



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Μελέτη διάρκειας ζωής μη γαλακτοκομικού προβιοτικού προϊόντος με βάση τη βρώμη υπό διαφορετικές συνθήκες –
Μελέτη επαλήθευσης μεθόδου καταμέτρησης Bifidobacteria κατά ISO

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ ΓΕΩΡΓΙΑΔΗΣ, ΚΥΡΙΟΣ ΕΡΕΥΝΗΤΗΣ

ΣΠΥΡΙΔΟΥΛΑ ΜΑΝΑΤΟΥ

A.M.0072

ΑΘΗΝΑ, 2021

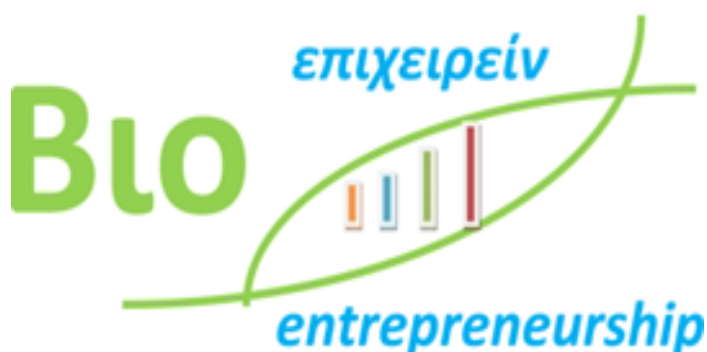


UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY



NATIONAL HELLENIC RESEARCH FOUNDATION
INSTITUTE OF CHEMICAL BIOLOGY

**INTERSTITUTIONAL PROGRAM OF POSTGRADUATE STUDIES
IN
BIOENTREPRENEURSHIP**



MASTER THESIS

A study on Non-dairy Vegan Cereal based matrix for probiotic dessert - Determination of shelf life for commercial viability of new product during storage at various conditions- Validation of enumeration ISO method of presumptive Bifidobacteria

SUPERVISOR: PANAGIOTIS GEORGIADIS, SENIOR RESEARCHER

**SPYRIDOULA MANATOU
A.M.0072
ATHENS, 2021**

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο σπουδών για την απόκτηση του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στο

ΒΙΟΕΠΙΧΕΙΡΕΙΝ

που απονέμει το Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, σε συνεργασία με την εταιρεία Γιώτης Α.Ε και το Ελληνικό Κέντρο Έρευνας και Καινοτομίας.

Εγκρίθηκε την από την τριμελή εξεταστική επιτροπή:

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ	ΒΑΘΜΙΔΑ	ΥΠΟΓΡΑΦΗ
(Επιβλέπων/ουσα) Παναγιώτης Γεωργιάδης	Κύριος Ερευνητής	
(Μέλος 1) Νικόλαος Μπαλατσός	Επίκουρος καθηγητής	
(Μέλος 2) Αιμιλία Ζίφα	Επίκουρος καθηγήτρια	

Ευχαριστίες

Στην εκπόνηση της εργασίας αυτής συνέβαλλε μια σειρά ατόμων με τον δικό της τρόπο, που σε κάθε περίπτωση θα ήθελα να ευχαριστήσω.

Αρχικά, τον επιβλέποντα καθηγητή μου, Κύριο Ερευνητή Δρ Παναγιώτη Γεωργιάδη, για την πολύτιμη βοήθεια του, την επιστημονική καθοδήγηση, αλλά και την συνεχή υποστήριξη κατά τη διάρκεια της συνεργασίας μας.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο καθηγητή Νικόλαο Μπαλατσό και την Επίκουρο καθηγήτρια Αιμιλία Ζίφα. που δέχτηκαν να είναι μέλη της τριμελούς επιτροπής για τη βοήθεια και τις γνώσεις που αποκόμισα στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος.

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε σε συνεργασία με την εταιρεία ΓΙΩΤΗΣ Α.Ε. και το Ελληνικό Κέντρο Έρευνας και Καινοτομίας (HRIC). Θα ήθελα να ευχαριστήσω την διεύθυνση για την ευκαιρία και τη δυνατότητα να εκπονήσω την εργασία μου στο σύγχρονο περιβάλλον του μικροβιολογικού εργαστηρίου του HRIC, σε ένα πολύ υποστηρικτικό κλίμα από όλους τους εργαζόμενους εκεί, στους οποίους είμαι ευγνώμων.

Συγκεκριμένα, θα ήθελα να ευχαριστήσω εγκάρδια την υπεύθυνη εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας Δρ Βασιλική Γιατράκου, η οποία αποτέλεσε και την υπεύθυνη του πρότζεκτ μου, για τις επιστημονικές γνώσεις που μου μετέδωσε, την ευκαιρία εκμάθησης ποικίλων εργαστηριακών μεθόδων που μου προσέφερε, την εργασιακή ηθική της, αλλά κυρίως το ειλικρινές της ενδιαφέρον και συνεχή ανατροφοδότηση της προόδου μου.

Την Επιστημονική Υπεύθυνη Ερευνητικών Έργων, Δρ Αικατερίνη Πισσαρίδη για την άφογη συνεργασία μας, την προσιτότητα αλλά και επαγγελματισμό της.

Την κυρία Ιωάννα Κολώνη και τον κύριο Δημήτρη Καρυώτη, που με καθοδήγησαν στη χρήση του εργαστηρίου και υπήρξαν πάντα πρόθυμοι να με βοηθήσουν σε οποια δυσκολία αντιμετώπισα κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων, ενώ εμπλούτισαν σημαντικά τις γνώσεις μου στη Μικροβιολογία.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια και τους φίλους μου για τη συνεχή υποστήριξη και συμβολή, που ήταν καθοριστικής σημασίας για την περάτωση της διπλωματικής εργασίας μου.

Πίνακας Περιεχομένων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ΛΕΞΕΙΣ-ΚΛΕΙΔΙΑ:	6
ABSTRACT	7
ΣΚΟΠΟΣ	8
Α)ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1. Προβιοτικά	9
1.1 Ορισμοί και αγορά προβιοτικών	9
1.2 Τα οφέλη των προβιοτικών στην υγεία	9
1.3 Γιατί χρειάζονται μη γαλακτοκομικά προβιοτικά	11
2. Βιγκανισμός- Vegan προϊόντα	12
2.1 Η τάση της vegan διατροφής στην αγορά	12
2.2 Τι μπορεί να θεωρηθεί vegan προϊόν - Πως ελέγχεται	13
2.3 Vegan προϊόντα με προβιοτικά - Παραδείγματα.....	14
2.4 Προβιοτικά που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε vegan προϊόντα - Παραδείγματα	15
2.4.1 Bifidobacterium	15
2.4.2 Lactobacillus	16
3.Ανάπτυξη νέου λειτουργικού τροφίμου με προβιοτικά	17
3.1 Προκαταρκτικός σχεδιασμός-διάγραμμα ροής	17
3.2 Κριτήρια για επιλογή προβιοτικών στελεχών για προσθήκη σε τρόφιμα	18
3.3 Μελέτη διάρκειας ζωής προϊόντος.....	19
Β)ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	22
4. Υλικά Μέθοδοι	22
4.1 Εξοπλισμός και υλικά που χρησιμοποιήθηκαν	22
4.2 Παρασκευή αντιδραστηρίων-Θρεπτικών υλικών	23
4.3 Μεθοδολογία παρασκευής προϊόντος	24
4.4 Μεθοδολογία καλλιέργειας προβιοτικών	26
4.5 Μεθοδολογία ανίχνευσης πρωτεϊνών γάλακτος (μη VEGAN συστατικά) στο προϊόν	27
4.6 Μελέτη επαλήθευσης μεθόδου καταμέτρησης βακτηρίων	28
Γ) ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	31
5.1 1 ^η συνταγή πιλοτικού προϊόντος(γάλα βρώμης).....	33
5.1.1 Ανθεκτικότητα προβιοτικού (BB-12) συναρτήσει του χρόνου και	

θερμοκρασία αποθήκευσης.....	33
5.1.2 Σταθερότητα και ασφάλεια κατανάλωσης του προϊόντος	34
5.2 2 ^η συνταγή πιλοτικού προϊόντος (γάλα βρώμης- χυμός φρούτων)	38
5.2.1 Ανθεκτικότητα προβιοτικού (BB-12) συναρτήσεως του χρόνου και θερμοκρασία αποθήκευσης.....	38
5.2.2 Σταθερότητα και ασφάλεια κατανάλωσης του προϊόντος (σχήμα????).....	39
5.2.3 Ανθεκτικότητα προβιοτικού (BB-12) παρουσία LGG συναρτήσεως του χρόνου και θερμοκρασία αποθήκευσης	40
6 Ανίχνευση πρωτεϊνών γάλακτος.....	41
7. Σύγκριση με γαλακτοκομική κρέμα προβιοτικών	44
8. Αποτελέσματα μελετης επαλήθευσης.....	46
Γ) ΣΥΖΗΤΗΣΗ	49
Ε) ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	50

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα προβιοτικά, συμπληρώματα διατροφής που περιέχουν ζωντανούς οργανισμούς (βακτήρια) και ζυμομύκητες, καταναλώνονται ευρέως λόγω των ευεργετικών ιδιοτήτων τους στην υγεία, κυρίως μέσω της προσθήκης τους σε τρόφιμα, συνιστώντας το μεγαλύτερο μέρος της αγοράς των λειτουργικών τροφίμων. Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής. δεδομένου ότι η vegan διατροφή υιοθετείται από ολοένα και περισσότερο πληθυσμό, επιχειρήθηκε η ανάπτυξη μιας vegan κρέμας ψυγείου βρώμης που περιέχει το προβιοτικό στέλεχος *Bifidobacteriumlactis* ή/και το προβιοτικό στέλεχος *Lactobacillusrhamnosus*. Η ανάπτυξη ενός τέτοιου προϊόντος περνά από ποικίλα σημεία ελέγχου μέχρι την κυκλοφορία στην αγορά. Η κρέμα που δημιουργήθηκε ελέγχθηκε όσον αφορά τη μικροβιακή αλλοίωση του ίδιου του προϊόντος αλλά και την επιβίωση του προβιοτικού στελέχους σε αυτό. Τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με αυτά που λήφθηκαν από την μελέτη μιας γαλακτοκομικής κρέμας με τα ίδια προβιοτικά βακτήρια. Επιπλέον έλαβε χώρα μελέτη επαλήθευσης της μεθόδου καταμέτρησης των *Bifidobacterium* κατά ISO στο περιβάλλον του εργαστηρίου, με στόχο τον προσδιορισμό της επαναληψιμότητας και της αβεβαιότητας. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται η διασφάλιση αξιόπιστων μετρήσεων.

ΛΕΞΕΙΣ-ΚΛΕΙΔΙΑ:

Μέχρι 6 λέξεις κλειδιά

Προβιοτικά, vegan, μελέτη διάρκειας ζωής, μελέτη επαλήθευσης μεθόδου

ABSTRACT

Probiotic bacteria are dietary supplements containing bacteria and yeasts widely consumed due to their beneficial properties to health, mainly through their addition to foods, making up the bulk of the functional food market. In conjunction with the introduction of the vegan diet in a growing population, an attempt was made to develop a vegan oat cream containing the probiotic strain *Bifidobacteriumlactis* and / or the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus*. The development of such a product goes through various checkpoints up to the market. The cream that was created was studied in terms of the lifespan of both the product itself and the survival of the probiotic strain in it. The results were compared with those obtained from the study of a dairy cream with the same probiotic bacteria. In addition, the method of counting *Bifidobacterium* according to ISO verification study took place in the laboratory environment, in order to determine repeatability and uncertainty. In this way, reliable measurements are ensured.

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπό της παρούσας εργασίας αποτελεί η ανάπτυξη ενός προβιοτικού προϊόντος, το οποίο να είναι κατάλληλο για κατανάλωση από άτομα που δεν συμπεριλαμβάνουν στη διατροφή τους ζωικά προϊόντα. Απαραίτητη προϋπόθεση για προϊόν είναι η ικανοποιητική διάρκεια ζωής του, όσο και η μακροχρόνια επιβίωση του προβιοτικού, ώστε να έχει εμπορική αξία. Ακόμη η εργασία αυτή εστιάστηκε στην επαλήθευση της μεθόδου καταμέτρησης των *Bifidobacterium* κατά ISO, εξετάζοντας τις παραμέτρους της επαναληψιμότητας και της αβεβαιότητας τους στο εργαστήριο που πραγματοποιήθηκε, ώστε να καθιερωθεί πως τα αποτελέσματα που λαμβάνονται είναι ασφαλή για τη διεξαγωγή συμπερασμάτων.

Α)ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Προβιοτικά

1.1 Ορισμοί και αγορά προβιοτικών

Η λέξη προβιοτικό είναι ελληνικής προέλευσης (προ + βιος) που σημαίνει υπέρ της ζωής και επιλέχθηκε σε αντιδιαστολή με την λέξη αντιβιοτικό, που αφορά ουσίες κατά της ζωής κάποιων βακτηρίων (Jungersenetal, 2014). Τα προβιοτικά αποτελούν ζωντανούς οργανισμούς, οι οποίοι όταν καταναλωθούν σε επαρκή ποσότητα είναι ευεργετικά για στην υγεία του ξενιστή (FAO/WHO 2001).

Στις μέρες μας, έχει καθιερωθεί τέτοια βακτήρια να καταναλώνονται από το κοινό, ως αρωγοί της υγείας. Αυτό έχει θετικό αντίκτυπο στην ανάπτυξη της αγοράς που έχει δημιουργηθεί γύρω από την παραγωγή και πώληση τους σε διαφορετικές μορφές. Στην Ιαπωνία, για παράδειγμα τα προβιοτικά καταναλώνονται στη μορφή κατεψυγμένων αποικιών σε κάψουλες, ενώ στην Ευρώπη λόγω της συσχέτισης των καψουλών με τα φάρμακα έχει δημιουργηθεί προκατάληψη γύρω από τη λήψη τους. Για αυτό το λόγο έχει καθιερωθεί η προσθήκη τους σε τρόφιμα, καθιστώντας τα τρόφιμα αυτά λειτουργικά (Yerlikayaetal., 2014). Λειτουργικά χαρακτηρίζονται τα τρόφιμα που δεν αποσκοπούν αποκλειστικά στην ικανοποίηση της πείνας και στην παροχή θρεπτικών συστατικών, αλλά και στην πρόληψη ασθενειών και τη βελτίωση της ψυχικής υγείας των καταναλωτών (Menrad, 2003). Τέτοια τρόφιμα μπορούν πλέον να δημιουργηθούν τεχνητά λόγω της διαθέσιμης τεχνογνωσίας (Butchkoetal., 2005).

Η αγορά των προβιοτικών αναπτύσσεται παγκοσμίως όλο και περισσότερο λόγω της αυξανόμενης επίγνωσης των οφελών τους από τους καταναλωτές. Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως αποτελεί το 60-70 % της αγοράς των λειτουργικών τροφίμων (Asprietal., 2020).

1.2 Τα οφέλη των προβιοτικών στην υγεία

Έπειτα από πολυάριθμες έρευνες έχει αποδειχθεί πως τα προβιοτικά εμφανίζουν πληθώρα ευεργετικών ενεργειών στον άνθρωπο, οπότε και κρίνεται ωφέλιμη η ενίσχυση του οργανισμού με την χορήγηση τους.

Συνεισφέρουν στην πρόληψη της διάρροιας που προκαλείται από ροταϊό, τη λήψη αντιβιοτικών αλλά και την ακτινοθεραπεία καρκινοπαθών (Vasudhaetal., 2013, Dicksetal., 2010)

Επιπλέον, φαίνεται πως τα προβιοτικά ενισχύουν τόσο την φυσική όσο και την επίκτητη ανοσία θωρακίζοντας έτσι το ανοσοποιητικό σύστημα. Έχει παρατηρηθεί ότι αυξάνουν την δραστηριότητα των NK κυττάρων και την φαγοκυττάρωση, αλλάζουν το προφίλ των κυτοκινών και αύξάνουν το επίπεδο των ανοσογλοβουλινών (Vasudhaetal., 2013). Χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων προβιοτικών στελεχών αποτελούν το *Bifidobacteriumlactis* και το *Lactobacillusrhamnosus*.

Τα προβιοτικά επίσης αποδεικνύεται πως βρίσκουν εφαρμογή στην ανακούφιση από ερεθισμούς του εντέρου, καθώς καταλαμβάνουν την επιφάνεια του, αποκλείοντας την πρόσβαση σε παθογόνα βακτήρια (Vasudhaetal., 2013).

Βελτιώνουν τον μεταβολισμό της λακτόζης σε άτομα με δυσανεξία διότι τα προβιοτικά βακτήρια εκκρίνουν β-γαλακτοσιδάση στο λεπτό έντερο, η οποία αντικαθιστά εν προκειμένω την ελλιπή παραγωγή της από τον ξενιστή (Vasudhaetal., 2013).

Ακόμη επιδρούν κατασταλτικά σε αλλεργίες, την εμφάνιση καρκίνου του παχέος εντέρου, αναπνευστικές λοιμώξεις, λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος καθώς και στη δυσκοιλιότητα. Όσον αφορά τον καρκίνο του παχέος εντέρου, μικροβιακά ένζυμα όπως η αζορεδουκτάση, η β-γλυκουρονιδάση και η νιτρορεδουκτάση φαίνεται πως αυξάνουν την πιθανότητα εμφάνισης του μέσω την μετατροπής προκαρκινογόνων σε καρκινογόνα. Τα προβιοτικά στελέχη όπως τα *Lactobacillusacidophilus* και *Lactobacillusrhamnosus* (εμπορικό στέλεχος LGG) μειώνουν την παραγωγή τέτοιων ενώσεων στο παχύ έντερο (Goldinetal., 1992).

Έρευνες υποδεικνύουν πως τα στελέχη *Lactobacillusacidophilus* και *Lactobacillusrhamnosus* καταπολεμούν τη λοίμωξη από *Helicobacterpylori*, βακτήριο που ενέχεται για γαστρίτιδα, καρκίνο του στομάχου και λεμφώματα (Vasudhaetal., 2013).

Τέλος, ένα ζυμωμένο γάλα με *Enterococcusfaecium* και *Streptococcusthermophilus* έδειξε να προκαλεί μικρή αλλά αισθητή μείωση της ολικής και της LDL χοληστερόλης σε ασθενείς με πρωτογενή υπερχοληστερολαιμία (Vasudhaetal., 2013).

Με βάση τα παραπάνω είναι εμφανές πως η λήψη προβιοτικών είναι ιδιαίτερα ευεργετική για τον άνθρωπο, τόσο για τον ενήλικο πληθυσμό όσο και τα παιδιά και βρέφη. Για αυτό το λόγο χρήζει της προσοχής της ακαδημαϊκής και βιομηχανικής έρευνας με σκοπό την προσθήκη τους σε τρόφιμα, αυξάνοντας σημαντικά την διατροφική τους αξία.

1.3 Γιατί χρειάζονται μη γαλακτοκομικά προβιοτικά

Ολοένα και περισσότερες εταιρείες προσανατολίζονται στην ανάπτυξη και παραγωγή μη γαλακτοκομικών προϊόντων με προβιοτικά, ακολουθώντας τις συγχρονες τάσεις της αγοράς στα λειτουργικά τρόφιμα. Τα προϊόντα αυτά είναι προσβάσιμα και από άτομα με συγκεκριμένες διατροφικές συνήθειες (vegan - vegetarian), άτομα με δυσανεξία ή αλλεργία στη λακτόζη, αλλά και το ευρύ κοινό που αναζητά βιώσιμες εναλλακτικές πηγές τροφής (Vasudhaetal, 2013). Επιπροσθέτως, η ανάπτυξη τέτοιων προϊόντων είναι απαραίτητη για λόγους υγείας του καταναλωτή λόγω της υψηλής περιεκτικότητας των γαλακτοκομικών προϊόντων σε χοληστερόλη.

Τα προβιοτικά κατά πάσα πιθανότητα συνιστούν το αρχαιότερο λειτουργικό τρόφιμο. Ως πιθανά υποστρώματα για την αναπτυξή τους μπορούν να χρησιμοποιηθούν δημητριακά, όσπρια, φρούτα και λαχανικά. Τέτοια προϊόντα στην αγορά συνιστούν κατά κύριο λόγο ροφήματα. Προϊόντα με αυτές τις προδιαγραφές έχουν εμπνευστεί από παραδοσιακά ζυμωμένα ροφήματα που περιέχουν προβιοτικά βακτήρια όπως το Boza φτιαγμένο από σιτάρι, σίκαλη, κεχρί, καλαμπόκι ή άλλα δημητριακά αναμεμιγμένα με ζάχαρη ή σακχαρίνη, που περιέχει μύκητες και βακτήρια γαλακτικού οξέος. Άλλα παραδείγματα παραδοσιακών μη γαλακτοκομικών ροφημάτων με προβιοτικά αποτελούν το Hardaliye και το Togwa. Το Hardaliye καταναλώνεται στην Τουρκία και παράγεται από τη φυσική ζύμωση κόκκινου σταφυλιού με σπόρους μουστάρδας, (το οποίο περιέχει τα στελέχη *Lactobacillusparacaseisubsp. paracasei*, *Lactobacilluscaseisubsp. pseudoplantarum*, *Lactobacillusbrevis*, *Lactobacilluspontis*, *Lactobacillusacetotolerans*, *Lactobacillussanfransisco* και *Lactobacillusvaccinostercus*). Το Togwa καταναλώνεται στην Αφρική και φτιάχνεται από αλεύρι αραβοσίτου και κεχρί. Από αυτό το ρόφημα έχουν απομονωθεί στελέχη *Lactobacillus* και *Streptococcus*. (Vasudhaetal, 2013)

2. Βιγκανισμός- Vegan προϊόντα

2.1 Η τάση της vegan διατροφής στην αγορά

Η σημερινή κατανάλωση προϊόντων ζωικής προέλευσης όπως το κρέας και τα γαλακτοκομικά κρίνεται μη βιώσιμη, λόγω περιβαλλοντικών φαινομένων όπως αυτά της εκπομπής ρύπων του θερμοκηπίου, της υπερβόσκησης, της διάβρωσης του εδάφους, την αποψίλωση εκτάσεων της εξαφάνισης της βιοποικιλότητας και της μόλυνσης των επιφανειακών και υπόγειων υδάτων.

Ωστόσο οι συνέπειες της αγοράς των ζωικών προϊόντων δεν περιορίζονται σε περιβαλλοντικές, αλλά επεκτείνονται και στην ανθρώπινη υγεία και την οικονομία. Η υπερβολική κατανάλωση τέτοιων προϊόντων δημιουργεί προδιάθεση για εμφάνιση ασθενειών όπως καρδιαγγειακές νόσοι, καρκίνους του παχέος εντέρου και προστάτη, παχυσαρκία, και διαβήτη τύπου 2. Μια διατροφή πλούσια σε κρέας και γαλακτοκομικά είναι υψηλή σε περιεκτικότητα λιπών και χοληστερόλης, ενώ είναι φτωχή σε κάποια χρήσιμα συστατικά για τον οργανισμό όπως αντιοξειδωτικά, φυτικές ίνες και βιταμίνες C και E, φολικό οξύ, προβιταμίνη A, χαλκό, κάλιο και μαγνήσιο.(Dyettetal, 2013)

Ο βιγκανισμός (veganism) είναι η πιο ακραία μορφή χορτοφαγίας. Η vegan διατροφή επιτυγχάνεται με την αποφυγή κατανάλωσης προϊόντων που προέρχονται από ζώα (κρέας, γαλακτοκομικά, αυγά , μέλι) αλλά και έχουν υποστεί σε επεξεργασία με συστατικά ζωικής προέλευσης σε οποιοδήποτε στάδιο της παραγωγής τους. Παράλληλα, υπάρχουν υποκατηγορίες με διαφοροποιήσεις στην αυστηρότητα της διατροφής όπως οι bevegans, δηλαδή vegans που τρώνε μέλι, lacto-vegetarians, δηλαδή χορτοφάγοι που τρώνε γαλακτοκομικά προϊόντα, οι egg-vegetarians δηλαδή χορτοφάγοι που τρώνε αυγά και οι pescetarians, δηλαδή χορτοφάγοι που τρώνε ψάρι.(Nezlek&Forestel, 2020) Στις μέρες μας η αύξηση του βιγκανισμού δεν έχει να κάνει αποκλειστικά με την προστασία των δικαιωμάτων των ζώων, αλλά επιπλέον προσφέρει μια βιώσιμη λύση σχετικά με την ισορροπημένη παραγωγή και κατανάλωση, αλλά και την κάλυψη των διαρκώς αυξανόμενων αναγκών για τροφή παγκοσμίως.

Παρότι μέχρι πρόσφατα αποτελούσαν μειονότητα του ανεπτυγμένου κόσμου, τα τελευταία χρόνια φαίνεται πως οι άνθρωποι που ακολουθούν τον βιγκανισμό, έχουν αυξηθεί αισθητά, καθώς υπάρχουν ενδείξεις ότι ο βιγκανισμός ως τρόπος ζωής πέρα από μόδα και μιμιτισμό μπορεί να έχει θετικό αντίκτυπο σε πτυχές της υγείας του καταναλωτή. Ένας δεύτερος λόγος που ανθεί η αγορά vegan προϊόντων είναι διότι οι καταναλωτές τους θεωρούν ότι έτσι συμβάλλουν στην αποτροπή της κλιματικής αλλαγής, μειώνοντας το ατομικό ενεργειακό τους αποτύπωμα τους. (Dyettetal., 2013)

Με βάση τα παραπάνω είναι πασιφανές πως η τάση του βιγκανισμού πλέον θεωρείται ως ένα “megatrend” και δεν απευθύνεται αποκλειστικά στον δυτικό ανεπτυγμένο κόσμο αλλά τείνει να καθιερωθεί μια παγκόσμια επιλογή. Για αυτό το λόγο και η βιομηχανία πλέον προσανατολίζεται στην παραγωγή τέτοιων προϊόντων, επενδύοντας στην επιστημονική έρευνα και ανάπτυξη, για τη δημιουργία καινοτόμων λειτουργικών τροφίμων. (Saarietal, 2020)

Σύμφωνα με την Vegan Society (2020), η ανάγκη για φαγητό ελεύθερο κρέατος αυξήθηκε κατά 987% το 2017 στο Ηνωμένο Βασίλειο. Στην Βραζιλία, 30 εκατομμύρια άνθρωποι (το 14% της χώρας) ακολουθούν χορτοφαγική διατροφή, ενώ το 55% του πληθυσμού έχουν πρόθεση να καταναλώσουν περισσότερα vegan προϊόντα και το 49% θεωρεί πως τα vegan προϊόντα είναι ανάλογης ποιότητας με τα ζωικά. Πρέπει να σημειωθεί ότι το 60% των ερωτηθέντων δηλώνει πως δεν καταναλώνει περισσότερα vegan προϊόντα λόγω του υψηλού τους κόστους σε σύγκριση με τα ζωικής προέλευσης (Ibore, 2018).

Με το πέρασμα του χρόνου τα υποκατάστατα του ζωικού γάλακτος αποτελούν μια ισχυρή παγκόσμια τάση της αγοράς, της τάξης δισεκατομμυρίων, που προβλέπεται μέχρι το 2023 να ξεπερνά τα 26 δισεκατομμύρια USD (Tangyuetal., 2019).

2.2 Τι μπορεί να θεωρηθεί vegan προϊόν - Πως ελέγχεται

Παρότι ο αριθμός των vegan αυξάνεται ραγδαία, δεν υπάρχει ακόμη θεσπισμένη νομοθεσία σχετικά με την επισήμανση των vegan προϊόντων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ανοχή παραπλανητικών πληροφοριών στις ετικέτες ακατάλληλων προϊόντων, που δεν πληρούν τις προϋποθέσεις.

Πρόσφατα, εκδόθηκε ένα πρότυπο κατά ISO και συγκεκριμένα το ISO 23662:2021 Definitions and technical criteria for foods and food ingredients suitable for vegetarians or vegans and for labelling and claims, το οποίο διευκρινίζει τις προϋποθέσεις κάτω από τις οποίες μπορεί να χαρακτηριστεί το προϊόν vegan. Αυτό που ισχύει εμπειρικά είναι πως vegan θεωρείται ένα τρόφιμο, το οποίο δεν περιέχει, εν γνώσει του κατασκευαστή, αλλά ούτε έχει χρησιμοποιηθεί σε οποιοδήποτε στάδιο της επεξεργασίας, κάποια ουσία ζωικής προέλευσης.

Όσον αφορά το κατά πόσον μπορεί ένα προϊόν με προβιοτικά να χαρακτηριστεί vegan οι απόψεις διίστανται. Υπάρχει μια ακραία μειονότητα των vegan, η οποία αρνείται να εντάξει στην διατροφή της προβιοτικά τρόφιμα, καθώς θεωρούν πως και τα βακτήρια είναι ζωντανοί ζωικοί οργανισμοί και ως εκ τούτου δεν θα πρέπει να καταναλώνονται.

Ωστόσο ο σημαντικότερος προβληματισμός ως προς τη χρήση των προβιοτικών σε vegan προϊόν είναι σχετικά με την προέλευση των βακτηριακών στελεχών. Τα ευρέως διαθέσιμα εμπορικά στελέχη προβιοτικών βακτηρίων έχουν απομονωθεί αρχικά από ζωικά παράγωγα και καλλιεργούνται σε υλικό που περιέχει γάλα. Ωστόσο υπάρχουν στη φύση στελέχη προβιοτικών που συναντώνται σε εναλλακτικές πηγές φυτικής προέλευσης όπως δημητριακά και φρούτα. Τα στελέχη αυτά είναι αρκετά συγγενή γενοτυπικά και φαινοτυπικά με τα στελέχη γαλακτοκομικής προέλευσης (Kumaretal, 2015).

Για παράδειγμα το στέλεχος *Lactobacilluslactis* (το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο προβιοτικό στέλεχος), μπορεί να βρεθεί και σε φυτά ή άλλες πηγές (Salamaetal, 1995). Μέχρι και σήμερα όμως, η παραγωγή δεν έχει προχωρήσει σε εμπορική εκμετάλλευση στελεχών φυτικής προέλευσης, καθώς η προσθήκη των ευρέως χρησιμοποιούμενων στελεχών δεν φαίνεται να “μολύνει” το τελικό προϊόν. Αυτό βέβαια είναι αμφιλεγόμενο ηθικά και ίσως δεν επαρκεί στην περίπτωση που θεσπιστεί αυστηρότερη νομοθεσία για τη σήμανση των vegan προϊόντων.

Ανάλογα με την σύσταση του προϊόντος πραγματοποιούνται έλεγχοι για την παρουσία των ουσιών ζωικής προέλευσης.. Για παράδειγμα σε τρόφιμα που υπάρχει φόβος πρόσμιξης με ζωικό γάλα, μπορούν να ανιχνευτούν οι πρωτεΐνες γάλακτος γαλακτογλοβουλίνη και καζεΐνη. Η ανίχνευση μπορεί να γίνει με την ανοσοχημική δοκιμασία ELISA, είτε με PCR

2.3 Vegan προϊόντα με προβιοτικά - Παραδείγματα

Εμπορικά έχει κυκλοφορήσει πληθώρα vegan προϊόντων με προβιοτικά, ακολουθώντας την τάση της εποχής. Η ανάπτυξη τέτοιων προϊόντων είναι δύσκολη καθώς τα προβιοτικά στελέχη μπορεί να επηρεάσουν την χημική σύσταση, οξύτητα, χρώμα και αποδοχή τους. Επομένως θα πρέπει με προσοχή να δημιουργηθούν προϊόντα κατάλληλα όσον αφορά την επιβίωση του βακτηρίου, τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του, τις τεχνολογικές ιδιότητες και την αισθητική αποδοχή του κοινού. Ωστόσο ένας παράγοντας που μπορεί να παίξει ρόλο στην αλλοίωση της vegan ταυτότητας του προϊόντος είναι η προέλευση του στελέχους που χρησιμοποιείται, αφού τα περισσότερα διαθέσιμα προβιοτικά στελέχη δεν έχουν απομονωθεί από φυτικές πηγές.(Pimenteletal., 2021) Εξ αυτού, θα ήταν ωφέλιμο να προωθηθεί η απομόνωση και εμπορική παραγωγή προβιοτικών που έχουν μη ζωική προέλευση.

Παραδείγματα προβιοτικών λειτουργικών τροφίμων κατάλληλων για χορτοφάγους αποτελούν διάφοροι χυμοί με προσθήκη προβιοτικών, όπως χυμοί ανανά, κράνμπερι, φράουλα, μάνγκο, καρότο και πορτοκάλι. Τέτοιοι χυμοί λαχανικών και φρούτων είναι ευνοϊκοί για την ανάπτυξη διαφόρων προβιοτικών στελεχών όπως *Lactobacillusacidophilus*, *Lactobacilluscasei*, *Lactobacillusparacasei*, *Lactobacillusramnosus*,

Lactobacillus plantarum, *Lactobacillus fermentum* και *Bifidobacterium bifidum*. Πολύ βοηθητικό για την επιβίωση των προβιοτικών στους χυμούς είναι το χαμηλό τους pH, αλλά η συγκέντρωση των απαραίτητων πεπτιδίων και ελεύθερων αμινοξέων για χρήση στο μεταβολισμό των βακτηρίων δεν είναι ικανοποιητική. Γενικά στους χυμούς επιβιώνει καλύτερα το είδος *Lactobacillus* παρά το *Bifidobacterium*.

Παρόλο που έχει παρατηρηθεί βελτίωση του λιπιδιακού προφίλ μετά από κατανάλωση vegan προβιοτικών προϊόντων και υπάρχουν πολλοί *in vitro* για τα vegan προβιοτικά είναι απαραίτητη, για την εξασφάλιση της αξιοπιστίας τους, η επαλήθευση τους με *in vivo* μελέτες (Pimenteletal, 2021).

2.4 Προβιοτικά που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε vegan προϊόντα - Παραδείγματα

2.4.1 Bifidobacterium

Το γένος *Bifidobacterium* αποτελείται από Gram θετικά, υποχρεωτικά αναερόβια βακτήρια, τα οποία χαρακτηρίζονται από την παραγωγή γαλακτικού οξέος. Πρώτη φορά απομονώθηκαν το 1899, από κόπρανα εμβρύου που τρέφονταν μέσω θηλασμού ενώ είναι συνήθη ενδογενή μικρόβια του ανθρώπινου εντερικού σωλήνα (Jungersenetal., 2014). Αρχικά θεωρήθηκε πως τα βακτήρια αυτά αποτελούν μέλη της οικογένειας *Lactobacteriaceae* αλλά το 1924 προτάθηκε από τον Orla-Jensen ότι συνιστούν ξεχωριστό είδος, και αποτελούν τον κρίκο σύνδεσης ανάμεσα στα βακτήρια γαλακτικού οξέος και τα βακτήρια προπιονικού οξέος. (Sgorbatietal., 1995)

Η προσθήκη του γένους *Bifidobacterium* στο ζυμωμένο γάλα και η αυξανόμενη γνώση γύρω από την ταξονομία του οδήγησε στην μεγάλη του δημοτικότητα στα λειτουργικά τρόφιμα ήδη από την δεκαετία του 70. Σε αυτό συνεισέφερε η σχετικά χαμηλή παραγωγή οξέων, αλλά και η υψηλή κατανάλωση L(+) γαλακτικού οξέος σε σχέση με του D(-) γαλακτικού οξέος από βακτήρια αυτού του γένους. Είναι επίσης αξιόλογο να σημειωθεί πως τα *Bifidobacteria* επάγουν την παραγωγή ανοσογλοβουλίνης, αυξάνουν την διατροφική αξία μεταβολίζοντας υποστρώματα που αδυνατεί να μεταβολήσει ο ξενιστής, διαθέτουν αντικαρκινικές ιδιότητες, αλλά παράγουν και το απαραίτητο για τον οργανισμό φολικό οξύ (βιταμίνη B9)(Yerlikaya,etal., 2014).

Το στέλεχος που έχει ευρεία χρήση στην βιομηχανία είναι το *Bifidobacterium lactis*, λόγω κυρίως της αντοχής του στο οξύγονο και σε περιβάλλον με όξινο pH. Το εμπορικό στέλεχος *Bifidobacterium BB-12*, που συνιστά το πιο μελετημένο στέλεχος του γένους είναι ένα ραβδοειδές, αρνητικό στην δοκιμασία της καταλάσης, βακτήριο. Αρχικά θεωρούνταν πως ανήκει στο είδος *Bifidobacterium bifidum*, όμως μετέπειτα ταξονομικές τεχνικές το

συγκατέλεξαν στα *Bifidobacterium animalis* και τελικά στο *Bifidobacterium lactis*. (Jungersen et al, 2014)

Η προέλευση του είναι από καλλιέργειες γάλακτος και έχει χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη ποικίλων εμπορικών προβιοτικών προϊόντων, όπως βρεφικές φόρμουλες, συμπληρώματα διατροφής και ζυμωμένα προϊόντα γάλακτος.

Ανάμεσα σε 60 ενδογενή στελέχη *Bifidobacterium* του ανθρώπου, το *Bifidobacterium BB-12* φάνηκε πως επιβιώνει στον ίδιο ή μεγαλύτερο βαθμό, τόσο στο γαστρικό οξύ όσο και στο χολικό οξύ. Το γεγονός αυτό το καθιστά κατάλληλο για την κατανάλωση του μέσω τροφίμων.

2.4.2 Lactobacillus

Το είδος *Lactobacillus* συναντάται φυσιολογικά στην στοματική κοιλότητα, στον εντερικό σωλήνα και στον γυναικείο αναπαραγωγικό σωλήνα, όπου με την παραγωγή γαλακτικού οξέος συντελεί στο χαμηλό pH και κατ' επέκταση στην καταστολή της ανάπτυξης παθογόνων μικροοργανισμών (Segers et al, 2014).

Τα μέλη του είδους *Lactobacilli* είναι μικρά, ραβδόμορφα ή κοκκώδη, λεπτά και Gram-θετικά βακτήρια. Συνήθως γονιδιωματικά η περιεκτικότητά τους σε βάσεις γουανίνης και κυτοσίνης (G+C) είναι μικρότερη του 50 %. Μπορούν να μεταβολίσουν ποικίλες πηγές σακχάρων για την παραγωγή ενέργειας (Hammes et al, 1995).

Οι αποικίες τους εμφανίζονται ομαλές, κυρτές και ημιδιαφανείς. Είναι μικροαερόφιλα ή αναερόβια (επομένως απαιτούν μειωμένη παρουσία ή πλήρη απουσία οξυγόνου στο περιβάλλον τους) και αρνητικά σε οξειδάση και καταλάση. Χαρακτηριστικό τους είναι πως υδρολύουν εσκουλίνη και ενδιάμεσα προϊόντα από τον μεταβολισμό υδατανθράκων. (Bratcher et al., 2018)

Ο *Lactobacillus rhamnosus* LGG αποτελεί ένα από τα πιο μελετημένα στελέχη προβιοτικών βακτηρίων και χαρακτηρίζεται από την ευρεία χρήση του σε προϊόντα που προορίζονται για βρέφη και παιδιά. Το συγκεκριμένο βακτήριο βρίσκεται και φυσιολογικά στην χλωρίδα του εντέρου και διαθέτει αντοχή στο χαμηλό pH (Yerlikaya et al., 2014)

3. Ανάπτυξη νέου λειτουργικού τροφίμου με προβιοτικά

3.1 Προκαταρκτικός σχεδιασμός-διάγραμμα ροής

Για την ανάπτυξη ενός νέου προϊόντος στη βιομηχανία συνήθως ακολουθείται η διαδικασία που περιγράφεται από το παρακάτω σχήμα:



Εικόνα 1: Διάγραμμα ροής ανάπτυξης νέου προϊόντος

Οι ιδέες για την ανάπτυξη ενός νέου προϊόντος μπορούν να προέλθουν από διαφορετικές πηγές, όπως πρόταση των καταναλωτών, τον ανταγωνισμό ή μια νέα ανάγκη της αγοράς. Στη συνέχεια οι ιδέες αξιολογούνται με βάση τους στόχους της επιχείρησης, τις πωλήσεις και τα κέρδη, αλλά και το εστιαζόμενο αγοραστικό κοινό και επιλέγεται η ιδέα που θα επιχειρηθεί η υλοποίησή της. Έπειτα παρασκευάζεται ένα πρωτότυπο με βάση τις ιδέες που επιλέχθηκαν και ελέγχεται σε όσες από τις παραμέτρους του μπορούν να προσδιοριστούν. Στην περίπτωση μας, επειδή πρόκειται για την ανάπτυξη μιας κρέμας προβιοτικών ψυγείου είναι απαραίτητο να μελετηθεί η διάρκεια ζωής του προϊόντος, καθώς και να καθοριστεί το ολικό μικροβιακό φορτίο της κρέμας, ενώ ταυτόχρονα πρέπει να εξασφαλιστεί η καλύτερη δυνατή γεύση και δομή. Τέλος ένα τμήμα της ανάπτυξης που είναι απαραίτητο για την επιτυχημένη ανάπτυξη του νέου προϊόντος είναι η αποδοχή από το αγοραστικό κοινό, με

ερωτηματολόγια και δοκιμές σε μικρή αρχικά κλίμακα ώστε να υπάρξει ανατροφοδότηση για διορθώσεις και αλλαγές.

Είναι ζωτικής σημασίας να καθοριστούν τα σωστά σημεία ελέγχου κατά την ανάπτυξη του νέου προϊόντος, ώστε να γίνεται αξιολόγηση έπειτα από κάθε στάδιο που εξετάζεται. Θα πρέπει τα κριτήρια ελέγχου έχουν κοινές βάσεις σε κάθε στάδιο ώστε οι αποφάσεις που λαμβάνονται να συμπνέουν με τα δεδομένα (Tzokasetal., 2003).

3.2 Κριτήρια για επιλογή προβιοτικών στελεχών για προσθήκη σε τρόφιμα

Για την επιτυχημένη προσθήκη των προβιοτικών στα τρόφιμα θα πρέπει να ληφθούν υπόψιν ορισμένες προϋποθέσεις.

1) Τα βακτηριακά στελέχη που επιλέγονται για την προσθήκη σε τρόφιμα ως προβιοτικά πρέπει να έχουν μελετηθεί εκτεταμένα στη βιβλιογραφία και να υπάρχουν βάσιμες αποδείξεις της θετικής επίδρασης τους στην υγεία του καταναλωτή.

2) Η επιβίωση του προβιοτικού πρέπει να διασφαλίζεται σε όλα τα στάδια επεξεργασίας, αποθήκευσης, χειρισμού και μεταφοράς, έως την κατανάλωση ώστε να είναι εξασφαλισμένη η επαρκής συγκέντρωση τους την στιγμή της κατανάλωσης. (Asprietal, 2020). Συγκεκριμένα η συγκέντρωση του προβιοτικού στο τρόφιμο είναι απαραίτητο να μετράται τουλάχιστον σε 6-7 Log (cfu (colony forming units) / g) (Yerlikaya, 2014). Εάν η ποσότητα του προβιοτικού στελέχους δεν είναι επαρκής, τότε δεν έχει ευεργετική δράση στον ξενιστή

3) Απαιτείται η επιβίωση τους κατά μήκος του γαστρεντερικού σωλήνα, δηλαδή η αντοχή τους σε χαμηλό pH και στα χολικά άλατα.

4) Ένα ακόμα κριτήριο είναι η αντιβιοτική τους δράση ενάντια σε παθογόνα βακτήρια, ώστε να κριθούν ωφέλιμα για την υγεία.

5) Απαραίτητη κρίνεται η ασφάλεια του στελέχους για κατανάλωση, καθώς και η ανθεκτικότητα του σε αντιβιοτικά.

6) Σε περίπτωση χρήσης περισσότερων του ενός στελέχους είναι ανάγκη να συνυπολογιστεί η αλληλεπίδραση των στελεχών, ώστε να βελτιστοποιηθεί η απόδοση της επεξεργασίας και επιβίωσης τους στο τελικό προϊόν που θα φτάσει στον καταναλωτή (Yerlikaya, 2014).

3.3 Μελέτη διάρκειας ζωής προϊόντος

Η διάρκεια ζωής ενός τροφίμου ορίζεται σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες του IFST (Institute of Food Science & Technology, 1993) ως το χρονικό διάστημα κατά το οποίο αυτό:

α) παραμένει ασφαλές προς κατανάλωση

β) είναι βέβαιο πως διατηρεί τα αισθητικά, φυσικοχημικά και μικροβιολογικά του χαρακτηριστικά

γ) συμμορφώνεται με όλους τους ισχυρισμούς διατροφικής αξίας της ετικέτας του

υπό την προϋπόθεση ότι διατηρείται υπό τις προτεινόμενες συνθήκες αποθήκευσης. (Kilcastetal, 2000)

Η διάρκεια ζωής ενός τροφίμου επηρεάζεται από εσωτερικούς αλλά και εξωτερικούς παράγοντες. Εσωτερικοί παράγοντες του προϊόντος είναι η ενεργότητα νερού, το pH και η ολική οξύτητα, το διαθέσιμο οξυγόνο, τα θρεπτικά συστατικά, η φυσική μικροβιακή χλωρίδα, βιοχημικοί παράγοντες (ένζυμα, χημικά αντιδραστήρια) και η χρήση συντηρητικών ουσιών. Αντίστοιχα στους εξωτερικούς παράγοντες συγκαταλέγονται ο έλεγχος της θερμοκρασίας κατά την αποθήκευση και τη διανομή, η έκθεση στο φως, το περιβαλλοντικό μικροβιακό φορτίο κατά την επεξεργασία, αποθήκευση και διανομή, η υγρασία του περιβάλλοντος αλλά και ο χειρισμός από τον καταναλωτή μετά την αγορά. (Kilcastetal, 2000)

Όσον αφορά το μικροβιακό φορτίο, μπορούν να χρησιμοποιηθούν δείκτες όπως η ενεργότητα του νερού, η θερμοκρασία αποθήκευσης, ο χρόνος αποθήκευσης και το pH ώστε να εκτιμηθεί σε μεγάλο βαθμό ποιοι μικροοργανισμοί ενδέχεται να αναπτυχθούν στο προϊόν. Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1) φαίνονται οι ελάχιστες συνθήκες ανάπτυξης των πιο κοινών παθογόνων μικροοργανισμών στην βιομηχανία των τροφίμων.

Πίνακας 1:Ελάχιστες συνθήκες ανάπτυξης μικροοργανισμών

Πηγή: Kilcast D., Subramaniam P .(2000) The stability and shelf-life of food , Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC

Type of microorganism	Minimum pH for growth	Minimum A_w for growth	Anaerobic growth ^a	Minimum growth temp. ^b (°C)
Pathogens^c				
<i>Salmonella</i>	4.0	0.94	Yes	7
<i>Staphylococcus aureus</i>	4.0(4.5 for toxin)	0.83 (0.90 for toxin)	Yes	6 (10 for toxin)
<i>Bacillus cereus</i> (psychrotrophic)	4.4	0.91	Yes	< 4
<i>Clostridium botulinum</i>				
Proteolytic A, B, F	4.6	0.93	Yes	10
Non-proteolytic B, E, F	5.0	0.97	Yes	3.3
<i>Listeria monocytogenes</i>	4.3	0.92	Yes	0
<i>Escherichia coli</i>	4.4	0.95	Yes	7.0
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	4.8	0.94	Yes	5
<i>Yersinia enterocolitica</i>	4.2	0.96	Yes	-2
<i>E. coli</i> 0157	4.5	0.95	Yes	-6.5
Spoilage organisms^d				
<i>Pseudomonas</i>	5.5	0.97	No	< 0
<i>Enterobacter aerogenes</i>	4.4	0.94	Yes	2
Lactic acid bacteria	3.8	0.94	Yes	4
Micrococci	5.6	0.9	No	4
Yeasts	1-5	0.8	Yes	-5
Moulds	< 2.0	0.6	No	< 0

^a Survival without oxygen, for example in vacuum pack.

^b Minimum growth temperatures are for growth in typical neutral pH. High water activity, chilled foods.

^c Data for pathogens taken from Anon., *Harmonisation of Safety Criteria for Minimally Processed Foods*. Inventory Report, Fair Concerted Action FAIR CT96-1020, 1997.

^d Data for spoilage organisms taken from Brown, H.M., *Evaluation of the Shelf-life of Chilled Foods*. Campden and Chorleywood FRA Technical Manual No. 28, 1991.

Επιπροσθέτως, τα προβιοτικά προϊόντα πέρα των επιθυμητών ευεργετικών ιδιοτήτων που φέρουν λόγω των βακτηριακών αποικιών, είναι απαραίτητο να πληρούν και οργανοληπτικά κριτήρια που αφορούν τη γεύση και το άρωμα του προϊόντος (Yerlikaya, 2014)

3.3 Μελέτη επαλήθευση μεθόδου καταμέτρησης προβιοτικών κατά ISO

Το κύριο αντικείμενο δραστηριοποίησης ενός εργαστηρίου συνιστά τη μέτρηση ενός μεγέθους ή μιας ιδιότητας. Η μέτρηση αυτή επηρεάζεται πολυπαραγοντικά και θα πρέπει να υπολογίζονται οσον το δυνατόν καλύτερα οι παράμετροι που μπορούν να αλλοιώσουν το αποτέλεσμα. Το σύνολο των παραγόντων αυτών είναι απαραίτητο να εμπεριέχονται στο Σύστημα Διαχείρισης της Ποιότητας του εργαστηρίου, ώστε να αναγνωρίζεται η τεχνική επάρκεια και η αξιοπιστία του, είτε πρόκειται για τη διενέργεια αναλύσεων, είτε πρόκειται για την διενέργεια διακριβώσεων.

Στο πλαίσιο ενός ολικού συστήματος διαχείρισης ποιότητας σε ένα εργαστήριο είναι απαραίτητη προϋπόθεση εκτός άλλων να επαληθεύονται οι νέες μέθοδοι που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν, ο εξοπλισμός να είναι διαπιστευμένος αλλά και το προσωπικό του εργαστηρίου να είναι άρτια καταρτισμένο και στην κατεύθυνση της συνεχούς εκπαίδευσης. (Κανάρης, 2018)

Για την μελέτη επαλήθευσης μιας μεθόδου το εργαστήριο πρέπει να υπολογίσει πέντε παραμέτρους: το όριο ανίχνευσης, το όριο ποσοτικοποίησης, την ορθότητα (ανάκτηση ή μεροληψία), την επαναληψιμότητα και την ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγικότητα.

Το όριο ανίχνευσης μιας μεθόδου είναι η ελάχιστη συγκέντρωση μιας ουσίας που μπορεί να μετρηθεί με την μέθοδο αυτή. Η συγκέντρωση αυτή δεν αποτελεί αξιόπιστη μέτρηση και αποτελεί απλά μία τιμή συγκέντρωσης πάνω από αυτή του τυφλού.

Το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ) ή λειτουργική ευαισθησία είναι η ελάχιστη συγκέντρωση της μετρούμενης παραμέτρου που μπορεί να προσδιοριστεί ποσοτικά με αποδεκτή ακρίβεια και επαναληψιμότητα. Το όριο ποσοτικοποίησης αποτελεί και την μικρότερη τιμή που πρέπει να χορηγείται στους ασθενείς.

Η ορθότητα ισούνται με το συστηματικό σφάλμα της μεθόδου και η πιστότητα με το τυχαίο σφάλμα της μεθόδου.

Η επαναληψιμότητα (repeatability ή r) είναι διασπορά των τιμών διαδοχικών μετρήσεων που έγιναν από τον ίδιο αναλυτή, με τα ίδια αντιδραστήρια, με την ίδια βαθμονόμηση και τις ίδιες εξωτερικές περιβαλλοντικές συνθήκες και μέσα στην ίδια ημέρα.

Η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγικότητα (interlaboratory reproducibility ή R) ή ενδιάμεση πιστότητα είναι η διασπορά των τιμών διαδοχικών μετρήσεων διαφορετικών ημερών.

Ως αβεβαιότητα πρακτικά ορίζεται η διασπορά των τιμών που μπορούν να αποδοθούν στο μετρούμενο συστατικό. Διαφέρει από την έννοια του σφάλματος στο ότι ενώ το σφάλμα αναφέρεται στη διαφορά μιας τιμής από την αληθή τιμή, η αβεβαιότητα αναφέρεται στη διασπορά των τιμών γύρω από την αληθή τιμή. (Καρκαλούσος, 2005)

Β) ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4. Υλικά Μέθοδοι

4.1 Εξοπλισμός και υλικά που χρησιμοποιήθηκαν

Ο εξοπλισμός του εργαστηρίου ελέγχεται τακτικά σύμφωνα με τις προδιαγραφές καλής λειτουργίας των μικροβιολογικών εργαστηρίων τροφίμων. Για την εκτέλεση του πειράματος χρησιμοποιήθηκε ο κάτωθι εξοπλισμός και αντιδραστήρια:

Για παρασκευή κρέμας:

άνθος αραβοσίτου βανίλια ΓΙΩΤΗΣ σε σκόνη

γάλα βρώμης Fytro

κρυσταλλική ζάχαρη

χυμός 9 φρούτων

κατσαρόλα

αυγοδάρτης

εστία κουζίνας

ζυγός

πλαστικά κύπελλα

κλιβανοί στους 4°C, 8°C, 14°C

για προετοιμασία και ανάλυση δείγματος:

σακούλες δειγματοληψίας

ζυγός

αποστειρωμένα σωληνάρια

Vortex

επωαστήρες του 30 37 26 βαθμούς κελσίου

τροβλία

πιπτετες

ρυγχη για πιπέτες

υδατόλουτρο στους 47 βαθμούς κελσίου

πλαστικός κρίκος ενοφθαλμισμού

Αντίδραστήρια:

MRD

BUFFERED PEPTONE WATER

Θρεπτικό υλικό TOS-MUP AGAR

Θρεπτικό υλικό PLATE COUNT AGAR

Θρεπτικό υλικό DRBC

Θρεπτικό υλικό VRBG

Θρεπτικό υλικό MRS

4.2 Παρασκευή αντιδραστηρίων-Θρεπτικών υλικών

Τα θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν παρασκευάστηκαν με τον εξής τρόπο:

TOS-MUP: Σε ένα λίτρο απιονισμένο νερό (dH₂O) προστίθενται 62,02 gr σκόνης SIGMA ALDRICH TOS-Propionateagar (ISO). Το υλικό θερμαίνεται υπό ανάδευση έως τον βρασμό του, το pH του ρυθμίζεται στο 6,3+0,2 και μοιράζεται σε φιάλες χωρητικότητας 250 ml έως τα 190 ml. Οι φιάλες αποστειρώνονται στους 115 βαθμούς κελσίου για 15 λεπτά. Έπειτα το υλικό θερμοστατεί στους 47 βαθμούς κελσίου σε υδατόλουτρο. Πρίν από την επίστρωση στις φιάλες προστίθενται 10 ml συμπληρώματος lithiummuricocin, ώστε να εξασφαλιστεί η επιλεκτική ανάπτυξη του Bifidobacterium. Διατηρείται στο ψυγείο εως και μια βδομάδα.

Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η διαφορική καταμέτρηση βακτηρίων γαλακτικού οξέος και Bifidobacteria βασίζεται κυρίως στην οπτική παρατήρηση αποικιών. Όμως η μορφολογία των αποικιών τους είναι αρκετά ασταθής φαινοτυπικά και εξ αυτού χρησιμοποιούνται εκλεκτικά θρεπτικά υλικά για τον σκοπό της καταμέτρησης τους.

PCA (PLATE COUNT AGAR): Σε ένα λίτρο απιονισμένο νερό (dH₂O) προστίθενται 17,5 gr σκόνης oxoidPlatecountagar (ISO). Το υλικό θερμαίνεται υπό ανάδευση έως τον βρασμό του και μοιράζεται σε φιάλες χωρητικότητας 250 ml έως 200 ml. Οι φιάλες αποστειρώνονται στους 121 βαθμούς κελσίου για 15 λεπτά. Έπειτα το υλικό θερμοστατεί στους 47 βαθμούς κελσίου σε υδατόλουτρο και είναι έτοιμο για χρήση.

VRBG (VIOLET RED BILE GLUCOSE): Σε ένα λίτρο απιονισμένο νερό (dH₂O) προστίθενται 38,5 gr σκόνης οξείδ VIOLET RED BILE GLUCOSE (VRBG) AGAR (ISO). Το υλικό θερμαίνεται υπό ανάδευση έως τον βρασμό, ώστε να υπάρξει πλήρης διάλυση της σκόνης και μοιράζεται σε φιάλες χωρητικότητας 250 ml έως τα 200 ml. Δεν αποστειρώνεται, θερμοστατεί στους 47°C και είναι έτοιμο για χρήση εντός 4 ωρών.

DRBC (Pre-supplemented Dichloran Rose-bengal Chloramphenicol Agar): Σε ένα λίτρο απιονισμένο νερό (dH₂O) προστίθενται 31,5 gr σκόνης οξείδ Pre-supplemented Dichloran Rose-bengal Chloramphenicol (ISO). Το υλικό θερμαίνεται υπό ανάδευση έως τον βρασμό, ώστε να υπάρξει πλήρης διάλυση της σκόνης και μοιράζεται σε φιάλες χωρητικότητας 250 ml έως τα 200 ml. Οι φιάλες αποστειρώνονται στους 121 βαθμούς κελσίου για 15 λεπτά. Στη συνέχεια το θρεπτικό υλικό θερμοστατεί στους 50 βαθμούς κελσίου σε υδατόλουτρο και στρώνεται σε τρυβλία petri, έτοιμα για επίστρωση δείγματος.

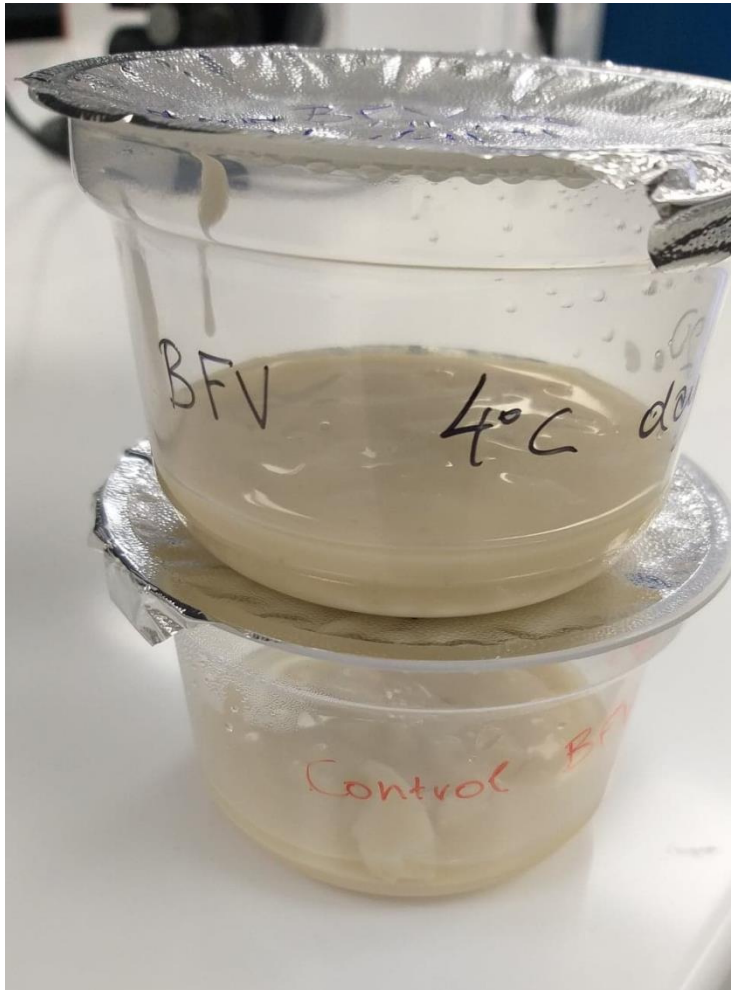
MRS: Σε ένα λίτρο απιονισμένο νερό (dH₂O) προστίθενται 66,73 gr σκόνης MRS (ISO) AGAR (DE MAN, ROGOSA and SHARPE). Το υλικό θερμαίνεται υπό ανάδευση έως τον βρασμό, ώστε να υπάρξει πλήρης διάλυση της σκόνης και μοιράζεται σε φιάλες χωρητικότητας 250 ml έως τα 200 ml. Οι φιάλες αποστειρώνονται στους 121 βαθμούς κελσίου για 15 λεπτά. Έπειτα το υλικό θερμοστατεί στους 47°C σε υδατόλουτρο και είναι έτοιμο για χρήση.

4.3 Μεθοδολογία παρασκευής προϊόντος

Στο πλαίσιο εκτέλεσης του πειράματος παρασκευάστηκαν δύο παρτίδες vegan κρέμας ψυγείου, ώστε να εμβολιαστούν με προβιοτικά στελέχη και να μελετηθεί η διάρκεια ζωής τους.

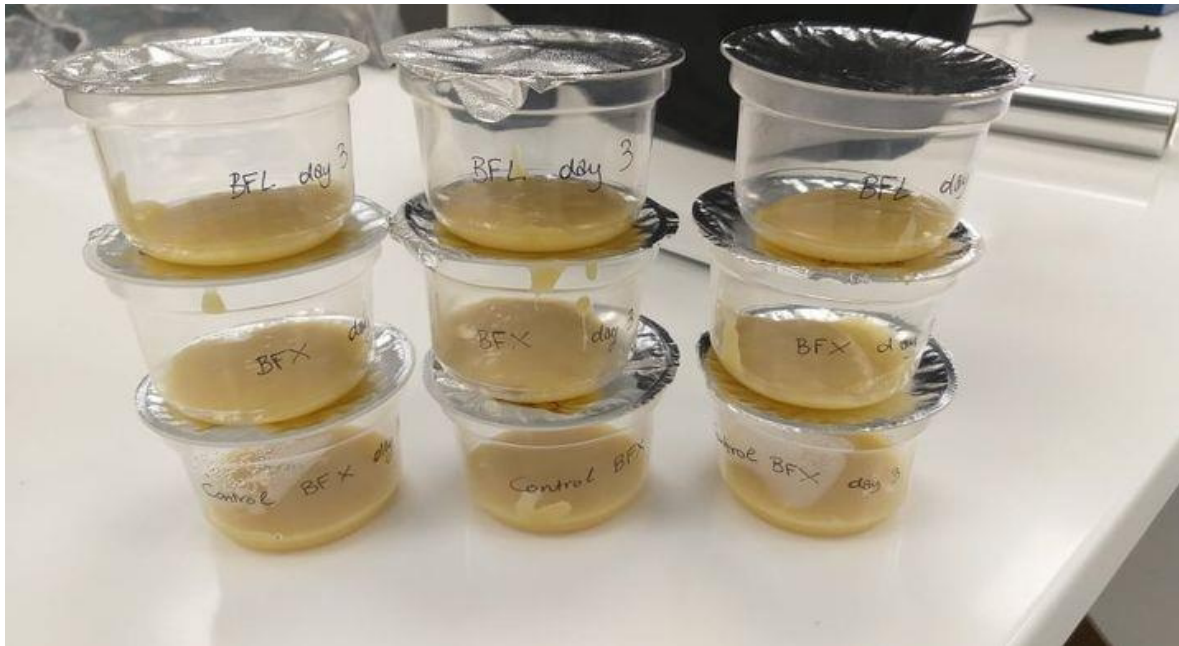
Η πρώτη παρτίδα παρασκευάστηκε με την ανάμειξη 3300 ml γάλακτος βρώμης, 215 γραμμαρίων άνθους αραβοσίτου βανίλια και 225 γραμμαρίων ζάχαρης σε μέτριας έντασης θερμότητα, έως ότου αποκτήσει στερεή μορφή η κρέμα. Το σύνολο της κρέμας χωρίστηκε σε δύο μέρη, εκ των οποίων το 1ο αποτέλεσε το control, στο οποίο δεν προστέθηκαν προβιοτικά ενώ στο 2ο έγινε προσθήκη 0,13 γραμμαρίων αρχικής καλλιέργειας *Bifidobacterium animalis* BB-12 συγκέντρωσης $4,9 \cdot 10^{11}$ colony forming units (cfu) / gr, ώστε το τελικό προϊόν να περιέχει $6 \cdot 10^9$ κύτταρα σε 100 γραμμάρια του προϊόντος. Η προσθήκη αυτή έγινε μόλις η θερμοκρασία της κρέμας έφτασε τους 42 βαθμούς κελσίου σε αποστειρωμένες συνθήκες. Η κρέμα χωρίστηκε σε μερίδες των 50 gr σε σφραγισμένα

κύπελλα, τα οποία αποθηκεύτηκαν σε 3 διαφορετικές θερμοκρασίες στους 4°C , 8°C και 14°C.



Εικόνα 2: Πρώτη παρτίδα κρέμας με γάλα βρώμης και προβιοτικό στέλεχος BB-12 και κρέμα control.

Η δεύτερη παρτίδα παρασκευάστηκε με την ανάμειξη 1650 ml γάλακτος βρώμης, 1650 ml ανάμεικτου χυμού φρούτων, 215 γραμμαρίων άνθους αραβοσίτου βανίλια και 225 γραμμαρίων ζάχαρης σε μέτριας έντασης θερμότητα, έως ότου αποκτήσει σωστή σύσταση η κρέμα. Το σύνολο της κρέμας χωρίστηκε σε τρία μέρη, εκ των οποίων το 1ο αποτέλεσε το control, στο οποίο δεν προστέθηκαν προβιοτικά ενώ στο 2ο έγινε προσθήκη 0,13 γραμμαρίων αρχικής καλλιέργειας *Bifidobacterium animalis* BB-12 συγκέντρωσης $4,9 \cdot 10^{11}$ cfu / gr, ώστε το τελικό προϊόν να περιέχει $6 \cdot 10^9$ σε 100 γραμμάρια του. Η προσθήκη αυτή έγινε μόλις η θερμοκρασία της κρέμας έφτασε τους 42 βαθμούς Κελσίου σε αποστειρωμένες συνθήκες. Έπειτα, το μέρος της κρέμας που εμβολιάστηκε με το προβιοτικό χωρίστηκε περαιτέρω στα δύο. Το 1ο της μέρος χωρίστηκε και αποθηκεύτηκε όπως περιγράφεται ανωτέρω για την πρώτη παρτίδα ενώ το δεύτερο μέρος της κρέμας εμβολιάστηκε και με 0,08 gr αρχικής καλλιέργειας στελέχους *Lactobacillus rhamnosus* συγκέντρωσης $5 \cdot 10^{11}$ cfu / gr, αφού αραιώθηκαν σε 5ml γάλακτος βρώμης.



Εικόνα 3: Δεύτερη παρτίδα κρέμας με α) γάλα βρώμης και χυμό (control) β) με γάλα βρώμης, χυμό και το προβιοτικό στέλεχος BB-12, και γ) με γάλα βρώμης, χυμό και τα δύο προβιοτικά στελέχη BB-12 και LGG.

4.4 Μεθοδολογία καλλιέργειας προβιοτικών

Για την καταμέτρηση των *Bifidobacterium* στις κρέμες ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία για κάθε δείγμα τις ημέρες που είχε προγραμματιστεί η δειγματοληψία.

Από τα δείγματα ζυγίστηκαν 10 γραμμάρια και αραιώθηκαν 1:10 σε 90 γραμμάρια Buffered Peptone Water. Το αραιωμένο δείγμα ομογενοποιήθηκε σε stomacher για ένα λεπτό.

Έπειτα έγιναν διαδοχικές αραιώσεις με τον εξής τρόπο: 1ml της πρώτης αραιώσης τοποθετήθηκε σε 9ml Maximum Recovery Diluent, αναδεύτηκε στο vortex και χρησιμοποιήθηκε για την επόμενη αραιώση. Μετά από 3 διαδοχικές αραιώσεις, 1ml μείγματος (αναμένεται να δώσει 30-300 αποικίες) εκχύθηκαν σε 25 ml TOS-MUP agar σε τρυβλία Petri. Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε και για τις προηγούμενες αραιώσεις.

Τα τρυβλία επώστηκαν για 72 ώρες σε κλίβανο στους 37 °C σε αναερόβιες συνθήκες. Μετά το πέρας των 3 ημερών προσδιορίστηκε ο αριθμός των αποικιών .

Όσον αφορά τα δείγματα που περιείχαν εκτός των *Bifidobacterium lactis* και *Lactobacillus rhamnosus* (μόνο στην 2η παρτίδα) οι κατάλληλες αραιώσεις των δειγμάτων εξετάστηκαν και σε τρυβλία με 25 ml MRS agar. Τα τρυβλία αυτά επώστηκαν αναερόβια για 48 ώρες στους 37°C.

Παράλληλα όλα τα δείγματα εξετάστηκαν όσον αφορά την ολική μεσόφιλη χλωρίδα, καθώς υψηλή συγκέντρωση της (μεγαλύτερη της 10^5) συνιστά δείκτη αλλοίωσης της κρέμας, ως ακολούθως:

1ml δείγματος από τις κατάλληλες αραιώσεις προστέθηκαν σε PLATE COUNT AGAR, και τα τρυβλία επώαστηκαν στους 30°C για 72 ώρες.

Δείκτες αλλοίωσης επίσης είναι η παρουσία εντεροβακτηρίων καθώς και ζυμών και μυκητών. Συνεπώς όλα τα δείγματα εξετάστηκαν για εντεροβακτήρια σε καλλιέργειες με θρεπτικό υλικό VRBG και επώαση στους 37°C για 24 ώρες καθώς επίσης και για την παρουσία ζυμών και μυκητών σε καλλιέργειες με θρεπτικό υλικό DRBC και επώαση στους 30°C για 5 ημέρες,

Μετρήθηκαν επίσης τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά καθώς και το pH όλων των δειγμάτων σε κάθε χρονική στιγμή δειγματοληψίας.

4.5 Μεθοδολογία ανίχνευσης πρωτεϊνών γάλακτος (μη VEGAN συστατικά) στο προϊόν

Για την επιβεβαίωση της παρουσίας/απουσίας μη vegan συστατικών του προϊόντος, πρέπει να ελεγχθεί για ίχνη από πρωτεΐνες γάλακτος με ανοσοδοκιμασία ELISA. Οι πρωτεΐνες γάλακτος θα μπορούσαν να έχουν παραμείνει στο προϊόν λόγω της παρουσίας τους στην αρχική καλλιέργεια *Bifidobacterium lactis*. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν τα kits RIDASCREEN®FAST Casein (R4612) και RIDASCREEN®FAST β-lactoglobulin (R4912), για την ανίχνευση καζεΐνης και β-γαλακτογλοβουλίνης αντίστοιχα. Αρχικά τα δείγματα περνούν από διαδικασία εκχύλισης. Το διάλυμα A-AEP, το οποίο παρασκευάζεται σύμφωνα τις οδηγίες του kit θερμαίνεται στους 60 °C σε υδατόλουτρο. Ζυγίζεται 1 γραμμάριο εξεταζόμενου δείγματος σε ένα σωληνάριο erpendorf των 50 ml και προστίθενται 4ml Extractor 2 (περιέχεται στο kit). Το περιεχόμενο του σωληναρίου αναδευεται στο vortex και τοποθετείται για 10 λεπτά σε λουτρό ύδατος που βράζει στους 100 °C. Το δείγμα κρυώνει σε παγωμένο λουτρό για μικρό χρονικό διάστημα και προστίθενται 16ml προθερμασμένου διαλύματος A-AEP. Τα σωληνάκια φυγοκεντρούνται για 10 λεπτά σε περισσότερα από 2.500 g και στους 4°C. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανοσοδοκιμασία.

Ο απαραίτητος αριθμός από πηγαδάκια μεταφέρεται στην πλάκα μικροτιπλοδότησης, ώστε να υπάρχουν επαρκή για όλα τα δείγματα, standard και θετικούς-αρνητικούς μάρτυρες. 100 μl από κάθε standard, δείγμα και θετικό-αρνητικό μάρτυρα μεταφέρονται με πιπέτα σε ξεχωριστό πηγαδάκι και η πλάκα επωάζεται για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το περιεχόμενο της πλάκας αδειάζεται και στεγνώνεται πάνω σε απορροφητικό χαρτί 3 φορές. Σε κάθε πηγάδι προστίθεται 250 μl διαλύματος έκπλυσης (περιέχεται στο kit) και αφαιρείται ξανά με τον ίδιο τρόπο. Η πλύση επαναλαμβάνεται ακόμη 2 φορές. Στη συνέχεια προστίθενται 100 μl διαλύματος σύνδεσης (Conjugate) στο κάθε πηγάδι και η πλάκα επωάζεται ακόμη 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το υγρό αφαιρείται από την πλάκα και αυτή στεγνώνεται πάνω σε απορροφητικό χαρτί. Επαναλαμβάνονται 3 διαδοχικές πλύσεις με διάλυμα πλύσης. Έπειτα τα πηγαδάκια γεμίζονται με 100 μl Υποστρώματος/χρωμογόνου και η πλάκα επωάζεται για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι. Μετά το πέρας των 10 λεπτών προστίθενται 100 μl του διαλύματος τερματισμού της αντίδρασης σε όλα τα πηγαδάκια και η πλάκα μικροτιπλοδότησης είναι έτοιμη για ανάγνωση στα 450 nm σε φωτόμετρο ορατού. Η διαδικασία είναι η ίδια και για τα δύο kit καζεΐνης και β-γαλακτογλοβουλίνης, με μόνη διαφοροποίηση την χρήση διαφορετικών standards και διαλυμάτων έκπλυσης, σύνδεσης, υποστρώματος και τερματισμού.

4.6 Μελέτη επαλήθευσης μεθόδου καταμέτρησης βακτηρίων

Το κύριο αντικείμενο δραστηριοποίησης ενός εργαστηρίου συνιστά τη μέτρηση ενός μεγέθους ή μιας ιδιότητας. Η μέτρηση αυτή επηρεάζεται πολυπαραγοντικά και θα πρέπει να υπολογίζονται οσον το δυνατόν καλύτερα οι παράμετροι που μπορούν να αλλοιώσουν το αποτέλεσμα. Το σύνολο των παραγόντων αυτών είναι απαραίτητο να εμπεριέχονται στο Σύστημα Διαχείρισης της Ποιότητας του εργαστηρίου, ώστε να αναγνωρίζεται η τεχνική επάρκεια και η αξιοπιστία του, είτε πρόκειται για τη διενέργεια αναλύσεων, είτε πρόκειται για την διενέργεια διακριβώσεων.

Στο πλαίσιο ενός ολικού συστήματος διαχείρισης ποιότητας σε ένα εργαστήριο είναι απαραίτητη προϋπόθεση εκτός άλλων να επαληθεύονται οι νέες μέθοδοι που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν, ο εξοπλισμός να είναι διαπιστευμένος αλλά και το προσωπικό του εργαστηρίου να είναι άρτια καταρτισμένο και στην κατεύθυνση της συνεχούς εκπαίδευσης. (Κανάρης, 2018)

Για την μελέτη επαλήθευσης μιας μεθόδου το εργαστήριο πρέπει να υπολογίσει πέντε παραμέτρους: το όριο ανίχνευσης, το όριο ποσοτικοποίησης, την ορθότητα (ανάκτηση ή μεροληψία), την επαναληψιμότητα και την ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα.

Το όριο ανίχνευσης μιας μεθόδου είναι η ελάχιστη συγκέντρωση μιας ουσίας που μπορεί να μετρηθεί με την μέθοδο αυτή. Η συγκέντρωση αυτή δεν αποτελεί αξιόπιστη μέτρηση και αποτελεί απλά μία τιμή συγκέντρωσης πάνω από αυτή του τυφλού.

Το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ) ή λειτουργική ευαισθησία είναι η ελάχιστη συγκέντρωση της μετρούμενης παραμέτρου που μπορεί να προσδιοριστεί ποσοτικά με αποδεκτή ακρίβεια και επαναληψιμότητα. Το όριο ποσοτικοποίησης αποτελεί και την μικρότερη τιμή που πρέπει να χορηγείται στους ασθενείς.

Η ορθότητα ισούνται με το συστηματικό σφάλμα της μεθόδου και η πιστότητα με το τυχαίο σφάλμα της μεθόδου.

Η επαναληψιμότητα (repeatability ή r) είναι διασπορά των τιμών διαδοχικών μετρήσεων που έγιναν από τον ίδιο αναλυτή, με τα ίδια αντιδραστήρια, με την ίδια βαθμονόμηση και τις ίδιες εξωτερικές περιβαλλοντικές συνθήκες και μέσα στην ίδια ημέρα.

Η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα (interlaboratory reproducibility ή R) ή ενδιάμεση πιστότητα είναι η διασπορά των τιμών διαδοχικών μετρήσεων διαφορετικών ημερών.

Ως αβεβαιότητα πρακτικά ορίζεται η διασπορά των τιμών που μπορούν να αποδοθούν στο μετρούμενο συστατικό. Διαφέρει από την έννοια του σφάλματος στο ότι ενώ το σφάλμα αναφέρεται στη διαφορά μιας τιμής από την αληθή τιμή, η αβεβαιότητα αναφέρεται στη διασπορά των τιμών γύρω από την αληθή τιμή. (Καρκαλούσος, 2005)

Στο πλαίσιο επαλήθευσης της μεθόδου καταμέτρησης των *Bifidobacteria* κατά ISO ελέγχθηκαν οι παράμετροι της επαναληψιμότητας και της αβεβαιότητας. Η μελέτη αυτή λαμβάνει χώρα με σκοπό τα παραγόμενα αναλυτικά αποτελέσματα να έχουν επαρκή ακρίβεια και αξιοπιστία καθώς και να αποδεικνύεται η επίτευξη της ακρίβειας με χρήση παράλληλα κατάλληλου πρωτοκόλλου ποιότητας.

Παρασκευάστηκε εμβόλιο *Bifidobacterium animalis* συγκέντρωσης $8,6 * 10^8$ με το οποίο επιμολύνθηκε τεχνητά έτοιμη κρέμα αραβοσίτου στην πρώτη αραίωσή της. Το επιμολυσμένο δείγμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά και ομογενοποιείται για ένα λεπτό στο stomacher. Η διαδικασία συνεχίζεται με την δημιουργία διαδοχικών αραιώσεων μέχρι την 7η αραίωση και έπειτα 1ml των αραιώσεων 5,6 και 7 ενσωματώνεται σε θρεπτικό υλικό TOS MUP agar. Να σημειωθεί πως σε αυτό το στάδιο χρησιμοποιούνται διπλά τρυβλία για

κάθε συγκέντρωση με σκοπό την εξάλειψη όσων είναι δυνατόν λαθών κατά τον χειρισμό των δειγμάτων. Τα τρυβλία επωάζονται σε αναερόβιες συνθήκες στους 37°C για 72 ώρες και καταμετρούνται οι αποικίες που έχουν εμφανιστεί ώστε να προσδιοριστεί η συγκέντρωση των βακτηρίων που μπορεί να ανιχνεύσει η μέθοδος. Το ίδιο δείγμα αναλύεται ξεχωριστά 6 φορές ώστε να αξιολογηθεί η επαναληψιμότητα του αναλυτή αλλά και της μεθόδου. Η συνολική αυτή διαδικασία επαναλαμβάνεται αυτούσια μια 2η χρονική στιγμή ώστε να αποδειχθεί η αμεταβλητότητα της όσον αφορά τις συνθήκες.

Ακόμη το εμβόλιο καλλιεργήθηκε σε θρεπτικό υλικό TOS MUP AGAR σε 6 διαφορετικές μετρήσεις με σκοπό να προσδιοριστεί η ακριβής του συγκέντρωση καθώς και να επαληθευτεί πως η παρασκευή του είναι αρκετά ακριβής για χρήση του στο πείραμα.

Έπειτα κρίθηκε απαραίτητη μια απόπειρα προσδιορισμού της αβεβαιότητας μέτρησης των *Bifidobacteria* με καταμέτρηση αποικιών στους 37°C. Στην συγκεκριμένη περίπτωση η προσέγγιση της εκτίμησης της αβεβαιότητας βασίζεται στη συνολική μεταβλητότητα της διαδικασίας ανάλυσης, η οποία περιλαμβάνει μόνο την ακρίβεια και όχι το συστηματικό σφάλμα λόγω του εμπειρικού τρόπου καταμέτρησης των μικροοργανισμών. Η συνολική προσέγγιση βασίζεται σε μια πειραματική εκτίμηση της τυπικής απόκλισης της αναπαραγωγιμότητας ενός τελικού αποτελέσματος που έχει υποβληθεί σε ολόκληρη τη διαδικασία. Αυτή η τυπική απόκλιση αντιστοιχεί στην συνδυασμένη αβεβαιότητα.

Στις μικροβιολογικές αναλύσεις η αβεβαιότητα προέρχεται κυρίως από την δειγματοληψία, το εργαστηριακό δείγμα, την φύση του υποστρώματος, τον εξοπλισμό, τα θρεπτικά υλικά-αντιδραστήρια, τον αναλυτή, το συστηματικό σφάλμα καθώς και πρόσθετα τυχαία σφάλματα.

Στο πειραματικό πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε δεν λαμβάνεται υπόψιν το συστηματικό σφάλμα ως πηγή αβεβαιότητας. Η τυπική απόκλιση της αναπαραγωγιμότητας υπολογίζεται με την τυπική απόκλιση της εσωτερικής αναπαραγωγιμότητας. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

Παρασκευάστηκαν 6 εμβόλια διαφορετικής συγκέντρωσης του προβιοτικού στελέχους *Bifidobacterium animalis* BB-12, με διαδοχικές αραιώσεις, ξεκινώντας από 1ml της αρχικής καλλιέργειας προβιοτικού και έπειτα αραιώση του σε 9 ml διαλύματος MRD και ούτως καθεξής. Στη συνέχεια ζυγίστηκαν 6 φορές από 10 γραμμάρια την καθεμία το ίδιο δείγμα κρέμας άνθους αραβοσίτου ψυγείου και αραιώθηκε 1:10 με την προσθήκη 90 γραμμαρίων διαλύματος MRD. Τα εμβόλια προστέθηκαν απευθείας στην 1η αραιώση του δείγματος και το επιμολυσμένο δείγμα παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά. Ύστερα το δείγμα ομογενοποιείται σε *stomacher* για ένα λεπτό και το δείγμα αναλύεται με την ίδια

μεθοδολογία που αναφέρθηκε παραπάνω για την καλλιέργεια προβιοτικών. Είναι σημαντικό η ανάλυση να ολοκληρωθεί εντός 45 λεπτών ώστε να εξασφαλιστεί η βιωσιμότητα του στελέχους *Bifidobacterium animalis*.

Μετά από 3 μέρες σε αναερόβιες συνθήκες στους 37°C, καταμετρούνται οι αποικίες στα τρυβλία και οι συγκεντρώσεις που υπολογίζονται μετασχηματίζονται σε λογάριθμους, ώστε να εξασφαλιστεί ότι η διακύμανση της αναπαραγωγιμότητας είναι ανεξάρτητη από το επίπεδο μόλυνσης και η συγκεκριμένη μελέτη δεν εφαρμόζεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα μόλυνσης (<100 cfu/gr).

Η τυπική απόκλιση της αναπαραγωγιμότητας για τις μετρήσεις υπολογίζεται με χρήση του τύπου:

$$SR = \sqrt{\frac{1}{n} \sum \frac{(y_iA - y_iB)^2}{2}}$$

Το διάστημα αβεβαιότητας U μέσα στο οποίο αναμένεται να βρίσκεται η πραγματική τιμή του αποτελέσματος της μέτρησης των αποικιών μπορεί να υπολογιστεί από τη συνδυασμένη τυπική αβεβαιότητα u_c (SR) με χρήση κατάλληλου συντελεστή κάλυψης k.

Ο συντελεστής k λαμβάνεται με χρήση της κανονικής κατανομής, με επίπεδο εμπιστοσύνης 95% με αποτέλεσμα να έχουμε πως $k=2$

Τελικά η διευρυμένη αβεβαιότητα των μετρήσεων υπολογίζεται από την εξίσωση:

$$U = 2u_c(y) = 2SR$$

Γ) ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στις καλλιέργειες, των οποίων η μεθοδολογία περιγράφηκε στο 4.4 μετρήθηκαν οι αποικίες μετά την κατάλληλη επώαση για κάθε θρεπτικό υλικό. Η μέτρηση αυτή γίνεται εμπειρικά με τη χρήση colony counter, στα τρυβλία που αντιπροσωπεύουν δυο διαδοχικές αραιώσεις και ο αριθμός των αποικιών τους είναι ανάμεσα σε 30 έως 300 ώστε να είναι το αποτέλεσμα να είναι αξιόπιστο.

Στη συνέχεια υπολογίζεται η συγκέντρωση του εξεταζόμενου μικροοργανισμού σε cfu/gr δείγματος με τη χρήση του παρακάτω τύπου:

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

όπου N: η συγκέντρωση του μικροοργανισμού σε (colonyformingunits) cfu/gr εξεταζόμενου δείγματος

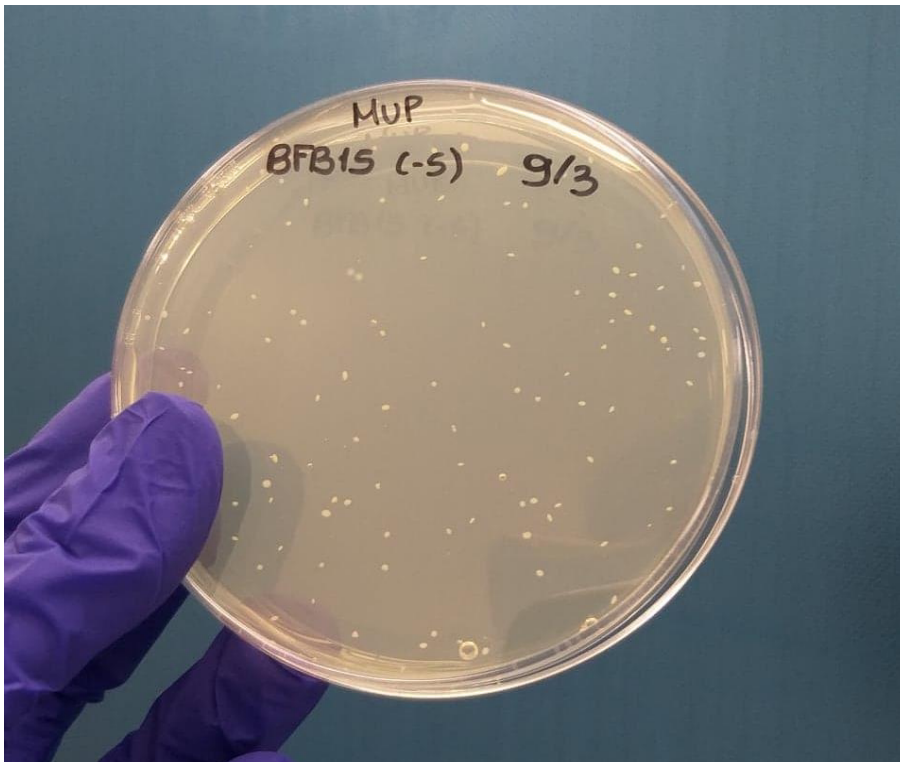
Σχι : το άθροισμα των αποικιών στα δύο τρυβλία των διαδοχικών αραιώσεων

n1: ο αριθμός των τρυβλίων στην πρώτη αραιώση που μετράται

n2: ο αριθμός των τρυβλίων στη δεύτερη αραιώση που μετράται

d: ο παράγοντας αραιώσης της πρώτης αραιώσης που μετράται

Τα αποτελέσματα έπειτα μετατρέπονται σε log(cfu/gr) ώστε να είναι συγκρίσιμα με ευκολία. Εδώ θα πρέπει να σημειωθεί πως εφόσον η επιθυμητή συγκέντρωση προβιοτικών βακτηρίων είναι 10^6 - 10^7 ανά 1 γραμμάριο προϊόντος σε λογαριθμική αντιστοιχία είναι 6-7.

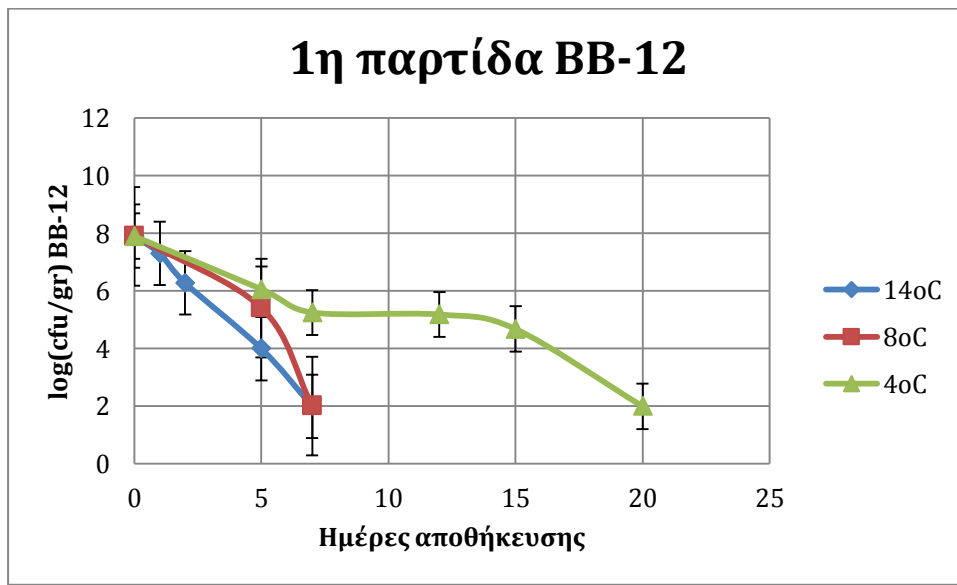


Εικόνα 4: Καλλιέργεια *Bifidobacteriumlactis* σε TOS-MUP agar

5.1 1^η συνταγή πιλοτικού προϊόντος (γάλα βρώμης)

5.1.1 Ανθεκτικότητα προβιοτικού (BB-12) συναρτήσει του χρόνου και θερμοκρασία αποθήκευσης

Το πιλοτικό προϊόν αποθηκεύτηκε στους 4,8,14, °C για διάφορα χρονικά διαστήματα (μέχρι 20 μέρες) και μετά από μέτρηση των αποικιών του BB-12 λήφθηκαν τα αποτελέσματα του γραφήματος 1:

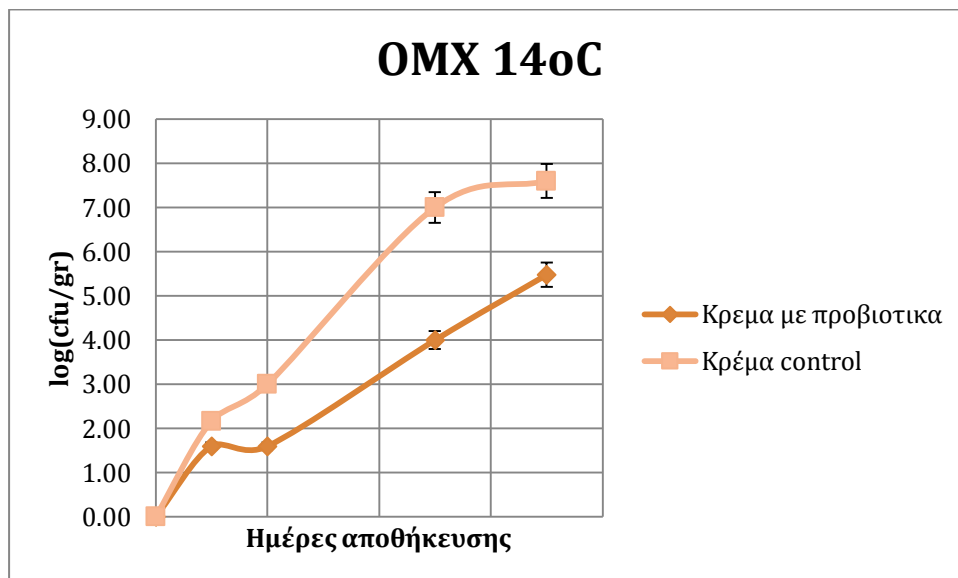


Γράφημα 1 Συγκέντρωση εμπορικού στελέχους BB-12 σε κρέμες της πρώτης παρτίδας όπως υπολογίστηκε μετά από συγκεκριμένες μέρες αποθήκευσης στους 14°C, 8°C και 4°C.

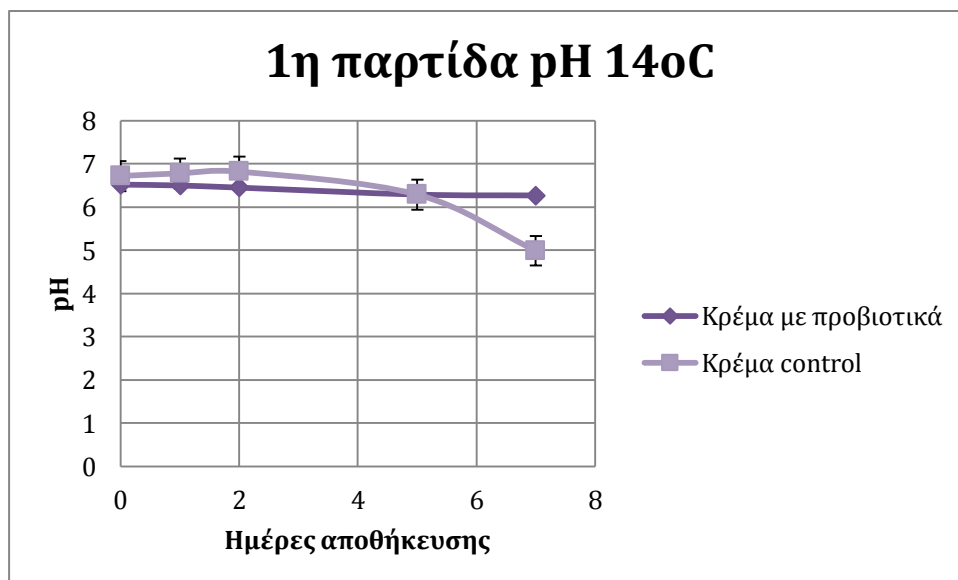
Στην πρώτη παρτίδα κρέμας φαίνεται πως το προβιοτικό στέλεχος *Bifidobacterium lactis* BB-12 επιβιώνει σε υψηλότερο βαθμό στους 4°C, συγκριτικά με τους 8°C και 14°C, όπου ο πληθυσμός του ουσιαστικά εξαφανίζεται κατά τις πρώτες 7 ημέρες.

Ωστόσο ακόμη και στους 4°C η επιβίωση του προβιοτικού στελέχους δεν είναι ικανοποιητική για την εμπορική κυκλοφορία του προϊόντος καθώς όπως φαίνεται και στο παρακάτω γράφημα η συγκέντρωση του είναι ελάχιστα εντός των επιθυμητών ορίων (6-7 log cfu/g) την 5η μέρα αποθήκευσης. Είναι όμως φανερά πιο ευνοϊκή η χαμηλή θερμοκρασία αποθήκευσης καθώς η συγκέντρωση του BB-12 διατηρείται στην τάξη το 10⁵ μέχρι και την ημέρα 15 μετά την παραγωγή της κρέμας.

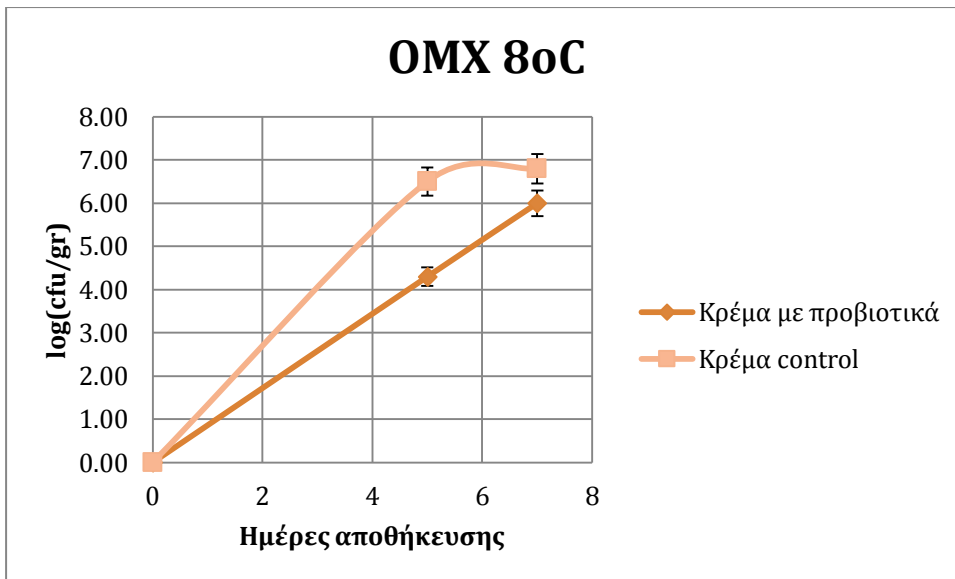
5.1.2 Σταθερότητα και ασφάλεια κατανάλωσης του προϊόντος



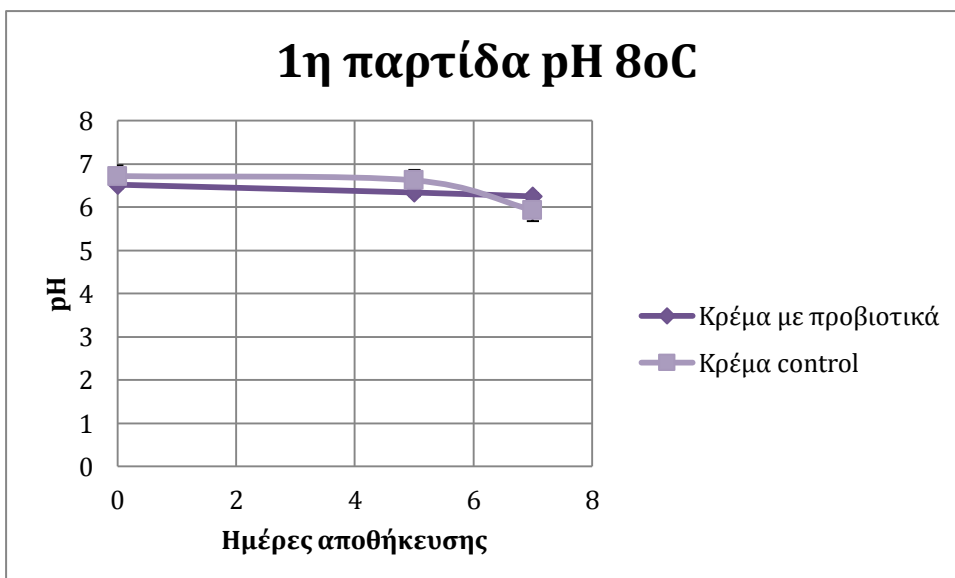
Γράφημα 2: Συγκέντρωση Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας 1ης παρτίδας στους 14°C



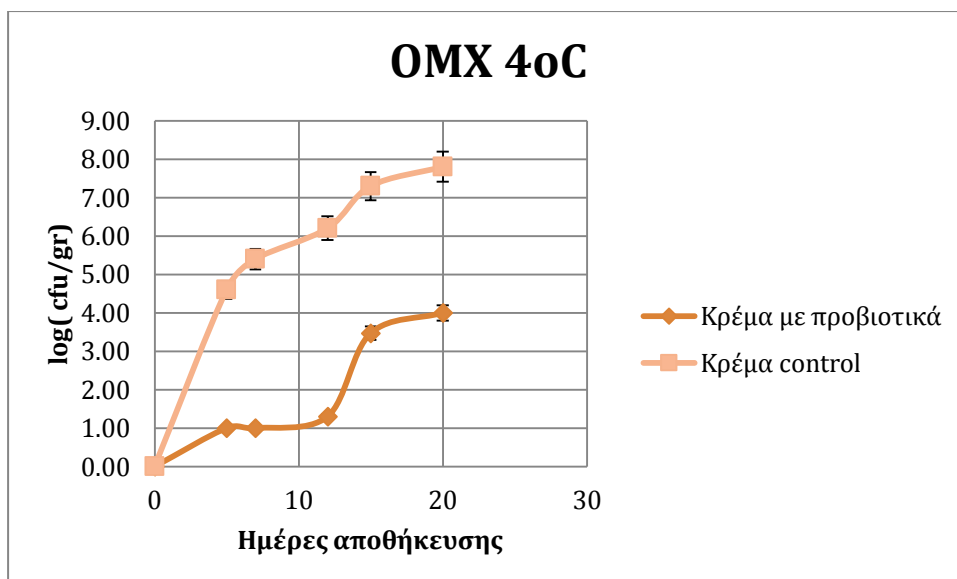
Γράφημα 3: ΡΗ πρώτης παρτίδας στους 14°C



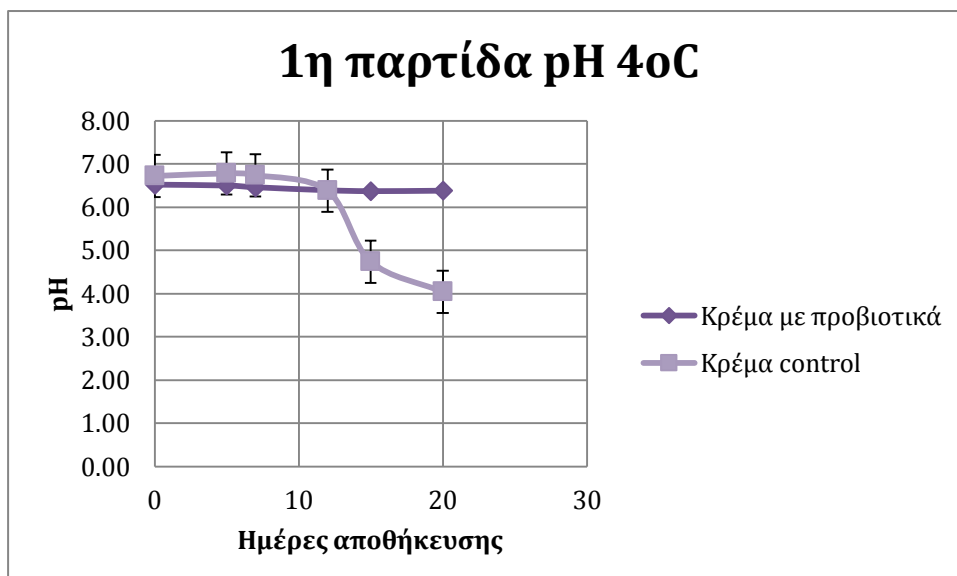
Γράφημα 4: Συγκέντρωση Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας της πρώτης παρτίδας στους 8°C



Γράφημα 5:PH πρώτης παρτίδας στους 8°C



Γράφημα 6: Συγκέντρωση Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας 1ης παρτίδας στους 4°C



Γράφημα 7: ΡΗ πρώτης παρτίδας στους 4°C

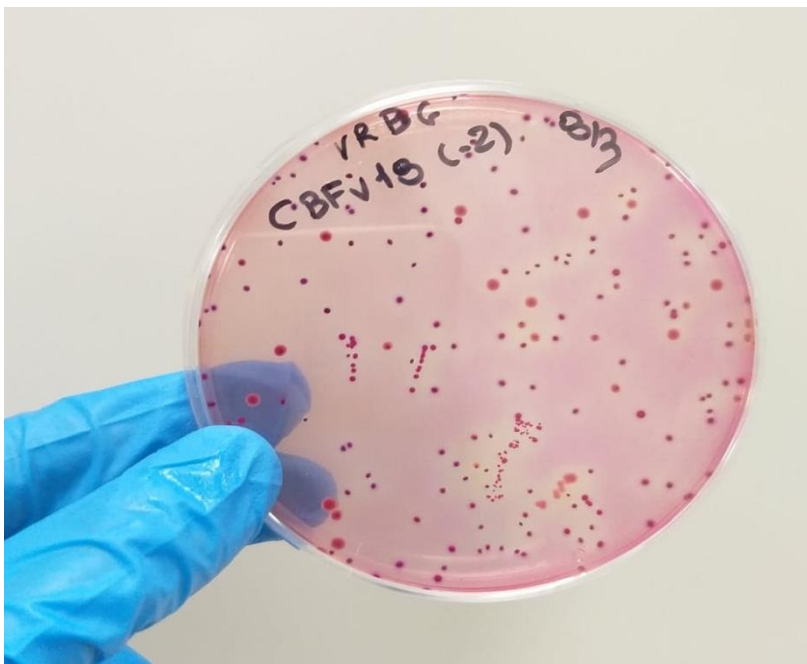
Όπως φαίνεται στα γραφήματα 2,4,6 η συγκέντρωση της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας είναι σε όλες τις θερμοκρασίες υψηλότερη στις κρέμες control από τις κρέμες που προστέθηκε το προβιοτικό στέλεχος *Bifidobacterium animalis* BB-12 (. Αντίστοιχα το pH είναι πιο όξινο στις κρέμες χωρίς προβιοτικό σε όλες τις θερμοκρασίες αλλά η διαφορά είναι πιο σύντομα εμφανής στους 14°C (λίγες μέρες αποθήκευσης) όπου η κρέμα δεν είναι κατάλληλη για κατανάλωση ήδη από την 5η μέρα αποθήκευσης (γραφήματα 3,5,7).

Ακόμη θα πρέπει να σημειωθεί πως ως προς την ανάπτυξη μυκήτων αλλά και εντεροβακτηρίων λήφθηκαν αποτελέσματα σε κάποια από τα δείγματα. Στις κρέμες control εντοπίστηκαν μύκητες μετά την 5^η μέρα στους 14°C και τους 8°C στην τάξη του 10⁵.



Εικόνα 5: Καλλιέργεια ζυμών μυκήτων σε DRBC

Μετά την 15η ημέρα αποθήκευσης στους 4°C ανιχνεύθηκαν στην κρέμα control εκτός των μυκήτων και εντεροβακτήρια, τα οποία μέχρι την 20η ημέρα έφτασαν την τάξη του 10⁶, καθιστώντας την κρέμα ακατάλληλη προς κατανάλωση.



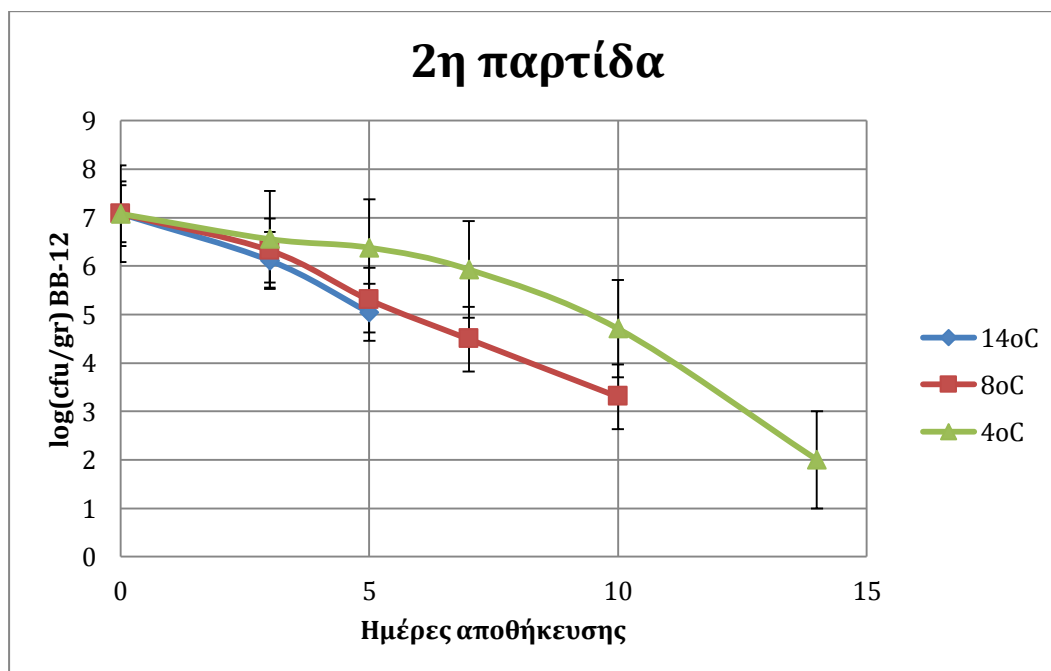
Εικόνα 6: Καλλιέργεια εντεροβακτηρίων σε θρεπτικό υλικό VRBG

5.2 2^η Συνταγή πιλοτικού προϊόντος (γάλα βρώμης- χυμός φρούτων)

5.2.1 Ανθεκτικότητα προβιοτικού (BB-12) συναρτήσει του χρόνου και θερμοκρασία αποθήκευσης

Θεωρήθηκε σκόπιμο να εξεταστεί το εάν και πως θα επηρεάσει την επιβίωση του συγκεκριμένου στελέχους (BB-12) η προσθήκη στη συνταγή της κρέμας ανάμεικτου χυμού φρούτων (μήλο, σταφύλι, ροδάκινο, πορτοκάλι, ανανάς, γκρέιπφρουτ). Αυτό προέκυψε λόγω βιβλιογραφικών αναφορών σχετικά με την ευεργετική δράση των χυμών φρούτων για την ανάπτυξη των προβιοτικών (Aspri et al, 2019). Επομένως η δεύτερη παρτίδα κρέμας που παρασκευάστηκε περιείχε ίσες ποσότητες γάλα βρώμης και χυμού.

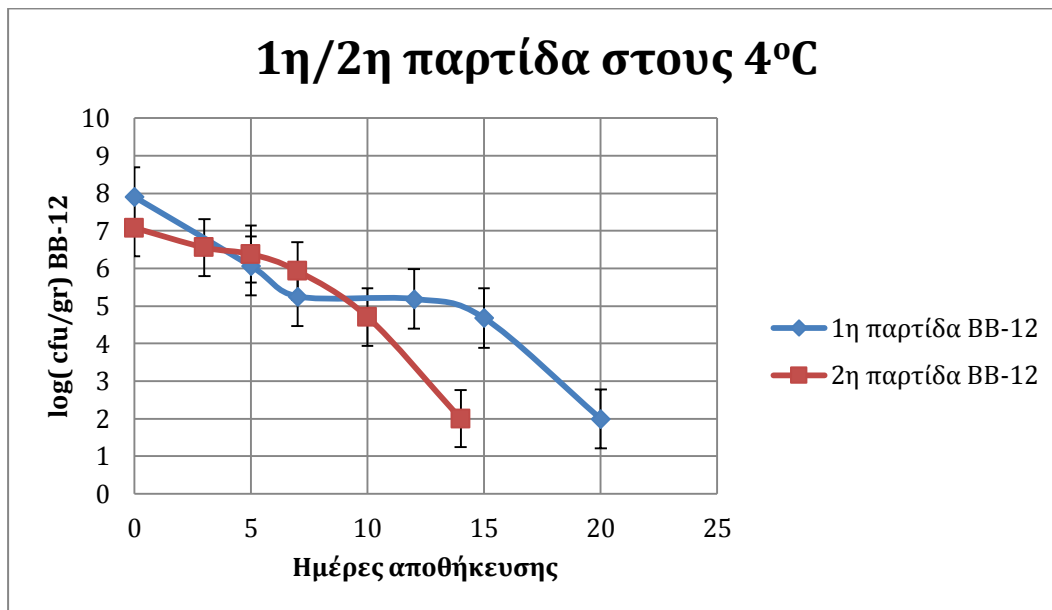
Η δειγματοληψία της 2ης παρτίδας εστιάστηκε κυρίως στις δύο χαμηλότερες θερμοκρασίες συντήρησης. Αρχικά για την κρέμα που περιείχε μόνο το στέλεχος BB-12 λάβαμε τα εξής αποτελέσματα:



Γράφημα 8 Συγκέντρωση εμπορικού στελέχους BB-12 σε κρέμες της δεύτερης παρτίδας όπως υπολογίστηκε μετά από συγκεκριμένες μέρες αποθήκευσης στους 14°C, 8°C και 4°C

Για τις πρώτες μέρες της αποθήκευσης παρατηρείται βελτιωμένη σταθερότητα του προβιοτικού, με τη συγκέντρωσή του να είναι διπλάσια από την αντίστοιχη στην 1η παρτίδα

των 5 έως 10 ημερών αποθήκευσης.(γράφημα 8). Η διαφορά σταθερότητας ανάμεσα στις διαφορετικές θερμοκρασίες είναι σημαντικά μικρότερη σε σχέση με αυτή που υπήρχε στην 1η παρτίδα κρέμας (γράφημα 9).Φαίνεται επίσης πως η καλύτερη επιβίωση του προβιοτικού μακροπρόθεσμα λαμβάνει χώρα στη χαμηλότερη θερμοκρασία αποθήκευσης, δηλαδή στους 4°C



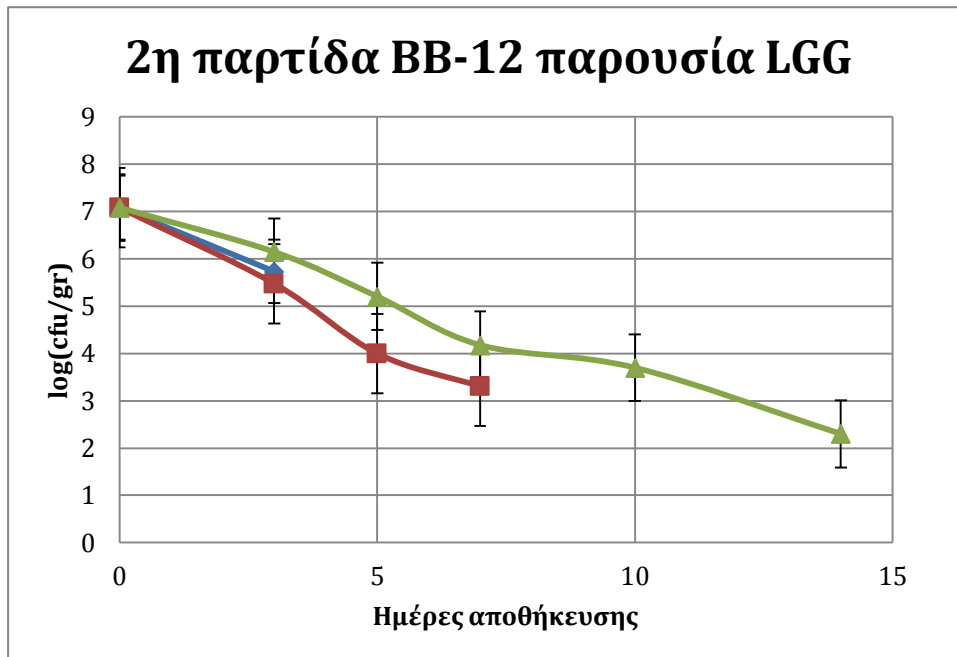
Γράφημα 9 Συγκέντρωση εμπορικού στελέχους BB-12 σε κρέμες της πρώτης και δεύτερης παρτίδας όπως υπολογίστηκε μετά από συγκεκριμένες μέρες αποθήκευσης στους 4°C.

5.2.2 Σταθερότητα και ασφάλεια κατανάλωσης του προϊόντος

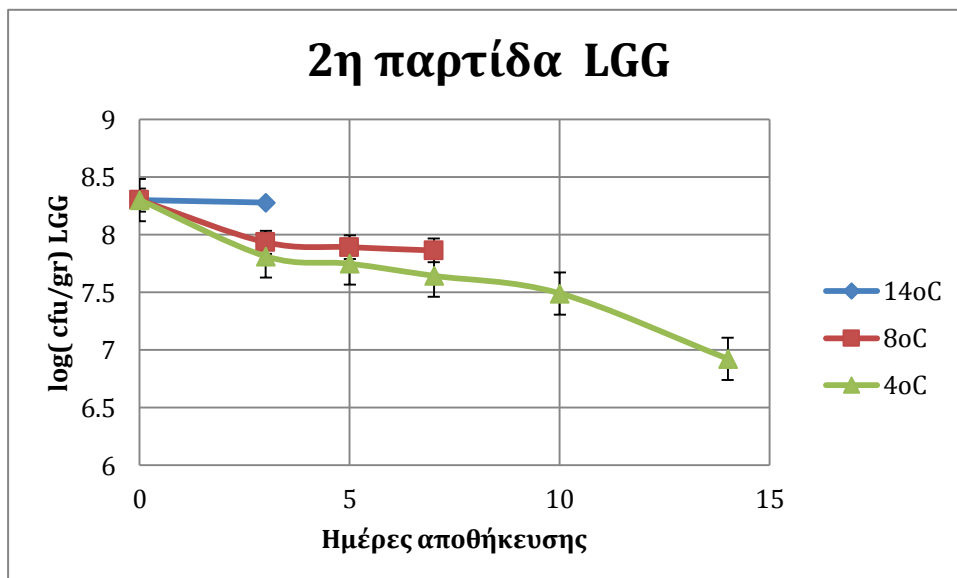
Η μέτρηση της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας ήταν τόσο για τις κρέμες με προβιοτικά, όσο και για τις κρέμες control σε πολύ χαμηλά επίπεδα. Μόλις την ημέρα 14, έφτασε στην τάξη του 10^3 , χωρίς να παρατηρηθούν συγχρόνως μεταβολές στο pH. Επιπλέον, την 14η μέρα εντοπίστηκε και στις δύο κρέμες πολύ μικρή ποσότητα εντεροβακτηρίων στο VRBG, τάξης 10^1 . Το pH ήταν σε όλες τις θερμοκρασίες αποθήκευσης τόσο για την κρέμα προβιοτικών όσο και την κρέμα control $4,45 \pm 0,05$. Τέλος, η δομή έμεινε ανέπαφη έως την ημέρα 10, αφού στη μέτρηση της ημέρας 14 άρχισε η κρέμα και το control να αποδομείται.

5.2.3 ανθεκτικότητα προβιοτικού (BB-12) παρουσία LGG συναρτήσει του χρόνου και θερμοκρασία αποθήκευσης

Η παρουσία LGG δεν φαίνεται να επιρεάζει την σταθερότητα του BB-12 (σχήμα 10)



Γράφημα 10: Συγκέντρωση εμπορικού στελέχους BB-12 σε κρέμες της δεύτερης παρτίδας παρουσία LGG όπως υπολογίστηκε μετά από συγκεκριμένες μέρες αποθήκευσης στους 14°C, 8°C και 4°C.



Γράφημα 11: Συγκέντρωση εμπορικού στελέχους LGG σε κρέμες της δεύτερης παρτίδας όπως υπολογίστηκε μετά από συγκεκριμένες μέρες αποθήκευσης στους 14°C, 8°C και 4°C.

Ενώ η συγκέντρωση του προβιοτικού στελέχους *Lactobacillus rhamnosus* (LGG) διατηρείται στα επιθυμητά επίπεδα καθόλη τη διάρκεια της μελέτης σταθερότητας, δηλαδή τις 15 ημέρες (σχήμα 11). Παρ' όλα αυτά Παρατηρείται μείωση της βιωσιμότητας του στελέχους μετά την 7η ημέρα.

6 Ανίχνευση πρωτεϊνών γάλακτος

Τα δείγματα που μελετήθηκαν ως προς την παρουσία των πρωτεϊνών γάλακτος καζεΐνη και β-γαλακτογλοβουλίνη που λήφθηκαν από τη μέτρηση με φωτόμετρο είναι τα εξής:

- 1) Κρέμα άνθους αραβοσίτου με *Lactobacillus rhamnosus* και *Bifidobacterium animalis*
- 2)Κρέμα άνθους αραβοσίτου με *Bifidobacterium animalis*
- 3)Κρέμα άνθους αραβοσίτου-control

Για την παρουσία καζεΐνης λήφθηκαν τα εξής αποτελέσματα από το φωτόμετρο στα 450 nm

Standard 1 ⇒ 1.111

Standard 2 ⇒ 1,333

Standard 3 ⇒ 1.714

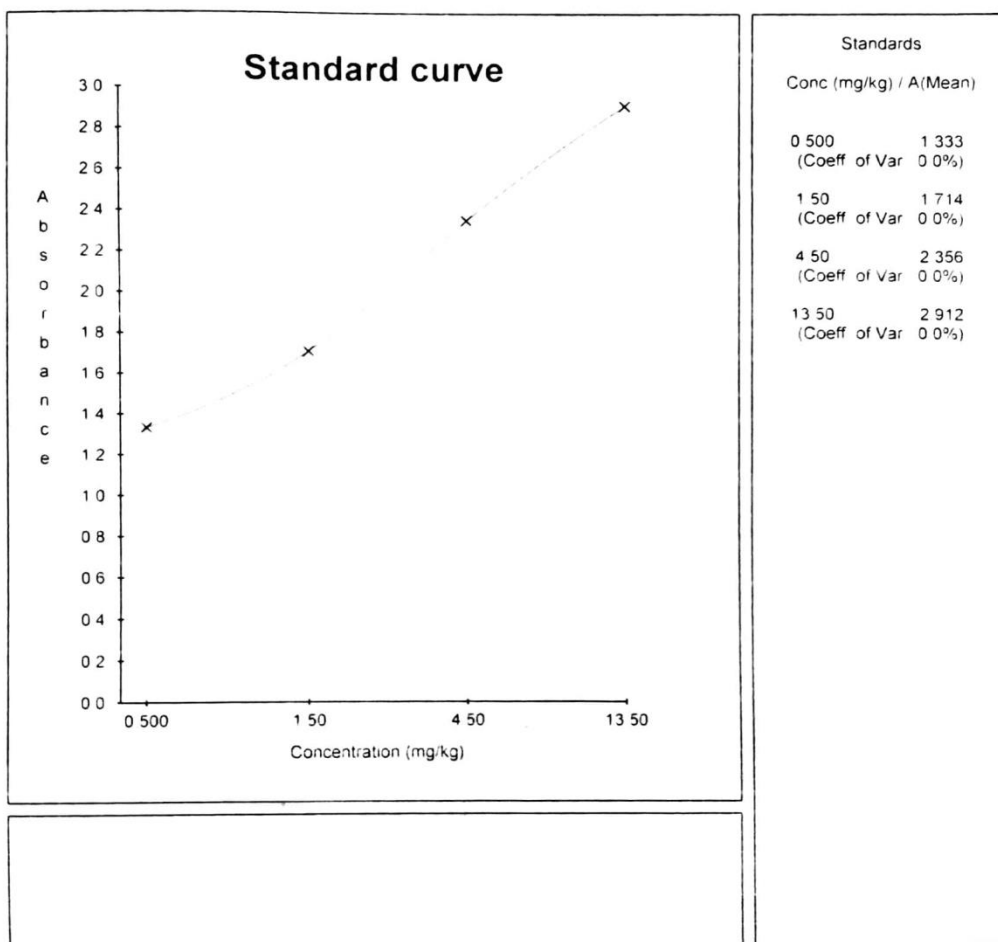
Standard 4 ⇒ 2.356

Standard 5 ⇒ 2.912

Δείγμα 1 ⇒ 0.976

Δείγμα 2 ⇒ 1.056

Δείγμα 3 ⇒ 1.003



Εικόνα 7: Πρότυπη καμπύλη ανοσοδοκιμασίας ELISA για την παρουσία καζεΐνης

Με χρήση της πρότυπης καμπύλης και συνυπολογίζοντας τον παράγοντα αραίωσης των δειγμάτων 1:5 από το λογισμικό που συνοδεύει το kit προκύπτει τελικά πως η συγκέντρωση της καζεΐνης είναι <2.50 mg/kg και κατ επέκταση σε αποδεκτό επίπεδο για την κατανάλωση του σε περίπτωση αλλεργίας στο γάλα.

Για την παρουσία β-γαλακτογλοβουλίνης λήφθηκαν τα εξής αποτελέσματα από το φωτόμετρο στα 450 nm:

Standard 1 ⇒ 0,160

Standard 2 ⇒ 0,455

Standard 3 \Rightarrow 1.072

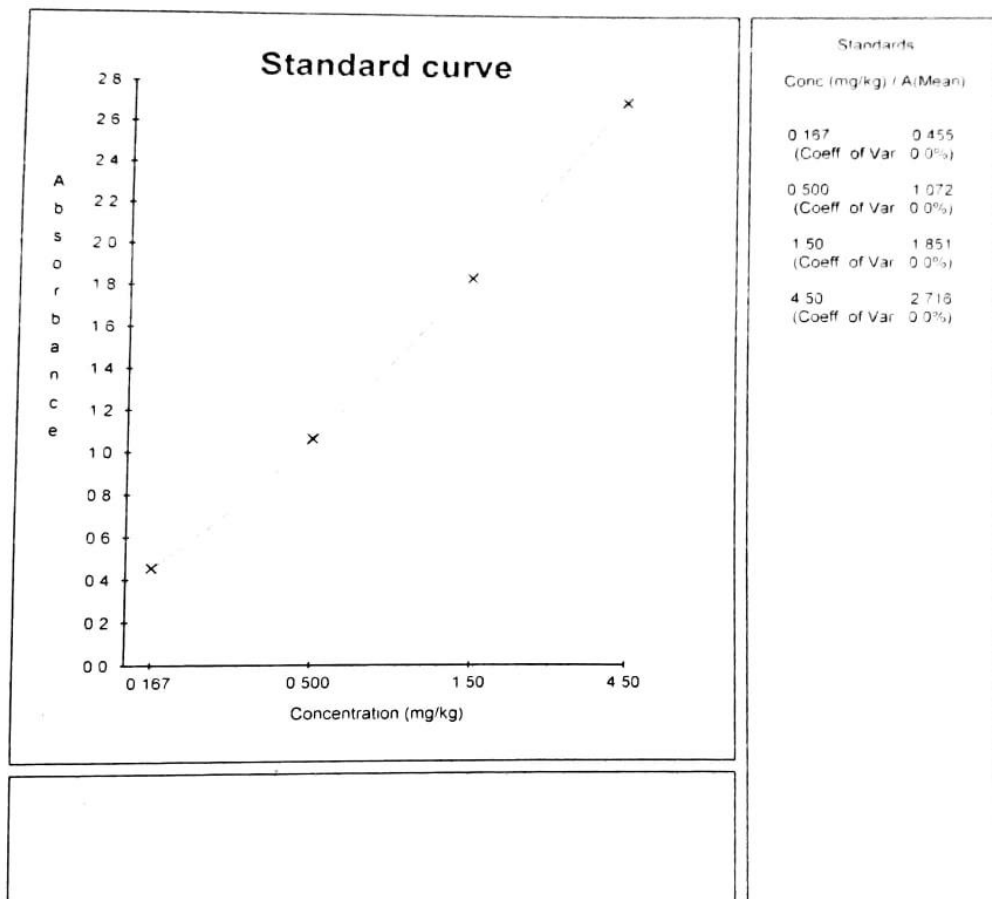
Standard 4 \Rightarrow 2.716

Standard 5 \Rightarrow 2.787

Δείγμα 1 \Rightarrow 0,247

Δείγμα 2 \Rightarrow 0.359

Δείγμα 3 \Rightarrow 0.392



C:\Ridawin NET\FOOD\Allergens\R4912 FAST beta-Lactoglobulin met

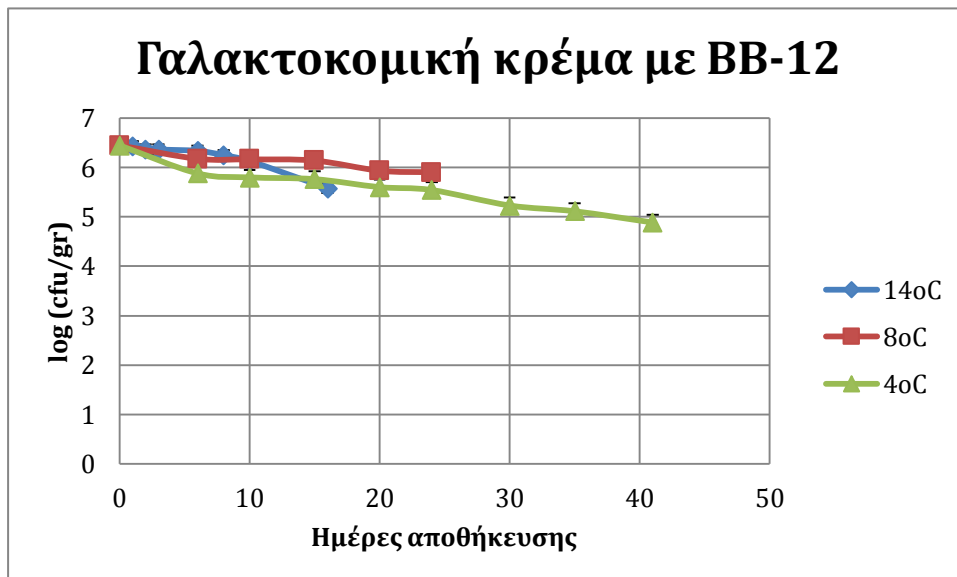
Εικόνα 8: Πρότυπη καμπύλη ανοσοδοκιμασίας ELISA για την παρουσία β-γαλακτογλοβουλίνης.

Με χρήση της πρότυπης καμπύλης από το λογισμικό που συνοδεύει το kit προκύπτει τελικά πως η συγκέντρωση της β-γαλακτογλοβουλίνης είναι <0,167 mg/kg και κατ επέκταση σε αποδεκτό επίπεδο για την κατανάλωση του σε περίπτωση αλλεργίας στο γάλα.

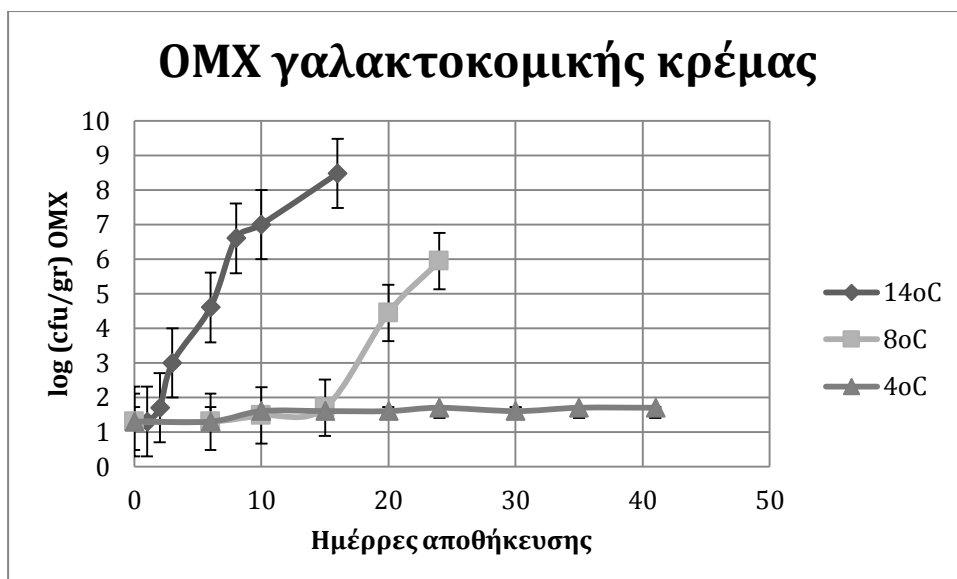
Από τα παραπάνω κρίνεται πως η κρέμα άνθους αραβοσίτου δεν έχει επιμολυνθεί από πρωτεΐνες γάλακτος και είναι κατάλληλη για κατανάλωση από άτομα που ακολουθούν διατροφή χωρίς προϊόντα ζωικής προέλευσης.

7. Σύγκριση με γαλακτοκομική κρέμα προβιοτικών

Η ίδια μελέτη διάρκειας ζωής έγινε στις ίδιες συνθήκες και σε κρέμα που περιείχε γάλα, ώστε να είναι εφικτή η σύγκριση της επιβίωσης του προβιοτικού στις δύο περιπτώσεις.



Γράφημα 12: Συγκέντρωση εμπορικού στελέχους BB-12 σε γαλακτοκομική κρέμα όπως υπολογίστηκε μετά από συγκεκριμένες μέρες αποθήκευσης στους 14°C, 8°C και 4°C.



Γράφημα 13: Συγκέντρωση Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας σε γαλακτοκομική κρέμα όπως υπολογίστηκε μετά από συγκεκριμένες μέρες αποθήκευσης στους 14°C, 8°C και 4°C.

Είναι προφανές πως η επιβίωση του προβιοτικού είναι πιο ικανοποιητική στην κρέμα που έχει ως βάση το γάλα. Στους 14°C μέχρι και την 10η ημέρα η επιβίωση του προβιοτικού είναι η μέγιστη, ενώ έπειτα σημειώνεται πτώση καθώς στο προϊόν αναπτύσσονται ανταγωνιστικοί μικροοργανισμοί που αλλοιώνουν την δομή, το pH και τη διαθεσιμότητα των θρεπτικών. Η διατήρηση στους 8°C φαίνεται επίσης επαρκής έως και την 24η μέρα, όποτε και το προϊόν έχει πλέον υψηλό μικροβιακό φορτίο. Τέλος στους 4°C το προϊόν είναι ασφαλές για κατανάλωση μέχρι και την 41η ημέρα αποθήκευσης, αλλά με σημαντική μείωση της βιωσιμότητας του *Bifidobacterium animalis* BB-12.

Όσον λοιπόν αφορά τις θερμοκρασίες συντήρησης παρατηρείται αναστροφή των αποτελεσμάτων που λήφθηκαν από την μέτρηση στη vegan κρέμα. Ενώ στην κρέμα με γάλα η μεγαλύτερη συγκέντρωση επιτυγχάνεται στην υψηλότερη θερμοκρασία δηλαδή στους 14°C, στην κρέμα χωρίς γάλα επιτυγχάνεται στην χαμηλότερη 4°C..

8. Αποτελέσματα μελέτης επαλήθευσης

Στον πίνακα που ακολουθεί εμφανίζονται οι τιμές του εμβολίου που χρησιμοποιήθηκε για την επιμόλυνση του δείγματος κρέμας κατά την πειραματική διαδικασία της μελέτης επαλήθευσης της μεθόδου καταμέτρησης :

Αριθμός μέτρησης εμβολίου	Μετρούμενη τιμή εμβολίου	Log cfu/gr
1	$8,1 * 10^{10}$	10,9084
2	$8 * 10^{10}$	10,9030
3	$8,6 * 10^{10}$	10,9344
4	$8,6 * 10^{10}$	10,9344
5	$9,2 * 10^{10}$	10,9637
6	$8,9 * 10^{10}$	10,9493
Μέσος όρος	$8,6 * 10^{10}$	10,9322

Με χρήση του μέσου όρου των τιμών που λήφθηκαν από τις 6 μετρήσεις συμπεραίνεται πως το εμβόλιο που χρησιμοποιήθηκε περιέχει $8,6 * 10^{10}$ ζωντανά κύτταρα *Bifidobacterium animalis* BB-12.

Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται οι μετρήσεις που λήφθηκαν μετά τον εμβολιασμό της πρώτης αραίωσης κρέμας ψυγείου με το εμβόλιο που υπολογίστηκε παραπάνω:

1η χρονική στιγμή			2η χρονική στιγμή				
S ₁	8,9 E+07	cfu/gr	7,94939	S _{1'}	1,1 E+08	cfu/gr	8,041393
S ₂	9,6 E+07	cfu/gr	7,982271	S _{2'}	9,4 E+07	cfu/gr	7,973128
S ₃	9,1 E +07	cfu/gr	7,959041	S _{3'}	9,2 E+07	cfu/gr	7,963788
S ₄	1 E +08	cfu/gr	8	S _{4'}	8,7 E+07	cfu/gr	7,939519
S ₅	9,9 E+07	cfu/gr	7,995635	S _{5'}	1,3 E+08	cfu/gr	8,113943
S ₆	9,3 E+07	cfu/gr	7,968483	S _{6'}	9,8 E +07	cfu/gr	7,991226
M.O.			7,975803				8,003833

Επομένως αφού τα δείγματα εμβολιάστηκαν με $8,6 * 10^{10}$ στα 100+-1ml δείγματος αναμένεται $8,6 * 10^8$ cfu/gr. Ωστόσο κατά τον εμβολιασμό είναι αναμενόμενο να παρατηρηθεί μείωση της βιωσιμότητας του στελέχους, όπως και προέκυψε.

Από τα παραπάνω δεδομένα υπολογίζεται η τυπική απόκλιση σύμφωνα με τον τύπο:

$$Sr = \sqrt{\frac{\sum^n (YiAVERAGE - Yia)^2}{(n-1)}}$$

όπου YiAverage: ο μέσος όρος των λογαρίθμων των 6 υποδειγμάτων την πρώτη χρονική στιγμή

Yia: ο λογάριθμος ενός αποτελέσματος ανά αναλυτή

n: ο αριθμός των επαναλήψεων σε κάθε χρονική στιγμή

Επομένως προκύπτει: $Sr_1=0,02$ και $Sr_2=0,06$

και κατά συνέπεια $r_1=0,06$ $r_2=0,168$

Το όριο επαναληψιμότητας (r) είναι η τιμή, ίση ή μικρότερη της απόλυτης αριθμητικής διαφοράς ανάμεσα σε 2 ανεξάρτητα εργαστηριακά αποτελέσματα (εκφρασμένα σε log10) που προέκυψαν από την εφαρμογή της ίδιας μεθόδου, από τον ίδιο αναλυτή, με χρήση του

ίδιο εξοπλισμού μέσα στο μικρότερο δυνατό χρονικό διάστημα σε διάστημα εμπιστοσύνης 95%. Στην περίπτωση στερεής κρέμας που περιέχει *B. animalis*, *L. delbrueckii*, *S. thermophilus* ισχύει πως $r=0,182$.

Αφού λοιπόν $r_1, r_2 < 0,182$, η εκτέλεση της μεθόδου διακρίνεται από επαναληψιμότητα

Η αβεβαιότητα υπολογίστηκε με χρήση της τυπικής απόκλισης της αναπαραγωγιμότητας σύμφωνα με τον τύπο:

$$SR = \sqrt{\frac{1}{n} \sum \frac{(y_{iA} - y_{iB})^2}{2}}$$

και επομένως με επεξεργασία των δεδομένων:

y_{iA}	y_{iB}	$y_{iA} - y_{iB}$	$(y_{iA} - y_{iB})^2 / 2$
9,9344	9,9822	-0,0478	0,00114242
8,903	8,9841	-0,0811	0,003288605
7,8976	7,9731	-0,0755	0,002850125
6,9777	6,9242	0,0535	0,001431125
5,8976	5,919	-0,0214	0,00022898

προκύπτει $SR=0.042$ και κατά συνέπεια $U=2SR \Rightarrow U=0,084$

Με βάση το αποτέλεσμα του προσδιορισμού της αβεβαιότητας οι μετρήσεις που λαμβάνονται από τη μέθοδο κατά ISO μπορούν να εκφράζονται πχ ως $4.0 \log \text{ cfu} \pm 0,084/\text{gr}$

Γ) ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Είναι επιτακτική ανάγκη της αγοράς τροφίμων να προσαρμοστούν οι εταιρείες παραγωγής στα νέα δεδομένα διατροφικών συνηθειών μίας συνεχώς αυξανόμενης ομάδας, των ανθρώπων που επιλέγουν να μην καταναλώνουν προϊόντα ζωικής προέλευσης. Παράλληλα τα προβιοτικά στελέχη *Bifidobacterium animalis* και *Lactobacillus rhamnosus* παρουσιάζουν ευεργετικές δράσεις στην υγεία και είναι ωφέλιμη η ένταξη τους στη διατροφή. Μια τέτοια προσπάθεια ανάπτυξης προϊόντος έγινε και στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής, με την απόπειρα δημιουργίας μιας κρέμας ψυγείου με προβιοτικά χωρίς τη χρήση γάλακτος. Η διάρκεια ζωής του προϊόντος κρίθηκε σημαντικά μικρότερη σε σχέση με αυτήν της γαλακτοκομικής κρέμας, κυρίως λόγω της επιβίωσης του προβιοτικού και όχι τόσο την επίδραση άλλων μικροοργανισμών. Η δομή της κρέμας καθώς και το pH της την καθιστούν κατάλληλη για κατανάλωση. Όμως περαιτέρω βελτιώσεις και μελέτες πρέπει να λάβουν χώρα ώστε επιτευχθεί η κυκλοφορία ενός τέτοιου προϊόντος στην αγορά.

Είναι ακόμη σημαντικό, να μελετηθούν σε μεγαλύτερο βαθμό προβιοτικά στελέχη που προέρχονται από φυτικές πηγές αλλά και θρεπτικά μέσα ανάπτυξης τους χωρίς ζωικά συστατικά, ως προς την αποτελεσματικότητα και ασφάλεια της χορήγησής τους στην υγεία του ανθρώπου αλλά και το ενδεχόμενο της εμπορικής τους εκμετάλλευσης. Αυτό θα αποτελούσε άλμα για την βιομηχανία των λειτουργικών τροφίμων, συνυπολογίζοντας πλήρως την ιδεολογική προσέγγιση της vegan κουλτούρας.

E) ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. *Aspri M, Papademas P, Tsaltas D, (2020) Review on non-dairy probiotics and their use in non-dairy based products, Fermentation 6,30;*
2. *Bratcher, D. F. (2018). Other Gram-Positive Bacilli. Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases, 786–790.e4.*
3. *Butchko, H.H., Petersen, B.J. (2005). Functional Foods Regulatory Aspects - Caballero, Benjamin. in: Encyclopedia of Human Nutrition (Second Edition), Elsevier. Oxford, pp. 366-375*
4. *Dicks, L., & Botes, M. (2010). Probiotic lactic acid bacteria in the gastro-intestinal tract: health benefits, safety and mode of action. Beneficial Microbes, 1(1), 11–29.*
5. *Dyett P. A., Sabate, J., Haddad, E., Rajaram, S., & Shavlik, D. (2013). Vegan lifestyle behaviors. An exploration of congruence with health-related beliefs and assessed health indices. Appetite, 67, 119–124.*
6. *Goldin, B.R., Gorbach, S.L., Saxelin, M., Barakat, S., Gualtieri, L. and Salminen, S., 1992. Survival of Lactobacillus species (strain GG) in human gastrointestinal tract. Digestive Disease Sciences 37: 121-128*
7. *Hammes W P, Vogel R F The genus Lactobacillus The Genera of Lactic Acid Bacteria Chapman & Hall 1995 pp 19-54*
8. *ISO 29981:2010 IDF 220:2010 Milk products - Enumeration of presumptive Bifidobacteria-Colony count technique at 37°C*
9. *Jungersen M, Wind A, Johansen E, Christensen J E, Stuer-Lauridsen B, Eskesen D (2014) The Science behind the Probiotic Strain Bifidobacterium animalis subsp. lactis BB-12®, Microorganisms, 2(2): 92–110.*
10. *Kilcast D., Subramaniam P .(2000) The stability and shelf-life of food , Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC*
11. *Kumar B, Vijayendra S, Redd O, (2015), Trends in dairy and non-dairy probiotic products- a review, Journal of Food Science and Technology, 52(10):6112–6124*
12. *Menrad K, (2003), Market and marketing of functional food in Europe, Journal of Food Engineering 56 (2003) 181–188*

13. Nezlek J B, Forestell C A, (2020) *Vegetarianism as a social identity*, *Current Opinion in Food Science* Volume 33, Pages 45-51
14. Pimentel T, Almeida da Costa W , Barão C , Rosset M , Magnani M (2021), *Vegan probiotic products: a modern tendency or the newest challenge in functional foods*, *Food Research International*, Volume 140
15. Saari A, Herstatt C , Tiwari R , Dedehayir O , Makinen S J, (2020), *The vegan trend and the microfoundations of institutional change: A commentary on food producers' sustainable innovation journeys in Europe*, *Trends in Food Science & Technology* 107:
16. Salama MS, Musafija-Jeknic T, Sandine WE, Giovannoni SJ (1995) *An ecological study of LAB: isolation of new strains of Lactococcus including Lactococcus lactis subsp. cremoris*. *Journal of Dairy Science* 78:1004–1017
17. Segers M E, Lebeer S, (2014) *Towards a better understanding of Lactobacillus rhamnosus GG-host interactions*, *Microbial Cell Factories*, 13: S7
18. Sgorbati B. , Biavati B. , Palenzona D. *the genus Bifidobacterium*, *The Genera of Lactic Acid Bacteria Chapman & Hall* 1995 pp 279-306
19. Süle J, Körösi T, Hucker A, Varga L (2014), *Evaluation of culture media for selective enumeration of bifidobacteria and lactic acid bacteria*, *Brazilian Journal of Microbiology*, 45: 3
20. Tangyu, M., Muller, J., Bolten, C. J., & Wittmann, C. (2019). *Fermentation of plant-based milk alternatives for improved flavour and nutritional value*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103, 9263-9275.
21. Tzokas, N., Hultink, E. J., & Hart, S. (2004). *Navigating the new product development process*. *Industrial Marketing Management*, 33(7), 619–626.
22. Vasudha S, Mishra H N, (2013) *Non dairy probiotic beverages*. *International Food Research Journal* 20(1):7-15.
23. Yerlikaya O, (2014) *Starter cultures used in probiotics dairy product preparation and popular probiotic dairy drinks*, *Food Science and Technology* 34 (2):221-229.

24. Κανάρης Ι.,(2018) Διπλωματική εργασία,Επαλήθευση της πρότυπης μεθόδου ISO 16649-2:2001, για τη διαπίστευση εργαστηρίου μικροβιολογικών αναλύσεων τροφίμων, Ελληνικό ανοικτό πανεπιστήμιο, Αλεξανδρούπολη
25. Καρκαλούσος Π. (2005) Οι βασικές αρχές του εξωτερικού ελέγχου ποιότητας. Ιατρική Επιθεώρηση ΙΚΑ 2005;10(6):43-48