

**ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ**  
**ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ**  
**ΤΟΜΕΑΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ**  
**ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**



**Εγκλεισμός του προβιοτικού στελέχους**  
***Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 και**  
**εφαρμογή του σε τρόφιμο**

Διδακτορική διατριβή

ΓΕΩΡΓΙΑ Ε. ΦΡΑΚΟΛΑΚΗ  
Χημικός Μηχανικός ΕΜΠ  
tzinafr@gmail.com

Αθήνα 2022



Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ανωτάτη Σχολή Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα (Ν. 5343/1932, Άρθρο 202).



## Πρόλογος

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας Κ. Τζιά η οποία είχε ενεργό ρόλο καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης. Θα ήθελα να την ευχαριστήσω θερμά καθώς με δέχτηκε στην επιστημονική της ομάδα και με δίδαξε να σκέφτομαι και να πράττω με ήθος, ενώ οι πολύτιμες συμβουλές της αποτέλεσαν αρωγό σε όλες τις δύσκολες φάσεις τόσο της ερευνητικής όσο και της ευρύτερης πορείας μου. Η καθοδήγηση, η συμπαράσταση και η βοήθεια που μου πρόσφερε όλα αυτά τα χρόνια σε όλους τους τομείς ήταν καθοριστική.

Ευχαριστώ, επίσης, ολόψυχα τα μέλη της τριμελούς επιτροπής μου, τον καθηγητή Δ. Κέκο για την καθοδήγηση και την καταλυτική βοήθεια που μου παρείχε σε όλους τους τομείς, όπως και τον αν. καθηγητή Ε. Τόπακα για την ενεργή παρουσία του καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής. Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω θερμά τα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, την επίκουρη καθηγήτρια Δ. Μάμμα (ΕΜΠ) για την καταλυτική της βοήθεια στα πρώτα στάδια εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής, καθώς και την καθηγήτρια Μ. Κροκίδα (ΕΜΠ) που με εμπιστεύτηκε και με δέχτηκε στην επιστημονική της ομάδα τους τελευταίους μήνες, παρέχοντάς μου εργασιακή απασχόληση σε ένα εξαιρετικό περιβάλλον παράλληλα με τη συγγραφή της διδακτορικής διατριβής. Ακόμη, ευχαριστώ ιδιαιτέρως τον καθηγητή Π. Ταούκη (ΕΜΠ) για την άριστη συνεργασία μας και την εμπιστοσύνη του, καθώς και τον καθηγητή Σ. Παπαδάκη (ΠΑΔΑ) για τη συμβολή του στην ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς τη Δρ. Β. Γιάννου και να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου, τόσο για την ηθική της υποστήριξη, όσο και για την ουσιώδη βοήθεια που μου προσέφερε όλα αυτά τα χρόνια. Ήταν διαθέσιμη ανά πάσα στιγμή και μου παρείχε πολύτιμες γνώσεις σε όλους τους τομείς με ευχαρίστηση και προθυμία.

Επιπλέον, ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στη Δρ. Μ. Τσεβδού, η οποία με το ενδιαφέρον και την εργαστηριακή εμπειρία της με βοήθησε να ξεπεράσω σημαντικά εμπόδια κατά την εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Θέλω ακόμη να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων για την στήριξή τους και για τις ευχάριστες στιγμές στο «εργαστήριο-σπίτι». Συγκεκριμένα, ευχαριστώ την επίκουρη καθηγήτρια Φ. Τσιρώνη και τους Δρ. Α. Ντζιμάνη, Δρ. Ε. Γώγου, Δρ. Δ. Τσιμογιάννη, Δρ. Ε. Δερμενσολούογλου, Δρ. Γ. Δημόπουλο και φυσικά τους υποψήφιους διδάκτορες Ι. Σεμένογλου, Α. Μπιζύμη, Θ. Λημναίο και Α. Κατσιμίχα. Δε θα μπορούσα να παραλείψω να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου και να ευχαριστήσω τη Δρ. Μ. Κατσούλη όχι μόνο για την εξαιρετική συνεργασία μας σε ερευνητικά θέματα, αλλά και για την ατέρμονη στήριξη, την υπομονή, τις συμβουλές της και τις ξεχωριστές στιγμές που μου παρείχε από την έναρξη της παρούσας διατριβής μέχρι και σήμερα, εξελίσσοντάς με τον καιρό μια σχέση συνεργασίας σε σχέση φιλίας. Θέλω ακόμη να ευχαριστήσω θερμά τον Δρ. Τ. Κεκέ, για την άριστη συνεργασία, την συμπαράσταση και την συμβολή του να ξεπεράσω κάθε εμπόδιο καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους προπτυχιακούς φοιτητές και συγκεκριμένα, τον Κ. Αλεξιά, την Φ. Λυμπάκη, τον Δ. Αναγνώστου, τον Τ. Κουβέλη, την Σ. Καραμπατάκη, την Α. Μιτρέ και τον μεταπτυχιακό φοιτητή Σ. Α. Παπαθεοδώρου που πέρασαν από το εργαστήριο για την εκτέλεση της διπλωματικής εργασίας τους και για το φιλικό κλίμα που δημιούργησαν όλα αυτά τα χρόνια.

Παράλληλα, ευχαριστώ ιδιαίτερως τον Δρ. Π. Σχοινά για την πολύτιμη βοήθεια του και το ευχάριστο κλίμα που δημιούργησε κατά τη χρήση του οργάνου SEM. Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω την εταιρεία ΦΑΓΕ Α.Ε. για τη δωρεάν παραχώρηση πρώτων υλών.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω θερμά για την εμπιστοσύνη, την υπομονή και την ηθική τους στήριξη κατά τη διάρκεια της συγγραφής της διδακτορικής διατριβής όλα τα μέλη του εργαστηρίου Σχεδιασμού και Ανάλυσης Διεργασιών, και ιδιαίτερα τη Δρ. Σ. Παπαδάκη, τη Δρ. Ο. Σεριφή και τη Δρ. Β. Οικονομοπούλου, που με δέχτηκαν στην επιστημονική τους ομάδα το τελευταίο διάστημα δημιουργώντας ένα οικογενειακό και ευχάριστο κλίμα από την πρώτη στιγμή.

Φυσικά, ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω σε όλους μου τους φίλους για την υπομονή, την κατανόηση και τη στήριξή τους σε όλες τις φάσεις της εκπόνησης της παρούσας διατριβής. Ολοκληρώνοντας θέλω να ευχαριστήσω τέσσερα πολυαγαπημένα μου πρόσωπα που στάθηκαν δίπλα μου με υπομονή και αγάπη και χωρίς την υποστήριξη των οποίων δε θα ήταν δυνατή η ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής. Αρχικά, ευχαριστώ τους γονείς μου, Λευτέρη και Μαρία, καθώς με δίδαξαν την αξία προσπαθειών σαν και αυτή και χάρη στις θυσίες, στην αγάπη και στην υποστήριξή τους κατάφερα να φτάσω ως εδώ. Θέλω ακόμη να ευχαριστήσω την αδερφή μου, Σέβη, η οποία μέχρι πρόσφατα ήταν δίπλα σε κάθε μου επιστημονικό ή προσωπικό βήμα, παρέχοντας μου λύσεις και στήριξη ακόμη και στα πιο μικρά πράγματα, αλλά δυστυχώς έφυγε ξαφνικά και άδικα. Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω από καρδιάς το σύντροφό μου Νίκο, καθώς με τη συνεχή του προσπάθεια και την αμέριστη υπομονή, αγάπη και στήριξή του σε τόσο δύσκολες συνθήκες μου έδωσε ώθηση να προχωρήσω ξανά με αισιοδοξία.

Αθήνα, Μάρτιος 2022  
**Γεωργία Ε. Φρακολάκη**

*Στη μνήμη της αδερφής μου, Σέβης.*

## Περίληψη

Ο εγκλεισμός των προβιοτικών κυττάρων ορίζεται ως η διεργασία κατά την οποία προβιοτικά κύτταρα εγκλείονται μέσα σε υλικά κατάλληλα για τρόφιμα, προκειμένου να παραχθούν σωματίδια με λεπτή, ημιπερατή μεμβράνη, διαμέτρου από μερικά  $\mu\text{m}$  έως μερικά  $\text{mm}$ . Τα παραγόμενα σφαιρίδια (προϊόντα εγκλεισμού) μπορούν να ενσωματωθούν σε προϊόντα τροφίμων για την παραγωγή προβιοτικών προϊόντων. Ο σκοπός της τεχνολογίας του εγκλεισμού είναι ο περιορισμός της φθοράς ή απώλειας των προβιοτικών κυττάρων κατά την έκθεσή τους σε αντίξοες συνθήκες κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης ή/και της κατανάλωσης. Ακόμη, ο εγκλεισμός των προβιοτικών βακτηρίων παρέχει στη βιομηχανία τροφίμων ευελιξία κατά την παραγωγή προϊόντων που περιέχουν τα συγκεκριμένα είδη βακτηρίων.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκε ο εγκλεισμός προβιοτικών βακτηρίων με σκοπό την επακόλουθη ενσωμάτωση των προϊόντων εγκλεισμού σε προϊόν τροφίμου. Το προβιοτικό στέλεχος που επιλέχθηκε προς εγκλεισμό ήταν το στέλεχος *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12, ενώ οι μέθοδοι εγκλεισμού που εφαρμόστηκαν ήταν η τεχνική της εξώθησης και της γαλακτωματοποίησης, καθώς επίσης και μία καινοτόμος μέθοδος η οποία συνδυάζει διπλό νερό-σε-λάδι-σε-νερό γαλάκτωμα με την τεχνική της εξώθησης, με στόχο την αύξηση της παρεχόμενης προστασίας στα προβιοτικά κύτταρα. Η τεχνική της εξώθησης στηρίζεται στην στάγδην προσθήκη του διαλύματος του εγκλειστικού μέσου που εμπεριέχει τα προς εγκλεισμό προβιοτικά κύτταρα σε διάλυμα  $\text{CaCl}_2$  με σκοπό την παραγωγή σφαιριδίων μέσω δημιουργίας σταυροειδών δεσμών μεταξύ του εγκλειστικού μέσου και των ιόντων  $\text{Ca}^{2+}$ . Αντίστοιχα, η τεχνική της γαλακτωματοποίησης στηρίζεται στη διασπορά μίας υδατικής φάσης που εμπεριέχει το εγκλειστικό μέσο και τα προβιοτικά βακτήρια εντός μίας λιπαρής φάσης και τον σχηματισμό γαλακτώματος. Όταν το γαλάκτωμα έρχεται σε επαφή με διάλυμα  $\text{CaCl}_2$ , πραγματοποιείται σχηματισμός σταυροειδών δεσμών όπως και στην περίπτωση της εξώθησης, με αποτέλεσμα τα σταγονίδια εντός της λιπαρής φάσης να μετατρέπονται σε στερεά σωματίδια. Τα εγκλειστικά μίγματα που εξετάστηκαν κατά την εφαρμογή των δύο πρώτων μεθόδων εγκλεισμού (εξώθηση και γαλακτωματοποίηση) περιελάμβαναν τα εξής: αλγινικό νάτριο μόνο του ως εγκλειστικό μέσο, καθώς και σε μίγμα με άλλα υλικά είτε συμβατικά, όπως ξανθάνη, γλυκερόλη, κ-καραγενάνη και σκόνη ορού γάλακτος μαζί με πηκτίνη, είτε καινοτόμα όπως νανοκρυσταλλική κυτταρίνη (CNC). Επιπρόσθετα, μελετήθηκε η χρήση γάλακτος αντί νερού για την παρασκευή του διαλύματος του εγκλειστικού μέσου αλγινικού νατρίου. Ακόμη, σε κάθε εγκλειστικό μίγμα εξετάστηκε η προσθήκη ινουλίνης, γλυκόζης ή L-κυστεΐνης-HCl, προκειμένου να μελετηθεί η πιθανή επίδραση αυτών στη βιωσιμότητα των προβιοτικών κυττάρων.

Κατά την εφαρμογή της καινοτόμου μεθόδου που συνδυάζει διπλό  $\text{v}_1/\text{e}/\text{v}_2$  γαλάκτωμα με την τεχνική της εξώθησης έγινε μελέτη διαφόρων εγκλειστικών μέσων (αλγινικό, αλγινικό-πηκτίνη, αλγινικό-ζελατίνη, αλγινικό-καζεΐνη, αλγινικό-αραβικό κόμμι) για το σχηματισμό του διπλού γαλακτώματος και επιλέχθηκε προς εφαρμογή το σταθερότερο γαλάκτωμα με βάση τις τιμές του ζ-δυναμικού και του ιξώδους του διπλού  $\text{v}_1/\text{e}/\text{v}_2$  γαλακτώματος. Σε κάθε περίπτωση, στην εσωτερική φάση του διπλού γαλακτώματος έγινε ενσωμάτωση του



προβιοτικού στελέχους BB-12 μαζί με ινουλίνη. Ακόμη, μετά το πέρας του εγκλεισμού εξετάστηκε και η πιθανότητα επικάλυψης των προκυπτόντων σφαιριδίων με χιτοζάνη.

Στόχος όλων των ανωτέρω ήταν η αξιολόγηση της ικανότητας των συγκεκριμένων μέσων να ενθυλακώσουν τα προβιοτικά βακτήρια και να τους παρέχουν επαρκή προστασία τόσο κατά τη διατήρηση των προκυπτόντων προϊόντων εγκλεισμού υπό ψύξη ή κατάψυξη, όσο και κατά την έκθεσή τους σε συνθήκες προσομοίωσης του γαστρεντερικού συστήματος. Η αποτελεσματικότητα κάθε μεθόδου ως προς τον εγκλεισμό του προβιοτικού στελέχους *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 εξετάστηκε μέσω της απόδοσης εγκλεισμού (EY%), ενώ η παρεχόμενη προστασία αξιολογήθηκε μέσω εκτίμησης του ποσοστού επιβίωσης (SR%) των προβιοτικών κυττάρων. Όλα τα παραπάνω προσδιορίστηκαν μέσω μικροβιολογικών αναλύσεων. Έγινε, επίσης, χρήση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM) με σκοπό τη μελέτη της δομής και της μορφολογίας των προϊόντων εγκλεισμού.

Από τα πειράματα προέκυψε ότι και οι δύο πρώτες μέθοδοι εγκλεισμού (εξώθηση, γαλακτωματοποίηση) παρείχαν υψηλές τιμές απόδοσης εγκλεισμού, με τα καλύτερα αποτελέσματα να επιτυγχάνονται εν γένει μέσω της τεχνικής της γαλακτωματοποίησης (84.2-99.7%) έναντι της τεχνικής της εξώθησης (58.6-100%). Από τα εγκλειστικά μέσα που μελετήθηκαν, καλύτερο αποδείχθηκε το μίγμα γάλακτος-αλγινικού-γλυκόζης, με αποδόσεις εγκλεισμού 100.0% και 99.2% μέσω των τεχνικών της εξώθησης και της γαλακτωματοποίησης, αντίστοιχα. Σημαντικά υψηλές τιμές απόδοσης εγκλεισμού επιτεύχθηκαν και μέσω συνδυασμού του αλγινικού με άλλα υλικά, την κ-καραγενάνη και το CNC, φτάνοντας μέχρι και 91.3% μέσω εξώθησης και 98.8% μέσω γαλακτωματοποίησης. Τα συγκεκριμένα εγκλειστικά μίγματα δημιουργούν ένα αρκετά σταθερό και πυκνό πλέγμα, εγκλείοντας με επιτυχία μεγάλο ποσοστό προβιοτικών κυττάρων, και ως εκ τούτου προτείνονται ως αποτελεσματικοί φορείς εγκλεισμού των προβιοτικών βακτηρίων. Αντίθετα, η χρήση μόνο αλγινικού νατρίου ως εγκλειστικού μέσου οδήγησε στις χαμηλότερες αποδόσεις εγκλεισμού (60.5% μέσω εξώθησης και 86.9% μέσω γαλακτωματοποίησης), ενώ η προσθήκη ξανθάνης, γλυκερόλης ή μίγματος σκόνης ορού γάλακτος-πηκτικής αύξησε αρκετά τις τιμές αυτές, είτε στην περίπτωση της εξώθησης (73.2, 78.0, 86.9% αντίστοιχα), είτε στην περίπτωση της γαλακτωματοποίησης (87.1, 92.6 και 87.4%). Ακόμη, η προσθήκη γλυκόζης φάνηκε να ευνοεί τη βιωσιμότητα των προβιοτικών κυττάρων κατά τη διάρκεια του εγκλεισμού, αυξάνοντας ελαφρώς την απόδοση εγκλεισμού.

Τα ίδια εγκλειστικά μίγματα (μίγματα αλγινικού με γλυκόζη και κ-καραγενάνη, CNC ή γάλα) που έδωσαν υψηλές τιμές απόδοσης εγκλεισμού παρείχαν, επίσης, ικανοποιητική προστασία στα εγκλεισμένα προβιοτικά κύτταρα τόσο κατά τη διατήρηση των προϊόντων εγκλεισμού υπό ψύξη ή κατάψυξη, όσο και κατά την έκθεσή τους σε συνθήκες προσομοίωσης πέψης. Τα υψηλότερα ποσοστά επιβίωσης κατά την αποθήκευση των προϊόντων εγκλεισμού στους 4°C επιτεύχθηκαν μέσω της τεχνικής της εξώθησης, ξεπερνώντας το 72%, σε αντίθεση με τα ποσοστά επιβίωσης που επιτεύχθηκαν με τα συγκεκριμένα εγκλειστικά μίγματα μέσω γαλακτωματοποίησης (>51.1%). Η χρήση, μόνο, αλγινικού ως εγκλειστικό μέσο δεν είχε ικανοποιητικά αποτελέσματα, και έτσι μελετήθηκε ο συνδυασμός του με άλλα υλικά. Τα βέλτιστα αποτελέσματα επιτεύχθηκαν, όπως και στην περίπτωση της απόδοσης εγκλεισμού, μέσω συνδυασμού γάλακτος με αλγινικό, με ποσοστά

επιβίωσης, μετά από 30 ημέρες αποθήκευσης στους 4°C, που ανέρχονταν στο 72.0% στην περίπτωση εγκλεισμού μέσω εξώθησης και στο 52.7% στην περίπτωση εγκλεισμού μέσω γαλακτωματοποίησης. Στην περίπτωση του εγκλεισμού μέσω εξώθησης, ο συνδυασμός αλγινικού με ξανθάνη, γλυκερόλη, μίγμα σκόνης ορού γάλακτος-πηκτίνης, κ-καραγενάνη ή CNC βοήθησε στη διατήρηση ενός μέρους της βιωσιμότητας των προβιοτικών κυττάρων (28.6-37.8%) μέχρι το τέλος των 30 ημερών αποθήκευσης στους 4°C. Ακόμη, αξίζει να σημειωθεί ότι σε όλα τα εγκλειστικά μίγματα πέραν του μίγματος γάλακτος-αλγινικού, η προσθήκη γλυκόζης οδήγησε σε αξιοσημείωτη αύξηση (12.9-42.2%) της βιωσιμότητας κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης υπό ψύξη. Η προσθήκη, επίσης, ινουλίνης σε κάθε εγκλειστικό μίγμα αύξησε μερικώς στις περισσότερες περιπτώσεις τη βιωσιμότητα των προβιοτικών κυττάρων. Αντίστοιχη τάση, όσον αφορά τη συμπεριφορά των εγκλειστικών μιγμάτων, παρατηρήθηκε και κατά την αποθήκευση των προϊόντων εγκλεισμού στους -18°C, καθώς με τα συγκεκριμένα εγκλειστικά μέσα (μίγματα αλγινικού με γλυκόζη και κ-καραγενάνη, CNC ή γάλα) επιτεύχθηκαν ποσοστά επιβίωσης 69.9-82.4% μέσω εξώθησης και 49.6-55.2% μέσω γαλακτωματοποίησης. Όσον αφορά το βακτηριακό φορτίο των προϊόντων εγκλεισμού μέσω εξώθησης, αυτό διατηρήθηκε σε επίπεδα άνω των 6 log cfu g<sup>-1</sup> μέχρι και για 30 ημέρες αποθήκευση στους 4°C ή στους -18°C στην περίπτωση των μιγμάτων κ-καραγενάνης, CNC ή γάλακτος με αλγινικό και γλυκόζη. Επιπρόσθετα, στην περίπτωση αποθήκευσης σε τόσο χαμηλές θερμοκρασίες η προσθήκη γλυκερόλης στο εγκλειστικό μίγμα είχε σημαντική συμβολή, με αποτέλεσμα τα ποσοστά επιβίωσης του προβιοτικού στελέχους μετά από διατήρηση στους -18°C για 30 ημέρες να φτάνουν στο 82.5% στην περίπτωση των προϊόντων εγκλεισμού μέσω εξώθησης και στο 57.1% στην περίπτωση των προϊόντων εγκλεισμού μέσω γαλακτωματοποίησης.

Εξίσου ενθαρρυντικά ήταν τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη δοκιμή προσομοίωσης πέψης, με τα βέλτιστα ποσοστά επιβίωσης του προβιοτικού στελέχους BB-12 (78.4%) να επιτυγχάνονται στα προϊόντα εγκλεισμού που παρήχθησαν μέσω εξώθησης με εγκλειστικό μέσο το μίγμα γάλακτος-αλγινικού. Τα αντίστοιχα προϊόντα εγκλεισμού μέσω γαλακτωματοποίησης διατήρησαν τη βιωσιμότητα του προβιοτικού στελέχους BB-12 μέχρι και 45.7%. Επιπρόσθετα, καθώς το αλγινικό μόνο του δεν παρείχε επαρκή προστασία στα εγκλεισμένα προβιοτικά κύτταρα, δοκιμάστηκαν συνδυασμοί αλγινικού με κ-καραγενάνη, ξανθάνη, σκόνη ορού γάλακτος-πηκτίνης ή CNC, οι οποίοι αύξησαν τα ποσοστά επιβίωσης κατά 7.9-44.6% στην περίπτωση εγκλεισμού μέσω εξώθησης και μέχρι 28.1% στην περίπτωση εγκλεισμού μέσω γαλακτωματοποίησης. Η προσθήκη της πρεβιοτικής ουσίας, της ινουλίνης, είχε σημαντική επίδραση στη βιωσιμότητα των προβιοτικών κυττάρων κατά την έκθεσή τους σε σύστημα προσομοίωσης πέψης, αυξάνοντας σε κάθε περίπτωση τα ποσοστά επιβίωσης, ενώ η προσθήκη γλυκόζης ή L-κυστεΐνης-HCl δεν είχε κάποια σημαντική συνεισφορά στη βιωσιμότητα των εγκλεισμένων προβιοτικών βακτηρίων μέσω των δύο μεθόδων εγκλεισμού.

Από την παρατήρηση των προϊόντων εγκλεισμού μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM) προέκυψε ότι η προσθήκη γλυκόζης, κ-καραγενάνης, CNC ή γάλακτος στο εγκλειστικό μίγμα βελτίωσε τη δομή των προϊόντων εγκλεισμού μέσω εξώθησης, στα οποία επιβεβαιώθηκε η απουσία ρωγμών ή διακριτών πόρων, επαληθεύοντας την παρεχόμενη προστασία στα εγκλεισμένα προβιοτικά βακτήρια. Τα προϊόντα εγκλεισμού που

παρήχθησαν μέσω γαλακτωματοποίησης χαρακτηρίζονταν από μικρότερο μέγεθος, περισσότερο ανομοιόμορφη μορφολογία και είχαν τάση σχηματισμού συσσωματωμάτων.

Κατά την εφαρμογή της καινοτόμου μεθόδου εγκλεισμού μέσω συνδυασμού διπλού  $v_1/\epsilon/v_2$  γαλακτώματος με την τεχνική της εξώθησης, με βάση τις μετρήσεις του ζ-δυναμικού και του ιξώδους των διαλυμάτων που εξετάστηκαν για χρήση ως εξωτερική φάση του διπλού γαλακτώματος, προέκυψε ως καταλληλότερο μέσο εγκλεισμού το αλγινικό καθώς οδήγησε στο σχηματισμό του πιο σταθερού γαλακτώματος. Συγκεκριμένα, το διάλυμα αλγινικού εμφάνισε την υψηλότερη απόλυτη τιμή ζ-δυναμικού (-65.1 mV). Αντίθετα, το διάλυμα μίγματος αραβικού κόμμεος και αλγινικού οξέος είχε τη χαμηλότερη απόλυτη τιμή ζ-δυναμικού (-18.8 mV). Το διπλό γαλακτώμα που σχηματίστηκε με εξωτερική φάση μόνο αλγινικό εμφάνισε τη μεγαλύτερη απόλυτη τιμή ζ-δυναμικού (3.4 mV) και τη χαμηλότερη τιμή ιξώδους (34.3 cP) σε σύγκριση με τα υπόλοιπα εξεταζόμενα  $v_1/\epsilon/v_2$  γαλακτώματα που εμφάνισαν απόλυτες τιμές ζ-δυναμικού μεταξύ 0.1-1.6 mV και τιμές ιξώδους μεταξύ 56.7-283.4 cP. Η εφαρμογή του μέσου αυτού ως εγκλειστικού με τους συνδυασμούς που αναφέρθηκαν παραπάνω οδήγησε σε τιμές απόδοσης εγκλεισμού που κυμάνθηκαν μεταξύ 72.5% και 81.6%. Η ενσωμάτωση του προβιοτικού στελέχους *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 εντός της εσωτερικής φάσης του διπλού  $v_1/\epsilon/v_2$  είχε ως αποτέλεσμα τη διατήρηση της βιωσιμότητάς του πάνω από το ελάχιστο όριο των 6 log cfu g<sup>-1</sup> σε κάθε περίπτωση κατά τη διάρκεια αποθήκευσης στους 4°C ή στους -18°C. Η επικάλυψη των προϊόντων εγκλεισμού με χιτοζάνη οδήγησε στα βέλτιστα ποσοστά επιβίωσης (82-86.1%) κατά την έκθεση των προϊόντων εγκλεισμού σε συνθήκες προσομοίωσης πέψης.

Με βάση τα συνολικά αποτελέσματα έγινε επιλογή των κατάλληλων προϊόντων εγκλεισμού, τα οποία παρήχθησαν μέσω των πιο βιώσιμων βιομηχανικά μεθόδων εγκλεισμού, για ενσωμάτωσή τους σε γάλα μαζί με συμβατική καλλιέργεια εκκίνησης με σκοπό την παραγωγή προβιοτικού γιαουρτιού. Έτσι, στο τελευταίο μέρος της διδακτορικής διατριβής τα προϊόντα που παρήχθησαν μέσω των τεχνικών της εξώθησης και της γαλακτωματοποίησης (τεχνικές που θεωρούνται άμεσα εφαρμόσιμες σε βιομηχανική κλίμακα) με βάση τα εγκλειστικά μίγματα αλγινικού με γλυκόζη και κ-καραγενάνη, CNC, γάλα, ή συνδυασμό σκόνης ορού γάλακτος-πηκτίνης ενσωματώθηκαν σε γάλα για παραγωγή προβιοτικού γιαουρτιού. Έγινε μελέτη της επίδρασης εγκλεισμένων ή ελεύθερων προβιοτικών βακτηρίων στη διεργασία της ζύμωσης κατά την προσθήκη τους στο γάλα σε συνδυασμό με συμβατική καλλιέργεια εκκίνησης. Η χρήση τόσο εγκλεισμένων όσο και ελεύθερων προβιοτικών βακτηρίων επηρέασε την εξέλιξη της ζύμωσης του γάλακτος (λανθάνουσα φάση, φάση μέγιστου ρυθμού μείωσης pH, συνολικός χρόνος ζύμωσης) επιταχύνοντας τη συνολική διεργασία παραγωγής του γιαουρτιού. Ο εγκλεισμός των προβιοτικών βακτηρίων περιόρισε τη συνεισφορά τους στη ζύμωση, ενώ μικρότερη λανθάνουσα φάση (176-186 min) και συνολικό χρόνο ζύμωσης (205-210 min) και μεγαλύτερη απόλυτη τιμή μέγιστου ρυθμού μείωσης pH (0.032-0.036 min<sup>-1</sup>) εμφάνισαν τα γιαούρτια με προϊόντα εγκλεισμού μέσω γαλακτωματοποίησης, ανεξάρτητα από το χρησιμοποιούμενο εγκλειστικό μέσο. Η χρήση εγκλεισμένων προβιοτικών βακτηρίων αύξησε τόσο τις τιμές του ιξώδους του γιαουρτιού (έως και 45483 cP έναντι 18594 cP γιαουρτιού μόνο με συμβατική καλλιέργεια μετά από 24 h αποθήκευση στους 4°C) όσο και τις τιμές της σταθερότητας του πήγματος (έως 0.82 N έναντι 0.62 N στην περίπτωση γιαουρτιού μόνο με

συμβατική καλλιέργεια), της προσκολλησιμότητας (έως 0.65 N·s έναντι 0.31 N·s στην περίπτωση του γιαουρτιού με μόνο συμβατική καλλιέργεια) και της ελαστικότητας (3.01 έως έναντι 2.15 στην περίπτωση του γιαουρτιού με μόνο συμβατική καλλιέργεια). Ο εγκλεισμός των προβιοτικών βακτηρίων, ειδικά μέσω της τεχνικής της εξώθησης, αύξησε το ποσοστό επιβίωσής τους τόσο κατά την αποθήκευση των γιαουρτιών, όσο και κατά την έκθεσή τους σε συνθήκες προσομοίωσης του γαστρεντερικού συστήματος. Τα μέγιστα ποσοστά επιβίωσης επιτεύχθηκαν κατά τον εγκλεισμό των προβιοτικών κυττάρων σε μίγμα αλγινικού-γάλακτος μέσω εξώθησης, πλησιάζοντας το 81.6% μετά από 30 ημέρες αποθήκευσης του γιαουρτιού υπό ψύξη (έναντι 35.0% στην περίπτωση του γιαουρτιού με μόνο συμβατική καλλιέργεια) και το 85.3% κατά την έκθεση σε συνθήκες προσομοίωσης του γαστρεντερικού συστήματος.

## Title of Dissertation

***Encapsulation of the probiotic strain Bifidobacterium animalis subsp. lactis BB-12 and incorporation of the encapsulated probiotic cells into food matrix***

### Abstract

The encapsulation of probiotic bacteria is defined as the process of entrapping probiotic cells in food-grade materials in order to produce particles with a thin, semipermeable film having a diameter of a few nanometers to a few millimeters. The produced beads can be incorporated into food matrices for the production of probiotic products. The aim of the encapsulation technology is the limitation of probiotic cell deterioration or loss when exposed to adverse conditions during storage and/or consumption. In addition, the encapsulation of probiotic bacteria provides the food industry with flexibility in developing products containing certain bacterial species.

In the current thesis, the encapsulation of probiotic bacteria is examined in order to subsequently integrate the encapsulated probiotic cells into a food matrix. The probiotic strain *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 was selected for the encapsulation, whereas the extrusion and the emulsification techniques were applied as the encapsulation methods. The extrusion method is based on the addition of the encapsulation blend, containing the probiotic cells, to a CaCl<sub>2</sub> solution, leading to the formation of beads through crosslinking. Accordingly, the emulsification method is based on the dispersion of an aqueous phase containing the encapsulating blend and the probiotic bacteria within an oil phase and the forthcoming emulsion formation. When the emulsion comes in contact with a CaCl<sub>2</sub> solution, crosslinking occurs as in the case of extrusion, resulting in the conversion of the droplets into solid particles. The encapsulation blends applied through these two encapsulation methods, included: sodium alginate on its own, as well as in combination with other materials either conventional such as xanthan, glycerol, κ-carrageenan and whey powder along with pectin, or innovative materials, such as nanocrystalline cellulose (CNC). Moreover, the use of milk instead of water for the preparation of the sodium alginate solution was studied. Inulin, glucose or L-cysteine-HCl were also added into the encapsulation blends in order to examine their effect on the viability of the probiotic bacteria.

Moreover, an innovative encapsulation method was applied which combines a double w<sub>1</sub>/o/w<sub>2</sub> emulsion with the extrusion technique, aiming to the increase of the provided protection. The application of this innovative method included the use of various encapsulating agents (alginate only, alginate-pectin, alginate-gelatin, alginate-casein, alginate-arabic gum) as the external phase for the formation of the double emulsion. Based on the ζ-potential and viscosity values, the most stable emulsion was selected for extrusion. In each case, the probiotic strain BB-12 was incorporated into the internal phase of the double emulsion along with inulin. Furthermore, the option of coating the produced beads with chitosan was studied.

The aim of the above was to evaluate the ability of these materials to encapsulate probiotic bacteria and protect them efficiently during refrigerated or frozen storage, as well as during

their exposure to simulated gastrointestinal conditions. The efficacy of each method regarding the encapsulation of the probiotic strain *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 was examined through the encapsulation yield (EY%), whereas the provided protection was assessed by determining the survival rates (SR%) of the probiotic cells. All of the above were determined through microbiological analysis. Scanning Electron Microscopy (SEM) was also used in order to study the structure and morphology of the encapsulation products.

The first two encapsulation methods (extrusion, emulsification) resulted in high encapsulation yield values, with the best results, generally, being achieved through the emulsification technique (84.2-99.7%) versus the extrusion technique (58.6-100%). Regarding the examined encapsulation agents, the milk-alginate-glucose blend provided the best results, with encapsulation yields of 100.0% and 99.2% through the extrusion and emulsification technique, respectively. High encapsulation efficiency values were also achieved through the combination of alginate with other materials, such as carrageenan and CNC, reaching up to 91.3% through the extrusion method and up to 98.8% through the emulsification method. These encapsulation blends form a sufficiently stable and dense grid which successfully encloses a great percentage of probiotic cells. Thus, they are proposed as effective carriers of probiotic bacteria. In contrast, the use of sodium alginate alone as an encapsulating agent resulted in lower encapsulation yields (60.5% through extrusion and 86.9% through emulsification), whereas the addition of xanthan, glycerol or a mixture of whey powder and pectin significantly increased these values, either in the case of extrusion (73.2, 78.0, 86.9% respectively), or in the case of emulsification (87.1, 92.6 and 87.4%). Furthermore, the addition of glucose was proved to be favorable for the viability of probiotic cells during encapsulation, slightly increasing the encapsulation yield.

The encapsulation blends (blends of alginate with glucose and  $\kappa$ -carrageenan, CNC or milk) which resulted in high encapsulation yield values provided, also, adequate protection to the encapsulated probiotic cells both during refrigerated or frozen storage and exposure to simulated gastrointestinal conditions. The highest survival rates during storage at 4°C were achieved through the extrusion technique, exceeding 72%, in contrast with the survival rates achieved using the same encapsulation blends through emulsification (> 51.1%). The use of alginate alone as an encapsulation agent did not provide satisfactory results and, thus, its combination with other materials was examined. As in the case of the encapsulation yield, the optimal results were achieved through the combination of milk with alginate, providing survival rates up to 72.0% in the case of encapsulation through extrusion and 52.7% in the case of encapsulation through emulsification, after 30 days of storage at 4°C. In the case of the extrusion method, the combination of alginate with xanthan, glycerol, whey-pectin powder mixture, carrageenan or CNC maintained the probiotic cells' survival rates up to 28.6-37.8% until the end of 30-days storage. Also, it is worth noting that the addition of glucose in all the encapsulating blends, except from the milk-alginate blend, led to significant viability increase (12.9-42.2%) during refrigerated storage. The addition of inulin to each encapsulation blend increased, in most cases, the viability of the probiotic cells. A similar trend regarding the behavior of the encapsulating blends was observed during storage at -18°C; the utilization of the previously referred encapsulating blends (blends of alginate with glucose and  $\kappa$ -carrageenan, CNC or milk) led to survival rates of 69.9-82.4% when

encapsulation was applied through extrusion and 49.6-55.2% when it was applied through emulsification. Regarding the bacterial load of the beads produced through extrusion, it was maintained at levels above  $6 \log \text{cfu g}^{-1}$  for up to 30 days of storage at  $4^\circ\text{C}$  or  $-18^\circ\text{C}$  in the case of blends of carrageenan, CNC or milk with alginate and glucose. In addition, in the case of storage at low temperatures, the addition of glycerol in the encapsulation blend significantly contributed to the viability maintenance; after 30 days of storage at  $-18^\circ\text{C}$ , survival rates of 82.5% and 57.1% were achieved in the case of extrusion and emulsification technique, respectively.

The results obtained from the exposure of encapsulated probiotic bacteria to simulated gastrointestinal conditions were also encouraging; the best survival rates were achieved in the case of beads produced through the extrusion of the milk-alginate blend (78.4%). The respective beads produced through emulsification maintained the viability of the probiotic strain BB-12 up to 45.7%. In addition, as alginate alone did not provide adequate protection to the encapsulated probiotic cells, its combinations with carrageenan, xanthan, whey powder-pectin or CNC were tested. This resulted in increased survival rates of 7.9-44.6% in the case of extrusion and of 28.1% in the case of emulsification. The addition of the prebiotic inulin to the encapsulating blend had a significant effect on the viability of probiotic cells when exposed to simulated gastrointestinal conditions, as it increased their survival at all cases. On the other hand, the addition of glucose or L-cysteine-HCl to the encapsulation blend did not contribute significantly to the viability of the encapsulated probiotic bacteria.

According to the beads' examination by scanning electron microscopy (SEM), the addition of glucose, carrageenan, CNC or milk to the encapsulation blend improved the structure of the extrusion products, as no cracks or discrete pores were observed, thus confirming the protective effect on the probiotic bacteria. The beads produced through emulsification were characterized by smaller size, more uneven morphology and tendency to form agglomerates.

Regarding the encapsulation of BB-12 through the innovative method that combines the double  $w_1/o/w_2$  emulsion with the extrusion technique, the aquatic solution of alginate on its own, was the most stable, based on the  $\zeta$ -potential and the viscosity values of the solutions used as the external phase of the double emulsions. The alginate solution had the highest absolute  $\zeta$ -potential value (-65.1 mV), whereas the aquatic solution of gum arabic and alginate had the lowest absolute  $\zeta$ -potential value (-18.8 mV). The double emulsion formed with alginate only as the external phase had the highest absolute  $\zeta$ -potential value (3.4 mV) and the lowest viscosity value (34.3 cP) in comparison to the other double emulsions that exhibited absolute  $\zeta$ -potential values between 0.1-1.6 mV and viscosity values between 56.7 and 283.4 cP. The application of this double emulsion with or without inulin for the encapsulation of BB-12, as well as with or without chitosan coating, led to encapsulation yields ranging between 72.5% and 81.6%. The incorporation of the probiotic strain *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 into the internal phase of the double  $w_1/o/w_2$  resulted, in all cases, in maintaining the viability above  $6 \log \text{cfu g}^{-1}$  during storage at  $4^\circ\text{C}$  or  $-18^\circ\text{C}$ . Coating the beads with chitosan resulted in optimal survival rates (82-86.1%) after the exposure of the beads to simulated gastrointestinal conditions.

Based on the overall results, the best encapsulation products obtained through the most sustainable methods were incorporated in milk along with conventional starter culture for the production of probiotic yogurt. Thus, in the last part of the thesis, the beads produced through extrusion and emulsification - which are considered industrially applicable methods – encapsulated with blends of alginate with glucose and carrageenan, CNC, milk or a mixture of whey powder and pectin were used. The fermentation process was accelerated by the addition of both encapsulated or free probiotic bacteria. The encapsulation of probiotic bacteria reduced their contribution to fermentation; the fermentation of products with beads produced through emulsification exhibited the shortest latent phases (176-186 min) and fermentation times (205-210 min) and the higher absolute values of maximum pH reduction rate ( $0.032-0.036 \text{ min}^{-1}$ ), regardless of the encapsulating agent used. The addition of encapsulated probiotic bacteria increased both the viscosity values of yogurt (up to 45483 cP versus 18594 cP of yogurt with only conventional culture after 24 h of storage at 4°C) and the values of firmness (up to 0.82 N versus 0.62 N in the case of yogurt with only conventional culture), adhesiveness (up to 0.65 N·s versus 0.31 N·s in the case of yogurt with only conventional culture) and elasticity (3.01 to 2.15 in the case of yogurt with only conventional culture). In agreement with the results reported earlier, the encapsulation of probiotic bacteria, especially through the extrusion technique, increased their survival rates both during storage and exposure to simulated gastrointestinal conditions. The maximum survival rates were achieved when the probiotic cells were encapsulated into an alginate-milk blend through the extrusion method, reaching up to 81.6%, after 30 days of refrigerated storage (compared with 35% in the case of conventional yogurt) and 85.3% upon exposure to simulated gastrointestinal conditions.



## Περιεχόμενα

Εισαγωγή.....	30
<b>1. Προβιοτικά βακτήρια .....</b>	<b>31</b>
1.1. Ορισμός.....	31
1.2. Στελέχη προβιοτικών βακτηρίων.....	31
1.3 Προβιοτική δράση .....	35
1.3.1. Μηχανισμός δράσης.....	35
1.3.2. Οφέλη στην υγεία.....	38
1.3.3. Ασφάλεια προβιοτικών βακτηρίων .....	40
1.4. Κριτήρια επιλογής προβιοτικών βακτηρίων .....	41
1.4.1. Κριτήρια ασφάλειας .....	41
1.4.2. Λειτουργικά κριτήρια .....	42
1.4.3. Τεχνολογικά κριτήρια .....	42
1.5. Η νομοθετική προσέγγιση του θέματος των προβιοτικών βακτηρίων.....	43
1.5.1. Νομοθεσία και ασφάλεια προβιοτικών βακτηρίων .....	43
1.5.2. Νομοθεσία και επισήμανση τροφίμων που περιέχουν προβιοτικά βακτήρια .....	46
1.6. Προβιοτικά βακτήρια νέας γενιάς – <i>Next generation probiotics (NGP)</i> .....	47
1.7. Χρήση πρεβιοτικών ουσιών για την ενίσχυση της βιωσιμότητας των προβιοτικών βακτηρίων .....	49
1.7.1. Ορισμός πρεβιοτικών ουσιών .....	49
1.7.2. Κριτήρια ταξινόμησης πρεβιοτικών ουσιών .....	51
1.7.3. Κατηγορίες πρεβιοτικών ουσιών.....	51
1.8. Συμβιωτικό Σύστημα .....	53
<b>2. Εγκλεισμός προβιοτικών βακτηρίων .....</b>	<b>55</b>
2.1. Ορισμός.....	55
2.2. Δυνατότητες και οφέλη του εγκλεισμού .....	55
2.3. Απαιτήσεις και δυσκολίες κατά την εφαρμογή του εγκλεισμού σε προβιοτικά βακτήρια .....	55
2.4. Σχεδιασμός συστήματος εγκλεισμού .....	60
2.5. Μέθοδοι Εγκλεισμού.....	60
2.5.1. Γαλακτωματοποίηση ( <i>Emulsification</i> ) .....	60
2.5.2. Εξώθηση ( <i>Extrusion</i> ) .....	63
2.5.3 Τεχνική Συσσωμάτωσης/Κροκίδωσης ( <i>Coacervation</i> ) - Διαχωρισμός Φάσεων.....	65
2.5.4. Ξήρανση με ψεκασμό ( <i>Spray drying</i> ).....	69

2.5.5. Ξήρανση με Ψεκασμό με Χρήση Υπερήχων υπό Κενό ( <i>Ultrasonic Vacuum Spray Drying</i> ).....	71
2.5.6. Ξήρανση με κατάψυξη ( <i>Freeze drying</i> ).....	72
2.5.7. Ξήρανση με ψεκασμό υπό κατάψυξη ( <i>Spray-freeze drying</i> ) .....	74
2.5.8. Κατάψυξη με ψεκασμό ( <i>Spray chilling</i> ) .....	75
2.5.9. Εγκλεισμός με χρήση ρευστοστερεάς κλίνης ( <i>Fluidized bed coating</i> ).....	77
2.5.10. Ηλεκτροστατική εναπόθεση ( <i>electrospraying</i> ) - ινοποίηση ( <i>electrospinning</i> )....	79
2.5.11. Τεχνολογία πρόσκρουσης εναιωρημάτων ( <i>Impinging aerosol technology</i> ) .....	82
2.5.12. Εξώθηση διπλού $v_1/\epsilon/v_2$ γαλακτώματος ( <i>Extrusion of double <math>w_1/o/w_2</math> emulsion</i> ) .....	83
<b>2.6. Μέσα εγκλεισμού</b> .....	<b>86</b>
<b>3. Ενσωμάτωση εγκλεισμένων προβιοτικών βακτηρίων σε τρόφιμα-φορείς</b> .....	<b>89</b>
3.1. Γαλακτοκομικά προϊόντα με εγκλεισμένα προβιοτικά βακτήρια .....	90
3.1.1. Γιαούρτι.....	90
3.1.2. Τυρί .....	92
3.1.3. Επιδόρπια .....	93
3.2. Μη γαλακτοκομικά προϊόντα με εγκλεισμένα προβιοτικά βακτήρια.....	98
<b>4. Πειραματικό Μέρος</b> .....	<b>102</b>
4.1. Σκοπός.....	102
4.2. Υλικά & Συσκευές.....	105
4.2.1. Υλικά.....	105
4.2.2. Συσκευές& Όργανα .....	105
4.3. Πειραματική διαδικασία .....	106
4.3.1. Παρασκευή διαλυμάτων των εγκλειστικών μιγμάτων .....	106
4.3.2. Εγκλεισμός του προβιοτικού στελέχους BB-12 μέσω της τεχνικής της εξώθησης ( <i>extrusion</i> ) .....	107
4.3.3. Εγκλεισμός του προβιοτικού στελέχους BB-12 μέσω της τεχνικής της γαλακτωματοποίησης ( <i>emulsification</i> ).....	108
4.3.4. Εγκλεισμός του προβιοτικού στελέχους BB-12 μέσω συνδυασμού διπλού $v_1/\epsilon/v_2$ γαλακτώματος με βάση το πυρηνέλαιο και της τεχνικής της εξώθησης.....	110
4.3.5. Ενσωμάτωση εγκλεισμένων προβιοτικών βακτηρίων σε γάλα και ζύμωση αυτού για παραγωγή προβιοτικού γιαουρτιού .....	111
4.4. Αναλύσεις - Μετρήσεις .....	112
4.4.1. Προσδιορισμός των ζώντων προβιοτικών βακτηρίων στα προϊόντα εγκλεισμού (εγκλεισμένων βακτηρίων).....	112

4.4.2. Εκτίμηση της απόδοσης των τεχνικών εγκλεισμού (EY%) .....	113
4.4.3. Εκτίμηση της βιωσιμότητας των εγκλεισμένων κυττάρων BB-12 κατά τη διατήρηση υπό ψύξη (4°C) ή κατάψυξη (-18°C).....	113
4.4.4. Εκτίμηση της βιωσιμότητας των εγκλεισμένων κυττάρων BB-12 σε συνθήκες προσομοίωσης του γαστρεντερικού συστήματος .....	113
4.4.5. Αξιολόγηση της δομής των προϊόντων εγκλεισμού (εγκλεισμένων βακτηρίων) μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM).....	114
4.4.6. Κινητική μελέτη ζύμωσης προς παραγωγή γιαουρτιού.....	114
4.4.7. Αξιολόγηση των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών των τελικών ζυμωμένων προϊόντων γιαουρτιού.....	115
4.4.8. Μελέτη χρόνου ζωής των τελικών προϊόντων γιαουρτιού ως φορέων προβιοτικών βακτηρίων .....	117
4.4.9. Εκτίμηση βιωσιμότητας των εγκλεισμένων κυττάρων BB-12 ενσωματωμένων σε γιαούρτι κατά την έκθεση σε συνθήκες προσομοίωσης του γαστρεντερικού συστήματος .....	117
<b>4.5. Σχεδιασμός πειραμάτων .....</b>	<b>118</b>
<b>4.6. Στατιστική Ανάλυση .....</b>	<b>120</b>
<b>5. Αποτελέσματα – Συζήτηση.....</b>	<b>121</b>
<b>5.1. Εγκλεισμός του προβιοτικού στελέχους BB-12 μέσω της τεχνικής της εξώθησης (extrusion).....</b>	<b>123</b>
5.1.1. Εκτίμηση απόδοσης εγκλεισμού (EY%) της τεχνικής της εξώθησης.....	123
5.1.2. Σταθερότητα εγκλεισμένου προβιοτικού στελέχους BB-12 μέσω της τεχνικής της εξώθησης κατά τη διατήρηση σε συνθήκες ψύξης ή κατάψυξης .....	126
5.1.3 Εκτίμηση βιωσιμότητας (SR%) εγκλεισμένου προβιοτικού στελέχους BB-12 μέσω της τεχνικής της εξώθησης κατά την έκθεσή του σε συνθήκες προσομοίωσης του γαστρεντερικού συστήματος (ΠΓΥ-ΠΕΥ).....	134
5.1.4 Αξιολόγηση μικροδομής και μορφολογίας προϊόντων εγκλεισμού μέσω της τεχνικής της εξώθησης με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM) .....	138
<b>5.2. Εγκλεισμός του προβιοτικού στελέχους BB-12 μέσω της τεχνικής της γαλακτωματοποίησης (emulsification) .....</b>	<b>143</b>
5.2.1. Εκτίμηση απόδοσης εγκλεισμού (EY%) της τεχνικής της γαλακτωματοποίησης..	143
5.2.2. Σταθερότητα εγκλεισμένου προβιοτικού στελέχους BB-12 μέσω της τεχνικής της γαλακτωματοποίησης κατά τη διατήρηση σε συνθήκες ψύξης ή κατάψυξης .....	145
5.2.3 Εκτίμηση βιωσιμότητας (SR%) εγκλεισμένου προβιοτικού στελέχους BB-12 μέσω της τεχνικής της γαλακτωματοποίησης κατά την έκθεσή του σε συνθήκες προσομοίωσης του γαστρεντερικού συστήματος (ΠΓΥ-ΠΕΥ).....	153

5.2.4 Αξιολόγηση μικροδομής και μορφολογίας προϊόντων εγκλεισμού μέσω της τεχνικής της γαλακτωματοποίησης με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM) .....	157
<b>5.3. Συγκριτική μελέτη των δύο μεθόδων εγκλεισμού (εξώθησης και γαλακτωματοποίησης) .....</b>	<b>161</b>
5.3.1. Αξιολόγηση μεθόδων εγκλεισμού ως προς την απόδοση εγκλεισμού (EY%) του προβιοτικού στελέχους BB-12.....	161
5.3.2. Συγκριτική μελέτη βιωσιμότητας (SR%) του εγκλεισμένου προβιοτικού στελέχους BB-12 μέσω τεχνικών εξώθησης και γαλακτωματοποίησης κατά την διατήρηση των προϊόντων εγκλεισμού σε συνθήκες ψύξης ή κατάψυξης .....	162
5.3.3. Συγκριτική μελέτη βιωσιμότητας (SR%) προβιοτικού στελέχους BB-12 (μέσω τεχνικών εξώθησης και γαλακτωματοποίησης) κατά την έκθεσή του σε συνθήκες προσομοίωσης του γαστρεντερικού συστήματος (ΠΓΥ – ΠΕΥ).....	164
5.3.4.Συσχέτιση αποτελεσματικότητας της συνολικής διαδικασίας εγκλεισμού μέσω των τεχνικών εξώθησης και γαλακτωματοποίησης - Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (PCA) 165	
<b>5.4. Εγκλεισμός του προβιοτικού στελέχους BB-12 μέσω συνδυασμού διπλού <math>v_1/\epsilon/v_2</math> γαλακτώματος με βάση το πυρηνέλαιο και της τεχνικής της εξώθησης .....</b>	<b>168</b>
5.4.1. Χαρακτηρισμός γαλακτώματος και επιλογή του κατάλληλου εγκλειστικού μέσου .....	169
5.4.2. Εκτίμηση απόδοσης εγκλεισμού (EY%) του συνδυασμού διπλού $v_1/\epsilon/v_2$ γαλακτώματος και τεχνικής εξώθησης.....	171
5.4.3. Σταθερότητα εγκλεισμένου προβιοτικού στελέχους BB-12 μέσω συνδυασμού διπλού $v_1/\epsilon/v_2$ γαλακτώματος και τεχνικής εξώθησης κατά την αποθήκευση σε συνθήκες ψύξης ή κατάψυξης – Βιωσιμότητα (SR%) του εγκλεισμένου προβιοτικού στελέχους BB-12 .....	172
5.4.4. Σταθερότητα εγκλεισμένου προβιοτικού στελέχους BB-12 μέσω συνδυασμού διπλού $v_1/\epsilon/v_2$ γαλακτώματος και τεχνικής εξώθησης κατά την έκθεσή του σε συνθήκες προσομοίωσης του γαστρεντερικού συστήματος (ΠΓΥ-ΠΕΥ) .....	175
5.4.5. Αξιολόγηση μικροδομής και μορφολογίας προϊόντων εγκλεισμού μέσω συνδυασμού διπλού $v_1/\epsilon/v_2$ γαλακτώματος και τεχνικής εξώθησης με Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (SEM) .....	177
5.4.6. Συσχέτιση αποτελεσματικότητας της συνολικής διαδικασίας εγκλεισμού μέσω των τριών τεχνικών εγκλεισμού: εξώθησης, γαλακτωματοποίησης και συνδυασμού διπλού γαλακτώματος με την τεχνική της εξώθησης - Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (PCA)...	178
<b>5.5. Ενσωμάτωση εγκλεισμένων προβιοτικών βακτηρίων μέσω εξώθησης ή γαλακτωματοποίησης σε γάλα και ζύμωση αυτού για παραγωγή προβιοτικού γιαουρτιού .....</b>	<b>181</b>
5.5.1. Κινητική μελέτη ζύμωσης γάλακτος για παραγωγή προβιοτικού γιαουρτιού .....	182
5.5.2. Αξιολόγηση φυσικοχημικών χαρακτηριστικών τελικών προϊόντων ζύμωσης .....	188
5.5.3. Αξιολόγηση τελικών προϊόντων γιαουρτιού ως φορείς προβιοτικών βακτηρίων	193

Μελέτη χρόνου ζωής των τελικών προβιοτικών προϊόντων γιαουρτιού κατά την αποθήκευση υπό ψύξη (4°C) – Βιωσιμότητα (SR%) εγκλεισμένου προβιοτικού στελέχους BB-12 .....	194
Εκτίμηση βιωσιμότητας (SR%) εγκλεισμένων κυττάρων BB-12 ενσωματωμένων σε γιαούρτι κατά την έκθεση των τελικών προϊόντων προβιοτικού γιαουρτιού σε συνθήκες προσομοίωσης του γαστρεντερικού συστήματος (ΠΓΥ-ΠΕΥ) .....	197
5.5.4. Συσχέτιση προϊόντων γιαουρτιού – Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) .....	199
<b>6. Συμπεράσματα .....</b>	<b>201</b>
<b>8. Βιβλιογραφία.....</b>	<b>207</b>

## Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1.1: Πιθανοί μηχανισμοί δράσης και οφέλη των <i>bifidobacteria</i> στον οργανισμό του ξενιστή (Sanz, 2016).....	37
Εικόνα 1.2: Κατευθυντήριες οδηγίες εφαρμογής QPS (Sanders et al., 2010).....	44
Εικόνα 1.3: Διάκριση μεταξύ πρεβιοτικών και μη ουσιών, με βάση τον πιο πρόσφατο ορισμό. Οι πρεβιοτικές ουσίες πρέπει να χρησιμοποιούνται επιλεκτικά και να υπάρχουν επαρκείς ενδείξεις για την επίδραση στην υγεία του ξενιστή. Οι διατροφικές πρεβιοτικές ουσίες πρέπει να αποικοδομούνται από τα ένζυμα του ξενιστή. Στην εικόνα παρουσιάζονται ουσίες με πιθανή ή αποδεδειγμένη πρεβιοτική δράση, με τους FOS και GOS να αποτελούν τις ευρύτερα μελετημένες πρεβιοτικές ουσίες. ....	52
Εικόνα 2.1: Σχηματική απεικόνιση της διεργασίας της γαλακτωματοποίησης(Burgain et al., 2011) 61	
Εικόνα 2.2: Σχηματική παράσταση του εγκλεισμού προβιοτικών κυττάρων μέσω ζελατινοποίησης με χρήση πυτιάς(Burgain et al., 2011). ....	63
Εικόνα 2.3: Τεχνικές εξώθησης: (α) συσκευή εξώθησης πολλαπλών ακροφυσίων, λειτουργεί συνήθως μέσω της πίεσης αέρα και (β) περιστρεφόμενος δίσκος με ακροφύσια (Burgain et al., 2011). ....	65
Εικόνα 2.4: Συγκριτικό διάγραμμα των τεχνικών εξώθησης, γαλακτωματοποίησης και συσσωμάτωσης.....	68
Εικόνα 2.5: Τυπικό σχηματικό διάγραμμα διάταξης ξήρανσης με ψεκασμό για τον εγκλεισμό προβιοτικών βακτηρίων (Fang and Bhandari, 2012). ....	70
Εικόνα 2.6: Σχηματική παράσταση ξηραντήρα υπερήχων υπό κενό (Semyonov et al., 2011). ....	72
Εικόνα 2.7: Σχηματική απεικόνιση ενός τυπικού εργαστηριακού ξηραντήρα υπό κατάψυξη (απεικονίζονται μόνο τα βασικά στοιχεία της διάταξης) (Fang and Bhandari, 2012). ....	73
Εικόνα 2.8: Σχηματική απεικόνιση της ξήρανσης με ψεκασμό υπό κατάψυξη (Fang and Bhandari, 2012).....	75
Εικόνα 2.9: Συγκριτικό διάγραμμα ροής των τεχνικών ξήρανσης με ψεκασμό, ξήρανσης υπό κατάψυξη και ξήρανσης με ψεκασμό υπό κατάψυξη. ....	75
Εικόνα 2.10: Διάγραμμα ροής της τεχνικής κατάψυξης με ψεκασμό. ....	77
Εικόνα 2.11: Σχηματική απεικόνιση εγκλεισμού με χρήση ρευστοστερεάς κλίνης συνεχούς ροής (Kailasapathy, 2009). ....	78
Εικόνα 2.12: Διάγραμμα ροής της τεχνικής του εγκλεισμού με ρευστοποιημένη κλίνη. ....	78
Εικόνα 2.13: Σχηματική απεικόνιση διάταξης ηλεκτροστατικής ινοποίησης (Shaikh et al., 2010). ....	79
Εικόνα 2.14: Διάγραμμα ροής των τεχνικών ηλεκτροστατικής ινοποίησης και εναπόθεσης. 81	
Εικόνα 2. 15: Διάγραμμα ροής της τεχνολογίας πρόσκρουσης αιωρημάτων. ....	82
Εικόνα 2.16: Σχηματική απεικόνιση της τεχνικής πρόσκρουσης αιωρημάτων για τον εγκλεισμό προβιοτικών βακτηρίων ....	82
Εικόνα 2. 17: Διάγραμμα ροής εξώθησης διπλού γαλακτώματος. ....	84
Εικόνα 4.1: Διάταξη για τον εγκλεισμό του προβιοτικού στελέχους BB-12 μέσω της τεχνικής της εξώθησης. 107	

Εικόνα 4.2: Τυπικό διάγραμμα μεταβολής pH κατά τη διάρκεια της οξυγαλακτικής ζύμωσης γιαουρτιού.....	115
Εικόνα 4.3: Ενδεικτικό διάγραμμα δύναμης-χρόνου που προκύπτει από την προσομοίωση της διαδικασίας της μάζησης κατά την ανάλυση υφής των προϊόντων γιαουρτιού.....	116
Εικόνα 5.1: Ενδεικτικές δομές των προϊόντων εγκλεισμού μέσω τεχνικής εξώθησης με Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης σε μεγέθυνση 50x. Στη συγκεκριμένη εικόνα παρουσιάζονται τα προϊόντα εγκλεισμού (α) A, (β) AI, (γ) AG, (δ) AWP, (ε) AX, (στ) AGI, (ζ) AC, (η) ACNC, (θ) AM. Η κωδικοποίηση των δειγμάτων παρουσιάζεται στον Πίνακα 4.1.	138
Εικόνα 5.3: Ενδεικτικές δομές των διαφορετικών προϊόντων εγκλεισμού μέσω τεχνικής γαλακτωματοποίησης με Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης σε μεγέθυνση 1000x. Στη συγκεκριμένη εικόνα παρουσιάζονται τα προϊόντα εγκλεισμού (α) A/EM, (β) AI/EM, (γ) AWP/EM, (δ) AX/EM, (ε) AGI/EM, (στ) AC/EM, (ζ) ACNC/EM (η) AM/EM. Η κωδικοποίηση των δειγμάτων παρουσιάζεται στον Πίνακα 4.2.....	158
Εικόνα 5.4: Εικόνες Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας Σάρωσης σε μεγεθύνσεις όπου παρουσιάζεται η συνολική μορφολογία των προϊόντων εγκλεισμού μέσω τεχνικής γαλακτωματοποίησης σε διαφορετικές μεγεθύνσεις. Στην εικόνα παρουσιάζεται η λυοφιλιωμένη μορφή του προϊόντος εγκλεισμού A, σε μεγεθύνσεις: α) 100x, (β) 1000x και (γ) 2000x.....	159
Εικόνα 5.4: Εικόνες Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας Σάρωσης σε μεγεθύνσεις όπου παρουσιάζεται η συνολική μορφολογία των προϊόντων εγκλεισμού μέσω τεχνικής γαλακτωματοποίησης σε διαφορετικές μεγεθύνσεις. Στην εικόνα παρουσιάζεται η λυοφιλιωμένη μορφή του προϊόντος εγκλεισμού A, σε μεγεθύνσεις: α) 100x, (β) 1000x και (γ) 2000x.....	160
Εικόνα 5.5: Απεικόνιση σφαιριδίων που προκύπτουν κατά τον εγκλεισμό του προβιοτικού στελέχους BB-12 μέσω συνδυασμού διπλού $v_1/\epsilon/v_2$ γαλακτώματος και της τεχνικής της εξώθησης. ....	168
Εικόνα 5.6: Ενδεικτικές δομές των διαφορετικών προϊόντων εγκλεισμού μέσω συνδυασμού διπλού $v_1/\epsilon/v_2$ γαλακτώματος και τεχνικής εξώθησης με Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης σε μεγέθυνση 40x. Στη συγκεκριμένη εικόνα παρουσιάζονται τα προϊόντα εγκλεισμού (α) A/wow και (β) ACh/wow. Η κωδικοποίηση των δειγμάτων παρουσιάζεται στον Πίνακα 4.3. ....	178
Εικόνα 5.7: Σιγμοειδής καμπύλης μεταβολής pH κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του γάλακτος προς γιαούρτι. ....	185

## Κατάλογος Διαγραμμάτων

Διάγραμμα 5.1: Μεταβολή ποσοστού επιβίωσης (SR%) του εγκλεισμένου προβιοτικού στελέχους BB-12 μέσω της τεχνικής της εξώθησης κατά τη διάρκεια της διατήρησης στους 4°C για 30 ημέρες. Η κωδικοποίηση των δειγμάτων έχει οριστεί στον Πίνακα 4.1.....	128
Διάγραμμα 5.2: Μεταβολή ποσοστού επιβίωσης (SR%) του εγκλεισμένου προβιοτικού στελέχους BB-12 μέσω της τεχνικής της εξώθησης κατά τη διάρκεια διατήρησης στους -18°C για 30 ημέρες. Η κωδικοποίηση των δειγμάτων έχει οριστεί στον Πίνακα 4.1.....	131
Διάγραμμα 5.3: Ποσοστά επιβίωσης (SR%) (μέσος όρος ± τυπική απόκλιση) του εγκλεισμένου προβιοτικού στελέχους BB-12 στα διάφορα εγκλειστικά μίγματα (χωρίς κάποιο πρόσθετο, με ινουλίνη ή με γλυκόζη) μέσω της τεχνικής της εξώθησης μετά την έκθεσή του σε συνθήκες προσομοίωσης γαστρικών υγρών (ΠΓΥ). Η κωδικοποίηση των δειγμάτων έχει οριστεί στον Πίνακα 4.1.....	136
Διάγραμμα 5.4: Ποσοστά επιβίωσης (SR%) (μέσος όρος ± τυπική απόκλιση) του εγκλεισμένου προβιοτικού στελέχους BB-12 στα διάφορα εγκλειστικά μίγματα (χωρίς κάποιο πρόσθετο, με ινουλίνη, με γλυκόζη ή με L-κυστεΐνη-HCl) μέσω της τεχνικής της εξώθησης μετά την έκθεσή του σε συνθήκες προσομοίωσης γαστρικών υγρών (ΠΓΥ). Η κωδικοποίηση των δειγμάτων έχει οριστεί στον Πίνακα 4.1.....	136
Διάγραμμα 5.5: Ποσοστά επιβίωσης (SR%) (μέσος όρος ± τυπική απόκλιση) του εγκλεισμένου προβιοτικού στελέχους BB-12 στα διάφορα εγκλειστικά μίγματα (χωρίς κάποιο πρόσθετο, με ινουλίνη ή με γλυκόζη) μέσω της τεχνικής της εξώθησης μετά την έκθεσή του σε συνθήκες προσομοίωσης εντερικών υγρών (ΠΕΥ). Η κωδικοποίηση των δειγμάτων έχει οριστεί στον Πίνακα 4.1.....	137
Διάγραμμα 5.6: Ποσοστά επιβίωσης (SR%) (μέσος όρος ± τυπική απόκλιση) του εγκλεισμένου προβιοτικού στελέχους BB-12 στα διάφορα εγκλειστικά μίγματα (χωρίς κάποιο πρόσθετο, με ινουλίνη, με γλυκόζη ή με L-κυστεΐνη-HCl) μέσω της τεχνικής της εξώθησης μετά την έκθεσή του σε συνθήκες προσομοίωσης εντερικών υγρών (ΠΕΥ). Η κωδικοποίηση των δειγμάτων έχει οριστεί στον Πίνακα 4.1.....	137
Διάγραμμα 5.7: Μεταβολή ποσοστού επιβίωσης (SR%) του εγκλεισμένου προβιοτικού στελέχους BB-12 μέσω της τεχνικής της γαλακτωματοποίησης κατά τη διάρκεια της διατήρησης στους 4°C για 30 ημέρες. Η κωδικοποίηση των δειγμάτων έχει οριστεί στον Πίνακα 4.2.....	147
Διάγραμμα 5.8: Μεταβολή ποσοστού επιβίωσης του εγκλεισμένου προβιοτικού στελέχους BB-12 μέσω της τεχνικής της γαλακτωματοποίησης κατά τη διάρκεια της διατήρησης στους -18°C για 30 ημέρες. Η κωδικοποίηση των δειγμάτων έχει οριστεί στον Πίνακα 4.2.....	151
Διάγραμμα 5.9: Ποσοστά επιβίωσης (SR%) (μέσος όρος ± τυπική απόκλιση) του εγκλεισμένου προβιοτικού στελέχους BB-12 στα διάφορα εγκλειστικά μίγματα (με ή χωρίς ινουλίνη) μέσω της τεχνικής της γαλακτωματοποίησης μετά την έκθεσή του σε συνθήκες προσομοίωσης γαστρικών υγρών (ΠΓΥ). Η κωδικοποίηση των δειγμάτων έχει οριστεί στον Πίνακα 4.2. ...	155
Διάγραμμα 5.10: Ποσοστά επιβίωσης (SR%) (μέσος όρος ± τυπική απόκλιση) του εγκλεισμένου προβιοτικού στελέχους BB-12 στα διάφορα εγκλειστικά μίγματα (με ή χωρίς ινουλίνη) μέσω της τεχνικής της γαλακτωματοποίησης μετά την έκθεσή του σε συνθήκες προσομοίωσης γαστρικών υγρών (ΠΓΥ). Η κωδικοποίηση των δειγμάτων έχει οριστεί στον Πίνακα 4.2.....	155



Διάγραμμα 5.11: Ποσοστά επιβίωσης (SR%) (μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση) του εγκλεισμένου προβιοτικού στελεχούς BB-12 στα διάφορα εγκλειστικά μίγματα (χωρίς κάποιο πρόσθετο, με ινουλίνη ή με L-κυστεΐνη-HCl) μέσω της τεχνικής της γαλακτωματοποίησης μετά την έκθεσή του σε συνθήκες προσομοίωσης εντερικών υγρών (ΠΕΥ). Η κωδικοποίηση των δειγμάτων έχει οριστεί στον Πίνακα 4.2. ....	156
Διάγραμμα 5.12: Ποσοστά επιβίωσης (SR%) (μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση) του εγκλεισμένου προβιοτικού στελεχούς BB-12 στα διάφορα εγκλειστικά μίγματα (χωρίς κάποιο πρόσθετο, με ινουλίνη ή με L-κυστεΐνη-HCl) μέσω της τεχνικής της γαλακτωματοποίησης μετά την έκθεσή του σε συνθήκες προσομοίωσης εντερικών υγρών (ΠΕΥ). Η κωδικοποίηση των δειγμάτων έχει οριστεί στον Πίνακα 4.2. ....	156
Διάγραμμα 5.13: Συγκριτικό διάγραμμα ποσοστιαίας απόδοσης εγκλεισμού (EY%) μεταξύ των δύο μεθόδων εγκλεισμού (εξώθησης και γαλακτωματοποίησης). Η κωδικοποίηση των δειγμάτων έχει οριστεί στους Πίνακες 4.1 και 4.2. ....	161
Διάγραμμα 5.14: Συγκριτικό διάγραμμα ποσοστού επιβίωσης (SR%) του εγκλεισμένου προβιοτικού στελεχούς BB-12 μεταξύ των δύο μεθόδων εγκλεισμού (εξώθηση & γαλακτωματοποίηση), μετά από 30 ημέρες αποθήκευσης στους 4°C. Η κωδικοποίηση των δειγμάτων έχει οριστεί στους Πίνακες 4.1 και 4.2. ....	163
Διάγραμμα 5.15: Συγκριτικό διάγραμμα ποσοστού επιβίωσης (SR%) του εγκλεισμένου προβιοτικού στελεχούς BB-12 μεταξύ των δύο μεθόδων εγκλεισμού (εξώθηση & γαλακτωματοποίηση), μετά από 30 ημέρες αποθήκευσης στους -18°C. Η κωδικοποίηση των δειγμάτων έχει οριστεί στους Πίνακες 4.1 και 4.2. ....	163
Διάγραμμα 5.16: Συγκριτικό διάγραμμα ποσοστού επιβίωσης (SR%) του εγκλεισμένου προβιοτικού στελεχούς BB-12 μεταξύ των δύο μεθόδων εγκλεισμού (εξώθηση και γαλακτωματοποίηση), μετά από έκθεση σε διάλυμα προσομοίωσης γαστρικών υγρών (ΠΓΥ). Η κωδικοποίηση των δειγμάτων έχει οριστεί στους Πίνακες 4.1 και 4.2. ....	164
Διάγραμμα 5.17: Συγκριτικό διάγραμμα ποσοστού επιβίωσης (SR%) του εγκλεισμένου προβιοτικού στελεχούς BB-12 μεταξύ των δύο μεθόδων εγκλεισμού (εξώθηση και γαλακτωματοποίηση), μετά από έκθεση σε διάλυμα προσομοίωσης εντερικών υγρών (ΠΕΥ). Η κωδικοποίηση των δειγμάτων έχει οριστεί στους Πίνακες 4.1 και 4.2. ....	165
Διάγραμμα 5.18: Διάγραμμα συσχετίσεων των μεταβλητών των πειραμάτων εγκλεισμού του προβιοτικού στελεχούς BB-12 μέσω της Ανάλυσης Κύριων Συνιστωσών (EY%: απόδοση εγκλεισμού, SR%-4°C: ποσοστό επιβίωσης κατά τη διατήρηση στους 4°C, SR%-18°C: ποσοστό επιβίωσης κατά τη διατήρηση στους -18°C, SR%,GT: ποσοστό επιβίωσης κατά την έκθεση σε διάλυμα ΠΓΥ, SR%,IT: ποσοστό επιβίωσης κατά την έκθεση σε διάλυμα ΠΕΥ). ....	166
Διάγραμμα 5.19: Διάγραμμα δειγμάτων-προϊόντων εγκλεισμού του προβιοτικού στελεχούς BB-12 μέσω της Ανάλυσης Κύριων Συνιστωσών. ....	167
Διάγραμμα 5.20: Μεταβολή ποσοστού επιβίωσης (SR%) του εγκλεισμένου προβιοτικού στελεχούς BB-12 μέσω συνδυασμού διπλού $v_1/\epsilon/v_2$ γαλακτώματος και τεχνικής εξώθησης κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης στους 4°C για 30 ημέρες. Η κωδικοποίηση των δειγμάτων έχει οριστεί στον Πίνακα 4.3. ....	173
Διάγραμμα 5.21: Μεταβολή ποσοστού επιβίωσης (SR%) του εγκλεισμένου προβιοτικού στελεχούς BB-12 μέσω συνδυασμού διπλού $v_1/\epsilon/v_2$ γαλακτώματος και τεχνικής εξώθησης κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης στους -18°C για 30 ημέρες. Η κωδικοποίηση των δειγμάτων έχει οριστεί στον Πίνακα 4.3. ....	174

Διάγραμμα 5.22: Διάγραμμα ποσοστών επιβίωσης (SR%) του εγκλεισμένου προβιοτικού στελέχους BB-12 μέσω συνδυασμού διπλού $v_1/\epsilon/v_2$ γαλακτώματος και τεχνικής εξώθησης μετά από έκθεση σε συνθήκες προσομοίωσης γαστρικών (ΠΓΥ). Η κωδικοποίηση των δειγμάτων έχει οριστεί στον Πίνακα 4.3. ....	176
Διάγραμμα 5.23: Διάγραμμα ποσοστών επιβίωσης (SR%) του εγκλεισμένου προβιοτικού στελέχους BB-12 μέσω συνδυασμού διπλού $v_1/\epsilon/v_2$ γαλακτώματος και τεχνικής εξώθησης μετά από έκθεση σε συνθήκες προσομοίωσης εντερικών υγρών (ΠΕΥ). Η κωδικοποίηση των δειγμάτων έχει οριστεί στον Πίνακα 4.3. ....	177
Διάγραμμα 5.24: Διάγραμμα συσχετίσεων των μεταβλητών των πειραμάτων εγκλεισμού του προβιοτικού στελέχους BB-12 μέσω της Ανάλυσης Κύριων Συνιστωσών (EY%: απόδοση εγκλεισμού, SR%-4°C: ποσοστό επιβίωσης κατά τη διατήρηση στους 4°C, SR%-18°C: ποσοστό επιβίωσης κατά τη διατήρηση στους -18°C, SR%,GT: ποσοστό επιβίωσης κατά την έκθεση σε διάλυμα ΠΓΥ, SR%,IT: ποσοστό επιβίωσης κατά την έκθεση σε διάλυμα ΠΕΥ). ....	180
Διάγραμμα 5.25: Διάγραμμα δειγμάτων-προϊόντων εγκλεισμού του προβιοτικού στελέχους BB-12 μέσω της Ανάλυσης Κύριων Συνιστωσών. ....	180
Διάγραμμα 5.26: Συγκριτικό διάγραμμα διάρκειας λανθάνουσας φάσης ζύμωσης γιαουρτιού με συμβατική καλλιέργεια εκκίνησης (Τυφλό), συμβατική καλλιέργεια εκκίνησης σε συνδυασμό με ελεύθερα προβιοτικά βακτήρια (Μη εγκλεισμένο BB12), συμβατική καλλιέργεια σε συνδυασμό με εγκλεισμένα μέσω εξώθησης προβιοτικά βακτήρια και συμβατική καλλιέργεια σε συνδυασμό με εγκλεισμένα μέσω γαλακτωματοποίησης προβιοτικά βακτήρια. Η κωδικοποίηση των δειγμάτων έχει οριστεί στους Πίνακες 4.1 και 4.2. ....	186
Διάγραμμα 5.27: Συγκριτικό διάγραμμα διάρκειας μέγιστου ρυθμού μείωσης pH γιαουρτιού με συμβατική καλλιέργεια εκκίνησης (Τυφλό), συμβατική καλλιέργεια εκκίνησης σε συνδυασμό με ελεύθερα προβιοτικά βακτήρια (Μη εγκλεισμένο BB12), συμβατική καλλιέργεια σε συνδυασμό με εγκλεισμένα μέσω εξώθησης προβιοτικά βακτήρια και συμβατική καλλιέργεια σε συνδυασμό με εγκλεισμένα μέσω γαλακτωματοποίησης προβιοτικά βακτήρια. Η κωδικοποίηση των δειγμάτων έχει οριστεί στους Πίνακες 4.1 και 4.2. ....	187
Διάγραμμα 5.28: Συγκριτικό διάγραμμα συνολικού χρόνου ζύμωσης γιαουρτιού με συμβατική καλλιέργεια εκκίνησης (Τυφλό), συμβατική καλλιέργεια εκκίνησης σε συνδυασμό με ελεύθερα προβιοτικά βακτήρια (Μη εγκλεισμένο BB12), συμβατική καλλιέργεια σε συνδυασμό με εγκλεισμένα μέσω εξώθησης προβιοτικά βακτήρια και συμβατική καλλιέργεια σε συνδυασμό με εγκλεισμένα μέσω γαλακτωματοποίησης προβιοτικά βακτήρια. Η κωδικοποίηση των δειγμάτων έχει οριστεί στους Πίνακες 4.1 και 4.2. ....	187
Διάγραμμα 5.29: Συγκριτικό διάγραμμα ιξώδους στους 45°C γιαουρτιών με συμβατική καλλιέργεια εκκίνησης (Τυφλό), συμβατική καλλιέργεια εκκίνησης σε συνδυασμό με ελεύθερα προβιοτικά βακτήρια (Μη εγκλεισμένο BB12), συμβατική καλλιέργεια σε συνδυασμό με εγκλεισμένα μέσω εξώθησης προβιοτικά βακτήρια (-/EX) και συμβατική καλλιέργεια σε συνδυασμό με εγκλεισμένα μέσω γαλακτωματοποίησης προβιοτικά βακτήρια (-/EM). Η κωδικοποίηση των δειγμάτων έχει οριστεί στους Πίνακες 4.1 και 4.2. ....	189
Διάγραμμα 5.30: Συγκριτικό διάγραμμα ιξώδους στους 4°C γιαουρτιών με συμβατική καλλιέργεια εκκίνησης (Τυφλό), συμβατική καλλιέργεια εκκίνησης σε συνδυασμό με ελεύθερα προβιοτικά βακτήρια (Μη εγκλεισμένο BB12), συμβατική καλλιέργεια σε	

συνδυασμό με εγκλεισμένα μέσω εξώθησης προβιοτικά βακτήρια (-/EX) και συμβατική καλλιέργεια σε συνδυασμό με εγκλεισμένα μέσω γαλακτωματοποίησης προβιοτικά βακτήρια (-/EM). Η κωδικοποίηση των δειγμάτων έχει οριστεί στους Πίνακες 4.1 και 4.2.....189

Διάγραμμα 5.31: Συγκριτικό διάγραμμα σταθερότητας πήγματος γιαουρτιών με συμβατική καλλιέργεια εκκίνησης (Τυφλό), συμβατική καλλιέργεια εκκίνησης σε συνδυασμό με ελεύθερα προβιοτικά βακτήρια (Μη εγκλεισμένο BB12), συμβατική καλλιέργεια σε συνδυασμό με εγκλεισμένα μέσω εξώθησης προβιοτικά βακτήρια (-/EX) και συμβατική καλλιέργεια σε συνδυασμό με εγκλεισμένα μέσω γαλακτωματοποίησης προβιοτικά βακτήρια (-/EM). Η κωδικοποίηση των δειγμάτων έχει οριστεί στους Πίνακες 4.1 και 4.2.....191

Διάγραμμα 5.32: Συγκριτικό διάγραμμα συνεκτικότητας γιαουρτιών με συμβατική καλλιέργεια εκκίνησης (Τυφλό), συμβατική καλλιέργεια εκκίνησης σε συνδυασμό με ελεύθερα προβιοτικά βακτήρια (Μη εγκλεισμένο BB12), συμβατική καλλιέργεια σε συνδυασμό με εγκλεισμένα μέσω εξώθησης προβιοτικά βακτήρια (-/EX) και συμβατική καλλιέργεια σε συνδυασμό με εγκλεισμένα μέσω γαλακτωματοποίησης προβιοτικά βακτήρια (-/EM). Η κωδικοποίηση των δειγμάτων έχει οριστεί στους Πίνακες 4.1 και 4.2.....191

Διάγραμμα 5.33: Συγκριτικό διάγραμμα προσκολλησιμότητας γιαουρτιών με συμβατική καλλιέργεια εκκίνησης (Τυφλό), συμβατική καλλιέργεια εκκίνησης σε συνδυασμό με ελεύθερα προβιοτικά βακτήρια (Μη εγκλεισμένο BB12), συμβατική καλλιέργεια σε συνδυασμό με εγκλεισμένα μέσω εξώθησης προβιοτικά βακτήρια (-/EX) και συμβατική καλλιέργεια σε συνδυασμό με εγκλεισμένα μέσω γαλακτωματοποίησης προβιοτικά βακτήρια (-/EM). Η κωδικοποίηση των δειγμάτων έχει οριστεί στους Πίνακες 4.1 και 4.2.....192

Διάγραμμα 5.34: Συγκριτικό διάγραμμα ελαστικότητας γιαουρτιών με συμβατική καλλιέργεια εκκίνησης (Τυφλό), συμβατική καλλιέργεια εκκίνησης σε συνδυασμό με ελεύθερα προβιοτικά βακτήρια (Μη εγκλεισμένο BB12), συμβατική καλλιέργεια σε συνδυασμό με εγκλεισμένα μέσω εξώθησης προβιοτικά βακτήρια (-/EX) και συμβατική καλλιέργεια σε συνδυασμό με εγκλεισμένα μέσω γαλακτωματοποίησης προβιοτικά βακτήρια (-/EM). Η κωδικοποίηση των δειγμάτων έχει οριστεί στους Πίνακες 4.1 και 4.2.....192

Διάγραμμα 5.35: Συγκριτικό διάγραμμα κομμώδους γιαουρτιών με συμβατική καλλιέργεια εκκίνησης (Τυφλό), συμβατική καλλιέργεια εκκίνησης σε συνδυασμό με ελεύθερα προβιοτικά βακτήρια (Μη εγκλεισμένο BB12), συμβατική καλλιέργεια σε συνδυασμό με εγκλεισμένα μέσω εξώθησης προβιοτικά βακτήρια (-/EX) και συμβατική καλλιέργεια σε συνδυασμό με εγκλεισμένα μέσω γαλακτωματοποίησης προβιοτικά βακτήρια (-/EM). Η κωδικοποίηση των δειγμάτων έχει οριστεί στους Πίνακες 4.1 και 4.2.....193

Διάγραμμα 5.36: Συγκριτικό διάγραμμα μεταβολής ποσοστού επιβίωσης (SR%) του προβιοτικού στελέχους ενσωματωμένου εντός προϊόντων γιαουρτιού σε ελεύθερη (Free BB-12) ή εγκλεισμένη μέσω εξώθησης μορφή (-/EX).....195

Διάγραμμα 5.37: Συγκριτικό διάγραμμα μεταβολής ποσοστού επιβίωσης (SR%) του προβιοτικού στελέχους ενσωματωμένου εντός προϊόντων γιαουρτιού σε ελεύθερη (Free BB-12) ή εγκλεισμένη μέσω γαλακτωματοποίησης μορφή (-/EM). .....196

Διάγραμμα 5.38: Συγκριτικό διάγραμμα μεταβολής ποσοστών επιβίωσης (SR%) του προβιοτικού στελέχους ενσωματωμένου σε ελεύθερη (Μη εγκλεισμένο BB12) ή εγκλεισμένη μέσω εξώθησης ή μέσω γαλακτωματοποίησης μορφή εντός προϊόντων γιαουρτιού, κατά την έκθεσή τους σε συνθήκες προσομοίωσης γαστρικών υγρών (ΠΓΥ). Η κωδικοποίηση των δειγμάτων έχει οριστεί στους Πίνακες 4.1 και 4.2.....198

Διάγραμμα 5.39: Συγκριτικό διάγραμμα μεταβολής ποσοστών επιβίωσης (SR%) του προβιοτικού στελέχους ενσωματωμένου σε ελεύθερη (Μη εγκλεισμένο BB12) ή εγκλεισμένη μέσω εξώθησης ή μέσω γαλακτωματοποίησης μορφή εντός προϊόντων γιαουρτιού, κατά την έκθεσή τους σε συνθήκες προσομοίωσης εντερικών υγρών (ΠΕΥ). Η κωδικοποίηση των δειγμάτων έχει οριστεί στους Πίνακες 4.1 και 4.2.....198

Διάγραμμα 5.40: Συσχέτιση των δειγμάτων προβιοτικών γιαουρτιών μέσω της Ανάλυσης Κύριων Συνιστωσών (SR%-4°C: ποσοστό επιβίωσης κατά τη διατήρηση στους 4°C, SR%-18°C: ποσοστό επιβίωσης κατά τη διατήρηση στους -18°C, SR%,GT: ποσοστό επιβίωσης κατά την έκθεση σε διάλυμα ΠΓΥ, SR%,IT: ποσοστό επιβίωσης κατά την έκθεση σε διάλυμα ΠΕΥ). .200

Διάγραμμα 5.41: Συσχέτιση των πειραματικών μεταβλητών και των ιδιοτήτων των προβιοτικών γιαουρτιών μέσω της Ανάλυσης Κύριων Συνιστωσών. ....200

## Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1.1: Τα κυριότερα στελέχη προβιοτικών βακτηρίων (Frakolaki et al., 2020a).....	33
Πίνακας 1.2: Θετικά κατά Gram βακτήρια που έχουν λάβει καθεστώς QPS (EFSA, 2019). ...	45
Πίνακας 1.3: Η εξέλιξη του θέματος των πρεβιοτικών.....	50
Πίνακας 2.1: Μελέτες χορήγησης εγκλεισμένων προβιοτικών βακτηρίων σε αρουραίους Wistar και ποντίκια	58
Πίνακας 2.2: Τεχνικές πληροφορίες και περιορισμοί μεθόδων εγκλεισμού προβιοτικών βακτηρίων.....	85
Πίνακας 2.3: Χρησιμοποιούμενα εγκλειστικά μέσα ανά μέθοδο εγκλεισμού προβιοτικών βακτηρίων.....	87
Πίνακας 3.1: Εφαρμογή εγκλεισμένων προβιοτικών βακτηρίων σε γαλακτοκομικά προϊόντα.	95
Πίνακας 3.2: Εφαρμογή εγκλεισμένων προβιοτικών βακτηρίων σε μη γαλακτοκομικά προϊόντα. ....	101
Πίνακας 4.1: Σύσταση και κωδικοποίηση μιγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για τον εγκλεισμό του προβιοτικού στελέχους BB-12 με την τεχνική της εξώθησης.	108
Πίνακας 4.2: Σύσταση και κωδικοποίηση μιγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για τον εγκλεισμό του προβιοτικού στελέχους BB-12 με την τεχνική της γαλακτωματοποίησης.....	109
Πίνακας 4.3: Σύνθεση και κωδικοποίηση των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των $v_1/\epsilon/v_2$ γαλακτωμάτων.....	110
Πίνακας 4.4: Περιγραφή σχεδιασμού πειραμάτων.....	118
Πίνακας 5.1: Τιμές απόδοσης εγκλεισμού (EY%) κατά τη διαδικασία εγκλεισμού του προβιοτικού στελέχους BB-12 μέσω της τεχνικής της εξώθησης με διάφορα εγκλειστικά μέσα.	124
Πίνακας 5.2: Τιμές απόδοσης εγκλεισμού (EY%) κατά τη διαδικασία εγκλεισμού του προβιοτικού στελέχους BB-12 μέσω της τεχνικής της γαλακτωματοποίησης με διάφορα εγκλειστικά μέσα. ....	144
Πίνακας 5.3: Τιμές ζ-δυναμικού της εξωτερικής φάσης ( $v_2$ ) του διπλού γαλακτώματος ( $v_1/\epsilon/v_2$ ) με διάφορα εγκλειστικά μέσα.....	169
Πίνακας 5.4: Τιμές ζ-δυναμικού των $v_1/\epsilon/v_2$ γαλακτωμάτων με ενσωματωμένο το προβιοτικό στέλεχος BB-12. ....	170
Πίνακας 5.5: Φυσικοχημικές ιδιότητες των $v/\epsilon$ και $v_1/\epsilon/v_2$ γαλακτωμάτων που επιλέχθηκαν για εξώθηση.....	171
Πίνακας 5.6: Τιμές απόδοσης εγκλεισμού (EY%) κατά τη διαδικασία εγκλεισμού του προβιοτικού στελέχους BB-12 μέσω συνδυασμού διπλού $v_1/\epsilon/v_2$ γαλακτώματος και της τεχνικής της εξώθησης με διάφορα εγκλειστικά μέσα. Η κωδικοποίηση των δειγμάτων έχει οριστεί στον Πίνακα 4.3.....	172

## Εισαγωγή

Τα λειτουργικά τρόφιμα και ποτά αποτελούν έναν ραγδαία αναπτυσσόμενο τομέα της βιομηχανίας τροφίμων τα τελευταία χρόνια. Συγκεκριμένα, η παγκόσμια αγορά λειτουργικών τροφίμων και ποτών αναμένεται να αυξηθεί από τα 281.14 δισεκατομμύρια δολάρια (2021) στα 529.66 δισεκατομμύρια δολάρια μέχρι το 2028, με σύνθετο ετήσιο ρυθμό αύξησης (CAGR) 9.5%. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζεται από τους καταναλωτές για την κατανάλωση λειτουργικών τροφίμων με περιεχόμενα προβιοτικά βακτήρια (προβιοτικά προϊόντα), λόγω των διαφόρων οφελών που προσφέρουν τα συγκεκριμένα είδη βακτηρίων στην υγεία. Συγκεκριμένα, σύμφωνα με πλήθος ερευνών, τα προβιοτικά βακτήρια καταστέλλουν τη δράση παθογόνων μικροοργανισμών και βοηθούν στην αντιμετώπιση προβλημάτων του γαστρεντερικού συστήματος (συμπτώματα διάρροιας, δυσκοιλιότητας, ιδιοπαθών φλεγμονωδών νοσημάτων του εντέρου) και τροφικών αλλεργιών. Επιπλέον, παρέχουν προστατευτική δράση έναντι ουρογενετικών δυσλειτουργιών, ενώ συνεισφέρουν στη μείωση της χοληστερόλης. Τέλος, σχετίζονται με χαμηλότερο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου στο πεπτικό σύστημα και ενδυναμώνουν το ανοσοποιητικό σύστημα.

Τα κυριότερα γένη προβιοτικών βακτηρίων που ενδιαφέρουν στα τρόφιμα είναι τα γένη *Lactobacillus* και *Bifidobacterium*. Η ενσωμάτωση προβιοτικών βακτηρίων στα τρόφιμα οδηγεί στην ανάπτυξη λειτουργικών-προβιοτικών προϊόντων τα οποία, όπως αναφέρθηκε, έχουν αποκτήσει ιδιαίτερο εμπορικό ενδιαφέρον. Μέχρι σήμερα, τα προβιοτικά βακτήρια χρησιμοποιούνται για παραγωγή ζυμωμένων προϊόντων κυρίως γαλακτοκομικών ή προστίθενται, ενίοτε, σε διάφορα τρόφιμα ή ποτά. Αναφέρεται ότι τέτοιου είδους προϊόντα σύμφωνα με τη νομοθεσία πρέπει να περιέχουν  $\geq 10^6$ - $10^7$  cfu/g ή mL προϊόντος (IDF, EU, ANVISA) ή  $\geq 10^8$ - $10^9$  cfu ανά ημερήσια μερίδα προϊόντος (ANVISA, CFIA), ώστε να παρέχονται τα αντίστοιχα οφέλη για την υγεία. Συνεπώς απαιτείται υψηλή βιωσιμότητα των προβιοτικών κυττάρων κατά την παραγωγή, αποθήκευση, μέχρι και την κατανάλωση των προϊόντων. Ειδικότερα, πρέπει να είναι ανθεκτικά στα γαστρικά υγρά και να είναι ικανά να αναπτύσσονται υπό την παρουσία των χολικών εκκρίσεων στο έντερο.

Προκειμένου να καλυφθούν οι ανάγκες των καταναλωτών από τη βιομηχανία τροφίμων, είναι απαραίτητη η ανάπτυξη τεχνολογιών που θα εξασφαλίζουν τη βιωσιμότητα και τη δραστικότητα των προβιοτικών βακτηρίων στα προβιοτικά προϊόντα με οικονομικά αποδοτικό τρόπο που θα εξασφαλίσει την ευημερία και την επιβίωση της βιομηχανίας σε μία ανταγωνιστική αγορά. Για τους παραπάνω λόγους, προτείνεται ο εγκλεισμός των προβιοτικών βακτηρίων πριν τη εισαγωγή τους σε κάποιο τρόφιμο, για ενίσχυση της βιωσιμότητά τους. Για το σκοπό αυτό έχουν μελετηθεί αρκετές τεχνικές εγκλεισμού, είτε συμβατικές, είτε καινοτόμες, οι οποίες παρουσιάζονται εκτενώς στην παρούσα διδακτορική διατριβή. Ο εγκλεισμός των προβιοτικών κυττάρων μπορεί να παρέχει προστασία σε αυτά τόσο κατά τη διεργασία της παραγωγής ενός τροφίμου, όσο και κατά την αποθήκευσή του ή τη διέλευσή του από το γαστρεντερικό σύστημα. Έτσι, τα εγκλεισμένα σε φορείς προβιοτικά βακτήρια δίνουν δυνατότητα για ανάπτυξη νέων λειτουργικών τροφίμων και ευελιξία στη βιομηχανική παραγωγή αυτών.

# 1. Προβιοτικά βακτήρια

## 1.1. Ορισμός

Ο όρος «προβιοτικό» προέρχεται από τις ελληνικές λέξεις «προ-» και «βίος», και σημαίνει «για τη ζωή», σε αντίθεση με τον όρο «αντιβιοτικό» που έχει την έννοια «κατά της ζωής» (Jungersen et al., 2014). Η πρώτη αναφορά στα προβιοτικά βακτήρια έγινε από τον Fuller (1989) ο οποίος τα χαρακτήρισε ως «ζωντανό μικροβιακό συμπλήρωμα ζωτροφής που επηρεάζει επωφελώς το ζώο-ξενιστή, βελτιώνοντας την εντερική του μικροβιακή ισορροπία». Ύστερα από έρευνες τόσο σε ζώα, όσο και σε ανθρώπους, ο παραπάνω ορισμός αναδιατυπώθηκε, ώστε να είναι σε συμφωνία με όσα ανακαλύφθηκαν στην πορεία των χρόνων σχετικά με τα οφέλη των προβιοτικών βακτηρίων στην υγεία. Ένας από τους ευρύτερα χρησιμοποιούμενους ορισμούς των προβιοτικών βακτηρίων είναι αυτός που υιοθετήθηκε από διαβούλευση των οργανισμών FAO και WHO το 2001 και χαρακτηρίζει τα προβιοτικά βακτήρια ως «ζωντανούς μικροοργανισμούς οι οποίοι, όταν χορηγούνται σε επαρκείς ποσότητες, επιφέρουν οφέλη στην υγεία του οργανισμού» (FAO/WHO 2001). Στη συνέχεια, σύμφωνα με έναν πιο πρόσφατο και περισσότερο εξειδικευμένο ως προς τα τρόφιμα ορισμό, τα προβιοτικά βακτήρια αναφέρονται ως «ζωντανοί μικροοργανισμοί, οι οποίοι όταν καταναλώνονται σε επαρκείς ποσότητες ως μέρος ενός τροφίμου, επιφέρουν οφέλη στην υγεία του οργανισμού» (Pineiro and Stanton 2007). Παρόλο που η χρήση του όρου «προβιοτικό» είναι ευρεία τόσο σε τρόφιμα, όσο και σε συμπληρώματα διατροφής, πολλές φορές γίνεται λανθασμένα, καθώς δεν ικανοποιούνται πάντοτε τα ελάχιστα απαιτούμενα κριτήρια που θα περιγραφούν στη συνέχεια.

## 1.2. Στελέχη προβιοτικών βακτηρίων

Μέχρι σήμερα, έχει αναφερθεί μία μεγάλη ποικιλία μικροοργανισμών με πιθανή προβιοτική δράση. Ένας κατάλογος των πιθανών προβιοτικών στελεχών παρουσιάζεται στον Πίνακα 1.1. Πρόκειται για θετικά κατά Gram βακτήρια, εκ των οποίων τα πιο κοινά είδη είναι γαλακτικά βακτήρια, κυρίως αυτά που ανήκουν στα γένη *Lactobacillus* (Lb.) και *Bifidobacterium* (B.) (FAO/WHO 2001; Foliagné et al. 2013). Αυτά τα γένη έχουν χαρακτηριστεί ως GRAS (Generally Recognized As Safe) και είναι κυρίαρχα γένη μικροοργανισμών του λεπτού (*Lactobacillus*) ή του παχέος εντέρου του ανθρώπινου οργανισμού (Dimitrellou et al., 2016; Tripathi and Giri, 2014).

Τα στελέχη του γένους *Lactobacillus* θεωρούνται γενικώς πιο ανθεκτικά από αυτά που ανήκουν στο γένος *Bifidobacterium*. Πιο συγκεκριμένα, παρουσιάζουν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα σε χαμηλές τιμές pH, και καλύτερη προσαρμοστικότητα στο γάλα και σε άλλα τρόφιμα που μπορούν να λειτουργήσουν ως υποστρώματα αυτών (Tripathi and Giri 2014). Παρόλα αυτά, οι ιδιότητες και τα οφέλη που προκύπτουν από τα προβιοτικά βακτήρια δεν εξαρτώνται μόνο από το γένος, αλλά και από το στέλεχος. Κάθε στέλεχος είναι μοναδικό και, συνεπώς, πρέπει να προσδιορίζονται τα χαρακτηριστικά του (Nuraida 2015). Ενδεικτικά

αναφέρεται ότι τα στελέχη *Lb. casei* και *Lb. acidophilus* μπορούν να επιβιώσουν σε περιβάλλον προσομοίωσης του γαστρεντερικού συστήματος, σε αντίθεση με το στέλεχος *Lb. delbruekii ssp. bulgaricus*. Επιπρόσθετα, τα στελέχη των *Bifidobacterium* παρουσιάζουν σημαντικές διακυμάνσεις μεταξύ τους όσον αφορά την ικανότητα επιβίωσής τους κατά τη διάρκεια της διέλευσής τους από το στομάχι (Daliri and Lee, 2015). Τα στελέχη *B. animalis* είναι πιο ανθεκτικά σε όξινες συνθήκες σε σύγκριση με άλλα στελέχη *Bifidobacterium* (Saarela et al., 2006).

Προβιοτικές ιδιότητες έχουν, επιπλέον, αποδοθεί και σε άλλα γένη, όπως τα: *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* και *Leuconostoc*. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι μερικά μη γαλακτικά βακτήρια ή ζύμες θα μπορούσαν να έχουν παρόμοιο ρόλο, όπως για παράδειγμα στελέχη που ανήκουν στα γένη *Bacillus* και *Saccharomyces* (Soccol et al., 2010; Tripathi and Giri, 2014).



Πίνακας 1.1: Τα κυριότερα στελέχη προβιοτικών βακτηρίων (Frakolaki, Giannou, et al. 2020)

Γένος	Στελέχη
<i>Lactobacillus</i> sp.	<i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. amylovorus</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. 'caucasicus'</i> = <i>Lb. kefiri</i> , <i>Lb. crispatus</i> , <i>Lb. cellobiosus</i> , <i>Lb. curvatus</i> , <i>Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> , <i>Lb. delbrueckii ssp. delbrueckii</i> , <i>Lb. delbrueckii ssp. lactis</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. gallinarum</i> , <i>Lb. gasseri</i> , <i>Lb. helveticus</i> , <i>Lb. johnsonii</i> , <i>Lb. paracasei</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. reuteri</i> , <i>Lb. rhamnosus</i> , <i>Lb. sakei</i> , <i>Lb. salivarius</i> , <i>Lb. sporogenes</i> = <i>Bc. Coagulans</i>
<i>Bifidobacterium</i> sp.	<i>B. adolescentis</i> , <i>B. animalis</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. thermophilum</i> , <i>B. lactis</i> , <i>B. longum ssp. infantis</i> , <i>B. longum ssp. longum</i>
<i>Enterococcus</i> sp.	<i>Ent. Faecalis</i> , <i>Ent. Faecium</i>
<i>Streptococcus</i> sp.	<i>S. cremoris</i> , <i>S. diacetylactis</i> , <i>S. intermedius</i> , <i>S. macedonicus</i> , <i>S. mitis</i> , <i>S. salivarius</i> , <i>S. sanguis</i> , <i>S. thermophilus</i>
<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bc. cereus</i> , <i>Bc. clausii</i> , <i>Bc. coagulans</i> , <i>Bc. licheniformis</i> , <i>Bc. mesentericus</i> , <i>Bc. subtilis</i>
Άλλα γαλακτικά βακτήρια	<i>Lactococcus lactis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>Pediococcus pentosaceus</i>
Άλλα βακτήρια	<i>Clostridium butyricum</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Propionibacterium freudenreichii</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae subsp. cerevisiae</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae subsp. boulardii</i>

Επιπρόσθετα, υπάρχουν ενδείξεις ότι τα μίγματα προβιοτικών στελεχών εμφανίζουν ενισχυμένη δράση σε σύγκριση με τα μεμονωμένα στελέχη. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι μίγματα των στελεχών *Lb. acidophilus* W70, *Lb. casei*, *Lb. salivarius*, *Lactococcus lactis*, *B. Bifidum* και *B. infantis*, καθώς επίσης και μίγματα των *Lb. Paracasei* B21060 και B21070 και *Lb. acidophilus* B21190 ή των *Lb. casei* και *Lb. acidophilus* αναστέλλουν με μεγαλύτερη επιτυχία την ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών απ' ότι κάθε στέλεχος μόνο του. Παρομοίως, ο συνδυασμός των *Lb. GG*, *Lb. rhamnosus*, *Propionibacterium freudenreichii* και *B. Breve* ή των *B. lactis*, *Lb. rhamnosus* GG, *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Lb. acidophilus* και *Lb. Johnsonii* βελτιώνει τις ιδιότητες πρόσδεσης του καθενός στον βλεννογόνο του εντέρου. Το μίγμα των *Lb. GG*, *Lb. rhamnosus*, *Propionibacterium freudenreichii* και *B. Breve* είναι, επίσης, πιο αποτελεσματικό από ότι κάθε στέλεχος μόνο του στην παρεμπόδιση προσκόλλησης παθογόνων στο έντερο. Έχει, ακόμη, αναφερθεί ότι το μίγμα των *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. longum*, *Lb. casei*, *Lb. acidophilus*, *Lb. salivarius*, *Lb. brevis*, *Lb. plantarum*, *Lb. helveticus*, *Lb. rhamnosus*, *S. Thermophilus* και *E. Faecium* είναι πιο αποτελεσματικό στη μείωση των

λοιμώξεων του γαστρεντερικού συστήματος σε υγιή παιδιά, απ' ότι τα στελέχη *Lb. casei* ή *Lb. rhamnosus* μόνο τους. Από τους διάφορους συνδυασμούς προβιοτικών στελεχών, τα μίγματα στελεχών που δεν ανήκουν στο γένος *Bifidobacterium* έχουν βρεθεί πιο αποτελεσματικά από εκείνα που περιέχουν ένα ή περισσότερα στελέχη του γένους *Bifidobacterium*, υποδηλώνοντας ότι η δράση των *bifidobacteria*, όταν βρίσκονται μαζί με άλλα προβιοτικά στελέχη, μπορεί να αναστέλλεται από στελέχη που ανήκουν σε διαφορετικά γένη. Γενικότερα, προβιοτικά βακτήρια που ανήκουν σε διαφορετικά είδη, μπορεί να αναστέλλουν το ένα τη δράση του άλλου, είτε εκκρίνοντας ανταγωνιστικούς παράγοντες, είτε ανταγωνιζόμενα για θρεπτικά συστατικά ή θέσεις πρόσδεσης στο γαστρεντερικό σύστημα. Έτσι, μία μεγάλη ποικιλία προβιοτικών στελεχών από διαφορετικά γένη ενδέχεται να μειώνει την αποτελεσματικότητα του μίγματος (Charman et al. 2011).

#### 1.2.1. Το γένος *Bifidobacterium*

Το γένος *Bifidobacterium* αποτελείται από 80 υποείδη, τα οποία βρίσκονται στο γαστρεντερικό σύστημα του ανθρώπου, των θηλαστικών, των πτηνών και των «κοινωνικών εντόμων» (μυρμήγκια, τερμίτες και μερικές μέλισσες και σφήκες), σε λύματα και στη στοματική κοιλότητα. Βάσει ερευνών, τα κυρίαρχα στελέχη του συγκεκριμένου γένους που υπάρχουν στο έντερο του ανθρώπου σε μεγαλύτερη αφθονία είναι τα *B. breve*, *B. bifidum*, *B. longum*, *B. adolescentis*, *B. pseudolongum*, *B. pseudocatenulatum*, και *B. animalis* subsp. *lactis* (Turroni et al. 2019). Τα στελέχη του συγκεκριμένου γένους αποτελούν ένα σημαντικό ποσοστό της εντερικής μικροχλωρίδας του ανθρώπου, η οποία αποτελεί ένα από τα πιο σύνθετα μικροβιακά οικοσυστήματα, καθώς υπάρχουν πάνω από  $10^{14}$  βακτήρια στο παχύ έντερο. Η δομή και η σύσταση αυτού του οικοσυστήματος εξαρτάται από περιβαλλοντικούς παράγοντες, καθώς και από συμβιωτικές αλληλεπιδράσεις με τον οργανισμό του ξενιστή. Για παράδειγμα, τα στελέχη του γένους *Bifidobacterium* έχει βρεθεί ότι αποτελούν το 90% της εντερικής μικροχλωρίδας σε νεογνά που βρίσκονται στο στάδιο του θηλασμού, σε αντίθεση με εκείνα που καταναλώνουν γάλα εμπορίου. Το ποσοστό των *bifidobacteria* στους ενήλικες είναι σημαντικά μειωμένο και αποτελεί το 3-7% της μικροχλωρίδας, ενώ μειώνεται περαιτέρω στα ηλικιωμένα άτομα (Sanz, 2016).

Τα βακτήρια που ανήκουν στο γένος *Bifidobacterium* είναι θετικά κατά Gram, ραβδοειδή, αναερόβια και δεν σχηματίζουν σπόρια. Μεταβολίζουν κυρίως γλυκόζη, αλλά έχουν την ικανότητα να ζυμώνουν γαλακτόζη, λακτόζη και φρουκτόζη, ενώ μπορούν να χρησιμοποιήσουν και κυστεΐνη ως πηγή αζώτου (Frakolaki et al. 2021). Τα *bifidobacteria* πρέπει να πληρούν ορισμένα τεχνολογικά κριτήρια, προκειμένου να εξασφαλίζεται η ύπαρξη ενός ελάχιστου αριθμού ζώντων μικροοργανισμών ( $6 \log_{10} \text{cfu/g}$ ) σε προϊόντα τροφίμων, ώστε αυτά να έχουν θεραπευτική δράση στον οργανισμό-ξενιστή. Ωστόσο, τα στελέχη του γένους *Bifidobacterium* που είναι ανθεκτικά από τεχνολογική άποψη, είναι περιορισμένα (Langa et al. 2020).

#### 1.2.2. Το στέλεχος *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (BB-12)

Το στέλεχος *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (BB-12) αποτελεί ένα από τα ευρέως μελετημένα στελέχη του συγκεκριμένου γένους. Έχει ραβδοειδές σχήμα, όπως όλα τα

στελέχη του γένους *Bifidobacterium*, και είναι αρνητικό στην καταλάση. Για πρώτη φορά κατατέθηκε στην τράπεζα κυτταρικών καλλιεργειών της Chr. Hansen το 1983. Κατά την πρώτη του απομόνωση θεωρήθηκε ότι ανήκει στο είδος *Bifidobacterium bifidum*. Ωστόσο, με τη χρήση σύγχρονων μεθόδων μοριακής ταξινόμησης έγινε επαναταξινόμηση του συγκεκριμένου στελέχους ως *Bifidobacterium animalis* και έπειτα σε ένα νέο είδος, το *Bifidobacterium lactis*. Στη συνέχεια, όμως, το *B. lactis* φάνηκε ότι δεν πληρούσε τις προϋποθέσεις ως προς το είδος και έτσι συμπεριελήφθη στο είδος *Bifidobacterium animalis* ως υποείδος. Εν τέλει, το στέλεχος BB-12 ταξινομείται ως *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* και, παρά τις διάφορες αλλαγές στην ονομασία του, παραμένει το ίδιο στέλεχος.

Το στέλεχος BB-12 προέρχεται από τη συλλογή καλλιεργειών της Chr. Hansen για γαλακτοκομικά προϊόντα. Επιλέχθηκε από τη συγκεκριμένη εταιρεία για την παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων. Έχει χρησιμοποιηθεί σε παιδικές τροφές, διατροφικά συμπληρώματα και ζυμωμένα προϊόντα γάλακτος παγκοσμίως. Το συγκεκριμένο στέλεχος είναι τεχνολογικά κατάλληλο, έχει ζυμωτική δράση, ικανοποιητική αντοχή στο οξυγόνο, καλή σταθερότητα και αντοχή σε οξέα και χολικά άλατα. Επιπρόσθετα, δεν έχει αρνητικές επιπτώσεις στη γεύση, την εμφάνιση ή την αίσθηση στο στόμα όταν εισάγεται σε κάποιο προϊόν τροφίμου.

Προκειμένου τα προβιοτικά βακτήρια να αποδώσουν τα οφέλη τους, πρέπει να δύνανται να προσκολλώνται στη βλεννογόνο του εντέρου, ώστε να αποικήσουν εκεί και να δράσουν. Το στέλεχος BB-12 έχει βρεθεί ότι φέρει αυτήν την ιδιότητα, με αποτέλεσμα να αποικεί προσωρινά στις βλεννογόνες επιφάνειες του εντέρου και να παραμένει εκεί αυξάνοντας την πιθανότητα απόδοσης των οφελών του (Jungersen et al. 2014). Το συγκεκριμένο προβιοτικό στέλεχος έχει συνδεθεί με πολλά οφέλη στην υγεία, συμπεριλαμβανομένων της πρόληψης ή του περιορισμού της διάρροιας των ταξιδιωτών, της αντιμετώπισης ιογενούς διάρροιας, της τροποποίησης της εντερικής μικροχλωρίδας και της απόκρισης του ανοσοποιητικού, της βελτίωσης της δυσκοιλιότητας, και της ανακούφισης ορισμένων αλλεργιών (Frakolaki et al. 2021).

### 1.3 Προβιοτική δράση

Τα οφέλη που μπορούν να προσδώσουν τα προβιοτικά βακτήρια στην υγεία του ανθρώπου οφείλονται στη δράση τους εντός του οργανισμού-ξενιστή και στην αλληλεπίδρασή τους με τη μικροχλωρίδα του εντέρου. Στο συγκεκριμένο υποκεφάλαιο θα παρουσιαστούν αναλυτικά οι πιθανοί μηχανισμοί δράσης των προβιοτικών βακτηρίων, καθώς και τα διάφορα οφέλη που έχει αποδειχθεί ότι μπορούν να προσφέρουν στην υγεία του ξενιστή.

#### 1.3.1. Μηχανισμός δράσης

Οι πιθανοί μηχανισμοί δράσης μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις κατηγορίες (Oelschlaeger, 2010):

- i. Τροποποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή.
- ii. Άμεση επίδραση σε άλλους μικροοργανισμούς (κοινούς ή/και παθογόνους)

- iii. Δράσεις που επηρεάζουν μικροβιακά παράγωγα (π.χ. τοξίνες), προϊόντα του ξενιστή (π.χ. χολικά άλατα) και συστατικά τροφίμων.

Πιο αναλυτικά, ο μηχανισμός δράσης των προβιοτικών βακτηρίων αποδίδεται κυρίως σε συγκεκριμένες δράσεις, όπως είναι η μείωση του pH του εντέρου, ο ανταγωνισμός έναντι παθογόνων βακτηρίων όσον αφορά θέσεις προσκόλλησης και θρεπτικά συστατικά, η παραγωγή αντι-μικροβιακών ουσιών, η απενεργοποίηση τοξινών και η ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος (Nuraida, 2015). Περίπου 70-80% των ανοσοκυττάρων του οργανισμού σχετίζεται με τη βλεννογόνο του εντέρου. Τα προβιοτικά βακτήρια αλληλεπιδρούν με το ανοσοποιητικό σύστημα μέσω των ανοσοκυττάρων αυτών. Η ενίσχυση της λειτουργίας φραγμού της εντερικής επένδυσης του ξενιστή αποτελεί, επίσης, έναν από τους βασικούς μηχανισμούς δράσης των προβιοτικών βακτηρίων. Η διατήρηση ενός ενιαίου και λειτουργικού στρώματος βλέννας και επιθηλιακών κυττάρων στο γαστρεντερικό σύστημα είναι απαραίτητη, προκειμένου ένας οργανισμός να διατηρείται υγιής (Jungersen et al., 2014).

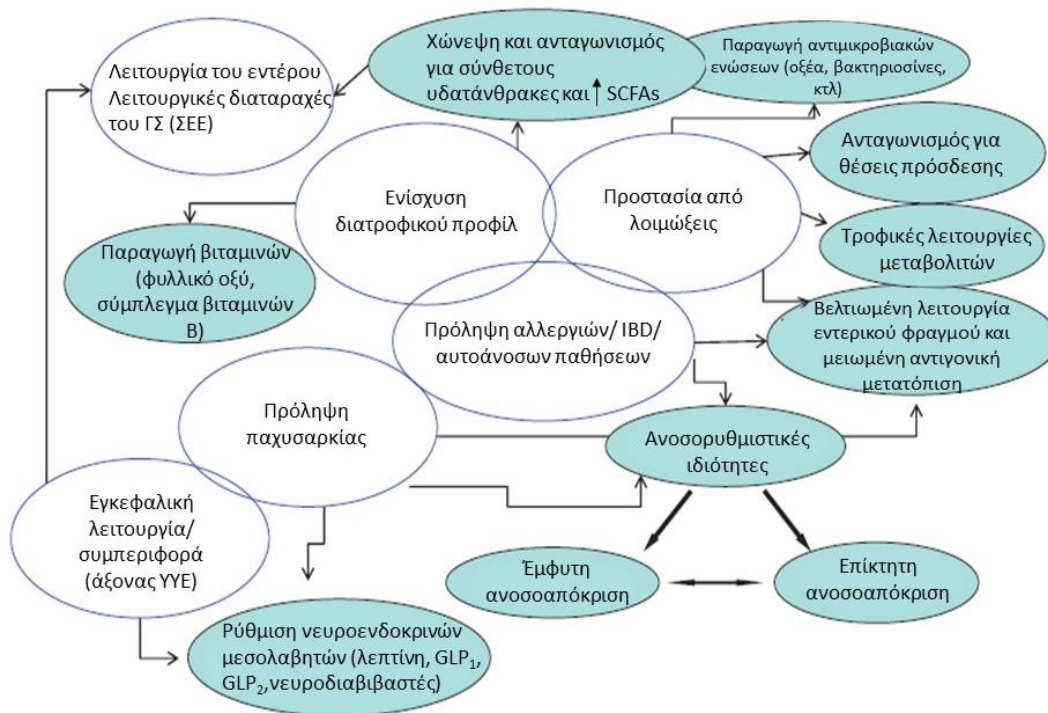
Όσον αφορά τα στελέχη του γένους *Bifidobacterium*, συγκεκριμένα, είναι γνωστά για τη συνεισφορά τους στο μεταβολισμό μη αφομοιώσιμων ολιγοσακχαριτών, που προέρχονται όχι μόνο από το ανθρώπινο γάλα αλλά και από την ευρύτερη διατροφή. Πάνω από το 9% των καταχωρημένων γονιδίων του γονιδιώματος των *bifidobacteria* είναι υπεύθυνα για την κωδικοποίηση ενζύμων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των υδατανθράκων. Αυτό το χαρακτηριστικό μπορεί να συνεισφέρει μερικώς στην ανάκτηση ενέργειας και την παραγωγή προϊόντων ζύμωσης (π.χ. οξικό) μέσω μηχανισμών διασταυρούμενης σίτισης με άλλα εντερικά βακτήρια (π.χ. βουτυρικό οξύ), επιφέροντας πιθανά οφέλη στην υγεία. Η ζύμωση στο εντερικό περιβάλλον θα μπορούσε να βελτιώσει τη λειτουργία του εντέρου και να δημιουργήσει ένα μη ευνοϊκό περιβάλλον για την επιβίωση των παθογόνων μικροοργανισμών. Επιπλέον, το βουτυρικό οξύ, το οποίο μπορεί να προκύψει από το οξικό οξύ που παράγεται από τα *bifidobacteria*, είναι η κύρια πηγή ενέργειας για τα εντεροκύτταρα και ενισχύει την ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση των κυττάρων και την παραγωγή του πεπτιδίου GLP-2 (glucagon-like peptide-2), με αποτέλεσμα τη βελτίωση της λειτουργίας του εντερικού φραγμού. Το βουτυρικό οξύ επίσης ενισχύει την παραγωγή του πεπτιδίου GLP-1 (glucagon-like peptide-1), το οποίο επιφέρει το αίσθημα του κορεσμού, βελτιώνει την ευαισθησία στην ινσουλίνη και έχει αντι-φλεγμονώδη ρόλο στο έντερο και τους περιφερικούς ιστούς.

Ακόμη, τα στελέχη του γένους *Bifidobacterium* μπορούν να συνεισφέρουν στην παροχή βασικών θρεπτικών συστατικών όπως οι βιταμίνες. Τα συγκεκριμένα βακτήρια εμπλέκονται στη βιοσύνθεση φολικού οξέος, με το βαθμό σύνθεσής του να διαφέρει ανάλογα με το βακτηριακό στέλεχος. Για παράδειγμα τα στελέχη *B. bifidum* και *B. longum subsp. infantis* παράγουν μεγάλες ποσότητες φολικού οξέος, σε αντίθεση με τα στελέχη *B. breve*, *B. longum subsp. longum* και *B. adolescentis*. Τα *bifidobacteria* μπορούν επίσης να συνεισφέρουν και στη σύνθεση άλλων βιταμινών Β. Για παράδειγμα η ζύμωση σόγιας από το στέλεχος *B. longum* R0175 έχει αναφερθεί ότι συνοδεύεται από παραγωγή θειαμίνης και πυριδοξίνης.

Καθώς τα περισσότερα βιοσυνθετικά μονοπάτια των βιταμινών φαίνονται ατελή βάσει των γονιδιωμάτων που έχουν χαρακτηριστεί μέχρι σήμερα, θεωρείται πιθανό ότι συμπληρώνονται από άλλα βακτήρια.

Όσον αφορά την προστασία που παρέχουν τα στελέχη του γένους *Bifidobacterium* έναντι παθογόνων βακτηρίων και ιών, έχει προταθεί πληθώρα πιθανών μηχανισμών, συμπεριλαμβανομένων της τροποποίησης των συνθηκών του περιβάλλοντος και της παραγωγής αντιμικροβιακών ενώσεων (οξέων και αντιμικροβιακών πεπτιδίων, όπως οι βακτηριοσίνες), του ανταγωνισμού για θρεπτικά συστατικά και θέσεις πρόσδεσης, και της τροποποίησης των μηχανισμών άμυνας του ανοσοποιητικού του ξενιστή.

Ακόμη, τα *bifidobacteria*, ύστερα από *in vitro* και *in vivo* μελέτες, έχει βρεθεί ότι μπορούν να συνεισφέρουν στον περιορισμό ή στην πρόληψη αλλεργιών και αυτοάνοσων νοσημάτων, μέσω επίδρασης στον μηχανισμό του ανοσοποιητικού συστήματος και στην παραγωγή T-λεμφοκυττάρων (Sanz 2016). Το σύνολο των μηχανισμών δράσης των συγκεκριμένων προβιοτικών στελεχών παρουσιάζεται στην εικόνα 1.1.



Εικόνα 1.1: Πιθανοί μηχανισμοί δράσης και οφέλη των *bifidobacteria* στον οργανισμό του ξενιστή (Sanz, 2016).

Οι παραπάνω μηχανισμοί δράσης έχουν επιβεβαιωθεί και για το στέλεχος BB-12 του γένους *Bifidobacterium*. Συγκεκριμένα έχει βρεθεί ότι είναι ικανό να αναστέλλει τη λειτουργία των παθογόνων, μέσω πληθώρας μηχανισμών, όπως: παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών (οργανικά οξέα,  $H_2O_2$ , βακτηριοσίνες), ανταγωνισμός για θρεπτικά συστατικά, απομάκρυνση/αποικοδόμηση τοξινών, ανταγωνισμός για θέσεις πρόσδεσης (βλέννα, κυτταρικοί υποδοχείς), συσσωμάτωση και τροποποίηση μολυσματικότητας, και επαγωγή ανοσολογικών αποκρίσεων ξενιστή. Ακόμη, υπάρχουν ενδείξεις ότι το στέλεχος BB-12 μπορεί να ενισχύσει τη λειτουργία φραγμού της εντερικής επένδυσης του ξενιστή (Jungersen

et al. 2014). Σε έρευνα, στην οποία μελετήθηκε *in vitro* η επίδραση ζυμωμένων από το στέλεχος BB-12 προϊόντων, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της αντοχής των στενοσυνδέσμων των επιθηλιακών κυττάρων και της διεπιθηλιακής ηλεκτρικής αντίστασης. Συνεπώς, υπάρχουν ενδείξεις ότι το στέλεχος BB-12 μπορεί να δράσει αυξάνοντας την αντοχή των δια-δεσμών και εμποδίζοντας τη διατάραξη της λειτουργίας του επιθηλιακού φραγμού (Commane et al., 2005). Τέλος, το στέλεχος BB-12 έχει βρεθεί ότι είναι ικανό να αλληλεπιδρά με τα ανοσοκύτταρα επιδρώντας θετικά στη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος (Jungersen et al. 2014).

### 1.3.2. Οφέλη στην υγεία

Η κατανάλωση προβιοτικών προϊόντων μπορεί να προσδώσει πολλαπλά οφέλη στην υγεία του καταναλωτή, ανάλογα με τα περιεχόμενα σε αυτά προβιοτικά στελέχη (FAO/WHO, 2001; Vandenplas et al., 2015). Σύμφωνα με τους οργανισμούς FAO και WHO (2001), τα προβιοτικά βακτήρια ενισχύουν το γαστρεντερικό σύστημα. Είναι ικανά να συμβάλλουν στην πρόληψη ή ακόμη και στη θεραπεία συμπτωμάτων οξείας διάρροιας προκαλούμενης από ροταϊούς και εντεροπαθογόνους ή παθογόνους μικροοργανισμούς, όπως η Σαλμονέλα, ενώ έχουν δράση εναντίον ενός συγκεκριμένου παθογόνου, του *Helicobacter pylori*, το οποίο προκαλεί γαστρίτιδα τύπου Β, πεπτικά έλκη και γαστρικό καρκίνο (Boltin, 2016; FAO/WHO, 2001). Επιπρόσθετα, τροποποιούν τη μικροχλωρίδα του εντέρου, θεραπεύουν τη δυσκοιλιότητα και προστατεύουν τον οργανισμό από φλεγμονώδεις παθήσεις του εντέρου (FAO/WHO, 2001; Hod and Ringel, 2016). Ορισμένα προβιοτικά βακτήρια έχει αναφερθεί ότι έχουν αντι-μεταλλαξιγόνο και αντι-καρκινική δράση μέσω παρεμπόδισης της παραγωγής καρκινογόνων ουσιών από τη μικροχλωρίδα του εντέρου (Ambalam et al., 2016; FAO/WHO, 2001). Άλλες δράσεις των προβιοτικών βακτηρίων περιλαμβάνουν την τροποποίηση του ανοσοποιητικού του ξενιστή, τη μείωση επιβλαβών ουσιών που μπορεί να υπάρχουν στο έντερο και την πρόληψη αλλεργιών και καρδιαγγειακών ή ουρογεννητικών διαταραχών (FAO/WHO, 2001; Vandenplas et al., 2015). Τα προβιοτικά βακτήρια έχουν την ικανότητα να μειώνουν τα επίπεδα χοληστερόλης του αίματος και να προστατεύουν από καρδιακές παθήσεις (Daliri and Lee, 2015), ενώ έχει αποδειχθεί ότι μπορούν να περιορίζουν γαστρεντερικά συμπτώματα των αθλητών (Kekkonen et al., 2007). Ακόμη, είναι γνωστό ότι η χορήγηση αντιβιοτικών μπορεί να έχει σημαντικές παρενέργειες στο γαστρεντερικό σύστημα. Συγκεκριμένα, η διατάραξη της γαστρεντερικής μικροχλωρίδας που προκαλείται από τα αντιβιοτικά μπορεί να προκαλέσει εμετούς και διάρροια. Τα προβιοτικά βακτήρια έχει βρεθεί ότι μπορούν να περιορίσουν τις παρενέργειες αυτές και ταυτόχρονα να αυξήσουν το ρυθμό ολοκλήρωσης της αντιβιοτικής θεραπείας. Επιπλέον, μπορούν να επιταχύνουν την ανάρρωση μετά την αντιβιοτική θεραπεία (Jungersen et al. 2014). Τέλος, προβιοτικά στελέχη που φέρουν το ένζυμο λακτάση μπορούν να παρέχουν ανακούφιση από συμπτώματα δυσανεξίας στη λακτόζη (Vandenplas et al., 2015).

Τα οφέλη που παρέχουν στην υγεία τα προβιοτικά βακτήρια, εξαρτώνται από το στέλεχος το οποίο χορηγείται στον οργανισμό. Σε μερικές περιπτώσεις, βέβαια, τα παρεχόμενα οφέλη μπορεί να μην αντιστοιχίζονται μόνο σε ένα μεμονωμένο στέλεχος, αλλά να είναι κοινά

μεταξύ ευρύτερων ταξινομικών ομάδων. Αυτό μπορεί να συμβεί για μία συγκεκριμένη ιδιότητα, όπως για παράδειγμα η παρουσία του ενζύμου λακτάση που έχει ως αποτέλεσμα τη μετρίαση των συμπτωμάτων δυσανεξίας στη λακτόζη (Binda et al. 2020).

Τα στελέχη του γένους *Bifidobacterium*, συγκεκριμένα, έχουν μελετηθεί ως προς τα οφέλη που μπορεί να παρέχουν στην υγεία είτε ενήλικων ατόμων, είτε παιδιών. Τα πιθανά οφέλη τους στον ενήλικο πληθυσμό που έχουν βρεθεί και εκτιμηθεί μέχρι σήμερα αφορούν κυρίως στη βελτίωση της λειτουργίας του εντέρου και τη μείωση της πιθανότητας εμφάνισης διάρροιας που σχετίζεται με την πρόσληψη αντιβιοτικών. Η πιθανή θεραπευτική τους δράση σε διάφορες περιπτώσεις, όπως στις φλεγμονώδεις νόσους του εντέρου, συμπεριλαμβανομένων της νόσου του Crohn και της ελκώδους κολίτιδας, και στο σύνδρομο του ευερέθιστου εντέρου έχει επίσης εξεταστεί σε ενήλικες.

Η διάρροια αποτελεί μία σοβαρή αιτία νοσηρότητας και θνησιμότητας των βρεφών, με αποτέλεσμα η ανάπτυξη προστατευτικών μέτρων να αποτελεί ένα σημαντικό στόχο. Στελέχη του γένους *Bifidobacterium* τα οποία προστίθενται σε βρεφικές ή παιδικές τροφές ως συμπληρώματα διατροφής έχει αποδειχτεί μέσω ερευνών ότι συνεισφέρουν στην κανονική λειτουργία του εντέρου και συμβάλλουν στη μείωση της σοβαρότητας ή της συχνότητας εμφάνισης γαστρεντερικών λοιμώξεων, διάρροιας που σχετίζεται με την πρόσληψη αντιβιοτικών, λοιμώξεων του αναπνευστικού συστήματος, κολικών και αλλεργικών εκδηλώσεων (ατοπικό έκζεμα, ευαισθητοποίηση σε αλλεργιογόνα και συριγμός/άσθμα). Ωστόσο, τα αποτελέσματα των ερευνών αυτών είναι πολλές φορές αντιφατικά μεταξύ τους, καθώς εξαρτώνται από το δείγμα του πληθυσμού στο οποίο διενεργείται η εκάστοτε έρευνα, και τη δόση και τη διαδικασία χορήγησης των προβιοτικών βακτηρίων (Sanz 2016).

Το στέλεχος BB-12 είναι το πιο διαδεδομένο προβιοτικό στέλεχος του γένους *Bifidobacterium*. Έχει αποτελέσει αντικείμενο σε περισσότερες από 300 επιστημονικές εργασίες, εκ των οποίων πάνω από τις 130 αποτελούν μελέτες κλινικών δοκιμών. Ξεκινώντας από το 1987, το στέλεχος BB-12 έχει δοκιμαστεί για περισσότερα από 30 χρόνια σε κλινικές δοκιμές που έχουν γίνει σε άτομα διαφόρων ηλικιών, από πρόωρα βρέφη μέχρι ηλικιωμένους, και έχει χορηγηθεί σε δόσεις μέχρι και  $10^{11}$  cfu/ημέρα.

Τα οφέλη του στελέχους BB-12 τόσο στην υγεία του γαστρεντερικού συστήματος, όσο και στη λειτουργία του ανοσοποιητικού έχουν αποδειχθεί σε πολυάριθμες κλινικές μελέτες. Συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί ότι το συγκεκριμένο στέλεχος βελτιώνει τη λειτουργία του εντέρου, ειδικά σε άτομα με ήπια δυσκοιλιότητα. Ακόμη, μελέτες πάνω στη χορήγηση βρεφικών ή παιδικών τροφών εμπλουτισμένων με το στέλεχος BB-12 σε βρέφη ή παιδιά, αντίστοιχα, έχουν δείξει ότι μπορεί το συγκεκριμένο στέλεχος να έχει ωφέλιμη επίδραση τόσο στη συχνότητα όσο και στη διάρκεια της διάρροιας σε βρέφη και παιδιά.

Ιδιαίτερα υποσχόμενη είναι η αντιμετώπιση του παθογόνου *Helicobacter pylori*, όταν το στέλεχος BB-12 συνδυάζεται με το *Lactobacillus acidophilus* LA-5. Βάσει μελέτης, η χορήγηση ζυμωμένου γάλακτος που περιέχει τα παραπάνω προβιοτικά στελέχη ταυτόχρονα με τη λήψη αντιβίωσης σε άτομα που είχαν προσβληθεί από το συγκεκριμένο παθογόνο, αλλά

κατά τα άλλα ήταν υγιή, οδήγησε σε μείωση της διάρκειας της σχετιζόμενης με την αντιβίωση διάρροιας σε 4 ημέρες (έναντι των 10 που παρατηρήθηκε στα άτομα που δεν κατανάλωσαν το συγκεκριμένο προϊόν) και σε βελτίωση των γενικότερων γαστρεντερικών συμπτωμάτων (De Vrese et al. 2011). Σε αντίστοιχη έρευνα, παρατηρήθηκε σημαντικός περιορισμός των παρενεργειών λόγω χορήγησης αντιβίωσης, όπως εμετός, δυσκοιλιότητα, διάρροια και μεταλλική γεύση. Στους ασθενείς στους οποίους χορηγήθηκε το προβιοτικό προϊόν ο ρυθμός εξάλειψης του *H. pylori* ήταν σημαντικά υψηλότερος και το ποσοστό του BB-12 σε δείγματα κοπράνων ήταν αυξημένο, σε σχέση με των ασθενών που δεν το είχαν λάβει (68% και 44%, αντίστοιχα) (Sheu et al., 2002). Παρόμοια αποτελέσματα έχουν βρεθεί και σε άλλες μελέτες (Sheu et al., 2006; Wang et al., 2004). Βάσει των παραπάνω, προκύπτει ότι το στέλεχος BB-12 σε συνδυασμό με το στέλεχος LA-5 μπορεί να μειώσει τη συχνότητα εμφάνισης και τη διάρκεια διάρροιας σχετιζόμενης με την πρόσληψη αντιβιοτικών, καθώς και να βοηθήσει στην εξάλειψη του *H. pylori* και να ενισχύσει την αποκατάσταση της μικροχλωρίδας σε άτομα που έχουν μολυνθεί από *H. pylori*. Τέλος, έχει βρεθεί ότι η χορήγηση του στελέχους BB-12 μπορεί να αυξήσει την άμυνα του οργανισμού έναντι κοινών λοιμώξεων, ενισχύοντας την απόκριση του ανοσοποιητικού, αλλά και να μειώσει τη συχνότητα και τη διάρκεια λοιμώξεων του αναπνευστικού συστήματος (Jungersen et al. 2014).

### 1.3.3. Ασφάλεια προβιοτικών βακτηρίων

Κατά τη χορήγηση προβιοτικών βακτηρίων με σκοπό την αποκόμιση οφελών από τον οργανισμό-ξενιστή, αναμένεται η κατανάλωση μεγάλων ποσοτήτων βακτηρίων, με αποτέλεσμα η ασφάλεια να αποτελεί μείζον ζήτημα, όπως σε κάθε τρόφιμο στο οποίο εμπλέκονται μικροοργανισμοί. Συγκεκριμένα, υπάρχουν δύο ζητήματα που πρέπει να ληφθούν υπόψιν: ο καθορισμός τυχόν δυσμενών επιπτώσεων του κάθε στελέχους στον οργανισμό-ξενιστή και η διασφάλιση συμφωνίας με συγκεκριμένα πρότυπα ποιότητας τα οποία εξασφαλίζουν την παρουσία του σωστού προβιοτικού στελέχους και την απουσία επιμολύνσεων. Οι βασικοί θεωρητικοί κίνδυνοι που εγκυμονούν κατά την κατανάλωση προβιοτικών βακτηρίων περιλαμβάνουν τη μόλυνση, τις επιπτώσεις από τις τοξίνες που προέρχονται είτε από το προβιοτικό στέλεχος είτε από ρυπαντές, και τις ανοσολογικές επιδράσεις. Η μεγαλύτερη πλειοψηφία κλινικών δοκιμών προβιοτικών βακτηρίων που έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία δεν έχουν προκαλέσει κάποια σοβαρή ανησυχία γύρω από την ασφάλεια αυτών. Παρόλα αυτά, έχουν αναφερθεί μερικά παραδείγματα σοβαρών παρενεργειών ανεξάρτητα από τη σύνθεση, τη δοσολογία και την καθημερινή πρόσληψη. Όσες παρενέργειες έχουν αναφερθεί αφορούν περιπτώσεις βακτηριακής σήψης που συνδέεται με συμπληρώματα προβιοτικών βακτηρίων που περιέχουν λακτοβάκιλλους, ή θάνατο πρόωρου βρέφους από γαστρεντερική βλεννομυκητίαση λόγω επιμόλυνσης προβιοτικού συμπληρώματος από μούχλα (Sanders et al. 2016; Vallabhaneni et al. 2015). Σε άλλες περιπτώσεις έχει αναφερθεί συσχέτιση μεταξύ κατανάλωσης προβιοτικού σκευάσματος και αυξημένου κινδύνου θνησιμότητας σε ασθενείς με σοβαρή οξεία παγκρεατίτιδα (Besselink et al. 2008). Για το λόγο αυτό, απαιτείται προσεκτική αξιολόγηση της ασφάλειας πριν την κατανάλωση προβιοτικών βακτηρίων από ευπαθείς ομάδες, όπως



ασθενείς με βλάβη στο βλεννογόνο του εντέρου ή με απορυθμισμένο ανοσοποιητικό, όπως μπορεί να συμβεί σε ασθενείς με φλεγμονώδεις παθήσεις του εντέρου, παθήσεις του συκωτιού, AIDS και άλλες παθήσεις (Sanders et al. 2010, 2016). Κατά την αξιολόγηση της ασφάλειας θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η φύση του προβιοτικού στελέχους, η μέθοδος χορήγησης, ο βαθμός έκθεσης, η κατάσταση υγείας του ξενιστή, και οι φυσιολογικές λειτουργίες των μικροοργανισμών. Περισσότερες πληροφορίες σχετικά με την αξιολόγηση και τη νομοθετική προσέγγιση της ασφάλειας των προβιοτικών βακτηρίων παρατίθενται στην υποενότητα 1.5.1.

Τα περισσότερα προβιοτικά βακτήρια που χρησιμοποιούνται σε εμπορικά προϊόντα προέρχονται από ζυμωμένα τρόφιμα με μακρά ιστορία ασφαλούς κατανάλωσης ή από μικροοργανισμούς που αποικίζουν υγιείς οργανισμούς. Όλα τα κοινά προβιοτικά στελέχη θεωρούνται ασφαλή για το γενικό πληθυσμό από την Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (European Food Safety Authority, EFSA). Παρόλα αυτά, ο ορισμός δεν παρέχει οδηγίες για την αυξανόμενη χρήση προβιοτικών σε μη υγιή άτομα και ο όρος προβιοτικό δεν γίνεται εύκολα αποδεκτός από την EFSA.

#### ***1.4. Κριτήρια επιλογής προβιοτικών βακτηρίων***

Τα προβιοτικά στελέχη μπορούν να εισαχθούν σε κάποιο σύστημα τροφίμου, μόνο εφόσον ικανοποιούνται συγκεκριμένα κριτήρια ποιότητας και ασφάλειας. Σύμφωνα με τη Διεθνή Επιστημονική Ένωση Προβιοτικών και Πρεβιοτικών (International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics, ISAPP), κάθε βακτηριακό στέλεχος, προκειμένου να χαρακτηριστεί προβιοτικό και να επιλεγεί για σχετική εφαρμογή πρέπει να είναι επαρκώς χαρακτηρισμένο, ασφαλές για την προβλεπόμενη χρήση και να υποστηρίζεται από τουλάχιστον μία κλινική μελέτη σε ανθρώπους που να έχει διεξαχθεί με βάση ευρέως αποδεκτά επιστημονικά πρότυπα (ISAPP 2018). Παρακάτω αναφέρονται αναλυτικά τα απαιτούμενα κριτήρια, όπως αυτά έχουν τεθεί από τους σχετιζόμενους επίσημους φορείς.

##### ***1.4.1. Κριτήρια ασφάλειας***

Η παροχή στον καταναλωτή τροφίμων που πληρούν τα ισχύοντα πρότυπα ασφάλειας είναι βασική ευθύνη της βιομηχανίας παραγωγής προβιοτικών προϊόντων. Η απόδειξη ότι ένα συγκεκριμένο προβιοτικό στέλεχος είναι ασφαλές προς χρήση σε τρόφιμα και διατροφικά συμπληρώματα, απαιτεί, αρχικά, κατάλληλη ταυτοποίηση του προβιοτικού στελέχους, και περαιτέρω τεκμηρίωση της ασφαλούς χρήσης του μέσω ιστορικών στοιχείων ή πειραμάτων. Τα ιστορικά δεδομένα της ασφαλούς χρήσης αποτελούν ένα σημαντικό παράγοντα στη συνολική αξιολόγηση της ασφάλειας για μία συγκεκριμένη χρήση. Σε περίπτωση που δεν είναι διαθέσιμα, η ασφάλεια πρέπει να καθορίζεται βάσει επιστημονικών αρχών, συμπεριλαμβανομένης της διεξαγωγής κατάλληλων μελετών (Binda et al. 2020).

Οι απαιτήσεις ασφάλειας για τα προβιοτικά βακτήρια πρέπει να είναι αντίστοιχες με τους αναμενόμενους κινδύνους. Σύμφωνα με τις βασικές απαιτήσεις ασφάλειας, τα προβιοτικά βακτήρια δεν πρέπει να προκαλούν αποσύζευξη των χολικών αλάτων ούτε να φέρουν

μεταφερόμενα γονίδια αντοχής σε αντιβιοτικά. Είναι, επίσης, αναμενόμενο ότι δεν πρέπει να είναι παθογόνα ή να σχετίζονται με ασθένειες ή παθήσεις (Frakolaki, Giannou, et al. 2020). Λεπτομερέστερη περιγραφή σχετικά με τα κριτήρια ασφαλείας των προβιοτικών βακτηρίων παρατίθεται στην υποενότητα 1.5.

#### 1.4.2. Λειτουργικά κριτήρια

Προκειμένου να μπορέσουν να αποδώσουν την προβιοτική τους δράση κατά τη διέλευσή τους από το ανθρώπινο γαστρεντερικό σύστημα, τα προβιοτικά βακτήρια πρέπει να φτάνουν ζωντανά στο συγκεκριμένο μέρος του σώματος. Συγκεκριμένα, πρέπει να αντέχουν στην οξύτητα των γαστρικών υγρών, τη χολή που εκκρίνεται στο ανώτερο πεπτικό σύστημα, και τα παγκρεατικά ένζυμα, ώστε να μπορούν να φτάσουν και να δράσουν στο λεπτό έντερο. Επιπρόσθετα, πρέπει να είναι ικανά να προσκολλώνται στα εντερικά τοιχώματα, προκειμένου να προσδώσουν τα οφέλη τους, να ανταγωνίζονται με πιθανά παθογόνα βακτήρια μέσω παραγωγής αντιμικροβιακών ουσιών και να έχουν, εάν είναι δυνατόν, αντιμεταλλαξιόνες και αντικαρκινικές ιδιότητες. Τέλος, πρέπει να ενισχύουν το ανοσοποιητικό σύστημα χωρίς προφλεγμονώδη επίδραση (Frakolaki, Giannou, et al. 2020; Turroni et al. 2019).

Καθώς δεν είναι γνωστό με μεγάλη ακρίβεια το σημείο-στόχος στο οποίο δρα το κάθε προβιοτικό στέλεχος, όπως και λόγω τεχνικών δυσκολιών όσον αφορά την καταμέτρηση των ζωντανών προβιοτικών κυττάρων *in situ*, η αξιολόγηση της βιωσιμότητας των προβιοτικών βακτηρίων γίνεται είτε μέσω *in vitro* δοκιμών που προσομοιάζουν το γαστρεντερικό σύστημα, είτε μέσω ανάκτησης κοπράνων σε *in vivo* δοκιμές (Jungersen et al., 2014).

#### 1.4.3. Τεχνολογικά κριτήρια

Τα προβιοτικά στελέχη πρέπει, επίσης, να καλύπτουν επαρκώς ορισμένα τεχνολογικά κριτήρια. Συγκεκριμένα, πρέπει να υπάρχει η δυνατότητα παραγωγής τους σε μεγάλη κλίμακα και να είναι ανθεκτικά σε αερόβιες συνθήκες. Επιπρόσθετα, πρέπει να μπορούν να ενσωματώνονται σε προϊόντα τροφίμων χωρίς να έχουν αρνητική επίδραση στα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά καθ' όλη τη διάρκεια ζωής τους. Τέλος, είναι απαραίτητη η διατήρηση του προβιοτικού βακτηριακού φορτίου σε υψηλά και σταθερά επίπεδα κατά τη διάρκεια των διεργασιών παραγωγής και της αποθήκευσης των προϊόντων (Daliri and Lee, 2015; Mattila-Sandholm et al., 2002; Saarela et al., 2000; Tripathi and Giri, 2014).

Σε περίπτωση ενσωμάτωσης σε ζυμωμένα προϊόντα, τα προβιοτικά βακτήρια πρέπει να είναι ικανά να συνεισφέρουν στη διεργασία της ζύμωσης σε συνδυασμό με την καλλιέργεια εκκίνησης, χωρίς να αναστέλλεται η ανάπτυξη κανενός από τα περιεχόμενα στελέχη. Τα τελικά προϊόντα πρέπει να έχουν παρόμοιες ή βελτιωμένες ιδιότητες (π.χ. σταθερότητα, ιξώδες, κ.α.) σε σύγκριση με τα συμβατικά προϊόντα (Frakolaki, Giannou, et al. 2020).

## 1.5. Η νομοθετική προσέγγιση του θέματος των προβιοτικών βακτηρίων

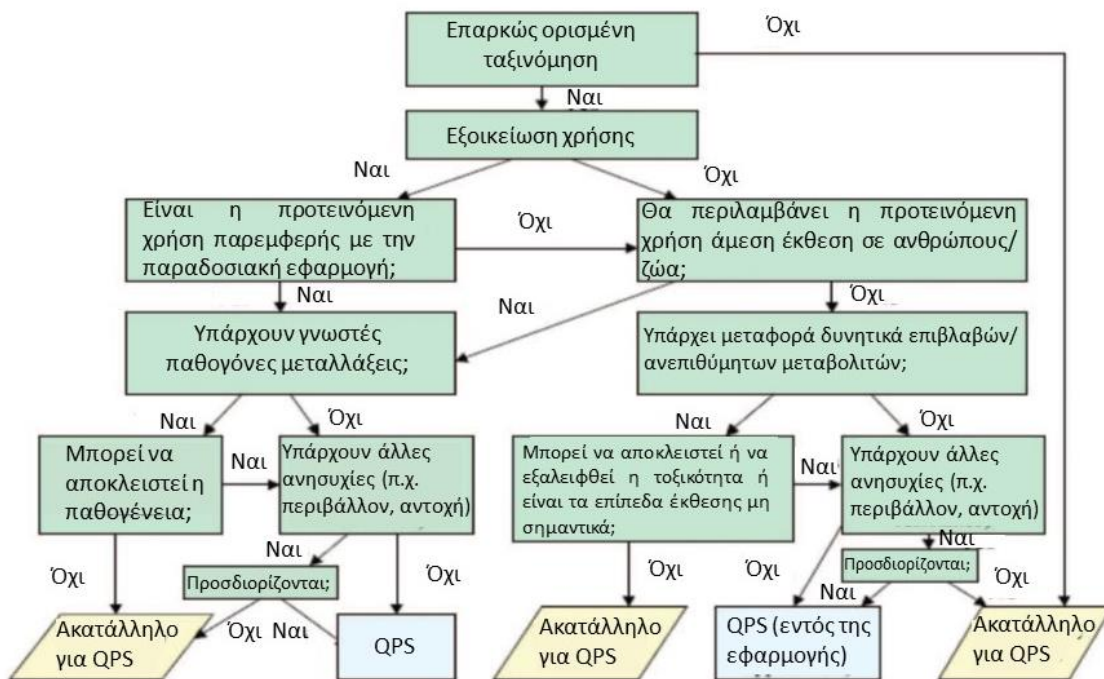
### 1.5.1. Νομοθεσία και ασφάλεια προβιοτικών βακτηρίων

Όσον αφορά την παροχή κατευθυντήριων οδηγιών σχετικά με την αξιολόγηση της ασφάλειας των προβιοτικών βακτηρίων κατά τη χορήγησή τους σε ανθρώπους, έχουν ληφθεί διάφορες πρωτοβουλίες. Ωστόσο, δεν έχουν ακόμη νομοθετηθεί επίσημες οδηγίες για τον έλεγχο της ασφάλειας μικροοργανισμών σχετιζόμενων συγκεκριμένα με τα τρόφιμα. Τη βάση για τη σχετική νομοθεσία κάθε κράτους αποτελεί σε πολλές περιπτώσεις ο Διεθνής Κώδικας Τροφίμων και Ποτών (Codex Alimentarius). Ο Κώδικας, παρόλα αυτά, δεν περιλαμβάνει κριτήρια εξειδικευμένα ως προς τα προβιοτικά βακτήρια, αλλά γενικότερες αρχές και κατευθυντήριες οδηγίες παρόμοιας φύσης σε θέματα όπως η επισήμανση, οι διατροφικοί ισχυρισμοί, η ασφάλεια και η υγιεινή των τροφίμων, που καλύπτουν γενικότερα τα προϊόντα τροφίμων. Μέχρι σήμερα θεωρείται ότι το θέμα των προβιοτικών βακτηρίων καλύπτεται από τα παραπάνω και από τη σύμπραξη των FAO και WHO (2001) και δεν απαιτούνται κανονισμοί εξειδικευμένοι ως προς αυτά (FAO/WHO CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION 2019).

Συγκεκριμένα, ο Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας των Ηνωμένων Εθνών (FAO) και ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (ΠΟΥ), ως μέρος της προσπάθειας για καθιέρωση κάποιων κατευθυντήριων γραμμών για τη χρήση προβιοτικών βακτηρίων σε τρόφιμα, περιέγραψαν μία γενική προσέγγιση για το χαρακτηρισμό των προβιοτικών βακτηρίων. Με βάση τα κριτήρια που σχετίζονται με τον προσδιορισμό της ασφάλειας, τα προβιοτικά βακτήρια θα πρέπει να έχουν αποδεδειγμένο ιστορικό ασφαλούς χρήσης, να μη φέρουν μεταφερόμενα γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά και να μην έχουν ιδιότητες μολυσματικότητας. Ακόμη, θα πρέπει να μπορούν να εκτελέσουν συγκεκριμένες μεταβολικές δραστηριότητες, όπως παραγωγή D-γαλακτικού ή αποσύνδεση χολικών αλάτων, και να μην παράγουν ενώσεις τοξικές για τον ανθρώπινο οργανισμό. Τέλος, για τον χαρακτηρισμό ενός προβιοτικού στελέχους ως ασφαλές πρέπει να γίνεται αξιολόγηση των παρενεργειών κατά τη διάρκεια μελετών σε ανθρώπους και επιδημιολογική παρακολούθηση ανεπιθύμητων περιστατικών σε καταναλωτές, μετά τη διάθεση στην αγορά (FAO/WHO 2001).

Κατά την παραγωγή τροφίμων, μία μεγάλη ποικιλία μικροοργανισμών προστίθεται σκόπιμα και υπόκειται σε αξιολόγηση ασφάλειας από την Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (European Food Safety Authority, EFSA) (Herman et al. 2019). Ωστόσο, το ακριβές ρυθμιστικό πλαίσιο για την έγκριση ενός νέου προβιοτικού τροφίμου παραμένει ασαφές. Ο Κανονισμός της ΕΕ σχετικά με τα Νέα Τρόφιμα (Regulation (EU) 2015/2283), ο οποίος περιλαμβάνει νέα τρόφιμα και συστατικά τροφίμων τα οποία δεν έχουν χρησιμοποιηθεί προς ανθρώπινη κατανάλωση σε σημαντικό βαθμό εντός της Ευρωπαϊκής Κοινότητας μέχρι το 1997, παρέχει ένα κανονιστικό πλαίσιο για τα προβιοτικά βακτήρια. Παρόλα αυτά, τα προβιοτικά που χρησιμοποιούνταν από παλιότερα ως πρόσθετα ή βοηθητικά μέσα διεργασίας δεν εμπίπτουν στο πεδίο εφαρμογής του Κανονισμού για τα Νέα Τρόφιμα. Μέχρι σήμερα κανένα προβιοτικό στέλεχος δεν έχει υποβληθεί σε μία τόσο ενδελεχή αξιολόγηση ασφάλειας με βάση τον Κανονισμό για τα Νέα Τρόφιμα.

Προκειμένου να υπάρχει μία εναρμονισμένη γενική προ-αξιολόγηση ασφάλειας για την υποστήριξη των εκτιμήσεων κινδύνου που διενεργούνται από την EFSA, αναπτύχθηκε το τεκμήριο αναγνωρισμένης ασφάλειας QPS (Herman et al. 2019). Στην εικόνα 1.2 παρουσιάζεται ένα γενικό σχήμα που περιγράφει τις κατευθυντήριες γραμμές του QPS για την αξιολόγηση της ασφάλειας μίας ταξινομικής βαθμίδας. Η εφαρμογή του QPS περιλαμβάνει τους εξής τέσσερις πυλώνες: (1) ορισμό της ταξινόμησης του μικροοργανισμού, (2) συλλογή επαρκών πληροφοριών που θα παρέχουν τη βάση για το καθεστώς QPS, συμπεριλαμβανομένων επιστημονικής βιβλιογραφίας, ιστορικού χρήσης, βιομηχανικών εφαρμογών, οικολογικών δεδομένων και δεδομένων ανθρώπινης παρέμβασης, (3) αποκλεισμό παθογένειας και (4) ορισμό της τελικής χρήσης.



Εικόνα 1.2: Κατευθυντήριες οδηγίες εφαρμογής QPS (Sanders et al., 2010)

Πίνακας 1.2: Θετικά κατά Gram βακτήρια που έχουν λάβει καθεστώς QPS (EFSA, 2019).

Γένος	Στελέχη	Επιπρόσθετες προδιαγραφές
Bifidobacterium (B.)	B. adolescentis, B. animalis, B. bifidum, B. breve, B. longum	Τα στελέχη δεν θα πρέπει να φέρουν γονίδια επίκτητης αντοχής σε αντιβιοτικά.
Lactobacillus (Lb.)	Lb. acidophilus, Lb. amylolyticus, Lb. amylovorus, Lb. animalis, Lb. alimentarius, Lb. aviaries, Lb. brevis, Lb. buchneri, Lb. casei, Lb. cellobiosus, Lb. collinoides, Lb. coryniformis, Lb. crispatus, Lb. curvatus, Lb. delbrueckii, Lb. dextrinicus, Lb. diolivorans, Lb. farciminis, Lb. fermentum, Lb. gallinarum, Lb. gasseri, Lb. helveticus, Lb. hilgardii, Lb. johnsonii, Lb. kefiranofaciens, Lb. kefiri, Lb. mucosae, Lb. panis, Lb. paracasei, Lb. parafarraginis, Lb. parapantarum, Lb. pentosus, Lb. plantarum, Lb. pontis, Lb. reuteri, Lb. rhamnosus, Lb. sakei, Lb. salivarius, Lb. sanfranciscensis.	
Lactococcus	Lactococcus lactis	
Leuconostoc	Leuconostoc citreum, Leuconostoc lactis, Leuconostoc mesenteroides, Leuconostoc pseudomesenteroides	
Propionibacterium	Propionibacterium acidipropionici, Propionibacterium freudenreichii	
Streptococcus	Streptococcus thermophilus	
Bacillus	Bc. amyloliquefaciens, Bc. Atrophaeus, Bc. circulans, Bc. clausii, Bc. coagulans, Bc. flexus, Bc. fusiformis, Bc. lentus, Bc. licheniformis, Bc. megaterium, Bc. mojavensis, Bc. pumilus, Bc. smithii, Bc. subtilis, Bc. vallismortis, Bc. velezensis	

Εάν δεν υπάρχουν ανησυχίες σχετικά με την ασφάλεια μίας συγκεκριμένης ταξινομικής βαθμίδας ή αν έχουν ήδη αντιμετωπιστεί τυχόν ζητήματα ασφάλειας, η βαθμίδα αυτή μπορεί να λάβει καθεστώς QPS. Συνεπώς, ένα μικροβιακό στέλεχος που έχει κατηγοριοποιηθεί σε κάποια ταξινομική βαθμίδα που έχει λάβει καθεστώς QPS θα εξαιρείται από περαιτέρω αξιολόγηση ασφάλειας, εκτός αν απαιτούνται συγκεκριμένες προδιαγραφές. Αντίθετα, μικροοργανισμοί που δεν θεωρούνται κατάλληλοι βάσει του καθεστώτος QPS θα συνεχίζουν να υπόκεινται σε πλήρη αξιολόγηση ασφάλειας (EFSA 2007). Βάσει των παραπάνω, έχει πλέον καθιερωθεί ο κατάλογος του QPS, ο οποίος περιλαμβάνει τις ταξινομικές μονάδες που έχουν λάβει καθεστώς QPS. Ο κατάλογος εισήχθη για πρώτη φορά το 2007 και έκτοτε αναθεωρείται και ενημερώνεται συνεχώς μέσω επιστημονικών συζητήσεων. Στον Πίνακα 1.2 παρουσιάζονται τα θετικά κατά Gram βακτήρια που έχουν λάβει καθεστώς QPS μέχρι και το 2019.

Τέλος, τονίζεται ότι το πιστοποιητικό QPS αναφέρεται στην κατανάλωση τροφίμων από τον γενικό, υγιή πληθυσμό, και δεν λαμβάνει υπόψιν πιθανούς κινδύνους για ευάλωτα άτομα (EFSA 2005) ή για χρήσεις των προβιοτικών βακτηρίων εκτός τροφίμων. Επιπρόσθετα, ο κατάλογος QPS δεν είναι εξαντλητικός, καθώς στηρίζεται σε υποβολές στην EFSA προς έγκριση για εμπορική διάθεση στην Ευρωπαϊκή αγορά. Έτσι, πολλοί μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται σε παραδοσιακά ζυμωμένα τρόφιμα δεν περιλαμβάνονται στον κατάλογο (Bourdichon et al. 2018). Στην Ευρώπη, αν ένα στέλεχος δεν ανήκει στον κατάλογο QPS, εμπίπτει στον Κανονισμό σχετικά με τα Νέα Τρόφιμα (Regulation (EU) 2015/2283).

#### *1.5.2. Νομοθεσία και επισήμανση τροφίμων που περιέχουν προβιοτικά βακτήρια*

Η δυνατότητα αναφοράς ισχυρισμών υγείας σε προϊόντα που περιλαμβάνουν προβιοτικά βακτήρια εμπίπτει στον Κανονισμό (ΕΚ) 1924/2006, βάσει του οποίου οι ισχυρισμοί υγείας και διατροφής που χρησιμοποιούνται στην ετικέτα, στην παρουσίαση και στη διαφήμιση των τροφίμων που κυκλοφορούν στην ευρωπαϊκή αγορά, δεν πρέπει να είναι ψευδείς ή παραπλανητικοί και πρέπει να τεκμηριώνονται από γενικώς αποδεκτά επιστημονικά στοιχεία. Οι ισχυρισμοί υγείας πρέπει να αξιολογούνται από την EFSA και να εγκρίνονται από την Ευρωπαϊκή Επιτροπή (European Commission).

Όσον αφορά τα προβιοτικά βακτήρια, πληθώρα ισχυρισμών υγείας έχει κατατεθεί στην Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (European Food Safety Authority, EFSA), συμπεριλαμβανομένων μεταξύ άλλων της υποστήριξης υγιούς εντερικής μικροχλωρίδας, του μειωμένου χρόνου διέλευσης από το πεπτικό σύστημα, της υποστήριξης του ανοσοποιητικού συστήματος, της άμυνας έναντι παθογόνων μικροοργανισμών και της στοματικής υγιεινής. Ωστόσο, όσοι ισχυρισμοί υγείας έχουν κατατεθεί μέχρι τώρα, δεν έχουν γίνει δεκτοί από την EFSA. Οι κυριότεροι λόγοι για τους οποίους η EFSA έχει απορρίψει τους εκάστοτε ισχυρισμούς περιλαμβάνουν ζητήματα στο σχεδιασμό της μελέτης, ανεπαρκή ορισμό του ισχυρισμού, ανεπαρκή χαρακτηρισμό του τροφίμου και έλλειψη στοιχείων που να αποδεικνύουν τον ισχυρισμό και να δημιουργούν μία σχέση αιτίου-αιτιατού (EC 2018).

Εκτός από τα οφέλη που παρέχουν τα προβιοτικά βακτήρια, μέχρι τώρα δεν είναι δυνατή ούτε η αναγραφή του όρου «προβιοτικό» στην ετικέτα ενός προϊόντος, καθώς θεωρείται ισχυρισμός υγείας. Οποιαδήποτε φράση δηλώνει, προτείνει ή υπονοεί μία σχέση μεταξύ τροφίμου και υγείας μπορεί να θεωρηθεί ισχυρισμός υγείας (Regulation (EC) No. 1924/2006). Έτσι, η δήλωση «περιέχει προβιοτικά» και οποιεσδήποτε παρεμφερείς αυτής υποδηλώνουν ότι το προϊόν περιέχει κάποια ουσία που έχει ευεργετική δράση στην υγεία και θεωρούνται ισχυρισμοί υγείας. Ο μόνος τρόπος ενημέρωσης του καταναλωτή για την ύπαρξη των προβιοτικών βακτηρίων στο προϊόν, είναι μέσω αναγραφής της επιστημονικής ονομασίας του προβιοτικού στελέχους ως συστατικό του προϊόντος.

Οι FAO και WHO έχουν εκδώσει κατευθυντήριες οδηγίες σχετικά με τη διατροφική ετικέτα ενός προβιοτικού προϊόντος. Βάσει αυτών, στην ετικέτα του προϊόντος θα πρέπει να αναγράφονται πληροφορίες σχετικά με το γένος, το είδος και το στέλεχος των περιεχόμενων προβιοτικών βακτηρίων, το ελάχιστο βακτηριακό φορτίο κάθε προβιοτικού στελέχους στο τέλος του χρόνου ζωής του προϊόντος, εκφρασμένο σε cfu, την προτεινόμενη δόση/μερίδα που θα παρέχει επαρκή ποσότητα προβιοτικών βακτηρίων, ώστε να αποδοθούν τα οφέλη που θα αναγράφονται στην ετικέτα, και τις κατάλληλες συνθήκες αποθήκευσης. Ακόμη σε περίπτωση που επιτρέπονται από τη νομοθεσία και υποστηρίζονται από αντίστοιχες μελέτες θα πρέπει να αναγράφονται οι σχετικοί ισχυρισμοί υγείας.

Μέχρι σήμερα δεν υπάρχει κάποιο νομοθετικό πλαίσιο που να προβλέπει τα παραπάνω. Υπάρχει, συνεπώς, ανάγκη νομοθέτησης των παραπάνω και καθιέρωσης επαρκών δόσεων και συνθηκών χρήσης για κάθε προβιοτικό στέλεχος ή συνδυασμό προβιοτικών στελεχών, καθώς και προτύπου χορήγησης. Αυτό θα μπορούσε να δώσει τη δυνατότητα χρήσης αξιόπιστων ισχυρισμών υγείας, παρέχοντας στους καταναλωτές πληρέστερη ενημέρωση (Sanz 2016).

### **1.6. Προβιοτικά βακτήρια νέας γενιάς – Next generation probiotics (NGP)**

Εκτός από τα συμβατικά προβιοτικά στελέχη που αναφέρθηκαν στην υποενότητα 1.2, τα τελευταία χρόνια γίνονται μελέτες σχετικά με το χαρακτηρισμό νέων στελεχών που αποτελούν μέρος της εντερικής χλωρίδας και παρουσιάζουν πιθανή προβιοτική δράση. Πολλά βακτηριακά στελέχη τα οποία δεν είχαν αναγνωριστεί μέχρι πρόσφατα έχουν συσχετιστεί με την εξέλιξη συγκεκριμένων παθήσεων, και αναφέρονται ως νέας γενιάς προβιοτικά (next generation probiotics, NGP). Για παράδειγμα, το στέλεχος *Akkermansia muciniphila* έχει αναφερθεί ότι μπορεί να τροποποιεί το μεταβολισμό και το ανοσοποιητικό του ξενιστή. Ορισμένα στελέχη του γένους *Clostridium* (C.) έχουν επίσης κατοχυρωθεί ως πιθανά προβιοτικά νέας γενιάς. Παρόλο που μερικά στελέχη *Clostridium*, όπως τα *Clostridium perfringens* και *Clostridium difficile* αποτελούν μερικά από τα πιο διαδεδομένα παθογόνα, κάποια μη-τοξικογόνα στελέχη *Clostridium* χρησιμοποιούνται ήδη ως προβιοτικά βακτήρια, ενώ συγκεκριμένα στελέχη, συμπεριλαμβανομένων των *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii*, *C. butyricum*, *C. cellulolyticum*, *C. ljungdahlii* και *C. Thermocellum* ερευνώνται ως πιθανά προβιοτικά νέας γενιάς. Επιπρόσθετα, η έγκριση της χρήσης του στελέχους

*Bacteroides xyloisolvans* στα τρόφιμα από την Ευρωπαϊκή Επιτροπή (European Commission) ενθαρρύνει την περαιτέρω έρευνα των στελεχών του γένους *Bacteroides*. Το γένος *Eggerthellaceae*, περιέχει, επίσης πιθανά προβιοτικά νέας γενιάς, λόγω της βιολογικής δράσης των μεταβολιτών τους, οι οποίοι παρουσιάζουν αντι-φλεγμονώδεις, αντι-καρκινικές, καρδιο-προστατευτικές και νευρο-προστατευτικές ιδιότητες. Το στέλεχος *Faecalibacterium prausnitzii* έχει αναφερθεί ότι μπορεί να βοηθήσει στη διατήρηση της εντερικής ομοιόστασης και ακεραιότητας μέσω παραγωγής βουτυρικού οξέος και, επίσης, να βελτιώσει εντερικές διαταραχές, όπως για παράδειγμα τη νόσο του Crohn και άλλες φλεγμονώδεις νόσους του εντέρου. Ακόμη, έχει πιθανές θεραπευτικές ιδιότητες εναντίον του καρκίνου. Τέλος, το στέλεχος *Parabacteroides goldsteinii* μπορεί, επίσης, να αποτελέσει προβιοτικό νέας γενιάς, καθώς έχει αντι-φλεγμονώδη δράση και ικανότητα αύξησης της ευαισθησίας στην ινσουλίνη και συμβάλλει στην αντιμετώπιση της παχυσαρκίας (Lin et al. 2019).

Η ανακάλυψη νέων προβιοτικών στελεχών, παρόλο που είναι επιθυμητή, θέτει νέες προκλήσεις, τόσο για τη βιομηχανία όσο και για τους επιστήμονες. Τα κύρια ερωτήματα γύρω από τα προβιοτικά νέας γενιάς αφορούν την αποτελεσματικότητά τους, την ασφάλειά τους και την τεχνολογική ευρωστία τους. Σε αντίθεση με τα παραδοσιακά προβιοτικά γένη *Lactobacillus* και *Bifidobacterium*, τα προβιοτικά βακτήρια νέας γενιάς φαίνεται να ενέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο πρόκλησης κάποιας νόσου. Οι έρευνες σχετικά με το στέλεχος *C. Butyricum* έχουν εξελιχθεί περισσότερο από όλες όσες σχετίζονται με τα προβιοτικά βακτήρια νέας γενιάς. Το στέλεχος αυτό είναι, μάλιστα, πλέον εμπορικά διαθέσιμο ως συμπλήρωμα διατροφής. Παρόλα αυτά, το συγκεκριμένο είδος έχει αναγνωριστεί και για την παθογόνο δράση σε ανήλικα άτομα. Η δυσκολία έγκρισης ενός προβιοτικού βακτηρίου νέας γενιάς μπορεί να γίνει περισσότερο κατανοητή στην περίπτωση του γένους *Bacteroides*, του οποίου τα στελέχη έχουν μελετηθεί εκτενώς για μεγάλο χρονικό διάστημα, άλλα ως σημαντικά παθογόνα στελέχη, και άλλα ως προβιοτικά νέας γενιάς. Όσον αφορά τα γένη *Faecalibacterium* και *Akkermansia*, οι πληροφορίες γύρω από την ασφάλειά τους είναι περιορισμένες. Τα δεδομένα αλληλούχισης όλου του γονιδιώματος θα βοηθήσουν στη διαλεύκανση των πιο βασικών ζητημάτων ασφάλειας (παρουσία γονιδίων ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά και παραγόντων μολυσματικότητας). Μελέτες τόσο σε ζώα, όσο και σε ανθρώπους, σχετικά με την ασφάλεια των βακτηρίων αυτών, θεωρείται απαραίτητο να γίνουν στο μέλλον.

Επιπρόσθετα, η παραγωγή και η σύνθεση πολλών στελεχών προβιοτικών βακτηρίων νέας γενιάς παρουσιάζει σημαντικές τεχνολογικές δυσκολίες. Τα περισσότερα εντερικά βακτήρια που θεωρούνται ως πιθανά προβιοτικά νέας γενιάς έχουν περίπλοκες απαιτήσεις σε θρεπτικά συστατικά και είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στο οξυγόνο. Έτσι είναι δύσκολο να παραχθούν οικονομικά σε μεγάλη κλίμακα και να παραμείνουν ζωντανά κατά τη διάρκεια της διεργασίας για την παραγωγή προϊόντων. Συγκεκριμένα, η ενσωμάτωσή τους σε τρόφιμα-φορείς δεν φαίνεται να είναι υλοποιήσιμη, σε αντίθεση με τη χρήση τους σε συμπληρώματα διατροφής, η οποία φαίνεται περισσότερο εφικτή (M. H. Saarela 2019).



## 1.7. Χρήση πρεβιοτικών ουσιών για την ενίσχυση της βιωσιμότητας των προβιοτικών βακτηρίων

### 1.7.1. Ορισμός πρεβιοτικών ουσιών

Σύμφωνα με τους Gibson & Roberfroid (1995) ο γενικός ορισμός των πρεβιοτικών ουσιών περιλαμβάνει «μη αφομοιώσιμα συστατικά τροφίμων που έχουν ευεργετική επίδραση στον ξενιστή, μέσω επιλεκτικής ενίσχυσης της ανάπτυξης ή/και της δράσης ενός ή περιορισμένου πλήθους βακτηριακών ειδών που βρίσκονται ήδη στο έντερο, βελτιώνοντας έτσι την υγεία του ξενιστή». Παρόλα αυτά, η περιγραφή αυτή ισχύει μόνο για έναν περιορισμένο αριθμό υδατανθρακικών ενώσεων και, πιο συγκεκριμένα, για τις β-φρουκτάνες μικρής και μεγάλης αλυσίδας (φρουκτοολιγοσακχαρίτες και ινουλίνη), τους γαλακτοολιγοσακχαρίτες και τη λακτουλόζη. Στην 6<sup>η</sup> Συνάντηση της Διεθνούς Επιστημονικής Ένωσης Προβιοτικών και Πρεβιοτικών (International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics, ISAPP) η πρεβιοτική ουσία ορίστηκε ως «ένα επιλεκτικά ζυμωμένο συστατικό που οδηγεί σε συγκεκριμένες μεταβολές στη σύσταση και/ή τη δράση της γαστρεντερικής μικροχλωρίδας, παρέχοντας έτσι όφελος/-η στην υγεία του ξενιστή» (Glenn R. Gibson et al. 2010). Το 2015, οι Bindels et al. (2015) πρότειναν την αφαίρεση των απαιτήσεων περί επιλεκτικότητας, στηριζόμενοι σε αναφορές που υποδεικνύουν ότι οι πρεβιοτικές ουσίες ευνοούν πολλαπλές τάξεις και όχι συγκεκριμένα είδη (Dewulf et al. 2013). Αυτή η πρόταση οδήγησε στον ορισμό της πρεβιοτικής ουσίας ως «μη αφομοιώσιμη ένωση η οποία μέσω του μεταβολισμού της από μικροοργανισμούς του εντέρου, οδηγεί στην τροποποίηση της σύνθεσης ή/και της δραστηριότητας της εντερικής μικροχλωρίδας, προσφέροντας έτσι μία ευεργετική φυσιολογική επίδραση στον ξενιστή» (Hill et al. 2014). Ως αποτέλεσμα, ο κατάλογος των πρεβιοτικών διευρύνεται, συμπεριλαμβάνοντας ενώσεις όπως τα ανθεκτικά άμυλα, την πηκτίνη, την αραβινοξυλάνη και μη υδατανθρακικές ενώσεις όπως τις πολυφαινόλες (Valcheva and Dieleman 2016). Η τελευταία αναθεώρηση του ορισμού έγινε από τη Διεθνή Επιστημονική Ένωση Προβιοτικών και Πρεβιοτικών το 2016, όπου πλέον μία πρεβιοτική ουσία ορίζεται ως το «υπόστρωμα που χρησιμοποιείται επιλεκτικά από μικροοργανισμούς του ξενιστή προσφέροντας όφελος στην υγεία» (Glenn R. Gibson et al. 2017). Πέρα από το συγκεκριμένο ορισμό, ο οποίος έγινε αποδεκτός τα τελευταία χρόνια, υπάρχουν και άλλοι ορισμοί-αναθεωρήσεις του αρχικού, οι οποίοι έχουν δημοσιευτεί σε διεθνείς επιστημονικές βάσεις δεδομένων. Στον πίνακα 2.1 παρουσιάζονται αναλυτικά οι αναθεωρήσεις που έχουν δημοσιευτεί από το 1995 μέχρι σήμερα. Παρά την απουσία ενός ομόφωνου ορισμού, μπορεί να γίνει αντιληπτό ότι τόσο ο αρχικός όσο και όλοι οι υπόλοιποι ορισμοί έχουν ως κοινό στοιχείο την παραδοχή ότι η κατανάλωση πρεβιοτικών ουσιών ενισχύει την υγεία του ξενιστή (Davani-Davari et al. 2019).

Πίνακας 1.3: Η εξέλιξη του θέματος των πρεβιοτικών.

Έτος	Ορισμός	Διαφοροποίηση	Πηγή
1995	Μη αφομοιώσιμα συστατικά τροφίμων που έχουν ευεργετική επίδραση στον ξενιστή, μέσω επιλεκτικής ενίσχυσης της ανάπτυξης ή/και της δράσης ενός ή περιορισμένου πλήθους βακτηριακών ειδών που βρίσκονται ήδη στο έντερο, βελτιώνοντας έτσι την υγεία του ξενιστή	-	(G R Gibson and Roberfroid 1995)
2003	Μη αφομοιώσιμες ουσίες που έχουν ωφέλιμη επίδραση στη φυσιολογία του ξενιστή ενισχύοντας επιλεκτικά την ευνοϊκή ανάπτυξη ή δράση ενός περιορισμένου αριθμού ενδογενών βακτηρίων	Επέκταση του αρχικού ορισμού ώστε να περιλαμβάνονται και άλλα σημεία του οργανισμού πέρα από το έντερο. Αλλαγή από «βελτιώνοντας την υγεία του ξενιστή» σε «ωφέλιμη επίδραση στη φυσιολογία του ξενιστή»	(G. Reid et al. 2003)
2004	Επιλεκτικά ζυμωμένα συστατικά που επιτρέπουν συγκεκριμένες μεταβολές, τόσο στη σύσταση όσο και στη δράση της γαστρεντερικής μικροχλωρίδας, που επιφέρουν οφέλη στην ευημερία και την υγεία του ξενιστή	Επέκταση του αρχικού ορισμού ώστε να περιλαμβάνει ολόκληρο το γαστρεντερικό σωλήνα. Για πρώτη φορά περιλαμβάνονται αλλαγές στη «σύσταση» και ο όρος «ευημερία»	(Glenn R. Gibson et al. 2004)

Πίνακας 1.3 (συνέχεια).

Έτος	Ορισμός	Διαφοροποίηση	Πηγή
2008	Μη ζωντανό συστατικό τροφίμων που παρέχει ένα όφελος στην υγεία του ξενιστή σχετικά με την τροποποίηση της μικροχλωρίδας	Αφαίρεση κριτηρίου επιλεκτικότητας και του περιορισμού δράσης μόνο στο γαστρεντερικό σύστημα. Δεν απαιτείται η ζύμωση ή ο μεταβολισμός του πρεβιοτικού από τα βακτήρια του εντέρου	(Pineiro et al. 2008)
2010	Διατροφικό πρεβιοτικό: ένα επιλεκτικά ζυμωμένο συστατικό που οδηγεί σε συγκεκριμένες αλλαγές στη σύσταση ή/και τη δράση της γαστρεντερικής μικροχλωρίδας, προσφέροντας έτσι όφελος /-η στην υγεία του ξενιστή	Αναφορά συγκεκριμένα σε διατροφικά πρεβιοτικά που στοχεύουν στο γαστρεντερικό σύστημα. Εστίαση στην υγεία χωρίς αναφορές στην ευημερία.	(G.R. Gibson et al. 2010)
2014	Μη αφομοιώσιμη ένωση η οποία μέσω του μεταβολισμού της από μικροοργανισμούς του εντέρου, οδηγεί στην τροποποίηση της σύνθεσης ή/και της δραστηριότητας της εντερικής μικροχλωρίδας, προσφέροντας έτσι μία ευεργετική φυσιολογική επίδραση στον ξενιστή.	Περιορισμός αλληλεπιδράσεων πρεβιοτικών με τη μικροχλωρίδα του εντέρου, αποκλείοντας περιοχές εκτός του εντέρου, όπως ο κόλπος και το δέρμα. Αφαίρεση της απαίτησης για επιλεκτική ζύμωση.	(Hill et al. 2014)
2017	Υπόστρωμα που χρησιμοποιείται επιλεκτικά από μικροοργανισμούς του ξενιστή προσφέροντας όφελος στην υγεία.	Διεύρυνση της επίδραση των πρεβιοτικών σε οποιοδήποτε μικροβιακό οικοσύστημα του ξενιστή, εκτός του εντέρου.	(Glenn R. Gibson et al. 2017)

### 1.7.2. Κριτήρια ταξινόμησης πρεβιοτικών ουσιών

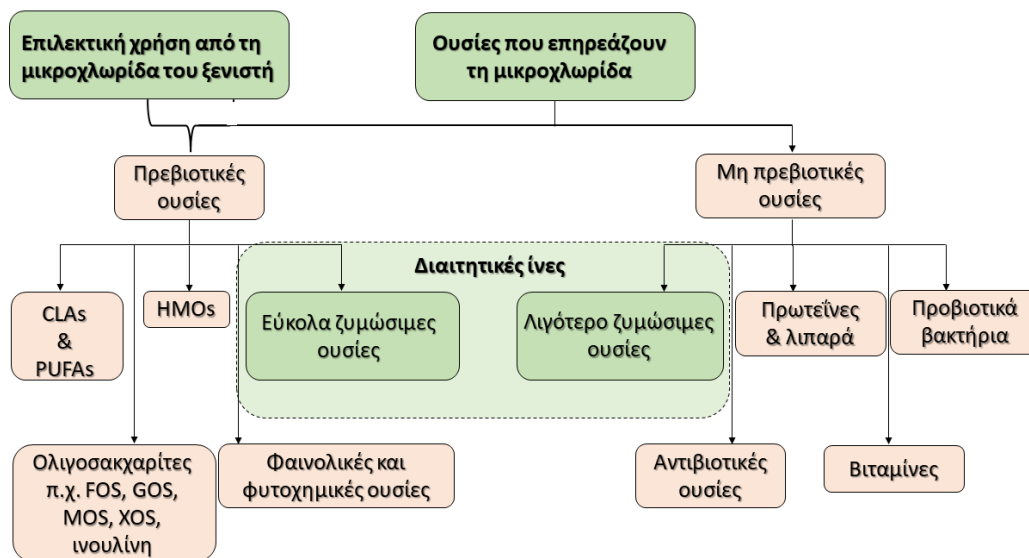
Προκειμένου μία ένωση να ταξινομηθεί ως πρεβιοτική ουσία, θα πρέπει να πληροί ορισμένα κριτήρια. Συγκεκριμένα, θα πρέπει:

- 1) να είναι ανθεκτική στο όξινο pH του στομάχου, να μην μπορεί να υδρολυθεί από τα πεπτικά ένζυμα των θηλαστικών και να μην απορροφάται στο γαστρεντερικό σύστημα
- 2) να μπορεί να μεταβολιστεί από την εντερική μικροχλωρίδα
- 3) να μπορεί να διεγείρει την ανάπτυξη και/ή τη δράση των εντερικών βακτηρίων και να βελτιώνει, κατ' αυτόν τον τρόπο την υγεία του ξενιστή (Glenn R. Gibson et al. 2010).

### 1.7.3. Κατηγορίες πρεβιοτικών ουσιών

Υπάρχουν πολλά είδη πρεβιοτικών ουσιών. Η πλειονότητα αυτών είναι υποσύνολο ομάδων υδατανθράκων και είναι κυρίως ολιγοσακχαρίτες. Με εξαίρεση την ινουλίνη, ένα μίγμα

φρουκτοολιγοσακχαριτών και πολυσακχαριτών, οι πρεβιοτικές ουσίες είναι κυρίως μη αφομοιώσιμοι υδατάνθρακες αποτελούμενοι από 3-10 μονομερή. Συνήθως παραλαμβάνονται μέσω εκχύλισης πρώτων υλών φυτικής προέλευσης, και ακολούθως ενζυμικής υδρόλυσης (Saad et al. 2013; Vieira da Silva et al. 2016). Στην Εικόνα 1.3 παρουσιάζεται ένα διάγραμμα ταξινόμησης ουσιών ως πρεβιοτικές ή μη, με βάση τον πιο πρόσφατο ορισμό.



Εικόνα 1.3: Διάκριση μεταξύ πρεβιοτικών και μη ουσιών, με βάση τον πιο πρόσφατο ορισμό. Οι πρεβιοτικές ουσίες πρέπει να χρησιμοποιούνται επιλεκτικά και να υπάρχουν επαρκείς ενδείξεις για την επίδραση στην υγεία του ξενιστή. Οι διατροφικές πρεβιοτικές ουσίες πρέπει να αποικοδομούνται από τα ένζυμα του ξενιστή. Στην εικόνα παρουσιάζονται ουσίες με πιθανή ή αποδεδειγμένη πρεβιοτική δράση, με τους FOS και GOS να αποτελούν τις ευρύτερα μελετημένες πρεβιοτικές ουσίες.

Συντομώσεις: CLA: συζευγμένο λινελαϊκό οξύ (conjugated linoleic acid), PUFAs: πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (polyunsaturated fatty acid), FOS: φρουκτο-ολιγοσακχαρίτες (fructo-oligosaccharides), GOS: γαλακτο-ολιγοσακχαρίτες (galacto-oligo-saccharides), ΧΟΣ: ξυλο-ολιγοσακχαρίτες (xylo-oligosaccharides), MOS: μανανν-ολιγοσακχαρίτες (mannan-oligosaccharides).

Οι κύριες κατηγορίες πρεβιοτικών ουσιών περιγράφονται παρακάτω.

### Φρουκτάνες

Αυτή η κατηγορία αποτελείται από την ινουλίνη και τους φρουκτο-ολιγοσακχαρίτες (fructo-oligosaccharides, FOS) ή ολιγοφρουκτόζες. Η δομή τους είναι μία γραμμική αλυσίδα φρουκτοζών με  $\beta$  2→1 δεσμό. Συνήθως έχουν τερματικές μονάδες γλυκόζης με  $\beta$  2→1 δεσμό. Η ινουλίνη έχει βαθμό πολυμερισμού (DP) έως και 60, ενώ ο βαθμός πολυμερισμού των FOS είναι μικρότερος από 10.

Σύμφωνα με έρευνες, οι φρουκτάνες μπορούν να ενισχύσουν επιλεκτικά την ανάπτυξη γαλακτικών βακτηρίων. Παρόλα αυτά, τα τελευταία χρόνια, υπάρχουν έρευνες που δείχνουν ότι το μήκος της αλυσίδας των φρουκτανών καθορίζει την ικανότητα ή μη συγκεκριμένων βακτηρίων να ζυμώνουν τις ουσίες αυτές (Davani-Davari et al. 2019).

### Γαλακτο-ολιγοσακχαρίτες

Οι γαλακτο-ολιγοσακχαρίτες (galacto-oligosaccharides, GOS), τα προϊόντα πολυμερισμού της λακτόζης, ταξινομούνται σε δύο υποκατηγορίες:

(i) οι GOS με περίσσεια γαλακτόζης στους C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> ή C<sub>6</sub> και (ii) οι GOS που παρασκευάζονται από λακτόζη μέσω ενζυμικής trans-γλυκοζυλίωσης. Το τελικό προϊόν της αντίδρασης είναι κυρίως ένα μίγμα τρι- και πεντα-σακχαριτών με γαλακτόζη στους δεσμούς β 1→6, β 1→3 και β 1→4. Αυτός ο τύπος GOS αναφέρεται επίσης ως trans-γαλακτοολιγοσακχαρίτες ή TOS (Glenn R. Gibson et al. 2010; Macfarlane et al. 2008).

Οι GOS μπορούν να ενισχύσουν σημαντικά τα βακτήρια των γενών *Bifidobacterium* και *Lactobacillus*. Τα γένη των Enterobacteria, Bacteroidetes, και Firmicutes επηρεάζονται επίσης θετικά από την παρουσία GOS, αλλά σε μικρότερο βαθμό από τα Bifidobacteria. Υπάρχουν επίσης μερικοί GOS οι οποίοι παράγονται από τη λακτουλόζη, το ισομερές της λακτόζης, και θεωρούνται επίσης πρεβιοτικές ουσίες. Πέρα από αυτούς τους τύπους GOS, άλλοι τύποι που στηρίζονται στον πολυμερισμό της σακχαρόζης ονομάζονται ολιγοσακχαρίτες της οικογένειας της ραφινόζης (RFO). Η επίδραση των RFO στην εντερική μικροχλωρίδα δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί (Davani-Davari et al. 2019).

### Άμυλο και ολιγοσακχαρίτες γλυκόζης

Υπάρχει ένα είδος αμύλου, το οποίο είναι ανθεκτικό στην πέψη στο ανώτερο γαστρεντερικό σύστημα και είναι γνωστό ως ανθεκτικό άμυλο. Το ανθεκτικό άμυλο μπορεί να ενισχύσει την υγεία προάγοντας την παραγωγή υψηλών επιπέδων βουτυρικού οξέος. Έτσι, έχει προταθεί να ταξινομηθεί ως πρεβιοτική ουσία (Fuentes-Zaragoza et al. 2011). Η πολυδεξτρόζη είναι ένας ολιγοσακχαρίτης γλυκόζης για τον οποίο υπάρχουν κάποιες ενδείξεις ότι μπορεί να ενισχύσει τη δράση των *bifidobacteria* (Costabile et al. 2012).

## 1.8. Συμβιωτικό Σύστημα

Ο συνεργιστικός συνδυασμός πρεβιοτικών ουσιών και προβιοτικών βακτηρίων οδηγεί σε ένα σύστημα με βελτιωμένη λειτουργικότητα, γνωστό και ως συμβιωτικό σύστημα (Mohanty et al. 2018). Συγκεκριμένα, ένα τέτοιο σύστημα ορίζεται ως «ένα μίγμα προβιοτικών και πρεβιοτικών που ωφελούν τον οργανισμό-ξενιστή βελτιώνοντας την επιβίωση και τη δράση ζωντανών μικροβιακών διατροφικών συμπληρωμάτων στο γαστρεντερικό σύστημα, ενισχύοντας επιλεκτικά την ανάπτυξη ή ενεργοποιώντας το μεταβολισμό ενός ή μερικών βακτηρίων με επωφέλη επίδραση στην υγεία του οργανισμού-ξενιστή» (Preedy and Watson 2016). Τα συμβιωτικά έχουν μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα σε σύγκριση με τα προβιοτικά ή τα πρεβιοτικά όταν χρησιμοποιούνται ανεξάρτητα (Mohanty et al. 2018). Συγκεκριμένα, ο συνδυασμός αυτός οδηγεί σε αύξηση της βιωσιμότητας των προβιοτικών βακτηρίων κατά την αποθήκευση, πιθανόν λόγω της διαθεσιμότητας των πρεβιοτικών ουσιών για αξιοποίηση από τα προβιοτικά βακτήρια (Carela et al. 2006). Προτείνονται, επίσης, για την προστασία προβιοτικών κυττάρων από θερμική ή όξινη καταπόνηση, καθώς επίσης και για βελτίωση της

σταθερότητας αυτών μέσω άμεσης αλληλεπίδρασης με την κυτταρική μεμβράνη (Carozzi et al. 2015).

## 2. Εγκλεισμός προβιοτικών βακτηρίων

### 2.1. Ορισμός

Εγκλεισμός ή ενθυλάκωση ορίζεται ως μία φυσικοχημική ή μηχανική διεργασία κατά την οποία ένα συστατικό εγκλείεται μέσα σε ένα κατάλληλο υλικό/μέσο προκειμένου να παραχθούν σφαιρικά σωματίδια με λεπτή αλλά ανθεκτική, ημιπερατή μεμβράνη και διάμετρο που μπορεί να κυμαίνεται από μερικά nm έως μερικά mm (Dorđević et al. 2014; Nedovic et al. 2011). Το εγκλεισμένο συστατικό αναφέρεται ως πυρήνας (core material), υλικό πλήρωσης (fill material), ενεργό συστατικό (active ingredient), εσωτερική φάση (internal phase) ή ωφέλιμο φορτίο (payload) και μπορεί να βρίσκεται είτε σε στερεή είτε σε υγρή μορφή. Αντίστοιχα, το μέσο εγκλεισμού (encapsulating agent) αναφέρεται ως επικαλυπτικό υλικό (coating material), μεμβράνη (membrane), κέλυφος (shell), υλικό-φορέας (carrier material), εξωτερική φάση (external phase) ή μήτρα (matrix). Κατά τον εγκλεισμό των προβιοτικών βακτηρίων, τα βακτηριακά κύτταρα «παγιδεύονται» εντός εγκλειστικών μέσων που είναι κατάλληλα για εφαρμογές σε τρόφιμα, με σκοπό τον περιορισμό της φθοράς ή απώλειας των κυττάρων και ταυτόχρονα την ελεγχόμενη απελευθέρωση αυτών στο έντερο (Huang et al. 2016; Martín et al. 2015; Ying et al. 2016).

### 2.2. Δυνατότητες και οφέλη του εγκλεισμού

Ο εγκλεισμός προτείνεται ως μία διεργασία που εφαρμόζεται για την επίλυση διαφόρων προβλημάτων, όπως:

- Προστασία ευαίσθητων συστατικών, όπως τα προβιοτικά βακτήρια, από ανεπιθύμητες αλληλεπιδράσεις με άλλα συστατικά κατά την αποθήκευση
- Δυνατότητα ενσωμάτωσης των εγκλεισμένων βακτηρίων σε τρόφιμα
- Δυνατότητα ελεγχόμενης απελευθέρωσης των προβιοτικών βακτηρίων (Chranioti and Tzia 2015).

### 2.3. Απαιτήσεις και δυσκολίες κατά την εφαρμογή του εγκλεισμού σε προβιοτικά βακτήρια

Η επιτυχία της υλοποίησης του εγκλεισμού έγκειται σε συγκεκριμένες παραμέτρους, όπως οι φυσικοχημικές ιδιότητες των κυττάρων, οι συνθήκες κατά τη διάρκεια του εγκλεισμού, το απαιτούμενο μέγεθος σφαιριδίων και το ζητούμενο βακτηριακό φορτίο ώστε η ανάπτυξη του τροφίμου-φορέα να είναι επιτυχής, καθώς και οι συνθήκες αποθήκευσης των προϊόντων εγκλεισμού πριν την εισαγωγή τους στο τρόφιμο-φορέα. Πρέπει, ακόμη, να λαμβάνονται υπόψιν οι συνθήκες τόσο κατά την επεξεργασία του τροφίμου, όσο και κατά την αποθήκευση του τελικού προϊόντος μέχρι την κατανάλωσή του, ο μηχανισμός απελευθέρωσης των προβιοτικών βακτηρίων όπως επίσης και οι οικονομικοί περιορισμοί (Zuidam and Nedovic 2010).

Ο εγκλεισμός των προβιοτικών βακτηρίων πρέπει να λαμβάνει χώρα σε ήπιες συνθήκες που περιλαμβάνουν σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες, μέτριες τιμές pH, χαμηλά επίπεδα οξυγόνου και ελεγχόμενο ρυθμό ανάδευσης. Το μέγεθος των παραγόμενων σφαιριδίων πρέπει να προσαρμόζεται κατάλληλα προκειμένου να παρέχεται ικανοποιητική προστασία στα προβιοτικά βακτήρια, χωρίς ωστόσο να υφίσταται αρνητική επίδραση στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τροφίμου. Τα εγκλεισμένα προϊόντα πρέπει να αποθηκεύονται σε χαμηλές προς ήπιες θερμοκρασίες (π.χ. 4°C ή θερμοκρασία δωματίου) ώστε να εξασφαλίζεται η βιωσιμότητα των βακτηρίων. Ο μηχανισμός για την απελευθέρωση των προβιοτικών βακτηρίων στηρίζεται στην τεχνολογία (μέθοδο εγκλεισμού) και τα μέσα εγκλεισμού που χρησιμοποιούνται και εξαρτάται από παράγοντες όπως το pH, οι χημικοί παράγοντες και η ενζυμική δράση (Martín et al. 2015).

Στην τεχνολογία του εγκλεισμού προβιοτικών βακτηρίων υπάρχει ένας, ακόμη, σημαντικός περιορισμός: το μέγεθος των βακτηριακών κυττάρων (1-5 μm) ή των σωματιδίων μίας λυοφιλιωμένης καλλιέργειας (πάνω από 100 μm), καθιστά την εφαρμογή της νανοτεχνολογίας μη εφικτή και περιορίζει σημαντικά την ποσότητα προβιοτικών κυττάρων που μπορούν να συμπεριληφθούν ή να εγκλωβιστούν σε μικρά σφαιρίδια (J. Chen et al. 2017; Zuidam and Nedovic 2010).

Ανεξάρτητα από τη μέθοδο εγκλεισμού που εφαρμόζεται, υπάρχουν σημαντικά σημεία που πρέπει να λαμβάνονται υπόψιν. Αρχικά, πρέπει να επικρατούν ασηπτικές συνθήκες καθ' όλη τη διάρκεια της διεργασίας, συμπεριλαμβανομένης της αποστείρωσης των μέσων εγκλεισμού και του χρησιμοποιούμενου εξοπλισμού, όπου αυτό είναι δυνατόν, προκειμένου να αποφεύγονται τυχόν μικροβιακές επιμολύνσεις. Επιπρόσθετα, καθώς πολλά προβιοτικά βακτήρια είναι αναερόβια, η παρουσία οξυγόνου έχει επιζήμια επίδραση στη βιωσιμότητά τους. Για την αντιμετώπιση του προβλήματος αυτού προτείνεται η δημιουργία αναερόβιου περιβάλλοντος τόσο κατά τη διάρκεια της διεργασίας του εγκλεισμού, όσο και κατά την αποθήκευση των προϊόντων εγκλεισμού. Ένας αναερόβιος θάλαμος αποτελεί μία τέτοια λύση, αλλά η εφαρμογή του σε μία διεργασία βιομηχανικής κλίμακας δεν είναι εύκολο να επιτευχθεί. Έτσι, απαιτείται περαιτέρω έρευνα στο συγκεκριμένο κομμάτι, ώστε να αντιμετωπιστεί η τοξική επίδραση του οξυγόνου σε αναερόβιους μικροοργανισμούς μέσω οικονομικά αποδοτικών καινοτομιών. Η προσθήκη αντιοξειδωτικών ουσιών στο προϊόν εγκλεισμού για τον περιορισμό της οξειδωτικής δράσης κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης θα μπορούσε επίσης να αποτελέσει μία λύση. Ακόμη, προκειμένου να αντιμετωπιστεί η επιζήμια επίδραση της παρουσίας οξυγόνου, των χαμηλών τιμών pH ή των υψηλών θερμοκρασιών, προτείνεται η επιπρόσθετη επικάλυψη των παραγόμενων σφαιριδίων ή η χρήση μίγματος εγκλειστικών μέσων (Corona-Hernandez et al. 2013).

Άλλο ένα πρόβλημα στον εγκλεισμό των προβιοτικών βακτηρίων αποτελεί η διαρροή προβιοτικών κυττάρων από τα σφαιρίδια κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης. Το γεγονός αυτό μπορεί, στη συνέχεια, να οδηγήσει σε ανεπιθύμητη ανάπτυξη προβιοτικών κυττάρων στο έτοιμο προϊόν του τροφίμου, επηρεάζοντας αρνητικά τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του. Ακόμη, έχει αναφερθεί ότι τα προϊόντα εγκλεισμού με αλγινικό μόνο δεν είναι πάντα



αποτελεσματικά ως προς την προστασία των προβιοτικών βακτηρίων από αντίξοες συνθήκες, λόγω της πορώδους δομής τους, με αποτέλεσμα να είναι επιρρεπή σε αποσύνθεση όταν βρίσκονται σε δυσμενές χημικό περιβάλλον ή παρουσία περίσσειας μονοσθενών ιόντων ή χηλικών παραγόντων ιόντων  $Ca^{2+}$ . Ιδιαίτερα αυξημένο είναι το ενδιαφέρον για τη χρήση μιγμάτων διαφορετικών ειδών πολυμερών, στοχεύοντας σε βελτιωμένη προστασία των βακτηριακών κυττάρων, καθώς επίσης και σε μείωση του κόστους με μερική αντικατάσταση ενός ακριβού πολυμερούς. Μία άλλη προσέγγιση περιλαμβάνει την προσθήκη κρουπροστατευτικών, αντιοξειδωτικών ή πρεβιοτικών στο εγκλειστικό μέσο. Παρόλα αυτά, ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δοθεί στη συμβατότητα των προβιοτικών βακτηρίων με τα μέσα εγκλεισμού ή τα συν-εγκλεισμένα υλικά (J. Chen et al. 2017).

Η αναζήτηση κατάλληλων υλικών προκειμένου να αυξηθεί η προστασία των προβιοτικών βακτηρίων σε υψηλές θερμοκρασίες είναι άλλο ένα σημαντικό ζήτημα, καθώς θα διευκολύνει την ενσωμάτωσή τους σε τρόφιμα-φορείς που απαιτούν θερμική επεξεργασία, όπως ψήσιμο ή αποστείρωση. Το σύστημα εγκλεισμού θα πρέπει να δρα ως μονωτικό περιβάλλον για τα προβιοτικά βακτήρια. Το αλγινικό νάτριο έχει δοκιμαστεί ως εγκλειστικό μέσο με σκοπό τη θερμική προστασία, αλλά τα αποτελέσματα δεν είναι ιδιαίτερα ενθαρρυντικά. Τα σφαιρίδια που παράγονται από αλγινικό νάτριο είναι ιδιαίτερα πορώδη, όπως προαναφέρθηκε, με αποτέλεσμα να επιτρέπουν τη διάχυση θερμού υγρού μέσα στο προϊόν εγκλεισμού. Η ελάχιστη συγκέντρωση αλγινικού νατρίου που απαιτείται για να επιτευχθεί ικανοποιητική θερμική προστασία είναι 3% w/v . Προκειμένου να βελτιωθούν οι ιδιότητες των σφαιριδίων του αλγινικού, έχουν εξεταστεί συνδυασμοί με άλλα βιοπολυμερή, όπως φυσικό άμυλο αραβοσίτου (Sabikhi et al. 2010), κόμμι τζελάνης (M.-J. Chen et al. 2007) και μίγμα CMC και αμύλου ρυζιού (Chitprasert et al., 2012). Για την επιτυχή ανάπτυξη ενός μονωτικού περιβάλλοντος, η έρευνα θα πρέπει, επίσης, να εστιαστεί στις ιδιότητες θερμικής αγωγιμότητας διαφόρων βιοϋλικών και λιπιδίων κατάλληλων για τρόφιμα (Anal and Singh 2007). Η επικάλυψη των σφαιριδίων με επιπρόσθετο στρώμα βιοπολυμερούς (Jantarathin et al. 2017), όπως και η διπλή επικάλυψη των σφαιριδίων (Rather et al. 2017) αποτελούν διαφορετικές προσεγγίσεις με ενθαρρυντικά αποτελέσματα, αλλά απαιτούν περαιτέρω έρευνα. Μία νέα τεχνική έχει προταθεί από τους Bosnea et al. (2017), οι οποίοι ενέκλεισαν ένα μικρό αριθμό προβιοτικών κυττάρων και προκάλεσαν την ανάπτυξή τους μέσα στα παραγόμενα σφαιρίδια. Αυτή η τεχνική οδήγησε σε αυξημένη βιωσιμότητα των κυττάρων κατά την έκθεσή τους σε υψηλές θερμοκρασίες, σε αντίθεση με άλλες συμβατικές διεργασίες εγκλεισμού.

Τέλος, η αποτελεσματικότητα των προϊόντων εγκλεισμού πρέπει να αξιολογείται, όχι μόνο *in vitro*, αλλά και *in vivo*. Τα μέχρι τώρα διαθέσιμα δεδομένα προέρχονται μόνο από *in vivo* μελέτες χορήγησης εγκλεισμένων προβιοτικών βακτηρίων σε αρουραίους Wistar και σε ποντίκια (Πίνακας 2.1). Είναι απαραίτητο να γίνουν περισσότερες μελέτες τόσο σε μοντέλα ζώων με φυσιολογία παρόμοια με αυτή του ανθρώπινου οργανισμού, όπως οι χοίροι, όσο και σε ανθρώπους (Cook et al. 2012).

Πίνακας 2.1: Μελέτες χορήγησης εγκλεισμένων προβιοτικών βακτηρίων σε αρουραίους Wistar και ποντίκια

Τελικό σημείο μελέτης	Αποτελέσματα	Μέθοδος Εγκλεισμού	Προβιοτικό Στέλεχος	Μέσα εγκλεισμού	Πηγή
Προσκόλληση σε βλεννογόνο αρουραίων	Αυξημένος αποικισμός ζώντων βακτηρίων στο λεπτό και το παχύ έντερο, με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της διέλευσης ενδοτοξίνης του εντερικού αυλού στη συστηματική κυκλοφορία.	Επίστρωση ξηρής σκόνης	<i>Lb. acidophilus</i> και <i>B. animalis ssp. lactis</i>	Αλγινικό νάτριο, ανθρακικό ασβέστιο, μονοελαϊκός γλυκερυλεστέρας, κίτρικος τριαιθυλεστέρας, ακετυλιωμένο μονογλυκερίδιο, οξική-ηλεκτρική υδροξυ-προπυλομεθυλοκυτταρίνη (HPMCAS).	(Park et al., 2016)
Καταμέτρηση ζώντων κυττάρων στο λεπτό και το παχύ έντερο αρουραίων Wistar.	Αυξημένος αριθμός ζώντων βακτηρίων στον ειλεό και το έντερο.	Εξώθηση	<i>Lb. plantarum</i> MA2	Αλγινικό νάτριο, αλγινικό εμβολιασμένο με πολυακρυλικό.	(Liu et al., 2016)
Καταμέτρηση ζώντων κυττάρων στα κόπρανα ποντικών.	Ο εγκλεισμός δεν παρείχε σημαντική βελτίωση της βιωσιμότητας των προβιοτικών βακτηρίων.	Γαλακτωματοποίηση	<i>Lb. paracasei</i> F19 και <i>Lb. casei</i> BFLM218	Καζεϊνικό νάτριο ή SGF-resistant fat sodium caseinate	(Würth et al., 2015)
Καταμέτρηση κυττάρων που παράγουν ανοσοσφαιρίνη A (IgA)- στο λεπτό έντερο των ποντικών	Σημαντικά μεγαλύτερος αριθμός κυττάρων παραγωγής IgA στο λεπτό έντερο στην περίπτωση των εγκλεισμένων καλλιιεργειών.	Ξήρανση με ψεκασμό	<i>Lb. acidophilus</i> A9, <i>Lb. paracasei</i> A13 και <i>Lb. casei</i> Nad	Αποβουτυρωμένο γάλα	(Paez et al., 2013)

Πίνακας 2.1 (συνέχεια)

Τελικό σημείο μελέτης	Αποτελέσματα	Μέθοδος Εγκλεισμού	Προβιοτικό Στέλεχος	Μέσα εγκλεισμού	Πηγή
Καταμέτρηση ζώντων κυττάρων στα κόπρανα αρουραίων Wistar.	Αύξηση της βιωσιμότητας των προβιοτικών κυττάρων μέσω του εγκλεισμού.	Εξώθηση	<i>Saccharomyces boulardii</i>	Αλγινικό νάτριο - Χιτοζάνη	(Graff et al., 2008)
Καταμέτρηση ζώντων κυττάρων στα κόπρανα αρουραίων Wistar.	Υψηλότερα ποσοστά επιβίωσης κατά την επικάλυψη με χιτοζάνη έναντι πολυ-L-λυσίνης	Εξώθηση	<i>Escherichia coli</i>	Αλγινικό νάτριο, χιτοζάνη ή πολυ-L-λυσίνη	(Lin et al., 2008)
Καταμέτρηση ζώντων προβιοτικών κυττάρων και κολοβακτηριδίων στα κόπρανα ποντικών. Παρακολούθηση των επιπέδων της β-γλυκουρονιδάσης στα κόπρανα.	Μείωση κολοβακτηριίων και β-γλυκουρονιδάσης στα κόπρανα κατά τη χορήγηση εγκλεισμένων προβιοτικών κυττάρων.	Εξώθηση – Ξήρανση υπό κατάψυξη	<i>Lb. acidophilus</i> και <i>B. bifidum</i>	Αλγινικό νάτριο, χιτοζάνη ή πολυ-L-λυσίνη	(Kushal et al., 2006)

## 2.4. Σχεδιασμός συστήματος εγκλεισμού

Η ανάπτυξη ενός συστήματος εγκλεισμού απαιτεί την πλήρη κατανόηση του σκοπού για τον οποίο απαιτείται ο εγκλεισμός. Πρέπει, επίσης, να λαμβάνονται υπόψη οι φυσικοί, χημικοί και βιολογικοί παράγοντες που επηρεάζουν τη συμπεριφορά τόσο του εγκλεισμένου συστατικού, όσο και του μέσου εγκλεισμού. Έτσι, κατά το σχεδιασμό μίας διεργασίας εγκλεισμού, πρέπει να λαμβάνονται υπόψη τα εξής:

- Η λειτουργικότητα που θα παρέχουν τα εγκλεισμένα συστατικά στο τελικό προϊόν στο οποίο θα ενσωματωθούν
- Το είδος του μέσου εγκλεισμού που θα πρέπει να επιλεγεί με βάση τις φυσικοχημικές του ιδιότητες (ελαστικότητα, διαπερατότητα, κ.α.)
- Οι συνθήκες στις οποίες εκτίθεται το εγκλεισμένο συστατικό πριν απελευθερωθεί
- Η βέλτιστη συγκέντρωση του ενεργού συστατικού στα σφαιρίδια.
- Ο μηχανισμός απελευθέρωσης του ενεργού συστατικού από τα σφαιρίδια
- Οι επιθυμητές ιδιότητες (π.χ. μέγεθος σωματιδίων, διαλυτότητα, πυκνότητα και τελική φυσική μορφή) και οι απαιτήσεις περί σταθερότητας του εγκλεισμένου συστατικού
- Οι οικονομικοί περιορισμοί γύρω από το σύστημα εγκλεισμού (Chranioti and Tzia 2015).

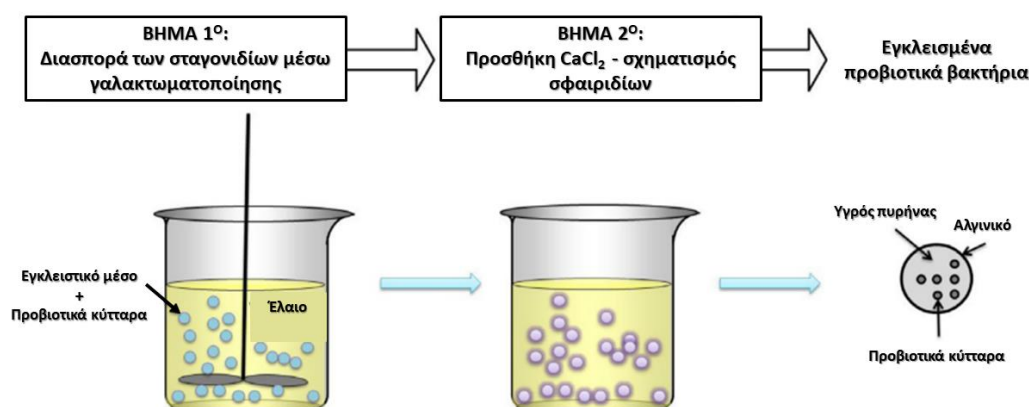
## 2.5. Μέθοδοι Εγκλεισμού

Η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου εγκλεισμού γίνεται με βάση το σχεδιασμό και τις απαιτήσεις του τελικού προϊόντος στο οποίο ενσωματώνονται τα εγκλεισμένα προβιοτικά βακτήρια. Οι πιο σημαντικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τον εγκλεισμό των προβιοτικών κυττάρων παρουσιάζονται παρακάτω.

### 2.5.1. Γαλακτωματοποίηση (Emulsification)

Η γαλακτωματοποίηση επιτυγχάνεται μέσω της διασποράς ενός υγρού μέσα σε ένα άλλο μη αναμίξιμο υγρό. Η «παγίδευση» των προβιοτικών κυττάρων στη διεσπαρμένη φάση οδηγεί στον εγκλεισμό τους. Η συγκεκριμένη τεχνική στηρίζεται στη συσχέτιση και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ της συνεχούς και της ασυνεχούς φάσης. Συγκεκριμένα, η διεργασία περιλαμβάνει τη διασπορά των κυττάρων σε μία μικρή ποσότητα ενός υδατικού πολυμερικού αιωρήματος (διεσπαρμένη φάση). Στη συνέχεια ακολουθεί η προσθήκη του σε μία μεγάλη ποσότητα ελαίου (συνεχής φάση), η μηχανική ομογενοποίηση του μίγματος με τη βοήθεια ενός επιφανειοδραστικού συστατικού και ο επακόλουθος σχηματισμός ενός γαλακτώματος νερού-σε-έλαιο (Εικόνα 2.1). Μέσω κατάλληλης επεξεργασίας, το υδατοδιαλυτό βιοπολυμερές γίνεται αδιάλυτο και σχηματίζονται σφαιρίδια μέσα στην ελαιώδη φάση, τα οποία συλλέγονται μέσω διήθησης ή φυγοκέντρωσης. Ο μηχανισμός με τον οποίο επιτυγχάνεται η μετατροπή των σταγονιδίων σε στερεά σφαιρίδια εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά των υλικών που χρησιμοποιούνται (Frakolaki, Giannou, et al. 2020). Η

έναρξή του επιτυγχάνεται μέσω ψύξης ή προσθήκης ενός παράγοντα σχηματισμού σταυροειδών δεσμών στο γαλάκτωμα (Rathore et al. 2013).



Εικόνα 2.1: Σχηματική απεικόνιση της διεργασίας της γαλακτωματοποίησης (Burgain et al. 2011)

Η χρήση υδροκολλοειδών, όπως το αλγινικό, η καραγενάνη και η πηκτίνη, ως παράγοντες σχηματισμού σταυροειδών δεσμών, οδηγεί στην ιοντική ζελατινοποίηση (ionic gelation), ενώ η χρήση ενός οργανικού διαλύτη ως συνεχούς φάσης οδηγεί σε διεπιφανειακό πολυμερισμό. Ο δεύτερος μηχανισμός οδηγεί σε αύξηση της παραγωγικότητας των κυττάρων, και για το λόγο αυτό εφαρμόζεται σε περιπτώσεις που τα εγκλεισμένα κύτταρα αξιοποιούνται σε διεργασίες ζύμωσης. Πολύ συχνά, χρησιμοποιούνται πρωτεΐνες γάλακτος, καθώς έχουν πολύ καλές ιδιότητες ζελατινοποίησης, και θεωρούνται εξαιρετικοί φορείς για τα προβιοτικά βακτήρια (Burgain et al. 2011). Τέλος, η εφαρμογή αμύλου υψηλής περιεκτικότητας σε αμυλόζη (Hylon) έχει αναφερθεί ότι βελτιώνει επιτυχώς τη θερμική αντοχή των σφαιριδίων που παράγονται κατά τη γαλακτωματοποίηση (Khosravi Zanjani et al. 2018).

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η παρουσία ενός επιφανειοδραστικού συστατικού είναι απαραίτητη προκειμένου να μειωθεί η επιφανειακή τάση στο υλικό εγκλεισμού και, κατ'επέκταση, το μέγεθος των σφαιριδίων. Απαιτείται, επίσης, η προσθήκη ενός παράγοντα στερεοποίησης (solidifying) (όπως χλωριούχο ασβέστιο) (Frakolaki, Giannou, et al. 2020). Οι πιο κοινές ουσίες που χρησιμοποιούνται για το σχηματισμό του γαλακτώματος παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.2. Τα σωματίδια που σχηματίζονται μπορούν, τελικά, να επικαλυφθούν με ένα δεύτερο στρώμα, μέσω εμβάπτισης σε ένα άλλο διάλυμα πολυμερούς, στοχεύοντας σε επιπρόσθετη προστασία ή βελτίωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών. Το μέγεθος των σφαιριδίων που παράγονται μπορεί να κυμαίνεται από 25  $\mu\text{m}$  μέχρι 2 mm, και μπορεί να τροποποιηθεί μεταβάλλοντας την ταχύτητα ανάδευσης, το λόγο νερό/έλαιο, το ρυθμό προσθήκης του διαλύματος σχηματισμού σταυροειδών δεσμών και τη συγκέντρωση του επιφανειοδραστικού συστατικού (Burgain et al. 2011; Martín et al. 2015).

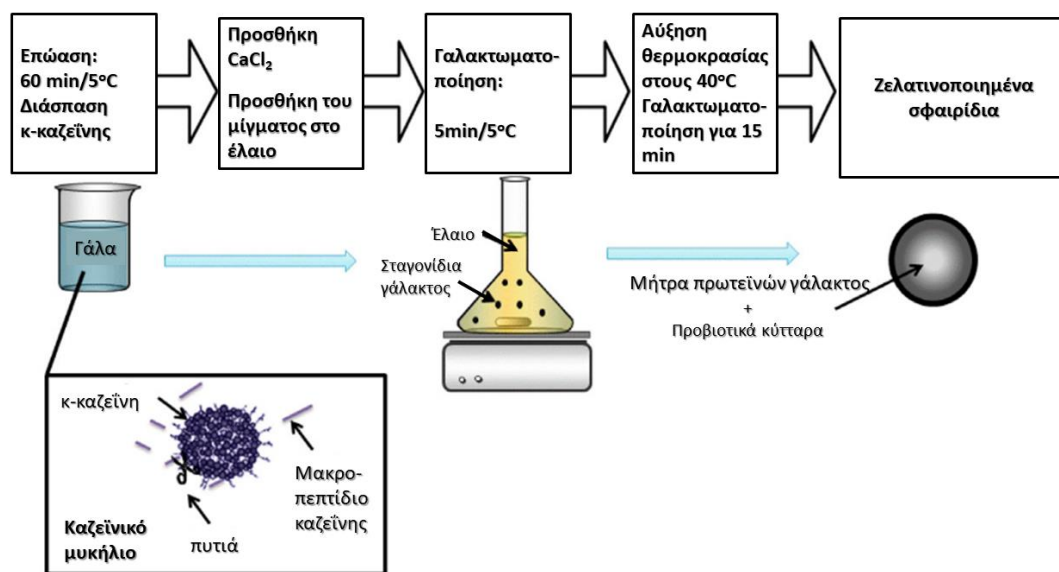
Η τεχνική της γαλακτωματοποίησης μπορεί να εφαρμοστεί εύκολα σε βιομηχανικό επίπεδο και παρέχει υψηλή βιωσιμότητα (M. J. Chen and Chen 2007). Η διάμετρος των παραγόμενων σφαιριδίων μπορεί να είναι ακόμη και μικρότερη από 300  $\mu\text{m}$ , ένα μέγεθος που δύσκολα

επιτυγχάνεται μέσω της εξώθησης, μίας τεχνικής που θα αναφερθεί αμέσως μετά. Παρόλα αυτά, η τεχνική αυτή έχει ως αποτέλεσμα μεγαλύτερο εύρος μεγέθους και σχήματος. Άλλο μειονέκτημα της μεθόδου είναι τα υπολείμματα ελαίων πάνω στα παραγόμενα σωματίδια, λόγω της εφαρμογής ελαίων ως συνεχούς φάσης (Rathore et al. 2013).

Ο εγκλεισμός των προβιοτικών βακτηρίων μέσω γαλακτωματοποίησης έχει μελετηθεί χρησιμοποιώντας διάφορα υδροκολλοειδή υλικά ως εγκλειστικά μέσα, με κυριότερο το αλγινικό νάτριο (Holkem et al. 2017; Mandal et al. 2006). Άλλα εγκλειστικά μέσα που έχουν χρησιμοποιηθεί για τον εγκλεισμό προβιοτικών κυττάρων με τη συγκεκριμένη μέθοδο περιλαμβάνουν το κόμμι γκουάρ, το κόμμι χαρουπιού, την ξανθάνη και την καραγενάνη, με τα δύο τελευταία να δίνουν τα πιο ενθαρρυντικά αποτελέσματα όσον αφορά την προστασία των κυττάρων κατά την έκθεσή τους σε όξινες συνθήκες ή παρουσία χολικών αλάτων (Ding and Shah 2009). Ακόμη, έχει αναφερθεί ότι ο εγκλεισμός προβιοτικών κυττάρων του γένους *Bifidobacterium* σε σφαιρίδια καραγενάνης μέσω γαλακτωματοποίησης πριν την ενσωμάτωσή τους σε γιαούρτι, βοήθησε στη διατήρηση του βακτηριακού φορτίου σε ικανοποιητικά επίπεδα κατά την αποθήκευση των δειγμάτων στους 4°C για 30 ημέρες. Λόγω της πορώδους δομής και της αστάθειας του αλγινικού νατρίου κατά την παρουσία χηλικών παραγόντων και μονοσθενών ιόντων ή αντίξων συνθηκών, προτείνεται ο συνδυασμός του με άλλα πολυμερή υλικά, όπως το κόμμι γελλάνης (Rosas-Flores et al. 2013) ή το άμυλο καλαμποκιού (Martin et al. 2013). Τέλος, έχει επιτευχθεί εγκλεισμός προβιοτικών κυττάρων μέσω γαλακτωματοποίησης χρησιμοποιώντας ως εγκλειστικά μέσα υπερσυμπύκνωμα ορού πρωτεΐνης και πουλουλάνη, οδηγώντας σε αύξηση της βιωσιμότητας των κυττάρων τόσο κατά την αποθήκευση όσο και κατά την έκθεση σε προσομοίωση γαστρεντερικού συστήματος (Cabuk and Tellioglu Harsa 2015). Η συγκεκριμένη τεχνική μπορεί, επίσης, να συνδυαστεί με τεχνικές ξήρανσης, όπως η ξήρανση με ψεκασμό (Bernucci et al. 2017) ή η ξήρανση υπό κατάψυξη (Dianawati and Shah 2011; Raddatz et al. 2019), με σκοπό τη μείωση των επιπέδων υγρασίας και την επιμήκυνση του χρόνου ζωής των προβιοτικών βακτηρίων (Martin et al. 2013). Παρόλο που η συντήρηση των προβιοτικών κυττάρων σε χαμηλά ποσοστά υγρασίας αυξάνει τη διατηρησιμότητά τους, σημαντικές απώλειες βιωσιμότητας λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια της ίδιας της διεργασίας της ξήρανσης. Για το λόγο αυτό, απαιτούνται ηπιότερες προσεγγίσεις για την αύξηση της διάρκειας ζωής των προβιοτικών βακτηρίων. Για παράδειγμα, μία άλλη πρακτική που προτείνεται είναι η χρήση πρεβιοτικών ουσιών, όπως το ανθεκτικό άμυλο, το οποίο έχει δώσει ικανοποιητικά αποτελέσματα όταν χρησιμοποιείται κατά τον εγκλεισμό των προβιοτικών βακτηρίων μέσω γαλακτωματοποίησης (Homayouni et al. 2008; Kailasapathy 2006; Kailasapathy and Sultana 2003; Khosravi Zanjani et al. 2012; Pankasemsuk et al. 2016).

Επιπρόσθετα, για τον εγκλεισμό των προβιοτικών βακτηρίων, η γαλακτωματοποίηση μπορεί να συνδυαστεί με μία συγκεκριμένη τεχνική εγκλεισμού, τον εγκλεισμό μέσω ζελατινοποίησης πρωτεϊνών με χρήση του ενζύμου ρεννίνη (rennet-gelled protein encapsulation), η οποία επιτυγχάνεται μέσω συνδυασμού ενός υδατικού διαλύματος πρωτεϊνών γάλακτος και ρεννίνης, ενός ενζύμου κατάλληλου για τρόφιμα (Heidebach et al.

2009; Martín et al. 2015). Η αρχή αυτής της μεθόδου στηρίζεται στη θερμο-εξαρτώμενη ζελατινοποίηση των πρωτεϊνών του γάλακτος, όταν έρθουν σε επαφή με πυτιά σε χαμηλή θερμοκρασία (cold renneting). Αυτή η κατάσταση επιτρέπει τη διατήρηση ενός υγρού συστήματος, καθώς οι κ-καζεΐνες διασπώνται από τα ένζυμα της πυτιάς. Στη συνέχεια, το διάλυμα πρωτεϊνών υπόκειται σε γαλακτωματοποίηση σε ψυχρό έλαιο, προκειμένου να σχηματιστεί ένα γαλάκτωμα νερού σε έλαιο. Η θερμική επαγωγή ενζυμικής πήξης οδηγεί στην κροκίδωση των πρωτεϊνών και παρέχει σωματίδια στα οποία τα προβιοτικά βακτήρια βρίσκονται διεσπαρμένα ανάμεσα σε πρωτεΐνες γάλακτος που έχουν υποστεί πήξη (Burgain et al. 2011). Η μέθοδος χαρακτηρίζεται από υψηλή απόδοση και παρέχει υψηλή βιωσιμότητα κυττάρων λόγω του υψηλότερου pH που επικρατεί μέσα στην πρωτεϊνική μήτρα των σφαιριδίων (Martín et al., 2015).



Εικόνα 2.2: Σχηματική παράσταση του εγκλεισμού προβιοτικών κυττάρων μέσω ζελατινοποίησης με χρήση πυτιάς (Burgain et al., 2011).

### 2.5.2. Εξώθηση (Extrusion)

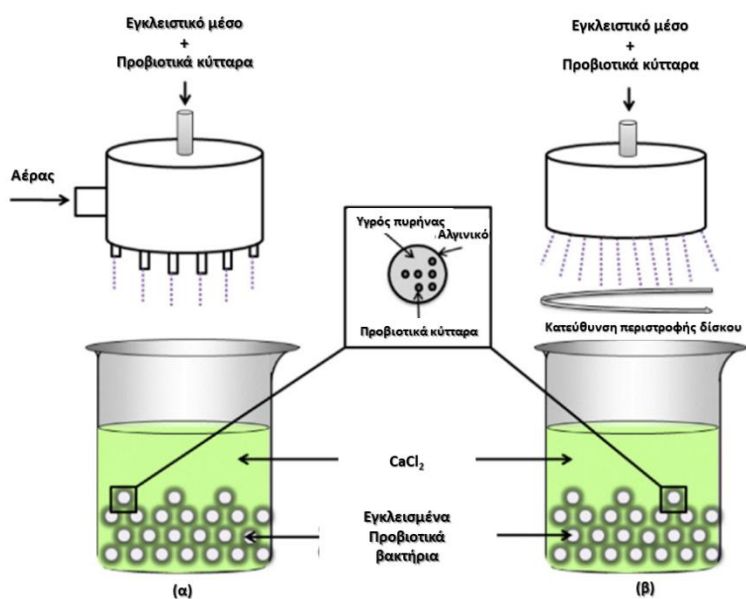
Η εξώθηση είναι μία φυσική μέθοδος κατά την οποία ζωντανά προβιοτικά κύτταρα εγκλείονται μέσα σε υδροκολλοειδή υλικά, όπως το αλγινικό και η καραγενάνη (Burgain et al. 2011). Είναι μία καλά καθιερωμένη και κοινή διεργασία, η οποία στηρίζεται στην εξαναγκασμένη διέλευση ενός διαλύματος που περιέχει τα προβιοτικά κύτταρα μέσα από ακροφύσια ή μικρά ανοίγματα υπό πίεση, χρησιμοποιώντας κατάλληλες συσκευές παραγωγής σταγονιδίων (De Vos et al. 2010). Η βακτηριακή καλλιέργεια αναμιγνύεται αρχικά με το διάλυμα του βιοπολυμερούς, προκειμένου να σχηματιστεί ένα αιώρημα (Sagis 2015). Το τελικό υγρό εξωθείται μέσω μίας σύριγγας υπό υψηλή πίεση και τα σταγονίδια που παράγοντα συλλέγονται σε ένα λουτρό ζελατινοποίησης (συνήθως ένα διάλυμα  $\text{CaCl}_2$ ). Έτσι, σχηματίζονται άμεσα σφαιρίδια, μέσω της ιονοτροπικής αλληλεπίδρασης μεταξύ ενός υδατικού διαλύματος υδροκολλοειδούς και δι- ή πολυσθενών ιόντων μετάλλων (παράγοντες

σχηματισμού σταυροειδών δεσμών) που οδηγεί στη δημιουργία τρισδιάστατου πλέγματος. Λόγω της ιδιότητάς τους να δημιουργούν αυτό το πλέγμα, τα υλικά αυτά θεωρούνται κατάλληλα για χρήση ως εγκλειστικά μέσα (Ta et al. 2021).

Στην περίπτωση που τα σταγονίδια σχηματίζονται με ελεγχόμενο τρόπο, η μέθοδος αναφέρεται ως σφαιροποίηση (prilling). Τέτοιου είδους σχηματισμός μπορεί να επιτευχθεί μέσω άσκησης δονήσεων ή παλμών στον πίδακα της ροής, ομοαξονικής ροής ή εφαρμογής ηλεκτροστατικού πεδίου. Το μέγεθος των σφαιριδίων και η σφαιρικότητα προσαρμόζονται ανάλογα με ορισμένες παραμέτρους λειτουργίας, όπως η διάμετρος του ακροφυσίου, η απόσταση μεταξύ της εξόδου και του λουτρού ζελατινοποίησης και η συγκέντρωση, η θερμοκρασία, το ιξώδες και ο ρυθμός ροής του διαλύματος του βιοπολυμερούς, όπως επίσης και οι πιεζοηλεκτρικές παράμετροι (Frakolaki, Giannou, et al. 2020).

Η τεχνική της εξώθησης μπορεί να λάβει χώρα είτε υπό αερόβιες, είτε υπό αναερόβιες συνθήκες και έχει πολλά πλεονεκτήματα, όπως η απλότητα, η ευκολία στο χειρισμό και το χαμηλό κόστος. Τα σφαιρίδια που παράγονται εμφανίζουν πολύ μικρή διακύμανση σε μέγεθος συγκριτικά με εκείνα που προκύπτουν από τη γαλακτωματοποίηση. Επιπρόσθετα, οι συνθήκες λειτουργίας είναι αρκετά ήπιες, ώστε να διασφαλίζονται υψηλά ποσοστά βιωσιμότητας των προβιοτικών κυττάρων, ενώ τα υλικά που χρησιμοποιούνται στη μέθοδο αυτή είναι κατάλληλα για τρόφιμα. Το ιξώδες των μέσων εγκλεισμού δεν περιορίζει την παραγωγή των σφαιριδίων. Τα μειονεκτήματα της μεθόδου αυτής είναι το μεγάλο μέγεθος των σχηματιζόμενων σωματιδίων (2-5mm) και η δυσκολία εφαρμογής σε μεγάλη κλίμακα, λόγω του αργού σχηματισμού των σφαιριδίων (Burgain et al., 2011; Chen and Chen, 2007; Mortazavian et al., 2007). Το δεύτερο, ωστόσο, μπορεί να αντιμετωπιστεί μέσω χρήσης συστημάτων πολλαπλών ακροφυσίων, ψεκαστήρων περιστροφικού δίσκου ή τεχνικών κατάτμησης του πίδακα ροής (jet-cutter) (De Vos et al., 2010). Στην Εικόνα 2.3 παρουσιάζεται η σχηματική απεικόνιση δύο τέτοιων διατάξεων με δυνατότητα βιομηχανικής εφαρμογής. Η μέθοδος απαιτεί διαλύματα πολυμερών με μικρό προς μέτριο ιξώδες και ακροφύσια με σχετικά μεγάλη διάμετρο (Rathore et al. 2013).





Εικόνα 2.3: Τεχνικές εξώθησης: (α) συσκευή εξώθησης πολλαπλών ακροφυσίων, λειτουργεί συνήθως μέσω της πίεσης αέρα και (β) περιστρεφόμενος δίσκος με ακροφύσια (Burqain et al., 2011).

Ο εγκλεισμός μέσω εξώθησης έχει μελετηθεί εκτενώς χρησιμοποιώντας ως εγκλειστικό μέσο το αλγινικό, λόγω της ιδιότητάς του να δημιουργεί ένα τρισδιάστατο πλέγμα όταν έρχεται σε επαφή με κατιόντα  $Ca^{2+}$ . Τα παραγόμενα προϊόντα εγκλεισμού έχουν πορώδη επιφάνεια, με αποτέλεσμα την ταχεία διάχυση νερού και άλλων συστατικών και τη μειωμένη προστασία των προβιοτικών βακτηρίων λόγω έκθεσής τους σε αυτά (Dianawati and Shah 2011). Για το λόγο αυτό, προτείνεται ο συνδυασμός του αλγινικού νατρίου με άλλα υλικά τα οποία θα αυξήσουν την αποτελεσματικότητα του εγκλεισμού, όπως η πηκτίνη, το ανθεκτικό άμυλο, ή η χιτοζάνη (Bekhit et al. 2016; Dimitrellou et al. 2019; Liserre et al. 2007; Olivares and Silva 2019; Ramos et al. 2017; Sandoval-Castilla et al. 2010; Ziar et al. 2012). Άλλοι συνδυασμοί υλικών που έχουν χρησιμοποιηθεί για τον εγκλεισμό προβιοτικών βακτηρίων μέσω εξώθησης και έχουν δώσει υποσχόμενα αποτελέσματα περιλαμβάνουν μίγμα καρβοξυ-μεθυλο-κυτταρίνης/ κ-καραγενάνης ή μίγμα πηκτίνης/ αμύλου. Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι μπορούν να παρέχουν ικανοποιητική προστασία στο προβιοτικό στέλεχος *L. plantarum*, περιορίζοντας τις απώλειες βιωσιμότητάς του τόσο κατά την έκθεσή του σε σύστημα προσομοίωσης του γαστρεντερικού συστήματος, όσο και κατά την αποθήκευσή του υπό συνθήκες ψύξης (4°C) (Dafe, Etemadi, Dilmaghani, et al. 2017; Dafe, Etemadi, Zarredar, et al. 2017). Επιπρόσθετα, η ανάπτυξη συμβιωτικού συστήματος μέσω προσθήκης ινουλίνης ή εκχυλισμάτων βοτάνων στο προϊόν εγκλεισμού που παρήχθη μέσω εξώθησης αποδείχθηκε επιτυχής για την προστασία των προβιοτικών κυττάρων κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης ή της παραμονής σε σύστημα προσομοίωσης του γαστρεντερικού συστήματος (Chaikham 2015; Darjani et al. 2016).

### 2.5.3 Τεχνική Συσσωμάτωσης/Κροκίδωσης (Coacervation) - Διαχωρισμός Φάσεων

Η συσσωμάτωση ή κροκίδωση ορίζεται ως ο διαχωρισμός φάσεων ενός κολλοειδούς συστήματος σε δύο υγρά μέρη (IUPAC 1997). Ο διαχωρισμός αυτός στηρίζεται στην ύπαρξη

αντίθετων ηλεκτρικών φορτίων που οδηγούν στη συσσωμάτωση και το σχηματισμό ενός στρώματος γύρω από τα προβιοτικά κύτταρα (Sharifi et al. 2021). Τα προβιοτικά βακτήρια προστίθενται μέσα σε ένα υδροκολλοειδές, συνήθως ένα πρωτεϊνικό εναιώρημα. Η διεργασία περιλαμβάνει τρία βασικά στάδια: το σχηματισμό τριών μη αναμίξιμων φάσεων, την εναπόθεση του επικαλυπτικού υλικού και τη στερεοποίηση του υλικού αυτού. Κατά τη διάρκεια του τρίτου σταδίου, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ένας παράγοντας σχηματισμού σταυροειδών δεσμών προκειμένου να ενισχύσει τη σκληρότητα του κελύφους (Đorđević et al. 2014).

Ανάλογα με τον αριθμό των βιοπολυμερών που εμπλέκονται, η μέθοδος μπορεί να διακριθεί σε δύο κατηγορίες: την απλή συσσωμάτωση/κροκίδωση, που χρησιμοποιείται σπάνια στη βιομηχανία τροφίμων, και τη σύνθετη συσσωμάτωση/κροκίδωση. Στην πρώτη περίπτωση, χρησιμοποιείται μόνο ένα πολυμερές, το οποίο προσροφάται πάνω στη διεπιφάνεια μεταξύ αιωρήματος και διαλύτη. Ύστερα από κατάλληλη τροποποίηση της θερμοκρασίας και/ή του pH, το πολυμερές γίνεται αδιάλυτο, δημιουργώντας τη φάση του «συσσωματώματος» (coacervate phase), η οποία περιβάλλει τη φάση του «εναιωρήματος» (suspended phase) και καταβυθίζεται. Τα σφαιρίδια που παράγονται συλλέγονται μέσω φυγοκέντρησης ή διήθησης και ξηραίνονται (π.χ. μέσω ξήρανσης με ψεκασμό).

Η σύνθετη συσσωμάτωση λαμβάνει χώρα σε συγκεκριμένες τιμές pH λόγω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ δύο ή περισσότερων αντίθετα φορτισμένων διαλυμάτων πολυμερών και ελέγχεται μέσω ενός μηχανισμού ρύθμισης του φορτίου, οδηγώντας στο σχηματισμό δύο ξεχωριστών υγρών φάσεων: μίας συνεχούς, πτωχής σε πολυμερές, και μίας πυκνής, πλούσιας σε πολυμερές, φάσης (Sharifi et al. 2021). Στο σχηματισμό των σύνθετων συσσωματωμάτων μπορούν να συνεισφέρουν και άλλες ασθενείς αλληλεπιδράσεις, όπως δεσμοί υδρογόνου και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Η σύνθετη συσσωμάτωση ευνοείται από τη διάλυση, μία ιδιότητα που διαφοροποιεί αυτήν την τεχνική από άλλα φαινόμενα διαχωρισμού φάσεων.

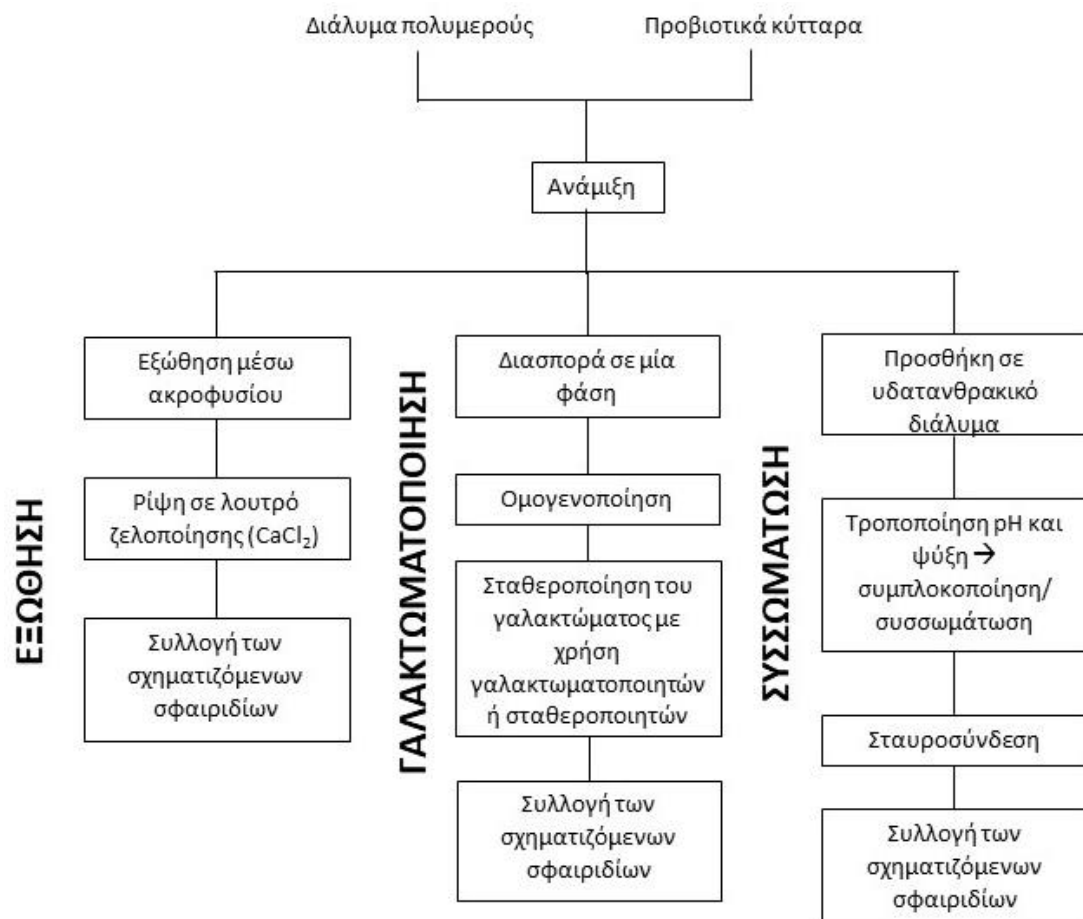
Τα πολυμερή που χρησιμοποιούνται ως μέσα εγκλεισμού είναι συνήθως πρωτεΐνες (κυρίως ζελατίνη) ως πολυκατιόντα, και ένα μεγάλο εύρος πολυσακχαριτών ως πολυανιόντα (Gaonkar et al. 2014). Στη συγκεκριμένη μέθοδο εγκλεισμού χρησιμοποιείται τα τελευταία χρόνια ένα πλήθος μιγμάτων πρωτεΐνης-πολυσακχαρίτη, όπως καζεϊνικό νάτριο-πηκτίνη χαμηλού βαθμού μεθοξυ-εστεροποίησης, πρωτεϊνικό υπερσυμπύκνωμα ορού-αραβικό κόμμι ή πρωτεϊνικό υπερσυμπύκνωμα λιναρόσπορου – κόμμι λιναρόσπορου (Sharifi et al. 2021). Προκειμένου να επιλεγεί ένα πολυμερές ως μέσο εγκλεισμού για τη συγκεκριμένη τεχνική, απαιτούνται συγκεκριμένες ιδιότητες, όπως υδροφιλικές κολλοειδείς ιδιότητες, διαλυτότητα στο νερό, και επαρκής πυκνότητα φορτίου (Alvim and Grosso 2010). Για την επίτευξη της σύνθετης συσσωμάτωσης, ο πολυσακχαρίτης ενσωματώνεται στο εναιώρημα των πρωτεϊνών και των κυττάρων, σε μία τιμή pH στην οποία και τα δύο πολυμερή είναι ομώνυμα φορτισμένα. Στη συνέχεια, το pH τροποποιείται κατάλληλα, ώστε τα δύο υδροκολλοειδή να είναι ετερόνυμα φορτισμένα, προκαλώντας τη συμπλοκοποίηση και τη συσσωμάτωσή τους (Kailasapathy 2009). Με τον τρόπο αυτό σχηματίζονται δύο φάσεις, εκ

των οποίων η πλούσια σε πολυμερές φάση καταβυθίζεται εντός του υπερκείμενου υγρού (φτωχή σε πολυμερές φάση) (Sharifi et al. 2021).

Η αντίδραση μεταξύ των πολυμερών είναι αντιστρέψιμη και έτσι μπορούν να διαλυθούν πάλι σε περίπτωση κατάλληλης μεταβολής του pH. Λόγω της ιοντικής φύσης των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πολυμερών, τα τοιχώματα των σφαιριδίων που σχηματίζονται έχουν μειωμένη μηχανική αντοχή και, έτσι, η στερεοποίησή τους είναι απαραίτητη προκειμένου να διασφαλισθεί η σταθερότητά τους.

Η στερεοποίηση μπορεί να επιτευχθεί είτε μέσω θερμικής επεξεργασίας, η οποία προκαλεί μετουσίωση των πρωτεϊνών, είτε χρησιμοποιώντας έναν παράγοντα σχηματισμού σταυροειδών δεσμών (cross-linking agent) (K. Zhang et al. 2012; Zuidam and Nedovic 2010). Ο παράγοντας σχηματισμού σταυροειδών δεσμών μπορεί να είναι ένα χημικό ή ενζυμικό συστατικό, ικανό να τροποποιήσει τις ιδιότητες των τοιχωμάτων των συσσωματωμάτων, όπως τη διαπερατότητα τους ή τη μηχανική ή θερμική αντοχή τους (Alvim and Grosso 2010). Έχει αναφερθεί ότι οι τροποποιήσεις στις παραμέτρους σχηματισμού σταυροειδών δεσμών όπως ο χρόνος στερεοποίησης, το pH, η θερμοκρασία και η συγκέντρωση του παράγοντα σχηματισμού σταυροειδών δεσμών επηρεάζουν το ρυθμό απελευθέρωσης του περιεχομένου των σφαιριδίων (Zhang et al. 2012).

Η συγκεκριμένη μέθοδος έχει μελετηθεί χρησιμοποιώντας όχι μόνο με συνδυασμό πρωτεΐνης-πολυσακχαρίτη ως εγκλειστικό μέσο, αλλά και με συνδυασμό διαφορετικών πρωτεϊνών. Οι Zhao et al. (2020) εφάρμοσαν τη σύνθετη συσσωμάτωση χρησιμοποιώντας ζελατίνη και καζεϊνικό νάτριο για τον εγκλεισμό του στελέχους *L. reuteri* TMW1.656 και σταθεροποίησαν τα προϊόντα εγκλεισμού μέσω ξήρανσης με ψεκασμό. Τα ποσοστά επιβίωσης των συγκεκριμένων προβιοτικών κυττάρων ήταν αυξημένα σε σύγκριση με των κυττάρων που βρίσκονταν εγκλεισμένα σε συνδυασμό ζελατίνης-αραβικού κόμμεος κατά την έκθεση σε σύστημα προσομοίωσης πέψης, κατά τη θερμική καταπόνηση και κατά την αποθήκευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Η αυξημένη προστασία σχετίζεται με μειωμένη υγροσκοπικότητα, διαλυτότητα και διαβρεξιμότητα, λόγω της σχετικά υψηλότερης υδροφοβικότητας του ετεροπρωτεϊνικού προκύπτοντος συστήματος (Zhao et al. 2020).



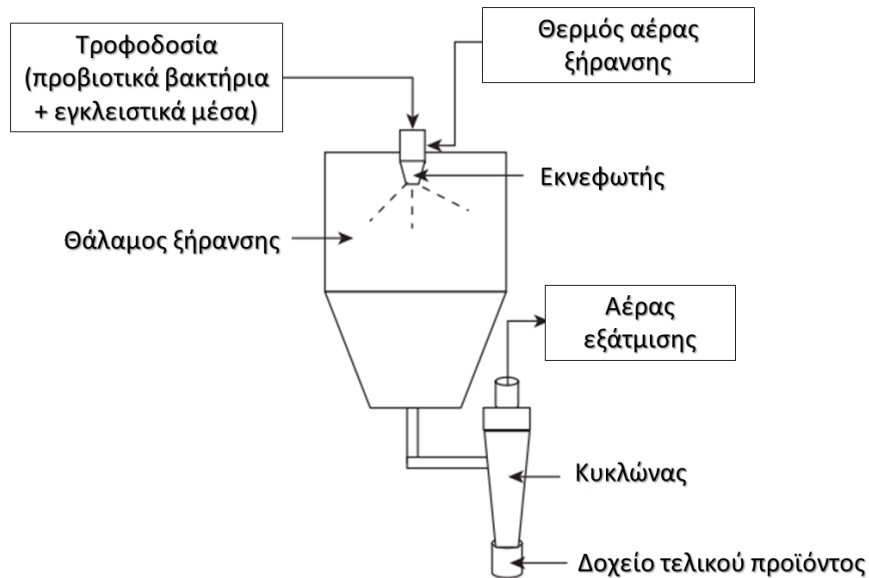
Εικόνα 2.4: Συγκριτικό διάγραμμα των τεχνικών εξώθησης, γαλακτωματοποίησης και συσσωμάτωσης.

Η συσσωμάτωση επηρεάζεται από διάφορες παραμέτρους, όπως τα χαρακτηριστικά των μέσων εγκλεισμού (μοριακό βάρος, δομή, πυκνότητα φορτίου και σύνθεση), το συνολικό περιεχόμενο σε στερεά και τις συνθήκες διασποράς (πίεση, διάτμηση, θερμοκρασία, pH, ιοντική ισχύς, κτλ.) (Eratte et al. 2018). Περιλαμβάνει ήπιες συνθήκες προετοιμασίας, όπως ήπια ανάδευση και χαμηλές θερμοκρασίες), καθώς και μη-τοξικούς διαλύτες. Η συσσωμάτωση παρέχει υψηλό φορτίο εγκλεισμού, υψηλή απόδοση εγκλεισμού και μη αναμιξιμότητα με το νερό, οδηγώντας σε βέλτιστες ιδιότητες ελεγχόμενης απελευθέρωσης. Επιπρόσθετα, επιτρέπει την εισαγωγή μεγάλης ποσότητας βακτηριακών κυττάρων σε συγκεκριμένη ποσότητα μέσου εγκλεισμού. Παρόλα αυτά, θεωρείται αρκετά ακριβή και σύνθετη μέθοδος, καθώς περιλαμβάνει δύο επιπρόσθετα στάδια: τη συσσωμάτωση και τη στερεοποίηση (Chávarri et al. 2012; Coghetto et al. 2016; Gaonkar et al. 2014). Η συσσωμάτωση είναι επίσης δύσκολο να εφαρμοστεί σε μεγάλη κλίμακα, ενώ το επιπρόσθετο στάδιο της ξήρανσης μπορεί να είναι επιβλαβές για τα προβιοτικά βακτήρια (Chávarri et al. 2012). Ένα συγκριτικό διάγραμμα των τριών μεθόδων εγκλεισμού που έχουν αναφερθεί παρουσιάζονται στην Εικόνα 2.4.

#### 2.5.4. Ξήρανση με ψεκασμό (*Spray drying*)

Η ξήρανση με ψεκασμό είναι μία από τις κυριότερες τεχνικές εγκλεισμού. Η βασική της αρχή είναι ο συνδυασμός μεταφοράς μάζας και θερμότητας από το ρεύμα θερμού αέρα στα ψεκαζόμενα σταγονίδια και αντίστροφα (Arslan et al. 2015). Η διεργασία περιλαμβάνει τη γαλακτωματοποίηση ή τη διασπορά των προβιοτικών βακτηρίων σε ένα υδατικό διάλυμα του μέσου εγκλεισμού-φορέα, τον ψεκασμό του υγρού μίγματος μέσω ενός ακροφυσίου ή ενός περιστρεφόμενου τροχού και την εξάτμισή του μέσω επαφής με θερμό αέρα ή αέριο (Fang and Bhandari, 2012). Ο φορέας εγκλείει τα κύτταρα και συμπεριφέρεται ως ένα προστατευτικό μέσο έναντι αντίξων συνθηκών κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης και της διέλευσης μέσω του γαστρεντερικού συστήματος (Huang et al. 2017). Τα ξηρά σωματίδια διαχωρίζονται από τον υγρό αέρα με τη βοήθεια ενός κυκλώνα ή ενός φίλτρου και συλλέγονται (Fang and Bhandari 2012). Ένα τυπικό σχηματικό διάγραμμα της διάταξης παρουσιάζεται στην Εικόνα 2.5.

Οι βασικοί παράγοντες που μπορεί να επηρεάσουν την αποτελεσματικότητα της μεθόδου είναι τα χαρακτηριστικά των προβιοτικών βακτηρίων (προβιοτικό στέλεχος και η φάση ανάπτυξης στην οποία βρίσκεται), τα χαρακτηριστικά του ξηραντήρα (θερμοκρασία και χρόνος ξήρανσης, τύπος ψεκασμού), τα χαρακτηριστικά της τροφοδοσίας (είδος και συγκέντρωση μέσου εγκλεισμού, είδος εφαρμοζόμενου στρες: ωσμωτικό, οξειδωτικό ή μηχανικό) και οι συνθήκες αποθήκευσης (Zuidam and Nedovic 2010). Οι χαμηλές θερμοκρασίες του αέρα εισόδου μειώνουν το ρυθμό εξάτμισης του νερού και οδηγούν σε σφαιρίδια με ιδιότητες περιορισμένης ροής (poor flow properties) και μεμβράνες με μεγάλη πυκνότητα, ενώ οι υψηλές θερμοκρασίες επηρεάζουν αρνητικά τη βιωσιμότητα των κυττάρων. Επιπλέον, η θερμοκρασία πρέπει να ρυθμίζεται κατάλληλα, ώστε να διευκολύνεται η ομοιογένεια του ψεκασμού (Coghetto et al., 2016). Προκειμένου να αυξηθεί η βιωσιμότητα των προβιοτικών βακτηρίων κατά τη διάρκεια της διεργασίας, προτείνεται η προσθήκη θερμοπροστατευτικών υλικών, όπως κοκκώδες άμυλο, διαλυτές ίνες και τρεχαλόζη, ή λιπόφιλα αντιοξειδωτικά (Ying et al. 2016). Για παράδειγμα, έχει παρατηρηθεί ότι η ενσωμάτωση τρεχαλόζης μέσα στο εγκλειστικό μίγμα μπορεί να παρέχει ικανοποιητική προστασία στο εγκλεισμένο στέλεχος *Lactobacillus acidophilus* La-5 κατά τη διάρκεια θερμικής επεξεργασίας στους 63°C για 30 min ή στους 72°C για 15 s (Nunes et al. 2018). Τα προκύπτοντα σφαιρίδια μπορούν, επίσης, να επικαλυφθούν με μία δεύτερη επίστρωση που θα παρέχει επιπρόσθετη προστασία έναντι του όξινου περιβάλλοντος του στομάχου και των χολικών αλάτων (Dianawati et al. 2016; Sagis 2015).



*Εικόνα 2.5: Τυπικό σχηματικό διάγραμμα διάταξης ξήρανσης με ψεκασμό για τον εγκλεισμό προβιοτικών βακτηρίων (Fang and Bhandari 2012).*

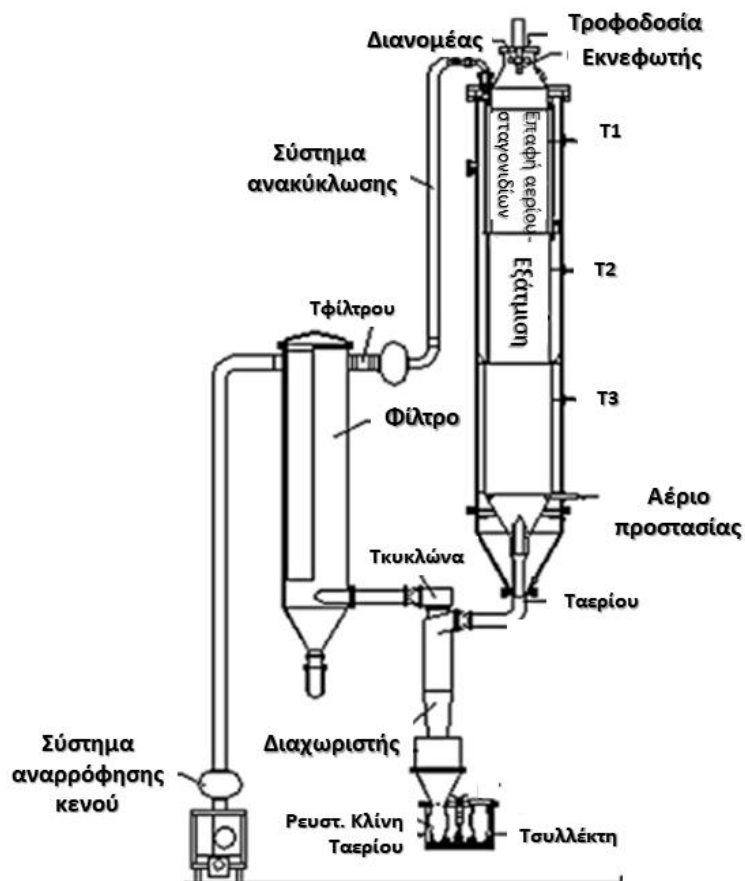
Η ξήρανση με ψεκασμό είναι οικονομική μέθοδος (περίπου 10 φορές οικονομικότερη από την ξήρανση υπό κατάψυξη) και αποτελεί διεργασία ενός σταδίου. Τα προκύπτοντα προϊόντα είναι ξηρά, σταθερά και χαμηλής πυκνότητας. Η μέθοδος χαρακτηρίζεται από υψηλό ρυθμό παραγωγής, εύκολη εφαρμογή σε βιομηχανική κλίμακα και μπορεί να εφαρμοστεί με χρήση ήδη υπάρχοντος εξοπλισμού. Παρόλα αυτά, η έκθεση των κυττάρων σε έντονο ωσμωτικό στρες κατά τη διάρκεια της αφυδάτωσης ή της επαφής με αέρα σε υψηλές θερμοκρασίες εισόδου, οδηγεί σε σημαντικές απώλειες βιωσιμότητας και δραστηριότητας, με αποτέλεσμα χαμηλά ποσοστά επιβίωσης κατά τη διάρκεια της διεργασίας και χαμηλή σταθερότητα κατά την αποθήκευση (Arslan et al., 2015; Huang et al., 2017). Η αύξηση της συγκέντρωσης των εγκλειστικών μέσων μπορεί, ωστόσο, να οδηγήσει σε αύξηση της προστασίας των κυττάρων από τη θερμική καταπόνηση που υφίστανται στη συγκεκριμένη τεχνική, με αποτέλεσμα μεγαλύτερες τιμές απόδοσης εγκλεισμού (Agerally and Goswami 2019). Επιπρόσθετα, καθώς τα περισσότερα σφαιρίδια που παράγονται από τη μέθοδο αυτή είναι υδατοδιαλυτά, υπάρχει κίνδυνος πρώιμης απελευθέρωσης των προβιοτικών βακτηρίων, η οποία θα περιορίσει την ωφέλιμη επίδρασή τους (Sagis 2015). Προκειμένου να ελαχιστοποιηθούν αυτές οι προκλήσεις, είναι απαραίτητη η βελτιστοποίηση των παραμέτρων της διεργασίας και η χρήση του κατάλληλου μέσου εγκλεισμού. Χαρακτηριστικά όπως η σταθερότητα κελύφους/προβιοτικών βακτηρίων σε επιβλαβείς περιβαλλοντικές συνθήκες και η διατήρηση των λειτουργικών και μορφολογικών χαρακτηριστικών τους, καθώς και η βιολογική δράση των εγκλεισμένων προβιοτικών βακτηρίων επηρεάζονται σημαντικά από τον τύπο, τη σύνθεση και τη φύση των μέσων εγκλεισμού (Akbarbaglu et al. 2021).

Η ξήρανση με ψεκασμό είναι μία μέθοδος που χρησιμοποιείται ευρέως για τον εγκλεισμό προβιοτικών κυττάρων λόγω της εύκολης εφαρμογής της σε βιομηχανικό επίπεδο,

προσδίδοντας στα προβιοτικά βακτήρια μεγαλύτερη σταθερότητα κατά την αποθήκευση σε σύγκριση με τα ελεύθερα προβιοτικά κύτταρα (De Prisco and Mauriello 2016). Έχουν γίνει μελέτες για τη βελτίωση της αποτελεσματικότητας της συγκεκριμένης μεθόδου, χρησιμοποιώντας περισσότερο εξειδικευμένα εγκλειστικά μέσα. Έχει βρεθεί, μάλιστα, ότι η υδρολυμένη πρωτεΐνη ορού γάλακτος μπορεί να παρέχει ικανοποιητική προστασία, τόσο κατά τη διάρκεια του εγκλεισμού μέσω ξήρανσης με ψεκασμό, όσο και κατά την αποθήκευση (Minj and Anand 2021).

#### 2.5.5. Ξήρανση με Ψεκασμό με Χρήση Υπερήχων υπό Κενό (*Ultrasonic Vacuum Spray Drying*)

Η ξήρανση με ψεκασμό με χρήση υπερήχων υπό κενό είναι μία τεχνική που στηρίζεται στην ξήρανση με ψεκασμό και στοχεύει στον περιορισμό του θερμικού και οξειδωτικού στρες που λαμβάνει χώρα κατά τη συγκεκριμένη διεργασία. Εφαρμόστηκε για πρώτη φορά από τους Semyonov et al. (2011), οι οποίοι χρησιμοποίησαν έναν ακροφύσιο υπερήχων υπό χαμηλή θερμοκρασία και ατμόσφαιρα κενού στο θάλαμο ψεκασμού. Στην Εικόνα 2.6 παρουσιάζεται η σχηματική παράσταση του ξηραντήρα. Η κατανομή μεγέθους των σταγονιδίων που επιτυγχάνεται μέσω της συγκεκριμένης μεθόδου είναι σημαντικά μικρότερη συγκριτικά με την αντίστοιχη που προκύπτει από συμβατικά συστήματα ξήρανσης και μπορεί να διατηρηθεί εντός συγκεκριμένων ορίων. Ο ξηραντήρας υπερήχων υπό κενό περιλαμβάνει ένα θάλαμο κενού με τρεις ρυθμιζόμενες θερμικές ζώνες. Η εσωτερική θερμοκρασία του θαλάμου ρυθμίζεται μέσω πηνίων θέρμανσης, ανάλογα με τις ανάγκες της συγκεκριμένης διεργασίας. Η θέρμανση των σταγονιδίων που ρίπτονται εντός του θαλάμου κενού επιτυγχάνεται μέσω συναγωγής θερμότητας από τα τοιχώματα του θαλάμου προς τα εκνεφωμένα σταγονίδια. Η ξήρανση επιτυγχάνεται σε δύο στάδια: στο πρώτο, τα σταγονίδια πέφτουν με χαμηλή ταχύτητα εντός χρονικού διαστήματος 3-4 s και εξατμίζεται η πλειονότητα του ελεύθερου νερού. Η πίεση διατηρείται σε χαμηλά επίπεδα (3.33 kPa) και η εξάτμιση του νερού επιτυγχάνεται σε χαμηλές θερμοκρασίες που δεν υπερβαίνουν τους 20-30°C. Συνεπώς, στη συγκεκριμένη τεχνική η χρήση του κενού μειώνει τη θερμοκρασία του προϊόντος, το οξειδωτικό στρες, καθώς και το χρόνο παραμονής των σωματιδίων στο θάλαμο ξήρανσης. Στο δεύτερο στάδιο, το εναπομείναν νερό εξατμίζεται σε ένα ψυχόμενο (10-15 °C) περιβάλλον ρευστοποιημένης κλίνης υπό κενό και παρουσία αζώτου για 20-60 min. Μετά το πέρας του σταδίου αυτού, το προϊόν με την επιθυμητή ενεργότητα νερού απομακρύνεται από το συλλέκτη χωρίς να διακόπτεται η διεργασία (Semyonov et al. 2011). Για τη συγκεκριμένη μέθοδο προτείνεται η χρήση μέσων εγκλεισμού που θα ενισχύσουν τη βιωσιμότητα των προβιοτικών κυττάρων, όπως μαλτοδεξτρίνη και τρεχαλόζη (Martín et al., 2015). Παρά τα πλεονεκτήματα που προσφέρει η συγκεκριμένη μέθοδος, η εφαρμογή της στον εγκλεισμό προβιοτικών βακτηρίων παραμένει ακόμη περιορισμένη.



Εικόνα 2.6: Σχηματική παράσταση ξηραντήρα υπερήχων υπό κενό (Semyonov et al., 2011).

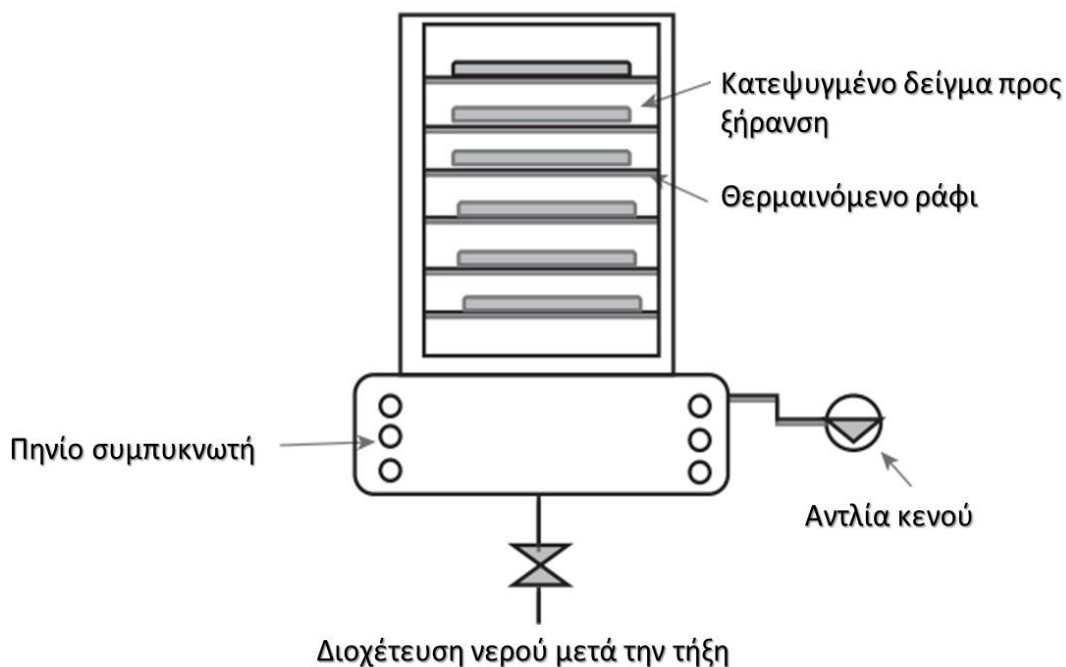
### 2.5.6. Ξήρανση με κατάψυξη (Freeze drying)

Η ξήρανση με κατάψυξη (γνωστή και ως λυοφιλίωση) είναι η πιο ευρέως διαδεδομένη μέθοδος ξήρανσης για εφαρμογή σε θερμο-ευαίσθητα συστατικά, όπως τα βακτηριακά κύτταρα. Στηρίζεται στην κατάψυξη και την επακόλουθη εξάχνωση του νερού από τη στερεή/κατεψυγμένη κατάσταση απευθείας στην αέρια μορφή, υπό κενό (Fang and Bhandari, 2012; Misra et al., 2021). Στην Εικόνα 2.7 παρουσιάζεται μία ενδεικτική σχηματική απεικόνιση ενός εργαστηριακού ξηραντήρα υπό κατάψυξη.

Η διεργασία περιλαμβάνει τρία βασικά φαινόμενα: κατάψυξη, πρωτογενή ξήρανση ή εξάχνωση και δευτερογενή ξήρανση ή εκρόφηση. Ένας ταχύς ρυθμός κατάψυξης βοηθά, ώστε να αποφευχθεί μεγάλο μέρος της επαγόμενης φθοράς στα προβιοτικά κύτταρα σε σύγκριση με έναν αργό ρυθμό ξήρανσης, λόγω του σχηματισμού μικρών κρυστάλλων πάγου. Οι συνθήκες της διεργασίας που επηρεάζουν το σχηματισμό κρυστάλλων, όπως ο ρυθμός κατάψυξης και η θερμοκρασία μπορούν να ρυθμιστούν κατάλληλα. Κατά τη διάρκεια της κατάψυξης, λαμβάνουν χώρα χημικές και ωσμωτικές καταπονήσεις των κυττάρων, λόγω της κρυστάλλωσης του νερού. Η απομάκρυνση του πάγου λαμβάνει χώρα κατά την εξάχνωση, εφαρμόζοντας συνθήκες κενού κατά την πρωτογενή εξάτμιση, και το εναπομείναν νερό εκροφάται κατά τη δευτερογενή εξάτμιση (Misra et al. 2021).



Η ξήρανση υπό κατάψυξη έχει αρνητική επίδραση στην επιβίωση των προβιοτικών βακτηρίων, καθώς επηρεάζει την κατάσταση των λιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης και τη δομή των ευαίσθητων κυτταρικών πρωτεϊνών (Nag and Das 2013). Προκειμένου να αντιμετωπιστεί αυτό το πρόβλημα, προτείνεται ο συνδυασμός των προβιοτικών βακτηρίων με κρυοπροστατευτικά υλικά, όπως πολυμερή, σάκχαρα (φρουκτόζη, λακτόζη, μαννόζη, τρεχαλόζη, μαλτοδεξτρίνη), μέλι, πολυόλες (σορβιτόλη) και αμινοξέα (γλουταμινικό μονονάτριο) (Dianawati et al. 2016). Ο βαθμός προστασίας ποικίλει ανάλογα με το προβιοτικό στέλεχος που χρησιμοποιείται. Έχει, μάλιστα, αναφερθεί ότι συγκεκριμένα προβιοτικά στελέχη εμφανίζουν αυξημένη βιωσιμότητα κατά τη διάρκεια της ξήρανσης υπό κατάψυξη, λόγω συγκεκριμένων διαφορών στα χαρακτηριστικά τους, όπως η επιφάνειά τους και η σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος και της μεμβράνης (Carela et al. 2006).



*Εικόνα 2.7: Σχηματική απεικόνιση ενός τυπικού εργαστηριακού ξηραντήρα υπό κατάψυξη (απεικονίζονται μόνο τα βασικά στοιχεία της διάταξης) (Fanq and Bhandari, 2012).*

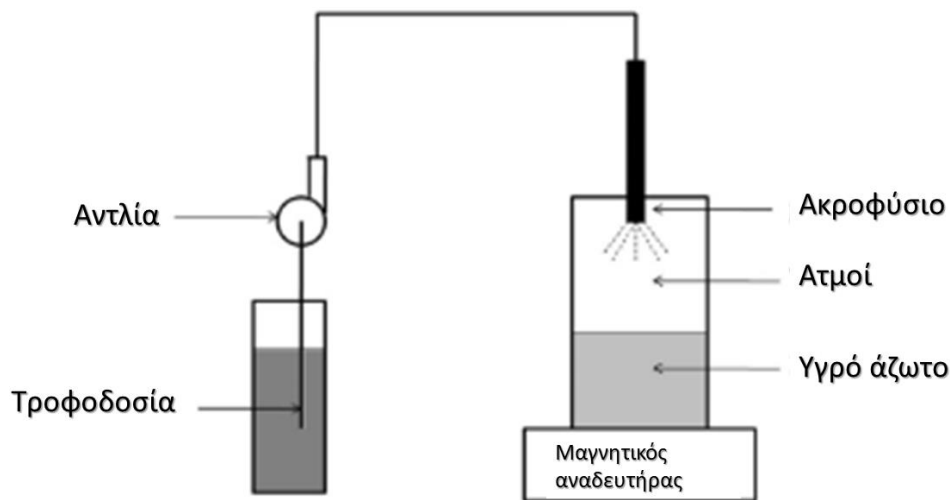
Το βασικό μειονέκτημα της ξήρανσης με κατάψυξη είναι ο μεγάλος χρόνος της διεργασίας, καθώς επίσης και το υψηλό κόστος επένδυσης και ενέργειας. Παρόλα αυτά, τα λυοφιλωμένα προβιοτικά βακτήρια είναι ιδιαίτερα σταθερά, ειδικά όταν αποθηκεύονται σε χαμηλές θερμοκρασίες και σε αδρανή ατμόσφαιρα (άζωτο ή κενό) (Frakolaki, Giannou, et al. 2020). Έχει βρεθεί, μάλιστα, ότι η συγκεκριμένη μέθοδος μπορεί να αποφέρει υψηλότερα ποσοστά επιβίωσης κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης συγκριτικά με την ξήρανση με ψεκασμό. Συγκεκριμένα, έχει μελετηθεί ο εγκλεισμός των προβιοτικών κυττάρων σε συμπύκνωμα πρωτεΐνης ορού γάλακτος, ορό γάλακτος και αλγινικό νάτριο τόσο μέσω ξήρανσης με κατάψυξη, όσο και μέσω ξήρανσης με ψεκασμό. Τα αποτελέσματα και στις δύο

περιπτώσεις είναι υποσχόμενα όσον αφορά την προστασία των κυττάρων κατά την αποθήκευση και κατά την έκθεσή τους σε σύστημα προσομοίωσης γαστρεντερικού συστήματος, με τα βέλτιστα ποσοστά να επιτυγχάνονται μέσω της ξήρανσης με κατάψυξη (Obradović et al. 2022). Στις περισσότερες περιπτώσεις η ξήρανση με κατάψυξη εφαρμόζεται συνδυαστικά με άλλες μεθόδους, όπως η εξώθηση ή η γαλακτωματοποίηση με σκοπό τη σταθεροποίηση των προϊόντων εγκλεισμού μέσω μείωσης της περιεχόμενης υγρασίας. Για παράδειγμα, έχει μελετηθεί ο εγκλεισμός του στελέχους *Lb. acidophilus* LA-5 σε σφαιρίδια πηκτίνης μέσω γαλακτωματοποίησης σε συνδυασμό με πρεβιοτικές ουσίες όπως η ινουλίνη ή το ανθεκτικό άμυλο. Στη συνέχεια, έγινε ξήρανση με κατάψυξη των προϊόντων εγκλεισμού και επιτεύχθηκε σημαντική επιμήκυνση της βιωσιμότητας των προβιοτικών κυττάρων, φτάνοντας τις 120 d κατά την αποθήκευση στους 7°C (Raddatz et al. 2020). Αντίστοιχα αποτελέσματα επιτεύχθηκαν και κατά το συνδυασμό εξώθησης με τη συγκεκριμένη τεχνική ξήρανσης χρησιμοποιώντας αλγινικό νάτριο, ινουλίνη και άπαχο γάλα κατά τη διάρκεια του εγκλεισμού του στελέχους *Lb. plantarum*. Ο συνδυασμός των δύο μεθόδων επιτρέπει την αυξημένη προστασία των προβιοτικών κυττάρων από τις αντίξοες συνθήκες που επικρατούν κατά την ξήρανση υπό κατάψυξη με αποτέλεσμα τη διατήρηση της βιωσιμότητας και της λειτουργικότητάς τους (L. Wang et al. 2016).

#### 2.5.7. Ξήρανση με ψεκασμό υπό κατάψυξη (*Spray-freeze drying*)

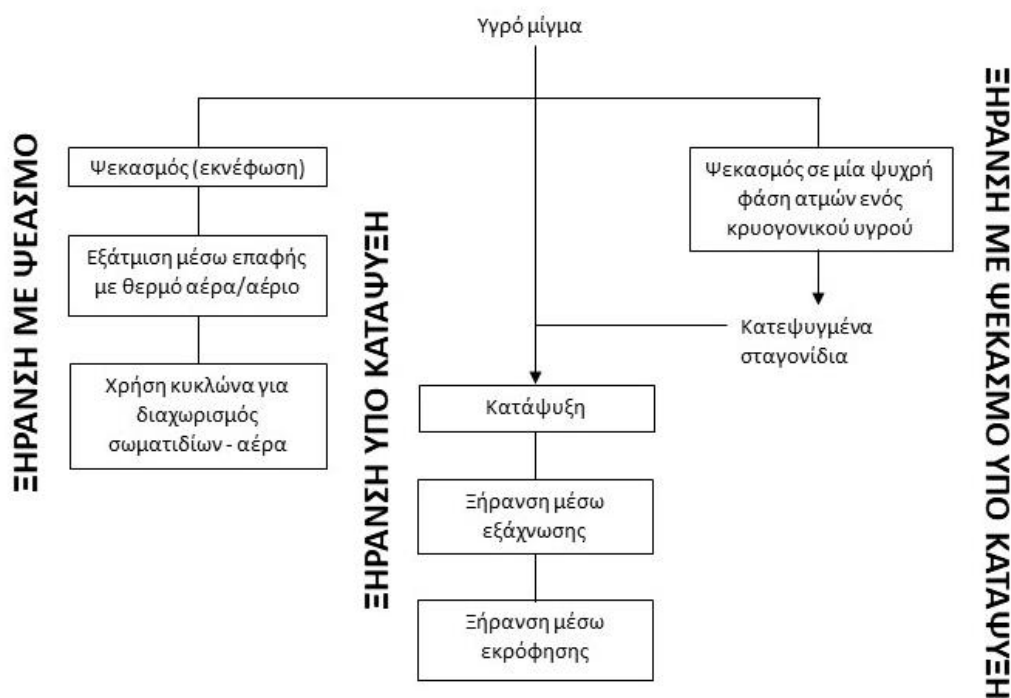
Η ξήρανση με ψεκασμό υπό κατάψυξη είναι μία σχετικά νέα μέθοδος που συνδυάζει την ξήρανση με ψεκασμό και την ξήρανση υπό κατάψυξη. Ο σκοπός του συγκεκριμένου συνδυασμού είναι η ανάπτυξη μίας λεπτόκοκκης σκόνης χωρίς τις παράπλευρες επιπτώσεις της θερμότητας που λαμβάνουν χώρα κατά την ξήρανση με ψεκασμό. Η ξήρανση με ψεκασμό υπό κατάψυξη αποτελείται από τρία στάδια και στηρίζεται στον ψεκασμό ενός διαλύματος που περιέχει τα προβιοτικά βακτήρια μέσω ενός ακροφυσίου ψεκασμού μέσα σε ψυχρούς ατμούς ενός κρυογενούς υγρού, όπως το υγρό άζωτο. Με αυτόν τον τρόπο, προκαλείται η κατάψυξη των σταγονιδίων καθώς αυτά διέρχονται μέσα από τους ψυχρούς ατμούς, και ολοκληρώνεται όταν έρχονται σε επαφή με το κρυογενές υλικό. Αυτό οδηγεί στη διασπορά των κατεψυγμένων σταγονιδίων, τα οποία στη συνέχεια ξηραίνονται μέσω ξήρανσης υπό κατάψυξη (Ishwarya et al. 2015). Ένα ενδεικτικό σχεδιάγραμμα της διάταξης παρουσιάζεται στην Εικόνα 2.8. Τα σωματίδια που προκύπτουν μετά τη συγκεκριμένη τεχνική έχουν διαφορετικές ιδιότητες από εκείνα που προκύπτουν από την ξήρανση υπό κατάψυξη, και έτσι τα μέσα εγκλεισμού που χρησιμοποιούνται κατά την ξήρανση υπό κατάψυξη δεν είναι απαραίτητα κατάλληλα για τη μέθοδο αυτή (Frakolaki, Giannou, et al. 2020).

Η ξήρανση με ψεκασμό υπό κατάψυξη είναι μία υποσχόμενη μέθοδος, καθώς παρέχει ελεγχόμενο μέγεθος παραγόμενων σωματιδίων και μεγαλύτερη ειδική επιφάνεια από την ξήρανση με ψεκασμό (Burgain et al. 2011). Συγκριτικά με την ξήρανση υπό κατάψυξη, είναι λιγότερο χρονοβόρα λόγω της υψηλής μεταφοράς θερμότητας (Her et al. 2015). Παρόλα αυτά, καταναλώνει μεγάλα ποσά ενέργειας και το κόστος της είναι περίπου 30-50 φορές υψηλότερο από το αντίστοιχο της ξήρανσης με ψεκασμό (Burgain et al. 2011).



Εικόνα 2.8: Σχηματική απεικόνιση της ξήρανσης με ψεκασμό υπό κατάψυξη (Fang and Bhandari, 2012).

Ένα συγκριτικό διάγραμμα των τριών μεθόδων παρουσιάζεται στην Εικόνα 2.9.



Εικόνα 2.9: Συγκριτικό διάγραμμα ροής των τεχνικών ξήρανσης με ψεκασμό, ξήρανσης υπό κατάψυξη και ξήρανσης με ψεκασμό υπό κατάψυξη.

### 2.5.8. Κατάψυξη με ψεκασμό (Spray chilling)

Η κατάψυξη με ψεκασμό είναι μία διεργασία που στηρίζεται στη διασπορά, τη γαλακτωματοποίηση και τη διασπορά των προβιοτικών βακτηρίων σε ένα τηγμένο λιπαρό μέσο. Το προκύπτον μίγμα ψεκάζεται μέσω ενός ακροφυσίου και τα σχηματιζόμενα σταγονίδια έρχονται σε επαφή με αέρα θερμοκρασίας μικρότερης του σημείου τήξης του υλικού-φορέα (είτε σε ένα θάλαμο ψυχρού αέρα, είτε σε υγρό άζωτο), και έτσι

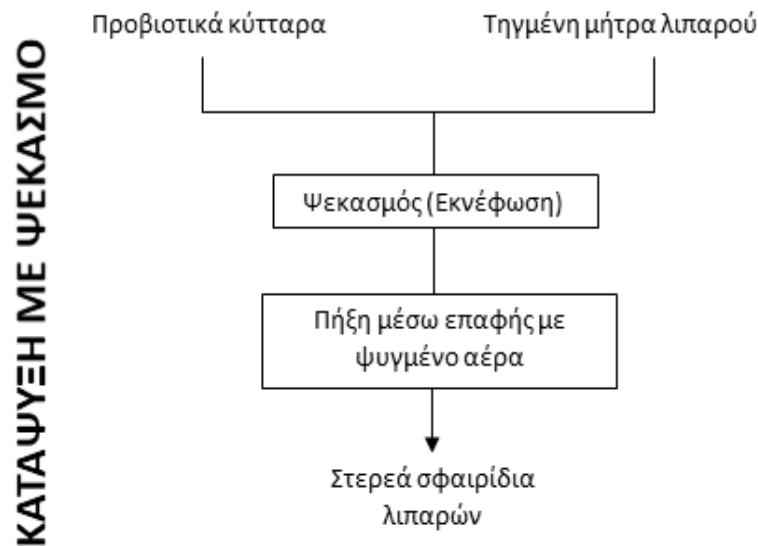
μετατρέπονται σε στερεά λιπαρά σφαιρίδια. Η κατάψυξη με ψεκασμό, παρόμοια με την ξήρανση με ψεκασμό, περιλαμβάνει το σχηματισμό μικρών σταγονιδίων, με τη διαφορά ότι ακολουθεί η έγχυση σε ψυχρό αντί για θερμό αέρα. Τα πιο κοινά χρησιμοποιούμενα μέσα εγκλεισμού που χρησιμοποιούνται στην κατάψυξη με ψεκασμό είναι τηγμένα κλάσματα φυτικών ελαίων με σημεία τήξης μεταξύ 32-42°C (Đorđević et al. 2014). Το διάγραμμα ροής της κατάψυξης με ψεκασμό παρουσιάζεται στο διάγραμμα 2.10.

Η εφαρμογή της συγκεκριμένης μεθόδου για τον εγκλεισμό των προβιοτικών βακτηρίων είναι υποσχόμενη, καθώς τα λίπη μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εναλλακτική λύση των βιοπολυμερών και των πολυσακχαριτών. Τα εγκλεισμένα προβιοτικά βακτήρια ελευθερώνονται, όταν η θερμοκρασία φτάσει στο σημείο τήξης του μέσου εγκλεισμού. Στη συνέχεια, οι λιπάσες που βρίσκονται στο έντερο χωνεύουν τα λιπαρά μέσα εγκλεισμού, απελευθερώνοντας τα προβιοτικά βακτήρια στο επιθυμητό σημείο (Okuro et al. 2013).

Η κατάψυξη με ψεκασμό θεωρείται ως η πιο οικονομική μέθοδος που μπορεί να χρησιμοποιηθεί βιομηχανικά, καθώς χαρακτηρίζεται από υψηλά ποσοστά εγκλεισμού και μπορεί να εφαρμοστεί είτε με συνεχή είτε με ασυνεχή τρόπο. Αποτελεί μία διεργασία ιδιαίτερου ενδιαφέροντος, καθώς αυξάνει την ποικιλία των υλικών που χρησιμοποιούνται ως εγκλειστικά μέσα και, επίσης, μπορεί να αξιοποιηθεί για την παραγωγή μικρότερων σωματιδίων. Επιπρόσθετα, δεν περιλαμβάνει υψηλές θερμοκρασίες που έχουν αρνητική επίδραση στη βιωσιμότητα των προβιοτικών κυττάρων, ενώ θεωρείται ως μία τεχνική σχετικά φιλική προς το περιβάλλον σε σύγκριση με άλλες μεθόδους, όπως η ξήρανση με ψεκασμό. Ακόμη, το μέγεθος και η μορφολογία των σφαιριδίων μπορεί να διευκολύνει τη ροή του υλικού, χωρίς να αλλοιώνεται η δομή των τελικών προϊόντων τροφίμων (Frakolaki, Giannou, et al. 2020). Εντούτοις, η συγκεκριμένη μέθοδος εμφανίζει χαμηλή απόδοση εγκλεισμού, καθώς ένας αριθμός βακτηριακών κυττάρων είτε παραμένει στην εξωτερική επιφάνεια των σφαιριδίων, είτε διαρρέει διαμέσου του λιπαρού υλικού και, κατ' επέκταση, εκτίθεται απευθείας στο περιβάλλον. Επιπρόσθετα, κατά την αποθήκευση εγκλεισμένων κυττάρων μπορεί να λάβει χώρα διαρροή προβιοτικών κυττάρων λόγω της κρυσταλλικής δομής και των χαρακτηριστικών πολυμορφικής διάταξης συγκεκριμένων λιπιδικών υλικών που αναπτύσσονται κατά τη στερεοποίηση και την κρυστάλλωσή τους (Pedroso et al. 2012). Τέλος, απαιτείται ειδικός χειρισμός και συνθήκες αποθήκευσης (Kailasarathy 2009).

Ο εγκλεισμός των στελεχών *Lb. acidophilus* και *B. lactis* σε φυτικό έλαιο μέσω της συγκεκριμένης τεχνικής έχει βρεθεί ότι παρέχει επαρκή προστασία των προβιοτικών κυττάρων τόσο κατά την αποθήκευση των δειγμάτων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, ψύξης ή κατάψυξης, όσο και κατά την έκθεσή τους σε σύστημα προσομοίωσης πέψης, καθιστώντας τα τελικά προϊόντα κατάλληλα για εφαρμογή σε τρόφιμα (Pedroso et al. 2012; M. P. Silva, Tulini, Matos-Jr, et al. 2018). Αντίστοιχα προϊόντα εγκλεισμού έχουν ενσωματωθεί και σε προϊόν τροφίμου (τυρί), δίνοντας ικανοποιητικά αποτελέσματα τόσο ως προς τη βιωσιμότητα των προβιοτικών κυττάρων, όσο και ως προς τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του προϊόντος τροφίμου (R. Silva et al. 2022). Τέλος, η συγκεκριμένη μέθοδος εγκλεισμού έχει συνδυαστεί με την ξήρανση με ψεκασμό για τον εγκλεισμό των προβιοτικών στελεχών

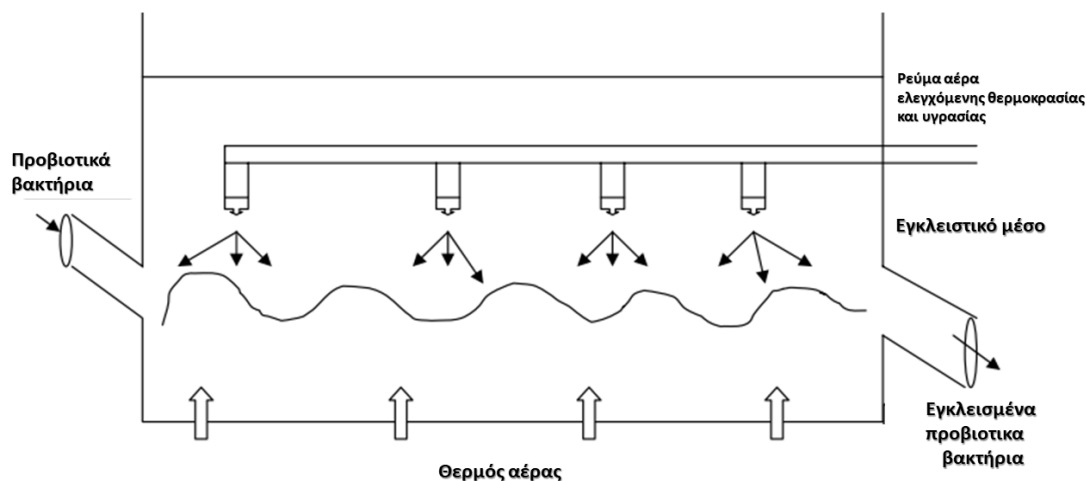
*Saccharomyces boulardii*, *Lb. acidophilus* και *B. Bifidum*. Για τον εγκλεισμό μέσω ξήρανσης με ψεκασμό χρησιμοποιήθηκαν αραβικό κόμμα και β-κυκλοδεξτρίνη, ενώ για τον εγκλεισμό μέσω ξήρανσης με κατάψυξη χρησιμοποιήθηκε υδρογονωμένο φοινικέλαιο. Ο συνδυασμός των δύο μεθόδων βελτίωσε την παρεχόμενη στα προβιοτικά κύτταρα προστασία έναντι θερμότητας και γαστρικών υγρών (Arslan-Tontul and Erbas 2017).



Εικόνα 2.10: Διάγραμμα ροής της τεχνικής κατάψυξης με ψεκασμό.

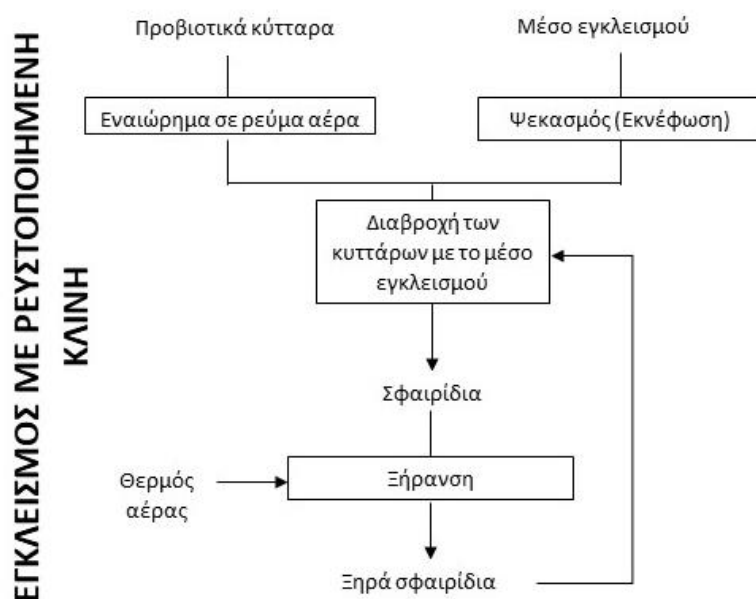
#### 2.5.9. Εγκλεισμός με χρήση ρευστοστερεάς κλίνης (Fluidized bed coating)

Η τεχνική του εγκλεισμού με ρευστοστερεά κλίνη είναι μία τροποποιημένη τεχνική ξήρανσης με ψεκασμό που περιλαμβάνει την εφαρμογή μίας επικάλυψης πάνω σε μία ρευστοποιημένη κλίνη στερεών σωματιδίων, είτε με συνεχή είτε με ασυνεχή τρόπο. Τα βακτηριακά κύτταρα αιωρούνται μέσω ενός ρεύματος αέρα συγκεκριμένης θερμοκρασίας και υγρασίας και ψεκάζονται με ένα μέσο εγκλεισμού (Frakolaki, Giannou, et al. 2020). Η παροχή θερμού αέρα γίνεται από τη βάση της διάταξης, προκειμένου να επιτευχθεί ξήρανση του υδατικού μέσου και να φτάσει η ενεργότητα του κονιοποιημένου υλικού σε ένα επιθυμητό επίπεδο (Nag and Das 2013). Οι επαναλαμβανόμενοι κύκλοι διαβροχής-ξήρανσης οδηγούν στο σχηματισμό μίας συνεχούς μεμβράνης (Kailasapathy 2009). Η εξάτμιση του νερού επηρεάζεται από την ταχύτητα ψεκασμού, την περιεκτικότητα του μέσου σε νερό, τη θερμοκρασία, τη ροή του αέρα και την υγρασία του εισερχόμενου αέρα (Đorđević et al. 2014). Στη συγκεκριμένη μέθοδο μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εγκλειστικά μέσα ένα μεγάλο εύρος υλικών, όπως λιπαρά, πρωτεΐνες, υδατάνθρακες και κόμματα (De Vos et al. 2010; Đorđević et al. 2014). Το διάγραμμα ροής της μεθόδου αυτής παρουσιάζεται στην Εικόνα 2.12.



Εικόνα 2.11: Σχηματική απεικόνιση εγκλεισμού με χρήση ρευστοστερεάς κλίνης συνεχούς ροής (Kailasapathy, 2009).

Η συγκεκριμένη τεχνική έχει χαμηλές ενεργειακές απαιτήσεις, είναι οικονομική και προκαλεί περιορισμένη καταπόνηση λόγω θερμότητας στα προβιοτικά κύτταρα, όταν εφαρμόζεται υπό ασυνεχή λειτουργία (Nag and Das 2013). Επιπλέον, στη συγκεκριμένη διεργασία υπάρχει η δυνατότητα ελέγχου της θερμοκρασίας και ευκολία κλιμάκωσης μεγέθους της διεργασίας (scale-up) ή προσαρμογής για την παραγωγή πολυστρωματικής επικάλυψης (Martín et al. 2015).



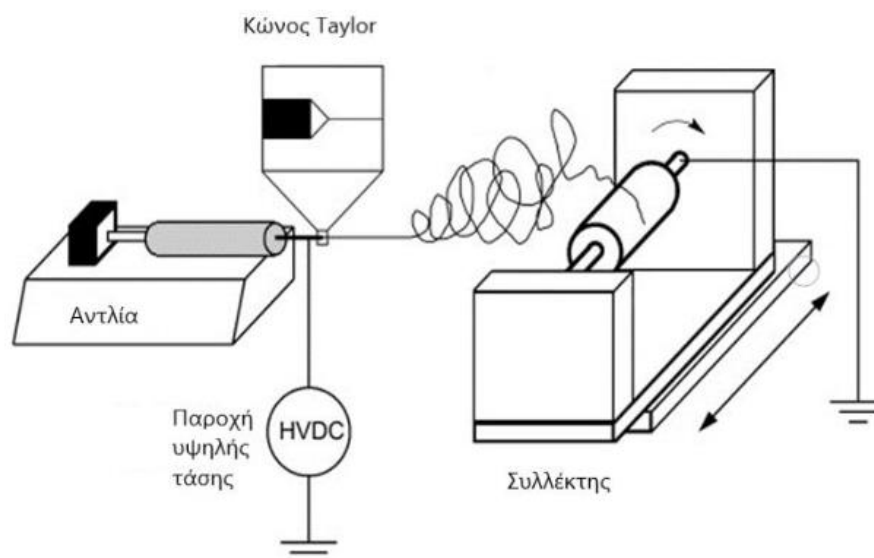
Εικόνα 2.12: Διάγραμμα ροής της τεχνικής του εγκλεισμού με ρευστοποιημένη κλίση.

Το βασικό μειονέκτημα της ρευστοποιημένης κλίνης είναι η ανεξέλεγκτη συσσωμάτωση των σωματιδίων, λόγω του διαβρεγμένου εγκλειστικού υλικού και της δημιουργίας υγρών γεφυρών μεταξύ των σωματιδίων, όταν η επιφανειακή τους θερμοκρασία είναι μεγαλύτερη της θερμοκρασίας υαλώδους μετάπτωσης του εγκλειστικού μέσου (Dorđević et al. 2014). Τέλος, η συγκεκριμένη τεχνική έχει το μειονέκτημα ότι είναι χρονοβόρα και ελέγχεται

δύσκολα (Martín et al. 2015), ενώ η εφαρμογή της για τον εγκλεισμό προβιοτικών βακτηρίων παραμένει ακόμη περιορισμένη. Σε πρόσφατη μελέτη έχει γίνει δοκιμή εγκλεισμού του προβιοτικού στελέχους *Lb. brevis* RK03 χρησιμοποιώντας σκόνη άπαχου γάλακτος, πρωτεΐνη ορού γάλακτος ή καζεΐνη ως εγκλειστικό μέσο και επιτεύχθηκαν μεγάλα ποσοστά απόδοσης εγκλεισμού σε κάθε περίπτωση. Τα τελικά προϊόντα εγκλεισμού αποδείχθηκαν αποτελεσματικά ως προς την προστασία που παρείχαν στα προβιοτικά κύτταρα κατά την έκθεσή τους σε σύστημα προσομοίωσης του γαστρεντερικού συστήματος (Wu et al. 2021).

#### 2.5.10. Ηλεκτροστατική εναπόθεση (electrospraying) - ινοποίηση (electrospinning)

Τα τελευταία χρόνια, ηλεκτροϋδροδυναμικές διεργασίες, όπως η ηλεκτροστατική εναπόθεση και η ηλεκτροστατική ινοποίηση, παρουσιάζονται ως εναλλακτικές μέθοδοι εγκλεισμού των προβιοτικών βακτηρίων (Mendes and Chronakis 2021). Οι συγκεκριμένες τεχνικές απαιτούν την εφαρμογή ενός ηλεκτρικού πεδίου υψηλού δυναμικού σε ένα κυτταρικό διάλυμα ή αιώρημα το οποίο εκνεφώνεται προς έναν φορτισμένο συλλέκτη, οδηγώντας στην εναπόθεση ξηρών σωματιδίων ή ινών, ανάλογα με την εφαρμοζόμενη τεχνική (Gomez-Mascaraque et al. 2016). Η βασική διάταξη της ηλεκτροστατικής εναπόθεσης και της ηλεκτροστατικής ινοποίησης περιλαμβάνει μία πηγή υψηλού δυναμικού (1-30 kV) η οποία συνήθως βρίσκεται σε λειτουργία συνεχούς ρεύματος (είναι δυνατή επίσης η λειτουργία εναλλασσόμενου ρεύματος), μία βελόνα/τριχοειδή σωλήνα από ανοξείδωτο χάλυβα με αμβλύ άκρο, μία αντλία έγχυσης σύριγγας και έναν γειωμένο συλλέκτη ο οποίος μπορεί να είναι είτε μία επίπεδη πλάκα, είτε ένα περιστρεφόμενο τύμπανο (Anu Bhushani and Anandharamakrishnan 2014). Μία απεικόνιση της διάταξης παρουσιάζεται στην Εικόνα 2.13.



Εικόνα 2.13: Σχηματική απεικόνιση διάταξης ηλεκτροστατικής ινοποίησης (Shaikh et al., 2010).

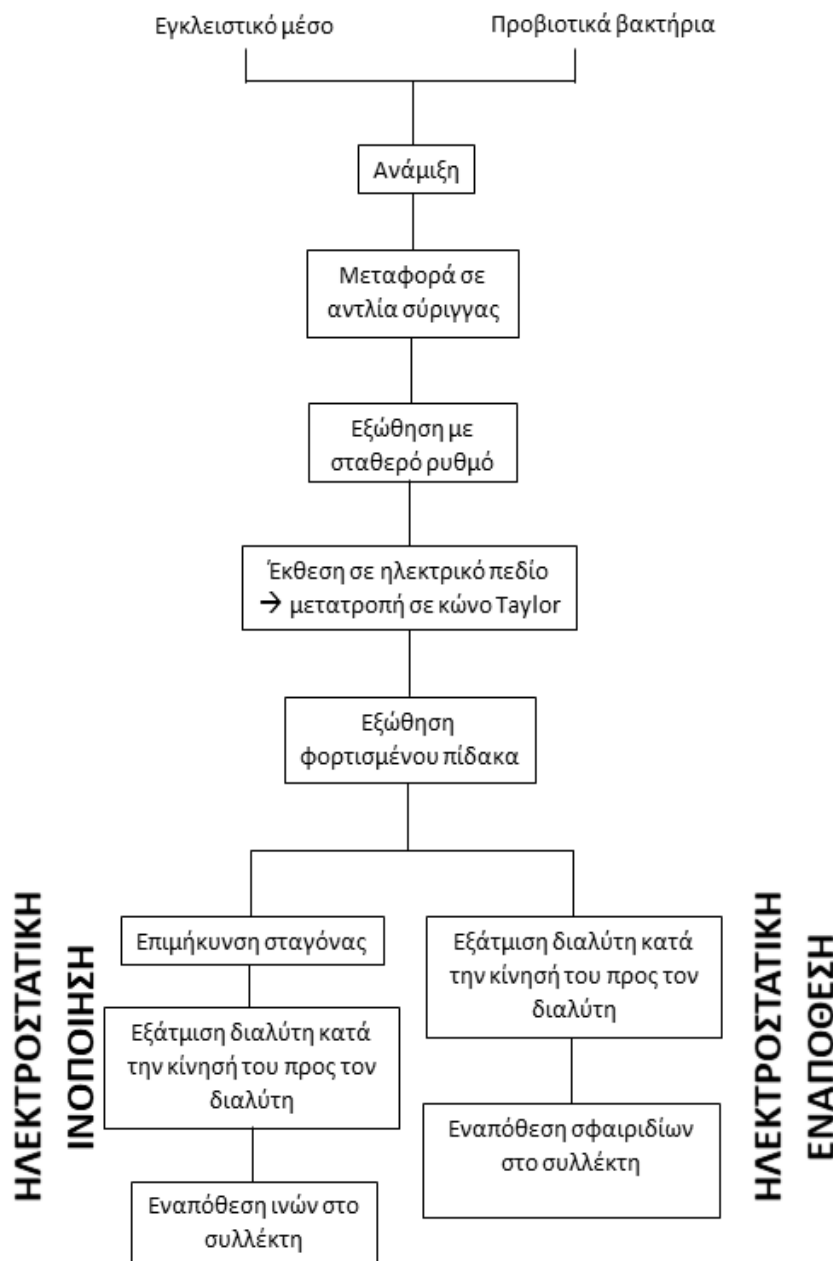
Η θεμελιώδης αρχή της ηλεκτροστατικής ινοποίησης είναι η χρήση ηλεκτροστατικών δυνάμεων προκειμένου να δημιουργηθεί μία σταγόνα του κυτταρικού αιωρήματος, η οποία θα μετατραπεί μετά σε μία λεπτή ίνα και θα ακολουθήσει η εναπόθεσή της σε ένα γειωμένο συλλέκτη (Ghorani and Tucker 2015). Αντίστοιχα, η αρχή της ηλεκτροστατικής εναπόθεσης είναι η εκνέφωση ενός υγρού μέσω εφαρμογής ηλεκτρικών δυνάμεων. Η διαφορά μεταξύ των δύο τεχνικών έγκειται στην έκταση της μοριακής συνοχής στην πρώτη ύλη. Ο βασικός τρόπος ελέγχου αυτής της παραμέτρου είναι μέσω τροποποίησης της συγκέντρωσης του αιωρήματος των κυττάρων. Υψηλές συγκεντρώσεις εγκλειστικών μέσων βοηθούν στη σταθεροποίηση του πίδακα κατά την επιμήκυνσή του και, κατ' επέκταση, ο πίδακας μετατρέπεται σε ίνα αντί να σπάσει σε σταγόνες. Στην περίπτωση χαμηλών συγκεντρώσεων, ο πίδακας αποσταθεροποιείται και σχηματίζονται μικρές σταγόνες. Αυτές οι σταγόνες έχουν υψηλό φορτίο και διασπείρονται, με αποτέλεσμα να εμποδίζεται η συσσωμάτωση των σταγονιδίων. Η περαιτέρω εξάτμιση του διαλύτη οδηγεί στη συστολή και στερεοποίησή τους, με αποτέλεσμα τα στερεά σωματίδια να συγκεντρώνονται πάνω στο συλλέκτη (Mendes and Chronakis 2021). Ένα συγκριτικό διάγραμμα ροής των δύο αυτών μεθόδων παρουσιάζεται στην Εικόνα 2.14.

Τόσο η ηλεκτροστατική εναπόθεση όσο και η ινοποίηση είναι εύκολες, οικονομικές και προσαρμοσίμες διεργασίες. Και οι δύο μέθοδοι οδηγούν στο σχηματισμό πολύ μικρών σωματιδίων σε μία μόνο διεργασία, υπό ήπιες μη θερμικές συνθήκες. Το μέγεθος και η μορφολογία των ινών/σφαιριδίων που παράγονται από αυτές τις μεθόδους μπορεί να τροποποιηθεί με κατάλληλη προσαρμογή των παραμέτρων των ηλεκτροϋδροδυναμικών διεργασιών (εφαρμοζόμενο δυναμικό, ηλεκτρικό πεδίο, απόσταση, ρυθμός ροής) και των παραμέτρων του διαλύματος (αγωγιμότητα, ιξώδες, επιφανειακή τάση, διηλεκτρική σταθερά). Οι ηλεκτροϋδροδυναμικές μέθοδοι μπορούν να αξιοποιηθούν για την παραγωγή υψηλής απόδοσης λειτουργικών ινών ή σφαιριδίων, με μεγάλο λόγο επιφάνειας/όγκου και διαστάσεις που μπορεί να ποικίλουν από νανο- μέχρι μικρο- κλίμακα (Mendes and Chronakis 2021).

Επιπλέον, και στις δύο μεθόδους μπορούν να αξιοποιηθούν υλικά κατάλληλα για τρόφιμα και να επιτευχθούν υψηλές αποδόσεις εγκλεισμού. Οι μέθοδοι αυτές παρέχουν ελεγχόμενη και παρατεταμένη απελευθέρωση του εγκλεισμένου υλικού και υψηλό λόγο επιφάνειας/όγκου. Ωστόσο, σε περίπτωση που οι συνθήκες δεν ρυθμιστούν κατάλληλα, υπάρχει η πιθανότητα διαρροής του υλικού (Anu Bhushani and Anandharamakrishnan 2014; Gomez-Mascaraque et al. 2016). Σε πολλές μελέτες που έχουν γίνει μέχρι σήμερα χρησιμοποιείται ως εγκλειστικό μέσο το αλγινικό νάτριο, είτε μόνο του, είτε συνδυαστικά με άλλα υλικά. Για παράδειγμα, το στέλεχος *Lb. plantarum* έχει εγκλειστεί μέσω ηλεκτροϋδροϋδροδυναμικής τεχνικής ενός ή περισσότερων σταδίων σε σφαιρίδια αλγινικού/χιτοζάνης. Στα παραγόμενα σφαιρίδια έγινε προσθήκη ινουλίνης ή ανθεκτικού αμύλου μέσω έγχυσης και παρατηρήθηκαν αυξημένα ποσοστά επιβίωσης των προβιοτικών κυττάρων κατά την αποθήκευση τόσο στους 25°C όσο και στους 4°C (Zaeim et al. 2020). Το διάλυμα πρωτεΐνης ορού γάλακτος που περιέχει το ένζυμο τρανσγλουταμινάση έχει, επίσης,



αποδειχθεί κατάλληλος φορέας για τον εγκλεισμό του στελέχους *Lb. casei* μέσω ηλεκτροϋδροδυναμικών μεθόδων, δίνοντας αποτελέσματα αντάξια της ξήρανσης με κατάψυξη (Alehosseini et al. 2019). Σε άλλη μελέτη, η επιβίωση των προβιοτικών κυττάρων του γένους *Lactobacillus* μετά τον εγκλεισμό τους μέσω ηλεκτροστατικής ινοποίησης σε μίγμα αραβικού κόμμεος-πουλουλάνης βρέθηκε σχετικά αυξημένη σε σύγκριση με τα προβιοτικά κύτταρα που είχαν εγκλειστεί μέσω ξήρανσης υπό κατάψυξη και διατήρησαν τη βιωσιμότητά τους στους 4°C για το διάστημα των 28 ημερών (Ma et al. 2021).

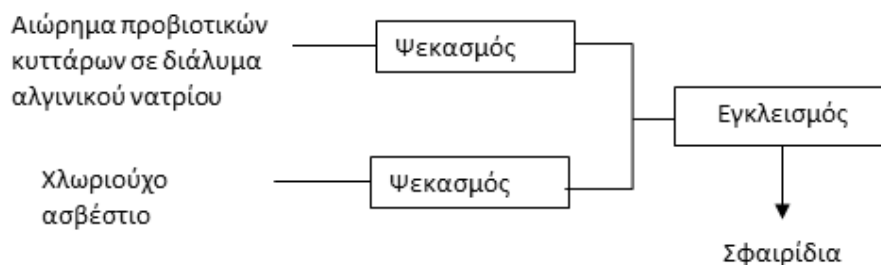


Εικόνα 2.14: Διάγραμμα ροής των τεχνικών ηλεκτροστατικής ινοποίησης και εναπόθεσης.

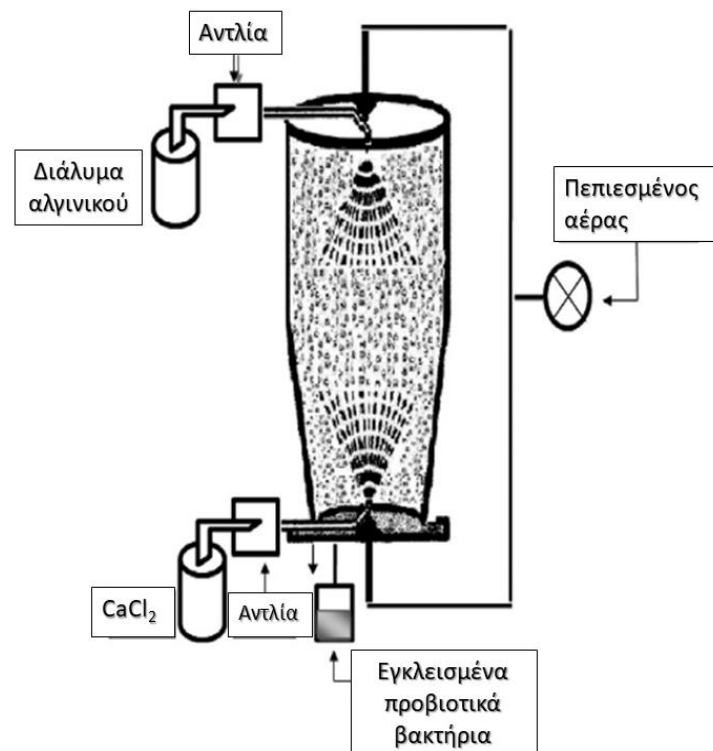
### 2.5.11. Τεχνολογία πρόσκρουσης ελαιωρημάτων (*Impinging aerosol technology*)

Η τεχνολογία πρόσκρουσης ελαιωρημάτων καθιερώθηκε υπό μορφή πατέντας από τον Bhandari (2009) και εφαρμόστηκε από τους Sohail et al. (2011). Περιλαμβάνει δύο διαφορετικά ελαιωρήματα. Το πρώτο, το οποίο περιέχει το μικροβιακό ελαιώρημα σε ένα διάλυμα αλγινικού, εγχέεται από την κορυφή ενός κυλίνδρου, ενώ το δεύτερο, το οποίο περιέχει χλωριούχο ασβέστιο, εγχέεται από τη βάση του. Τα σωματίδια που παράγονται έχουν μία μέση διάμετρο μικρότερη από 40 μm και μπορούν να επεξεργαστούν περαιτέρω μέσω ξήρανσης με ψεκασμό ή με κατάψυξη (Sohail et al. 2012). Το διάγραμμα ροής της συγκεκριμένης μεθόδου και η σχηματική απεικόνιση της διάταξης παρουσιάζονται στις Εικόνες 2.15 και 2.16.

## Τεχνολογία πρόσκρουσης αιωρημάτων



Εικόνα 2. 15: Διάγραμμα ροής της τεχνολογίας πρόσκρουσης αιωρημάτων.



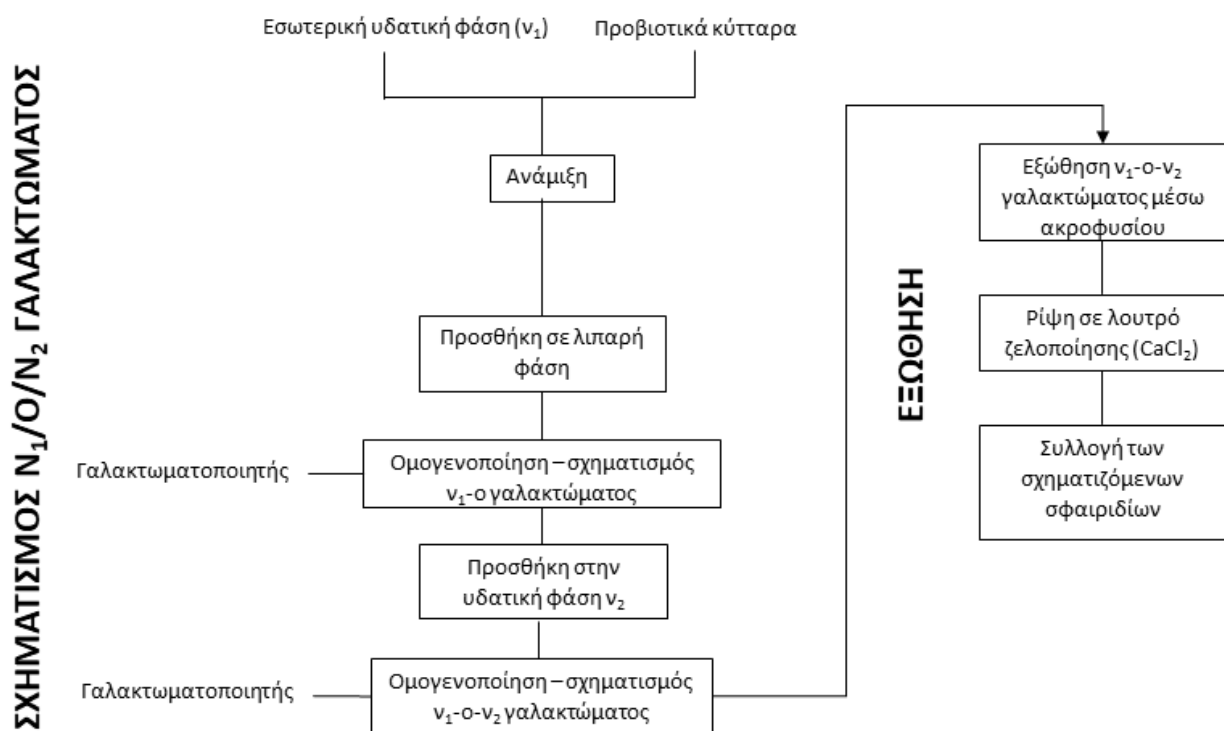
Εικόνα 2.16: Σχηματική απεικόνιση της τεχνικής πρόσκρουσης αιωρημάτων για τον εγκλεισμό προβιοτικών βακτηρίων

Αυτή η τεχνολογία είναι κατάλληλη για θερμο-ευαίσθητα συστατικά, όπως τα βακτηριακά κύτταρα. Επιπλέον έχει μεγάλη απόδοση, είναι μία συνεχής διεργασία και οδηγεί σε προϊόντα με μικρή διάμετρο (Sohail et al. 2012).

#### 2.5.12. Εξώθηση διπλού $v_1/\varepsilon/v_2$ γαλακτώματος (*Extrusion of double $w_1/o/w_2$ emulsion*)

Για την αύξηση της προστασίας των προβιοτικών βακτηρίων που εγκλείονται μέσω εξώθησης προτείνεται η πρότερη ενσωμάτωσή τους σε ένα διπλό νερό-σε-έλαιο-σε-νερό ( $v_1/\varepsilon/v_2$  ή  $w_1/o/w_2$ ) γαλακτώμα. Στα διπλά  $v_1/\varepsilon/v_2$  γαλακτώματα τα σταγονίδια νερού διασκορπίζονται σε σταγονίδια ελαίου, τα οποία με τη σειρά τους διασπείρονται σε συνεχή υδατική φάση. Ο εγκλεισμός των προβιοτικών βακτηρίων στην εσωτερική φάση ενός διπλού  $v_1/\varepsilon/v_2$  γαλακτώματος μπορεί να παρέχει επαρκή προστασία από τις δυσμενείς συνθήκες του περιβάλλοντός τους, υψηλή αντοχή σε οξέα και στοχευμένη απελευθέρωση στο λεπτό έντερο. Τα διπλά  $v_1/\varepsilon/v_2$  γαλακτώματα αποτελούν υποσχόμενη λύση για την προστασία των προβιοτικών βακτηρίων κατά την εισαγωγή τους σε τρόφιμα, καθώς η παρασκευή τους δεν απαιτεί αντίξοες συνθήκες, βοηθώντας στη διατήρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων. Λόγω του υδροφοβικού χαρακτήρα των προβιοτικών κυττάρων, προτιμάται η ενσωμάτωσή τους στην εσωτερική διεσπαρμένη υδατική φάση. Βάσει μελετών, τα ποσοστά επιβίωσης των προβιοτικών βακτηρίων που βρίσκονται εγκλεισμένα στην εσωτερική φάση διπλών  $v_1/\varepsilon/v_2$  γαλακτωμάτων είναι σημαντικά υψηλότερα από τα αντίστοιχα εκείνων που βρίσκονται στην εξωτερική φάση τέτοιων γαλακτωμάτων (Marefati et al. 2021; Pimentel-González et al. 2009).

Η εφαρμογή διπλών γαλακτωμάτων στη βιομηχανία τροφίμων είναι αρκετά δύσκολη, καθώς η σταθερότητά τους επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες. Τα διπλά γαλακτώματα αποτελούνται, συνήθως, από μεγάλα και πολυδιεσπαρμένα σωματίδια που έχουν έντονη τάση για κροκίδωση, δημιουργία κρέμας (κρεμοποίηση) και συσσωμάτωση (Frakolaki, Katsouli, et al. 2020). Επιπλέον, είναι δύσκολη η διατήρηση των εγκλεισμένων προβιοτικών εντός της εσωτερικής υδατικής φάσης, λόγω διάχυσης, ειδικά κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης (van der Ark et al. 2017). Έτσι, η ενσωμάτωση προβιοτικών βακτηρίων εντός της εσωτερικής υδατικής φάσης ενός  $v_1/\varepsilon/v_2$  διπλού γαλακτώματος και η εξώθηση αυτού για το σχηματισμό σφαιριδίων αλγινικού μπορεί να αποτρέψει την κατάρρευση του συνολικού συστήματος, παρέχοντας αυξημένη προστασία στα προβιοτικά κύτταρα. Πιο συγκεκριμένα, τα προβιοτικά βακτήρια προστίθενται και προστατεύονται εντός της εσωτερικής υδατικής φάσης του  $v_1/\varepsilon/v_2$  γαλακτώματος, ενώ το εγκλειστικό μέσο με βάση το αλγινικό νάτριο προστίθεται στην εξωτερική υδατική φάση προκειμένου να μπορεί να αλληλεπιδράσει με τα κατιόντα  $Ca^{2+}$  στο επόμενο στάδιο, αυτό της εξώθησης. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται αφενός καλύτερη προστασία των προβιοτικών κυττάρων και αφετέρου μικρότερο μέγεθος τελικών προϊόντων εγκλεισμού λόγω μικρότερου ιξώδους του εγκλειστικού μίγματος (Frakolaki, Katsouli, et al. 2020).



*Εικόνα 2. 17: Διάγραμμα ροής εξώθησης διπλού γαλακτώματος.*

Τα πλεονεκτήματα της συνδυαστικής αυτής τεχνικής περιλαμβάνουν περιορισμό της διάχυσης των προβιοτικών βακτηρίων εκτός των προϊόντων εγκλεισμού, αυξημένη απόδοση εγκλεισμού, μικρότερο μέγεθος σφαιριδίων και περιορισμένη έκθεση των προβιοτικών κυττάρων σε ανεπιθύμητους παράγοντες όπως, για παράδειγμα, τα γαστρικά υγρά. Έχει βρεθεί, μάλιστα, ότι η συγκεκριμένη μέθοδος εγκλεισμού αυξάνει τα ποσοστά επιβίωσης των προβιοτικών βακτηρίων κατά την έκθεσή τους σε υψηλές θερμοκρασίες (50-90°C) (Beldarrain-Iznaga et al. 2020). Παρόλα αυτά, η συγκεκριμένη μέθοδος δεν έχει μελετηθεί, ακόμη, εκτενώς. Ένα ενδεικτικό διάγραμμα ροής της συγκεκριμένης μεθόδου παρουσιάζεται στην Εικόνα 2.17.

Πίνακας 2.2: Τεχνικές πληροφορίες και περιορισμοί μεθόδων εγκλεισμού προβιοτικών βακτηρίων.

Μέθοδος	Θερμοκρασία	Πίεση	Κόστος	Διάμετρος	Τεχνικοί περιορισμοί
Εξώθηση (extrusion)	Θερμοκρασία περιβάλλοντος	101 kPa	*	2 – 5 mm	Μεγάλο μέγεθος σωματιδίων. Δυσκολία εφαρμογής σε βιομηχανική κλίμακα.
Γαλακτωματοποίηση (emulsification)	Θερμοκρασία περιβάλλοντος	101 kPa	*	25 μm – 2 mm	Ανομοιόμορφο μέγεθος σωματιδίων. Αίσθηση κοκκώδους υφής στο στόμα.
Σχηματισμός συμπλόκων (complex coacervation)	Θερμοκρασία περιβάλλοντος	101 kPa	*	65-105 μm	Δυσκολία εφαρμογής σε βιομηχανική κλίμακα. Ανάγκη πρόσθετου σταδίου ξήρανσης.
Ξήρανση με ψεκασμό (spray drying)	T <sub>inlet</sub> =100-170°C T <sub>outlet</sub> =45-100°C	30-400 kPa	**	50-75 μm	Υψηλές θερμοκρασίες (θερμική καταπόνηση βακτηρίων), ωσμωτικό στρες.
Κατάψυξη με ψεκασμό (spray chilling)	T <sub>inlet</sub> = 34-58°C T <sub>outlet</sub> = 10-13°C	30-500 kPa	***	40-280 μm	Μικρή απόδοση εγκλεισμού. Εκροή εγκλεισμένων βακτηρίων κατά την αποθήκευση.
Ξήρανση υπό κατάψυξη (freeze drying)	(-88°C) – (-50°C)	0.002-0.04 kPa	****	70-250 μm	Υψηλή κατανάλωση ενέργειας, μεγάλος χρόνος διεργασίας, υψηλό κόστος, καταπόνηση λόγω κατάψυξης.
Ξήρανση με ψεκασμό υπό κατάψυξη (Spray-freeze drying)	T <sub>spray</sub> = (-85°C) – (-40°C) T <sub>freeze</sub> = (-30°C) – 25°C	p <sub>spray</sub> =20-30kPa p <sub>freeze</sub> = 0.01-0.13kPa	***	400-1400 μm	Ανάγκη εξειδικευμένου εξοπλισμού. Υψηλή κατανάλωση ενέργειας, υψηλό κόστος.
Εγκλεισμός με ρευστοποιημένη κλίνη (fluidized bed coating)	T <sub>inlet</sub> =50-55°C T <sub>outlet</sub> =35-40°C	100-350 kPa	*	15-40 μm	Δυσκολία αριστοποίησης, μεγάλος χρόνος διεργασίας.
Ηλεκτροστατική εναπόθεση (electrospraying) ή ινοποίηση (electrospinning)	Θερμοκρασία περιβάλλοντος	101 kPa	**	450-1500 μm	Ανάγκη εξειδικευμένου εξοπλισμού. Εφαρμογή υψηλής τάσης.
Ξήρανση με Ψεκασμό με Χρήση Υπερήχων υπό Κενό (ultrasonic vacuum spray drying)	20-30°C	2.3-3.3 kPa	**	20-50 μm	Ανάγκη εξειδικευμένου εξοπλισμού.
Τεχνολογία πρόσκρουσης αιωρημάτων (impinging aerosol technology)	Θερμοκρασία περιβάλλοντος	350-450 kPa	*	10-40μm	Ανάγκη εξειδικευμένου εξοπλισμού.
Εξώθηση πολλαπλού v <sub>1</sub> /ε/v <sub>2</sub> γαλακτώματος (Extrusion of double W <sub>1</sub> /O/W <sub>2</sub> emulsion)	Θερμοκρασία περιβάλλοντος	101 kPa	*	1-2 mm	Μέθοδος δύο σταδίων. Δυσκολία εφαρμογής σε βιομηχανική κλίμακα.

## 2.6. Μέσα εγκλεισμού

Τα εγκλειστικά μέσα πρέπει να έχουν συγκεκριμένες ιδιότητες προκειμένου να θεωρηθούν κατάλληλα για τον εγκλεισμό των προβιοτικών κυττάρων. Αρχικά, πρέπει να έχουν ικανοποιητικές ρεολογικές ιδιότητες, και συγκεκριμένα, μικρό ιξώδες σε υψηλές συγκεντρώσεις και χαμηλή υγροσκοπικότητα. Ακόμη, πρέπει να παρουσιάζουν καλές γαλακτωματοποιητικές ιδιότητες και δυνατότητα σχηματισμού μεμβράνης και διατήρησης της δομικής ακεραιότητας. Κατά τον εγκλεισμό των προβιοτικών, τα εγκλειστικά μέσα πρέπει να καλύπτουν πλήρως τα βακτηριακά κύτταρα και να τα προστατεύουν κατά τον τρόπο αυτό από εξωτερικούς παράγοντες, όπως οξύγονο, θερμότητα, φως και υγρασία. Η διαλυτότητα των εγκλειστικών μέσων σε διαλύτες κατάλληλους για εφαρμογή σε τρόφιμα (κυρίως νερό και αιθανόλη) αποτελεί απαραίτητη ιδιότητα των συγκεκριμένων υλικών. Επιπρόσθετα, πρέπει να έχουν ήπια προς καμία γεύση και συγκεκριμένες ιδιότητες όσον αφορά τη διαλυτότητα των τελικών σφαιριδίων και την απελευθέρωση των προβιοτικών κυττάρων. Άλλα χαρακτηριστικά, όπως η ευκολία χειρισμού και το χαμηλό κόστος, είναι, επίσης, επιθυμητά. Καθώς ένα εγκλειστικό μέσο δεν μπορεί να ικανοποιήσει όλα τα παραπάνω κριτήρια, προτιμάται η χρήση κατάλληλων μιγμάτων αυτών (Chranioti and Tzia 2015). Προκειμένου να καλυφθούν τα παραπάνω, προτείνεται επίσης ο συνδυασμός με τροποποιητικές ουσίες, όπως παράγοντες δέσμευσης οξύγονου, αντιοξειδωτικά, χηλικοί παράγοντες και επιφανειοδραστικές ουσίες (Chranioti and Tzia 2015; Corona-Hernandez et al. 2013).

Στα υλικά που χρησιμοποιούνται ευρέως ως εγκλειστικά μέσα περιλαμβάνονται τα υδατανθρακικά πολυμερή, τα οποία είναι τα πιο διαδεδομένα, οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια (Chranioti and Tzia 2015; Nedovic et al. 2011). Τα υλικά που χρησιμοποιούνται σε κάθε μέθοδο εγκλεισμού παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 2.2.

Τα υδατανθρακικά πολυμερή ταξινομούνται σε: άμυλο και παράγωγά του (αμυλόζη, αμυλοπηκτίνη, δεξτρίνες, μαλτοδεξτρίνες, πολυδεξτρόζη, σιρόπια και κυτταρίνη και παράγωγά της), φυτικά εκχυλίσματα (αραβικό κόμμα, γαλακτομαννάνες, πηκτίνες και διαλυτοί πολυσακχαρίτες σόγιας), εκχυλίσματα από φύκια (καραγενάνες και αλγινικό νάτριο) και πολυσακχαρίτες μικροβιακής ή ζωικής προέλευσης (δεξτράνη, χιτοζάνη, ξανθάνη και τζελάνη) (Burgain et al. 2011; Nedovic et al. 2011). Το αλγινικό νάτριο είναι ένας φυσικός πολυσακχαρίτης και αποτελεί το κύριο υλικό που χρησιμοποιείται ως εγκλειστικό μέσο, καθώς είναι μη τοξικό, βιοσυμβατό, οικονομικό και εύκολο στην εφαρμογή (Wunwisa Krasaekoort et al. 2003). Ωστόσο, όταν χρησιμοποιείται μόνο του, δεν παρέχει επαρκή προστασία στα προβιοτικά βακτήρια λόγω του μεγάλου πορώδους του. Έτσι, κατιόντα υδρογόνου ( $H^+$ ), χολικά άλατα και πεπτικά ένζυμα μπορούν εύκολα να διαπεράσουν εντός των σφαιριδίων και να προκαλέσουν βλάβες στα εγκλεισμένα κύτταρα (Z. Zhang et al. 2021). Παρόλα αυτά, έχει αναφερθεί πως όταν συνδυάζεται το αλγινικό νάτριο με άλλες ουσίες,

όπως ζελατίνη, χιτοζάνη, πηκτίνη, γλυκομαννάνη, άμυλο, ινουλίνη, εκχυλίσματα βοτάνων, γαλακτοολιγοσακχαρίτες ή φρουκτοολιγοσακχαρίτες, επιτυγχάνεται ενίσχυση της ικανότητας επιβίωσης διαφόρων προβιοτικών στελεχών (Burgain et al. 2011; Chaikham 2015).

Ως εγκλειστικά μέσα χρησιμοποιούνται επίσης και διάφορες πρωτεΐνες, όπως η ζελατίνη, το καζεϊνικό νάτριο, η πρωτεΐνη ορού και τα πρωτεϊνικά συμπυκνώματα και υπερσυμπυκνώματα σόγιας (Chranioti and Tzia 2015). Οι πρωτεΐνες του γάλακτος είναι, επίσης, ένα κατάλληλο εγκλειστικό μέσο, καθώς έχουν σημαντικές φυσικοχημικές ιδιότητες, κατάλληλες για την εφαρμογή αυτή. Η παρεχόμενη προστασία επιτυγχάνεται μέσω της ζελατινοποίησης των πρωτεϊνών αυτών, η οποία πραγματοποιείται μέσω θερμικής επεξεργασίας. Η ανάπτυξη ωστόσο υψηλών θερμοκρασιών μειώνει σημαντικά τη βιωσιμότητα των βακτηρίων (Sagis 2015). Έχει αναφερθεί ότι ο συνδυασμός πρωτεϊνικών συστημάτων με σάκχαρα βραχείας αλύσου, ενισχύει τη βιωσιμότητα των προβιοτικών κυττάρων κατά τον εγκλεισμό μέσω ξήρανσης με ψεκασμό. Η ενσωμάτωση πολυσακχαριτών μπορεί, επίσης, να ενισχύσει τη σταθερότητά τους (Dianawati et al., 2016). Οι λιπαρές ουσίες που προτείνονται για τη χρήση αυτή είναι λιπαρά οξέα και λιπαρές αλκοόλες, κηροί (κερί μέλισσας, κεριά carnauaba, κεριά candellia), γλυκερίδια και φωσφολιπίδια (Chranioti and Tzia, 2015; Nedovic et al., 2011).

Πίνακας 2.3: Χρησιμοποιούμενα εγκλειστικά μέσα ανά μέθοδο εγκλεισμού προβιοτικών βακτηρίων

<b>Μέθοδος Εγκλεισμού</b>	<b>Εγκλειστικά μέσα – πρόσθετα υλικά</b>
Εξώθηση (extrusion)	Αλγινικό νάτριο, χλωριούχο ασβέστιο, κ-καραγενάνη, ξανθάνη, τζελάνη, άμυλο, πηκτίνη, πρωτεΐνη ορού γάλακτος, χιτοζάνη, πολυ-L-λυσίνη, ζελατίνη, κολλαγόνο
Γαλακτωματοποίηση (emulsification)	Αλγινικό νάτριο, χλωριούχο ασβέστιο, αραβικό κόμμι, κόμμι χαρουπιού, κ-καραγενάνη, όξινη φθαλικήκυτταρίνη, καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη, χιτοζάνη, μαλτοδεξτρίνη, πρωτεΐνη ορού γάλακτος, ζελατίνη, πρωτεΐνη ρεβουθίου, τροποποιημένο άμυλο, αποβουτυρωμένο γάλα σε σκόνη, πυτιά
Σχηματισμός συμπλόκων (complex coacervation)	Αραβικό κόμμι, πηκτίνη, αλγινικό νάτριο, κόμμι ξανθάνης, καραγενάνη, καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη, πρωτεΐνη ορού γάλακτος, ζελατίνη, αλβουμίνη αβγού, πρωτεΐνες γάλακτος, καζεΐνη, β-λακτογλοβουλίνη, ορός γάλακτος, λιποπρωτεΐνες

Πίνακας 2.3 (συνέχεια)

Μέθοδος Εγκλεισμού	Εγκλειστικά μέσα – πρόσθετα υλικά
Ξήρανση με ψεκασμό (spray drying)	Αποβουτυρωμένο γάλα σε σκόνη, πρωτεΐνη ορού γάλακτος, πρωτεϊνικό υπερσυμπύκνωμα σόγιας, ζελατίνη, αραβικό κόμμι, πηκτίνη, τροποποιημένο άμυλο, οξική φθαλική κυτταρίνη, μαλτοδεξτρίνη και άλλα σάκχαρα
Κατάψυξη με ψεκασμό (spray chilling)	Σησαμέλαιο, διεστεροποιημένα λιπαρά φοινικέλαιου και φοινικοκυρηνέλαιου
Ξήρανση υπό κατάψυξη (freeze drying)	Πρωτεΐνες ή αμινοξέα (π.χ. πρωτεϊνικό υπερσυμπύκνωμα σόγιας, γλουταμινικόμονονάτριο), μαλτοδεξτρίνη, φρουκτόζη, λακτόζη, μαννόζη, τρεχαλόζη, σορβιτόλη, κόμμεα
Εγκλεισμός με ρευστοποιημένη κλίνη (fluidized bed coating)	Κηροί, λιπαρά οξέα και έλαια, κυτταρίνη και παράγωγα κυτταρίνης, καραγενάνη, παράγωγα αμύλου, φλουτένη, καζεΐνη, αλγινικό νάτριο
Ηλεκτροστατική εναπόθεση (electrospraying) ή ινοποίηση (electrospinning)	Συμπύκνωμα πρωτεΐνης ορού γάλακτος, πρωτεϊνικό υπερσυμπύκνωμα ορού γάλακτος, , αλβουμίνη αβγού, κολλαγόνο, ζελατίνη, καζεΐνη, άμυλο, κυτταρίνη, πηκτίνη, κόμμι γκουάρ, χιτοζάνη, αλγινικό νάτριο, καραγενάνη, ξανθάνη, δεξτράνη, κυκλοδεξτρίνες, πουλουλάνη
Ξήρανση με Ψεκασμό με Χρήση Υπερήχων υπό Κενό (ultrasonic vacuum spray drying)	Μαλτοδεξτρίνη, τρεχαλόζη
Τεχνολογία πρόσκρουσης ελαιωρημάτων (Impinging aerosol technology)	Αλγινικό νάτριο
Εξώθηση πολλαπλού $v_1/\epsilon/v_2$ γαλακτώματος (Extrusion of double $w_1/o/w_2$ emulsion)	Αλγινικό νάτριο



### **3. Ενσωμάτωση εγκλεισμένων προβιοτικών βακτηρίων σε τρόφιμα-φορείς**

Τα τελευταία χρόνια, τα λειτουργικά τρόφιμα λαμβάνουν ιδιαίτερης προσοχής από τους επιστήμονες και τη βιομηχανία τροφίμων, λόγω των απαιτήσεων των καταναλωτών για διάφορους λόγους. Τα συγκεκριμένα προϊόντα παρέχουν οφέλη στην υγεία πέρα από τα συνηθισμένα που προσφέρουν τα αντίστοιχα συμβατικά τρόφιμα, εφόσον καταναλώνονται σε επαρκείς ποσότητες ως μέρος μίας ισορροπημένης διατροφής. Τα προβιοτικά τρόφιμα αποτελούν μια ειδική κατηγορία λειτουργικών τροφίμων (Ta et al. 2021).

Τα προβιοτικά βακτήρια χρησιμοποιούνται παραδοσιακά σε ζυμωμένα προϊόντα γάλακτος (π.χ. προβιοτικά γιαούρτια) ή ενσωματώνονται σε άλλα γαλακτοκομικά προϊόντα, όπως τυρί, ζυμωμένο βουτυρόγαλα και γαλακτοκομικά ροφήματα, είτε σε ελεύθερη μορφή, είτε μέσω χρήσης κατάλληλων φορέων (M. Saarela 2009). Στις περισσότερες από αυτές τις περιπτώσεις, τα προβιοτικά στελέχη επιλέγονται όχι μόνο με βάση τα οφέλη που παρέχουν στην υγεία, αλλά και σύμφωνα με τη συνολική τους συνεισφορά στο στάδιο της ζύμωσης και τα χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος (Maragkoudakis et al. 2006). Επιπλέον, έχουν ενσωματωθεί με επιτυχία σε μία ποικιλία μη γαλακτοκομικών προϊόντων, όπως κρέας, ροφήματα, δημητριακά, λαχανικά και αρτοσκευάσματα (Shori 2015).

Η ανάπτυξη και η βιωσιμότητα των προβιοτικών βακτηρίων μπορεί να επηρεαστεί από διάφορους παράγοντες του προϊόντος, όπως η συγκέντρωση των πρωτεϊνών, των σακχάρων και των λιπαρών, το pH, καθώς και από τις παραμέτρους της διεργασίας, όπως επίσης και από τις συνθήκες που επικρατούν στο περιβάλλον του γαστρεντερικού συστήματος (Ranadheera et al. 2010). Σύμφωνα με τους κανονισμούς που έχουν τεθεί από τη διεθνή ομοσπονδία γαλακτοκομικών προϊόντων (International Dairy Federation, IDF), την Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΕ) και την Εθνική Υπηρεσία Εποπτείας Υγείας της Βραζιλίας (Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA), το ελάχιστο φορτίο προβιοτικών κυττάρων πρέπει να είναι  $10^6$ - $10^7$  cfu/g ή mL προϊόντος τη στιγμή της κατανάλωσης, προκειμένου τα προβιοτικά βακτήρια να αποφέρουν τα οφέλη τους στον οργανισμό (ANVISA 2008; A. Mortazavian et al. 2007). Για το σκοπό αυτό προτείνεται η προσθήκη ενός μεγάλου αριθμού προβιοτικών κυττάρων στην αρχή της παραγωγής του προϊόντος, προκειμένου να επιτυγχάνεται το επιθυμητό βακτηριακό φορτίο τη στιγμή της κατανάλωσης, καθώς επίσης και ο έλεγχος της επιβίωσης των προβιοτικών κυττάρων μετά από συγκεκριμένο χρονικό διάστημα αποθήκευσης, όπως και υπό συνθήκες προσομοίωσης του γαστρεντερικού συστήματος. Τα διάφορα προϊόντα τροφίμων που έχουν μελετηθεί ως προς την ενσωμάτωση εγκλεισμένων προβιοτικών βακτηρίων παρουσιάζονται στα επόμενα υποκεφάλαια.

### 3.1. Γαλακτοκομικά προϊόντα με εγκλεισμένα προβιοτικά βακτήρια

#### 3.1.1. Γιαούρτι

Το γιαούρτι ήταν το πρώτο προϊόν τροφίμου που χρησιμοποιήθηκε ως φορέας προβιοτικών βακτηρίων. Για την παραγωγή προβιοτικού γιαουρτιού, πολλοί ερευνητές χρησιμοποιούν συμβατικές καλλιέργειες εκκίνησης (*S. thermophilus* και *Lb. bulgaricus*) και ενσωματώνουν εγκλεισμένα προβιοτικά κύτταρα, με συχνότερα τα προβιοτικά στελέχη *Lb. acidophilus* και *Bifidobacterium spp.*, είτε μαζί με αυτές (Donkor et al. 2007; Ribeiro et al. 2014; Zare et al. 2012), είτε απευθείας στο τελικό προϊόν (Sandoval-Castilla et al. 2010). Η χρήση ελεύθερων προβιοτικών κυττάρων ως καλλιέργειες εκκίνησης ή ως συμπλήρωμα ως προς τις καλλιέργειες εκκίνησης έχει επίσης μελετηθεί. Οι εφαρμογές εγκλεισμένων προβιοτικών βακτηρίων σε προϊόντα γιαουρτιού συνοψίζονται στον Πίνακα 3.1.

Στις περιπτώσεις που χρησιμοποιούνται αποκλειστικά προβιοτικές καλλιέργειες για τη ζύμωση του γάλακτος, τα προϊόντα που προκύπτουν έχουν υποβαθμισμένα ποιοτικά χαρακτηριστικά, καθώς η ανάπτυξη των προβιοτικών βακτηρίων στο γάλα είναι περιορισμένη σε σύγκριση με αυτή των συμβατικών καλλιεργειών εκκίνησης. Ακόμη, έχει παρατηρηθεί ότι η εισαγωγή προβιοτικών βακτηρίων κατά τη ζύμωση του γιαουρτιού μεταβάλλει τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος (Maragkoudakis et al. 2006). Τα προβιοτικά κύτταρα έχουν επίσης χαμηλή βιωσιμότητα κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, λόγω των χαμηλών τιμών pH του προϊόντος (4.2-4.6) (Chen and Chen 2007). Έτσι, προτιμάται η προσθήκη τους ως συμπληρωματικές καλλιέργειες που συμμετέχουν στη διεργασία της ζύμωσης. Η προσθήκη εγκλεισμένων προβιοτικών βακτηρίων σε ενδιάμεση ή τελική φάση της ζύμωσης έχει βρεθεί ότι επηρεάζει ελάχιστα τη γεύση/άρωμα του προκύπτοντος γιαουρτιού και δεν μεταβάλλει την οσμή του (M. Li et al. 2019). Ωστόσο, κατά την αποθήκευση δειγμάτων γιαουρτιού με εγκλεισμένα προβιοτικά βακτήρια, έχει παρατηρηθεί αλλοίωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών τους. Συγκεκριμένα, ενώ ο εγκλεισμός του προβιοτικού στελέχους *Lb. casei* 30-1 σε συνδυασμό με την πρεβιοτική ουσία λακτιτόλη, πριν την εισαγωγή του σε γιαούρτι, βελτίωσε τη βιωσιμότητά του κατά την αποθήκευση ή την παραμονή σε χαμηλές τιμές pH, οι ιδιότητες υφής του γιαουρτιού ήταν υποβαθμισμένες. Ιδιαίτερα έντονο ήταν το φαινόμενο της συναίρεσης, ενώ παρατηρήθηκε και μείωση της σκληρότητας των δειγμάτων 21 ημέρες μετά την αρχική αποθήκευση (H. Li et al. 2020).

Έχει, ακόμη, αναφερθεί ότι η ενσωμάτωση προβιοτικών καλλιεργειών, είτε σε εγκλεισμένη, είτε σε ελεύθερη μορφή τείνει να μειώνει την οξίνιση του προϊόντος κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης και να μεταβάλλει την υφή του γιαουρτιού. Επιπρόσθετα, ο σχηματισμός εξωπολυσακχαριτών από τις προβιοτικές καλλιέργειες παρουσία αλγινικού νατρίου ως εγκλειστικού μέσου και αμύλου υψηλού σε αμυλόζη ως πολυμερούς πλήρωσης συνεισφέρει στην πρόληψη της συναίρεσης και στην αύξηση του ιξώδους, οδηγώντας σε βελτιωμένη αίσθηση στο στόμα. Παρόλα αυτά, η

προσθήκη εγκλεισμένων κυττάρων οδηγεί σε ανεπιθύμητη κοκκώδη αίσθηση (grittiness) στο τελικό προϊόν (Kailasapathy 2006). Στις περιπτώσεις όπου ο εγκλεισμός επιτυγχάνεται μέσω μεθόδων που οδηγούν σε τελικά σφαιρίδια με σχετικά μεγάλη διάμετρο (π.χ. εξώθηση), η παρουσία τους γίνεται αισθητή και το τελικό προϊόν έχει υποβαθμισμένα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά.

Διάφορα προβιοτικά στελέχη έχουν μελετηθεί ως προς την ενσωμάτωσή τους σε προϊόντα γιαουρτιού, συμπεριλαμβανομένων των στελεχών *Lb. casei*, *Lb. acidophilus*, *Lb. rhamnosus*, *B. lactis*, *B. bifidum*, *B. Breve* και *B. longum*. Η επιβίωση ελεύθερων και εγκλεισμένων κυττάρων του στελέχους *Lb. acidophilus* LA-5 σε αναμεμιγμένο γιαούρτι κατά την αποθήκευσή του υπό ψύξη έχει μελετηθεί από τους Ribeiro et al. (2014). Από τον έλεγχο της βιωσιμότητας των προβιοτικών βακτηρίων σε προσομοίωση γαστρεντερικού συστήματος βρέθηκε ότι ο εγκλεισμός ενίσχυσε την προστασία των προβιοτικών κυττάρων. Ταυτόχρονα, η οξύτητα μειώθηκε και το τελικό προϊόν παρουσίασε ικανοποιητικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (Ribeiro et al. 2014). Το προβιοτικό στέλεχος *Lb. casei* έχει εγκλειστεί σε μίγματα αλγινικού-πηκτίνης μέσω εξώθησης και τα τελικά προϊόντα ενσωματώθηκαν σε γιαούρτι χαμηλό σε λιπαρά, δίνοντας εξίσου ικανοποιητικά αποτελέσματα. Παρατηρήθηκε, ότι ο συνδυασμός αλγινικού και πηκτίνης έδωσε καλύτερη προστασία σε σύγκριση με κάθε υλικό μόνο του, με την αναλογία αλγινικού:πηκτίνης 1:6 να οδηγεί σε προϊόντα με τα πιο ικανοποιητικά χαρακτηριστικά υφής, τη μικρότερη σφαιρικότητα εγκλεισμένων προϊόντων και τα υψηλότερα επίπεδα επιβίωσης τόσο κατά την έκθεση σε γαστρικά υγρά και χολικά άλατα, όσο και κατά την αποθήκευση στους 4°C για 20 ημέρες. Ικανοποιητικά αποτελέσματα έχουν προκύψει και κατά τον εγκλεισμό του προβιοτικού στελέχους *B. Breve* σε σφαιρίδια πηκτίνης χαμηλής μεθυλίωσης, όπου η βιωσιμότητα των προβιοτικών κυττάρων βελτιώθηκε τόσο κατά την αποθήκευση, όσο και κατά την παραμονή σε σύστημα προσομοίωσης γαστρεντερικού συστήματος (M. Li et al. 2019).

Προκειμένου να επιτευχθεί βελτίωση της βιωσιμότητας των προβιοτικών βακτηρίων, έχουν μελετηθεί διάφοροι παράγοντες, όπως η προσθήκη ασκορβικού οξέος ή κυστεΐνης ως δεσμευτές οξυγόνου ή η ενσωμάτωση παραγόντων ανάπτυξης των προβιοτικών βακτηρίων μέσα στο γιαούρτι, όπως σκόνης ορού γάλακτος ή πρωτεϊνικού συμπυκνώματος ορού γάλακτος (Maragkoudakis et al. 2006). Η προσθήκη άλλων συστατικών στο προβιοτικό γιαούρτι, όπως χυμού ή πούλπας φρούτου, μπορεί να έχει επιβλαβή επίδραση στα κύτταρα, λόγω της οξύτητας και της παρουσίας αντιμικροβιακών ενώσεων (Bedani et al. 2014; Shori 2015). Αντίθετα, οι πρωτεΐνες γάλακτος είναι ένα οικονομικό και εύκολα διαθέσιμο συστατικό, το οποίο μπορεί να ενισχύσει την ανάπτυξη και τη βιωσιμότητα των προβιοτικών βακτηρίων κατά τη ζύμωση του γάλακτος. Η προσθήκη δημητριακών μπορεί, επίσης, να συνεισφέρει στην ανάπτυξη των βακτηριακών κυττάρων, παρέχοντας μία πηγή υδατανθράκων, πρωτεϊνών, μεταλλικών στοιχείων και βιταμινών. Άλλες ουσίες που

μπορούν να ενισχύσουν την βιωσιμότητα και τη δράση των προβιοτικών βακτηρίων είναι τα πρεβιοτικά, όπως η ινουλίνη και η λακτουλόζη.

### 3.1.2. Τυρί

Το τυρί θεωρείται, επίσης, ένα προϊόν που μπορεί να λειτουργήσει ως φορέας προβιοτικών. Τα βακτήρια μπορούν να ενσωματωθούν στο προϊόν με δύο τρόπους: είτε ως καλλιέργεια εκκίνησης, εφόσον είναι δυνατόν να παράγουν επαρκείς ποσότητες γαλακτικού οξέος, είτε ως συμπληρωματικές καλλιέργειες σε συνδυασμό με την καλλιέργεια εκκίνησης κατά την παραγωγή του τυριού, το οποίο αποτελεί την προτιμότερη εναλλακτική (Shori 2015). Το τυρί Cheddar έχει μελετηθεί εκτενώς ως προϊόν-φορέας προβιοτικών βακτηρίων, λόγω της σχετικά υψηλής τιμής pH του (~5.5) η οποία υποδηλώνει ένα περιβάλλον κατάλληλο για την επιβίωση των βακτηριακών κυττάρων. Επιπρόσθετα, αυτός ο τύπος τυριού παρουσιάζει καλή ρυθμιστική ικανότητα, ενώ το σχετικά υψηλό περιεχόμενό του σε λιπαρά βοηθά στην προστασία των προβιοτικών κυττάρων από την ενζυμική αποικοδόμηση, καθώς επίσης και από το όξινο περιβάλλον του στομάχου (Burgain et al. 2011). Υπάρχουν πολλές μελέτες που αφορούν την απευθείας προσθήκη προβιοτικών βακτηρίων σε Cheddar ή άλλους τύπους τυριών (Vinderola et al. 2009; Gomes et al. 2011; Oliveira et al. 2014; Albenzio et al. 2013; Bezerra et al. 2017; Blaiotta et al. 2017). Παρόλα αυτά, κατά την ωρίμανση και την αποθήκευση του τυριού Cheddar, αυξάνεται η οξύτητα του προϊόντος. Επίσης, η παρουσία και η δράση των οξυγαλακτικών βακτηρίων μπορεί να επηρεάσει αρνητικά τη βιωσιμότητα των προβιοτικών βακτηρίων. Συνεπώς, η επιβίωση των προβιοτικών βακτηρίων υπό αυτές τις συνθήκες κατά την περίοδο της ωρίμανσης (6-12 μήνες) μειώνεται. Για το σκοπό αυτό προτείνεται ο εγκλεισμός των προβιοτικών βακτηρίων (Kailasapathy 2009; Demers-Mathieu et al. 2016).

Σε άλλους τύπους τυριών έχει παρατηρηθεί ότι η ενσωμάτωση εγκλεισμένων προβιοτικών βακτηρίων παρέχει τη δυνατότητα όχι μόνο της ενίσχυσης της βιωσιμότητας των κυττάρων, αλλά και βελτίωσης της γεύσης/αρώματος του προϊόντος (Chen and Chen 2007). Για την επιτυχημένη παραγωγή προβιοτικού τυριού είναι απαραίτητη η επιλογή του σωστού προβιοτικού στελέχους, καθώς και των κατάλληλων συνθηκών παραγωγής, δηλαδή αερόβιου περιβάλλοντος και συγκεκριμένων συνθηκών ωρίμανσης και αποθήκευσης (Shori 2015).

Στα στελέχη που έχουν ενσωματωθεί σε τυροκομικά προϊόντα σε εγκλεισμένη μορφή περιλαμβάνονται τα εξής: *Lb. acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei ssp. paracasei*, *B. bifidum*, *B. longum*, *B. lactis* και *B. adolescentis* και συνοψίζονται στον Πίνακα 3.1. Πιο συγκεκριμένα, οι Ozer et al. (2009) μελέτησαν την ενσωμάτωση των προβιοτικών στελεχών *B. bifidus* BB-12 και *Lb. acidophilus* LA-5 σε λευκό τυρί σε άλμη, είτε σε ελεύθερη είτε σε εγκλεισμένη μορφή. Ο εγκλεισμός επιτεύχθηκε μέσω εξώθησης ή γαλακτωματοποίησης. Οι δύο μέθοδοι συνεισέφεραν σημαντικά στην επιβίωση των κυττάρων και ταυτόχρονα προκάλεσαν το σχηματισμό ακεταλδεϋδης και διακετυλίου και την αύξηση της συγκέντρωσης λιπαρών οξέων μακράς αλύσου. Οι Gardiner et al.

(2002) ενέκλεισαν το στέλεχος *Lb. paracasei* σε άπαχο γάλα μέσω ξήρασης με ψεκάσμο και το χρησιμοποίησαν ως ένα λειτουργικό συμπλήρωμα κατά την παρασκευή προβιοτικού τυριού Cheddar. Το στέλεχος *Lb. paracasei* παρέμεινε σταθερό κατά την αποθήκευση (7 βδομάδες) είτε σε θερμοκρασία δωματίου, είτε υπό ψύξη. Ακόμη, έχει προταθεί η εφαρμογή της μεθόδου των Heidebach et al. (2009), κατά την οποία επιτυγχάνεται εγκλεισμός των προβιοτικών κυττάρων μέσω ζελατινοποίησης των πρωτεϊνών γάλακτος με χρήση πυτιάς, πριν την παρασκευή του τυριού (Clemente 2013; Abd-Elhamid 2012). Σε περίπτωση που ο εγκλεισμός των προβιοτικών βακτηρίων συνδυάζεται με ενσωμάτωση και άλλων ουσιών, π.χ. φυτοστερολών, όπως στην περίπτωση του προβιοτικού στελέχους *L. plantarum*, επιτυγχάνεται ακόμη μεγαλύτερη αύξηση της βιωσιμότητας των προβιοτικών κυττάρων (Sharifi et al. 2021).

### 3.1.3. Επιδόρπια

Καθώς το ενδιαφέρον των καταναλωτών στρέφεται προς ελαφρύτερα και υγιεινότερα επιδόρπια (Shori 2015), η ενσωμάτωση προβιοτικών στελεχών σε τέτοια προϊόντα, όπως σοκολάτα (Possemiers et al. 2010) και μους σοκολάτας (Gul 2017), φαίνεται υποσχόμενη. Τα κρεμώδη επιδόρπια παρέχουν ένα ευνοϊκό περιβάλλον για την επιβίωση των προβιοτικών βακτηρίων, καθώς οι τιμές pH αυτών των προϊόντων είναι υψηλότερες του 6.0, το ποσοστό υγρασίας τους είναι άνω του 60% ενώ δεν περιέχουν μικροοργανισμούς-ανταγωνιστές των προβιοτικών βακτηρίων (Valencia et al. 2016). Η σοκολάτα (Kemsawasd et al. 2016; Klindt-Toldam et al. 2016; Lalicic-Petronijevic et al. 2015; M. P. Silva et al. 2017; Yonejima et al. 2015) και τα επιδόρπια σοκολάτας (Aragon-Alegro et al. 2007; Valencia et al. 2016) είναι πλούσια σε λιπαρά, και, έτσι, είναι κατάλληλοι φορείς για προβιοτικά βακτήρια, χωρίς να απαιτείται απαραίτητα ο εγκλεισμός τους. Τα στελέχη *Lb. acidophilus* και *B. lactis* έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως (Klindt-Toldam et al. 2016; Lalicic-Petronijevic et al. 2015; M. P. Silva et al. 2017), ενώ έχουν, επίσης, δοκιμαστεί τα στελέχη *Lb. casei* (Kemsawasd et al. 2016), *Lb. paracasei ssp. Paracasei* (Aragon-Alegro et al. 2007; Valencia et al. 2016) και *Lb. brevis ssp. Coagulans* (Yonejima et al. 2015). Παρόλα αυτά, σύμφωνα με τους Possemiers et al. (2010), ο συνδυασμός της τεχνολογίας του εγκλεισμού με την επικάλυψη σοκολάτας θα μπορούσε να είναι ιδανική λύση για την προστασία των προβιοτικών κυττάρων από το περιβαλλοντικό στρες ή κατά τη διέλευσή τους από το στομάχι ή το λεπτό έντερο. Αντίστοιχα, το στέλεχος *Lb. casei* εμφάνισε υψηλότερα ποσοστά επιβίωσης σε εγκλεισμένη μορφή αντί της ελεύθερης μορφής κατά την εισαγωγή του σε μους σοκολάτας (Gul 2017). Μεγάλη διάρκεια ζωής επιτεύχθηκε και στην περίπτωση εγκλεισμού μίγματος προβιοτικών στελεχών (*Lb. acidophilus* LH5, *S. thermophilus* ST3, *B. breve* BR2) πριν την ενσωμάτωση σε σοκολάτα. Κατά τη διάρκεια 360 ημερών αποθήκευσης, το συνολικό βακτηριακό φορτίο παρέμεινε πάνω από 8-9 logcfu/g. Παρατηρήθηκε, μάλιστα, ότι η χρήση μιγμάτων προβιοτικών στελεχών προσφέρει το πλεονέκτημα αντιστάθμισης της απώλειας βιωσιμότητας ενός συγκεκριμένου στελέχους με την παρουσία των υπολοίπων στελεχών. Με τον τρόπο

αυτό το προβιοτικό φορτίο παραμένει σε υψηλότερα όρια στο τελικό προϊόν σε σύγκριση με άλλα προϊόντα στα οποία περιέχεται αποκλειστικά και μόνο ένα προβιοτικό στέλεχος (Laličić-Petronijević et al. 2017).

Στην περίπτωση ενσωμάτωσης σε κατεψυγμένα γαλακτοκομικά επιδόρπια, τα προβιοτικά βακτήρια εκτίθενται σε συνθήκες μεγάλης οξύτητας, υψηλής ωσμωτικής πίεσης και καταπόνησης από την κατάψυξη (Chen and Chen 2007). Το παγωτό, συγκεκριμένα, φαίνεται ιδανικός φορέας προβιοτικών βακτηρίων καθώς αποθηκεύεται σε χαμηλές θερμοκρασίες, οι τιμές pH του είναι κοντά στο 7 και τα επίπεδα συνολικών στερεών υψηλά (Cruz et al. 2009). Παρόλα αυτά, η βιωσιμότητα των προβιοτικών βακτηρίων σε τέτοιο προϊόν είναι περιορισμένη, λόγω των απωλειών που λαμβάνουν χώρα κατά το στάδιο της παρασκευής ή της κατάψυξής του, καθώς και από άλλους εγγενείς παράγοντες, όπως οι υψηλές οξειδοαναγωγικές τιμές και η τοξικότητα του οξυγόνου. Το προβιοτικό παγωτό μπορεί να παραχθεί είτε με απευθείας εμβολιασμό του μίγματος των προβιοτικών βακτηρίων, είτε με ανάμιξη με acidified milk or probiotic yogurt (Soukoulis et al. 2010). Πολλοί ερευνητές έχουν ενσωματώσει προβιοτικά στελέχη, συμπεριλαμβανομένων των *Lb. acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. johnsonii*, *Lb. rhamnosus* και *B. lactis*, σε προϊόντα παγωτού, χωρίς να προηγηθεί εγκλεισμός, επιτυγχάνοντας ικανοποιητικά ποσοστά επιβίωσης (Akin et al. 2007; Alamprese et al. 2002; Di Criscio et al. 2010; Farias et al. 2019). Τα στελέχη *Lb. casei*, *Lb. acidophilus* και *B. lactis* έχουν ενσωματωθεί και σε εγκλεισμένη μορφή. Συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί ότι ο εγκλεισμός των στελεχών *Lb. acidophilus* και *B. animalis* σε παγωτό οδήγησε σε υψηλότερα ποσοστά επιβίωσης σε σχέση με τα αντίστοιχα σε προϊόντα γιαουρτιού (Ranadheera et al. 2012). Η ενίσχυση των σφαιριδίων, δε, με πρεβιοτικές ουσίες, όπως το ανθεκτικό άμυλο, είχε ως αποτέλεσμα αυξημένη βιωσιμότητα των προβιοτικών βακτηρίων Homayouni et al. (2008). Αντίθετα, άλλες έρευνες έχουν δείξει ότι δεν υπάρχει κάποια διαφοροποίηση όσον αφορά τη βιωσιμότητα των προβιοτικών βακτηρίων κατά την ενσωμάτωσή τους σε προϊόντα παγωτού είτε σε εγκλεισμένη, είτε σε ελεύθερη μορφή (Kailasapathy and Sultana (2003) (Πίνακας 3.1).

**Πίνακας 3.1: Εφαρμογή εγκλεισμένων προβιοτικών βακτηρίων σε γαλακτοκομικά προϊόντα.**

Προβιοτικό στέλεχος	Μέθοδος εγκλεισμού	Εγκλειστικό μέσο	Προϊόν	Αρχικό βακτηριακό φορτίο (cfu/g) / Ποσοστό επιβίωσης (%)	Συνθήκες αποθήκευσης	Αναφορές
<i>Lb. acidophilus</i> LA-5	Ξήρανση με ψεκασμό	Αραβικό κόμμα, Πρωτεΐνη ορού	Γιαούρτι	5.4E+08 / 97.1%	4°C, 28 d	(Leylak et al. 2021)
<i>B. lactis</i> BB-12	Ξήρανση με ψεκασμό	Αραβικό κόμμα, ινουλίνη		7.1E+06 / 97%	4°C, 30 d	(Pinto et al. 2019)
<i>Lb. casei</i>	Ξήρανση με ψεκασμό	Άπαχο γάλα		5.4E+08 / 91.4%	4°C, 28 d	(Dimitrellou et al. 2016)
<i>Lb. casei</i> <i>Lb. acidophilus</i> <i>B. lactis</i>	Εξώθηση	Αλγινικό νάτριο-εκχυλίσματα βοτάνων Ταϊλάνδης		~1E+09 / ~46-67%	4°C, 30 d	(Chaikham 2015)
<i>Lb. acidophilus</i>	Ιονική ζελατινοποίηση και σχηματισμός συμπλόκων	Πηκτίνη-βούτυρο, χλωριούχο ασβέστιο, WPC <sup>1</sup>		1,8E+07 / 62%	4°C, 35 d	(Ribeiro et al. 2014)
<i>Lb. casei</i>	Εξώθηση	Αλγινικό νάτριο, αμιδιωμένη πηκτίνη		~1E+09 / 45-83%	4°C, 20 d	(Sandoval-Castilla et al. 2010)
<i>Lb. acidophilus</i> <i>Lb. casei</i> <i>B. bifidum</i>	Εξώθηση	Αλγινικό νάτριο, χιτοζάνη		4E+09 / 62-97%	4°C, 28 d	(Wunwisa Krasaekoopt, Bhandari, and Deeth 2006)
<i>Lb. acidophilus</i> <i>B. lactis</i>	Γαλακτωματοποίηση	Αλγινικό νάτριο, άμυλο Hi-Maize		3.2E+07/ 73,3%	4°C, 7 wk	(Kailasapathy 2006)
<i>B. longum</i>	Γαλακτωματοποίηση	κ-καραγενάνη		1.5E+09 / 98%	4°C, 30 d	(Adhikari et al. 2000)
<i>Lb. casei</i> <i>Lb. acidophilus</i>	Εξώθηση	Αλγινικό νάτριο, ινουλίνη ή GOS <sup>2</sup> , χιτοζάνη		1.6E+09-2E+10/ 73.3-90.2%	4°C, 28 d	(W. Krasaekoopt and Watcharapoka 2014)

<sup>1</sup>WPC: Whey protein concentrate, συμπύκνωμα πρωτεΐνης ορού, <sup>2</sup>GOS: Galactooligosaccharides, γαλακτοολιγοσακχαρίτες.

Πίνακας 3.1 (συνέχεια)

Προβιοτικό στέλεχος	Μέθοδος εγκλεισμού	Εγκλειστικό μέσο	Προϊόν	Αρχικό βακτηριακό φορτίο (cfu/g) / Ποσοστό επιβίωσης (%)	Συνθήκες αποθήκευσης	Αναφορές
<i>Lb. acidophilus</i> <i>Lb. casei</i> <i>Lb. rhamnosus</i> <i>Bifidobacterium spp</i>	Γαλακτωματοποίηση	Αλγινικό νάτριο, άμυλο Hi-Maize, FOS <sup>1</sup> , ινουλίνη	Λυοφυλιωμένο γιαούρτι	8.5E+08 / 97 and 76%, respectively	4°C and 21°C, 180 d	(Capela, Hay, and Shah 2006)
<i>Lb. plantarum</i> ATCC 8014	Σχηματισμός συμπλόκων & Ξήρανση με ψεκασμό	Αραβικό κόμμα, πηκτίνη, WPI <sup>2</sup> , φυτοστερόλες	Ιρανικό λευκό τυρί	δ.α. / 60.52%	4°C, 60 d	(Sharifi et al. 2021)
<i>Lb. plantarum</i> ATCC 8014	Σχηματισμός συμπλόκων & Ξήρανση υπό κατάψυξη	Αραβικό κόμμα, πηκτίνη, WPI <sup>2</sup> , φυτοστερόλες	Ιρανικό λευκό τυρί	δ.α. / 82.03%	4°C, 60 d	(Sharifi et al. 2021)
<i>Lb. rhamnosus</i>	Πρόσκρουση αιωρημάτων	Αλγινικό νάτριο	Τυρί κρέμα	1.3E+07-4.1E+07 / 87.1%-99%	4°C, 35 d	(Ningtyas et al. 2019)
<i>B. adolescentis</i>	Γαλακτωματοποίηση	Άπαχο γάλα, πυτιά	Τυρί Kariesh	1E+09 / 89%	9°C, 14 d	(Abd-Elhamid 2012)
<i>Lb. acidophilus</i> <i>B. bifidum</i>	Εξώθηση	Αλγινικό νάτριο	Λευκό τυρί σε άλμη	1E+09-2.6E+10/ 9-16%	4°C, 90 d	(Ozer et al. 2009)
	Γαλακτωματοποίηση	κ-καραγενάνη		2.9E+09-1.8E+10 / 14-15%	4°C, 90 d	

<sup>1</sup>FOS: Fructooligosaccharides, φρουκτοολιγοσακχαρίτες.

<sup>2</sup>WPI: Whey protein isolate, υπερσυμπύκνωμα πρωτεΐνης ορού γάλακτος.



Πίνακας 3.1 (συνέχεια)

Προβιοτικό στέλεχος	Μέθοδος εγκλεισμού	Εγκλειστικό μέσο	Προϊόν	Αρχικό βακτηριακό φορτίο (cfu/g) / Ποσοστό επιβίωσης (%)	Συνθήκες αποθήκευσης	Αναφορές
<i>Lb. paracasei ssp. paracasei</i>	Εξώθηση	Αλγινικό νάτριο	Μοτσαρέλα	5.4E+08 / 96.2%	4°C, 42 d	(Ortakci et al. 2012)
<i>Lb. acidophilus B. lactis</i>	Γαλακτωματοποίηση	Αλγινικό νάτριο- άμυλο Hi-Maize	Παγωτό	~1E+09 / 70-75%	-5°C, 24 wk	(Kailaspathy and Sultana 2003)
<i>Lb. casei B. lactis</i>	Γαλακτωματοποίηση	Αλγινικό νάτριο- άμυλο Hi-Maize	Παγωτό	5.8-6.1E+09 / 86-93%	-20°C, 180 d	(Homayouni et al. 2008)
<i>Lb. rhamnosus ASCC 290, Lb. casei ATCC 334</i>	Εξώθηση	Αλγινικό νάτριο-χιτοζάνη	Παγωτό	3.5-4.2E+09 / 84.3-89.0%	-18°C, 150 d	(Farias et al. 2019)

### 3.2. Μη γαλακτοκομικά προϊόντα με εγκλεισμένα προβιοτικά βακτήρια

Τα μη γαλακτοκομικά προϊόντα με εγκλεισμένα προβιοτικά βακτήρια, όπως οι χυμοί φρούτων, τα επιδόρπια, η μαγιονέζα, το βούτυρο, τα προϊόντα κρέατος και τα αρτοσκευασμάτα αποτελούν μία ενδιαφέρουσα εναλλακτική επιλογή για κατανάλωση προβιοτικών βακτηρίων από άτομα με δυσανεξία στη λακτόζη ή αλλεργία στο γάλα. Παρόλα αυτά, υπάρχουν διάφοροι παράγοντες που κάνουν την ενσωμάτωση των προβιοτικών βακτηρίων αρκετά δύσκολη, όπως η οξύτητα του προϊόντος (pH), τα επίπεδα οξυγόνου, η έλλειψη θρεπτικών συστατικών και η παρουσία αντιμικροβιακών ουσιών στο προϊόν. Έχουν αναφερθεί αρκετά προβιοτικά στελέχη τα οποία είναι ικανά να επιβιώσουν σε ζυμωμένα ή μη ροφήματα, συμπεριλαμβανομένων των *Lb. acidophilus*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei*, *Lb. plantarum*, *Lb. reuteri*, *Lb. delbruecki*, *Lb. brevis*, *B. bifidum* και *B. lactis* (Shori 2015). Προκειμένου να ενισχυθεί η επιβίωση των προβιοτικών στελεχών σε τέτοια όξινα και αντίξοα περιβάλλοντα, έχει προταθεί ο εγκλεισμός τους μέσω εξώθησης, ξήρανσης με ψεκασμό ή διπλού αερολύματος (double aerosol), καθώς επίσης και η ενσωμάτωση πρεβιοτικών ουσιών, όπως εκχυλίσματα βοτάνων, ινουλίνη ή GOS, στα προϊόντα εγκλεισμού. Οι Chaikham (2015) εφάρμοσαν τη μέθοδο της εξώθησης για να εγκλείσουν τα προβιοτικά στελέχη *Lb. casei*, *Lb. acidophilus* και *B. Lactis* BB-12 μαζί με εκχυλίσματα Ταϊλανδικών βοτάνων, προκειμένου να ενισχύσουν τη βιωσιμότητα των προβιοτικών κυττάρων. Τα προκύπτοντα σφαιρίδια χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια για την παρασκευή προβιοτικών χυμών φρούτων. Η προσθήκη των εκχυλισμάτων βοτάνων αύξησε τη βιωσιμότητα των κυττάρων κατά την αποθήκευση (30 ημέρες στους 4°C), με μεγαλύτερα ποσοστά επιβίωσης να παρατηρούνται στα προβιοτικά στελέχη *Lb. casei* και *B. Lactis* BB-12 σε σύγκριση με το προβιοτικό στέλεχος *Lb. acidophilus*. Εξίσου αποτελεσματική έχει βρεθεί και η ενσωμάτωση ινουλίνης σε σφαιρίδια με εγκλεισμένα μέσω εξώθησης κύτταρα του προβιοτικού στελέχους *Lb. rhamnosus* GG. Τα συγκεκριμένα σφαιρίδια ενσωματώθηκαν σε χυμό μήλου χωρίς να μεταβληθούν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του χυμού, και παρατηρήθηκαν 4.5 φορές υψηλότερα ποσοστά επιβίωσης των εγκλεισμένων προβιοτικών βακτηρίων κατά την αποθήκευση στους 4°C ή 25°C για 90 ημέρες σε σύγκριση με των ελεύθερων βακτηρίων (Gandomi et al. 2016). Αντίστοιχη ενίσχυση βιωσιμότητας παρατηρήθηκε και κατά την προσθήκη ινουλίνης ή GOS σε διάφορες αναλογίες στο εγκλειστικό μίγμα που χρησιμοποιήθηκε για τον εγκλεισμό των στελεχών *Lb. acidophilus* και *Lb. casei* μέσω εξώθησης. Τα καλύτερα αποτελέσματα επιτεύχθηκαν με την προσθήκη GOS (W. Krasaekoort and Watcharapoka 2014). Οι εφαρμογές εγκλεισμένων προβιοτικών βακτηρίων σε ποτά περιλαμβάνονται στον Πίνακα 3.2.

Τα προβιοτικά βακτήρια έχουν, επίσης, ενσωματωθεί σε τρόφιμα πλούσια σε λιπαρά, χωρίς να έχει προηγηθεί εγκλεισμός αυτών, καθώς τα λιπαρά φαίνονται να

προστατεύουν τα προβιοτικά βακτήρια από αντίξοες συνθήκες. Έτσι, το βούτυρο (Erkaya et al. 2015) και το φυστικοβούτυρο (Klu et al. 2014; Klu and Chen 2015) έχουν αναφερθεί ως κατάλληλοι φορείς για προβιοτικά βακτήρια όπως τα στελέχη *Lb. acidophilus* και *B. bifidum* (Erkaya et al. 2015), καθώς και για εμπορικά μίγματα προβιοτικών στελεχών (Klu et al. 2014; Klu and Chen 2015).

Άλλα προϊόντα τροφίμων στα οποία έχει γίνει ενσωμάτωση προβιοτικών βακτηρίων είναι η μαγιονέζα (Khalil and Mansour 1998) και τα προϊόντα κρέατος (Kearney et al. 1990; Pérez-Chabela et al. 2013), κυρίως ζυμωμένα λουκάνικα (Πίνακας 3.2). Τα προϊόντα ζύμωσης κρέατος θεωρούνται κατάλληλοι φορείς για προβιοτικά βακτήρια, λόγω της πιθανής απουσίας θερμικής επεξεργασίας και του προστατευτικού ρόλου του φορέα κατά τη διέλευση από το γαστρεντερικό σύστημα. Η ζύμωση μπορεί να διευκολυνθεί από ένα μεγάλο πλήθος μικροβιακών κυττάρων, όπως βακτήρια, ζύμες και μύκητες. Τα γαλακτικά βακτήρια, και συγκεκριμένα τα στελέχη *Lb. acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. fermentum*, *Lb. gasseri*, *Lb. paracasei*, *Lb. plantarum*, *Lb. reuteri*, *Lb. rhamnosus*, *B. animalis*, *B. lactis* και *P. pentosaceus*, μπορούν να χρησιμοποιηθούν με επιτυχία στη ζύμωση προϊόντων κρέατος καθώς προσαρμόζονται εύκολα σε τέτοιο περιβάλλον. Παρόλα αυτά, η παρουσία προβιοτικών καλλιέργειών μπορεί να οδηγήσει σε ανεπιθύμητες μεταβολές στα φυσικοχημικά ή οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του προϊόντος, ανάλογα με το στέλεχος και τις προβιοτικές ή/και συμβατικές καλλιέργειες εκκίνησης που προστίθενται. Αυτό μπορεί να αποφευχθεί με αύξηση της θερμοκρασίας ζύμωσης όταν χρησιμοποιείται και προβιοτική καλλιέργεια, καθώς συνεισφέρει σε επιθυμητές μεταβολές των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών (Pasqualin Cavalheiro et al. 2015). Ο εμπλουτισμός προϊόντων κρέατος με προβιοτικά βακτήρια στοχεύει επίσης στην παροχή αντιμικροβιακής προστασίας του προϊόντος. Παρόλα αυτά, ο εγκλεισμός των προβιοτικών κυττάρων προτείνεται σε αυτήν την περίπτωση καθώς άλλοι παράγοντες μπορεί να επηρεάσουν τη βιωσιμότητα των κυττάρων αρνητικά, όπως οι χαμηλές τιμές pH και ενεργότητας νερού και ανταγωνιστικοί μικροοργανισμοί (De Prisco and Mauriello 2016). Η ακινητοποίηση των προβιοτικών κυττάρων σε λυοφιλιωμένα σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου μελετήθηκε αρχικά από τους Kearney et al. (1990). Πολλά χρόνια αργότερα, οι Muthukumarasamy & Holley (2006) ενέκλεισαν το στέλεχος *Lb. reuteri* μέσω εξώθησης ή διπλής γαλακτωματοποίησης και στη συνέχεια ενσωμάτωσαν τα τελικά σφαιρίδια σε ζυμωμένα προϊόντα κρέατος. Τα τεχνολογικά χαρακτηριστικά των προϊόντων με εγκλεισμένα βακτήρια ήταν παρεμφερή με αυτά των συμβατικών προϊόντων και η βιωσιμότητα των προβιοτικών βακτηρίων αυξημένη (Muthukumarasamy and Holley 2006). Παρόλα αυτά, η έρευνα σε αυτό το πεδίο είναι ακόμη περιορισμένη.

Επιπλέον, η ενσωμάτωση προβιοτικών βακτηρίων σε αρτοσκευάσματα αποτελεί ένα νέο πεδίο που έχει διερευνηθεί ελάχιστα και μάλιστα με περιορισμένη επιτυχία μέχρι σήμερα. Τα προϊόντα που έχουν μελετηθεί περιλαμβάνουν ψωμί, καθώς και σουφλέ σοκολάτας ή κέικ με γέμιση κρέμας (Πίνακας 3.2). Τα βασικά προβλήματα που

προκύπτουν σε τέτοιου είδους προϊόντα είναι οι υψηλές θερμοκρασίες που σχετίζονται με το ψήσιμο και ο μεγάλος χρόνος ζωής ορισμένων παρόμοιων προϊόντων (π.χ. μπισκότα). Άλλες δυσκολίες σχετίζονται με τις σύνθετες χημικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα εντός του τροφίμου-φορέα, όπως οι μεταβολές του pH ή της ενεργότητας νερού, η παραγωγή αιθανόλης και οι αντιδράσεις Maillard (De Prisco and Mauriello 2016). Η έρευνα γύρω από τον εμπλουτισμό αρτοσκευασμάτων πριν το ψήσιμό τους με ελεύθερα προβιοτικά κύτταρα (*B. lactis*) είναι περιορισμένη, χωρίς ικανοποιητικά αποτελέσματα, καθώς τα επίπεδα επιβίωσης μετά το ψήσιμο είναι ιδιαίτερα χαμηλά (Zhang et al. 2014). Από την άλλη πλευρά, ο εγκλεισμός φαίνεται να αποτελεί μία υποσχόμενη λύση, αλλά δεν έχει ακόμη μελετηθεί εκτενώς σε αρτοσκευάσματα. Η προσθήκη προβιοτικών καλλιιεργειών σε τέτοιου είδους προϊόντα μπορεί να επιτευχθεί με τρεις τρόπους: εφαρμογή στην επιφάνεια του προϊόντος (Altamirano-Fortoul et al. 2012; Soukoulis et al. 2014), απευθείας μέσα στο ζυμάρι (Malmo et al. 2013; A. A. Reid et al. 2007) ή σε κρέμες που χρησιμοποιούνται για γέμιση του αρτοσκευάσματος (Zanjani, et al. 2012). Η πρώτη τεχνική έχει εφαρμοστεί στα στελέχη *Lb. rhamnosus* και *Lb. Acidophilus*. Οι Altamirano-Fortoul et al. (2012) εφάρμοσαν διαφορετικές επικαλύψεις, εμπλουτισμένες με εγκλεισμένα κύτταρα του στελέχους *Lb. acidophilus*, πάνω στην επιφάνεια προψημένων άρτων και επέτυχαν ποσοστά επιβίωσης γύρω στο 63% μετά το ψήσιμο και 10% μετά από αποθήκευση 24 h. Από την άλλη πλευρά, οι Soukoulis et al. (2014) χρησιμοποίησαν διαλύματα που περιείχαν το στέλεχος *Lb. rhamnosus* GG για το σχηματισμό μεμβρανών, τα εφάρμοσαν πάνω στην επιφάνεια ψημένου τηγανόψωμου και παρατήρησαν σημαντικές απώλειες βιωσιμότητας κατά τις πρώτες 24 h, μικρές απώλειες βιωσιμότητας τις επόμενες 2-3 ημέρες και ανάπτυξη βακτηρίων τις τελευταίες ημέρες αποθήκευσης (4η-7η ημέρα). Η απευθείας ενσωμάτωση προβιοτικών κυττάρων στο ζυμάρι έχει μελετηθεί για τα στελέχη *Lb. rhamnosus* και *Lb. reuteri* σε μπισκότα και σουφλέ σοκολάτας, αντίστοιχα. Και στις δύο περιπτώσεις, τα ποσοστά επιβίωσης ήταν χαμηλά, αλλά σημαντικά υψηλότερα από τα αντίστοιχα των ελεύθερων προβιοτικών βακτηρίων (Malmo et al. 2013; A. A. Reid et al. 2007). Μία άλλη προσέγγιση προτάθηκε από τους Zanzani et al. (2012), οι οποίοι πρόσθεσαν σε έτοιμα ψημένα κέικ γέμιση κρέμας εμπλουτισμένης με εγκλεισμένα προβιοτικά βακτήρια. Αυτή η μέθοδος ήταν επιτυχής, καθώς επιτεύχθηκε υψηλή βιωσιμότητα προβιοτικών βακτηρίων μέσω του εγκλεισμού, ενώ ο εμπλουτισμός των σφαιριδίων με άμυλο Hi-Maize οδήγησε σε ακόμη υψηλότερα ποσοστά επιβίωσης (Zanjani, et al. 2012).

Πίνακας 3.2: Εφαρμογή εγκλεισμένων προβιοτικών βακτηρίων σε μη γαλακτοκομικά προϊόντα.

Προβιοτικό στέλεχος	Μέθοδος εγκλεισμού	Εγκλειστικό μέσο	Προϊόν	Αρχικό βακτηριακό φορτίο (cfu/g) / Ποσοστό επιβίωσης (%)	Συνθήκες αποθήκευσης	Πηγή
<i>Lb. casei</i> <i>Lb. acidophilus</i> <i>B. lactis</i>	Εξώθηση	Αλγινικό νάτριο, εκχυλίσματα βοτάνων	Φρουτοχυμός	~1E+09 / 33.7-78.9%	4°C, 30 d	(Chaikham 2015)
<i>Lb. rhamnosus</i> GG	Εξώθηση	Αλγινικό νάτριο, ινουλίνη, χιτοζάνη	Χυμός μήλο	δ.α. <sup>1</sup> / ~80%	4°C και 25°C, 90 d	(Gandomi et al. 2016)
<i>Lb. casei</i> <i>Lb. acidophilus</i>	Εξώθηση	Αλγινικό νάτριο, ινουλίνη ή GOS, χιτοζάνη	Χυμός πορτοκάλι	2E+08-2.5E+09 / 81.9-97.6%	4°C, 28 d	(W. Krasaekoopt and Watcharapoka 2014)
<i>Lb. rhamnosus</i> <i>Lb. acidophilus</i>	Μέθοδος διπλού αερολύματος	Αλγινικό νάτριο	Χυμός πορτοκάλι	2E+07-2.5E+08, 0-92% και 34.5-100%	4°C, 28 d και 25°C, 12 d	(Sohail et al. 2012)
<i>B. bifidum</i> DI <i>B. infantis</i> 4038	Εξώθηση	Αλγινικό νάτριο	Μαγιονέζα	7.9E+08-1.6E+09, 37.6-43.1%	4°C, 16 wk	(Khalil and Mansour 1998)
<i>L. acidophilus</i>	Λυοφυλίωση	κ-καραγενάνη, ινουλίνη	Μπάρα σόγιας	5E+08 / 100% και 66.7%	4°C και 25°C, 14 wk	(M. Chen and Mustapha 2012)
<i>Lb. acidophilus</i>	Ξήρανση με ψεκάσμο	WPI <sup>2</sup> , CMC <sup>3</sup> , πηκτίνη, ινουλίνη, σιρόπι αγάβης	Ψωμί	2.40-3.05E+07 / 84.4%	Θερμοκρασία περιβάλλοντος, 24 h	(Altamirano-Fortoul et al. 2012)
<i>Lb. rhamnosus</i>	Μεμβράνες	Αλγινικό νάτριο, πρωτεΐνες ορού	Τηγανόψωμο	7.9E+06-2E+08 / 15.9-76.3%	Θερμοκρασία περιβάλλοντος, 7 d	(Soukoulis et al. 2014)
<i>Lb. rhamnosus</i>	Εξώθηση	WPI	Μπισκότα	4.5E+05 / <35%	23°C, 3 wk	(Reid et al. 2007)
<i>Lb. casei</i>	Γαλακτωματοποίηση	Αλγινικό νάτριο, ανθεκτικό άμυλο	Κέικ με γέμιση	5E+11 / 61.1-71.5% και 52.1-64.3%	4°C και 25°C, 28 d	(Mohammad Ali Khosravi Zanjani, et al. 2012)

<sup>1</sup> δ.α.: δεν αναφέρεται, <sup>2</sup> WPI: Whey protein isolate, Υπερσυμπύκνωμα πρωτεϊνών ορού γάλακτος, <sup>3</sup> CMC: Carboxy methyl cellulose, Καρβοξυ μεθυλο κυτταρίνη

## 4. Πειραματικό Μέρος

### 4.1. Σκοπός

Τα προβιοτικά βακτήρια έχουν σύνθετες απαιτήσεις σε θρεπτικά συστατικά και είναι ευαίσθητα σε στρες προερχόμενο από το περιβάλλον. Έτσι, κατά την ανάπτυξη ενός νέου προϊόντος με ενσωματωμένα προβιοτικά βακτήρια, η απώλεια της βιωσιμότητάς τους είναι ένα ζήτημα μείζονος σημασίας. Ο σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι η ενίσχυση της βιωσιμότητας του προβιοτικού στελέχους *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 κατά την διατήρησή του σε ψύξη ή κατάψυξη, κατά την ενσωμάτωσή του σε προϊόντα τροφίμων όπως και κατά τη διέλευσή του από το γαστρεντερικό σύστημα.

Η τεχνολογία του εγκλεισμού εφαρμόζεται ήδη στη βιομηχανία τροφίμων και φαρμακευτικών προϊόντων με σκοπό την προστασία των βιοδραστικών συστατικών από αντιδράσεις οξείδωσης ή αλληλεπίδρασης με άλλα συστατικά των τροφίμων, και συνεπώς την ευκολία ενσωμάτωσης των συστατικών αυτών σε προϊόντα τροφίμων. Αντικείμενο της διδακτορικής διατριβής είναι η διερεύνηση της δυνατότητας εγκλεισμού του προβιοτικού στελέχους *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 σε μίγματα υδροκολλοειδών και άλλων υλικών πριν την ενσωμάτωσή του σε προϊόν τροφίμου, και συγκεκριμένα σε ζυμωμένο προϊόν γάλακτος (γιαούρτι), και η μελέτη των παρεχόμενων οφελών του εγκλεισμού στη βιωσιμότητα των προβιοτικών κυττάρων κατά την έκθεσή τους σε διάφορες συνθήκες. Ταυτόχρονα διερευνάται η επίδραση της ενσωμάτωσης εγκλεισμένων προβιοτικών βακτηρίων στη διεργασία της ζύμωσης του γάλακτος προς γιαούρτι και στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος (προβιοτικού γιαουρτιού).

Οι βασικοί άξονες της διδακτορικής διατριβής καθορίστηκαν με βάση τα υπάρχοντα βιβλιογραφικά δεδομένα. Συγκεκριμένα, επιλέχθηκαν οι μέθοδοι και τα υλικά εγκλεισμού, το προς εγκλεισμό προβιοτικό στέλεχος και το σύστημα τροφίμου στο οποίο θα γίνει η ενσωμάτωση των εγκλεισμένων προβιοτικών βακτηρίων. Όσον αφορά την επιλογή των μεθόδων εγκλεισμού έγινε με βάση τεχνολογικά κριτήρια, την ευκολία εκτέλεσης και το κόστος εφαρμογής τους. Για το σκοπό αυτό, επιλέχθηκε ο εγκλεισμός μέσω εξώθησης ή γαλακτωματοποίησης, ενώ εφαρμόστηκε και συνδυασμός της εξώθησης με  $v_1/\epsilon/v_2$  διπλό γαλάκτωμα. Για την παρασκευή των μιγμάτων εγκλεισμού επιλέχθηκαν συμβατικά και καινοτόμα υλικά. Η επιλογή του προβιοτικού στελέχους *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 αιτιολογείται, με βάση όσα έχουν προαναφερθεί περί αυτού, από τα πολλαπλά οφέλη του στην υγεία του ξενιστή και από την ευρεία εμπορική του χρήση σε ελεύθερη μορφή σε προϊόντα τροφίμων.

Το πρώτο μέρος της διατριβής περιλαμβάνει τη μελέτη εγκλεισμού του προβιοτικού στελέχους BB-12 μέσω της τεχνικής της εξώθησης σε έναν αριθμό μιγμάτων εγκλειστικών μέσων που έχουν ως βάση το αλγινικό νάτριο. Τα επιλεγμένα προς δοκιμή υλικά είναι, είτε συμβατικά όπως πηκτίνη, σκόνη ορού γάλακτος, κόμμι ξανθάνης, κ-καραγενάνη και γλυκερόλη, είτε καινοτόμα υλικά όπως το CNC (cellulose

nanocrystalline). Κατά τον εγκλεισμό των προβιοτικών κυττάρων θεωρήθηκε ενδιαφέρον να εξεταστεί, επίσης, η χρήση της πρεβιοτικής ουσίας ινουλίνης, με σκοπό την ενίσχυση της βιωσιμότητας των κυττάρων. Επιπρόσθετα, θεωρήθηκε χρήσιμο να εξεταστεί η ενσωμάτωση γλυκόζης ή L-κυστεΐνης-HCl στα παραπάνω εγκλειστικά μίγματα, καθώς και η χρήση πλήρους γάλακτος κατά την παρασκευή του διαλύματος των εγκλειστικών μέσων, με σκοπό την περαιτέρω ενίσχυση της βιωσιμότητας των προβιοτικών βακτηρίων. Η αξιολόγηση των πειραμάτων μετά το πέρας του εγκλεισμού, γίνεται με βάση την απόδοση εγκλεισμού (encapsulation yield, EY%) σε κάθε περίπτωση, μέσω μικροβιολογικών αναλύσεων. Για τα προκύπτοντα σφαιρίδια (προϊόντα εγκλεισμού) θεωρήθηκε σκόπιμο να εξεταστεί, επίσης, η δυνατότητα διατήρησής τους σε συνθήκες ψύξης ή κατάψυξης (στους 4°C και στους -18°C) και να μελετηθεί η μεταβολή της βιωσιμότητας των εγκλεισμένων προβιοτικών κυττάρων ανάλογα με τις συνθήκες αποθήκευσης όπως και κατά την έκθεσή τους σε συνθήκες προσομοίωσης του γαστρεντερικού συστήματος (πέψης). Παράλληλα, σημαντική συνεισφορά στη μελέτη έχει και η εξέταση της μορφολογίας των προκύπτοντων σφαιριδίων με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM).

Το δεύτερο μέρος της διατριβής περιλαμβάνει τη μελέτη του εγκλεισμού του προβιοτικού στελέχους BB-12 μέσω της τεχνικής της γαλακτωματοποίησης. Ως μέσα εγκλεισμού επιλέχθηκαν να δοκιμαστούν τα εγκλειστικά μίγματα με βάση τα καλύτερα αποτελέσματα που προέκυψαν από το πρώτο μέρος της διδακτορικής διατριβής (για τη μέθοδο εγκλεισμού μέσω εξώθησης). Έτσι, για τους παραπάνω λόγους, τα υλικά εγκλεισμού προς δοκιμή ήταν πηκτίνη, σκόνη ορού γάλακτος, κόμμα ξανθάνης, κ-καραγενάνη, γλυκερόλη και CNC. Η γλυκόζη, λόγω της σημαντικής συνεισφοράς στη βιωσιμότητα των προβιοτικών κυττάρων, όπως αποδείχθηκε στην πρώτη πειραματική σειρά, επιλέχθηκε να προστεθεί σε κάθε εγκλειστικό μίγμα. Εξετάζεται, επίσης, η επίδραση της ινουλίνης και της L-κυστεΐνης-HCl, καθώς και της χρήσης πλήρους γάλακτος αντί νερού στη βιωσιμότητα των προβιοτικών βακτηρίων. Τα πειράματα με τη δεύτερη μέθοδο εγκλεισμού αξιολογούνται ομοίως ως προς την απόδοση εγκλεισμού, ενώ και για τα προϊόντα εγκλεισμού (σφαιρίδια) θεωρήθηκε σκόπιμο να εξεταστεί η βιωσιμότητα των προβιοτικών βακτηρίων κατά τη διατήρησή τους σε συνθήκες ψύξης και κατάψυξης (στους 4°C και στους -18°C), αλλά και κατά την έκθεσή τους σε συνθήκες προσομοίωσης του γαστρεντερικού συστήματος. Ομοίως, στο δεύτερο μέρος της μελέτης η εξέταση της μορφολογίας των προϊόντων εγκλεισμού μέσω χρήσης SEM θα συνεισφέρει στο χαρακτηρισμό τους.

Κατά το τρίτο μέρος της παρούσας διδακτορικής διατριβής, σχεδιάστηκε η μελέτη του εγκλεισμού του προβιοτικού στελέχους *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 μέσω συνδυασμού διπλού  $v_1/\epsilon/v_2$  γαλακτώματος (με βάση το πυρηνέλαιο) και εξώθησης προκειμένου να ενισχυθεί περαιτέρω η βιωσιμότητά του. Ως εγκλειστικό μέσο επιλέχθηκε το αλγινικό νάτριο, μετά από εξέταση διαφόρων υλικών (αραβικό κόμμα, αλγινικό νάτριο, πηκτίνη, ινουλίνη, ζελατίνη, κόμμα γελάνης, καζεΐνη), με σκοπό την επιλογή του καταλληλότερου για το σχηματισμό του διπλού γαλακτώματος. Και στην περίπτωση αυτή, στα προϊόντα εγκλεισμού θεωρήθηκε σκόπιμο να μελετηθεί η διατήρηση της βιωσιμότητας των προβιοτικών κυττάρων

κατά την διατήρηση υπό ψύξη και κατάψυξη (στους 4°C και στους -18°C) και κατά την έκθεση σε συνθήκες προσομοίωσης του γαστρεντερικού συστήματος.

Το τέταρτο και τελευταίο μέρος της διδακτορικής διατριβής έχει ως σκοπό την ενσωμάτωση των εγκλεισμένων προβιοτικών κυττάρων σε τρόφιμο. Προς τούτο τα προϊόντα εγκλεισμού προερχόμενα από τις δύο πρώτες μεθόδους εγκλεισμού (μέσω εξώθησης και γαλακτωματοποίησης) με τα υψηλότερα ποσοστά επιβίωσης στους 4°C θεωρήθηκαν ως πιο σκόπιμη επιλογή για να μελετηθούν στη ζύμωση του γάλακτος για παραγωγή γιαουρτιού. Η επίδραση της ενσωμάτωσης των προβιοτικών βακτηρίων στα προϊόντα γιαουρτιού διερευνάται μέσω παρακολούθησης της διεργασίας της ζύμωσης και της μελέτης των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των τελικών προϊόντων γιαουρτιού, συγκεκριμένα του ιζώδους τους (μετά τη ζύμωση στους 45°C και μετά από 24 h αποθήκευση στους 4°C), όπως και των χαρακτηριστικών υφής τους μετά από 24 h στους 4°C. Τέλος, για την επιβεβαίωση της δυνατότητας χαρακτηρισμού των τελικών προϊόντων γιαουρτιού ως προβιοτικών χρειάζεται να ελεγχθεί η βιωσιμότητα των προβιοτικών κυττάρων κατά την αποθήκευση των προϊόντων (για 28 ημέρες στους 4°C) όπως επίσης και η επιβίωση των εγκλεισμένων βακτηρίων κατά την έκθεσή τους σε συνθήκες προσομοίωσης του γαστρεντερικού συστήματος (πέψης).

Η εκπόνηση των πειραμάτων της παρούσας διατριβής πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων της Σχολής Χημικών Μηχανικών του ΕΜΠ.



## 4.2. Υλικά & Συσκευές

### 4.2.1. Υλικά

#### Καλλιέργειες

Το προβιοτικό στέλεχος *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα εγκλεισμού προμηθεύτηκε από την εταιρεία Chr. Hansen (Αθήνα, Ελλάδα).

Η συμβατική καλλιέργεια εκκίνησης (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* και *Streptococcus thermophilus*) που χρησιμοποιήθηκε για τη ζύμωση του γάλακτος και παραγωγή γιαουρτιού ήταν ευγενική χορηγία της εταιρείας ΦΑΓΕ Α.Ε.

#### Υλικά εγκλεισμού

Το αλγινικό νάτριο, η κ-καραγενάνη, η ξανθάνη, η πηκτίνη, το χλωριούχο ασβέστιο, η ινουλίνη και η γλυκόζη προμηθεύτηκαν από την εταιρεία Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Germany), η γλυκερόλη από την εταιρεία Lach-Ner (Brno, Czech Republic) και η νανοκρυσταλλική κυτταρίνη (NanoCrystalline Cellulose, CNC) από την εταιρεία CelluForce (Montreal, Canada). Ο γαλακτωματοποιητής μονοελαϊκή πολυοξυ-αιθυλενο-σορβιτάνη (Tween 80-T80, C<sub>32</sub>H<sub>60</sub>O<sub>10</sub>, PubChemCID: 5284448, HLB=15 MW: 604.8g/mol) προμηθεύτηκε από την Acros Organics (New Jersey, ΗΠΑ).

Το πλήρες γάλα προμηθεύτηκε από την τοπική αγορά. Η σκόνη ορού γάλακτος με τις ακόλουθες προδιαγραφές: υγρασία 1%, περιεχόμενα λιπαρά 1%, περιεχόμενο σε πρωτεΐνες 10.2%, λακτόζη (ενυδατωμένη) 75%, περιεχόμενη τέφρα 7.3%, ήταν ευγενική χορηγία της ION Α.Ε. (Πειραιάς, Ελλάδα). Το εξευγενισμένο πυρηνέλαιο (ΟΡΟ) ήταν ευγενική προσφορά της εταιρείας Μινέρβα Α.Ε.

#### Μικροβιολογικές αναλύσεις

Το θρεπτικό υπόστρωμα MRS Agar και το ισοτονικό διάλυμα Ringer (Maximum Recovery Diluent for microbiology) προμηθεύτηκαν από την εταιρεία Biolab Diagnostics Laboratory Inc (Budapest, Hungary). Τα χημικά αντιδραστήρια L-κυστεΐνη-HCl, neomycine sulphate, nalidixic acid, lithium chloride, sodium propionate και paromomycine sulphate προμηθεύτηκαν από την εταιρεία ThermoFischer Scientific (Massachusetts, USA). Για τη διάρρηξη του πλέγματος των προϊόντων εγκλεισμού πριν τη μικροβιολογική ανάλυση παρασκευάστηκε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού οξέος 0.1 M – Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2 M (ρυθμιστικό διάλυμα McIlvaine). Τα συγκεκριμένα χημικά αντιδραστήρια προμηθεύτηκαν από την εταιρεία Acros Organics (New Jersey, ΗΠΑ).

### 4.2.2. Συσκευές & Όργανα

Για την παρασκευή των προϊόντων εγκλεισμού και των τελικών προϊόντων προβιοτικού γιαουρτιού, καθώς και για την ανάλυσή τους, χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω εργαστηριακές συσκευές και όργανα:

- Περιστροφικό ιξωδόμετρο Brookfield (DV – II+ Pro, USA)

- Αναλυτής υφής (Stable Micro Systems / TA-XT2i, UK)
- Ηλεκτρονικός ζυγός (620C, Precisa Instruments, Switzerland)
- Υδατόλουτρο (GFL 1083, Labortechnik GmbH, Burgwedel, Germany)
- Ομογενοποιητής υψηλής ταχύτητας (High intensity ultrasonic processor, Microprocessor controlled, 400W)
- Αναδευτήρες (IKA – WERKE EURO – ST PVC, GmbH & CO.KG, Staufen, Germany)
- Επωαστήρας (SANYO, Japan)
- Ηλεκτρονικό pH-μετρο
- Συσκευή ομογενοποίησης (bagmixer)
- Θάλαμος επώασης μικροβιολογικών αναλύσεων

### 4.3. Πειραματική διαδικασία

#### 4.3.1. Παρασκευή διαλυμάτων των εγκλειστικών μιγμάτων

Τα υλικά και οι συγκεντρώσεις των εγκλειστικών μιγμάτων επιλέχθηκαν για τον εγκλεισμό του προβιοτικού στελέχους *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* επιλέχθηκαν ύστερα από βιβλιογραφική έρευνα και με κατάλληλα προκαταρκτικά πειράματα. Στον πίνακα 5.1 παρουσιάζεται η σύσταση και η κωδικοποίηση των εγκλειστικών μιγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για τον εγκλεισμό του προβιοτικού στελέχους BB-12.

Για την προετοιμασία των διαλυμάτων των εγκλειστικών μιγμάτων γίνεται ζύγιση των συστατικών σε ζυγό ακριβείας 0.1 g. Οι κατάλληλες ποσότητες από κάθε ουσία προστίθενται σε φιάλη από πυρίμαχο γυαλί μαζί με την κατάλληλη ποσότητα απιονισμένου νερού, με σκοπό την παρασκευή του κάθε εγκλειστικού μίγματος. Το προκύπτον μίγμα τοποθετείται σε θερμαινόμενη πλάκα στους 80°C και αναδύεται με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα έως ότου ομογενοποιηθεί. Για τις ανάγκες των πειραμάτων, γίνεται, επίσης, παρασκευή κατάλληλης ποσότητας διαλύματος CaCl<sub>2</sub> 0.5 M. Όλα τα διαλύματα των εγκλειστικών μιγμάτων, τα διαλύματα CaCl<sub>2</sub> και τα απαιτούμενα υαλικά υφίστανται θερμική επεξεργασία στους 121°C για 15 min, με σκοπό την αποστείρωσή τους. Ακολούθως, τα διαλύματα εγκλειστικών μιγμάτων και τα διαλύματα CaCl<sub>2</sub> τοποθετούνται εντός υδατόλουτρου, μέχρις ότου αποκτήσουν θερμοκρασία περιβάλλοντος. Έπειτα, προστίθεται σε κάθε διάλυμα εγκλειστικού μίγματος κατάλληλη ποσότητα προβιοτικής καλλιέργειας, ώστε να προκύψει συγκέντρωση 5% w/v. Ο αριθμός των ζώντων βακτηρίων της καλλιέργειας προς χρήση είναι 10<sup>11</sup> cfu/g. Ακολουθεί ανάδευση του μίγματος σε θερμοκρασία περιβάλλοντος μέχρι την ομογενοποίησή του.

#### 4.3.2. Εγκλεισμός του προβιοτικού στελέχους BB-12 μέσω της τεχνικής της εξώθησης (extrusion)

Το διάλυμα εγκλειστικού μίγματος μεταφέρεται στάγδην εντός του διαλύματος  $\text{CaCl}_2$ , το οποίο βρίσκεται υπό μαγνητική ανάδευση, με τη βοήθεια αποστειρωμένης σύριγγας των 50mL χρησιμοποιώντας βελόνα των 0.8 mm (21 G) (Pic Solution, Greece). Η σύριγγα σταθεροποιείται ώστε η απόσταση μεταξύ του στομίου εξόδου και της επιφάνειας του διαλύματος να είναι 50 cm. Προκειμένου να εξασφαλιστεί σταθερή πίεση και κατ' επέκταση σταθερή ροή του εγκλειστικού μίγματος, τοποθετούνται στο άνω μέρος της σύριγγας βαρίδια συγκεκριμένης μάζας, όπως φαίνεται στη διάταξη της παρακάτω εικόνας (Εικόνα 4.1).



Εικόνα 4.1: Διάταξη για τον εγκλεισμό του προβιοτικού στελέχους BB-12 μέσω της τεχνικής της εξώθησης.

Κατά την επαφή του διαλύματος του εγκλειστικού μίγματος με το διάλυμα  $\text{CaCl}_2$ , σχηματίζονται, ακαριαία, τα σφαιρίδια εγκλεισμού. Ακολουθεί διήθηση υπό κενό για το διαχωρισμό των προκύπτοντων σφαιριδίων από το διάλυμα και έκπλυσή τους με αποστειρωμένο και απιονισμένο νερό. Τέλος, τα σφαιρίδια τοποθετούνται σε αποστειρωμένα τρυβλία και αποθηκεύονται στους  $4^\circ\text{C}$  και στους  $-18^\circ\text{C}$ . Όλη η διαδικασία του εγκλεισμού λαμβάνει χώρα σε προστατευμένο περιβάλλον.

Η σύσταση και η κωδικοποίηση των μιγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για τον εγκλεισμό του στελέχους BB-12 με την τεχνική της εξώθησης παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.1.

Πίνακας 4.1: Σύσταση και κωδικοποίηση μιγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για τον εγκλεισμό του προβιοτικού στελέχους BB-12 με την τεχνική της εξώθησης.

Σύσταση		Κωδικοποίηση
	-	A/EX
	-	Ινουλίνη 2% (w/v)
		Γλυκόζη 5% (w/v)
		AG/EX
	Ξανθάνη 0.5% (w/v)	-
		ΑΧ/EX
		Ινουλίνη 2% (w/v)
		ΑΧΙ/EX
		Γλυκόζη 5% (w/v)
		ΑΧΓ/EX
		ΑΓΙ/EX
		ΑΓΙΙ/EX
Αλγινικό νάτριο 2% (w/v)	Γλυκερόλη 11% (w/v)	
		ΑΓΙΓ/EX
		-
		ΑC/EX
	κ-καραγενάνη 1% (w/v)	Ινουλίνη 2% (w/v)
		ΑCΙ/EX
		Γλυκόζη 5% (w/v)
		ΑCΓ/EX
		Γλυκόζη 5% (w/v), L-κυστεΐνη-HCl 0.5% (w/v)
		ΑCΓ-Lcys/EX
		-
		ΑCNC/EX
	Νανοκρυσταλλική κυτταρίνη (CNC) 2% (w/v)	Ινουλίνη 2% (w/v)
		ΑCNCΙ/EX
		Γλυκόζη 5% (w/v)
		ΑCNCΓ/EX
		Γλυκόζη 5% (w/v), L-κυστεΐνη-HCl 0.5% (w/v)
		ΑCNCΓ-Lcys/EX
Αλγινικό νάτριο 3% (w/v)	Σκόνη ορού γάλακτος 1% (w/v), Πηκτίνη 1% (w/v)	-
		ΑWP/EX
		Ινουλίνη 2% (w/v)
		ΑWPΙ/EX
		Γλυκόζη 5% (w/v)
		ΑWPG/EX
		-
		ΑM/EX
Αλγινικό νάτριο 1% (w/v)	Γάλα	Ινουλίνη 2% (w/v)
		ΑMΙ/EX
		Γλυκόζη 5% (w/v)
		ΑMΓ/EX
		Γλυκόζη 5% (w/v), L-κυστεΐνη-HCl 0.5% (w/v)
		ΑMGL-cys/EX

4.3.3. Εγκλεισμός του προβιοτικού στελέχους BB-12 μέσω της τεχνικής της γαλακτωματοποίησης (emulsification)

Αρχικά, ογκομετρείται κατάλληλη ποσότητα πυρηνέλαιου και γαλακτωματοποιητή Tween 80, προκειμένου να προκύψει συγκέντρωση γαλακτωματοποιητή στο έλαιο 0.2 % v/v, και το μίγμα προστίθεται σε ποτήρι ζέσεως. Ακολουθεί ανάδευση του μίγματος με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα μέχρι την ομογενοποίησή του. Στη

συνέχεια, ογκομετρείται κατάλληλη ποσότητα μίγματος πυρηνέλαιου-γαλακτωματοποιητή, ώστε κατά την ανάμιξή του με το εγκλειστικό μίγμα να προκύψει αναλογία «εγκλειστικό μίγμα : πυρηνέλαιο-γαλακτωματοποιητή» = 1:3. Η ομογενοποίηση του προκύπτοντος μίγματος γίνεται με τη χρήση ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας στα 1200 rpm για 5 min. Κατά την ομογενοποίηση πραγματοποιείται διασπορά της υδατικής φάσης (εγκλειστικό μίγμα) στη λιπαρή φάση (πυρηνέλαιο), με αποτέλεσμα το σχηματισμό γαλακτώματος.

Πίνακας 4.2: Σύσταση και κωδικοποίηση μινμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για τον εγκλεισμό του προβιοτικού στελέχους BB-12 με την τεχνική της γαλακτωματοποίησης.

Σύσταση		Κωδικοποίηση
Αλγινικό νάτριο 2% (w/v), Γλυκόζη 5% (w/v)	-	A/EM
	Ινουλίνη 2% (w/v)	AI/EM
	Ξανθάνη 0.5% (w/v)	-
	Ινουλίνη 2% (w/v)	AXI/EM
	-	AGI/EM
	Γλυκερόλη 11% (w/v)	Ινουλίνη 2% (w/v)
	-	AGII/EM
	κ-καραγενάνη 1% (w/v)	-
	Ινουλίνη 2% (w/v)	AC/EM
	L-κυστεΐνη-HCl 0.5% (w/v)	ACI/EM
Νανοκρυσταλλική κυτταρίνη (CNC) 2% (w/v)	-	ACG-Lcys/EM
	Ινουλίνη 2% (w/v)	ACNC/EM
	L-κυστεΐνη-HCl 0.5% (w/v)	ACNCI/EM
Αλγινικό νάτριο 3% (w/v), Γλυκόζη 5% (w/v)	Σκόνη ορού γάλακτος 1% (w/v), Πηκτίνη 1% (w/v)	-
	Ινουλίνη 2% (w/v)	ACNCG- Lcys/EM
Αλγινικό νάτριο 1% (w/v), Γλυκόζη 5% (w/v)	-	AWP/EM
	Σε γάλα	Ινουλίνη 2% (w/v)
	L-κυστεΐνη-HCl 0.5% (w/v)	AWPI/EM
-	-	AM/EM
-	Ινουλίνη 2% (w/v)	AMI/EM
-	L-κυστεΐνη-HCl 0.5% (w/v)	AMGL-cys/EM

Μετά την ολοκλήρωση της ομογενοποίησης προστίθεται στο υπό ανάδευση γαλάκτωμα διάλυμα CaCl<sub>2</sub> 0.5M με αποτέλεσμα το σχηματισμό προϊόντων εγκλεισμού. Μετά το πέρας της διαδικασίας σχηματισμού των σφαιριδίων, ακολουθεί διαχωρισμός των δύο φάσεων και παραλαβή των προϊόντων εγκλεισμού έπειτα από φυγοκέντρηση. Τέλος, γίνεται έκπλυση των προϊόντων εγκλεισμού με και ακολούθως αποθήκευσή τους σε αποστειρωμένα τρυβλία στους 4°C και στους -18°C. Η διαδικασία του εγκλεισμού λαμβάνει χώρα σε προστατευμένο περιβάλλον.

Η σύσταση και η κωδικοποίηση των μιγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για τον εγκλεισμό του στελέχους BB-12 με την τεχνική της γαλακτωματοποίησης παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.2.

4.3.4. Εγκλεισμός του προβιοτικού στελέχους BB-12 μέσω συνδυασμού διπλού  $v_1/\varepsilon/v_2$  γαλακτώματος με βάση το πυρηνέλαιο και της τεχνικής της εξώθησης

Για τον εγκλεισμό του προβιοτικού στελέχους BB-12 με τη συγκεκριμένη μέθοδο γίνεται ενσωμάτωση αυτού στην εσωτερική φάση ενός διπλού  $v_1/\varepsilon/v_2$  γαλακτώματος, μέσω ομογενοποίησης δύο σταδίων. Αρχικά, το προβιοτικό στέλεχος ενσωματώνεται υπό μαγνητική ανάδευση σε ποσοστό 3% w/v σε μία υδατική φάση που περιέχει γλυκόζη ή μίγμα γλυκόζης και της πρεβιοτικής ουσίας ινουλίνης (εσωτερική φάση). Ταυτόχρονα, μίγμα γαλακτωματοποιητών Span 20:Tween 40 (50:50) αναμιγνύεται με πυρηνέλαιο σε ποσοστό 5% w/v. Στη συνέχεια, η υδατική φάση που περιέχει το προβιοτικό στέλεχος BB-12 και γλυκόζη ή γλυκόζη και ινουλίνη προστίθεται στάγδην στην λιπαρή φάση σε ποσοστό 20% w/v. Η ομογενοποίηση του μίγματος επιτυγχάνεται με τη χρήση ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας (CAT Unidrive 1000; CAT Scientific, Paso Robles, CA, USA) στις 9.500 rpm για 10 min. Στο τελευταίο στάδιο, το αρχικό  $v_1/\varepsilon$  γαλάκτωμα (15% w/v) ομογενοποιείται με την εξωτερική υδατική φάση ( $v_2$ ), ένα υδατικό διάλυμα των εγκλειστικών μέσων σε συνδυασμό με το γαλακτωματοποιητή Tween 40 (5% w/v), για 10 min στις 9.500 rpm (CAT Unidrive 1000; CAT Scientific, PasoRobles, CA, USA).

Πίνακας 4.3: Σύνθεση και κωδικοποίηση των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των  $v_1/\varepsilon/v_2$  γαλακτωμάτων.

Σύσταση	Κωδικοποίηση
<b>Εσωτερική φάση</b>	
Γλυκόζη 5% w/v	G/wow
Γλυκόζη 5% w/v, Ινουλίνη 2% w/v	GI/wow
<b>Εξωτερική φάση</b>	
-	AI/wow
Πηκτίνη 1% w/v	AP/wow
Αλγινικό νάτριο 2% w/v	AG/wow
Καζεΐνη 1% w/v	AC/wow
Αραβικό κόμμα 1% w/v	AA/wow

Το διπλό  $v_1/\varepsilon/v_2$  γαλάκτωμα με το ενσωματωμένο προβιοτικό στέλεχος BB-12 μεταφέρεται στάγδην με τη βοήθεια αποστειρωμένης σύριγγας των 50 mL και βελόνας των 0.8 mm (21 G) (Pic Solution, Greece) στη διάταξη που περιεγράφηκε στην υποενότητα 5.3.2. Οι σταγόνες συλλέγονται σε ένα διάλυμα  $\text{CaCl}_2$  συγκέντρωσης 0.5 M και διατηρούνται υπό μαγνητική ανάδευση για 30 min. Ακολουθεί συλλογή μέσω διήθησης των σφαιριδίων εγκλεισμού που σχηματίζονται, έκπλυσή τους με

νερό και αποθήκευση σε αποστειρωμένα τρυβλία στους 4°C και στους -18°C. Το σύνολο των χειρισμών λαμβάνει χώρα σε προστατευμένο περιβάλλον.

Η σύσταση και η κωδικοποίηση των μιγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για τον εγκλεισμό του στελέχους BB-12 μέσω συνδυασμού του διπλού γαλακτώματος και της τεχνικής της εξώθησης παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.3.

#### 4.3.5. Ενσωμάτωση εγκλεισμένων προβιοτικών βακτηρίων σε γάλα και ζύμωση αυτού για παραγωγή προβιοτικού γιαουρτιού

Η διαδικασία παραγωγής του γιαουρτιού που ακολουθείται σε όλα τα πειράματα ζύμωσης είναι η εξής:

Αρχικά, 1 L ομογενοποιημένου πλήρους γάλακτος τοποθετείται σε μεταλλικό σκεύος μέσα σε υδατόλουτρο και ακολουθεί θέρμανσή του στους 85°C για 10 min. Μετά τη θερμική κατεργασία, ακολουθεί η ψύξη του γάλακτος στους 45°C και ο εμβολιασμός του με συμβατική καλλιέργεια εκκίνησης. Στη συνέχεια, το μίγμα αναδεύεται ήπια με τη χρήση μηχανικού αναδευτήρα, με σκοπό την ομοιόμορφη διασπορά της καλλιέργειας στο γάλα. Έπειτα, σε πλαστικά κύπελλα ζυγίζονται ποσότητες εγκλεισμένων προβιοτικών βακτηρίων και προστίθεται σε αυτά το ήδη εμβολιασμένο με τη συμβατική καλλιέργεια γάλα. Τα κύπελλα μεταφέρονται σε θάλαμο επώασης ρυθμισμένο στους 45°C, όπου παραμένουν μέχρι την ολοκλήρωση της ζύμωσης (που ορίζεται όταν το pH φθάσει στην τιμή 4.6). Η μεταβολή του pH καταγράφεται ανά 5 min με τη βοήθεια ηλεκτρονικού pH-μετρου. Μετά τη λήξη της ζύμωσης, πραγματοποιείται μέτρηση του ιξώδους του παραγόμενου γιαουρτιού στη θερμοκρασία ζύμωσης (45°C) με τη χρήση ιξωδόμετρου Brookfield. Έπειτα, τα κύπελλα με το γιαούρτι μεταφέρονται σε ψυγείο και αποθηκεύονται στους 4°. Μετά από 24 h αποθήκευσης σε ψύξη επαναλαμβάνεται η μέτρηση του ιξώδους του γιαουρτιού, και πραγματοποιείται επίσης ανάλυση υφής του γιαουρτιού στη θερμοκρασία των 4°C.

#### 4.4. Αναλύσεις - Μετρήσεις

##### 4.4.1. Προσδιορισμός των ζώντων προβιοτικών βακτηρίων στα προϊόντα εγκλεισμού (εγκλεισμένων βακτηρίων)

Για τον προσδιορισμό των ζώντων κυττάρων του προβιοτικού στελέχους BB-12 πραγματοποιούνται μικροβιολογικές αναλύσεις στα προϊόντα εγκλεισμού. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

Αρχικά γίνεται παρασκευή κατάλληλης ποσότητας υποστρώματος MRS agar, με δεδομένο ότι για κάθε τρυβλίο απαιτούνται περίπου 15 mL υποστρώματος. Παράλληλα, παρασκευάζεται κατάλληλη ποσότητας διαλύματος Ringer για τη διεξαγωγή των απαιτούμενων αραιώσεων, με δεδομένο ότι για κάθε αραιώση απαιτούνται 9 mL διαλύματος Ringer. Επίσης, παρασκευάζεται ρυθμιστικό διάλυμα McIlvaine με pH 7.0, με σκοπό τη διαλυτοποίηση των προϊόντων εγκλεισμού, την απελευθέρωση των προβιοτικών μικροοργανισμών και την ομογενοποίηση του προς ανάλυση δείγματος. Για κάθε 1 g δείγματος απαιτούνται 9 mL ρυθμιστικού διαλύματος. Όλα τα παραπάνω αποστειρώνονται στους 121°C.

Εν τω μεταξύ παρασκευάζονται διαλύματα L-κυστεΐνης-HCl και NNLP (neomycine sulphate, nalidixic acid, lithium chloride, paromomycine sulphate) ως εξής: Για την παρασκευή 100 mL διαλύματος NNLP ζυγίζονται σε ζυγό ακριβείας 4 δεκαδικών ψηφίων 0.016 g nalidixic acid, 0.01 g neomycine sulphate, 0.02 g paromomycine sulphate και 0.3 g lithium chloride. Οι παραπάνω ποσότητες υλικών τοποθετούνται σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL και προστίθεται απιονισμένο νερό. Τα ανωτέρω διαλύματα προστίθενται μετά την αποστείρωση και την ψύξη του υποστρώματος στις απαιτούμενες ποσότητες που υπολογίζονται ως v/v επί του συνολικού όγκου του υποστρώματος: 0.3% για το διάλυμα L-κυστεΐνης-HCl και 0.5% v/v για το διάλυμα NNLP αντίστοιχα.

Μετά την ολοκλήρωση της αποστείρωσης, το δοχείο με το ρυθμιστικό διάλυμα και το διάλυμα Ringer αφήνονται να ψυχθούν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, ενώ το υπόστρωμα διατηρείται σε υδατόλουτρο στους 50°C. Ακολούθως, το προς ανάλυση δείγμα ζυγίζεται εντός του αποστειρωμένου θαλάμου, τοποθετείται σε αποστειρωμένη σακούλα μαζί με το ρυθμιστικό διάλυμα και μεταφέρεται και υποβάλλεται σε κατεργασία στον ομογενοποιητή bagmixer για περίπου 10 min. Το ομογενοποιημένο μίγμα αντιστοιχεί στην πρώτη αραιώση. Από το δείγμα αυτό λαμβάνεται 1 mL και τοποθετείται στον πρώτο αποστειρωμένο σωλήνα μαζί με 9 mL διαλύματος Ringer. Έπειτα, λαμβάνεται 1 mL από τον πρώτο σωλήνα και τοποθετείται στο δεύτερο σωλήνα μαζί με 9 mL Ringer και ούτω καθεξής, έως ότου επιτευχθεί ο επιθυμητός αριθμός αραιώσεων. Ακολούθως, 1 mL δείγματος λαμβάνεται διπλά από συγκεκριμένο σωλήνα για καλύτερη επαναληψιμότητα της μέτρησης και τοποθετείται σε τρυβλίο. Η προετοιμασία του υποστρώματος ολοκληρώνεται με την προσθήκη του διαλύματος της L-κυστεΐνης και του διαλύματος NNLP με τη βοήθεια αποστειρωμένης σύριγγας και ενός μικροφίλτρου Millipore 0.22 μm, αφού το υπόστρωμα φτάσει σε θερμοκρασία 45-50°C. Σε κάθε τρυβλίο τοποθετούνται 15 mL υποστρώματος, μοιρασμένα σε δύο στρώσεις, προκειμένου να



εξασφαλισθούν αναερόβιες συνθήκες. Το σύνολο των ενεργειών διεξάγεται υπό ασηπτικές συνθήκες. Μόλις ολοκληρωθεί η παραπάνω διαδικασία, τα τρυβλία τοποθετούνται μέσα σε θάλαμο επώασης στους 37°C, για 72 h.

#### 4.4.2. Εκτίμηση της απόδοσης των τεχνικών εγκλεισμού (EY%)

Για τον υπολογισμό της απόδοσης εγκλεισμού, χρησιμοποιήθηκε η παρακάτω σχέση:

$$EY(\%) = \frac{N}{N_0} \cdot 100\% \quad (4.1)$$

Όπου:

N: ο αριθμός των ζώντων εγκλεισμένων κυττάρων BB-12 που απελευθερώνονται από τα σφαιρίδια και N<sub>0</sub>: ο θεωρητικός αριθμός των κυττάρων που υπολογίζονται με βάση τον αριθμό των προβιοτικών κυττάρων που προστίθενται πριν τη διεργασία του εγκλεισμού.

Για τον προσδιορισμό των ζώντων προβιοτικών βακτηρίων στα προϊόντα εγκλεισμού ακολουθήθηκε η παραπάνω διαδικασία (4.4.1).

#### 4.4.3. Εκτίμηση της βιωσιμότητας των εγκλεισμένων κυττάρων BB-12 κατά τη διατήρηση υπό ψύξη (4°C) ή κατάψυξη (-18°C)

Μετά το πέρας της διεργασίας του εγκλεισμού, τα τελικά προϊόντα διατηρούνται, όπως προαναφέρθηκε, στους 4°C και στους -18°C. Η δειγματοληψία για την εκτίμηση της βιωσιμότητας των προβιοτικών βακτηρίων γίνεται ανά 10 ημέρες και ακολουθούν μικροβιολογικές αναλύσεις, όπως αυτές περιγράφονται στην υποενότητα 4.4.1. Με βάση τα αποτελέσματα των μικροβιολογικών αναλύσεων υπολογίζεται το ποσοστό επιβίωσης (survival rate, (SR%)) του προβιοτικού στελέχους BB-12 με βάση την παρακάτω σχέση:

$$SR(\%) = \frac{N}{N_0} \cdot 100\% \quad (4.2)$$

Όπου:

N<sub>i</sub>: ο αριθμός των ζώντων εγκλεισμένων κυττάρων BB-12 που απελευθερώνονται από τα προϊόντα εγκλεισμού την ημέρα της δειγματοληψίας και N: ο αριθμός των ζώντων εγκλεισμένων κυττάρων BB-12 που απελευθερώνονται από τα προϊόντα εγκλεισμού στην αρχή της αποθήκευσης.

#### 4.4.4. Εκτίμηση της βιωσιμότητας των εγκλεισμένων κυττάρων BB-12 σε συνθήκες προσομοίωσης του γαστρεντερικού συστήματος

Τα προϊόντα εγκλεισμού υπόκεινται σε *in vitro* δοκιμή πέψης και στη συνέχεια ελέγχεται η βιωσιμότητα των περιεχόμενων σε αυτά προβιοτικών βακτηρίων. Για την εκτέλεση της μεθόδου απαιτείται η προπαρασκευή συγκεκριμένων διαλυμάτων τα οποία προσομοιάζουν τα υγρά του γαστρεντερικού συστήματος.

Το διάλυμα προσομοίωσης των γαστρικών υγρών παρασκευάζεται με διάλυση 2.5 g πεψίνης σε 100 mL HCl 0.1N και γίνεται ρύθμιση του pH στην τιμή 2. Αντίστοιχα, το

διάλυμα προσομοίωσης των εντερικών υγρών παρασκευάζεται με διάλυση 12 g χολικών αλάτων και 2.0 g παγκρεατίνης σε 1 L διαλύματος  $\text{NaHCO}_3$  0.1 M και γίνεται ρύθμιση του pH στην τιμή 5. Προκειμένου να εξεταστεί η σταθερότητα των εγκλεισμένων προβιοτικών κυττάρων σε συνθήκες προσομοίωσης του γαστρεντερικού συστήματος, 0.5 g προϊόντος εγκλεισμού προστίθενται σε 5 mL διαλύματος προσομοίωσης γαστρικών υγρών και το μίγμα διατηρείται στους 37°C για 120 min. Στη συνέχεια, 5 mL διαλύματος προσομοίωσης εντερικών υγρών προστίθενται στο μίγμα, το pH ρυθμίζεται στην τιμή 5.0 και ακολούθως το μίγμα παραμένει στους 37°C για άλλα 120 min.

Μετά το πέρας της δοκιμής, τα προϊόντα εγκλεισμού υπόκεινται σε μικροβιολογικές αναλύσεις σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται στην υποενότητα 4.4.1, προκειμένου να εξεταστεί η ικανότητα επιβίωσής τους στις παραπάνω συνθήκες. Το ποσοστό επιβίωσης των προβιοτικών βακτηρίων στις συγκεκριμένες συνθήκες υπολογίζεται με βάση τη σχέση 4.2.

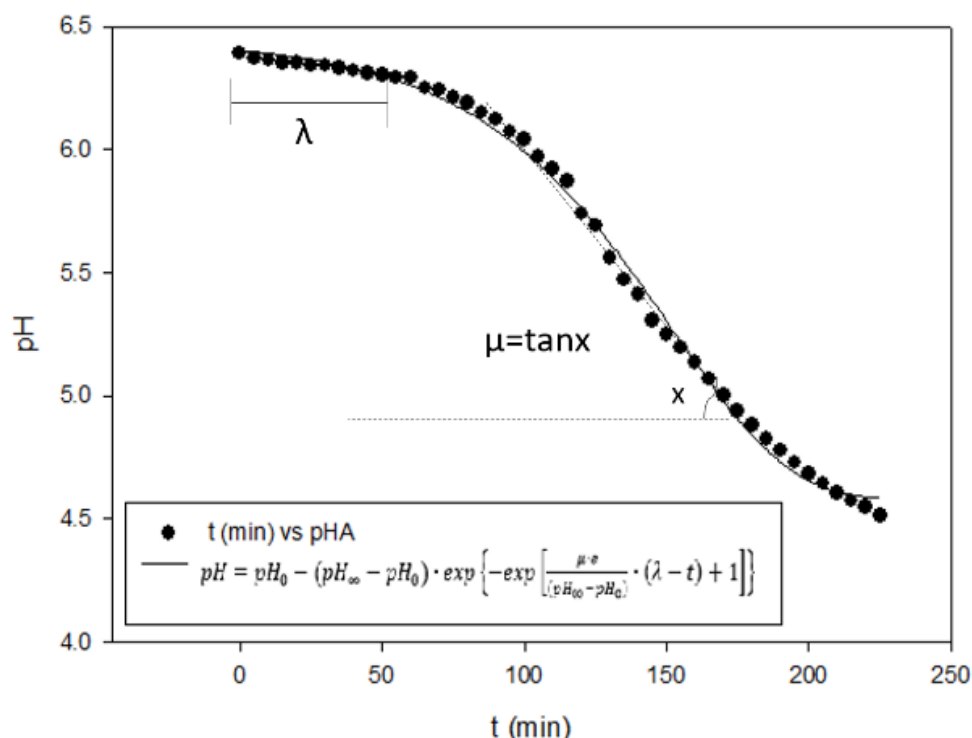
#### 4.4.5. Αξιολόγηση της δομής των προϊόντων εγκλεισμού (εγκλεισμένων βακτηρίων) μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM).

Το σχήμα, το μέγεθος και τα επιφανειακά χαρακτηριστικά των προϊόντων εγκλεισμού προσδιορίζονται μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιείται το μηχάνημα QUANTA 200FEI 2004 (Thermo Fisher Scientific, USA) με τάση επιτάχυνσης 20 kV. Πριν την παρατήρησή τους στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης τα προϊόντα εγκλεισμού ξηραίνονται, σταθεροποιούνται σε μεταλλικά στελέχη επάνω σε ταινία διπλής όψης και επιμεταλλώνονται με στρώμα χρυσού (15 nm) με χρήση του επιμεταλλωτή SC7620 Mini Sputter Coater (Quorum Technologies, West Sussex, UK) για 180 s.

#### 4.4.6. Κινητική μελέτη ζύμωσης προς παραγωγή γιαουρτιού

Η διεργασία της οξυγαλακτικής ζύμωσης που οδηγεί στην πήξη του γάλακτος και στη μετατροπή του σε γιαούρτι ελέγχεται μέσω της μεταβολής της τιμής pH. Στην αρχή της ζύμωσης η τιμή pH του προς ζύμωση μίγματος κυμαίνεται στο 6.4-6.8, ενώ κατά την εξέλιξη της ζύμωσης η παραγωγή γαλακτικού οξέος οδηγεί σε σταδιακή μείωση του pH μέχρι και το πέρας της ζύμωσης όπου το pH φθάνει στην τιμή 4.6.

Η μεταβολή του pH με το χρόνο ακολουθεί σιγμοειδή καμπύλη με τρία διακριτά τμήματα/φάσεις. Κατά την πρώτη φάση παρατηρείται μικρή κλίση της καμπύλης, η οποία οφείλεται στην ανάπτυξη του *S. thermophilus* και στην παραγωγή πρωτεϊνικών μεταβολικών προϊόντων που δρουν ως ενεργοποιητές του *L. bulgaricus*. Το δεύτερο τμήμα της καμπύλης παρουσιάζει μεγάλη κλίση καθώς ο ρυθμός μείωσης του pH είναι μεγαλύτερος λόγω της συμβιωτικής δράσης των οξυγαλακτικών στελεχών *S. thermophilus* - *L. bulgaricus*. Στην τρίτη και τελευταία φάση, παύει η δράση του στελέχους *S. thermophilus* και μειώνεται ο ρυθμός μείωσης του pH καθώς οφείλεται αποκλειστικά στη δράση του οξυάντοχου στελέχους *L. bulgaricus*. Στην εικόνα 4.2 παρουσιάζεται μία τυπική καμπύλη μεταβολής του pH. Σύμφωνα με τους De Brabandere & De Baerdemaeker (1999), η μεταβολή του pH με το χρόνο μπορεί να περιγραφεί από το τροποποιημένο μοντέλο Gompertz.



Εικόνα 4.2: Τυπικό διάγραμμα μεταβολής pH κατά τη διάρκεια της οξυαναλακτικής ζύμωσης γιαουρτιού.

Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την καταγραφή του pH προσαρμόζονται στο τροποποιημένο μοντέλο Gompertz, όπως περιγράφεται από την παρακάτω εξίσωση:

$$pH = pH_0 + (pH_{\infty} - pH_0) \cdot \exp \left\{ -\exp \left[ \frac{\mu \cdot e}{(pH_{\infty} - pH_0)} \cdot (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (4.3)$$

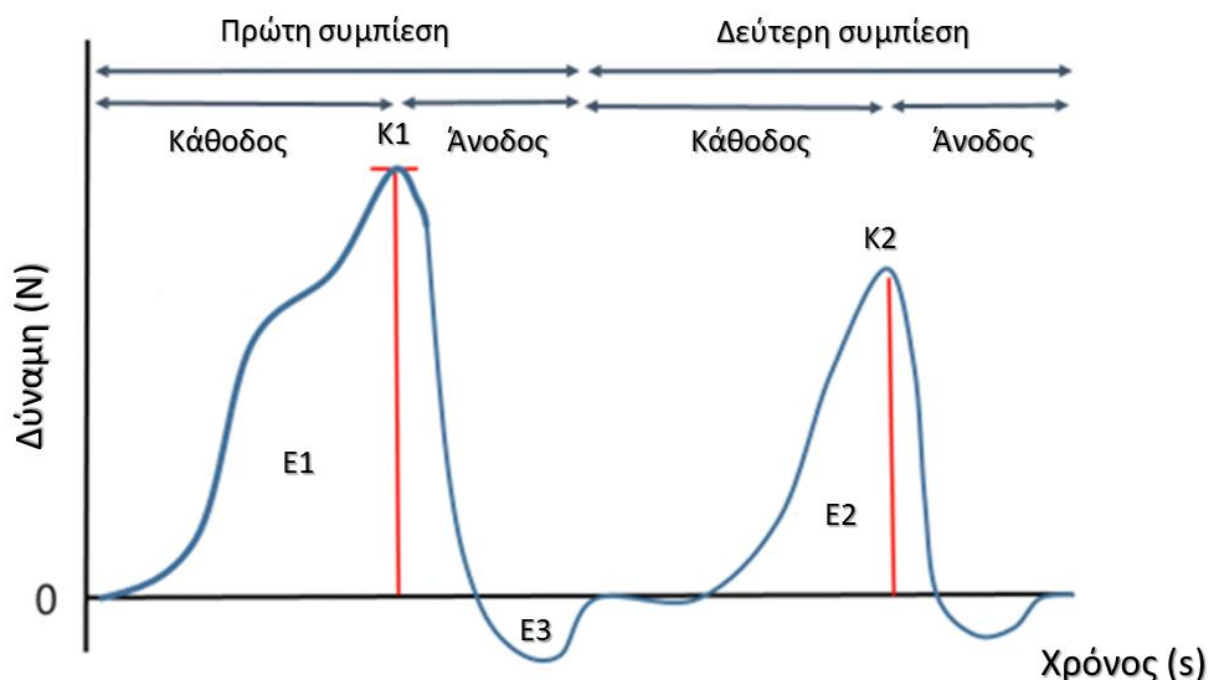
Όπου,  $pH_0$ : = η αρχική τιμή pH,  $pH_{\infty}$ = η τιμή pH στο τέλος της ζύμωσης,  $\mu$ = ο μέγιστος ρυθμός μείωσης του pH και  $\lambda$ = η λανθάνουσα φάση (1<sup>ο</sup> τμήμα της καμπύλης) (Εικόνα 4.2).

Από την παραπάνω εξίσωση υπολογίζονται η λανθάνουσα φάση ( $\lambda$ ) και ο μέγιστος ρυθμός μείωσης pH ( $\mu$ ) και χρησιμοποιούνται μαζί με το συνολικό χρόνο ζύμωσης για το χαρακτηρισμό της συνολικής διεργασίας.

#### 4.4.7. Αξιολόγηση των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών των τελικών ζυμωμένων προϊόντων γιαουρτιού

Τα τελικά προϊόντα γιαουρτιού εξετάζονται προς τα φυσικοχημικά τους χαρακτηριστικά, συμπεριλαμβανομένων του ιξώδους και των χαρακτηριστικών υφής τους. Συγκεκριμένα, μετά το πέρας της ζύμωσης γίνεται μέτρηση του ιξώδους των δειγμάτων σε θερμοκρασία 45°C με τη βοήθεια του περιστροφικού ιξώδομέτρου Brookfield (DV-II + Pro, USA) με χρήση του στελέχους T-bar F και με ταχύτητα περιστροφής 20 rpm. Μετά από παραμονή των γιαουρτιών για 24 h σε ψύξη, επαναλαμβάνεται η μέτρηση ιξώδους τους στους 4°C.

Οι παράμετροι υφής (σταθερότητα πήγματος, συνεκτικότητα, προσκολλησιμότητα, ελαστικότητα και κομμιώδες) των γιαουρτιών ύστερα από παραμονή τους για 24 h στους 4°C εξετάζονται με τη βοήθεια αναλυτή υφής (TA-XT2i, Stable Micro Systems, UK) που είναι συνδεδεμένος με κατάλληλο λογισμικό (Exponent) και με χρήση ανοξείδωτου κυλινδρικού στελέχους διαμέτρου 40 mm. Κάθε δείγμα συμπιέζεται αξονικά σε δύο διαδοχικούς κύκλους μέχρι το 50% του αρχικού του ύψους, με ταχύτητα κατά τη διάρκεια της δοκιμής 1 mm/s και ταχύτητα μετά το πέρας της δοκιμής 4 mm/s. Οι παράμετροι υφής των δειγμάτων υπολογίστηκαν από τα διαγράμματα δύναμης – χρόνου (Εικόνα 4.3). Συγκεκριμένα, ως σταθερότητας πήγματος ορίζεται η απαιτούμενη δύναμη για την επίτευξη συγκεκριμένης παραμόρφωσης, ως συνεκτικότητα η ισχύς μεταξύ των εσωτερικών δεσμών που είναι υπεύθυνοι για τη δομή του προϊόντος, ως προσκολλησιμότητα η δύναμη που καταγράφεται κατά την έξοδο του στελέχους από το δείγμα, ως ελαστικότητα ο βαθμός επαναφοράς του προϊόντος μετά τη συμπίεση και ως κομμιώδες η απαιτούμενη ενέργεια για τη διάσπαση του προϊόντος. Αντικειμενικά, η σταθερότητα του πήγματος αντιστοιχεί στο ύψος της μέγιστης κορυφής (K1), η συνεκτικότητα ως ο λόγος του εμβαδού κορυφής της 2ης συμπίεσης προς το εμβαδό κορυφής της 1ης συμπίεσης (E1/E2), η προσκολλησιμότητα ως το εμβαδόν της αρνητικής κορυφής (E3), η ελαστικότητα ως ο λόγος του χρόνου της 1<sup>ης</sup> επαφής προς το χρόνο της 2<sup>ης</sup> επαφής και το κομμιώδες ως το γινόμενο της σταθερότητας του πήγματος επί τη συνεκτικότητα.



*Εικόνα 4.3: Ενδεικτικό διάγραμμα δύναμης-χρόνου που προκύπτει από την προσομοίωση της διαδικασίας της μάσησης κατά την ανάλυση υφής των προϊόντων γιαουρτιού.*

#### 4.4.8. Μελέτη χρόνου ζωής των τελικών προϊόντων γιαουρτιού ως φορέων προβιοτικών βακτηρίων

Κατά την αποθήκευση των προϊόντων γιαουρτιού σε ψύξη για 30 ημέρες έγινε μελέτη της βιωσιμότητας των εγκλεισμένων προβιοτικών βακτηρίων με δειγματοληψία και εξέταση ανά 10 ημέρες. Για το σκοπό αυτό, γίνεται ήπια ανάδευση του προς εξέταση δείγματος μέχρι την ομογενοποίησή του και λαμβάνεται 1 g αυτού το οποίο διαλύεται σε 9 mL ρυθμιστικού διαλύματος McIlvaine με pH 7.0. Ακολουθεί ομογενοποίηση του μίγματος σε περισταλτικό Stomacher μέχρι την πλήρη διάλυση των σφαιριδίων και την απελευθέρωση των κυττάρων BB-12. Το πρωτόκολλο μικροβιολογικής ανάλυσης που ακολουθείται περιγράφεται στην υποενότητα 4.4.1. Το ποσοστό επιβίωσης των προβιοτικών βακτηρίων που περιέχονται στα προϊόντα γιαουρτιού κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης των δειγμάτων υπολογίζεται με βάση τη σχέση 4.2.

#### 4.4.9. Εκτίμηση βιωσιμότητας των εγκλεισμένων κυττάρων BB-12 ενσωματωμένων σε γιαούρτι κατά την έκθεση σε συνθήκες προσομοίωσης του γαστρεντερικού συστήματος

Τα τελικά προϊόντα γιαουρτιού υπόκεινται σε *in vitro* δοκιμή πέψης και στη συνέχεια ελέγχεται η βιωσιμότητα των περιεχόμενων σε αυτά εγκλεισμένων προβιοτικών βακτηρίων. Το πρωτόκολλο της μεθόδου περιγράφεται αναλυτικά στην υποενότητα 4.4.4 και το ποσοστό επιβίωσης στις συγκεκριμένες συνθήκες υπολογίζεται από τη σχέση 4.2.

#### 4.5. Σχεδιασμός πειραμάτων

Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται οι σειρές πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν ανάλογα με το σκοπό και τα χαρακτηριστικά κάθε πειράματος.

Πίνακας 4.4: Περιγραφή σχεδιασμού πειραμάτων

<b>Σειρά 1<sup>η</sup>: Εγκλεισμός προβιοτικών βακτηρίων με την τεχνική της εξώθησης (extrusion)</b>
<p>Μελέτη της επίδρασης υλικών εγκλεισμού (αλγινικό νάτριο, κόμμα ξανθάνης, γλυκερόλη, κ-καραγενάνη, CNC, σκόνη ορού γάλακτος, πηκτίνη, πλήρες γάλα), πρεβιοτικών ουσιών (ινουλίνη), θρεπτικών ουσιών (γλυκόζη) ή αναγωγικών μέσων (L-κυστεΐνη-HCl) σε:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>➤ Απόδοση εγκλεισμού (%)</li><li>➤ Βιωσιμότητα προβιοτικού στελέχους BB-12 σε συνθήκες ψύξης κατά τον εγκλεισμό του σε διάφορα εγκλειστικά μίγματα - Προσδιορισμός ποσοστού επιβίωσης προβιοτικού στελέχους</li><li>➤ Βιωσιμότητα προβιοτικού στελέχους BB-12 σε συνθήκες κατάψυξης κατά τον εγκλεισμό του σε διάφορα εγκλειστικά μίγματα - Προσδιορισμός ποσοστού επιβίωσης προβιοτικού στελέχους</li><li>➤ Βιωσιμότητα εγκλεισμένου προβιοτικού στελέχους BB-12 σε <i>in vitro</i> γαστρεντερικές συνθήκες - Προσδιορισμός ποσοστού επιβίωσης προβιοτικού στελέχους</li><li>➤ Μορφολογία των τελικών προϊόντων εγκλεισμού - Μελέτη με χρήση SEM</li></ul>
<b>Σειρά 2<sup>η</sup>: Εγκλεισμός προβιοτικών βακτηρίων με την τεχνική της γαλακτωματοποίησης (emulsification)</b>
<p>Μελέτη της επίδρασης υλικών εγκλεισμού (αλγινικό νάτριο, κόμμα ξανθάνης, γλυκερόλη, κ-καραγενάνη, CNC, σκόνη ορού γάλακτος, πηκτίνη, πλήρες γάλα), πρεβιοτικών ουσιών (ινουλίνη) ή αναγωγικών μέσων (L-κυστεΐνη-HCl) σε:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>➤ Απόδοση εγκλεισμού (%)</li><li>➤ Βιωσιμότητα προβιοτικού στελέχους BB-12 σε συνθήκες ψύξης κατά τον εγκλεισμό του σε διάφορα εγκλειστικά μίγματα - Προσδιορισμός ποσοστού επιβίωσης προβιοτικού στελέχους</li><li>➤ Βιωσιμότητα προβιοτικού στελέχους BB-12 σε συνθήκες κατάψυξης κατά τον εγκλεισμό του σε διάφορα εγκλειστικά μίγματα - Προσδιορισμός ποσοστού επιβίωσης προβιοτικού στελέχους</li><li>➤ Βιωσιμότητα εγκλεισμένου προβιοτικού στελέχους BB-12 σε <i>in vitro</i> γαστρεντερικές συνθήκες - Προσδιορισμός ποσοστού επιβίωσης προβιοτικού στελέχους</li><li>➤ Μορφολογία των τελικών προϊόντων εγκλεισμού - Μελέτη με χρήση SEM</li></ul>

Πίνακας 4.4 (συνέχεια)

<b>Σειρά 3<sup>η</sup>: Εγκλεισμός προβιοτικών βακτηρίων με συνδυασμό της τεχνικής της εξώθησης με πολλαπλό W/O/W γαλάκτωμα</b>
<p>Μελέτη της επίδρασης διπλού W/O/W γαλακτώματος με βάση το πυρηνέλαιο ή/και πρεβιοτικών ουσιών (ινουλίνη) σε:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>➤ Απόδοση εγκλεισμού (%)</li><li>➤ Βιωσιμότητα προβιοτικού στελέχους BB-12 σε συνθήκες ψύξης κατά τον εγκλεισμό του σε διάφορα εγκλειστικά μίγματα - Προσδιορισμός ποσοστού επιβίωσης προβιοτικού στελέχους</li><li>➤ Βιωσιμότητα προβιοτικού στελέχους BB-12 σε συνθήκες κατάψυξης κατά τον εγκλεισμό του σε διάφορα εγκλειστικά μίγματα - Προσδιορισμός ποσοστού επιβίωσης προβιοτικού στελέχους</li><li>➤ Βιωσιμότητα εγκλεισμένου προβιοτικού στελέχους BB-12 σε <i>in vitro</i> γαστρεντερικές συνθήκες - Προσδιορισμός ποσοστού επιβίωσης προβιοτικού στελέχους</li><li>➤ Μορφολογία των τελικών προϊόντων εγκλεισμού-Μελέτη με χρήση SEM</li></ul>
<b>Σειρά 4<sup>η</sup>: Ενσωμάτωση προϊόντων εγκλεισμού (εγκλεισμένων προβιοτικών βακτηρίων) σε γιαούρτι - Μελέτη ζύμωσης γάλακτος</b>
<p>Ενσωμάτωση του προβιοτικού στελέχους BB-12 σε εγκλεισμένη μορφή σε συνδυασμό με συμβατική καλλιέργεια εκκίνησης και μελέτη της επίδρασης σε:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>➤ Παραμέτρους της ζύμωσης γάλακτος προς γιαούρτι: λανθάνουσα φάση (λ), μέγιστος ρυθμός μείωσης pH(μ), συνολικός χρόνος ζύμωσης (t)</li><li>➤ Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά (ιξώδες, χαρακτηριστικά υψής) των τελικών προϊόντων γιαουρτιού</li><li>➤ Βιωσιμότητα του προβιοτικού στελέχους BB-12 κατά την αποθήκευση των τελικών προϊόντων γιαουρτιού υπό ψύξη (4°C) - Προσδιορισμός ποσοστού επιβίωσης</li><li>➤ Βιωσιμότητα εγκλεισμένου προβιοτικού στελέχους BB-12 ενσωματωμένου σε γιαούρτι κατά την έκθεση των προϊόντων γιαουρτιού σε <i>in vitro</i> γαστρεντερικές συνθήκες - Προσδιορισμός ποσοστού επιβίωσης προβιοτικού στελέχους</li></ul>

#### 4.6. Στατιστική Ανάλυση

Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από τα πειράματα πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού STATISTICA (StatSoft. Inc, Chicago, IL, USA). Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν και στην παρούσα διατριβή παρουσιάζεται ο μέσος όρος των τιμών των μετρούμενων μεγεθών και η διακύμανσή τους. Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων (απόδοση εγκλεισμού, ποσοστό επιβίωσης, φυσικοχημικά χαρακτηριστικά) των προϊόντων εγκλεισμού ή των τελικών προϊόντων γιαουρτιού έγινε με ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) και χρήση του κριτηρίου διαφοράς Duncan's test με βαθμό εμπιστοσύνης 95% ( $P < 0.05$ ). Επίσης, εφαρμόστηκε η Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (Principal Component Analysis - PCA) για την αξιολόγηση της επίδρασης των μεθόδων και των μέσων εγκλεισμού στη βιωσιμότητα των προβιοτικών βακτηρίων, όπως και στα χαρακτηριστικά της διεργασίας της ζύμωσης και στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των τελικών προϊόντων γιαουρτιού.



## 5. Αποτελέσματα – Συζήτηση

Το στέλεχος *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 είναι ένα προβιοτικό στέλεχος ευρέως χρησιμοποιούμενο στη βιομηχανία τροφίμων, αλλά είναι αρκετά ευαίσθητο. Τόσο η ψύξη όσο και η κατάψυξη χρησιμοποιούνται ευρέως για τη διατήρηση των τροφίμων προκειμένου να παραταθεί η διάρκεια ζωής τους, καθυστερώντας την ανάπτυξη των μικροοργανισμών και τις χημικές αντιδράσεις που προκαλούν αλλοίωση ή ποιοτική υποβάθμιση των προϊόντων τροφίμων. Προκειμένου να διερευνηθεί η δυνατότητα ενσωμάτωσης του προβιοτικού στελέχους BB-12 σε ένα εύρος προϊόντων τροφίμων, μελετήθηκε η βιωσιμότητά του κατά την έκθεσή του στις δύο αυτές συνθήκες διατήρησης. Ιδιαίτερα η κατάψυξη μπορεί να έχει αρνητική επίδραση στη βιωσιμότητα των προβιοτικών βακτηρίων. Ακόμη, προκειμένου το προβιοτικό στέλεχος BB-12 να επιφέρει τα οφέλη του στην υγεία του ξενιστή, πρέπει να διατηρεί τη βιωσιμότητά του κατά τη διέλευσή του από το γαστρεντερικό σύστημα, αντέχοντας τις διάφορες στρεσογόνες συνθήκες.

Ο εγκλεισμός του προβιοτικού στελέχους BB-12 αναμένεται ότι θα περιορίσει τους τραυματισμούς που λαμβάνουν χώρα συνήθως κατά τη διάρκεια της κατάψυξης αλλά και κατά την έκθεση των προβιοτικών κυττάρων στα πεπτικά ένζυμα και στις αντίξοες συνθήκες του γαστρεντερικού συστήματος. Για το σκοπό αυτό, προτείνεται ο εγκλεισμός του προβιοτικού στελέχους BB-12 σε διάφορα εγκλειστικά μίγματα συμβατικών ή/και καινοτόμων υλικών. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή ο εγκλεισμός του προβιοτικού στελέχους BB-12 επιτεύχθηκε μέσω εξώθησης (1<sup>η</sup> πειραματική σειρά) ή/και γαλακτωματοποίησης (2<sup>η</sup> πειραματική σειρά). Ακόμη, μελετήθηκε η εφαρμογή μίας καινοτόμου μεθόδου, η οποία συνδυάζει τη μέθοδο της εξώθησης με διπλό νερό-σε-έλαιο-σε-νερό ( $v_1/\epsilon/v_2$ ) γαλάκτωμα, με σκοπό την αύξηση της παρεχόμενης προστασίας στο προβιοτικό στέλεχος BB-12 (3<sup>η</sup> πειραματική σειρά). Όσον αφορά τα μέσα εγκλεισμού, εξετάστηκε η χρήση μόνο αλγινικού νατρίου ως εγκλειστικό μέσο, καθώς και συνδυασμός αυτού με άλλα υδροκολλοειδή ή βοηθητικά υλικά, με σκοπό την ενίσχυση του πλέγματος των παραγόμενων προϊόντων εγκλεισμού. Έτσι, δοκιμάστηκαν συμβατικά υδροκολλοειδή όπως η ξανθάνη και η κ-καραγενάνη, καθώς και καινοτόμα υλικά όπως η νανοκρυσταλλική κυτταρίνη (CNC). Ακόμη, έγινε χρήση γλυκερόλης, μίας κρυσταλλικής ουσίας που ενσωματώνεται μέσα στο εγκλειστικό μίγμα προκειμένου να βελτιωθεί η βιωσιμότητα των προβιοτικών βακτηρίων, ειδικά κατά την έκθεσή τους σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες (Capela et al. 2006; Sultana et al. 2000). Η σκόνη ορού γάλακτος είναι άλλο ένα υλικό το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως για τον εγκλεισμό προβιοτικών στελεχών μέσω ξήρανσης με ψεκασμό λόγω των προστατευτικών ιδιοτήτων του (De Castro-Cislaghi et al. 2012; Dutra et al. 2019; Jantzen et al. 2013) και εξετάστηκε στην παρούσα διδακτορική διατριβή ως εγκλειστικό μέσο στην περίπτωση της εξώθησης ή της γαλακτωματοποίησης. Ακόμη, μελετήθηκε η επίδραση της παροχής θρεπτικών συστατικών στο προβιοτικό στέλεχος

BB-12, μέσω ενσωμάτωσης γλυκόζης στο εγκλειστικό μέσο ή μέσω χρήσης πλήρους γάλακτος αντί νερού κατά την παρασκευή του διαλύματος του μέσου αυτού. Η χρήση γάλακτος εναλλακτικά του νερού ως φορέα για τη διαλυτοποίηση του αλγινικού νατρίου κατά την παρασκευή του διαλύματος του εγκλειστικού μέσου επιλέχθηκε γιατί το πλήρες γάλα λειτουργεί ως πηγή θρεπτικών συστατικών για τα *Bifidobacteria*, ενώ η σύνθετη δομή του παρέχει ένα εξαιρετικό περιβάλλον για τον εγκλεισμό και την προστασία του προβιοτικού στελέχους BB-12. Ακόμη, λόγω της γνωστής επωφελούς συνεισφοράς των πρεβιοτικών ουσιών στα προβιοτικά βακτήρια, όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 1, μελετήθηκε η ενσωμάτωση ινουλίνης στο εγκλειστικό μίγμα και η επίδρασή της στις μελετώμενες παραμέτρους. Τέλος, είναι γνωστό ότι ο εγκλεισμός παρέχει ένα αναερόβιο περιβάλλον εντός των παραγόμενων σφαιριδίων, το οποίο είναι ευνοϊκό για βακτήρια ευαίσθητα στο οξυγόνο όπως το στέλεχος BB-12, ειδικά όταν το τρόφιμο-φορέας περιέχει μεγάλες ποσότητες διαλυμένου οξυγόνου. Για την ενίσχυση της προστασίας των αναερόβιων μικροοργανισμών, προτείνεται η χρήση L-κυστεΐνης-HCl, η οποία μπορεί να λειτουργήσει τόσο ως ουσία δέσμευσης οξυγόνου, με αποτέλεσμα να περιορίζεται το οξειδωτικό στρες που υφίστανται τα προβιοτικά κύτταρα, όσο και ως πηγή αζώτου για τα *bifidobacteria*.

Τα παραπάνω υλικά χρησιμοποιήθηκαν στις αναλογίες που αναφέρονται στους πίνακες 4.1-4.3. Τα τελικά προϊόντα εγκλεισμού αξιολογήθηκαν τόσο ως προς την απόδοση εγκλεισμού, όσο και ως προς την παρεχόμενη προστασία στο προβιοτικό στέλεχος BB-12 κατά τη διατήρηση υπό ψύξη ή κατάψυξη και κατά την έκθεση των προϊόντων εγκλεισμού σε συνθήκες προσομοίωσης πέψης. Προκειμένου να διερευνηθεί η επίδραση της κάθε μεθόδου εγκλεισμού αλλά και της εκάστοτε σύνθεσης του εγκλειστικού μέσου στην απόδοση εγκλεισμού και τη βιωσιμότητα των προβιοτικών βακτηρίων στις διάφορες συνθήκες, τα προϊόντα εγκλεισμού προστέθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα McIlvaine με pH 7.0 με στόχο την πλήρη διάρρηξη του πλέγματος και την απελευθέρωση των προβιοτικών κυττάρων. Ακόμη, έγινε μελέτη της μικροδομής των προϊόντων εγκλεισμού μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM). Με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις τρεις πειραματικές σειρές έγινε επιλογή των κατάλληλων προϊόντων εγκλεισμού προς ενσωμάτωση σε προϊόν γιαουρτιού (4<sup>η</sup> πειραματική σειρά). Τα τελικά προϊόντα γιαουρτιού αξιολογήθηκαν τόσο ως προς τα φυσικοχημικά τους χαρακτηριστικά, όσο και ως προς τα ποσοστά επιβίωσης του προβιοτικού στελέχους BB-12 κατά την αποθήκευση υπό ψύξη ή κατά την έκθεση σε συνθήκες προσομοίωσης του γαστρεντερικού συστήματος. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την εφαρμογή για κάθε σειρά πειραμάτων όπως σχεδιάστηκαν και παρουσιάστηκαν στον Πίνακα 4.4 αναλύονται μετά από επεξεργασία και σχολιάζονται στις παρακάτω υποενότητες.

## 5.1. Εγκλεισμός του προβιοτικού στελέχους BB-12 μέσω της τεχνικής της εξώθησης (extrusion)

### 5.1.1. Εκτίμηση απόδοσης εγκλεισμού (EY%) της τεχνικής της εξώθησης

Στα πλαίσια της συγκεκριμένης πειραματικής σειράς, ο εγκλεισμός του προβιοτικού στελέχους BB-12 επιτεύχθηκε μέσω της τεχνικής της εξώθησης, χρησιμοποιώντας ένα μεγάλο εύρος εγκλειστικών μιγμάτων, όπως περιγράφεται στην υποενότητα 4.3. Η συγκεκριμένη μέθοδος οδήγησε σε προϊόντα εγκλεισμού σφαιρικής μορφής, μέσης διαμέτρου 2-3 mm. Από τα πειράματα βρέθηκε ότι οι τιμές της απόδοσης εγκλεισμού κυμαίνονται από 58.6% μέχρι και 100%. Τα αποτελέσματα τα οποία παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.1 υποδηλώνουν ότι, όταν το αλγινικό νάτριο (A/EX) χρησιμοποιείται μόνο του ως εγκλειστικό μέσο, προκύπτουν χαμηλότερες τιμές απόδοσης εγκλεισμού (60.5%) σε σύγκριση με τις περιπτώσεις όπου αυτό συνδυάζεται με άλλα πολυμερή υλικά ( $p < 0.05$ ), όπως ξανθάνη (AX/EX), πηκτίνη (AWP/EX), κ-καραγενάνη (AC/EX) ή νανοκρυσταλλική κυτταρίνη (ACNC/EX) (EY% > 77%). Τα παραπάνω αποτελέσματα έρχονται σε συμφωνία με εκείνα των Amine et al. (2014) οι οποίοι βρήκαν αποδόσεις εγκλεισμού μεταξύ 31% και 65% με τη χρήση διαφόρων τύπων αλγινικού νατρίου ως εγκλειστικών μέσων. Ακόμη, οι Sandoval-Castilla et al. (2010) επέτυχαν υψηλότερες τιμές απόδοσης εγκλεισμού με χρήση μίγματος αλγινικού νατρίου και πηκτίνης από ότι με χρήση μόνο αλγινικού νατρίου. Η προσθήκη της πρεβιοτικής ουσίας, της ινουλίνης στο εγκλειστικό μίγμα οδήγησε σε μειωμένες τιμές απόδοσης εγκλεισμού στις περισσότερες περιπτώσεις, πιθανόν λόγω μερικής παρεμπόδισης σχηματισμού ενός τρισδιάστατου πλέγματος με αποτέλεσμα τον εγκλεισμό μικρότερου αριθμού προβιοτικών κυττάρων.

Πίνακας 5.1: Τιμές απόδοσης εγκλεισμού (EY%) κατά τη διαδικασία εγκλεισμού του προβιοτικού στελέχους BB-12 μέσω της τεχνικής της εξώθησης με διάφορα εγκλειστικά μέσα.

<b>Εγκλειστικό μέσο</b>	<b>EY (%)</b>
<b>A/EX</b>	60.52±3.75 <sup>αA</sup>
<b>AI/EX</b>	58.61±4.21 <sup>αB</sup>
<b>AG/EX</b>	83.22±3.73 <sup>αΓ</sup>
<b>AX/EX</b>	73.25±6.72 <sup>αβA</sup>
<b>AXI/EX</b>	67.99±2.66 <sup>αβB</sup>
<b>AXG/EX</b>	81.37±4.67 <sup>αβΓ</sup>
<b>AWP/EX</b>	86.93±3.54 <sup>γδA</sup>
<b>AWPI/EX</b>	85.76±4.87 <sup>γδB</sup>
<b>AWPG/EX</b>	80.98±4.96 <sup>γδΓ</sup>
<b>AGI/EX</b>	78.02±2.58 <sup>βγA</sup>
<b>AGII/EX</b>	72.44±3.83 <sup>βγB</sup>
<b>AGIG/EX</b>	86.83±0.41 <sup>βγΓ</sup>
<b>AC/EX</b>	83.91±4.61 <sup>γδA</sup>
<b>ACI/EX</b>	79.98±1.28 <sup>γδB</sup>
<b>ACG/EX</b>	87.42±5.12 <sup>γδΓ</sup>
<b>ACG-Lcys/EX</b>	89.39±2.11 <sup>γδΓ</sup>
<b>ACNC/EX</b>	91.31±4.41 <sup>δA</sup>
<b>ACNCI/EX</b>	88.98±2.35 <sup>δB</sup>
<b>ACNCG/EX</b>	90.44±3.84 <sup>δΓ</sup>
<b>ACNCG-Lcys/EX</b>	91.93±1.44 <sup>δΓ</sup>
<b>AM/EX</b>	95.80±1.71 <sup>εA</sup>
<b>AMI/EX</b>	97.07±2.21 <sup>εB</sup>
<b>AMG/EX</b>	100.06±1.97 <sup>εΓ</sup>
<b>AMGL-cys/EX</b>	99.61±1.52 <sup>εΓ</sup>

Οι τιμές που παρουσιάζονται είναι μέσοι όροι ± τυπικές αποκλίσεις (n=3). Οι διαφορετικοί δείκτες υποδηλώνουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων. Η κωδικοποίηση των δειγμάτων έχει οριστεί στον Πίνακα 4.1.

Οι δείκτες α,β,γ,δ,ε χρησιμοποιούνται για τη διαφοροποίηση λόγω προσθήκης ινουλίνης ή γλυκόζης, ενώ τα κεφαλαία για τη διαφοροποίηση μεταξύ εγκλειστικών υλικών

Στις περισσότερες περιπτώσεις το βακτηριακό φορτίο στα παραγόμενα προϊόντα εγκλεισμού (σφαιρίδια εγκλεισμού) ήταν ικανοποιητικά υψηλό, ενώ τυχόν χαμηλότερες τιμές δεν οφείλονται απαραίτητα σε περιορισμένη δυνατότητα εγκλεισμού, αλλά μπορεί να σχετίζονται με απώλειες της βιωσιμότητας των προβιοτικών βακτηρίων ως αποτέλεσμα των συνθηκών ή των χειρισμών που λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια της διεργασίας του εγκλεισμού. Η παροχή θρεπτικών συστατικών στο προβιοτικό στέλεχος BB-12, όπως γλυκόζης (AG/EX), σκόνης ορού γάλακτος (AWP/EX) ή γάλακτος (AM/EX) οδήγησε σε σημαντική αύξηση των τιμών της απόδοσης εγκλεισμού. Συγκεκριμένα, η προσθήκη γλυκόζης στο εγκλειστικό μίγμα, στις περισσότερες περιπτώσεις, ενίσχυσε τη βιωσιμότητα των προβιοτικών κυττάρων κατά τη διάρκεια της διεργασίας του εγκλεισμού (Πίνακας 5.1), καθώς είναι ένας από τους βασικούς μεταβολίτες των *Bifidobacteria* και είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό τους. Η χρήση σκόνης ορού γάλακτος ή πλήρους γάλακτος ως υλικά του εγκλειστικού μίγματος επίσης αύξησε αξιοσημείωτα τη βιωσιμότητα του προβιοτικού στελέχους BB-12, παρέχοντας αποδόσεις εγκλεισμού μεταξύ 86.9% και 95.8%, αντίστοιχα. Η σκόνη ορού γάλακτος περιέχει λακτόζη, έναν άλλο βασικό μεταβολίτη των *Bifidobacteria*, και διαλυτές πρωτεΐνες. Η εφαρμογή της σκόνης ορού γάλακτος ή των πρωτεϊνών ορού γάλακτος έχει μελετηθεί από διάφορους ερευνητές, ειδικά μέσω ξήρανσης με ψεκασμό, επιτυγχάνοντας ικανοποιητικά αποτελέσματα αναφορικά με τις αντίξοες συνθήκες της εν λόγω μεθόδου (De Castro-Cislaghi et al. 2012). Η εφαρμογή σκόνης ορού γάλακτος στον εγκλεισμό μέσω εξώθησης δεν έχει ακόμη μελετηθεί ιδιαίτερα. Οι Doherty et al. (2011) που μελέτησαν τη χρήση πρωτεϊνών ορού γάλακτος για τον εγκλεισμό του προβιοτικού στελέχους *L. rhamnosus* GG μέσω εξώθησης, επέτυχαν παρόμοιες υψηλές τιμές απόδοσης εγκλεισμού (96.5%). Η εφαρμογή υπερσυμπυκνώματος πρωτεϊνών ορού γάλακτος για τον εγκλεισμό δύο προβιοτικών στελεχών, των *L. bulgaricus* και *L. paracasei* ήταν επίσης επιτυχημένη, παρέχοντας απόδοση εγκλεισμού 89.1% (Xiao et al. 2020). Επιπρόσθετα, έχει μελετηθεί η παραγωγή σφαιριδίων αλγινικού-γάλακτος για τον εγκλεισμό προβιοτικών κυττάρων από τους Shi et al. (2013), παρέχοντας αποδόσεις εγκλεισμού που πλησιάζουν στο 100%, αντίστοιχα με τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής. Τυχόν αυξήσεις του βακτηριακού φορτίου κατά τη διάρκεια της διεργασίας αποδίδονται στη βραδεία ανάπτυξη του προβιοτικού στελέχους BB-12 σε θερμοκρασίες άνω των 30°C, όπως περιγράφεται και από τους Østlie, Treimo, & Narvhus (2005). Τέλος, η παρουσία της L-κυστεΐνης-HCl στο εγκλειστικό μίγμα επηρέασε μερικώς την απόδοση εγκλεισμού. Συγκεκριμένα, φαίνεται ότι οδήγησε σε αύξηση της βιωσιμότητας των προβιοτικών βακτηρίων, με αποτέλεσμα υψηλότερες τιμές απόδοσης εγκλεισμού, όπως, επίσης, αναφέρεται και από τους Rodrigues et al. (2011).

### 5.1.2. Σταθερότητα εγκλεισμένου προβιοτικού στελέχους BB-12 μέσω της τεχνικής της εξώθησης κατά τη διατήρηση σε συνθήκες ψύξης ή κατάψυξης

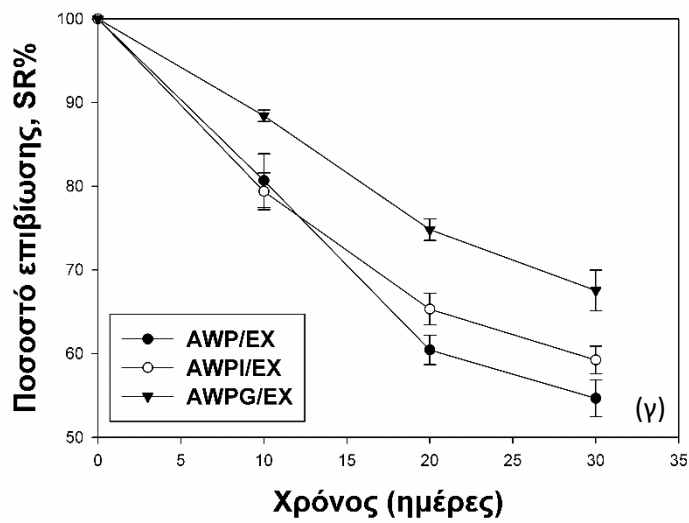
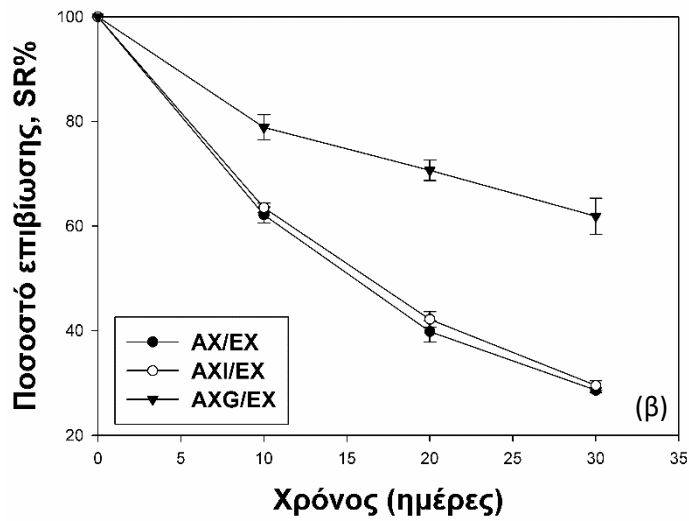
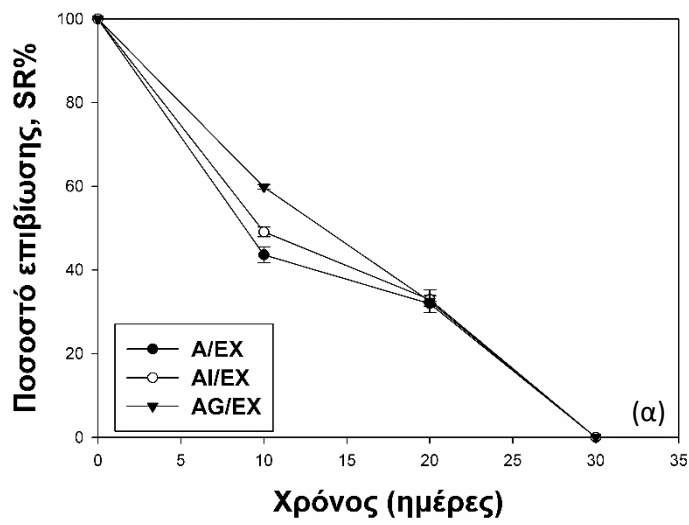
Προκειμένου να εξεταστεί η σταθερότητα των εγκλεισμένων προβιοτικών κυττάρων BB-12 κατά τη διάρκεια διατήρησης σε χαμηλές θερμοκρασίες, τα προϊόντα εγκλεισμού αποθηκεύτηκαν στους 4°C και στους -18°C για 30 ημέρες. Στα Διαγράμματα 5.1 και 5.2 παρουσιάζεται η διατήρηση της βιωσιμότητας του εγκλεισμένου προβιοτικού στελέχους BB-12 στους 4°C και στους -18°C, αντίστοιχα, κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης.

### Διατήρηση προϊόντων εγκλεισμού (μέσω της τεχνικής της εξώθησης) υπό ψύξη (4°C) – Βιωσιμότητα (SR%) του εγκλεισμένου προβιοτικού στελέχους BB-12

Σε όλες τις περιπτώσεις, το ποσοστό επιβίωσης του προβιοτικού στελέχους BB-12 μειώνεται περισσότερο στο διάστημα των πρώτων 10 ημερών. Η βιωσιμότητα των προβιοτικών βακτηρίων που ήταν εγκλεισμένα μόνο σε αλγινικό ή σε μίγμα αλγινικού με ινουλίνη ή γλυκόζη μειώθηκε ραγδαία. Συγκεκριμένα, μετά από 10 ημέρες αποθήκευσης, τα ποσοστά επιβίωσης μειώθηκαν σε 43.6-59.8%, ενώ στο τέλος της αποθήκευσης το βακτηριακό φορτίο ήταν σχεδόν μηδενικό (Διάγραμμα 5.1). Όπως έχει ήδη αναφερθεί, καθώς το αλγινικό από μόνο του δεν παρέχει ικανοποιητική προστασία των προβιοτικών κυττάρων, μελετήθηκαν μίγματα αλγινικού νατρίου με άλλα πολυμερή. Ο συνδυασμός του αλγινικού με άλλα υλικά, όπως η ξανθάνη (AX/EX), η κ-καραγενάνη (AC/EX) και το CNC (ACNC/EX), είχε θετική επίδραση ( $p < 0.05$ ) στη βιωσιμότητα του BB-12, καθώς αυτά συνεισφέρουν στη δημιουργία πυκνότερης δομής, παρέχοντας έτσι καλύτερη προστασία από εξωτερικούς παράγοντες, όπως το οξυγόνο και η υγρασία. Στο τέλος της αποθήκευσης των προϊόντων εγκλεισμού στους 4°C καταγράφηκαν ποσοστά επιβίωσης 28.6-37.8% (Διάγραμμα 5.1β,ε,στ). Οι Huq et al. (2017) έχουν επίσης αποδείξει ότι το CNC παρέχει ικανοποιητικές ιδιότητες ενίσχυσης του πλέγματος του αλγινικού, επαληθεύοντας τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης. Ακόμη, η προσθήκη σκόνης ορού γάλακτος και πηκτίνης (AWP/EX) αύξησε τα ποσοστά επιβίωσης (54.7%) κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης (Διάγραμμα 5.1γ). Οι De Castro-Cislaghi et al. (2012) χρησιμοποιώντας ορό γάλακτος για τον εγκλεισμό του προβιοτικού στελέχους BB-12 μέσω ξήρανης με ψεκασμό, επέτυχαν την ενίσχυση της βιωσιμότητάς του κατά την αποθήκευση. Η θερμική μετουσίωση των πρωτεϊνών του ορού γάλακτος κατά τη διάρκεια της αποστείρωσης στους 121°C για 15 min, επηρεάζει τις ιδιότητες γαλακτωματοποίησης των πρωτεϊνών και, κατ'επέκταση την ικανότητα εγκλεισμού αυτών. Η γλυκερόλη (AGI/EX), επίσης, φαίνεται να παρέχει ένα επιπρόσθετο προστατευτικό στρώμα στα προβιοτικά κύτταρα (Διάγραμμα 5.1δ). Παρόλα αυτά, τα πιο ικανοποιητικά αποτελέσματα ελήφθησαν στην περίπτωση των δειγμάτων που παρασκευάστηκαν με διάλυση αλγινικού νατρίου σε γάλα αντί για νερό κατά την παρασκευή του διαλύματος του εγκλειστικού μίγματος (AM/EX) (Διάγραμμα 5.1ζ). Μετά το πέρας της αποθήκευσης, τα ποσοστά επιβίωσης των εγκλεισμένων προβιοτικών βακτηρίων

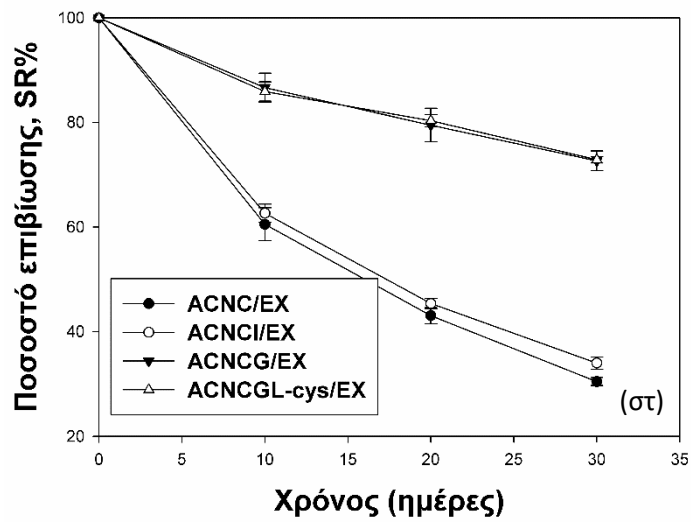
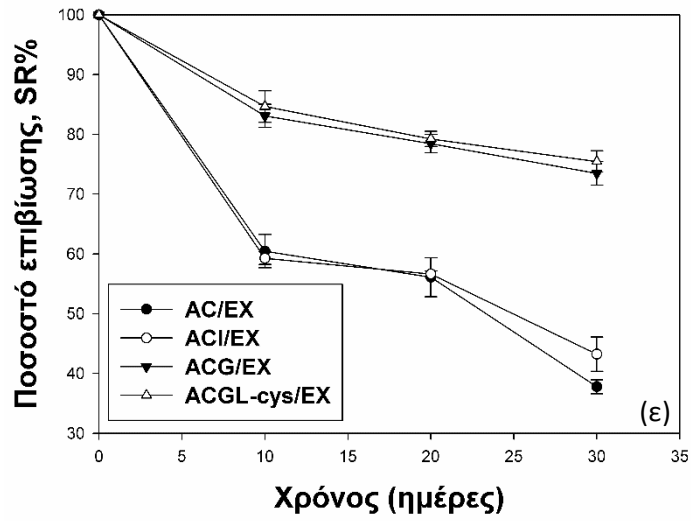
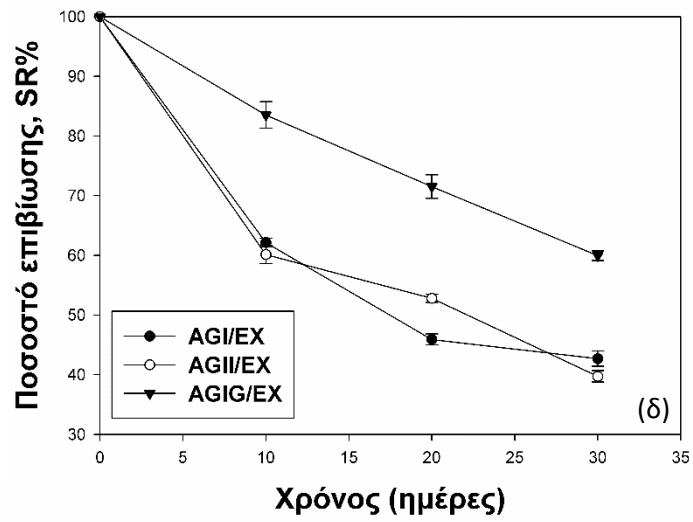
έφτασαν στο 66.9%. Αντίστοιχα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και από τους Shi et al. (2013) οι οποίοι εφάρμοσαν την τεχνική της εξώθησης για τον εγκλεισμό του *L. bulgaricus* σε σφαιρίδια αλγινικού-γάλακτος, επιτυγχάνοντας ομοίως εξαιρετικά αποτελέσματα όσον αφορά τη βιωσιμότητα του προβιοτικού στελέχους κατά την αποθήκευσή του στους 4°C. Στην περίπτωση των προϊόντων εγκλεισμού AM/EX, το τελικό βακτηριακό φορτίο ήταν 6.6 logcfu g<sup>-1</sup>, υπερβαίνοντας το ελάχιστο όριο των 6 logcfu g<sup>-1</sup> τη στιγμή της κατανάλωσης, το οποίο έχει υιοθετηθεί από τη βιομηχανία τροφίμων ως απαραίτητη προϋπόθεση για τα εμπορικά προϊόντα για την απόδοση των οφελών στην υγεία του ξενιστή από τα *Bifidobacteria* (Holkem et al. 2016).

Η προσθήκη ινουλίνης στο εγκλειστικό μίγμα οδήγησε σε μικρή αύξηση των ποσοστών επιβίωσης του προβιοτικού στελέχους BB-12 σε όλες σχεδόν τις περιπτώσεις, με αποτέλεσμα να προκύπτουν περίπου 0.9-5.5% υψηλότερες τιμές επιβίωσης σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές ποσοστού επιβίωσης των προβιοτικών βακτηρίων εγκλεισμένων χωρίς χρήση ινουλίνης. Οι Wang, Korber, Low, & Nickerson (2014) ασχολήθηκαν με τον εγκλεισμό του στελέχους *L. plantarum* σε σφαιρίδια αλγινικού-άπαχου γάλακτος ενισχυμένα με ινουλίνη και παρατήρησαν βελτιωμένη σταθερότητα του *L. plantarum* κατά την αποθήκευση. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί και από άλλους ερευνητές (Fritzen-Freire et al. 2012; W. Krasaekoort and Watcharapoka 2014). Αξιοσημείωτη ήταν η αύξηση της βιωσιμότητας ( $p < 0.05$ ) του προβιοτικού στελέχους BB-12 λόγω της ενσωμάτωσης γλυκόζης στο εγκλειστικό μίγμα, παρέχοντας στα εγκλεισμένα βακτήρια ένα θρεπτικό μέσο κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης. Τα ποσοστά επιβίωσης αυξήθηκαν κατά 12.9-42.2% στις περισσότερες περιπτώσεις, με εξαίρεση τα προϊόντα εγκλεισμού AM/EX και AMG/EX (αλγινικό-γάλα-γλυκόζη). Στη συγκεκριμένη περίπτωση, σημειώνεται ότι η προσθήκη γλυκόζης αύξησε μόνο κατά 5.1% το ήδη υψηλό ποσοστό επιβίωσης του BB-12. Στην περίπτωση των προϊόντων εγκλεισμού ACG/EX (αλγινικό-κ-καραγενάνη-γλυκόζη), ACNCG/EX (αλγινικό-CNC-γλυκόζη) και AMG/EX, πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι το βακτηριακό φορτίο στο τέλος του χρόνου αποθήκευσης ήταν υψηλότερο από το ελάχιστο απαιτούμενο για εμπορική χρήση, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως (6.7-7.5 logcfu g<sup>-1</sup>). Παρόλο που η αποθήκευση υπό ψύξη είναι κατάλληλη για τη διατήρηση της βιωσιμότητας των βακτηριακών κυττάρων, παρατηρείται σημαντική μείωση της βιωσιμότητάς τους, πιθανόν λόγω της παραγωγής ελευθέρων ριζών παρουσία οξυγόνου και της επακόλουθης καταστροφής των κυττάρων. Έτσι, κατά την ενσωμάτωση L-κυστεΐνης-HCl σε συγκεκριμένα εγκλειστικά μίγματα (ACG/EX, ACNCG/EX και AMG/EX) παρατηρήθηκε σημαντικά υψηλή βιωσιμότητα του προβιοτικού στελέχους BB-12, αυξάνοντας περαιτέρω τα ποσοστά επιβίωσης μέχρι και 6.3%. Το συγκεκριμένο γεγονός δείχνει τη σημαντική επίδραση που έχει το οξυγόνο στη σταθερότητα και τη βιωσιμότητα των προβιοτικών βακτηρίων.

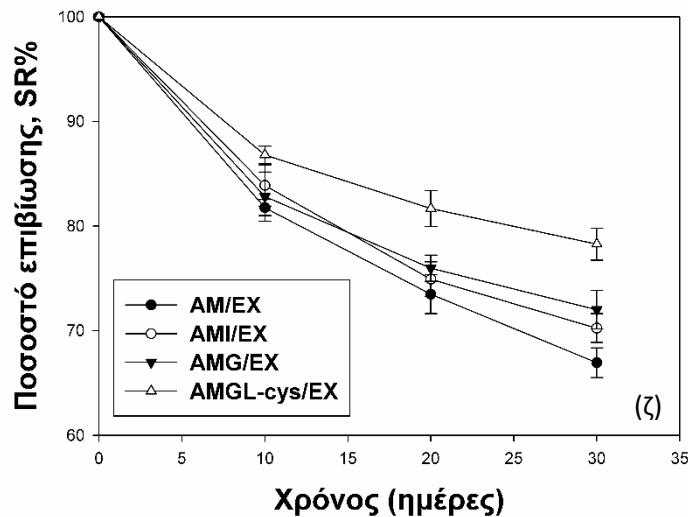


Διάγραμμα 5.1: Μεταβολή ποσοστού επιβίωσης (SR%) του εγκλεισμένου προβιοτικού στελέχους BB-12 μέσω της τεχνικής της εξώθησης κατά τη διάρκεια της διατήρησης στους 4°C για 30 ημέρες. Η κωδικοποίηση των δειγμάτων έχει οριστεί στον Πίνακα 4.1.





Διάγραμμα 5.1 (συνέχεια).

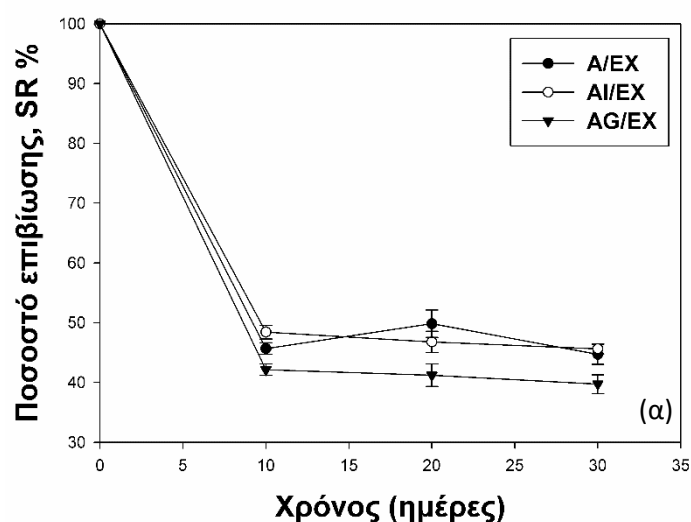


Διάγραμμα 5.1 (συνέχεια).

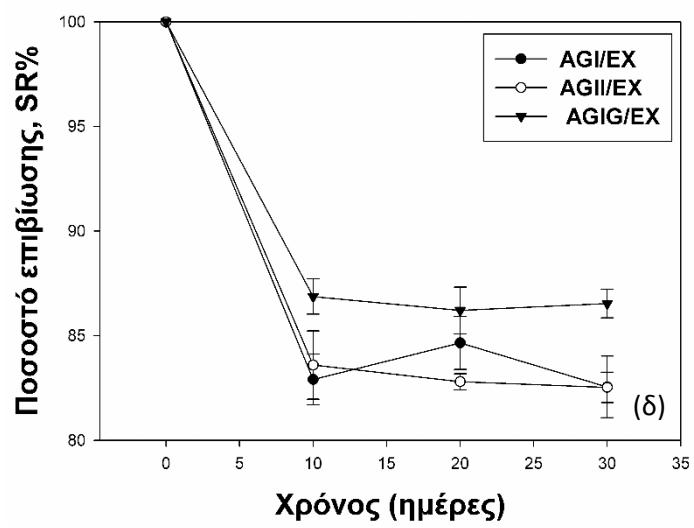
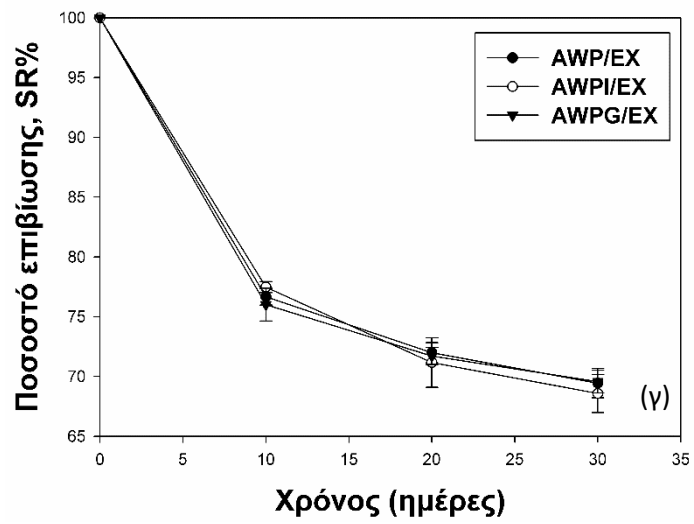
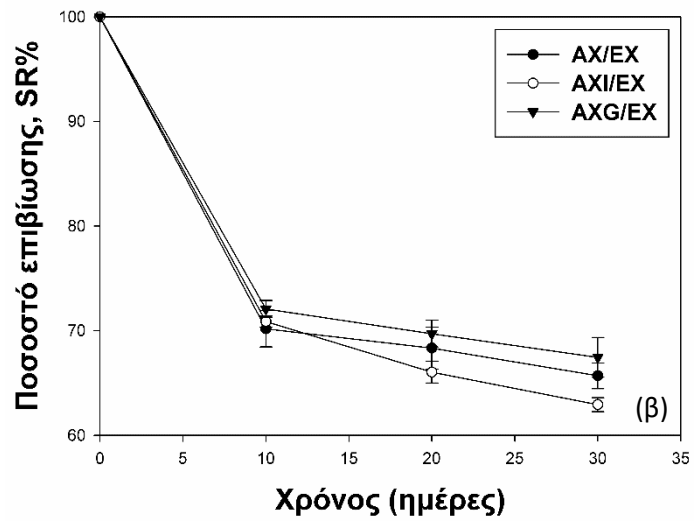
Διατήρηση προϊόντων εγκλεισμού (μέσω της τεχνικής της εξώθησης) υπό κατάψυξη (-18°C) – Βιωσιμότητα (SR%) του εγκλεισμένου προβιοτικού στελέχους BB-12

Ο εγκλεισμός αναμένεται να έχει προστατευτική επίδραση στη βιωσιμότητα των προβιοτικών βακτηρίων κατά την αποθήκευσή τους σε χαμηλές θερμοκρασίες κατάψυξης. Παρόλα αυτά, η ίδια η διεργασία της κατάψυξης μπορεί να έχει επιζήμια επίδραση στην ακεραιότητα των εγκλεισμένων κυττάρων λόγω των σχηματιζόμενων κρυστάλλων πάγου (Sousa et al. 2015). Με βάση τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 5.2, επιβεβαιώνεται ότι η κατάψυξη είχε αρνητική επίδραση στη βιωσιμότητα του προβιοτικού στελέχους BB-12, οδηγώντας σε απώλεια της βιωσιμότητάς του τις πρώτες 10 ημέρες αποθήκευσης κατά 1.2-5.0 logcfu g<sup>-1</sup>. Το συγκεκριμένο γεγονός μπορεί να αποδοθεί στην απότομη έκθεση των βακτηριακών κυττάρων στις αντίξοες συνθήκες της κατάψυξης. Κατά τα άλλα, κατά τη διάρκεια του υπόλοιπου χρονικού διαστήματος της αποθήκευσης η βιωσιμότητα των προβιοτικών κυττάρων παρέμεινε σχετικά σταθερή. Το αλγινικό μόνο του (A/EX) δεν παρείχε ικανοποιητική προστασία στο προβιοτικό στέλεχος BB-12 κατά την απότομη έκθεσή του σε χαμηλή θερμοκρασία, καθώς παρατηρήθηκε μείωση του ποσοστού επιβίωσης των προβιοτικών βακτηρίων στο 45.7% μετά τις 10 ημέρες αποθήκευσης (Διάγραμμα 5.2α). Ωστόσο, ο συνδυασμός του αλγινικού με άλλα πολυμερή υλικά, όπως η ξανθάνη (AX/EX), η κ-καραγενάνη (AC/EX) και το CNC (ACNC/EX), προσέφερε επιπρόσθετη προστασία στα προβιοτικά κύτταρα (p<0,05), αυξάνοντας το ποσοστό επιβίωσης κατά 17.3-35.3% στη διάρκεια της αποθήκευσης υπό κατάψυξη (Διάγραμμα 5.2β,ε,ζ). Συγκεκριμένα, η χρήση κ-καραγενάνης ή CNC συνεισέφερε στη διατήρηση του βακτηριακού φορτίου πάνω από το ελάχιστο απαιτούμενο όριο, με αποτέλεσμα στο τέλος της αποθήκευσης των συγκεκριμένων προϊόντων εγκλεισμού στους -18°C να εντοπίζεται βακτηριακό φορτίο 6.3-6.8 logcfu

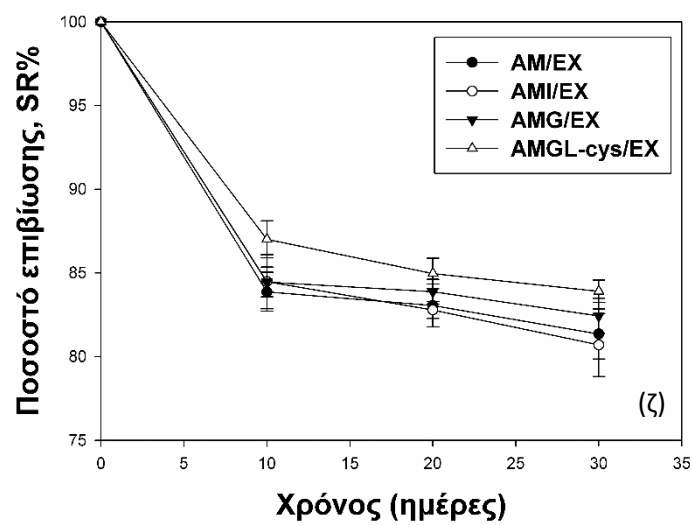
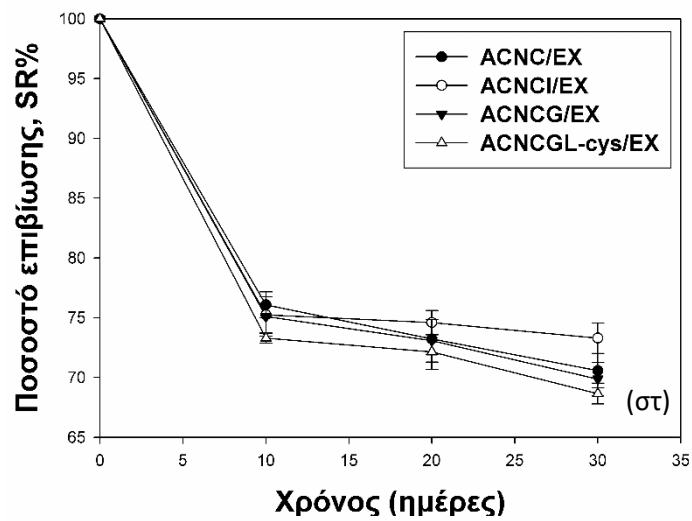
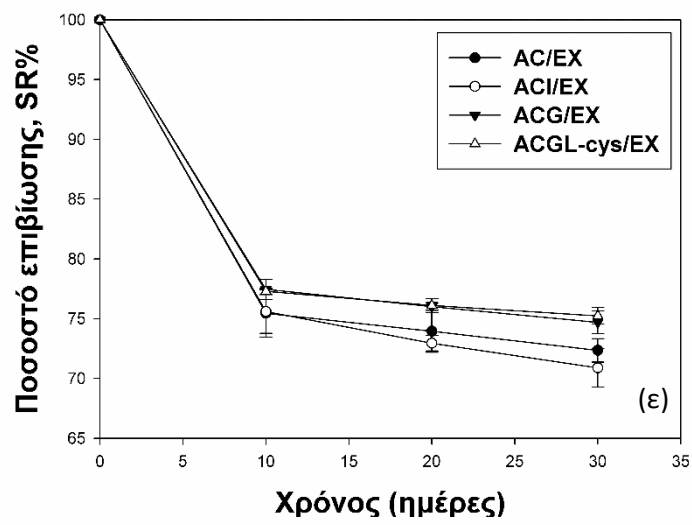
g<sup>-1</sup>. Παρόμοια αποτελέσματα βρέθηκαν όταν συνδυάστηκαν σκόνη ορού γάλακτος και πηκτίνη με αλγινικό νάτριο (AWP/EX), διατηρώντας το φορτίο των προβιοτικών βακτηρίων ίσο με 5.8-6.3 logcfu g<sup>-1</sup> (68.6-69.5% του αρχικού φορτίου) στο τέλος των 30 ημερών αποθήκευσης υπό κατάψυξη. Ακόμη πιο αξιόλογη προστασία του προβιοτικού στελέχους BB-12 (p<0.05) επιτεύχθηκε με συνδυασμό της κρουπροστατευτικής ουσίας γλυκερόλης με το αλγινικό νάτριο (AGI/EX) (Διάγραμμα 5.2δ). Στην περίπτωση αυτή επιτεύχθηκαν ποσοστά επιβίωσης 82.6-86.5% που αντιστοιχούν σε ένα ικανοποιητικά υψηλό βακτηριακό φορτίο της τάξης των 6.2-7.8 logcfu g<sup>-1</sup> στο τέλος του χρόνου αποθήκευσης υπό κατάψυξη. Οι Sultana et al. (2000) χρησιμοποίησαν μίγμα γλυκερόλης-αλγινικού για τον εγκλεισμό προβιοτικών βακτηρίων και παρατήρησαν πολλαπλάσια αύξηση στη βιωσιμότητα των βακτηρίων σε σχέση με καλλιέργειες που είχαν εγκλειστεί μόνο σε αλγινικό ή σε μίγμα αλγινικού-αμύλου. Ακόμη, όταν το γάλα χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή των προϊόντων εγκλεισμού AM/EX, AMI/EX (αλγινικό-γάλα-ινουλίνη), AMG/EX και AMGL-cys/EX (αλγινικό-γάλα-γλυκόζη-L-κυστεΐνη), φάνηκε ότι παρείχε αποτελεσματική προστασία στο προβιοτικό στέλεχος BB-12 κατά την αποθήκευσή του υπό κατάψυξη, οδηγώντας σε μέγιστα συνολικά αντίστοιχα ποσοστά επιβίωσης, κυμαινόμενα από 80.7% μέχρι 83.9% (Διάγραμμα 5.2ζ). Το τελικό βακτηριακό φορτίο διατηρήθηκε σε σημαντικά υψηλότερα επίπεδα από το ελάχιστο απαιτούμενο όριο για εμπορικά προϊόντα, φτάνοντας στα 8.1-8.5 logcfu g<sup>-1</sup> στο τέλος του χρόνου αποθήκευσης. Αντίθετα, η προσθήκη ινουλίνης ή γλυκόζης στο εγκλειστικό μίγμα δεν φάνηκε να παρέχει κάποια αξιόλογη προστασία στο προβιοτικό στέλεχος. Τα ανωτέρω προϊόντα εγκλεισμού, παρόλα αυτά, εμφάνισαν, εν γένει ελαφρώς υψηλότερη σταθερότητα, με ποσοστά επιβίωσης υψηλότερα κατά 0.6-1.5% από αυτά των αντίστοιχων δειγμάτων που δεν περιείχαν ινουλίνη ή γλυκόζη.



Διάγραμμα 5.2: Μεταβολή ποσοστού επιβίωσης (SR%) του εγκλεισμένου προβιοτικού στελέχους BB-12 μέσω της τεχνικής της εξώθησης κατά τη διάρκεια διατήρησης στους -18°C για 30 ημέρες. Η κωδικοποίηση των δειγμάτων έχει οριστεί στον Πίνακα 4.1.



Διάγραμμα 5.2 (συνέχεια).



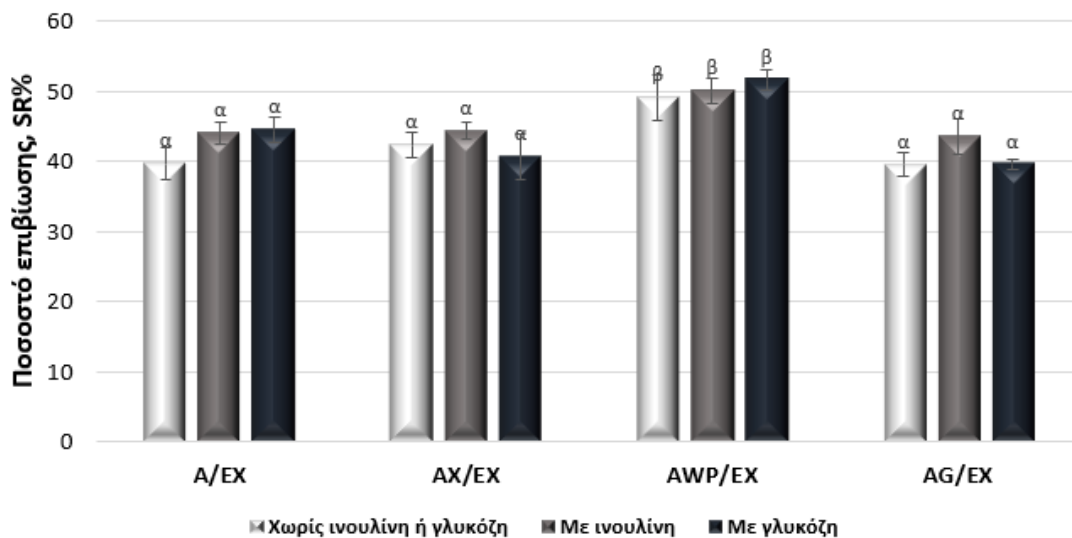
Διάγραμμα 5.2 (συνέχεια).

5.1.3 Εκτίμηση βιωσιμότητας (SR%) εγκλεισμένου προβιοτικού στελέχους BB-12 μέσω της τεχνικής της εξώθησης κατά την έκθεσή του σε συνθήκες προσομοίωσης του γαστρεντερικού συστήματος (ΠΓΥ-ΠΕΥ)

Η έκθεση των εγκλεισμένων κυττάρων σε διάλυμα προσομοίωσης γαστρικών υγρών (ΠΓΥ) και, στη συνέχεια, σε διάλυμα προσομοίωσης εντερικών υγρών (ΠΕΥ), προκάλεσε σημαντική μείωση της βιωσιμότητας των προβιοτικών κυττάρων σε όλες τις περιπτώσεις με χρήση όλων των εγκλειστικών μιγμάτων. Παρόλα αυτά, μεταξύ των διαφόρων εγκλειστικών μέσων προέκυψαν σημαντικές διαφορές ως προς το μέγεθος της παρεχόμενης προστασίας ( $p < 0.05$ ) στα εγκλεισμένα κύτταρα (Διαγράμματα 5.3-5.6). Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 5.3, το αλγινικό νάτριο (A/EX) λόγω του υψηλού πορώδους του πλέγματος που σχηματίζει λειτουργεί ως ασθενής ασπίδα προστασίας των προβιοτικών κυττάρων κατά την έκθεση των προϊόντων εγκλεισμού σε συνθήκες προσομοίωσης του γαστρεντερικού συστήματος. Ο συνδυασμός αλγινικού νατρίου με άλλα πολυμερή με τα οποία δημιουργεί ισχυρά σύμπλοκα μπορεί να οδηγήσει σε πιο σταθερές και πυκνές δομές και συνεπώς να μειώσει το ρυθμό διάχυσης των γαστρικών υγρών. Υλικά όπως το CNC, συγκεκριμένα, έχει αναφερθεί ότι μπορούν να περιορίσουν την απορρόφηση γαστρικών υγρών, με αποτέλεσμα να παρέχουν αυξημένη βιωσιμότητα στα εγκλεισμένα προβιοτικά βακτήρια (Razavi et al. 2021). Τα παραπάνω επιβεβαιώνονται κατά την ενσωμάτωση κ-καραγενάνης (AC/EX), ξανθάνης (AX/EX) ή CNC (ACNC/EX) στο εγκλειστικό μίγμα, η οποία ενίσχυσε την προστασία των προβιοτικών κυττάρων, αυξάνοντας έτσι τα ποσοστά επιβίωσης κατά 2.7-19.5% κατά την έκθεση σε διάλυμα ΠΓΥ και κατά 7.9-44.6% κατά την έκθεση σε διάλυμα ΠΕΥ. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί και από άλλους ερευνητές, οι οποίοι διαπίστωσαν βελτιωμένη προστασία συνδυάζοντας διάφορα υλικά στα εγκλειστικά μίγματα. Για παράδειγμα, οι Sandoval-Castilla et al. (2010) συνδύασαν πηκτίνη με αλγινικό νάτριο σε διάφορες αναλογίες για τον εγκλεισμό του προβιοτικού στελέχους *L. casei*, επιτυγχάνοντας βέλτιστα αποτελέσματα με εφαρμογή διαλύματος αλγινικού νατρίου 0.5% (w/w) και πηκτίνης 3% (w/w). Αντίστοιχα, οι Dafe, Etemadi, Zarredar, et al. (2017) επέτυχαν βέλτιστη προστασία του προβιοτικού στελέχους *L. plantarum* ATCC μέσω εγκλεισμού του σε ένα μίγμα CMC (0.5% w/w) και κ-καραγενάνης (1.5% w/w). Όσον αφορά την προστασία, ωστόσο, των προβιοτικών βακτηρίων στο περιβάλλον του γαστρεντερικού συστήματος, η γλυκερόλη δεν έχει αναφερθεί ότι έχει κάποια σημαντική συνεισφορά, όπως παρατηρήθηκε και από άλλους ερευνητές (Sultana et al., 2000), αλλά επιβεβαιώθηκε και στην παρούσα διδακτορική διατριβή. Από την άλλη πλευρά, η χρήση σκόνης ορού γάλακτος (AWP/EX) ή γάλακτος (AM/EX) αναμένεται ότι θα παρέχει επαρκή προστασία στα προβιοτικά βακτήρια. Μάλιστα, ο εγκλεισμός του προβιοτικού στελέχους BB-12 σε σφαιρίδια που περιέχουν σκόνη ορού γάλακτος, βρέθηκε ότι αυξάνει τη βιωσιμότητά του σε διάλυμα ΠΓΥ κατά 6.0-9.5% σε σχέση με σφαιρίδια αποτελούμενα μόνο από αλγινικό νάτριο. Σύμφωνα με τους Cook, Tzortzis, Charalampopoulos, & Khutoryanskiy (2012), αυτό οφείλεται στην

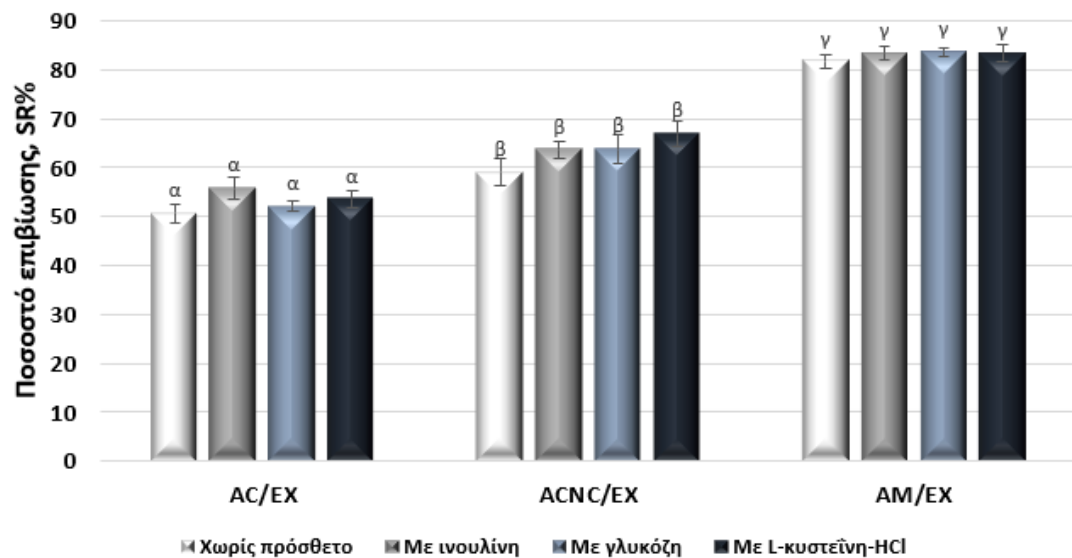
αντοχή των πρωτεϊνών του ορού γάλακτος σε αποικοδόμηση κατά την έκθεσή τους στα γαστρικά υγρά. Πάντως, τα καλύτερα αποτελέσματα στην παρούσα διδακτορική διατριβή επιτεύχθηκαν με τη χρήση γάλακτος κατά τον εγκλεισμό του προβιοτικού στελέχους BB-12, οδηγώντας σε ποσοστό επιβίωσης 81.2% μετά το πέρας της έκθεσης των προϊόντων εγκλεισμού σε συνθήκες προσομοίωσης του γαστρεντερικού συστήματος. Σύμφωνα με τους Verruck et al. (2017), η χρήση πλήρους γάλακτος στη σύνθεση του εγκλειστικού μίγματος περιορίζει σημαντικά τη διάχυση των κατιόντων  $H^+$ , του οξυγόνου, των οργανικών οξέων και του νερού εντός των προϊόντων εγκλεισμού, ενισχύοντας έτσι τη διατήρηση των προβιοτικών βακτηρίων. Επιπλέον, τα αυξημένα ποσοστά επιβίωσης του προβιοτικού στελέχους BB-12, όταν αυτό βρίσκεται εγκλεισμένο σε σφαιρίδια αλγινικού-γάλακτος και εκτίθεται σε ένζυμα όπως η πεψίνη, έχει αναφερθεί ότι μπορεί να οφείλονται στη διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών όπως πεπτίδια και αμινοξέα. Τούτο επιτυγχάνεται είτε μέσω της ενζυμικής δράσης στις πρωτεΐνες του γάλακτος είτε ως αποτέλεσμα της ρυθμιστικής δράσης των πρωτεϊνικών υδρολυμάτων (Liserre et al. 2007).

Οι Verruck et al. (2017) παρατήρησαν επίσης ότι η χρήση αλγινικού νατρίου σε συνδυασμό με πλήρες κατσικίσιο γάλα ή/και ινουλίνη ως εγκλειστικό μέσο παρέχει ικανοποιητική προστασία του προβιοτικού στελέχους *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 κατά την έκθεσή του σε *in vitro* γαστρεντερικό σύστημα, προτείνοντας έτσι τη χρήση του συγκεκριμένου μίγματος για τον εγκλεισμό του συγκεκριμένου στελέχους. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, η προσθήκη ινουλίνης στο εγκλειστικό μίγμα οδήγησε σε αύξηση της βιωσιμότητας των προβιοτικών κυττάρων έως και κατά  $0.8 \log_{cfu} g^{-1}$ . Η προσθήκη γλυκόζης στη σύνθεση του εγκλειστικού μίγματος οδήγησε σε ελάχιστη αύξηση του βακτηριακού φορτίου μετά την έκθεση των προϊόντων εγκλεισμού σε διαλύματα προσομοίωσης γαστρικών και εντερικών υγρών σε σύγκριση με τα αντίστοιχα προϊόντα εγκλεισμού χωρίς περιεχόμενη γλυκόζη, γεγονός που υποδεικνύει τη λειτουργία της γλυκόζης πιθανότερα ως θρεπτικής ουσίας για τα προβιοτικά κύτταρα, παρά ως προστατευτικού μέσου αυτών. Η προσθήκη L-κυστεΐνης-HCl φαίνεται να αύξησε ελαφρά την επιβίωση του προβιοτικού στελέχους BB-12 κατά την έκθεσή του σε συνθήκες προσομοίωσης του γαστρεντερικού συστήματος στην περίπτωση του δείγματος ACNCGL-cys/EX (αλγινικό-CNC-γλυκόζη-L-κυστεΐνη-HCl). Παρόλα αυτά, δεν παρατηρήθηκε αντίστοιχη αύξηση στην περίπτωση του αντίστοιχου δείγματος AMGL-cys/EX (αλγινικό-γάλα-γλυκόζη-L-κυστεΐνη) σε σύγκριση με το δείγμα AMG/EX. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα εγκλειστικά μίγματα που αποδείχθηκαν πιο αποτελεσματικά στην προστασία του προβιοτικού στελέχους BB-12 κατά τη συντήρησή του σε χαμηλές θερμοκρασίες, ιδιαίτερα τα προϊόντα εγκλεισμού AM/EX, AMI/EX, AMG/EX και AMGL-cys/EX, ήταν και εκείνα με την πιο ικανοποιητική προστασία κατά την έκθεσή του σε συνθήκες προσομοίωσης του γαστρεντερικού συστήματος.



*Διάγραμμα 5.3: Ποσοστά επιβίωσης (SR%) (μέσος όρος ± τυπική απόκλιση) του εγκλεισμένου προβιοτικού στελεχούς BB-12 στα διάφορα εγκλειστικά μίγματα (χωρίς κάποιο πρόσθετο, με ινουλίνη ή με γλυκόζη) μέσω της τεχνικής της εξώθησης μετά την έκθεσή του σε συνθήκες προσομοίωσης γαστρικών υγρών (ΠΓΥ). Η κωδικοποίηση των δειγμάτων έχει οριστεί στον Πίνακα 4.1.*

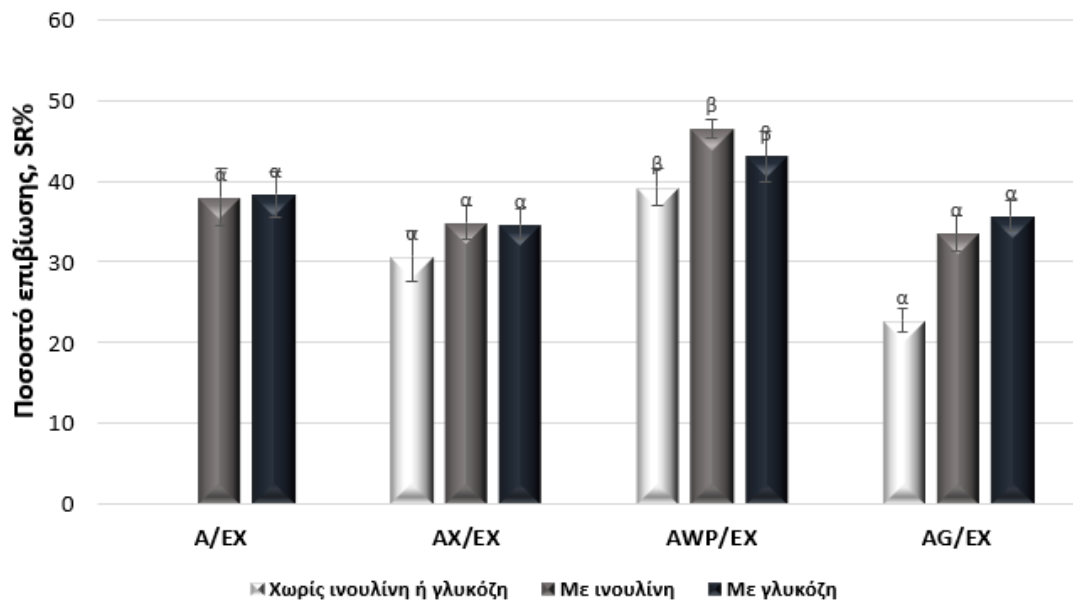
\*Τα μικρά γράμματα παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές ( $p < 0.05$ ) μεταξύ των εγκλειστικών μιγμάτων.



*Διάγραμμα 5.4: Ποσοστά επιβίωσης (SR%) (μέσος όρος ± τυπική απόκλιση) του εγκλεισμένου προβιοτικού στελεχούς BB-12 στα διάφορα εγκλειστικά μίγματα (χωρίς κάποιο πρόσθετο, με ινουλίνη, με γλυκόζη ή με L-κυστεΐνη-HCl) μέσω της τεχνικής της εξώθησης μετά την έκθεσή του σε συνθήκες προσομοίωσης γαστρικών υγρών (ΠΓΥ). Η κωδικοποίηση των δειγμάτων έχει οριστεί στον Πίνακα 4.1.*

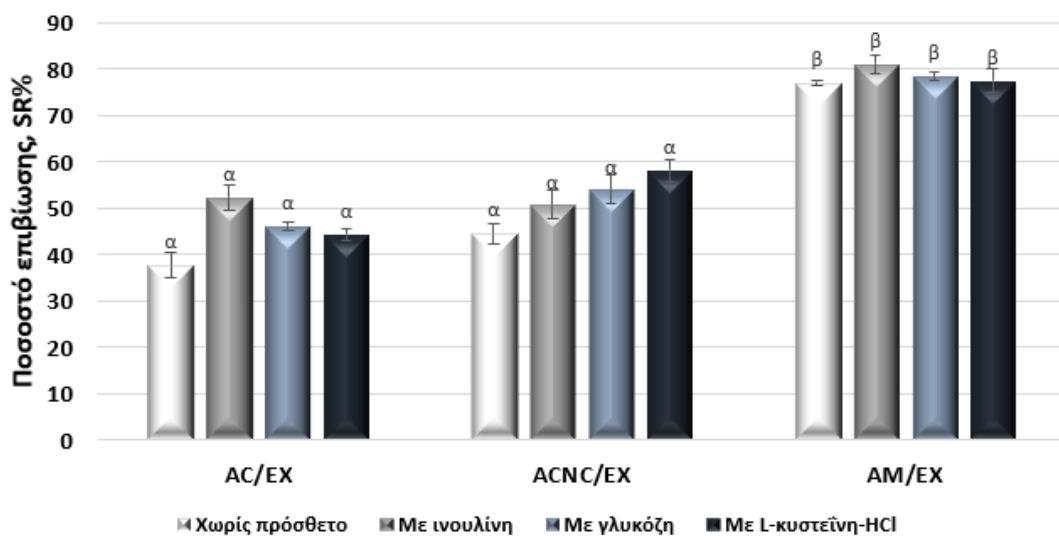
\* Τα μικρά γράμματα παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές ( $p < 0.05$ ) μεταξύ των εγκλειστικών μιγμάτων.





*Διάγραμμα 5.5: Ποσοστά επιβίωσης (SR%) (μέσος όρος ± τυπική απόκλιση) του εγκλεισμένου προβιοτικού στελέχους BB-12 στα διάφορα εγκλειστικά μίγματα (χωρίς κάποιο πρόσθετο, με ινουλίνη ή με γλυκόζη) μέσω της τεχνικής της εξώθησης μετά την έκθεσή του σε συνθήκες προσομοίωσης εντερικών υγρών (ΠΕΥ). Η κωδικοποίηση των δειγμάτων έχει οριστεί στον Πίνακα 4.1.*

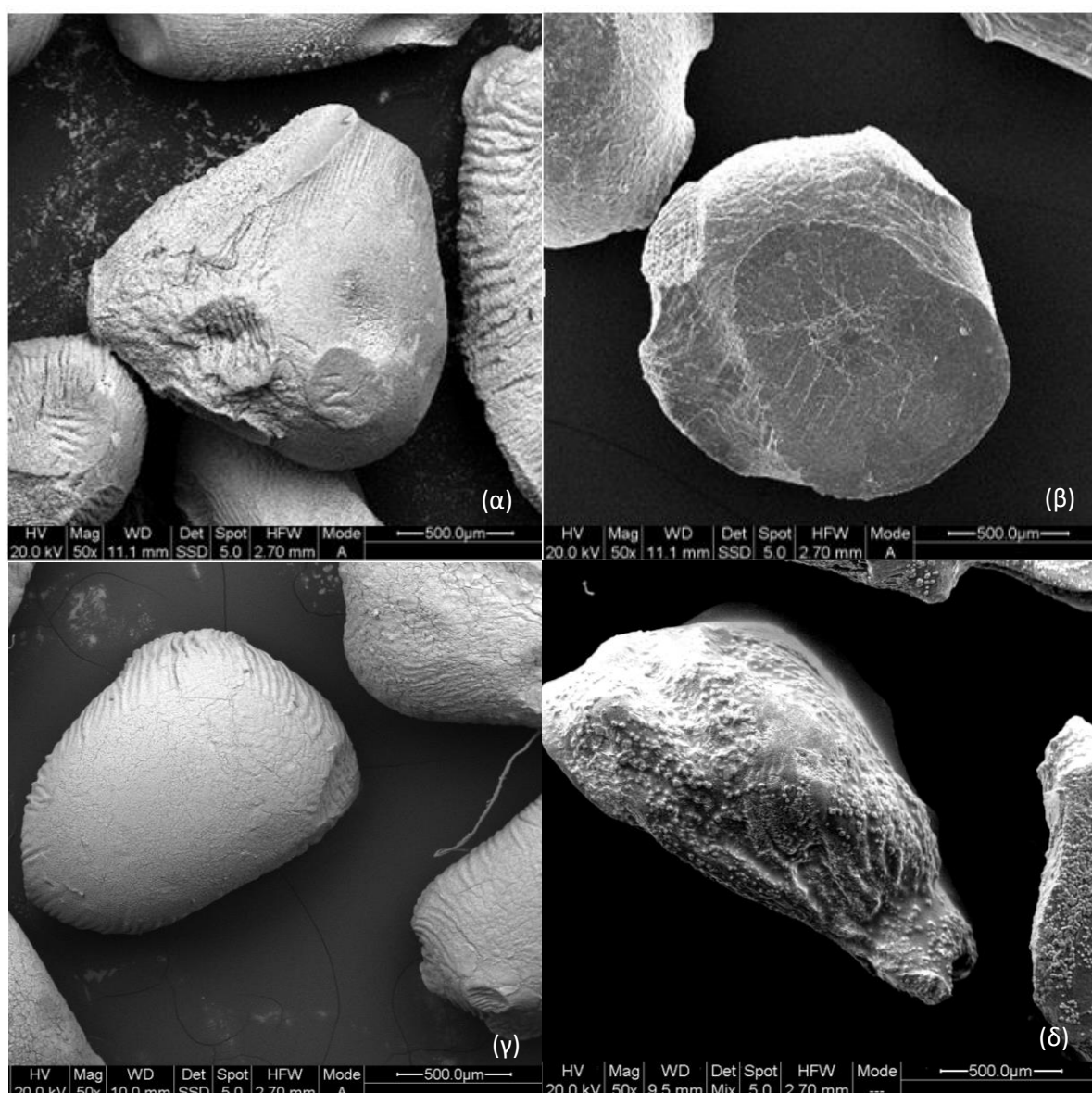
\* Τα μικρά γράμματα παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές ( $p < 0.05$ ) μεταξύ των εγκλειστικών μιγμάτων.



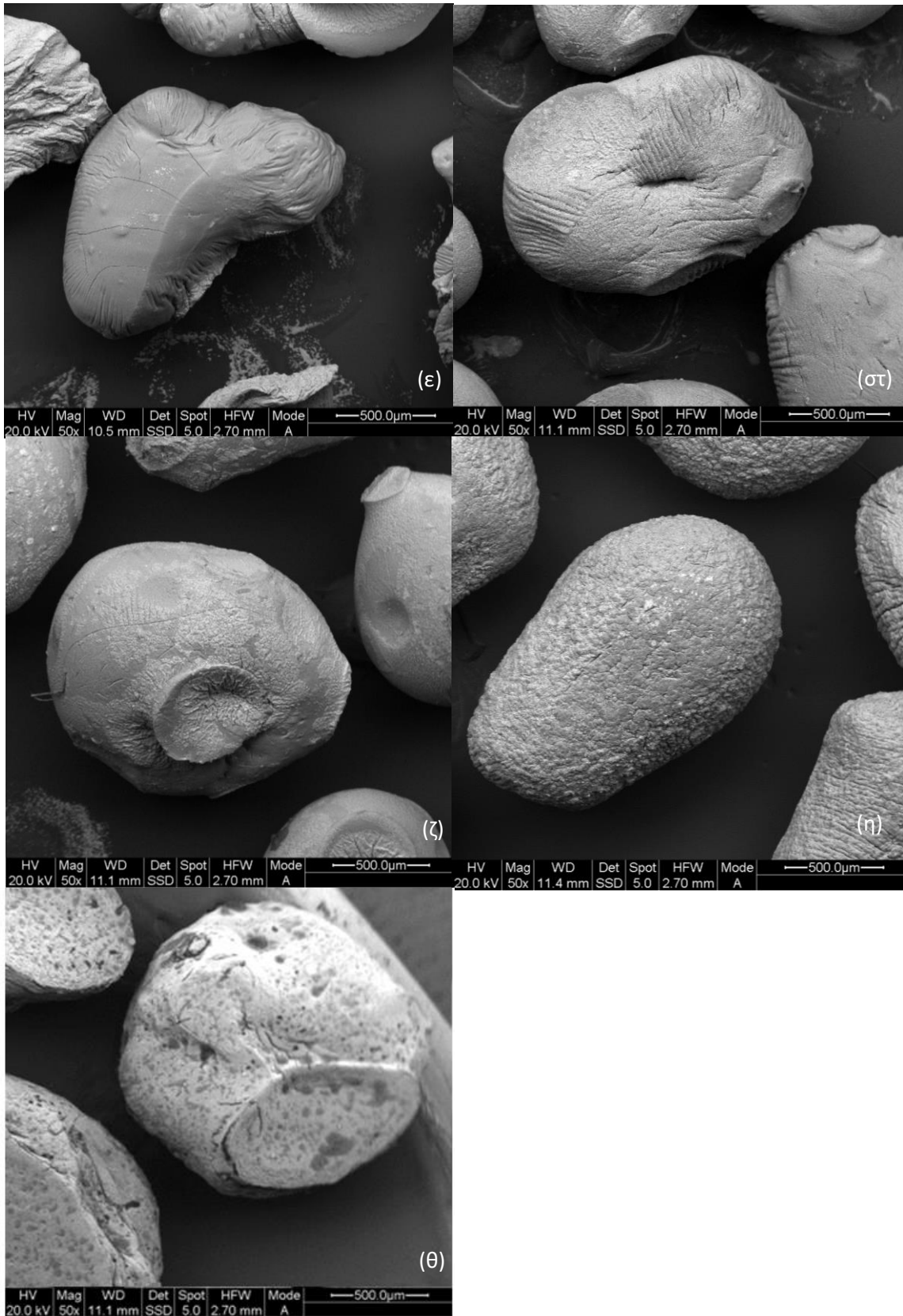
*Διάγραμμα 5.6: Ποσοστά επιβίωσης (SR%) (μέσος όρος ± τυπική απόκλιση) του εγκλεισμένου προβιοτικού στελέχους BB-12 στα διάφορα εγκλειστικά μίγματα (χωρίς κάποιο πρόσθετο, με ινουλίνη, με γλυκόζη ή με L-κυστεΐνη-HCl) μέσω της τεχνικής της εξώθησης μετά την έκθεσή του σε συνθήκες προσομοίωσης εντερικών υγρών (ΠΕΥ). Η κωδικοποίηση των δειγμάτων έχει οριστεί στον Πίνακα 4.1.*

#### 5.1.4 Αξιολόγηση μικροδομής και μορφολογίας προϊόντων εγκλεισμού μέσω της τεχνικής της εξώθησης με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM)

Η μικροδομή των προϊόντων εγκλεισμού (σφαιριδίων) παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της βιωσιμότητας των εγκλεισμένων προβιοτικών βακτηρίων. Μία πορώδης δομή ή η παρουσία ρωγμών στην επιφάνεια των σφαιριδίων περιορίζουν την προστατευτική δράση αυτών, καθώς διευκολύνεται η διάχυση ουσιών από το περιβάλλον, καθιστώντας τα προβιοτικά βακτήρια επιρρεπή στις εξωτερικές συνθήκες. Η μορφολογία των τελικών προϊόντων εγκλεισμού μελετήθηκε με τη χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης (SEM). Οι εικόνες που ελήφθησαν μέσω της ανάλυσης SEM παρουσιάζονται στις Εικόνες 5.1 και 5.2.



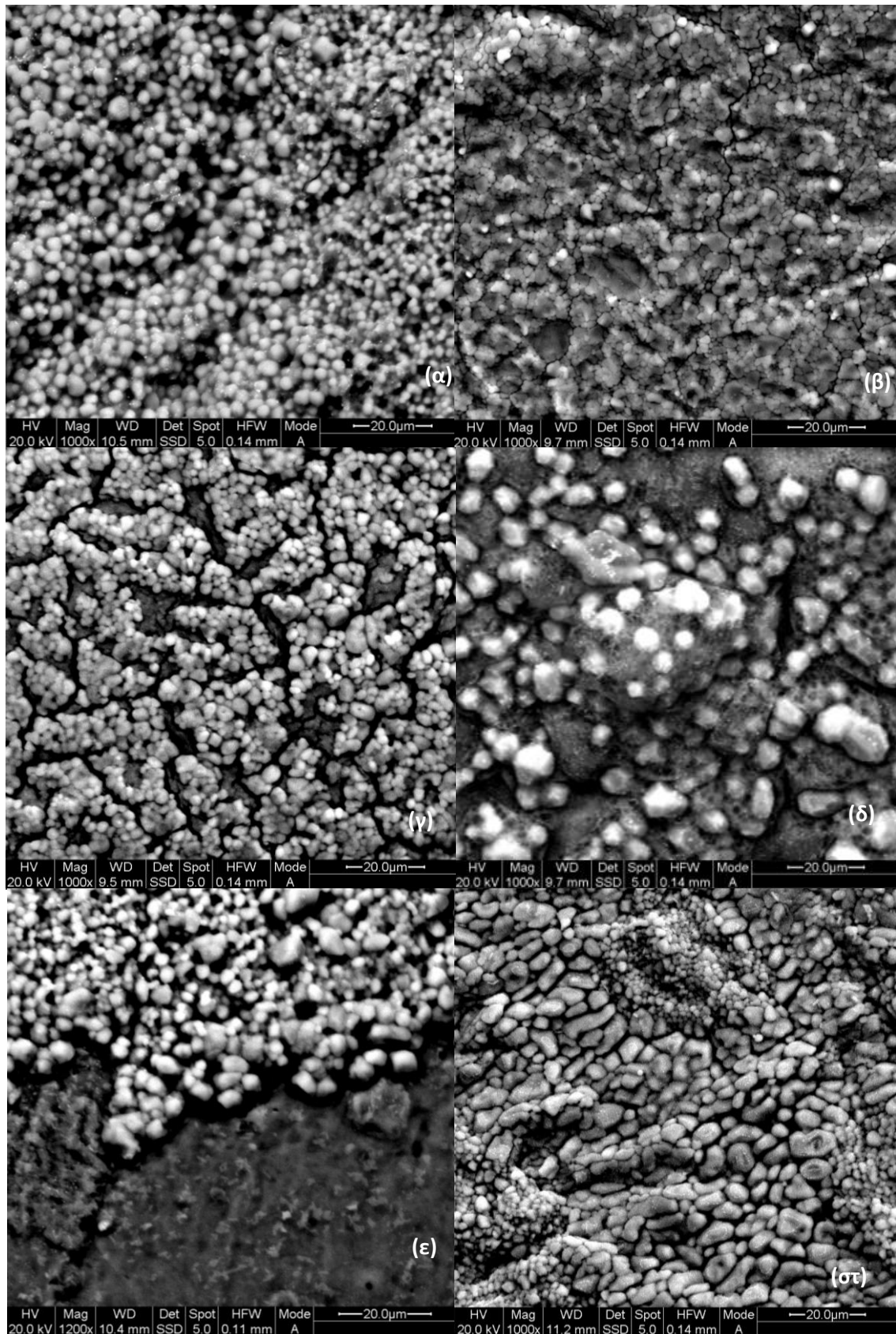
Εικόνα 5.1: Ενδεικτικές δομές των προϊόντων εγκλεισμού μέσω τεχνικής εξώθησης με Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης σε μεγέθυνση 50x. Στη συγκεκριμένη εικόνα παρουσιάζονται τα προϊόντα εγκλεισμού (α) A, (β) AI, (γ) AG, (δ) AWP, (ε) AX, (στ) AGI, (ζ) AC, (η) ACNC, (θ) AM. Η κωδικοποίηση των δειγμάτων παρουσιάζεται στον Πίνακα 4.1.



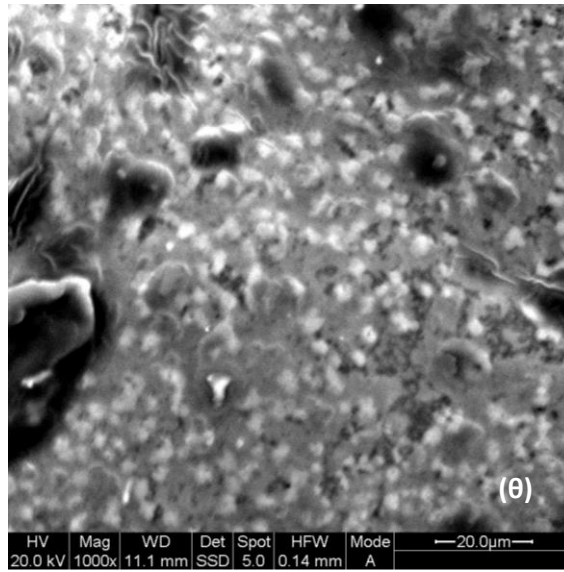
Εικόνα 5.1 (συνέχεια)

Για το χαρακτηρισμό της επιφανειακής μορφολογίας των προϊόντων εγκλεισμού οι εικόνες ελήφθησαν σε μεγέθυνση 50x και 1000x. Όλες οι εικόνες έχουν ληφθεί σε ίδιες μεγεθύνσεις προκειμένου να διευκολύνεται η σύγκριση μεταξύ των διαφορετικών δειγμάτων εγκλεισμένων προϊόντων που παρασκευάστηκαν με τη συγκεκριμένη μέθοδο. Ειδικότερα, στην Εικόνα 5.1 παρουσιάζεται η δομή των διαφόρων προϊόντων εγκλεισμού σε μεγέθυνση 50x, ενώ στην Εικόνα 5.2 απεικονίζεται λεπτομερέστερα η μορφολογία της επιφάνειας των προϊόντων εγκλεισμού σε μεγέθυνση 1000x. Τα σφαιρίδια που προέκυψαν από διαδικασία εγκλεισμού μέσω της τεχνικής εξώθησης είχαν γενικώς παρόμοιο ακανόνιστο σχήμα, με λεία επιφάνεια και χωρίς σημάδια συσσωμάτωσης (Εικόνα 5.1).

Τα διαφορετικά εγκλειστικά μίγματα απέδωσαν προϊόντα εγκλεισμού με σημαντικές διαφοροποιήσεις στη δομή τους. Συγκεκριμένα, η προσθήκη ξανθάνης (AX/EX) ή μίγματος σκόνης ορού γάλακτος και πηκτίνης (AWP/EX) στο βασικό εγκλειστικό του αλγινικού είχε ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μίας λιγότερο σφαιρικής και περισσότερο συρρικνωμένης δομής, ενώ τα υπόλοιπα υλικά δεν επηρέασαν τη σφαιρικότητα των σωματιδίων. Η προσθήκη γλυκόζης (AG/EX), γλυκερόλης (AGI/EX) ή κ-καραγενάνης (AC/EX) στο βασικό εγκλειστικό του αλγινικού παρείχε στα προϊόντα εγκλεισμού μία πιο λεία επιφάνεια με λιγότερες κοιλότητες σε σύγκριση με τα σφαιρίδια που παρασκευάστηκαν μόνο με αλγινικό (A/EX). Ακόμη καλύτερα αποτελέσματα προέκυψαν κατά την προσθήκη CNC (ACNC/EX) στο βασικό εγκλειστικό του αλγινικού, όπου προέκυψαν προϊόντα εγκλεισμού με ακόμη πιο λεία επιφάνεια χωρίς καθόλου κοιλότητες. Παρόμοια αποτελέσματα βελτίωσης της μικροδομής έχουν αναφερθεί από προηγούμενους ερευνητές κατά την ενίσχυση αλγινικού με shellac (Silva et al., 2018). Με τη χρήση γάλακτος εναλλακτικά του νερού για την παρασκευή του διαλύματος του εγκλειστικού μέσου προέκυψε πιο πυκνή και σύνθετη δομή, όπως φαίνεται στις εικόνες 5.1θ και 5.2θ. Επιπλέον, δεν υπάρχουν ορατές ρωγμές ή σπασίματα στην επιφάνεια των διαφόρων σφαιριδίων, υποδηλώνοντας ότι έτσι παρέχεται δυνατότητα για περιορισμό της διαπερατότητας σε αέρα, όπως έχει αναφερθεί και από τους Nunes et al. (2018). Η μεγαλύτερη μεγέθυνση στην εικόνα 5.2 διευκολύνει την παρατήρηση των βακτηριακών αποικιών στην επιφάνεια των σφαιριδίων. Συγκεκριμένα, γίνεται αντιληπτή η διασύνδεση των προβιοτικών κυττάρων στην επιφάνεια του εγκλειστικού μέσου, με αποτέλεσμα την ακινητοποίηση των βακτηρίων και την τυχαία κατανομή τους στην επιφάνεια των προϊόντων εγκλεισμού.



*Εικόνα 5.2: Ενδεικτικές δομές των προϊόντων εγκλεισμού μέσω τεχνικής εξώθησης με Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης σε μεγέθυνση 1000x. Στη συγκεκριμένη εικόνα παρουσιάζονται τα προϊόντα εγκλεισμού (α) A, (β) Al, (γ) AG, (δ) AWP, (ε) AX, (στ) AGI, (ζ) AC, (η) ACNC, (θ) AM. Η κωδικοποίηση των δειγμάτων παρουσιάζεται στον Πίνακα 4.1.*



Εικόνα 5.2 (συνέχεια).

## 5.2. Εγκλεισμός του προβιοτικού στελέχους BB-12 μέσω της τεχνικής της γαλακτωματοποίησης (emulsification)

Τα εγκλειστικά μίγματα που χρησιμοποιήθηκαν για τον εγκλεισμό του προβιοτικού στελέχους BB-12 με την τεχνική της γαλακτωματοποίησης επιλέχθηκαν με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την 1<sup>η</sup> πειραματική σειρά (εγκλεισμός του προβιοτικού στελέχους BB-12 με την τεχνική της εξώθησης). Λόγω της σημαντικής επίδρασης της γλυκόζης στη βιωσιμότητα των προβιοτικών κυττάρων, εξετάστηκαν εγκλειστικά μίγματα που περιείχαν γλυκόζη, σε ποσοστό 5% w/v. Για λόγους σύγκρισης μεταξύ των δύο μεθόδων εγκλεισμού (εξώθηση-γαλακτωματοποίηση), παρασκευάστηκαν όλα τα διαφορετικά εγκλειστικά μίγματα που περιείχαν γλυκόζη, ανεξάρτητα από την τελική τους συνεισφορά στη διατήρηση της βιωσιμότητας του προβιοτικού στελέχους BB-12.

### 5.2.1. Εκτίμηση απόδοσης εγκλεισμού (EY%) της τεχνικής της γαλακτωματοποίησης

Όπως προαναφέρθηκε στην υποενότητα 5.1, τα διάφορα εγκλειστικά μίγματα επιλέχθηκαν με στόχο την ενίσχυση του πλέγματος του αλγινικού, με βάση την ικανότητά τους να του προσδίδουν πυκνότερη ή σταθερότερη δομή. Τόσο τα συμβατικά όσο και τα καινοτόμα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για το σκοπό αυτό, επιλέχθηκαν με βάση είτε τις ιδιότητες σχηματισμού πηκτής, είτε τη δυνατότητα παροχής ενός θρεπτικού ή κρυοπροστατευτικού μέσου, ή ενός περισσότερο ανοξικού περιβάλλοντος στο προβιοτικό στέλεχος BB-12. Ο εγκλεισμός ενός ικανοποιητικού αριθμού ζώντων προβιοτικών κυττάρων εντός των προϊόντων εγκλεισμού είναι μεγάλης σημασίας καθώς συνδέεται άμεσα με τον αριθμό των ζώντων προβιοτικών βακτηρίων τόσο στο τέλος της περιόδου αποθήκευσης ενός εμπορικού προϊόντος τροφίμου όσο και κατά την κατανάλωση και τη διέλευση από το γαστρεντερικό σύστημα. Οι τιμές της απόδοσης εγκλεισμού που επιτεύχθηκαν μέσω της τεχνικής της γαλακτωματοποίησης ήταν ικανοποιητικά υψηλές, που σημαίνει ότι τα ποσοστά επιβίωσης του προβιοτικού στελέχους BB-12 στις συνθήκες της συγκεκριμένης διεργασίας βρέθηκαν πολύ υψηλά, όπως φαίνεται στον Πίνακα 5.2.

Με βάση τις προκύπτουσες τιμές απόδοσης εγκλεισμού, ο εγκλεισμός μέσω γαλακτωματοποίησης φάνηκε ότι είναι περισσότερο αποτελεσματικός όταν το αλγινικό συνδυάζεται με άλλα υλικά, οπότε τότε επιτυγχάνονται υψηλότερες τιμές απόδοσης εγκλεισμού. Έτσι, με τη χρήση μόνο αλγινικού (A/EM) ή αλγινικού σε συνδυασμό με ινουλίνη (AI/EM) επιτεύχθηκαν αποδόσεις εγκλεισμού 86.9 και 84.7%, αντίστοιχα. Παρόμοια αποτελέσματα βρέθηκαν και από τους Song et al. (2013) οι οποίοι, εγκλείοντας κύτταρα ζύμης σε αλγινικό μέσω γαλακτωματοποίησης και επικαλύπτοντάς τα με χιτοζάνη, επέτυχαν ποσοστά απόδοσης εγκλεισμού γύρω στο 77-80%. Από την άλλη πλευρά, η ενσωμάτωση ξανθάνης (AX/EM), κ-καραγενάνης (AC/EM) ή CNC (ACNC/EM) στο βασικό εγκλειστικό μίγμα του αλγινικού, όπως επίσης και ο συνδυασμός του αλγινικού με πηκτίνη και σκόνη ορού γάλακτος (AWP/EM) παρείχαν σημαντικά ( $p < 0.05$ ) υψηλότερες τιμές απόδοσης εγκλεισμού, οι οποίες

έφθασαν έως και 98.9%. Η χρήση γάλακτος για την παρασκευή του διαλύματος του εγκλειστικού μίγματος για τη δημιουργία σφαιριδίων αλγινικού-γάλακτος (AM/EM) είχε ως αποτέλεσμα τιμές απόδοσης εγκλεισμού, οι οποίες έφθασαν έως και 99.2%. Η αυξημένη αποτελεσματικότητα μέσω του συνδυασμού των υλικών αυτών σε ένα εγκλειστικό μίγμα αποδίδεται στην ανάπτυξη ενός πυκνότερου και σταθερότερου πλέγματος το οποίο είναι ικανό να διατηρεί και να προστατεύει ένα μεγαλύτερο αριθμό προβιοτικών κυττάρων.

Πίνακας 5.2: Τιμές απόδοσης εγκλεισμού (EY%) κατά τη διαδικασία εγκλεισμού του προβιοτικού στελέχους BB-12 μέσω της τεχνικής της γαλακτωματοποίησης με διάφορα εγκλειστικά μέσα.

<b>Εγκλειστικό μέσο</b>	<b>EY (%)</b>
<b>A/EM</b>	86.89 ± 1.53 <sup>aA</sup>
<b>AI/EM</b>	84.74 ± 1.95 <sup>aB</sup>
<b>AX/EM</b>	87.06 ± 2.23 <sup>aA</sup>
<b>AXI/EM</b>	85.20 ± 1.75 <sup>aB</sup>
<b>AWP/EM</b>	87.37 ± 3.21 <sup>aA</sup>
<b>AWPI/EM</b>	84.18 ± 2.22 <sup>aB</sup>
<b>AGI/EM</b>	92.60 ± 1.05 <sup>bA</sup>
<b>AGII/EM</b>	90.05 ± 1.37 <sup>bB</sup>
<b>AC/EM</b>	98.85 ± 1.27 <sup>dA</sup>
<b>ACI/EM</b>	96.68 ± 1.74 <sup>dB</sup>
<b>ACL-cys/EM</b>	97.19 ± 1.99 <sup>d</sup>
<b>ACNC/EM</b>	96.17 ± 3.38 <sup>cA</sup>
<b>ACNCI/EM</b>	95.28 ± 2.53 <sup>cB</sup>
<b>ACNCL-cys/EM</b>	97.07 ± 2.05 <sup>c</sup>
<b>AM/EM</b>	99.23 ± 1.14 <sup>eA</sup>
<b>AMI/EM</b>	98.21 ± 1.06 <sup>eB</sup>
<b>AML-cys/EM</b>	99.74 ± 1.13 <sup>e</sup>

Οι τιμές που παρουσιάζονται είναι μέσοι όροι ± τυπικές αποκλίσεις (n=3). Οι διαφορετικοί δείκτες υποδηλώνουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων. Τα μικρά γράμματα χρησιμοποιούνται για τη διαφοροποίηση μεταξύ των δειγμάτων με/ή χωρίς προσθήκη ινουλίνης, ενώ τα κεφαλαία για τη διαφοροποίηση μεταξύ των διαφορετικών εγκλειστικών υλικών. Η κωδικοποίηση των δειγμάτων έχει οριστεί στον Πίνακα 4.2.

Τα παραπάνω αποτελέσματα έρχονται σε συμφωνία με αντίστοιχα άλλων ερευνητών οι οποίοι επιχείρησαν να ενισχύσουν το σύστημα του αλγινικού με άλλα υλικά, όπως π.χ. άμυλο. Οι Martin et al. (2013) μελέτησαν την ανάπτυξη σφαιριδίων αλγινικού ή αλγινικού-αμύλου με εφαρμογή της τεχνικής της γαλακτωματοποίησης επιτυγχάνοντας υψηλότερες αποδόσεις εγκλεισμού με την προσθήκη αμύλου, από 74.4% χωρίς άμυλο σε 97.3% με άμυλο. Επίσης, οι Gebara et al. (2013) μελέτησαν την παραγωγή σφαιριδίων πηκτίνης μέσω γαλακτωματοποίησης και με επικάλυψή τους με πρωτεΐνη ορού γάλακτος επιτυγχάνοντας εξίσου υψηλές τιμές απόδοσης



εγκλεισμού (84.3%). Παρομοίως, οι Khosravi Zanjani et al. (2014) μελέτησαν τον εγκλεισμό των προβιοτικών στελεχών *L. casei* και *B. bifidum* σε σφαιρίδια αλγινικού-ζελατινοποιημένου αμύλου, με ή χωρίς επικάλυψη χιτοζάνης, και επέτυχαν αποδόσεις εγκλεισμού μεταξύ 96.4-98.1%. Η προσθήκη ινουλίνης στο εγκλειστικό μίγμα είχε ως αποτέλεσμα μικρή αλλά σημαντική μείωση των τιμών απόδοσης εγκλεισμού ( $p < 0.05$ ), όπως παρατηρήθηκε και στην περίπτωση εγκλεισμού μέσω της μεθόδου της εξώθησης. Από την άλλη πλευρά, η επιπρόσθετη ενσωμάτωση L-κυστεΐνης-HCl, δε φάνηκε ότι συνεισέφερε σε σημαντική αύξηση της απόδοσης εγκλεισμού.

#### 5.2.2. Σταθερότητα εγκλεισμένου προβιοτικού στελέχους BB-12 μέσω της τεχνικής της γαλακτωματοποίησης κατά τη διατήρηση σε συνθήκες ψύξης ή κατάψυξης

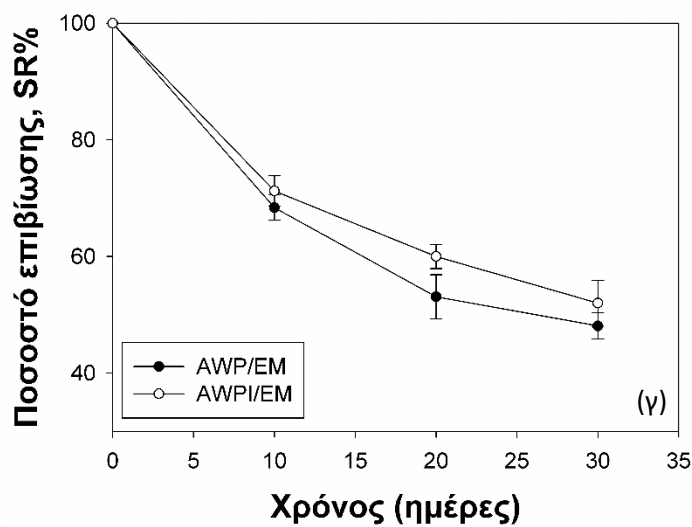
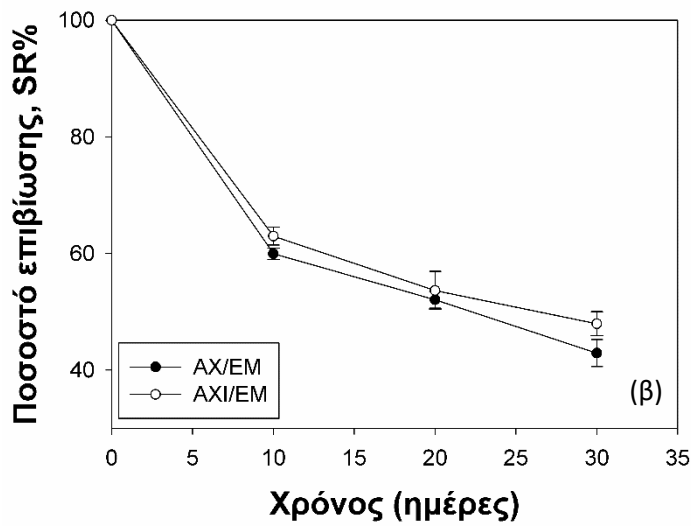
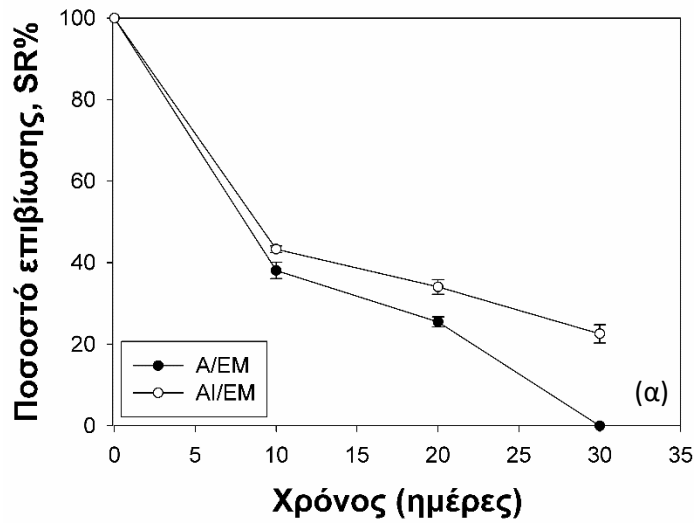
Όπως και στην περίπτωση του εγκλεισμού μέσω εξώθησης, έτσι και στην περίπτωση του εγκλεισμού μέσω γαλακτωματοποίησης έγινε δειγματοληψία και εκτίμηση ανά 10 ημέρες του βακτηριακού φορτίου και των ποσοστών επιβίωσης του προβιοτικού στελέχους BB-12 κατά τη διατήρησή του σε αποθήκευση στους 4°C ή -18°C για διάστημα 30 ημερών. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα Διαγράμματα 5.7 και 5.8, αντίστοιχα.

#### Διατήρηση προϊόντων εγκλεισμού (μέσω της τεχνικής της γαλακτωματοποίησης) υπό ψύξη (4°C) – Βιωσιμότητα (SR%) του εγκλεισμένου προβιοτικού στελέχους BB-12

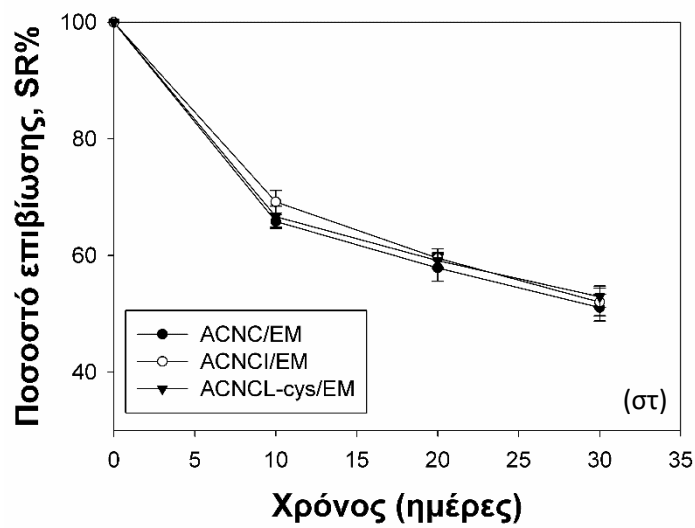
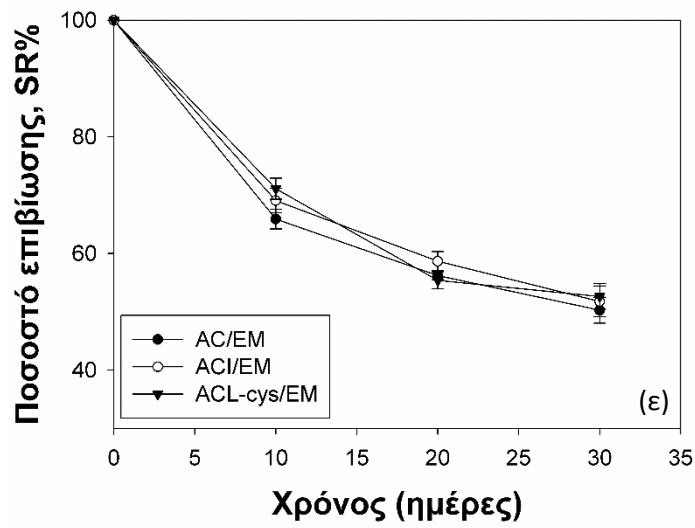
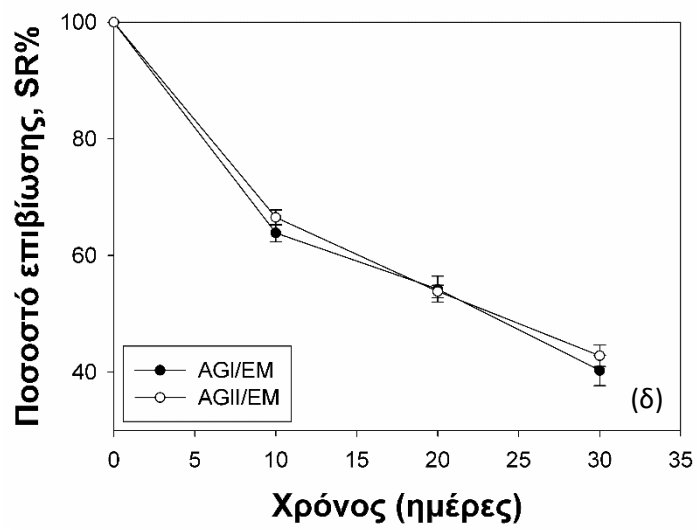
Τα προβιοτικά βακτήρια που εγκλείστηκαν μόνο σε αλγινικό ή σε αλγινικό συνδυαζόμενο με ινουλίνη υπέστησαν σημαντικές απώλειες βιωσιμότητας κατά την αποθήκευση σε ψύξη (Διάγραμμα 5.7α). Τα ποσοστά επιβίωσης των προϊόντων εγκλεισμού μειώθηκαν σε 38.1-43.3% με την πάροδο των 10 πρώτων ημερών αποθήκευσης, ενώ στο τέλος του χρόνου αποθήκευσης το βακτηριακό φορτίο των προϊόντων εγκλεισμού μόνο με αλγινικό ήταν σχεδόν μηδενικό. Η εισαγωγή ινουλίνης στο εγκλειστικό μίγμα ενίσχυσε ελαφρώς τη βιωσιμότητα των κυττάρων, διατηρώντας το ποσοστό επιβίωσης σε 22.5% ως προς το αρχικό βακτηριακό φορτίο στο τέλος του χρόνου αποθήκευσης. Καθώς το αλγινικό από μόνο του δεν επαρκεί για την προστασία και τη διατήρηση της βιωσιμότητας του προβιοτικού στελέχους BB-12, κρίθηκε απαραίτητος ο συνδυασμός του με τα προαναφερθέντα συμβατικά πολυμερή υλικά, όπως με την ξανθάνη (AX/EM) και την κ-καραγενάνη (AC/EM). Η συγκεκριμένη προσέγγιση ήταν επιτυχής, καθώς τα ποσοστά επιβίωσης των εγκλεισμένων κυττάρων αυξήθηκαν έτσι σημαντικά ( $p < 0.05$ ), ξεπερνώντας το 42.9% και 50.3%, αντίστοιχα, στο τέλος των 30 ημερών αποθήκευσης (Διάγραμμα 5.7β,ε). Η βέλτιστη προστασία επιτεύχθηκε στην περίπτωση των προϊόντων εγκλεισμού AM/EM (αλγινικό-γάλα), καθώς τα ποσοστά επιβίωσης ξεπέρασαν το 52.7%, υποδεικνύοντας ότι η συγκεκριμένη σύνθεση εγκλειστικού μίγματος ήταν η πιο αποτελεσματική στην προστασία του προβιοτικού στελέχους BB-12 από εξωτερικούς παράγοντες, όπως υγρασία και οξυγόνο, κατά την αποθήκευσή του υπό ψύξη. Ο εγκλεισμός του προβιοτικού στελέχους BB-12 σε μίγμα αλγινικού-σκόνης ορού

γάλακτος-πηκτικής (AWP/EM) μέσω γαλακτωματοποίησης, οδήγησε σε ποσοστά επιβίωσης μέχρι και 48.1% στο πέρας του χρόνου αποθήκευσης στους 4°C (Διάγραμμα 5.7γ). Αξίζει να σημειωθεί, όπως ήδη έχει τονιστεί, ότι η θερμική μετουσίωση των πρωτεϊνών του ορού γάλακτος που λαμβάνει χώρα κατά την αποστείρωση μπορεί να επηρεάσει τις γαλακτωματοποιητικές τους ιδιότητες και την ικανότητα εγκλεισμού τους. Η ενσωμάτωση γλυκερόλης (AGI/EM) φάνηκε ότι αυξάνει, επίσης, την προστασία των κυττάρων κατά την αποθήκευσή τους υπό ψύξη (Διάγραμμα 5.7δ). Επιπλέον, η χρήση του καινοτόμου νανοϋλικού CNC για τη δημιουργία προβιοτικών προϊόντων εγκλεισμού (ACNC/EM) αποδείχθηκε ότι συνεισφέρει σε αύξηση του ποσοστού επιβίωσης του προβιοτικού στελέχους BB-12, φτάνοντας σε 51.1% στο τέλος των 30 ημερών αποθήκευσης, υποδηλώνοντας έτσι ότι το συγκεκριμένο υλικό παρέχει ενισχυτικές ιδιότητες όταν χρησιμοποιείται συνδυαστικά με το αλγινικό (Διάγραμμα 5.7στ). Επιπρόσθετα, η χρήση της πρεβιοτικής ουσίας ινουλίνης φάνηκε ότι αύξησε τη βιωσιμότητα του προβιοτικού στελέχους BB-12, οδηγώντας σε υψηλότερα ποσοστά επιβίωσης κατά 0.9-22.5%. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί και από άλλους ερευνητές, οι οποίοι παρατήρησαν βελτιωμένη βιωσιμότητα κατά την αποθήκευση διαφόρων προβιοτικών στελεχών που είχαν εγκλειστεί σε σφαιρίδια με περιεχόμενη ινουλίνη (Fritzen-freire et al. 2013; W. Krasaekoopt and Watcharapoka 2014).

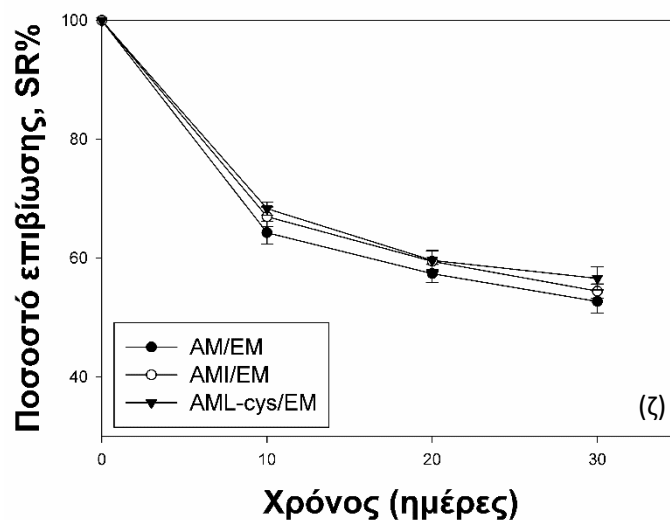
Παρόλο που η αποθήκευση υπό ψύξη προτείνεται ευρέως για τη διατήρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων και ο εγκλεισμός θεωρείται ότι παρέχει ένα αναερόβιο περιβάλλον, απαραίτητο για το στέλεχος BB-12 που είναι ευαίσθητο παρουσία οξυγόνου, η βιωσιμότητα του εγκλεισμένου προβιοτικού στελέχους BB-12 παρουσίασε πτωτική τάση κατά την αποθήκευση. Η L-κυστεΐνη-HCl φάνηκε ότι μπορεί να λειτουργήσει ως δεσμευτής οξυγόνου και ως πηγή αζώτου για το προβιοτικό στέλεχος BB-12. Για το λόγο αυτό, προστέθηκε σε συγκεκριμένα εγκλειστικά μίγματα τα οποία άλλωστε έδωσαν και τα καλύτερα αποτελέσματα όσον αφορά στην προστασία των προβιοτικών κυττάρων, συγκεκριμένα τα: ACL-cys/EM, ACNCL-cys/EM και AML-cys/EM παρείχαν αυξημένη βιωσιμότητα των προβιοτικών βακτηρίων κατά 1.8-3.8%.



Διάγραμμα 5.7: Μεταβολή ποσοστού επιβίωσης (SR%) του εγκλεισμένου προβιοτικού στελέχους BB-12 μέσω της τεχνικής της γαλακτωματοποίησης κατά τη διάρκεια της διατήρησης στους 4°C για 30 ημέρες. Η κωδικοποίηση των δειγμάτων έχει οριστεί στον Πίνακα 4.2.



Διάγραμμα 5.7 (συνέχεια).



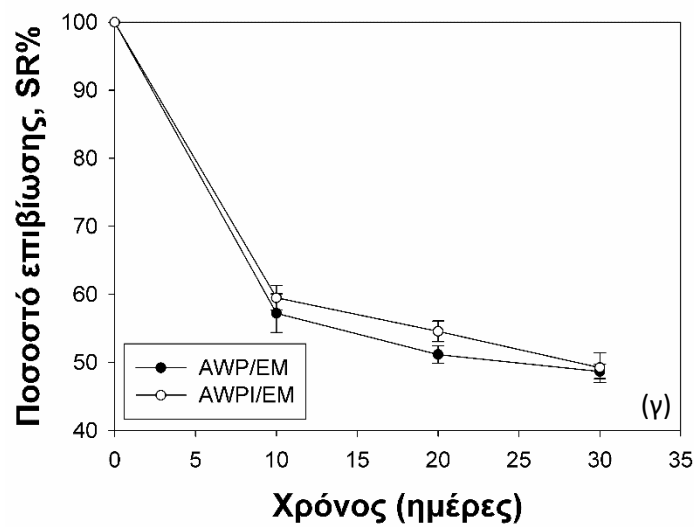
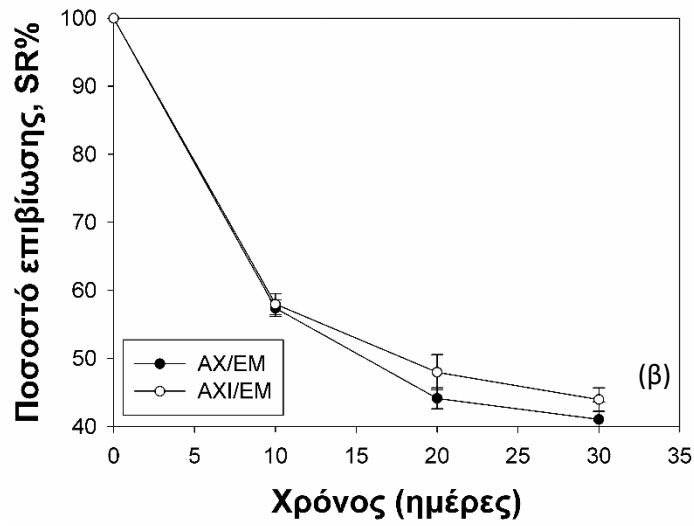
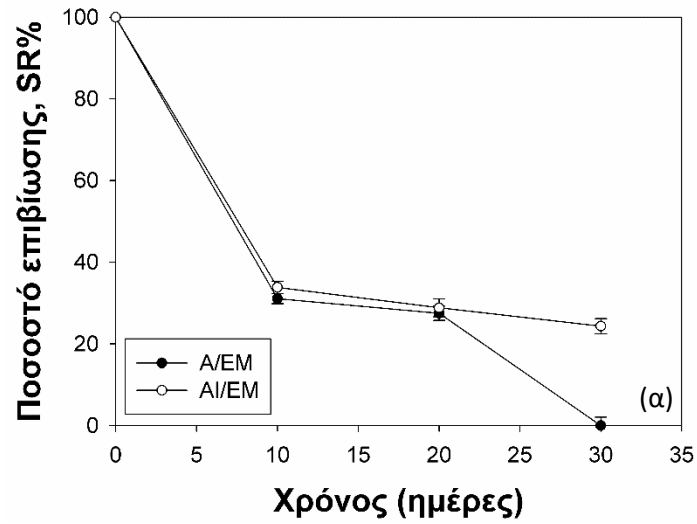
Διάγραμμα 5.7 (συνέχεια).

Αποθήκευση προϊόντων εγκλεισμού (μέσω της τεχνικής της γαλακτωματοποίησης) υπό κατάψυξη (-18°C) – Βιωσιμότητα (SR%) του εγκλεισμένου προβιοτικού στελέχους BB-12

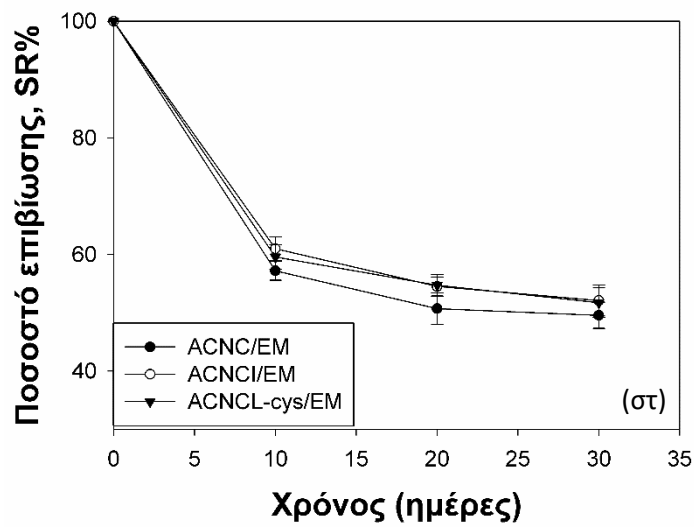
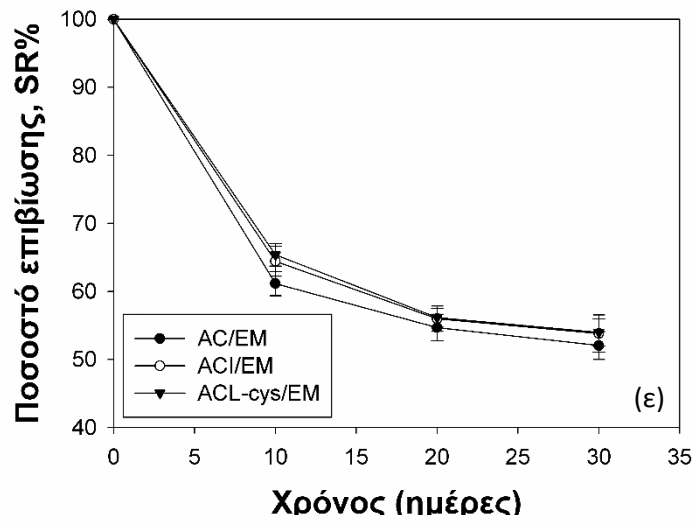
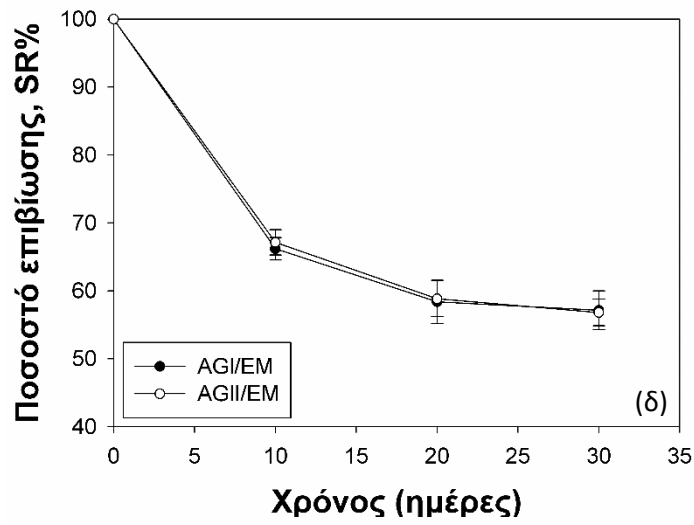
Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 5.8 υποδεικνύουν ότι ο εγκλεισμός του BB-12 σε μίγματα αλγινικού με άλλα εγκλειστικά μέσα ενίσχυσε σημαντικά ( $p < 0.05$ ) την επιβίωση των προβιοτικών κυττάρων κατά την αποθήκευση υπό κατάψυξη σε σύγκριση με τον εγκλεισμό τους σε απλό αλγινικό ή αλγινικό-ινουλίνη (A/EM, AI/EM). Σε όλες τις περιπτώσεις, τις 10 πρώτες ημέρες αποθήκευσης έλαβαν χώρα σημαντικές απώλειες της βιωσιμότητας περίπου κατά 3.1-6.2 logcfu g<sup>-1</sup> λόγω της απότομης έκθεσης των προβιοτικών κυττάρων σε ιδιαίτερα χαμηλή θερμοκρασία. Ο σχηματισμός κρυστάλλων πάγου, όπως έχει αναφερθεί και προηγουμένως, προκαλεί βλάβες στη δομή της κυτταρικής μεμβράνης των προβιοτικών κυττάρων και, συνεπώς, μπορεί λόγω μεταβολής της φυσιολογικής τους κατάστασης να οδηγήσει στη θανάτωσή τους (Etchepare et al. 2020). Όπως και στην περίπτωση του εγκλεισμού μέσω εξώθησης, η χρήση πολυμερών υλικών όπως της ξανθάνης (AX/EM) και της κ-καραγενάνης (AC/EM) για την ενίσχυση των σφαιριδίων του αλγινικού οδήγησε σε αυξημένη βιωσιμότητα των εγκλεισμένων προβιοτικών κυττάρων κατά τη διατήρησή τους υπό κατάψυξη κατά 41.0-52.1% (Διάγραμμα 5.8β, ε). Ικανοποιητικά αποτελέσματα επιτεύχθηκαν, επίσης, μέσω του συνδυασμού του αλγινικού με σκόνη ορού γάλακτος και πηκτίνη (AWP/EM, AWPI/EM) στο εγκλειστικό μίγμα, που οδήγησε σε ποσοστά επιβίωσης 48.7-49.2%. Ομοίως μέσω συνδυασμού του αλγινικού με CNC (ACNC/EM, ACNCI/EM) στο εγκλειστικό μίγμα, προέκυψε ποσοστό βιωσιμότητας του προβιοτικού στελέχους BB-12 49.6-52.1% κατά τη διατήρηση σε κατάψυξη για διάρκεια 30 ημερών. Επιπρόσθετα, η νέα προσέγγιση της αντικατάστασης του νερού με πλήρες γάλα στο διάλυμα του εγκλειστικού για την

παραγωγή σφαιριδίων αλγινικού-γάλακτος (AM/EM) οδήγησε σε ικανοποιητικά αποτελέσματα, φτάνοντας σε ποσοστά επιβίωσης του προβιοτικού στελέχους BB-12 55.2% στο τέλος του χρόνου αποθήκευσης υπό κατάψυξη (Διάγραμμα 5.8ζ). Όλα τα προϊόντα εγκλεισμού που είχαν ως βάση το γάλα (AM/EM, AMI/EM, AML-cys/EM) διατήρησαν το βακτηριακό φορτίο πάνω από το ελάχιστο απαιτούμενο όριο των 6 logcfu g<sup>-1</sup> μέχρι και 20 ημέρες αποθήκευσης σε κατάψυξη. Όπως και στην περίπτωση της αποθήκευσης υπό ψύξη, τα προϊόντα εγκλεισμού AWP/EM, AC/EM, ACNC/EM και AM/EM παρείχαν τη βέλτιστη προστασία του προβιοτικού στελέχους BB-12. Επιπλέον, στην περίπτωση της αποθήκευσης υπό κατάψυξη, τα μέγιστα ποσοστά επιβίωσης (57.1%) επιτεύχθηκαν όταν προστέθηκε στο εγκλειστικό μίγμα γλυκερόλη, η οποία είναι γνωστή για την κρουπροστατευτική της δράση (Διάγραμμα 5.8δ). Παρόμοια ενίσχυση της βιωσιμότητας με προσθήκη γλυκερόλης σε σφαιρίδια αλγινικού αναφέρεται και από τους Sultana et al. (2000), οι οποίοι παρατήρησαν πολλαπλάσια αύξηση των ποσοστών επιβίωσης των προβιοτικών βακτηρίων σε σχέση με τη βιωσιμότητα σε σφαιρίδια παραγόμενα μόνο με αλγινικό ή μίγμα αλγινικού-αμύλου.

Η προσθήκη ινουλίνης στο εγκλειστικό μίγμα για την παραγωγή των σφαιριδίων αλγινικού είχε επίσης επωφελή δράση στη διατήρηση της βιωσιμότητας του προβιοτικού στελέχους κατά την αποθήκευση υπό κατάψυξη, αυξάνοντας τα ποσοστά επιβίωσης κατά 0.6-24.4%. Οι Raddatz et al. (2019) παρατήρησαν ομοίως ότι η ινουλίνη έχει προστατευτική δράση στη βιωσιμότητα των προβιοτικών βακτηρίων κατά την αποθήκευσή τους στους -18°C. Επιπρόσθετα, τα προϊόντα εγκλεισμού που περιείχαν L-κυστεΐνη-HCl παρουσίασαν ελαφρώς αυξημένη σταθερότητα κατά την αποθήκευσή τους υπό κατάψυξη. Τα βέλτιστα αποτελέσματα επιτεύχθηκαν με συνδυασμό γάλακτος, αλγινικού, ινουλίνης και L-κυστεΐνης-HCl (AML-cys/EM), όπου ακόμη και μετά το πέρας των 30 ημερών αποθήκευσης σε κατάψυξη το βακτηριακό φορτίο διατηρήθηκε στα 6.1 logcfu g<sup>-1</sup>. Αντίστοιχα αποτελέσματα παρουσιάστηκαν από τους Sousa et al. (2012) οι οποίοι παρατήρησαν ομοίως βελτιωμένη συμπεριφορά των σφαιριδίων αλγινικού κατά την αποθήκευσή τους στους -18°C με προσθήκη L-κυστεΐνης-HCl.

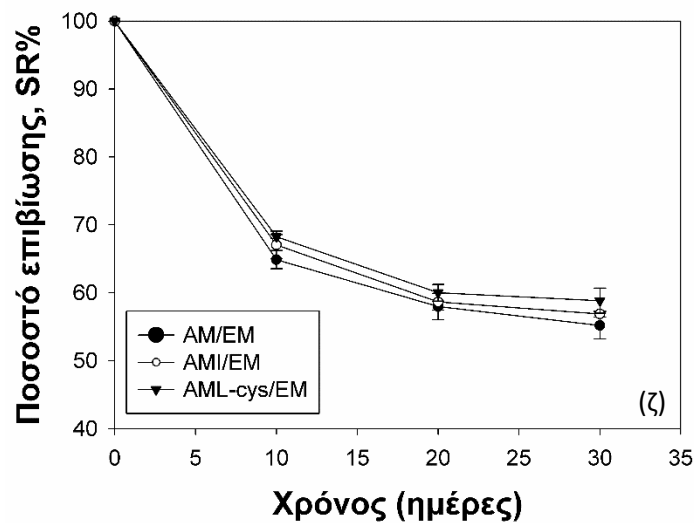


Διάγραμμα 5.8: Μεταβολή ποσοστού επιβίωσης του εγκλεισμένου προβιοτικού στελέχους BB-12 μέσω της τεχνικής της γαλακτωματοποίησης κατά τη διάρκεια της διατήρησης στους -18°C για 30 ημέρες. Η κωδικοποίηση των δειγμάτων έχει οριστεί στον Πίνακα 4.2.



*Διάγραμμα 5.8 (συνέχεια).*



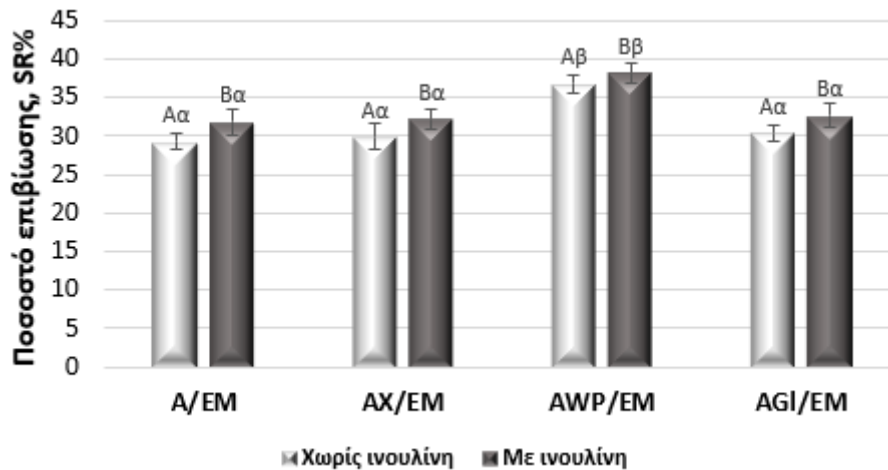


*Διάγραμμα 5.8 (συνέχεια).*

5.2.3 Εκτίμηση βιωσιμότητας (SR%) εγκλεισμένου προβιοτικού στελέχους BB-12 μέσω της τεχνικής της γαλακτωματοποίησης κατά την έκθεσή του σε συνθήκες προσομοίωσης του γαστρεντερικού συστήματος (ΠΓΥ-ΠΕΥ)

Για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας των διαφόρων εγκλειστικών μέσων που δοκιμάστηκαν, τα προϊόντα εγκλεισμού υποβλήθηκαν σε δοκιμή έκθεσης σε συνθήκες προσομοίωσης του γαστρεντερικού συστήματος, όπως περιγράφεται στην υποενότητα 4.4.4. Τα αποτελέσματα που αφορούν την επιβίωση των εγκλεισμένων κυττάρων του BB-12 μετά τη δοκιμή αυτή παρουσιάζονται στα Διαγράμματα 5.9-5.11. Σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρήθηκε μείωση του βακτηριακού φορτίου στα προϊόντα εγκλεισμού κατά την έκθεσή τους σε συνθήκες προσομοίωσης του γαστρεντερικού συστήματος. Ο βαθμός προστασίας διέφερε μεταξύ των διαφορετικών εγκλειστικών μέσων ( $p < 0.05$ ). Συγκεκριμένα, τα προϊόντα εγκλεισμού με εγκλειστικά μέσα μόνο αλγινικό, αλγινικό-ξανθάνη και αλγινικό-γλυκερόλη με (AI/EM, AXI/EM, AGII/EM) ή χωρίς ινουλίνη (A/EM, AX/EM, AGI/EM) παρουσίασαν το χαμηλότερο βακτηριακό φορτίο με ποσοστά επιβίωσης 22.3-29.3% μετά το πέρας της in vitro προσομοίωσης του γαστρεντερικού συστήματος. Η προσθήκη ξανθάνης ή γλυκερόλης στο εγκλειστικό μίγμα δεν επηρέασε σημαντικά τη βιωσιμότητα του προβιοτικού στελέχους BB-12 κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης του γαστρεντερικού συστήματος. Παρόμοια δράση της γλυκερόλης κατά την έκθεση των προβιοτικών βακτηρίων σε συνθήκες πέψης έχει αναφερθεί και από τους Sultana et al. (2000). Από την άλλη πλευρά, ο συνδυασμός του αλγινικού με ορισμένα υλικά, όπως με την κ-καραγενάνη (AC/EM), το CNC (ACNC/EM) ή το μίγμα σκόνης ορού γάλακτος-πηκτίνης (AWP/EM), μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη ισχυρότερων, παχύτερων και πιο στιβαρών προϊόντων εγκλεισμού, περιορίζοντας τη διάχυση των γαστρικών οξέων, με αποτέλεσμα τα ποσοστά επιβίωσης να φθάνουν μέχρι και 42.0%. Επιπρόσθετα, η χρήση γάλακτος για την παρασκευή και το σχηματισμό

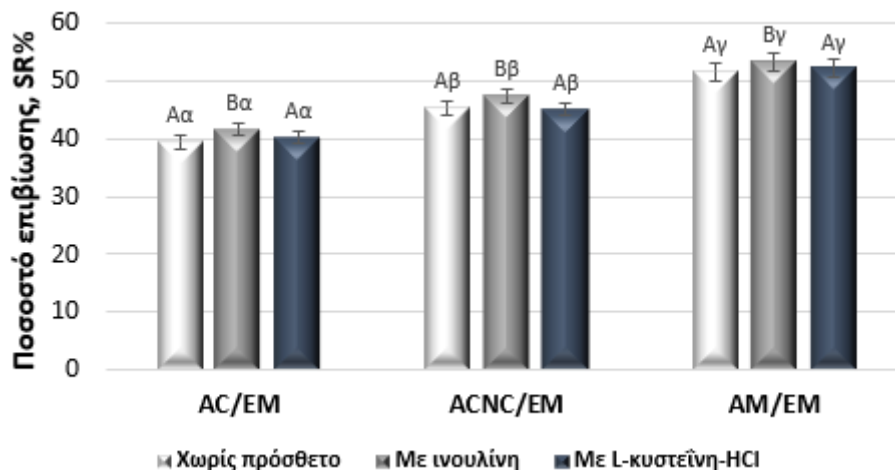
σφαιριδίων αλγινικού-γάλακτος (AM/EM) είχε ως αποτέλεσμα αυξημένα ποσοστά επιβίωσης του προβιοτικού στελέχους BB-12 κατά την έκθεσή του σε συνθήκες προσομοίωσης του γαστρεντερικού συστήματος, πιθανόν λόγω της πολύπλοκης σύστασης του μίγματος που δημιουργεί ένα θρεπτικό και προστατευτικό περιβάλλον για τα προβιοτικά βακτήρια (ποσοστά επιβίωσης μέχρι και 50.3%). Ο συνδυασμός διαφορετικών υλικών έχει, επίσης, δοκιμαστεί και από άλλους ερευνητές με σκοπό τη βελτίωση της παρεχόμενης στα προβιοτικά βακτήρια προστασίας. Για παράδειγμα, οι Pankasemsuk et al. (2016) εφαρμόζοντας την τεχνική του εγκλεισμού για να εγκλείσουν το προβιοτικό στέλεχος *L. casei* 01 σε σφαιρίδια αλγινικού-αμύλου παρατήρησαν ότι η αύξηση της περιεκτικότητας των σφαιριδίων σε άμυλο οδήγησε σε μεγαλύτερα ποσοστά επιβίωσης των προβιοτικών κυττάρων κατά την έκθεσή τους σε συνθήκες προσομοίωσης του γαστρεντερικού συστήματος. Αντίστοιχη βελτίωση παρατηρήθηκε και από τους Sabikhi et al. (2010) οι οποίοι εξέτασαν την επιβίωση του *L. acidophilus* σε διάφορες συγκεντρώσεις χολικών αλάτων (1%, 1.5% και 2%). Σημαντική συνεισφορά στην ενίσχυση της προστασίας των προβιοτικών κυττάρων έχει βρεθεί ότι παρέχει και ο συνδυασμός πηκτίνης και πρωτεΐνης ορού γάλακτος με αλγινικό για την παρασκευή εγκλειστικού μίγματος. Οι Gerez et al. (2012) ενέκλεισαν το προβιοτικό στέλεχος *L. rhamnosus* CRL 1505 σε σφαιρίδια πηκτίνης ή πρωτεΐνης ορού γάλακτος-πηκτίνης μέσω γαλακτωματοποίησης και στη συνέχεια επικάλυψαν τα προκύπτοντα σφαιρίδια με πρωτεΐνη ορού γάλακτος για επιπρόσθετη προστασία. Έτσι, τα εγκλεισμένα προβιοτικά κύτταρα κατά την έκθεσή τους σε συνθήκες προσομοίωσης του γαστρεντερικού συστήματος, εμφάνισαν σημαντικά υψηλότερα ποσοστά επιβίωσης σε σχέση με τα ελεύθερα κύτταρα. Οι Zou et al. (2011) ανέφεραν αύξηση  $0.5 \log_{cfu} g^{-1}$  στην επιβίωση του προβιοτικού στελέχους *B. bifidum* F-35 με προσθήκη πηκτίνης στα σφαιρίδια αλγινικού. Αντίθετα, η προσθήκη αμύλου στη συγκεκριμένη περίπτωση δεν βελτίωσε τα ποσοστά επιβίωσης του συγκεκριμένου προβιοτικού στελέχους.



*Διάγραμμα 5.9: Ποσοστά επιβίωσης (SR%) (μέσος όρος ± τυπική απόκλιση) του εγκλεισμένου προβιοτικού στελέχους BB-12 στα διάφορα εγκλειστικά μίγματα (με ή χωρίς ινουλίνη) μέσω της τεχνικής της γαλακτωματοποίησης μετά την έκθεσή του σε συνθήκες προσομοίωσης γαστρικών υγρών (ΠΓΥ). Η κωδικοποίηση των δειγμάτων έχει οριστεί στον Πίνακα 4.2.*

\*Τα μικρά γράμματα παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές ( $p < 0.05$ ) μεταξύ των εγκλειστικών μιγμάτων.

\*\* Τα κεφαλαία γράμματα παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές ( $p < 0.05$ ) μεταξύ των προϊόντων εγκλεισμού με ή χωρίς ινουλίνη.



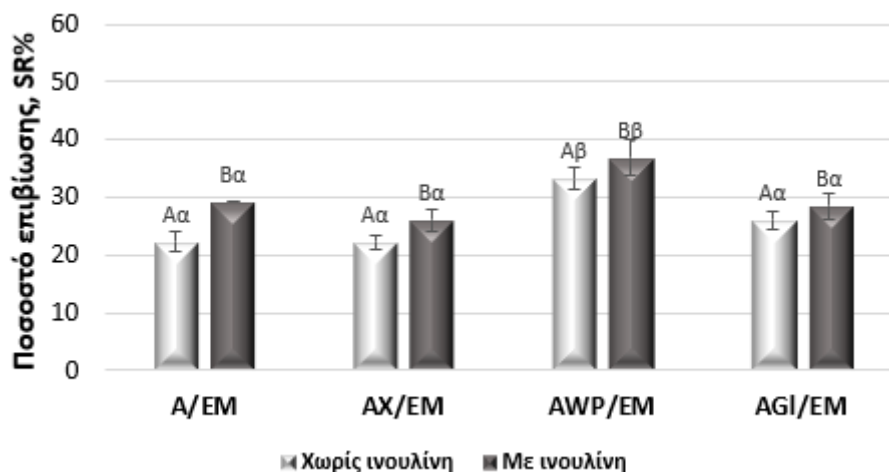
*Διάγραμμα 5.10: Ποσοστά επιβίωσης (SR%) (μέσος όρος ± τυπική απόκλιση) του εγκλεισμένου προβιοτικού στελέχους BB-12 στα διάφορα εγκλειστικά μίγματα (με ή χωρίς ινουλίνη) μέσω της τεχνικής της γαλακτωματοποίησης μετά την έκθεσή του σε συνθήκες προσομοίωσης γαστρικών υγρών (ΠΓΥ). Η κωδικοποίηση των δειγμάτων έχει οριστεί στον Πίνακα 4.2.*

\*Τα μικρά γράμματα παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές ( $p < 0.05$ ) μεταξύ των εγκλειστικών μιγμάτων.

\*\*Τα κεφαλαία γράμματα παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές ( $p < 0.05$ ) μεταξύ των προϊόντων εγκλεισμού με ή χωρίς ινουλίνη.

Η προσθήκη ινουλίνης στα εγκλειστικά μίγματα ενίσχυσε ( $p < 0.05$ ) τη βιωσιμότητα αυξάνοντας έτσι τα ποσοστά επιβίωσης του προβιοτικού στελέχους BB-12 μέχρι και 7.0%. Τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι σύμφωνα με αντίστοιχα αποτελέσματα άλλων ερευνητών οι οποίοι ανέφεραν επίσης την επωφελή δράση της ινουλίνης κατά την έκθεση προβιοτικών βακτηρίων σε συνθήκες προσομοίωσης του γαστρεντερικού συστήματος (Fritzen-freire et al. 2013; Khosravi Zanjani et al. 2014; W. Krasaekoopt and Watcharapoka 2014). Από την άλλη πλευρά,

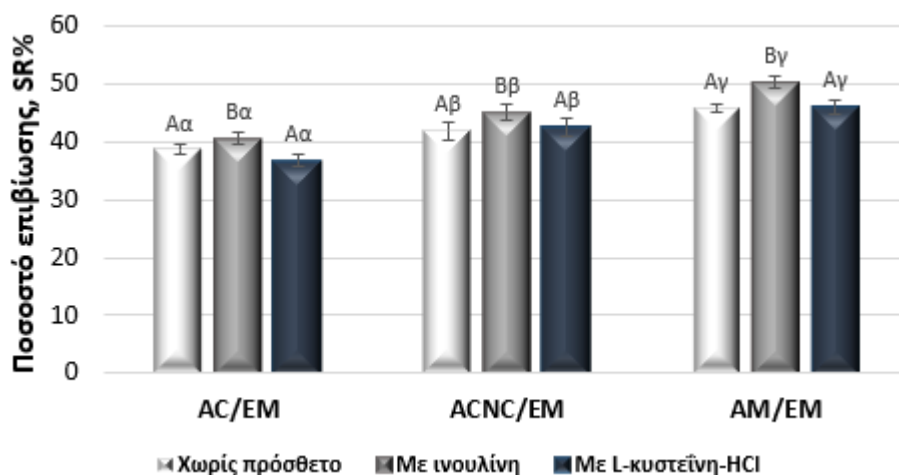
η προσθήκη L-κυστεΐνης-HCl στα εγκλειστικά μίγματα (Διαγράμματα 5.9 και 5.10), όπως προέκυψε, είχε ως αποτέλεσμα μία μικρή μόνο αύξηση των ποσοστών επιβίωσης (0.4-0.7%) κατά την έκθεση των προϊόντων εγκλεισμού σε συνθήκες προσομοίωσης του γαστρεντερικού συστήματος.



*Διάγραμμα 5.11: Ποσοστά επιβίωσης (SR%) (μέσος όρος ± τυπική απόκλιση) του εγκλεισμένου προβιοτικού στελέχους BB-12 στα διάφορα εγκλειστικά μίγματα (χωρίς κάποιο πρόσθετο, με ινουλίνη ή με L-κυστεΐνη-HCl) μέσω της τεχνικής της γαλακτωματοποίησης μετά την έκθεσή του σε συνθήκες προσομοίωσης εντερικών υγρών (ΠΕΥ). Η κωδικοποίηση των δειγμάτων έχει οριστεί στον Πίνακα 4.2.*

\*Τα μικρά γράμματα παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές ( $p < 0.05$ ) μεταξύ των εγκλειστικών μιγμάτων.

\*\* Τα κεφαλαία γράμματα παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές ( $p < 0.05$ ) μεταξύ των προϊόντων εγκλεισμού με ή χωρίς πρόσθετο (ινουλίνη ή L-κυστεΐνη-HCl).



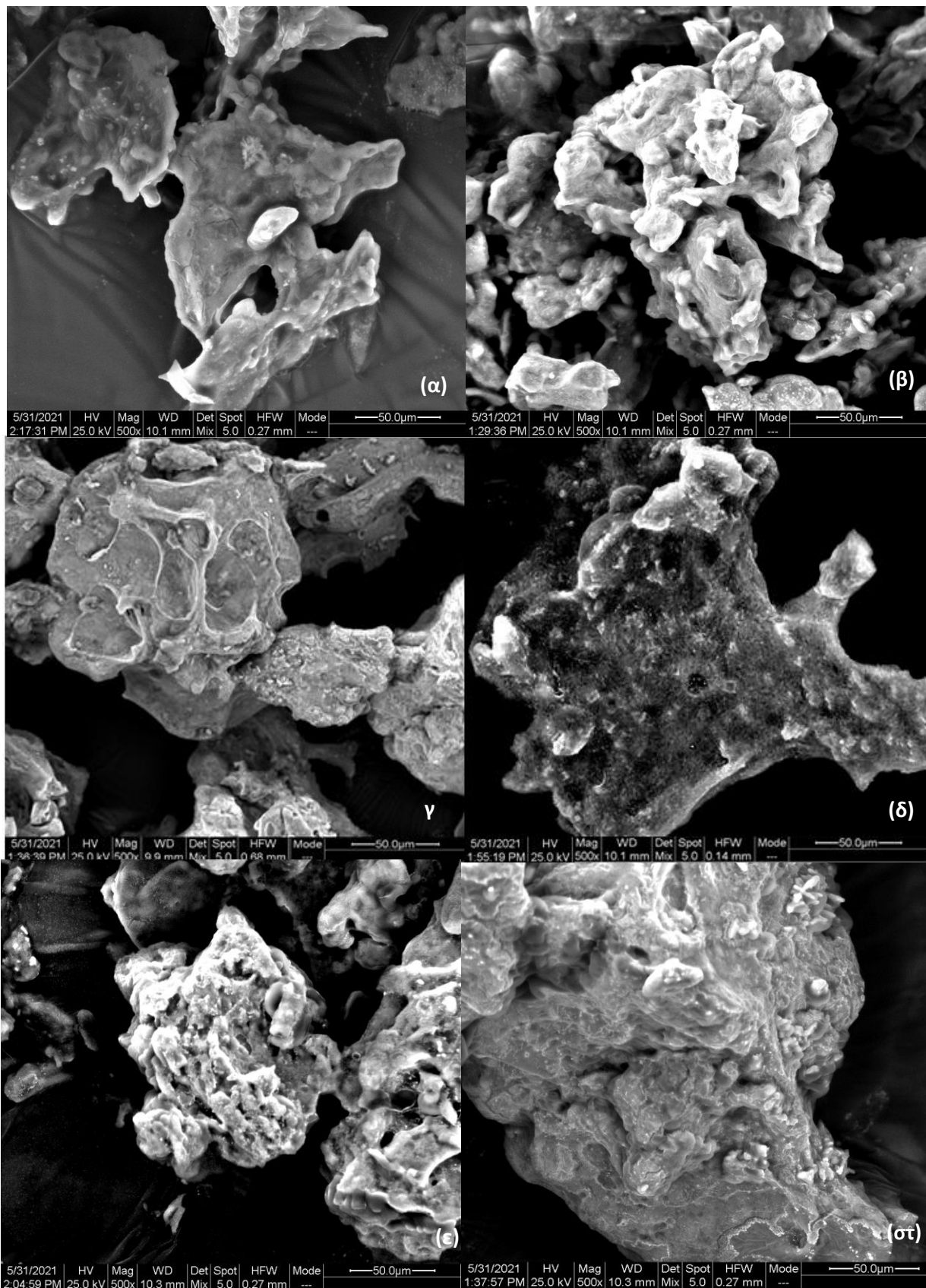
*Διάγραμμα 5.12: Ποσοστά επιβίωσης (SR%) (μέσος όρος ± τυπική απόκλιση) του εγκλεισμένου προβιοτικού στελέχους BB-12 στα διάφορα εγκλειστικά μίγματα (χωρίς κάποιο πρόσθετο, με ινουλίνη ή με L-κυστεΐνη-HCl) μέσω της τεχνικής της γαλακτωματοποίησης μετά την έκθεσή του σε συνθήκες προσομοίωσης εντερικών υγρών (ΠΕΥ). Η κωδικοποίηση των δειγμάτων έχει οριστεί στον Πίνακα 4.2.*

\*Τα μικρά γράμματα παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές ( $p < 0.05$ ) μεταξύ των εγκλειστικών μιγμάτων.

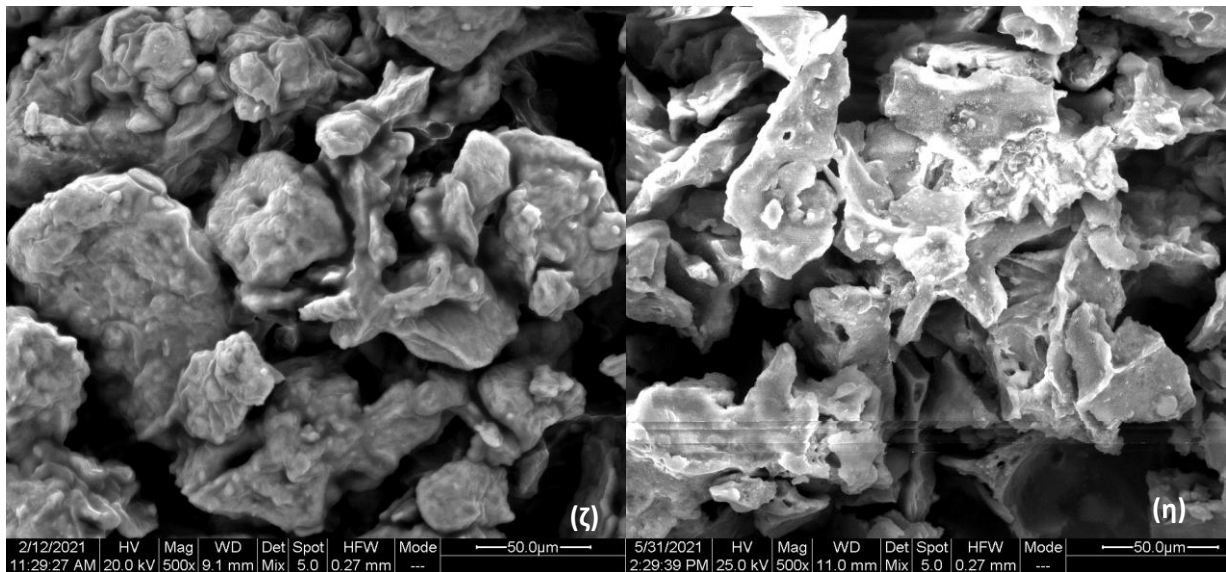
\*\* Τα κεφαλαία γράμματα παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές ( $p < 0.05$ ) μεταξύ των προϊόντων εγκλεισμού με ή χωρίς πρόσθετο (ινουλίνη ή L-κυστεΐνη-HCl).

#### 5.2.4 Αξιολόγηση μικροδομής και μορφολογίας προϊόντων εγκλεισμού μέσω της τεχνικής της γαλακτωματοποίησης με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM)

Όπως και στην περίπτωση της τεχνικής της εξώθησης, έγινε χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης (SEM) για τη μελέτη των τελικών προϊόντων εγκλεισμού που παρήχθησαν μέσω της τεχνικής της γαλακτωματοποίησης. Στις Εικόνες 5.3 και 5.4 παρουσιάζονται οι εικόνες που ελήφθησαν για τα προϊόντα εγκλεισμού που προέκυψαν από τα διάφορα εγκλειστικά μίγματα. Η επιφάνεια των προϊόντων εξετάστηκε στην ίδια μεγέθυνση (500x) για λόγους σύγκρισης. Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι για τις ανάγκες της ανάλυσης μικροσκοπίας σάρωσης, τα προϊόντα εγκλεισμού υπέστησαν ξήρανση υπό κατάψυξη και αυτό είχε ως αποτέλεσμα τα προκύπτοντα δείγματα να παρουσιάζουν ακανόνιστο σχήμα και μέγεθος. Έτσι, η αρχική λεία και ομοιόμορφη επιφάνεια των προϊόντων εγκλεισμού μετατράπηκε σε τραχεία επιφάνεια με ακανόνιστες κοιλότητες και ρωγμές, λόγω αφυδάτωσης των υδροπηκτών. Αυτή η σπογγώδης εξωτερική μορφή προκύπτει λόγω της απότομης εξάχνωσης του πάγου από την υδροπηκτική, οδηγώντας στο σχηματισμό πόρων στη θέση των κρυστάλλων πάγου (Amine et al. 2014). Με βάση την εικόνα 5.3, τα δείγματα AI/EM και AGI/EM φαίνεται να έχουν παρεμφερή επιφανειακά χαρακτηριστικά (Εικόνα 5.3β,ε). Τα δείγματα AC/EM και AWP/EM έχουν μία πιο συμπαγή μορφή με λιγότερο πορώδη επιφάνεια (Εικόνα 5.3γ,στ), ενώ η δομή του δείγματος ACNC/EM χαρακτηρίζεται ως περισσότερο σπογγώδης (Εικόνα 5.3ζ). Επιπλέον, η δομή των δειγμάτων A/EM και AM/EM φαίνεται να είναι αρκετά παρόμοια, με λιγότερες κοιλότητες (Εικόνα 5.3α,η).

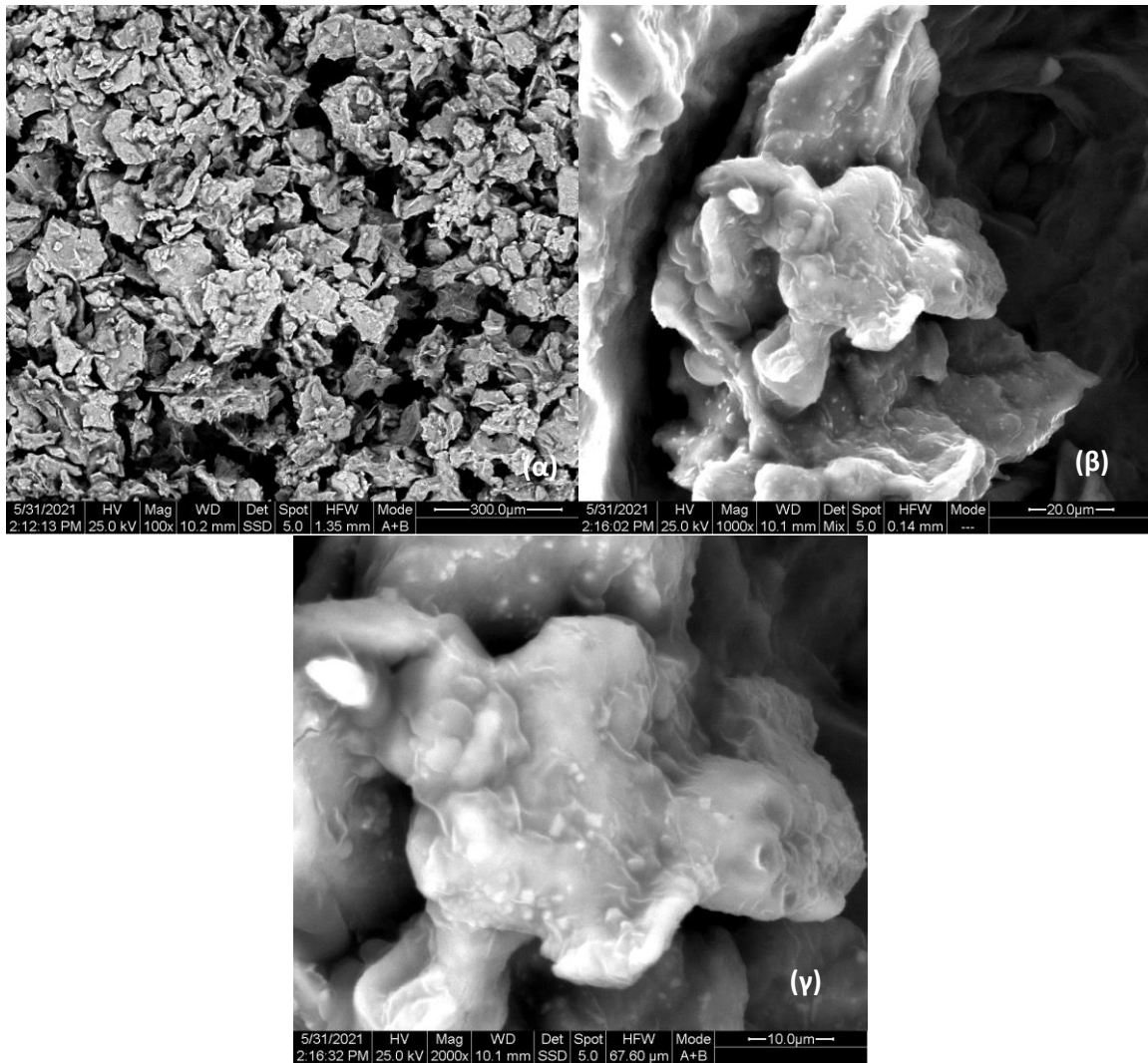


*Εικόνα 5.2: Ενδεικτικές δομές των διαφορετικών προϊόντων εγκλεισμού μέσω τεχνικής γαλακτωματοποίησης με Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης σε μεγέθυνση 1000x. Στη συγκεκριμένη εικόνα παρουσιάζονται τα προϊόντα εγκλεισμού (α) A/EM, (β) AI/EM, (γ) AWP/EM, (δ) AX/EM, (ε) AGI/EM, (στ) AC/EM, (ζ) ACNC/EM (η) AM/EM. Η κωδικοποίηση των δειγμάτων παρουσιάζεται στον Πίνακα 4.2.*



Εικόνα 5.3 (συνέχεια).

Προκειμένου να παρουσιαστεί μία περισσότερο λεπτομερής προσέγγιση της μικροδομής των προϊόντων εγκλεισμού, στην εικόνα 5.4 παρουσιάζεται ένα τυχαία επιλεγμένο δείγμα σε τρεις διαφορετικές μεγεθύνσεις (100x, 1000x and 2000x). Η έλλειψη ομοιογένειας, αναφορικά με το μέγεθος και το σχήμα των προϊόντων εγκλεισμού, γίνεται σαφής στην Εικόνα 5.4α, όπου βρίσκονται διάσπαρτα προϊόντα εγκλεισμού διαφόρων μεγεθών και σχημάτων, ενώ έχουν σχηματιστεί και συσσωματώματα αυτών. Αυτός ο σχηματισμός μπορεί να αποδοθεί στη φύση των χρησιμοποιούμενων εγκλειστικών μέσων (Rather et al. 2017). Αξίζει να σημειωθεί ότι στην Εικόνα 5.4 υποδηλώνεται η απουσία ελεύθερων βακτηρίων, επιβεβαιώνοντας έτσι την επιτυχία του εγκλεισμού των προβιοτικών κυττάρων.



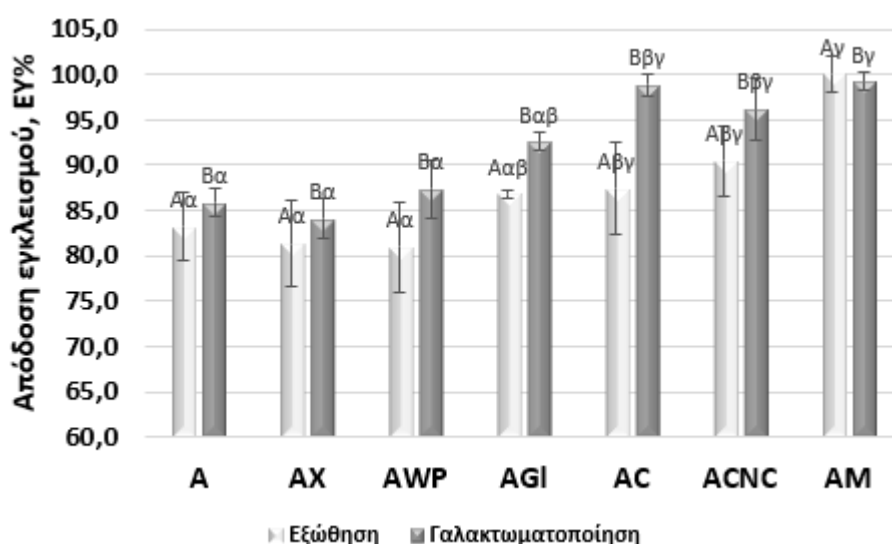
*Εικόνα 5.4: Εικόνες Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας Σάρωσης σε μεγεθύνσεις όπου παρουσιάζεται η συνολική μορφολογία των προϊόντων εγκλεισμού μέσω τεχνικής γαλακτωματοποίησης σε διαφορετικές μεγεθύνσεις. Στην εικόνα παρουσιάζεται η λυοφιλιωμένη μορφή του προϊόντος εγκλεισμού Α, σε μεγεθύνσεις: α) 100x, (β) 1000x και (γ) 2000x.*



### 5.3. Συγκριτική μελέτη των δύο μεθόδων εγκλεισμού (εξώθησης και γαλακτωματοποίησης)

#### 5.3.1. Αξιολόγηση μεθόδων εγκλεισμού ως προς την απόδοση εγκλεισμού (EY%) του προβιοτικού στελέχους BB-12

Οι δύο μέθοδοι εγκλεισμού (εξώθηση και γαλακτωματοποίηση) οδήγησαν σε ικανοποιητικά υψηλές αποδόσεις εγκλεισμού, όπως φαίνεται στο συγκριτικό Διάγραμμα 5.13. Τα υψηλά ποσοστά επιβίωσης του προβιοτικού στελέχους BB-12 κατά τη διάρκεια της διεργασίας του εγκλεισμού υποδηλώνουν ότι οι συνθήκες που επικρατούν τόσο κατά την εφαρμογή της μεθόδου της εξώθησης, όσο και της μεθόδου της γαλακτωματοποίησης είναι ήπιες και σχετικά μη αντίξοες για το συγκεκριμένο προβιοτικό στέλεχος, καθώς δεν περιλαμβάνουν υψηλές θερμοκρασίες και πιέσεις ή τοξικούς διαλύτες, με αποτέλεσμα να μην έχουν αρνητική επίδραση στη βιωσιμότητα των προβιοτικών κυττάρων.



Διάγραμμα 5.13: Συγκριτικό διάγραμμα ποσοστιαίας απόδοσης εγκλεισμού (EY%) μεταξύ των δύο μεθόδων εγκλεισμού (εξώθησης και γαλακτωματοποίησης). Η κωδικοποίηση των δειγμάτων έχει οριστεί στους Πίνακες 4.1 και 4.2.

\*Τα μικρά γράμματα παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές ( $p < 0.05$ ) μεταξύ των εγκλειστικών μιγμάτων.

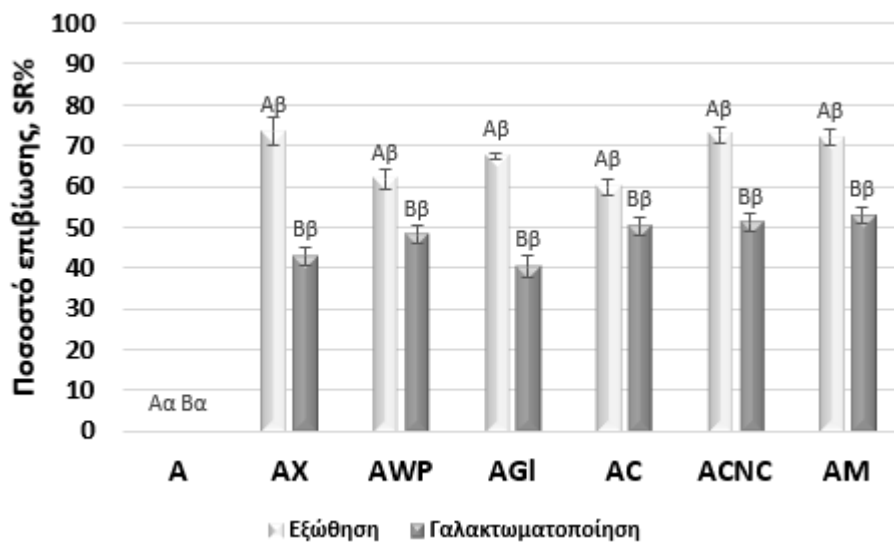
\*\*Τα κεφαλαία γράμματα παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές ( $p < 0.05$ ) μεταξύ των διαφορετικών μεθόδων εγκλεισμού.

Στα προϊόντα εγκλεισμού που παρήχθησαν με τη μέθοδο της γαλακτωματοποίησης παρατηρήθηκαν μεγαλύτερες τιμές απόδοσης εγκλεισμού συγκριτικά με τα προϊόντα εγκλεισμού μέσω εξώθησης ( $p < 0.05$ ), ιδιαίτερα όταν γίνεται χρήση των εγκλειστικών μιγμάτων με κ-καραγενάνη (AC) ή σκόνη ορού γάλακτος και πηκτίνη (AWP). Οι αυξημένες τιμές είναι πιθανόν να οφείλονται στις μικρότερες απώλειες που εμπλέκονται στη συνολική διαδικασία εγκλεισμού μέσω της τεχνικής της γαλακτωματοποίησης σε σχέση μέσω της τεχνικής της εξώθησης.

5.3.2. Συγκριτική μελέτη βιωσιμότητας (SR%) του εγκλεισμένου προβιοτικού στελέχους BB-12 μέσω τεχνικών εξώθησης και γαλακτωματοποίησης κατά την διατήρηση των προϊόντων εγκλεισμού σε συνθήκες ψύξης ή κατάψυξης

Τα προϊόντα εγκλεισμού που προέκυψαν από τη μέθοδο της εξώθησης παρείχαν μεγαλύτερη προστασία στα προβιοτικά κύτταρα, καθώς τα ποσοστά επιβίωσης μετά το πέρας του χρόνου διατήρησής τόσο υπό ψύξη, όσο και υπό κατάψυξη, ήταν σημαντικά υψηλότερα σε σύγκριση με τα αντίστοιχα που προέκυψαν από τη μέθοδο της γαλακτωματοποίησης. Τα ποσοστά επιβίωσης του εγκλεισμένου προβιοτικού στελέχους BB-12 μετά το πέρας του χρόνου αποθήκευσης των 30 ημερών παρατίθενται στα Διαγράμματα 5.14 και 5.15 για λόγους σύγκρισης. Στα συγκεκριμένα διαγράμματα προκύπτει σαφώς ότι η μέθοδος της εξώθησης είναι αποτελεσματικότερη στη διατήρηση της βιωσιμότητας του προβιοτικού στελέχους BB-12, ανεξάρτητα του χρησιμοποιούμενου εγκλειστικού μέσου. Η διαφορά ανάμεσα στις δύο μεθόδους αποδίδεται στο μέγεθος των προκύπτοντων προϊόντων εγκλεισμού. Τα προϊόντα εγκλεισμού μέσω εξώθησης έχουν μεγαλύτερη διάμετρο (1-2 cm έναντι 100-1000 μm), με αποτέλεσμα το ίδιο βακτηριακό φορτίο να έρχεται σε επαφή με το περιβάλλον και άλλους επιβλαβείς παράγοντες, όπως το οξυγόνο, μέσω μικρότερης επιφάνειας. Συνεπώς με τον τρόπο αυτό, εκτίθεται στο περιβάλλον μικρότερο ποσοστό προβιοτικών κυττάρων σε σύγκριση με τα προϊόντα εγκλεισμού μέσω γαλακτωματοποίησης με άμεση συνέπεια να περιορίζονται σημαντικά οι απώλειες της βιωσιμότητας του προβιοτικού στελέχους BB-12.

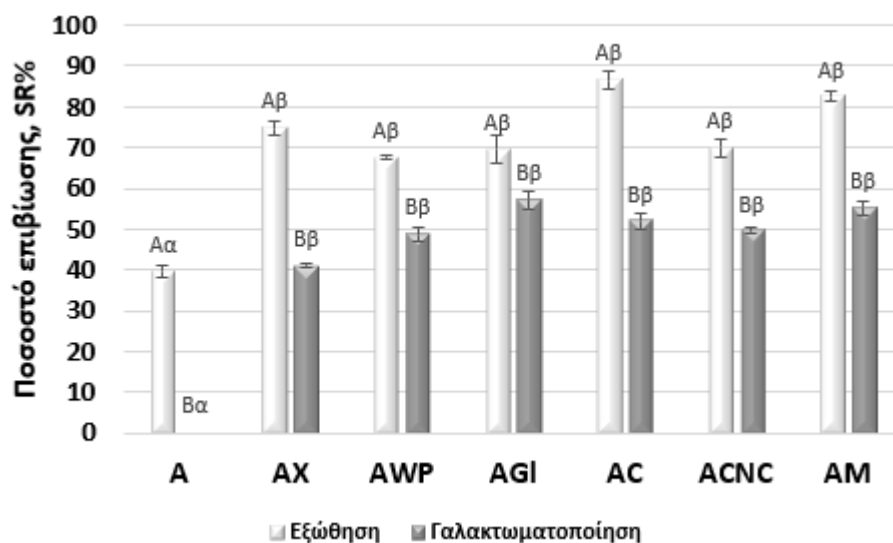
Έτσι, αντίθετα με τα προϊόντα εγκλεισμού μέσω γαλακτωματοποίησης, στα προϊόντα εγκλεισμού μέσω εξώθησης με συγκεκριμένα εγκλειστικά μέσα (AC, ACNC, AM) το βακτηριακό φορτίο ήταν υψηλότερο του ελάχιστου απαιτούμενου για εμπορικά προϊόντα των  $6 \log_{cfu} g^{-1}$  μέχρι και 30 ημέρες μετά από την αποθήκευσή τους στους  $4^{\circ}C$ . Παρόμοια, κατά την αποθήκευση στους  $-18^{\circ}C$  το βακτηριακό φορτίο των προϊόντων εγκλεισμού μέσω εξώθησης διατηρήθηκε μέχρι και  $8.5 \log_{cfu} g^{-1}$ , σε αντίθεση με τα προϊόντα εγκλεισμού μέσω γαλακτωματοποίησης όπου το μέγιστο βακτηριακό φορτίο μετά από 30 ημέρες αποθήκευσης ήταν  $5.7 \log_{cfu} g^{-1}$ .



**Διάγραμμα 5.14:** Συγκριτικό διάγραμμα ποσοστού επιβίωσης (SR%) του εγκλεισμένου προβιοτικού στελέχους BB-12 μεταξύ των δύο μεθόδων εγκλεισμού (εξώθηση & γαλακτωματοποίηση), μετά από 30 ημέρες αποθήκευσης στους 4°C. Η κωδικοποίηση των δειγμάτων έχει οριστεί στους Πίνακες 4.1 και 4.2.

\*Τα μικρά γράμματα παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές ( $p < 0.05$ ) μεταξύ των εγκλειστικών μιγμάτων.

\*\*Τα κεφαλαία γράμματα παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές ( $p < 0.05$ ) μεταξύ των διαφορετικών μεθόδων εγκλεισμού.



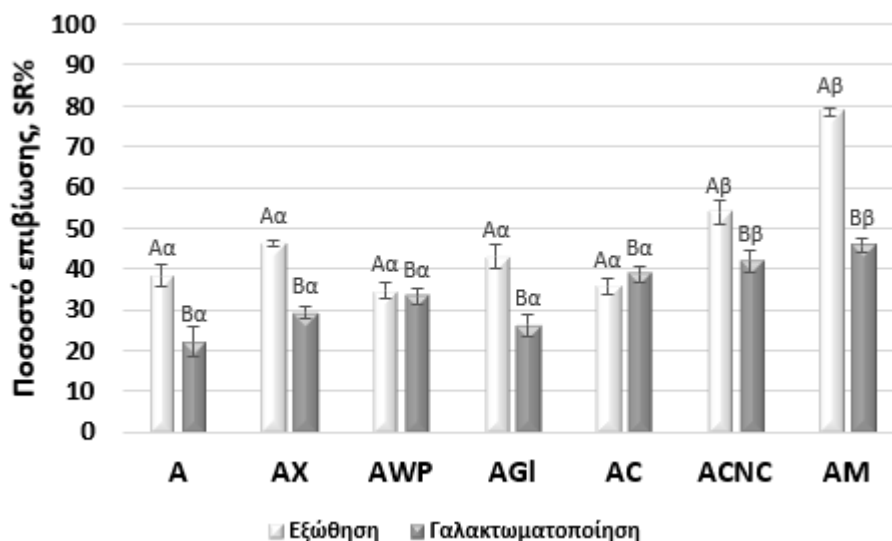
**Διάγραμμα 5.15:** Συγκριτικό διάγραμμα ποσοστού επιβίωσης (SR%) του εγκλεισμένου προβιοτικού στελέχους BB-12 μεταξύ των δύο μεθόδων εγκλεισμού (εξώθηση & γαλακτωματοποίηση), μετά από 30 ημέρες αποθήκευσης στους -18°C. Η κωδικοποίηση των δειγμάτων έχει οριστεί στους Πίνακες 4.1 και 4.2.

\*Τα μικρά γράμματα παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές ( $p < 0.05$ ) μεταξύ των εγκλειστικών μιγμάτων.

\*\*Τα κεφαλαία γράμματα παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές ( $p < 0.05$ ) μεταξύ των διαφορετικών μεθόδων εγκλεισμού.

5.3.3. Συγκριτική μελέτη βιωσιμότητας (SR%) προβιοτικού στελέχους BB-12 (μέσω τεχνικών εξώθησης και γαλακτωματοποίησης) κατά την έκθεσή του σε συνθήκες προσομοίωσης του γαστρεντερικού συστήματος (ΠΓΥ – ΠΕΥ)

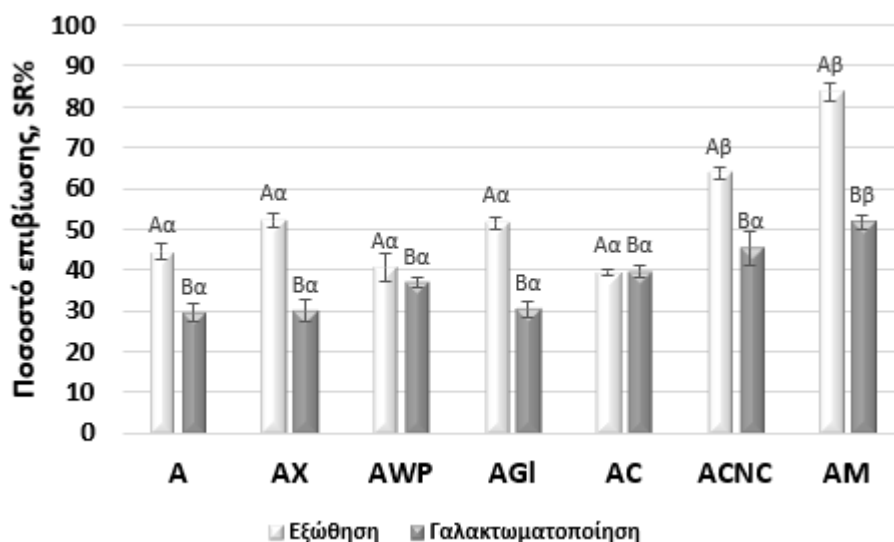
Τα προϊόντα εγκλεισμού που προέκυψαν με τη μέθοδο της εξώθησης, όπως και εκείνα που προέκυψαν από τη μέθοδο της γαλακτωματοποίησης υποβλήθηκαν σε δοκιμή έκθεσης σε συνθήκες προσομοίωσης του γαστρεντερικού συστήματος. Τόσο στο πρώτο στάδιο που περιλαμβάνει την έκθεσή τους σε διάλυμα προσομοίωσης γαστρικών υγρών (ΠΓΥ), όσο και στο δεύτερο στάδιο που αφορά την έκθεσή τους σε διάλυμα προσομοίωσης εντερικών υγρών (ΠΕΥ), τα προϊόντα εγκλεισμού μέσω εξώθησης παρείχαν καλύτερη προστασία στα ενθυλακωμένα προβιοτικά κύτταρα ( $p < 0.05$ ). Στα Διαγράμματα 5.16 και 5.17 παρουσιάζονται συγκριτικά τα ποσοστά επιβίωσης του εγκλεισμένου με τις δύο μεθόδους προβιοτικού στελέχους BB-12 κατά την έκθεσή του σε διάλυμα ΠΓΥ και ΠΕΥ, αντίστοιχα. Συγκεκριμένα, στο τέλος της δοκιμής, τα ποσοστά επιβίωσης για τα προϊόντα εγκλεισμού μέσω εξώθησης έφτασαν μέχρι και 78.4%, ενώ για τα προϊόντα εγκλεισμού μέσω γαλακτωματοποίησης τα ποσοστά επιβίωσης περιορίστηκαν μέχρι 45.7%. Όπως και κατά τη διάρκεια της αποθήκευσής τους, το μικρότερο μέγεθος των προϊόντων εγκλεισμού μέσω γαλακτωματοποίησης έχει ως αποτέλεσμα την έκθεση μεγαλύτερου ποσοστού προβιοτικών κυττάρων σε επιβλαβείς παράγοντες του περιβάλλοντος. Η μικρότερη διάμετρος των προϊόντων εγκλεισμού διευκολύνει τη διάχυση των γαστρικών και εντερικών υγρών εντός αυτών, με αποτέλεσμα να προκύπτουν σημαντικές απώλειες βιωσιμότητας.



Διάγραμμα 5.16: Συγκριτικό διάγραμμα ποσοστού επιβίωσης (SR%) του εγκλεισμένου προβιοτικού στελέχους BB-12 μεταξύ των δύο μεθόδων εγκλεισμού (εξώθηση και γαλακτωματοποίηση), μετά από έκθεση σε διάλυμα προσομοίωσης γαστρικών υγρών (ΠΓΥ). Η κωδικοποίηση των δειγμάτων έχει οριστεί στους Πίνακες 4.1 και 4.2.

\*Τα μικρά γράμματα παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές ( $p < 0.05$ ) μεταξύ των εγκλειστικών μιγμάτων.

\*\*Τα κεφαλαία γράμματα παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές ( $p < 0.05$ ) μεταξύ των διαφορετικών μεθόδων εγκλεισμού.



*Διάγραμμα 5.17: Συγκριτικό διάγραμμα ποσοστού επιβίωσης (SR%) του εγκλεισμένου προβιοτικού στελέχους BB-12 μεταξύ των δύο μεθόδων εγκλεισμού (εξώθηση και γαλακτωματοποίηση), μετά από έκθεση σε διάλυμα προσομοίωσης εντερικών υγρών (ΠΕΥ). Η κωδικοποίηση των δειγμάτων έχει οριστεί στους Πίνακες 4.1 και 4.2.*

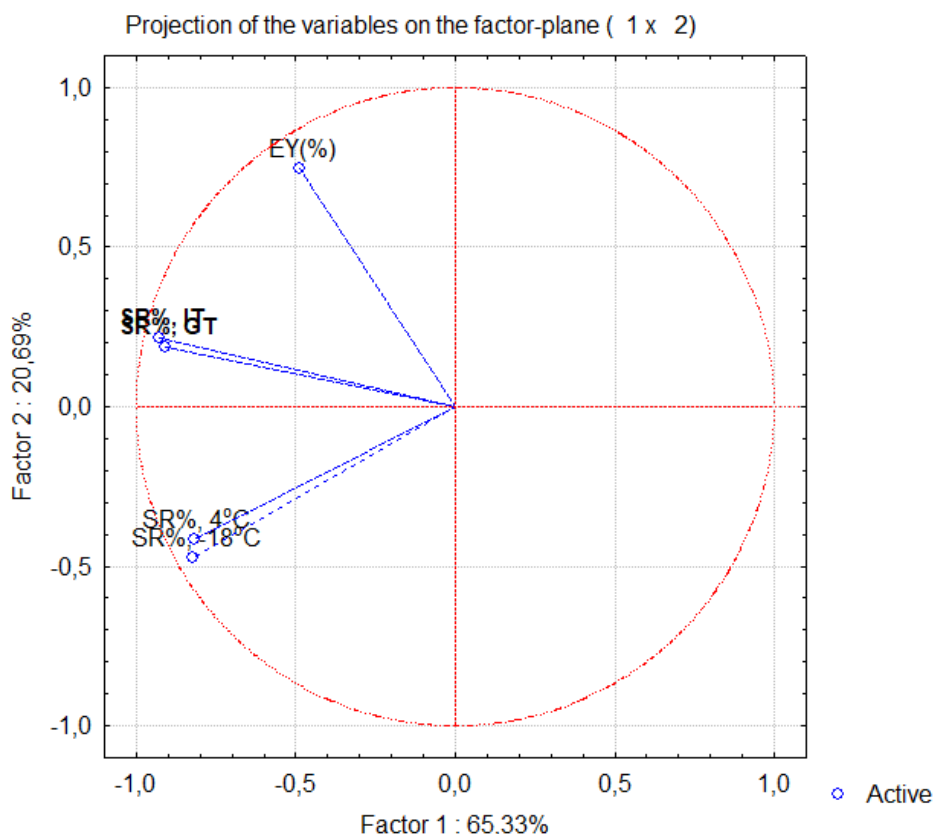
\*Τα μικρά γράμματα παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές ( $p < 0.05$ ) μεταξύ των εγκλειστικών μιγμάτων.

\*\*Τα κεφαλαία γράμματα παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές ( $p < 0.05$ ) μεταξύ των διαφορετικών μεθόδων εγκλεισμού.

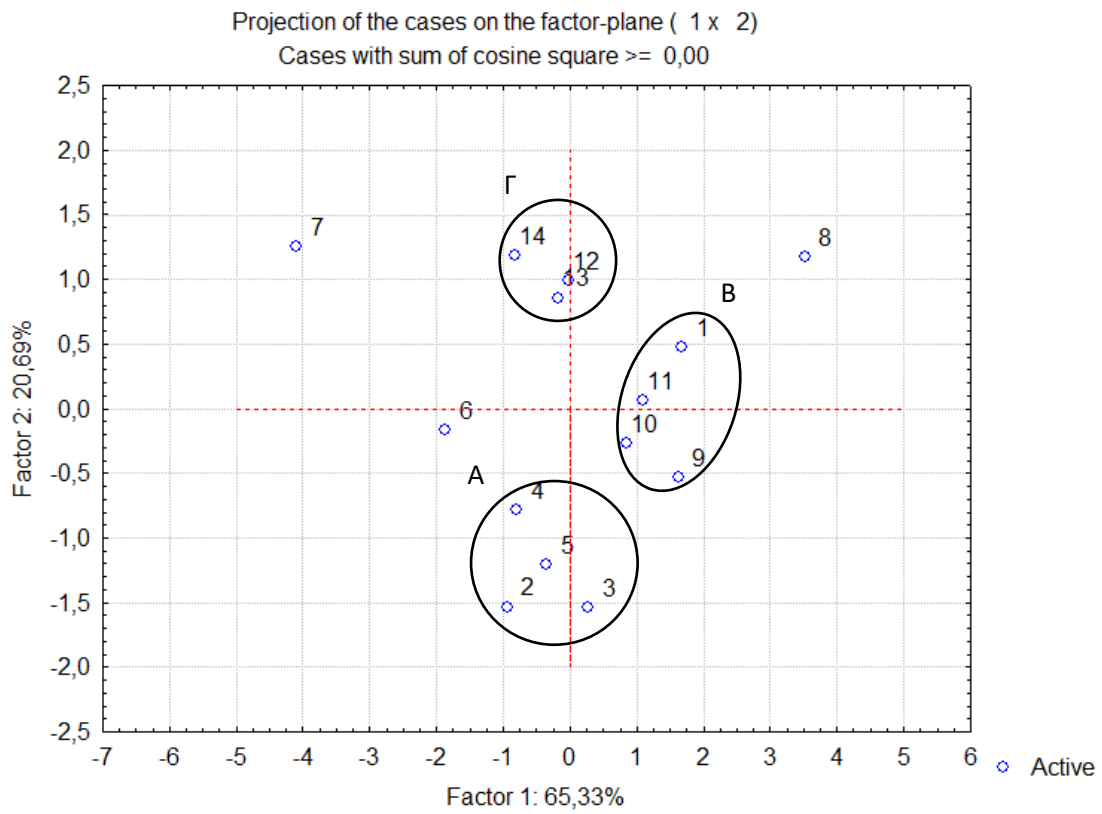
#### 5.3.4. Συσχέτιση αποτελεσματικότητας της συνολικής διαδικασίας εγκλεισμού μέσω των τεχνικών εξώθησης και γαλακτωματοποίησης - Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (PCA)

Η Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (PCA) πραγματοποιήθηκε με σκοπό τη διερεύνηση της συσχέτισης μεταξύ της συνολικής διαδικασίας εγκλεισμού μέσω των δύο τεχνικών, της εξώθησης και της γαλακτωματοποίησης, και των εμπλεκόμενων συνθηκών όπως και την ομαδοποίηση των προϊόντων εγκλεισμού ανάλογα με τις ιδιότητές τους. Όπως φαίνεται από τα διαγράμματα των συσχετίσεων των μεταβλητών των πειραμάτων εγκλεισμού του προβιοτικού στελέχους BB-12 και των δειγμάτων-προϊόντων εγκλεισμού (Διαγράμματα 5.18 και 5.19 αντίστοιχα), το «πείραμα» εγκλεισμού του προβιοτικού στελέχους BB-12 περιγράφεται από δύο κύριες συνιστώσες, την 1<sup>η</sup> και τη 2<sup>η</sup> με συνεισφορά 65.33% και 20.69% αντίστοιχα στη συνολική διακύμανση. Τα ποσοστά επιβίωσης των εγκλεισμένων προβιοτικών βακτηρίων κατά την αποθήκευση σε ψύξη και κατάψυξη, όπως επίσης και κατά την έκθεση σε συνθήκες προσομοίωσης του γαστρεντερικού συστήματος σχετίζονται αρνητικά με την 1<sup>η</sup> κύρια συνιστώσα, ενώ η απόδοση εγκλεισμού των μεθόδων σχετίζεται θετικά με τη 2<sup>η</sup> κύρια συνιστώσα. Ακόμη, παρατηρείται θετική συσχέτιση μεταξύ των ποσοστών επιβίωσης κατά την αποθήκευση σε ψύξη και κατάψυξη, αλλά και μεταξύ των ποσοστών επιβίωσης των προβιοτικών κυττάρων κατά την έκθεση σε σύστημα προσομοίωσης γαστρικών υγρών και εντερικών υγρών. Από την ομαδοποίηση των δειγμάτων, με βάση το Διάγραμμα 5.17, προκύπτουν τρεις ομάδες. Τα δείγματα της ομάδας A (AX/EX, AWP/EX, AGI/EX, AC/EX) εμφανίζουν σχετικά χαμηλές τιμές απόδοσης εγκλεισμού αλλά ταυτόχρονα τα υψηλότερα ποσοστά

επιβίωσης τόσο κατά τη διατήρηση υπό ψύξη όσο και κατά την έκθεση σε συνθήκες προσομοίωσης του γαστρεντερικού συστήματος. Είναι όλα προϊόντα εγκλεισμού που παράγονται μέσω εξώθησης με χρήση συνδυασμού αλγινικού με άλλα υλικά, όπως σκόνη ορού γάλακτος-πηκτίνη, ξανθάνη, γλυκερόλη ή κ-καραγενάνη και αποτελούν τα βέλτιστα προϊόντα όσον αφορά τη διατήρηση της βιωσιμότητας του προβιοτικού στελέχους BB-12. Αντίθετα, τα δείγματα της ομάδας Β εμφανίζουν ενδιάμεσες τιμές απόδοσης εγκλεισμού και τα χαμηλότερα ποσοστά επιβίωσης σε όλες τις συνθήκες (διατήρηση σε ψύξη, έκθεση σε συνθήκες προσομοίωσης του γαστρεντερικού συστήματος) και αποτελούν προϊόντα εγκλεισμού μόνο με αλγινικό που παράγονται είτε μέσω της τεχνικής της εξώθησης είτε μέσω της τεχνικής της γαλακτωματοποίησης, καθώς και προϊόντα εγκλεισμού που παράγονται μέσω της τεχνικής της γαλακτωματοποίησης χρησιμοποιώντας ως εγκλειστικά μέσα μίγματα αλγινικού με ξανθάνη ή σκόνη ορού γάλακτος-πηκτίνη (A/EX, A/EM, AX/EM, AWP/EM). Τέλος, τα δείγματα της ομάδας Γ εμφανίζουν τις υψηλότερες τιμές απόδοσης εγκλεισμού και ενδιάμεσα ποσοστά επιβίωσης και αποτελούν προϊόντα εγκλεισμού που παράγονται με την τεχνική της γαλακτωματοποίησης μέσω χρήσης των μιγμάτων αλγινικού με καραγενάνη, CNC ή γάλα (AC/EM, ACNC/EM, AM/EM).



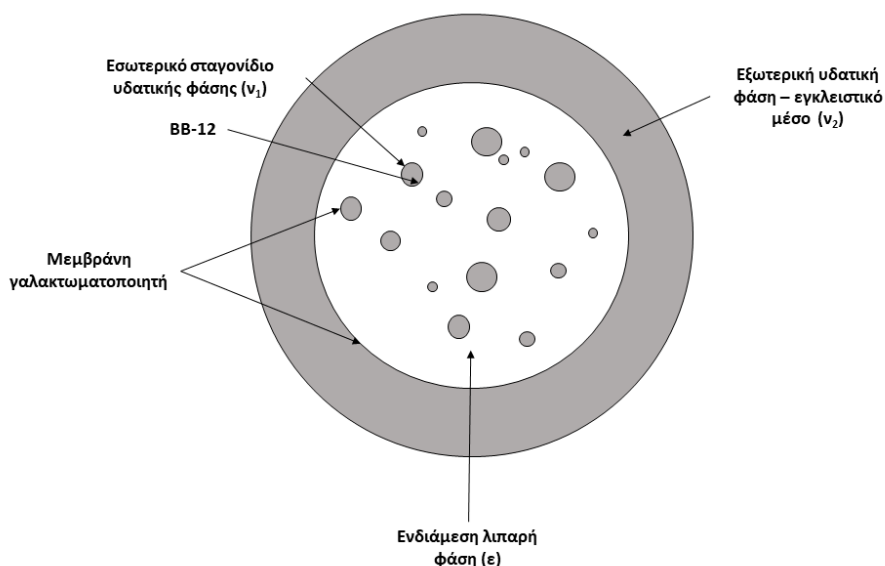
*Διάγραμμα 5.18: Διάγραμμα συσχετίσεων των μεταβλητών των πειραμάτων εγκλεισμού του προβιοτικού στελέχους BB-12 μέσω της Ανάλυσης Κύριων Συνιστωσών (EY%: απόδοση εγκλεισμού, SR%-4°C: ποσοστό επιβίωσης κατά τη διατήρηση στους 4°C, SR%-18°C: ποσοστό επιβίωσης κατά τη διατήρηση στους -18°C, SR%:GT: ποσοστό επιβίωσης κατά την έκθεση σε διάλυμα ΠΓΥ, SR%:IT: ποσοστό επιβίωσης κατά την έκθεση σε διάλυμα ΠΕΥ).*



Διάγραμμα 5.19: Διάγραμμα δειγμάτων-προϊόντων εγκλεισμού του προβιοτικού στελέγους BB-12 μέσω της Ανάλυσης Κύριων Συνιστωσών.

5.4. Εγκλεισμός του προβιοτικού στελέχους BB-12 μέσω συνδυασμού διπλού  $v_1/\epsilon/v_2$  γαλακτώματος με βάση το πυρηνέλαιο και της τεχνικής της εξώθησης

Για την περαιτέρω αύξηση της προστασίας που παρέχει ο εγκλεισμός στο προβιοτικό στέλεχος BB-12 διερευνήθηκε μία καινοτόμος μέθοδος εγκλεισμού, η οποία συνδυάζει την τεχνολογία του διπλού γαλακτώματος με την τεχνική της εξώθησης. Συγκεκριμένα, το προβιοτικό στέλεχος BB-12 ενσωματώθηκε εντός της εσωτερικής υδατικής φάσης ενός  $v_1/\epsilon/v_2$  διπλού γαλακτώματος με βάση το πυρηνέλαιο. Στην εξωτερική φάση ( $v_2$ ) του διπλού γαλακτώματος περιέχεται κατάλληλο εγκλειστικό μέσο με βάση το αλγινικό νάτριο, το οποίο αλληλεπιδρά στη συνέχεια με το χλωριούχο ασβέστιο στο οποίο εξωθείται το διπλό γαλάκτωμα, οδηγώντας σε σχηματισμό ενός τρισδιάστατου πλέγματος και στην επακόλουθη ανάπτυξη σφαιριδίων. Στην Εικόνα 5.5 παρουσιάζεται η δομή των προκύπτοντων σφαιριδίων. Η επιλογή του εγκλειστικού μέσου έγινε με βάση τις τιμές του ζ-δυναμικού και του ιζώδους των διπλών γαλακτωμάτων που εξετάστηκαν όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.3. Στη συνέχεια, έγινε εξώθηση των επιλεγμένων διπλών γαλακτωμάτων και αξιολόγηση της επιτυχίας του εγκλεισμού μέσω εκτίμησης της απόδοσης εγκλεισμού (ΕΥ%). Τα προϊόντα εγκλεισμού που προέκυψαν αξιολογήθηκαν ως προς την ικανότητά τους να προστατεύουν το προβιοτικό στέλεχος BB-12 τόσο κατά τη διατήρησή τους υπό ψύξη ή κατάψυξη, όσο και κατά την έκθεσή τους σε σύστημα προσομοίωσης του γαστρεντερικού συστήματος.



Εικόνα 5.5: Απεικόνιση σφαιριδίων που προκύπτουν κατά τον εγκλεισμό του προβιοτικού στελέχους BB-12 μέσω συνδυασμού διπλού  $v_1/\epsilon/v_2$  γαλακτώματος και της τεχνικής της εξώθησης.



#### 5.4.1. Χαρακτηρισμός γαλακτώματος και επιλογή του κατάλληλου εγκλειστικού μέσου

Μέσω του ζ-δυναμικού μπορεί να εκτιμηθεί η σταθερότητα ενός γαλακτώματος. Τα μόρια του πολυμερούς που προσροφώνται στην επιφάνεια των σταγονιδίων του γαλακτώματος είναι πιθανό να παρέχουν φορτίο και λόγω της άπωσης των σταγονιδίων να βοηθούν στη σταθεροποίηση του συστήματος (Πίνακας 5.3). Όσον αφορά τα εγκλειστικά μέσα που εξετάστηκαν, το μίγμα αραβικού κόμμεος και αλγινικού οξέος (AA/wow) οδήγησε στο σχηματισμό γαλακτώματος με τη χαμηλότερη απόλυτη τιμή ζ-δυναμικού, περίπου σε  $-18.8 \pm 2.15$  mV. Αντίθετα, τις υψηλότερες απόλυτες τιμές ζ-δυναμικού παρουσίασαν τα δείγματα που περιείχαν αποκλειστικά αλγινικό νάτριο (A/wow), φτάνοντας σε  $-65.1 \pm 0.354$  mV ( $p < 0.05$ ) (με μεγαλύτερη ηλεκτραρνητικότητα). Οι υψηλότερες απόλυτες τιμές ζ-δυναμικού των γαλακτωμάτων σχετίζονται με μεγαλύτερο ενεργειακό φράγμα ανάμεσα στα σταγονίδια του γαλακτώματος, που παρέχει κατ' αυτόν τον τρόπο ικανοποιητική ηλεκτροστατική άπωση μεταξύ τους.

Πίνακας 5.3: Τιμές ζ-δυναμικού της εξωτερικής φάσης ( $v_2$ ) του διπλού γαλακτώματος ( $v_1/\epsilon/v_2$ ) με διάφορα εγκλειστικά μέσα.

Εξωτερική φάση ( $v_2$ ) του $v_1/\epsilon/v_2$ γαλακτώματος	ζ-δυναμικό (mV)
AI/wow	$-65.1 \pm 0.4^a$
AP/wow	$-31.7 \pm 1.1^b$
AA/wow	$-18.8 \pm 2.2^c$
AG/wow	$-39.4 \pm 0.7^d$
AC/wow	$-58.3 \pm 2.2^e$

Οι τιμές που παρουσιάζονται είναι μέσοι όροι  $\pm$  τυπικές αποκλίσεις ( $n=3$ ). Οι διαφορετικοί δείκτες υποδηλώνουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων. Η κωδικοποίηση των δειγμάτων έχει οριστεί στον Πίνακα 4.3.

Το ιξώδες και το ζ-δυναμικό των  $v_1/\epsilon/v_2$  γαλακτωμάτων που παρασκευάστηκαν με βάση τα εγκλειστικά μέσα που εξετάστηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.4. Οι ιδιότητες αυτές μπορούν να αξιοποιηθούν ως δείκτες σταθερότητας των γαλακτωμάτων. Η προσθήκη πολυμερών σε υδατικά διαλύματα δημιουργεί σύνθετα συσσωματώματα μέσω δεσμών υδρογόνου και διασύνδεσης των πολυμερών. Πιο συγκεκριμένα, τα δείγματα που περιείχαν μόνο αλγινικό νάτριο (A/wow) παρουσίασαν ιξώδες  $34.3 \pm 1.5$  cP, ενώ τα δείγματα που περιείχαν μίγμα αλγινικού και πηκτίνης (AP/wow) είχαν τιμές ιξώδους  $283.4 \pm 0.95$  cP. Η αύξηση στην τιμή του ιξώδους οφείλεται στην ανάπτυξη ενός σύνθετου δικτύου με διασυνδέσεις. Βιβλιογραφικά αναφέρεται ότι ο ρυθμός κρεμοποίησης ή καταβύθισης, που σχετίζεται με την αποσταθεροποίηση του γαλακτώματος, είναι αντιστρόφως ανάλογος του ιξώδους της υδατικής φάσης (Gharehbeglou et al. 2019). Από την άλλη πλευρά, η αύξηση αρνητικών φορτίων η οποία προκαλείται από τα

χρησιμοποιούμενα πολυμερή, οδηγεί σε αύξηση των αρνητικών απωστικών δυνάμεων (ηλεκτροστατικών και στερικών) μεταξύ των σταγονιδίων του γαλακτώματος. Ως εκ τούτου, σχηματίζεται μία συνεκτική διεπιφανειακή μεμβράνη γύρω από τα σταγονίδια του γαλακτώματος που επιβραδύνει την αποσταθεροποίηση του γαλακτώματος (Ravindran et al. 2018). Τα γαλακτώματα με τα ασθενέστερα φορτισμένα σταγονίδια παρουσίασαν τις μεγαλύτερες τιμές ιξώδους.

Πίνακας 5.4: Τιμές ζ-δυναμικού και ιξώδους των  $v_1/\varepsilon/v_2$  γαλακτωμάτων με ενσωματωμένο το προβιοτικό στέλεχος BB-12.

$v_1/\varepsilon/v_2$ γαλάκτωμα	ζ-δυναμικό (mV)	Ιξώδες (cP) στους 25°C
A/wow	-3.4±0.1 <sup>a</sup>	34.3±1.5 <sup>a</sup>
AP/wow	-0.1±0.04 <sup>c</sup>	283.4±1.0 <sup>b</sup>
AG/wow	-1.3±0.3 <sup>bc</sup>	66.0±1.2 <sup>c</sup>
AC/wow	-1.6±0.03 <sup>b</sup>	56.7±1.5 <sup>d</sup>
AA/wow	-0.27±0.5 <sup>c</sup>	90.8±0.2 <sup>e</sup>

Οι τιμές που παρουσιάζονται είναι μέσοι όροι ± τυπικές αποκλίσεις (n=3). Σε κάθε στήλη οι διαφορετικοί δείκτες υποδηλώνουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων. Η κωδικοποίηση των δειγμάτων έχει οριστεί στον Πίνακα 4.3.

Η επιλογή του πιο σταθερού κολλοειδούς συστήματος προκειμένου να χρησιμοποιηθεί κατά την εφαρμογή της εξώθησης γίνεται με βάση τις τιμές του ζ-δυναμικού και του ιξώδους των  $v_1/\varepsilon/v_2$  γαλακτωμάτων. Έτσι, ως καταλληλότερο υλικό για την εξωτερική φάση του διπλού γαλακτώματος κρίθηκε το αλγινικό νάτριο (A/wow), το οποίο παρουσίασε τις υψηλότερες απόλυτες τιμές ζ-δυναμικού και τις χαμηλότερες τιμές ιξώδους. Στον Πίνακα 5.5 παρουσιάζονται οι φυσικοχημικές ιδιότητες των  $v_1/\varepsilon$  και  $v_1/\varepsilon/v_2$  γαλακτωμάτων τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή σφαιριδίων μέσω εξώθησης. Η προσθήκη ινουλίνης στα αρχικά  $v_1/\varepsilon$  γαλακτώματα (GI/wow) στην εσωτερική φάση των οποίων περιέχεται το προβιοτικό στέλεχος BB-12, προκάλεσε μείωση του μεγέθους των σταγονιδίων, της κατανομής των σταγονιδίων και του ιξώδους των γαλακτωμάτων, υποδεικνύοντας ότι η παρουσία της διευκολύνει την ομογενοποίηση και κατ' επέκταση το σχηματισμό γαλακτώματος. Τα  $v_1/\varepsilon/v_2$  γαλακτώματα με ινουλίνη ενσωματωμένη στην εσωτερική υδατική φάση εμφάνισαν χαμηλές τιμές μεγέθους και κατανομής σταγονιδίων και αυξημένες τιμές ζ-δυναμικού, καθώς το μέγεθος σταγονιδίων του εσωτερικού  $v_1/\varepsilon$  γαλακτώματος επηρεάζει τη δομή του διπλού γαλακτώματος (Yildirim et al. 2016). Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε ότι τα διπλά γαλακτώματα ήταν αρκετά σταθερά ώστε να υποβληθούν σε εξώθηση, ακόμη και αν χαρακτηρίζονταν από υψηλές τιμές δείκτη πολυδιασποράς (PDI > 0.3), που υποδηλώνει μεγάλο εύρος κατανομής μεγέθους σταγονιδίων.

Πίνακας 5.5: Φυσικοχημικές ιδιότητες των ν/ε και ν<sub>1</sub>/ε/ν<sub>2</sub> γαλακτωμάτων που επιλέχθηκαν για εξώθηση.

ν/ε γαλάκτωμα	G/wow	GI/wow
Μέση διάμετρος σταγονιδίων (nm)	810.10±5.52	715.10±4.10
Δείκτης πολυδιασποράς	0.498±0.034	0.389±0.023
Ιξώδες 25°C (cP)	117.0±9.6	98.0±10.5
ν <sub>1</sub> /ε/ν <sub>2</sub> γαλάκτωμα	A/wow	AI/wow
Μέση διάμετρος σταγονιδίων (nm)	3.39±0.93	2.97±0.47
Δείκτης πολυδιασποράς	0.658±0.024	0.594±0.017
ζ-δυναμικό (mV)	-1.8±0.1	-3.5±0.4

Οι τιμές που παρουσιάζονται είναι μέσοι όροι ± τυπικές αποκλίσεις (n=3). Η κωδικοποίηση των δειγμάτων έχει οριστεί στον Πίνακα 4.3.

5.4.2. Εκτίμηση απόδοσης εγκλεισμού (EY%) του συνδυασμού διπλού ν<sub>1</sub>/ε/ν<sub>2</sub> γαλακτώματος και τεχνικής εξώθησης

Στην εσωτερική υδατική φάση (ν<sub>1</sub>) του αρχικού γαλακτώματος νερό-σε-έλαιο προστέθηκε ποσότητα του προβιοτικού στελέχους BB-12 και ακολούθησε ομογενοποίηση για την παρασκευή του ν<sub>1</sub>/ε γαλακτώματος. Στη συνέχεια το ν<sub>1</sub>/ε γαλάκτωμα ομογενοποιήθηκε με την εξωτερική υδατική φάση ν<sub>2</sub> που περιείχε αλγινικό νάτριο, προκειμένου να παραχθεί το τελικό ν<sub>1</sub>/ε/ν<sub>2</sub> διπλό γαλάκτωμα.

Η παραγωγή των διπλών γαλακτωμάτων και η τεχνική της εξώθησης θεωρούνται ήπιες διεργασίες, που έχουν ως αποτέλεσμα την επίτευξη υψηλών αποδόσεων εγκλεισμού (>72.5%). Ο αριθμός των ζώντων κυττάρων στα προϊόντα εγκλεισμού μετά το πέρας του εγκλεισμού κυμάνθηκε μεταξύ 7.12-8.03 logcfu g<sup>-1</sup>, το οποίο αντιστοιχεί σε αποδόσεις εγκλεισμού μεταξύ 72.5% και 81.6% όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 5.6. Η ενσωμάτωση του προβιοτικού στελέχους BB-12 στο διπλό γαλάκτωμα πριν τη διαδικασία της εξώθησης, χρησιμοποιώντας αλγινικό στην εξωτερική φάση του ν<sub>1</sub>/ε/ν<sub>2</sub> γαλακτώματος ως εγκλειστικό μέσο, παρείχε υψηλότερες αποδόσεις εγκλεισμού, σε σύγκριση με τη συμβατική εξώθηση (81.6% και 60.5%, αντίστοιχα). Οι Pimentel-González et al. (2009) ανέφεραν απόδοση εγκλεισμού της τάξης του 95.9% για τον εγκλεισμό του στελέχους *Lactobacillus rhamnosus* σε διπλά γαλακτώματα, ενώ οι Amine et al. (2014) ενέκλεισαν το στέλεχος *Bifidobacterium longum* μέσω εξώθησης και επέτυχαν αποδόσεις εγκλεισμού που κυμαίνονταν από 31% μέχρι 65%, ανάλογα με τον χρησιμοποιούμενο τύπο αλγινικού, επιβεβαιώνοντας τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μεθόδου. Οι τιμές της απόδοσης εγκλεισμού μειώθηκαν τόσο με την προσθήκη ινουλίνης στο εγκλειστικό μίγμα, όσο και κατά την επικάλυψη των σφαιριδίων με χιτοζάνη. Η ινουλίνη, πιθανόν, παρεμποδίζει μερικώς τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ιόντων αλγινικού και ασβεστίου κατά τη διάρκεια του σχηματισμού του τρισδιάστατου δικτύου,

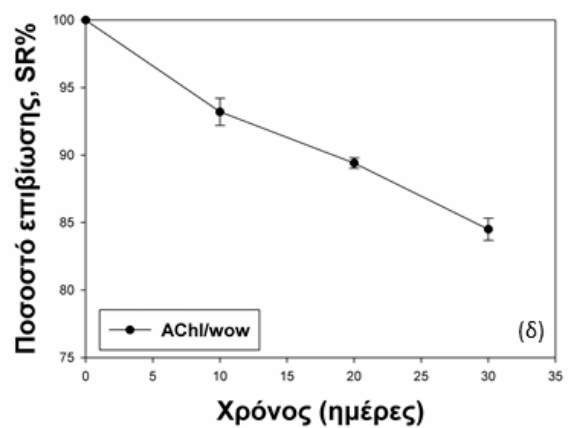
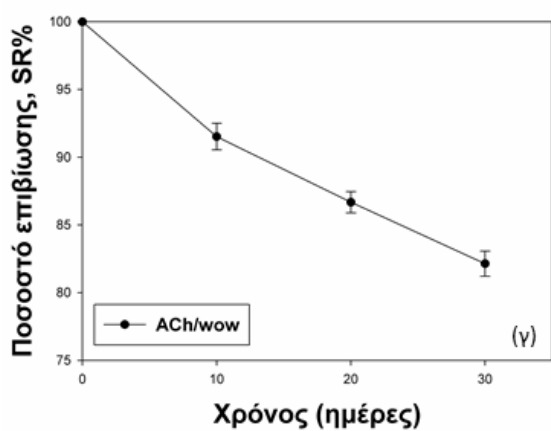
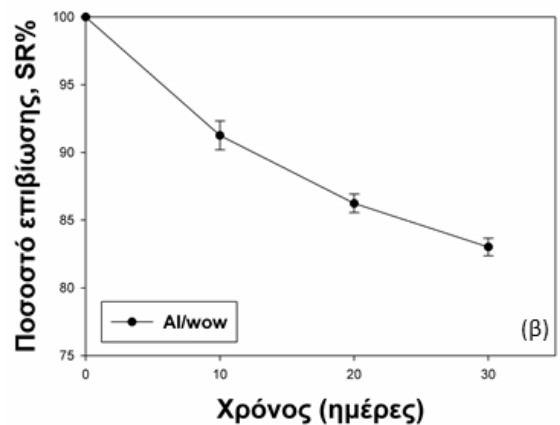
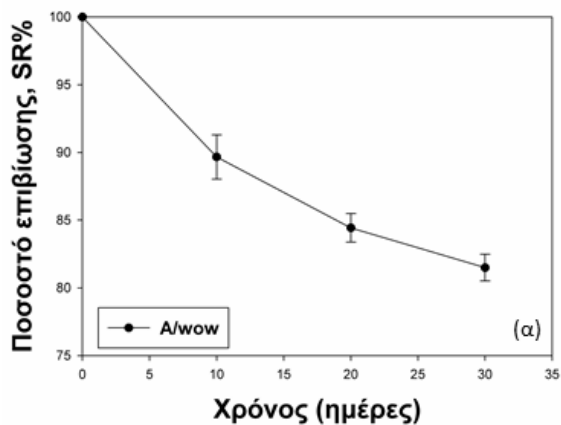
οδηγώντας έτσι σε χαμηλότερες τιμές απόδοσης εγκλεισμού (77.6%). Στην περίπτωση των επικαλυμμένων με χιτοζάνη προϊόντων εγκλεισμού η μειωμένη σχετικά απόδοση εγκλεισμού (80.41%) αποδίδεται στην αντιμικροβιακή δράση της χιτοζάνης, η οποία επηρεάζει αρνητικά τη βιωσιμότητα των προβιοτικών κυττάρων. Παρόμοια μείωση του ποσοστού επιβίωσης προβιοτικών κυττάρων λόγω χρήσης χιτοζάνης στη διεργασία του εγκλεισμού έχει αναφερθεί και από άλλους ερευνητές (Yonekura et al. 2014).

Πίνακας 5.6: Τιμές απόδοσης εγκλεισμού (EY%) κατά τη διαδικασία εγκλεισμού του προβιοτικού στελέχους BB-12 μέσω συνδυασμού διπλού  $v_1/\epsilon/v_2$  γαλακτώματος και της τεχνικής της εξώθησης με διάφορα εγκλειστικά μέσα. Η κωδικοποίηση των δειγμάτων έχει οριστεί στον Πίνακα 4.3.

<i>Εγκλειστικό μέσο</i>	<i>Κωδικοποίηση</i>	<i>(EY%)</i>
Αλγινικό νάτριο	A/wow	81.64 ± 2.16
Αλγινικό νάτριο - Ινουλίνη	AI/wow	77.62 ± 1.81
Αλγινικό νάτριο - Χιτοζάνη	ACh/wow	80.41 ± 1.44
Αλγινικό νάτριο – Ινουλίνη - Χιτοζάνη	AChI/wow	72.48 ± 3.27

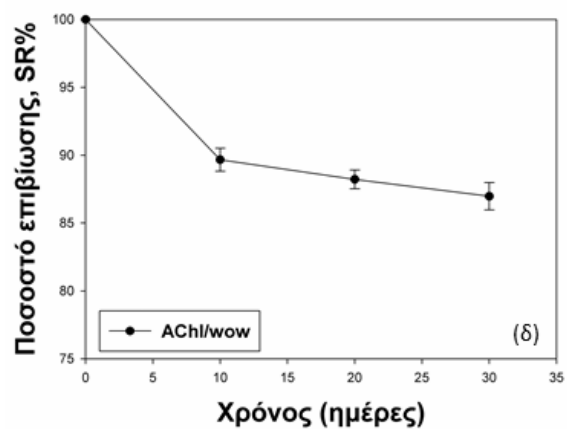
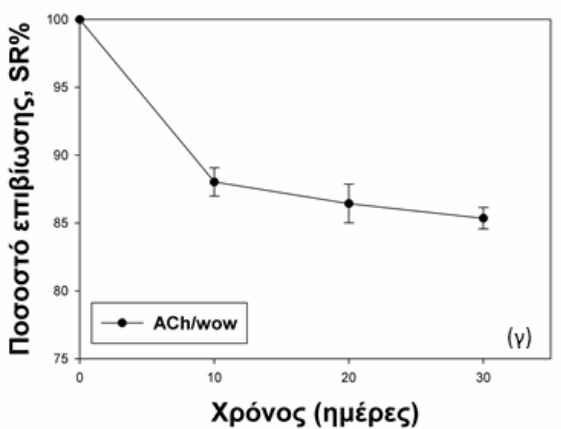
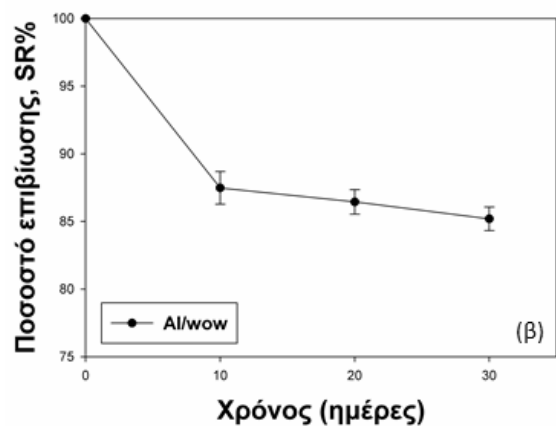
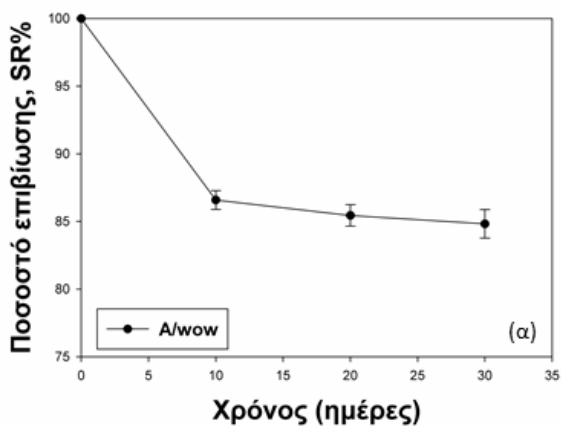
5.4.3. Σταθερότητα εγκλεισμένου προβιοτικού στελέχους BB-12 μέσω συνδυασμού διπλού  $v_1/\epsilon/v_2$  γαλακτώματος και τεχνικής εξώθησης κατά την αποθήκευση σε συνθήκες ψύξης ή κατάψυξης – Βιωσιμότητα (SR%) του εγκλεισμένου προβιοτικού στελέχους BB-12

Όπως και στις προηγούμενες πειραματικές σειρές, εξετάστηκε η βιωσιμότητας του προβιοτικού στελέχους BB-12 κατά τη διατήρησή του στους 4°C και -18°C για διάρκεια 1 μήνα. Τα ποσοστά επιβίωσης των προβιοτικών κυττάρων παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 5.20. Το βακτηριακό φορτίο φάνηκε ότι μειώνεται μεν σημαντικά κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης υπό ψύξη, παραμένοντας όμως αρκετά υψηλό μέχρι το τέλος των 30 ημερών αποθήκευσης. Η ενσωμάτωση του προβιοτικού στελέχους BB-12 στην εσωτερική φάση του διπλού  $v_1/\epsilon/v_2$  γαλακτώματος πριν την εξώθηση αποδείχθηκε ότι αυξάνει την προστασία των προβιοτικών κυττάρων, οδηγώντας τελικά σε εγκλεισμένα προϊόντα με υψηλά επίπεδα βακτηριακού φορτίου ( $>6 \log_{cfu} g^{-1}$ ) που ξεπερνούν το ελάχιστο απαιτούμενο όριο για εμπορική χρήση. Αντίθετα, τα προβιοτικά κύτταρα που εγκλείστηκαν στο ίδιο εγκλειστικό μέσο (AG/EX) με την τεχνική της συμβατικής εξώθησης επιβίωσαν μόνο μέχρι τις 20 πρώτες ημέρες της αποθήκευσης σε ψύξη. Με βάση τα παραπάνω, φαίνεται ότι τα προβιοτικά βακτήρια προστατεύονται ικανοποιητικά εντός του διπλού  $v_1/\epsilon/v_2$  γαλακτώματος, διατηρούμενα με υψηλά ποσοστά επιβίωσης κατά την αποθήκευσή τους υπό ψύξη.



Διάγραμμα 5.20: Μεταβολή ποσοστού επιβίωσης (SR%) του εγκλεισμένου προβιοτικού στελέχους BB-12 μέσω συνδυασμού διπλού  $v_1/\varepsilon/v_2$  γαλακτώματος και τεχνικής εξώθησης κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης στους 4°C για 30 ημέρες. Η κωδικοποίηση των δειγμάτων έχει οριστεί στον Πίνακα 4.3.

Κατά τη διάρκεια της διατήρησης των προϊόντων εγκλεισμού στους -18°C ( $p < 0.05$ ) παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της βιωσιμότητας κατά τις πρώτες 10 ημέρες αποθήκευσης, πιθανόν λόγω βλάβης των κυττάρων ένεκα της απότομης μεταβολής της θερμοκρασίας στην αρχή της αποθήκευσης (Διάγραμμα 5.21). Κατά τη διάρκεια των επόμενων 20 ημερών αποθήκευσης, το βακτηριακό φορτίο των προϊόντων εγκλεισμού παρέμεινε σταθερό, υπερβαίνοντας το ελάχιστο όριο των 6 logcfu g<sup>-1</sup>.



*Διάγραμμα 5.21: Μεταβολή ποσοστού επιβίωσης (SR%) του εγκλεισμένου προβιοτικού στελέχους BB-12 μέσω συνδυασμού διπλού  $v_1/\epsilon/v_2$  γαλακτώματος και τεχνικής εξώθησης κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης στους  $-18^\circ\text{C}$  για 30 ημέρες. Η κωδικοποίηση των δειγμάτων έχει οριστεί στον Πίνακα 4.3.*

Η προσθήκη της πρεβιοτικής ουσίας ινουλίνης στην εσωτερική φάση των  $v_1/\epsilon/v_2$  γαλακτωμάτων αύξησε τη βιωσιμότητα του προβιοτικού στελέχους BB-12, περιορίζοντας το ρυθμό θανάτωσης των κυττάρων. Επιπρόσθετα, ενώ η επικάλυψη των προϊόντων εγκλεισμού με χιτοζάνη είχε αρνητική επίδραση στη βιωσιμότητα του προβιοτικού στελέχους BB-12 κατά τη διάρκεια του εγκλεισμού, φάνηκε να έχει ικανοποιητική προστατευτική δράση κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, καθώς προέκυψαν υψηλότερα ποσοστά επιβίωσης των προβιοτικών κυττάρων στα προϊόντα εγκλεισμού όπου είχε εφαρμοστεί επικάλυψη με χιτοζάνη σε σχέση με τα αντίστοιχα προϊόντα χωρίς επικάλυψη (83.0-85.5% και 82.1-83.6%, αντίστοιχα). Αναφορά στη δράση της χιτοζάνης κατά τη χρήση της ως επικαλυπτικό σε προϊόντα εγκλεισμού προβιοτικών κυττάρων έχει γίνει και σε άλλες μελέτες, στις οποίες μάλιστα έχει προκύψει ότι αύξηση της συγκέντρωσης της χιτοζάνης στην επικάλυψη των προϊόντων ενισχύει την επιβίωση των προβιοτικών κυττάρων κατά την αποθήκευση. Παρόλα αυτά, εάν η συγκέντρωση υπερβεί τα 0.56 g/100 mL, η βιωσιμότητα των κυττάρων επηρεάζεται αρνητικά (Cook et al. 2013; Kamalian et al. 2014). Έτσι, ο συνδυασμός του πυκνού δικτύου που προκύπτει από τη χρήση του εγκλειστικού και την επικάλυψη της χιτοζάνης παρέχει σημαντική προστασία στο

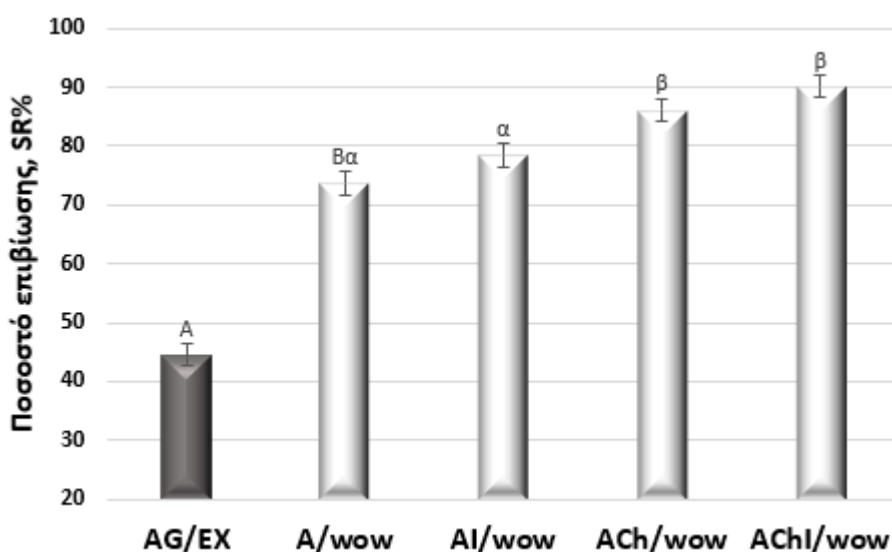
προβιοτικό στέλεχος BB-12 έναντι περιβαλλοντικών παραγόντων που έχουν αρνητική επίδραση σε αυτό, όπως το οξυγόνο και η υγρασία.

5.4.4. Σταθερότητα εγκλεισμένου προβιοτικού στελέχους BB-12 μέσω συνδυασμού διπλού  $v_1/\epsilon/v_2$  γαλακτώματος και τεχνικής εξώθησης κατά την έκθεσή του σε συνθήκες προσομοίωσης του γαστρεντερικού συστήματος (ΠΓΥ-ΠΕΥ)

Όπως προαναφέρθηκε, τα προβιοτικά βακτήρια, προκειμένου να ασκήσουν την προβιοτική τους δράση πρέπει να είναι ικανά να επιβιώνουν όχι μόνο κατά την αποθήκευση των προβιοτικών προϊόντων, αλλά και κατά τη διέλευσή τους από το γαστρεντερικό σύστημα. Για το λόγο αυτό, τα προϊόντα εγκλεισμού εκτέθηκαν σε σύστημα προσομοίωσης του γαστρεντερικού συστήματος, όπως περιγράφεται στην υποενότητα 4.4.4 (Διαγράμματα 5.22-5.23). Σε κάθε περίπτωση, η προστασία που παρασχέθηκε στα εγκλεισμένα προβιοτικά κύτταρα βρέθηκε ικανοποιητικά υψηλή (68.6-86.1%). Τα ποσοστά επιβίωσης ήταν σημαντικά υψηλότερα ( $p < 0.05$ ) από εκείνα που επιτεύχθηκαν στα αντίστοιχα προϊόντα εγκλεισμού μέσω συμβατικής εξώθησης (AG/EX) (38.4%), υποδηλώνοντας ότι το διπλό  $v_1/\epsilon/v_2$  γαλάκτωμα μπορεί να παρέχει ένα ευνοϊκότερο περιβάλλον για το προβιοτικό στέλεχος BB-12 κατά τη διέλευσή του από το γαστρεντερικό σύστημα. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν βρεθεί και από τους Pimentel-González et al. (2009) οι οποίοι ενσωμάτωσαν το στέλεχος *Lactobacillus rhamnosus* σε διπλά γαλακτώματα, επιτυγχάνοντας σημαντική βελτίωση στη βιωσιμότητά του σε σύγκριση με το ελεύθερο προβιοτικό στέλεχος.

Η επικάλυψη με χιτοζάνη των προϊόντων εγκλεισμού που έχουν παραχθεί μέσω  $v_1/\epsilon/v_2$  γαλακτώματος και τεχνικής εξώθησης ενισχύει την προστασία των προβιοτικών κυττάρων ( $p < 0.05$ ), αυξάνοντας τα ποσοστά επιβίωσης από 68.6-71.3% σε 82-86.1%. Το πλέγμα του αλγινικού είναι αρκετά πορώδες, ειδικά στην περίπτωση παρουσίας προβιοτικών κυττάρων κατά τη διάρκεια του σχηματισμού πηκτής. Σύμφωνα με τους Hansen et al. (2002), οι πηκτές του αλγινικού έχουν χαμηλή ρυθμιστική ικανότητα και μεγάλο πορώδες, με αποτέλεσμα να μην είναι ικανά να εμποδίσουν αποτελεσματικά τη διάχυση των ιόντων  $H^+$  εντός των προϊόντων εγκλεισμού, παρέχοντας ουσιαστικά έτσι περιορισμένη προστασία στα βακτηριακά κύτταρα. Η χιτοζάνη είναι υλικό που μπορεί να επάγει το σχηματισμό ισχυρών συμπλόκων με το αλγινικό, οδηγώντας σε ισχυρότερες και πυκνότερες δομές με μικρότερο πορώδες, περιορίζοντας έτσι το ρυθμό διάχυσης των γαστρικών υγρών και των χολικών αλάτων εντός των προϊόντων εγκλεισμού (Hansen et al., 2002; Kamalian et al., 2014). Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης επιβεβαιώνονται και από άλλους ερευνητές οι οποίοι παρατήρησαν σημαντική βελτίωση της προστασίας των προβιοτικών κυττάρων κατά την επικάλυψη των προϊόντων εγκλεισμού με χιτοζάνη. Η βελτίωση αυτή παρατηρήθηκε, συγκεκριμένα, είτε κατά τον εγκλεισμό του προβιοτικού στελέχους *Bifidobacterium breve* σε αλγινικό με επακόλουθη επικάλυψη των προϊόντων εγκλεισμού με πολλαπλά διαδοχικά στρώματα χιτοζάνης και αλγινικού (Cook et al. 2013), είτε κατά τον εγκλεισμό του προβιοτικού στελέχους *B. pseudocatenulatum* G4 σε απλά σφαιρίδια αλγινικού-χιτοζάνης.

Η προσθήκη ινουλίνης στο εγκλειστικό μίγμα έχει βρεθεί ότι ενισχύει την επιβίωση των προβιοτικών κυττάρων ακόμη και κατά την έκθεσή τους σε συνθήκες προσομοίωσης του γαστρεντερικού συστήματος. Έτσι, όπως και στις προηγούμενες πειραματικές σειρές, η προσθήκη ινουλίνης στην εσωτερική φάση του  $v_1/\epsilon/v_2$  γαλακτώματος ενίσχυσε τη βιωσιμότητα του προβιοτικού στελέχους BB-12 κατά 3-4% κατά τη διάρκεια της έκθεσης σε προσομοίωση του γαστρεντερικού συστήματος. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν τη σταθερότητα της ινουλίνης σε εύρος τιμών pH και ιοντικής ισχύος παρόμοιων με του ανθρώπινου γαστρεντερικού συστήματος, υποδεικνύοντας έτσι την επωφελή επίδρασή της κατά τη διάρκεια της μεταφοράς των προβιοτικών βακτηρίων στο έντερο (Barclay et al. 2010; Fritzen-freire et al. 2013). Επιπρόσθετα, οι πρεβιοτικές ουσίες όπως η ινουλίνη αποτελούν πηγές άνθρακα και αζώτου για την ανάπτυξη των προβιοτικών κυττάρων και, έτσι, μπορούν να διευκολύνουν τη διέλευση και την αποίκηση των προβιοτικών βακτηρίων στο έντερο (W. Krasaekoort and Watchararoka 2014). Συνεπώς, ο εγκλεισμός του προβιοτικού στελέχους BB-12 στην εσωτερική φάση των  $v_1/\epsilon/v_2$  διπλών γαλακτωμάτων πριν τη διεργασία της εξώθησης μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη επιβίωση κατά την έκθεσή τους σε αντίξοες συνθήκες, με αποτέλεσμα η συγκεκριμένη προσέγγιση να είναι ευνοϊκή για τη μεταφορά των προβιοτικών βακτηρίων στο ανθρώπινο γαστρεντερικό σύστημα.

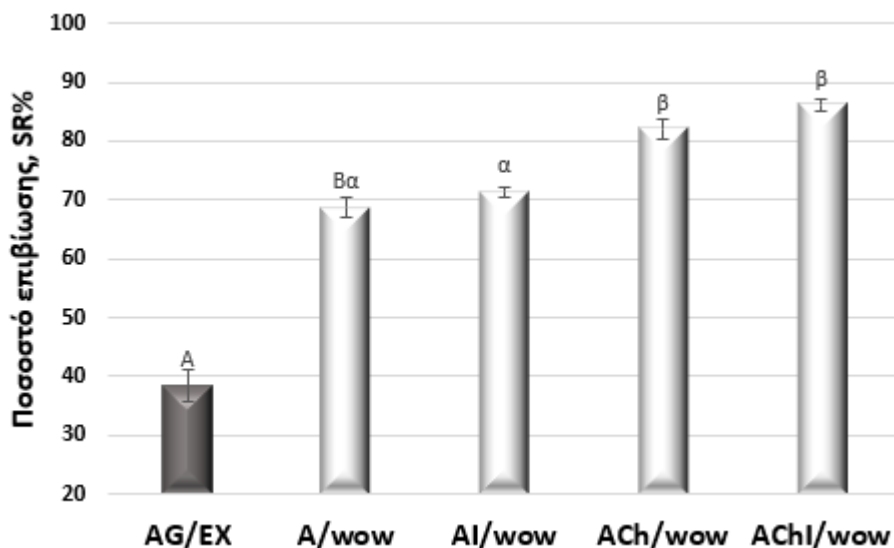


Διάγραμμα 5.22: Διάγραμμα ποσοστών επιβίωσης (SR%) του εγκλεισμένου προβιοτικού στελέχους BB-12 μέσω συνδυασμού διπλού  $v_1/\epsilon/v_2$  γαλακτώματος και τεχνικής εξώθησης μετά από έκθεση σε συνθήκες προσομοίωσης γαστρικών (ΠΓΥ). Η κωδικοποίηση των δειγμάτων έχει οριστεί στον Πίνακα 4.3.

\*Τα μικρά γράμματα παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές ( $p < 0.05$ ) μεταξύ των εγκλειστικών μιγμάτων.

\*\*Τα κεφαλαία γράμματα παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές ( $p < 0.05$ ) μεταξύ των διαφορετικών μεθόδων εγκλεισμού.





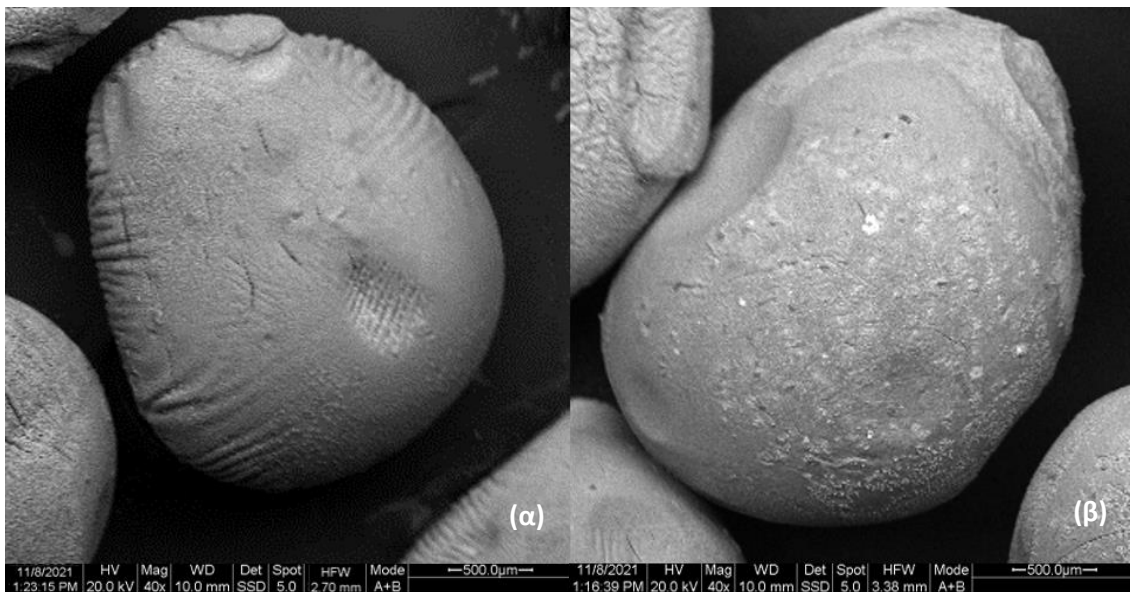
*Διάγραμμα 5.23: Διάγραμμα ποσοστών επιβίωσης (SR%) του εγκλεισμένου προβιοτικού στελέχους BB-12 μέσω συνδυασμού διπλού  $v_1/\epsilon/v_2$  γαλακτώματος και τεχνικής εξώθησης μετά από έκθεση σε συνθήκες προσομοίωσης εντερικών υγρών (ΠΕΥ). Η κωδικοποίηση των δειγμάτων έχει οριστεί στον Πίνακα 4.3.*

\*Τα μικρά γράμματα παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές ( $p < 0.05$ ) μεταξύ των εγκλειστικών μιγμάτων.

\*\*Τα κεφαλαία γράμματα παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές ( $p < 0.05$ ) μεταξύ των διαφορετικών μεθόδων εγκλεισμού.

#### 5.4.5. Αξιολόγηση μικροδομής και μορφολογίας προϊόντων εγκλεισμού μέσω συνδυασμού διπλού $v_1/\epsilon/v_2$ γαλακτώματος και τεχνικής εξώθησης με Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (SEM)

Όπως και στις προηγούμενες δύο τεχνικές εγκλεισμού, έγινε και στην περίπτωση αυτή χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης (SEM) για τη μελέτη της εξωτερικής μορφολογίας των τελικών προϊόντων εγκλεισμού που παρήχθησαν μέσω της συγκεκριμένης καινοτόμου μεθόδου με συνδυασμό διπλού  $v_1/\epsilon/v_2$  γαλακτώματος και της τεχνικής της εξώθησης. Οι εικόνες που ελήφθησαν παρουσιάζονται στην Εικόνα 5.6. Στην Εικόνα 5.6α, φαίνεται ενδεικτικά ένα προϊόν εγκλεισμού μόνο με αλγινικό στην εξωτερική φάση του διπλού γαλακτώματος, ενώ στην Εικόνα 5.6β παρουσιάζεται το αντίστοιχο προϊόν εγκλεισμού ύστερα από επικάλυψη με χιτοζάνη. Η μορφολογία των δύο αυτών προϊόντων εγκλεισμού είναι παρεμφερής. Η μόνη διαφοροποίηση έγκειται στην πιο ομοιόμορφη και συμπαγή επιφάνεια που δημιουργείται από την επικάλυψη χιτοζάνης, η οποία αιτιολογεί την αυξημένη προστασία που παρέχουν τα δεύτερα προϊόντα εγκλεισμού στο προβιοτικό στέλεχος BB-12, τόσο κατά την αποθήκευσή του, όσο και κατά την έκθεσή του σε συνθήκες προσομοίωσης του γαστρεντερικού συστήματος.



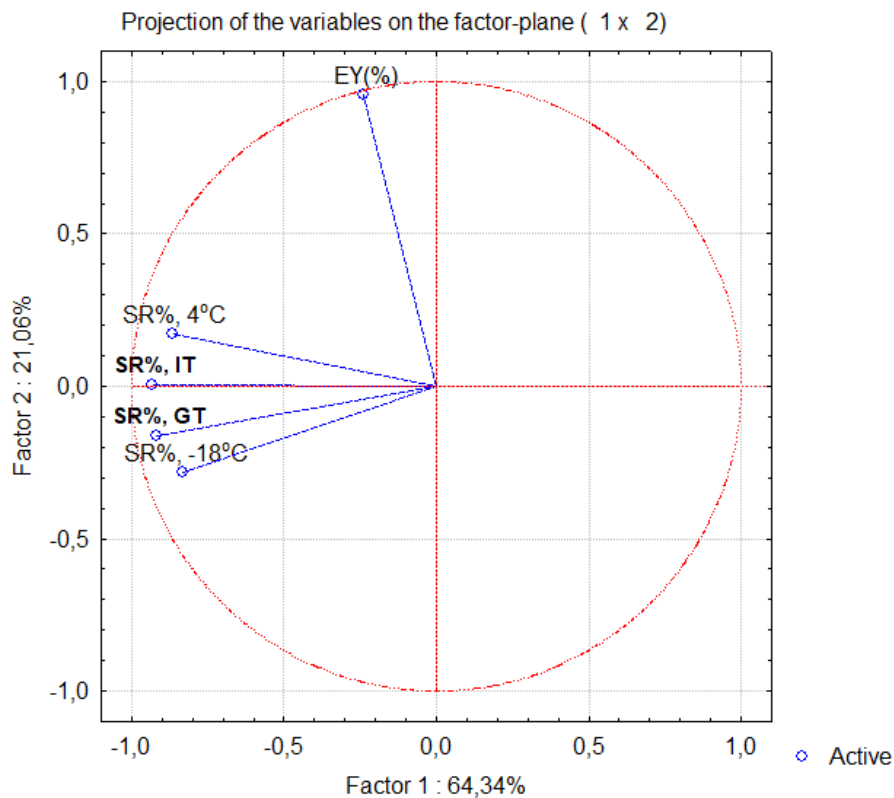
Εικόνα 5.6: Ενδεικτικές δομές των διαφορετικών προϊόντων εγκλεισμού μέσω συνδυασμού διπλού  $v_1/\epsilon/v_2$  γαλακτώματος και τεχνικής εξώθησης με Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης σε μεγέθυνση 40x. Στη συγκεκριμένη εικόνα παρουσιάζονται τα προϊόντα εγκλεισμού (α) A/wow και (β) ACh/wow. Η κωδικοποίηση των δειγμάτων παρουσιάζεται στον Πίνακα 4.3.

Τέλος, η εξωτερική μορφολογία των προϊόντων εγκλεισμού μέσω της καινοτόμου αυτής μεθόδου, στην οποία συνδυάζεται το διπλό γαλάκτωμα  $v_1/\epsilon/v_2$  και η τεχνική της εξώθησης, είναι παρόμοια με αυτή των προϊόντων εγκλεισμού που προκύπτουν από την τεχνική της εξώθησης, καθώς τα προϊόντα αυτά παρουσιάζουν σχεδόν σφαιρική δομή και λεία, ομοιόμορφη επιφάνεια.

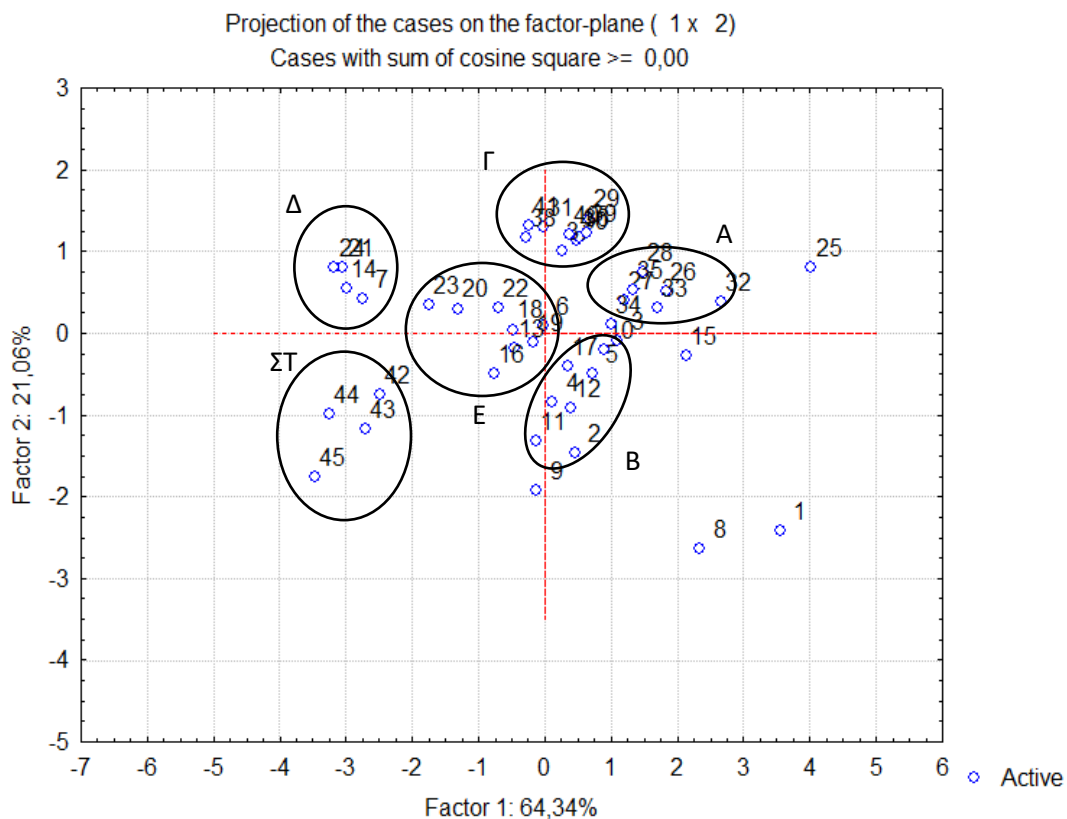
#### 5.4.6. Συσχέτιση αποτελεσματικότητας της συνολικής διαδικασίας εγκλεισμού μέσω των τριών τεχνικών εγκλεισμού: εξώθησης, γαλακτωματοποίησης και συνδυασμού διπλού γαλακτώματος με την τεχνική της εξώθησης - Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (PCA)

Η Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (PCA) πραγματοποιήθηκε με σκοπό τη μελέτη της συσχέτισης των τριών μεθόδων (της καινοτόμου μεθόδου εγκλεισμού που συνδυάζει το διπλό γαλάκτωμα με την τεχνική της εξώθησης και των τεχνικών της εξώθησης και της γαλακτωματοποίησης) που μελετήθηκαν, καθώς επίσης και την ομαδοποίηση των προϊόντων εγκλεισμού με βάση τις ιδιότητές τους. Από τα διαγράμματα των συσχετίσεων των μεταβλητών που εμπλέκονται με τον εγκλεισμό του προβιοτικού στελέχους BB-12 και των δειγμάτων-προϊόντων εγκλεισμού (Διαγράμματα 5.24 και 5.25 αντίστοιχα), προκύπτει ότι το πείραμα του εγκλεισμού του προβιοτικού στελέχους BB-12 περιγράφεται από δύο κύριες συνιστώσες, την 1<sup>η</sup> και τη 2<sup>η</sup> με συνεισφορά 64.34% και 21.06% αντίστοιχα στη συνολική διακύμανση. Τα ποσοστά επιβίωσης των εγκλεισμένων προβιοτικών βακτηρίων κατά την έκθεση σε συνθήκες προσομοίωσης του γαστρεντερικού συστήματος (ΠΓΥ, ΠΕΥ) σχετίζονται αρνητικά με την 1<sup>η</sup> κύρια συνιστώσα, όπως επίσης και τα ποσοστά επιβίωσης κατά την αποθήκευση σε ψύξη και κατάψυξη. Αντίστοιχα, φαίνεται ότι η απόδοση εγκλεισμού των μεθόδων σχετίζεται θετικά με τη 2<sup>η</sup> κύρια συνιστώσα. Από την ομαδοποίηση των

δειγμάτων, με βάση το Διάγραμμα 5.24, προκύπτουν έξι ομάδες. Τα δείγματα της ομάδας Α αποτελούν προϊόντα εγκλεισμού που παρήχθησαν μέσω γαλακτωματοποίησης με χρήση είτε αλγινικού μόνο με γλυκόζη, είτε μιγμάτων αλγινικού με γλυκόζη και ξανθάνη, γλυκερόλη ή μίγμα σκόνης ορού γάλακτος-πηκτίνης, με ή χωρίς ινουλίνη, τα οποία εμφάνισαν τα χαμηλότερα ποσοστά επιβίωσης κατά τη διατήρησή τους υπό κατάψυξη, όπως επίσης και κατά την έκθεσή τους σε συνθήκες προσομοίωσης του γαστρεντερικού συστήματος. Αρκετά χαμηλά ήταν και τα ποσοστά επιβίωσής τους κατά τη διατήρησή τους υπό ψύξη, ενώ αντίθετα οι τιμές της απόδοσης εγκλεισμού που επιτεύχθηκαν στην περίπτωση τους ήταν υψηλές. Τα δείγματα της ομάδας Β περιλαμβάνουν προϊόντα εγκλεισμού που παρήχθησαν μέσω εξώθησης με χρήση μιγμάτων αλγινικού με ξανθάνη, γλυκερόλη ή κ-καραγενάνη, με ή χωρίς ινουλίνη τα οποία παρουσιάζουν αντίστοιχα χαμηλά ποσοστά επιβίωσης τόσο κατά τη διατήρησή τους υπό κατάψυξη όσο και κατά την έκθεσή τους σε συνθήκες προσομοίωσης του γαστρεντερικού συστήματος, ενώ σημειώνουν τα χαμηλότερα ποσοστά επιβίωσης κατά τη διατήρησή τους υπό ψύξη και τις χαμηλότερες τιμές απόδοσης εγκλεισμού. Όσον αφορά τα δείγματα της ομάδας Γ, τα οποία είναι προϊόντα εγκλεισμού που προκύπτουν μέσω γαλακτωματοποίησης με χρήση μιγμάτων αλγινικού με γλυκόζη και κ-καραγενάνη, CNC ή γάλα, με ή χωρίς ινουλίνη, αξίζει να σημειωθεί ότι εμφανίζουν τις μέγιστες τιμές απόδοσης εγκλεισμού σε σύγκριση με τα υπόλοιπα δείγματα, ενώ ενδιάμεσες είναι οι τιμές των ποσοστών επιβίωσης του εγκλεισμένου προβιοτικού στελέχους BB-12. Από την άλλη πλευρά, τα δείγματα της ομάδας Δ αποτελούν προϊόντα εγκλεισμού που παράγονται κυρίως μέσω εξώθησης με χρήση εγκλειστικού μίγματος με βάση το γάλα και εμφανίζουν πολύ υψηλά ποσοστά επιβίωσης τόσο κατά τη διατήρησή τους υπό ψύξη, όσο και κατά την έκθεση σε συνθήκες προσομοίωσης του γαστρεντερικού συστήματος, καθώς επίσης και πολύ υψηλές τιμές απόδοσης εγκλεισμού. Τα δείγματα της ομάδας Ε εμφανίζουν υψηλές τιμές απόδοσης εγκλεισμού και ενδιάμεσες τιμές ποσοστών επιβίωσης του προβιοτικού στελέχους BB-12 σε όλες τις περιπτώσεις και αποτελούν προϊόντα εγκλεισμού που παράγονται μέσω εξώθησης με χρήση μιγμάτων αλγινικού με CNC με ή χωρίς ινουλίνη, καθώς και μιγμάτων αλγινικού με γλυκόζη και ξανθάνη, γλυκερόλη, κ-καραγενάνη ή CNC, με ή χωρίς L-κυστεΐνη-HCl. Τέλος, τα δείγματα της ομάδας ΣΤ αποτελούν τα δείγματα που παρήχθησαν μέσω της καινοτόμου μεθόδου συνδυασμού διπλού γαλακτώματος με την τεχνική της εξώθησης και εμφανίζουν τα καλύτερα αποτελέσματα όσον αφορά το ποσοστό επιβίωσης του προβιοτικού στελέχους BB-12 κατά τη διατήρησή του σε ψύξη ή κατάψυξη, όπως επίσης και κατά την έκθεσή του σε συνθήκες προσομοίωσης του γαστρεντερικού συστήματος, ενώ οι τιμές απόδοσης εγκλεισμού που επιτεύχθηκαν είναι ενδιάμεσες. Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, ανάλογα με τις απαιτήσεις της εφαρμογής για την οποία προορίζονται, μπορούν κάθε φορά να επιλεγθούν τα προϊόντα εγκλεισμού με το βέλτιστο συνδυασμό απόδοσης εγκλεισμού και ποσοστών επιβίωσης.



Διάγραμμα 5.24: Διάγραμμα συσχετίσεων των μεταβλητών των πειραμάτων εγκλεισμού του προβιοτικού στελέχους BB-12 μέσω της Ανάλυσης Κύριων Συνιστωσών (EY%: απόδοση εγκλεισμού, SR%-4°C: ποσοστό επιβίωσης κατά τη διατήρηση στους 4°C, SR%-18°C: ποσοστό επιβίωσης κατά τη διατήρηση στους -18°C, SR%,GT: ποσοστό επιβίωσης κατά την έκθεση σε διάλυμα ΠΓΥ, SR%,IT: ποσοστό επιβίωσης κατά την έκθεση σε διάλυμα ΠΕΥ).



Διάγραμμα 5.25: Διάγραμμα δειγμάτων-προϊόντων εγκλεισμού του προβιοτικού στελέχους BB-12 μέσω της Ανάλυσης Κύριων Συνιστωσών.

### 5.5. Ενσωμάτωση εγκλεισμένων προβιοτικών βακτηρίων μέσω εξώθησης ή γαλακτωματοποίησης σε γάλα και ζύμωση αυτού για παραγωγή προβιοτικού γιαουρτιού

Με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις προηγούμενες πειραματικές σειρές, οι τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν στον εγκλεισμό του προβιοτικού στελέχους BB-12 (εξώθησης, γαλακτωματοποίησης, συνδυασμού διπλού  $v_1/\epsilon/v_2$  γαλακτώματος με εξώθηση) συγκρίνονται ως προς το κόστος και τη βιώσιμότητά τους για βιομηχανική εφαρμογή. Έτσι, η καινοτόμος μέθοδος που διπλού  $v_1/\epsilon/v_2$  γαλακτώματος-εξώθησης αποτελεί μία μέθοδο πολλαπλών σταδίων με δυσκολία εφαρμογής σε μεγάλη κλίμακα, ενώ οι τεχνικές της εξώθησης και της γαλακτωματοποίησης, οι οποίες μελετήθηκαν εκτενώς, θεωρούνται εύκολες και άμεσα εφαρμόσιμες μέθοδοι. Για το λόγο αυτό αποφασίστηκε τα προϊόντα εγκλεισμού με τα βέλτιστα εγκλειστικά μίγματα που έχουν προκύψει μέσω των δύο αυτών μεθόδων να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή προβιοτικού γιαουρτιού. Στην παραγωγή προβιοτικού γιαουρτιού έγινε χρήση συμβατικής καλλιέργειας εκκίνησης μαζί με τα εγκλεισμένα προβιοτικά βακτήρια, και μελετήθηκε η διεργασία της ζύμωσης και τα χαρακτηριστικά των τελικών προϊόντων γιαουρτιού.

Τα ανωτέρω εφαρμόστηκαν σε μία τυπική παραγωγική διαδικασία γιαουρτιού. Οι συνθήκες της θερμικής κατεργασίας του γάλακτος πριν τον εμβολιασμό του με την καλλιέργεια εκκίνησης και το ποσοστό του εγκλεισμένου προβιοτικού στελέχους BB-12 επιλέχθηκαν με βάση υπάρχοντα βιβλιογραφικά δεδομένα. Η θερμική επεξεργασία του γάλακτος παίζει εν μέρει ρόλο στο βακτηριακό φορτίο των προβιοτικών κυττάρων. Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι η θερμική επεξεργασία του γάλακτος στους 95°C για 15 min, η οποία εφαρμόστηκε στην παρούσα διδακτορική διατριβή, βοηθά σημαντικά στη διατήρηση των προβιοτικών κυττάρων σε υψηλότερα επίπεδα συγκριτικά με άλλες θερμικές επεξεργασίες (στους 85°C για 30 min ή στους 95°C για 5 min) (A. M. Mortazavian et al. 2006). Αυτό οφείλεται στη θανάτωση ανταγωνιστικών βακτηρίων στο γάλα, καθώς και στην απελευθέρωση περισσότερων ελεύθερων αμινοξέων και διαθέσιμων πεπτιδίων του γάλακτος. Η κατάλληλη θερμική επεξεργασία περιορίζει επίσης επιτυχώς την παρουσία οξυγόνου, με αποτέλεσμα να προκύπτει ασθενέστερο οξειδοαναγωγικό δυναμικό και κατ' επέκταση να παρέχεται δυνατότητα για μεγαλύτερη ανάπτυξη των προβιοτικών βακτηρίων και ιδιαίτερα αυτών του γένους *Bifidobacterium* (A. M. Mortazavian et al. 2006). Επιπρόσθετα, το pH και η οξύτητα που επικρατούν κατά τη διεργασία ζύμωσης του γάλακτος όπως και κατά την αποθήκευση του τελικού προϊόντος του γιαουρτιού σε ψύξη επηρεάζουν τόσο τη βιωσιμότητα των προβιοτικών βακτηρίων όσο και τα μεταβολικά τους χαρακτηριστικά. Οι βέλτιστες τιμές pH για τα *bifidobacteria*, συγκεκριμένα, κυμαίνονται μεταξύ 6.0 και 7.0 (Tripathi and Giri 2014), ενώ τιμές pH μικρότερες από 4.6 θεωρείται ότι έχουν επιβλαβή επίδραση σε αυτά (Turgut and

Çakmakci 2018). Για το λόγο αυτό το πέρας της ζύμωσης των προϊόντων γιαουρτιού θεωρήθηκε στην τιμή pH 4.6.

Για λόγους σύγκρισης έγινε παραγωγή γιαουρτιού τόσο με ελεύθερα προβιοτικά βακτήρια σε συνδυασμό με καλλιέργεια εκκίνησης, όσο και αποκλειστικά και μόνο με συμβατική καλλιέργεια εκκίνησης. Σκοπός ήταν η μελέτη των επιδράσεων σε κάθε περίπτωση στην εξέλιξη της ζύμωσης (προφίλ μεταβολής του pH), στα φυσικοχημικά και ποιοτικά χαρακτηριστικά των προϊόντων γιαουρτιού, όπως και στο ποσοστό επιβίωσης του ενσωματωμένου προβιοτικού στελέχους BB-12. Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μελέτη αυτή.

#### 5.5.1. Κινητική μελέτη ζύμωσης γάλακτος για παραγωγή προβιοτικού γιαουρτιού

Η διεργασία της ζύμωσης αποτελεί το σημαντικότερο μέρος της παραγωγής γιαουρτιού, καθώς κατά τη διάρκεια αυτής δημιουργείται το πήγμα του γιαουρτιού. Έτσι, η ζύμωση αποτελεί ένα στάδιο κρίσιμο για την ανάπτυξη των χαρακτηριστικών υφής και των αρωμάτων (flavor) του τελικού προϊόντος γιαουρτιού. Βασικό ρόλο κατά τη διάρκεια της ζύμωσης έχει η καλλιέργεια εκκίνησης, η οποία δρα μέσω βιοχημικών αντιδράσεων και επάγει το σχηματισμό του πηγματος και την ανάπτυξη αρωματικών ενώσεων. Προκειμένου ένα εμπορικό προϊόν να θεωρείται «γιαούρτι» πρέπει να περιέχει επαρκές φορτίο από δύο βακτηριακά στελέχη, το *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* και το *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Το στέλεχος *S. thermophilus* είναι ένα θετικό κατά Gram, θερμοανθεκτικό βακτήριο με βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης 35-53°C. Αντίστοιχα, το στέλεχος *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* είναι επίσης θετικό κατά Gram, αλλά αναερόβιο βακτήριο με βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης 40-44 °C. Το στέλεχος *Lb. bulgaricus* μπορεί να παράγει πολύ μεγάλες ποσότητες γαλακτικού οξέος μέσω μεταβολισμού της γλυκόζης. Τα δύο αυτά στελέχη εμφανίζουν συνεργιστική δράση στο περιβάλλον του γάλακτος, καθώς μεταβολίζουν τη λακτόζη σε γαλακτικό οξύ και προκαλούν σταδιακή μείωση του pH. Η συνέργεια αυτή μεταξύ των δύο στελεχών στηρίζεται στα χαρακτηριστικά του καθενός και μέσω αυτής, επιτυγχάνεται ταχύτερος μεταβολισμός της λακτόζης και μεγαλύτερη παραγωγή γαλακτικού οξέος από ότι μέσω της μεμονωμένης δράσης του κάθε στελέχους. Κατά την έναρξη της ζύμωσης, το στέλεχος *S. thermophilus* αναπτύσσεται ταχέως, σε αντίθεση με το στέλεχος *Lb. bulgaricus*, και λόγω της πρωτεολυτικής του δράσης παράγει μεγάλη ποσότητα πεπτιδίων, η οποία διεγείρει την ανάπτυξη του *Lb. bulgaricus*. Κατά το πρώτο στάδιο της ζύμωσης, το στέλεχος *S. thermophilus* παράγει μεγάλα ποσά του ενζύμου λακτάση, η οποία καταλύει την υδρόλυση της λακτόζης του γάλακτος σε γλυκόζη και γαλακτόζη. Η γλυκόζη μετατρέπεται σε πυροσταφυλικό, το οποίο μεταβολίζεται σε γαλακτικό οξύ από το ένζυμο γαλακτική αφυδρογονάση. Η μειωμένη τάση οξυγόνου και το μυρμηκικό (παραπροϊόν του μεταβολισμού του *S. thermophilus*) ευνοούν την ανάπτυξη του *Lb. bulgaricus*, η οποία στη συνέχεια ενισχύεται από την απελευθέρωση αμινοξέων μέσω των ενεργών πεπτιδασών που εκκρίνονται από το στέλεχος *S. thermophilus*. Μέσω

συντονισμένων διαδοχικών δράσεων, τα δύο βακτηριακά στελέχη επιταχύνουν τη συνολική ζύμωση. Όταν το pH του γιαουρτιού πλησιάζει το 5.0, η δράση του *S. thermophilus* περιορίζεται σημαντικά και επικρατεί σταδιακά το στέλεχος *Lb. bulgaricus* στη ζύμωση του γιαουρτιού μέχρι να επιτευχθεί η επιθυμητή τιμή pH οπότε και διακόπτεται η ζύμωση. Το τελικό σημείο της διεργασίας της ζύμωσης συνήθως καθορίζεται από την τιμή του pH, η οποία στην παρούσα διδακτορική διατριβή επιλέχθηκε να είναι 4.6 για τους λόγους που αναφέρθηκαν νωρίτερα. Η διεργασία της ζύμωσης τερματίζεται μέσω μείωσης της θερμοκρασίας στους 4°C. Στη θερμοκρασία αυτή, η βακτηριακή καλλιέργεια παραμένει ζωντανή, αλλά η δράση της περιορίζεται δραστικά.

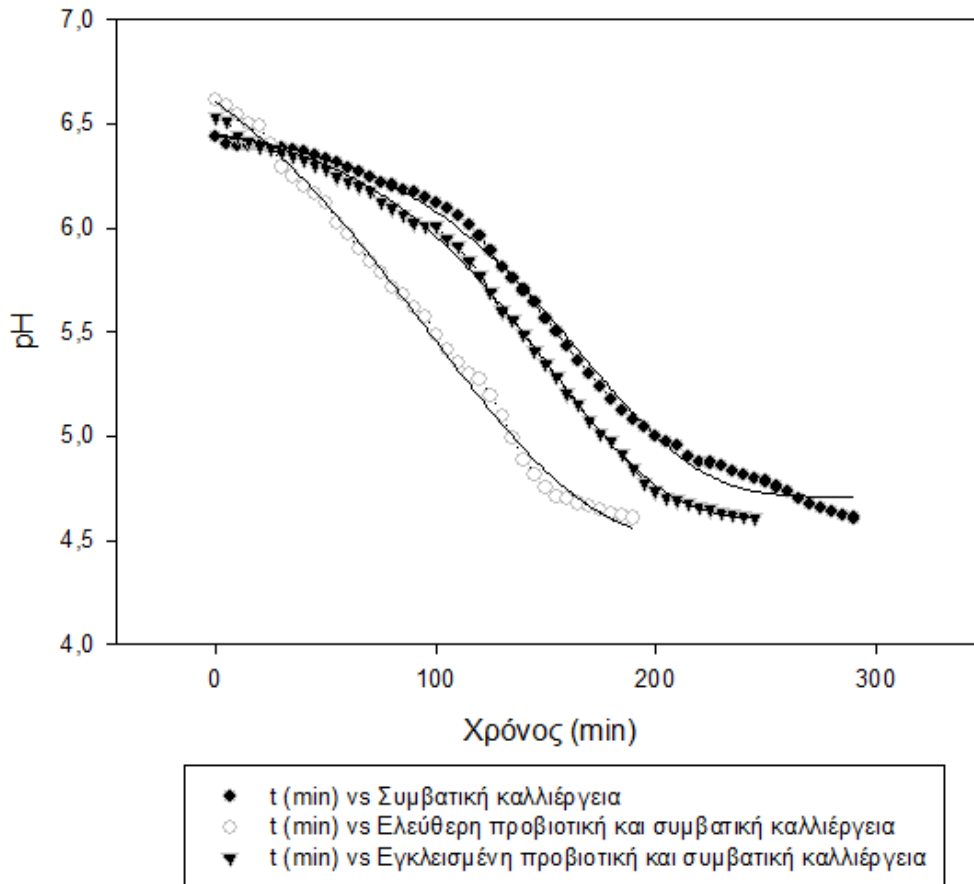
Η ανάπτυξη της συμβιωτικής καλλιέργειας επάγει μεταβολές στα συστατικά του γάλακτος που είναι υπεύθυνα για τα φυσικοχημικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του παραγόμενου γιαουρτιού. Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, η λακτόζη, οι πρωτεΐνες του γάλακτος και το μικροβιακό περιεχόμενο, όπως επίσης και διάφορες ανθρακικές ενώσεις, υπόκεινται σε σημαντικές μεταβολές, ενώ βιταμίνες και μέταλλα υφίστανται μικρότερες αλλαγές. Η λακτόζη μειώνεται κατά 30% και παράγεται η αντίστοιχη (διπλάσια γραμμομοριακή) ποσότητα γαλακτικού οξέος. Οι πρωτεΐνες (καζεΐνες και πρωτεΐνες ορού) συσσωματώνονται και, έτσι, αυξάνεται η συνεκτικότητα του πήγματος του γιαουρτιού. Λόγω της πρωτεόλυσης που προκαλείται από την καλλιέργεια εκκίνησης, απελευθερώνονται αμινοξέα (κυρίως προλίνη και γλυκίνη) στο γιαούρτι, ακόμη και κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης στους 4°C. Ακόμη, κατά τη διάρκεια της ζύμωσης λαμβάνει χώρα απελευθέρωση διαφόρων λιπαρών οξέων, κυρίως στεατικό και ελαϊκό οξύ, λόγω της δράσης του ενζύμου λιπάση. Καθώς η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος αυξάνεται κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, το pH μειώνεται και κατ' επέκταση οι καρβοξυλικές ομάδες και η φωσφοσερίνη ιοντίζονται και το αρνητικό φορτίο μεταξύ των μικκυλίων καζεΐνης αυξάνεται. Παρόλα αυτά, η παρουσία φωσφορικού ασβεστίου εξουδετερώνει το αρνητικό φορτίο, διατηρώντας την ηλεκτροστατική άπωση σε ένα επίπεδο στο οποίο επικρατούν οι ελκτικές δυνάμεις μεταξύ των πρωτεϊνικών μορίων. Λόγω αυτών των ελκτικών δυνάμεων, τα καζεϊνικά μικκύλια συσσωματώνονται οπότε δημιουργείται ένα πήγμα λόγω του σχηματιζόμενου δικτύου πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα την αύξηση του ιξώδους και το σχηματισμό τελικά του πήγματος του γιαουρτιού (Sfakianakis and Tzia 2014).

Η προσθήκη προβιοτικής καλλιέργειας αναμένεται να έχει σημαντική επίδραση τόσο στο συνολικό προφίλ της ζύμωσης όσο και στα φυσικοχημικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος γιαουρτιού, λόγω της συνεισφοράς του προβιοτικού στελέχους BB-12 στο μεταβολισμό των συστατικών του γάλακτος. Η ασθενής πρωτεολυτική δράση του BB-12 σε συνδυασμό με την ανάγκη ύπαρξης χαμηλού οξειδοαναγωγικού δυναμικού περιορίζει την ανάπτυξή του στο περιβάλλον του γάλακτος. Ωστόσο, έχει βρεθεί ότι η ανάπτυξή του διεγείρεται σημαντικά όταν

δρα συνεργιστικά με τη συμβατική καλλιέργεια εκκίνησης, συνεισφέροντας στην οξίνιση του γάλακτος και μεταβάλλοντας το προφίλ μεταβολής του pH (Settachaimongkon et al. 2014). Για το λόγο αυτό, στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκε η επίδραση του προβιοτικού στελέχους BB-12, σε ελεύθερη και εγκλεισμένη μορφή, στη διεργασία της ζύμωσης, μέσω παρακολούθησης της μεταβολής του pH.

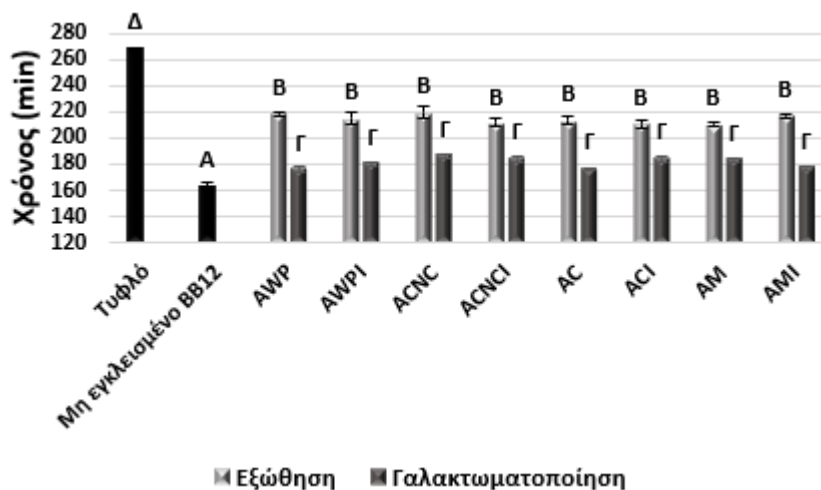
Η διεργασία της ζύμωσης μπορεί να ελέγχεται συνεπώς μέσω συνεχούς παρακολούθησης της μεταβολής του pH, όπως έχει προταθεί από τους De Brabandere και De Baerdemaeker (1999). Η διεργασία της ζύμωσης διακρίνεται σε τρεις φάσεις: φάση προσαρμογής ή υστέρησης (αργή μείωση pH), λογαριθμική ή εκθετική φάση ανάπτυξης (ταχεία μείωση pH) και μείωση ρυθμού όξυνσης. Η μορφή της καμπύλης επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες, όπως η θερμική επεξεργασία του γάλακτος, ο τύπος και η σύσταση του μίγματος του γάλακτος (π.χ. % λιπαρά γάλακτος, % στερεά ενίσχυσης όπως πρωτεΐνικά συστατικά, % σταθεροποιητές), το είδος της καλλιέργειας εκκίνησης, το ποσοστό της καλλιέργειας, η θερμοκρασία επώασης. Η μορφή της καμπύλης μεταβολής του pH σε συνάρτηση με το χρόνο μπορεί να περιγραφεί από το τροποποιημένο μοντέλο Gompertz 4 παραμέτρων για τη βακτηριακή ανάπτυξη, όπως αναφέρθηκε στην υποενότητα 4.4.6 (Εξίσωση 4.3). Έτσι, τα αποτελέσματα από την καταγραφή των τιμών pH κατά τη διάρκεια της ζύμωσης προσαρμόστηκαν στο τροποποιημένο μοντέλο Gompertz. Στην Εικόνα 5.7 παρουσιάζεται ενδεικτικά η εφαρμογή του μοντέλου σε τρεις καμπύλες μεταβολής του pH για τα προϊόντα γιαουρτιού που ζυμώθηκαν: (α) με συμβατική καλλιέργεια εκκίνησης, (β) με συμβατική καλλιέργεια εκκίνησης και ελεύθερη προβιοτική καλλιέργεια και (γ) με συμβατική καλλιέργεια εκκίνησης και εγκλεισμένη προβιοτική καλλιέργεια.





Εικόνα 5.7: Σιγμοειδής καμπύλης μεταβολής pH κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του γάλακτος προς γιαούρτι.

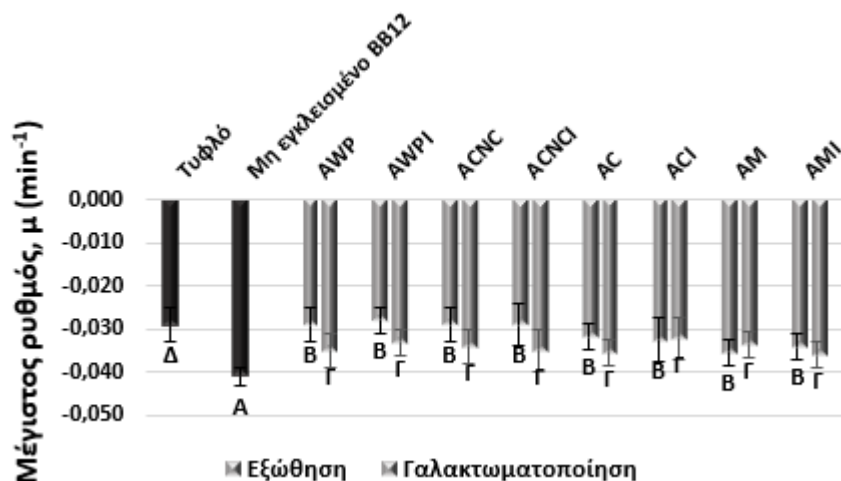
Οι παράμετροι της ζύμωσης των γιαουρτιών που προέκυψαν μέσω της προσαρμογής αυτής, όπως η διάρκεια της λανθάνουσας φάσης, ο μέγιστος ρυθμός μείωσης του pH και ο συνολικός χρόνος ζύμωσης, παρουσιάζονται στα Διαγράμματα 5.26-5.28. Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 5.26, η προσθήκη προβιοτικών βακτηρίων, είτε σε εγκλεισμένη μορφή είτε σε ελεύθερη μορφή, μείωσε τη διάρκεια της φάσης υστέρησης ( $p < 0.05$ ), υποδηλώνοντας τη μερική συνεισφορά του προβιοτικού στελέχους BB-12 στη διεργασία της ζύμωσης. Έτσι, με χρήση προβιοτικών βακτηρίων μαζί με την καλλιέργεια εκκίνησης, η λανθάνουσα φάση ( $\lambda$ ) περιορίστηκε από 269 min (μόνο με συμβατική καλλιέργεια) σε 163-219 min. Επιπρόσθετα, ο εγκλεισμός των προβιοτικών βακτηρίων μέσω εξώθησης περιόρισε τη συνεισφορά τους στη ζύμωση με αποτέλεσμα μεγαλύτερη φάση υστέρησης (211-219 min έναντι 163 min με συμβατική καλλιέργεια και προβιοτική καλλιέργεια σε ελεύθερη μορφή), ανεξάρτητα του μέσου που χρησιμοποιήθηκε για τον εγκλεισμό της προβιοτικής καλλιέργειας. Μεγαλύτερη συνεισφορά είχαν τα εγκλεισμένα μέσω γαλακτωματοποίησης προβιοτικά βακτήρια, εμφανίζοντας μικρότερες φάσεις υστέρησης (176-186 min) σε σχέση με τα εγκλεισμένα μέσω εξώθησης προβιοτικά βακτήρια (211-219 min) ( $p < 0.05$ ).



*Διάγραμμα 5.26: Συγκριτικό διάγραμμα διάρκειας λανθάνουσας φάσης ζύμωσης γιαουρτιού με συμβατική καλλιέργεια εκκίνησης (Τυφλό), συμβατική καλλιέργεια εκκίνησης σε συνδυασμό με ελεύθερα προβιοτικά βακτήρια (Μη εγκλεισμένο BB12), συμβατική καλλιέργεια σε συνδυασμό με εγκλεισμένα μέσω εξώθησης προβιοτικά βακτήρια και συμβατική καλλιέργεια σε συνδυασμό με εγκλεισμένα μέσω γαλακτωματοποίησης προβιοτικά βακτήρια. Η κωδικοποίηση των δειγμάτων έχει οριστεί στους Πίνακες 4.1 και 4.2.*

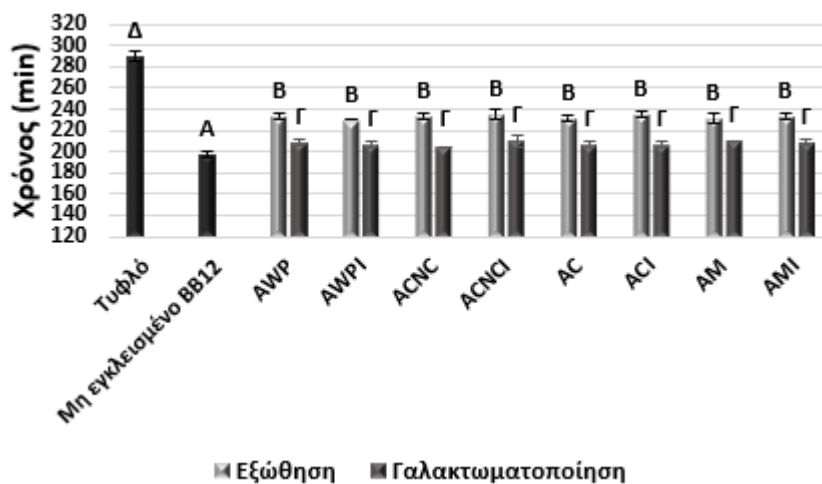
\*Τα κεφαλαία γράμματα χρησιμοποιούνται για τη διαφοροποίηση μεταξύ γιαουρτιών με διαφορετικό συνδυασμό καλλιεργειών εκκίνησης (συμβατική & ελεύθερη, συμβατική & εγκλεισμένη μέσω εξώθησης, συμβατική & εγκλεισμένη μέσω γαλακτωματοποίησης).

Αντίστοιχη τάση παρατηρήθηκε τόσο στο μέγιστο ρυθμό μείωσης του pH ( $\mu$ ) όσο και στο συνολικό χρόνο ζύμωσης (t). Συγκεκριμένα, οι μεγαλύτερες απόλυτες τιμές του μέγιστου ρυθμού μείωσης pH παρατηρήθηκαν με συνδυασμό της συμβατικής καλλιέργειας εκκίνησης με ελεύθερα προβιοτικά βακτήρια ( $0,041 \text{ min}^{-1}$ ), ενώ ο εγκλεισμός του προβιοτικού στελέχους BB-12 περιόρισε τη συνεισφορά του στη διεργασία της ζύμωσης οδηγώντας σε μικρότερες τιμές του μέγιστου ρυθμού μείωσης pH ( $0.028-0.036 \text{ min}^{-1}$ ) και μεγαλύτερους χρόνους ζύμωσης (205-235 min έναντι 197 min συμβατική καλλιέργεια και προβιοτική καλλιέργεια σε ελεύθερη μορφή) (Διαγράμματα 5.27-5.28). Η μέθοδος εγκλεισμού της προβιοτικής καλλιέργειας είχε, επίσης, σημαντική επίδραση ( $p < 0.05$ ) στις παραμέτρους της διεργασίας, καθώς στα προϊόντα γιαουρτιού με εγκλεισμένα προβιοτικά βακτήρια μέσω εξώθησης παρατηρήθηκαν μικρότερες απόλυτες τιμές μέγιστου ρυθμού μείωσης ( $0.028-0.035 \text{ min}^{-1}$ ) και μεγαλύτεροι χρόνοι ζύμωσης (230-235 min) σε σύγκριση με τα αντίστοιχα προϊόντα με προβιοτικά βακτήρια εγκλεισμένα μέσω γαλακτωματοποίησης ( $0.032-0.036 \text{ min}^{-1}$  και 205-210 min, αντίστοιχα).



*Διάγραμμα 5.27: Συγκριτικό διάγραμμα διάρκειας μέγιστου ρυθμού μείωσης pH γιαουρτιού με συμβατική καλλιέργεια εκκίνησης (Tuφλό), συμβατική καλλιέργεια εκκίνησης σε συνδυασμό με ελεύθερα προβιοτικά βακτήρια (Μη εγκλεισμένο BB12), συμβατική καλλιέργεια σε συνδυασμό με εγκλεισμένα μέσω εξώθησης προβιοτικά βακτήρια και συμβατική καλλιέργεια σε συνδυασμό με εγκλεισμένα μέσω γαλακτωματοποίησης προβιοτικά βακτήρια. Η κωδικοποίηση των δειγμάτων έχει οριστεί στους Πίνακες 4.1 και 4.2.*

\*Τα κεφαλαία γράμματα χρησιμοποιούνται για τη διαφοροποίηση μεταξύ γιαουρτιών με διαφορετικό συνδυασμό καλλιεργιών εκκίνησης (συμβατική & ελεύθερη, συμβατική & εγκλεισμένη μέσω εξώθησης, συμβατική & εγκλεισμένη μέσω γαλακτωματοποίησης).



*Διάγραμμα 5.28: Συγκριτικό διάγραμμα συνολικού χρόνου ζύμωσης γιαουρτιού με συμβατική καλλιέργεια εκκίνησης (Tuφλό), συμβατική καλλιέργεια εκκίνησης σε συνδυασμό με ελεύθερα προβιοτικά βακτήρια (Μη εγκλεισμένο BB12), συμβατική καλλιέργεια σε συνδυασμό με εγκλεισμένα μέσω εξώθησης προβιοτικά βακτήρια και συμβατική καλλιέργεια σε συνδυασμό με εγκλεισμένα μέσω γαλακτωματοποίησης προβιοτικά βακτήρια. Η κωδικοποίηση των δειγμάτων έχει οριστεί στους Πίνακες 4.1 και 4.2.*

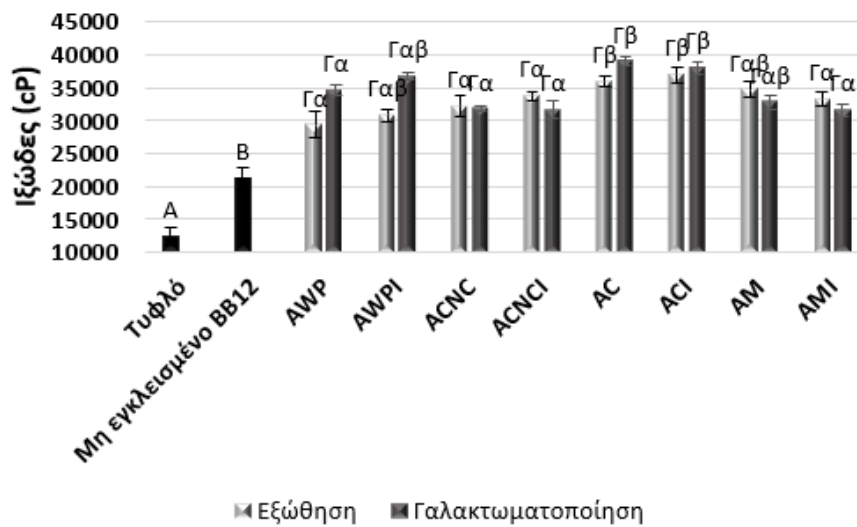
\*Τα κεφαλαία γράμματα χρησιμοποιούνται για τη διαφοροποίηση μεταξύ γιαουρτιών με διαφορετικό συνδυασμό καλλιεργιών εκκίνησης (συμβατική & ελεύθερη, συμβατική & εγκλεισμένη μέσω εξώθησης, συμβατική & εγκλεισμένη μέσω γαλακτωματοποίησης).

### 5.5.2. Αξιολόγηση φυσικοχημικών χαρακτηριστικών τελικών προϊόντων ζύμωσης

Η δομή του πήγματος του γιαουρτιού καθορίζει σημαντικά τα ρεολογικά χαρακτηριστικά του, καθώς και τα χαρακτηριστικά υφής του (Lalou et al. 2017). Για το λόγο αυτό, μελετήθηκαν τόσο το ιξώδες των προϊόντων γιαουρτιού, όσο και χαρακτηριστικά υφής του όπως η σταθερότητα πήγματος, η συνεκτικότητα, η προσκολλησιμότητα, η ελαστικότητα και το κομμώδες.

Το ιξώδες των προϊόντων γιαουρτιού επηρεάζει τόσο τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά όσο και τη σταθερότητα των προϊόντων. Στα Διαγράμματα 5.29 – 5.30, παρουσιάζονται οι τιμές ιξώδους των δειγμάτων γιαουρτιού στο τέλος της ζύμωσης (στους 45°C), καθώς και μετά από 24 h αποθήκευσης σε ψύξη (στους 4°C). Οι τιμές του ιξώδους στους 45°C εμφάνισαν διακυμάνσεις μεταξύ των διαφορετικών δειγμάτων γιαουρτιού (12508-39019 cP). Η χρήση του προβιοτικού στελέχους BB-12 οδήγησε σε προϊόντα με υψηλότερο ιξώδες (>21349 cP έναντι 12508 cP με μόνο συμβατική καλλιέργεια). Άλλα στελέχη του γένους *Bifidobacterium* έχει, επίσης, βρεθεί ότι συνεισφέρουν στη ζύμωση σε περίπτωση προσθήκης, είτε σε ελεύθερη, είτε σε εγκλεισμένη μορφή (M. Li et al. 2019). Επιπρόσθετα, ο εγκλεισμός του προβιοτικού στελέχους BB-12 επηρέασε σημαντικά το ιξώδες των τελικών προϊόντων γιαουρτιού, ανεξαρτήτως της μεθόδου ή του μέσου εγκλεισμού που έχουν χρησιμοποιηθεί. Όπως αναφέρθηκε στην υποενότητα 5.3.1, ο εγκλεισμός του προβιοτικού στελέχους περιόρισε τη συνεισφορά του στη διεργασία της ζύμωσης, με αποτέλεσμα να αναμένονται μικρότερες τιμές ιξώδους συγκριτικά με τα δείγματα που περιέχουν το συγκεκριμένο στέλεχος σε ελεύθερη μορφή. Παρόλα αυτά, φαίνεται ότι η παρουσία των εγκλειστικών μέσων είχε σημαντική επίδραση στο ιξώδες των δειγμάτων. Για παράδειγμα, στην περίπτωση των προϊόντων με AWP εγκλεισμένα προβιοτικά βακτήρια οι αυξημένες τιμές ιξώδους (29398-36743 cP) μπορούν να αποδοθούν στη συσσωμάτωση της πηκτίνης με τις πρωτεΐνες του γάλακτος κατά τη διάρκεια της ζύμωσης (M. Li et al. 2019). Αντίστοιχα, η χρήση κ-καραγενάνης στο εγκλειστικό μίγμα αυξάνει τις τιμές ιξώδους των προϊόντων γιαουρτιού που φθάνουν μέχρι και τα 39019 cP. Οι τιμές αυτές οφείλονται στην αλληλεπίδραση της κ-καραγενάνης με τις πρωτεΐνες γάλακτος και ιδιαίτερα με τις κ-καζεΐνες. Οι αρνητικά φορτισμένες θεϊκές ομάδες της κ-καραγενάνης αλληλεπιδρούν ηλεκτροστατικά με τις θετικά φορτισμένες περιοχές των κ-καζεϊνών, οδηγώντας σε ένα ισχυρότερο πλέγμα πηκτής (Verbeken et al. 2006). Η μέθοδος ή το μέσο εγκλεισμού δεν είχε σημαντική επίδραση στις τιμές ιξώδους στο τέλος της ζύμωσης (Διάγραμμα 5.29). Αντίστοιχη διαφοροποίηση παρουσίασαν τα ιξώδη των διαφόρων γιαουρτιών μετά από 24 h αποθήκευσης στους 4°C (Διάγραμμα 5.30). Οι χαμηλότερες τιμές παρουσιάστηκαν στην περίπτωση του γιαουρτιού με αποκλειστικά συμβατική καλλιέργεια εκκίνησης (18594 cP). Η προσθήκη προβιοτικών βακτηρίων σε ελεύθερη ή εγκλεισμένη μορφή αύξησε σημαντικά το ιξώδες των δειγμάτων, ενώ οι τιμές του ιξώδους διαφοροποιήθηκαν και ανάλογα με τη μέθοδο εγκλεισμού. Συγκεκριμένα, τα δείγματα με προϊόντα εγκλεισμού εξώθησης

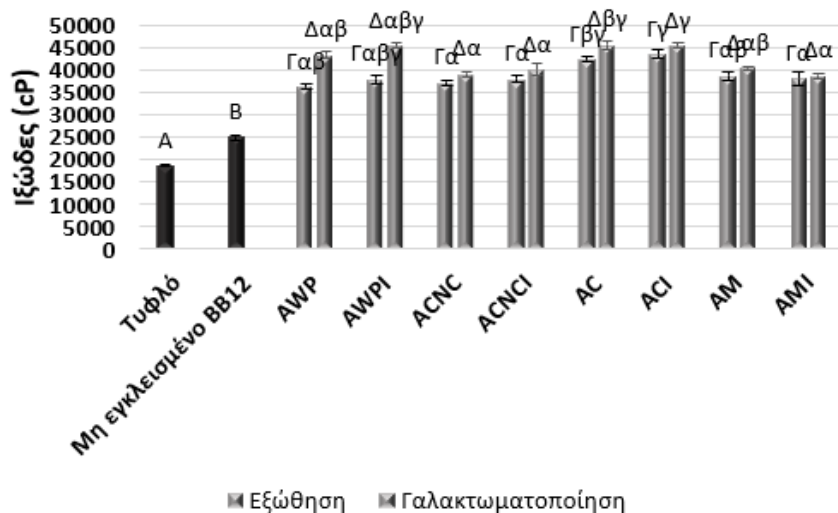
εμφάνισαν χαμηλότερες τιμές ιξώδους ( $p < 0.05$ ) κατά 635-7537 cP σε σύγκριση με τα δείγματα με προϊόντα εγκλεισμού γαλακτωματοποίησης (Διάγραμμα 5.29).



*Διάγραμμα 5.29: Συγκριτικό διάγραμμα ιξώδους στους 45°C για ουρτιών με συμβατική καλλιέργεια εκκίνησης (Τυφλό), συμβατική καλλιέργεια εκκίνησης σε συνδυασμό με ελεύθερα προβιοτικά βακτήρια (Μη εγκλεισμένο BB12), συμβατική καλλιέργεια σε συνδυασμό με εγκλεισμένα μέσω εξώθησης προβιοτικά βακτήρια (-/EX) και συμβατική καλλιέργεια σε συνδυασμό με εγκλεισμένα μέσω γαλακτωματοποίησης προβιοτικά βακτήρια (-/EM). Η κωδικοποίηση των δειγμάτων έχει οριστεί στους Πίνακες 4.1 και 4.2.*

\*Τα κεφαλαία γράμματα χρησιμοποιούνται για τη διαφοροποίηση μεταξύ γιαουρτιών με διαφορετικό συνδυασμό καλλιεργειών εκκίνησης (συμβατική, συμβατική & ελεύθερη, συμβατική & εγκλεισμένη μέσω εξώθησης, συμβατική & εγκλεισμένη μέσω γαλακτωματοποίησης).

\*\*Τα μικρά γράμματα χρησιμοποιούνται για τη διαφοροποίηση μεταξύ των εγκλειστικών υλικών.

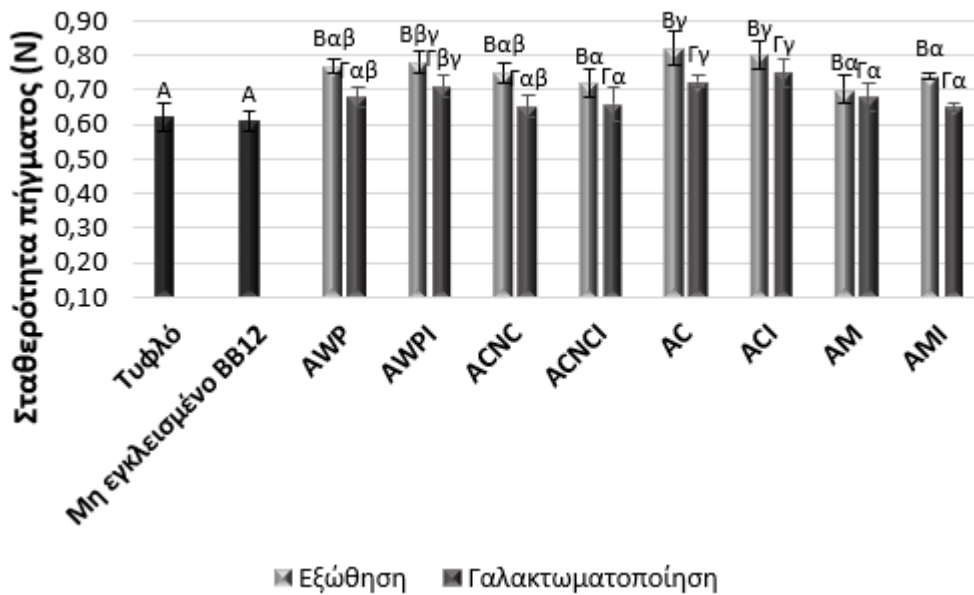


*Διάγραμμα 5.30: Συγκριτικό διάγραμμα ιξώδους στους 4°C για ουρτιών με συμβατική καλλιέργεια εκκίνησης (Τυφλό), συμβατική καλλιέργεια εκκίνησης σε συνδυασμό με ελεύθερα προβιοτικά βακτήρια (Μη εγκλεισμένο BB12), συμβατική καλλιέργεια σε συνδυασμό με εγκλεισμένα μέσω εξώθησης προβιοτικά βακτήρια (-/EX) και συμβατική καλλιέργεια σε συνδυασμό με εγκλεισμένα μέσω γαλακτωματοποίησης προβιοτικά βακτήρια (-/EM). Η κωδικοποίηση των δειγμάτων έχει οριστεί στους Πίνακες 4.1 και 4.2.*

\*Τα κεφαλαία γράμματα χρησιμοποιούνται για τη διαφοροποίηση μεταξύ γιαουρτιών με διαφορετικό συνδυασμό καλλιεργειών εκκίνησης (συμβατική, συμβατική & ελεύθερη, συμβατική & εγκλεισμένη μέσω εξώθησης, συμβατική & εγκλεισμένη μέσω γαλακτωματοποίησης).

\*\*Τα μικρά γράμματα χρησιμοποιούνται για τη διαφοροποίηση μεταξύ των εγκλειστικών υλικών.

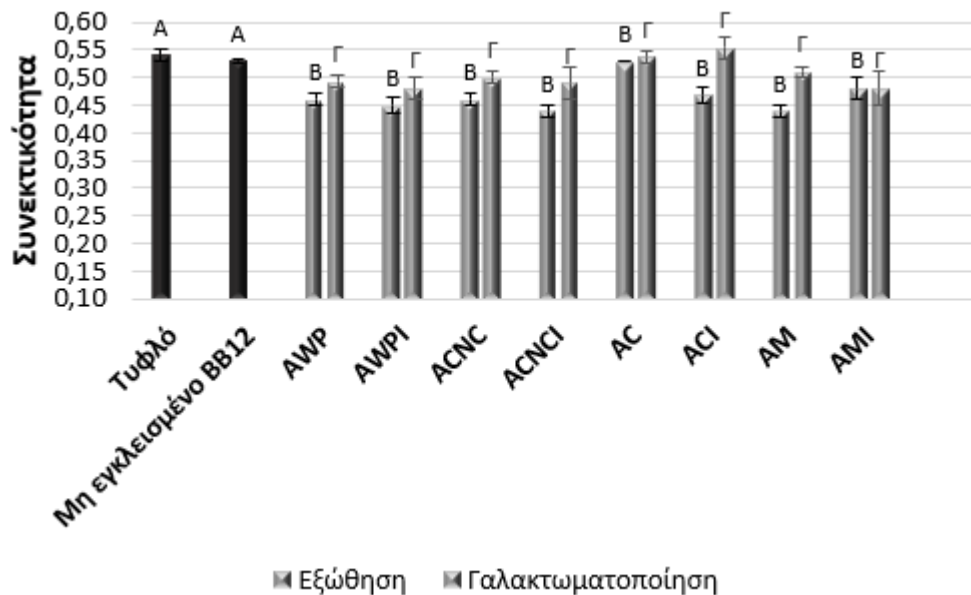
Αναφορικά με τα χαρακτηριστικά υφής, τα προϊόντα γιαουρτιού πρέπει να είναι αρκετά συνεκτικά ώστε να διατηρούν τη δομή τους. Έτσι, η σταθερότητα του πήγματος, η συνεκτικότητα, η προσκολλησιμότητα, η ελαστικότητα και το κομμώδες αποτελούν τις πιο σημαντικές προς εξέταση παραμέτρους (Lalou et al. 2017). Για το σκοπό αυτό, ύστερα από 24 h παραμονής στους 4°C, τα δείγματα γιαουρτιού υποβλήθηκαν σε ανάλυση υφής. Όπως φαίνεται στα διαγράμματα 5.31-5.35, η εισαγωγή εγκλεισμένων προβιοτικών βακτηρίων αύξησε σημαντικά τη σταθερότητα του πήγματος, την προσκολλησιμότητα και την ελαστικότητα των τελικών προϊόντων γιαουρτιού, ενώ μείωσε τη συνεκτικότητά τους ( $p < 0.05$ ). Τα προϊόντα που περιείχαν εγκλεισμένα μέσω εξώθησης προβιοτικά βακτήρια είχαν τις υψηλότερες τιμές σταθερότητας πήγματος (0.70-0.82 N) και προσκολλησιμότητας (0.49-0.61 N·s) ( $p < 0.05$ ). Αύξηση των τιμών της σταθερότητας πήγματος (0.65-0.75 N) και της προσκολλησιμότητας (0.41-0.59 N·s) παρουσίασαν και τα δείγματα με εγκλεισμένα μέσω γαλακτωματοποίησης προβιοτικά βακτήρια συγκριτικά με το τυφλό (0.61 N και 0.35 N·s, αντίστοιχα). Η αύξηση αυτή μπορεί να αποδοθεί στη δράση των υδροκολλοειδών όπως το αλγινικό και η κ-καραγενάνη που χρησιμοποιήθηκαν στον εγκλεισμό των προβιοτικών βακτηρίων, καθώς αυτά μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τις πρωτεΐνες του γάλακτος, όπως αναφέρθηκε νωρίτερα, συνεισφέροντας στο σχηματισμό πήγματος με αυξημένη σταθερότητας πήγματος. Αντίστοιχα, οι τιμές της ελαστικότητας των δειγμάτων με εγκλεισμένα προβιοτικά βακτήρια ήταν στις περισσότερες περιπτώσεις υψηλότερες από τις αντίστοιχες του τυφλού ( $p < 0.05$ ), υποδηλώνοντας την επίδραση των υδροκολλοειδών υλικών στα χαρακτηριστικά αυτά. Η μεγαλύτερη αύξηση στις παραμέτρους υφής παρατηρήθηκε στα δείγματα που περιείχαν προβιοτικά βακτήρια εγκλεισμένα σε κ-καραγενάνη, λόγω των πηκτικών ιδιοτήτων της. Η χρήση ελεύθερης προβιοτικής καλλιέργειας μαζί με τη συμβατική καλλιέργεια εκκίνησης δεν προκάλεσε σημαντική μεταβολή στις ιδιότητες υφής του γιαουρτιού, υποδηλώνοντας ότι οι παραπάνω διαφορές οφείλονται στην ύπαρξη υδροκολλοειδών υλικών στο προϊόν.



*Διάγραμμα 5.31: Συγκριτικό διάγραμμα σταθερότητας πήγματος γιαουρτιών με συμβατική καλλιέργεια εκκίνησης (Tuφλό), συμβατική καλλιέργεια εκκίνησης σε συνδυασμό με ελεύθερα προβιοτικά βακτήρια (Μη εγκλεισμένο BB12), συμβατική καλλιέργεια σε συνδυασμό με εγκλεισμένα μέσω εξώθησης προβιοτικά βακτήρια (-/EX) και συμβατική καλλιέργεια σε συνδυασμό με εγκλεισμένα μέσω γαλακτωματοποίησης προβιοτικά βακτήρια (-/EM). Η κωδικοποίηση των δειγμάτων έχει οριστεί στους Πίνακες 4.1 και 4.2.*

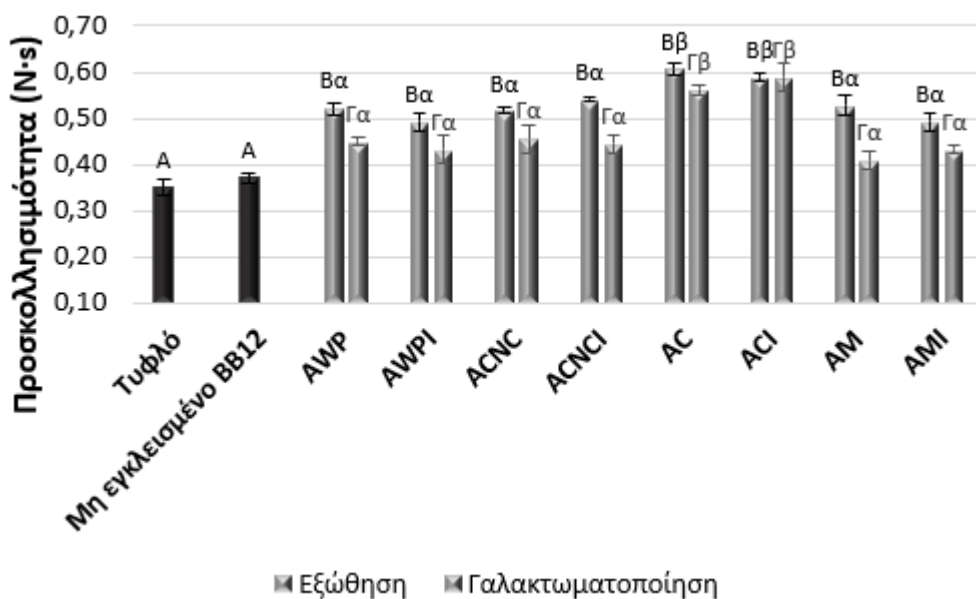
\*Τα κεφαλαία γράμματα χρησιμοποιούνται για τη διαφοροποίηση μεταξύ γιαουρτιών με διαφορετικό συνδυασμό καλλιεργειών εκκίνησης (συμβατική, συμβατική & ελεύθερη, συμβατική & εγκλεισμένη μέσω εξώθησης, συμβατική & εγκλεισμένη μέσω γαλακτωματοποίησης).

\*\*Τα μικρά γράμματα χρησιμοποιούνται για τη διαφοροποίηση μεταξύ των εγκλειστικών υλικών.



*Διάγραμμα 5.32: Συγκριτικό διάγραμμα συνεκτικότητας γιαουρτιών με συμβατική καλλιέργεια εκκίνησης (Tuφλό), συμβατική καλλιέργεια εκκίνησης σε συνδυασμό με ελεύθερα προβιοτικά βακτήρια (Μη εγκλεισμένο BB12), συμβατική καλλιέργεια σε συνδυασμό με εγκλεισμένα μέσω εξώθησης προβιοτικά βακτήρια (-/EX) και συμβατική καλλιέργεια σε συνδυασμό με εγκλεισμένα μέσω γαλακτωματοποίησης προβιοτικά βακτήρια (-/EM). Η κωδικοποίηση των δειγμάτων έχει οριστεί στους Πίνακες 4.1 και 4.2.*

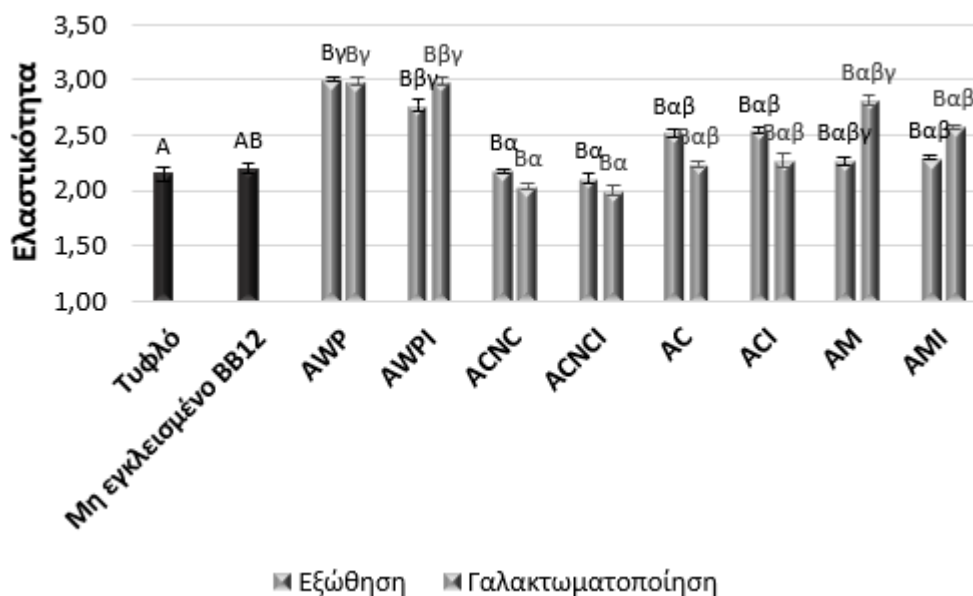
\*Τα κεφαλαία γράμματα χρησιμοποιούνται για τη διαφοροποίηση μεταξύ γιαουρτιών με διαφορετικό συνδυασμό καλλιεργειών εκκίνησης (συμβατική, συμβατική & ελεύθερη, συμβατική & εγκλεισμένη μέσω εξώθησης, συμβατική & εγκλεισμένη μέσω γαλακτωματοποίησης).



*Διάγραμμα 5.33: Συγκριτικό διάγραμμα προσκολλησιμότητας γιαουρτιών με συμβατική καλλιέργεια εκκίνησης (Tuφλό), συμβατική καλλιέργεια εκκίνησης σε συνδυασμό με ελεύθερα προβιοτικά βακτήρια (Μη εγκλεισμένο BB12), συμβατική καλλιέργεια σε συνδυασμό με εγκλεισμένα μέσω εξώθησης προβιοτικά βακτήρια (-/EX) και συμβατική καλλιέργεια σε συνδυασμό με εγκλεισμένα μέσω γαλακτωματοποίησης προβιοτικά βακτήρια (-/EM). Η κωδικοποίηση των δειγμάτων έχει οριστεί στους Πίνακες 4.1 και 4.2.*

\*Τα κεφαλαία γράμματα χρησιμοποιούνται για τη διαφοροποίηση μεταξύ γιαουρτιών με διαφορετικό συνδυασμό καλλιεργειών εκκίνησης (συμβατική, συμβατική & ελεύθερη, συμβατική & εγκλεισμένη μέσω εξώθησης, συμβατική & εγκλεισμένη μέσω γαλακτωματοποίησης).

\*\*Τα μικρά γράμματα χρησιμοποιούνται για τη διαφοροποίηση μεταξύ των εγκλειστικών υλικών.

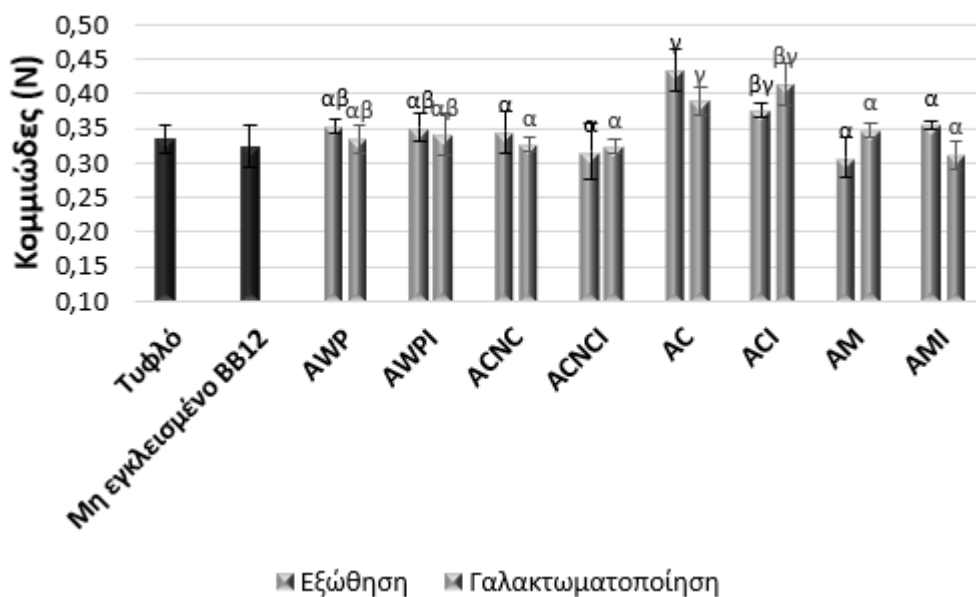


*Διάγραμμα 5.34: Συγκριτικό διάγραμμα ελαστικότητας γιαουρτιών με συμβατική καλλιέργεια εκκίνησης (Tuφλό), συμβατική καλλιέργεια εκκίνησης σε συνδυασμό με ελεύθερα προβιοτικά βακτήρια (Μη εγκλεισμένο BB12), συμβατική καλλιέργεια σε συνδυασμό με εγκλεισμένα μέσω εξώθησης προβιοτικά βακτήρια (-/EX) και συμβατική καλλιέργεια σε συνδυασμό με εγκλεισμένα μέσω γαλακτωματοποίησης προβιοτικά βακτήρια (-/EM). Η κωδικοποίηση των δειγμάτων έχει οριστεί στους Πίνακες 4.1 και 4.2.*

\*Τα κεφαλαία γράμματα χρησιμοποιούνται για τη διαφοροποίηση μεταξύ γιαουρτιών με διαφορετικό συνδυασμό καλλιεργειών εκκίνησης (συμβατική, συμβατική & ελεύθερη, συμβατική & εγκλεισμένη μέσω εξώθησης, συμβατική & εγκλεισμένη μέσω γαλακτωματοποίησης).

\*\*Τα μικρά γράμματα χρησιμοποιούνται για τη διαφοροποίηση μεταξύ των εγκλειστικών υλικών.





*Διάγραμμα 5.35: Συγκριτικό διάγραμμα κομμώδους γιαουρτιών με συμβατική καλλιέργεια εκκίνησης (Τυφλό), συμβατική καλλιέργεια εκκίνησης σε συνδυασμό με ελεύθερα προβιοτικά βακτήρια (Μη εγκλεισμένο BB12), συμβατική καλλιέργεια σε συνδυασμό με εγκλεισμένα μέσω εξώθησης προβιοτικά βακτήρια (-/EX) και συμβατική καλλιέργεια σε συνδυασμό με εγκλεισμένα μέσω γαλακτωματοποίησης προβιοτικά βακτήρια (-/EM). Η κωδικοποίηση των δειγμάτων έχει οριστεί στους Πίνακες 4.1 και 4.2.*

\*Τα μικρά γράμματα χρησιμοποιούνται για τη διαφοροποίηση μεταξύ των εγκλειστικών υλικών.

### 5.5.3. Αξιολόγηση τελικών προϊόντων γιαουρτιού ως φορείς προβιοτικών βακτηρίων

Η ενσωμάτωση των προβιοτικών βακτηρίων σε τρόφιμα-φορείς απαιτεί την αντιμετώπιση διαφόρων προκλήσεων όσον αφορά τη διατήρηση της βιωσιμότητάς τους, τόσο κατά τη συντήρηση των τροφίμων υπό ψύξη (~4°C) μέχρι την κατανάλωσή τους, όσο και κατά τη διέλευσή τους από το γαστρεντερικό σύστημα, όπου εισέρχονται στο εξαιρετικά όξινο περιβάλλον του στομάχου (pH νηστείας ανάμεσα στο 1 με 2) θερμοκρασίας ~37°C και στη συνέχεια μεταβαίνουν ραγδαία στο ουδέτερο περιβάλλον του λεπτού εντέρου με pH 7.5 παρουσία χολικών αλάτων. Προκειμένου να αποδώσουν τα οφέλη τους στην υγεία του ξενιστή, τα προβιοτικά βακτήρια πρέπει να φτάσουν ζωντανά και σε επαρκή ποσότητα στο λεπτό έντερο. Ωστόσο, στην περίπτωση έκθεσης ελεύθερων προβιοτικών βακτηρίων σε συνθήκες προσομοίωσης του γαστρεντερικού συστήματος έχουν αναφερθεί απώλειες των 6 με 8 logcfu g<sup>-1</sup> (Muthukumarasamy and Holley 2006; Sabikhi et al. 2010; Truelstrup Hansen et al. 2002), το οποίο υποδηλώνει ότι η συνιστώμενη δόση των 7 logcfu g<sup>-1</sup> σε ένα προβιοτικό τρόφιμο δεν είναι επαρκής για την απόδοση των αντίστοιχων οφελών. Παρόλο που πολλές φορές το τρόφιμο-φορέας μπορεί να λειτουργήσει ως μέσο προστασίας των προβιοτικών βακτηρίων από τις αντίξοες συνθήκες του γαστρεντερικού συστήματος λόγω ρυθμιστικής ικανότητας, στην περίπτωση του γιαουρτιού δεν ισχύει κάτι τέτοιο. Η βιωσιμότητα των προβιοτικών βακτηρίων αποτέλεσε αντικείμενο μελέτης της συγκεκριμένης διατριβής καθώς είναι ο πιο κρίσιμος παράγοντας σε ένα προβιοτικό προϊόν όπως το γιαούρτι. Ο εγκλεισμός των

προβιοτικών βακτηρίων και η χρήση πρεβιοτικών ουσιών αποτελούν τις πιο βιομηχανικά εφικτές τεχνικές για την αύξηση της βιωσιμότητας των κυττάρων.

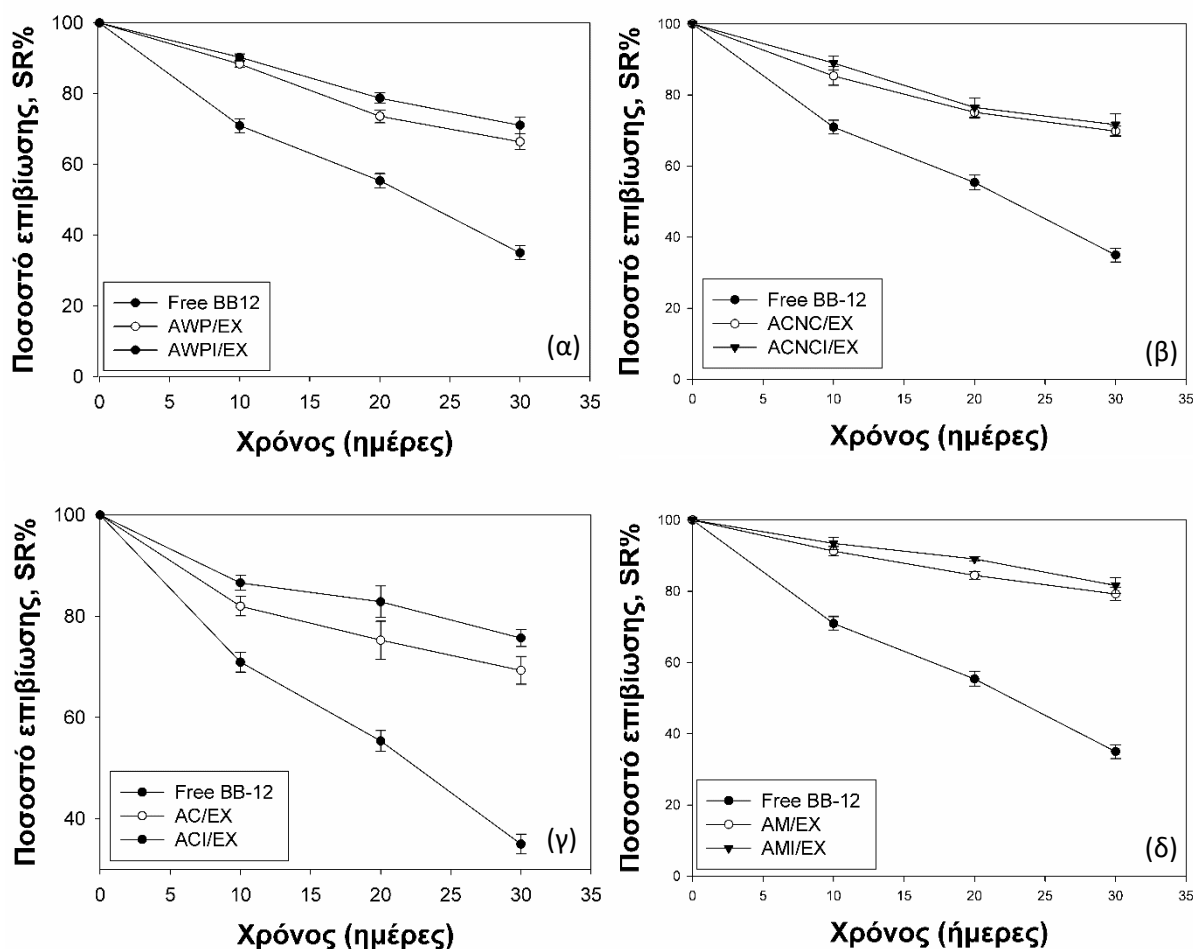
Μελέτη χρόνου ζωής των τελικών προβιοτικών προϊόντων γιαουρτιού κατά την αποθήκευση υπό ψύξη (4°C) – Βιωσιμότητα (SR%) εγκλεισμένου προβιοτικού στελέχους BB-12

Η βιωσιμότητα των προβιοτικών κυττάρων στα προϊόντα προβιοτικού γιαουρτιού που κυκλοφορούν στο εμπόριο είναι πολλές φορές περιορισμένη (Meybodi et al. 2020). Τα χαμηλά ποσοστά επιβίωσης των προβιοτικών βακτηρίων οφείλονται συνήθως στις χαμηλές τιμές pH του γιαουρτιού και στην περαιτέρω μείωση του pH λόγω μετα-οξίνισης κατά την αποθήκευση (post-acidification). Συγκεκριμένα, η παραγωγή οξέων από την καλλιέργεια εκκίνησης αποτελεί το βασικό παράγοντα μείωσης της βιωσιμότητας των προβιοτικών κυττάρων στα προϊόντα γιαουρτιού κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης. Ακόμη, το βακτηριακό φορτίο του προβιοτικού στελέχους BB-12 μειώνεται κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης των προϊόντων γιαουρτιού υπό ψύξη. Λόγω της μεγάλης ευαισθησίας του BB-12 σε χαμηλές θερμοκρασίες ψύξης, έχει βρεθεί ότι η βέλτιστη θερμοκρασία αποθήκευσης υπό ψύξη είναι οι 8°C. Ωστόσο, τα προϊόντα γιαουρτιού αποθηκεύονται συνήθως σε χαμηλότερες θερμοκρασίες (2-4°C). Για το λόγο αυτό, η μελέτη του χρόνου ζωής των προϊόντων γιαουρτιού με το εγκλεισμένο προβιοτικό στέλεχος BB-12 έγινε σε αποθήκευση στους 4°C. Η διεργασία παραγωγής γιαουρτιού περιλαμβάνει στάδια όπως η ανάδευση και η ανάμιξη που εισάγουν στο προϊόν σημαντικές ποσότητες οξυγόνου. Επίσης, κατά την αποθήκευση των δειγμάτων γίνεται σταδιακή διάχυση οξυγόνου εντός του προϊόντος. Τα *bifidobacteria* είναι αναερόβιοι μικροοργανισμοί με ιδιαίτερη ευαισθησία στα επίπεδα διαλυμένου οξυγόνου. Έτσι, η παρουσία του μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη και παραγωγή τοξικών μεταβολιτών στα βακτηριακά κύτταρα, το οποίο προκαλεί οξειδωτικό στρες, βλάβες και εν τέλει θάνατο των κυττάρων (Meybodi et al. 2020).

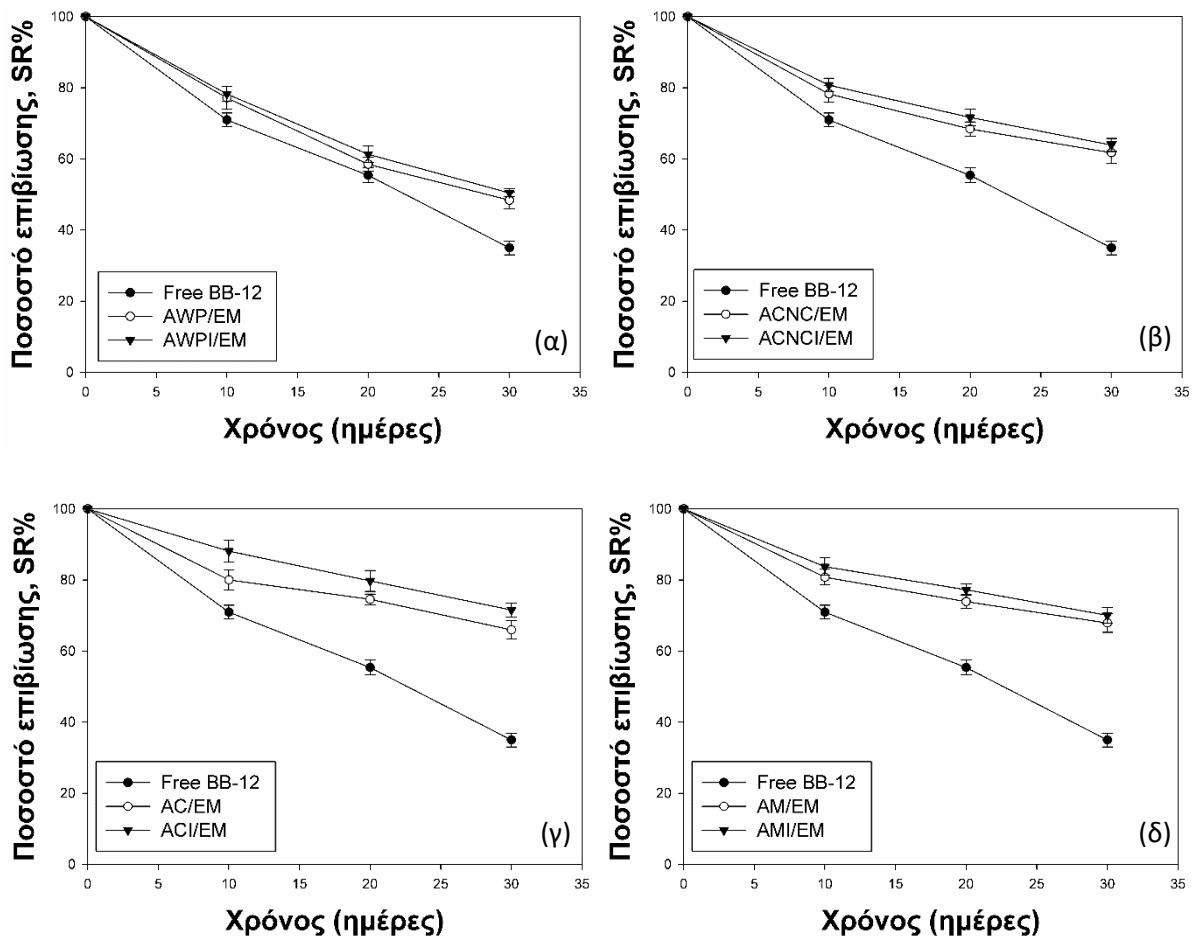
Όπως και στις υποενότητες 5.1 και 5.2, η μεγαλύτερη μείωση των ποσοστών επιβίωσης πραγματοποιήθηκε κατά τις 10 πρώτες ημέρες αποθήκευσης. Ο εγκλεισμός του προβιοτικού στελέχους BB-12, ανεξαρτήτως της χρησιμοποιούμενης μεθόδου εγκλεισμού, ήταν επιτυχής καθώς οδήγησε σε καλύτερη διατήρηση της βιωσιμότητας του σε σύγκριση με την περίπτωση των ελεύθερων κυττάρων του BB-12. Τα προϊόντα γιαουρτιού με εγκλεισμένα προβιοτικά βακτήρια εμφάνισαν σημαντικά υψηλότερα ποσοστά επιβίωσης κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης υπό ψύξη, φτάνοντας μέχρι και 81.6% μετά το πέρας των 30 ημερών σε αντίθεση με τα αντίστοιχα προϊόντα γιαουρτιού με ελεύθερα προβιοτικά βακτήρια όπου το ποσοστό επιβίωσης μετά τις 30 ημέρες αποθήκευσης ήταν 35.0%. Η μεταβολή του ποσοστού επιβίωσης του εγκλεισμένου προβιοτικού στελέχους BB-12 κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης στους 4°C παρουσιάζεται στα Διαγράμματα 5.36-5.37 παράλληλα κάθε

φορά με τη μεταβολή του ποσοστού επιβίωσης του ελεύθερου προβιοτικού στελέχους στα προϊόντα γιαουρτιού.

Η μέθοδος εγκλεισμού αποδείχθηκε ότι είχε σημαντικό ρόλο στο τελικό αποτέλεσμα όσον αφορά τη βιωσιμότητα των προβιοτικών βακτηρίων. Συγκεκριμένα, τα προϊόντα εγκλεισμού μέσω εξώθησης εμφάνισαν σημαντικά υψηλότερα ποσοστά επιβίωσης σε σχέση με τα αντίστοιχα προϊόντα εγκλεισμού μέσω γαλακτωματοποίησης ( $p < 0.05$ ). Στην πρώτη περίπτωση τα ποσοστά επιβίωσης μετά από 30 ημέρες αποθήκευσης στους 4°C κυμάνθηκαν μεταξύ 66.4% και 81.6%, ενώ στην περίπτωση της γαλακτωματοποίησης τα αντίστοιχα ποσοστά περιορίστηκαν μεταξύ 48.4% και 70.0%. Η διαφορά της παρεχόμενης προστασίας από επιβλαβείς παράγοντες όπως το οξυγόνο ή άλλες ουσίες του τροφίμου-φορέα (π.χ. οξέα) οφείλεται στο μεγαλύτερο μέγεθος των προϊόντων εγκλεισμού μέσω εξώθησης. Με τον τρόπο αυτό, εκτίθεται μικρότερο ποσοστό προβιοτικών βακτηρίων στο περιβάλλον, λόγω μικρότερης επιφάνειας επαφής και μικρότερου ρυθμού διάχυσης, με αποτέλεσμα να διατηρείται η βιωσιμότητα των βακτηρίων σε μεγαλύτερο ποσοστό.



Διάγραμμα 5.36: Συγκριτικό διάγραμμα μεταβολής ποσοστού επιβίωσης (SR%) του προβιοτικού στελέχους ενσωματωμένου εντός προϊόντων γιαουρτιού σε ελεύθερη (Free BB-12) ή εγκλεισμένη μέσω εξώθησης μορφή (-/EX).



Διάγραμμα 5.37: Συγκριτικό διάγραμμα μεταβολής ποσοστού επιβίωσης (SR%) του προβιοτικού στελέχους ενσωματωμένου εντός προϊόντων γιαουρτιού σε ελεύθερη (Free BB-12) ή εγκλεισμένη μέσω γαλακτωματοποίησης μορφή (-/EM).

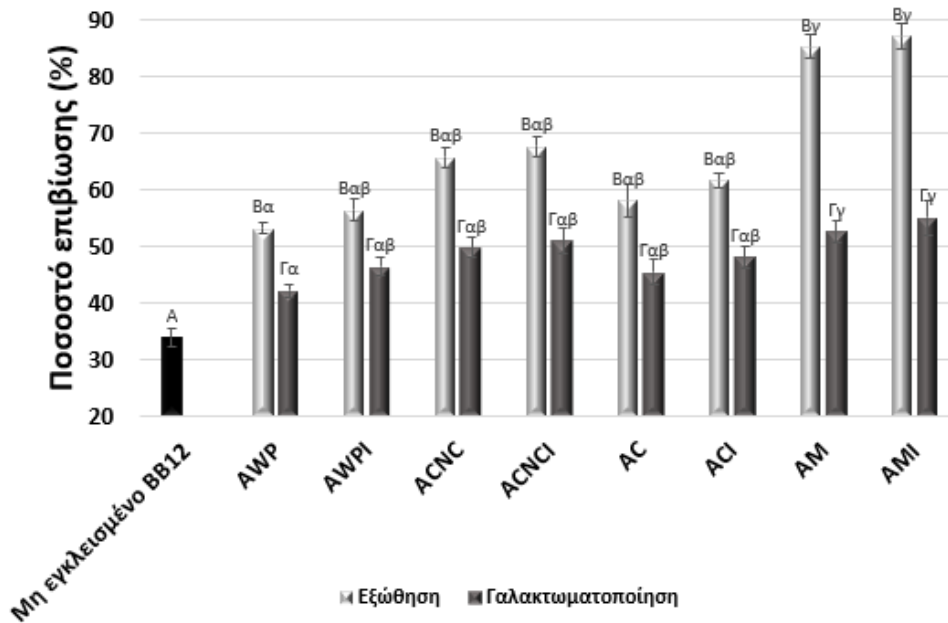
Τα ποσοστά επιβίωσης του προβιοτικού στελέχους BB-12 μετά το πέρας του χρόνου αποθήκευσης υπό ψύξη διαφοροποιήθηκαν ανάλογα με το μέσο που είχε χρησιμοποιηθεί στον εγκλεισμό ( $p < 0.05$ ). Τα μικρότερα ποσοστά παρατηρήθηκαν στην περίπτωση χρήσης του εγκλειστικού μίγματος αλγινικού με σκόνη ορού γάλακτος και πηκτίνη (48.4%-50.4% στην περίπτωση της γαλακτωματοποίησης και 66.4-71.0% στην περίπτωση της εξώθησης), ενώ λίγο υψηλότερα ποσοστά επιβίωσης επιτεύχθηκαν κατά την ενίσχυση του αλγινικού πλέγματος με CNC ή κ-καραγενάνη (ποσοστά επιβίωσης μέχρι και 75.7%). Η χρήση γάλακτος για την παρασκευή των διαλυμάτων των εγκλειστικών μιγμάτων ήταν η αποτελεσματικότερη προσέγγιση για τη διατήρηση της βιωσιμότητας του προβιοτικού στελέχους BB-12 ενσωματωμένου εντός γιαουρτιού, δημιουργώντας ένα πυκνό πλέγμα που οδήγησε σε ποσοστά επιβίωσης έως και 81.6% ακόμη και μέσα στο σύστημα του τροφίμου (προβιοτικό γιαούρτι). Τέλος, μικρή αύξηση της βιωσιμότητας του προβιοτικού στελέχους BB-12 ενσωματωμένου σε γιαούρτι, της τάξης του 1.8-5.6%, επιτεύχθηκε μέσω προσθήκης ινουλίνης σε ποσοστό 2% στο εγκλειστικό μίγμα.

Εκτίμηση βιωσιμότητας (SR%) εγκλεισμένων κυττάρων BB-12 ενσωματωμένων σε γιαούρτι κατά την έκθεση των τελικών προϊόντων προβιοτικού γιαουρτιού σε συνθήκες προσομοίωσης του γαστρεντερικού συστήματος (ΠΓΥ-ΠΕΥ)

Η βιωσιμότητα του εγκλεισμένου προβιοτικού στελέχους BB-12 εξετάστηκε επίσης ως ενσωματωμένο σε γιαούρτι κατά την έκθεση των προϊόντων προβιοτικού γιαουρτιού σε συνθήκες προσομοίωσης του γαστρεντερικού συστήματος, προκειμένου να διαπιστωθεί η αποτελεσματικότητα τόσο των τεχνικών εγκλεισμού που εφαρμόστηκαν όσο και των μέσων εγκλεισμού που χρησιμοποιήθηκαν. Με βάση τα προκύπτοντα αποτελέσματα διαπιστώθηκε ότι ο εγκλεισμός των προβιοτικών βακτηρίων ενίσχυσε ( $p < 0.05$ ) την προστασία των προβιοτικών κυττάρων, αυξάνοντας τα ποσοστά επιβίωσής τους κατά 12.1-59.2% (Διαγράμματα 5.38-5.39).

Σημαντικές διαφοροποιήσεις παρατηρήθηκαν ανάμεσα στις δύο τεχνικές εγκλεισμού. Συγκεκριμένα, όπως αναφέρθηκε και στην υποενότητα 5.3, τα προϊόντα εγκλεισμού που παράγονται μέσω εξώθησης παρέχουν καλύτερη προστασία ( $p < 0.05$ ) στο προβιοτικό στέλεχος BB-12 σε σχέση με τα αντίστοιχα προϊόντα εγκλεισμού που προκύπτουν από την τεχνική της γαλακτωματοποίησης. Τα εγκλεισμένα μέσω εξώθησης βακτήρια που ενσωματώθηκαν σε γιαούρτι διατηρήθηκαν μετά την έκθεση σε συνθήκες προσομοίωσης του γαστρεντερικού συστήματος έως και 85.3%, σε αντίθεση με τα εγκλεισμένα μέσω γαλακτωματοποίησης προβιοτικά βακτήρια ενσωματωμένα σε γιαούρτι που εμφάνισαν ποσοστά επιβίωσης έως το πολύ 52.2%. Όπως έχει αναφερθεί και σε άλλες έρευνες, το μέγεθος των προϊόντων εγκλεισμού έχει καθοριστικό ρόλο στην προστασία των εγκλεισμένων προβιοτικών βακτηρίων από τις συνθήκες που επικρατούν στο γαστρεντερικό σύστημα (Muthukumarasamy and Holley 2006). Έτσι μέσω της εξώθησης επιτυγχάνονται μεγαλύτερα ποσοστά επιβίωσης προβιοτικών βακτηρίων, καθώς ως μέθοδος οδηγεί σε προϊόντα εγκλεισμού μεγαλύτερης διαμέτρου.

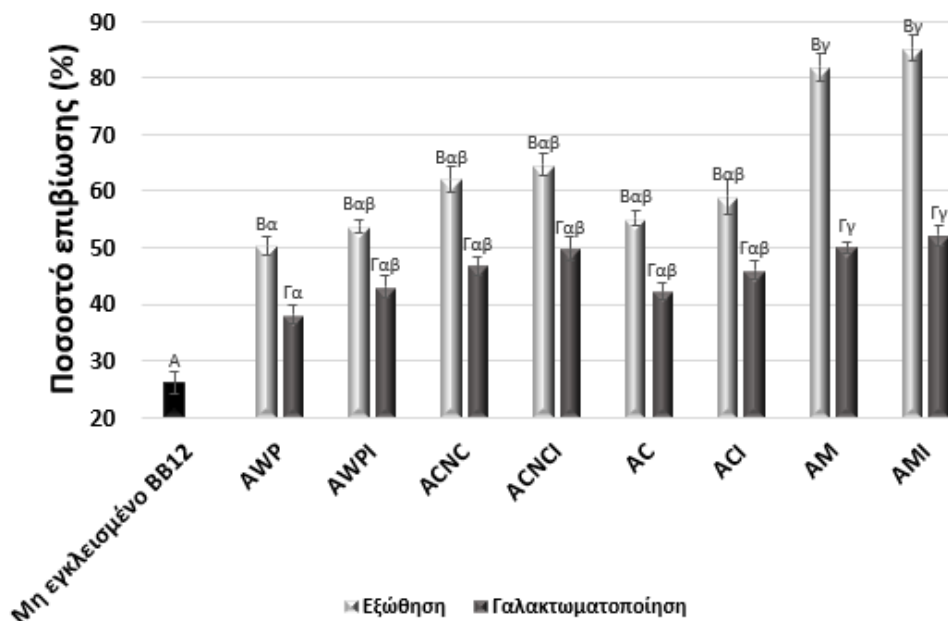
Τα ποσοστά επιβίωσης του εγκλεισμένου προβιοτικού στελέχους BB-12 που ενσωματώθηκε σε γιαούρτι διαφοροποιήθηκαν επίσης ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο μέσο εγκλεισμού ( $p < 0.05$ ). Όπως και κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης των προϊόντων εγκλεισμού μέσω της τεχνικής της εξώθησης ή της γαλακτωματοποίησης, ο συνδυασμός γάλακτος με αλγινικό (AM) παρείχε την καλύτερη δυνατή προστασία στα προβιοτικά βακτήρια (ποσοστά επιβίωσης μέχρι και 85.3%) δημιουργώντας ένα πυκνότερο πλέγμα προστασίας. Χαμηλότερα αλλά εξίσου ικανοποιητικά ποσοστά επιτεύχθηκαν και με τη χρήση άλλων μέσων εγκλεισμού όπως της κ-καραγενάνης (42.3-59.1%) και του CNC (46.8-64.7%). Τέλος, μικρή ενίσχυση της βιωσιμότητας παρατηρήθηκε μέσω της ενσωμάτωσης της ινουλίνης στα εγκλειστικά μίγματα.



Διάγραμμα 5.38: Συγκριτικό διάγραμμα μεταβολής ποσοστών επιβίωσης (SR%) του προβιοτικού στελέχους ενσωματωμένου σε ελεύθερη (Μη εγκλεισμένο BB12) ή εγκλεισμένη μέσω εξώθησης ή μέσω γαλακτωματοποίησης μορφή εντός προϊόντων γιαουρτιού, κατά την έκθεσή τους σε συνθήκες προσομοίωσης γαστρικών υγρών (ΠΓΥ). Η κωδικοποίηση των δειγμάτων έχει οριστεί στους Πίνακες 4.1 και 4.2.

\*Τα κεφαλαία γράμματα χρησιμοποιούνται για τη διαφοροποίηση μεταξύ γιαουρτιών με διαφορετικό συνδυασμό καλλιεργείων εκκίνησης (συμβατική & ελεύθερη, συμβατική & εγκλεισμένη μέσω εξώθησης, συμβατική & εγκλεισμένη μέσω γαλακτωματοποίησης).

\*\*Τα μικρά γράμματα χρησιμοποιούνται για τη διαφοροποίηση μεταξύ των εγκλειστικών υλικών.



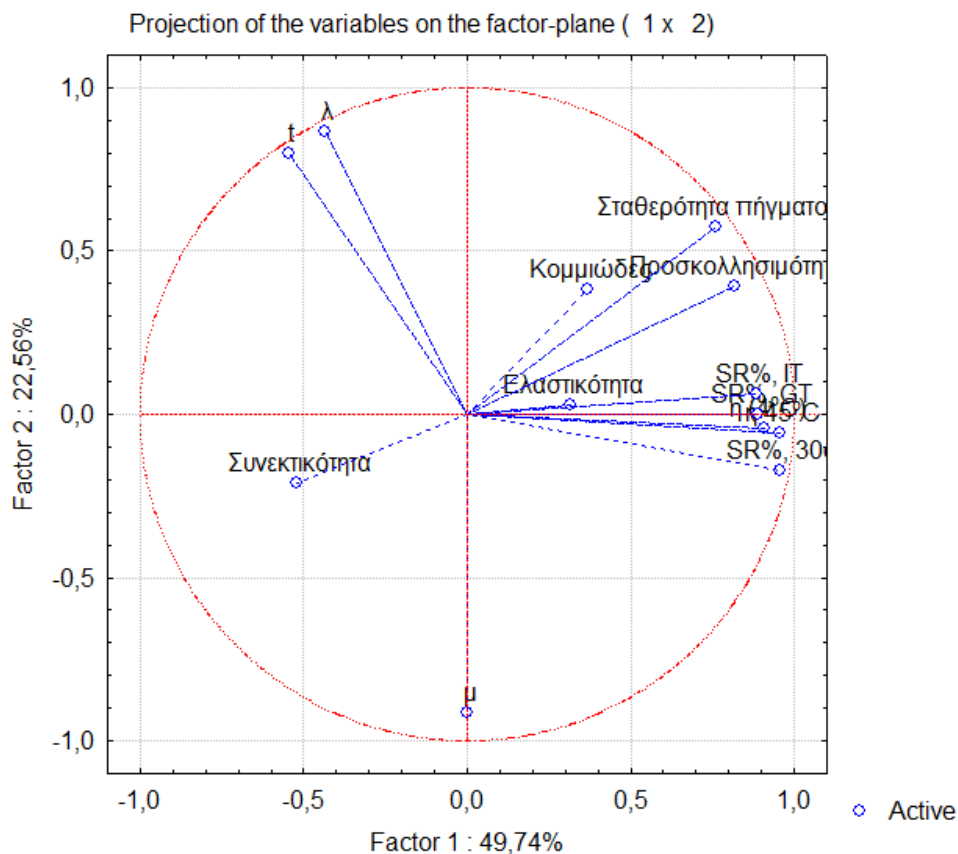
Διάγραμμα 5.39: Συγκριτικό διάγραμμα μεταβολής ποσοστών επιβίωσης (SR%) του προβιοτικού στελέχους ενσωματωμένου σε ελεύθερη (Μη εγκλεισμένο BB12) ή εγκλεισμένη μέσω εξώθησης ή μέσω γαλακτωματοποίησης μορφή εντός προϊόντων γιαουρτιού, κατά την έκθεσή τους σε συνθήκες προσομοίωσης εντερικών υγρών (ΠΕΥ). Η κωδικοποίηση των δειγμάτων έχει οριστεί στους Πίνακες 4.1 και 4.2.

\*Τα κεφαλαία γράμματα χρησιμοποιούνται για τη διαφοροποίηση μεταξύ γιαουρτιών με διαφορετικό συνδυασμό καλλιεργείων εκκίνησης (συμβατική & ελεύθερη, συμβατική & εγκλεισμένη μέσω εξώθησης, συμβατική & εγκλεισμένη μέσω γαλακτωματοποίησης).

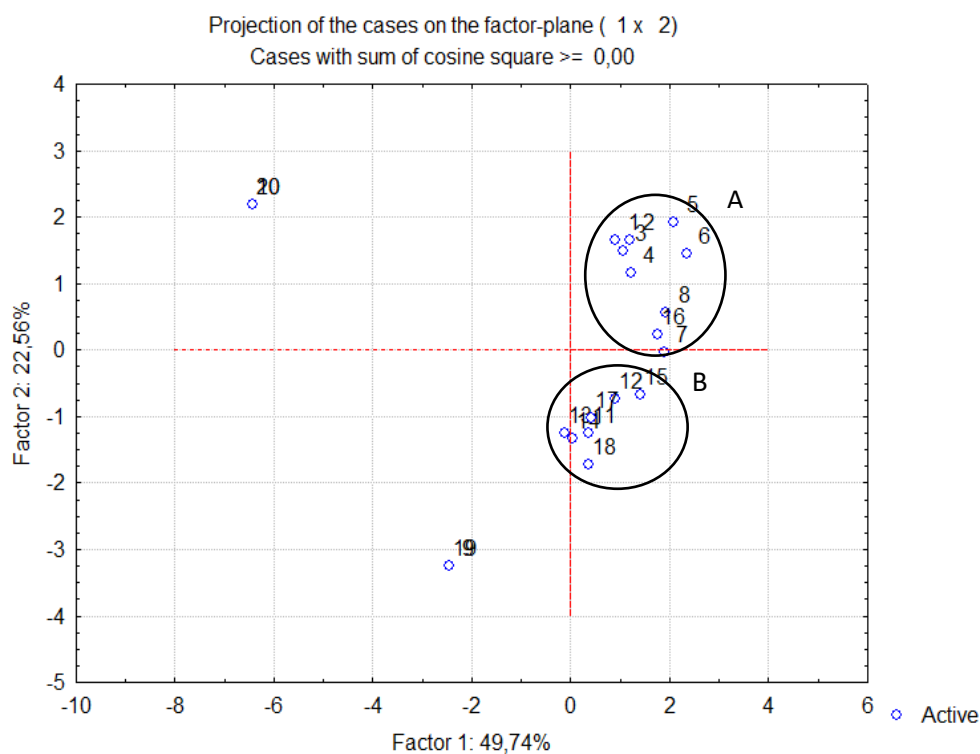
\*\*Τα μικρά γράμματα χρησιμοποιούνται για τη διαφοροποίηση μεταξύ των εγκλειστικών υλικών.

#### 5.5.4. Συσχέτιση προϊόντων γιαουρτιού – Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA)

Η Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (PCA) πραγματοποιήθηκε με σκοπό τη διερεύνηση της συσχέτισης μεταξύ της συνολικής διεργασίας της ζύμωσης αλλά και των τελικών χαρακτηριστικών των γιαουρτιών που ζυμώθηκαν είτε μόνο με συμβατική καλλιέργεια, είτε με συμβατική καλλιέργεια σε συνδυασμό με ελεύθερη ή εγκλεισμένη προβιοτική καλλιέργεια, καθώς και την ομαδοποίηση των γιαουρτιών ανάλογα με τις ιδιότητές τους. Σύμφωνα με το διάγραμμα συσχέτισης των μεταβλητών των πειραμάτων ζύμωσης προβιοτικού γιαουρτιού (Διάγραμμα 5.40) και το διάγραμμα συσχέτισης των δειγμάτων-προϊόντων γιαουρτιού (Διάγραμμα 5.41), η μελέτη της ζύμωσης προβιοτικού γιαουρτιού περιγράφεται από δύο κύριες συνιστώσες, την 1<sup>η</sup> και τη 2<sup>η</sup>, με συνεισφορά 49.74% και 22.56% αντίστοιχα στη συνολική διακύμανση. Τα ιξώδη των γιαουρτιών στους 45°C και στους 4°C και τα ποσοστά επιβίωσης του προβιοτικού στελέχους BB-12 τόσο κατά την αποθήκευση των γιαουρτιών στους 4°C όσο και κατά την έκθεσή τους σε συνθήκες προσομοίωσης του γαστρεντερικού συστήματος σχετίζονται θετικά με την 1<sup>η</sup> κύρια συνιστώσα. Αντίστοιχα, η λανθάνουσα φάση της ζύμωσης σχετίζεται θετικά με τη 2<sup>η</sup> κύρια συνιστώσα, ενώ ο μέγιστος ρυθμός μείωσης του pH κατά τη διάρκεια της ζύμωσης σχετίζονται αρνητικά. Με βάση το Διάγραμμα 5.41, τα εξεταζόμενα προϊόντα γιαουρτιού μπορούν να ομαδοποιηθούν σε δύο μεγάλες ομάδες οι οποίες διαφοροποιούνται ως προς τα προϊόντα γιαουρτιού με μόνο συμβατική ή με συμβατική και ελεύθερη προβιοτική καλλιέργεια. Η ομάδα Α περιλαμβάνει δείγματα με ενδιάμεσες τιμές ιξώδους και τα μεγαλύτερα ποσοστά επιβίωσης του προβιοτικού στελέχους BB-12 κατά τη διάρκεια της διατήρησης των προϊόντων γιαουρτιού υπό ψύξη και κατά την έκθεσή τους σε συνθήκες προσομοίωσης του γαστρεντερικού συστήματος. Κατά τη ζύμωσή τους σημειώθηκαν ενδιάμεσες τιμές μέγιστου ρυθμού μείωσης pH και λανθάνουσας φάσης. Τα δείγματα της ομάδας αυτής αποτελούν προϊόντα γιαουρτιού με περιεχόμενα προϊόντα εγκλεισμού που παρήχθησαν μέσω της τεχνικής της εξώθησης. Αντίθετα, τα δείγματα της ομάδας Β εμφάνισαν τις χαμηλότερες τιμές λανθάνουσας φάσης και τις μεγαλύτερες απόλυτες τιμές μέγιστου ρυθμού μείωσης pH. Τα συγκεκριμένα δείγματα αποτελούν γιαούρτια με εγκλεισμένα μέσω γαλακτωματοποίησης προβιοτικά βακτήρια και χαρακτηρίζονται από μεγάλες τιμές ιξώδους και ενδιάμεσες προς υψηλές τιμές ποσοστών επιβίωσης του προβιοτικού στελέχους BB-12 τόσο κατά τη διατήρηση των προϊόντων γιαουρτιού υπό ψύξη, όσο και κατά την έκθεσή τους σε συνθήκες προσομοίωσης του γαστρεντερικού συστήματος. Έτσι, μέσω της ανάλυσης κυρίων συνιστωσών επιβεβαιώνεται η συνεισφορά των προϊόντων εγκλεισμού στην αύξηση τόσο των ποσοστών επιβίωσης του προβιοτικού στελέχους BB-12, όσο και των τιμών του ιξώδους των γιαουρτιών.



Διάγραμμα 5.40: Συσχέτιση των πειραματικών μεταβλητών και των ιδιοτήτων των προβιοτικών γιαουρτιών μέσω της Ανάλυσης Κύριων Συνιστωσών.(SR%-4°C: ποσοστό επιβίωσης κατά τη διατήρηση στους 4°C, SR%-18°C: ποσοστό επιβίωσης κατά τη διατήρηση στους -18°C, SR%,GT: ποσοστό επιβίωσης κατά την έκθεση σε διάλυμα ΠΓΥ, SR%,IT: ποσοστό επιβίωσης κατά την έκθεση σε διάλυμα ΠΕΥ).



Διάγραμμα 5.41: Συσχέτιση των δειγμάτων προβιοτικών γιαουρτιών μέσω της Ανάλυσης Κύριων Συνιστωσών.



## 6. Συμπεράσματα

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε εγκλεισμός του προβιοτικού στελέχους *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 μέσω τριών τεχνικών: της εξώθησης, της γαλακτωματοποίησης και μίας καινοτόμου μεθόδου η οποία συνδυάζει την τεχνική της εξώθησης με την τεχνολογία του διπλού  $v_1/\varepsilon/v_2$  γαλακτώματος. Για τις ανάγκες των δύο πρώτων μεθόδων χρησιμοποιήθηκαν μίγματα του αλγινικού νατρίου τόσο με συμβατικά υλικά, όπως η ξανθάνη, η σκόνη ορού γάλακτος, η πηκτίνη και η κ-καραγενάνη, είτε καινοτόμα όπως η νανοκρυσταλλική κυτταρίνη (CNC). Ακόμη, εξετάστηκε η ενσωμάτωση κρυσταλλικών υλικών (γλυκερόλη), πρεβιοτικών (ινουλίνη), θρεπτικών ουσιών (γλυκόζη) και αναγωγικών μέσων (L-κυστεΐνη-HCl) στο εγκλειστικό μίγμα, καθώς και η χρήση πλήρους γάλακτος αντί νερού κατά την παρασκευή των διαλυμάτων των εγκλειστικών μιγμάτων. Αντίστοιχα, για τον εγκλεισμό του προβιοτικού στελέχους BB-12 μέσω της τρίτης μεθόδου έγινε χρήση μόνο αλγινικού ή μίγματος αλγινικού-ινουλίνης, καθώς και επικάλυψη των σχηματιζόμενων σφαιριδίων με χιτοζάνη. Ο σκοπός των ανωτέρω ήταν η επίτευξη υψηλής απόδοσης εγκλεισμού (encapsulation yield, EY%) και η αύξηση του ποσοστού επιβίωσης του προβιοτικού στελέχους BB-12 (survival rate, SR%) κατά τη διατήρησή του υπό συνθήκες ψύξης ή κατάψυξης όπως και κατά την έκθεσή του σε συνθήκες προσομοίωσης του γαστρεντερικού συστήματος καθώς και η επιλογή των κατάλληλων προϊόντων εγκλεισμού για την ανάπτυξη προβιοτικού γιαουρτιού με αποδεκτά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά και επαρκές βακτηριακό φορτίο ( $>6 \log_{10} \text{cfu g}^{-1}$ ), ώστε το τελικό προϊόν να μπορεί να χαρακτηριστεί ως «προβιοτικό» προϊόν.

Σε κάθε μέθοδο επιτεύχθηκαν ικανοποιητικά υψηλές τιμές απόδοσης εγκλεισμού, λόγω των ήπιων για τα προβιοτικά βακτήρια συνθηκών που εμπλέκονται κατά την εφαρμογή τους. Πιο συγκεκριμένα, οι μέθοδοι αυτές δεν περιλαμβάνουν ακραίες θερμοκρασίες και πιέσεις ή τοξικούς διαλύτες που μπορεί να επιδράσουν αρνητικά στη βιωσιμότητα του συγκεκριμένου προβιοτικού στελέχους. Όσον αφορά τις δύο πρώτες μεθόδους (εξώθηση και γαλακτωματοποίηση), οι υψηλότερες τιμές απόδοσης εγκλεισμού (EY%) επιτεύχθηκαν μέσω της τεχνικής της γαλακτωματοποίησης σε σύγκριση με την τεχνική της εξώθησης. Καλύτερο εγκλειστικό μίγμα και στις δύο περιπτώσεις ως προς την απόδοση εγκλεισμού αποδείχθηκε το μίγμα γάλακτος-αλγινικού-γλυκόζης, με αποδόσεις εγκλεισμού 100.0% και 99.2% με εφαρμογή της τεχνικής της εξώθησης και της γαλακτωματοποίησης, αντίστοιχα, αποδεικνύοντας ότι το γάλα λόγω της σύνθετης δομής του μπορεί να λειτουργήσει ως ένα αποτελεσματικό περιβάλλον εγκλεισμού. Εξίσου ικανοποιητικά αποτελέσματα όσον αφορά την απόδοση εγκλεισμού έδωσαν και οι συνδυασμοί του αλγινικού με κ-καραγενάνη ή CNC, οδηγώντας σε τιμές αποδόσεων έως και 91.3% στην περίπτωση του εγκλεισμού μέσω εξώθησης και έως 98.8% στην περίπτωση εγκλεισμού μέσω γαλακτωματοποίησης. Τα συγκεκριμένα υλικά, αποδείχθηκε ότι όταν συνδυάζονται με το αλγινικό για τη δημιουργία

εγκλειστικού μίγματος, είναι ικανά να δημιουργούν ένα πυκνότερο και σταθερότερο πλέγμα, ενθυλακώνοντας έτσι με επιτυχία μεγαλύτερο ποσοστό προβιοτικών κυττάρων. Λόγω της ιδιότητάς τους αυτής, τα συγκεκριμένα εγκλειστικά μίγματα αποδείχθηκαν επίσης ως τα πιο αποτελεσματικά στη διατήρηση της βιωσιμότητας των προβιοτικών κυττάρων σε κάθε περίπτωση κατά την αποθήκευση των προϊόντων εγκλεισμού στους 4°C ή στους -18°C. Το πλήρες γάλα, συγκεκριμένα, φάνηκε ότι μπορεί επίσης να λειτουργήσει και ως πηγή θρεπτικών συστατικών για το προβιοτικό στέλεχος BB-12. Όσον αφορά τις δύο μεθόδους εγκλεισμού, τα προϊόντα που προέκυψαν μέσω της τεχνικής της εξώθησης παρείχαν μεγαλύτερη προστασία στα εγκλεισμένα προβιοτικά κύτταρα σε σύγκριση με τα αντίστοιχα προϊόντα μέσω της τεχνικής της γαλακτωματοποίησης. Το μεγαλύτερο μέγεθος των προϊόντων εγκλεισμού που προκύπτουν μέσω εξώθησης έχει ως αποτέλεσμα μικρότερη επιφάνεια επαφής και κατ'επέκταση έκθεση μικρότερου ποσοστού των προβιοτικών κυττάρων σε επιβλαβείς παράγοντες του περιβάλλοντος. Ακόμη, η συμπεριφορά των εγκλειστικών μιγμάτων ήταν ανάλογη και κατά τη διατήρηση των προϊόντων εγκλεισμού που προέκυψαν από τις δύο μεθόδους. Έτσι, τα μέγιστα ποσοστά επιβίωσης κατά τη διάρκεια αποθήκευσης υπό ψύξη ή κατάψυξη, επιτεύχθηκαν στην περίπτωση και των δύο μεθόδων (εξώθηση, γαλακτωματοποίηση) με χρήση εγκλειστικών μιγμάτων με βάση το γάλα, υποδεικνύοντας ότι η συγκεκριμένη σύνθεση εγκλειστικού μίγματος είναι η πιο αποτελεσματική όσον αφορά την προστασία του προβιοτικού στελέχους BB-12 από εξωτερικούς παράγοντες όπως το οξυγόνο, η υγρασία και οι χαμηλές τιμές pH. Συγκεκριμένα, μετά από 30 ημέρες αποθήκευση στους 4°C, το ποσοστό επιβίωσης των εγκλεισμένων μέσω εξώθησης προβιοτικών βακτηρίων έφτασε στο 72.0%, ενώ μέσω γαλακτωματοποίησης το ποσοστό επιβίωσης προβιοτικών βακτηρίων ξεπέρασε το 52.7%.

Επιπρόσθετα, η ενσωμάτωση γλυκόζης στο εγκλειστικό μίγμα ως θρεπτικό μέσο για τα προβιοτικά βακτήρια αποδείχθηκε επιτυχής, καθώς οδήγησε σε αξιοσημείωτη αύξηση της βιωσιμότητας των προβιοτικών κυττάρων κατά την αποθήκευση υπό ψύξη. Λόγω της παρουσίας της γλυκόζης και της υψηλής προστασίας των προβιοτικών κυττάρων που επιτεύχθηκε στις περιπτώσεις των προϊόντων εγκλεισμού μέσω εξώθησης με συνδυασμό κ-καραγενάνης, CNC ή γάλακτος με αλγινικό και γλυκόζη, το βακτηριακό φορτίο διατηρήθηκε υψηλότερο του ελάχιστου απαιτούμενου για εμπορικά προϊόντα των 6 log cfu g<sup>-1</sup> μετά από αποθήκευση για 30 ημέρες στους 4°C. Εξίσου ικανοποιητικά αποτελέσματα έδωσε η μέθοδος της εξώθησης και κατά την αποθήκευση των προϊόντων εγκλεισμού σε κατάψυξη, όπου το προβιοτικό βακτηριακό φορτίο διατηρήθηκε μετά από 30 ημέρες έως 8.5 log cfu g<sup>-1</sup>. Αντίθετα, το μέγιστο βακτηριακό φορτίο μετά από 30 ημέρες αποθήκευση στα προϊόντα εγκλεισμού μέσω γαλακτωματοποίησης ήταν 5.7 log cfu g<sup>-1</sup>. Ακόμη, η ενσωμάτωση της γλυκερόλης στο εγκλειστικό μίγμα, λόγω των κρουοπροστατευτικών ιδιοτήτων της, είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική διατήρηση της βιωσιμότητας του προβιοτικού στελέχους BB-12 κατά τη διατήρηση των προϊόντων εγκλεισμού υπό κατάψυξη, με αποτέλεσμα το ποσοστό επιβίωσης των προβιοτικών κυττάρων μετά από αποθήκευση στους -18°C για 30 ημέρες να φτάνει σε 82.5% στην περίπτωση των

προϊόντων εγκλεισμού μέσω εξώθησης και 57.1% στην περίπτωση των προϊόντων εγκλεισμού μέσω γαλακτωματοποίησης.

Αντίστοιχη ήταν η συμπεριφορά των προϊόντων εγκλεισμού και κατά την έκθεσή τους σε συνθήκες προσομοίωσης του γαστρεντερικού συστήματος. Το υψηλότερο ποσοστό επιβίωσης του προβιοτικού στελέχους BB-12 που βρέθηκε ήταν 78.4% και σημειώθηκε στα προϊόντα εγκλεισμού μέσω εξώθησης με εγκλειστικό μέσο το μίγμα γάλακτος-αλγινικού, ενώ στα αντίστοιχα προϊόντα εγκλεισμού μέσω γαλακτωματοποίησης το ποσοστό επιβίωσης περιορίστηκε μέχρι 45.7%. Η μεγαλύτερη διάμετρος των προϊόντων εγκλεισμού μέσω εξώθησης φάνηκε ότι περιορίζει τη διάχυση των γαστρικών και εντερικών υγρών εντός αυτών, με αποτέλεσμα να μην προκύπτουν σημαντικές απώλειες βιωσιμότητας. Όσον αφορά την πρεβιοτική ουσία, την ινουλίνη, φάνηκε ότι έχει σημαντικότερη συνεισφορά μέσω της προσθήκης της στο εγκλειστικό μίγμα κατά την έκθεση των εγκλεισμένων μέσω γαλακτωματοποίησης προβιοτικών κυττάρων σε συνθήκες προσομοίωσης του γαστρεντερικού συστήματος, ενισχύοντας σε κάθε περίπτωση τη βιωσιμότητα του προβιοτικού στελέχους BB-12. Τέλος, τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν και μέσω της μελέτης μορφολογίας και δομής των προϊόντων εγκλεισμού μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM), όπου παρατηρήθηκε βελτίωση της δομής των προϊόντων εγκλεισμού μέσω εξώθησης κατά την προσθήκη υλικών όπως η γλυκόζη, η κ-καραγενάνη, το CNC και το γάλα. Ακόμη, δεν παρατηρήθηκαν τυχόν ρωγμές ή σπασίματα στην επιφάνεια των προϊόντων εγκλεισμού, επιβεβαιώνοντας την ικανοποιητική προστασία των εγκλεισμένων προβιοτικών κυττάρων. Η μορφολογία και η δομή των προϊόντων εγκλεισμού μέσω γαλακτωματοποίησης ήταν αρκετά διαφορετική και περισσότερο ανομοιομορφή συγκριτικά με αυτή των προϊόντων εγκλεισμού μέσω εξώθησης, ενώ το μέγεθός τους ήταν μικρότερο. Ακόμη, μεταξύ αυτών των προϊόντων εγκλεισμού σχηματίζονται συσσωματώματα, κάτι το οποίο δεν παρατηρείται στην περίπτωση των προϊόντων εγκλεισμού μέσω εξώθησης.

Όσον αφορά την καινοτόμο μέθοδο που συνδυάζει την τεχνική της εξώθησης με την τεχνολογία του διπλού  $v_2/\epsilon/v_2$  γαλακτώματος, το σταθερότερο διπλό γαλάκτωμα προέκυψε με χρήση μόνο αλγινικού ως εξωτερική φάση, καθώς εμφάνισε την υψηλότερη απόλυτη τιμή ζ-δυναμικού (-65.1 mV) και τη χαμηλότερη τιμή ιξώδους (34.3 cP), και έτσι επιλέχθηκε προς χρήση για εγκλεισμό του προβιοτικού στελέχους BB-12 μέσω εξώθησης. Οι τιμές απόδοσης εγκλεισμού που επιτεύχθηκαν μέσω της μεθόδου αυτής κυμάνθηκαν μεταξύ 72,5% και 81,6%. Η βιωσιμότητα των προβιοτικών κυττάρων που ενθυλακώθηκαν εντός της εσωτερικής φάσης των διπλών  $v_1/\epsilon/v_2$  γαλακτωμάτων διατηρήθηκε σε ικανοποιητικά επίπεδα κατά την αποθήκευση των προϊόντων εγκλεισμού υπό ψύξη ή κατάψυξη, υπερβαίνοντας το ελάχιστο όριο των  $6 \log \text{cfu g}^{-1}$  για εμπορικά προϊόντα. Σημαντική συνεισφορά στην προστασία των προβιοτικών κυττάρων φάνηκε ότι είχε η επικάλυψη των προϊόντων εγκλεισμού με χιτοζάνη, όσον αφορά την έκθεση των προϊόντων εγκλεισμού σε συνθήκες προσομοίωσης του γαστρεντερικού συστήματος, λειτουργώντας ως ένα επιπρόσθετο προστατευτικό φράγμα και αυξάνοντας το ποσοστό επιβίωσης από 68,6-71.3% σε 82.0-86.1%. Η χιτοζάνη φάνηκε ότι σχηματίζει ισχυρά σύμπλοκα με το αλγινικό,

δημιουργώντας πυκνότερες και σταθερότερες δομές με μικρότερο πορώδες, όπως επιβεβαιώθηκε και κατά την παρατήρηση μέσω SEM, περιορίζοντας έτσι τον ρυθμό διάχυσης των γαστρικών υγρών και των χολικών αλάτων εντός των προϊόντων εγκλεισμού. Συγκριτικά με τις άλλες δύο μεθόδους εγκλεισμού, η συγκεκριμένη συνδυαστική τεχνική χρήζει περαιτέρω μελέτης ώστε η εφαρμογή της σε βιομηχανική κλίμακα να είναι περισσότερο βιώσιμη.

Για την ανάπτυξη προϊόντων προβιοτικού γιαουρτιού επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθούν εγκλεισμένα προβιοτικά βακτήρια που έχουν παραχθεί μέσω των μεθόδων που θεωρούνται εφαρμόσιμες σε βιομηχανική κλίμακα, της εξώθησης και της γαλακτωματοποίησης, και οι οποίες μελετήθηκαν σε βάθος στην παρούσα διδακτορική διατριβή. Η προσθήκη εγκλεισμένων προβιοτικών κυττάρων κατά τη διεργασία της ζύμωσης του γάλακτος προς γιαούρτι αποδείχθηκε ότι επηρεάζει την εξέλιξη της ζύμωσης, ανεξάρτητα από το χρησιμοποιούμενο εγκλειστικό μέσο. Τα προϊόντα εγκλεισμού μέσω γαλακτωματοποίησης είχαν τη μεγαλύτερη συνεισφορά στη ζύμωση, με αποτέλεσμα μικρότερη λανθάνουσα φάση (176-186 min), μεγαλύτερη απόλυτη τιμή μέγιστου ρυθμού μείωσης pH ( $0.032-0.036 \text{ min}^{-1}$ ) και μικρότερο συνολικό χρόνο ζύμωσης (205-210 min). Ωστόσο, παρατηρείται ότι ο εγκλεισμός των προβιοτικών κυττάρων περιορίσε μερικώς τη συνεισφορά τους στη ζύμωση. Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των προϊόντων γιαουρτιού με εγκλεισμένα προβιοτικά βακτήρια κρίθηκαν ικανοποιητικά, καθώς ήταν παραπλήσια ή καλύτερα σε σύγκριση με τα αντίστοιχα του συμβατικού γιαουρτιού. Λόγω της προσθήκης εγκλεισμένων προβιοτικών βακτηρίων, τα τελικά προϊόντα γιαουρτιού είχαν αυξημένες τιμές ιξώδους σε σύγκριση με τα συμβατικά προϊόντα γιαουρτιού (έως και 45483 cP έναντι 18594 cP μετά από 24 h αποθήκευση στους 4°C), είτε λόγω της μερικής συνεισφοράς του προβιοτικού στελέχους BB-12 στη διεργασία της ζύμωσης, είτε λόγω της αλληλεπίδρασης των εγκλειστικών μέσων που χρησιμοποιήθηκαν με τις πρωτεΐνες του γάλακτος. Αντίστοιχα τα πήγματα του γιαουρτιού είχαν αυξημένες τιμές σταθερότητας, προσκολλησιμότητας και της ελαστικότητας, ενώ είχαν μειωμένες τιμές συνεκτικότητας σε σύγκριση με το συμβατικό γιαούρτι. Οι διαφορές αυτές οφείλονται στην επίδραση των υδροκολλοειδών υλικών του εγκλειστικού μίγματος στο πήγμα του γιαουρτιού, καθώς κατά τον εμβολιασμό με ελεύθερη προβιοτική καλλιέργεια μαζί με τη συμβατική καλλιέργεια εκκίνησης δεν παρατηρήθηκε αντίστοιχη σημαντική μεταβολή στα χαρακτηριστικά αυτά. Αναφορικά με τη βιωσιμότητα των εγκλεισμένων προβιοτικών κυττάρων, ο εγκλεισμός είχε σημαντική συνεισφορά στη διατήρηση αυτής τόσο κατά την αποθήκευση των έτοιμων γιαουρτιών σε ψύξη, όσο και κατά την κατανάλωσή τους (μέσω έκθεσής τους σε συνθήκες προσομοίωσης του γαστρεντερικού συστήματος). Ύστερα από 30 ημέρες αποθήκευση των γιαουρτιών επιτεύχθηκαν ποσοστά επιβίωσης των προβιοτικών κυττάρων έως και 81.6% έναντι 35.0% (γιαούρτι με μόνο συμβατική καλλιέργεια εκκίνησης), ενώ, αντίστοιχα, η βιωσιμότητα των προβιοτικών κυττάρων κατά την έκθεσή τους σε συνθήκες προσομοίωσης του γαστρεντερικού συστήματος αυξήθηκε κατά 12.1-59.2%. Αντίστοιχα με όσα αναφέρθηκαν παραπάνω, η μέθοδος της εξώθησης οδήγησε σε

εγκλεισμένα προβιοτικά βακτήρια με μεγαλύτερα ποσοστά επιβίωσης στο γιαούρτι (66.4-81.6% κατά την αποθήκευση υπό ψύξη και 50.4-85.3% κατά την έκθεση σε συνθήκες προσομοίωσης του γαστρεντερικού συστήματος) σε σύγκριση με τη μέθοδο της γαλακτωματοποίησης (48.4-70.0% κατά την αποθήκευση υπό ψύξη και 38.2-52.2% κατά την έκθεση σε συνθήκες προσομοίωσης του γαστρεντερικού συστήματος). Το βέλτιστο ποσοστό επιβίωσης σε κάθε περίπτωση επιτεύχθηκε μέσω εγκλεισμού του προβιοτικού στελέχους BB-12 σε μίγμα αλγινικού-γάλακτος μέσω της τεχνικής της εξώθησης.

Συνοψίζοντας, αξίζει να σημειωθεί ότι με τον κατάλληλο συνδυασμό υλικών, ο εγκλεισμός του προβιοτικού στελέχους BB-12 είτε μέσω γαλακτωματοποίησης, είτε μέσω εξώθησης αποτελεί μία επιτυχημένη προσέγγιση για τη διατήρηση της βιωσιμότητάς του κατά την ενσωμάτωσή του σε γιαούρτι και τη διατήρηση των τελικών προϊόντων υπό ψύξη. Συγκεκριμένα, οι συνδυασμοί αλγινικού-καραγενάνης, αλγινικού-καραγενάνης-ινουλίνης, αλγινικού-γάλακτος και αλγινικού-γάλακτος-ινουλίνης βοήθησαν στη διατήρηση του βακτηριακού φορτίου πάνω από το απαιτούμενο όριο των  $6 \log \text{ cfu g}^{-1}$  για εμπορικά προϊόντα, τόσο στην περίπτωση που ο εγκλεισμός διενεργήθηκε μέσω εξώθησης, όσο και στην περίπτωση της γαλακτωματοποίησης. Σημαντικό ρόλο, βέβαια, έχει και το αρχικό φορτίο των προβιοτικών βακτηρίων στα προϊόντα γιαουρτιού, καθώς επηρεάζει το τελικό ποσοστό των ζώντων προβιοτικών κυττάρων τόσο κατά τη διάρκεια της διατήρησης σε αποθήκευση υπό ψύξη όσο και κατά τη διέλευση μέσω του γαστρεντερικού συστήματος. Για παράδειγμα, παρόλο που τα εγκλεισμένα μέσω γαλακτωματοποίησης προβιοτικά κύτταρα εμφάνισαν χαμηλότερα ποσοστά επιβίωσης από τα αντίστοιχα εγκλεισμένα μέσω εξώθησης προβιοτικά κύτταρα, το τελικό βακτηριακό φορτίο ύστερα από 30 ημέρες αποθήκευση των γιαουρτιών υπό ψύξη ήταν αντίστοιχο, λόγω του υψηλότερου αρχικού βακτηριακού φορτίου που οφειλόταν στις μεγαλύτερες τιμές απόδοσης εγκλεισμού. Ο εμβολιασμός με επαρκές βακτηριακό φορτίο θα μπορούσε να διατηρήσει το τελικό φορτίο αρκετά υψηλότερα, διασφαλίζοντας τη θεραπευτική δράση των προβιοτικών βακτηρίων έως την κατανάλωση στο τέλος του χρόνου ζωής των προϊόντων (Ranadheera et al., 2012). Παρόλα αυτά, ένα υψηλό βακτηριακό φορτίο στα προϊόντα γιαουρτιού μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα ανεπάρκεια θρεπτικών συστατικών η οποία μπορεί να οδηγήσει σε μείωση του ποσοστού επιβίωσης (Mortazavian et al., 2011) και σε ανεπιθύμητες μεταβολές στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των προϊόντων γιαουρτιού (Meybodi et al., 2020).

## 7. Προτάσεις

Η παρούσα διδακτορική διατριβή παρείχε ενθαρρυντικά αποτελέσματα σχετικά με τον εγκλεισμό των προβιοτικών βακτηρίων και την ανάπτυξη προβιοτικών προϊόντων. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μελέτη των μεθόδων εγκλεισμού οδηγούν σε νέα ερευνητικά μονοπάτια, όπως ο συνδυασμός των τεχνικών της εξώθησης και της γαλακτωματοποίησης με μεθόδους ξήρανσης, όπως η ξήρανση υπό κατάψυξη, με σκοπό τη μείωση της ενεργότητας νερού των προϊόντων εγκλεισμού και την αύξηση του χρόνου ζωής αυτών. Επίσης, μέσω του συνδυασμού αυτού θα επιτευχθεί σημαντική μείωση του μεγέθους των προϊόντων εγκλεισμού, με αποτέλεσμα να είναι δυνατή η ενσωμάτωση υψηλότερου προβιοτικού φορτίου σε προϊόν τροφίμου χωρίς αρνητική επίδραση στα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά. Ακόμη, λόγω των ενθαρρυντικών αποτελεσμάτων που προέκυψαν από την καινοτόμο μέθοδο που συνδυάζει το διπλό  $v_1/\epsilon/v_2$  γαλάκτωμα με την τεχνική της εξώθησης, προτείνεται η εκτενέστερη μελέτη της μεθόδου αυτής ώστε να γίνει βιώσιμη η εφαρμογή της σε βιομηχανική κλίμακα. Τέλος, για μελλοντική έρευνα προτείνεται ο εγκλεισμός συμβιωτικής προβιοτικής καλλιέργειας έναντι προβιοτικής καλλιέργειας ενός στελέχους, και η διερεύνηση της πιθανότητας αύξησης του ποσοστού επιβίωσης λόγω της συνεργιστικής δράσης των διαφορετικών προβιοτικών στελεχών.

Ως συνέχεια της συγκεκριμένης μελέτης και δεδομένου ότι η παραγωγή προβιοτικού γιαουρτιού με εγκλεισμένα προβιοτικά βακτήρια και επαρκές προβιοτικό φορτίο μέχρι το τέλος του χρόνου ζωής του προϊόντος είναι ιδιαίτερα περιορισμένη, προτείνεται η μελέτη ανάπτυξης τέτοιων προϊόντων σε πιλοτική κλίμακα, με στόχο την παραγωγή και διάθεση αυτών στην αγορά.

Άλλοι άξονες στους οποίους είναι σκόπιμο να στραφεί η έρευνα είναι η αξιοποίηση των προϊόντων εγκλεισμού για ενσωμάτωση σε διάφορα προϊόντα τροφίμων με σκοπό την ανάπτυξη διαφόρων προβιοτικών προϊόντων. Πέρα από τα προϊόντα γιαουρτιού, μπορεί να γίνει μελέτη της ενσωμάτωσης εγκλεισμένων προβιοτικών βακτηρίων και σε άλλα υποσχόμενα τρόφιμα-φορείς που διατηρούνται υπό ψύξη ή κατάψυξη. Τέτοια τρόφιμα μπορεί να είναι είτε γαλακτοκομικά, όπως τυρί, κρέμες ή παγωτό, είτε μη γαλακτοκομικά όπως βούτυρο, προϊόντα επάλειψης ή προϊόντα επεξεργασίας κρέατος. Μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον παρουσιάζει, επίσης, η μελέτη εγκλεισμού προβιοτικών βακτηρίων σε κατάλληλα θερμοάντοχα και κατάλληλα για τρόφιμα υλικά με στόχο τη διατήρηση της βιωσιμότητας των προβιοτικών κυττάρων κατά την έκθεσή τους σε υψηλές θερμοκρασίες. Τέτοια προϊόντα εγκλεισμού θα μπορούν να ενσωματωθούν στη συνέχεια σε ένα μεγάλο εύρος τροφίμων-φορέων που υφίστανται θερμική επεξεργασία, όπως για παράδειγμα τα αρτοσκευάσματα.

## 8. Βιβλιογραφία

Abd-Elhamid, A. M. (2012). Production of functional kariesh cheese by microencapsulation of *Bifidobacterium adolescentis* ATCC 15704. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 4(2), 112–117.

Akbarbaglu, Z., Peighambaroust, S. H., Sarabandi, K., & Jafari, S. M. (2021). Spray drying encapsulation of bioactive compounds within protein-based carriers; different options and applications. *Food Chemistry*, 359(April), 129965. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129965>

Akin, M. B., Akin, M. S., & Kirmaci, Z. (2007). Effects of inulin and sugar levels on the viability of yogurt and probiotic bacteria and the physical and sensory characteristics in probiotic ice-cream. *Food Chemistry*, 104(1), 93–99. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.11.030>

Alamprese, C., Foschino, R., Rossi, M., Pompei, C., & Savani, L. (2002). Survival of *Lactobacillus johnsonii* La1 and influence of its addition in retail-manufactured ice cream produced with different sugar and fat concentrations. *International Dairy Journal*, 12, 201–208. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00159-5](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00159-5)

Albenzio, M., Santillo, A., Caroprese, M., Ruggieri, D., Napolitano, F., & Sevi, A. (2013). Physicochemical properties of Scamorza ewe milk cheese manufactured with different probiotic cultures. *Journal of dairy science*, 96(5), 2781–91. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-6218>

Alehosseini, A., Sarabi-Jamab, M., Ghorani, B., & Kadkhodaei, R. (2019). Electro-encapsulation of *Lactobacillus casei* in high-resistant capsules of whey protein containing transglutaminase enzyme. *LWT - Food Science and Technology*, 102(November 2018), 150–158. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.12.022>

Altamirano-Fortoul, R., Moreno-Terrazas, R., Quezada-Gallo, A., & Rosell, C. M. (2012). Viability of some probiotic coatings in bread and its effect on the crust mechanical properties. *Food Hydrocolloids*, 29(1), 166–174. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.02.015>

Alvim, I. D., & Grosso, C. R. F. (2010). Microparticles obtained by complex coacervation: influence of the type of reticulation and the drying process on the release of the core material. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 30(4), 1069–1076. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612010000400036>

Amine, K. M., Champagne, C. P., Salmieri, S., Britten, M., St-Gelais, D., Fustier, P., & Lacroix, M. (2014). Effect of palmitoylated alginate microencapsulation on viability of *Bifidobacterium longum* during freeze-drying. *LWT - Food Science and Technology*, 56(1), 111–117. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.11.003>

Anal, A. K., & Singh, H. (2007). Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science and Technology*, 18(5), 240–251. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.01.004>

Anu Bhushani, J., & Anandharamakrishnan, C. (2014). Electrospinning and electrospraying techniques: Potential food based applications. *Trends in Food Science*

- and Technology*, 38(1), 21–33. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.03.004>
- ANVISA. (2008). Brazilian Agency of Sanitary Surveillance. Food with health claims, new foods/ingredients, bioactive compounds and probiotics.
- Aragon-Alegro, L. C., Alarcon Alegro, J. H., Roberta Cardarelli, H., Chih Chiu, M., & Isay Saad, S. M. (2007). Potentially probiotic and synbiotic chocolate mousse. *LWT - Food Science and Technology*, 40(4), 669–675. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2006.02.020>
- Arepally, D., & Goswami, T. K. (2019). Effect of inlet air temperature and gum arabic concentration on encapsulation of probiotics by spray drying. *LWT - Food Science and Technology*, 99(May 2018), 583–593. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.10.022>
- Arslan-Tontul, S., & Erbas, M. (2017). Single and double layered microencapsulation of probiotics by spray drying and spray chilling. *LWT - Food Science and Technology*, 81, 160–169. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.03.060>
- Arslan, S., Erbas, M., Tontul, I., & Topuz, A. (2015). Microencapsulation of probiotic *Saccharomyces cerevisiae* var: *Bouardii* with different wall materials by spray drying. *LWT - Food Science and Technology*, 63(1), 685–690. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.034>
- Barclay, T., Ginic-markovic, M., Cooper, P., & Petrovsky, N. (2010). Inulin - a versatile polysaccharide with multiple pharmaceutical and food chemical uses. *The Journal of Excipients and Food Chemicals*, 1(3), 27–50.
- Bedani, R., Vieira, A. D. S., Rossi, E. A., & Saad, S. M. I. (2014). Tropical fruit pulps decreased probiotic survival to invitro gastrointestinal stress in synbiotic soy yoghurt with okara during storage. *LWT - Food Science and Technology*, 55(2), 436–443. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.10.015>
- Bekhit, M., Sánchez-González, L., Ben Messaoud, G., & Desobry, S. (2016). Encapsulation of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* on alginate/pectin composite microbeads: Effect of matrix composition on bacterial survival and nisin release. *Journal of Food Engineering*, 180, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.01.031>
- Beldarrain-Iznaga, T., Villalobos-Carvajal, R., Leiva-Vega, J., & Sevillano Armesto, E. (2020). Influence of multilayer microencapsulation on the viability of *Lactobacillus casei* using a combined double emulsion and ionic gelation approach. *Food and Bioproducts Processing*, 124, 57–71. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.08.009>
- Bernucci, B. S. P., Loures, C. M. G., Lopes, S. C. A., Oliveira, M. C., Sabino, A. P., Vilela, J. M. C., et al. (2017). Effect of microencapsulation conditions on the viability and functionality of *Bifidobacterium longum* 51A. *LWT - Food Science and Technology*, 80, 341–347. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.02.036>
- Besselink, M. G., van Santvoort, H. C., Buskens, E., Boermeester, M. A., van Goor, H., Timmerman, H. M., et al. (2008). Probiotic prophylaxis in predicted severe acute pancreatitis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet*, 371(9613), 651–659. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60207-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60207-X)
- Bezerra, T. K. A., de Oliveira Arcanjo, N. M., Ribeiro de Araújo, A. R., Meneses de



- Queiroz, A. L., Gomes de Oliveira, M. E., Gomes, A. M. P., & Madruga, M. S. (2017). Volatile profile in goat coalho cheese supplemented with probiotic lactic acid bacteria. *LWT - Food Science and Technology*, *76*, 209–215. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.03.041>
- Bhandari, B. (2009). Device and method for preparing microparticles. PCTWO2009062254- A1. Australia.
- Binda, S., Hill, C., Johansen, E., Obis, D., Pot, B., Sanders, M. E., et al. (2020). Criteria to Qualify Microorganisms as “Probiotic” in Foods and Dietary Supplements. *Frontiers in Microbiology*, *11*(July), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01662>
- Bindels, L. B., Delzenne, N. M., Cani, P. D., & Walter, J. (2015). Opinion: Towards a more comprehensive concept for prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, *12*(5), 303–310. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2015.47>
- Blaiotta, G., Murru, N., Di Cerbo, A., Succi, M., Coppola, R., & Aponte, M. (2016). Commercially standardized process for probiotic “Italico” cheese production. *LWT - Food Science and Technology*, (November). <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.11.008>
- Bosnea, L. A., Moschakis, T., Nigam, P. S., & Biliaderis, C. G. (2017). Growth adaptation of probiotics in biopolymer-based coacervate structures to enhance cell viability. *LWT - Food Science and Technology*, *77*, 282–289. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.11.056>
- Bourdichon, F., Morelli, L., Zuliani, V., & Laulund, S. (2018). Inventory of microbial food cultures with safety demonstration in fermented food products. Update of the Bulletin of the IDF No. 455-2012. *Bulletin of the IDF*, *495*, 5–71.
- Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M., & Scher, J. (2011). Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering*, *104*(4), 467–483. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.12.031>
- Cabuk, B., & Tellioglu Harsa, S. (2015). Protection of *Lactobacillus acidophilus* NRRL-B 4495 under in vitro gastrointestinal conditions with whey protein/pullulan microcapsules. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *120*(6), 650–656. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2015.04.014>
- Capela, P., Hay, T. K. C., & Shah, N. P. (2006). Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt. *Food Research International*, *39*(2), 203–211. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2005.07.007>
- Capozzi, V., Arena, M. P., Russo, P., Spano, G., & Fiocco, D. (2015). Stressors and Food Environment: Toward Strategies to Improve Robustness and Stress Tolerance in Probiotics. In *Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics: Bioactive Foods in Health Promotion* (pp. 245–256). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802189-7.00016-2>
- Chaikhram, P. (2015). Stability of probiotics encapsulated with Thai herbal extracts in fruit juices and yoghurt during refrigerated storage. *Food Bioscience*, *12*, 61–66. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2015.07.006>

- Chapman, C. M. C., Gibson, G. R., & Rowland, I. (2011). Health benefits of probiotics : are mixtures more effective than single strains ? *European Journal of Nutrition*, 1–17. <https://doi.org/10.1007/s00394-010-0166-z>
- Chávarri, M., Marañón, I., & Villarán, M. C. (2012). Encapsulation Technology to Protect Probiotic Bacteria (ch.23). In E. C. Rigobelo (Ed.), *Probiotics* (pp. 501–540). <https://doi.org/10.5772/50046>
- Chen, J., Wang, Q., Liu, C., & Gong, J. (2017). Issues Deserve Attention in Encapsulating Probiotics : Critical Review of Existing Literature. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(6), 1228–1238. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.977991>
- Chen, M.-J., Chen, K.-N., & Kuo, Y.-T. (2007). Optimal Thermotolerance of *Bifidobacterium bifidum* in Gellan–Alginate Microparticles. *Biotechnology and Bioengineering*, 98(2), 411–419. <https://doi.org/10.1002/bit>
- Chen, M. J., & Chen, K. N. (2007). Applications of Probiotic Encapsulation in Dairy Products. In *Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems* (pp. 83–112). <https://doi.org/10.1002/9780470277881.ch4>
- Chranioti, C., & Tzia, C. (2015). Encapsulation of Food Ingredients: Agents and Techniques. In T. Varzakas & C. Tzia (Eds.), *Food Engineering Handbook* (pp. 522–554).
- Coghetto, C. C., Brinques, G. B., & Ayub, M. A. Z. (2016). Probiotics production and alternative encapsulation methodologies to improve their viabilities under adverse environmental conditions. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 67(8), 929–943. <https://doi.org/10.1080/09637486.2016.1211995>
- Commane, D. M., Shortt, C. T., Silvi, S., Cresci, A., Hughes, R. M., & Rowland, I. R. (2005). Effects of fermentation products of pro- and prebiotics on trans-epithelial electrical resistance in an in vitro model of the colon. *Nutrition and Cancer*, 51(1), 102–109. [https://doi.org/10.1207/s15327914nc5101\\_14](https://doi.org/10.1207/s15327914nc5101_14)
- Cook, M. T., Tzortzis, G., Charalampopoulos, D., & Khutoryanskiy, V. V. (2012). Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. *Journal of Controlled Release*, 162(1), 56–67. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.06.003>
- Cook, M. T., Tzortzis, G., Khutoryanskiy, V. V., & Charalampopoulos, D. (2013). Layer-by-layer coating of alginate matrices with chitosan-alginate for the improved survival and targeted delivery of probiotic bacteria after oral administration. *Journal of Materials Chemistry B*, 1, 52–60.
- Corona-Hernandez, R. I., Alvarez-Parilla, E., Lizardi-mendoza, J., Islas-rubio, A. R., De La Rosa, L. A., & Wall-medrano, A. (2013). Structural Stability and Viability of Microencapsulated Probiotic Bacteria : A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12, 614–628. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12030>
- Costabile, A., Fava, F., Röytiö, H., Forssten, S. D., Olli, K., Klievink, J., et al. (2012). 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>
- Cruz, A. G., Antunes, A. E. C., Sousa, A. L. O. P., Faria, J. A. F., & Saad, S. M. I. (2009).

Ice-cream as a probiotic food carrier. *Food Research International*, 42(9), 1233–1239. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.03.020>

Dafe, A., Etemadi, H., Dilmaghani, A., & Mahdavinia, G. R. (2017). Investigation of pectin/starch hydrogel as a carrier for oral delivery of probiotic bacteria. *International Journal of Biological Macromolecules*, 97, 536–543. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.01.060>

Dafe, A., Etemadi, H., Zarredar, H., & Mahdavinia, G. R. (2017). Development of novel carboxymethyl cellulose/k-carrageenan blends as an enteric delivery vehicle for probiotic bacteria. *International Journal of Biological Macromolecules*, 97, 299–307. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.01.016>

Darjani, P., Hosseini Nezhad, M., Kadkhodae, R., & Milani, E. (2016). Influence of prebiotic and coating materials on morphology and survival of a probiotic strain of *Lactobacillus casei* exposed to simulated gastrointestinal conditions. *LWT - Food Science and Technology*, 73, 162–167. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.05.032>

Davani-Davari, D., Negahdaripour, M., Karimzadeh, I., Seifan, M., Mohkam, M., Masoumi, S. J., et al. (2019). Prebiotics: Definition, types, sources, mechanisms, and clinical applications. *Foods*, 8(3), 1–27. <https://doi.org/10.3390/foods8030092>

De Brabandere, A. G., & De Baerdemaeker, J. G. (1999). Effects of process conditions on the pH development during yogurt fermentation. *Journal of Food Engineering*, 41(3), 221–227. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(99\)00096-5](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(99)00096-5)

De Castro-Cislaghi, F. P., Silva, C. D. R. E., Fritzen-Freire, C. B., Lorenz, J. G., & Sant'Anna, E. S. (2012). Bifidobacterium BB-12 microencapsulated by spray drying with whey: Survival under simulated gastrointestinal conditions, tolerance to NaCl, and viability during storage. *Journal of Food Engineering*, 113(2), 186–193. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.06.006>

De Prisco, A., & Mauriello, G. (2016). Probiotication of foods: A focus on microencapsulation tool. *Trends in Food Science and Technology*, 48, 27–39. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.11.009>

De Vos, P., Faas, M. M., Spasojevic, M., & Sikkema, J. (2010). Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal*, 20, 292–302. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2009.11.008>

De Vrese, M., Kristen, H., Rautenberg, P., Laue, C., & Schrezenmeir, J. (2011). Probiotic lactobacilli and bifidobacteria in a fermented milk product with added fruit preparation reduce antibiotic associated diarrhea and *Helicobacter pylori* activity. *Journal of Dairy Research*, 78(4), 396–403. <https://doi.org/10.1017/S002202991100063X>

Demers-Mathieu, V., St-Gelais, D., Audy, J., Laurin, E., & Fliss, I. (2016). Effect of the low-fat Cheddar cheese manufacturing process on the viability of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei/casei*, and *Lactobacillus plantarum* isolates. *Journal of Functional Foods*, 24, 327–337. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.04.025>

Dewulf, E. M., Cani, P. D., Claus, S. P., Fuentes, S., Puylaert, P. G. B., Neyrinck, A. M., et al. (2013). Insight into the prebiotic concept: Lessons from an exploratory, double blind intervention study with inulin-type fructans in obese women. *Gut*, *62*(8), 1112–1121. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-303304>

Di Criscio, T., Fratianni, A., Mignogna, R., Cinquanta, L., Coppola, R., Sorrentino, E., & Panfili, G. (2010). Production of functional probiotic, prebiotic, and synbiotic ice creams. *Journal of dairy science*, *93*(10), 4555–64. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3355>

Dianawati, D., Mishra, V., & Shah, N. P. (2016). Survival of Microencapsulated Probiotic Bacteria after Processing and during Storage : A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *56*(10), 1685–1716. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.798779>

Dianawati, D., & Shah, N. P. (2011). Enzyme Stability of Microencapsulated *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* Bb12 after Freeze Drying and during Storage in Low Water Activity at Room Temperature. *Journal of Food Science*, *76*(6). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02246.x>

Dimitrellou, D., Kandyli, P., Lević, S., Petrović, T., Ivanović, S., Nedović, V., & Kourkoutas, Y. (2019). Encapsulation of *Lactobacillus casei* ATCC 393 in alginate capsules for probiotic fermented milk production. *LWT - Food Science and Technology*, *116*, 108501. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108501>

Ding, W. K., & Shah, N. P. (2009). Effect of various encapsulating materials on the stability of probiotic bacteria. *Journal of Food Science*, *74*(2). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01067.x>

Doherty, S. B., Gee, V. L., Ross, R. P., Stanton, C., Fitzgerald, G. F., & Brodkorb, A. (2011). Development and characterisation of whey protein micro-beads as potential matrices for probiotic protection. *Food Hydrocolloids*, *25*(6), 1604–1617. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.12.012>

Donkor, O. N., Henriksson, A., Singh, T. K., Vasiljevic, T., & Shah, N. P. (2007). ACE-inhibitory activity of probiotic yoghurt. *International Dairy Journal*, *17*(11), 1321–1331. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.02.009>

Đorđević, V., Balanč, B., Belščak-Cvitanović, A., Lević, S., Trifković, K., Kalušević, A., et al. (2014). Trends in Encapsulation Technologies for Delivery of Food Bioactive Compounds. *Food Engineering Reviews*, *7*(4), 452–490. <https://doi.org/10.1007/s12393-014-9106-7>

Dutra, M., Weber, F., Diaz, P., Oliveira, D., Rochedo, F., Scherer, R., et al. (2019). Symbiotic microencapsulation of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* R7 using whey and inulin by spray drying. *LWT - Food Science and Technology*, *115*(July), 108411. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108411>

EC. (2006). Regulation (EC) No. 1924/2006 of the European Parliament and of the Council of 20 December 2006 on nutrition and health claims made on foods. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2006R1924:20080304:EN:PD>

## F

- EC. (2018). EU Register on nutrition and health claims made on foods., 1–866.
- EFSA. (2005). Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA related to a generic approach to the safety assessment by EFSA of microorganisms used in food/feed and the production of food/feed additives. *EFSA Journal*, 3(226), 1–12. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2005.226>
- EFSA. (2007). Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA on the introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA. *The EFSA Journal*, (587), 1–16. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2007.587>
- Eratte, D., Dowling, K., Barrow, C. J., & Adhikari, B. (2018). Recent advances in the microencapsulation of omega-3 oil and probiotic bacteria through complex coacervation: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 71(September 2016), 121–131. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.10.014>
- Erkaya, T., Şengül, M., Ürkek, B., & Çetin, B. (2015). Probiotic butter: Stability, free fatty acid composition and some quality parameters during refrigerated storage. *International Dairy Journal*, 49, 102–110. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.04.011>
- Etchepare, M. D. A., Nunes, G. L., Nicoloso, B. R., Smanioto, J., Marlon, E., Flores, M., et al. (2020). Improvement of the viability of encapsulated probiotics using whey proteins. *LWT - Food Science and Technology*, 117(September 2019), 108601. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108601>
- EU. (2015). Regulation (EU) 2015/2283 of the European Parliament and of the Council of 25 November 2015 on novel foods, amending Regulation (EU) No 1169/2011 of the European Parliament and of the Council and repealing Regulation (EC) No 258/97 etc. *Official Journal of the European Union*, 327, 1–22.
- Fang, Z., & Bhandari, B. (2012). Spray drying, freeze drying and related processes for food ingredient and nutraceutical encapsulation. In N. Garti & D. J. McClements (Eds.), *Encapsulation Technologies and Delivery Systems for Food Ingredients and Nutraceuticals* (pp. 73–109). Elsevier Masson SAS. <https://doi.org/10.1016/B978-0-85709-124-6.50004-4>
- FAO/WHO. (2001). Probiotics in food: Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. *FAO Food and Nutrition Paper*, 85. <https://doi.org/10.1201/9781420009613.ch16>
- FAO/WHO CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. (2019). Discussion Paper on Harmonized Probiotic Guidelines for Use in Foods and Dietary Supplements. Agenda Item 11, CX/NFSDU 19/41/11, Dusseldorf, Germany.
- Farias, T. G. S. de, Ladislau, H. F. L., Stamford, T. C. M., Medeiros, J. A. C., Soares, B. L. M., Stamford Arnaud, T. M., & Stamford, T. L. M. (2019). Viabilities of *Lactobacillus rhamnosus* ASCC 290 and *Lactobacillus casei* ATCC 334 (in free form or encapsulated with calcium alginate-chitosan) in yellow mombin ice cream. *LWT - Food Science and*

- Technology*, 100(October 2018), 391–396. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.10.084>
- Foligné, B., Daniel, C., & Pot, B. (2013). Probiotics from research to market: The possibilities, risks and challenges. *Current Opinion in Microbiology*, 16(3), 284–292. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.06.008>
- Frakolaki, G., Giannou, V., Kekos, D., & Tzia, C. (2020). A review of the microencapsulation techniques for the incorporation of probiotic bacteria in functional foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1–22. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1761773>
- Frakolaki, G., Giannou, V., Topakas, E., & Tzia, C. (2021). Effect of various encapsulating agents On the beads' morphology and the viability of cells during BB-12 encapsulation through extrusion. *Journal of Food Engineering*, 294, 110423. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.110423>
- Frakolaki, G., Katsouli, M., Giannou, V., & Tzia, C. (2020). Novel encapsulation approach for Bifidobacterium subsp. lactis (BB-12) viability enhancement through its incorporation into a double emulsion prior to the extrusion process. *LWT - Food Science and Technology*, 130(May), 109671. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109671>
- Fritzen-Freire, C. B., Prudêncio, E. S., Amboni, R. D. M. C., Pinto, S. S., Negrão-Murakami, A. N., & Murakami, F. S. (2012). Microencapsulation of bifidobacteria by spray drying in the presence of prebiotics. *Food Research International*, 45(1), 306–312. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.09.020>
- Fritzen-freire, C. B., Prudêncio, E. S., Pinto, S. S., Muñoz, I. B., & Amboni, R. D. M. C. (2013). Effect of microencapsulation on survival of Bifidobacterium BB-12 exposed to simulated gastrointestinal conditions and heat treatments. *LWT - Food Science and Technology*, 50(1), 39–44. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.07.037>
- 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/Staerke*, 63(7), 406–415. <https://doi.org/10.1002/star.201000099>
- Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 66(5), 365–378. <https://doi.org/10.1111/jam.1989.66.issue-5>
- Gandomi, H., Abbaszadeh, S., Misaghi, A., Bokaie, S., & Noori, N. (2016). Effect of chitosan-alginate encapsulation with inulin on survival of Lactobacillus rhamnosus GG during apple juice storage and under simulated gastrointestinal conditions. *LWT - Food Science and Technology*, 69, 365–371. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.01.064>
- Gaonkar, A., Vasisht, N., Khare, A., & Sobel, R. (2014). *Microencapsulation in the Food Industry A Practical Implementation Guide*. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Gebara, C., Chaves, K. S., Ribeiro, M. C. E., Souza, F. N., Grosso, C. R. F., & Gigante, M. L. (2013). Viability of Lactobacillus acidophilus La5 in pectin-whey protein microparticles during exposure to simulated gastrointestinal conditions. *Food Research International*, 51(2), 872–878.

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.02.008>

Gerez, C. L., de Valdez, G. F., Gigante, M. L., & Grosso, C. R. F. (2012). Whey protein coating bead improves the survival of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* CRL 1505 to low pH. *Letters in Applied Microbiology*, 54(6), 552–556. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2012.03247.x>

Gharehbeiglou, P., Mahdi, S., Homayouni, A., & Hamishekar, H. (2019). Fabrication of double W1/O/W2 nano-emulsions loaded with oleuropein in the internal phase (W1) and evaluation of their release rate. *Food Hydrocolloids*, 89(October 2018), 44–55.

Ghorani, B., & Tucker, N. (2015). Fundamentals of electrospinning as a novel delivery vehicle for bioactive compounds in food nanotechnology. *Food Hydrocolloids*, 51, 227–240. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.05.024>

Gibson, G.R., Scott, K. P., Rastall, R. A., Tuohy, K. M., Hotchkiss, A., Dubert-Ferrandon, A., et al. (2010). Dietary prebiotics: current status and new definition. *Food Science & Technology Bulletin: Functional Foods*, 7(1), 1–19. <https://doi.org/10.1616/1476-2137.15880>

Gibson, G R, & Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *The Journal of nutrition*, 125(6), 1401–1412. <https://doi.org/10.1079/NRR200479>

Gibson, Glenn R., Hutkins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., et al. (2017). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 14(8), 491–502. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>

Gibson, Glenn R., Probert, H. M., Loo, J. Van, Rastall, R. A., & Roberfroid, M. B. (2004). Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews*, 17(2), 259–275. <https://doi.org/10.1079/nrr200479>

Gibson, Glenn R., Scott, K. P., Rastall, R. a., Tuohy, K. M., Hotchkiss, A., Dubert-Ferrandon, A., et al. (2010). Dietary prebiotics: current status and new definition. *Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods*, 7(January), 1–19. <https://doi.org/10.1616/1476-2137.15880>.

Gomes, A. A., Braga, S. P., Cruz, A. G., Cadena, R. S., Lollo, P. C. B., Carvalho, C., et al. (2011). Effect of the inoculation level of *Lactobacillus acidophilus* in probiotic cheese on the physicochemical features and sensory performance compared with commercial cheeses. *Journal of Dairy Science*, 94(10), 4777–4786. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4175>

Gomez-Mascaraque, L. G., Morfin, R. C., Pérez-Masiá, R., Sanchez, G., & Lopez-Rubio, A. (2016). Optimization of electrospinning conditions for the microencapsulation of probiotics and evaluation of their resistance during storage and in-vitro digestion. *LWT - Food Science and Technology*, 69, 438–446. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.01.071>

Gul, O. (2017). Microencapsulation of *Lactobacillus casei* Shirota by spray drying using different combinations of wall materials and application for probiotic dairy dessert. *Journal of Food Processing and Preservation*, (April 2016), e13198. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13198>

Hansen, L. T., Allan-Wojtas, P. ., Jin, Y. ., & Paulson, A. . (2002). Survival of Ca-alginate microencapsulated Bifidobacterium spp. in milk and simulated gastrointestinal conditions. *Food Microbiology*, 19(1), 35–45. <https://doi.org/10.1006/fmic.2001.0452>

Heidebach, T., Först, P., & Kulozik, U. (2009). Microencapsulation of probiotic cells by means of rennet-gelation of milk proteins. *Food Hydrocolloids*, 23(7), 1670–1677. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.01.006>

Her, J., Kim, M. S., & Lee, K. (2015). Preparation of probiotic powder by the spray freeze-drying method. *Journal of Food Engineering*, 150, 70–74. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.10.029>

Herman, L., Chemaly, M., Cocconcelli, P. S., Fernandez, P., Klein, G., Peixe, L., et al. (2019). The qualified presumption of safety assessment and its role in EFSA risk evaluations: 15 years past. *FEMS Microbiology Letters*, 366(1), 1–7. <https://doi.org/10.1093/femsle/fny260>

Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., et al. (2014). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 11(August 2014), 9. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>

Holkem, A. T., Raddatz, G. C., Barin, J. S., Moraes Flores, É. M., Muller, E. I., Codevilla, C. F., et al. (2016). Production of microcapsules containing Bifidobacterium BB-12 by emulsification/internal gelation. *LWT - Food Science and Technology*, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.07.013>

Holkem, A. T., Raddatz, G. C., Barin, J. S., Moraes Flores, É. M., Muller, E. I., Codevilla, C. F., et al. (2017). Production of microcapsules containing Bifidobacterium BB-12 by emulsification/internal gelation. *LWT - Food Science and Technology*, 76, 216–221. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.07.013>

Homayouni, A., Azizi, A., Ehsani, M. R., Yarmand, M. S., & Razavi, S. H. (2008). Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream. *Food Chemistry*, 111(1), 50–55. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.03.036>

Huang, S., Cauty, C., Dolivet, A., Le Loir, Y., Chen, X. D., Schuck, P., et al. (2016). Double use of highly concentrated sweet whey to improve the biomass production and viability of spray-dried probiotic bacteria. *Journal of Functional Foods*, 23, 453–463. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.02.050>

Huang, S., Vignolles, M. L., Chen, X. D., Le Loir, Y., Jan, G., Schuck, P., & Jeantet, R. (2017). Spray drying of probiotics and other food-grade bacteria: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 63, 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.02.007>



Huq, T., Fraschini, C., Khan, A., Riedl, B., Bouchard, J., & Lacroix, M. (2017). Alginate based nanocomposite for microencapsulation of probiotic: Effect of cellulose nanocrystal (CNC) and lecithin. *Carbohydrate Polymers*, 168, 61–69. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.03.032>

ISAPP. (2018). ISAPP position statement on minimum criteria for harmonizing global regulatory approaches for probiotics in foods and supplements. Background and aim, 5. <https://4cau4jsaler1zglkq3wnmje1-wpengine.netdna-ssl.com/wp-content/uploads/2018/10/summary-document-probiotics-criteria-ISAPP.pdf>

Ishwarya, S. P., Anandharamakrishnan, C., & Stapley, A. G. F. (2015). Spray-freeze-drying: A novel process for the drying of foods and bioproducts. *Trends in Food Science and Technology*, 41(2), 161–181. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.10.008>

IUPAC. (1997). Coacervation. *IUPAC Compendium of Chemical Terminology*. <https://doi.org/10.1351/goldbook.C01116>

Jantarathin, S., Borompichaichartkul, C., & Sanguandeekul, R. (2017). Microencapsulation of probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules and its effect on viability under heat process in shrimp feeding. *Materials Today: Proceedings*, 4(5), 6166–6172. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2017.06.111>

Jantzen, M., Göpel, A., & Beermann, C. (2013). Direct spray drying and microencapsulation of probiotic *Lactobacillus reuteri* from slurry fermentation with whey. *Journal of Applied Microbiology*, 115(4), 1029–1036. <https://doi.org/10.1111/jam.12293>

Jungersen, M., Wind, A., Johansen, E., Christensen, J., Stuer-Lauridsen, B., & Eskesen, D. (2014). The Science behind the Probiotic Strain *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12<sup>®</sup>. *Microorganisms*, 2(2), 92–110. <https://doi.org/10.3390/microorganisms2020092>

Kailasapathy, K. (2006). Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt. *LWT - Food Science and Technology*, 39(10), 1221–1227. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.07.013>

Kailasapathy, K. (2009). Encapsulation technologies for functional foods and nutraceutical product development. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, 4(033), 19. <https://doi.org/10.1079/PAVSNNR20094033>

Kailasapathy, K., & Sultana, K. (2003). Survival and  $\beta$ -D-galactosidase activity of encapsulated and free *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in ice cream. *Australian Journal of Dairy Technology*, 58(3), 223–227.

Kamalian, N., Mirhosseini, H., Mustafa, S., & Manap, M. Y. A. (2014). Effect of alginate and chitosan on viability and release behavior of *Bifidobacterium pseudocatenulatum* G4 in simulated gastrointestinal fluid. *Carbohydrate Polymers*, 111, 700–706. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.05.014>

Kearney, L., Upton, M., & Mcloughlin, A. (1990). Meat fermentations with immobilized lactic acid bacteria. *Applied Microbiology Biotechnology*, 33, 648–651.

- Kemsawasd, V., Chaikham, P., & Rattanasena, P. (2016). Survival of immobilized probiotics in chocolate during storage and with an in vitro gastrointestinal model. *Food Bioscience*, *16*(February), 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2016.09.001>
- Khalil, A. H., & Mansour, E. H. (1998). Alginate encapsulated bifidobacteria survival in mayonnaise. *Journal of Food Science*, *63*(4), 702–705. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1998.tb15817.x>
- Khosravi Zanjani, M. A., Ehsani, M. R., Tarzi, B. G., & Sharifan, A. (2018). Promoting Probiotics Survival by Microencapsulation with Hylon Starch and Genipin Cross-linked Coatings in Simulated Gastro-intestinal Condition and Heat Treatment. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, *17*(2), 753–766.
- Khosravi Zanjani, M. A., Tarzi, B. G., Sharifan, A., & Mohammadi, N. (2014). Microencapsulation of probiotics by calcium alginate-gelatinized starch with chitosan coating and evaluation of survival in simulated human gastro-intestinal condition. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, *13*(3), 843–852.
- Khosravi Zanjani, M. A., Tarzi, B. G., Sharifan, A., Mohammadi, N., Bakhoda, H., & Madanipour, M. M. (2012). Microencapsulation of Lactobacillus casei with calcium alginate-resistant starch and evaluation of survival and sensory properties in cream-filled cake. *African Journal of Microbiology Research*, *6*(26), 5511–5517. <https://doi.org/10.5897/AJMR12.972>
- Klindt-Toldam, S., Larsen, S. K., Saaby, L., Olsen, L. R., Svenstrup, G., Müllertz, A., et al. (2016). Survival of Lactobacillus acidophilus NCFM® and Bifidobacterium lactis HN019 encapsulated in chocolate during in vitro simulated passage of the upper gastrointestinal tract. *LWT - Food Science and Technology*, *74*, 404–410. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.07.053>
- Klu, Y. A. K., & Chen, J. (2015). Effect of peanut butter matrices on the fate of probiotics during simulated gastrointestinal passage. *LWT - Food Science and Technology*, *62*(2), 983–988. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.02.018>
- Klu, Y. A. K., Phillips, R. D., & Chen, J. (2014). Survival of four commercial probiotic mixtures in full fat and reduced fat peanut butter. *Food Microbiology*, *44*, 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.04.018>
- Krasaekoopt, W., & Watcharapoka, S. (2014). Effect of addition of inulin and galactooligosaccharide on the survival of microencapsulated probiotics in alginate beads coated with chitosan in simulated digestive system, yogurt and fruit juice. *LWT - Food Science and Technology*, *57*(2), 761–766. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.01.037>
- Krasaekoopt, Wunwisa, Bhandari, B., & Deeth, H. (2003). Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal*, *13*(1), 3–13. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(02\)00155-3](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(02)00155-3)
- Laličić-Petronijević, J., Popov-Raljić, J., Lazić, V., Pezo, L., & Nedović, V. (2017). Synergistic effect of three encapsulated strains of probiotic bacteria on quality parameters of chocolates with different composition. *Journal of Functional Foods*, *38*, 329–337. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.09.041>

- Lalicic-Petronijevic, J., Popov-Raljić, J., Obradović, D., Radulović, Z., Paunović, D., Petrušić, M., & Pezo, L. (2015). Viability of probiotic strains *Lactobacillus acidophilus* NCFM<sup>??</sup> and *Bifidobacterium lactis* HN019 and their impact on sensory and rheological properties of milk and dark chocolates during storage for 180 days. *Journal of Functional Foods*, *15*, 541–550. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.03.046>
- Lalou, S., Kadri, H. El, & Gkatzionis, K. (2017). Incorporation of water-in-oil-in-water (W1/O/W2) double emulsion in a set-type yogurt model. *Food Research International*, *100*(June), 122–131. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.08.027>
- Langa, S., Peirotén, A., Gaya, P., Garde, S., Arqués, J. L., Nuñez, M., et al. (2020). Human *Bifidobacterium* strains as adjunct cultures in Spanish sheep milk cheese. *Journal of Dairy Science*, *103*(9), 7695–7706. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18203>
- Leylak, C., Özdemir, K. S., Gurakan, G. C., & Ogel, Z. B. (2021). Optimisation of spray drying parameters for *Lactobacillus acidophilus* encapsulation in whey and gum Arabic: Its application in yoghurt. *International Dairy Journal*, *112*. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104865>
- Li, H., Zhang, T., Li, C., Zheng, S., Li, H., & Yu, J. (2020). Food Science and Technology Development of a microencapsulated synbiotic product and its application in yoghurt. *LWT - Food Science and Technology*, *122*(January), 109033. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109033>
- Li, M., Jin, Y., Wang, Y., Meng, L., Zhang, N., Sun, Y., et al. (2019). Preparation of *Bifidobacterium breve* encapsulated in low methoxyl pectin beads and its effects on yogurt quality. *Journal of Dairy Science*, *102*(6), 4832–4843. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15597>
- Lin, T., Shu, C., Lai, W., Tzeng, C., & Lai, H. (2019). Investiture of next generation probiotics on amelioration of diseases – Strains do matter. *Medicine in Microecology*, *1–2*(December), 100002. <https://doi.org/10.1016/j.medmic.2019.100002>
- Liserre, A. M., Ré, M. I., & Franco, B. D. G. M. (2007). Microencapsulation of *Bifidobacterium animalis* subs. *lactis* in Modified Alginate-chitosan Beads and Evaluation of Survival in Simulated Gastrointestinal Conditions. *Food Biotechnology*, *21*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1080/08905430701191064>
- Ma, J., Xu, C., Yu, H., Feng, Z., Yu, W., Gu, L., et al. (2021). Electro-encapsulation of probiotics in gum Arabic-pullulan blend nanofibres using electrospinning technology. *Food Hydrocolloids*, *111*(August 2020), 106381. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106381>
- Macfarlane, G. T., Steed, H., & Macfarlane, S. (2008). Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. *Journal of Applied Microbiology*, *104*(2), 305–344. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03520.x>
- Malmö, C., La Stora, A., & Mauriello, G. (2013). Microencapsulation of *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 Cells Coated in Alginate Beads with Chitosan by Spray Drying to Use as a Probiotic Cell in a Chocolate Soufflé. *Food and Bioprocess Technology*, *6*(3), 795–805. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0755-8>

- Mandal, S., Puniya, A. K., & Singh, K. (2006). Effect of alginate concentrations on survival of microencapsulated *Lactobacillus casei* NCDC-298. *International Dairy Journal*, *16*(10), 1190–1195. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.10.005>
- Maragkoudakis, P. A., Miaris, C., Rojez, P., Manalis, N., Magkanari, F., Kalantzopoulos, G., & Tsakalidou, E. (2006). Production of traditional Greek yoghurt using *Lactobacillus* strains with probiotic potential as starter adjuncts. *International Dairy Journal*, *16*(1), 52–60. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.12.013>
- Marefati, A., Pitsiladis, A., Oscarsson, E., Ilestam, N., & Bergenståhl, B. (2021). Encapsulation of *Lactobacillus reuteri* in W1/O/W2 double emulsions: Formulation, storage and in vitro gastro-intestinal digestion stability. *LWT - Food Science and Technology*, *146*. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111423>
- Martin, M. J., Lara-Villoslada, F., Ruiz, M. A., & Morales, M. E. (2013). Effect of unmodified starch on viability of alginate-encapsulated *Lactobacillus fermentum* CECT5716. *LWT - Food Science and Technology*, *53*(2), 480–486. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.03.019>
- Martín, M. J., Lara-Villoslada, F., Ruiz, M. A., & Morales, M. E. (2015). Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *27*, 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2014.09.010>
- Mendes, A. C., & Chronakis, I. S. (2021). Electrohydrodynamic encapsulation of probiotics: A review. *Food Hydrocolloids*, *117*(February), 106688. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106688>
- Meybodi, N. M., Mortazavian, A. M., Arab, M., & Nematollahi, A. (2020). Probiotic viability in yoghurt: A review of influential factors. *International Dairy Journal*, *109*, 104793. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104793>
- Minj, S., & Anand, S. (2021). Development of a spray-dried conjugated whey protein hydrolysate powder with entrapped probiotics. *Journal of Dairy Science*. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-20978>
- Misra, S., Pandey, P., & Mishra, H. N. (2021). Novel approaches for co-encapsulation of probiotic bacteria with bioactive compounds, their health benefits and functional food product development: A review. *Trends in Food Science and Technology*, *109*(October 2020), 340–351. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.039>
- Mohanty, D., Misra, S., Mohapatra, S., & Sahu, P. S. (2018). Prebiotics and synbiotics: Recent concepts in nutrition. *Food Bioscience*, *26*(October), 152–160. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2018.10.008>
- Mortazavian, A. M., Reshani, M., Mousavi, S. M., Reinheimer, J. A., Emamdjomeh, Z., Sohrabvandi, S., & Rezaei, K. (2006). Preliminary investigation of the combined effect of heat treatment and incubation temperature on the viability of the probiotic microorganisms in freshly made yogurt. *International Journal of Dairy Technology*, *59*(1), 8–11.
- Mortazavian, A., Razavi, S. H., Ehsani, M. R., & Sohrabvandi, S. (2007). Principles and

methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 5(1), 1–18.

Muthukumarasamy, P., & Holley, R. A. (2006). Microbiological and sensory quality of dry fermented sausages containing alginate-microencapsulated *Lactobacillus reuteri*. *International Journal of Food Microbiology*, 111(2), 164–169. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.04.036>

Nag, A., & Das, S. (2013). Improving ambient temperature stability of probiotics with stress adaptation and fluidized bed drying. *Journal of Functional Foods*, 5(1), 170–177. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2012.10.001>

Nedovic, V., Kalusevic, A., Manojlovic, V., Levic, S., & Bugarski, B. (2011). An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science*, 1, 1806–1815. <https://doi.org/10.1016/j.profoo.2011.09.265>

Ningtyas, D. W., Bhandari, B., Bansal, N., & Prakash, S. (2019). The viability of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* (non-encapsulated and encapsulated) in functional reduced-fat cream cheese and its textural properties during storage. *Food Control*, 100(November 2018), 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.12.048>

Nunes, G. L., Araújo, M. De, José, A., Queiroz, L., Jacob, E., Smanioto, J., et al. (2018). Inulin, hi-maize, and trehalose as thermal protectants for increasing viability of *Lactobacillus acidophilus* encapsulated by spray drying. *LWT - Food Science and Technology*, 89, 128–133. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.10.032>

Nuraida, L. (2015). A review: Health promoting lactic acid bacteria in traditional Indonesian fermented foods. *Food Science and Human Wellness*, 4(2), 47–55. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2015.06.001>

Obradović, N., Volić, M., Nedović, V., Rakin, M., & Bugarski, B. (2022). Microencapsulation of probiotic starter culture in protein-carbohydrate carriers using spray and freeze-drying processes: Implementation in whey-based beverages. *Journal of Food Engineering*, 321(January). <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2022.110948>

Olivares, A., & Silva, P. (2019). Viability dataset on microencapsulated probiotics: Sodium alginate viscosity effect. *Data in brief*, 27, 104735. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2019.104735>

Oliveira, M. E. G., Garcia, E. F., Oliveira, C. E. V., Gomes, A. M. P., Pintado, M. M. E., Madureira, A. R. F. M., et al. (2014). Addition of probiotic bacteria in a semi-hard goat cheese (coalho): Survival to simulated gastrointestinal conditions and inhibitory effect against pathogenic bacteria. *Food Research International*, 64, 241–247. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.06.032>

Østlie, H. M., Treimo, J., & Narvhus, J. A. (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>

Pankasemsuk, T., Apichartsrangkoon, A., Worametrachanon, S., & Techarang, J. (2016). Encapsulation of *Lactobacillus casei* 01 by alginate along with hi-maize starch for exposure to a simulated gut model. *Food Bioscience*, 16, 32–36.

<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2016.07.001>

Pasqualin Cavalheiro, C., Ruiz-Capillas, C., Herrero, A. M., Jiménez-Colmenero, F., Ragagnin de Menezes, C., & Martins Fries, L. L. (2015). Application of probiotic delivery systems in meat products. *Trends in Food Science and Technology*, *46*(1), 120–131. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.09.004>

Pedroso, D. de L., Thomazini, M., Heinemann, R. J. B., & Favaro-Trindade, C. S. (2012). Protection of *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus acidophilus* by microencapsulation using spray-chilling. *International Dairy Journal*, *26*(2), 127–132. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.04.008>

Pérez-Chabela, M. L., Lara-Labastida, R., Rodríguez-Huezo, E., & Totosaus, A. (2013). Effect of Spray Drying Encapsulation of Thermotolerant Lactic Acid Bacteria on Meat Batters Properties. *Food and Bioprocess Technology*, *6*(6), 1505–1515. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0865-y>

Pimentel-González, D. J., Campos-Montiel, R. G., Lobato-Calleros, C., Pedroza-Islas, R., & Vernon-Carter, E. J. (2009). Encapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* in double emulsions formulated with sweet whey as emulsifier and survival in simulated gastrointestinal conditions. *Food Research International*, *42*(2), 292–297. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2008.12.002>

Pineiro, M., Asp, N. G., Reid, G., Macfarlane, S., Morelli, L., Brunser, O., & Tuohy, K. (2008). FAO Technical meeting on prebiotics. *Journal of clinical gastroenterology*, *42 Suppl 3*(September), 156–159. <https://doi.org/10.1097/mcg.0b013e31817f184e>

Pineiro, M., & Stanton, C. (2007). Probiotic Bacteria: Legislative Framework-Requirements to Evidence Basis. *Journal of Nutrition*, *137*(3), 850S – 853.

Pinto, S. S., Fritzen-Freire, C. B., Dias, C. O., & Amboni, R. D. M. C. (2019). A potential technological application of probiotic microcapsules in lactose-free Greek-style yoghurt. *International Dairy Journal*, *97*, 131–138. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2019.05.009>

Possemiers, S., Marzorati, M., Verstraete, W., & Van de Wiele, T. (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>

Preedy, V. R., & Watson, R. R. (2016). *Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics: Bioactive Foods in Health Promotion*. Academic Press, USA.

Raddatz, G. C., de Souza da Fonseca, B., Poletto, G., Jacob-Lopes, E., Cichoski, A. J., Muller, E. I., et al. (2020). Influence of the prebiotics hi-maize, inulin and rice bran on the viability of pectin microparticles containing *Lactobacillus acidophilus* LA-5 obtained by internal gelation/emulsification. *Powder Technology*, *362*, 409–415. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2019.11.114>

Raddatz, G. C., Poletto, G., Deus, C. De, Franco, C., Cichoski, A. J., Jacob-lobes, E., et al. (2019). Use of prebiotic sources to increase probiotic viability in pectin microparticles obtained by emulsification/internal gelation followed by freeze-drying. *Food Research*

*International*, 108902. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108902>

Ramos, P. E., Silva, P., Alario, M. M., Pastrana, L. M., Teixeira, J. A., Cerqueira, M. A., & Vicente, A. A. (2017). Effect of alginate molecular weight and M/G ratio in beads properties foreseeing the protection of probiotics. *Food Hydrocolloids journal*, 77, 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.08.031>

Ranadheera, C. S., Evans, C. A., Adams, M. C., & Baines, S. K. (2012). In vitro analysis of gastrointestinal tolerance and intestinal cell adhesion of probiotics in goat's milk ice cream and yogurt. *Food Research International*, 49(2), 619–625. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.09.007>

Ranadheera, R. D. C. S., Baines, S. K., Adams, M. C., Ishwarya, S. P., Anandharamakrishnan, C., Stapley, A. G. F., et al. (2010). Importance of food in probiotic efficacy. *Food Research International*, 43, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.profoo.2011.09.265>

Rather, S. A., Akhter, R., Masoodi, F. A., Gani, A., & Wani, S. M. (2017). Effect of double alginate microencapsulation on in vitro digestibility and thermal tolerance of *Lactobacillus plantarum* NCDC201 and *L. casei* NCDC297. *LWT - Food Science and Technology*, 83, 50–58. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.04.036>

Rathore, S., Desai, P. M., Liew, C. V., Chan, L. W., & Heng, P. W. S. (2013). Microencapsulation of microbial cells. *Journal of Food Engineering*, 116(2), 369–381. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.12.022>

Ravindran, S., Williams, M. A. K., Ward, R. L., & Gillies, G. (2018). Understanding how the properties of whey protein stabilized emulsions depend on pH, ionic strength and calcium concentration, by mapping environmental conditions to zeta potential. *Food hydrocolloids*, 79, 572–578. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.12.003>

Razavi, S., Janfaza, S., Tasnim, N., Gibson, D. L., & Hoorfar, M. (2021). Nanomaterial-based encapsulation for controlled gastrointestinal delivery of viable probiotic bacteria. *Nanoscale Advances*, 3(10), 2699–2709. <https://doi.org/10.1039/d0na00952k>

Reid, A. A., Champagne, C. P., Gardner, N., Fustier, P., & Vuilleumard, J. C. (2007). Survival in food systems of *Lactobacillus rhamnosus* R011 microentrapped in whey protein gel particles. *Journal of food science*, 72(1), 31–37. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00222.x>

Reid, G., Sanders, M. E., Gaskins, H. R., Gibson, G. R., Mercenier, A., Rastall, R., et al. (2003). New scientific paradigms for probiotics and prebiotics. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 37(2), 105–118. <https://doi.org/10.1097/00004836-200308000-00004>

Ribeiro, M. C. E., Chaves, K. S., Gebara, C., Infante, F. N. S., Grosso, C. R. F., & Gigante, M. L. (2014). Effect of microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 on physicochemical, sensory and microbiological characteristics of stirred probiotic yoghurt. *Food Research International*, 66, 424–431. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.10.019>

- Rodrigues, D., Sousa, S., Rocha-Santos, T., Silva, J. P., Sousa Lobo, J. M., Costa, P., et al. (2011). Influence of l-cysteine, oxygen and relative humidity upon survival throughout storage of probiotic bacteria in whey protein-based microcapsules. *International Dairy Journal*, 21(11), 869–876. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.05.005>
- Rosas-Flores, W., Ramos-Ramírez, E. G., & Salazar-Montoya, J. A. (2013). Microencapsulation of *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus delbrueckii* using alginate and gellan gum. *Carbohydrate Polymers*, 98(1), 1011–1017. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.06.077>
- Saad, N., Delattre, C., Urdaci, M., Schmitter, J. M., & Bressollier, P. (2013). An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *LWT - Food Science and Technology*, 50(1), 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.05.014>
- Saarela, M. (2009). Probiotics as ingredients in functional beverages. In P. Paquin (Ed.), *Functional and Speciality Beverage Technology* (pp. 55–70). Woodhead Publishing Limited. <https://doi.org/10.1533/9781845695569.1.55>
- Saarela, M. H. (2019). Safety aspects of next generation probiotics. *Current Opinion in Food Science*, 30, 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.09.001>
- Sabikhi, L., Babu, R., Thompkinson, D. K., & Kapila, S. (2010). Resistance of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* LA1 to processing treatments and simulated gut conditions. *Food and Bioprocess Technology*, 3(4), 586–593. <https://doi.org/10.1007/s11947-008-0135-1>
- Sagis, L. M. C. (2015). *Microencapsulation and Microspheres for Food Applications*. Academic Press. USA. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Sanders, M. E., Akkermans, L. M. A., Haller, D., Hammerman, C., Heimbach, J., Hörmannspenger, G., et al. (2010). Safety assessment of probiotics for human use. *Gut microbes*, 1(3), 164–185. <https://doi.org/10.4161/gmic.1.3.12127>
- Sanders, M. E., Merenstein, D. J., Ouwehand, A. C., Reid, G., Salminen, S., Cabana, M. D., et al. (2016). Probiotic use in at-risk populations. *Journal of the American Pharmacists Association*, 56(6), 680–686. <https://doi.org/10.1016/j.japh.2016.07.001>
- Sandoval-Castilla, O., Lobato-Calleros, C., García-Galindo, H. S., Alvarez-Ramírez, J., & Vernon-Carter, E. J. (2010). Textural properties of alginate-pectin beads and survivability of entrapped *Lb. casei* in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *Food Research International*, 43(1), 111–117. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.09.010>
- Sanz, Y. (2016). *Bifidobacteria in Foods: Health Effects*. (B. Caballero, P. Finglas, & F. Toldrá, Eds.) *Encyclopedia of Food and Health* (1st ed.). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00065-9>
- Semyonov, D., Ramon, O., & Shimoni, E. (2011). Using ultrasonic vacuum spray dryer to produce highly viable dry probiotics. *LWT - Food Science and Technology*, 44(9), 1844–1852. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.03.021>
- Settachaimongkon, S., Nout, M. J. R., Antunes Fernandes, E. C., van Hooijdonk, T. C. M., Zwietering, M. H., Smid, E. J., & Van Valenberg, H. J. F. (2014). The impact of



selected strains of probiotic bacteria on metabolite formation in set yoghurt. *International Dairy Journal*, 38(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.04.002>

Sfakianakis, P., & Tzia, C. (2014). Conventional and Innovative Processing of Milk for Yogurt Manufacture; Development of Texture and Flavor: A Review. *Foods*, 3(1), 176–193. <https://doi.org/10.3390/foods3010176>

Sharifi, S., Rezazad-Bari, M., Alizadeh, M., Almasi, H., & Amiri, S. (2021). Use of whey protein isolate and gum Arabic for the co-encapsulation of probiotic *Lactobacillus plantarum* and phytosterols by complex coacervation: Enhanced viability of probiotic in Iranian white cheese. *Food Hydrocolloids*, 113, 106496. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106496>

Sheu, B. S., Wu, J. J., Lo, C. Y., Wu, H. W., Chen, J. H., Lin, Y. S., & Lin, M. D. (2002). Impact of supplement with *Lactobacillus*- and *Bifidobacterium*-containing yogurt on triple therapy for *Helicobacter pylori* eradication. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 16(9), 1669–1675. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2036.2002.01335.x>

Sheu, Bor Shyang, Cheng, H. C., Kao, A. W., Wang, S. T., Yang, Y. J., Yang, H. B., & Wu, J. J. (2006). Pretreatment with *Lactobacillus*- and *Bifidobacterium*-containing yogurt can improve the efficacy of quadruple therapy in eradicating residual *Helicobacter pylori* infection after failed triple therapy. *American Journal of Clinical Nutrition*, 83(4), 864–869. <https://doi.org/10.1093/ajcn/83.4.864>

Shi, L. E., Li, Z. H., Li, D. T., Xu, M., Chen, H. Y., Zhang, Z. L., & Tang, Z. X. (2013). Encapsulation of probiotic *Lactobacillus bulgaricus* in alginate' milk microspheres and evaluation of the survival in simulated gastrointestinal conditions. *Journal of Food Engineering*, 117(1), 99–104. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.02.012>

Shori, A. B. (2015). The potential applications of probiotics on dairy and non-dairy foods focusing on viability during storage. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4, 423–431. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2015.09.010>

Silva, M. P., Tulini, F. L., Marinho, J. F. U., Mazzocato, M. C., De Martinis, E. C. P., Lucas, V., & Favaro-Trindade, C. S. (2017). Semisweet chocolate as a vehicle for the probiotics *Lactobacillus acidophilus* LA3 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BLC1: Evaluation of chocolate stability and probiotic survival under in vitro simulated gastrointestinal conditions. *LWT - Food Science and Technology*, 75, 640–647. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.10.025>

Silva, M. P., Tulini, F. L., Martins, E., Penning, M., Fávoro-Trindade, C. S., & Poncelet, D. (2018). Comparison of extrusion and co-extrusion encapsulation techniques to protect *Lactobacillus acidophilus* LA3 in simulated gastrointestinal fluids. *LWT - Food Science and Technology*, 89, 392–399. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.11.008>

Silva, M. P., Tulini, F. L., Matos-Jr, F. E., Oliveira, M. G., Thomazini, M., & Fávoro-Trindade, C. S. (2018). Application of spray chilling and electrostatic interaction to produce lipid microparticles loaded with probiotics as an alternative to improve resistance under stress conditions. *Food Hydrocolloids*, 83, 109–117. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.05.001>

Silva, R., Pimentel, T. C., Eustáquio de Matos Junior, F., Esmerino, E. A., Freitas, M. Q.,

- Fávaro-Trindade, C. S., et al. (2022). Microencapsulation with spray-chilling as an innovative strategy for probiotic low sodium requeijão cremoso processed cheese processing. *Food Bioscience*, 46(November 2021). <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101517>
- Soccol, C. R., Vandenberghe, L. P. de S., Spier, M. R., Medeiros, A. B. P., Yamaguishi, C. T., De Dea Lindner, J., et al. (2010). The potential of probiotics: A review. *Food Technology and Biotechnology*, 48(4), 413–434.
- Sohail, A., Turner, M. S., Coombes, A., Bostrom, T., & Bhandari, B. (2011). Survivability of probiotics encapsulated in alginate gel microbeads using a novel impinging aerosols method. *International Journal of Food Microbiology*, 145(1), 162–168. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.12.007>
- Sohail, A., Turner, M. S., Prabawati, E. K., Coombes, A. G. A., & Bhandari, B. (2012). Evaluation of Lactobacillus rhamnosus GG and Lactobacillus acidophilus NCFM encapsulated using a novel impinging aerosol method in fruit food products. *International Journal of Food Microbiology*, 157(2), 162–166. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.04.025>
- Song, H., Yu, W., Gao, M., Liu, X., & Ma, X. (2013). Microencapsulated probiotics using emulsification technique coupled with internal or external gelation process. *Carbohydrate Polymers*, 96(1), 181–189. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.03.068>
- Soukoulis, C., Lyroni, E., & Tzia, C. (2010). Sensory profiling and hedonic judgement of probiotic ice cream as a function of hydrocolloids, yogurt and milk fat content. *LWT - Food Science and Technology*, 43(9), 1351–1358. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.05.006>
- Soukoulis, C., Yonekura, L., Gan, H. H., Behboudi-Jobbehdar, S., Parmenter, C., & Fisk, I. (2014). Probiotic edible films as a new strategy for developing functional bakery products: The case of pan bread. *Food Hydrocolloids*, 39, 231–242. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.01.023>
- Sousa, S., Gomes, A. M., Pintado, M. M., Malcata, F. X., Silva, J. P., Sousa, J. M., et al. (2012). Encapsulation of probiotic strains in plain or cysteine-supplemented alginate improves viability at storage below freezing temperatures. *Engineering in Life Sciences*, 12(4), 457–465. <https://doi.org/10.1002/elsc.201200007>
- Sousa, S., Gomes, A. M., Pintado, M. M., Silva, J. P., Costa, P., Amaral, M. H., et al. (2015). Characterization of freezing effect upon stability of, probiotic loaded, calcium-alginate microparticles. *Food and Bioprocess Processing*, 93, 90–97. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2013.11.007>
- Sultana, K., Godward, G., Reynolds, N., Arumugaswamy, R., Peiris, P., & Kailasapathy, K. (2000). Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Journal of Food Microbiology*, 62(1–2), 47–55. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00380-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00380-9)
- Ta, L. P., Bujna, E., Antal, O., Ladányi, M., Juhász, R., Szécsi, A., et al. (2021). Effects of

various polysaccharides (alginate, carrageenan, gums, chitosan) and their combination with prebiotic saccharides (resistant starch, lactosucrose, lactulose) on the encapsulation of probiotic bacteria *Lactobacillus casei* 01 strain. *International Journal of Biological Macromolecules*, 183, 1136–1144. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.04.170>

Tripathi, M. K., & Giri, S. K. (2014). Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods*, 9(1), 225–241. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.04.030>

Truelstrup Hansen, L., Allan-Wojtas, P. ., Jin, Y.-L., & Paulson, A. . (2002). Survival of Ca-alginate microencapsulated *Bifidobacterium* spp. in milk and simulated gastrointestinal conditions. *Food Microbiology*, 19, 35–45. <https://doi.org/10.1006/fmic.2001.0452>

Turgut, T., & Cakmakci, S. (2018). Probiotic Strawberry Yogurts: Microbiological, Chemical and Sensory Properties. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 10(1), 64–70. <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9278-6>

Turroni, F., Duranti, S., Milani, C., Lugli, G. A., van Sinderen, D., & Ventura, M. (2019). *Bifidobacterium bifidum*: A key member of the early human gut microbiota. *Microorganisms*, 7(11), 1–13. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7110544>

Valcheva, R., & Dieleman, L. A. (2016). Prebiotics: Definition and protective mechanisms. *Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology*, 30(1), 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2016.02.008>

Valencia, M. S., Salgado, S. M., Andrade, S. A. C., Padilha, V. M., Livera, A. V. S., & Stamford, T. L. M. (2016). Development of creamy milk chocolate dessert added with fructo-oligosaccharide and *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* LBC 81. *LWT - Food Science and Technology*, 69, 104–109. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.01.039>

Vallabhaneni, S., Walker, T., Lockhart, R., Ng, D., Chiller, T., Melchreit, R., et al. (2015). Notes from the Field: Fatal Gastrointestinal Mucormycosis in a Premature Infant Associated with a Contaminated Dietary Supplement— Connecticut, 2014. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 64(6), 155–156. <https://doi.org/10.1080/15245000309112>

van der Ark, K. C. H., Nugroho, A. D. W., Berton-Carabin, C., Wang, C., Belzer, C., de Vos, W. M., & Schroen, K. (2017). Encapsulation of the therapeutic microbe *Akkermansia muciniphila* in a double emulsion enhances survival in simulated gastric conditions. *Food Research International*. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.09.004>

Vandenplas, Y., Huys, G., & Daube, G. (2015). Probiotics: An update. *Jornal de Pediatria*, 91(1), 6–21. <https://doi.org/10.1016/j.jpmed.2014.08.005>

Verbeken, D., Bael, K., Thas, O., & Dewettinck, K. (2006). Interactions between k - carrageenan , milk proteins and modified starch in sterilized dairy desserts. *International Dairy Journal*, 16, 482–488. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.06.006>

- Verruck, S., de Carvalho, M. W., de Liz, G. R., Amante, E. R., Vieira, C. R. W., Amboni, R. D. de M. C., & Prudencio, E. S. (2017). Survival of Bifidobacterium BB-12 microencapsulated with full-fat goat's milk and prebiotics when exposed to simulated gastrointestinal conditions and thermal treatments. *Small Ruminant Research*, *153*, 48–56. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2017.05.008>
- Vieira da Silva, B., Barreira, J. C. M., & Oliveira, M. B. P. P. (2016). Natural phytochemicals and probiotics as bioactive ingredients for functional foods: Extraction, biochemistry and protected-delivery technologies. *Trends in Food Science and Technology*, *50*, 144–158. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.12.007>
- Vinderola, G., Prosello, W., Molinari, F., Ghiberto, D., & Reinheimer, J. (2009). Growth of Lactobacillus paracasei A13 in Argentinian probiotic cheese and its impact on the characteristics of the product. *International Journal of Food Microbiology*, *135*(2), 171–174. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.08.021>
- Wang, J., Korber, D. R., Low, N. H., & Nickerson, M. T. (2014). Entrapment, survival and release of Bifidobacterium adolescentis within chickpea protein-based microcapsules. *Food Research International*, *55*, 20–27. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.09.018>
- Wang, K. Y., Li, S. N., Liu, C. S., Perng, D. S., Su, Y. C., Wu, D. C., et al. (2004). Effects of ingesting Lactobacillus- and Bifidobacterium-containing yogurt in subjects with colonized Helicobacter pylori. *American Journal of Clinical Nutrition*, *80*(3), 737–741. <https://doi.org/10.1093/ajcn/80.3.737>
- Wang, L., Yu, X., Xu, H., Aguilar, Z. P., & Wei, H. (2016). Effect of skim milk coated inulin-alginate encapsulation beads on viability and gene expression of Lactobacillus plantarum during freeze-drying. *LWT - Food Science and Technology*, *68*, 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.12.001>
- Wu, C. H., Liu, Y. C., Ou, S. F., Chen, S. T., Kuo, J. M., & Hsueh, Y. H. (2021). Improving acid resistance and characteristics of microencapsulated Lactobacillus brevis RK03 using top fluid bed drying technology. *Process Biochemistry*, *110*(May), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2021.07.010>
- Xiao, Y., Han, C., Yang, H., Liu, M., Meng, X., & Liu, B. (2020). Layer (whey protein isolate) -by-layer (xanthan gum) microencapsulation enhances survivability of L. bulgaricus and L. paracasei under simulated gastrointestinal juice and thermal conditions. *International Journal of Biological Macromolecules*, *148*(April), 238–247. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.113>
- Yildirim, M., Sumnu, G., & Sahin, S. (2016). The Effects of Emulsifier Type, Phase Ratio and Homogenization Methods on Stability of Double Emulsion. *Journal of Dispersion Science and Technology*, *38*(6), 807–814. <https://doi.org/10.1080/01932691.2016.1201768>
- Ying, D. Y., Sanguansri, L., Weerakkody, R., Bull, M., Singh, T. K., & Augustin, M. A. (2016). Effect of encapsulant matrix on stability of microencapsulated probiotics. *Journal of Functional Foods*, *25*, 447–458. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.06.020>
- Yonejima, Y., Hisa, K., Kawaguchi, M., Ashitani, H., Koyama, T., Usamikrank, Y., et al.

(2015). Lactic acid bacteria-containing chocolate as a practical probiotic product with increased acid tolerance. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4(4), 773–777. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2015.09.001>

Yonekura, L., Sun, H., Soukoulis, C., & Fisk, I. (2014). Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* NCIMB 701748 in matrices containing soluble fibre by spray drying: Technological characterization, storage stability and survival after in vitro digestion. *Journal of Functional Foods*, 6(1), 205–214. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.10.008>

Zaeim, D., Sarabi-Jamab, M., Ghorani, B., Kadkhodae, R., Liu, W., & Tromp, R. H. (2020). Microencapsulation of probiotics in multi-polysaccharide microcapsules by electro-hydrodynamic atomization and incorporation into ice-cream formulation. *Food Structure*, 25(18), 100147. <https://doi.org/10.1016/j.foostr.2020.100147>

Zare, F., Champagne, C. P., Simpson, B. K., Orsat, V., & Boye, J. I. (2012). Effect of the addition of pulse ingredients to milk on acid production by probiotic and yoghurt starter cultures. *LWT - Food Science and Technology*, 45(2), 155–160. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.08.012>

Zhang, K., Zhang, H., Hu, X., Bao, S., & Huang, H. (2012). Synthesis and release studies of microalgal oil-containing microcapsules prepared by complex coacervation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 89(1), 61–66. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.08.023>

Zhang, L., Huang, S., Ananingsih, V. K., Zhou, W., & Chen, X. D. (2014). A study on *Bifidobacterium lactis* BB12 viability in bread during baking. *Journal of Food Engineering*, 122(1), 33–37. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.08.029>

Zhang, Z., Gu, M., You, X., Sela, D. A., Xiao, H., & McClements, D. J. (2021). Encapsulation of bifidobacterium in alginate microgels improves viability and targeted gut release. *Food Hydrocolloids*, 116(January), 106634. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106634>

Zhao, M., Huang, X., Zhang, H., Zhang, Y., Gänzle, M., Yang, N., et al. (2020). Probiotic encapsulation in water-in-water emulsion via heteroprotein complex coacervation of type-A gelatin/caseinate. *Food Hydrocolloids*, 105790. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105790>

Ziar, H., Gérard, P., & Riazi, A. (2012). Calcium alginate-resistant starch mixed gel improved the survival of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB12 and *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS in yogurt and simulated gastrointestinal conditions. *International Journal of Food Science and Technology*, 47(7), 1421–1429. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.02989.x>

Zou, Q., Zhao, J., Liu, X., Tian, F., Zhang, H. ping, Zhang, H., & Chen, W. (2011). Microencapsulation of *Bifidobacterium bifidum* F-35 in reinforced alginate microspheres prepared by emulsification/internal gelation. *International Journal of Food Science and Technology*, 46(8), 1672–1678. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02685.x>

Zuidam, N. J., & Nedovic, V. A. (2010). *Encapsulation technologies for active food*

*ingredients and food processing*. USA: Springer International Publishing.  
<https://doi.org/10.1007/978-3-319-14892-2>