



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Μελέτη επιβίωσης προβιοτικών μικροοργανισμών με διαφορετικές μεθόδους ξήρανσης
και ενθυλάκωσης»

"Survival Assessment of Probiotic Bacteria Using Various Drying and Encapsulation
Methods"



Προπτυχιακές φοιτήτριες:
Καλύβα Δέσποινα-Μαρία
Μπουκλά Βικτώρια

Επιβλέπων Καθηγητής : Δρ. Γιαβάσης Ιωάννης

ΚΑΡΔΙΤΣΑ 2024

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες.....	4
Περίληψη.....	5
Abstract	6
Εισαγωγή.....	7
Κεφάλαιο 1 ^ο - Προβιοτικά.....	11
1.1 Ορισμός.....	11
1.2 Κυριότερα είδη προβιοτικών μικροοργανισμών	12
1.2.1 Βακτήρια Γαλακτικού Οξέος – Lactic Acid Bacteria (LAB)	13
1.2.2 <i>Bifidobacterium</i>	17
1.2.3 <i>Bacillus</i>	19
1.2.4 Ζύμες	20
1.3 Μηχανισμοί δράσης των προβιοτικών	21
1.3.1 Ενίσχυση λειτουργίας επιθηλιακού φραγμού	22
1.3.2 Βελτίωση της σύστασης της εντερικής μικροβιακής κοινότητας	22
1.3.3 Ρύθμιση αποκρίσεων του έμφυτου και επίκτητου ανοσοβιολογικού συστήματος	23
1.4 Ευεργετικά οφέλη των προβιοτικών στην υγεία	24
1.5 Κριτήρια επιλογής προβιοτικών.....	28
1.5.1 Ιδιότητες των προβιοτικών	30
1.5.2 Αξιολόγηση ασφάλειας σε σχέση με τον ανθρώπινο οργανισμό.....	32
1.5.3 Τεχνολογικά χαρακτηριστικά και απαιτήσεις της βιομηχανίας	33
1.6 Βιωσιμότητα των προβιοτικών μικροοργανισμών	34
1.6.1 Επιπτώσεις της επεξεργασίας, αποθήκευσης και σύνθεσης του τροφίμου στη βιωσιμότητα προβιοτικών βακτηρίων	35
1.6.2 Επίδραση της ψύξης, της κατάψυξης και της απόψυξης στη βιωσιμότητα προβιοτικών βακτηρίων.....	36
1.6.3 Επίδραση της θερμοκρασίας και το οξυγόνου στη βιωσιμότητα των προβιοτικών βακτηρίων	37
1.6.4 Επίδραση του διαφορετικού τύπου συσκευασίας στη βιωσιμότητα προβιοτικών βακτηρίων	38
Κεφάλαιο 2. Ενθυλάκωση προβιοτικών μικροοργανισμών	40
2.1 Ορισμός ενθυλάκωσης.....	40
2.2 Υλικά που χρησιμοποιούνται στην ενθυλάκωση μικροοργανισμών.....	40
2.2.1 Ενθυλάκωση προβιοτικών μικροοργανισμών με τη χρήση πολυσακχαριτών και ολιγοσακχαριτών.....	41
2.2.1.1 Αλγινικό νάτριο	41

2.2.1.2 Χιτοζάνη.....	44
2.2.1.3 Άμυλο	45
2.2.1.4 Μαλτοδεξτρίνη.....	45
2.2.2 Ενθυλάκωση προβιοτικών μικροοργανισμών με τη χρήση λιπιδίων	46
2.2.3 Ενθυλάκωση προβιοτικών μικροοργανισμών με τη χρήση πρωτεϊνών	47
2.2.3.1 Πρωτεΐνη ορού γάλακτος.....	47
Κεφάλαιο 3 ^ο – Ξήρανση	48
3.1 Ορισμός Ξήρανσης	48
3.2 Μέθοδοι Ξήρανσης	49
3.2.1 Ξήρανση με Λυοφιλίωση- Freeze Drying	50
3.2.2 Ξήρανση με Θερμό αέρα- Hot Air Drying.....	52
3.2.3 Ξήρανση με ψεκασμό- Spray Drying	53
3.3 Επίδραση Ξήρανσης στους προβιοτικούς μικροοργανισμούς.....	55
3.3.1 Επίδραση Λυοφιλίωσης στους προβιοτικούς μικροοργανισμούς.....	57
3.3.2 Επίδραση ξήρανσης με θερμό αέρα στους προβιοτικούς μικροοργανισμούς.....	59
3.3.3 Επίδραση ξήρανσης με ψεκασμό στους προβιοτικούς μικροοργανισμούς	60
3.4 Χρήση και οφέλη της ξήρανσης στην βιομηχανία τροφίμων	61
Κεφάλαιο 4 ^ο - Πειραματικό μέρος.....	62
4.1 Υλικά και μέθοδοι.....	62
4.2 Προετοιμασία προβιοτικών μικροοργανισμών <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus curvatus</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> και <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	64
4.3 Δημιουργία ενθυλακωμένων και μη προβιοτικών μικροοργανισμών <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus curvatus</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> και <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	64
4.4 Επίδραση της διαδικασίας ξήρανσης στους 45 °C στη βιωσιμότητα των ενθυλακωμένων και μη, προβιοτικών μικροοργανισμών	66
4.5 Επίδραση της λυοφιλίωσης στη βιωσιμότητα των ενθυλακωμένων και μη, προβιοτικών μικροοργανισμών	68
4.6 Καταμέτρηση βιωσιμότητας προβιοτικών καλλιεργειών	68
Κεφάλαιο 5 ^ο - Αποτελέσματα και συζήτηση.....	80
5.1 Αποτελέσματα της ξήρανσης στους 45°C των προβιοτικών μικροοργανισμών.....	80
5.2 Αποτελέσματα της λυοφιλίωσης των προβιοτικών μικροοργανισμών.....	82
Κεφάλαιο 6 ^ο - Συμπεράσματα.....	86
Βιβλιογραφικές Αναφορές	89

Ευχαριστίες

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Αρχικά, θα θέλαμε να εκφράσουμε τις ολόψυχες ευχαριστίες μας στον επιβλέποντα καθηγητή μας κ. Γιαβάση Ιωάννη για την εμπιστοσύνη που μας έδειξε καθ' όλη τη διάρκεια της προπτυχιακής μας φοίτησης, καθώς και για τις πολύ χρήσιμες γνώσεις που μας μετέδωσε όλα αυτά τα χρόνια. Επιπλέον, θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε την υποψήφια διδάκτορα κ. Μιτσάγγα Χρυσάνθη για την πολύτιμη βοήθεια που μας προσέφερε κατά την εκτέλεση των πειραμάτων της παρούσας διατριβής καθώς και για την υπομονή της. Επιπλέον, ευχαριστούμε θερμά την υποψήφια διδάκτορα κ. Μπούκη Παρασκευή που μας συμβούλευε διαρκώς στο πως να προσπεράσουμε κάθε εμπόδιο με το οποίο ερχόμασταν αντιμέτωπες. Τέλος, θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε τις οικογένειές μας για την στήριξή τους και για την αγάπη τους, που χάρη σε αυτές ανακτούσαμε δυνάμεις για να συνεχίσουμε.

Περίληψη

Τα προβιοτικά βακτήρια όταν καταναλώνονται σε επαρκείς ποσότητες, παρέχουν οφέλη για την υγεία του οργανισμού του ανθρώπου. Αναφορικά, συμβάλλουν στη διατήρηση της φυσιολογικής ισορροπίας της εντερικής χλωρίδας, βελτιώνουν την πέψη, ενισχύουν το ανοσοποιητικό σύστημα και έχουν αντιμικροβιακή δράση έναντι των παθογόνων βακτηρίων. Οι συγκεκριμένοι μικροοργανισμοί διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στη διατήρηση της ανθρώπινης υγείας και ομοιόστασης και παράλληλα συμμετέχουν σε συμβιωτικές σχέσεις με τον άνθρωπο – ξενιστή, προσφέροντας ευεργετικά οφέλη. Η παρούσα διπλωματική εργασία επικεντρώνεται στη χρήση των προβιοτικών μικροοργανισμών στα τρόφιμα και στη βελτιστοποίηση της βιωσιμότητάς τους, ύστερα από την ενθυλάκωση και ξήρανσή τους. Πιο συγκεκριμένα εξετάστηκαν τα βακτηριακά στελέχη *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus curvatus* και *Lactobacillus rhamnosus* που κατατάσσονται στην ομάδα των βακτηρίων γαλακτικού οξέος (Lactic Acid Bacteria - LAB). Τα αποτελέσματα αποκάλυψαν τις πιο κατάλληλες συνθήκες για την επιβίωση των διαφόρων βακτηριακών στελεχών, με διακρίσεις στην ανταπόκρισή τους, λόγω των φυσικών χαρακτηριστικών και ιδιοτήτων που ξεχωρίζουν τα προβιοτικά στελέχη. Αυτό περιλαμβάνει την ανθεκτικότητά τους σε διαφορετικές θερμοκρασίες, την ικανότητά τους να επιβιώνουν σε αντίξοες συνθήκες όπως η ξήρανση, καθώς και την ικανότητά τους να προσαρμόζονται σε διαφορετικά περιβάλλοντα. Συμπερασματικά, η εύρεση των πιο ευνοϊκών συνθηκών για την ανάπτυξη των προβιοτικών βακτηρίων απαιτεί επαναληπτικές και συστηματικές εργαστηριακές δοκιμές, προκειμένου να επιτευχθεί ο καλύτερος συνδυασμός για τη βιωσιμότητά τους. Σκοπός αυτής της εργασίας είναι ο έλεγχος της βιωσιμότητας των προβιοτικών μικροοργανισμών αλλά και η εξέταση της χρησιμότητας των φορέων ενθυλάκωσης στην συντηρησιμότητά τους.

Abstract

Probiotic bacteria, when consumed in adequate amounts, provide health benefits to the human body. Specifically, they contribute to maintaining the normal balance of gut flora, improve digestion, boost the immune system, and exhibit antimicrobial action against pathogenic bacteria. These microorganisms play a crucial role in maintaining human health and homeostasis and participate in symbiotic relationships with the human host, offering beneficial effects. This thesis focuses on the use of probiotic microorganisms in food and the optimization of their viability after encapsulation and drying. Specifically, the bacterial strains *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus curvatus* and *Lactobacillus rhamnosus*, which belong to the group of lactic acid bacteria (LAB), were examined. The results revealed the most suitable conditions for the survival of the various bacterial strains, with distinctions in their responses due to the physical characteristics and properties that differentiate the probiotic strains. This includes their resistance to different temperatures, their ability to survive in adverse conditions such as drying, and their capacity to adapt to different environments. In conclusion, finding the most favorable conditions for the development of probiotic bacteria requires iterative and systematic laboratory tests to achieve the best combination for their viability. The aim of this work is to check the viability of probiotic microorganisms and examine the usefulness of encapsulation carriers in their preservation.

Εισαγωγή

Η συμβολή ενός υγιούς εντερικού συστήματος στην φυσιολογία και ομοιόσταση του ανθρώπινου οργανισμού έχει αναγνωριστεί εδώ και αρκετούς αιώνες. Πρώτος ο Ιπποκράτης είχε αναφέρει από την αρχαιότητα ότι η απαρχή όλων των ασθενειών προέρχονται από το έντερο. Ύστερα από αρκετά χρόνια, ο Metchnikoff εντόπισε και ανέδειξε τη συσχέτιση του εντερικού μικροβιώματος με την ανθρώπινη υγεία (Mowat, 2021). Ειδικότερα, παρατήρησε ότι η παρουσία γαλακτικών βακτηρίων στο έντερο επάγει την ομαλή λειτουργία του γαστρεντερικού συστήματος και συμβάλει στην επιμήκυνση της ανθρώπινης ζωής.

Το μικροβίωμα αναφέρεται στο σύνολο των μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένων των βακτηρίων, των ιών, των μυκήτων και των αρχαίων, που διαβιούν σε ένα συγκεκριμένο περιβάλλον, καθώς και των γονιδίων αυτών (Yousuf & Mishra, 2019). Ο όρος «μικροβίωμα» χρησιμοποιείται συχνά για την περιγραφή του ανθρώπινου μικροβιώματος, το οποίο αποτελεί την συνάθροιση των μικροοργανισμών που εντοπίζονται εντός αλλά και στην επιφάνεια του ανθρώπινου σώματος. Οι συγκεκριμένοι μικροοργανισμοί διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στη διατήρηση της ανθρώπινης υγείας και ομοιόστασης και παράλληλα συμμετέχουν σε συμβιωτικές σχέσεις με τον άνθρωπο – ξενιστή, προσφέροντας ευεργετικά οφέλη. Αξίζει να τονιστεί, πως πολλές παθήσεις, όπως η οξεία ωτίτιδα (Hilty et al, 2012), το σύνδρομο φλεγμονώδους εντέρου (Sartor & Mazmanian, 2012), το σύνδρομο ευερέθιστου εντέρου (Kennedy, 2014) και οι χρόνιες πνευμονικές παθήσεις (Huffnagle & Dickson, 2015), φαίνεται να συνδέονται με την δυσβίωση ή την ανισορροπία του ανθρώπινου μικροβιώματος. Οι συγκεκριμένες ανισορροπίες θα μπορούσαν να αντιμετωπισθούν μέσω της προσθήκης επαρκούς ποσότητας ωφέλιμων μικροοργανισμών, γνωστών ως προβιοτικά. Αναλυτικότερα, τα προβιοτικά είναι αβλαβείς μικροοργανισμοί, που ανήκουν κυρίως στο γένος *Lactobacillus* και *Bifidobacterium*. Η χρήση τους εντοπίζεται χιλιάδες χρόνια πριν, με αναφορές σε ζυμούμενα γαλακτοκομικά προϊόντα να βρίσκονται σε γραπτά της παλαιάς διαθήκης και σε τοιχογραφίες που χρονολογούνται από το 2500 π.Χ. (Fuller, 1992). Παρόλο που

τα προβιοτικά είναι ιδιαίτερα διαδεδομένα στη βιομηχανία τροφίμων, πρόσφατα το ενδιαφέρον για αυτά έχει αυξηθεί και στη φαρμακευτική βιομηχανία. Το αυξημένο ενδιαφέρον φαίνεται να πηγάζει από την ευαισθητοποίηση σχετικά με την επείγουσα ανάγκη για εναλλακτικές λύσεις για αντιβιοτικά (Oliphant & Eroschenko, 2015) και τη νέα ευρωπαϊκή και διεθνή νομοθεσία που απαιτεί πιο αυστηρή τεκμηρίωση των υποτιθέμενων ισχυρισμών υγείας για τα προβιοτικά σε λειτουργικά τρόφιμα (Foligné *et al.*, 2013).

Η ραγδαία ανάπτυξη στο πεδίο της ιατρικής και της επιστήμης τροφίμων, καθώς και η έγκυρη πληροφόρηση των καταναλωτών από φορείς υγείας σχετικά με την επίδραση της διατροφής στην υγεία οδήγησε σε σημαντική αύξηση της ζήτησης για λειτουργικά τρόφιμα με προβιοτικά (Tripathi & Giri, 2014). Για τον λόγο αυτό, η κατανάλωση προβιοτικών μικροοργανισμών μέσω των τροφίμων είναι η πιο διαδεδομένη προσέγγιση αυτή τη στιγμή. Τα περισσότερα από τα προβιοτικά τρόφιμα κατηγοριοποιούνται ως λειτουργικά τρόφιμα και αντιπροσωπεύουν ένα μεγάλο ποσοστό τους. Ο όρος «λειτουργικά τρόφιμα» εμφανίστηκε για πρώτη φορά το 1993 στο ειδησεογραφικό περιοδικό Nature υπό τον τίτλο «Η Ιαπωνία εξερευνά τα όρια μεταξύ τροφίμων και φαρμάκων» και είναι, εξ ορισμού, τρόφιμα ή συστατικά τα οποία, εκτός από τις θρεπτικές τους ιδιότητες, επεξεργάζονται κατά τρόπο προς όφελος της υγείας του καταναλωτή (Swinbanks & O'Brien, 1993). Αν και δεν υπάρχει συναίνεση για τον ακριβή ορισμό των λειτουργικών τροφίμων, γενικά χαρακτηρίζονται από ιδιότητες όπως είναι για την βελτίωση της υγείας και για χαμηλότερο κίνδυνο εμφάνισης ασθενειών (Kavoosi-Kalashami *et al.*, 2017). Επιπλέον, αναμένεται η παγκόσμια αγορά λειτουργικών τροφίμων να αυξηθεί από 203,64 δισεκατομμύρια δολάρια το 2022 σε 229,7 δισεκατομμύρια δολάρια το 2023 με σύνθετο ετήσιο ρυθμό ανάπτυξης 12,8% (Chopra *et al.*, 2022). Τέλος, έχει υπολογιστεί πως τα προϊόντα που περιέχουν προβιοτικά αποτελούν το 60-70% της συνολικής αγοράς των λειτουργικών τροφίμων (Kołożyn-Krajewska & Dolatowski, 2012).

Τα λειτουργικά τρόφιμα με προβιοτικά αντιπροσωπεύουν έναν από τους πιο ενδιαφέροντες τομείς έρευνας και καινοτομίας στη βιομηχανία τροφίμων, ωστόσο η ανάπτυξη τους γεννά προκλήσεις. Αναλυτικότερα, αρκετοί παράγοντες κατά τη

διαδικασία της παραγωγής και αποθήκευσή τους επηρεάζουν δυσμενώς τη βιωσιμότητά των προβιοτικών μικροοργανισμών (Tripathi & Giri, 2014). Ακόμη, ύστερα από την πρόληψή τους δια στόματος και κατά τη διέλευση τους μέσω της γαστρεντερικής οδού οι μικροοργανισμοί εκτίθενται σε αντίξοες συνθήκες, όπως το χαμηλό pH, τα χολικά άλατα και τα συστατικά άλλων τροφίμων, οι οποίες συνδράμουν περαιτέρω στη μείωση της βιωσιμότητάς τους (Sarkar, 2010). Προκειμένου, λοιπόν, να διατηρηθεί και να ενισχυθεί η βιωσιμότητα των προβιοτικών μικροοργανισμών έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες μέθοδοι, όπως η επιλογή του κατάλληλου βακτηριακού στελέχους, η προσαρμογή του μικροοργανισμού σε στρεσογόνους παράγοντες, η επιλογή κατάλληλων υλικών συσκευασίας, η προσθήκη συστατικών που προάγουν την ανάπτυξη των προβιοτικών και η ενθυλάκωση.

Η μέθοδος της ενθυλάκωσης αποτελεί αποτελεσματική μέθοδος για τη προστασία των προβιοτικών κατά τη διαδικασία παραγωγής και αποθήκευσης των τροφίμων, ωστόσο η επιβίωση του βακτηρίου μέσα στον ξενιστή και η διατήρηση των αποκλειστικών ιδιοτήτων παραμένουν κρίσιμα ζητήματα (Forssten *et al.*, 2011). Κατά τη βελτιστοποίηση της διαδικασίας και τον σχεδιασμό του προϊόντος θα πρέπει να ληφθούν υπόψη η βιωσιμότητα των κυττάρων και η λειτουργικότητα των προβιοτικών. Παράλληλα, θα πρέπει να ελέγχονται αυστηρά οι συνθήκες της ζύμωσης (pH, σύνθεση πηγής άνθρακα, θερμοκρασία και διάρκεια ζύμωσης), όπως και η επεξεργασία μετά τη ζύμωση (ψεκασμός- ξήρανση, λυοφιλοποίηση, ομογενοποίηση, ανάμειξη και δισκιοποίηση υψηλής πίεσης και συσκευασία). Δεν θα πρέπει να παραλειφθεί, πως μετά την παραγωγή, η παρακολούθηση της διάρκειας ζωής παραμένει αναγκαία. Με τον τρόπο αυτό διασφαλίζεται τη βιωσιμότητα των κυττάρων σε επιδιωκόμενα επίπεδα κατά τη διάρκεια της απαιτούμενης χρονικής περιόδου.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να εξεταστεί η ικανότητα διαφόρων μεθόδων ενθυλάκωσης ώστε να διασφαλίσουν τη βιωσιμότητα προβιοτικών στελεχών, υπό συνθήκες υψηλών θερμοκρασιών και διεργασιών όπως η ξήρανση και η λυοφιλίωση, οι οποίες συχνά χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων. Οι υψηλές θερμοκρασίες στις οποίες εκτέθηκαν τα ενθυλακωμένα δείγματα

προβιοτικών μικροοργανισμών προσομοιάζουν τις συνθήκες παστερίωσης στα τρόφιμα και αποτελούν επιπλέον ένα σημαντικό πρόβλημα μείωσης της βιωσιμότητας των προβιοτικών κυττάρων κατά την ανάπτυξη λειτουργικών τροφίμων. Ωστόσο, η ενσωμάτωσή τους στα τρόφιμα που υφίστανται τις προαναφερόμενες διαδικασίες αποτελεί πρόκληση, λόγω των υψηλών θερμοκρασιών που χρησιμοποιούνται καθώς και της άμεσης αφυδάτωσης των κυττάρων που οδηγεί σε υψηλά ποσοστά θνησιμότητας. Επομένως, η ανεύρεση αποτελεσματικών μεθόδων προστασίας τους αποτελεί μια σημαντική πρόκληση στον τομέα των τροφίμων.

Κεφάλαιο 1^ο- Προβιοτικά

1.1 Ορισμός

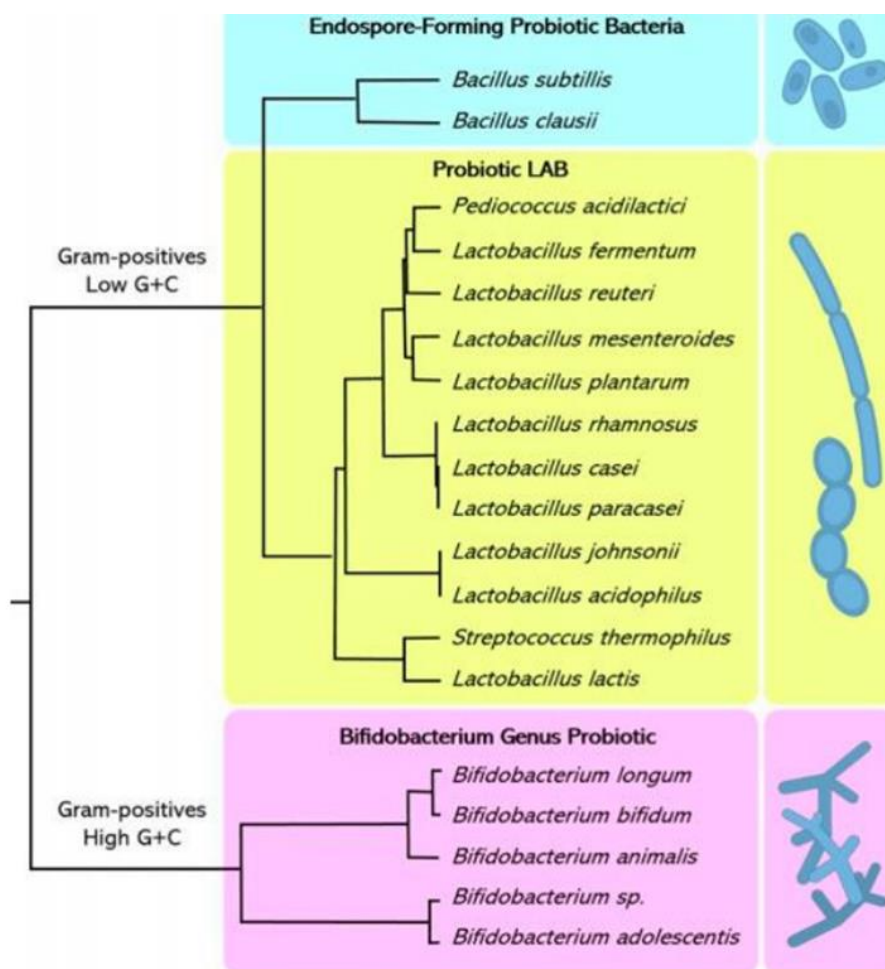
Η αναδιατύπωση της 'υπόθεσης υγιεινής' οδήγησε στην αναθεώρηση του ρόλου των μικροοργανισμών στην υγεία του ανθρώπου. Έτσι, προωθήθηκε η ιδέα της σκόπιμης διαμόρφωσης του μικροβιώματος του εντέρου για θεραπευτικούς σκοπούς. Ωστόσο, η ιδέα της εξάλειψης των παθογόνων και της αντικατάστασής τους με "φιλικά" βακτήρια μέσω στοματικής προς βελτίωση της μικροβιακής ισορροπίας, της υγείας και της μακροζωίας δεν είναι κάτι καινοφανές. Αντιθέτως, η συγκεκριμένη ιδέα παρουσιάστηκε για πρώτη φορά σχεδόν έναν αιώνα νωρίτερα από τον Tissier (1906) και τον Metchnikoff (1907) (Mavroudi, 2012). Αναλυτικότερα, ο Tissier ανέδειξε ότι τα βακτήρια του γένους *Bifidobacterium* επικρατούν στην εντερική μικροχλωρίδα των βρεφών, συγκριτικά με άλλα είδη βακτηρίων και πρότεινε τη χορήγηση τους με σκοπό την επαναφορά της ισορροπίας στην εντερική μικροχλωρίδα και τη θεραπεία της διάρροιας σε βρέφη. Ταυτόχρονα, ο Metchnikoff ανέπτυξε τη θεωρία της αυτό-αποτοξίνωσης του οργανισμού, συνδέοντας την κατανάλωση γιαουρτιού που περιέχει βακτήρια του γένους *Lactobacillus*, με την ασυνήθιστη μακροζωία που παρατηρήθηκε σε χωρικούς της Βουλγαρίας. Έπειτα, το 1965, πρώτοι οι Lilly και Stillwell χρησιμοποίησαν τον όρο «προβιοτικό» (προ-βίος, προάγω τη ζωή), για να περιγράψουν ουσίες, οι οποίες εκκρίνονται από έναν μικροοργανισμό και προάγουν την ανάπτυξη ενός άλλου. Παρουσίασαν, δηλαδή, την έννοια των προβιοτικών ως αντίθετη του όρου «αντιβιοτικό». Ωστόσο, ο ορισμός αυτός δεν απέκτησε ευρεία αποδοχή, με τον Sperti να τον χρησιμοποιεί το 1971 για να περιγράψει εκκρίματα ιστών που διεγείρουν τη μικροβιακή ανάπτυξη. Το 1989 ο Fuller επαναδιατύπωσε τον ορισμό για τα προβιοτικά και όρισε ως «προβιοτικό» : ένα ζωντανό, μικροβιακό συμπλήρωμα διατροφής, το οποίο δρα ευεργετικά στο ζωο-ξενιστή, βελτιώνοντας την εντερική μικροβιακή ισορροπία του. Μέσω αυτού του ορισμού, ο Fuller τόνισε την ανάγκη οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί να βρίσκονται ζωντανοί στο έντερο του ξενιστή (Fuller, 1992). Έκτοτε, ο όρος προβιοτικός επαναδιατυπώθηκε αρκετές φορές και σήμερα είναι ευρέως γνωστός και αποδεκτός ο όρος που προτάθηκε από τη Διεθνή Οργάνωση Τροφίμων και Γεωργίας (FAO) και

τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO), σύμφωνα με τον οποίο: «προβιοτικά ονομάζονται οι ζωντανοί μικροοργανισμοί, οι οποίοι όταν χορηγηθούν σε επαρκείς ποσότητες προσδίδουν ευεργετικά οφέλη στην υγεία του ξενιστή» (FAO/WHO, 2001). Τέλος, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Γαστρεντερολογίας (WGO) απέδωσε έναν παρόμοιο αλλά περαιτέρω απλουστευμένο ορισμό, ο οποίος αναφέρει πως τα προβιοτικά είναι ζωντανοί μικροοργανισμοί που προσδίδουν ένα όφελος για την υγεία του ξενιστή (Turkmen *et al*, 2019).

1.2 Κυριότερα είδη προβιοτικών μικροοργανισμών

Τα συχνότερα γένη βακτηρίων που έχουν χρησιμοποιηθεί για τις προβιοτικές τους ιδιότητες είναι τα *Lactobacillus* και τα *Bifidobacterium*, μαζί με τη μαγιά *Saccharomyces boulardi* και ορισμένα είδη *E.coli* και *Bacillus* (Hempel *et al.*, 2011) . Το *Lactobacillus*, που ανήκει στην ομάδα των βακτηρίων γαλακτικού οξέος (Lactic Acid Bacteria, LAB), ήταν το πρώτο προβιοτικό που ανακαλύφθηκε (**Εικόνα 1**). Επιπρόσθετα, ορισμένες προβιοτικές καλλιέργειες αποτελούν κυρίως μέλη του γένους *Bifidobacterium*, το οποίο παράγει επίσης γαλακτικό οξύ ως ένα από τα κύρια τελικά προϊόντα ζύμωσης, ωστόσο, από ταξινομικής άποψης, είναι μέλη του *Actinobacteria*. Επιπλέον, οι *Enterococcus spp.* εντοπίζονται σε πολλά μικροβιοτικά ζυμωμένα τρόφιμα, αλλά, επειδή υπάρχει πιθανότητα να προκαλέσουν μολύνσεις και να αποκτήσουν μηχανισμούς αντοχής στα αντιβιοτικά, δεν χρησιμοποιούνται συνήθως ως καλλιέργειες εκκίνησης (Kanamarlapudi & Muddada, 2017). Η επιστημονική έρευνα κατευθύνει την προσοχή της στην επιλογή νέων στελεχών με διαφορετικές λειτουργικές ιδιότητες. Ταυτόχρονα, νέες μικροβιακές ομάδες, όπως ζύμη και *Bacillus* και πιο συγκεκριμένα στελέχη LAB ταυτοποιούνται συνεχώς (de Melo Pereira *et al.*, 2018). Οι συγκεκριμένοι προβιοτικοί μικροοργανισμοί συνήθως απομονώνονται από τον ανθρώπινο οργανισμό, διότι θεωρείται μια ασφαλής πηγή για την απομόνωση μικροοργανισμών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανάπτυξη προϊόντων. Στη σημερινή εποχή, ωστόσο, χρησιμοποιούνται νέες πηγές απομόνωσης, όπως τα γαλακτοκομικά προϊόντα, τα φρούτα, τα δημητριακά και τα απόβλητα (de Melo Pereira *et al.*, 2018). Τέλος, τα τελευταία χρόνια οι έρευνες έχουν

επικεντρωθεί κυρίως στη διερεύνηση των παραγόντων που επηρεάζουν τη βιωσιμότητα των προβιοτικών στελεχών κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας και της αποθήκευσης (Kerry *et al.*, 2018).



Εικόνα 1. Φυλογενετική σχέση των διαφόρων προβιοτικών βακτηριακών ομάδων μέσω 16S rRNA αλληλουχιών γονιδίου (de Melo Pereira *et al.*, 2018).

1.2.1 Βακτήρια Γαλακτικού Οξέος – Lactic Acid Bacteria (LAB)

Τα βακτήρια γαλακτικού οξέος (Lactic Acid Bacteria, LAB) διαδραματίζουν πολύπλευρο ρόλο στα τρόφιμα, στη γεωργία και σε κλινικές εφαρμογές (Bintsis, 2018). Η χρήση τους στη ζύμωση τροφίμων είναι μια αρχαία τεχνική συντήρησης τροφίμων, με προϊόντα που έχουν υποστεί ζύμωση, όπως το γιαούρτι και το τυρί, να

συμπεριλαμβάνονται στην ανθρώπινη διατροφή εδώ και χιλιετίες. Τα LAB περιλαμβάνουν 183 αναγνωρισμένα είδη και εφαρμόζονται σε ποικίλες βιομηχανικές διεργασίες, όπως για την παραγωγή συντηρητικών, οξινιστικών και αρωματικών ουσιών στα τρόφιμα, καθώς και στην παρασκευή φαρμάκων, καλλυντικών και βιοαποικοδομήσιμων πολυμερών πολυγαλακτικού οξέος (Kumar *et al.*, 2010). Οι συγκεκριμένες μικροβιακές ομάδες εκδηλώνουν ανθεκτικότητα σε δυσμενείς συνθήκες του ανθρώπινου σώματος, όπως στα ένζυμα σιέλου, το χαμηλό pH και τα παγκρεατικά υγρά. Επίσης, αποικίζουν τα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου και συμβάλλουν στην υγεία του περιβάλλοντος του ξενιστή, ρυθμίζοντας τη μικροβιακή κοινότητα και εκτελώντας βιολογικές λειτουργίες (Zoumporoulou *et al.*, 2017).

Τα LAB ταξινομούνται ως Gram⁺ βακτήρια και χαρακτηρίζονται από χαμηλή περιεκτικότητα σε γουανίνη + κυτοσίνη (G + C). Είναι ανθεκτικά στα οξέα, μη σπορογόνα, μη κινητά και εμφανίζονται είτε με σχήμα ράβδου είτε κόκκου. Τα LAB χρησιμοποιούνται κυρίως ως καλλιέργειες εκκίνησης στη βιομηχανία τροφίμων και αυτό επειδή η κύρια λειτουργία τους είναι η παραγωγή γαλακτικού οξέος, δηλαδή η οξίνιση της τροφής. Πιο συγκεκριμένα, εντοπίζονται σε μια τεράστια ποικιλία γαλακτοκομικών προϊόντων που έχουν υποστεί ζύμωση, όπως κρέας, ψάρι, δημητριακά, φρούτα και λαχανικά. Επιπλέον, τα LAB ενισχύουν τόσο τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των ζυμωμένων τροφίμων παράγοντας συστατικά αρώματος, όσο και την διατροφική τους αξία (Picon, 2017). Ακόμη, γίνεται χρήση αυτών για την παραγωγή ή αποικοδόμηση εξωπολυσακχαριτών, λιπιδίων και πρωτεϊνών και θρεπτικών συστατικών όπως βιταμινών (Bintsis, 2018). Παράλληλα, συμβάλλουν στην αναστολή της ανάπτυξης παθογόνων μικροοργανισμών και συνεπώς χρησιμοποιούνται ως βιοπροστατευτικές καλλιέργειες (Souza *et al.*, 2022).

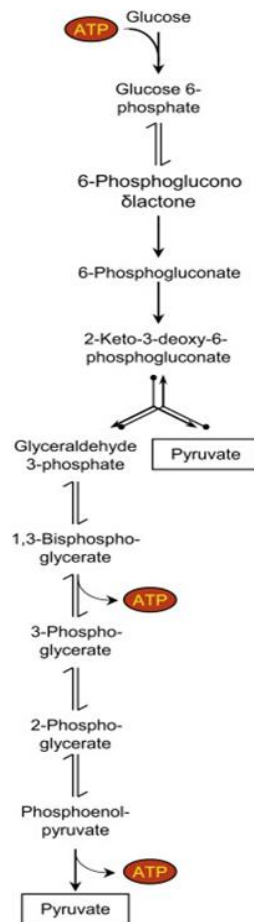
Η σημασία τους συνδέεται κυρίως με την ασφαλή μεταβολική τους δραστηριότητα, ειδικά σε τρόφιμα που χρησιμοποιούν διαθέσιμους υδατάνθρακες για την παραγωγή οργανικών οξέων και άλλων μεταβολιτών, όπως CO₂, αιθανόλη, υπεροξειδίου του υδρογόνου και διακετυλίου, καθώς και αντιμικροβιακών ενώσεων, όπως λιπαρών οξέων, βακτηριοκινών και συναφών πρωτεϊνούχων ενώσεων. Η συχνή τους εμφάνιση σε τρόφιμα, μαζί με τη μακροχρόνια χρήση τους, συντελεί στη φυσική αποδοχή τους ως GRAS (Generally Recognized as Safe) για ανθρώπινη κατανάλωση

(Kargozari *et al.*, 2014). Επιπρόσθετα, βοηθούν στη διατήρηση και τη μικροβιακή ασφάλεια των ζυμωμένων τροφίμων, προάγοντας την μικροβιακή σταθερότητα των τελικών προϊόντων. Οι αρωματικές ενώσεις που παράγουν, δημιουργούνται με διάφορες μεθόδους, όπως οι μετατροπές λακτόζης και κιτρικού οξέος (γλυκόλυση και πυροσταφυλικός μεταβολισμός), λίπους (λιπόλυση) και πρωτεϊνών (πρωτεόλυση, πεπτιδόλυση και ο καταβολισμός των αμινοξέων. Χάρε σε αυτές τους τις ιδιότητες, τα LAB έχουν ευρείες βιομηχανικές εφαρμογές, κυρίως ως εκκινητές ή συμπληρωματικές καλλιέργειες, σε ποικίλες ζυμώσεις τροφίμων. Διαρκώς απομονώνονται νέες μικροβιακές ομάδες από νέες πηγές, όπως απεικονίζεται και στον πίνακα (**Πίνακας 1**).

Ως γνωστόν τα LAB παράγουν μεταβολικά μεγάλες ποσότητες γαλακτικού οξέος και άλλων μεταβολιτών από μια διαφορετική πηγή άνθρακα, συμπεριλαμβανομένης της γλυκόζης, της φρουκτόζης, της λακτόζης και της γαλακτόζης (de Melo Pereira *et al.*, 2018). Με βάση τον μεταβολισμό της γλυκόζης, τα LAB ταξινομούνται ως ομοπαραγωγικά, όπου παράγουν αποκλειστικά γαλακτικό οξύ μέσω της οδού Embden-Meyerhof-Parnas (**Εικόνα 3**) ή ετεροπαραγωγικά, τα οποία εκτός από το γαλακτικό οξύ, παράγουν αρκετούς άλλους μεταβολίτες, όπως αιθανόλη, οξικό οξύ και διοξείδιο του άνθρακα μέσω τη μονοφωσφορική οδού πεντόζης (Salveti *et al.*, 2013). Τέλος, τα LAB έχουν την ικανότητα να παράγουν δευτερογενείς μεταβολίτες στους οποίους συμπεριλαμβάνονται οι βακτηριοκίνες, οι εξωπολυσακχαρίτες και τα ένζυμα, που αυξάνουν την ποιότητα και τη διάρκεια ζωής των ζυμωμένων τροφίμων.



Εικόνα 2. Απεικόνιση του *Lactobacillus paracasei* σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (by Dr. Horst Neve, Max Rubner-Institut).



Εικόνα 3. Οδός Embden-Meyerhof-Parnas (King *et al.*, 2022).

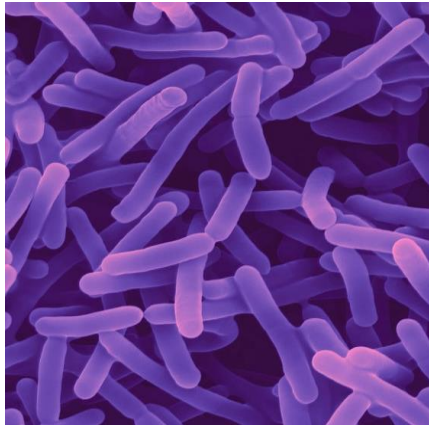
Πίνακας 1. Είδη και Προέλευση *Lactobacillus* (de Melo Pereira *et al.*, 2018).

Είδη <i>Lactobacillus</i>	Προέλευση
<i>L. reuteri</i>	Ανθρώπινο στομάχι
<i>L. rhamnosus</i>	Βρεφικά κόπρανα
<i>L. salivarius</i>	Ανθρώπινο στομάχι
<i>L. delbrueckii</i>	Ανθρώπινο γάλα
<i>L. gasseri</i>	Ανθρώπινο στομάχι
<i>L. lactis</i>	Γάλα καμήλας
<i>L. paracasei</i>	Φέτα
<i>L. paraplantarum</i>	Γάλα χοιρομητέρας

<i>L. plantarum</i>	Κακάο
<i>L. pentosus</i>	Ελιές
<i>L. sakei</i>	Κινόα και σπόρους αμάρανθου
<i>L. brevis</i>	Γάλα χοιρομητέρας
<i>L. casei</i>	Κινόα και σπόρους αμάρανθου
<i>L. diolivorans</i>	Ταχίνι

1.2.2 *Bifidobacterium*

Το *Bifidobacterium* απομονώθηκε για πρώτη φορά στα τέλη του 19ου αιώνα από τον Γάλλο Henry Tissier. Λόγω της υψηλής περιεκτικότητας σε DNA της γουανίνης και της κυτοσίνης, η οποία κυμαίνεται από 42 έως 67%, ενσωματώθηκε στη σειρά των ακτινομυκητών. Τα *Bifidobacterium* είναι Gram+, ετεροπαραγωγικά, μη κινητά, αναερόβια βακτήρια και έχουν την ικανότητα να μεταβολίζουν τη γλυκόζη, τη γαλακτόζη, τη λακτόζη και τη φρουκτόζη (Russell *et al.*, 2011). Το γένος *Bifidobacterium* περιλαμβάνει 30 είδη και στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 2) αναγράφονται μερικά ακόμα από τα στελέχη *bifidobacteria*, αλλά και η προέλευσή τους. Τα *Bifidobacterium* που παρουσιάζουν προβιοτικά αποτελέσματα (Εικόνα 4) είναι τα *B. teencensis*, *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. breve* και *B. Longum* και χρησιμοποιούνται σε γάλα, γιαούρτια, τυρί και άλλα γαλακτοκομικά προϊόντα (Russell *et al.*, 2011). Με την παρουσία τους φαίνεται να παρεμποδίζεται η ανάπτυξη των κολοβακτηριδίων και των κλωστριδίων και ταυτόχρονα θεωρείται πως συνδράμουν στην επιδιόρθωση τυχόν ανωμαλιών της εντερικής μικροχλωρίδας σε ενήλικες και ηλικιωμένα άτομα (Cho & Finocchiaro, 2009). Κάποια από αυτά τα βακτήρια ενδέχεται να βελτιώνουν τη διαδικασία της υδρόλυσης της λακτόζης, όπως και την απορρόφηση του ασβεστίου από τον οργανισμό, να εκδηλώνουν αντικαρκινική δράση και να μειώνουν τα επίπεδα της χοληστερόλης (Xu *et al.*, 2011).



Εικόνα 4. Έγχρωμη ηλεκτρονική μικρογραφία σάρωσης του προβιοτικού βακτηρίου *Bifidobacterium animalis* που αποικίζει το ανθρώπινο έντερο (by Dennis Kunkel Microscopy/science Photo Library).

Πίνακας 2. Είδη και προέλευση *Bifidobacteria* (de Melo Pereira *et al.*, 2018).

Είδη <i>Bifidobacterium</i>	Προέλευση
<i>B. adolescentis</i>	Εντερικό σύστημα ενηλίκων
<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	Ζωικά κόπρανα
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	Γιαούρτι
<i>B. asteroides</i>	Επιγάστριο μελισσών
<i>B. bifidum</i>	Βρεφικά κόπρανα
<i>B. breve</i>	Βρεφικά κόπρανα
<i>B. catenulatum</i>	Εντερικό σύστημα ενηλίκων
<i>B. coryneforme</i>	Επιγάστριο μελισσών
<i>B. cuniculi</i>	Κόπρανα κονίκλων
<i>B. gallicum</i>	Ανθρώπινα κόπρανα
<i>B. gallinarum</i>	Εντερικό σύστημα κοτόπουλων
<i>B. indicum</i>	Επιγάστριο μελισσών
<i>B. longum</i> biotype <i>longum</i>	Εντερικό σύστημα ενηλίκων

<i>B. longum</i> biotype <i>infantis</i>	Εντερικό σύστημα βρεφών
<i>B. magnum</i>	Κόπρανα κόνικλων
<i>B. merycicum</i>	Προστόμαχος βοοειδών
<i>B. minimum</i>	Υγρά απόβλητα
<i>B. pseudocatenulatum</i>	Βρεφικά κόπρανα
<i>B. pseudolongum</i> subsp. <i>pseudolongum</i>	Κόπρανα χοίρων
<i>B. pseudolongum</i> subsp. <i>globosum</i>	Προστόμαχος βοοειδών
<i>B. psychraerophilum</i>	Κόπρανα χοίρων
<i>B. pullorum</i>	Εντερικό σύστημα κοτόπουλων
<i>B. ruminantium</i>	Προστόμαχος βοοειδών
<i>B. scardovii</i>	Ανθρώπινο αίμα
<i>B. subtilis</i>	Υγρά απόβλητα
<i>B. thermacidophilum</i> subsp. <i>thermacidophilum</i>	Λύματα
<i>B. thermacidophilum</i> subsp. <i>porcinum</i>	Κόπρανα χοίρων
<i>B. thermophilum</i>	Κόπρανα χοίρων

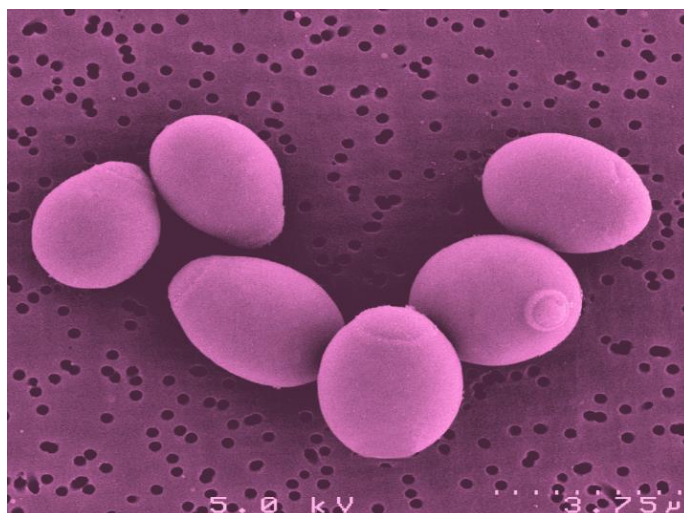
1.2.3 *Bacillus*

Τα είδη *Bacillus*, όπως το *B. clausii* και το *B. subtilis* εφαρμόζονται και αυτά ως προβιοτικά στη βιομηχανία τροφίμων και φαρμακευτικών προϊόντων (Liu *et al.*, 2018). Τα συγκεκριμένα βακτήρια είναι κατάλληλα για ανθρώπινη κατανάλωση, παράγουν αντιμικροβιακές πρωτεΐνες και η βιωσιμότητά τους διατηρείται σταθερή σε ένα μεγάλο εύρος συνθηκών επεξεργασίας (Ghelardi *et al.*, 2022). Αυτό που χαρακτηρίζει τα Gram⁺, αερόβια βακτήρια είναι η δημιουργία ενδοσπορίων, τα οποία εξασφαλίζουν τη διατήρηση της βιωσιμότητας για μεγάλα χρονικά διαστήματα κατά την αποθήκευση (Cutting, 2011). Από την άλλη πλευρά, ορισμένα είδη *Bacillus* παράγουν τοξίνες που μπορούν να επιφέρουν αρνητικά αποτελέσματα στην υγεία

του ανθρώπου εάν τις καταναλώσει. Ειδικότερα, το *B. cereus*, είναι γνωστό πως παράγει τοξίνες που προκαλούν τροφική δηλητηρίαση, ιδίως όταν μολυνθούν τα τρόφιμα και έπειτα παραμένουν σε θερμοκρασίες δωματίου για αρκετό καιρό (Santos Mascarenhas *et al*, 2024).

1.2.4 Ζύμες

Οι ζύμες αποτελούν μια μεγάλη και ετερογενή ομάδα ευκαρυωτικών μικροοργανισμών που είναι ευρέως διαδεδομένες σε φυσικά περιβάλλοντα, συμπεριλαμβανομένων του πεπτικού συστήματος των ανθρώπων, φυτών, αερομεταφερόμενων σωματιδίων και προϊόντων διατροφής (Alkalbani *et al.*, 2022). Το ενδιαφέρον για τη χρήση ζυμών ως προβιοτικών έχει αυξηθεί τα τελευταία χρόνια λόγω της υψηλής τους περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες, βιταμίνη Β, ιχνοστοιχεία και διάφορες ανοσοδιεγερτικές ενώσεις, όπως πρωτεάσες, β-γλυκάνες και ολιγοσακχαρίτες μαννάνης (Arévalo-Villena *et al.*, 2018). Επιπλέον, οι ζύμες παρουσιάζουν τα πλεονεκτήματα της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά και της καλής ανοχής για τις βιομηχανικές συνθήκες επεξεργασίας, καθιστώντας τις ιδανικές για επεξεργασία με λυοφιλίωση και χρήση υψηλών θερμοκρασιών (Abdel-Rahman *et al.*, 2013). Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA), το *Saccharomyces boulardii* (**Εικόνα 5**), έχει καθεστώς Πιστοποιημένου Τεκμηρίου Ασφάλειας (QPS) και μπορεί να χρησιμοποιηθεί κυρίως ως προβιοτικό (EFSA Panel on Biological Hazards Hudson *et al.*, 2024). Τέλος, διαρκώς εντοπίζονται πολλές πιθανές προβιοτικές ζύμες, όπως *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Schizosaccharomyces* και *Candida* (Banjara *et al.*, 2015).



Εικόνα 5. Προβιοτικό είδος ζύμης *Saccharomyces boulardii* (Łukaszewicz, 2012).

1.3 Μηχανισμοί δράσης των προβιοτικών

Τα ευεργετικά οφέλη που προσφέρουν των προβιοτικά στην υγεία συνδέονται, άμεσα ή έμμεσα, με το γαστρεντερικό σωλήνα του ανθρώπου. Αυτό οφείλεται όχι μόνο στο ότι οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί των τροφίμων ή των θεραπευτικών σκευασμάτων λαμβάνονται μέσω στόματος, αλλά και στο ότι οι μηχανισμοί δράσης τους βασίζονται στις αλληλεπιδράσεις των προβιοτικών μικροοργανισμών με την εντερική μικροχλωρίδα. Επιπρόσθετα, οι μηχανισμοί δράσης των προβιοτικών παρουσιάζουν ποικιλομορφία και πολυπλοκότητα. Ειδικότερα, τα διαφορετικά στελέχη των προβιοτικών επιδεικνύουν διαφορετικό τρόπο δράσης, ο οποίος εξαρτάται από το είδος των μορίων που εκφράζονται στην επιφάνεια των κυττάρων τους (πχ γλυκολιπίδια) ή που εκκρίνονται από αυτά (Pandey *et al.*, 2015). Πρόσφατα δεδομένα αποδεικνύουν ότι οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί δρουν ευεργετικά στην υγεία ενισχύοντας τη λειτουργία του επιθηλιακού φραγμού και ρυθμίζοντας τόσο τη σύσταση της εντερικής μικροχλωρίδας, όσο τις αποκρίσεις του έμφυτου και επίκτητου ανοσοβιολογικού συστήματος (Reiff & Kelly, 2010).

1.3.1 Ενίσχυση λειτουργίας επιθηλιακού φραγμού

Το εντερικό επιθήλιο λειτουργεί ως μηχανικός φραγμός που παρεμποδίζει την είσοδο των συμβιωτικών και των παθογόνων μικροοργανισμών. Αυτό οφείλεται στη στενή σύνδεση που υπάρχει μεταξύ των κύτταρων του εντερικού επιθηλίου μέσω της πρωτεϊνικής φύσεως εξωκυττάριας μάζας. Η δυσλειτουργία του επιθηλιακού φραγμού, είτε λόγω απώλειας, είτε λόγω μεταβολών, συνδέεται άμεσα με την εμφάνιση Ιδιοπαθών Φλεγμονωδών Νόσων του Εντέρου (ΙΦΝΕ). Στις ΙΦΝΕ συμπεριλαμβάνονται η Ελκώδης Κολίτιδα και η Νόσος Crohn που αποτελούν ανίατες χρόνιες παθήσεις του γαστρεντερικού συστήματος. Επιπροσθέτως, η λειτουργία του μηχανικού επιθηλιακού φραγμού επηρεάζεται από συγκεκριμένα στελέχη προβιοτικών μικροοργανισμών μέσω της εκδήλωσης ποικίλων μηχανισμών, που σχετίζονται με τον τύπο των μορίων που εκφράζονται στην επιφάνεια των κυττάρων τους ή εκκρίνονται από αυτά (Fedorak, 2008). Οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί, λοιπόν, δρουν ενισχύοντας την ακεραιότητα του φραγμού των επιθηλιακών κυττάρων του ξενιστή ή επιδιορθώνοντας τις βλάβες σε αυτά. Τέλος, οι μοριακοί μηχανισμοί της παραπάνω δράσης των προβιοτικών περιλαμβάνουν την αναστολή φλεγμονωδών κυτοκινών, που ενδέχεται να βλάψουν στις στενές συνδέσεις μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων και την προώθηση της παραγωγής βλεννινών, λιπαρών οξέων βραχείας αλυσίδας (SCFAs) και προστατευτικών κυτοκινών (IL-6) που αναστέλλουν την απόπτωση των επιθηλιακών κυττάρων (Vanderpool *et al.*, 2008).

1.3.2 Βελτίωση της σύστασης της εντερικής μικροβιακής κοινότητας

Η διατήρηση της ισορροπίας και της δομής της εντερικής μικροβιακής κοινότητας αποτελεί κρίσιμο παράγοντα για την υγεία του οργανισμού. Διαταραχές σε αυτήν την ισορροπία, όπως η μείωση των ωφέλιμων βακτηρίων και η αύξηση των παθογόνων μικροοργανισμών, συνδέονται με την εμφάνιση παθολογικών καταστάσεων, όπως φλεγμονώδεις και μολυσματικές παθήσεις του εντέρου. Με τη σειρά τους οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί αναστέλλουν την ανάπτυξη και δράση 22 παθογόνων μικροοργανισμών και διατηρούν με αυτόν τον τρόπο την ισορροπία της

εντερικής μικροχλωρίδας (Vanderpool *et al.*, 2008). Στους συγκεκριμένους μηχανισμούς δράσης συμπεριλαμβάνονται:

- η απευθείας παραγωγή αντιβακτηριδιακών ουσιών, όπως οι βακτηριοσίνες και τα οξέα,
- ο ανταγωνιστικός αποκλεισμός λόγω συναγωνισμού για τις ίδιες θέσεις σύνδεσης στα επιθηλιακά κύτταρα,
- η αναστολή της έκφρασης των γονιδίων που ευθύνονται για τους μολυσματικούς παράγοντες των παθογόνων,
- η ενίσχυση των αντιμικροβιακών ανοσοβιολογικών αποκρίσεων του εντερικού βλεννογόνου μέσω της παραγωγής sIgA, φλεγμονωδών (IL-6) και ρυθμιστικών κυτοκινών (TGF- β) και
- η παραγωγή βιταμινών B που είναι αναγκαίες για το μεταβολισμό των τροφών για την διατήρηση υγιούς δέρματος και νευρικού συστήματος (Arenahalli Ningegowda & Siddalingaiya Gurudutt, 2012).

1.3.3 Ρύθμιση αποκρίσεων του έμφυτου και επίκτητου ανοσοβιολογικού συστήματος

Οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί έχουν την ικανότητα να αλληλοεπιδρούν με το ανοσολογικό σύστημα του ξενιστή μέσω μιας ποικιλίας μοριακών και κυτταρικών μηχανισμών. Μέσω αυτών των αλληλεπιδράσεων τροποποιούνται οι αποκρίσεις του ανοσολογικού συστήματος του ξενιστή και ρυθμίζεται η ισορροπία μεταξύ των φλεγμονωδών και αντί-φλεγμονωδών αποκρίσεων του, καθορίζοντας την εντερική ομοιόσταση. Οι μηχανισμοί με τους οποίους οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί τροποποιούν την απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος δεν έχουν εξακριβωθεί ακόμα. Ωστόσο, ένας μεγάλος αριθμός αποτελεσμάτων από *in vitro* και *in vivo* δοκιμές δείχνει ότι οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί επιδρούν στα κύτταρα του έμφυτου και επίκτητου ανοσοβιολογικού συστήματος, όπως τα μακροφάγα κύτταρα, τα φυσικά φονικά κύτταρα (Natural Killer Cells), τα δενδριτικά κύτταρα και τα θυμικά κύτταρα Treg (Lebeer *et al.*, 2008). Ειδικότερα, όσον αφορά την επίδραση τους στα μακροφάγα κύτταρα, συγκεκριμένα στελέχη προβιοτικών βακτηρίων ενισχύουν την

φαγοκυτταρική ικανότητα των μακροφάγων, θέτοντας τα σε μία καλύτερη θέση για την αντιμετώπιση των μικροβιακών εισβολών. Παράλληλα, επάγουν την παραγωγή νιτρικού οξειδίου και φλεγμονωδών κυτοκινών από αυτά, προωθώντας έτσι μια αποτελεσματικότερη ανοικτή δράση (Romo-Barrera *et al.*, 2021). Κάποιοι προβιοτικοί μικροοργανισμοί επάγουν, επίσης, την ενεργοποίηση των φυσικών φονικών κυττάρων και επηρεάζουν τη λειτουργία των δενδριτικών κυττάρων, είτε απευθείας μετά τη σύνδεσή τους σε αυτά, είτε έμμεσα μέσω της παραγωγής κυτοκινών από τα επιθηλιακά κύτταρα. Οι μελέτες σχετικά με τους προβιοτικούς μικροοργανισμούς αποδεικνύουν ότι επιδρούν σε ένα ευρύ φάσμα των λειτουργιών του ανοσοβιολογικού συστήματος μέσω ποικίλων μηχανισμών. Αυτό υποδηλώνει πως η δράση συγκεκριμένων στελεχών προβιοτικών είναι πιθανόν να οφείλεται όχι μόνο σε έναν, αλλά σε συνδυασμό διαφορετικών μηχανισμών (Κοτζαμανίδης, 2010).

1.4 Ευεργετικά οφέλη των προβιοτικών στην υγεία

Κατά τη διάρκεια του 19^{ου} αιώνα, επιστήμονες παρατήρησαν τα ευεργετικά οφέλη που προσφέρει στην ανθρώπινη υγεία η κατανάλωση ποσοτήτων γαλακτοκομικών προϊόντων που είχαν υποστεί ζύμωση. Ωστόσο, η αιτία αυτών των επιπτώσεων παρέμενε άγνωστη. Το 1892 μια ωφέλιμη συσχέτιση των μικροοργανισμών με το ανθρώπινο σώμα διαπιστώθηκε από τον Doberlein και σύμφωνα με αυτήν τα κολπικά βακτήρια παράγουν γαλακτικό οξύ από τα σάκχαρα αναστέλλοντας ή και παρεμποδίζοντας έτσι την ανάπτυξη των παθογόνων βακτηρίων. Αρκετά χρόνια αργότερα και συγκεκριμένα το 1928, ο Stanley Thomas απομόνωσε και προσδιόρισε ότι το βακτήριο του Doberlein, ήταν ο *Lactobacillus acidophilus*. Όπως είναι ευρέως διαδεδομένο, ο γαλακτοβάκιλλος *Lactobacillus acidophilus* εντοπίζεται στο γαστρεντερικό σωλήνα των ανθρώπων, των ζώων καθώς, επίσης και των βρεφών τα οποία καταναλώνουν αρκετές ποσότητες γάλακτος, λακτόζης ή διατροφή η οποία περιέχει δεξτράνες. Επιπρόσθετα, το 1905 ο Elie Metchnikoff, ο οποίος είχε συνεργαστεί με τον Pasteur στη δεκαετία του 1860, συσχέτισε την μακροζωία βοσκών της Βουλγαρίας, με τους γαλακτοβάκιλλους που χρησιμοποιούνταν για τη ζύμωση του γιαουρτιού και την παρουσία αυτών των

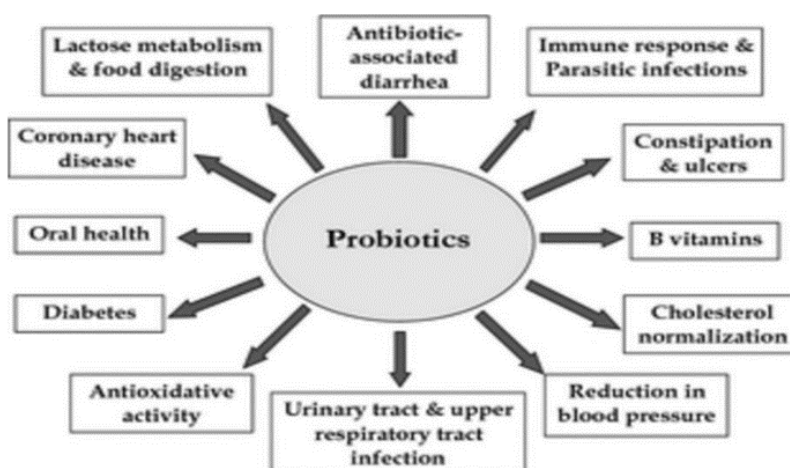
γαλακτοβάκιλλων στο παχύ έντερο βοσκών (Mackowiak, 2013). Αναλυτικότερα, το 1908 ο Elie Metchnikoff στην μελέτη του με τίτλο «Ο πρόλογος της ζωής», υπέθεσε ότι το *Lactic Acid Bacterio* και ο *Streptococcus thermophilus*, που ανιχνεύτηκαν σε βουλγάρικα γιαούρτια, ευθύνονται για την ενδυνάμωση του εντερικού συστήματος παρεμποδίζοντας τις μικροβιακές ζυμώσεις με αποτέλεσμα τη μείωση των παραγόμενων ανεπιθύμητων παραπροϊόντων, όπως αμίνες και αμμωνία. Έτσι, χάρη σε αυτό το γεγονός ο Metchnikoff ονόμασε το βάκιλλο βουλγάρικο και κατόπιν έγινε γνωστός ως *Lactobacillus bulgaricus*, ενώ σήμερα ονομάζεται *L. debrueckii subsp bulgaricus*. Έτσι, πρώτους από όλους ο Metchnikoff επισήμανε τη σημαντικότητα των συγκεκριμένων μικροοργανισμών και τη συμβολή τους στην ανθρώπινη υγεία και στην μακροζωία. Αντιθέτως, επισήμανε ότι τα εντεροβακτήρια είναι περισσότερο επιβλαβή παρά αβλαβή στο σύνολο τους για την ανθρώπινη υγεία. Εν συνεχεία, το 1906, ο Γάλλος παιδίατρος Henry Tissier απομόνωσε τα *Bifidobacterium* καθώς παρατήρησε ότι ο αριθμός τους στα κόπρανα παιδιών με διάρροια ήταν μικρός σε σχέση με τον αριθμό τους στα κόπρανα υγιών παιδιών. Με βάση αυτή την παρατήρηση ισχυρίστηκε ότι θα μπορούσε η χορήγηση των *Bifidobacterium* να μετατοπίσει τα παθογόνα βακτήρια από το έντερο. Οι συγκεκριμένες ανακαλύψεις βοήθησαν καταλυτικά στην έρευνα των μικρόβιων που προάγουν την ανθρώπινη υγεία και έθεσαν τα θεμέλια για την διεξαγωγή κι άλλων ερευνών για το ρόλο των προβιοτικών στην πρόληψη των ασθενειών. Το 1922, σε μια από τις πρώτες μελέτες όπου χρησιμοποιήθηκε ο *Lactobacillus acidophilus* σε 30 ασθενείς με χρόνια δυσκοιλιότητα, διάρροια, ή έκζεμα διαπιστώθηκαν βελτιώσεις και για τις τρεις περιπτώσεις (Rettger & Cheplin, 1922).

Όπως προαναφέρθηκε ο Metchnikoff ανέπτυξε μια θεωρία, μέσω της οποίας υποστήριζε ότι η βελτίωση της υγείας και η καθυστέρηση της διαδικασίας της γήρανσης μπορούν να επιτευχθούν μέσω της χειραγώγησης του εντερικού μικροβιώματος ενός οργανισμού, με φιλικά προς τον ξενιστή βακτήρια που εντοπίζονται στο γιαούρτι. Η θεωρία του Metchnikoff ευδοκίμησε για λίγο καιρό, όμως σύντομα απορρίφθηκε και βρέθηκε στο περιθώριο της ιατρικής επιστήμης. Στα μέσα της δεκαετίας του 1990 αναδύθηκε εκ νέου, ως μια ιδέα ικανή να εισέλθει στον τομέα της σύγχρονης, εμπορικής ιατρικής (Mackowiak, 2013). Το πρωταρχικό κλινικό

ενδιαφέρον, αναφορικά με την εφαρμογή των προβιοτικών, ήταν η πρόληψη και η αντιμετώπιση λοιμώξεων και ασθενειών της γαστρεντερικής οδού. Πλέον, υπάρχουν πολλά δεδομένα από κλινικές μελέτες που υποστηρίζουν τους ισχυρισμούς ότι η χορήγηση προβιοτικών επιφέρει ευεργετικά οφέλη στην ανθρώπινη υγεία (Εικόνα 6). Τα οφέλη αυτά βασίζονται σε ποικίλους μηχανισμούς δράσης των προβιοτικών οι οποίοι περιλαμβάνουν τη βελτίωση του επιθηλιακού μικροβιώματος του εντέρου, την ανταγωνιστικότητά τους ως προς τους παθογόνους μικροοργανισμούς, την παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών και την ικανότητα ανοσοδιέγερσης (Fontana *et al.*, 2013). Όσον αφορά τις αντιμικροβιακές ιδιότητες των γαλακτικών βακτηρίων (LAB) και των βακτηρίων του γένους *Bifidobacterium*, μπορούν να αποδοθούν, αφενός στον ανταγωνισμό για θρεπτικά στοιχεία, και αφετέρου στην παραγωγή παρεμποδιστικών ουσιών, όπως οργανικών οξέων, υπεροξειδίου του υδρογόνου και βακτηριοσινών. Επιπρόσθετα, η επίδραση των οργανικών οξέων, ειδικότερα του γαλακτικού και οξικού οξέος, που παράγονται από αυτά τα βακτήρια, προκαλούν μείωση του pH και ταυτόχρονα παρέχουν βακτηριοκτόνο ή βακτηριοστατική δράση (González-González *et al.*, 2022). Επιπλέον, ορισμένα στελέχη του γένους *Lactobacillus* έχει βρεθεί πως παρεμποδίζουν την ανάπτυξη του παθογόνου βακτηρίου *Helicobacter pylori*, το οποίο ευθύνεται για έλκη του πεπτικού συστήματος και διάφορες γαστρίτιδες. Μέσω, λοιπόν, την χορήγησης στελεχών του γένους *Lactobacillus* μειώνεται η πιθανότητα αποίκησης του στο έντερο, καθώς και της λοίμωξης που προκαλεί (González-González *et al.*, 2022). Γίνεται εμφανές πως οι στοχευμένες παρεμβάσεις στη μικροβιολογία με τη χρήση προβιοτικών έχουν τη δυνατότητα να ισορροπήσουν ή να βελτιώσουν τη δομή, τη σύσταση και τη λειτουργία του εντερικού μικροβιώματος. Ακόμη, έχει εντοπιστεί ότι τα προβιοτικά βελτιώνουν το γαστρεντερικό σύστημα καθ' όλη την οδό διέλευσης, καθώς και ότι παράγουν βιταμίνες και συνεισφέρουν στη διαθεσιμότητά τους (Abatenh, 2018). Παράλληλα, πολυάριθμες αναφορές με στοιχεία αποδεικνύουν πως τα προβιοτικά εξαλείφουν τα συμπτώματα που προκαλούνται από την δυσανεξία στη λακτόζη, καθυστερούν την απορρόφηση της χοληστερίνης, διεγείρουν το ανοσοποιητικό σύστημα και μειώνουν τόσο την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων στο έντερο, όσο την ενζυμική τους δραστηριότητα στα κόπρανα (Rivera-Espinoza & Gallardo-Navarro, 2010). Τέλος, η λήψη προβιοτικών μπορεί να οδηγήσει σε σημαντική μείωση των

επίπεδων των τριγλυκεριδίων (Total Cholesterol, TC) και της «κακής» χοληστερόλης (Low-Density Lipoprotein, LDL) στον ορό σε υπερχοληστερολαιμικούς ασθενείς, ειδικά σε όσους έχουν υψηλά αρχικά επίπεδα TC. Επιπροσθέτως, η επίδραση των προβιοτικών συμπληρωμάτων στη μείωση της LDL χοληστερόλης δύναται να ενισχυθεί αυξάνοντας τον αριθμό των προβιοτικών ειδών σε ένα συμπλήρωμα, τη διάρκεια της θεραπείας και τη δοσολογία (Jiang *et al.*, 2020).

Προκειμένου, λοιπόν, να διασφαλιστεί η βέλτιστη λειτουργία των βακτηριακών κυττάρων, πρέπει πρώτα να διευθετηθούν οι κατάλληλες συνθήκες ανάπτυξης και μεταβολισμού τους, καθώς και η προστασία τους από τις αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες στις οποίες εκτίθενται. Επιπρόσθετα, στην περίπτωση που τα προβιοτικά βακτήρια παράγουν ουσίες εμπορικής σημασίας, τότε κρίνεται αναγκαία η επίτευξη υψηλής πυκνότητας μικροβιακών κυττάρων σε ένα προϊόν, έτσι ώστε να αυξηθεί η απόδοση τους και να διατηρηθεί η δραστηριότητά τους για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (Naklong *et al.*, 2023). Επιπλέον, η λειτουργία των κυττάρων επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων των συνθηκών που επικρατούν στο εσωτερικό του οργανισμού-ξενιστή, οι οποίες διαφέρουν μεταξύ ατόμων, των συνθηκών ανάπτυξης κατά την παρασκευή και αποθήκευση της καλλιέργειας ή του προϊόντος, και της μεθόδου καταμέτρησης της βιωσιμότητας των βακτηριακών κυττάρων (Mishra & Mishra, 2012).



Εικόνα 6. Τα ευεργετικά οφέλη που προσφέρουν τα προβιοτικά στην υγεία (Nagpal *et al.*, 2012).

1.5 Κριτήρια επιλογής προβιοτικών

Σύμφωνα με τις προτάσεις του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (ΠΟΥ), της Διεθνούς Οργάνωση Τροφίμων και Γεωργίας (FAO) και της Ευρωπαϊκής Αρχής για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA) κατά τη διαδικασία επιλογής τους, τα προβιοτικά στελέχη επιβάλλεται να πληρούν τα λειτουργικά κριτήρια, τα οποία να σχετίζονται πρωτίστως με την ασφάλεια (de Melo Pereira *et al.*, 2018). Τα συγκεκριμένα κριτήρια περιλαμβάνονται στον πίνακα 3 και θα εξεταστούν λεπτομερώς στη συνέχεια. Τα χαρακτηριστικά που αφορούν τα προβιοτικά δεν εξαρτώνται από το γένος ή το είδος ενός μικροοργανισμού, αλλά από λίγα και ειδικά επιλεγμένα στελέχη ενός συγκεκριμένου είδους (Hill *et al.*, 2014). Η ασφάλεια των στελεχών καθορίζεται από την προέλευσή τους, την έλλειψη σύνδεσης με παθογόνους μικροοργανισμούς και το προφίλ της αντοχής τους στα αντιβιοτικά. Οι λειτουργικές πτυχές επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό την επιβίωσή τους κατά την εισαγωγή τους στον ανθρώπινο οργανισμό, την διέλευσή τους από το γαστρεντερικό σύστημα και την αλληλεπίδρασή τους με το ανοσοποιητικό σύστημα. Παράλληλα, τα προβιοτικά στελέχη είναι αναγκαίο να πληρούν τις τεχνολογικές απαιτήσεις για την παραγωγή τους. Αυτό σημαίνει ότι πρέπει να έχουν την δυνατότητα να διατηρήσουν την απόδοση και τις ιδιότητές τους καθ' όλο το διάστημα της διαδικασίας αποθήκευσης, διανομής και ζωής του προϊόντος (Lee & Salminen, 2009). Εν κατακλείδι, είναι απαραίτητο τα προβιοτικά να διαθέτουν επιστημονική τεκμηρίωση σχετικά με τα οφέλη τους για τη υγεία, με βάση τα χαρακτηριστικά του κάθε στελέχους που υπάρχει σε ένα προϊόν που διατίθεται στην αγορά.

Πίνακας 3. Κριτήρια επιλογής των προβιοτικών στελεχών (EFSA, 2005; FAO & WHO, 2006).

ΚΡΙΤΗΡΙΑ	ΑΠΑΙΤΟΥΜΕΝΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ
Ασφάλειας	• Ανθρώπινη ή ζωική προέλευση. • Απομόνωση από τον γαστρεντερικό σωλήνα υγιών ανθρώπων. • Ιστορικό ασφαλούς χρήσης.

	• Ακριβής διαγνωστική ταυτοποίηση (χαρακτηριστικά φαινότυπου και γονότυπου). • Απουσία δεδομένων σχετικά με συσχέτιση με μολυσματική νόσο. • Απουσία της ικανότητας διάσπασης των αλάτων χολικού οξέος. • Να μην εντοπίζονται δυσμενείς επιπτώσεις. • Απουσία γονιδίων που ευθύνονται για αντοχή στα αντιβιοτικά
Λειτουργικά	• Ανταγωνιστικότητα σε σχέση με τα μικρόβια που αποικούν το εντερικό οικοσύστημα. • Δυνατότητα επιβίωσης και διατήρησης της μεταβολικής δραστηριότητας και ανάπτυξης στο σημείο προορισμού. • Αντοχή στα χολικά άλατα και τα ένζυμα. • Αντοχή στο χαμηλό pH του στομάχους. • Ανταγωνιστικότητα σε σχέση με τα μικροβιακά είδη που κατοικούν στο γαστρεντερικό σωλήνα. • Ανταγωνιστική δράση έναντι παθογόνων (π.χ. <i>H. pylori</i>, <i>Salmonella sp.</i>, <i>Listeria monocytogenes</i>, <i>Clostridium difficile</i>). • Αντοχή σε βακτηριοκίνες και οξέα που παράγονται από το ενδογενές εντερικό μικροβίωμα. • Προσκόλληση και ικανότητα αποικισμού ορισμένων συγκεκριμένων θέσεων εντός του οργανισμού του ξενιστή και κατάλληλο ποσοστό επιβίωσης στο γαστρεντερικό σύστημα.

Τεχνολογικά	• Εύκολη παραγωγή υψηλών ποσοτήτων βιομάζας. • Βιωσιμότητα και σταθερότητα των επιθυμητών ιδιοτήτων των προβιοτικών βακτηρίων κατά τη διαδικασία στερέωσης (κατάψυξη, ξήρανση με κατάψυξη), προετοιμασία και διανομή προβιοτικών προϊόντων. • Υψηλό ποσοστό επιβίωσης στα τελικά προϊόντα κατά την αποθήκευσή τους σε αερόβιες και μικρο-αερόφιλες συνθήκες. • Εγγύηση των επιθυμητών αισθητηριακών ιδιοτήτων των τελικών προϊόντων. • Γενετική σταθερότητα. • Αντοχή σε βακτηριοφάγους.
---------------------------	---

1.5.1 Ιδιότητες των προβιοτικών

1.5.1.1 Ανθεκτικότητα στο στρες

Προκειμένου ένα πιθανό προβιοτικό στέλεχος να εκδηλώσει την ευεργετική του δράση, θα πρέπει να εμφανίζει ορισμένες επιθυμητές ιδιότητες. Καταρχάς, τα υποψήφια στελέχη υποβάλλονται σε αξιολόγηση, ώστε να αντιμετωπίσουν τις πιέσεις και τις δυσμενείς συνθήκες που επιβάλλει το ανθρώπινο σώμα. Πιο συγκεκριμένα, το προβιοτικό θα πρέπει να παρουσιάζει αντοχή στις επιδράσεις των ενζύμων που υπάρχουν στην στοματική κοιλότητα, όπως η αμυλάση και η λυσοζύμη και έτσι να παραμείνουν αναλλοίωτα (de Melo Pereira *et al.*, 2018). Γενικότερα, τα Gram⁺ βακτήρια εμφανίζουν ευαισθησία στη λυσοζύμη, αλλά ορισμένα LAB είναι ανθεκτικότερα σε σύγκριση με άλλα Gram⁺ βακτήρια, διότι μπορούν να ενσωματωθούν στο μικροβίωμα της στοματικής κοιλότητας (Haddouchi *et al.*, 2013). Οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί, λοιπόν, μετά την κατανάλωσή τους, εκτίθενται σε αντίξοες συνθήκες, όπως η υψηλή οξύτητα του στομάχου, τα γαστρικά υγρά και η

πεψίνη, καθώς και στην παγκρεατίνη και τα χολικά άλατα στο γαστρεντερικό σωλήνα. Επιπλέον, έρχονται αντιμέτωπα με ήπιο θερμικό σοκ που προέρχεται από την εσωτερική θερμοκρασία του σώματος. Για του προαναφερόμενους λόγους, τα προβιοτικά πρέπει να έχουν ανοχή στο χαμηλό pH, τα χολικά άλατα και μηχανισμούς αποκλεισμού για να επιβιώσουν στο έντερο. Ανάλογα με το είδος του προβιοτικού, καθορίζεται και η αντίσταση στον γαστρεντερικό σωλήνα. Για παράδειγμα, το *Lactobacillus* είναι γενικά ανθεκτικό σε ακραίες συνθήκες, ενώ από την άλλη πλευρά το *Bifidobacterium* είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο σε χαμηλό pH, εμφανίζοντας χαμηλά ή μηδενικά ποσοστά επιβίωσης σε pH 2 και pH 3 (Asghar *et al.*, 2016). Συνοψίζοντας, η επιλογή των προβιοτικών μικροοργανισμών επηρεάζεται από ένα εύρος pH που κυμαίνεται από 2 έως 5 και τις συγκεντρώσεις του χολικού άλατος από 0,3 έως 2% (Ogunremi *et al.*, 2015).

1.5.1.2 Ικανότητα προσκόλλησης

Μια δεύτερη προϋπόθεση που πρέπει να εξεταστεί είναι εάν τα υποψήφια προβιοτικά μπορούν να κατακτήσουν τα επιθηλιακά κύτταρα στο γαστρεντερικό σωλήνα. Η ικανότητα προσκόλλησης των μικροβίων στα επιθηλιακά κύτταρα συνδέεται τόσο με την ικανότητά τους να αυτοσυσσωματώνονται, όσο με τις υδρόφοβες ιδιότητες της επιφάνειας των κυττάρων (de Melo Pereira *et al.*, 2018). Γενικά, η προσκόλληση στο βλεννογόνο και στις επιθηλιακές επιφάνειες θεωρείται από τα σημαντικότερα κριτήρια επειδή με αυτόν τον τρόπο τα προβιοτικά παραμένουν στο έντερο για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα αποκλείοντας τη προσκόλληση παθογόνων μικροοργανισμών. Τέλος, η ικανότητα προσκόλλησης των προβιοτικών ποικίλλει και εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως οι συνθήκες στο στομάχι, οι συνθήκες ανάπτυξής τους, ο αριθμός των ανακαλλιεργειών και η χρήση κρυοπροστατευτικών μέσων στην περίπτωση που έχουν λυοφιλιωθεί.

1.5.1.3 Αντιμικροβιακή δράση

Τα προβιοτικά, εφόσον προσκολληθούν στο έντερο, ξεκινούν να παράγουν εξωκυτταρικά αντιμικροβιακά συστατικά. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της μετατροπής των υδατανθράκων, των πρωτεϊνών και άλλων δευτερευόντων ενώσεων σε σημαντικές ουσίες, όπως οργανικά οξέα, ένζυμα, υπεροξείδιο του υδρογόνου, βακτηριοκίνες και πεπτίδια χαμηλής μοριακής μάζας, που μπορούν να εξοντώσουν τα παθογόνα βακτήρια (Tomar *et al.*, 2015). Άλλοι μηχανισμοί ανταγωνισμού των προβιοτικών περιλαμβάνουν την ανταγωνιστική ανάλωση θρεπτικών συστατικών, την αναστολή της ανάπτυξης παθογόνων μικροοργανισμών μέσω της συσσωμάτωσης, καθώς και τη διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος (Mortazavi & Akhlaghi, 2012). Η συσσωμάτωση αποτελεί μια επιπρόσθετη ανταγωνιστική δράση των προβιοτικών που προσφέρει τη συσσωμάτωση παθογόνων με προβιοτικά κύτταρα και στη συνέχεια την αποβολή τους συσσωματώματος μέσω των περιττωμάτων. Τέλος, θα πρέπει να αναφερθεί πως οι ανταγωνιστικές δραστηριότητες ποικίλλουν ανάλογα με τη φύση των μικροβιακών στελεχών (Verón *et al.*, 2017).

1.5.2 Αξιολόγηση ασφάλειας σε σχέση με τον ανθρώπινο οργανισμό

Οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί προστίθενται με ασφάλεια στα τρόφιμα για αρκετές δεκαετίες. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια λόγω του αυξανόμενου ενδιαφέροντος για τη χρήση τους ως παράγοντες πρόληψης ή αντιμετώπισης ασθενειών, καθίσταται επιτακτική ανάγκη να διεξαχθούν περαιτέρω κλινικές μελέτες, οι οποίες να στοχεύουν στη συλλογή δεδομένων σχετικά με την ασφάλειά τους. Έτσι, ορισμένες πρωτοβουλίες της Ευρωπαϊκής κοινότητας (ο κανονισμός για τα νέα τρόφιμα της Ευρωπαϊκής Ένωσης, QPS και PROSAFE), οι Ηνωμένες Πολιτείες (FDA και WHO) και ο Καναδάς (Health Canada: NHPR) έχουν καθορίσει κριτήρια για την αξιολόγηση της ασφάλειας των προβιοτικών για την ανθρώπινη χρήση (de Melo Pereira *et al.*, 2018). Στις κοινές συστάσεις περιλαμβάνονται αρχεία ιστορικού απομόνωσης, ταξινομικής αναγνώρισης και απουσίας δραστικότητας, μολυσματικότητας, τοξικότητας και μεταβιβάσιμων γονιδίων ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά (Sanders *et al.*, 2010). Τα περισσότερα από τα προβιοτικά που είναι

διαθέσιμα στην αγορά σήμερα αποτελούν γηγενή συστατικό του ανθρώπινου γαστρεντερικού συστήματος (ανθρώπινης προέλευσης). Οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί που έχουν απομονωθεί από τον πεπτικό σωλήνα υγιούς ανθρώπου θεωρούνται ασφαλέστεροι για κατανάλωση και ταυτόχρονα αποτελεσματικότεροι στην επιβίωση στο γαστρεντερικό σύστημα του ανθρώπου (Panghal *et al.*, 2018). Στη σύγχρονη εποχή παρατηρείται η χρήση διαφόρων νέων πηγών για την απομόνωση νέων προβιοτικών στελεχών. Ένα παράδειγμα είναι η απομόνωση του στελέχους *Bacillus amyloliquefaciens* από σάλτσα σόγιας (Lee *et al.*, 2017).

Το 2007, η Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των τροφίμων (EFSA) προσδιόρισε για πρώτη φορά την αντιμικροβιακή αντοχή ως ένα από τα θέματα ασφαλείας που σχετίζονται με την κατανάλωση προβιοτικών. Αυτή η αξιολόγηση βασίστηκε στα ευρήματα που δείχνουν τη δυνατότητα οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων από ωφέλιμα βακτήρια σε παθογόνα βακτήρια στο έντερο του ξενιστή (Gueimonde *et al.*, 2013). Ως αποτέλεσμα, το 2012, ο κατάλογος QPS (Qualified Presumption of Safety) συμπεριέλαβε αυτό το κριτήριο ως μέρος της αξιολόγησης της ασφαλείας των προβιοτικών, καθιστώντας τα GRAS (Generally Recognized as Safe). Η αντοχή των προβιοτικών στα αντιβιοτικά θεωρείται ως ένα ζήτημα ασφαλείας όταν υπάρχει πιθανότητα μετάδοσης γονιδίων (Daniali *et al.*, 2020).

1.5.3 Τεχνολογικά χαρακτηριστικά και απαιτήσεις της βιομηχανίας

Τα προβιοτικά σκευάσματα θα πρέπει να θεωρούνται ως ιατρικά ή φαρμακευτικά όταν απαιτούνται για θέματα που αφορούν την υγεία, όπως η διάγνωση, η θεραπεία, η πρόληψη ή η ανακούφιση ασθενειών (de Simone, 2022). Σε παράλληλη προσέγγιση, τα επιλεγμένα προβιοτικά δεν θα πρέπει να προκαλούν δυσμενείς μεταβολές στο άρωμα ή τη γεύση του προϊόντος, ούτε να αυξάνουν την οξύτητά του κατά τη διάρκεια της αποθήκευσής του (Gopal & Dhanasekaran, 2021). Επιπλέον, είναι αναγκαίο τα προβιοτικά να είναι ανθεκτικά σε διαδικασίες επεξεργασίας τροφίμων, όπως η ζύμωση, η συλλογή, η ξήρανση με κατάψυξη, καθώς και σε διακυμάνσεις της θερμοκρασίας, του pH και των οξειδωτικών και οσμωτικών παραγόντων κατά την αποθήκευση. Τέλος, από άποψη ασφαλείας, είναι ζωτικής

σημασίας οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί να διατηρούν τη γενετική τους σταθερότητα, προκειμένου να αποφευχθεί η πιθανότητα ανάπτυξης παθογένειας ή η απώλεια παραγωγικότητας (de Melo Pereira *et al.*, 2018).

Για να διασφαλιστεί η αποτελεσματικότητα των προβιοτικών, απαιτείται η παρουσία πληθυσμών στο εύρος από 10^6 έως 10^8 cfu/g κατά την κατανάλωση (Monica & Jayaraj, 2021). Ωστόσο, αυτή η αναλογία πληθυσμού μπορεί να μεταβληθεί από τους βακτηριοφάγους, οι οποίοι μολύνουν τα προβιοτικά κύτταρα και προκαλούν κυτταρική λύση (Mercanti, 2021). Ακόμη, ορισμένα προϊόντα μπορεί να υποστούν μεταβολές κατά την αποθήκευσή τους, όπως η οξίνιση που ευθύνεται για την απώλεια προβιοτικής βιωσιμότητας. Η βιωσιμότητα των κυττάρων μπορεί, επίσης, να επηρεαστεί από την ύπαρξη οξυγόνου κατά τη διάρκεια διεργασιών και αποθήκευσης (Pereira *et al.*, 2016). Συνοψίζοντας, κρίνεται αναγκαίο οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί να παραμένουν σταθεροί, τόσο κατά την παρασκευή, όσο και κατά την αποθήκευση του προϊόντος.

1.6 Βιωσιμότητα των προβιοτικών μικροοργανισμών

Όπως προαναφέρθηκε, σύμφωνα με τον ευρέως χρησιμοποιούμενο όρο που προτάθηκε για τα προβιοτικά από τη Διεθνή Οργάνωση Τροφίμων και Γεωργίας (FAO) και τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO), «προβιοτικά» ονομάζονται οι ζωντανοί μικροοργανισμοί, οι οποίοι όταν χορηγηθούν σε επαρκείς ποσότητες προσδίδουν ευεργετικά οφέλη στην υγεία του ξενιστή. (FAO/WHO, 2001). Εξ' ορισμού γίνεται αντιληπτό πως η βιωσιμότητα είναι μια εγγενής ιδιότητα των προβιοτικών και αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για τα προβιοτικά. Θα πρέπει να τονιστεί, πως η βιωσιμότητα των προβιοτικών βακτηρίων στα τρόφιμα επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, όπως το στέλεχος του προβιοτικού βακτηρίου, το pH του προϊόντος, οι αλληλεπιδράσεις με άλλους μικροοργανισμούς, η θερμοκρασία αποθήκευσης και οι συνθήκες παρασκευής (Wendel, 2022). Κάθε ένας από αυτούς τους παράγοντες επηρεάζει όχι μόνο τη βιωσιμότητα των προβιοτικών, αλλά και τη διατήρηση της αποτελεσματικότητάς τους στο προϊόν. Ωστόσο, τα προβιοτικά θα πρέπει να είναι σε

θέση να αντιμετωπίσουν τις συγκεκριμένες προκλήσεις, έτσι ώστε να διατηρηθούν τα ευεργετικά οφέλη που προσφέρουν στην υγεία.

1.6.1 Επιπτώσεις της επεξεργασίας, αποθήκευσης και σύνθεσης του τροφίμου στη βιωσιμότητα προβιοτικών βακτηρίων

Πρώτα από όλα, είναι απαραίτητο στα τρόφιμα που περιέχουν προβιοτικούς μικροοργανισμούς να διατηρείται ο πληθυσμός πάνω από 10^7 CFU/g, έως το τέλος της διάρκειας ζωής, καθώς υπάρχουν ποικίλοι παράγοντες κατά την παραγωγή, την μεταποίηση και την αποθήκευση ενός προϊόντος που επηρεάζουν τον αριθμό των βιώσιμων προβιοτικών κύτταρων ανά γραμμάριο προϊόντος, στον οποίο βασίζονται τα ευεργετικά αποτελέσματα για την υγεία (Kierś & Dembczyński, 2022). Οι παράγοντες αυτοί περιλαμβάνουν:

- παραμέτρους τροφίμων, όπως το pH, η οξύτητα, το μοριακό οξυγόνο, η ενεργότητα νερού, η παρουσία άλατος, ζάχαρης και χημικών ουσιών (υπεροξειδίου του υδρογόνου), οι βακτηριοσίνες, τα τεχνητά αρώματα και οι χρωστικές,
- παραμέτρους επεξεργασίας, όπως η θερμική επεξεργασία, η θερμοκρασία επώασης, ο ρυθμός ψύξης του προϊόντος, τα υλικά συσκευασίας και οι συνθήκες αποθήκευσης και
- μικροβιολογικές παράμετροι, όπως τα στελέχη προβιοτικών βακτηρίων.

Αναλυτικότερα, όταν τα προβιοτικά βακτήρια βρίσκονται σε χαμηλό pH ($\text{pH} < 4,5$), απαιτείται πολλή ενέργεια για να διατηρήσουν το ενδοκυττάριο pH, με αποτέλεσμα να εξαντλείται αρκετή ποσότητα ATP, που είναι αναγκαία για κρίσιμες λειτουργίες του κυττάρου, και ως εκ τούτου να προκαλείται κυτταρικός θάνατος (Nualkaekul, Salmeron & Charalampopoulos, 2011). Επιπλέον, η παρουσία οξυγόνου μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό και στη συσσώρευση τοξικών μεταβολιτών οξυγόνου, προκαλώντας αναπόφευκτα κυτταρικό θάνατο από οξειδωτική βλάβη (Boza-Mendez *et al.*, 2012). Επιπροσθέτως, έχει βρεθεί πως η ελάχιστη απαιτούμενη συγκέντρωση πρωτεΐνης για τη διατήρηση τη βιωσιμότητα των προβιοτικών είναι 0,3% (Nualkaekul,

Salmeron και Charalampopoulos, 2011). Επίσης, σύμφωνα με αποτελέσματα έρευνας (Michael *et al.*, 2010), η προσθήκη στη γιαούρτι 0,014% και 0,028% L-κυστεΐνης (Cys) διατήρησε υψηλότερη τη βιωσιμότητα του *L. bulgaricus* ($46 \log \text{cfu g}^{-1}$), από ότι στη γιαούρτι που δεν προστέθηκε Cys, κατά τη διάρκεια 50 ημερών αποθήκευσης. Ακόμη, σε μελέτη είχε εντοπιστεί ότι ο εμπλουτισμός γιαουρτιού με αρωματικούς παράγοντες, όπως εκχυλίσματα φράουλας, βανίλιας, ροδάκινου και μπανάνας στις βέλτιστες συγκεντρώσεις που χρησιμοποιούνται συνήθως στη γαλακτοβιομηχανία, δεν επηρέασε την ανάπτυξη των προβιοτικών βακτηρίων (Sharma *et al.*, 2023). Δεν θα πρέπει να παραλειφθεί, πως έχει αποδειχθεί ότι η μους σοκολάτας αποτελεί ένα ιδανικό τρόφιμο για την ενσωμάτωση του *L.paracasei subsp. paracasei* LBC 82 (Aragon-Alegro *et al.*, 2007). Το ουδέτερο pH της μους σοκολάτας με προβιοτικά, που κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 5,7 και 6,3, παρέχει κατάλληλες συνθήκες για την επιβίωση του *L. paracasei* για 28 ημέρες αποθήκευσης στους 4 °C. Λαμβάνοντας υπόψη τα διάφορα είδη σοκολάτας που κυκλοφορούν στο εμπόριο, ο πληθυσμός των προβιοτικών κύτταρων θα μπορούσε να παραμείνει υψηλότερος στη μαύρη σοκολάτα με 50% κακάο, ακολουθούμενη από τη σοκολάτα γάλακτος με 10% κακάο και από τη λευκή σοκολάτα με 0% κακάο (Kemsawasd *et al.*, 2016). Οι ίδιοι επιστήμονες απέδωσαν την εξήγηση αυτού του γεγονότος στις ιδιότητες της μαύρης σοκολάτας, η οποία περιέχει υψηλότερα επίπεδα κακάο και αντιοξειδωτικών ενώσεων, συγκριτικά με την σοκολάτα γάλακτος και με τη λευκή σοκολάτα.

1.6.2 Επίδραση της ψύξης, της κατάψυξης και της απόψυξης στη βιωσιμότητα προβιοτικών βακτηρίων

Η κατάψυξη και η απόψυξη επηρεάζουν τα προβιοτικά βακτήρια, καθώς εξαιτίας αυτών καταστρέφεται η ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης και έτσι κατά τη διάρκεια της διαδικασίας κατάψυξης η μεταβολική δραστηριότητα των κυττάρων μπορεί να σταματήσει. Επιπρόσθετα, κατά την απόψυξη, τα μικροβιακά κύτταρα μπορούν να επιτεθούν στα προβιοτικά λόγω οσμωτικών επιδράσεων. (Shahsavan *et al.*, 2018). Μία έρευνα των Khalf *et al.*, το 2010 (Khalf *et al.*, 2010), έδειξε ότι ο χυμός σφενδάμου ήταν σε θέση να διατηρήσει την βιωσιμότητα του

συνδυασμού προβιοτικών, BB12 και *L. rhamnosus* GG, καθ' όλη τη διάρκεια της αποθήκευσης στους 4 °C. Όπως περιγράφεται από τους Kemsawasd et al. (Kemsawasd et al., 2016) στη δική τους μελέτη, μετά από 60 ημέρες αποθήκευσης σοκολάτας ψυγείου στους 4 °C, τα επίπεδα του πληθυσμού των προβιοτικών *L. casei* και *L. acidophilus* παρέμειναν αρκετά υψηλά. Όπως συμπεραίνεται, οι χαμηλές θερμοκρασίες αποθήκευσης βοηθούν στην καλύτερη συντήρηση της βιωσιμότητας των προβιοτικών σε παρατεταμένη αποθήκευση. Επιπλέον, έχει μελετηθεί η επίδραση της θερμοκρασίας αποθήκευσης στο ψυγείο στους 2, 5 και 8 °C στη βιωσιμότητα των προβιοτικών *L. acidophilus*, *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* BB-12 στη γιαούρτι (Mortazavian et al., 2007). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης, η αποθήκευση στους 2 °C για 20 ημέρες είχε ως αποτέλεσμα την υψηλότερη βιωσιμότητα του *L. acidophilus*, ενώ για το *B. lactis*, η υψηλότερη βιωσιμότητα επιτεύχθηκε κατά την αποθήκευση του γιαουρτιού στους 8 °C. Αν και η ανοχή στο στρες που προκαλείται από τον πάγο εξαρτάται από το στέλεχος, οι περισσότεροι γαλακτοβάκιλλοι μπορούν να επιβιώσουν κατά την αποθήκευση σε συνθήκες κατάψυξης. Τέλος, με βάση όλα τα παραπάνω δεδομένα, το παγωτό, το οποίο υπόκειται σε κατάψυξη και έχει υψηλό pH, φαίνεται ένα αρκετό καλό προϊόν για την προσθήκη προβιοτικών.

1.6.3 Επίδραση της θερμοκρασίας και το οξυγόνου στη βιωσιμότητα των προβιοτικών βακτηρίων

Μία άλλη κρίσιμη παράμετρος για τη διατήρηση της βιωσιμότητας των προβιοτικών είναι η θερμοκρασία ζύμωσης. Ειδικότερα, η ευνοϊκή θερμοκρασία για τα περισσότερα προβιοτικά βακτήρια κυμαίνεται μεταξύ των 37 με 43 °C, αλλά εάν η θερμοκρασία ξεπεράσει τους 45 °C θα μειωθεί αισθητά ο πληθυσμός (Korbekandi et al., 2011). Ακολούθως, το οξυγόνο αποτελεί έναν άλλο τοξικό παράγοντα για την επιβίωση των προβιοτικών. Αυτό οφείλεται εν μέρει στην αναερόβια ή μικροαερόφιλη φύση αυτών των μικροοργανισμών που δεν διαθέτουν αποτελεσματικούς κυτταρικούς μηχανισμούς απομάκρυνσης οξυγόνου όπως η παραγωγή καταλάσης. Κατά την παρουσία οξυγόνου, λοιπόν, συσσωρεύονται

τοξικοί μεταβολίτες οξυγόνου στο κύτταρο οδηγώντας σε κυτταρικό θάνατο από οξειδωτική βλάβη. Ως αποτέλεσμα, προκαλείται απώλεια προβιοτικής βιωσιμότητας κατά την παραγωγή και αποθήκευση και επιβλαβής επιβίωση σε ολόκληρη την γαστρεντερική οδό. Έτσι, οι επιστήμονες, επιθυμώντας να δώσουν λύση στο συγκεκριμένο πρόβλημα, ανακάλυψαν μεθόδους μείωσης των επιπέδων οξυγόνου, όπως η ζύμωση υπό κενό, η συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας (Modified Atmosphere Packaging-MAP), η έξυπνη συσκευασία κ.ά. (Ščetar *et al.*, 2019). Τέλος, η συνεχής έκθεση σε οξυγόνο κάτω από όξινες συνθήκες κατά την αποθήκευση είναι ο κύριος λόγος για τη μείωση του πληθυσμού των προβιοτικών (Sheehan *et al.*, 2007).

1.6.4 Επίδραση του διαφορετικού τύπου συσκευασίας στη βιωσιμότητα προβιοτικών βακτηρίων

Το υλικό της συσκευασίας στην οποία αποθηκεύεται ένα τρόφιμο που περιέχει προβιοτικούς μικροοργανισμούς παίζει σημαντικό ρόλο στη μικροβιακή επιβίωση καθ' όλη τη διάρκεια ζωής του (Chaikham, 2015). Γενικότερα, οι συσκευασίες των τροφίμων φαίνεται να δρουν θετικά στη διατήρηση της βιωσιμότητας των προβιοτικών βακτηρίων καθώς τα ίδια είναι αναερόβιοι ή μικροαερόφιλοι μικροοργανισμοί (Ranadheera *et al.*, 2013). Ειδικότερα, η γυάλινη συσκευασία προστατεύει το προϊόν από τον εξωτερικό αέρα και το φως, που μπορούν να επηρεάσουν την ποιότητα και την απόδοση των προβιοτικών μικροοργανισμών που βρίσκονται στο τρόφιμο. Επιπλέον, το γυαλί παρουσιάζει χαμηλή διαπερατότητα στο οξυγόνο με αποτέλεσμα στο εσωτερικό της συσκευασίας να μην υπάρχει διαθέσιμο οξυγόνο και να διατηρείται η βιωσιμότητα των προβιοτικών. Ωστόσο, οι βιομηχανίες τροφίμων προτιμούν τη χρήση πλαστικών συσκευασιών. Αυτό συμβαίνει διότι το πλαστικό είναι συνήθως πιο οικονομικό σε σχέση με το γυαλί, οπότε μπορεί να συμβάλει στη μείωση του κόστους παραγωγής και συσκευασίας. Επίσης, τα πλαστικά υλικά είναι ελαφρύτερα από το γυαλί, μειώνοντας τον κίνδυνο ατυχημάτων κατά τη μεταφορά και την αποθήκευση. Παρόλο τα πλεονεκτήματα της πλαστικής συσκευασίας, στη περίπτωση των προϊόντων με προβιοτικά είναι αναγκαίο να ληφθεί υπόψη η διαπερατότητα στο

οξυγόνο της πλαστικής συσκευασίας. Τέλος, οι Pimentel *et al.* (2015) κατέληξαν στο ότι η γυάλινη συσκευασία ήταν καταλληλότερη σε σύγκριση με την πλαστική συσκευασία για τη διατήρηση της βιωσιμότητας της προβιοτικής καλλιέργειας σε χυμό μήλου με *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei*.

Κεφάλαιο 2. Ενθυλάκωση προβιοτικών μικροοργανισμών

2.1 Ορισμός ενθυλάκωσης

Ως «ενθυλάκωση» ορίζεται η διαδικασία κατά την οποία μία ουσία εγκλωβίζεται μέσα σε μία άλλη ουσία, παράγοντας σωματίδια σε διάφορες κλίμακες, όπως στην κλίμακα των νανομέτρων (νανοενθυλάκωση), μικρόμετρων (μικρο-ενθυλάκωση) ή στην κλίμακα χιλιοστών (Burgain *et al.*, 2011). Η ενθυλακωμένη ουσία συνήθως αποκαλείται υλικό πυρήνα, δραστικός παράγοντας, παράγοντας πλήρωσης, εσωτερική φάση ή φάση ωφέλιμου φορτίου. Η ουσία που χρησιμοποιείται για την ενθυλάκωση ονομάζεται μεμβράνη επικάλυψης, κέλυφος, υλικό φορέα ή τοιχώματος, εξωτερική φάση ή μήτρα. Για συγκεκριμένες διαδικασίες ενθυλάκωσης, όπως η λυοφιλίωση, οι ουσίες που χρησιμοποιούνται για την ενθυλάκωση αναφέρονται, επίσης, ως κρυοπροστατευτικά.

2.2 Υλικά που χρησιμοποιούνται στην ενθυλάκωση μικροοργανισμών

Ιδιαίτερη προσοχή επιβάλλεται να δοθεί στα μέσα ενθυλάκωσης που χρησιμοποιούνται στα τρόφιμα καθώς θα πρέπει να είναι ασφαλή για κατανάλωση, δηλαδή Γενικώς Αναγνωρισμένα ως Ασφαλή (Generally Recognized As Safe, GRAS), αποδοτικά και οικονομικά, δεδομένου ότι ένα υψηλό κόστος επηρεάζει άμεσα την αξία του τελικού προϊόντος (Zuidam & Nedovic, 2010). Επιπροσθέτως, εντοπίζονται πολύ σημαντικές παράμετροι για την επιλογή του κατάλληλου υλικού τοιχώματος, όπως ο τύπος και η συγκέντρωση του υλικού επικάλυψης, το μέγεθος των σωματιδίων, ο αρχικός αριθμός κυττάρων και τα βακτηριακά στελέχη. Στη βιομηχανία τροφίμων ως μέσα ενθυλάκωσης με χαμηλό κόστος χρησιμοποιούν άμυλα, ινουλίνη, πηκτίνη και τους περισσότερους υδατάνθρακες (de Vos *et al.*, 2010). Άλλα υλικά, όπως το αλγινικό νάτριο και η τρεχαλόζη, είναι συχνά προτιμώμενα, αλλά έχουν υψηλότερο κόστος. Παρακάτω αναλύονται λεπτομερώς τα κύρια υλικά για την ενθυλάκωση.

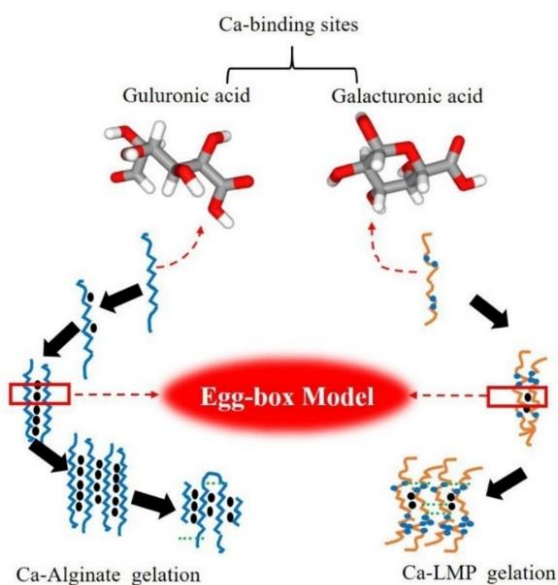
2.2.1 Ενθυλάκωση προβιοτικών μικροοργανισμών με τη χρήση πολυσακχαριτών και ολιγοσακχαριτών

Οι πολυσακχαρίτες και οι ολιγοσακχαρίτες είναι υδατάνθρακες που ευρέως χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία ως γλυκαντικές ύλες, πηκτικά μέσα, πυκνωτικά και ως πρόδρομες ενώσεις για αρωματικές ή χρωστικές ουσίες. Από χημικής απόψεως, τα σάκχαρα αποτελούν πολυϋδροξυλιωμένα παράγωγα αλδεϋδών ή κετονών, όπως επίσης κι από πολυμερή τα οποία απελευθερώνουν τα συγκεκριμένα παράγωγα με τη διεργασία της υδρόλυσης (Σπηλιόπουλος, 2016). Ο εμπειρικός τύπος είναι $(CH_2O)_n$, ενώ μερικά από αυτά περιέχουν άζωτο, φώσφορο ή θείο. Αξίζει να σημειωθεί ότι στην κατηγορία αυτή δεν περιλαμβάνονται ορισμένα σάκχαρα, όπως το γαλακτικό οξύ ($C_3H_6O_3$) και το οξικό οξύ ($C_2H_4O_2$). Οι κύριοι πολυσακχαρίτες που χρησιμοποιούνται στην ενθυλάκωση μικροοργανισμών είναι το άγαρ, το αλγινικό νάτριο, η καραγενάνη, το αραβικό κόμμι, η χιτοζάνη, η δεξτράνη, το άμυλο και η κυτταρίνη (αιθυλοκυτταρίνη, ακετυλοκυτταρίνη, μεθυλοκυτταρίνη, καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη, νιτροκυτταρίνη) (Liliana *et al.*, 2013). Από την άλλη πλευρά, το σιρόπι καλαμποκιού, η σακχαρόζη και η μαλτοδεξτρίνη αποτελούν τους πιο συχνά χρησιμοποιούμενους ολιγοσακχαρίτες για την ενθυλάκωση προβιοτικών.

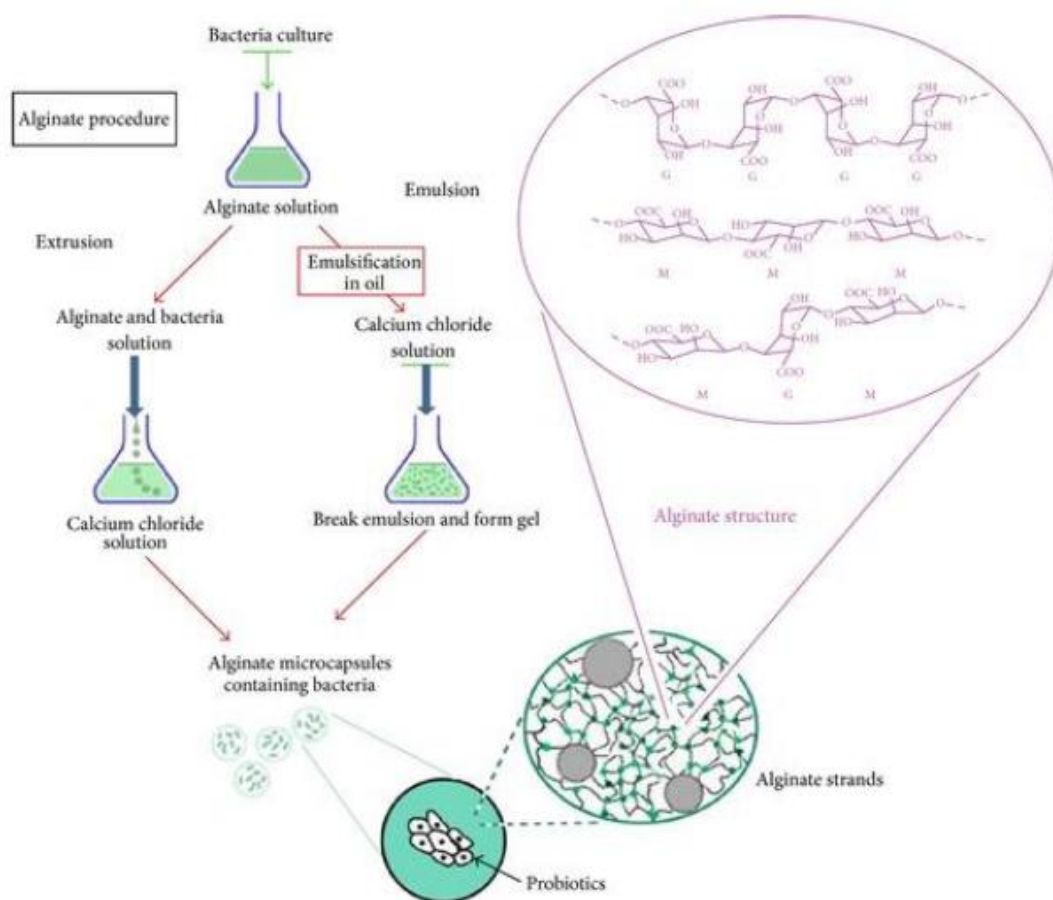
2.2.1.1 Αλγινικό νάτριο

Το αλγινικό νάτριο αποτελεί το πιο διαδεδομένο υλικό που χρησιμοποιείται σχεδόν σε όλες τις μεθόδους ενθυλάκωσης (Burgain *et al.*, 2011). Είναι ένας φυσικός πολυσακχαρίτης, ο οποίος παραλαμβάνεται ύστερα από εκχύλιση διαφόρων ειδών φυκιών. Επιπρόσθετα, χρησιμοποιείται ευρέως ως πηκτικός παράγοντας λόγω της δυνατότητάς του να δημιουργεί πηκτώματα. Πιο συγκεκριμένα, όταν οι πηκτές αλγινικού έρχονται σε επαφή με δισθενή κατιόντα Ca^{+2} , Ba^{+2} , Sr^{+} , σχηματίζουν μία δομή κλωβού μέσω συσσωμάτωσης τεσσάρων υπομονάδων αλγινικού (**Εικόνα 7**). Το μοντέλο που περιγράφει καλύτερα αυτό το δίκτυο που σχηματίζεται είναι το

«μοντέλο του κουτιού αυγών» (Εικόνα) (Cao *et al.*, 2020). Επιπρόσθετα, οι πιο συνηθέστερες τεχνικές για την ενθυλάκωση βακτηριακών κυττάρων σε αλγινικό είναι η τεχνική της γαλακτωματοποίησης και η τεχνική της εξώθησης (Εικόνα 8) (Mitropoulou *et al.*, 2013). Τα πλεονεκτήματα της χρήσης αλγινικού ως μέσο ενθυλάκωσης είναι πολυάριθμα και ποικίλουν. Πρώτο από όλα, παρέχει την δυνατότητα ενθυλάκωσης τόσο ευκαρυωτικών, όσο και των προκαρυωτικών κυττάρων εντός των πηκτωμάτων αλγινικού. Επιπλέον, καθίσταται ιδανικός φορέας διανομής των προβιοτικών στο έντερο λόγω του όξινου πηκτώδους του χαρακτηρία [pH κάτω του pK_a (3.3 - 3.5)]. Από την άλλη πλευρά, το αλγινικό εμφανίζει και κάποια μειονεκτήματα που αφορούν την αδυναμία παραγωγής καψιδίων σε μεγάλη κλίμακα, εφόσον είναι μια αρκετά χρονοβόρα διαδικασία (Silva *et al.*, 2014). Ωστόσο, τα συγκεκριμένα ελαττώματα δύναται να αντιμετωπιστούν όταν το αλγινικό αναμιχθεί με άλλα υλικά. Σύμφωνα με αποτελέσματα έρευνας, ο συνδυασμός του αλγινικού με το τροποποιημένο αμύλο για την ενθυλάκωση των προβιοτικών βακτηρίων *L. acidophilus* και *B. lactis* ενίσχυσε την βιωσιμότητά τους. Ειδικότερα, τα ενθυλακωμένα προβιοτικά που ενσωματώθηκαν στη γιαούρτι παρουσίασαν μεγαλύτερη βιωσιμότητα κατά την αποθήκευση του προϊόντος σε σύγκριση με τα κύτταρα που δεν είχαν ενθυλακωθεί. Παράλληλα, μέσω μιας αισθητηριακής ανάλυσης διαπιστώθηκε ότι η χρήση ενθυλακωμένων κυττάρων στη γιαούρτι δεν επηρέασε τόσο τα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά, όσο και την οξύτητά του (Kailasapathy, 2006). Κατά την διεξαγωγή μιας άλλης έρευνας, το αλγινικό νάτριο χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 20 g/L σε συνδυασμό με πρωτεΐνη ορού γάλακτος στα 10 g/L για την ενθυλάκωση του *Lactobacillus plantarum*. Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης έρευνας έδειξαν ότι τα ενθυλακωμένα στελέχη που επώαστηκαν σε γαστρικό υγρό παρουσίασαν μεγαλύτερη βιωσιμότητα από τα μη ενθυλακωμένα στελέχη, οδηγώντας στο συμπέρασμα πως τα πρώτα είναι σε θέση να επιβιώσουν στο εντερικό περιβάλλον (Gbassi *et al.*, 2010).



Εικόνα 7. Μοντέλο του κουτιού-αυγών (Cao *et al.*, 2020).



Εικόνα 8. Διαδικασία εγκλεισμού με τη μέθοδο της εξώθησης και τη μέθοδο της γαλακτωματοποίησης (Mitropoulou *et al.*, 2013).

2.2.1.2 Χιτοζάνη

Η χιτοζάνη είναι η μερικώς ακετυλιωμένη (1-4)-2-αμινο-2-δεοξυ-β- d- γλυκάνη που λαμβάνεται από χιτίνη (Muzzarelli *et al.*, 2012). Ειδικότερα, απομονώνεται από μαλακά όστρακα μυδιών, επιδερμίδες εντόμων και μεμβράνες μυκήτων. Όπως το αλγινικό, έτσι και η χιτοζάνη διατίθεται στο εμπόριο σε ένα ευρύ φάσμα μοριακών βαρών. Συνήθως, χρησιμοποιείται ως υλικό επικάλυψης σε σφαιρίδια αλγινικού, καθώς έχει αποδειχθεί πως αυτή η τεχνική βελτιώνει την επιβίωση των προβιοτικών μικροοργανισμών σε προσομοιωμένα γαστρικά και εντερικά υγρά συγκριτικά με τα μη επικαλυμμένα σφαιρίδια αλγινικού (Cook *et al.*, 2011). Το αλγινικό, που είναι αρνητικά φορτισμένο, σχηματίζει μια ημιπερατή μεμβράνη με τη θετικά φορτισμένη χιτοζάνη και έτσι η επιφάνεια της κάψουλας γίνεται πιο λεία και λιγότερο διαπερατή στα υδατοδιαλυτά συστατικά (Nualkaekul *et al.*, 2012). Οι Lee *et al.*, (2004), οδηγήθηκαν στο συμπέρασμα ότι η ενθυλάκωση LAB σε σφαιρίδια αλγινικού και με επικάλυψη χιτοζάνης είχε ως αποτέλεσμα τη διατήρηση της βιωσιμότητας των βακτηριακών κυττάρων στο παχύ έντερο, εξασφαλίζοντας την επιβίωσή τους κατά τη διάρκεια αποθήκευσης σε ψύξη. Παράλληλα, σύμφωνα με άλλη μελέτη που διεξήχθη υπό συνθήκες προσομοίωσης γαστρεντερικού σωλήνα, φάνηκε πως ο εγκλεισμός των προβιοτικών βακτηρίων με αλγινικό και επικάλυψη χιτοζάνης παρείχε αξιόλογη προστασία στα προβιοτικά βακτήρια (Chánarri *et al.*, 2010). Συμπερασματικά, αυτή η μέθοδος θα μπορούσε να αποτελέσει αποτελεσματικό τρόπο χορήγησης βιώσιμων βακτηριακών κυττάρων στο παχύ έντερο. Τέλος, κατά την χρήση χιτοζάνης σε συγκέντρωση 1% w/v για την ενθυλάκωση των *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, και *Lactobacillus casei*, παρατηρήθηκε μεγαλύτερη βιωσιμότητα για τον *L. acidophilus* και καλύτερη προστασία των κυττάρων του *L. casei*. Ωστόσο, κανένα υλικό φορέα δεν συνέβαλε στη διατήρηση της βιωσιμότητας του *B. bifidum* λόγω της χαμηλής του αντοχής του στο όξινο pH (Krasaekoopt *et al.*, 2004).

2.2.1.3 Άμυλο

Το άμυλο, ως ένα φυσικό, οικονομικό βιοπολυμερές, το οποίο έχει τη δυνατότητα να βιοαποικοδομείται, παρουσιάζει ευρεία χρήση και διαφορετικές εφαρμογές, εφόσον πρώτα μετατραπεί σε νανοσωματίδια. Μία από τις κυριότερες εφαρμογές του είναι η δημιουργία συμπλόκων που θα μπορούν να εφαρμοστούν σε διάφορους τομείς και ιδιαίτερα στον τομέα των τροφίμων, λόγω της μη τοξικότητας και της βιοσυμβατότητάς του. Πιο συγκεκριμένα, το άμυλο λειτουργεί ως μήτρα (matrix), προστατεύοντας με αυτόν τον τρόπο το υλικό το οποίο εμπεριέχεται σε αυτή (Kim *et al.*, 2015). Μια μορφή αμύλου, που εντοπίζεται συχνά στα τρόφιμα είναι το ανθεκτικό άμυλο (Resistant Starch, RS). Πρόκειται για το κλάσμα του αμύλου που διαφεύγει της πέψης, δηλαδή δεν διασπάται από την παγκρεατική αμυλάση στο λεπτό έντερο των ανθρώπων, αλλά υφίσταται ζύμωση από την μικροχλωρίδα του παχέος εντέρου (Englyst *et al.*, 1985). Χάρη σε αυτή την ιδιαιτερότητά του, προσφέρει καλύτερη απελευθέρωση των βακτηριακών κυττάρων στο παχύ έντερο. Επιπροσθέτως, το ανθεκτικό άμυλο αποτελεί ιδανικό υλικό για την προσκόλληση των προβιοτικών κυττάρων στους κόκκους του (Anal & Singh, 2007). Αυτό μπορεί να ενισχύσει την απελευθέρωση των προβιοτικών σε μια βιώσιμη και μεταβολικά ενεργή κατάσταση στο έντερο (Sir & Grajek, 2010). Ολοκληρώνοντας, αποτελέσματα έρευνας έδειξαν ότι η χρήση αμύλου από αραβόσιτο ως φορέα ενθυλάκωσης προβιοτικών βακτηρίων βελτίωσε την βιωσιμότητα των βακτηρίων σε μεγάλο βαθμό (Scott *et al.*, 2018).

2.2.1.4 Μαλτοδεξτρίνη

Οι μαλτοδεξτρίνες $(C_6H_{10}O_5)_n \cdot H_2O$ είναι πολυμερή σακχαριτών που αποτελούνται κυρίως από μονάδες γλυκόζης, συνδεδεμένες με α -1,4 γλυκοσιδικούς δεσμούς. Μπορούν να παραληφθούν μέσω ενζυματικής υδρόλυσης, με ή χωρίς τη χρήση οξέος, αλλά σε μικρότερο βαθμό από αυτόν που απαιτείται για την παραγωγή σιροπιών αμύλου (Klinjaro *et al.*, 2018). Η διαθεσιμότητά τους σε διαφορετικά

μοριακά βάρη ως, ισοδύναμο δεξτρόζης (Dextrose Equivalent-DE), εξαρτάται από τη μέθοδο παραγωγής και την πηγή. Το DE αποτελεί μέτρο της ποσότητας των αναγωγικών σακχάρων που υπάρχουν σε ένα προϊόν ζάχαρης, εκφρασμένο ως ποσοστό σε ξηρή βάση σε σχέση με τη δεξτρόζη (Rong *et al.*, 2009). Οι μαλτοδεξτρίνες με 10–20DE είναι κατάλληλες για εφαρμογές ως υλικά ενθυλάκωσης και διατηρούν την γεύση σε υψηλό επίπεδο (Gallardo *et al.*, 2013). Συμπληρωματικά, συνδυάζουν το χαμηλό κόστος τους με την αποτελεσματικότητα, παρουσιάζουν ήπια γεύση, ενώ έχουν χαμηλό ιξώδες. Όπως προαναφέρθηκε τα υλικά ενθυλάκωσης δρουν πιο αποτελεσματικά όταν χρησιμοποιείται μείγμα διαφορετικών υλικών. Σύμφωνα με μελέτη, λοιπόν, κατάλληλο μείγμα μαλτοδεξτρίνης και τρεχαλόζης που χρησιμοποιήθηκε ως μέσο φορέα για την ενθυλάκωση του *Lactobacillus paracasei* με ψύξη με εκπομπή ψεκασμού, οδήγησε σε υψηλή βιωσιμότητα των βακτηρίων. Ολοκληρώνοντας, η παρουσία της τρεχαλόζης σε συγκεκριμένη συγκέντρωση συνέβαλε στην αύξηση της βιωσιμότητας των κυττάρων λόγω της υψηλής οσμωτικής πίεσης που παρουσιάζει (Semyonov *et al.*, 2010).

2.2.2 Ενθυλάκωση προβιοτικών μικροοργανισμών με τη χρήση λιπιδίων

Η ενθυλάκωση των προβιοτικών μικροοργανισμών με τη χρήση λιπιδίων είναι μία τεχνική που στοχεύει στην προστασία και στην βελτίωση της επιβίωσης των προβιοτικών καθ' όλη τη διάρκεια ζωής ενός προϊόντος που τα περιέχει. Τα κυριότερα είδη λιπιδίων που χρησιμοποιούνται στην ενθυλάκωση προβιοτικών είναι οι κήροι, η παραφίνη, τα διγλυκερίδια, τα μονογλυκερίδια, το στεατικό οξύ και τα έλαια. Σύμφωνα με έρευνα, στην οποία χρησιμοποιήθηκε σησαμέλαιο για την ενθυλάκωση του *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* με γαλάκτωμα, η βιωσιμότητα των κυττάρων αυξήθηκε κατά 5,4% υπό συνθήκες ψύξης έναντι των κυττάρων που δεν είχαν ενθυλακωθεί. Παράλληλα, υπό προσομοιωμένες εντερικές συνθήκες, παρατηρήθηκε καλύτερη κυτταρική βιωσιμότητα των ενθυλακωμένων βακτηρίων (Hou *et al.*, 2003). Συμπερασματικά, η μέθοδος της ενθυλάκωσης με λιπίδια βοηθάει στην αποτελεσματική παράδοση των προβιοτικών στον ανθρώπινο

οργανισμό, ενισχύοντας με αυτόν τον τρόπο τα οφέλη του για την υγεία του εντερικού συστήματος.

2.2.3 Ενθυλάκωση προβιοτικών μικροοργανισμών με τη χρήση πρωτεϊνών

Η ενθυλάκωση των προβιοτικών μικροοργανισμών με πρωτεΐνη αποτελεί μια εναλλακτική και αποτελεσματική τεχνική που επιτρέπει την ενίσχυση της βιωσιμότητας των προβιοτικών κυττάρων κατά την έκθεσή τους σε δυσμενείς συνθήκες. Η γλουτένη, η καζεΐνη, η πρωτεΐνη ορού γάλακτος και η αλβουμίνη αποτελούν τα συνήθως χρησιμοποιούμενα υλικά ενθυλάκωσης με βάση τις πρωτεΐνες.

2.2.3.1 Πρωτεΐνη ορού γάλακτος

Το 2004 ο Picot και ο Lacroix χρησιμοποίησαν την πρωτεΐνη ορού γάλακτος ως υλικό φορέα για να εγκλωβίσουν τα *Bifidobacterium breve* και *Bifidobacterium longum* με την τεχνική της ξήρανσης με ψεκασμό, ώστε να τα συμπεριλάβουν αργότερα στο γιαούρτι. Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν ότι η πρωτεΐνη ορού γάλακτος μπορεί να αυξήσει την ανοχή των βακτηρίων στο όξινο pH. Αβίαστα, λοιπόν, οδηγούμαστε στο συμπέρασμα πως οι πρωτεΐνες ορού γάλακτος δύναται να συμπεριληφθούν σε προβιοτικά και σε προϊόντα όπου τα βακτήρια πρέπει να είναι βιώσιμα όταν φτάνουν στο γαστρεντερικό σωλήνα (Picot & Lacroix, 2004). Τέλος, σε μία άλλη έρευνα οι πρωτεΐνες ορού γάλακτος χρησιμοποιήθηκαν για την ενθυλάκωση του *Lactobacillus rhamnosus* με εξώθηση σε ένα προσομοιωμένο γαστρεντερικό περιβάλλον. Έτσι, τα πρωτεϊνικά καψίδια διαμόρφωσαν μια μήτρα που παρείχε προστασία στον *Lactobacillus rhamnosus* σε όξινο pH και ταυτόχρονα ελέγχθηκε η απελευθέρωση των προβιοτικών κυττάρων στο απαιτούμενο σημείο του οργανισμού (Doherty *et al.*, 2011).

Κεφάλαιο 3^ο – Ξήρανση

3.1 Ορισμός Ξήρανσης

Ο όρος "ξήρανση" αφορά κυρίως την αφαίρεση μικρών ποσοτήτων νερού από στερεά ή ημιστερεά υλικά. Στην περίπτωση της αφαίρεσης υγρασίας από αέρια, χρησιμοποιούνται κυρίως οι όροι "αφύγρανση" και «προσρόφηση». Αντίστοιχα, ο όρος "εξάτμιση" αναφέρεται κυρίως στην αφαίρεση μεγάλων ποσοτήτων νερού από διαλύματα (Niamah *et al.*, 2021). Στις διαδικασίες ξήρανσης, η προσοχή επικεντρώνεται συνήθως στο τελικό αποξηραμένο προϊόν, ενώ η ξήρανση συνήθως πραγματοποιείται σε θερμοκρασίες κάτω από το σημείο βρασμού. Αντίθετα, στην εξάτμιση, η αφαίρεση υγρασίας γίνεται στο σημείο βρασμού του διαλύματος. Συχνά αντί για τον όρο "ξήρανση", χρησιμοποιείται επίσης ο όρος "αφυδάτωση", ο οποίος περιγράφει καλύτερα την πλήρη αφαίρεση νερού από το τρόφιμο. Σύμφωνα με τον παραπάνω ορισμό, διεργασίες αφαίρεσης νερού με κατάλληλους διαλύτες ή μείωσης του διαθέσιμου νερού με προσθήκη ζάχαρης ή αλατιού δεν περιλαμβάνονται στον όρο "ξήρανση". Μια ειδική περίπτωση είναι η αφαίρεση νερού μέσω εξάχνωσης πάγου, που πραγματοποιείται σε χαμηλές θερμοκρασίες και ονομάζεται "ξήρανση με κατάψυξη" ή "αφυδάτωση με κατάψυξη". Επιπλέον, η αφαίρεση νερού μέσω διαλυμάτων ζάχαρης ή αλατιού, με υψηλή ωσμωτική πίεση, αποκαλείται "ωσμωτική αφυδάτωση".

Η ξήρανση των περισσότερων τροφίμων γίνεται μέσω θέρμανσης και περιλαμβάνει μεταφορά μάζας (νερού) από το τρόφιμο προς το περιβάλλον και μεταφορά θερμότητας από το μέσον θέρμανσης προς το τρόφιμο. Αυτή η διαδικασία πραγματοποιείται σε ξηραντήρες διαφόρων τύπων, με διαφορετικούς μηχανισμούς μεταφοράς θερμότητας και μάζας από το προϊόν. Η φυσική ξήρανση στον αέρα έχει περιορισμένη εφαρμογή, ενώ οι βασικές αρχές που διέπουν την ξήρανση τροφίμων είναι παρόμοιες με εκείνες άλλων προϊόντων (Niamah *et al.*, 2021). Οι ιδιαιτερότητες των τροφίμων συνδέονται με το ρόλο του νερού και την ευαισθησία των συστατικών και των ποιοτικών χαρακτηριστικών τους στις θερμικές διεργασίες.

Η διαδικασία ξήρανσης στους προβιοτικούς μικροοργανισμούς αποτελεί κρίσιμο βήμα στην παραγωγή σταθερών και αποτελεσματικών προϊόντων. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας αυτής, η υγρασία απομακρύνεται από τους προβιοτικούς μικροοργανισμούς, επηρεάζοντας τη βιολογική τους δραστηριότητα και επιβίωση. Θετικά, η ξήρανση μπορεί να αυξήσει την αντοχή των προβιοτικών μικροοργανισμών στις συνθήκες αποθήκευσης και να επιταχύνει τη διαδικασία παραγωγής προϊόντων. Επίσης, η αφαίρεση υγρασίας μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο αλλοίωσης των προβιοτικών προϊόντων και να αυξήσει τη διάρκεια ζωής τους. Ωστόσο, αρνητικές επιπτώσεις μπορεί να προκύψουν εάν η διαδικασία ξήρανσης δεν ελεγχθεί σωστά. Υψηλές θερμοκρασίες και μακρά διάρκεια ξήρανσης μπορεί να οδηγήσουν σε μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας και επομένως στη μείωση της αποτελεσματικότητας των προβιοτικών. Επίσης, η υπερβολική ξήρανση μπορεί να προκαλέσει θέματα που σχετίζονται με την επανανυδάτωση των προϊόντων κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης (Niamah *et al.*, 2021).

Κατάλληλες θερμοκρασίες για τη ξήρανση των προβιοτικών μικροοργανισμών εξαρτώνται από τον τύπο του προϊόντος και το είδος του μικροοργανισμού. Γενικά, οι θερμοκρασίες κάτω από το σημείο βρασμού χρησιμοποιούνται για να αποφευχθεί η απώλεια της βιολογικής δραστηριότητας των προβιοτικών. Ωστόσο, η επιλογή της κατάλληλης θερμοκρασίας πρέπει να λαμβάνει υπόψη την επίδραση στην ποιότητα και την αποδοτικότητα του τελικού προϊόντος (Niamah *et al.*, 2021).

3.2 Μέθοδοι Ξήρανσης

Η ξήρανση αποτελεί μία από τις παλαιότερες και πιο διαδεδομένες μεθόδους στην επεξεργασία τροφίμων, αλλά επίσης χρησιμοποιείται εκτενώς και στον τομέα της μικροβιολογίας. Οι μέθοδοι ξήρανσης περιλαμβάνουν, μεταξύ άλλων, την αέρια ξήρανση, την ηλιακή ξήρανση, την ξήρανση με κατάψυξη, και την αποξήρανση. Στην μικροβιολογία τροφίμων, η ξήρανση είναι μια σημαντική διαδικασία για τη διατήρηση της σταθερότητας των τροφίμων και τη μείωση της ανάπτυξης μικροβίων. Επίσης, η ξήρανση χρησιμοποιείται για την παραγωγή στερεών μορφών προβιοτικών

μικροοργανισμών, οι οποίοι διατηρούνται σε σταθερή κατάσταση και μπορούν να παρέχουν θετικά οφέλη για την υγεία (Jeszka-Skowron,2017).

3.2.1 Ξήρανση με Λυοφιλίωση- Freeze Drying

Το freeze drying, επίσης γνωστό ως ξήρανση υπό κατάψυξη, είναι μια διαδικασία αφαίρεσης υγρασίας από ένα υλικό χρησιμοποιώντας την αρχή της υποβοήθησης. Αρχικά, το υλικό καταψύχεται σε χαμηλές θερμοκρασίες, συνήθως κάτω από το σημείο του βρασμού του νερού. Έπειτα, με τη χρήση ειδικών συνθηκών πίεσης και υγρασίας, η υγρασία αφαιρείται από το κατεψυγμένο υλικό με τη μορφή ατμού, παρακάμπτοντας την κατάσταση του υγρού (Coles *et al.*,2005).

Η διαδικασία της ξήρανσης υπό κατάψυξη είναι ένας σημαντικός τρόπος επεξεργασίας των τροφίμων που έχει εφαρμογές σε ποικίλα προϊόντα υψηλής αξίας. Αρχικά αναπτύχθηκε τη δεκαετία του 1940 για την παραγωγή ξηρού πλάσματος και αργότερα επεκτάθηκε για την ξήρανση αντιβιοτικών και βιολογικών υλικών. Σήμερα, χρησιμοποιείται ευρέως σε τρόφιμα που περιέχουν υψηλά ποσοστά πρωτεΐνης και πτητικών ουσιών, όπως εκχυλίσματα καφέ ή τσαγιού, φρούτα, λαχανικά, κρέας και ψάρια, καθώς και σε φαρμακευτικά προϊόντα, λόγω της ήπιας διαδικασίας παραγωγής υψηλής ποιότητας προϊόντων (Coles *et al.*,2005).

Η διαδικασία της ξήρανσης υπό κατάψυξης πραγματοποιείται συνήθως υπό την επίδραση υψηλού κενού, συνήθως μεταξύ 0,03 έως 3 mbar. Εναλλακτικά, μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλες μεθόδους όπως η εφαρμογή μικροκυμάτων ή η λειτουργία σε ατμοσφαιρική πίεση, μειώνοντας έτσι το κόστος λειτουργίας.

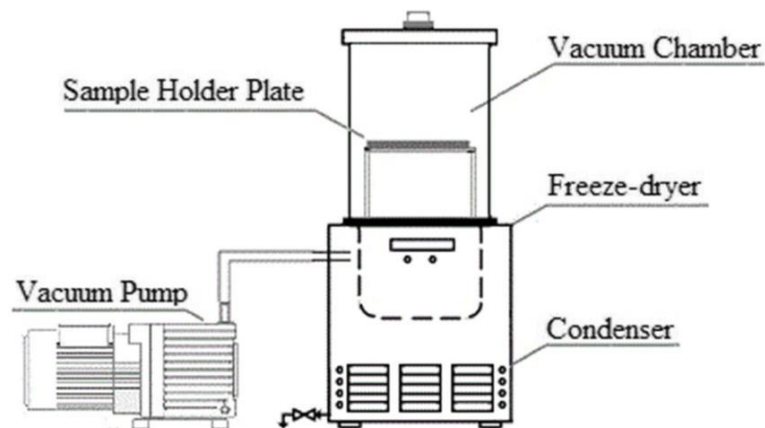
Η διαδικασία της ξήρανσης υπό κατάψυξη περιλαμβάνει δύο στάδια. Αρχικά, το υλικό καταψύχεται και στη συνέχεια ο πάγος απομακρύνεται με εξάχνωση, απευθείας από τη στερεή στην αέρια φάση, μία απεικόνιση του σχήματος ενός λυοφιλιωτή παρατηρείται παρακάτω στην **εικόνα 9**. Κατά την κατάψυξη, αρχικά το νερό που βρίσκεται στο εσωτερικό του μετατρέπεται σε πάγο (Coles *et al.*,2005). Στη συνέχεια, η θερμοκρασία ψύξης μειώνεται έως ότου κρυσταλλωθούν τα ευτηκτικά

διαλύματα. Η κατάψυξη διαχωρίζει τα υδατικά διαλύματα των τροφίμων σε δύο φάσεις, τον πάγο και τη συμπυκνωμένη φάση των διαλυτών στερεών.

Η εξάχνωση βασίζεται στη δημιουργία διαφοράς τάσης ατμών μεταξύ του πάγου στο εσωτερικό του υλικού και του ξηρού περιβάλλοντος. Κατά τη διαδικασία, ο ρυθμός ξήρανσης μειώνεται με την πάροδο του χρόνου, καθώς εμποδίζεται η μεταφορά θερμότητας και μάζας από το εξωτερικό περιβάλλον στο εσωτερικό του υλικού.

Η χρήση του freeze drying στη μικροβιολογία τροφίμων είναι ευρέως διαδεδομένη λόγω των πλεονεκτημάτων της διαδικασίας. Καθώς η κατάψυξη διατηρεί τη δομή των μικροοργανισμών, το freeze drying βοηθάει στη διατήρηση της βιολογικής ακεραιότητάς τους και των βιοχημικών τους ιδιοτήτων (Coles *et al.*, 2005). Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό για τους προβιοτικούς μικροοργανισμούς, οι οποίοι απαιτούν ιδιαίτερη προσοχή κατά την επεξεργασία τους για να διατηρηθούν ζωντανοί και λειτουργικοί.

Οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί μπορούν να ενσωματωθούν σε φάρμακα, συμπληρώματα διατροφής και λειτουργικά τρόφιμα. Με τη χρήση του freeze drying, οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί μπορούν να ενσωματωθούν σε προϊόντα τροφίμων με τρόπο που διατηρεί την αποτελεσματικότητά τους. Η κατάψυξη προστατεύει τα κύτταρά τους από την καταστροφή που μπορεί να προκαλέσει η αποξήρανση σε υψηλές θερμοκρασίες, ενώ η απομάκρυνση του νερού διατηρεί τη σταθερότητά τους κατά την αποθήκευση και τη χρήση. Έτσι, ο παραγόμενος προβιοτικός και μικροβιακός πλούτος παραμένει αναλλοίωτος και αποτελεσματικός για την υγεία (Coles *et al.*, 2005).



Εικόνα 9. Σχηματική απεικόνιση λυοφιλιοτή

(https://www.researchgate.net/figure/Schematic-diagram-of-the-freeze-dryer_fig2_342952670).

3.2.2 Ξήρανση με Θερμό αέρα- Hot Air Drying

Η ξήρανση με θερμό αέρα αποτελεί μια δημοφιλή μέθοδο στον τομέα της διατήρησης τροφίμων. Κατά τη διαδικασία αυτή, ο θερμός αέρας χρησιμοποιείται για την απομάκρυνση της υγρασίας από τα τρόφιμα, επιτρέποντας τη μείωση του επίπεδου της υδατικής δραστηριότητας και την αποτροπή της μικροβιακής ανάπτυξης (Inyang *et al.*, 2017). Αυτή η μέθοδος είναι ευρέως αποδεκτή λόγω της απλότητάς της και του σχετικά χαμηλού της κόστους. Κατά τη διαδικασία της ξήρανσης με θερμό αέρα, η θερμοκρασία και η ταχύτητα του αέρα είναι κρίσιμες παράμετροι που επηρεάζουν το τελικό αποτέλεσμα. Η αύξηση της θερμοκρασίας μπορεί να επιταχύνει τη διαδικασία, αλλά πρέπει να γίνεται με προσοχή για να μην επηρεαστεί η ποιότητα των τροφίμων. Επιπλέον, η κατάλληλη διαχείριση της ροής του αέρα είναι απαραίτητη για τη διασφάλιση ομοιόμορφης ξήρανσης όλων των τροφίμων. Παρόλο που η ξήρανση με θερμό αέρα είναι αποτελεσματική, η προσοχή στις λεπτομέρειες της διαδικασίας είναι απαραίτητη για την επίτευξη υψηλής ποιότητας τελικού προϊόντος.

Στη ξήρανση με ζεστό αέρα, πρέπει να αφαιρεθεί αρκετό νερό ώστε να μειωθεί η δραστηριότητα του νερού σε ένα επίπεδο που εμποδίζει την ανάπτυξη των

μικροοργανισμών και μειώνει το ρυθμό των ενζυμικών και μη ενζυμικών αντιδράσεων. Έτσι, ένα από τα κύρια απαιτούμενα στη χρήση της ξήρανσης με ζεστό αέρα είναι η κατανόηση της διαδικασίας της ξήρανσης, η δυνατότητα πρόβλεψης των χρόνων ξήρανσης, η καθιέρωση της κατανομής της υγρασίας σε όλα τα στερεά κομμάτια κατά τη διάρκεια της ξήρανσης και η επίδραση των μεταβλητών επεξεργασίας όπως η θερμοκρασία και η ταχύτητα του αέρα, η προεπεξεργασία και το μέγεθος των κομματιών στη συμπεριφορά της ξήρανσης (Johnson *et al.*, 1998). Η ξήρανση με ζεστό αέρα είναι μια εναλλακτική μέθοδος ξήρανσης. Η χρήση αφυδατωτών με ζεστό αέρα οδηγεί σε πιο ομοιόμορφα, υγιεινά και ελκυστικά προϊόντα που μπορούν να παραχθούν γρήγορα (Karathanos & Belessiotis, 1999).

3.2.3 Ξήρανση με ψεκασμό- Spray Drying

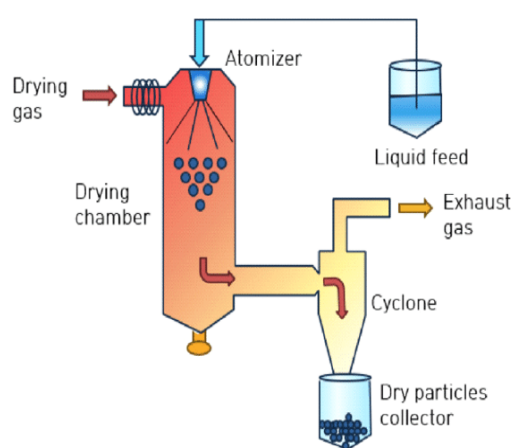
Η ξήρανση με ψεκασμό είναι μια τεχνική επεξεργασίας αιωρούμενων σωματιδίων (SPP) και αποτελεί σημαντική μέθοδο ξήρανσης υγρών τροφίμων, ειδικά στον δυτικό κόσμο, όπου συχνά συνδέεται με τις γαλακτοβιομηχανίες λόγω της παραγωγής σκόνης γάλακτος. Στη διαδικασία αυτή, το υγρό υλικό μετατρέπεται σε ξηρό προϊόν με τη χρήση ενός μέσου ξήρανσης (Selvamuthukumaran *et al.*, 2020).

Ένα από τα πλεονεκτήματα αυτής της μεθόδου είναι η δυνατότητα χρήσης ως πρώτη ύλη ενός υγρού που είναι ευαίσθητο στη θερμότητα, μη θερμοευαίσθητο και ανθεκτικό στη θερμότητα, διατηρώντας την ποιότητά του. Τα σωματίδια του τελικού προϊόντος έχουν προσδιορισμένο μέγεθος, σχήμα και ποσοστό υγρασίας, καθώς και υψηλή ποιότητα. Επιπλέον, η διάρκεια ζωής του προϊόντος είναι συνήθως μεγαλύτερη λόγω της χαμηλής ενεργότητας του νερού. Τέλος, η λειτουργία της μηχανής είναι συνεχής και περιλαμβάνει σχετικά απλό εξοπλισμό (Selvamuthukumaran *et al.*, 2020).

Ένα από τα αδύνατα σημεία αυτής της τεχνικής ξήρανσης είναι η αδυναμία διαχείρισης υλικών με υψηλή πυκνότητα. Γενικά, οι υλικές μορφές που χρησιμοποιούνται πρέπει να είναι κατάλληλες για άντληση κατά τη διαδικασία ξήρανσης. Κατά τη διαδικασία αυτή, παρατηρείται απώλεια προϊόντος, ιδίως λόγω

προσκόλλησης στο τοίχωμα του ξηραντήρα, κυρίως λόγω της υψηλής περιεκτικότητας σε σάκχαρα. Επιπλέον, αν η μονάδα ξήρανσης είναι σχεδιασμένη για την παραγωγή μικρών σωματιδίων, μπορεί να είναι δύσκολο να παράγει σωματίδια μεγαλύτερης διαστάσεως. Όσον αφορά το οικονομικό κομμάτι, η αρχική επένδυση είναι συνήθως υψηλότερη από τους άλλους τύπους ξηραντήρων, ενώ οι δαπάνες για την ανάκτηση και τη συλλογή του προϊόντος αυξάνουν το κόστος ξήρανσης (Selvamuthukumar *et al.*, 2020).

Η διαδικασία της ξήρανσης με ψεκασμό περιλαμβάνει τέσσερα κύρια στάδια. Αρχικά, το υγρό υλικό τροφοδοτείται στη συσκευή ψεκασμού μέσω μιας αντλίας, η οποία μπορεί να είναι είτε ψεκαστήρας περιστροφικού δίσκου, είτε ακροφύσιο πίεσης ή ακροφύσιο υπερήχων. Στη συνέχεια, ο αέρας που απαιτείται για τη διαδικασία της ξήρανσης αναρροφάται από το περιβάλλον και θερμαίνεται πριν διοχετευτεί στον διανομέα αέρα (**Εικόνα 10**). Το υγρό υλικό ψεκάζεται σε σταγονίδια, τα οποία στη συνέχεια ξηραίνονται όταν έρχονται σε επαφή με ζεστό αέρα. Η εξάτμιση του νερού γίνεται γρήγορα, επιτρέποντας τη διατήρηση χαμηλής θερμοκρασίας στα σταγονίδια. Αφού το υλικό ξηρανθεί, η σκόνη καταλέγεται κυρίως στον πυθμένα του θαλάμου και απομακρύνεται στη συνέχεια μέσω ενός κυκλώνα, όπου γίνεται ο διαχωρισμός της από τον αέρα (Selvamuthukumar *et al.*, 2020).



Εικόνα 10. Σχηματική απεικόνιση Spray Dryer

(https://www.researchgate.net/figure/Spray-drying-process-Adapted-from-Sonik-Seremeta-with-permission-of-Elsevier-8_fig1_338483319).

3.3 Επίδραση Ξήρανσης στους προβιοτικούς μικροοργανισμούς

Η αυξανόμενη γνώση για το ανθρώπινο μικροβίωμα οδηγεί στην επίγνωση του πόσο σημαντικά μπορούν να είναι τα προβιοτικά για την υγεία μας. Αν και απαιτείται περαιτέρω τεκμηρίωση, φαίνεται ότι αρκετές παθολογίες θα μπορούσαν να αντιμετωπιστούν ή να προληφθούν με τη χορήγηση φαρμακευτικών σκευασμάτων που περιέχουν τέτοια ζωντανά ωφέλιμα για την υγεία βακτήρια (Broeckx *et al.*, 2016). Αυτά τα φαρμακοβιοτικά πρέπει να παρέχουν τα αποτελέσματά τους μέχρι το τέλος της διάρκειας ζωής τους, κάτι που μπορεί να επιτευχθεί με τον βέλτιστο τρόπο με την ξήρανση πριν από την περαιτέρω σύνθεση. Ωστόσο, οι διαδικασίες ξήρανσης, συμπεριλαμβανομένης της ξήρανσης με ψεκασμό, κατάψυξης, εν κενό και ρευστοποιημένης κλίνης, προκαλούν πίεση στα προβιοτικά, μειώνοντας έτσι τη βιωσιμότητά τους. Μπορούν να προβλεφθούν διάφορες στρατηγικές προστασίας για την ενίσχυση της βιωσιμότητάς τους, συμπεριλαμβανομένης της προσθήκης προστατευτικών παραγόντων, του ελέγχου των παραμέτρων της διαδικασίας και της προέντασης των προβιοτικών πριν από την ξήρανση. Επιπλέον, η βιωσιμότητα των προβιοτικών πρέπει να διατηρείται κατά τη μακροχρόνια αποθήκευση. Συνολικά, η χαμηλότερη θερμοκρασία αποθήκευσης και η χαμηλή περιεκτικότητα σε υγρασία έχουν ως αποτέλεσμα καλά ποσοστά επιβίωσης. Πρέπει επίσης να δοθεί προσοχή στις συνθήκες επανυδάτωσης των αποξηραμένων προβιοτικών, καθώς αυτό μπορεί να ασκήσει σημαντική επίδραση στην αναβίωσή τους. Περιγράφοντας όχι μόνο τα χαρακτηριστικά, αλλά και τα αποτελέσματα βιωσιμότητας που λαμβάνονται από τις πιο σχετικές τεχνικές ξήρανσης στη βιομηχανία προβιοτικών (Broeckx *et al.*, 2016).

Η διαδικασία ξήρανσης εμπεριέχει την απομάκρυνση μεγάλου όγκου ενδοκυττάριου νερού, το οποίο παρεμβαίνει στην κυτταρική δομή του μικροβιακού κυττάρου και μπορεί να οδηγήσει στον θάνατο του. Οι πιέσεις που ασκούνται στους μικροοργανισμούς από αφυδατικές διαδικασίες μπορούν να χωριστούν σε δύο βασικές κατηγορίες. Από τη μία πλευρά, η εκτεταμένη απώλεια νερού δημιουργεί μηχανικές πιέσεις, κυρίως επηρεάζοντας την κυτταρική μεμβράνη. Έχει περιγραφεί ότι η πλασματική μεμβράνη αποτελεί τον κύριο στόχο της κυτταρικής βλάβης κατά τη διαταραχή του νερού στο κύτταρο (Ragoosanan *et al.*, 2008). Κατά τη διάρκεια της

αφυδάτωσης, η αύξηση της αναλογίας επιφάνειας προς όγκο μπορεί να προκαλέσει παραμόρφωση της μεμβράνης. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η γρήγορη αφυδάτωση προκαλεί διάτρηση της μεμβράνης που οδηγεί στον θάνατο του κυττάρου (Lemetais *et al.*, 2012). Επιπλέον, η μειωμένη δραστηριότητα του νερού προκαλεί μια μετάβαση της μεμβράνης από μια υγρή κρυσταλλική φάση σε μια φάση ζελέ (Milhaud, 2004), η οποία ενδέχεται να οδηγήσει σε διαρροή και θάνατο του κυττάρου.

Από την άλλη πλευρά, επειδή η αφυδάτωση αυξάνει την επαφή των επιφανειών των κυττάρων με τον αέρα και, συνεπώς, με μόρια οξυγόνου, οι διαδικασίες ξήρανσης προκαλούν επίσης τη δημιουργία και την ενδοκυττάρια συσσώρευση αντιδραστικών ειδών οξυγόνου (Franc *et al.*, 2007), προκαλώντας ζημιές σε πρωτεΐνες κυττάρου, λιπίδια και νουκλεϊκά οξέα (Dupont *et al.*, 2012).

Η λυοφιλίωση είναι η κύρια διαδικασία που χρησιμοποιείται για τη μακροπρόθεσμη διατήρηση των μικροοργανισμών. Η διαδικασία της λυοφιλίωσης συνδυάζει ένα κρίσιμο βήμα παγοκρυσταλλοποίησης (Dumont *et al.*, 2003) και ένα βήμα υπολειμματοποίησης (για μερικές ημέρες), το οποίο είναι απαραίτητο για την αφαίρεση πρώτα των παγοκρυστάλλων και στη συνέχεια του δεμένου νερού από το στερεό προϊόν (Morgan *et al.*, 2006).

Πίνακας 4. Απεικόνιση των κύριων χαρακτηριστικών των διαφορετικών τεχνικών ξήρανσης (Broeckx *et al.*, 2016).

Επισκόπηση των κύριων χαρακτηριστικών των διαφορετικών τεχνικών ξήρανσης.			
Τύπος διαδικασίας	συνεχής	συνολική	συνολική
Εξοδα			
Πάγια εξοδα	12%	100%	52,20%
Εξοδα κατασκευής	20%	100%	50,60%
Έλεγχος των χαρακτηριστικών των σωματιδίων	Ναι	Όχι	Όχι
Γνώση και εμπειρία	αυξανόμενη	καλά γνώριμη και επεξηγημένη	περιορισμένη
Συνθήκες της διαδικασίας			
Χρόνος	δευτερόλεπτα-λεπτά	ώρες- μέρες	ώρες- μέρες
Θερμοκρασία	υψηλή	ήπια	ήπια
Πίεση	περιορισμένη	υψηλή πίεση (≤ 10 mbar)	χαμηλή υποπίεση (≥ 10 mbar)

3.3.1 Επίδραση Λυοφιλίωσης στους προβιοτικούς μικροοργανισμούς

Εδώ και δεκαετίες, η λυοφιλίωση, γνωστή και ως freeze drying, είναι η πιο βολική και ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος για την απομάκρυνση του νερού για την ενίσχυση της σταθερότητας αποθήκευσης των προβιοτικών. Η λυοφιλίωση μπορεί να χωριστεί σε 3 στάδια: κατάψυξη, αρχική ξήρανση και δευτερογενής ξήρανση. Κατά την κατάψυξη, σχηματίζονται παγοκρύσταλλοι που μπορούν να βλάψουν τα προβιοτικά. Η ανάπτυξη των κρυστάλλων πάγου εξαρτάται από τον ρυθμό κατάψυξης και τη θερμοκρασία. Ένας υψηλός ρυθμός κατάψυξης προτιμάται από έναν αργό ρυθμό κατάψυξης, καθώς θα οδηγήσει στο σχηματισμό μικρότερων κρυστάλλων πάγου αποφεύγοντας εκτεταμένες κυτταρικές βλάβες (Fowler & Toner, 2005). Όχι μόνο ο σχηματισμός κρυστάλλων πάγου είναι επιζήμιος για τα προβιοτικά.

Καθώς το νερό κρυσταλλώνεται, οι διαλυμένες ουσίες στο υπόλοιπο μη παγωμένο κλάσμα συμπυκνώνονται, γεγονός που οδηγεί σε χημική και οσμωτική βλάβη. Στο στάδιο της πρωτογενούς ξήρανσης το κατεψυγμένο νερό απομακρύνεται με εξάχνωση υπό κενό, ενώ στο δεύτερο στάδιο ξήρανσης, το μη παγωμένο νερό απομακρύνεται με εκρόφηση (Maltesen & van de Weert, 2008). Καθώς το νερό παίζει σημαντικό ρόλο στην ακεραιότητα και τη σταθερότητα των κυττάρων, η απομάκρυνσή του από τα προβιοτικά κύτταρα μπορεί να προκαλέσει εκτεταμένη βλάβη στις επιφανειακές πρωτεΐνες, στο κυτταρικό τοίχωμα και στην κυτταρική μεμβράνη, μειώνοντας έτσι τη βιωσιμότητά τους μετά την ξήρανση (Castro *et al.*, 1997). Ενώ είναι μια πολύ γνωστή και ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνολογία ξήρανσης για προβιοτικά, η λυοφιλίωση έχει επίσης αρκετά μειονεκτήματα. Είναι μια δαπανηρή και χρονοβόρα διαδικασία παρτίδας, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ξηρού προϊόντος. Ένα επιπλέον στάδιο επεξεργασίας είναι επομένως απαραίτητο για τη λήψη μεμονωμένων σωματιδίων σκόνης (Maltesen & van de Weert, 2008). Επιπλέον, έχει σημειωθεί ένας πιθανός κίνδυνος διασταυρούμενης μόλυνσης σε ένα στεγνωτήριο ψύξης (Barbaree & Sanchez, 1982). Θα ήταν επομένως σκόπιμο να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή κατά την ανάμειξη διαφορετικών βακτηριακών ειδών σε έναν θάλαμο λυοφιλοποίησης και να διασφαλίζεται η σωστή προσεκτική χρήση των εργαστηριακών ψυκτικών ξηραντηρίων μικρής κλίμακας. Παρόλα αυτά, η λυοφιλίωση είναι μια πολύτιμη τεχνική, η οποία χρησιμοποιείται ευρέως και καλά μελετημένη, με διάφορες διαθέσιμες στρατηγικές για την ενίσχυση του ποσοστού επιβίωσης των ενσωματωμένων προβιοτικών.

Η λυοφιλίωση (Freeze-Drying) έχει αποτελέσει μια μέθοδος προτίμησης για τη μακροπρόθεσμη διατήρηση βιοενεργών υλικών. Αυτή η μέθοδος αφυδάτωσης προκαλεί ελάχιστη συρρίκνωση και οδηγεί σε ένα πλήρως διαλυτό προϊόν που είναι εύκολο να επανυδρωθεί. Επιπλέον, η λυοφιλοποίηση χρησιμοποιείται συχνά για τη διατήρηση καλλιεργειών με βακτήρια του γαλακτικού οξέος που εμπλέκονται σε γαλακτοκομικές και τροφικές ζύμωσεις (Lodato *et al.*, 1999). Ωστόσο, δεν επιβιώνουν όλες οι φυλές της διαδικασίας (Abadias *et al.*, 2001). Οι κύριες αιτίες απώλειας της κυτταρικής επιβίωσης κατά την λυοφιλίωση είναι πιθανόν η δημιουργία παγοκρυστάλλων και η υψηλή ομοιογένεια (Conrad *et al.*, 2000). Η επιβίωση των

μικροβίων κυττάρων κατά τη διαδικασία της λυοφιλίωσης εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων προστατευτικών προσθέτων και συνθηκών κατά την επανυδρωση (Font de Valdez *et al.*, 1983). Έχουν δοκιμαστεί πολλές ενώσεις για τη βελτίωση της επιβίωσης των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος κατά την διαδικασία αυτή, συμπεριλαμβανομένων πολυσακχαριτών, δισακχαριτών, αμινοξέων και πρωτεϊνών (Champagne *et al.*, 1991). Αυτές οι ενώσεις βρέθηκαν σε περισσότερες περιπτώσεις να είναι αποτελεσματικές για την προστασία διαφορετικών βακτηρίων του γαλακτικού οξέος (Carvalho *et al.*, 2002). Ο Zayed και ο Roos (2004) μελέτησαν την επίδραση των λυοπροστατευτικών παραγόντων στην επιβίωση του *Lactobacillus salivarius* και βρήκαν ότι η τρεχαλόζη και η σακχαρόζη, μαζί με το γάλα, ήταν οι πιο αποτελεσματικοί υλικοί.

3.3.2 Επίδραση ξήρανσης με θερμό αέρα στους προβιοτικούς μικροοργανισμούς

Η ξήρανση με θερμό αέρα είναι μια γρήγορη και οικονομικά αποδοτική μέθοδος ξήρανσης που μπορεί να παράγει ξηρά σφαιρικά σωματίδια σκόνης με επιθυμητές ιδιότητες, όπως καλή ρευστότητα, ειδική υπολειμματική περιεκτικότητα σε υγρασία και ομοιόμορφη κατανομή σχήματος και μεγέθους (Champagne *et al.*, 1991).

Κατά τη φάση σταθερής ξήρανσης, η θερμοκρασία των προβιοτικών περιορίζεται στη θερμοκρασία του υγρού βολβού. Επομένως, η απενεργοποίηση θερμότητας είναι πιο πιθανό να συμβεί κατά τη φάση της πτώσης του ρυθμού στεγνώματος. Σε αυτό το στάδιο, τα προβιοτικά κύτταρα μπορούν να φτάσουν τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος ξήρανσης αέρα. Επειδή τα αποξηραμένα σωματίδια συχνά παραμένουν στο μηχάνημα μέχρι το τέλος του κύκλου στεγνώματος, μπορούν να θερμανθούν στη θερμοκρασία εξόδου, καθιστώντας αυτή μια κρίσιμη παράμετρο που επηρεάζει τη βιωσιμότητα (Ghandi *et al.*, 2012)

Η αδρανοποίηση που προκαλείται από την αφυδάτωση συμβαίνει συχνά ταυτόχρονα με τη ζημιά από τη θερμότητα. Κατά την αφυδάτωση, τα μόρια του νερού

απομακρύνονται από τα κύτταρα και το περιβάλλον τους, περιορίζοντας έτσι τις χημικές αντιδράσεις και τις μεταβολικές δραστηριότητες (Ananta *et al.*, 2005). Καθώς τα μόρια του νερού παίζουν σημαντικό ρόλο στη σταθεροποίηση πολλών κυτταρικών συστατικών, η απομάκρυνσή τους θα έχει φυσιολογικές επιπτώσεις στην ακεραιότητα και τη δομή των κυττάρων. Η λιπιδική διπλοστοιβάδα της κυτταρικής μεμβράνης σταθεροποιείται με μια ισορροπία μεταξύ της έλξης van der Waals και της απώθησης της ενυδάτωσης. Αυτή η σταθερότητα εξασθενεί από την αφυδάτωση, προκαλώντας διαρροή των ενδοκυτταρικών ενώσεων, προκαλώντας πιθανώς κυτταρικό θάνατο (Ananta *et al.*, 2005). Οι Perdana *et al.* (2013) πραγματοποίησαν πειράματα ξήρανσης με μία σταγόνα σε *Lactobacillus plantarum* WCFS1 και αξιολόγησαν την επίδραση της θερμοκρασίας και της αφυδάτωσης στην αδρανοποίηση των προβιοτικών. Τα αποτελέσματά τους έδειξαν ότι με τη χρήση θερμοκρασιών κάτω των 45 °C, κυριαρχούσε η αδρανοποίηση με αφυδάτωση. Αυτό ήταν σε αντίθεση με θερμοκρασίες υψηλότερες από 45 °C, όπου υπήρχε αδρανοποίηση τόσο από αφυδάτωση όσο και από θερμικό στρες (Perdana *et al.*, 2013). Πρότειναν επίσης ότι όσο μεγαλύτερος είναι ο χρόνος ξήρανσης, τόσο περισσότερα προβιοτικά κύτταρα είναι επιρρεπή σε στρες αφυδάτωσης.

3.3.3 Επίδραση ξήρανσης με ψεκασμό στους προβιοτικούς μικροοργανισμούς

Η ξήρανση με ψεκασμό φαίνεται να παρέχει μεγάλα πλεονεκτήματα σε σύγκριση με άλλες τεχνικές ξήρανσης (Sosnik & Seremeta, 2015). Είναι μια γρήγορη, συνεχής και οικονομική διαδικασία που μπορεί να χειριστεί μεγάλες ποσότητες καλλιέργειες υγρής τροφής σε σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα. Το κύριο πλεονέκτημα είναι ότι τα χαρακτηριστικά της σκόνης μπορούν να ελεγχθούν εύκολα. Επιπλέον, η ξήρανση με ψεκασμό είναι φθηνότερη στην κλιμάκωση όσον αφορά τον εξοπλισμό, τα βοηθητικά προγράμματα και τον χρόνο κύκλου. Κατά την ξήρανση με ψεκασμό, ωστόσο, τα προβιοτικά κύτταρα αντιμετωπίζουν διαφορετικές καταπονήσεις, οι οποίες μπορούν να βλάψουν τη βιωσιμότητά τους.

Κατά τη διάρκεια της ξήρανσης με ψεκασμό, τα προβιοτικά υφίστανται διάφορες καταπονήσεις που περιλαμβάνουν θερμική καταπόνηση, αφυδάτωση, διατμητική καταπόνηση, οσμωτική και οξειδωτική καταπόνηση (όπως επίσης αναθεωρείται λεπτομερέστερα από Santivarangkna *et al.*, 2008). Με τον τρόπο αυτό, η θερμική καταπόνηση και η αφυδάτωση πιστεύεται ότι είναι οι δύο κύριες μηχανισμοί που οδηγούν σε αδρανοποίηση και απώλεια βιωσιμότητας των προβιοτικών (Perdana *et al.*, 2013). Ωστόσο, οι μηχανισμοί αδρανοποίησης των προβιοτικών βακτηρίων κατά την ξήρανση με ψεκασμό δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητοί. Η γενίκευση των συμπερασμάτων των δημοσιευμένων μελετών είναι δύσκολη, επειδή τα αποτελέσματα δεν διαφέρουν μόνο μεταξύ διαφορετικών βακτηριακών γενών και ειδών, αλλά είναι επίσης ειδικά για το στέλεχος. Ακόμη και για το ίδιο στέλεχος, η ανοχή στο στρες θα είναι διαφορετική ανάλογα με τις συνθήκες ανάπτυξης ή/και το στάδιο ανάπτυξης (Fu & Chen, 2011).

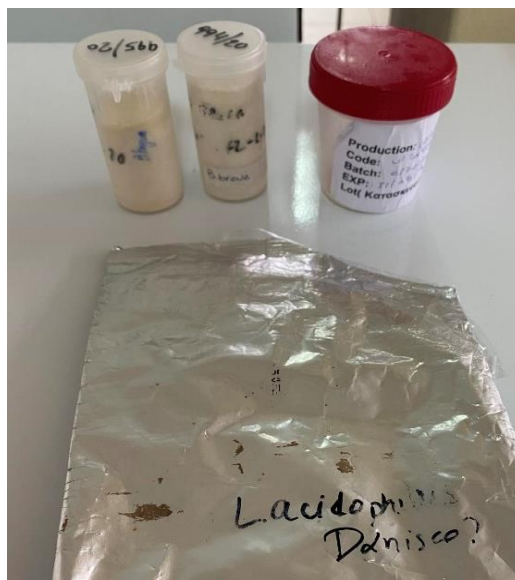
3.4 Χρήση και οφέλη της ξήρανσης στην βιομηχανία τροφίμων

Η ξήρανση των τροφίμων είναι μια εξαιρετικά σημαντική τεχνική για τη βιομηχανία τροφίμων και προσφέρει δυνατότητες ανάπτυξης συστατικών και νέων προϊόντων στους καταναλωτές. Τα τελευταία χρόνια, έχουν σημειωθεί πολλές εξελίξεις στην τεχνολογία που σχετίζονται με τη βιομηχανική ξήρανση τροφίμων, συμπεριλαμβανομένων των προεπεξεργασιών, των τεχνικών, του εξοπλισμού και της ποιότητας. Πρόσφατη έρευνα αποκάλυψε ότι νέες προσεγγίσεις ξήρανσης, όπως ξήρανση με μικροκύματα ή υπερήχους, ξήρανση υψηλού ηλεκτρικού πεδίου, ξήρανση με αντλία θερμότητας και στέγνωμα παραθύρου διάθλασης μπορούν τώρα να χρησιμοποιηθούν για τη βελτίωση της απόδοσης και της αποτελεσματικότητας της ξήρανσης, ώστε η κατανάλωση ενέργειας να μπορεί να μειωθεί ενώ διατηρώντας ταυτόχρονα την ποιότητα του τελικού προϊόντος. Ωστόσο, ενώ η έρευνα έχει δείξει ότι αυτές οι τεχνολογίες είναι επιτυχημένες, οι επαγγελματίες του εμπορίου δεν γνωρίζουν συχνά ποιες τεχνικές έχουν τις μεγαλύτερες δυνατότητες στη βιομηχανία (Moses *et al.*, 2014).

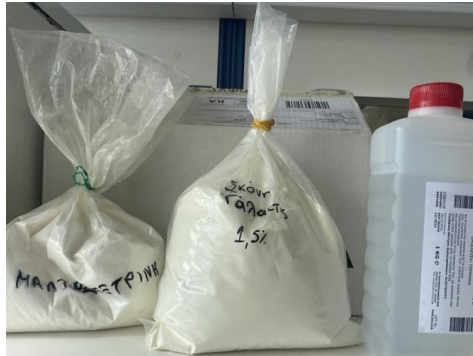
Κεφάλαιο 4^ο- Πειραματικό μέρος

4.1 Υλικά και μέθοδοι

Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν ήταν προβιοτικοί και ήταν οι ακόλουθοι : *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus plantarum* και *Lactobacillus rhamnosus* (**Εικόνα 11**). Τα βακτηριακά στελέχη και οι φορείς ενθυλάκωσης που χρησιμοποιήθηκαν και πιο συγκεκριμένα η μαλτοδεξτρίνη, η γλυκερόλη και η σκόνη γάλακτος (**Εικόνα 12**) ήταν ευγενική προσφορά του εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Επιπρόσθετα, για τη συλλογή της βιομάζας τα δείγματα τοποθετήθηκαν στην φυγόκεντρο digi cen20-R (**Εικόνα 13**). Για την ξήρανση σε θερμό αέρα των προβιοτικών μικροοργανισμών χρησιμοποιήθηκε θάλαμος που ρυθμίστηκε στους 45 °C, ενώ για τη διαδικασία της λυοφιλίωσης έγινε χρήση του Gellert Freeze Dryer (**Εικόνα 14**).



Εικόνα 11. Λυοφιλωμένες καλλιέργειες προβιοτικών βακτηρίων που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα.



Εικόνα 12. Φορείς ενθυλάκωσης που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα.



Εικόνα 13. Φυγόκεντρος.



Εικόνα 14. Λυοφιλιωτής.

4.2 Προετοιμασία προβιοτικών μικροοργανισμών *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus plantarum* και *Lactobacillus rhamnosus*

Για την ανακαλλιέργεια των προβιοτικών μικροοργανισμών *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus plantarum* και *Lactobacillus rhamnosus* προστέθηκαν 0,1g από την κάθε λυοφιλιωμένη καλλιέργεια σε 9ml θρεπτικό υγρό MRS broth και επώαστηκαν στους 37 °C για 48h. Έπειτα, ποσότητα εμβολίου τοποθετήθηκε μέσω της τεχνικής της γραμμωτής ράβδωσης (streaking) σε στερεοποιημένο υπόστρωμα MRS agar και επώαστηκαν στους 37 °C για 48 - 72h. Στη συνέχεια, απομονώθηκαν μεμονωμένες αποικίες και τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα falcon, τα οποία περιείχαν 10ml MRS broth και επώαστηκαν στους 37 °C για 48h. Μετά το πέρας της επώασης ακολουθούσε η συλλογή της βιομάζας μέσω της φυγοκέντρησης των δειγμάτων στα 4500rpm για 20min (**Εικόνα 15**).



Εικόνα 15. Ίζημα του *Lactobacillus acidophilus* μετά από φυγοκέντρηση.

4.3 Δημιουργία ενθυλακωμένων και μη προβιοτικών μικροοργανισμών *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus plantarum* και *Lactobacillus rhamnosus*

Στο πειραματικό μέρος της παρούσας εργασίας, παρασκευάστηκαν ενθυλακωμένα και μη δείγματα (**Εικόνα 16**) προβιοτικών μικροοργανισμών και συγκεκριμένα των *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus plantarum* και *Lactobacillus rhamnosus* με τη χρήση φορέων ενθυλάκωσης. Για την ενθυλάκωση των μικροοργανισμών χρησιμοποιήθηκαν ως φορείς ενθυλάκωσης η μαλτοδεξτρίνη, η γλυκερόλη και η σκόνη γάλακτος και προστέθηκαν σε διαφορετικές αναλογίες, ενώ για κάθε μικροοργανισμό υπήρξαν και δύο μη ενθυλακωμένα δείγματα. Η ποσότητα των φορέων ενθυλάκωσης που προστέθηκε υπολογίστηκε με βάση το νωπό βάρος του κάθε δείγματος και την προκαθορισμένη, για κάθε δείγμα, αναλογία του βάρους του φορέα ενθυλάκωσης προς το νωπό βάρος των κυττάρων. Συνολικά, για κάθε προβιοτικό μικροοργανισμό δημιουργήθηκαν δεκατέσσερα διαφορετικά δείγματα με διαφορετικές αναλογίες οι οποίες απεικονίζονται στον ακόλουθο πίνακα (**Πίνακας 5**), από τα οποία τα επτά υποβλήθηκαν σε ξήρανση στους 45 °C και τα άλλα επτά σε λυοφιλίωση.



Εικόνα 16. Δείγμα *Lactobacillus acidophilus* με μέσο ενθυλάκωσης την μαλτοδεξτρίνη πριν την ενθυλάκωση.

Πίνακας 5. Αναλογίες βάρους φορέα ενθυλάκωσης ως προς νωπό βάρος κυττάρων προβιοτικών μικροοργανισμών.

ΔΕΙΓΜΑ	ΦΟΡΕΑΣ ΕΝΘΥΛΑΚΩΣΗΣ	ΒΑΡΟΣ ΦΟΡΕΑ ΕΝΘΥΛΑΚΩΣΗΣ/ ΝΩΠΟ ΒΑΡΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ
1	Χωρίς ενθυλάκωση	Χωρίς ενθυλάκωση
2	Μαλτοδεξτρίνη	1/1
3	Μαλτοδεξτρίνη	1/5
4	Μαλτοδεξτρίνη	1/10
5	Γλυκερόλη	1/0,3
6	Σκόνη γάλακτος	1/2
7	Σκόνη γάλακτος	1/5

4.4 Επίδραση της διαδικασίας ξήρανσης στους 45 °C στη βιωσιμότητα των ενθυλακωμένων και μη, προβιοτικών μικροοργανισμών

Όπως προαναφέρθηκε επτά δείγματα από κάθε προβιοτικό μικροοργανισμό (έξι ενθυλακωμένα και ένα μη ενθυλακωμένο) ξηράνθηκαν στους 45 °C, αφού πρώτα ενθυλακώθηκαν. Πιο συγκεκριμένα, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε θάλαμο στους 45 °C (**Εικόνα 17**) και παρέμειναν εκεί για 48h, προκειμένου να αφαιρεθεί όλη η υγρασία από τα δείγματα. Μετά το πέρας της ξήρανσης πραγματοποιήθηκε στα δείγματα εξέταση βιωσιμότητας όπως περιγράφεται στην **παράγραφο 4.6**, αφού πρώτα ενυδατώθηκαν.



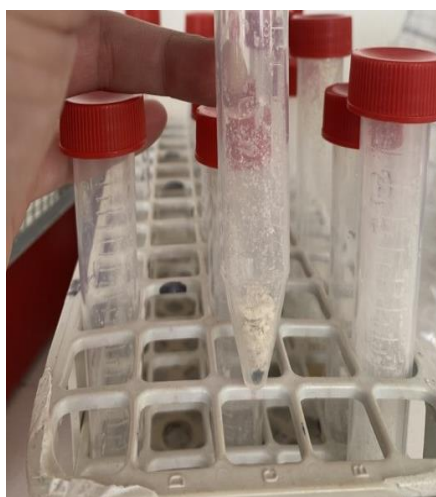
Εικόνα 17. Ενθυλακωμένα δείγματα προβιοτικών βακτηρίων υπό ξήρανση στους 45°C.



Εικόνα 18. Ενθυλακωμένα δείγματα προβιοτικών βακτηρίων μετά από ξήρανση στους 45°C.

4.5 Επίδραση της λυοφιλίωσης στη βιωσιμότητα των ενθυλακωμένων και μη, προβιοτικών μικροοργανισμών

Συνολικά επτά δείγματα από κάθε προβιοτικό μικροοργανισμό (έξι ενθυλακωμένα και ένα μη ενθυλακωμένο) υποβλήθηκαν σε λυοφιλίωση με σκοπό να εξεταστεί η βιωσιμότητα των ενθυλακωμένων κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, τα δείγματα, αφού πρώτα ενθυλακώθηκαν, καταψύχθηκαν στους -28°C για 48h και στη συνέχεια τα falcon τοποθετήθηκαν στο θάλαμο του λυοφιλιωτή για 48h (**Εικόνα 19**). Μετά το πέρας της λυοφιλίωσης, τα δείγματα ενυδατώθηκαν και έπειτα πραγματοποιήθηκε εξέταση βιωσιμότητας στα ενθυλακωμένα και μη ενθυλακωμένα, λυοφιλιωμένα κύτταρα όπως περιγράφεται στην παράγραφο.

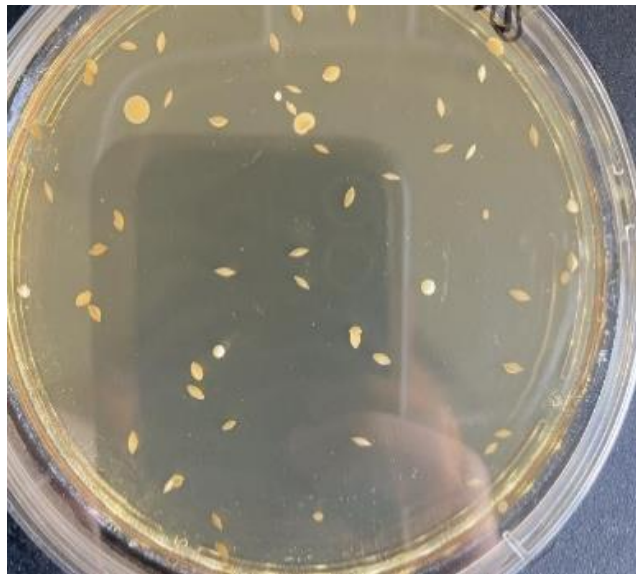


Εικόνα 19. Ενθυλακωμένα δείγματα προβιοτικών βακτηρίων μετά από λυοφιλίωση.

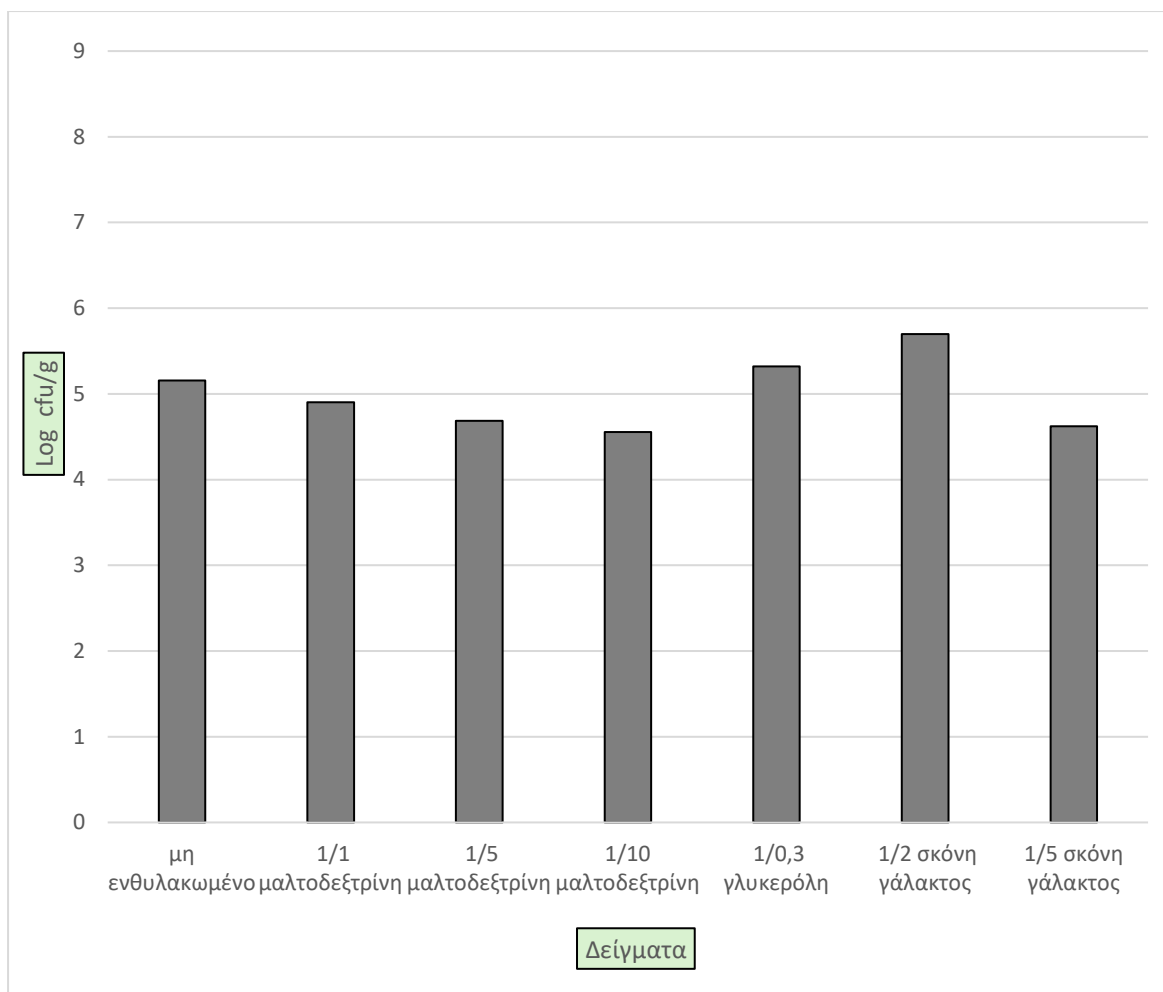
4.6 Καταμέτρηση βιωσιμότητας προβιοτικών καλλιιεργειών

Για την καταμέτρηση του αρχικού πληθυσμού της προβιοτικών μικροοργανισμών καθώς και του πληθυσμού που επιβίωσε μετά από κάθε μεταχείριση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε η κλασική μέθοδος των διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων σε αποστειρωμένο αραιωτικό υγρό Maximum Recovery Diluent. Συγκεκριμένα, 1ml από την προς καταμέτρηση καλλιέργεια μεταφέρθηκε σε 9ml διαλύματος Maximum Recovery Diluent κ.ο.κ, πραγματοποιώντας με αυτό τον τρόπο τον επιθυμητό αριθμό των διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων. Ακολούθως,

1ml από κάθε αραίωση μεταφέρθηκε σε τρυβλίο Petri, το οποίο στη συνέχεια συμπληρώθηκε με 20-25ml MRS agar σε υγρή μορφή (40 – 45°C). Τα τρυβλία επωάστηκαν στους 37 °C 48-72h και ακολούθησε καταμέτρηση των αποικιών στο τρυβλίο (Εικόνα 20).

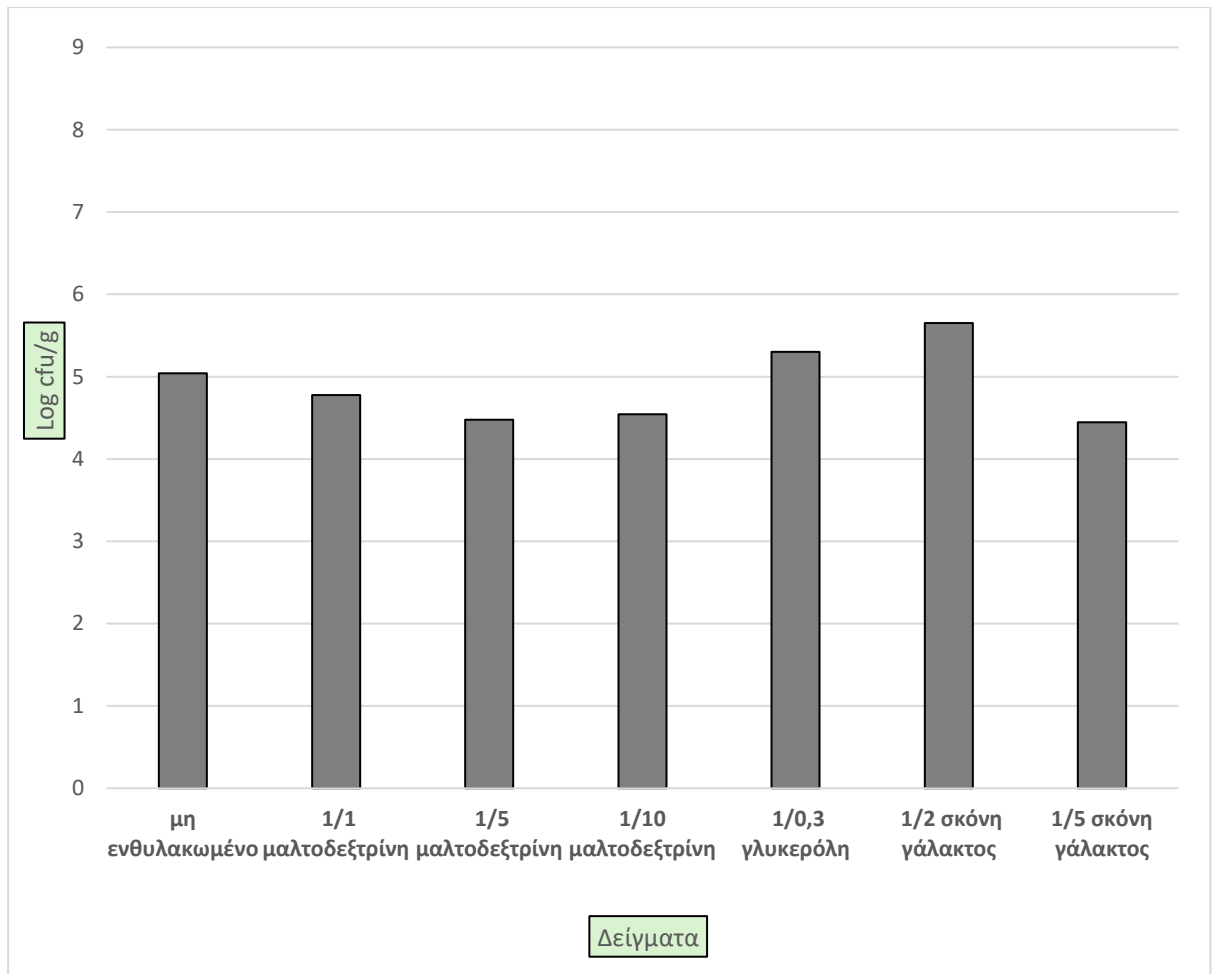


Εικόνα 20. Αποικίες του προβιοτικού μικροοργανισμού *Lactobacillus rhamnosus*.



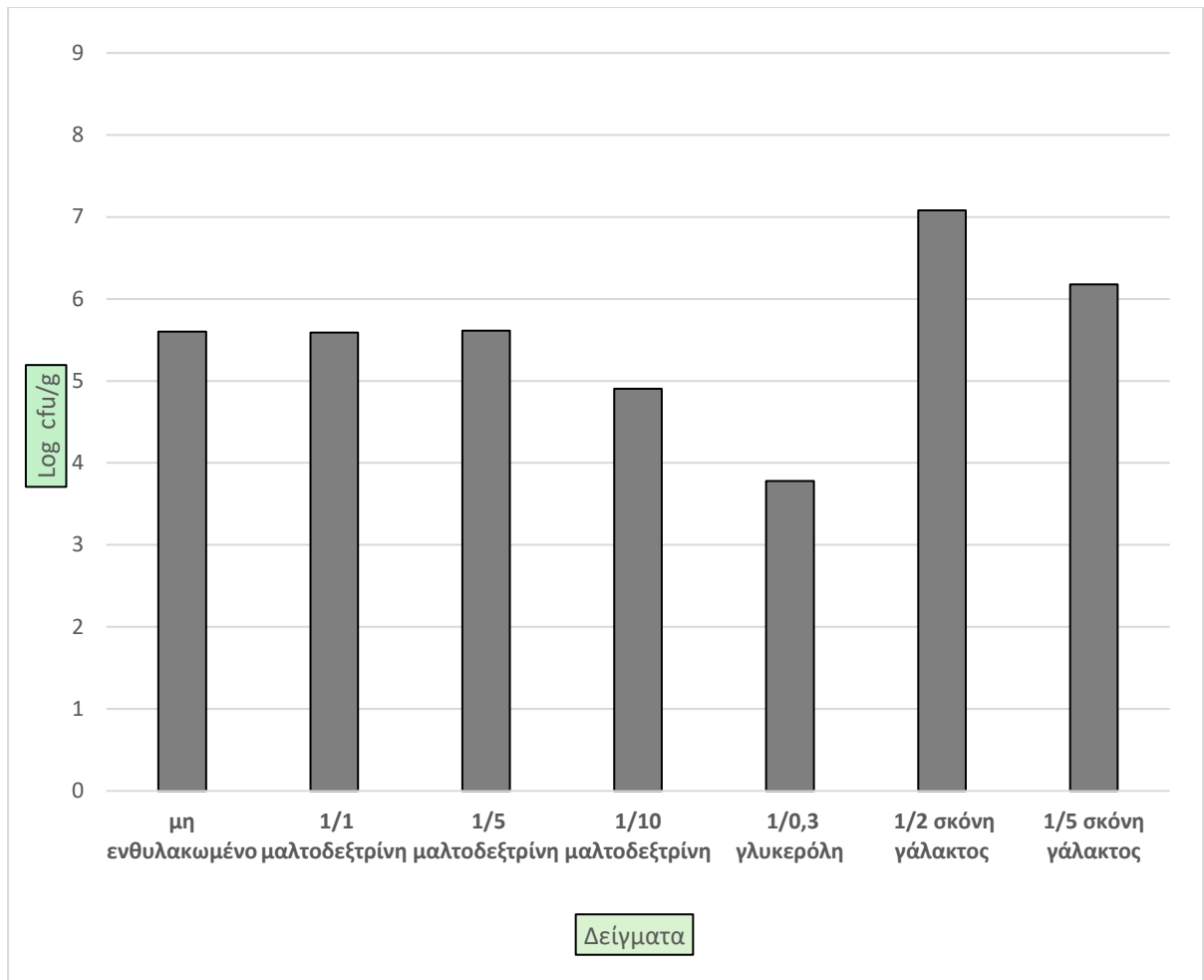
Διάγραμμα 1. Πληθυσμός (log cfu/g) του *Lactobacillus acidophilus* ύστερα από ξήρανση στους 45°C.

Στο **διάγραμμα 1** παρουσιάζεται η επίδραση της ξήρανσης στη βιωσιμότητα των ενθυλακωμένων και μη ενθυλακωμένων κυττάρων του *Lactobacillus acidophilus*. Από το **διάγραμμα 1**, λοιπόν, διεξάγεται το συμπέρασμα πως η μέθοδος ενθυλάκωσης του *Lactobacillus acidophilus* με **σκόνη γάλακτος** και αναλογία ½ (νωπό βάρος κυττάρων/μέσο ενθυλάκωσης) ήταν η αποτελεσματικότερη, καθώς το δείγμα με ½ **σκόνη γάλακτος** παρουσιάζει αύξηση στην βιωσιμότητα του συγκεκριμένου μικροοργανισμού κατά 0,54 log cfu/g μετά την ξήρανση στους 45°C σε σύγκριση με το μη ενθυλακωμένο δείγμα.



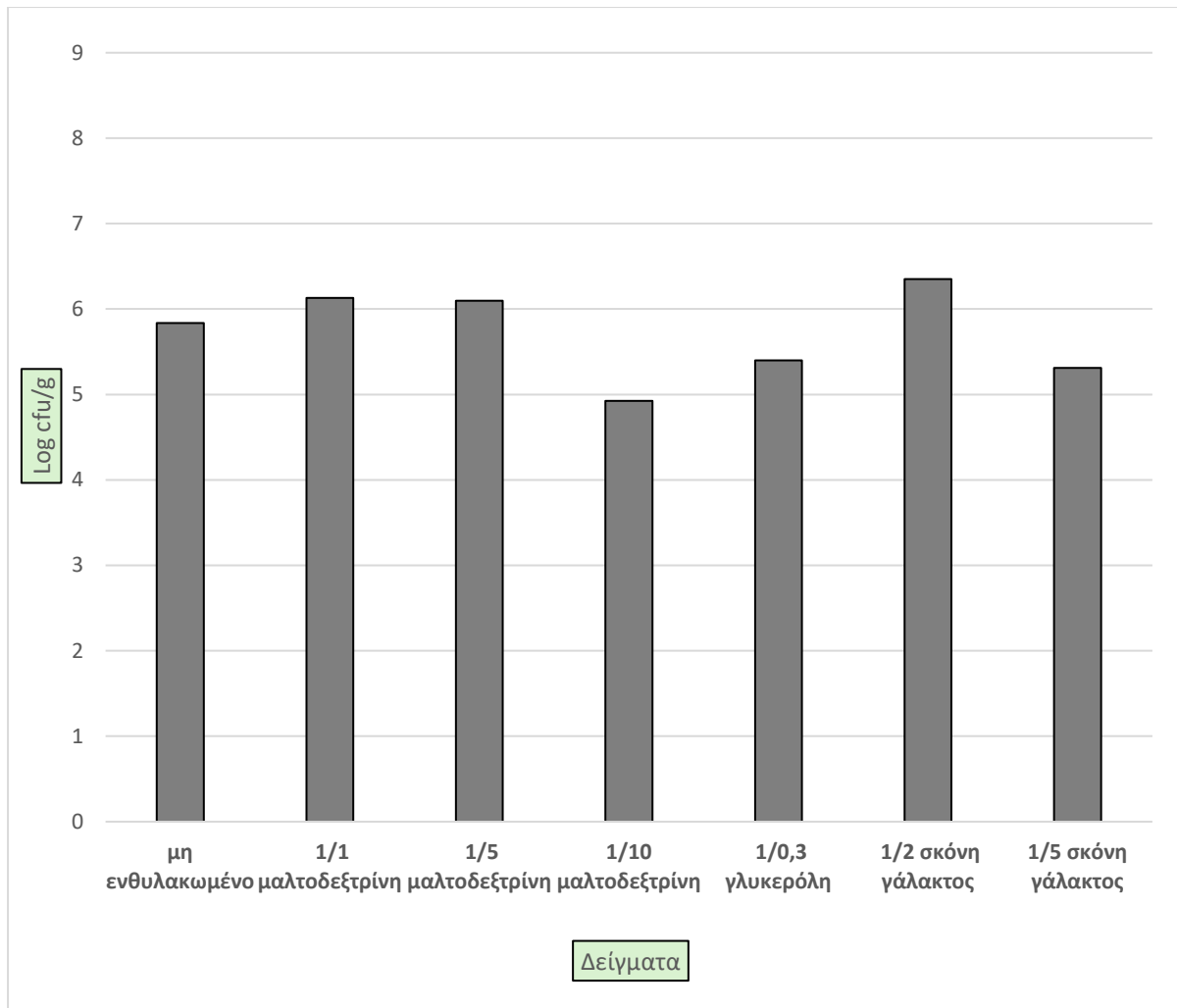
Διάγραμμα 2. Πληθυσμός (log cfu/g) του *Lactobacillus casei* ύστερα από ξήρανση στους 45°C.

Σύμφωνα με το **διάγραμμα 2**, η μέθοδος ενθυλάκωσης του *Lactobacillus casei* με σκόνη γάλακτος και αναλογία $\frac{1}{2}$ ήταν η αποτελεσματικότερη. Αυτό προκύπτει από το γεγονός πως το δείγμα με $\frac{1}{2}$ **σκόνη γάλακτος** παρουσιάζει αύξηση στην βιωσιμότητα του συγκεκριμένου μικροοργανισμού κατά 0,61 log cfu/g μετά την ξήρανση στους 45°C σε σύγκριση με το μη ενθυλακωμένο δείγμα.



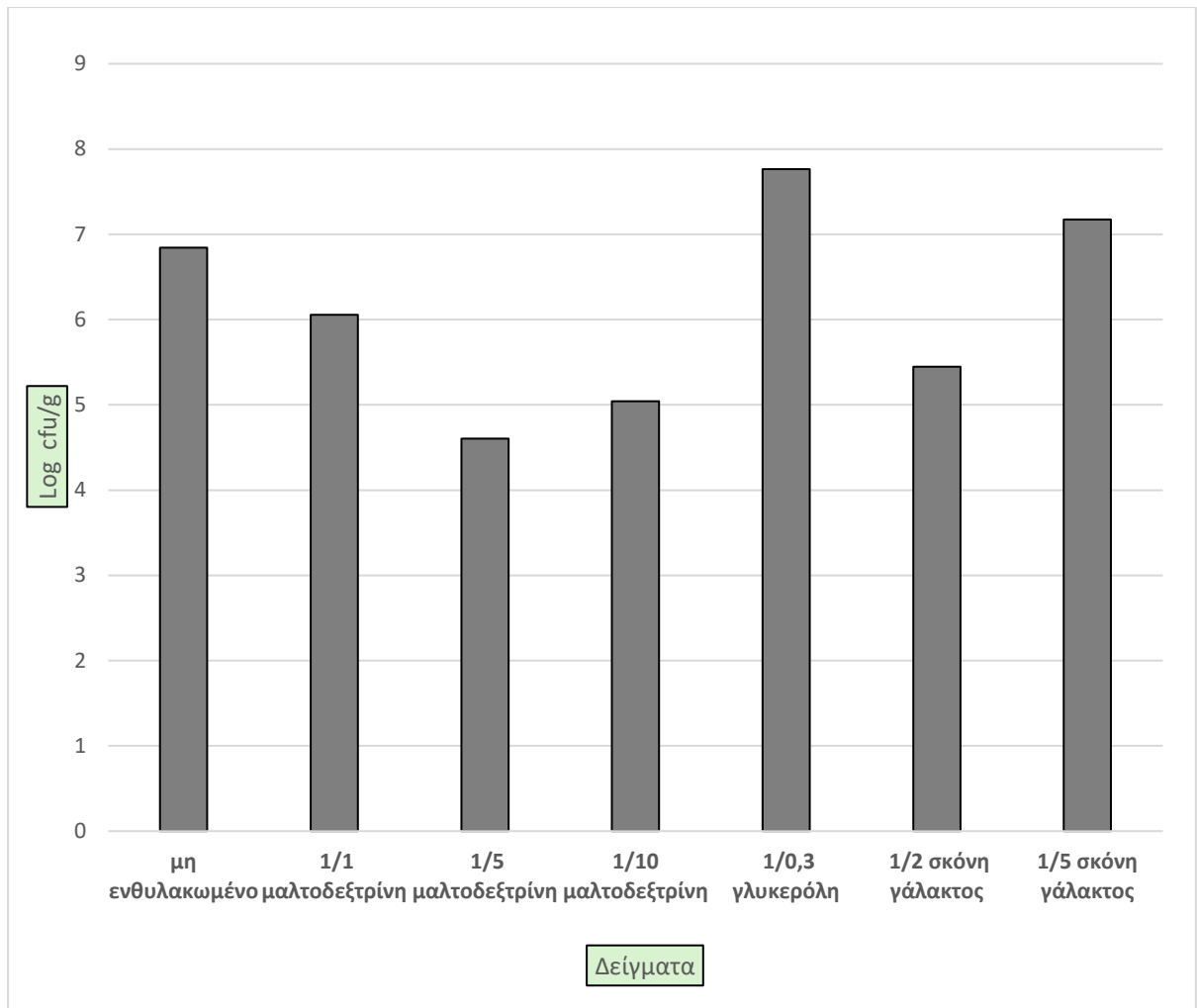
Διάγραμμα 3. Πληθυσμός (log cfu/g) του *Lactobacillus curvatus* ύστερα από ξήρανση στους 45°C.

Σύμφωνα με **διάγραμμα 3**, στο δείγμα *Lactobacillus curvatus* με **σκόνη γάλακτος** και αναλογία $\frac{1}{2}$ παρατηρείται αύξηση στον πληθυσμό του *Lactobacillus curvatus* κατά 1,48 log cfu/g σε σύγκριση με το μη ενθυλακωμένο δείγμα. Έτσι, οδηγούμαστε στο συμπέρασμα πως από τις 6 διαφορετικές μεθόδους ενθυλάκωσης που χρησιμοποιήθηκαν για τον *Lactobacillus curvatus*, η ενθυλάκωση με **σκόνη γάλακτος** $\frac{1}{2}$ ήταν η καταλληλότερη για την διατήρηση της βιωσιμότητάς του κατά την ξήρανση στους 45°C.



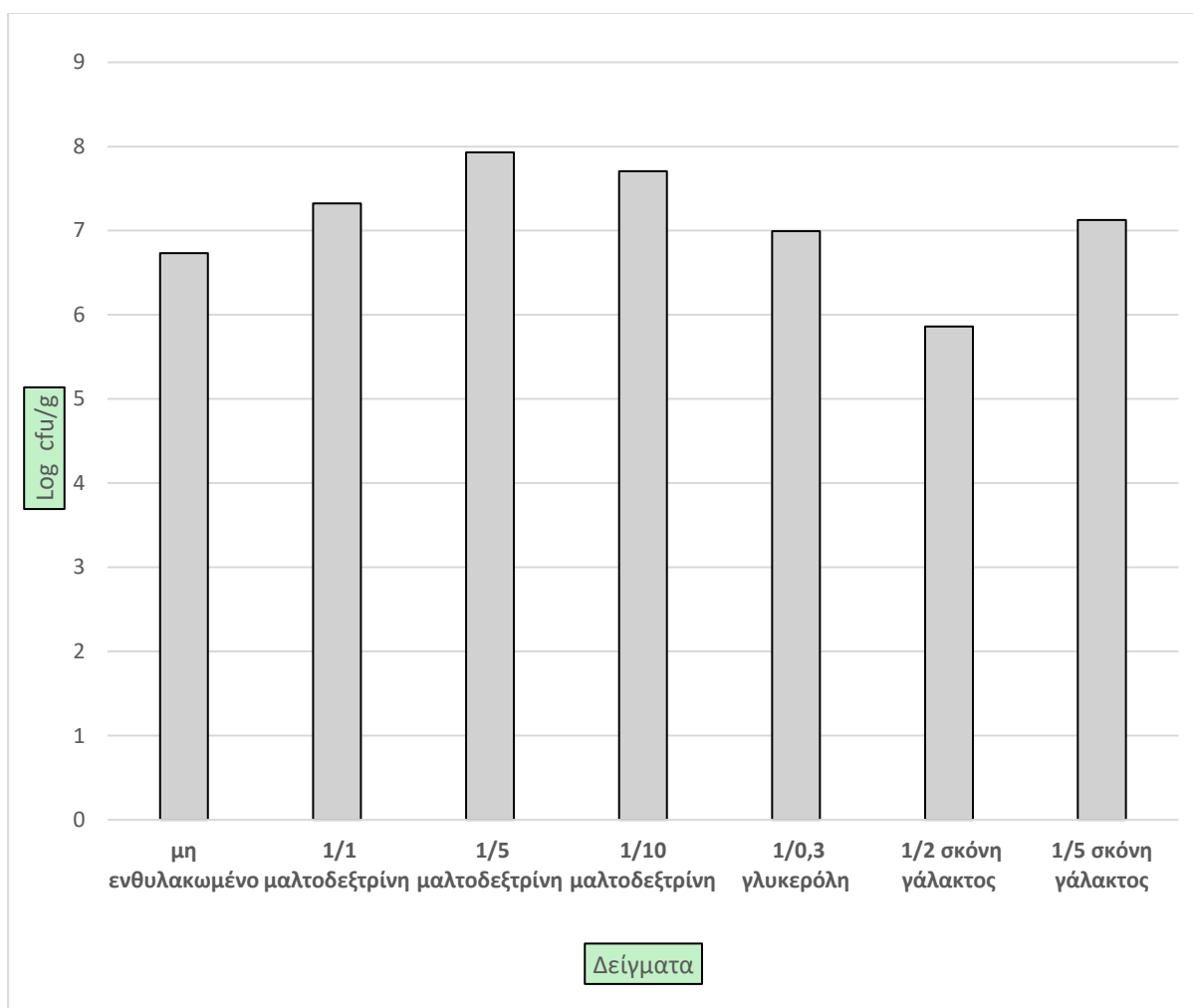
Διάγραμμα 4. Πληθυσμός (log cfu/g) του *Lactobacillus plantarum* ύστερα από ξήρανση στους 45°C.

Από το **διάγραμμα 4**, λοιπόν, διεξάγεται το συμπέρασμα πως η μέθοδος ενθυλάκωσης του *Lactobacillus plantarum* με **σκόνη γάλακτος** και αναλογία ½ ήταν η καταλληλότερη, καθώς το δείγμα με ½ **σκόνη γάλακτος** παρουσιάζει αύξηση στην βιωσιμότητα του συγκεκριμένου μικροοργανισμού, μετά την ξήρανση στους 45°C, κατά 0,52 log cfu/g σε σύγκριση με το μη ενθυλακωμένο δείγμα.



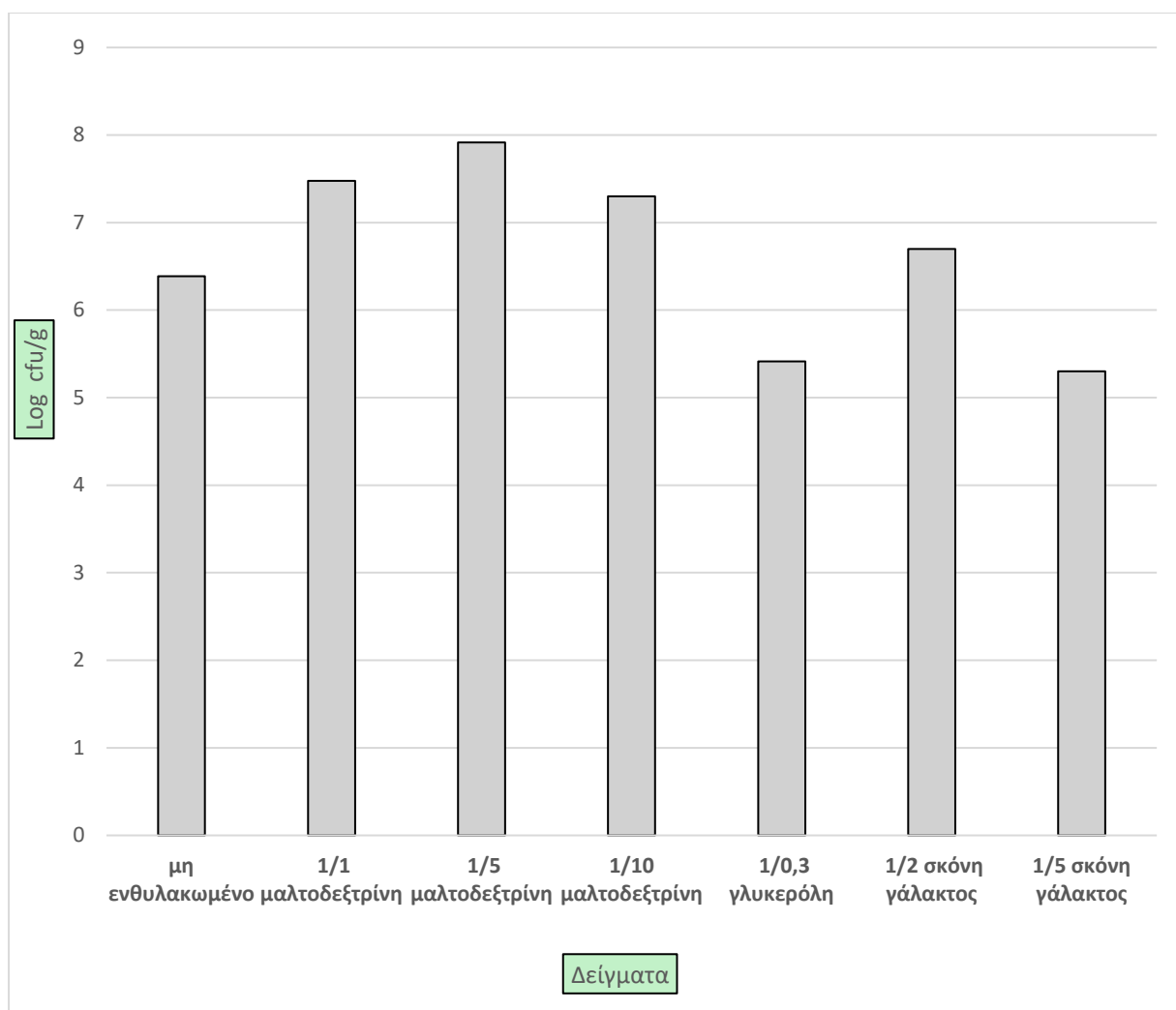
Διάγραμμα 5. Πληθυσμός (log cfu/g) του *Lactobacillus rhamnosus* ύστερα από ξήρανση στους 45°C.

Σύμφωνα με το **διάγραμμα 5**, η μέθοδος ενθυλάκωσης του *Lactobacillus rhamnosus* με **γλυκερόλη** και αναλογία **1/0,3** ήταν η αποτελεσματικότερη. Αυτό προκύπτει από το γεγονός πως στο δείγμα με **1/0,3 γλυκερόλη** παρουσιάζεται αυξημένος ο πληθυσμός του συγκεκριμένου μικροοργανισμού, μετά την ξήρανση στους 45°C, κατά 0,92 log cfu/g συγκριτικά με το μη ενθυλακωμένο δείγμα.



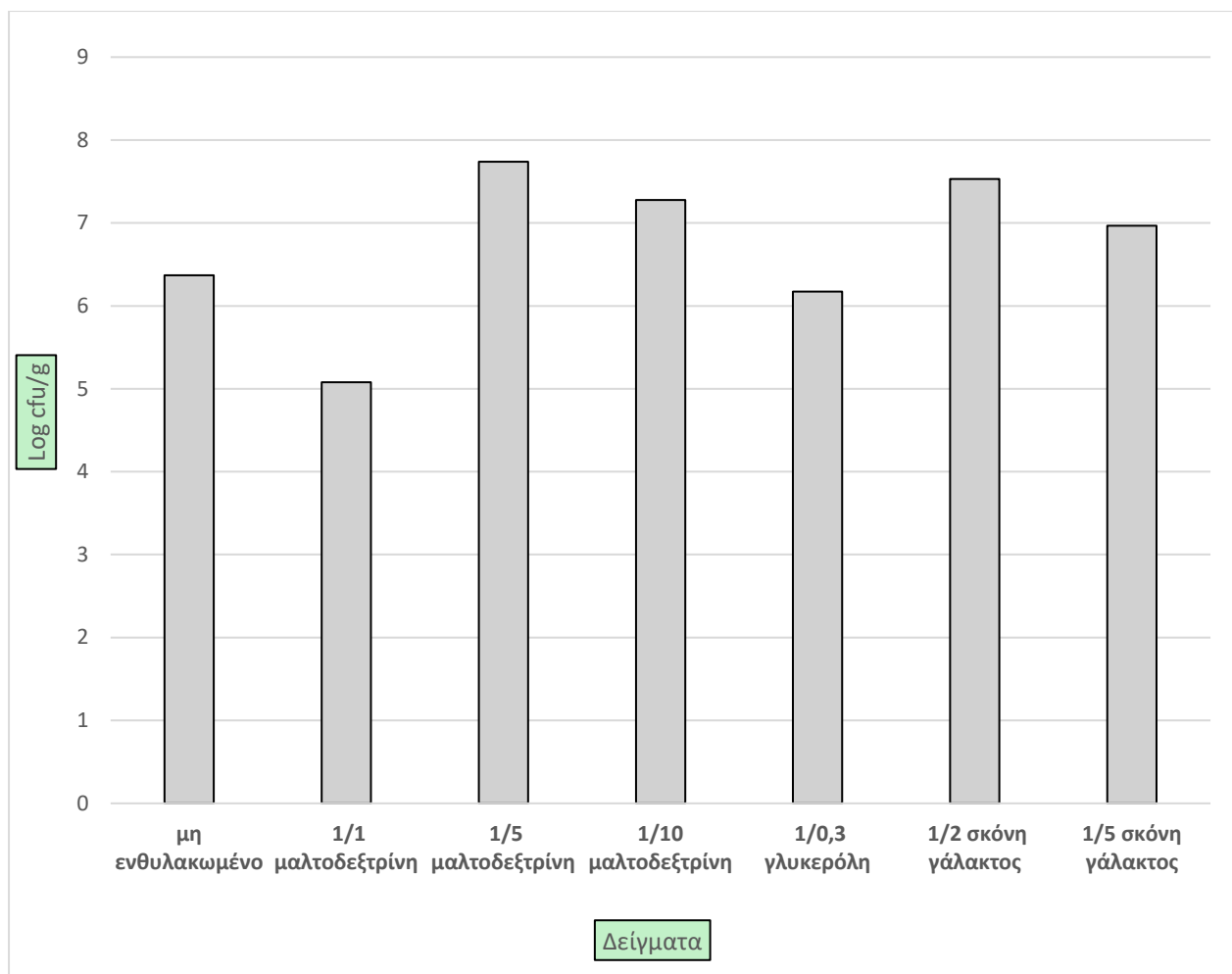
Διάγραμμα 6. Πληθυσμός (log cfu/g) του *Lactobacillus acidophilus* ύστερα από ξήρανση με λυοφιλίωση.

Στο **διάγραμμα 6** διατυπώνεται η επίδραση της λυοφιλίωσης στη βιωσιμότητα των ενθυλακωμένων και μη ενθυλακωμένων κυττάρων του *Lactobacillus acidophilus*. Σύμφωνα με **διάγραμμα 6**, λοιπόν, στο δείγμα *Lactobacillus acidophilus* με **μαλτοδεξτρίνη** και αναλογία **1/5** παρατηρείται αύξηση στον πληθυσμό του *Lactobacillus acidophilus* κατά 1,20 log cfu/g συγκριτικά με το μη ενθυλακωμένο δείγμα. Έτσι, συμπεραίνεται πως από τις 6 διαφορετικές μεθόδους ενθυλάκωσης που χρησιμοποιήθηκαν για τον *Lactobacillus acidophilus*, η ενθυλάκωση με **μαλτοδεξτρίνη 1/5** ήταν η αποτελεσματικότερη για την διατήρηση της βιωσιμότητάς του κατά την λυοφιλίωση.



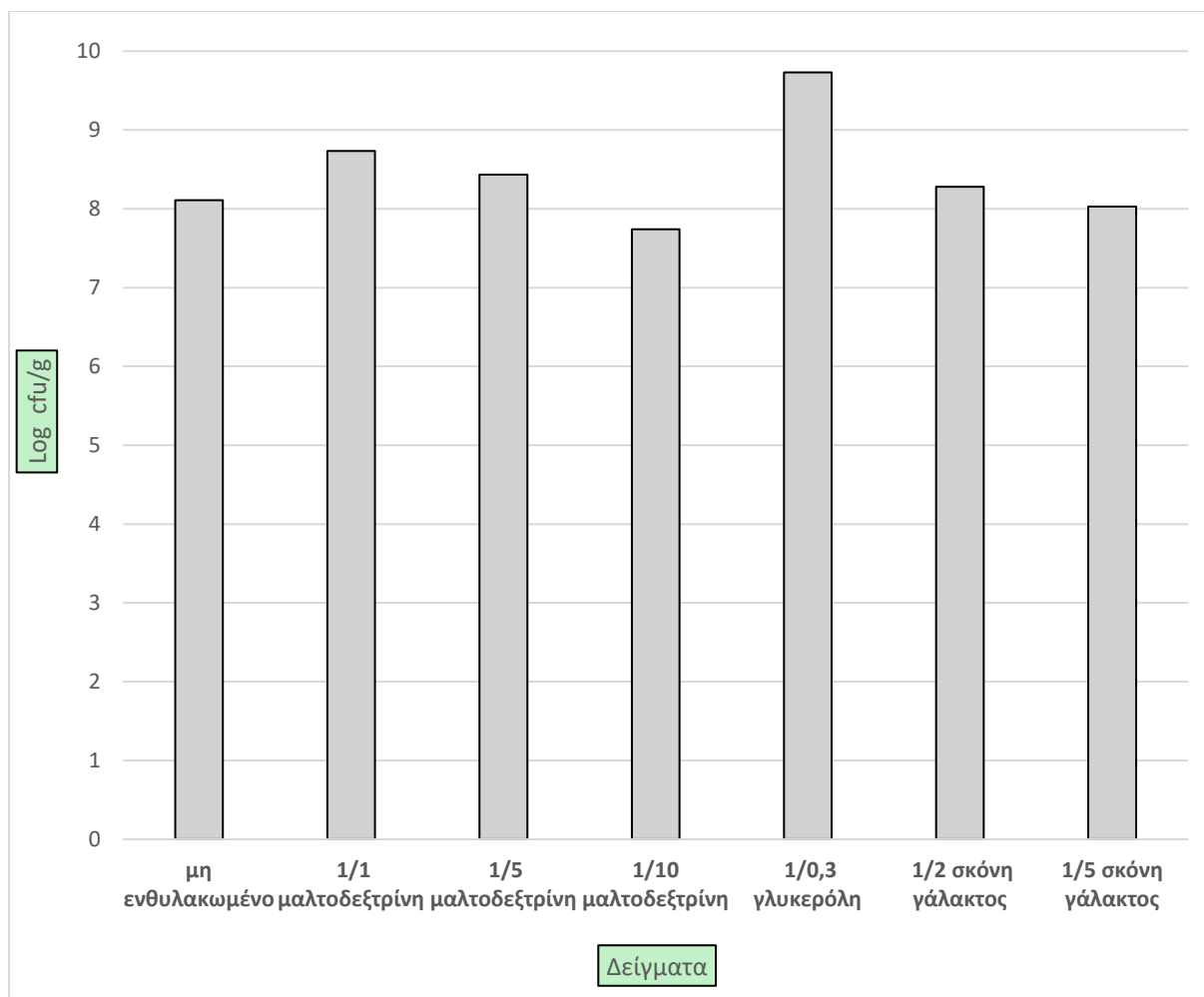
Διάγραμμα 7. Πληθυσμός (log cfu/g) του *Lactobacillus casei* ύστερα από ξήρανση με λυοφιλίωση.

Σύμφωνα με το **διάγραμμα 7**, η μέθοδος ενθυλάκωσης του *Lactobacillus casei* με **μαλτοδεξτρίνη 1/5** ήταν η αποτελεσματικότερη. Αυτό προκύπτει από το γεγονός πως το δείγμα με **μαλτοδεξτρίνη 1/5** παρουσιάζει αύξηση στην βιωσιμότητα του συγκεκριμένου μικροοργανισμού κατά 1,53 log cfu/g, μετά την λυοφιλίωση σε σύγκριση με το μη ενθυλακωμένο δείγμα.



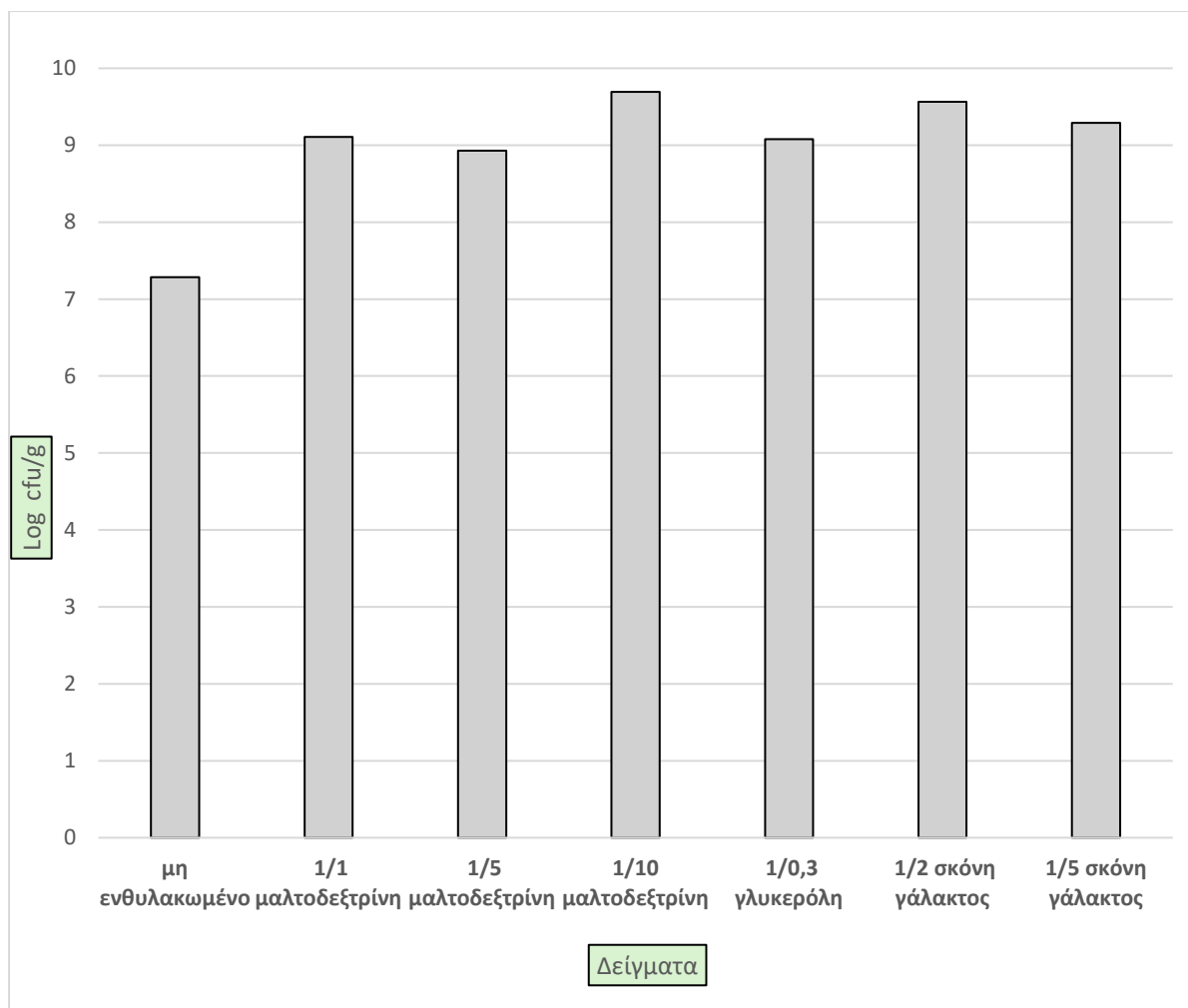
Διάγραμμα 8. Πληθυσμός (log cfu/g) του *Lactobacillus curvatus* ύστερα από ξήρανση με λυοφιλίωση.

Από το **διάγραμμα 8** διεξάγεται το συμπέρασμα πως η μέθοδος ενθυλάκωσης του *Lactobacillus curvatus* με **μαλτοδεξτρίνη** και αναλογία **1/5** ήταν η αποτελεσματικότερη, καθώς στο δείγμα με **1/5 μαλτοδεξτρίνη** παρουσιάζεται αύξηση στην βιωσιμότητα του συγκεκριμένου μικροοργανισμού κατά 1,37 log cfu/g, μετά την λυοφιλίωση, σε σύγκριση με το μη ενθυλακωμένο δείγμα



Διάγραμμα 9. Πληθυσμός (log cfu/g) του *Lactobacillus plantarum* ύστερα από ξήρανση με λυοφιλίωση.

Σύμφωνα με το **διάγραμμα 9**, το ενθυλακωμένο δείγμα *Lactobacillus plantarum* με **1/0,3 γλυκερόλη** παρουσιάζει αυξημένο πληθυσμό κατά 1,62 log cfu/g σε σύγκριση με το μη ενθυλακωμένο δείγμα. Έτσι, οδηγούμαστε στο συμπέρασμα πως από τις 6 διαφορετικές μεθόδους ενθυλάκωσης που χρησιμοποιήθηκαν για τον *Lactobacillus plantarum*, η ενθυλάκωση με **1/0,3 γλυκερόλη** ήταν η καταλληλότερη για την διατήρηση της βιωσιμότητάς του κατά την λυοφιλίωση.



Διάγραμμα 10. Πληθυσμός (log cfu/g) του *Lactobacillus rhamnosus* ύστερα από ξήρανση με λυοφιλίωση.

Σύμφωνα με το **διάγραμμα 10**, η μέθοδος ενθυλάκωσης του *Lactobacillus rhamnosus* με **μαλτοδεξτρίνη** και αναλογία **1/5** ήταν η αποτελεσματικότερη. Αυτό προκύπτει από το γεγονός πως στο δείγμα με **1/5 μαλτοδεξτρίνη** παρουσιάζεται αυξημένος ο πληθυσμός του συγκεκριμένου μικροοργανισμού, μετά από την λυοφιλίωση, κατά 2,41 log cfu/g συγκριτικά με το μη ενθυλακωμένο δείγμα.

Κεφάλαιο 5^ο- Αποτελέσματα και συζήτηση

5.1 Αποτελέσματα της ξήρανσης στους 45°C των προβιοτικών μικροοργανισμών

Μια σημαντική πρόκληση που καλείται να αντιμετωπίσει η βιομηχανία τροφίμων είναι η βελτίωση της βιωσιμότητας των προβιοτικών μικροοργανισμών κατά τις διαδικασίες παραγωγής τροφίμων με προβιοτικούς μικροοργανισμούς και ειδικότερα κατά τη διάρκεια της θερμικής τους επεξεργασίας. Λαμβάνοντας υπόψη την σπουδαιότητα της ανάπτυξης θερμοανθεκτικών προβιοτικών μικροοργανισμών για τη βιομηχανία τροφίμων και φαρμάκων, προκύπτουν δύο πρωταρχικές προσεγγίσεις για την περαιτέρω έρευνα. Η πρώτη εστιάζει στην ανακάλυψη νέων στελεχών προβιοτικών βακτηρίων, τα οποία είναι από την φύση τους ανθεκτικά σε υψηλές θερμοκρασίες ή έχουν υποστεί γενετική τροποποίηση για την αύξηση της θερμοανθεκτικότητάς τους. Η δεύτερη προσέγγιση επικεντρώνεται στην ανάπτυξη συστημάτων μικροενθυλάκωσης που μπορούν να λειτουργήσουν ως αποτελεσματικά προστατευτικά περιβλήματα για τους μικροοργανισμούς κατά την έκθεσή τους σε υψηλές θερμοκρασίες (Liu *et al.*, 2020).

Η επίδραση της ξήρανσης στους 45°C στον *Lactobacillus acidophilus* απεικονίζεται στο **διάγραμμα 1**. Από το **διάγραμμα 1**, λοιπόν, φαίνεται πως η καταλληλότερη αναλογία μαλτοδεξτρίνης για ενθυλάκωση του *Lactobacillus acidophilus*, ανάμεσα στις αναλογίες 1/1, 1/5 και 1/10, είναι η αναλογία 1/1. Ωστόσο, επειδή η διαφορά του πληθυσμού είναι μικρή ανάμεσα στα δείγματα που ενθυλακώθηκαν με διαφορετικές αναλογίες μαλτοδεξτρίνης, θα μπορούσε να θεωρηθεί ιδανική η ενθυλάκωση με **1/10 μαλτοδεξτρίνη**, καθώς με αυτόν τον τρόπο θα ήταν εφικτό να παραχθεί μεγαλύτερη ποσότητα προϊόντος, το οποίο 1 μέρος του θα αποτελούνταν από προβιοτικό μικροοργανισμό και 10 από μαλτοδεξτρίνη. Όμως, σε αυτήν την περίπτωση το προϊόν θα είχε πληθυσμό μειωμένο κατά 0,35 log cfu/g απ' ότι το προϊόν που θα παράγονταν με ενθυλάκωση με 1/1 μαλτοδεξτρίνη. Επιπλέον, η βιωσιμότητα του *Lactobacillus acidophilus* παρουσιάζεται κατά 0,17 log cfu/g χαμηλότερη στο δείγμα με 1/0,3 γλυκερόλη συγκριτικά με το μη ενθυλακωμένο δείγμα. Τέλος, η ενθυλάκωση με **½ σκόνη γάλακτος** αποδίδει τον μεγαλύτερο

πληθυσμό μετά την λυοφιλίωση των δειγμάτων και σε σύγκριση με τη μέθοδο ενθυλάκωσης με 1/5 σκόνη γάλακτος παρουσιάζει μεγαλύτερο πληθυσμό κατά 1,07 log cfu/g. Η σημαντική αυτή μείωση του πληθυσμού στο δείγμα με 1/5 σκόνη γάλακτος μπορεί να οφείλεται στο γεγονός πως η σκόνη γάλακτος αραιώνει τα βακτηριακά κύτταρα. Το ίδιο παρατηρείται και στη χρήση μεγαλύτερης ποσότητας μαλτοδεξτρίνης, η οποία, επίσης, αραιώνει τα κύτταρα του μικροοργανισμού.

Σύμφωνα με το **διάγραμμα 2**, η ξήρανση στους 45°C σε συνδυασμό με τη ενθυλάκωση του *Lactobacillus casei* με μαλτοδεξτρίνη και αναλογίες 1/1, 1/5 και 1/10 φαίνεται να μείωσε τον πληθυσμό του σε σύγκριση με το μη ενθυλακωμένο δείγμα κατά 0,26 log cfu/g , 0,56 log cfu/g και 0,5 log cfu/g, αντιστοίχως. Επιπρόσθετα, η ενθυλάκωση με 1/0,3 γλυκερόλη δείχνει να ενισχύει την βιωσιμότητα του *Lactobacillus casei*, καθώς το συγκεκριμένο δείγμα έχει πληθυσμό υψηλότερο κατά 0,26 log cfu/g από το μη ενθυλακωμένο δείγμα. Τέλος, όπως παρατηρήθηκε και για τον *Lactobacillus acidophilus*, η ενθυλάκωση του *Lactobacillus casei* με **½ σκόνη γάλακτος** αποτελεί την καταλληλότερη μέθοδο για τον συγκεκριμένο μικροοργανισμό.

Το **διάγραμμα 3**, που αντιστοιχεί στα αποτελέσματα της ξήρανσης στους 45°C του *Lactobacillus curvatus*, δείχνει πως η ενθυλάκωσή του με 1/1 μαλτοδεξτρίνη και 1/5 μαλτοδεξτρίνη δίνει σχεδόν ίδια αποτελέσματα με το μη ενθυλακωμένο δείγμα. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει πως ο *Lactobacillus curvatus* θα μπορούσε να ενθυλακωθεί με 1/5 μαλτοδεξτρίνη αποδίδοντας πληθυσμό που θα απέδιδε και ένα μη ενθυλακωμένο δείγμα αλλά ταυτόχρονα θα παράγονταν μεγαλύτερη ποσότητα προϊόντος. Η ενθυλάκωση με 1/0,3 γλυκερόλη φαίνεται να μην συμβάλει αποτελεσματικά στην βιωσιμότητα του *Lactobacillus curvatus* διότι ο πληθυσμός αυτού του δείγματος είναι 1,89 log cfu/g χαμηλότερος από το δείγμα που δεν έχει ενθυλακωθεί. Τέλος, για ακόμη μία φορά η μέθοδος της ενθυλάκωσης με **½ σκόνη γάλακτος** εμφανίζεται ως η πιο αποτελεσματική και από τις 6.

Το **διάγραμμα 4** απεικονίζει τα αποτελέσματα της ξήρανσης στους 45°C του *Lactobacillus plantarum*. Σύμφωνα με το **διάγραμμα 4**, λοιπόν, η ενθυλάκωση του *Lactobacillus plantarum* με 1/10 μαλτοδεξτρίνη αραιώνει σε μεγάλο βαθμό τα κύτταρα του μικροοργανισμού και αυτό φαίνεται από το χαμηλό πληθυσμό που

παρουσιάζει το συγκεκριμένο δείγμα. Συμπερασματικά, όσον αφορά την χρήση της **μαλτοδεξτρίνης** ως φορέα ενθυλάκωσης, η αναλογία **1/1** είναι η καταλληλότερη. Εν κατακλείδι, ανάμεσα στην ενθυλάκωση με ½ σκόνη γάλακτος και με 1/10 σκόνη γάλακτος, η αποτελεσματικότερη είναι η πρώτη καθώς αποδίδει κατά 0,52 log cfu/g υψηλότερο πληθυσμό απ' ότι το μη ενθυλακωμένο δείγμα.

Τα αποτελέσματα της ξήρανσης στους 45°C του *Lactobacillus rhamnosus* αναπαρίστανται στο **διάγραμμα 5** και με βάση αυτό η ενθυλάκωση με **1/0,3 γλυκερόλη** είναι η αποτελεσματικότερη μέθοδος και από τις 6 για τον *Lactobacillus rhamnosus*. Αυτό αποδεικνύεται από το γεγονός ότι το δείγμα με 1/0,3 γλυκερόλη παρουσιάζει πληθυσμό υψηλότερο κατά 0,92 log cfu/g από το μη ενθυλακωμένο δείγμα. Επίσης, σχετικά με τις αναλογίες που χρησιμοποιήθηκαν στην ενθυλάκωση με μαλτοδεξτρίνη, η 1/1 εντοπίζεται ως η καταλληλότερη. Τέλος, όσον αφορά την ενθυλάκωση με σκόνη γάλακτος από το διάγραμμα γίνεται κατανοητό πως η ενθυλάκωση με **1/5 σκόνη γάλακτος** είναι πιο ιδανική, σε σύγκριση με την ενθυλάκωση με ½ σκόνη γάλακτος, για τη διατήρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων κατά την ξήρανση. Αυτό επιβεβαιώνεται από τις τιμές του πληθυσμού, με το ενθυλακωμένο δείγμα με 1/5 σκόνη γάλακτος να εμφανίζει 1,73 log cfu/g υψηλότερο πληθυσμό απ' ότι το δείγμα με ½ σκόνη γάλακτος.

5.2 Αποτελέσματα της λυοφιλίωσης των προβιοτικών μικροοργανισμών

Στο **διάγραμμα 6** απεικονίζεται η επίδραση της λυοφιλίωσης στον *Lactobacillus acidophilus*. Από το **διάγραμμα 6**, λοιπόν, φαίνεται πως η καταλληλότερη αναλογία **μαλτοδεξτρίνης** για ενθυλάκωση του *Lactobacillus acidophilus*, ανάμεσα στις αναλογίες 1/1, 1/5 και 1/10, είναι η **αναλογία 1/5**. Ωστόσο, επειδή η διαφορά του πληθυσμού είναι μικρή ανάμεσα στα δείγματα που ενθυλακώθηκαν με αναλογίες μαλτοδεξτρίνης 1/5 και 1/10, θα μπορούσε να θεωρηθεί ιδανική η ενθυλάκωση με 1/10 μαλτοδεξτρίνη, καθώς με αυτόν τον τρόπο θα μπορούσε να παραχθεί μεγαλύτερη ποσότητα προϊόντος, το οποίο 1 μέρος του θα αποτελούνταν από προβιοτικό μικροοργανισμό και 10 από μαλτοδεξτρίνη. Όμως, στην συγκεκριμένη περίπτωση το προϊόν θα είχε πληθυσμό μειωμένο κατά 0,22 log

cfu/g απ' ότι το προϊόν που θα παράγονταν με ενθυλάκωση με 1/5 μαλτοδεξτρίνη. Επιπλέον, η βιωσιμότητα του *Lactobacillus acidophilus* παρουσιάζεται κατά 0,26 log cfu/g υψηλότερη στο δείγμα με 1/0,3 γλυκερόλη συγκριτικά με το μη ενθυλακωμένο δείγμα. Τέλος, η ενθυλάκωση με **1/5 σκόνη γάλακτος** σε σύγκριση με τη μέθοδο ενθυλάκωσης με ½ σκόνη γάλακτος παρουσιάζει μεγαλύτερο πληθυσμό κατά 1,26 log cfu/g. Στην περίπτωση του *Lactobacillus acidophilus*, λοιπόν, η μεγαλύτερη ποσότητα σκόνη γάλακτος φαίνεται να συμβάλλει θετικά στην βιωσιμότητά του.

Σύμφωνα με το **διάγραμμα 7**, η λυοφιλίωση του *Lactobacillus casei* σε συνδυασμό με τη ενθυλάκωσή του με μαλτοδεξτρίνη και αναλογίες 1/1, 1/5 και 1/10 φαίνεται να αύξησε τον πληθυσμό του σε σύγκριση με το μη ενθυλακωμένο δείγμα κατά 1,09 log cfu/g , 1,53 log cfu/g και 0,92 log cfu/g, αντιστοίχως. Σύμφωνα, με τα παραπάνω η ενθυλάκωση του *Lactobacillus casei* με **1/5 μαλτοδεξτρίνη** είναι η αποτελεσματικότερη μέθοδος για την ενθυλάκωση και την λυοφιλίωσή του, σε σύγκριση με τις υπόλοιπες αναλογίες μαλτοδεξτρίνης/νωπό βάρος κυττάρων. Ακόμη, η ενθυλάκωση με 1/0,3 γλυκερόλη δείχνει να επηρεάζει αρνητικά την βιωσιμότητα του *Lactobacillus casei*, καθώς το συγκεκριμένο δείγμα παρουσιάζει πληθυσμό χαμηλότερο κατά 0,97 log cfu/g από το μη ενθυλακωμένο δείγμα.

Το **διάγραμμα 8**, που αντιστοιχεί στα αποτελέσματα της λυοφιλίωσης του *Lactobacillus curvatus*, δείχνει πως η ενθυλάκωσή του με 1/1 μαλτοδεξτρίνη επηρέασε αρνητικά τον βιωσιμότητά τους καθώς το συγκεκριμένο δείγμα παρουσιάζει μειωμένο πληθυσμό κατά 1,29 log cfu/g από το μη ενθυλακωμένο δείγμα. Επιπροσθέτως, η λυοφιλίωση του σε συνδυασμό με τη ενθυλάκωσή του με μαλτοδεξτρίνη και αναλογίες 1/5 και 1/10 φαίνεται να αύξησε τον πληθυσμό του σε σύγκριση με το μη ενθυλακωμένο δείγμα κατά 1,37 log cfu/g και 0,91 log cfu/g, αντιστοίχως. Η ενθυλάκωση του με 1/0,3 γλυκερόλη φαίνεται να μην συμβάλει αποτελεσματικά στην βιωσιμότητα του διότι ο πληθυσμός αυτού του δείγματος είναι 0,20 log cfu/g χαμηλότερος από το δείγμα που δεν έχει ενθυλακωθεί. Τέλος, για η μέθοδος της ενθυλάκωσης με ½ **σκόνη γάλακτος** εμφανίζεται πιο αποτελεσματική απ' ότι η μέθοδος ενθυλάκωσης με 1/5 σκόνη γάλακτος. Όπως αποδεικνύει και το **διάγραμμα 8** η βιωσιμότητα του *Lactobacillus* παρουσιάζεται κατά 0,89 log cfu/g και

0,39 log cfu/g υψηλότερη στο δείγμα με ½ σκόνη γάλακτος 1/5 σκόνη γάλακτος, αντιστοίχως, συγκριτικά με το μη ενθυλακωμένο δείγμα

Το **διάγραμμα 9** απεικονίζει τα αποτελέσματα της λυοφιλίωσης του *Lactobacillus plantarum*. Σύμφωνα με το **διάγραμμα 9**, όσον αφορά την χρήση της **μαλτοδεξτρίνης** ως φορέα ενθυλάκωσης, η αναλογία **1/1** είναι η καταλληλότερη ανάμεσα στις αναλογίες 1/1, 1/5 και 1/10 καθώς το συγκεκριμένο δείγμα παρουσιάζει πληθυσμό κατά 0,62 log cfu/g υψηλότερο από το μη ενθυλακωμένο δείγμα. Επιπρόσθετα, ο πληθυσμός του *Lactobacillus plantarum* εμφανίζεται κατά 0,32 log cfu/g υψηλότερος από το δείγμα που έχει λυοφιλιωθεί αλλά δεν έχει ενθυλακωθεί. Τέλος, ανάμεσα στην ενθυλάκωση με ½ σκόνη γάλακτος και με 1/5 σκόνη γάλακτος, η αποτελεσματικότερη είναι η πρώτη καθώς αποδίδει κατά 1,17 log cfu/g υψηλότερο πληθυσμό απ' ότι το μη ενθυλακωμένο δείγμα. Ωστόσο, και το δείγμα 1/5 σκόνη γάλακτος παρουσιάζει 0,08 log cfu/g υψηλότερο πληθυσμό απ' ότι το μη ενθυλακωμένο δείγμα δείχνοντας πως και με αυτήν την μέθοδο θα βελτιωθεί η βιωσιμότητα του *Lactobacillus plantarum* ύστερα από την λυοφιλίωση και ταυτόχρονα θα παραχθεί μεγαλύτερη ποσότητα προϊόντος.

Τα αποτελέσματα της λυοφιλίωσης του *Lactobacillus rhamnosus* αναπαρίστανται στο **διάγραμμα 10** και με βάση αυτό η ενθυλάκωση με **1/0,3 γλυκερόλη** είναι η αποτελεσματικότερη μέθοδος και από τις 6 για τον *Lactobacillus rhamnosus*. Αυτό αποδεικνύεται από το γεγονός ότι το δείγμα με 1/0,3 γλυκερόλη παρουσιάζει πληθυσμό υψηλότερο κατά 1,62 log cfu/g από το μη ενθυλακωμένο δείγμα. Επίσης, σχετικά με τις αναλογίες που χρησιμοποιήθηκαν στην ενθυλάκωση με μαλτοδεξτρίνη, η 1/1 εντοπίζεται ως η καταλληλότερη, καθώς το συγκεκριμένο δείγμα παρουσιάζει πληθυσμό υψηλότερο κατά 0,62 log cfu/g από το μη ενθυλακωμένο δείγμα. Τέλος, όσον αφορά την ενθυλάκωση με σκόνη γάλακτος από το **διάγραμμα 10** αποδεικνύεται πως η ενθυλάκωση με **1/2 σκόνη γάλακτος** είναι πιο κατάλληλη, σε σύγκριση με την ενθυλάκωση με 1/5 σκόνη γάλακτος, για τη διατήρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων κατά την λυοφιλίωση. Ωστόσο, σύμφωνα με τις τιμές του πληθυσμού, το ενθυλακωμένο δείγμα με ½ σκόνη γάλακτος εμφανίζει 0,25 log cfu/g υψηλότερο πληθυσμό απ' ότι το δείγμα με 1/5 σκόνη γάλακτος. Γίνεται εμφανές πως δεν υπάρχει μεγάλη διαφορά στις τιμές του πληθυσμού ανάμεσα στις

δύο μεθόδους και έτσι ως καταλληλότερη από τις δύο μπορεί να θεωρηθεί η ενθυλάκωση με **1/5 σκόνη γάλακτος** με σκοπό την παραγωγή μεγαλύτερης ποσότητας προϊόντος.

Κεφάλαιο 6ο- Συμπεράσματα

Τα τελευταία χρόνια, η βιομηχανία τροφίμων παράγει μεγαλύτερο αριθμό προϊόντων που περιέχουν προβιοτικά. Αυτό οφείλεται στην αυξανόμενη ευαισθητοποίηση των καταναλωτών σχετικά με την υγιεινή διατροφή και τα οφέλη από την κατανάλωση προβιοτικών βακτηρίων. Ωστόσο, μία από τις κύριες προκλήσεις που αντιμετωπίζει η βιομηχανία τροφίμων είναι να διασφαλίσει ότι τα προϊόντα θα παρουσιάζουν επαρκή αριθμό βιώσιμων βακτηριακών κυττάρων καθ' όλη τη διάρκεια ζωής τους. Η χρήση τεχνικών ενθυλάκωσης των προβιοτικών βακτηρίων φαίνεται να ενισχύει τη διατήρηση της βιωσιμότητας τους κατά την επεξεργασία και αποθήκευση τους. Ωστόσο, επιβάλλεται να επιλέγονται κατάλληλα υλικά ενθυλάκωσης, ώστε να διασφαλίζεται η καλύτερη δυνατή προστασία των βακτηρίων χωρίς να διακυβεύονται τα η ασφάλεια και τα χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος (Chávarri *et al.*, 2012).

Στην παρούσα εργασία εξετάστηκαν διάφορα συστήματα προστασίας προβιοτικών μικροοργανισμών που είχαν ως βάση την τεχνική της ενθυλάκωσης. Κύριος στόχος ήταν να εξεταστεί η ικανότητα διαφόρων μεθόδων ενθυλάκωσης να διασφαλίσουν τη βιωσιμότητα προβιοτικών στελεχών, υπό συνθήκες υψηλών θερμοκρασιών και διεργασιών, όπως η ξήρανση και η λυοφιλίωση, οι οποίες συχνά χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του πειράματος, όσον αφορά τη μέθοδο της **ξηράνσης με θερμό αέρα στους 45°C**, η **καταλληλότερη τεχνική ενθυλάκωσης** είναι η ενθυλάκωση με **½ σκόνη γάλακτος**. Αναλυτικότερα, τα δείγματα των *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus curvatus* και *Lactobacillus plantarum* που ενθυλακώθηκαν με ½ σκόνη γάλακτος και έπειτα ξηράνθηκαν με θερμό αέρα στους 45°C, παρουσίασαν τον μεγαλύτερο πληθυσμό σε σύγκριση με τα υπόλοιπα δείγματα του κάθε μικροοργανισμού. Οι πρωτεΐνες που περιέχονται στη σκόνη γάλακτος λειτούργησαν ως γαλακτωματοποιητικοί παράγοντες σχηματίζοντας μεμβράνες, οι οποίες με τη σειρά τους προστάτεψαν τα προβιοτικά κύτταρα από την υψηλή θερμοκρασία που εκτέθηκαν. Παράλληλα, η σκόνη γάλακτος έδρασε δεσμεύοντας υγρασία και βοηθώντας με αυτόν τον τρόπο πρόληψη της αφυδάτωσης

των προβιοτικών κυττάρων. Επιπρόσθετα, ο Sheu και ο Rosenberg (1998) πρότειναν τη χρήση της πρωτεΐνης ορού γάλακτος σε συνδυασμό με υδατάνθρακες. Το 2020 οι Bhagwat *et al.* μελέτησαν την ενθυλάκωση σε συνδυασμό με την ξήρανση με ψεκασμό προβιοτικών σκονών που περιείχαν στελέχη εντερόκοκκου. Αναλυτικότερα, χρησιμοποίησαν μείγμα πρωτεϊνών-υδατανθράκων για τη ενθυλάκωση των προβιοτικών μικροοργανισμών με αποτέλεσμα να εξασφαλίσουν καλύτερη επιβίωση τους κατά τη διάρκεια της ξήρανσης με ψεκασμό (Bhagwat *et al.*, 2020). Επιπρόσθετα, ο *Lactobacillus rhamnosus* ήταν ο μοναδικός που παρουσίασε **υψηλότερο πληθυσμό** ύστερα από την ενθυλάκωσή του με **1/0,3 γλυκερόλη**. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι η γλυκερόλη συνέλαβε στη διατήρηση της ωσμωτικής ισορροπίας μέσα στα κύτταρα του *Lactobacillus rhamnosus*, αποτρέποντας την αφυδάτωση και διατηρώντας την κυτταρική τους δομή και λειτουργία.

Στην περίπτωση της **ξήρανσης με λυοφιλίωση** των προβιοτικών μικροοργανισμών που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα, αποδείχθηκε πως η ενθυλάκωση με **1/5 μαλτοδεξτρίνη** ήταν η πιο **αποτελεσματική** για την πλειοψηφία των μικροοργανισμών. Συμπερασματικά, η μαλτοδεξτρίνη έδρασε ως κρυοπροστατευτικό μέσο και ταυτόχρονα δημιούργησε ένα μικροπεριβάλλον γύρω από τους προβιοτικούς μικροοργανισμούς που βοήθησε στην προστασία τους από τις χαμηλές θερμοκρασίες της λυοφιλίωσης. Ωστόσο, στο πείραμα παρατηρήθηκε πως η χρήση της μαλτοδεξτρίνης αλλά σε μεγαλύτερη αναλογία, συγκεκριμένα 1 μέρος νωπού βάρους κυττάρων προς 10 μέρη μαλτοδεξτρίνης, επηρέασε αρνητικά την βιωσιμότητα των περισσότερων προβιοτικών μικροοργανισμών και μείωσε αισθητά τον πληθυσμό σε σύγκριση με τα μη ενθυλακωμένα δείγματα. Αυτό αποδεικνύει πως δεν αρκεί μόνο να επιλεχθεί το κατάλληλο μέσο ενθυλάκωσης για τον κάθε μικροοργανισμό, αλλά αντιθέτως θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί και στην κατάλληλη αναλογία ώστε να μην οδηγήσει σε αντίθετα αποτελέσματα από τα επιθυμητά. Επιπλέον, σε πολλές περιπτώσεις προβιοτικών μικροοργανισμών ενδείκνυται η χρήση του συστήματος της διπλής ενθυλάκωσης, το οποίο ενισχύει τη βιωσιμότητα τους. Ειδικότερα, ο Sohail *et al* μελέτησαν την βιωσιμότητα των *Lactobacillus rhamnosus* GG και *Lactobacillus acidophilus* NCFM μετά από διπλή ενθυλάκωση σε αλγινικό και μαλτοδεξτρίνη. Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης έρευνας έδειξαν

πως η βιωσιμότητα των κυττάρων διατηρήθηκε περισσότερο στα δείγματα που ενθυλακώθηκαν με μαλτοδεξτρίνη και αλγινικό, απ' ότι στα δείγματα που χρησιμοποιήθηκε μόνο η μαλτοδεξτρίνη, ή μόνο το αλγινικό ως μέσο ενθυλάκωσης (Sohail *et al.*, 2013). Επιπρόσθετα, σύμφωνα με αποτελέσματα έρευνας η δράση της μαλτοδεξτρίνης, κατά την χρήση της στην ενθυλάκωση προβιοτικής ζύμης, μπορεί να ενισχυθεί μέσω της προσθήκης συμπληρωμάτων σακχαρόζης και σορβιτόλης. Εν κατακλείδι, αποδείχθηκε πως 2% σακχαρόζη και σορβιτόλη βελτίωσαν τη βιωσιμότητα της ζύμης κατά την ξήρανση με ψεκασμό (Suryabhan *et al.*, 2019).

Βιβλιογραφικές Αναφορές

- Abadias, M., Benabarre, A., Teixidó, N., Usall, J., & Vinas, I. (2001). Effect of freeze drying and protectants on viability of the biocontrol yeast *Candida sake*. *International journal of food microbiology*, 65(3), 173-182.
- Abatenh, E. (2018). Health-benefits-of-probiotics. Environmental microbiology View project enviromental study View project. *J Bacteriol Infec Dis* (Vol. 2). 1999).
- Abdel-Rahman, M. A., Tashiro, Y., & Sonomoto, K. (2013). Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. *Biotechnology advances*, 31(6), 877-902.
- Alkalbani, N. S., Osaili, T. M., Al-Nabulsi, A. A., Olaimat, A. N., Liu, S. Q., Shah, N. P., ... & Ayyash, M. M. (2022). Assessment of yeasts as potential probiotics: A review of gastrointestinal tract conditions and investigation methods. *Journal of Fungi*, 8(4), 365.
- Anal, A. K., & Singh, H. (2007). Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in food science & technology*, 18(5), 240-251.
- Ananta, E., Volkert, M., & Knorr, D. (2005). Cellular injuries and storage stability of spray-dried *Lactobacillus rhamnosus* GG. *International dairy journal*, 15(4), 399-409.
- Andersson, D. I., & Hughes, D. (2011). Persistence of antibiotic resistance in bacterial populations. *FEMS microbiology reviews*, 35(5), 901-911.
- Aragon-Alegro, L. C., Alegro, J. H. A., Cardarelli, H. R., Chiu, M. C., & Saad, S. M. I. (2007). Potentially probiotic and synbiotic chocolate mousse. *LWT-Food Science and technology*, 40(4), 669-675.
- Arenahalli Ningegowda, M., & Siddalingaiya Gurudutt, P. (2012). In vitro fermentation of prebiotics by *Lactobacillus plantarum* CFR 2194: selectivity, viability and effect of metabolites on β -glucuronidase activity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28, 901-908.

- Arévalo-Villena, M., Fernandez-Pacheco, P., Castillo, N., Bevilacqua, A., & Pérez, A. B. (2018). Probiotic capability in yeasts: Set-up of a screening method. *Lwt*, 89, 657-665.
- Asghar, S., Arif, M., Nawaz, M., Muhammad, K., Ali, M. A., Ahmad, M. D., ... & Nazir, J. (2016). Selection, characterisation and evaluation of potential probiotic *Lactobacillus* spp. isolated from poultry droppings. *Beneficial Microbes*, 7(1), 35-44.
- B.D., Tsakalidou, E.,(2015). Discovering probiotic microorganisms: in vitro, in vivo,
- Banjara, N., Suhr, M. J., & Hallen-Adams, H. E. (2015). Diversity of yeast and mold species from a variety of cheese types. *Current microbiology*, 70, 792-800.
- Barbaree, J. M., & Sanchez, A. (1982). Cross-contamination during lyophilization. *Cryobiology*, 19(4), 443-447.
- Bhagwat, A., Bhushette, P., & Annapure, U. S. (2020). Spray drying studies of probiotic *Enterococcus* strains encapsulated with whey protein and maltodextrin. *Beni-Suef university journal of basic and applied sciences*, 9, 1-8.
- Boza-Méndez, E., López-Calvo, R., & Cortés-Muñoz, M. (2012). Innovative dairy products development using probiotics: challenges and limitations. *Tech Costa Rica*, 10, 213-36.
- Brennan, M., Wanismail, B., Johnson, M. C., & Ray, B. (1986). Cellular damage in dried *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Food Protection*, 49(1), 47-53.
- Broadbent, J. R., McMahon, D. J., Welker, D. L., Oberg, C. J., & Moineau, S. (2003). Biochemistry, genetics, and applications of exopolysaccharide production in *Streptococcus thermophilus*: a review. *Journal of dairy science*, 86(2), 407-423.
- Broeckx, G., Vandenheuvel, D., Claes, I. J., Lebeer, S., & Kiekens, F. (2016). Drying techniques of probiotic bacteria as an important step towards the development of novel pharmabiotics. *International journal of pharmaceutics*, 505(1-2), 303-318.

- Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M., & Scher, J. (2011). Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of food engineering*, 104(4), 467-483.
- Cao, L., Lu, W., Mata, A., Nishinari, K., & Fang, Y. (2020). Egg-box model-based gelation of alginate and pectin: A review. *Carbohydrate polymers*, 242, 116389.
- Carvalho, A. S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F. X., & Gibbs, P. (2004). Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 14(9), 835-847.
- Carvalho, A. S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F. X., & Gibbs, P. (2002). Effect of additives on survival of freeze-dried *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* during storage. *Biotechnology Letters*, 24(17), 1587-1591.
- Castro, H. P., Teixeira, P. M., & Kirby, R. (1997). Evidence of membrane damage in *Lactobacillus bulgaricus* following freeze drying. *Journal of Applied Microbiology*, 82(1), 87-94.
- Chaikham, P. (2015). Stability of probiotics encapsulated with Thai herbal extracts in fruit juices and yoghurt during refrigerated storage. *Food Bioscience*, 12, 61-66.
- Champagne, C. P., Detournay, H., & Hardy, M. J. (1991). Effect of medium on growth and subsequent survival of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* to freeze-drying. *Journal of Industrial Microbiology*, 7(3-4), 147-152.
- Chávarri, M., Marañón, I., Ares, R., Ibáñez, F. C., Marzo, F., & del Carmen Villarín, M. (2010). Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. *International journal of food microbiology*, 142(1-2), 185-189.
- Chen, H. C., Lin, C. W., & Chen, M. J. (2006). The effects of freeze drying and rehydration on survival of microorganisms in kefir. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 19(1), 126-130.

- Chen, M. J., & Lin, C. W. (2005). Study of the microbial and chemical properties of goat milk kefir produced by inoculation with Taiwanese kefir grains. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 18(5), 711-715.
- Cho, S. S., & Finocchiaro, T. (2009). *Handbook of prebiotics and probiotics ingredients: health benefits and food applications*. CRC press.
- Chopra, A. S., Lordan, R., Horbańczuk, O. K., Atanasov, A. G., Chopra, I., Horbańczuk, J. O., ... & Arkells, N. (2022). The current use and evolving landscape of nutraceuticals. *Pharmacological research*, 175, 106001.
- Coles, L. T., Moughan, P. J., & Darragh, A. J. (2005). In vitro digestion and fermentation methods, including gas production techniques, as applied to nutritive evaluation of foods in the hindgut of humans and other simple stomached animals. *Animal Feed Science and Technology*, 123-124.
- Conrad, P. B., Miller, D. P., Cielenski, P. R., & De Pablo, J. J. (2000). Stabilization and preservation of *Lactobacillus acidophilus* in saccharide matrices. *Cryobiology*, 41(1), 17-24.
- Cook, M. T., Tzortzis, G., Charalampopoulos, D., & Khutoryanskiy, V. V. (2012). Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. *Journal of controlled release*, 162(1), 56-67.
- Cook, M. T., Tzortzis, G., Charalampopoulos, D., & Khutoryanskiy, V. V. (2011). Production and evaluation of dry alginate-chitosan microcapsules as an enteric delivery vehicle for probiotic bacteria. *Biomacromolecules*, 12(7), 2834-2840.
- Cutting, S. M. (2011). *Bacillus* probiotics. *Food microbiology*, 28(2), 214-220.
- Daniali, M., Nikfar, S., & Abdollahi, M. (2020). Antibiotic resistance propagation through probiotics. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 16(12), 1207-1215.
- de Almada, C. N., Almada, C. N., Martinez, R. C., & Sant'Ana, A. S. (2016). Paraprobiotics: Evidences on their ability to modify biological responses, inactivation methods and perspectives on their application in foods. *Trends in food science & technology*, 58, 96-114.

- de Melo Pereira, G. V., de Oliveira Coelho, B., Júnior, A. I. M., Thomaz-Soccol, V., & Soccol, C. R. (2018). How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria. *Biotechnology advances*, 36(8), 2060-2076.
- De Simone, C. (2022). The authenticity of probiotic foods and dietary supplements: facts and reflections from a court case. *CyTA-Journal of Food*, 20(1), 366-373.
- de Vos, P., Faas, M. M., Spasojevic, M., & Sikkema, J. (2010). Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International dairy journal*, 20(4), 292-302.
- Diniz-Mendes, L., Bernardes, E., de Araujo, P. S., & Panek, A. D. (1999). Preservation of frozen yeast cells by trehalose. *Biotechnology and Bioengineering*, 65(5), 573-578.
- dos Santos Mascarenhas, L. R., Vivoni, A. M., Caetano, R. G., Rusak, L. A., Alvarenga, V. O., & Lacerda, I. C. A. (2024). Molecular characterization and toxigenic profiles of *Bacillus cereus* isolates from foodstuff and food poisoning outbreaks in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 1-9.
- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), Koutsoumanis, K., Allende, A., Alvarez-Ordóñez, A., Bolton, D., Bover-Cid, S., ... & Herman, L. (2024). Update of the list of qualified presumption of safety (QPS) recommended microbiological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 19: Suitability of taxonomic units notified to EFSA until September 2023. *EFSA Journal*, 22(1), e8517.
- Englyst, H. N., & Cummings, J. H. (1985). Digestion of the polysaccharides of some cereal foods in the human small intestine. *The American journal of clinical nutrition*, 42(5), 778-787.
- European Food Safety Authority (EFSA). (2005). Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA related to a generic approach to the safety assessment by EFSA of microorganisms used in food/feed and the production of food/feed additives. *EFSA Journal*, 3(6), 226.
- FAO/WHO. (1977). Report joint FAO/WHO expert committee on the code of principles concerning milk and milk products. FAO/WHO, Rome.

- FAO/WHO. (2001) Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Cordoba, Argentina: Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report. in Food Science and Technology, 18(5), 240–251.
- Fedorak, R. N. (2008). Understanding why probiotic therapies can be effective in treating IBD. *Journal of clinical gastroenterology*, 42, S111-S115.
- Foligné, B., Daniel, C., & Pot, B. (2013). Probiotics from research to market: the possibilities, risks and challenges. *Current opinion in microbiology*, 16(3), 284-292.
- Fontana, L., Bermudez-Brito, M., Plaza-Diaz, J., Munoz-Quezada, S., & Gil, A. (2013). Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics. *British journal of nutrition*, 109(S2), S35-S50.
- Forssten, S. D., Sindelar, C. W., & Ouwehand, A. C. (2011). Probiotics from an industrial perspective. *Anaerobe*, 17(6), 410-413.
- Fowler, A., & Toner, M. (2006). Cryo-injury and biopreservation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1066(1), 119-135.
- Franc, N., Götmark, F., Økland, B., Nordén, B., & Paltto, H. (2007). Factors and scales potentially important for saproxylic beetles in temperate mixed oak forest. *Biological conservation*, 135(1), 86-98.
- Fu, N., & Chen, X. D. (2011). Towards a maximal cell survival in convective thermal drying processes. *Food Research International*, 44(5), 1127-1149.
- Fuller, R., (1992). History and development of probiotics. *Probiotics: The scientific basis*, 1-8.
- Gallardo, G., Guida, L., Martinez, V., López, M. C., Bernhardt, D., Blasco, R., ... & Hermida, L. G. (2013). Microencapsulation of linseed oil by spray drying for functional food application. *Food Research International*, 52(2), 473-482.
- Gbassi, G. K., Vandamme, T., Ennahar, S., & Marchioni, E. (2009). Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* spp in an alginate matrix coated with whey proteins. *International journal of food microbiology*, 129(1), 103-105.
- Ghandi, A., Powell, I. B., Howes, T., Chen, X. D., & Adhikari, B. (2012). Effect of shear rate and oxygen stresses on the survival of *Lactococcus lactis* during the

atomization and drying stages of spray drying: a laboratory and pilot scale study. *Journal of food engineering*, 113(2), 194-200.

- Ghelardi, E., Abreu y Abreu, A. T., Marzet, C. B., Álvarez Calatayud, G., Perez III, M., & Moschione Castro, A. P. (2022). Current progress and future perspectives on the use of *Bacillus clausii*. *Microorganisms*, 10(6), 1246.
- González-González, F., Delgado, S., Ruiz, L., Margolles, A., & Ruas-Madiedo, P. (2022). Functional bacterial cultures for dairy applications: Towards improving safety, quality, nutritional and health benefit aspects. *Journal of Applied Microbiology*, 133(1), 212-229.
- Gopal, V., & Dhanasekaran, D. (2021). Probiotics as a growth promotant for livestock and poultry production. In *Advances in Probiotics* (pp. 349-364). Academic Press.
- Granato, D., Branco, G. F., Nazzaro, F., Cruz, A. G., & Faria, J. A. (2010). Functional foods and nondairy probiotic food development: trends, concepts, and products. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 9(3), 292-302.
- Gueimonde, M., Sánchez, B., G. de los Reyes-Gavilán, C., & Margolles, A. (2013). Antibiotic resistance in probiotic bacteria. *Frontiers in microbiology*, 4, 202.
- Haddouchi, F., Chaouche, T. M., Zaouali, Y., Ksouri, R., Attou, A., & Benmansour, A. (2013). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from four *Ruta* species growing in Algeria. *Food chemistry*, 141(1), 253-258.
- Halder, G., Dupont, S., & Piccolo, S. (2012). Transduction of mechanical and cytoskeletal cues by YAP and TAZ. *Nature reviews Molecular cell biology*, 13(9), 591-600.
- Hempel, S., Newberry, S., Ruelaz, A., Wang, Z., Miles, J. N., Suttorp, M. J., ... & Shekelle, P. G. (2011). Safety of probiotics used to reduce risk and prevent or treat disease. *Evidence report/technology assessment*, (200), 1-645.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., ... & Sanders, M. E. (2014). The International Scientific Association for Probiotics

and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 11(8), 506-514.

- Hilty, M., Qi, W., Brugger, S. D., Frei, L., Agyeman, P., Frey, P. M., ... & Mühlemann, K. (2012). Nasopharyngeal microbiota in infants with acute otitis media. *Journal of infectious diseases*, 205(7), 1048-1055.
- Hou, R. C. W., Lin, M. Y., Wang, M. M. C., & Tzen, J. T. C. (2003). Increase of viability of entrapped cells of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* in artificial sesame oil emulsions. *Journal of Dairy Science*, 86(2), 424-428.
- Huffnagle, G. B., & Dickson, R. P. (2015). The bacterial microbiota in inflammatory lung diseases. *Clinical Immunology*, 159(2), 177-182.
- Inyang, U., Oboh, I., & Etuk, B. (2017). Drying and the different techniques. *International Journal of Food Nutrition and Safety*, 8(1), 45-72.
- Jeszka-Skowron, M., Zgoła-Grześkowiak, A., Stanisław, E., & Waśkiewicz, A. (2017). Potential health benefits and quality of dried fruits: Goji fruits, cranberries and raisins. *Food chemistry*, 221, 228-236.
- Jiang, J., Wu, C., Zhang, C., Zhao, J., Yu, L., Zhang, H., ... & Zhai, Q. (2020). Effects of probiotic supplementation on cardiovascular risk factors in hypercholesterolemia: A systematic review and meta-analysis of randomized clinical trial. *Journal of Functional Foods*, 74, 104177.
- Johnson, D. W., & Todd Jr, D. E. (1998). Harvesting effects on long-term changes in nutrient pools of mixed oak forest. *Soil science society of America journal*, 62(6), 1725-1735.
- Kailasapathy, K. (2006). Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt. *LWT-Food Science and Technology*, 39(10), 1221-1227.
- Kanamarlapudi, S. L. R. K., & Muddada, S. (2017). Characterization of exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* CC30. *BioMed research international*, 2017.

- Karathanos, V. T., & Belessiotis, V. G. (1999). Application of a thin-layer equation to drying data of fresh and semi-dried fruits. *Journal of Agricultural Engineering Research*, 74(4), 355-361.
- Kavoosi-Kalashami, M., Pourfarzad, A., Ghaibi, S., Allahyari, M. S., Surujlal, J., & Borsellino, V. (2017). Urban consumers' attitudes and willingness to pay for functional foods in Iran: A case of dietary sugar. *AIMS Agriculture & Food*, 2(3).
- Kemsawasd, V., Chaikham, P., & Rattanasena, P. (2016). Survival of immobilized probiotics in chocolate during storage and with an in vitro gastrointestinal model. *Food Bioscience*, 16, 37-43.
- Kennedy, P. J., Clarke, G., O'Neill, A., Groeger, J. A., Quigley, E. M. M., Shanahan, F., ... & Dinan, T. G. (2014). Cognitive performance in irritable bowel syndrome: evidence of a stress-related impairment in visuospatial memory. *Psychological medicine*, 44(7), 1553-1566.
- Kerry, R. G., Patra, J. K., Gouda, S., Park, Y., Shin, H. S., & Das, G. (2018). Benefaction of probiotics for human health: A review. *Journal of food and drug analysis*, 26(3), 927-939.
- Khalf, M., Dabour, N., & Fliss, I. (2010). Viability of probiotic bacteria in maple sap products under storage and gastrointestinal conditions. *Bioresource technology*, 101(20), 7966-7972.
- Kieps, J., & Dembczyński, R. (2022). Current trends in the production of probiotic formulations. *Foods*, 11(15), 2330.
- Kim, H. Y., Park, S. S., & Lim, S. T. (2015). Preparation, characterization and utilization of starch nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 126, 607-620.
- Klinjapo, R., & Krasaekoopt, W. (2018). Microencapsulation of color and flavor in confectionery products. In *Natural and Artificial Flavoring Agents and Food Dyes* (pp. 457-494). Academic Press.
- Kołożyn-Krajewska, D., & Dolatowski, Z. J. (2012). Probiotic meat products and human nutrition. *Process Biochemistry*, 47(12), 1761-1772.
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B., & Deeth, H. (2004). The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of

microencapsulated probiotic bacteria. *International dairy journal*, 14(8), 737-743.

- Krasaekoopt, W., Bhandari, B., & Deeth, H. (2004). The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. *International dairy journal*, 14(8), 737-743.
- Lee, S., Lee, J., Jin, Y. I., Jeong, J. C., Chang, Y. H., Lee, Y., ... & Kim, M. (2017). Probiotic characteristics of Bacillus strains isolated from Korean traditional soy sauce. *LWT-Food Science and Technology*, 79, 518-524.
- Lee, Y. K., & Salminen, S. (2009). *Handbook of probiotics and prebiotics*. John Wiley & Sons.
- Lemetais, G., Dupont, S., Beney, L., & Gervais, P. (2012). Air-drying kinetics affect yeast membrane organization and survival. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96, 471-480.
- Liliana, S. C., Vladimir, V. C., Serna-Cock, L., & Vallejo-Castillo, V. (2013). Probiotic encapsulation. *Afr. J. Microbiol. Res*, 7, 4743-4753.
- Liu, C. H., Wu, K., Chu, T. W., & Wu, T. M. (2018). Dietary supplementation of probiotic, Bacillus subtilis E20, enhances the growth performance and disease resistance against Vibrio alginolyticus in parrot fish (Oplegnathus fasciatus). *Aquaculture International*, 26, 63-74.
- Liu, H., Xie, M., & Nie, S. (2020). Recent trends and applications of polysaccharides for microencapsulation of probiotics. *Food frontiers*, 1(1), 45-59.
- Lodato, P., Segovia de Huergo, M., & Buera, M. P. (1999). Viability and thermal stability of a strain of Saccharomyces cerevisiae freeze-dried in different sugar and polymer matrices. *Applied microbiology and biotechnology*, 52, 215-220.
- Łukaszewicz, M. (2012). Saccharomyces cerevisiae var. boulardii–Probiotic Yeast. In *Probiotics*. IntechOpen.
- Mackowiak, P. A. (2013). Recycling Metchnikoff: Probiotics, the intestinal microbiome and the quest for long life. *Frontiers in Public Health*, 1(NOV).

- Maltesen, M. J., & Van De Weert, M. (2008). Drying methods for protein pharmaceuticals. *Drug Discovery Today: Technologies*, 5(2-3), e81-e88.
- Mavroudi, A. (2012). Probiotics in Pediatrics—Properties, Mechanisms of Action, and Indications. *Probiotics. Edited by Everlon Cid Rigobelo*, 309-324.
- McCabe W.L., Smith J.C. and Harriott P. (2001) Βασικές διεργασίες Χημικής Μηχανικής, μετ. Σ. Πολυματίδου, Εκδ. Τζιόλα, Θεσσαλονίκη, σελ. 887-930.
- Mercanti, D. J. (2021). Detection of Bacteriophages in Milk Products. In *Handbook of Dairy Foods Analysis* (pp. 465-477). CRC Press.
- Milhaud, J. (2004). New insights into water–phospholipid model membrane interactions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1663(1-2), 19-51.
- Mishra, S., & Mishra, H. N. (2012). Technological aspects of probiotic functional food development: a review. *Nutrafoods*, 11, 117-130.
- Mitropoulou, G., Nedovic, V., Goyal, A., & Kourkoutas, Y. (2013). Immobilization technologies in probiotic food production. *Journal of nutrition and metabolism*, 2013.
- Monica, K. S., & Jayaraj, E. G. (2021). Review on probiotics as a functional feed additive in aquaculture. *International journal o fisheries and aquatic sciences*.
- Mortazavi, S., & Akhlaghi, N. (2012). Salivary Streptococcus mutans and Lactobacilli levels following probiotic cheese consumption in adults: A double blind randomized clinical trial. *Journal of research in medical sciences: the official journal of Isfahan University of Medical Sciences*, 17(1), 57.
- Mortazavian, A. M., Ehsani, M. R., Mousavi, S. M., Rezaei, K., Sohrabvandi, S., & Reinheimer, J. A. (2007). Effect of refrigerated storage temperature on the viability of probiotic micro-organisms in yogurt. *International Journal of Dairy Technology*, 60(2), 123-127.
- Moses, J. A., Norton, T., Alagusundaram, K., & Tiwari, B. K. (2014). Novel drying techniques for the food industry. *Food Engineering Reviews*, 6, 43-55.
- Mowat, A. M. (2021). Historical Perspective: Metchnikoff and the intestinal microbiome. *Journal of Leucocyte Biology*, 109(3), 513-517.
- Muzzarelli, R. A., Boudrant, J., Meyer, D., Manno, N., DeMarchis, M., & Paoletti, M. G. (2012). Current views on fungal chitin/chitosan, human chitinases, food

preservation, glucans, pectins and inulin: A tribute to Henri Braconnot, precursor of the carbohydrate polymers science, on the chitin bicentennial. *Carbohydrate polymers*, 87(2), 995-1012.

- Nagpal, R., Kumar, A., Kumar, M., Behare, P. V., Jain, S., & Yadav, H. (2012). Probiotics, their health benefits and applications for developing healthier foods: a review. *FEMS microbiology letters*, 334(1), 1-15.
- Naklong, K., Therdtatha, P., Sumonsiri, N., Leksawasdi, N., Techapun, C., Rachtanapun, P., ... & Khemacheewakul, J. (2023). Microencapsulation of Bifidobacterium breve to enhance microbial cell viability in green soybean yogurt. *Fermentation*, 9(3), 296.
- Niamah, A. K., Al-Sahlany, S. T. G., Ibrahim, S. A., Verma, D. K., Thakur, M., Singh, S., ... & Utama, G. L. (2021). Electro-hydrodynamic processing for encapsulation of probiotics: A review on recent trends, technological development, challenges and future prospect. *Food Bioscience*, 44, 101458.
- Nualkaekul, S., Lenton, D., Cook, M. T., Khutoryanskiy, V. V., & Charalampopoulos, D. (2012). Chitosan coated alginate beads for the survival of microencapsulated Lactobacillus plantarum in pomegranate juice. *Carbohydrate polymers*, 90(3), 1281-1287.
- Nualkaekul, S., Salmeron, I., & Charalampopoulos, D. (2011). Investigation of the factors influencing the survival of Bifidobacterium longum in model acidic solutions and fruit juices. *Food Chemistry*, 129(3), 1037-1044.
- Ogunremi, O. R., Sanni, A. I., & Agrawal, R. J. J. O. A. M. (2015). Probiotic potentials of yeasts isolated from some cereal-based Nigerian traditional fermented food products. *Journal of Applied Microbiology*, 119(3), 797-808.
- Oliphant, C. M., & Eroschenko, K. (2015). Antibiotic resistance, part 2: gram-negative pathogens. *The Journal for Nurse Practitioners*, 11(1), 79-86.
- Pandey, K. R., Naik, S. R., & Vakil, B. V. (2015). Probiotics, prebiotics and synbiotics-a review. *Journal of food science and technology*, 52, 7577-7587.
- Panghal, A., Janghu, S., Virkar, K., Gat, Y., Kumar, V., & Chhikara, N. (2018). Potential non-dairy probiotic products—A healthy approach. *Food bioscience*, 21, 80-89.

- Perdana, J., Bereschenko, L., Fox, M. B., Kuperus, J. H., Kleerebezem, M., Boom, R. M., & Schutyser, M. A. (2013). Dehydration and thermal inactivation of *Lactobacillus plantarum* WCFS1: Comparing single droplet drying to spray and freeze drying. *Food Research International*, 54(2), 1351-1359.
- Pereira, E. P. R., Cavalcanti, R. N., Esmerino, E. A., Silva, R., Guerreiro, L. R. M., Cunha, R. L., ... & Cruz, A. G. (2016). Effect of incorporation of antioxidants on the chemical, rheological, and sensory properties of probiotic petit suisse cheese. *Journal of Dairy Science*, 99(3), 1762-1772.
- Picot, A., & Lacroix, C. (2004). Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International dairy journal*, 14(6), 505-515.
- Pimentel, T. C., Madrona, G. S., Garcia, S., & Prudencio, S. H. (2015). Probiotic viability, physicochemical characteristics and acceptability during refrigerated storage of clarified apple juice supplemented with *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* and oligofructose in different package type. *LWT-Food science and Technology*, 63(1), 415-422.
- Ragoonanan, V., & Aksan, A. (2008). Heterogeneity in desiccated solutions: implications for biostabilization. *Biophysical journal*, 94(6), 2212-2227.
- Ranadheera, C. S., Evans, C. A., Adams, M. C., & Baines, S. K. (2013). Production of probiotic ice cream from goat's milk and effect of packaging materials on product quality. *Small Ruminant Research*, 112(1-3), 174-180.
- Reiff, C., & Kelly, D. (2010). Inflammatory bowel disease, gut bacteria and probiotic therapy. *International journal of medical microbiology*, 300(1), 25-33.
- RETTGER, L. F., & CHEPLIN, H. A. (1922). *Bacillus acidophilus* and its therapeutic application. *Archives of Internal Medicine*, 29(3), 357-367.
- Rivera-Espinoza, Y., & Gallardo-Navarro, Y. (2010). Non-dairy probiotic products. *Food Microbiology* (Vol. 27, Issue 1, pp. 1–11).
- Romo-Barrera, C. M., Castrillón-Rivera, L. E., Palma-Ramos, A., Castañeda-Sánchez, J. I., & Luna-Herrera, J. (2021). *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis*, probiotics that induce the formation of macrophage extracellular traps. *Microorganisms*, 9(10), 2027.

- Rong, Y., Sillick, M., & Gregson, C. M. (2009). Determination of dextrose equivalent value and number average molecular weight of maltodextrin by osmometry. *Journal of Food Science*, 74(1), C33-C40.
- Russell, D. A., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Stanton, C. (2011). Metabolic activities and probiotic potential of bifidobacteria. *International journal of food microbiology*, 149(1), 88-105.
- Sanders, M. E., Benson, A., Lebeer, S., Merenstein, D. J., & Klaenhammer, T. R. (2018). Shared mechanisms among probiotic taxa: implications for general probiotic claims. *Current opinion in biotechnology*, 49, 207-216.
- Sarkar, S. (2010). Approaches for enhancing the viability of probiotics: a review. *British Food Journal*, 112(4), 329-349.
- Sartor, R. B., & Mazmanian, S. K. (2012). Intestinal microbes in inflammatory bowel diseases. *The American journal of gastroenterology supplements*, 1(1), 15.
- Ščetar, M., Barukčić, I., Kurek, M., Jakopović, K. L., & Božanić, R. (2019). Packaging perspective of milk and dairy products. *Dairy/Mljekarstvo*, 69(1).
- Scott, A. J., Merrifield, C. A., Younes, J. A., & Peklaring, E. P. (2018). Pre-, pro- and synbiotics in cancer prevention and treatment—a review of basic and clinical research. *Ecancermedicalscience*, 12.
- Selvamuthukumar, M. (Ed.). (2020). Applications of Membrane Technology for Food Processing Industries. CRC Press.
- Semyonov, D., Ramon, O., Kaplun, Z., Levin-Brener, L., Gurevich, N., & Shimoni, E. (2010). Microencapsulation of *Lactobacillus paracasei* by spray freeze drying. *Food Research International*, 43(1), 193-202.
- Setta, M. C., Matemu, A., & Mbega, E. R. (2020). Potential of probiotics from fermented cereal-based beverages in improving health of poor people in Africa. *Journal of Food Science and Technology*, 57, 3935-3946.
- Shahsavan, A., Pourahmad, R., & Rajaei, P. (2018). Effect of different amounts of sugar and fat on the viability of *Lactobacillus casei*, physical, chemical and sensory properties of probiotic ice cream. *International journal of biology and biotechnology*, 15(1), 63-69.

- Sharma, H., Ozogul, F., Bartkiene, E., & Rocha, J. M. (2023). Impact of lactic acid bacteria and their metabolites on the techno-functional properties and health benefits of fermented dairy products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 63(21), 4819-4841.
- Sheu, T. Y., & Rosenberg, M. (1998). Microstructure of microcapsules consisting of whey proteins and carbohydrates. *Journal of Food Science*, 63(3), 491-494.
- Silva, P. T. D., Fries, L. L. M., Menezes, C. R. D., Holkem, A. T., Schwan, C. L., Wigmann, É. F., ... & Silva, C. D. B. D. (2014). Microencapsulation: concepts, mechanisms, methods and some applications in food technology. *Ciência Rural*, 44, 1304-1311.
- Simpson, N. E., Stabler, C. L., Simpson, C. P., Sambanis, A., & Constantinidis, I. (2004). The role of the CaCl₂–guluronic acid interaction on alginate encapsulated β TC3 cells. *Biomaterials*, 25(13), 2603-2610.
- Sip, A., & Grajek, W. (2010). Probiotics and prebiotics. *Functional food product development*, 146-177.
- Sohail, A., Turner, M. S., Coombes, A., & Bhandari, B. (2013). The viability of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus acidophilus* NCFM following double encapsulation in alginate and maltodextrin. *Food and Bioprocess Technology*, 6, 2763-2769.
- Sosnik, A., & Seremeta, K. P. (2015). Advantages and challenges of the spray-drying technology for the production of pure drug particles and drug-loaded polymeric carriers. *Advances in colloid and interface science*, 223, 40-54.
- Suryabhan, P., Lohith, K., & Anu-Appaiah, K. A. (2019). Sucrose and sorbitol supplementation on maltodextrin encapsulation enhance the potential probiotic yeast survival by spray drying. *Lwt*, 107, 243-248.
- Swinbanks, D., & O'Brien, J. (1993). Japan explores the boundary between food and medicine.
- Tomar, S. K., Anand, S., Sharma, P., Sangwan, V., & Mandal, S. (2015). Role of probiotics, prebiotics, synbiotics and postbiotics in inhibition of pathogens. *The Battle against Microbial Pathogens: Basic Science*,

Technological Advances and Educational Programs; Méndez-Vilas, A., Ed, 717-732.

- Tripathi, M. K., & Giri, S. K. (2014). Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of functional foods, 9*, 225-241.
- Turkmen, N., Akal, C., & Özer, B. (2019). Probiotic dairy-based beverages: A review. *Journal of Functional Foods, 53*, 62-75.
- Vanderpool, C., Yan, F., & Polk, B. D. (2008). Mechanisms of probiotic action: implications for therapeutic applications in inflammatory bowel diseases. *Inflammatory bowel diseases, 14*(11), 1585-1596.
- Verón, H. E., Di Risio, H. D., Isla, M. I., & Torres, S. (2017). Isolation and selection of potential probiotic lactic acid bacteria from *Opuntia ficus-indica* fruits that grow in Northwest Argentina. *LWT, 84*, 231-240.
- Wendel, U. (2022). Assessing viability and stress tolerance of probiotics—a review. *Frontiers in Microbiology, 12*, 818468.
- Xu, R., Shang, N., & Li, P. (2011). In vitro and in vivo antioxidant activity of exopolysaccharide fractions from *Bifidobacterium animalis* RH. *Anaerobe, 17*(5), 226-231.
- Yousuf, B., & Mishra, A. (2019). Exploring human bacterial diversity toward prevention of infectious disease and health promotion. In *Microbial Diversity in the Genomic Era* (pp. 519-533). Academic Press.
- Zastrow, M. (2019). Energy harvesters pick up power. *Nature, 576*(7786), S38-S38.
- Zuidam, N. J., & Nedovic, V. (Eds.). (2010). *Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing* (Vol. 410). New York, NY, USA:: Springer.
- Αμαρτωλού, Α. Μ. (2023). Επίδραση του τρόπου ξήρανσης σε χυμό μανταρινιού.
- Κοτζαμανίδης, Χ. (2010). *Μοριακός και βιοχημικός χαρακτηρισμός βακτηριακών στελεχών εντερικής προέλευσης-προβιοτικές ιδιότητες και επίδρασή τους σε διάφορες ανοσοβιολογικές παραμέτρους σε ποντίκια* (Doctoral dissertation, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης)

(ΑΠΘ). Σχολή Θετικών Επιστημών. Τμήμα Βιολογίας. Τομέας Γενετικής, Ανάπτυξης και Μοριακής Βιολογίας).

- Σπηλιόπουλος, Ι. (2016). Υδατάνθρακες.