



Πανεπιστήμιο
Ιωαννίνων

ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΤΩΝ ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΚΩΝ ΚΑΙ
ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ**

Δωροθέα Καγκαρά

Παναγιώτης Αλέστας

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Αθηνά Τζώρα

Άρτα, Απρίλιος, 2021



Πανεπιστήμιο
Ιωαννίνων

ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΤΩΝ ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΚΩΝ ΚΑΙ
ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ**

Δωροθέα Καγκαρά

Παναγιώτης Αλέστας

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Αθηνά Τζώρα

Άρτα, Απρίλιος, 2021

**MICROORGANISMS IN DAIRY PRODUCTS AND THEIR IMPACT
ON HUMAN HEALTH**

Εγκρίθηκε από τριμελή εξεταστική επιτροπή

Άρτα, Απρίλιος, 2021

ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ

1. Επιβλέπουσα καθηγήτρια

Αθηνά Τζώρα

Καθηγήτρια

2. Μέλος επιτροπής

Ιωάννης Σκούφος

Καθηγητής

3. Μέλος επιτροπής

Κωνσταντίνα Φώτου

ΕΔΠΠ

© Καγκαρά, Δωροθέα, Αλέστας, Παναγιώτης, 2021.

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Δήλωση μη λογοκλοπής

Δηλώνουμε υπεύθυνα και γνωρίζοντας τις κυρώσεις του Ν. 2121/1993 περί Πνευματικής Ιδιοκτησίας, ότι η παρούσα πτυχιακή εργασία είναι εξ ολοκλήρου αποτέλεσμα δικής μας ερευνητικής εργασίας, δεν αποτελεί προϊόν αντιγραφής ούτε προέρχεται από ανάθεση σε τρίτους. Όλες οι πηγές που χρησιμοποιήθηκαν (κάθε είδους, μορφής και προέλευσης) για τη συγγραφή της περιλαμβάνονται στη βιβλιογραφία.

Καγκαρά, Δωροθέα,

Αλέστας, Παναγιώτης

Υπογραφές

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε ιδιαίτερωσ την καθηγήτριά μας Αθηνά Τζώρα, η οποία μας καθοδήγησε και μας παρείχε χρήσιμες συμβουλές καθ' όλη τη διάρκεια της συγγραφής της πτυχιακής εργασίας μας, καθώς και για την πολύτιμη συμβολή της στην επιλογή του θέματος και την αναζήτηση της βιβλιογραφίας.

Επίσης, θέλουμε να εκφράσουμε την ευγνωμοσύνη μας στις οικογένειές μας, που ακατάπαυστα μας στηρίζουν και μας συμπαραστέκονται στην εκπλήρωση των στόχων μας, που κάθε φορά επιδιώκουμε.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα εργασία σχετίζεται με τα γαλακτοκομικά προϊόντα και την επίδραση των μικροοργανισμών που εμπεριέχονται για την ανθρώπινη υγεία. Τα ζυμούμενα γαλακτοκομικά προϊόντα είναι γνωστά από παλιότερα και καταναλώνονται ευρέως, λόγω των ιδιαίτερων οργανοληπτικών ιδιοτήτων τους και των θρεπτικών συστατικών που περιέχουν. Τα τελευταία χρόνια, μελέτες έχουν καταλήξει στο συμπέρασμα ότι η κατανάλωση αυτών των προϊόντων επηρεάζει θετικά την ανθρώπινη υγεία και κυρίως το εντερικό μικροβίωμα. Στη συγκεκριμένη εργασία, αρχικά αναλύεται το ανθρώπινο μικροβίωμα και δίνεται ιδιαίτερη έμφαση στην εντερική μικροχλωρίδα και στους λακτοβάκιλλους, οι οποίοι είναι οι κυρίαρχοι μικροοργανισμοί στο γαστρεντερικό σύστημα του ανθρώπου. Αναφορικά με τη χρήση προβιοτικών βακτηρίων στην παρασκευή γαλακτοκομικών προϊόντων, επισημαίνονται τα χαρακτηριστικά και η ευεργετική δράση τους, καθώς και οι τρόποι αύξησης της βιωσιμότητάς τους. Μια σύντομη παρουσίαση γίνεται όσον αφορά τα πιο γνωστά είδη ζυμούμενων γαλακτοκομικών προϊόντων, τα οφέλη στην υγεία από την κατανάλωσή τους, ενώ πιο εκτενώς παρουσιάζονται οι μικροοργανισμοί που υπάρχουν σε αυτά και η επίδραση που έχουν στην υγεία τα μόρια που παράγονται κατά τη ζύμωση. Μεγάλο ενδιαφέρον παρατηρείται για την παρασκευή προβιοτικών τυριών και τα οφέλη που μπορεί να προσδώσουν στον καταναλωτή. Ειδικότερα, στην εργασία γίνεται λόγος για την προσθήκη προβιοτικών στελεχών στα τυροκομικά, τα ενδεχόμενα μειονεκτήματά τους, τους παράγοντες που επηρεάζουν τη βιωσιμότητα αυτών στο τυρί, αλλά και τις τεχνικές για αύξηση της βιωσιμότητάς τους. Τέλος, διασαφηνίζεται τι ισχύει με βάση τη νομοθεσία για τη χρήση προβιοτικών στα τρόφιμα, αλλά και την ασφάλεια των προβιοτικών για ανθρώπινη χρήση.

Λέξεις – Κλειδιά: Εντερικό Μικροβίωμα, Προβιοτικά, Βακτήρια Γαλακτικού Οξέος, Ζυμομύκητες, Ζυμούμενα Γαλακτοκομικά Προϊόντα, Βιωσιμότητα Βακτηρίων, Υγεία, Γαλακτική Ζύμωση, Τυρί

ABSTRACT

This paper is a literature review on the microorganisms of dairy products as well as their effects on human health. Fermented dairy products are known from the past and continue to be widely consumed due to their special organoleptic properties and their included nutritional ingredients. In recent years studies have shown that the consumption of these products positively affects human health and in particular improve the intestinal microbiome. In this text initially is analyzed the human microbiome with special emphasis on the gut microbiome and lactobacilli which are the prevailing microorganisms in the human gastrointestinal tract. Additionally, have been highlighted the probiotic bacteria in dairy products and their characteristics and beneficial effects, as well as the ways to increase their viability. A brief presentation is made on the most well-known types of fermented dairy products, the benefits on health, while more extensively have been presented the existed microorganisms within them and the effect that the delivered molecules during fermentation could be confer to our health. A great interest is observed in the production of probiotic cheeses and the benefits that they may offer. There is a particular reference to the adding of probiotic strains to cheese, the possible disadvantages they have and the factors that affect the viability (of probiotics) in cheese as well as the techniques that increase their viability. Finally, a small report was made on the legislation governing the safety of probiotics and how they can be used in food for human benefit.

Keywords: Gut microbiome, Probiotics, Lactic Acid Bacteria, Yeasts, Fermented Dairy Products, Bacterial Viability, Health, Lactic Fermentation, Cheese

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	vii
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	viii
ABSTRACT	ix
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ.....	x
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1. ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΜΙΚΡΟΒΙΩΜΑ.....	3
1.1 Γενικά για το ανθρώπινο μικροβίωμα	3
1.2 Εντερικό μικροβίωμα.....	5
1.2.1 Ορισμοί.....	5
1.2.2 Σύσταση εντερικού μικροβιώματος.....	5
1.2.3 Λειτουργίες του εντερικού μικροβιώματος.....	7
1.2.4 Αλληλεπίδραση ξενιστή και εντερικού μικροβιώματος.....	8
1.2.5 Μεταβολή του εντερικού μικροβιώματος στα διάφορα στάδια ζωής του ατόμου	10
1.2.6 Εντερικό μικροβίωμα και ασθένειες.....	12
1.3 Οι λακτοβάκιλλοι ως κυρίαρχο LAB στο εντερικό μικροβίωμα του ανθρώπου	15
1.3.1 Γενικά για τους λακτοβάκιλλους	15
1.3.2 Αποικισμός σε ζώα και ανθρώπους.....	16
1.3.3 Λειτουργίες των λακτοβάκιλλων στο γαστρεντερικό σωλήνα του ανθρώπου	18
2. ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΑ ΣΤΑ ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ	21
2.1 Ορισμός και είδη λειτουργικών τροφίμων.....	21
2.2 Προβιοτικά.....	23
2.2.1 Γενικά	23
2.2.2 Χαρακτηριστικά των προβιοτικών	24
2.2.3 Ευεργετική δράση των προβιοτικών	25
2.2.4 Αλληλεπίδραση προβιοτικών και ανοσοποιητικού συστήματος.....	27
2.2.5 Προβιοτικά και γαστρεντερικές διαταραχές.....	27
2.2.6 Αύξηση της βιωσιμότητας και λειτουργικότητας των προβιοτικών στα ζυμούμενα γαλακτοκομικά προϊόντα και το γαστρεντερικό σωλήνα	30
3. ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΣ ΚΟΣΜΟΣ ΣΤΑ ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΚΑΙ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΥΓΕΙΑ	32

3.1 Γαλακτική ζύμωση.....	32
3.2 Ορισμός και ρόλος των οξυγαλακτικών βακτηρίων (LAB)	33
3.3 Γένη και είδη μικροοργανισμών και η χρήση τους στα γαλακτοκομικά προϊόντα	34
3.4 Είδη ζυμούμενων γαλακτοκομικών προϊόντων	37
3.5 Οφέλη από τη κατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων	41
3.6 Μηχανισμοί με τους οποίους τα γαλακτοκομικά προϊόντα επηρεάζουν το εντερικό μικροβίωμα	42
3.7 Παραγωγή μορίων κατά τη ζύμωση των γαλακτοκομικών προϊόντων και ανθρώπινη υγεία.....	43
4. ΤΟ ΤΥΡΙ ΩΣ ΦΟΡΕΑΣ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ	49
4.1 Γενικά για το τυρί.....	49
4.2 Προβιοτικά και τυρί.....	57
4.3 Χρήση προβιοτικών στελεχών στο τυρί.....	58
4.4 Μειονεκτήματα χρήσης προβιοτικών στελεχών στο τυρί.....	61
4.5 Παράγοντες που επηρεάζουν τη βιωσιμότητα των προβιοτικών στο τυρί.....	62
4.6 Τεχνικές αύξησης της βιωσιμότητας των προβιοτικών στο τυρί.....	63
4.6.1 Παστερίωση γάλακτος.....	63
4.6.2 Διαδικασία ζύμωσης δύο σταδίων	64
4.6.3 Εμβολιασμός γάλακτος με προβιοτικά	64
4.6.4 Δημιουργία και κατεργασία τυροπήγματος.....	66
4.6.5 Αλάτισμα	67
4.6.6 Ωρίμανση και αποθήκευση.....	68
4.6.7 Συσκευασία.....	70
4.7 Διατροφικά στοιχεία	70
4.8 Οφέλη για την υγεία.....	71
5. ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΣΦΑΛΗ ΧΡΗΣΗ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ.....	73
5.1 Ασφάλεια των προβιοτικών για ανθρώπινη χρήση	73
5.2 Νομοθεσία για τη χρήση προβιοτικών στα τρόφιμα	75
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	78

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα ζυμούμενα γαλακτοκομικά προϊόντα είναι μια σημαντική ομάδα τροφίμων για πολλούς πολιτισμούς σε όλο τον κόσμο. Τα πιο γνωστά που έχουν ως βάση το γάλα είναι το κεφίρ, το βουτυρόγαλα, διάφορα είδη τυριών και το γιαούρτι. Η κατανάλωση των πρώτων ζυμούμενων γαλακτοκομικών έγινε στη νεολιθική εποχή στην Ιρλανδία. Πρόσφατες έρευνες έχουν επικεντρωθεί στα ζυμούμενα γαλακτοκομικά προϊόντα μιας και είναι άμεσα συνδεδεμένα τόσο με την βελτίωση της υγείας όσο και με την μακροζωία των ανθρώπων. Ο Matchenkoff και η ομάδα του ανακάλυψαν ότι ο βουλγάρικος πληθυσμός που κατανάλωνε γιαούρτι εμπλουτισμένο με μικρόβια, είχε ενισχυμένο ανοσοποιητικό σύστημα και μακροζωία. Η ζύμωση συμβάλει στον εμπλουτισμό των γαλακτοκομικών με θρεπτικά συστατικά, στη διατήρηση των υπαρχόντων θρεπτικών ουσιών και στην προστασία των προϊόντων από παθογόνους παράγοντες. Οι γαλακτοβιομηχανίες στη σύγχρονη εποχή έχουν πρωτοπορήσει στη διαδικασία παραγωγής ζυμούμενων γαλακτοκομικών μέσω της χρήσης ωφέλιμων βακτηρίων για τη δημιουργία προβιοτικών προϊόντων τα οποία είναι ωφέλιμα για τον ανθρώπινο οργανισμό. Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή προβιοτικών προϊόντων είναι γνωστοί ως βακτήρια γαλακτικού οξέος (Lactic acid bacteria-LAB). Έτσι, πολλοί καταναλωτές με την κατανάλωση των προϊόντων αυτών, τα οποία στην ουσία συγκαταλέγονται στα λειτουργικά τρόφιμα, μείωσαν τη συχνότητα εμφάνισης κάποιων ασθενειών όπως η νόσος του Crohn και η ελκώδης κολίτιδα (UC) ή ελαχιστοποίησαν τη συμπτωματολογία τους. Η παρασκευή προβιοτικών προϊόντων αντιμετωπίζει κάποια προβλήματα όπως η διαδικασία ενσωμάτωσης και διατήρησης της βιωσιμότητας των προβιοτικών, η μη χαρτογράφηση όλων των μικροοργανισμών για τη χρήση τους και γενικότερα η ασφάλεια αυτών για ανθρώπινη χρήση.

Η παρούσα εργασία χωρίζεται σε πέντε επιμέρους κεφάλαια ως εξής:

Στο πρώτο κεφάλαιο αναλύεται το εντερικό μικροβίωμα του ανθρώπου, πως δηλαδή αυτό επηρεάζεται με την πάροδο του χρόνου και πως σχετίζεται με ορισμένα νοσήματα. Παράλληλα αναφορά γίνεται και στους λακτοβάκιλλους, οι οποίοι είναι τα κυρίαρχα βακτήρια γαλακτικού οξέος τα οποία ανευρίσκονται στο γαστρεντερικό σύστημα του ανθρώπου και των ζώων.

Το δεύτερο κεφάλαιο σχετίζεται με τη χρήση των προβιοτικών στα γαλακτοκομικά προϊόντα. Πιο συγκεκριμένα, γίνεται αναφορά στην ευεργετική δράση των προβιοτικών, στη χρήση αυτών σε διάφορα εντερικά νοσήματα για την μείωση των κλινικών

συμπτωμάτων και στους τρόπους αύξησης της βιωσιμότητας αυτών στα ζυμούμενα γαλακτοκομικά προϊόντα.

Στο τρίτο κεφάλαιο γίνεται αναφορά στα LAB, στον ρόλο τους στα ζυμούμενα γαλακτοκομικά, αλλά και στους μικροοργανισμούς που χρησιμοποιούνται σε αυτά. Επίσης, αναφορά γίνεται στη γαλακτική ζύμωση, στα πιο γνωστά προϊόντα ζύμωσης του γάλακτος, τα οφέλη από την κατανάλωσή τους και πως επηρεάζουν το εντερικό μικροβίωμα. Τέλος, παρουσιάζονται κάποια μόρια που παράγονται από τα LAB κατά τη ζύμωση και οι ευεργετικές τους ιδιότητες για την υγεία του ανθρώπου.

Το τέταρτο κεφάλαιο σχετίζεται με τη χρήση των προβιοτικών στο τυρί. Ειδικότερα, αρχικά παρουσιάζονται κάποιες πληροφορίες για το τυρί και στη συνέχεια αναλύονται οι μέθοδοι με τις οποίες τα προβιοτικά εισάγονται στο τυρί, οι αδυναμίες των μεθόδων αυτών, οι τεχνικές ενίσχυσης της βιωσιμότητάς τους και τα διατροφικά αποτελέσματα που βασίστηκαν πάνω σε έρευνες και πορίσματα.

Στο πέμπτο κεφάλαιο καταγράφονται οι κανονισμοί οι οποίοι καθορίστηκαν από την ευρωπαϊκή ένωση και από τον παγκόσμιο οργανισμό υγείας για τη χρήση των προβιοτικών καθώς και οι παράμετροι ασφάλειας όσον αφορά τα προβιοτικά στα τρόφιμα.

Τα ζυμούμενα γαλακτοκομικά προϊόντα αποτελούν βασική ομάδα τροφίμων για τους ανθρώπους, ιδιαίτερα δημοφιλής και καταναλώνονται σχεδόν καθημερινά από την πλειονότητα του ανθρώπινου πληθυσμού σε σημαντικές ποσότητες. Επομένως, σκοπός της εργασίας αυτής, είναι η καλύτερη κατανόηση της έννοιας των προβιοτικών που απαντώνται στο γαστρεντερικό μικροβίωμα, καθώς και της μεταξύ τους σύνδεσης αναφορικά με τη βελτίωση της υγείας του ανθρώπου διαμέσου της κατανάλωσης των προβιοτικών των γαλακτοκομικών προϊόντων.

1. ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΜΙΚΡΟΒΙΩΜΑ

1.1 Γενικά για το ανθρώπινο μικροβίωμα

Γενικά ο όρος ανθρώπινο μικροβίωμα (human microbiome), αναφέρεται στο σύνολο των μικροοργανισμών που αποικίζουν τον ανθρώπινο οργανισμό. Ομοίως και ο όρος ανθρώπινη μικροχλωρίδα (Μεντής, κ.ά., 2013). Ωστόσο, πιο συγκεκριμένα, ο όρος ανθρώπινο μικροβίωμα αναφέρεται ως ο συνολικός αριθμός των γονιδίων των οργανισμών (microbiota), που αποικίζουν μια συγκεκριμένη περιοχή του ανθρώπινου σώματος. Στους μικροοργανισμούς αυτούς συμπεριλαμβάνονται τα βακτήρια, τα αρχαία, οι ιοί και οι ευκαρυώτες (Ogunrinola, et al., 2020).

Το ανθρώπινο μικροβίωμα εμφανίζει εξαιρετική ποικιλομορφία και είναι μοναδικό για κάθε άνθρωπο (Ogunrinola, et al., 2020). Υπολογίζεται ότι το ανθρώπινο μικροβίωμα αποτελείται από περισσότερους από 100 τρισεκατομμύρια μικροοργανισμούς με την πλειονότητα αυτών να εντοπίζεται στο ανθρώπινο έντερο (Hair & Sharpe, 2014). Οι μικροοργανισμοί αυτοί είναι 10 φορές περισσότεροι από τα ανθρώπινα κύτταρα και για το λόγο αυτό, οι άνθρωποι χαρακτηρίζονται ως «υπεροργανισμοί» (Thursby & Juge, 2017). Το ανθρώπινο μικροβίωμα και κυρίως το εντερικό μικροβίωμα έχουν περίπου 200 φορές περισσότερα γονίδια από το συνολικό γονιδίωμα του ανθρώπου (Hair & Sharpe, 2014).

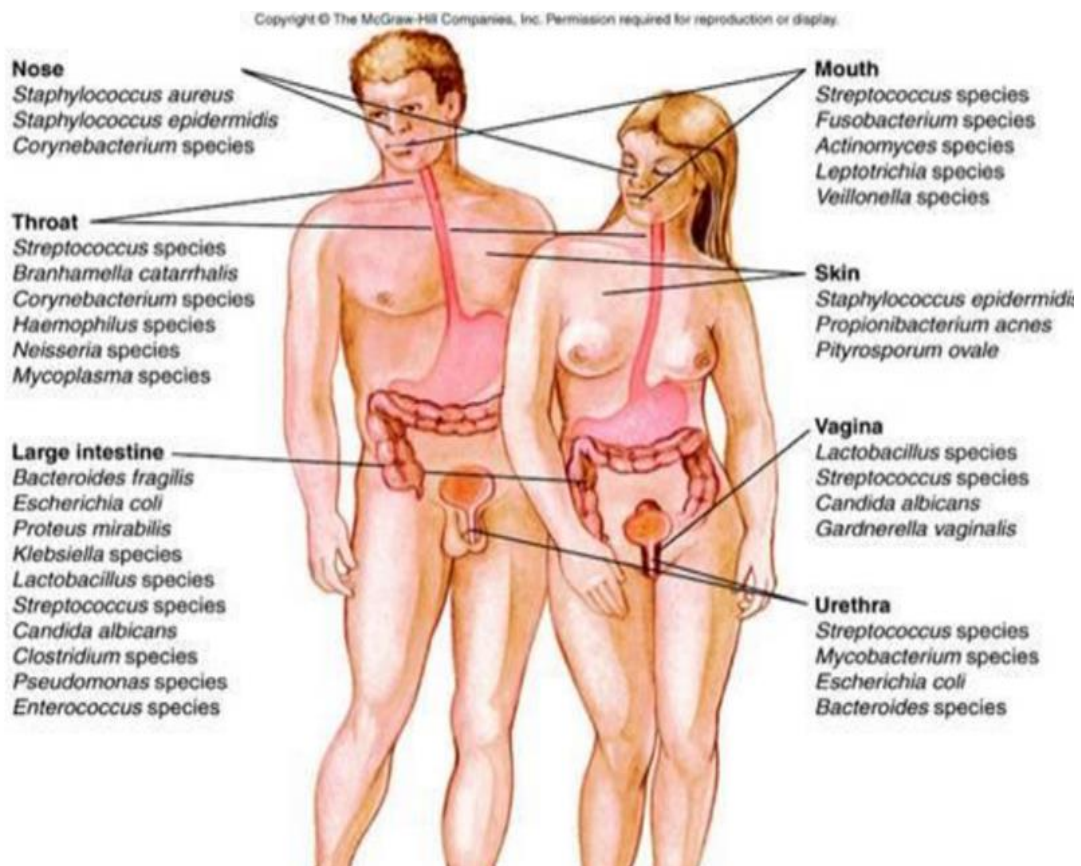
Οι μικροχλωρίδες σχετίζονται με πολλαπλές φυσιολογικές λειτουργίες του ξενιστή σημαντικότερες από τις οποίες είναι η ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος, η ανάπτυξη του εντερικού βλεννογόνου, η προστασία από παθογόνους μικροοργανισμούς, η πέψη των τροφών και η σύνθεση βιταμινών (βιταμίνη K, B12, θειαμίνη και ριβοφλαβίνη) (Hair & Sharpe, 2014).

Η παθογένεση αρκετών ασθενειών όπως η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου, οι βακτηριακές λοιμώξεις, ο καρκίνος και οι καρδιαγγειακές παθήσεις συσχετίζονται με τη διατάραξη του ανθρώπινου μικροβιώματος και κυρίως του εντερικού (Ogunrinola, et al., 2020).

Επομένως, γίνεται κατανοητό ότι οι μικροοργανισμοί αυτοί, παίζουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της υγείας του ανθρώπου ή στην διατάραξή της καθώς, έχουν την ικανότητα να

επηρεάζουν με θετικό ή αρνητικό τρόπο τις φυσιολογικές μεταβολικές και ανοσολογικές λειτουργίες του οργανισμού.

Το ανθρώπινο μικροβίωμα εντοπίζεται στο δέρμα, στους βλεννογόνους, στο γαστρεντερικό σωλήνα, στο αναπνευστικό σύστημα, στο ουρογεννητικό σύστημα και στο μαστό. Η μεγαλύτερη συγκέντρωσή του βρίσκεται στο γαστρεντερικό σωλήνα και πιο συγκεκριμένα στο έντερο. Στο γαστρεντερικό σωλήνα κυριαρχούν οι προαιρετικά αναερόβιοι μικροοργανισμοί, ενώ οι αυστηρά αερόβιοι μικροοργανισμοί εντοπίζονται στο δέρμα, στο αναπνευστικό σύστημα και τη ρινική κοιλότητα (Ogunrinola, et al., 2020).



Εικόνα 1.1.1 Μέρη του σώματος όπου εντοπίζεται το ανθρώπινο μικροβίωμα (Σιδεράς, χ.χ).

1.2 Εντερικό μικροβίωμα

1.2.1 Ορισμοί

Στη διεθνή βιβλιογραφία, οι όροι εντερική μικροχλωρίδα (gut microbiota) και εντερικό μικροβίωμα (gut microbiome) εναλλάσσονται και πολλές φορές συγχέονται μεταξύ τους. Ωστόσο, υπάρχει μια διαφορά μεταξύ αυτών. Συγκεκριμένα:

Ο όρος **εντερική μικροχλωρίδα (gut microbiota)** αναφέρεται στο σύνολο των μικροοργανισμών που αποικίζουν το γαστρεντερικό σωλήνα ενός ατόμου και αποτελείται από βακτήρια, ιούς, αρχαία, μύκητες, καθώς και ευκαρυώτες, ενώ ο όρος εντερικό μικροβίωμα (**gut microbiome**) είναι ο συνολικός αριθμός των γονιδίων των μικροοργανισμών της εντερικής μικροχλωρίδας ενός ατόμου (Μεντής, κ.ά., 2013).

1.2.2 Σύσταση εντερικού μικροβιώματος

Αν και υπήρχε η πεποίθηση ότι το εντερικό μικροβίωμα αποτελείται από 500-1000 διαφορετικά είδη μικροβίων, μελέτες έχουν εκτιμήσει ότι η συνολική εντερική μικροχλωρίδα του ανθρώπου αποτελείται από περισσότερα από 35000 είδη βακτηρίων (Jandhyala, et al., 2015).

Παρά την μεγάλη ποικιλομορφία που υπάρχει όσον αφορά τον αριθμό των ειδών των βακτηρίων που αποικίζουν το εντερικό μικροβίωμα, μόνο 30-40 είδη αποτελούν το 99% του μικροβιώματος, ενώ σε κάθε άνθρωπο δεν υπάρχουν όλα τα είδη, αλλά συνήθως 100-150 διαφορετικά (Σιδεράς, χ.χ).

Όσον αφορά την ποσοτική σύσταση της μικροχλωρίδας η οποία μεταβάλλεται κατά μήκος του γαστρεντερικού σωλήνα, ο στόμαχος περιέχει περίπου (10^3 - 10^4) βακτήρια, το δωδεκαδάκτυλο (10^5 - 10^6) και ο ειλεός (10^8 - 10^9) βακτήρια (ανά γραμμάριο εντερικού ιστού ή κοπράνων). Το παχύ έντερο περιέχει το πιο μεγάλο αριθμό βακτηρίων (10^{12}) και εμφανίζει μεγαλύτερη ποικιλομορφία σε σχέση με το λεπτό έντερο (Μεντής, κ.ά., 2013).



Εικόνα 1.2.2.1 Μεταβολές στον αριθμό και τη σύνθεση της μικροχλωρίδας κατά μήκος του γαστρεντερικού σωλήνα (Μεντής, κ.ά., 2013).

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η εντερική μικροχλωρίδα αποτελείται από διάφορα είδη μικροοργανισμών οι οποίοι κατοικούν κατά μήκος του γαστρεντερικού σωλήνα και των οποίων ο αριθμός και η σύσταση μεταβάλλονται.

Τα βακτήρια είναι οι κυρίαρχοι μικροοργανισμοί της εντερικής μικροχλωρίδας και με βάση αυτά, το εντερικό μικροβίωμα μπορεί να αποτελείται από τα εξής βακτηριακά φύλα: ***Firmicutes***, ***Bacteroidetes***, ***Actinobacteria***, ***Proteobacteria*** και ***Fusobacteria***. Τα ***Firmicutes*** και ***Bacteroidetes*** αποτελούν το 90% του εντερικού μικροβιώματος (Aslam, et al., 2020). Τα ***Firmicutes*** περιλαμβάνουν Gram⁺ βακτήρια, με πιο γνωστά γένη τα ***Clostridium***, ***Lactobacillus*** και ***Staphylococcus***. Τα ***Bacteroidetes*** περιλαμβάνουν Gram⁻ βακτήρια με πιο γνωστά γένη τα ***Bacteroides*** και ***Provootella***. Στα ***Actinobacteria*** ανήκει το γένος ***Bifidobacterium*** το οποίο είναι πολύ γνωστό. Στα ***Proteobacteria*** ανήκουν τα Gram⁻ βακτήρια με χαρακτηριστικά γένη τα ***Escherichia***, ***Pseudomonas***, ***Klebsiella*** και ***Proteus*** (Σιδεράς, χ.χ). Ένα άλλο βακτηριακό φύλο είναι το ***Verrucomicrobia*** με πιο γνωστό είδος το ***Akkermansia muciniphila*** (Thursby & Juge, 2017). Τέλος, πρέπει να τονιστεί ότι υπάρχουν και άλλα βακτηριακά φύλα, όμως τα πιο συνηθισμένα είναι αυτά που αναφέρθηκαν πιο πάνω.

Ένας άλλος τρόπος ταξινόμησης της εντερικής μικροχλωρίδας των ανθρώπων βασίζεται στη κατηγοριοποίηση ανάλογα με την επικράτηση των γενών σε μία από τους τρεις «εντερότυπους»: ο εντερότυπος 1, ο οποίος έχει μεγάλη αφθονία *Bacteroides*, ο εντερότυπος 2, ο οποίος έχει μεγάλη αφθονία *Prevotella* και ο εντερότυπος 3, ο οποίος έχει μεγάλη αφθονία *Ruminococcus* (Jandhyala, et al., 2015). Πρόσφατα στοιχεία φανερώνουν ότι στο έντερο υπάρχουν πολλές ενδιάμεσες καταστάσεις παρά το διαχωρισμό τους σε εντερότυπους. Η επικράτηση του κάθε εντερότυπου εξαρτάται κυρίως από τη διατροφή. Φαίνεται όμως ότι κάθε άτομο έχει σταθερά βακτηριακά στελέχη, αν και η σύνθεση μπορεί να μεταβάλλεται. Μελέτες οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι στην εντερική μικροχλωρίδα κάθε ατόμου υπάρχουν βακτηριακά στελέχη τα οποία είναι χαρακτηριστικά για το μικροβίωμά του και που δεν αντικαθίστανται εύκολα (Μεντής, κ.ά., 2013).

1.2.3 Λειτουργίες του εντερικού μικροβιώματος

Το εντερικό μικροβίωμα παρέχει πολλές ευεργετικές ιδιότητες στο ξενιστή και συμμετέχει στο μεταβολισμό θρεπτικών ουσιών όπως είναι:

- Οι υδατάνθρακες
- Οι πρωτεΐνες
- Τα λίπη-χολικά οξέα

Μεταβολισμός υδατανθράκων: Τα βακτήρια του παχέος εντέρου όπως τα *Bacteroides*, *Roseburia*, *Bifidobacterium*, *Fecalibacterium* και *Enterobacteria* έχουν την ικανότητα να παράγουν ένζυμα τα οποία ζυμώνουν τους σύνθετους υδατάνθρακες (Jandhyala, et al., 2015). Τα τελικά προϊόντα της ζύμωσης των υδατανθράκων είναι αέρια και λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου (Short Chain Fatty Acids, SCFAs-οξικό, προπιονικό και βουτυρικό οξύ). Τα SCFAs απορροφώνται από τα επιθηλιακά κύτταρα στο γαστρεντερικό σωλήνα όπου εμπλέκονται στη ρύθμιση κυτταρικών διεργασιών όπως είναι η γονιδιακή έκφραση, η χημειοταξία, η διαφοροποίηση, ο πολλαπλασιασμός και η απόπτωση. Αποτελούν πηγή ενέργειας για το ξενιστή και έχουν την ικανότητα ρύθμισης της όρεξης. Τα SCFAs και κυρίως το βουτυρικό οξύ έχουν αντιφλεγμονώδεις, αντιμικροβιακές και αντικαρκινικές ιδιότητες, συμβάλλουν στη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος και επηρεάζουν την

παραγωγή κυτοκινών όπως για παράδειγμα η ιντερλευκίνη IL-18, η οποία εμπλέκεται στη διατήρηση και την επιδιόρθωση της επιθηλιακής ακεραιότητας (Thursby & Juge, 2017).

Μεταβολισμός πρωτεϊνών: Το μικροβίωμα του εντέρου περιέχει έναν αποτελεσματικό μηχανισμό με τον οποίο γίνεται ο μεταβολισμός των πρωτεϊνών μέσω των μικροβιακών πρωτεασών και πεπτιδασών, σε συνδυασμό με τις ανθρώπινες πρωτεάσες. Η αποικοδόμηση των πρωτεϊνών έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή κυρίως SCFAs (Jandhyala, et al., 2015).

Μεταβολισμός λιπιδίων-χολικών οξέων: Το μικροβίωμα του εντέρου έχει θετική επίδραση στο μεταβολισμό των λιπιδίων, αποτρέποντας την αναστολή της δράσης της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης στα λιποκύτταρα. Επιπρόσθετα, αυξάνεται η αποτελεσματικότητα της υδρόλυσης των λιπιδίων μέσω του *Bacteroides thetaiotaomicron* το οποίο ρυθμίζει την έκφραση μιας κολιπάσης, η οποία απαιτείται από την παγκρεατική λιπάση για την πέψη των λιπών. Η κατανάλωση λιπών συνδέεται με την έκκριση πρωτογενών χολικών οξέων, τα οποία επηρεάζονται από το εντερικό μικροβίωμα και κυρίως από τα *Bacteroides intestinalis*, *Bacteroides fragilis* και *E. coli* με αποτέλεσμα τη μετατροπή τους σε δευτερογενή χολικά οξέα μετά από αποσυμπίεση και αφυδάτωση (Jandhyala, et al., 2015).

Άλλες ευεργετικές ιδιότητες για την υγεία του ξενιστή στις οποίες συμμετέχει το εντερικό μικροβίωμα είναι:

- Η παραγωγή θρεπτικών ουσιών όπως είναι οι βιταμίνες (σύμπλεγμα B, K) και το συζευγμένο λινολεϊκό οξύ (Conjugated Linoleic Acid, CLA).
- Η προστασία από παθογόνα (αντιμικροβιακή δράση).
- Η ορθή ανοσολογική λειτουργία (ανοσορύθμιση).
- Η διατήρηση της ακεραιότητας του εντερικού φραγμού.
- Ο μεταβολισμός φαρμάκων (Jandhyala, et al., 2015)

1.2.4 Αλληλεπίδραση ξενιστή και εντερικού μικροβιώματος

Από τη στιγμή της γέννησης ενός βρέφους κι ύστερα, αρχίζει σταδιακά μια αλληλεπίδραση-συμβιωτική σχέση (symbiosis) μεταξύ του ανθρώπινου μικροβιώματος και πιο συγκεκριμένα του εντερικού με το ξενιστή. Αυτή η συμβιωτική σχέση είναι σημαντική στη

διατήρηση της υγείας (Ogunrinola, et al., 2020). Τόσο ο ξενιστής όσο και οι μικροοργανισμοί επωφελούνται μεταξύ τους. Από τη μια πλευρά, ο ξενιστής αποτελεί τόπο ανάπτυξης και διατροφής για τα συμβιωτικά εντερικά βακτήρια και από την άλλη πλευρά, τα συμβιωτικά εντερικά βακτήρια ευνοούν τη λειτουργία του ξενιστή μέσω της επαγωγής αντίστασης στις λοιμώξεις και μέσω της διευκόλυνσης της απορρόφησης των τροφών που έχουν υποστεί πέψη (Μεντής, κ.ά, 2013). Η διατάραξη της μικροβιακής κοινότητας του εντέρου (δυσβίωση), κυρίως εξαιτίας του τρόπου ζωής, έχει ως αποτέλεσμα την ευαισθησία του ξενιστή στις λοιμώξεις και την παθογένεση ασθενειών (Ogunrinola, et al., 2020).

Εκτός από το τρόπο ζωής του ξενιστή, άλλοι σημαντικοί παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν το εντερικό μικροβίωμα και τις λειτουργίες του είναι:

- Η γεωγραφική θέση και η διαβίωση σε αγροτικές ή αστικές περιοχές. Ο παράγοντας αυτός έχει άμεση σχέση με τις περιβαλλοντικές συνθήκες της περιοχής και το είδος της διατροφής. Τα παιδιά στην Αφρική έχουν μεγαλύτερη αφθονία *Prevotella*, ενώ στην Ευρώπη έχουν υψηλότερα ποσοστά *Bacteroides* (Jandhyala, et al., 2015).
- Η διατροφή (δυτικού τύπου, μεσογειακή, μητρικό γάλα ή υποκατάστατο του μητρικού γάλακτος) αποτελεί έναν άλλο σημαντικό παράγοντα επηρεασμού του μικροβιώματος. Τα βρέφη που θηλάζουν, το εντερικό τους μικροβίωμα κυριαρχείται από τα γένη *Lactobacillus* και *Bifidobacterium* (Jandhyala, et al., 2015).
- Η χρήση φαρμάκων όπως είναι τα αντιβιοτικά, έχει ως αποτέλεσμα την αλλοίωση της φυσιολογικής μικροχλωρίδας του εντέρου και τη διάδοση ανθεκτικών στελεχών μέσω οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων (Jandhyala, et al., 2015).
- Το στρες, η άσκηση και το κάπνισμα (Jandhyala, et al., 2015).
- Ο τρόπος με τον οποίο έγινε ο τοκετός (φυσιολογικός τοκετός ή καισαρική) και γενικότερα οι χειρουργικές επεμβάσεις. Το εντερικό μικροβίωμα των βρεφών που γεννιούνται φυσιολογικά αποτελείται από γένη *Lactobacillus* και *Prevotella*, ενώ αυτών που γεννιούνται με καισαρική τομή από *Streptococcus*, *Corynebacterium* και *Propionibacterium* (Jandhyala, et al., 2015).
- Η ηλικία. Το εντερικό μικροβίωμα των βρεφών και των νέων ατόμων διαφέρει από των ενηλίκων μέχρι την ηλικία περίπου των τριών ετών όπου και σταδιακά παρουσιάζει ομοιότητες με των τελευταίων (Jandhyala, et al., 2015).



Εικόνα 1.2.4.1 Παράγοντες που επηρεάζουν το εντερικό μικροβίωμα και τις λειτουργίες του (Σιδεράς, χ.χ).

1.2.5 Μεταβολή του εντερικού μικροβιώματος στα διάφορα στάδια ζωής του ατόμου

Η ανάπτυξη του ανθρώπινου μικροβιώματος αρχίζει από τη γέννηση αν και υπάρχει αμφισβήτηση από περιορισμένο αριθμό μελετών οι οποίες ανίχνευσαν μικρόβια σε ιστούς της μήτρας όπως ο πλακούντας (Thursby & Juge, 2017). Η εντερική μικροχλωρίδα μεταβάλλεται με το πέρασμα των χρόνων ανάλογα το στάδιο της ζωής του ατόμου. Το ανθρώπινο μικροβίωμα επηρεάζεται περισσότερο μετά τη γέννηση του νεογνού, το οποίο εξέρχεται από το στείρο περιβάλλον της μήτρας μέσα στην οποία βρισκόταν και σταδιακά αποικίζεται από πλήθος μικροοργανισμών στην επιφάνεια του δέρματός του και στους βλεννογόνους (Μεντής, κ.ά., 2013). Ο τρόπος με τον οποίο γεννιέται ένα νεογνό επηρεάζει τη σύνθεση του εντερικού μικροβιώματος και συνήθως μοιάζει με εκείνο των μητέρων τους. Κατά τη διάρκεια του φυσιολογικού τοκετού, τα νεογνά έχουν μεγάλη αφθονία σε λακτοβάκιλλους λόγω της άμεσης επαφής τους με τη κολπική μικροχλωρίδα των μητέρων τους η οποία είναι πλούσια σε λακτοβάκιλλους επίσης. Αντίθετα, τα παιδιά που έχουν γεννηθεί με καισαρική τομή παρουσιάζουν διαφορές στη σύσταση της εντερικής τους μικροχλωρίδας σε σχέση με αυτά που γεννήθηκαν φυσιολογικά. Καθυστερούν στον αποικισμό από είδη του γένους *Bacteroides* και αποικίζονται από αναερόβια είδη

Clostridium. Επίσης, έχει παρατηρηθεί ότι στα νεογνά που γεννιούνται φυσιολογικά, υπάρχει ομοιότητα του μικροβιώματος των κοπράνων τους με των μητέρων τους έως και 72%, ενώ, τα νεογνά που γεννιούνται με καισαρική το ποσοστό αυτό μειώνεται στο 41% και πιο κάτω (Thursby & Juge, 2017).

Το μητρικό γάλα, είναι απαραίτητη τροφή για τα βρέφη καθώς συμβάλει τόσο στη διαμόρφωση της εντερικής μικροχλωρίδας όσο και στην προστασία από παθογόνα βακτήρια μέσω των αντισωμάτων IgA που περιέχει. Τα αντισώματα αυτά προέρχονται από το μαστικό αδέν, ο οποίος αποικίζεται από ανοσολογικά κύτταρα του εντέρου μέσω του «εντερο-μαστικού άξονα» (“entero-mammary axis”) (Μεντής, κ.ά., 2013). Το μητρικό γάλα δεν είναι στείρο μικροοργανισμών. Μπορεί να περιέχει έως και 600 διαφορετικά είδη βακτηρίων που εμπλουτίζουν το έντερο του βρέφους σε σχέση το συνθετικό (Σιδεράς, χ.χ).

Στα αρχικά στάδια της ανάπτυξης δεν υπάρχει μεγάλη ποικιλομορφία στο μικροβίωμα και κυριαρχούν τα φύλλα *Actinobacteria* και *Proteobacteria*. Στην ηλικία των 2,5-3 ετών, το μικροβίωμα σταθεροποιείται. Η σύνθεση, η ποικιλομορφία και οι λειτουργικές του ικανότητες μοιάζουν με το μικροβίωμα των ενηλίκων και παραμένει έτσι σε όλη την ενήλικη ζωή (υπό φυσιολογικές συνθήκες), ενώ τροποποιείται μερικώς στους ηλικιωμένους (Thursby & Juge, 2017).



Εικόνα 1.2.5.1 Μεταβολές της εντερικής μικροχλωρίδας στα διάφορα στάδια ζωής του ανθρώπου (Μεντής, κ.ά., 2013).

1.2.6 Εντερικό μικροβίωμα και ασθένειες

Η διατάραξη της εντερικής μικροχλωρίδας, η οποία μπορεί να συμβεί εξαιτίας των παραγόντων που προαναφέρθηκαν, μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση νοσημάτων. Αρκετές ασθένειες πιθανώς να σχετίζονται με διαταραχές του εντερικού μικροβιώματος (δυσβίωση) και παρακάτω παρουσιάζονται ενδεικτικά κάποιες από αυτές:

Νοσήματα του Γαστρεντερικού συστήματος: η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου (Ελκώδης κολίτιδα & Νόσος του Crohn), το σύνδρομο ευερέθιστου εντέρου (σπαστική κολίτιδα), η κουλιοκάκη δυσανεξία στη γλουτένη, ο καρκίνος του παχέος εντέρου, η χρόνια διάρροια από κλωστηρίδιο, η νεκρωτική εντεροκολίτιδα και οι κωλικοί στα βρέφη.

Διαταραχές του Ανοσοποιητικού συστήματος: αλλεργίες (ατοπική δερματίτιδα και άσθμα), αυτοάνοσα νοσήματα (σακχαρώδης διαβήτης τύπου I, ρευματοειδής αρθρίτιδα, συστηματικός ερυθριματώδης λύκος κλπ.), ευπάθεια (ευαισθησία) σε λοιμώξεις από ιούς (π.χ. ρετροϊούς), ενώ φαίνεται να επηρεάζεται και η αντίδραση του ανοσοποιητικού έναντι του ξενιστή κατά τις μεταμοσχεύσεις. Η πλειονότητα των ανοσολογικών αντιδράσεων του οργανισμού γίνονται στο έντερο.

Διαταραχές του Νευρικού συστήματος: ο αυτισμός, τα νευροεκφυλιστικά νοσήματα (Alzheimer και Parkinson), η κατάθλιψη και άλλες διαταραχές της διάθεσης και η σκλήρυνση κατά πλάκας μεταξύ άλλων. Μέσω του άξονα Εγκεφάλου-Εντέρου (Brain-Gut axis) τα μικρόβια έχουν πρόσβαση στην συμπεριφορά του εγκεφάλου και τον επηρεάζουν με τη βοήθεια βακτηριακών προϊόντων που φτάνουν στον εγκέφαλο μέσω της κυκλοφορίας του αίματος. Ακόμη, το στρες και τα συναισθήματα μέσω της απελευθέρωσης των ορμονών του στρες ή των νευροδιαβιβαστών του συμπαθητικού επηρεάζουν τη φυσιολογία του εντέρου και μεταβάλλουν τη σύνθεση του εντερικού μικροβιώματος. Ορμόνες του στρες όπως η νοραδρεναλίνη μπορεί να αλλάξει τη μικροβιακή σύνθεση και τη δραστηριότητα του μικροβιώματος.

Οι διαταραχές του εντερικού μικροβιώματος συνδέονται επίσης αιτιολογικά και με πολλά άλλα συστηματικά νοσήματα όπως: η παχυσαρκία, το μεταβολικό σύνδρομο, ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2, η μη-αλκοολική λιπώδης διήθηση του ήπατος, η αρτηριοσκλήρωση και τα καρδιαγγειακά νοσήματα (Σιδερός, χ.χ).

Από τις παραπάνω κατηγορίες νοσημάτων υπογραμμίζεται πιο αναλυτικά η επίδραση του εντερικού μικροβιώματος σε μερικές από αυτές.

Καρκίνος: Μελέτες υποστηρίζουν ότι οι παράγοντες που συμβάλλουν στη δυσβίωση του εντερικού μικροβιώματος, οι συνεχείς ενδοκοιλιακές λοιμώξεις και τα αντιβιοτικά ευνοούν την εμφάνιση καρκίνου του παχέος εντέρου. Ακόμη, τα τελικά προϊόντα που απελευθερώνονται από το εντερικό μικροβίωμα μπορούν να προκαλέσουν καρκινογένεση ή να εμποδίσουν την ογκογένεση. Το *H. pylori* φαίνεται να σχετίζεται με το καρκίνο του στομάχου. Άτομα με το συγκεκριμένο νόσημα έχουν αυξημένες συγκεντρώσεις βακτηρίων των γενών *Fusobacterium* και *Clostridium* (Ogunrinola, et al., 2020).

Καρδιαγγειακές παθήσεις: Η παραγωγή μεταβολιτών N-οξειδίου της τριμεθυλαμίνης (Trimethylamine N-oxide, TMAO) από το εντερικό μικροβίωμα μπορεί να σχετίζεται με καρδιακές παθήσεις. Το εντερικό μικροβίωμα μεταβολίζει τη τριμεθυλαμίνη η οποία ανευρίσκεται σε δίαιτες πλούσιες σε χολίνη, L-καρνιτίνη και φωσφατιδυλοχολίνη σε N-οξείδιο της τριμεθυλαμίνης. Το TMAO επηρεάζει τη μεταφορά των λιπών στο σώμα και προκαλεί σκλήρυνση των αρτηριών σε ζωικά μοντέλα. Η δυσβίωση του εντερικού μικροβιώματος έχει ανακαλυφθεί ότι σχετίζεται με καρδιαγγειακές παθήσεις. Κλινική μελέτη μεταξύ ατόμων με χαμηλό κίνδυνο καρδιαγγειακών παθήσεων και ατόμων με κίνδυνο καρδιαγγειακής νόσου έδειξε ότι τα άτομα με υψηλό κίνδυνο καρδιαγγειακής νόσου είχαν διαταραγμένη εντερική μικροχλωρίδα. Επιπλέον, μεταμοσχεύσεις κοπράνων με αυξημένη συγκέντρωση *Prevotella* και *Klebsiella* από υπερτασικά άτομα σε ποντίκια χωρίς μικρόβια είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της αρτηριακής τους πίεσης (Ogunrinola, et al., 2020).

Αλλεργικές ασθένειες: Τα άτομα που γεννιούνται με καισαρική τομή έχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης αλλεργικών ασθενειών εξαιτίας του γεγονότος ότι τη στιγμή της γέννησής τους δεν έρχονται σε επαφή με τη φυσιολογική μικροχλωρίδα των μητέρων τους. Μια πρόσφατη επιδημιολογική μελέτη ανέφερε ότι υπάρχει στενή συσχέτιση μεταξύ της εντερικής μικροχλωρίδας που έχει διαταραχθεί και της παραγωγής ενός αλλεργικού αντιγόνου, το IgE με αποτέλεσμα της εμφάνισης της νόσου των αεραγωγών στα παιδιά (Ogunrinola, et al., 2020).

Λοιμώξεις από μετατόπιση βακτηρίων: Στους ανθρώπινους ξενιστές η συνεχής μετακίνηση βακτηρίων οδηγεί σε συστηματική λοίμωξη. Ο κίνδυνος συστηματικής νόσου είναι μεγαλύτερος σε ανοσοκατασταλμένα άτομα, σε χειρουργημένα άτομα ή μέσω ενός τραύματος. Η υπερβολική λήψη αντιβιοτικών και μια πιθανή βλάβη στο εντερικό επιθήλιο οδηγεί στη διατάραξη της μικροχλωρίδας, στην αύξηση των προαιρετικά αναερόβιων μικροοργανισμών και στον επηρεασμό της ανοσολογικής απόκρισης του ξενιστή. Η διατάραξη της εντερικής μικροχλωρίδας μπορεί να προκαλέσει την παραγωγή αζωτούχων ενώσεων οι οποίες επηρεάζουν την ακεραιότητα του εντερικού φραγμού, επιτρέποντας με αυτό το τρόπο τη μεταφορά άλλων μικροοργανισμών και τοξινών αυτών σε άλλα σημεία του σώματος. Χαρακτηριστικοί μικροοργανισμοί οι οποίοι προκαλούν συστηματικές λοιμώξεις μετά από μετατόπιση είναι: *E.coli*, *Streptococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Enterobacter spp.*, κ.ά (Ogunrinola, et al., 2020).

Η εμφάνιση των ασθενειών που αναφέρθηκαν προηγουμένως όπως ξαναιπώθηκε φαίνεται να σχετίζονται με τη δυσβίωση της εντερικής μικροχλωρίδας. Για το λόγο αυτό, έχει προκύψει μεγάλο ενδιαφέρον από τους ερευνητές και πολλές έρευνες γίνονται τα τελευταία χρόνια για την χρήση των προβιοτικών και τα οφέλη τους στην υγεία του ανθρώπου. Υπάρχουν αξιόπιστες ενδείξεις μέχρι τώρα ότι τα προβιοτικά μικρόβια μπορούν να παρεμποδίσουν διάφορες ασθένειες και διαταραχές, ιδίως γαστρεντερικές διαταραχές. Οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί προέρχονται από ζυμούμενα τρόφιμα και προϊόντα ζύμωσης ζωικής κυρίως προέλευσης όπως είναι τα γαλακτοκομικά προϊόντα. Τα προβιοτικά φαίνεται να παίζουν ρόλο μείωση διαταραχών που σχετίζονται με ελαττωματικό ανοσοποιητικό προγραμματισμό που οδηγεί σε αυτοάνοσες διαταραχές ή στη διόρθωση της διατάραξης της εντερικής μικροχλωρίδας η οποία μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση μεταβολικών ασθενειών, άγχους, κατάθλιψης και άλλων εκφράσεων της λειτουργίας του εγκεφάλου. Τα προβιοτικά θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν και ως βιοθεραπευτικά προϊόντα ωστόσο, απαιτούνται αρκετές μελέτες ακόμη για να κατανοήσουμε τα οφέλη που μπορούν να προσφέρουν στην ανθρώπινη υγεία (Zommiti, et al., 2020).

1.3 Οι λακτοβάκιλλοι ως κυρίαρχο LAB στο εντερικό μικροβίωμα του ανθρώπου

1.3.1 Γενικά για τους λακτοβάκιλλους

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, στα θηλαστικά νεογνά όπως είναι το ανθρώπινο νεογνό, το χοιρίδιο και το μοσχάρι το έντερό τους είναι στείρο μικροβίων τη στιγμή της γέννησής τους. Σταδιακά μετά τη γέννηση αποικίζονται από το στόμα και το ορθό με τη κολπική μικροχλωρίδα της μητέρας. Σε διάφορα είδη νεαρών ζώων έχει παρατηρηθεί το γαστρεντερικό σύστημα να αποικίζεται με πολλαπλασιαζόμενα βακτήρια όπως είναι: τα κολοβακτηρίδια, τα bifidobacteria, οι στρεπτόκοκκοι, οι εντερόκοκκοι, τα κλωστρίδια, τα βακτηριοειδή και άλλα αναερόβια καθώς επίσης και οι λακτοβάκιλλοι (DENEV, et al., 2000).

Οι λακτοβάκιλλοι (γένος *Lactobacillus*), είναι Gram⁺ βακτήρια, προαιρετικά αναερόβια, μη σπορογόνα και ανήκουν στην ευρύτερη ομάδα των βακτηρίων που παράγουν γαλακτικό οξύ (Lactic Acid Bacteria, LAB). Οι λακτοβάκιλλοι χωρίζονται σε τρεις ομάδες:

- Η 1^η Ομάδα είναι οι υποχρεωτικά ομοιοζυμωτικοί βάκιλλοι, οι οποίοι ζυμώνουν τις εξόζες και παράγεται σχεδόν μόνο γαλακτικό οξύ.
- Η 2^η Ομάδα είναι οι προαιρετικά ομοιοζυμωτικοί, οι οποίοι ζυμώνουν εξόζες και παράγεται αποκλειστικά γαλακτικό οξύ, ενώ ορισμένα είδη παράγουν οξικό οξύ, αιθανόλη και μυρμηκικό οξύ.
- Η 3^η Ομάδα είναι οι υποχρεωτικά ετεροζυμωτικοί, οι οποίοι ζυμώνουν πεντόζες και εξόζες και παράγουν γαλακτικό, οξικό οξύ, αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα (CO₂) (Μάντης, κ.ά., 2015,2018).

Οι λακτοβάκιλλοι αποτελούν μέρος της φυσιολογικής χλωρίδα του ουρογεννητικού και γαστρεντερικού συστήματος των ανθρώπων και ο ρόλος τους είναι η αποτροπή εγκατάστασης παθογόνων μικροοργανισμών, εξαιτίας της παραγωγής γαλακτικού οξέος και άλλων αντιμικροβιακών ουσιών (Wikipedia, n.d.). Λόγω των ευεργετικών ιδιοτήτων τους για τον ανθρώπινο οργανισμό, χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με άλλα είδη βακτηρίων κυρίως του γένους *Bifidobacterium* στη ζύμωση πολλών γαλακτοκομικών προϊόντων. Υπάρχουν πολλές άλλες αναφορές όπως αυτή του Metchnikoff, ο οποίος υποστήριζε ότι τα

LAB και ιδιαίτερα οι λακτοβάκιλλοι είναι αριθμητικά κυρίαρχη και σημαντική ομάδα μικροοργανισμών που αποικίζουν το γαστρεντερικό σωλήνα (Gastrointestinal Tract, GT) και κυρίως την εντερική μικροχλωρίδα του ανθρώπου και των ζώων (DENEV, et al., 2000)

Τα LAB και κυρίως οι λακτοβάκιλλοι έχουν πολλές θεραπευτικές ιδιότητες οι οποίες έχουν ερευνηθεί. Σύμφωνα με μελέτες η ύπαρξη λακτοβάκιλλων στον εντερικό σωλήνα βοηθά στην αποκατάσταση της σωματικής δύναμης, στη διέγερση των μηχανισμών του ανοσοποιητικού συστήματος, στην παραγωγικότητα, στη καταπολέμηση εντερικών διαταραχών και άλλων παθήσεων και γενικότερα στη διατήρηση της καλής υγείας. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το είδος *Lb. Acidophilus*, το οποίο σύμφωνα με έρευνες έχει αποδειχθεί ότι είναι κυρίαρχο είδος της εντερικής μικροχλωρίδας του ανθρώπου και έχει ευεργετικές ιδιότητες όπως η σταθεροποίηση της εντερικής μικροχλωρίδας, η ανταγωνιστική δράση έναντι παθογόνων, ο έλεγχος των επιπέδων χοληστερόλης στον ορό, η πρόληψη του καρκίνου του παχέος εντέρου και η βελτίωση της διαθεσιμότητας των θρεπτικών συστατικών. Εξαιτίας των πολλών ευεργετικών ιδιοτήτων τους οι λακτοβάκιλλοι έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον πολλών ερευνητών. Ωστόσο, οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην έκφραση αυτών των δραστηριοτήτων δεν είναι πλήρως κατανοητοί (DENEV, et al., 2000).

1.3.2 Αποικισμός σε ζώα και ανθρώπους

Ο αποικισμός του εντερικού βλεννογόνου από λακτοβάκιλλους είναι ένα φυσικό φαινόμενο που προκύπτει περισσότερο σε ζώα που εκτρέφονται σε παραδοσιακές εκτροφές παρά σε ζώα που εκτρέφονται σε εντατικού τύπου εκτροφές, όπου οι αποικίες μπορεί να επηρεάζονται λόγω της επιτάχυνσης των κύκλων εκτροφής και πάνω απ' όλα από τη συχνή χρήση αντιβιοτικών. Για τη χορήγηση της καλλιέργειας *Lactobacillus* σε ζώα, είναι απαραίτητη η ιδιαιτερότητα του ξενιστή έναντι των χρησιμοποιούμενων στελεχών και η ικανότητά τους να σχηματίζουν σταθερούς πληθυσμούς στο γαστρεντερικό σωλήνα (DENEV, et al., 2000).

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, οι λακτοβάκιλλοι αποικίζουν επιθηλιακές επιφάνειες αμέσως μετά τη γέννηση/εκκόλαψη. Μερικά στελέχη που αποικίζουν το γαστρεντερικό σωλήνα των ζώων εμφανίζουν μια ιδιαίτερα στενή σχέση με τους ξενιστές τους. Η περιογή του

ανθρώπινου λεπτού εντέρου αποικίζεται από λακτοβάκιλλους σε πληθυσμιακά επίπεδα ($<10^8/g$) σε σύγκριση με τη χλωρίδα του παχέος εντέρου ($10^{10}/g$) όπου τα bifidobacteria είναι κυρίαρχα μέλη ($10^9/g$). Ιστός που σχετίζεται με λακτοβάκιλλους έχει επίσης βρεθεί και στη γαστρεντερική επιφάνεια πολλών ζωικών ειδών μιας και οι λακτοβάκιλλοι έχουν την ικανότητα να προσκολλώνται και να πολλαπλασιάζονται πάνω στα στρωματοποιημένα πλακώδη επιθηλιακά κύτταρα του εγγύς (δωδεκαδάκτυλος) λεπτού εντέρου σε ζώα όπως είναι τα τρωκτικά, οι χοίροι και τα πουλερικά. Για παράδειγμα, στα ποντίκια, οι λακτοβάκιλλοι κατοικούν στην εσωτερική επιφάνεια του ιστού του οισοφάγου και του προ-στόμαχου. Στους αρουραίους, αποικίζουν τον προ-στόμαχο. Στα πτηνά, κατοικούν στην επιθηλιακή επιφάνεια. Στους χοίρους, αποικίζουν την επιθηλιακή επιφάνεια του οισοφάγου και τα οισοφάγια. Όπως αναφέρθηκε πιο πάνω οι λακτοβάκιλλοι επιτυγχάνουν υψηλά επίπεδα πληθυσμού στην επιθηλιακή επιφάνεια (της τάξης των 10^8 βακτηρίων/γραμμάριο δείγματος) και ένα στρώμα λακτοβάκιλλου μερικές φορές πάχους αρκετών κυττάρων, υπάρχει στην επιφάνεια του ιστού σε όλη τη διάρκεια ζωής του ξενιστή. Τέλος, οι λακτοβάκιλλοι μπορούν να απομακρύνονται από την αποικισμένη επιφάνεια και να ανιχνεύονται σε όλη την υπόλοιπη πεπτική οδό του ζώου (DENEV, et al., 2000).

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, υπάρχουν αρκετές ενδείξεις ότι η ικανότητα αποικισμού των λακτοβάκιλλων είναι ιδιαίτερη για κάθε ξενιστή. Η εξειδίκευση του ξενιστή με σχετιζόμενα στελέχη έχει αποδειχθεί και σε *in vivo* και *in vitro* πειράματα. Δυο στελέχη *L. acidophilus* χρησιμοποιήθηκαν ως συμπλήρωμα διατροφής για νεαρούς μόσχους και διαπιστώθηκε ότι το στέλεχος *L. acidophilus* που προήλθε από μόσχους ήταν αποτελεσματικότερο ως συμπλήρωμα διατροφής των μοσχαριών σε σύγκριση με το στέλεχος ανθρώπινης προέλευσης. Επομένως, αυτό δείχνει ότι ένα στέλεχος λακτοβάκιλλου που απομονώθηκε από την γηγενή μικροχλωρίδα ενός ζωικού είδους δεν θα αποικίσει απαραίτητα άλλα ζωικά είδη. Εκτός από την εξειδίκευση των ζωικών ειδών για προσκόλληση, μπορεί να αναγνωριστεί επίσης η εξειδίκευση που έχει το στέλεχος εντός των βακτηριακών ειδών. Σύμφωνα με μια έρευνα, ο βαθμός προσκόλλησης στα πλακώδη επιθηλιακά κύτταρα του στομάχου των χοίρων ήταν διαφορετικός για διάφορα στελέχη εντός των ίδιων ειδών *lactobacillus* ενώ σύμφωνα με μια άλλη έρευνα, οι λακτοβάκιλλοι από το καλλιεργημένο γάλα και τυρί δεν προσκολλήθηκαν *in vitro* σε επιθηλιακά κύτταρα χοίρων και μόσχων. Επομένως, φαίνεται ότι πολλά στελέχη λακτοβάκιλλων δεν συνδέονται με επιθηλιακές επιφάνειες και πολλά ζωικά είδη δεν αποδεικνύουν το φαινόμενο του επιθηλιακού αποικισμού από μικρόβια (DENEV, et al., 2000).

1.3.3 Λειτουργίες των λακτοβάκιλλων στο γαστρεντερικό σωλήνα του ανθρώπου

Έλεγχος ανάπτυξης ανεπιθύμητων μικροοργανισμών στο έντερο: Οι λακτοβάκιλλοι καταναλώνονται από τους ανθρώπους και δίνονται στα ζώα εμπορικής αξίας στην προσπάθεια για τον έλεγχο ποικίλων ασθενειών και της διατήρησης μιας ισορροπημένης μικροχλωρίδας με μείωση των πιθανών παθογόνων παραγόντων που παραμένουν στο έντερο. Καταστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των παθογόνων και σηπτικών βακτηρίων που προκαλούν εντερίτιδα, διάρροια και πεπτικές διαταραχές και συμβάλλουν στη διατήρηση της υγείας. Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο οι λακτοβάκιλλοι μπορεί να αναστέλλουν τα εντερικά παθογόνα δεν είναι σαφής. Ανταγωνιστικοί παράγοντες που μπορεί να συμβάλουν στον αποκισμό και στη συνεχή παρουσία λακτοβάκιλλων στο πεπτικό σύστημα των ζώων είναι η παρουσία ειδικών αντιμικροβιακών ενώσεων. Αυτές περιλαμβάνουν βακτηριοσίνες και ευρείας εμβέλειας αντιβιοτικές ουσίες, οργανικά οξέα όπως γαλακτικό οξύ, οξικό οξύ και υπεροξειδίο του υδρογόνου (DENEV, et al., 2000).

Βακτηριοσίνες και ουσίες που μοιάζουν με βακτηριοσίνη: Οι βακτηριοσίνες, είναι πρωτεϊνούχες ενώσεις που παράγονται από βακτήρια που έχουν βακτηριοκτόνο δράση έναντι στενών συγγενικών ειδών. Οι βακτηριοσίνες και οι ενώσεις που μοιάζουν με βακτηριοσίνη διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της σύνθεσης της γηγενούς μικροχλωρίδας και στη ρύθμιση της δυναμικής του πληθυσμού σε διάφορα βακτηριακά οικοσυστήματα. Οι βακτηριοσίνες συνήθως δρουν μόνο ενάντια των οργανισμών που συνδέονται στενά με τους οργανισμούς παραγωγής επομένως, ο ρόλος τους στην αναστολή των εντερικών παθογόνων μπορεί να είναι περιορισμένος. Οι βακτηριοσίνες των Gram⁺ βακτηρίων διαθέτουν συνήθως ένα ευρύτερο ανασταλτικό φάσμα και είναι επίσης ενεργές έναντι άλλων Gram⁺ ειδών. Ωστόσο, μπορεί να είναι πολύ σημαντικές στην ενεργοποίηση ενός επιλεγμένου στελέχους του *Lactobacillus* σε ανταγωνισμό με άλλα LAB στο έντερο. Βακτηριοσίνες, όπως η acidolin, η acidophilin, και η reuteriin έχουν αναφερθεί ότι διαθέτουν πολύ ευρύτερο ανασταλτικό φάσμα και σίγουρα οι συγκεκριμένοι τύποι βακτηριοσινών μπορεί να είναι πολύ αποτελεσματικές για τον έλεγχο της ανάπτυξης των εντερικών παθογόνων (DENEV, et al., 2000).

Άλλες ανταγωνιστικές ενώσεις: Αρκετά υποπροϊόντα του μεταβολισμού των LAB είναι ικανά για ανταγωνισμό *in vitro* και *in vivo*. Οι πιο γνωστές από αυτές τις ενώσεις είναι γαλακτικά και οξικά οξέα, υπεροξειδίο του υδρογόνου και διακετύλιο.

Οργανικά οξέα όπως το γαλακτικό και το οξικό είναι υπεύθυνα για σημαντικές μεταβολές του pH του εντέρου και για τον ανταγωνισμό πολλών μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένων παθογόνων Gram⁻ οργανισμών. Χαμηλότερες τιμές pH ισχυροποιούν τη δραστηριότητα αυτών των οξέων. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να αποδοθεί στην ικανότητα των συγκεκριμένων οξέων να διεισδύουν στο βακτηριακό κύτταρο. Επιπλέον, τα πτητικά οξέα είναι ιδιαίτερα αντιμικροβιακά και βοηθούν στη διατήρηση των λακτοβάκιλλων στο έντερο (DENEV, et al., 2000).

Το υπεροξειδίο του υδρογόνου έχει αντιμικροβιακή δράση. Αυτή η ένωση είναι κυτταροτοξική λόγω της ικανότητάς της να παράγει αντιδραστικές κυτταροτοξικές ρίζες που είναι έντονα οξειδωτικές. Οι λακτοβάκιλλοι παράγουν συνήθως υπεροξειδίο του υδρογόνου από άμεση μείωση του οξυγόνου. Εκτός από την παραγωγή ριζών υδροξυλίου, οι *in vivo* βακτηριοκτόνες δράσεις του υπεροξειδίου του υδρογόνου μπορεί να σχετίζονται με την ενεργοποίηση ενός συστήματος υπεροξειδάσης-υπεροξειδίου του υδρογόνου και συνήθως αναφέρεται ως σύστημα γαλακτουπεροξειδάσης. Ένα καλά μελετημένο σύστημα λακτουπεροξειδάσης παρουσιάζεται στο γάλα, όπου η βακτηριοκτόνος δράση κατά των εντερικών Gram⁻ βακτηρίων σχετίζεται με θειοκυανικά. Αυτός ο μηχανισμός μπορεί επίσης να εμφανιστεί στο έντερο (DENEV, et al., 2000).

Ανταγωνιστικός αποκλεισμός: Ο ανταγωνιστικός αποκλεισμός (Competitive Exclusion, CE) από τους λακτοβάκιλλους είναι ένας μηχανισμός σημαντικός για τον έλεγχο των εντερικών λοιμώξεων. Οι λακτοβάκιλλοι είναι ικανοί να καταλαμβάνουν συγκεκριμένες θέσεις στο εντερικό τοίχωμα, με αποτέλεσμα να αποτρέπεται η προσκόλληση και η ανάπτυξη των εντερικών παθογόνων. Ο *L.acidophilus* αυξάνει τον ανταγωνιστικό αποκλεισμό στο έντερο ενάντια σε επιβλαβείς μικροοργανισμούς όπως ο *S.typhimurium*, ο *Staphylococcus aureus* και το *E.coli*. Νεοσσοί που εμβολιάστηκαν με *L.acidophilus* παρουσίασαν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στην παθογόνο επίδραση του *E.coli* (DENEV, et al., 2000).

Εξουδετέρωση τοξινών και άλλων εντερικών αντιδράσεων: Έρευνες σε χοίρους έχουν δείξει ότι κάποια είδη λακτοβάκιλλων και κυρίως ο *L.bulgaricus* έχουν την ικανότητα να εξουδετερώνουν την επίδραση των εντεροτοξινών των κολοβακτηροειδών και πιο

συγκεκριμένα της εντεροτοξίνης του *E.coli*. Σε μια άλλη έρευνα οι λακτοβάκιλλοι μείωσαν τη δραστηριότητα των βακτηριακών ενζύμων των κοπράνων τα οποία εμπλέκονται στην προκαρκινογόνο ενεργοποίηση και τη μειωμένη απέκκριση των μεταλλαξιογόνων στα κόπρανα και τα ούρα (DENEV, et al., 2000).

Αντιμεταλλαξιογόνος δράση: Η μετάλλαξη των κυττάρων μπορεί να οδηγήσει σε καρκινογένεση. Υπάρχουν ενδείξεις ότι οι λακτοβάκιλλοι και γενικότερα τα LAB επηρεάζουν τη μεταλλαξιογένεση του εντερικού περιεχομένου και των επιπέδων των μικροβιακών ενζύμων στα κόπρανα. Κάποια στελέχη λακτοβάκιλλων μείωσαν τα επίπεδα του *E.coli* και τα μικροβιακά ένζυμα στα κόπρανα ασθενών που έπασχαν από καρκίνο του παχέος εντέρου. Γάλατα που έχουν υποστεί ζύμωση με *L.bulgaricus* και *S.thermophilus* φαίνεται να έχουν επίσης αντιμεταλλαξιογόνο δράση (DENEV, et al., 2000).

Υποχοληστερολαιμική δράση: Αρκετές έρευνες υποστηρίζουν ότι οι λακτοβάκιλλοι και κυρίως τα εντερικά στελέχη όπως ο *L.acidophilus* μπορούν να μειώσουν τα επίπεδα της χοληστερόλης στον ορό (DENEV, et al., 2000).

Αντικαρκινογόνος δράση: Η κατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων που έχουν υποστεί ζύμωση με λακτοβάκιλλους, φαίνεται να μειώνει το κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του παχέος εντέρου σε ζώα και ανθρώπους (DENEV, et al., 2000).

Ανοσολογικές επιδράσεις: Πειράματα έχουν δείξει ότι τα LAB και κυρίως οι λακτοβάκιλλοι θα μπορούσαν να έχουν ανοσοδιεγερτικά αποτελέσματα και να ενισχύσουν την αντίσταση του ξενιστή σε πειραματικές λοιμώξεις λόγω της ενεργοποίησης των μακροφάγων και της μη ειδικής ανοσίας από στοιχεία του κυτταρικού τοιχώματος των λακτοβάκιλλων. Ωστόσο, απαιτούνται περισσότερες μελέτες για τον προσδιορισμό των επιπτώσεων των λακτοβάκιλλων στο ξενιστή και της ικανότητάς τους να ενισχύσουν την ανοσολογική απόκριση (DENEV, et al., 2000).

2. ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΑ ΣΤΑ ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ

2.1 Ορισμός και είδη λειτουργικών τροφίμων

Τα λειτουργικά τρόφιμα είναι εκείνα που περιέχουν ορισμένα συστατικά που προάγουν την υγεία και υπερβαίνουν τα παραδοσιακά θρεπτικά συστατικά. Στην Ιαπωνία τη δεκαετία του 1980 χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά ο όρος «λειτουργικά τρόφιμα» προκειμένου να περιγράψει ένα τρόφιμο με υψηλές συγκεντρώσεις σε φυσικούς μεταβολίτες και με αναγνωρισμένα οφέλη για την ανθρώπινη υγεία (αντιμικροβιακές, αντικαρκινικές, αντιϊκές, αντικαρκινικές ιδιότητες κ.ά) (Τσάκης & Τσάκαλη, 2019). Ένας τρόπος με τον οποίο τα τρόφιμα μπορούν να τροποποιηθούν για να γίνουν λειτουργικά είναι με την προσθήκη προβιοτικών. Ένα προβιοτικό τρόφιμο είναι ένα επεξεργασμένο προϊόν που περιέχει βιώσιμους προβιοτικούς μικροοργανισμούς σε μια κατάλληλη μήτρα τροφίμου και σε επαρκή συγκέντρωση. Τα τρόφιμα που περιέχουν προβιοτικές καλλιέργειες είναι τα γαλακτοκομικά προϊόντα που έχουν υποστεί ζύμωση όπως τα γάλατα και τα γιαούρτια (Castro, et al., 2015).

Σύμφωνα με τη Συντονισμένη Δράση της Ευρωπαϊκής Επιτροπής για την επιστήμη των λειτουργικών τροφίμων το 1999, ένα διατροφικό προϊόν το οποίο ταυτόχρονα με τη βασική διατροφική αξία του έχει και ευεργετικά αποτελέσματα σε μία ή περισσότερες λειτουργίες του ανθρώπινου οργανισμού, είτε βελτιώνοντας τις γενικές και φυσικές συνθήκες ή και μειώνοντας τον κίνδυνο της εξέλιξης ασθενειών μόνο τότε μπορεί να χαρακτηριστεί ως λειτουργικό. Τα λειτουργικά τρόφιμα πιθανώς να έχουν μια ή και περισσότερες επωφελείς δράσεις, καταναλώνοντας όμως συνήθεις ποσότητες (Τσάκης & Τσάκαλη, 2019).

Για να χαρακτηριστεί ένα τρόφιμο ως λειτουργικό και να αναγραφτούν οι ευεργετικές του ιδιότητες στην ετικέτα ενός προϊόντος, πρέπει να έχει αποδειχθεί επιστημονικά. Τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του (οσμή, γεύση, υφή) δε διαφοροποιούνται σε σχέση με τα αντίστοιχα συμβατικά τρόφιμα, ωστόσο η θρεπτική του αξία μπορεί να είναι λίγο έως πολύ διαφορετική (Castro, et al., 2015). Η πρόσληψη των λειτουργικών τροφίμων πρέπει να γίνεται με το φαγητό και όχι με τη μορφή κάψουλας ή χαπιών. Υπό την ευρεία έννοια των λειτουργικών τροφίμων υπάρχουν αρκετά τρόφιμα τα οποία θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν ως λειτουργικά:

- Τρόφιμα ή συστατικά τα οποία σύμφωνα με ισχυρές επιστημονικές αποδείξεις έχουν άμεσο αντίκτυπο στην πρόληψη ασθενειών.
- Προϊόντα τα οποία εμπλουτίζονται με ένα ή περισσότερα συστατικά με εκτιμώμενες ισχυρές επιπτώσεις στην πρόληψη ή διατροφική θεραπεία μιας νόσου ή των κλινικών συμπτωμάτων της.
- Τρόφιμα που σχετίζονται με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης ορισμένων ασθενειών. Ωστόσο, ο συγκεκριμένος ισχυρισμός για να χρησιμοποιηθεί ευρέως σε εμπορικό επίπεδο, απαιτεί περισσότερες *in vitro*, *in vivo* επιδημιολογικές μελέτες, ενώ μέχρι τώρα τα κλινικά αποτελέσματα είναι περιορισμένα και μερικές φορές αμφισβητήσιμα.
- Τρόφιμα με μειωμένη περιεκτικότητα ή πλήρη απομάκρυνση συγκεκριμένων συστατικών που αποδεικνύονται βλαβερά. Αυτά τα τρόφιμα είναι γνωστά ως διατροφικά ή light προϊόντα.
- Τα συμπληρώματα διατροφής είναι συστατικά με βιολογικές ιδιότητες, τα οποία μπορούν να απομονωθούν από τη φυσική τους πηγή και να καταναλωθούν απευθείας ή μετά από προσθήκη τους σε άλλα τρόφιμα προκειμένου να τροποποιηθούν οι ιδιότητές τους με λειτουργικό τρόπο (Τσάκνης & Τσάκαλη, 2019).

Χαρακτηριστικά παραδείγματα λειτουργικών τροφίμων είναι οι φυτικές μαργαρίνες, γιαούρτι και αλειφόμενο τυρί με φυτικές στερόλες και στανόλες για τη μείωση χοληστερίνης, δημητριακά προϊόντα ενισχυμένα σε βιταμίνες, όπως είναι το φολικό οξύ, γαλακτοκομικά προϊόντα ενισχυμένα με προβιοτικές καλλιέργειες για την υγεία του γαστρεντερικού συστήματος (ONMED.GR, 2016).

Τρόφιμο	Παρεχόμενο όφελος
Γάλατα που έχουν υποστεί ζύμωση και γιαούρτια με προβιοτικές καλλιέργειες	Βελτώνουν τη λειτουργία του πεπτικού συστήματος.
Μαργαρίνη, γιαούρτι, αλειφόμενο τυρί, που περιέχουν φυτικές στερόλες / στανόλες	Οι φυτικές στερόλες και στανόλες μειώνουν τη χοληστερόλη και τον κίνδυνο για καρδιοπάθεια.
Αυγά πλούσια σε ωμέγα-3 λιπαρά οξέα	3 - 4 αυγά την εβδομάδα παρέχουν τη συνιστώμενη ποσότητα ω-3 λιπαρών οξέων για τη μείωση του κινδύνου καρδιοπάθειας.
Δημητριακά πρωινού εμπλουτισμένα με φυλλικό οξύ	Η προσθήκη φυλλικού οξέος πιθανώς να μειώνει τον κίνδυνο γέννησης βρεφών με προβλήματα του νευρικού σωλήνα (π.χ. δισχιδή ράχη).
Ψωμί, μπάρες από μούσλι εμπλουτισμένα με ισοφλαβόνες.	Η προσθήκη ισοφλαβονών μειώνει πιθανώς τον κίνδυνο εκδήλωσης καρκίνου του μαστού και του προστάτη, καρδιοπάθειας και οστεοπόρωσης.

Εικόνα 2.1.1 Λειτουργικά τρόφιμα και παρεχόμενα οφέλη στην ανθρώπινη υγεία (ONMED.GR, 2016).

Τα λειτουργικά τρόφιμα μπορεί να έχουν κάποιες ευεργετικές ιδιότητες για την υγεία, όμως σε καμία περίπτωση δεν πρέπει να θεωρούνται ως φαρμακευτικές ουσίες ή να τις αντικαθιστούν. Όλα τα τρόφιμα μπορούν να συμπεριληφθούν σε ένα σχήμα υγιεινής διατροφής και να κάνουν καλό στην υγεία, αρκεί να χρησιμοποιούνται σε συγκεκριμένες ποσότητες και σωστούς συνδυασμούς. Με λίγα λόγια η ισορροπία μεταξύ λειτουργικών και μη λειτουργικών τροφίμων είναι απαραίτητη.

2.2 Προβιοτικά

2.2.1 Γενικά

Σύμφωνα με την Υπηρεσία Τροφίμων και Γεωργίας του Οργανισμού των Ηνωμένων Εθνών (FAO) και τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO), προβιοτικά είναι «οι ζωντανοί μικροοργανισμοί οι οποίοι όταν χορηγούνται σε επαρκείς ποσότητες προσφέρουν οφέλη στην υγεία του ξενιστή» (FAO/WHO, 2001). Τα προβιοτικά βακτήρια έχουν ενσωματωθεί σε ένα ευρύ φάσμα τροφίμων, συμπεριλαμβανομένων των γαλακτοκομικών προϊόντων (όπως το γιαούρτι, το τυρί, το παγωτό, τα καλλιεργημένα γάλατα ή το παστεριωμένο μη ζυμωμένο γάλα). Ωστόσο, αν και τα γαλακτοκομικά προϊόντα αποτελούν την πιο κοινή πηγή προβιοτικών, υπάρχουν επίσης και μη γαλακτοκομικά προϊόντα (όπως η σοκολάτα, τα δημητριακά και οι χυμοί) τα οποία είναι εμπλουτισμένα με προβιοτικά (Castro, et al., 2015). Τα πιο συχνά προβιοτικά που έχουν διερευνηθεί και τα πιο εμπορικά διαθέσιμα προβιοτικά είναι κυρίως μικροοργανισμοί από είδη των γενών *Lactobacillus* και *Bifidobacterium*. Επιπλέον, πολλά άλλα όπως τα *Propionibacterium*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Enterococcus*, *Escherichia coli* και οι ζυμομύκητες έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί (Fernández, et al., 2015).

Η έννοια των προβιοτικών αναπτύχθηκε για πρώτη φορά το 1908 από τον Metchnikoff, ο οποίος παρατήρησε ότι οι αγρότες των Βαλκανικών χωρών που κατανάλωναν γαλακτοκομικά προϊόντα ζύμωσης παρέμεναν υγιείς και ζούσαν περισσότερο. Από τότε τα

προβιοτικά έχουν αποτελέσει αντικείμενο έρευνας λόγω της θετικής τους συμβολής στη διατήρηση της υγείας και στην αντιμετώπιση ποικίλων παθήσεων.

Η προσθήκη ορισμένων συστατικών τροφίμων στα τρόφιμα θα μπορούσε να βελτιώσει την επιβίωση των προβιοτικών, όπως είναι η περίπτωση των πρεβιοτικών. Αυτά μπορούν να οριστούν ως «ένα επιλεκτικά ζυμωμένο συστατικό που οδηγεί σε συγκεκριμένες αλλαγές στη σύνθεση και / ή τη δραστηριότητα του γαστρεντερικού μικροβιώματος, προσφέροντας έτσι οφέλη στην υγεία του ξενιστή». Τα περισσότερα πρεβιοτικά είναι σύνθετοι υδατάνθρακες φυτικής προέλευσης. Τα προβιοτικά έχουν χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με πρεβιοτικά (συμβιωτικά) για τη βελτίωση της βιωσιμότητάς τους. Τα πρεβιοτικά συχνά παγιδεύουν το μικροοργανισμό κατά τη διάρκεια της γαστρεντερικής διέλευσης, τον απελευθερώνουν στο έντερο και στη συνέχεια χρησιμεύουν ως ζυμώσιμο υπόστρωμα. Η μικροενθλάκωση των προβιοτικών σε διαφορετικά υλικά έχει χρησιμοποιηθεί για την ενίσχυση της βιωσιμότητάς τους (Peterson, et al., 2019).

Λόγω της συνεργικής τους δράσης, τα προβιοτικά συχνά συνδυάζονται με τα πρεβιοτικά και συλλογικά ονομάζονται συμβιωτικά. Τα συμβιωτικά ανήκουν στην κατηγορία των 'λειτουργικών' τροφίμων (functional foods). Ουσιαστικά, πρόκειται για τρόφιμα τα οποία περιέχουν ενεργά συστατικά (είτε φυσικά, είτε μετά από εμπλουτισμό) και επιδρούν ευεργετικά στην υγεία, μειώνοντας τον κίνδυνο εμφάνισης ασθενειών (Fernández, et al., 2015).

2.2.2 Χαρακτηριστικά των προβιοτικών

Τα προβιοτικά πρέπει να είναι σε θέση να επιβιώσουν στη γαστρεντερική οδό και να είναι ανθεκτικά στους γαστρικούς «χυμούς» και στη χολή. Θα πρέπει να ασκούν οφέλη στον ξενιστή μέσω της δραστηριότητάς τους στο ανθρώπινο σώμα. Προκειμένου να προσφέρουν οφέλη για την υγεία, πρέπει να είναι μη παθογόνοι και μη τοξικοί μικροοργανισμοί και να παρέχουν προστασία από παθογόνους μικροοργανισμούς μέσω πολλαπλών μηχανισμών. Επιπλέον, τα προβιοτικά δεν πρέπει να έχουν μεταβιβάσιμα γονίδια αντοχής σε μικροοργανισμούς (Fernández, et al., 2015). Οι περισσότερες τρέχουσες εθνικές νομοθεσίες θεσπίζουν ελάχιστες βιώσιμες ποσότητες 10^6 - 10^7 CFU / g ή CFU / ml προβιοτικών

καλλιιεργειών που υπάρχουν στα τρόφιμα λαμβάνοντας υπόψη την ημερήσια κατανάλωση που είναι 100 g ή 100 ml (Castro, et al., 2015).

2.2.3 Ευεργετική δράση των προβιοτικών

Διαφορετικά βακτηριακά στελέχη του ίδιου γένους και είδους μπορεί να ασκήσουν διαφορετικές επιδράσεις στο ξενιστή. Η πιο υποσχόμενη επίδραση των προβιοτικών στην ανθρώπινη υγεία σε μελέτες παρέμβασης στον άνθρωπο περιλαμβάνουν βελτίωση της οξείας διάρροιας στα παιδιά, μείωση του κινδύνου λοίμωξης του αναπνευστικού συστήματος, ανακούφιση των παιδιών από την αλλεργία / ατοπική δερματίτιδα που οφείλεται στο γάλα και ανακούφιση του συνδρόμου ευερέθιστου εντέρου. Τα προβιοτικά μπορούν να ασκήσουν τα ευεργετικά τους αποτελέσματα στην υγεία με ομαλοποίηση του μικροβιώματος του ξενιστή, με αναστολή των παθογόνων, μέσω αλληλεπίδρασης με το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή και μέσω της δικής τους μεταβολικής δραστηριότητας. Τα προβιοτικά μπορούν επίσης να ενισχύσουν την ανθεκτικότητα του μικροβιώματος έναντι επιβλαβών εξωτερικών παραγόντων. Ωστόσο, οι μοριακοί μηχανισμοί πίσω από τις επιδράσεις είναι σε μεγάλο βαθμό άγνωστοι (Fernández, et al., 2015). Η ευεργετική δράση των προβιοτικών σχετίζεται μεταξύ άλλων με την ικανότητά τους να αποικίζουν τον ξενιστή. Σε μια μελέτη εξετάστηκαν οι μηχανισμοί που είναι υπεύθυνοι για τον αποικισμό του ξενιστή από το *Bifidobacterium* και τους παράγοντες που εμπλέκονται. Δύο πειραματικά άρθρα που παρουσιάστηκαν, μελέτησαν τους μηχανισμούς αλληλεπίδρασης των προβιοτικών-ξενιστών. Σε ένα από αυτά, αναλύθηκε η ικανότητα ρύθμισης της ανοσολογικής απάντησης και της ινσουλίνης εξαρτώμενοι από την ομοιοστάση της γλυκόζης από δύο στελέχη *Bifidobacterium* που παράγουν εξωπολυσακχαρίτη σε α-μοντέλο αρουραίου Wistar. Από την άλλη μεριά μελετήθηκε σε ένα *in vitro* μοντέλο η τροποποίηση του προφίλ των ανοσοποιητικών μεσολαβητών και των πρωτεϊνών που συντίθεται από την εντερική κυτταρική γραμμή HT29 με την παρουσία ενός στελέχους *Bifidobacterium breve*, καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι η παρουσία των *Bifidobacterium* θα μπορούσε να ευνοήσει την έμφυτη ανοσοαπόκριση και ενίσχυση του φυσικού φραγμού του εντέρου (de los Reyes-Gavilán, et al., 2015).

Οι γαστρεντερικές και αναπνευστικές οδοί καλύπτονται από επιθηλιακές επιφάνειες του βλεννογόνου που εκτίθενται συνεχώς σε πολλούς μικροοργανισμούς και χρησιμεύουν ως

πύλες εισόδου για τους περισσότερους μολυσματικούς ιούς. Η προσκόλληση παθογόνων σε ένα κύτταρο ξενιστή είναι το πρώτο βήμα στη διαδικασία της νόσου και επομένως, η διακοπή αυτής της προσκόλλησης θα μπορούσε να είναι επωφελής για τον ξενιστή. Τα προβιοτικά βακτήρια μπορεί να προσδεθούν απευθείας στο παθογόνο και έτσι να αναστείλουν την προσκόλληση του παθογόνου στο αισθητήριο όργανο του κυττάρου του ξενιστή. Για παράδειγμα υπάρχουν ενδείξεις ότι *in vitro* συγκεκριμένα στελέχη λακτοβάκιλλων και bifidobacteria είναι ικανά να δεσμεύουν και να απενεργοποιούν το ροταϊό και τον ιό της φυσαλιδώδους στοματίτιδας. Επιπλέον, η προσκόλληση των προβιοτικών στην επιθηλιακή επιφάνεια μπορεί να αναστείλει τη σύνδεση παθογόνων σε συγκεκριμένους υποδοχείς υδατανθράκων. Τα αντιμικροβιακά πεπτίδια (defensins) μπορούν επίσης να προστατεύσουν τα επιθηλιακά κύτταρα από λοιμώξεις. Οι εντερτιναλλοκίνες μπορεί να δεσμεύουν παθογόνα μέσω συγκεκριμένης αλληλεπίδρασης βακτηριδίου / ιού και να αναστέλλουν την προσκόλλησή τους στα επιθηλιακά κύτταρα. Τα προβιοτικά μπορεί να προκαλέσουν αναγέννηση του βλεννογόνου αυξάνοντας το ρυθμό μίτωσης στο λεπτό έντερο. Μπορούν επίσης να προωθήσουν την εντερική επιθηλιακή ομοιοστάση μέσω διαλυτών πρωτεϊνών. Τα προβιοτικά δείχνουν να δρουν ενάντια στα παθογόνα με παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών όπως οργανικά οξέα, υπεροξειδίου του υδρογόνου, διακετύλιο, λιπαρά οξέα βραχείας αλυσίδας, επιφανειακά βιοδραστικά και βακτηριοσίνες. Είναι ευρέως γνωστό ότι η εντερική διαπερατότητα αυξάνεται στις γαστρεντερικές λοιμώξεις, καθώς προσκολλώνται τα παθογόνα στους κυτταρικούς υποδοχείς κάτω από τις σφιχτές συνδέσεις στη βασική πλευρική μεμβράνη, τροποποιώντας έτσι τις σφιχτές συνδέσεις και διαταράσσοντας το φραγμό. Ένας πιθανός μηχανισμός ευεργετικής δράσης των προβιοτικών είναι η ενίσχυση του φραγμού άμυνας του εντέρου με την ομαλοποίηση της διαπερατότητάς του (Fernández, et al., 2015).

Επίσης, τα προβιοτικά μπορούν να ασκήσουν θετική επίδραση στο έντερο του ανθρώπου με τους εξής τρόπους:

- Παραγωγή SCFA και γαλακτικού οξέος τα οποία αναστέλλουν την ανάπτυξη παθογόνων μικροβίων και έχουν αντιφλεγμονώδη δράση.
- Μειωμένη παραγωγή επιβλαβών ουσιών που συμβάλλουν στην εμφάνιση φλεγμονώδους νόσου του εντέρου (IBD).

2.2.4 Αλληλεπίδραση προβιοτικών και ανοσοποιητικού συστήματος

Μια βέλτιστη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος είναι σημαντική για τη συντήρηση της φυσιολογικής ακεραιότητας και υγείας. Το ανοσοποιητικό σύστημα παρέχει άμυνα κατά των λοιμώξεων που προκαλούνται από παθογόνους μικροοργανισμούς. Ρυθμίζει επίσης την υγεία και την ευεξία μας με πολλούς τρόπους μερικές φορές με την αύξηση ή τη μείωση της ρύθμισης του αμυντικού μας συστήματος. Ένα αποτελεσματικά λειτουργικό ανοσοποιητικό σύστημα είναι θεμελιώδες για την προστασία από μολυσματικές ασθένειες. Ένας πιθανός προβιοτικός μηχανισμός κατά των λοιμώξεων θα μπορούσε να είναι η διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος του εντέρου. Στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου, τα προβιοτικά μπορούν να αναγνωριστούν από tolllike (κατηγορία πρωτεϊνών) υποδοχείς. Τα προβιοτικά μπορούν επομένως, να διαμορφώσουν μοτίβα έκφρασης κυτοκίνης μέσω επιθηλιακών κυττάρων και / ή μέσω μακροφάγων και δενδριτικών κυττάρων. Πολλές πειραματικές μελέτες *in vitro* δείχνουν ότι ορισμένα στελέχη των προβιοτικών είναι σε θέση να παρέχουν προστασία κατά των λοιμώξεων διεγείροντας αντιικές, κυτοκίνη και χημειοκίνη αποκρίσεις σε γαστρεντερικά και αναπνευστικά επιθηλιακά κύτταρα ή ανοσοκύτταρα. Χορήγηση λακτοβάκιλλων σε ποντίκια έδειξε ότι μπορεί να επηρεάσει τις αναπνευστικές λοιμώξεις μειώνοντας τον τίτλο του ιού στους πνεύμονες και αυξάνοντας το ποσοστό επιβίωσης των ζώων μέσω της διέγερσης έμφυτων ανοσοαποκρίσεων (Fernández, et al., 2015).

2.2.5 Προβιοτικά και γαστρεντερικές διαταραχές

Ορισμένα ζυμούμενα γαλακτοκομικά προϊόντα περιέχουν βακτήρια γαλακτικού οξέος (LAB) και Bifidobacteria, μερικά από τα οποία έχουν χαρακτηριστεί ως προβιοτικά, τα οποία μπορούν να τροποποιήσουν το εντερικό μικροβίωμα και μπορεί να είναι ευεργετικά για την πρόληψη και ίσως για τη θεραπεία ως ένα βαθμό μέσω της βελτίωσης των κλινικών συμπτωμάτων, της φλεγμονώδους νόσου του εντέρου (Inflammatory Bowel Disease, IBD), του συνδρόμου ευερέθιστου εντέρου (Irritable Bowel Syndrome, IBS) και της χολαγγειίτιδας (Primary Sclerosing Cholangitis, PSC) (Saez-Lara, et al., 2015).

Η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου (IBD): περιλαμβάνει τη νόσο του Crohn (Crohn's Disease, CD) και την ελκώδη κολίτιδα (Ulcerative Colitis, UC), είναι μια χρόνια φλεγμονή του λεπτού και παχέος εντέρου που προκαλείται από μια μη ρυθμιζόμενη ανοσοαπόκριση στο εντερικό μικροβίωμα του ξενιστή. Στο (IBD) και άλλες ασθένειες, παρατηρείται μικροβιακή ανισορροπία, η οποία χαρακτηρίζεται από αύξηση των επιβλαβών μικροβίων (*E.coli*, *Cl.perfringens*) και μείωση των ωφέλιμων βακτηρίων (LAB και Bifidobacteria) (Saez-Lara, et al., 2015).

Η νόσος του Crohn (CD): είναι μια χρόνια φλεγμονώδης κατάσταση της γαστρεντερικής οδού, που οφείλεται σε μη φυσιολογικές αποκρίσεις των T-κυττάρων στο εντερικό μικροβίωμα. Πειραματικά και κλινικά δεδομένα προτείνουν ότι τα εντερικά βακτήρια, μπορεί να συμβάλλουν στη μετεγχειρητική επανεμφάνιση της CD. Κατά συνέπεια, ασθενείς που έχουν χειρουργηθεί, αποτελούν τη καλύτερη *in vivo* ευκαιρία, για αξιολόγηση της επιρροής των εντερικών (luminal) βακτηρίων στην εμφάνιση νέων αλλοιώσεων. Τυχαίες ελεγχόμενες δοκιμές με *L.rhamnosus* (LGG) και εικονικό φάρμακο τα οποία δόθηκαν σε ασθενείς αμέσως μετά την χειρουργική αφαίρεση τμήματος νοσούντος εντέρου. Η βασική ιδέα της μελέτης ήταν ότι η εξισορρόπηση του επιβλαβούς μικροβιώματος του εντέρου (μια πιθανή αιτία επανεμφάνισης βλαβών στη CD), με ένα ωφέλιμο βακτήριο, θα απέτρεπε την εμφάνιση νέων αλλοιώσεων ή θα μείωνε τη σοβαρότητά τους. Δεν παρατηρήθηκε όμως καμία διαφορά στη κλινική και ενδοσκοπική ύφεση μεταξύ των δυο ομάδων. Ομοίως, σε κάποιες άλλες τυχαίες ελεγχόμενες δοκιμές χορηγήθηκε LGG και εικονικό φάρμακο σε παιδιά αυτή τη φορά, για να δουν αν η προσθήκη LGG σε μια τυπική θεραπεία μπορεί να προκαλέσει ύφεση στα παιδιά που έπασχαν από CD. Όμως, πάλι δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δυο ομάδων. Οι ερευνητές σε μια άλλη μελέτη, χορήγησαν σε τυχαίες ομάδες εικονικό φάρμακο και *L.johnsonii* (LA1), τα αποτελέσματα ωστόσο δεν διέφεραν αρκετά, άρα δεν υπήρχε επαρκές συμπέρασμα αν ο (LA1) μπορεί να εμποδίσει την εμφάνιση της CD. Τέλος, έχει αξιολογηθεί και η *per' os* χορήγηση LA1 στην πρόωμη μετεγχειρητική ενδοσκοπική υποτροπή του CD. Ωστόσο, οι παραπάνω μελέτες δείχνουν ότι η χρήση μεμονωμένων LAB δεν προάγει κλινικές βελτιώσεις σε ασθενείς με CD (Saez-Lara, et al., 2015).

Η ελκώδης κολίτιδα (UC): είναι μια μη ειδική φλεγμονώδης κατάσταση του παχέος εντέρου η οποία χαρακτηρίζεται από φλεγμονή του βλεννογόνου, διάβρωση και έλκος. Πολλές μελέτες έχουν παρατηρήσει την επίδραση των εντερικών βακτηρίων στην ανάπτυξη ή την επιδείνωση της UC. Μελέτες έδειξαν ότι στα κόπρανα των ασθενών βρέθηκε μικρό ποσοστό

Bifidobacterium σε αντίθεση με τα υγιή άτομα. Ρύθμιση του εντερικού μικροβιώματος μπορεί να γίνει είτε με τη χρήση αντιμικροβιακών είτε με τη χρήση προβιοτικών. Η πρώτη κατηγορία δεν υποστηρίζεται διότι υπάρχει φόβος για μικροβιακή ανθεκτικότητα, παρενέργειες και οικολογικές ανησυχίες. Η τροποποίηση του μικροβιώματος με τη χρήση προστατευτικών βακτηρίων θα μπορούσε να παίξει προστατευτικό ρόλο στη φλεγμονώδη διαδικασία. Συμπλήρωμα γάλακτος υπό ζύμωση με bifidobacteria (BFM) φαίνεται ότι μπορεί να μειώσει τις παροξύνσεις του (UC) μέσω της κανονικοποίησης του εντερικού μικροβιώματος (Saez-Lara, et al., 2015).

Το συγκεκριμένο συμπλήρωμα μειώνει τη συγκέντρωση του φωσφορικού και βουτυρικού άλατος, ένα βασικό μόριο στην ελάττωση της ελκώδους κολίτιδας. Αυτή η μείωση αντιπροσωπεύει την αυξημένη πρόσληψη ή οξείδωση των SCFAs από τον βελτιωμένο βλεννογόνο του παχέος εντέρου. Σύμφωνα με μια μελέτη, στα κόπρανα ασθενών που έπασχαν από UC, βρέθηκαν αυξημένα επίπεδα βουτυρικού, προπιονικού οξέος και SCFA. Σε αυτήν τη μελέτη οι ασθενείς που έλαβαν συμπλήρωμα έδειξαν ένα σημαντικά χαμηλό κλινικό δείκτη δραστηριότητας από ότι η ομάδα με το εικονικό φάρμακο. Επίσης ο ενδοσκοπικός και ο ιστολογικός δείκτης ήταν μειωμένος στην ομάδα με το συμπλήρωμα (BDM). Ακόμη, έχει μελετηθεί η αποτελεσματικότητα των συμπληρωμάτων προβιοτικού *L.rhamnosus* (LGG) έναντι της μεσαλαζίνης (χρησιμοποιείται για τη θεραπεία εντερικών ασθενειών) για τη διατήρηση της ύφεσης της νόσου σε ασθενείς με UC. Τα αποτελέσματα ήταν ενθαρρυντικά. Σε μια άλλη μελέτη, χορήγηση per' os του Lacteol ενός άλλου προβιοτικού σκευάσματος που περιέχει *L.delbrueckii* και *L.fermentum* μαζί με σουλφασαλαζίνη σε ασθενείς με UC με χρόνια δοιάρροια, ανέστειλε την έκταση της φλεγμονής, απέτρεψε τη βλάβη του βλεννογόνου και ανακούφισε απ' την UC. Σε άλλες τυχαίες ελεγχόμενες κλινικές δοκιμές αποδείχθηκε ότι η χορήγηση ενός συμβιωτικού *B.longum plus Surgery1* σε ασθενείς με UC, βελτίωσε την πλήρη κλινική εμφάνιση χρόνιας φλεγμονής. Ακόμη, οι προφλεγμονώδεις κυτοκίνες TNF-1 και IL-1 μειώθηκαν μετά τη θεραπεία και τα Bifidobacteria αυξήθηκαν 42 φορές στην ομάδα των συμβιωτικών. Συμπερασματικά, οι παραπάνω μελέτες δείχνουν ότι η χρήση προβιοτικών και συμβιωτικών έχει θετική επίδραση στην θεραπεία και στη συντήρηση των περιόδων ύφεσης της UC (Saez-Lara, et al., 2015).

Σύνδρομο ευερέθιστου εντέρου (IBS): είναι λειτουργική διαταραχή η οποία χαρακτηρίζεται από χρόνια κοιλιακό άλγος, δυσφορία, φούσκωμα, διάρροια ή και δυσκοιλιότητα. Κατά τη διάρκεια μιας δοκιμής, LAB και *Bifidobacterium* χορηγήθηκαν σε ασθενείς με IBS.

Παρατηρήθηκε αύξηση του γαλακτικού οξέος που μπορεί να παράγεται από εντερικά βακτήρια κατά τη ζύμωση που κάνουν εξαιτίας αυξημένων πληθυσμών εντερικών LAB μετά από την προβιοτική χορήγηση. Σε μια άλλη έρευνα, οι επιστήμονες επιβεβαίωσαν ότι η χορήγηση συμβιωτικού παράγοντα (ολιγοσακχαρίτες και στελέχη *Bifidobacterium longum* W11) σε ασθενείς με IBS οι οποίοι είχαν δυσκοιλιότητα, βελτίωσε την εντερική λειτουργία και τις κλινικές εκδηλώσεις της νόσου. Οι δυο μελέτες αυτές υποδηλώνουν ότι ο συνδυασμός προβιοτικών και συμβιωτικών, μπορούν να ασκήσουν ευεργετικά αποτελέσματα στα συμπτώματα του IBS, ωστόσο, απαιτούνται περισσότερες μελέτες (Saez-Lara, et al., 2015)

Χολαγγειίτιδα: είναι η βακτηριακή λοίμωξη του χολικού πόρου, η οποία προκαλείται όταν ο αγωγός είναι μπλοκαρισμένος από χολόλιθους ή όγκο. Η μόλυνση μπορεί να επεκταθεί στο ήπαρ. Σε μια δοκιμή, συνδυασμός ανοσοκατασταλτικής θεραπείας και του προβιοτικού *L. Casei shirota* παρείχε οφέλη τόσο για τη IBD όσο και για τη PSC. Αυτή η καταστολή της φλεγμονής του εντέρου και της συντήρησης της βακτηριακής ομοιόστασης, ίσως είναι σημαντική για τη θεραπεία της χολαγγειίτιδας και άλλων ασθενειών στις οποίες, η σχέση του εντερικού μικροβιώματος και του ξενιστή είναι στενή. Περεταίρω μελέτες απαιτούνται για τον προσδιορισμό των επιδράσεων των προβιοτικών ως συμπληρωματική θεραπεία γι' αυτές τις φλεγμονώδεις καταστάσεις του εντέρου (Saez-Lara, et al., 2015).

2.2.6 Αύξηση της βιωσιμότητας και λειτουργικότητας των προβιοτικών στα ζυμούμενα γαλακτοκομικά προϊόντα και το γαστρεντερικό σωλήνα

Τα προβιοτικά συνήθως προστίθενται ως συμπληρωματικές καλλιέργειες στα ζυμούμενα γαλακτοκομικά προϊόντα. Ως λειτουργικό τρόφιμο, η βιωσιμότητά τους στα τρόφιμα πρέπει να διασφαλίζει την ελάχιστη ημερήσια δόση η οποία είναι ικανή να παρέχει οφέλη στην ανθρώπινη υγεία. Τα προβιοτικά συχνά δείχνουν κακή επιβίωση στην τροφική μήτρα, λόγω παραγόντων όπως το χαμηλό pH, η περιεκτικότητα σε οξυγόνο, η θερμοκρασία και η παρουσία άλλων μικροοργανισμών. Επιπλέον, τα προβιοτικά πρέπει να παραμείνουν βιώσιμα σε επαρκή επίπεδα μέσω της γαστρεντερικής διέλευσης για να φτάσουν ζωντανά στον τόπο δράσης, δηλαδή στο έντερο. Στη διάρκεια της πέψης, πρέπει να αντιμετωπίσουν διαφορετικά φυσιολογικά εμπόδια, συμπεριλαμβανομένων των πεπτικών ενζύμων, του

όξινου pH του στομάχου, των χολικών αλάτων στο έντερο και στη συνέχεια να ανταγωνίζονται με τα μέλη του εντερικού μικροβιώματος που κατοικούν εκεί. Επιπλέον, όχι μόνο η βιωσιμότητα αλλά και η διατήρηση της μεταβολικής δραστηριότητας και οι ευεργετικές ιδιότητες των στελεχών είναι σημαντικές (Fernández, et al., 2015).

Ορισμένες στρατηγικές στοχεύουν στο προϊόν διατροφής και / ή στη σύνθεση των εκκινητών καλλιεργειών που έχουν χρησιμοποιηθεί για να βελτιώσουν τη βιωσιμότητα των μικροοργανισμών σε γαλακτοκομικά προϊόντα που έχουν υποστεί ζύμωση. Η επιλογή και ο συνδυασμός κατάλληλων στελεχών LAB, ο έλεγχος του τελικού pH, ή η προσθήκη σαρωτών οξυγόνου είναι μερικά παραδείγματα (Fernández, et al., 2015).

Άλλες στρατηγικές που επηρεάζουν τον ίδιο τον μικροοργανισμό, είναι χρήσιμες για την αύξηση της επιβίωσης στη μήτρα τροφίμων και κατά τη διάρκεια της γαστρεντερικής διέλευσης. Για παράδειγμα, η επιλογή της παραγωγής εξωπολυσακχαριτών (EPS) προβιοτικών θα μπορούσε να είναι ο κατάλληλος τρόπος για να ληφθούν στελέχη με επαρκή βιωσιμότητα, καθώς αυτά τα πολυμερή μπορούν να δράσουν ως προστατές των βακτηρίων που παράγονται, συμβάλλοντας στη βιωσιμότητά τους. Ανθεκτικά παράγωγα σε τεχνολογικές ή φυσιολογικές καταστάσεις είναι εύκολο να ληφθούν με την έκθεση του προβιοτικού σε θανατηφόρους παράγοντες καταπόνησης (κατάψυξη, θερμότητα, ξήρανση, οξυγόνο, οξύ, χολή, NaCl, κ.λπ.). Συνήθως, οι ανθεκτικοί μικροοργανισμοί παρουσιάζουν ένα σταθερό φαινότυπο με μεγαλύτερη βιωσιμότητα, αλλά συχνά αναπτύσσουν διασταυρούμενες αντιστάσεις σε άλλες στρεσοτικές καταστάσεις. Η προσαρμογή στο στρες μπορεί επίσης να επηρεάσει τα φυσιολογικά χαρακτηριστικά των μικροοργανισμών που θα μπορούσαν επομένως να επηρεάσουν τεχνολογικές και αισθητηριακές πτυχές καθώς και ιδιότητες που σχετίζονται με τα προβιοτικά. Η τροποποίηση γονιδίων είναι ένας άλλος τρόπος αύξησης της ανοχής στο στρες. Ωστόσο, η χρήση τέτοιων γενετικά τροποποιημένων μικροοργανισμών περιορίζονται από την τρέχουσα ρύθμιση σε αρκετές χώρες. Τέλος, η προσθήκη ορισμένων συστατικών τροφίμων όπως είναι τα πρεβιοτικά, θα μπορούσε να βελτιώσει τη βιωσιμότητα των προβιοτικών (Fernández, et al., 2015).

3. ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΣ ΚΟΣΜΟΣ ΣΤΑ ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΚΑΙ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΥΓΕΙΑ

Τα γαλακτοκομικά προϊόντα που έχουν υποστεί ζύμωση είναι βασική ομάδα τροφίμων για πολλές κουλτούρες σε όλο το κόσμο. Η ζύμωση του γάλακτος ξεκίνησε ως μέσο διατήρησης των τροφίμων με μετατροπή των υδατανθράκων, ιδιαίτερα της λακτόζης, σε γαλακτικό οξύ, το οποίο αποτρέπει την ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών που σχετίζονται με την καταστροφή του προϊόντος και την εμφάνιση νόσου.

3.1 Γαλακτική ζύμωση

Ζύμωση ονομάζεται το «χημικό φαινόμενο κατά το οποίο πολυσύνθετες οργανικές ενώσεις, όπως οι πρωτεΐνες, οι υδατάνθρακες και τα λίπη, διασπώνται σε άλλες απλούστερες με τη βοήθεια ενζύμων. Τα ένζυμα είναι ουσίες που εκκρίνονται από μικροοργανισμούς (μύκητες) ή ορισμένους αδένες του σώματος των θηλαστικών. Κάθε ένζυμο έχει την ικανότητα να διασπά μία μόνο οργανική ουσία. Για το λόγο αυτό, υπάρχουν πολλά είδη ζυμώσεων, τα οποία παίρνουν το όνομά τους είτε από το προϊόν που σχηματίζεται είτε από το μικροοργανισμό που προκαλεί τη ζύμωση» (Γκακνή, 2016). Υπάρχουν οι εξής βασικές κατηγορίες ζυμώσεων στα τρόφιμα:

- Αλκοολική ζύμωση
- Ζύμωση του άρτου
- Γαλακτική ζύμωση
- Οξική ζύμωση (Γκακνή, 2016)

Τα περισσότερα ζυμούμενα γαλακτοκομικά προϊόντα παράγονται από ωφέλιμες ζυμώσεις λόγω της δράσης των LAB. Έτσι, παράγονται ουσίες οι οποίες προσδίδουν ιδιαίτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Οι κυριότερες ωφέλιμες ζυμώσεις του γάλακτος είναι η γαλακτική ζύμωση, η προπιονική, η αλκοολική και οι ζυμώσεις παραγωγής διακετυλίου, ακετόνης (Μάντης, κ.ά, 2015,2018).

Όσον αφορά τη **γαλακτική ζύμωση**, σε αυτή την περίπτωση, τα σάκχαρα όπως η γλυκόζη, που περιέχονται στο γάλα μετατρέπονται σε γαλακτικό οξύ [$\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}$]. Η γαλακτική ζύμωση μπορεί να παράγει μεγάλη ποικιλία προϊόντων συμπεριλαμβανομένων του γιαουρτιού και των τυροκομικών. Τα διαφορετικά είδη προϊόντων εξαρτώνται από τη σύνθεση του γάλακτος (πλήρες ή αποβουτυρωμένο, αγελαδινό ή πρόβειο κτλ.), το είδος των μικροοργανισμών, τις συνθήκες ζύμωσης και τα πρόσθετα που χρησιμοποιούνται. Η γαλακτική ζύμωση, διακρίνεται σε δύο κατηγορίες, την ομοιοζυμωτική και την ετεροζυμωτική (Kouris, 2019).

Ομοιοζυμωτική: 1 γραμμομόριο (mol) λακτόζης αντιστοιχεί σε 4 mol γαλακτικού οξέος υπό ζύμωση και σχηματίζονται 4 μόρια ATP. Το μεγαλύτερο ποσοστό της λακτόζης (85%-95%) ζυμώνεται σε γαλακτικό οξύ. Το υπόλοιπο 5%-15% μετατρέπεται σε άλλα προϊόντα όπως το CO_2 και το βουτυρικό οξύ. Περιλαμβάνει ένα μόνο βήμα στο οποίο το πυρουβικό οξύ ανάγεται σε γαλακτικό οξύ. Τα βακτήρια που συμμετέχουν στην αντίδραση ανήκουν στα γένη *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus* και κάποια είδη του γένους *Lactobacillus* (Kouris, 2019).

Ετεροζυμωτική: Ο μεταβολισμός της λακτόζης αποδίδει μόνο 2 mol γαλακτικού οξέος. Εκτός από γαλακτικό οξύ παράγεται αιθανόλη, οξικό οξύ και CO_2 . Οι αερόβιες συνθήκες συμβάλλουν στον σχηματισμό οξικού οξέος. Στα ετεροζυμωτικά LAB ανήκουν είδη του γένους *Leuconostoc* και κάποια είδη του γένους *Lactobacillus* (Kouris, 2019).

3.2 Ορισμός και ρόλος των οξυγαλακτικών βακτηρίων (LAB)

Τα γαλακτοκομικά προϊόντα που έχουν υποστεί ζύμωση αποτελούν σημαντικό μέρος της διατροφής μας και περιέχουν διάφορα είδη μικροοργανισμών μεταξύ των οποίων είναι και τα οξυγαλακτικά βακτήρια τα οποία χωρίζονται σε δυο υποκατηγορίες: στα οξυγαλακτικά βακτήρια εκκινητές (Starter Lactic Acid Bacteria, SLAB) και στα οξυγαλακτικά βακτήρια μη εκκινητές (Non Starter Lactic Acid Bacteria, NSLSB).

Οξυγαλακτικά βακτήρια εκκινητές (Lactic Acid Bacteria, LAB): είναι οι κύριοι μικροοργανισμοί που προκαλούν ωφέλιμες ζυμώσεις στα τρόφιμα και για αυτό ονομάζονται εκκινητές (starters). Είναι οι κύριοι παράγοντες κατά τη ζύμωση του γάλακτος, μετατρέποντας τη λακτόζη σε γαλακτικό οξύ με ή χωρίς αέριο με αποτέλεσμα την αύξηση

της οξύτητας. Αν ζυμώνουν τη λακτόζη και παράγεται σχεδόν μόνο γαλακτικό οξύ (>85%), ονομάζονται ομοιοζυμωτικά ενώ, όταν εκτός από γαλακτικό οξύ παράγεται αιθανόλη και CO₂ ονομάζονται ετεροζυμωτικά (Μάντης, κ.ά., 2015,2018).

Τα LAB τα οποία εμπλέκονται στη διαδικασία ζύμωσης των γαλακτοκομικών προϊόντων ανήκουν σε 14 διαφορετικά γένη που χαρακτηρίζονται από διαφορετικές διατροφικές, μεταβολικές απαιτήσεις και απαιτήσεις καλλιέργειας καθώς και διαφορετικές τεχνολογικές ιδιότητες. Τα πιο συνηθισμένα LAB που υπάρχουν στο γάλα περιλαμβάνουν είδη που ανήκουν στο γένος *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Lactococcus* και *Pediococcus* (Fernández, et al., 2015).

Τα βακτήρια γαλακτικού οξέος (LAB) είναι μία ομάδα Gram+ βακτηρίων, με χαμηλή περιεκτικότητα σε γουανίνη και κυτοσίνη, είναι οξεάντοχα και αναερόβια. Κάποια από αυτά είναι μεσόφιλα, δηλαδή αναπτύσσονται καλύτερα σε θερμοκρασίες 20-30°C, ενώ κάποια άλλα είναι θεرمόφιλά και αναπτύσσονται καλύτερα σε θερμοκρασίες 35-45°C. Επιπλέον, τα LAB εμφανίζουν διαφορετική ανθεκτικότητα στο αλάτι, δηλαδή, μερικά είδη επηρεάζονται από μικρές περιεκτικότητες της τάξης 1% κατά βάρος ενώ κάποια άλλα είναι αλατοάντοχα και μπορούν να αναπτυχθούν σε περιεκτικότητες πάνω της 6% του βάρους (Kouris, 2019).

Οξυγαλακτικά βακτήρια μη εκκινητές (No Lactic Acid Bacteria, NLAB): τα συγκεκριμένα οξυγαλακτικά βακτήρια βρίσκονται «φυσιολογικά στο γάλα», μιας και αποτελούν μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του μαστού των ζώων. Ονομάζονται και «αυτόχθονα» (autochthonous) (Μάντης, κ.ά., 2015,2018).

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια μέσω των ενώσεων που παράγουν κατά τη ζύμωση των προϊόντων, συμβάλουν στη αύξηση της διάρκειας ζωής του προϊόντος και στην διαμόρφωση ιδιαίτερων οργανοληπτικών χαρακτηριστικών.

3.3 Γένη και είδη μικροοργανισμών και η χρήση τους στα γαλακτοκομικά προϊόντα

Τα κυριότερα είδη οξυγαλακτικών βακτηρίων (LAB) που χρησιμοποιούνται στην παρασκευή ζυμούμενων γαλακτοκομικών προϊόντων ανήκουν στα παρακάτω γένη:

Streptococcus: Αν και πολλά στρεπτόκοκκα είδη είναι παθογόνα, ο *Streptococcus thermophilus* φέρει κατάσταση "GRAS" (General Recognized as Safe) δηλαδή, έχει αναγνωριστεί ως ασφαλής για τη χρήση του βιομηχανία τροφίμων σύμφωνα με τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA). Ο *S. thermophilus* είναι ένα θερμόφιλο LAB, το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως ως καλλιέργεια εκκίνησης στην παρασκευή γαλακτοκομικών προϊόντων, ιδίως στην παραγωγή γιαουρτιού, και θεωρείται ως ο δεύτερος σημαντικότερος βιομηχανικός γαλακτοκομικός εκκινητής μετά το *L. lactis* (Fernández, et al., 2015).

Enterococcus: Οι εντερόκοκκοι είναι η πιο αμφιλεγόμενη ομάδα LAB που σχετίζεται με τα τρόφιμα και θα μπορούσαν να ενεργήσουν είτε ως καλλιέργειες εκκίνησης, προβιοτικά, ή παθογόνοι μικροοργανισμοί ανάλογα το στέλεχος που απαντάται (Fernández, et al., 2015). Οι εντερόκοκκοι στα παραδοσιακά ζυμούμενα τρόφιμα βοηθούν στην ωρίμανση και στην ανάπτυξη αρωμάτων. Κάποια στελέχη εντεροκόκκων, χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ορισμένων ειδών τυριών όπως ο *E. faecalis* και ο *E. durans* (Μάντης, κ.ά., 2015,2018).

Leuconostoc: ειδικότερα τα είδη *Leuc. mesenteroides* και *Leuc. pseudomesenteroides*, έχουν την ικανότητα να παράγουν CO₂ που είναι υπεύθυνο για τον σχηματισμό των «ματιών» σε ορισμένους τύπους τυριών (Fernández, et al., 2015). Ο *Leuc. cremoris* χρησιμοποιείται για την παραγωγή τυριού cottage, τυριού κρέμας, καλλιεργημένου βουτύρου και οξυγάλακτος. Τα είδη *Leuconostoc* έχουν αντιμικροβιακή δράση, επιδρούν στη σύσταση και προσδίδουν αρώματα στα προϊόντα (Μάντης, κ.ά., 2015,2018).

Lactococcus: χρησιμοποιούνται για την παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων που έχουν υποστεί ζύμωση, όπως τα τυριά. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε καλλιέργειες εκκίνησης μόνα τους ή σε καλλιέργειες μικτού στελέχους με άλλα LAB όπως είδη του γένους *Lactobacillus* και *Streptococcus*. Τα πιο σημαντικά είδη είναι ο *L.lactis* και ο *L.cremoris* (Fernández, et al., 2015).

Bifidobacteria: είναι οξυγαλακτικά βακτήρια μη εκκινητές που περιλαμβάνονται σε ορισμένα γαλακτοκομικά προϊόντα κυρίως γάλατα που έχουν υποστεί ζύμωση και ορισμένα από αυτά προάγουν ευεργετικές ιδιότητες όσον αφορά την ανθρώπινη υγεία και κυρίως παίζουν ρόλο στη διατήρηση της καλής λειτουργίας του εντέρου (Fernández, et al., 2015). Μαζί με κάποια είδη λακτοβάκιλλων θεωρούνται ως "προβιοτικοί" μικροοργανισμοί. Για όλους αυτούς τους λόγους χρησιμοποιούνται είδη *Bifidobacterium* στην παρασκευή γαλακτοκομικών προϊόντων. Μερικά χαρακτηριστικά είδη είναι τα *Bif. Bifidum*, *Bif.longum*

και *Bif. breve* (Μάντης, κ.ά, 2015,2018). Αν και συνήθως έχουν πολύ χαμηλότερο ρυθμό ανάπτυξης από τις καλλιέργειες εκκίνησης, ο πολλαπλασιασμός τους θα συμβάλει στην αύξηση των επιπέδων γαλακτικού και οξικού στα τελικά προϊόντα (Fernández, et al., 2015).

Lactobacillus: αποτελείται σήμερα από 174 διαφορετικά είδη. Οι λακτοβάκιλλοι παίζουν δύο βασικούς ρόλους στα γαλακτοκομικά προϊόντα που έχουν υποστεί ζύμωση, ως εκκινητές ή ως δευτερεύοντα μικρόβια. Οι *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* και *Lactobacillus delbrueckii ssp. lactis* χρησιμοποιούνται παγκοσμίως ως εκκινητές στην παραγωγή γιαουρτιού. Σε αντίθεση, άλλοι λακτοβάκιλλοι αρχικά παρουσιάζονται στο νοπό γάλα αυξημένοι σε αριθμό κατά την παραγωγή των γαλακτοκομικών προϊόντων και γίνονται ιδιαίτερα κυρίαρχοι κατά την ωρίμανση του τυριού. Αυτοί οι πληθυσμοί, οι οποίοι συχνά αναφέρονται ως μη εκκινητές LAB (ή NSLAB), είναι σε θέση να πραγματοποιούν πρωτεόλυση και λιπόλυση, σημαντικοί παράγοντες που συμβάλλουν στην ανάπτυξη της γεύσης και της υφής των τυριών. Τα είδη που εμπλέκονται συχνότερα είναι τα εξής: *L. helveticus*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. plantarum/paraplantarum*, *L. rhamnosus*, *L. curvatus*, *L. brevis*, *L. sake*, *L. pentosus*, *L. acidophilus*, *L. reuteri*, *L. johnsonii*, *L. crispatus*, *L. fermentum*, *L. buchneri*, και *L. gasseri* (Fernández, et al., 2015).

Άλλες μικροβιακές ομάδες Gram+ και Gram- βακτηρίων συμβάλλουν επίσης στις οργανοληπτικές και φυσικοχημικές ιδιότητες των γαλακτοκομικών προϊόντων. Gram+ βακτήρια όπως τα *Corynebacterium spp.*, *Arthrobacter spp.* και *Brevibacterium* είναι απαραίτητα στα τυριά που έχουν ωριμάσει. Το *Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii* εκτελεί την προπιονική ζύμωση μέσω της μετατροπής του γαλακτικού οξέος, το οποίο σχηματίζεται από τα οξινοστικά βακτήρια σε οξικό, προπιονικό και CO₂. Το τελευταίο είναι υπεύθυνο για τον σχηματισμό των «ματιών» στα Ελβετικού τύπου και άλλα τυριά (Fernández, et al., 2015).

Ζυμομύκητες (yeasts) και μυκητυλιακοί μύκητες-μούχλες (molds): είναι σημαντικοί μικροβιακοί πληθυσμοί στα γαλακτοκομικά προϊόντα, ειδικά σε ορισμένους τύπους τυριών. Όπως και με τα βακτήρια, η ανάπτυξη ανεξάρτητου καλλιεργητικού DNA, βασισμένο σε αναλυτικές μεθόδους, επέτρεψαν την ανίχνευση γενών και ειδών που δεν βρέθηκαν προηγουμένως σε γαλακτοκομικά περιβάλλοντα, όπως τα *Torrubiella* και *Malassezia*. Στο τυρί, παίζουν βασικό ρόλο στην ανάπτυξη και τη βελτίωση της υφής και της γεύσης μέσω της δραστηριότητας των μικροβιακών εξωκυτταρικών ενζύμων στη μήτρα των τροφίμων. (Fernández, et al., 2015). Τα είδη ζυμομυκήτων τα οποία βρίσκονται πιο συχνά στα

γαλακτοκομικά προϊόντα είναι οι *Kluyveromyces lactis*, *Debaryomyces hansenii*, *Candida spp.*, *Geotrichum candidum*, και *Yarrowia lipolytica*. Οι ζυμομύκητες χρησιμοποιούνται ως καλλιέργειες ζύμωσης όπως στο κεφίρ με τους κόκκους. Ωστόσο, η επιμόλυνση του γάλακτος και ο πολλαπλασιασμός τους εκεί, προκαλεί παραγωγή δυσάρεστων οσμών και διόγκωση στα δοχεία τυριών (Μάντης, κ.ά., 2015,2018).

Οι μυκητυλιακοί μύκητες χρησιμοποιούνται για την παρασκευή ορισμένων ειδών τυριών και συνήθως αναπτύσσονται επιφανειακά στα γαλακτοκομικά προϊόντα. Χαρακτηριστικό γένος είναι το *Penicillium* (*P. roqueforti*, *P. camemberti*) για την παρασκευή (Roquefort, Danablu κ.α). Υπάρχουν και γένη τα οποία επιμολύνουν το γάλα εξαιτίας της ύπαρξής τους στο περιβάλλον. Τέτοια γένη είναι τα *Geotrichum spp.*, *Aspergillus spp.*, *Mucor spp.*, και *Fusarium spp.* Κάποια άλλα παράγουν τοξίνες (Μάντης, κ.ά., 2015,2018).

BAKTHPIA			ZYMO MYKHTEΣ [yeasts]	MOYXAEΣ [molds]
OΞYΓAΛAKTIKA BAKTHPIA		MH OΞYΓAΛAKTIKA BAKTHPIA		
BAKI MOI	KOKKOI			
Lactobacillus	Lactococcus	Bifidobacteria	Candida kefir	Penicillium camemberti / Penicillium candidum
	Streptococcus	Brevibacterium linens	Kluyveromyces	Penicillium roqueforti
	Leuconostoc	Acetobacter acetii	Torulospora	Aspergillus oryzae
	Enterococcus [?]	Propionibacteria	Saccharomyces	Mucor rasmussen
	Pediococcus [?]			Geotrichum candidum
	Staphylococcus [?]			

Εικόνα 3.3.1 Γένη Lab, ζυμομύκητες και ζυμομυκητόλια που χρησιμοποιούνται στην παραγωγή γαλακτοκομικών (Kouris, 2019).

3.4 Είδη ζυμούμενων γαλακτοκομικών προϊόντων

Υπάρχουν πολλά είδη γαλακτοκομικών προϊόντων που έχουν υποστεί ζύμωση, τα οποία ποικίλουν μεταξύ τους ως προς το τρόπο παραγωγής τους (αρχικό υπόστρωμα, είδη μικροοργανισμών που χρησιμοποιούνται, συνθήκες που επικρατούν) και καταναλώνονται από διαφορετικούς πληθυσμούς ανάλογα τις διατροφικές συνήθειες, τα ήθη και τα έθιμα κάθε περιοχής. Μερικά από τα πιο γνωστά είδη ζυμούμενων γαλακτοκομικών προϊόντων είναι:

Η **γιαούρτη**: η γιαούρτη είναι το πηγμένο γαλακτοκομικό προϊόν που παράγεται με τη δράση καλλιέργειών-εκκινητών *L.bulgaricus* και *S.thermophilus*. Οι μικροοργανισμοί αυτοί είναι σημαντικοί για τη διαμόρφωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών και στο τελικό προϊόν πρέπει να βρίσκονται σε μεγάλη αναλογία και να είναι ζωντανοί. Η γιαούρτη μπορεί να φτιάχνεται από αγελαδινό ή αιγοπρόβειο γάλα το οποίο μπορεί να είναι πλήρες ή μερικώς αποβουτυρωμένο ή και συμπυκνωμένο. Τέλος, μπορεί να περιέχει πρόσθετες ύλες όπως σκόνη γάλακτος ή τυρογάλακτος, συμπύκνωμα πρωτεϊνών γάλακτος, αρωματικές ουσίες κ.λ.π) οι οποίες επιτρέπονται μόνο στα επιδόρπια ή τα σκευάσματα (Ελευθεριάδου, 2009). Το εμπορικό γιαούρτι είναι συνήθως μια απλή καλλιέργεια μερικών LAB, κυρίως *Lactobacillus spp* και *Streptococcus thermophilus*. Ωστόσο, υπάρχει ένα ευρύ φάσμα παρασκευασμάτων γιαουρτιού, το καθένα με διακυμάνσεις στο θρεπτικό περιεχόμενο και τις βιοθεραπευτικές δυνατότητες (Peterson, et al., 2019).



Εικόνα 3.4.1 Γιαούρτη (NutriClinic, n.d.)

Το **βουτυρόγαλα**: είναι ένα συχνά ζυμούμενο, δευτερεύον προϊόν από την παραγωγή βουτύρου. Περιέχει χαμηλά λιπαρά, έχει υψηλή θρεπτική αξία και αποτελεί μια καλή εναλλακτική λύση σε σύγκριση με το συμβατικό γάλα. Ζυμώνεται με είδη του γένους *Lactococcus* (*Lc. lactis* subsp. *Lc. Lactis* subsp. *cremoris*) και *Leuconostoc* (*Leuc. mesenteroides. cremoris*) (Μάντης, κ.ά., 2015,2018).

Το **κεφίρ**: είναι παραδοσιακό προϊόν του Καυκάσου, το οποίο φτιάχνεται κυρίως από γίδινο γάλα αλλά κάποιες φορές μπορεί να χρησιμοποιηθεί πρόβειο ή αγελαδινό. Η ζύμωση είναι γαλακτική και αλκοολική, γίνεται με τη βοήθεια οξυγαλακτικής καλλιέργειας και διαιωνίζεται με τη μορφή αφυδατωμένων κόκκων οι οποίοι είναι γνωστοί σαν κόκκοι κεφίρ. Οι κόκκοι κεφίρ περιέχουν *Lactococcus Lactis*, *Lactobacillus bulgaricus* και *Saccharomyces* ενώ η ζύμη ανήκει στο γένος *Torula*. Λόγω της σύνθετης μικροβιακής του σύνθεσης (περιέχει LAB και ζυμομύκητες) σε σχέση με τις αυστηρά βακτηριακές ζυμώσεις άλλων γαλακτοκομικών προϊόντων, το κεφίρ αποτελεί ένα μοναδικό προϊόν η κατανάλωση του οποίου έχει πολλά οφέλη για την ανθρώπινη υγεία (Ελευθεριάδου, 2009).



Εικόνα 3.4.2 Κεφίρ (Θερμόπουλος, 2020).

Ελληνικό οξύγαλο ή ξυνόγαλο: είναι παραδοσιακό προϊόν ζύμωσης του βουτυρογάλακτος ή του άπαχου γάλακτος. Η υγιεινή του βουτυρογάλακτος επιβάλλει θέρμανση στους 90-95°C για 15 min, ψύξη στους 25 -28°C και ενοφθαλμισμό του με οξυγαλακτική καλλιέργεια 10%-15%. Αυτή η καλλιέργεια είναι είτε οξύγαλα της προηγούμενης μέρας, είτε ειδικά προετοιμασμένη καλλιέργεια. Τα οξυγαλακτικά στελέχη που χρησιμοποιούνται είναι: *Lactococcus cremoris*, *Lactococcus lactis* και το *Leuconostoc citrovorum* (Ελευθεριάδου, 2009).

Κουμίζ ή οινόγαλα: Είναι παραδοσιακό προϊόν των λαών κοντά στην Κασπία θάλασσα. Παράγεται από γάλα φοράδας, γάλα όνου ή καμήλας. Σήμερα χρησιμοποιείται αγελαδινό γάλα. Η ζύμωση είναι γαλακτική και αλκοολική και χρησιμοποιείται συνδυασμός στελεχών *Lactobacillus bulgaricus*, *L.casei* ή *L.lactis* και ζυμομύκητα *Torula koumiss* και *Kluyveromyces lactis* (Μάντης, κ.ά, 2015,2018).



Εικόνα 3.4.3 Κουμίζ (Tengrist, 2016).

Τυρί: είναι το προϊόν που παράγεται από γάλα και αποτελεί προϊόν ωρίμανσης του πήγματος (στάλπης), που είναι απαλλαγμένο από το τυρόγαλα και το οποίο παρασκευάστηκε από την επενέργεια πυτιάς ή άλλων ενζύμων που δρουν ανάλογα σε γάλα (νωπό ή παστεριωμένο, αγελάδας, προβάτου, κατσίκας, βουβάλου και μίγματα αυτών) ή σε μερικώς αποβουτυρωμένο γάλα ή σε μίγματα αυτών ή και σε μίγματα αυτών με κρέμα γάλακτος (αφρόγαλα).

Βασικές πρώτες ύλες για την παραγωγή τυριών είναι: το γάλα, τα πηκτικά ένζυμα (πυτιά και υποκατάστατα αυτής), οξυγαλακτική καλλιέργεια, αλάτι, πρόσθετες ύλες (χρωστικές, συντηρητικά). Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή του είναι : των γενών *Streptococcus* (*Str.thermophilus*), *Lactococcus* (*Lc. Lactis subsp. Lactis*), *Lactobacillus* (*Lb. casei*, *Lb. helveticus*), *Leuconostoc* (*Leuc. mesenteroides subsp. cremoris.*) και *Propionibacterium* (*P. Shermanii*). Από τους μύκητες χρησιμοποιούνται κυρίως τα είδη *Penicillium* για εσωτερικό ενοφθαλμισμό και *P.camemberti* (Μάντης, κ.ά., 2015,2018).



Εικόνα 3.4.4 Διάφορες κατηγορίες τυριών (Flowmagazine, 2018).

3.5 Οφέλη από τη κατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων

Τα οφέλη για την υγεία από την κατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων που έχουν υποστεί ζύμωση έχουν αναγνωρισθεί εδώ και αρκετό καιρό στις αρχές του 1900. Ο Élie Metchnikoff ήταν ένας από τους πρώτους επιστήμονες ο οποίος υποδήλωσε ότι το γιαούρτι μπορεί να έχει οφέλη για την υγεία, βασισμένος σε παρατηρήσεις αυξημένης μακροζωίας σε ορισμένους βουλγαρικούς πληθυσμούς που κατανάλωναν υψηλά επίπεδα. Η έρευνα επικεντρώθηκε στην διερεύνηση αυτού του φαινομένου με σκοπό την κατανόηση των μηχανισμών και της αξιοποίησης των βιοδραστικών μορίων για πιθανή χρήση τους ως λειτουργικά συστατικά. Επιπλέον, η αυξανόμενη έρευνα του μικροβιώματος του εντέρου και ο ρόλος του στην υγεία έχουν αναζωογονήσει τις έρευνες πιθανής βιοθεραπευτικής ικανότητας των «ζωντανών» ζυμωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων (Peterson, et al., 2019).

Τα περισσότερα οφέλη για την υγεία τα οποία σχετίζονται με τα ζυμούμενα γαλακτοκομικά προϊόντα προέρχονται μέσω διαμόρφωσης των ανοσολογικών αντιδράσεων όπως η φλεγμονή και η άμυνα κατά των παθογόνων, κυρίως μέσω του μικροβιώματος του εντέρου. Έρευνες για τις ευεργετικές επιπτώσεις στην υγεία των γαλακτοκομικών προϊόντων που έχουν υποστεί ζύμωση έχουν δείξει ότι μπορούν να μειώσουν τη φλεγμονή, να ρυθμίσουν/διαμορφώσουν την ανοσοαπόκριση, να μειώσουν το κίνδυνο καρδιαγγειακών ασθενειών (Cardiovascular Disease, CVD) και καρκίνου, να προστατεύσουν το σώμα από ασθένειες που προκαλούνται από μικροοργανισμούς, να αυξήσουν τη θρεπτική αξία του γάλακτος και να γίνει χρήση θρεπτικών συστατικών. Έχουν ευεργετική επίδραση στην πείνα/στις ορμόνες σηματοδότησης κορεσμού και στο μεταβολισμό και μπορεί να προωθήσουν ένα υγιή εγκέφαλο και πεπτικό σωλήνα μεταξύ άλλων ωφελειών. Τα βακτηριακά στελέχη που σχετίζονται με τα γαλακτοκομικά που έχουν υποστεί ζύμωση έχει αποδειχθεί ότι παρέχουν προστασία κατά των επιληπτικών κρίσεων σε μοντέλα ζώων. Αποτελεσματικότητα των υπό ζύμωση γαλακτοκομικών έχει επίσης αποδειχθεί σε μοντέλα απώλειας βάρους και στο διαβήτη τύπου 2 (Type 2 Diabetes, T2D). Τέλος, οι ζωντανές καλλιέργειες γιαουρτιού μπορούν να βελτιώσουν την πέψη της λακτόζης στο γιαούρτι, πράγμα το οποίο βοηθά τα άτομα με δυσανεξία στη λακτόζη να απολαύσουν τα οφέλη των γαλακτοκομικών προϊόντων (Peterson, et al., 2019).

3.6 Μηχανισμοί με τους οποίους τα γαλακτοκομικά προϊόντα επηρεάζουν το εντερικό μικροβίωμα

Το μικροβίωμα του εντέρου αποτελείται από πέντε βακτηριακά φύλα: 1) *Firmicutes*, 2) *Bacteroidetes*, 3) *Actinobacteria*, 4) *Proteobacteria*, και 5) *Fusobacteria*. Τα δύο πρώτα αποτελούν το 90% του εντερικού μικροβιώματος αν και υπάρχουν μεταβολές ως προς το ποσοστό αυτό που σχετίζονται με παράγοντες όπως το περιβάλλον, το γενετικό υλικό, η διατροφή και η ασθένεια. Η διατροφή παίζει πρωτεύοντα ρόλο στη ρύθμιση του εντερικού μικροβιώματος και τα γαλακτοκομικά προϊόντα μέσω των θρεπτικών συστατικών τους μπορούν να επηρεάσουν τη σύνθεσή του. Ειδικότερα, οι πιθανοί μηχανισμοί με τους οποίους τα γαλακτοκομικά προϊόντα μπορούν να επηρεάσουν το εντερικό μικροβίωμα είναι (Aslam, et al., 2020):

1) Η διευκόλυνση ανάπτυξης των ωφέλιμων στελεχών

Ορισμένα συστατικά των γαλακτοκομικών προϊόντων όπως η λακτόζη και οι πρωτεΐνες έχουν την ικανότητα να διεγείρουν την ανάπτυξη ορισμένων βακτηριακών γενών όπως των *Bifidobacterium* και *Lactobacillus*. Η λακτόζη (σάκχαρο του γάλακτος), σύμφωνα με *in vivo* και *in vitro* μελέτες, περιέχει έναν πρεβιοτικό δείκτη 5,75 που είναι παρόμοιος με άλλα πρεβιοτικά. Τα πρεβιοτικά μπορούν να προκαλέσουν αλλαγές στη σύνθεση και στη δραστηριότητα των γαστρεντερικών μικροβίων, τα οποία αποφέρουν οφέλη στην υγεία.

Οι πρωτεΐνες του γάλακτος μπορούν επίσης να διευκολύνουν την ανάπτυξη των γενών *Bifidobacterium* και *Lactobacillus*. Η καζεΐνη αποτελεί το 80% της πρωτεΐνης γάλακτος και αποτελείται από τέσσερις υπομονάδες τις (α-καζεΐνη S1, α-καζεΐνη S2, β-καζεΐνη, κ-καζεΐνη). Η πρωτεΐνη ορού γάλακτος αποτελεί το 20% των πρωτεϊνών γάλακτος και περιλαμβάνουν το υδατοδιαλυτό κλάσμα πρωτεΐνης: α-γαλακτοαλβουμίνη, β-λακτοσφαιρίνη, ανοσοσφαιρίνες (Ig), λακτοφερίνη, αλβουμίνη ορού, λακτοϋπεροξειδάση και λυσοζύμες. Σε μια έρευνα αποδείχθηκε ότι η καζεΐνη και ο ορός γάλακτος δεν προκάλεσαν καμία αλλαγή στην σύνθεση του εντερικού μικροβιώματος και της ποικιλομορφίας του, το ίδιο και η ποσότητα (υψηλή/χαμηλή) των γαλακτοκομικών προϊόντων που καταναλώθηκαν (Aslam, et al., 2020).

Σύμφωνα με μια μελέτη, η πρόσληψη γάλακτος μείωσε τη βακτηριακή ποικιλομορφία και αύξησε τον αριθμό των γενών *Lactobacillus* και *Bifidobacterium*. Το κεφίρ και το γιαούρτι

ομοίως αύξησαν τον αριθμό των γενών *Lactobacillus* και *Bifidobacterium*. Τα προηγούμενα γένη βακτηρίων θεωρούνται προβιοτικά είδη και είναι ωφέλιμα για τον άνθρωπο (Aslam, et al., 2020).

2) Η καταστολή ανάπτυξης των παθογόνων στελεχών

Τα γαλακτοκομικά προϊόντα μπορούν να καταστείλουν την ανάπτυξη των παθογόνων στελεχών μέσω του ανταγωνιστικού αποκλεισμού των παθογόνων από τη διευκόλυνση ανάπτυξης συγκεκριμένων βακτηριακών στελεχών και μέσω της παραγωγής βιοενεργών πεπτιδίων, τα οποία έχουν αντιμικροβιακή δράση και επιβραδύνουν την ανάπτυξη παθογόνων στελεχών.

Σε μια μελέτη οι επιστήμονες έδειξαν ότι η κατανάλωση γιαουρτιού μείωσε το στέλεχος *Bacteroides fragilis* το οποίο έχει συσχετιστεί με διάρροια, τη φλεγμονώδη νόσο του εντέρου και το καρκίνο του παχέος εντέρου.

Ακόμη, έχει παρατηρηθεί ότι η κατανάλωση γιαουρτιού που έχει υποστεί ζύμωση αύξησε τον ειδικό τίτλο IgA ορού έναντι του εντεροπαθογόνου στελεχούς, *Salmonella typhi* (Aslam, et al., 2020)

3) Η μεταβολή του γαστρεντερικού περιβάλλοντος

Τα συστατικά των γαλακτοκομικών προϊόντων κυρίως οι πρωτεΐνες γάλακτος και τα λίπη είναι ικανά να μεταβάλλουν το περιβάλλον του αυλού του εντέρου, προκαλώντας αλλαγές στη σύνθεση των εντερικών μικροβίων (Aslam, et al., 2020).

3.7 Παραγωγή μορίων κατά τη ζύμωση των γαλακτοκομικών προϊόντων και ανθρώπινη υγεία

Η ενζυματική διαδικασία της μικροβιακής ζύμωσης η οποία γίνεται με τα LAB απελευθερώνει μόρια που πέπτονται εύκολα. Αυτές οι ενζυματικές διεργασίες, πραγματοποιούνται από βακτήρια, επιτρέπουν ευκολότερη πέψη των θρεπτικών συστατικών στο έντερο, και επίσης δημιουργούν βιοενεργά πεπτίδια που συνδέονται με βασικές βιταμίνες και ιχνοστοιχεία για την προώθηση της απορρόφησής τους. Μεταξύ των μορίων που παράγονται και που μεταδίδουν τις φυσιολογικές επιδράσεις των

γαλακτοκομικών που έχουν υποστεί ζύμωση, συμπεριλαμβάνονται οι βιταμίνες, το συζευγμένο λινολεϊκό οξύ, οι ολίγο και εξωπολυσακχαρίτες, το γαμμα-αμινοβουτυρικό οξύ, τα βραχείας αλυσίδας λιπαρά οξέα και τα βιοδραστικά πεπτίδια. Κατανάλωση ορισμένων εξ' αυτών των συστατικών τα οποία περιέχονται στα τρόφιμα, μπορεί να έχει ευεργετικές επιπτώσεις στο μικροβίωμα του εντέρου, ακόμα και όταν δεν υπάρχουν ζωντανά μικρόβια στο τρόφιμο. Για παράδειγμα, η ζύμωση της λακτόζης οδηγεί στο σχηματισμό πρεβιοτικών ολιγοσακχαριτών, και μπορεί να διεγείρει ευεργετικά βακτήρια στο παχύ έντερο (Peterson, et al., 2019).

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, μερικές ιδιότητες των ζυμούμενων γαλακτοκομικών προϊόντων που προάγουν την υγεία οφείλονται στη σύνθεση ή στην απελευθέρωση από τη μήτρα τροφίμων βιοδραστικών ενώσεων ως αποτέλεσμα της μεταβολικής δράσης των LAB, των προπιονοβακτηρίων, των ζυμομύκητων και των ζυμών. Τα μόρια που παράγονται στα ζυμούμενα γαλακτοκομικά προϊόντα σχετίζονται με τους μικροοργανισμούς που υπάρχουν σε αυτά. Τα LAB παράγουν γαλακτικό οξύ ενώ το *Acetobacter* συμμετέχει κυρίως στην παραγωγή οξικού οξέος. Ο *Lactobacillus*, ως συχνά κυρίαρχο LAB, εμπλέκεται στην παραγωγή γαλακτικού οξέος, καθώς και στην παραγωγή καρβοξυλικού οξέος, εστέρων και κετονών. Τα γαλακτικά και οξικά οξέα είναι τα κύρια οξέα που υπάρχουν σε γαλακτοκομικές ζυμώσεις και συμβάλλουν επίσης σημαντικά στη συντήρηση της ζύμωσης, καθώς, αυτά τα οξέα εμποδίζουν την ανάπτυξη παθογόνων βακτηρίων. Το *Propionibacterium spp.* παράγει προπιονικό, CO₂ και οξικό άλας. Ο ζυμομύκητας *Saccharomyces* αποδίδεται κυρίως στην παραγωγή εστέρων που συμβάλλουν στη γεύση (Peterson, et al., 2019). Άλλες ενώσεις που παράγονται και αξίζει να αναφερθούμε σε αυτές λίγο πιο αναλυτικά είναι: το συζευγμένο λινολεϊκό οξύ (CLA), οι εξωπολυσακχαρίτες (Exopolysacchrides, EPS), τα βιοδραστικά πεπτίδια, οι βιταμίνες, το γάμμα-αμινοβουτυρικό οξύ (Gamma Aminobutyric Acid, GABA), οι γαλακτοολιγοσακχαρίτες (Galactooligosaccharide, GOS), οι βακτηριοσίνες και τα λιπαρά οξέα βραχείας αλυσίδας (Short-chain fatty acids, SCFAs). Πιο συγκεκριμένα:

Λινολεϊκό οξύ (CLA): δημιουργείται από τη δράση των LAB από άκορεστα λίπη που υπάρχουν στο γάλα και παρέχει οφέλη για την υγεία, όπως αντιφλεγμονώδεις, αντιοξειδωτικές, και αντι-αθηρωματικές ιδιότητες. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι έχει αντιπερτασικά αποτελέσματα (Peterson, et al., 2019). Το CLA είναι ένα φυσικό συστατικό του λίπους του γάλακτος. Η περιεκτικότητά του μπορεί να αυξηθεί στο γάλα που έχει

υποστεί ζύμωση μέσω βιομετατροπής ακόρεστων λιπαρών οξέων όπως λινολεϊκό και λινολενικά οξέα από διαφορετικά LAB (Fernández, et al., 2015).

Γάμμα-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA): ένας αριθμός άλλων γαλακτοκομικών βιοενεργών προϊόντων, όπως το GABA, έχει επίσης αποδειχθεί ότι έχουν προστατευτικές και αντιυπερτασικές ιδιότητες (Peterson, et al., 2019). Το GABA είναι μια άλλη ένωση με ιδιότητες καταστολής της αρτηριακής πίεσης και έχει αποδειχθεί ότι παράγεται σε γάλα που έχει υποστεί ζύμωση από το *Lactobacillus casei shirota* και το *Lactobacillus lactis*, μέσω μετασχηματισμού του γλουταμινικού οξέος που προέρχεται από πρωτεΐνες γάλακτος (Fernández, et al., 2015).

Λιπαρά οξέα βραχείας αλυσίδας (SCFAs): περιλαμβάνουν προπιονικό (συζυγές προπιονικό οξύ), βουτυρικό (συζυγές βουτυρικό οξύ) και οξικό (συζυγές οξικό οξύ). Τα SCFAs έχουν συνδεθεί με τη μειωμένη φλεγμονή και τη μειωμένη εμφάνιση καρκίνου του παχέος εντέρου (Peterson, et al., 2019).

Βιταμίνες B: η B12, το φυλλικό οξύ, άλλα συζεύγματα φολικού οξέος, βιοτίνης και ριβοφλαβίνης υπάρχουν στα υπό ζύμωση γαλακτοκομικά προϊόντα και είναι σημαντικές για την υγεία (Peterson, et al., 2019). Αν και το γάλα περιέχει βιταμίνες, η ζύμωση από τα LAB συχνά οδηγεί στον εμπλουτισμό ορισμένων από αυτά, όπως είναι η περίπτωση για τη βιταμίνη B12, το φολικό οξύ και τη βιοτίνη που παράγονται από τα *Propionibacteria* ή η υψηλότερη σύνθεση φυλλικού οξέος στο γάλα που έχει υποστεί ζύμωση με κάποια LAB σε σχέση με το σύμπλεγμα γάλακτος χωρίς μέσα καλλιέργειας (Fernández, et al., 2015).

Βιοδραστικά πεπτίδια: είναι ειδικά θραύσματα πρωτεϊνών γάλακτος που απελευθερώνονται κυρίως από πρωτεολυτική δράση των καζεϊνών και επίσης από πρωτεΐνες ορού γάλακτος. Αντιυπερτασικές, αντιμικροβιακές, αντιοξειδωτικές και ανοσορρυθμιστικές δραστηριότητες έχουν περιγραφεί για πεπτίδια που απελευθερώνονται ως αποτέλεσμα της δραστηριότητας των LAB σε γαλακτοκομικά προϊόντα που έχουν υποστεί ζύμωση. Γενικά, τα βιοδραστικά χαρακτηριστικά τους βασίζονται στη συγκεκριμένη αμινο αλληλουχία οξέος και το μήκος αλυσίδας, καθώς και στην αντοχή τους στην υδρόλυση. Ο πιο μελετημένος μηχανισμός βιοδραστικών πεπτιδίων είναι η αντιυπερτασική δράση που εμφανίζεται από την αναστολή μετατροπής του ενζύμου αγγειοτασίνης-I (ACE, πεπτιδυλδιπεπτίδιο υδρολάση, EC) που ρυθμίζει την αρτηριακή πίεση. Μερικά γάλατα και τυριά που έχουν υποστεί ζύμωση με προσθήκη προβιοτικού *lactobacilli* αποκάλυψαν ανασταλτική δράση ACE . Ιδιαίτερη αναφορά αξίζουν τα βιοδραστικά πεπτίδια, συστατικά

πρωτεϊνών που εκκρίνονται από LAB και προβιοτικά βακτήρια. Χαρακτηριστική είναι η περίπτωση του εμπλουτισμένου πεπτιδίου σερίνης/ θρεονίνης το οποίο προέρχεται από μία από τις κύριες εξωκυτταρικές πρωτεΐνες που παράγονται από τον *L.plantarum*, το οποίο εμφανίζει ανοσορυθμιστικές ιδιότητες μετά την απελευθέρωσή του κατά τη διάρκεια της πέψης (Fernández, et al., 2015).

Βακτηριοσίνες: συγκαταλέγονται επίσης στα ευεργετικά πεπτίδια που εγγενώς συντίθεται από κάποια LAB κατά τη ζύμωση του γάλακτος και η χρησιμότητά τους σχετίζεται με την πρόληψη ανάπτυξης ανεπιθύμητων και παθογόνων μικροοργανισμών κατά τη ζύμωση του γάλακτος (Fernández, et al., 2015).

Γαλακτοολιγοσακχαρίτες (GOS): η σύνθεση του συγκεκριμένου γαλακτοολιγοσακχαρίτη από τα LAB οφείλεται σε δραστηριότητα πλευρικής γραμμής διαγαλακτοσυλίωσης από β-γαλακτοσιδάση στη λακτόζη, την κύρια ζάχαρη του γάλακτος. Ο γαλακτοσακχαρίτης GOS έχει αναγνωριστεί ως πρεβιοτικός παράγοντας ο οποίος δρα στα εντερικά μικροβιώματα, προάγοντας την επιλεκτική ανάπτυξη των bifidobacteria (Fernández, et al., 2015).

Εξωπολυσακχαρίτες (EPS): είναι πολύπλοκα εξωκυτταρικά πολυμερή υδατανθράκων που παράγονται από ορισμένους μικροοργανισμούς. Μπορούν να προστατεύσουν από το περιβάλλον, τους ανεπιθύμητους παράγοντες και μερικοί από αυτούς αλληλεπιδρούν θετικά με το μικροβίωμα του παχέος εντέρου και με το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή (Fernández, et al., 2015).

Υπάρχουν ακόμη περιέργως, πολλά μόρια τα οποία αν και έχουν μια δυσάρεστη γεύση είναι γνωστό ότι παρέχουν οφέλη στην υγεία. Το οκτανοϊκό, το δεκανοϊκό και το μηνοϊκό οξύ είναι μερικά παραδείγματα και συνδέονται όλα με την «κατσικίσια» ή «chesse» μυρωδιά. Το οκτανοϊκό οξύ (επίσης γνωστό ως καπρυλικό οξύ) συνδέεται με τη ρύθμιση του κορεσμού/πείνας, την απώλεια βάρους και χρησιμοποιείται επίσης ως αντιμικροβιακό. Το δεκανοϊκό οξύ (επίσης γνωστό ως καπρικό ή δεκυλικό οξύ) και το μη νανοϊκό οξύ έχει αποδειχθεί ότι ασκούν αντιεπιληπτικές επιδράσεις που σχετίζονται με την κλινική κετογονική διαίτα (Peterson, et al., 2019).

Αν και η μεταβολική δραστηριότητα των μικροοργανισμών κατά τη διάρκεια της ζύμωσης των γαλακτοκομικών αποφέρει κυρίως ευεργετικές ενώσεις, σε ορισμένες περιπτώσεις, οι μεταβολικές δραστηριότητες έχουν ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση τοξικών ουσιών για τον καταναλωτή. Δύο τύποι τοξικών ενώσεων έχουν εντοπιστεί σε γαλακτοκομικά

προϊόντα: 1) οι μυκοτοξίνες οι οποίες παράγονται από μερικούς μύκητες και 2) οι βιογενείς αμίνες (Biogenic Amines, BA) κυρίως λόγω της μεταβολικής δραστηριότητας κάποιου LAB (Fernández, et al., 2015).

Οι **μυκοτοξίνες** αποτελούν χημικούς κινδύνους που συντίθενται κυρίως από τρία γένη νηματώδους μύκητα: *Aspergillus*, *Fusarium*, και *Penicillium*. Ονομάζονται δευτερογενείς μεταβολίτες, επειδή δεν είναι απαραίτητοι για την κανονική αύξηση και ανάπτυξη. Αν και οι μύκητες μπορούν να παράγουν συλλογικά εκατοντάδες μυκοτοξίνες, μόνο οι φουμονισίνες, η ζεαραλενόνη (παράγεται από είδη *Fusarium*), οι αφλατοξίνες, οι ωχρατοξίνες και η πατουλίνη (παράγονται από *Aspergillus* τα είδη του πενικιλίου) είναι άξια αναφοράς από τη θεώρηση της υγείας. Αυτοί οι δευτερεύοντες μεταβολίτες είναι προϊόντα πολλαπλών σταδίων και βιοχημικών μονοπατιών. Στο γάλα και στα γαλακτοκομικά προϊόντα οι μυκοτοξίνες προέρχονται κυρίως από ζωοτροφές μολυσμένες είτε στο χωράφι, είτε κατά την ξήρανση και την αποθήκευση. Η πιο σημαντική μυκοτοξίνη παγκοσμίως είναι η αφλατοξίνη. Αυτό το πολυκετίδιο παράγεται κυρίως από το *Aspergillus flavus* και το *Aspergillus parasiticus* και είναι ισχυρά καρκινογόνο. Η αφλατοξίνη M1, η οποία προέρχεται από τη μεταβολική μετατροπή της αφλατοξίνης B1, μπορεί να εμφανιστεί στο γάλα και στα γαλακτοκομικά προϊόντα από ζώα που καταναλώνουν ζωοτροφές μολυσμένες με B1 αφλατοξίνες. Παραγωγή αφλατοξίνης από το *Aspergillus* μπορεί να μολύνει τους κόκκους πριν από τη συγκομιδή ή κατά τη διάρκεια αποθήκευσης. Ευνοϊκές συνθήκες θερμοκρασίας, υγρασίας και μηχανική βλάβη του πυρήνα κατά τη συγκομιδή μπορεί να ευνοήσουν την ενεργή παραγωγή της αφλατοξίνης B1 σε μολυσμένους κόκκους. Η αφλατοξίνη B1 μετατρέπεται σε αφλατοξίνη M1 στο ήπαρ των θηλαζόντων ζώων και απεκκρίνεται από το μαστικό αδέν. Η πιθανή εμφάνιση μυκοτοξινών στα γαλακτοκομικά προϊόντα και κυρίως στο γάλα αποτελούν κίνδυνο για τον καταναλωτή, λόγω των αρνητικών επιπτώσεών τους στους ενήλικες και ειδικά στα παιδιά (Fernández, et al., 2015).

Οι **Βιογενείς αμίνες (BA)**: είναι άλλες τοξικές ενώσεις που σχετίζονται κυρίως με το μεταβολισμό ορισμένων βακτηρίων. Αυτές είναι χαμηλού μοριακού βάρους αζωτούχες οργανικές βάσεις με βιολογική δραστηριότητα και συντίθενται κυρίως με αποκαρβοξυλίωση του αντίστοιχου αμινοξέος. Οι πιο σημαντικές και συχνές BA που βρέθηκαν στα γαλακτοκομικά προϊόντα είναι η ισταμίνη, η τυραμίνη και η πουτρεσκίνη, οι οποίες παράγονται με αποκαρβοξυλίωση της ιστιδίνης, τυροσίνης, και ορνιθίνης αντίστοιχα. Η καδαβερίνη (προέρχεται από αποκαρβοξυλίωση της λυσίνης) βρίσκεται λιγότερο συχνά στα γαλακτοκομικά προϊόντα. Οι BA υπάρχουν φυσικά στα λαχανικά, στα ζώα και στους

ανθρώπους και εμπλέκονται σε σημαντικές βιολογικές διεργασίες. Πολλά βακτήρια διαφόρων γενών και ειδών έχουν την ικανότητα παραγωγής ΒΑ. Gram⁻ βακτήρια (κυρίως *Enterobacteriaceae*) που μπορεί να υπάρχουν στο γάλα, είναι ικανά για την παραγωγή ισταμίνης, πουτρεσκίνης και καδαβερίνης. Ωστόσο, οι βασικοί παραγωγοί ΒΑ στα γαλακτοκομικά προϊόντα είναι κυρίως LAB των γενών *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* και *Streptococcus*. Αυτά τα βακτήρια μπορούν (i) να υπάρχουν στο γάλα, (ii) να εισάγονται από μόλυνση καθ' όλη τη διαδικασία παρασκευής του τυριού. Μεταξύ των γαλακτοκομικών προϊόντων που έχουν υποστεί ζύμωση, τα τυριά μπορούν να έχουν τις υψηλότερες συγκεντρώσεις ΒΑ, λόγω των πολύπλοκων μικροβίων τους και της διαθεσιμότητας προδρόμων αμινοξέων από πρωτεόλυση της καζεΐνης. Έχουν αναφερθεί συγκεντρώσεις ΒΑ μέχρι και 2.000 mg ανά kg τυριού. Η πρόσληψη τέτοιων μολυσμένων τροφίμων θα μπορούσαν να προκαλέσουν σοβαρά προβλήματα υγείας. Γι' αυτό το λόγο, κατά το πρόσφατο παρελθόν οι μεταβολικές οδοί που ενεπλάκησαν στη σύνθεση αυτών των ενώσεων και οι περιβαλλοντικές συνθήκες που ευνοούν τη συσσώρευσή τους στα τρόφιμα έχουν μελετηθεί σε βάθος, παράλληλα με την ανάπτυξη αξιόπιστων μεθόδων ανίχνευσης είτε για τις ΒΑ είτε για τους μικροβιακούς παραγωγούς ΒΑ (Fernández, et al., 2015).

Compounds	Main producer microorganisms in dairy products
Beneficial	
Conjugated linoleic acid (CLA)	BAL (<i>Lactobacillus</i> , <i>Lactococcus</i> , and <i>Bifidobacterium</i>)
Microbial exopolysaccharides (EPS)	BAL (<i>Lactobacillus</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , and <i>Bifidobacterium</i>)
Oligosaccharides	BAL (<i>Bifidobacterium</i> and <i>Lactobacillus</i>) and <i>Kluyveromyces lactis</i>
Vitamins (B ₁₂ , biotin, and folic acid)	BAL (<i>Lb. plantarum</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>S. thermophilus</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> , and <i>Propionibacterium</i>)
Gamma-aminobutyric acid (GABA)	BAL (<i>Lactococcus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , and <i>Leuconostoc</i>)
Bioactive peptides:	
Immune modulatory	<i>Lactobacillus</i> GG
Antihypertensive	<i>Lactobacillus</i> GG, <i>Lb. helveticus</i> , and <i>S. thermophilus</i> ,
Antimicrobial	<i>Lb. helveticus</i> and <i>Lb. acidophilus</i>
Antioxidative	<i>Bifidobacterium longum</i> and <i>Lb. delbrueckii</i>
Bacteriocins	BAL (<i>Lactococcus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Bifidobacterium</i> , and <i>Leuconostoc</i>)
Detrimental	
Mycotoxins:	
Aflatoxins, ochratoxin, and patulin	<i>Aspergillus</i> and <i>Penicillium</i>
Trichothecenes, fumonisins, and zearalenone	<i>Fusarium</i>
Biogenic Amines:	
Tyramine	BAL (<i>Enterococcus</i> , <i>Lb. curvatus</i> , and <i>Lb. brevis</i>)
Putrescine	BAL (<i>Enterococcus</i> , <i>Lb. curvatus</i> , <i>Lb. brevis</i> , and <i>La. lactis</i>) and <i>Enterobacteriaceae</i>
Cadaverine	<i>Enterobacteriaceae</i>
Histamine	BAL (<i>Lb. buchneri</i> and <i>S. thermophilus</i>)

Εικόνα 3.7.1 Ευεργετικές και επιβλαβείς ενώσεις που παράγονται από μικροοργανισμούς που υπάρχουν στα γαλακτοκομικά. (Fernández, et al., 2015).

4. ΤΟ ΤΥΡΙ ΩΣ ΦΟΡΕΑΣ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ

4.1 Γενικά για το τυρί

Με βάση τον ορισμό του Codex Alimentarius «Τυρί είναι το ώριμο ή νωπό προϊόν που προέρχεται από τη στράγγιση, ύστερα από πήξη του πλήρους, ή μερικού αποβουτυρωμένου ή άπαχου γάλακτος ή βουτυρογάλακτος ή μίγματος ορισμένων ή όλων αυτών των προϊόντων» (Μάντης, κ.ά., 2015,2018).

Τα στάδια παρασκευής του τυριού είναι τα εξής:

1. Επιλογή βασικών υλών για την παραγωγή τυριού:

Μια από τις βασικές πρώτες ύλες είναι το **1) γάλα**. Τα είδη γάλακτος που χρησιμοποιούνται περισσότερο στη τυροκομία είναι το αγελαδινό, το πρόβειο ή το κατσικίσιο. Η απόδοση του γάλακτος εξαρτάται από την περιεκτικότητα του σε στερεά συστατικά όπως η καζεΐνη και το λίπος τα οποία συνδέονται άμεσα με παράγοντες όπως το είδος του ζώου, η φυλή και η εποχή του έτους. Η λακτόζη αποτελεί σημαντικό κλάσμα των στερεών συστατικών του γάλακτος, ωστόσο, συνεισφέρει ελάχιστα στο τελικό βάρος του ώριμου τυριού, ενώ ταυτόχρονα διαφεύγει κατά μεγάλο μέρος στο τυρόγαλα. Το ποσοστό όμως που ζυμώνεται παράγει γαλακτικό και άλλα οργανικά οξέα τα οποία ρυθμίζουν το pH του γάλακτος κατά τη τυροκόμηση και αργότερα το pH του τυροπήγματος. Το τυρόπηγμα αποτελείται από πρωτεΐνες και λίπος. Οι απώλειες καζεϊνών (περίπου 4%) στο τυρόγαλα είναι αποτέλεσμα της μερικής πρωτεόλυσής του από πηκτικά ένζυμα. Τα περισσότερα από τα πρωτεολυτικά αυτά ένζυμα είναι πολύ θερμοάντοχα ακόμα και κατά την παστερίωση του γάλακτος και συνεχίζουν να δρουν κατά την τυροκόμηση και την ωρίμανση του τυριού (Μάντης, κ.ά., 2015,2018).

Μια άλλη σημαντική βασική ύλη είναι τα **2) πηκτικά ένζυμα**. Η πήξη του γάλακτος για την παρασκευή περισσότερων ειδών τυριού γίνεται με πηκτικά ένζυμα (πυτιά). Σε ορισμένα τυριά η πήξη γίνεται με προσθήκη ορισμένων οργανικών οξέων ή προσθήκη οξυγαλακτικής καλλιέργειας σε μεγάλη αναλογία. Το γάλα μετατρέπεται σε τυρόπηγμα. Στο τυρόπηγμα και στο τυρί τα πηκτικά ένζυμα συμβάλλουν, στην πρωτεόλυση και στην ωρίμανση του τυριού. Έχουν την ικανότητα να επηρεάζουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τυριού, τη

συνολική απόδοση και ποιότητά του, τις απώλειες των καζεϊνών στο τυρόπηγμα και την ποιότητα του τυρογάλακτος. Η ποσότητα και το είδος των πηκτικών ενζύμων εξαρτάται από την πηκτική τους ισχύ, την πρωτεολυτική τους δράση και τη τεχνολογία παρασκευής του τυριού. Οι κατηγορίες πηκτικών ενζύμων που υπάρχουν είναι οι εξής:

Πυτιά: Αποτελεί το κύριο πηκτικό μέσο. Με το όνομα “’πυτιά” φέρεται στο εμπόριο κυρίως το ζωικής προέλευσης παρασκεύασμα του ήνυστρου των μικρών μηρυκαστικών. Η πυτιά από ήνυστρα μικρών μηρυκαστικών έχει εντονότερη δράση και δίνει εντονότερη γεύση και άρωμα στο τυρί σε σχέση με την πυτιά που παράγεται από το ήνυστρο μοσχαριών. Το εκχύλισμα που παράγεται με ειδική κατεργασία περιέχει κατά κύριο λόγο το ένζυμο ρεννίνη κατά 88%-94% και σε μικρότερη αναλογία 6%-12% πεπτίνη και άλλες πεπτιδάσες. Πρέπει να έχει ικανοποιητική πηκτική ισχύ και να είναι απαλλαγμένη από μικροοργανισμούς που μπορούν να προκαλέσουν ανώμαλη ζύμωση ή είναι παθογόνοι. Πρέπει να έχει pH 5,8 και να διατηρείται σε θερμοκρασία ψύξης εκτός άμα είναι υπό μορφή σκόνης, οπότε μπορεί και διατηρείται εκτός ψυγείου σύμφωνα πάντα, με τις οδηγίες του παρασκευαστή (Μάντης, κ.ά., 2015,2018).

Υποκατάστατα πυτιάς

- Ζωικής προέλευσης: Τέτοια πηκτικά ένζυμα ζωικής προέλευσης ή συνδυασμός αυτών μπορεί να είναι πεψίνη βοοειδών, χοίρων, μοσχαριών και συνδυασμός πεψίνης μοσχαριού/χοίρου(50/50).
- Φυτικής προέλευσης: Περισσότερο γνωστό είναι η φυκίνη που προέρχεται από το Ficus (Ficus carica) και η παπαΐνη που λαμβάνεται από το φυτό Carica papaya.
- Μικροβιακής προέλευσης: Σε μερικές χώρες μεγάλο μέρος της τυροκόμησης γίνεται με τη χρήση πεπτικών ενζύμων μικροβιακής προέλευσης. Χρησιμοποιούνται πηκτικά ένζυμα από είδη όπως *Bacillus*, *Kluyveromyces lactis*, *Escherichia coli* καθώς και είδη μυκήτων όπως *M.pusillus* και *Aspergillus niger* (Μάντης, κ.ά., 2015,2018).

Εκτός από τα πηκτικά ένζυμα γίνεται και χρήση **οξυγαλακτικών καλλιιεργειών (Lactic Acid Bacteria ή starters) ή ειδών μυκήτων**. Αυτές/οί, βοηθούν στην διαδικασία της ζύμωσης των τυριών, η οποία αρχίζει λίγο πριν την πήξη του γάλακτος και ολοκληρώνεται κατά την ωρίμανση του τυριού. Τα βακτήρια που ενοφθαλμίζονται στο γάλα είναι: Είδη *Streptococcus* (*Str.thermophilus*), Είδη *Lactococcus* (*Lc. Lactis subsp. Lactis*), Είδη *Lactobacillus* (*Lb. casei*, *Lb. helveticus*), Είδη *Leuconostoc* (*Leuc. mesenteroides subsp.*

cremoris.) και Είδη *Propionibacterium (P. Shermanii)*. Από τους μύκητες χρησιμοποιούνται κυρίως τα είδη *Penicillium* για εσωτερικό ενοφθαλμισμό και *P.camemberti* για επιφανειακή ανάπτυξη. Η καλλιέργεια χρήσης προετοιμάζεται από αντίστοιχη μητρική, διαδικασία που απαιτεί προσοχή για την αποφυγή επιμολύνσεων, αλλιώς, χρησιμοποιείται συμπυκνωμένη καλλιέργεια εμπορίου, για την προσθήκη της κατευθείαν προς το τυροκόμηση γάλα. Παλιότερα, η ζύμωση των τυριών γινόταν μόνο με την αυτόχθονη οξυγαλακτική χλωρίδα, όμως υπήρχαν ανώμαλες ζυμώσεις (Μάντης, κ.ά., 2015,2018).

Τέλος, χρησιμοποιείται το κοινό μαγειρικό **αλάτι** (NaCl) το οποίο πρέπει να είναι καλά αφυδατωμένο (υγρασία<4%) και απαλλαγμένο από ξένες ύλες και παθογόνους μικροοργανισμούς. Οι προσμίξεις χαλκού (Cu) και μαγνησίου (Mg) δεν πρέπει να υπερβαίνουν το 0,01%, αλλιώς υπάρχει κίνδυνος πικρότητας του προϊόντος. Άλλες πρόσθετες ύλες που χρησιμοποιούνται είναι τα ιόντα ασβεστίου και χλωρίου και χρωστικές (Μάντης, κ.ά., 2015,2018).

2. Προετοιμασία γάλακτος

Η προετοιμασία ξεκινάει με τον έλεγχο της ποιότητας του γάλακτος. Στις σύγχρονες τυροκομικές επιχειρήσεις το γάλα που προορίζεται για παραγωγή τυριού υποβάλλεται σε ποιοτικό έλεγχο. Ελέγχεται κυρίως η οξύτητά του, η ικανότητα προς πήξη και η πιθανή ύπαρξη αντιμικροβιακών ουσιών (αντιβιοτικά), οι οποίες μπορούν να επηρεάσουν την ανάπτυξη των οξυγαλακτικών καλλιέργειών και συνεπώς την ωρίμανση του τυριού. Παράλληλα γίνεται έλεγχος λιποπεριεκτικότητας και του ΣΥΑΛ (Στερεό υπόλειμμα άνευ λίπους) και το γάλα τυποποιείται προς το λίπος και τις πρωτεΐνες, με προσθήκη κρέμας η αποβουτυρωμένου γάλακτος. Αμέσως μετά τον έλεγχο γίνεται η παστερίωση του γάλακτος. Η παστερίωση μπορεί να γίνει στους 63-65°C για 30 min (βραδεία παστερίωση LTLT) ή στους 72-73°C για 15 sec (ταχεία παστερίωση HTST) έτσι ώστε να απαλλαχθεί το γάλα από παθογόνους μικροοργανισμούς. Το απαστερίωτο γάλα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τυροκομία μόνο άμα έχει επεξεργαστεί με μια από τις παρακάτω μεθόδους: Θέρμιση του γάλακτος, βακτηριοκάθαρση (*bactofugation*), ή προσθήκη υπεροξειδίου του υδρογόνου στο γάλα. Μετά τη διαδικασία της παστερίωσης το γάλα φέρεται σε θερμοκρασία ευνοϊκή για την ανάπτυξη των στελεχών της ειδικής οξυγαλακτικής καλλιέργειας και ενοφθαλμίζεται με την ανάλογη ποσότητα της από την καλλιέργειας αυτή η οποία πρέπει να είναι πρόσφατη ζωντανή και χωρίς επιμολύνσεις (Μάντης, κ.ά., 2015,2018).

3. Πήξη γάλακτος

Η πήξη του γάλακτος γίνεται με πυτιά. Η πυτιά προετοιμάζεται υπό μορφή διαλύματος και προστίθεται στο γάλα σε ποσότητα ανάλογα με την πηκτική της δύναμη. Το γάλα πρέπει να διατηρείται σε 30-35°C και η πήξη πρέπει να ολοκληρωθεί σε 30-60 min. Η ταχύτητα της πήξης και η συνεκτικότητα του τυροπήγματος επηρεάζεται εκτός από την ποσότητα και το είδος της πυτιάς και τη θερμοκρασία του γάλακτος, το pH, την περιεκτικότητα σε ασβέστιο (Ca), την αναλογία λίπους προς ΣΥΑΛ, την μετουσίωση των πρωτεϊνών του ορού, την πρωτεώλυση της κ-καζεΐνης και άλλους παράγοντες (Μάντης, κ.ά., 2015,2018). Μετά την προσθήκη της πυτιάς, το γάλα αφήνεται σε ηρεμία για να γίνει η πήξη κάτω από συνθήκες πλήρους ακινησίας. Ο χρόνος πρόπηξης του πρέπει να είναι περίπου 8 min. Η πρόπηξη ή αρχή της πήξης γίνεται αισθητή με την αύξηση του ιζώδους του γάλατος. Ο χρόνος αυτός διαπιστώνεται με τους εξής τρόπους:

- Εμφάνιση κόκκων πήγματος καζεΐνης στη σπάτουλα με μαύρο χρώμα.
- Παραμένει σε κατακόρυφο θέση η εισαγωγή σπέρτου, στην επιφάνεια του γάλατος.
- Σταγόνα νερού διατηρεί το σχήμα της όταν τοποθετείται στην επιφάνεια του γάλατος.
- Διατήρηση φυσαλλίδων που σχηματίζονται όταν αναταραχθεί το γάλα. Καθώς προχωρεί ο μηχανισμός της πήξης, το γάλα από ιζώδες γίνεται στερεότερο και τελικά παίρνει τη μορφή του τυροπήγματος με τη χαρακτηριστική ζελατινώδη μαλακή υφή

(ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑ ΗΠΕΙΡΟΥ, 2015).

4. Διαίρεση του τυροπήγματος

Μετά την πήξη, το τυρόπηγμα διαιρείται με τυροκόπτη. Περισσότερη διαίρεση οδηγεί σε μεγαλύτερη διαφυγή του λίπους στο τυρόγαλα και πιο γρήγορη αποβολή του τυρογάλακτος. Η υπερβολική διαίρεση του τυροπήγματος κυρίως όταν το γάλα έχει χαμηλή λιποπεριεκτικότητα και υψηλή οξύτητα πρέπει να αποφεύγεται (ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑ ΗΠΕΙΡΟΥ, 2015).

5. Στράγγιση ή Αναθέρμανση και εξαγωγή τυροπήγματος

Η αναθέρμανση γίνεται υπό συνεχή ανάδευση αρχικά με βραδύ ρυθμό και επιταχύνεται στη συνέχεια. Ο καθορισμός της θερμοκρασίας διαφέρει ανάλογα το είδος και την ποιότητα του γάλακτος. Αν η οξύτητα του τυρογάλακτος κατά τη διαίρεση, είναι πάνω από την κανονική, τότε απαιτείται ταχύτερη αναθέρμανση και υψηλότερες θερμοκρασίες. Αν αντίθετα η

οξύτητα είναι ανεπαρκής, τότε επιμηκύνεται ο χρόνος θερμάνσεως ενώ η θερμοκρασία είναι χαμηλότερη από τη κανονική (ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑ ΗΠΕΙΡΟΥ, 2015).

Αν δε γίνει αναθέρμανση του τυροπήγματος, μπορεί να γίνει άμεση στράγγιση όταν κοπεί και εισαγωγή του σε διάφορα καλούπια μέχρι να αποβληθεί το τυρόγαλα. Για καλύτερη στράγγιση, γίνεται αναστροφή καλουπιών. Η άμεση στράγγιση γίνεται συνήθως στα μαλακά τυριά (Μάντης, κ.ά, 2015,2018).

Η τυρομάζα, κόβεται σε τεμάχια και μεταφέρεται σε καλούπια, στα οποία προηγουμένως έχει απλωθεί από ένα τυρόπανο (τσαντίλα). Τα καλούπια συνήθως είναι μεταλλικά ανοξείδωτα, κυκλικού σχήματος, χωρίς πυθμένα, διαμέτρου 25-35 cm και ύψους 7-9 cm. Κάθε καλούπι συνοδεύεται με μία ξύλινη βάση και ένα ξύλινο δίσκο – τάκο. Ο τελευταίος έχει μικρότερη διάμετρο από εκείνη του καλουπιού, για να είναι δυνατή η άσκηση της πίεσεως στην τυρομάζα (ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑ ΗΠΕΙΡΟΥ, 2015).



Εικόνα 4.1.1 Αναθέρμανση τυροπήγματος
(ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑ ΗΠΕΙΡΟΥ, 2015).

6. Πίεση και Αλάτισμα τυριού

Στα σκληρά και ημίσκληρα κυρίως τυριά, ασκείται πίεση για να αποβληθεί όσο περισσότερο τυρόγαλα γίνεται και να συγκολληθούν οι κόκκοι της τυρομάζας ενιαία. Η πίεση γίνεται σε ειδικά πιεστήρια και διαφέρει ανάλογα το είδος τυριού. Ανάλογα με το είδος του πιεστηρίου, τα καλούπια μπαίνουν σ' αυτό ανά ένα, ανά δύο ή και περισσότερα χωριζόμενα μεταξύ τους.

Μετά την πίεση τους τα τυριά βγαίνουν από τις τσαντίλες ξαναμπαίνουν στα καλούπια και μεταφέρονται σε αποθήκη 14-16 °C (Μάντης, κ.ά., 2015,2018).

Η αλάτιση διαφέρει ανάλογα το είδος του τυριού. Το αλάτι είναι χοντρόκκοκο σε μέγεθος ρυζιού. Υπάρχουν οι εξής μέθοδοι αλάτισης:

- Προσθήκη αλατιού στο γάλα προς τυροκόμηση
- Αλάτιση του τυροπήγματος
- Ξηρή αλάτιση
- Έγχυση άλμης
- Υγρή αλάτιση σε άλμη

(Μάντης, κ.ά., 2015,2018).



Εικόνα 4.1.2 Πιεστήριο με καλούπι όπου εισέρχεται στο τυρόπηγμα (ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑ ΗΠΕΙΡΟΥ, 2015).

7. Ωρίμανση

Η ωρίμανση των τυριών γίνεται σε θαλάμους με θερμοκρασία 14°C και σχετική υγρασία 85-90%. Το επίπεδο αυτό της σχετικής υγρασίας είναι τέτοιο, ώστε να μην προκαλείται υπερβολική εξάτμιση και συνεπώς ξηράνση ή δημιουργία ρωγμών στα τυριά. Το στάδιο αυτό είναι επίσης πολύ κρίσιμο διότι καθορίζει και αυτό σε μεγάλο βαθμό το είδος του

τυριού και πραγματοποιούνται διεργασίες που προκαλούνται από την πυτιά, από μικροοργανισμούς της οξυγαλακτικής καλλιέργειας (SLAB) και εκείνων που επιβιώνουν μετά την παστερίωση του γάλατος (NSLAB) καθώς και από τα ένζυμα που προέρχονται από τους μικροοργανισμούς, που παραμένουν στο γάλα ή που προστίθενται στο γάλα. Στο θάλαμο ωρίμανσης, πλένονται τα τυριά με αραιή άλμη και τρίβονται συγχρόνως με τη βοήθεια ψήκτρας ή υφάσματος. Επίσης, επουλώνονται οι τυχόν ρωγμές με λίπος (ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑ ΗΠΕΙΡΟΥ, 2015).

Η πορεία ωρίμανσης εξαρτάται από:

- το είδος και τη δραστηριότητα της μικροχλωρίδας που υπάρχει στο τυρί.
- από τη θερμοκρασία ωρίμανσης.
- από τη σχετική υγρασία του θαλάμου ωρίμανσης (Μάντης, κ.ά., 2015,2018).



Εικόνα 4.1.3 Χώρος ωρίμανσης και αποθήκευσης τυριών

(ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑ ΗΠΕΙΡΟΥ, 2015).

Με βάση τη δομή, τη συνεκτικότητά τους, την υγρασία και τον τρόπο παρασκευής και ωρίμανσής τους τα τυριά κατατάσσονται στις εξής κατηγορίες σύμφωνα με τον πίνακα:

Κατηγορίες Τυριών	Χαρακτηριστικά τυριών
Πολύ Σκληρά	Ωριμάζουν με βακτήρια που αναπτύσσονται σε όλη τους τη μάζα και έχουν υγρασία λιγότερο από 32% (Parmesan, Romago, Asiago και Pecorino).

<p>Ημίσκληρα</p>	<p>Ημίσκληρα τυριά που ωριμάζουν με βακτήρια σε όλη τους τη μάζα (Edam, Gouda και Κασέρι). Ημίσκληρα τυριά που ωριμάζουν με εσωτερική ανάπτυξη μυκήτων.(Roquefort, Blue cheese). Ημίσκληρα που ωριμάζουν με επιφανειακή ανάπτυξη βακτηρίων (Brick και Limburger). Η υγρασία με βάση τη νομοθεσία δεν πρέπει να υπερβαίνει το 46%.</p>
<p>Σκληρά</p>	<p>Τα σκληρά τυριά ωριμάζουν με βακτήρια σε όλη τους τη μάζα διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: Α- Σκληρά τυριά με οπές στην τυρομάζα. Στα τυριά αυτά εκτός από την ομοιογαλακτική ζύμωση έχουμε και ετερογαλακτική ζύμωση όπου παράγεται CO₂ και δημιουργούνται οι οπές γνωστές και ως μάτια (Γραβιέρα, Λαδοτύρι, Κεφαλοτύρι και Ελβετικό τυρί Emmental). Β-Σκληρά τυριά χωρίς οπές στη τυρομάζα. Η ζύμωση είναι ομοιογαλακτική (Cheddar και Provolone). Η υγρασία δεν πρέπει να ξεπερνάει το 38%.</p>
<p>Μαλακά</p>	<p>Περιλαμβάνονται τυριά που ωριμάζουν με βακτήρια σε όλη την επιφάνεια της μάζας τους (Φέτα, Τελεμές και Κοπανιστή). Τυριά που ωριμάζουν με επιφανειακή ανάπτυξη μυκήτων (Camembert και Brie). Η υγρασία στα μαλακά τυριά διακυμαίνεται από 46% έως και 58%.</p>
<p>Νωπά τυριά με αλοιφώδη υφή</p>	<p>Έχουν υψηλό ποσοστό υγρασίας 58%-78%. Κατά την παρασκευή των περισσότερων προστίθεται οξυγαλακτική καλλιέργεια με αποτέλεσμα να έχουν μια υπόξινη ευχάριστη γεύση και άρωμα(Cottage cheese, cream cheese, Baker's , Quarg, Ricotta , Mozzarella).</p>
<p>Τυριά τυρογάλακτος</p>	<p>Χαρακτηρίζονται τα τυριά τα οποία λαμβάνονται με ισχυρή θέρμανση του τυρογάλακτος με ή χωρίς προσθήκη Α) γάλακτος Β) γάλακτος και κρέμας γάλακτος Γ) αλατιού Έχουν μέγιστη υγρασία 60%-70%, λίπος επι ξηρού 70%-50% και επιτρέπεται η χρήση πρόσθετων και βοηθητικών ουσιών (Μυζήθρα, Ανθότυρο).</p>
<p>Ανακατεργασμένα ή τηγμένα τυριά</p>	<p>Χαρακτηρίζονται τα προϊόντα που παρασκευάζονται με άλεση, ανάμιξη, λιώσιμο και γαλακτωματοποίηση διαφόρων ειδών τυριών με θέρμανση και προσθήκη γαλακτωματοποιητών, με ή χωρίς την προσθήκη γάλακτος ή άλλων τροφίμων. Στη συσκευασία τους πάντα αναγράφεται ότι είναι ανακατεργασμένα, όπως επίσης και τα πρόσθετα που έχουν χρησιμοποιηθεί κατά την παρασκευή του.</p>

Πίνακας 4.1.1 Κατάταξη τυριών με βάση τη δομή, τη συνεκτικότητάς τους, την υγρασία και τον τρόπο παρασκευής και ωρίμανσής τους (Μάντης, κ.ά, 2015,2018).

4.2 Προβιοτικά και τυρί

Ένα προβιοτικό τρόφιμο είναι ένα επεξεργασμένο προϊόν που περιέχει ζωντανούς προβιοτικούς μικροοργανισμούς σε επαρκή συγκέντρωση. Ο γαλακτοκομικός τομέας υπερτερεί στον τομέα των προβιοτικών τροφίμων και το τυρί προσφέρει αρκετά πλεονεκτήματα ως προβιοτικός φορέας. Για να αναγνωριστεί ένα τυρί ως προβιοτικό, οι κατάλληλοι προστιθέμενοι προβιοτικοί μικροοργανισμοί πρέπει να διατηρήσουν την ποσότητα και την ποιότητα καθ' όλη τη διάρκεια των διαδικασιών που συμβαίνουν κατά την παρασκευή, κάτι το οποίο δεν είναι τόσο εύκολο, ξεκινώντας από το γεγονός ότι ο ανταγωνισμός θα ασκηθεί κατά πάσα πιθανότητα από καλλιέργειες εκκίνησης και θα τελειώσει με την πρόκληση να επιτευχθεί σωστή παράδοση στο γαστρεντερικό σωλήνα (Castro, et al., 2015).

Τα τελευταία χρόνια αναπτύσσονται νέες ποικιλίες τυριών, ενσωματώνονται νέα προβιοτικά και καλά χαρακτηρισμένα στελέχη, ή κατασκευάζονται συμβιωτικά τυριά. Ωστόσο, τεχνολογικά εμπόδια συναντώνται στην ανάπτυξη και τη σταθερότητα των προβιοτικών τυριών. Πολλοί συζητούν, αν οι ευεργετικές προβιοτικές καλλιέργειες επιβιώνουν πραγματικά στο τυρί και γενικότερα συζητούνται πτυχές σχετικά με τη βιωσιμότητα των προβιοτικών καλλιιεργειών (Castro, et al., 2015).

Πολλά τυριά αναπτύσσονται ως προβιοτικά και επιστημονικά δεδομένα δείχνουν ότι η προβιοτική καλλιέργεια εξακολουθεί να υπάρχει σε αρκετά υψηλούς αριθμούς. Μελλοντικά, ο αριθμός των διαθέσιμων προβιοτικών τυριών θα αυξηθεί σημαντικά, αν και πολλά από αυτά δεν θα είναι εμπορεύσιμα, ακόμη και αν έχουν επιπρόσθετα πλεονεκτήματα, όπως χαμηλότερη περιεκτικότητα σε λιπαρά ή χοληστερόλη, επειδή δεν θα έχουν επιθυμητή γεύση ούτε επιθυμητά χαρακτηριστικά, για παράδειγμα, στη ρεολογία (Castro, et al., 2015).

Οι περισσότερες μελέτες για στελέχη που χρησιμοποιούνται ως προβιοτικά βασίζονται σε λειτουργικές ιδιότητες και λιγότερες γνώσεις είναι σχετικά διαθέσιμες με την ικανότητά τους να αντέχουν στο stress που υπόκεινται με την παραγωγή και την αποθήκευση των

τροφίμων. Το τυρί ως προβιοτικό τρόφιμο αποτελεί μια καλή επιλογή για τη γαλακτοκομική βιομηχανία, αλλά ταυτόχρονα αποτελεί τεχνολογική πρόκληση. Η βιωσιμότητα των στελεχών και η διατήρηση επιθυμητών χαρακτηριστικών κατά τα στάδια επεξεργασίας και αποθήκευσης είναι απαραίτητη για να εξασφαλιστεί ένα ευεργετικό αποτέλεσμα (Castro, et al., 2015).

4.3 Χρήση προβιοτικών στελεχών στο τυρί

Ένας τομέας ενεργού έρευνας είναι η αναζήτηση στελεχών που εμφανίζουν επιθυμητά χαρακτηριστικά, όπως η ικανότητα παραγωγής αντιμικροβιακών ενώσεων, η απουσία μικροβιοανθεκτικότητας και η ικανότητα επιβίωσης των επιβληθέντων τεχνολογικών εμποδίων κατά την παρασκευή τυριών. Οι περισσότερες μελέτες ως τώρα έχουν επικεντρωθεί στα *Lactobacillus spp.* και *Bifidobacterium spp.* (Castro, et al., 2015).

Τα προβιοτικά *Lactobacillus spp.* και *Bifidobacterium spp.* είναι οι πιο συνηθισμένοι μικροοργανισμοί που περιλαμβάνονται στο τυρί, μιας και η φυσιολογία τους ταιριάζει πολύ καλά σε αυτή τη μήτρα. Ωστόσο, πολλά άλλα βακτήρια εκτός από αυτά μπορεί να παίζουν βασικούς ρόλους στα προβιοτικά τυριά και άλλοι μικροβιακοί υποψήφιοι αναμένεται να αυξήσουν τον αριθμό τους μελλοντικά. Μερικά παραδείγματα με ιδιαίτερο ενδιαφέρον αποτελούν τα προβιοτικά δυνητικά προπιονοβακτήρια (Propionic Acid Bacteria, PAB) και βακτήρια του γένους *Pediococcus*. (Castro, et al., 2015).

Δυνητικά προπιονοβακτήρια (PAB): αυτά είναι γνωστά όχι μόνο για την ικανότητά τους να παράγουν προπιονικό οξύ με αντιμικροβιακές ιδιότητες ιδιαίτερα έναντι των μυκήτων, αλλά ακόμη παράγουν ποικιλία βακτηριοσινών, με ένα ευρύτερο αντιμικροβιακό φάσμα που καλύπτει άλλα Gram⁺ βακτήρια, συμπεριλαμβανομένων LAB, Gram⁻ βακτηρίων, ζυμών και νηματοειδών μυκήτων σε ορισμένες περιπτώσεις. Επιπλέον, τα γαλακτοκομικά προπιονοβακτήρια παρουσιάζουν τεχνολογικές ιδιότητες πολύ κατάλληλες για τη χρήση τους ως προβιοτικά στο τυρί. Εμφανίζουν δηλαδή, ανοχή σε τεχνολογικές πιέσεις, όπως η ανασύσταση στο γάλα, η ζύμωση ενός ευρέος φάσματος με υποστρώματα υδατανθράκων, η μικροενθυλάκωση, η ξήρανση με ψεκασμό, η ξήρανση με ψύξη, και η αποθήκευση σε χαμηλές θερμοκρασίες. Τα προπιονοβακτήρια στο τυρί έχουν καλύτερη ανοχή στην πρόκληση οξέος από τις ελεύθερες καλλιέργειες και παράγουν προπιονικό οξύ, ένα φυσικό

βιολογικό οξύ που ωφελεί το bifidus microbiota και εμφανίζει μια καλή συστατική επιβίωση κάτω από το πεπτικό στρες (Castro, et al., 2015).

Ωστόσο, η συμπλήρωση με γαλακτοκομικά προπιονοβακτήρια περιλαμβάνει κυρίως μείγματα με προβιοτικά βακτήρια από άλλα γένη. Υπάρχουν διαθέσιμα συμπληρώματα διατροφής σε κάψουλες σχεδιασμένες για τη διατήρηση της ισορροπίας του εντερικού οικοσυστήματος, η οποία περιλαμβάνει δύο στελέχη *P. freudenreichii securil*, στην αγορά. Η χρήση των propionibacteria ως πρόσθετο προβιοτικό ή σε συνδυασμό με LAB ή/και bifidobacteria είναι θέμα χρόνου. Έχει αναφερθεί ότι ένα τυρί που περιέχει ένα μείγμα προβιοτικών (λακτοβάκιλλους και *P. freudenreichii ssp. shermanii* JS) μειώνει το ρίσκο υψηλών μετρήσεων μυκήτων, ειδικά *Candida spp.* σε ηλικιωμένους (Castro, et al., 2015).

Pediococcus: μόνο τα *P. acidilacti* και *P. pentosaceus* είναι σχετικά γαλακτοκομικά στελέχη που βρίσκονται στα τυριά ως τυχαίες καλλιέργειες και χρησιμοποιούνται περιστασιακά κατά την παρασκευή τους. Ορισμένες από τις ιδιότητές τους, όπως η ικανότητα παραγωγής αντιμικροβιακών ενώσεων (πεδιοκίνη) και η τροποποίηση της υφής λόγω της ικανότητάς τους να παράγουν εξωπολυσακχαρίτες έχουν τραβήξει την προσοχή των ερευνητών. Υπάρχουν προβιοτικοί υπονήφιοι οι οποίοι προάγουν το σχηματισμό γαλακτικού κρυστάλλου μέσω του σχηματισμού μείγματος L- και D-γαλακτικών ισομερών που συνήθως θεωρείται ως ελάττωμα του τυριού. Επιπλέον, η προσθήκη καθαρών βακτηριοσινών έχει μέχρι στιγμής περιορισμένες εγκεκριμένες χρήσεις στα τρόφιμα. Το 1988, η νισίνη που παράχθηκε από το *Lactococcus lactisreived* έλαβε την έγκριση ΗΠΑ-FDA ως πρόσθετο τροφίμων για πρώτη φορά και χρησιμοποιείται στην Ευρωπαϊκή ένωση σε ορισμένα τυριά (Castro, et al., 2015).

Η χρήση των *pediococci* που παράγουν πεδικινή Pediocin-PA-1 μπορεί να συμβάλει στη βελτίωση των αισθητηριακών ιδιοτήτων και στην αποφυγή ανάπτυξης ανεπιθύμητων μικροβίων. Για παράδειγμα, η Danisco εμπορεύεται το λυοφιλοποιημένο *P. acidilactali* για να συμπεριληφθεί ως συμπληρωματικός εκκινητής στην επεξεργασία τυριού cheddar και άλλων ημίσκληρων τυριών για ενίσχυση του αρώματος και της γεύσης. Παρόμοια στελέχη αναμένεται να αξιοποιηθούν με τον ίδιο τρόπο στο μέλλον (Castro, et al., 2015).

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	Others (*)
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i>	<i>E. faecium</i>
<i>L. casei</i> ssp. <i>pseudopantarum</i>	<i>B. breve</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
<i>L. casei</i> ssp. <i>rhamnosus</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Leuconostoc paramesenteroides</i>
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	<i>B. lactis</i>	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i>
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i>	<i>B. longum</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>L. gasseri</i>		
<i>L. paracasei</i>		
<i>L. plantarum</i>		
<i>L. rhamnosus</i>		
<i>L. salivarius</i>		

Εικόνα 4.3.1 Είδη που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως προβιοτικά στο τυρί

(Castro, et al., 2015).

Παρά το γεγονός ότι ένα συγκεκριμένο είδος ενδιαφέροντος για την παρασκευή τυριών μπορεί να διατίθεται σε επαρκείς ποσότητες για να καλύψει τις βιομηχανικές απαιτήσεις, πρέπει να είναι σταθερό, ανεξάρτητα από το εάν έχει σχεδιαστεί ως καλλιέργεια εκκίνησης ή προβιοτικό συμπλήρωμα ή συμπληρωματική καλλιέργεια. Όλα τα είδη έχουν πολλές κοινές ιδιότητες, όμως προφανώς μπορούν να παίξουν και διαφορετικούς ρόλους. Οι καλλιέργειες εκκίνησης χρησιμοποιούνται σε ένα ή περισσότερα στάδια στη διαδικασία παρασκευής τυριού, αναπτύσσουν επιθυμητή μεταβολική δραστηριότητα κατά τη ζύμωση ή την ωρίμανση, προσδίδοντας με αυτό το τρόπο μοναδικά χαρακτηριστικά κυρίως γεύση, άρωμα, χρώμα, υφή, ασφάλεια, συντήρηση, διατροφική αξία και ίσως, πιθανά οφέλη για την υγεία σύμφωνα με τον ορισμό της μικροβιακής καλλιέργειας στα τρόφιμα από τον Ευρωπαϊκό Σύνδεσμο Τροφίμων, Ζωοτροφών και μικροβιακών καλλιεργειών (European Food and Feed Cultures Association-EFFCA).

Μια συνδυασμένη προσθήκη προβιοτικών βακτηρίων και καλλιέργειας εκκίνησης απαιτεί δοκιμή κατάλληλων αναλογιών για την επίλυση βιώσιμης προβιοτικής απώλειας κατά την αποστράγγιση. Τα προβιοτικά μπορούν να προστεθούν ως αρχικός εκκινητής/πρωτεύουσα

καλλιέργεια ή ως συμπληρωματική καλλιέργεια. Στην πρώτη περίπτωση, η χαμηλή ικανότητα των προβιοτικών να παράγουν γαλακτικό οξύ κατά τη διάρκεια της ζύμωσης θα μπορούσε να θεωρηθεί μειονέκτημα (Castro, et al., 2015).

4.4 Μειονεκτήματα χρήσης προβιοτικών στελεχών στο τυρί

Με την πρώτη ματιά, η χρήση στελεχών της γαστρεντερικής οδού (Gastrointestinal Tract, GIT) μπορεί να θεωρηθεί ως ένα μειονέκτημα για την παραγωγή τυριών, καθώς είναι δύσκολο να παρασκευαστούν συγκεκριμένα τυριά με ιδιαίτερες και αυθεντικές ιδιότητες, όταν προστίθενται μεγάλες ποσότητες συμπληρωματικών καλλιεργειών. Τα GIT στελέχη είναι συνήθως ευαίσθητα στο οξυγόνο και απαιτητικά σε πολύπλοκα θρεπτικά συστατικά. Αυτό αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους λόγους γιατί για ένα νέο στέλεχος είναι αναγκαίο να επιδείξει «λογική» συμπεριφορά επιβίωσης, όταν προστίθεται κατά τη διαδικασία παρασκευής τυριού και επίσης να ελέγχει τις επιδράσεις στη χρήση υδατανθράκων, πρωτεϊνών και λίπους. Βρέθηκε μια καλή επιβίωση προβιοτικών μικροοργανισμών σε προσομοιωμένες γαστρεντερικές συνθήκες των προβιοτικών στελεχών που προστέθηκαν στο τυρί cottage και παρουσίασαν μια καλή μεταβολική συμπεριφορά και τη δημιουργία δυνητικών αντιοξειδωτικών πεπτιδίων τα οποία έχουν αντιεπιληπτική δράση (Castro, et al., 2015).

Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι ένα αρχικό και συχνό σοβαρό πρόβλημα για οποιοδήποτε προβιοτικό στέλεχος να συμπεριληφθεί στην επεξεργασία γαλακτοκομικών τροφίμων είναι η μεγάλης κλίμακας παραγωγή βιομάζας. Είναι αξιοσημείωτο να αναφερθεί ότι αυτή η κλιμάκωση πρέπει να λύσει τις κατάλληλες διαδικασίες ζύμωσης, επαρκή φθηνά συστατικά, και συνθήκες ανάπτυξης καθώς επίσης και δοκιμές για την παρουσία πιθανών αλλεργιογόνων. Η βιομάζα στην συνέχεια συμπυκνώνεται με φυγοκέντηση ή υπερδιήθηση και διατηρείται χρησιμοποιώντας στάδια ξήρανσης με κατάψυξη και κρυοσυντηρητικά για μεγιστοποίηση της μεταγενέστερης ανάκτησης των κυττάρων. Τα τελικά βήματα περιλαμβάνουν σωστή άλεση και συσκευασία (Castro, et al., 2015).

4.5 Παράγοντες που επηρεάζουν τη βιωσιμότητα των προβιοτικών στο τυρί

Πολλοί παράγοντες σύνθεσης και διεργασίας, καθώς και οι συνθήκες αποθήκευσης, επηρεάζουν σημαντικά τη βιωσιμότητα των προβιοτικών στο τυρί. Πιο συγκεκριμένα, το είδος και η ποσότητα προβιοτικών εμβολιασμού, οι συμπληρωματικές αρωματικές ουσίες, οι ανταγωνιστικές ουσίες του μικροβιώματος, η πιθανή παρουσία βακτηριοσινών ή άλλων αντιμικροβιακών ουσιών, το pH, το δυναμικό οξειδοαναγωγής, η θερμοκρασία επώασης και αποθήκευσης, η δραστηριότητα του αλατιού και του νερού και τα υλικά συσκευασίας αποτελούν μερικούς παράγοντες από αυτούς (Castro, et al., 2015).

Από δεδομένα που συλλέχθηκαν, είναι φανερό ότι, η ικανότητα επιβίωσης συνδέεται με ένα συγκεκριμένο στέλεχος και όχι με ένα συγκεκριμένο είδος ή γένος. Ως εκ τούτου, είναι σημαντική η μελέτη κατά περίπτωση, για να δούμε αν τα χαρακτηριστικά διατηρούνται σωστά στη μήτρα του τυριού ή όχι. Ένα ενδεικτικό γενικό παράδειγμα θα μπορούσε να είναι ο *Lactococcus lactis ssp. lactis*, που είναι υποψήφιο προβιοτικό για χρήση στην υδατοκαλλιέργεια. Η σημαντικά υψηλότερη αλογονικότητα/ αλογόρος (η ικανότητα ενός οργανισμού να αναπτύσσεται σε συγκεντρώσεις άλατος υψηλότερες από αυτές που απαιτούνται για την ανάπτυξη/ανοχή στο ιονικό στρες) στα στελέχη από θαλάσσια ψάρια σε σύγκριση με εκείνα που χρησιμοποιήθηκαν ως εκκινητές τυριού, δείχνει ότι κάθε στέλεχος έχει προσαρμοστεί στο ιδιαίτερο περιβάλλον του, επιβεβαιώνοντας την ανάγκη διεξαγωγής προσεκτικής επιλογής στελέχους ανάλογα με το σκοπό. Είναι δύσκολο να φανταστεί κανείς πώς θα εξελιχθεί η συμπεριφορά μιας αποικίας. Επομένως, πρέπει να διεξαχθούν σε βάθος μελέτες για να διασφαλιστούν κατάλληλα χαρακτηριστικά και να επιβεβαιωθεί η σταθερότητα, προκειμένου τα χαρακτηριστικά αυτά να μπορούν να διατηρηθούν. (Castro, et al., 2015)

Το προβιοτικό τυρί cheddar αξίζει ιδιαίτερη αναφορά, καθώς είναι σήμερα το πιο ευρέως παραγόμενο και καταναλώμενο σκληρό τυρί στον κόσμο. Διαφορετικές αναφορές δείχνουν, ότι διαφορετικά είδη/στελέχη του *Lactobacillus* και *Bifidobacterium* εμφανίζουν διαφορετική ικανότητα επιβίωσης, αν και ορισμένες αναφορές περιγράφουν σαφώς ότι παράγοντες όπως το αλάτι, το οξύγνο και η θερμοκρασία επηρεάζουν αρνητικά τη βιωσιμότητα (Castro, et al., 2015).

4.6 Τεχνικές αύξησης της βιωσιμότητας των προβιοτικών στο τυρί

4.6.1 Παστερίωση γάλακτος

Το γάλα ξεκινά την ιστορία του τυριού. Στην παρασκευή τυριών μεγάλης κλίμακας, το γάλα είναι γενικά παστεριωμένο, για παράδειγμα, 73° C για 15 sec. Τα βακτήρια γαλακτικού οξέος μη εκκινητές (NSLAB) μπορούν να επιβιώσουν από την παστερίωση σε χαμηλούς αριθμούς και να αναπτύσσονται αργά κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης του τυριού έως 10^6 - 10^7 CFU/g, ανάλογα με την περίοδο ωρίμανσης και τη θερμοκρασία. Τα περισσότερα είδη NSLAB είναι λακτοβάκιλλοι, πεδιόκοκκοι, και μικρόκοκκοι. Αυτό είναι ενδιαφέρον, διότι τουλάχιστον στις δύο πρώτες περιπτώσεις τα διάφορα είδη που εμπλέκονται περιλαμβάνουν NSLAB καθώς επίσης και τα προβιοτικά στελέχη, δηλαδή, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, και ούτω καθεξής. Η χρήση και των δύο ειδών στελεχών θα μπορούσε να βελτιώσει την ένταση της γεύσης του τυριού και να παρέχει κατάλληλες τεχνολογικές ιδιότητες, όπως μεγαλύτερες περιόδους αποθήκευσης. Η προσθήκη των *L. plantarum* I91 και *L. paracasei* I90 ως επιλεγμένα στελέχη NSLAB άσκησε τεχνολογικό και προβιοτικό ρόλο στην επεξεργασία τυριού, παρουσιάζοντας ικανοποιητικές ιδιότητες για τη χρήση τους ως συμπληρωματικές καλλιέργειες, επιτυγχάνοντας τον διπλό ρόλο τους ως δευτερεύοντες εκκινητές και προβιοτικές καλλιέργειες (Castro, et al., 2015).

Μια εναλλακτική λύση στην παραδοσιακή θερμική επεξεργασία γάλακτος είναι μια υπερβατική κατεργασία μέσω της ομογενοποίησης υψηλής πίεσης (High Pressure Homogenization, HPH). Η τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκε κατά την επεξεργασία του τυριού Crescenza χρησιμοποιώντας *S. thermophilus* ως εκκινητή και εμπορικό προβιοτικό λακτοβάκιλλο. Οι συγγραφείς πραγματοποίησαν συνθετική, μικροβιολογική, φυσικοχημική και οργανοληπτική ανάλυση από 1 έως 12 ημέρες ψυκτικής αποθήκευσης στους (4°C). Δεν διαπιστώθηκαν σημαντικές διαφορές στη συγκριτική ανάλυση με μάρτυρες τυριού για την ολική σύνθεση και το pH. Από τη μία πλευρά, υπήρξε μια καλή τεχνολογική συμπεριφορά δεδομένου ότι το HPH-γάλα αύξησε την απόδοση του τυριού περίπου 1% και επηρέασε θετικά τη βιωσιμότητα κατά τη διάρκεια της ψυκτικής αποθήκευσης των προβιοτικών βακτηρίων. Από την άλλη πλευρά, παρατηρήθηκε σημαντική θετική επίδραση στην απελευθέρωση ελεύθερων λιπαρών οξέων και στην πρωτεόλυση του τυριού (Castro, et al., 2015).

4.6.2 Διαδικασία ζύμωσης δύο σταδίων

Η ζύμωση δύο σταδίων για τα καλλιεργημένα γαλακτοκομικά προϊόντα έχει αποδειχθεί αποτελεσματική στην αύξηση της βιωσιμότητας των προβιοτικών βακτηρίων, επιτρέποντας στα προβιοτικά να γίνονται κυρίαρχα πριν από την προσθήκη καλλιεργειών εκκίνησης. Τα βακτήρια εκκινητές θα μπορούσαν να παράγουν ανασταλτικές ουσίες κατά των προβιοτικών βακτηρίων και να αναπτυχθούν ταχύτερα κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, με αποτέλεσμα η βιωσιμότητα των προβιοτικών να μειωθεί σημαντικά. Η πραγματοποίηση ζύμωσης με προβιοτικά βακτήρια αρχικά για δύο ώρες, ακολουθούμενη από ζύμωση με καλλιέργειες εκκίνησης μπορεί να είναι χρήσιμη για τη βελτίωση της βιωσιμότητας των πρώτων και να οδηγήσει σε υψηλότερες τιμές αυτών. Αυτό επέτρεψε στα προβιοτικά βακτήρια να βρίσκονται στο τελικό στάδιο της καθυστερημένης φάσης ανάπτυξης ή στο αρχικό στάδιο της φάσης log καταγραφής, και έτσι, θα μπορούσαν να κυριαρχήσουν με αποτέλεσμα υψηλότερες μετρήσεις. Οι αρχικές μετρήσεις των προβιοτικών βακτηρίων έχει βρεθεί ότι αυξάνονται κατά τέσσερις έως πέντε φορές στο προϊόν που επεξεργάζεται η διαδικασία ζύμωσης δύο σταδίων. Τα προβιοτικά βακτήρια θα μπορούσαν επίσης να προστεθούν στο τέλος της ζύμωσης (Castro, et al., 2015).

4.6.3 Εμβολιασμός γάλακτος με προβιοτικά

Συγκρίθηκαν δύο τύποι μεθόδων εμβολιασμού σε ένα τύπο πειραματικού τυριού. Στην πρώτη περίπτωση, τα προβιοτικά βακτήρια προστέθηκαν απευθείας στο γάλα ως λυοφιλοποιημένη καλλιέργεια, ενώ στη δεύτερη περίπτωση, αρχικά προεπώσθηκαν σε ένα υπόστρωμα αποτελούμενο από γάλα και λίπος γάλακτος και στη συνέχεια προστέθηκαν στο γάλα. Η άμεση προσθήκη λυοφιλοποιημένης καλλιέργειας θεωρήθηκε πιο αποτελεσματική καθώς η άμεση προσθήκη ήταν ευκολότερη, ταχύτερη και λιγότερο τρωτή σε κάποιου είδους μόλυνση. Αν και η προεπάση στο υπόστρωμα αύξησε τον προβιοτικό πληθυσμό στο εμβόλιο κατά σχεδόν έναν κύκλο καταγραφής, ο οποίος μπορεί να θεωρηθεί οικονομικά αποδοτικότερος για τη βιομηχανία, η προσθήκη προβιοτικών μετά την προεπάση στο υπόστρωμα δεν βελτίωσε την επιβίωσή τους κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης του τυριού. Το υπόστρωμα όχι μόνο ενίσχυσε την προστασία των προβιοτικών βακτηρίων, αλλά ήταν επίσης, μια πιο πολύπλοκη μεθοδολογία από την άμεση προσθήκη λυοφιλοποιημένων

(πάγωμα-ξηρό πάγωμα) καλλιέργειών. Επιπρόσθετα, η προεπώση ήταν μια χρονοβόρα διαδικασία και θα μπορούσε να είναι ένα ευαίσθητο βήμα κατά την εξέταση ζητημάτων που σχετίζονται με τη μόλυνση και επίθεση από φάγο (Castro, et al., 2015).

Στην περίπτωση που το προβιοτικό προστεθεί αργότερα από τον εκκινητή, συνήθως περιλαμβάνεται ένα βήμα ψύξης για τη μείωση και των δυο μεταβολικών δραστηριοτήτων. Προστίθενται αργότερα πηκτικά μέσα όπως χυμός λεμονιού, φυτική πυτιά ή πρωτεολυτικά ένζυμα όπως η χυμοσίνη και η ρεννίνη ή ακόμα και παράγωγα μούχλας. Η πήξη στη συνέχεια συμβαίνει υπό ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας όταν τα ένζυμα που αναφέρθηκαν προηγουμένως εμφανίζουν βέλτιστη δραστηριότητα. Το ελαφρώς όξινο περιβάλλον κάτω από το οποίο το LAB απελευθερώνει αρκετό γαλακτικό οξύ, μειώνει το pH δημιουργώντας ένα κατάλληλο περιβάλλον για βέλτιστη δραστηριότητα της ρεννίνης. Καθώς η επεξεργασία συνεχίζεται, οι χαμηλότερες τιμές δημιουργούν μια ακατάλληλη ατμόσφαιρα για ανεπιθύμητους μικροοργανισμούς (Castro, et al., 2015).

Υπάρχουν ορισμένα σοβαρά προβλήματα που πρέπει να επιλυθούν για να επιτευχθεί βελτίωση της επιβίωσης των προβιοτικών και διαδικασίες για να βοηθηθούν τα προβιοτικά να ξεπεράσουν τα προαναφερθέντα εμπόδια. Τα προβιοτικά τοποθετούνται επίσης πολύ συχνά στο τυρί με ελαφρώς διαφορετικούς τρόπους από εκείνους που υπάρχουν στα βιομηχανικά πρωτόκολλα. Μια σαφής τάση είναι η μικροενθυλάκωση (Micro-Encapsulation, ME) των προβιοτικών βακτηρίων. Οι επικαλύψεις με βάση το αλγινικό ή άλλοι τύποι επικαλύψεων είναι έγκυροι φορείς προβιοτικών και πρεβιοτικών, λόγω της μη τοξικότητάς τους, της βιοσυμβατότητας και του χαμηλού κόστους τους. Για παράδειγμα, κύτταρα ακινητοποιημένα σε πηκτώματα αλγινικού ασβεστίου έχουν προστεθεί στο τυρί Crescenza σε μια προσπάθεια βελτίωσης της επιβίωσης των *Bifidobacterium* στο τελικό προϊόν. (Castro, et al., 2015).

Πάστες πυτιάς αρνιού που περιέχουν ενθυλακωμένο *L.acidophilus* και ένα μείγμα *B. longum* και *B.Lactis* σχεδιάστηκαν για την παρασκευή τυριού Pecorino από γάλα προβατίνας Gentile di Puglia. Από τη μία πλευρά, ο *L.acidophilus* διατήρησε τη βιωσιμότητά του για λίγες ημέρες και στη συνέχεια έδειξε μια γρήγορη μείωση. Από την άλλη, τα *B.longum* και *B.lactis*, έδειξαν μια αρχική κλίση θανάτου, ακολουθούμενη από ένα αποτέλεσμα ουράς λόγω επίκτητης αντίστασης. Μετά από μια αρχική περίοδο στην οποία παρατηρήθηκαν τα χαμηλότερα επίπεδα, τα υψηλότερα επίπεδα επιτεύχθηκαν μετά από ένα μήνα ωρίμανσης και στη συνέχεια παρέμειναν έτσι μέχρι το τέλος για το *L. acidophilus*, ενώ τα

Bifidobacterium υπέστησαν μείωση περίπου 1 CFU/g. Μεγαλύτερες ενζυμικές δραστηριότητες και θετικός συσχετισμός βρέθηκε μεταξύ ενζυμικών ενεργειών και υδατοδιαλυτού αζώτου και πρωτεόζης-πεπτόνης σε προβιοτικά τυριά λόγω της απελευθέρωσής του από αλγινικά σφαιρίδια. (Castro, et al., 2015).

Σε μια άλλη ενδιαφέρουσα μελέτη ένα αρκετά καλό ποσοστό επιβίωσης παρατηρήθηκε χρησιμοποιώντας την αλγινική-μικροενθυλάκωση ενός προβιοτικού στελέχους του *L. paracasei ssp. paracasi* κατά τη διάρκεια της παρασκευής του τυριού Mozzarella, ενός τυριού ζυμαρικού filata στο οποίο το τυρόπηγμα θερμάνθηκε σε 55° C και επακολούθως τεντώθηκε σε 70°C ζεστή άλμη ακολουθούμενη από αποθήκευση 6 εβδομάδων στους 4° C (Castro, et al., 2015).

4.6.4 Δημιουργία και κατεργασία τυροπήγματος

Ορισμένες διαδικασίες παρασκευής περιλαμβάνουν θέρμανση του τυροπήγματος. Μια θέρμανση μεταξύ 37 και 45°C επηρεάζει το ρυθμό αποβολής του ορού γάλακτος, καθώς επίσης και την ανάπτυξη της καλλιέργειας εκκίνησης. Το τυρόπηγμα και ο ορός γάλακτος συχνά αναδεύονται για να διαχωριστούν σε σωματίδια. Μόλις τα σωματίδια του τυροπήγματος γίνουν σφιχτά και έχει γίνει μια σωστή ανάπτυξη οξέος, ο ορός γάλακτος αφαιρείται επιτρέποντας στα σωματίδια να ενωθούν. Όταν το τυρόπηγμα φτάσει στην επιθυμητή υφή, διαλύεται σε μικρά κομμάτια για να μπορέσει να αλατιστεί, όπως σε τυριά σαν το Cheddar. Η άλεση του τυροπήγματος μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε με το χέρι είτε μηχανικά. Στην παραγωγή τυριού Fior di Latte μετά από μια σωστή φάση ωρίμανσης του τυροπήγματος, το στραγγισμένο τυρόπηγμα απλώνεται σε ζεστό νερό. Μια προηγούμενη επιλογή ανθεκτικών στη θερμότητα προβιοτικών λακτοβάκιλλων, αποτέλεσαν καλή επιλογή και οδήγησαν στην επίτευξη επαρκών ποσοστών επιβίωσης κάτω υπό θερμικές συνθήκες, οι οποίες μιμούνταν το τέντωμα της στάρπης. Μετά από έλεγχο αντοχής στη θέρμανση (65 ή 55° C για 10 λεπτά) σε 18 προβιοτικά στελέχη, η προσθήκη ειδικών προβιοτικών στελεχών *L. delbrueckii ssp. Bulgaricus* και *L. Paracasei* προσαρμοσμένων στη θερμότητα, ενίσχυσαν τη διάρκεια ζωής και το σχηματισμό της γεύσης του τυριού (Castro, et al., 2015).

Το τυρί cottage δεν υπόκειται ωρίμανση, δηλαδή καταναλώνεται φρέσκο. Είναι σωματιδιακό και όξινο τυρί φτιαγμένο από αποβουτυρωμένο γάλα. Το τυρόπηγμα κόβεται και θερμαίνεται στους 55°C, στη συνέχεια, προστίθεται μια επικάλυψη κρέμας και αλατιού, καθώς και τα προβιοτικά. Όσον αφορά τα προβιοτικά, είναι σημαντικό να ληφθεί υπόψη η φυσιολογική τους κατάσταση, προκειμένου να σχηματιστεί μια ιδέα της επιβίωσής τους σε όλη την ωρίμανση ή/και την αποθήκευσή τους. Σχετικά με την καμπύλη ανάπτυξης, τα μικροβιακά κύτταρα μεταξύ της όψιμης εκθετικής και της στατικής φάσης είναι η αγαπημένη επιλογή και η προετοιμασία ενός προηγούμενου υποστρώματος για τον εμβολιασμό του στελέχους (Castro, et al., 2015).

Η μορφή των προβιοτικών εμβολιασμών, η βιωσιμότητα και η συντήρησή τους αποτελεί σημαντική τεχνολογική πρόκληση. Η σκόνη γάλακτος που περιείχε ένα προβιοτικό στέλεχος *L.paracasei* ως συμπληρωματικό εκκινητή, ξηράνθηκε με ψεκασμό κατά τη διάρκεια παρασκευής του τυριού cheddar με χαμηλή απώλεια βιωσιμότητας και χωρίς δυσμενή αποτελέσματα μετά από τρεις μήνες ωρίμανσης. Σε ένα ημίσκληρο τυρί η χρήση είτε λυοφιλοπημένης σκόνης διασκορπισμένης στο γάλα ή ενός υποστρώματος που περιέχει γάλα και λίπος γάλακτος έχουν προταθεί για τη βελτίωση της επιβίωσης των προβιοτικών βακτηρίων (Castro, et al., 2015).

4.6.5 Αλάτισμα

Είναι γνωστό ότι τα προβιοτικά βακτήρια είναι ευαίσθητα σε υψηλές συγκεντρώσεις άλατος. Για αυτό το λόγο, η βιωσιμότητα προβιοτικών βακτηρίων μειώθηκε σημαντικά σε τυριά με συγκέντρωση άλατος άνω του 4%. Αυτό υποδηλώνει την ανάγκη βελτιστοποίησης των συνθηκών παραγωγής, προκειμένου να ενσωματωθούν λειτουργικά χαρακτηριστικά. Σχεδόν χωρίς εξαίρεση, ένα ξηρό αλάτισμα του αλεσμένου τυροπήγματος, ένα επιφανειακό ξηρό αλάτισμα μετά τη χύτευση (καλούπωμα) ή μια εμβάπτιση σε άλμη χρησιμοποιούνται στην επεξεργασία τυριών μετά από την πήξη πυτιάς και το σχηματισμό του τυροπήγματος, για την ενίσχυση της γεύσης του, της ασφάλειας και της διάρκειας ζωής του. Πιθανές λύσεις για την αύξηση της βιωσιμότητας των προβιοτικών αποτελούν η μικροενθυλάκωση, η επώαση των κυττάρων υπό θανατηφόρες συνθήκες και η προσεκτική επιλογή στελεχών. Οι προαναφερθέντες λύσεις, πρέπει να πραγματοποιηθούν χωρίς αρνητικές επιπτώσεις στην υφή, το άρωμα ή/και την αποδοχή από τους καταναλωτές. (Castro, et al., 2015)

Η βιωσιμότητα των ενθυλακωμένων προβιοτικών *B. bifidum* BB-12 και *L. acidophilus* LA-5 μελετήθηκε σε λευκό τυρί άλμης και χρησιμοποιήθηκε αλγινικό νάτριο είτε με εξώθηση είτε με τεχνική γαλακτώματος. Οι συγγραφείς βρήκαν αποτελεσματικές και τις δύο τεχνικές, όπου ο προβιοτικός πληθυσμός είναι υψηλότερος από το θεραπευτικό όριο. Οι μετρήσεις για μη εγκλεισμένα και μικροενθυλακωμένα προβιοτικά βακτήρια μειώθηκαν κατά περίπου 3 και 1 log αντίστοιχα. Σε άλλες περιπτώσεις, τα αποτελέσματα δεν ήταν τόσο ελπιδοφόρα. Η μικροενθυλάκωση των προβιοτικών *L. acidophilus* DD910 και *B. Lactis* DD920 σε κάψουλες αλγινικού αμύλου που παράγονται από ασβέστιο δεν βελτίωσαν τη βιωσιμότητά τους στο δίκτυο φέτας κατά τη διάρκεια αποθήκευσης της σε διάλυμα άλμης, πιθανώς λόγω υψηλών συγκεντρώσεων άλατος (Castro, et al., 2015).

Ενώ η βιωσιμότητα των προβιοτικών σε ποικιλίες ξηρού αλατισμένου τυριού έχει τεκμηριωθεί επαρκώς δεν υπάρχουν πολλά διαθέσιμα στοιχεία για την προβιοτική βιωσιμότητα σε τυριά αλατισμένα με μείγματα NaCl και KCl. Οι νέες διαδικασίες αλάτησης περιλαμβάνουν τη δυνατότητα αντικατάστασης τουλάχιστον εν μέρει του NaCl με το KCl. Αυτό φάνηκε στο προβιοτικό τυρί Akawi, το οποίο αποθηκεύτηκε για 30 ημέρες στους 4° C χωρίς εμφανείς σημαντικές διαφορές στα αισθητήρια γνωρίσματα μεταξύ των πειραματικών Akawi τυριών κατά την ίδια περίοδο αποθήκευσης. Η προσθήκη ενισχυμένης σύνθεσης KCl σε προβιοτικά ιρανικά τυριά φέτας (3% αλάτι και περίοδο ωρίμανσης 3 μηνών) και μόνο εκείνα με αντικατάσταση 25% από KCl, είχαν παρόμοια αισθητηριακή αποδοχή με εκείνα που περιέχουν μόνο NaCl. Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρθηκαν προηγουμένως στο φρέσκο τυρί Mina. (Castro, et al., 2015).

4.6.6 Ωρίμανση και αποθήκευση

Η διαδικασία ωρίμανσης είναι παράδειγμα μιας σύνθετης ανάπτυξης βιοφίλμ, στην οποία μικροβιολογικές και βιοχημικές αλλαγές συμβαίνουν στο τυρόπηγμα και σχετίζονται κυρίως με το μεταβολισμό της υπολειμματικής λακτόζης, του γαλακτικού και του κιτρικού οξέος εκτός της λιπόλυσης και της πρωτεόλυσης. Και πάλι μια σημαντική ανησυχία είναι η προβιοτική επιβίωση για μια μακρά ουσιαστική περίοδο ωρίμανσης, η οποία γίνεται για την ανάπτυξη του αρώματος και της γεύσης από τη δραστηριότητα πολλών ενζύμων. Η παρουσία περιόδων ωρίμανσης κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας τυριού είναι ένα πρόσθετο πρόβλημα για την σταθερότητα μιας προβιοτικής καλλιέργειας εξαιτίας των

βιοχημικών αλλαγών που συμβαίνουν, όπως μειώσεις στη δραστηριότητα του νερού, συχνά μαζί με περαιτέρω μειώσεις στο pH, δημιουργώντας ένα ακατάλληλο περιβάλλον για τις συμπληρωματικές καλλιέργειες. Επιπλέον μια πιθανή λύση για την αύξηση της σταθερότητας και της βιωσιμότητας είναι η μικροενθυλάκωση (Microencapsulation, ME) και η προσεκτική βελτιστοποίηση των συνθηκών ωρίμανσης (Castro, et al., 2015).

Αναφορικά με την αποθήκευση, οι εταιρίες τυριών θα πρέπει να παρέχουν τον απαιτούμενο βιώσιμο προβιοτικό πληθυσμό όταν πωλείται το προϊόν, αλλά και να εγγυώνται ότι η κατάσταση αυτή συνεχίζεται καθ' όλη τη διάρκεια του χρόνου αποθήκευσης. Οι προβιοτικές καλλιέργειες θα μπορούσαν να παράγουν αντιμικροβιακές ουσίες, συμβάλλοντας έτσι στην παρεμπόδιση της ανάπτυξης κακοήθων μικροβίων και στη συνέχεια να αποκτήσουν μια παρατεταμένη διάρκεια ζωής. Σε άλλες περιπτώσεις συντηρητικοί παράγοντες όπως NaCl προστίθενται. Η μη επαρκής θερμοκρασία αποθήκευσης, για παράδειγμα, 12°C, η οποία συχνά παρουσιάζεται σε πολλές αγορές τροφίμων λιανικής πώλησης θα μπορούσε να μειώσει αυτόν τον πληθυσμό και να αυξήσει την απόρριψη των καταναλωτών λόγω αισθητηριακών αλλαγών (Castro, et al., 2015).

Ακόμη, οι κατάλληλες προβιοτικές ιδιότητες μπορούν να ελεγχθούν *in vitro* πριν από την εφαρμογή. Για παράδειγμα, πιθανά προβιοτικά στελέχη από τυριά φέτας, κασέρι και γραβιέρας ελέγχθηκαν για αναζήτηση εκείνων που παρουσίασαν καλά επίπεδα β-γαλακτοσιδάσης, χαμηλή πρωτεολυτική ικανότητα και δραστηριότητες πήξης, καθώς και αντιβακτηριακές δραστηριότητες που θα μπορούσαν να εξαχθούν κατάλληλα, ώστε να βελτιώσουν τη διάρκεια αποθήκευσης για μεγαλύτερες χρονικές περιόδους (Castro, et al., 2015).

Άλλες δραστηριότητες που υπάρχουν σε πιθανά προβιοτικά μπορεί να χρησιμοποιηθούν για την επίτευξη παρατεταμένης ωρίμανσης και βελτιωμένης αποθήκευσης, όπως αντιμυκητιακές και αντι-λιστεριακές δραστηριότητες ως πιθανά συντηρητικά. Η προσέγγιση αυτή θα μπορούσε να παρέχει χρήσιμα στοιχεία για την ανάπτυξη προβιοτικών συμπληρωματικών καλλιεργειών που παράγουν φυσικά βιοσυντηρητικά κατά τη διάρκεια των ζυμώσεων των τροφίμων. Για παράδειγμα, εντοπίστηκαν αντιμικροβιακές και αντιμυκητιασικές δραστηριότητες του *L. curvatus*, στελέχους που απομονώθηκε από σπιτικό τυρί στο Αζερμπαϊτζάν. Αυτοί οι συγγραφείς αξιολόγησαν τις προβιοτικές ιδιότητες αυτού του στελέχους, καθώς και την ασφάλειά του όσον αφορά την αντοχή στα αντιβιοτικά (Castro, et al., 2015).

4.6.7 Συσκευασία

Τα περισσότερα προβιοτικά στελέχη είναι μικροαερόφιλα και αναερόβια. Για αυτό το λόγο χρήζει ιδιαίτερης προσοχής, τόσο η διαπερατότητα στην έκθεση σε οξυγόνο κατά τη διάρκεια της παρασκευής και αποθήκευσης, όσο και η επιλογή κατάλληλου συστήματος συσκευασίας και κενού. Το προβιοτικό τυρί συνήθως συσκευάζεται σε πλαστικές μεμβράνες με χαμηλή διαπερατότητα στο οξυγόνο ή χρησιμοποιώντας διαδικασίες με βάση το κενό. Αξιοσημείωτο γεγονός όσον αφορά τη συσκευασία σε κενό μετά το αλάτισμα κατά την επεξεργασία τούρκικου προβιοτικού λευκού τυριού (περιείχε *L.acidophilus*), αποτελεί η απόσπαση καλύτερων βαθμολογιών στη γεύση και την υφή σε σύγκριση με το μάρτυρα που αποθηκεύτηκε στην άλμη μετά το αλάτισμα. (Castro, et al., 2015).

4.7 Διατροφικά στοιχεία

Η κύρια εστίαση στην ανάπτυξη προβιοτικών τυριών βασίζεται στα θρεπτικά στοιχεία και κυρίως στην αυξανόμενη ζήτηση που υπάρχει για διατροφή με ελαφριά τρόφιμα. Ένα καλό παράδειγμα αυτού, είναι η μελέτη της επίδρασης των γλυκαντικών στο προβιοτικό τυρί *petitSuisse* σε συγκεντρώσεις ισοδύναμες με εκείνες της σακχαρόζης. Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει το συμπέρασμα ότι καμία από τις γλυκαντικές ουσίες δεν είχε αρνητική επίπτωση στη βιωσιμότητα είτε των αρχικών καλλιιεργειών είτε των προβιοτικών. Οι κατασκευαστικές εταιρείες παρέχουν στους καταναλωτές προϊόντα που προέρχονται από τυρί και περιέχουν εύλογα επίπεδα νατρίου, συμπεριλαμβανομένων των φυσικών τυριών, των τυριών που έχουν υποστεί επεξεργασία και των αλειμμάτων. Μια κορυφαία τεχνολογία είναι η αντικατάσταση του νατρίου (Na) από χλωριούχο κάλιο (KCL), διότι μειώνουν το ελεύθερο νερό, τη μικροβιακή ανάπτυξη και την εμφάνιση παθογόνων παραγόντων. Ως γνωστόν, από πάντα το χλωριούχο κάλιο συμβάλλει στην ανεπιθύμητη πικρία, αλλά πολλά από τα σκευάσματα που υπάρχουν στην αγορά φαίνεται να ξεπερνούν αυτό το μειονέκτημα.

Οι μελέτες που έχουν εξετάσει την επίδραση των προβιοτικών συμπληρωμάτων στα λιπαρά οξέα και στη σύνθεση του συζευγμένου λινολαικού οξέος (CLA) είναι λιγοστές. Έχει αναφερθεί ότι το LAB μπορεί να παράγει CLA από λινελαϊκό οξύ, το οποίο είναι βιολειτουργικό λιπίδιο. Μια θετική συσχέτιση μεταξύ των CLA και λινελαϊκού των

προβιοτικών τυριών με *L. paracasei* και *L. acidophilus* παρατηρήθηκε όταν μελετήθηκαν λευκά τυριά Pickle με πέντε διαφορετικές προβιοτικές καλλιέργειες. Η περιεκτικότητα του CLA κατά τη διάρκεια της περιόδου αποθήκευσης αυξήθηκε εξαιτίας της λιπόλυσης του ελεύθερου λινελαϊκού οξέος από τα LAB. Μια άλλη ενδιαφέρουσα συμβολή, ήταν η επεξεργασία ενός προβιοτικού τυριού άνθρακα φυσικά εμπλουτισμένου με CLA ως φορέα για το *L. acidophilus* και τα ευεργετικά λιπαρά οξέα (Castro, et al., 2015).

4.8 Οφέλη για την υγεία

Πρόσφατες μελέτες που έχουν γίνει για τα προβιοτικά, έχουν οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι είναι αποτελεσματικότερη η χορήγησή τους σε συνδυασμό με δίαιτες που επικεντρώνονται στον έλεγχο του μεταβολισμού των υδατανθράκων, των λιπιδίων και στον κύκλο εργασιών των αμινοξέων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η κατανάλωση μιας υποθερμιδικής δίαιτας συμπληρωμένης με πλούσιο σε πρωτεΐνες τυρί πλήρους λίπους, το οποίο είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα κατά 18%, χωρίς αύξηση των επιπέδων ολικής χοληστερόλης, των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας ή των τριγλυκεριδίων. Επομένως, σύμφωνα με τη παραπάνω μελέτη η υποθερμιδική διατροφή σε συνδυασμό με ένα προβιοτικό τυρί θα μπορούσε να βοηθήσει στη μείωση του δείκτη μάζας σώματος, της αρτηριακής πίεσης και του κινδύνου μεταβολικού συνδρόμου σε παχύσαρκους ασθενείς με υπέρταση (Castro, et al., 2015).

Τέλος, κάποιες άλλες δημοσιεύσεις, υποστηρίζουν ότι πιθανώς ένα προβιοτικό τυρί με συγκεκριμένα στελέχη τα *L. plantarum* ή *L. acidophilus* και *Bifidobacterium longum* μπορεί να συμβάλει στη του κινδύνου εμφάνισης καρδιαγγειακών παθήσεων. Στην πρώτη περίπτωση, η προσθήκη του *L. plantarum* K15 σε τυρί cheddar μείωσε τις επιδράσεις της χοληστερόλης σε ένα μοντέλο ποντικού. Στη δεύτερη περίπτωση, ένα δημοφιλές Βραζιλιάνικο προβιοτικό φρέσκο τυρί (Minas Frescal) εξασθένησε την ανοσοκαταστολή, που προκαλείται από άσκηση σε αρουραίους Wistar, αποτελώντας με αυτό το τρόπο μια πιθανή εναλλακτική λύση για την ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος και την πρόληψη λοιμώξεων. Οι παραπάνω μελέτες σε συνδυασμό με νέες που θα προκύψουν μελλοντικά, θα συμβάλλουν έντονα στην ανάπτυξη παρόμοιων νέων προϊόντων σχεδιασμένων για τη βελτίωση της υγείας των ανθρώπων, χωρίς ωστόσο να αποτελούν

φάρμακο το οποίο δεν αποτελεί εναλλακτική θεραπεία για οποιαδήποτε νόσο (Castro, et al., 2015).

5. ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΣΦΑΛΗ ΧΡΗΣΗ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ

5.1 Ασφάλεια των προβιοτικών για ανθρώπινη χρήση

Στην παραγωγή τροφίμων και ζωοτροφών χρησιμοποιείται μια μεγάλη ποικιλία μικροβιακών ειδών. Μερικά έχουν ιστορικό φαινομενικής ασφαλούς χρήσης, ενώ άλλα είναι λιγότερο κατανοητά και η χρήση τους μπορεί να αποτελεί κίνδυνο για τους καταναλωτές. Η εμπειρία έχει δείξει ότι υπάρχει ανάγκη για ένα εργαλείο για τον καθορισμό προτεραιοτήτων στο πλαίσιο της εκτίμησης κινδύνου των μικροοργανισμών που χρησιμοποιούνται στην παραγωγή τροφίμων / ζωοτροφών (EFSA, 2007).

Η EFSA αξιολογεί την ασφάλεια των μικροοργανισμών που χρησιμοποιούνται στα τρόφιμα και τις ζωοτροφές, προτού εγκριθούν για χρήση στην ευρωπαϊκή αγορά. Η αρχή εισήγαγε την έννοια του του πιστοποιημένου τεκμηρίου ασφαλείας (Qualified Presumption of Safety, QPS) για την εναρμόνιση της αξιολόγησης της ασφαλείας των μικροοργανισμών που χρησιμοποιούνται ως πρόσθετα τροφίμων ή ζωοτροφών, ένζυμα τροφίμων, νέα τρόφιμα ή φυτοφάρμακα. Η ιδέα του QPS βασίζεται σε εύλογα αποδεικτικά στοιχεία. Αν μια ομάδα μικροοργανισμών κατά την αξιολόγησή της δεν εγείρει ανησυχίες σχετικά με την ασφάλειά της, λαμβάνει «κατάσταση QPS» (QPS status). Οι μικροοργανισμοί που ανήκουν σε αυτή την ομάδα δεν χρειάζεται να υποβληθούν σε πλήρη αξιολόγηση της ασφαλείας τους. Για να αποκτήσει τη κατάσταση QPS ένας μικροοργανισμός πρέπει να πληροί τις εξής προϋποθέσεις (EFSA, 2007) :

- Η ταξινόμική του ταυτότητα πρέπει να είναι καλά αναγνωρισμένη.
- Το διαθέσιμο σύνολο γνώσεων πρέπει να είναι επαρκές για την απόδειξη της ασφαλείας του.
- Η έλλειψη παθογόνων ιδιοτήτων πρέπει να έχει αποδειχθεί και τεκμηριωθεί.
- Η προβλεπόμενη χρήση του πρέπει να περιγράφεται με σαφήνεια.

Οι μικροοργανισμοί οι οποίοι δεν είναι καλά καθορισμένοι, διεγείρουν ανησυχίες για την ασφάλεια ή δεν είναι δυνατό να εξαχθεί κάποιο συμπέρασμα αν θέτουν ανησυχία για τον

άνθρωπο, το περιβάλλον και τα ζώα θεωρούνται ακατάλληλα για τη κατάσταση του QPS και απαιτούν πλήρη αξιολόγηση της ασφάλειάς τους (EFSA, 2007).

Η εκτίμηση της ασφάλειας των προβιοτικών αντιπροσωπεύει ένα λεπτό έργο. Γενικά, οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί διακρίνονται άμα είναι ασφαλής ή όχι με βάση τη κατάσταση GRAS (Generally Recognized As Safe, γενικά θεωρούνται ασφαλείς) από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ). Τα προβιοτικά στελέχη πρέπει να χαρακτηρίζονται από την απουσία του μολυσματικού προφίλ τους και να έχουν χαμηλή αντίσταση στα αντιβιοτικά. Τα ωφέλιμα μικρόβια που έχουν καλό ιστορικό ασφαλείας κατά την ιστορία, είναι στελέχη του *Lactobacilli* και *Bifidobacteria*. Οι δοκιμές που έχουν γίνει και η εμπειρία σχετικά με άλλα μικροβιακά είδη που χρησιμοποιούνται ως προβιοτικά είναι πιο περιορισμένη. Τα επιλεκτικά κριτήρια των νέων πιθανών προβιοτικών μικροοργανισμών στοχεύουν σε νέα βακτηριακά στελέχη και ακόμη σε νέα γένη με υψηλότερο ωφέλιμο δυναμικό ή και με πιο συγκεκριμένες ιδιότητες και αυτό δεν είναι εύκολο έργο. Η εισαγωγή νέων μικροβίων απαιτεί έντονες έρευνες και αξιολόγηση της ασφάλειας και της σχέσης κινδύνου προς όφελος. Τα νέα προβιοτικά βακτήρια πρέπει να ανήκουν σε γένη και στελέχη που βρίσκονται συνήθως στα υγιή ανθρώπινα εντερικά μικροβιώματα και πρέπει να ληφθεί προσοχή για τα βακτήρια που ανήκουν στο γένος *Bacillus* ή *Enterococcus*, μπορεί να είναι παθογόνα ή ευκαιριακά παθογόνα. Τα περισσότερα προβιοτικά είναι ασφαλή. Ωστόσο, έχουν αναφερθεί σποραδικά ανεπιθύμητες ενέργειες και απαιτείται προσοχή για την ύπαρξη πιθανών παρενεργειών. Το 2002, μια έκθεση που κυκλοφόρησε από κοινού από το ΠΟΥ και τον οργανισμό Τροφίμων και γεωργίας (FAO) στην οποία μπορεί να είναι σε θεωρητικό επίπεδο υπεύθυνα για 4 τύπους επιδράσεων (Zommiti, et al., 2020):

- Συστηματικές λοιμώξεις
- Επιβλαβείς μεταβολικές δραστηριότητες
- Υπερβολική διέγερση του ανοσοποιητικού σε ευαίσθητα άτομα
- Πιθανή μεταφορά γονιδίων (Zommiti, et al., 2020)

Συνοψίζοντας, ο κόσμος των προβιοτικών αυξάνεται συνεχώς όχι μόνο από τον αυξανόμενο αριθμό ατόμων που χρησιμοποιούν προβιοτικά αλλά και από την ποικιλία των προβιοτικών προϊόντων και των νέων προβιοτικών στελεχών. Οι μελλοντικές έρευνες και οι επιστημονικές μελέτες πρέπει να αναφέρουν μια πιο λεπτομερή περιγραφή του δοκιμασμένου προβιοτικού μικροβίου που να περιλαμβάνει το γένος, το είδος, το επίπεδο στελέχους επιπλέον τη καθημερινή δόση και τη διάρκεια της θεραπείας. Οι πάροχοι

υγειονομικής περίθαλψης και οι κατασκευαστές πρέπει να κερδίσουν σε διεθνείς κανονισμούς και πρότυπα και να παρέχουν καθοδήγηση για συγκεκριμένη θεραπεία βάσει τεκμηρίων (Zommiti, et al., 2020).

Οι μέχρι τώρα πληροφορίες από διάφορες μελέτες, φανερώνουν ότι οι λακτοβάκιλλοι είναι ασφαλείς, μιας και εδώ και πολλά χρόνια χρησιμοποιούνται ως προβιοτικά χωρίς να εμφανιστεί κάποιος κίνδυνος για τον άνθρωπο. Επιπλέον, δεν έχουν βρεθεί παθογόνες ή λοιμογόνες ιδιότητες για τους γαλακτοβακίλλους, τα bifidobacteria ή lactococci. Υπό ορισμένες συνθήκες, ορισμένα στελέχη γαλακτοβακίλλων έχουν συσχετιστεί με ανεπιθύμητες ενέργειες, όπως δεκαπέντε σπάνιες περιπτώσεις βακτηριαμίας. Ωστόσο, μια πρόσφατη επιδημιολογική μελέτη από συστηματικά συλλεγόμενες αναφορές περιπτώσεων βακτηριαμίας από γαλακτοβακίλλους σε μία χώρα, έχει δείξει ότι δεν υπάρχει αυξημένη συχνότητα ή συχνότητα βακτηριαμίας με αυξημένη χρήση προβιοτικών γαλακτοβακίλλων (FAO/WHO, 2001).

Αναγνωρίζεται επίσης ότι ορισμένα μέλη βακτηρίων γαλακτικού οξέος, όπως οι εντεροκόκκοι μπορεί να έχουν χαρακτηριστικά μολυσματικότητας. Έτσι, συνιστάται να μην αναφέρεται ο *Enterococcus* ως προβιοτικό για ανθρώπινη χρήση. Ειδικότερα υπάρχουν οι εξής παρατηρήσεις:

- Τα στελέχη μπορούν να εμφανίσουν υψηλό επίπεδο αντοχής στη βανκομυκίνη ή μπορούν να αποκτήσουν τέτοια ανθεκτικότητα. Εάν υπάρχει αυτή η ανθεκτικότητα, μπορεί να συμβεί μεταφορά της σε άλλους μικροοργανισμούς.
- Ορισμένα στελέχη των ανθεκτικών στη βανκομυκίνη εντεροκόκκων σχετίζονται συνήθως με νοσοκομειακές λοιμώξεις

Η διαβούλευση αναγνωρίζει ότι ορισμένα στελέχη του γένους *Enterococcus* εμφανίζουν προβιοτικές ιδιότητες και ενδέχεται να μην περιλαμβάνονται σε ένα προϊόν που εμφανίζει αντίσταση στη βανκομυκίνη (FAO/WHO, 2001).

5.2 Νομοθεσία για τη χρήση προβιοτικών στα τρόφιμα

Οι κανονισμοί που σχετίζονται με τα προβιοτικά διαφέρουν μεταξύ των χωρών και μέχρι σήμερα δεν έχει καθιερωθεί σε διεθνές επίπεδο η χρήση τους ως συστατικό των τροφίμων.

Για πολλά άτομα, τα προβιοτικά αποτελούν συμπληρώματα διατροφής επειδή συνήθως λαμβάνονται από το στόμα μέσω των τροφίμων ή με τη μορφή καψουλών και δισκίων, ενώ δεν είναι λίγες οι φορές οι οποίες αυτά συγχέονται με τα φάρμακα λόγω των αναφερόμενων ευεργετικών ιδιοτήτων τους. Ωστόσο, στην πραγματικότητα, τα προβιοτικά διαφοροποιούνται από τα φάρμακα με πολλούς τρόπους, κυρίως σε σχέση με τις αξιώσεις. Τα φάρμακα επιτρέπεται να διεκδικούν αποτελεσματικότητα όσον αφορά το μετριασμό ή τη θεραπεία μιας ασθένειας σε σχέση με τα τρόφιμα, τα πρόσθετα ζωοτροφών και τα συμπληρώματα διατροφής τα οποία μπορούν να παράγουν μόνο ισχυρισμούς υγείας. Ο «ισχυρισμός υγείας» ορίζεται ως «δήλωση, που χαρακτηρίζει τη σχέση οποιασδήποτε ουσίας με ασθένεια ή κατάσταση που σχετίζεται με την υγεία και αυτή πρέπει να βασίζεται σε καθιερωμένες, γενικά αποδεκτές γνώσεις από αποδεικτικά στοιχεία στην επιστημονική βιβλιογραφία ή / και συστάσεις από εθνικούς ή διεθνείς φορείς δημόσιας υγείας» (FAO/WHO, 2001).

Η άνοδος στο κόσμο των προβιοτικών ως προς τη χρήση τους συνοδεύτηκε από την απουσία ενός καθολικού προτύπου για την αξιολόγηση της ασφάλειας και τη ρύθμιση που αντικατοπτρίζει μια μεγάλη διακύμανση από χώρα σε χώρα ή από περιφερειακό επίπεδο. Σε όλο το κόσμο και εντελώς ανόμοια με τα εμπορικά φάρμακα, τα προβιοτικά κατηγοριοποιούνται κυρίως ως τρόφιμα ή και συμπληρώματα διατροφής στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής και την Ευρώπη, ως φυσικά προϊόντα υγείας στο Καναδά και ως τρόφιμα για ειδική χρήση υγείας στην Ιαπωνία. Αυτή η κατηγοριοποίηση πληροί με σημαντικά λιγότερους δραστικούς κανονισμούς. Για παράδειγμα, στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής (Η.Π.Α), η κατάσταση GRAS αντιπροσωπεύει ένα σημαντικό κριτήριο για την ασφάλεια των βακτηρίων, μια ταξινόμηση, η οποία παρέχεται από την Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) και τέτοια προϊόντα δεν υπόκεινται σε δραστική παρακολούθηση. Στην Ιαπωνία, τα προβιοτικά ρυθμίζονται από τον Οργανισμό Τροφίμων για ειδική χρήση υγείας (Foods for Specified Health Uses, FOSHU), ο οποίος επιτρέπει την επισήμανση με ισχυρισμούς υγείας σε τρόφιμα ή συστατικά που πληρούν επιστημονικά στοιχεία που απαιτούνται για την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα. Οι ισχυρισμοί ταξινομούνται ως εξής: ειδικές διατροφικές χρήσεις, συγκεκριμένες εφαρμογές υγείας και τρόφιμα με θεραπευτική λειτουργία. Στην Κίνα, η Κρατική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (Saudi Food and Drug Authority, SFDA) ρυθμίζει και επιβλέπει τα λειτουργικά τρόφιμα και τα προβιοτικά τα οποία συγκαταλέγονται στα προηγούμενα (Zommiti, et al., 2020).

Επομένως, συνοψίζοντας με βάση όσα αναφέρθηκαν προηγουμένως όσον αφορά την ασφάλεια των προβιοτικών, ένα σύνολο γενικών αρχών και πρακτικών κριτηρίων πρέπει να δημιουργηθούν για να παρέχουν κατευθυντήριες γραμμές για το πώς δεδομένοι δυνητικοί μικροοργανισμοί μπορεί να ελεγχθούν και να αποδειχθούν ότι έχουν χαμηλό κίνδυνο πρόκλησης κάποιας ασθένειας ή συσχέτισης, έναντι της προσφοράς σημαντικού οφέλους για την υγεία κατά τη χορήγησή τους σε ανθρώπους. Επιπλέον, πρέπει να αναγνωρίζεται ότι ορισμένα είδη απαιτούν μεγαλύτερη ανάλυση από κάποια άλλα. Η αξιολόγηση της ασφάλειας απαιτεί τουλάχιστον ορισμένες μελέτες σε ανθρώπους και πρέπει να εξετάζει όλες τις πτυχές της προτεινόμενης τελικής χρήσης του προβιοτικού στελέχους.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ελληνόγλωσση

- Ελευθεριάδου, Α. (2009). *Επιθεώρηση κτηνοτροφικής παραγωγής εργαστήρια και θεωρία*. Θεσσαλονίκη: Εκδόσεις "σοφία".
- Μάντης, Α. Ι., Παπαγεωργίου, Δ. Κ., Φλετούρης, Δ. Ι., & Αγγελίδης, Α. Σ. (2015,2018). *Υγιεινή και τεχνολογία του γάλακτος και των προϊόντων του* (Αναθεωρημένη εκδ.). Θεσσαλονίκη: Αφοί Κυριακίδη-Εκδόσεις Α.Ε.
- Μεντής, Α.-Φ. Α., Γύπας, Φ., & Μεντής, Α. Φ. (2013). Ανθρώπινο μικροβίωμα του εντέρου: Ο ρόλος του στην υγεία και στη νόσο. *ΑΡΧΕΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ*, 30(3), σσ. 272-288. Ανάκτηση από <http://www.mednet.gr/archives/2013-3/pdf/272.pdf>

Ξενόγλωσση

- Aslam, H., Marx, W., Rocks, T., Loughman, A., Chandrasekaran, V., Ruusunen, A., . . . Jacka, F. N. (2020). The effects of dairy and dairy derivatives on the gut microbiota: A systematic literature review. *GUT MICROBES*, 12(1), σ. 19. doi:10.1080/19490976.2020.1799533
- Castro, J. M., Tornadijo, M. E., Fresno, J. M., & Sandoval, H. (2015). Biocheese: A food probiotic carrier. *BioMed Research International*, 2015, σ. 11. doi:10.1155/2015/723056
- de los Reyes-Gavilán, C. G., Fernández, M., Hudson, J. A., & Korpela, R. (2015). Role of microorganisms present in dairy fermented products in health and disease. *BioMed Research International* 2015, σ. 2. doi:10.1155/2015/204173
- DENEV, S. A., SUZUKI, I., & KIMOTO, H. (2000). Role of lactobacilli in human and animal health. *Animal Science Journal*, 71(6), σσ. 549-562. Ανάκτηση από https://www.jstage.jst.go.jp/article/chikusan1924/71/6/71_6_549/_pdf
- EFSA. (2007). Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA on the introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA. *The EFSA Journal*, 587, σσ. 1-16. Ανάκτηση από <https://vkm.no/download/18.13735ab315cffeccb51fce0/1499080564379/cd704fe>

- Fernández, M., Hudson, J. A., Korpela, R., & de los Reyes-Gavilán, C. G. (2015). Impact on human health of microorganisms present in fermented dairy products: An overview. *BioMed Research International*, 2015, σ. 13. doi:10.1155/2015/412714
- Jandhyala, S. M., Talukdar, R., Subramanyam, C., Vuyyuru, H., Sasikala, M., & Reddy, D. N. (2015). Role of the normal gut microbiota. *World Journal of Gastroenterology*, 21(29), pp. 8787-8803. doi:10.3748/wjg.v21.i29.8787
- Ogunrinola, G. A., Oyewale, J. O., Oshamika, O. O., & Olasehinde, G. I. (2020). The human microbiome and its impacts on health. *Hindawi International Journal of Microbiology*, 2020, σ. 7. doi:10.1155/2020/8045646
- Peterson, V. L., Cotter, P. D., & Walsh, M. (2019). Fermented dairy exploring the health benefits. *Dairy Nutrition Forum*, 11(1), σ. 4. Ανάκτηση από <https://ndc.ie/wp-content/uploads/2019/06/DN-FORUM-JUNE-19.pdf>
- Saez-Lara, M.J., Gomez-Llorente, C.G., Plaza-Diaz, J., & Gil, A. (2015). The role of probiotic lactic acid bacteria and bifidobacteria in prevention and treatment of inflammatory bowel disease and other related diseases: A systematic review of randomized human clinical trials. *BioMed Research International*, 2015, σ. 15. doi:10.1155/2015/505878
- Thursby, E., & Juge, N. (2017). Introduction to the human gut microbiota. *Biochemical Journal*, 474(11), σσ. 1823-1836. doi:10.1042/BCJ20160510
- Zommiti, M., Feuilloley, M. G. J., & Connil, N. (2020). Update of probiotics in human world: A nonstop source of benefactions till the end of time. *Microorganisms*, 8(12), 1907 doi:10.3390/microorganisms8121907

Ιστοσελίδες

- FAO/WHO. (2001, October 1-4). Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Córdoba, Argentina: FAO/WHO. Ανάκτηση από http://www.fao.org/documents/pub_dett.asp?lang=en&pub_id=61756
- Flowmagazine. (2018, Νοέμβριος 22). Τα κίτρινα ή τα λευκά τα τυριά είναι πιο υγιεινά;. Ανάκτηση από https://www.flowmagazine.gr/ta_kitrina_i_ta_leuka_turia_einai_pio_ugieina/
- Hair, M., & Sharpe, J. (2014, January). Fast facts about the human microbiome. Ανάκτηση από https://depts.washington.edu/ceeh/downloads/FF_Microbiome.pdf

- Kouris, A. (2019, Μάιος 11). Γαλακτική ζύμωση-Η 1η ζύμωση που μας ενδιαφέρει. Ανάκτηση από <https://www.dairy-services.com/%CE%B3%CE%B1%CE%BB%CE%B1%CE%BA%CF%84%CE%B9%CE%BA%CE%AE-%CE%B6%CF%8D%CE%BC%CF%89%CF%83%CE%B7/>
- Kouris, A. (2019, Μάρτιος 23). Οξυγαλακτικά βακτήρια? Ποια είναι τελικά? Ανάκτηση από <https://www.dairy-services.com/%CE%BF%CE%BE%CF%85%CE%B3%CE%B1%CE%BB%CE%B1%CE%BA%CF%84%CE%B9%CE%BA%CE%AC-%CE%B2%CE%B1%CE%BA%CF%84%CE%AE%CF%81%CE%B9%CE%B1/>
- NutriClinic. (n.d.). Γιαούρτι...όλα όσα δε ξέρουμε! Ανάκτηση από <https://nutriclinic.gr/giaourti-ola-osa-de-kseroume/>
- ONMED.GR. (2016, Οκτώβρης 1). Τι είναι τα λειτουργικά τρόφιμα και ποια τα οφέλη τους. Ανάκτηση από <https://www.onmed.gr/diatrofi/story/347915/ti-einai-ta-leitoyrgika-trofima-kai-poia-ta-ofeli-toys>
- The Tengrist. (2016, July 25). Drink of Steppe People "Kumis". Ανάκτηση από <https://thetengristculture.wordpress.com/2016/07/25/drink-of-steppe-people-kumis/>
- Wikipedia. (n.d.). Γαλακτοβάκιλλοι. Ανάκτηση Ιανουάριος 7, 2021, από <https://el.wikipedia.org/wiki/%CE%93%CE%B1%CE%BB%CE%B1%CE%BA%CF%84%CE%BF%CE%B2%CE%AC%CE%BA%CE%B9%CE%BB%CE%BB%CE%BF%CE%B9>
- Γκακνή, Δ. (2016, Σεπτέμβριος 16). Ζύμωση. Ανάκτηση από <https://www.mednutrition.gr/portal/efarmoges/leksiko-diatrofis/14333-zymosi>
- Θερμόπουλος, Μ. (2020, Ιούλιος 15). Κεφίρ: Τι είναι ακριβώς και ποια οφέλη έχει για την υγεία σας. Ανάκτηση από <https://www.iatropedia.gr/diatrofi/kefir-ti-einai-akrivos-kai-poia-ofeli-echei-gia-tin-ygeia-sas-vid/74038/>
- ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑ ΗΠΕΙΡΟΥ. (2015, Μάρτιος 5). ΠΗΞΗ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ. Ανάκτηση από <http://www.agroepirus.gr/egro/farmers/articles/article.jsp?context=9104&articleid=6007>
- Σιδεράς, Β. (χ.χ). *Εντερικό Μικροβίωμα και EnteroScan®*. Ανάκτηση από https://athenslab.gr/upload/file/enteriko_mikrobiwma_kai_EnteroScan.pdf
- Τσάκνης, Γ., & Τσάκαλη, Ε. (2019, Φεβρουαρίου 15). *Λειτουργικά τρόφιμα: Ένα νέο ισχυρό εργαλείο υγείας*. Ανάκτηση από ΑΓΡΟΔΙΑΤΡΟΦΙΚΗ ΣΥΜΠΡΑΞΗ ΣΤΕΡΕΑΣ ΕΛΛΑΔΑΣ: <https://agrifoodcentralgreece.gr/leitoyrgika-trofima-ena-neo-ischyro-ergaleio-ygeias/>

[Οπισθόφυλλο. Κενή σελίδα]