



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΣΠΟΥΔΩΝ**

---

**ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ  
«ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΥΔΑΤΩΝ & ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ»**



**ΧΡΗΣΗ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ  
ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ  
ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ**

**ΓΚΑΤΖΙΩΛΗ ΜΑΡΙΑ ΤΟΥ ΓΡΗΓΟΡΙΟΥ  
ΚΤΗΝΙΑΤΡΟΣ Α.Π.Θ.**

---

2014



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΣΠΟΥΔΩΝ**

---

**ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ  
«ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΥΔΑΤΩΝ & ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ»**



**ΧΡΗΣΗ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ  
ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ  
ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ**

**ΓΚΑΤΖΙΩΛΗ ΜΑΡΙΑ ΤΟΥ ΓΡΗΓΟΡΙΟΥ  
ΚΤΗΝΙΑΤΡΟΣ Α.Π.Θ.**

---

2014

**Επιβλέπων:** ΦΛΕΤΟΥΡΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ  
(Αναπληρωτής Καθηγητής Α.Π.Θ.)

**Μέλη Τριμελούς Επιτροπής:** ΓΚΟΒΑΡΗΣ ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ  
(Καθηγητής Π.Θ.)

ΣΟΛΩΜΑΚΟΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ  
(Λέκτορας Π.Θ.)

*Αφιερώνεται στους γονείς μου, Γρηγόριο και Αγγελική και στην αδερφή μου Χριστίνα*

## Περίληψη

### Η ΧΡΗΣΗ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον για την προσθήκη προβιοτικών μικροοργανισμών σε διάφορα γαλακτοκομικά προϊόντα με σκοπό να βελτιωθεί η θρεπτική και θεραπευτική τους αξία. Οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί προσθέτονται παραδοσιακά κυρίως στη γιαούρτη, αλλά και σε άλλα ζυμωμένα γαλακτοκομικά προϊόντα, όπως τα τυριά και το ξινόγαλα. Κυκλοφορούν όμως στην αγορά και πολλά άλλα προϊόντα που περιέχουν προβιοτικούς μικροοργανισμούς, όπως το γάλα και η σκόνη γάλακτος, το παγωτό και τα κατεψυγμένα επιδόρπια. Τα γαλακτοκομικά προϊόντα αποτελούν το κυριότερο μέσο χορήγησης των προβιοτικών μικροοργανισμών στον καταναλωτή.

Ο Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας (FAO) των Ηνωμένων Εθνών και ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) ορίζει ως προβιοτικά "τους ζωντανούς μικροοργανισμούς που χορηγούμενοι σε επαρκείς ποσότητες, έχουν ευεργετική επίδραση στην υγεία του ξενιστή". Στην Ευρωπαϊκή Νομοθεσία, δεν υπάρχει μέχρι σήμερα ορισμός του όρου "προβιοτικός", ούτε συγκεκριμένη νομοθεσία που να αφορά τα προβιοτικά τρόφιμα ή την ευρύτερη κατηγορία των λειτουργικών τροφίμων στην οποία ανήκουν. Ωστόσο, υπάρχει ένας αριθμός νομοθετικών διατάξεων, που αφορούν κυρίως την ασφάλεια και την επισήμανση των τροφίμων, οι οποίες πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά την παρασκευή και εμπορία ενός προβιοτικού γαλακτοκομικού προϊόντος.

Για την επίτευξη των ευεργετικών ωφελειών που σχετίζονται με τους προβιοτικούς μικροοργανισμούς, συνιστάται ένας ελάχιστος πληθυσμός κυττάρων της τάξης του  $10^8$  cfu/g, ενώ έχουν προταθεί ακόμα υψηλότεροι πληθυσμοί. Στα γένη *Lactobacillus* και *Bifidobacterium* ανήκουν τα κύρια και τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα προβιοτικά στα τρόφιμα για ανθρώπινη κατανάλωση, δεδομένου ότι σημαντικά οφέλη για την υγεία συνδέονται με την πρόσληψη αυτών των μικροοργανισμών. Επίσης χρησιμοποιούνται και πολλά στελέχη άλλων ειδών βακτηρίων και μυκήτων. Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται ως προβιοτικοί θα πρέπει να αναγνωρίζονται γενικά ως ασφαλείς (GRAS-Generally Regarded As Safe).

Ένας προβιοτικός μικροοργανισμός προτού χορηγηθεί στον καταναλωτή πρέπει να πληροί ορισμένα κριτήρια. Για την επιτυχή προσθήκη τους στα τρόφιμα, τα προβιοτικά στελέχη πρέπει πρώτα να μπορούν να παρασκευαστούν υπό βιομηχανικές συνθήκες, και στη συνέχεια να επιβιώνουν και να διατηρούν τη λειτουργικότητά τους στα τρόφιμα, στα οποία ενοφθαλμίζονται. Οι τεχνολογικές απαιτήσεις που τίθενται στα προβιοτικά στελέχη είναι μεγάλες και συχνά απαιτούνται νέες διαδικασίες παρασκευής. Η βάση για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας των προβιοτικών μικροοργανισμών σε ανθρώπους απαιτεί την κατανόηση ότι κάθε στέλεχος είναι διαφορετικό και ότι οι ιδιότητές του θα πρέπει να είναι σαφώς καθορισμένες.

## Abstract

### USE OF PROBIOTIC CULTURES IN THE PRODUCTION OF DAIRY PRODUCTS

Over the last years, there has been great interest for the addition of probiotic microorganisms in various dairy products in order to improve their nutritional and therapeutic value. The probiotic microorganisms are traditionally added mainly in yoghurt and in other fermented dairy products such as cheese and cultured buttermilk. However, many other products containing probiotic microorganisms can be found in the market, such as milk and milk powder, ice cream and frozen desserts. Dairy products are the main vehicle for the administration of probiotic microorganisms through diet to the consumer.

The Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations and the World Health Organization (WHO) define probiotics as "live microorganisms which when administered in adequate amounts confer a health benefit on the host". There is currently no definition in European Legislation of the term "probiotic" or specific legislation regarding probiotic foods or the broader category of functional foods to which they belong. However, there is a number of legislative rules, mainly concerning safety and food labeling, which must be taken into account in the preparation and marketing of a probiotic milk product.

To achieve the benefits associated with probiotic microorganisms, it is recommended a minimum amount of  $10^6$  cfu/g, while the use of higher amounts of probiotics has also been suggested. The genus *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* are the main and most commonly used probiotics in foods for human consumption, since important health benefits are associated with the intake of these microorganisms. In addition several strains of other species of bacteria and fungi are used. The microorganisms which are used as probiotics should be generally recognized as safe (GRAS).

A probiotic microorganism before being administered to the consumer must fulfill certain criteria. For the successful addition of the probiotic strains into the foods, they must first be produced under industrial conditions, and then survive and maintain their functionality within the food that they are inoculated. Due to the technological requirements that are placed on probiotic strains new manufacturing processes are frequently introduced. In order to evaluate the effectiveness of probiotic microorganisms in humans, it is required to understand that each species is different and its properties should be clearly defined.

# Περιεχόμενα

Ευχαριστίες .....	IX
Κατάσταση Πινάκων .....	X
Κατάσταση Διαγραμμάτων .....	XI
1 Εισαγωγή .....	1
2 Προβιοτικοί μικροοργανισμοί .....	2
2.1 Γενικά χαρακτηριστικά προβιοτικών μικροοργανισμών .....	3
2.2 Κριτήρια επιλογής προβιοτικών μικροοργανισμών .....	7
2.3 Επιδράσεις των προβιοτικών μικροοργανισμών στην υγεία .....	10
2.3.1 Ενζυμική δραστηριότητα και βελτίωση της πέψης.....	13
2.3.2 Προληπτική και θεραπευτική δράση των προβιοτικών μικροοργανισμών κατά των εντερικών παθήσεων .....	15
2.3.3 Αναστολή της ανάπτυξης του ελικοβακτηριδίου του πυλωρού και εντερικών παθογόνων μικροοργανισμών.....	16
2.3.4 Πρόληψη της φλεγμονώδους νόσου του εντέρου .....	17
2.3.5 Θεραπεία και πρόληψη αλλεργιών/ατοπικού εκζέματος .....	17
2.3.6 Μείωση του κινδύνου που συνδέεται με τη μεταλλαξιογένεση και την καρκινογένεση .....	18
2.3.7 Υποχοληστερολαιμική επίδραση .....	19
2.3.8 Διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος .....	19
2.3.9 Λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος.....	20
2.3.10 Άλλες πιθανές ευεργετικές επιδράσεις.....	20
3 Ζυμωμένα γάλατα .....	22
3.1 Ικανότητα οξίνισης των προβιοτικών μικροοργανισμών εκκίνησης.....	23
3.2 Παρασκευή προβιοτικής γιαούρτης.....	24
3.3 Παράγοντες που επηρεάζουν τους προβιοτικούς μικροοργανισμούς κατά την παρασκευή γιαούρτης .....	28
3.3.1 Αλληλοεπιδράσεις μεταξύ προβιοτικών μικροοργανισμών και καλλιεργειών εκκίνησης.....	30
3.3.2 Παράγοντες στην προβιοτική γιαούρτη που επηρεάζουν την ανάπτυξη των προβιοτικών μικροοργανισμών.....	30
3.3.3 Σύσταση του γαλακτοκομικού προϊόντος και αυξητικοί παράγοντες και υποκινητές των προβιοτικών βακτηρίων .....	34
3.3.4 Παράγοντες του προϊόντος που προστατεύουν τα προβιοτικά βακτήρια.....	35
3.3.5 Θερμοκρασία και χρόνος επώασης .....	35
3.3.6 Συνθήκες συντήρησης.....	36
3.3.7 Μικροεγκαυλίωση .....	36
3.4 Οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των προβιοτικών ζυμωμένων γαλάτων .....	37
3.5 Πόσιμα προβιοτικά γαλακτοκομικά προϊόντα ζύμωσης.....	39
3.5.1 Καλλιεργημένο βουτυρόγαλα.....	39
3.5.2 Ελληνικό οξύγαλα ή ξινόγαλα.....	40
3.5.3 Κεφίρ.....	40
3.5.4 Αριάνι (Ayran).....	43
3.5.5 Doogh.....	43
3.5.6 Koumiss.....	45
3.5.7 Γάλα acidophilus και "γλυκό γάλα AB".....	45
3.5.8 Μακράς διάρκειας γαλακτοκομικά προϊόντα .....	47
3.6 Παχύρρευστα προβιοτικά γαλακτοκομικά προϊόντα ζύμωσης .....	47

3.7	Διάφορα γαλακτοκομικά προϊόντα.....	49
3.7.1	Επαλειφόμενα γαλακτοκομικά προϊόντα .....	49
3.7.2	Αφυδατωμένα προϊόντα .....	49
3.7.3	Πουτίγκες δημητριακών με βάση το γάλα και το νερό .....	50
4	Προβιοτικό Τυρί .....	51
4.1	Το τυρί ως υπόστρωμα ενσωμάτωσης προβιοτικών μικροοργανισμών .....	52
4.2	Επιλογή στελέχους .....	55
4.3	Ενσωμάτωση των προβιοτικών βακτηρίων σε τυριά.....	57
4.4	Κυριότερα τεχνολογικά εμπόδια στην παραγωγή προβιοτικών τυριών. ....	61
4.4.1	Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των προβιοτικών καλλιιεργειών και των καλλιιεργειών εκκίνησης.....	61
4.4.2	Αλάτιση.....	61
4.4.3	Συσκευασία .....	64
4.4.4	Ωρίμανση.....	64
4.4.5	Συνθήκες συντήρησης.....	65
4.5	Επίδραση των προβιοτικών μικροοργανισμών στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τυριού.....	65
4.5.1	Επίδραση της πρωτεόλυσης από τη δράση των προβιοτικών βακτηρίων στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τυριού .....	68
4.6	Άλλες προκλήσεις που σχετίζονται με την παραγωγή των προβιοτικών τυριών .....	70
5	Παγωτό και κατεψυγμένα προϊόντα ως φορείς προβιοτικών μικροοργανισμών .....	71
5.1	Τεχνολογικά εμπόδια ενσωμάτωσης των προβιοτικών βακτηρίων στο παγωτό .....	72
5.2	Οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των προβιοτικών παγωτών .....	76
6	Ευρωπαϊκή νομοθεσία για τα προβιοτικά γαλακτοκομικά προϊόντα .....	78
7	Συμπεράσματα .....	81
	BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	82



## Ευχαριστίες

Θα ήθελα να απευθύνω τις ευχαριστίες μου σε μία σειρά ανθρώπων χωρίς τη βοήθεια των οποίων θα ήταν αδύνατη η εκπόνηση της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας. Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς τον επιβλέποντα της διπλωματικής μου, κ. Δημήτριο Φλετούρη, Αναπληρωτή Καθηγητή του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, για την πολύτιμη καθοδήγηση, τις συμβουλές του και τη μεγάλη βοήθεια που μου πρόσφερε. Ιδιαίτερως θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Αλέξανδρο Γκόβαρη, Καθηγητή του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την ανάθεση της συγκεκριμένης εργασίας, τις συμβουλές του και την εκτίμηση που μου έδειξε. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Νικόλαο Σολωμάκο, Λέκτορα του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την πρόθυμη συμβολή και βοήθεια του στη προσπάθεια ολοκλήρωσης αυτής της εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στους γονείς μου, την αδερφή μου και τη φίλη μου Αθηνά για την ηθική τους υποστήριξη.

## Κατάσταση Πινάκων

Πίνακας 1. Προβιοτικά γαλακτοκομικά προϊόντα (Granato <i>et al.</i> , 2010b; http1; http2).....	3
Πίνακας 2. Καλλιέργειες εκκίνησης που χρησιμοποιούνται στην παρασκευή ζυμωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων (Heller, 2001). .....	4
Πίνακας 3. Μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται ως προβιοτικοί (Salminen <i>et al.</i> , 2002, Shah, 2006; Prado <i>et al.</i> , 2008; de Vrese <i>et al.</i> , 2008).....	6
Πίνακας 4. Προβιοτικά βακτήρια που κυκλοφορούν παγκοσμίως (Prado <i>et al.</i> , 2008; Emiliane <i>et al.</i> , 2012). .....	7
Πίνακας 5. Βασικά και επιθυμητά κριτήρια για την επιλογή των προβιοτικών σε εμπορικές εφαρμογές (Shah, 2006; Morelli, 2007) .....	8
Πίνακας 6. Διάφορες ειδικές θεραπευτικές ή προληπτικές ιδιότητες που αποδίδονται σε προβιοτικούς μικροοργανισμούς (Parvez <i>et al.</i> , 2006). .....	11
Πίνακας 7. Επιστημονικά τεκμηριωμένες και πιθανές ευεργετικές επιδράσεις των προβιοτικών μικροοργανισμών στην υγεία του ανθρώπου (Vasiljevic & Shah, 2008). .....	14
Πίνακας 8. Παράμετροι που επηρεάζουν την ανάπτυξη των προβιοτικών βακτηρίων στη γιαούρτη (Champagne, 2009). .....	29
Πίνακας 9. Ταυτοποιημένη μικροχλωρίδα κόκκων κεφίρ (Rattray & O’Connell, 2011).....	41
Πίνακας 10. Τυριά με ενσωματωμένα προβιοτικά βακτήρια (Plessas <i>et al.</i> , 2012).....	56
Πίνακας 11. Τεχνολογικά εμπόδια κατά την παραγωγή προβιοτικού τυριού (Cruz <i>et al.</i> , 2009b).....	62
Πίνακας 12. Τεχνολογικά εμπόδια κατά την παραγωγή του προβιοτικού παγωτού (Cruz <i>et al.</i> , 2009a) .....	74

## Κατάσταση Διαγραμμάτων

Σχήμα 1. Διαδικασία παρασκευής διαφόρων τύπων γιαούρτης (Heller, 2001).....	26
Σχήμα 2. Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας παραγωγής του κεφίρ με τη χρήση κόκκων (Heller, 2001) .....	42
Σχήμα 3. Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας παραγωγής του κεφίρ με τη χρήση καλλιιεργειών DVI (Rattray & O’Connell, 2011).....	44
Σχήμα 4. Διαδικασία παραγωγής του γλυκού και του ζυμωμένου γάλακτος <i>acidophilus</i> (Heller, 2001).....	46
Σχήμα 5. Διάγραμμα ροής για την παρασκευή του τυριού Cottage (Heller, 2001).....	59
Σχήμα 6. Διάγραμμα ροής για την παρασκευή του τυριού Cheddar (Tamime, 2005).....	60
Σχήμα 7. Διάγραμμα ροής για την παρασκευή του προβιοτικού παγωτού (Méndez <i>et al.</i> , 2012).....	73



# 1 Εισαγωγή

Ο ρόλος της διατροφής σήμερα είναι διαφορετικός απ' ό τι ήταν στο παρελθόν. Ξεκίνησε από την προσπάθεια κάλυψης των καθημερινών ενεργειακών απαιτήσεων και στρέφει αργά και σταθερά το κέντρο βάρους της σε θέματα βελτίωσης της ποιότητας και επίτευξης καλύτερου επιπέδου υγείας. Οι σύγχρονοι καταναλωτές ενδιαφέρονται όλο και περισσότερο, για την προσωπική τους υγεία και προσδοκούν τα τρόφιμα που καταναλώνουν να είναι υγιεινά ή ακόμη ικανά να αποτρέψουν διάφορες ασθένειες (Mattila-Sandholm *et al.*, 2002).

Τα προβιοτικά βακτήρια βρίσκονται στο κέντρο του ενδιαφέροντος τόσο των επιστημονικών μελετών όσο και των εμπορικών εταιρειών. Και αυτό εξαιτίας ενός μεγάλου αριθμού ευεργετικών επιδράσεων στην υγεία του ανθρώπου. Η αγορά τροφίμων που περιέχουν προβιοτικά βακτήρια συνεχώς επεκτείνεται, παράλληλα με την αυξανόμενη ευαισθητοποίηση των καταναλωτών σχετικά με το ρόλο της διατροφής στη διατήρηση της υγείας (Ross *et al.*, 2005). Τα προβιοτικά προϊόντα διατροφής αποτελούν το 60% έως 70% της συνολικής αγοράς των λειτουργικών τροφίμων (Holzapfel, 2006). Ένα ευρύ φάσμα γαλακτοκομικών προϊόντων, ενισχυμένων με προβιοτικούς μικροοργανισμούς, είναι διαθέσιμα στις αγορές. Μερικά παραδείγματα είναι το παστεριωμένο γάλα, ζυμωμένα γάλατα, παγωτό, τυριά, σκόνη γάλακτος για βρέφη και το βούτυρο. Η γιαούρτη είναι το κλασικό παράδειγμα των προβιοτικών τροφίμων που έχουν υποστεί ζύμωση (Giraffa *et al.*, 2010). Οι Saxelin *et al.* (2010) απέδειξαν ότι τα γιαούρτια και τα ζυμωμένα γάλατα ήταν αποτελεσματικά στη χορήγηση προβιοτικών μικροοργανισμών στον καταναλωτή, τονίζοντας τη σημασία αυτών των υποστρωμάτων ως λειτουργικά υποστρώματα τροφίμων.

Εκτός από τα γαλακτοκομικά προϊόντα, η χρήση των προβιοτικών μικροοργανισμών έχει επεκταθεί και σε άλλα είδη τροφίμων, όπως είναι τα αλλαντικά αέρος, δημητριακά, γκοφρέτες και σοκολάτες (Czinn *et al.*, 2008), μαγιονέζα (Cruz *et al.*, 2009), σόγια, προϊόντα σε μορφή καψουλών ή κόκκων που διαλύονται σε κρύα ροφήματα όπως χυμοί φρούτων και λαχανικών (Wagar *et al.*, 2009; Granato *et al.*, 2010a; Rivera-Espinoza & Gallardo-Navarro, 2010), κρασί (Gupta & Garg, 2009) και τρόφιμα φυτικής προέλευσης που έχουν υποστεί ζύμωση (Cruz *et al.*, 2009; Alegre *et al.*, 2011).

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η ανασκόπηση της διεθνούς βιβλιογραφίας που αναφέρεται στη χρήση των προβιοτικών μικροοργανισμών στην παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων, η κριτική θεώρηση της υπάρχουσας γνώσης και η αναδρομή στο νομοθετικό πλαίσιο που διέπει την κυκλοφορία τέτοιων προϊόντων στην Ευρωπαϊκή Ένωση.

## 2 Προβιοτικοί μικροοργανισμοί

Ο νομπελίστας καθηγητής Élie Metchnikoff του Ινστιτούτου Παστέρ στο Παρίσι, θεωρείται ο εφευρέτης των προβιοτικών. Στις αρχές του 20<sup>ου</sup> αιώνα, υπέθεσε ότι ο λόγος για τη μακροζωία του Καυκασιανού πληθυσμού ήταν η κατανάλωση μεγάλων ποσοτήτων γαλακτοκομικών προϊόντων που είχαν υποστεί ζύμωση, όπως το βουτυρόγαλα και τα τυριά. Πίστευε ότι τα οξυγαλακτικά βακτήρια των προϊόντων αυτών, αντικαθιστούν τους επιβλαβείς οργανισμούς που βρίσκονται στο έντερο και μειώνουν την παραγωγή τοξινών που οδηγούν σε ασθένειες και μολύνσεις (Singh *et al.*, 2011).

Αν και η έννοια των προβιοτικών εισήχθη στις αρχές του 20<sup>ου</sup> αιώνα, ο όρος δεν επινοήθηκε μέχρι τη δεκαετία του 1960. Ο ορισμός έχει εξελιχθεί με τα χρόνια. Η λέξη "προβιοτικό" προέρχεται από τις Ελληνικές λέξεις "προ" και "βιοτικό" που σημαίνουν "για τη ζωή". Ο όρος αυτός πρωτίστως χρησιμοποιήθηκε για να περιγράψει μια μικροβιακή ουσία που παρακινεί την ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών ή εκχυλίσματα ιστών που προάγουν την ανάπτυξη μικροβίων, αλλά δεν έλαβε τη γενική αποδοχή. Ο Parker (1974) ήταν ο πρώτος συγγραφέας που χρησιμοποίησε τη λέξη προβιοτικό για να ορίσει τους οργανισμούς και τις ουσίες που συμβάλλουν στην ισορροπία της εντερικής χλωρίδας (Granato *et al.*, 2010b). Ο Fuller (1989) όρισε ως προβιοτικά τα συμπληρώματα διατροφής που περιέχουν ζώντες μικροοργανισμούς και επηρεάζουν το ξενιστή με ένα υγιή τρόπο, εξισορροπώντας την εντερική του χλωρίδα (Czinn *et al.*, 2008), ενώ ένας πιο πρόσφατος ορισμός αναφέρει ότι: "τα προβιοτικά είναι μη-παθογόνοι μικροοργανισμοί, κυρίως ανθρώπινης προέλευσης, οι οποίοι παρέχουν όφελος στην υγεία του ξενιστή και επιτρέπουν την αποφυγή ή τη βελτίωση ορισμένων ασθενειών, όταν χορηγούνται σε επαρκείς ποσότητες" (Fric, 2007). Τέλος ο Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας (FAO) των Ηνωμένων Εθνών και ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) ορίζει ως προβιοτικό "τους ζωντανούς μικροοργανισμούς που χορηγούμενοι σε επαρκείς ποσότητες, έχουν ευεργετική επίδραση στην υγεία του ξενιστή" (FAO/WHO, 2001).

Δεν υπάρχει αμφιβολία ότι τα γαλακτοκομικά προϊόντα αποτελούν το κύριο μέσο χορήγησης των προβιοτικών μέσω της διατροφής (Sánchez *et al.*, 2009). Ως εκ τούτου, δεν είναι τυχαίο ότι τα τελευταία χρόνια, υπήρξε μια έντονη αύξηση στην ιατρική έρευνα για την αξιολόγηση των θεραπευτικών ωφελειών των προβιοτικών, καθώς και ένα αυξανόμενο εμπορικό ενδιαφέρον για την ιδέα των προβιοτικών τροφίμων. Πράγματι, έχει αναφερθεί ότι, η κατανάλωση προβιοτικών γιαουρτιών, γαλακτοκομικών ροφημάτων που έχουν υποστεί ζύμωση, τυριών και παγωτών, προάγει την υγεία (Czinn *et al.*, 2008).

Η ανάπτυξη και η παραγωγή των προβιοτικών τροφίμων είναι μία ακριβή και πολύπλευρη διαδικασία που λαμβάνει υπόψη πολλούς παράγοντες. Η διατήρηση της λειτουργικότητας των προβιοτικών μικροοργανισμών σε ένα γαλακτοκομικό υπόστρωμα σχετίζεται με διάφορα εγγενή εμπόδια που υπάρχουν στον τομέα της μεταποίησης (Granato *et al.*, 2010b). Τα προβιοτικά στελέχη μπορούν επιτυχώς να παρασκευάζονται και να ενσωματώνονται σε υψηλής ποιότητας αποδεκτά προϊόντα τροφίμων, όπου μπορούν να διατηρούν τη βιωσιμότητα και τη λειτουργικότητά τους (Mattila-Sandholm *et al.*, 1999). Στον Πίνακα 1 αναφέρονται προβιοτικά

γαλακτοκομικά προϊόντα που κυκλοφορούν στην παγκόσμια αγορά, καθώς επίσης και προϊόντα στα οποία προστέθηκαν πειραματικά προβιοτικοί μικροοργανισμοί.

## 2.1 Γενικά χαρακτηριστικά προβιοτικών μικροοργανισμών

Στα γένη *Lactobacillus* και *Bifidobacterium* ανήκουν τα κύρια (FAO/WHO, 2001) και τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα προβιοτικά στα τρόφιμα για ανθρώπινη κατανάλωση, δεδομένου ότι σημαντικά οφέλη για την υγεία συνδέονται με την πρόσληψη αυτών των μικροοργανισμών (Tuohy *et al.*, 2003; Ross *et al.*, 2005; Bhardwaj *et al.*, 2011). Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται ως προβιοτικοί θα πρέπει να αναγνωρίζονται γενικά ως ασφαλείς (GRAS-Generally Regarded As Safe) (Gupta & Garg, 2009). Τα είδη των γενών *Lactobacillus* και *Bifidobacterium* είναι Gram-θετικά βακτήρια που παράγουν γαλακτικό οξύ (FAO/WHO, 2001) και ορισμένα από αυτά αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος της φυσιολογικής εντερικής μικροχλωρίδας σε ζώα και ανθρώπους (de Vrese *et al.*, 2008). Τα οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB) έχουν χρησιμοποιηθεί για μεγάλο χρονικό διάστημα ως καλλιέργειες εκκίνησης σε ζυμωμένα τρόφιμα και ποτά, επειδή μπορούν να βελτιώσουν τα διατροφικά, οργανοληπτικά, τεχνολογικά χαρακτηριστικά και τη διάρκεια ζωής του προϊόντος (Florou-Paneri *et al.*, 2013).

Πίνακας 1. Προβιοτικά γαλακτοκομικά προϊόντα (Granato *et al.*, 2010b; [http1](#); [http2](#))

Προϊόντα	
Γάλα <i>Acidophilus</i>	Τυρί Cottage
Συμβιωτικό γάλα <i>Acidophilus</i>	Τυρί Minas fresco
<i>Acidophilus</i> "γλυκό" ρόφημα	Τυρί σκληρό Canestrato pugliese
Μη ζυμωμένο γίδινο ρόφημα	Τυρί Argentine fresco
Ζυμωμένο γίδινο γάλα	Τυρί Crescenza
Ζυμωμένα γαλακτικά ροφήματα με ολιγοφρουκτόζη και τυρόγαλα	Βούτυρο <i>Acidophilus</i>
Υψηλής πίεσης - ομοιογενοποιημένο ζυμωμένο γάλα	Παραδοσιακή Ελληνική γιαούρτη
Ποτά με βάση τις πρωτεΐνες τυρογάλακτος	Γιαούρτη πλήρης
Κεφίρ	Γιαούρτη χαμηλών λιπαρών
Κεφίρ με φράουλα και στέβια	Γιαούρτη με φρούτα
Ξινόγαλα	Γιαούρτη Αçaï
Τυρί Cheddar	Dahi
Τυρί Kazar	Προβιοτική γιαούρτη εμπλουτισμένη με πρωτεΐνη σόγιας και μάνγκο
Τυρί από αίγιο γάλα	Παγωμένη γιαούρτη
Τυρί ημίσκληρο μειωμένων λιπαρών	Μους με βάση το γκουάβα
Τυρί Petit-Suisse με ινουλίνη και/ή ολιγοφρουκτόζη	Παγωτό συμβιωτικό
Λευκό τυρί άλμης	Παγωτό προβιοτικό
	Παγωτό με βάση το γάλα <i>Acidophilus</i>
	Παγωμένο συμβιωτικό επιδόρπιο

Μία σύνοψη των καλλιεργειών εκκίνησης που χρησιμοποιούνται στις ζυμώσεις γαλακτοκομικών προϊόντων και μερικές σχετικές φυσιολογικές ιδιότητες δίνονται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2. Καλλιέργειες εκκίνησης που χρησιμοποιούνται στην παρασκευή ζυμωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων (Heller, 2001)

Είδος	Θερμοκρασία Ανάπτυξης °C			Οξυγαλακτική Ζύμωση			
	Ελάχιστη	Άριστη	Μέγιστη	Ομοιοζυμωτική	Ετεροζυμωτική	Γαλακτικό οξύ %	Τελικό pH
<i>L. acidophilus</i>	27	37	48	+		0,3-1,9	4,2
<i>L. helveticus</i>	22	42	54	+		1,5-2,2	3,8
<i>L. kefir</i>	8	32	43		+	1,2-1,5	-
<i>L. brevis</i>	8	30	42		+	1,2-1,5	-
<i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i>		30		+		1,2-1,5	-
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	8	30	40	+		0,5-0,7	4,6
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	8	22	37	+		0,5-0,7	4,6
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>	8	22-28	40	+		0,5-0,7	4,6
<i>Ln. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	4	20-28	37		+	0,1-0,2	5,6
<i>Ln. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>	4	20-28	37		+	0,1-0,2	5,6
<i>Bifidobacterium</i> ( <i>bifidum</i> , <i>infantis</i> , κ.α)	22	37	48			0,1-1,4	4,5



Οι λακτοβάκιλλοι είναι αυστηρά ζυμωτικά (de Vuyst, 2000) μη σπορογόνα, μικροαερόφιλα, ραβδοειδούς σχήματος βακτήρια. Τα *Bifidobacterium* spp. είναι αυστηρά αναερόβια ραβδοειδή βακτήρια και μπορούν να παράγουν εκτός από γαλακτικό και οξικό οξύ (Holzapfel *et al.*, 2001; Gershwin *et al.*, 2004). Σε αντίθεση με τα οξυγαλακτικά βακτήρια, οι μηχανισμοί των ευεργετικών αποτελεσμάτων αυτών των βακτηρίων δεν είναι πολύ γνωστοί. Τα bifidobacteria είναι απαιτητικοί μικροοργανισμοί και δύσκολα μπορούν να μελετηθούν στο εργαστήριο, ωστόσο, η πρόσφατη εφαρμογή των σύγχρονων προσεγγίσεων των γονιδιωματικών πληροφοριών αλληλουχίας επιτρέπει τη συσσώρευση ενός εντυπωσιακού μεγέθους δεδομένων, κάτι που δεν θα μπορούσε να είχε προβλεφθεί πριν από λίγα χρόνια (Sonomoto & Atsushi, 2011). Τα στελέχη του είδους *B. lactis* και ιδιαίτερα το *B. animalis* subsp. *lactis*, αν και δεν είναι ανθρώπινης προέλευσης, είναι τα πιο κοινά στελέχη των bifidobacteria που χρησιμοποιούνται στα ζυμωμένα γάλατα λόγω της καλής τους ανοχής ενάντια σε ανασταλτικούς παράγοντες ανάπτυξης των βακτηρίων όπως τα οξέα, οι χαμηλές τιμές pH και το διαλυμένο οξυγόνο των προϊόντων (Lee & Salminen, 2009).

Επιπλέον, και άλλα βακτήρια καθώς και μερικές ζύμες μπορούν να έχουν προβιοτικές ιδιότητες (Πίνακας 3). Άλλα οξυγαλακτικά βακτήρια με προβιοτικές ιδιότητες είναι: *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *Sporolactobacillus inulinus*, ενώ οι μικροοργανισμοί *Propionibacterium freudenreichii* και *Saccharomyces cerevisiae*, οι οποίοι αναφέρονται ως μη οξυγαλακτικοί μικροοργανισμοί, συνδέονται με προβιοτικές δραστηριότητες, ιδίως στον τομέα της φαρμακευτικής και των ζωικών προϊόντων (Holzapfel *et al.*, 2002).

Πίνακας 3. Μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται ως προβιοτικοί (Salminen *et al.*, 2002, Shah, 2006; Prado *et al.*, 2008; de Vrese *et al.*, 2008)

Lactobacilli <sup>1</sup>	Bifidobacteria	Άλλα LAB
<i>L. acidophilus</i> -group	<i>B. longum</i> (BB536) <i>B. longum</i> (SP07/3-SBT2928)	<i>Enterococcus faecium</i> <sup>2</sup> (πρώην <i>Streptococcus faecium</i> )
<i>L. acidophilus</i> (LA5)	<i>B. bifidum</i> (MF20/5)	<i>Enterococcus faecalis</i> <sup>3</sup>
<i>L. crispatus</i> ( <i>L. acidophilus</i> Gilliland)	<i>B. infantis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
<i>L. johnsonii</i> (LA1)	<i>B. lactis</i> (HN019)	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<i>L. gasseri</i> (PA16/8)	<i>B. breve</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>
<i>L. casei</i> - group	<i>B. adolescentis</i>	
<i>L. (para)casei</i> ( <i>L. casei</i> Shirota, <i>L. casei</i> Defensis, <i>L. casei</i> Zhang)	<i>B. animalis</i> ( <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB12)	
<i>L. rhamnosus</i> (LGG)	<i>B. essensis</i>	
<i>L. reuteri</i> (MM53)	<i>B. laterosporus</i>	
<i>L. plantarum</i> (299 και 299v)		<b>Μη LAB</b>
<i>L. fermentum</i>		<i>E. coli</i> <b>Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.</b> <sup>2</sup> ( <i>E. coli</i> "Nissle 1917")
<i>L. salivarius</i>		<i>Sporolactobacillus inulinus</i> <b>Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.</b> <sup>2</sup>
<i>L. amylovorus</i>		Spores of <i>Bacillus cereus</i> "toyoi"
<i>L. brevis</i>		<i>Clostridium butyricum</i>
<i>L. helveticus</i>		<i>Saccharomyces boulardii</i> <sup>4</sup>
<i>L. kefir</i>		<i>Bacillus subtilis</i>
<i>L. kefiranoformis</i>		<i>Propionibacterium freudenreichii</i>

<sup>1</sup> Τα εμπορικά ονόματα των συγκεκριμένων στελεχών αναφέρονται εντός των παρενθέσεων

<sup>2</sup> Κυρίως χρησιμοποιείται στην κτηνοτροφία

<sup>3</sup> Κυρίως χρησιμοποιούνται σε φαρμακευτικά σκευάσματα

<sup>4</sup> Κατατάσσεται ως στέλεχος του *S. cerevisiae*

Παρακάτω, στον Πίνακα 4, αναφέρονται ορισμένοι από τους προβιοτικούς μικροοργανισμούς που έχουν μελετηθεί εκτενώς και κυκλοφορούν ήδη στην αγορά.

Πίνακας 4. Προβιοτικά βακτήρια που κυκλοφορούν παγκοσμίως (Prado *et al.*, 2008; Emiliane *et al.*, 2012)

Στελέχη	Προέλευση
<i>Lactobacillus casei</i> Shirota	Yakult, Ιαπωνία
<i>Lactobacillus crispatus</i> CTV05	Gynelogix, USA
<i>Lactobacillus reuteri</i> MM53	BioGaia, Σουηδία
<i>Bifidobacterium lactis</i> HN019	Danisco, Γαλλία
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	Valio, Φιλανδία
<i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> JS	Valio, Φιλανδία
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM	Nestle, Ελβετία
<i>Lactobacillus plantarum</i> 299v	Probi AB, Σουηδία
<i>Lactobacillus casei</i> DN-173 010	Danone, Γαλλία
<i>Lactobacillus casei</i> CRI-431	Chr. Hansen, USA
<i>Bifidobacterium animalis</i> BB12	Chr. Hansen, Γερμανία
<i>Bifidobacterium animalis</i> DN173010	Danone, Γαλλία

## 2.2 Κριτήρια επιλογής προβιοτικών μικροοργανισμών

Ένας προβιοτικός μικροοργανισμός προτού χορηγηθεί στον καταναλωτή πρέπει να πληροί ορισμένα κριτήρια. Για την επιτυχή προσθήκη τους στα τρόφιμα, τα προβιοτικά στελέχη πρέπει πρώτα να μπορούν να παρασκευαστούν υπό βιομηχανικές συνθήκες, και στη συνέχεια να επιβιώνουν και να διατηρούν τη λειτουργικότητά τους στα τρόφιμα, στα οποία ενοφθαλμίζονται (Saarela *et al.*, 2000; Mattila-Sandholm *et al.*, 2002; Sánchez *et al.*, 2009).

Μόνο λίγοι προβιοτικοί μικροοργανισμοί μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μοναδική καλλιέργεια εκκίνησης (Tamime, 2005). Στην πλειονότητα των περιπτώσεων, η ζύμωση γίνεται αποκλειστικά ή κυρίως με τις συμβατικές καλλιέργειες εκκίνησης (*Streptococcus thermophilus* (de Vrese *et al.*, 2008) ή καλλιέργεια γιαούρτης (Tamime, 2005). Η χρήση του *S. thermophilus* ως καλλιέργεια εκκίνησης επιτρέπει την πολύ καλή επιβίωση όλων των προβιοτικών στελεχών (Saxelin *et al.*, 1999). Σήμερα κυκλοφορούν στην αγορά λυοφιλοποιημένες σκόνες και κατεψυγμένα συμπυκνώματα των προβιοτικών βακτηρίων των γενών *Lactobacillus* και *Bifidobacterium* (de Vrese *et al.*, 2008).

Μελέτες έδειξαν ότι οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί έχουν γενικά φτωχή συνεισφορά στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των προϊόντων και αναπτύσσονται αργά στο γάλα (Oliveira *et al.*, 2001; Lucas *et al.*, 2004; Damin *et al.*, 2008). Σε γενικές γραμμές, η ποιότητα των προβιοτικών τροφίμων δεν πρέπει να είναι μικρότερη από εκείνη των αντίστοιχων συμβατικών προϊόντων και όλα τα προβιοτικά τρόφιμα πρέπει να είναι ασφαλή και να έχουν καλά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (de Vrese *et al.*, 2008). Εκτός από τις ιδιότητες που προάγουν την υγεία, οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί στα

τρόφιμα πρέπει να πληρούν διάφορες βασικές προϋποθέσεις για την ανάπτυξη εμπορεύσιμων προβιοτικών προϊόντων οι οποίες αναφέρονται στον Πίνακα 5.

Οι σημαντικότερες απαιτήσεις είναι ότι τα προβιοτικά στελέχη πρέπει να επιβιώνουν σε επαρκείς αριθμούς στο προϊόν, να είναι εγγυημένη η φυσική και η γενετική τους σταθερότητα, χωρίς την ύπαρξη μηχανισμού μεταφοράς πλασμιδίου, ιδίως όσο αφορά την ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά (Heller, 2001). Τα βακτήρια αυτά δεν θα πρέπει να είναι παθογόνα, τοξικά, μεταλλαξιγόνα, καρκινογόνα για το ξενιστή, και θα πρέπει να είναι ανταγωνιστικά των παθογόνων μικροοργανισμών (Granato *et al.*, 2010b). Θα πρέπει να επιβιώνουν κατά τη διάρκεια της πέψης και να έχουν την ικανότητα να προσκολλούνται και να αποικίζουν το βλεννογόνο του εντέρου, προωθώντας τη διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος χωρίς αντιφλεγμονώδη δράση (Saarela *et al.*, 2000) καθώς και, την ικανότητα να ανέχονται τη θερμότητα, το οσμωτικό στρες και το οξυγόνο (Ross *et al.*, 2005), ιδιότητες οι οποίες είναι χρήσιμες για την επιτυχή ενσωμάτωση των προβιοτικών μικροοργανισμών στα τρόφιμα (Ross *et al.*, 2005).

Πίνακας 5. Βασικά και επιθυμητά κριτήρια για την επιλογή των προβιοτικών σε εμπορικές εφαρμογές (Shah, 2006; Morelli, 2007)

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

Άλλοι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την επιβίωση των προβιοτικών βακτηρίων στα ζυμωμένα γαλακτοκομικά προϊόντα, είναι οι συνθήκες καλλιέργειας, η επιλογή στελέχους, το επίπεδο ενοφθαλμισμού (Dave & Shah, 1997a; Phillips *et al.*, 2006), η σύνθεση του μέσου ζύμωσης (Kailasapathy *et al.*, 2008), η προσθήκη πρεβιοτικών (Oliveira *et al.*, 2009), οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ειδών (Vinderola *et al.*, 2002b; Sánchez *et al.*, 2009), η τελική οξύτητα (Kneifel *et al.*, 1993; Bolduc *et al.*, 2006; Donkor *et al.*, 2006; Vasiljevic & Shah, 2008), η διαθεσιμότητα των θρεπτικών ουσιών, οι αυξητικοί και οι ανασταλτικοί παράγοντες, η συγκέντρωση του σακχάρου (Kailasapathy *et al.*, 2008), το διαλυμένο οξυγόνο, η θερμοκρασία επώασης και συντήρησης, και ο χρόνος επώασης (Shah *et al.*, 1995; Talwalkar & Kailasapathy, 2004; Talwalkar *et al.*, 2004; Saarela *et al.*, 2006; Saarela, 2007).

Οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί θα πρέπει να διατηρούνται ζωντανοί κατά την παρασκευή και τη συντήρηση των προϊόντων στα οποία ενσωματώνονται. Τα υλικά συσκευασίας που χρησιμοποιούνται και οι συνθήκες κάτω από τις οποίες συντηρούνται τα προϊόντα είναι σημαντικοί παράγοντες που καθορίζουν την ποιότητα τους (Mattila-Sandholm *et al.*, 2002). Ωστόσο, αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι τα ζυμωμένα γαλακτοκομικά προϊόντα δεν διατηρούν επαρκείς πληθυσμούς προβιοτικών βακτηρίων κατά τη διάρκεια της ζωής τους (Nousia *et al.*, 2011). Τα προβιοτικά που παράγουν βακτηριοσίνες μπορεί να αναστείλουν τη δραστηριότητα των συμβατικών καλλιιεργειών εκκίνησης και αντιστρόφως (de Vrese *et al.*, 2008).

Επιπλέον, τα προβιοτικά θα πρέπει να μην έχουν δυσμενείς επιπτώσεις στη γεύση και στο άρωμα του προϊόντος και δεν θα πρέπει να αυξάνουν την οξύτητα κατά τη διάρκεια ζωής του προϊόντος (Heller, 2001). Για να αποφευχθεί η αλλοίωση της γεύσης, του αρώματος, της σύστασης και η μείωση της διάρκειας ζωής των γαλακτοκομικών προϊόντων μέσω της οξίνισης, της λιπόλυσης ή/και της πρωτεόλυσης από τις προβιοτικές καλλιέργειες, τα προϊόντα αυτά θα πρέπει να φυλάσσονται σε θερμοκρασίες  $\leq 8$  °C (Shah *et al.*, 1995). Η γεύση και το άρωμα του οξικού οξέος προσδίδει ανεπιθύμητα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά στα γαλακτοκομικά προϊόντα και μπορεί να χρειαστεί η προσθήκη διαφόρων γευστικών παραγόντων, ώστε να ελαχιστοποιηθεί ή να συγκαλυφθεί το ελάττωμα αυτό, που είναι γνωστό ως προβιοτική γεύση. Μία αποτελεσματική εναλλακτική λύση για να ξεπεραστεί αυτό το ανεπιθύμητο αποτέλεσμα που προκαλείται από την παρουσία αυτών των καλλιιεργειών είναι η προσθήκη μικροεγκαψυλιωμένων προβιοτικών καλλιιεργειών στα γαλακτοκομικά προϊόντα (Granato *et al.*, 2010b). Η αποτελεσματικότητα των προβιοτικών βακτηρίων ενισχύεται όταν αυτά προσλαμβάνονται με τα τρόφιμα. Η λιποπεριεκτικότητα, η συγκέντρωση και ο τύπος των πρωτεϊνών, των σακχάρων και το pH του τροφίμου είναι μερικοί από τους παράγοντες που θα μπορούσαν να επηρεάσουν την ανάπτυξη και την επιβίωση των προβιοτικών βακτηρίων. Το είδος του τροφίμου παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του αποικισμού των μικροοργανισμών στο γαστρεντερικό σωλήνα του ανθρώπου (Ranadheera *et al.*, 2010).

Η επιβίωση των προβιοτικών στελεχών στα γαλακτοκομικά προϊόντα εξακολουθεί να είναι μια πρόκληση για τη βιομηχανία αφού πολλές μεταβολικές καταστάσεις (π.χ., ευαισθησία στο οξυγόνο) θα πρέπει να ληφθούν υπόψη προκειμένου να αναπτυχθεί ένα προβιοτικό τρόφιμο που να ασκεί θεραπευτική δράση (Cruz *et al.*, 2012). Κάποιες από τις πρόσφατες προσεγγίσεις όσο αναφορά τη βελτίωση της επιβίωσης των προβιοτικών βακτηρίων στα ζυμωμένα γαλακτοκομικά προϊόντα είναι:

Η συντήρηση των προϊόντων αυτών σε ειδικές πλαστικές συσκευασίες (Rodrigues *et al.*, 2011) ή ο έλεγχος της θερμοκρασίας επώασης και του τελικού pH (Shafiee *et al.*, 2010; Mohammadi *et al.*, 2011).

Τέλος, θα πρέπει να υπάρχουν διαθέσιμες μέθοδοι για την ακριβή ταυτοποίηση των προβιοτικών στελεχών (Heller, 2001). Ένα προβιοτικό προϊόν απαιτεί σωστή ταυτοποίηση και μοριακό χαρακτηρισμό των χρησιμοποιούμενων βακτηριακών ειδών, μαζί με κατάλληλη σήμανση στην ετικέτα των ειδών που είναι παρόντα. Η προσοχή σε τέτοια χαρακτηριστικά είναι σημαντική, καθώς μια σειρά από μελέτες έχουν δείξει ότι η ταυτότητα των ανακτηθέντων μικροοργανισμών δεν αντιστοιχεί πάντα με αυτήν που αναγράφεται στην ετικέτα του προϊόντος (Temmerman *et al.*, 2003; Gueimonde *et al.*, 2004).

Για την επίτευξη των ευεργετικών ωφελειών που σχετίζονται με τους προβιοτικούς μικροοργανισμούς, συνιστάται ένας ελάχιστος αριθμός κυττάρων. Μερικοί έχουν προτείνει ένα ελάχιστο επίπεδο της τάξης των  $10^6$  cfu ανά g (Shah, 2007) ενώ άλλοι συνιστούν ένα επίπεδο ημερήσιας κατανάλωσης τουλάχιστον  $10^8$  έως  $10^9$  cfu ανά 100 g προϊόντος (Heydari *et al.*, 2011; Nousia *et al.*, 2011), που ισοδυναμεί με  $10^6$  έως  $10^7$  cfu ανά g (Lourens-Hattingh & Viljoen, 2001a; Cruz *et al.*, 2009a).

Πιο πρόσφατα, έχουν προταθεί υψηλότερα επίπεδα ημερήσια πρόσληψης, όπως  $10^8$  έως  $10^{10}$  cfu (Champagne *et al.*, 2011). Στην Ιαπωνία, αναφέρεται ότι τα προβιοτικά τρόφιμα θα πρέπει να περιέχουν τουλάχιστον  $10^7$  cfu ανά g προϊόντος, το οποίο είναι πολύ υψηλότερο από την ελάχιστη ευεργετική δόση, η οποία είναι  $10^5$  cfu ανά g προϊόντος. Η πιο ευρέως αποδεκτή συγκέντρωση προβιοτικών μικροοργανισμών είναι  $10^6$  cfu ανά g, η οποία ορίζεται ως βιομηχανικό πρότυπο (Plessas *et al.*, 2012). Στη Βραζιλία, η νομοθεσία ορίζει ότι ο ελάχιστος προσλαμβανόμενος πληθυσμός των προβιοτικών βακτηρίων θα πρέπει να είναι μεταξύ  $10^8$  και  $10^9$  cfu ανά ημερήσια μερίδα προϊόντος (ANVISA, 2008). Ο Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας των Ηνωμένων Εθνών και ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (FAO/WHO, 2002) έχει πραγματοποιήσει μια γενική σύσταση ότι ένα προβιοτικό τρόφιμο θα πρέπει να περιέχει  $10^6$  έως  $10^7$  cfu/g έτσι ώστε μία μερίδα, για παράδειγμα, τυριού 100 g να παρέχει συνολικά  $10^8$  -  $10^9$  cfu προβιοτικών μικροοργανισμών. Ωστόσο, οι μελέτες που υποστηρίζουν αυτόν τον αριθμό είναι λίγες. Ο αριθμός των προβιοτικών που θα εξασφαλίσει ένα αποτέλεσμα δεν έχει τυποποιηθεί, και αυτός ο αριθμός εξαρτάται από το στέλεχος και τη δράση του (Ortakci *et al.*, 2012). Όταν η προστιθέμενη καλλιέργεια είναι τα bifidobacteria, η Διεθνής Ομοσπονδία Γάλακτος (International Dairy Federation-IDF) ορίζει ότι το προϊόν θα πρέπει να περιέχει τουλάχιστον  $10^7$  cfu/mL οξυγαλακτικά βακτήρια, εκ των οποίων τουλάχιστον τα  $10^6$  cfu/mL να είναι bifidobacteria (di Criscio *et al.*, 2010).

### **2.3 Επιδράσεις των προβιοτικών μικροοργανισμών στην υγεία**

Από την εποχή του Metchnikoff και μετά, μια σειρά από οφέλη για την υγεία έχουν αποδοθεί σε προϊόντα που περιέχουν προβιοτικούς μικροοργανισμούς. Μερικά από αυτά τα οφέλη είναι καλά τεκμηριωμένα, ενώ για άλλα διαφαίνεται ένα ελπιδοφόρο μέλλον λόγω των πειραμάτων που έχουν πραγματοποιηθεί σε ζώα (Vasiljevic & Shah, 2008). Οι ισχυρισμοί υγείας πρέπει να είναι επιστημονικά τεκμηριωμένοι από κλινικές μελέτες σε ανθρώπους, να εκτελούνται από ανεξάρτητες ερευνητικές ομάδες και να

δημοσιεύονται σε έγκριτα επιστημονικά περιοδικά (Ouwehand *et al.*, 2002). Έχει αποδειχθεί επιστημονικά ότι συγκεκριμένα στελέχη των προβιοτικών μικροοργανισμών παρέχουν οφέλη για την υγεία του ξενιστή και είναι ασφαλή για ανθρώπινη χρήση. Ωστόσο, τα οφέλη αυτά δεν μπορούν να επεκταθούν σε άλλα στελέχη, γιατί οι επιδράσεις αυτές είναι ειδικές για κάθε στέλεχος (Senok *et al.*, 2005). Συνεπώς, δεν υπάρχει στέλεχος που να παρέχει όλα τα προτεινόμενα πλεονεκτήματα, ακόμη και μεταξύ των στελεχών του ίδιου είδους. Επιπλέον, δεν είναι όλα τα στελέχη του ίδιου είδους αποτελεσματικά εναντίον καθορισμένων συνθηκών υγείας (Vasiljevic & Shah, 2008). Καθώς συνεχίζεται να διερευνάται η πρακτική σημασία των μικροοργανισμών για την ανθρώπινη φυσιολογία και την ασθένεια, προκύπτουν νέες θεραπευτικές αντιλήψεις και παρέχονται νέες προσεγγίσεις στη θεραπεία τόσο των οξείων όσο και των χρόνιων ασθενειών (Aggarwal *et al.*, 2013). Η χρήση λοιπόν των προβιοτικών πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω για να διαπιστωθεί εάν υπάρχουν πιθανά οφέλη και παρενέργειες (Parvez *et al.*, 2006). Ορισμένες από αυτές τις ειδικές επιδράσεις διαφόρων στελεχών μικροοργανισμών στην υγεία παρατίθενται στον Πίνακα 6.

Προς το παρόν, έχουν διερευνηθεί και τεκμηριωθεί συγκεκριμένα οφέλη για την υγεία, στα οποία περιλαμβάνονται, η θεραπεία χρόνιων φλεγμονωδών νόσων του εντέρου, η πρόληψη και η θεραπεία της διάρροιας που προκαλείται από παθογόνα, οι λοιμώξεις του ουρογεννητικού συστήματος και οι ατοπικές ασθένειες. Επιπλέον, ο Gilliland ανακάλυψε ότι στα οφέλη από την τακτική κατανάλωση προβιοτικών συμπεριλαμβάνονται η μείωση του κινδύνου του καρκίνου του παχέος εντέρου, των επιπέδων χοληστερόλης του αίματος, η μείωση της συχνότητας εμφάνισης διάρροιας και η ενίσχυση στο ανοσοποιητικό σύστημα (Aggarwal *et al.*, 2013). Επίσης, άλλα επιστημονικά τεκμηριωμένα οφέλη που σχετίζονται με τα προβιοτικά είναι οι αντιυπερτασικές ιδιότητες και οι ευεργετικές επιδράσεις στο μεταβολισμό των μετάλλων, ιδίως όσο αφορά τη σταθερότητα των οστών (Granato *et al.*, 2010b).

Πίνακας 6. Διάφορες ειδικές θεραπευτικές ή προληπτικές ιδιότητες που αποδίδονται σε προβιοτικούς μικροοργανισμούς (Parvez *et al.*, 2006)

Μικροχλωρίδα	Δράσεις
Είδη Bifidobacteria	Μειωμένη επίπτωση της νεογνικής νεκρωτικής εντεροκολίτιδας
<i>Enterococcus faecium</i>	Μειωμένη διάρκεια της οξείας διάρροιας από γαστρεντερίτιδα
Στελέχη Lactobacillus	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Αποτελεσματική βελτίωση της εγκολπωματικής νόσου</li> <li>- Βελτίωση της πέψης της λακτόζης, μειωμένη διάρροια και μείωση των συμπτωμάτων σε άτομα με δυσανεξία στη λακτόζη, σε παιδιά με διάρροια, και σε άτομα με σύνδρομο βραχέους εντέρου</li> <li>- Ως μικροβιακή θεραπεία παρέμβασης για την εξάλειψη των παθογόνων και ως συμπληρωματική μαζί με τα αντιβιοτικά</li> <li>- Βελτίωση της ανοσοποιητικής λειτουργίας του εντερικού βλεννογόνου, της έκκρισης της εντερικής βλέννης και την πρόληψη εντερικής νόσου</li> </ul>

<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Σημαντική μείωση της διάρροιας σε ασθενείς που υφίστανται ακτινοβολήση της πυέλου</li> <li>- Μειωμένοι πολύποδες, αδενώματα και καρκίνο του παχέος εντέρου σε πειραματόζωα</li> <li>- Αποτροπή ουρογεννητικής λοίμωξης μετά από έκθεση στα παθογόνα <i>Escherichia coli</i>, <i>Klebsiella pneumoniae</i>, και <i>Pseudomonas aeruginosa</i></li> <li>- Μειωμένα επίπεδα χοληστερόλης στον ορό</li> </ul>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Μείωση της συχνότητας εμφάνισης της διάρροιας σε κέντρα ημερήσιας φροντίδας παιδιών, όταν χορηγείται σε παιδιά του παιδικού σταθμού</li> <li>- Αποτελεσματικό στη μείωση της φλεγμονής του εντέρου, π.χ. σε εντεροκολίτιδα στους αρουραίους, σε βακτηριακή υπερανάπτυξη του λεπτού εντέρου σε παιδιά, σε εγκολπωματική νόσο</li> <li>- Μειωμένος πόνος και δυσκοιλιότητα στο σύνδρομο του ευερέθιστου εντέρου</li> <li>- Μειωμένο φούσκωμα, μετεωρισμός, πόνος στο σύνδρομο ευερέθιστου εντέρου σε ελεγχόμενη δοκιμή</li> <li>- Θετική επίδραση στην ανοσία σε παιδιά με HIV +</li> </ul>
<i>Lactobacillus reuteri</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Μείωση της διάρκειας της οξείας γαστρεντερίτιδας</li> <li>- Μείωση της οξείας διάρροιας</li> </ul>
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Ενίσχυση της κυτταρικής ανοσίας σε υγιείς ενήλικες σε ελεγχόμενη δοκιμή
<i>Lactobacillus salivarius</i>	Καταστολή και εξάλειψη του ελικοβακτηριδίου του πυλωρού σε καλλιέργειες ιστών και ζωικά μοντέλα με έκκριση γαλακτικού οξέος
Είδη Bacteroides	Χρόνια κολίτιδα, γαστρίτιδα, αρθρίτιδα (αυξημένη βακτηριακή δραστηριότητα ουρεάσης σε χρόνια νεανική αρθρίτιδα)
<i>Saccharomyces boulardii</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Μειωμένη επανεμφάνιση διάρροιας από <i>Clostridium difficile</i></li> <li>- Επίδρασεις σε <i>C. difficile</i> και <i>Klebsiella oxytoca</i> που οδήγησαν σε μείωση του κινδύνου και/ή σε μείωση της διάρκειας της διάρροιας που σχετίζεται με αντιβιοτικά</li> <li>- Μείωση της διάρκειας της οξείας γαστρεντερίτιδας</li> <li>- Μείωση μόνο της λειτουργικής διάρροιας του συνδρόμου ευερέθιστου εντέρου</li> </ul>



Οι μηχανισμοί με τους οποίους τα προβιοτικά βακτήρια ασκούν τις επιδράσεις τους είναι σε μεγάλο βαθμό άγνωστοι, αλλά μπορεί να περιλαμβάνουν την τροποποίηση του pH του εντέρου, τον ανταγωνισμό με παθογόνους μικροοργανισμούς μέσω της παραγωγής αντιμικροβιακών ενώσεων, τον ανταγωνισμό για τη σύνδεση των παθογόνων σε υποδοχείς, καθώς και για τις διαθέσιμες θρεπτικές ουσίες και τους αυξητικούς παράγοντες, τη διέγερση ανοσοτροποποιητικών κυττάρων και την παραγωγή λακτάσης (Parvez *et al.*, 2006). Ορισμένες από τις επιδράσεις των προβιοτικών στην υγεία συνοψίζονται στον Πίνακα 7.

### 2.3.1 Ενζυμική δραστηριότητα και βελτίωση της πέψης

Η δράση των μικροοργανισμών κατά την παρασκευή των ζυμωμένων τροφίμων ή στην πεπτική οδό, έχει αποδειχθεί ότι βελτιώνει την ποσότητα, τη βιοδιαθεσιμότητα και την πεπτικότητα ορισμένων διαιτητικών θρεπτικών ουσιών. Η ζύμωση του γάλακτος με οξυγαλακτικά βακτήρια αυξάνει το φολικό οξύ στη γιαούρτη, το γάλα bifidus και το κεφίρ (Parvez *et al.*, 2006). Έχει καταγραφεί ενίσχυση της περιεκτικότητας της γιαούρτης σε φολικό οξύ κατά έξι φορές λόγω της ενσωμάτωσης του *B. animalis*. Έχει αποδειχθεί ότι είναι καλύτερη, η κατανάλωση από παιδιά γιαούρτης που περιέχει *L. acidophilus* La 1 γιατί ενισχύει τα επίπεδα της βιταμίνης B12 και του φολικού οξέος στο πλάσμα του αίματος (Sarkar *et al.*, 2008). Άλλα φυσιολογικά οφέλη των προβιοτικών στελεχών είναι: η βελτίωση της απορρόφησης του σιδήρου και του ασβεστίου, η μείωση των προϊόντων καταβολισμού που αποβάλλονται από τους νεφρούς και το ήπαρ, η καλύτερη ανάπτυξη, η βελτίωση της άμυνας του οργανισμού και η σύνθεση και άλλων θρεπτικών συστατικών εκτός της B9, όπως η νιασίνη, η ριβοφλαβίνη και οι βιταμίνες B6 και B12 (Granato *et al.*, 2010). Επιπλέον το γαλακτικό οξύ που παράγεται από το *Lactobacillus* μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως συντηρητικό τροφίμων, γευστικός παράγοντας και ως γαλακτωματοποιητής (Mack *et al.*, 1999).

Επίσης, δεδομένα από διάφορες μελέτες έδειξαν ότι άτομα με δυσανεξία στη λακτόζη μπορεί να ανακουφιστούν από τα συμπτώματα αν αντικαταστήσουν το γάλα στη διατροφή τους με ζυμωμένα γαλακτοκομικά προϊόντα (Cogan *et al.*, 2007). Η μερική υδρόλυση της λακτόζης κατά τη ζύμωση, μειώνει τη συγκέντρωσή της στα προϊόντα αυτά, σε σχέση με το γάλα, και συμβάλλει στην καλύτερη ανοχή της γιαούρτης από άτομα με δυσανεξία. Συχνά η ανακούφιση από τα συμπτώματα αυτά οφείλεται περισσότερο στη ζύμωση από ότι στο προβιοτικό μικροοργανισμό, αλλά οι ιδιότητες συγκεκριμένων προβιοτικών στελεχών μπορεί να επηρεάσουν το αποτέλεσμα (Short & O' Brien, 2004). Ο *Lactobacillus bulgaricus* και άλλοι λακτοβάκιλλοι που χρησιμοποιούνται σε ζυμωμένα γαλακτοκομικά προϊόντα προσφέρουν αρκετή βακτηριακή λακτάση στο έντερο, όπου αποικοδομείται η λακτόζη, με αποτέλεσμα την αποτροπή των συμπτωμάτων στα άτομα με δυσανεξία (Parvez *et al.*, 2006; Cogan *et al.*, 2007).

Επίσης έχει μελετηθεί η ικανότητα των ενζύμων των προβιοτικών βακτηρίων να βοηθούν την πέψη σε βρέφη με ανεπάρκεια σακχαράσης. Η ικανότητα αφομοίωσης της σακχαρόζης επαυξήθηκε με τη χορήγηση του *Saccharomyces cerevisiae*, μιας ζύμης που παράγει το ένζυμο σακχαράση (Tamime, 2005).

Πίνακας 7. Επιστημονικά τεκμηριωμένες και πιθανές ευεργετικές επιδράσεις των προβιοτικών μικροοργανισμών στην υγεία του ανθρώπου (Vasiljevic & Shah, 2008)

Επιδράσεις στην υγεία	Μηχανισμός
<i>Επιστημονικά τεκμηριωμένες</i>	
Ανακούφιση από τη δυσανεξία της λακτόζης	Παραγωγή της ενδοκυτταρικής β-γαλακτοσιδάσης στο γαστρεντερικό σωλήνα του ανθρώπου
Πρόληψη και μείωση των συμπτωμάτων του ροταϊού και της διάρροιας που σχετίζεται με αντιβιοτικά	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ανταγωνιστικός αποκλεισμός</li> <li>- Εκτόπιση / επίδραση φραγμού</li> <li>- Βελτιωμένη ανοσολογική απάντηση</li> </ul>
<i>Πιθανά οφέλη</i>	
Θεραπεία και πρόληψη της αλλεργίας (ατοπικό έκζεμα, τροφική αλλεργία)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Εκτόπιση / αποτέλεσμα φραγμού</li> <li>- Ανοσοποιητικός αποκλεισμός, εξάλειψη και ρύθμιση</li> </ul>
Μείωση του κινδύνου μεταλλαξιογένεσης και καρκινογένεσης	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Μεταβολισμός μεταλλαξιογόνων</li> <li>- Μεταβολή της εντερικής μικροοικολογίας</li> <li>- Μεταβολή της εντερικής δραστηριότητας</li> <li>- Ομαλοποίηση της εντερικής διαπερατότητας</li> <li>- Βελτιωμένη εντερική ανοσία</li> </ul>
Υποχοληστερολαιμική επίδραση	Αποσύζευξη των χολικών αλάτων
Αναστολή του ελικοβακτηριδίου του πυλωρού και των εντερικών παθογόνων	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ανταγωνιστικός αποκλεισμός</li> <li>- Επίδραση φραγμού</li> <li>- Παραγωγή αντιμικροβιακών ενώσεων</li> </ul>
Πρόληψη των φλεγμονωδών νόσων του εντέρου	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ανταγωνιστικός αποκλεισμός</li> <li>- Βελτίωση των στενών επιθηλιακών συνδέσεων</li> <li>- Τροποποίηση της εντερικής διαπερατότητας</li> <li>- Διαμόρφωση της ανοσολογικής απόκρισης</li> <li>- Παραγωγή αντιμικροβιακών προϊόντων</li> <li>- Διάσπαση των παθογόνων αντιγόνων</li> </ul>
Διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Αναγνώριση από υποδοχείς-επαγωγή της έμφυτης και προσαρμοστικής ανοσίας: <ul style="list-style-type: none"> <li>• μειωμένη ρύθμιση των προφλεγμονωδών</li> <li>• κυτοκινών και χημειοκινών</li> <li>• αυξημένη ρύθμιση της φαγοκυτταρικής δραστηριότητας</li> <li>• ρύθμιση της ισορροπίας των T-βοηθητικών κυττάρων, Th1/Th2</li> </ul> </li> </ul>

### 2.3.2 Προληπτική και θεραπευτική δράση των προβιοτικών μικροοργανισμών κατά των εντερικών παθήσεων

Η ευεργετική επίδραση των προβιοτικών μικροοργανισμών στη μείωση της συχνότητας ή της διάρκειας εμφάνισης ορισμένων διαρροϊκών ασθενειών είναι ίσως η πιο τεκμηριωμένη διαπίστωση για την υγεία (Reid *et al.*, 2003). Η χορήγηση των *L. rhamnosus* GG, *B. lactis* BB12 και *L. reuteri* SD2222 βοηθούν στην πρόληψη και τη θεραπεία της διάρροιας σε παιδιά που οφείλεται σε ροταϊό (Kotowska *et al.*, 2005; Senok *et al.*, 2005; Can *et al.*, 2006; Hickson *et al.*, 2007). Στα προβιοτικά είδη που θεωρούνται πιο υποσχόμενα για τη θεραπεία ασθενειών με διάρροια σε παιδιά συμπεριλαμβάνονται οι *Lactobacillus* spp., *L. reuteri*, *L. casei*, *S. boulandii*, *B. bifidum* (Parvez *et al.*, 2006). Διάφορες μελέτες με εικονικό φάρμακο (placebo), απέδειξαν ότι οι *S. boulandii*, *L. rhamnosus* GG και *Enterococcus faecium* SF68 ήταν αποτελεσματικοί στη μείωση της συχνότητας εμφάνισης της διάρροιας που σχετίζεται με αντιβιοτικά (Tamime, 2005). Σύμφωνα με τους Senok *et al.* (2005), διάφορες μελέτες εξέτασαν την επίδραση του *S. boulandii* στην πρόληψη της διάρροιας που σχετίζεται με αντιβιοτικά, αλλά τα αποτελέσματα ήταν ασαφή, γιατί η μειωμένη συχνότητα εμφάνισης που παρατηρήθηκε σε μερικές μελέτες δεν επιβεβαιώθηκε σε άλλες. Επίσης, η χορήγηση του *S. boulandii* σε ελεγχόμενη μελέτη με εικονικό φάρμακο ως συμπληρωματική αγωγή σε θεραπεία με αντιβιοτικά απέδειξε ότι εμπόδισε την υποτροπή της διάρροιας (Senok *et al.*, 2005). Επιπλέον, μια άλλη μελέτη έδειξε ότι η πρόσληψη προβιοτικών μείωσε τη συχνότητα εμφάνισης ασθενών θετικών στην τοξίνη του *C. difficile* σε σύγκριση με την αντίστοιχη ομάδα του εικονικού φαρμάκου (Tamime, 2005).

Η διάρροια των ταξιδιωτών συνήθως προκαλείται από την εντεροτοξινογόνο *Escherichia coli*, είδη των *Salmonella*, *Shigella*, *Aeromonas*, καθώς και από τους *Plesiomonas shigelloides* και non-cholera vibrios τα οποία είναι υπεύθυνα για το 80% περίπου των περιπτώσεων της. Διάφορα προβιοτικά όπως το *S. boulandii*, καθώς και ένας συνδυασμός που αποτελείται από *L. acidophilus* και *B. bifidum* φαίνεται να είναι αποτελεσματικά στην πρόληψη της διάρροιας των ταξιδιωτών (McFarland, 2007).

Η εφαρμογή των προβιοτικών μικροοργανισμών σε κλινικό περιβάλλον είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της διάρροιας που σχετίζεται με αντιβιοτικά κατά 52%, του κινδύνου διάρροιας των ταξιδιωτών κατά 8% και της οξείας διάρροιας διαφόρων αιτιών κατά 34%. Επιπλέον, ο κίνδυνος οξείας διάρροιας στα παιδιά και στους ενήλικες μειώθηκε κατά 57% και 26%, αντίστοιχα. Όλα τα στελέχη που αξιολογήθηκαν συμπεριλαμβανομένων των *S. boulandii*, *L. rhamnosus* GG, *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, μόνα τους ή σε συνδυασμούς έδειξαν ευεργετικό αποτέλεσμα στις καταστάσεις διάρροιας (Sazawal *et al.*, 2006). Η ισχυρότερη απόδειξη της ευεργετικής επίδρασης των προβιοτικών στελεχών σε τέτοιες καταστάσεις έχει αποδειχθεί για τα *L. rhamnosus* GG και *B. animalis* BB12 (Hickson *et al.*, 2007).

Σε μια ελεγχόμενη με εικονικό φάρμακο μελέτη που έγινε για να διερευνηθεί η αποτελεσματικότητα των προβιοτικών για την πρόληψη της διάρροιας που προκαλείται από την ακτινοβολία σε ασθενείς με καρκίνο, προέκυψε ότι, οι περισσότεροι ασθενείς με εικονικό φάρμακο υπέστησαν διάρροια 3<sup>ου</sup> ή 4<sup>ου</sup> βαθμού σε σύγκριση με τους υπόλοιπους. Το γεγονός αυτό οδήγησε στο συμπέρασμα ότι τα προβιοτικά που παράγουν γαλακτικό οξύ είναι μια εύκολη, ασφαλής και εφικτή προσέγγιση για την

προστασία των ασθενών με καρκίνο έναντι της διάρροιας που προκαλείται από την ακτινοβολία (Gupta & Garg, 2009).

Επίσης σε μία άλλη γαστρεντερική πάθηση όπως είναι το σύνδρομο του ευερέθιστου εντέρου παρατηρήθηκε ότι ο *S. boulardii* μείωσε τη διάρροια, αλλά δεν ήταν αποτελεσματικός στην ανακούφιση άλλων συμπτωμάτων του συνδρόμου (Parvez *et al.*, 2006). Στις οδηγίες του NICE (National Institute for Health and Care Excellence) το 2008 επισημαίνεται πως ορισμένα στελέχη προβιοτικών είναι ευεργετικά για ορισμένους ασθενείς με ευερέθιστο έντερο, ενώ για άλλους όχι, υπογραμμίζοντας έτσι πως το προβιοτικό στέλεχος, η δοσολογία και ο τρόπος χορήγησης είναι παράγοντες που πιθανώς επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα των διαθέσιμων προϊόντων (<http3>).

Επίσης τα προβιοτικά ζυμωμένα γάλατα έχουν προταθεί για την ανακούφιση της δυσκοιλιότητας και έχουν αναφερθεί μερικές μελέτες με θετική έκβαση. Ο *B. animalis* DN-173 010 φαίνεται να έχει ευεργετικό αποτέλεσμα μειώνοντας το χρόνο διέλευσης σε υγιείς γυναίκες (Marteau *et al.*, 2002). Το ίδιο στέλεχος βρέθηκε να βελτιώνει τη δυσκοιλιότητα σε ασθενείς με σύνδρομο του ευερέθιστου εντέρου (Guyonnet *et al.*, 2007; Agrawal *et al.*, 2008) καθώς και την πεπτική δυσφορία στο γενικό πληθυσμό (Guyonnet *et al.*, 2009). Έχει αναφερθεί ότι τα ζυμωμένα γάλατα που περιέχουν τα στελέχη *L. casei* Shirota και *L. johnsonii* La1 έχουν ευεργετική επίδραση στη δυσκοιλιότητα (Fukushima *et al.*, 2004).

Σε μια αναδρομική μελέτη σύγκρισης απεδείχθη ότι, η χορήγηση ενός συνδυασμού προβιοτικών στελεχών (*L. acidophilus* και *B. infantis*) ήταν αποτελεσματική στη μείωση της εμφάνισης της νεκρωτικής εντεροκολίτιδας η οποία είναι μια αιτία θνησιμότητας σε πρόωρα βρέφη (Senok *et al.*, 2005). Εξίσου σε μια τυχαιοποιημένη, ελεγχόμενη με εικονικό φάρμακο μελέτη, η στοματική χορήγηση *B. lactis* BB12 σε πρόωρα βρέφη, βελτίωσε αρκετά τους δείκτες υγείας τους (Granato *et al.*, 2010b). Ωστόσο, σε άλλη μελέτη η χορήγηση μόνο του *L. acidophilus* δεν έδειξε στατιστικά σημαντική μείωση στην εμφάνιση της νεκρωτικής εντεροκολίτιδας. Παρά το γεγονός ότι υπάρχουν ευεργετικά αποτελέσματα, η χρήση των προβιοτικών σε βρέφη και σε περίοδο όπου η μικροχλωρίδα του εντέρου δεν έχει ακόμη καθοριστεί, μπορεί να οδηγήσει σε μακροχρόνιο αποικισμό της με αυτούς τους μικροοργανισμούς. Οι επιπτώσεις της τροποποίησης του σύνθετου εντερικού μικροβιακού οικοσυστήματος είναι ακόμα ασαφείς και χρειάζεται καλύτερη κατανόηση των επιπτώσεων αυτών των παρεμβάσεων στη μικροχλωρίδα του εντέρου των βρεφών (Senok *et al.*, 2005).

### **2.3.3 Αναστολή της ανάπτυξης του ελικοβακτηριδίου του πυλωρού και εντερικών παθογόνων μικροοργανισμών**

Οι προβιοτικές καλλιέργειες παράγουν ένα ευρύ φάσμα αντιβακτηριακών ενώσεων στις οποίες περιλαμβάνονται οργανικά οξέα (π.χ. γαλακτικό και οξικό οξύ), υπεροξειδίο του υδρογόνου, βακτηριοσίνες (πχ. νισίνη), διάφορα χαμηλού μοριακού βάρους πεπτίδια, αντιμυκητιακά, πεπτίδια/πρωτεΐνες, λιπαρά οξέα, φαινυλ-γαλακτικό οξύ, και ΟΗ-φαινυλ-γαλακτικό οξύ. Το γαλακτικό και οξικό οξύ είναι τα κύρια οργανικά οξέα που παράγονται κατά την ανάπτυξη των προβιοτικών βακτηρίων και η μείωση του pH που προκαλούν στο γαστρεντερικό σωλήνα έχει βακτηριοκτόνο ή βακτηριοστατική δράση.

Οι χαμηλού μοριακού βάρους ενώσεις, όπως το γαλακτικό οξύ, έχει αναφερθεί ότι έχουν ανασταλτική δράση έναντι των Gram-αρνητικών παθογόνων βακτηρίων (Vasiljevic & Shah, 2008). Επιπλέον, αυξάνουν την παραγωγή της μουκίνης στο έντερο, η οποία εμποδίζει την προσκόλληση των εντεροπαθογόνων μικροοργανισμών στο βλεννογόνο (Parvez *et al.*, 2006). Οι Corr *et al.* (2007) απέδειξαν ότι ο *L. salivarius* ήταν ικανός να προστατεύσει τους ποντικούς έναντι της *Listeria monocytogenes* με άμεσο ανταγωνισμό διαμέσου της βακτηριοσίνης Abp118. Υπάρχουν επίσης εμπορικές προβιοτικές καλλιέργειες των *L. rhamnosus* και *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* με δραστηριότητα έναντι μολυσματικών ζυμών, μυκήτων και κλωστριδίων (Tamime, 2005).

Η χορήγηση προβιοτικών βακτηρίων έχει προταθεί και στις λοιμώξεις από *H. pylori* για τη βελτίωση του ρυθμού της εξάλειψής τους καθώς και για την προσαρμογή στα πολλαπλά σχήματα των αντιβιοτικών που χρησιμοποιούνται θεραπευτικά. Έχει παρατηρηθεί ότι, σε ανθρώπους που κατανάλωναν *L. johnsonii* παρεμποδίζονταν ο αποικισμός του στομάχου από *H. pylori* (Parvez *et al.*, 2006). Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε πειραματόζωα και σε ανθρώπους έδειξαν ότι οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί δεν φαίνεται να εξαλείφουν το *H. pylori*, αλλά είναι σε θέση να μειώσουν το βακτηριακό φορτίο και τη φλεγμονή. Η επίδραση αυτή φαίνεται να εξαρτάται από το στέλεχος (Vasiljevic & Shah, 2008).

### 2.3.4 Πρόληψη της φλεγμονώδους νόσου του εντέρου

Η ιδιοπαθής φλεγμονώδης νόσος του εντέρου (ΙΦΝΕ) εκπροσωπείται από δύο μεγάλες νόσους, την ελκώδη κολίτιδα και τη νόσο του Crohn, όπου και οι δύο είναι χρόνιες, υποτροπιάζουσες ασθένειες, στις οποίες τα προσβεβλημένα άτομα εμφανίζουν προδιάθεση στην ανάπτυξη του καρκίνου του παχέος εντέρου. Αρκετές *in vitro* μελέτες της ΙΦΝΕ σε κυτταρικά μοντέλα απέδειξαν την ικανότητα ορισμένων προβιοτικών στελεχών, όπως ο *L. rhamnosus* GG, να ρυθμίζουν το ανοσοποιητικό σύστημα, και επιπλέον ότι έχουν ευεργετικό αποτέλεσμα επί των ασθενών που πάσχουν από ΙΦΝΕ (Vasiljevic & Shah, 2008). Επίσης, υπάρχουν στοιχεία που υποδεικνύουν ότι η χορήγηση συνδυασμού προβιοτικών στελεχών μπορεί να είναι αποτελεσματική στην ανακούφιση των συμπτωμάτων (Reid *et al.*, 2003).

### 2.3.5 Θεραπεία και πρόληψη αλλεργιών/ατοπικού εκζέματος

Ο επιπολασμός των αλλεργικών νοσημάτων έχει αυξηθεί τα τελευταία 40 χρόνια, ιδιαίτερα στις δυτικές κοινωνίες (Parvez *et al.*, 2006). Μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η χρήση των προβιοτικών στην εγκυμοσύνη φαίνεται να έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της ανάπτυξης της ατοπικής νόσου στην παιδική ηλικία. Επιπλέον, τα δεδομένα από την τετραετή παρακολούθηση της ίδιας ομάδας βρεφών έδειξαν ότι αυτή η προστατευτική επίδραση εκτεινόταν και πέρα από τη βρεφική ηλικία (Senok *et al.*, 2005). Ομοίως, μια άλλη μελέτη έδειξε ότι η χορήγηση *Lactobacillus* GG μπορεί να ανακουφίσει από τα συμπτώματα του συνδρόμου ατοπικού εκζέματος/δερματίτιδας σε IgE-ευαισθητοποιημένα βρέφη, αλλά όχι σε μη IgE-ευαισθητοποιημένα βρέφη, ενώ η χορήγηση επί 4 εβδομάδες *Lactobacillus* GG ελάττωσε την εντερική φλεγμονή σε

βρέφη με σύνδρομο ατοπικού εκζέματος/δερματίτιδας και αλλεργίας στο γάλα. Οι μηχανισμοί της προστατευτικής δράσης των προβιοτικών μικροοργανισμών σε αλλεργικές αντιδράσεις δεν είναι ακόμη πλήρως γνωστοί, έχουν όμως αποδοθεί στην ενίσχυση των διαφόρων γραμμών άμυνας του εντέρου, συμπεριλαμβανομένου του ανοσοποιητικού αποκλεισμού, της ανοσοποιητικής εξάλειψης και της ανοσοποιητικής ρύθμισης (Vasiljevic & Shah, 2008).

### **2.3.6 Μείωση του κινδύνου που συνδέεται με τη μεταλλαξιγένεση και την καρκινογένεση**

Τα προβιοτικά ως μέρος της εντερικής χλωρίδας, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην επαγωγή και την ανάπτυξη του καρκίνου του παχέος εντέρου, μειώνοντας τη συχνότητα και τον αριθμό των όγκων. Η ενδογενής χλωρίδα και το ανοσοποιητικό σύστημα συμβάλλουν στην ανάπτυξη της καρκινογένεσης. Τα προβιοτικά μπορούν να επηρεάσουν και τα δύο, και αυτό οδήγησε σε μελέτες διερεύνησης του ρόλου των προβιοτικών στην πρόληψη ή τη θεραπεία όγκων σε πειραματόζωα (Granato *et al.*, 2010b).

Ορισμένοι ερευνητές (Parvez *et al.*, 2006; Vasiljevic & Shah, 2008) ισχυρίζονται ότι οι προβιοτικές καλλιέργειες μπορούν να μειώσουν την έκθεση σε καρκινογόνες ενώσεις με:

- την αποτοξίνωση από τις καταναλωθείσες ενώσεις,
- την τροποποίηση του περιβάλλοντος του εντέρου και τη μείωση των πληθυσμών ή των μεταβολικών δραστηριοτήτων των βακτηρίων που μπορεί να παράγουν καρκινογόνες ενώσεις,
- την παραγωγή προϊόντων μεταβολισμού που βελτιώνουν την απόπτωση ή τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, όπως π.χ. το βουτυρικό οξύ 2006, που επίσης εμφανίζει μία ευρέου φάσματος αντιμεταλλαξιγόνο δράση έναντι όλων των μεταλλαξιγόνων ή προμεταλλαξιγόνων παραγόντων,
- την παραγωγή ενώσεων που αναστέλλουν την ανάπτυξη των ογκογόνων κυττάρων,
- την τόνωση του ανοσοποιητικού συστήματος για την καλύτερη υπεράσπιση ενάντια στο πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων.

Μια άλλη πιθανή εξήγηση θα μπορούσε να είναι η προληπτική επίδραση των προβιοτικών επί των βακτηρίων που προάγουν την καρκινογένεση στο έντερο. Τα προβιοτικά μπορούν να καταστείλουν την ανάπτυξη των βακτηρίων που μετατρέπουν τους προκαρκινικούς σε καρκινογόνους παράγοντες, μειώνοντας έτσι την ποσότητα των καρκινογόνων παραγόντων στο έντερο (Parvez *et al.*, 2006). Οι εξηγήσεις αυτές τονίζουν τη σημασία της κατανάλωσης ζωντανών προβιοτικών βακτηρίων και τη διατήρηση της επιβίωσης τους στο έντερο έτσι ώστε να παρέχεται μια αποτελεσματική αναστολή της δράσης των μεταλλαξιγόνων παραγόντων (Cogan *et al.*, 2007; Vasiljevic & Shah, 2008). Έχει διατυπωθεί ο ισχυρισμός ότι η συνήθης κατανάλωση ζυμωμένου γάλακτος (Yakult) με *L. casei* Shirota μείωσε τον κίνδυνο εμφάνισης του καρκίνου της ουροδόχου κύστης στον Ιαπωνικό πληθυσμό (Senok *et al.*, 2005; Vasiljevic & Shah, 2008). Επίσης, υπάρχουν στοιχεία που δείχνουν ότι μερικά μέλη της εντερικής μικροχλωρίδας επηρεάζουν την έναρξη της καρκινογένεσης με την παραγωγή ενζύμων,

όπως η γλυκοσιδάση, η αζορεδουκτάση, η νιτρορεδουκτάση και η β-γλυκουρονιδάση. Διάφορες μελέτες σε ανθρώπους έδειξαν ότι η χορήγηση του *L. acidophilus* ή *L. casei* είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση των παραπάνω ενζύμων στα κόπρανα των εθελοντών. Είναι όμως ακόμη άγνωστο εάν η κατανάλωση των προβιοτικών πράγματι θα οδηγήσει σε μειωμένη συχνότητα εμφάνισης καρκίνου, και τέτοια αντικαρκινικά αποτελέσματα πρέπει να αποδειχθούν σε κλινικές δοκιμές που περιλαμβάνουν τη χρήση αναγνωρισμένων καρκινικών δεικτών (Senok *et al.*, 2005).

### 2.3.7 Υποχοληστερολαιμική επίδραση

Διάφορες μελέτες σε ανθρώπους έδειξαν ότι τα επίπεδα χοληστερόλης στο αίμα μειώνονταν με την κατανάλωση προβιοτικών γαλακτοκομικών προϊόντων, αλλά σε γενικές γραμμές τα στοιχεία αυτά δεν ήταν αδιαμφισβήτητα. Ακόμη δεν έχουν οριστικοποιηθεί τα αποτελέσματα των κλινικών μελετών σε ανθρώπους για την επίδραση των προβιοτικών στη μείωση της χοληστερόλης ή των χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (LPL). Ίσως η επίδραση να είναι μικρή και είναι δύσκολο να μετρηθεί. Επιπλέον, είναι πιθανό ορισμένα στελέχη να εμφανίσουν αυτή την επίδραση, ενώ άλλα όχι (Parvez *et al.*, 2006). Οι Mann & Sproepp (1974) ήταν οι πρώτοι που παρατήρησαν μια μείωση στα επίπεδα χοληστερόλης του ορού σε άνδρες που τρέφονταν με μεγάλες ποσότητες (8,33 L/άνθρωπο/ημέρα) γάλακτος που είχε ζυμωθεί με στελέχη *Lactobacillus* (Vasiljevic & Shah, 2008). Έχει βρεθεί ότι μία μικρή ποσότητα αφυδατωμένης καλλιέργειας *L. fermentum* KC5b, μπορεί να αφαιρέσει 14,8 mg χοληστερόλης από το υπόστρωμα στο οποίο βρίσκεται η καλλιέργεια (Aggarwal *et al.*, 2013). Επιπλέον, λαμβάνοντας υπόψη τη μεγάλη εξάπλωση της καρδιακής νόσου που παρατηρείται σήμερα, η τακτική κατανάλωση προβιοτικών μπορεί να προσφέρει μια μικρή προφυλακτική δράση κατά των καρδιακών παθήσεων και της υπέρτασης (Parvez *et al.*, 2006). Οι *L. acidophilus* και *Bifidobacterium spp.* χρησιμοποιήθηκαν για να παραχθεί στη Φιλανδία ένα τυρί με χαμηλά λιπαρά (Ryhänen *et al.*, 2001). Οι μικροοργανισμοί αυτοί κατά την ωρίμανση του τυριού παράγουν βιοδραστικά πεπτίδια με αντιυπερτασικές ιδιότητες, προσθέτοντας έτσι στις διατροφικές και προβιοτικές αξίες του προϊόντος. Όμως, παρά τις πολλές μελέτες σε ανθρώπους, η μείωση της χοληστερόλης του ορού εξακολουθεί να μη θεωρείται μια εξακριβωμένη επίδραση και απαιτούνται διπλές, τυφλές, ελεγχόμενες με εικονικό φάρμακο, κλινικές δοκιμές σε ανθρώπους για την τεκμηρίωση αυτού του ισχυρισμού. Ομοίως, οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στη μείωση της χοληστερόλης πρέπει να διευκρινιστούν (Vasiljevic & Shah, 2008).

### 2.3.8 Διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος

Ένας από τους συνηθισμένους ισχυρισμούς που χρησιμοποιούνται για την εμπορία των προβιοτικών προϊόντων είναι ότι βοηθούν στην ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος (Senok *et al.*, 2005; Cogan *et al.*, 2007). Τα προβιοτικά βακτήρια φαίνεται να προωθούν τους ενδογενείς μηχανισμούς άμυνας του ξενιστή. Εκτός από τις επιδράσεις τους στη μη ανοσολογική άμυνα του εντέρου, η οποία χαρακτηρίζεται από τη σταθεροποίηση της μικροχλωρίδας του εντέρου, τα προβιοτικά βακτήρια φαίνεται να

αυξάνουν τη χυμική ανοσολογική απόκριση και κατά συνέπεια να προάγουν το ανοσολογικό φραγμό του εντέρου. Επιπλέον, τα προβιοτικά βακτήρια έχουν αποδείξει ότι διεγείρουν τη μη ειδική αντίσταση του ξενιστή στους παθογόνους μικροοργανισμούς και διαμορφώνουν την ανοσολογική απόκριση σε δυνητικά επιβλαβή αντιγόνα με τη δυνατότητα της μειωτικής ρύθμισης των αντιδράσεων υπερευαισθησίας (Granato *et al.*, 2010b). Μολονότι διάφορες *in vitro* και *in vivo* μελέτες έδειξαν ότι τα προβιοτικά βακτήρια μπορούν να ρυθμίζουν την ανοσολογική απόκριση, οι ακριβείς μηχανισμοί που εμπλέκονται παραμένουν ασαφείς (Reid *et al.*, 2003), και μελέτες με προβιοτικά παρασκευάσματα σε διαφορετικά εργαστήρια δημιούργησαν αντικρουόμενα αποτελέσματα (Senok *et al.*, 2005). Τέλος, δεν έχει διερευνηθεί η επίδραση της χορήγησης προβιοτικών για παρατεταμένο χρονικό διάστημα, στο ανοσοποιητικό σύστημα διαφορετικών ηλικιακών ομάδων συμπεριλαμβανομένων των παιδιών και των ηλικιωμένων (Gill & Guarner, 2004).

### 2.3.9 Λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος

Τόσο οι μελέτες σε ζώα όσο και σε ανθρώπους έχουν δείξει ότι η από του στόματος χορήγηση προβιοτικών και τα κοιλικά υπόθετα προβιοτικών μειώνουν τη συχνότητα εμφάνισης υποτροπής των λοιμώξεων του ουροποιητικού συστήματος. Η τοπική ενστάλαξη λακτοβακίλλων οδήγησε σε αξιοσημείωτη αναστολή της ανάπτυξης της *Escherichia coli*, καθώς και σε μείωση τόσο της σοβαρότητας της φλεγμονής όσο και του κινδύνου υποτροπής της λοίμωξης του ουροποιητικού συστήματος (Reid *et al.*, 2003). Περαιτέρω, έχει αποδειχθεί ότι η από του στόματος πρόσληψη προβιοτικών λακτοβακίλλων μειώνει τον κίνδυνο βακτηριακής κολπίτιδας, καντιντίασης και μόλυνσης της ουροποιητικής οδού (Senok *et al.*, 2005). Ειδικότερα η ενδοκοιλιακή ή η από του στόματος χορήγηση προβιοτικών συνδυασμών, που περιέχουν *L. rhamnosus* GR-1 και *L. fermentum* RC-14, αποκατέστησε την κοιλιακή χλωρίδα σε ποσοστό 90% των γυναικών που τα έλαβαν (Tamime, 2005). Δυστυχώς, τα αποδεικτικά στοιχεία για την αποτελεσματικότητα των προβιοτικών βακτηρίων δεν είναι ακόμα αδιάσειστα, εν μέρει επειδή υπάρχουν ακόμα αναφορές στην επιστημονική βιβλιογραφία που αποτυγχάνουν να αποδείξουν την προστατευτική δράση τους έναντι των λοιμώξεων του ουροποιητικού συστήματος. Εντούτοις, η συντριπτική πλειοψηφία των στοιχείων στηρίζει το ευεργετικό αποτέλεσμα (Senok *et al.*, 2005).

### 2.3.10 Άλλες πιθανές ευεργετικές επιδράσεις

Τα προβιοτικά βακτήρια έχουν ερευνηθεί για ένα ευρύ φάσμα ασθενειών. Υπάρχουν σαφείς αποδείξεις από διάφορες μελέτες που αφορούσαν:

- το μετριασμό της υποτροπιάζουσας μέσης ωτίτιδας των παιδιών μέσω της εφαρμογής ενός ρινικού σπρέι που περιείχε προβιοτικά (Tamime, 2005),
- τη μείωση της ουλίτιδας και της αιμορραγίας των ούλων με μαστίχα που περιείχε *L. reuteri* (Twenman *et al.*, 2009), καθώς και τη μείωση του παθογόνου μικροοργανισμού της στοματικής κοιλότητας *Streptococcus mutan*, με την τακτική κατανάλωση προβιοτικού παγωτού που περιείχε *Bifidobacterium lactis* BB12



(Çaglar *et al.*, 2008). Επίσης, η χρησιμοποίηση του προβιοτικού στελέχους *L. rhamnosus* GG μαζί με την καλλιέργεια εκκίνησης στην παρασκευή τυριού μπορεί να έχει ευεργετική επίδραση στην οδοντική τερηδόνα (Tamime, 2005),

- την εφαρμογή των προβιοτικών για τη θεραπεία και την πρόληψη χειρουργικών μολύνσεων. Μελέτες έδειξαν ότι ο *L. fermentum* RC-14 ανέστειλε σημαντικά τη μόλυνση από *S. aureus* (Gupta & Garg, 2009),
- τη ρύθμιση της φλεγμονής που σχετίζεται με τη ρευματοειδή αρθρίτιδα, με τη χρήση προβιοτικών (Parvez *et al.*, 2006),
- τη μείωση της έναρξης του συστηματικού φλεγμονώδους επαγόμενου διαβήτη με την προσθήκη προβιοτικών στη διατροφή για εβδομάδες (Aggarwal *et al.*, 2013),
- την εμπόδιση της παθογένειας της ηπατικής εγκεφαλοπάθειας με τη χορήγηση προβιοτικών μικροοργανισμών όπως bifidobacteria, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. casei*, και *E. faecium* που μπορεί να παρέχουν θεραπευτικό αποτέλεσμα με πολλαπλούς μηχανισμούς δράσης που αφορούν τη μείωση της πίεσης στην πυλαία κυκλοφορία και του κινδύνου αιμορραγίας (Parvez *et al.*, 2006; Granato *et al.*, 2010b), και
- τη σημαντική μείωση του λίπους στην κοιλιακή κοιλότητα και στις περιοχές υποδόριου λίπους, του βάρους του σώματος, της περιμέτρου της μέσης, της περιμέτρου του ισχίου, και της λιπώδους μάζας του σώματος με την χορήγηση των προβιοτικών *L. gasseri* LG2055 (Aggarwal *et al.*, 2013).

### 3 Ζυμωμένα γάλατα

Τα ζυμωμένα γάλατα παρασκευάζονται ευρέως σε όλο τον κόσμο και περίπου 400 γενικής χρήσης ονόματα συναντώνται σε παραδοσιακά και εμπορικά προϊόντα. Είναι πολύ δημοφιλή λόγω των ιδιαίτερων οργανοληπτικών χαρακτηριστικών τους, των ωφελειών τους για την υγεία, και της μεγάλης διάρκειας ζωής τους (Saint-Eve *et al.*, 2006; de Almeida *et al.*, 2008; Mohammadi *et al.*, 2012). Τα ζυμωμένα γάλατα και ιδιαίτερα η γιαούρτη, θεωρούνται ως τα κύρια προϊόντα ενσωμάτωσης των προβιοτικών μικροοργανισμών (Ranadheera *et al.*, 2010). Οι προβιοτικές καλλιέργειες μπορούν να αναπτυχθούν σε γάλατα πολλών ειδών ζώων αλλά τις περισσότερες φορές η ανάπτυξή τους είναι αργή (Champagne, 2009). Οι περισσότερες μελέτες που υπάρχουν στη βιβλιογραφία διεξήχθησαν σε αγελαδινό γάλα και, εκτός αν εκφράζεται διαφορετικά, ο όρος "γάλα" θα αναφέρεται στο αγελαδινό γάλα. Τα τελευταία χρόνια ορισμένα προϊόντα γιαούρτης περιλαμβάνουν ζωντανά στελέχη των *L. acidophilus* και *Bifidobacterium* spp. (γνωστά ως AB-καλλιέργεια) επιπλέον της συμβατικής καλλιέργειας εκκίνησης της γιαούρτης (Lourens-Hattingh & Viljoen, 2001b). Η επεξεργασία της όμως με συμπληρωματικές προβιοτικές καλλιέργειες δεν είναι εύκολη, ιδίως όσο αφορά τη διατήρηση της ζωτικότητάς τους (Corcoran *et al.*, 2008; Cruz *et al.* 2012). Τα προβιοτικά βακτήρια είναι πιο απαιτητικοί οργανισμοί αναφορικά με την ανάπτυξή τους από ότι οι καλλιέργειες εκκίνησης (Champagne, 2009).

Διάφορες μελέτες έχουν αποδείξει ότι οι παραδοσιακές καλλιέργειες γιαούρτης εμφανίζουν περιορισμένη ικανότητα επιβίωσης στο γαστρεντερικό σωλήνα (Plessas *et al.*, 2012). Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι η επιβίωση των bifidobacteria στη γιαούρτη είναι βραχύτερη από εκείνη των *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* και *S. thermophilus* (Ibrahim & Carr, 2006). Σύμφωνα με τους Lourens-Hattingh & Viljoen (2001b), η επιβίωση των προβιοτικών βακτηρίων στα γιαούρτια είναι χαμηλότερη από εκείνη που απαιτείται για τη συνιστώμενη ημερήσια πρόσληψη, με το φαινόμενο να είναι πιο έντονο στα προβιοτικά γιαούρτια που έχουν ενσωματωθεί bifidobacteria ή *L. acidophilus* (Shah, 2000).

Η γιαούρτη είναι το πιο δημοφιλές ζυμωμένο γαλακτοκομικό προϊόν στον κόσμο (Korbekandi *et al.*, 2011). Η λέξη "yoghurt" προέρχεται από την τουρκική λέξη "jugurt" και είναι ένα παραδοσιακό τρόφιμο και ρόφημα των περιοχών των Βαλκανίων και της Μέσης Ανατολής (Sarkar, 2008). Περιγράφει κάθε ζυμωμένο τρόφιμο με όξινη γεύση (Hussain *et al.*, 2009). Σύμφωνα με τους οργανισμούς FAO/WHO (1977) η γιαούρτη ορίζεται ως "πηγμένο γαλακτοκομικό προϊόν που παράγεται με γαλακτική ζύμωση γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων (παστεριωμένο ή συμπυκνωμένο γάλα), με τη δράση των *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* και *Streptococcus thermophilus*, με ή χωρίς προαιρετικές προσθήκες, δηλαδή γάλα σε σκόνη, αποβουτυρωμένο γάλα σε σκόνη, ορός γάλακτος σε σκόνη, κλπ.". Επίσης, σύμφωνα με τους οργανισμούς FAO/WHO (1972) εκτός από την κανονική καλλιέργεια γιαούρτης επιτρέπεται η χρήση και άλλων κατάλληλων οξυγαλακτικών βακτηρίων ως συμπληρωματική χλωρίδα.

Όταν η γιαούρτη δεν υφίσταται θερμική επεξεργασία μετά τη ζύμωση, πρέπει να περιέχει μεγάλο πληθυσμό και των δύο βακτηρίων. Τα κριτήρια των παραγωγών γιαούρτης (National Yogurt Association) των Η.Π.Α. για "ζωντανή και ενεργή καλλιέργεια γιαούρτης" απαιτούν το προϊόν να περιέχει 100 εκατομμύρια ( $10^8$ )

μικροοργανισμούς ανά γραμμάριο που να εξακολουθούν να είναι ζωντανοί σε όλη τη διάρκεια ζωής του προϊόντος. Ωστόσο επιτρέπεται η θερμική επεξεργασία μετά τη ζύμωση η οποία μπορεί να σκοτώσει μέρος ή το σύνολο των οξυγαλακτικών βακτηρίων (Czinn & Blanchard, 2008).

Στη γιαούρτη έχει αναφερθεί η ενσωμάτωση των συνδυασμών bifidobacteria, *B. bifidum*, *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* και των *B. bifidum*, *L. acidophilus* *L. reuterii* μαζί με τις καλλιέργειες γιαούρτης. Τέλος, έχει προταθεί ο συνδυασμός των προπιονικών βακτηρίων με καλλιέργειες γιαούρτης ή με καλλιέργειες εκκίνησης όπως οι *L. acidophilus*, *B. bifidum* και *Lc. citrovorum* για την ενίσχυση της επιβίωσης αυτών των μικροοργανισμών στον εντερικό σωλήνα του ανθρώπου (Sarkar, 2008).

Η μοναδικότητα της γιαούρτης οφείλεται στη συμβιωτική ζύμωση που εμπλέκεται στην παρασκευή της. Η σύνθεσή της εξαρτάται από το είδος και την προέλευση του γάλακτος και μια σειρά από παράγοντες όπως η εποχή, η γαλακτική περίοδος και ο τρόπος σίτισης των ζώων. Επίσης, επηρεάζεται σημαντικά από τις συνθήκες παρασκευής (όπως η θερμοκρασία, διάρκεια επώασης και ο χρησιμοποιούμενος εξοπλισμός) και από την παρουσία άλλων συστατικών, όπως το γάλα σε σκόνη ή το συμπυκνωμένο γάλα (Hussain *et al.*, 2009).

Κατά την παραγωγή των προβιοτικών ζυμωμένων γαλάτων, πρέπει να ληφθούν υπόψη αρκετοί παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων των εξής (Tamime, 2005):

- πολλά προβιοτικά στελέχη αναπτύσσονται αργά σε γάλα που δεν έχει ενισχυθεί με πρόσθετες ύλες,
- οι συνθήκες παραγωγής (ιδίως οι παραδοσιακές θερμοκρασίες ζύμωσης) είναι συχνά ακατάλληλες για την ανάπτυξη των προβιοτικών βακτηρίων, και
- οι μεταβολίτες των προβιοτικών μικροοργανισμών μπορεί να είναι ανεπιθύμητοι λόγω της δυσάρεστης γεύσης που προσδίδουν στα προϊόντα (π.χ. τα bifidobacteria παράγουν οξικό οξύ, το οποίο προσδίνει γεύση ξιδιού).

### **3.1 Ικανότητα οξίνισης των προβιοτικών μικροοργανισμών εκκίνησης**

Τα προβιοτικά βακτήρια από μόνα τους δεν μπορούν να ζυμώσουν επαρκώς το γάλα λόγω της βραδείας ανάπτυξής τους. Παρόλο που παράγουν σε σημαντικό βαθμό το ένζυμο β-γαλακτοσιδάση, η χαμηλή συγκέντρωση των ελεύθερων αμινοξέων και των μικρών πεπτιδίων στο γάλα έχει ως αποτελέσματα τη βραδεία ανάπτυξη των προβιοτικών βακτηρίων και την ανεπαρκή ζύμωση και οξίνιση του γάλακτος (Korbekandi *et al.*, 2011). Έχει αποδειχθεί ότι η παραγωγή οξέος από τις καλλιέργειες γιαούρτης εξαρτάται από το βακτηριακό στέλεχος, και ότι ο *S. thermophilus* σε συνδυασμό με *B. adolescentis* παράγει μεγαλύτερη ποσότητα οξέος. Έχει επίσης παρατηρηθεί ότι ο συνδυασμός του *B. adolescentis* με το *S. thermophilus* παράγει μεγαλύτερη ποσότητα οξέος απ' ό τι με το *L. acidophilus* (Sarkar, 2008).

Η βραδεία παραγωγή οξέος από τα προβιοτικά βακτήρια οδηγεί σε μεγάλους χρόνους ζύμωσης στα ζυμωμένα προϊόντα. Οι κύριες μέθοδοι για τη βελτίωση του ρυθμού οξίνισης του γάλακτος από τις προβιοτικές καλλιέργειες εκκίνησης είναι (Mohammadi *et al.*, 2012):

- η χρήση προβιοτικών στελεχών με μεγαλύτερη ικανότητα οξίνισης,
- η προσθήκη αυξητικών παραγόντων και αυξητικών υποκινητών στο γάλα, και
- η χρήση συμπληρωματικών καλλιεργειών εκκίνησης.

Το πρόβλημα της βραδείας αύξησης της οξύτητας θα μπορούσε να επιλυθεί με την ενσωμάτωση 0,5% υδρολυμένων πρωτεϊνών ή 3% ινουλίνης στο γάλα. Έχει προταθεί η διαδικασία ζύμωσης δύο σταδίων που περιλαμβάνει καλλιέργειες γιαούρτης κατά το αρχικό στάδιο για ταχεία οξίνιση, ακολουθούμενη από ένα δεύτερο στάδιο ζύμωσης με προβιοτικές καλλιέργειες, όπως οι *L. gasseri* και *B. infantis* (Sarkar, 2008). Οι Hadadji & Bensoltane (2006) ανέφεραν ενίσχυση της οξίνισης μετά από μικτό ενοφθαλμισμό του γάλακτος με *B. longum* και *L. acidophilus* και επώαση στους 45 °C.

## 3.2 Παρασκευή προβιοτικής γιαούρτης

Η γιαούρτη παρασκευάζεται ως φυσική/συνεκτική, αναμιγμένη, ή ως ρόφημα. Τα προϊόντα μπορεί να είναι αρωματισμένα ή όχι με προσθήκη φρούτων ή αποσταγμάτων φρούτων και χρώματος. Τα στάδια παραγωγής των προβιοτικών γιαουρτιών είναι παρόμοια με εκείνα της «κλασικής» γιαούρτης, αλλά η φυσική/πλήρης προβιοτική γιαούρτη έχει ελαφρώς πιο γλυκιά γεύση και ο χρόνος ζύμωσής της είναι ελαφρώς μεγαλύτερος σε σύγκριση με το «κλασικό» προϊόν (Tamime, 2005).

Η προετοιμασία του γάλακτος για την παραγωγή της γιαούρτης είναι ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη τόσο της καλλιέργειας εκκίνησης όσο και της προβιοτικής καλλιέργειας (Lourens-Hattingh & Viljoen, 2001b) και διαφέρει ανάλογα με τη συγκέντρωση των στερεών συστατικών και τη διαδικασία θέρμανσης/ομογενοποίησης του γάλακτος. Δεν υπάρχουν πολλά επιστημονικά δεδομένα σχετικά με την επίδραση της θερμικής επεξεργασίας του γάλακτος στην ανάπτυξη των προβιοτικών βακτηρίων, αλλά μπορεί να ισχυριστεί κανείς ότι οι τάσεις είναι παρόμοιες με εκείνες που παρατηρούνται στις καλλιέργειες εκκίνησης. Οι λακτοβάκιλλοι αναπτύσσονται πολύ καλύτερα σε γάλα που έχει προηγουμένως θερμανθεί στους 95 °C για 5 λεπτά (Champagne, 2009).

Τα διάφορα προϊόντα γιαούρτης που παρασκευάζονται διαφέρουν ως προς την υφή και τη σύσταση. Η φυσική/συνεκτική, η αναμιγμένη και η πόσιμη γιαούρτη διαφέρουν ως προς τη περιεκτικότητά τους σε μη λιπαρά στερεά συστατικά (Non Fat Milk Solids-NFMS): 16-18%, 13-14% και 11-12%, αντίστοιχα. Τα μη λιπαρά στερεά συστατικά του γάλακτος επηρεάζουν τους πληθυσμούς των βακτηριακών στελεχών στα προϊόντα γιαούρτης, καθώς και τις αναλογίες μεταξύ των στελεχών αυτών (Champagne, 2009). Λόγω της θερμοφίλης φύσης της κλασικής καλλιέργειας εκκίνησης, η ζύμωση του γάλακτος διενεργείται συνήθως μεταξύ 40 και 45 °C και ο χρόνος που απαιτείται μπορεί να είναι σύντομος ≈ 2,5 ώρες (Heller, 2001). Όταν χρησιμοποιούνται μικτές προβιοτικές καλλιέργειες, και ιδιαίτερα όταν η καλλιέργεια της γιαούρτης συγκαλλιεργηθεί με

προβιοτικές καλλιέργειες, η επιλογή της κατάλληλης θερμοκρασία ζύμωσης αποτελεί πολύ σημαντικό παράγοντα (Mohammadi *et al.*, 2012).

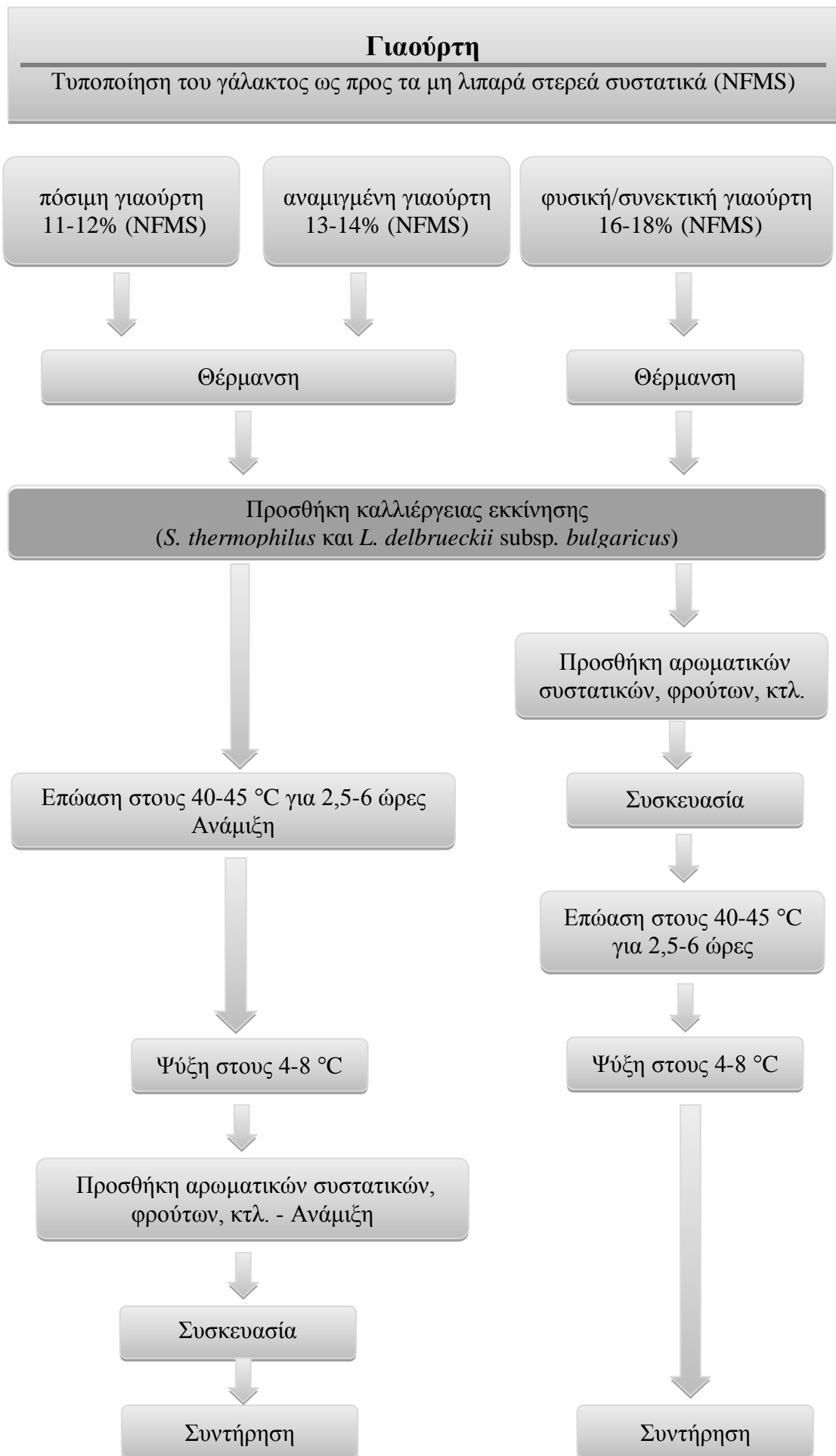
Η χαμηλής οξύτητας γιαούρτη παράγεται με τη χρησιμοποίηση θερμοφίλης καλλιέργειας αποτελούμενης από *S. thermophilus* και ένα είδος *Lactobacillus*, συνήθως το *L. acidophilus*. Απαιτούνται όμως 6-8 ώρες ζύμωσης, κυρίως λόγω της χρήσης του *L. acidophilus* ως συστατικό της καλλιέργειας εκκίνησης. Σε κάθε περίπτωση όμως, είναι αναγκαίο το τελικό pH της γιαούρτης να διαμορφώνεται σε επίπεδα < 4,8 ώστε να διασφαλίζεται ο σχηματισμός σταθερού πήγματος. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό και για τη φυσική/συνεκτική γιαούρτη (Heller, 2001).

Η αναμιγμένη και η πόσιμη γιαούρτη είναι κατάλληλες για την προσθήκη προβιοτικών μετά από τη ζύμωση. Τα προβιοτικά μπορούν να προστεθούν εύκολα κατά τη διάρκεια της ανάδευσης του προϊόντος αμέσως πριν από την πλήρωση των περιεκτών (Σχήμα 1). Στη φυσική/συνεκτική γιαούρτη τα προβιοτικά βακτήρια πρέπει να είναι παρόντα κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, διότι η ζύμωση πραγματοποιείται στους τελικούς περιέκτες και η μετέπειτα ανάδευση θα κατέστρεφε την υφή του προϊόντος (Champagne, 2009).

Η πόσιμη γιαούρτη, που κατηγοριοποιείται ως αναμιγμένη γιαούρτη με χαμηλό ιξώδες, είναι ένα αναπτυσσόμενο προϊόν με μεγάλο ενδιαφέρον, τόσο για τη βιομηχανία όσο και για τους καταναλωτές, λόγω κυρίως της ευκολίας στη μεταφορά (Allgeyer *et al.*, 2010).

Οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί μπορούν να ενσωματωθούν σε ζυμωμένο γάλα χρησιμοποιώντας διαφορετικές μεθόδους:

- Η πιο κοινή πρακτική είναι η προσθήκη των προβιοτικών μικροοργανισμών μαζί με τις καλλιέργειες εκκίνησης, δηλαδή ως DVI (Direct to Vat Inoculation) καλλιέργεια. Η συγκαλλιέργεια αυτή οδηγεί σε μείωση της επιβίωσης των προβιοτικών μικροοργανισμών, επειδή η καλλιέργεια της γιαούρτης αναπτύσσεται ταχύτερα κατά τη διάρκεια της ζύμωσης και περιορίζει την ανάπτυξη και τη δραστηριότητα των προβιοτικών μικροοργανισμών μέσω της παραγωγής ανασταλτικών ουσιών (Mohammadi *et al.*, 2012).
- Η προσθήκη προβιοτικών μικροοργανισμών μετά τη ζύμωση. Σε αυτήν τη διαδικασία, τα προβιοτικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται ξεχωριστά σε κατάλληλο υπόστρωμα και κατόπιν τα ενεργά κύτταρα ενοφθαλμίζονται στη γιαούρτη που παράγεται από τους παραδοσιακούς μικροοργανισμούς εκκίνησης. Με τη χρήση της μεθόδου αυτής, μειώνεται σημαντικά ο χρόνος επώασης (Modler & Villa-Garcia, 1993; Korbekandi *et al.*, 2011). Οι Modler & Villa-Garcia (1993) ανέφεραν ότι η ξεχωριστή διαδικασία ανάπτυξης των *Bifidobacterium* spp., που ακολουθείται από την έκπλυση των ελεύθερων μεταβολιτών και τη μεταφορά των κυττάρων στη γιαούρτη, αποτελεί την ιδανική μέθοδο ενσωμάτωσης των προβιοτικών βακτηρίων.



**Σχήμα 1.** Διαδικασία παρασκευής διαφόρων τύπων γιαούρτης (Heller, 2001)

Ωστόσο, υπάρχουν κάποιες ενδείξεις ότι η ενσωμάτωση των προβιοτικών μικροοργανισμών μετά τη ζύμωση μειώνει την προσαρμοστικότητα τους και ενδέχεται όταν εκτεθούν σε στρεσογόνες καταστάσεις (χαμηλό pH, υψηλή τιτλοδοτούμενη οξύτητα και υπεροξειδίο του υδρογόνου), να οδηγηθούν σε δραματική μείωση του πληθυσμού τους (Mohammadi *et al.*, 2012).

- Η διαδοχική ζύμωση, κατά την οποία η προβιοτική καλλιέργεια προστίθεται νωρίτερα από ότι η καλλιέργεια γιαούρτης ή προστίθενται ταυτόχρονα, με διαδοχική μεταβολή της θερμοκρασία επώασης που είναι ευνοϊκή για την προβιοτική καλλιέργεια ή την καλλιέργεια εκκίνησης (Shah, 2000). Στη μία περίπτωση, η ζύμωση πραγματοποιείται αρχικά από την προβιοτική καλλιέργεια («στάδιο αρχικής ζύμωσης» που διαρκεί περίπου 2 ώρες), και ακολουθεί η ολοκλήρωση της ζύμωσης με ένα ή και τα δύο βακτήρια της γιαούρτης «στάδιο τελικής ζύμωσης». Η διαδικασία αυτή είναι γνωστή ως «ζύμωση δύο-σταδίων» και επιτρέπει τους προβιοτικούς μικροοργανισμούς να φθάσουν στο τελικό στάδιο της φάσης υστέρησης τους ή το πρώιμο στάδιο της λογαριθμικής φάσης της ανάπτυξής τους, με αποτέλεσμα σημαντικά μεγαλύτερους πληθυσμούς προβιοτικών βακτηρίων στο τέλος της ζύμωσης, που διαρκεί περίπου 6 ώρες. Ωστόσο, ο χρόνος της ζύμωσης είναι ελαφρώς μεγαλύτερος από εκείνο της παραδοσιακής διαδικασίας ζυμώσεως (Mohammadi *et al.*, 2012). Επίσης η διαδοχική ζύμωση μπορεί να πραγματοποιηθεί με την αλλαγή της θερμοκρασίας κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Για παράδειγμα, μπορεί να ξεκινήσει στους 37 °C επιτρέποντας στα προβιοτικά να κυριαρχήσουν στο μέσο, ακολουθούμενη από τη σταδιακή αύξηση της, στους 40 °C, 42 °C, ή 44 °C, σε δύο ή περισσότερα στάδια, ώστε να βελτιωθεί η υφή και η γεύση του προϊόντος (Shafiee *et al.*, 2010).
- Οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως καλλιέργεια εκκίνησης. Ωστόσο, ο χρόνος ζύμωσης μπορεί να παραταθεί 8-24 ώρες σε σύγκριση με το χρόνο ζύμωσης των παραδοσιακών καλλιεργειών γιαούρτης (Saarela *et al.*, 2000; Ostlie *et al.*, 2003). Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα χρήσης μόνο της προβιοτικής καλλιέργειας είναι η παρασκευή του *Yakult*, το οποίο ζυμώνεται με *L. casei* Shirota (Tamime, 2005).

Συνήθως υπάρχουν δύο μέθοδοι ενοφθαλμισμού των προβιοτικών καλλιεργειών σε τρόφιμα και ποτά (Champagne, 2009):

- ο (DVI) ενοφθαλμισμός στο υπόστρωμα του τροφίμου, από συμπυκνωμένες κατεψυγμένες ή λυοφιλιωμένες καλλιέργειες, και
- οι υγρές καλλιέργειες που παρασκευάζονται σε δεξαμενές παραγωγής καλλιεργειών εκκίνησης.

Σε σύγκριση με τις λυοφιλιωμένες καλλιέργειες, η χρήση των κατεψυγμένων προβιοτικών καλλιεργειών μειονεκτεί σε σχέση με το χρόνο συντήρησης, τη θερμοκρασία αποθήκευσης και την ευκολία της δειγματοληψίας. Η κατεψυγμένη καλλιέργεια μπορεί να προστεθεί απευθείας στο υγρό υπόστρωμα. Μολονότι οι λυοφιλιωμένες καλλιέργειες είναι πολύ πιο εύκολο να μεταφερθούν και να συντηρηθούν απ' ότι οι κατεψυγμένες, η χρήση τους στη μονάδα επεξεργασίας τροφίμων είναι πιο δύσκολη (Liu & Luo, 2002). Τέσσερις παράμετροι επηρεάζουν τον πληθυσμό των προβιοτικών μικροοργανισμών κατά την προσθήκη μιας σκόνης σε ένα υπόστρωμα τροφίμου: η φύση του τροφίμου ή

το υπόστρωμα του ροφήματος, η θερμοκρασία ενυδάτωσης, η αναλογία σκόνης-υγρού και ο χρόνος ενυδάτωσης (Champagne, 2009).

Επίσης, το μέγεθος του ενοφθαλμίσματος των προβιοτικών βακτηρίων είναι ένας σημαντικός παράγοντας για την εξασφάλιση επαρκούς πληθυσμού ζωντανών κυττάρων στο τελικό προϊόν (Shah, 2000). Λόγω της κακής τους ανάπτυξης στο γάλα, το μέγεθος του ενοφθαλμισμού για τους προβιοτικούς μικροοργανισμούς είναι συνήθως μεγαλύτερο (5-10%) από ότι απαιτείται για τις καλλιέργειες εκκίνησης της γιαούρτης, δηλαδή των *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* και *S. thermophilus*, που συνήθως προστίθενται σε ποσοστό 1% (v/v) (Vasiljevic & Shah, 2008). Η χρήση ενός υψηλού μεγέθους ενοφθαλμισμού, εξασφαλίζει ένα υψηλό αριθμό κυττάρων στο τέλος της επώασης και την επιβίωση των προβιοτικών βακτηρίων κατά τη συντήρηση μέχρι την κατανάλωση (Lourens-Hattingh & Viljoen, 2001b).

Ο λόγος ενοφθαλμισμού μεταξύ της προβιοτικής καλλιέργειας και της καλλιέργειας γιαούρτης είναι ένας άλλος βασικός παράγοντας. Η χαμηλή αναλογία των βακτηρίων εκκίνησης της γιαούρτης σε σχέση με τους προβιοτικούς μικροοργανισμούς μπορεί να οδηγήσει σε μεγαλύτερο χρόνο ζύμωσης καθώς και σε μη ικανοποιητικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Αντίθετα, ένα υψηλό ποσοστό βακτηρίων γιαούρτης σε σχέση με τα προβιοτικά βακτήρια οδηγεί στην κυριαρχία των πρώτων και στην υπεροξίνιση από το *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* με αποτέλεσμα τη μειωμένη επιβίωση των προβιοτικών βακτηρίων (Korbekandi *et al.*, 2011; Mortazavian *et al.*, 2011; Shafiee *et al.*, 2011).

Εκτός από το μέγεθος του ενοφθαλμισμού, πρέπει να δίνεται σημασία στη συγκέντρωση βιώσιμων κυττάρων ανά χιλιοστόλιτρο του ενοφθαλμίσματος, επειδή η αύξηση του αριθμού των βιώσιμων κυττάρων ανά γραμμάριο ή χιλιοστόλιτρο σε ένα σταθερό μέγεθος ενοφθαλμίσματος, αυξάνει την τελική μέτρηση των ενοφθαλμισμένων κυττάρων σε ορισμένο όγκο γάλακτος (Mortazavian *et al.*, 2011).

Επιπλέον, το αποτέλεσμα εξαρτάται από τη σύνθεση του προϊόντος καθώς και τη θερμοκρασία ζύμωσης. Η υπερβολική αύξηση του μεγέθους του ενοφθαλμισμού σε ένα μέσο που στερείται θρεπτικής αξίας μπορεί να οδηγήσει σε αντίθετα αποτελέσματα όσο αφορά στην επιβίωση του μικροοργανισμού. Επομένως, η επιβίωση των μικροοργανισμών εκκίνησης μπορεί να μειωθεί λόγω του ανταγωνισμού σε θρεπτικά συστατικά και των ανταγωνιστικών σχέσεων μεταξύ τους (Mohammadi *et al.*, 2012).

### **3.3 Παράγοντες που επηρεάζουν τους προβιοτικούς μικροοργανισμούς κατά την παρασκευή γιαούρτης**

Πολλές είναι οι παράμετροι που επηρεάζουν την ανάπτυξη των προβιοτικών μικροοργανισμών στη γιαούρτη κατά την παραγωγική διαδικασία (Πίνακας 8). Αυτό σημαίνει ότι η τυποποίηση είναι απαραίτητη για την επίτευξη επαναλήψιμων αποτελεσμάτων (Champagne, 2009).



Πίνακας 8. Παράμετροι που επηρεάζουν την ανάπτυξη των προβιοτικών βακτηρίων στη γιαούρτη (Champagne, 2009)

Κατηγορίες	Παράμετροι
<i>Μείγμα γάλακτος</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ζωική προέλευση</li> <li>- Προεπεξεργασία κατά τη διάρκεια συντήρησης του νοπού γάλακτος</li> <li>- Μη λιπαρά στερεά συστατικά</li> <li>- Αυξητικά συμπληρώματα</li> <li>- Περιεκτικότητα ζάχαρης</li> <li>- Γεύσεις και φρούτα</li> <li>- Συντηρητικά</li> <li>- Παράμετροι θέρμανσης</li> <li>- Οξειδοαναγωγικό επίπεδο</li> </ul>
<i>Επώαση</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Συμβατοί μικροοργανισμοί εκκίνησης</li> <li>- Μορφή προβιοτικών ή μικροοργανισμών εκκίνησης (υγρή, DVI)</li> <li>- Παράμετροι ενυδάτωσης (στερεά, χρόνος θερμοκρασία,) σε περίπτωση λυοφιλιωμένης DVI καλλιέργειας</li> <li>- Μέγεθος ενοφθαλμισμού προβιοτικών ή μικροοργανισμών εκκίνησης (cfu/mL)</li> <li>- Στιγμή ενοφθαλμισμού</li> <li>- Θερμοκρασία επώασης</li> <li>- Χρόνος επώασης</li> </ul>
<i>Συντήρηση</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- pH (σε απλή γιαούρτη και μετά την προσθήκη φρούτων)</li> <li>- Στιγμή ενοφθαλμισμού</li> <li>- Περιεκτικότητα <i>L. bulgaricus</i> και δραστηριότητα (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, υπεροξίνιση)</li> <li>- Οξειδοαναγωγικό επίπεδο</li> <li>- Προσθήκη αντιοξειδωτικών</li> <li>- Συσκευασία (ιδιαίτερα η διαπερατότητα στο O<sub>2</sub>)</li> <li>- Εγκαυλίωση</li> </ul>

### 3.3.1 Αλληλοεπιδράσεις μεταξύ προβιοτικών μικροοργανισμών και καλλιιεργειών εκκίνησης

Μία από τις πιο σημαντικές πτυχές στα ζυμωμένα γαλακτοκομικά προϊόντα είναι οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των καλλιιεργειών εκκίνησης και των προβιοτικών μικροοργανισμών. Τα προβιοτικά βακτήρια δεν είναι σε θέση να ζυμώσουν επαρκώς το γάλα, γι' αυτό είναι κοινή πρακτική η προσθήκη παραδοσιακών καλλιιεργειών γιαούρτης (π.χ., *S. thermophilus*) μαζί με αυτά, οι οποίες ονομάζονται "καλλιέργειες υποστήριξης" ή "συμπληρωματικές καλλιέργειες" (Sarkar, 2008). Τα βακτήρια γιαούρτης μπορεί να έχουν συνεργό ή ανταγωνιστική δράση με τα προβιοτικά βακτήρια, ανάλογα με τα στελέχη τους, τα στελέχη των προβιοτικών, καθώς και τη σύνθεση και τις συνθήκες επεξεργασίας του προϊόντος (Oliveira *et al.*, 2001; Shihata & Shah, 2002).

Η ανάπτυξη του *B. bifidum* εξαρτάται από διάφορα οξυγαλακτικά βακτήρια. Από τα 17 στελέχη *bifidobacteria* που καλλιιεργήθηκαν σε γάλα, τα 15 απέτυχαν να επιβιώσουν. Ο ρυθμός ανάπτυξης του *L. acidophilus* δεν επηρεάζεται από το *B. bifidum*, αλλά η ανάπτυξη του *B. bifidum* καταστέλλεται εκτός εάν ο αρχικός ενοφθαλμισμός είναι σε αναλογία  $10^4:10^3$  (*B. bifidum*: *L. acidophilus*). Επίσης ο *S. thermophilus* δρα ως συλλέκτης οξυγόνου στην προβιοτική γιαούρτη και είναι επωφελής για την ανάπτυξη των *Bifidobacterium* spp. (Lourens-Hattingh & Viljoen, 2001b).

Η αργή ανάπτυξη των προβιοτικών μικροοργανισμών στο γάλα έχει ως αποτέλεσμα τον κίνδυνο ανάπτυξης ανεπιθύμητων μικροοργανισμών, οι οποίοι μπορούν να παράγουν δυσάρεστες γεύσεις (Lee & Salminen, 2009). Η βελτίωση των συνθηκών ανάπτυξης των προβιοτικών βακτηρίων μπορεί να επιτευχθεί με την παραγωγή ουσιών που ευνοούν την ανάπτυξη τους ή μειώνουν κάποιους αναστολείς. Ωστόσο, η επιβίωση των προβιοτικών βακτηρίων μπορεί να επηρεάζεται από τους μεταβολίτες που σχηματίζονται από τα βακτήρια των καλλιιεργειών εκκίνησης, στους οποίους περιλαμβάνονται το γαλακτικό οξύ, υπεροξειδίο υδρογόνου, βακτηριοσίνες, ακόμα και πτητικές ενώσεις (Mortazavian *et al.*, 2011).

### 3.3.2 Παράγοντες στην προβιοτική γιαούρτη που επηρεάζουν την ανάπτυξη των προβιοτικών μικροοργανισμών

Η επιβίωση των προβιοτικών βακτηρίων στη γιαούρτη μπορεί να επηρεαστεί σημαντικά από τη σύνθεση του προϊόντος και τους διάφορους παράγοντες επεξεργασίας κατά τη διάρκεια της παραγωγής, καθώς και κατά τη διάρκεια της συντήρησης του προϊόντος.

### 3.3.2.1 Το pH και η οξύτητα του ζυμωμένου γάλακτος και του τελικού προϊόντος

Το χαμηλό pH και η οξύτητα είναι οι πιο σημαντικοί παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη και την επιβίωση των προβιοτικών βακτηρίων στα προϊόντα ζύμωσης. Το βέλτιστο pH για την ανάπτυξη του *L. acidophilus* είναι 5,5 έως 6,0, με την ανάπτυξη των κυττάρων του να επιβραδύνεται σημαντικά σε pH μικρότερο από 5,5 (Mohammadi & Mortazavian, 2011), ενώ για τα bifidobacteria το βέλτιστο pH ανάπτυξης κυμαίνεται από 6,0 έως 7,0 (de Vuyst, 2000). Ο *L. acidophilus* είναι πιο ανθεκτικός σε όξινες συνθήκες από ότι ο *B. bifidum* (Champagne, 2009), ενώ η ανθεκτικότητα των *Bifidobacterium* spp. σε όξινες συνθήκες είναι ειδική του κάθε στελέχους (Mohammadi *et al.*, 2012). Γενικά, τα περισσότερα στελέχη του γένους bifidobacteria είναι ευαίσθητα σε τιμές pH κάτω του 4,6. Ως εκ τούτου, η τιμή του pH του τελικού προϊόντος θα πρέπει να διατηρείται πάνω από 4,6 προς αποφυγή της μείωσης των πληθυσμών bifidobacteria (Champagne, 2009). Το *B. animalis* subsp. *lactis* έχει την μεγαλύτερη ανθεκτικότητα σε όξινες συνθήκες και για το λόγο αυτό χρησιμοποιείται κατά προτίμηση σε προϊόντα "bifidus". Η χρήση του *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* στη γιαούρτη μπορεί να επηρεάσει την επιβίωση των *L. acidophilus* και *Bifidobacterium* λόγω της παραγωγής υπεροξειδίου του υδρογόνου και οξέων κατά τη ζύμωση. Ωστόσο, λόγω της πρωτεολυτικής του φύσης ο *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* μπορεί να απελευθερώσει τα αμινοξέα βαλίνη, γλυκίνη και ιστιδίνη που απαιτούνται για την υποστήριξη της ανάπτυξης των bifidobacteria (Vasiljevic & Shah, 2008).

Η επιβίωση των ειδών *Lactobacillus* και *Bifidobacterium* μειώνεται σημαντικά κατά τη διάρκεια της συντήρησης υπό ψύξη σε χαμηλά επίπεδα pH (Ali *et al.*, 2013). Έχει αναφερθεί μεγαλύτερη σταθερότητα κατά τη διάρκεια της συντήρησης της γιαούρτης των *B. longum* και *L. fermentum* απ' ότι το *B. infantis*, των *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* και *B. bifidum* από τις παραδοσιακές καλλιέργειες γιαούρτης, του *L. acidophilus* απ' ότι το *L. rhamnosus*, του *B. animalis* από το *B. longum*, του *B. animalis* subsp. *lactis* από τους *B. longum*, *B. breve*, *B. bifidum* και *B. adolescentis* και των *L. acidophilus* και *L. paracasei* από το *B. lactis* (Sarkar, 2008).

Η περιεκτικότητα σε οξέα των ζυμωμένων γαλάτων είναι σε άμεση συσχέτιση με την τιμή του δυναμικού οξειδοαναγωγής (Oliveira *et al.*, 2001). Γενικώς, τα προβιοτικά βακτήρια είναι πιο ευαίσθητα σε καταπονήσεις που σχετίζονται με το pH (τιμή pH και ρυθμός πτώσης) από ότι στην οξύτητα των ζυμωμένων γαλάτων, η οποία όμως φαίνεται να επηρεάζει την επιβίωση των προβιοτικών μικροοργανισμών κατά τη διάρκεια της συντήρησης σε μεγαλύτερο βαθμό από ότι κατά τη διάρκεια της ζύμωσης (Shafiee *et al.*, 2010).

Η υπεροξίνιση μπορεί να προληφθεί με τον έλεγχο του pH ώστε να είναι μεγαλύτερο από 5, εφαρμόζοντας «θερμικό σοκ» (58 °C επί 5 λεπτά) στη γιαούρτη πριν από την προσθήκη των προβιοτικών καλλιεργειών, μειώνοντας τη θερμοκρασία συντήρησης σε τιμές μικρότερες από 3-4 °C και βελτιώνοντας τη ρυθμιστική ικανότητα της γιαούρτης με την προσθήκη συμπυκνώματος πρωτεΐνης ορού γάλακτος (Lourens-Hattingh & Viljoen, 2001b).

### 3.3.2.2 Το διαλυμένο οξυγόνο και το υπεροξειδίο του υδρογόνου στα ζυμωμένα γαλακτοκομικά προϊόντα

Η παρουσία του οξυγόνου (θετικό δυναμικό οξειδοαναγωγής) σε προβιοτικά προϊόντα μπορεί να έχει αρνητικές συνέπειες στην επιβίωση των προβιοτικών μικροοργανισμών. Τα στελέχη των *L. acidophilus* και *Bifidobacterium* spp. είναι μικροαερόφιλα και αναερόβια, αντίστοιχα. Επιπλέον, στερούνται καταλάσης, και επομένως είναι ανίκανα να μετατρέψουν το υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό (Vasiljevic & Shah, 2008). Η ευαισθησία στο οξυγόνο ποικίλλει σημαντικά μεταξύ διαφορετικών ειδών και στελεχών. Σε γενικές γραμμές, οι λακτοβάκιλλοι είναι πιο ανθεκτικοί στο οξυγόνο από τα bifidobacteria (Kawasaki *et al.*, 2006).

Είναι γνωστό ότι τα βακτήρια των καλλιιεργειών εκκίνησης της γιαούρτης λειτουργούν ως δεσμευτές οξυγόνου καταναλώνοντας το μεγαλύτερο μέρος του οξυγόνου με την ολοκλήρωση της ζυμωτικής εξεργασίας του προϊόντος (Dave & Shah, 1997b). Γενικά, ο *S. thermophilus* δημιουργεί ένα αναερόβιο περιβάλλον που μπορεί να ενισχύσει την ανάπτυξη και την επιβίωση των *Bifidobacterium* όταν χρησιμοποιούνται μαζί στις καλλιέργειες εκκίνησης (Lourens-Hattingh & Viljoen, 2001b).

Η αναμιγμένη γιαούρτη μπορεί να οδηγήσει σε χαμηλά επίπεδα επιβίωσης του προβιοτικού στελέχους σε σύγκριση με τη συνεκτική γιαούρτη, στην περίπτωση που το στέλεχος αυτό έχει μικρότερη αντοχή στο οξυγόνο, επειδή το τελευταίο ενσωματώνεται κατά την ανάμιξη του πολτού φρούτων στη γιαούρτη (Ranadheera *et al.*, 2010).

Έχουν προταθεί διάφορες εναλλακτικές τεχνολογικές λύσεις για την αντιμετώπιση του προβλήματος του οξειδωτικού στρες. Οι σημαντικότερες από αυτές είναι η ολοκλήρωση της ζυμωτικής εξεργασίας υπό κενό (Mohammadi *et al.*, 2011), η προσθήκη αζώτου ταυτόχρονα με την προσθήκη των καλλιιεργειών, ακολουθούμενη από ζύμωση στους 37 °C (Hogiuchi *et al.*, 2009), η προσθήκη αερίων για την τροποποίηση του οξειδοαναγωγικού δυναμικού (Ebel *et al.*, 2011), η χρήση συσκευασίας υπό κενό, η χρήση υλικών συσκευασίας με χαμηλή διαπερατότητα στο οξυγόνο, η προσθήκη αντιοξειδωτικών ουσιών και ουσιών που δεσμεύουν το οξυγόνο στο γάλα (όπως το ασκορβικό οξύ) (Mohammadi *et al.*, 2011).

Επίσης, έχει προταθεί η χρήση ενός ενζυμικού συμπλόκου γλυκόζης - οξειδάσης της γλυκόζης ως εναλλακτική λύση για τη μείωση του διαλυμένου οξυγόνου στα προβιοτικά γιαούρτια και τη διατήρηση του πληθυσμού του *B. longum*. Ωστόσο, η προσθήκη υπερβολικών ποσοτήτων ενζύμου μπορεί να είναι αναποτελεσματική, λόγω της ύπαρξης ανεπαρκούς υποστρώματος (γλυκόζη) για τη δράση του (Cruz *et al.*, 2012). Μερικοί ακόμη τρόποι για τη μείωση των αρνητικών συνεπειών της παρουσίας του οξυγόνου στα προβιοτικά ζυμωμένα γαλακτοκομικά προϊόντα είναι η προσθήκη του *L. lactis* subsp. *lactis* στο γάλα που προορίζεται για την παρασκευή γιαούρτης (Yonezawa *et al.*, 2010; Odamaki *et al.*, 2011), ο έλεγχος της διαδικασίας παραγωγής με σκοπό την ελαχιστοποίηση του διαλυμένου οξυγόνου (Talwalkar *et al.*, 2004; Mohammadi *et al.*, 2011) και η ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών στο οξυγόνο (Li *et al.*, 2010).

### 3.3.2.3 Πρόσθετα

Τα προβιοτικά βακτήρια έχουν αποδειχθεί ότι είναι πιο ανθεκτικά σε πρόσθετες ουσίες από ότι τα οξυγαλακτικά βακτήρια εκκίνησης (Mohammadi *et al.*, 2012). Το χλωριούχο νάτριο μέχρι μία ορισμένη συγκέντρωση (π.χ., 0,5%, αλλά όχι πάνω από 1%) μπορεί να έχει διεγερτική επίδραση στην ανάπτυξη και τη δραστηριότητα των προβιοτικών βακτηρίων στα ζυμωμένα γάλατα (Mortazavian *et al.*, 2010). Τα αιθέρια έλαια που προστίθενται σε τέτοια προϊόντα ως αποστάγματα μπορούν να επηρεάσουν αρνητικά την επιβίωση των εν λόγω βακτηρίων (Mohammadi *et al.*, 2012). Η προσθήκη ζάχαρης στη γιαούρτη σε αναλογία 12% είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση του πληθυσμού του *L. acidophilus* και των bifidobacteria κατά 1 λογάριθμο σε σύγκριση με γιαούρτια που περιείχαν ζάχαρη σε αναλογία 8% (Shah & Ravula, 2000a). Η προσθήκη ασκορβικού οξέος αναφέρθηκε ότι βελτιώνει την επιβίωση του *L. acidophilus* στα γιαούρτια αν και δεν παρουσιάζει καμία επίδραση στα bifidobacteria (Ranadheera *et al.*, 2010).

Η συνεκτική γιαούρτη εμφάνισε σημαντική ικανότητα διατήρησης ενός υψηλότερου πληθυσμού του *L. acidophilus* κατά τη διάρκεια της ζωής της σε σύγκριση με την αναμιγμένη γιαούρτη που περιείχε μούρα ή φρούτα. Ωστόσο, ενδιαφέρον παρουσιάζει η αναμιγμένη γιαούρτη με μάνγκο ή φράουλα στην οποία ο *L. acidophilus* εμφανίζει μεγαλύτερο ποσοστό επιβίωσης από ότι στη συνεκτική γιαούρτη γεγονός που αποδεικνύει την επίδραση διαφορετικών ιδιοτήτων ( π.χ., pH) στην επιβίωση των προβιοτικών βακτηρίων στη γιαούρτη φρούτων (Ranadheera *et al.*, 2010). Οι Emiliane *et al.* (2012) διαπίστωσαν ότι η ενσωμάτωση του *S. boulardii* στα γαλακτοκομικά προϊόντα και η συντήρησή τους στους 4 °C για 4 εβδομάδες, είχε ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη της ζύμης ώστε ο πληθυσμός της να υπερβεί τα 10<sup>7</sup> cfu/g. Ο πληθυσμός της ζύμης ήταν σημαντικά υψηλότερος στη γιαούρτη φρούτου, κυρίως λόγω της παρουσίας της σακχαρόζης και της φρουκτόζης που περιέχεται στο φρούτο. Επίσης, σε ζυμωμένα γάλατα στα οποία είχαν προστεθεί ίνες από λεμόνι και πορτοκάλι παρατηρήθηκε αύξηση του πληθυσμού των *L. acidophilus* και *L. casei* κατά τη διάρκεια της συντήρησης των προϊόντων αυτών υπό ψύξη. Αυτό δεν συνέβη για το *B. bifidum*, πιθανώς λόγω της γνωστής ευαισθησίας των ειδών του γένους bifidobacteria σε όξινο περιβάλλον.

Επίσης τα οξυγαλακτικά βακτήρια είναι σχετικά ανθεκτικά στο διοξείδιο του άνθρακα και ο ρυθμός ανάπτυξής τους δεν επηρεάζεται σημαντικά από το αέριο αυτό (Ostlie *et al.*, 2003). Η παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του γάλακτος μειώνει σημαντικά το χρόνο επώασης για την καλλιέργεια (*L. acidophilus* και *S. thermophilus*) και την καλλιέργεια (*L. acidophilus*, bifidobacteria και *S. thermophilus*) λόγω της διεγερτικής επίδρασης του αερίου στην καλλιέργεια εκκίνησης, καθώς και των επιπτώσεών του στην οξύτητα του γάλακτος (Vinderola *et al.*, 2000a).

### 3.3.3 Σύσταση του γαλακτοκομικού προϊόντος και αυξητικοί παράγοντες και υποκινητές των προβιοτικών βακτηρίων

Διάφορες μελέτες έδειξαν ότι η σύσταση του προϊόντος επηρεάζει τους πληθυσμούς των προβιοτικών βακτηρίων. Διαφορετικής σύστασης γιαούρτια έχουν επιδείξει διαφορετικά επίπεδα επιβίωσης της προβιοτικής καλλιέργειας. Στην πλήρη φυσική/συνεκτική προβιοτική γιαούρτη που παρασκευάζεται από μίγμα συμπυκνωμένου γάλακτος και ζάχαρης, η επιβίωση των προβιοτικών βακτηρίων μειώθηκε κατά 1.5 λογάριθμους. Η παρασκευή της γιαούρτης με γάλα υψηλής λιποπεριεκτικότητας είχε ανασταλτικά αποτελέσματα για τις προβιοτικές καλλιέργειες, ιδιαίτερα για το *B. bifidum* BBI (Vinderola *et al.*, 2000b).

Ορισμένα δεδομένα μελετών έδειξαν ότι η παρουσία του λίπους βελτίωσε ελαφρώς τη ζύμωση του γάλακτος και τους κυτταρικούς πληθυσμούς των προβιοτικών βακτηρίων αποτέλεσμα (Champagne, 2009). Τα λιπαρά οξέα είναι παράγοντες ανάπτυξης. Η πολύ περιορισμένη λιπόλυση μπορεί να είναι διεγερτική, ενώ η εκτεταμένη λιπόλυση έχει το αντίθετο αποτέλεσμα (Champagne, 2009).

Οι προβιοτικοί λακτοβάκιλλοι και κυρίως τα bifidobacteria δεν αναπτύσσονται επαρκώς στο γάλα λόγω έλλειψης μη πρωτεϊνικού αζώτου (ελεύθερα αμινοξέα και μικρά πεπτιδία) και ορισμένων βιταμινών, καθώς και λόγω της αργής δραστηριότητας της β-γαλακτοσιδάσης και της έλλειψης της πρωτεολυτικής δραστηριότητας. Μία καλή και κοινή μέθοδος για την αντιστάθμιση της αργής ανάπτυξης είναι η ενίσχυση του γάλακτος με διάφορους παράγοντες ανάπτυξης (που καταναλώνονται από τα προβιοτικά βακτήρια ως θρεπτικά στοιχεία) και/ή αυξητικούς υποκινητές (οι οποίοι βελτιώνουν την επιβίωση των προβιοτικών βακτηρίων) όπως καζεΐνη, υδρολυμένη πρωτεΐνη ορού γάλακτος, L-κυστεΐνη, εκχύλισμα ζύμης, γλυκόζη, βιταμίνες, ανόργανα άλατα και αντιοξειδωτικά (Mohammadi *et al.*, 2012). Το υψηλό επίπεδο πρωτεόλυσης διεγείρει την ανάπτυξη των προβιοτικών βακτηρίων (Vasiljevic & Shah, 2008). Οι Sarkar *et al.* (2008) ανέφεραν την παραγωγή μεγαλύτερης ποσότητας μικρού μεγέθους διαλυτών πεπτιδίων στη γιαούρτη όταν συνυπήρχαν bifidobacteria και *L. acidophilus*. Ο συνδυασμός ενός μη πρωτεολυτικού στελέχους των bifidobacteria με μία ισχυρά πρωτεολυτική καλλιέργεια *L. acidophilus* μπορεί να είναι βοηθητικός για τα bifidobacteria. Επίσης, η προσθήκη στο γάλα ιχνοστοιχείων, αμινοξέων και νουκλεοτιδίων έχει βρεθεί ότι βελτιώνει την ανάπτυξη του *L. johnsonii* ενώ τα αμινοξέα θεωρούνται ως επαρκή συμπληρώματα για τα bifidobacteria (Champagne, 2009).

Δεδομένης της περιορισμένης πρωτεολυτικής δραστηριότητας των προβιοτικών βακτηρίων στην καζεΐνη του γάλακτος, είναι συχνά απαραίτητο να συμπληρωθεί το υπόστρωμα των γαλακτοκομικών προϊόντων με πηγές αζώτου (υδρολυμένη πρωτεΐνη, παράγωγα ορού γάλακτος και αμινοξέα) που χρησιμοποιούνται από τα προβιοτικά βακτήρια (Dave & Shah 1997a; Antunes *et al.*, 2005). Η συμβατότητα μεταξύ του προστιθέμενου μίγματος και του χρησιμοποιούμενου προβιοτικού στελέχους στο προϊόν αξίζει περαιτέρω διερεύνησης, δεδομένου ότι ορισμένα στελέχη μπορεί να έχουν διαφορετική πρόσληψη του μίγματος, που επηρεάζει την απόδοση προϊόντων όπως η γιαούρτη (Sodini *et al.*, 2005).

### 3.3.4 Παράγοντες του προϊόντος που προστατεύουν τα προβιοτικά βακτήρια

Η ρυθμιστική ικανότητα του γαλακτοκομικού προϊόντος, καθώς και η δομή του υποστρώματος του μπορεί να επηρεάσουν σημαντικά την επιβίωση των προβιοτικών βακτηρίων. Η αύξηση της ρυθμιστικής ικανότητας του γάλακτος διεγείρει την ανάπτυξη και δραστηριότητα των προβιοτικών βακτηρίων στα ζυμωμένα γάλατα. Το τυρί και η γιαούρτη παρουσιάζουν σημαντικά υψηλότερη ρυθμιστική ικανότητα από ότι τα ροφήματα με βάση τα ζυμωμένα γάλατα και κατά συνέπεια καλύτερη επιβίωση των προβιοτικών μικροοργανισμών τόσο στα προϊόντα όσο και στη γαστρεντερική οδό (Heydari *et al.*, 2011; Karimi *et al.*, 2011). Η συμπλήρωση της γιαούρτης με πρόσθετα ανάπτυξης για τα προβιοτικά βακτήρια μπορεί να ενισχύσει την επιβίωση ορισμένων από αυτά λόγω της διατήρησης της ρυθμιστικής ικανότητας της γιαούρτης (Ranadheera *et al.*, 2010).

Αντίθετα, τα υγρά τρόφιμα σε σχέση με τα τρόφιμα στερεάς δομής, όπως είναι το πήγμα της γιαούρτης ή του τυριού, προστατεύουν τα προβιοτικά βακτήρια μειώνοντας την έκθεση τους σε επιβλαβείς παράγοντες (π.χ., ιόντα υδρογόνου και οργανικά οξέα) (Korbekandi *et al.*, 2011; Shafiee *et al.*, 2011).

### 3.3.5 Θερμοκρασία και χρόνος επώασης

Η θερμοκρασία και ο χρόνος επώασης είναι από τους πιο σημαντικούς παράγοντες που επηρεάζουν την επιβίωση των προβιοτικών μικροοργανισμών στα ζυμωμένα γάλατα. Η επιλογή θερμοφίλων και θερμοανθεκτικών μικροοργανισμών αποτελεί πλεονέκτημα λόγω της ικανότητάς τους να αντέχουν σε υψηλότερες θερμοκρασίες κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας και της συντήρησης (Gardiner *et al.*, 1998; Gardiner *et al.*, 2000). Η ανάπτυξη του *L. acidophilus* μπορεί να συμβεί σε θερμοκρασία 45 °C, αλλά η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης κυμαίνεται μεταξύ 40 και 42 °C. Χαμηλότερη θερμοκρασία επώασης (37 °C) ευνοεί την ανάπτυξη των bifidobacteria ενώ για τις παραδοσιακές καλλιέργειες γιαούρτης, η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης κυμαίνεται μεταξύ 42 και 45 °C (Lourens-Hattingh & Viljoen, 2001b).

Μερικά από τα παραδοσιακά γαλακτοκομικά προϊόντα υφίστανται επώαση σε θερμοκρασίες 20 ή 30 °C, οι οποίες δεν είναι κατάλληλες για την ανάπτυξη των προβιοτικών μικροοργανισμών και ειδικότερα των στελεχών που προέρχονται από τον ανθρώπινο γαστρεντερικό σωλήνα (βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης 37 °C). Όμως δεν συνιστάται η αύξηση της θερμοκρασίας επώασης για την ενίσχυση της ανάπτυξης των προβιοτικών βακτηρίων διότι μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό απαράδεκτης γεύσης στο προϊόν. Ως εκ τούτου, η μικτή ζύμωση έχει τις καλύτερες πιθανότητες επιτυχίας, όταν το προβιοτικό στέλεχος συνδυάζεται με θερμοφιλή καλλιέργεια (π.χ. ένα μίγμα από *L. acidophilus* ή/και bifidobacteria και καλλιέργειες εκκίνησης της γιαούρτης). Εναλλακτικά, τα προβιοτικά βακτήρια μπορούν να προστεθούν σε υψηλούς πληθυσμούς ταυτόχρονα με μία «παραδοσιακή» καλλιέργεια εκκίνησης, ανεξάρτητα από την καταλληλότερη θερμοκρασία ανάπτυξής τους (Tamime, 2005).

Οι κλασικές καλλιέργειες γιαούρτης επιτυγχάνουν την ολοκλήρωση της ζυμωτικής διαδικασίας του προϊόντος εντός 5-10 ωρών και την κατανάλωση του μεγαλύτερου μέρους του οξυγόνου στο γάλα. Ως εκ τούτου, ο χρόνος επώασης του προϊόντος επηρεάζει εξίσου την επιβίωση των προβιοτικών βακτηρίων στη γιαούρτη (Dave & Shah, 1997a).

### 3.3.6 Συνθήκες συντήρησης

Η θερμοκρασία συντήρησης των ζυμωμένων προβιοτικών προϊόντων είναι σημαντική για την επιβίωση των προβιοτικών μικροοργανισμών. Οι περισσότερες μελέτες έδειξαν ότι τα υψηλότερα ποσοστά επιβίωσης των οξυγαλακτικών βακτηρίων ελήφθησαν σε χαμηλές θερμοκρασίες συντήρησης. Τα bifidobacteria είναι λιγότερα ανθεκτικά στη χαμηλή θερμοκρασία συντήρησης σε σύγκριση με το *L. acidophilus* (Champagne, 2009).

Ο χρόνος συντήρησης είναι έμμεσα ανάλογος με την επιβίωση των προβιοτικών στελεχών. Στα ζυμωμένα γάλατα, με τιμές pH χαμηλότερες από 4,2, είναι πολύ δύσκολο η διάρκεια ζωής τους να υπερβαίνει τις 21 ημέρες διατηρώντας το πληθυσμό του κάθε προβιοτικού στελέχους σε τιμές μεγαλύτερες των  $10^7$  ή ακόμη  $10^6$  cfu/g, αν και η αντίσταση των προβιοτικών κυττάρων σε σκληρές περιβαλλοντικές συνθήκες είναι ειδικές του στελέχους (Mohammadi *et al.*, 2012).

Για την καλύτερη επιβίωση των *L. acidophilus* και *Bifidobacterium* spp. κατά τη διάρκεια της παραγωγής και της συντήρησης της γιαούρτης, έχουν προταθεί ορισμένες προσεγγίσεις, στις οποίες περιλαμβάνεται η ενσωμάτωση ορισμένων συστατικών στο μίγμα της γιαούρτης, όπως είναι το συμπύκνωμα πρωτεΐνης ορού γάλακτος, η ραφινόζη, η ινουλίνη, η κυστεΐνη, ή ο χειρισμός ορισμένων τεχνολογικών παραμέτρων όπως είναι η μείωση της θερμοκρασίας επώασης στους 37 °C, η ολοκλήρωση της επώασης σε pH άνω του 5, η διατήρηση της θερμοκρασίας συντήρησης κάτω από τους 3-4 °C, η υποβολή της γιαούρτης σε υδροστατική πίεση στους 200-300 Mpa/10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, ή σε θερμοκρασία shock στους 58 °C/5 λεπτά για την αποτροπή της μεταοξίνισης (Sarkar, 2008).

### 3.3.7 Μικροεγκαψυλίωση

Η μικροεγκαψυλίωση των προβιοτικών μικροοργανισμών είναι μία διαδικασία εγκλωβισμού των προβιοτικών κυττάρων, χρησιμοποιώντας κατάλληλα υλικά επικάλυψης (κυρίως υδροκολλοειδή), με σκοπό την προστασία τους από τις δυσμενείς συνθήκες του περιβάλλοντος χώρου, οδηγώντας τους στην κατάλληλη απελευθέρωση στο έντερο του καταναλωτή (Krasaekoort *et al.*, 2003; Mortazavian *et al.*, 2007; Plessas *et al.*, 2012). Έχει εφαρμοστεί σε λακτοβάκιλλους και σε άλλους προβιοτικούς μικροοργανισμούς ως μέσο για την αύξηση της επιβιώσής τους σε *in vitro* δοκιμές, σε διαδικασίες ζύμωσης για ζωοτροφές, και σε ενσωμάτωση σε τρόφιμα όπως η μαγιονέζα και τα κατεψυγμένα επιδόρπια. Επίσης, έχει εφαρμοστεί στην παραγωγή γιαούρτης, με αποτέλεσμα την καλύτερη επιβίωση των εγκαψυλιωμένων βακτηρίων (Ranadheera *et*



*al.*, 2010). Έχει χρησιμοποιηθεί ως αποτελεσματική μέθοδος για τη βελτίωση της επιβίωσης των προβιοτικών βακτηρίων στα ζυμωμένα ροφήματα γάλακτος, τα ζυμωμένα κατεψυγμένα γαλακτοκομικά επιδόρπια, τα παγωτά και τους χυμούς (Adhikari *et al.*, 2000; Mohammadi *et al.*, 2011), και σε προσομοιωμένο γαστρεντερικό σωλήνα (Sultana *et al.*, 2000). Τα εγκαψυλιωμένα προβιοτικά κύτταρα επιβίωσαν σε πληθυσμούς μεγαλύτερους των  $10^5$  cfu/g στα ζυμωμένα κατεψυγμένα γαλακτοκομικά επιδόρπια σε σύγκριση με πληθυσμούς κάτω των  $10^3$  cfu/g που παρατηρήθηκαν όταν χρησιμοποιήθηκαν μη εγκαψυλιωμένοι μικροοργανισμοί (Mohammadi *et al.*, 2012).

Η μικροεγκαψυλίωση προφυλάσσει τα προβιοτικά κύτταρα από επιβλαβείς περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως το χαμηλό pH, η υψηλή οξύτητα, τα χολικά άλατα (Mortazavian *et al.*, 2007), το κρύο σοκ που προκαλείται κατά τη διαδικασία παραγωγής τους, όπως η βαθιά κατάψυξη και η λυοφιλοποίηση, το μοριακό οξυγόνο στην περίπτωση των υποχρεωτικών αναερόβιων, το σοκ της θερμοότητας που προκαλείται από τις συνθήκες επεξεργασίας, οι βακτηριοφάγοι, και οι χημικοί αντιμικροβιακοί παράγοντες. Επιπλέον, επιτυγχάνεται η ακινητοποίηση των κυττάρων με σκοπό την ομοιογενή κατανομή τους σε ολόκληρο το προϊόν και η βελτίωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του προϊόντος (Mohammadi *et al.*, 2012).

Αρκετά είναι τα υλικά εγκαψυλίωσης που έχουν χρησιμοποιηθεί μέχρι σήμερα για τη βελτίωση της επιβίωσης των προβιοτικών βακτηρίων στα γαλακτοκομικά προϊόντα (Lourens-Hattingh & Viljoen, 2001b). Σ' αυτά περιλαμβάνονται τα αλγινικά, το άμυλο, η καραγενάνη και η πρωτεΐνη ορού γάλακτος, καθώς και συνδυασμοί αυτών. Τα τροποποιημένα άμυλα έχει βρεθεί ότι βελτιώνουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των γιαουρτιών, επειδή εμποδίζουν τη συναίρεση και βελτιώνουν την υφή του τελικού προϊόντος. Ωστόσο, κατά την εγκαψυλίωση των προβιοτικών βακτηρίων εμφανίζονται δύο ειδών προβλήματα που σχετίζονται με το μέγεθός τους και την επιβίωσή τους. Αυτή η τελευταία πτυχή είναι καθοριστική για την επιλογή της κατάλληλης τεχνολογίας μικροεγκαψυλίωσης (Plessas *et al.*, 2012).

### **3.4 Οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των προβιοτικών ζυμωμένων γαλάτων**

Είναι αποδεδειγμένο ότι οι καταναλωτές δεν ενδιαφέρονται για την κατανάλωση λειτουργικών τροφίμων, τα οποία μπορεί να προσφέρουν σημαντικά οφέλη στην υγεία τους δεν εμφανίζουν όμως ικανοποιητικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (Tuorilla & Monteleone, 2009).

Τα ζυμωμένα γάλατα μπορεί να εμφανίσουν μη ικανοποιητικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, εφόσον παράγονται μόνο με προβιοτικές καλλιέργειες. Ο μεταβολισμός των προβιοτικών καλλιιεργειών ενδέχεται να οδηγήσει στην παραγωγή συστατικών, όπως το οξικό οξύ που παράγεται από τα *Bifidobacterium* spp., τα οποία συμβάλλουν στην υποβάθμιση της γεύσεως και του αρώματος του προϊόντος (Cruz *et al.*, 2010). Οι Adhikari *et al.* (2002) επισήμαναν ότι η εισαγωγή των *Bifidobacterium* spp. στη γιαούρτη επηρέαζε τη σύνθεση ορισμένων οργανικών οξέων όπως το οξικό και το προπιονικό οξύ, ενώ το κιτρικό άλας παρέμεινε σταθερό κατά τη συντήρηση. Οι Ostlie *et al.* (2003) παρατήρησαν ότι οι προβιοτικές καλλιέργειες *L. acidophilus* La5, *L. acidophilus* 1748, *L. rhamnosus* GG, *L. reuteri* SD 2112 και *B. animalis* BB12 δεν είναι

σε θέση να μεταβολίσουν το κιτρικό άλας και τις αρωματικές ενώσεις που παράγονται όπως το διακετύλιο, την ακετοΐνη και την ακεταλδεΐδη, οι οποίες δίνουν χαρακτηριστική γεύση και άρωμα στη γιαούρτη. Τα ετεροζυμωτικά προβιοτικά βακτήρια παράγουν αντί του γαλακτικού οξέος άλλους μεταβολίτες όπως αιθανόλη, οξικό οξύ και διοξειδίο του άνθρακα, οι οποίοι προσδίδουν δυσάρεστα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά στο προϊόν. Οι συγκεντρώσεις των ανωτέρω ενώσεων επηρεάζονται έντονα από παράγοντες όπως το προβιοτικό στέλεχος και τη θερμοκρασία επώασης (Korbekand *et al.*, 2011). Μεταξύ των διαφόρων προβιοτικών βακτηρίων που χρησιμοποιούνται στα ζυμωμένα γάλατα, ο *L. acidophilus* έδειξε μοναδική δυνατότητα παραγωγή ακεταλδεΐδης. Ωστόσο, το μεγαλύτερο μέρος της ακεταλδεΐδης που παράγεται από αυτό το βακτήριο ανάγεται προς αιθανόλη από την αλκοολική αφυδρογονάση (Ostlie *et al.*, 2003). Ο εμπλουτισμός του γάλακτος με θρεονίνη (1-3 g/L) έχει προταθεί για την ενίσχυση της παραγωγής της ακεταλδεΐδης σε γιαούρτη που περιείχε bifidobacteria ή/και *L. acidophilus* (Sarkar, 2008).

Οι Hekmat & Reid (2006) διεξήγαγαν οργανοληπτική εξέταση γεύσεως σε καταναλωτές για να συγκρίνουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των προβιοτικών γιαουρτιών, που περιείχαν *L. rhamnosus* και *L. reuteri*, και των τυποποιημένων γιαουρτιών. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η εμφάνιση, η γεύση, η υφή και η συνολική ποιότητα της προβιοτικής γιαούρτης με 1% λιπαρά ήταν εφάμιλλα και συγκρίσιμα με την τυποποιημένη γιαούρτη με 1% λιπαρά.

Οι Maragkoudakis *et al.* (2006) εξέτασαν τους *L. plantarum* και *L. paracasei* subsp. *tolerans* για την πιθανή χρησιμοποίησή τους ως συμπληρωματική καλλιέργεια στην παραγωγή της παραδοσιακής συνεκτικής ελληνικής γιαούρτης. Η γιαούρτη που περιείχε *L. paracasei* subsp. *tolerans* ACA-DC 4037 παρουσίαζε πλούσια, απαλή και παραδοσιακή γεύση, δεν ήταν πολύ όξινη, είχε παρόμοια εμφάνιση με εκείνη της κανονικής γιαούρτης και είχε καλή αποδοχή μεταξύ των καταναλωτών. Ο *L. paracasei* subsp. *tolerans* ACA-DC 4037 έχει απομονωθεί από το παραδοσιακό Ελληνικό τυρί κασέρι, και ως εκ τούτου μπορεί να θεωρηθεί ασφαλής. Η περαιτέρω αύξηση του προβιοτικού φορτίου, με τη χρήση συμπυκνωμένου και εγκαψυλιωμένου ενοφθαλμίσματος (10-11 log cfu/g), έδωσε γιαούρτη με μεγαλύτερη διάρκεια επώασης και δυσάρεστα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (Ranadheera *et al.*, 2010).

Επίσης, έχει προταθεί η προσθήκη συμπληρωματικής ποσότητας γάλακτος για τη βελτίωση της ανάπτυξης και της επιβίωσης των προβιοτικών βακτηρίων κατά τη συντήρηση της γιαούρτης και για τη βελτίωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του τελικού προϊόντος (Lucas *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2010). Οι Antunes *et al.* (2005) διερεύνησαν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά προβιοτικής αποβουτυρωμένης γιαούρτης που περιείχε *L. acidophilus* και *B. longum* και ήταν ενισχυμένη με συμπύκνωμα πρωτεϊνών ορού γάλακτος και απέδειξαν ότι η κοινή και η ενισχυμένη με συμπύκνωμα πρωτεϊνών προβιοτική γιαούρτη δεν διέφερε σημαντικά ( $p < 0,05$ ) ενώ είχε καλή οργανοληπτική αποδοχή μεταξύ των καταναλωτών.

Αναφορικά με τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των προβιοτικών ροφημάτων, οι Antunes *et al.* (2009) αξιολόγησαν την αποδοχή ενός προβιοτικού καλλιεργημένου βουτυρογάλακτος που ήταν αρωματισμένο με διάφορα φρούτα (φράουλα, βανίλια, μέντα, graviola και cupuaçu) και περιείχε σακχαρόζη ή σουκρόζη. Παρά το γεγονός της απουσίας σχολίων σχετικά με το τυπικό άρωμα του βουτυρογάλακτος, όλα τα

βουτυρογάλατα που περιείχαν σακχαρόζη παρουσίασαν τις ίδιες επιδόσεις στο τεστ αποδοχής, με τα αποτελέσματα να κυμαίνονται από 6,0 – 8,0, στην οργανοληπτική κλίμακα των 9-σημείων (the 9<sup>th</sup> point hedonic scale). Η ίδια συμπεριφορά παρατηρήθηκε και στα βουτυρογάλατα που περιείχαν σουκρόζη.

Οι Vinderola *et al.* (2000a) μελέτησαν τη προσθήκη CO<sub>2</sub> σε παστεριωμένο γάλα, με *L. acidophilus* και *B. bifidum*, ως μέθοδο βελτίωσης της επιβίωσης των προβιοτικών βακτηρίων. Το CO<sub>2</sub> δεν είχε αρνητικές επιπτώσεις στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του ζυμωμένου γάλακτος το οποίο παρουσίαζε μία ελαφρώς βελτιωμένη αίσθηση στη γεύση, την αποδοχή οξύτητας και τη συνολική αποδοχή.

Οι Martín-Diana *et al.* (2003) αξιολόγησαν την οργανοληπτική αποδοχή ζυμωμένου προβιοτικού ροφήματος από γίδινο γάλα που περιείχε *L. acidophilus* και *B. animalis* BB12. Το ζυμωμένο γίδινο γάλα που ήταν ενισχυμένο με συμπύκνωμα πρωτεϊνών ορού γάλακτος παρουσίασε υψηλό ποσοστό συνολικής αποδοχής, παρόμοιο με το ζυμωμένο αγελαδινό γάλα.

### 3.5 Πόσιμα προβιοτικά γαλακτοκομικά προϊόντα ζύμωσης

#### 3.5.1 Καλλιεργημένο βουτυρόγαλα

Το καλλιεργημένο βουτυρόγαλα είναι υποπροϊόν της παραγωγικής διαδικασίας του βουτύρου και λαμβάνεται κατά τη βουτυροποίηση της καλλιεργημένης (όξινης) κρέμας γάλακτος. Το Σκανδιναβικό (Nordic) καλλιεργημένο βουτυρόγαλα παρασκευάζεται από τη μικροβιακή ζύμωση πλήρους παστεριωμένου ή αποβουτυρωμένου γάλακτος (Antunes *et al.*, 2009). Οι τυπικές καλλιέργειες εκκίνησης στα καλλιεργημένα βουτυρογάλατα είναι τα μεσόφιλα οξυγαλακτικά βακτήρια, όπως τα *Lc. lactis* subsp. *cremoris*, *Lc. lactis* subsp. *lactis*, *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* και *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*. Το γάλα επωάζεται στους 20 °C για περίπου 20 ώρες (τελικό pH 4,5-4,6) και ακολουθεί ανάδευση, ψύξη, προαιρετική προσθήκη αρωματικών ουσιών και συσκευασία. Στο καλλιεργημένο βουτυρόγαλα συχνά προστίθενται γλυκαντικές και αρωματικές ουσίες. Τα προβιοτικά καλλιεργημένα βουτυρογάλατα περιέχουν διάφορους μικροοργανισμούς εκτός από τις οξυγαλακτικές καλλιέργειες εκκίνησης, όπως ο *L. rhamnosus* GG (ονομάζεται *riimä* στη Φινλανδία, *haruriim* στην Εσθονία, και *syynet melk* στη Νορβηγία), ο *L. rhamnosus* 271 (*viilijuoima* στη Φινλανδία), ο *L. reuteri* (*riimä* στη Φινλανδία), ο *L. casei* 431 (*riimä* στη Φινλανδία), και ο *L. acidophilus* μόνος του ή σε συνδυασμό με *Bifidobacterium* spp. (*fil* στη Σουηδία, *riimä* στη Φινλανδία) (Tamime, 2005).

### 3.5.2 Ελληνικό οξύγαλα ή ξινόγαλα

Το Ελληνικό οξύγαλα ή ξινόγαλα είναι επίσης ένα παραδοσιακό προϊόν ζύμωσης του βουτυρογάλακτος ή του άπαχου γάλακτος. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια που χρησιμοποιούνται είναι τα *Lc. cremoris*, *Lc. lactis* και *Lc. citrovorum*. Αρχικά το βουτυρόγαλα θερμαίνεται στους 90-95 °C για 15 λεπτά, ψύχεται στους 25-28 °C και ενοφθαλμίζεται με την καλλιέργεια (σε αναλογία 10-15%). Ακολουθεί επώαση στους 28-30 °C, πήξη και μετά ανάδευση του πηγματος για την μετατροπή του σε παχύρευστη μάζα η οποία τοποθετείται σε φιάλες και συντηρείται υπό ψύξη (Μάντης, 2000).

Το Ελληνικό οξύγαλα βουτυρόγαλα μπορεί να θεωρηθεί ένας κατάλληλος φορέας παροχής προβιοτικών μικροοργανισμών στους καταναλωτές γιατί το προϊόν είναι καλά αποδεκτό. Ωστόσο, το προβιοτικό στέλεχος που επιλέγεται μπορεί να επηρεάσει τη περιεκτικότητα του διακετυλίου στο τελικό προϊόν και κατ' επέκταση τη γεύση του οξυγάλακτος (Antunes *et al.*, 2009).

### 3.5.3 Κεφίρ

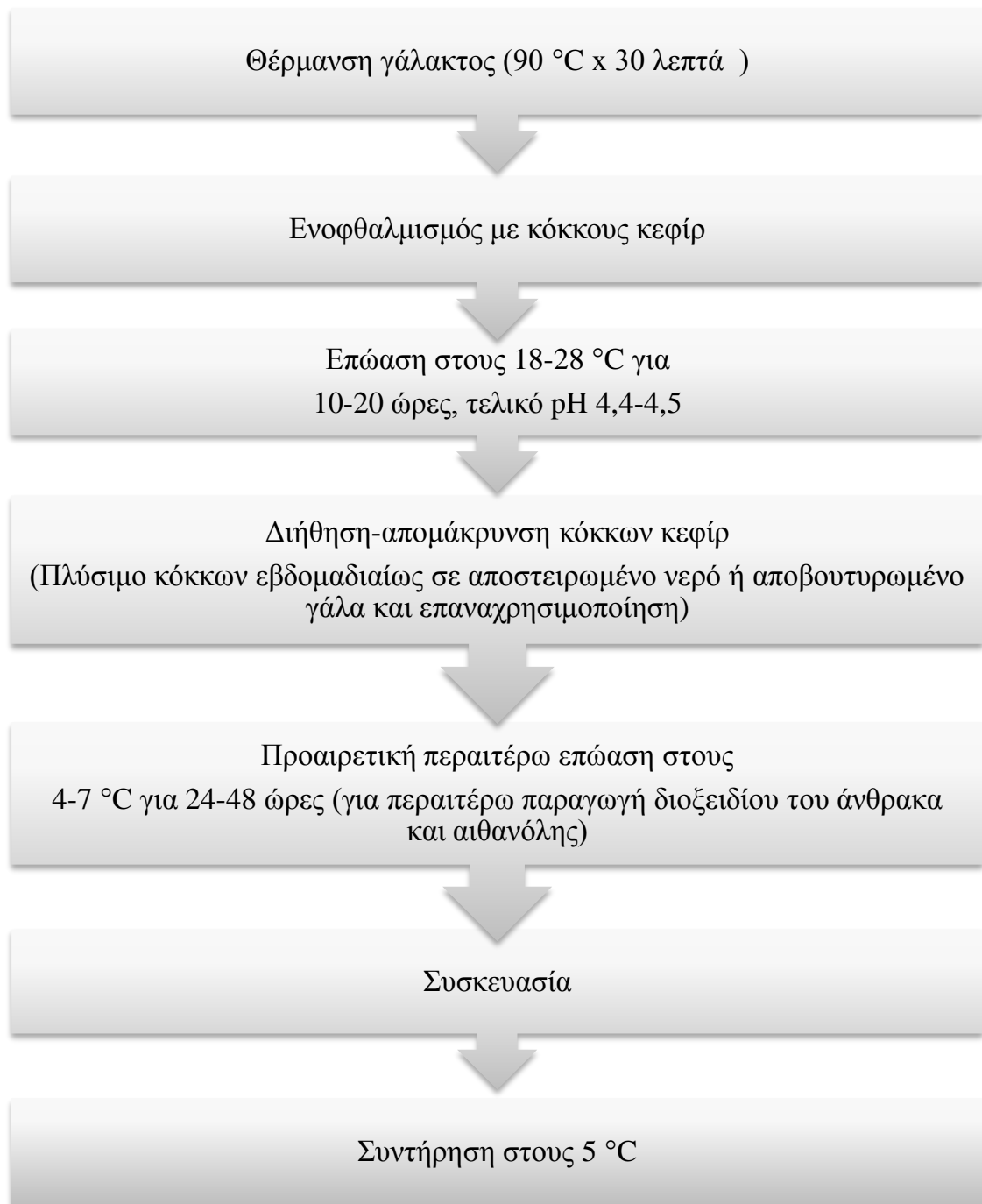
Το κεφίρ είναι ένα παραδοσιακό προϊόν του Καυκάσου που για την παρασκευή του χρησιμοποιείται κυρίως γίδινο γάλα αλλά μπορεί να χρησιμοποιηθεί και πρόβειο ή αγελαδινό. Οι Καυκάσιοι υποστηρίζουν ότι οι κόκκοι του κεφίρ είναι "δώρο των Θεών" και ότι το κεφίρ χαρίζει μακροζωία (Μάντης, 2000). Το κεφίρ είναι ένα ανθρακούχο προϊόν ζύμωσης του γάλακτος που παρασκευάζεται με τη χρήση ενός σύνθετου μίγματος μικροοργανισμών που είναι γνωστοί ως κόκκοι κεφίρ (Tamime, 2005). Μπορεί να θεωρηθεί σχεδόν ως ένα ιδανικό προβιοτικό γαλακτοκομικό προϊόν (Heller, 2001), διότι πολλά προβιοτικά στελέχη έχουν απομονωθεί από τη χαρακτηριστική του χλωρίδα (Πίνακας 9). Ο συνδυασμός αυτός των βακτηρίων και των ζυμών στους κόκκους κεφίρ εμφανίζεται ως σύμπλεγμα μικροβίων που συγκρατούνται μεταξύ τους με ένα υπόστρωμα που αποτελείται κυρίως από τον πολυσακχαρίτη "kefiran", που παράγεται από το *L. kefirifaciens*, και από πρωτεΐνη. Λόγω των άγνωστων μέχρι τώρα αλληλοεπιδράσεων και των ανεπαρκών εκλεκτικών υποστρωμάτων, υπάρχει μεγάλη πιθανότητα ένας αριθμός οξυγαλακτικών βακτηρίων και ζυμών να μην έχει ακόμη ταυτοποιηθεί (Rattray & O'Connell, 2011).

Στην Εσθονία και τη Λετονία παράγεται κεφίρ με το προβιοτικό στέλεχος *L. rhamnosus* GG. Στην Πολωνία το κεφίρ περιέχει *Bifidobacterium spp.* ή/και *L. acidophilus* (Farnworth & Mainville, 2003; Tamime, 2005). Ωστόσο, η δυναμικότητα της αγοράς αυτού του προϊόντος είναι περιορισμένη, διότι η παραγωγή του διοξειδίου του άνθρακα μετά από τη ζύμωσή του, λαμβάνεται ως αλλοίωση από τους περισσότερους καταναλωτές (Heller, 2001). Μια σύντομη επισκόπηση πάνω στη διαδικασία παραγωγής του κεφίρ παρουσιάζεται στο Σχήμα 2. Σήμερα, υπάρχουν δύο κύριες μέθοδοι παραγωγής του κεφίρ: (α) η παραδοσιακή, η οποία χρησιμοποιεί κόκκους κεφίρ, και (β) η σύγχρονη, η οποία χρησιμοποιεί λυοφιλοποιημένες (DVI) καλλιέργειες με απευθείας προσθήκη στο γάλα (Tamime, 2005).

Πίνακας 9. Ταυτοποιημένη μικροχλωρίδα κόκκων κεφίρ (Ratray & O'Connell, 2011)

<i>Lactobacilli</i>	<i>Lactococci &amp; Leuconostoc spp.</i>	Ζύμες	Άλλα
<u>Ομοιοζυμωτικά</u> - <i>L. acidophilus</i> - <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> - <i>L. helveticus</i> - <i>L. kerifanofaciens</i> - <i>L. kefirgranus</i>	<u>Ομοιοζυμωτικά</u> - <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> - <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	<u>Ζυμώνουν την λακτόζη</u> - <i>Kluyveromyces marxianus</i> (α)/ <i>Candida kefir</i> (μ) - <i>Kluyveromyces lactis</i> var. <i>lactis</i> - <i>Debaryomyces hansenii</i> (α)/ <i>Candida famata</i> (μ) - <i>Dekkera anomala</i> (α)/ <i>Brerranomyces anomalus</i> (μ)	- <i>S. thermophilus</i> - <i>Acetobacter aceti</i> - <i>Acetobacter rasens</i> - <i>Enterococcus durans</i> - <i>Geotricum candium</i> - <i>Galactomyces geotrichum</i>
<u>Ετεροζυμωτικά</u> - <i>L. kefir</i> - <i>L. parakefir</i> - <i>L. brevis</i> - <i>L. fermentum</i> - <i>L. fructivorans</i> - <i>L. hilgardi</i> - <i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i> - <i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	<u>Ετεροζυμωτικά</u> - <i>Lc. Lactis</i> - <i>Ln. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> - <i>Ln. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> - <i>Ln. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>	<u>Δεν ζυμώνουν την λακτόζη</u> - <i>Saccharomyces unisporus</i> - <i>Saccharomyces turicensis</i> - <i>Saccharomyces cerevisiae</i> - <i>Saccharomyces exiguus</i> - <i>Saccharomyces pastorianus</i> - <i>Torulasporea delbrueckii</i> - <i>Candida friedrichii</i> - <i>Candida humilis</i> - <i>Candida maris</i> - <i>Debaryomyces occidentalis</i> - <i>Issatchenkia orientalis</i> (α)/ <i>Candida krusei</i> (μ) - <i>Yarrowia lipolytica</i> (α)/ <i>Candida lipolytica</i> - <i>Pichia fermentans</i> (α) (μ)/ <i>Candida firmetaria</i>	

(α): αμφιγονική (εγγενής) αναπαραγωγή, (μ): μονογονική (αγενής) αναπαραγωγή



Σχήμα 2. Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας παραγωγής του κεφίρ με τη χρήση κόκκων (Heller, 2001)

Το κεφίρ που παράγεται από κόκκους κεφίρ (Σχήμα 2) μπορεί να διαφέρει σημαντικά λόγω του ποικίλου μικροβιολογικού προφίλ των κόκκων. Επίσης, η παραλλαγή της ζυμωτικής διαδικασίας έχει ως αποτέλεσμα σημαντικές διαφορές στη γεύση και την υφή. Η επώαση σε θερμοκρασίες > 30 °C ευνοεί την ανάπτυξη των θερμοφίλων οξυγαλακτικών βακτηρίων εις βάρος των μεσόφιλων και των ζυμών. Παρομοίως, η ανάδευση κατά τη διάρκεια της επώασης αυξάνει τον αριθμό των ομοιοζυμωτικών οξυγαλακτικών βακτηρίων ενώ δεν διαφοροποιούνται τα ετεροζυμωτικά και εκείνα που παράγουν οξικό οξύ. Όλοι αυτοί οι παράγοντες επιδρούν στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος (Ratray & O'Connell, 2011).

Στην παραδοσιακή μέθοδο το γάλα μετά από θέρμανση στους 90 °C για 30 λεπτά, ψύχεται στους 22 °C και ενοφθαλμίζεται με νωπούς κόκκους κεφίρ (2-10 g/100ml) και επωάζεται για 12 ώρες. Μετά την επώαση οι κόκκοι κεφίρ συλλέγονται με διήθηση, εκπλένονται με κρύο νερό και συντηρούνται στο ψυγείο. Το πήγμα συσκευάζεται, επωάζεται στους 12-15 °C για 1 ημέρα και συντηρείται υπό ψύξη (Μάντης, 2000).

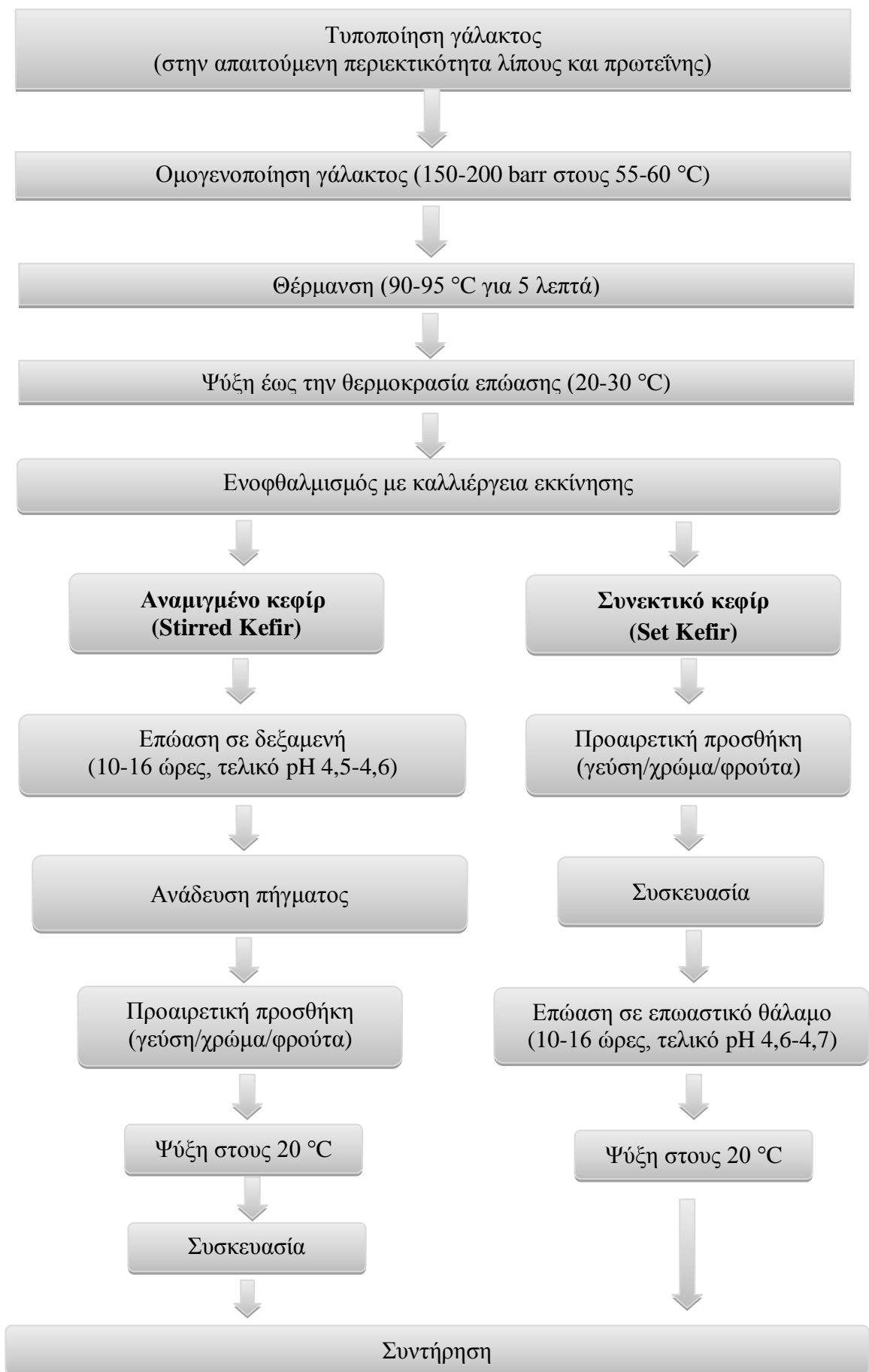
Όταν χρησιμοποιούνται DVI καλλιέργειες (Σχήμα 3), το γάλα υφίσταται θερμική επεξεργασία, ψύχεται σε θερμοκρασία επώασης ( $\approx 30$  °C), ενοφθαλμίζεται με DVI καλλιέργειες, και επωάζεται για 10-15 ώρες (τελικό pH 4,5 – 4,6). Το ζυμωμένο προϊόν αναδεύεται, ψύχεται και συσκευάζεται (Tamime, 2005). Η χρήση εμπορικών DVI καλλιεργείων απλοποιεί την παραγωγική διαδικασία του κεφίρ και με την προσεκτική επιλογή των ζυμών και των βακτηρίων είναι δυνατή η παραγωγή ενός προϊόντος με επιθυμητή γεύση και ποιοτικά χαρακτηριστικά. Το κεφίρ που παράγεται με αυτό τον τρόπο έχει διάρκεια ζωής έως 28 ημέρες σε σύγκριση με εκείνο που παράγεται με σπόρους κεφίρ το οποίο έχει διάρκεια ζωής από 3-12 ημέρες. Ωστόσο αυτό ο τύπος κεφίρ στερείται μικροβιακής ποικιλίας και γι' αυτό το λόγο μπορεί να μην έχει τα ίδια θεραπευτικά και προβιοτικά χαρακτηριστικά (Rattray & O'Connell, 2011).

### 3.5.4 Αριάνι (Ayran)

Το Ayran (αριάνι στα Ελληνικά) είναι ένα από τα βασικά ροφήματα που παράγεται στην Τουρκία και κατάγεται από την Κεντρική Ασία όπου είναι πολύ δημοφιλές. Το όνομά του προέρχεται από την τουρκική λέξη "γιαούρτη" που απορρέει από το ρήμα "yoğurtmak", που σημαίνει "να αναμιγνύω" και αναφέρεται στον τρόπο με τον οποίο παρασκευάζεται (<http4>). Το αριάνι είναι πόσιμη γιαούρτη και παρασκευάζεται με την ανάμιξη γιαούρτης με κρύο νερό, ενώ διατίθεται στο εμπόριο και ως συσκευασμένο ρόφημα. Ξεχωρίζει από τα άλλα ζυμωμένα γαλακτοκομικά ροφήματα γιατί περιέχει αλάτι. Το αριάνι έχει προβιοτικές ιδιότητες ανάλογα με τα προβιοτικά βακτήρια που προστίθενται (Ayar & Bugucu, 2013). Παρόμοια ροφήματα είναι το Ινδικό λάσι (που περιέχει ινδικά μπαχαρικά και φρούτα) και το Ιρανικό ντουγκ (το οποίο περιέχει μέντα).

### 3.5.5 Doogh

Το doogh είναι ένα ρόφημα που παράγεται κυρίως στο Ιράν και που βασίζεται στο ζυμωμένο γάλα το οποίο παρασκευάζεται με την ανάμιξη γιαούρτης με πόσιμο νερό και εδώδιμο αλάτι ή με την ανάμιξη γάλατος με πόσιμο νερό και εδώδιμο αλάτι, και ακολουθεί θερμική επεξεργασία και ζύμωση. Στο doogh, παραδοσιακά και φυσιολογικά, προστίθενται γεύσεις με τη μορφή αποσταγμάτων ή εκχυλισμάτων (όπως μέντα, φλισκούνι, αγγούρι, άγριο θυμάρι κλπ.) και ονομάζεται "Φυσικό doogh". "Αρωματισμένο doogh" ονομάζεται όταν προστίθενται διαφορετικά αρώματα όπως αρωματικά βότανα, μπαχαρικά και καρκεύματα. Μπορεί να είναι και ανθρακούχο (FAO/WHO, 2013). Το εκχύλισμα μέντας ανάλογα με τη συγκέντρωση μπορεί να μειώσει ή να αυξήσει την επιβίωση των προβιοτικών μικροοργανισμών που υπάρχουν στο doogh (Vosough *et al.*, 2009).



Σχήμα 3. Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας παραγωγής του κεφίρ με τη χρήση καλλιεργείων DVI (Rattray & O'Connell, 2011)



### 3.5.6 Koumiss

Το koumiss (επίσης γνωστό ως koumyss, kumys, kumyz , kimiz ή coomys ) είναι ένα ζυμωμένο ρόφημα που παράγεται παραδοσιακά από γάλα φοράδας στις χώρες της Κεντρικής Ασίας και από γάλα καμήλας στη Μογγολία. Η λέξη koumiss προέρχεται από τη συρο-αραμαϊκή λέξη khamets που σημαίνει "ξινό, αυτό που έχει υποστεί ζύμωση" ενώ κατά άλλους πιστεύεται ότι προέρχεται από το όνομα της Τούρκικης φυλής Kumyks ([http5](http://)). Στην Ευρώπη και τη Βόρεια Αμερική, ένα προϊόν όπως το koumiss παρασκευάζεται από πλήρες ή αποβουτυρωμένο αγελαδινό γάλα (di Cagno *et al.*, 2004).

Αρχικά γινόταν η ζύμωση σε ένα σάκκο στο άλογο η οποία περιείχε τη μικροχλωρίδα από την προηγούμενη παρτίδα. Το koumiss είναι παρόμοιο με το κεφίρ, αλλά δεν παράγεται χρησιμοποιώντας κόκκους, αλλά μία υγρή καλλιέργεια εκκίνησης που αποτελείται από λακτοβάκιλλους και ζύμες ([http5](http://)).

Η μικροχλωρίδα του koumiss δεν έχει αναγνωριστεί πλήρως, αλλά αποτελείται κυρίως από (Tamime, 2005):

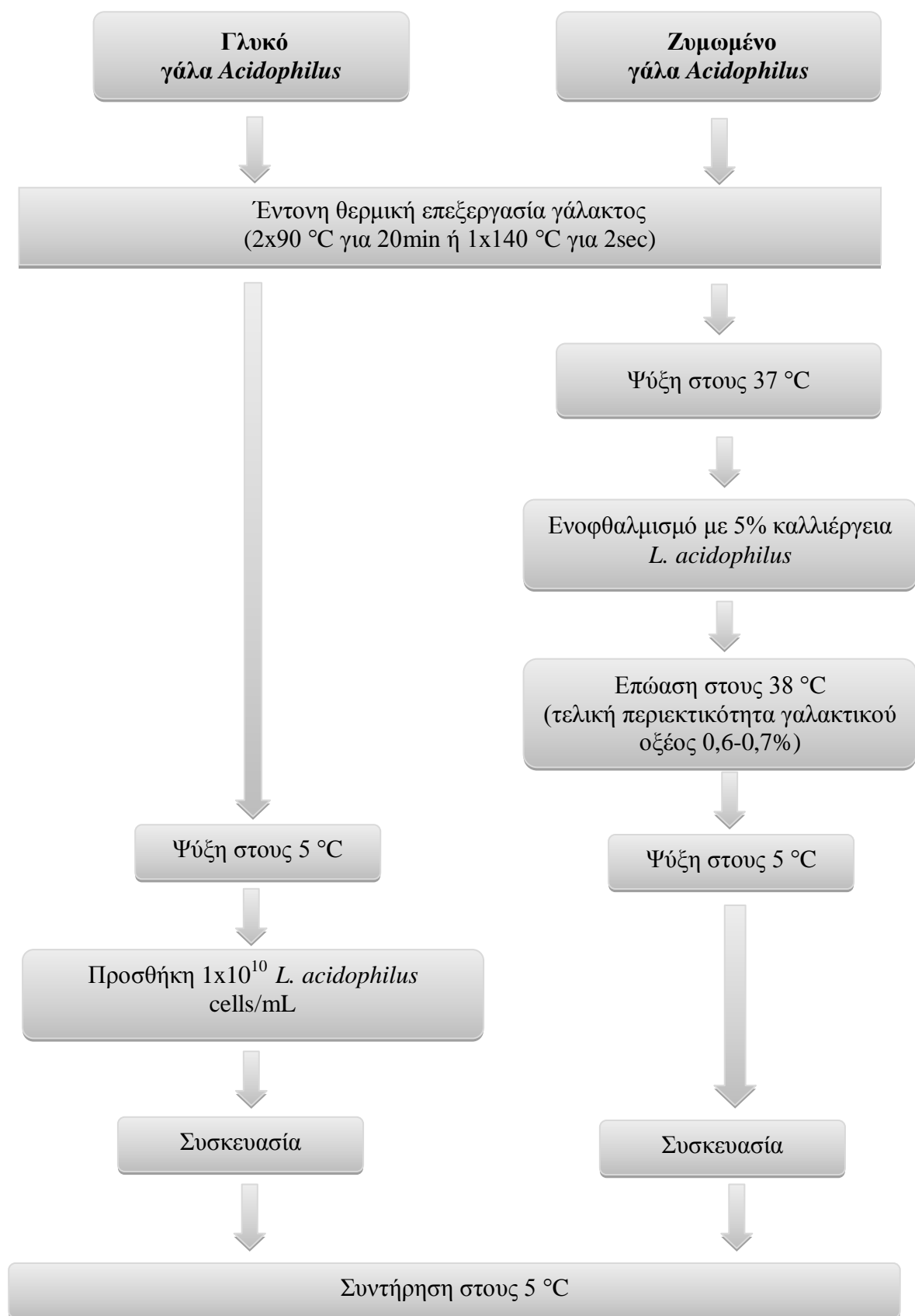
- λακτοβάκιλλους (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, κ.α.,)
- ζύμες που ζυμώνουν τη λακτόζη (*Saccharomyces* spp., *K. marxianus* var. *marxianus* και *Candida koumiss*),
- ζύμη που δεν ζυμώνει τη λακτόζη (*S. cartilaginosus*),
- ζύμες που δεν ζυμώνουν υδατάνθρακες (*Mycoderma* spp).

Από τα 16 δείγματα παραδοσιακού koumiss που συλλέχθηκαν στην Έσω Μογγολία της Κίνας απομονώθηκαν 48 στελέχη λακτοβακίλλων. Τα κυρίαρχα είδη λακτοβακίλλων που ταυτοποιήθηκαν ήταν οι *L. casei* (17 στελέχη), *L. helveticus* (10 στελέχη) και *L. plantarum* (8 στελέχη), ενώ με χαμηλότερη συχνότητα απομονώθηκαν οι *L. coryniformis* subsp. *coryniformis* (5 στελέχη), *L. paracasei* (3 στελέχη), *L. kefiranofaciens* (2 στελέχη), *L. curvatus* (1 στέλεχος), *L. fermentum* (1 στέλεχος) και *W. kandleri* (1 στέλεχος) (Wu *et al.*, 2009).

Ο *L. casei* Zhang είναι ένα νέο προβιοτικό στέλεχος που ταυτοποιήθηκε από τη διαλογή των οξυγαλακτικών βακτηρίων που απομονώθηκαν σε δείγματα koumiss τα οποία συλλέχθηκαν στην Έσω Μογγολία της Κίνας και παρουσιάζει υψηλού επιπέδου αντοχή στο οξύ και τη χολή, καθώς και αντιβακτηριακές, αντιοξειδωτικές και ανοσολογικές ιδιότητες (Ya *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2010).

### 3.5.7 Γάλα acidophilus και "γλυκό γάλα AB"

Το γάλα acidophilus και το "γλυκό γάλα AB" (sweet AB milk) είναι προβιοτικά γαλακτοκομικά προϊόντα με βάση το μη ζυμωμένο γάλα (Σχήμα 4). Και τα δύο παράγονται με την προσθήκη συμπυκνωμένων προβιοτικών βακτηρίων σε θερμικά επεξεργασμένο γάλα. Ο *L. acidophilus* προστίθεται στο γλυκό γάλα acidophilus και ο *L. acidophilus* μαζί με τα bifidobacteria προστίθενται στο γλυκό γάλα AB. Η θερμική επεξεργασία είναι αναγκαία για την επίτευξη επαρκούς μικροβιολογικής σταθερότητας



Σχήμα 4. Διαδικασία παραγωγής του γλυκού και του ζυμωμένου γάλακτος acidophilus (Heller, 2001)

κατά τη συντήρηση του τελικού προϊόντος (Heller, 2001). Το γάλα acidophilus μπορεί επίσης να επωαστεί στους 38 °C μέχρις ότου δημιουργηθεί πήγμα. Τέλος μπορεί να συμπεριληφθεί και το *B. bifidum* ([http5](#)).

Ένα άλλο προϊόν παρόμοιο με το γάλα acidophilus είναι γνωστό ως BRA γλυκό γάλα. Περιέχει *B. infantis*, *L. reuteri* και *L. acidophilus* και οι μικροοργανισμοί προστίθενται σε κρύο παστεριωμένο γάλα πριν από τη συσκευασία (Tamime, 2005).

### 3.5.8 Μακράς διάρκειας γαλακτοκομικά προϊόντα

Μέχρι σήμερα τα μακράς διάρκειας γαλακτοκομικά προϊόντα δεν περιείχαν ούτε οξυγαλακτικές καλλιέργειες εκκίνησης ούτε προβιοτικούς μικροοργανισμούς (Tamime, 2005). Το πρόβλημα ξεπεράστηκε με τη χρήση ενός ειδικά σχεδιασμένου καλαμακίου (γνωστό ως LifeTop™ Straw ή εναλλακτικά αναφέρεται ως προβιοτικό καλαμάκι), το οποίο κατάσκευάστηκε και κατοχυρώθηκε από την εταιρεία BioGaia στη Σουηδία ([http6](#)). Μία λυόφιλη καλλιέργεια *L. reuteri* αιωρείται σε σταγονίδια ελαίου και επισυνάπτεται στο εσωτερικό ενός διπλού καλύμματος καλαμακίου. Το καλαμάκι είναι συσκευασμένο σε μία εξωτερική συσκευασία η οποία είναι κατασκευασμένη από πλαστικοποιημένο φύλλο αλουμινίου και είναι αδιαπέραστη στην υγρασία και το οξυγόνο. Σύμφωνα με τον κατασκευαστή, το καλαμάκι περιέχει 10<sup>8</sup> cfu μικροοργανισμών, έχει διάρκεια ζωής 12 μηνών στους 25 °C και όταν ο καταναλωτής πίνει 100 ml ροφήματος αποδεσμεύεται το 99% των προβιοτικών βακτηρίων. Η ίδια ιδέα χρησιμοποιείται και σε παστεριωμένο γάλα ή γάλατα με διάφορες γεύσεις τα οποία καταναλώνονται ιδίως από τα παιδιά ([http7](#)).

## 3.6 Παχύρευστα προβιοτικά γαλακτοκομικά προϊόντα ζύμωσης

Το *Viili* (viili φινλανδικά, fil σουηδικά) και το *Långfil* είναι παραλλαγές παχύρευστων ζυμωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων, παρασκευασμένων με μεσόφιλες καλλιέργειες εκκίνησης (Tamime, 2005). Το *viili* είναι αποτελέσματα της μικροβιακής δράσης οξυγαλακτικών βακτηρίων συμπεριλαμβανομένων των *Lc. lactis* subsp. *cremoris*, *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, *Ln. mesenteroides* subsp. *cremoris* και μιας επιφανειακά αναπτυσσόμενης ζύμης *Geotrichum candidum* στο γάλα, η οποία σχηματίζει μια βελούδινη επιφάνεια. Επιπλέον, στις περισσότερες παραδοσιακές καλλιέργειες *viili* περιέχονται επίσης στελέχη ζυμομυκήτων όπως το *Kluveromyces marxianus* και *Pichia fermentans*. Μεταξύ των μεσόφιλων στελεχών οξυγαλακτικών βακτηρίων, ο *Lc. lactis* subsp. *cremoris* παράγει ένα φωσφορικό άλας που περιέχει ένα ετεροπολυσακχαρίτη, που ονομάζεται "viilian" (Leporanta, 2003). Το "viilian" είναι παρόμοιο με το "kefiran" που παράγεται από τους κόκκους κεφίρ ([http8](#)).

Το *Långfil* παράγεται με τα ίδια μεσόφιλα οξυγαλακτικά είδη βακτηρίων που παράγεται και το καλλιεργημένο βουτυρόγαλα, αλλά τα στελέχη αυτά παράγουν μεγάλες ποσότητες εξωπολυσακχαριτών, γεγονός που καθιστά το προϊόν πολύ πιο ιξώδες από το

καλλιεργημένο βουτυρόγαλα (Tamime, 2005). Σύμφωνα με τις μέχρι τώρα γνώσεις μας, δεν υπάρχουν προβιοτικά *långfil* προϊόντα στην αγορά.

Το *Filmjölk* (επίσης γνωστό ως *fil* ή *surmjölk*) είναι ένα σκανδιναβικό γαλακτοκομικό προϊόν, παρόμοιο με γιαούρτη, ζυμωμένο με μια ποικιλία στελεχών *Lc. lactis* και *Ln. mesenteroides* που προσδίδουν μια ιδιαίτερη γεύση και υφή στο προϊόν. Σε σύγκριση με τη γιαούρτη, το *filmjölk* είναι λιγότερο ξινό ([http9](#)). Στην αγορά υπάρχουν διάφορες παραλλαγές του *filmjölk* όσον αναφορά τη λιποπεριεκτικότητα, τη γεύση και το άρωμα καθώς και *filmjölk* με προβιοτικά βακτήρια, όπως είναι το *Onaka fil* που περιέχει *B. lactis* ([http10](#)) και το *Verum Hälsofil* που περιέχει *Lc. lactis* L1A NCIMB 40157 ([http11](#)).

Το *Skyr* είναι η παραδοσιακή γιαούρτη της Ισλανδίας ([http12](#)). Πρόκειται για ένα συμπυκνωμένο ζυμωμένο προϊόν γάλακτος που παράγεται από αποβουτυρωμένο γάλα ή σκόνη αποβουτυρωμένου γάλακτος, το οποίο ζυμώνεται από καλλιέργειες εκκίνησης γιαούρτης και ζύμες που ζυμώνουν τη λακτόζη. Το γάλα θερμαίνεται σε υψηλή θερμοκρασία, ψύχεται στους 40 °C, ενοφθαλμίζεται με τις καλλιέργειες εκκίνησης, επώάζεται για περίπου 5 ώρες και στη συνέχεια ψύχεται στους 20 °C. Η ζύμωση συνεχίζεται στους 20 °C για 18 ώρες, επιτρέποντας στις ζύμες να αναπτυχθούν (ή έως ότου το pH πέσει στο 4,2). Με τη χρήση μηχανικών διαχωριστήρων ή της υπερδιήθησης αφαιρείται ο ορός του γάλακτος και ανακτάται το προϊόν (Tamime, 2005). Συναντάται με διάφορες γεύσεις και με την προσθήκη της προβιοτικής καλλιέργειας *L. acidophilus*. Επίσης μπορεί να προστεθούν οι *L. paracasei*, *S. thermophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, και *Bifidobacterium* spp. ([http12](#)).

Το *Ymer* είναι ένα συμπυκνωμένο ζυμωμένο γαλακτοκομικό προϊόν που παράγεται στη Δανία. Το 1937, ο E. Larsen, ένας αγρότης από το Hatting καταχώρησε το νέο ζυμωμένο προϊόν γάλακτος με το όνομα *Ymer*. Το όνομα χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια από άλλα γαλακτοκομεία ξεκινώντας έτσι η παραγωγή του προϊόντος (Law, 1997). Το *Ymer* παράγεται από θερμικά επεξεργασμένο γάλα που έχει ομογενοποιηθεί και υπερδιηθηθεί. Όταν χρησιμοποιείτε υπερδιηθημένο γάλα, το προϊόν γίνεται πιο πυκνό. Το υπερδιηθημένο γάλα αναθερμαίνεται εκ νέου, ομογενοποιείται και υπόκειται σε ζύμωση με τους *Lc. lactis* subsp. *cremoris* και *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* στους 18-20 °C για 18-20 ώρες (τελικό pH 4,4 έως 4,6). Μετά τη ζύμωση, το προϊόν αναδεύεται, ψύχεται και αφήνεται σε ηρεμία στους 5 °C για 1 ημέρα και στη συνέχεια αναδεύεται εκ νέου πριν από τη συσκευασία (Tamime, 2007). Σύμφωνα με τις μέχρι τώρα γνώσεις μας, δεν υπάρχουν διαθέσιμα στην αγορά προβιοτικά προϊόντα *Ymer*.

Στην κατηγορία των συμπυκνωμένων ζυμωμένων γαλάτων ανήκει η *στραγγιστή* ή *ελληνικού τύπου γιαούρτη*. Στο υπερδιηθημένο ελληνικού τύπου προϊόν, ο πληθυσμός των ζωντανών κυττάρων των bifidobacteria κυμαίνεται μεταξύ  $2 \times 10^5$  και  $4 \times 10^7$  cfu/g, ανάλογα με τον τύπο του γάλακτος που χρησιμοποιείται (Tamime, 2005).

## 3.7 Διάφορα γαλακτοκομικά προϊόντα

### 3.7.1 Επαλειφόμενα γαλακτοκομικά προϊόντα

Μια επιχείρηση στο County Mayo της Ιρλανδίας ήταν η πρώτη στον κόσμο που παρήγαγε ένα καινοτόμο προβιοτικό βούτυρο για ευρέα κατανάλωση ([http13](#)). Πρόκειται για ένα πρωτότυπο προϊόν επάλειψης, μειωμένων λιπαρών (60%), από λίπος γάλακτος και λάδι σόγιας, το οποίο περιείχε μικτές καλλιέργειες *L. casei* ACA-DC 212.3 και *B. infantis* ATCC 25962. Έχει παρατηρηθεί ότι κατά τη διάρκεια της συντήρησης του προϊόντος, το ποσοστό μείωσης του πληθυσμού των bifidobacteria ήταν μεγαλύτερο από εκείνο των λακτοβάκιλλων (Tamime, 2005). Επίσης, έχει παρασκευαστεί βούτυρο χαμηλής λιποπεριεκτικότητας που περιέχει τις οξυγαλακτικές καλλιέργειες εκκίνησης *Lc. diacetilactis* και *Lc. lactis* οι οποίες ενισχύουν το άρωμα, τη γεύση, το χρώμα, τη συνεκτικότητα, και βοηθούν στη σωστή πέψη της τροφής. Το βούτυρο αυτό διατηρείται μέχρι και 17 ημέρες σε θερμοκρασία ψυγείου (0-9 °C) ([http14](#)). Τέλος προβιοτικά στελέχη του είδους *L. plantarum* έχουν απομονωθεί από το παραδοσιακό βούτυρο που παρασκευάζεται από γάλα καμήλας (Shmen) σε περιοχές της Σαχάρας στην Αλγερία (Maurad & Meriem, 2008).

### 3.7.2 Αφυδατωμένα προϊόντα

Τα αφυδατωμένα προβιοτικά φαρμακευτικά προϊόντα είναι μία σημαντική αγορά και υπάρχει μία ποικιλία από διαθέσιμα προϊόντα σε μορφή διατροφικών συμπληρωμάτων. Τα αφυδατωμένα προϊόντα παρασκευάζονται είτε με τη μέθοδο της λυοφιλοποίησης είτε με τη μέθοδο εκνεφώσεως. Το κόστος παραγωγής, η επιβίωση των προβιοτικών βακτηρίων κατά τη διάρκεια της διαδικασίας αποξήρανσης και της συντήρησης που ακολουθεί, είναι σημαντικοί παράγοντες που λαμβάνονται υπόψη κατά την παρασκευή του προϊόντος. Οι παράγοντες που αφορούν την επιβίωση των προβιοτικών μικροοργανισμών στα αφυδατωμένα προϊόντων είναι οι εξής (FAO/WHO, 2001):

- Μέθοδος αποξήρανσης
- Είδος και μέγεθος συσκευασίας
- Συνθήκες συντήρησης (θερμοκρασία, υγρασία, κ.α)
- Ποιότητα αφυδατωμένου γάλακτος (τυπικές συστάσεις)
- Διαδικασία ενυδάτωσης (θερμοκρασία)
- Χειρισμός ενυδατωμένου προϊόντος

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η παραγωγή αφυδατωμένων προβιοτικών παρασκευασμάτων για βρέφη. Ένας σημαντικός στόχος της βιομηχανίας βρεφικών τροφίμων είναι η παραγωγή λειτουργικού προϊόντος παρόμοιου με το ανθρώπινο μητρικό γάλα. Το μητρικό γάλα περιέχει bifidobacteria τα οποία συμβάλλουν στην υγιή χλωρίδα του γαστρεντερικού σωλήνα. Παράδειγμα τέτοιας γαλακτόσκονης είναι η Neslac που περιέχει *B. animalis* subsp. *lactis* BB12 (Playne *et al.*, 2003). Επίσης, σε γαλακτόσκονη της Nestle έχουν ενσωματωθεί περί τα 130 εκατομμύρια *B. lactis* ανά

100 ml ενυδατωμένου βρεφικού γάλακτος (http15). Η προσθήκη των *L. acidophilus*, *L. reuteri*, και *B. bifidum* σε βρεφική φόρμουλα και η κατανάλωση των τριών αυτών μικροοργανισμών σε πληθυσμούς της τάξης  $10^8$  έως  $10^{10}$  cfu/ημέρα, είναι αποτελεσματική για την πρόληψη της διάρροιας σε βρέφη (Tamime, 2005).

Οι Zubaith & Mufidah (2011) διεξήγαγαν μία έρευνα για να προσδιορίσουν, την ικανότητα της βρεφικής προβιοτικής φόρμουλας να αναστείλει την ανάπτυξη παθογόνων βακτηρίων, την αντίσταση των προβιοτικών βακτηρίων στο χαμηλό pH και την επίδραση της θερμοκρασίας ενυδάτωσης στην επιβίωσή τους. Χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα είδη προβιοτικής φόρμουλας (Dancow Lactobacillus Protectus, Chilkid Platinum, Kidzee Platinum και NAN 2 Probiotics). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι και τα τέσσερα προϊόντα είχαν την ικανότητα να αναστείλουν την ανάπτυξη παθογόνων βακτηρίων. Ο πληθυσμός των προβιοτικών βακτηρίων μειωνόταν σε pH 2 από  $10^3$  έως  $10^5$  cfu/ml και pH 3 από  $10^1$ - $10^2$  cfu/ml. Αναφορικά με την ενυδάτωση, όταν αυτή γινόταν σε θερμοκρασία 60-85 °C παρατηρήθηκε μείωση της επιβίωσης των προβιοτικών βακτηρίων σε σχέση με την ενυδάτωση σε θερμοκρασία 40 °C.

### 3.7.3 Πουτίγκες δημητριακών με βάση το γάλα και το νερό

Οι *L. rhamnosus* GG, *L. acidophilus* La5 και 1748, και *B. animalis* subsp. *lactis* BB12 έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για την παραγωγή πουτιγκών με βάση το γάλα και το νερό με ή χωρίς πρεβιοτικά. Όλα τα στελέχη παρουσίασαν καλή ανάπτυξη και επιβίωση στις πουτίγκες με βάση το γάλα, ενώ το *L. rhamnosus* ήταν το μόνο στέλεχος με ικανοποιητική επιβίωση σε πουτίγκες με βάση το νερό. (Helland *et al.*, 2004). Οι Irkin & Gulsas (2011) παρασκεύασαν μία πουτίγκα με κακάο στην οποία πρόσθεσαν προβιοτικούς μικροοργανισμούς και εξέτασαν την επιβίωσή τους και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του προϊόντος, κατά τη διάρκεια των 25 ημερών συντήρησής της υπό ψύξη. Οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί που ενοφθαλμίστηκαν ήταν οι *B. animalis* subsp. *lactis* LAFTI B94, *L. acidophilus* LAFTI L10, *L. casei* LAFTI L26. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η πουτίγκα με κακάο ήταν καλός φορέας των προβιοτικών μικροοργανισμών *B. animalis* subsp. *lactis* και *L. acidophilus* κατά τη διάρκεια των 15 και 25 ημερών, αντίστοιχα. Η ενσωμάτωση των προβιοτικών βακτηρίων δεν επηρέασε τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του προϊόντος εκτός από την πουτίγκα που περιείχε *L. casei*, η οποία πήρε τη χαμηλότερη οργανοληπτική αξιολόγηση.

## 4 Προβιοτικό Τυρί

Τα τελευταία χρόνια η έρευνα στον τομέα του προβιοτικού τυριού αποτελεί προτεραιότητα για τη βιομηχανία τροφίμων (Rodrigues *et al.*, 2012). Το τυρί έχει προταθεί ως ο πιο κατάλληλος φορέας προβιοτικών καλλιιεργειών σε σχέση με τα άλλα γαλακτοκομικά προϊόντα, αφενός μεν διότι συμμετέχει περισσότερο στη διαίτα του καταναλωτή (Vinderola *et al.*, 2000c; Oberg *et al.*, 2011), αφετέρου δε λόγω της καλύτερης επιβίωσης της προβιοτικής καλλιέργειας κατά τη διάρκεια της συντήρησης του προϊόντος και της διέλευσής της μέσω του γαστρεντερικού σωλήνα (Bergamini *et al.*, 2005; Ong *et al.*, 2006; Sharp *et al.*, 2008; Ortakci *et al.*, 2012). Επιπλέον, η πολύ μεγάλη ποικιλία τύπων τυριού σε όλο τον κόσμο, τα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά, η καταλληλότητα των τυριών για κατανάλωση από διάφορες ηλικιακές ομάδες (Gomes & Malcata, 1999), καθώς και η υψηλή διατροφική τους αξία, που αφορά στην υψηλή περιεκτικότητα τους σε ασβέστιο και στην παρουσία των απαραίτητων αμινοξέων (Ash & Wilbey, 2010), κατατάσσουν το προβιοτικό τυρί ως το πλέον υποσχόμενο προϊόν στην αναπτυσσόμενη αγορά των γαλακτοκομικών τροφίμων (Karimi *et al.*, 2012b).

Πολλοί ερευνητές και παρασκευαστές έχουν ενσωματώσει προβιοτικούς μικροοργανισμούς σε διάφορα είδη τυριών, όπως: το τυρί Minas fresco (Souza *et al.*, 2008), φρέσκο τυρί κρέμα με προσθήκη ινουλίνης, Crescenza (Gobbetti *et al.*, 1997), Cottage, μαλακό τυρί, Petit Suisse, Argentinean fresco (Vinderola *et al.*, 2000c), Arzúa-Ulloa, Kariesh, τυρί Cremoso, Μασκαρπόνε, Γκούντα, Pategrás (Bergamini *et al.*, 2009a), προβιοτικό αίγαιο τυρί (Gomes & Malcata, 1998), Festivo, Canestrato Pugliese σκληρό τυρί, Tallaga, Cheddar (Phillips *et al.*, 2006; Sharp *et al.*, 2008), τυρί τύπου Cheddar, Ιρανικό λευκό τυρί άλμης, Τουρκικό άσπρο τυρί (Kasimoğlu *et al.*, 2004), λευκό τυρί άλμης (Özer *et al.*, 2009), Kasar τυρί (Özer *et al.*, 2008), λευκό τυρί και Τούρκικο τυρί Beyaz (Kasimoğlu *et al.*, 2004).

Μελέτες έχουν δείξει ότι τα τυριά, Τουρκικό λευκό τυρί άλμης, τυρί τύπου Φέτας, Cheddar, λευκό μαλακό τυρί Φιλιπίνων, Edam, Emmental, Domiati, Ras, τυριά Herrgård και Quarg, αποτελούν καλύτερους φορείς διανομής ζωντανών προβιοτικών μικροοργανισμών στον άνθρωπο σε σχέση με την γιαούρτη (Tamime, 2005). Οι Gomes *et al.* (2011) από την άλλη πλευρά έχουν αναφέρει ότι τα 30 g τυριού περιέχουν περίπου 4 δισεκατομμύρια προβιοτικά ζωντανά κύτταρα, τα οποία εξακολουθούν να είναι λιγότερα από τις τιμές που διαπιστώνονται στα εμπορικά ζυμωμένα γάλατα και στα γιαούρτια (10 δισεκατομμύρια κύτταρα ανά μερίδα). Θεωρείται λοιπόν πιο πρακτικό η κατανάλωση 200 mL ζυμωμένου γάλακτος ή γιαούρτης σε σύγκριση με την κατανάλωση μίας φέτας τυριού, που μπορεί να εξηγήσει, μεταξύ άλλων, την προτίμηση των καταναλωτών για τα ζυμωμένα γάλατα ή τα γιαούρτια ως φορείς διανομής των προβιοτικών μικροοργανισμών.

Ένα από τα πιο σημαντικά χαρακτηριστικά του τυριού που επηρεάζει την ανάπτυξη των προβιοτικών μικροοργανισμών είναι το pH. Σε σύγκριση με τα υγρά γαλακτοκομικά προϊόντα που έχουν υποστεί ζύμωση, το τυρί έχει χαμηλότερη οξύτητα και ενεργότητα ύδατος (Sumeri *et al.*, 2012). Οι μικροοργανισμοί αυτοί χρειάζονται λιγότερο όξινο περιβάλλον από τις ζύμες για να αναπτυχθούν. Το pH στα ζυμωμένα γάλατα κυμαίνεται από 3,7 – 4,3, το οποίο είναι χαμηλότερο από το pH του τυριού που βρίσκεται μεταξύ 4,8 – 5,6. Συνεπώς, τα προβιοτικά βακτήρια μπορούν να αναπτυχθούν πιο εύκολα στο

υπόστρωμα του τυριού καθώς το pH είναι πιο κοντά στη βέλτιστη τιμή ανάπτυξής τους (Plessas *et al.*, 2012).

Επιπλέον, το πρωτεϊνικό υπόστρωμα του τυριού, η πιο συμπαγής υφή, και η υψηλότερη περιεκτικότητα σε λίπος (Boylston *et al.*, 2004; Ong *et al.*, 2006) προσφέρουν επιπλέον προστασία στους προβιοτικούς μικροοργανισμούς από τις περιβαλλοντικές αλλαγές κατά τη διάρκεια της παραγωγής, της ωρίμανσης και της κατανάλωσης του τυριού από τον άνθρωπο (Vinderola *et al.*, 2002b; Phillips *et al.*, 2006).

Τέλος το τυρί παρέχει την καλύτερη δυνατότητα διανομής των προβιοτικών μικροοργανισμών στο εντερικό σωλήνα του ανθρώπου σε σύγκριση με τα ζυμωμένα γάλατα, λόγω της υψηλότερης διαθεσιμότητας των θρεπτικών συστατικών και της χαμηλότερης περιεκτικότητας σε οξυγόνο (Settanni & Moschetti, 2010; Karimi *et al.*, 2012b). Δημιουργεί ένα ρυθμιστικό σύστημα εναντίον του πολύ όξινου περιβάλλοντος του γαστρεντερικού σωλήνα, παρέχοντας ένα πιο ευνοϊκό περιβάλλον για την επιβίωση των προβιοτικών μικροοργανισμών κατά τη διέλευση τους από το γαστρεντερικό σωλήνα, λόγω του υψηλότερου pH του τυριού (Cruz *et al.*, 2009b). Το χαμηλότερο pH και τα υψηλότερα επίπεδα του οξυγόνου σε ένα υγρό υπόστρωμα, όπως είναι στα ζυμωμένα γάλατα και στη γιαούρτη, δεν μπορούν να διατηρήσουν ένα επαρκή αριθμό άνω των  $10^7$  ζωντανών προβιοτικών κύτταρων/g προϊόντος μέχρι το τέλος της διάρκειας ζωής του προϊόντος (Ortakci *et al.*, 2012).

Ένα μειονέκτημα του τυριού είναι οι σχετικά μικρές μερίδες οι οποίες απαιτούν αυξημένες συγκεντρώσεις προβιοτικών. Και τελευταίο αλλά όχι λιγότερο σημαντικό, η αγορά του τυριού αποτελείται από ένα μεγάλο αριθμό μικρών παρασκευαστών ενώ τα καθιερωμένα ονόματα των γνωστών παρασκευαστών είναι μάλλον η εξαίρεση. Το γεγονός αυτό το καθιστά δύσκολο για τους μικρούς παραγωγούς των προβιοτικών τυριών να καθιερώσουν ένα επώνυμο προϊόν και να αποσβέσουν το υψηλό κόστος της έρευνας, των νομικών διατάξεων και της εμπορίας (de Vrese & Schrezenmeir, 2008).

#### **4.1 Το τυρί ως υπόστρωμα ενσωμάτωσης προβιοτικών μικροοργανισμών**

Η επιβίωση των προβιοτικών μικροοργανισμών στο τυρί είναι ένα πολύπλοκο φαινόμενο (Karimi *et al.*, 2012b). Οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί πρέπει να επιβιώνουν καθόλη τη διάρκεια ζωής του τυριού, δεν θα πρέπει να παράγουν μεταβολίτες, κατά τη διάρκεια της παρασκευής ή ωρίμανσης, που να είναι επιζήμιοι για την ποιότητα του τυριού, και δεν θα πρέπει να παρεμβαίνουν στη φυσιολογική δραστηριότητα των άλλων βασικών μικροοργανισμών του τυριού. Επιπλέον, θα πρέπει να είναι σε θέση να αναπτυχθούν μαζί με την καλλιέργεια εκκίνησης σε υπόστρωμα, όπως είναι ο ορός γάλακτος ή σε υποστρώματα που εμποδίζουν την ανάπτυξη των βακτηριοφάγων (Tamime, 2005).

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την επιβίωση των προβιοτικών μικροοργανισμών στο τυρί μπορούν να ταξινομηθούν σε 3 κατηγορίες (Karimi *et al.*, 2011; Karimi *et al.*, 2012a; Karimi *et al.*, 2012b):



α) στους παράγοντες τυποποίησης, στους οποίους περιλαμβάνονται τα χρησιμοποιηθέντα προβιοτικά στελέχη, οι μικροβιακές αλληλεπιδράσεις, ο μικροβιακός ανταγωνισμός, το pH, η οξύτητα, το υπεροξειδίο του υδρογόνου, το μοριακό οξυγόνο, οι αυξητικοί παράγοντες, τα αντιμικροβιακά συντηρητικά, το δυναμικό οξειδοαναγωγής, οι βακτηριοσίνες, οι αρωματικοί παράγοντες, η προσθήκη αλατιού, η συμπλήρωση γάλακτος με θρεπτικά συστατικά, η μικροεγκαψυλίωση και οι παράγοντες ωρίμανσης,

β) στους παράγοντες επεξεργασίας, στους οποίους περιλαμβάνονται η θερμική επεξεργασία, η θερμοκρασία επώασης, τα είδη επώασης και η θερμοκρασία συντήρησης,

γ) στα υλικά συσκευασίας.

Το νωπό τυρί φαίνεται να είναι κατάλληλος φορέας για τους προβιοτικούς μικροοργανισμούς γιατί δεν υφίσταται ωρίμανση και έχει περιορισμένο χρόνο ζωής σε θερμοκρασίες ψυγείου (Granato *et al.*, 2010). Οι Souza *et al.* (2008) μελέτησαν την παρασκευή του νωπού τυριού Minas που ενοφθαλμίστηκε με το προβιοτικού στελέχους *L. acidophilus* La-5 μεμονωμένα ή σε συνδυασμό με την καλλιέργεια *S. thermophilus*. Τα τυριά που παρασκευάστηκαν με το προβιοτικό στέλεχος παρουσίαζαν πληθυσμό άνω του  $1 \times 10^6$  cfu/g, φθάνοντας το  $1 \times 10^7$  cfu/g την 14<sup>η</sup> ημέρα της συντήρησης. Επίσης, η προσθήκη του προβιοτικού στελέχους οδήγησε στη βελτίωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών τους. Οι Cruz *et al.* (2009b) εξέτασαν την επιβίωση των στελεχών *L. acidophilus* JCN11047, *L. acidophilus* 1132T και *L. gasseri* JCM11657, που απομονώθηκαν από το έντερο του ανθρώπου και έχουν υψηλή αντοχή στο γαστρικό υγρό και τη χολή. Οι μικροοργανισμοί αυτοί ενοφθαλμίστηκαν σε νωπά τυριά τα οποία συντηρήθηκαν στους 7 °C για 4 εβδομάδες. Τα αποτελέσματα έδειξαν μία αμελητέα μείωση της επιβίωσης όλων των στελεχών καθόλη τη διάρκεια ζωής των τυριών, με τους πληθυσμούς τους να παραμένουν σε επίπεδα πάνω από  $8 \times 10^7$  cfu/g μέχρι το τέλος της συντήρησής τους.

Σε ότι αφορά τα τυριά τυρογάλακτος, αυτά, σε σύγκριση με τ' άλλα γαλακτοκομικά τρόφιμα, παρέχουν σημαντική προστασία στα προβιοτικά στελέχη λόγω του σχετικά υψηλού τους pH, της λιποπεριεκτικότητας και της μηχανικής συνοχής τους, σε συνδυασμό με το τυπικά χαμηλό επίπεδο του οξυγόνου. Επιπροσθέτως, η λιγότερο απαιτητική τεχνολογία τους, η ταχύτερη παρασκευή, η υποχρεωτική συντήρηση σε θερμοκρασίες ψυγείου, και η τυπικά μικρή διάρκεια ζωής τους, κατατάσσει τα τυριά τυρογάλακτος στους ιδιαίτερα κατάλληλους φορείς για τα προβιοτικά στελέχη (Plessas *et al.*, 2012).

Η παραγωγή ενός λειτουργικού τροφίμου προϋποθέτει η προβιοτική καλλιέργεια να διατηρείται ζωντανή κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης του τυριού (Cruz *et al.*, 2009b) και επιπλέον να μην επηρεάζει αρνητικά τα ποιοτικά του χαρακτηριστικά (Kalavrouzioti *et al.*, 2005). Το δύσκολο έργο στην παραγωγή του προβιοτικού τυριού δεν είναι η ανάπτυξη των προβιοτικών βακτηρίων, αλλά η επιβίωσή τους λόγω της μακράς περιόδου ωρίμανσής του (Plessas *et al.*, 2012). Το τυρί περιέχει ένα πολύπλοκο συνδυασμό μικροοργανισμών που αλλάζει με το χρόνο (Karimi *et al.*, 2012b) και, παρόλο που ενοφθαλμίζεται μόνο με περιορισμένα είδη, κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης του αναπτύσσεται μια ποικίλη μικροβιακή χλωρίδα (Rodrigues *et al.*, 2012). Η μικροχλωρίδα του τυριού αποτελείται από βακτήρια εκκίνησης (Starter Lactic Acid Bacteria, SLAB), τα οποία φθάνουν στο μέγιστο επίπεδο κατά τη διάρκεια της

παρασκευής του, ενώ κατά την ωρίμανση αναπτύσσεται ένας αυξανόμενος αριθμός βακτηρίων (Non Starter Lactic Acid Bacteria, NSLAB) που δεν ανήκουν στην καλλιέργεια εκκίνησης, τα οποία βρίσκονται στο γάλα ή εισάγονται κατά τη διάρκεια της παρασκευής του τυριού (Ross *et al.*, 2002; Ong & Shah, 2008). Διάφορα NSLAB βακτήρια, όπως τα *L. plantarum*, *L. rhamnosus* και *L. casei*, έχουν απομονωθεί από διάφορα είδη τυριών και έχουν ελεγχθεί αν πληρούν τα κριτήρια επιλογής για χρήση τους ως προβιοτικοί μικροοργανισμοί. Η αντοχή αυτών των λακτοβακίλλων, στο χαμηλό pH, τα χολικά άλατα, την πεψίνη και την παγκρεατίνη σε βιολογικές συγκεντρώσεις, έχει αποδειχθεί ότι είναι εξαρτώμενη από το στέλεχος. Επιπλέον, διάφορες μελέτες έχουν αποδείξει ότι οι προβιοτικοί λακτοβάκιλλοι ανθρώπινης προέλευσης καθώς και εκείνοι που απομονώθηκαν από διάφορα τυριά, επιβιώνουν κατά την περίοδο ωρίμανσης των τυριών (Phillips *et al.*, 2006).

Σε τυριά με μεγάλο χρονικό διάστημα ωρίμανσης, όπως το Cheddar, απαιτείται προσεκτική εξέταση της καταλληλότητας των συγκεκριμένων στελεχών (Ross *et al.*, 2002). Ο έλεγχος της δυνατότητας των σκληρών τυριών να χρησιμοποιηθούν ως φορέας προσφοράς προβιοτικών βακτηρίων στον καταναλωτή, έγκειται στο προσδιορισμό της επιβίωσης των προβιοτικών βακτηρίων, που χρησιμοποιούνται ως συμπληρωματικές καλλιέργειες, ανάμεσα στο μικτό πληθυσμό της υπάρχουσας μικροχλωρίδας του τυριού. Αυτός ο προσδιορισμός γίνεται πιο δύσκολος λόγω της αύξησης των NSLAB κατά τη διάρκεια της περιόδου ωρίμανσης των τυριών ειδικότερα επειδή πολλά από αυτά τα NSLAB συνδέονται στενά με τις συμπληρωματικές προβιοτικές καλλιέργειες (Oberg *et al.*, 2011).

Οι Sharp *et al.* (2008) χρησιμοποίησαν το *L. casei* 334e, ένα ανθεκτικό στην ερυθρομυκίνη παράγωγο του στελέχους ATCC 334, ως μοντέλο για να συγκρίνουν την επιβίωσή του σε γιαούρτη και σε τυρί Cheddar χαμηλών λιπαρών κατά τη συντήρησή τους υπό ψύξη. Οι συγγραφείς συμπέραναν ότι τα ζωντανά κύτταρα παρουσίασαν καλή σταθερότητα και στα δύο προϊόντα ( $10^7$  cfu/g), με αμελητέα μεταβολή του πληθυσμού κατά τη διάρκεια των 3 μηνών συντήρησης για το τυρί και των 3 εβδομάδων για τη γιαούρτη. Στην περίπτωση της έκθεσης σε όξινες συνθήκες, ο πληθυσμός του *L. casei* 334e παρέμενε σε υψηλότερα επίπεδα ( $10^4$  cfu/g) στο τυρί Cheddar, μετά από 120 λεπτά έκθεσης, σε σύγκριση με τη γιαούρτη που μειώθηκε σε επίπεδα κάτω από 10 cfu/g, μετά από 30 λεπτά έκθεσης. Σε ένα άλλο πείραμα με τυρί Cheddar, προβιοτικά στελέχη του *E. faecium* επιβίωσαν σε πληθυσμούς  $1.1 \times 10^8$  έως  $3.9 \times 10^8$  cfu/g μετά από 250 ημέρες ωρίμανσης. Ο αρχικός πληθυσμός ήταν  $6.9 \times 10^7$  cfu/g. Στο ίδιο πείραμα ένα άλλο στέλεχος του *E. faecium* επιβίωσε σε πληθυσμό  $1.7 \times 10^8$  cfu/g μετά από 430 ημέρες ωρίμανσης (Plessas *et al.*, 2012). Οι Gomes & Malcata (1998), ανέφεραν ότι οι *B. lactis* και *L. acidophilus* διατηρήθηκαν σε πληθυσμούς της τάξης των  $10^7$  cfu/g και  $10^6$  cfu/g, αντίστοιχα, σε αίγιο τυρί μετά από 70 ημέρες συντήρησης. Οι Oberg *et al.* (2011) πρόσθεσαν το *B. infantis* σε καλλιεργημένη κρέμα για την παραγωγή τυριού τύπου Cheddar και ανέφεραν την ύπαρξη bifidobacteria σε πληθυσμούς της τάξης των  $10^6$  cfu/g μέχρι την 84<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης του τυριού στους 4°C. Οι Mc Brearty *et al.* (2001) παρασκεύασαν τυρί Cheddar με 2 εμπορικά στελέχη των bifidobacteria και διαπίστωσαν πληθυσμό  $>10^8$  cfu/g μετά από 6 μήνες συντήρησης όταν χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος *B. lactis* BB12, ενώ ο πληθυσμός ήταν μικρότερος ( $10^5$  cfu/g) όταν χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος *B. longum* BB536.

Επιπλέον, οι Bergamini *et al.* (2005) ανέφεραν ότι σε μελέτες που έγιναν σε ημίσκληρο τυρί, ο πληθυσμός του προβιοτικού στελέχους *L. acidophilus* ήταν υψηλότερος από  $10^7$

cfu/g μετά από έξι μήνες ωρίμανσης, και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι τα ημίσκληρα τυριά ήταν κατάλληλοι φορείς για την προσφορά προβιοτικών μικροοργανισμών.

Εκτός του τυριού Cheddar (Phillips *et al.*, 2006) και του Cheddar χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά (Sharp *et al.*, 2008) έχουν ερευνηθεί και διάφορα άλλα τυριά, συμπεριλαμβανομένων των Gouda και Cottage (Heller, 2001), Τούρκικο άσπρο τυρί (Kasimoğlu *et al.*, 2004), τυρί Αργεντινής (Bergamini *et al.*, 2005) και Kaşar (Özer *et al.*, 2008), αλλά δεν έχει ακόμη αναφερθεί εάν οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί μπορούν να επιβιώσουν σε τυριά που εκτίθενται σε ισχυρή θερμική επεξεργασία, όπως συμβαίνει και στην διαδικασία *pasta filata* που χρησιμοποιείται για την παρασκευή του τυριού Mozzarella (Ortakci *et al.*, 2012).

Τα διάφορα υποστρώματα έχουν σημαντικές επιδράσεις στην επιτυχή δίοδο των προβιοτικών μικροοργανισμών στο έντερο (Karimi *et al.*, 2012b). Έχουν αναφερθεί απώλειες της τάξεως των 6 έως 9 log cfu/g προβιοτικών μικροοργανισμών σε προσομοίωση γαστρικής πέψης, ανάλογα με το βακτηριακό στέλεχος και τις συνθήκες δοκιμών (Ortakci *et al.*, 2012). Ωστόσο, υπάρχουν περιορισμένες μελέτες που σχετίζονται με την επιβίωση των προβιοτικών κυττάρων στα τυριά υπό συνθήκες γαστρεντερικού σωλήνα. Στις μελέτες αυτές εμφανίζεται μία σχετικά καλή προστασία του υποστρώματος του τυριού (Fresco, Cheddar, Minas fresh) για τα προβιοτικά στελέχη (*B. bifidum* και *L. casei*) κάτω από προσομοιωμένες συνθήκες γαστρεντερικού σωλήνα, με μείωση του πληθυσμού κατά περίπου 2 έως > 3 λογάριθμους (Vinderola *et al.*, 2000c; Sharp *et al.*, 2008).

## 4.2 Επιλογή στελέχους

Η σημασία της σωστής επιλογής του μικροβιακού στελέχους για τις προβιοτικές γαλακτοκομικές εφαρμογές αναγνωρίζεται ευρέως, και ισχύει και για τα τυριά. Οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται στην τυροκομία ανήκουν στα γένη *Lactobacillus* και *Bifidobacterium*. Πολυάριθμα στελέχη προβιοτικών μικροοργανισμών έχουν προστεθεί επιτυχώς σε διαφορετικούς τύπους τυριών συμπεριλαμβανομένων των λακτοβακίλλων (*L. acidophilus*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. gasseri*) και των *Bifidobacterium* (*B. animalis* subsp. *lactis*, *B. longum*, *B. bifidum*, και *B. infantis*) (Kalavrouzioti *et al.*, 2005). Τα bifidobacteria έχουν χρησιμοποιηθεί σε τυριά όπως το Cheddar, Cottage, Crescenza, Canestrato Pugliese και σε αίγιο τυρί. Ο συνδυασμός των bifidobacteria με *L. acidophilus* δοκιμάστηκε στο αίγιο τυρί Queijo de Cabra, στο Argentinean fresco και σε ένα νέο τυρί με χαμηλά λιπαρά (Bergamini *et al.*, 2005).

Επιπλέον, έχουν αποδειχτεί οι προβιοτικές ιδιότητες των βακτηρίων του γένους *Propionibacterium*, ειδικότερα το *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* (Karimi *et al.*, 2011), καθώς και του γένους *Enterococcus* (Plessas *et al.*, 2012), που επίσης χρησιμοποιούνται στα τυριά. Ορισμένα στελέχη των προπιονικών βακτηρίων χρησιμοποιούνται στην παρασκευή του Ελβετικού τυριού προσφέροντας τη δυνατότητα αύξησης της διατροφικής αξίας του τυριού. Έχει αποδειχθεί ότι το *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* παράγει ένα bifidογενή παράγοντα που χρησιμεύει ως αυξητικός παράγοντας για τα bifidobacteria (Tamime, 2005). Τέλος, έχουν απομονωθεί ζυμομύκητες, με προβιοτικές ιδιότητες, από κόπρανα βρεφών και από το τυρί Φέτα, οι

οποίοι θα μπορούσαν, κάτω από ορισμένες προϋποθέσεις, να ενσωματωθούν σε διάφορους τύπους νωπών και τυριών που έχουν υποστεί ωρίμανση αυξάνοντας έτσι τη διατροφική αξία των προϊόντων (Psomas *et al.*, 2001). Αρκετοί τύποι τυριών παρασκευάζονται με ενσωμάτωση προβιοτικών βακτηρίων (Πίνακας 10).

Οι Vinderola *et al.* (2000c) διαπίστωσαν ότι η επιβίωση των *B. bifidum*, *L. acidophilus* και *L. casei* ήταν μεγαλύτερη σε τυρόπηγμα από ότι σε ρυθμιστικό διάλυμα, όταν και τα δύο είχαν ρυθμιστεί σε pH=3. Υπάρχουν σημαντικές διαφορές στην επιβίωση των διαφόρων ειδών και γενοτύπων των οξυγαλακτικών βακτηρίων και μεταξύ των στελεχών εντός των ειδών *L. casei/L. paracasei*. Κάτω από προσομοιωμένες συνθήκες του γαστρεντερικού σωλήνα, τα πιο πολλά σε αριθμό και σε ανθεκτικότητα είδη NSLAB του τυριού ήταν τα *L. casei/paracasei*. Οι διαφορές στους πληθυσμούς και τα ποσοστά επιβίωσης των NSLAB, ειδικά εκείνων των *L. casei/paracasei* επηρεάζουν σημαντικά τη συνολική επιβίωση της μικροχλωρίδας του τυριού.

Πίνακας 10. Τυριά με ενσωματωμένα προβιοτικά βακτήρια (Plessas *et al.*, 2012)

Τύπος Τυριού	Ενσωματωμένα προβιοτικά βακτήρια
Cheddar	<i>L. salivarius</i> , <i>L. paracasei</i>
	<i>L. paracasei</i>
	<i>B. lactis</i> , <i>B. Longum</i>
	<i>B. infantis</i>
	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>B. longum</i>
Gouda	<i>L. acidophilus</i> , bifidobacteria
Fresco	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. bifidum</i>
Canestrato Pugliese	<i>B. longum</i> , <i>B. bifidum</i>
Λευκό τυρί	<i>L. acidophilus</i>
Argentinean	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. paracasei</i>
Minas	<i>L. paracasei</i>
Τυρί τύπου Κεφαλοτύρι	<i>L. rhamnosus</i> , <i>L. paracasei</i>
Τυρί τύπου Φέτα	<i>L. casei</i>
Crescenza (Ιταλία)	<i>B. bifidum</i> , <i>B. longum</i>

Επίσης, η επίδραση άλλων παραγόντων, όπως το νωπό γάλα, η σύνθεση του τυριού, διάφορες παράμετροι επεξεργασίας ή αλληλεξάρτησης μεταξύ των οξυγαλακτικών βακτηρίων κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης, μπορούν να επηρεάσουν τη μικροβιακή σύνθεση ενός τυριού και την επιβίωσή τους κατά τη διάρκεια της διέλευσης από το γαστρεντερικό σωλήνα (Rodrigues *et al.*, 2012).

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή των χαρακτηριστικών ιδιοτήτων των διαφορετικών τύπων τυριού ενισχύουν την ανάπτυξη και την επιβίωση των bifidobacteria μέσω της μεταβολής του pH, της περιεκτικότητας των αυξητικών παραγόντων και των παραγόντων αναστολής, καθώς και της περιεκτικότητας του τυριού σε οξύγονο. Έχει αποδειχθεί ότι επιλεγμένα στελέχη *S. thermophilus* με μεγάλη ικανότητα κατανάλωσης οξυγόνου ενισχύουν την επιβίωση των bifidobacteria στα τυριά (Boylston *et al.*, 2004).

Η προσθήκη των bifidobacteria στο τυρί, έχει αποδειχθεί τεχνολογικά και οικονομικά εφικτή. Τα *B. bifidum* και *B. longum* έδειξαν καλή επιβίωση κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας και της συντήρησης αρκετών τυριών (Plessas *et al.*, 2012). Τα τυριά έχουν εύρος pH 4,8-5,6 και παρέχουν ένα πιο σταθερό περιβάλλον για τη μακροπρόθεσμη επιβίωση των οξεοευαίσθητων bifidobacteria. Ο μεταβολισμός τους εντός του υποστρώματος του τυριού οδηγεί στην ανάπτυξη ενός σχεδόν αναερόβιου περιβάλλοντος μετά από λίγες εβδομάδες ωρίμανσης του τυριού, ευνοώντας την επιβίωση των bifidobacteria και άλλων αναερόβιων μικροοργανισμών (Boylston *et al.*, 2004). Αρκετά λοιπόν στελέχη bifidobacteria έχουν ενσωματωθεί επιτυχώς σε τυριά χωρίς σημαντικές αλλαγές στην επεξεργασία. Αυτό είναι αντίθετο με ότι συμβαίνει στη γιαούρτη, όπου η ενσωμάτωσή τους περιορίζεται στο *B. animalis*, ένα βακτήριο που απομονώνεται στα ζώα, λόγω της μεγάλης αντοχής του στο οξύ και το οξύγονο σε σύγκριση με τα ανθρώπινα bifidobacteria (Grattepanche *et al.*, 2008).

Οι Plessas *et al.* (2012) μελέτησαν την επιβίωση των καλλιεργίων *B. catelanum*, *B. longum*, *B. breve*, *B. angulatum*, *B. bifidum* και *B. infantis* στο τυρί Cottage μετά από 14 ημέρες παραμονής στο ψυγείο. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η καλλιέργεια *B. bifidum* διατήρησε τη ζωτικότητα της χωρίς αμελητέες απώλειες, ενώ η *B. breve* και η *B. infantis* επιβίωσαν σε μικρό βαθμό.

Οι Gobbetti *et al.* (1997) ενσωμάτωσαν τρία είδη *Bifidobacterium*, τα *B. bifidum*, *B. longum* και *B. infantis* σε τυρί Crescenza, στο οποίο διατηρήθηκε ο πληθυσμός των κυττάρων τους σε επίπεδα  $10^8$ ,  $10^7$  και  $10^5$  cfu/g, αντίστοιχα, για 14 ημέρες μετά την παρασκευή του. Αντίθετα, άλλοι ερευνητές διαπίστωσαν μικρούς πληθυσμούς προβιοτικών βακτηρίων, ιδιαίτερα των bifidobacteria, κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης του τυριού (Mc Brearty *et al.*, 2001).

### 4.3 Ενσωμάτωση των προβιοτικών βακτηρίων σε τυριά

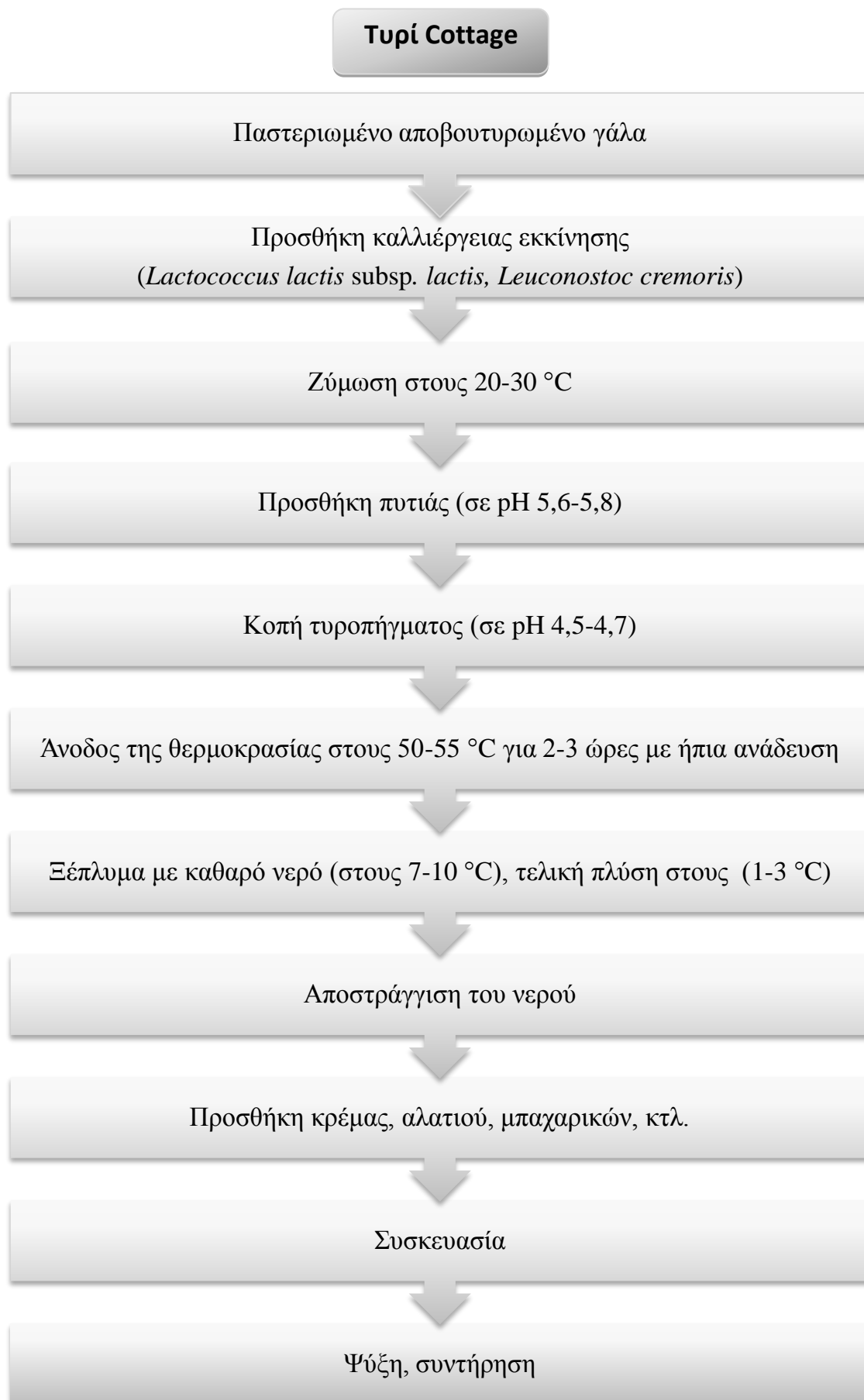
Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται στην τυροκομία σε συνδυασμό με τις ειδικές επεξεργασίες συμβάλλουν στα διακριτά χαρακτηριστικά της γεύσης και της υφής των διαφόρων τύπων τυριού (Granato *et al.*, 2010). Ο χρόνος και η μέθοδος προσθήκης της προβιοτικής καλλιέργειας κατά τη διάρκεια παρασκευής του τυριού πρέπει να επιλέγονται προσεκτικά και είναι δυνατόν να εξαρτώνται από το στέλεχος ή την ποικιλία τυριού (Tamime, 2005). Για την επιλογή του καταλληλότερου χρόνου εισαγωγής της προβιοτικής καλλιέργειας είναι σημαντική η ανάλυση όλων των βημάτων που εμπλέκονται στην παρασκευή του τυριού, ιδιαίτερα της θερμοκρασίας θέρμανσης του γάλακτος ή αναθέρμανσης του τυροπήγματος, διαδικασίες που συνήθως χρησιμοποιούνται από τους παραγωγούς και οι οποίες μπορεί να έχουν αρνητικές επιπτώσεις στην επιβίωση των προβιοτικών βακτηρίων. Είναι επίσης σημαντικό να

εξεταστούν οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των προβιοτικών μικροοργανισμών και των καλλιέργειών εκκίνησης, οι οποίες μπορούν να επιδράσουν αρνητικά την παρασκευή και τη σταθερότητα του προϊόντος (Cruz *et al.*, 2009b).

Η επιτυχία της ενσωμάτωσης των προβιοτικών μικροοργανισμών στα τυριά εξαρτάται από τα προβιοτικά στελέχη, τη δραστικότητα των οξυγαλακτικών βακτηρίων που χρησιμοποιούνται στην παρασκευή του τυριού, τη σύνθεση του τυριού, και τις συνθήκες επεξεργασίας και ωρίμανσής του (Boylston *et al.*, 2004). Υπάρχουν δύο τρόποι προσθήκης των προβιοτικών μικροοργανισμών κατά τη διάρκεια παρασκευής του τυριού, οι οποίοι μπορούν να επηρεάσουν άμεσα την επιβίωσή τους. Τα προβιοτικά βακτήρια μπορούν να εισαχθούν στο τυρί μαζί με τις οξυγαλακτικές καλλιέργειες εκκίνησης, ως συμπληρωματικές καλλιέργειες, πριν από τη ζύμωση, ή μετά από αυτή (Mc Brearty *et al.*, 2001). Η εισαγωγή των προβιοτικών μικροοργανισμών, μαζί με τις οξυγαλακτικές καλλιέργειες εκκίνησης απευθείας στο γάλα πριν από την τυροκόμηση αυξάνει τον κίνδυνο απώλειας μεγάλου αριθμού προβιοτικών κυττάρων στον ορό του γάλακτος ή κυριαρχίας της οξυγαλακτικής καλλιέργειας εκκίνησης. Αυτό παρατηρείται λόγω της αργής ανάπτυξης των προβιοτικών μικροοργανισμών, αλλά με την κατάλληλη επιλογή του στελέχους, η μέθοδος αυτή έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς (Tamime, 2005). Στην πρώτη επιλογή πρέπει να πραγματοποιούνται προκαταρκτικές δοκιμές για να γίνεται γνωστός ο πληθυσμός των προβιοτικών κυττάρων που χάνονται στο τυρόγαλα κατά τη διάρκεια της αποστράγγισης (Oberg *et al.*, 2011). Στη δεύτερη περίπτωση εκτελείται άμεση ψύξη του προϊόντος (κατά προτίμηση κάτω των 8 °C), γιατί οι μεταβολικές δραστηριότητες της καλλιέργειας εκκίνησης και των προβιοτικών βακτηρίων μειώνονται δραστικά σε αυτές τις θερμοκρασίες (Cruz *et al.*, 2009b). Τα προβιοτικά στελέχη θα πρέπει να είναι τεχνολογικά συμβατά με τη διαδικασία παρασκευής του τυριού. Η καλλιέργεια αυτών των στελεχών θα πρέπει να αποδίδει υψηλή πυκνότητα κυττάρων για τον επιτυχή ενοφθαλισμό τους, ή τα στελέχη να είναι σε θέση να πολλαπλασιάζονται κατά την διάρκεια της διαδικασίας παρασκευής ή/και ωρίμανσης του τυριού (Ross *et al.*, 2002). Τα προβιοτικά κύτταρα που βρίσκονται στο τέλος της εκθετικής φάσης και την αρχή της στατικής φάσης ανάπτυξης είναι η καλύτερη επιλογή (Cruz *et al.*, 2009b).

Η προσθήκη των προβιοτικών βακτηρίων στο τυρί Cottage μπορεί να πραγματοποιηθεί μαζί με την προσθήκη της καλλιέργεια εκκίνησης ή κατά την προσθήκη της κρέμας και του αλατιού. Η προσθήκη μαζί με την καλλιέργεια εκκίνησης είναι προβληματική για 2 λόγους. Πρώτον, ένας σημαντικός αριθμός βακτηριακών κυττάρων χάνονται από το τυρόπηγμα κατά την αποστράγγιση του ορού. Δεύτερον, θερμοκρασίες γύρω στους 55 °C μπορούν να επηρεάζουν αρνητικά την επιβίωση των προβιοτικών βακτηρίων στο προϊόν. Η καλύτερη λύση για το τυρί Cottage είναι η προσθήκη των προβιοτικών βακτηρίων μαζί με την κρέμα και το αλάτι (Heller, 2001; Cruz *et al.*, 2009b). Στο Σχήμα 5 περιγράφεται η μέθοδος παρασκευής του τυριού Cottage.

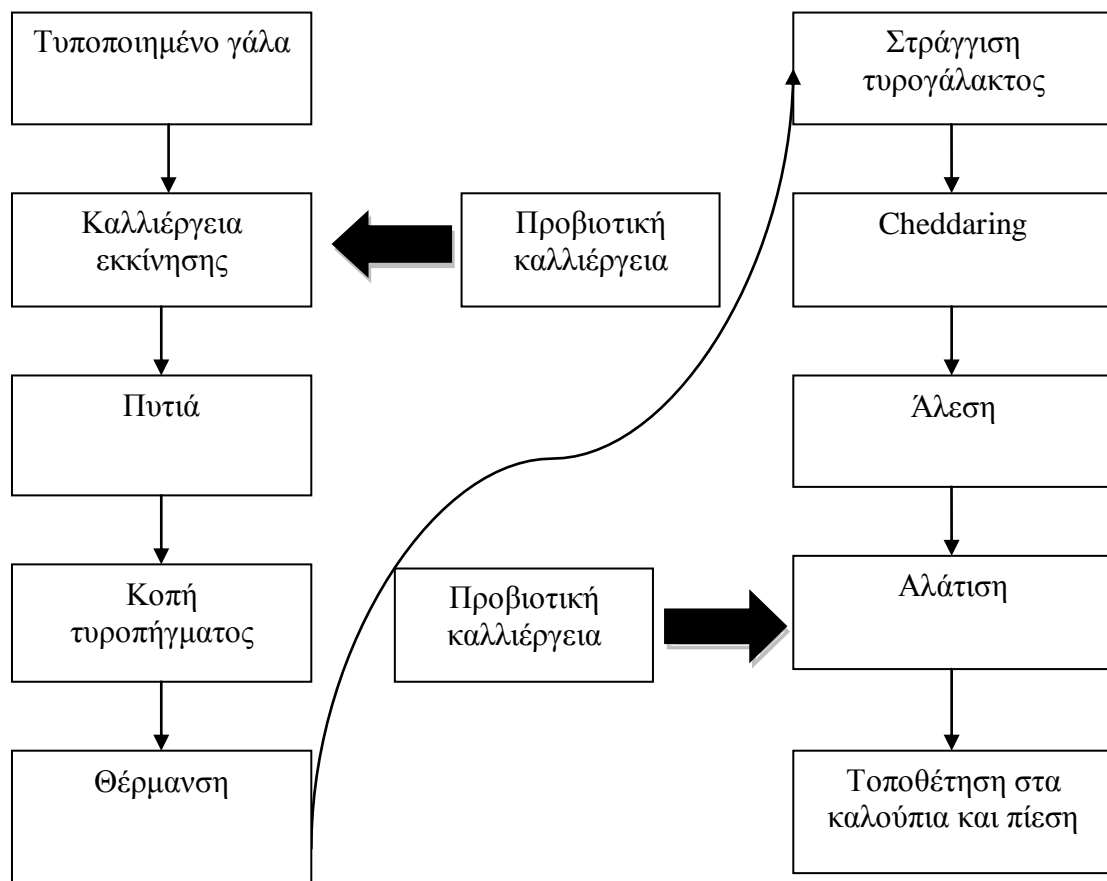
Σε ότι αφορά τα τυριά ωρίμανσης ο χρόνος προσθήκης των προβιοτικών βακτηρίων και οι διαδικασίες θέρμανσης του γάλακτος ή/και του τυροπήγματος έχουν επίδραση στην επιβίωσή τους. Σε ημίσκληρα και σκληρά τυριά που αλατίζονται, όπως το Cheddar,



Σχήμα 5. Διάγραμμα ροής για την παρασκευή του τυριού Cottage (Heller, 2001).

είναι δυνατή η προσθήκη ενός συγκεκριμένου πληθυσμού προβιοτικών βακτηρίων στο στάδιο της παραγωγής που προστίθεται το αλάτι (π.χ., με ψεκασμό ενός εξαιρετικά συμπυκνωμένου εναιωρήματος προβιοτικών βακτηρίων πάνω από το αλεσμένο τυρόπηγμα). Η μέθοδος αυτή ελαχιστοποιεί τις απώλειες των προβιοτικών κυττάρων στον ορό του γάλακτος και εξαλείφει τα αποτελέσματα του ανταγωνισμού με τα οξυγαλακτικά βακτήρια κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης του τυριού (Dinakar & Mistry, 1994). Στο Σχήμα 6 παρουσιάζονται τα στάδια παρασκευής του τυριού Cheddar.

Τέλος, η εφαρμογή της ζύμωσης των δύο σταδίων έχει αποδειχθεί ότι είναι αποτελεσματική στην αύξηση της επιβίωσης των προβιοτικών βακτηρίων, επιτρέποντας τους να γίνουν κυρίαρχα πριν από την προσθήκη των καλλιέργειών εκκίνησης. Οι Boylston *et al.* (2004) ανέφεραν ότι η αρχική ζύμωση με *L. acidophilus* 2409 και *B. longum* 1941 για 2 ώρες, ακολουθούμενη από τη ζύμωση με τις καλλιέργειες εκκίνησης, βελτίωσε τόσο την επιβίωση των προβιοτικών μικροοργανισμών όσο και τον πληθυσμό τους.



Σχήμα 6. Διάγραμμα ροής για την παρασκευή του τυριού Cheddar (Tamime, 2005).



## 4.4 Κυριότερα τεχνολογικά εμπόδια στην παραγωγή προβιοτικών τυριών.

Τα εμπόδια που επηρεάζουν άμεσα τη διατήρηση των λειτουργικών δραστηριοτήτων των προβιοτικών στελεχών στο τυρί χωρίζονται σε πέντε κατηγορίες. Πρόκειται για τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των προβιοτικών καλλιιεργειών και των καλλιιεργειών εκκίνησης, το αλάτισμα, την ωρίμανση, τη συσκευασία και τις συνθήκες συντήρησης (Πίνακας 11).

### 4.4.1 Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των προβιοτικών καλλιιεργειών και των καλλιιεργειών εκκίνησης

Οι καλλιιεργειες εκκίνησης και οι προβιοτικές καλλιιεργειες μπορούν να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους αλλά τα περισσότερα πειράματα έχουν διεξαχθεί σε ποικιλίες τυριών που παρασκευάζονται με μεσόφιλη καλλιιεργεια εκκίνησης (Bergamini *et al.*, 2005). Οι λακτόκοκκοι, λακτοβάκιλλοι και οι στρεπτόκοκκοι είναι μεταξύ των καλλιιεργειών εκκίνησης που χρησιμοποιούνται συνήθως στην τυροκομία, ανάλογα με το είδος του τυριού και τα χαρακτηριστικά του καθώς και τη διαθεσιμότητα, το κόστος και την ευκολία χειρισμού των μικροοργανισμών. Για την αποφυγή του μεταξύ τους ανταγωνισμού κρίνεται απαραίτητη η χρήση κατάλληλων καλλιιεργειών εκκίνησης και προβιοτικών στελεχών τα οποία να προέρχονται από τον ίδιο προμηθευτή (Boylston *et al.*, 2004).

Τα προβιοτικά στελέχη εκτός από τη συνεισφορά τους, μαζί με τις καλλιιεργειες εκκίνησης, στην παραγωγή οργανικών οξέων συμβάλλουν και στην παραγωγή αντιμικροβιακών ενώσεων (υπεροξειδίου του υδρογόνου, αλκοολικές ενώσεις, διακετύλιο και βακτηριοσίνες), με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός εχθρικού περιβάλλοντος για τους παθογόνους παράγοντες και μικροοργανισμούς. Διάφορα στελέχη λακτοβακίλλων, ιδίως εκείνα του είδους *L. casei*, είναι υπεύθυνα γι' αυτή τη μορφή δράσης (Cruz *et al.*, 2009b).

### 4.4.2 Αλάτιση

Τα περισσότερα τυριά αλατίζονται μετά από το σχηματισμό του τυροπήγματος. Οι μέθοδοι που συνήθως χρησιμοποιούνται είναι η ξηρή και η υγρή αλάτιση ή βύθιση σε άλμη. Η αλάτιση συμβάλλει στη γεύση των τυριών, με αποτέλεσμα τη βελτίωση των οργανοληπτικών τους χαρακτηριστικών, καθώς και στις βιοχημικές αντιδράσεις κατά τη διάρκεια της συντήρησης του προϊόντος (Guinee, 2004). Έχει όμως επιπτώσεις στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών, με την επιβίωση των bifidobacteria και άλλων βακτηρίων να είναι αντιστρόφως ανάλογη της συγκέντρωσης του άλατος (Vinderola *et al.*, 2002b; Kasimoğlu *et al.*, 2004). Η επιβίωση των προβιοτικών μικροοργανισμών μειώνεται δραστικά σε τυριά με συγκέντρωση άλατος άνω του 4%. Για το λόγο αυτό,

Πίνακας 11. Τεχνολογικά εμπόδια κατά την παραγωγή προβιοτικού τυριού (Cruz *et al.*, 2009b)

Βήμα	Πρόβλημα	Πιθανές λύσεις
Προσθήκη προβιοτικών	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Αλληλοεπιδράσεις μεταξύ προβιοτικών βακτηρίων και καλλιέργειας εκκίνησης</li> <li>- Απώλεια ζωντανών κυττάρων στο τυρόγαλα λόγω αποστράγγισης</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Προκαταρκτικές δοκιμές για την επιλογή κατάλληλου συνδυασμού προβιοτικού μικροοργανισμού και μικροοργανισμού εκκίνησης</li> <li>- Χρήση στελεχών από το ίδιο προμηθευτή</li> <li>- Έλεγχος των διαφορετικών σταδίων προσθήκης των προβιοτικών βακτηρίων. Παρατήρηση της επίδρασης στο τελικό κόστος του προϊόντος και στην επιβίωση των προβιοτικών βακτηρίων.</li> </ul>
Αλάτιση	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ευαισθησία των προβιοτικών βακτηρίων στις υψηλές συγκεντρώσεις άλατος</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Μικροεγκαψυλίωση</li> <li>- Κατάλληλη επιλογή στελέχους</li> </ul>
Συσκευασία	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ευαισθησία των προβιοτικών βακτηρίων στο οξυγόνο</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Επιλογή κατάλληλου συστήματος συσκευασίας με χαμηλή διαπερατότητα στο οξυγόνο, συσκευασία υπό κενό</li> <li>- Επώαση κυττάρων σε υποθανάτιες συνθήκες για ανάπτυξη αντοχής στο αλάτι</li> <li>- Κατάλληλη επιλογή στελέχους</li> </ul>
Ωρίμανση	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Επιβίωση των προβιοτικών βακτηρίων καθόλη τη διάρκεια της περιόδου ωρίμανσης</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Μικροεγκαψυλίωση</li> <li>- Βελτιστοποίηση των συνθηκών ωρίμανσης μέσω προκαταρκτικών δοκιμών</li> </ul>
Συνθήκες συντήρησης	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ανεπαρκείς συνθήκες συντήρησης που επηρεάζουν την επιβίωση των προβιοτικών βακτηρίων</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Συστηματικός έλεγχος των θερμοκρασιών συντήρησης</li> </ul>

στα τυριά που περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις άλατος, θα πρέπει να βελτιστοποιηθεί η διαδικασία ενσωμάτωσης των προβιοτικών μικροοργανισμών (Cruz *et al.*, 2009b). Δεδομένου ότι η κατανάλωση τυριού αυξάνεται σ' όλο τον κόσμο, η μείωση του αλατιού ως φορέα νατρίου, χωρίς να επηρεάζεται η αποδοχή του τυριού, πρέπει να λαμβάνεται σοβαρά υπόψη. Η εν μέρει αντικατάσταση του χλωριούχου νατρίου (συνήθως περισσότερο από 25%) από άλλες πηγές άλατος, όπως το χλωριούχο κάλιο ή ένα μίγμα NaCl και KCl, είναι η πλέον ευρέως και επιτυχώς χρησιμοποιούμενη τεχνική σε διάφορα τυριά συμπεριλαμβανομένου του τυριού τύπου Φέτα. Το προβιοτικό τυρί τύπου Φέτα που παράγεται με υπερδιήθηση και έχει χαμηλή περιεκτικότητα σε νάτριο θα μπορούσε να παρασκευαστεί με μίγμα 75% NaCl + 25% KCl χωρίς αρνητικές επιπτώσεις στην επιβίωση του *L. casei* και στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τυριού (Karimi *et al.*, 2012).

Μια εναλλακτική λύση για την προστασία των προβιοτικών μικροοργανισμών και τη βελτίωση της επιβίωσής τους από τις υψηλές συγκεντρώσεις άλατος είναι η μικροεγκαψυλίωση (Tamime, 2005) ή η ενίσχυση της βακτηριακής αντοχής τους σε διάφορους παράγοντες stress (π.χ., υψηλές συγκεντρώσεις αλατιού), με την προηγούμενη έκθεση τους σε υποθανάτια επίπεδα του συγκεκριμένου παράγοντα stress (Cruz *et al.*, 2009b). Η μικροεγκαψυλίωση δεν επηρεάζει δυσμενώς την εμφάνιση, το χρώμα, την υφή και τη συνολική οργανοληπτική αποδοχή του τυριού (Özer *et al.*, 2008). Τα εγκαψυλιωμένα στελέχη των *B. bifidum*, *B. infantis* και *B. longum* έχουν χρησιμοποιηθεί για την παρασκευή του τυριού Crescenza (Tamime, 2005). Οι Ortakci *et al.* (2012) μελέτησαν την προσθήκη του *L. paracasei* subsp. *paracasei* LBC-1 (LBC-1e) σε ημιαποβουτυρωμένο τυρί Μοτσαρέλα, σε μικροεγκαψυλιωμένη μορφή ή σε ελεύθερη μορφή, σε πληθυσμούς της τάξης των  $10^8$  και  $10^7$  cfu/g, αντιστοίχως. Διερευνήθηκε η επιβίωση του *L. paracasei* subsp. *paracasei* LBC-1e και των συνολικών οξυγαλακτικών βακτηρίων κατά τη διαδικασία *pasta filata* (στην οποία το τυρόπηγμα θερμάνθηκε στους 55 °C και στη συνέχεια υπέστη μάλαξη στους 70 °C σε θερμή άλμη), και συντήρηση στους 4 °C για 6 εβδομάδες. Παρατηρήθηκαν μειώσεις στους πληθυσμούς τόσο των ελεύθερων όσο και των εγκαψυλιωμένων *L. paracasei* subsp. *paracasei* LBC-1e κατά τη θέρμανση και τη μάλαξη του τυροπήγματος, με τα εγκαψυλιωμένα *L. paracasei* subsp. *paracasei* LBC-1e να επιβιώνουν ελαφρώς καλύτερα. Δεν ήταν στατιστικά σημαντικές οι συνολικές απώλειες των οξυγαλακτικών βακτηρίων κατά τη διάρκεια της θέρμανσης και της μάλαξης του τυροπήγματος. Κατά τη συντήρηση, παρατηρήθηκε μείωση στα συνολικά οξυγαλακτικά βακτήρια, αλλά δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση στα *L. paracasei* subsp. *paracasei* LBC-1e. Οι μικροκάψουλες αλγινικού δεν παρείχαν καμία προστασία έναντι του HCl κατά την προσομοίωση της γαστρικής πέψης, ενώ ούτε τα ελεύθερα ούτε τα εγκαψυλιωμένα *L. paracasei* subsp. *paracasei* LBC-1e επηρεάστηκαν από την επώαση σε διάλυμα παγκρεατίνης-χολής.

Οι Cruz *et al.* (2009b) ανέφεραν ότι η μικροεγκαψυλίωση των προβιοτικών στελεχών *L. acidophilus* DD910 και *B. lactis* DD920 σε κάψουλες αλγινικού ασβεστίου προσροφημένου σε άμυλο δεν βελτίωσε την επιβίωσή τους σε τυρί Φέτα κατά τη διάρκεια της συντήρησης του σε άλμη στην οποία παρατηρήθηκαν απώλειες της τάξης των 2-3 log στα ελεύθερα και στα ακινητοποιημένα κύτταρα. Οι πιθανοί λόγοι ήταν η μη συνεκτική υφή του τυριού και η υψηλή συγκέντρωση του άλατος, 7,3 έως 8,4%, που προκαλεί το θάνατο των κυττάρων.

Επίσης έχει αναφερθεί ότι η μικροεγκαψυλίωση των προβιοτικών βακτηρίων επηρεάζει την περιεκτικότητα της ακεταλδεΐδης στο τυρί (Karimi *et al.*, 2012b). Οι Heidebacha *et al.* (2012) ανέφεραν ότι τα τυριά που περιείχαν εγκαψυλωμένα προβιοτικά βακτήρια δεν διέφεραν από τα τυριά που περιείχαν ελεύθερα κύτταρα από την άποψη των οργανοληπτικών τους χαρακτηριστικών. Ενώ οι Bergamini *et al.* (2005) ανέφεραν ότι δεν βρέθηκε καμία διαφορά στη γεύση μεταξύ των τυριών που περιέχει ελεύθερα ή εγκαψυλωμένα προβιοτικά βακτήρια, ωστόσο διαπιστώθηκε κοκκώδης υφή στα τυριά που περιείχαν εγκαψυλωμένα προβιοτικά βακτήρια.

#### 4.4.3 Συσκευασία

Τα προβιοτικά γαλακτοκομικά προϊόντα, όπως το τυρί, είναι συσκευασμένα σε πλαστικές μεμβράνες οι οποίες έχουν διαφορετικά επίπεδα διαπερατότητας στο οξυγόνο. Αυτό αποτελεί πρόβλημα, λόγω της διαφορετικής εξάρτησης σε οξυγόνο από το εκάστοτε στέλεχος. Το σύστημα παγίδευσης οξυγόνου στους *L. acidophilus* και *Bifidobacterium* spp. είναι είτε μειωμένο ή απουσιάζει εντελώς. Κατά συνέπεια, λαμβάνει χώρα η συσσώρευση τοξικών μεταβολιτών του οξυγόνου, όπως είναι το υπεροξειδικό ανιόν ( $O_2^-$ ), η ρίζα υδροξυλίου ( $OH^-$ ) και το υπεροξειδίο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) στα κύτταρα, που τελικά οδηγεί στο θάνατό τους. Συνεπώς, επιβάλλεται η επιλογή πλαστικών μεμβρανών με χαμηλή διαπερατότητα στο οξυγόνο. Εναλλακτικά, χρησιμοποιείται η συσκευασία υπό κενό (Cruz *et al.*, 2009b).

Τα υλικά συσκευασίας, όπως το Polyvinylidene Chloride (PVDC) και Ethylene Vinyl Alcohol (EVOH) έχουν αποδειχθεί ότι είναι πιο αποτελεσματικά στη διατήρηση της ζωτικότητας των bifidobacteria από ότι το πολυαιθυλένιο και το πολυστυρένιο που χρησιμοποιούνται ευρέως στα τρόφιμα (Boylston *et al.*, 2004).

Οι Kasimoğlu *et al.* (2004) διερεύνησαν την επίδραση της συσκευασίας κενού και της άλμης σε Τούρκικο λευκό τυρί ωρίμανσης. Οι συγγραφείς διαπίστωσαν ότι το τυρί που ήταν συσκευασμένο σε κενό αέρος παρουσίασε καλύτερη επίδοση στην οργανοληπτική αξιολόγηση (καλή γεύση και υφή), αλλά είχε υψηλότερο επίπεδο πρωτεόλυσης σε σύγκριση με αυτό που συντηρούνταν στην άλμη.

#### 4.4.4 Ωρίμανση

Η διαδικασία ωρίμανσης του τυριού είναι πολύ πολύπλοκη και περιλαμβάνει μικροβιολογικές και βιοχημικές μεταβολές στο τυρόπηγμα, με αποτέλεσμα τη χαρακτηριστική γεύση και την υφή μιας συγκεκριμένης ποικιλίας. Η παρουσία σταδίων ωρίμανσης κατά την επεξεργασία του τυριού είναι ένα επιπλέον πρόβλημα για τη σταθερότητα της προβιοτικής καλλιέργειας, γιατί η επιβίωσή της κατά την διάρκεια αυτής της περιόδου δεν μπορεί να προβλεφθεί με ακρίβεια. Οι βιοχημικές αλλαγές που συμβαίνουν μέσα στο τυρί, καθώς μειώνεται η ενεργότητα του ύδατος, μερικές φορές σε συνδυασμό με την μείωση του pH, δημιουργεί ένα εχθρικό και στρεσογόνο περιβάλλον για τις συμπληρωματικές καλλιέργειες (Cruz *et al.*, 2009b).

#### 4.4.5 Συνθήκες συντήρησης

Η εκτεταμένη περίοδος συντήρησης (πάνω από 3 μήνες) μπορεί να επηρεάσει τις βιοχημικές δραστηριότητες, να μεταβάλλει το δυναμικό οξειδοαναγωγής και να αναδιοργανώσει τη σύσταση του τυριού (Tamime, 2005). Επιπλέον οι καταναλωτές απαιτούν το προϊόν που αγοράζουν να περιέχει τις προβιοτικές καλλιέργειες ζωντανές κατά τη στιγμή της κατανάλωσής του. Οι εταιρείες πρέπει να εγγυώνται ότι το προϊόν κατά τη στιγμή που διατίθεται στο εμπόριο παρέχει τον απαιτούμενο ζωντανό πληθυσμό προβιοτικών βακτηρίων και επιπλέον ότι κατά τη συντήρηση ο πληθυσμός αυτός θα διατηρηθεί στα επιθυμητά επίπεδα. Τυπικώς, το "καλύτερα πριν" την ημερομηνία δίνεται ώστε να παρέχεται μια περίοδος που να εγγυάται τον επιθυμητό πληθυσμό (Cruz *et al.*, 2009b).

#### 4.5 Επίδραση των προβιοτικών μικροοργανισμών στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τυριού

Η επιτυχία ενός προβιοτικού προϊόντος συνδέεται άμεσα με την αντίληψη των καταναλωτών για τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του, καθόλη τη διάρκεια της εμπορικής του ζωής (Gomes *et al.*, 2011). Τα προβιοτικά τυριά πρέπει να εμφανίζουν ελάχιστες διαφορές σε σύγκριση με τα συμβατικά παραδοσιακά προϊόντα (Cruz *et al.*, 2011). Η επίδραση των προβιοτικών βακτηρίων στα χαρακτηριστικά της γεύσης του τυριού εξαρτάται κυρίως από τα είδη και τα στελέχη που προστίθενται, αλλά επιπλέον και από τη μεταβολική δραστηριότητα των στελεχών κατά τη διάρκεια της παρασκευής και της συντήρησης του τυριού (Karimi *et al.*, 2012b). Τέλος, πολλοί μη οργανοληπτικοί παράγοντες, όπως η εμπορική αξία, η εμπιστοσύνη στην εταιρεία, οι ισχυρισμοί υγείας, η ετικέτα και η επάρκεια του φορέα τροφίμων, αποτελούν θεμελιώδεις παράγοντες που σχετίζονται άμεσα με την κατανάλωση ενός συγκεκριμένου προϊόντος και την αποδοχή του από τους καταναλωτές (Cruz *et al.*, 2010b).

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι οι προβιοτικές καλλιέργειες δεν επηρεάζουν σημαντικά την οργανοληπτική ποιότητα των τυριών (Gobbetti *et al.*, 1997). Ωστόσο σύμφωνα με τους Gratteranche *et al.* (2008) η προσθήκη μεγάλου πληθυσμού ζωντανών και μεταβολικά ενεργών κυττάρων μπορεί να επηρεάσει την ποιότητα του προϊόντος και ιδιαίτερα τα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά. Η μελέτη τους για την προσθήκη μιας δυναμικής προβιοτικής καλλιέργειας *L. plantarum* 14 σε ένα μαλακό τυρί οδήγησε στο συμπέρασμα ότι, αν και ο πληθυσμός κυμαινόταν μεταξύ  $10^6$  και  $10^7$  cfu/g, τα τυριά που περιείχαν αυτό το στέλεχος παρουσίασαν ελαφρώς χαμηλότερη επίδοση στην οργανοληπτική ανάλυση.

Η χαρακτηριστική γεύση και υφή των τυριών αναπτύσσονται κατά τη διάρκεια της περιόδου ωρίμανσης, μέσω της λιπολυτικής και πρωτεολυτικής δραστηριότητας των βακτηρίων που υπάρχουν στο τυρί. Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται στην τυροκομία σε συνδυασμό με τις ειδικές επεξεργασίες συμβάλλουν στα διακριτά χαρακτηριστικά γεύσης και υφής των διαφόρων τύπων τυριού (Boylston *et al.*, 2004; Rodrigues *et al.*, 2012).

Η παραγωγή του οξικού οξέος από την ετερογαλακτική ζύμωση της λακτόζης από την καλλιέργεια εκκίνησης ή από τους προβιοτικούς μικροοργανισμούς του γένους *Lactobacillus* και *Bifidobacterium* μπορεί να επηρεάσει αρνητικά τη γεύση των τυριών (Karimi *et al.*, 2012b). Τα τυριά που ωριμάζουν και περιέχουν bifidobacteria παράγουν μεγάλη ποσότητα οξικού οξέος, καθώς επίσης και γαλακτικού οξέος σε μοριακή αναλογία 2:3 (Cruz *et al.*, 2009b) μέσω της φρουκτόζης-6-φωσφορικής οδού. Μερικοί λακτοβάκιλλοι επίσης παράγουν οξικό οξύ, αλλά σε μικρότερο βαθμό σε σύγκριση με τα bifidobacteria (Desai *et al.*, 2004). Το οξικό οξύ συμβάλλει στην τυπική γεύση των διαφόρων τυριών. Ωστόσο, οι υπερβολικές συγκεντρώσεις του είναι ανεπιθύμητες, γιατί προκαλούν δευτερεύουσες δυσάρεστες γεύσεις (Gratterpanche *et al.*, 2008).

Τα πρώτα χρόνια της παρασκευής των προβιοτικών τυριών τα bifidobacteria επηρέαζαν αρνητικά τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους. Σήμερα, η κατάσταση αυτή έχει αλλάξει και τα προβιοτικά τυριά έχουν οργανοληπτικά χαρακτηριστικά παρόμοια με τα παραδοσιακά προϊόντα (Plessas *et al.*, 2012). Οι Corbo *et al.* (2001) αξιολόγησαν οργανοληπτικά το τυρί Canestrato, μετά από ωρίμανση 56 ημερών, για την εμφάνιση, το χρώμα, τα μηχανικά χαρακτηριστικά, την οσμή, τη γεύση και την υφή, με ένα περιγραφικό τεστ, αλλά δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ του προβιοτικού και του παραδοσιακού τυριού. Οι Ryhänen *et al.* (2001) χρησιμοποιώντας *L. acidophilus* και *Bifidobacterium* spp. για την παραγωγή του τυριού Festivo με χαμηλά λιπαρά, πέτυχαν καλά αποτελέσματα σε σχέση με τη γεύση, την εμφάνιση και την υφή (Karimi *et al.*, 2012b). Σε άλλες μελέτες, τυρί Cheddar με bifidobacteria είχε υψηλότερες συγκεντρώσεις οξικού και γαλακτικού οξέος σε σύγκριση με το μη προβιοτικό τυρί, αλλά οι οργανοληπτικές τους διαφορές ήταν ασήμαντες, αποδεικνύοντας ότι τα bifidobacteria δεν εμφάνισαν εκτεταμένη μεταβολική δραστηριότητα (Gobbetti *et al.*, 1997). Επίσης, οι Souza *et al.* (2008) έδειξαν ότι η προσθήκη της καλλιέργειας *L. acidophilus* La-5 κατά την παραγωγή του τυριού Minas fresh, παρείχε οργανοληπτική σταθερότητα κατά τη συντήρηση του προϊόντος μέχρι και 14 ημέρες, ιδιαίτερα σε τυρί που παράχθηκε με την προσθήκη προβιοτικών βακτηρίων σε συγκαλλιέργεια με *S. thermophilus*. Οι Karimi *et al.* (2012b) εξέτασαν τα τυριά Cheddar που παράχθηκαν με τα προβιοτικά συμπληρώματα *B. longum* 1941, *B. lactis* B94 και *L. paracasei* L26 ή *L. acidophilus* L10 και διαπίστωσαν ότι έλαβαν οργανοληπτική αποδοχή και αποτελέσματα συγκρίσιμα με εκείνα των συμβατικών τυριών.

Επιπλέον, ορισμένοι ερευνητές έχουν διατυπώσει ότι η προσθήκη προβιοτικών στελεχών στα τυριά μπορεί να βελτιώσει τη γεύση και άλλα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους (Souza *et al.*, 2008), όπως στο τυρί Petit Suisse και το προβιοτικό αίγειο τυρί (Gomes *et al.*, 2011). Σε τυρί Gouda ενοφθαλμισμένο με *B. longum* και *B. lactis*, βρέθηκε ότι η γεύση και το άρωμα ήταν καλύτερα από εκείνα του συμβατικού τυριού (Mc Brearty *et al.*, 2001). Σε μια άλλη μελέτη τα προβιοτικά στελέχη *L. rhamnosus* και *L. paracasei* subsp. *paracasei* χρησιμοποιήθηκαν ως συμπληρώματα για την παραγωγή αίγειου τυριού τύπου Κεφαλοτύρι και διαπιστώθηκε ότι δεν επηρέασαν σημαντικά τη μικροχλωρίδα του τυριού. Επιπλέον, με την προσθήκη τους ενισχύθηκε η πρωτεόλυση και η λιπόλυση των τυριών και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους ήταν καλύτερα από το συμβατικό τυρί. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης έδειξαν ότι το Κεφαλοτύρι, και ιδίως εκείνο με τη συμπληρωματική καλλιέργεια *L. paracasei* subsp. *paracasei*, θα μπορούσε να αποτελέσει έναν αποτελεσματικό φορέα παροχής μεγάλου αριθμού προβιοτικών κυττάρων στον καταναλωτή (Kalavrouzioti *et al.*, 2005). Οι Kasimoğlu *et al.* (2004) ερεύντησαν την επίδραση της προσθήκης του *L. acidophilus*

στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, τη σύσταση και το χρόνο ωρίμανσης του Τουρκικού λευκού τυριού. Παρήχθησαν δύο τύποι λευκών τυριών, το παραδοσιακό τυρί (μάρτυρας, με ενοφθαλμισμό *Lc. lactis* subsp. *lactis* και *Lc. lactis* subsp. *cremoris*) και το προβιοτικό τυρί (με *Lc. lactis* subsp. *lactis*, *Lc. lactis* subsp. *cremoris* και *L. acidophilus* 593 N) τα οποία ωρίμασαν σε συσκευασίες υπό κενό ή σε άλμη στους 4 °C για 90 ημέρες. Τα δείγματα αναλύθηκαν μικροβιολογικά και εξετάστηκε η σύσταση και η πρωτεόλυση, ενώ έγινε και οργανοληπτική αξιολόγηση σε διαφορετικά στάδια της ωρίμανσης. Στην ωρίμανση σε συσκευασία κενού, ο *L. acidophilus* επιβίωσε σε πληθυσμό > 10<sup>7</sup> cfu/g, ο οποίος είναι απαραίτητος για τις θετικές επιδράσεις στην υγεία του καταναλωτή. Η περιεκτικότητα των προβιοτικών τυριών σε γαλακτικό οξύ ήταν ελαφρώς υψηλότερη από εκείνη των συμβατικών τυριών, τόσο στην αεροστεγή συσκευασία όσο και στην άλμη. Το συσκευασμένο σε κενό αέρος προβιοτικό τυρί είχε το υψηλότερο επίπεδο πρωτεόλυσης και την υψηλότερη οργανοληπτική αποδοχή από όλα τα τυριά. Κατά συνέπεια, το στέλεχος *L. acidophilus* 593 N θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την παρασκευή προβιοτικού λευκού τυριού, με προτιμώμενη τη συσκευασία σε κενό αέρος. Άλλοι ερευνητές πειραματιζόμενοι σε σκληρό τυρί με χαμηλά λιπαρά, τύπου Κεφαλογραβιέρα, ανέφεραν ότι η προσθήκη του *L. casei* subsp. *rhamnosus* LBC 80 σε συγκαλλιέργεια με CR-213 (που αποτελείται από δύο στελέχη *Lc. lactis* subsp. *lactis* και ένα στέλεχος *Lc. lactis* subsp. *cremoris*) είχε ως αποτέλεσμα θετικές οργανοληπτικές μεταβολές στη γεύση και την υφή του προϊόντος, μετά από 90 και 180 ημέρες ωρίμανσης, σε σύγκριση με το συμβατικό τυρί (Karimi *et al.*, 2012b). Οι Gomes *et al.*, (2011) παρασκεύασαν ένα προβιοτικό τυρί από τυρόγαλα ενοφθαλμισμένο με *L. casei* και *B. animalis* στο οποίο παρατηρήθηκε αυξημένη οργανοληπτική αποδοχή, αποδεικνύοντας ότι ο μεταβολισμός ενός προβιοτικού στελέχους μαζί με το χειρισμό του υποστρώματος του τροφίμου μπορεί να οδηγήσει σε ένα προϊόν με διαφοροποιημένα θετικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά.

Από την άλλη πλευρά υπάρχουν ερευνητές που έχουν αναφέρει ότι η ενσωμάτωση των προβιοτικών βακτηρίων στο τυρί μειώνει την οργανοληπτική (ιδιαίτερα τη γεύση) αποδοχή του τελικού προϊόντος, συγκριτικά με τα μη προβιοτικά τυριά, όπως φάνηκε στο λευκό τυρί από το Ιράν που παράχθηκε με υπερδύηση (Zomorodi *et al.*, 2011), το Τουρκικό τυρί Beyaz (Kilic *et al.*, 2009), και το τυρί Pategras (Perotti *et al.*, 2009). Ενδιαφέρον, παρουσιάζει η παραγωγή οξικού οξέος σε φρέσκο τυρί Minas που παρασκευάστηκε με αυξημένη ποσότητα *L. acidophilus*. Παρότι τα στελέχη του *Lactobacillus* είναι κυρίως ομοιοζυμωτικά, εμφανίζουν επίσης ένα ετεροζυμωτικό χαρακτήρα (Gomes & Malcata, 1999). Παρόμοια ευρήματα βρέθηκαν και για το τυρί Cheddar στο οποίο προστέθηκε bifidobacteria, *L. casei*, και *L. acidophilus* (Ong *et al.*, 2006). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι μπορεί να παρατηρηθούν αρνητικές επιπτώσεις στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά όταν χρησιμοποιείται μεγάλη ποσότητα συμπληρωματικής καλλιέργειας *L. acidophilus* στην παρασκευή του προβιοτικού τυριού. Οι Mc Brearty *et al.* (2001) ανέφεραν ότι τυριά που παρασκευάστηκαν με την προσθήκη του *L. paracasei* subsp. *paracasei* στέλεχος CHCC 2115 είχαν μια αδύναμη οσμή και μια ήπια, φρέσκια, όξινη, ελαφρώς πικρή γεύση. Υπήρχαν αναφορές για ανεπιθύμητες γεύσεις που σχετιζόνταν με την υπερβολική παραγωγή οξικού οξέος (ιζώδεις κηλίδες) ειδικότερα στα τυριά που περιείχαν bifidobacteria. Οι Ong *et al.* (2006) επίσης διαπίστωσαν ότι τα bifidobacteria που χρησιμοποιήθηκαν, σε συνδυασμό με το *L. acidophilus* στέλεχος Ki, ως εκκινητές για την παρασκευή του τυριού Gouda, παρουσίασαν σημαντική επίδραση στη γεύση του τυριού μετά από 9 εβδομάδες ωρίμανσης, πιθανώς λόγω της παραγωγής οξικού οξέος. Οι Vinderola *et al.* (2009)

μελέτησαν την ικανότητα ανάπτυξης των στελεχών *L. paracasei* A13, *B. bifidum* A1 και *L. acidophilus* A3, στο προβιοτικό τυρί Fresco της Αργεντινής, κατά την παρασκευή και τη συντήρησή του στους 5 °C και 12 °C για 60 ημέρες. Ο *L. paracasei* A13 αυξήθηκε κατά μισό λογάριθμο στους 43 °C, κατά τη διάρκεια της διαδικασίας παρασκευής του προβιοτικού τυριού και άλλο μισό λογάριθμο κατά τη διάρκεια των πρώτων 15 ημερών της συντήρησής του στους 5 °C, χωρίς αρνητικές επιπτώσεις στην οργανοληπτική αποδοχή του προϊόντος. Ωστόσο, παρατηρήθηκε μια αρνητική επίδραση στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των τυριών όταν αυτά συντηρήθηκαν στους 12 °C για 60 ημέρες (Granato *et al.*, 2010). Σε μια άλλη μελέτη οι Boylston *et al.* (2004) διερεύνησαν την παρασκευή ενός τυριού τύπου Gouda με σκοπό την παραγωγή ενός ισοδύναμου προβιοτικού προϊόντος με *Bifidobacterium* spp. και *L. acidophilus*. Κατά τη διάρκεια της παραγωγικής διαδικασίας και των 9 εβδομάδων συντήρησης, τα ζωντανά κύτταρα ήταν περισσότερα από το συνιστώμενο επίπεδο των προβιοτικών μικροοργανισμών σε τρόφιμα ( $10^6$  cfu/g). Μετά από μια περίοδο ωρίμανσης 9 εβδομάδων, η επιβίωση των bifidobacteria ήταν εξαρτώμενη από τη συγκέντρωση του άλατος και την περιοχή του τυριού. Η υψηλότερη επιβίωση παρατηρήθηκε στο κέντρο του τυριού, εφόσον τα επίπεδα του οξυγόνου και του άλατος ήταν χαμηλά. Τέλος, αναφέρθηκαν ανεπιθύμητες γεύσεις. Οι Ong & Shah (2009) χρησιμοποίησαν τα προβιοτικά στελέχη *B. longum* 1941, *B. animalis* subsp. *lactis* LAFTI<sup>®</sup>B94 (B94), *L. casei* 279, *L. paracasei* LAFTI<sup>®</sup>L26 (L26), *L. acidophilus* 4962 ή *L. acidophilus* LAFTI<sup>®</sup>L10 (L10) ως πρόσθετα για την παραγωγή τυριών Cheddar που ωρίμασαν για 24 εβδομάδες στους 4 °C και 8 °C. Η συγκέντρωση οξικού οξέος σε τυριά με *Bifidobacterium* spp. ή *L. casei* spp. ήταν σημαντικά υψηλότερη από εκείνη των συμβατικών τυριών. Τα προβιοτικά τυριά είχαν υψηλότερη συγκέντρωση γαλακτικού οξέος, ιδιαίτερα εκείνα που είχαν ωριμάσει με *L. casei* 279 ή *L. casei* L26 στους 8 °C, ενώ η περιεκτικότητα του κιτρικού, προπιονικού και ηλεκτρικού οξέος δεν επηρεάστηκε σημαντικά από τον τύπο των προβιοτικών ή τις θερμοκρασίες ωρίμανσης. Τελικά διαπιστώθηκε ότι τυριά που παρασκευάστηκαν με την προσθήκη *L. casei* και ενός μίγματος καλλιέργειας ABC (*L. acidophilus* 4962, *B. longum* 1941, και *L. casei* 279) έλαβαν το χαμηλότερο βαθμό αποδοχής. Η πικρότητα του τυριού με *L. casei* 279 και *L. paracasei* L26 ήταν σημαντικά υψηλότερη από εκείνη των συμβατικών τυριών.

#### **4.5.1 Επίδραση της πρωτεόλυσης από τη δράση των προβιοτικών βακτηρίων στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τυριού**

Η πρωτεόλυση του τυριού κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης είναι μια σημαντική διαδικασία, καθώς παίζει ένα άμεσο και κρίσιμο ρόλο στην ανάπτυξη της γεύσης και της υφής του τυριού και των λοιπών οργανοληπτικών χαρακτηριστικών στις περισσότερες ποικιλίες τυριών. Πρόκειται για ένα σημαντικό δείκτη ποιότητας του τυριού (Karimi *et al.*, 2012b). Η ενσωμάτωση των προβιοτικών καλλιιεργειών στο τυρί δεν επηρεάζει γενικά την πρωτογενή πρωτεόλυση, ωστόσο, έχουν αναφερθεί συχνά αλλαγές στη δευτερογενή πρωτεόλυση και στην αύξηση της περιεκτικότητας των ελεύθερων αμινοξέων (Gobbetti *et al.*, 1997; Mc Brearty *et al.*, 2001; Ong *et al.*, 2006). Ορισμένα προβιοτικά βακτήρια παράγουν πρωτεολυτικά ένζυμα που είναι σε θέση να αποδομήσουν πικρά πεπτιδία (Albenzio *et al.*, 2010). Οι προβιοτικοί λακτοβάκιλλοι, για παράδειγμα, παράγουν πολλές πεπτιδάσες, οι οποίες μπορούν να υδρολύσουν τις καζεΐνες ( $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ -, και  $\kappa$ -καζεΐνη), σε πεπτιδία και εκείνες με τη σειρά τους σε



ολιγοπεπτίδια και ελεύθερα αμινοξέα και να προκαλέσουν μεταβολές στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τυριού (Bergamini *et al.*, 2009b).

Έχουν παρατηρηθεί διαφορές στο πρωτεολυτικό προφίλ μεταξύ προβιοτικών και συμβατικών τυριών, που έχουν υποστεί ωρίμανση, όπως στο τυρί από πρόβειο γάλα, στο προβιοτικό τυρί Αργεντινής, στα σκληρά και ημίσκληρα τυριά Αργεντινής (Gomes *et al.*, 2011), καθώς και σε διάφορα άλλα είδη τυριών όπως τα Cheddar, Πεκορίνο Foggiano, Minas fresh, Gouda και το Τούρκικο λευκό τυρί (Kasimoğlu *et al.*, 2004). Τα τυριά που περιείχαν *L. acidophilus* έδειξαν πιο εκτεταμένη πεπτιδολύση, ενώ τα στελέχη του είδους *L. casei* παρουσίασαν μικρότερη συμβολή στην πεπτιδολύση των τυριών (Bergamini *et al.*, 2009b).

Ειδικότερα, η προσθήκη λακτοβακίλλων στο πρόβειο τυρί έχει συσχετιστεί με αυξημένη πρωτεόλυση και έντονη γεύση. Η ενσωμάτωση κατάλληλων πληθυσμών του *L. acidophilus* και ενός μείγματος από *B. longum* και *B. lactis* είχε ως αποτέλεσμα την υψηλότερη πρωτεόλυση και λιπόλυση στα πρόβεια τυριά και τη βελτίωση των διατροφικών τους χαρακτηριστικών (Albenzio *et al.*, 2010). Οι Kalavrouzioti *et al.*, (2005) χρησιμοποίησαν γιαούρτη ως καλλιέργεια εκκίνησης και την προβιοτική καλλιέργεια *L. rhamnosus* LC 705 ή/και *L. paracasei* subsp. *paracasei* DC 412 για την παρασκευή σκληρών τυριών τύπου Κεφαλοτύρι από αίγιο γάλα. Τα αποτελέσματα έδειξαν, ότι το συμπλήρωμα των λακτοβακίλλων ενίσχυσε την αποδόμηση τόσο της  $\alpha_1$ -καζεΐνης όσο και της  $\beta$ -καζεΐνης. Σε μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε σκληρό τυρί χαμηλής λιποπεριεκτικότητας βρέθηκε ότι δύο στελέχη του *L. rhamnosus* αυξάνουν την πεπτιδολύση με αποτέλεσμα τη θετική επίδραση στη γεύση και την υφή των τυριών (Karimi *et al.*, 2012b). Σε μελέτη των Ong *et al.* (2006) για το τυρί Cheddar διαπιστώθηκαν υψηλότερα επίπεδα πρωτεόλυσης μετά από 9 μήνες ωρίμανσης στους 4 °C. Στο τέλος της εννεάμηνης περιόδου ωρίμανσης, το ποσοστό υδρόλυσης της  $\alpha_{s1}$ -καζεΐνης σε όλα τα προβιοτικά τυριά που παρασκευάστηκαν, εκτός του τυριού με προσθήκη *B. longum* 1941, ήταν σημαντικά υψηλότερο από ότι στα συμβατικά τυριά. Η αυξημένη πρωτεόλυση στα προβιοτικά τυριά έδειξε ότι αυτά ωριμάζουν ταχύτερα από τα συμβατικά τυριά.

Αντίθετα στα νωπά τυριά, το κύριο γεγονός είναι η πρωτογενής πρωτεόλυση. Ο ενοφθαλμισμός των τυριών αυτών με προβιοτικούς μικροοργανισμούς έχει μόνο μια σχετική επίδραση στη δευτερογενή πρωτεόλυση (Cruz *et al.*, 2009b). Τα προβιοτικά νωπά τυριά παρουσίασαν χαμηλότερη επίδοση στην εμφάνιση, το άρωμα και την υφή σε σύγκριση με τα συμβατικά τυριά όταν χρησιμοποιήθηκε υψηλή ποσότητα συμπληρωματικής καλλιέργειας με *L. acidophilus* (Martín-Diana *et al.*, 2003). Σε άλλες μελέτες με νωπά τυριά στα οποία προστέθηκε *L. acidophilus*, όπως το νωπό βουβαλίσιο τυρί Minas και Τουρκικό άσπρο τυρί, δεν παρατηρήθηκε αρνητική επίδραση στην οργανοληπτική αποδοχή των προϊόντων (Bergamini *et al.*, 2009b).

Η χυμοσίνη είναι ο πρωταρχικός πρωτεολυτικός παράγοντας που συμμετέχει στην ωρίμανση του τυριού και έχει συσχετιστεί με το μαλάκωμα της υφής του μέσω της υδρόλυσης της  $\alpha_{s1}$ -καζεΐνης, η οποία φθάνει σε υψηλότερα επίπεδα στα προβιοτικά τυριά (Albenzio *et al.*, 2010). Οι Ong *et al.* (2007) μελέτησαν το τυρί Cheddar και διαπίστωσαν ότι με την προσθήκη των *B. longum* 1941, *L. casei* 279, και *L. paracasei* L26 έλαβε σημαντικά χαμηλότερες βαθμολογίες σκληρότητας από το συμβατικό τυρί. Έρευνες σχετικά με τις επιπτώσεις της προσθήκης των προβιοτικών μικροοργανισμών

στα χαρακτηριστικά γνωρίσματα της υφής του τυριού παρουσίασαν διαφορετικά αποτελέσματα. Μερικές δεν υποδείκνυαν καμία σημαντική μεταβολή, άλλες παρουσίαζαν τα χαρακτηριστικά της υφής συγκρίσιμα με εκείνα του μη προβιοτικού μάρτυρα, και οι υπόλοιπες παρουσίαζαν θετικές αλλαγές στην υφή σε σύγκριση με το συμβατικό μάρτυρα. Φαίνεται ότι το είδος και το στέλεχος του προβιοτικού μικροοργανισμού που χρησιμοποιείται, καθώς και οι παράγοντες σύνθεσης και επεξεργασίας κατά την παραγωγή και συντήρηση του τυριού, είναι οι αιτίες των αναφερθέντων διαφορών (Karimi *et al.*, 2012b).

Η υφή και οι ρεολογικές ιδιότητες του τυριού επηρεάζονται και από την περιεκτικότητα του σε αλάτι, μέσω της επίδρασής του στη δράση των προβιοτικών βακτηρίων (με την αύξηση της οξύτητας και της πρωτεόλυσης), της άμεσης επίδρασής του στο πρωτεϊνικό υπόστρωμα του τυριού, και της επιρροής του στην υφή μέσω της μείωσης του ελεύθερου ύδατος. Η μειωμένη πρωτεόλυση σχετίζεται με εξαιρετικά αλατισμένα τυριά και οδηγεί σε ένα πιο συμπαγές δίκτυο πρωτεΐνης που είναι πιο στερεό και με αυξημένη σκληρότητα. Η μείωση της περιεκτικότητας σε υγρασία ή η αύξηση της περιεκτικότητας σε αλάτι μειώνει την ενυδάτωση της πρωτεΐνης. Τα αποτελέσματα αυτά σχετίζονται με την αλευρώδη και εύθραυστη εμφάνιση των πολύ αλατισμένων τυριών και την ομαλότερη εμφάνιση των χαμηλής περιεκτικότητας σε αλάτι τυριών (Gomes & Malcata, 1998).

#### **4.6 Άλλες προκλήσεις που σχετίζονται με την παραγωγή των προβιοτικών τυριών**

Σήμερα, το ενδιαφέρον των καταναλωτών στρέφεται σε προϊόντα τα οποία συμβάλλουν στη μείωση των κινδύνων χρόνιων εκφυλιστικών ασθενειών. Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη προβιοτικών τυριών με μειωμένη περιεκτικότητα σε λίπος ή νάτριο. Ωστόσο, η μείωση αυτών των συστατικών μπορεί να επηρεάσει τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος. Οι Cruz *et al.* (2009b) μελέτησαν ημίσκληρα τυριά μειωμένης περιεκτικότητας σε λιπαρά που παρασκευάστηκαν με *L. paracasei* subsp. *paracasei* (στελέχη CHCC 2115, 4256, και 5583). Η μείωση της λιποπεριεκτικότητας δεν επηρέασε τους πληθυσμούς των στελεχών *Lactobacillus*, που διατηρήθηκαν σε επίπεδα  $1 \times 10^8$  cfu/g καθόλη τη διάρκεια της συντήρησης των τυριών. Τα τυριά χαμηλής λιποπεριεκτικότητας περιέχουν περισσότερη υγρασία και γενικά παράγονται χρησιμοποιώντας χαμηλότερες θερμοκρασίες οπότε τα οξυγαλακτικά βακτήρια είναι σε θέση να αναπτυχθούν σε υψηλούς πληθυσμούς (Cruz *et al.*, 2009b).

## 5 Παγωτό και κατεψυγμένα προϊόντα ως φορείς προβιοτικών μικροοργανισμών

Το παγωτό αποτελεί ένα κατεψυγμένο μίγμα διαφόρων συστατικών, όπως είναι το γάλα, οι γλυκαντικές ουσίες, οι σταθεροποιητές, οι γαλακτωματοποιητές και οι παράγοντες γεύσης (Marshall *et al.*, 2003). Η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει αρκετά συναφή προϊόντα, όπως το πλήρες παγωτό, το χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά, το άπαχο, με φρούτα και με ξηρούς καρπούς, οι πουτίγκες, το μους, το σερμπέτι, η παγωμένη γιαούρτη κ.ά. (Cruz *et al.*, 2009a). Για την παραγωγή παγωτού, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και το κατσικίσιο γάλα το οποίο προσδίδει στο παγωτό μαλακότερη υφή και επιθυμητά χαρακτηριστικά τήξης (Ribeiro & Ribeiro, 2010).

Το παγωτό θεωρείται ένας εξαιρετικός φορέας προβιοτικών μικροοργανισμών (Akin *et al.*, 2007; Cruz *et al.*, 2009a; Turgut & Cakmakci, 2009) με το πρόσθετο πλεονέκτημα ότι χαίρει μεγάλης εκτίμησης από ανθρώπους που ανήκουν σε όλες τις ηλικιακές ομάδες και κοινωνικά επίπεδα (Cruz *et al.*, 2009a). Αρκετές μελέτες (Hekmat & McMahon 1992; Davidson *et al.*, 2000; Akin, 2005) απέδειξαν ότι είναι δυνατή η παραγωγή παγωτού τύπου παγωμένης γιαούρτης χρησιμοποιώντας διαφορετικές αναλογίες ζυμωμένων μιγμάτων. Η παραγωγή προβιοτικών παγωτών είναι μία τεχνολογική πρόκληση λόγω της αστάθειας των προβιοτικών βακτηρίων σε κατεψυγμένα προϊόντα. Η ανεπιθύμητη ανάπτυξη της οξύτητας, οι τραυματισμοί των κυττάρων κατά την κατάψυξη και η μηχανική καταπόνηση που προκαλείται από την ανάδευση του μίγματος του παγωτού κατά τη διάρκεια της παρασκευής και της κατάψυξης του, μπορεί να συμβάλλει στη μικρότερη επιβίωση των προβιοτικών βακτηρίων στα κατεψυγμένα γαλακτοκομικά προϊόντα (Kailasapathy & Sultana, 2003).

Σύμφωνα με άλλους ερευνητές (Cruz *et al.*, 2009a; Ranadheera *et al.*, 2010; Mohammadi *et al.*, 2011), το παγωτό αποτελεί το καλύτερο υπόστρωμα για την ενσωμάτωση προβιοτικών μικροοργανισμών λόγω της χαμηλής θερμοκρασίας συντήρησης του και του μικρότερου κινδύνου καταπόνησης των προβιοτικών κυττάρων κατά τη διάρκεια της κατάψυξης, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα μεγάλους πληθυσμούς κατά τη στιγμή της κατανάλωσης. Σε σύγκριση λοιπόν με τα ζυμωμένα γάλατα, στο παγωτό παρατηρείται σημαντικά μεγαλύτερη επιβίωση των προβιοτικών στελεχών κατά τη διάρκεια της παραγωγής και ιδιαίτερα της συντήρησης του προϊόντος (Mohammadi *et al.*, 2011).

Ωστόσο, διάφορες μελέτες έδειξαν ότι ορισμένοι προβιοτικοί μικροοργανισμοί δεν μπορούν να επιβιώσουν σε αρκετά υψηλούς αριθμούς όταν ενσωματώνονται σε κατεψυγμένα γαλακτοκομικά προϊόντα (Ravula & Shah, 1998a; Alamprese *et al.*, 2002; Ranadheera *et al.*, 2010). Φαίνεται ότι ο ρυθμός απώλειας των προβιοτικών κυττάρων είναι μεγαλύτερος κατά τη διαδικασία της κατάψυξης από ότι κατά τη διάρκεια της συντήρησης (Mohammadi *et al.*, 2011). Μέθοδοι όπως η επιλογή και η χρήση ανθεκτικών στο οξυγόνο προβιοτικών στελεχών, η εξάλειψη του μοριακού οξυγόνου (χρησιμοποιώντας εξαρτήματα παγίδευσης οξυγόνου, υλικά συσκευασίας που είναι αδιαπέραστα από το οξυγόνο, καθώς και παχύτερα υλικά συσκευασίας), η εφαρμογή έντονης θερμικής επεξεργασίας, η χρήση της μικροεγκαψυλίωσης και ο εμπλουτισμός του γάλακτος με θρεπτικά συστατικά και πρεβιοτικά, μπορούν να αυξήσουν την

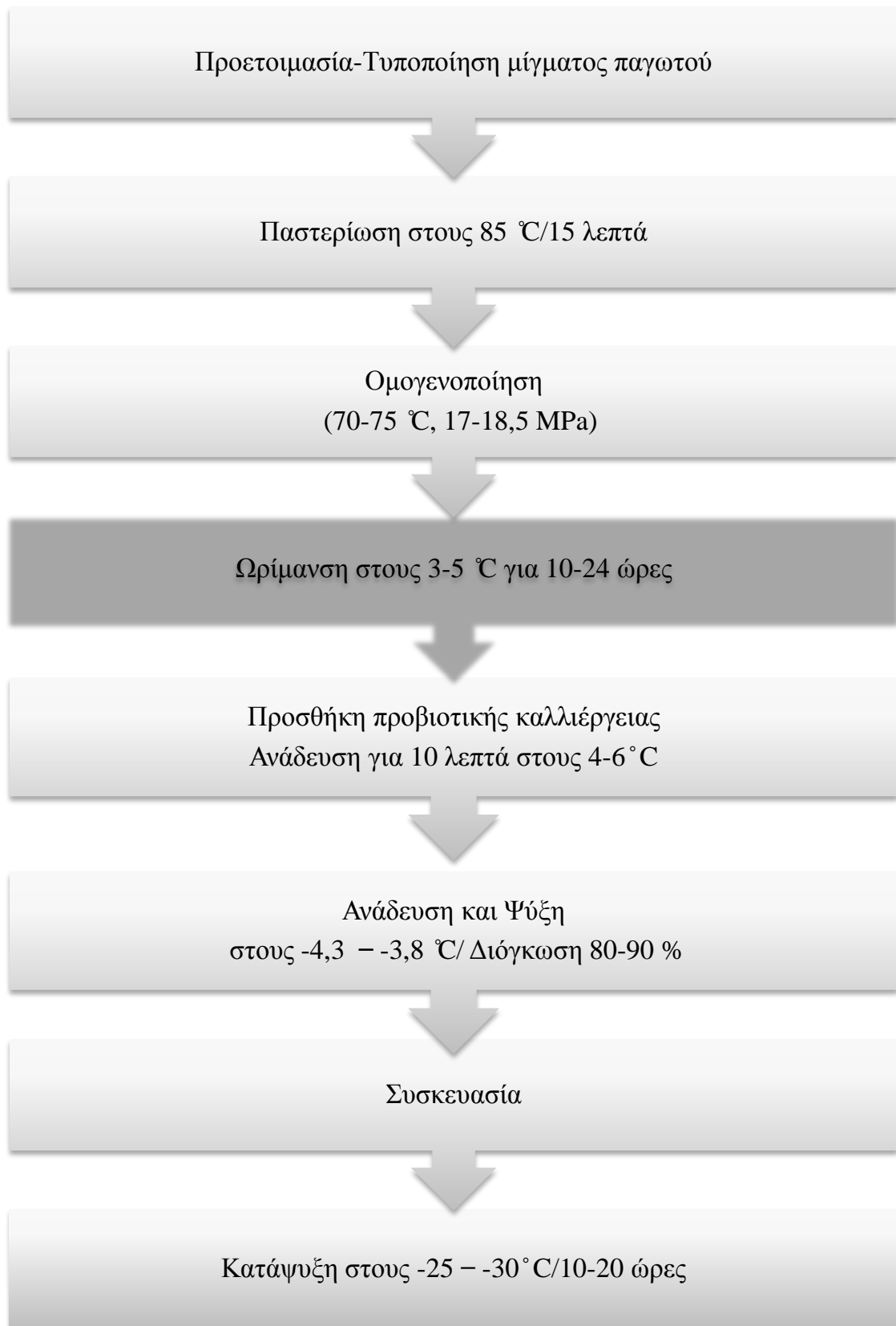
επιβίωση των προβιοτικών μικροοργανισμών στο τελικό προϊόν (Ravula & Shah, 1998a; Kailasapathy & Sultana, 2003; Mohammadi *et al.*, 2011).

Μεταξύ των προβιοτικών γαλακτοκομικών προϊόντων, το προβιοτικό παγωτό είναι το πιο δημοφιλές ως φορέας ζωντανών προβιοτικών μικροοργανισμών λόγω του ουδέτερου pH. Το pH του μη ζυμωμένου παγωτού είναι κοντά στο επτά, εξασφαλίζοντας την επιβίωση των προβιοτικών βακτηρίων (Akin *et al.*, 2007; Homayouni *et al.*, 2008a). Επίσης, το υψηλό επίπεδο συνολικών στερεών στο παγωτό, παρέχει προστασία στα προβιοτικά βακτήρια (Homayouni *et al.*, 2012).

Το προβιοτικό παγωτό μπορεί να παραχθεί με την ενσωμάτωση των προβιοτικών βακτηρίων τόσο σε ζυμωμένο όσο και σε μη ζυμωμένο μίγμα (Homayouni *et al.*, 2012). Η προσθήκη μπορεί να είναι άμεση (δηλαδή αναμιγνύοντας το μίγμα του παγωτού και των προβιοτικών κυττάρων αμέσως πριν από την κατάψυξη), ή μπορεί να περιλαμβάνει τη ζύμωση του γάλακτος για τον πολλαπλασιασμό των προβιοτικών κυττάρων πριν από την ανάμιξή τους με το μίγμα του παγωτού (Tamime, 2005) (Σχήμα 7). Τα προβιοτικά παγωτά που χρησιμοποιούν τη ζύμωση για την παραγωγή τους είναι φυσικά περισσότερο όξινα, λόγω της παραγωγής του γαλακτικού οξέος κατά τη διάρκεια της ζυμωτικής διαδικασίας (Basyžit *et al.*, 2006).

## **5.1 Τεχνολογικά εμπόδια ενσωμάτωσης των προβιοτικών βακτηρίων στο παγωτό**

Η παραγωγή παγωτών που περιέχουν προβιοτικά βακτήρια απαιτεί την υπερπήδηση ορισμένων τεχνολογικών εμποδίων που σχετίζονται με τα διάφορα στάδια της παραγωγικής διαδικασίας (Πίνακας 12). Στην περίπτωση των κατεψυγμένων προϊόντων, όπως είναι το παγωτό, είναι απαραίτητη η υπέρβαση εμποδίων (Cruz *et al.*, 2009a) όπως η ενσωμάτωση του αέρα, που συνήθως αναφέρεται ως διόγκωση και η οποία αποτελεί ένα υποχρεωτικό στάδιο της παραγωγικής διαδικασίας του παγωτού με κρίσιμη επίδραση στις φυσικές του ιδιότητες και τα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά (Ferraz *et al.*, 2012). Η διόγκωση επηρεάζει τη δομή του τελικού προϊόντος, αφού η παρουσία του αέρα δίνει στο παγωτό μία ευχάριστη λεπτή υφή, τις φυσικές ιδιότητες της τήξεως και της σκληρότητας του τελικού προϊόντος (Sofjan & Hartel, 2004). Σύμφωνα με τους Ferraz *et al.* (2012), τα υψηλότερα επίπεδα διόγκωσης οδηγούν σε μειωμένη επιβίωση των προβιοτικών βακτηρίων στο παγωτό κατά τη διάρκεια της συντήρησης. Η περίσσεια οξυγόνου μπορεί να επηρεάσει την ανάπτυξη του μικροαερόφιλου *L. acidophilus* και των αναερόβιων bifidobacteria (Kailasapathy & Sultana, 2003) και έτσι να μειωθεί η προβιοτική αξία του προϊόντος. Η επιλογή ανθεκτικών στελεχών στο οξυγόνο είναι απαραίτητη για την επιτυχή διατήρηση της ζωτικότητας της καλλιέργειας στα προβιοτικά παγωτά. Οι Salen *et al.* (2005) ανέφεραν ότι οι διαφορές στο βαθμό διόγκωσης των προβιοτικών παγωτών είχαν σχέση με την ικανότητα οξίνισης των προβιοτικών καλλιεργειών, η οποία επηρεάζει τη φύση των πρωτεϊνών, προκαλώντας μετουσίωση.



Σχήμα 7. Διάγραμμα ροής για την παρασκευή του προβιοτικού παγωτού (Méndez *et al.*, 2012)

Πίνακας 12. Τεχνολογικά εμπόδια κατά την παραγωγή του προβιοτικού παγωτού (Cruz *et al.*, 2009a)

Βήμα	Πρόβλημα	Λύσεις
Επιλογή συστατικών (πολτός ή χυμός φρούτων)	Υψηλή οξύτητα του τελικού προϊόντος που μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη επιβίωση των προβιοτικών βακτηρίων, καθώς και σε μειωμένη οργανοληπτική αποδοχή.	Χρήση πολτού ή χυμού φρούτων με χαμηλότερη φυσική οξύτητα
	Η ανασταλτική δράση που μπορεί να έχουν μερικά συστατικά έναντι των προβιοτικών στελεχών	Έλεγχος για ανασταλτική δράση των χρησιμοποιούμενων συστατικών έναντι των προβιοτικών στελεχών που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν
Παρασκευή ζυμωμένου ενοφθαλμίσιματος από προβιοτικές καλλιέργειες	Θάνατος των προβιοτικών βακτηρίων σε χαμηλές τιμές pH	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Έλεγχος pH κατά τη διάρκεια της ζυμωτικής διεργασίας</li> <li>•Αυξημένη συγκέντρωση ενοφθαλμίσιματος</li> <li>•Επιλογή ανθεκτικών στελεχών σε χαμηλές τιμές pH</li> </ul>
Ανάδευση	Το οξυγόνο ως παράγοντας τοξικότητας των προβιοτικών βακτηρίων, τα οποία παρουσιάζουν αναερόβιο ή/και μικροαερόφιλο μεταβολισμό	Επιλογή ανθεκτικών στελεχών στο οξυγόνο
Συντήρηση	Η πρόκληση στρες κατάψυξης με μείωση του πληθυσμού των προβιοτικών βακτηρίων κατά τουλάχιστον 1 log	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Αυξημένη συγκέντρωση ενοφθαλμίσιματος</li> <li>•Αποφυγή διακυμάνσεων της θερμοκρασίας κατά τη συντήρηση του προϊόντος</li> </ul>

Οι Cowman & Speck (1965) ανέφεραν ότι οι γαλακτικοί στρεπτόκοκκοι και οι οξυγαλακτικές καλλιέργειες εκκίνησης εμφάνισαν διαφορετικό ποσοστό επιβίωσης, ανάπτυξης σε όξινες συνθήκες και δραστηριότητας της πρωτεΐνάσης, κάτω από διαφορετικές θερμοκρασίες κατάψυξης, σε αποβουτυρωμένο γάλα. Επομένως, όταν ένα προβιοτικό στέλεχος χρησιμοποιείται για την παραγωγή κατεψυγμένου προϊόντος η αποτελεσματικότητά του μπορεί να διαφέρει από ένα μη κατεψυγμένο προϊόν που είναι εμπλουτισμένο με το ίδιο στέλεχος (Ranadheera *et al.*, 2010).

Επίσης, η επιβίωση των προβιοτικών βακτηρίων μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με τα επίπεδα σακχάρου του παγωτού (Akin *et al.*, 2007). Οι Alamprese *et al.* (2002) μελέτησαν το στέλεχος *L. johnsonii* La1 και παρατήρησαν ότι επιβίωσε σε παγωτό που περιείχε σχετικά υψηλή συγκέντρωση ζάχαρης, καθώς και στις συνθήκες καταπόνησης των κυττάρων που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της κατάψυξης. Ο πληθυσμός του *L. johnsonii* La1 διατηρήθηκε σε επίπεδα μεγαλύτερα από  $10^7$  cfu/g για 10 εβδομάδες ή για 8 μήνες συντήρησης στην κατάψυξη (Rao & Prakash, 2004). Σε παγωτά που διέφεραν ως προς τη συγκέντρωση λίπους και γλυκαντικής ύλης παρατηρήθηκαν διαφορετικά ποσοστά επιβίωσης του προβιοτικού στελέχους *L. johnsonii* La1 μετά από 30 ημέρες συντήρησης στους  $-28\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Alamprese *et al.*, 2002). Άλλη μελέτη (Alamprese *et al.*, 2005) έδειξε ότι ο πληθυσμός του *L. rhamnosus* GG δεν μεταβλήθηκε, σε παγωτό με δύο διαφορετικές περιεκτικότητες σε σακχαρόζη (15 και 22%) και λίπος (5 και 10%) κατά τη διάρκεια ενός χρόνου συντήρησης σε διαφορετικές θερμοκρασίες ( $-16\text{ }^{\circ}\text{C}$  και  $-28\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Οι Başyigit *et al.* (2006) ανέφεραν ότι η συντήρηση παγωτού επί έξι μήνες στους  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , που περιείχε σακχαρόζη και ασπαρτάμη, δεν επηρέασε σημαντικά τον πληθυσμό των *L. acidophilus*, *L. agilis* και *L. rhamnosus*.

Το παγωτό χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά, παρέχει καλύτερες συνθήκες για την επιβίωση των *L. acidophilus*, *L. paracasei* και *B. lactis* σε σύγκριση με το πλήρες παγωτό (Mizota, 1996). Σύμφωνα με τους Davidson *et al.* (2000), τα *B. longum* και *B. infantis* είναι σε θέση να επιβιώσουν κατά την ανάδευση, την κατάψυξη και τη συντήρηση μέχρι και 11 ή 52 εβδομάδες, χωρίς να επηρεάζονται από τη λιποπεριεκτικότητα του προϊόντος (Haynes & Playne, 2002).

Στα κατεψυγμένα γαλακτοκομικά επιδόρπια που παρασκευάζονται από γιαούρτη, μπορεί να μειωθεί η βιοδιαθεσιμότητα των *L. acidophilus* και *Bifidobacterium*, λόγω του χαμηλού pH (<4.5), ενώ η ενσωμάτωση των προβιοτικών βακτηρίων σε μη ζυμωμένο παγωτό δεν δημιουργεί πρόβλημα επειδή το pH του παγωτού (6,5 έως 6,6) είναι ιδανικό για την επιβίωσή τους (Ravula & Shah, 1998b). Η προσθήκη διαφόρων φρούτων ή παραγώγων τους με έντονα όξινο χαρακτήρα πρέπει να αποφεύγονται σε παγωτά που περιέχουν προβιοτικές καλλιέργειες, δεδομένου ότι η οξύτητα που προσδίδουν στο παγωτό μπορεί να επηρεάσει την οργανοληπτική αποδοχή του και τη ζωτικότητα της καλλιέργειας (Favaro-Trindade *et al.*, 2006).

Τέλος, η εφαρμογή στρεσογόνων συνθηκών σε προβιοτικά βακτήρια, όπως είναι η παρατεταμένη έκθεση σε πολύ χαμηλές τιμές pH (2,0-3,0) για καθορισμένο χρονικό διάστημα, έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός σταθερού και εξαιρετικά ανθεκτικού στο οξύ προβιοτικό στέλεχος το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην παραγωγική διαδικασία του παγωτού (Cruz *et al.*, 2009a).

Μια πιθανή εναλλακτική λύση για την αντιμετώπιση των προβλημάτων που δημιουργεί η ενσωμάτωση του αέρα στο παγωτό είναι η μικροεγκαψυλίωση των προβιοτικών βακτηρίων, έτσι ώστε να ξεπεραστεί η ευαισθησία τους στο οξυγόνο και να παραταθεί η διάρκεια συντήρησης των προϊόντων (Kebary *et al.*, 1998; Shah & Ravula, 2000b; Tamime, 2005; Homayouni *et al.*, 2008b; Cruz *et al.*, 2009a). Άλλοι ερευνητές (Godward & Kailasapathy, 2003; Kailasapathy & Sultana, 2003; Talwalker & Kailasapathy, 2003), διερεύνησαν την επίδραση της εγκαψυλίωσης, της λυοφιλοποίησης και της συν-εγκαψυλίωσης διαφόρων μικροοργανισμών (όπως οι *L. acidophilus* 2401, 2404, 2409, 2415, *B. infantis* 1912, *B. animalis* subsp. *lactis* 1941, 920 και BB12, *B. longum* 5581) στην επιβίωσή τους στη μάζα του παγωτού και βρήκαν ότι τα ελεύθερα κύτταρα καθώς και τα προσφάτως εγκαψυλωσμένα κύτταρα χωρίς λυοφιλοποίηση έδειξαν καλύτερα ποσοστά επιβίωσης. Τέλος, οι Nousia *et al.* (2011), οι οποίοι πειραματίστηκαν με λυοφιλοποιημένα και με ενεργοποιημένα κύτταρα του *L. acidophilus*, διαπίστωσαν ότι η συντήρηση στην κατάψυξη δεν είχε καμία επίδραση στην επιβίωση των κυττάρων του *L. acidophilus* και ο πληθυσμός των βακτηρίων παρέμενε πάνω από το ελάχιστο συνιστώμενο επίπεδο των  $10^6$  cfu/g. Σύμφωνα με τους ίδιους ερευνητές, η ενσωμάτωση εμπορικών λυοφιλοποιημένων προβιοτικών καλλιέργειών αποτελεί σημαντικό πλεονέκτημα της διαδικασίας παραγωγής του παγωτού επειδή δεν απαιτείται επεξεργασία της καλλιέργειας πριν από την ενσωμάτωσή της στο μίγμα του παγωτού.

## 5.2 Οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των προβιοτικών παγωτών

Το προβιοτικό παγωτό μπορεί να δημιουργήσει διαφορετικά προφίλ γεύσης σε σύγκριση με το συμβατικό παγωτό. Σύμφωνα με τους Saxelin *et al.* (1999), Champagne *et al.* (2005) και Mohammadi *et al.*, (2011), η ενσωμάτωση προβιοτικών μικροοργανισμών στο παγωτό έχει μικρή επίδραση στη γεύση, την υφή και σε άλλα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του. Σε γενικές γραμμές, τα παγωτά που παράγονται με προβιοτικές καλλιέργειες παρουσιάζουν λιγότερο έντονο άρωμα και ηπιότερη γεύση γιαούρτης σε σχέση με το προϊόν που παρασκευάζεται με τις παραδοσιακές καλλιέργειες (Hekmat & McMahon, 1992; Aryana & Summers, 2006; Favaro-Trindade *et al.*, 2006).

Η συνολική αποδοχή των μη-ζυμωμένων προβιοτικών παγωτών είναι η ίδια με τα συμβατικά, αλλά στα ζυμωμένα προβιοτικά παγωτά καθώς και στα ζυμωμένα κατεψυγμένα επιδόρπια, οι χαμηλές τιμές pH (4,0 έως 4,5) έχουν αρνητικές επιπτώσεις στην οργανοληπτική αποδοχή τους, αφού παραδοσιακά, το παγωτό δεν χαρακτηρίζεται ως όξινο προϊόν διατροφής (Cruz *et al.*, 2009a). Ωστόσο, η αύξηση της συγκέντρωσης του σακχάρου μπορεί να βελτιώσει τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του ζυμωμένου παγωτού (Homayouni *et al.*, 2012). Μερικοί μικροοργανισμοί, όπως ο *L. reuteri* ή ο *B. bifidum* παράγουν μια ελαφρώς όξινη γεύση λόγω της ζύμωσης που προκαλούν. Μπορεί όμως να ακολουθηθούν κατάλληλες συνθήκες επεξεργασίας που να περιορίζουν τη ζύμωση και να επιτύχουν την ελαχιστοποίηση των δυσάρεστων αυτών γεύσεων (Tamime, 2005). Σύμφωνα με τους Ferraz *et al.* (2012), στα προβιοτικά παγωτά, ούτε η προσθήκη του *L. acidophilus*, ούτε η διακύμανση στο επίπεδο της διόγκωσης επηρέασε την οργανοληπτική αποδοχή του προϊόντος. Συνολικά, όμως θα πρέπει να υιοθετούνται χαμηλότερα επίπεδα διόγκωσης προκειμένου να διατηρηθεί ζωντανός ο κατάλληλος



πληθυσμός προβιοτικών μικροοργανισμών. Οι Nousia *et al.* (2011) ανέφεραν ότι η ενσωμάτωση λυοφιλωμένων κυττάρων *L. acidophilus* είχε μικρή επίδραση επί των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του παγωτού, ενώ η ενσωμάτωση ενεργοποιημένων κυττάρων του ίδιου μικροοργανισμού βελτίωσε σημαντικά ( $P < 0,01$ ) τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος. Τέλος, για τη βελτιστοποίηση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του παγωτού συνιστάται η διενέργεια προκαταρκτικών δοκιμών με διαφορετικά επίπεδα ενοφθαλμισμού και διαφορετικούς προβιοτικούς μικροοργανισμούς (Cruz *et al.*, 2009a).

## 6 Ευρωπαϊκή νομοθεσία για τα προβιοτικά γαλακτοκομικά προϊόντα

Στην Ευρωπαϊκή Νομοθεσία, δεν υπάρχει μέχρι σήμερα ορισμός του όρου "προβιοτικός", ούτε συγκεκριμένη νομοθεσία που να αφορά τα προβιοτικά τρόφιμα ή την ευρύτερη κατηγορία των λειτουργικών τροφίμων στην οποία ανήκουν. Ωστόσο, υπάρχει ένας αριθμός νομοθετικών διατάξεων, που αφορούν κυρίως την ασφάλεια και την επισήμανση των τροφίμων, οι οποίες πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά την παρασκευή και εμπορία ενός προβιοτικού γαλακτοκομικού προϊόντος.

Για τη διασφάλιση της υγείας του καταναλωτή ο Κανονισμός 258/97/EK (Commission Regulation 258/97/EC1997a) αξιώνει τα καινοφανή τρόφιμα και τα συστατικά τους, τα οποία δεν είχαν προηγουμένως χρησιμοποιηθεί σε σημαντικό βαθμό στα Κράτη Μέλη της Ευρωπαϊκής Ένωσης, να υπόκεινται σε εκτίμηση της ασφάλειάς τους πριν κυκλοφορήσουν στην αγορά. Στις κατηγορίες των τροφίμων που αναφέρονται στο σκοπό του παραπάνω Κανονισμού περιλαμβάνονται συστατικά τροφίμων που περιέχουν μικροοργανισμούς, επομένως θα μπορούσαν να συμπεριληφθούν σ' αυτά τα προβιοτικά τρόφιμα. Αξίζει όμως να σημειωθεί ότι πολλά προβιοτικά γαλακτοκομικά προϊόντα κυκλοφορούσαν στην Ευρωπαϊκή αγορά πριν την έναρξη εφαρμογής του συγκεκριμένου Κανονισμού. Τα εν λόγω εμπορικά προϊόντα, που είχαν έγκριση κυκλοφορίας σε τουλάχιστον ένα Κράτος Μέλος, δεν υπόκεινται σε περαιτέρω εκτίμηση της ασφάλειάς τους σύμφωνα με τις διατάξεις του Κανονισμού 258/97/EK και επιτρέπεται η κυκλοφορία τους στην Ευρωπαϊκή αγορά με βάση τη αρχή της αμοιβαίας αναγνώρισης (Tamime,2005).

Όταν, όμως, μία εταιρεία σχεδιάζει να κυκλοφορήσει για πρώτη φορά στην Ευρωπαϊκή Ένωση ένα καινοφανές τρόφιμο ή συστατικό τροφίμου, πρέπει να υποβάλλει αίτηση μαζί με τον πλήρη φάκελο στην αρμόδια αρχή του Κράτους Μέλους που θα κυκλοφορήσει αρχικά το προϊόν, ενώ ταυτόχρονα αντίγραφο του φακέλου, συνοδευόμενο από περίληψη, πρέπει να υποβληθεί στην Ευρωπαϊκή Επιτροπή. Σημειώνεται ότι στην Ευρωπαϊκή Νομοθεσία ορίζονται σαφώς με ένα μακροσκελές και λεπτομερές κείμενο (Commission Recommendation 97/618/EC 1997b) οι απαιτήσεις μιας τέτοιας υποβολής φακέλου. Ακολουθεί, εντός τριών μηνών, μία αρχική εκτίμηση του υποβληθέντος φακέλου από την αρμόδια αρχή του Κράτους Μέλους, η οποία κοινοποιείται στην Ευρωπαϊκή Επιτροπή. Η τελευταία αποστέλλει την αρχική αυτή εκτίμηση μαζί με την περίληψη του φακέλου σε όλα τα Κράτη Μέλη, τα οποία εντός 60 ημερών πρέπει να καταθέσουν τα σχόλιά τους. Εάν η αρχική εκτίμηση είναι ευνοϊκή και δεν εγείρονται αντιρρήσεις από την υπόλοιπη διαδικασία, ενημερώνεται η εταιρεία από την αρμόδια αρχή του Κράτους Μέλους ότι εγκρίνεται η κυκλοφορία του προϊόντος στην αγορά. Εάν, αντίθετα, η αρχική εκτίμηση δεν είναι ευνοϊκή, η δικαιούχος εταιρεία μπορεί να υποβάλλει επιπλέον στοιχεία ή/και μελέτες τα οποία η Ευρωπαϊκή Επιτροπή αποστέλλει στα Κράτη Μέλη και στην Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA) για να εκφράσουν την επιστημονική τους άποψη. Εάν υπάρξει αντίρρηση από κάποιο Κράτος Μέλος ο φάκελος μεταφέρεται στην Μόνιμη Επιτροπή για την Τροφική Αλυσίδα και την Υγεία των Ζώων (Standing Committee for the Food Chain and Animal Health, SCFAH) μαζί με την επιστημονική άποψη της EFSA. Στην

περίπτωση που η SCFCAH δεν μπορέσει να καταλήξει σε απόφαση, ο φάκελος παραπέμπεται στο Συμβούλιο Υπουργών το οποίο εντός τριών μηνών πρέπει να αποφασίσει. Σε περίπτωση θετικής εξέλιξης, η Ευρωπαϊκή Επιτροπή εξουσιοδοτείται να αποφασίσει για τον καθορισμό των συνθηκών χρήσης του προϊόντος, της επωνυμίας του, των προδιαγραφών του και των ιδιαίτερων απαιτήσεων για την επισήμανσή του. Η απόφαση αυτή δημοσιεύεται στην Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Επιτροπής.

Όταν ο δικαιούχος θεωρεί ότι το τρόφιμο ή το συστατικό είναι ουσιαστικά ισοδύναμο ενός παρόμοιου προϊόντος που κυκλοφορεί στην Ευρωπαϊκή αγορά, ακολουθείται η λεγόμενη απλοποιημένη διαδικασία. Ο δικαιούχος δηλαδή μπορεί να απευθυνθεί άμεσα στην Ευρωπαϊκή Επιτροπή παρέχοντας όλες τις επιστημονικές αποδείξεις ή εναλλακτικά επιζητά την άποψη της αρμόδιας Επιτροπής ενός Κράτους Μέλους.

Στοχεύοντας στην προστασία του καταναλωτή από παραπλανητικές διαφημίσεις και συγκεκριμένα από ισχυρισμούς υγείας και διατροφής χωρίς επιστημονικό υπόβαθρο που ενδέχεται να βλάψουν την υγεία του καταναλωτή ή να του δημιουργήσουν ψευδείς ελπίδες ίασης, υιοθετήθηκε από το Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο ο Κανονισμός 1924/06/EK (Commission Regulation 1924/06/EC 2007). Σύμφωνα με τη διαδικασία που ορίζει ο Κανονισμός, ο δικαιούχος πρέπει να απευθυνθεί στην αρμόδια αρχή ενός Κράτους Μέλους καταθέτοντας φάκελο με όλα τα απαραίτητα δικαιολογητικά. Η αρμόδια αρχή θα ενημερώσει χωρίς καθυστέρηση την EFSA και θα θέσει στη διάθεσή της το φάκελο και κάθε πρόσθετη πληροφόρηση που κατέθεσε ο δικαιούχος. Σε περίπτωση θετικής έκβασης, η EFSA στην απόφασή της θα συμπεριλάβει το όνομα και τη διεύθυνση του δικαιούχου, την επωνυμία του προϊόντος ή την κατηγορία τροφίμου που κατατάσσεται και τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του, την προτεινόμενη γραπτή διατύπωση (σε όλες τις γλώσσες της Ευρωπαϊκής Ένωσης) του ισχυρισμού για ευεργετική επίδραση στην υγεία, τις συνθήκες χρήσης του τροφίμου και, όταν κρίνεται απαραίτητο, μία πρόσθετη δήλωση ή προειδοποίηση που θα συνοδεύει τον παραπάνω ισχυρισμό στην επισήμανση και τη διαφήμιση. Η EFSA, στη συνέχεια, θα κοινοποιήσει την απόφασή της στην Ευρωπαϊκή Επιτροπή η οποία εντός δύο μηνών θα πάρει την τελική απόφαση λαμβάνοντας υπόψη τη γνώμη της EFSA και επιπλέον όλες τις σχετικές διατάξεις της Ευρωπαϊκής νομοθεσίας.

Στις 25.05.2012 δημοσιεύτηκε στην Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης ο Κανονισμός 432/12/EK (Commission Regulation 432/12/EC 2012) της Επιτροπής, σχετικά με τη θέσπιση καταλόγου επιτρεπόμενων ισχυρισμών υγείας που διατυπώνονται για τα τρόφιμα, εξαιρουμένων όσων αφορούν τη μείωση του κινδύνου εκδήλωσης ασθένειας και την ανάπτυξη και υγεία των παιδιών. Στο Παράρτημα του Κανονισμού μπορούν να βρεθούν οι εγκεκριμένοι ισχυρισμοί, οι οποίοι μπορούν να αναζητηθούν και μέσω του Κοινοτικού μητρώου. Στο Κοινοτικό μητρώο μπορεί επίσης να βρεθούν οι απορριφθέντες ισχυρισμοί υγείας. Σημειώνεται η υποχρέωση των επιχειρήσεων τροφίμων για την απομάκρυνση των προϊόντων που φέρουν απορριφθέντες ισχυρισμούς υγείας εντός εξαμήνου από την έναρξη ισχύος του εν λόγω Κανονισμού.

Στις 21.09.2013 η Ευρωπαϊκή Επιτροπή ενέκρινε Κανονισμό για τον καθορισμό των κανόνων για τις αιτήσεις που αφορούν τη χρήση των περιγραφών κοινής χρήσης (ονομασίες). Σύμφωνα με τον Κανονισμό 907/13/EK (Commission Regulation

907/13/EC 2013) προκειμένου να διασφαλιστεί το υψηλό επίπεδο προστασίας των καταναλωτών η χρήση των ισχυρισμών δεν θα πρέπει να είναι ψευδής, διφορούμενη ή παραπλανητική. Η ίδια βασική αρχή θα πρέπει να ισχύει για τη χρήση των περιγραφών κοινής χρήσης (ονομασίες) που μπορούν να επηρεάσουν την υγεία. Οι εταιρείες θα πρέπει να χρησιμοποιούν τις περιγραφές κοινής χρήσης (ονομασίες) για τουλάχιστον 20 χρόνια στο κράτος ή κράτη μέλη της ΕΕ πριν από την ημερομηνία έναρξης ισχύος του παρόντος κανονισμού.

Σύμφωνα με το GAP (Global Alliance for Probiotics) ([http16](http://16)) περισσότερες από 300 αιτήσεις που υποβλήθηκαν βάσει του κανονισμού περί ισχυρισμών υγείας, αναφορικά με προβιοτικά βακτήρια δεν έχουν λάβει θετική αξιολόγηση από την EFSA ή έγκριση από την Επιτροπή, με αποτέλεσμα τα προβιοτικά τρόφιμα να είναι από τα είδη των τροφίμων που έχουν πληγεί περισσότερο από τις επιπτώσεις του κανονισμού. Οι κριτικές σχετικά με την εγκυρότητα και την πληρότητα του καταλόγου επιτρεπόμενων ισχυρισμών, αλλά και οι αρνητικές αξιολογήσεις των ισχυρισμών δημοφιλών ουσιών, όπως η γλυκοζαμίνη και τα προβιοτικά βακτήρια, έχουν εγείρει ενστάσεις και καχυποψία απέναντι στην επιστημονικότητα των μεθόδων αξιολόγησης, αλλά και πολλά ερωτηματικά αν θα είναι πλέον δυνατή η ενημέρωση του καταναλωτή σχετικά με το προϊόν το οποίο πρόκειται να αγοράσει, χωρίς τη χρήση ισχυρισμών στην επισήμανση και στα προωθητικά έντυπα του προϊόντος, και τι θα συμβεί με τα προϊόντα των οποίων οι ισχυρισμοί υγείας δεν εγκρίθηκαν. Θα σταματήσουν να είναι λειτουργικά ή δεν θα υπάρχουν οφέλη από τη χρήση τους;

Σε παγκόσμιο επίπεδο, η Επιτροπή του Codex Alimentarius (CAC) των οργανισμών FAO/WHO υιοθέτησε, στην 26<sup>η</sup> Σύνοδό της, ένα νέο πρότυπο για τα ζυμωμένα γάλατα (FAO/WHO 2003). Το νέο αυτό πρότυπο περιλαμβάνει ένα ευρύτερο φάσμα ζυμωμένων γαλάτων, όπως το κεφίρ, το κουμίζ και το γάλα acidophilus. Αν και το εν λόγω πρότυπο δεν απευθύνεται ειδικά στα προβιοτικά γαλακτοκομικά προϊόντα, καθορίζει τα χαμηλότερα επίπεδα των μικροοργανισμών της καλλιέργειας εκκίνησης στο τρόφιμο στα  $10^7$  cfu/g, ενώ όταν υπάρχει επισήμανση για ειδικούς μικροοργανισμούς (εκτός της φυσιολογικής καλλιέργειας εκκίνησης) ορίζει ως χαμηλότερο επίπεδο για τους εν λόγω μικροοργανισμούς εκείνο των  $10^6$  cfu/g τροφίμου.

## 7 Συμπεράσματα

Τα γαλακτοκομικά προϊόντα ζύμωσης, είναι τρόφιμα τα οποία επιδρούν ευεργετικά στην υγεία του καταναλωτή, ιδιαίτερα όταν ενσωματώνονται σε αυτά προβιοτικοί μικροοργανισμοί. Τα προβιοτικά ζυμωμένα γάλατα είναι τα πιο δημοφιλή προβιοτικά προϊόντα διατροφής.

Όταν τα προβιοτικά βακτήρια χρησιμοποιούνται στην παραγωγή ζυμωμένων γαλάτων, τα διάφορα χαρακτηριστικά τους εμπλέκονται στην ποιότητα και τα χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος. Η ανάπτυξη των προβιοτικών τροφίμων είναι μία ακριβή και πολύπλευρη διαδικασία που λαμβάνει υπόψη πολλούς παράγοντες, όπως την οργανοληπτική αξιολόγηση, τη φυσική και τη μικροβιολογική σταθερότητα, την εμπορική αξία και τις χημικές και άλλες ενδογενείς λειτουργικές ιδιότητες, ώστε το τελικό προϊόν να έχει εμπορική επιτυχία.

Περισσότερη έρευνα απαιτείται για την εξακρίβωση των μηχανισμών εκείνων μέσω των οποίων οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί επηρεάζουν την ευημερία μας σε μοριακό επίπεδο. Οι μελλοντικές προοπτικές θα πρέπει να βασίζονται κυρίως στην απομόνωση νέων ανθεκτικών και κατάλληλων προβιοτικών στελεχών καθώς και στην τροποποίηση των υφισταμένων προβιοτικών βακτηρίων που είναι σε θέση να επιδείξουν φαρμακευτικές (*in vivo*) και τεχνολογικές ιδιότητες. Επίσης ευρύ φάσμα της έρευνας έχει επικεντρωθεί στη βελτιστοποίηση της σύνθεσης, της επεξεργασίας και της συσκευασίας των προβιοτικών γαλακτοκομικών προϊόντων ζύμωσης.

# BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

**Adhikari,K., Mustapha,A., Grun,I.U. & Fernando,L.** (2000). “*Viability of microencapsulated bifidobacteria in set yogurt during refrigerated storage*”. **Journal of Dairy Science**, 83(9): 1946–1951.

**Adhikari,K., Grun,I.U., Mustapha,A. & Fernando,L.N.** (2002). “*Changes in the profiles of organic acids in plain set and stirred yoghurt during manufacture and refrigerated storage*”. **Journal of Food Quality**, 25(5): 435-51.

**Aggarwal,J., Swami,G. & Kumar,M.** (2013). “*Probiotics and their Effects on Metabolic Diseases: An Update*”. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, 7(1): 173-177.

**Agrawal,A., Houghton,L.A., Morris,J., Reilly,B., Guyonnet,D., Goupil Feullerat,N., Scgulumberger,A., Jakob,S. & Whorwell,P.J.** (2008). “*Clinical trial: the effects of a fermented milk product containing Bifidobacterium lactis DN-173 010 on abdominal distension and gastrointestinal transit in irritable bowel syndrome with constipation*”. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, 29(1): 104–114.

**Akin,M.B., Akin,M.S. & Kirmaci,Z.** (2007). “*Effects of inulin and sugar levels on the viability of yogurt and probiotic bacteria and the physical and sensory characteristics in probiotic ice-cream*”. **Food Chemistry**, 104(1): 93–99.

**Albenzio,M., Santillo,A., Caroprese,M., Marino,R., Trani,A. & Faccia,M.** (2010). “*Biochemical patterns in ovine cheese: Influence of probiotic strains*”. **Journal of Dairy Science**, 93(8): 3487-3496.

**Alegre,I., Viñas,I., Usall,J., Anguera,M. & Abadias,M.** (2011). “*Microbiological and physicochemical quality of fresh-cut apple enriched with the probiotic strain Lactobacillus rhamnosus GG*”. **Food Microbiology**, 28(1): 59–66.

**Ali,F.S., Saad,O.A.O. & Saiwa,A.G.H.** (2013). “*Probiotic stability of yoghurts during refrigerated storage*”. **Egyptian Academic Journal of Biological Science**, 5(2): 9-19.

**Allgeyer,L.C., Miller,M.J. & Lee,S.Y.** (2010). “*Sensory and microbiological quality of yogurt drinks with prebiotics and probiotics*”. **Journal of Dairy Science**, 93(10): 4471–4479.

**de Almeida,M.H.B., Zoellner,S.S., da Cruz,A.G., Moura,M.R.L., de Carvalho,L.M.J., Freitas,M.C.J., & de Santana,A.** (2008). “*Potentially probiotic açai yogurt*”. **International Journal of Dairy Technology**, 61(2): 178–182.

**Akin,M.S.** (2005). “*Effects of inulin and different sugar levels on viability of probiotic bacteria and the physical and sensory characteristics of probiotic fermented ice-cream*”. **Milchwissenschaft**, 60(3): 297–301.

**Akin,M.B., Akin,M.S. & Kirmaci,Z.** (2007). “*Effects of inulin and sugar levels on the viability of yogurt and probiotic bacteria and the physical and sensory characteristics in probiotic ice cream*”. **Food Chemistry**, 104(1): 93-99.

**Alamprese,C., Foschino,R., Rossi,M., Pompei,C. & Savani,L.** (2002). “*Survival of Lactobacillus johnsonii La 1 and influence of its addition in retail-manufactured ice-cream produced with different sugar and fat concentrations*”. **International Dairy Journal**, 12(2–3): 201–208.

**Alamprese,C., Foschino,R., Rossi,M., Pompei,C. & Corti,S.** (2005). “*Effects of Lactobacillus rhamnosus GG addition in ice cream*”. **International Journal of Dairy Technology**, 58(4): 200-206.

**Antunes,A.E., Cazetto,T.F. & Bolini,H.M.A.** (2005). “*Viability of probiotic microorganisms during storage, postacidification and sensory analysis of fat-free yogurts with added whey protein concentrate*”. **International Journal of Dairy Technology**, 58(3): 169–73.

**Antunes,A.E.D., Silva,E.R.A, Van Dender,A.D.F., Marasca,E.T.G., Moreno,I., Faria,E.V., Padula,M. & Lepayer,A.L.S.** (2009). “*Probiotic buttermilk-like fermented milk product development in a semiindustrial scale: Physicochemical, microbiological and sensory acceptability*”. **International Journal of Dairy Technology**, 62(4): 556–563.

**ANVISA** (2008). (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Brazilian Agency of Sanitary Surveillance. Food with health claims, new foods/ ingredients, bioactive compounds and probiotic. Διαθέσιμο στο:  
[http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno\\_lista\\_alega.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm). [Προσπελάστηκε: 15 Νοεμβρίου 2012].

**Aragon-Alegro,L.C., Alegro,J.H.A., Cardarelli,H.R.C., Chiu,M.C. & Saad,S.M.I.** (2007). “*Potentially probiotic and synbiotic chocolate mousse*”. **LWT—Food Science and Technology**, 40(4): 669–75.

**Aryana,K.J. & Summers,M.** (2006). “*Probiotic fat-free, no sugar added ice-cream*”. **Milchwissenschaft**, 61(1): 184–187.

**Ash,A. & Wilbey,A.** (2010). “*The nutritional significance of cheese in the UK diet*”. **International Journal of Dairy Technology**, 63(3): 305–317.

**Ayar,A. & Burucu,H.** (2013). “*Effect of whey fractions on microbial and physicochemical properties of probiotic ayran (drinkable yogurt)*”. **International Food Research Journal**, 20(3):1409-1415.

**Başyğit,G., Kuleaşan,H. & Karahan,A.G.** (2006). “*Viability of human-derived probiotic lactobacilli in ice-cream with sucrose and aspartame*”. **Journal of Industrial Microbiology and Technology**, 33(9): 796–800.

- Bergamini,C.V., Hynes,E.R., Quiberoni,A., Suárez,V.B. & Zalazar,C.A.** (2005). “*Probiotic bacteria as adjunct starters: influence of the addition methodology on their survival in a semi-hard Argentinean cheese*”. **Food Research International**, 38(5): 597-604.
- Bergamini,C.V., HynesE.R., Candiotti,M.C. & Zalazar,C.A.** (2009a). “*Multivariate analysis of proteolysis patterns differentiated the impact of six strains of probiotic bacteria on a semi-hard cheese*”. **Journal of Dairy Science**, 92(6): 2455-2467.
- Bergamini,C.V., Hynes,E.R., Palma,S.B., Sabbag,N.G. & Zalazar,C.A.** (2009b). “*Proteolytic activity of three probiotic strains in semi-hard cheese as single and mixed cultures: Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus paracasei and Bifidobacterium lactis*”. **International Dairy Journal**, 19(8): 467–75.
- Bolduc,M.P., Raymond,Y., Fustier,P., Champagne,C.P. & Vuillemand,J.C.** (2006). “*Sensitivity of bifidobacteria to oxygen and redox potential in non-fermented pasteurized milk*”. **International Dairy Journal**, 16(9): 1038–1048.
- Boylston,T.D., Vinderola,C.G., Ghoddusi,H.B., & Reinheimer,J.A.** (2004). “*Incorporation of bifidobacteria into cheeses: challenges and rewards*”. **International Dairy Journal**, 14(5): 375-387.
- Buriti,F.C.A., Rocha,J.S. & Saad,S.M.I.** (2005). “*Incorporation of Lactobacillus acidophilus in Minas fresh cheese and its implications for textural and sensorial properties during storage*. **International Dairy Journal**, 15(12): 1279–1288.
- di Cagno,R., Tamborrino,A., Gallo,G., Leone,C., de Angelis,M., Faccia,M., Amirante,P. & Gobbetti,M.** (2004). “*Uses of mares & apos; milk in manufacture of fermented milks*”. **International Dairy Journal**, 14(9): 767-775.
- Çaglar,E., Kusu,O., Kuwetli,S., Cildir,S.K., Sandalli,N. & Twetman,S.** (2008). “*Short-term effect of ice-cream containing Bifidobacterium lactis Bb-12 on the number of salivary mutants streptococci and lactobacilli*”. **Acta Odontologica Scandinavica**, 66(3): 154–158.
- Can,M., Besirbellioglu,B.A., Avci,I.Y., Bekker,C.M. & Pahsa,A.** (2006). “*Prophylactic Saccharomyces boulardii in the prevention of antibiotic associated diarrhea: a prospective study*”. **Medical Science Monitor**, 12(4): 19–22.
- Champagne,C.P., Gardner,N.J. & Roy,D.** (2005). “*Challenges in the addition of probiotic cultures to foods*”. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 45(1): 61–84.
- Champagne,C.P.** (2009). *Some Technological Challenges in the Addition of Probiotic Bacteria to Foods*, pp. 762-803. Springer Science and Business Media, LLC.
- Champagne,C.P., Ross,R.P., Saarela,M., Hansen,K.F. & Charalampopoulos,D.** (2011). “*Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated*



*cultures and in food matrices*". **International Journal of Food Microbiology**, 149(3): 185–93.

**Cogan,T.M., Beresford,T.P., Steele,J., Broadbent,J., Shah,N.P. & Ustunol,Z.** (2007). "*Invited review: advances in starter cultures and cultured food*". **Journal of Dairy Science**, 90(9): 4005-4021.

**Commission Regulation 258/97/EC** (1997a). "*Concerning novel foods and novel food ingredients*". **Official Journal of the European Commission**, L43: 1-6.

**Commission Recommendation 97/618/EC** (1997b). "*Concerning the scientific aspects and the presentation of information necessary to support applications for the placing on the market of novel foods and novel food ingredients and the preparation of initial assessment reports under Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the Council*". **Official Journal of the European Commission**, L253: 1-36.

**Commission Regulation 1924/06/EC** (2007). "*Concerning nutrition and health claims made on foods*". **Official Journal of the European Union**, L12: 3-18.

**Commission Regulation 432/12/EC** (2012). "*Establishing a list of permitted health claims made on foods, other than those referring to the reduction of disease risk and to children's development and health*". **Official Journal of the European Union**, L136: 1-40.

**Commission Regulation 907/13/EC** (2013). "*Setting the rules for applications concerning the use of generic descriptors (denominations)*". **Official Journal of the European Union**, L251: 7-9.

**Corbo,M.R., Albenzio,M., de Angelis,M., Sevi,A. & Gobbetti,M.** (2001). "*Microbiological and biochemical properties of Canestrato Pugliese hard cheese supplemented with bifidobacteria*". **Journal of Dairy Science**, 84(3): 551–561.

**Corcoran,B.M., Stanton,C., Fitzgerald,G. & Ross,R.P.** (2008). "*Life under stress: The probiotic stress response and how it may be manipulated*". **Current Pharmaceutical Design**, 14(14): 1382–1399.

**Corr,S.C., Li,Y., Riedel,C.U., O'Toole,P.W., Hill,C. & Gahan,C.G.** (2007). "*Bacteriocin production as a mechanism for the antiinfective activity of Lactobacillus salivarius UCC118*". **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 104(18): 7617–7621.

**Cowman,E.A. & Speck,M.L.** (1965). "*Ultra-low temperature storage of lactic Streptococci*". **Journal of Dairy Science**, 48(11): 1531–1532.

**di Criscio,T., Fratianni,A., Mignogna,R., Cinquanta,L., Coppola,R., Sorrentimo,E. & Panfili,G.** (2010). "*Production of functional probiotic, prebiotic, and synbiotic ice creams*". **Journal of Dairy Science**, 93(10): 4555-4564.

**Cruz,A.G., Faria,J.A.F., Cadena,R.S. & Granato,D.** (2002). “*Sensory evaluation of probiotic, prebiotic and symbiotic foods: relevance for product development*”. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 9: 358–373.

**Cruz,A.G., Antunes,A.E.C., Sousa,A-L.O.P., Faria,J.A.F. & Saad,S.M.I.** (2009a). “*Ice-cream as a probiotic food carrier*”. **Food Research International**, 42(9): 1233-1239.

**Cruz,A.G., Buriti,F.C.A., Souza,C.H.B., Faria,J.A.F. & Saad,S.M.I.** (2009b). “*Probiotic cheese: Health benefits, technological and stability aspects*”. **Trends in Food Science & Technology**, 20(8): 344-354.

**Cruz,A.G., Cadena,R.S., Walter,E.H.M., Mortazavian,A., Granato,D., Faria,J.A.F. & Bolini,H.M.A.** (2010). “*Sensory analysis: Relevance for prebiotic, probiotic, and synbiotic product development*”. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 9(4): 358–373.

**Cruz,A.G., Faria,J.A.F., Pollonio,M.A.R., Bolini,H.M.A., Celeghini,R.M.S., Granato,D. & Shah,N.P.** (2011). “*Cheeses with reduced sodium content: Effects on functionality, public health benefits and sensory properties*”. **Trends in Food Science and Technology**, 22(6): 276–291.

**Cruz,A.G., Castro,W.F., Faria,J.A.F., Lollo,P.C.B., Amaya-Farfán,J., Freitas,M.Q., Rodrigues,D., Oliveira,C.A.F. & Godoy,H.T.** (2012). “*Probiotic yogurts manufactured with increased glucose oxidase levels: Postacidification, proteolytic patterns, survival of probiotic microorganisms, production of organic acid and aroma compounds*”. **Journal of Dairy Science**, 95(5): 2261–2269.

**Czinn,J.S. & Blanchard,S.S.** (2008). “*Probiotics in Foods and Supplements. Nutrition and Health*”. **Probiotics in Pediatric Medicine**, 21: 299-306.

**Damin,M.R., Minowa,E., Alcântara,M.R. & Oliveira,M.N.** (2008). “*Effect of cold storage on culture viability and some rheological properties of fermented milk prepared with yogurt and probiotic bacteria*”. **Journal of Texture Studies**, 39(1): 40–55.

**Dave,R.I. & Shah,N.P.** (1997a). “*Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures*”. **International Dairy Journal**, 7(1): 31–41.

**Dave,R.I. & Shah,N.P.** (1997b). “*Effectiveness of ascorbic acid as an oxygen scavenger in improving viability of probiotic bacteria in yoghurts made with commercial starter cultures*”. **International Dairy Journal**, 7(6–7): 435–443.

**Davidson,R.H., Duncan,S.E., Hackney,C.R., Eigel,W.N. & Boling,J.W.** (2000). “*Probiotic culture survival and implications in fermented frozen yogurt characteristics*”. **Journal of Dairy Science**, 83(4): 666–673.

**Desai,A.R., Powell,I.B. & Dhah,N.P.** (2004). “*Survival and activity of probiotic lactobacilli in skim milk containing prebiotics*”. **Journal of Food Science**, 69(3): 57-60.

**Dinakar,P. & Mistry,V.V.** (1994). “*Growth and viability of Bifidobacterium bifidum in Cheddar cheese*”. **Journal of Dairy Science**, 77(10): 2854-2864.

**Donkor,O.N., Henriksson,A., Vasiljevic,T. & Shah,N.P.** (2006). “*Effect of acidification on the activity of probiotics in yoghurt during cold storage*”. **International Dairy Journal**, 16(10): 1181–1189.

**Ebel,B., Martin,F., Le,L.D.T., Gervai,P. & Cachon,R.** (2011). “*Use of gases to improve survival of Bifidobacterium bifidum by modifying redox potential in fermented milk*”. **Journal of Dairy Science**, 94(5): 2185–2191.

**Emiliane,A.A., dos Santos Pires,A.C., de Carvalho,A.F., Pinto,M.S. & Jan,G.** (2012). Probiotics in Dairy Fermented Products. In Everlon, C.R. (Ed.), *Probiotics*, pp. 129-148.

**FAO/WHO** (1972). Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization. Report of Joint FAO/WHO Expert Committee on the Code of Principles Concerning Milk and Milk Products.

**FAO/WHO** (1977). Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization. Report of Joint FAO/WHO Expert Committee on the Code of Principles Concerning Milk and Milk Products.

**FAO/WHO** (2001). Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization. Evaluation of health and nutritional properties of powder milk and lactic acid bacteria. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report, pp. 1–4.

**FAO/WHO** (2001). Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization. Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria.

**FAO/WHO** (2002). Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization. Guidelines for the evaluation of probiotics in food.FAO/WHO Joint Working Group Report. <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>

**FAO/WHO** (2003). Codex standard for fermented milks. CODEX STAN 243.

**FAO/WHO** (2013). Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization. Proposed Draft Codex Regional Standard for Doogh. Joint FAO/WHO food standards programme. FAO/WHO coordinating committee for the Near East. Seventh Session. Beirut, Lebanon.

**Farnworth,E.R. & Mainville,I.** (2003). Kefir: A fermented milk product. In Farnworth, E.R. (ed.), *Handbook of Fermented Functional Foods*, pp77-111. CRC Press LLC, Boca Raton.

- Floros,G., Hatzikamari,M., Litopoulou-Tzanetaki,E. & Tzanetakis,N.** (2012). “*Probiotic and Technological Properties of Facultatively Heterofermentative Lactobacilli from Greek Traditional Cheeses*”. **Food Biotechnology**, 26(1): 85-105.
- Florou-Paneri,P., Christaki,E. & Bonos,E.** (2013). Biochemistry, Genetics and Molecular Biology "Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes". In Marcelino Kongo (ed.), *Lactic Acid Bacteria as Source of Functional Ingredients*, pp.569-614.
- Fávaro-Trindade,C.S., Bernadi,S., Boldini,R.B., Balieiro,J.C.C. & de Almeida,E.** (2006). “*Sensory acceptability and stability of probiotic microorganisms and vitamin C in fermented acerola (Malpighia emarginata DC.) ice-cream*”. **Journal of Food Science**, 71(6): S492–S495.
- Ferraz,J.L., Cruz,A.G., Cadena,R.S., Freitas,M.Q., Pinto,U.M., Carvalho,C.C., Faria,J.A.F. & Bolini,H.M.A.** (2012). “*Sensory Acceptance and Survival of Probiotic Bacteria in Ice Cream Produced with Different Overrun Level*”. **Journal of Food Science**, 77(1): S24–S28.
- Fric,P.** (2007). “*Probiotics and prebiotics-renaissance of a therapeutic principle*”. **Central European Journal of Medicine**, 2(3): 237-270.
- Fritzen-Freire,C.B., Muller,C.M.O., Laurindo,J.B. & Prudêncio,E.S.** (2010). “*The influence of Bifidobacterium Bb-12 and lactic acid incorporation on the properties of Minas Frescal cheese*”. **Journal of Food Engineering**, 96(4): 621–627.
- Fukushima,Y., Yamano,T., Kusano,A., Takada,M., Amano,M. & Lino,H.** (2004). “*Effect of fermented milk containing Lactobacillus johnsonii La1 (LC1) on defecation in healthy Japanese adults - a double blind placebo controlled study*”. **Bioscience Microflora**, 23(4): 139–147.
- Gardiner,G.E., Ross,R.P., Collins,J.K., Fitzgerald,G. & Stanton,C.** (1998). “*Development of a probiotic Cheddar cheese containing human-derived Lactobacillus paracasei strains*”. **Applied Environmental Microbiology**, 64(6): 2192–2199.
- Gardiner,G.E., O'Sullivan,E., Kelly,J., Auty,M.A.E., Fitzgerald,G.F., Collins,J.K., Ross,R.P. & Stanton,C.** (2000). “*Comparative survival rates of human-derived probiotic Lactobacillus paracasei and L. salivarius strains during heat treatment and spray drying*”. **Applied Environmental Microbiology**, 66(6): 2605–2612.
- Gershwin,M., Nestel,P. & Keen,C.** (2004). *Handbook of Nutrition and Immunity*, pp. 213-242. Humana Press, Totowa. NJ.
- Gill,H.S. & Guarner,F.** (2004). “*Probiotics and Human Health: a clinical perspective*”. **Postgraduate Medical Journal**, 80: 516-526.
- Giraffa,G., Chanishvili,N. & Widyastuti,Y.** (2010). “*Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology*”. **Research in Microbiology**, 161(6): 480-487.

- Gobbetti,M., Corsetti,A., Smacchi,E., Zocchetti,A. & de Angelis,M.** (1997). “*Production of Crescenza cheese by incorporation of bifidobacteria*”. **Journal of Dairy Science**, 81(1): 37–47.
- Godward,G. & Kailasapathy,K.** (2003). “*Viability and survival of free, encapsulated and co- encapsulated probiotic bacteria in ice-cream*”. **Milchwissenschaft**, 58: 396-399.
- GomesA.M.P. & Malcata,F.X.** (1998). “*Development of probiotic cheese manufactured from goat milk: response surface analysis via technological manipulation*”. **Journal of Dairy Science**, 81(6): 1492–507.
- Gomes,A.M.P. & Malcata,F.X.** (1999). “*Bifidobacterium spp. and Lactobacillus acidophilus: Biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics*”. **Trends in Food Science and Technology**, 10(4-5): 139–157.
- Gomes,A.A., Braga,S.P., Cruz,A.G., Cadena,R.S., Lollo,P.C.B., Carvalho,C., Amaya-Farfán,J., Faria,J.A.F. & Bolini,H.M.A.** (2011). “*Effect of the inoculation level of Lactobacillus acidophilus in probiotic cheese on the physicochemical features and sensory performance compared with commercial cheeses*”. **Journal of Dairy Science**, 94(10): 4777-4786.
- Granato,D., Branco,G.F., Cruz,A.G., Faria,J.A.F. & Nazarro,F.** (2010a). “*Functional foods and non-dairy probiotic food development: Trends, concepts and products*”. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 9(3): 292-302.
- Granato,D., Branco,G.F., Cruz,A.G., Faria,J.A.F. & Shah,N.** (2010b). “*Probiotic Dairy Products as Functional Foods*”. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 9(5): 455-470.
- Grattepanche,F., Miescher-Schwenninger,S., Meile,L. & Lacroix,C.** (2008). “*Recent developments in cheese cultures with protective and probiotic functionalities*”. **Dairy Science Technology**, 88: 421-444.
- Gupta,V. & Garg,R.** (2009). “*Review: Probiotics*”. **Indian Journal of Medical Microbiology**, 27(3): 202-209.
- Guyonnet,D., Chassany,O., Ducrotte,P., Picard,C., Mouret,M., Matuchansky,C. & Mercier,C.H.** (2007). “*Effect of a fermented milk containing Bifidobacterium animalis DN-173 010 on the health-related quality of life and symptoms in irritable bowel syndrome in adults in primary care: a multicentre, randomized, double blind, controlled trial*”. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, 26(3): 475–486.
- Guyonnet,D., Woodcock,A., Stefani,B., Trevisan,C. & Hall,C.** (2009). “*Fermented milk containing Bifidobacterium lactis DN-173 010 improved self-reported digestive comfort amongst a general population of adults. A randomized, open-label, controlled, pilot study*”. **Journal of Digestive Diseases**, 10(1): 61–70.

**Guinee,T.P.** (2004). “*Salting and the role of salt in cheese*”. **International Journal of Dairy Technology**, 57(2–3): 99–109.

**Hadadji,M. & Bensoltane,A.** (2006). “*Growth and lactic acid production by Bifidobacterium longum and Lactobacillus acidophilus in goat's milk*”. **African Journal of Biotechnology**, 5(6): 505-509.

**Haynes,I.N. & Playne,M.J.** (2002). “*Survival of probiotic cultures in low-fat ice-cream*”. **Australian Journal of Dairy Technology**, 57: 10-14.

**Heidebacha,T., Första,P. & Kulozika,U.** (2012). “*Microencapsulation of Probiotic Cells for Food Applications*”. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 52(4): 291-311.

**Helland,M.H., Wicklund,T. & Narvhus,J.A.** (2004). “*Growth and metabolism of selected strains of probiotic bacteria in milk- and water-based cereal puddings*”. **International Dairy Journal**, 14(11): 957-965.

**Heller,K.J.** (2001). “*Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms*”. **The American Journal of Clinical Nutrition**, 73(suppl):374S–379S.

**Hekmat,S. & McMahon,D.J.** (1992). “*Survival of Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium bifidum in ice cream for use as a probiotic food*”. **Journal Dairy Science**, 75(6): 1415–1422.

**Hekmat,S. & Reid,G.** (2006). “*Sensory properties of probiotic yogurt are comparable to standard yogurt*”. **Nutrition Research**, 26(4): 163–166.

**Heydari,S., Mortazavian,A.M., Ehsani,M.R., Mohammadifar,M.A. & Ezzatpanah,H.** (2011). “*Biochemical, microbiological and sensory characteristics of probiotic yogurt containing various prebiotic compounds*”. **Italian Journal of Food Science**, 23(2): 153–163.

**Hickson,M., D’Souza,A.L., Muthu,N., Rogers,T.R., Want,S., Rajkumar,C. & Bulpitt,C.J.** (2007). “*Use of probiotic Lactobacillus preparation to prevent diarrhoea associated with antibiotics: randomised double blind placebo controlled trial*”. **British Medical Journal**, 335: 80.

**Holzappel,W.H., Haberer,P., Geisen,R., Björkroth,J. & Schillinger,U.** (2001). “*Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition*”. **The American Journal of Clinical Nutrition**, 73(2 Suppl): 365–373.

**Holzappel,W.H. & Schillinger,U.** (2002). “*Introduction to pre and probiotics*”. **Food Research International**, 35(2-3):109–16.

**Holzappel,W.H.** (2006). Introduction to prebiotics and probiotics. In Goktepe,I., Juneja,V.K., & Ahmedna,M. (Eds.), *Probiotics in Food Safety and Human Health*, pp. 1-34. CRC Press, Taylor & Francis Group, LLC, New York.

- Homayouni,A., Ehsani,M.R., Azizi,A., Razavi,S.H. & Yarmand,M.S.** (2008a). “*Growth and survival of some probiotic strains in simulated ice cream conditions*”. **Journal of Applied Science**, 8(2): 379-382.
- Homayouni,A., Azizi,A., Ehsani,M.R., Yarmand,M.S. & Razavi,S.H.** (2008b). “*Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream*”. **Food Chemistry**, 111(1): 50-55.
- Homayouni,A., Azizi,A., Javadi,M., Mahdipour,S. & Ejtahed,H.** (2012). “*Factors Influencing Probiotic Survival in Ice Cream: A Review*”. **International Journal of Dairy Science**, 7(1): 1-10.
- Horiuchi,H., Inoue,H., Liu,E., Fukui,M., Sasaki,Y. & Saaki,T.** (2009). “*A method for manufacturing superior set yogurt under reduced oxygen concentration*”. **Journal of Dairy Science**, 92(2): 4112–4121.
- Hussain,I., Rahman,A.U. & Atkinson,N.** (2009). “*Quality Comparison of Probiotic and Natural Yogurt*”. **Pakistan Journal of Nutrition**, 8(1): 9-12.
- Ibrahim,S.A. & Carr,J.P.** (2006). “*Viability of bifidobacteria in commercial yogurt products in North Carolina during refrigerated storage*”. **International Journal of Dairy Technology**, 59(4): 272-277.
- Irkin,R. & Gulsas,M.** (2011). “*Evaluation of cacao-pudding as a probiotic food carrier and sensory acceptability properties*”. **Acta agriculturae Slovenica**, 97(3): 223-232.
- Kailasapathy,K. & Sultana,K.** (2003). “*Survival and  $\beta$ -D-galactosidase activity of encapsulated and free *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in ice cream*”. **Australian Journal of Dairy Technology**, 58(3): 223-227.
- Kailasapathy,K., Harmstorf,I. & Phillips,M.** (2008). “*Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* in stirred fruit yogurts*”. **LWT-Food Science and Technology**, 41(7): 1317–1322.
- Kalavrouzioti,I., Hatzikamari,M., Litopoulou-Tzanetaki,E. & Tzanetakis,N.** (2005). “*Production of hard cheese from caprine milk by the use of two types of probiotic cultures as adjuncts*”. **International Journal of Dairy Technology**, 58(1): 30-38.
- Karimi,R., Mortazavian,A.M. & da Cruz,A.G.** (2011). “*Viability of probiotic microorganisms in cheese during production and storage: a review*”. **Dairy Science and Technology**, 91(3): 283–308.
- Karimi,R., Mortazavian,A.M. & Karami,M.** (2012a). “*Incorporation of *Lactobacillus casei* in Iranian ultrafiltered Feta cheese made by partial replacement of NaCl with KCl*”. **Journal of Dairy Science**, 95(8): 4209-4222.

**Karimi,R., Sohrabvandi,S. & Mortazavian,A.M.** (2012b). “Review Article: Sensory Characteristics of Probiotic Cheese”. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 11(5): 437-452.

**Kasımoğlu,A., Goncuoğlu,M. & Akgun,S.** (2004). “Probiotic white cheese with *Lactobacillus acidophilus*”. **International Dairy Journal**, 14(12): 1067–1073.

**Kawasaki,S., Mimura,T., Satoh,T., Takeda,K. & Nimura,Y.** (2006). “Response of the Microaerophilic *Bifidobacterium* species, *B. boum* and *B. thermophilum*, to Oxygen”. **Applied Environmental Microbiology**, 72(10): 6854–6858.

**Kılıç,G.B., Kuleaşan,H., Eralp,I. & Karahan,A.G.** (2009). “Manufacture of Turkish Beyaz cheese added with probiotic strains”. **LWT-Food Science Technology**, 42(5): 1003–1008.

**Kneifel,W., Jaros,D. & Erhard,F.** (1993). “Microflora and acidification properties of yogurt and yogurt-related products fermented with commercially available starter cultures”. **International Journal of Food Microbiology**, 18 (3): 179–189.

**Korbekandi,H., Mortazavian,A.M. & Irvani,S.** (2011). Technology and stability of probiotic in fermented milks. In Shah,N.P., Cruz,A.G. & Faria,J.A.F. (Eds.), *Probiotic and Prebiotic Foods: Technology, Stability and Benefits to the Human Health*. Nova Science Publishers, New York.

**Kotowska,M., Albrecht,P. & Szajewska,H.** (2005). “*Saccharomyces boulardii* in the prevention of antibiotic-associated diarrhea in children: a randomized double blind placebo-controlled trial”. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, 21(5): 583–590.

**Krasaekoopt,W., Bhandari,B. & Deeth,H.** (2003). “Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt”. **International Dairy Journal**, 13(1): 3–13.

**Law,B.A.** (1997). *Microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk*. Springer, Heidelberg.

**Lee,Y.K. & Salminen,S.** (2009). *Handbook of Probiotics and Prebiotics*. John Wiley & Sons, New Jersey, Canada.

**Leporanta,K.** (2003). “The word of Fermented milks-4: Viili and Långfil – exotic fermented products from Scandinavia”. **Valio Foods & Functionals**, 2: 3-5.

**Li,Q., Chen,Q., Ruan,H., Zhu,D. & He,G.** (2010). “Isolation and characterisation of an oxygen, acid and bile resistant *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Qq 08”. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 90(8): 1340–1346.

**Lourens-Hattingh,A. & Viljoen,B.C.** (2001a). “Growth and survival of probiotic yeast in dairy products”. **Food Research International**, 34(9): 791-796.



- Lourens-Hattingh,A. & Viljoen,B.C.** (2001b). “*Yogurt as probiotic carrier food*”. **International Dairy Journal**, 11(1-2): 1–17.
- Lucas,A., Sodini,I., Monnet,C., Jolivet,P. & Corrieu,G.** (2004). “*Probiotic cell counts and acidification in fermented milks supplemented with milk protein hydrolysates*”. **International Dairy Journal**, 14(1): 47–53.
- Mack,D.R., Michail,S., Wei,S., McDougall,L. & Hollingsworth,M.A.** (1999). “*Probiotics inhibit enteropathogenic E. coli adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression*”. **American Journal of Physiology**, 276(4 Pt 1): G941-G950.
- Mc Brearty,S., Ross,R.P., Fitzgerald,G.F., Collins,J.K., Wallace,J.M. & Stanton,C.** (2001). “*Influence of two commercially available bifidobacteria cultures on Cheddar cheese quality*”. **International Dairy Journal**, 11(8): 599–610.
- McFarland,L.V.** (2007). “*Meta-analysis of probiotics for the prevention of traveler’s diarrhea*”. 1st International Conference of Travel Medicine and Infectious Disease, 5(2): 97-105.
- Maragkoudakis,P.A., Miaris,C., Rojez,P., Manalis,N., Magkanari,F., Kalantzopoulos,G. & Tsakalidou,E.** (2006). “*Production of traditional Greek yoghurt using Lactobacillus strains with probiotic potential as starter adjuncts*”. **International Dairy Journal**, 16(1): 52-60.
- Marshall,R.T., Goff,H.D. & Hartel,R.W.** (2003). *Ice cream*, pp. 366. Springer, New York.
- Martín-Diana,A.B., Janer,C., Peláez,C. & Requena,T.** (2003). “*Development of a fermented goat's milk containing probiotic bacteria*”. **International Dairy Journal**, 13(10): 827–833.
- Marteau,P., Cuillerier,E., Meance,S., Gerhardt,M.F., Myara,A., Bouvier,M., Bouley,C., Tondu,F., Bommelaer,G. & Grimaud,J.C.** (2002). “*Bifidobacterium animalis strain DN-173 010 shortens the colonic transit time in healthy women: a double-blind, randomized, controlled study*”. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, 16(3): 587–593.
- Mattila-Sandholm,T., Mättö,J. & Saarela,M.** (1999). “*Lactic acid bacteria with health claims—interference and interactions with gastrointestinal flora*”. **International Dairy Journal**, 9(1): 25–35.
- Mattila-Sandholm,T., Myllärinen,P., Crittenden,R., Mogensen,G., Fondén,R. & Saarela,M.** (2002). “*Technological challenges for future probiotics foods*”. **International Dairy Journal**, 12(2-3): 173-182.
- Maurad,K. & Meriem,K.H.** (2008). “*Probiotic characteristics of Lactobacillus plantarum strains from traditional butter made from camel milk in arid regions (Sahara) of Algeria*”. **Grasas Y Aceites**, 59(3): 218-224.

**Méndaz,E.B., Calvo,R.L. & Muñoz,M.C.** (2012). Innovative Dairy Products Development Using Probiotics: Challenges and Limitations. In Everlon,C.R. (Ed.), *Probiotics* .

**Mizota,T.** (1996). “*Functional and nutritional foods containing bifidogenic factors*”. **Bulletin- FIL-International Dairy Federation**, 313: 31-35.

**Modler,H.W. & Villa-Garcia,L.** (1993). “*The growth of Bifidobacterium longum in a whey based medium and viability of this organism in frozen yogurt with low and high levels of developed acidity*”. **Cultured Dairy Products Journal**, 28(1): 4–8.

**Mohammadi,R. & Mortazavian,A.M.** (2011). “*Review article: technological aspects of prebiotics in probiotic fermented milks*”. **Food Review International**, 27(2): 192–212.

**Mohammadi,R., Mortazavian,A.M., Khosrokhavar,R. & da Cruz,A.G.** (2011). “*Probiotic ice cream: viability of probiotic bacteria and sensory properties*”. **Annals of Microbiology**, 61(3): 411-424.

**Mohammadi,R., Sohrabvandi,S. & Mortazavian,A.M.** (2012). “*The starter culture characteristics of probiotic microorganisms in fermented milks*”. **Engineering in Life Sciences, Special Issue: Biotechnology of fermented food systems**, 12(4): 399-409.

**Morelli,L.** (2007). “*In vitro assessment of probiotic bacteria: From survival to functionality*”. **International Dairy Journal**, 17(11): 1278–1283.

**Mortazavian,A.M., Razavi,S.H., Ehsani,M.R. & Sohrabvandi,S.** (2007). “*Review Article: Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms*”. **Iranian Journal of biotechnology**, 5(1):1-18.

**Mortazavian,A.M., KHosrokhvar, R., Rastegar,H. & Mortazaei,G. R.** (2010). “*Effects of dry matter standardization order on biochemical and microbiological characteristics of freshly made probiotic Doogh (Iranian fermented milk drink)*”. **Italian Journal of Food Science**, 22(1): 98–102.

**Mortazavian,A.M., Ghorbanipour,S., Mohammadifar,M.A. & Mohammadi,M.** (2011). “*Biochemical properties and viable probiotic population of yogurt at different bacterial inoculation rates and incubation temperatures*”. **Philippine Agricultural Scientist**, 94(2): 155–160.

**Nousia,F.G., Androulakis,P.I. & Fletouris,D.J.** (2011). “*Survival of Lactobacillus acidophilus LMGP-21381 in probiotic ice cream and its influence on sensory acceptability*”. **International Journal of Dairy Technology**, 64(1): 130-136.

**Oberg,C.J., Moyes,L.V., Domek,M.J., Brothersen,C. & McMahon,D.J.** (2011). “*Survival of probiotic adjunct cultures in cheese and challenges in their enumeration using selective media*”. **Journal of Dairy Science**, 94(5): 2220-2230

- Odamaki,T., Xiao,J.Z., Yonezawa,S., Yaeshima, T. & Iwatsuki,K.** (2011). “Improved viability of bifidobacteria in fermented milk by cocultivation with *Lactococcus lactis subspecies lactis*”. **Journal of Dairy Science**, 94(3): 1112–1121.
- Oliveira,M.N., Sodini,I., Remeuf,F. & Corrieu,G.** (2001). “Effect of milk supplementation and culture composition on acidification, textural properties and microbiological stability of fermented milks containing probiotic bacteria”. **International Dairy Journal**, 11(11): 935–942.
- Oliveira,R.P.S., Florence,A.C.R., Silva,R.C., Perego,P., Converti,A., Gioielli,L.A. & Oliveira,M.N.** (2009). “Effect of different prebiotics on the fermentation kinetics, probiotic survival and fatty acids profiles in nonfat symbiotic fermented milk”. **International Journal of Food Microbiology**, 128(3): 467–472.
- Ong,L., Henriksson,A. & Shah,N.P.** (2006). “Development of probiotic Cheddar cheese containing *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* and *Bifidobacterium spp.* and the influence of these bacteria on proteolytic patterns and production of organic acid”. **International Dairy Journal**, 16(5):446-456.
- Ong,L. & Shah,N.P.** (2009). “Probiotic Cheddar cheese: Influence of ripening temperatures on survival of probiotic microorganisms, cheese composition and organic acid profiles”. **LWT - Food Science and Technology**, 42(7): 1260-1268.
- Ortakci,F., Broadbent,J.R., McManus,W.R. & McMahan,D.J.** (2012). “Survival of microencapsulated probiotic *Lactobacillus paracasei LBC-1e* during manufacture of *Mozzarella* cheese and simulated gastric digestion”. **Journal of Dairy Science**, 95(11): 6274–6281.
- Ortolani,M.B.T., Moraes,P.M., Viçosa,G.N., Perin,L.M., Lima,K.G.C., Silva-Junior,A. & Nero,L.A.** (2010). “Molecular identification of naturally occurring bacteriocinogenic and bacteriocinogenic-like lactic acid bacteria in raw milk and soft cheese”. **Journal of Dairy Science**, 93(7): 2880–2886.
- Ostlie,M.H., Helland, M.H. & Narvhus,J.A.** (2003). “Growth and metabolism of selected strains of probiotic bacteria in milk”. **International Journal of Food Microbiology**, 87(1-2): 17–27.
- Özer,B., Uzun,Y.S. & Kirmaci,H.A.** (2008). “Effect of microencapsulation on viability of *Lactobacillus acidophilus LA-5* and *Bifidobacterium bifidum BB-12* during *Kasar* cheese ripening”. **International Journal of Dairy Technology**, 61(3): 237–244.
- Özer,B., Kirmaci, H.A., Senel,E., Atamer,M. & Hayaloğlu,A.** (2009). “Improving the viability of *Bifidobacterium bifidum BB-12* and *Lactobacillus acidophilus LA-5* in white-brined cheese by microencapsulation”. **International Dairy Journal**, 19(1): 22–29.
- Parvez,S., Malik,K.A., Ah Kang,S. & Kim,H.Y.** (2006). “Probiotics and their fermented food products are beneficial for health”. **Journal of Applied Microbiology**, 100(6): 1171–1185.

**Perotti,M.G., Mercanti,D.J., Bernal,S.M. & Zalazar,C.A.** (2009). “*Characterization of the free fatty acids profile of Pategrás cheese during ripening*”. **International Journal of Dairy Technology**, 62(3): 331–338.

**Phillips,M., Kailasapathy,K. & Tran,L.** (2006). “*Viability of commercial probiotic cultures (L. acidophilus, Bifidobacterium spp., L. casei, L. paracasei and L. rhamnosus) in Cheddar cheese*”. **International Journal of Food Microbiology**, 108(2): 276–280.

**Playne,M.J., Bennet,L.E. & Smithers,G.W.** (2003). “*Functional dairy foods and ingredients*”. **Australian Journal of Dairy Technology**, 58(3): 242-264.

**Plessas,S., Bosnea,L., Alexopoulos,A. & Bezirtzoglou,E.** (2012). “*Potential effects of probiotics in cheese and yogurt production: A review*”. **Engineering in Life Sciences, Special Issue: Biotechnology of fermented food systems**, 12(4): 433-440.

**Psomas,E., Andrighetto,C., Litopoulou-Tzanetaki,E., Lombardi,A. & Tzanetakis,N.** (2001). “*Some probiotic properties of yeast isolates from infant faeces and Feta cheese*”. **International Journal of Food Microbiology**, 69(1-2): 125-133.

**Ranadheera,R.D.C.S., Baines,S.K. & Adams,M.C.** (2010). “*Importance of food in probiotic efficacy*”. **Food Research International**, 43(1): 1-7.

**Ratray,F.P. & O’Connell,M.J.** (2011). *Fermented Milks: Kefir*, pp.518-524. Elsevier Ltd.

**Rao,H.G.R. & Prakash,A.S.** (2004). “*Development of probiotic kulfi (Indian ice-cream)*”. **Indian Dairyman**, 56(6): 57-64.

**Ravula,R.R. & Shah,N.P.** (1998a). “*Effect of acid casein hydrolysate and cysteine on the viability of yogurt and probiotic bacteria in fermented frozen dairy desserts*”. **Australian Journal of Dairy Technology**, 53(3): 174–179.

**Ravula,R.R. & Shah,N.P.** (1998b). “*Viability of probiotic bacteria in fermented frozen dairy desserts*”. **Food Australia**, 50(3): 136-139.

**Reid,G., Jass,J., Sebulsky,M.T. & McCormick,J.K.** (2003). “*Potential Uses of Probiotics in Clinical Practice*”. **Clinical Microbiology Reviews**, 16(4): 658–672.

**Ribeiro,A.C. & Ribeiro,S.D.A.** (2010). “*Specialty products made from goat milk*”. **Small Ruminant Research**, 89(2–3): 225–233.

**Rivera-Espinoza,Y. & Gallardo-Navarro,Y.** (2010). “*Non-dairy probiotic products*”. **Food Microbiology**, 27(1): 1–11.

**Rodrigues,D., Rocha-Santos,T., Sousa,S., Gomes,A.M., Pintado,M.M., Malcata,F.X., Sousa Lobo,J.M. & Freitas,A.C.** (2011). “*On the viability of five probiotic strains when immobilised on various polymers*”. **International Journal of Dairy Technology**, 64(1): 137–144.

- Rodrigues,D., Rocha-Santos,T.A.P., Gomes,A.M., Goodfellow,B.J. & Freitas,A.C.** (2012). “*Lipolysis in probiotic and synbiotic cheese: The influence of probiotic bacteria, prebiotic compounds and ripening time on free fatty acid profiles*”. **Food Chemistry**, 131(4): 1414-1421.
- Ross,R.P., Fitzgerald,G., Collins,K. & Stanton,C.** (2002). “*Cheese delivering biocultures: probiotic cheese*”. **Australian Journal of Dairy Technology**, 57(2): 71–78.
- Ross,R.P., Desmond,C., Fitzgerald,G.F. & Stanton,C.** (2005). “*Overcoming the technological hurdles in the development of probiotic foods*”. **Journal of Applied Microbiology**, 98(6): 1410-1417.
- Prado,F.C., Parada,J.L., Pandey,A. & Soccol,C.R.** (2008). “*Trends in non-dairy probiotic beverages*”. **Food Research International**, 41(2): 111–123.
- Ryhänen,E.L., Pihlanto-Leppälä,A. & Pahkala,E.** (2001). “*A new type of ripened, low-fat cheese with bioactive properties*”. **International Dairy Journal**, 11(4-7):441-447.
- Saad,S.M.I., Corrêa,S.B.M. & Castro,I.A.** (2008). “*Probiotic potential and sensory properties of coconut flan supplemented with Lactobacillus paracasei and Bifidobacterium lactis*”. **International Journal of Food Science Technology**, 43(9): 1560–1568.
- Saarela,M., Mogensen,G., Fondén,R., Mättö,J. & Mattila-Sandholm,T.** (2000). “*Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties*”. **Journal of Biotechnology**, 84(3): 197–215.
- Saarela,M.H., Virkajärvi,I., Alakomi,H.L., Sigvart-Mattila,P. & Mättö,J.** (2006). “*Stability and functionality of freeze-dried probiotic Bifidobacterium cells during storage in juice and milk*”. **International Dairy Journal**, 16(12): 1477–1482.
- Saarela,M.H.** (2007). “*Probiotic technology maintaining viability and stability*”. **Agro Food Industry Hi-Tech**, 18: 19–21.
- Saint-Eve,A., Levy,C., Martin,N. & Souchon,I.** (2006). “*Influence of proteins on the perception of flavored stirred yogurts*”. **Journal of Dairy Science**, 89(3): 922–933.
- Salen,M.M.F., Fathi,F.A. & Awad,R.A.** (2005). “*Production of probiotic ice-cream*”. **Polish Journal of Food Science and Nutrition**, 14/55(3): 267–271.
- Salminen,S. & Ouwehand,A.C.** (2002). “*Probiotics, Applications in dairy products*”. **Encyclopedia of Dairy Sciences**, 2315-2322.
- Sánchez,B., de Los Reyes-Gavilán,C.G., Margolles,A. & Gueimonde,M.** (2009). “*Probiotic fermented milks: Present and future*”. **Society of Dairy Technology**, 62(4): 472-483.

**Sarkar,S.** (2008). “*Effect of probiotics on biotechnological characteristics of yoghurt: A review*”. **British Food Journal**, 110(7): 717–740.

**Saxelin,M., Grenov,B., Svensson,U., Fondén,R., Reniero,R. & Mattila-Sandholm,T.** (1999). “*The technology of probiotics*”. **Trends in Food Science and Technology**, 10(12): 387-392.

**Saxelin,M., Lassig,A., Karjalainen,H., Tynkkyen,S., Surakka,A., Vapaatalo,H., Jarvenpaa,S., Korpela,R., Mutanen,M. & Hatakka,K.** (2010). “*Persistence of probiotic strains in the gastrointestinal tract when administered as capsules, yogurts or cheese*”. **International Journal of Food Microbiology**, 144(2): 293–300.

**Sazawal,S., Hiremath,G., Dhinga,U., Malik,P., Deb,S. & Black,R.E.** (2006). “*Efficacy of probiotics in prevention of acute diarrhea: A meta-analysis of masked, randomised, placebo-controlled trials*”. **The Lancet Infectious Diseases**, 6(6): 374–382.

**Senok,A.C., Ismael,A.Y. & Botta,G.A.** (2005). “*Probiotics: facts and myths*”. **Clinical Microbiology and Infection**, 11(12): 958–966.

**Settanni,L. & Moschetti,G.** (2010). “*Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits*”. **Food Microbiology**, 27(6): 691–697.

**Shafiee,G., Mortazavian,A.M., Mohammadifar,M.A., Koushki,M.R., Mohammadi,A. & Mohammadi,R.** (2010). “*Combined effects of dry matter content, incubation temperature and final pH of fermentation on biochemical and microbiological characteristics of probiotic fermented milk*”. **African Journal of Microbiology Research**, 4(12): 1265–1274.

**Shah,N.P., Lankaputhra,W.E.V., Britz,M.L. & Kyle,W.S.A.** (1995). “*Survival of L. acidophilus and Bifidobacterium bifidum in commercial yogurt during refrigerated storage*”. **International Dairy Journal**, 5(5): 515-521.

**Shah,N.P.** (2000). “*Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods*”. **Journal of Dairy Science**, 83(4): 894–907.

**Shah,N.P. & Ravula,R.R.** (2000a). “*Influence of water activity on fermentation, organic acids production and viability of yogurt and probiotic bacteria*”. **Australian Journal of Dairy Technology**, 55(3): 127–131.

**Shah,N.P. & Ravula,R.R.** (2000b). “*Microencapsulation of probiotic bacteria and their survival in frozen fermented dairy desserts*”. **Australian Journal of Dairy Technology**, 55(3): 139-144.

**Shah,N.P.** (2006). Probiotics and fermented milks. In Chandan,R.C. (Ed.), *Manufacturing Yogurt and Fermented Milks*, pp.341-355. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK.

**Shah,N.P.** (2007). “*Functional cultures and health benefits*”. **International Dairy**

**Journal**, 17(11): 1262–1277.

**Sharp, M.D., McMahon, D.J. & Broadbent, J.R.** (2008). “Comparative evaluation of yogurt and low-fat Cheddar cheese as delivery media for probiotic *Lactobacillus casei*”. **Journal of Food Science**, 73(7): M375–M377.

**Shihata, A. & Shah, N.P.** (2002). “Influence of addition of proteolytic strains of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* to commercial ABT starter cultures on texture of yoghurt, exopolysaccharide production and survival of bacteria”. **International Dairy Journal**, 12(9): 765–772.

**Short, C. & O’ Brien, J.** (2004) *Handbook of Functional Dairy Products*, pp.27. Functional Foods and Nutraceuticals. CRC Press, USA.

**Singh, K., Kallali, B., Kumar, A. & Thaker, V.** (2011). “Probiotic: A review”. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, 1: S287-S290.

**Sodini, I., Lucas, A., Tissier, J.P. & Corriey, G.** (2005). “Physical properties and microstructure of yoghurts supplemented with milk protein hydrolysates”. **International Dairy Journal**, 15(1): 29–35.

**Sofjan, R.P. & Hartel, R.W.** (2004). “Effects of overrun on structural and physical characteristics of ice-cream”. **International Dairy Journal**, 14(3): 255–262.

**Sonomoto, K. & Atsushi, Y.** (2011). *Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria, current progress in advanced research*, pp.159-164. Caister Academic Press.

**Souza, C.H.B., Buriti, F.C.A., Behrens, J.H. & Saad, S.M.I.** (2008). “Sensory evaluation of probiotic Minas fresh cheese with *Lactobacillus acidophilus* added solely or in co-culture with a thermophilic starter culture”. **International Journal of Food Science Technology**, 43(5): 871–877.

**Sultana, K., Godward, G., Reynolds, N., Arumugaswamy, R., Peiris, P. & Kailasapathy, K.** (2000). “Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt”. **International Journal of Food Microbiology**, 62(1-2): 47–55.

**Sumeri, I., Adamberg, S., Uusna, R., Sarand, I. and Paalme, T.** (2012). “Survival of cheese bacteria in a gastrointestinal tract simulator”. **International Dairy Journal**, 25(1): 36-41.

**Talwalkar, A.I. & Kailasapathy, K.A.** (2003). “Effect of microencapsulation on oxygen toxicity in probiotic bacteria”. **Australian Journal of Dairy Technology**, 58(1): 36-39.

**Talwalkar, A.I. & Kailasapathy, K.A.** (2004). “The role of oxygen in the viability of probiotic bacteria with reference to *L. acidophilus* and *Bifidobacterium spp*”. **Current Issues in Intestinal Microbiology**, 5: 1–8.

**Talwalkar,A., Miller,C.W., Kailasapathy,K. & Nguyen,M.H.** (2004). “*Effect of packaging materials and dissolved oxygen on the survival of probiotic bacteria in yoghurt*”. **International Journal of Food Science Technology**, 39(6): 605–611.

**Tamime,A.Y.** (2005). *Probiotic Dairy Products*, pp.39-56. Society of Dairy Technology, Blackwell Publishing Ltd, Oxford, U.K.

**Tamime,A.Y.** (2007). *Structure of Dairy Products*, pp.157. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, U.K.

**Temmerman,R., Pot,B., Huys,G. & Swings,J.** (2003). “*Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products*”. **International Journal of Food Microbiology**, 81(1): 1–10.

**Tuohy,K.M., Probert,H.M., Smejkal,C.W. & Gibson,G.R.** (2003). “*Using probiotics and prebiotics to improve gut health*”. **Drug Discovery Today**, 8(15): 692–700.

**Tuorilla,H. & Monteleone,E.** (2009). “*Sensory science in the changing society: opportunities, needs and challenges*”. **Trends in Food Science & Technology**, 20(2): 54–62.

**Turgut,T. & Cakmakci,S.** (2009). “*Investigation of the possible use of probiotics in ice cream manufacture*”. **International Journal of Dairy Technology**, 62(3): 444–451.

**Twetman,S., Derawi,B., Keller,M., Ekstrand,K., Yucel-Lindberg,T. & Stecksens-Blicks,C.** (2009). “*Short-term effect of chewing gums containing probiotic Lactococcus reuteri on the level of inflammatory mediators in gingival crevicular fluid*”. **Acta Odontologica Scandinavica**, 67: 19-24.

**Vasiljevic,T. & Shah,N.P.** (2008). “*Probiotics—From Metchnikoff to bioactives*”. **International Dairy Journal**, 18(7): 714–728.

**Vinderola,C.G., Gueimonde,M., Delgado,T., Reinheimer,J.A. & Reyes-Gavilán,C.G.** (2000a). “*Characteristics of carbonated fermented milk and survival of probiotic bacteria*”. **International Dairy Journal**, 10(3): 213–320.

**Vinderola,C.G., Bailo,N. & Reinheimer,J.A.** (2000b). “*Survival of probiotic microflora in Argentinian yoghurts during refrigerated storage*”. **Food Research International**, 33(2): 97–102.

**Vinderola,C.G., Prosello,W., Ghiberto,D. & Reinheimer,J.A.** (2000c). “*Viability of probiotic (Bifidobacterium, Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus casei) and nonprobiotic microflora in Argentinean fresco cheese*”. **Journal of Dairy Science**, 83: 1905–1911.

**Vinderola,C.G., Mocchiutti,P. & Reinheimer,J.A.** (2002a). “*Interactions among lactic acid starter and probiotic bacteria used for fermented dairy products*”. **Journal of Dairy Science**, 85: 721–729.



**Vinderola,G.C., Costa,G.A., Regenhardt,S. & Reinheimer,J.A.** (2002b). “*Influence of compounds associated with fermented dairy products on the growth of lactic acid starter and probiotic bacteria*”. **International Dairy Journal**, 12(7): 579–589.

**Vinderola,G., Prosello,W., Molinari,F., Ghilberto,D. & Reinheimer,J.** (2009). “*Growth of Lactobacillus paracasei A13 in Argentinian probiotic cheese and its impact on the characteristics of the product*”. **International Journal of Food Microbiology**, 135(2): 171–174.

**Vosough,A.S., Khomeyri,M., Kashaninezhad,M. & Seyed,M.J.** (2009). “*Effects of mint extract on the viability of probiotic bacteria in a native Iranian dairy drink (doogh)*”. **Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources**, 16(1): 156-164.

**de Vrese,M. & Schrezenmeir,J.** (2008). “*Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics*”. **Advances Biochemical Engineering/Biotechnology**, 111: 1-66.

**de Vuyst,L.** (2000). “*Technology aspects related to the application of functional starter cultures*”. **Food Technology and Biotechnology**, 38(2): 105–112.

**Wagar,L.E., Champagne,C.P., Buckley,N.D., Raymond,Y. & Green-Johnson,J.M.** (2009). “*Immunomodulatory properties of fermented soy and dairy milks prepared with lactic acid bacteria*”. **Journal of Food Science**, 74(8): 423–430.

**Wu,R., Wang,L., Wang,J., Li,H., Menghe,B., Wu,J., Guo,M. & Zhang,H.** (2009). “*Isolation and preliminary probiotic selection of lactobacilli from koumiss in Inner Mongolia*”. **Journal of Basic Microbiology**, 49(3): 318-326.

**Ya,T., Zhang,Q., Chu,F., Merritt,J., Bilige,M., Sun,T., Du,R. & Zhang,H.** (2008). “*Immunological evaluation of Lactobacillus casei Zhang: a newly isolated strain from koumiss in Inner Mongolia, China*”. **BMC Immunology**, 9:68.

**Yonezawa,S., Xiao,J.Z., Odamaki,T., Ishida,T., Miyaji,K., Yamada,A., Yaeshima,T. & Iwatsuki,K.** (2010). “*Improved growth of bifidobacteria by cocultivation with Lactococcus lactis subspecies lactis*”. **Journal of Dairy Science**, 93(5): 1815–1823.

**Zhang,W., Yu,D., Sun,Z., Wu,R., Chen,X., Chen,W., Meng,H., Hu,S. & Zhang,H.** (2010). “*Complete Genome Sequence of Lactobacillus casei Zhang, a New Probiotic Strain Isolated from Traditional Homemade Koumiss in Inner Mongolia, China*”. **Journal of Bacteriology**, 192(19): 5268-5269.

**Zomorodi,S., Khosrowshahi,A., Rohani,S.M.R. & Miraghaei,S.** (2011). “*Survival of Lactobacillus casei, Lactobacillus plantarum and Bifidobacterium bifidum in free and microencapsulated forms on Iranian white cheese produced by ultrafiltration*”. **International Journal of Dairy Technology**, 64(1): 84–91.

**Zubaith,E. & Mufidah,V.N.** (2011). *Probiotic Ability test from Lactic acid Bacteria isolates of infant formula milk powder and effect of rehydration temperature on probiotic ability*. The 3rd International Conference of Indonesian Society for Lactic Acid

Bacteria (3rd IC-ISLAB): Better Life with Lactic Acid Bacteria: Exploring Novel Functions of Novel Acid Bacteria.

**Μάντης,Α.Ι.** (2000) *Υγιεινή και τεχνολογία του γάλακτος και των προϊόντων του*, σελ.231-262. 3<sup>η</sup> έκδοση. Αδελφών Κυριακίδη, Θεσσαλονίκη.

#### Δικτυακές πηγές

**http1:** <http://www.mevgal.gr>. Προσπέλαση την 21 Νοεμβρίου 2012.

**http2:** <http://www.vivartia.gr>. Προσπέλαση την 21 Νοεμβρίου 2012.

**http3:** [http://eligastgr/index.php?option=com\\_content&view=article&id=1350:2012-08-03-08-23-26&catid=16:2011-12-01-20-42-57&Itemid=36](http://eligastgr/index.php?option=com_content&view=article&id=1350:2012-08-03-08-23-26&catid=16:2011-12-01-20-42-57&Itemid=36). Προσπέλαση την 21 Νοεμβρίου 2012.

**http4:** <http://ayran.com/>. Προσπέλαση την 15 Μαρτίου 2013.

**http5:**<http://www.milkingredients.ca/index-eng.php?id=180>. Προσπέλαση την 17 Μαρτίου 2013.

**http6:** <http://www.biogaia.com/>. Προσπέλαση την 23 Μαΐου 2013.

**http7:** <http://lifetop.eu/products/lifetop-straw>. Προσπέλαση την 23 Μαΐου 2013.

**http8:** <http://viiliculture.wordpress.com/history/>. Προσπέλαση την 17 Μαρτίου 2013.

**http9:**<http://www.arla.se/vara-produkter/vara-produkter/alla/arla-ko/arla-ko-filmjolk/>. Προσπέλαση την 16 Μαρτίου 2013.

**http10:** <http://www.arla.se/vara-produkter/produkt/?productId=7310865071552>  
Προσπέλαση την 16 Μαρτίου 2013.

**http11:** <http://verum.se/produkter>. Προσπέλαση την 17 Μαρτίου 2013.

**http12:** [http://www.skyr.com/about\\_skyr.html](http://www.skyr.com/about_skyr.html). Προσπέλαση την 15 Μαρτίου 2013.

**http13:** <http://www.preparedfoods.com/articles/probiotic-butter-developed>.  
Προσπέλαση την 25 Μαΐου 2013.

**http14:**[http://ovcre.uplb.edu.ph/index.php?option=com\\_joobd&view=article&joobase=2&id=412:probiotic-low-fat-butter&Itemid=154](http://ovcre.uplb.edu.ph/index.php?option=com_joobd&view=article&joobase=2&id=412:probiotic-low-fat-butter&Itemid=154). Προσπέλαση την 23 Μαΐου 2013.

**http15:** [http://www.nestle-baby.ca/en/products/formula/starter/goodstart\\_probiotic.htm](http://www.nestle-baby.ca/en/products/formula/starter/goodstart_probiotic.htm).  
Προσπέλαση την 25 Μαΐου 2013.

**http16:** <http://www.gap-probiotics.org/about-probiotics/regulatory-situation/>. Προσπέ-  
λαση την 2 Φεβρουαρίου 2014