



Σχολή Επιστημών Τροφίμων  
Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Ανάπτυξη προϊόντων ζαχαροπλαστικής υψηλής θρεπτικής αξίας  
εμπλουτισμένα με προβιοτικά ή/ και πρεβιοτικά**

English Title

**Innovative confectionery products of high nutritional value  
fortified with probiotics-prebiotics**

ΒΑΧΟΥ-ΠΕΙΡΑΝΤΑΚΟΥ ΜΙΧΑΕΛΑ-ΓΕΩΡΓΙΑ/VACHOU-PEIRANTAKOU MICHAELA-GEORGIA

ΠΟΥΡΝΑΡΑ ΜΑΡΓΑΡΙΤΑ/POURNARA MARGARITA

ΑΝΤΩΝΟΠΟΥΛΟΣ ΔΙΟΝΥΣΙΟΣ

ΑΙΓΑΛΕΩ/AIGALEO 2022

Έγινε δεκτή

Οι υπογράφοντες δηλώνουμε ότι έχουμε εξετάσει τη πτυχιακή εργασία με τίτλο **‘Ανάπτυξη προϊόντων ζαχαροπλαστικής υψηλής θρεπτικής αξίας εμπλουτισμένα με προβιοτικά και πρεβιοτικά’** που παρουσιάστηκε από τις **ΒΑΧΟΥ-ΠΕΙΡΑΝΤΑΚΟΥ ΜΙΧΑΕΛΑ-ΓΕΩΡΓΙΑ και ΠΟΥΡΝΑΡΑ ΜΑΡΓΑΡΙΤΑ** και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.

Ημερομηνία

Όνομα επιβλέποντος

Ημερομηνία

Όνομα μέλους επιτροπής

Ημερομηνία

Όνομα μέλους επιτροπής

## Δήλωση περί λογοκλοπής/Copyright

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

ΒΑΧΟΥ-ΠΕΙΡΑΝΤΑΚΟΥ ΜΙΧΑΕΛΑ-ΓΕΩΡΓΙΑ

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Μιχαέλα' (Michela) with a stylized flourish at the end.

ΠΟΥΡΝΑΡΑ ΜΑΡΓΑΡΙΤΑ

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Μαργαρίτα' (Margarita) with a stylized flourish at the end.

## Ευχαριστίες

Θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε τον επιβλέποντα καθηγητή μας, Αντωνόπουλο Διονύσιο, για την καθοδήγηση, το ενδιαφέρον και για τον χρόνο που αφιέρωσε κατά την εκτέλεση και την συγγραφή της συγκεκριμένης μελέτης.

Εν συνεχεία, θα θέλαμε επίσης να ευχαριστήσουμε την Δρ. Χούχουλα Δήμητρα για την πρότασή της και τις συμβουλές τις, καθώς και την Λέτσιου Σοφία για την υποστήριξη και την βοήθειά της.

Τέλος, θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε τους γονείς μας για την πολύτιμη υποστήριξή τους καθ'όλη την διάρκεια των σπουδών μας.

## Περίληψη

**Εισαγωγή:** Σε μία εποχή όπου οι ανάγκες για έναν υγιεινό τρόπο ζωής συνεχώς αυξάνονται και πολλές φορές έρχονται σε αντίθεση με τις γαστρονομικές παραδόσεις, ο εμπλουτισμός προβιοτικών και πρεβιοτικών σε γλυκά ζαχαροπλαστικής αποτελεί μια αρμονική συγχώνευση δύο επιθυμητών, αλλά συχνά αντικρουόμενων χαρακτηριστικών, της γαστρονομικής απόλαυσης, και της υψηλής διατροφικής ποιότητας. Στην παρούσα πτυχιακή εργασία, εξερευνάται η ενίσχυση παραδοσιακών γλυκών με την ενσωμάτωση προβιοτικών, πρεβιοτικών και συμβιωτικών, τα οποία χρησιμοποιούνται ήδη σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία σε πληθώρα τροφίμων, γαλακτοκομικών και μη, ενισχύοντας τα λειτουργικά τους χαρακτηριστικά, και προσφέροντας οφέλη για την υγεία. Επιπλέον, γίνεται αναφορά στην ισχύουσα νομοθεσία σχετικά με την χρήση προβιοτικών, καθώς σε πολλές περιπτώσεις, όπως και την Ελλάδα, δεν προβλέπεται η επισήμανση τροφίμων με τον όρο «προβιοτικό», γεγονός που αποτελεί εμπόδιο στην ανάπτυξη αντίστοιχων καινοτόμων προϊόντων. Καθώς το γάλα αποτελεί πολύ συχνό συστατικό των γλυκών, μελετήθηκε η καταλληλότητά του ως υπόστρωμα χωρίς προσθήκη καλλιέργειας εκκίνησης, και σύμφωνα με τα αποτελέσματα τριών δοκιμών σε μη-παστεριωμένο γάλα συνήχθη το συμπέρασμα ότι δεν υπάρχει επαρκής ποσότητα προβιοτικών βακτηρίων χωρίς να έχει προηγηθεί ζύμωση, επομένως απαιτείται προσθήκη καλλιεργιών εκκίνησης όταν χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα το γάλα.

**Λέξεις – Κλειδιά:** Προβιοτικά, Πρεβιοτικά, Συμβιωτικά, Λειτουργικά τρόφιμα, Καλλιέργειες εκκίνησης, Παραδοσιακή ζαχαροπλαστική

## **Abstract**

**Introduction:** At a time when the needs for a healthy lifestyle are constantly increasing and often contradict culinary traditions, enrichment of probiotics and prebiotics in pastry sweets provides a harmonious fusion of two desirable, but often conflicting characteristics, gastronomic pleasure, and high nutritional quality. In this thesis we explore the enhancement of traditional sweets by incorporating probiotics, prebiotics and symbiotics, which are already used according to the existing literature in a variety of foods, dairy and non-dairy, enhancing their functional characteristics and offering health benefits. Furthermore, reference is made to the current legislation on the use of probiotics, as in many cases, as in Greece, the labelling of foods with the term "probiotic" is not foreseen, which is an obstacle to the development of innovative products. As milk is a very common ingredient in sweets, its suitability as a substrate without the addition of starter cultures was studied, and according to the results of three trials on unpasteurized milk, it was concluded that there is not a sufficient level of probiotic bacteria without prior fermentation, therefore the addition of starter cultures is required when milk is used as a substrate.

**Keywords:** Probiotics, Prebiotics, Symbiotics, Functional food, Starter cultures, Traditional pastry

## Περιεχόμενα

<b>Δήλωση περί λογοκλοπής</b> .....	iii
<b>Ευχαριστίες</b> .....	iv
<b>Περίληψη</b> .....	vi
<b>Abstract</b> .....	vii
<b>Δήλωση περί λογοκλοπής/Copyright</b> .....	<b>3</b>
<b>Ευχαριστίες</b> .....	<b>4</b>
<b>Περίληψη</b> .....	<b>5</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>6</b>
<b>Κατάλογος Εικόνων</b> .....	<b>8</b>
<b>Κατάλογος Πινάκων</b> .....	<b>9</b>
<b>Κατάλογος Σχημάτων</b> .....	<b>9</b>
<b>Κεφάλαιο 2: Θεωρητικό υπόβαθρο-ανασκόπηση βιβλιογραφίας</b> .....	<b>11</b>
2.1 Εισαγωγή .....	11
2.2 Προϊόντα ζαχαροπλαστικής στη σύγχρονη βιομηχανία τροφίμων .....	11
2.3 Διατροφική αξία των παραδοσιακών γλυκών ζαχαροπλαστικής .....	14
2.4 Εισαγωγή στα προβιοτικά και πρεβιοτικά .....	15
2.4.1 Ορισμοί και οφέλη .....	16
2.4.2 Ιστορικά .....	18
2.4.3 Κατηγορίες/Χαρακτηριστικά προβιοτικών .....	20
2.4.4 Πρεβιοτικά .....	36
2.4.5 Χαρακτηριστικά/Κατηγορίες πρεβιοτικών .....	37
2.4.6 Συμβιωτική σχέση μεταξύ προβιοτικών και πρεβιοτικών .....	38
2.5 Οφέλη των προβιοτικών για την υγεία .....	39
2.5.1 Εισαγωγή .....	39
2.5.2 Τύποι προβιοτικών μικροοργανισμών .....	40
2.5.3 Πλεονεκτήματα στην υγεία του εντέρου και στην λειτουργία του πεπτικού συστήματος .....	40
2.5.4 Υποστήριξη ανοσοποιητικού συστήματος .....	44
2.5.5 Ψυχική υγεία και άξονας εγκεφάλου-εντέρου .....	48
2.5.6 Γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα και υγεία του κόλπου .....	49
2.5.7 Ασφάλεια και παρενέργειες .....	51
2.5.8 Συμπεράσματα .....	52
2.6 Προβιοτικά και πρεβιοτικά στα τρόφιμα .....	52
2.6.1 Ζυμωμένο γάλα .....	55
2.6.2 Γιαούρτι .....	57

2.6.3	Τυρί.....	58
2.6.4	Κρέμα και βούτυρο .....	60
2.6.5	Παγωτό .....	61
2.6.6	Μη-γαλακτοκομικά προβιοτικά προϊόντα .....	62
2.6.7	Μη-γαλακτοκομικά επιδόρπια.....	63
2.7	Νομοθεσία.....	65
2.7.1	Νομοθεσία σύμφωνα με τις οδηγίες του παγκόσμιου οργανισμού υγείας (WHO) και του παγκόσμιου οργανισμού τροφίμων και γεωργίας (FAO) .....	66
2.7.2	Νομοθεσία στην Ευρωπαϊκή Ένωση .....	68
2.7.3	Νομοθεσία στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής.....	69
2.7.4	Νομοθεσία στην Ελλάδα .....	70
2.7.5	Συμπεράσματα .....	70
	<b>Κεφάλαιο 3. Σκοπός της εργασίας .....</b>	<b>72</b>
	<b>Κεφάλαιο 4: Υλικά &amp; Μέθοδοι .....</b>	<b>74</b>
4.1	Εισαγωγή .....	74
4.2	Υλικά .....	75
4.3	Μέθοδοι λήψης δειγμάτων και χειρισμού .....	76
4.4	Εργαστηριακό πείραμα .....	76
4.5	Ποιοτικός έλεγχος .....	77
	<b>Κεφάλαιο 5: Αποτελέσματα &amp; Συζήτηση .....</b>	<b>79</b>
5.1	Αποτελέσματα .....	79
5.1.1	Δοκιμή 1 <sup>η</sup> .....	79
5.1.2	Δοκιμή 2 <sup>η</sup> .....	81
5.1.3	Δοκιμή 3 <sup>η</sup> .....	84
5.2	Συζήτηση .....	88
	<b>Κεφάλαιο 6: Συμπεράσματα και υποδείξεις για περαιτέρω έρευνα .....</b>	<b>89</b>
	<b>Βιβλιογραφία-Αναφορές .....</b>	<b>89</b>
	<b>Πηγές Εικόνων .....</b>	<b>97</b>

### Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1: Σχηματικό διάγραμμα που απεικονίζει πιθανούς ή γνωστούς μηχανισμούς με τους οποίους τα προβιοτικά βακτήρια μπορούν να επηρεάσουν τη μικροβιακή χλωρίδα (Ο' Toole & Cooney, 2008). .....	42
Εικόνα 2: Τακινόμηση και τύποι προβιοτικών τροφίμων (Kumar et al., 2015). .....	55
Εικόνα 3: Νωπό και παστεριωμένο στην αραιώση 100.....	79
Εικόνα 4: Νωπό και παστεριωμένο στην αραιώση 10-1 .....	80
Εικόνα 5: Νωπό και παστεριωμένο στην αραιώση 10-3 .....	80
Εικόνα 6: Τα τρυβλία της δεύτερης δοκιμής πριν την επίστρωση. ....	81
Εικόνα 7: Νωπό στις αραιώσεις 100 (A) και 10-1 (A).....	82
Εικόνα 8: Νωπό στις αραιώσεις 10-1 (B) και 10-2 (A) .....	82



Εικόνα 9: Νωπό στις αραιώσεις 10-2 (B) και 10-3 (A) .....	83
Εικόνα 10: Νωπό στις αραιώσεις 10-3 (B) και 10-4 (A) .....	83
Εικόνα 11: Νωπό στην αραιώση 10-4 (B).....	84
Εικόνα 12: Τρυβλία τρίτης δοκιμής μετά την επώαση .....	85
Εικόνα 13: Τρυβλία τρίτης δοκιμής μετά την επώαση .....	86
Εικόνα 14: Τρυβλία τρίτης δοκιμής μετά την επώαση .....	87

## Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1: Οι πέντε βασικές διαστάσεις της καινοτομίας (Bay & Çil, 2016) .....	13
Πίνακας 2: Δημοφιλή παραδοσιακά γλυκά και τα διαφορετικά μέρη τους που μπορεί να γίνει προσθήκη starter προβιοτικών .....	14
Πίνακας 3: Μέση διατροφική αξία των προαναφερθέντων γλυκών και πηγές .....	15
Πίνακας 4: Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά χρησιμά για τον χαρακτηρισμό των γενών γαλακτικών βακτηρίων Streptococcus, Lactococcus, Enterococcus και Pediococcus. Όλα τα γένη είναι θετικά κατά Gram, αρνητικά ως προς την καταλάση, μη σπορογόνα και χημειο-οργανοτροφικά, με ζυμωτικό μεταβολισμό.....	33

## Κατάλογος Σχημάτων

Σχήμα 1: Ιστορική πρόοδος στην κατανόηση και ανάπτυξη των προβιοτικών, πρεβιοτικών, συνβιοτικών, μεταπροβιοτικών και μεταβιοτικών από το1905 έως σήμερα (Gao et al., 2021).....	16
Σχήμα 2: Φυλογενετικό δέντρο που δείχνει τη γονιδιωματική ομοιότητα μεταξύ των ειδών P. freudenreichii που προάγουν την υγεία, άλλων προβιοτικών ή στενά συγγενών ειδών (de Rezende Rodovalho V. et al., 2022).....	27
Σχήμα 3: Τάσεις στο Pubmed για τις λέξεις-κλειδιά "Bacillus + προβιοτικά" και "Lactobacillus + προβιοτικά" για τα τελευταία 25 χρόνια (F. Elshagabee et al., 2017).....	28
Σχήμα 4: Σχηματική σύνοψη των φαρμακοδυναμικών δραστηριοτήτων του προβιοτικού στελέχους E. coli Nissle 1917 (EcN) στον αυλό του εντέρου (ανταγωνιστική δράση) και στο εντερικό επιθήλιο και πέραν αυτού (σηματοδότηση των κυττάρων του ξενιστή) (Sonnenborn & Schulze, 2009).....	29
Σχήμα 5: Ομαδοποίηση προβιοτικών και εμπορική χρήση κάθε είδους (Gao et al., 2021). .....	35
Σχήμα 6: Βασικά κριτήρια απιλογής κατάλληλων προβιοτικών στελεχών για συγκεκριμένες εφαρμογές (Palanivelu, 2022).....	54
Σχήμα 7: Κατευθυντήριες γραμμές για την αξιολόγηση των προβιοτικών για χρήση σε τρόφιμα, σύμφωνα με την ομάδα εργασίαςFAO/WHO. Από την ταυτοποίηση του στελέχους με φαινοτυπικές και γονοτυπικές μεθόδους, την ασφάλεια και τις λειτουργικές ιδιότητες σε μελέτες σε ζώα και ανθρώπους μέχρι την εφαρμογή στα τρόφιμα (FAO/WHO, 2002, Ansari et al., 2023) .....	68
Σχήμα 8: Διάγραμμα ροής για τον έλεγχο γάλακτος ως κατάλληλο non-starter υπόστρωμα για την μελέτη. ....	74

## Κεφάλαιο 1. Εισαγωγή

Η σύγχρονη τεχνολογία τροφίμων, επικεντρώνεται στη βελτιστοποίηση της ποιότητας στην παραγωγή, αλλά και στην αναβάθμιση των ήδη υπάρχοντων προϊόντων. Η τάση τα τελευταία χρόνια κλίνει προς τον όρο των «λειτουργικών τροφίμων», τα οποία ορίζονται από τη Διεθνή Οργάνωση Τροφίμων και Γεωργίας ως «Ένα τρόφιμο που παρέχει όφελος για την υγεία πέραν της βασικής διατροφής, αποδεικνύοντας συγκεκριμένα οφέλη για την υγεία ή την ιατρική περίθαλψη, συμπεριλαμβανομένης της πρόληψης και της θεραπείας ασθενειών». Εμείς επιλέξαμε να επικεντρωθούμε στην αναβάθμιση παραδοσιακών γλυκών με την προσθήκη προβιοτικών μικροοργανισμών ως τελικό μας στόχο για τη δημιουργία ενός νέου λειτουργικού τρόφιμου. Παράλληλα, επιδιώκεται η προσθήκη πρεβιοτικών ως αντικατάστατα της ζάχαρης ή άλλων πρόσθετων ώστε να έχουμε υψηλότερη διατροφική αξία.

Η πτυχιακή χωρίζεται σε 3 μέρη, το Κεφάλαιο 2 στο οποίο αναλύεται η βιβλιογραφία πάνω στα προβιοτικά, πρεβιοτικά, και τα τρόφιμα που ήδη κυκλοφορούν στην αγορά τα οποία περιέχουν, το κεφάλαιο 3 και 4 στα οποία αναγράφονται ο σκοπός της πλήρους έρευνας αλλά και οι ειδικοί στόχοι που μελετήσαμε στο τελευταίο εξάμηνο, και τα Κεφάλαια 5 και 6 στα οποία παρέρχονται τα συμπεράσματα και αποτελέσματα από την μέχρι τώρα έρευνα.

## **Κεφάλαιο 2: Θεωρητικό υπόβαθρο-ανασκόπηση βιβλιογραφίας**

### **2.1 Εισαγωγή**

Το κεφάλαιο αυτό αποτελεί το υπόστρωμα πάνω στο οποίο στηρίζεται η έρευνά μας για τα "Καινοτόμα προϊόντα ζαχαροπλαστικής υψηλής διατροφικής αξίας εμπλουτισμένα με προβιοτικά και/ή πρεβιοτικά". Εμβαθύνει στο θεωρητικό τοπίο της ζαχαροπλαστικής, των προβιοτικών, των πρεβιοτικών, της καινοτομίας στην επιστήμη των τροφίμων και της ανάλυσης των προβιοτικών στα προϊόντα διατροφής. Στόχος μας είναι να αποκαλύψουμε τη δυναμική συνεργατικότητα μεταξύ αυτών των τομέων, η οποία παίζει καθοριστικό ρόλο στη δημιουργία προϊόντων ζαχαροπλαστικής που ταυτόχρονα ικανοποιούν τον καταναλωτή γευστικά και θρέφουν την υγεία.

Ξεκινάμε παρακολουθώντας την εξέλιξη της ζαχαροπλαστικής, αναγνωρίζοντας την ιστορική της σημασία και συσχετίζοντάς την με τις σύγχρονες καινοτομίες. Τα προβιοτικά και τα πρεβιοτικά αποκτούν σημαντική θέση, με έμφαση στη συμβολή τους στην υγεία του εντέρου, στη διατροφική ενίσχυση και στην ανάλυσή τους σε διάφορα προϊόντα διατροφής.

Στις επόμενες σελίδες, παρουσιάζεται μια ολοκληρωμένη βιβλιογραφική ανασκόπηση, η οποία φωτίζει την υπάρχουσα γνώση και τις τάσεις της έρευνας. Το εννοιολογικό πλαίσιο αυτού του κεφαλαίου θα μας κατευθύνει για τη δημιουργία καινοτόμων, θρεπτικών προϊόντων ζαχαροπλαστικής.

### **2.2 Προϊόντα ζαχαροπλαστικής στη σύγχρονη βιομηχανία τροφίμων**

Τα είδη ζαχαροπλαστικής ταξινομούνται σε τρεις τύπους: είδη ζαχαροπλαστικής από σοκολάτα, είδη ζαχαροπλαστικής από σιτάρι και είδη ζαχαροπλαστικής από ζάχαρη. Τα σοκολατένια γλυκίσματα προέρχονται προφανώς από τη σοκολάτα. Η ζαχαροπλαστική από αλεύρι αναφέρεται σε είδη που παρασκευάζονται με αλεύρι. Τα υπόλοιπα είδη ζαχαροπλαστικής καλύπτονται από τη ζαχαροπλαστική με ζάχαρη. Πολλά είδη ζαχαροπλαστικής που αποτελούν συνδυασμό κατηγοριών έχουν αναπτυχθεί από τη βιομηχανία ζαχαροπλαστικής. Μια άλλη ομάδα αναφέρεται ως "γλυκά χωρίς ζάχαρη". Αυτό το οξύμωρο αναφέρεται σε τρόφιμα που μοιάζουν με γλυκά με ζάχαρη, αλλά δεν έχουν δημιουργηθεί με ζάχαρη. Η πιο συνηθισμένη αιτιολογία για την παραγωγή αυτών

των ειδών είναι η ικανοποίηση συγκεκριμένων διατροφικών απαιτήσεων. Τα "ανάλογα της ζάχαρης" θα ήταν μια καλύτερη ονομασία (Edwards, 2018).

Η παραγωγή γλυκών δεν είναι μια βιομηχανία που βασίζεται στην επιστήμη. Τα προϊόντα ζαχαροπλαστικής κατασκευάζονται παραδοσιακά εμπειρικά από εκπαιδευμένους βιοτέχνες ζαχαροπλάστες και η επιστημονική κατανόηση των προϊόντων ζαχαροπλαστικής έχει αποκτηθεί αναδρομικά (Edwards, 2018).

Το 2016, οι Bay και Çil, διεξήγαν μια έρευνα για τη βιομηχανία ζαχαροπλαστικής στην Τουρκία σε μεγάλη κλίμακα (42,7% της βιομηχανίας). Σύμφωνα με τα ευρήματα, η βιομηχανία ζαχαροπλαστικής, η οποία θεωρείται τομέας χαμηλής τεχνολογίας, υπολείπεται του εθνικού μέσου όρου σε ό,τι αφορά την καινοτομία. Ενώ η διάσταση της οργάνωσης βρέθηκε να είναι σημαντικά καλύτερη από τις άλλες διαστάσεις, η διάσταση των διασυνδέσεων μεταξύ των τομέων της παραγωγής προσδιορίστηκε ως η φτωχότερη από τις πέντε διαστάσεις. Τα ευρήματα αυτά μπορούν να θεωρηθούν ανάλογα με τη βιβλιογραφία σε τεχνολογικό επίπεδο, ωστόσο θα πρέπει να σημειωθεί ότι υπάρχουν εξαιρετικά αποτελεσματικές επιχειρήσεις χαμηλής τεχνολογίας όσον αφορά την καινοτομία.

Διάσταση	Επεξήγηση	Πηγή
Στρατηγική	Η στρατηγική καινοτομίας είναι ένα γενικό σχέδιο που καθορίζει τους στόχους και την κατεύθυνση της καινοτομίας, κατανέμει τους πόρους και τις επενδύσεις, καθορίζει τα κριτήρια επιτυχίας και βοηθά στο συντονισμό όλων των έργων καινοτομίας.	Nada et al., 2012
Οργάνωση	Η οργανωτική δομή και κουλτούρα πρέπει να σχεδιάζονται με τέτοιο τρόπο ώστε τα άτομα να ενθαρρύνονται να σκέφτονται ανεξάρτητα και δημιουργικά, προκειμένου να προσαρμόζουν τη δική τους τεχνογνωσία στα θεσμικά ζητήματα.	Lam & Hsu, 2006 Tidd & Bessant, 2014
Διαδικασία	Οι διαδικασίες χρησιμεύουν ως θεμέλιο για άλλες μορφές καινοτομίας, αποτελώντας το σκελετό του συστήματος καινοτομίας.	Pisano, 1997 Garratt, 1987
Διασυνδέσεις	Τόσο οι εσωτερικές όσο και οι εξωτερικές διασυνδέσεις	Bruno,

	<p>θεωρούνται κρίσιμοι μηχανισμοί ανάπτυξης στις επιχειρήσεις όσον αφορά την ανάπτυξη της δημιουργικής παραγωγής. Ένας από τους κύριους εσωτερικούς δεσμούς που προάγει την αποτελεσματικότητα της καινοτομίας είναι η εξέλιξη των εργαζομένων μέσω της αλληλεπίδρασης μεταξύ τους. Οι εξωτερικοί δεσμοί με άλλους φορείς, από την άλλη πλευρά, μπορούν να ελαχιστοποιήσουν δραστικά τον χρόνο και τα χρήματα που δαπανώνται για την καινοτομία.</p> <p>Ως εκ τούτου, οι εταιρείες συνεργάζονται με ανεξάρτητες ερευνητικές ομάδες, πανεπιστήμια και άλλα ινστιτούτα έρευνας και ανάπτυξης.</p>	<p>Reinhilde and Pluvia, 2008</p> <p>Machikita and Ueki, 2011</p>
Εκπαίδευση	<p>Η ικανότητα του οργανισμού να παρέχει νέες γνώσεις στους υπαλλήλους του, καθώς και από την ικανότητά του να εκτελεί αυτές τις πληροφορίες</p>	<p>Calantone et al., 2002</p>

Πίνακας 1: Οι πέντε βασικές διαστάσεις της καινοτομίας (Bay & Çil, 2016)

Όσον αφορά τη διατροφική αξία των γλυκών, η κύρια πηγή θερμίδων είναι οι υδατάνθρακες και μάλιστα κυρίως σε μορφή σακχάρων. Λίπη και έλαια προέρχονται από την προσθήκη βουτύρου κακάου, γάλακτος, καραμέλας και φυτικά λιπαρά όπως οι ξηροί καρποί. Η πιο πολύτιμη πηγή ζωικής πρωτεΐνης στη ζαχαροπλαστική είναι το γάλα, το οποίο βρίσκεται ως στερεό γάλα στη σοκολάτα γάλακτος, τις καραμέλες και το fudge. Οι ξηροί καρποί, οι οποίοι περιλαμβάνονται σε πολλά γλυκά, αποτελούν εξαιρετική πηγή φυτικής πρωτεΐνης. Το αλεύρι σίτου στα μπισκότα ή τις γκοφρέτες είναι μια άλλη πηγή πρωτεΐνης. Ανόργανα συστατικά βρίσκονται στα φρούτα, στα στερεά του γάλακτος, στους κόκκους κακάο και σε πολλά φυσικά αγαθά, αλλά τα ιδιαίτερα επεξεργασμένα υλικά, όπως η λευκή ζάχαρη, η οποία είναι σχεδόν καθαρός υδατάνθρακας, έχουν σημαντικά χαμηλότερη περιεκτικότητα σε ανόργανα συστατικά. Πολλά πιάτα περιέχουν πλέον "ακατέργαστη" ζάχαρη, η οποία περιέχει ανόργανα άλατα (NPCS Board, 2013).

Η σοκολάτα και τα είδη ζαχαροπλαστικής περιέχουν συνήθως μικρές ποσότητες βιταμινών που βρίσκονται στα συστατικά, όπως το γάλα, η σοκολάτα, οι ξηροί καρποί και τα φρούτα. Παρόλο που δεν αποτελεί κοινή πρακτική ο εμπλουτισμός αυτών των προϊόντων για ευρεία κατανάλωση, ορισμένοι κατασκευαστές τροφίμων και ποτών, ιδίως

εκείνοι που εξάγουν σε αναπτυσσόμενες χώρες, έχουν προσθέσει συμπυκνώματα βιταμινών. Τα συστατικά δημητριακών, όπως το αποβουτυρωμένο φύτρο σιταριού, είναι καλές πηγές βιταμινών και πρωτεϊνών και χρησιμοποιούνται για τον εμπλουτισμό των δημητριακών πρωινού, συμπεριλαμβανομένων των σοκολάτας (NPCS Board, 2013)

Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η βιομηχανία ελληνικών προϊόντων ζαχαροπλαστικής στηρίζεται κυρίως σε τεχνογνωσία που διδάσκεται είτε μέσω του λόγου και της παράδοσης ή μέσω Ινστιτούτων Επαγγελματικής Κατάρτισης. Η επιστήμη των τροφίμων και η βιβλιογραφία έχουν οριακά μηδενικές αναφορές στην τεχνογνωσία των προϊόντων αυτών καθιστώντας τα δύσκολα ως υποψήφια για μελέτη.

Στη συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία θέλουμε να επικεντρώσουμε την προσοχή μας στα ευρύτερα ελληνικά παραδοσιακά γλυκά. Το κριτήριο επιλογής συνταγών είναι αν μπορεί να ενσωματωθεί κάπου στο προϊόν κατά την παραγωγή του ως προσθήκη (π.χ. εντός του σιρόπι στα μελομακάρονα ή κανταΐφι) ή στο ίδιο το γλυκό (π.χ. κρέμα). Μερικά από αυτά τα γλυκά και το που μπορεί να γίνει η προσθήκη τους σε θεωρητικό επίπεδο βρίσκονται στον παρακάτω πίνακα:

Γλυκό	Μέρος γλυκού που μπορεί να γίνει η προσθήκη	Καταγωγή
Ραβανί	Σιρόπι	Οθωμανική αυτοκρατορία-Βέροια
Παστέλι	Ευρύ φάσμα επιλογών για πρώτες ύλες	Αρχαία Ελλάδα (πρώτες αναφορές στον Όμηρο)
Σουτζουκ Λουκουμ	Γέμιση	Οθωμανική αυτοκρατορία
Γαλακτομπούρεκο	Κρέμα	Μικρά Ασία
Εκμέκ κανταΐφι	Κρέμα-σιρόπι	Αφιόν Καραχισάρ (Μικρά Ασία)

Πίνακας 2: Δημοφιλή παραδοσιακά γλυκά και τα διαφορετικά μέρη τους που μπορεί να γίνει προσθήκη starter προβιοτικών

### 2.3 Διατροφική αξία των παραδοσιακών γλυκών ζαχαροπλαστικής

	Ενεργειακή Αξία	Λιπαρά	Εκ των οποίων κορεσμένα	Υδατάνθρακες	Εκ των οποίων Σάκχαρα	Πρωτεΐνες	Συνταγή / Πηγή
Ραβανί 100 g	329 kcal /	3.5 g	0.9 g (4%)	126.3 g (49%)	109.9 g	4.3 g (9%)	Μύλοι Αγίου

	1374 kcal / (16%)	KJ (5%)				(122%)		Γεωργίου
Παστέλι 100 g	450 kcal / 1879 KJ (22%)	27.4 g (39%)	-	44.9 g (17%)	-	8.8 g (19%)		Mynutrihealth.gr
Σουτζούκ Λουκούμ τεμάχιο	421 kcal / 1758 KJ (21%)	22.9 g (33%)	1.5 g (8%)	52.2 g (20%)	40.4 g (45%)	8.1 g (16%)		Γιώργος Τσούλης – Δανάη Πετροπούλου
Γαλακτομπούρεκο 100 g	238 kcal / 1018 KJ (12%)	8.1 g (12%)	4.9 g (24%)	66.0 g (25%)	55.6 g (62%)	3.4 g (7%)		Μύλοι Αγίου Γεωργίου
Εκμέκ κανταΐφι 100 g	193 kcal / 826 KJ (10%)	3.8 g (6%)	3.2 g (16%)	34.5 g (13%)	4.3 g (5%)	4.8 g (10%)		Φάρμα Χασιώτη

Πίνακας 3: Μέση διατροφική αξία των προαναφερθέντων γλυκών και πηγές

Σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα, μπορούμε να αντλήσουμε σημαντικά συμπεράσματα σχετικά με τη θρεπτική αξία των επιλεγμένων γλυκών και τους τρόπους βελτίωσής τους. Καταρχάς, η ενεργειακή αξία, παρά τη σημαντική της συνεισφορά στη συνολική θερμιδική πρόσληψη, δεν μπορεί να θεωρηθεί ως το μοναδικό κριτήριο για την αξία της διατροφής. Αυτό οφείλεται στην ποικιλία παραγόντων που επηρεάζουν τον συνολικό αριθμό των θερμίδων σε ένα προϊόν και στο γεγονός ότι η ενέργεια από μη-κορεσμένα φυτικά έλαια, όπως αυτά που προέρχονται από τους ξηρούς καρπούς στο παστέλι, δεν πρέπει αυτόματα να απορρίπτεται, διότι αποτελεί χρήσιμη πηγή ενέργειας.

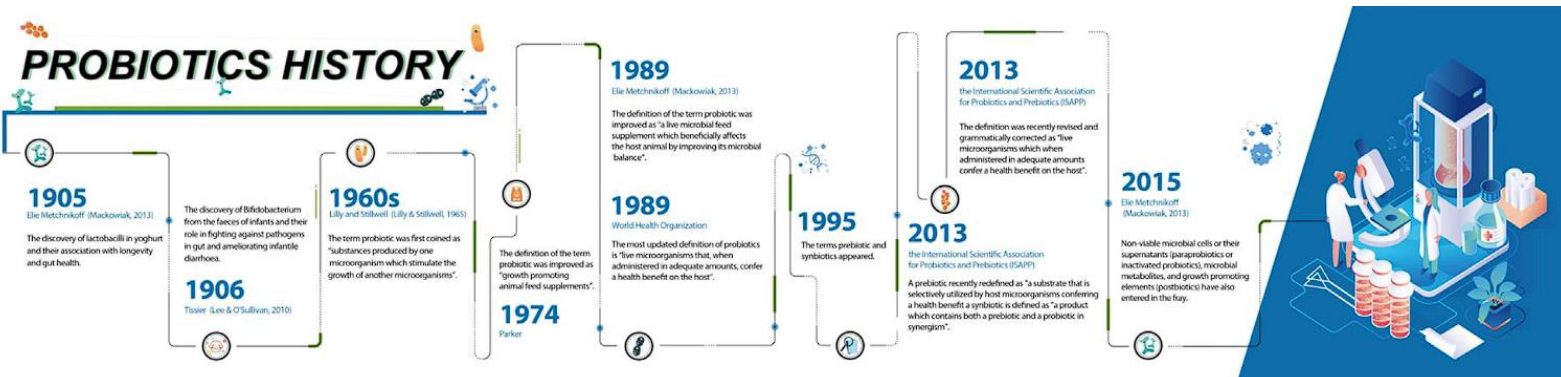
Συνεπώς, οι κρίσιμοι παράγοντες που απαιτούν προσοχή είναι τα κορεσμένα λιπαρά και τα σάκχαρα. Στην περίπτωση των κορεσμένων λιπαρών, πρέπει να δίνουμε έμφαση στη μείωσή τους, διότι αυξάνουν τον κίνδυνο για ασθένειες. Όσον αφορά τα σάκχαρα, είναι σημαντικό να παρακολουθούμε την προσθήκη ζάχαρης στα γλυκά προϊόντα. Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι η παρουσία τους δεν είναι απαραίτητως αρνητική, εκτός αν υπερβαίνουν τα όρια και είναι προστιθέμενα ζάχαρα.

## 2.4 Εισαγωγή στα προβιοτικά και πρεβιοτικά

## 2.4.1 Ορισμοί και οφέλη

Τα προβιοτικά έχουν μελετηθεί εκτενώς σε βάθος χρόνου, με αποτέλεσμα ο ορισμός τους να εμπλουτίζεται διαρκώς. Ετυμολογικά, η λέξη προβιοτικά σχηματίζεται από τις λέξεις προ- και βίος, δηλαδή κυριολεκτικά σημαίνει «για την ζωή» και σχετίζεται με βακτήρια που ωφελούν την ανθρώπινη υγεία.

Η αρχική παρατήρηση της δράσης τους, χωρίς βέβαια να χρησιμοποιείται ο όρος «προβιοτικά», έγινε το 1906-1907 από τους Henry Tissier και την βραβευμένη με νόμπελ Ilya Metchnikoff οι οποίοι παρατήρησαν την σύνδεση εντερικής χλωρίδας με την τροφή και κάποια οφέλη που μπορεί να προέλθουν στην υγεία με την τροποποίησή τους. Ακολούθησαν οι πρώτοι ορισμοί (Fuller, 1989, Harenaar, 1992) οι οποίοι ήταν παρεμφερείς, με κοινό γνώμονα ότι πρόκειται για μικροοργανισμούς με ωφέλιμη δράση στην εντερική μικροχλωρίδα του ξενιστή. Αργότερα, με τον επίσημο ορισμό των προβιοτικών από τον FAO το 2001 ως «Ζώντες μικροοργανισμοί οι οποίοι όταν χορηγούνται σε επαρκείς ποσότητες βελτιώνουν την υγεία του ξενιστή» (FAO/WHO, 2002) επιτεύχθηκε μεγαλύτερη διαύγεια ως προς τον γενικότερο έως τότε όρο «προβιοτικά». Αξίζει να σημειώσουμε ότι δεν επιλέχθηκαν λέξεις όπως κατάποση ή κατανάλωση, αλλά χορήγηση, έτσι ώστε να τονιστεί το ότι ο τρόπος μετάδοσης μικροοργανισμών στον ξενιστή δεν είναι συγκεκριμένος και μπορεί να περιλαμβάνει διάφορες έννοιες. Έμφαση δόθηκε επίσης στο ότι δεν νοούνται νεκροί μικροοργανισμοί ως προβιοτικά, ανεξαρτήτως από τα οφέλη που ενδέχεται να έχουν στον οργανισμό (Reid, 2016). Έκτοτε, οι δημοσιεύσεις, οι μελέτες και οι εμπορικές χρήσεις των προβιοτικών έχουν εκτοξευθεί, ωστόσο ο ορισμός αυτός παραμένει έως και σήμερα, με μικρές αλλαγές, ο πιο διαδεδομένος (Reid, 2016).



Σχήμα 1: Ιστορική πρόοδος στην κατανόηση και ανάπτυξη των προβιοτικών, πρεβιοτικών, συνβιοτικών, μεταπροβιοτικών και μεταβιοτικών από το 1905 έως σήμερα (Gao et al., 2021).



Τα προβιοτικά χαρακτηρίζονται από το συγκεκριμένο τους στέλεχος, δηλαδή το γένος, το είδος, το υποείδος (εάν υπάρχει), και την αλφαριθμητική ονομασία που προσδιορίζει το στέλεχος (World Gastroenterology Organization, 2017). Κάποια από τα πιο γνωστά γένη προβιοτικών είναι τα *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Saccharomyces*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Escherichia* και *Bacillus* (Office of Dietary Supplements - Probiotics), με μερικά από τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα στελέχη να είναι τα *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Saccharomyces cerevisiae* Boulardii, το οποίο είναι η μόνη ζύμη με αποδεδειγμένα προβιοτικά χαρακτηριστικά, *Lactobacillus casei* Shirota, και *Bifidobacterium animalis* (Figuerola-González et al., 2011).

Η κατανάλωση τροφίμων με προβιοτικές καλλιέργειες θεωρείται ότι έχει μια σειρά από οφέλη για την υγεία. Ορισμένα από αυτά έχουν αποδειχθεί επιστημονικά, ενώ άλλα χρειάζονται ακόμη επιπλέον μελέτες σε ανθρώπους (Gomes da Cruz et al., 2009).

Τα προβιοτικά έχουν μια σειρά από σημαντικά πλεονεκτήματα, συμπεριλαμβανομένης της ικανότητας να μειώνουν ή ακόμη και να θεραπεύουν πλήρως καταστάσεις όπως η δυσκοιλιότητα, η διάρροια από ταξίδια και ο ερεθισμός του παχέος εντέρου. Άλλα πλεονεκτήματα για την υγεία περιλαμβάνουν την πρόληψη της ανάπτυξης παθογόνων βακτηρίων, τη σύνθεση βιταμινών Β, τη μείωση των επιπέδων αμμωνίας στο αίμα, την απορρόφηση χοληστερόλης, την πρόληψη της ανάπτυξης όγκων, τη βελτίωση της απορρόφησης ασβεστίου και τη βελτίωση της αξιοποίησης της λακτόζης μέσω της παραγωγής β-γαλακτοσιδάσης ((Rosenberg-Kima et al., 2008) όταν υπάρχουν αρκετά προβιοτικά στο παχύ έντερο. Αν και οι τιμές διαφέρουν από στέλεχος σε στέλεχος (Anekella & Orsat, 2013), είναι απαραίτητο να υπάρχει τουλάχιστον ένα εκατομμύριο βιώσιμοι προβιοτικοί οργανισμοί ανά γραμμάριο προϊόντος ή 10<sup>7</sup> CFUg<sup>-1</sup> στο σημείο παράδοσης ή να καταναλώνονται σε επαρκείς ποσότητες ώστε να αποδίδουν ημερήσια πρόσληψη 10<sup>8</sup> CFU.

Η ανεκτικότητα στο ανθρώπινο γαστρικό χυμό και τη χολή, η προσκόλληση στις επιθηλιακές επιφάνειες, η παραμονή στον ανθρώπινο γαστρεντερικό σωλήνα (GIT), η διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος, η ανταγωνιστική δράση έναντι εντερικών παθογόνων (όπως το *Helicobacter pylori*, η *Salmonella* spp., η *Listeria monocytogenes* και το *Clostridium difficile*) και η ικανότητα σταθεροποίησης και διαμόρφωσης του εντερικού μικροβιόκοσμου αποτελούν λειτουργικές απαιτήσεις για τα προβιοτικά. Η παραγωγή

βακτηριοσινών είναι πλέον ένα από τα επιθυμητά χαρακτηριστικά στην επιλογή προβιοτικών στελεχών (Dobson et al., 2012).

Η έννοια των πρεβιοτικών θεσπίστηκε για πρώτη φορά το 1995 στην Ασία ως «δύσπεπτο βρώσιμο συστατικό το οποίο επηρεάζει τον ξενιστή δίνοντας ερέθισμα επιλεκτικά για την ανάπτυξη ή/και την δραστηριότητα ενός ή μιας ομάδας βακτηρίων που υπάρχουν ήδη στο παχύ έντερο» από τους Glenn Gibson και Marcel Roberfroid, ωστόσο σύμφωνα με αυτόν τον ορισμό τα στελέχη που μπορούν να χαρακτηριστούν ως πρεβιοτικά περιορίζεται σημαντικά σε συγκεκριμένους υδατάνθρακες. Επιπλέον, παρατηρούμε πως η προσέγγιση αυτή υποστηρίζει την διαχείριση μη βιώσιμων οντοτήτων (Gibson et al., 2010). Το 2008 ορίστηκαν τα διατροφικά πρεβιοτικά από την διεθνή επιστημονική ένωση προβιοτικών και πρεβιοτικών (ISAPP) ως «επιλεκτικά ζυμωμένο συστατικό που οδηγεί σε συγκεκριμένες αλλαγές στην σύνθεση ή/και στην δραστηριότητα του γαστρεντερικού μικροβιώματος, κι έτσι επιφέρει θετική επίδραση στην υγεία του ξενιστή».

Τα πρεβιοτικά απαντώνται φυσικά σε κάποια τρόφιμα, όπως το πράσο, τα σπαράγγια, το σκόρδο, το κρεμμύδι, το σιτάρι κ.α., ωστόσο το ποσοστό πρόσληψης πρεβιοτικών από τις προαναφερθείσες τροφές είναι μικρό. Επομένως, προκειμένου να επιτευχθεί πρόσληψη επαρκής ώστε να επιφέρει θετικά αποτελέσματα στην υγεία απαιτείται ο εμπλουτισμός τροφίμων με πρεβιοτικά. Έτσι, τα πρεβιοτικά αποτελούν μια υποκατηγορία λειτουργικών συστατικών τροφίμων που μπορούν να προστεθούν σε αρκετά τρόφιμα (Gibson et al., 2010).

Ένα στέλεχος μπορεί να ενταχθεί στην κατηγορία των πρεβιοτικών εφόσον πληροί τα εξής κριτήρια:

i) Να είναι ανθεκτικό στο όξινο pH του στομάχου, να μην υδρολύεται από τα ένζυμα των θηλαστικών και να μην απορροφάται στην γαστρεντερική οδό

ii) Να είναι ικανό να ζυμωθεί από την εντερική μικροχλωρίδα

iii) Η ανάπτυξη ή/και η δραστηριότητα των εντερικών βακτηρίων να μπορεί να διεγερθεί από το συγκεκριμένο στέλεχος και όλη η διαδικασία να φέρει πλεονεκτήματα για την υγεία του ξενιστή (Gibson et al., 2010, Davani-Davari et al., 2019).

#### 2.4.2 Ιστορικά

Η εμπορευματοποίηση των προβιοτικών ήρθε το 1906, όταν η γαλλική εταιρεία "Le

Fermente" άρχισε να κυκλοφορεί στην αγορά ένα προϊόν ζύμωσης γάλακτος (Lactobacilline) που περιείχε *Streptococcus thermophilus* και *Lactobacillus delbruekii*. Το 1919, ο Ισαάκ Καράσο ξεκίνησε ομοίως την εμπορική παραγωγή γιαουρτιού στην Ισπανία. Είναι ασαφές αν τα προϊόντα αυτά περιείχαν ζωντανούς οργανισμούς και, αν ναι, αν οι οργανισμοί αυτοί ήταν σε θέση να επιβιώσουν κατά τη διέλευση από την ανώτερη γαστρεντερική οδό. Κατά συνέπεια, το γάλα ζύμωσης Yakult (που περιγράφεται παραπάνω) αναφέρεται συνήθως ως το πρώτο εμπορικά διαθέσιμο προβιοτικό προϊόν (Gogineni, 2013)

Στις αρχές του 20ού αιώνα, η έμφαση δόθηκε στη χρήση ζυμωμένου γάλακτος και προβιοτικών για τη θεραπεία εντερικών λοιμώξεων. Η εστίαση μετατοπίστηκε σταδιακά στην ικανότητα των βακτηρίων αυτών να επιβιώνουν στον γαστρεντερικό σωλήνα και στην τροφή-φορέα με στόχο να ωφελήσουν τον ξενιστή. Οι πιέσεις της Μεγάλης Ύφεσης, του Β' Παγκοσμίου Πολέμου και η ανακάλυψη και η ευρεία χρήση πολλών αντιβιοτικών οδήγησαν σε σταδιακή μείωση του ενδιαφέροντος για τα προβιοτικά ξεκινώντας από τα τέλη της δεκαετίας του 1930. Παρ' όλα αυτά, από τη δεκαετία του 1980 έως σήμερα, παρατηρούνται παγκόσμιες τάσεις που περιλαμβάνουν την αυξανόμενη μικροβιακή αντοχή, την έλλειψη φαρμακευτικής έρευνας και ανάπτυξης σχετικά με τις λοιμώδεις νόσους, την εκτίναξη των τιμών των νέων αντιβιοτικών στα ύψη και τις διαφοροποιήσεις στην προσβασιμότητα ή/και τη χρήση τυποποιημένων μέτρων πρόληψης λοιμώξεων (Gogineni, 2013).

Στο παρελθόν, κατά την ανάπτυξη των προβιοτικών, λαμβάνονταν σοβαρά υπόψη στις φαρμακευτικές εφαρμογές όπως η θεραπεία της διάρροιας, η πρόληψη της διάρροιας που σχετίζεται με αντιβιοτικά, η αντιμετώπιση των λοιμώξεων του στομάχου και του γαστρεντερικού συστήματος, η αντιμετώπιση των χρόνιων φλεγμονών και ούτω καθεξής. Ωστόσο, είναι δύσκολο να επεκταθούν αυτές οι εφαρμογές στην κατηγορία των λειτουργικών τροφίμων που προορίζονται για άτομα που έχουν γενικότερα καλή υγεία. Η εναπομένουσα πρόκληση είναι να αποδειχθούν οι μακροπρόθεσμες επιδράσεις των προβιοτικών τροφίμων, όπως απαιτείται επί του παρόντος από τους κανονισμούς για τους ισχυρισμούς υγείας στην Ευρώπη, παρά το γεγονός ότι οι ευεργετικές επιδράσεις συγκεκριμένων προβιοτικών έχουν αποδειχθεί αποτελεσματικές στη θεραπεία και την πρόληψη πολλών διαταραχών της υγείας (Jankovic et al., 2010).

### 2.4.3 Κατηγορίες/Χαρακτηριστικά προβιοτικών

Μία από τις μεγαλύτερες κατηγορίες προβιοτικών είναι τα οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB). Τα LAB είναι θετικοί κατά Gram, αερόβιοι έως προαιρετικά αναερόβιοι, μη σπορογόνοι βάκιλλοι και κόκκοι που είναι αρνητικοί σε οξειδάση, καταλάση και βενζιδίνη. Κύριο χαρακτηριστικό τους είναι η παραγωγή γαλακτικού οξέος ως τελικό προϊόν του μεταβολισμού υδατανθράκων (Carr et al., 2002).

Διακρίνονται σε δύο βασικές κατηγορίες, τα ομοζυμωτικά και τα ετεροζυμωτικά γαλακτικά βακτήρια. Τα ομοζυμωτικά παράγουν γαλακτικό οξύ ως κύριο προϊόν από την ζύμωση της γλυκόζης, ενώ τα ετεροζυμωτικά παράγουν επιπλέον και διοξείδιο του άνθρακα, αιθανόλη και οξικό οξύ. Κατά την μεταβολισμό των ετεροζυμωτικών γαλακτικών βακτηρίων γίνεται μετατροπή εξοζών σε πεντόζες με την δράση του ενζύμου φωσφοκετολάση, παράγοντας παράλληλα αρωματικές ουσίες που ενισχύουν το flavor. Γι' αυτόν τον λόγο τα ετεροζυμωτικά γαλακτικά βακτήρια χρησιμοποιούνται συχνά στη γαλακτοβιομηχανία και προτιμώνται από τα ομοζυμωτικά (Carr et al., 2002).

Είναι σημαντικό να αποσαφηνίσουμε τις συνήθεις παρανοήσεις που γίνονται σχετικά με τα προβιοτικά και τα οξυγαλακτικά βακτήρια, με την πιο κοινή να είναι η πλήρης ταύτιση μεταξύ τους. Ενώ ένα μεγάλο μέρος των LAB είναι προβιοτικά υπάρχουν και άλλα στελέχη με διαφορετική δράση, έως και παθογόνα. Γι' αυτό είναι καίριας σημασίας η σωστή ταξινόμηση των προβιοτικών όπως αναφέρεται και παραπάνω (J. Gao et al., 2021).

#### 2.4.3.1 *Lactobacillus*

Οι Gram-θετικοί ράβδοι γνωστοί ως *Lactobacilli*, είναι μια υποομάδα βακτηρίων γαλακτικού οξέος (LAB). Μπορούν να βρεθούν σε ποικίλα οικοσυστήματα, συμπεριλαμβανομένων των βλεννογόνων μεμβρανών τόσο των ανθρώπων όσο και των ζώων (στοματική κοιλότητα, έντερο και κόλπος), . Ο γαστρεντερικός σωλήνας περιέχει Λακτοβάκιλλους, οι οποίοι είναι διαδεδομένοι στη διατροφή και εμφανίζονται λίγο μετά τη γέννηση. Οι λακτοβάκιλλοι είναι τα κυρίαρχα βακτήρια στον κόλπο και συνήθως βρίσκονται στη στοματική κοιλότητα (10<sup>3</sup>-10<sup>4</sup> cfu/g), στον ειλέο (10<sup>3</sup>-10<sup>7</sup> cfu/g) και στο παχύ έντερο (10<sup>4</sup>-10<sup>8</sup> cfu/g) των υγιών ατόμων (Bernardeau et al., 2008).

Η παραγωγή ζυμούμενων τροφίμων, συμπεριλαμβανομένων των λαχανικών, των κρεάτων και ιδιαίτερα των ζυμούμενων γαλακτοκομικών προϊόντων, εξαρτάται σε μεγάλο

βαθμό από τους γαλακτοβάκιλλους. Τα τελευταία είκοσι χρόνια έχει σημειωθεί σημαντική αύξηση των επιστημονικών γνώσεων για τους γαλακτοβάκιλλους (όπως ο μεταβολισμός και οι λειτουργίες τους), γεγονός που επέτρεψε ακριβέστερο έλεγχο των διεργασιών κατά την παραγωγή και μια ευρύτερη ποικιλία βιομηχανικών γαλακτοκομικών εφαρμογών ως εκκινητές και συμπληρωματικοί εκκινητές/καλλιέργειες (συμπεριλαμβανομένων των προβιοτικών) (Bernardeau et al., 2008).

Το *Lactobacillus Rhamnosus* GG ανακαλύφθηκε το 1985 και είναι το πιο πολυμελετημένο στέλεχος, ενώ τα *Lactobacillus reuteri* (Daliri, Ofosu, Xiuqin, Chelliah, & Oh, 2021) και *Lactobacillus johnsonii* (Davoren et al., 2018) είναι δύο νέα στελέχη με σημαντικές δυνατότητες για την ανάπτυξη λειτουργικών γαλακτοκομικών προϊόντων (J. Gao et al., 2021).

Οι γαλακτοβάκιλλοι είναι γνωστοί ως NSLAB (Non Starter Lactic Acid Bacteria), και είναι βακτήρια που συμβάλλουν σημαντικά στη μικροχλωρίδα των περισσότερων ειδών τυριού κατά την ωρίμανση. Είναι επίσης απαραίτητα για τη γεύση. Πολλά μεσόφιλα είδη *Lactobacillus* έχουν απομονωθεί από τυριά, αλλά τα πιο συνηθισμένα είναι τα *L. casei*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* και *L. curvatus* (Bernardeau et al., 2008).

Μπορούν επίσης να προστεθούν στο γιαούρτι που παρασκευάζεται σύμφωνα με το πρότυπο Codex Alimentarius, όπως το *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Codex alimentarius, 2003). Οι *Lactobacillus acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. reuteri*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. johnsonii*, *L. crispatus*, *L. paracasei* και *L. gasseri* είναι μεταξύ των λακτοβακίλλων που ανιχνεύονται στο ζυμωμένο γάλα (Bernardeau et al., 2008).

#### **2.4.3.2 Bifidobacterium**

Το γένος *Bifidobacterium* ανήκει στο φύλο *Actinobacteria* και είναι μέλος της οικογένειας *Bifidobacteriaceae* και της τάξης *Bifidobacteriales*. Είναι μία από τις μεγαλύτερες ταξινομικές ομάδες βακτηρίων. Τα βακτήρια του γένους *Bifidobacteria* μπορούν να βρεθούν σε μια ποικιλία περιβάλλοντων, όπως το έντερο (άνθρωποι, αγελάδες, κουνέλια, ποντίκια, κοτόπουλα και έντομα), τη στοματική κοιλότητα, τα λύματα, το αίμα και τα τρόφιμα. Όλες αυτές οι κόγχες σχετίζονται είτε άμεσα είτε έμμεσα με το εντερικό περιβάλλον του ανθρώπου/ζώου, με τις τρεις τελευταίες να είναι πιθανότατα αποτέλεσμα μόλυνσης από την αρχική φυσική τους πηγή (το γαστρεντερικό σύστημα). Υποθέτουμε ότι τα *bifidobacteria* κατανέμονται καθολικά μεταξύ των ζωντανών οργανισμών που ανατρέφουν τους απογόνους τους μέσω της γονικής φροντίδας (π.χ. θηλαστικά, πτηνά,

κοινωνικά έντομα) και ότι αυτή η οικολογική κατανομή των bifidobacteria μπορεί να είναι αποτέλεσμα της άμεσης μετάδοσης των bifidobacterial κυττάρων από τον γονέα/φροντιστή στους απογόνους (Turroni et al., 2013).

Τα βακτήρια του γένους Bifidobacteria μπορούν να βρεθούν σε μια ποικιλία περιβάλλοντων, όπως το έντερο (άνθρωποι, αγελάδες, κουνέλια, ποντίκια, κοτόπουλα και έντομα), τη στοματική κοιλότητα, τα λύματα, το αίμα και τα τρόφιμα. Όλες αυτές οι κόγχες σχετίζονται είτε άμεσα είτε έμμεσα με το εντερικό περιβάλλον του ανθρώπου/ζώου, με τις τρεις τελευταίες να είναι πιθανότατα αποτέλεσμα μόλυνσης από την αρχική φυσική τους πηγή (το γαστρεντερικό σύστημα). Υποθέτουμε ότι τα bifidobacteria κατανέμονται καθολικά μεταξύ των ζωντανών οργανισμών που ανατρέφουν τους απογόνους τους μέσω της γονικής φροντίδας (π.χ. θηλαστικά, πτηνά, κοινωνικά έντομα) και ότι αυτή η οικολογική κατανομή των bifidobacteria μπορεί να είναι αποτέλεσμα της άμεσης μετάδοσης των bifidobacterial κυττάρων από τον γονέα/φροντιστή στους απογόνους (F. Turroni et al., 2011).

Τα bifidobacteria έχουν την ικανότητα να παρασκευάζουν και να παράγουν βιταμίνες όπως η ριβοφλαβίνη, η θειαμίνη, η βιταμίνη Β6 και η βιταμίνη Κ, καθώς και συναφείς βιοδραστικές ενώσεις όπως το φολικό οξύ, η νιασίνη και η πυριδοξίνη. Το ζυμωμένο γάλα που περιέχει Bifidobacteria είναι πλούσιο σε ελεύθερα αμινοξέα και βιταμίνες. Τα Bifidobacteria δημιουργούν κατά προτίμηση L(+)-γαλακτικό οξύ, το οποίο είναι πιο εύκολα αφομοιώσιμο από τον άνθρωπο και μπορεί να είναι σημαντικό στην περίπτωση βρεφών ή ατόμων που πάσχουν από μεταβολική οξέωση. Τα τρόφιμα που περιέχουν μπιφιδοβακτήρια μπορεί ενδεχομένως να ενισχύσουν την απορρόφηση των ανόργανων συστατικών προωθώντας τον ιονισμό (McCartney, 2003). Τα προβιοτικά σκευάσματα που ενσωματώνουν Bifidobacterium περιλαμβάνουν μεμονωμένα βακτηριακά στελέχη, σε συνδυασμό με άλλα προβιοτικά μικρόβια, ενθυλακωμένα βακτηριακά κύτταρα και συν-ενθυλακωμένα κύτταρα με πρεβιοτικά (Sharma et al., 2021).

#### **2.4.3.3 Streptococcus**

Οι στρεπτόκοκκοι είναι θετικά κατά Gram, αρνητικά σε καταλάση βακτήρια που αναπτύσσονται σε προαιρετικά αερόβια περιβάλλοντα, με ορισμένα να απαιτούν επιπλέον CO<sub>2</sub>. Διαθέτουν χημειο-οργανοτροφικό μεταβολισμό και ζυμωτικό μεταβολισμό. Ως κύριο υποπροϊόν της ζύμωσης της γλυκόζης μέσω της οδού Embden-Meyerhof-Parnas, παράγουν L-(+)-γαλακτικό οξύ. Οι στρεπτόκοκκοι είναι ομοζυμωτικοί, πράγμα που

σημαίνει ότι δεν δημιουργούν CO<sub>2</sub> από τη γλυκόζη. Τα κύτταρα έχουν σφαιρικό ή ωοειδές σχήμα και διάμετρο μικρότερη από 2μm. Όταν αναπτύσσονται σε υγρό μέσο, τα κύτταρα σχηματίζουν ζεύγη ή αλυσίδες. Οι στρεπτόκοκκοι είναι μη κινητικοί και δεν παράγουν ενδοσπόρια (Du Toit et al., 2014).

Εκτός από τα είδη της ομάδας των ειδών *mitis*, τα κυτταρικά τοιχώματα των στρεπτόκοκκων περιέχουν συχνά ραμνόζη. Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης είναι συνήθως γύρω στους 37 βαθμούς Κελσίου, ωστόσο οι ελάχιστες και μέγιστες θερμοκρασίες ανάπτυξης ενδέχεται να διαφέρουν μεταξύ των ειδών. Πολλά είδη είναι κοινά για τον άνθρωπο και τα ζώα, ενώ ορισμένα είναι άκρως παθογόνα. Επειδή το γένος *Streptococcus* είναι ιδιαίτερα δύσκολο να ταυτοποιηθεί μεταξύ των γενών *Enterococcus* και *Lactococcus* χρησιμοποιώντας φαινοτυπικές δοκιμές, η ταυτοποίηση του γένους θα πρέπει να συμπληρώνεται από διαδικασίες γενετικής ταυτοποίησης (Du Toit et al., 2014). Το πιο κοινό στέλεχος το οποίο εντοπίζεται στη βιβλιογραφία αναφορικά με τη χρήση του ως προβιοτικό, είναι το *Streptococcus thermophilus*.

#### 2.4.3.4 *Saccharomyces*

Οι μη παθογόνοι ορότυποι του *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* (*S. boulardii*) που ταξινομούνται ως προβιοτικά έχουν συνταγογραφηθεί από τους επαγγελματίες υγείας για τη θεραπεία μιας ποικιλίας διαταραχών που σχετίζονται με το έντερο τα τελευταία χρόνια (Ansari et al., 2023).

Το *S. boulardii* έχει βρεθεί στο *lychee* (*Litchi chinensis*), στα φρούτα *mangosteen*, στο *kombucha* και σε γαλακτοκομικά προϊόντα όπως το κεφίρ. Το *S. boulardii* έχει χρησιμοποιηθεί ως προβιοτικό (είτε μόνο του είτε σε συνδυασμό με άλλους προβιοτικούς μικροοργανισμούς) στην παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων όπως κεφίρ, κουμίρ, τυρί, γιαούρτι και παγωτό. Σε αυτά τα τρόφιμα, η προαναφερθείσα μαγιά περιλαμβάνεται ως βοηθητικό μαζί με μια ποικιλία άλλων προβιοτικών βακτηρίων, όπως αυτά των γενών *Lactobacillus* και *Bifidobacterium* (Ansari et al., 2023).

Το *Saccharomyces boulardii* είναι ένα ευεργετικό στέλεχος ζύμης για την υγεία του ανθρώπου και των ζώων και ένα προβιοτικό προϊόν θα πρέπει να περιέχει τουλάχιστον 10<sup>7</sup>cfu/g *S. boulardii* και να λαμβάνεται σε επίπεδα μεγαλύτερα από 100 g/ημέρα. Μπορεί να προσκολληθεί εύκολα στο γαστρικό τοίχωμα και στον εντερικό βλεννογόνο, καθιστώντας το εξαιρετικά βιώσιμο στον ανθρώπινο και ζωικό γαστρεντερικό σωλήνα (Ansari et al., 2023).

Τα σάκχαρα αποτελούν σημαντική πηγή άνθρακα για τους περισσότερους προβιοτικούς οργανισμούς. Λόγω της ποικιλόμορφης εξειδίκευσης των υποστρωμάτων τους και της ευκολίας παραγωγής τους υπό αναερόβιες συνθήκες, οι ζύμες, ιδίως η *S. cerevisiae*, είναι οι πιο επιθυμητοί οργανισμοί για τη σύνθεση αιθανόλης. Επιπλέον, παρουσιάζουν υψηλή ανοχή στην αιθανόλη (Mohd Azhar et al., 2017). Μπορεί επίσης να δημιουργήσει αντιοξειδωτικά (γλουταθειόνη, σιδηροφόρα), βιταμίνη B12, οργανικά οξέα και ένα ισχυρό βιοφίλμ. Είναι επίσης ένας απορροφητής χοληστερόλης με δυνατότητες αυτόματης συσσωμάτωσης και υδρόφοβη κυτταρική επιφάνεια. Αν και η απομονωμένη ζύμη προκαλεί την ανάπτυξη εντερικών ενζύμων όπως κυτταρίνη, αμυλάση, λιπάση και πρωτεάση, δεν είναι σε θέση να παράγει DNAάση, γαλακτοσιδάση και ζελατινάση. Στην πραγματικότητα, είναι ένας αντιβακτηριακός παράγοντας που αναστέλλει την ανάπτυξη βακτηρίων και μυκήτων. Τα προϊόντα λύσης πρωτεϊνών του έχουν μεγαλύτερη αντιβακτηριακή δύναμη από το υπερκείμενο ολόκληρων κυττάρων ή καλλιέργειας (Fakruddin et al., 2017).

Το *S. boulardii* είναι ένα από τα λίγα προβιοτικά που λειτουργούν καλά στη θερμοκρασία του ανθρώπινου σώματος (37 βαθμοί Κελσίου). Η βέλτιστη θερμοκρασία για τα περισσότερα στελέχη *Saccharomyces* κυμαίνεται από 22 έως 30 βαθμούς Κελσίου. Άλλα στελέχη *S. cerevisiae* προτιμούν χαμηλότερες θερμοκρασίες (de Paula et al., 2015). Το *S. boulardii* είναι ανθεκτικό σε χαμηλό pH και χολικό οξύ, ενώ άλλα στελέχη *Saccharomyces* δεν μπορούν να αντέξουν τέτοιες σκληρές συνθήκες (McFarland, 2010). Το *S. boulardii* έχει αποδειχθεί ότι αναπτύσσεται με επιτυχία σε pH 2 (Du et al. 2012). Η ενεργότητα του νερού μπορεί να έχει αντίκτυπο στη ζωτικότητα και τη βιωσιμότητα του *S. boulardii*. Μια μελέτη διαπίστωσε ότι η ενεργότητα νερού ( $a_w$ ) 0,98 (σε σύγκριση με τις τιμές ενεργότητας νερού 0,98, 0,97, 0,96, 0,95, 0,64, 0,93, 0,92, 0,91 και 0,90) στα υποστρώματα αύξησε την επιβίωση κατά την κατάψυξη των κυττάρων του *S. boulardii* που αποθηκεύτηκαν στους 20 βαθμούς Κελσίου για 2 μήνες. Οι χαμηλότερες συνθήκες  $a_w$  μείωσαν την κινητικότητα των κυττάρων της ζύμης (Pardo et al., 2009).

Οι ζύμες και τα βακτήρια αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές προκαλούνται από τον ανταγωνισμό των θρεπτικών συστατικών και τη δημιουργία μεταβολιτών στο μέσο. Η σύνθεση μεταβολιτών όπως το γαλακτικό και το οξικό οξύ από τα βακτήρια γαλακτικού οξέος (LAB) εμποδίζει την υπερβολική ειδική αναλογία ανάπτυξης και την παραγωγή αιθανόλης του *S. cerevisiae*. Η παρουσία ζύμης, από την άλλη πλευρά,



έχει βρεθεί ότι επηρεάζει ευνοϊκά το μέγιστο ειδικό ποσοστό ανάπτυξης του *L.sanfranciscensis* (Stadie et al., 2013).

#### 2.4.3.5 *Enterococcus*

Τα βακτήρια του γένους *Enterococcus* είναι βακτήρια γαλακτικού οξέος (LAB) που περιλαμβάνουν τόσο παθογόνα όσο και μη, οι οποίοι είναι ευρέως διαδεδομένοι σε όλο το περιβάλλον, μεταξύ άλλων και στο ανθρώπινο εντερικό σωλήνα. Τα στελέχη του *Enterococcus* spp. είναι ιδιαίτερα προσαρμοσμένα σε διάφορα διατροφικά συστήματα λόγω της ανεκτικότητάς τους σε άλατα και οξέα- συμμετέχουν επίσης στη δραστηριότητα ζύμωσης των παραδοσιακά παρασκευασμένων τυριών και ξηρών λουκάνικων, όπου πιστεύεται ότι συμβάλλουν στην ανάπτυξη οργανοληπτικών χαρακτηριστικών (Foulquié Moreno et al., 2006). Επιπλέον, ορισμένα στελέχη *Enterococcus* έχουν βρεθεί ότι παράγουν αντιμικροβιακές ουσίες, όπως οι βακτηριοσίνες. Η παραγωγή βακτηριοσινών έχει χρησιμοποιηθεί για τη συντήρηση μιας μεγάλης ποικιλίας τροφίμων και θεωρείται σήμερα ως προβιοτικό χαρακτηριστικό (Yang et al., 2014).

Γενικά, οι εντερόκοκκοι μπορούν να υπάρχουν ως μεμονωμένοι κόκκοι, σε ζεύγη ή σε μικρές αλυσίδες. Δεν έχουν σπόρια, είναι αρνητικοί σε οξειδάση και είναι προαιρφετικά αναερόβιοι. Κατατάσσονται στα βακτήρια του γαλακτικού οξέος (LAB) επειδή μοιράζονται την πλειονότητα των φαινοτύπων των άλλων μελών της ομάδας, όπως η θετικότητα κατά Gram, η αρνητικότητα της καταλάσης και η ικανότητα μετατροπής της γλυκόζης σε γαλακτικό οξύ ως πρωταρχικό προϊόν (ομοζυμωτικά). Επιπλέον, τα είδη αυτού του γένους αναπτύσσονται καλύτερα σε θερμοκρασία 35°C, ενώ άλλα είδη του γένους μπορούν να αναπτυχθούν σε θερμοκρασίες που κυμαίνονται από 10 έως 45°C. Τα περισσότερα από αυτά ευδοκιμούν σε υψηλές συγκεντρώσεις NaCl (έως 6,5%), pH 9,6 και μπορούν να επιβιώσουν στους 60°C για 30 λεπτά, επομένως είναι θερμοανθεκτικά (Araújo & Ferreira, 2013). Πολλοί από αυτούς τους μικροοργανισμούς έχουν την ικανότητα να υδρολύουν την εσκουλίνη παρουσία χολικών αλάτων 40%, γεγονός που αποτελεί ένα από τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά (Devriese et al., 2006). Ο *Enterococcus faecalis* και ο *E. faecium* είναι τα δύο πιο κοινά είδη σε διατροφικά και κλινικά δείγματα. (Hardie & Whiley, 1997).

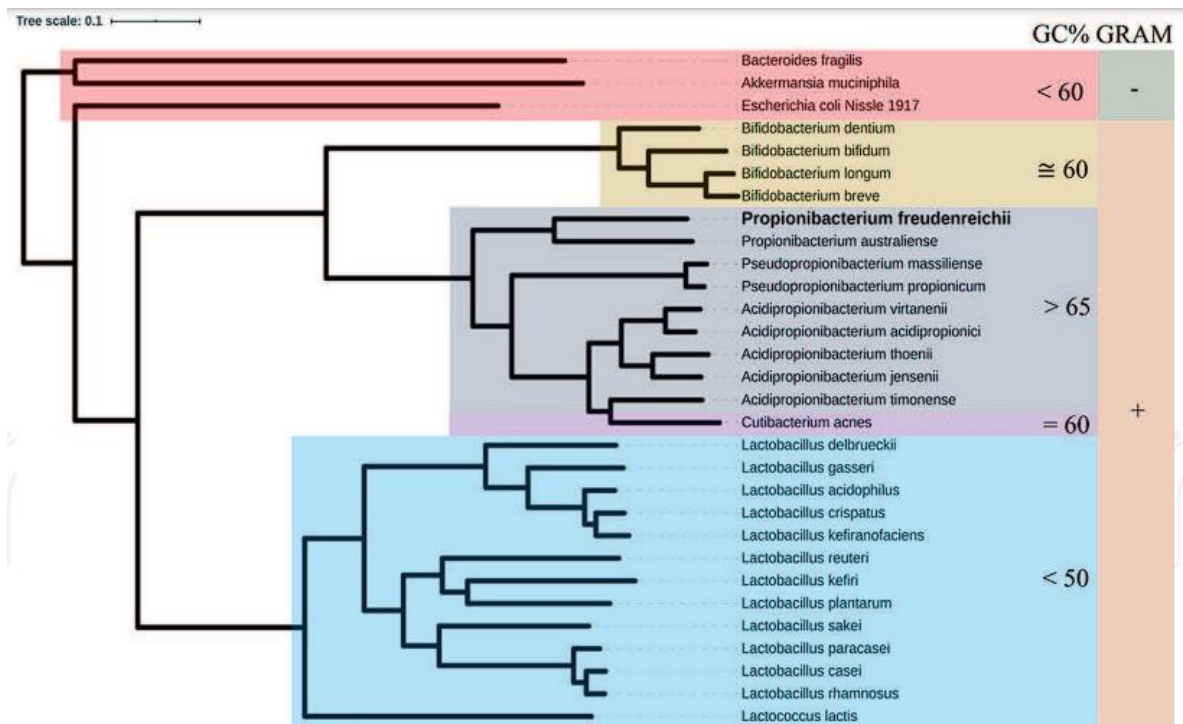
#### 2.4.3.6 *Propionibacterium freudenreichii*

Το *Propionibacterium freudenreichii* είναι ένα Gram-θετικό, μεσόφιλο, αερόφιλο, μη

κινητικό, μη σπορογόνο βακτήριο με ελάχιστες διατροφικές απαιτήσεις και την ικανότητα να επιμένει σε δύσκολες συνθήκες, γαλακτοκομικό προβιοτικό βακτηριακό είδος που χρησιμοποιείται εδώ και καιρό ως εκκινητής ωρίμανσης στην παραγωγή τυριών ελβετικού τύπου. Όσον αφορά τη μορφολογία, πρόκειται για ένα πλειομορφικό ραβδωτό βακτήριο με τάση για συσσωμάτωση, δημιουργώντας συστάδες που μοιάζουν με κινεζικούς χαρακτήρες (de Rezende Rodvalho et al., 2022).

Έχει χρησιμοποιηθεί για τη βελτιστοποίηση της παρασκευής τυριού, συμπεριλαμβανομένης της ικανότητας ωρίμανσης και της σύνθεσης αρωματικών ενώσεων, καθώς και για την παρασκευή βιταμίνης B12 και οργανικών οξέων. Επιπλέον, έχει εμφανιστεί στο τοπίο των προβιοτικών λόγω μιας σειράς θετικών χαρακτηριστικών, συμπεριλαμβανομένης της ανεκτικότητας στο γαστρεντερικό στρες, της προσκόλλησης στα κύτταρα του ξενιστή, της αντιπαθογόνου δράσης, του αντικαρκινικού δυναμικού και των ανοσοτροποποιητικών δραστηριοτήτων (de Rezende Rodvalho et al., 2022).

Η ικανότητα αυτού του βακτηρίου να παράγει βιταμίνη B12, οργανικά οξέα, τρεαλόζη και άλλους μεταβολίτες, καθώς και η ασφαλής χρήση του ως εκκινητής ωρίμανσης τυριού και οι προβιοτικές του ιδιότητες, το καθιστούν ελκυστικό για ποικίλες βιοτεχνολογικές και βιομηχανικές χρήσεις. Είναι επίσης σημαντικό το γεγονός ότι οι ανοσοτροποποιητικές ικανότητες του *P. freudenreichii* διατηρούνται όταν χρησιμοποιούνται ως φορείς μεταφοράς υποστρώματα τροφίμων, όπως το τυρί και το ζυμωμένο γάλα, γεγονός που δείχνει ότι υπάρχουν μεγάλες δυνατότητες για την παραγωγή λειτουργικών τροφίμων με βάση προβιοτικά και ανοσοτροποποιητικές ιδιότητες (de Rezende Rodvalho et al., 2022).



Σχήμα 2: Φυλογενετικό δέντρο που δείχνει τη γονιδιωματική ομοιότητα μεταξύ των ειδών *P. freudenreichii* που προάγουν την υγεία, άλλων προβιοτικών ή στενά συγγενών ειδών (de Rezende Rodvalho V. et al., 2022).

#### 2.4.3.7 *Bacillus*

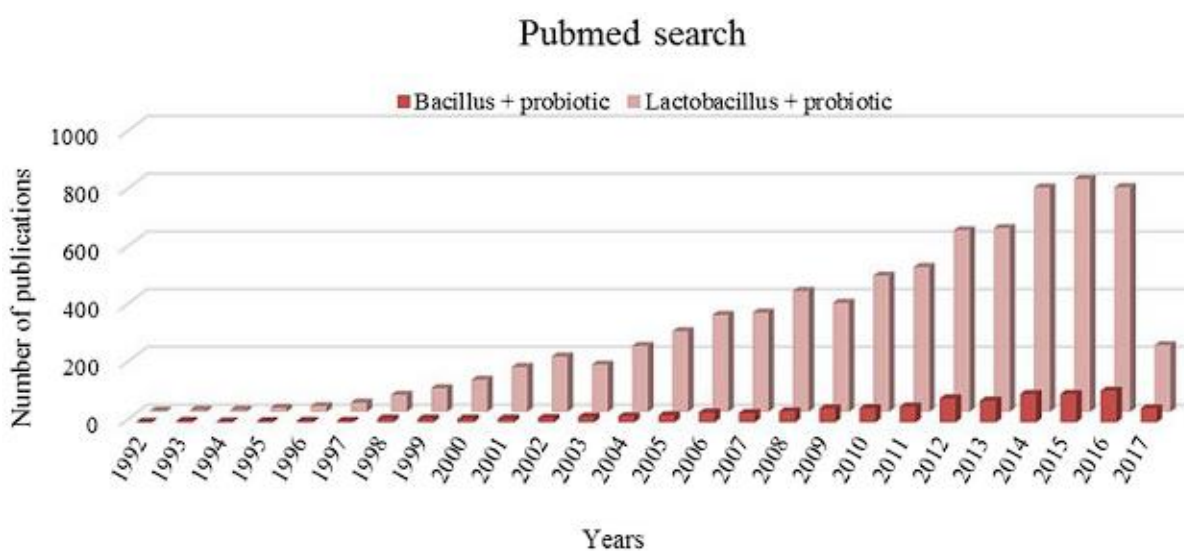
Τα βακτήρια του γένους *Bacillus* είναι θετικά κατά Gram, ραβδοειδή, σπορογόνα βακτήρια που μπορεί να είναι αερόβια ή προαιρετικά αναερόβια. Οι βάκιλλοι κατατάσσονται στην κατηγορία των εν γένει εδαφικών οργανισμών. Από την άλλη πλευρά, οι *Bacillus* spp. μπορούν να απομονωθούν από διάφορες εστίες, όπως ο αέρας, το νερό, το ανθρώπινο και ζωικό στομάχι, καθώς και τα λαχανικά και τα τρόφιμα (Kotb, 2015). Παρ' όλα αυτά, ο *Bacillus* spp. είναι η πιο ποικιλόμορφη ομάδα όσον αφορά τα φαινοτυπικά και γονοτυπικά χαρακτηριστικά. Ορισμένα μοναδικά είδη έχουν επίσης εντοπιστεί σε ανθρώπινους ή ζωικούς ξενιστές ως ευκαιριακά παθογόνα ή παραγωγοί τοξινών. Ο *Bacillus* spp. δεν θεωρείται φυσικός κάτοικος του στομάχου, αποικούν το έντερο μετά την κατανάλωση λαχανικών ή ακατέργαστων συστατικών τροφίμων που έχουν μολυνθεί. Το γένος *Bacillus* συγγενεύει στενά με το *Lactobacillus* spp., καθώς και οι δύο ανήκουν στο ίδιο φύλο, Firmicutes, και ταξινομούνται ως Bacilli (Elshagabee et al., 2017).

Τα σπόρια του *Bacillus* μπορούν να επιβιώσουν σε υψηλή οξύτητα του στομάχου και να ανεχθούν τα χολικά άλατα. Επιπλέον, οι βάκιλλοι είναι πιο σταθεροί κατά την επεξεργασία και την αποθήκευση τροφίμων και φαρμακευτικών σκευασμάτων, καθιστώντας τους καλύτερο συστατικό για παρασκευάσματα που προάγουν την υγεία. Ως

αποτέλεσμα, εκτός από τις ανθρώπινες πηγές, τα προβιοτικά στελέχη *Bacillus* μπορούν να βρεθούν σε ζυμωμένες ή μη ζυμωμένες πηγές τροφίμων και να διατεθούν στο εμπόριο με τη μορφή ποικίλου φάσματος συμπληρωμάτων υγείας (Elshagabee et al., 2017).

Τα στελέχη *Bacillus* αναγνωρίζονται επίσης ως μελλοντικά προβιοτικά που θα μπορούσαν να ωφελήσουν την ανθρώπινη υγεία με την κατανάλωση μεγάλου αριθμού ζωντανών κυττάρων (Manhar et al., 2016). Αρκετά προβιοτικά στελέχη *Bacillus* έχουν εγκριθεί για ανθρώπινη χρήση από ρυθμιστικούς φορείς σε διάφορες χώρες και είναι δημοφιλής στην παγκόσμια αγορά ως φαρμακευτικά σκευάσματα που βελτιώνουν γενικά την υγεία (F. Elshagabee et al., 2017).

Επειδή η διαφωνία σχετικά με την ετικέτα προβιοτικού έναντι παθογόνου του *Bacillus* spp. εξακολουθεί να υφίσταται στα πεδία της έρευνας και της παραγωγής, τα εμπορικά προϊόντα του *Bacillus* που συνθέτουν λειτουργικά τρόφιμα δεν είναι δημοφιλής στην αγορά των θρεπτικών προϊόντων (Elshagabee et al., 2017).



Σχήμα 3: Τάσεις στο Pubmed για τις λέξεις-κλειδιά "*Bacillus* + προβιοτικά" και "*Lactobacillus* + προβιοτικά" για τα τελευταία 25 χρόνια (F. Elshagabee et al., 2017).

Τα είδη *bacillus* τα οποία μπορούν να καταταχθούν ως προβιοτικά στη βιβλιογραφία είναι τα *B. subtilis*, *B. coagulance*, *B. Licheniformis* και *B. Megaterium* (Elshagabee et al., 2017).

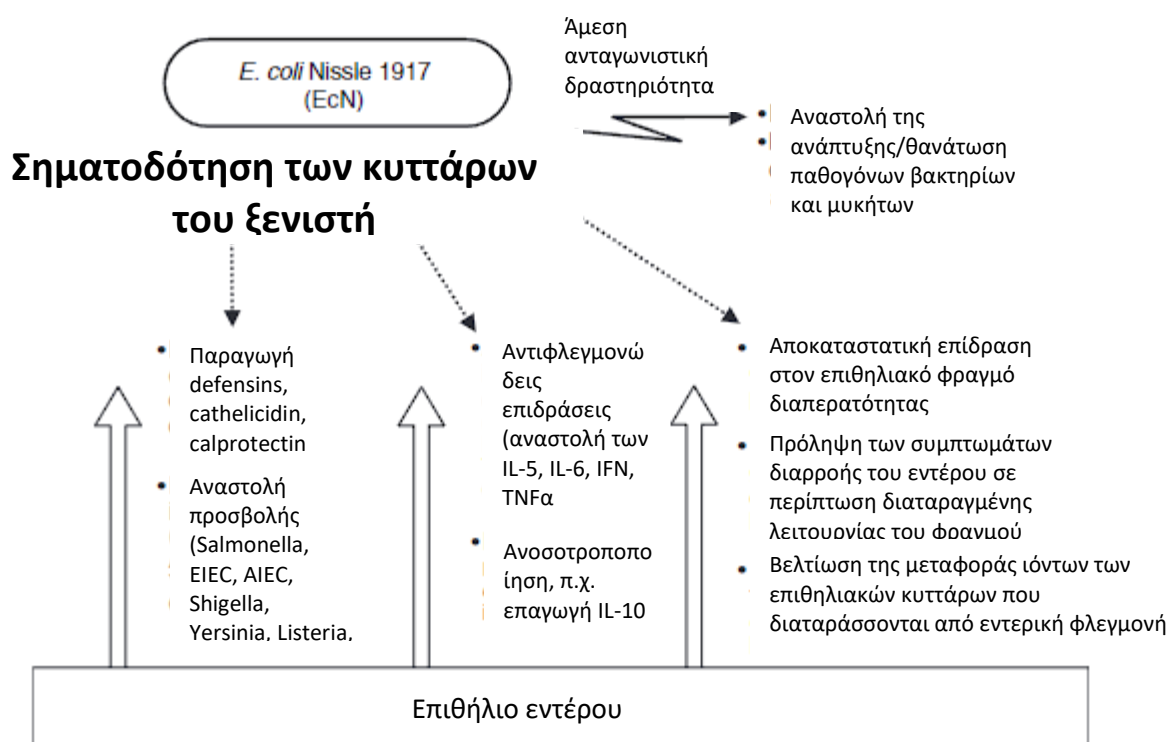
#### 2.4.3.8 *Escherichia coli*

Μεταξύ των αρνητικών κατά Gram μικροοργανισμών που έχουν προβιοτικές ιδιότητες, το

στέλεχος *Escherichia coli* Nissle 1917 (συντομογραφία EcN) είναι πιθανότατα το πιο εκτεταμένα μελετημένο βακτηριακό στέλεχος σήμερα (Sonnenborn, 2016).

Το EcN συνδέεται ορολογικά με την ομάδα *E. coli* O6 και έχει τον ορότυπο O6:K5:H1, είναι ένα τυπικό αρνητικό κατά Gram εντεροβακτήριο με λιποπολυσακχαρίτη (LPS) ως δομικό συστατικό της εξωτερικής κυτταρικής του μεμβράνης. Το EcN είναι ένα τυπικό στέλεχος *E. coli* όσον αφορά τις μεταβολικές ικανότητες, με εξαίρεση την ικανότητά του να μεταβολίζει την αργινίνη. Η ιδιότητα αυτή παρατηρείται σε περίπου 7% όλων των απομονωμένων στελεχών *E. coli*. Το EcN παράγει λιπαρά οξέα βραχείας αλυσίδας ως τελικά προϊόντα του μεταβολισμού των υδατανθράκων υπό αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες ανάπτυξης (Sonnenborn, 2016).

Ένα μέλος της οικογένειας LAB, το *Pediococcus* spp., έχει αποδειχθεί ότι είναι επιτυχής στην παραγωγή αντιμικροβιακών πεπτιδίων (βακτηριοσίνες) με χρήσεις στις βιομηχανίες τροφίμων και υγείας. Επιπλέον, η δεύτερη πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη βακτηριοσίνη στην επιστημονική κοινότητα είναι η πεδιοκίνη PA-1, η οποία παράγεται από διάφορα στελέχη *Pediococcus* και χρησιμοποιείται ως βιοσυντηρητικό στα τρόφιμα, ιδίως για την πρόληψη και τον έλεγχο της επιμόλυνσης από Gram-θετικά παθογόνα, ιδίως τη *Listeria monocytogens* (Garsa et al., 2014).



Σχήμα 4: Σχηματική σύνοψη των φαρμακοδυναμικών δραστηριοτήτων του προβιοτικού στελέχους *E. coli* Nissle 1917 (EcN) στον αυλό του εντέρου (ανταγωνιστική δράση) και στο εντερικό επιθήλιο και πέραν αυτού (σηματοδότηση των κυττάρων του ξενιστή) (Sonnenborn, 2016).

#### 2.4.3.9 *Pediococci*

Οι *Pediococci* είναι Gram-θετικά, μη παραγωγικά καταλάσης, προαιρετικά αναερόβια, ομοζυμωτικά, μη κινητικά και μη σπορογόνα βακτήρια γαλακτικού οξέος (*Lactobacillales*). Όπως τα περισσότερα LAB, η αντοχή των διαφόρων στελεχών *Pediococcus* στο οξυγόνο, στα επίπεδα pH, στη θερμοκρασία και στο NaCl ποικίλλει. Με βάση τους μηχανισμούς απορρόφησης που αφορούν συγκεκριμένα είδη, οι *Pediococcus spp.* μπορούν να ζυμώσουν υδατάνθρακες (Todorov et al., 2022).

Το στέλεχος το οποίο αναφέρεται στη βιβλιογραφία ως υποψηφίο για χρήση σε τρόφιμα ως starter είναι το *Pediococcus pentosaceus*. Το *P. pentosaceus* λειτουργεί ως πρόσθετο τροφίμων, βελτιώνοντας τη γεύση αυξάνοντας τη συγκέντρωση λιπαρών οξέων μικρής αλυσίδας (SCFAs) και την υδρόλυση των πρωτεϊνών του κρέατος. Οι Jang et al. ανακάλυψαν ότι το *P. pentosaceus* T1 ενίσχυσε την υφή, την ξινότητα και άλλες οργανοληπτικές αισθήσεις, υποδηλώνοντας ότι θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως εκκινητής για το παραδοσιακό kimchi. Το *P. pentosaceus* T1 επιβράδυνε την ωρίμανση του kimchi για να αυξήσει τη χρησιμότητά του αναστέλλοντας την LAB, δηλαδή έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να βοηθήσει στη διάρκεια ζωής ενός τροφίμου που περιέχει LAB. Το *P. pentosaceus* CRAG3 (αριθμός καταχώρησης GenBank JX679020) ήταν το πρώτο που αποδείχθηκε ότι παράγει γλυκανσουκράση και ικανότητες αξιοποίησης πρεβιοτικών. Στη συνέχεια, λόγω της υψηλής παραγωγής γλυκανσουκράσης, εγκρίθηκε ότι συμβάλλει στη γεύση των γαλακτοκομικών προϊόντων (Jiang et al., 2021).

#### 2.4.3.10 *Leuconostoc*

Τα στελέχη που ανήκουν στο γένος *Leuconostoc* είναι θετικά κατά Gram βακτήρια γαλακτικού οξέος (LAB), με κοκκοειδές ή ραβδόμορφο σχήμα. Τα βακτήρια αυτά είναι μη κινητικά, μη σπορογόνα, αρνητικά ως προς την καταλάση, αναερόβια προαιρετικά, μεσόφιλα και δεν παράγουν αμμωνία από αργινίνη. Έχουν πολύπλοκες διατροφικές απαιτήσεις, συμπεριλαμβανομένων διαφορετικών αμινοξέων. Επιπλέον, δεν παρουσιάζουν σχηματισμό H<sub>2</sub>S, ούτε ανάπτυξη παρουσία 7% NaCl. Αυτοί οι μικροοργανισμοί είναι μεσόφιλοι, με βέλτιστες θερμοκρασίες ανάπτυξης μεταξύ 20 και 30 βαθμών Κελσίου (de Paula et al., 2015, Hemme & Foucaud-Scheunemann, 2004).

Διαφορετικά απομονωμένα στελέχη του *Lc. mesenteroides* έχουν επιδείξει την ικανότητα επιβίωσης σε χαμηλό pH, συμπεριλαμβανομένων των στελεχών H4 και H5 από

προϊόντα θαλασσινών, του στελέχους B-1 από βιολογικό γιαούρτι και του στελέχους PLsr-1(w) από ορό γάλακτος, τα στελέχη KFRI818, KFRI821, LA89406, YML003, PH1 και DM1, όλα απομονωμένα από kimchi, τα στελέχη CLFP 68 και LAB-4, και τα δύο απομονωμένα από το έντερο ψαριού, και το στέλεχος Lnm-1RM3 από narezushi (de Paula et al., 2015).

Επειδή οι μικροοργανισμοί παράγουν σημαντικούς μεταβολίτες, η μεταβολική δραστηριότητα αποτελεί σημαντικό αντικείμενο μελέτης. Το *Lc. mesenteroides* παράγεται υψηλές συγκεντρώσεις συζευγμένου λινολεϊκού οξέος, το οποίο έχει συνδεθεί με ποικίλα οφέλη για την υγεία, συμπεριλαμβανομένων των αντιαθηρογενετικών, αντιδιαβητικών, αντιφλεγμονωδών και αντικαρκινογόνων ιδιοτήτων. Η συμπερίληψη προβιοτικών στελεχών (*Lc. mesenteroides* MTCC 5442 και *Bacillus subtilis natto* RG4365) σε προβιοτική βύνη ragi (λειτουργικό τρόφιμο) είχε ως αποτέλεσμα υψηλά επίπεδα ευεργετικών λιπαρών οξέων, όπως λινελαϊκό και λινολενικό οξύ, καθώς και αύξηση της περιεκτικότητας σε ανόργανα άλατα (σίδηρο και ψευδάργυρο) (de Paula et al., 2015).

Η δυσανεξία στη λακτόζη είναι ένα άλλο ζήτημα υγείας στο οποίο μπορεί να βοηθήσει ο μεταβολισμός των προβιοτικών καλλιεργειών. Ορισμένοι καταναλωτές γαλακτοκομικών προϊόντων παρουσιάζουν δυσανεξία στη λακτόζη λόγω έλλειψης ή χαμηλής παραγωγής του ενζύμου γαλακτοσιδάση, το οποίο προκαλεί δυσφορία μετά την πέψη του γάλακτος. Η παραγωγή της -γαλακτοσιδάσης βρέθηκε σε διάφορα στελέχη του *Lc. Mesenteroides* (de Paula et al., 2015).

Σημαντικές ποσότητες διακετυλίου μπορούν να σχηματιστούν από το *Leuconostoc spp.* από το κιτρικό άλας στο γάλα, το οποίο είναι μια σημαντική ένωση που παράγεται κυρίως από το *Lc. mesenteroides subsp. cremoris* και σχετίζεται με το άρωμα και τη γεύση. Η ουσία αυτή είναι απαραίτητη για την παραγωγή βουτύρου και τυριού. Το είδος αυτό παράγει μεγάλη ποσότητα εξωπολυσακχαριτών (de Paula et al., 2015). Αν και η φυσιολογία και η γενετική τους είναι λιγότερο τεκμηριωμένες από εκείνες του *Lactococcus*, η σημασία των στελεχών *Leuconostoc* στην τεχνολογία γαλακτοκομικών προϊόντων είναι ευρέως αναγνωρισμένη. Βρίσκονται συχνά στις καλλιέργειες εκκίνησης γαλακτοκομικών προϊόντων και στο γαλακτοκομικό περιβάλλον και, επομένως, θα μπορούσαν να ταξινομηθούν ως μη εκκινητικά βακτήρια γαλακτικού οξέος (NSLAB) με τον ίδιο τρόπο που ταξινομούνται οι μεσόφιλοι γαλακτοβάκิลλοι (Hemme & Foucaud-Scheunemann, 2004). Η γαλακτοβιομηχανία χρησιμοποιεί συχνά τη ιδιότητά του να σχηματίζει βλέννα, ιδίως στην παραγωγή παχύρρευστων, ζυμωμένων γαλακτοκομικών



προϊόντων. Αυτό το είδος μπορεί επίσης να αναπτυχθεί σε ένα ευρύ φάσμα θερμοκρασιών και να ανεχθεί υψηλότερες συγκεντρώσεις αλατιού έως και 7% NaCl. Παρά αυτά τα τεχνολογικά χαρακτηριστικά, η έρευνα σχετικά με τον *Lc. mesenteroides* ως δυνητικό προβιοτικό μικροοργανισμό είναι σπάνια (de Paula et al., 2015).

#### 2.4.3.11 *Lactococcus*

Τα στελέχη *Lactococcus* έχουν μορφή κόκκων και αναπτύσσονται στο μέσο ανάπτυξης τους ως μεμονωμένα ζεύγη κόκκων ή ως σχηματισμοί μικρών αλυσίδων (0,5-1,5  $\mu\text{m}$ ). Η ιδανική θερμοκρασία ανάπτυξης τους είναι οι 30°C, αλλά μπορούν να αναπτυχθούν σε θερμοκρασίες που κυμαίνονται από 10°C έως 45°C. Η ικανότητά τους να αναπτύσσονται πάνω από τους 40°C, σε υψηλότερες συγκεντρώσεις αλάτων (>4% χλωριούχο νάτριο) και να παράγουν οξύ από διάφορα σάκχαρα (αραβινόζη, λακτόζη, μαννιτόλη και ραφινόζη) ποικίλλει ανάλογα με το είδος (Schlegel, 1997, Furet et al., 2004, Khemariya et al., 2017). Δεν μπορούν να αναπτυχθούν σε 6,5% NaCl ή σε pH 9,6 (Yerlikaya, 2019).

Η ικανότητά τους να ζυμώνουν τη λακτόζη είναι κρίσιμη, ιδίως για τη χρήση τους ως καλλιέργειες εκκίνησης στη γαλακτοβιομηχανία (Yerlikaya, 2019). Πιο συγκεκριμένα, ο *Lactococcus lactis* ssp. προσαρμόζεται εύκολα σε περιβάλλοντα που περιέχουν γάλα ή γαλακτοκομικά προϊόντα και έτσι μεταβολίζει τη λακτόζη γρήγορα και εύκολα (Gutiérrez-Méndez et al., 2010). Απομονώνεται συνήθως από γαλακτοκομικά προϊόντα όπως το νωπό γάλα και οι κόκκοι κεφίρ. Χρησιμοποιείται επίσης σε καλλιέργειες εκκίνησης για την παραγωγή διαφόρων γαλακτοκομικών προϊόντων, συμπεριλαμβανομένου του τυριού. Ο *L. lactis* έχει status GRAS (generally regarded as safe) με βάση το ιστορικό της χρήσης του σε ζυμώσεις τροφίμων. Ο *Lactococcus lactis* παράγει γαλακτικό οξύ στις καλλιέργειες εκκίνησης γαλακτοκομικών προϊόντων, το οποίο βοηθά στη διάσπαση των πρωτεϊνών του γάλακτος κατά τη ζύμωση, βελτιώνοντας τις οργανοληπτικές και μικροβιολογικές ιδιότητες του προϊόντος (Cavanagh et al., 2015).

Χαρακτηριστικά	<i>Streptococcus</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Pediococcus</i>
Μορφολογία κυττάρου	Ωοειδείς κόκκοι	Ωοειδείς κόκκοι	Ωοειδείς κόκκοι	Σφαιροειδείς κόκκοι
Διάταξη κυττάρων σε	Ζεύγη ή αλυσίδες	Μονά, ζεύγη, μικρές	Μονά, ζεύγη, μικρές αλυσίδες	Μονά, ζεύγη, τετράδες



υγρό μέσο		αλυσίδες	ή μικρές ομάδες	
Κινητικότητα	Μη κινητικά	Μη κινητικά	Κυρίως μη κινητικά	Μη κινητικά
Αντοχή στο NaCl	Λίγα είδη έως 6,5%	Έως 4%	Έως 6,5%	Έως 10%

Πίνακας 4: Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά χρησιμά για τον χαρακτηρισμό των γενών γαλακτικών βακτηρίων *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* και *Pediococcus*. Όλα τα γένη είναι θετικά κατά Gram, αρνητικά ως προς την καταλάση, μη σπορογόνα και χημειο-οργανοτροφικά, με ζυμωτικό μεταβολισμό (Du Toit et al., 2014).

#### 2.4.3.12 *Clostridium*

Τα βακτήρια *Clostridium* είναι ραβδόμορφα, θετικά κατά Gram, αναερόβια που σχηματίζουν σπόρια. Βρίσκονται στο έδαφος, στα έντερα των ζώων, στο νερό και σε άλλους βιοτόπους (Guo et al., 2020).

Το *Clostridium* προτιμά τους υδατάνθρακες, ιδίως τους μη αμυλούχους πολυσακχαρίτες. Η ποσότητα των ειδών *Clostridium* στο έντερο μπορεί να επηρεαστεί από την υποκατάσταση των πολυσακχαριτών της διατροφής. Επιπλέον, οι διατροφικές φρουκτάνες τύπου ινουλίνης και οι αραβινοξυλάνες-ολιγοσακχαρίτες θα μπορούσαν όχι μόνο να προάγουν άμεσα την ανάπτυξη και την αναπαραγωγή των ειδών *Clostridium*, αλλά και να διευκολύνουν έμμεσα την παραγωγή οξικού οξέος από τη ζύμωση των διφιδιοβακτηριακών στελεχών, παρέχοντας περισσότερα υποστρώματα για τα είδη *Clostridium* για την παραγωγή βουτυρικού οξέος (P. Guo et al., 2020).

Τα είδη *Clostridium*, ως τα κυρίαρχα βακτήρια στο έντερο, παρέχουν πολυάριθμα οφέλη για την υγεία του οργανισμού αλληλεπιδρώντας με το έντερο άμεσα ή έμμεσα. Η άμεση αλληλεπίδραση με το ανοσοποιητικό σύστημα και η παραγωγή μεταβολιτών είναι δύο σημαντικές οδοί για να διαδραματίσουν τα είδη *Clostridium* ρόλο στην υγεία του εντέρου. Τα βακτήρια *Clostridium* είναι χημειοργανότροφοι. Μπορούν να ζυμώσουν υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, οργανικά οξέα και άλλες οργανικές ουσίες για να παράγουν οξικό οξύ, προπιονικό οξύ, βουτυρικό οξύ και ορισμένους διαλύτες όπως η ακετόνη και η βουτανόλη. Τα είδη *Clostridium* χρησιμοποιούν κυρίως δύσπεπτους πολυσακχαρίτες στα έντερα των ζώων και των ανθρώπων. Τα βακτήρια του γένους *Clostridium*, είναι οι πρωταρχικές δυνάμεις στην παραγωγή λιπαρών οξέων βραχείας αλυσίδας (SCFAs) από τη ζύμωση υδατανθράκων (Guo et al., 2020).

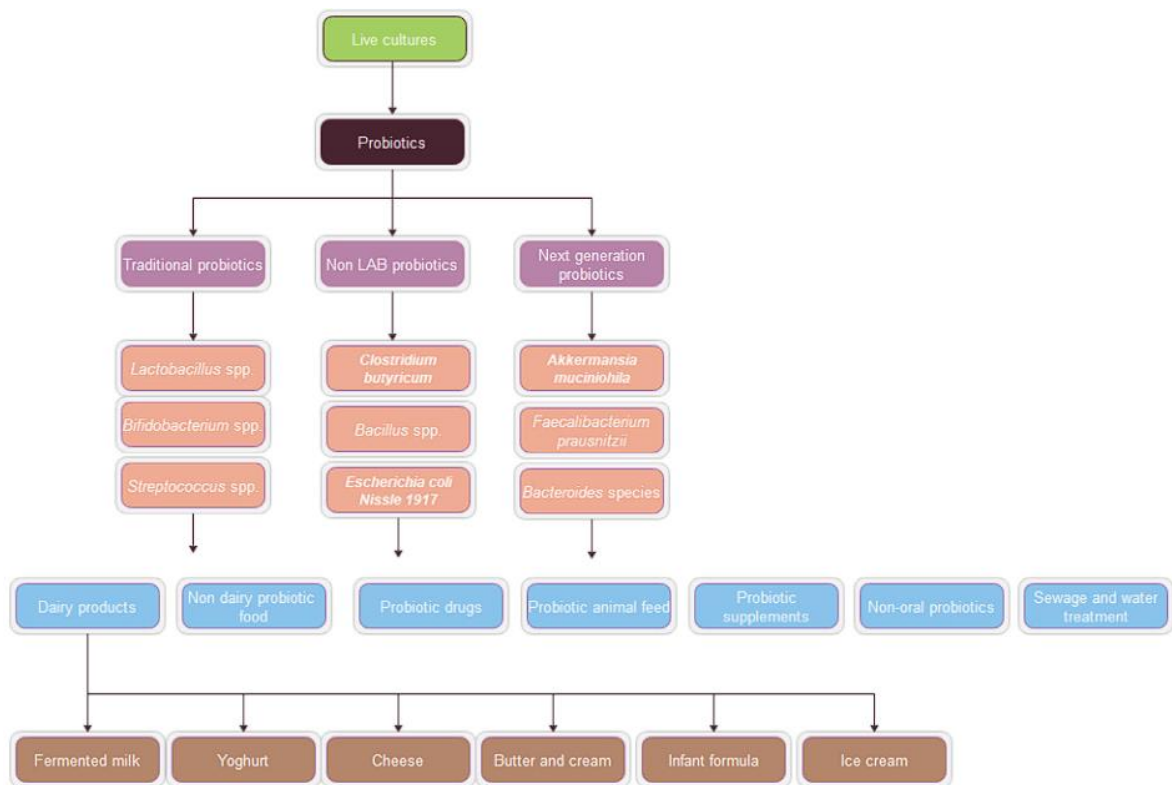
Στο επίκεντρο της υφιστάμενης βιβλιογραφίας, παρατηρείται ένα έλλειμμα σε

έρευνες που εξετάζουν τη χρήση Clostridium σε γαλακτοκομικά προϊόντα και άλλα προϊόντα διαθέσιμα στην αγορά. Η κενότητα στο ερευνητικό πεδίο υπογραμμίζει την ανάγκη για εξειδικευμένες μελέτες που θα διερευνήσουν τον δυνητικό ρόλο των Clostridium στη βιομηχανία και θα συμβάλλουν στην βελτίωση της ποιότητας και ασφάλειας των προϊόντων.

#### 2.4.3.13 *Next generation Probiotics*

Παρότι τα προβιοτικά έχουν μελετηθεί εκτενώς τα τελευταία χρόνια, οι μελέτες αυτές περιορίζονται κυρίως στα παραδοσιακά προβιοτικά όπως για παράδειγμα τα LAB, των οποίων η δράση σχετίζεται άμεσα με την βελτίωση της υγείας του ανθρώπου. Καθώς όμως τα προβιοτικά στις περισσότερες χώρες δεν θεωρούνται φάρμακα, η χρήση τους διέπεται από ελάχιστους κανονισμούς, με αποτέλεσμα οι καταναλωτές να λαμβάνουν ασαφείς ποσότητες και είδη προβιοτικών, χωρίς ιδιαίτερη αποτελεσματικότητα (Zhang et al., 2022).

Με την επέκταση της μελέτης μικροοργανισμών με προβιοτική δράση, ανακαλύφθηκαν νέα βακτήρια τα οποία βοηθούν σημαντικά στην βελτίωση της υγείας μέσω της ρύθμισης της εντερικής χλωρίδας και χαρακτηρίστηκαν ως προβιοτικά «νέας γενιάς» (NPGs). Τα NPGs ορίζονται ως «ζωντανοί μικροοργανισμοί που προσδιορίζονται με βάση συγκριτικές αναλύσεις μικροβίων και όταν χορηγούνται σε επαρκείς ποσότητες επιφέρουν βελτίωση της υγείας του ξενιστή» (Martín & Langella, 2019), και αναφέρεται πως μπορούν να ξεπεράσουν τις ελλείψεις υπάρχοντων προβιοτικών και να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στην αντιμετώπιση ασθενειών στο μέλλον (H. Zhang et al., 2022).



Σχήμα 5: Ομαδοποίηση προβιοτικών και εμπορική χρήση κάθε είδους (Gao et al., 2021).

Τα προβιοτικά είναι γνωστά για τα οφέλη τους στην υγεία, όπως αντιμικροβιακή δράση, πρόληψη γαστρεντερικών λοιμώξεων, βελτίωση του μεταβολισμού της λακτόζης, αντιμεταλλαξιόγones και αντικαρκινικές ιδιότητες, μείωση της χοληστερόλης ορού, αντιδιαρροϊκές ιδιότητες, τόνωση του ανοσοποιητικού συστήματος και βελτίωση φλεγμονωδών εντερικών νόσων (Shah, 2007).

Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι τα οφέλη για την υγεία είναι συγκεκριμένα για το εκάστοτε στέλεχος, επομένως το καθένα από αυτά, ή συνδυασμός τους, έχει διαφορετική αποτελεσματικότητα έναντι κάθε ασθένειας. Ωστόσο ένα κοινό όφελος μεταξύ των περισσότερων προβιοτικών είναι οι αντιδιαρροϊκές τους ιδιότητες οι οποίες συνδέονται με τον ανταγωνιστικό αποκλεισμό παθογόνων μικροοργανισμών (Figueroa-González et al., 2011).

Κάποια επιθυμητά χαρακτηριστικά των προβιοτικών προκειμένου να θεωρηθούν αποτελεσματικά είναι τα εξής:

- Να ασκούν ευεργετική δράση όταν καταναλώνονται
- Να μην είναι παθογόνα και τοξικά
- Να περιέχουν μεγάλο αριθμό βιώσιμων κυττάρων

- Να έχουν την ικανότητα επιβίωσης και μεταβολισμού στο έντερο
- Να διατηρούν την βιωσιμότητα τους κατά την αποθήκευση και την χρήση
- Εφόσον βρίσκονται ενσωματωμένα σε κάποιο τρόφιμο, να έχουν ευχάριστα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (Guarner, 1998).

#### 2.4.4 Πρεβιοτικά

Η έννοια των πρεβιοτικών θεσπίστηκε για πρώτη φορά το 1995 στην Ασία ως «δύσπεπτο βρώσιμο συστατικό το οποίο επηρεάζει τον ξενιστή δίνοντας ερέθισμα επιλεκτικά για την ανάπτυξη ή/και την δραστηριότητα ενός ή μιας ομάδας βακτηρίων που υπάρχουν ήδη στο παχύ έντερο» από τους Glenn Gibson και Marcel Roberfroid, ωστόσο σύμφωνα με αυτόν τον ορισμό τα στελέχη που μπορούν να χαρακτηριστούν ως πρεβιοτικά περιορίζεται σημαντικά σε συγκεκριμένους υδατάνθρακες. Επιπλέον, παρατηρούμε πως η προσέγγιση αυτή υποστηρίζει την διαχείριση μη βιώσιμων οντοτήτων (Gibson et al., 2010). Το 2008 ορίστηκαν τα διατροφικά πρεβιοτικά από την διεθνή επιστημονική ένωση προβιοτικών και πρεβιοτικών (ISAPP) ως «επιλεκτικά ζυμωμένο συστατικό που οδηγεί σε συγκεκριμένες αλλαγές στην σύνθεση ή/και στην δραστηριότητα του γαστρεντερικού μικροβιώματος, κι έτσι επιφέρει θετική επίδραση στην υγεία του ξενιστή».

Τα πρεβιοτικά απαντώνται φυσικά σε κάποια τρόφιμα, όπως το πράσο, τα σπαράγγια, το σκόρδο, το κρεμμύδι, το σιτάρι κ.α., ωστόσο το ποσοστό πρόσληψης πρεβιοτικών από τις προαναφερθείσες τροφές είναι μικρό. Επομένως, προκειμένου να επιτευχθεί πρόσληψη επαρκής ώστε να επιφέρει θετικά αποτελέσματα στην υγεία απαιτείται ο εμπλουτισμός τροφίμων με πρεβιοτικά. Έτσι, τα πρεβιοτικά αποτελούν μια υποκατηγορία λειτουργικών συστατικών τροφίμων που μπορούν να προστεθούν σε αρκετά τρόφιμα (Gibson et al., 2010).

Ένα στέλεχος μπορεί να ενταχθεί στην κατηγορία των πρεβιοτικών εφόσον πληροί τα εξής κριτήρια: i) Να είναι ανθεκτικό στο όξινο pH του στομάχου, να μην υδρολύεται από τα ένζυμα των θηλαστικών και να μην απορροφάται στην γαστρεντερική οδό ii) Να είναι ικανό να ζυμωθεί από την εντερική μικροχλωρίδα iii) Η ανάπτυξη ή/και η δραστηριότητα των εντερικών βακτηρίων να μπορεί να διεγερθεί από το συγκεκριμένο στέλεχος και όλη η διαδικασία να φέρει πλεονεκτήματα για την υγεία του ξενιστή (Gibson et al., 2010) Davani-Davari et al., 2019).

### 2.4.5 Χαρακτηριστικά/Κατηγορίες πρεβιοτικών.

Αν και υπάρχουν αρκετά είδη πρεβιοτικών, τα περισσότερα από αυτά περιλαμβάνονται σε ομάδες υδατανθράκων και πιο συγκεκριμένα στους ολιγοσακχαρίτες.

#### 2.4.5.1 Φρουκτάνες

Μια από τις μεγαλύτερες κατηγορίες ολιγοσακχαριτών είναι οι φρουκτάνες, οι οποίες περιλαμβάνουν την ινουλίνη και τους φρουκτο-ολιγοσακχαρίτες (FCOs). Αποτελούνται από γραμμική ανθρακική αλυσίδα συνδεδεμένη με φρουκτόζη με δεσμό β(2->1), ενώ το μήκος της αλυσίδας αυτής είναι το βασικό κριτήριο που καθορίζει ποια βακτήρια μπορούν να τις ζυμώσουν (Davani-Davari et al., 2019).

#### 2.4.5.2 Γαλακτο- ολιγοσακχαρίτες

Οι γαλακτο- ολιγοσακχαρίτες (GOS) παράγονται από την επέκταση της λακτόζης και διακρίνονται σε δύο υποκατηγορίες: αυτούς που έχουν περίσσεια γαλακτόζη στη θέση C3, C4 ή C6 , και αυτούς που παράγονται από λακτόζη μέσω της ενζυματικής δια-γλυκοζυλίωσης. Μπορούν να διεγείρουν τα Lactobacilli και Bifidobacteria, και σε μικρότερο βαθμό τα Enterobacteria, Bacteroidetes, και Firmicutes (Davani-Davari, 2019).

#### 2.4.5.3 Ολιγοσακχαρίτες αμύλου και γλυκόζης

Υπάρχει ένα είδος αμύλου που είναι ανθεκτικό στην πέψη του ανώτερου εντέρου γνωστό ως ανθεκτικό άμυλο (RS). Το RS μπορεί να προάγει την υγεία με την υψηλή παραγωγή βουτυρικού , κι έτσι έχει χαρακτηριστεί πρεβιοτικό (Fuentes-Zaragoza et al., 2011). Η αποικοδόμησή του γίνεται κυρίως από διάφορες ομάδες Firmicutes, από το Ruminococcus bromii, και το Bifidobacterium adolescentis, ενώ έχει βρεθεί πως σε μικτές επωάσεις βακτηρίων και κοπράνων η αποικοδόμησή του είναι αδύνατη απουσία του R. Bromii (Ze et al., 2012).

Αντίστοιχα η πολυδεξτρόζη είναι ολιγοσακχαρίτης που προέρχεται από την γλυκόζη και αποτελείται από γλυκάνη με πολλές διακλαδώσεις και γλυκοζιτικούς δεσμούς. Υπάρχουν κάποιες ενδείξεις πως μπορεί να διεγείρει Bifidobacteria ωστόσο δεν υπάρχει ακόμα επίσημη επιβεβαίωση (Costabile et al., 2011).

#### 2.4.5.4 Μη-υδατανθρακικοί ολιγοσακχαρίτες

Υπάρχουν ακόμα αρκετές ενώσεις που δεν κατατάσσονται στη κατηγορία των υδατανθράκων, ωστόσο πληρούν τα κριτήρια για να χαρακτηριστούν πρεβιοτικά, όπως για παράδειγμα οι φλαβανόλες που προέρχονται από το κακάο. Όπως έχει φανεί σε πειράματα *in vivo* και *in vitro* οι φλαβανόλες μπορούν να διεγείρουν οξυγαλακτικά βακτήρια (Tzounis et al., 2011) Davani-Davari et al., 2019).

#### 2.4.6 Συμβιωτική σχέση μεταξύ προβιοτικών και πρεβιοτικών

Όταν ο Gibson εισήγαγε την έννοια των πρεβιοτικών, εικάστηκε τα πρόσθετα οφέλη που θα λαμβάναμε με τον συνδυασμό προβιοτικών και πρεβιοτικών προς τον σχηματισμό αυτού που όρισε ως συμβιωτικό. Ένα συμβιωτικό προϊόν επηρεάζει θετικά τον ξενιστή του συμβάλλοντας στην επιβίωση των ζωντανών μικροβιακών συμπληρωμάτων διατροφής στον γαστρεντερικό σωλήνα, διεγείροντας επιλεκτικά την ανάπτυξή τους ή/και ενεργοποιώντας τον μεταβολισμό ενός ή περισσότερων ωφέλιμων βακτηρίων για την υγεία. Ο όρος συμβιωτικά παραπέμπει σε συνέργεια, επομένως χρησιμοποιείται για προϊόντα στα οποία η πρεβιοτική ένωση ευνοεί επιλεκτικά τους προβιοτικούς μικροοργανισμούς, καθώς και ο βασικός στόχος τους είναι να το να ξεπεραστούν πιθανές δυσκολίες επιβίωσης για τα προβιοτικά (Pandey et al., 2015).

Τα συνηθέστερα στελέχη προβιοτικών που χρησιμοποιούνται στα συμβιωτικά είναι οι *Lacbobacilli*, *Bifidobacteria spp*, *S. boulardii*, *B. coagulans* κ.α., ενώ τα κυριότερα πρεβιοτικά περιλαμβάνουν ολιγοσακχαρίτες όπως οι φρουτο-ολιγοσακχαρίτες, οι γαλακτο-ολιγοσακχαρίτες, οι ξυλο-ολιγοσακχαρίτες, η ινουλίνη, και τα πρεβιοτικά από φυσικές πηγές όπως οι ρίζες κικωρίου και γασόν (Pandey et al., 2015).

Τα προβιοτικά είναι ενεργά στο λεπτό και το παχύ έντερο, ενώ η επίδραση των πρεβιοτικών παρατηρείται κυρίως στο τελευταίο. Τα πρεβιοτικά χρησιμοποιούνται κυρίως ως μέσο για την ανάπτυξη των προβιοτικών, την ζύμωση, και την εντερική διέλευση καθώς οδηγούν στην μείωση της ευαισθησίας των προβιοτικών στις συνθήκες που επικρατούν στην γαστρεντερική οδό όπως η οξείδωση, το pH, και η θερμοκρασία (Sekhon & Jairath, 2010). Ο συνδυασμός αυτός οδηγεί στην δημιουργία των συμβιωτικών, τα οποία έχουν δύο τύπους μηχανισμού δράσης. Ο πρώτος είναι η βελτιωμένη βιωσιμότητα των προβιοτικών, ενώ ο δεύτερος είναι η παροχή συγκεκριμένων πλεονεκτημάτων στην υγεία. Η διέγερση των προβιοτικών με τα πρεβιοτικά οδηγεί στην

τροποποίηση της μεταβολικής δραστηριότητας του εντέρου, μέσω της ανάπτυξης ωφέλιμων μικροοργανισμών και της αναστολής δυνητικά παθογόνων. Η χρήση των συμβιοτικών συμβάλλει ακόμα στην μείωση της συγκέντρωσης ανεπιθύμητων μεταβολιτών, και στην αδρανοποίηση καρκινογόνων ουσιών και νιτροζαμινών, ενώ παράλληλα αυξάνει τα επίπεδα λιπαρών οξέων μικρού μήκους, κετονών, δισουλφιδίων άνθρακα και οξικού μεθυλίου (Markowiak & Ślizewska, 2017).

Κάποια πλεονεκτήματα που προσφέρει η κατανάλωση συμβιωτικών περιλαμβάνουν: αυξημένα επίπεδα *Lactobacillus* και *Bifidobacterium* και ισορροπημένη εντερική μικροχλωρίδα, βελτίωση της λειτουργίας του ήπατος σε κίρρωτικούς ασθενείς, βελτίωση της ανοσοτροποποιητικής ικανότητας, πρόληψη βακτηριακής μετατόπισης κ.α. (M. Zhang et al., 2010). Συγκεκριμένα, η δράση τους υπέρ του ανοσοποιητικού συστήματος φαίνεται να είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική. Για παράδειγμα, ο συνδυασμός του *B. coagulans* με ινουλίνη και η ενσωμάτωση του συμβιωτικού στην διατροφή για 6 εβδομάδες οδήγησε σε σημαντική μείωση των επιπέδων της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP) και σε αύξηση των επιπέδων γλουταθειόνης (Panda et al., 2006). Επιπρόσθετα, αποδεικνύεται πως τα συμβιωτικά είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικά στην πρόληψη της οστεοπόρωσης, στην μείωση των επιπέδων λίπους και σακχάρων στο αίμα, και στην θεραπεία εγκεφαλικών διαταραχών που σχετίζονται με μη φυσιολογική ηπατική λειτουργία (Pandey et al., 2015).

## 2.5 Οφέλη των προβιοτικών για την υγεία

### 2.5.1 Εισαγωγή

Η συσχέτιση των προβιοτικών με την ευεξία χρονολογείται αρκετά χρόνια πίσω. Οι πρώτες παρατηρήσεις έγιναν από τον Tissier στις αρχές του 20ου αιώνα, ο οποίος αντιλήφθηκε ότι η εντερική χλωρίδα βρεφών που τρέφονται με μητρικό γάλα και είναι υγιή κυριαρχείται από βακτήρια του γένους *Bifidobacterium*, σε αντίθεση με βρέφη που τρέφονται με γάλα σε σκόνη, όπου το *Bifidobacterium* απουσιάζει πλήρως, και υποφέρουν από γαστρεντερικά προβλήματα όπως διάρροια. Έτσι, έγινε η σύνδεση της δράσης του *Bifidobacterium* με οφέλη για την υγεία του γαστρεντερικού συστήματος. Έκτοτε έχουν γίνει αρκετές μελέτες οι οποίες με την πάροδο του χρόνου παρέχουν όλο και περισσότερες αποδείξεις ότι τα προβιοτικά βακτήρια έχουν πλεονεκτήματα για την ανθρώπινη υγεία. Τα



προβιοτικά όπως αναφέρεται και παραπάνω, ορίζονται ως ζωντανοί μικροοργανισμοί, οι οποίοι εφόσον χορηγηθούν σε επαρκείς ποσότητες επιφέρουν πλεονεκτήματα στην υγεία του ξενιστή (FAO/WHO, 2001).

### 2.5.2 Τύποι προβιοτικών μικροοργανισμών

Λαμβάνοντας υπόψιν τον ορισμό των προβιοτικών, υπάρχουν πολλά είδη μικροοργανισμών που διαθέτουν αυτές τις ιδιότητες και μπορούν να χαρακτηριστούν προβιοτικά, ωστόσο η πλειοψηφία αποτελείται από βακτήρια, με τα γένη *Lactobacillus* και *Bifidobacterium* να είναι αυτά που χρησιμοποιούνται συχνότερα (Goldin, 1998). Κάποια αντιπροσωπευτικά στελέχη είναι τα *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. plantarum*, *B. lactis*, *B. longum*, και *B. bifidum*. Δύο άλλα είδη που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην βιομηχανία τροφίμων και ανήκουν, όπως και τα *Lactobacillus* και *Bifidobacterium*, στα οξυγαλακτικά βακτήρια είναι τα *Streptococcus thermophilus* και *Lactococcus lactis* (Kailasapathy & Chin, 2000).

Τα προβιοτικά διαθέτουν αρκετούς διαφορετικούς μηχανισμούς δράσης. Αυτοί μπορεί να κυμαίνονται από παραγωγή βακτηριοσίνης και λιπαρών οξέων μικρού μοριακού βάρους, μείωση του pH του εντέρου, διέγερση λειτουργίας του βλεννογόνου φράγματος, έως και ανοσοτροποποίηση (Kailasapathy & Chin, 2000). Έτσι και τα οφέλη για την υγεία εξαρτώνται από το εκάστοτε στέλεχος, και επηρεάζονται από τους διάφορους μηχανισμούς.

### 2.5.3 Πλεονεκτήματα στην υγεία του εντέρου και στην λειτουργία του πεπτικού συστήματος

Μεγάλος αριθμός ασθενειών και εντερικών διαταραχών σχετίζεται με την ισορροπία της μικροχλωρίδας του γαστρεντερικού συστήματος. Οι πρώτες μελέτες όσον αφορά τα πλεονεκτήματα στην υγεία που επιφέρουν τα προβιοτικά σχετίζονταν με την επίδραση που έχουν στην υγεία του εντέρου, όπως τα ευρήματα του Henry Tissier που αποτέλεσαν σημαντική ανακάλυψη για την εξέλιξη των ερευνών.

Το έντερο του ανθρώπου μπορεί να χαρακτηριστεί ως ένα πολύπλοκο οικοσύστημα στο οποίο τα θρεπτικά συστατικά, η μικροχλωρίδα, και τα κύτταρα ξενιστές αλληλεπιδρούν διαρκώς. Σύμφωνα με αρκετές μελέτες, η σύσταση της φυσικής



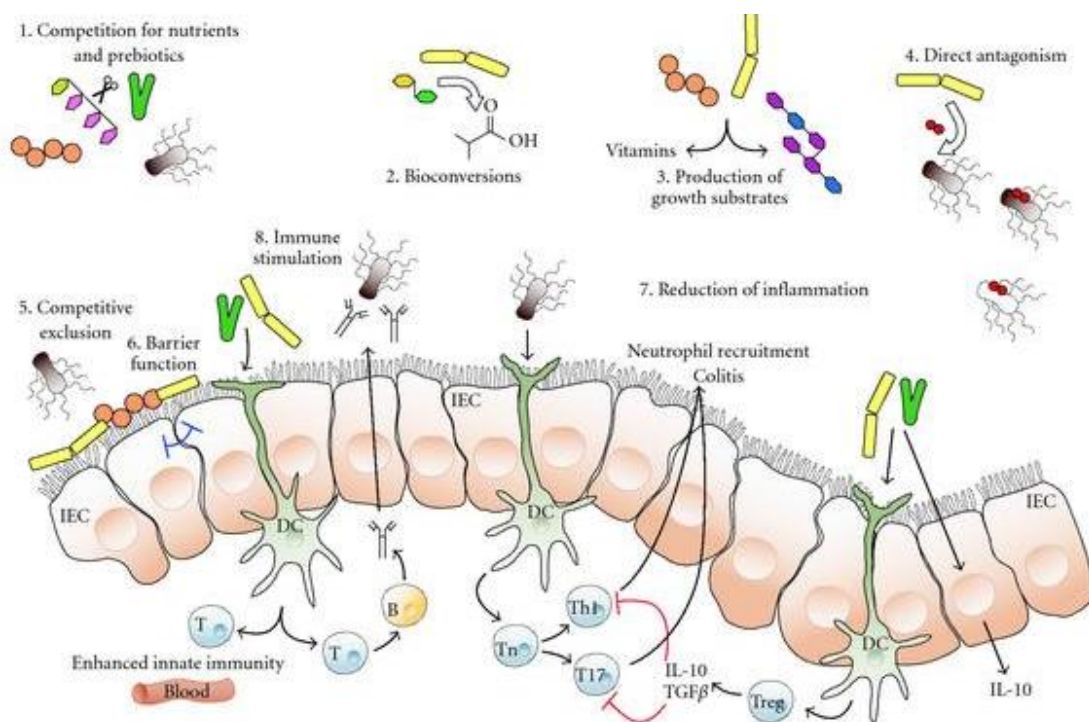
μικροχλωρίδας έχει την δυνατότητα να επιφέρει σημαντικά πλεονεκτήματα στην υγεία του ξενιστή. Έτσι, η εξάρτηση της υγείας από την μικροχλωρίδα του εντέρου έχει στρέψει το ενδιαφέρον στην ρύθμιση της σύστασής του, που μπορεί να επιτευχθεί με την χορήγηση προβιοτικών.

Η σύσταση της μικροχλωρίδας του εντέρου περιλαμβάνει βακτήρια, μύκητες, αρχαία, πρωτόζωα και ιούς όπου το καθένα αλληλεπιδρά με τον ξενιστή και επηρεάζει την υγεία του. Τα βακτήρια διαδραματίζουν τον σημαντικότερο ρόλο, καθώς συμβάλλουν στην παραγωγή βιταμίνης Β, βοηθούν την διαδικασία της πέψης, και προάγουν την αγγειοσύνθεση και την λειτουργία των νεύρων. Τα συνηθέστερα βακτήρια που εντοπίζονται στο έντερο περιλαμβάνουν κυρίως τρία φύλα: τα Bacteroidetes (*Porphyromonas*, *Prevotella*), τα Firmicutes (*Ruminococcus*, *Clostridium*, και *Eubacteria*), και τα Actinobacteria (*Bifidobacterium*), ενώ οι λακτοβάκιλλοι, οι στρεπτόκοκκοι και η *E.coli* βρίσκονται σε μικρότερους πληθυσμούς (Azad et al., 2018).

Οι διαταραχές στην σύσταση των μικροβιακών κοινοτήτων, γνωστές και ως δυσβίωση, μπορεί να οδηγήσουν σε διαταραγμένες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μικροβίων και του ξενιστή τους. Αυτές οι αλλαγές στην σύσταση του μικροβιώματος μπορεί να καταστήσουν τον ξενιστή πιο ευάλωτο σε ασθένειες. Σύμφωνα με μελέτες, η γαστρεντερική δυσβίωση σχετίζεται άμεσα με χαμηλού βαθμού χρόνιες φλεγμονές και μεταβολικές διαταραχές, οδηγώντας έτσι σε παχυσαρκία, διαβήτη, και μεταβολικό σύνδρομο (Hemarajata & Versalovic, 2013). Τα προβιοτικά μπορεί επίσης να επηρεάσουν την σύνθεση και την λειτουργία των μικροβιακών κοινοτήτων, μέσω ανταγωνισμού για θρεπτικά συστατικά, παραγωγής υποστρωμάτων ανάπτυξης ή αναστολέων και ρύθμισης της γαστρεντερικής ανοσίας (O'Toole & Cooney, 2008).

Τα προβιοτικά έχουν αρκετούς μηχανισμούς δράσης εντός του εντέρου. Αρχικά, ανταγωνίζονται με άλλους μικροοργανισμούς, συμπεριλαμβανομένων των παθογόνων για την πρόσβαση σε θρεπτικά συστατικά, έχουν την δυνατότητα μετατροπής ουσιών σε ενώσεις με ανασταλτικές ιδιότητες, παράγουν θρεπτικά συστατικά που λειτουργούν ως υπόστρωμα για άλλα -επιθυμητά- βακτήρια, ανταγωνίζονται άμεσα τους παθογόνους μικροοργανισμούς μέσω της παραγωγής βακτηριοσίνων, δεσμεύουν θέσεις πρόσδεσης αποκλείοντας έτσι ανεπιθύμητους μικροοργανισμούς, ενισχύουν την λειτουργία του εντερικού φραγμού, μειώνουν τις φλεγμονές και προάγουν την παραγωγή αντιμικροβιακών παραγόντων, ενισχύοντας έτσι την ανοσολογική απόκριση (O'Toole &

Cooney, 2008).



Εικόνα 1: Σχηματικό διάγραμμα που απεικονίζει πιθανούς ή γνωστούς μηχανισμούς με τους οποίους τα προβιοτικά βακτήρια μπορούν να επηρεάσουν τη μικροβιακή χλωρίδα (Ο' Toole & Cooney, 2008).

Η μολυσματική διάρροια είναι η διάρροια που προκαλείται λόγω επιμόλυνσης του εντέρου από μικροοργανισμούς. Υπολογίζεται ότι συμβαίνουν 2-4 δισεκατομμύρια επεισόδια μολυσματικής διάρροιας κάθε χρόνο, με τα βρέφη να ανήκουν στην πιο ευπαθή ομάδα (Hodges & Gill, 2010). Οξεία διάρροια επίσης επηρεάζει πολύ συχνά τους ταξιδιώτες, στους οποίους η συνηθέστερη αιτία είναι η εντεροτοξική E.coli. Άλλα συνηθισμένα παθογόνα βακτήρια που προκαλούν διάρροια ανήκουν στα γένη Salmonella, Campylobacter, και Shigella. Καθώς τα προβιοτικά έχουν ανταγωνιστική δράση έναντι αυτών των μικροοργανισμών, και αυξάνουν την ανοσολογική απόκριση, η χορήγησή τους αποτελεί πλέον ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο για την πρόληψη και την αντιμετώπιση της μολυσματικής διάρροιας (Sánchez et al., 2016). Σε κλινικές δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν σε ασθενείς με μολυσματική διάρροια, ενήλικες και παιδιά μικρής ηλικίας, φάνηκε πως τα προβιοτικά μείωσαν την συνολική διάρκεια της διάρροιας, και την συχνότητα των κοπράνων (Allen et al., 2010).

Η διάρροια που σχετίζεται με αντιβιοτικά (AAD) είναι μία συχνή παρενέργεια της χρήσης αντιβιοτικών, που επηρεάζει το 30% των ασθενών που λαμβάνουν αντιβιοτικά.

Υπάρχουν αρκετοί τρόποι μέσω των οποίων μπορεί να προκληθεί AAD, όπως η θανάτωση οφέλιμων μικροβίων και η τροποποίηση των μεταβολικών διαδικασιών, ενώ υπάρχουν συγκεκριμένα αντιβιοτικά που προκαλούν AAD με αυξημένες επιπτώσεις, όπως η αμοξυκιλλίνη/ κλαβουναλικό οξύ, η αμπικιλίνη, οι κεφαλοσπορίνες και η κλινδαμυκίνη. Σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη AAD διαδραματίζει επίσης και η ευαισθησία του κάθε ασθενή (Milner et al., 2021). Τα προβιοτικά πολύ συχνά χορηγούνται ως ένα αποτελεσματικό και ασφαλές μέσο καταπολέμησης των παραπάνω συμπτωμάτων. Η μόλυνση από *C. difficile* μπορεί να επέλθει μετά από την απώλεια της εντερικής χλωρίδας που σχετίζεται με τα αντιβιοτικά, αυξάνοντας σημαντικά τη διαρροϊκή νόσο, και αποτελεί την κυριότερη αιτία εμφάνισης AAD. Μία μετά-ανάλυση 25 τυχαίων ελεγχόμενων δοκιμών έδειξε ότι τα προβιοτικά μείωσαν τον σχετικό κίνδυνο AAD, και η ανάλυση 6 τυχαίων δοκιμών οδήγησε σε σημαντική στατιστική μείωση του *C. difficile* (McFarland, 2006). Τα προβιοτικά που ταυτοποιήθηκαν ως αποτελεσματικά για τη θεραπεία της AAD ήταν τα *L. rhamnosus* GG και *S. Boulardii*, με το *S. Boulardii* να είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικό και στην μείωση της μόλυνσης από *C. difficile* (Milner et al., 2021). Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε για την αποτελεσματικότητα ενός μίγματος με προβιοτικά που αποτελείται από *L. acidophilus*, *Lactobacillus casei*, και *L. rhamnosus*, βρέθηκε πως αυτό μείωσε την παραγωγή του ανθεκτικού στην μεθικιλίνη *S. aureus* κατά 99%, επιβεβαιώνοντας έτσι την δυνατότητα αναστολής ανάπτυξης ανεπιθύμητων μικροοργανισμών. Επιπλέον, έδειξε αντικυτταροτοξικά αποτελέσματα σε δοκιμασία εξουδετέρωσης τοξινών (Auclair et al., 2015).

Το σύνδρομο ευερέθιστου εντέρου (IBS) εμφανίζεται σε ένα φάσμα που μπορεί να είναι από ήπιο έως σοβαρό, και περιλαμβάνει συμπτώματα όπως επαναλαμβανόμενη κοιλιακή ενόχληση και πόνο, φούσκωμα, και μεταβολές κοπράνων που ποικίλλουν μεταξύ διάρροιας και δυσκοιλιότητας. Η ακριβής αιτία του IBS παραμένει έως σήμερα αδιευκρίνιστη, ενώ τα συμπτώματα μπορούν να αποδοθούν σε πληθώρα διαφορετικών διαγνώσεων. Οι κλινικές δοκιμές σχετικά με την χορήγηση προβιοτικών σε ασθενείς που πάσχουν από IBS έχουν δείξει ότι επιφέρουν σημαντική μείωση των συμπτωμάτων (Milner et al., 2021). Ένας συνδυασμός προβιοτικών που έχει αποδειχθεί αποτελεσματικός στην καταπολέμηση των συμπτωμάτων του IBS είναι το μίγμα *Lactobacillus acidophilus* CL1285, *L. casei* LBC80R and *L. rhamnosus* CLR2. Ο συνδυασμός αυτός έδειξε βελτίωση στο τελικό σημείο συμπεριλαμβανομένου του κοιλιακού πόνου και των ημερών που διαρκούσε, της

συσσώρευσης αερίων στο στομάχι, και των συνηθειών των κοπράνων (Preston et al., 2018).

Η ιδιοπαθής φλεγμονώδης εντερική νόσος (IBD) είναι μία χρόνια εντερική νόσος που περιλαμβάνει την νόσο του Κρον, και την ελκώδη κολίτιδα (UC). Χαρακτηρίζεται από απορρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος που οδηγεί σε φλεγμονή του γαστρεντερικού συστήματος, ενώ σημαντικό ρόλο στην παθογένεια του IBD διαδραματίζει η σύσταση της εντερικής χλωρίδας. Λαμβάνοντας υπόψιν το γεγονός ότι τα προβιοτικά μπορούν να ρυθμίσουν την σύσταση αυτή και την λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, πολλοί ειδικοί στο πεδίο του IBD τα χρησιμοποιούν για την θεραπεία του. Η μεγαλύτερη απόδειξη για την αποτελεσματικότητα των προβιοτικών σε αυτές τις παθολογίες είναι η χρήση τους για την πρόληψη της φλεγμονής του θυλάκου από τελικό ειλεό (μίγμα VSL#3 που περιέχει *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis* και *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*) (Sánchez et al., 2016).

Καταλαβαίνουμε πως η σύσταση της εντερικής μικροχλωρίδας αποτελεί βασικό παράγοντα για την διατήρηση της υγείας και την αποφυγή ασθενειών και παθήσεων που σχετίζονται με το πεπτικό σύστημα, όπως η μολυσματική διάρροια, η διάρροια που οφείλεται σε αντιβιοτικά, το σύνδρομο ευερέθιστου εντέρου, η φλεγμονώδης εντερική νόσος, κ.α. Τα προβιοτικά διαθέτουν διάφορους μηχανισμούς δράσης που εντός του εντέρου που συμβάλλουν στην διατήρηση της ισορροπίας προάγοντας την ανάπτυξη ωφέλιμων μικροοργανισμών, αναστέλλοντας την ανάπτυξη παθογόνων και ενισχύοντας την ανοσολογική απόκριση και την προστασία του εντέρου. Με αυτόν τον τρόπο δρουν ως μέσο πρόληψης και θεραπείας των γαστρεντερικών παθήσεων, και προσφέρουν πολλαπλά οφέλη στην υγεία του πεπτικού συστήματος.

#### 2.5.4 Υποστήριξη ανοσοποιητικού συστήματος

Όπως είδαμε και παραπάνω, τα προβιοτικά διαθέτουν πολλούς μηχανισμούς δράσης με τους οποίους επιφέρουν πλεονεκτήματα για την υγεία του καταναλωτή. Εκτός από την βελτίωση της υγείας και της λειτουργίας του πεπτικού συστήματος ωστόσο, οι μηχανισμοί αυτοί λειτουργούν και προς όφελος του ανοσοποιητικού συστήματος, μειώνοντας τον

κίνδυνο από μολύνσεις, αλλεργίες, και αυτοάνοσα νοσήματα.

Προκειμένου να αναλύσουμε τα οφέλη των προβιοτικών στο ανοσοποιητικό σύστημα, θα πρέπει να αρχικά να κατανοήσουμε την λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος του εντέρου. Η ανοσία εντός του εντέρου ενισχύεται από φυσικά φράγματα, όπως το επιθήλιο και ο υποκείμενος συνδετικός ιστός που ονομάζεται "lamina propria" και περιέχει τα ανοσοενεργά κύτταρα. Ο εντερο-συσχετιζόμενος λεμφικός ιστός που επίσης παρουσιάζει σημαντικές ανοσολογικές λειτουργίες ονομάζεται GALT (gut-associated lymphoid tissue), και ανήκει στον βλεννο-συσχετιζόμενο λεμφικό ιστό (MALT). Ο ιστός αυτός αποτελεί πηγή T και B κυττάρων, ενώ βρίσκονται σε αυτόν και δενδριτικά κύτταρα (DC) τα οποία αιχμαλωτίζουν επιθηλιακά και M κύτταρα προκειμένου να ενεργοποιήσουν μέσω αναγνώρισης αντιγόνων τα T κύτταρα. Ακόμα, ο GALT περιλαμβάνει τις πλάκες Πέγιερ (λεμφικοί θύλακες που εντοπίζονται σε όλο το εντερικό επιθήλιο και σε εκκριτικές θέσεις εντός του βλεννογόνου) οι οποίες διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ανοσολογικό ρόλο, επιτηρώντας τα εντερικά βακτήρια και προστατεύοντας έτσι την γαστρεντερική οδό από μολύνσεις. Λαμβάνοντας υπόψιν την σύνθεση των ιστών και την ανατομία του εντέρου, μπορούμε να θεωρήσουμε ότι το επιθήλιο λαμβάνει κυρίως εξωτερικά ερεθίσματα, ενώ το GALT μεσολαβεί για προσαρμοστικές ανοσολογικές αποκρίσεις (Mazziotto et al., 2023). Το έντερο θεωρείται το μεγαλύτερο ανοσολογικό όργανο αφού περιέχει περίπου το 70-80% όλων των B κυττάρων που παράγουν ανοσοσφαιρίνες A (IgAs) (Reinholdt, 2003). Τα IgAs είναι αντισώματα, ανθεκτικά στην πρωτεόλυση, που συντίθενται τοπικά σε ιστούς-τελεστές και αναστέλλουν την προσκόληση μικροοργανισμών στα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα. Υπάρχουν ωστόσο πρόσφατες έρευνες που υποδεικνύουν πως τα IgAs μπορεί να εμφανιστούν ως φλεγμονώδεις παράγοντες, τόσο σε βλεννογόνες όσο και σε μη-βλεννογόνες περιοχές (Hansen et al., 2018).

Το μικροβίωμα του λειτουργεί βοηθητικά στην πέψη και στην αφομοίωση θρεπτικών συστατικών και κυτταρικών υπολειμμάτων. Οι μικροοργανισμοί που βρίσκονται σε συμβίωση συμβάλλουν στην διατήρηση της υγείας του ξενιστή, συνθέτοντας απαραίτητα θρεπτικά συστατικά από ενώσεις που δεν μπορεί να επεξεργαστεί το έντερο, και εξασφαλίζουν την ομαλή λειτουργία του. Μία από τις σημαντικότερες δραστηριότητες του μικροβιώματος του εντέρου είναι η διατήρηση υγιούς ανοσοποιητικού συστήματος μέσω ανοσοτροποποιητικών μηχανισμών, όπως η

ενεργοποίηση μακροφάγων μετά την σηματοδότηση προβιοτικών, η διέγερση ουδετερόφιλων και κυττάρων που παράγουν ανοσοσφαιρίνες-A, η διέγερση παραγωγής βλέννας και η αναστολή απελευθέρωσης φλεγμονωδών κυτοκινών (Azad et al., 2018; Cristofori et al., 2018; Mazziotta et al., 2023).

Πολλαπλά οφέλη των προβιοτικών στην εντερική ομοιόσταση έχουν αναφερθεί, όπως μεταξύ άλλων η βελτίωση εγγενών και προσαρμοστικών ανοσολογικών αποκρίσεων και των σχετικών αντιφλεγμονώδων δραστηριοτήτων και η ενίσχυση της βιοδιαθεσιμότητας συγκεκριμένων θρεπτικών και μεταβολικών συστατικών. Έτσι λοιπόν, όπως και η φυσική μικροχλωρίδα του εντέρου, επηρεάζουν θετικά τον οργανισμό του ξενιστή βελτιώνοντας την πέψη και την ανοσία (Mazziotta et al., 2023).

Τα προβιοτικά εκκρίνουν έναν τεράστιο αριθμό μορίων στο εντερικό περιβάλλον, τα οποία δρουν ως τελεστές στην αλληλεπίδραση μεταξύ της μικροχλωρίδας, των επιθηλιακών κυττάρων, και του ανοσοποιητικού. Τα μόρια αυτά είναι κυρίως πρωτεΐνες διαφόρων φύσεων που είτε εντοπίζονται στις μικροβιακές επιφάνειες, είτε εκκρίνονται στον εξωκυτταρικό χώρο, πεπτίδια και αμινοξέα μικρού μοριακού βάρους, βακτηριακό DNA, και βλαστοκύτταρα (Turroni et al., 2013); Macpherson & Harris, 2004). Όπως και τα θραύσματα από την επιφάνεια βακτηριακών κυττάρων, τα προβιοτικά αντιγόνα μπορούν να διασχίσουν το φράγμα του εντέρου και να διεγείρουν το ανοσοποιητικό σύστημα.

Καταλαβαίνουμε πως η ανοσοτροποποιητική δραστηριότητα είναι μία από τις πιο σημαντικές λειτουργίες των προβιοτικών, και μπορεί να αποδοθεί σε πολυάριθμους μηχανισμούς. Τα προβιοτικά βακτήρια διαθέτουν την δυνατότητα αλληλεπίδρασης με κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος όπως λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα, μακροφάγους, δενδρικά και επιθηλιακά κύτταρα και μπορούν να βελτιώσουν την ανοσολογική δράση του εντέρου προκαλώντας επέκταση των B κυττάρων, που διεγείρονται προς παραγωγή ανοσοσφαιρινών-A, χωρίς όμως να διαταράσσεται ο αριθμός CD4+ T κυττάρων. Μετά την κατάποση προβιοτικών βακτηρίων όπως οι *Lactobacillus casei* CRL 431 and *Lactobacillus helveticus* R389, παρατηρήθηκε αύξηση στα επίπεδα της αντιφλεγμονώδους κυτοκίνης IL-6, της οποίας η έκκριση εξαρτάται από τον υποδοχέα TLR2. Έτσι, προκαλείται αύξηση των κυττάρων που παράγουν κυτταρική ανοσοσφαιρίνη-A με τον αριθμό των CD4+ T κυττάρων να παραμένει σταθερός. Αυτά τα στοιχεία επιβεβαιώνουν ότι οι γαλακτοβάκιλλοι μπορούν να προκαλέσουν κλωνική επέκταση των B κυττάρων προκειμένου να απελευθερώσουν IgAs (Vinderola et al., 2005;

Mazziotta et al., 2023). Ακόμα, τα προβιοτικά έχουν την δυνατότητα να αποτρέψουν την προσκόλληση και τον πολλαπλασιασμό επιβλαβών παθογόνων στο στρώμα του βλεννογόνου, και να διεγείρουν τον αποικισμό της κοινής ευεργετικής μικροχώρας. Επομένως, τα προβιοτικά μπορούν να επηρεάσουν ευεργετικά τις ανοσολογικές λειτουργίες μεταβάλλοντας την δραστηριότητα ή/και την σύνθεση των κυττάρων του εντερικού ανοσοποιητικού συστήματος και της μικροβιακής κοινότητας (Mazziotta et al., 2023).

Οι διατροφικές αλλεργίες περιγράφονται ως η ενεργοποίηση ιστιοκυττάρων ή βασεόφιλων και η παραγωγή IgE ως απόκριση σε συγκεκριμένες πρωτεΐνες τροφίμων. Από αυτές υποφέρουν περίπου το 1-2% των ενηλίκων και το 5-7% των παιδιών, με την συχνότητα των περιστατικών να αυξάνεται ριζικά εντός των τελευταίων 20 ετών (Burks et al., 2012). Ενώ τα συμπτώματα των αλλεργιών είναι εύκολα διαχειρίσιμα με φαρμακευτικές αγωγές, δεν υπάρχει κάποια θεραπεία εκτός από την αποφυγή των αλλεργιογόνων τροφών. Φαίνεται ωστόσο πως η έκθεση σε βακτήρια όπως προβιοτικά από νεαρή ηλικία ενεργοποιεί τα APCs (antigen-presenting cells) και οδηγεί σε ανοσολογική ομοίωση και επακόλουθη μείωση των αλλεργιών. Ακόμα, τα προβιοτικά έχουν την ικανότητα να ρυθμίζουν τις ανοσολογικές αποκρίσεις προς τους φαινοτύπους Th1/Th2 και Treg, κάτι που είναι απαραίτητο για την διαχείριση και την πρόληψη παθολογιών που προκαλούνται από το ανοσοποιητικό σύστημα, συμπεριλαμβανομένων των αλλεργιών (Barberi et al., 2015). Σύμφωνα με έρευνες, η χορήγηση *B. longum* και *L. acidophilus* σε ανθρώπους μέσω σκόνης, κάψουλας, ή ακόμα και σε τυνταλισμένη μορφή μπορεί να ανακουφίσει από τα συμπτώματα της αλλεργικής ρινίτιδας και του άσθματος σε σύγκριση με το εικονικό φάρμακο (Vliagoftis et al., 2008). Σε παιδιά με αλλεργίες και επανεμφανιζόμενες μολύνσεις του αναπνευστικού συστήματος, φάνηκε πως το προβιοτικό *B. clausii* ρύθμιζε το προφίλ κυτοκινών και διέγειρε κύτταρα Treg, ενώ παράλληλα αυξήθηκαν τα επίπεδα IL-10 και TGF- $\beta$  (Ciprandi et al., 2005). Όλα αυτά υποδηλώνουν τη χρήση προβιοτικών ως μία νέα προσέγγιση σε αλλεργικές παθήσεις λόγω της μεγάλης τους ισχύος στην πόλωση κυττάρων T προς Treg στο έντερο (Dargahi et al., 2019).

Η επιρροή που ασκεί η εντερική μικροχλωρίδα στην λειτουργία του εντερικού ανοσοποιητικού συστήματος φαίνεται πως μπορεί να έχει επίδραση και στην εμφάνιση ή στην προφύλαξη από αρκετά αυτοάνοσα νοσήματα. Καθώς τα προβιοτικά επηρεάζουν την

σύσταση της μικροχλωρίδας αλλά και την ανοσολογική απόκριση, αρκετές μελέτες συνιστούν ευεργετική δράση των προβιοτικών έναντι των αυτοάνοσων νοσημάτων, οι οποίες ωστόσο πρέπει να επισημάνουμε ότι περιορίζονται κυρίως σε ζωικά μοντέλα, και όχι τόσο σε ανθρώπους. Για παράδειγμα, η χορήγηση ασθενών που πάσχουν από ρευματοειδή αρθρίτιδα με κάψουλες που περιέχουν *L. casei* βελτίωσε την κατάσταση της νόσου σε σχέση με αυτούς που έλαβαν εικονικό φάρμακο. Παρόμοια ήταν τα αποτελέσματα και σε ασθενείς που έλαβαν συνδυασμό προβιοτικών *L. acidophilus*, *L. casei* και *B. bifidum* (Vaghef-Mehrabany et al., 2014; Zamani et al., 2016). Ο διαβήτης τύπου 1 ή αλλιώς ινσουλινοεξαρτώμενος είναι μία αυτόανοση πάθηση που χαρακτηρίζεται από καταστροφή των παγκρεατικών β κυττάρων, τα οποία είναι υπεύθυνα για την παραγωγή ινσουλίνης. Σε διάφορες μελέτες που αναλύθηκαν δείγματα περιττωμάτων από ασθενείς που πάσχουν από διαβήτη τύπου 1 βρέθηκαν μειωμένοι πληθυσμοί βακτηρίων *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* και *Staphylococcus*, γεγονός που σχετίζεται με την γέννηση και εξέλιξη φλεγμονωδών διαταραχών. Έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε παιδιά με ινσουλινοεξαρτώμενο διαβήτη ηλικίας 4 έως 10 ετών ανέδειξε τις δυνατότητες χορήγησης προβιοτικών στην μείωση στην συχνότητα εμφάνισης αυτοανοσίας. Από τα 7473 παιδιά που έλαβαν μέρος στην έρευνα και έλαβαν προβιοτικά μέσω συμπληρωμάτων ή βρεφικού γάλακτος, τα 601 ανέπτυξαν αντισώματα νησιδίων (Uusitalo et al., 2016).

### 2.5.5 Ψυχική υγεία και άξονας εγκεφάλου-εντέρου

Ο άξονας εγκεφάλου-εντέρου (gut-brain axis) είναι ένας όρος που περιγράφει την πολύπλοκη αμφίδρομη επικοινωνία μεταξύ του κεντρικού νευρικού συστήματος και της γαστρεντερικής οδού, και είναι ζωτικής σημασίας για την διατήρηση της ομοιόστασης. Ο άξονας εγκεφάλου-εντέρου λαμβάνει μέρος σε πληθώρα φυσιολογικών διαδικασιών όπως ο κορεσμός, η πρόσληψη τροφής, η ρύθμιση του μεταβολισμού της γλυκόζης και του λίπους, η έκκριση και η ευαισθησία ινσουλίνης, ο μεταβολισμός των οστών, ακόμα και η διάρκεια ζωής. Συναισθηματικοί ή σωματικοί στρεσογόνοι παράγοντες μπορεί να προκαλέσουν διαταραχές σε όλα τα επίπεδα του άξονα εγκεφάλου-εντέρου, συμπεριλαμβανομένου του κεντρικού, αυτόνομου, και εντερικού νευρικού συστήματος και να επηρεάσουν την ρύθμιση της σπλαχνικής αντίληψης και της συναισθηματικής



απόκρισης σε σπλαχνικά συμβάντα. Υπάρχουν αδιάρρηκτες αποδείξεις πως η έκθεση σε στρες και η έκκριση κατεχολαμινών στην γαστρεντερική οδό μπορεί να ευθύνονται για την απορρύθμιση του άξονα και να οδηγήσουν σε διάφορες παθήσεις του εντέρου (Kumar et al., 2020).

Το μικροβίωμα του εντέρου αποτελεί σημαντικό παράγοντα της συνολικής υγείας του ανθρώπου, αλλά και συγκεκριμένα της λειτουργία του άξονα εγκεφάλου-εντέρου, έχοντας σημαντική επίδραση στην συμπεριφορά και την χημεία του εγκεφάλου. Άγχος και κατάθλιψη για παράδειγμα εμφανίζονται πολύ συχνά σε ασθενείς με χρόνιες γαστρεντερικές διαταραχές. Καθώς ερευνάται η συμβολή της εντερικής μικροχλωρίδας στην διατήρηση της φυσιολογικής λειτουργίας του εγκεφάλου, ανέρχεται η δυνατότητα της θεραπευτικής στόχευσης του μικροβιώματος ως μία βιώσιμη στρατηγική θεραπείας των διαταραχών του ΚΝΣ. Το προβιοτικό *Bifidobacterium longum* φαίνεται πως επαναφέρει την φυσιολογική συμπεριφορά και βιοχημεία του ΚΝΣ σε ποντίκια με ήπια κολίτιδα και παράγει αγχολυτικό αποτέλεσμα σε δύο διαφορετικά μοντέλα συμπεριφοράς που μοιάζουν με άγχος, όπως αξιολογείται από την προτίμηση φωτός/σκοταδιού και από τεστ υποχώρησης λανθάνοντα χρόνου (Berčič et al., 2010), ενώ σε μελέτη όπου χορηγήθηκε μίγμα προβιοτικών *Lactobacillus helveticus* R0052 και *Bifidobacterium longum* R0175 σε υγιείς ανθρώπους παρατηρήθηκαν ευεργετικά ψυχολογικά αποτελέσματα (Messaoudi et al., 2011).

### 2.5.6 Γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα και υγεία του κόλπου

Το κολπικό μικροβιακό περιβάλλον αποτελείται από την φυσική μικροχλωρίδα του κόλπου, την ενδοκρινική ρύθμιση και το επιθηλιακό φράγμα του βλεννογόνου (Saraf et al., 2021). Το κολπικό μικροβίωμα περιλαμβάνει περισσότερα από 50 είδη, ενώ κυριαρχείται από βακτήρια του γένους *Lactobacillus*. Η ισορροπία στην οποία βρίσκεται το κολπικό μικροβίωμα μπορεί να διαταχθεί από διάφορους παράγοντες, όπως οι ορμονικές αλλαγές (ιδίως τα οιστρογόνα), το pH του κόλπου, και η περιεκτικότητα σε γλυκογόνο οι οποίοι μεταβάλλουν την ικανότητα των γαλακτοβάκιλλων να προσκολλώνται στα επιθηλιακά κύτταρα και να αποικίζουν τον κόλπο. Τέτοιες αλλαγές μπορεί να οφείλονται στον εμμηνορρυσιακό κύκλο και την εμμηνόπαυση η οποία σχετίζεται με μείωση του πληθυσμού των γαλακτοβάκιλλων. Οι μεταεμμηνοπαυσιακές

γυναίκες είναι επίσης πιο επιρρεπείς σε λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος, γεγονός που επαληθεύει την θεώρηση πως ο αποικισμός του κόλπου από γαλακτοβάκιλλους δρα προστατευτικά ενάντια σε παθογόνους μικροοργανισμούς (Cribby et al., 2008).

Παρόλο που ελαφρές μεταβολές στην σύνθεση της κολπικής μικροχλωρίδας αυτορυθμίζονται, η έντονη ανισορροπία μπορεί να οδηγήσει γυναικολογικές παθήσεις. Καθώς οι γαλακτοβάκιλλοι κυριαρχούν το κολπικό μικροβίωμα, τα προβιοτικά μπορούν να αποικίσουν στον κόλπο και να επιφέρουν πλεονεκτήματα στην υγεία του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος διατηρώντας ή επαναφέροντας την μικρο-οικολογική ισορροπία (Mei & Li, 2022).

Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας είναι ο πρώτος κακοήθης όγκος της γυναικείας αναπαραγωγικής οδού, και προκαλεί περίπου 300.000 θανάτους ετησίως (Jahanshahi et al., 2020; Kovachev, 2019). Η μόλυνση από HPV μπορεί να καταστρέψει την ισορροπία της μικροχλωρίδας του κόλπου, να μειώσει το πλήθος γαλακτοβάκιλλων και να αυξήσει τον αποικισμό μη φυσιολογικής χλωρίδας. Έτσι, ευνοείται η έκφραση της πρωτεΐνης HPV και η ανάπτυξη ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας του τραχήλου της μήτρας, οδηγώντας στην εμφάνιση καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Σύμφωνα με μελέτη που πραγματοποιήθηκε, βρέθηκε πως στις γυναίκες που ήταν θετικές στον HPV η βακτηριακή ποικιλία του κόλπου ήταν πιο περίπλοκη και η σύνθεση της μικροχλωρίδας διέφερε από την φυσιολογική (W. Gao et al., 2013). Τα βακτήρια του γένους *Lactobacillus* ενεργοποιούν το ανοσοποιητικό σύστημα ώστε να αναστείλει τον πολλαπλασιασμό κακοήθων όγκων, επομένως η πρόσληψη προβιοτικών έχει συνδεθεί άμεσα με την μείωση της εξέλιξης του καρκίνου (Mei & Li, 2022).

Οι ουρογεννητικές λοιμώξεις αποτελούν πολύ συχνό είδος λοιμώξεων στις γυναίκες, με την ιδιαιτερότητα ότι η επανεμφάνισή τους μετά την αντιμικροβιακή θεραπεία είναι πολύ πιθανή. Η επαναλαμβανόμενη λοίμωξη μπορεί να οφείλεται στον αποκλεισμό της φυσιολογικής μικροχλωρίδας του κόλπου από τον αντιμικροβιακό παράγοντα, γεγονός που αυξάνει την ευαισθησία σε επανααποικισμό από παθογόνους μικροοργανισμούς. Έτσι, η χρήση προβιοτικών για την αναπλήρωση των κοινών μικροβίων αποτελεί πλέον ένα αποτελεσματικό μέσο μείωσης του κινδύνου επαναμόλυνσης (Cribby et al., 2008). Σε μία μελέτη 120 παιδιών με επίμονη πρωτοπαθή κυστεοουρητική παλινδρόμηση, η καθημερινή θεραπεία με *L. acidophilus* ήταν εξίσου αποτελεσματική με

την θεραπεία τριμεθοπρίμης/σουλφαμεθοξαζόλης στη μείωση του ποσοστού ουρολοίμωξης, υποδηλώνοντας ότι τα προβιοτικά μπορούν να παρέχουν μία αποτελεσματική επιλογή πρόληψης (Lee et al., 2007). Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε, 46 προ-εμμηνοπαυσιακές γυναίκες με τουλάχιστον 4 επεισόδια βακτηριακής κολπίτιδας ή/και κολπικής καντιντίασης το προηγούμενο έτος αξιολογήθηκαν για την υποτροπή της βακτηριακής κολπίτιδας χρησιμοποιώντας ένα προβιοτικό γιαούρτι (συγκεκριμένα με *Lactobacillus acidophilus*) και ένα παστεριωμένο. Μετά από δύο μήνες καθημερινής κατανάλωσης και στη συνέχεια δύο μήνες χωρίς γιαούρτι, τα αποτελέσματα έδειξαν μείωση 60% στα επεισόδια βακτηριακής κολπίτιδας στις ασθενείς που κατανάλωσαν προβιοτικό γιαούρτι, ενώ σε αυτές που έλαβαν παστεριωμένο γιαούρτι η μείωση ήταν μόνο 25% (Shalev et al., 1996).

### 2.5.7 Ασφάλεια και παρενέργειες

Τα προβιοτικά, όπως γνωρίζουμε, είναι αποκλειστικά ζωντανοί μικροοργανισμοί, γεγονός που σημαίνει πως ο κίνδυνος δεν μπορεί να εξαλειφθεί πλήρως. Οι περιπτώσεις σύνδεσης της κατανάλωσης των προβιοτικών με ανεπιθύμητα αποτελέσματα που έχουν καταγραφεί είναι λίγες δεδομένης της ευρείας χρήσης τους και περιορίζονται κυρίως σε ασθενείς με υποκείμενες παθήσεις. Επιπλέον, λαμβάνοντας υπόψιν την μεγάλη ποικιλία μικροοργανισμών που θεωρούνται προβιοτικά, οι εγκυμονούντες κίνδυνοι-αν και εφόσον υπάρχουν- είναι στενά συνδεδεμένοι με το εκάστοτε στέλεχος, ενώ εξαρτώνται επίσης από το μέσο χορήγησης και άλλους παράγοντες. Είναι σημαντικό λοιπόν να μελετηθούν οι συντελεστές που μπορεί να καθιστούν κάποιο προβιοτικό μη ασφαλές, ιδίως σε ομάδες ευπαθών ατόμων (Sanders et al., 2010).

Κάποιες πιθανές παρενέργειες που σχετίζονται με την χρήση των προβιοτικών (όταν καταναλώνονται σε μεγάλες ποσότητες) είναι η αυξημένη συχνότητα και το μαλάκωμα των περιττωμάτων, ενώ σε δοκιμές θεραπείας με προβιοτικά υπάρχουν κάποια σπάνια περιστατικά διάρροιας και εμετού. Μάλιστα, σε μελέτη όπου χρησιμοποιήθηκαν και ζωντανά και αδρανοποιημένα με θερμότητα προβιοτικά, φάνηκε πως αυξημένο κίνδυνο να προκαλέσουν ανεπιθύμητα αποτελέσματα έχουν τα προβιοτικά που έχουν υποστεί θερμική επεξεργασία. Συγκεκριμένα,

### 2.5.8 Συμπεράσματα

Τα προβιοτικά έχουν πολυπληθή οφέλη για την υγεία, καθώς επηρεάζουν την σύσταση της του εντερικού μικροβιώματος, προάγοντας την ανάπτυξη ωφέλιμων μικροβίων και αναστέλλοντας τον αποικισμό παθογόνων. Έτσι, βελτιώνουν την υγεία της γαστρεντερικής οδού χωρίς όμως τα πλεονεκτήματά τους να περιορίζονται εκεί. Ευνοούν την υγεία του ανοσοποιητικού συστήματος, και προσφέρουν οφέλη στην ψυχική υγεία, δρώντας προληπτικά ή/και κατασταλτικά σε διάφορες νόσους και παθήσεις όπως το σύνδρομο ευερέθιστου εντέρου, η μολυσματική διάρροια και διάφορα αυτοάνοσα νοσήματα όπως ο ινσουλινοεξαρτώμενος διαβήτης. Επιπλέον, βοηθούν και στην ρύθμιση της κοπλικής μικροχλωρίδας η οποία αποτελείται κυρίως από βακτήρια του γένους *Lactobacillus*, προστατεύοντας το γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα από βακτηριακές λοιμώξεις, και προλαμβάνοντας ή μειώνοντας την εμφάνιση καρκίνου του τραχήλου της μήτρας.

Με το ευρύ φάσμα εφαρμογών τους, τα προβιοτικά είναι πολλά υποσχόμενα στο φάσμα της γαστρονομικής καινοτομίας, και ιδιαίτερα στο πλαίσιο της ενίσχυσης προϊόντων ζαχαροπλαστικής. Αξιοποιώντας τις δυνατότητές τους, μπορούμε να δημιουργήσουμε γλυκά που όχι μόνο καλύπτουν τις ανάγκες των καταναλωτών γευστικά αλλά συμβάλλουν επίσης στην βελτίωση της συνολικής υγείας.

## 2.6 Προβιοτικά και πρεβιοτικά στα τρόφιμα

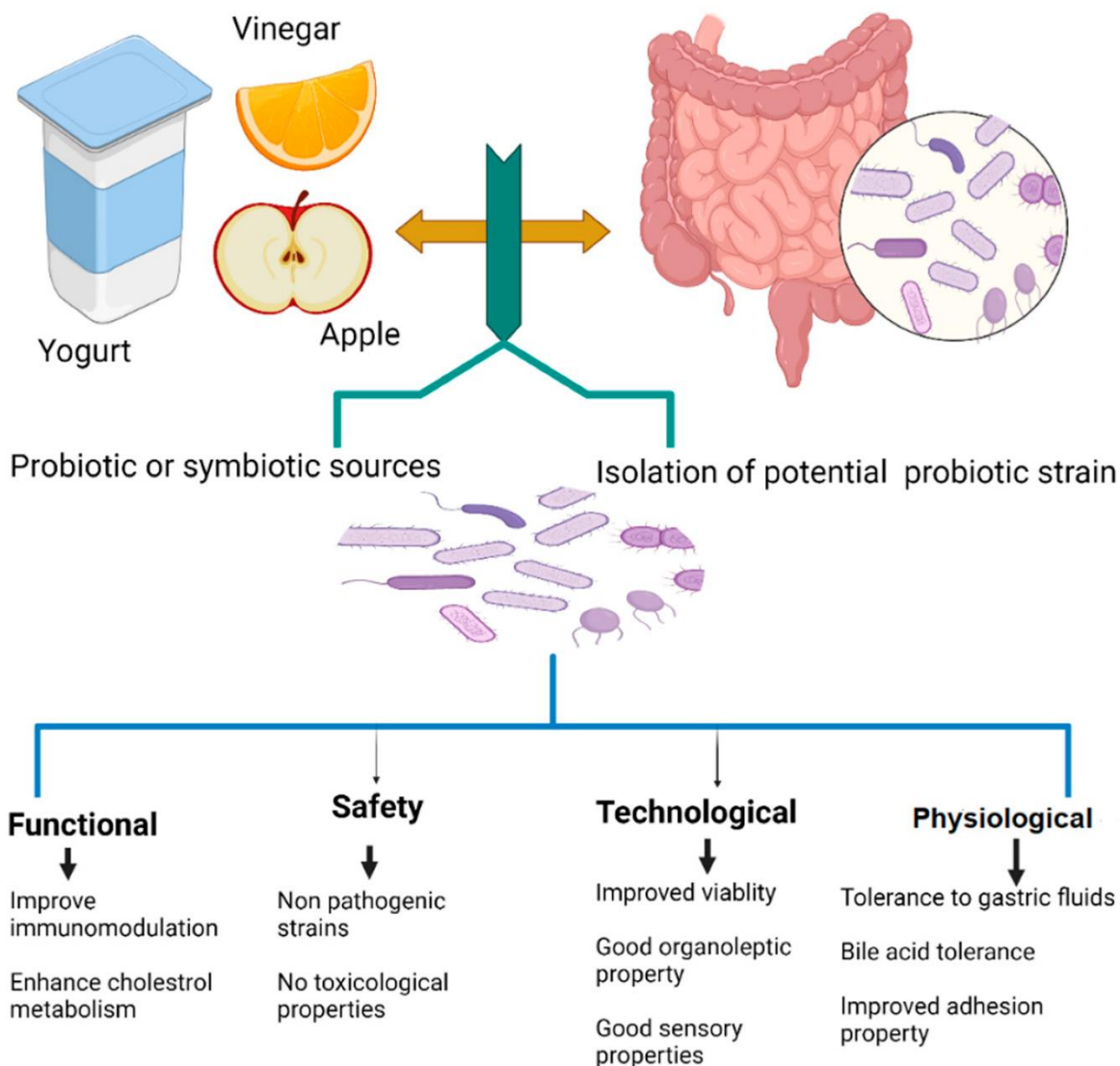
Παρά το γεγονός ότι τα προβιοτικά υπάρχουν φυσικά στα ζυμούμενα γαλακτοκομικά προϊόντα όπως το γάλα, το γιαούρτι, το τυρί, το κεφίρ κ.α., τα ακριβή στελέχη και ο αριθμός προβιοτικών που περιέχει το καθένα δεν είναι σαφώς καθορισμένα. Ως αποτέλεσμα, έχει δημιουργηθεί επιτακτική ανάγκη για ανάπτυξη προϊόντων, γαλακτοκομικών και μη, τα οποία θα έχουν συγκεκριμένη προβιοτική δράση. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με την προσθήκη προβιοτικών είτε ως είναι είτε σε συνδυασμό με παραδοσιακές καλλιέργειες εκκίνησης, κυρίως στα γαλακτοκομικά προϊόντα (J. Gao et al., 2021).

Παράλληλα, η διαρκής αναζήτηση των καταναλωτών για τρόφιμα με όσο το δυνατόν περισσότερα οφέλη για την υγεία έχει οδηγήσει στην δημιουργία προϊόντων με προστιθέμενη διατροφική αξία, τα λεγόμενα «λειτουργικά τρόφιμα». Τα λειτουργικά τρόφιμα χαρακτηρίζονται ως τρόφιμα του μέλλοντος και περιέχουν αυξημένη ποσότητα

θρεπτικών συστατικών προσφέροντας αυξημένα οφέλη για την υγεία σε σχέση με μια συμβατική διαίτα. Προκειμένου ένα τρόφιμο να χαρακτηριστεί λειτουργικό πρέπει να πληροί συγκεκριμένες προϋποθέσεις που περιλαμβάνουν την συμμόρφωση με τους κανονισμούς περί ασφάλειας τροφίμων, την ελεύθερη πρόσβαση και την τεκμηρίωση των πλεονεκτημάτων που προσφέρει στην υγεία όταν καταναλώνεται στα πλαίσια μιας ισορροπημένης διαίτας (Koirala & Anal, 2021).

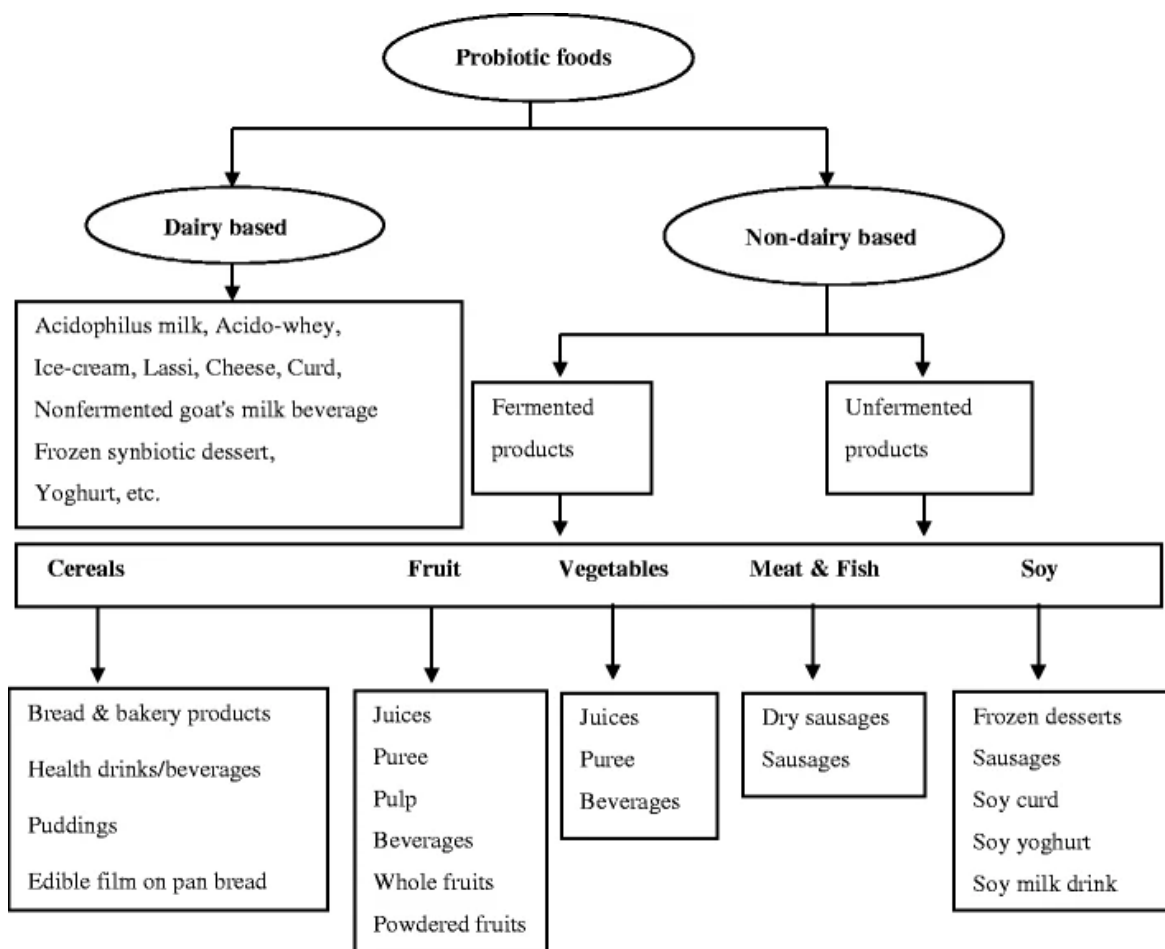
Ανάμεσα στις διάφορες κατηγορίες λειτουργικών τροφίμων, τα προϊόντα με βάση τα προβιοτικά αποτελούν μία από τις πιο δημοφιλείς μεταξύ των καταναλωτών καθώς προσφέρουν πληθώρα ευεργετικών ιδιοτήτων στην υγεία του καταναλωτή, κυρίως όσον αφορά στην υγεία του γαστρεντερικού συστήματος και στην βελτίωση του ανοσοποιητικού (Abenavoli et al., 2019).

Προκειμένου να λάβουμε όσο το δυνατόν περισσότερα οφέλη για την υγεία, είναι απαραίτητη η βιωσιμότητα των προβιοτικών στα τρόφιμα. Στις περισσότερες περιπτώσεις μόνο η έρευνα σε ζώα ή οι κλινικές δοκιμές μπορούν να καθορίσουν κατά πόσο οι εκάστοτε καλλιέργειες προβιοτικών είναι ωφέλιμες ή όχι για την υγεία του ξενιστή. Έτσι, η δοκιμή βιωσιμότητας είναι η πιο εφικτή δοκιμή διασφάλισης ποιότητας. Γενικά η παρουσία προβιοτικών σε περίσσεια βιώσιμων κυττάρων ανά ημέρα έχει συσχετιστεί με οφέλη για την υγεία στις κλινικές έρευνες. Παρακάτω φαίνονται τα κριτήρια (λειτουργικά, ασφαλείας, τεχνολογικά, φυσιολογίας) για την επιλογή κατάλληλων προβιοτικών στελεχών για συγκεκριμένες εφαρμογές (Palanivelu et al., 2022).



Σχήμα 6: Βασικά κριτήρια απιλογής κατάλληλων προβιοτικών στελεχών για συγκεκριμένες εφαρμογές (Palanivelu, 2022)

Τα γαλακτοκομικά προϊόντα καθιερώνονται ως υγιή φυσικά προϊόντα, ενώ η τακτική κατανάλωση συγκεκριμένων προϊόντων έχει συσχετιστεί με ευεργετικά αποτελέσματα στην πρόληψη ασθενειών. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια και οι μεταβολίτες τους διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ενίσχυση της μικροβιολογικής ποιότητας και της διάρκειας ζωής των γαλακτοκομικών προϊόντων που έχουν υποστεί ζύμωση. Επιπλέον, η παρουσία τους στα γαλακτοκομικά έχει μεγάλη σημασία καθώς έχουν την ικανότητα να παράγουν αντιμικροβιακές ενώσεις που προάγουν την προβιοτική δράση. Διάφορα γαλακτοκομικά προϊόντα, όπως για παράδειγμα το γιαούρτι και το τυρί χρησιμοποιούνται ως μέσα παράδοσης προβιοτικών στον καταναλωτή (Ramchandran & Shah, 2009).



Εικόνα 2: Τακινόηση και τύποι προβιοτικών τροφίμων (Kumar et al., 2015).

### 2.6.1 Ζυμωμένο γάλα

Το γάλα που έχει υποστεί ζύμωση είναι ο μεγαλύτερος φορέας προβιοτικών στην βιομηχανία γαλακτοκομικών προϊόντων, καθώς η υψηλή διατροφική αξία, τα επιθυμητά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά που του προσδίδουν, και η ευρεία διαθεσιμότητα στην αγορά το καθιστούν ένα από τα πιο δημοφιλή προϊόντα παγκοσμίως. Υπάρχουν πλέον αρκετά εμπορικά προϊόντα ζυμωμένου γάλακτος με βάση τα προβιοτικά, με κάποια από τα πιο συνηθισμένα να είναι το κεφίρ και το κούμης.

Διάφορες μελέτες έχουν υποδείξει την ενσωμάτωση προβιοτικών σε παραδοσιακά προϊόντα ζυμωμένου γάλακτος με στόχο την ενίσχυση των οφελών στην υγεία, ή την χρήση προβιοτικών σε συνδυασμό με καλλιέργειες εκκίνησης για να ενισχυθεί το προφίλ της γεύσης και οι φυσιολογικές ιδιότητες του γάλακτος (Kakisu et al., 2011), καθώς αυτά συνδέονται άμεσα με τα επίπεδα αποδοχής λειτουργικών τροφίμων με βάση τα προβιοτικά.

Παρά τα πολυπληθή οφέλη που αναφέρθηκαν παραπάνω και την ευρεία χρήση ζυμωμένου γάλακτος ως προϊόν με προβιοτική δράση υπάρχουν αρκετές προκλήσεις στο συγκεκριμένο προϊόν, λόγω του ότι το γάλα δεν αποτελεί το ιδανικό μέσο για την ανάπτυξη και τον μεταβολισμό αρκετών προβιοτικών βακτηρίων, συμπεριλαμβανομένων πολλών οξυγαλακτικών βακτηρίων (Østlie et al., 2005). Είναι καίριας σημασίας κατά τον εμπλουτισμό ζυμωμένου γάλακτος με προβιοτικά να εξασφαλισθεί ότι αυτά αναπτύσσονται επαρκώς και επιβιώνουν κατά την ζύμωση και την επακόλουθη αποθήκευση σε χαμηλή θερμοκρασία. Σε αρκετούς διεθνείς και παγκόσμιους κανονισμούς περί προβιοτικών απαιτείται το προϊόν να διατηρεί ποσότητα προβιοτικών τουλάχιστον  $10^6$  με  $10^7$  CFU/g ή CFU/ml, από το οποίο συνιστάται η κατανάλωση τουλάχιστον 100 g ή 100 ml ημερησίως (J. Gao et al., 2021).

Κάθε στέλεχος προβιοτικών έχει διαφορετικούς μηχανισμούς που επηρεάζουν τους ρυθμούς ανάπτυξης και επιβίωσης κατά την ζύμωση του γάλακτος. Όταν πέντε στελέχη προβιοτικών (*L. acidophilus* La5 and 1748, *L. rhamnosus* GG, *B. animalis* BB12, και *L. reuteri* SD 2112) αφέθηκαν να ζυμώσουν γάλα σε υπερυψηλές θερμοκρασίες 37°C για 72 ώρες παρατηρήθηκε σημαντική διακύμανση στον αριθμό των βακτηρίων, στο CO<sub>2</sub>, στις πτητικές ενώσεις και στα οργανικά οξέα (Østlie et al., 2003). Μπορούμε λοιπόν να συμπεράνουμε πως η επιλογή των κατάλληλων στελεχών για την ζύμωση γάλακτος είναι μείζονας σημασίας (Li et al., 2017).

Υπάρχουν αρκετοί τρόποι και τεχνικές που μπορούν να χρησιμοποιηθούν προκειμένου να βελτιωθεί η ανάπτυξη των προβιοτικών και να καταστεί δυνατή η επιβίωσή τους κατά την ζύμωση του γάλακτος, ανάλογα με το εκάστοτε στέλεχος. Για παράδειγμα, τα προβιοτικά που ανήκουν στο είδος *Bifidobacterium* καθώς είναι υποχρεωτικά αναερόβιοι, λιγότερο πρωτεολυτικοί μικροοργανισμοί αδυνατούν να επιβιώσουν κατά την ζύμωση. Με την προσθήκη όμως του *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, ο οποίος συμβάλλει στην προστασία έναντι ενεργών ενώσεων οξυγόνου και έτσι μειώνει την καταστρεπτική δράση λόγω αυτού, φαίνεται πως ευνοείται η ανάπτυξη και η επιβίωση του *B. longum* BB536 στο ζυμωμένο γάλα (Odamaki et al., 2011). Σε διαφορετική μελέτη η χρήση ανθρακικών αλάτων φάνηκε να διευκολύνει την ανάπτυξη και την επιβίωση των *B. animalis* ssp. *lactis* Bb-12 and *L. rhamnosus*, ενώ παράλληλα βελτίωνε τις φυσικοχημικές ιδιότητες και την υφή του προϊόντος (Szajnar et al., 2020). Ακόμα, έχει αναφερθεί πως η πούλπα κυρίως κόκκινων φρούτων βελτιώνει τα ποσοστά επιβίωσης αρκετών



προβιοτικών στο ζυμωμένο γάλα κατά την αποθήκευση (Barat & Özcan, 2017; J. Gao et al., 2021).

### 2.6.2 Γιαούρτι

Το γιαούρτι αποτελεί ιδανικό φορέα λειτουργικών συστατικών, συμπεριλαμβανομένων των προβιοτικών, με αποτέλεσμα να εγείρεται μεγάλο ενδιαφέρον στην παραγωγή γιαουρτιού με προβιοτικά, με καλλιέργειες που είτε χρησιμοποιούνται για την ζύμωσή του, είτε προστίθενται μεταγενέστερα.

Η πιο συνηθισμένη μέθοδος παραγωγής γιαουρτιού είναι η ζύμωση γάλακτος από οξυγαλακτικά βακτήρια όπως οι *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* και *S. thermophilus*. Καθώς αυτοί επιβιώνουν στο γαστρεντερικό σωλήνα του ανθρώπου και παρουσιάζουν ευεργετικές ιδιότητες στην υγεία αυτού, οι μικροοργανισμοί αυτοί θεωρούνται προβιοτικά. Αντίστοιχα και οι περισσότερες καλλιέργειες εκκίνησης που χρησιμοποιούνται κατά την διαδικασία παραγωγής γιαουρτιού έχουν προβιοτικές ιδιότητες, χωρίς όμως αυτό να σημαίνει πως είναι απαραίτητα επαρκείς για να προσδώσουν στο τελικό προϊόν τον επιθυμητό αριθμό προβιοτικών βακτηρίων (J. Gao et al., 2021).

Γι' αυτό ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος είναι και η επιπλέον προσθήκη καλλιεργείων προβιοτικών βακτηρίων με μεγάλο πλεονέκτημα το γεγονός ότι προσφέρει την δυνατότητα πολύ πιο ελεγχόμενης διαδικασίας όσον αφορά τα στελέχη που θα ενσωματωθούν, και σε τι ποσότητες αυτά χρειάζονται. Οι προστιθέμενες καλλιέργειες μπορούν να χρησιμοποιηθούν και αυτόνομα αλλά και σε συνδυασμό με τις καλλιέργειες εκκίνησης, προσφέροντας τελικά προϊόντα με βελτιωμένα οργανοληπτικά, διατροφικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά (J. Gao et al., 2021).

Τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του γιαουρτιού όπως η γεύση και η υφή του εξαρτώνται από διάφορες μεταβλητές, όπως ο τύπος της καλλιέργειας εκκίνησης που θα επιλεγεί, η θερμοκρασία και η διάρκεια της ζύμωσης. Η προσθήκη προβιοτικών επίσης μπορεί να επηρεάσει το τελικό αποτέλεσμα. Για παράδειγμα κάποιες μελέτες συνιστούν να γίνει ο εμπλουτισμός μετά το στάδιο της ζύμωσης, ενώ άλλες δείχνουν επιφύλαξη σχετικά με την επιβίωση των προβιοτικών σε όξινο περιβάλλον (Mani-López et al., 2014). Τα γιαούρτια που παράγονται με πολυποίκιλα στελέχη προβιοτικών εμφανίζουν

διαφορετικές, και σε πολλές περιπτώσεις βελτιωμένες φυσικοχημικές, αισθητηριακές και μικροβιολογικές ιδιότητες σε σχέση με τα γιαούρτια παραδοσιακής παραγωγής. Παρακάτω παρατίθενται κάποια παραδείγματα συγκεκριμένων προβιοτικών στελεχών και της δράσης τους στο γιαούρτι.

Γιαούρτι που παράχθηκε με προσθήκη *L. reuteri* RC-14 και *L. rhamnosus* GR-1 παρουσίασε βελτιωμένες αισθητηριακές ιδιότητες και μεγαλύτερη αποδοχή από τους καταναλωτές σε σχέση με το παραδοσιακό γιαούρτι (Hekmat & Reid, 2006). Η ζύμωση από *L. acidophilus*, *Bifidobacterium*, και *S. thermophilus* είχε ως αποτέλεσμα παραγωγή λιγότερο όξινο γιαουρτιού, γεγονός που το καθιστά πιο επιθυμητό στους καταναλωτές (Saarela et al., 2000). Παρόμοια αποτελέσματα είχε και η προσθήκη προβιοτικών (*L. acidophilus* and *B. lactis*) σε συνδυασμό με καλλιέργειες εκκίνησης (περισσότεροι εξωκυτταρικοί πολυσακχαρίτες, απαλότερη υφή και ήπια οξύτητα) (Kailasarathy, 2006). Βελτιωμένη συνεκτικότητα και μειωμένη συναίρεση παρουσίασε επίσης η ζύμωση του γιαουρτιού με βάση τα προβιοτικά *L. bulgaricus* και *L. reuteri* ή *L. acidophilus* (Mani-López et al., 2014), και η παραγωγή γιαουρτιού με *L. plantarum*, είτε μόνο του είτε σε συνδυασμό με *L. casei*, η οποία οδήγησε σε υψηλότερα επίπεδα ασβεστίου, φωσφόρου, πρωτεΐνης, και σε χαμηλότερη συναίρεση σε σχέση με το συνηθισμένο γιαούρτι (Soni et al., 2020).

Η προσθήκη προβιοτικών ακόμα αναφέρεται πως επηρεάζει σημαντικά το άρωμα του γιαουρτιού, αυξάνοντας την παραγωγή οξικού και άλλων οργανικών οξέων, ακετοΐνης, 2-βουτανόνης και 2-αιθυλ-1-εξανόλης (Dimitrellou et al., 2019), τα οποία προσδίδουν επίσης πιο ευχάριστο flavor στο γιαούρτι (M. Zhang et al., 2010).

Τα βασικά εμπόδια που προκύπτουν με την ενσωμάτωση προβιοτικών στο γάλα κατά την ζύμωση είναι ο αργός ρυθμός ανάπτυξής τους και τα μικρά ποσοστά επιβίωσης που παρουσιάζουν κατά την αποθήκευση. Μια στρατηγική που εφαρμόζεται για την βελτίωση του ρυθμού ανάπτυξης των προβιοτικών βακτηρίων είναι η προσθήκη πρεβιοτικών ουσιών σε συνδυασμό με την επιλογή κατάλληλων καλλιεργειών εκκίνησης. Προκειμένου να λάβουμε και αυξημένο ρυθμό ανάπτυξης αλλά και τις επιθυμητές λειτουργικές ιδιότητες στο γιαούρτι έχει μελετηθεί πληθώρα πρεβιοτικών συμπληρωμάτων με δραστικές ενώσεις όπως φυτικά εκχυλίσματα, πρωτεΐνες γάλακτος, ινουλίνη και λακτουλόζη (M. Zhang et al., 2010).

### 2.6.3 Τυρί

Το τυρί θεωρείται ένας από τους καλύτερους φορείς προβιοτικών μεταξύ των υπόλοιπων γαλακτοκομικών προϊόντων, κυρίως λόγω της χαμηλής ενεργότητας νερού που έχει ( $a_w > 0.90$ ), των χαμηλών θερμοκρασιών αποθήκευσης (4 έως 8°C), του pH του, το οποίο είναι υψηλότερο σε σχέση με άλλα προϊόντα όπως το γάλα και το γιαούρτι και τέλος λόγω κάποιων χαρακτηριστικών της υφής του, παραδείγματος χάριν η υψηλή λιποπεριεκτικότητα η οποία προστατεύει τα προβιοτικά κατά την διέλευση από τον γαστρεντερικό σωλήνα (J. Gao et al., 2021).

Παρόλα τα πλεονεκτήματα που παρουσιάζει το τυρί ως φορέας προβιοτικών υπάρχουν κάποιοι ενδοιασμοί σχετικά με την προσθήκη προβιοτικών σε αυτό. Αρχικά επιβάλλεται να εξασφαλιστεί η επιβίωση των προβιοτικών κατά την παραγωγή του τυριού, δηλαδή στις διαδικασίες της αλάτισης και της ωρίμανσης (Castro, 2015). Επιπλέον, δεν πρέπει οι μικροοργανισμοί να προκαλέσουν αισθητηριακές ανωμαλίες στο τελικό προϊόν (J. Gao et al., 2021).

Γενικά ο εμπλουτισμός τυριών με προβιοτικά έχει ως βασικό στόχο να ενισχύσει την θρεπτική τους αξία και να κεντρίσει το ενδιαφέρον των καταναλωτών, και δεν αποσκοπεί τόσο στην βελτίωση των τεχνολογικών και φυσιολογικών χαρακτηριστικών του τυριού, ωστόσο έχει αποδειχθεί πως τα τυριά που είναι εμπλουτισμένα με προβιοτικά παρουσιάζουν αρκετά ποιοτικά πλεονεκτήματα.

Η παραγωγή τυριών με προβιοτικά συνήθως γίνεται με την ανάμιξη προβιοτικών με τις καλλιέργειες εκκίνησης των τυριών κατά την ζύμωση του γάλακτος, σε συγκεκριμένες πάντα αναλογίες, καθώς όμως τα προβιοτικά δεν ευδοκιμούν υπό αναερόβιες συνθήκες και η παρουσία μεταβολικά ενεργών οξυγαλακτικών βακτηρίων δρα ανταγωνιστικά, φαίνεται πως η προσθήκη των προβιοτικών σε μεταγενέστερα στάδια είναι προτιμότερη (Dinakar & Mistry, 1994). Σύμφωνα με δοκιμές που έγιναν σχετικά με τον εμπλουτισμό σε διαφορετικά στάδια, φαίνεται πως το πότε θα γίνει η ενσωμάτωση των προβιοτικών στο τυρί επηρεάζει σημαντικά το ποσοστό επιβίωσής τους. Το προβιοτικό *B. longum* για παράδειγμα όταν προστέθηκε στο στάδιο της αλάτισης παρέμεινε πιο σταθερό και βιώσιμο κατά την αποθήκευση από εκείνα που εμβολιάστηκαν στο γάλα πριν ή μετά την πυτιά (Fortin et al., 2011). Όταν οι *L. acidophilus*, *L. plantarum*, και *L. casei* προστέθηκαν στο γάλα πριν την διαδικασία προσθήκης της πυτιάς κατά την παρασκευή προβιοτικού ημίσκληρου τυριού, παρατηρήθηκε μείωση στην ποσότητα των

λακτοβάκιλλων από 108 σε 107 CFU/g μετά από 180 ημέρες ωρίμανσης (Lonayoná et al., 2014). Ομοίως, το πλήθος *L. acidophilus* και *B. longum* BB536 σημείωσε σημαντική μείωση σε δείγματα τυριού στα οποία ο εμβολιασμός με προβιοτικά έλαβε χώρα κατά την προσθήκη της πυτιάς (Phillips et al., 2006).

#### 2.6.4 Κρέμα και βούτυρο

Η κρέμα γάλακτος παράγεται με ζύμωση από οξυγαλακτικά βακτήρια, ενώ η κρέμα γάλακτος που έχει υποστεί οξίνιση παρασκευάζεται με τα κατάλληλα μέσα οξίνισης, χωρίς να είναι απαραίτητη η χρήση καλλιεργειών LAB. Η τιτλοδοτούμενη οξύτητα και των δύο παραπάνω προϊόντων είναι τουλάχιστον 0,5%, εκφρασμένη σε γαλακτικό οξύ, ενώ η περιεκτικότητα λίπους στο γάλα είναι τουλάχιστον 18% πριν την οποιαδήποτε προσθήκη γλυκαντικών και ενισχυτικών γεύσης. Η κρέμα γάλακτος μπορεί ακόμα να περιέχει έως και 0,1% κιτρικό νάτριο πριν την ζύμωση.

Μια παλαιότερη μέθοδος παραγωγής κρέμας γάλακτος ήταν η διατήρηση της κρέμας σε κατάλληλη θερμοκρασία ώστε τα ήδη υπάρχοντα βακτήρια να παράγουν οξύ, επιτρέποντας έτσι στην κρέμα να ξινίσει. Η διαδικασία αυτή ωστόσο οδηγεί σε διαχωρισμό του ορού γάλακτος από το τυρόπηγμα και στην ανάπτυξη ανεπιθύμητων βακτηρίων, ζυμών, και μυκήτων, επομένως δεν προτιμάται πλέον. Η πιο πρόσφατη αναλυτική περιγραφή της διαδικασίας παραγωγής κρέμας γάλακτος έγινε από τους (Kosikowski & Mistry, 1999) ως εξής: τυποποίηση κρέμας σε λίπος περίπου 19%, προσθήκη έως 0,5% σταθεροποιητή και περίπου 0,2% κιτρικό οξύ, παστερίωση και ομογενοποίηση, ψύξη στους 22 °C, εμβολιασμός με εκκινητή μεσόφιλου γαλακτικού οξέος (*Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* and *L. lactis* ssp. *lactis*), προσθήκη πυτιάς (προαιρετικό στάδιο), απαλή ανάδευση για μερικά λεπτά, επώαση μέχρι τα επιθυμητά επίπεδα pH (4.5-4.6) και οξύτητας (περίπου 0,70%), ψύξη και συσκευασία. Υπάρχει το ενδεχόμενο της διπλής ομογενοποίησης σε περίπτωση που επιθυμείται τελική κρέμα με πλούσιο σώμα, διαφορετικά η επώαση μπορεί να πραγματοποιηθεί και εντός συσκευασίας (Argana & Olson, 2017).

Οι ουσίες που προσδίδουν στην κρέμα γάλακτος το χαρακτηριστικό προφίλ γεύσης της είναι το γαλακτικό οξύ και κάποιες αρωματικές ενώσεις όπως το διακετύλιο. Σύμφωνα με μελέτες, κρέμες οι οποίες χαρακτηρίζονται από τις γευστικές ενώσεις

διακετυλίου, ακετοΐνης, δ-δεκαλακτόνης, και 2-μεθυλ-3-φουρανθειόλης κρίθηκαν ως οι πιο επιθυμητές στους καταναλωτές. Αναφέρθηκε ακόμα πως χαρακτηριστικά όπως μέτρια προς υψηλά επίπεδα διακετυλίου και λίπους γάλακτος με παράλληλα χαμηλά προς μέτρια επίπεδα ξινής γεύσης και αρώματος και μέτρια πυκνότητα και συνεκτικότητα σε μια κρέμα είναι τα ιδανικά για την μέγιστη αποδοχή των καταναλωτών (Shepherd, 2013).

Κάποια είδη βουτύρου παρασκευάζονται από ζυμωμένη κρέμα γάλακτος, καθώς επιτυγχάνεται καλύτερος διαχωρισμός του βουτύρου από την ωριμασμένη κρέμα, καλύτερη διατήρηση της ποιότητας και βελτιωμένη γεύση (“Bacteria in Milk, Cream and Butter,” 1889). Οι αρχικές μέθοδοι παραγωγής βουτύρου περιλάμβαναν την αυθόρμητη οξίνιση χωρίς κάποιο επιπρόσθετο μέσο οξίνισης, και την προσθήκη είτε κρέμας γάλακτος είτε βουτυρογάλακτος, ωστόσο αυτές παρουσίαζαν συχνά προβλήματα επιμόλυνσης. Μια βελτιωμένη διαδικασία παραγωγής ζυμωμένου βουτύρου από ωριμασμένη κρέμα προτάθηκε από τον Vilhelm Storch (1893), με την εφαρμογή θερμικής επεξεργασίας 70-80 °C στην κρέμα ή στο γάλα και την προσθήκη καλλιέργειας βακτηρίων που προέρχονται από φρέσκο βούτυρο, πλήρως ωριμασμένη κρέμα, ή φρέσκο βουτυρόγαλα. Παρατηρήθηκε επίσης πως το προφίλ γεύσης, όπως και στην ζυμωμένη κρέμα, οφειλόταν κυρίως στην δράση των βακτηρίων. Στη συνέχεια συζητήθηκε από τους Babel & Hammer, (1944) ο εμβολιασμός του βουτύρου απευθείας με καλλιέργειες. Οι καλλιέργειες βουτύρου έως τότε θεωρούντουσαν αποκλειστικά οξυγαλακτικές και στρεπτοκόκκων, ενώ πλέον χρησιμοποιούνται ποικίλοι μικροοργανισμοί όπως οι *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis*, και *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* (Frede, 2003).

### 2.6.5 Παγωτό

Η ενσωμάτωση προβιοτικών στα παγωτά αποτελεί μια αρκετά συμφέρουσα τεχνική, αφού συμβάλλει στην παραγωγή λειτουργικών προϊόντων με υψηλότερη θρεπτική αξία, και υπερτερεί έναντι άλλων γαλακτοκομικών προϊόντων καθώς οι συνθήκες παραγωγής και αποθήκευσης του παγωτού είναι ευνοϊκές για την επιβίωση των προβιοτικών. Παρόλα αυτά, υπάρχουν αρκετοί ακόμα παράγοντες (διαδικασία ζύμωσης, κατάψυξης, ανάμειξης και διόγκωσης, περίοδος αποθήκευσης σε κατάψυξη και λιώσιμο ή απόψυξη του προϊόντος) που μπορεί να επηρεάσουν την τελική δυνατότητα επιβίωσης, κι έτσι

καθίσταται επιτακτική η ανάπτυξη ιδανικών μεθόδων ώστε να επιτευχθεί η διατήρηση ισορροπίας μεταξύ της βιωσιμότητας των προβιοτικών και της διατήρησης των ιδανικών φυσικοχημικών ιδιοτήτων του παγωτού (Mohammadi & Mortazavian, 2011).

Η προτιμότερη μέθοδος εμπλουτισμού φαίνεται να είναι η ζύμωση του παγωτού που έχει αναμειχθεί με προβιοτικά, έναντι της ενσωμάτωσης των προβιοτικών στο μείγμα του παγωτού χωρίς να έχει προηγηθεί ζύμωση. Καθώς το χαμηλό pH που αποκτά το παγωτό κατά την ζύμωση δρα ανασταλτικά στην ανάπτυξη των περισσότερων προβιοτικών στελεχών, είναι απαραίτητο η ζύμωση να εξαχθεί υπό καθορισμένες, ελεγχόμενες συνθήκες και στη συνέχεια να καταψύχεται σε τιμές pH περίπου 5,6 (Davidson et al., 2000). Τα πιο κρίσιμα στάδια σε σχέση με την επιβίωση των προβιοτικών φαίνεται να είναι τα στάδια κατάψυξης και ανάδευσης κατά την μετατροπή του μίγματος σε παγωτό. Για παράδειγμα, όταν ενσωματώθηκαν στο παγωτό οι *L. acidophilus* και *B. lactis* και ακολούθησε ανάδευση και κατάψυξη, ο *L. acidophilus* σημείωσε σημαντική μείωση ενώ ο *B. lactis* δεν σημείωσε έντονη μεταβολή. Έτσι, φαίνεται πως το ποσοστό επιβίωσης κατά τις παραπάνω διαδικασίες μπορεί να διαφοροποιηθεί σε μεγάλο βαθμό ανάλογα με το εκάστοτε στέλεχος (Haynes, 2002).

Τα πλεονεκτήματα ενσωμάτωσης προβιοτικών στο παγωτό, εκτός από την βελτίωση της θρεπτικής του αξίας, είναι γενικότερα βελτιωμένα ποιοτικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά σε σχέση με το απλό παγωτό. Ο εμπλουτισμός, για παράδειγμα, του μίγματος παγωτού με *L. acidophilus* La5 πριν την ζύμωση οδήγησε σε σημαντικά υψηλότερα επίπεδα ολικών στερεών (42%), τιτλοδοτούμενης οξύτητας (2,2%), και πρωτεϊνών (16,5%) σε σχέση με παγωτό που δεν περιέχει προβιοτικά (Senanayake et al., 2013).

### 2.6.6 Μη-γαλακτοκομικά προβιοτικά προϊόντα

Τα γαλακτοκομικά προϊόντα με προβιοτικά έχουν αναδειχτεί ως κάποια από τα πιο ενδιαφέροντα λειτουργικά τρόφιμα, καθώς διαθέτουν ιδανικές συνθήκες για τη διατήρηση της βιωσιμότητας των προβιοτικών βακτηρίων, ωστόσο τα αυξανόμενα περιστατικά καταναλωτών με αλλεργία στις πρωτεΐνες του γάλακτος, υψηλά επίπεδα χοληστερόλης και δυσανεξία στη λακτόζη στρέφουν την ζήτηση σε εναλλακτικές επιλογές, όπως τα φυτικά γάλατα και τα τρόφιμα χωρίς γαλακτοκομικά. Έτσι, δημιουργείται η

πρόκληση για δημιουργία τροφίμων απαλλαγμένων από τα γαλακτοκομικά, που να διατηρούν ωστόσο τον χαρακτήρα λειτουργικού τροφίμου και να περιέχουν προβιοτικά. Αρκετά προϊόντα όπως επιδόρπια, προϊόντα δημητριακών, φρούτα, λαχανικά και προϊόντα κρέατος έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς ως φορείς προβιοτικών (Farnworth et al., 2007).

### 2.6.7 Μη-γαλακτοκομικά επιδόρπια

Τα επιδόρπια αποτελούν μια κατηγορία τροφίμων με μεγάλες δυνατότητες στην αγορά, και σε συνδυασμό με την ζήτηση των καταναλωτών για ελαφρύτερα και πιο υγιεινά γλυκά, τα προϊόντα επιδορπίων με προβιοτικά έχουν συναντήσει μεγάλη επιτυχία.

Η μους σοκολάτας φαίνεται να είναι ένα αποτελεσματικό μέσο ενσωμάτωσης προβιοτικών, και πιο συγκεκριμένα του *L. paracasei* subsp. *paracasei* LBC 82, καθώς παρουσιάζει πλεονεκτήματα όπως το ουδέτερο pH (6,3- 5,7) που επιτρέπει την επιβίωση του βακτηρίου έως και 28 ημέρες σε θερμοκρασία 4 °C (Aragón-Alegro et al., 2007). Επιπλέον, η σοκολάτα διαθέτει προστατευτικές ιδιότητες, δρώντας ως μέσο στοματικής χορήγησης μικροενθυλακωμένου μίγματος προβιοτικών με υψηλό ποσοστό επιβίωσης σε όξινες συνθήκες (Possemiers et al., 2010).

Αναπτυσσόμενη αγορά είναι ακόμα και τα κατεψυγμένα επιδόρπια που δεν περιέχουν γαλακτοκομικά, διαθέσιμα σε διάφορες μορφές, όπως γρανίτες, προϊόντα φυτικών πρωτεϊνών (σόγια, καρύδα, ρύζι, αμύγδαλο, κ.α.), και προϊόντα με βάση τα φρούτα (σορμπέ, παγωμένα γλειφιτζούρια και smoothies), ενώ τα τελευταία χρόνια μελετάται η το ενδεχόμενο εμπλουτισμού τους με προβιοτικά. Τα κατεψυγμένα επιδόρπια έχουν τη δυνατότητα να γίνουν αποτελεσματικοί φορείς προβιοτικών χάρη στη σύνθεσή τους- περιέχουν λιπίδια, πρωτεΐνες, και άλλες ενώσεις- , στο γεγονός ότι αποθηκεύονται σε θερμοκρασίες κατάψυξης, συνθήκη που ευνοεί σε μεγάλο βαθμό την επιβίωση των προβιοτικών, και στο σχετικά υψηλό pH που έχουν (5,5- 6,5), το οποίο εκτός του ότι βοηθά στην επιβίωση των προβιοτικών συμβάλλει ακόμα και στην μεγαλύτερη αποδοχή των καταναλωτών, ιδιαίτερα εκείνων που προτιμούν προϊόντα χαμηλής οξύτητας (Pimentel et al., 2021).

Η σύνθεση των καταψυγμένων επιδορπίων που δεν περιέχουν γαλακτοκομικά περιλαμβάνει ένα μείγμα συστατικών όπως φυτικά εκχυλίσματα, λίπη, ζάχαρη ή

γλυκαντικές ουσίες, νερό, σταθεροποιητές, ομογενοποιητές, ενισχυτικά γεύσης, χρωστικές, κ.α. (Öztürk et al., 2018). Τα κύρια βήματα επεξεργασίας τους περιλαμβάνουν την ανάμειξη των συστατικών σε θερμοκρασία 50 °C για την δημιουργία σιροπιού, το οποίο στη συνέχεια παστεριώνεται με κατάλληλο εξοπλισμό, συνήθως στους 70-85 °C για 30 δευτερόλεπτα έως 30 λεπτά. Η παστερίωση είναι απαραίτητη για τον περιορισμό των παθογόνων μικροοργανισμών και την απενεργοποίηση των ενζύμων, ενώ συμβάλλει στην τήξη του λίπους και στην αύξηση της ομοιομορφίας του προϊόντος. Στη συνέχεια, ακολουθεί ομογενοποίηση του μίγματος σε συγκεκριμένες συνθήκες πίεσης και θερμοκρασίας (500- 2500 Psi, 60-80), ψύξη στους 4, και ωρίμανση για 4-24 ώρες. Έπειτα, προστίθενται τα ενισχυτικά γεύσης και οι χρωστικές, το σιρόπι καταψύχεται και απλώνεται σε επίπεδη επιφάνεια όπου γίνεται η διόγκωση και έτσι παραλαμβάνεται το τελικό προϊόν σε ημι-στερεή, παγωμένη μορφή (Deosarkar et al., 2016).

Στην περίπτωση παρασκευής κατεψυγμένου επιδορπίου με προβιοτικά, η διαδικασία παραγωγής παραμένει ίδια, με την προσθήκη ενός ακόμα σταδίου, όπου γίνεται η ενσωμάτωση των προβιοτικών. Υπάρχουν αρκετοί τρόποι προσθήκης των προβιοτικών. Ένας από αυτούς είναι η προσθήκη της καλλιέργειας μέσω ζύμωσης μέρους του φυτικού εκχυλίσματος που χρησιμοποιείται για την παραγωγή του επιδορπίου, και η ενσωμάτωσή του στο υπόλοιπο μίγμα, πριν από το στάδιο της κατάψυξης (Villalva et al., 2017). Άλλοι μέθοδοι είναι η προσθήκη βιομάζας προβιοτικών ή λυοφυλιωμένης καλλιέργειας πριν την κατάψυξη, ή η χρήση ολόκληρου του εκχυλίσματος σε ζυμωμένη μορφή. Η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου εξαρτάται από τα ποσοστά επιβίωσης των προβιοτικών, από την τεχνολογική όψη και τις δυσκολίες ή ευκολίες που παρουσιάζει η κάθε μέθοδος, και την δυνατότητα επεξεργασίας σε βιομηχανικό επίπεδο (Pimentel et al., 2021).

Όπως γνωρίζουμε, η συνιστώμενη περιεκτικότητα των τροφίμων σε προβιοτικά προκειμένου να λάβουμε τα επιθυμητά οφέλη στην υγεία είναι τουλάχιστον 10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup> CFU/ml ή g. Στην περίπτωση των κατεψυγμένων επιδορπίων θα πρέπει να αξιολογηθεί επιπλέον και ο ελάχιστος αρχικός πληθυσμός που περιλαμβάνεται στο προϊόν. Κάποια παραδείγματα συγκεκριμένων προϊόντων που περιέχουν προβιοτικά σε ποσότητες τουλάχιστον 10<sup>6</sup> cfu/g είναι τα παγωμένα γλυκίσματα από καρύδα ή γάλα σόγιας, το σορμπέ κολοκύθας, κ.α. (Szydłowska & Kołożyn-Krajewska, 2019; Aboulfazli & Baba, 2015; Pimentel et al., 2021).



Μία από τις πιο βασικές παραμέτρους που επηρεάζουν την επιβίωση των προβιοτικών είναι η πρώτη ύλη που χρησιμοποιείται στην παρασκευή των των επιδορπίων. Σύμφωνα με μελέτη (Aboufazli & Baba, 2015), η χρήση γάλακτος από καρύδα και σόγια είχε ως αποτέλεσμα τελικά προϊόντα με υψηλότερα ποσοστά επιβίωσης στα προβιοτικά (*Lactobacillus acidophilus* και *Bifidobacterium bifidum*) σε σχέση με αυτά που παρασκευάστηκαν με βόειο γάλα. Επομένως, είναι σημαντικό να καθοριστεί η συμβατότητα πρώτης ύλης με την εκάστοτε καλλιέργεια προβιοτικών. Άλλοι παράγοντες που μπορεί να επηρεάσουν τα ποσοστά επιβίωσης είναι οι διαδικασίες που πραγματοποιούνται κατά την παραγωγή του προϊόντος, όπως το στάδιο διόγκωσης, όπου η ενσωμάτωση οξυγόνου στο μίγμα δυσχεραίνει την δυνατότητα επιβίωσης. Έτσι, είναι σημαντικό τα στελέχη που επιλέγονται να είναι ανθεκτικά στην οξείδωση, ή να εισαχθούν μέσω εγκλεισμού σε μικροκάψουλα, η οποία προστατεύει τα προβιοτικά από διάφορους μη-ευνοϊκούς παράγοντες, όπως η κατάψυξη και το έντονα όξινο περιβάλλον (Pimentel et al., 2021).

Η ενσωμάτωση προβιοτικών σε παγωμένα μη-γαλακτοκομικά επιδόρπια συνήθως δεν επηρεάζει τη σύσταση, τα φυσικοχημικά και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του προϊόντος, ωστόσο αυτά μπορεί να μεταβληθούν ανάλογα με τον τύπο πρώτης ύλης, τα στελέχη που χρησιμοποιούνται, και το αν έχει προηγηθεί ζύμωση.

Πιο συγκεκριμένα, τα παγωμένα επιδόρπια στα οποία προστέθηκε *Lactobacillus acidophilus* La-5 εμφάνισαν μικρότερο ρυθμό τήξης, μεγαλύτερο μέγεθος σωματιδίων και πιο έντονο ιξώδες από τα προϊόντα στα οποία προστέθηκε *Bifidobacterium bifidum* BB-12, χωρίς ωστόσο να εντοπίζεται κάποια διαφορά στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Η ζύμωση με *Bifidobacterium bifidum* BB-12 επίσης μείωσε τον ρυθμό τήξης και αύξησε το μέγεθος των σωματιδίων και το ιξώδες, ενώ ζύμωση παγωτού από γάλα σόγιας με *Lactobacillus casei* ssp. *casei* CRL-431 αύξησε την διόγκωση και την σχετική πυκνότητα, οδήγησε σε βελτίωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών και μείωσε το ιξώδες (Aboufazli & Baba, 2015; Vaghef-Mehrabany et al., 2014).

## 2.7 Νομοθεσία

Από το 1990 άρχισαν να εμφανίζονται όλο και περισσότερες δημοσιεύσεις σχετικά με τα πλεονεκτήματα που προσφέρουν τα προβιοτικά στην υγεία, γεγονός που

οδήγησε σε μία αυξανόμενη προσπάθεια να επιτραπεί η χρήση σχετικών ισχυρισμών στην επισήμανση, εμπορία και διαφήμιση προϊόντων που περιέχουν προβιοτικούς μικροοργανισμούς. Οι προσπάθειες αυτές δεν περιορίστηκαν μόνο στα προϊόντα με προβιοτικά, αλλά στο γενικότερο σύνολο λειτουργικών τροφίμων, τα οποία εμπίπτουν στην γκρίζα ζώνη μεταξύ τροφίμων και φαρμάκων. Ως αποτέλεσμα, ορισμένες χώρες ανέπτυξαν τα δικά τους νομοθετικά συστήματα για να διασφαλίσουν την ασφάλεια των τροφίμων και να αντιμετωπίσουν τα ζητήματα που αναδύθηκαν με αυτή τη νέα κατηγορία τροφίμων. Καθώς όμως προέκυψαν αρκετές διαφορετικές προσεγγίσεις σχετικά με τα προβιοτικά στα τρόφιμα, οι εκάστοτε οδηγίες διαφέρουν από περιοχή σε περιοχή, δημιουργώντας την ανάγκη για περαιτέρω αποσαφήνιση της χρήσης των προβιοτικών (Hickey, 2017). Σε αυτό το κεφάλαιο θα δούμε την ισχύουσα νομοθεσία σχετικά με τα προβιοτικά σε παγκόσμιο αλλά και κρατικό επίπεδο, και συγκεκριμένα ποιες οδηγίες πρέπει να ακολουθούνται σύμφωνα με την Ελληνική νομοθεσία.

Όποτε αναφέρεται το ζήτημα της νομοθεσίας λειτουργικών τροφίμων, γίνεται αναφορά στο Ιαπωνικό σύστημα κανονισμών για τα τρόφιμα με ισχυρισμούς υγείας και τα τρόφιμα ειδικής διαιτητικής χρήσης, όπου εισάχθηκε η κατηγορία τροφίμων με ειδικές χρήσεις για την υγεία (FOSHU, Foods for Specified Health Use) το 1991 από το Υπουργείο Υγείας και Πρόνοιας (WHLW). Το 2003 προστέθηκε μια επιπλέον κατηγορία τροφίμων με ισχυρισμούς για θρεπτικές λειτουργίες (Foods with Nutrient Functional Claims, FNFC), ενώ το 2015 θεσπίστηκε μία νέα κατηγορία τροφίμων με λειτουργικούς ισχυρισμούς με στόχο να συμπεριλάβει περισσότερα προϊόντα στα οποία θα επισημαίνεται σαφώς η λειτουργικότητά τους και να μπορούν έτσι οι καταναλωτές να κάνουν πιο ενημερωμένες επιλογές. Όντας το πρώτο σύστημα που έθεσε το θέμα των λειτουργικών τροφίμων, η Ιαπωνική προσέγγιση αποδείχθηκε σημαντικό μοντέλο και σημείο αναφοράς σε αυτόν τον τομέα (Hickey, 2017).

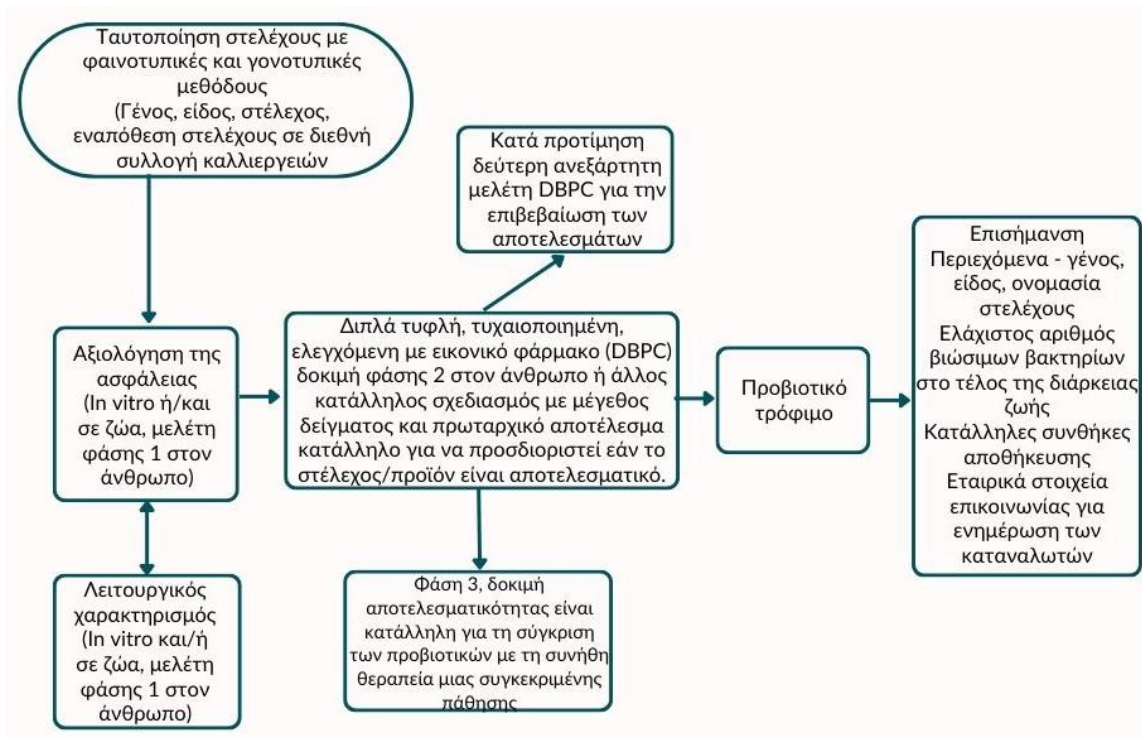
### 2.7.1 Νομοθεσία σύμφωνα με τις οδηγίες του παγκόσμιου οργανισμού υγείας (WHO) και του παγκόσμιου οργανισμού τροφίμων και γεωργίας (FAO)

Τα προβιοτικά κατατάσσονται στην κατηγορία των τροφίμων και των συμπληρωμάτων διατροφής καθώς στην πλειοψηφία τους καταναλώνονται μέσω του στόματος, ως τρόφιμα. Επιπλέον, δεν μπορούν να χαρακτηριστούν ως φάρμακα καθώς

αυτά επιτρέπεται να κάνουν ισχυρισμούς σχετικά με την αποτελεσματικότητά τους στην θεραπεία ή την άμβλυωση ασθενειών. Αντιθέτως, τα τρόφιμα, τα πρόσθετα τροφίμων και τα συμπληρώματα διατροφής μπορούν να κάνουν μόνο γενικούς ισχυρισμούς υγείας.

Προκειμένου να διευκρινιστεί η ταυτότητα των προβιοτικών που υπάρχουν σε ένα προϊόν, συστήνεται το/-α είδος/-η προβιοτικών που περιέχονται να δηλώνονται στην ετικέτα. Εάν έχει πραγματοποιηθεί διαδικασία επιλογής σε επίπεδο στελέχους, θα πρέπει επίσης να συμπεριληφθεί η ταυτότητά του, καθώς το προβιοτικό αποτέλεσμα φαίνεται να είναι ειδικό για κάθε στέλεχος. Θα πρέπει ακόμα στην ετικέτα να αναγράφεται η βιώσιμη συγκέντρωση κάθε προβιοτικού που υπάρχει κατά την λήξη της διάρκειας ζωής.

Προκειμένου να εξασφαλιστεί πως οποιαδήποτε καλλιέργεια διατηρεί τις ωφέλιμες ιδιότητές της, η αποθεματική καλλιέργεια θα πρέπει να διατηρείται υπό τις κατάλληλες συνθήκες και να ελέγχονται περιοδικά η ταυτότητα των στελεχών και οι προβιοτικές ιδιότητες. Θα πρέπει ακόμα η βιωσιμότητα και η προβιοτική δραστηριότητα να διατηρούνται καθ' όλη την διάρκεια της επεξεργασίας, χειρισμού, και αποθήκευσης του προϊόντος που περιέχει προβιοτικά, και να επαληθεύονται στην λήξη της διάρκειας ζωής του. Προκειμένου να τηρηθούν τα παραπάνω, θα πρέπει να εισαχθούν σχετικά προγράμματα διασφάλισης ποιότητας και να ακολουθούνται πρακτικές καλής παραγωγικής διαδικασίας (GMP). Συστήνεται η συμμόρφωση με τις γενικές αρχές του κώδικα υγιεινής τροφίμων και τις οδηγίες για την εφαρμογή του HACCP.



Σχήμα 7: Κατευθυντήριες γραμμές για την αξιολόγηση των προβιοτικών για χρήση σε τρόφιμα, σύμφωνα με την ομάδα εργασίας FAO/WHO. Από την ταυτοποίηση του στελέχους με φαινοτυπικές και γονοτυπικές μεθόδους, την ασφάλεια και τις λειτουργικές ιδιότητες σε μελέτες σε ζώα και ανθρώπους μέχρι την εφαρμογή στα τρόφιμα (FAO/WHO, 2002, Ansari et al., 2023)

## 2.7.2 Νομοθεσία στην Ευρωπαϊκή Ένωση

Οι κανονισμοί της ΕΕ σχετικά με την θρεπτική αξία και τους ισχυρισμούς υγείας των τροφίμων έχουν αποτελέσει εμπόδιο σε διάφορα προϊόντα τροφίμων, και ιδιαίτερα στα προβιοτικά, αφού για αρκετά χρόνια δεν υπήρχαν συγκεκριμένες οδηγίες, με την νομοθεσία να διαφέρει μεταξύ κρατών-μελών. Το 2006 υιοθετήθηκε ο κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1924/2006 ο οποίος αποσκοπούσε στην εναρμόνιση των νομοθετικών διατάξεων των κρατών μελών που έχουν σχέση με τη χρήση ισχυρισμών διατροφής και υγείας που διατυπώνονται στα τρόφιμα ώστε να εξασφαλιστεί η αποτελεσματική λειτουργία της εσωτερικής αγοράς και η παροχή υψηλού επιπέδου προστασίας του καταναλωτή. Σύμφωνα με αυτόν καθορίστηκαν με ακρίβεια οι συνθήκες υπό τις οποίες επιτρέπεται η αναγραφή ισχυρισμών, εφόσον αυτοί είναι εγκεκριμένοι.

Τα προβιοτικά σύμφωνα με πολλές έρευνες έχουν αρκετά οφέλη για την υγεία, ωστόσο μέχρι και σήμερα ο όρος «προβιοτικό» δεν αποτελεί εγκεκριμένο ισχυρισμό υγείας σύμφωνα με τον κανονισμό (ΕΚ) 1924/2006, επομένως προϊόντα που χαρακτηρίζονται ως προβιοτικά ή ισχυρίζονται πως έχουν συγκεκριμένη επίδραση στην

υγεία δεν μπορούν να πωληθούν εντός της ΕΕ. Συγκεκριμένα, ενώ υποβλήθηκαν περισσότερες από 300 αιτήσεις, η χρήση σχετικών ισχυρισμών απορρίφθηκε λόγω ανεπαρκούς χαρακτηρισμού των στελεχών των μικροοργανισμών. Η μοναδική σχετική επισήμανση που επιτρέπεται είναι η λατινική ονομασία των συγκεκριμένων βακτηριακών στελεχών που περιέχονται, κάτι που πολλές φορές είναι δυσνόητο και δεν διευκολύνει τον καταναλωτή, ωστόσο, καθώς τα τελευταία χρόνια η τάση για προβιοτικά αυξάνεται ραγδαία, κάποια κράτη μέλη έχουν υιοθετήσει εθνικές κατευθυντήριες γραμμές, προκειμένου να επιτραπεί η χρήση του όρου «προβιοτικό» υπό καθορισμένες συνθήκες.

### 2.7.3 Νομοθεσία στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής

Όπως και στην περίπτωση της ΕΕ, δεν υπάρχει στις ΗΠΑ συγκεκριμένη νομοθεσία όσον αφορά τα προβιοτικά αλλά και γενικότερα τα λειτουργικά τρόφιμα. Σύμφωνα με το Ινστιτούτο Ιατρικής της Εθνικής Ακαδημίας Επιστημών των ΗΠΑ τα λειτουργικά τρόφιμα ορίζονται ως «οποιοδήποτε τροποποιημένο τρόφιμο ή συστατικό τροφίμου που μπορεί να προσφέρει οφέλη για την υγεία πέρα από τα παραδοσιακά θρεπτικά συστατικά που περιέχει», ωστόσο αυτός ο ορισμός δεν είναι επίσημα αναγνωρισμένος, επομένως η προσέγγιση στην σχετική νομοθεσία εστιάζει για άλλη μία φορά στον τομέα των ισχυρισμών υγείας και διατροφής (Hickey, 2017). Η Αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) έχει ορίσει τέσσερις κατηγορίες τροφίμων: τα συμβατικά τρόφιμα, τα συμπληρώματα διατροφής, τα τρόφιμα για συγκεκριμένη διατροφική χρήση, και τα φαρμακευτικά τρόφιμα. Ενώ θεωρητικά τα προβιοτικά θα μπορούσαν να ενταχθούν σε όλες τις παραπάνω κατηγορίες, φαίνεται πως δεν υπάρχει κανένα προβιοτικό προϊόν στην κατηγορία των φαρμακευτικών τροφίμων, και ελάχιστα που κατηγοριοποιούνται ως τρόφιμα με συγκεκριμένη διατροφική χρήση.

Επιπλέον, υπάρχουν συγκεκριμένοι ισχυρισμοί υγείας εγκεκριμένοι από το FDA, οι οποίοι συσχετίζουν συγκεκριμένες τροφές με συγκεκριμένους ισχυρισμούς. Το κυριότερο όφελος των προβιοτικών, δηλαδή η προαγωγή της καλής υγείας του εντέρου, σύμφωνα με την νομοθεσία των ΗΠΑ δεν θεωρείται ισχυρισμός που σχετίζεται αποκλειστικά με την υγεία, αλλά περισσότερο ισχυρισμός δομής/λειτουργίας, οι οποίοι επιτρέπεται να χρησιμοποιούνται, αναγράφοντας υποχρεωτικά όμως ότι δεν είναι εγκεκριμένοι από τον FDA (Hickey, 2017).

## 2.7.4 Νομοθεσία στην Ελλάδα

Σχετικά με τους ισχυρισμούς διατροφής και υγείας, η Ελλάδα ακολουθεί τον κανονισμό (ΕΚ) 1924/2006 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, επομένως μπορούν να χρησιμοποιούνται όσοι είναι εγκεκριμένοι από τον EFSA. Ο Ενιαίος Φορέας Ελέγχου Τροφίμων της Ελλάδας (ΕΦΕΤ) το 2009 ορίζει τα προβιοτικά ως «τρόφιμα με ζωντανές καλλιέργειες μικροοργανισμών τα οποία προσλαμβάνόμενα σε επαρκείς ποσότητες συνεισφέρουν στη βελτίωση της ισορροπίας της εντερικής μικροβιακής χλωρίδας με συνολικά ευεργετικά αποτελέσματα για την λειτουργία του εντέρου», ενώ αναγνωρίζει ως προβιοτικά βακτήρια μόνο συγκεκριμένα στελέχη των *Lactobacillus* και *Bifidobacterium* που είναι ικανά να επιβιώνουν στο όξινο περιβάλλον του στομάχου, ωστόσο σύμφωνα με τον παραπάνω Ευρωπαϊκό κανονισμό, αλλά και ανακοίνωση της Διοίκησης του Εθνικού Οργανισμού Φαρμάκων (ΕΟΦ), δεν γίνεται αποδεκτή η αναγραφή του όρου «προβιοτικά» σε κανένα σημείο της παρουσίασης των διατροφικών προϊόντων αρμοδιότητάς του, παρά μόνο του διατροφικού πίνακα, όπου θα πρέπει να αναγράφονται οι περιεχόμενοι μικροοργανισμοί ποσοτικά και ποιοτικά. Επιπλέον, οι αναφορές «προβιοτικά», «με προβιοτικά», κλπ. δεν γίνονται αποδεκτές καθώς θεωρούνται έμμεσοι ισχυρισμοί υγείας, όπως επίσης δεν γίνεται αποδεκτός και κανένας άλλος ισχυρισμός υγείας σχετικός με τα συγκεκριμένα συστατικά («Εθνικός Οργανισμός Φαρμάκων - Ανακοινώσεις Για Λοιπά Προϊόντα,» n.d.).

## 2.7.5 Συμπεράσματα

Παρά το γεγονός ότι εδώ και πολλά χρόνια έχει αναγνωριστεί η επιστημονική βάση για τα οφέλη των προβιοτικών στην υγεία, το σχετικό νομοθετικό σύστημα δεν ακολουθεί την ίδια εξέλιξη, καθώς στην ΕΕ και στις ΗΠΑ ο όρος «προβιοτικό» απαιτείται να πληροί προϋποθέσεις σχεδόν ανάλογες με αυτές των ιατρικών φαρμάκων προκειμένου να εγκριθεί. Αντίστοιχη νομοθεσία ισχύει και στην Ελλάδα όπου ακολουθούνται τα Ευρωπαϊκά πρότυπα, επομένως προκύπτει το ερώτημα πώς θα προωθηθεί στην αγορά ένα καινοτόμο προϊόν ζαχαροπλαστικής με προβιοτικά και ποιιά θα είναι η γενικότερη εξέλιξη της νομοθεσίας με την ανάγκη των καταναλωτών για ξεκάθαρη επισήμανση σχετικών προϊόντων να αυξάνεται.



### Κεφάλαιο 3. Σκοπός της εργασίας

Η επιλογή του ερευνητικού μας θέματος, "καινοτόμα προϊόντα ζαχαροπλαστικής υψηλής διατροφικής αξίας εμπλουτισμένα με προβιοτικά ή/και πρεβιοτικά", απορρέει από την ιδέα που πρότεινε η αξιότιμη καθηγήτρια, Δρ Δ. Χούχουλα, διακεκριμένη ειδικός στον τομέα της χημείας, μικροβιολογίας και τεχνολογίας των τροφίμων. Το κεφάλαιο αυτό διευκρινίζει τη σημασία του θέματος που επιλέξαμε, περιγράφει τον γενικότερο σκοπό της μελέτης μας και περιγράφει τα ερευνητικά ερωτήματα που θα εξεταστούν κατά τη διάρκεια αυτής της ακαδημαϊκής προσπάθειας.

Η πρότασή μας διερευνά την προσθήκη προβιοτικών και πρεβιοτικών σε παραδοσιακά γλυκά ζαχαροπλαστικής, μια καινοτόμα προσπάθεια που γεφυρώνει το χάσμα μεταξύ της μαγειρικής παράδοσης και της σύγχρονης συνείδησης για την υγεία. Η επιλογή να ενισχυθούν αυτά τα αγαπημένα γλυκά με προβιοτικά και πρεβιοτικά βασίζεται στην ανάγκη αναζωογόνησης των πατροπαράδοτων συνταγών, ενώ παράλληλα ανταποκρίνεται στις εξελισσόμενες προτιμήσεις των απαιτητικών καταναλωτών. Καθώς εμβαθύνουμε σε αυτό το θέμα, στοχεύουμε να ξεδιαλύνουμε τη σημασία και τα πιθανά οφέλη του.

Η συγχώνευση των προβιοτικών και πρεβιοτικών με τα παραδοσιακά γλυκά προσφέρει βαθιές προοπτικές, ξεπερνώντας τα όρια της απόλαυσης. Μέσω αυτής της μελέτης, φιλοδοξούμε να παρουσιάσουμε μια επιτακτική υπόθεση για την αναζωογόνηση των παραδοσιακών γλυκών, μετατρέποντάς τα σε μέσα τόσο απόλαυσης όσο και διατροφικής αξίας. Η συνάρθρωση μεταξύ προβιοτικών και πρεβιοτικών όχι μόνο προάγει την υγεία του εντέρου, αλλά ενδεχομένως επηρεάζει και τη συνολική ευεξία και τη ρύθμιση της διάθεσης.

Μέσα από αυτή την ιδέα, συνδυάζεται η διασταύρωση της γαστρονομικής παράδοσης και η νεωτερικότητα, αναδεικνύοντας τον τρόπο με τον οποίο η διατροφική κουλτούρα μπορεί να εξελιχθεί διατηρώντας παράλληλα τον ιστορικό της πλούτο. Πέρα από αυτό, από διατροφική άποψη, η έρευνά ευθυγραμμίζεται με την αυξανόμενη συνειδητοποίηση της βαθιάς αλληλεπίδρασης μεταξύ διατροφής και υγείας. Εμπλουτίζοντας τα παραδοσιακά γλυκά με προβιοτικά και πρεβιοτικά, σκοπεύουμε να συμβάλουμε σε μια στροφή του προτύπου όπου το επιδόρπιο υπερβαίνει τον συνήθη ρόλο του και αναδεικνύεται σε πηγή τόσο απόλαυσης όσο και θρέψης, αλλά και σε μια



αλλαγή στη προσβασιμότητα αυτών των προϊόντων για άτομα με ειδικές διατροφικές παθήσεις που δεν δύναται να καταναλώσουν τα γλυκά ως έχουν, όπως τα άτομα με σακχαρώδη διαβήτη.

Ο γενικός σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να βελτιώσει την ποιότητα, τη διατροφική αξία και τη διάρκεια ζωής των παραδοσιακών γλυκών, ευθυγραμμίζοντάς τα με τη σύγχρονη ζήτηση για πιο υγιεινές διατροφικές επιλογές. Στο πλαίσιο αυτό, η μελέτη μας εξετάζει διάφορα θεμελιώδη ερωτήματα:

- Πώς μπορούν τα παραδοσιακά γλυκά ζαχαροπλαστικής να ενισχυθούν με προβιοτικά και πρεβιοτικά, διατηρώντας παράλληλα την πολιτιστική τους σημασία;
- Ποια είναι τα πιθανά οφέλη για την υγεία από τον συνδυασμό αυτών των στοιχείων και πώς συμβάλλουν στην ανάπτυξη πιο υγιεινών επιλογών γλυκών;
- Με ποιους τρόπους αυτή η έρευνα επηρεάζει τη μαγειρική καινοτομία και τη διατροφή και ποια είναι η ευρύτερη σημασία της στον τομέα της επιστήμης και της τεχνολογίας των τροφίμων;

## Κεφάλαιο 4: Υλικά & Μέθοδοι

### 4.1 Εισαγωγή

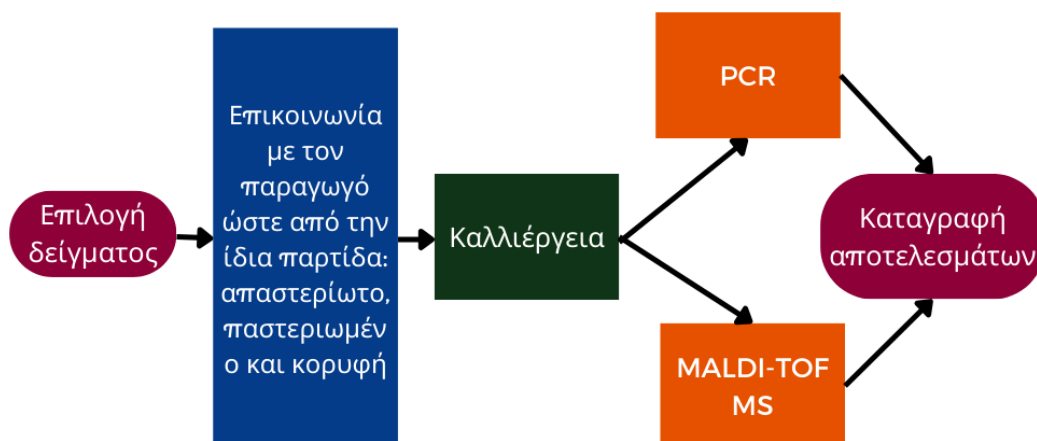
Κατά την ανάπτυξη του προτεινόμενου εγχειρήματος, η αρχική σκέψη που καθοδήγησε τη διαδικασία επιλογής των σταδίων ήταν η ανάγκη για μια προσεκτική εξέταση του κατάλληλου υποστρώματος. Καθώς επικεντρωθήκαμε στον τομέα των γλυκών, η πρώτη μας ερώτηση αφορούσε την παρουσία προβιοτικών βακτηρίων στο επιλεγμένο υπόστρωμα. Αναγνωρίσαμε ότι το γάλα, το οποίο αποτελεί το πιο διαδεδομένο υλικό στα γλυκά, περιλαμβάνει φυσικά προβιοτικά βακτήρια. Συνεπώς, καταφέραμε να αποκτήσουμε μια αρχική κατανόηση σχετικά με την ύπαρξη προβιοτικών στο υπόστρωμα και τα είδη τους.

Προκειμένου να συνεχίσουμε με τη μελέτη μας, έθεσαμε τρία βασικά ερωτήματα:

- Υπάρχουν ήδη προβιοτικά βακτήρια στο υπόστρωμα;
- Ποια ακριβώς είναι αυτά τα προβιοτικά βακτήρια;
- Υπάρχει ανάγκη για την προσθήκη ενός starter culture, και, εάν ναι, ποια στελέχη μπορούν να εισαχθούν στο υπόστρωμα χωρίς να επιφέρουν αρνητικές οργανοληπτικές επιπτώσεις;

Ακολουθεί ένα σχεδιάγραμμα του πλάνου για τα πρώτα βήματα στον έλεγχο υποστρώματος

## Έλεγχος γάλακτος



Σχήμα 8: Διάγραμμα ροής για τον έλεγχο γάλακτος ως κατάλληλο non-starter υπόστρωμα για την μελέτη.

Στο παραπάνω διάγραμμα ροής παρατηρούμε δύο τρόπους ανάλυσης: PCR και MALDI-TOF MS. Η PCR (Μοριακή Μέθοδος Ανάλυσης) προσφέρει ακρίβεια με τη διαφορά ότι πρέπει να επιλεγθούν κατάλληλοι εκκινητές. Ωστόσο, λόγω της σχετικής εξοικείωσής μας με το δείγμα, μπορούμε να εξάγουμε πληροφορίες είτε από την ελληνική βιβλιογραφία σχετικά με τα γάλατα είτε από τους προμηθευτές, προκειμένου να επιλέξουμε τους κατάλληλους εκκινητές.

Αντίθετα, η μέθοδος ανάλυσης με τη χρήση MALDI-TOF MS αναδεικνύεται ως μια πιο ακριβής προσέγγιση. Σε αυτήν την περίπτωση, δεν απαιτούνται εκκινητές, και ο αλγόριθμος που χρησιμοποιείται στο σύστημα έχει ευρύτερη εφαρμογή. Σημειώνουμε, ωστόσο, ότι το εργαστήριο ανάλυσης στο Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής προσφέρει μόνο τη μέθοδο PCR, ενώ στην Ελλάδα γενικότερα, αυτή η μέθοδος είναι διαθέσιμη μόνο σε περιορισμένα δημόσια νοσοκομεία.

Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι υπάρχει περιορισμός στο τι μπορεί να αναλυθεί εντός του εργαστηρίου τροφίμων, καθώς μετά την καταγραφή περεταίρω διεργασία μπορεί να γίνει μόνο σε ειδικά εργαστήρια παραγωγής τα οποία θα αναλύσουμε καλύτερα σε επόμενο κεφάλαιο.

## 4.2 Υλικά

Τρυβλία

MRS agar

- Το κατάλληλο υπόστρωμα για καλλιέργεια Lactobacilli και ορισμένα στελέχη Lactococcus και Pediococcus.

Κυκλοεξαμίδιο

- Εμποδίζει σε μικρές ποσότητες εντός του υποστρώματος την ανάπτυξη μυκήτων.

Γάλα νωπό, παστεριωμένο

Φιάλες 500mL

Κλίβανος επώασης

Κλίβανος αποστείρωσης

Λύχνος Bunsen

Πιπέτα

Τιτς πιπέτας

### 4.3 Μέθοδοι λήψης δειγμάτων και χειρισμού

Μετά από επικοινωνία με διάφορους παραγωγούς, αναδείξαμε δύο καταλληλότερους προμηθευτές που διέθεταν ακατέργαστο και παστεριωμένο γάλα από την ίδια παρτίδα: το Μοναστήρι και τα Γάλατα Κουκάκη. Η παραλαβή του γάλακτος πραγματοποιήθηκε την ημέρα της παραγωγής, της παστερίωσης και της εμφιάλωσης, και στη συνέχεια μεταφέρθηκε σε οικιακό ψυγείο προκειμένου να διατηρηθεί σε χαμηλή θερμοκρασία έως τη μεταφορά στο εργαστήριο. Το γάλα υποβλήθηκε σε μία αρχική δειγματοληψία για καλλιέργεια την ίδια ημέρα και σε μία δεύτερη δειγματοληψία τρεις ημέρες αργότερα, μετά από αποθήκευση στην κατάψυξη.

### 4.4 Εργαστηριακό πείραμα

Η αναλυτική διαδικασία που ακολουθήθηκε 3 φορές είναι η παρακάτω:

- Δημιουργία αραιωτικού υγρού σε σωλήνες.
- Δημιουργία υποστρώματος MRS Agar σε φιάλες 500mL.
- Αποστείρωση τρυβλίων, φιαλών υποστρώματος, αραιωτικού υγρού και τιτς πιπετών για 90 λεπτά στον κλίβανο στους 100°C.

- Μετά την αποστείρωση και ακριβώς πριν την τοποθέτηση υποστρώματος στα τρυβλία γίνεται προσθήκη κυκλοεξαμιδίου ποσότητας 2,5mL/500mL.
- Μετά την προσθήκη κυκλοεξαμιδίου εντός της φιάλης, δεν μπορεί να γίνει ψύξη ή να θερμανθεί ξανά, οπότε πρέπει να στρωθούν άμεσα τα τρυβλία εντός του θαλάμου.
- Αφήνονται τα τρυβλία με το υπόστρωμα να στερεοποιηθούν.
- Απολύμανση της επιφάνειας εργασίας.
- Προετοιμασία χώρου με λύχνους Bunsen και ρύθμιση πιπέτας στα 10mL.
- Καταγράφεται πάνω στα τρυβλία ποιο δείγμα έχουμε, ημερομηνία και αραιώση. Για κάθε δείγμα στρώνονται δύο φορές σε διαφορετικά τρυβλία και για κάθε αραιώση (Α και Β) για αποφυγή σφαλμάτων.
- Τοποθέτηση των τρυβλίων σε σειρά και πραγματοποιούνται οι αραιώσεις ( $10^0$  έως  $10^{-5}$  για παστεριωμένο γάλα,  $10^0$  έως  $10^{-6}$  για νωπό γάλα).
- Ρύθμιση πιπέτας στα 1000μL.
- Με αναμμένο λύχνο Bunsen, ξεκινώντας από την μεγαλύτερη αραιώση εμβολιάζουμε 1mL σε δύο τρυβλία για κάθε αραιώση με επιφανειακή εξάπλωση.
- Συγκεντρώνονται τα τρυβλία και τοποθετούνται για επώαση στους 37°C για 72 ώρες σε αναερόβιες συνθήκες.
- Μετά τις 72 ώρες γίνεται καταγραφή αποτελεσμάτων και επιλογή τρυβλίων για PCR.

#### 4.5 Ποιοτικός έλεγχος

Σκοπός των διπλών τρυβλίων για κάθε αραιώση είναι η πρόληψη του σφάλματος που προκαλείται από την καταστροφή των βακτηρίων λόγω της έκθεσής τους σε υψηλή θερμοκρασία από τη φλόγα στο γυάλινο διανεμητή.

Για τις δύο διαφορετικές δοκιμές χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικοί τρόποι διασφάλισης αναερόβιων συνθηκών. Στο πρώτο εντός της φιάλης που τοποθετήθηκαν τα τρυβλία τοποθετήσαν αναμμένα κεριά για να καταναλώσουν το οξυγόνο. Στη δεύτερη δοκιμή χρησιμοποιήσαμε φακέλους που διασφαλίζουν αναερόβιες συνθήκες εντός της φιάλης.



## Κεφάλαιο 5: Αποτελέσματα & Συζήτηση

### 5.1 Αποτελέσματα

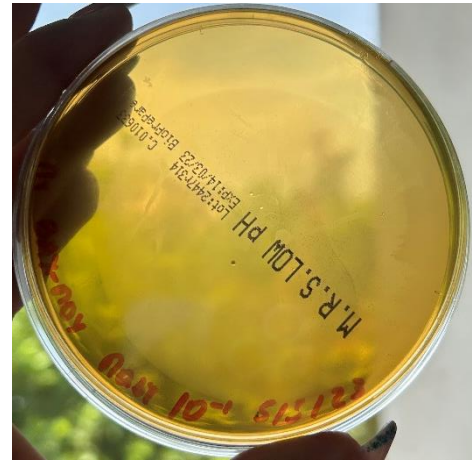
Τα αποτελέσματα θα αναλυθούν ανά δοκιμή.

#### 5.1.1 Δοκιμή 1<sup>η</sup>

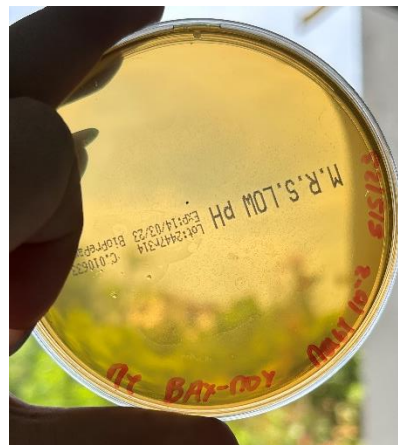
Η αρχική δοκιμή πραγματοποιήθηκε κατά την παραλαβή του δείγματος από το μοναστήρι, με την εφαρμογή του προκαθορισμένου πρωτοκόλλου που είχε αναλυθεί ενδελεχώς. Ωστόσο, σημειώνεται ότι τα τρυβλία που χρησιμοποιήθηκαν για τη δοκιμή παρασκευάστηκαν από το εργαστήριο τροφίμων, καθώς ήταν διαθέσιμο το MRS agar ως υπόστρωμα, χωρίς όμως την παρουσία κυκλοεξαμιδίου. Μετά από 72 ώρες, καταγράφηκαν τα εξής αποτελέσματα:



Εικόνα 3: Νωπό και παστεριωμένο στην αραιώση  $10^0$



Εικόνα 4: Νωπό και παστεριωμένο στην αραιώση  $10^{-1}$



Εικόνα 5: Νωπό και παστεριωμένο στην αραιώση  $10^{-3}$

Τα μόνα τρυβλία τα οποία έδωσαν αποικίες ορατές με το γυμνό μάτι ήταν οι αραιώσεις  $10^0$  (Αρχ) και  $10^{-1}$  του νωπού δείγματος και η αραιώση  $10^0$  (Αρχ) του παστεριωμένου δείγματος. Επιπλέον, ανάλογα με τον τρόπο ανάλυσης, ορισμένα αποτελέσματα δεν μπορούν να θεωρηθούν μετρήσιμα. Συγκεκριμένα, σύμφωνα με την μικροβιολογία τροφίμων, για να θεωρηθεί ένα τρυβλίο μετρήσιμο πρέπει να διακριθούν πάνω από 30 αποικίες. Ωστόσο, στο πλαίσιο των πειραματικών μας συνθηκών, ακόμη και στο τρυβλίο με την υψηλότερη αραιώση (νωπό  $10^0$ ) μετρούνται το πολύ 21. Κατά συνέπεια, αυτό το τρυβλίο δεν μπορεί να θεωρηθεί μετρήσιμο, καθώς δεν πληροί τα απαιτούμενα κριτήρια.

Θεωρήσαμε ότι καθώς το δείγμα μας ήταν φρέσκο μπορεί στη δεύτερη δοκιμή να έβγαζε μετρήσιμα αποτελέσματα και ένα άλλο πιθανό σφάλμα πέρα από αυτά που



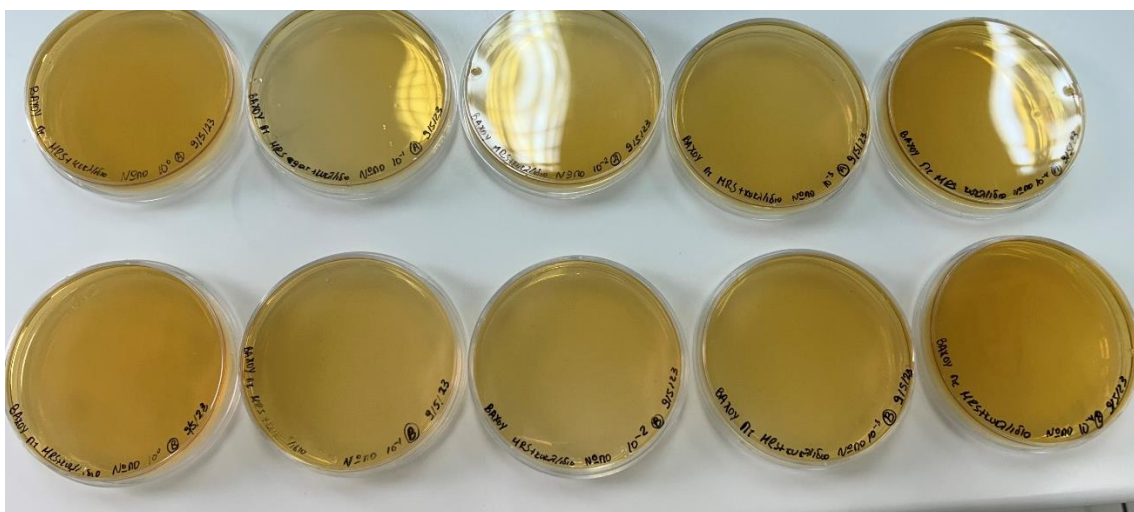
αναφέρονται στο 4.6, είναι το γεγονός ότι τα τρυβλία ήταν έτοιμα και πιθανά καιρό μέσα στο ψυγείο. Αυτό ενδέχεται να έχει επηρεάσει την ανάπτυξη των αποικιών και να έχει οδηγήσει σε μη μετρήσιμα αποτελέσματα.

Εν κατακλείδι, ενώ παρέχονται ορισμένες αποικίες πιθανών λακτοβακίλλων στο πρώτο τρυβλίο, προτείνουμε ότι οποιαδήποτε δοκιμή PCR πρέπει να διενεργηθεί σε τρυβλία που πληρούν τα απαιτούμενα κριτήρια μετρησιμότητας, όπως ορίζονται στη μικροβιολογία τροφίμων. Αυτό θα εξασφαλίσει την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων και θα αποφύγει τη δυνατότητα παραπλανητικών ερμηνειών των δεδομένων.

### 5.1.2 Δοκιμή 2<sup>η</sup>

Η δεύτερη δοκιμή έγινε την ημέρα που λάβαμε τα αποτελέσματα της πρώτης, δηλαδή 72 ώρες μετά την παραλαβή του δείγματος. Αποφασίστηκε να γίνει η επόμενη δοκιμή μόνο με το νωπό δείγμα καθώς αυτό έδειξε τα πιο επιθυμητά αποτελέσματα και θεωρήσαμε ότι πιθανά πάλι το παστεριωμένο γάλα θα προσφέρει αρνητικά αποτελέσματα, με τις αραιώσεις οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για επίστρωση να είναι οι  $10^0$  έως  $10^{-4}$ .

Αμέσως μετά την επίστρωση των δειγμάτων στην πρώτη δοκιμή, τα δείγματα αποθηκεύτηκαν σε κατάψυξη. Για τη διεξαγωγή της δεύτερης δοκιμής, η φιάλη με το δείγμα υποβλήθηκε σε υδατόλουτρο προκειμένου να αποψυχθεί επαρκώς, επιτρέποντας την επίστρωση και τις αραιώσεις. Στη συνέχεια, ακολουθήθηκε η διαδικασία όπως περιγράφεται στο προηγούμενο κεφάλαιο.



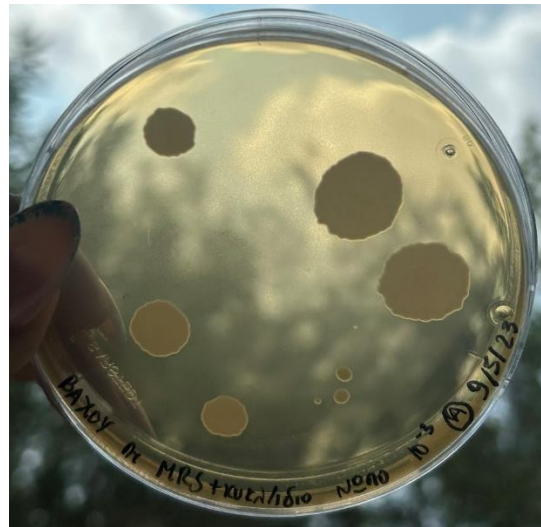
Εικόνα 6: Τα τρυβλία της δεύτερης δοκιμής πριν την επίστρωση.



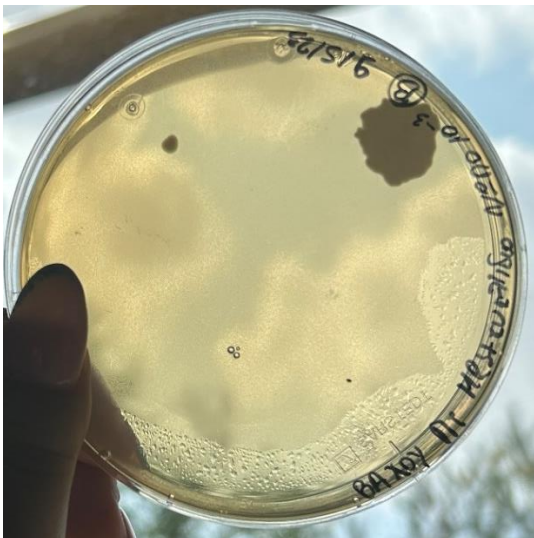
Εικόνα 7: Νωπό στις αραιώσεις 100 (A) και 10<sup>-1</sup> (A)



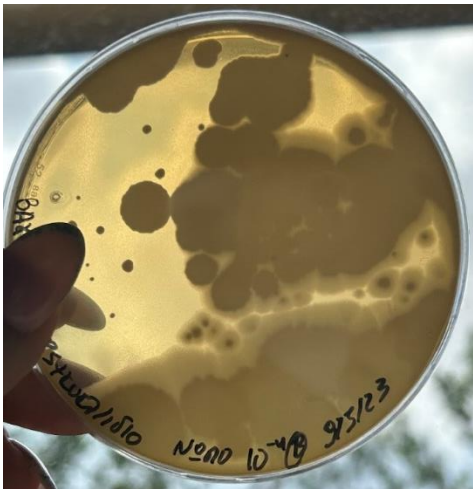
Εικόνα 8: Νωπό στις αραιώσεις 10<sup>-1</sup> (B) και 10<sup>-2</sup> (A)



Εικόνα 9: Νωπό στις αραιώσεις 10-2 (B) και 10-3 (A)



Εικόνα 10: Νωπό στις αραιώσεις 10-3 (B) και 10-4 (A)



Εικόνα 11: Νωπό στην αραιώση 10<sup>-4</sup> (B)

Τα αποτελέσματα αυτής της δοκιμής ήταν ξανά μη μετρήσιμα αλλά για άλλο λόγο. Τα περισσότερα τρυβλία έδωσαν ανάπτυξη η οποία δεν συνάδει με αυτή των προβιοτικών βακτηρίων, αλλά ζυμών - μυκήτων.

Αυτό μπορεί να αποδοθεί σε πολλούς παράγοντες, όπως η απόκλιση από πλήρεις αναερόβιες συνθήκες κατά την επώαση, ελλιπή απολύμανση του εργασιακού περιβάλλοντος, και την πιθανή παρουσία μυκήτων στο δείγμα νωπού γάλακτος, είτε στο υδατόλουτρο, είτε ακόμη και κατά τη διαδικασία κατάψυξης πριν τη στερεοποίηση του δείγματος μέσα στη φιάλη. Το μοναδικό τρυβλίο που δεν εμφάνισε ανάπτυξη ζυμών - μυκήτων (το A της αραιώσης 10<sup>-1</sup>) ίσως οφείλεται σε ένα σφάλμα στη διαδικασία θέρμανσης του γυάλινου διανεμητή, όπου η θερμοκρασία δεν ήταν αρκετά υψηλή για να εξαλείψει τους μύκητες και τις ζύμες, ενώ παράλληλα δεν επηρέασε τα βακτήρια. Επιπλέον, η ποσότητα κυκλοεξαμιδίου στο δείγμα φαίνεται να ήταν ανεπαρκής για να προσφέρει αποτελεσματική αναστολή της ανάπτυξης των μυκήτων και των ζυμών.

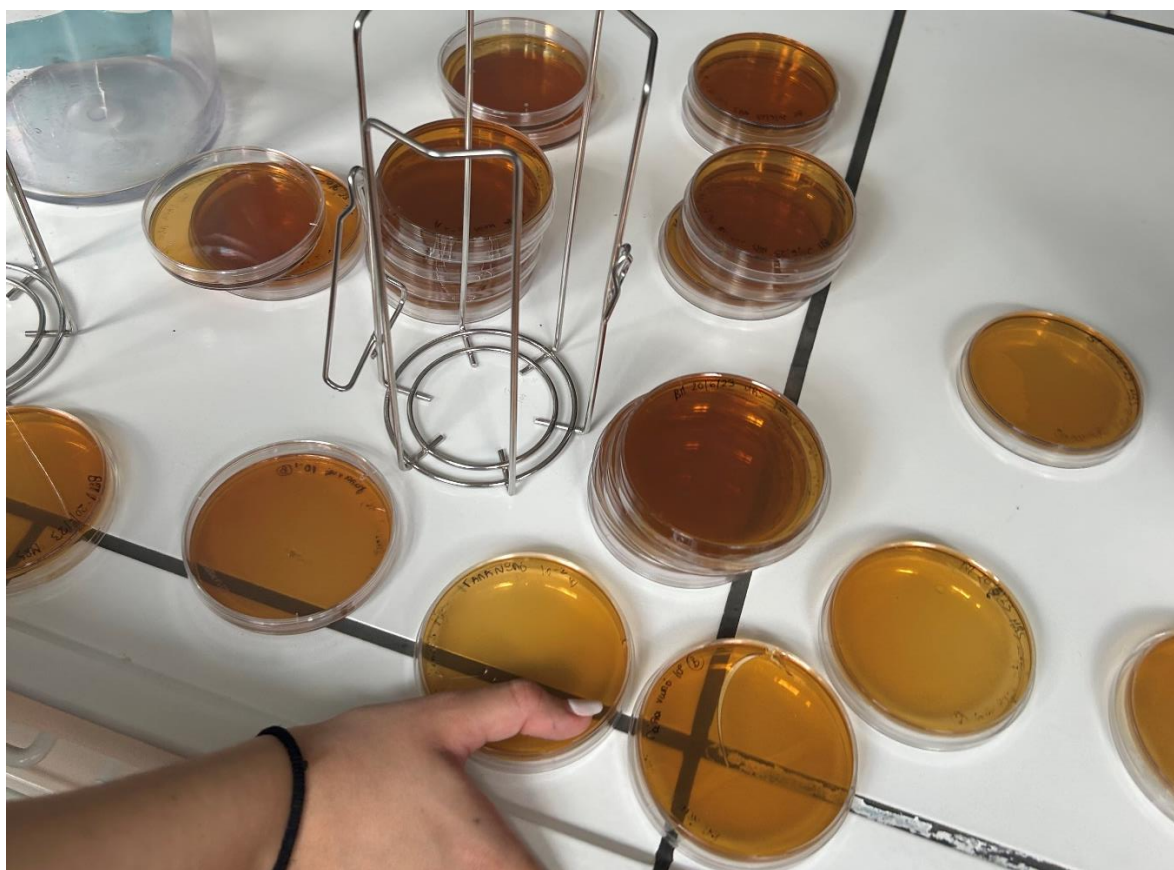
Συνεπώς, βάσει των παρατηρήσεων αυτών, η δοκιμή όχι μόνο απορρίπτεται, αλλά και το συγκεκριμένο δείγμα θεωρείται ακατάλληλο για τον σκοπό της μελέτης. Κατά συνέπεια, απαιτείται η διεξαγωγή νέας δοκιμής με αυστηρότερα πρωτόκολλα και ελέγχους προκειμένου να εξασφαλιστούν αξιόπιστα αποτελέσματα που θα μπορέσουν να χρησιμοποιηθούν για την περαιτέρω ανάλυση και ερμηνεία της μελέτης.

### 5.1.3 Δοκιμή 3<sup>η</sup>



Για την Τρίτη δοκιμή παραλάβαμε δείγματα από τα γάλατα Κουκάκη. Έγιναν αραιώσεις  $10^0$  έως και  $10^{-5}$ , με δύο τρυβλία για κάθε αραιώση, δειγμάτων νωπού και παστεριωμένου γάλακτος από την ίδια παρτίδα.

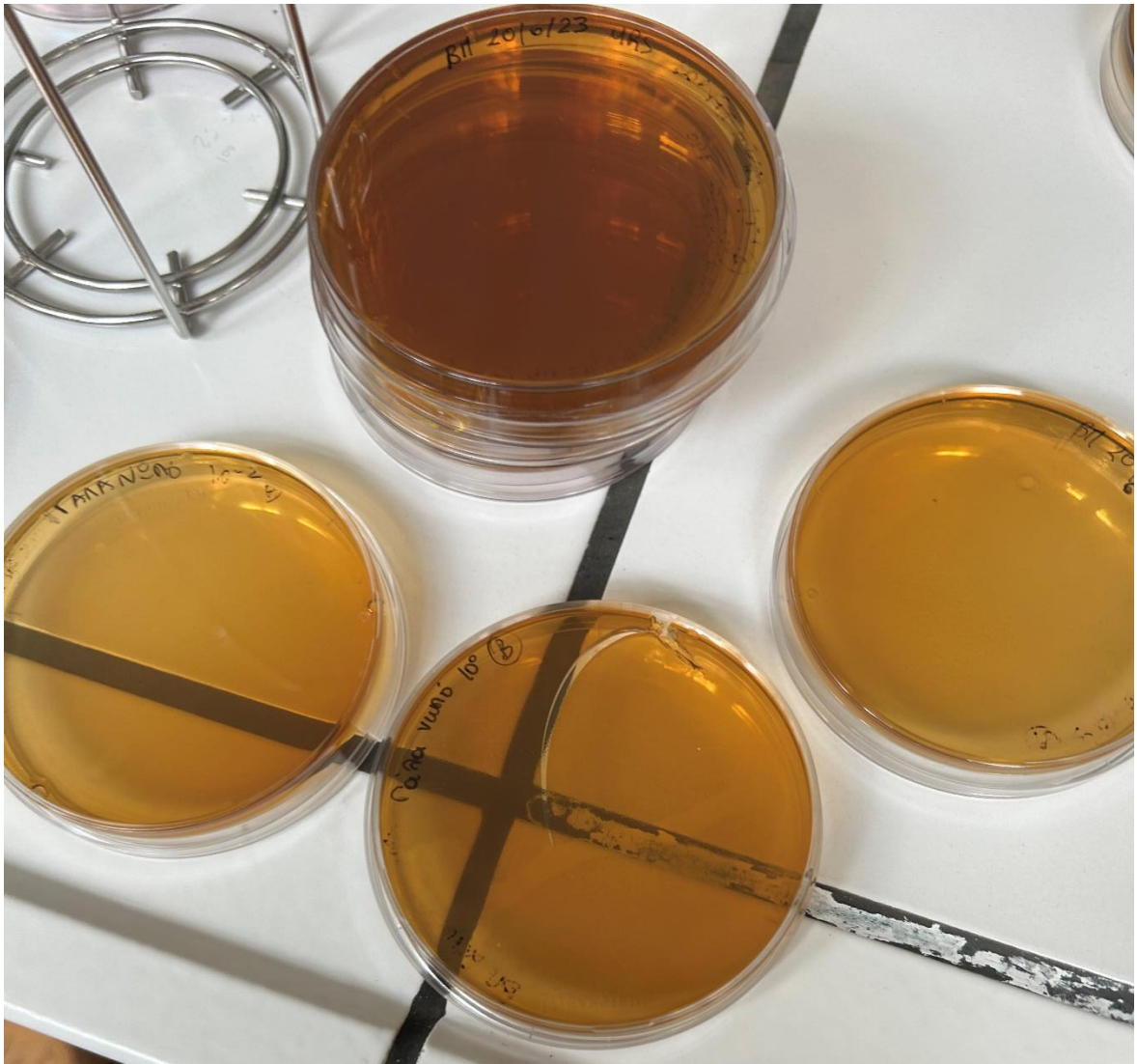
Η διαδικασία που ακολουθήσαμε βασίστηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο, με τη χρήση φακέλων διασφάλισης αναερόβιων συνθηκών εντός των φιαλών κατά τη διάρκεια της επώασης. Παράλληλα, αποφασίσαμε να αυξήσουμε την ποσότητα κυκλοξαμιδίου που προστέθηκε στο υπόστρωμα από 2,5 mL σε 5 mL, με σκοπό την αντιμετώπιση πιθανών προβλημάτων που προέκυψαν από την προηγούμενη δοκιμή. Αυτή η απόφαση λήφθηκε μετά από συζητήσεις με τους καθηγητές του εργαστηρίου και στοχεύει στην αύξηση της αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων.



Εικόνα 12: Τρυβλία τρίτης δοκιμής μετά την επώαση



Εικόνα 13: Τρυβλία τρίτης δοκιμής μετά την επώαση



Εικόνα 14: Τρυβλία τρίτης δοκιμής μετά την επώαση

Σε όλα τρυβλία, από την πιο μικρή έως την πιο μεγάλη αραιώση, παρατηρήθηκε απουσία ανάπτυξης μικροοργανισμών. Σε ορισμένα από αυτά τα τρυβλία, παρατηρήθηκε η αύξηση της υγρασίας, ενώ σε ένα τρυβλίο απουσίας ανάπτυξης αντιληφθήκαμε βλάβη στο υπόστρωμα.

Πέραν των σφαλμάτων που αναγράφονται στο 4.6, τα παρακάτω μπορεί να είναι πιθανά για την λήψη μηδενικών αποτελεσμάτων:

- Ορισμένοι μικροοργανισμοί μπορεί να έχουν μεγαλύτερες περιόδους επώασης και 72 ώρες μπορεί να μην επαρκούν για να δημιουργήσουν ορατές αποικίες.
- Είναι επίσης πιθανό να υπήρχαν προβλήματα με το ίδιο το άγαρ MRS, όπως μια ληγμένη ή ακατάλληλα παρασκευασμένη παρτίδα. Αυτό θα



μπορούσε να οδηγήσει τόσο σε έλλειψη ανάπτυξης όσο και σε ανωμαλίες στο μέσο καλλιέργειας (όπως σπάσιμο).

- Η ποσότητα του κυκλοεξαμιδίου που προστέθηκε ενδέχεται να υπερβεί την αναγκαία ποσότητα, οδηγώντας σε ολική αναστολή της ανάπτυξης των μικροοργανισμών.

Αν και η ανακολουθία των γεγονότων με το κυκλοεξαμίδιο φαίνεται να μην είναι πλήρως συμβατή με την απουσία ανάπτυξης, δεν μπορούμε να αποκλείσουμε την πιθανότητα αυτού του σφάλματος.

## 5.2 Συζήτηση

Από τα αποτελέσματα και των τριών δοκιμών συμπεραίνουμε ότι το γάλα δεν έχει αρκετά cfu προβιοτικών βακτηρίων χωρίς ζύμωση όπως π.χ. στο γιαούρτι. Με την εργαστηριακή δοκιμή αυτή, δηλαδή καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι είναι αναγκαία η προσθήκη καλλιιεργειών starter όταν χρησιμοποιείται το γάλα ως υπόστρωμα, π.χ. σε προϊόντα όπως η κρέμα.

Χρειάζεται μετρήσιμη ποσότητα εντός του υποστρώματος έτσι ώστε να επιβιώσει μαγειρικές διαδικασίες που μπορεί να έχουν για λίγη ώρα υψηλότερη θερμοκρασία από την βέλτιστη θερμοκρασία ανάμειξης (π.χ. ανακάτεμα υλικών σε μέτρια θερμοκρασία στο κανταΐφι για την παραγωγή κρέμας).

Παρά τυχόν πιθανά σφάλματα που μπορεί να εμφανίστηκαν κατά τη διάρκεια της εργαστηριακής δοκιμής, θεωρούμε ότι οι τρεις αυτές δοκιμές αντιπροσωπεύουν ικανοποιητικά τα δείγματα και, γενικότερα, τις παραγωγές γάλακτος στην ελληνική αγορά.



## Κεφάλαιο 6: Συμπεράσματα και υποδείξεις για περαιτέρω έρευνα

Στο πλαίσιο της παρούσας ακαδημαϊκής έρευνας, έχουμε τον στόχο να εξετάσουμε την ανάπτυξη παραδοσιακών προϊόντων ζαχαροπλαστικής που ενισχύονται με προβιοτικά και πρεβιοτικά, με σκοπό τη βελτίωση της διατροφής και τη σύνδεση της γαστρονομικής απόλαυσης με έναν υγιεινό τρόπο ζωής. Μέσω της εκτενούς ανασκόπησης της βιβλιογραφίας, επικεντρωθήκαμε στην ανάλυση των διαφόρων ειδών προβιοτικών και πρεβιοτικών και την εξέταση των δυνητικών τους εφαρμογών στα τρόφιμα. Σημαντικά οφέλη προέκυψαν από την κατανάλωση προβιοτικών τροφίμων, καθιστώντας την ανάπτυξη αυτών των προϊόντων ακόμη πιο ενδιαφέρουσα.

Ειδικότερα, εξετάσαμε τη χρήση του γάλακτος ως κύριου συστατικού στην παρασκευή παραδοσιακών γλυκών, και πραγματοποιήσαμε πειράματα για να διερευνήσουμε τον ρόλο του ως υπόστρωμα για την ενσωμάτωση προβιοτικών. Σε αυτήν τη διαδικασία, διαπιστώσαμε την αναγκαιότητα προσθήκης καλλιεργειών εκκίνησης προκειμένου να εξασφαλιστεί η επαρκής παρουσία των προβιοτικών.

Αυτή η πτυχιακή εργασία εξυπηρετεί ως αρχική βιβλιογραφική ανασκόπηση/δοκιμή για την καινοτομία στην ελληνική ζαχαροπλαστική. Στη συνέχεια, υπάρχει ανάγκη για αναλυτική έρευνα πάνω σε αυτά τα προϊόντα και δυνητικά την δυνατότητα ανύψωσης της θρεπτικής τους αξίας σε συνδυασμό με την μετατροπή τους σε λειτουργικά τρόφιμα. Πρέπει να ακολουθηθούν διαφορετικές μέθοδοι, όπως η ενθυλάκωση μικροοργανισμών, και ύστερα παρατήρηση των αποτελεσμάτων.

### Βιβλιογραφία-Αναφορές

- Abenavoli, L., Scarpellini, E., Colica, C., Boccuto, L., Salehi, B., Sharifi-Rad, J., Aiello, V., Romano, B., Lorenzo, A. De, Izzo, A. A., & Capasso, R. (2019). Gut Microbiota and Obesity: A Role for Probiotics. *Nutrients*, *11*(11), 2690. <https://doi.org/10.3390/nu11112690>
- Aboufazli, F., & Baba, A. S. (2015). Effect of Vegetable Milk on Survival of Probiotics in Fermented Ice Cream under Gastrointestinal Conditions. *Food Science and Technology Research*, *21*(3), 391–397. <https://doi.org/10.3136/fstr.21.391>
- Allen, S., Martinez, E. G., Gregorio, G. V., & Dans, L. F. (2010). Probiotics for treating acute infectious diarrhoea. *The Cochrane Library*. <https://doi.org/10.1002/14651858.cd003048.pub3>
- Anekella, K., & Orsat, V. (2013). Optimization of microencapsulation of probiotics in raspberry juice by spray drying. *LWT - Food Science and Technology*, *50*(1), 17–24. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2012.08.003>
- Ansari, F., Alian Samakkhah, S., Bahadori, A., Jafari, S. M., Ziaee, M., Khodayari, M. T., & Pourjafar, H. (2023).

- Health-promoting properties of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* as a probiotic; characteristics, isolation, and applications in dairy products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 63(4), 457–485. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1949577>
- Aragón-Alegro, L. C., Alegro, J. H. A., Cardarelli, H. R., Chiu, M., & Saad, S. M. I. (2007). Potentially probiotic and synbiotic chocolate mousse. *LWT*, 40(4), 669–675. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2006.02.020>
- Araújo, T. F., & Ferreira, C. L. de L. F. (2013). The genus *Enterococcus* as probiotic: safety concerns. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 56(3), 457–466. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132013000300014>
- Aryana, K. J., & Olson, D. W. (2017). A 100-Year Review: Yogurt and other cultured dairy products. *Journal of Dairy Science*, 100(12), 9987–10013. <https://doi.org/10.3168/JDS.2017-12981>
- Auclair, J. L., Frappier, M., & Millette, M. (2015). *Lactobacillus acidophilus* CL1285, *Lactobacillus casei* LBC80R, and *Lactobacillus rhamnosus* CLR2 (Bio-K+): Characterization, Manufacture, Mechanisms of Action, and Quality Control of a Specific Probiotic Combination for Primary Prevention of *Clostridium difficile* Infection. *Clinical Infectious Diseases*, 60(suppl\_2), S135–S143. <https://doi.org/10.1093/cid/civ179>
- Azad, Md. A. K., Sarker, M., Li, T., & Yin, J. (2018). Probiotic Species in the Modulation of Gut Microbiota: An Overview. *BioMed Research International*, 2018, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2018/9478630>
- Babel, F. J., & Hammer, B. W. (1944). Action of Butter Cultures in Butter: A Review. *Journal of Dairy Science*, 27(2), 79–141. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(44\)92571-3](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(44)92571-3)
- Bacteria in milk, cream and butter. (1889). *Second Annual Report of the Storrs School Agricultural Experiment Station*.
- Barat, A., & Özcan, T. (2017). Growth of probiotic bacteria and characteristics of fermented milk containing fruit matrices. *International Journal of Dairy Technology*, 71, 120–129. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12391>
- Barberi, C., Campana, S., Pasquale, C. De, Khorasgani, M. R., Ferlazzo, G., & Bonaccorsi, I. (2015). T cell polarizing properties of probiotic bacteria. *Immunology Letters*, 168(2), 337–342. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2015.11.005>
- Berčič, P., Verdú, E. F., Foster, J. A., Macri, J., Potter, M., Huang, X., Malinowski, P., Jackson, W., Blennerhassett, P., Neufeld, K. M., Lü, J., Khan, W. I., Corthésy-Theulaz, I., Cherbut, C., Bergonzelli, G., & Collins, S. M. (2010). Chronic Gastrointestinal Inflammation Induces Anxiety-Like Behavior and Alters Central Nervous System Biochemistry in Mice. *Gastroenterology*, 139(6), 2102–2112.e1. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.06.063>
- Bernardeau, M., Vernoux, J. P., Henri-Dubernet, S., & Guéguen, M. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. *International Journal of Food Microbiology*, 126(3), 278–285. <https://doi.org/10.1016/j.IJFOODMICRO.2007.08.015>
- Burks, A. W., Tang, M. L. K., Sicherer, S. H., Muraro, A., Eigenmann, P., Ebisawa, M., Fiocchi, A., Chiang, W. C., Beyer, K., Wood, R. A., Hourihane, J., Jones, S. M., Lack, G., & Sampson, H. A. (2012). ICON: Food allergy. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 129(4), 906–920. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.02.001>
- Calantone, R. J., Cavusgil, S. T., & Zhao, Y. (2002). Learning orientation, firm innovation capability, and firm performance. *Industrial Marketing Management*, 31(6), 515–524. [https://doi.org/10.1016/S0019-8501\(01\)00203-6](https://doi.org/10.1016/S0019-8501(01)00203-6)
- Carr, F. J., Chill, D., & Maida, N. (2002). The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. *Critical Reviews in Microbiology*, 28(4), 281–370. <https://doi.org/10.1080/1040-840291046759>
- Cavanagh, D., Fitzgerald, G. F., & McAuliffe, O. (2015). From field to fermentation: The origins of *Lactococcus lactis* and its domestication to the dairy environment. *Food Microbiology*, 47, 45–61. <https://doi.org/10.1016/j.FM.2014.11.001>
- Ciprandi, G., Vizzaccaro, A., Cirillo, I., & Tosca, M. (2005). *Bacillus clausii* effects in children with allergic rhinitis. *Allergy*, 60(5), 702–703. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2005.00722.x>
- Costabile, A., Fava, F., Röytiö, H., Forssten, S. D., Olli, K., Klievink, J., Rowland, I., Ouwehand, A. C., Rastall, R. A., Gibson, G. R., & Walton, G. (2011). Impact of polydextrose on the faecal microbiota: a double-blind, crossover, placebo-controlled feeding study in healthy human subjects. *British Journal of Nutrition*,

- 108(3), 471–481. <https://doi.org/10.1017/s0007114511005782>
- Cribby, S., Taylor, M. K., & Reid, G. (2008). Vaginal Microbiota and the Use of Probiotics. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2008, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2008/256490>
- Cristofori, F., Indrio, F., Miniello, V. L., Angelis, M. De, & Francavilla, R. (2018). Probiotics in Celiac Disease. *Nutrients*, 10(12), 1824. <https://doi.org/10.3390/nu10121824>
- Dargahi, N., Johnson, J., Donkor, O., Vasiljevic, T., & Apostolopoulos, V. (2019). Immunomodulatory effects of probiotics: Can they be used to treat allergies and autoimmune diseases? *Maturitas*, 119, 25–38. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2018.11.002>
- Davani-Davari, D., Negahdaripour, M., Karimzadeh, I., Seifan, M., Mohkam, M., Masoumi, S. J., & Berenjian, A. (2019). Prebiotics: Definition, Types, Sources, Mechanisms, and Clinical Applications. *Foods*, 8(3), 92. <https://doi.org/10.3390/foods8030092>
- Davidson, R. H., Duncan, S. E., Hackney, C. R., Eigel, W. N., & Boling, J. W. (2000). Probiotic Culture Survival and Implications in Fermented Frozen Yogurt Characteristics. *Journal of Dairy Science*, 83(4), 666–673. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(00\)74927-7](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(00)74927-7)
- Davoren, M., Liu, J., Castellanos, J., Rodríguez-Malavé, N. I., & Schiestl, R. H. (2018). A novel probiotic, *Lactobacillus johnsonii* 456, resists acid and can persist in the human gut beyond the initial ingestion period. *Gut Microbes*, 10(4), 458–480. <https://doi.org/10.1080/19490976.2018.1547612>
- de Paula, A. T., Jeronymo-Ceneviva, A. B., Todorov, S. D., & Penna, A. L. B. (2015). The Two Faces of *Leuconostoc mesenteroides* in Food Systems. *Food Reviews International*, 31(2), 147–171. <https://doi.org/10.1080/87559129.2014.981825>
- de Rezende Rodovalho, V., Lucas Neres Rodrigues, D., Jan, G., Le Loir, Y., Ariston de Carvalho Azevedo, V., & Guédon, E. (2022). *Propionibacterium freudenreichii* : General Characteristics and Probiotic Traits. In *Prebiotics and Probiotics - From Food to Health*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.97560>
- Deosarkar, S. S., Kalyankar, S. D., Pawshe, R. D., & Khedkar, C. D. (2016). Ice Cream: Composition and Health Effects. In *Elsevier eBooks*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-384947-2.00385-8>
- Devriese, L., Baele, M., & Butaye, P. (2006). The Genus *Enterococcus*. In *The Prokaryotes* (pp. 163–174). Springer US. [https://doi.org/10.1007/0-387-30744-3\\_5](https://doi.org/10.1007/0-387-30744-3_5)
- Dimitrellou, D., Kandyli, P., & Kourkoutas, Y. (2019). Assessment of Freeze-Dried Immobilized *Lactobacillus casei* as Probiotic Adjunct Culture in Yogurts. *Foods*, 8(9), 374. <https://doi.org/10.3390/foods8090374>
- Dinakar, P., & Mistry, V. V. (1994). Growth and Viability of *Bifidobacterium bifidum* in Cheddar Cheese. *Journal of Dairy Science*, 77(10), 2854–2864. [https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302\(94\)77225-8](https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302(94)77225-8)
- Dobson, A., Cotter, P. D., Paul Ross, R., & Hill, C. (2012). Bacteriocin production: A probiotic trait? *Applied and Environmental Microbiology*, 78(1), 1–6. <https://doi.org/10.1128/AEM.05576-11/ASSET/9EDEF9CF-E485-404F-8A5B-E4D5EC4A53C7/ASSETS/GRAPHIC/ZAM9991028040002.JPEG>
- Du Toit, M., Huch, M., Cho, G. S., & Franz, C. M. A. P. (2014). The genus *Streptococcus*. *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy*, 9781444333831, 457–505. <https://doi.org/10.1002/9781118655252.CH28>
- Edwards, W. (2018). *The Science of Sugar Confectionery*. Royal Society of Chemistry.
- Elshaghabee, F. M. F., Rokana, N., Gulhane, R. D., Sharma, C., & Panwar, H. (2017). *Bacillus* As Potential Probiotics: Status, Concerns, and Future Perspectives. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01490>
- Fakruddin, M., Hossain, M. N., & Ahmed, M. M. (2017). Antimicrobial and antioxidant activities of *Saccharomyces cerevisiae* IFST062013, a potential probiotic. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/S12906-017-1591-9/FIGURES/4>
- Farnworth, E. R., Mainville, I., Desjardins, M.-L., Gardner, N. J., Fliss, I., & Champagne, C. P. (2007). Growth of probiotic bacteria and bifidobacteria in a soy yogurt formulation. *International Journal of Food Microbiology*, 116(1), 174–181. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.12.015>
- Figuroa-González, I., Quijano, G., Ramírez, G., & Cruz-Guerrero, A. (2011). Probiotics and prebiotics-perspectives and challenges. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(8), 1341–1348. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4367>
- Fortin, M.-H., Champagne, C. P., St-Gelais, D., Britten, M., Fustier, P., & Lacroix, M. (2011). Viability of *Bifidobacterium longum* in cheddar cheese curd during manufacture and storage: effect of

- microencapsulation and point of inoculation. *Dairy Science & Technology*, 91(5), 599–614. <https://doi.org/10.1007/s13594-011-0034-5>
- Foulquié Moreno, M. R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., & De Vuyst, L. (2006). The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*, 106(1), 1–24. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2005.06.026>
- Fuentes-Zaragoza, E., Sánchez-Zapata, E., Sendra, E., Sayas, E., Navarro, C., Fernández-López, J., & Pérez-Alvarez, J. A. (2011). Resistant starch as prebiotic: A review. *Starch-Starke*, 63(7), 406–415. <https://doi.org/10.1002/star.201000099>
- Gao, J., Li, X., Zhang, G., Sadiq, F. A., Simal-Gándara, J., Xiao, J., & Sang, Y. (2021). Probiotics in the dairy industry—Advances and opportunities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(4), 3937–3982. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12755>
- Gao, W., Weng, J., Gao, Y., & Chen, X. (2013). Comparison of the vaginal microbiota diversity of women with and without human papillomavirus infection: a cross-sectional study. *BMC Infectious Diseases*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-271>
- Garsa, A. K., Kumariya, R., Kumar, A., Lather, P., Kapila, S., Sood, S. K., & Kapasiya, M. (2014). In vitro evaluation of the probiotic attributes of two pediococci strains producing pediocin PA-1 with selective potency as compared to nisin. *European Food Research and Technology*, 239(3), 491–499. <https://doi.org/10.1007/s00217-014-2243-7>
- Gibson, G. R., Scott, K. P., Rastall, R. A., Tuohy, K., Hotchkiss, A. T., Dubert-Ferrandon, A., Gareau, M. G., Murphy, E. F., Saulnier, D. M., Loh, G., Macfarlane, S., Delzenne, N. M., Ringel, Y., Kozianowski, G., Dickmann, R. S., Lenoir-Wijnkoop, I., Walker, C., & Buddington, R. K. (2010). Dietary prebiotics: current status and new definition. *Food Science and Technology Bulletin*, 7(1), 1–19. <https://doi.org/10.1616/1476-2137.15880>
- Gogineni, V. K. (2013). Probiotics: History and Evolution. *Journal of Ancient Diseases & Preventive Remedies*, 01(02). <https://doi.org/10.4172/2329-8731.1000107>
- Gomes da Cruz, A., Buriti, F. C. A., Batista de Souza, C. H., Fonseca Faria, J. A., & Isay Saad, S. M. (2009). Probiotic cheese: Health benefits, technological and stability aspects. *Trends in Food Science & Technology*, 20(8), 344–354. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2009.05.001>
- Guarner, F. (1998). Probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 39(3), 237–238. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(97\)00136-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(97)00136-0)
- Guo, P., Zhang, K., Ma, X., & He, P. (2020). Clostridium species as probiotics: potentials and challenges. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 11(1), 24. <https://doi.org/10.1186/s40104-019-0402-1>
- Gutiérrez-Méndez, N., Rodríguez-Figueroa, J. C., González-Córdova, A. F., Nevárez-Moorillón, G. V., Rivera-Chavira, B., & Vallejo-Cordoba, B. (2010). Phenotypic and genotypic characteristics of *Lactococcus lactis* strains isolated from different ecosystems. <https://doi.org/10.1139/W10-026>, 56(5), 432–439. <https://doi.org/10.1139/W10-026>
- Hansen, I. S., Baeten, D., & Dunnen, J. Den. (2018). The inflammatory function of human IgA. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76(6), 1041–1055. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2976-8>
- Hardie, J. M., & Whiley, R. A. (1997). Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*, 83, 1–11. <https://www.researchgate.net/publication/13794797>
- Haynes, I. N. (2002). *Survival of probiotic cultures in low-fat ice-cream*. <https://publications.csiro.au/rpr/pub?list=BRO&pid=procite:734b2a81-f73d-4857-8f58-11ad304546be>
- Hekmat, S., & Reid, G. (2006). Sensory properties of probiotic yogurt is comparable to standard yogurt. *Nutrition Research*, 26(4), 163–166. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2006.04.004>
- Hemarajata, P., & Versalovic, J. (2013). Effects of probiotics on gut microbiota: Mechanisms of intestinal immunomodulation and neuromodulation. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, 6(1), 39–51. [https://doi.org/10.1177/1756283X12459294/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177\\_1756283X12459294-FIG5.JPEG](https://doi.org/10.1177/1756283X12459294/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177_1756283X12459294-FIG5.JPEG)
- Hemme, D., & Foucaud-Scheunemann, C. (2004). *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. *International Dairy Journal*, 14(6), 467–494. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2003.10.005>

- Hickey, M. C. (2017). Current legislation of probiotic products. In *John Wiley & Sons, Ltd eBooks*.  
<https://doi.org/10.1002/9781119214137.ch5>
- Hodges, K., & Gill, R. K. (2010). Infectious diarrhea. *Gut Microbes*, 1(1), 4–21.  
<https://doi.org/10.4161/gmic.1.1.11036>
- Jahanshahi, M., Dana, P. M., Badehnoosh, B., Asemi, Z., Hallajzadeh, J., Mansournia, M. A., Yousefi, B., Moazzami, B., & Chaichian, S. (2020). Anti-tumor activities of probiotics in cervical cancer. *Journal of Ovarian Research*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s13048-020-00668-x>
- Jankovic, I., Sybesma, W., Phothirath, P., Ananta, E., & Mercenier, A. (2010). Application of probiotics in food products—challenges and new approaches. *Current Opinion in Biotechnology*, 21(2), 175–181.  
<https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2010.03.009>
- Jiang, S., Cai, L., Lv, L., & Li, L. (2021). *Pediococcus pentosaceus*, a future additive or probiotic candidate. *Microbial Cell Factories*, 20(1), 45. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01537-y>
- Kailasapathy, K. (2006). *Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt*. <https://researchdirect.westernsydney.edu.au/islandora/object/uws:5049>
- Kailasapathy, K., & Chin, J. (2000). Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Immunology and Cell Biology*, 78(1), 80–88.  
<https://doi.org/10.1046/j.1440-1711.2000.00886.x>
- Kakisu, E. J., Irigoyen, A., Torre, P., Antoni, G. L. De, & Abraham, A. G. (2011). Physicochemical, microbiological and sensory profiles of fermented milk containing probiotic strains isolated from kefir. *Journal of Dairy Research*, 78(4), 456–463. <https://doi.org/10.1017/s0022029911000653>
- Koirala, S., & Anal, A. K. (2021). Probiotics-based foods and beverages as future foods and their overall safety and regulatory claims. *Future Foods*, 3, 100013. <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2021.100013>
- Kosikowski, F., & Mistry, V. (1999). Cheese and Fermented Milk Foods. Vol 1, Origins and Principles, 739 pp. Vol 2, Procedures and Analysis, 3rd ed, 2nd printing. *Dairy Science Publication Database*.  
[https://openprairie.sdstate.edu/dairy\\_pubdb/234](https://openprairie.sdstate.edu/dairy_pubdb/234)
- Kotb, E. (2015). Purification and partial characterization of serine fibrinolytic enzyme from *Bacillus megaterium* KSK-07 isolated from kishk, a traditional Egyptian fermented food. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 51(1), 34–43. <https://doi.org/10.1134/S000368381501007X/METRICS>
- Kovachev, S. (2019). Cervical cancer and vaginal microbiota changes. *Archives of Microbiology*, 202(2), 323–327. <https://doi.org/10.1007/s00203-019-01747-4>
- Kumar, A., Roy, A., Deshmukh, M. V., & Tamuli, R. (2020). Dominant mutants of the calcineurin catalytic subunit (CNA-1) showed developmental defects, increased sensitivity to stress conditions, and CNA-1 interacts with CaM and CRZ-1 in *Neurospora crassa*. *Archives of Microbiology*, 202(4), 921–934.  
<https://doi.org/10.1007/S00203-019-01768-Z/FIGURES/7>
- Lam, T., & Hsu, C. H. C. (2006). Predicting behavioral intention of choosing a travel destination. *Tourism Management*, 27(4), 589–599. <https://doi.org/10.1016/J.TOURMAN.2005.02.003>
- Lee, S. J., Shim, Y. H., Cho, S. J., & Lee, J. W. (2007). Probiotics prophylaxis in children with persistent primary vesicoureteral reflux. *Pediatric Nephrology*, 22(9), 1315–1320.  
<https://doi.org/10.1007/s00467-007-0507-1>
- Li, C., Kwok, L., Mi, Z., Bala, J., Xue, J., Yang, J., Ma, Y., Zhang, H., & Chen, Y. (2017). Characterization of the angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of fermented milks produced with *Lactobacillus casei*. *Journal of Dairy Science*, 100(12), 9495–9507. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12970>
- Lovayová, V., Dudříková, E., Rimárová, K., & Siegfried, L. (2014). Quantity of selected probiotic cultures in semi-hard cheese with low-cooking curd during the maturation process. *Journal of Food Science and Technology*, 52(8), 4697–4702. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1619-9>
- Macpherson, A. J., & Harris, N. L. (2004). Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nature Reviews Immunology*, 4(6), 478–485. <https://doi.org/10.1038/nri1373>
- Manhar, A. K., Bashir, Y., Saikia, D., Nath, D., Gupta, K., Konwar, B. K., Kumar, R., Namsa, N. D., & Mandal, M. (2016). Cellulolytic potential of probiotic *Bacillus Subtilis* AMS6 isolated from traditional fermented soybean (Churpi): An in-vitro study with regards to application as an animal feed additive. *Microbiological Research*, 186–187, 62–70. <https://doi.org/10.1016/J.MICRES.2016.03.004>
- Mani-López, E., Palou, E., & López-Malo, A. (2014). Probiotic viability and storage stability of yogurts and

- fermented milks prepared with several mixtures of lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*, 97(5), 2578–2590. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7551>
- Markowiak, P., & Śliżewska, K. (2017). Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. *Nutrients*, 9(9), 1021. <https://doi.org/10.3390/nu9091021>
- Martín, R., & Langella, P. (2019). Emerging Health Concepts in the Probiotics Field: Streamlining the Definitions. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01047>
- Mazziotta, C., Tognon, M., Martini, F., Torreggiani, E., & Rotondo, J. C. (2023). Probiotics Mechanism of Action on Immune Cells and Beneficial Effects on Human Health. *Cells*, 12(1), 184. <https://doi.org/10.3390/cells12010184>
- McCartney, A. L. (2003). Bifidobacteria In foods. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, 4023–4027. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/01335-3>
- McFarland, L. V. (2006). Meta-Analysis of Probiotics for the Prevention of Antibiotic Associated Diarrhea and the Treatment of Clostridium difficile Disease. *The American Journal of Gastroenterology*, 101(4), 812–822. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2006.00465.x>
- Mei, Z., & Li, D. (2022). The role of probiotics in vaginal health. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.963868>
- Messaoudi, M., Violle, N., Bisson, J., Desor, D., Javelot, H., & Rougeot, C. (2011). Beneficial psychological effects of a probiotic formulation (*Lactobacillus helveticus*R0052 and *Bifidobacterium longum*R0175) in healthy human volunteers. *Gut Microbes*, 2(4), 256–261. <https://doi.org/10.4161/gmic.2.4.16108>
- Milner, E., Stevens, B. D., An, M., Lam, V., Ainsworth, M., Dihle, P., Stearns, J., Dombrowski, A., Rego, D. T., & Segars, K. (2021). Utilizing Probiotics for the Prevention and Treatment of Gastrointestinal Diseases. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.689958>
- Mohammadi, R., & Mortazavian, A. M. (2011). Review article: Technological Aspects of Prebiotics in Probiotic Fermented Milks. *Food Reviews International*, 27(2), 192–212. <https://doi.org/10.1080/87559129.2010.535235>
- Mohd Azhar, S. H., Abdulla, R., Jambo, S. A., Marbawi, H., Gansau, J. A., Mohd Faik, A. A., & Rodrigues, K. F. (2017). Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 10, 52–61. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.03.003>
- Nada, S., Ilija, D., Igor, T., Jelena, M., & Ruzica, G. (2012). Implication of food safety measures on microbiological quality of raw and pasteurized milk. *Food Control*, 25(2), 728–731. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.12.022>
- NPCS Board. (2013). *Confectionery Products Handbook (Chocolstr, Toffees, Chewing Gum & Sugar Free Confectionery)*.
- Odamaki, T., Xiao, J., Yonezawa, S., Yaeshima, T., & Iwatsuki, K. (2011). Improved viability of bifidobacteria in fermented milk by cocultivation with *Lactococcus lactis* subspecies *lactis*. *Journal of Dairy Science*, 94(3), 1112–1121. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3286>
- Office of Dietary Supplements - Probiotics. (n.d.). <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Probiotics-HealthProfessional/>
- Østlie, H. M., Helland, M. H., & Narvhus, J. (2003). Growth and metabolism of selected strains of probiotic bacteria in milk. *International Journal of Food Microbiology*, 87(1–2), 17–27. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(03\)00044-8](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(03)00044-8)
- Østlie, H. M., Treimo, J., & Narvhus, J. (2005). Effect of temperature on growth and metabolism of probiotic bacteria in milk. *International Dairy Journal*, 15(10), 989–997. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.08.015>
- O’Toole, P. W., & Cooney, J. C. (2008). Probiotic Bacteria Influence the Composition and Function of the Intestinal Microbiota. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2008, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2008/175285>
- Öztürk, H. İ., Demirci, T., & Akın, N. (2018). Production of functional probiotic ice creams with white and dark blue fruits of *Myrtus communis*: The comparison of the prebiotic potentials on *Lactobacillus casei* 431 and functional characteristics. *LWT*, 90, 339–345. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.12.049>
- Palanivelu, J., Thanigaivel, S., Vickram, S., Dey, N., Mihaylova, D., & Desseva, I. (2022). Probiotics in Functional Foods: Survival Assessment and Approaches for Improved Viability. *Applied Sciences*, 12(1),

455. <https://doi.org/10.3390/app12010455>

- Panda, A. K., Rao, S. V. R., Raju, M. V. L. N., & Sharma, S. R. (2006). Dietary Supplementation of *Lactobacillus Sporogenes* on Performance and Serum Biochemico-Lipid Profile of Broiler Chickens. *Journal of Poultry Science*, 43(3), 235–240. <https://doi.org/10.2141/jpsa.43.235>
- Pandey, K., Naik, S. R., & Vakil, B. V. (2015). Probiotics, prebiotics and synbiotics- a review. *Journal of Food Science and Technology*, 52(12), 7577–7587. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1921-1>
- Pardo, S., Galvagno, M. Á., & Cerrutti, P. (2009). [Studies of viability and vitality after freezing of the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii*: physiological preconditioning effect]. *Revista Iberoamericana de Micología*, 26(2), 155–160. [https://doi.org/10.1016/S1130-1406\(09\)70028-2](https://doi.org/10.1016/S1130-1406(09)70028-2)
- Phillips, M., Kailasapathy, K., & Tran, L. T. (2006). Viability of commercial probiotic cultures (*L. acidophilus*, *Bifidobacterium* sp., *L. casei*, *L. paracasei* and *L. rhamnosus*) in cheddar cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 108(2), 276–280. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.12.009>
- Pimentel, T. C., Costa, W. K. A. Da, Barão, C. E., Rosset, M., & Magnani, M. (2021). Vegan probiotic products: A modern tendency or the newest challenge in functional foods. *Food Research International*, 140, 110033. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.110033>
- Pisano, G. (1997). *The Development Factory: Unlocking the Potential of Process Innovation*. Harvard Business Press.
- Possemiers, S., Marzorati, M., Verstraete, W., & Wiele, T. Van De. (2010). Bacteria and chocolate: A successful combination for probiotic delivery. *International Journal of Food Microbiology*, 141(1–2), 97–103. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.03.008>
- Preston, K. L., Krumian, R., Hattner, J. A. T., Montigny, D. De, Stewart, M. E., & Gaddam, S. (2018). *Lactobacillus acidophilus* CL1285, *Lactobacillus casei* LBC80R and *Lactobacillus rhamnosus* CLR2 improve quality-of-life and IBS symptoms: a double-blind, randomised, placebo-controlled study. *Beneficial Microbes*, 9(5), 697–706. <https://doi.org/10.3920/bm2017.0105>
- Ramchandran, L., & Shah, N. P. (2009). Effect of exopolysaccharides on the proteolytic and angiotensin-I converting enzyme-inhibitory activities and textural and rheological properties of low-fat yogurt during refrigerated storage. *Journal of Dairy Science*, 92(3), 895–906. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1796>
- Reid, G. (2016). Probiotics: definition, scope and mechanisms of action. *Best Practice & Research in Clinical Gastroenterology*, 30(1), 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2015.12.001>
- Reinholdt, J. (2003). *IgA and mucosal homeostasis*. <https://portal.findresearcher.sdu.dk/en/publications/iga-and-mucosal-homeostasis>
- Rosenberg-Kima, R. B., Baylor, A. L., Plant, E. A., & Doerr, C. E. (2008). Interface agents as social models for female students: The effects of agent visual presence and appearance on female students' attitudes and beliefs. *Computers in Human Behavior*, 24(6), 2741–2756. <https://doi.org/10.1016/j.chb.2008.03.017>
- Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mättö, J., & Mattila-Sandholm, T. (2000). Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, 84(3), 197–215. [https://doi.org/10.1016/s0168-1656\(00\)00375-8](https://doi.org/10.1016/s0168-1656(00)00375-8)
- Sánchez, B., Delgado, S., Blanco-Míguez, A., Lourenço, A., Gueimonde, M., & Margollés, A. (2016). Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease. *Molecular Nutrition & Food Research*, 61(1), 1600240. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201600240>
- Sanders, M. E., Akkermans, L. M. A., Haller, D., Hammerman, C., Heimbach, J. T., Hörmannspurger, G., Huys, G., Levy, D. D., Lutgendorff, F., Mack, D. R., Phothirath, P., Solano-Aguilar, G., & Vaughan, E. E. (2010). Safety assessment of probiotics for human use. *Gut Microbes*, 1(3), 164–185. <https://doi.org/10.4161/gmic.1.3.12127>
- Saraf, V. S., Sheikh, S. A., Ahmad, A., Gillevet, P. M., Bokhari, H., & Javed, S. (2021). Vaginal microbiome: normalcy vs dysbiosis. *Archives of Microbiology*, 203(7), 3793–3802. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02414-3>
- Sekhon, B., & Jairath, S. (2010). Prebiotics, probiotics and synbiotics: An overview. *ResearchGate*. [https://www.researchgate.net/publication/216529828\\_Prebiotics\\_probiotics\\_and\\_synbiotics\\_An\\_overview](https://www.researchgate.net/publication/216529828_Prebiotics_probiotics_and_synbiotics_An_overview)
- Senanayake, S. A., Fernando, S. S. N., Bamunuarachchi, A., & Arsekularatne, M. (2013). Application of

- <sc>L</sc> *actobacillus acidophilus* (<sc>LA</sc> 5) strain in fruit-based ice cream. *Food Science and Nutrition*, 1(6), 428–431. <https://doi.org/10.1002/fsn3.66>
- Shah, N. P. (2007). Functional cultures and health benefits. *International Dairy Journal*, 17(11), 1262–1277. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.01.014>
- Shalev, E., Battino, S., Weiner, E., Colodner, R., & Keness, Y. (1996). Ingestion of yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* compared with pasteurized yogurt as prophylaxis for recurrent candidal vaginitis and bacterial vaginosis. *Archives of Family Medicine*, 5(10), 593–596. <https://doi.org/10.1001/archfami.5.10.593>
- Sharma, M., Wasan, A., & Sharma, R. K. (2021). Recent developments in probiotics: An emphasis on *Bifidobacterium*. *Food Bioscience*, 41, 100993. <https://doi.org/10.1016/j.FBIO.2021.100993>
- Shepherd, G. M. (2013). Corticostriatal connectivity and its role in disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(4), 278–291. <https://doi.org/10.1038/nrn3469>
- Soni, R., Jain, N., Shah, V. A., Soni, J., Suthar, D., & Gohel, P. (2020). Development of probiotic yogurt: effect of strain combination on nutritional, rheological, organoleptic and probiotic properties. *Journal of Food Science and Technology*, 57(6), 2038–2050. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04238-3>
- Sonnenborn, U. (2016). *Escherichia coli* strain Nissle 1917—from bench to bedside and back: history of a special *Escherichia coli* strain with probiotic properties. *FEMS Microbiology Letters*, 363(19), fnw212. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw212>
- Stadie, J., Gulitz, A., Ehrmann, M. A., & Vogel, R. F. (2013). Metabolic activity and symbiotic interactions of lactic acid bacteria and yeasts isolated from water kefir. *Food Microbiology*, 35(2), 92–98. <https://doi.org/10.1016/j.FM.2013.03.009>
- Szajnar, K., Znamirowska, A., & Kuźniar, P. (2020). Sensory and textural properties of fermented milk with viability of *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* Bb-12 and increased calcium concentration. *International Journal of Food Properties*, 23(1), 582–598. <https://doi.org/10.1080/10942912.2020.1748050>
- Szydłowska, A., & Kołożyn-Krajewska, D. (2019). Development of potentially probiotic and synbiotic pumpkin frozen desserts. *Cyta-Journal of Food*, 17(1), 251–259. <https://doi.org/10.1080/19476337.2019.1570975>
- Tidd, J., & Bessant, J. (2014). Strategic Innovation Management. *Chichester: Wiley*.
- Todorov, S. D., Popov, I., Weeks, R., & Chikindas, M. L. (2022). Use of Bacteriocins and Bacteriocinogenic Beneficial Organisms in Food Products: Benefits, Challenges, Concerns. *Foods*, 11(19), 3145. <https://doi.org/10.3390/foods11193145>
- Turroni, F., Ventura, M., Buttó, L. F., Duranti, S., O’Toole, P. W., Motherway, M. O., & Sinderen, D. Van. (2013). Molecular dialogue between the human gut microbiota and the host: a *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* perspective. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71(2), 183–203. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1318-0>
- Tzounis, X., Rodriguez-Mateos, A., Vulevic, J., Gibson, G. R., Kwik-Urbe, C., & Spencer, J. P. E. (2011). Prebiotic evaluation of cocoa-derived flavanols in healthy humans by using a randomized, controlled, double-blind, crossover intervention study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 93(1), 62–72. <https://doi.org/10.3945/ajcn.110.000075>
- Uusitalo, U., Liu, X., Yang, J., Aronsson, C. A., Hummel, S., Butterworth, M., Lernmark, Å., Rewers, M., Hagopian, W., She, J., Simell, O., Toppari, J., Ziegler, A. G., Akolkar, B., Krischer, J. P., Norris, J. M., & Virtanen, S. M. (2016). Association of Early Exposure of Probiotics and Islet Autoimmunity in the TEDDY Study. *JAMA Pediatrics*, 170(1), 20. <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2015.2757>
- Vaghef-Mehrabany, E., Alipour, B., Rad, A. H., Sharif, S.-K., Jafarabadi, M. A., & Zavvari, S. (2014). Probiotic supplementation improves inflammatory status in patients with rheumatoid arthritis. *Nutrition*, 30(4), 430–435. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2013.09.007>
- Villalva, F. J., Bruneri, A. P. C., Vinderola, G., Oliveira, E. G. De, Paz, N. F., & Ramón, A. N. (2017). Formulation of a peach ice cream as potential synbiotic food. *Food Science and Technology*, 37(3), 456–461. <https://doi.org/10.1590/1678-457x.19716>
- Vinderola, C. G., Duarte, J. C., Thangavel, D., Perdígón, G., Farnworth, E. R., & Matar, C. (2005). Immunomodulating capacity of kefir. *Journal of Dairy Research*, 72(2), 195–202.



<https://doi.org/10.1017/s0022029905000828>

- Vliagoftis, H., Kouranos, V. D., Betsi, G. I., & Falagas, M. E. (2008). Probiotics for the treatment of allergic rhinitis and asthma: systematic review of randomized controlled trials. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 101(6), 570–579. [https://doi.org/10.1016/S1081-1206\(10\)60219-0](https://doi.org/10.1016/S1081-1206(10)60219-0)
- Yang, H. H., Jun, H. K., Jung, Y. J., & Choi, B. K. (2014). Enterococcus faecalis Activates Caspase-1 Leading to Increased Interleukin-1 Beta Secretion in Macrophages. *Journal of Endodontics*, 40(10), 1587–1592. <https://doi.org/10.1016/J.JOEN.2014.06.015>
- Yerlikaya, O. (2019). Probiotic potential and biochemical and technological properties of Lactococcus lactis ssp. lactis strains isolated from raw milk and kefir grains. *Journal of Dairy Science*, 102(1), 124–134. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14983>
- Zamani, B., Golkar, H. R., Farshbaf, S., Emadi-Baygi, M., Tajabadi-Ebrahimi, M., Jafari, P., Akhavan, R. K., Taghizadeh, M., Memarzadeh, M. R., & Asemi, Z. (2016). Clinical and metabolic response to probiotic supplementation in patients with rheumatoid arthritis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *International Journal of Rheumatic Diseases*, 19(9), 869–879. <https://doi.org/10.1111/1756-185x.12888>
- Ze, X., Duncan, S. H., Louis, P., & Flint, H. J. (2012). Ruminococcus bromii is a keystone species for the degradation of resistant starch in the human colon. *The ISME Journal*, 6(8), 1535–1543. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.4>
- Zhang, H., Duan, Y., Feng, C., Cao, D., Wang, L., Qiao, Z., Hong, Q., Li, N., Zheng, Y., Su, M., Liu, Z., & Zhu, B. (2022). Next-Generation Probiotics: Microflora Intervention to Human Diseases. *BioMed Research International*, 2022, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2022/5633403>
- Zhang, M., Cheng, J., Lu, Y., Yi, Z., Yang, P., & Wu, X. (2010). Use of pre-, pro- and synbiotics in patients with acute pancreatitis: A meta-analysis. *World Journal of Gastroenterology*, 16(31), 3970. <https://doi.org/10.3748/wjg.v16.i31.3970>

## Πηγές Εικόνων

- Εικόνα 1: O’Toole, P. W., & Cooney, J. C. (2008). Probiotic Bacteria Influence the Composition and Function of the Intestinal Microbiota. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2008, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2008/175285>
- Εικόνα 2: Kumar, A., Roy, A., Deshmukh, M. V., & Tamuli, R. (2020). Dominant mutants of the calcineurin catalytic subunit (CNA-1) showed developmental defects, increased sensitivity to stress conditions, and CNA-1 interacts with CaM and CRZ-1 in Neurospora crassa. *Archives of Microbiology*, 202(4), 921–934. <https://doi.org/10.1007/S00203-019-01768-Z/FIGURES/7>
- Εικόνα 3-14: Προσωπικό αρχείο.