοδιαθεσιμότητα τους σε γαλακτοκομικά προϊόντα κυρίως σε γιαούρτια.

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια τα οποία αναγνωρίζονται ως 'GRAS', μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως καλλιέργειες εκκίνησης σε ζυμώμενα γαλακτοκομικά προϊόντα, ως πρόσθετα για την παραγωγή τυρίων, ενώ παράλληλα, είναι ευρέως διαδεδομένα για την ευεργετική τους δράση στον ανθρώπινο οργανισμό ως προβιοτικά. Στη σημερινή εποχή οι καταναλωτές είναι περισσότερο ενημερωμένοι και ευαισθητοποιημένοι σε θέματα υγιεινής και ωφέλιμης διατροφής, επομένως, αναζητούν προϊόντα που εκτός από θρεπτικά συστατικά θα παρέχουν οφέλη στην υγεία του ανθρώπου.

Πραγματοποιήθηκε εγκλεισμός στις προβιοτικές καλλιέργειες σε πρεβιοτικές μήτρες, λόγω του ότι αρκετά στελέχη προβιοτικών αδυνατούν να επιβιώσουν στις όξινες συνθήκες που επικρατούν στο πεπτικό σύστημα.

Από τα ζυμώμενα γαλακτοκομικά προϊόντα καταναλώνεται ευρέως η γιαούρτη, η οποία παρασκευάζεται με τον εμβολιασμό και την συμβιωτική δράση των *Streptococcus thermophilus* και *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*. Σύμφωνα με το πρότυπο CXS243-2003 του Codex Alimentarius για τα ζυμώμενα γαλακτοκομικά προϊόντα, η γιαούρτη απαιτεί συνολικό πληθυσμό καλλιεργειών εκκίνησης, κατά την ημερομηνία της ελάχιστης διατηρησιμότητας, τουλάχιστον 10^7 cfu/g. Εκτός από τις παραδοσιακές καλλιέργειες εκκίνησης, πλέον προστίθενται και προβιοτικά στελέχη για την ενίσχυση της λειτουργικότητας του τελικού προϊόντος. Σύγχρονες δημοσιεύσεις καταλήγουν στο συμπέρασμα πως είναι απαραίτητο ο συνολικός πληθυσμός των προβιοτικών μικροοργανισμών να είναι 10^6 - 10^7 cfu/g στο τέλος της διάρκειας ζωής των τελικών προϊόντων.

Στη συγκεκριμένη εργασία, καταμετρήθηκαν αποικίες μικροοργανισμών σε λυοφιλιωμένη μορφή και σε εμπορικά γιαούρτια. Ειδικότερα, μελετήθηκαν εννέα διαφορετικά στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων τα οποία είναι: *Lacticaseibacillus casei* LC89, *Lactiplantibacillus plantarum* Lp90, *Lactobacillus acidophilus* LA85, *Lactobacillus bulgaricus* LB42, *Bifidobacterium lactis* BLa80, *Lacticaseibacillus rhamnosus* LGG, *Lactobacillus helveticus* LH76, *Lacticaseibacillus rhamnosus* LLa05, *Bifidobacterium longum* BL21, *Streptococcus thermophilus* ST81. Επίσης, μελετήθηκαν έξι εγκλεισμένοι μικροοργανισμοί κυρίως του γένους *Lacticaseibacillus rhamnosus* LGG με διαφορετικές τεχνικές εγκλεισμού και τέσσερα εμπορικά γιαούρτια εκ των οποίων τα τρία εμπεριέχουν προβιοτικά βακτήρια.

Η τεχνική που ακολουθήθηκε για την ανάπτυξη και συνεπώς για την καταμέτρηση των αποικιών είναι η ενσωμάτωση σε MRS και TOS-MUP θρεπτικά υποστρώματα ανάλογα με το είδος του μικροοργανισμού. Ειδικότερα, οι συνθήκες επώασης ήταν 37°C για 72 ώρες υπό αναερόβιες συνθήκες, οι οποίες ήταν κοινές για τους παραπάνω μικροοργανισμούς. Για ορισμένους μικροοργανισμούς χρησιμοποιήθηκαν εκλεκτικοί παράγοντες για την ανάπτυξη τους. Συγκεκριμένα, στα υποστρώματα MRS και TOS έγινε προσθήκη των αντιβιοτικών βανκομυκίνη (Van) και μουπιροκίνη (MUP), αντίστοιχα. Οι μικροοργανισμοί *Lactocaseibacillus casei* και *Lactocaseibacillus rhamnosus* εμβολιάστηκαν σε υπόστρωμα MRS-Van, ενώ *Bifidobacterium longum* και *Bifidobacterium lactis* σε υπόστρωμα TOS-MUP.

Σύμφωνα με τα πειράματα και την επεξεργασία των αποτελεσμάτων προέκυψε ότι όλες οι εμπορικές λυοφιλιωμένες καλλιέργειες παρουσίασαν επαρκή ανάπτυξη περισσότερο από 10^8 cfu/g. Κατά τον εγκλεισμό του *Lactocaseibacillus rhamnosus* τέσσερα δείγματα εμφάνισαν ανάπτυξη πάνω από 10^8 cfu/g, ενώ στα υπόλοιπα δύο δείγματα οι τεχνικές εγκλεισμού που εφαρμόστηκαν εμφάνισαν μη ικανοποιητική ανάπτυξη. Τέλος, στα εμπορικά γιαούρτια που αναλύθηκαν ο συνολικός πληθυσμός μικροοργανισμών που εμπεριείχαν, είναι σύμφωνος με το διεθνές πρότυπο του Codex Alimentarius.

Λέξεις κλειδιά: Οξυγαλακτικά βακτήρια, προβιοτικά, εγκλεισμός, γιαούρτη, καταμέτρηση.

Abstract

During this present thesis diploma, lactic acid bacteria's applications in the food industry and their probiotic properties were studied. Commercial cultures specifically freeze-dried and encapsulated strains were evaluated for their viability and bioavailability in dairy products, mainly in yogurt.

The lactic acid bacteria, which are recognized as 'GRAS', can be used as starter cultures in fermented dairy products, as additives for the production of cheeses, while at the same time they are commonly known for their beneficial effect on the human body as probiotics. Nowadays, consumers are more informed and aware of healthy and beneficial nutrition issues, therefore they are looking for products that, in addition to nutrients, will provide benefits to human health.

Encapsulation of probiotic cultures in prebiotic matrices was performed, due to the fact that several strains of probiotics are unable to survive the acidic conditions prevailing in the digestive tract.

As one of the fermented dairy products yogurt is widely consumed and is prepared by the inoculation and symbiotic action of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*. According to Codex Alimentarius Standard CXS243-2003 for Fermented Dairy Products, yogurt requires a total starter culture population of at least 10^7 cfu/g at the minimum shelf-life date. In addition to traditional starter cultures, probiotic strains are now added to enhance the functionality of the final product. Lately publications conclude that it is necessary for the total population of probiotic micro organisms to be 10^6 - 10^7 cfu/g at the end of the shelf life of the final product.

In this thesis, colonies of micro organisms in freeze-dried form and in commercial yogurts were enumerated. In particular, nine different strains of lactic acid bacteria were studied, these are: *Lacticaseibacillus casei* LC89, *Lactiplantibacillus plantarum* Lp90, *Lactobacillus acidophilus* LA85, *Lactobacillus bulgaricus* LB42, *Bifidobacterium lactis* BLa80, *Lacticaseibacillus rhamnosus* LGG, *Lactobacillus helveticus* LH76, *Lacticaseibacillus rhamnosus* LRa05, *Bifidobacterium longum* BL21, *Streptococcus thermophilus* ST81. Also, six of the studied encapsulated micro organisms mainly of the genus *Lacticaseibacillus rhamnosus* LGG were conducted with different encapsulation techniques and four commercial yogurts, three of which contain probiotic bacteria.

The technique followed for the growth and therefore for the enumeration of the colonies is the incorporation in MRS and TOS-MUP nutrient media depending on the type of micro organism. In particular, the incubation conditions were 37 °C for 72 hours under anaerobic conditions, which were identical to the above micro organisms. For some micro organisms selective agents were used for their growth. Specifically, the

antibiotics vancomycin (Van) and mupirocin (MUP) were added to the MRS and TOS media, respectively. The micro organisms *Lacticaseibacillus casei* and *Lacticaseibacillus rhamnosus* were inoculated on MRS-Van medium, while *Bifidobacterium longum* and *Bifidobacterium lactis* on TOS-MUP medium.

According to the experiments that were conducted, all the commercial freeze-dried cultures showed sufficient growth of more than 10^8 cfu/ g. During the encapsulation of *Lacticaseibacillus rhamnosus* four samples showed growth above 10^8 cfu/g, while the remaining two samples showed unsatisfactory growth. Finally, the commercial yogurts that were analyzed showed that the total population of micro organisms they contained is in accordance with the international standard of Codex Alimentarius.

Key words: lactic acid bacteria, probiotics, encapsulation, yoghurt, enumeration.

Περιεχόμενα

Κατάλογος πινάκων	1
Κατάλογος εικόνων	3
Κατάλογος διαγραμμάτων	5
Συντομεύσεις	6
Εισαγωγή	7
1. Θεωρητικό μέρος.....	8
1.1. Οξυγαλακτικά βακτήρια.....	8
1.2. Προβιοτικά.....	11
1.3. Τεχνική εγκλεισμού.....	14
1.4. Η γιαούρτη.....	15
1.5. Ο Codex Alimentarius για ζυμώμενα γάλατα.....	17
1.6. Η επαναταξινόμηση του γένους <i>Lactobacillus</i>	18
1.7. <i>Lactobacillus acidophilus</i>	19
1.7.1. Γενικά χαρακτηριστικά.....	19
1.7.2. Εφαρμογές.....	20
1.8. <i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	21
1.8.1. Γενικά χαρακτηριστικά.....	21
1.8.2. Εφαρμογές.....	21
1.9. <i>Lacticaseibacillus casei</i>	23
1.9.1. Γενικά χαρακτηριστικά.....	23
1.9.2. Εφαρμογές.....	24
1.10. <i>Lactobacillus helveticus</i>	26
1.10.1. Γενικά χαρακτηριστικά.....	26
1.10.2. Εφαρμογές.....	27
1.11. <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	28
1.11.1. Γενικά χαρακτηριστικά.....	28
1.11.2. Εφαρμογές.....	29
1.12. <i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	30
1.12.1. Γενικά χαρακτηριστικά.....	30
1.12.2. Εφαρμογές.....	31
1.13. <i>Streptococcus thermophilus</i>	32
1.13.1. Γενικά χαρακτηριστικά.....	32
1.13.2. Εφαρμογές.....	33
1.14. <i>Bifidobacterium spp.</i>	35
1.14.1. Γενικά χαρακτηριστικά.....	35
1.14.2. Εφαρμογές.....	36
1.14.3. Περισσότερες πληροφορίες για <i>Bifidobacterium longum</i>	37
1.14.3.1. Εφαρμογές.....	37

1.14.4.	Περισσότερες πληροφορίες για <i>Bifidobacterium lactis</i>	39
1.14.4.1.	Εφαρμογές.....	39
1.15.	Καλλιεργητικές συνθήκες.....	40
1.15.1.	Αφυδατωμένα μέσα καλλιέργειας.....	44
1.15.2.	Αντιβιοτικά.....	46
1.15.2.1.	Βανκομυκίνη (Van).....	46
1.15.2.2.	Μουπιροκίνη (MUP).....	48
2.	Πειραματικό μέρος.....	49
2.1.	Αρχή Μεθόδου.....	49
2.2.	Εξοπλισμός – Υλικά.....	49
2.3.	Δείγματα.....	51
2.4.	Προετοιμασία υποστρωμάτων με και χωρίς αντιβιοτικά.....	53
2.5.	Πειραματική πορεία εμπορικών καλλιέργειών.....	55
2.6.	Πειραματική πορεία εμπορικών γιαουρτιών.....	59
2.7.	Τρόπος αρίθμησης αποικιών.....	61
2.8.	Εγκλεισμός προβιοτικών στελεχών σε πρεβιοτικές μήτρες.....	62
2.9.	Αποτελέσματα – Συζήτηση.....	63
2.9.1.	Εμπορικές καλλιέργειες.....	63
2.9.2.	Εγκλεισμένα.....	69
2.9.3.	Εμπορικά γιαούρτια.....	71
	Βιβλιογραφία.....	74

Κατάλογος πινάκων

Πίνακας 1: Οφέλη προβιοτικών για την υγεία του ανθρώπου	12
Πίνακας 2: Ποσοτική σύνθεση γιαούρτης και γιαούρτης με εναλλακτικές καλλιέργειες..	15
Πίνακας 3: Συνολικός αριθμός χαρακτηριστικών μικροοργανισμών ζυμώμενων γαλάτων	17
Πίνακας 4: Ονομασία πριν και μετά την επαναταξινόμηση του γένους <i>Lactobacillus</i>	18
Πίνακας 5: Εφαρμογές του <i>Streptococcus thermophilus</i>	33
Πίνακας 6: Κυριότερα / επιλεκτικά υποστρώματα και συνθήκες επώασης σε ορισμένους μικροοργανισμούς	40
Πίνακας 7: Τα κυριότερα προτεινόμενα διεθνή πρότυπα καταμέτρησης αποικιών των LAB	43
Πίνακας 8: Συστατικά υποστρώματος MRS agar	44
Πίνακας 9: Συστατικά υποστρώματος TOS agar	45
Πίνακας 10: Γαλακτοβάκιλλοι ευαίσθητοι και ανθεκτικοί στην βανκομυκίνη	46
Πίνακας 11: Γαλακτοβάκιλλοι ευαίσθητοι και ανθεκτικοί στην βανκομυκίνη	47
Πίνακας 12: Τα δείγματα εμπορικών στελεχών και η κωδική τους ονομασία για την παρούσα πτυχιακή	51
Πίνακας 13: Τα δείγματα εγκλεισμένων βακτηρίων και η κωδική τους ονομασία	51
Πίνακας 14: Τα δείγματα εμπορικών γιαουρτιών, η κωδική τους ονομασία και η διατροφική τους δήλωση ανά 100g προϊόντος	52
Πίνακας 15: Πληροφορίες σχετικά με το είδος της μήτρας των εγκλεισμένων βακτηρίων και την περιεκτικότητά τους στο τελικό προϊόν	62
Πίνακας 16 : Συνολικός αριθμός αποικιών όλων των καλλιεργειών υπό αναερόβιες συνθήκες στους 37°C για 72h σε MRS agar υπόστρωμα εκφρασμένα σε cfu/g	63
Πίνακας 17: Συνολικός αριθμός αποικιών των καλλιεργειών που αναπτύχθηκαν υπό αναερόβιες συνθήκες στους 37°C για 72h σε MRS-Van agar υπόστρωμα εκφρασμένα σε cfu/g	66

Πίνακας 18: Συνολικός αριθμός αποικίων καλλιιεργειών που αναπτύχθηκαν υπό αναερόβιες συνθήκες στους 37°C για 72h σε TOS-MUP agar υπόστρωμα εκφρασμένα σε cfu/g	66
Πίνακας 19: Συνολικός αριθμός αποικίων εγκλεισμένων καλλιιεργειών που αναπτύχθηκαν υπό αναερόβιες συνθήκες στους 37°C για 72h σε MRS agar εκφρασμένα σε cfu/g	69
Πίνακας 20: Συνολικός αριθμός αποικίων εγκλεισμένων καλλιιεργειών που αναπτύχθηκαν υπό αναερόβιες συνθήκες στους 37°C για 72h σε MRS agar εκφρασμένα σε cfu/g	69
Πίνακας 21: Συνολικός αριθμός αποικίων καλλιιεργειών που αναπτύχθηκαν υπό αναερόβιες συνθήκες στους 37°C για 72h σε MRS agar στα γιαούρτια εκφρασμένα σε cfu/g	71
Πίνακας 22: Συνολικός αριθμός αποικίων καλλιιεργειών που αναπτύχθηκαν υπό αναερόβιες συνθήκες στους 37°C για 72h σε TOS-MUP agar στα γιαούρτια εκφρασμένα σε cfu/g	71

Κατάλογος εικόνων

Εικόνα 1: Εφαρμογές των LAB, (48)	10
Εικόνα 2: Κυριότεροι προβιοτικοί μικροοργανισμοί, (52)	11
Εικόνα 3: Μικροσκοπία ατομικής δύναμης (AFM) του <i>Lb. acidophilus</i> και των σχετικών μεμβρανικών κυστιδίων του (με 10 micron σαρώσεις) (90)	19
Εικόνα 4: Ηλεκτρονική μικρογραφία σάρωσης (SEM) κυττάρων του <i>Lb. bulgaricus</i> σε μεγέθυνση 1,0 μm (91)	21
Εικόνα 5: Ηλεκτρονική μικρογραφία σάρωσης (SEM) κυττάρων του <i>Lb. casei</i> (84)	23
Εικόνα 6: Μέθοδοι προβιοτικής δράσης της ομάδας LC (McGee et al., 2010), (5)	24
Εικόνα 7: Απεικόνιση του <i>Lb. helveticus</i> με Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Διέλευσης (TEM) (a) 2μm (b) 0,5μm (92)	26
Εικόνα 8: Ηλεκτρονική μικρογραφία σάρωσης (SEM) κυττάρων του <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> LP299v® (47)	28
Εικόνα 9: Ηλεκτρονική μικρογραφία σάρωσης (SEM) κυττάρων του <i>Lb. rhamnosus</i> . (47).....	30
Εικόνα 10: Ηλεκτρονική μικρογραφία σάρωσης (SEM) κυττάρων του <i>S. thermophilus</i> σε μεγέθυνση 0,5 μm (91)	32
Εικόνα 11: Η απεικόνιση του δισχιδούς σχήματος του <i>B. longum</i> BL-212 στο μικροσκόπιο (93)	35
Εικόνα 12: Οι προστατευτικοί μηχανισμοί του <i>Bifidobacterium longum</i> (45)	38
Εικόνα 13: Η τροποποίηση του μικροβιώματος του εντέρου είναι η κύρια ευεργετική δράση του <i>Bifidobacterium longum subsp. longum</i> BB536 στην προαγωγή της ανθρώπινης υγείας (37)	38
Εικόνα 14: Απεικόνιση αποικιών <i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> και <i>B. lactis</i> σε MRS-φρουκτόζη υπόστρωμα (69)	43
Εικόνα 15: Η πολύπλοκη χημική δομή της βανκομυκίνης (80).....	46
Εικόνα 16: Χημική δομή μουπιροσίνης (87)	48
Εικόνα 17: α. Αναδευτής Vortex-Genie 2. β. Θάλαμος νηματικής ροής (BIOBASE). γ. Ομογενοποιητής τύπου Stomacher	49

Εικόνα 18: α.Αυτόματη πιπέτα των 100-1000 μL. β.Στατό με δοκιμαστικούς σωλήνες.....	50
Εικόνα 19: α. Αντιβιοτικό βανκομυκίνη σε μη ενυδατωμένη μορφή (της Sigma- Aldrich). β.Αφυδατωμένο υπόστρωμα MRS agar (της Oxoid)	53
Εικόνα 20: α. Αφυδατωμένο υπόστρωμα TOS agar (της Millipore) β. Αντιβιοτικό μουπιτοκίνη (της Sigma- Aldrich)	54
Εικόνα 21: Ζύγιση λυοφιλιωμένης καλλιέργειας σε αναλυτικό ζυγό με τη χρήση λύχνου.....	55
Εικόνα 22: Απαιτούμενα υλικά για τη διαδικασία της ενσωμάτωσης στον θάλαμο νηματικής ροής	57
Εικόνα 23: α. Φάκελος αναεροβίωσης AnaeroGen 2.5L β. Δείκτης αναεροβίωσης (Anaerobic Indicator BR0055B) γ. Φιάλη αναεροβίωσης (GasPak System).....	57
Εικόνα 24: Αποτελέσματα ανάπτυξης του <i>Lb. casei</i> στην 8η αραιώση (10^{-8}) εικόνα α και 9η αραιώση (10^{-9}) εικόνα β σε MRS agar θρεπτικό υπόστρωμα	64
Εικόνα 25: Αποτελέσματα ανάπτυξης του <i>Lb. casei</i> στην 10η αραιώση (10^{-10}) εικόνα γ και 11η αραιώση (10^{-11}) εικόνα δ σε MRS agar θρεπτικό υπόστρωμα	64

Κατάλογος διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1: Ταξινόμική ιεραρχία του γένους <i>Lactobacillus</i> (Beijerinck, 1901 emend. Haakensen et al., 2009 emend. Cai et al., 2012)	9
Διάγραμμα 2: Ταξινόμική ιεραρχία του γένους <i>Bifidobacterium</i> (Orla-Jensen, 1924)	9
Διάγραμμα 3α: Τα κυριότερα προβιοτικά στελέχη του γένους <i>Lactobacillus</i> (47)	13
Διάγραμμα 3β: Τα κυριότερα προβιοτικά στελέχη του γένους <i>Bifidobacterium</i> (47)	13
Διάγραμμα 4: Απεικόνιση της διαδικασίας παραγωγής της γιαούρτης. *Η ομογενοποίηση δεν πραγματοποιείται στα παραδοσιακά γιαούρτια με πέτσα (100) ...	16
Διάγραμμα 5: Απεικόνιση πειραματικής πορείας εμπορικών καλλιεργειών	58
Διάγραμμα 6: Απεικόνιση πειραματικής πορείας εμπορικών γιαουρτιών	60
Διάγραμμα 7: Καταμέτρηση αποικιών των μικροοργανισμών σε MRS agar υπόστρωμα.....	65
Διάγραμμα 8: Σύγκριση συνολικού πληθυσμού <i>Lb. rhamnosus</i> (LR-LGG) σε MRS και TOS-MUP agar.	66
Διάγραμμα 9: Σύγκριση συνολικού πληθυσμού <i>Bifidobacterium spp.</i> σε MRS και TOS-MUP agar	67
Διάγραμμα 10: Σύγκριση συνολικού πληθυσμού <i>Lb. casei</i> (LC-LC89) σε MRS με και χωρίς αντιβιοτικό	68
Διάγραμμα 11: Καταμέτρηση αποικιών των εγκλεισμένων μικροοργανισμών σε MRS agar υπόστρωμα	70
Διάγραμμα 12: Σύγκριση πλυθησμού LGG με εγκλεισμό (ProbiYo (i) και ProbiYo (ii)) και χωρίς εγκλεισμό (LGG)	70
Διάγραμμα 13: Σύγκριση συνολικού πληθυσμού μικροοργανισμών σε δείγματα γιαουρτιών σε MRS και TOS-MUP υπόστρωμα	72

ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΙΣ

AFM = Atomic Force Microscopy (Μικροσκοπία ατομικής δύναμης)

APHA = American Public Health Association

BIOHAZ = Biological Hazards

EFSA = European Food Safety Authority (Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων)

EMP = Embden-Meyerhof Pathway (μεταβολική οδός του Embden-Meyerhof)

FAO = Food and Agriculture Organization of the United Nations

FEEDAP = Feed Additives / EFSA

GRAS = Generally Recognized as Safe (Γενικά Αναγνωρισμένο ως Ασφαλές)

IBS = Irritable Bowel Syndrome (Συνδρόμο του Ευερέθιστου Εντέρου)

IDF = International Dairy Federation

IPA = International Probiotic Association

ISO = International Organization for Standardization

ITIS = Integrated Taxonomic Information System

LAB = Lactic Acid Bacteria (οξυγαλακτικά βακτήρια)

MUP = Mupirocin (μουπιροκίνη)

NSLAB = non-starter Lactic Acid Bacteria (μη-εκκινητά γαλακτικά βακτήρια)

QPS = Qualified Presumption of Safety (Πιστοποιημένο Τεκμήριο Ασφάλειας)

SEM = Scanning Electron Microscope (Ηλεκτρονική μικρογραφία σάρωσης)

spp. = species (ειδός μικροοργανισμού)

TEM = Transmission Electron Microscopy (Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Διέλευσης)

Van = Vancomycin (βανκομυκίνη)

WHO = World Health Organization (Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας)

ΚΤΠ = Κώδικας Τροφίμων και Ποτών

Εισαγωγή

Στη παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκαν τα οξυγαλακτικά βακτήρια, οι εφαρμογές τους στην βιομηχανία τροφίμων και οι προβιοτικές τους ιδιότητες. Αξιολογήθηκαν εμπορικές καλλιέργειες, λυοφιλιωμένων και εγκλεισμένων στελεχών, για την βιωσιμότητα και την βιοδιαθεσιμότητα τους σε γαλακτοκομικά προϊόντα κυρίως σε γιαούρτια.

Μέσω της μεθόδου της ενσωμάτωσης των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε στερεό υπόστρωμα MRS και TOS-MUP επιτυγχάνεται η καταμέτρηση των σχηματιζόμενων αποικιών και συνεπώς η εκτίμηση του συνολικού μικροβιακού φορτίου.

Συνοπτικά ο σκοπός της εργασίας είναι:

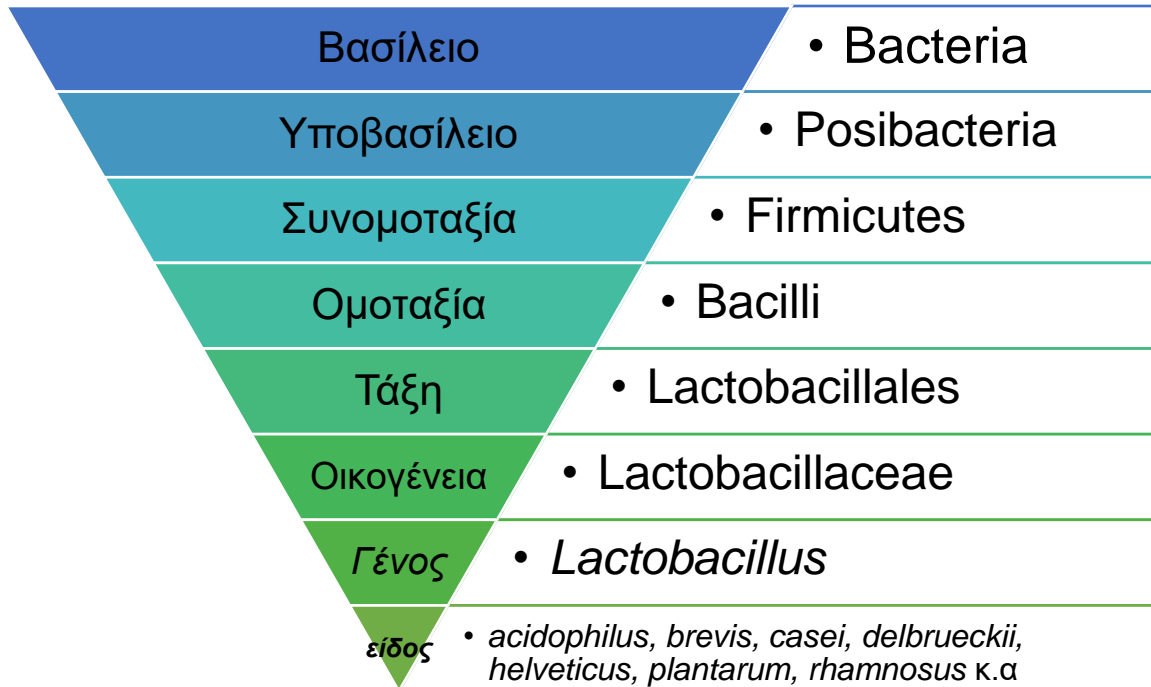
- Χαρακτηρισμός οξυγαλακτικών βακτηρίων με προβιοτική δράση και οφέλη για την υγεία του ανθρώπινου οργανισμού.
- Αξιολόγηση της ικανότητας ανάπτυξης διάφορων οξυγαλακτικών βακτηρίων για την παραγωγή γιαούρτης.
- Έλεγχος εμπορικών γιαουρτίων για την τήρηση των προδιαγραφών και προτύπων για τα ζυμώμενα γαλακτοκομικά προϊόντα.

Η παρούσα πτυχιακή εργασία έχει την δυνατότητα να προσφέρει τεχνογνωσία για τη διεκπεραίωση αντίστοιχων πειραμάτων από άλλους ερευνητές στο μέλλον. Επιπλέον, τα προβιοτικά βακτήρια με ή χωρίς εγκλεισμό μπορούν να ενσωματωθούν σε γαλακτοκομικά προϊόντα, όπως η γιαούρτη, με σκοπό να προσφέρουν λειτουργικές ιδιότητες αλλά και να αναπτυχθούν καινοτόμα γαλακτοκομικά προϊόντα στο μέλλον.

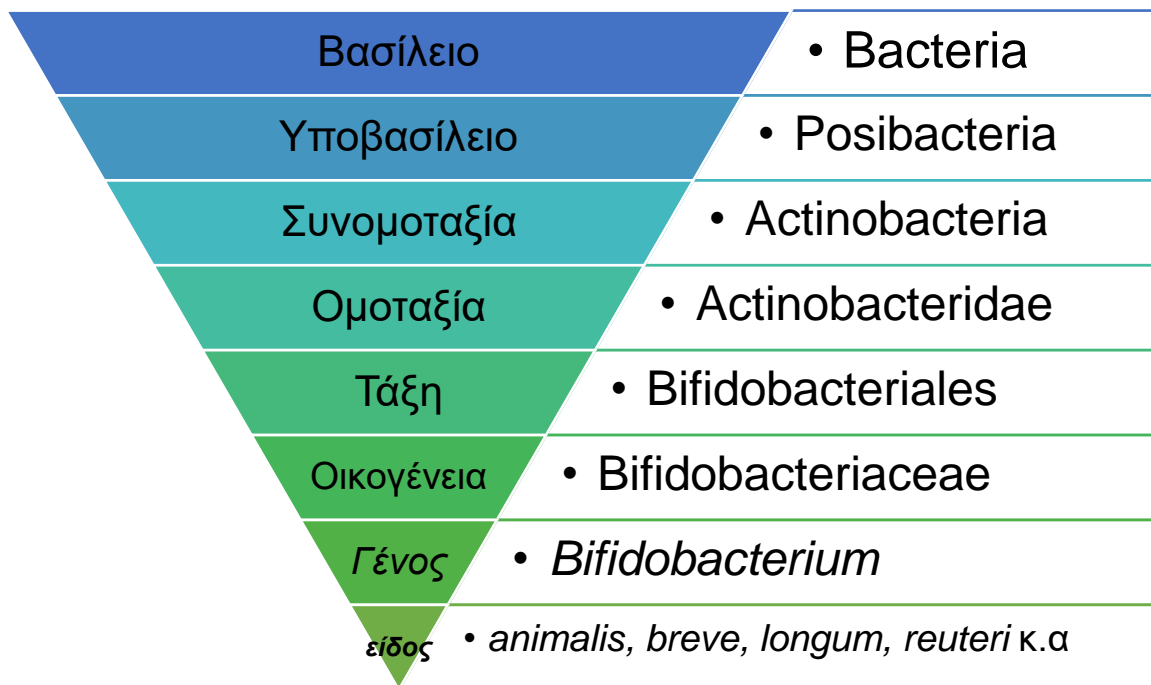
1. Θεωρητικό μέρος

1.1. Οξυγαλακτικά βακτήρια

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια παλαιότερα χαρακτηρίζονταν ως βακτήρια για το «ξίνισμα του γάλακτος» ή βακτήρια «που παράγουν γαλακτικό οξύ», οροί που προκάλεσαν σύγχυση, έτσι από τις αρχές του 20^{ου} αιώνα υιοθετήθηκε ο όρος LAB (lactic acid bacteria) από τον Orla-Jensen. Τα LAB αποτελούν μια ετερογενή ομάδα βακτηρίων που φέρουν κοινές μορφολογικές, φυσιολογικές, μεταβολικές ιδιότητες και είναι φυλογενετικά στενά συσχετισμένα μεταξύ τους. Στην ομάδα αυτή συμπεριλαμβάνονται κυρίως τα γένη *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* και *Streptococcus*. Σύμφωνα με νέες ταξινομικές αναθεωρήσεις προστέθηκαν τα γένη *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* και *Weissella* (50). Η οικογένεια των LAB περιλαμβάνει και το γένος *Bifidobacterium* παρόλο που έχει διαφορετικές μεταβολικές ιδιότητες από τα παραπάνω LAB (51). Γενικά χαρακτηρίζονται ως Gram θετικά, μη σπορογόνα, αρνητικά στην καταλάση, προαιρετικά αναερόβια βακτήρια, που παράγουν ως μεταβολικό προϊόν κυρίως γαλακτικό οξύ. (48,52) Η μακροχρόνια παρουσία των LAB στην ανθρώπινη διατροφή μέσω κυρίως των ζυμώμενων τροφίμων τα οδήγησε στην αποδοχή τους ως «Γενικά Αναγνωρισμένα Ασφαλή», GRAS (Generally Recognised as Safe) (48). Επιπλέον, σύμφωνα με δημοσίευση του 2020 της επιτροπής Biological Hazards (BIOHAZ) της EFSA, τα LAB δεν έχουν σχετιστεί με κλινικά προβλήματα. (49)

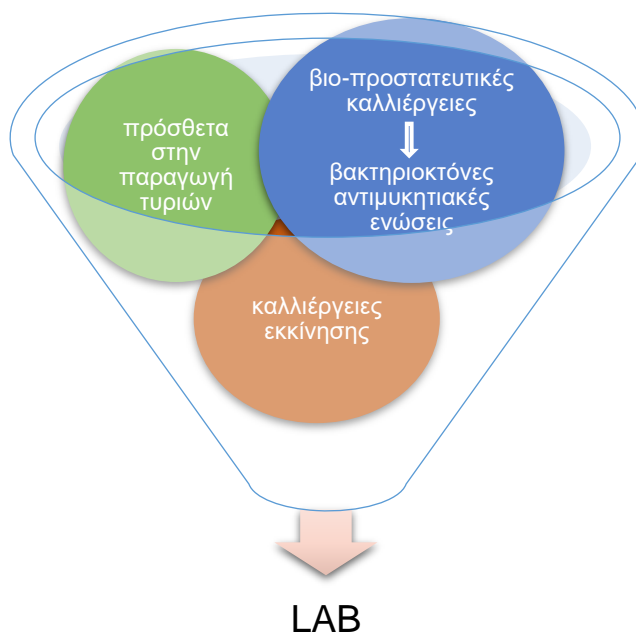


Διάγραμμα 1: Ταξινομική ιεραρχία του γένους *Lactobacillus* (Beijerinck, 1901 emend. Haakensen et al., 2009 emend. Cai et al., 2012). Πηγή: ITIS-Report, (2012) (64a)



Διάγραμμα 2: Ταξινόμηση ιεραρχία του γένους Bifidobacterium (Orla-Jensen, 1924) Πηγή: ITIS-Report, (2012) (64b)

Τα LAB βρίσκουν εφαρμογή στα τρόφιμα ως καλλιέργειες εκκίνησης κυρίως σε ζυμώμενα γαλακτοκομικά προϊόντα (γιαούρτη, τυρί, κεφίρ, γάλα acidophilus). Χρησιμοποιούνται ως πρόσθετα στην παραγωγή τυριών για να ενισχύσουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και να επιταχύνουν την ωρίμανση τους, ενώ στην παραγωγή γιαούρτη βελτιώνουν την υφή με την παραγωγή εξωπολυσακχαριτών. Δρουν ως βιο-προστατευτικές καλλιέργειες με τον σχηματισμό βακτηριοσινών και αντιμυκητιακών ενώσεων. Τέλος, ορισμένα στελέχη των LAB σε συνδυασμό με τα *Bifidobacterium* φέρουν ιδιότητες προβιοτικών προσφέροντας έτσι ευεργετικά αποτελέσματα στην υγεία του ανθρώπου (48). Περιληπτικά οι εφαρμογές των LAB παρουσιάζονται στην εικόνα 1.



Εικόνα 1: Εφαρμογές των LAB, (48).

1.2. Προβιοτικά

Τα προβιοτικά διατυπώθηκαν για πρώτη φορά απο τον Metchnikoff το 1900 με την λέξη «προβιοτικό» που προέρχεται από την λατινική πρόθεση "pro" που σημαίνει "για " και την ελληνική λέξη βιωτικός που σημαίνει «βίος» ή «ζωή». Σύμφωνα με τον FAO/WHO (2001) και με αναθεώρηση από τους Hill κ.α (2014), ορίζονται ως «ζωντανοί μικροοργανισμοί που, όταν χορηγούνται σε επαρκείς ποσότητες, προσφέρουν οφέλη στην υγεία του ξενιστή». Το 2002 κατά την αξιολόγηση των προβιοτικών στα τρόφιμα η Ομάδα Εργασίας του FAO/WHO όρισαν ως βασικές προϋποθέσεις ότι τα προβιοτικά πρέπει:

- Να χορηγούνται ως ζωντανά
- Να είναι επιστημονικά τεκμηριωμένα όσον αφορά το όφελος για την υγεία στον ξενιστή-στόχο
- Να είναι ένας ταξινομικά καθορισμένος μικροοργανισμός ή συνδυασμός μικροοργανισμών (γένος, είδος και επίπεδο στελέχους)
- Να είναι ασφαλή για την προβλεπόμενη χρήση τους
- Να επιβιώνουν στο πέρασμα από το στομάχι και να διατηρούν τη βιωσιμότητα και τη μεταβολική τους δραστηριότητα στο έντερο (Hyun και Shin, 1998). (56, 57)

Στην εικόνα 2 παρουσιάζονται τα κυριότερα προβιοτικά. Στο διάγραμμα 3α και 3β φαίνονται τα κυριότερα στελέχη με προβιοτική δράση.



Εικόνα 2: Κυριότεροι προβιοτικοί μικροοργανισμοί, (52).

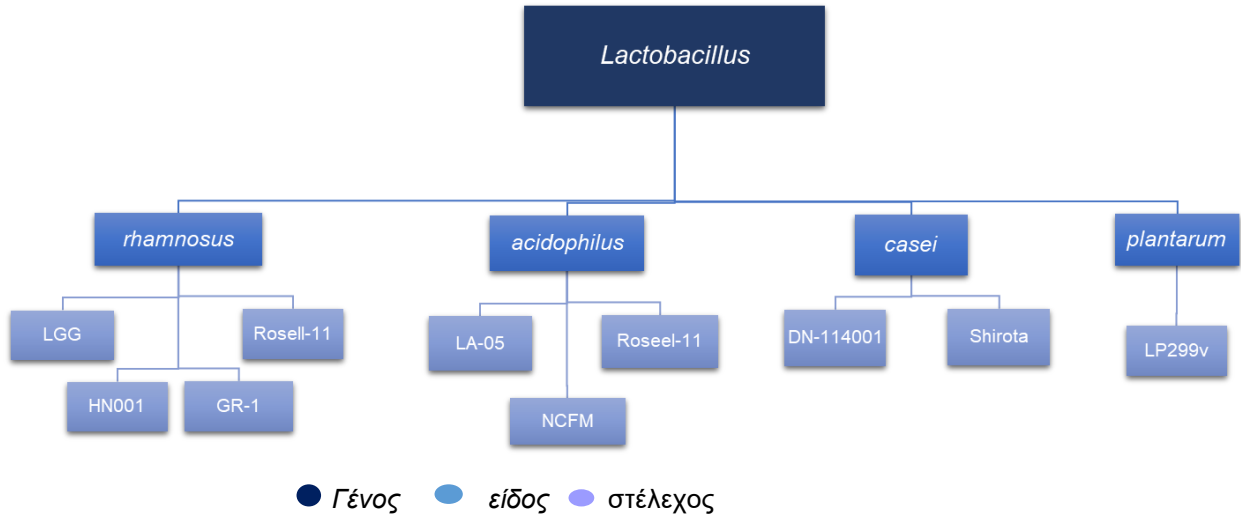
Στον πίνακα 1 αναφέρονται κάποιες από τις ευεργετικές επιδράσεις των προβιοτικών στην υγεία του ανθρώπου.

Πίνακας 1: Οφέλη προβιοτικών για την υγεία του ανθρώπου.

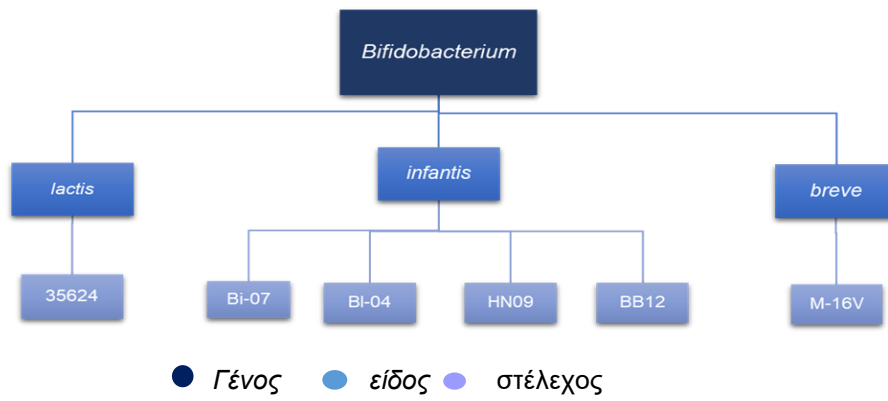
Οφέλη προβιοτικών για την υγεία
Επίδραση στην εντερική μικροχλωρίδα
Βελτίωση λειτουργίας του εντερικού φραγμού
Τροποποίηση ανοσολογικών λειτουργιών
Παραγωγή αντιβακτηριακών ουσιών
Ρύθμιση πρόσληψης χοληστερόλης
Βελτίωση ανοχής στη λακτόζη
Ανταγωνιστικός αποκλεισμός εντερικών βακτηρίων
Καταστολή ενδογενών και εξωγενών παθογόνων

Πηγές: Araújo et al. (2012), Naidu et al.(2012), (57,58)

Σύμφωνα με έρευνες η απαιτούμενη ποσότητα προβιοτικού μικροοργανισμού σε επεξεργασμένο τρόφιμο, ώστε να έχει ευεργετικές ιδιότητες, εξαρτάται από το είδος του μικροοργανισμού (π.χ ο *Lb. rhamnosus* GG απαιτεί 10^9 cfu/g) και τις συνθήκες που επικρατούν σε αυτό. Πρόσφατες δημοσιεύσεις καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι απαιτούνται τουλάχιστον 10^6 - 10^7 cfu/g ή ml βιώσιμων μικροοργανισμών στο τέλος της διάρκειας ζωής του προϊόντος (52 - 55,57,59).



Διάγραμμα 3α: Τα κυριότερα προβιοτικά στελέχη του γένους *Lactobacillus*, (47).



Διάγραμμα 3β: Τα κυριότερα προβιοτικά στελέχη του γένους *Bifidobacterium*, (47).

1.3. Τεχνική εγκλεισμού

Αρκετά στελέχη προβιοτικών, αδυνατούν να επιβιώσουν στις όξινες συνθήκες που επικρατούν στο πεπτικό σύστημα του ανθρώπινου οργανισμού. Συνεπώς, η ενθυλάκωση βιοδραστικών ενώσεων και προβιοτικών βακτηρίων μέσα σε πρεβιοτικές μήτρες είναι απαραίτητη, ώστε να προστατευθεί ή ακόμη και να ενισχυθεί η επιβίωσή τους. Η μέθοδος επιτυγχάνει την βελτίωση της βιωσιμότητας και της βιοδιαθεσιμότητας των βακτηρίων, κατά την παραγωγή, αποθήκευση και κατανάλωση του προϊόντος. Η τεχνική του εγκλεισμού συνίσταται στην επικάλυψη ή παγίδευση ενός επιθυμητού συστατικού μέσα σε ένα δευτερεύον, για τον έλεγχο της απελευθέρωσης του δραστικού συστατικού μέχρι την επίτευξη κατάλληλων συνθηκών. Αναφέρεται ότι τα σωματίδια που προκύπτουν έχουν διάμετρο από λίγα nm μέχρι μερικά μm. Η τεχνική αυτή εφαρμόζεται σε διάφορους επιστημονικούς και βιομηχανικούς κλάδους, όπως στην τεχνολογία τροφίμων. Κάποια από τα πλεονεκτήματα του εγκλεισμού είναι η προστασία του υλικού από την αποικοδόμηση, η επιβράδυνση του ρυθμού μεταφοράς του δραστικού υλικού στο περιβάλλον και η διαμόρφωση των φυσικών χαρακτηριστικών του δραστικού υλικού. Τα εγκλειστικά μέσα - μήτρες περιλαμβάνουν κυρίως πρωτεΐνες και υδατάνθρακες. (105) Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι ενθυλάκωσης προβιοτικών μικροοργανισμών με κυριότερες τις:

- Ξήρανση με ψεκασμό (spray drying)
- Λυοφιλίωση / ξήρανση υπό κατάψυξη (freeze drying)
- Γαλακτωματοποίηση (emulsification)
- Συσσωμάτωση (coacervation)
- Νανο - καταβύθιση (nano-precipitation)
- Εκβολή (extrusion)
- Ηλεκτροστατική ινοποίηση / ηλεκτροστατικό ψεκασμό (electro spinning / electro spraying)
- Χρήση λιποσωμάτων (liposome preparation). (105)

1.4. Η γιαούρτη

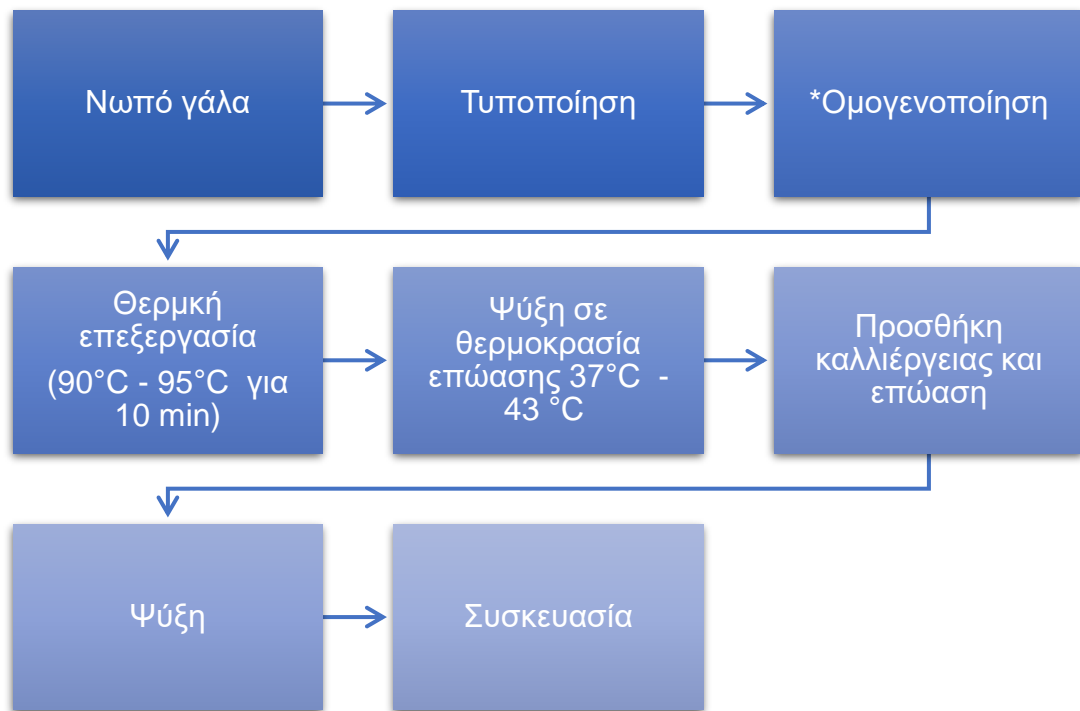
Πριν από χιλιετίες, οι άνθρωποι άρχισαν να καταναλώνουν ζυμώμενα γαλακτοκομικά προϊόντα από την εξημέρωση των ζώων (97), για να παρατείνουν την διάρκεια ζωής του γάλακτος (98). Ιστορικά, η γιαούρτη αποτελεί παραδοσιακό προϊόν γάλακτος στις διατροφικές συνήθειες πολλών πληθυσμών της Σκανδιναβίας, της Μέσης Ανατολής και της νοτιοανατολικής Ασίας, ενώ παράγεται εμπορικά για πάνω από έναν αιώνα (98). Η γιαούρτη είναι ένα στερεό ζυμώμενο προϊόν. Ο όρος γιαούρτη προέρχεται από την τούρκικη λέξη 'yogurt' και συνδέεται με τις λέξεις 'yogurtmak' που σχετίζεται με την ζύμωση και 'yogun' που συνδέεται με την λέξη πυκνό (95). Σύμφωνα με το άρθρο 82 του Ελληνικού Κώδικα Τροφίμων και Ποτών (2016) η «γιαούρτη» χαρακτηρίζεται το γαλακτοκομικό προϊόν το οποίο παράγεται από τη ζύμωση και πήξη του γάλακτος, με τη χρήση υποχρεωτικά των καλλιιεργειών εκκίνησης *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* και *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, ώστε το τελικό ζυμωμένο προϊόν να περιέχει τουλάχιστον 10^7 cfu/g προϊόντος μέχρι την ημερομηνία ανάλωσής του (99). Τα τελευταία χρόνια, παράγεται ευρύ φάσμα καταναλωτικών προϊόντων με βάση την γιαούρτη όπως ζαχαρούχα, αρωματισμένα, χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά, προβιοτικά και άλλα γιαούρτια με λειτουργικές ιδιότητες για την υγεία (98). Η κατανάλωση γιαουρτιού συμβάλλει στην υγεία του ανθρώπινου οργανισμού, συγκεκριμένα βελτιώνει την εντερική λειτουργία, το ανοσοποιητικό σύστημα, μειώνει τον κίνδυνο για διαβήτη τύπου II και αύξηση βάρους, επιπλέον συμβάλλει στην πρόληψη καρδιαγγειακών παθήσεων, γι'αυτό το λόγο το εμπόριο γιαούρτης έχει αυξηθεί παγκοσμίως (96,98).

Με βάση το διεθνές αναγνωρισμένο πρότυπο CXS243-2003 του Codex Alimentarius η σύσταση για γιαούρτια με παραδοσιακές καλλιέργειες και γιαούρτια με εναλλακτικές καλλιέργειες αναφέρονται στον πίνακα 2. Επιπλέον, σύμφωνα με το άρθρο 82 του ΚΤΠ ως πρώτη ύλη της γιαούρτης χρησιμοποιείται το γάλα όπως αυτό ορίζεται στον Κανονισμό (ΕΚ) 1308/2013 και απαγορεύεται η χρήση ολικά αφυδατωμένου γάλακτος ή γάλακτος σε μορφή σκόνης.

Πίνακας 2: Ποσοτική σύνθεση γιαούρτης και γιαούρτης με εναλλακτικές καλλιέργειες.

Συστατικά	Γιαούρτη, γιαούρτη με εναλλακτικές καλλιέργειες
Πρωτεΐνη γάλακτος	ελάχιστο 2,7%
Λιπαρά γάλακτος	λιγότερο από 15%
Οξύτητα εκφρασμένη σε γαλακτικό οξύ	ελάχιστο 0,6%

Πηγή: Codex Alimentarius, (2003)



Διάγραμμα 4: Απεικόνιση της διαδικασίας παραγωγής της γιαούρτης. *Η ομογενοποίηση δεν πραγματοποιείται στα παραδοσιακά γιαούρτια με πέτσα, (100).

1.5. Ο Codex Alimentarius για ζυμώμενα γάλατα

Το πρότυπο CXS243-2003 του Codex Alimentarius δημιουργήθηκε το 2003 και με βάση την τελευταία τροποποίηση του 2018, εφαρμόζεται σε ζυμώμενα γαλακτοκομικά προϊόντα, συγκεκριμένα περιλαμβάνει τη γιαούρτη, την εναλλακτική καλλιέργεια γιαούρτης, το γάλα acidophilus, το κεφίρ και το κούμης. Τα ζυμώμενα γαλακτοκομικά προϊόντα είναι γάλατα που έχουν υποστεί ζύμωση από τη δράση συγκεκριμένων μικροοργανισμών, με αποτέλεσμα τη μείωση του pH με ή χωρίς πήξη. Οι εκκινητές καλλιέργειες που χρησιμοποιούνται πρέπει να είναι βιώσιμες, ζωντανές και άφθονες στο προϊόν μέχρι την ημερομηνία ανάλωσης. Ωστόσο, εάν το προϊόν έχει υποστεί θερμική επεξεργασία μετά τη ζύμωση, δεν ισχύει η απαίτηση για βιώσιμους μικροοργανισμούς.

Ορισμένα ζυμώμενα προϊόντα χαρακτηρίζονται από συγκεκριμένες καλλιέργειες εκκίνησης ως εξής:

- Γιαούρτη: συμβιωτικές καλλιέργειες, *Streptococcus thermophilus* - *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.
- Γιαούρτη εναλλακτικής καλλιέργειας: Καλλιέργειες *Streptococcus thermophilus* και μαζί με οποιοδήποτε είδος *Lactobacillus*.
- Γάλα acidophilus: *Lactobacillus acidophilus*

Μπορούν να προστεθούν και άλλοι μικροοργανισμοί εκτός από τους ειδικούς εκκινητές που αναφέρονται παραπάνω (π.χ *Bifidobacterium* spp.).

Όπως φαίνεται στον πίνακα 3, στο πρότυπο προβλέπεται ο συνολικός αριθμός των χαρακτηριστικών μικροοργανισμών της γιαούρτης όπου πρέπει κατά την ημερομηνία της ελάχιστης διατηρησιμότητας να είναι τουλάχιστον 10^7 cfu/g. (94)

Πίνακας 3: Συνολικός αριθμός χαρακτηριστικών μικροοργανισμών ζυμώμενων γαλάτων.

	Ζυμώμενα γάλατα	Γιαούρτη, γιαούρτη εναλλακτικής καλλιέργειας, γάλα acidophilus
Σύνολο μ.ο που αποτελούν εκκινητές καλλιέργειες (cfu/g).	Ελάχιστο 10^7	Ελάχιστο 10^7
Μικροοργανισμοί που αναγράφονται στην ετικέτα (cfu/g).	Ελάχιστο 10^6	Ελάχιστο 10^6

Πηγή Codex Alimentarius, (2018)

codex alimentarius commission



FOOD AND AGRICULTURE
ORGANIZATION
OF THE UNITED NATIONS

WORLD
HEALTH
ORGANIZATION



1.6. Η επαναταξινόμηση του γένους *Lactobacillus*

Είναι γεγονός ότι το γένος *Lactobacillus* περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1901 από τον Beijerinck. Έκτοτε, το γένος περιλαμβάνει περισσότερα από 260 είδη, τα οποία πλέον φέρουν διαφορετική γενετική σύνθεση και δεν συμμορφώνονται, αφενός στους κανόνες της ετερογένειας και αφετέρου στους κανόνες της ονοματολογίας. Μια διεθνής ομάδα επιστημών χρησιμοποιώντας μια πολυφασική προσέγγιση, επαναταξινόμησε το γένος *Lactobacillus* σε 25 γένη, εκ των οποίων τα 23 δημιουργήθηκαν πρόσφατα. Τα αποτελέσματα της έρευνας δημοσιεύτηκαν τον Απρίλιο του 2020 στο *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (IJSEM). Συνέπεια αυτής της νέας ομαδοποίησης είναι ότι τα είδη με κοινά φυσιολογικά χαρακτηριστικά ανήκουν πλέον στον ίδιο γένος και πιθανόν να διευκολύνουν την κατανόηση των μηχανισμών που οφελούν στην υγεία του ανθρώπου. Η επαναταξινόμηση οδήγησε στην αλλαγή ονομασίας ορισμένων γενών, ωστόσο η ονομασία των ειδών παρέμεινε ίδια. Κάποια παραδείγματα αναγράφονται στον πίνακα 4. Αξίζει να σημειωθεί ότι αναμένονται αλλαγές και στην ονοματολογία του γένους *Bifidobacterium* (Orla-Jensen, 1924). (60-63)

Πίνακας 4: Ονομασία πριν και μετά την επαναταξινόμηση του γένους *Lactobacillus*.

Πρώην ονομασία γένους	Σημερινή ονομασία γένους	Συντομογραφία ονόματος
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Levilactobacillus brevis</i>	<i>Lb. brevis</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lacticaseibacillus casei</i>	<i>Lb. casei</i>
<i>Lactobacillus paracasei</i>	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	<i>Lb. paracasei</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	<i>Lb. plantarum</i>
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	<i>Lb. rhamnosus</i>

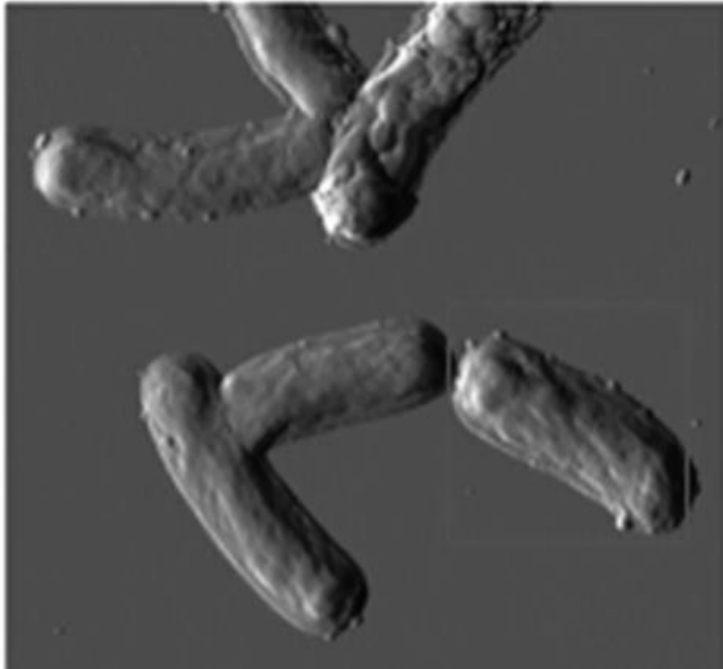
Πηγή: IPA, (2020)

1.7. *Lactobacillus acidophilus*

Ο *Lb. acidophilus* κατατάχθηκε από τον Moro το 1900 ως «*Bacillus acidophilus*» από βρεφικά περιττώματα και ανανεώθηκε το 1970 από τους Hanson και Moquot (8). Το 1980, χαρακτηρίστηκε ως ετερογενής ομάδα με παρόμοιες λειτουργικές και μεταβολικές ιδιότητες (7). Η ομάδα αποτελείται από τα στελέχη *Lb. acidophilus*, *Lb. amylovorus*, *Lb. crispatus*, *Lb. gallinarum*, *Lb. gasseri* και *Lb. johnsonii* (8). Ο *Lb. acidophilus* με βάση τα φυλογενετικά χαρακτηριστικά σχετίζεται περισσότερο με τον *Lb. helveticus*. Ορίστηκε ως οξεόφιλος λόγω του όξινου περιβάλλοντος που επικρατεί στο εντερικό σύστημα κατά την απομόνωσή του (7). Αποτελεί μέρος της φυσικής ανθρώπινης μικροχλωρίδας και συγκεκριμένα απομονώνεται από το στοματικό, κολπικό και γαστρεντερικό σύστημα (6).

1.7.1. Γενικά χαρακτηριστικά

Ο *Lactobacillus acidophilus* είναι gram θετικό LAB, μη κινητό, μη σπορογόνο, ραβδόμορφο με μέγεθος 2–10 μm, με στρογγυλεμένα άκρα, το οποίο εμφανίζεται



μεμονωμένα, σε ζευγάρια και σε κοντές αλυσίδες. Είναι αναερόβιο, θερμοφιλο βακτήριο με βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης 37°C έως 42°C (Altermann et al., 2005) και αναπτύσσεται σε pH 5,5 – 6,0 ενώ, σταματά κάτω από το pH 4,0 (Shah, 2007). Οι διατροφικές τους απαιτήσεις περιλαμβάνουν παντοθενικό ασβέστιο, φολικό οξύ, νιασίνη και ριβοφλαβίνη. Επιπλέον, κατατάσσεται στα υποχρεωτικά ομοζυμωτικά LAB, παράγει D- και L- γαλακτικά οξέα ζυμώνοντας τις εξόζες κατά την γλυκόλυση (EMP) (Hutkins, 2006).

Εικόνα 3: Μικροσκοπία ατομικής δύναμης (AFM) του *Lb. acidophilus* και των σχετικών μεμβρανικών κυστιδίων του (με 10 micron σαρώσεις), (90).

1.7.2. Εφαρμογές

Ο *Lb. acidophilus* έχει πολλές εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων και είναι αναγνωρισμένος για τα προβιοτικά του αποτελέσματα (Shah, 2007). Αναλυτικότερα, προστίθεται για την παραγωγή όξινου γάλακτος (καταναλώνεται από άτομα που έχουν δυσπεψία και δυσανεξία στη λακτόζη), γιαουρτιού, κεφίρ, κούμις και γάλα σόγιας. Σε αυτά τα προϊόντα, είναι απαραίτητο να υπάρχει ένας συγκεκριμένος αριθμός ζωντανών κυττάρων. (8)

Στη περίπτωση της ζύμωσης του γάλακτος μόνο με *Lb. acidophilus* δεν σχηματίζεται η βουτυρώδης γεύση γιαουρτιού, λόγω της έλλειψης παραγωγής ακεταλδεΐδης, με αποτέλεσμα το γιαούρτι να είναι απλό και ξινό (7). Επιπρόσθετα, ο *Lb. acidophilus* εμβολιάζεται μαζί με άλλους προβιοτικούς μικροοργανισμούς (*Lb. casei*, *Lb. paracasei* ή *Bifidobacterium spp.*) σε τυρί τσένταρ (Ong et al., 2007), φρέσκο τυρί minas (Flavia et al., 2006), προβιοτικό λευκό τυρί (Lu et al., 2004) και τυρί Gouda (El-Sayed et al., 2010). Ειδικότερα, ο *Lb. acidophilus* ATCC 43121 μέσω της μικροενθυλάκωσης προστίθεται σε συμπληρώματα διατροφής τα οποία αποτρέπουν μολύνσεις από ζύμες, τη δυσφορία του γαστρεντερικού συστήματος και τη χαμηλή ανοσολογική δραστηριότητα. (8)

Ο *Lb. acidophilus* παρουσιάζει ευεργετικά οφέλη στην υγεία του ανθρώπου (Saxelin et al. 2005). Συμβάλλει στην ελάττωση της χοληστερόλης, ανακουφίζει από την δυσκοιλιότητα και τη διάρροια. Μειώνει τον κίνδυνο μεταλλαξιογένεσης και καρκινογένεσης. (8)

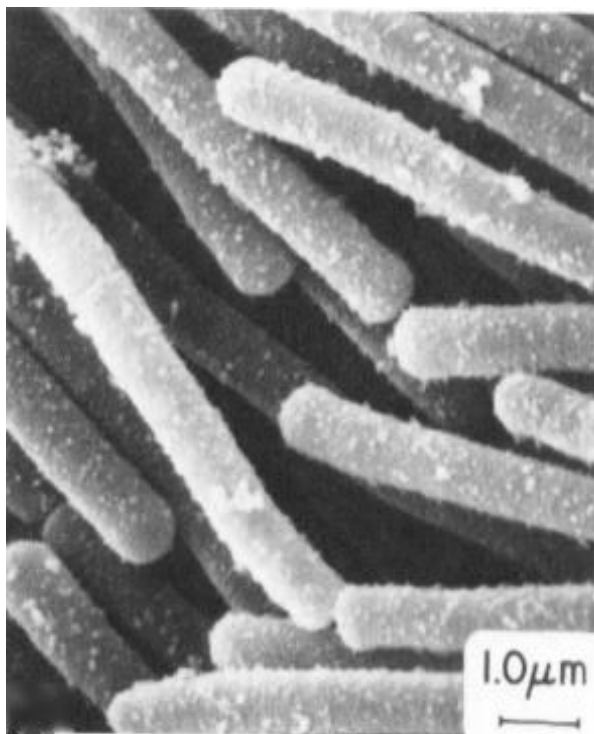
Πολλά από τα στελέχη του *Lb. acidophilus* έχουν μελετηθεί ότι παράγουν βακτηριοσίνες οι οποίες είναι φυσικοί αντιμικροβιακοί παράγοντες που έχουν πρωτεϊνική φύση και είναι θανατηφόρες για ορισμένα βακτήρια (Deraz et al., 2005). Στις βακτηριοσίνες περιλαμβάνονται οι: λακτοκίνη Β, λακτοκίνη F, οξινοκίνη Α και οξινοκίνη Β. Η λακτοκίνη Β αντιδρά ενάντια των *Lb. bulgaricus*, *Lb. helveticus*, *Lb. lactis* και *Lb. leichmannii*, η λακτοκίνη F ενάντια *Enterococcus faecalis* και *Lb. fermentum*. Η οξίνη Β είναι ενεργή έναντι παθογόνων όπως η *Listeria monocytogenes*, *Clostridium sporogenes* και *Brochothrix thermosphacta*. (8)

1.8. *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*

Ο *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, τους γένους *Lactobacillus*, αποτελεί ένα από τα τέσσερα βασικά είδη της ομάδας *Lactobacillus delbrueckii*, παρουσιάζοντας παρόμοιο φαινότυπο με τα *Lb. delbrueckii*, *Lb. leichanii*, *Lb. lactis* και *Lb. bulgaricus* (9). Απομονώνεται κυρίως από ζυμώμενα γαλακτοκομικά προϊόντα, από το γάλα, το τυρί (13) και τα βουλγαρικά φυτά (14), τέλος ανιχνεύεται στο γαστρεντερικό σωλήνα (11).

1.8.1. Γενικά χαρακτηριστικά

Είναι Gram θετικά, μη κινητά, μη σπορογόνα, ραβδόμορφα με στρογγυλά άκρα με μέγεθος 2-9 μm τα οποία εμφανίζονται μόνα τους ή σε κοντές αλυσίδες. Είναι προαιρετικά αναερόβια, θερμόφιλα, ανθεκτικά στο οξύ (11), έτσι παρουσιάζουν βέλτιστη ανάπτυξη σε θερμοκρασία μεταξύ 40°C και 45°C και pH 5,5 - 5,8. Επιπρόσθετα, είναι υποχρεωτικά ομοζυμωτικά βακτήρια, συγκεκριμένα ζυμώνουν τις εξόζες προς γαλακτικό οξύ μέσω του EMP. Αναλυτικότερα, μεταβολίζει την φρουκτόζη, την γλυκόζη και την λακτόζη κυρίως σε γαλακτικό οξύ και δευτερευόντως σε μικρότερες συγκεντρώσεις παράγονται ακεταλδεΐδη, ακετόνη, ακετοΐνη και διακετύλιο. Αξίζει να αναφερθεί, ότι ο *Lactobacillus bulgaricus* φέρει λυτικούς βακτηριοφάγους οι οποίοι αποτελούν πρόβλημα τόσο κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του γάλακτος όσο και σε προϊόντα τυριού και γιαουρτιού. (9)



Εικόνα 4: Ηλεκτρονική μικρογραφία σάρωσης (SEM) κυττάρων του *Lb. bulgaricus* σε μεγέθυνση 1,0 μm, (91).

1.8.2. Εφαρμογές

Κατά την παραγωγική διαδικασία των προϊόντων γάλακτος και ζυμώμενων προϊόντων όπως γιαούρτι και τυρί χρησιμοποιείται κυρίως ο *Lactobacillus bulgaricus*. Ειδικότερα, συνδυάζεται σαν εκκινητής καλλιέργειών με τον *Streptococcus thermophilus*

για την παραγωγή περισσότερης ποσότητας γαλακτικού οξέος. Ο μικροοργανισμός διαθέτει το ένζυμο αλδολάση θρεονίνη όπου μεταβολίζει τη θρεονίνη και παράγει την βασική πτητική ένωση της γιαούρτης την ακεταλδεΐδη. Παράλληλα, σχηματίζονται και άλλες ενώσεις που συμβάλλουν στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά όπως διακετύλιο, ακετοΐνη, ακετόνη, τα οξέα: γαλακτικό, ηλεκτρικό, βουτυρικό, μυρμηκικό και οξικό, άλλα πτητικά (αιθυλεστέρες, αιθανόλη και βουτανόνη) και μείγμα αμινοξέων. Σε ορισμένα εμπορικά γιαούρτια παράγονται σημαντικές συγκεντρώσεις εξωπολυσακχαριτών (EPS). Αυτά επηρεάζουν τις ρεολογικές ιδιότητες, συγκεκριμένα αυξάνουν το ιξώδες, βελτιώνοντας έτσι την υφή και την αίσθηση που αφήνουν στο στόμα. Μια άλλη εφαρμογή είναι η παρασκευή τυροπήγματος, ελβετικών τυριών και πολύ σκληρών τυριών ιταλικού τύπου εμβολιασμένα με *Lb. delbrueckii subsp. lactis* και *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus*. (9) Παρόλα αυτά μπορεί να προκαλέσει ροζ αποχρωματισμό στα τυρία (20).

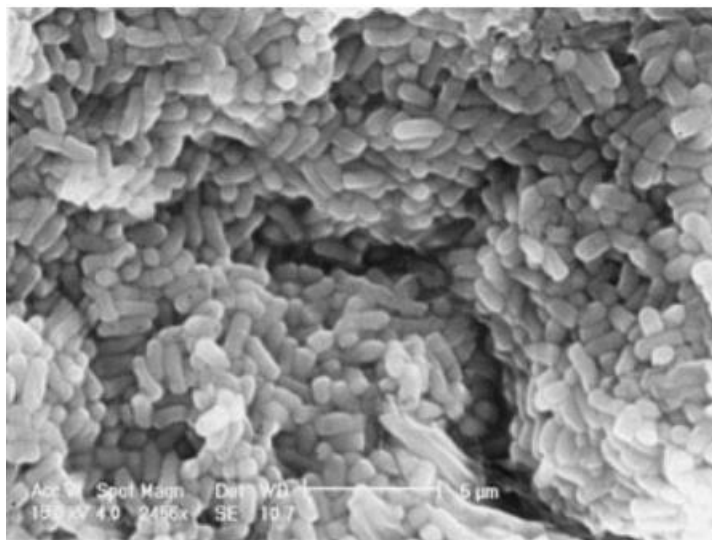
Κάποια στελέχη του *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* παράγουν την θερμοσταθερή βακτηριοσίνη bulgarican τα οποία αναστέλλουν διαφορετικά είδη Gram θετικών και Gram αρνητικών βακτηρίων (9). Οι ενώσεις που παράγει ο *Lb. bulgaricus*: διακετύλιο, υπεροξειδίο του υδρογόνου, αλδεΐδες, γαλακτικό οξύ και οξικό οξύ οδηγούν στην πτώση του pH και συμβάλλουν στην αντιβακτηριακή δράση κατά των *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *K. pneumonia*, *S. typhimurium* και *E. cloacae* (10).

1.9. *Lacticaseibacillus casei*

Ο *Lb. casei* αντιπροσωπεύει το μεγαλύτερο γένος της οικογένειας *Lactobacillaceae*. Περιλαμβάνει τα είδη *Lb. paracasei* και *Lb. rhamnosus*, τα οποία είναι φυλογενετικά και φαινοτυπικά στενά συνδεδεμένα μεταξύ τους (4). Απομονώνεται από φυτά που βρίσκονται σε αποσύνθεση, ζωοτροφές, γαστρεντερικό σύστημα του ανθρώπου, το στόμα, κολεό, λύματα, διάφορα γαλακτοκομικά προϊόντα (1), καθώς και από τρόφιμα που έχουν υποστεί ζύμωση, όπως φρούτα, κρέας, προζύμι, λαχανικά, και κρασί (4).

1.9.1. Γενικά χαρακτηριστικά

Είναι μη κινητοί μικροοργανισμοί, προαιρετικά αναερόβιοι ή μικροαερόφιλοι (4), μη σπορογόνοι, θετικοί κατά Gram, ραβδόμορφοι με διάμετρο $0,7\pm 1,1$ μm $2,0\pm 4,0$ μm και εμφανίζονται είτε μεμονωμένα, είτε σε ζευγάρια ή αλυσίδες. Είναι ανθεκτικοί στο οξύ και σε θερμοκρασίες παστερίωσης, αρνητικοί στην καταλάση και καλούνται μη-εκκινητά γαλακτικά βακτήρια (NSLAB). Στις διατροφικές τους απαιτήσεις περιλαμβάνονται: ριβοφλαβίνη, φολικό οξύ, ασβέστιο, παντοθενικό και νιασίνη. Κατά την ζύμωση, μέσω της μεταβολικής πορείας EMP, μεταβολίζεται η πεντόζη προς το γαλακτικό οξύ και δευτερευόντως σε οξικό οξύ, (αυτό τα καθιστά προαιρετικά ετεροζυμωτικούς). Ενώ, σε ορισμένες περιπτώσεις με την ζύμωση της γλυκόζης παράγονται εκτός από γαλακτικό οξύ, οξικό, φορμικό οξύ και αιθανόλη. (1)

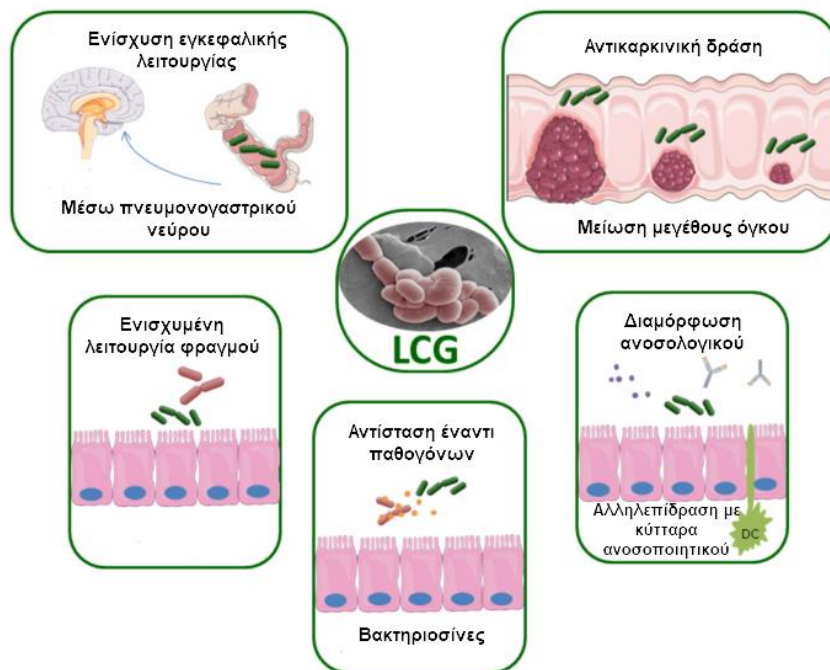


Εικόνα 5: Ηλεκτρονική μικρογραφία σάρωσης (SEM) κυττάρων του *Lb. casei*, (84).

1.9.2. Εφαρμογές

Χρησιμοποιούνται ως προβιοτικές καλλιέργειες και ως πρόσθετα ωρίμανσης στα τυριά, όπως το τυρί Cheddar, σε ζυμούμενα γάλατα και σκόνες γάλακτος. Παράλληλα, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη οργανοληπτικών χαρακτηριστικών σε αυτά τα προϊόντα (Swearingen et al., 2001; Van Hoorde et al., 2010). (2)

Τα είδη *Lb. paracasei* και *Lb.rhamnosus* χρησιμοποιούνται για την παρασκευή τυριού, συμβάλλοντας στην ελεγχόμενη και επιταχυνόμενη ωρίμανσή του, προσδίδοντας χαρακτηριστικό άρωμα, γεύση και υφή (1). Ωστόσο, ο *Lb. casei subsp. casei* εμφανίζει ελάττωμα στο τυρί μοτσαρέλα όπως μαλάκωμα του κέντρου του (20). Συγκεκριμένα στελέχη λειτουργούν ως προβιοτικά, ενώ άλλα στελέχη παράγουν βακτηριοσίνες οι οποίες αναστέλλουν την ανάπτυξη κλωστριδίων, μούχλας, άλλων γαλακτοβάκιλλων και παθογόνων. Προστίθενται σε χαμηλές συγκεντρώσεις (10^4 - 10^6 cfu/ml), τα οποία όμως δεν συμμετέχουν σημαντικά στην παραγωγή οξέος. Ωστόσο, κατά την ωρίμανση αυξάνονται και διατηρούνται σε υψηλές συγκεντρώσεις 10^7 - 10^8 cfu/g. (5)



Εικόνα 6: Μέθοδοι προβιοτικής δράσης της ομάδας LC (McGee et al., 2010), (5).

Επιπλέον, οι καλλιέργειες υπό λυοφιλιωμένη μορφή χρησιμοποιούνται στην σκόνη γάλακτος και συσκευάζονται σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα ή πραγματοποιείται μικροενθυλάκωση για την επέκταση της διάρκειας ζωής τους. Άλλη εφαρμογή των *Lb.*

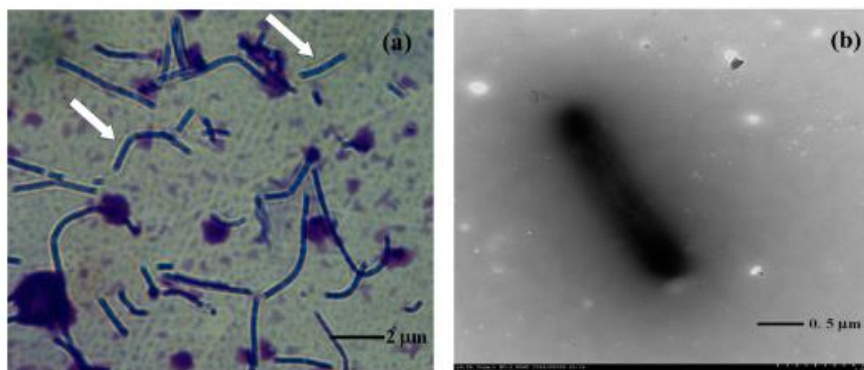
casei είναι στα ζυμωμένα γάλατα (κυρίως γιαούρτη), προσδίδοντας χαρακτηριστικό άρωμα ακεταλδεύδης και διακετυλίου και ιδιαίτερη υφή που οφείλεται στην παραγωγή εξωπολυσακχαριτών (1). Εκτός από τις ευεργετικές ιδιότητες στα τρόφιμα, μελέτες διερεύνησαν ότι ο *Lb. casei* παρουσιάζει οφέλη για την υγεία του ανθρώπου. Συγκεκριμένα, εμφανίζει προστατευτική δράση σε παιδιά με κίνδυνο ανάπτυξης άσθματος και η ατοπικής δερματίτιδας (Kalliomaki et al., 2001). Ενισχύει την λειτουργία του εγκεφάλου, συμβάλλει στην πρόληψη και στη θεραπεία της παχυσαρκίας ιδιαίτερα στις γυναίκες. Τέλος, τα προβιοτικά έχουν ερευνηθεί ως συμπληρωματική θεραπεία και ως μικροβιακή θεραπεία για τον καρκίνο (Huang et al., 2016; So et al., 2017). (5)

1.10. *Lactobacillus helveticus*

Ο *Lactobacillus helveticus*, με αρχική ονομασία *Thermobacterium helveticus*, αποτελεί μέλος των οξυγαλακτικών βακτηρίων (LAB). Απομονώνεται κυρίως από γαλακτοκομικά προϊόντα, όπως ξινόγαλα και τυρί. (28)

1.10.1. Γενικά χαρακτηριστικά

Ο *Lactobacillus helveticus* είναι Gram θετικό, προαιρετικά αναερόβιο, μη σπορογόνο, ραβδόμορφο βακτήριο με διάμετρο 0,5-1,1 μm και αρνητικό στην καταλάση. Χαρακτηρίζεται ως θερμόφιλο με ιδανική θερμοκρασία ανάπτυξης 45°C και μέγιστη 50±52°C. Στις διατροφικές του απαιτήσεις, περιλαμβάνονται υποχρεωτικά 14 εξωγενή αμινοξέα (Chopin, 1993) η νιασίνη, η ριβοφλαβίνη, το παντοθενικό ασβέστιο και ως βασικός αυξητικός παράγοντας χρησιμοποιείται είτε η πυριδοξαμίνη, είτε η πυριδοξάλη. (28) Για να διασφαλίσει τις διατροφικές του απαιτήσεις όταν καλλιεργείται σε γάλα, ο *Lb. helveticus* βασίζεται σε ένα ισχυρό πρωτεολυτικό σύστημα ικανό να παράγει μικρού μήκους αμινοξέα και να τα απελευθερώνει από την καζεΐνη (Callanan et al., 2008). Αυτό εξηγεί γιατί έχει υψηλότερη πρωτεολυτική δράση από τους περισσότερους γαλακτοβάκιλλους (29). Επίσης, κατατάσσεται στους υποχρεωτικά ομοζυμωτικούς, δηλαδή μεταβολίζει τις εξόζες (φρουκτόζη, μαννόζη, γλυκόζη, γαλακτόζη) και τα σάκχαρα μαλτόζη, τρεαλόζη και λακτόζη προς γαλακτικό οξύ μέσω της διαδικασίας της γλυκόλυσης (EMP) (31). Αξίζει να αναφερθεί, ότι *Lb. helveticus* φέρει βακτηριοφάγους τα οποία προκαλούν προβλήματα κατά την ζύμωση και κατά την τυροκόμηση (28).



Εικόνα 7: Απεικόνιση του *Lb. helveticus* με Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Διέλευσης (TEM) (a) 2 μm (b) 0,5 μm , (92).

1.10.2. Εφαρμογές

Ο *Lactobacillus helveticus*, συνήθως σε συνδυασμό με τον *Streptococcus thermophilus*, χρησιμοποιείται ως εκκινητής σε κάποια γιαούρτια αλλά όχι για μεγάλη παραγωγή όπως χρησιμοποιείται ο *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus*. Σε σύγκριση με τον *Lb. bulgaricus* σχηματίζει χαμηλότερο τελικό pH και λιγότερο D-γαλακτικό οξύ στα ζυμώμενα γάλατα. Στα βρεφικά γιαούρτια όπου η παρουσία του D-ισομερούς μπορεί να προκαλέσει πρόβλημα, προτιμάται ως εκκινητής ο *Lb. helveticus*. Ο *Lb. helveticus* μαζί με τον *St. thermophilus* προστίθονται ως εκκινητές καλλιέργειας για την παρασκευή των τυριών ελβετικού και ιταλικού τύπου. Κατά την ωρίμανση των τυριών συμβάλλει στην παραγωγή γαλακτικού οξέος και στην ανάπτυξη οργανοληπτικών χαρακτηριστικών. Συγκεκριμένα, στην μοτσαρέλα ο μικροοργανισμός μεταβάλλει τις ιδιότητες τήξεως και ιξώδους, ενώ στη Gouda, στο Cheddar και σε τυριά χαμηλών λιπαρών ενισχύει τα χαρακτηριστικά τους αρώματα. (28)

Μερικά στελέχη του *Lb. helveticus* παράγουν βακτηριοσίνες με τις πιο γνωστές τις lactocin 27 και helveticin J οι οποίες εμποδίζουν τη δράση ορισμένων γαλακτοβακίλλων (*Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Lb. delbrueckii subsp. lactis* και *Lb. acidophilus*). (28)

Ο *Lactobacillus helveticus* ως προβιοτικό προάγει την υγεία των ανθρώπων (Taverniti, Guglielmetti). Αναλυτικότερα, προσκολλάται στα επιθηλιακά κύτταρα και εμποδίζει τις γαστρεντερικές λοιμώξεις, προστατεύει τον οργανισμό από λοιμώξεις παθογόνων, όπως *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Campylobacter jejuni*, *E. coli* O157:H7 (33), βελτιώνει το ανοσοποιητικό σύστημα και την εντερική μικροχλωρίδα (Slattery et al., 2010). (29) Αυτά τα ευεργετικά αποτελέσματα οφείλονται στην υδρόλυση των πρωτεϊνών του γάλακτος από το πρωτεολυτικό σύστημα του *Lb. helveticus*. (30)

1.11. *Lactiplantibacillus plantarum*

Ο *Lb. plantarum* ανήκει στο γένος *Lactiplantibacillus* και στην οικογένεια *Lactobacillaceae* (20), ο οποίος αρχικά ονομάστηκε *Streptobacterium plantarum* το 1919 από τον Orla-Jensen. Απομονώνεται από ζυμώμενα τρόφιμα, προζύμι, ελίες, ζυμωμένα λαχανικά, ζυμωμένα λουκάνικα, τυρί, κρασί και ενσίρωση (17). Άλλες σημαντικές πηγές αποτελούν, το γαστρεντερικό σύστημα, το στόμα και ο κολεός του ανθρώπου καθώς και περιπτώματα αγελάδας. (19)

1.11.1. Γενικά χαρακτηριστικά

Ο *Lb. plantarum* είναι ένα Gram θετικό, μη κινητό, μη σπορογόνο βακτήριο. Κάποια στελέχη του χαρακτηρίζονται από ψευδοκαταλάση και με μειωμένα νιτρικά. Είναι ραβδόμορφα με στρογγυλεμένα άκρα, μεγέθους $0,9\pm 1,2$ μm , $3,0\pm 8,0$ μm , που εμφανίζονται μεμονωμένα, σε ζευγάρια ή σε κοντές αλυσίδες. Το κυτταρικό του τοίχωμα περιέχει τον τύπο διαμινοπιμελικού οξέος (DAP) πεπτιδογλυκάνης. Στις διατροφικές του απαιτήσεις περιλαμβάνονται τα: παντοθενικό ασβέστιο, νιασίνη και νικοτινικό οξύ. Είναι μη εκκινήτο βακτήριο γαλακτικού οξέος (NSLAB), μεσόφιλο με την θερμοκρασία ανάπτυξης να κυμαίνεται στους 15-45°C και με pH 3,2. Είναι προαιρετικά αναερόβιο και προαιρετικά ετεροζυμωτικό, μεταβολίζει τις εξόζες προς γαλακτικό οξύ μέσω της πορείας Embden - Meyerhof και τις πεντόζες προς γαλακτικό και οξικό οξύ μέσω της οδού 6-φωσφογλυκονικό/φωσφοκετολάση. Άλλα δευτερογενή μεταβολικά προϊόντα που παράγονται ανάλογα με τα στελέχη και τις καλλιεργητικές συνθήκες είναι το CO₂, οξικό άλας, αιθανόλη, διακετύλιο, ακετοΐνη και 2,3-βουτανοδιόλη. (19) Επιπλέον, ο μικροοργανισμός ζυμώνει πάντα την μελιβιόζη, συνήθως την ραφινόζη και μερικές φορές την ραμνόζη, αλλά δεν ζυμώνει την ινοσιτόλη, σορβόζη ή γλυκερίνη. (16)



Εικόνα 8: Ηλεκτρονική μικρογραφία σάρωσης (SEM) κυττάρων του *Lactiplantibacillus plantarum* LP299v®, (47).

1.11.2. Εφαρμογές

Παραδοσιακά ζυμωμένα τρόφιμα, όπως ο τραχανάς περιέχουν *Lb. plantarum* και σε συνδυασμό με άλλους μικροοργανισμούς (*Lb. casei*, *Lb. brevis*) δρουν ως βελτιωτικά αρώματος του προϊόντος. Κατά την ωρίμανση ορισμένων τυριών κυρίαρχος μικροοργανισμός αποτελεί ο *Lb. plantarum* σε συγκεντρώσεις $10^6 \pm 10^8$ cfu/g. Ειδικότερα, ο *Lb. plantarum* μαζί με τον *Lb. paracasei* προσφέρουν το χαρακτηριστικό άρωμα του τυριού Cheddar. Ενώ, μαζί με τον *Lb. casei* βελτώνει την γεύση και την υφή ορισμένων ημίσκληρων ιταλικών τυριών. Επίσης, για την παρασκευή λευκών τυριών άλμης εμβολιάζονται μαζί με τις μικτές εκκινήτες καλλιέργειες και ο *Lb. plantarum*. (19) Άλλα ζυμωμένα προϊόντα είναι τα λουκάνικα και το μη αλκοολούχο μαγειρεμένο ποτό «uji» (παρασκευασμένο από σόργο, καλαμπόκι ή κεχρί). (21)

Ο *Lb. plantarum* επιπλέον, φέρει τις ιδιότητες των προβιοτικών, συγκεκριμένα έρευνες υπέδειξαν ότι συμβάλλει στη μείωση εμφάνισης στεφανιαίας νόσου, των συμπτωμάτων του IBS (Σύνδρομο Ευερέθιστου Εντέρου). (18)

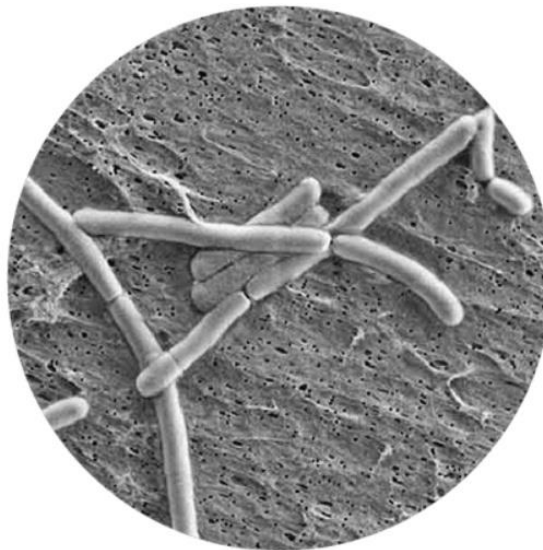
Ορισμένα στελέχη του *Lb. plantarum* διακρίνονται για την αντιμικροβιακή τους δράση παράγοντας βακτηριοσίνες, οι κυριότερες των οποίων είναι οι: Plantaricin A, C, D, F, S, T, BN, Plantaricin B και Pediocin AcH. Αναλυτικότερα, η Plantaricin A έχει χαρακτηριστεί ως φερομόνη, η οποία έχει την ικανότητα να δρα ως εξωκυτταρικό σήμα και είναι απαραίτητη για την έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται στη σύνθεση βακτηριοσίνης. Η Plantaricin C και η Pediocin AcH έχουν διαπιστωθεί ότι προέρχονται από γαλακτοκομικά προϊόντα. Η Plantaricin C εμφανίζει βακτηριοκτόνο δράση έναντι ορισμένων φυσικών ανταγωνιστικών LAB βακτηρίων και των *Enterococcus faecalis*, *Propionibacterium spp.* και *Cl. tyrobutyricum*. Η Pediocin AcH δρα ενάντια της *Listeria monocytogenes* και τον έλεγχο ορισμένων σημαντικών παθογόνων, ειδικά για γαλακτοκομικά προϊόντα που έχουν pH μεγαλύτερο του 5,0. (19)

1.12. *Lacticaseibacillus rhamnosus*

Ο *Lb. rhamnosus* ανήκει στην ευρύτερη ομάδα του *Lb. casei* (LCG) (26), με αρχική ονομασία *Lb. casei subsp. rhamnosus*, καθώς σχετίζεται με το σάκχαρο ραμνόζη. Το 1983, απομονώθηκε από δείγματα κοπράνων υγιή ενήλικων ανθρώπων (Sherwood Gorbach και Barry Goldin) γι' αυτό και χαρακτηρίστηκαν συντομογραφικά LGG (23). Σήμερα, απομονώνεται από γαλακτοκομικά προϊόντα, λύματα, ανθρώπους και κλινικές πηγές. (25)

1.12.1. Γενικά χαρακτηριστικά

Ο *Lb. rhamnosus* είναι Gram θετικός, μη σπορογόνο, προαιρετικά αναερόβιο ή μικροαερόφιλο, μη κινητό και αρνητικό στην καταλάση βακτήριο. Πρόκειται για ραβδόμορφο κύτταρο με διάστασεις 0,8 - 1,0 μm σε πλάτος και από 2,0 - 4,0 μm σε μήκος και εμφανίζεται μεμονωμένα ή σε κοντές αλυσίδες (22). Ανήκει στους μεσόφιλους και αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες χαμηλότερες των 15°C και σε υψηλότερες των 45 °C (22, 27). Αναπτύσσεται βέλτιστα σε pH 4,5 – 6,4. Επιπλέον, στις διατροφικές του προτιμήσεις περιλαμβάνονται οι βιταμίνες, όπως το φολικό οξύ, η ριβοφλαβίνη, η νιασίνη, το παντοθενικό οξύ και το ανόργανο ασβέστιο (22). Κατατάσσεται στους προαιρετικά ετεροζυμωτικούς γαλακτοβάκιλλους. Ζυμώνει τους υδατάνθρακες όπως αραβινόζη, κελλοβιόζη, εσκουλίνη, ριβόζη, σορβιτόλη και σακχαρόζη (23). Συγκεκριμένα, μεταβολίζει τις εξόζες σε L(+)- γαλακτικό οξύ με την οδό Embden-Meyerhof και παράγει δευτερογενή προϊόντα όπως οξικό, φορμικό οξύ, αιθανόλη, διακετύλιο και ακετοΐνη. (22)



Εικόνα 9: Ηλεκτρονική μικρογραφία σάρωσης (SEM) κυττάρων του *Lb. rhamnosus*, (47).

1.12.2. Εφαρμογές

Ο *Lb. rhamnosus* GG έχει προβιοτικές ιδιότητες οι οποίες βελτιώνουν το πεπτικό σύστημα και ενδυναμώνουν τη φυσική αντίσταση του ανθρώπου. Οι Martín κ.α ανέφεραν ότι ο LGG δημιουργεί βιοφίλμ, ενισχύοντας έτσι την αναστολή των παθογόνων (24). Κάποια στελέχη του εμποδίζουν την προσκόλληση του *Clostridium histolyticum*, του *Cl. difficile* και της *Salmonella enterica*, ενώ σε συνδυασμό με άλλους μικροοργανισμούς αναστέλλουν την ανάπτυξη παθογόνων βακτηρίων όπως *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* και *Listeria monocytogenes* και ορισμένων ζυμομυκήτων, μουχλών και αφλατοξίνων. (22)

Αναλυτικότερα, όσο αφορά τις εφαρμογές στην υγεία, τα στελέχη του *Lb. rhamnosus* μετά από έρευνες έχει αποδειχθεί ότι είναι αποτελεσματικά στην καταπολέμηση της λοιμώδους διάρροιας στα παιδιά από τον ροταϊό (rotavirus), προστατεύει από λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος, αποτρέπει την ατοπική δερματίτιδα (Kalliomaki et al., 2001) και βελτιώνει τα συμπτώματα του συνδρόμου του ευερέθιστου εντέρου (IBS) (23). Αυτά οφείλονται στην επιβίωση του μικροοργανισμού στο γαστρεντερικού σωλήνα και στην προσκόλλησή του στα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα (24). Επιπρόσθετα, ο *Lb. rhamnosus* όταν χορηγείται στις έγκυες γυναίκες αυξάνει το βάρος στα παιδιά (Luoto et al., 2010). (26)

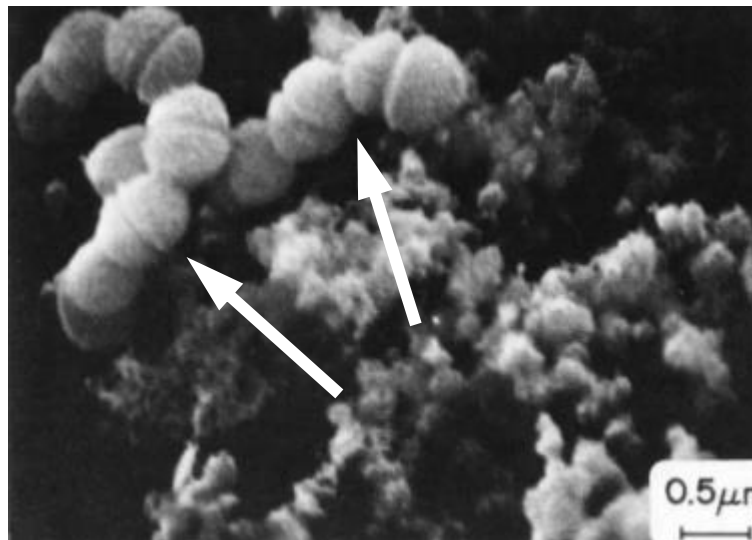
Στη βιομηχανία τροφίμων χρησιμοποιείται ως προβιοτικό και ως προστατευτική καλλιέργεια σε ζυμωμένα και μη ζυμωμένα γαλακτοκομικά προϊόντα, ποτά, έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα, ξηρά λουκάνικα και σαλάτες (22). Στα ζυμώματα γαλατα προστίθεται μαζί με τον *Lb. paracasei* για την παραγωγή εξωπολυσακχαριτών, βακτηριοσινών ή αρωματικών ενώσεων (όπως ακεταλδεΐδη και διακετύλιο), επίσης έχουν την ιδιότητα να μην ξινίζουν γρήγορα το γάλα. Για την παρασκευή τυριού όλα τα στελέχη του *Lb. rhamnosus* χρησιμοποιούν το κιτρικό και το διοξείδιο του άνθρακα συμβάλλοντας στο σχηματισμό ανοιχτής υφής. (27)

1.13. *Streptococcus thermophilus*

Ο *Streptococcus thermophilus* ανήκει στο γένος *Streptococcus*. Αρχικά ονομάστηκε *Streptococcus salivarius*, αλλά έρευνες απέδειξαν ότι παρουσιάζουν διαφορετικά φυσιολογικά και φαινοτυπικά χαρακτηριστικά, επομένως πρόκειται για δύο διαφορετικά είδη στρεπτόκοκκου (37). Είναι ο δεύτερος χρησιμοποιούμενος οξυγαλακτικός μικροοργανισμός στην βιομηχανία τροφίμων μετά το *Lactococcus lactis*. Έχει αναδειχθεί ως Πιστοποιημένο Τεκμήριο Ασφάλειας (QPS) στην Ευρωπαϊκή Ένωση (35). Απομονώνεται κυρίως από το γάλα, ιδίως το παστεριωμένο και εντοπίζεται ως βιοφίλμ σε εξοπλισμό παστερίωσης. (37)

1.13.1. Γενικά χαρακτηριστικά

Είναι Gram θετικό, προαιρετικά αναερόβιο, μη κινητό, αρνητικό στην καταλάση βακτήριο. Με σφαιρικό προς ωειδές σχήμα, με διάμετρο $0,7\pm 0,9$ μm και εμφανίζονται σε ζεύγη και αλυσίδες. Είναι θερμοφίλος μικροοργανισμός, με βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης $40\pm 45^\circ\text{C}$, ελάχιστη $20\pm 25^\circ\text{C}$ και μέγιστη $47\pm 50^\circ\text{C}$. Τα στελέχη *Streptococcus thermophilus* απαιτούν για την ανάπτυξή τους ελεύθερα αμινοξέα, συγκεκριμένα, το γλουταμικό οξύ, ιστιδίνη, μεθειονίνη, κυστεΐνη, βαλίνη, λευκίνη, ισολευκίνη, τρυπτοφάνη, αργινίνη και τυροσίνη. Ζυμώνει περιορισμένο αριθμό σακχάρων (λακτόζη, φρουκτόζη, σακχαρόζη και γλυκόζη) και μέσω της οδού EM, η λακτόζη μεταβολίζεται κυρίως προς L(+) γαλακτικό οξύ, έτσι το βακτήριο χαρακτηρίζεται ως ομοζυμωτικό. Επίσης, είναι ευαίσθητο στα αντιβιοτικά και στα απολυμαντικά με χαμηλή πρωτεολυτική δράση ενώ παρουσιάζει σημαντική δραστηριότητα ουρεάσης. (34, 35, 37)



Εικόνα 10: Ηλεκτρονική μικρογραφία σάρωσης (SEM) κυττάρων του *S. thermophilus* σε μεγέθυνση $0,5 \mu\text{m}$, (91).

Ο *Streptococcus thermophilus* φέρει βακτηριοφάγους τα οποία μπορεί να έχουν αρνητική επίδραση στην ζύμωση και στην παραγωγή προϊόντων. Ένα άλλο πρόβλημα των στρεπτόκοκκων είναι ο σχηματισμός βιοφίλμ σε επιφάνειες παστεριωτών κατά την τυροκόμηση των τυριών Cheddar και Gouda, ενώ στην παρασκευή γιαούρτης γίνεται μεγαλύτερη θερμική επεξεργασία και έτσι δεν εμφανίζεται αυτό το πρόβλημα. (34)

1.13.2. Εφαρμογές

Ο *S. thermophilus* έχει μεγάλη βιομηχανική σημασία στην παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων (Hols et al., 2005). Παρά το γεγονός της συμβιωτικής του ανάπτυξης με τον *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* στο γιαούρτι, χρησιμοποιείται και για την παραγωγή πολλών ποικιλιών τυριού, όπως το ελβετικό τυρί, τυρί Brick, παρμεζάνα, προβολόνε, μοσσαρέλα και Asiago (Parente και Cogan, 2004). Παράλληλα, συνδυάζεται με μεσόφιλη καλλιέργεια για την παραγωγή του τυριού Cheddar (Awad, Hassan και Muthukumarappan, 2005). Κατά την ζύμωση ο *S. thermophilus* συμβάλλει εκτός από την παραγωγή γαλακτικού οξέος που προκαλεί γρήγορη οξίνιση και στην παραγωγή χαμηλών συγκεντρώσεων μυρμηκικού, ακετοΐνης, διακετυλίου, ακεταλδεΐδης και οξικού οξέος στα τελικά προϊόντα (Ott, Germond και Chaintreau, 2000) (35). Στη γιαούρτη το γαλακτικό οξύ και η ακεταλδεΐδη ευθύνονται για τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της γιαούρτης. (36)

Πίνακας 5: Εφαρμογές του Streptococcus thermophilus.

Ελβετικού τύπου τυριά
Emmentaler
Gryere
Pasta-filata τυριά
Mozzarella
Provolone
Σκληρά τυριά
Parmesan
Romano
Asiago
Ζυμώμενα γάλατα
Γιαούρτι

Πηγή: Gerald Zirnstein, (1999), (37).

Επιπρόσθετα, ο μικροοργανισμός παράγει εξωκυτταρικούς πολυσακχαρίτες (EPS), συγκεκριμένα πολυμερή ετεροσακχαριτών (γαλακτόζη, γλυκόζη και ραμνόζη) αλλά και N-πολυμερή (ακετυλο-γαλακτοζαμίνη, φουκόζη και ακετυλιωμένα γαλακτόζη) (Laws, Gu, & Marshall, 2001). Τα EPS ενισχύουν την υφή ζυμωμένων γαλακτοκομικών

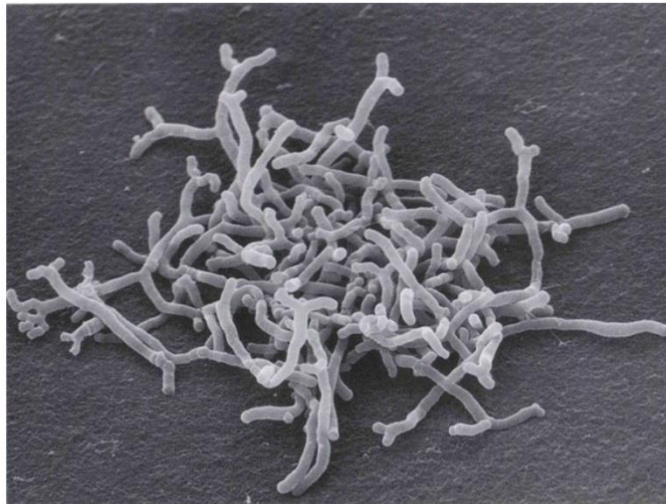
προϊόντων (γιαούρτη) (35) και παράγουν τυριά με μειωμένα λιπαρά (20). Όσον αφορά την υγεία του ανθρώπου, ενισχύουν τις ανοσολογικές λειτουργίες και μπορεί να έχουν την ικανότητα διαφοροποίησης ορισμένων λειτουργιών μακροφάγων και σπληνοκυττάρων (Kitazawa et al., 2000· Sato et al., 2004· Vinderola, Perdigo'ñ, Duarte, Farnworth και Matar, 2006). (35)

Ο *S. thermophilus* παράγει βακτηριοσίνες, γνωστές ως thermophilins οι οποίες είναι θερμοσταθερές και ενεργές σε ευρή φάσμα pH. Έχουν καθιερωθεί ως GRAS (Somkuti και Steinberg, 2003) και μόνο πέντε έχουν ταυτοποιηθεί, συγκεκριμένα η θερμοφιλίνη 347 που παράγεται από γιαούρτη, thermophilin A, thermophilin T που παράγεται από ένα στέλεχος τυριού «φέτα», thermophilin 13, και μια νέα βακτηριοσίνη από το *S. thermophilus* Adria 91L 580 που αναστέλλει το *Clostridium tyrobutyricum* που απομονώνεται από σκληρό τυρί. (35)

Τέλος, ο *S. thermophilus* διακρίνεται για τις προβιοτικές του ιδιότητες, ειδικότερα έχει ευεργετικά αποτελέσματα στην καταπολέμηση της διάρροιας σε μικρά παιδιά, της εντεροκολίτιδας σε πρόωρα νεογνά και της φλεγμονώδης νόσου του εντέρου. Βοηθά στην πέψη της λακτόζης σε άτομα με δυσανεξία στη λακτόζη, παράγει αντιοξειδωτικές ουσίες, ενισχύει το ανοσοποιητικό σύστημα του εντέρου, μειώνει τον κίνδυνο του έλκους, της φλεγμονής και ορισμένων τύπων καρκίνου και παρουσιάζει αντιμεταλλαξιογόνες ιδιότητες. (35)

1.14. *Bifidobacterium* spp.

Το γένος *Bifidobacterium* απομονώθηκε το 1899 από τον Tissier στο Ινστιτούτο Παστέρ (41). Αρχικά ονομάστηκε *Bacillus bifidus*, λόγω των μορφολογικών του χαρακτηριστικών καθώς εμφανίζεται σε σχήμα Υ ή «δισχιδής» μορφή (38). Μέχρι το 1974, ταξινομήθηκε σε διάφορα γένη όπως *Bacillus*, *Bacteroides*, *Nocardia*, *Lactobacillus* και *Corynebacterium*, σήμερα αποτελεί ξεχωριστό γένος με 29 είδη. Συγκεκριμένα, 14 απαντώνται στον άνθρωπο, 12 στα ζώα και 3 στις μέλισσες. Στην γαλακτοβιομηχανία για την παραγωγή προβιοτικού γάλακτος και προϊόντων χρησιμοποιούνται κυρίως *Bif. adolescentis*, *Bif. bifidum*, *Bif. breve*, *Bif. infantis* και *Bif. longum* (38). Οι μικροοργανισμοί αποτελούν μέρος της φυσικής μικροχλωρίδας του εντέρου του ανθρώπου και των ζώων και απομονώνονται από κόπρανα αυτών, καθώς επίσης και από μέλισσες, τον ανθρώπινο κολεό και από την τερηδόνα σε μορφή παθογόνου. (41)



Εικόνα 11: Η απεικόνιση του δισχιδούς σχήματος του *B. longum* BL-212 στο μικροσκόπιο, (93).

Το 1967, οι DeVries και Stouthamer ανακάλυψαν την παρουσία της φρουκτόζης-6-φωσφατεφωσφοκετολάσης στο *Bifidobacterium* και την απουσία δύο ενζύμων, της αλδολάσης και της 6-φωσφορικής αφυδρογονάσης της γλυκόζης, που βρίσκονται στους γαλακτοβάκιλλους. Η παρουσία άλλων ενζύμων, όπως π.χ α-γαλακτοσιδάση και α-γλυκοσιδάση που υπάρχουν στα *Bifidobacterium*, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για γρήγορη διαφοροποίηση και ταυτοποίηση του γένους. (38)

1.14.1. Γενικά χαρακτηριστικά

Όλα τα είδη του γένους *Bifidobacterium* είναι ραβδόμορφα με κοντές, κανονικές, λεπτές κυψέλες με διακλαδώσεις σχήματος V, Υ, Χ. Χαρακτηρίζονται ως θετικοί κατά

Gram, μη κινητοί, μη σπορογόνοι και αναερόβιοι μικροοργανισμοί, αρνητικοί στην καταλάση (38,40). Η ιδανική θερμοκρασία ανάπτυξης των *Bifidobacterium* ανθρώπινης προέλευσης είναι $36\pm 38^{\circ}\text{C}$, ενώ ζωικής προέλευσης είναι $41\pm 43^{\circ}\text{C}$. Σύμφωνα με τον Scardoni βέλτιστο pH ανάπτυξη είναι $6,5\pm 7,0$ (41). Κατατάσσονται στην κατηγορία των ετεροζυμωτικών LAB, δηλαδή παράγουν υψηλά επίπεδα οξικού οξέος από το γαλακτικό οξύ, συνήθως σε αναλογία 3 : 2, επίσης παράγουν μυρμηκικό οξύ, αιθανόλη και ηλεκτρικό (38). Συγκεκριμένα, ζυμώνουν την λακτόζη μέσω της οδού της 6-φωσφορικής φρουκτόζης σε αντίθεση με άλλους γαλακτοβάκιλλους που χρησιμοποιούν την διακλάδωση 6-φωσφορικής γλυκόζης (41). Όσον αφορά τις διατροφικές του απαιτήσεις το ανθρακικό ή διττανθρακικό, η γλυκόζη, γαλακτόζη, λακτόζη, λακτουλόζη, ολιγοσακχαρίτες και προϊόντα υδρόλυσης αμύλου μπορούν να αξιοποιηθούν ως πηγές άνθρακα (40), ενώ απαραίτητα για την ανάπτυξη τους είναι ορισμένες βιταμίνες όπως η θειαμίνη (B1), πυριδοξίνη (B6), φολικό οξύ (B9) και κυανοκοβαλαμίνη (B12). (38)

1.14.2. Εφαρμογές

Στη σημερινή αγορά υπάρχουν περισσότερα από 70 προϊόντα που περιέχουν καλλιέργειες του γένους *Bifidobacterium*. Τέτοια προϊόντα είναι η κρέμα γάλακτος, το βούτυρο, η γιαούρτη, η σκόνη γάλακτος, τα μπισκότα και τα κατεψυγμένα επιδόρπια. Στα ζυμώμενα προϊόντα κυριαρχούν τα είδη *Bif. bifidum*, *Bif. breve* και *Bif. longum*. (39) Η γιαούρτη είναι το πιο δημοφιλές Bifidus προϊόν το οποίο εμφανίζεται με διάφορες ονομασίες όπως Bio-garde, Bioghurt, Bifidusmilk, Bifighurt, Milmil και Progurt. Παραδοσιακά η παρασκευή γιαούρτης πραγματοποιούνταν με την ενσωμάτωση του *S. thermophilus* και του *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* ως καλλιέργειες εκκίνησης. Αυτά τα βακτήρια της γιαούρτης παρουσιάζουν ευαισθησία στις όξινες συνθήκες του γαστρεντερικού σωλήνα (δεν συμπεριλαμβάνονται στην φυσική μικροχλωρίδα του εντέρου), επομένως, σήμερα για να θεωρηθεί η γιαούρτη ως προβιοτικό προϊόν εκτός από τις κλασικές καλλιέργειες εκκίνησης προστίθενται επικουρικά *Lb. acidophilus* και *Bifidobacterium* ή *Lb. acidophilus*, *Bifidobacterium* και *Lb. casei*. Η αιτία που δεν παράγεται γιαούρτη αποκλειστικά από *Bifidobacterium* είναι ο μεγάλος χρόνος επώασης με αποτέλεσμα την αλλοίωση της ποιότητας του προϊόντος (39). Στην Ευρώπη και στην Αυστραλία, γιαούρτη που περιέχει *Lb. acidophilus* και *Bifidobacterium spp.* αναφέρεται ως «AB» γιαούρτη, επιπλέον τα γιαούρτια που περιέχουν *Lb. casei*, *Lb. acidophilus* και *Bifidobacterium* είναι γνωστά ως «ABC» γιαούρτη. (42) Ορισμένα παραδείγματα *Bifidobacterium* προϊόντων είναι:

- Acidophilus Bifidus yogurt: αγελαδινό γάλα + *Lb. acidophilus* και *Bifidobacteria spp.*
- Bifidus Milk: αγελαδινό γάλα + *B. bifidum* ή *longum* ως καλλιέργεια εκκίνησης.
- Bifidus yogurt: Είναι μια μικτή καλλιέργεια εκκίνησης του *B. bifidum* ή *longum* και καλλιέργεια γιαουρτιού με ή χωρίς *Lb. acidophilus*.

- Bifighurt: Αυτό είναι παρόμοιο με το γάλα ή το γιαούρτι *Bifidus*, αλλά η καλλιέργεια εκκίνησης είναι αποκλειστικά του *Bifid. longum* και *S. thermophilus*. Ο αριθμός *Bifidobacterium* στο προϊόν είναι 10^7 cfu/ml και παράγει μόνο γαλακτικό οξύ (95%). (41)

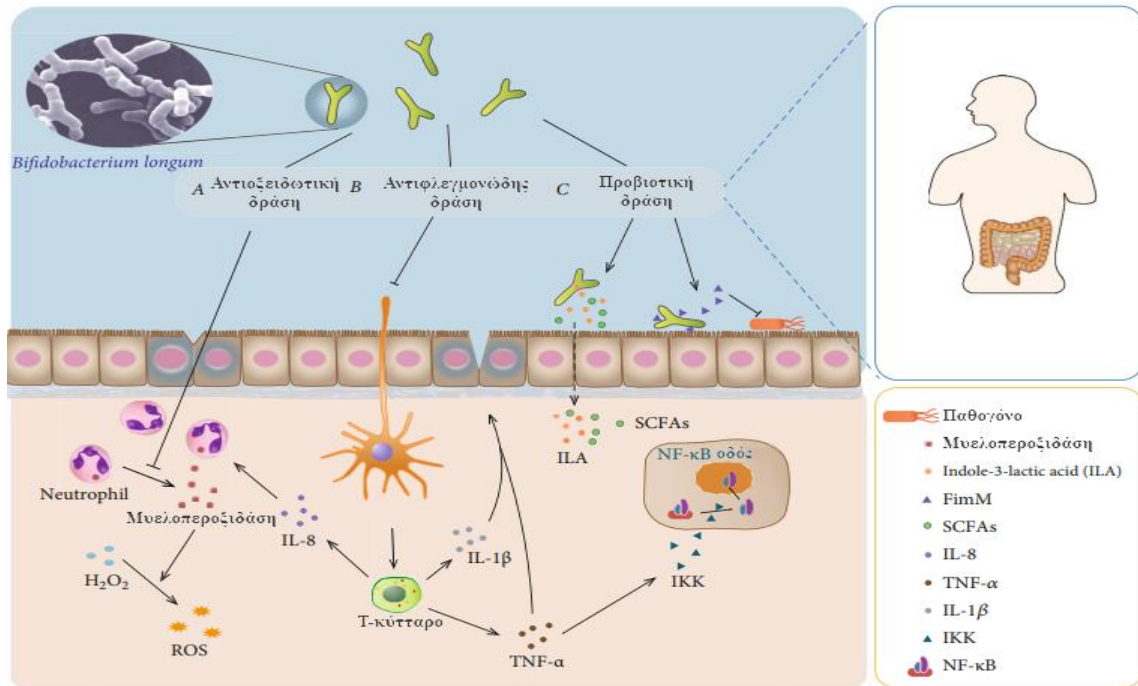
Το γένος *Bifidobacterium* έχει πολλές ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία του ανθρώπου. Αρχικά, κατατάσσεται στα προβιοτικά με τουλάχιστον 10^6 βιώσιμα κύτταρα ανά γραμμάριο για την διατήρηση της ισορροπίας της μικροβιακής μικροχλωρίδας του εντέρου. Τα *Bifidobacterium* μέσω της δράσης της φωσφοπρωτεϊνικής φωσφατάσης ενισχύει την απορρόφηση της πρωτεΐνης του ανθρώπινου γάλακτος μέσω της διάσπασης της καζεΐνης του γάλακτος (41). Επιπλέον, έχει αντιμεταλλαξιогόνες ιδιότητες, αντικαρκινογόνο δράση, μειώνει την χοληστερόλη του ορού, βελτιώνει την ανοχή στη λακτόζη και καταπολεμά την δυσκοιλιότητα (39). Μια άλλη ιδιότητα όπως έχει προκύψει από *in vitro* έρευνες είναι η αντιβακτηριακή τους δράση κατά ορισμένων παθογόνων όπως *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhi*, *Proteus spp.* και *Candida albicans* (41). Η δράση τους οφείλεται στην παραγωγή οργανικών οξέων (π.χ. οξικό και γαλακτικό), υπεροξειδίου του υδρογόνου και βακτηριοσινών. (39)

1.14.3. Περισσότερες πληροφορίες για *Bifidobacterium longum*

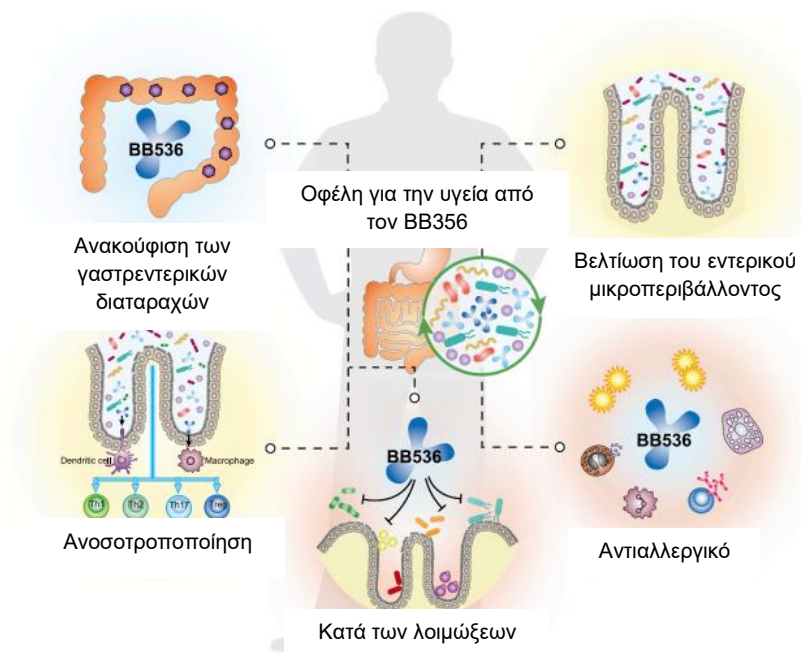
Ο μικροοργανισμός *Bifidobacterium longum* κατατάσσεται στα γένη *Actinomyces* και *Bifidobacterium*, και περιλαμβάνει τρία υποείδη *longum*, *infantis* και *suis*. Το είδος *longum* απομονώνεται από το ανθρώπινο, βρεφικό και ενήλικο έντερο και προστίθεται για την παραγωγή προβιοτικών προϊόντων. (43,45)

1.14.3.1. Εφαρμογές

Από έρευνα που δημοσιεύθηκε το 2021, αναφέρει ότι ο *Bifidobacterium longum* συμβάλλει στη μείωση των συμπτωμάτων της κολίτιδας και στην ανακούφιση από τη χρόνια φλεγμονή του εντέρου (IBD), ωστόσο ο μηχανισμός δράσης της θεραπείας IBD είναι ακόμα ασαφής. Άλλες ωφέλιμες ιατρικές ιδιότητες αυτού του είδους είναι η προστασία και η ενίσχυση του εντερικού επιθηλιακού φραγμού, του ανοσοποιητικού συστήματος του ανθρώπου και η ρύθμιση της ισορροπίας της μικροχλωρίδας του εντέρου. Εμφανίζει τρεις προστατευτικούς μηχανισμούς (όπως φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα), συγκεκριμένα παρουσιάζει αντιοξειδωτική δράση (η οποία ρυθμίζει το οξειδωτικό στρες) και έχει αντιφλεγμονώδεις επιδράσεις σε εντερικές παθήσεις. Τέλος, παράγει διάφορους μεταβολίτες οι οποίοι αναστέλλουν την ανάπτυξη παθογόνων μέσω της προσκόλλησής τους στην εντερική οδό. (45)



Εικόνα 12: Οι προστατευτικοί μηχανισμοί του *Bifidobacterium longum*, (45).



Εικόνα 13: Η τροποποίηση του μικροβιώματος του εντέρου είναι η κύρια ευεργετική δράση του *Bifidobacterium longum subsp. longum* BB536 στην προαγωγή της ανθρώπινης υγείας, (37).

1.14.4. Περισσότερες πληροφορίες για *Bifidobacterium lactis*

Ο *Bifidobacterium lactis* αποτελεί υποείδος του *Bifidobacterium animalis*, ωστόσο για λόγους ευκολίας αναφέρεται ως *Bifidobacterium lactis*, ενώ λανθασμένα συσχετίζεται και με το *Streptococcus lactis* spp.. (46, 47)

1.14.4.1. Εφαρμογές

Ο *Bifidobacterium lactis* χρησιμοποιείται ως καλλιέργεια εκκίνησης στην παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων, παραδείγματος χάριν γιαούρτη, τυρί cottage, βούτυρο και βρεφικά παρασκευάσματα, όπως το βρεφικό γάλα. Ενισχύει την υγεία του ανθρώπου απορροφώντας βιταμίνες και μέταλλα, ενώ συγχρόνως παράγει φολικό οξύ (βιταμίνη B9). Επιπλέον, προστατεύει το έντερο του ανθρώπου από παθογόνα μικρόβια καθώς παράγει οξέα, υπεροξειδία και βακτηριοσίνες. Αυτό το είδος του *Bifidobacterium* ενδυναμώνει την άμυνα του εντέρου, καταπολεμά την διάρροια που σχετίζεται με τα αντιβιοτικά, τη δυσκοιλιότητα του παχέος εντέρου και μειώνει τα συμπτώματα των λοιμώξεων του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος, όπως το κοινό κρυολόγημα και η γρίπη. (46)

1.15. Καλλιεργητικές συνθήκες

Στον πίνακα 6 περιγράφονται ορισμένα υποστρώματα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον κάθε μικροοργανισμό, καθώς και οι συνθήκες επώασής τους. Επιπλέον, αναφέρονται και τυχόν προσθήκες ή παράγοντες που συμβάλλουν στην εκλεκτική τους ανάπτυξη. Στον πίνακα 7 απεικονίζονται προτεινόμενα διεθνή πρότυπα (ISO) καταμέτρησης αποικιών για τους μικροοργανισμούς *Lb. acidophilus*, *S. thermophilus* και *Bifidobacterium spp.*

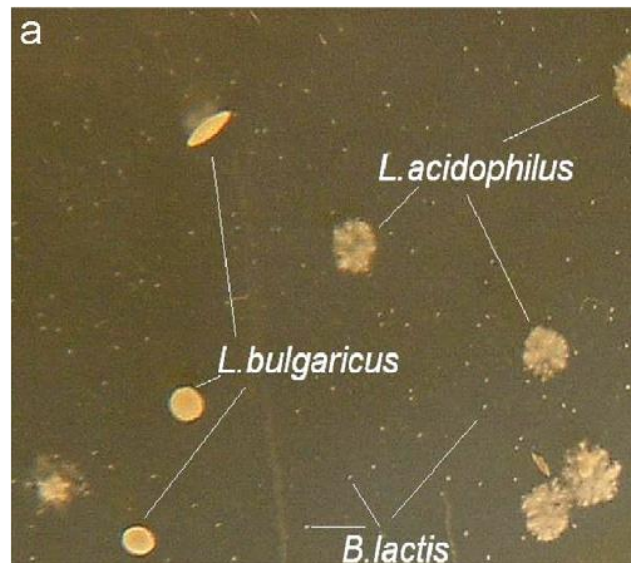
Πίνακας 6: Κυριότερα / επιλεκτικά υποστρώματα και συνθήκες επώασης σε ορισμένους μικροοργανισμούς.

Μικροοργανισμοί	Υποστρώματα	Εκλεκτική/ός προσθήκη/ παράγοντας και συνθήκες επώασης	Πηγές
<i>Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	MRSF	Φρουκτόζη, επώαση στους 45°C για 72h	71
	MRS 5.2	pH=5.2, αναερόβια επώαση στους 45°C για 72h	66,71, 2
	RCA 5.3	pH=5.3, αναερόβια επώαση στους 45°C για 72h	71,14
	Rogosa agar	0.5% (w/v) εκχύλισμα κρέατος	14
<i>Lb. acidophilus</i>	MRS-agar	Αναερόβια επώαση στους 43°C για 72 h	7
	MRS-agar	Οξικό νάτριο, τοματοχυμός, χολή βοδιού, 0.05% (w/v) κυστεΐνη	7
	MRSM	Μαλτόζη	71
	MRSB	Χολή βοδινού (0,15%)	71,72
	LC-MRS	Αερόβια ή αναερόβια επώαση στους 42°C	70,71
	MRS-salicin	Σαλικίνη	65,71
	MRS-sorbitol	Σορβιτόλη	65,71

Μικροοργανισμοί	Υποστρώματα	Εκλεκτική/ός προσθήκη/ παράγοντας και συνθήκες επώασης	Πηγές
<i>Lb. acidophilus</i>	MRS-clindamycin	Κλινδαμυκίνη, αναερόβια επώαση στους 37°C για 72 h	71
	BAM	Μαλτόζη, αναερόβια επώαση στους 43°C	71
	NA-salicin	Αναερόβια επώαση στους 37°C για 72 h	71
	Basal agar-maltose agar	Αναερόβια επώαση στους 43°C για 72 h	66
	BA-sorbitol agar	Αναερόβια επώαση στους 37°C για 72 h	66
<i>Lb. casei</i>	LC - MRS	Ριβόζη (1% w/v), αναερόβια επώαση στους 27°C	71
	MRS-LP	μίγμα LP, αναερόβια επώαση στους 37°C για 72 h	70,71
	MRSB	Χολή βοδινού (0.15% w/v), αναερόβια επώαση στους 37°C για 72 h	71,72
	MRS-free from sugar	0.05% κελοβιόζη, αναερόβια επώαση στους 37°C για 48 h	2
	MRS-vancomycin	Αναερόβια επώαση στους 37°C για 72 h, (10g/L βανκομυκίνη)	66,3
	LC-agar	Αναερόβια επώαση στους 27°C για 72 h	66
<i>S. thermophilus</i>	ST agar	pH, αναερόβια επώαση στους 37°C για 24 h	66,71
	M17 agar	Αναερόβια επώαση στους 37°C για 48 h	67,69,2
	M17-lactose agar	Αερόβια επώαση στους 45°C για 24h	69
<i>Lb. rhamnosus</i>	MRS-vancomycin	Αναερόβια επώαση στους 43°C για 72 h	66
	Rogosa agar	pH 5.35	1
<i>Lb. helveticus</i>	MRS	5.4, αναερόβια επώαση στους 37°C	28

Μικροοργανισμοί	Υποστρώματα	Εκλεκτική/ός προσθήκη/ παράγοντας και συνθήκες επώασης	Πηγές
<i>Bifidobacterium</i> spp.	NPNL-BL	NPNL διάλυμα	71
	MRS-NPNL	NPNL διάλυμα, αναερόβια επώαση στους 37 °C για 72 h	71,73
	MRS-NNLP	0.05% L-κυστεΐνη, αναερόβια επώαση στους 37 °C για 72 h	65,66
	TOS-NPNL	NPNL διάλυμα	71,41
	Rogosa agar	40μg/L X-Glu agar.	41
	MRS-raffinose	Ραφινόζη, LiCl (0.05%) και επώαση στους 45 °C	71
	BL agar	Χολή βοδιού, Γενταμικίνη, αναερόβια επώαση στους 37 °C για 48 h	73
	MTPY	Μουπιροκίνη	71,41
	WCM	Μουπιροκίνη	71
	DP	Δικλοξακιλλίνη, προπιονικό οξύ	74
	RB	LiCl, προπιονικό νάτριο	74
	RMS-PPNL	Προπιονικό νάτριο, νεομικίνη, παραμοκίνη, LiCl	74
TOS-MUP	Αναερόβια επώαση στους 37 °C για 72 h	86,89	
<i>Lb. plantarum</i>	MRS-vancomycin	pH 5.6, αερόβια επώαση στους 30°C για 48 h	67
	Acidified MRS	pH 5.2, αναερόβια επώαση στους 37 °C για 48h	44
	Ellikre's lactic agar	Αερόβια ή και αναερόβια επώαση στους 37 °C για 48-72 h	44
	YL	Αερόβια επώαση στους 37 °C για 48-72 h	44

BA = Basal agar
NNLP = Nalidixic acid, neomycine sulfate, lithium chloride and paromomycine sulfate,
NPNL = Sodium propionate, neomycin sulfate, paromomycin sulfate, nalidixic acid and lithium chloride
PPNL= Sodium propionate, paromomycin sulphate, neomycin sulfate and lithium chloride
ST agar = Streptococcus thermophilus agar
RCA = Reinforced clostridial agar
RSM = Reconstituted skim milk
MRS = deMan Rogosa Sharpe
NA = Nutrient agar
BL = Blood-glucose-Liver
LC = Liver-Cystine
LP = Lithium chloride–sodium propionate-based agar
TPY = Trypticase phytone yeast
RB = Raffinose-Bifidobacterium agar
RMS = Modified Rogosa agar
YL = Yogurt lactic agar



Εικόνα 14: Απεικόνιση αποικιών *Lb. acidophilus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* και *B. lactis* σε MRS-φρουκτόζη υπόστρωμα, (69).

Πίνακας 7: Τα κυριότερα προτεινόμενα διεθνή πρότυπα καταμέτρησης αποικιών των LAB.

Μικροοργανισμοί	Προτεινόμενα διεθνή πρότυπα	Πηγή
<i>Lb. acidophilus</i>	ISO 20128:2006 IDF 192:2006	67
<i>S. thermophilus</i>	ISO 7889:2003 IDF 117:2003	67
<i>Bifidobacterium</i> spp.	ISO 29981:2010 IDF 220:2010	68

- Επίσης, το ευρέως διαδεδομένο πρότυπο ISO 9232:2003 | IDF 146:2003 εφαρμόζεται για την αναγνώριση των χαρακτηριστικών μικροοργανισμών της γιαούρτης, δηλαδή τον *S. thermophilus* και τον *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*. (83)
- Για την ταυτοποίηση - επιβεβαίωση των LAB χρησιμοποιείται το API 50CHkit (BioMerieux, France) το οποίο βασίζεται στην ζύμωση 49 υδατανθράκων και η ανάλυση των δεδομένων γίνεται μέσω του λογισμικού APILAB Plus. (82)

1.15.1. Αφυδατωμένα μέσα καλλιέργειας

Στους πίνακες 8 και 9 αναφέρονται οι τυπικές φόρμουλες των δύο υποστρωμάτων, deMan, Rogosa, Sharpe (MRS) και Transgalctosylated Oligiosaccharide agar (TOS) που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα πτυχιακή.

Πίνακας 8: Συστατικά υποστρώματος MRS agar.

Τυπική φόρμουλα	g
Peptone	10.0
`Lab-Lemco' powder	8.0
Yeast extract	4.0
Glucose	20.0
Sorbitanmono-oleate	1ml
Dipotassium hydrogen phosphate	2.0
Sodium acetate 3H ₂ O	5.0
Triammonium citrate	2.0
Magnesium sulphate 7H ₂ O	0.2
Manganese sulphate 4H ₂ O	0.05
Agar	10.0
pH 6.2 ± 0.2, 25°C	

Πηγή Oxoid, (2022) (85)

- Το MRS Agar χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη των οξαγαλακτικών βακτηρίων (LAB). Είναι εκλεκτικό για γαλακτοβάκιλλους, αλλά μπορεί να επιτρέψει την ανάπτυξη *Leuconostoc* και *Pediococcus*. Με τη ρύθμιση του pH αλλάζει η εκλεκτικότητα του υποστρώματος, επειδή οι γαλακτοβάκιλλοι αντέχουν σε χαμηλά επίπεδα pH. (85)

Πίνακας 9: Συστατικά υποστρώματος TOS agar.

Τυπική φόρμουλα	g
Casein enzymic hydrolysate	10.0
Yeast extract	1.0
Potassium dihydrogen phosphate	3.0
Dipotassium hydrogen phosphate	4.8
Ammonium sulphate	3.0
Magnesium sulphate heptahydrate	0.2
L-Cysteine hydrochloride, monohydrate	0.5
Sodium propionate	15.0
Galactooligosaccharide	10.0
Agar	15.0
Final pH (at 25°C) 6.3 +/- 0.2	

Πηγή: Millipore, (2022) (86)

- Το TOS Propionate Agar είναι ένα υπόστρωμα σύμφωνα με το ISO 29981 για την άμεση ανίχνευση βιώσιμων *Bifidobacterium*. Η μέθοδος εφαρμόζεται στα γαλακτοκομικά προϊόντα, όπως ζυμώμενα γάλατα και γάλατα που δεν έχουν υποστεί ζύμωση, σκόνες γάλακτος, παρασκευάσματα για βρέφη και καλλιέργειες εκκίνησης. (86)
- Στο υπόστρωμα TOS μπορούν να αναπτυχθούν οι μικροοργανισμοί *B. adolescentis*, *B. animalis subsp. animalis*, *B. animalis subsp. lactis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis* και *B. longum*. (86)
- Η κυστεΐνη θεωρείται βασική πηγή αζώτου για τα γένη *Bifidobacterium*, καθώς μειώνει το δυναμικό οξειδοαναγωγής και έτσι οδηγεί στη βελτίωση των αναερόβιων συνθηκών. (70)
- Το υδρόλυμα καζεΐνης και το εκχύλισμα ζύμης αποτελούν τη βασική πηγή αζώτου και άλλων θρεπτικών συστατικών όπως τις βιταμίνες του συμπλέγματος B.
- Το υπόστρωμα περιέχει γαλακτοολιγοσακχαρίτες υψηλής καθαρότητας, οι οποίες είναι εξαιρετικές ενώσεις για την ανάπτυξη των *Bifidobacterium*.
- Επιπλέον, περιέχει προπιονικό νάτριο που προάγει την ανάπτυξη.
- Το θειικό αμμώνιο λειτουργεί ως πηγή θείου και αζώτου και τέλος το θειικό μαγνήσιο παρέχει ένα σημαντικό δισθενές κατιόν αλλά και θειικό άλας. (86)

1.15.2. Αντιβιοτικά

1.15.2.1. Βανκομυκίνη (Van)

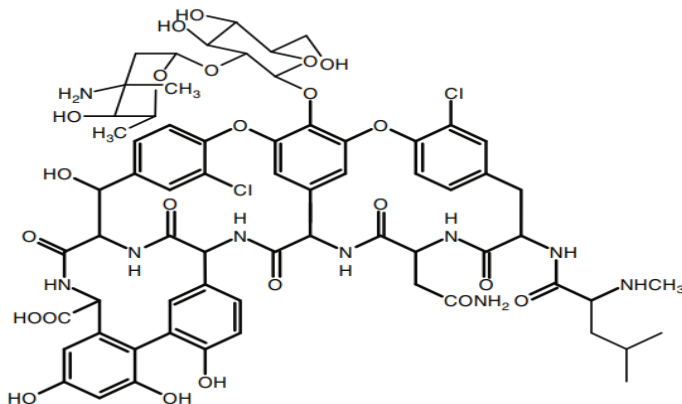
Η βανκομυκίνη ανακαλύφθηκε από την Eli Lilly το 1956, πρόκειται για γλυκοπεπτιδικό αντιβιοτικό το οποίο λαμβάνεται από το *Amycolatopsis orientalis* και έχει βακτηριοκτόνο δράση έναντι των θετικών κατά Gram βακτηρίων. (75,76,77) Σύμφωνα με τους W.J. Simpson κ.ά (1988) οι γαλακτοβάκιλλοι που αποδείχθηκαν ευαίσθητοι και ανθεκτικοί στην βανκομυκίνη αναγράφονται στον πίνακα 10.

Πίνακας 10: Γαλακτοβάκιλλοι ευαίσθητοι και ανθεκτικοί στην βανκομυκίνη.

Ευαίσθητα	Ανθεκτικά
<i>Lb. delbrueckii bulgaricus</i>	<i>Lb. casei</i>
<i>Lb. helveticus</i>	<i>Lb. rhamnosus</i>
	<i>Lb. plantarum</i>

Πηγή: Simpson, W. J., J. R. M. Hammond, and R. B. Miller, (1988), (79).

Οι J.M.T. Hamilton-Miller και S. Shah (1998) ερεύνησαν την ευαισθησία 40 στελεχών γαλακτοβάκιλλων στην βανκομυκίνη και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι ανθεκτικά στη δράση της είναι ο *Lb. casei* και ο *Lb. rhamnosus*, ενώ ευαίσθητα είναι ο *Lb. acidophilus* και ο *Lb. delbrueckii*. (78)



Εικόνα 15: Η πολύπλοκη χημική δομή της βανκομυκίνης. (80).

Σύμφωνα με την επιτροπή FEEDAP της EFSA (2018) οι γαλακτοβάκιλλοι που είναι ευαίσθητοι και ανθεκτικοί στην βανκομυκίνη αναγράφονται στον πίνακα 11.

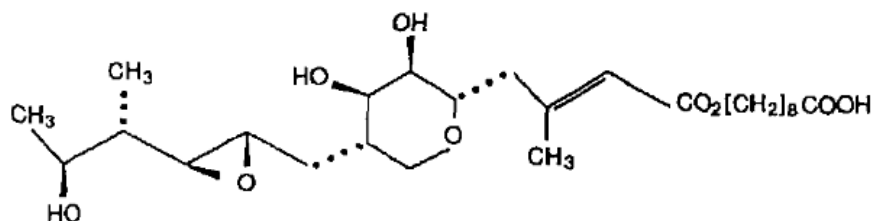
Πίνακας 11: Γαλακτοβάκιλλοι ευαίσθητοι και ανθεκτικοί στην βανκομυκίνη.

Ευαίσθητα	Ανθεκτικά
<i>Lb. delbrueckii</i>	<i>Lb. casei</i>
<i>Lb. helveticus</i>	<i>Lb. rhamnosus</i>
<i>Lb. acidophilus</i>	<i>Lb. plantarum</i>
<i>Bifidobacterium spp.</i>	

Πηγή: EFSA, (2018), (81).

1.15.2.2. Μουπιροκίνη (MUP)

Οι Fuller κ.α. απομόνωσαν και ταυτοποίησαν μια ομάδα αντιβακτηριακών ουσιών που παράγονται από τον μικροοργανισμό *Pseudomonas fluorescens*. Το 1971 οι Chain κ.α. ανακάλυψαν ότι υπεύθυνο για την αντιβακτηριακή δράση είναι ο μεταβολίτης ψευδομονικό οξύ A (pseudomononic acid A). Ακόλουθες έρευνες απέδειξαν την παρουσία άλλων τριών χημικών ενώσεων τα οποία κατατάχθηκαν στους δευτερεύοντες μεταβολίτες (με ονομασίες ψευδομονικό οξύ B, C και D) λόγω της μειωμένης αντιμικροβιακής τους δράσης. Έτσι, για λόγους ευκολίας μετονόμασαν το ψευδομονικό οξύ A σε μουπιροκίνη. (87)



Εικόνα 16: Χημική δομή μουπιροκίνης, (87).

Σύμφωνα με τα διεθνή πρότυπα ISO 29981 / IDF 220:2010 το MUP αντιβιοτικό το οποίο περιέχει μουπιροκίνη λιθίου, συμβάλλει στην επιλεκτική ανάπτυξη των *Bifidobacterium*, ενώ αποτρέπει την ανάπτυξη τυπικών οξυγαλακτικών βακτηρίων *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* και *Leuconostoc* σε γαλακτοκομικά προϊόντα. (88)

2. Πειραματικό μέρος

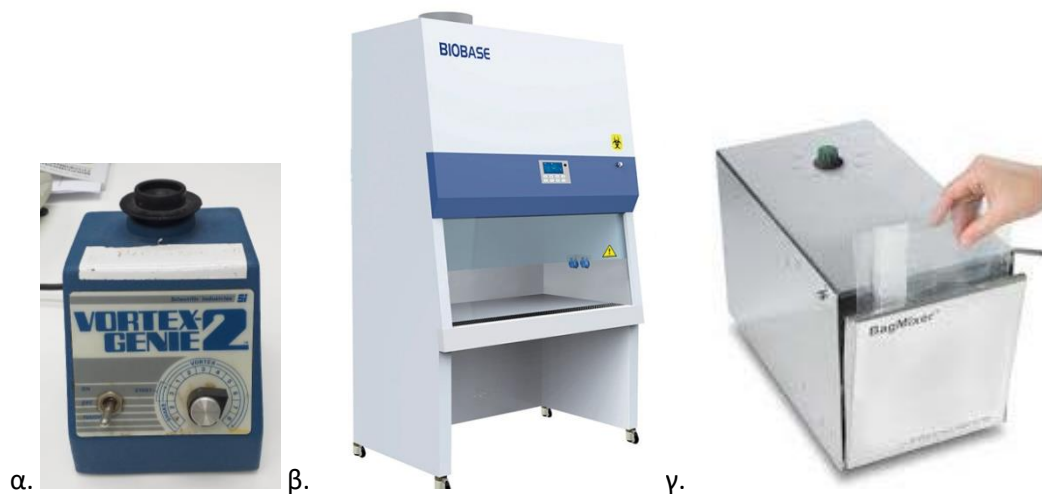
2.1. Αρχή Μεθόδου

Ζυγίζεται ποσότητα λυοφιλιωμένων καλλιεργειών και εμπορικών γιαουρτιών και ακολουθούν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις (10^{-2} μέχρι 10^{-11}) με αραιωτικό διάλυμα. Η καταμέτρηση πραγματοποιείται με την μέθοδο της ενσωμάτωσης. Η επώαση γίνεται σε συνθήκες 37°C για 3 μέρες με την χρήση αναερόβιας φιάλης και χρήση κιτ για την εξασφάλιση αναερόβιων συνθηκών. Μόνο τα τρυβλία με 30 έως 300 αποικίες απαριθμούνται και το αποτέλεσμα εκφράζεται σε μονάδες σχηματιζόμενων αποικιών ανά γραμμάριο καλλιέργειας ή προϊόντος (cfu/g). Τα πειράματα επαναλαμβάνονται τουλάχιστον δύο φορές και τα αποτελέσματα εκφράζονται από τους μέσους όρους δύο τρυβλίων.

2.2. Εξοπλισμός – Υλικά

Εργαστηριακός Εξοπλισμός

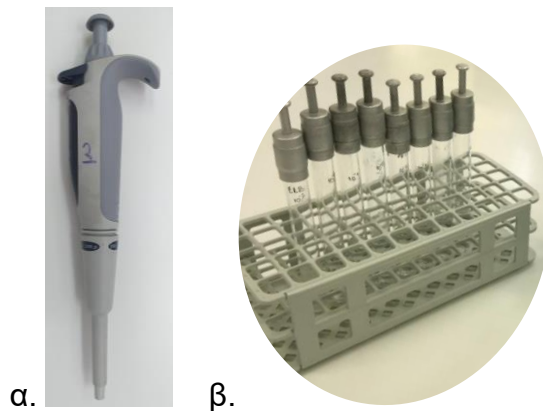
- Αναλυτικός ζυγός
- Συσκευές ομογενοποίησης (τύπου Vortex και Stomacher)
- Μετρητής αποικιών
- Κλίβανος επώασης
- Κλίβανος αποστείρωσης (ατμοκλίβανος)
- Υδατόλουτρο, για την διατήρηση σε ρευστή κατάσταση των υποστρωμάτων στους 45°C
- Φούρνος μικροκυμάτων
- Θάλαμος νηματικής ροής (ειδικός αποστειρωμένος χώρος)



Εικόνα 17: α. Αναδευτής Vortex-Genie 2. β. Θάλαμος νηματικής ροής (BIOBASE). γ. Ομογενοποιητής τύπου Stomacher.

Υλικά για την μικροβιολογική ανάλυση

- Λύχνοι εργαστηριακού τύπου
- Φιάλες – δοκιμαστικοί σωλήνες με πώμα, για αραιωτικά υγρά
- Αποστειρωμένα τρυβλία μιας χρήσης
- Στατό, για τη στήριξη δοκιμαστικών σωλήνων
- Σπάτουλα ή άλλα παρόμοια σύνεργα, για την ομογενοποίηση και μεταφορά δείγματος
- Γυάλινοι ράβδοι
- Ποτήρια ζέσεως
- Πιπέτες – σιφώνια – tips



Εικόνα 18: α.Αυτόματη πιπέτα των 100-1000 μL. β.Στατό με δοκιμαστικούς σωλήνες.

- Αποστειρωμένη σακούλα, για ζύγιση και ομογενοποίηση δείγματος
- Αναερόβια φιάλη (GasPak System)
- Δείκτης αναεροβίωσης (Anaerobic Indicator BR0055B)
- Φάκελος αναεροβίωσης (AnaeroGen 2.5L της Oxoid)
- MRS agar υπόστρωμα (της Oxoid)
- TOS agar υπόστρωμα (της Millipore)
- Vancomycin αντιβιοτικό (της Sigma- Aldrich)
- Lithium muricocin αντιβιοτικό (της Sigma- Aldrich)
- Μητρικό αραιωτικό διάλυμα (δισόξινο φωσφορικό κάλιο, KH_2PO_4)
- Δείγματα λυοφιλιωμένα και εμπορικά γιαούρτια

2.3. Δείγματα

Για την πραγματοποίηση της παρούσας πτυχιακής χρησιμοποιήθηκαν δέκα λυοφιλωμένα στελέχη διαφορετικών καλλιεργειών (πίνακας 12) και έξι εγκλεισμένες καλλιέργειες (πίνακας 13), οι οποίες προμηθεύτηκαν από την εταιρεία ΓΙΩΤΗΣ Α.Ε.. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα διπλά διαφορετικά γιούρτια (πίνακας 14) της ίδιας παρτίδας τα οποία πάρθηκαν από την υπεραγορά. Οι καλλιέργειες και τα γιαούρτια διατηρήθηκαν στους +4°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

Πίνακας 12: Τα δείγματα εμπορικών στελεχών και η κωδική τους ονομασία για την παρούσα πτυχιακή.

ΛΥΟΦΙΛΙΩΜΕΝΟΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ	ΚΩΔΙΚΗ ΟΝΟΜΑΣΙΑ
<i>Lacticaseibacillus casei</i> LC89	LC-LC89
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> Lp90	LP-Lp90
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA85	LA-LA85
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> LB42	LB-LB42
<i>Bifidobacterium lactis</i> BLa80	BL-BLa80
<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> LGG	LR-LGG
<i>Lactobacillus helveticus</i> LH76	LH-LH76
<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> LRa05	LR-LRa05
<i>Bifidobacterium longum</i> BL21	BL-BL21
<i>Streptococcus thermophilus</i> ST81	ST-ST81

Πίνακας 13: Τα δείγματα εγκλεισμένων βακτηρίων και η κωδική τους ονομασία.

ΕΓΚΛΕΙΣΜΕΝΟΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ	ΚΩΔΙΚΗ ΟΝΟΜΑΣΙΑ
LGG	ProbiYo (i)
LGG	ProbiYo (ii)
Athuba3001	EA
C44	EC
LGG	ELA
LGG	ELB

Πίνακας 14: Τα δείγματα εμπορικών γιαουρτιών, η κωδική τους ονομασία και η διατροφική τους δήλωση ανά 100g προϊόντος.

ΚΩΔΙΚΗ ΟΝΟΜΑΣΙΑ	ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ (g)	ΛΙΠΑΡΑ (g)	ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΕΣ (g)
SA	5.4	2.5	15.7
AZ	4.5	2.0	7.0
OP	7.4	2.0	4.0
AB	4.7	2.0	4.0

- Το 'AB' περιέχει εκτός από τις παραδοσιακές καλλιέργειες που περιλαμβάνει η γιαούρτη *Lactobacillus bulgaricus* και *Streptococcus thermophilus* και ένα συγκεκριμένο είδος *Bifidobacterium* το *Bifid. lactis*. (101)
- Η γιαούρτη 'OP' περιέχει καλλιέργεια γιαούρτης και προβιοτική καλλιέργεια *bifidus*. (102)
- Η γιαούρτη 'AZ' περιέχει *Lactobacillus bulgaricus* και *Streptococcus thermophilus*. (103)
- Η γιαούρτη 'SA' περιέχει εκτός από τις παραδοσιακές καλλιέργειες και καλλιέργεια *bifidus*. (104)

2.4. Προετοιμασία υποστρωμάτων με και χωρίς αντιβιοτικά

➤ MRS

Το MRS υπόστρωμα (σύνθεση συστατικών πίνακας 8) προετοιμάστηκε σύμφωνα με τις οδηγίες που αναγράφονται στην συσκευασία. Μετά την πλήρη διάλυση των συστατικών, το υπόστρωμα κατανεμήθηκε ανά 200 ml σε γυάλινες φιάλες χωρητικότητας 250 ml. Αποστειρώθηκαν στον ατμοκλίβανο στους 121,1°C για 15 min. (85)

➤ MRS – Van

Αρχικά και σύμφωνα με την εταιρεία παρασκευής, το αντιβιοτικό ενυδατώνεται με την προσθήκη 10,0 ml αποστειρωμένου νερού στο φιαλίδιο. Μετά την πλήρη διάλυσή του, μεταφέρονται ποσοτικά 200 μL σε 200 ml MRS υποστρώματος (το οποίο πρέπει να έχει θερμοκρασία 45°C). Η όλη διαδικασία πραγματοποιείται υπό ασηπτικές συνθήκες. Το υπόστρωμα MRS–Van χρησιμοποιείται άμεσα μετά την παρασκευή του, αφού πρώτα γίνει ανάδευση.



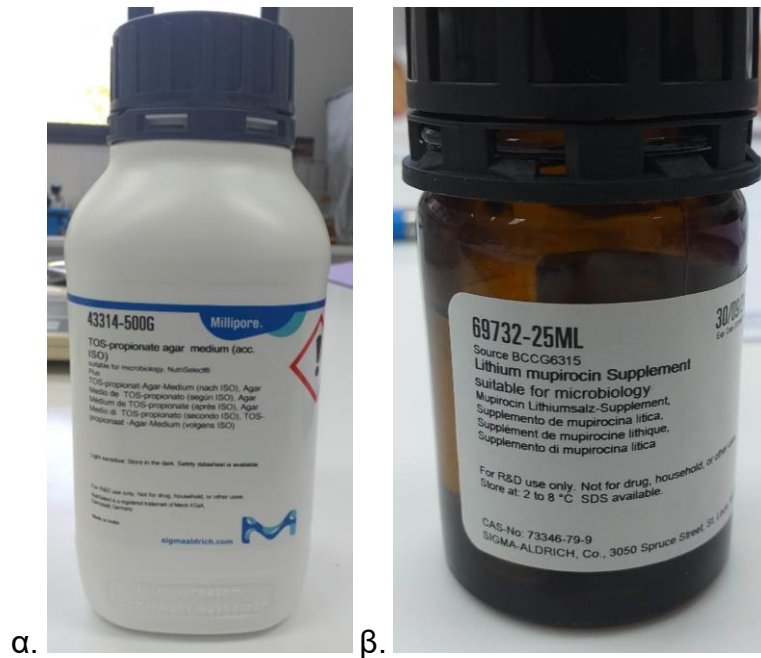
Εικόνα 19: α. Αντιβιοτικό βανκομυκίνη σε μη ενυδατωμένη μορφή (της Sigma- Aldrich).
β. Αφυδατωμένο υπόστρωμα MRS agar (της Oxoid).

➤ **TOS**

Το TOS υπόστρωμα (σύνθεση συστατικών πίνακας 9) προετοιμάστηκε σύμφωνα με τις οδηγίες που αναγράφονται στην συσκευασία. Μετά την πλήρη διάλυση των συστατικών, κατανεμήθηκε ανά 200 ml σε γυάλινες φιάλες χωρητικότητας 250 ml. Αποστειρώθηκαν στον ατμοκλίβανο στους 115°C για 15 min. (86)

➤ **TOS-MUP**

Σύμφωνα με το διεθνές πρότυπο ISO 29981:2010 / IDF 220:2010 και με την εταιρεία παρασκευής, μεταφέρονται ποσοτικά και ασηπτικά 10,4 ml αντιβιοτικού MUP σε 200 ml TOS υποστρώματος (το οποίο πρέπει να έχει θερμοκρασία 45°C). Το υπόστρωμα TOS – MUP χρησιμοποιείται άμεσα μετά την παρασκευή του, αφού πρώτα γίνει ανάδευση. (88)



Εικόνα 20: α. Αφυδατωμένο υπόστρωμα TOS agar (της Millipore) β. Αντιβιοτικό μουπιροκίνη (της Sigma- Aldrich).

2.5. Πειραματική πορεία εμπορικών καλλιέργειών

1. Ζύγιση 0,1000 g καλλιέργειας.

Η ζύγιση έγινε σε αναλυτικό ζυγό υπό ασηπτικές συνθήκες με την χρήση λύχνου.



Εικόνα 21: Ζύγιση λυοφιλωμένης καλλιέργειας σε αναλυτικό ζυγό με τη χρήση λύχνου.

2. Σήμανση δοκιμαστικών σωλήνων και τρυβλίων petri.

3. Προσθήκη της καλλιέργειας σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει 9,0 ml αραιωτικό υγρό.

Τα αραιωτικά υγρά είναι αραιά διαλύματα αλάτων, σε ισότονο περιβάλλον ώστε να διατηρείται η κατάλληλη οσμωτική πίεση στο κύτταρο των μικροοργανισμών και να μην καταστρέφονται. Για αυτό και δεν χρησιμοποιείται απεσταγμένο νερό. Επίσης, τα αραιωτικά δεν περιέχουν θρεπτικά στοιχεία που συμβάλλουν στην ανάπτυξη των μικροβίων, αλλά έχουν ουσίες για την ανόρθωση των κατεστραμμένων κυττάρων.

Ανακίνηση του δοκιμαστικού σωλήνα στην συσκευή Vortex, για την ισομερή κατανομή των μικροοργανισμών μέσα στο αραιωτικό υγρό, αυτός ο δοκιμαστικός αποτελεί την δεύτερη αραιώση (10^{-2}).

4. Παρασκευή διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων.

- Οι αραιώσεις γίνονται για να πετύχουμε μετρήσιμο αριθμό αποικιών στα τρυβλία.
- Διαδοχικές, για να μπορούν να γίνουν αναγωγές και να διευκολύνουν την εκτίμηση του συνολικού πληθυσμού της καλλιέργειας.

- ο Δεκαδικές 1:10, για την διευκόλυνση των αραιώσεων λόγω του υψηλού μικροβιακού φορτίου που υπάρχει στο αρχικό δείγμα.

Τεχνική: Ανακίνηση αραιώσης σε Vortex, ασηπτική λήψη δείγματος με πιπέτα ρυθμισμένη στο 1,000 ml και τοποθέτηση προϊόντος σε δοκιμαστικό σωλήνα με 9,0 ml αραιωτικού υγρού, αυτός ο δοκιμαστικός αποτελεί την τρίτη αραιώση (10^{-3}). Με την ίδια τεχνική ακολουθούν οι επόμενες αραιώσεις. Η διαδικασία πραγματοποιείται στον θάλαμο νηματικής ροής. Στο παρόν πείραμα χρειάστηκαν να γίνουν επιπλέον δέκα αραιώσεις (μέχρι 10^{-11}).

Παρασκευή μητρικού διαλύματος: Το μητρικό διάλυμα είναι δισόξινο φωσφορικό κάλιο (KH_2PO_4), το οποίο 34,0g προστίθονται σε 500ml απιονισμένου νερού και γίνεται η διόρθωση του pH σε 7,2. Συμπληρώνεται με απιονισμένο νερό μέχρι τα 1000,0 ml και ακολουθεί διήθηση. Αποστειρώνεται στους $121,1^\circ\text{C}$ για 15 min και αποθηκεύεται στο ψυγείο.

Παρασκευή κυρίως αραιωτικού διαλύματος: Μεταφέρονται ασηπτικά 1,25 ml μητρικού διαλύματος (KH_2PO_4) σε ογκομετρική φιάλη των 1000,0 ml και προστίθεται απιονισμένο νερό μέχρι την χαραγή της φιάλης. Ακολουθεί αποστείρωση στους $121,1^\circ\text{C}$ για 15 min.

5. Μέθοδος αρίθμησης:

Λαμβάνοντας υπόψη στον πίνακα 6 και το ISO 29981:2010 / IDF 220:2010 παρατηρήθηκε πως το υπόστρωμα το οποίο συνίσταται για την καταμέτρηση των LAB είναι το MRS agar ενώ για το γένος *Bifidobacterium* το TOS agar, αντίστοιχα. Ορισμένοι μικροοργανισμοί χρειάζονται την προσθήκη αντιβιοτικού στο υπόστρωμα για να ενισχύσει την ανάπτυξη τους, όπως ο *Lb. casei* και ο *Lb. rhamnosus* χρειάζονται Vancomycin και ο *B. longum* και ο *B. lactis* χρειάζονται MUP.

Υπάρχουν δύο μέθοδοι για την αρίθμηση των LAB, η μέθοδος της ενσωμάτωσης και της επιφανειακής εξάπλωσης. Εφαρμόζεται η μέθοδος της ενσωμάτωσης για την καλύτερη εξασφάλιση αναερόβιων συνθηκών.

Τεχνική της ενσωμάτωσης: από τις αραιώσεις (συνήθως από την 7^η έως την 11^η) των μικροοργανισμών γίνεται ενοφθαλμισμός 1,000 ml δείγματος σε διπλή σειρά τρυβλίων. Ακολουθεί η προσθήκη 12-15 ml του υποστρώματος σε θερμοκρασία $45-47^\circ\text{C}$, ανακίνηση με περιστροφικές κινήσεις και προς τις δύο κατευθύνσεις, αναμονή μέχρι την στερεοποίηση το υποστρώματος στα τρυβλία. Η διαδικασία πραγματοποιείται στον θάλαμο νηματικής ροής.

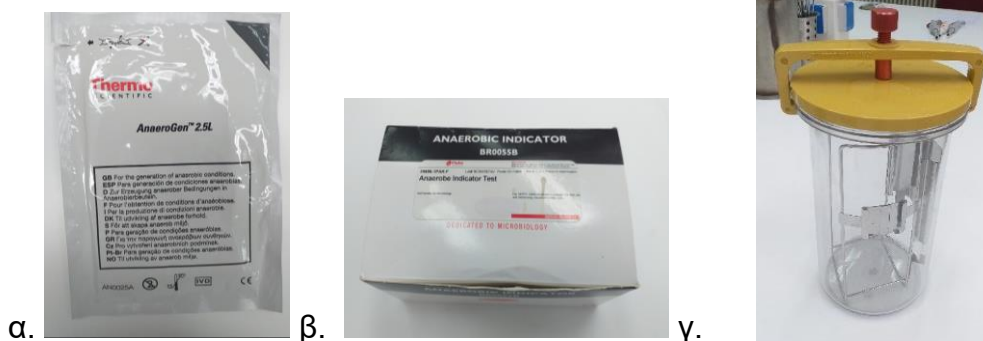


Εικόνα 22: Απαιτούμενα υλικά για τη διαδικασία της ενσωμάτωσης στον θάλαμο νηματικής ροής.

6. Συνθήκες επώασης:

Σύμφωνα με τον πίνακα 6 και το ISO 29981:2010 / IDF 220:2010 οι πιο κατάλληλες συνθήκες επώασης τόσο για τα LAB όσο και για τα *Bifidobacterium spp.* είναι 37°C για 72h σε αναερόβιο περιβάλλον.

Τεχνική: Αναστροφή των τρυβλίων για αποφυγή σχηματισμού υδρατμών στην επιφάνεια του τρυβλίου, ώστε να μην προκαλέσει την διασπορά των μεμονομένων αποικιών και έτσι να είναι αδύνατη η διάκριση τους. Τοποθέτηση τους στην αναερόβια φιάλη μαζί με τον φάκελο και τον δείκτη αναεροβίωσης και τέλος τοποθέτηση της φιάλης στον επωαστικό κλίβανο.

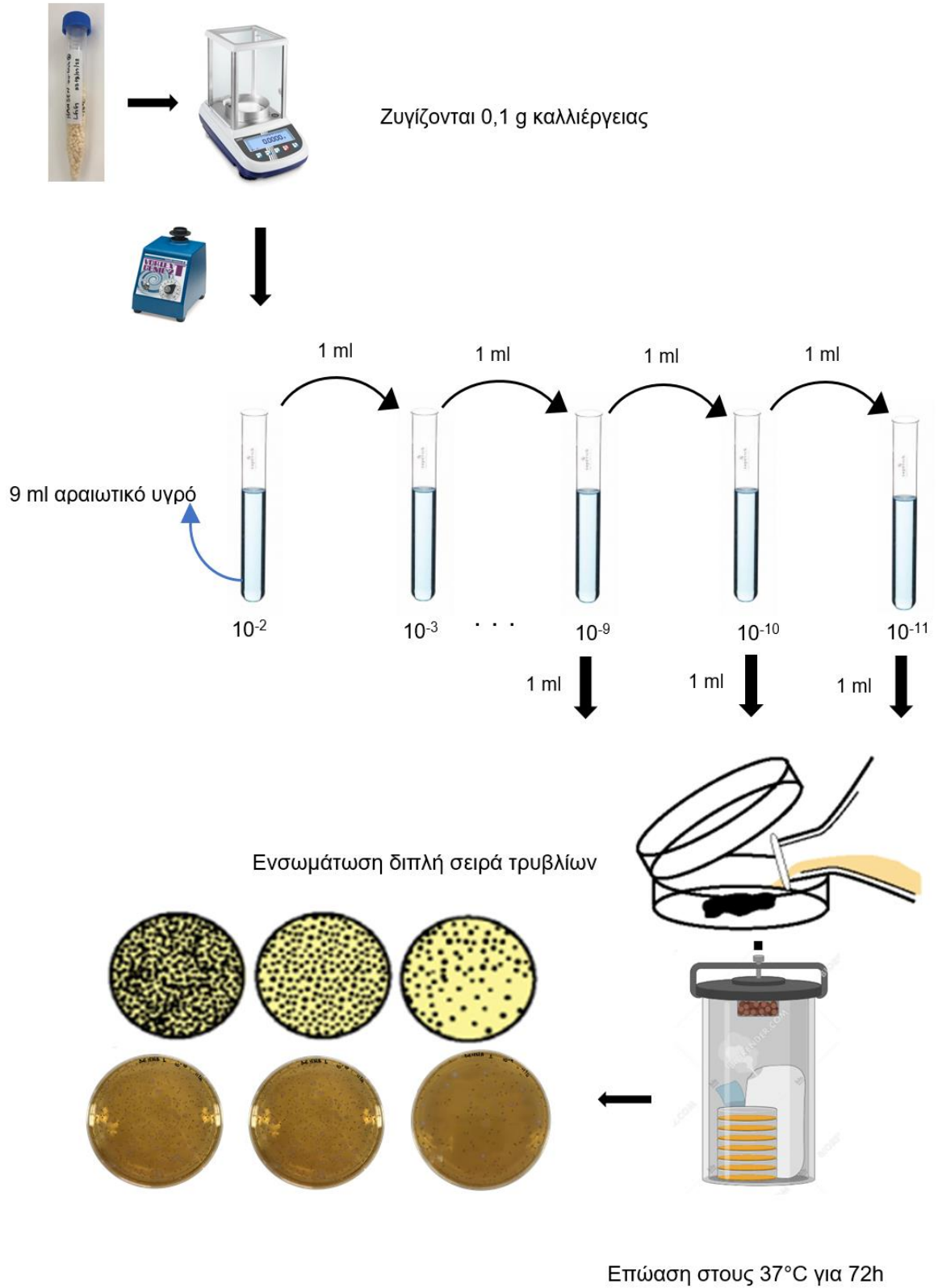


Εικόνα 23: α. Φάκελος αναεροβίωσης AnaeroGen 2.5L β. Δείκτης αναεροβίωσης (Anaerobic Indicator BR0055B) γ. Φιάλη αναεροβίωσης (GasPak System).

7. Μέτρηση αποικιών με την χρήση μετρητή.

8. Εξαγωγή - επεξεργασία αποτελεσμάτων. (86, 106)

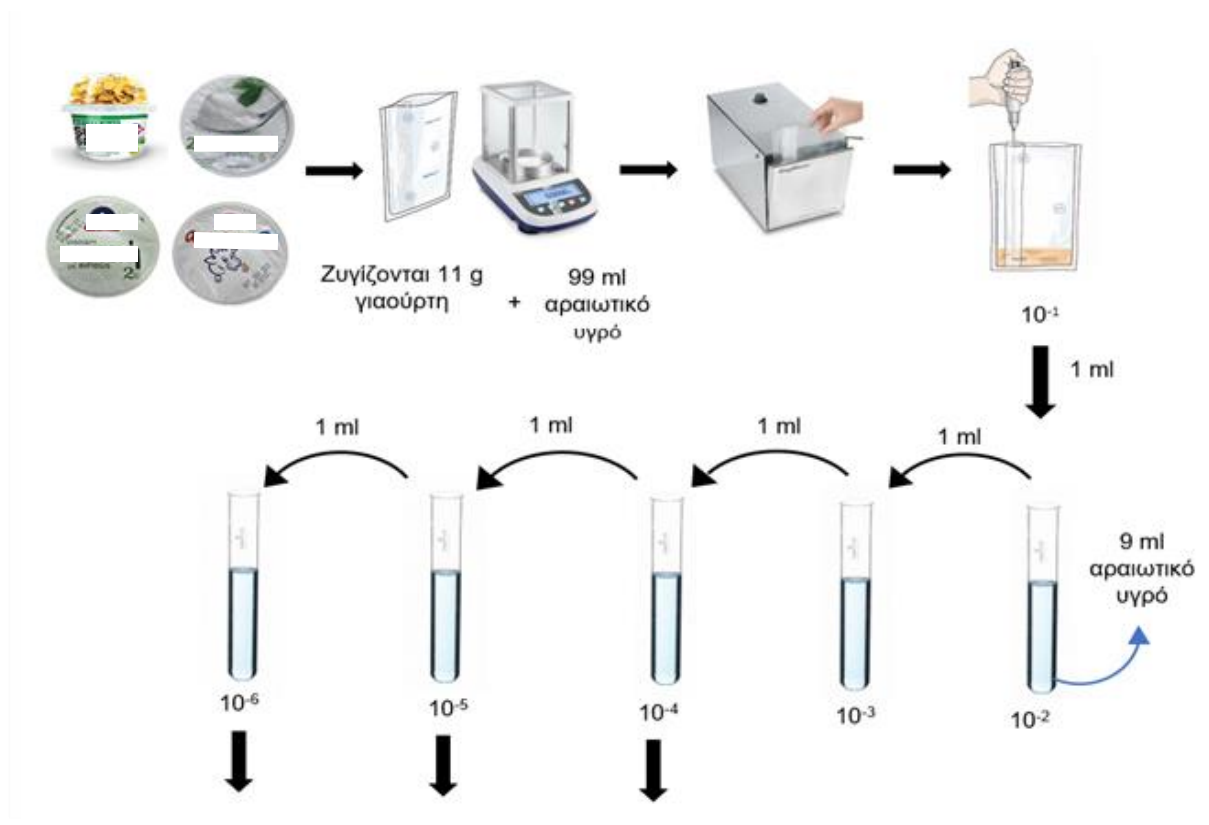
* Η ίδια διαδικασία πραγματοποιείται και για τις εκλεισμένες καλλιέργειες.



Διάγραμμα 5: Απεικόνιση πειραματικής πορείας εμπορικών καλλιεργειών.

2.6. Πειραματική πορεία εμπορικών γιαουρτιών

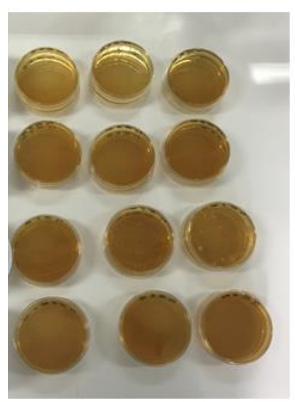
1. Δειγματοληψία και ζύγιση 11,00 g γιαουρτίου.
Τεχνική: Αρχικά, γίνεται ανάδευση της γιαούρτης και στην συνέχεια ζύγιση 11,00 g προϊόντος σε αποστειρωμένη σακούλα υπό άσηπτες συνθήκες οι οποίες εξασφαλίζονται με την χρήση λύχνου.
2. Σήμανση αποστειρωμένης σακούλας, δοκιμαστικών σωλήνων και τρυβλίων petri.
3. Προσθήκη 99,0 ml αραιωτικού υγρού στην σακούλα υπό άσηπτες συνθήκες.
Τεχνική: Ομογενοποίηση του δείγματος με την χρήση Stomacher, για την ισομερή κατανομή των μικροοργανισμών μέσα στο αραιωτικό υγρό, το μίγμα αυτό αποτελεί την πρώτη αραιώση (10^{-1}).
4. Παρασκευή διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων, με την ίδια τεχνική που χρησιμοποιήθηκε στις καλλιέργειες.
5. Μέθοδος αριθμησης, με την ίδια τεχνική που χρησιμοποιήθηκε στις καλλιέργειες.
Με βάση τα πρότυπα που εφαρμόστηκαν στις καλλιέργειες έτσι και στα γιαούρτια χρησιμοποιήθηκε υπόστρωμα MRS agar ενώ για τα γιαούρτια που περιείχαν καλλιέργεια *Bifidus* χρησιμοποιήθηκε TOS agar.
6. Τα βήματα 6, 7 και 8 παραμένουν τα ίδια με τις καλλιέργειες. (86, 106)



Ενσωμάτωση διπλή σειρά τρυβλίων



Επώαση στους 37°C για 72h



Διάγραμμα 6: Απεικόνιση πειραματικής πορείας εμπορικών γιαουρτιών.

2.7. Τρόπος αρίθμησης αποικιών

Η αρίθμηση των αποικιών και ο τρόπος εξαγωγής των αποτελεσμάτων έχουν θεσπιστεί από την APHA (American Public Health Association). Η καταμέτρηση των αποικιών γίνεται με μετρητή αποικιών ο οποίος διαθέτει μεγεθυντικό φακό και ειδικό φωτισμό. Οι παρακάτω κανόνες αρίθμησης βοηθούν στον υπολογισμό του πληθυσμού των μικροβίων:

- Λαμβάνονται υπόψη μόνο τα τρυβλία με 30 έως 300 αποικίες.
- Εάν υπάρχει μόνο ένα καταμετρήσιμο τρυβλίο, τότε ο αριθμός των αποικιών πολλαπλασιάζεται με τον συντελεστή της αντίστοιχης αραιώσης.
- Εάν υπάρχει καταμετρήσιμη διπλή σειρά τρυβλίων, τότε εξάγετε ο μέσος όρος των αποικιών και πολλαπλασιάζεται με τον συντελεστή της αντίστοιχης αραιώσης.
- Εάν υπάρχουν καταμετρήσιμα τρυβλία σε δύο διαδοχικές αραιώσεις, τότε εφαρμόζεται ο παρακάτω τύπος:

$$N = \frac{\Sigma c}{V(n_1 + 0,1 n_2)d}$$

Όπου:

Σc : το άθροισμα των αποικιών σε όλα τα μετρούμενα τρυβλία

V: ο όγκος του ενοφθαλμίσματος εντός των τρυβλίων

n_1 : ο αριθμός των τρυβλίων που ανήκουν στη μικρότερη αραιώση, από τις μετρούμενες

n_2 : αριθμός των τρυβλίων που ανήκουν στη μεγαλύτερη αραιώση, από τις μετρούμενες

d: βαθμός της μικρότερης αραιώσης, από τις δύο χρησιμοποιούμενες, για την έκφραση του αποτελέσματος. (106)

Παράδειγμα: Καταμέτρηση δύο διαδοχικών τρυβλίων, με τη μέθοδο της ενσωμάτωσης, με βάση τον παραπάνω τύπο:

$$N = \frac{280+260+39+45}{1*(2+0,1*2)*0,001} = 2,8 * 10^5 \text{ cfu/g}$$

Αραιώση	10 ⁻³	10 ⁻⁴
	280	39
cfu/g	260	45

2.8. Εγκλεισμός προβιοτικών στελεχών σε πρεβιοτικές μήτρες

Πίνακας 15: Πληροφορίες σχετικά με το είδος της μήτρας των εγκλεισμένων βακτηρίων και την περιεκτικότητά τους στο τελικό προϊόν.

Δείγματα εγκλεισμένης σκόνης	Ποσότητα (g)	Είδος μήτρας	*Περιεκτικότητα σκόνης στο τελικό προϊόν (%w/w)
Athuba3001	20	WPI:IN	2
C44	20	WPI:IN	2
LGG	30	WPI:IN	0,03
LGG	30	MALTODEXTRIN	0,03

*ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ:

1. Οι εγκλεισμένες σκόνες που αναπτύχθηκαν και εμπεριέχουν τα επιλεγμένα προβιοτικά βακτήρια **Athuba3001** και **C44** προορίζονται να έχουν συγκέντρωση 2% w/w στο τελικό προϊόν, η οποία θα δίνει τον επιθυμητό αριθμό **10⁷cfu/g τελικού προϊόντος**, σύμφωνα με την προδιαγραφή της εταιρίας.
2. Οι εγκλεισμένες σκόνες που αναπτύχθηκαν και εμπεριέχουν το εμπορικό στέλεχος **LGG** προορίζονται να έχουν συγκέντρωση **0,03% w/w** στο τελικό προϊόν, η οποία θα δίνει τον επιθυμητό αριθμό **10⁷ cfu/g τελικού προϊόντος**, σύμφωνα με την προδιαγραφή της εταιρίας.

Συνίσταται τα δείγματα να φυλάσσονται σε **θερμοκρασία -20°C (κατάψυξη)**.

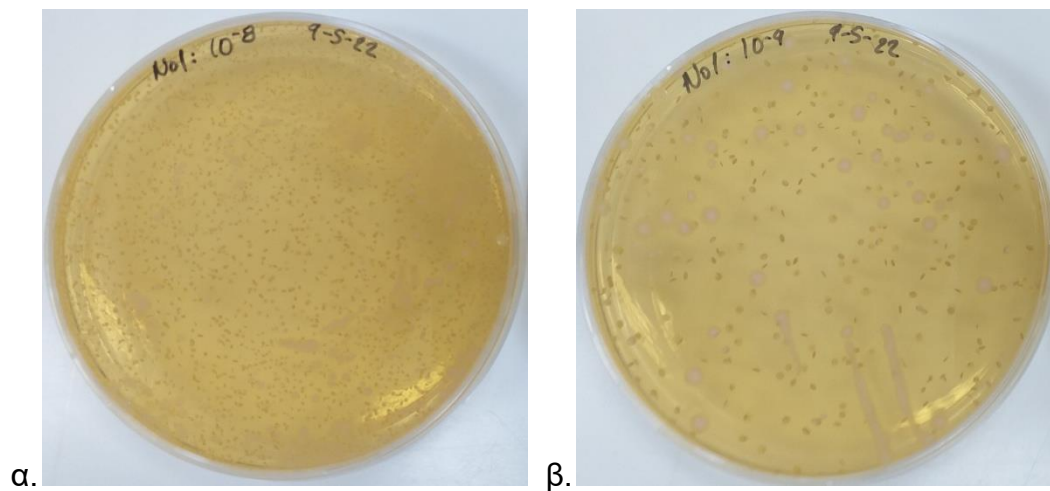
2.9. Αποτελέσματα – Συζήτηση

2.9.1. Εμπορικές καλλιέργειες

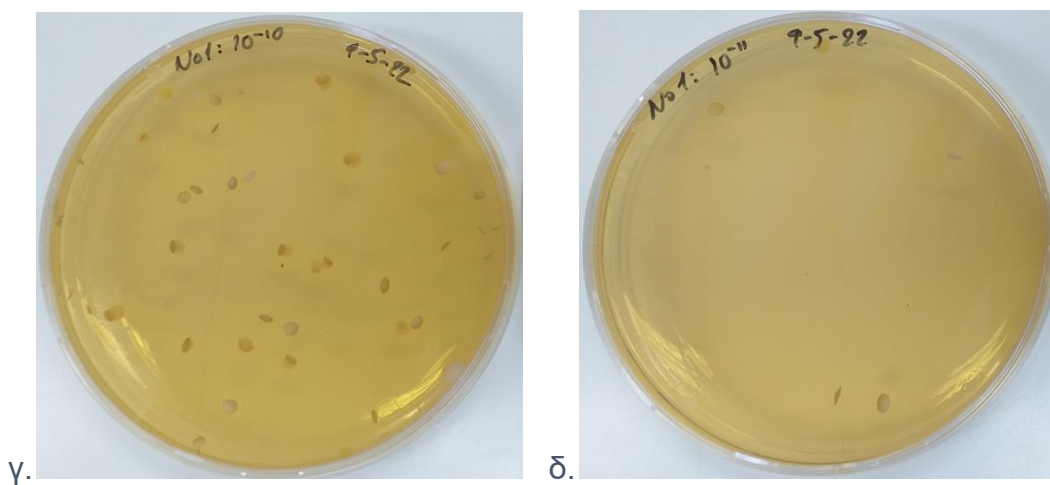
Πίνακας 16 : Συνολικός αριθμός αποικιών όλων των καλλιεργειών υπό αναερόβιες συνθήκες στους 37°C για 72h σε *MRS agar* υπόστρωμα εκφρασμένα σε cfu/g.

ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ	ΑΡΑΙΩΣΕΙΣ						ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ
	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹		10 ⁻¹⁰	10 ⁻¹¹	cfu/g
LC-LC89	-	>300	242	249	>300	203 262	2,30*10 ¹³
LP-Lp90	-	>300	>300		90 76	<30	8,30*10 ¹¹
LA-LA85	-	>300	94	96	<30	<30	9,50*10 ¹⁰
LB-LB42	-	>300	66	55	<30	<30	6,05*10 ¹⁰
BL-BLa80	-	>300	264	>300	34 34	<30	2,76*10 ¹¹
LR-LGG	>300	>300	174	72	<30	<30	1,23*10 ¹¹
LH-LH76	-	>300	80	129	<30	<30	1,04*10 ¹¹
LR-LRa05	-	>300	195	214	<30	<30	2,04*10 ¹¹
BL-BL21	46 54	ΚΑΜΙΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗ					5,00*10 ⁸
ST-ST81	-	33 53	<30	<30	<30	<30	4,30*10 ⁹

Στις εικόνες 24 και 25 παρουσιάζονται οι σχηματιζόμενες αποικίες του *Lb. casei* στα τρυβλία σε υπόστρωμα *MRS agar* από την 8^η μέχρι και την 11^η αραιώση. Παρατηρείται ελάττωση του συνολικού πληθυσμού λόγω των διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων.

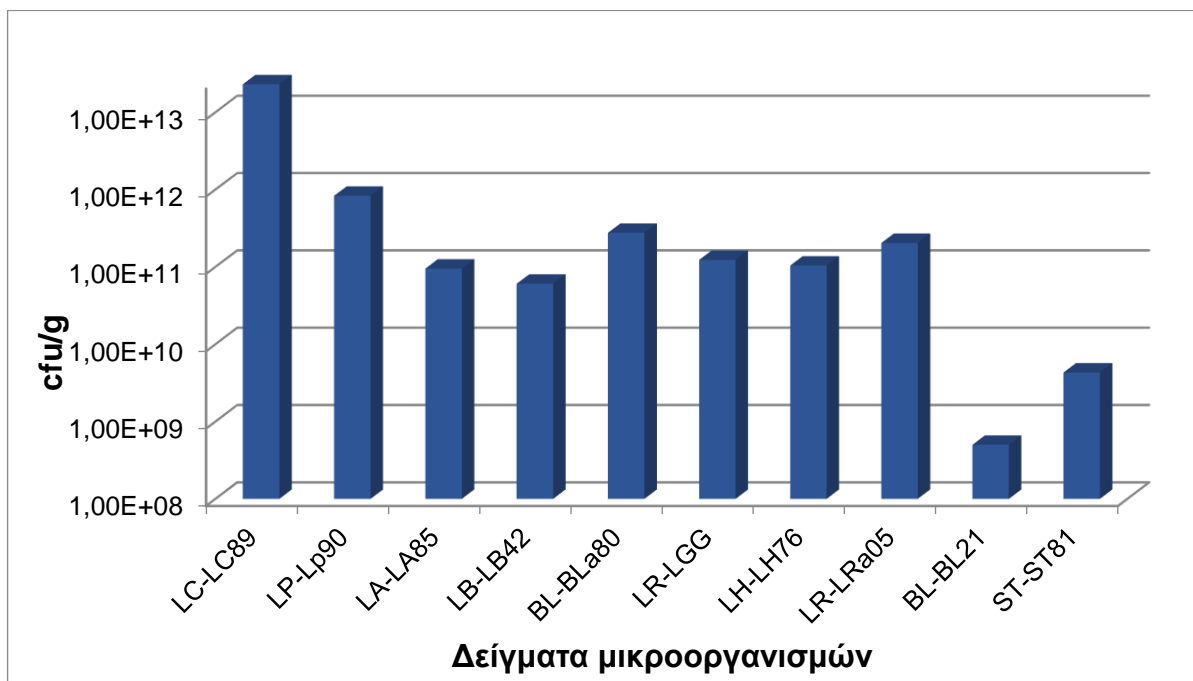


Εικόνα 24: Αποτελέσματα ανάπτυξης του *Lb. casei* στην 8η αραιώση (10^{-8}) εικόνα α και 9η αραιώση (10^{-9}) εικόνα β σε MRS agar θρεπτικό υπόστρωμα.



Εικόνα 25: Αποτελέσματα ανάπτυξης του *Lb. casei* στην 10η αραιώση (10^{-10}) εικόνα γ και 11η αραιώση (10^{-11}) εικόνα δ σε MRS agar θρεπτικό υπόστρωμα.

Στο διάγραμμα 7 απεικονίζεται ο συνολικός πληθυσμός των εμπορικών καλλιεργειών σε MRS agar. Παρατηρείται ότι οι μικροοργανισμοί του γένους *Lactobacillus* συμπεριλαμβανομένου του *B. lactis* αναπτύσσονται σε MRS υπόστρωμα με τον πληθυσμό τους να κυμαίνεται κοντά στους 11 λογαριθμικούς κύκλους. Αντίθετα, ο *B. longum* και ο *S. thermophilus* δεν αναπτύσσονται ικανοποιητικά, καθώς το υπόστρωμα δεν είναι εκλεκτικό για την ανάπτυξή τους, προτείνονται τα υποστρώματα TOS-MUP και M17, αντίστοιχα. Γενικότερα, κάποιοι μικροοργανισμοί ίσως να βρίσκονται σε κατάσταση στρες ή να περιέχουν τραυματισμένα κύτταρα και έτσι ο πληθυσμός να εμφανίζεται χαμηλότερος. Κατά την διάρκεια παρασκευής της γιαούρτης υπάρχει μεταβολή του αρχικού συνολικού πληθυσμού μικροβίων.



Διάγραμμα 7: Καταμέτρηση αποικιών των μικροοργανισμών σε MRS agar υπόστρωμα.

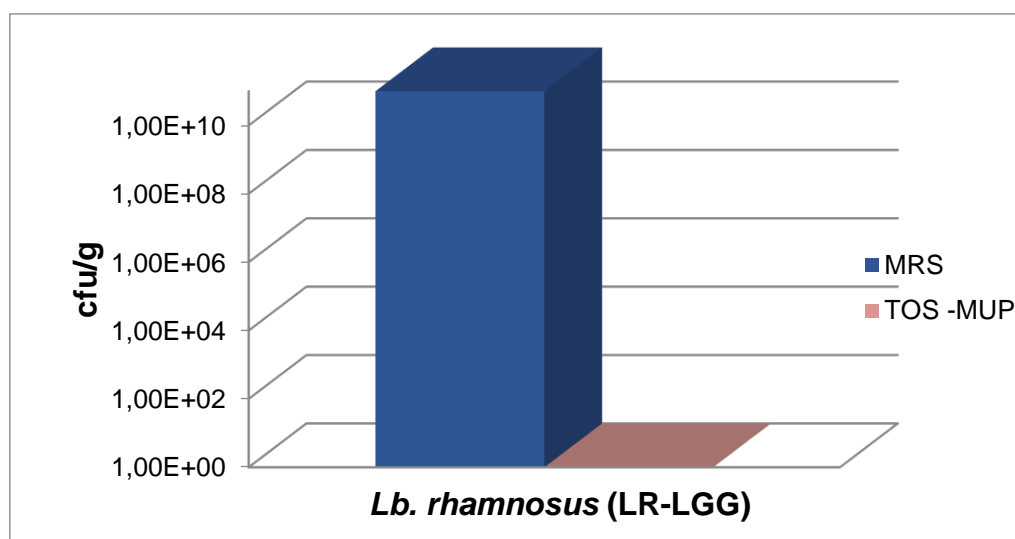
Πίνακας 17: Συνολικός αριθμός αποικιών των **καλλιεργείων** που αναπτύχθηκαν υπό αναερόβιες συνθήκες στους 37°C για 72h σε **MRS-Van agar** υπόστρωμα εκφρασμένα σε cfu/g.

ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ	ΑΡΑΙΩΣΕΙΣ					ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ cfu/g
	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰	10 ⁻¹¹	
LC-LC89	-	>300	>300	51 41	<30	4,60*10 ¹¹
LR-LGG	>300	>300	>300	-	-	ΜΗ ΜΕΤΡΗΣΙΜΑ

Πίνακας 18: Συνολικός αριθμός αποικιών **καλλιεργείων** που αναπτύχθηκαν υπό αναερόβιες συνθήκες στους 37°C για 72h σε **TOS-MUP agar** υπόστρωμα εκφρασμένα σε cfu/g.

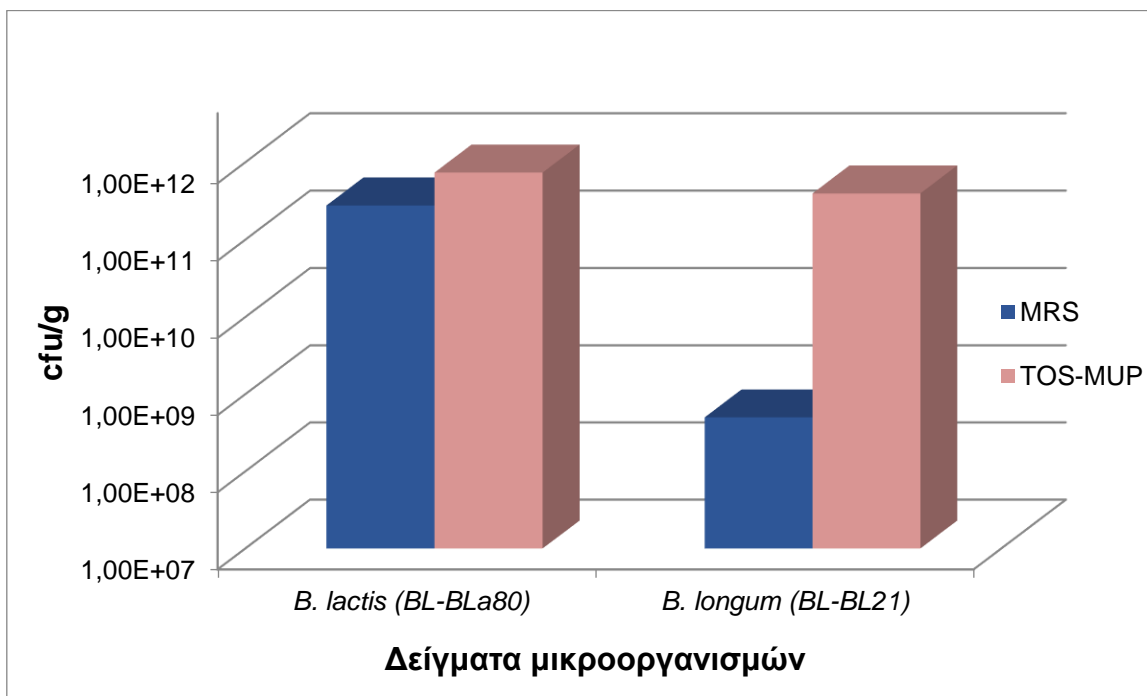
ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ	ΑΡΑΙΩΣΕΙΣ					ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ cfu/g
	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰	10 ⁻¹¹	
BL-BLa80	-	>300	>300	80 67	<30	7,35*10 ¹¹
LR-LGG	ΚΑΜΙΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗ					ΚΑΜΙΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗ
BL-BL21	-	-	>300	37 42	<30	3,95*10 ¹¹

Στο διάγραμμα 8 παρουσιάζεται η σύγκριση του πληθυσμού του *Lb. rhamnosus* (LR-LGG) σε MRS και TOS-MUP υπόστρωμα. Η απουσία σχηματιζόμενων αποικιών στο TOS-MUP είναι αναμενόμενη, επειδή το συγκεκριμένο υπόστρωμα δεν συμβάλλει στην ανάπτυξη γαλακτοβάκιλλων.



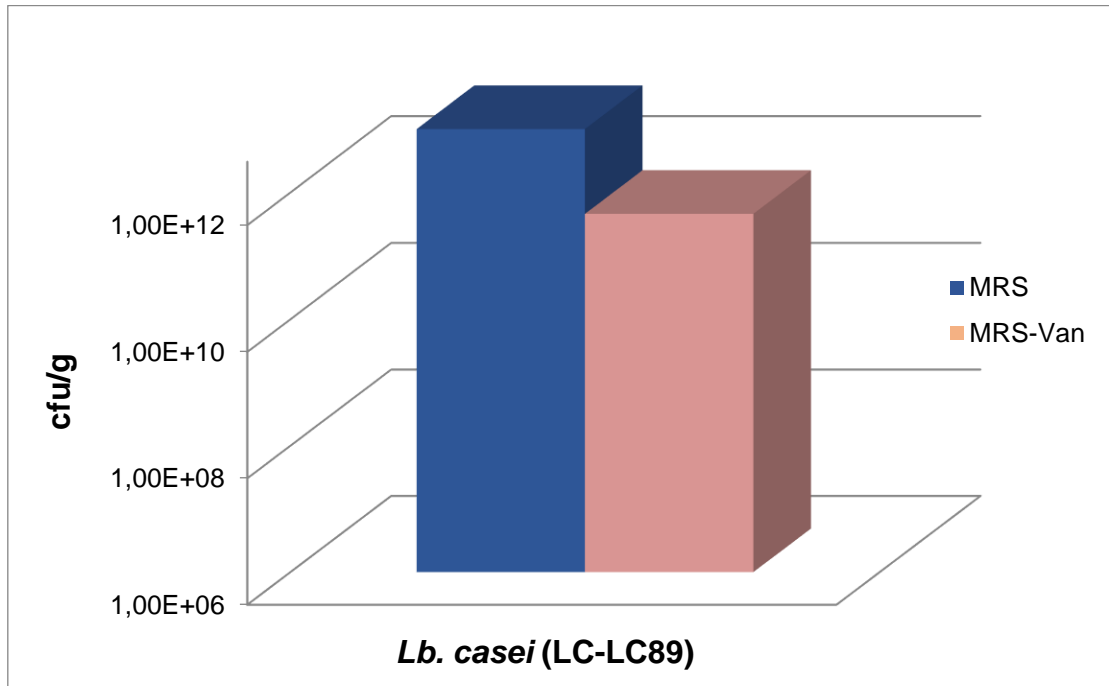
Διάγραμμα 8: Σύγκριση συνολικού πληθυσμού *Lb. rhamnosus* (LR-LGG) σε MRS και TOS-MUP agar.

Στο διάγραμμα 9 συγκρίνεται η ανάπτυξη μικροοργανισμών του γένους *Bifidobacterium* μεταξύ των δύο υποστρωμάτων MRS και TOS-MUP. Σύμφωνα με το ISO 29981/ IDF 220 το υπόστρωμα TOS-MUP είναι εκλεκτικό για την ανάπτυξη των *Bifidobacterium spp.* Για αυτό και στον *B. longum* παρατηρείται μεγαλύτερη ανάπτυξη στο TOS-MUP κατά 3 λογαριθμικούς κύκλους από ότι στο υπόστρωμα MRS. Η καλλιέργεια BL-BLa80 εμφανίζει πληθυσμό στον ίδιο λογαριθμικό κύκλο και στα δυο υποστρώματα. Η υψηλή ανάπτυξη στο MRS μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι το δείγμα δεν περιέχει καθαρή καλλιέργεια *B. lactis*, αλλά πιθανόν να είναι μίγμα LAB μικροοργανισμών.



Διάγραμμα 9: Σύγκριση συνολικού πληθυσμού *Bifidobacterium spp.* σε MRS και TOS-MUP agar.

Στο διάγραμμα 10 απεικονίζονται οι συνολικές σχηματιζόμενες αποικίες του δείγματος LC-LC89 σε MRS και MRS-Van. Η καλλιέργεια LC-LC89 παρουσιάζει χαμηλότερη ανάπτυξη με το αντιβιοτικό κατά 2 λογαριθμικούς κύκλους, ωστόσο αν η καλλιέργεια ήταν καθαρή τα αποτελέσματα θα ανήκαν στον ίδιο λογάριθμο. Επομένως, το δείγμα ίσως να είναι μίγμα που περιέχει μικροοργανισμούς ευαίσθητους στη βανκομυκίνη (*Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* και *Lb. helveticus*).



Διάγραμμα 10: Σύγκριση συνολικού πληθυσμού *Lb. casei* (LC-LC89) σε MRS με και χωρίς αντιβιοτικό.

2.9.2. Εγκλεισμένα

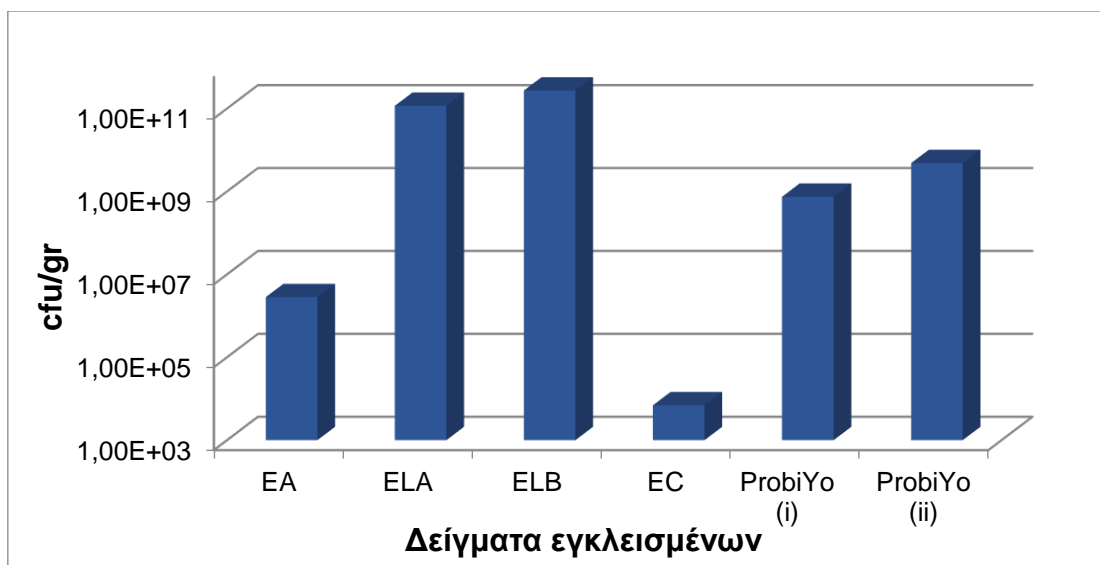
Πίνακας 19: Συνολικός αριθμός αποικίων **εγκλεισμένων** καλλιεργείων που αναπτύχθηκαν υπό αναερόβιες συνθήκες στους 37°C για 72h σε **MRS agar** εκφρασμένα σε cfu/g.

ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ	ΑΡΑΙΩΣΕΙΣ					ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ cfu/g		
	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰	10 ⁻¹¹			
ELA	>300	>300	119	113	<30	<30	1,16*10 ¹¹	
ELB	>300	>300	240	268	41	44	<30	2,70*10 ¹¹
Probi Yo (i)	88	60	<30	<30	<30	<30	7,40*10 ⁸	
Probi Yo (ii)	>300	52	44	<30	<30	<30	4,80*10 ⁹	

Πίνακας 20: Συνολικός αριθμός αποικίων **εγκλεισμένων** καλλιεργείων που αναπτύχθηκαν υπό αναερόβιες συνθήκες στους 37°C για 72h σε **MRS agar** εκφρασμένα σε cfu/g.

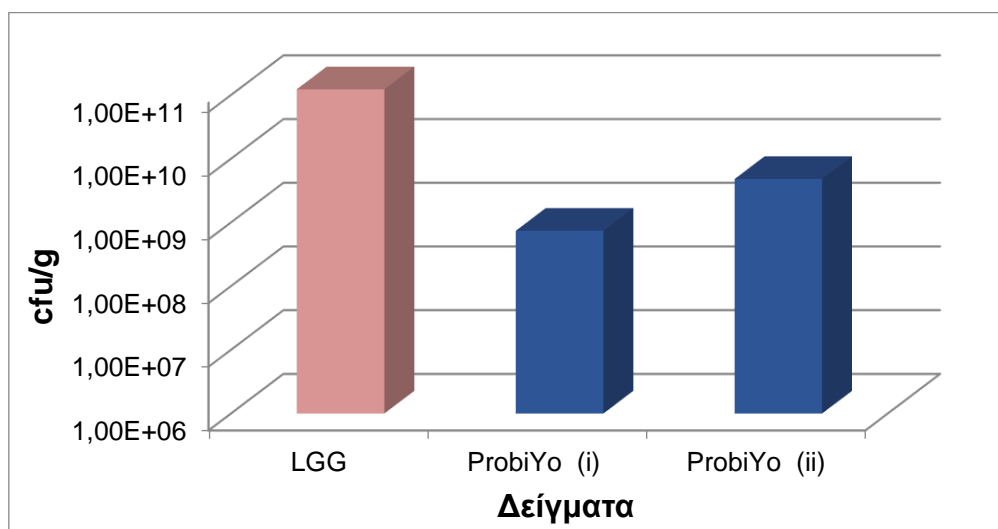
ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ	ΑΡΑΙΩΣΕΙΣ					ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ cfu/g		
	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶			
EC	72	66	<30	<30	ΚΑΜΙΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗ		6,90*10 ³	
EA			274	274	<30	43	<30	2,81*10 ⁶

Στο διάγραμμα 11 απεικονίζεται ο συνολικός πληθυσμός των εγκλεισμένων καλλιεργείων σε υπόστρωμα MRS agar. Παρατηρείται ότι στα δείγματα ELA, ELB, ProbiYo (i) και ProbiYo (ii) οι μέθοδοι εγκλεισμού που εφαρμόστηκαν ήταν ικανοποιητικές, καθώς οι μικροοργανισμοί παρουσιάζουν συνολικό πληθυσμό πάνω από 10⁸ cfu/g. Τα δείγματα ProbiYo i και ii ανάλογα με τον τρόπο και τις συνθήκες εμβολιασμού τους, πιθανόν να μην μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην παραγωγή γιαουρτίων, επειδή ο πληθυσμός των μικροοργανισμών μπορεί να μειωθεί περαιτέρω, κάτω από 10⁷ cfu/g. Αντιθέτως, τα δείγματα EA και EC εμφάνισαν πληθυσμό ανάπτυξης 10⁶ cfu/g και 10³ cfu/g, αντίστοιχα. Ωστόσο, δεν μπορεί να γίνει εμβολιασμός αυτών στα γιαούρτια, επειδή δεν είναι σύμφωνα με τις προδιαγραφές των προβιοτικών και του Codex Alimentarius για τα γιαούρτια. Αξίζει να σημειωθεί ότι είναι πιθανόν σε ένα ποσοστό των καθαρών καλλιεργείων να μην έχει πραγματοποιηθεί ενθυλάκωση, συνεπώς ο πληθυσμός δεν είναι αντιπροσωπευτικός.



Διάγραμμα 11: Καταμέτρηση αποικιών των εγκλεισμένων μικροοργανισμών σε MRS agar υπόστρωμα.

Στο διάγραμμα 12 συγκρίνεται η ανάπτυξη του μικροοργανισμού *Lb. rhamnosus* GG με και χωρίς εγκλεισμό. Εφαρμόστηκαν δυο διαφορετικές μέθοδοι εγκλεισμού. Και στις δύο περιπτώσεις παρατηρήθηκε πτώση του μικροβιακού πληθυσμού τουλάχιστον κατά δύο λογαριθμικούς κύκλους.



Διάγραμμα 12: Σύγκριση πληθυσμού LGG με εγκλεισμό (ProbiYo (i) και ProbiYo (ii)) και χωρίς εγκλεισμό (LGG).

2.9.3. Εμπορικά γιαούρτια

Πίνακας 21: Συνολικός αριθμός αποικίων καλλιιεργειών που αναπτύχθηκαν υπό αναερόβιες συνθήκες στους 37°C για 72h σε **MRS agar** στα γιαούρτια εκφρασμένα σε cfu/g.

ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ	ΑΡΑΙΩΣΕΙΣ				ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ cfu/g	
	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶			
SA	>300	>300	48	53	5,05*10 ⁷	
AZ	>300	206	239	30	25	2,26*10 ⁷
OP	>300	>300	60	50	5,50*10 ⁷	
AB	>300	>300	237	65	69	1,77*10 ⁷

Πίνακας 22: Συνολικός αριθμός αποικίων καλλιιεργειών που αναπτύχθηκαν υπό αναερόβιες συνθήκες στους 37°C για 72h σε **TOS-MUP agar** στα γιαούρτια εκφρασμένα σε cfu/g.

ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ	ΑΡΑΙΩΣΕΙΣ				ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ cfu/g	
	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸			
SA	>300	253	60	65	<30	3.10*10 ⁸
OP	>300	>300	222	73	78	7.55*10 ⁸
AB	>300	>300	156	30	31	1.80*10 ⁹

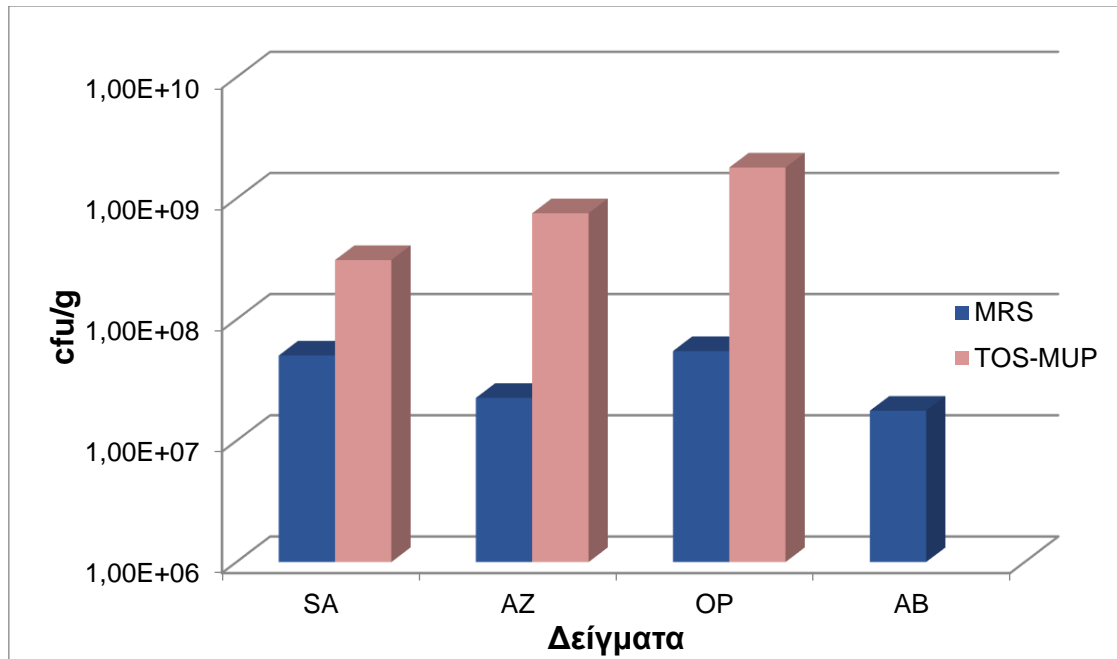
Στο διάγραμμα 13 παρουσιάζεται και συγκρίνεται η ανάπτυξη μικροοργανισμών εμπορικών γιαουρτιών σε διαφορετικά υποστρώματα. Στο υπόστρωμα MRS agar αναπτύχθηκαν LAB μικροοργανισμοί κυρίως του γένους *Lactobacillus*, ενώ στο TOS-MUP υπόστρωμα αναπτύχθηκαν μικροοργανισμοί του γένους *Bifidobacterium spp.*

Συγκεκριμένα, στο MRS οι συνολικοί πληθυσμοί των LAB μικροοργανισμών στα γιαούρτια παρουσιάζουν αποτέλεσμα στον ίδιο λογαριθμικό κύκλο (10⁷). Με βάση το πρότυπο CXS 243-2003 του Codex Alimentarius για τα ζυμώμενα γάλατα, τα γιαούρτια πρέπει να περιέχουν συνολικό πληθυσμό καλλιιεργειών εκκίνησης το ελάχιστο 10⁷ cfu/g μέχρι την ημερομηνία ελάχιστης διατηρησιμότητας, για να μπορούν να διατίθενται στο εμπόριο. Επομένως, τα δείγματα αυτά είναι σύμφωνα με ότι ορίζει το πρότυπο για τα γιαούρτια.

Στο TOS-MUP, το οποίο είναι εκλεκτικό υπόστρωμα για τα *Bifidobacterium spp.*, παρατηρείται μεγαλύτερη ανάπτυξη από ότι στο MRS κατά ένα με δύο λογαριθμικούς κύκλους, αφού τα γιαούρτια είναι προβιοτικά και εμβολιασμένα με καλλιέργειες *Bifidus*. Σύμφωνα με έρευνες, για να έχουν τα προβιοτικά τρόφιμα ευεργετικές ιδιότητες στον άνθρωπο απαιτούνται τουλάχιστον 10⁶-10⁷ cfu/g ή ml στο

τέλος της διάρκειας ζωής του προϊόντος. Επομένως, τα δείγματα αυτά είναι σύμφωνα με τον ορισμό των προβιοτικών.

Το δείγμα AB πρόκειται για παραδοσιακό γιαούρτι που παρασκευάζεται χωρίς την προσθήκη άλλων μικροοργανισμών, παρά μόνο με τις καλλιέργειες εκκίνησης *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* και *S. thermophilus*. Γι' αυτό το λόγο εμβολιάστηκε μόνο σε MRS υπόστρωμα.



Διάγραμμα 13: Σύγκριση συνολικού πληθυσμού μικροοργανισμών σε δείγματα γιαουρτιών σε MRS και TOS-MUP υπόστρωμα.

Υπόμνημα πινάκων:

- Με μπλε υπογράμμιση υποδηλώνονται τα καταμετρήσιμα τρυβλία.
- - : δεν πραγματοποιήθηκε ενοφθαλμισμός σε τρυβλίο στην αντίστοιχη αραίωση.
- >300: ο αριθμός των αποικιών είναι υψηλότερος των 300 και μη μετρήσιμος.
- <30: ο αριθμός των αποικιών είναι χαμηλότερος των 30 και μη μετρήσιμος.

Συνοψίζοντας...

με βάση την παρούσα πτυχιακή προκύπτει ότι εκλεκτικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη μικροοργανισμών του γένους *Lactobacillus* είναι το MRS agar, ενώ για το γένος *Bifidobacterium* είναι το TOS-MUP agar υπόστρωμα. Ορισμένα στελέχη αυτών των γενών κατατάσσονται στα προβιοτικά με ευεργετικές ιδιότητες για τον ανθρώπινο οργανισμό όταν ο πληθυσμός τους που καταναλώνεται από τη γιαούρτη και επιβιώνει στο γαστρεντερικό σύστημα βρίσκεται σε ποσότητες 10^6 - 10^7 cfu/g. Τέλος, ο εγκλεισμός είναι ιδανική τεχνική για την καλύτερη επιβίωση των προβιοτικών μικροοργανισμών στο όξινο περιβάλλον του πεπτικού συστήματος.

Βιβλιογραφία

1. B. Curry, V. Crow, LACTOBACILLUS spp. | Lactobacillus casei Group, Editor(s): Hubert Roginski, Encyclopedia of Dairy Sciences, Elsevier, 2002, Pages 1488-1494
2. El-Shafei, Kawther, et al. "Assessment the viability properties of Lactobacillus casei strain using labneh as a carrier." Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria 17.3 (2018): 267-276.
3. Maria Di Lena, Grazia M. Quero, Elisa Santovito, Joanna Verran, Maria De Angelis, Vincenzina Fusco, A selective medium for isolation and accurate enumeration of Lactobacillus casei-group members in probiotic milks and dairy products, International Dairy Journal, Volume 47, 2015, Pages 27-36,
4. Huang, Chien-Hsun, et al. "Identification and classification for the Lactobacillus casei group." Frontiers in Microbiology 9 (2018): 1974.
5. Hill, Daragh, et al. "The Lactobacillus casei group: history and health related applications." Frontiers in microbiology (2018): 2107.
6. Matthew Bull, Sue Plummer, Julian Marchesi, Eshwar Mahenthiralingam, The life history of Lactobacillus acidophilus as a probiotic: a tale of revisionary taxonomy, misidentification and commercial success, FEMS Microbiology Letters, Volume 349, Issue 2, December 2013, Pages 77–87,
7. P.K. Gopal, Lactic Acid Bacteria | Lactobacillus spp.: Lactobacillus acidophilus, Editor(s): John W. Fuquay, Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition), Academic Press, 2011, Pages 91-95
8. Anjum, Nazia, et al. "Lactobacillus acidophilus: characterization of the species and application in food production." Critical reviews in food science and nutrition 54.9 (2014): 1241-1251
9. V. Crow, B. Curry, LACTOBACILLUS spp. | Lactobacillus delbrueckii Group, Editor(s): Hubert Roginski, Encyclopedia of Dairy Sciences, Elsevier, 2002, Pages 1494-1497,
10. TURGAY, ÖZLEM, and Feryal Erbilir. "Isolation and characterization of Lactobacillus bulgaricus and Lactobacillus casei from various foods." Turkish Journal of Biology 30.1 (2006): 39-44.
11. Rogers, LA375033. "The inhibiting effect of Streptococcus lactis on Lactobacillus bulgaricus." Journal of bacteriology 16.5 (1928): 321-325.
12. Wheeler, Dorothy M. "The characteristics of Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus bulgaricus." Microbiology 12.1 (1955): 123-132.
13. Kudo, Yuko, Kaihei Oki, and Koichi Watanabe. "Lactobacillus delbrueckii subsp. sunkii subsp. nov., isolated from sunki, a traditional Japanese pickle." International journal of systematic and evolutionary microbiology 62.Pt_11 (2012): 2643-2649.

14. P. Teixeira, LACTOBACILLUS | *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, Editor(s): Carl A. Batt, Mary Lou Tortorello, Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition), Academic Press, 2014, Pages 425-431,
15. Cebeci, Aysun, and Candan Gürakan. "Properties of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains." Food microbiology 20.5 (2003): 511-518.
16. Wheater, Dorothy M. "The characteristics of *Lactobacillus plantarum*, *L. helveticus* and *L. casei*." Microbiology 12.1 (1955): 133-139.
17. Parente, Eugenio, et al. "Diversity of stress tolerance in *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus paraplantarum*: a multivariate screening study." International journal of food microbiology 144.2 (2010): 270-279.
18. Maaïke C. de Vries, Elaine E. Vaughan, Michiel Kleerebezem, Willem M. de Vos, *Lactobacillus plantarum*—survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract, International Dairy Journal, Volume 16, Issue 9, 2006, Pages 1018-1028
19. A. Corsetti, S. Valmorri, Lactic Acid Bacteria | *Lactobacillus* spp.: *Lactobacillus plantarum*, Editor(s): John W. Fuquay, Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition), Academic Press, 2011, Pages 111-118,
20. Jose M. Lorenzo, Paulo E. Munekeata, Ruben Dominguez, Mirian Pateiro, Jorge A. Saraiva, Daniel Franco, Chapter 3 - Main Groups of Microorganisms of Relevance for Food Safety and Stability: General Aspects and Overall Description, Editor(s): Francisco J. Barba, Anderson S. Sant'Ana, Vibeke Orlien, Mohamed Koubaa, Innovative Technologies for Food Preservation, Academic Press, 2018, Pages 53-107,
21. Behera, Sudhanshu S., Ramesh C. Ray, and Nevijo Zdolec. "*Lactobacillus plantarum* with functional properties: an approach to increase safety and shelf-life of fermented foods." BioMed Research International 2018 (2018).
22. Valík, L'ubomír, Medved'ová, Alžbeta, Liptáková, Denisa. Journal of Food and Nutrition Research: Characterization of the growth of *Lactobacillus rhamnosus* GG in milk at suboptimal temperatures (2008): 60-67.
23. Calasso, M., Gobbetti, M. Encyclopedia of Dairy Sciences: Second Edition: Lactic Acid Bacteria: *Lactobacillus* spp.: Other Species (2011): 125-131
24. Mathipa-Mdakane, Moloko G., and Mapitsi S. Thantsha. "*Lactobacillus rhamnosus*: A Suitable Candidate for the Construction of Novel Bioengineered Probiotic Strains for Targeted Pathogen Control." Foods 11.6 (2022): 785.
25. Collins, Matthew D., Brian A. Phillips, and Paolo Zannoni. "Deoxyribonucleic Acid Homology Studies of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* sp. nov., subsp. *paracasei* and subsp. *tolerans*, and *Lactobacillus rhamnosus* sp. nov., comb. nov." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 39.2 (1989): 105-108.

26. Hill, Daragh, et al. "The *Lactobacillus casei* group: history and health related applications." *Frontiers in microbiology* (2018): 2107.
27. B. Curry, V. Crow, *LACTOBACILLUS* spp. | *Lactobacillus casei* Group, Editor(s): Hubert Roginski, *Encyclopedia of Dairy Sciences*, Elsevier, 2002.
28. V. Crow, B. Curry, *LACTOBACILLUS* spp. | *Lactobacillus helveticus*, Editor(s): Hubert Roginski, *Encyclopedia of Dairy Sciences*, Elsevier, 2002, Pages 1497-1501.
29. Giraffa, Giorgio. "Lactobacillus helveticus: importance in food and health." *Frontiers in microbiology* 5 (2014): 338.
30. Griffiths, Mansel W., and Angela Maria Tellez. "Lactobacillus helveticus: the proteolytic system." *Frontier sin Microbiology* 4 (2013): 30.
31. Sharpe, M. Elisabeth, and Dorothy M. Wheeler. "Lactobacillus helveticus." *Microbiology* 16.3 (1957): 676-679.
32. Moser, Aline, et al. "Detection and enumeration of *Lactobacillus helveticus* in dairy products." *International Dairy Journal* 68 (2017): 52-59.
33. Taverniti, Valentina, and Simone Guglielmetti. "Health-promoting properties of *Lactobacillus helveticus*." *Frontiers in microbiology* 3 (2012): 392
34. J. Harnett, G. Davey, A. Patrick, C. Caddick, L. Pearce, *Lactic Acid Bacteria | Streptococcus thermophilus*, Editor(s): John W. Fuquay, *Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition)*, Academic Press, 2011, Pages 143-148,
35. Iyer, Ramya, et al. "Streptococcus thermophilus strains: Multifunctional lactic acid bacteria." *International Dairy Journal* 20.3 (2010): 133-141.
36. M. Gobbetti, M. Calasso, *STREPTOCOCCUS* | Introduction, Editor(s): Carl A. Batt, Mary Lou Tortorello, *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)*, Academic Press, 2014, Pages 535-553,
37. Gerald Zirnstein, Robert Hutkins, *STREPTOCOCCUS* | *Streptococcus Thermophilus*, Editor(s): Richard K. Robinson, *Encyclopedia of Food Microbiology*, Elsevier, 1999, Pages 2127-2133
38. N.P. Shah, W.E.V. Lankaputhra, *BIFIDOBACTERIUM* spp., Morphology and Physiology, Editor(s): Hubert Roginski, *Encyclopedia of Dairy Sciences*, Elsevier, 2002, Pages 141-146.
39. N. Shah, *BIFIDOBACTERIUM* spp., Applications in Fermented Milks, Editor(s): Hubert Roginski, *Encyclopedia of Dairy Sciences*, Elsevier, 2002, Pages 147-151.
40. Dallas G. Hoover, *BIFIDOBACTERIUM*, Editor(s): Richard K. Robinson, *Encyclopedia of Food Microbiology*, Elsevier, 1999, Pages 210-217.
41. Kantha D. Arunachalam, Role of Bifidobacteria in nutrition, medicine and technology, *Nutrition Research*, Volume 19, Issue 10, 1999, Pages 1559-1597
42. Shah, N. P. "Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods." *Journal of dairy science* 83.4 (2000): 894-907.

43. Ibrahim, Salam A., and Anatoly Bezkorovainy. "Growth-promoting factors for *Bifidobacterium longum*." *Journal of Food Science* 59.1 (1994): 189-191.
44. Yahya, Shafiei, et al. "Differential cultivation and enumeration of *Lactobacillus plantarum* (PTCC 1058) in the presence of yogurt starter bacteria." *African Journal of Microbiology Research* 6.34 (2012): 6386-6391.
45. Yao, Shunyu, et al. "Bifidobacterium longum: protection against inflammatory bowel disease." *Journal of Immunology Research* 2021 (2021).
46. International probiotics association website:
<https://internationalprobiotics.org/bifidobacterium-lactis/>
47. Optibac probiotics (database) website
<https://www.optibacprobiotics.com/professionals/probiotics-database/bifidobacterium/bifidobacterium-lactis>
48. Bintsis, T. "Lactic acid bacteria: their applications in foods." *J BacteriolMycol* 6.2 (2018): 89-94.
49. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), et al. "Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 12: suitability of taxonomic units notified to EFSA until March 2020." *EFSA Journal* 18.7 (2020): e06174.
50. Khalid, Khalisanni. "An overview of lactic acid bacteria." *Int. J. Biosci* 1.3 (2011): 1-13.
51. Adrienne Klijn, Annick Mercenier, Fabrizio Arigoni, Lessons from the genomes of bifidobacteria, *FEMS Microbiology Reviews*, Volume 29, Issue 3, August 2005, Pages 491–509
52. B. Curry, V. Crow, LACTOBACILLUS spp. | General Characteristics, Editor(s): Hubert Roginski, *Encyclopedia of Dairy Sciences*, Elsevier, 2002, Pages 1479-1484
53. Farnworth, Edward R. "The evidence to support health claims for probiotics." *The Journal of Nutrition* 138.6 (2008): 1250S-1254S.
54. Quinto, Emiliano J., et al. "Probiotic lactic acid bacteria: a review." *Food and Nutrition Sciences* 5.18 (2014): 1765.
55. Katarzyna Neffe-Skocińska, Anna Rzepkowska, Aleksandra Szydłowska, Danuta Kołożyn-Krajewska, Chapter 3 - Trends and Possibilities of the Use of Probiotics in Food Production, In *Handbook of Food Bioengineering, Alternative and Replacement Foods*, Academic Press, 2018, Pages 65-94,
56. International probiotics association website:
<https://www.ipaeurope.org/probiotics/what-are-probiotics/>
57. Araújo, Emiliane Andrade, et al. "Probiotics in dairy fermented products." *Rijeja: Intech* 3 (2012): 129-48
58. Naidu, K. Suresh Babu, Jamila Khatoon Adam, and Patrick Govender. "The use of probiotics and safety concerns: A review." (2012).

59. <https://www.probioticadvisor.com/probiotic-essentials-2/dosage/>
60. Zheng, Jinshui, et al. "A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*." *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 70.4 (2020): 2782-2858.
61. International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics. New names for important probiotic *Lactobacillus* species <https://isappscience.org/new-names-for-important-probiotic-lactobacillus-species/>
62. International Probiotics Association. 5 Essentials to Understanding *Lactobacillus* Taxonomy Changes <https://internationalprobiotics.org/>
63. International Committee on Systematics of Prokaryotes (ICSP). Subcommittee on taxonomy of *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* and related organisms <https://site.unibo.it/subcommittee-lactobacillus-bifidobacterium/en>
64. Integrated Taxonomic Information System ITIS:
- a. Report (2012): *Lactobacillus*, Beijerinck, 1901 emend. Haakensen et al., 2009 emend. Cai et al., 2012. https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=957444#null
 - b. Report (2012): *Bifidobacterium*, Orla-Jensen, 1924. https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=956829#null
65. R.I. Dave, N.P. Shah, Evaluation of Media for Selective Enumeration of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, and *Bifidobacteria*, *Journal of Dairy Science*, Volume 79, Issue 9, 1996, Pages 1529-1536.
66. Tharmaraj, N., and N. P. Shah. "Selective enumeration of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *bifidobacteria*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, and *propionibacteria*." *Journal of Dairy Science* 86.7 (2003): 2288-2296.
67. Veselá, Kristina, et al. "Selective culture medium for the enumeration of *Lactobacillus plantarum* in the presence of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*." *LWT* 114 (2019): 108365.
68. Monique Colombo, Aline Evelyn Zimmermann de Oliveira, Antonio Fernandes de Carvalho, Luís Augusto Nero, Development of an alternative culture medium for the selective enumeration of *Lactobacillus casei* in fermented milk, *Food Microbiology*, Volume 39, 2014, Pages 89-95.
69. Tabasco, Raquel, et al. "Selective enumeration and identification of mixed cultures of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. paracasei* subsp. *paracasei* and

- Bifidobacteriumlactis in fermented milk." *International Dairy Journal* 17.9 (2007): 1107-1114.
70. de Carvalho Lima, Katia Gianni, et al. "Evaluation of culture media for enumeration of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium animalis* in the presence of *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*." *LWT-Food Science and Technology* 42.2 (2009): 491-495.
71. Ashraf, Rabia, and Nagendra P. Shah. "Selective and differential enumerations of *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium* spp. in yoghurt—A review." *International journal of food microbiology* 149.3 (2011): 194-208.
72. Vinderola, Celso Gabriel, and Jorge Alberto Reinheimer. "Enumeration of *Lactobacillus casei* in the presence of *L. acidophilus*, bifidobacteria and lactic starter bacteria in fermented dairy products." *International dairy journal* 10.4 (2000): 271-275.
73. Lim, K. S., et al. "A selective enumeration medium for bifidobacteria in fermented dairy products." *Journal of Dairy Science* 78.10 (1995): 2108-2112.
74. Roy, Denis. "Media for the isolation and enumeration of bifidobacteria in dairy products." *International journal of food microbiology* 69.3 (2001): 167-182.
75. Yao, Raymond C., and Louise W. Crandall. "Glycopeptides: classification, occurrence, and discovery." *Glycopeptide Antibiotics*. CRC Press, 2020. 1-28.
76. Nicolaou, K. C., et al. "Chemistry, biology, and medicine of the glycopeptide antibiotics." *Angewandte Chemie International Edition* 38.15 (1999): 2096-2152.
77. Reynolds, P. E. "Studies on the mode of action of vancomycin." *Biochimica et Biophysica Acta* 52.2 (1961): 403-405.
78. Hamilton-Miller, J. M., and Saroj Shah. "Vancomycin susceptibility as an aid to the identification of lactobacilli." *Letters in Applied Microbiology* 26.2 (1998): 153-154.
79. Simpson, W. J., J. R. M. Hammond, and R. B. Miller. "Avoparcin and vancomycin: useful antibiotics for the isolation of brewery lactic acid bacteria." *Journal of applied bacteriology* 64.4 (1988): 299-309.
80. Van Bambeke, Françoise, et al. "Glycopeptide antibiotics." *Drugs* 64.9 (2004): 913-936.
81. EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP), et al. "Guidance on the characterisation of microorganisms used as feed additives or as production organisms." *EFSA Journal* 16.3 (2018): e05206.

82. Shazali, Nurhazirah, et al. "Prevalence of antibiotic resistance in lactic acid bacteria isolated from the faeces of broiler chicken in Malaysia." *Gut pathogens* 6.1 (2014): 1-7.
83. International Organization for Standardization (ISO) website:
<https://www.iso.org/advancedsearch/x/title/Streptococcus%2520thermophilus/status/P/docNumber/docPartNo/docType/10/langCode/ics/currentStage/true/searchAbstract/true/stage/stageDateStart/stageDateEnd/committee/sdg>
84. M. Gobbetti, F. Minervini, LACTOBACILLUS | *Lactobacillus casei*, Editor(s): Carl A. Batt, Mary Lou Tortorello, *Encyclopedia of Food Microbiology* (Second Edition), Academic Press, 2014, Pages 432-438.
85. Oxoid website
http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0361&org=82&c=UK&lang=EN
86. ISO 29981, IDF 220, Milk products- Enumeration of presumptive bifidobacteria- colony count technique at 37°C, 2010.
87. Pappa, Keith A. "The clinical development of mupirocin." *Journal of the American Academy of Dermatology* 22.5 (1990): 873-879.
88. MUP Selective Supplement Supplement for the preparation of TOS-MUP Medium (ISO 29981/IDF 220: 2010).
89. Miranda, Rodrigo Otávio, Antonio Fernandes de Carvalho, and Luís Augusto Nero. "Development of a selective culture medium for bifidobacteria, Raffinose-Propionate Lithium Mupirocin (RP-MUP) and assessment of its usage with Petrifilm™ Aerobic Count plates." *Food microbiology* 39 (2014): 96-102.
90. Dean, S.N., Leary, D.H., Sullivan, C.J. et al. Isolation and characterization of *Lactobacillus*-derived membrane vesicles. *Sci Rep* 9, 877 (2019).
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-37120-6>
91. Schellhaass, S. M., and H. A. Morris. "Rheological and scanning electron microscopic examination of skim milk gels obtained by fermenting with ropy and non-ropy strains of lactic acid bacteria." *Food structure* 4.2 (1985): 11.
92. Li, Wei, et al. "Structural characterization and anticancer activity of cell-bound exopolysaccharide from *Lactobacillus helveticus* MB2-1." *Journal of agricultural and food chemistry* 63.13 (2015): 3454-3463.
93. https://www.mysticalbiotech.com/portfolio_category/bifidobacterium/
94. CODEX ALIMENTARIUS, STANDARD FOR FERMENTED MILKS, CXS 243-2003, Adopted in 2003. Revised in 2008, 2010, 2018.
95. Yıldız, F. (2010). Overview of yogurt and other fermented dairy products. Development and Manufacture of Yogurt and Other Functional Dairy Products, 1-46.

96. Ramesh C. Chandan, Akanksha Gandhi, Nagendra P. Shah, Chapter 1 - Yogurt: Historical Background, Health Benefits, and Global Trade, Editor(s): Nagendra P. Shah, Yogurt in Health and Disease Prevention, Academic Press, 2017, Pages 3-29
97. Daragh Hill, Reynolds P. Ross, Elke Arendt, Catherine Stanton, Chapter 4 - Microbiology of Yogurt and Bio-Yogurts Containing Probiotics and Prebiotics, Editor(s): Nagendra P. Shah, Yogurt in Health and Disease Prevention, Academic Press, 2017, Pages 69-85,
98. M.A. Fernandez, É. Picard-Deland, M. Le Barz, N. Daniel, A. Murette, Chapter 13 - Yogurt and Health, Editor(s): Juana Frias, Cristina Martinez-Villaluenga, Elena Peñas, Fermented Foods in Health and Disease Prevention, Academic Press, 2017, Pages 305-338
99. Άρθρο 82, «γιαούρτη» του Κώδικα Τροφίμων και Ποτών (ΚΤΠ) (ΦΕΚ788/Β'/31.12.1987)
100. Χ. Κεχαγιάς, Ε. Τσάκαλη, Επιστήμη και Τεχνολογία Γάλακτος και Γαλακτοκομικών Προϊόντος, Κεφάλαιο 8 - Γιαούρτη και άλλα ζυμώμενα γάλατα, Εκδόσεις Νέων Τεχνολογιών, 2020, σελίδα 201.
101. Activia website: <https://activia.gr/index.php/gnorise-mas>
102. Olympos website: <https://www.olympos.gr/proionta/giaourti/pnoi-2/>
103. Ageladitsa website: <https://gr.fage/ageladitsa/ageladitsa-2>
104. Kri kri website: https://www.krikri.gr/giaourti/73/Super_Spoon_Active_Plus
105. Διπλωματική Εργασία: Μίκρο- και νάνο-εγκλεισμός προβιοτικών βακτηρίων σε πρεβιοτικές μήτρες μέσω των τεχνικών του ηλεκτροστατικού ψεκασμού και της ξήρανσης υπό κατάψυξη, Δασκαλάκης Μουντάνος Αλέξανδρος, 2019.
106. Δημ. Τυμπής, Ελ. Πετράκης, Σπ. Κοντελής, Μικροβιολογία Τροφίμων: Μεθοδολογία και Τεχνικές Αναλύσεων, Κεφάλαια 4, 6, 13, Εκδόσεις Δίσιγμα, 2016.