

ΜΕΛΕΤΗ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΛΥΟΦΙΛΙΩΜΕΝΩΝ
ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ ΓΙΑ ΧΡΗΣΗ ΣΕ ΚΡΕΜΕΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

των

ΚΑΡΕΚΛΗ ΓΕΩΡΓΙΑ ΚΑΙ ΠΟΤΑΜΙΑΝΟΥ ΝΙΚΟΛΕΤΑ

Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

Σχολή Περιβάλλοντος

ΙΟΝΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ



Αργοστόλι Κεφαλληνίας

Οκτώβριος 2024

ΜΕΛΕΤΗ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΛΥΟΦΙΛΙΩΜΕΝΩΝ
ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ ΓΙΑ ΧΡΗΣΗ ΣΕ ΚΡΕΜΕΣ

Η πτυχιακή εργασία εγκρίθηκε από:

Δημητρέλλου Δήμητρα

Σαμαράς Ιωάννης

Σακαντάνη Ελένη

«Δηλώνω υπεύθυνα ότι η διπλωματική εργασία είναι εξ' ολοκλήρου δικό μου έργο και κανένα μέρος της δεν είναι αντιγραμμένο από έντυπες ή ηλεκτρονικές πηγές, μετάφραση από ξενόγλωσσες πηγές και αναπαραγωγή από εργασίες άλλων ερευνητών ή φοιτητών. Όπου έχω βασιστεί σε ιδέες ή κείμενα άλλων, έχω προσπαθήσει με όλες μου τις δυνάμεις να τα προσδιορίσω σαφώς μέσα από την καλή χρήση αναφορών ακολουθώντας την ακαδημαϊκή δεοντολογία και την αποφυγή λογοκλοπής.

Επίσης δηλώνω υπεύθυνα ότι κατά τη διάρκεια της συγγραφής της διπλωματικής εργασίας ΔΕΝ χρησιμοποίησα οποιοδήποτε λογισμικό τεχνητής νοημοσύνης (AI). Σε περίπτωση χρήσης έχω αναφέρει τον λόγο χρήσης της, την υπηρεσία τεχνητής νοημοσύνης που χρησιμοποίησα και τη θέση στη διπλωματική εργασία όπου εφαρμόστηκε.»

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ευχαριστούμε τον Καθηγητή Θωμά Μοσχάκη του Τμήματος Γεωπονίας του ΑΠΘ για την παραχώρηση του στελέχους *L. plantarum* 2035.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία αξιολογήθηκε η ικανότητα των λυοφιλιωμένων, με και χωρίς ίνες μήλου, προβιοτικών να επιβιώνουν σε επαρκείς ποσότητες, ενσωματωμένα σε βρεφικές κρέμες κατά την αποθήκευση για ένα μήνα. Τα προβιοτικά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ο *L. casei* ATCC 393 και ο *L. plantarum* 2035. Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι *L. plantarum* είναι ανθεκτικότερος από τον *L. casei*. Συγκεκριμένα ο ελεύθερος *L. plantarum* κατά την αποθήκευση μειώθηκε κατά 75% ενώ με ίνες μήλου μειώθηκε μόνο κατά 5% και ο ελεύθερος *L. casei* κατά την αποθήκευση μειώθηκε κατά 83% ενώ με ίνες μήλου μειώθηκε μόνο κατά 16%. Όσον αφορά τα μείγματα βρεφικών κρεμών ο *L. plantarum*, στις βρεφικές κρέμες με 0%, 1%, 5%, 10% ίνες μήλου, σημείωσε μείωση 27%, 10 %, 9%, 6% αντίστοιχα. Ομοίως ο *L. casei*, στις βρεφικές κρέμες με 0%, 1%, 5%, 10% ίνες μήλου, σημείωσε μείωση 9%, 20 %, 20%, 16% αντίστοιχα. Τα μίγματα των βρεφικών προβιοτικών κρεμών με *L. plantarum* με και 5% και 10% ίνες μήλου διατήρησαν τον αριθμό των ζωντανών κυττάρων σε πάνω από 10^6 cfu/g έτοιμης βρεφικής κρέμας. Ειδικότερα, η βρεφική κρέμα με *L. Plantarum* και 10% ίνες μήλου περιείχε 6,98 log cfu/g έτοιμης βρεφικής κρέμας και ήταν η υψηλότερη τιμή που καταγράφηκε. Για την παραγωγή προβιοτικών βρεφικών κρεμών απαιτείται περαιτέρω έρευνα προκειμένου να αυξηθεί η βιωσιμότητα των προβιοτικών κατά την αποθήκευση.

Λέξεις κλειδιά: Βρέφος, Προβιοτικά, Βρεφικά παρασκευάσματα, Μικροχλωρίδα, Βιωσιμότητα, Λυοφιλίωση, *L. casei*, *L. plantarum*

ABSTRACT

In the present essay, the ability of freeze-dried, with and without apple fibers, probiotics to survive in adequate amounts incorporated into baby food during one month of storage, was evaluated. The probiotic strains used, were *L. casei* ATCC 393 and *L. plantarum* 2035. The results showed that *L. plantarum* is more resistant than *L. casei*. Specifically, during storage, free *L. plantarum* was reduced by 75% while with apple fibers, it was reduced by only 5% and free *L. casei* during storage was reduced by 83% while with apple fibers it was reduced by only 16%. Regarding the infant food mixtures, *L. plantarum* in the infant food with 0%, 1%, 5%, 10% apple fibers, showed a reduction of 27%, 10%, 9%, 6% respectively. Similarly, *L. casei* in baby food with 0%, 1%, 5%, 10% apple fibers showed a reduction of 9%, 20%, 20%, 16% respectively. Probiotic infant food mixtures with *L. plantarum* with 5% and 10% apple fiber maintained viable cell counts at over 10^6 cfu/g of prepared infant food. In particular the infant food with *L. Plantarum* and 10% apple fiber contained 6.98 log cfu/g of ready infant food and was the highest value recorded. For the production of probiotic baby food, further research is needed in order to increase the viability of probiotics during storage.

Keywords: Infant, Probiotics, Infant Formulas, Microflora, Viability, Lyophilization, *L. casei*, *L. plantarum*

Πίνακας περιεχομένων

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	iv
Ευχαριστούμε τον Καθηγητή Θωμά Μοσχάκη του Τμήματος Γεωπονίας του ΑΠΘ για την παραχώρηση του στελέχους <i>L. plantarum</i> 2035.	iv
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	v
ABSTRACT	vi
Κατάλογος πινάκων.....	ix
Κατάλογος Διαγραμμάτων.....	x
Κατάλογος εικόνων	1
ΜΕΡΟΣ Ι : ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	1
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Βρεφικές τροφές.....	1
1.1 Βασικές έννοιες.....	1
1.2 Ανάπτυξη βρεφικών τροφών.....	1
1.3 Διατροφικές απαιτήσεις βρεφών	2
1.4 Σύσταση βρεφικών τροφών.....	4
1.5 Ποιότητα και ασφάλεια.....	6
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Προβιοτικά.....	8
2.1 Ιστορική αναδρομή	8
2.2 Τρόφιμα και προβιοτικά.....	9
2.2.1 Συνηθέστερα τρόφιμα με προβιοτικά.....	9
2.2.2 Προβιοτικά και βρεφικά παρασκευάσματα	10
2.3 Κριτήρια επιλογής προβιοτικών	12
2.4 Τρόποι ενσωμάτωσης προβιοτικών στα τρόφιμα.....	12
2.5 Οφέλη προβιοτικών	14
2.5.1 Οφέλη στον ανθρώπινο οργανισμό	14
2.5.2 Οφέλη στα βρέφη.....	15
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: <i>Lactobacillus casei</i> και <i>Lactobacillus plantarum</i>	17
3.1 <i>Lactobacillus casei</i> και οι κυριότερες εφαρμογές του στα τρόφιμα.....	17
3.2 <i>Lactobacillus plantarum</i> και οι κυριότερες εφαρμογές του στα τρόφιμα.....	18
3.3 Ξήρανση μικροοργανισμών με λυοφιλίωση.....	20
ΜΕΡΟΣ ΙΙ : ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	22
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Μεθοδολογία.....	22
4.1 Υλικά και εξοπλισμός	22
4.2 Παρασκευή διαλυμάτων.....	23

4.3 Πειραματική πορεία	23
4.3.1 Καλλιέργεια προβιοτικών στελεχών	23
4.3.2 Προετοιμασία για λυοφιλίωση.....	24
4.3.3 Λυοφιλίωση	24
4.3.4 Μεταχείριση μετά τη λυοφιλίωση.....	24
4.3.5 Υπολογισμός βιωσιμότητας.....	25
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Αποτελέσματα.....	28
5.1 Μεταβολή βιωσιμότητας των προβιοτικών πριν και μετά τη λυοφιλίωση ...	28
5.2 Μεταβολή βιωσιμότητας των προβιοτικών χωρίς και με ίνες μήλου.....	28
5.3 Μεταβολή βιωσιμότητας των προβιοτικών σε βρεφικές κρέμες χωρίς ίνες και με ίνες μήλου	32
5.3.1 Βρεφικές κρέμες χωρίς ίνες μήλου	32
5.3.2 Βρεφικές κρέμες με 1% ίνες μήλου	33
5.3.3 Βρεφικές κρέμες με 5% ίνες μήλου	33
5.3.4 Βρεφικές κρέμες με 10% ίνες μήλου.....	34
5.3.5 Συγκεντρωτικά αποτελέσματα των βρεφικών κρεμών	35
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: Συζήτηση	39
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: Συμπεράσματα	42
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	43

Κατάλογος πινάκων

Πίνακας	Σελίδα
Πίνακας 1.1: Απαιτήσεις ως προς τη σύνθεση με βάση τον Κανονισμό 126/2016 της Ε.Ε.	5
Πίνακας 1.2: Απαιτήσεις ως προς την περιεκτικότητα σε ανόργανα συστατικά με βάση τον Κανονισμό 126/2016 της Ε.Ε.	5
Πίνακας 1.3: Απαιτήσεις ως προς την περιεκτικότητα σε βιταμίνες σε βάση τον Κανονισμό 127/2016 της Ε.Ε.....	6
Πίνακας 4.1: Υλικά και συσκευές.....	22
Πίνακας 5.1: Αποτελέσματα μικροβιολογικής ανάλυσης πριν και μετά τη λυοφιλίωση των προβιοτικών.	28

Κατάλογος Διαγραμμάτων

Γράφημα

Σελίδα

Διάγραμμα 5.1: Αποτελέσματα μικροβιολογικής ανάλυσης δειγμάτων προβιοτικών χωρίς ίνες μήλου κατά τις τριάντα ημέρες αποθήκευσης σε συνθήκες δωματίου (25°C).....	29
Διάγραμμα 5.2: Αποτελέσματα μικροβιολογικής ανάλυσης δειγμάτων προβιοτικών με ίνες μήλου κατά τις τριάντα ημέρες αποθήκευσης σε συνθήκες δωματίου (25°C).	29
Διάγραμμα 5.3: Αποτελέσματα μικροβιολογικής ανάλυσης δειγμάτων του <i>L. plantarum</i> με και χωρίς ίνες μήλου κατά τις τριάντα ημέρες αποθήκευσης σε συνθήκες δωματίου (25°C).	30
Διάγραμμα 5.4: Αποτελέσματα μικροβιολογικής ανάλυσης δειγμάτων του <i>L. casei</i> με και χωρίς ίνες μήλου κατά τις τριάντα ημέρες αποθήκευσης σε συνθήκες δωματίου (25°C).....	31
Διάγραμμα 5.5: Ποσοστά επιβίωσης του <i>L. casei</i> και του <i>L. plantarum</i> κατά τον πρώτο μήνα αποθήκευσης σε συνθήκες δωματίου (25°C).	31
Διάγραμμα 5.6: Αποτελέσματα μικροβιολογικής ανάλυσης δειγμάτων βρεφικών κρεμών με προβιοτικά χωρίς ίνες μήλου κατά τις τριάντα ημέρες αποθήκευσης σε συνθήκες δωματίου (25°C).	32
Διάγραμμα 5.7: Αποτελέσματα μικροβιολογικής ανάλυσης δειγμάτων βρεφικών κρεμών με 1% περιεκτικότητα λυοφιλιωμένο μικροοργανισμό σε ίνες μήλου κατά τις τριάντα ημέρες αποθήκευσης σε συνθήκες δωματίου (25°C)..	33
Διάγραμμα 5.8: Αποτελέσματα μικροβιολογικής ανάλυσης δειγμάτων βρεφικών κρεμών με 5% περιεκτικότητα λυοφιλιωμένο μικροοργανισμό σε ίνες μήλου κατά τις τριάντα ημέρες αποθήκευσης σε συνθήκες δωματίου (25°C).	34

Διάγραμμα 5.9: Αποτελέσματα μικροβιολογικής ανάλυσης δειγμάτων βρεφικών κρεμών με 10% περιεκτικότητα λυοφιλωμένο μικροοργανισμό σε ίνες μήλου κατά τις τριάντα ημέρες αποθήκευσης σε συνθήκες δωματίου (25°C).	35
Διάγραμμα 5.10: Αποτελέσματα μικροβιολογικής ανάλυσης δειγμάτων βρεφικών κρεμών με 0, 1, 5, 10% περιεκτικότητα λυοφιλωμένου <i>L. plantarum</i> σε ίνες μήλου κατά τις τριάντα ημέρες αποθήκευσης σε συνθήκες δωματίου (25°C).	36
Διάγραμμα 5.11: Αποτελέσματα μικροβιολογικής ανάλυσης δειγμάτων βρεφικών κρεμών με 0, 1, 5, 10% περιεκτικότητα λυοφιλωμένου <i>L. casei</i> σε ίνες μήλου κατά τις τριάντα ημέρες αποθήκευσης σε συνθήκες δωματίου (25°C).	37
Διάγραμμα 5.12: Ποσοστά επιβίωσης του <i>L. casei</i> και του <i>L. plantarum</i> σε βρεφική κρέμα με ίνες μήλου κατά τον πρώτο μήνα αποθήκευσης σε συνθήκες δωματίου (25°C).	38

Κατάλογος εικόνων

Εικόνα	Σελίδα
Εικόνα 4.1: Μίγματα προβιοτικών βρεφικών κρεμών με 1%, 5% και 10% λυοφιλιωμένου μικροοργανισμού σε ίνες μήλου αποθηκευμένα σε σταθερές συνθήκες δωματίου (25°C) (Πηγή: Από προσωπικό αρχείο).....	24
Εικόνα 4.2: Επανυδάτωση λυοφιλιωμένων <i>L. casei</i> ATCC 393 και <i>L. plantarum</i> 2035 (Πηγή: Από προσωπικό αρχείο).....	25
Εικόνα 4.3: Επανυδάτωση λυοφιλιωμένων <i>L. casei</i> ATCC 393 και <i>L. plantarum</i> 2035 με ίνες μήλου (Πηγή: Από προσωπικό αρχείο).....	26
Εικόνα 4.4: Σωληνάκια διαδοχικών αραιώσεων των δειγμάτων των προβιοτικών βρεφικών κρεμών με ίνες μήλου (Πηγή: Από προσωπικό αρχείο).	27
Εικόνα 4.5: Τρυβλία με MRS Agar των δειγμάτων των προβιοτικών βρεφικών κρεμών με ίνες μήλου (Πηγή: Από προσωπικό αρχείο).....	27

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Την τελευταία δεκαετία πολλοί καταναλωτές έχουν στραφεί σε τρόφιμα που περιέχουν προβιοτικά προκειμένου να επωφεληθούν των ευεργετικών ιδιοτήτων τους. Τα προβιοτικά, όταν καταναλωθούν σε επαρκείς ποσότητες (10^6 cfu/g ή mL τροφίμου), συμβάλλουν στην πρόληψη και την αντιμετώπιση πολλών ασθενειών, ενώ είναι ικανά να βελτιώσουν τη λειτουργία του εντέρου. Τα γαλακτοκομικά και τα ζυμούμενα τρόφιμα αποτελούν τα βασικά προϊόντα που περιέχουν προβιοτικά όμως πλέον αυτά ενσωματώνονται σε πολλές και διαφορετικές μήτρες τροφίμων προκειμένου να ικανοποιούν τις ανάγκες όλου του καταναλωτικού κοινού. Η ενσωμάτωσή τους στα τρόφιμα πραγματοποιείται με τη χρήση διαφόρων τεχνικών, όπως αυτές της λυοφιλίωσης και της μικροενθυλάκωσης, οι οποίες επιτρέπουν την επιβίωση και τη διατήρηση τους για αρκετό διάστημα. Τα βρεφικά παρασκευάσματα αποτελούν μια κατηγορία τροφίμων στα οποία προστίθενται προβιοτικά, ώστε να επωφεληθούν και τα βρέφη από τη δράση τους. Τα βρέφη ανήκουν στις ιδιαίτερα ευπαθείς ομάδες και ταλαιπωρούνται συχνά από γαστρεντερικές διαταραχές όπως διάρροια, δυσκοιλιότητα, νεκρωτική εντεροκολίτιδα κλπ. Οι τροφές που απευθύνονται σε βρέφη και περιέχουν προβιοτικά έχει αποδειχτεί ότι κατά τη βρεφική ηλικία προωθούν την φυσιολογική αύξηση και ανάπτυξη των μωρών και ενισχύουν την εντερική μικροχλωρίδα, συμβάλλοντας στην πρόληψη και στην αντιμετώπιση διαφόρων διαταραχών και παθήσεων.

ΜΕΡΟΣ Ι : ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Βρεφικές τροφές

1.1 Βασικές έννοιες

Είναι γνωστό ότι η σημαντικότερη περίοδος του κύκλου ζωής του ανθρώπου είναι η βρεφική ηλικία (WHO, 2023). Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ε.Ε.), ως βρέφος ορίζεται το άτομο ηλικίας έως 12 μηνών και το χρονικό αυτό διάστημα αναφέρεται ως πρώτη βρεφική ηλικία (Ε.Ε., 2023). Ο μητρικός θηλασμός είναι αναγκαίος τουλάχιστον για τους πρώτους 6 μήνες της ζωής των βρεφών, καθώς το μητρικό γάλα έχει την κατάλληλη σύσταση σε θρεπτικά συστατικά, τα οποία προάγουν την υγιή και ομαλή ανάπτυξή τους. Επιπλέον, μέσω του θηλασμού επιτυγχάνεται ραγδαία η μείωση της βρεφικής θνησιμότητας (WHO, 2024).

Ακολούθως ως δεύτερη βρεφική ηλικία ορίζεται το δεύτερο και τρίτο έτος ζωής των ατόμων και οποίο καταναλώνουν συμπληρωματικά παρασκευάσματα, όπως επεξεργασμένα δημητριακά και παιδικές τροφές. Γενικότερα, τα παρασκευάσματα αυτά χρησιμοποιούνται προκειμένου να διευκολυνθεί η μετάβαση, στην κατανάλωση στερεάς τροφής (Ε.Ε., 2023). Οι βρεφικές τροφές, με βάση το σύστημα ταξινόμησης NOVA, ανήκουν στην κατηγορία των υπερεπεξεργασμένων τροφίμων (Amorim et al., 2023).

Για την ουσιαστικότερη κατανόηση της έρευνας οφείλεται να παρατεθεί ο ορισμός των συμπληρωματικών παρασκευασμάτων κατά τον Codex Alimentarius, «*συμπληρωματικά παρασκευάσματα ορίζονται τα προϊόντα που βασίζονται σε γάλα αγελάδων ή άλλων ζώων ή σε μίγμα αυτών και/ή σε άλλα συστατικά που έχει αποδειχθεί ότι είναι κατάλληλα για την διατροφή των βρεφών. Η διατροφική ασφάλεια και επάρκεια του βρεφικού παρασκευάσματος πρέπει να αποδεικνύεται επιστημονικά ότι υποστηρίζει την εξέλιξη και ανάπτυξη των βρεφών. Όλα τα συστατικά και τα πρόσθετα πρέπει να είναι χωρίς γλουτένη*» (Codex Alimentarius, 1981).

1.2 Ανάπτυξη βρεφικών τροφών

Η διατροφή των νεαρών παιδιών και περισσότερο των βρεφών, απασχολεί την κοινωνία από την αρχαιότητα. Συγκεκριμένα, από το 20^ο αιώνα π.Χ. έως και τον 19^ο αιώνα μ.Χ. όπου πολλές μητέρες πέθαιναν κατά τον τοκετό, η ανάγκη για επιβίωση των βρεφών αυξήθηκε. Οι μοναδικές εναλλακτικές πηγές τροφής προέρχονταν από

παρένθετες μητέρες ή νοσοκόμες που θήλαζαν ή από άλλα θηλαστικά (πρόβατα, βοοειδή, κλπ.). Παρά τις προσπάθειες αυτές, η βρεφική θνησιμότητα παρέμενε σε υψηλά επίπεδα (Wargo, 2016).

Η βιομηχανική επανάσταση (1760-1870), γνωστή ως μια περίοδος εξέλιξης της τεχνολογίας και των επιστημών οδήγησε σε μια σειρά επιστημονικών ανακαλύψεων που συνέβαλε στην καταπολέμηση των τροφογενών ασθενειών. Συγκεκριμένα, το 1811 ο Nicolas Appert ανακάλυψε ότι το φρέσκο γάλα μπορεί να συντηρηθεί σε γυάλινα δοχεία, ενώ ο Luis Pasteur συμβάλλει δυναμικά το 1864 με την ανακάλυψη της παστερίωσης (Wargo, 2016).

Σημαντική είναι η συμβολή του Γερμανού Justus von Liebig το 1865-1877 με την ανακάλυψη του πρώτου εμπορικού βρεφικού γάλακτος αποτελούμενο από αλεύρι σίτου και βύνης, βόειου γάλακτος και διττανθρακικό κάλιο, το οποίο αργότερα κυκλοφόρησε και σε μορφή σκόνης όπου για την παρασκευή του χρησιμοποιούνταν θερμό βόειο γάλα. Την ίδια χρονική περίοδο, ο χημικός και έμπορος Henri Nestle ανέπτυξε το πρώτο τεχνητό παρασκεύασμα για βρέφη, την φαρίν λακτέ με μοναδική διαφορά την αραίωση του σε θερμό νερό (Wargo, 2016).

Τον 20^ο αιώνα μ.Χ. η ανάγκη για κατασκευή θρεπτικότερων βρεφικών τροφών, οδήγησε τους ερευνητές να εμπλουτίσουν τις βρεφικές τροφές με βιταμίνη D (1923), σίδηρο (1959), ταυρίνη (1984), νουκλεοτίδια (1990) και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (2000). Τα στοιχεία αυτά έδειξαν ότι ενισχύουν το ανοσοποιητικό σύστημα και την ανάπτυξη εγκεφάλου των βρεφών (Wargo, 2016). Στη σύγχρονη εποχή, κυρίως στον δυτικό κόσμο, η βιομηχανία των βρεφικών παρασκευασμάτων έχει ανθίσει, εξαιτίας του γρήγορου ρυθμού ζωής και της δυσκολίας των μητέρων να ανταπεξέλθουν στις βρεφικές ανάγκες (Baker et al., 2021).

Σύμφωνα με τα παραπάνω, ξεκίνησε και η ανάγκη ανάπτυξης νομοθεσίας, σχετικά με την ασφάλεια και την υγιεινή των τροφίμων. Η Nestle είναι η πρώτη εταιρεία που εφάρμοσε τις οδηγίες του παγκόσμιου οργανισμού υγείας (Π.Ο.Υ) για τα υποκατάστατα μητρικού γάλακτος (Wargo, 2016).

1.3 Διατροφικές απαιτήσεις βρεφών

Ο ρυθμός αύξησης και ανάπτυξης κατά τη βρεφική ηλικία επηρεάζεται τόσο από βιολογικούς όσο και από περιβαλλοντικούς παράγοντες. Ωστόσο, ο σημαντικότερος παράγοντας είναι η διατροφή. Η διαθεσιμότητα των θρεπτικών ουσιών στην περίοδο

αυτή επηρεάζει σημαντικά τη διαφοροποίηση των οργάνων και των ιστών, καθώς και την υγεία, τόσο στο κοντινό όσο στο μακρινό μέλλον (Czech-Kowalska, 2020).

Οι απαιτήσεις σε ενέργεια των βρεφών είναι υψηλές καθώς το μεγαλύτερο ποσοστό καταναλώνεται κατά την παραγωγή θερμότητας και μεταβολισμού (Patel and Rouster, 2020). Σύμφωνα με τον FAO, απαραίτητη ενέργεια ορίζεται ως η ποσότητα που απαιτείται για να εξισορροπιστεί η ενεργειακή δαπάνη, να διατηρηθεί το μέγεθος και η σύσταση του σώματος και να διασφαλιστεί η βέλτιστη ανάπτυξη που συνάδει με καλή υγεία (FAO, 2004).

Το μητρικό γάλα καλύπτει τις απαιτήσεις σε πρωτεΐνες και σε απαραίτητα αμινοξέα τους πρώτους 4-6 μήνες της ζωής, ενώ μετά τους 6 μήνες σημαντικό ρόλο λαμβάνουν τα συμπληρώματα διατροφής τα οποία είναι εξίσου πλούσια σε πρωτεΐνες (Yi and Kim, 2021). Παράλληλα, τα λιπίδια αποτελούν την κύρια πηγή ενέργειας, καλύπτοντας το 40-50% των ενεργειακών τους απαιτήσεων, ενώ τα ω-3, ω-6 και ω-9 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, συμβάλλουν στη φυσιολογική ανάπτυξη των οργάνων, κυρίως του εγκεφάλου και των ματιών (Patel and Rouster, 2020).

Επιπλέον, οι υδατάνθρακες προσφέρουν τις περισσότερες θερμίδες σε ποσοστό 40-55% των ημερήσιων αναγκών. Η λακτόζη είναι ο κυριότερος υδατάνθρακας που βρίσκεται στο μητρικό γάλα και αποτελεί βασική πηγή γλυκόζης (Patel and Rouster, 2020). Ακολουθούν οι ολιγοσακχαρίτες οι οποίοι, συμβάλλουν στην ομαλή λειτουργία του βρεφικού πεπτικού συστήματος, προστατεύοντάς το από βακτηριακές μολύνσεις ενώ ταυτόχρονα συμβάλλουν στην ανάπτυξη των Bifidobacteria (Li et al., 2021).

Όσον αφορά τις απαιτήσεις σε μικροθρεπτικά συστατικά κύριο ρόλο έχει ο σίδηρος, ο ψευδάργυρος, ο χαλκός, το νάτριο, το ιώδιο, το ασβέστιο και οι βιταμίνες. Χαρακτηριστικά αξίζει να αναφερθεί ότι ο σίδηρος, παίζει σημαντικό ρόλο στη λειτουργία του μεταβολισμού και στο ανοσοποιητικό σύστημα παρόλο που, βρίσκεται σε μικρές συγκεντρώσεις στο ανθρώπινο γάλα. Τα βρέφη κατά τους πρώτους 6 μήνες της ζωής τους, καλύπτουν τις ανάγκες τους σε σίδηρο μέσω των αποθεμάτων που έχουν λάβει από τη μητέρα κατά την κύηση, ενώ τα βρέφη που βρίσκονται σε μεγαλύτερη ηλικία και τρέφονται αποκλειστικά μέσω του θηλασμού συχνά παρουσιάζουν έλλειψη σιδήρου. Λόγω αυτού, ελλοχεύει κίνδυνος εμφάνισης σιδηροπενίας, όπου μέσω κατάλληλης διατροφής μπορεί να αντιμετωπιστεί. Σημαντικό ρόλο στη μείωση πιθανοτήτων εμφάνισης σιδηροπενίας έχει ο χαλκός, ο οποίος συμβάλει τόσο στην απελευθέρωση, όσο και στην απορρόφηση σιδήρου που

είναι αποθηκευμένος. Η ανεπάρκεια του χαλκού, δεν παρατηρείται συχνά στα νεογνά καθώς αυτά διαθέτουν μεγάλα αποθέματα στο συκώτι τους (Perrella et al., 2021).

Η περιεκτικότητα του μητρικού γάλακτος σε θρεπτικά εξαρτάται από τα αποθέματα που διαθέτει η μητέρα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η Βιταμίνη D, η οποία συνήθως βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις και η έλλειψή της προκαλεί προβλήματα στην ανάπτυξη των οστών. Για τον λόγο αυτό, προστίθεται σε πολλά βρεφικά παρασκευάσματα. Συμπερασματικά, τα μικροθρεπτικά όπως οι βιταμίνες και τα μέταλλα είναι αναγκαία για την σωστή και ομαλή ανάπτυξη των βρεφών (Perrella, et al., 2021).

1.4 Σύσταση βρεφικών τροφών

Η εισαγωγή συμπληρωματικών τροφών κρίνεται απαραίτητη μετά την ηλικία των 6 μηνών, προκειμένου να καλύπτονται οι διατροφικές ανάγκες των βρεφών. Προκειμένου τα συμπληρώματα να ανταποκρίνονται στις απαιτήσεις των βρεφών πρέπει να εισάγονται την κατάλληλη χρονική στιγμή, να είναι επαρκή ως προς την περιεκτικότητά τους σε ενέργεια, πρωτεΐνες και μακροθρεπτικά, να είναι ασφαλή και να χορηγούνται σωστά (WHO, 2022).

Η Ε.Ε. με τον Κανονισμό 127/2016 έχει καθορίσει αυστηρά τη σύσταση των βρεφικών παρασκευασμάτων. Συγκεκριμένα στον Πίνακα 1.1 παρατηρείται ότι το μεγαλύτερο ποσοστό της ενέργειας προέρχεται από τους υδατάνθρακες και τα λιπίδια. Συγκεκριμένα, οι υδατάνθρακες απαιτούνται σε μεγαλύτερα ποσοστά από τα υπόλοιπα, ενώ η λακτόζη έχει μόνο κατώτερο όριο. Όσον αφορά τα ανόργανα στοιχεία που παρατίθενται στον Πίνακα 1.2, η νομοθεσία ακολουθεί τις ανάγκες των βρεφών απαιτώντας υψηλή περιεκτικότητα σε ασβέστιο και κάλιο.

Πίνακας 1.1: Απαιτήσεις ως προς τη σύνθεση με βάση τον Κανονισμό 126/2016 της Ε.Ε.

Συστατικά	Ελάχιστη τιμή	Μέγιστη τιμή
Ενέργεια	60 kcal/100 mL	70 kcal/100 mL
Πρωτεΐνες αγελαδινού ή κατσικίσιου γάλακτος	1,8 g/100 mL	2,5 g/100 mL
Πρωτεΐνες σόγιας	2,25 g/100 mL	2,8 g/100 mL
Υδατάνθρακες	9 g/100 mL	14 g/100 mL
Λακτόζη	4,5 g/100 mL	-
Λιπίδια	4,4 g/100 mL	6,0 g/100 mL

Οι παραπάνω τιμές αναφέρονται στα παρασκευάσματα δεύτερης βρεφικής ηλικίας που παρασκευάζονται από πρωτεΐνες αγελαδινού ή κατσικίσιου γάλακτος ή από υποπροϊόντα υδρόλυσης πρωτεϊνών. Υπάρχουν διαφορετικές τιμές αναφοράς για αυτά που παρασκευάζονται με πρωτεΐνες σόγιας (Κανονισμός 127/2016).

Πίνακας 1.2: Απαιτήσεις ως προς την περιεκτικότητα σε ανόργανα συστατικά με βάση τον Κανονισμό 126/2016 της Ε.Ε.

Ανόργανα στοιχεία	ανά 100 kJ		ανά 100 kcal	
	Ελάχιστο	Μέγιστο	Ελάχιστο	Μέγιστο
Νάτριο (mg)	6	14,3	25	60
Κάλιο (mg)	19,1	38,2	80	160
Χλώριο (mg)	14,3	38,2	60	160
Ασβέστιο (mg)	12	3,5	50	140
Φωσφόρος (mg)	6	21,5	25	90
Μαγνήσιο (mg)	1,2	3,6	5	15
Σίδηρος (mg)	0,14	0,48	0,6	2
Ψευδάργυρος (mg)	0,12	0,24	0,5	1
Χαλκός (μg)	14,3	24	1	100
Ιώδιο (μg)	3,6	6,9	15	29
Σελήνιο (μg)	0,72	2	3	8,6
Μαγγάνιο (μg)	0,24	24	1	100
Μολυβδαίνιο (μg)	-	3,3	-	14
Φθόριο (μg)	-	24	-	100

Οι παραπάνω τιμές αναφέρονται στα παρασκευάσματα δεύτερης βρεφικής ηλικίας που παρασκευάζονται από πρωτεΐνες αγελαδινού ή κατσικίσιου γάλακτος ή από υποπροϊόντα υδρόλυσης πρωτεϊνών. Υπάρχουν διαφορετικές τιμές αναφοράς για αυτά που παρασκευάζονται με πρωτεΐνες σόγιας (Κανονισμός 127/2016).

Αντίστοιχα στον Πίνακα 1.3, οι βιταμίνες που κυριαρχούν είναι του συμπλέγματος B, με τις ριβοφλαβίνη (B2), Θειαμίνη (B1) και B6, να κατακτούν τις υψηλότερες θέσεις.

Πίνακας 1.3: Απαιτήσεις ως προς την περιεκτικότητα σε βιταμίνες σε βάση τον Κανονισμό 127/2016 της Ε.Ε.

Ανόργανα στοιχεία	ανά 100 kJ		ανά 100 kcal	
	Ελάχιστο	Μέγιστο	Ελάχιστο	Μέγιστο
Βιταμίνη A (μg)	16,7	27,2	70	114
Βιταμίνη D (μg)	0,48	0,72	2	3
Θειαμίνη (μg)	9,6	72	40	300
Ριβοφλαβίνη (μg)	14,3	95,6	60	400
Νιασίνη (mg)	0,1	0,36	0,4	1,5
Παντοθενικό οξύ	0,1	0,48	0,4	2
Βιταμίνη B ₆ (μg)	4,8	41,8	20	175
Βιοτίνη (μg)	0,24	1,8	1	7,5
Φολικό οξύ (μg)	3,6	11,4	15	47,6
Βιταμίνη B ₁₂ (μg)	0,02	0,12	0,1	0,5
Βιταμίνη C (mg)	0,96	7,2	4	30
Βιταμίνη K (μg)	0,24	6	1	25
Βιταμίνη E (mg)	0,14	1,2	0,6	5

Οι παραπάνω τιμές αναφέρονται στα παρασκευάσματα δεύτερης βρεφικής ηλικίας που παρασκευάζονται από πρωτεΐνες αγελαδινού ή κατσικίσιου γάλακτος ή από υποπροϊόντα υδρόλυσης πρωτεϊνών. Υπάρχουν διαφορετικές τιμές αναφοράς για αυτά που παρασκευάζονται με πρωτεΐνες σόγιας (Κανονισμός 127/2016).

Παράλληλα ο FDA έχει ορίσει 30 θρεπτικά συστατικά τα οποία πρέπει απαραίτητως να περιέχονται μέσα στα βρεφικά παρασκευάσματα και τονίζει ότι κάθε ουσία που υπάρχει μέσα σε αυτά πρέπει να ελέγχεται (FDA, 2023).

1.5 Ποιότητα και ασφάλεια

Τα προϊόντα διατροφής που διατίθενται στο εμπόριο θεωρούνται σε γενικές γραμμές ασφαλή. Παρόλα αυτά όμως συχνά τυχαίνει να συσχετίζονται με μικροβιολογικούς, φυσικούς και χημικούς κινδύνους (Yeak et al., 2024).

Τα βρεφικά παρασκευάσματα δεν είναι στείρα, αλλά ενίοτε έχουν απομονωθεί από αυτά διάφοροι παθογόνοι μικροοργανισμοί όπως: *Listeria monocytogenes*, *Cronobacter* spp., *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella* spp., *Clostridium botulinum* (Yeak et al., 2024), με τα *Salmonella* spp. και το *Cronobacter sakazakii*. να βρίσκονται πρώτα στη λίστα επικινδυνότητας. (Parra-Flores et al., 2020).

Για τον λόγο αυτό συστήνεται αυστηρά η χρήση νερού θερμοκρασίας άνω των 70°C για τη θανάτωση των μικροοργανισμών αυτών (EFSA, 2004).

Θα αποτελούσε σοβαρή παράλειψη να μην υπογραμμιστεί ότι το νερό αποτελεί παράγοντα μόλυνσης καθώς το μικροβιολογικό του φορτίο και η περιεκτικότητά του σε επικίνδυνες ουσίες είναι υψηλή. Συχνά αυτό παρατηρείται στις αναπτυσσόμενες χώρες, όπου η χρήση μολυσμένου νερού κατά την παρασκευή βρεφικών τροφών, αποτελεί αιτία λοιμώξεων του πεπτικού συστήματος οδηγώντας σε διάρροια (Koletzko et al., 2012).

Χρειάζεται επίσης να σημειωθεί ότι τα βρεφικά παρασκευάσματα συχνά επιβαρύνονται με ρύπους, όπως ακρυλαμίδιο, δισφαινόλη Α και φυτοφάρμακα (Mielech et al., 2021) Αντίθετα, σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες ο κίνδυνος από την παρουσία βαρέων μετάλλων στις βρεφικές τροφές είναι μηδαμινός (Parker et al., 2022).

Η Ε.Ε προκειμένου να διασφαλίσει την ποιότητα και την ασφάλεια των βρεφικών τροφών, θέσπισε κανονισμούς για τα επιτρεπόμενα πρόσθετα (1333/2008), την ύπαρξη και τα όρια αντίχρευσης φυτοφαρμάκων (609/2013), ακόμα και για την καταλληλότητα των υλικών συσκευασίας (10/2011) (EFSA, 2017).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Προβιοτικά

2.1 Ιστορική αναδρομή

Από τις αρχές του 19 αιώνα, μέχρι και σήμερα τα προβιοτικά βρίσκονται στο επίκεντρο των επιστημονικών ερευνών με τους Metchnikoff και Tisser να είναι από τους πρώτους ερευνητές που αναγνώρισαν την θετική επίδραση των γαλακτικών βακτηρίων στην υγεία. Συγκεκριμένα, πρότειναν ως μέθοδο θεραπείας την κατανάλωση προβιοτικών σε ασθενείς που πάσχουν από διάρροια προκειμένου, να αποκατασταθεί η εντερική μικροχλωρίδα τους. Αργότερα, οι ερευνητές Lilly και Stillwell διατύπωσαν την άποψη ότι οι κυτταρικοί μεταβολίτες ενός βακτηρίου μπορούν να συμβάλουν στην ανάπτυξη ενός άλλου. Ωστόσο, κατά το πέρασμα των χρόνων έχουν διατυπωθεί πολλοί και διαφορετικοί ορισμοί σχετικά με τα προβιοτικά από την επιστημονική κοινότητα (Zommiti et al., 2020).

Σήμερα σύμφωνα με τον World Gastroenterology Organisation (WGO) ως προβιοτικά ορίζονται *«Οι ζωντανοί μικροοργανισμοί που, όταν χορηγούνται σε επαρκείς ποσότητες, προσφέρουν οφέλη για την υγεία στον ξενιστή»*. Παράλληλα, ο όρος *πρεβιοτικά* χρησιμοποιείται για να περιγράψει *«Ένα συστατικό που έχει υποστεί επιλεκτική ζύμωση που έχει ως αποτέλεσμα συγκεκριμένες αλλαγές στην σύνθεση και/ ή τη δραστηριότητα της μικροχλωρίδας του γαστρεντερικού συστήματος, παρέχοντας έτσι όφελος στην υγεία του ξενιστή»*. Με τον όρο *συμβιωτικά* γίνεται αναφορά σε *«Ένα μείγμα που περιλαμβάνει ζωντανούς μικροοργανισμούς και υποστρώματα που χρησιμοποιούνται εκλεκτικά από μικροοργανισμούς-ξενιστές που προσδίδουν όφελος στην υγεία του ξενιστή»* (Guarner et al., 2023).

Τα τελευταία χρόνια, όλο και περισσότερες έρευνες έχουν ως αντικείμενο μελέτης τα προβιοτικά και τα οφέλη τους στην υγεία. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία σύγχρονων ορισμών, οι οποίοι συμπεριλαμβάνουν τα νέα επιστημονικά ευρήματα. Συγκεκριμένα, η διαπίστωση ότι τα νεκρά κύτταρα των προβιοτικών συμβάλλουν θετικά στην υγεία του ανθρώπου οδήγησε στη δημιουργία του όρου *παραπροβιοτικό*. Τα παραπροβιοτικά, ορίζονται ως *«μη βιώσιμα κύτταρα ή κυτταρικά εκχυλίσματα που προσδίδουν υγεία στον ξενιστή όταν χορηγούνται σε επαρκείς ποσότητες»*. Επιπλέον, προκειμένου να προσδιοριστούν όλες οι παραγόμενες ουσίες (βιταμίνες, ένζυμα, πρωτεΐνες, κ.λπ.), οι οποίες έχουν ευεργετικά οφέλη δημιουργήθηκε ο όρος *μεταβιοτικό*. Οι ουσίες αυτές, προκύπτουν με λύση των προβιοτικών κυττάρων και παραλαμβάνονται μέσω εκχύλισης (Zendeboodi et al., 2020).

Επιπροσθέτως, η έννοια των προβιοτικών είναι άρρηκτα συνυφασμένη με τα γαλακτικά βακτήρια, *Lactobacillus* και *Bifidobacterium*, τα οποία είναι μη παθογόνοι μικροοργανισμοί, θετικοί κατά Gram. Τα βακτήρια αυτά, εντοπίζονται κυρίως στα ζυμούμενα γαλακτοκομικά τρόφιμα (γιαούρτη, τυρί) τα οποία καταναλώνονται από τον άνθρωπο εδώ και χιλιάδες χρόνια (Zendeboodi et al., 2020).

2.2 Τρόφιμα και προβιοτικά

2.2.1 Συνηθέστερα τρόφιμα με προβιοτικά

Αναμφίβολα, τα λειτουργικά τρόφιμα με προβιοτικά καταλαμβάνουν ολοένα και μεγαλύτερο μερίδιο στην αγορά των τροφίμων (Latif et al., 2023). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι, οι σύγχρονοι καταναλωτές έχουν στραφεί σε πιο φυσικές πηγες προβιοτικών καθώς και σε λιγότερο επεξεργασμένα τρόφιμα. Γενικά τα προβιοτικά, διατίθενται προς κατανάλωση είτε με τη μορφή συμπληρωμάτων διατροφής (χαπιών) είτε βρίσκονται ενσωματωμένα σε διάφορα προϊόντα διατροφής (Fenster et al., 2019).

Σήμερα, στο εμπόριο είναι διαθέσιμη μια μεγάλη γκάμα πολλών και διαφορετικών τροφίμων, τα οποία ενσωματώνουν τα προβιοτικά στη μήτρα τους. Τα γαλακτοκομικά, όπως η γιαούρτη, το κεφίρ, κ.ά., αποτελούν τα συνηθέστερα τρόφιμα που φιλοξενούν προβιοτικά λόγω της σύνθεσης και των συνθήκων αποθήκευσής τους. Αναλυτικότερα, τα τυριά εξαιτίας της υψηλής περιεκτικότητά τους σε λιπαρά, του τρόπου αποθήκευσης και της ικανότητάς τους να επιτρέπουν των πολλαπλασιασμό των προβιοτικών κατά την ωρίμανσή τους, αποτελούν μια ενδιαφέρουσα μήτρα ενσωμάτωσης αυτών (Fenster et al., 2019). Επιπλέον, το παγωτό αποτελεί έναν εξαιρετικό φορέα προβιοτικών, λόγου του ουδέτερου pH του και των ιδιαίτερα χαμηλών θερμοκρασιών που επικρατούν κατά την αποθήκευσή του (da Cruz Rodrigues et al., 2020). Με τον τρόπο αυτό, στο παγωτό η βιωσιμότητα των προβιοτικών διατηρείται σε υψηλά επίπεδα για μεγάλο χρονικό διάστημα (Fenster et al., 2019).

Πάρα το γεγονός, ότι τα γαλακτοκομικά συνδυάζονται κατάλληλα με τα προβιοτικά συμβάλλοντας στην ανάπτυξη και διατήρησή τους, υπάρχει η ανάγκη για ανάπτυξη μη γαλακτοκομικών προβιοτικών προϊόντων (Fenster et al., 2019). Αυτή η τάση, έχει προκύψει από την ύπαρξη πληθυσμιακών ομάδων, οι οποίες δεν καταναλώνουν γαλακτοκομικά προϊόντα είτε λόγω δυσανεξίας είτε λόγω ηθικών φραγμών (vegan) (Vera-Santander et al., 2023).

Ειδικότερα, οι παραγωγοί τροφίμων έχουν στρέψει το ενδιαφέρον τους στην ενσωμάτωση των προβιοτικών σε προϊόντα αρτοποιίας, δημητριακά πρωινού, σοκολάτες, πατατάκια, ποτά και σε διαφορά αλλά σνακ (Fenster et al., 2019). Πολλές μελέτες, έχουν επικεντρωθεί στη χρήση προβιοτικής μαγιάς (*Saccharomyces cerevisiae* var *boulardii*) για την παραγωγή μπύρας με χαμηλή περιεκτικότητα σε αλκοόλη καθώς και σε προϊόντα δημητριακών, όπως προϊόντα ολικής άλεσης και πολύσπορα δημητριακά. Αξίζει να τονιστεί, ότι απαιτούνται νέες τεχνικές προκειμένου να επιβιώσουν μεγαλύτερα ποσοστά προβιοτικών βακτηρίων σε τρόφιμα που υφίστανται θερμική επεξεργασία (Staniszewski and Kordowska-Wiater 2021). Επιπλέον, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η κατανάλωση χυμού φρούτων με προβιοτικά εξαιτίας της κοινής αποδοχής του από το καταναλωτικό κοινό (Latif et al., 2023).

Επιπλέον, πρέπει να επισημανθεί ότι, προκειμένου οι καταναλωτές να επωφεληθούν από την κατανάλωση των προβιοτικών τροφίμων, τα επίπεδα των προβιοτικών κυττάρων σε αυτά πρέπει να είναι υψηλά (Peng et al., 2023). Η επιστημονική κοινότητα έχει καταλήξει ότι, τα συγκεκριμένα προϊόντα πρέπει να περιέχουν τουλάχιστον 10^6 cfu/g ή mL τροφίμου (Staniszewski and Kordowska-Wiater, 2021). Αξίζει να αναφερθεί ότι, τα επίπεδα αυτά δεν καθορίζονται από καμιά νομοθεσία καθώς δεν υπάρχει νομικό πλαίσιο που να αφορά τα προβιοτικά (Peivasteh-Roudsari et al., 2019). Φορείς όπως η Ε.Ε., ο F.D.A. κλπ., τα αντιμετωπίζουν άλλοτε ως φάρμακα και συμπληρώματα και άλλοτε ως τρόφιμα. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα, η έγκριση ενός προβιοτικού προϊόντος και ο χαρακτηρισμός του ως προβιοτικό λειτουργικό τρόφιμο, να εξαρτάται από τον εκάστοτε φορέα (Arora et al., 2019).

Συμπερασματικά, στο εμπόριο διατίθεται μεγάλη ποικιλία λειτουργικών τροφίμων παρά τη δυσκολία ενσωμάτωσης και διατήρησης των προβιοτικών στελεχών στα τρόφιμα, τόσο κατά την επεξεργασία όσο και κατά την αποθήκευσή τους. Τα προϊόντα αυτά είναι σχεδιασμένα ώστε να ικανοποιούν τις ανάγκες όλου του καταναλωτικού κοινού ακόμα και ομάδων με ιδιαίτερα χαρακτηριστικά (Latif et al., 2023).

2.2.2 Προβιοτικά και βρεφικά παρασκευάσματα

Όπως προαναφέρθηκε, τα προβιοτικά ενσωματώνονται σε διάφορα καθημερινά προϊόντα διατροφής, συμπεριλαμβανομένων και των βρεφικών τροφών. Έρευνες

έχουν δείξει ότι, τα προβιοτικά όταν προστίθενται στα βρεφικά παρασκευάσματα σε επαρκείς ποσότητες, είναι ικανά να συμβάλλουν στην ενίσχυση της εντερικής χλωρίδας καθώς και στη φυσιολογική ανάπτυξη των βρεφών (Kusumitha et al., 2020). Στην πλειοψηφία τους τα βρεφικά προϊόντα διατροφής, εμπλουτίζονται με *Bifidobacterium* spp. και *Lactobacillus* spp. τα οποία έχει αποδειχθεί ότι είναι ασφαλή για κατανάλωση (Salminen et al., 2020). Το πρώτο προβιοτικό βακτήριο που εγκρίθηκε για την χρήση αυτή έπειτα από αξιολόγηση από τον FDA ήταν το *Bifidobacterium lactis* (Kusumitha et al., 2020).

Αναλυτικότερα, στο εμπόριο διατίθενται βρεφικές φόρμουλες ενισχυμένες με το *B. lactis*, οι οποίες είναι κατάλληλες προς κατανάλωση από το στάδιο του απογαλακτισμού μέχρι την νηπιακή ηλικία. Επιπλέον, τα προβιοτικά στελέχη, *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* HN019 και *Lactocaseibacillus rhamnosus* HN001, έχουν χρησιμοποιηθεί για τον εμπλουτισμό βρεφικού γάλακτος, το οποίο συμβάλει επιβεβαιωμένα στη διαμόρφωση της εντερικής μικροχλωρίδας (Lemoine et al., 2023). Τα τελευταία χρόνια έχει παρατηρηθεί αύξηση στη ζήτηση προβιοτικών γιαουρτιών, τα οποία απευθύνονται σε βρέφη. Σε αυτά είναι δυνατή, η προσθήκη φρούτων, τα οποία δρουν ως πρεβιοτικά και συμβάλουν τόσο στη γεύση όσο και στη θρεπτική αξία του τελικού προϊόντος (Atik and Çoşkun, 2021).

Γενικά τα προβιοτικά, έχουν συνδεθεί κυρίως με τα γαλακτοκομικά προϊόντα όμως αυτά μπορούν να προσδεθούν και σε άλλα τρόφιμα που προορίζονται για μωρά και νήπια προσδίδοντας αντίστοιχα οφέλη. Για παράδειγμα, το προβιοτικό βακτήριο *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB-12 έχει προστεθεί σε δημητριακά που απευθύνονται σε βρέφη. Τα δημητριακά είναι μια από τις πρώτες τροφές που εισάγονται στη διατροφή των βρεφών και αποτελούν εξαιρετική πηγή βιταμινών και μετάλλων. Τα τρόφιμα τα οποία περιέχουν προβιοτικά και δημητριακά, έχει αποδειχθεί ότι συνδυάζουν άριστα τα οφέλη και των δυο, προάγοντας μια υγιή εντερική μικροχλωρίδα (Salgaço et al., 2021). Ένα άλλο παράδειγμα, μη γαλακτοκομικών βρεφικών τροφών με προβιοτικά είναι οι βρεφικοί πουρέδες. Τα αλεσμένα γεύματα αυτά, μπορούν να ενισχυθούν με προβιοτικά όπως *Bacillus coagulans* και ανάλογα με τη σύνθεσή τους να διατηρηθούν στο ράφι έως και αρκετές εβδομάδες (López Marín et al., 2020).

Λαμβάνοντας υπόψη τη σημασία των προβιοτικών στη διατροφή των βρεφών καθώς και την αναγκαιότητα να καλύψουν μεγαλύτερο μέρος της αγοράς τα προβιοτικά έχουν ενσωματωθεί σε ποικίλα προϊόντα καθημερινής διατροφής (Fenster

et al., 2019). Η χρήση των προβιοτικών στις βρεφικές τροφές προέκυψε μέσα από την αναζήτηση πιο υγιεινών και λειτουργικών τροφών, οι οποίες θα μπορούσαν να βοηθήσουν στην αντιμετώπιση πολλών γαστρεντερικών διαταραχών και στην ολοκληρωμένη ανάπτυξη του παιδιού (López Marín et al., 2020).

2.3 Κριτήρια επιλογής προβιοτικών

Για τη δημιουργία ενός τροφίμου με προβιοτικά πρέπει αρχικά να επιλεγεί το κατάλληλο είδος και στέλεχος του βακτηρίου. Οι παράμετροι που λαμβάνονται υπόψη για την επιλογή αυτή, αφορούν τεχνολογικές, λειτουργικές και αισθητηριακές ιδιότητες του βακτηρίου (Nyanzi et al., 2021).

Βασικό κριτήριο για την επιλογή ενός στελέχους που χρησιμοποιείται για την παραγωγή εμπορικών προϊόντων αποτελεί η ανθεκτικότητα, η σταθερότητα καθώς και η διάρκεια ζωής του. Γενικά, η διάρκεια ζωής των προβιοτικών που περιέχονται στα τρόφιμα είναι κατά πολύ μικρότερη από αυτών που υπάρχουν στα συμπληρώματα διατροφής και η σταθερότητα αυτών εξαρτάται κυρίως από την ενεργότητα νερού του τροφίμου (Fenster et al., 2019). Η βιωσιμότητα αυτών, είναι πολύ σημαντική τόσο κατά την αποθήκευση όσο και κατά τη διέλευση από το γαστρεντερικό σύστημα. Τα προβιοτικά πρέπει να είναι ικανά να επιβιώνουν κατά την πέψη και να μπορούν να προσκολληθούν στο κύτταρο του επιθηλίου του εντέρου προκειμένου να δράσουν προς όφελος του οργανισμού (Kusumitha et al., 2020).

Επιπλέον, η γνώση του είδους του στελέχους και των πληροφοριών σχετικά με το χρησιμοποιούμενο στέλεχος είναι απαραίτητη πριν την οποιαδήποτε ενέργεια. Ενώ ταυτόχρονα από τα αποτελέσματα των *in vivo* και *in vitro* δοκιμών, πρέπει να προκύπτει ότι, το προβιοτικό δεν έχει τοξικές ή παθογόνες επιδράσεις και δεν φέρει γονίδια ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά. Όσον αφορά τα οφέλη που προσδίδουν στον ανθρώπινο οργανισμό αυτά, πρέπει να επιβεβαιώνονται μέσα από αντίστοιχες ιατρικές μελέτες (Kusumitha et al., 2020).

2.4 Τρόποι ενσωμάτωσης προβιοτικών στα τρόφιμα

Προκειμένου τα προβιοτικά, να προσδώσουν τα ευεργετικά τους οφέλη πρέπει να ενσωματωθούν κατάλληλα στα τρόφιμα και να επιζήσουν κατά τις διαδικασίες της επεξεργασίας, της παραμονής και της αποθήκευσης (Vera-Santander et al., 2023). Ορισμένοι από τους τρόπους ενσωμάτωσης, είναι μέσω της ζύμωσης, της

ενθυλάκωσης καθώς και μέσω της χρήσης λυοφιλωμένων κυττάρων και μεταβιοτικών (Vera-Santander et al., 2023, Prapa et al., 2023).

Ειδικότερα, τα ζυμούμενα με προβιοτικά τρόφιμα βρίσκονται στο επίκεντρο του ενδιαφέροντος των βιομηχανιών λόγω των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών που προσδίδουν σε αυτά. Κατά τη ζύμωση, τα προβιοτικά μεταβάλλουν το pH σε όξινο, αυξάνοντας τη διάρκεια ζωής των προϊόντων ενώ ταυτόχρονα βελτιώνουν την υφή, τα αρώματα και τη θρεπτική αξία του τελικού προϊόντος (Vera-Santander et al., 2023).

Παράλληλα η μικροενθυλάκωση, αποτελεί έναν τρόπο ενσωμάτωσης προβιοτικών βακτηρίων σε μη γαλακτοκομικά προϊόντα. Η διαδικασία αυτή, στοχεύει στη διατήρηση της βιωσιμότητας των προβιοτικών καθόλη τη διάρκεια ζωής των προϊόντων. Η διαδικασία μιας επιτυχούς μικροενθυλάκωσης, εξαρτάται από το στέλεχος, το τρόφιμο, την τεχνική και το υλικό που χρησιμοποιείται. Κατά καιρούς, έχουν χρησιμοποιηθεί πολλά υλικά, βιοπολυμερή καθώς και μέσα ενθυλάκωσης όπως χιτοζάνη, πηκτίνες, άμυλο, πρωτεΐνες γάλακτος και γλουτένη. Με την μικροενθυλάκωση, τα προβιοτικά, είναι δυνατόν να ενσωματωθούν σε διάφορα τρόφιμα όπως φρούτα, προϊόντα κρέατος, σοκολάτες και αρτοσκευάσματα (Vera-Santander et al., 2023).

Όσον αφορά τη χρήση μεταβιοτικών, πρόκειται για έναν νέο επαναστατικό τρόπο εμπλουτισμού των τροφίμων, με μεταβολίτες προβιοτικών κυττάρων. Η χρήση τους στα προϊόντα διατροφής αυξάνει τη σταθερότητά τους κατά την αποθήκευση ενώ ταυτόχρονα κάνει πιο εύκολη και οικονομικότερη τη διαχείρισή τους. Η απορρόφηση των μεταβιοτικών από τον μεταβολισμό είναι γρηγορότερη με αποτέλεσμα να δρουν αμεσότερα προς όφελος του ανθρώπινου οργανισμού (Vera-Santander et al., 2023).

Τέλος, κατά καιρούς έχουν χρησιμοποιηθεί προβιοτικά βακτήρια σε λυοφιλωμένη μορφή για τη δημιουργία λειτουργικών τροφίμων. Κάποια από τα παραδείγματα τροφίμων είναι τα λουκάνικα, τα προϊόντα κρασιού και τα γαλακτοκομικά (Prapa et al., 2023).

Αξίζει να αναφερθεί ότι τα προβιοτικά και τα μεταβιοτικά δεν συμβάλλουν μόνο στην υγεία των καταναλωτών αλλά και στη διατήρηση και ασφάλεια του ίδιου του τρόφιμου. Οι παραπάνω μέθοδοι ενσωμάτωσης των προβιοτικών στα τρόφιμα επιτρέπουν την ανάπτυξη νέων καινοτόμων τροφίμων που απευθύνονται σε μεγαλύτερο εύρος καταναλωτών (Vera-Santander et al., 2023).

2.5 Οφέλη προβιοτικών

2.5.1 Οφέλη στον ανθρώπινο οργανισμό

Η δράση των προβιοτικών επηρεάζει τη λειτουργία του ανθρώπινου οργανισμού, προάγοντας την υγεία, μέσω της αλληλεπίδρασής τους τόσο με τον ξενιστή όσο και με τη μικροχλωρίδα του (Guarner et al., 2023). Τα οφέλη που προσφέρουν είναι αποτέλεσμα των διαφόρων βιοδραστηριοτήτων τους, όπως η πτώση του pH και η παραγωγή βιταμινών, ενζύμων και αντιμικροβιακών ουσιών (Zendeboodi et al., 2020). Οι μηχανισμοί δράσης τους είναι πολύπλοκοι και διαφέρουν ακόμα και ανάμεσα σε στελέχη του ίδιου είδους (Cunningham et al., 2021).

Τα προβιοτικά στελέχη συμβάλουν, σημαντικά στη διατήρηση της μικροβιακής χλωρίδας του εντέρου και στη βελτίωση της λειτουργίας του (Nyanzi et al., 2021). Συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί ότι η κατανάλωση γιαουρτιού με τα προβιοτικά *L. lactis*, *L. plantarum* και *L. casei*, έχει συμβάλλει στην ανακούφιση της δυσκοιλιότητας (Vera-Santander et al., 2023). Επιπλέον, τα προβιοτικά έχουν έντονη αντιμικροβιακή δράση διότι μειώνουν το pH του εντέρου εμποδίζοντας έτσι την ανάπτυξη και την προσκόλληση των παθογόνων ενώ ταυτόχρονα μπορούν να δεσμεύουν διάφορους τοξικούς μεταβολίτες (Zendeboodi et al., 2020). Για παράδειγμα, η ενσωμάτωση του *L. bulgaricus* OLL1073R-1 σε γάλα, φαίνεται να είναι ικανή να καταπολεμήσει τη γρίπη Α (Vera-Santander et al., 2023). Συνεπώς, σημαντική είναι η δράση τους στην πρόληψη και στον έλεγχο λοιμώξεων και φλεγμονών (Zendeboodi et al., 2020).

Κλινικές μελέτες, έχουν συσχετίσει την κατανάλωση των προβιοτικών με την πρόληψη και την αντιμετώπιση πολλών και διαφόρων ασθενειών, ενισχύοντας με αυτό τον τρόπο το ανοσοποιητικό σύστημα (Koirala and Anal, 2021). Αναλυτικότερα, έχει αποδειχτεί ότι συντελούν στην πρόληψη διαφόρων μορφών καρκίνου, κυρίως του παχέος εντέρου, στην αντιμετώπιση καρδιαγγειακών παθήσεων και του διαβήτη. Επίσης, η επίδρασή τους είναι εξίσου εμφανής στη μείωση της χοληστερίνης, τριγλυκεριδίων και παχυσαρκίας, ενώ ακόμα είναι ικανά να βελτιώσουν την ικανότητα πέψης της λακτόζης σε ασθενείς με δυσανεξία (Staniszewski and Kordowska-Wiater, 2021).

Συμπερασματικά τα προβιοτικά, μπορούν να προσδώσουν σημαντικά οφέλη στην υγεία, όταν αυτά βρίσκονται σε επαρκείς ποσότητες σε καθημερινά προϊόντα διατροφής (Koirala and Anal, 2021). Ο τρόπος με τον οποίο τα προβιοτικά επιδρούν στον ανθρώπινο οργανισμό έχει αποτελέσει αντικείμενο πολυάριθμων ερευνών, οι

οποίες έχουν αποδείξει ότι τα προβιοτικά διαθέτουν αντιμικροβιακές, αντιιικές, αντιφλεγμονώδεις, αντικαρκινικές, αντιοξειδωτικές, αντιαλλεργικές και ψυχοβιοτικές ιδιότητες (Vera-Santander et al., 2023). Η ικανότητα των προβιοτικών, να επιδρούν ευεργετικά στις φυσιολογικές λειτουργίες του ανθρώπινου οργανισμού κατατάσσει τα τρόφιμα αυτά στην κατηγορία λειτουργικών τροφίμων (Staniszewski and Kordowska-Wiater, 2021).

2.5.2 Οφέλη στα βρέφη

Τα προβιοτικά, που προστίθενται στις βρεφικές τροφές σε ικανοποιητική ποσότητα, είναι ικανά να προσδώσουν εξίσου ευεργετικά οφέλη στα βρέφη, όπως και στους ενήλικες (Lemoine et al., 2023). Τα βρέφη ανήκουν στις ιδιαίτερα ευπαθείς ομάδες καθώς συχνά ταλαιπωρούνται από διαταραχές όπως διάρροια, δυσκοιλιότητα, νεκρωτική εντεροκολίτιδα και πολλές ακόμη ασθένειες. Οι τροφές που απευθύνονται σε βρέφη και περιέχουν προβιοτικά έχει αποδειχτεί ότι συμβάλουν στην πρόληψη και στην αντιμετώπιση πολλών τέτοιων καταστάσεων (López Marín et al., 2020).

Αναλυτικότερα, η βρεφική φόρμουλα με *B. lactis* B-12 κατάφερε να μειώσει τον κίνδυνο λοιμώξεων του αναπνευστικού συστήματος στα παιδιά μέχρι την ηλικία των 5,5 ετών (Lemoine et al., 2023). Επιπλέον, σε συνδυασμό με τον *Streptococcus thermophilus* συμβάλουν στην πρόληψη πολλών γαστρεντερικών διαταραχών. Η ενίσχυση των τροφών με *Lactobacillus*, *Bifidobacterium bifidum* και *Streptococcus thermophilus* έχει σαν αποτέλεσμα την ελάττωση των περιστατικών διάρροιας από ρετροϊούς. Ταυτόχρονα το βρεφικό γάλα συμπληρωμένο με *L. fermentum* CECT5716 περιόρισε τη διάρροια σε μωρά έως και 12 μηνών (Kusumitha et al., 2020). Γενικά έχει παρατηρηθεί ότι τα προβιοτικά στελέχη συμβάλουν σημαντικά στην ανάπτυξη της μικροβιακής χλωρίδας του εντέρου και στη βελτίωση της λειτουργίας του, ειδικότερα στα βρέφη τα οποία δεν έχουν θηλάσει επαρκώς κατά τους πρώτους μήνες της ζωής τους (Vera-Santander et al., 2023). Παράλληλα τα βρεφικά παρασκευάσματα με προβιοτικά αποτελούν έναν εναλλακτικό τρόπο θεραπείας αλλεργικών παθήσεων όπως έκζεμα σε βρέφη ηλικίας 4-13 μηνών. Η επίδραση των προβιοτικών στην καταπολέμηση προβλημάτων όπως, δυσανεξία στη λακτόζη, ατοπική δερματίτιδα και ιογενείς λοιμώξεις δεν μπορεί να παραληφθεί.

Παρά το γεγονός ότι, τα βρεφικά προβιοτικά τρόφιμα έχουν ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία των μωρών, έχει παρατηρηθεί ότι η κατανάλωση αυτών των τροφίμων σε μεγάλη ποσότητα μπορεί να προκαλέσει φούσκωμα και μετεωρισμό, η

ένταση των οποίων εξαρτάται από την ηλικία και την ευαισθησία του μωρού. Οι κλινικές μελέτες, σχετικά με τις επιδράσεις των προβιοτικών βρεφικών τροφών είναι πολυάριθμες και η διεξαγωγή συμπερασμάτων είναι δύσκολη λόγω της μεγάλης ετερογένειας που παρουσιάζουν μεταξύ τους (Lemoine et al., 2023).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: *Lactobacillus casei* και *Lactobacillus plantarum*

3.1 *Lactobacillus casei* και οι κυριότερες εφαρμογές του στα τρόφιμα

Τις τελευταίες δεκαετίες, έχουν πραγματοποιηθεί πολυάριθμες μελέτες σχετικά με τον τρόπο δράσης και επίδρασης των γαλακτικών βακτηρίων ως προβιοτικοί μικροοργανισμοί. Τα γαλακτικά βακτήρια προσδίδουν ασφάλεια, αποτελεσματικότητα και επιθυμητά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά στα τρόφιμα ενώ ταυτόχρονα προσφέρουν οφέλη στην υγεία του ανθρώπου. Οι γαλακτοβάκιλλοι είναι θετικοί κατά Gram, προαιρετικά αναερόβιοι μικροοργανισμοί οι οποίοι, δεν σχηματίζουν σπόρια και αποτελούν μέρος του ανθρώπινου μικροβιώματος. Τα είδη, που βρίσκονται σε μεγάλες ποσότητες στο γαστρεντερικό σωλήνα είναι τα *L. casei*, *L. plantarum*, *L. fermentum* και *L. rhamnosus* (Zhang et al., 2018).

Συγκεκριμένα, ο *L. casei* είναι ένα από τα πλέον διαδεδομένα είδη γαλακτοβακίλλων και όταν καταναλώνεται ενσωματωμένο σε καθημερινά προϊόντα διατροφής είναι ικανό να μειώσει τη χοληστερίνη και τον κίνδυνο εμφάνισης οστεοπόρωσης ενώ προσδίδει αντικαρκινικές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Abdel-Hamid et al., 2019). Επιπλέον, σύμφωνα με έρευνες έχει αποδειχτεί ότι ο *L. casei* συμβάλλει στη διατήρηση της ισορροπίας του εντέρου, στην ενίσχυση του ανοσοποιητικού, ανακουφίζει συμπτώματα από γαστρεντερικές διαταραχές όπως δυσκοιλιότητα, βελτιώνει την πέψη ενώ ταυτόχρονα παράγει και συμβάλλει στην απορρόφηση βιταμινών Β και Κ (Aleman et al., 2024). Έχει διαπιστωθεί ότι, τα στελέχη BL23 και ATCC 393, είναι ικανά να επιλύσουν προβλήματα που έχουν προκύψει από διάφορες εντερικές παθήσεις (Liu et al., 2021). Παράλληλα, το στέλεχος ATCC 393 μπορεί να ρυθμίσει και να τροποποιήσει το ανοσοποιητικό σύστημα και να δράσει έναντι μολυσματικών παραγόντων (Xu et al., 2020). Επίσης, ο *L. casei* έχει χρησιμοποιηθεί για την ενίσχυση του βρεφικού γάλακτος καθώς φαίνεται να βοηθάει στην αντιμετώπιση πολλών γαστρεντερικών διαταραχών που ταλαιπωρούν τα βρέφη και τα νήπια (Fabiano et al., 2021). Αξίζει να αναφερθεί ότι ο *L. casei* έχει θετικές επιδράσεις και στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των τροφίμων προσδίδοντάς τους ιδιαίτερη γεύση, υφή και άρωμα (Dimitrellou et al., 2019a). Επιπρόσθετα, οι μικροοργανισμοί αυτοί παράγουν οξέα τα οποία συμβάλλουν στη διατήρηση των τροφίμων ενώ δρουν έναντι παθογόνων και αλλοιογόνων μικροοργανισμών (Sidira et al., 2019).

Τα παραπάνω οφέλη, έχουν ως αποτέλεσμα την ευρεία χρήση και ενσωμάτωση του *L. casei* σε πλήθος λειτουργικών τροφίμων, τα οποία καταναλώνονται από μια μεγάλη μερίδα του πληθυσμού (Liu et al., 2021). Ο *L. casei*, κατά κύριο λόγο χρησιμοποιείται σε γαλακτοκομικά προϊόντα, όπως τυρί, γιαούρτη, παγωτό και ξινόγαλα. Ειδικότερα, ο *L. casei* έχει αξιοποιηθεί ως καλλιέργεια εκκίνησης αλλά και ως συμπληρωματική καλλιέργεια σε ζυμούμενα γαλακτοκομικά προσδίδοντάς τους ιδιαίτερα και μοναδικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (Dimitrellou et al., 2019a). Χαρακτηριστικό παράδειγμα, αποτελεί η μελέτη των Dimitrellou et al. (2019b) οι οποίοι, συμπέραναν ότι η προσθήκη του μαζί με κομμάτια μήλου και καζέϊνη σε γιαούρτη βελτίωσε σημαντικά τα χαρακτηριστικά του προϊόντος παρέχοντάς του ιδιαίτερα αρώματα. Ένα διαφορετικό παράδειγμα μη γαλακτοκομικών τροφίμων στο οποίο έχει γίνει προσπάθεια ενσωμάτωσης του *L. casei* είναι, τα λουκάνικα τα οποία έχουν υποστεί ζύμωση. Συγκεκριμένα το στέλεχος ATCC 393 έχει ενσωματωθεί σε λουκάνικα που έχουν υποστεί ξηρή ζύμωση και έχει αποδειχθεί ότι παρέχουν στο προϊόν ένα μοναδικό απαλό άρωμα, χωρίς να έχει όμως ακόμη εφαρμοστεί σε προϊόντα μαζικής παραγωγής (Sidira et al., 2019).

Συμπερασματικά, ο *L. casei* είναι ένα πολλά υποσχόμενο προβιοτικό βακτήριο το οποίο χρησιμοποιείται και καταναλώνεται από τον άνθρωπο εδώ και πολλά χρόνια ενώ ταυτόχρονα αποτελεί μέρος της φυσιολογικής μικροχλωρίδας του (Abdel-Hamid, et al., 2019). Το είδος αυτό, όταν προστίθεται στα τρόφιμα έχει πολλαπλά οφέλη τόσο για την υγεία του καταναλωτή όσο και για την ποιότητα του ίδιου του τροφίμου (Aleman et al., 2024).

3.2 *Lactobacillus plantarum* και οι κυριότερες εφαρμογές του στα τρόφιμα

Όπως όλα τα γαλακτικά βακτήρια, έτσι και ο *Lactiplantibacillus plantarum* (πρώην *Lactobacillus plantarum*) είναι ένα θετικό κατά Gram βακτήριο (Yilmaz et al., 2022). Επιπλέον ο *L. plantarum* είναι προαιρετικά ετεροζυμωτικός μικροοργανισμός, ο οποίος απαντάται κυρίως σε τρόφιμα που έχουν υποστεί ζύμωση ενώ ταυτόχρονα αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι της ανθρώπινης μικροχλωρίδας. Σε αντίθεση με τα άλλα είδη γαλακτικών βακτηρίων, ο *L. plantarum* διαθέτει πολύ πιο πλούσιο γονιδίωμα, πράγμα που του επιτρέπει να προσαρμόζεται σχετικά εύκολα σε πολλά και διαφορετικά περιβάλλοντα και να παράγει ουσίες που να επιδρούν θετικά τόσο στα τρόφιμα όσο και στον άνθρωπο (Evanovich et al., 2019).

Ο *L. plantarum* υπάρχει φυσικά ή και προστίθεται σε μια μεγάλη γκάμα τροφίμων που περιλαμβάνει γαλακτοκομικά προϊόντα, λαχανικά, δημητριακά, προϊόντα κρέατος και ποτά που έχουν υποστεί ζύμωση όπως το κρασί (Dimitrellou et al., 2021). Η τόσο διαδεδομένη χρήση του οφείλεται στα μεταβολικά προϊόντα που είναι ικανός να παράγει συμβάλλοντας στη βελτίωση της ποιότητας των τροφίμων (Evanovich et al., 2019). Αναλυτικότερα ο *L. plantarum* συνεργάζεται άψογα με ζυμομύκητες κατά τη διάρκεια της μηλογαλακτικής ζύμωσης διάφορων χυμών φρούτων για την παραγωγή ξιδιού και αλκοολούχων ποτών. Οι αλδεϋδες, οι κετόνες και τα φαινολικά που παράγει κατά τη ζύμωση έχει αποδειχτεί ότι βελτιώνουν τη γεύση, το άρωμα και συνολικά την ποιότητα του προϊόντος (Hu et al., 2024). Επιπλέον, πολλές επιστημονικές μελέτες έχουν αποδείξει ότι ο *L. plantarum* μπορεί να παράγει μια σειρά αντιμικροβιακών ενώσεων όπως οργανικά οξέα, υπεροξειδίο, βακτηριοσίνες. Οι βακτηριοσίνες, συμβάλουν στη συντήρηση τροφίμων καθώς λειτουργούν εναντίων των παθογόνων όπως *L. monocytogenes* και αλλοιογόνων μικροοργανισμών. Επιπρόσθετα, ο *L. plantarum* παράγει μεταβολίτες οι οποίοι έχουν αντιοξειδωτικές και αντιμυκητιακές ιδιότητες ενώ παράλληλα βελτιώνει την παραγωγή βιταμινών και αμινοξέων (Yilmaz et al., 2022).

Ως προβιοτικός μικροοργανισμός, ο *L. plantarum* παρέχει αντίστοιχα οφέλη προάγοντας την υγεία του ανθρώπου (Prete et al., 2020). Ειδικότερα είναι ικανός να ρυθμίσει την εντερική μικροχλωρίδα και το ανοσοποιητικό σύστημα, να μειώσει την χοληστερίνη και τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου, να βελτιώσει τον μεταβολισμό του λίπους στο σώμα καταπολεμώντας την παχυσαρκία και να ανακουφίσει από προβλήματα που έχουν προκύψει από διάφορες παθήσεις του γαστρεντερικού συστήματος (Yilmaz et al., 2022).

Μερικά παραδείγματα τροφίμων που έχει χρησιμοποιηθεί ο *L. plantarum* και έχει προσδώσει αποδεδειγμένα λειτουργικά χαρακτηριστικά είναι το ζυμούμενο γάλα με *L. plantarum* το οποίο βελτιώνει το άρωμα και την αποθήκευση, το τόφου ζυμούμενο με *L. plantarum* το οποίο έχει αντιοξειδωτική δράση και τα ζυμούμενα φασόλια και κουνουπίδια με *L. plantarum* τα οποία βελτιώσαν τη σύνθεση των βιταμινών και των αμινοξέων (Yilmaz et al., 2022). Επιπλέον, η γιαούρτη με *L. plantarum* έχει διαπιστωθεί ότι είναι ικανή να ανακουφίσει από τη δυσκοιλιότητα και να μειώσει την χοληστερίνη (Latif et al., 2023).

Γενικά, ο *L. plantarum* είναι ένα πολύ καλά μελετημένο προβιοτικό βακτήριο. Τα στελέχη του *L. plantarum* εντοπίζονται σε πολλά τρόφιμα όμως κυρίως εντοπίζονται

στα ζυμούμενα γαλακτοκομικά. Η πολυπλοκότητα του γονιδιώματος, είναι αυτή που του παρέχει τη δυνατότητα να επιβιώνει και να αναπτύσσεται σε πολλές μήτρες τροφίμων και να προσδίδει πολλά λειτουργικά χαρακτηριστικά στα τρόφιμα, κυρίως σε αυτά που έχουν υποστεί ζύμωση (Yilmaz et al., 2022).

3.3 Ξήρανση μικροοργανισμών με λυοφιλίωση

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα τελευταία χρόνια τα προβιοτικά παράγονται μαζικά τόσο από τη βιομηχανία των τροφίμων όσο και από τη φαρμακοβιομηχανία προκειμένου να ικανοποιήσουν τις ανάγκες της αγοράς (Sayedboworn et al., 2019). Όμως τα προβιοτικά, είναι πολύ ευαίσθητα και ασταθή κατά τα διάφορα στάδια επεξεργασίας, αποθήκευσης και μεταφοράς των προϊόντων. Προκειμένου να σταθεροποιηθούν, να συντηρηθούν αλλά και να ενσωματωθούν ευκολότερα και αργότερα στα τρόφιμα, τα προβιοτικά κύτταρα υπόκεινται σε κάποιες επεξεργασίες όπως κρυσταλλοποίηση, ξήρανση με ψεκασμό και ξήρανση με κατάψυξη (λυοφιλίωση). Οι δυο πρώτες, είναι κατά πολύ πιο οικονομικές όμως δεν μπορούν να επιτύχουν τα υψηλά ποσοστά βιωσιμότητας των κυττάρων που μπορεί να επιφέρει η λυοφιλίωση (Verlhac et al., 2020).

Η λυοφιλίωση, είναι μια διαδικασία κατά την οποία το περιεχόμενο νερό του υλικού που λυοφιλιώνεται μεταφέρεται από υγρή σε στερεή κατάσταση με κατάψυξη και στη συνέχεια σε ατμό με εξάχνωση χρησιμοποιώντας χαμηλές πιέσεις και κατάλληλη θερμοκρασία (Alexeenko et al., 2020). Ειδικότερα, η λυοφιλίωση αποτελείται από τρία κύρια στάδια την κατάψυξη, την πρωτογενή και τη δευτερογενή ξήρανση. Η βασική διαφορά της με άλλες παρόμοιες μεθόδους είναι ότι το περιεχόμενο νερό καταψύχεται και παραμένει σε αυτή τη μορφή μέχρι να μεταβεί απευθείας στην αέρια. Το γεγονός αυτό, επιτρέπει στα προϊόντα να διατηρήσουν τα αρώματα, τη γεύση τους, καθώς και την περιεκτικότητά τους σε θρεπτικά συστατικά. Αυτή η μέθοδος αφυδάτωσης φαίνεται να είναι ηπιότερη συγκριτικά με τις άλλες, ενώ ταυτόχρονα μπορεί να εξασφαλίζει μεγαλύτερα ποσοστά βιώσιμων κυττάρων (Nowak and Jakubczyk, 2020).

Παρόλα αυτά, η λυοφιλίωση δεν χρησιμοποιείται συχνά από τις βιομηχανίες για μαζική παραγωγή, όπου προτιμώνται κυρίως μέθοδοι όπως ξήρανση με ψεκασμό (Luangthongkam et al., 2021). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι, είναι μια κοστοβόρα και χρονοβόρα διαδικασία. Επιπλέον, κατά τη λυοφιλίωση μπορεί να παρατηρηθούν φαινόμενα όπως μετουσίωση πρωτεϊνών και ενζύμων, βλάβη στο DNA,

τραυματισμός της κυτταρικής μεμβράνης και άλλες δομικές βλάβες (Kanimozhi et al., 2023). Παράλληλα, ο λάθος χειρισμός των συνθηκών της λυοφιλίωσης (θερμοκρασίας και πίεσης) μπορεί να επιφέρει υποβάθμιση του προϊόντος (Nowak and Jakubczyk, 2020). Αξίζει να αναφερθεί, ότι δεν ανταποκρίνονται με τον ίδιο τρόπο όλα τα προβιοτικά στελέχη στη λυοφιλίωση με αποτέλεσμα κάποια να είναι ανθεκτικότερα από κάποια άλλα (Verlhac et al., 2020).

Τα παραπάνω, μπορούν να αντιμετωπιστούν με την χρήση κρυοπροστατευτικών μέσων, τα οποία είναι ουσίες, όπως πρωτεΐνες, αμινοξέα, σάκχαρα και ολιγοσακχαρίτες, που είναι ικανές να προστατεύσουν τα κύτταρα κατά τη διάρκεια της διαδικασίας της λυοφιλίωσης (Sayedboworn et al., 2019). Ένα άλλος τρόπος, είναι η ενσωμάτωσή τους σε απλές ή σύνθετες μήτρες τροφίμων όπως αποβουτυρωμένο γάλα. Τα συστατικά αυτών, έχει αποδειχτεί ότι μπορούν να προστατεύσουν τα κύτταρα από πιθανές βλάβες λόγω αφυδάτωσης (Araujo et al., 2020). Τέλος, η σωστή ρύθμιση των συνθηκών της λυοφιλίωσης οι οποίες θα ανταποκρίνονται στις ανάγκες του εκάστοτε υλικού αποτελεί βασικό τρόπο αποφυγής προβλημάτων και βλαβών στο προϊόν (Nowak and Jakubczyk, 2020).

Η μέθοδος αυτή, χρησιμοποιείται για τη σταθεροποίηση προϊόντων όπως βιολογικά υλικά, εμβόλια και άλλα φαρμακευτικά προϊόντα. Λυοφιλωμένα προβιοτικά, έχουν ενσωματωθεί σε πολλά τρόφιμα και ποτά όπως γαλακτοκομικά, σε νιφάδες δημητριακών, ξηρούς καρπούς και προϊόντα κρασιού (Prapa et al., 2023).

Γενικά, η λυοφιλίωση αποτελεί μια σύγχρονη μέθοδο αφυδάτωσης, η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη σταθεροποίηση και διατήρηση διαφόρων ειδών υλικών, επιτρέποντας την ευκολότερη διαχείριση των παραγόμενων προϊόντων (Kanimozhi and Sukumar, 2023). Ταυτόχρονα, δίνει τη δυνατότητα παραγωγής νέων καινοτόμων λειτουργικών τροφίμων, τα οποία είναι δυνατό να περιέχουν επαρκείς ποσότητες βιώσιμων κυττάρων για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα από τις άλλες τεχνικές που είναι διαθέσιμες. Όμως, το κόστος πολλές φορές είναι αποτρεπτικό για την εφαρμογή της από μεγάλες βιομηχανίες (Prapa et al., 2023).

ΜΕΡΟΣ II : ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Μεθοδολογία

4.1 Υλικά και εξοπλισμός

Για τη σωστή και ακριβή διεξαγωγή του πειράματος κρίθηκε απαραίτητη η χρήση των υλικών και των οργάνων που παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 4.1: Υλικά και συσκευές.

Υλικά και Συσκευές	Διαλύματα και Υποστρώματα
Τιπς αυτόματης πιπέτας	Απεσταγμένο κι αποστειρωμένο νερό
Γυάλινη ράβδος	Δισκία Ringer
Κουτάλι	MRS Agar
Γυάλινα φιαλίδια για Λυοφιλίωση	MRS Broth
Δίσκοι ζύγισης	KCl
Τρυβλία petri	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
Κωνικές φιάλες	NaHCO_3
Σωληνάκια Falcon	NaCl
Μικροβιολογικά σωληνάκια	Τνες μήλου
Πουάρ	Κρέμα εμπορίου Φαρίν λακτέ
Βαθμονομημένα Σιφόνια	
Ποτήρια ζέσεως	
Πλαστικά δοχεία αποθήκευσης	
Φιάλες Duran	
Αυτόματη πιπέτα	
Γκαζάκι υγραερίου	
Αναλυτικός ζυγός	
Συσκευή ανάδευσης vortex	
Μετρητής αποικιών	
Υδατόλουτρο	
Αυτόκαυστο	
Φυγόκεντρος	
Θάλαμος επώασης	

Στο πείραμα αυτό, επιλέχθηκε το βρεφικό παρασκεύασμα Φαρίν λακτέ (NOYNOY) το οποίο είναι πλούσιο σε βιταμίνες A, D, B₁₂ και ιχνοστοιχεία που συμβάλλουν στην ομαλή ανάπτυξη των βρεφών.

Οι ίνες μήλου (Όλα Bio) είναι ένα βιολογικό προϊόν υψηλής περιεκτικότητας σε εδώδιμες ίνες και υδατάνθρακες.

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε στο χώρο των εργαστηρίων Τροφίμων και Μικροβιολογίας του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων με τη χρήση του διαθέσιμου εργαστηριακού εξοπλισμού τους.

4.2 Παρασκευή διαλυμάτων

Διάλυμα Ringer

Για την αραίωση των δειγμάτων με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων χρησιμοποιήθηκε αρχικά διάλυμα Ringer (NaCl 1,25g, KCl 0,0525g, CaCl₂ * 2H₂O 0,0425g και NaHCO₃ 0,25g) σε 500 mL απεσταγμένο νερό.

MRS Broth

Το MRS Broth χρησιμοποιούνταν για την ανάπτυξη των προβιοτικών στελεχών και παρασκευάζονταν με βάση της οδηγίες της εταιρείας και στη συνέχεια αποστειρώνονταν και αποθηκεύονταν μέχρι τη χρήση τους.

MRS Agar

Το MRS Agar χρησιμοποιούνταν για την καλλιέργεια των προβιοτικών στελεχών και παρασκευάζονταν με βάση της οδηγίες της εταιρείας και στη συνέχεια αποστειρώνονταν και μέχρι πριν τη χρήση αποθηκεύονταν σε θερμαινόμενο θάλαμο στους 50°C.

4.3 Πειραματική πορεία

4.3.1 Καλλιέργεια προβιοτικών στελεχών

Τα στελέχη *L. casei* ATCC 393 και *L. plantarum* 2035 ήταν αποθηκευμένα στην κατάψυξη στους -18°C σε φιαλίδια με γλυκερόλη. Αρχικά έγινε λήψη 100 μL από αυτά τα φιαλίδια, τα οποία προστεθήκαν σε σωληνάκια με 10 mL MRS Broth και επωαστήκαν στους 37°C για 24 ώρες. Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε και μετά από επώαση για 24 ώρες, και έπειτα το περιεχόμενο από τα σωληνάκια μεταφέρθηκε σε φιάλες που περιείχαν 100 mL MRS Broth και επωάστηκαν ξανά στους 37°C για 24 ώρες. Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιήθηκε υπό ασηπτικές συνθήκες με σκοπό την ανάπτυξη των προβιοτικών κυττάρων.

4.3.2 Προετοιμασία για λυοφιλίωση

Το περιεχόμενο των ανωτέρω φιαλών μετά από την επώαση φυγοκεντρήθηκε στις 4.000 στροφές για 2 λεπτά. Το υπερκείμενο υγρό απορρίφθηκε και το ίζημα που παρέμεινε πλύθηκε με αποστειρωμένο διάλυμα Ringer και μετά από φυγοκέντρηση συλλέχθηκε το τελικό ίζημα. Στην περίπτωση των ινών μήλου στη διαδικασία αυτή προστέθηκαν 0,25 g σκόνης ινών μήλου.

4.3.3 Λυοφιλίωση

Η λυοφιλίωση πραγματοποιήθηκε σε λυοφιλιωτή, όπου το δείγμα προς λυοφιλίωση τοποθετήθηκε αρχικά για 24 ώρες στην κατάψυξη και στη συνέχεια για 24-48 ώρες, ανάλογα το δείγμα.

4.3.4 Μεταχείριση μετά τη λυοφιλίωση

Τα δείγματα μετά τη λυοφιλίωση χωριστήκαν σε οκτώ ομάδες. Οι πρώτες τέσσερις αφορούσαν τον ελεύθερο *L. casei* ATCC 393 και τον *L. casei* ATCC 393 με ίνες μήλου, τον ελεύθερο *L. plantarum* 2035 και τον *L. plantarum* 2035 με ίνες μήλου. Οι υπόλοιπες αφορούσαν τις βρεφικές κρέμες με ελεύθερο *L. casei* ATCC 393 και *L. casei* ATCC 393 με ίνες μήλου και με ελεύθερο *L. plantarum* 2035 και *L. plantarum* 2035 με ίνες μήλου.

Τα φιαλίδια που περιείχαν τον *L. casei* ATCC 393 με και χωρίς ίνες μήλου και τον *L. plantarum* 2035 αντίστοιχα, οδηγήθηκαν για αποθήκευση σε σταθερές συνθήκες δωματίου (25°C). Στη συνέχεια ακολούθησε η παρασκευή μιγμάτων με τα ανάλογα δείγματα και την εμπορική κρέμα. Τα μείγματα παρασκευάστηκαν σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις 1%, 5%, 10% λυοφιλιωμένου μικροοργανισμού και ινών μήλου. Ως δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν 5g εμπορικής βρεφικής κρέμας.



Εικόνα 4.1: Μίγματα προβιοτικών βρεφικών κρεμών με 1%, 5% και 10% λυοφιλιωμένου μικροοργανισμού σε ίνες μήλου αποθηκευμένα σε σταθερές συνθήκες δωματίου (25°C) (Πηγή: Από προσωπικό αρχείο).

Στόχος της παραπάνω διαδικασίας, ήταν ο μικροοργανισμός να ενσωματωθεί και να προστατευτεί, όσον το δυνατόν καλύτερα γινόταν. Τα δοχεία με τα μίγματα αποθηκεύτηκαν στις ίδιες συνθήκες με τα προηγούμενα.

4.3.5 Υπολογισμός βιωσιμότητας

Τα παραπάνω δείγματα εξετάστηκαν ως προς τη βιωσιμότητα των προβιοτικών στελεχών στις 0, 7, 15, 30 ημέρες αποθήκευσης ακολουθώντας την παρακάτω διαδικασία.

Τα φιαλίδια που περιείχαν τον *L. casei* ATCC 393 ή τον *L. plantarum* 2035 με και χωρίς ίνες μήλου επανυδατώθηκαν με 1 mL αποστειρωμένου απεσταγμένου νερού για 30 λεπτά. Έπειτα, όλη η ποσότητα του φιαλιδίου προστέθηκε σε 9 mL αποστειρωμένου διαλύματος Ringer και ακολουθήθηκε έντονη μηχανική ανάδευση. Η διαδικασία συνέχιζε κάθε φορά μέχρι τον επιθυμητό αριθμό αραιώσεων. Έπειτα, επιστρώθηκαν τα αντίστοιχα τρυβλία, με τη μέθοδο της ενσωμάτωσης, λαμβάνοντας κάθε φορά 1mL από το αντίστοιχο σωληνάκι. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε και στα δείγματα πριν τη λυοφιλίωση προκειμένου να υπολογιστούν οι βιώσιμες μονάδες που υπήρχαν στα αρχικά δείγμα πριν τη λυοφιλίωση.

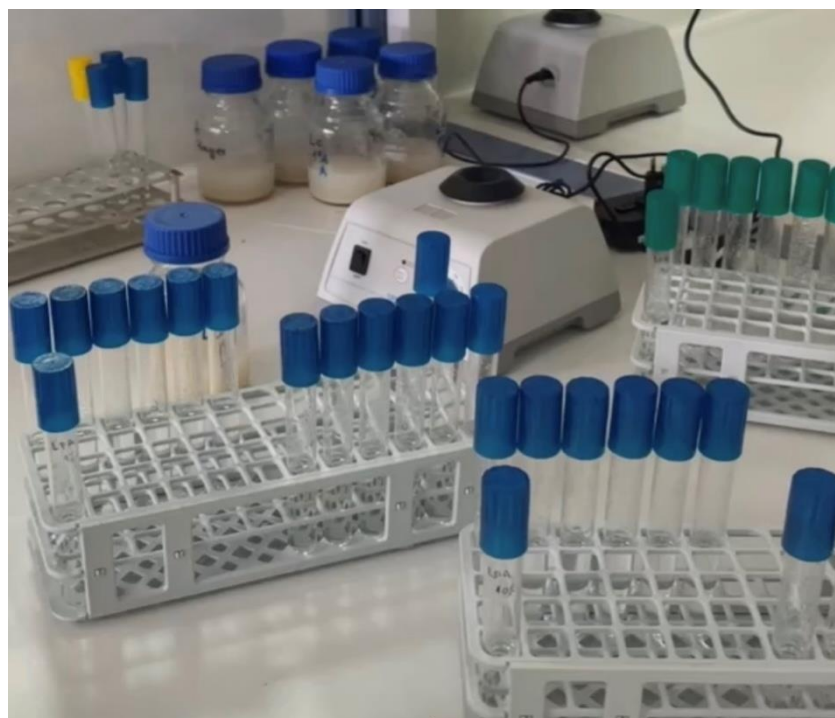


Εικόνα 4.2: Επανυδάτωση λυοφιλιωμένων *L. casei* ATCC 393 και *L. plantarum* 2035 (Πηγή: Από προσωπικό αρχείο).

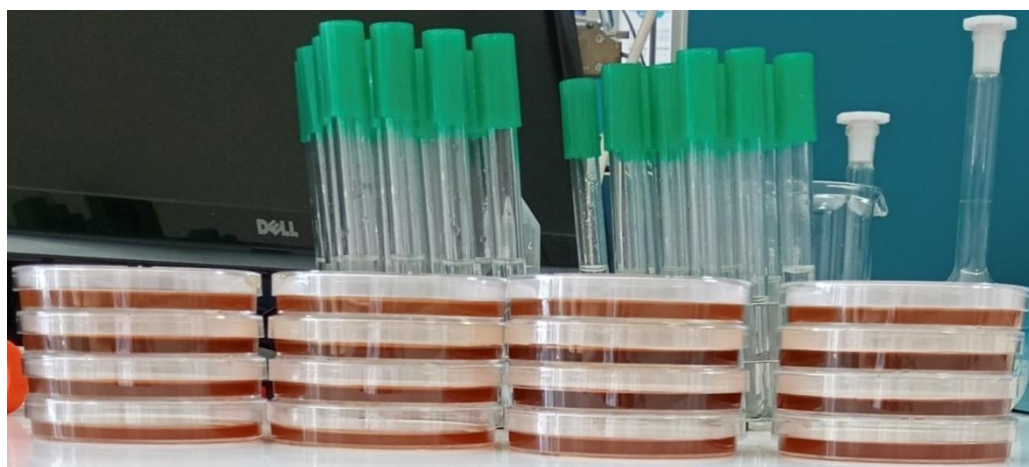


Εικόνα 4.3: Επανυδάτωση λυοφιλιωμένων *L. casei* ATCC 393 και *L. plantarum* 2035 με ίνες μήλου (Πηγή: Από προσωπικό αρχείο).

Για τις κρέμες χωρίς ίνες μήλου, το μίγμα κρέμας-μικροοργανισμού τοποθετήθηκε μαζί με 20 mL αποστειρωμένου απεσταγμένου νερού σύμφωνα με τις οδηγίες της εμπορικής κρέμας, σε falcon των 50 mL και ακολούθησε ανάδευση με συσκευή vortex. Απαραίτητη προϋπόθεση ήταν το νερό που χρησιμοποιήθηκε να βρίσκεται σε θερμοκρασία 37 °C προκειμένου να διαλύσει το μίγμα χωρίς να βλάψει τα προβιοτικά στελέχη. Έπειτα, 10 g του παραπάνω μείγματος αραιώθηκαν με 90 mL αποστειρωμένου διαλύματος Ringer σε φιάλη Duran και αναδεύτηκαν ξανά. Τέλος πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις και επίστρωση των αντίστοιχων τρυβλίων με τον ίδιο τρόπο που αναφέρεται παραπάνω. Παρόμοια διαδικασία, ακολούθηθηκε και για τις κρέμες με ίνες μήλου.



Εικόνα 4.4: Σωληνάκια διαδοχικών αραιώσεων των δειγμάτων των προβιοτικών βρεφικών κρεμών με ίνες μήλου (Πηγή: Από προσωπικό αρχείο).



Εικόνα 4.5: Τρυβλία με MRS Agar των δειγμάτων των προβιοτικών βρεφικών κρεμών με ίνες μήλου (Πηγή: Από προσωπικό αρχείο).

Προκειμένου να, εξασφαλίσουμε μέγιστη ακρίβεια και επαναληψιμότητα, το κάθε δείγμα παρασκευάστηκε δυο φορές (A, B). Η μέτρηση των αποικιών των τρυβλίων έγιναν μετά από 48 ώρες με την χρήση μετρητή αποικιών ενώ η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με την χρήση του προγράμματος “Excel”.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Αποτελέσματα

Στο κεφάλαιο αυτό παρατίθενται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από το πειραματικό μέρος. Η βιωσιμότητα των προβιοτικών αξιολογήθηκε και τα αποτελέσματα συνοψίζονται στα παρακάτω διαγράμματα. Οι τιμές αφορούν τους μέσους όρους των δυο επαναλήψεων (A, B) κάθε δείγματος.

5.1 Μεταβολή βιωσιμότητας των προβιοτικών πριν και μετά τη λυοφιλίωση

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μικροβιολογική ανάλυση των δειγμάτων των προβιοτικών βακτηρίων πριν και μετά τη λυοφιλίωση παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα.

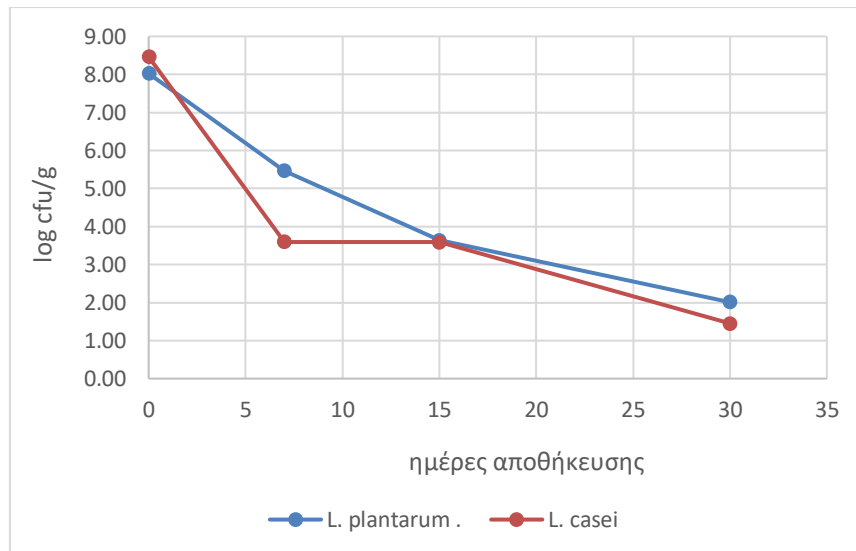
Πίνακας 5.1: Αποτελέσματα μικροβιολογικής ανάλυσης πριν και μετά τη λυοφιλίωση των προβιοτικών.

log cfu/g	<i>L. plantarum</i>	<i>L. casei</i>
Πριν	9,04± 0,02	9,15± 0,02
Μετά	8,32± 0,59	8,30± 0,15

Η λυοφιλίωση φαίνεται να μην προκάλεσε μεγάλη πτώση της βιωσιμότητας των προβιοτικών στελεχών. Συγκεκριμένα ο *L. plantarum* μειώθηκε κατά 0,72 log cfu/g ενώ ο *L. casei* κατά 0,85 log cfu/g Σκόνης Λυοφιλιωμένου Μικροοργανισμού (Σ.Λ.Μ).

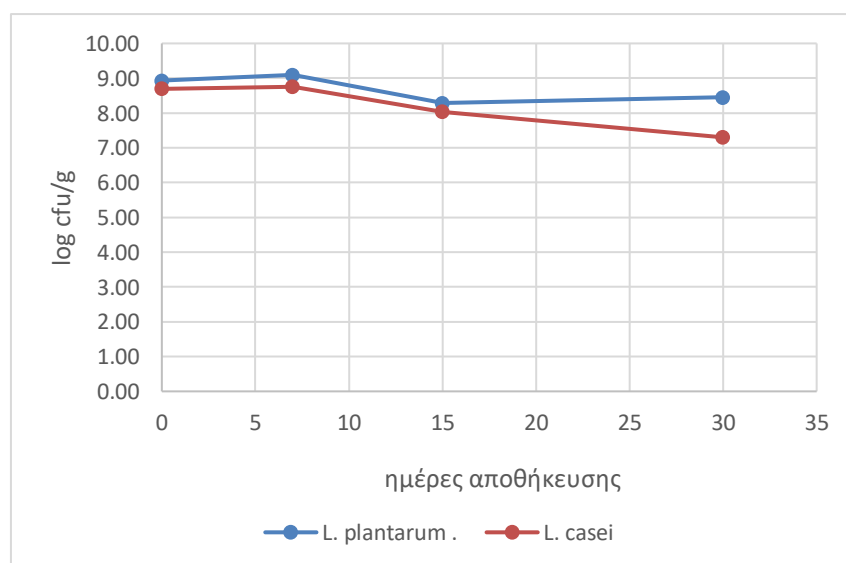
5.2 Μεταβολή βιωσιμότητας των προβιοτικών χωρίς και με ίνες μήλου

Στο παρακάτω διάγραμμα, αναπαρίσταται η μεταβολή της βιωσιμότητας των προβιοτικών μικροοργανισμών κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης. Συγκεκριμένα, στο Διάγραμμα 5.1, φαίνεται η πτώση της βιωσιμότητας και των δύο προβιοτικών στελεχών με το πέρασμα του χρόνου, η οποία είναι εντονότερη κατά τις πρώτες επτά ημέρες αποθήκευσης. Όσον αφορά τον *L. plantarum*, παρατηρείται πτώση της βιωσιμότητας από 8,02 ±0,16 σε 2,00 ± 0,35 log cfu/g Σ.Λ.Μ, ενώ στον *L. casei* καταγράφηκε μεγαλύτερη μείωση από 8,46 ±0,04 σε 1,45 ± 1,45 log cfu/g Σ.Λ.Μ, κατά τις 0 και 30 ημέρες αποθήκευσης αντίστοιχα.



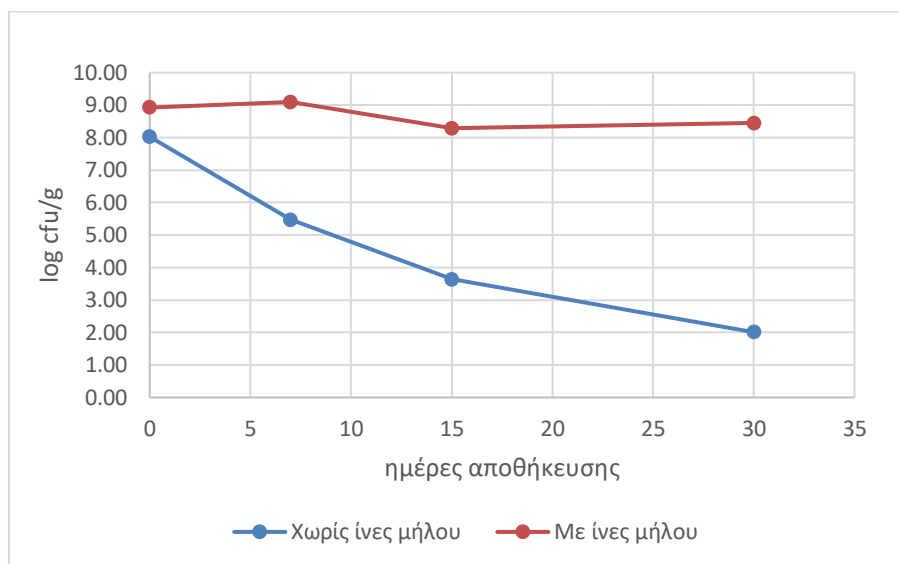
Διάγραμμα 5.1: Αποτελέσματα μικροβιολογικής ανάλυσης δειγμάτων προβιοτικών χωρίς ίνες μήλου κατά τις τριάντα ημέρες αποθήκευσης σε συνθήκες δωματίου (25°C).

Στο Διάγραμμα 5.2, αποτυπώνεται η μείωση της βιωσιμότητας των προβιοτικών βακτηρίων λυοφιλωμένων με ίνες μήλου. Στην περίπτωση αυτή, τα στελέχη εμφανίζουν ομαλότερη μεταβολή βιωσιμότητας καθ' όλη τη διάρκεια αποθήκευσης τους. Το στέλεχος *L. casei*, εμφανίζει μεγαλύτερη μείωση από τον *L. plantarum* με τιμές να κυμαίνονται για τον *L. casei* από 8,93 σε 8,44 log cfu/g ιών μήλου, ενώ για το στέλεχος *L. plantarum* από 8,69 σε 7,30 log cfu/g ιών μήλου κατά τις 30 ημέρες αποθήκευσης.



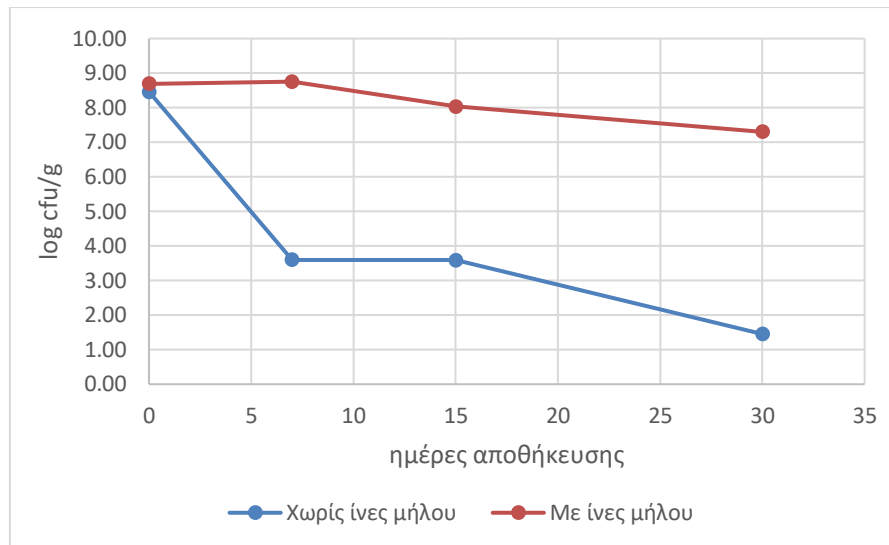
Διάγραμμα 5.2: Αποτελέσματα μικροβιολογικής ανάλυσης δειγμάτων προβιοτικών με ίνες μήλου κατά τις τριάντα ημέρες αποθήκευσης σε συνθήκες δωματίου (25°C).

Στο Διάγραμμα 5.3, φαίνεται η θετική επίδραση των ινών μήλου στη συντήρηση του στελέχους *L. plantarum* κατά την αποθήκευσή του σε συνθήκες περιβάλλοντος. Ειδικότερα σημειώθηκε μείωση μόλις 0,48 log cfu/g ινών μήλου έναντι 6,44 cfu/g Σ.Λ.Μ. χωρίς ίνες μήλου.



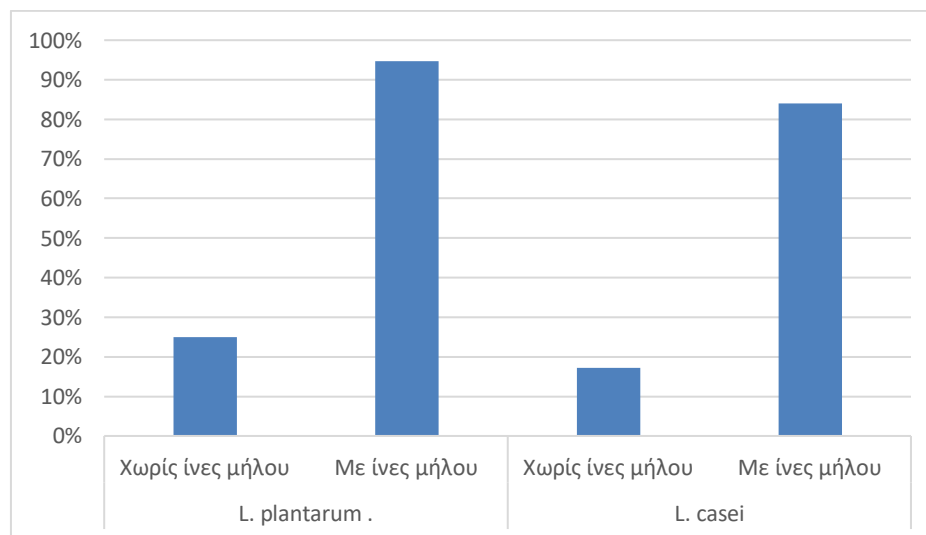
Διάγραμμα 5.3: Αποτελέσματα μικροβιολογικής ανάλυσης δειγμάτων του *L. plantarum* με και χωρίς ίνες μήλου κατά τις τριάντα ημέρες αποθήκευσης σε συνθήκες δωματίου (25°C).

Ομοίως στο Διάγραμμα 5.4, αποτυπώνεται η θετική επίδραση των ινών μήλου στη συντήρηση του στελέχους *L. casei* κατά την αποθήκευση του σε συνθήκες δωματίου. Ειδικότερα, καταγράφηκε μείωση 1,40 log cfu/g ινών μήλου ενώ στα δείγματα που δεν περιείχαν ίνες μήλου μειώθηκε κατά 5,85 cfu/g Σ.Λ.Μ.



Διάγραμμα 5.4: Αποτελέσματα μικροβιολογικής ανάλυσης δειγμάτων του *L. casei* με και χωρίς ίνες μήλου κατά τις τριάντα ημέρες αποθήκευσης σε συνθήκες δωματίου (25°C).

Συνολικά τα αποτελέσματα μπορούν να εκφραστούν και με τη μορφή ποσοστού. Στο Διάγραμμα 5.5 που ακολουθεί αναπαρίσταται η διατήρηση των επιπέδων των προβιοτικών στελεχών κατά τον έναν μήνα αποθήκευσης.



Διάγραμμα 5.5: Ποσοστά επιβίωσης του *L. casei* και του *L. plantarum* κατά τον πρώτο μήνα αποθήκευσης σε συνθήκες δωματίου (25°C).

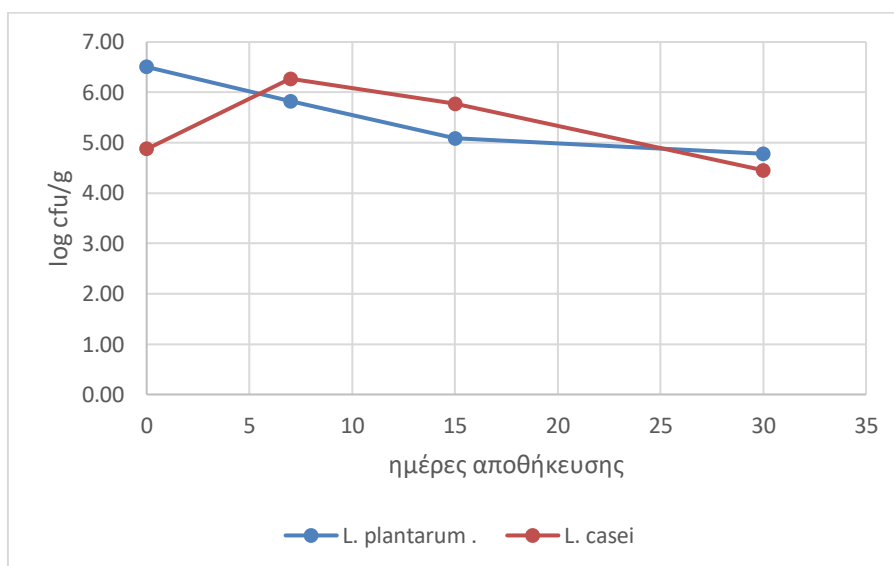
Στο παραπάνω διάγραμμα αποτυπώνεται η ευεργετική δράση των ινών μήλου στη διατήρηση της βιωσιμότητας των *L. casei* και *L. plantarum*. Συγκεκριμένα μόνο το 17% του *L. casei* επιβίωσε χωρίς ίνες ενώ με την παρουσία ινών το ποσοστό αυτό

αυξήθηκε περίπου κατά πέντε φορές (84%). Ομοίως το ποσοστό του *L. plantarum* που επιβίωσε χωρίς ίνες μήλου ήταν 25%, ενώ με ίνες μήλου αυξήθηκε στο 95%.

5.3 Μεταβολή βιωσιμότητας των προβιοτικών σε βρεφικές κρέμες χωρίς ίνες και με ίνες μήλου

5.3.1 Βρεφικές κρέμες χωρίς ίνες μήλου

Στο Διάγραμμα 5.6 αναπαρίσταται η σταδιακή μείωση της βιωσιμότητας του *L. casei* και του *L. plantarum* σε βρεφική κρέμα χωρίς ίνες μήλου κατά τον πρώτο μήνα αποθήκευσης. Τα λυοφιλωμένα προβιοτικά στελέχη παρέμειναν ζωντανά σε σχετικά υψηλές ποσότητες ενώ καταγράφηκε ομαλότερη μείωση της βιωσιμότητάς τους μέσα σε εμπορική βρεφική κρέμα.



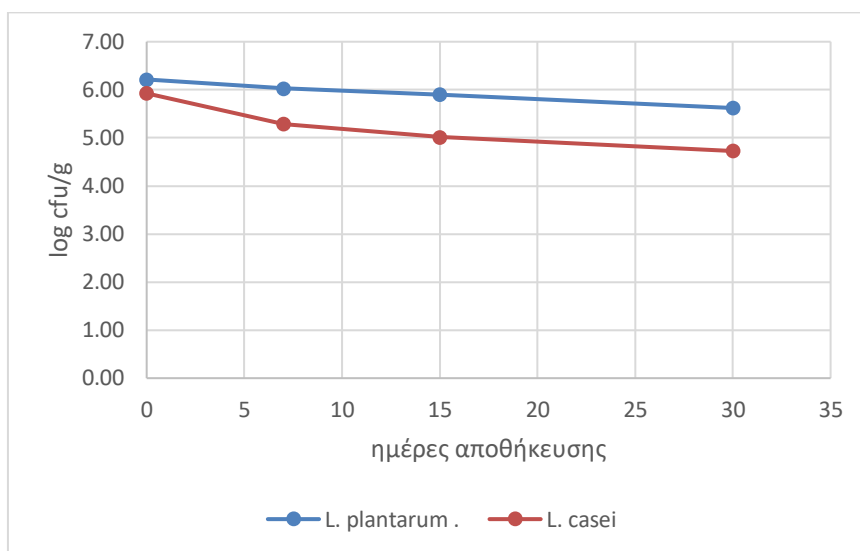
Διάγραμμα 5.6: Αποτελέσματα μικροβιολογικής ανάλυσης δειγμάτων βρεφικών κρεμών με προβιοτικά χωρίς ίνες μήλου κατά τις τριάντα ημέρες αποθήκευσης σε συνθήκες δωματίου (25°C).

Όπως φαίνεται και παραπάνω ο *L. plantarum* ξεκινάει από 6,5 log cfu/g και καταλήγει σε $4,8 \pm 0,1$ log cfu/g έτοιμης κρέμας. Όσον αφορά τον *L. casei*, την πρώτη ημέρα ανιχνεύτηκαν $4,87 \pm 0,03$ log cfu/g ενώ την έβδομη ημέρα αποθήκευσης εντοπιστήκαν $6,3 \pm 0,02$ log cfu/g έτοιμης κρέμας και $4,5 \pm 0,1$ log cfu/g έτοιμης κρέμας. μετά από ένα μήνα Δηλαδή τα επίπεδα του *L. casei*, φαίνεται να αυξάνονται στις πρώτες επτά ημέρες, γεγονός που είναι αδύνατον, καθώς η συνθήκες αποθήκευσης αλλά και το προϊόν δεν ευνοούν τον πολλαπλασιασμό του.

Πιθανόν τα αποτελέσματα αυτά να αποτελούν συνέπεια κάποιου λανθασμένου χειρισμού κατά τις μικροβιολογικές ανάλυσης.

5.3.2 Βρεφικές κρέμες με 1% ίνες μήλου

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μικροβιολογική ανάλυση των βρεφικών κρεμών με 1% σκόνης λυοφιλιωμένου μικροοργανισμού με ίνες μήλου κατά την αποθήκευση παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 5.7 .

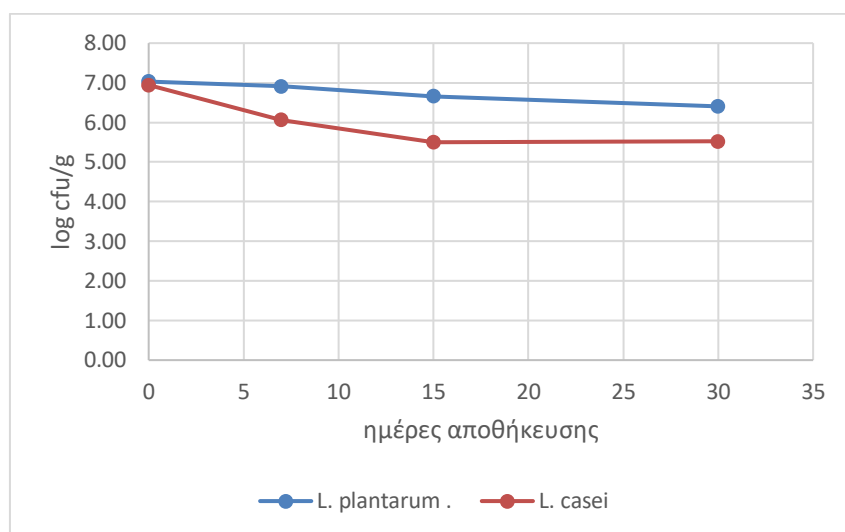


Διάγραμμα 5.7: Αποτελέσματα μικροβιολογικής ανάλυσης δειγμάτων βρεφικών κρεμών με 1% περιεκτικότητα λυοφιλιωμένο μικροοργανισμό σε ίνες μήλου κατά τις τριάντα ημέρες αποθήκευσης σε συνθήκες δωματίου (25°C)..

Από το παραπάνω διάγραμμα καθίστανται σαφές ότι προσθήκη του μικροοργανισμού με 1% ίνες μήλου σε βρεφική κρεμά είχε σαν αποτέλεσμα την διατήρηση της βιωσιμότητας των προβιοτικών στελεχών σε υψηλότερα επίπεδα κατά την αποθήκευση. Αναλυτικότερα ο *L. plantarum* από $6,21 \pm 0,23$ μειώθηκε σε $5,62 \pm 0,7$ log cfu/g έτοιμης βρεφικής κρέμας και ο *L. casei* από $5,79 \pm 0,23$ μειώθηκε σε $4,73 \pm 0,04$ log cfu/g έτοιμης βρεφικής κρέμας. Η βιωσιμότητα του *L. casei* κατάγραφε με μεγαλύτερη πτώση από τον *L. plantarum* κατά τις πρώτες επτά ημέρες αποθήκευσης ενώ στη συνέχεια η μείωση και των δυο προβιοτικών έγινε με τον ίδιο ρυθμό.

5.3.3 Βρεφικές κρέμες με 5% ίνες μήλου

Ομοίως, η βιωσιμότητα των προβιοτικών σε μίγματα βρεφικών κρεμών που περιείχαν 5% ίνες μήλου διατηρήθηκε σε ακόμα πιο υψηλά επίπεδα από τα προηγούμενα. Επίσης, η μείωση που σημείωσε είναι κατά πολύ μικρότερη, όπως απεικονίζεται στο Διάγραμμα 5.8.

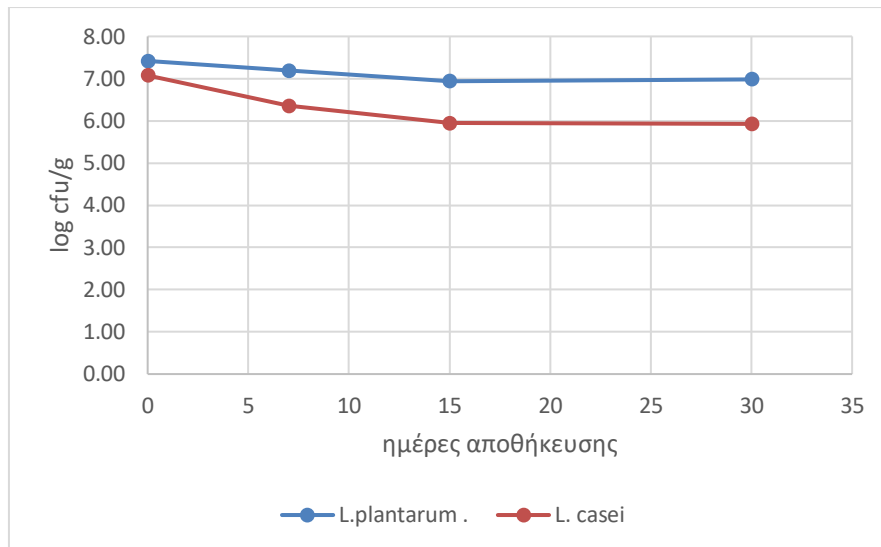


Διάγραμμα 5.8: Αποτελέσματα μικροβιολογικής ανάλυσης δειγμάτων βρεφικών κρεμών με 5% περιεκτικότητα λυοφιλιωμένο μικροοργανισμό σε ίνες μήλου κατά τις τριάντα ημέρες αποθήκευσης σε συνθήκες δωματίου (25°C).

Σε αυτή την περίπτωση την πρώτη ημέρα εντοπίστηκαν για τον *L. plantarum* $7,03 \pm 0,36$ και για τον *L. casei* $6,97 \pm 0,11$ log cfu/g έτοιμης βρεφικής κρέμας ενώ μετά από τριάντα ημέρες αποθήκευσης βρέθηκαν για τον *L. plantarum* $6,40 \pm 0,07$ log cfu/g και για τον *L. casei* $5,51 \pm 0,02$ log cfu/g έτοιμης βρεφικής κρέμας. Οι τιμές αυτές, είναι σημαντικά μεγαλύτερες από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων που δεν περιείχαν καθόλου ή περιείχαν μόνο 1% ίνες μήλου.

5.3.4 Βρεφικές κρέμες με 10% ίνες μήλου

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τα δείγματα των βρεφικών κρεμών με προβιοτικά που περιείχαν 10% ίνες μήλου, ήταν ακόμα πιο ενθαρρυντικά καθώς η βιωσιμότητα και των δυο στελεχών κατά την αποθήκευση διατηρήθηκε σε υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα. Η βιωσιμότητα και των δυο στελεχών αναπαρίσταται γραφικά στο Διάγραμμα 5.9 που ακολουθεί.

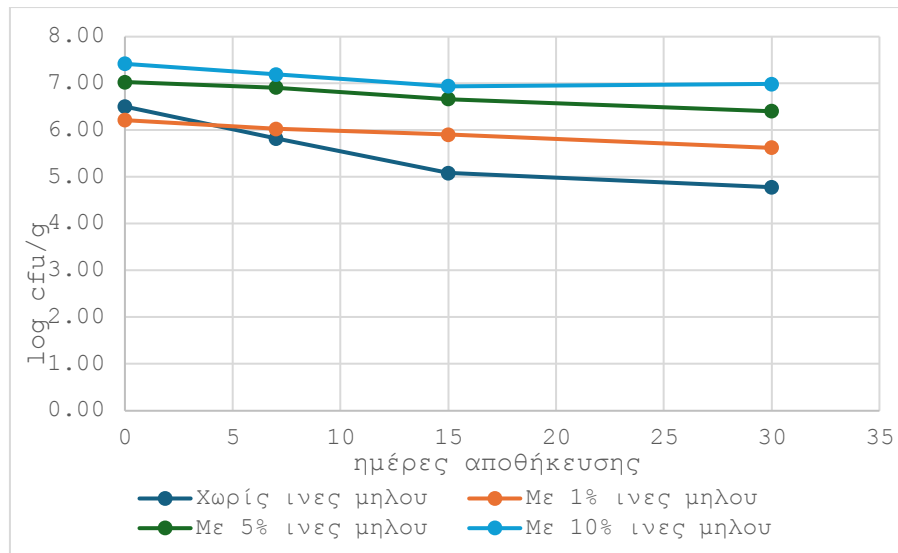


Διάγραμμα 5.9: Αποτελέσματα μικροβιολογικής ανάλυσης δειγμάτων βρεφικών κρεμών με 10% περιεκτικότητα λυοφιλωμένο μικροοργανισμό σε ίνες μήλου κατά τις τριάντα ημέρες αποθήκευσης σε συνθήκες δωματίου (25°C).

Ειδικότερα, ο *L. plantarum* ξεκινάει από $7,42 \pm 0,06 \log \text{ cfu/g}$ και καταλήγει σε $6,98 \pm 0,04 \log \text{ cfu/g}$ έτοιμης κρέμας. Σε παρόμοια επίπεδα κινήθηκε και ο *L. casei*, στα δείγματα του οποίου την πρώτη ημέρα ανιχνεύτηκαν $7,07 \log \text{ cfu/g}$ ενώ την έβδομη ημέρα αποθήκευσης εντοπίστηκαν $5,93 \pm 0,09 \log \text{ cfu/g}$ έτοιμης κρέμας. Η πτώση της βιωσιμότητας του *L. casei* και σε αυτή την περίπτωση ήταν λίγο μεγαλύτερη από αυτή του *L. plantarum* όπως και στα άλλα δείγματα. Επιπλέον, αξίζει να αναφερθεί ότι τα επίπεδα βιωσιμότητας και των δυο στελεχών μετά από τις δεκαπέντε ημέρες διατηρήθηκαν σε σταθερά επίπεδα με τις αντίστοιχες γραμμές στο παραπάνω διάγραμμα να είναι σχεδόν ευθείες και να κινούνται παράλληλα.

5.3.5 Συγκεντρωτικά αποτελέσματα των βρεφικών κρεμών

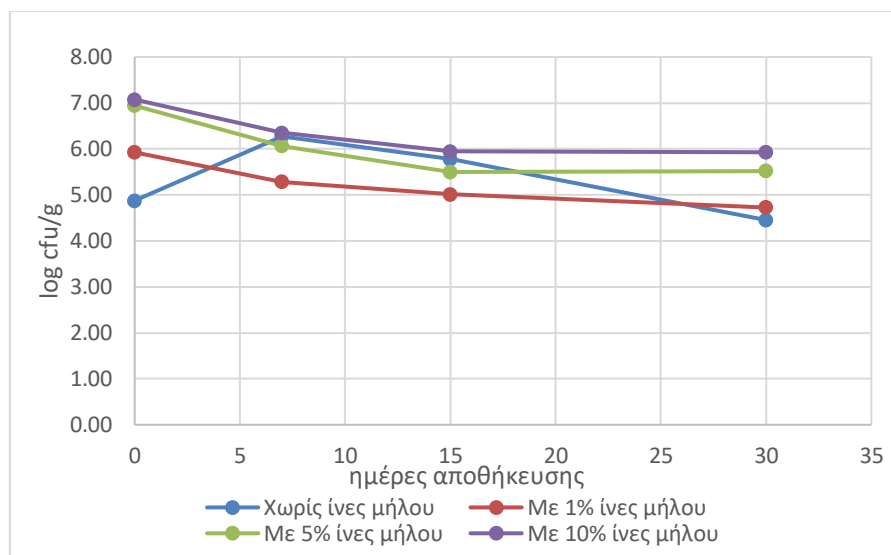
Στο Διάγραμμα 5.10 αναπαρίσταται γραφικά η επίδραση που έχουν οι ίνες μήλου σε εμπορική βρεφική κρεμά στη διατήρηση του στελέχους *L. plantarum* κατά την αποθήκευση του για τριάντα ημέρες σε συνθήκες περιβάλλοντος.



Διάγραμμα 5.10: Αποτελέσματα μικροβιολογικής ανάλυσης δειγμάτων βρεφικών κρεμών με 0, 1, 5, 10% περιεκτικότητα λυοφιλιωμένου *L. plantarum* σε ίνες μήλου κατά τις τριάντα ημέρες αποθήκευσης σε συνθήκες δωματίου (25°C).

Η πτώση της βιωσιμότητας του *L. plantarum* στα δείγματα χωρίς ίνες μήλου είναι συνεχόμενη και μεγαλύτερη από τα υπόλοιπα καθώς, μειώνεται κατά 1,72 log cfu/g έτοιμης βρεφικής κρέμας. Επιπλέον, από το παραπάνω διάγραμμα προκύπτει ότι τα επίπεδα βιωσιμότητας του *L. plantarum* αυξάνονται αναλογικά με την περιεκτικότητα σε ίνες μήλου. Οι γραμμές που αναπαριστούν τις διάφορες συγκέντρωσης των δειγμάτων με ίνες μήλου μετά τις δεκαπέντε ημέρες είναι σχεδόν παράλληλες και η μια πάνω από την άλλη. Χαρακτηριστικά αξίζει να αναφέρει ότι για τα δείγματα με 1% ίνες μήλου καταγράφηκε μείωση 0,59 log cfu/g ενώ για τα δείγματα με 10% ίνες μήλου η μείωση ήταν 0,43 log cfu/g.

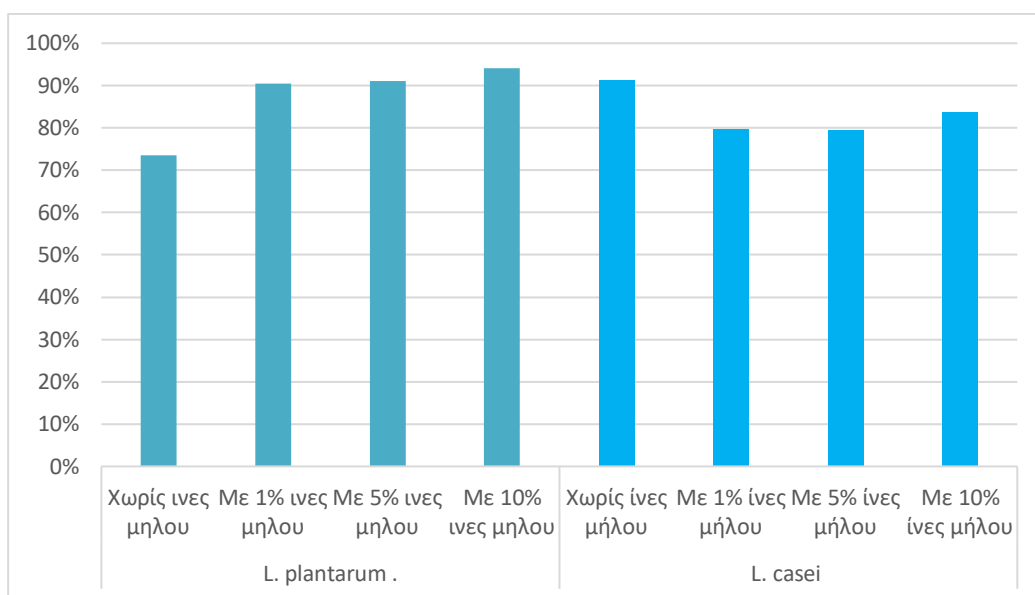
Ομοίως στο Διάγραμμα 5.11, αναπαρίσταται γραφικά η επίδραση που έχουν οι ίνες μήλου σε εμπορική βρεφική κρέμα στη διατήρηση του στελέχους *L. casei* κατά την αποθήκευση του για τριάντα ημέρες σε συνθήκες περιβάλλοντος.



Διάγραμμα 5.11: Αποτελέσματα μικροβιολογικής ανάλυσης δειγμάτων βρεφικών κρεμών με 0, 1, 5, 10% περιεκτικότητα λυοφιλωμένου *L. casei* σε ίνες μήλου κατά τις τριάντα ημέρες αποθήκευσης σε συνθήκες δωματίου (25°C).

Στα δείγματα χωρίς ίνες μήλου η βιωσιμότητα του *L. casei* μειώνεται σταθερά ενώ όπως αναφέρθηκε και παραπάνω τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την πρώτη μέρα αποθήκευσης αυτών δεν είναι αντιπροσωπευτικά. Επιπρόσθετα, από το παραπάνω διάγραμμα προκύπτει ότι η επιβίωση του κατά την αποθήκευση αυξάνεται όσο αυξάνεται και η συγκέντρωση των ινών μήλου. Όπως στο Διάγραμμα 5.9 έτσι και στο Διάγραμμα 5.10 οι γραμμές που απεικονίζουν τις διάφορες συγκεντρώσεις των δειγμάτων με ίνες μήλου μετά τις δεκαπέντε ημέρες είναι σχεδόν παράλληλες και η μια πάνω από την άλλη. Να σημειωθεί ότι η βιωσιμότητα του *L. casei* στα δείγματα με 1% περιεκτικότητα σε ίνες μήλου μειώθηκε κατά 1,20 log cfu/g ενώ για τα δείγματα με 10% ίνες μήλου η μείωση ήταν μόλις 1,15 log cfu/g.

Συνολικά τα αποτελέσματα μπορούν να εκφραστούν και με τη μορφή ποσοστού. Στο Διάγραμμα 5.12 που ακολουθεί αναπαρίσταται η διατήρηση των κυτταρικών επιπέδων των προβιοτικών στελεχών σε βρεφική κρέμα με ίνες μήλου κατά τον έναν μήνα αποθήκευσης.



Διάγραμμα 5.12: Ποσοστά επιβίωσης του *L. casei* και του *L. plantarum* σε βρεφική κρέμα με ίνες μήλου κατά τον πρώτο μήνα αποθήκευσης σε συνθήκες δωματίου (25°C).

Στο παραπάνω διάγραμμα αποτυπώνεται η θετική επίδραση των ινών μήλου στη διατήρηση της βιωσιμότητας των *L. casei* και *L. plantarum* σε βρεφική κρέμα. Συγκεκριμένα, το ποσοστό του *L. plantarum* που επιβίωσε χωρίς ίνες μήλου σε βρεφική κρέμα ήταν 73% ενώ με 1%, 5% και 10% ίνες μήλου αυξήθηκε στο 90%, 91% και 94% αντίστοιχα. Όσον αφορά τον *L. Casei*, το ποσοστό που επιβίωσε χωρίς ίνες βάση των αποτελεσμάτων ήταν 91%. Όμως, για να υπολογιστεί αυτό το ποσοστό χρησιμοποιήθηκαν και τα αποτελέσματα των αναλύσεων των συγκεκριμένων δειγμάτων κατά την πρώτη ημέρα αποθήκευσης, τα οποία ήταν μικρότερα από τα αναμενόμενα και οδήγησαν σε πλασματική αύξηση του ποσοστού επιβίωσης του *L. plantarum* χωρίς ίνες μήλου σε βρεφική. Τέλος το ποσοστό του *L. casei* που επιβίωσε με ίνες μήλου 1%, 5% και 10% ήταν 80%, 80% και 84% αντίστοιχα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: Συζήτηση

Από την περάτωση της παραπάνω πειραματικής διαδικασίας και την ανάλυση των αποτελεσμάτων προέκυψαν ενδιαφέροντα στοιχεία για την επιβίωση των *L. plantarum* και *L. casei* κατά την αποθήκευση τόσο ως ελεύθεροι μικροοργανισμοί όσο και σε μίγματα με ίνες μήλου αλλά και ενσωματωμένα με ίνες σε βρεφική κρέμα.

Οι μετρήσεις στην παρούσα μελέτη έδειξαν ότι τα επίπεδα του ελεύθερου *L. plantarum* διατηρήθηκαν σε ποσοστό 92% μετά τη λυοφιλίωση. Το ποσοστό αυτό είναι μικρότερο από αυτό που προέκυψε από τη μελέτη των Aryaee et al. (2023), που ήταν 99,5%. Η διαφορά αυτή πιθανόν να οφείλεται στις διαφορετικές συνθήκες κατά τη λυοφιλίωση και στο γεγονός ότι στην αναφερόμενη έρευνα, ο μικροοργανισμός λυοφιλιώθηκε μαζί με χυμό φρούτων. Αντίστοιχα, στην παρούσα μελέτη κατά τη λυοφιλίωση τα επίπεδα του *L. casei* παρέμειναν υψηλά, σε ποσοστό 91%. Όμως στην μελέτη των Araújo et al. (2020), που αφορούσε την αξιολόγηση των προστατευτικών ιδιοτήτων των παραπροϊόντων της αγροτοβιομηχανίας, το αντίστοιχο ποσοστό για το στέλεχος *L. casei* L-26 ήταν 71,6%. Ένα πιθανό αίτιο αυτής της διαφοράς μπορεί να είναι ο διαφορετικός ρυθμός καταψύξεως κατά τη λυοφιλίωση καθώς και το διαφορετικό στέλεχος.

Όσον αφορά τη ζωτικότητα του *L. plantarum* κατά την αποθήκευση, αυτή μειώθηκε κατά 75% στον έναν μήνα αποθήκευσης. Το ποσοστό αυτό ήταν υψηλότερο, 86%, στην μελέτη των He et al. (2021), όπου ο λυοφιλιωμένος *L. plantarum* LIP-1 αποθηκεύτηκε στους 25 °C. Αντίστοιχα ο *L. casei* μειώθηκε κατά 83% μέσα σε ένα μήνα αποθήκευσης. Στην έρευνα των Araújo et al. (2020), η μείωση του λυοφιλιωμένου *L. casei* L-26 μετά την αποθήκευση για ένα μήνα στους 25 °C ήταν περίπου η μισή (45%).

Όταν τα στελέχη αποθηκευτήκαν με ίνες μήλου τα ποσοστά της επιβίωσης αυξηθήκαν σημαντικά. Η αύξηση αυτή ήταν αναμενόμενη, δεδομένου της αποδεδειγμένης προστατευτικής δράσης που έχουν οι φυτικές ίνες στην επιβίωση των προβιοτικών (Peng et al., 2023). Ειδικότερα ο *L. plantarum* μειώθηκε μόνο κατά 5% και ο *L. casei* κατά 16%. Όσον αφορά τον *L. plantarum* το ποσοστό αυτό είναι παρόμοιο με αυτό που προέκυψε από την έρευνα των Aryaee et al. (2023), όπου το στέλεχος *L. plantarum* PTCC 1058 σε σκόνη χυμού φρούτων (90%) λυοφιλιώθηκε και αποθηκεύτηκε στους 4°C για έναν μήνα. Συγκεκριμένα, η μείωση που καταγράφηκε ήταν 7,8%. Ενώ για τον *L. casei* στην έρευνα των Araújo et al. (2020) όταν ο *L. casei* L-26 αποθηκεύτηκε στους 25 °C μαζί με φρουκτοολιγосακχαρίτες το

ποσοστό επιβίωσης που σημειώθηκε ήταν 57% αντίστοιχα. Αυτή η ασυμφωνία των αποτελεσμάτων οφείλεται στον διαφορετικό τρόπο με τον οποίο επιδρούν διάφορες μήτρες τροφίμων στα κύτταρα (Araújo et al. 2020).

Στα μίγματα των προβιοτικών βρεφικών κρεμών με ίνες μήλου η βιωσιμότητα των κύτταρων παρέμεινε σε υψηλό επίπεδο παρόμοιο με τα μίγματα που περιείχαν τον μικροοργανισμό με ίνες μήλου. Επιπλέον, από τη σύγκριση των ποσοστών επιβίωσης των ελεύθερων μικροοργανισμών και των μιγμάτων βρεφικής κρέμας χωρίς ίνες πρόκυψε ότι η εμπορική βρεφική κρεμά συνέβαλε σημαντικά στη διατήρηση της βιωσιμότητας των στελεχών κατά την αποθήκευση. Συγκεκριμένα για τον *L. plantarum* από 25% πήγε στο 73% και για τον *L. casei* από 17% πήγε 91%. Η αύξηση αυτή, πιθανόν να οφείλεται στη μεγάλη περιεκτικότητα της βρεφικής κρέμας σε δισακχαρίτες όπως λακτόζη (14,4%) και εδώδιμες ίνες (2,3%). Οι ενώσεις αυτές έχει αποδειχθεί ότι είναι ικανές να διατηρήσουν τη βιωσιμότητα των προβιοτικών (Araújo et al., 2020).

Επιπλέον, τα ποσοστά επιβίωσης και των δυο στελεχών φαίνεται να αυξάνονται αναλογικά με την αύξηση της ποσότητας των ινών μήλου. Αναλυτικότερα η βρεφική κρεμά με *L. plantarum* και 1% ίνες μήλου σημείωσε μείωση 20% ενώ με 10% η μείωση ήταν μόλις 6%. Ομοίως, η βρεφική κρεμά με *L. casei* και 1% ίνες μήλου κατέγραψε μείωση 20% ενώ με 10% η μείωση ήταν 16%.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί προκειμένου να μπορέσουν οι καταναλωτές να επωφεληθούν από τη δράση των προβιοτικών, η βιωσιμότητα τους πρέπει να είναι πάνω από 10^6 cfu/g ή mL τροφίμου. Μετά από τις 30 ημέρες μόνο τα μίγματα των βρεφικών προβιοτικών κρεμών με *L. plantarum* και με 5% και 10% ίνες μήλου ίνες μήλου διατήρησαν τον αριθμό των ζωντανών κυττάρων πάνω από 10^6 cfu/g έτοιμης βρεφικής κρέμας. Συγκεκριμένα ο αριθμός των ζωντανών κυττάρων στην βρεφική κρέμα με *L. plantarum* και 10% ίνες μήλου, ήταν 6,98 log cfu/g έτοιμης βρεφικής κρέμας ενώ τα στην αντίστοιχη κρέμα με *L. casei* εντοπιστικαν μόνο 5,93 log cfu/g έτοιμης βρεφικής κρέμας. Γενικά ο *L. plantarum* αποδείχτηκε ανθεκτικότερος από τον *L. casei* δεδομένου ότι τα επίπεδα βιωσιμότητάς του ήταν σε όλα τα δείγματα υψηλότερα.

Η παρούσα εργασία ανέδειξε τη δυνατότητα ενσωμάτωσης προβιοτικών στις βρεφικές κρέμες. Ωστόσο η μελέτη επιπλέον ενώσεων για την προστασία των κύτταρων, η βελτίωση των συνθηκών αποθήκευσης και η χρήση ακινητοποιημένων

και μικροενθυλακωμένων κυττάρων και άλλων προβιοτικών βακτηριών πιθανόν να δώσουν βελτιωμένα αποτελέσματα.

Ειδικότερα μελλοντικά θα μπορούσε να μελετηθεί η διατήρηση της βιωσιμότητας των προβιοτικών σε βρεφικές κρέμες κατά την αποθήκευση, τα όποια όμως θα έχουν λυοφιλωθεί ταυτόχρονα με ενώσεις όπως η λακτόζη, η τρεχαλόζη ή με αποβουτυρωμένο γάλα. Οι ενώσεις αυτές έχει αποδειχθεί ότι είναι ικανές να διατηρήσουν τη βιωσιμότητα των προβιοτικών σε υψηλά επίπεδα κατά την αποθήκευση (Yuste et al., 2021). Επιπρόσθετα η μικροενθυλάκωση των προβιοτικών είναι μια νέα μέθοδος η οποία διατηρεί τα κύτταρα ζωντανά όχι μόνο κατά την παράγωγή και αποθήκευση αλλά και κατά την πέψη (Staniszewski and Kordowska-Wiater, 2021). Επιπλέον θα μπορούσαν να δοκιμαστούν διαφορετικές μήτρες βρεφικών τροφίμων, οι οποίες πιθανόν να αλληλεπιδρούσαν αποτελεσματικότερα με τα προβιοτικά, αλλά και διαφορετικά προβιοτικά στελέχη τα όποια θα ήταν ανθεκτικότερα. Οι συνθήκες αποθήκευσης αποτελούν μια άλλη παράμετρο η οποία χρήζει επιπλέον μελέτη καθώς πολλές έρευνες έχουν δείξει ότι η αποθήκευση στους 4 °C ήταν αποτελεσματικότερη ενώ τα προβιοτικά φαίνεται να αντιδρούν διαφορετικά σε διάφορα περιβάλλοντα αποθήκευσης. Τέλος, τα προβιοτικά πρέπει να φτάσουν σε επαρκείς ποσότητες στο έντερο για να προσδώσουν τα ευεργετικά τους οφέλη όποτε απαραίτητη κρίνεται η μελέτη της επιβίωσής τους κατά την πέψη.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: Συμπεράσματα

Η αναζήτηση των καταναλωτών για πιο υγιεινές τροφές, η ανάγκη της βιομηχανίας για δημιουργία νέων καινοτόμων προϊόντων και η ανάπτυξη της τεχνολογίας σε συνδυασμό με την ανάδειξη των προβιοτικών οδήγησε στην ενσωμάτωσή τους σε πολλές και διαφορετικές μήτρες τροφίμων (Latif et al., 2023). Τα οφέλη που προκύπτουν από την κατανάλωση επαρκής ποσότητας προβιοτικών (10^6 cfu/g ή mL) είναι πολλά τόσο για τους ενήλικες όσο και για τα βρέφη, τα όποια είναι ιδιαίτερα ευάλωτα και ταλαιπωρούνται συχνά από διαφορές γαστρεντερικές διαταραχές (López Marín et al., 2020). Από την παρούσα εργασία προέκυψε ότι η χρήση προβιοτικών σε συνδυασμό με ίνες μήλου σε βρεφικές κρέμες είναι πολλά υποσχόμενη. Ο *L. plantarum* αποδείχθηκε ανθεκτικότερος από τον *L. casei*, με υψηλότερα επίπεδα βιωσιμότητας όπως φάνηκε από τα αποτελέσματα. Ο αριθμός των βιώσιμων κυττάρων των επιλεγμένων στελεχών μετά από 30 ημέρες ήταν επαρκής στα μίγματα των βρεφικών προβιοτικών κρεμών με *L. plantarum* και με 5% και 10% ίνες μήλου. Η καταγεγραμμένη πτώση της βιωσιμότητας του *L. casei* και του *L. plantarum* σε βρεφικές κρέμες μειωνόταν με την αύξηση του ποσοστού των ινών μήλου. Επομένως η αύξηση των ινών μήλου πιθανώς να οδηγούσε σε ακόμα καλύτερα αποτελέσματα. Παράλληλα αποδείχθηκε ότι η εμπορική βρεφική κρέμα προστάτευε και τα δυο στελέχη κατά την αποθήκευση, καθώς υπήρξε μικρότερη πτώση της βιωσιμότητας στα μίγματα συγκριτικά με τα ελεύθερα κύτταρα. Συμπερασματικά, η παραγωγή προβιοτικών βρεφικών κρεμών είναι δυνατή όμως απαιτείται περαιτέρω έρευνα προκειμένου να διαπιστωθεί ότι η ποσότητα των ενσωματωμένων προβιοτικών σε βρεφική κρέμα που τελικά φτάνει στο έντερο είναι επαρκής, άλλα και να διασφαλιστεί ότι τα τρόφιμα αυτά είναι απολύτως ασφαλή για την υγεία των βρεφών.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Abdel-Hamid, M., Romeih, E., Gamba, R. R., Nagai, E., Suzuki, T., Koyanagi, T., & Enomoto, T. (2019). The biological activity of fermented milk produced by *Lactobacillus casei* ATCC 393 during cold storage. *International Dairy Journal*, 91, 1-8.
2. Aleman, R. S., Delarca, F., Sarmientos, M., Marcia, J., Yaday, A., & Kayanush, A. (2024). Impact of Novel Functional Ingredients on *Lactobacillus casei* Viability. *Bacteria*, 3(1), 30-41.
3. Alexeenko, A., & Topp, E. (2020). Future directions: lyophilization technology roadmap to 2025 and beyond. *Drying Technologies for Biotechnology and Pharmaceutical Applications*, 355-372.
4. Amorim, A., Silva, V. L., & do Amaral Sobral, P. J. (2023). Food Processing: An overview on links between safety, security, supply chains, and NOVA classification. *Cleaner and Circular Bioeconomy*, 100047
5. Araújo, C. M., Sampaio, K. B., Menezes, F. N. D. D., Almeida, E. T. D. C., Lima, M. D. S., Viera, V. B., ... & de Oliveira, M. E. G. (2020). Protective effects of tropical fruit processing coproducts on probiotic *Lactobacillus* strains during freeze-drying and storage. *Microorganisms*, 8(1), 96.
6. Arora, M., Arora, M., Bansal, P., & Baldi, A. (2019). Need and recommendations for universal guidelines on regulatory status and quality control/safety of probiotic products. *Applied Clinical Research, Clinical Trials and Regulatory Affairs*, 6(3), 231-249.
7. Aryaee, H., Ariaei, P., Zare, D., Mirdamadi, S., & Naghizadeh Raeisi, S. (2023). Evaluation of the Physicochemical Characteristics of a Blend Fruit Juice Powder Mixed with *Lactiplantibacillus plantarum*: A Comparison of Spray Drying and Freeze Drying, *Journal of Food Processing and Preservation*, 2023.
8. Atik, D. S., & Çoşkun, F. (2021). Some properties of probiotic yoghurt produced for babies by adding fruit puree, containing *B. infantis*, *B. bifidum*, *B. longum*, *L. paracasei*. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 9(10), 1840-1848.
9. Baker, P., Russ, K., Kang, M., Santos, T. M., Neves, P. A., Smith, J., ... & McCoy, D. (2021). Globalization, first-foods systems transformations and corporate power:

- a synthesis of literature and data on the market and political practices of the transnational baby food industry. *Globalization and Health*, 17(1), 58.
10. Cunningham, M., Azcarate-Peril, M. A., Barnard, A., Benoit, V., Grimaldi, R., Guyonnet, D., ... & Gibson, G. R. (2021). Shaping the future of probiotics and prebiotics. *Trends in Microbiology*, 29(8), 667-685.
 11. Czech-Kowalska, J. (2020, February). Mineral and nutritional requirements of preterm infant. In *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine* (Vol. 25, No. 1, p. 101071). WB Saunders.
 12. da Cruz Rodrigues, V. C., Duque, A. L. R. F., de Carvalho Fino, L., Simabuco, F. M., Sartoratto, A., Cabral, L., ... & Antunes, A. E. C. (2020). Modulation of the intestinal microbiota and the metabolites produced by the administration of ice cream and a dietary supplement containing the same probiotics. *British Journal of Nutrition*, 124(1), 57-68
 13. Dimitrellou, D., Kandylis, P., & Kourkoutas, Y. (2019). Assessment of freeze-dried immobilized *Lactobacillus casei* as probiotic adjunct culture in yogurts. *Foods*, 8(9), 374, b.
 14. Dimitrellou, D., Kandylis, P., Kokkinomagoulos, E., Hatzikamari, M., & Bekatorou, A. (2021). Emmer-based beverage fortified with fruit juices. *Applied Sciences*, 11(7), 3116.
 15. Dimitrellou, D., Kandylis, 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*, 116, 108501.
 16. EFSA Scientific Committee, Hardy, A, Benford, D, Halldorsson, T, Jeger, MJ, Knutsen, HK, More, S, Naegeli, H, Noteborn, H, Ockleford, C, Ricci, A, Rychen, G, Schlatter, JR, Silano, V, Solecki, R, Turck, D, Bresson, J-L, Dusemund, B, Gundert-Remy, U, Kersting, M, Lambré, C, Penninks, A, Tritscher, A, Waalkens-Berendsen, I, Woutersen, R, Arcella, D, Court Marques, D, Dorne, J-L, Kass, GEN and Mortensen, A, 2017. Guidance on the risk assessment of substances present in food intended for infants below 16 weeks of age. *EFSA Journal* 2017; 15(5):4849, pp 58.
 17. Evanovich, E., de Souza Mendonça Mattos, P. J., & Guerreiro, J. F. (2019). Comparative genomic analysis of *Lactobacillus plantarum*: an overview. *International Journal of Genomics*, 2019.

18. Fabiano, V., Indrio, F., Verduci, E., Calcaterra, V., Pop, T. L., Mari, A., ... & Goulet, O. (2021). Term infant formulas influencing gut microbiota: An overview. *Nutrients*, 13(12), 4200.
19. Fenster, K., Freeburg, B., Hollard, C., Wong, C., Rønhave Laursen, R., & Ouwehand, A. C. (2019). The production and delivery of probiotics: A review of a practical approach. *Microorganisms*, 7(3), 83.
20. Guarner, F., Sanders, M. E., Eliakim, R., Fedorak, R., Gangl, A., Garisch, J., ... & Salminen, S. (2023). Probióticos y prebióticos. Guías mundiales de la Organización Mundial de Gastroenterología [en línea][consultado el 25/04/2018]. Disponible en www.worldgastroenterology.org/guidelines/global-guidelines/probiotics-and-prebiotics/probiotics-and-prebiotics-spanish.
21. He, Z., Zhang, X., Sun, R., Chen, J., Jingjing, E., Yao, C., ... & Wang, J. (2021). Effects of three different gas environments on the storage stability of *Lactobacillus plantarum* LIP-1 at room temperature. *Food Bioscience*, 44, 101391.
22. Hu, Q., Qi, Y., Liu, C., Chen, Q., Mai, X., Zhu, Z., & Ma, B. (2024). Effects of *Lactobacillus plantarum* cofermentation on the flavor and taste characteristics of mango vinegar. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 1-13.
23. Joint FAO/WHO Codex Alimentarius Commission. (1981). Codex alimentarius: Standard for Infant Formula and Formulas for Special Medical Purposes Intended for Infants. Rome: World Health Organization: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
24. Joint FAO (2004). Human energy requirements (No. 641.1 J74h). Rome, IT: FAO.
25. Kanimozhi, N. V., & Sukumar, M. (2023). Effect of different cryoprotectants on the stability and survivability of freeze dried probiotics. *Food Chemistry Advances*, 3, 100428.
26. Koirala, S., & Anal, A. K. (2021). Probiotics-based foods and beverages as future foods and their overall safety and regulatory claims. *Future Foods*, 3, 100013.
27. Koletzko, B., Shamir, R., & Ashwell, M. (2012). Quality and safety aspects of infant nutrition. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 60(3), 179-184
28. Kusumitha, S., Aeron, V., gh Jeelani, P., & Chidambaram, R. (2020). Prebiotics and probiotics in the formulation of infant foods. *Food Science, Technology and Nutrition for Babies and Children*, 35-57

29. Lemoine, A., Tounian, P., Adel-Patient, K., & Thomas, M. (2023). Pre-, pro-, syn-, and postbiotics in infant formulas: what are the immune benefits for infants?. *Nutrients*, 15(5), 1231.
30. Li, W., Wang, J., Lin, Y., Li, Y., Ren, F., & Guo, H. (2021). How far is it from infant formula to human milk? A look at the human milk oligosaccharides. *Trends in Food Science & Technology*, 118, 374-387.
31. Liu, Y., Li, Y., Yu, X., Yu, L., Tian, F., Zhao, J., ... & Chen, W. (2021). Physiological characteristics of *Lactobacillus casei* strains and their alleviation effects against inflammatory bowel disease. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(1), 92.
32. López Marín, B. E., Cardona, M. A., & Restrepo, M. (2020). Development of a Baby Food Pureed with Probiotic Microorganisms for an Infant from 6 to 12 Months
33. Luangthongkam, P., Blinco, J. A., Dart, P., Callaghan, M., & Speight, R. (2021). Comparison of spray-drying and freeze-drying for inoculum production of the probiotic *Bacillus amyloliquefaciens* strain H57. *Food and Bioproducts Processing*, 130, 121-131.
34. Mielech, A., Puścion-Jakubik, A., & Socha, K. (2021). Assessment of the Risk of Contamination of Food for Infants and Toddlers. *Nutrients*, 13(7), 2358.
35. Nowak, D., & Jakubczyk, E. (2020). The freeze-drying of foods—The characteristic of the process course and the effect of its parameters on the physical properties of food materials. *Foods*, 9(10), 1488.
36. Nyanzi, R., Jooste, P. J., & Buys, E. M. (2021). Invited review: Probiotic yogurt quality criteria, regulatory framework, clinical evidence, and analytical aspects. *Journal of Dairy Science*, 104(1), 1-19.
37. Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on a request from the Commission related to the microbiological risks in infant formulae and follow-on formulae. *The EFSA Journal* 2004 113, 1–35
38. Parker, G. H., Gillie, C. E., Miller, J. V., Badger, D. E., & Kreider, M. L. (2022). Human health risk assessment of arsenic, cadmium, lead, and mercury ingestion from baby foods. *Toxicology Reports*, 9, 238-249.
39. Parra-Flores, J., Maury-Sintjago, E., Rodriguez-Fernández, A., Acuña, S., Cerda, F., Aguirre, J., & Holy, O. (2020). Microbiological quality of powdered infant formula in Latin America. *Journal of Food Protection*, 83(3), 534-541.

40. Patel JK, Rouster AS. Infant Nutrition Requirements and Options. In: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL); 2023. PMID: 32809593.
41. Peivasteh-Roudsari, L., Pirhadi, M., Karami, H., Tajdar-Oranj, B., Molaee-Aghaee, E., & Sadighara, P. (2019). Probiotics and food safety: an evidence-based review. *Journal of Food Safety and Hygiene*, 5(1), 1-9.
42. Peng, C., Liu, B., & Chen, Z. (2023). Protective effects of enzymatic hydrolysis products of pomelo peel cellulose on *Lactobacillus plantarum* during freeze-drying process. *Applied Food Research*, 3(1), 100301.
43. Perrella, S., Gridneva, Z., Lai, C. T., Stinson, L., George, A., Bilston-John, S., & Geddes, D. (2021, March). Human milk composition promotes optimal infant growth, development and health. In *Seminars in Perinatology* (Vol. 45, No. 2, p. 151380). WB Saunders.
44. Prapa, I., Nikolaou, A., Panas, P., Tassou, C., & Kourkoutas, Y. (2023). Developing stable freeze-dried functional ingredients containing wild-type presumptive probiotic strains for food systems. *Applied Sciences*, 13(1), 630.
45. Prete, R., Long, S. L., Gallardo, A. L., Gahan, C. G., Corsetti, A., & Joyce, S. A. (2020). Beneficial bile acid metabolism from *Lactobacillus plantarum* of food origin. *Scientific Reports*, 10(1), 1165.
46. Regulation 127/2016. The specific compositional and information requirements for infant formula and follow-on formula and requirements on information relating to infant and young child feeding. European Parliament, Council of the European Union.
47. Salgaço, M. K., Perina, N. P., Tomé, T. M., Mosquera, E. M. B., Lazarini, T., Sartoratto, A., & Sivieri, K. (2021). Probiotic infant cereal improves children's gut microbiota: Insights using the Simulator of Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME®). *Food Research International*, 143, 110292.
48. Salminen, S., Stahl, B., Vinderola, G., & Szajewska, H. (2020). Infant formula supplemented with biotics: current knowledge and future perspectives. *Nutrients*, 12(7), 1952.
49. Savedboworn, W., Teawsomboonkit, K., Surichay, S., Riansa-Ngawong, W., Rittisak, S., Charoen, R., & Phattayakorn, K. (2019). Impact of protectants on the storage stability of freeze-dried probiotic *Lactobacillus plantarum*. *Food Science and Biotechnology*, 28, 795-805.

50. Sidira, M., Mitropoulou, G., Galanis, A., Kanellaki, M., & Kourkoutas, Y. (2019). Effect of sugar content on quality characteristics and shelf-life of probiotic dry-fermented sausages produced by free or immobilized *Lactobacillus casei* ATCC 393. *Foods*, 8(6), 219.
51. Staniszewski, A., & Kordowska-Wiater, M. (2021). Probiotic and potentially probiotic yeasts—Characteristics and food application. *Foods*, 10(6), 1306.
52. Vera-Santander, V. E., Hernández-Figueroa, R. H., Jiménez-Munguía, M. T., Mani-López, E., & López-Malo, A. (2023). Health benefits of consuming foods with bacterial probiotics, postbiotics, and their metabolites: a review. *Molecules*, 28(3), 1230.
53. Verlhac, P., Vessot-Crastes, S., Degobert, G., Cogné, C., Andrieu, J., Beney, L., ... & Moundanga, S. (2020). Experimental study and optimization of freeze-drying cycles of a model Casei type probiotic bacteria. *Drying Technology*, 38(16), 2120-2133.
54. Wargo, W. F. (2016). The history of infant formula: quality, safety, and standard methods. *Journal of AOAC International*, 99(1), 7-11.
55. WHO (2022). Complementary feeding. World Health Organization
56. Xu, C., Yan, S., Guo, Y., Qiao, L., Ma, L., Dou, X., & Zhang, B. (2020). *Lactobacillus casei* ATCC 393 alleviates Enterotoxigenic *Escherichia coli* K88-induced intestinal barrier dysfunction via TLRs/mast cells pathway. *Life Sciences*, 244, 117281.
57. Yeak, K. Y. C., Dank, A., den Besten, H. M., & Zwietering, M. H. (2024). A web-based microbiological hazard identification tool for infant foods. *Food Research International*, 178, 113940.
58. Yi, D. Y., & Kim, S. Y. (2021). Human breast milk composition and function in human health: from nutritional components to microbiome and microRNAs. *Nutrients*, 13(9), 3094.
59. Yilmaz, B., Bangar, S. P., Echegaray, N., Suri, S., Tomasevic, I., Manuel Lorenzo, J., ... & Ozogul, F. (2022). The impacts of *Lactiplantibacillus plantarum* on the functional properties of fermented foods: A review of current knowledge. *Microorganisms*, 10(4), 826.
60. Yuste, A., Arosemena, E. L., & Calvo, M. À. (2021). Study of the probiotic potential and evaluation of the survival rate of *Lactiplantibacillus plantarum* lyophilized as a function of cryoprotectant. *Scientific Reports*, 11(1), 19078.

61. Zendeboodi, F., Khorshidian, N., Mortazavian, A. M., & da Cruz, A. G. (2020). Probiotic: conceptualization from a new approach. *Current Opinion in Food Science*, 32, 103-123. Probiotics and prebiotics, World Gastroenterology Organisation Global Guidelines, 1-52
62. Zhang, Z., Lv, J., Pan, L., & Zhang, Y. (2018). Roles and applications of probiotic *Lactobacillus* strains. *Applied microbiology and biotechnology*, 102, 8135-8143.
63. Zommiti, M., Feuilleux, M. G., & Connil, N. (2020). Update of probiotics in human world: a nonstop source of benefactions till the end of time. *Microorganisms*, 8(12), 1907.
64. https://food.ec.europa.eu/safety/labelling-and-nutrition/specific-groups/food-infants-and-young-children_en#related-links, εξακριβώθηκε 10 Δεκεμβρίου 2023
65. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/infant-and-young-child-feeding>, εξακριβώθηκε 5 Μαρτίου 2024).
66. https://food.ec.europa.eu/safety/labelling-and-nutrition/specific-groups/food-infants-and-young-children_en#related-links, εξακριβώθηκε 10 Δεκεμβρίου 2023
67. <https://www.fda.gov/food/resources-you-food/infant-formula>, εξακριβώθηκε τις 10 Δεκεμβρίου 2023