

ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΔΙΠΛΗΣ ΕΝΘΥΛΑΚΩΣΗΣ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΗΝ
ΠΗΚΤΙΝΗ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

της

ΕΙΡΗΝΗ ΠΑΤΡΑΜΑΝΗ

Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

Σχολή Περιβάλλοντος

ΙΟΝΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ



Αργοστόλι Κεφαλληνίας

Μάιος 2024

ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΔΙΠΛΗΣ ΕΝΘΥΛΑΚΩΣΗΣ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΗΝ ΠΗΚΤΙΝΗ

Η πτυχιακή εργασία εγκρίθηκε από:

Παναγιώτης Κανδύλης

Ιωάννης Σαμαράς

Ελένη Σακαντάνη

«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».

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μελέτη των προβιοτικών μικροοργανισμών αποτελεί έναν από τους πιο αναπτυσσόμενους κλάδους τα τελευταία χρόνια, λόγω των θετικών επιδράσεων τους για την ανθρώπινη υγεία. Ωστόσο, η χορήγησή τους είναι μία δύσκολη διαδικασία, καθώς τόσο οι διάφορες επεξεργασίες κατά την παρασκευή των τροφίμων όσο και το δυσμενές περιβάλλον του γαστρεντερικού σωλήνα επιδρούν αρνητικά στην επιβίωσή τους. Οι τεχνικές ακινητοποίησης, όπως είναι η ενθυλάκωση, συμβάλλουν στην προστασία των προβιοτικών και στην αύξηση της αντοχής τους σε αυτές τις συνθήκες, διατηρώντας τη βιωσιμότητά τους σε υψηλά επίπεδα. Η παρούσα πτυχιακή εργασία επικεντρώθηκε στη μελέτη της επιβίωσης του προβιοτικού μικροοργανισμού *Lactobacillus casei* ATCC 393, με έμφαση στην επίδραση του pH και της θερμοκρασίας. Εφαρμόστηκε η σύνθετη συσσωρευματοποίηση με τη χρήση πρωτεΐνης πατάτας και πηκτίνης ως πρώτο στρώμα εγκλεισμού και επιπλέον ποσότητα πηκτίνης ως δεύτερο για τη δημιουργία σφαιριδίων. Η θερμοκρασία μελέτης ήταν οι 63°C, για την προσομοίωση των συνθηκών παστερίωσης, για 0, 15, 30 και 40 λεπτά και το pH ήταν το 2,0, ως προσομοίωση του γαστρεντερικού υγρού, για 0, 1, 2,5 και 4 ώρες. Οι δοκιμές πραγματοποιήθηκαν για τα ελεύθερα και ενθυλακωμένα κύτταρα *L. casei* ATCC 393. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η προστασία που έδωσε η ενθυλάκωση ήταν 15,94% κατά την έκθεση στη θερμοκρασία και 6,53% ήταν στο pH.

Λέξεις κλειδιά: *Lactobacillus casei* ATCC 393, συσσωρεύματα, σφαιρίδια, πρωτεΐνη πατάτας, πηκτίνη, προβιοτικά

ABSTRACT

The study of probiotic microorganisms is one of the most growing disciplines in recent years, due to their positive effects on human health. However, their administration is a difficult process, as both the various treatments during food preparation and the adverse environment of the gastrointestinal tract have a negative impact on their survival. Immobilization techniques, such as encapsulation, help to protect probiotics and increase their resistance to these conditions, maintaining their viability at high levels. This thesis focused on the study of the survival of the probiotic microorganism *Lactobacillus casei* ATCC 393, with emphasis on the effect of pH and temperature. The Complex Coacervation was applied using potato protein and pectin as the first layer of encapsulation and additional amount of pectin as the second layer to form pellets. The study temperature was 63°C, to simulate pasteurization conditions, for 0, 15, 30 and 40 min and pH was 2.0, to simulate gastrointestinal fluid, for 0, 1, 2.5 and 4 h. The assays were performed for free and encapsulated *L. casei* ATCC 393 cells. According to the results, the protection given by encapsulation was 15.94% on exposure to temperature and 6.53% was to pH.

Key words: *Lactobacillus casei* ATCC 393, coacervates, beads, potato protein, pectin, probiotics

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Κεφάλαιο	Σελίδα
I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1. Προβιοτικά.....	1
1.1.1. Ορισμός και είδη μικροοργανισμών που χρησιμοποιούνται.....	2
1.1.2. Ιστορική Αναδρομή.....	3
1.1.3. Βακτήρια Γαλακτικού Οξέος	4
1.1.4. <i>Lactobacillaceae</i>	6
1.1.4.1. <i>Lactobacillus</i>	7
1.1.4.2. <i>Lactocaseibacillus casei</i>	9
1.1.5. Οφέλη για την υγεία	11
1.1.6. Προκλήσεις στην παροχή προβιοτικών.....	13
1.2. Ακινητοποίηση.....	14
1.2.1. Ενθυλάκωση	16
1.2.2. Σκοπός και εφαρμογές.....	16
1.2.3. Τεχνικές ενθυλάκωσης.....	17
1.2.3.1. Ξήρανση με ψεκασμό	17
1.2.3.2. Λυοφιλίωση.....	18
1.2.3.3. Επικάλυψη σε ρευστοποιημένη κλίνη	18
1.2.3.4. Γαλακτωματοποίηση.....	19
1.2.3.5. Εξώθηση.....	19
1.2.3.6. Συσσωρευματοποίηση.....	20
1.2.3.6.1. Απλή συσσωρευματοποίηση	20
1.2.3.6.2. Σύνθετη συσσωρευματοποίηση	20
1.2.3.6.3. Απλή έναντι σύνθετης συσσωρευματοποίηση	21
1.2.3.6.4. Διπλό στρώμα συσσωρευματοποίηση.....	22
1.2.3.7. Πλεονεκτήματα των τεχνικών ακινητοποίησης.....	23
1.3. Η πηκτίνη ως συστατικό	24
1.3.1. Η πηκτίνη ως βιοπολυμερές για ενθυλάκωση.....	25
1.4. Πρωτεΐνη πατάτας.....	26
1.5. Σκοπός πειράματος	27
II. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	28
2.1. Υλικά και Εξοπλισμός	28
2.1.1. Υλικά	28
2.1.2. Εξοπλισμός.....	28
2.2. Προετοιμασία προβιοτικής καλλιέργειας <i>Lactocaseibacillus casei</i>	29
2.3. Παρασκευή των διαλυμάτων	29
2.4. Προετοιμασία συμπλόκων συσσωμάτωσης IPP-PEC και προσθήκη βιομάζας	30
2.5. Παρασκευή κάψουλων (beads) πηκτίνης με προσθήκη CaCl ₂	31
2.6. Επίδραση του pH στην επιβίωση του ελεύθερου και του ενθυλακωμένου <i>Lactobacillus casei</i>	32
2.7. Επίδραση της θερμοκρασίας στην επιβίωση του ενθυλακωμένου	

Lactobacillus casei	33
2.8. Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων	34
 III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ	35
3.1 Ελεύθερα κύτταρα <i>L. casei</i> ATCC 393	36
3.1.1. Επίδραση της θερμοκρασίας στη βιωσιμότητα.....	36
3.1.1. Επίδραση του pH στη βιωσιμότητα	37
3.2 Ενθυλακωμένα κύτταρα <i>L. casei</i> ATCC 393.....	38
3.1.1. Επίδραση της θερμοκρασίας στη βιωσιμότητα.....	38
3.1.1. Επίδραση του pH στη βιωσιμότητα	39
3.3 Σύγκριση	40
3.1.1. Σύγκριση αποτελεσμάτων ελεύθερων και ενθυλακωμένων κυττάρων με την επίδραση θερμοκρασίας.....	40
3.1.2. Σύγκριση αποτελεσμάτων ελεύθερων και ενθυλακωμένων κυττάρων με την επίδραση pH.....	42
 IV. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	44
 BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	45

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας	Σελίδα
Πίνακας 1. Νέα ονόματα για μερικά είδη <i>Lactobacillus</i>	3
Πίνακας 2. Παραδείγματα LAB με ανασταλτική δράση έναντι Παθογόνων Στελεχών.	6
Πίνακας 3. Οφέλη του <i>Lactocaseibacillus casei</i> στον ανθρώπινο οργανισμό	10
Πίνακας 4. Οφέλη του <i>Lactocaseibacillus casei</i> ATCC 393 στον ανθρώπινο οργανισμό.....	10
Πίνακας 5. Οφέλη προβιοτικών στην υγεία, ανά επίπεδο επιστημονικών αποδείξεων	12
Πίνακας 6. Οφέλη προβιοτικών στην υγεία, ανά κατηγορία.....	12
Πίνακας 7. Πολυμερή για των εγκλωβισμό των κυττάρων σε πηκτή	15
Πίνακας 8. Παραδείγματα συμπλόκων της σύνθετης συσσωρευματοποίησης	21
Πίνακας 9. Πλεονεκτήματα μεθόδων ενθυλάκωσης	23
Πίνακας 10. Τύποι πηκτίνης	25
Πίνακας 11. Αποτελέσματα βιωσιμότητας ελευθέρων κύτταρων σε θερμοκρασία 63°C	36
Πίνακας 12. Αποτελέσματα βιωσιμότητας ελευθέρων κύτταρων σε pH 2,0	37
Πίνακας 13. Αποτελέσματα βιωσιμότητας ενθυλακωμένων κύτταρων σε θερμοκρασία 63°C	38
Πίνακας 14. Αποτελέσματα βιωσιμότητας ενθυλακωμένων κύτταρων σε pH 2,0	39

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

Γράφημα	Σελίδα
Γράφημα 1. Οι Πωλήσεις της Αγοράς Προβιοτικών Παγκοσμίως: Ανάλυση των Δεδομένων του IPA για το 2018 (USD billion).....	2
Γράφημα 2. Ανάπτυξη της Παγκόσμιας Αγοράς Προβιοτικών, Ανά Προϊόν από το 2021 έως το 2032	7
Γράφημα 3. Σύγκριση αποτελεσμάτων θερμοκρασίας σε ελεύθερα και ενθυλακωμένα κύτταρα	41
Γράφημα 4. Ποσοστό επιβίωσης κατά την έκθεση θερμοκρασίας σε ελεύθερα και ενθυλακωμένα κύτταρα	42
Γράφημα 5. Σύγκριση αποτελεσμάτων pH σε ελεύθερα και ενθυλακωμένα κύτταρα	43
Γράφημα 6. Ποσοστό επιβίωσης κατά την έκθεση σε pH 2,0 σε ελεύθερα και ενθυλακωμένα κύτταρα	43

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα	Σελίδα
Εικόνα 1. Η Ανάπτυξη της Αγοράς Προβιοτικών στην Ευρώπη (2022-2028)	1
Εικόνα 2. Ταξινόμηση των βακτηρίων γαλακτικού οξέος	5
Εικόνα 3. Ποικιλομορφία του μικροβιώματος ανά ηλικία	5
Εικόνα 4. Απεικόνιση του <i>Lactocaseibacillus casei</i> (A) με φωτεινό μικροσκόπιο και (B) με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM)	9
Εικόνα 5. A) Βιωσιμότητα του ενθυλακωμένου <i>L. plantarum</i> σε προσομοιωμένο γαστρικό υγρό, B) Χρόνος απελευθέρωσης του <i>L. plantarum</i> σε προσομοιωμένο εντερικό υγρό	23
Εικόνα 6. Ποσότητα πρωτεΐνης (αριστερά) και ποσότητα πηκτίνης (δεξιά).....	30
Εικόνα 7. Αναλογίες πρωτεΐνης:πηκτίνης: A) αναλογία 5:1, B) αναλογία 7:1, Γ) αναλογία 3:1	30
Εικόνα 8. A) Σχηματισμός καψουλών με τη χρήση σύριγγας, B) Τελική μορφή καψουλών.....	31
Εικόνα 9. Διαλυμένα beads.....	32
Εικόνα 10. Αποικίες <i>L. casei</i> ATCC 393 μετά την επώαση	33
Εικόνα 11. Αναλογίες πρωτεΐνης:πηκτίνης μετά τις δύο ώρες: A) αναλογία 3:1, B) αναλογία 5:1, Γ) αναλογία 7:1	36

ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΙΣ

ALG: Αλγινικά

Beads: Κάψουλες

CAGR: Σύνθετο ετήσιο ρυθμό ανάπτυξης

FAO: Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας των Ηνωμένων Εθνών

HM: Πηκτίνη υψηλού βαθμού μεθοξυλίου

IDFA: Διεθνής Ένωση Γαλακτοκομικών Τροφίμων

IPA: Διεθνής Ένωση Προβιοτικών

IPP: Πρωτεΐνης πατάτας

ISAPP: Διεθνής Επιστημονική Ένωση για τα προβιοτικά και τα πρεβιοτικά

IUPAC: Διεθνής Ένωση Καθαρής και Εφαρμοσμένης Χημείας

LAB: Βακτήρια Γαλακτικού Οξέος

LM: Πηκτίνη χαμηλού βαθμού μεθοξυλίου

LP: *Lactiplantibacillus plantarum*

NCCIH: Εθνικό Κέντρο Συμπληρωματικής και Ολοκληρωτικής Υγείας

PEC: Πηκτίνη

Tip: Ρύγχη πιπέτας

WHO: Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας

WPI: Πρωτεΐνη ορού γάλακτος

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι

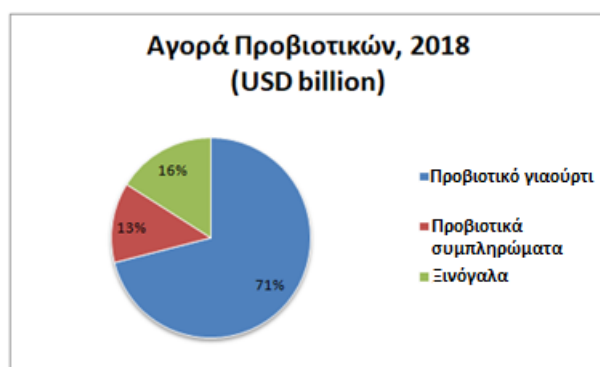
ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Προβιοτικά

Η αγορά προβιοτικών έχει γνωρίσει σημαντική ανάπτυξη και έχει αναδειχθεί ως ένας από τους ταχύτερα αναπτυσσόμενους κλάδους στην παγκόσμια βιομηχανία συμπληρωμάτων διατροφής. Όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 1**, η αγορά προβιοτικών στην Ευρώπη βρίσκεται σε εντυπωσιακή πορεία ανάπτυξης και αναμένεται να αυξηθεί σε αξία από 12,4 δισ. δολάρια το 2022 σε 18,76 δισ. δολάρια έως το 2028. Αυτό αντιπροσωπεύει έναν ισχυρό σύνθετο ετήσιο ρυθμό ανάπτυξης (CAGR) της τάξης του 7,1%. Επίσης, σε παγκόσμιο επίπεδο οι πωλήσεις των προβιοτικών, σύμφωνα με δεδομένα του IPA (Διεθνής Ένωση Προβιοτικών), το 2018 ανήλθαν στα 43.8 δισεκατομμύρια δολάρια. Αναλυτικότερα σύμφωνα με το **Γράφημα 1**, το 71% του ποσού των πωλήσεων προήλθε από το προβιοτικό γιαούρτι, το 16% καταλαμβάνει το ξινόγαλα, ενώ το 13% αποτελούν τα προβιοτικά συμπληρώματα.



Εικόνα 1: Η Ανάπτυξη της Αγοράς Προβιοτικών στην Ευρώπη (2022-2028) (Research and Markets, 2023).



Γράφημα 1: Οι Πωλήσεις της Αγοράς Προβιοτικών Παγκοσμίως: Ανάλυση των Δεδομένων του IPA για το 2018 (USD billion) (International Probiotics Association, 2019).

1.1.1. Ορισμός και είδη μικροοργανισμών που χρησιμοποιούνται

Σύμφωνα με τον IPA, τα προβιοτικά είναι «ζωντανοί μικροοργανισμοί που όταν καταναλώνονται σε επαρκείς ποσότητες, παρέχουν οφέλη για την υγεία του ξενιστή» (International Probiotics Association, n.d). Ορισμός που υποστηρίζεται από τον FAO, τον WHO και τον ISAPP (Fijan, 2014). Γενικότερα, οι Lilly και Stillwell ήταν οι πρώτοι που χρησιμοποίησαν τον όρο «προβιοτικά» το 1965, ερμηνεύοντάς τα ως «παράγοντες που προάγουν την ανάπτυξη και παράγονται από μικροοργανισμούς». Ο Parker το 1974, ακολουθώντας την ιδέα του Metchnikoff (βλ. 1.12.), τα όρισε ως «οργανισμούς και ουσίες που συμβάλλουν στην εντερική μικροβιακή ισορροπία», λίγο πριν ο Fuller δώσει την πρώτη αποδεκτή έννοια του όρου «προβιοτικά». Ο Fuller το 1989 αναφέρθηκε σε αυτά ως «ζωντανά μικροβιακά συμπληρώματα ζωοτροφών που επηρεάζουν ευεργετικά το ζώο-ξενιστή βελτιώνοντας την εντερική μικροβιακή ισορροπία του» (Sánchez et al., 2017, Mishra et al., 2018).

Οι πιο συνηθισμένοι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται ως προβιοτικά είναι τα βακτηριακά γένη *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Escherichia*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* και το γένος μυκήτων *Saccharomyces* (Fijan, 2014, Wang and Shurtleff, 2019). Ωστόσο, έχουν σημειωθεί περιστατικά σοβαρών ή θανατηφόρων λοιμώξεων σε βρέφη που έχουν γεννηθεί πρόωρα και έχουν λάβει προβιοτικά. Ως αποτέλεσμα, ο Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (FDA) προέβει σε προειδοποιήσεις για τους επαγγελματίες υγείας σχετικά με αυτόν τον κίνδυνο (Wang and Shurtleff, 2019).

1.1.2. Ιστορική Αναδρομή

Περίπου πριν από εκατό χρόνια, ο επιστήμονας Ilya Metchnikoff παρουσίασε τη θεωρία ότι τα βακτήρια γαλακτικού οξέος θα μπορούσαν να συμβάλουν στη βελτίωση της υγείας και της μακροζωίας. Στήριξε την ιδέα ότι μπορεί να αντιμετωπιστεί η "εντερική αυτό-δηλητηρίαση" και η διαδικασία γήρανσης αντικαθιστώντας πρωτεολυτικά μικροβιώματα με σακχαρολυτικά. Επίσης, διαμόρφωσε μια διατροφή που περιλάμβανε γάλα που είχε ζυμωθεί με ένα βακτήριο που ονομάστηκε "*Bulgarian bacillus*" (Guarner et al., 2023). Ωστόσο, άλλοι επιστήμονες ακολούθησαν το παράδειγμά του ανακαλύπτοντας μη παθογόνα βακτήρια για τη θεραπεία προβλημάτων του εντερικού συστήματος, εγκαινιάζοντας τις πρώτες πρακτικές των προβιοτικών. Αυτές οι πρωτοπόρες επιστημονικές εξελίξεις οδήγησαν στην ανάπτυξη του επιστημονικού τομέα των προβιοτικών. Σήμερα, η έρευνα σχετικά με τα προβιοτικά έχει αναπτυχθεί σημαντικά, και υπάρχουν πάνω από 1500 κλινικές δοκιμές που υποστηρίζουν τα οφέλη των προβιοτικών για την υγεία. Αυτά τα προϊόντα περιέχουν ζωντανούς μικροοργανισμούς που προσφέρουν οφέλη στον οργανισμό όταν λαμβάνονται σε κατάλληλες ποσότητες, και συνήθως περιλαμβάνουν *Lactobacillus* και *Bifidobacterium*. Το 2020 η ταξινόμηση του γένους *Lactobacillus* υποβλήθηκε σε αναδιάρθρωση για να ανταπεξέλθει στην ευρεία ποικιλία των βακτηρίων που ανήκουν σε αυτό το γένος. Ουσιαστικά, ομαδοποιήθηκαν πάνω από 300 είδη σε 7 γένη και 2 οικογένειες. Η πρώτη είναι η *Lactobacillaceae*, με 31 γένη, συμπεριλαμβανομένων των *Lactobacillus*, *Paralactobacillus*, *Pediococcus*, *Weissella*, *Fructobacillus*, *Convivina*, *Oenococcus*, *Leuconostoc*, και 23 νέα γένη (Qiao et al., 2022). Στα γένη αυτά περιλαμβάνονται ορισμένα προβιοτικά στελέχη που έχουν υποστεί εκτεταμένη έρευνα και προηγουμένως ανήκαν στο είδος *Lactobacillus* (Guarner et al., 2023, Qiao et al., 2022). Μερικά από αυτά διατυπώνονται στον **Πίνακα 1**.

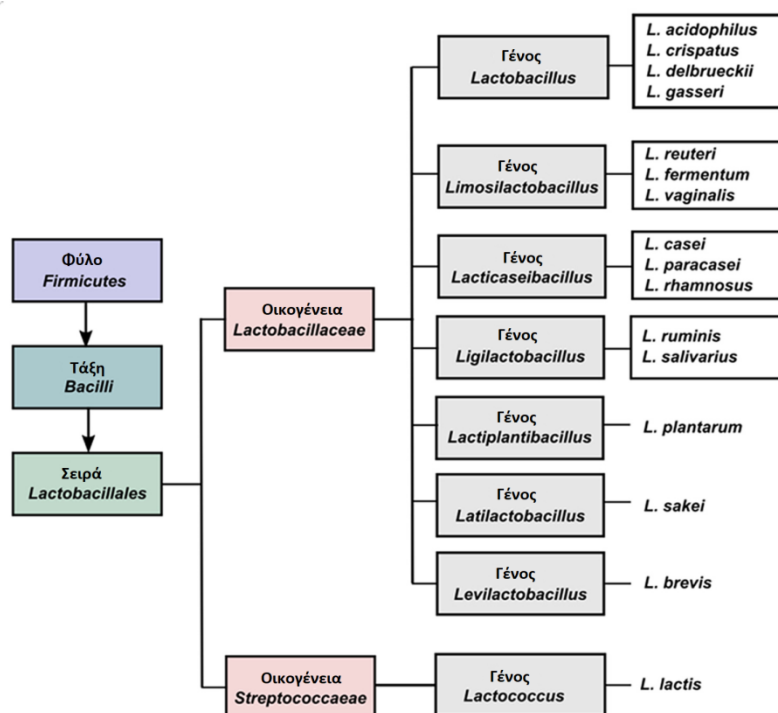
Πίνακας 1: Νέα ονόματα για μερικά είδη *Lactobacillus* (Vinot and Pane, 2020)

Προηγούμενη ονομασία	Νέα ονομασία
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lacticaseibacillus casei</i>
<i>Lactobacillus paracasei</i>	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>

<i>Lactobacillus salivarius</i>	<i>Ligilactobacillus salivarius</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
<i>Lactobacillus pentosus</i>	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>
<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>
<i>Lactobacillus reuteri</i>	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Levilactobacillus brevis</i>
<i>Lactobacillus kefir</i>	<i>Lentilactobacillus kefir</i>

1.1.3. Βακτήρια Γαλακτικού Οξέος

Τα βακτήρια γαλακτικού οξέος (LAB) είναι μια ομάδα Gram θετικών μικροοργανισμών (Abedi & Hashemi, 2020) που έχουν την ικανότητα να παράγουν γαλακτικό οξύ ως μοναδικό ή κύριο (> 50%) τελικό προϊόν από τη ζύμωση των υδατανθράκων (Zheng et al., 2020, George et al., 2018). Η παραγωγή γαλακτικού οξέος εξαρτάται από το pH (3,5-9,6), τη θερμοκρασία (5-45°C), την παρουσία θρεπτικών συστατικών και το στέλεχος του LAB που χρησιμοποιείται (Abedi & Hashemi, 2020). Στα LAB συμπεριλαμβάνονται μεταξύ άλλων και οι *Lactobacilli*, *Lactococci*, *Enterococci*, *Streptococci*, *Leuconostoc* και *Pediococci*. Αυτά τα γένη εμφανίζουν μεγάλη διαφοροποίηση ως προς τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά, την ανθεκτικότητα στο pH και τα άλατα, το βέλτιστο θερμοκρασιακό εύρος και το παθογόνο δυναμικό. Ωστόσο, λόγω των χαρακτηριστικών τους είναι δύσκολο να ταξινομηθούν σε ωφέλιμα και ιογενή είδη, καθώς κάποια προβληματικά χαρακτηριστικά τους σχετίζονται σε μεγαλύτερο βαθμό με το στέλεχος από ότι με είδος (Pessione, 2012). Στην **Εικόνα 2**, απεικονίζεται η τελευταία ταξινόμηση των γαλακτικών βακτηρίων.



Εικόνα 2: Ταξινόμηση των γαλακτικών βακτηρίων (Huynh et al., 2023).

Τα LAB έχουν την ικανότητα προσαρμογής σε ποικίλες περιβαλλοντικές συνθήκες με σκοπό την επιβίωσή τους (Zarour et al., 2017). Αποικίζουν σε διάφορα τρόφιμα, όπως το γάλα (Taye et al., 2021), το κρέας (Hernandez-Aquino et al., 2020), τα θαλασσινά (Françoise, 2010), τα λαχανικά (Linares-Morales et al., 2020), τα σιτηρά (Manini et al., 2016) και το έντερο ανθρώπων και ζώων (Vieco-Saiz et al., 2019). Συγκεκριμένα, στο ανθρώπινο μικροβίωμα του εντέρου, τα LAB μεταβάλλονται ανάλογα με την ηλικία (**Εικόνα 3**) (Duolac Worldwide, 2020) και είναι από τα πιο πολυάριθμα βακτήρια που έχουν θετική αλληλεπίδραση με τον άνθρωπο (Makarova & Koonin, 2007).



Εικόνα 3: Ποικιλομορφία του μικροβιώματος ανά ηλικία (Duolac Worldwide, 2020).

Σήμερα, τα LAB έχουν οικονομική σημασία, εξαιτίας της χρήσης τους στην παραγωγή τροφίμων και ζωοτροφών, στη βιοτεχνολογία, στην κομποστοποίηση και σε θεραπευτικούς σκοπούς (προβιοτικά) (Walter & O'Toole, 2023, Makarova et al., 2006). Σημαντικός είναι και ο ρόλος τους στον παγκόσμιο εφοδιασμό τροφίμων, εκτελώντας τις κύριες βιομετατροπές στα ζυμωμένα γαλακτοκομικά προϊόντα, τα κρέατα και τα λαχανικά (Makarova et al., 2006). Επίσης, ως μικροοργανισμοί ζύμωσης είναι ευρέως διαδεδομένοι ως παράγοντες συντήρησης (Perez et al., 2014) και για τη ενίσχυση και ανάπτυξη της γεύσης των τροφίμων (Hu et al., 2022). Η ικανότητά τους να παράγουν οξέα και αντιμικροβιακούς παράγοντες, όπως οι βακτηριοσίνες (Perez et al., 2014), να αναπτύσσονται σε όξινες συνθήκες και να προκαλούν γρήγορη πρώτη του pH είναι οι λόγοι που τους καθιστούν ως πολύτιμα φυσικά εργαλεία για τη συντήρηση τροφίμων (Walter & O'Toole, 2023, Deegan et al., 2006). Οι βακτηριοσίνες είναι αντιμικροβιακά πεπτίδια τα οποία δύνανται να σκοτώσουν ή να αναστείλουν βακτηριακά στελέχη (Yang et al., 2014).

Στον **Πίνακα 2** παρουσιάζονται κάποια στελέχη μικροοργανισμών που έχει αποδειχθεί ότι είναι αποτελεσματικά ως βιοσυντηρητικά για την αναστολή παθογόνων βακτηρίων.

Πίνακας 2: Παραδείγματα LAB με ανασταλτική δράση έναντι παθογόνων στελεχών

Γαλακτικά βακτήρια	Παθογόνο Στέλεχος	Πηγή
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	Meloni et al., 2023
<i>L. casei</i>	<i>Helicobacter pylori</i>	Shokryazdan et al., 2014
<i>L. casei</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	Shokryazdan et al., 2014
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Klebsiella spp</i>	Jebur, 2010
<i>L. casei</i> ATCC 393	<i>Trichinella britovi</i>	Boros et al., 2022

1.1.4. *Lactobacillaceae*

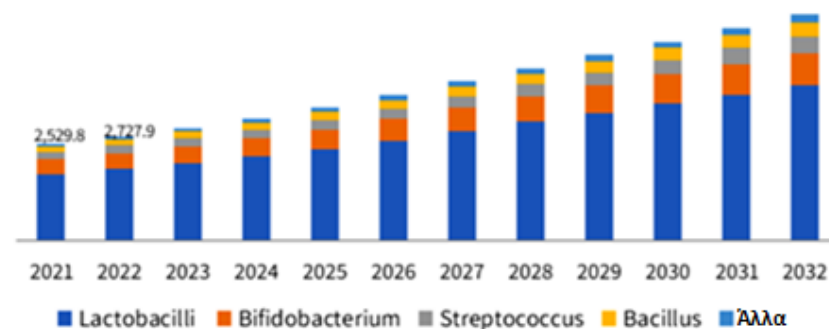
Τα γένη της οικογένειας *Lactobacillaceae* ως LAB χρησιμοποιούνται συχνά ως προβιοτικοί μικροοργανισμοί (Suisse et al., 2022). Ωστόσο, δεν είναι όλα τα είδη της οικογένειας *Lactobacillaceae* κατάλληλα για αυτή τη χρήση, καθώς κάποια είδη συμπεριφέρονται ως αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί (Sanders et al., 2019). Χαρακτηριστικό παράδειγμα μικροοργανισμού που προκαλεί αλλοίωση είναι ο *Lb. sakei* που συμβάλλει στη σήψη των πουλερικών (Xu et al., 2020).

Οι γαλακτοβάκιλλοι είναι Gram θετικά βακτήρια, μη σπορογόνα, προαιρετικά ή αυστηρά αναερόβια και χαρακτηρίζονται ως κόκκοι ή βάκιλλοι. Ο μεταβολισμός τους διακρίνεται από τη ζύμωση της λακτόζης και απλών υδατανθράκων, με το γαλακτικό οξύ να είναι το κυρίαρχο προϊόν που παράγεται, αν και μπορεί να δημιουργηθεί οξικό οξύ, αιθανόλη, διοξείδιο του άνθρακα, μυρμηκικό ή ηλεκτρικό οξύ (Pessione, 2012, Zheng et al., 2020). Ωστόσο, για να καλύψουν τις διατροφικές τους ανάγκες, έχουν απαιτήσεις σε αμινοξέα, πεπτίδια, παράγωγα νουκλεϊκών οξέων, βιταμίνες, άλατα, λιπαρά οξέα ή εστέρες λιπαρών οξέων και ζυμώσιμους υδατάνθρακες (Zheng et al., 2020).

Αξίζει να σημειωθεί ότι τα στελέχη της οικογένειας *Lactobacillaceae* σε ζυμούμενα προϊόντα θεωρούνται ως GRAS (Γενικά Αναγνωρισμένο ως Ασφαλές) (Qiao et al., 2022).

1.1.4.1. *Lactobacillus*

Το βακτηριακό γένος *Lactobacillus* χρησιμοποιείται περισσότερο στη βιομηχανία των προβιοτικών σε σχέση με τα υπόλοιπα είδη μικροοργανισμών. Αυτό φαίνεται στο **Γράφημα 2**, όπου απεικονίζεται το μέγεθος της παγκόσμια αγοράς προβιοτικών, ανά προϊόν από το 2021 και το πώς προβλέπεται να φτάσει έως το 2032. Συγκεκριμένα, η αγορά των προβιοτικών με βάση το *Lactobacillus* ξεπέρασε τα 1,8 δισεκατομμύρια δολάρια το 2022. Η μεγάλη εμπορική σημασία προέρχεται από την υψηλή ανοχή στα οξέα, την υψηλή απόδοση και παραγωγικότητα, γεγονός που το ενσωματώνει στην σφαίρα των προβιοτικών μικροοργανισμών (Abedi & Hashemi, 2020).



Γράφημα 2: Ανάπτυξη της Παγκόσμιας Αγοράς Προβιοτικών, Ανά Προϊόν από το 2021 έως το 2032 (USD Billion) (Ahuja, & Bayas, 2023).

Το γένος *Lactobacillus* εντάσσεται στην οικογένεια των *Lactobacillaceae*, στο φύλο *Firmicutes* και στην τάξη *Bacilli* (Makarova et al., 2006). Ο *Lactobacillus*

κατοικεί φυσικά στη μικροχλωρίδα του εντέρου των ζώων και των ανθρώπων και έχει την τάση να βρίσκεται στον κόλπο των ανθρώπων και στη στοματική κοιλότητα (Optibac Probiotics^β), n.d.). Γενικά, είναι μεταξύ των πιο κοινών μικροοργανισμών που υπάρχουν στον γαστρεντερικό σωλήνα των ανθρώπων (Heeney et al., 2018). Μπορεί επίσης να βρεθεί στο εδαφικό οικοσύστημα, ιδιαίτερα στη ριζόσφαιρα, και στα φυτά, ειδικά στην αποσύνθεση της φυτικής ύλης. Η παρουσία του σε αυτά τα περιβάλλοντα έχει χρησιμοποιηθεί στη γεωργία για μεγάλο χρονικό διάστημα, λόγω του καθοριστικού ρόλου του στην ενίσχυση της ποιότητας του εδάφους, στην προστασία των φυτών από ασθένειες και στις θετικές επιδράσεις στην ανάπτυξη των φυτικών ειδών (Optibac Probiotics^β), n.d.).

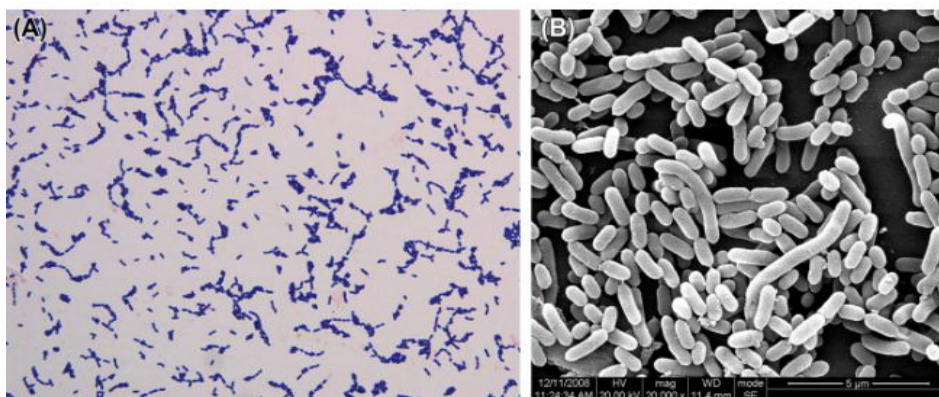
Το πιο γνωστό στέλεχος που χρησιμοποιείται στα προβιοτικά είναι ο *Lactobacillus acidophilus* (Stewart, 2020). Επίσης, λόγω της αποτελεσματικότητας τους, τα στελέχη του *Lactocaseibacillus casei* χρησιμοποιούνται ευρέως σε προβιοτικά συμπληρώματα, με δύο από τα πιο εκτενώς μελετημένα στελέχη να είναι το *Lactocaseibacillus casei* Shirota και το *Lactocaseibacillus casei* DN-114001 (Optibac Probiotics^α), n.d.). Σύμφωνα με τον ISAPP, το *Lactocaseibacillus casei* Shirota είναι ανάμεσα στα πρώτα προβιοτικά που πουλήθηκαν σε εμπορικό επίπεδο και η πρώτη του πώληση πραγματοποιήθηκε το 1935 (International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics, 2020).

Οι εξαιρετικές ικανότητες του *Lactobacillus* να μεταβολίζει τη λακτόζη στο γάλα, του έχει δώσει μια αξιόλογη θέση στη σφαίρα των γαλακτοκομικών προϊόντων. Κατά συνέπεια, έχει γίνει απαραίτητος για τη ζύμωση τυριού, γιαουρτιού και κεφίρ. Ωστόσο, η ευελιξία του εκτείνεται και στην παραγωγή των vegan τυριών, στο τουρσί, στο kimchi και στη δημιουργία προζυμένιου ψωμιού από σπόρους που έχουν υποστεί ζύμωση (Optibac Probiotics^β), n.d.). Παρόλα αυτά, η ταξινομική πολυπλοκότητα του είδους *Lactobacillus* παρουσιάζει μια πρόκληση στο σχηματισμό γενικεύσεων λόγω περιορισμένων διαθέσιμων δεδομένων. Ωστόσο, είναι αξιοσημείωτο ότι εμφανίζει μία ανθεκτικότητα σε όξινα περιβάλλοντα, όπως εκείνο του στομαχίου (Goldstein et al., 2015).

Σημαντικά είναι και τα οφέλη του *Lactobacillus* στον ανθρώπινο οργανισμό, όπως η πρόληψη της νόσου του Alzheimer (Tripathi et al., 2023), η εμφάνιση νευροπροστατευτικών επιδράσεων στο πλαίσιο της νόσου του Πάρκινσον (Keshavarzian et al., 2020) και η βελτίωση των συμπτωμάτων της νοροϊού στους ηλικιωμένους (Lei et al., 2016).

1.1.4.2. *Lactocaseibacillus casei*

Το *Lactocaseibacillus casei* (**Εικόνα 4**), σύμφωνα με την μικροβιολογική εγκυκλοπαίδεια, είναι ένα Gram θετικό, μη κινητικό, μη σπορογόνο και αρνητικό στην καταλάση βακτήριο (Gobbetti, 1999). Το *L. casei* μπορεί να απομονωθεί από το γάλα (Uraz et al., 2001), από τρόφιμα που έχουν υποστεί ζύμωση (Bao et al., 2016), όπως το τυρί (Herrero-Fresno et al., 2012), αλλά και από προζύμι (Paucean et al., 2013), την κοπριά αγελάδας (Huang et al., 2018), τον ανθρώπινο εντερικό σωλήνα (An & Miyamoto, 2006), το στόμα (Meyers et al., 1958) και τον κόλπο (Aroutcheva et al., 2001). Το κυτταρικό τοίχωμα αυτού του τύπου βακτηρίων περιέχει τειχοϊκό οξύ, το οποίο βοηθά τα βακτήρια να προσκολληθούν στο δέρμα και σε άλλους ιστούς του σώματος (Shori et al., 2019).



Εικόνα 4: Απεικόνιση του *Lactocaseibacillus casei* (A) με φωτεινό μικροσκόπιο και (B) με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM) (Kambura, 2019).

Ο *Lactocaseibacillus casei* προσφέρει πολλά σημαντικά οφέλη, μεταξύ των οποίων είναι και η μείωση της προσκόλλησης των παθογόνων μικροοργανισμών στον εντερικό βλεννογόνο, δημιουργώντας λιγότερο χώρο για να ευδοκιμήσουν. Συγκεκριμένα στελέχη του *L. casei* μπορούν να διαμορφώσουν το ανθρώπινο ανοσοποιητικό σύστημα και να μεταβάλουν τη σύνθεση του εντέρου. Για παράδειγμα, ο *Lactocaseibacillus casei* DN-114001 έχει μελετηθεί εκτενώς για τις ανοσοϋποστηρικτικές του ιδιότητες, ενώ ο *L. casei* Shirota ενισχύει τη δραστηριότητα των κυττάρων στην καταπολέμηση όγκων και μολυσματικών κυττάρων. Ορισμένα στελέχη του *L. casei* έχουν επίσης ερευνηθεί στο πλαίσιο της υγείας των γυναικών και της εγκυμοσύνης (Optibac Probiotics^{α)}, n.d.). Στον **Πίνακα 3** παραθέτονται κάποια ακόμα πλεονεκτήματα του *L.casei*.

Πίνακας 3: Οφέλη του *Lactocaseibacillus casei* στον ανθρώπινο οργανισμό.

Οφέλη	Πηγές
Μείωση κίνδυνου εμφάνισης διάρροιας που προκαλείται από τα αντιβιοτικά	Wong et al., 2014
Πρόληψη διάρροιας που προκαλείται από ακτινοβολία	Giralt et al., 2008
Διατήρηση της ύφεσης της συμπτωματικής μη επιπλεγμένης εκκολπωματικής νόσου του παχέος εντέρου	Tursi et al., 2008
Πρόληψη του λεπτού εντέρου από τραυματισμό που προκαλείται από χαμηλή δόση ασπιρίνης	Endo et al., 2015

Όσον αφορά το στέλεχος *Lactocaseibacillus casei* ATCC 393 που μελετήθηκε στη συγκεκριμένη εργασία, φαίνεται ότι έχει σημαντικά πλεονεκτήματα για τον ανθρώπινο οργανισμό, όπως φαίνεται και στον **Πίνακα 4**.

Πίνακας 4: Οφέλη του *Lactocaseibacillus casei* ATCC 393 στον ανθρώπινο οργανισμό

Οφέλη	Πηγές
Μείωση βιωσιμότητας καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου	(Tiptiri-Kourpeti et al., 2016, Spyridopoulou et al., 2021)
Ανακούφιση εντερικών ασθενειών	(Liu et al., 2021)
Προστατευτική δράση στη νοητική δυσλειτουργία	(Qiao et al., 2022)
Απομάκρυνσης της χοληστερόλης	(Lye et al., 2010)
Ανακούφιση της δυσλειτουργία του εντερικού επιθηλιακού φραγμού λόγω του οξειδωτικού στρες	(Xu et al., 2019)
Ανακούφιση της ελκώδης κολίτιδας	(Zhu et al., 2023)
Ρύθμιση εντερικού μικροβιώματος	(Song et al., 2022)
Μείωση πιθανότητας εμφάνισης οστεοπόρωσης	(Collins et al., 2017)

1.1.5. Οφέλη για την υγεία

Τα προβιοτικά έχουν ένα ευρύ φάσμα ευεργετικών επιδράσεων στην υγεία. Σήμερα, τα προβιοτικά χρησιμοποιούνται μεταξύ άλλων και για τη διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος και για την πρόληψη πολλών ασθενειών (Karami et al., 2017).

Τα προβιοτικά επιδρούν στο ανοσοποιητικό σύστημα του οργανισμού, καθιστώντας τα ένα ανεκτίμητο πλεονέκτημα για τη ρύθμιση του. Μέσω των αλληλεπιδράσεών τους με τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος στον λεμφικό ιστό που σχετίζεται με το έντερο, τα προβιοτικά ενισχύουν την άμυνα του οργανισμού έναντι των επιβλαβών μικροοργανισμών. Με αυτόν τον τρόπο μειώνουν την πιθανότητα εμφάνισης ασθενειών και λοιμώξεων που σχετίζονται με το ανοσοποιητικό. Επιπλέον, ορισμένα στελέχη προβιοτικών έχουν την ικανότητα να συνθέτουν ζωτικές βιταμίνες και θρεπτικά συστατικά. Για παράδειγμα, μπορεί να παράγουν βιταμίνες B, όπως φυλλικό οξύ και B12, οι οποίες είναι απαραίτητες για τη λειτουργία του εγκεφάλου, την κυτταρική διαίρεση και τη σύνθεση ενέργειας. Η βιταμίνη K είναι μία ακόμα βιταμίνη που μπορούν να συνθέσουν και σχετίζεται με την υγεία των οστών και την πήξη του αίματος (Figuerola-González et al., 2011). Ένα βακτηριακό στέλεχος που έχει αποδειχτεί ότι μπορεί να παράγει βιταμίνες είναι το *Lactiplantibacillus plantarum* (WebMD Editorial Contributors, 2023).

Αδιαμφισβήτητα, για να διατηρηθεί η βέλτιστη υγεία, είναι επιτακτική η ανάγκη να διασφαλιστεί η ευημερία και η ισορροπία της μικροχλωρίδας του εντέρου. Τα προβιοτικά διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην επίτευξη αυτής της ισορροπίας, καθώς δημιουργούν ένα ευνοϊκό περιβάλλον για τον πολλαπλασιασμό των ωφέλιμων μικροοργανισμών. Αυτή η συμβιωτική συνθήκη βασίζεται στην ευημερία τόσο του ανοσοποιητικού όσο και του πεπτικού συστήματος, καθώς και στην πρόληψη των γαστρεντερικών ασθενειών (Figuerola-González et al., 2011). Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι η επίδραση της μικροχλωρίδας του εντέρου εκτείνεται πέρα από το ίδιο το έντερο, επηρεάζοντας δυνητικά την κατάθλιψη, τη λειτουργία του εγκεφάλου, το στρες, τα επίπεδα χοληστερόλης στο αίμα, τις λοιμώξεις του ουροποιητικού και του κόλπου, καθώς και διάφορους τύπους αλλεργιών (International Probiotics Association, 2017). Στον **Πίνακα 5** διατυπώνονται μερικά από τα οφέλη των προβιοτικών που έχουν ερευνηθεί σε μεγαλύτερη κλίμακα, σύμφωνα με τον IPA. Στον **Πίνακα 6** παραθέτονται μερικά ακόμα, σύμφωνα με το Εθνικό Κέντρο Συμπληρωματικής και Ολοκληρωτικής Υγείας (NCCIH) (Wang & Shurtleff,

2019) και σύμφωνα με διάφορες μελέτες (Guarner et al., 2023, Schreck Bird et al., 2017, Thomas et al., 2023, Ciprandi & Tosca, 2022, Johansson et al., 2011, Dinan & Cryan, 2017, Sanchez et al., 2014, Lei et al., 2016).

Πίνακας 5: Οφέλη προβιοτικών στην υγεία, ανά επίπεδο επιστημονικών αποδείξεων
(International Probiotics Association, n.d)

Οφέλη για την υγεία	Επίπεδο Αποδείξεως
Μείωση του κινδύνου για διάρροια	Καλό
Μείωση του κινδύνου για νεκρωτική εντεροκολίτιδα	Καλό
Μείωση του κινδύνου για λοιμώξεις του αναπνευστικού	Καλό
Διάρροια που σχετίζεται με το <i>Clostridium difficile</i>	Καλό
Πρόληψη της ατοπίας	Καλό

Πίνακας 6: Οφέλη προβιοτικών στην υγεία, ανά κατηγορία

Οφέλη στην υγεία	
Γαστρεντερικές παθήσεις	• Λοίμωξη από <i>Clostridium difficile</i> • Δυσκοιλιότητα • Διάρροια που προκαλείται από τη θεραπεία του καρκίνου • Εκκολπωματική νόσος • Φλεγμονώδης νόσος του εντέρου • Σύνδρομο ευερέθιστου εντέρου • Διάρροια ταξιδιωτών • Νοροϊός στους ηλικιωμένους
Παθήσεις σε βρέφη	• Βρεφικοί κολικοί • Νεκρωτική εντεροκολίτιδα • Σήψη
Διαταραχές των δοντιών	• Οδοντική τερηδόνα • Περιοδοντικές παθήσεις (νόσοι των ούλων)

Καταστάσεις που σχετίζονται αλλεργία	• Αλλεργική ρινίτιδα • Άσθμα • Πρόληψη των αλλεργιών
Άλλες παθήσεις	• Ακμή Ηπατική εγκεφαλοπάθεια • Λοιμώξεις του ανώτερου αναπνευστικού • Λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος • Βελτίωση ψυχικής υγείας • Παχυσαρκία

Παρόλα αυτά, οι θετικές επιδράσεις των προβιοτικών διαφέρουν ανάλογα το είδος του προβιοτικού, καθώς το κάθε ένα έχει συγκεκριμένες λειτουργίες και οφέλη (International Probiotics Association, 2017). Υπάρχει μια επικρατούσα εσφαλμένη αντίληψη ότι η αποτελεσματικότητα των προβιοτικών εξαρτάται από την ικανότητά τους να αλλάζουν την περίπλοκη ισορροπία της μικροχλωρίδας του εντέρου. Ωστόσο, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι τα προβιοτικά δεν δημιουργούν μια μόνιμη κατοικία στο έντερο και μπορεί να μην αλλάζουν εμφανώς την παρουσία των μικροοργανισμών που κατοικούν φυσικά σε αυτό. Αντίθετα, καθώς τα προβιοτικά διασχίζουν το πεπτικό σύστημα, συμβιώνουν με τα κύτταρα του εντερικού σωλήνα, με τα θρεπτικά συστατικά του εντέρου και με τις μικροσκοπικές οντότητες που συνυπάρχουν στον οργανισμό. Με αυτόν τον τρόπο, προσφέρουν ένα πλήθος ευεργετικών αποτελεσμάτων (International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics, 2018).

1.1.6. Προκλήσεις στην παροχή προβιοτικών

Προκειμένου όμως να γίνει πλήρης αξιοποίηση των προβιοτικών από τον οργανισμό, είναι απαραίτητο να ξεπεραστούν σημαντικά εμπόδια για την αποτελεσματική και ασφαλή είσοδο τους στο γαστρεντερικό σύστημα. Η πορεία τους ξεκινά στο στομάχι, ένα περιβάλλον που διακρίνεται για την όξινη φύση του. Η παρουσία πεπτικών ενζύμων, οι αλλαγές στη θερμοκρασία και τα επίπεδα pH συμβάλλουν σε ένα περίπλοκο περιβάλλον που μπορεί να δυσχεράνει την επιβίωση των προβιοτικών, τα οποία κινούνται μέσω του πεπτικού συστήματος. Επομένως, ο σχεδιασμός ενός μηχανισμού χορήγησης που εξασφαλίζει την ακριβή απελευθέρωση

των προβιοτικών στις συγκεκριμένες θέσεις-στόχους τους είναι απαραίτητος για τη μεγιστοποίηση της επίδρασής τους. Επίσης, τα προβιοτικά πρέπει να περιλαμβάνονται σε μια ποικιλία τροφίμων και συμπληρωμάτων διατροφής προκειμένου να είναι βιώσιμα και αποτελεσματικά. Αυτό παρέχει ένα ακόμα πολύπλοκο πρόβλημα, καθώς απαιτούνται προσεκτικές διαδικασίες διαμόρφωσης για την ενσωμάτωση αυτών των μικροοργανισμών σε διάφορες «μήτρες» χωρίς να επηρεάζεται η λειτουργία τους (Figueroa-González et al., 2011).

1.2 Ακίνητοποίηση

Η χρήση μεθόδων ακίνητοποίησης έχει συγκεντρώσει το ενδιαφέρον ως βιώσιμη στρατηγική για την αντιμετώπιση των εμποδίων που συνδέονται με τη χορήγηση των προβιοτικών. Ακίνητοποιημένα κύτταρα είναι εκείνα που περικλείονται ή σταθεροποιούνται σε μια συγκεκριμένη θέση ή μήτρα (Pras & Woerdenbag, 1999). Η ακίνητοποίηση των κυττάρων είναι «ο φυσικός περιορισμός ή εντοπισμός των κυττάρων σε μια ορισμένη καθορισμένη περιοχή του χώρου με διατήρηση κάποιας επιθυμητής δραστηριότητας» (Willaert, 2018). Η ακίνητοποίηση χωρίζεται σε τέσσερις τεχνικές: α) φυσική ακίνητοποίηση με τη χρήση υποστηρικτικών μέσων, β) αυτό-ακίνητοποίηση με κροκίδωση ή συσσωμάτωση, γ) συγκράτηση σε μεμβράνες και δ) ενθυλάκωση (Bai et al., 2011).

Στην πρώτη κατηγορία συγκαταλέγονται οι δύο συχνότερες μέθοδοι που εφαρμόζονται (Yang et al., 2011), η προσρόφηση, δηλαδή η προσκόλληση των κυττάρων σε στερεά μέσα, μέσω φυσικής ή χημικής έλξης (Yang et al., 2011) και ο εγκλωβισμός σε πορώδη μήτρα ή πηκτώματα (Kumar et al., 2016). Η προσρόφηση σε μία επιφάνεια επιτυγχάνεται φυσικά με τη βοήθεια ηλεκτροστατικών δυνάμεων ή τεχνητά χρησιμοποιώντας συνδετικούς παράγοντες (ομοιοπολική σύνδεση) (Willaert, 2018, Ge et al., 2017). Η διαδικασία αυτή επηρεάζεται από το υπόστρωμα, τα μόρια συγκόλλησης που εκκρίνονται από τα κύτταρα, το θρεπτικό υλικό και την κυτταρική επιφάνεια (Ge et al., 2017). Η κυτταρική μεμβράνη στη συγκεκριμένη μέθοδο έχει συνήθως πάχος μεγαλύτερο από ένα στρώμα κυττάρων (Kourkoutas et al., 2004). Στον εγκλωβισμό, τα προκαλλιεργημένα κύτταρα είναι διασκορπισμένα στο διάλυμα πηκτωμάτων (**Πίνακας 7**) μέχρι την πήξη και τη δημιουργία ενός τελικού μεγέθους και σχήματος (σφαιρίδια ή φύλλα) (Bai et al., 2011). Πιο συγκεκριμένα, ο εγκλωβισμός σε μήτρες πηκτής έχει αποδειχθεί ότι λειτουργεί ως φυσική προστασία

των κυττάρων από τους βακτηριοφάγους και τα μολυσματικά κύτταρα (Lacroix et al., 1996). Αντίθετα, στον εγκλωβισμό σε πορώδη μήτρα, τα κύτταρα είτε αφήνονται να διεισδύσουν εντός της μήτρας, είτε το υλικό σχηματίζεται επιτόπου γύρω από αυτά (Verbelen et al., 2006). Ο εγκλωβισμός πραγματοποιείται με σκοπό τον περιορισμό των κυττάρων εντός σφαιριδίων, ενώ παράλληλα επιτρέπει την ελεύθερη διάχυση των υποστρωμάτων και των προϊόντων μεταβολισμού εντός και εκτός των σφαιριδίων (Ge et al., 2017). Επίσης, είναι η πιο συνηθισμένη μέθοδος, λόγω της μικρής πιθανότητας πρόκλησης αλλαγών στη λειτουργία των κυττάρων (Zhu, 2007).

Πίνακας 7: Πολυμερή για των εγκλωβισμό των κυττάρων σε πηκτή.

Πολυμερή	Πηγές
Άγαρ	(Vassileva et al., 2003)
Πολυακρυλαμίδιο	(Mandwal et al., 2004)
Αλγινικό	(Smidsrød & Skja, 1990)
Ακρυλονιτρίλιο	(Godjevargova et al., 2006)
Καραγενάνη	(Lamboley et al., 1999)
Ουρεθάνη	(Cipolatti et al., 2014)
Βινυλική αλκοόλη	(Lozinsky & Plieva, 1998)
Υδροξυαιθυλομεθακρυλικό (HEMA)	(Lane et al., 2011)
Χιτοζάνη	(Jianlong & Yi, 1999)

Η αυτό-ακίνητοποίηση και συγκεκριμένα η κροκίδωση των κυττάρων ονομάζεται η ιδιότητα τους να δημιουργούν συσσωματώματα και να καθιζάνουν με γρήγορο ρυθμό όταν βρίσκονται σε αιωρήματα (Kourkoutas et al., 2004).

Η συγκράτηση σε μεμβράνες περιορίζει τα κύτταρα, τα οποία μπορούν να αναπτυχθούν και να συσσωματωθούν, ενώ επιτρέπει την παροχή θρεπτικών συστατικών και την απομάκρυνση των αποβλήτων (Zhu, 2007). Επίσης, έχει εφαρμοστεί για την ανακύκλωση κυττάρων, δηλαδή για την αύξηση της πυκνότητας και της παραγωγικότητας των κυττάρων που έχουν ανακτηθεί από κάποια διεργασία (Ge et al., 2017). Επιτυχημένη είναι και η εφαρμογή της στην αερόβια καλλιέργεια μικροβιακών κυττάρων (Zhu, 2007).

1.2.1. Ενθυλάκωση

Η ενθυλάκωση μπορεί να περιγραφεί ως η διαδικασία εγκλεισμού ενός υλικού μέσα σε ένα άλλο (Gibbs et al., 1999; Singh et al., 2022). Στην ουσία εγκλωβίζονται διάφορα συστατικά μέσα μια μικρή κάψουλα, που τυπικά κυμαίνεται από 5 έως 300 μικρόμετρα. Η σύνθεση της κάψουλας μπορεί να περιλαμβάνει μια ποικιλία ουσιών όπως σάκχαρα, κόμμεα, πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες, λιπίδια και πολυμερή. Το υλικό που εγκλωβίζεται είναι κυρίως υγρό, ωστόσο ενδέχεται να είναι στερεό ή αέριο (Gibbs et al., 1999). Το υλικό που περικλείεται αναφέρεται ως ενεργό, πληρωτικό ή εσωτερικό υλικό, ενώ το υλικό που περικλείει είναι γνωστό ως φορέας, φιλμ επίστρωσης, εξωτερικό φιλμ ή μήτρα (Singh et al., 2022).

Οι βασικότερες παραλλαγές της ενθυλάκωσης, ανάλογα με τη μέθοδο που χρησιμοποιείται είναι τρεις. Πιο συγκεκριμένα, είναι η δεξαμενή (Reservoir), η μήτρα (μικροσωματίδιο) και η επικαλυμμένη μήτρα (δομή πολλαπλών τοιχωμάτων). Στη μέθοδο της δεξαμενής, το ενεργό υλικό ενθυλακώνεται από το εξωτερικό στρώμα του υλικού του φορέα. Στη μέθοδο μήτρας, το ενεργό υλικό επικαλύπτει ομοιόμορφα την επιφάνεια του υλικού του φορέα. Ενώ, η μέθοδος της επικαλυμμένης μήτρας περιλαμβάνει την επίστρωση του ενθυλακωμένου ενεργού υλικού με ένα πρόσθετο υλικό επικάλυψης (Singh et al., 2022).

1.2.2. Σκοπός και εφαρμογές

Με την γενικότερη έννοια, η ενθυλάκωση εφαρμόζεται σε διάφορους τομείς της βιομηχανίας τροφίμων, ιδίως στην προστασία των προβιοτικών, εξυπηρετώντας πολλαπλούς σκοπούς. Μέσα σε αυτούς συγκαταλέγεται η διατήρηση της ακεραιότητας του ενεργού υλικού σε προϊόντα τροφίμων και η ελαχιστοποίηση της επίδρασης σε αυτό των εξωτερικών συνθηκών, όπως είναι η θερμότητα και η υγρασία. Επίσης, η ενθυλάκωση συμβάλει στη διευκόλυνση της σταδιακής και ρυθμιζόμενης απελευθέρωσης του ενεργού συστατικού, ώστε, για παράδειγμα, να επιτυγχάνεται η επιβράδυνση της απελευθέρωσης των ιδιοτήτων μέχρι το κατάλληλο ερέθισμα. Ένας ακόμα σκοπός της είναι η τροποποίηση του εγκλωβισμένου συστατικού για τον ευκολότερο χειρισμό, αλλά και η αραίωσή του, όταν χρειάζεται μικρότερη αναλογία (Desai & Jin Park, 2005). Η απόκρυψη γεύσεων, χρωμάτων ή οσμών, η παράταση της διάρκειας ζωής των προϊόντων, η διαφύλαξη της θρεπτικής αξίας των συστατικών και ο χειρισμός των αντιδράσεων οξείδωσης (Anal & Singh,

2007, Arslan-Tontul & Erbas, 2017) είναι μερικοί ακόμα λόγοι που καθιστούν την ενθυλάκωση αναγκαία.

Αξίζει να σημειωθεί ότι στην ενθυλάκωση προβιοτικών χρησιμοποιούνται συνήθως πολυμερή τροφίμων, όπως αλγινικά, χιτοζάνες, καρβοξυμεθυλοκυτταρίνες (CMC), καραγενάνες, ζελατίνες και πηκτίνες (Anal & Singh, 2007) .

1.2.3. Τεχνικές ενθυλάκωσης

Οι τεχνικές ενθυλάκωσης προβιοτικών που είναι ευρέως διαδεδομένες στην βιομηχανία τροφίμων είναι η γαλακτωματοποίηση (Emulsification), η ξήρανση με ψεκασμό (spray drying), η επικάλυψη σε ρευστοποιημένη κλίνη (fluidized bed coating), η εξώθηση (extrusion), η συσσωρευματοποίηση (coacervation), και η λυοφιλίωση (freeze drying) (Mishra, 2015; Singh et al., 2022).

Ωστόσο, η ξήρανση με ψεκασμό, η επικάλυψη σε ρευστοποιημένη κλίνη και η λυοφιλίωση εμφανίζουν κάποιους περιορισμούς στη χρήση τους, λόγω της απελευθέρωσης των κυττάρων εντός του προϊόντος. Ουσιαστικά, δεν συμβάλλουν στην προστασία των κυττάρων στο περιβάλλον της μήτρας των τροφίμων και έναντι στο γαστρικού υγρό (Gbassi & Vandamme, 2012).

1.2.3.1. Ξήρανση με ψεκασμό

Στη μέθοδο της ξήρανσης με ψεκασμό συγκαταλέγονται τρία θεμελιώδη βήματα, ξεκινώντας με τον ψεκασμός ενός εναιωρήματος, το οποίο περιέχει προβιοτικούς μικροοργανισμούς και το υλικό του φορέα (Gbassi & Vandamme, 2012), για τη δημιουργία λεπτών σταγονιδίων (Koh, et al., 2022). Στη συνέχεια, με την παροχή θερμού αέρα, τα σταγονίδια υποβάλλονται σε εξάτμιση, ώστε να απομακρυνθεί το νερό που περιέχουν (Rokka & Rantamäki, 2010). Η μέθοδος ολοκληρώνεται με την απομόνωση της σκόνης που έχει μείνει μετά την ξήρανση (Koh, et al., 2022).

Το πρόβλημα με την συγκεκριμένη μέθοδο είναι ότι λόγω υψηλών θερμοκρασιών (45°C-170°C) (Gbassi & Vandamme, 2012, Serna & Vallejo-Castillo, 2013), η βιωσιμότητα και η ακεραιότητα των προβιοτικών επηρεάζεται αρνητικά, χάνοντας σε μεγάλο βαθμό τις ιδιότητές τους (Arslan-Tontul & Erbas, 2017, Rokka & Rantamäki, 2010). Επίσης, μπορεί ακόμα και να οδηγηθούν σε αδρανοποίηση (Gbassi & Vandamme, 2012) ή σε ολική καταστροφή (Koh, et al., 2022)

1.2.3.2. Λυοφιλίωση

Η λυοφιλίωση είναι μία εξίσου πολύ συνηθισμένη μέθοδος για την ενθυλάκωση των προβιοτικών και αποτελείται από τρία στάδια. Το πρώτο είναι η υποβολή των προβιοτικών και του υλικού του φορέα σε θερμοκρασίες κατάψυξης, σχηματίζοντας έτσι παγοκρυστάλλους. Στη συνέχεια ακολουθεί η υποβολή τους σε διπλή ξήρανση, με τη δεύτερη να λειτουργεί ως μέσο απομάκρυνσης του υπόλοιπου νερού που μπορεί να έχει παραμείνει από την πρώτη (Koh, et al., 2022).

Τα αρνητικά της μεθόδου αυτής είναι ότι ενδέχεται να μειώσει την επιβίωση των προβιοτικών, καθώς ο σχηματισμών κρυστάλλων κατά την κατάψυξη μπορεί να προκαλέσει τη βλάβη των κυττάρων (Koh, et al., 2022) και να μειώσει την περιεκτικότητά τους σε υγρασία, συμβάλλοντας με αυτό τον τρόπο, ακόμα και, στην ολική καταστροφή τους (Singh et al., 2022). Επίσης, η χαμηλή θερμοκρασία πιθανόν να μεταβάλει τη ρευστότητα της προστατευτικής μεμβράνης των προβιοτικών, παρεμποδίζοντας την αποτελεσματικότητα της μεταφοράς των θρεπτικών συστατικών. Ακόμα, μπορεί να εμποδίσει τη λειτουργία των ενζύμων που είναι υπεύθυνα για τον κυτταρικό μεταβολισμό και να θέσει σε κίνδυνο τη σταθερότητα της δομής του RNA κατά τη διεργασία της μετάφρασης (Chen et al., 2023). Οι κρυοπροστατευτικές ενώσεις, όπως είναι οι φρουκτάνες (Bircher et al., 2018) και ορισμένα σάκχαρα μπορούν να συμβάλλουν στη μείωση των μειονεκτημάτων της μεθόδου. Ωστόσο, είναι μία κοστοβόρα μέθοδος με μεγάλο χρόνο επεξεργασίας (Koh, et al., 2022).

1.2.3.3. Επικάλυψη σε ρευστοποιημένη κλίνη

Η επικάλυψη σε ρευστοποιημένη κλίνη είναι μια παραλλαγή της ξήρανσης με ψεκασμό και αφορά τον ψεκασμό ενός ρευστού διαλύματος επικάλυψης πάνω σε μια κλίνη ρευστοποιημένων στερεών σωματιδίων. Πρακτικά, το ρευστό υλικό που χρησιμοποιείται για την επικάλυψη ψεκάζεται πάνω στα προβιοτικά, τα οποία αιωρούνται με τη βοήθεια θερμού αέρα. Στη συνέχεια ακολουθεί μία ταχύτατη εξάτμιση του υδαρές υλικού, ώστε να δημιουργηθεί ένα στρώμα προστασίας γύρω από τα προβιοτικά. Με αυτόν τον τρόπο πραγματοποιείται μία ομοιόμορφη κατάσταση επικάλυψης. Τα υλικά που ενδείκνυνται για τη συγκεκριμένη μέθοδο είναι λιπίδια και παράγωγα κυτταρινών, πρωτεϊνών και αμύλου. (Saikiran et al., 2018, Koh, et al., 2022). Ωστόσο, το υλικό επίστρωσης έχει κάποια κριτήρια που πρέπει να

πληρεί, όπως το να έχει ιξώδες εντός αποδεκτών ορίων, να διακρίνεται από θερμική σταθερότητα και να έχει την ικανότητα να δημιουργεί μεμβράνη (Mishra, 2016).

Το πρόβλημα με την επικάλυψη σε ρευστοποιημένη κλίνη που την καθιστά δύσκολη στην υλοποίηση της είναι ότι ο χρόνος εφαρμογής της κυμαίνεται περίπου στις δύο ώρες και είναι πιθανόν να προκαλέσει την καταστροφή των προβιοτικών. Για το λόγο αυτό, συστήνεται η ενθυλάκωσή τους πριν υποβληθούν στη συγκεκριμένη μέθοδο (Koh, et al., 2022).

1.2.3.4. Γαλακτωματοποίηση

Η γαλακτωματοποίηση είναι μια χημική διαδικασία που περιλαμβάνει τον εγκλεισμό δραστικών ουσιών σε συστήματα δύο φάσεων (Singh et al., 2022). Σε αυτή τη μέθοδο, δημιουργείται μια ασυνεχής φάση, που αποτελείται από προβιοτικά κύτταρα και πολυμερές, ενώ η συνεχής φάση αποτελείται από ένα διάλυμα φυτικού ελαίου (Koh, et al., 2022). Η ασυνεχής φάση, η οποία εμπεριέχει το δραστικό υλικό, αναμιγνύεται με περισσότερο όγκο της συνεχούς φάσης ενώ αναδεύεται συνεχώς (Singh et al., 2022). Αυτή η ανάμειξη έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό γαλακτωμάτων, τα οποία στη συνέχεια στερεοποιούνται με την προσθήκη CaCl_2 . Μόλις δημιουργηθεί το γαλάκτωμα, εξαλείφεται το εξωτερικό στρώμα για να ληφθούν μικροσκοπικά σωματίδια που ενθυλακώνουν το δραστικό υλικό. Τα σωματίδια σε σχήμα σφαιριδίου συλλέγονται μέσω διήθησης ή φυγοκέντρωσης (Koh, et al., 2022),

1.2.3.5. Εξώθηση

Η εξώθηση είναι μια διαδικασία ενθυλάκωσης όπου τα προβιοτικά αναμιγνύονται με ένα υδροκολλοειδές συστατικό επικάλυψης (Singh et al., 2022), όπως αλγικά, καραγενάση, ζελατίνη και χιτοζάνη (Haji et al., 2022). Το διάλυμα στη συνέχεια ψεκάζεται μέσω ενός ακροφύσιου και τα σταγονίδια που δημιουργούνται εκτοξεύονται σε διάλυμα χλωριούχου ασβεστίου και ζελατινοποιούνται, δημιουργώντας σκληρές σφαιρικές κάψουλες (Singh et al., 2022). Συγκεκριμένα, η τεχνική αυτή αποφεύγει τις υψηλές θερμοκρασίες κατά την επεξεργασία, επιτρέποντας υψηλότερο ποσοστό επιβίωσης των προβιοτικών (Haji et al., 2022).

Ωστόσο, το πρόβλημα της εξώθησης είναι ότι απαιτείται ο διαρκής έλεγχος αρκετών συνθηκών, που μεταβάλλουν το μέγεθος των καψουλών. Μερικά χαρακτηριστικά παραδείγματα συνθηκών, σύμφωνα με τους Singh και συνεργάτες,

είναι η θερμοκρασία, η περιεκτικότητα, η ταχύτητα ροής και το ιξώδες του διαλύματος, καθώς και το ύψος ψεκασμού μαζί με τη διάμετρο του οργάνου που χρησιμοποιείται για τον ψεκασμό (Singh et al., 2022).

1.2.3.6. Συσσωρευματοποίηση (Coacervation)

Η συσσωρευματοποίηση ή αλλιώς διαχωρισμός φάσεων είναι μια ευρέως διαδεδομένη μέθοδος που εφαρμόζεται στην ενθυλάκωση προβιοτικών μικροοργανισμών. Σύμφωνα με τη Διεθνή Ένωση Καθαρής και Εφαρμοσμένης Χημείας (IUPAC), ως συσσωρευματοποίηση ορίζεται ο διαχωρισμός ενός πολυμερούς κολλοειδούς διαλύματος σε δύο υγρές φάσεις. Η φάση που είναι πιο πλούσια σε κολλοειδές υλικό είναι το συσώρευμα (coacervate), το οποίο παραμένει στον πυθμένα και η δεύτερη είναι η φάση ισορροπίας (αραιή φάση) (IUPAC, 2019, Moulik et al., 2022). Η μέθοδος αυτή μπορεί να ταξινομηθεί σε μία απλή ή μία σύνθετη μορφή. Πιο συγκεκριμένα, οι δύο μηχανισμοί μοιράζονται πολλές ομοιότητες, με την κύρια διαφορά να βρίσκεται στον τρόπο με τον οποίο συμβαίνει ο διαχωρισμός των φάσεων. Ωστόσο, είναι περίπλοκη μέθοδος, δαπανηρή και δύσκολο να επεκταθεί σε μεγάλη κλίμακα (Misra et al., 2022).

1.2.3.6.1. Απλή συσσωρευματοποίησης

Στην περίπτωση της απλής συσσωρευματοποίησης εμπλέκεται μόνο ένα πολυμερές, το οποίο είτε διαχωρίζεται με τη χρήση ηλεκτρολυτών, όπως το θειικό νάτριο, είτε χρησιμοποιώντας έναν μη υδατοδιαλυτό διαλύτη, όπως είναι η αιθανόλη (Cittadini et al., 2022).

1.2.3.6.2. Σύνθετη συσσωρευματοποίηση

Η σύνθετη συσσωρευματοποίηση περιλαμβάνει την αρμονική αλληλεπίδραση δύο πολυμερών με αντίθετα φορτία σε ένα υδατικό μέσο σε συγκεκριμένες συνθήκες. Οι πρωτεΐνες και οι πολυσακχαρίτες είναι ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα πολυμερών. Τα δύο επιλεγμένα πολυμερή διαλύονται χωριστά σε διαλύτη (Cittadini et al., 2022, Thies, 2016). Η σύνθετης συσσωρευματοποίηση είναι μία διαδικασία που αποτελείται από το διαλύτη, το ενεργό υλικό (προβιοτικό) και το πολυμερές σύμπλοκο και χωρίζεται σε κάποια στάδια. Για αρχή πραγματοποιείται η παρασκευή των δύο διαλυμάτων πολυμερών, τα οποία στη συνέχεια θα ομογενοποιηθούν. Κατά την ανάμειξη τους, τα αντίθετα φορτία τους έλκονται, οδηγώντας στο σχηματισμό μιας ρευστής φάσης συσσωρευματοποίησης που είναι πλούσια σε νερό. Στη

συνέχεια, μεταβάλλοντας το pH και τη θερμοκρασία, ξεκινάει ο διαχωρισμός των δύο φάσεων. Στο τελικό στάδιο πραγματοποιείται η στερεοποίηση με την αύξηση της θερμοκρασίας ή προσθέτοντας έναν παράγοντα συσσωρευματοποίησης (Timilsena, et al., 2019). Στον **Πίνακα 8** είναι μερικά παραδείγματα συμπλόκων που χρησιμοποιούνται για την ενθυλάκωση προβιοτικών.

Πίνακας 8: Παραδείγματα συμπλόκων της σύνθετης συσσωρευματοποίησης.

Πρωτεΐνη	Πολυσακχαρίτης	Παραπομπές
ζελατίνη	πηκτίνη	(Saravanan & Rao, 2010)
πρωτεΐνη ορού γάλακτος	αραβικό κόμμι	(Eratte et al., 2014)
ζελατίνη	αραβικό κόμμι	(Rousi et al., 2019)
πρωτεΐνη πατάτας	πηκτίνη	(Yavuz-Düzgün et al., 2023)

Στη συγκεκριμένη ερευνητική εργασία χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της διπλής συσσωρευματοποίησης με χρήση πρωτεΐνης πατάτας και πηκτίνης.

1.2.3.6.3. Απλή έναντι σύνθετης συσσωρευματοποίησης

Η αποτελεσματικότητα της ενθυλάκωσης ανάμεσα στους δύο τύπος συσσωρευματοποίησης διαφέρει. Πιο συγκεκριμένα, η σύνθετη συσσωρευματοποίηση περιέχει περισσότερη κολλοειδής ουσία, σε σχέση με την απλή (Manaf et al., 2018). Όσο αυξάνεται η περιεκτικότητα σε πολυμερές, τόσο πιο αποδοτική είναι η ενθυλάκωση και βελτιώνεται η ικανότητα στερεοποίησης των καψουλών. Όταν η στερεοποίηση ακολουθεί ένα αργό ρυθμό, εισέρχεται νερό από το υδατικό μέσο στην κολλοειδή φάση, δημιουργώντας πόρους γεμάτους με νερό. Στη διάρκεια του χρόνου που χρειάζεται για να ολοκληρωθεί η στερεοποίηση, οι κάψουλες αρχίζουν να συρρικνώνονται ακόμα περισσότερο, με αποτέλεσμα να γίνονται μικρές και πυκνές (Yeo & Park, 2004). Επίσης, οι πορώδης κάψουλες έχουν μεγάλη επιφάνεια και επηρεάζουν αρνητικά την αποτελεσματικότητα της ενθυλάκωσης, αυξάνοντας παράλληλα την πιθανότητα να συμβεί ρήξη. Αντίθετα, η ταχεία στερεοποίηση οδηγεί σε μία πιο λεία επιφάνεια χωρίς καμία ογκομετρική μεταβολή. Επομένως, η αύξηση της σταθεροποίησης συμβάλει στη δημιουργία ενός τελικού προϊόντος (κάψουλες) με μια λιγότερο πορώδη επιφάνεια, γεγονός που

αυξάνει την αποτελεσματικότητα της ενθυλάκωσης (Manaf et al., 2018, Yeo & Park, 2004). Γενικότερα, πιο λείες είναι οι κάψουλες που έχουν δημιουργηθεί με τη σύνθετη συσσωρευματοποίηση (Manaf et al., 2018).

Στη συσσωρευματοποίηση, οι πρωτεΐνες και οι πολυσακχαρίτες χρησιμοποιούνται περισσότερο ως υλικά που εγκλωβίζουν τα προβιοτικά. Οι πρωτεΐνες, εκτός από την υψηλή τους ικανότητα να δημιουργούν περίβλημα γύρω από τα προβιοτικά κύτταρα, αποσυντίθενται από την πεψίνη που υπάρχει στα γαστρικά υγρά. Ουσιαστικά, η πεψίνη τις διασπά σε μικρά πεπτίδια και αμινοξέα, με σκοπό τη διευκόλυνση της απορρόφησής τους από το λεπτό έντερο. Από την άλλη πλευρά, οι πολυσακχαρίτες, σε αντίθεση με τις πρωτεΐνες, παραμένουν σταθεροί στο στομάχι, καθώς έχουν καλή αντοχή στο υδροχλωρικό οξύ που υπάρχει στο γαστρικό υγρό, αλλά και στην πεψίνη. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την πιο στοχευόμενη χρονική περίοδο απελευθέρωσης των καψουλών, εντός του στομάχου. Όμως, δεν είναι πολύ καλοί στην προστασία των προβιοτικών, επειδή δεν μπορούν να σχηματίσουν ισχυρό προστατευτικό περίβλημα και παρουσιάζουν μεγάλα κενά μεταξύ των μορίων τους. Επομένως, δεν είναι αρκετή η χρήση μόνο ενός από εκ των δύο παραπάνω υλικών ενθυλάκωσης, αλλά απαιτείται ο συνδυασμός τους για την υψηλότερη απόδοση γεγονός που καθιστά την απλή συσσωρευματοποίηση λιγότερο αποτελεσματική σε σύγκριση με την σύνθετη (Liu et al., 2023).

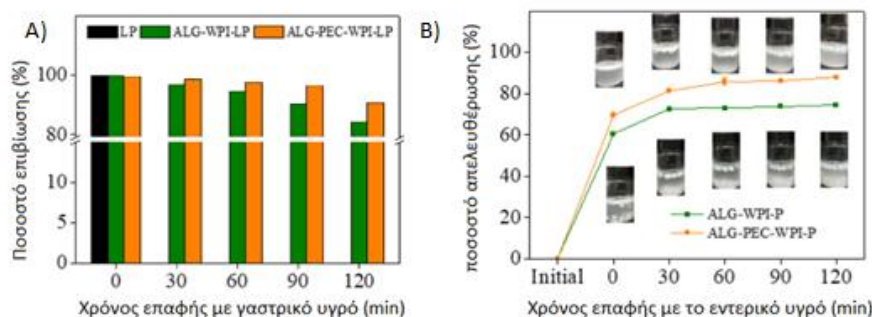
Ωστόσο, η απλή συσσωρευματοποίηση προσφέρει αρκετά πλεονεκτήματα, έναντι της σύνθετης, συμπεριλαμβανομένων της εξοικονόμησης κόστους και μίας μεγαλύτερης ευελιξίας από άποψη διαδικασιών και γενικότερα βασίζεται σε φθηνά ανόργανα άλατα για να προκαλέσει τον επιθυμητό διαχωρισμό (Cittadini et al., 2022).

Παρόλα αυτά, η σύνθετη συσσωρευματοποίηση έχει αποδειχθεί μια εξαιρετικά επιτυχημένη μέθοδος για την ενθυλάκωση ενώσεων ευαίσθητων στη θερμοκρασία και στα λιποδιαλυτά συστατικά των τροφίμων, όπως τα έλαια που είναι πλούσια σε ωμέγα-3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και αρωματικά έλαια. Επίσης, διακρίνεται από μεγάλη αποτελεσματικότητα εξαιτίας του ότι προκαλεί πολύ μικρή βλάβη στην ποιότητα του πυρήνα των καψουλών, με υψηλές αντιοξειδωτικές ιδιότητες και ρυθμιστική ικανότητα απελευθέρωσης (Cittadini et al., 2022).

1.2.3.6.4 Διπλό στρώμα συσσωρευματοποίησης

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση του κολλοειδούς, τόσο μεγαλύτερη είναι η βιωσιμότητα των προβιοτικών κυττάρων.

Επομένως, η προσθήκη ενός ακόμα στρώματος πολυμερούς θα είχε ως αποτέλεσμα τη βελτίωση της ενθυλάκωσης. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η μελέτη των Luo και συνεργάτες που έδειξαν ότι η βιωσιμότητα του *L. plantarum* (LP) αυξήθηκε σε συνθήκες προσομοίωσης του γαστρικού και εντερικού υγρού, όταν εφάρμοσαν ένα δεύτερο στρώμα συσσωρευματοποίησης. Όπως φαίνεται και από την **Εικόνα 5**, όταν χρησιμοποίησαν αλγινικά (ALG) και πρωτεΐνη ορού γάλακτος (WPI), η βιωσιμότητά του μικροοργανισμού ήταν χαμηλότερη από όταν χρησιμοποίησαν αλγινικά (ALG), πηκτίνη (PEC) και πρωτεΐνη ορού γάλακτος (WPI) (Luo et al., 2022).



Εικόνα 5: A) Βιωσιμότητα του ενθυλακωμένου *L. plantarum* σε προσομοιωμένο γαστρικό υγρό, B) Χρόνος απελευθέρωσης του *L. plantarum* σε προσομοιωμένο εντερικό υγρό (Luo et al., 2022).

1.2.3.7. Πλεονεκτήματα των τεχνικών ακινητοποίησης

Στον **Πίνακα 9** αναφέρονται τα κυριότερα πλεονεκτήματα ανάλογα με τη μέθοδο ενθυλάκωσης.

Πίνακας 9: Πλεονεκτήματα μεθόδων ενθυλάκωσης.

Μέθοδος	Πλεονεκτήματα
Ξήρανση με ψεκασμό	- Χαμηλό κόστος (Saikiran et al., 2018) - Εύκολη εφαρμογή (Koh et al., 2022), ιδίως σε βιομηχανικό επίπεδο (Vivek et al., 2023) - Ταχεία και αδιάκοπη μέθοδος (Koh et al., 2022) - Σταθερό τελικό προϊόν μετά την ξήρανση με χαμηλή πυκνότητα (Misra et al., 2022) - Μικρή κατανάλωση ενέργειας (Singh et al., 2022)

Λυοφιλίωση	• Σταθερότητα σε συνθήκες αποθήκευσης (Misra et al., 2022) • Ενθυλάκωση βακτηριακών στελεχών ευαίσθητων στη θερμότητα (Misra et al., 2022)
Επικάλυψη σε ρευστοποιημένη κλίνη	• Οικονομική μέθοδος (Ghandi et al., 2024) • Μικρή ενεργειακή κατανάλωση (Nag & Das, 2013)
Γαλακτωματοποίηση	• Χαμηλό κόστος (Haji et al., 2022) • Υψηλότερη βιωσιμότητα των κυττάρων (Misra et al., 2022) • Εύκολη εφαρμογή σε βιομηχανικό επίπεδο (Vivek et al., 2023)
Εξώθηση	• Απλή μέθοδος (Aghajania et al., 2020) • Υψηλή αποτελεσματικότητα (Aghajania et al., 2020) (ήπιες συνθήκες επεξεργασίας (Sultana et al., 2022)). • Χαμηλό λειτουργικό κόστος (Sultana et al., 2022)
Σύνθετη συσσωρευματοποίηση	• Δεν χρειάζεται εξειδικευμένο εξοπλισμό (Cittadini et al., 2022) • Ήπιες συνθήκες διεργασίας (Timilsena, et al., 2019) • Υψηλή αποτελεσματικότητα (Timilsena, et al., 2019)

1.3. Η πηκτίνη ως συστατικό

Η πηκτίνη είναι ένας ετεροπολυσακχαρίτης που απαρτίζεται από μερικώς μεθυλιωμένες ομάδες γαλακτουρονικού οξέως και χωρίζεται σε δύο ομάδες, ανάλογα με το βαθμό εστεροποίησης. Πιο συγκεκριμένα, είναι η πηκτίνη υψηλού βαθμού μεθοξυλίου (HM) και η πηκτίνη χαμηλού βαθμού μεθοξυλίου (LM). Όπως φαίνεται και στον **Πίνακα 10**, η κάθε ομάδα δημιουργεί πηκτή κάτω από συγκεκριμένο εύρος διαλυτών στερεών και pH. Για την πηκτίνη LM απαιτείται η προσθήκη δισθενών κατιόντων, όπως είναι το Ca^{+2} για τη δημιουργία πηκτής (Campos-Espinoza et al., 2022), σε αντίθεση με την HM δεν χρειάζεται την παρουσία σακχάρων ή οξέων (Fellows & Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1997).

Πίνακας 10: Τύποι πηκτίνης (Fellows & Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1997, Wang et al., 2018).

Τύποι πηκτίνης	Φάσμα διαλυτών στερεών	pH
Πηκτίνες HM (>50% μεθυλεστέρες)	Πάνω από 55%	2,0-3,5
Πηκτίνες LM (<50% μεθυλεστέρες)	10-80%	2,5-6,5

Η πηκτίνη, ως βασικό συστατικό που υπάρχει σχεδόν σε όλα τα φρούτα και τα λαχανικά, χρησιμοποιείται ευρέως στα τρόφιμα για την πήξη ζελέ και μαρμελάδας. Επίσης, βρίσκει εφαρμογή ως πηκτωματοποιητής σε προϊόντα γάλακτος. Οι κυριότερες πηγές της είναι οι φλούδες των εσπεριδοειδών, ενώ στο εμπόριο υπάρχει με τη μορφή ανοιχτόχρωμης καφέ σκόνης, αλλά και ως συμπυκνωμένο σκουρόχρωμο υγρό. Η πηκτίνη είναι ένα αρκετά σταθερό συστατικό που κάτω από κατάλληλες συνθήκες αποθήκευσης έχει την ικανότητα να διατηρεί το 98% της ισχύος της κατά τη διάρκεια ενός έτους, χάνοντας μόνο ένα 2% (Fellows & Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1997).

1.3.1 Η πηκτίνη ως βιοπολυμερές για ενθυλάκωση

Η πηκτίνη ως ένας φυσικός πολυσακχαρίτης, που υπάρχει στα κυτταρικά τοιχώματα πολλών φυτών, έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον ως δυνητικό βιοπολυμερές για την ενθυλάκωση βιοδραστικών ουσιών όπως τα προβιοτικά. Η χρήση της πηκτίνης ως υλικό ενθυλάκωσης συνεπάγεται με αρκετά πλεονεκτήματα. Αρχικά, η πηκτίνη παρουσιάζει ανθεκτικές ιδιότητες απέναντι στα γαστρικά και εντερικά ένζυμα και ευνοεί τη ρυθμιζόμενη απελευθέρωση των ενθυλακωμένων κυττάρων, λόγω της ταχείας δυνατότητάς της να ζυμώνεται από το εντερικό μικροβίωμα (Koh et al., 2022). Επίσης, παρά το γεγονός ότι οι κάψουλες που περιέχουν πηκτίνη, στις όξινες συνθήκες του γαστρικού υγρού ενυδατώνονται ελαφρώς και διογκώνονται, διατηρούν τη σταθερότητά τους, χωρίς σημαντική επίδραση στα ενθυλακωμένα κύτταρα. Ένα ακόμα σημαντικό πλεονέκτημα είναι ότι τα ένζυμα του λεπτού εντέρου, όπως οι πρωτεάσες και οι αμυλάσες, δεν μπορούν να διασπάσουν τις περισσότερες πηκτίνες και μένουν ανέπαφες μέχρι να διέλθουν στο παχύ έντερο. Διασπώνται μόνο κατά τη διέλευση στο παχύ έντερο, κυρίως λόγω των ενζύμων που βρίσκονται σε αυτό το σημείο, αλλά και λόγω του ότι σε $\text{pH} \geq 6,8$ διασπώνται οι καρβοξυλικοί δεσμοί και αποσταθεροποιείται η πηκτίνη (Morales-Medina et al., 2022).

Ένα άλλο αξιοσημείωτο λειτουργικό χαρακτηριστικό της πηκτίνης είναι η αλληλεπίδρασή της με το βλεννογόνο, στο οποίο τείνει να προσκολλάται. Αυτή η βλεννοπροσκόλληση είναι αποτέλεσμα των αντιδράσεων μεταξύ των καρβοξυλομάδων της πηκτίνης και διαφόρων λειτουργικών ομάδων που υπάρχουν στην επιφάνεια του βλεννογόνου. Αποτέλεσμα των αντιδράσεων είναι η υψηλή απόδοση των ενθυλακωμένων κυττάρων, όταν εισέλθουν στο παχύ έντερο, καθώς η αλληλεπίδραση της πηκτίνης με τη βλέννα αυξάνει το χρόνο που τα βιοενεργά υλικά παραμένουν στη θέση απορρόφησης. Με αυτό τον τρόπο, βελτιώνει την απελευθέρωση και πρόσληψη των προβιοτικών (Morales-Medina et al., 2022).

1.4. Πρωτεΐνη πατάτας

Η πρωτεΐνη πατάτας είναι ένα υλικό GRAS και θεωρείται ασφαλής για άτομα που έχουν διατροφικές αλλεργίες, γι' αυτό και δεν χρειάζεται να αναγράφεται στις ετικέτες των τροφίμων. Επίσης είναι ένα φυσικό συστατικό που μπορεί να ενσωματωθεί σε προϊόντα που προορίζονται για χορτοφάγους και vegan. Η πρωτεΐνη πατάτας έχει αρνητικό φορτίο σε pH περίπου 7, εμφανίζοντας το ισοηλεκτρικό της σημείο σε pH 4,5-5,2 (Dachmann et al., 2020). Επομένως σε pH<4,5 έχει θετικό φορτίο (Tokmakov et al., 2021).

Όσον αφορά τα χαρακτηριστικά της, η πρωτεΐνη πατάτας είναι αρκετά υδατοδιαλυτή σε χαμηλό pH, λόγω της υψηλής συγκέντρωσής της σε νερό και του όξινο pH της (David & Livney, 2016). Επίσης, έχει την ικανότητα να δημιουργεί φιλμ και να συγκρατεί νερό και λιπίδια. Αυτά τα χαρακτηριστικά της την καθιστούν αποτελεσματική στην ενθυλάκωση των προβιοτικών κυττάρων (Galves et al., 2023). Εκτός αυτού, η πρωτεΐνη πατάτας διαθέτει ένα πλήθος αμινοξέων, και αποτελεί μία από σημαντικότερες φυτικές πρωτεΐνες, καθώς συγκρίνεται με το ασπράδι του αυγού και το γάλα. Σύμφωνα με προηγούμενες έρευνες, η συγκεκριμένη πρωτεΐνη μπορεί να βοηθήσει στην καταπολέμηση της φλεγμονής και του καρκίνου, στον έλεγχο της υψηλής αρτηριακής πίεσης και στη ρύθμιση της οι γεύσης στο τυρί και το κρασί. Παρά τις θετικές της επιδράσεις, η πρωτεΐνη πατάτας ως ενθυλακωτικό μέσο έχει ερευνηθεί σε ένα πολύ μικρό ποσοστό (Galves et al., 2023).

1.5 Σκοπός πειράματος

Η σύνθεση των μικροβιακών κοινοτήτων επηρεάζεται άμεσα από τους περιβαλλοντικούς παράγοντες (Uribe-Lorío et al., 2019), καθώς ο κάθε μικροοργανισμός ευδοκimeί σε συγκεκριμένες συνθήκες (Icer et al., 2023). Η θερμοκρασία και το pH είναι δύο από τους παράγοντες που επηρεάζουν την επιβίωση των μικροοργανισμών (Igo & Schaffner, 2019). Για παράδειγμα, οι ιδανικές συνθήκες ανάπτυξης για τον *L. casei* είναι σε pH $6,69 \pm 0,20$ και θερμοκρασία $38,63 \pm 0,32$ °C (Kondybayev et al., 2022), με το ποσοστό επιβίωσης τους να μειώνεται όταν βρίσκεται σε pH=2,0, σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες (Dimitrellou et al., 2016). Επομένως, για την για την πλήρη αξιοποίηση των προβιοτικών από τον οργανισμό (Icer et al., 2023) και για την αποτελεσματική και ασφαλή είσοδο τους στο γαστρεντερικό σύστημα (Figueroa-González et al., 2011) είναι αναγκαία η ενθυλάκωσή τους. Αξίζει να σημειωθεί ότι το pH επηρεάζει το χρώμα, τη γεύση αλλά και την υφή των τροφίμων (Oey et al., 2008). Επίσης το pH και η θερμοκρασία επιδρούν στη μετουσίωση των πρωτεϊνών (Brandts, 1964, Zhang & Vardhanabhuti, 2014).

Επομένως, λαμβάνοντας όλα αυτά υπ' όψιν, ερευνήθηκε στην παρούσα εργασία το αν τα συσσωρεύματα που δημιουργήθηκαν από την απομονωμένη πρωτεΐνη πατάτας και την πηκτίνη, μπορούν να προστατεύσουν τον *Lactocaseibacillus casei* ATCC 393. Μελετήθηκε η βιωσιμότητα του μικροοργανισμού μετά την επίδραση της θερμοκρασίας στους 63°C για 0 λεπτά, 15 λεπτά, 30 λεπτά και 40 λεπτά. Στους 63°C για 30λεπτά (British Columbia Centre for Disease Control, 2002) πραγματοποιείται η παστερίωση, η οποία δύναται να επηρεάσει τη βιωσιμότητα των προβιοτικών που έχουν ενσωματωθεί στα τρόφιμα (Anderson & Zagorski, 2022). Τέλος, διερευνήθηκε η επίδραση του pH=2 για 0 ώρες, 1 ώρα, 2,5 ώρες και 4 ώρες ως προσομοίωση του όξινου περιβάλλοντος του στομάχου στο οποίο εκτίθενται τα προβιοτικά μετά τη χορήγησή τους (Koga, 2022). Η πρωτεΐνη πατάτας χρησιμοποιήθηκε ως μια φυτική λύση, λόγω της αύξησης της χορτοφαγικής διατροφής τα τελευταία χρόνια (Jones, 2020).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ II

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

2.1. Υλικά και Εξοπλισμός

2.1.1. Υλικά

Η απομονωμένη πρωτεΐνη πατάτας (IPP) Solanic® 300 (95% w/w πρωτεΐνη, 0,1% w/w λίπος, 0,1% υδατάνθρακες και 0,2% w/w φυτικές ίνες) σε μορφή σκόνης ήταν προϊόν της Royal Avebe U.A. (Veendam, Ολλανδία). Η σκόνη πηκτίνης (PEC) (E440) με χαμηλό βαθμό εστεροποίησης και υψηλή ενεργότητα ασβεστίου (PECTNER™ APC300FB LMC) (pH 3,4-3,8) ήταν προϊόν της Koninklijke DSM N.V (Heerlen, Ολλανδία). Η πηκτίνη και πρωτεΐνη αποθηκεύτηκαν σε σκοτεινό μέρος, σε συσκευασία υπό κενό. Ο μικροοργανισμός *Lactocaseibacillus casei* (ATCC393) που χρησιμοποιήθηκε ήταν από την ATCC (Manassas, Virginia) και ήταν σε ξηρή μορφή. Το γαλακτικό οξύ (E270) αγοράστηκε από την Corbion N.V (Amsterdam, Ολλανδία), χλωριούχο ασβέστιο (CaCl_2) από την IMCD (Rotterdam, Ολλανδία) και το $\text{C}_6\text{H}_9\text{Na}_3\text{O}_9$ (trisodium citrate dihydrate) ($\text{Mr}=294,10$) από την Sigma-Aldrich (Burlington, Massachusetts, Η.Π.Α.). Επίσης, χρησιμοποιήθηκε MRS broth της HiMedia (Mumbai, Maharashtra, Ινδία), MRS Agar από OXOID (De Man, Rogosa και Sharpe) (Basingstoke, Ηνωμένο Βασίλειο) και ταμπλέτες RINGER από Sigma-Aldrich (Burlington, Massachusetts, Η.Π.Α.).

2.1.2. Εξοπλισμός

- Δύο μαγνητικοί αναδευτήρες (Agimatic-Rev-E και Agimatic-S)
- Δύο πεχάμετρα (Hanna Hi 9025 και Parkside PPHM 14 A1)
- Φυγόκεντρος (Universal 320R)
- Θερμοστατούμενο Υδατόλουτρο
- Θερμοθάλαμος
- Αναδευτήρας Vortex (RX3 Vortex Mixer, VELP Scientifica Srl)
- Ποτήρια ζέσεως

- Φιάλες Duran
- Σωληνάκια Falcon (50mL και 15mL)
- Δοκιμαστικά σωληνάκια
- Τρυβλία Petri
- Πιπέτες και ρύγχι πιπέτας (tips)

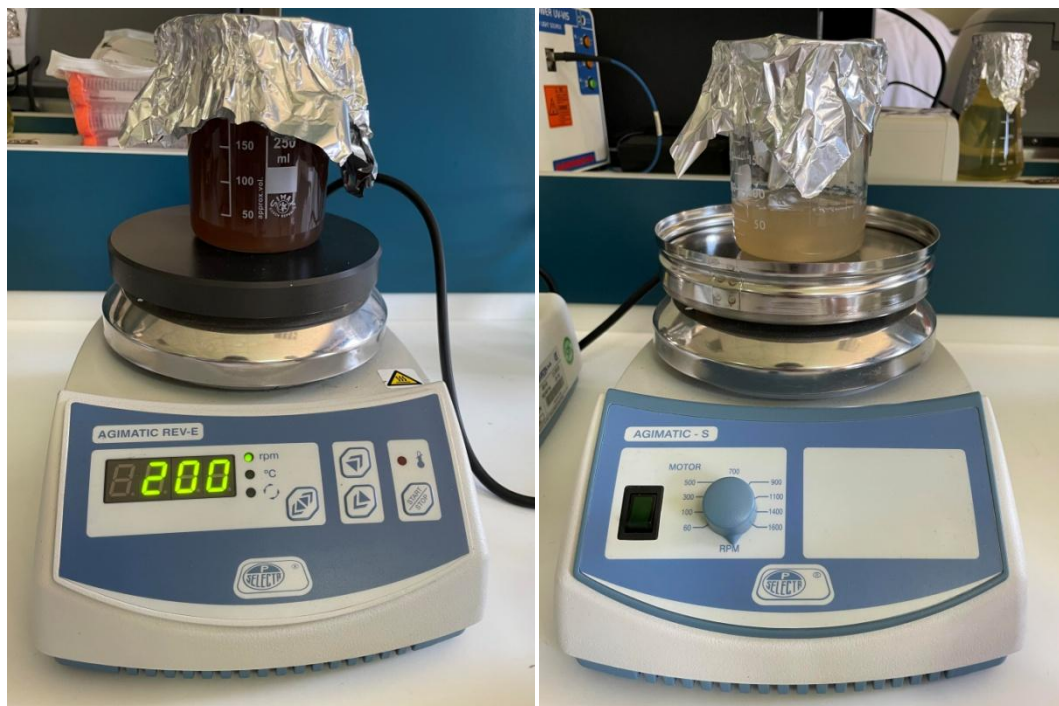
2.2. Προετοιμασία προβιοτικής καλλιέργειας *Lactocaseibacillus casei*

Ο *Lactocaseibacillus casei* συντηρήθηκε σε MRS broth και γλυκερόλη (γλυκερόλη 25% v/v) σε θερμοκρασία κατάψυξης. Αρχικά, 100μL της καλλιέργειας, αφού αποψύχθηκαν, μεταφέρθηκαν σε δοκιμαστικό σωλήνα που είχε 10 mL MRS broth (αποστειρωμένο) και επώαστηκαν στους 37°C για 24 ώρες. Στη συνέχεια, το περιεχόμενο του δοκιμαστικού σωλήνα μεταφέρθηκε σε 100mL MRS broth (αποστειρωμένο) και επώαστηκε για άλλες 24 ώρες στους 37°C. Μετά την δεύτερη επώαση πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στα 4000 RPM για 5 λεπτά, για να ληφθεί η βιομάζα (στερεή μορφή). Η διαδικασία της φυγοκέντρησης πραγματοποιήθηκε τρεις φορές στο σύνολο, με μία ενδιάμεση έκπλυση με αποστειρωμένο Ringer. Όλη η διαδικασία πραγματοποιήθηκε παρουσία φλόγας, για να επιτευχθούν ασηπτικές συνθήκες.

2.3. Παρασκευή των διαλυμάτων

Παρασκευάστηκε με την προσθήκη απεσταγμένου νερού ποσότητα γαλακτικού οξέος 20% w/w, CaCl_2 0,5% w/w και 0,06M $\text{C}_6\text{H}_9\text{Na}_3\text{O}_9$ και ακολούθησε αποστείρωση των διαλυμάτων. Τα σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των διαλυμάτων ήταν αποστειρωμένα και η προετοιμασία τους πραγματοποιήθηκε υπό την παρουσία φλόγας για την αποφυγή της μικροβιακής επιμόλυνσης τους.

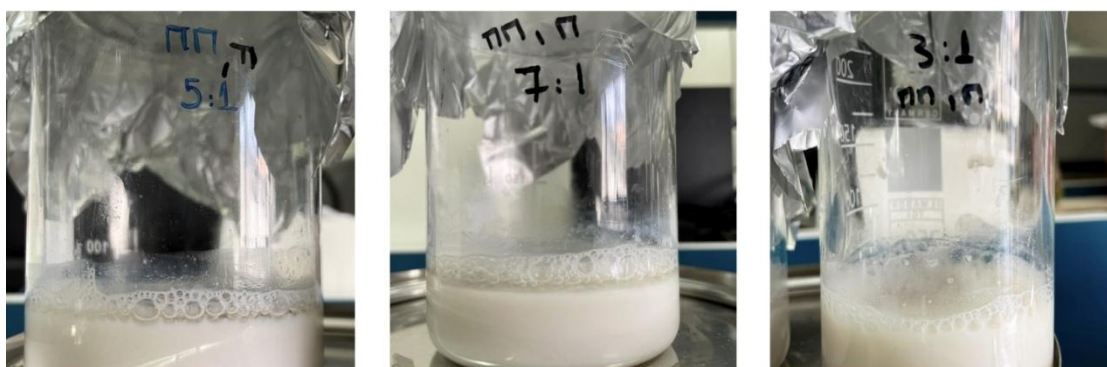
Για την παρασκευή του διαλύματος πρωτεΐνης πατάτας 3% w/w και πηκτίνης 3% w/w χρησιμοποιήθηκε αποστειρωμένο νερό Milli-Q (ultra pure) υπό την παρουσία φλόγας, για να αποφευχθεί η επιμόλυνση τους. Τα διαλύματα αναδεύτηκαν ήπια σε μαγνητικό αναδευτήρα χωρίς θέρμανση για 8 ώρες και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στο ψυγείο (5°C) για ένα βράδυ. Τέλος, τα διαλύματα πρωτεΐνης και πηκτίνης εφόσον ήρθαν σε θερμοκρασία δωματίου, αναμίχθηκαν σε συγκεκριμένη αναλογία.



Εικόνα 6: Ποσότητα πρωτεΐνης (αριστερά) και ποσότητα πηκτίνης (δεξιά)

2.4. Προετοιμασία συμπλόκων συσσωρευματοποίησης IPP-PEC και προσθήκη βιομάζας

Η σύνθετη συσσωρευματοποίηση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση των κολλοειδών (πρωτεΐνη πατάτας και πηκτίνη) σε τρεις δοκιμαστικές αναλογίες πριν επιλεγεί εκείνη που οδηγεί σε καλύτερο διαχωρισμό. Οι αναλογίες πρωτεΐνης:πηκτίνης ήταν: 7:1, 5:1 και 3:1 (*Εικόνα 7*).



Εικόνα 7: Αναλογίες πρωτεΐνης:πηκτίνης: Α) αναλογία 5:1, Β) αναλογία 7:1, Γ) αναλογία 3:1.

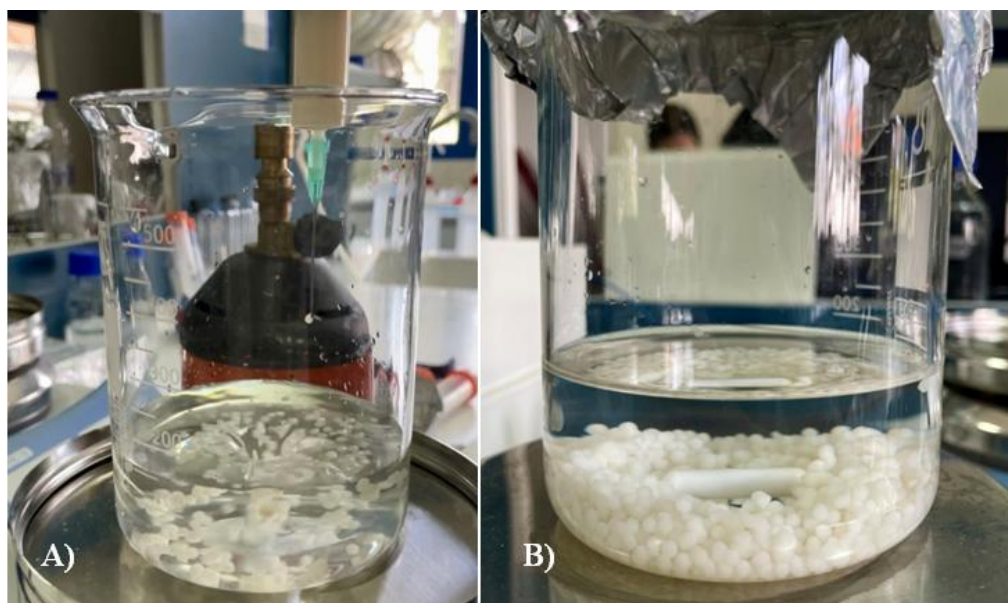
Η ανάμιξη πραγματοποιήθηκε ήπια με τη χρήση μαγνητικού αναδευτήρα. Σε αυτό το σημείο προστέθηκε και η βιομάζα. Για το σχηματισμό των συμπλόκων συσσωρευματοποίησης μεταξύ των πολυμερών, γίνεται προσθήκη γαλακτικού οξέος

20% w/w μέχρι την πτώση του pH στο 4,0, δηλαδή κάτω από το ισοηλεκτρικό σημείο της πρωτεΐνης. Το διάλυμα παραμένει σε ηρεμία χωρίς ανάδευση για 2 ώρες, μέχρι να γίνει εμφανής ο διαχωρισμός τους. Στη συνέχεια, το διαυγές υγρό απομακρύνεται με τη χρήση αποστειρωμένου tip και η υπόλοιπη ποσότητα μεταφέρεται σε αποστειρωμένο σωλήνα για να γίνει η φυγοκέντρωση. Η φυγοκέντρωση σε 4000 RPM για 5 λεπτά πραγματοποιείται με σκοπό τον καλύτερο διαχωρισμό των δύο φάσεων, ώστε το τελικό δείγμα να είναι απαλλαγμένο από το διαυγές υγρό.

Όλες οι διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν με την παρουσία φλόγας.

2.5. Παρασκευή κάψουλων (beads) πηκτίνης με προσθήκη CaCl_2

Για παραπάνω προστασία των ενθυλακωμένων κυττάρων του *Lactobacillus casei* προστέθηκε ένα ακόμα στρώμα πηκτίνη σε αναλογία 1:2 (σύνθετο συσώρευμα:πηκτίνη) υπό ήπια ανάδευση για 20 λεπτά παρουσία φλόγας. Στη συνέχεια το διάλυμα με τη βοήθεια σύριγγας μεταφέρθηκε στάγδην σε ένα διάλυμα CaCl_2 0,5% w/w, το οποίο βρισκόταν υπό ανάδευση, όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 8^A**. Η κάθε σταγόνα που έπεφτε στο χλωριούχο ασβέστιο γινόταν αμέσως κάψουλα και μετά από 30 λεπτά συνεχόμενης ανάδευσης είχε αποκτήσει μία σκληρή μορφή (**Εικόνα 8^B**). Μετά το πέρας των 30 λεπτών, οι κάψουλες εκπλύθηκαν με αποστειρωμένο Ringer για να απομακρυνθεί η περίσσεια ποσότητα CaCl_2 .



Εικόνα 8: A) Σχηματισμός καψουλών με τη χρήση σύριγγας, B) Τελική μορφή καψουλών.

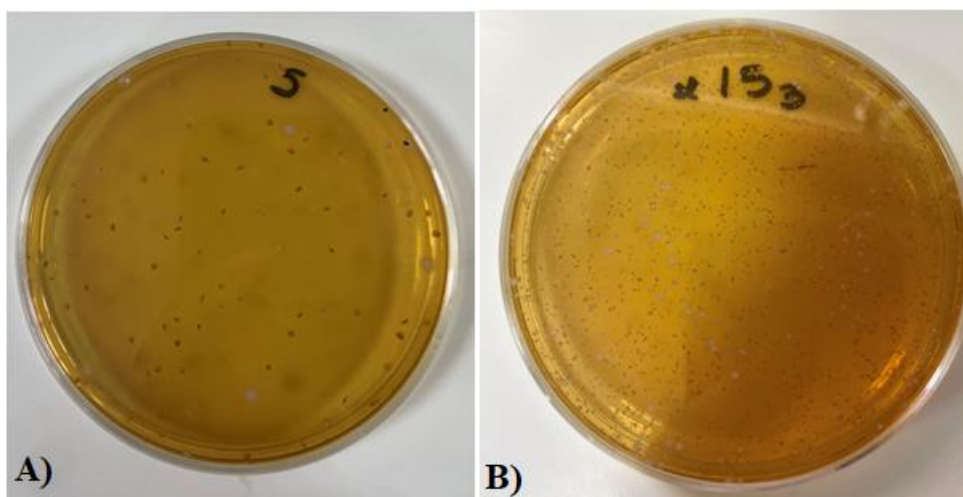
Για λόγους σύγκρισης μελετήθηκε και η επίδραση της θερμοκρασίας σε ελεύθερα κύτταρα *L. casei* χρησιμοποιώντας 1 mL καλλιέργειας.

2.6. Επίδραση του pH στην επιβίωση του ελεύθερου και του ενθυλακωμένου *Lactobacillus casei*



Εικόνα 9: Διαλυμένα beads

Για τα ενθυλακωμένα κύτταρα, οι κάψουλες που παρασκευάστηκαν, μετά τη σκλήρυνση σε χλωριούχο ασβέστιο, δέχτηκαν την επίδραση pH 2,0 (προσομοίωση pH γαστρικού υγρού). Πιο συγκεκριμένα, 1g beads προστέθηκε σε σωληνάκι με 9mL αποστειρωμένο MRS broth (pH=2,0, 37°C) για 0, 1, 2,5 και 4ώρες. Τα σωληνάκια τοποθετήθηκαν σε θερμοθάλαμο και σε κατάλληλο χρόνο απομακρύνθηκαν και αφέθηκαν να ψυχθούν μέχρι να φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια απομακρύνθηκε το MRS broth και προστέθηκαν 9mL $C_6H_9Na_3O_9$, για να διαλυθούν οι κάψουλες. Η διαδικασία διάλυσης πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια μηχανικού αναδευτήρα (**Εικόνα 9**) και πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις με Ringer για τον κάθε χρόνο. Για κάθε αραιώση, 1mL μεταφέρθηκε σε τρυβλίο Petri και καλύφθηκε με υγρό MRS Agar περίπου 20mL. Τέλος, πραγματοποιήθηκε επώαση στους 37°C για 48 με 72 ώρες και στη συνέχεια μετρήθηκαν οι αποικίες.



Εικόνα 10: Αποικίες *L. casei* ATCC 393 μετά την επώαση.

Για λόγους σύγκρισης μελετήθηκε και η επίδραση του pH σε ελεύθερα κύτταρα *L. casei* χρησιμοποιώντας 1 mL καλλιέργειας.

2.7. Επίδραση της θερμοκρασίας στην επιβίωση του ενθυλακωμένου *Lactobacillus casei*

Για τα ενθυλακωμένα κύτταρα, οι κάψουλες δέχτηκαν την επίδραση θερμοκρασίας (63°C) με σκοπό τον έλεγχο του βαθμού επιβίωσής τους. Όπως και στην μέθοδο του pH, 1g beads προστέθηκε σε σωληνάκι που περιείχε 9mL αποστειρωμένο MRS broth (63°C) για 0, 15, 30 και 40λεπτά. Τα σωληνάκια τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο και την κατάλληλη χρονική στιγμή απομακρύνθηκαν από αυτό με σκοπό να ψυχθούν και να φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια απομακρύνθηκε το MRS broth και προστέθηκαν 9mL $C_6H_9Na_3O_9$, για να διαλυθούν οι κάψουλες. Η διαδικασία διάλυσης πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια μηχανικού αναδευτήρα και πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις με Ringer. Για κάθε αραιώση, 1mL μεταφέρθηκε σε τρυβλίο Petri και καλύφθηκε με υγρό MRS Agar περίπου 20mL. Τέλος, πραγματοποιήθηκε επώαση για 48 έως 72 ώρες στους 37°C (*Εικόνα 10^B*) και στη μετρήθηκαν οι αποικίες.

2.8. Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

Για τα πειράματα των ελεύθερων και τα ενθυλακωμένων κυττάρων πραγματοποιήθηκαν δύο κύριες επαναλήψεις και μερικές ακόμα δοκιμαστικές. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν με τη χρήση του Microsoft Excel.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ III

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σε αυτό το κεφάλαιο θα γίνει παρουσίαση των αποτελεσμάτων για την κάθε πειραματική δοκιμή. Ο *Lactocaseibacillus casei* ATCC 393 ακινητοποιήθηκε με τη μέθοδο της σύνθετης διπλοστρωματικής συσσωρευματοποίησης. Χρησιμοποιήθηκε πρωτεΐνη πατάτας (IPP) και πηκτίνης (PEC) ως πρώτο στρώμα, επιπλέον ποσότητας πηκτίνης για το δεύτερο και ακολούθησε η δημιουργία σφαιριδίων με τη χρήση CaCl_2 . Αρχικά πραγματοποιήθηκαν κάποιες προκαταρκτικές δοκιμές για την εύρεση της κατάλληλης αναλογίας IPP:PEC. Μεγαλύτερος διαχωρισμός σε διάστημα 2 ωρών παρατηρήθηκε στην αναλογία 7:1 (**Εικόνα 11**), αφού είχε προηγηθεί ρύθμιση του pH στο 4,0. Στη συνέχεια προστέθηκε ένα έξτρα στρώμα πηκτίνης για την ενίσχυση της αποτελεσματικότητας της ενθυλάκωσης. Στα πειράματα, που υλοποιήθηκαν, εξετάστηκε το πώς το pH και η θερμοκρασία επηρεάζουν τη βιωσιμότητα των κυττάρων του βακτηρίου σε διαφορετικές χρονικές στιγμές. Μετά από αυτό το στάδιο, μετρήθηκαν οι αποικίες του *L. casei* που επιβίωσαν μετά την έκθεση του σε pH 2,0 και σε θερμοκρασία 63°C. Ο λόγος που επιλέχθηκε το συγκεκριμένο pH είναι για την προσομοίωση του ανθρώπινου γαστρικού υγρού του στομαχιού που υπολογίζεται ότι έχει pH 1,5-2,0 (Fujimori, 2020). Η συγκεκριμένη θερμοκρασία ελέγχθηκε, καθώς σύμφωνα με τον IDFA (Διεθνής Ένωση Γαλακτοκομικών Τροφίμων) η απλή παστερίωση πραγματοποιείται στους 63°C για 30 λεπτά (International Dairy Foods Association, 2020). Μετά την επίδραση των δύο παραπάνω συνθηκών, μετρήθηκαν οι αποικίες που επιβίωσαν. Τέλος, τα αποτελέσματα αποτυπώθηκαν σε διαγράμματα και υπολογίστηκε ο μέσος όρος των διαφορετικών δοκιμών του κάθε πειράματος.

Πραγματοποιήθηκαν πειράματα και σε μη ενθυλακωμένα κύτταρα του *Lactocaseibacillus casei* ATCC 393 σε συνθήκες προσομοίωσης του γαστρικού υγρού και σε θερμοκρασία παστερίωσης. Τα πειράματα αυτά υλοποιήθηκαν για να συγκριθούν τα αποτελέσματά τους με εκείνα των ενθυλακωμένων για την εύρεση της αποτελεσματικότητάς της ενθυλάκωσης.



Εικόνα 11: Αναλογίες πρωτεΐνης:πηκτίνης μετά τις δύο ώρες: Α) αναλογία 3:1, Β) αναλογία 5:1, Γ) αναλογία 7:1

3.1 Ελεύθερα κύτταρα *L. casei* ATCC 393

3.1.1 Επίδραση της θερμοκρασίας στη βιωσιμότητα

Πραγματοποιήθηκαν δοκιμές των ελευθέρων κυττάρων του *L. casei* ATCC 393 σε θερμοκρασία 63°C (παστερίωσης) για 0, 15, 30 και 40 λεπτά. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον **Πίνακα 11**.

Πίνακας 11: Αποτελέσματα βιωσιμότητας ελευθέρων κύτταρων σε θερμοκρασία 63°C

Χρόνος (min)	1ο πείραμα (Log CFU/mL)	2ο πείραμα (Log CFU/mL)
0	8,83	8,85
15	6,36	6,49
30	5,90	4,97
40	4,90	3,97

Η αρχική ποσότητα του μικροοργανισμού ήταν 8,83 log CFU/mL και 8,85 log CFU/mL. Στα πρώτα 15 λεπτά στους 63°C, η βιωσιμότητα έπεσε σημαντικά στα 6,36 log CFU/mL και 6,49 log CFU/mL φτάνοντας στα 5,90 log CFU/mL και 4,97 log CFU/mL αντίστοιχα στα 30 λεπτά. Στα 40 λεπτά επίδρασης της θερμοκρασίας, η επιβίωση των ελευθέρων κυττάρων συνεχίζει την φθίνουσα πορεία της μέχρι τα 4,90 log CFU/mL και τα 3,97 log CFU/mL. Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε προβιοτικούς μικροοργανισμούς παρατηρήθηκε εξίσου μία πτώση στον αριθμό των κυττάρων που επιβίωσαν μετά από 30 και 60 λεπτά στους 65°C. Πιο συγκεκριμένα ο

L. plantarum και ο *L. acidophilus* από τα περίπου 11 log CFU/mL μειώθηκαν κάτω από τα 6 log CFU/mL μετά από 30 λεπτά και περίπου στα 4 log CFU/mL μετά από 60 λεπτά (Ding & Shah, 2007). Σε άλλες μελέτες συνέβη το ίδιο με τα κύτταρα του *L. casei* Shirota (Du Toit et al., 2013) και με τα κύτταρα του *L. paracasei* NFBC 338 (Desmond et al., 2001) που εκτέθηκαν στους 60°C μέχρι και τα 20 λεπτά και 30 λεπτά αντίστοιχα.

3.1.2 Επίδραση του pH στη βιωσιμότητα

Πραγματοποιήθηκαν δοκιμές των ελευθέρων κυττάρων του *L. casei* ATCC 393 σε pH 2.0 για 0, 1, 2,5 και 4 ώρες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον **Πίνακα 12**.

Πίνακας 12: Αποτελέσματα βιωσιμότητας ελευθέρων κυττάρων σε pH 2.0

Χρόνος (h)	1ο πείραμα (Log CFU/mL)	2ο πείραμα (Log CFU/mL)
0	9,62	9,65
1	6,77	6,78
2,5	-	5,17
4	5,60	5,03

Στον **Πίνακα 12**, παρατηρείται ότι ο αρχικός αριθμός των ελεύθερων κυττάρων μειώθηκε σημαντικά μετά την επίδραση του pH. Αρχικά, από τα 9,62 log CFU/mL και τα 9,65 log CFU/mL, οι αποικίες του μικροοργανισμού έφτασαν στις 6,77 log CFU/mL και 6,78 log CFU/mL αντίστοιχα, μέσα στην πρώτη ώρα έκθεσης. Μικρότερη πτώση της βιωσιμότητας παρατηρήθηκε στις 2,5 και 4 ώρες. Σε προηγούμενη έρευνα, οι μικροοργανισμοί *L. rhamnosus* και *L. salivarius* μελετήθηκαν στην ίδια τιμή pH και καταγράφηκαν παρόμοια αποτελέσματα (Ding et al., 2007). Σε άλλες πειραματικές δοκιμές σε προσομοιωμένες γαστρεντερικές συνθήκες (pH 1,5), ο *L. casei* από τα 12,21 log CFU/mL έφτασε στα 8,25 log CFU/mL και στα 6,42 log CFU/mL μέσα σε μία και δύο ώρες αντίστοιχα (Shafizadeh et al., 2020). Σε pH 1,5 εκτέθηκε και ο *L. casei* NCDC-298 με τον αριθμό των κυττάρων να μειώνεται στο μισό μέσα σε τρεις ώρες (Mandal et al., 2006). Οι *L. paracasei* και *L. paraplantarum* εκτέθηκαν, επίσης, σε pH 2,0 με τα αποτελέσματα να είναι παρόμοια με τις προηγούμενες έρευνες (Bosnea et al., 2014).

Οι Corcoran και συνεργάτες, σύγκριναν την βιωσιμότητα πέντε στελεχών *Lactobacillus* σε pH 2,0 και σημειώθηκε η ίδια πτώση μετά από 60 λεπτά έκθεσης (Corcoran et al., 2005). Οι Rather και συνεργάτες και οι Xu και συνεργάτες ασχολήθηκαν με την επιβίωση των ελεύθερων κυττάρων του *L. plantarum* NCDC201 και *Lactocaseibacillus casei* ATCC 393 αντίστοιχα σε pH 2,0 με την επιβίωση των κυττάρων να παρουσιάζει σε μία φθίνουσα πορεία μέσα σε δύο ώρες (Rather et al., 2017, Xu et al., 2016).

3.2 Ενθυλακωμένα κύτταρα *L. casei* ATCC 393

Η ενθυλάκωση των κυττάρων του *L. casei* πραγματοποιήθηκε με σκοπό τη βελτίωση της βιωσιμότητας σε συνθήκες θερμικής επεξεργασίας (65°C) και στην προστασία τους από το όξινο γαστρικό περιβάλλον (Rajam & Subramanian, 2022).

3.2.1 Επίδραση της θερμοκρασίας στη βιωσιμότητα

Τα ενθυλακωμένα κύτταρα του *L. casei* ATCC 393 εκτέθηκαν σε θερμοκρασία 63°C για 0, 15, 30 και 40 λεπτά. Στον **Πίνακα 13** αποτυπώνονται τα αποτελέσματα των πειραματικών δοκιμών.

Πίνακας 13: Αποτελέσματα βιωσιμότητας των ενθυλακωμένων κυττάρων *L. casei* ATCC 393 σε θερμοκρασία 63°C

Χρόνος (m)	1ο πείραμα (Log CFU/g)	2ο πείραμα (Log CFU/g)
0	10,07	10,03
15	8,47	9,04
30	8,02	8,55
40	6,63	6,67

Στον πρώτο χρόνο (0 min) η βιωσιμότητα των ενθυλακωμένων κυττάρων του *L. casei* ανέρχεται στα 10,07 log CFU/g στην πρώτη δοκιμή και στα 10,03 log CFU/g στη δεύτερη. Μετά από 15 min έκθεσης στους 63°C, το ποσοστό επιβίωσης μειώθηκε 15,86% και 9,85% αντίστοιχα, και ακολούθησε μία μικρή μεταβολή μέχρι και τα 30 λεπτά. Η μεγαλύτερη πτώση παρατηρήθηκε στα τελευταία 10 λεπτά, όπου η

βιωσιμότητα μειώθηκε κατά 17,33% και 22,02%. Συνολικά τα κύτταρα του μικροοργανισμού μειώθηκαν κατά μέσο όρο 1,79 log CFU/g μέχρι τα 30min. Σε παρόμοια μελέτη, ο *L. plantarum* ενθυλακώθηκε με πρωτεΐνη σόγιας, αλγινικό και πηκτίνη στους 60°C για 30 λεπτά, με τη μεταβολή των κυττάρων να ανέρχεται τα -1,14 log CFU/mL (Huang et al., 2021). Επίσης, οι *L. plantarum* και *L. acidophilus* μετά την ενθυλάκωση εκτέθηκαν στους 65°C έπεσαν κάτω από τα 6,0 log CFU/mL (Ding & Shah, 2007).

Σε άλλη έρευνα, ο ενθυλακωμένος *L. casei* NCDC-298 εκτέθηκε σε θερμοκρασία 60°C και 65°C με διαφορετικές συγκεντρώσεις αλγινικού. Παρατηρήθηκε, λοιπόν, πως όσο αυξανόταν η ποσότητα του πολυμερούς, τόσο μεγαλύτερη ήταν η βιωσιμότητα των κυττάρων (Mandal & Singh, 2006). Επίσης, οι Apiwattanasiri και συνεργάτες μελέτησαν την επιβίωση του ενθυλακωμένου *Lactobacillus casei* TISTR 1463 με τη χρήση διάφορων συμπλόκων πολυμερούς στους 65°C/ 15 λεπτά. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η χρήση συμπλόκων και ενός επιπλέον στρώματος από σερικίνη μεταξιού έδωσε μία παραπάνω προστασία στο μικροοργανισμό (Apiwattanasiri et al., 2022).

3.2.2 Επίδραση του pH στη βιωσιμότητα

Για την προσθήκη του *L. casei* ως λειτουργικό συστατικό σε προϊόντα διατροφής και για την αξιοποίηση των ευεργετικών του αποτελεσμάτων στην υγεία, θα πρέπει να επιβιώσει κατά τη διέλευσή τους από το γαστρεντερικό σύστημα (Darjani et al., 2016).

Στη συγκεκριμένη μελέτη, ερευνήθηκε η βιωσιμότητα του ενθυλακωμένου *L. casei* μετά από 0, 1, 2,5 και 4 ώρες έκθεσης σε pH 2,0 (**Πίνακας 14**).

Πίνακας 14: Αποτελέσματα βιωσιμότητας ενθυλακωμένων κύτταρων σε pH 2,0

Χρόνος (h)	1ο πείραμα (Log CFU/g)	2ο πείραμα (Log CFU/g)
0	10,31	10,43
1	7,23	7,32
2,5	6,03	6,87
4	5,93	6,87

Στον **Πίνακα 14** φαίνεται ότι μέχρι και τις 2,5 ώρες η βιωσιμότητα έχει μειωθεί 41,51% και 34,13% στο πρώτο και στο δεύτερο πείραμα αντίστοιχα. Μικρή μεταβολή σημειώθηκε την τελευταία μιάμιση ώρα, με ποσοστό μείωσης των κυττάρων 1,66% και 0,00%. Οι αποικίες στην αρχή ήταν 10,31 log CFU/g και 10,43 log CFU/g, ενώ συνολικά εκείνες που επιβίωσαν μετά τις 4 ώρες ήταν περισσότερες από τις μισές. Τα αποτελέσματα που καταγράφηκαν σε άλλη έρευνα για την πρώτη ώρα έκθεσης του *L. casei* ATCC 393 σε pH 2,0 ήταν κοντά με όσα αντλήθηκαν από το συγκεκριμένο πείραμα, δηλαδή στα 7,34 log cfu/g. Ο Li και συνεργάτες έδειξαν, επίσης, ότι η βιωσιμότητα αυξήθηκε με την αύξηση των πολυμερών (Li et al., 2011). Σε παρόμοια μελέτη, ο ενθυλακωμένος *L. casei* TISTR 1463 έδειξε να επιβιώνει καλύτερα σε pH 2,0 για 3 ώρες, όταν εκτός από το σύμπλοκο πολυμερών προστέθηκε ένα επιπλέον στρώμα επικάλυψης από σερικίνη (Apiwattanasiri et al., 2022). Επίσης, ο ενθυλακωμένος *L. acidophilus* στην πρώτη ώρα είχε μειωθεί η βιωσιμότητά του στο 26,23% και στο 30,88% τη δεύτερη ώρα (Ding & Shah, 2007). Τα αποτελέσματα αυτά είναι πολύ κοντά με εκείνα του συγκεκριμένου πειράματος, στο οποίο η βιωσιμότητα μειώθηκε 29,85% κατά μέσο όρο και στα δύο πειράματα την πρώτη ώρα.

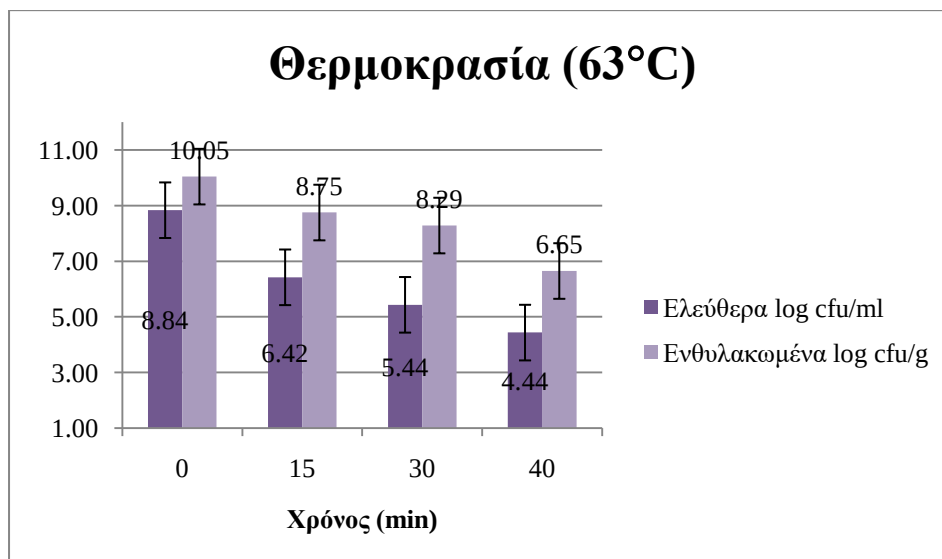
Σε άλλη έρευνα ο ενθυλακωμένος *L. casei* ATCC 393 έδειξε να μειώνεται κατά 0,41 log cfu/g μέσα στις δύο ώρες έκθεσης σε pH 2,0 (Xu et al., 2016). Σε ίδιες συνθήκες δοκιμάστηκε και ο *L. casei* ATCC 393 που ενθυλακώθηκε με τη μέθοδο ξήρανση με ψεκασμό και έφτασε τα 7,54 log cfu/g στις τρεις ώρες (Dimitrellou et al., 2016). Επίσης, ο *L. plantarum* ενθυλακωμένος σε αλγινικό, πηκτίνη και πρωτεΐνη γάλακτος κατέγραψε μεγαλύτερο ποσοστό επιβίωσης από το να ενθυλακωνόταν χωρίς την πηκτίνη για δύο ώρες (Luo et al., 2022).

3.3 Σύγκριση

3.3.1 Σύγκριση αποτελεσμάτων ελεύθερων και ενθυλακωμένων κυττάρων με την επίδραση θερμοκρασίας

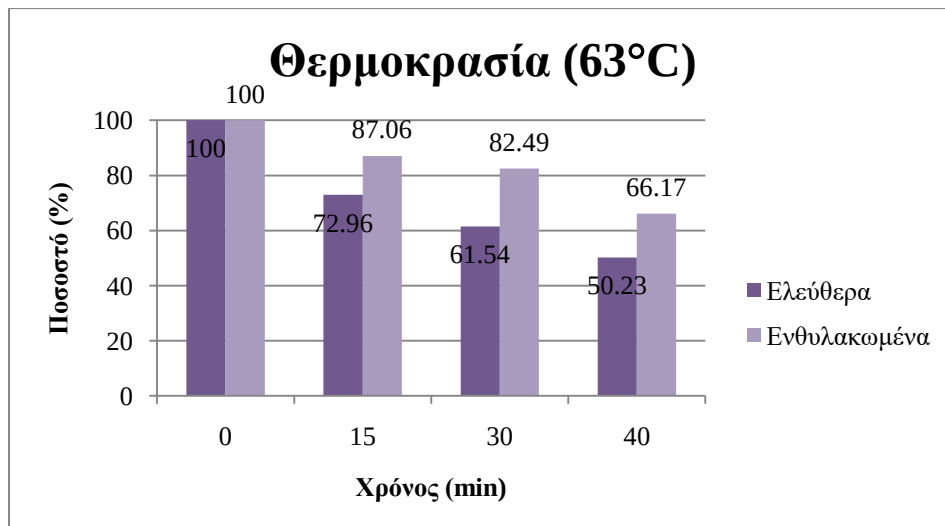
Το **Γράφημα 3** αποτυπώνει τη σύγκριση των αποτελεσμάτων για τα ελεύθερα και τα ενθυλακωμένα κύτταρα του *L. casei* ATCC 393 που εκτέθηκαν σε θερμοκρασία παστερίωσης (63°C) για τις χρονικές περιόδους που μελετήθηκαν.

Σύμφωνα με το **Γράφημα 3**, στο χρόνο 0 παρατηρείται μικρότερος μέσος όρος τιμών στα ελεύθερα κύτταρα, ενδεχομένως λόγω διαφορετικής μονάδας μέτρησης. Ωστόσο, στους υπόλοιπους χρόνους σημειώθηκε μεγαλύτερος μέσος όρος στα ενθυλακωμένα κύτταρα κατά την επίδραση της θερμοκρασίας. Φυσικά αυτό δικαιολογείται λόγω της προστασίας που προσέδωσε η συσσωρευματοποίηση στο μικροοργανισμό.



Γράφημα 3: Σύγκριση αποτελεσμάτων θερμοκρασίας σε ελεύθερα και ενθυλακωμένα κύτταρα.

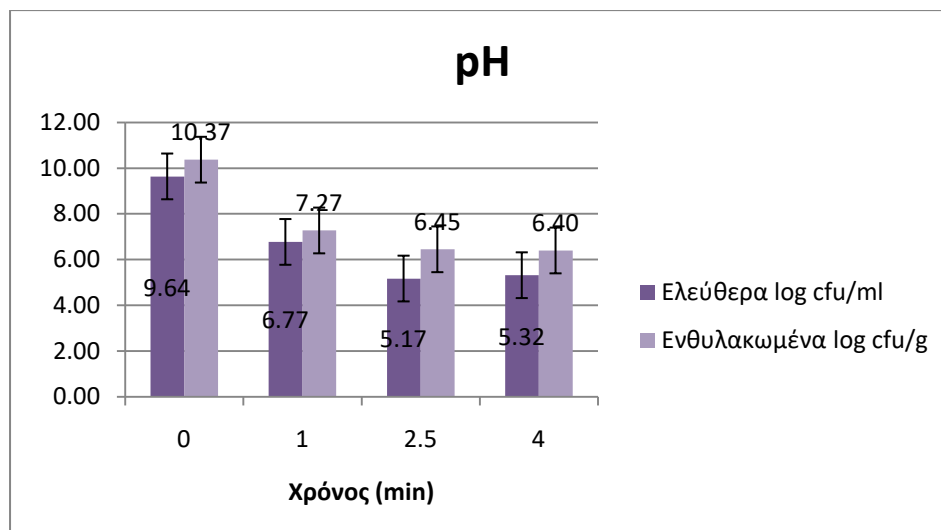
Στον **Γράφημα 4** αποτυπώνεται το ποσοστό επιβίωσης του μικροοργανισμού των ελεύθερων και των ενθυλακωμένων κυττάρων μέχρι και τα 40 λεπτά επίδρασης της θερμοκρασίας για καλύτερη κατανόηση της αποτελεσματικότητας της συσσωρευματοποίησης. Διαπιστώθηκε ότι η μέθοδος ενθυλάκωσης ήταν αποτελεσματική ήδη από τα πρώτα 15 λεπτά και πιθανόν το παραπάνω στρώμα πηκτικής προσέδωσε μία επιπλέον προστασία.



***Γράφημα 4:** Ποσοστό επιβίωσης κατά την έκθεση θερμοκρασίας σε ελεύθερα και ενθυλακωμένα κύτταρα*

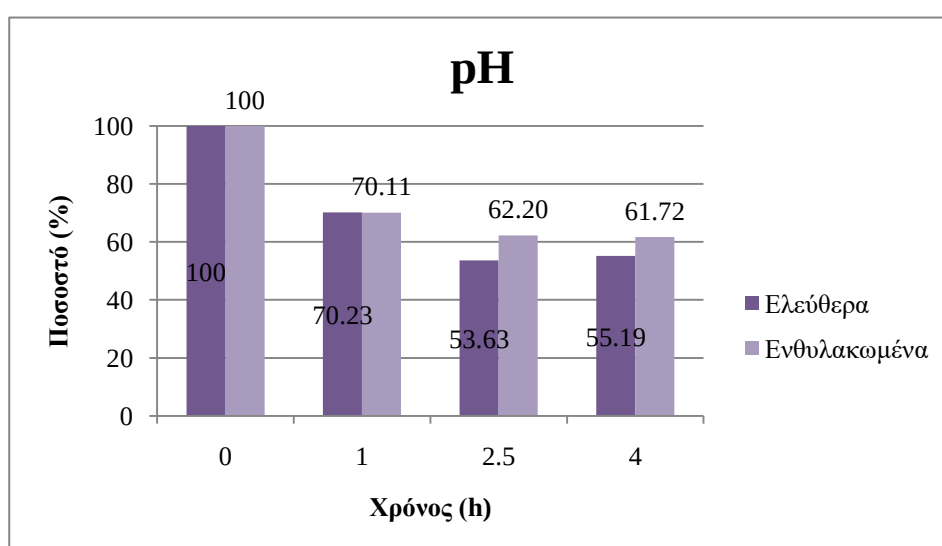
3.3.2 Σύγκριση αποτελεσμάτων ελεύθερων και ενθυλακωμένων κυττάρων με την επίδραση pH

Το ***Γράφημα 5*** απεικονίζει τη σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ ελεύθερων και ενθυλακωμένων κυττάρων του *L. casei* ATCC 393 που υποβλήθηκαν σε pH 2,0 για όλες τις χρονικές περιόδους που εξετάστηκαν. Παρατηρήθηκε μεγαλύτερος μέσος όρος τιμών πριν την έναρξη της επίδρασης του pH, όπως και συνέβη και στη θερμοκρασία, πιθανόν λόγω διαφορετικών μονάδων μέτρησης. Παρόλα αυτά, σημειώθηκε μεγαλύτερη πτώση στα ελεύθερα συγκριτικά με τα ενθυλακωμένα, γεγονός που επιβεβαιώνει την αποτελεσματικότητα της συσσωρευματοποίησης.



Γράφημα 5: Σύγκριση αποτελεσμάτων pH σε ελεύθερα και ενθυλακωμένα κύτταρα.

Το **Γράφημα 6** δείχνει το ποσοστό επιβίωσης του μικροοργανισμού σε όλο το χρονικό διάστημα επίδρασης του pH. Πιο συγκεκριμένα, σημειώθηκε μία μεγάλη πτώση της βιωσιμότητας του μικροοργανισμού σε ελεύθερη μορφή, χάνοντας περίπου 45% της αρχικής συγκέντρωσης. Αντίθετα, τα κύτταρα σε ενθυλακωμένη μορφή έχασαν περίπου ένα 38%. Επομένως, η συσσωρευματοποίηση φάνηκε να προστατεύει τα κύτταρα από το όξινο pH και εξάγεται το συμπέρασμα ότι ενδεχομένως μπορούν να επιβιώσουν και κατά την επαφή τους με το γαστρικό οξύ. Πιθανόν και στο pH και το περαιτέρω στρώμα πηκτικής να συνέβαλε στην βελτίωση της προστασία του μικροοργανισμού.



Γράφημα 6: Ποσοστό επιβίωσης κατά την έκθεση σε pH 2,0 σε ελεύθερα και ενθυλακωμένα κύτταρα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ IV

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία, εξετάστηκε η συσσωρευματοποίηση ως μέθοδος ενθυλάκωσης των προβιοτικών μικροοργανισμών και πιο συγκεκριμένα του *Lactocaseibacillus casei* ATCC 393. Κύριος στόχος της μελέτης ήταν η διερεύνηση των πιθανών προστατευτικών επιδράσεων του συμπλόκου πολυμερών IPP-PEC στη βιωσιμότητα των κυττάρων του μικροοργανισμού, υπό δύσκολες συνθήκες, όπως το όξινο περιβάλλον και η υψηλή θερμοκρασία. Γι' αυτό οι συνθήκες έκθεσης που μελετήθηκαν ήταν η θερμοκρασία παστερίωσης και το pH=2,0 (προσομοίωση των συνθηκών που υπάρχουν στο γαστρικό σωλήνα). Δοκιμές πραγματοποιήθηκαν για τα ελεύθερα κύτταρα του μικροοργανισμού και έπειτα συγκρίθηκαν με τα αποτελέσματα των δοκιμών από τα ενθυλακωμένα κύτταρα. Αξίζει να σημειωθεί ότι η πρωτεΐνη πατάτες έχει χρησιμοποιηθεί ελάχιστα σε δοκιμές ενθυλάκωσης μέχρι στιγμής.

Η προστασία που παρείχε η ενθυλάκωση του *Lactocaseibacillus casei* ATCC 393 ήταν 15,94% περισσότερη στη θερμοκρασία και 6,53% στο pH. Επομένως, στην πρώτη συνθήκη το ποσοστό επιβίωσης τείνει να είναι χαμηλό, ενώ στη δεύτερη είναι αρκετά μικρό, γεγονός που εκτός από τη μέθοδο μπορεί να οφείλεται και στη χρήση του μηχανικού αναδευτήρα που διευκόλυνε τη διάλυση των beads. Ωστόσο, τα αποτελέσματα έδειξαν πως το μεγαλύτερο ποσοστό επιβίωσης των ενθυλακωμένων κυττάρων σε σχέση με τα ελεύθερα ήταν στη θερμοκρασία. Επίσης, το επιπλέον στρώμα πηκτίνης ίσως συνέβαλε στην επιθυμητή προστασία. Φυσικά η περαιτέρω έρευνα είναι αναγκαία για την επίτευξη μίας επιτυχημένης ενθυλάκωσης, ιδίως λόγω της αυξανόμενης προβιοτικής αγοράς και της φυτικής διατροφής.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abedi, E., & Hashemi, S. M. B. (2020). Lactic acid production–producing microorganisms and substrates sources-state of art. *Heliyon*, 6(10).
- Aghajania, A., Mortazavi, S. A., & Yazdi, F. T. (2020) Microencapsulation of probiotics in yogurt: A Review.
- Ahuja, K., & Bayas, S. (2023, March). *Probiotics Market Size By Ingredients (Lactobacilli, Bifidobacterium, Streptococcus, Bacillus), By End-Use (Human, Animal), By Application (Food and Beverages, Dietary Supplements, Animal Feed) & Forecast, 2023 – 2032*. Global Market Insights Inc. <https://www.gminsights.com/industry-analysis/probiotics-market>
- An, H. Y., & Miyamoto, T. (2006). Cloning and sequencing of plasmid pLC494 isolated from human intestinal *Lactobacillus casei*: construction of an *Escherichia coli*–*Lactobacillus* shuttle vector. *Plasmid*, 55(2), 128-134.
- Anal, A. K., & Singh, H. (2007). Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in food science & technology*, 18(5), 240-251.
- Anderson, E., & Zagorski, J. (2022, March 14). *Probiotics & Prebiotics – Ingredient Safety*. Center for Research on Ingredient Safety at Michigan State University. <https://www.canr.msu.edu/news/probiotics-prebiotics-ingredient-safety>
- Apiwattanasiri, P., Charoen, R., Rittisak, S., Phattayakorn, K., Jantrasee, S., & Savedboworn, W. (2022). Co-encapsulation efficiency of silk sericin-alginate-prebiotics and the effectiveness of silk sericin coating layer on the survival of probiotic *Lactobacillus casei*. *Food Bioscience*, 46, 101576.
- Aroutcheva, A., Gariti, D., Simon, M., Shott, S., Faro, J., Simoes, J. A., ... & Faro, S. (2001). Defense factors of vaginal lactobacilli. *American journal of obstetrics and gynecology*, 185(2), 375-379.
- Arslan-Tontul, S., & Erbas, M. (2017). Single and double layered microencapsulation of probiotics by spray drying and spray chilling. *Lwt-food science and technology*, 81, 160-169.
- Bai, F. W., Zhao, X.-Q. ., & Xu, J. (2011). 2.35 - Immobilization Technology: Cells. In M. Moo-Young (Ed.), *Comprehensive Biotechnology (Second Edition)* (pp. 477–489). Academic Press. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978008088504900115X?via%3Dihub>
- Bao, Q., Song, Y., Xu, H., Yu, J., Zhang, W., Menghe, B., ... & Sun, Z. (2016). Multilocus sequence typing of *Lactobacillus casei* isolates from naturally fermented foods in China and Mongolia. *Journal of dairy science*, 99(7), 5202-5213.
- Bircher, L., Geirnaert, A., Hammes, F., Lacroix, C., & Schwab, C. (2018). Effect of cryopreservation and lyophilization on viability and growth of strict anaerobic human gut microbes. *Microbial biotechnology*, 11(4), 721-733.
- Boros, Z., Băieș, M. H., Vodnar, D. C., Gherman, C. M., Borșan, S. D., Cozma-Petruț, A., Lefkaditis, M., Györke, A., & Cozma, V. (2022). Antiparasitic Action of *Lactobacillus casei* ATCC 393 and *Lactobacillus paracasei* CNCM Strains in CD-1 Mice Experimentally Infected with *Trichinella britovi*. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 11(3), 296. <https://doi.org/10.3390/pathogens11030296>.
- Bosnea, L. A., Moschakis, T., & Biliaderis, C. G. (2014). Complex coacervation as a novel microencapsulation technique to improve viability of probiotics under different stresses. *Food and Bioprocess Technology*, 7, 2767-2781.

- Brandts, J. F. (1964). The thermodynamics of protein denaturation. I. The denaturation of chymotrypsinogen. *Journal of the American Chemical Society*, 86(20), 4291-4301.
- British Columbia Centre for Disease Control . (2002, September 7). *Pasteurization*. <http://www.bccdc.ca/gallery/Documents/Educational%20Materials/EH/FPS/Dairy/Pasteurization.pdf>.
- Campos-Espinoza, F., Castano-Agudelo, J., & Rodriguez-Llamazares, S. (2022). Polysaccharides systems for probiotic bacteria microencapsulation: mini review. *Food Science and Technology*, 42, e95121.
- Chen, B., Wang, X., Li, P., Feng, X., Mao, Z., Wei, J., ... & Wang, L. (2023). Exploring the protective effects of freeze-dried *Lactobacillus rhamnosus* under optimized cryoprotectants formulation. *LWT*, 173, 114295.
- Cipolatti, E. P., Valério, A., Nicoletti, G., Theilacker, E., Araújo, P. H., Sayer, C., ... & de Oliveira, D. (2014). Immobilization of *Candida antarctica* lipase B on PEGylated poly (urea-urethane) nanoparticles by step miniemulsion polymerization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 109, 116-121.
- Ciprandi, G., & Tosca, M. A. (2022). Probiotics in children with asthma. *Children*, 9(7), 978.
- Cittadini, A., Munekata, P. E. S., Pateiro, M., Sarriés, M. V., Domínguez, R., & Lorenzo, J. M. (2022). Encapsulation techniques to increase lipid stability. *Food Lipids*, 413-459.
- Collins, F. L., Rios-Arce, N. D., Schepper, J. D., Parameswaran, N., & McCabe, L. R. (2017). The potential of probiotics as a therapy for osteoporosis. *Microbiology spectrum*, 5(4), 5-4.
- Corcoran, B. M., Stanton, C., Fitzgerald, G. F., & Ross, R. (2005). Survival of probiotic lactobacilli in acidic environments is enhanced in the presence of metabolizable sugars. *Applied and environmental microbiology*, 71(6), 3060-3067.
- Dachmann, E., Nobis, V., Kulozik, U., & Dombrowski, J. (2020). Surface and foaming properties of potato proteins: Impact of protein concentration, pH value and ionic strength. *Food Hydrocolloids*, 107, 105981.
- Darjani, P., Nezhad, M. H., Kadkhodae, R., & Milani, E. (2016). Influence of prebiotic and coating materials on morphology and survival of a probiotic strain of *Lactobacillus casei* exposed to simulated gastrointestinal conditions. *LWT*, 73, 162-167.
- David, S., & Livney, Y. D. (2016). Potato protein based nanovehicles for health promoting hydrophobic bioactives in clear beverages. *Food Hydrocolloids*, 57, 229-235.
- Deegan, L. H., Cotter, P. D., Hill, C., & Ross, P. (2006). Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *International dairy journal*, 16(9), 1058-1071.
- Desai, K. G. H., & Jin Park, H. (2005). Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying technology*, 23(7), 1361-1394.
- Desmond, C., Stanton, C., Fitzgerald, G. F., Collins, K., & Ross, R. P. (2001). Environmental adaptation of probiotic lactobacilli towards improvement of performance during spray drying. *International dairy journal*, 11(10), 801-808.
- Dimitrellou, D., Kandylis, P., Petrović, T., Dimitrijević-Branković, S., Lević, S., Nedović, V., & Kourkoutas, Y. (2016). Survival of spray dried microencapsulated *Lactobacillus casei* ATCC 393 in simulated gastrointestinal conditions and fermented milk. *LWT-Food Science and Technology*, 71, 169-174.
- Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2017). The microbiome-gut-brain axis in health and disease. *Gastroenterology Clinics*, 46(1), 77-89.
- Ding, W. K., & Shah, N. P. (2007). Acid, bile, and heat tolerance of free and microencapsulated probiotic bacteria. *Journal of food science*, 72(9), M446-M450.
- Duolac Worldwide (2020). *Professional Multi-Strain Formulation Technology*. <https://www.duolac.com/professional-multi-strain-formulation-technology/>
- Du Toit, E., Vesterlund, S., Gueimonde, M., & Salminen, S. (2013). Assessment of the effect of stress-tolerance acquisition on some basic characteristics of specific probiotics. *International journal of food microbiology*, 165(1), 51-56.
- Endo, H., Sakai, E., Kato, T., Umezawa, S., Higurashi, T., Ohkubo, H., & Nakajima, A. (2015). Small bowel injury in low-dose aspirin users. *Journal of Gastroenterology*, 50, 378-386.

- Eratte, D., Wang, B., Dowling, K., Barrow, C. J., & Adhikari, B. P. (2014). Complex coacervation with whey protein isolate and gum arabic for the microencapsulation of omega-3 rich tuna oil. *Food & function*, 5(11), 2743-2750.
- Fellows, P., & Food and Agriculture Organization of the United Nations. (1997). 2.2. Selecting products and production methods. In *Guidelines for small-scale fruit and vegetable processors* (p. 195). Food and Agriculture Organization of the United Nations
- Ferreira, C.L., Salminen, S., Grzes'kowiak, L.M., Brizuela, M.A., Sánchez, L., Carneiro, H., & Bonnet, M. (2011). Terminology concepts of probiotic and prebiotic and their role in human and animal health, *Rev. Salud Anim.*, 33(3), 137-146.
- Fijan S. (2014). Microorganisms with claimed probiotic properties: an overview of recent literature. *International journal of environmental research and public health*, 11(5), 4745–4767. <https://doi.org/10.3390/ijerph110504745>
- Françoise L. (2010). Occurrence and role of lactic acid bacteria in seafood products. *Food microbiology*, 27(6), 698–709. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.05.016>
- Fujimori, S. (2020). Gastric acid level of humans must decrease in the future. *World Journal of Gastroenterology*, 26(43), 6706–6709. <https://doi.org/10.3748/wjg.v26.i43.6706>
- Galves, C., Galli, G., & Kurozawa, L. (2023). Potato protein: Current review of structure, technological properties, and potential application on spray drying microencapsulation. *Critical reviews in food science and nutrition*, 63(23), 6564-6579.
- Gbassi, G. K., & Vandamme, T. (2012). Probiotic encapsulation technology: from microencapsulation to release into the gut. *Pharmaceutics*, 4(1), 149–163. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics4010149>
- George, F., Daniel, C., Thomas, M., Singer, E., Guilbaud, A., Tessier, F. J., ... & Foligné, B. (2018). Occurrence and dynamism of lactic acid bacteria in distinct ecological niches: A multifaceted functional health perspective. *Frontiers in microbiology*, 9, 2899. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02899>
- Ge, X., Yang, L., & Xu, J. (2017). Cell immobilization: fundamentals, technologies, and applications. *Industrial biotechnology: products and processes*, 205-235.
- Ghandi, A., Adhikari, B., & Powell, I. B. (2024). Powders containing microorganisms and enzymes. *Handbook of food powders*, 471-494.
- Gibbs, B. F., Kermasha, S., Alli, I., & Mulligan, C. N. (1999). Encapsulation in the food industry: a review. *International journal of food sciences and nutrition*, 50(3), 213–224. <https://doi.org/10.1080/096374899101256>
- Giralt, J., Regadera, J. P., Verges, R., Romero, J., de la Fuente, I., Biete, A., ... & Guarner, F. (2008). Effects of probiotic *Lactobacillus casei* DN-114 001 in prevention of radiation-induced diarrhea: results from multicenter, randomized, placebo-controlled nutritional trial. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*, 71(4), 1213-1219.
- Gobbetti, M. (1999). Encyclopedia of Food Microbiology. In *ScienceDirect* (Richard K. Robinson, pp. 1157–1164). Oxford: Elsevier. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B0122270703009107>
- Godjevargova, T., Nenkova, R., & Konsulov, V. (2006). Immobilization of glucose oxidase by acrylonitrile copolymer coated silica supports. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 38(2), 59-64.
- Goldstein, E. J., Tyrrell, K. L., & Citron, D. M. (2015). *Lactobacillus* species: taxonomic complexity and controversial susceptibilities. *Clinical Infectious Diseases*, 60(suppl_2), S98-S107.
- Guarner, F., Sanders, M. E., Szajewska, H., Cohen, H., Eliakim, R., Herrera, C., ..., Salminen, S. (2023, February). World gastroenterology organisation global guidelines: probiotics and prebiotics <https://www.worldgastroenterology.org/guidelines/probiotics-and-prebiotics/probiotics-and-prebiotics-english>
- Haji, F., Cheon, J., Baek, J., Wang, Q., & Tam, K. C. (2022). Application of Pickering emulsions in probiotic encapsulation-A review. *Current Research in Food Science*.

- Heeney, D. D., Gareau, M. G., & Marco, M. L. (2018). Intestinal Lactobacillus in health and disease, a driver or just along for the ride?. *Current opinion in biotechnology*, 49, 140–147. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.08.004>.
- Hernandez-Aquino, S., Simán, E. D. J. M., Miranda-Romero, L. A., & Zuñiga, B. A. (2020). Meat native lactic acid bacteria capable to inhibit Salmonella sp. and Escherichia coli. *Biocontrol Science*, 25(2), 107-112.
- Herrero-Fresno, A., Martínez, N., Sánchez-Llana, E., Díaz, M., Fernández, M., Martín, M. C., ... & Alvarez, M. A. (2012). Lactobacillus casei strains isolated from cheese reduce biogenic amine accumulation in an experimental model. *International journal of food microbiology*, 157(2), 297-304.
- Hu, Y., Zhang, L., Wen, R., Chen, Q., & Kong, B. (2022). Role of lactic acid bacteria in flavor development in traditional Chinese fermented foods: A review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 62(10), 2741-2755.
- Huang, C. H., Liou, J. S., Lee, A. Y., Tseng, M., Miyashita, M., Huang, L., & Watanabe, K. (2018). Polyphasic characterization of a novel species in the Lactobacillus casei group from cow manure of Taiwan: Description of L. chiayiensis sp. nov. *Systematic and applied microbiology*, 41(4), 270-278.
- Huang, R. M., Feng, K., Li, S. F., Zong, M. H., Wu, H., & Han, S. Y. (2021). Enhanced survival of probiotics in the electrosprayed microcapsule by addition of fish oil. *Journal of Food Engineering*, 307, 110650.
- Huynh, U., & Zastrow, M. L. (2023). Metallobiology of Lactobacillaceae in the gut microbiome. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 238, 112023.
- Icer, M. A., Özbay, S., Ağagündüz, D., Kelle, B., Bartkiene, E., Rocha, J. M. F., & Ozogul, F. (2023). The impacts of acidophilic lactic acid Bacteria on food and human health: a review of the current knowledge. *Foods*, 12(15), 2965.
- Igo, M. J., & Schaffner, D. W. (2019). Quantifying the Influence of Relative Humidity, Temperature, and Diluent on the Survival and Growth of *Enterobacter aerogenes*. *Journal of food protection*, 82(12), 2135–2147. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-19-261>.
- International Dairy Foods Association. (2020, January 25). *Pasteurization*. IDFA. <https://www.idfa.org/pasteurization>
- International Probiotics Association (2019). *5 Essentials of the Probiotic Marketplace*. <https://internationalprobiotics.org/home/infographics/5-essentials-to-understanding-the-probiotic-marketplace/>.
- International Probiotics Association (n.d). *5 Essentials to understanding Probiotics*. <https://internationalprobiotics.org/infographics/5-essentials-to-understanding-probiotics/>
- International Probiotics Association. (2017, March). What Probiotics Can Do for You ... A quick guide to probiotics. https://ipaeurope.org/wp-content/uploads/2020/02/IPAEurope_Brochure_V12017.pdf
- International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics. (2018, January 22). Probiotics: Dispelling Myths. Retrieved from <https://isappscience.org/wp-content/uploads/2019/04/Dispelling-Probiotic-Myths.pdf>
- International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics. (2020). *The big break up of lactobacillus*. Retrieved from https://isappscience.org/wp-content/uploads/2020/08/Lactobacillus_scientist_linked.pdf
- Jebur M. S.h (2010). Therapeutic efficacy of Lactobacillus acidophilus against bacterial isolates from burn wounds. *North American journal of medical sciences*, 2(12), 586–591. <https://doi.org/10.4297/najms.2010.2586>.
- Jianlong, W., & Yi, Q. (1999). Microbial degradation of 4-chlorophenol by microorganisms entrapped in carrageenan-chitosan gels. *Chemosphere*, 38(13), 3109-3117.
- Johansson, M. A., Sjögren, Y. M., Persson, J. O., Nilsson, C., & Sverremark-Ekström, E. (2011). Early colonization with a group of Lactobacilli decreases the risk for allergy at five years of age despite allergic heredity. *PloS one*, 6(8), e23031.

- Jones, L. (2020, January 2). Veganism: Why are vegan diets on the rise? *BBC*.
<https://www.bbc.com/news/business-44488051>
- Kambura, D. (2019). Biologisesti aktiivisen suodatinmateriaalin suunnittelu.
- Karami, S., Roayaei, M., Hamzavi, H., Bahmani, M., Hassanzad-Azar, H., Leila, M., & Rafieian-Kopaei, M. (2017). Isolation and identification of probiotic *Lactobacillus* from local dairy and evaluating their antagonistic effect on pathogens. *International journal of pharmaceutical investigation*, 7(3), 137–141. https://doi.org/10.4103/jphi.JPHI_8_17
- Keshavarzian, A., Engen, P., Bonvegna, S., & Cilia, R. (2020). The gut microbiome in Parkinson's disease: A culprit or a bystander?. *Progress in brain research*, 252, 357–450.
- Koga Y. (2022). Microbiota in the stomach and application of probiotics to gastroduodenal diseases. *World journal of gastroenterology*, 28(47), 6702–6715. <https://doi.org/10.3748/wjg.v28.i47.6702>
- Koh, W. Y., Lim, X. X., Tan, T. C., Kobun, R., & Rasti, B. (2022). Encapsulated probiotics: Potential techniques and coating materials for non-dairy food applications. *Applied Sciences*, 12(19), 10005.
- Kondybayev, A., Konuspayeva, G., Strub, C., Loiseau, G., Mestres, C., Grabulos, J., ... & Achir, N. (2022). Growth and metabolism of *Lactocaseibacillus casei* and *Lactobacillus kefir* isolated from qymyz, a traditional fermented central asian beverage. *Fermentation*, 8(8), 367.
- Kourkoutas, Y., Bekatorou, A., Banat, I. M., Marchant, R., & Koutinas, A. A. (2004). Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. *Food microbiology*, 21(4), 377–397.
- Kumar, G., Mudhoo, A., Sivagurunathan, P., Nagarajan, D., Ghimire, A., Lay, C. H., ... & Chang, J. S. (2016). Recent insights into the cell immobilization technology applied for dark fermentative hydrogen production. *Bioresource technology*, 219, 725–737.
- Lacroix, C., Sodini, I., & Corrieu, G. (1996). Microbiological stability of an immobilized cell bioreactor with mixed lactic acid bacteria during continuous fermentation of milk. In *Progress in Biotechnology* (Vol. 11, pp. 600–607). Elsevier.
- Lambole, L., Lacroix, C., Artignan, J. M., Champagne, C. P., & Vuilleumard, J. C. (1999). Long-term mechanical and biological stability of an immobilized cell reactor for continuous mixed-strain mesophilic lactic starter production in whey permeate. *Biotechnology progress*, 15(4), 646–654.
- Lane, S. M., Kuang, Z., Yom, J., Arifuzzaman, S., Genzer, J., Farmer, B., ... & Vaia, R. A. (2011). Poly (2-hydroxyethyl methacrylate) for enzyme immobilization: impact on activity and stability of horseradish peroxidase. *Biomacromolecules*, 12(5), 1822–1830.
- Lei, S., Ramesh, A., Twitchell, E., Wen, K., Bui, T., Weiss, M., ... & Yuan, L. (2016). High protective efficacy of probiotics and rice bran against human norovirus infection and diarrhea in gnotobiotic pigs. *Frontiers in microbiology*, 7, 1699.
- Li, X. Y., Chen, X. G., Sun, Z. W., Park, H. J., & Cha, D. S. (2011). Preparation of alginate/chitosan/carboxymethyl chitosan complex microcapsules and application in *Lactobacillus casei* ATCC 393. *Carbohydrate Polymers*, 83(4), 1479–1485.
- Linares-Morales, J. R., Cuellar-Nevárez, G. E., Rivera-Chavira, B. E., Gutiérrez-Méndez, N., Pérez-Vega, S. B., & Nevárez-Moorillón, G. V. (2020). Selection of Lactic Acid Bacteria Isolated from Fresh Fruits and Vegetables Based on Their Antimicrobial and Enzymatic Activities. *Foods (Basel, Switzerland)*, 9(10), 1399. <https://doi.org/10.3390/foods9101399>
- Liu, Q., Lin, C., Yang, X., Wang, S., Yang, Y., Liu, Y., ... & Yuan, Y. (2023). Improved Viability of Probiotics via Microencapsulation in Whey-Protein-Isolate-Octenyl-Succinic-Anhydride-Starch-Complex Coacervates. *Molecules*, 28(15), 5732.
- 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.

- Lozinsky, V. I., & Plieva, F. M. (1998). Poly (vinyl alcohol) cryogels employed as matrices for cell immobilization. 3. Overview of recent research and developments. *Enzyme and microbial technology*, 23(3-4), 227-242.
- Luo, X., Fan, S., He, Z., Ni, F., Liu, C., Huang, M., ... & Xie, H. (2022). Preparation of alginate-whey protein isolate and alginate-pectin-whey protein isolate composites for protection and delivery of *Lactobacillus plantarum*. *Food Research International*, 161, 111794.
- Lye, H. S., Rusul, G., & Liong, M. T. (2010). Removal of cholesterol by lactobacilli via incorporation and conversion to coprostanol. *Journal of dairy science*, 93(4), 1383-1392.
- Makarova, K. S., & Koonin, E. V. (2007). Evolutionary genomics of lactic acid bacteria. *Journal of bacteriology*, 189(4), 1199-1208.
- Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E., Pavlov, A., Pavlova, N., Karamychev, V., Polouchine, N., Shakhova, V., Grigoriev, I., Lou, Y., Rohksar, D., Lucas, S., Huang, K., Goodstein, D. M., Hawkins, T., Plengvidhya, V., Welker, D., ... Mills, D. (2006). Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(42), 15611–15616. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607117103>
- Manaf, M. A., Subuki, I., Jai, J., Raslan, R., & Mustapa, A. N. (2018, May). Encapsulation of volatile citronella essential oil by coacervation: efficiency and release study. In *IOP conference series: materials science and engineering* (Vol. 358, p. 012072). IOP Publishing.
- Mandal, S., Puniya, A. K., & Singh, K. J. I. D. J. (2006). Effect of alginate concentrations on survival of microencapsulated *Lactobacillus casei* NCDC-298. *International Dairy Journal*, 16(10), 1190-1195.
- Mandwal, A. K., Tripathi, C. K. M., Trivedi, P. D., Joshi, A. K., Agarwal, S. C., & Bihari, V. (2004). Production of L-phenylacetyl carbinol by immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology letters*, 26, 217-221.
- Manini, F., Casiraghi, M. C., Poutanen, K., Brasca, M., Erba, D., & Plumed-Ferrer, C. (2016). Characterization of lactic acid bacteria isolated from wheat bran sourdough. *LWT-food Science and Technology*, 66, 275-283.
- Meloni, M. P., Piras, F., Siddi, G., Cabras, D., Comassi, E., Lai, R., ... & Scarano, C. (2023). Comparison of Activity of Commercial Protective Cultures and Thermophilic Lactic Acid Bacteria against *Listeria monocytogenes*: A New Perspective to Improve the Safety of Sardinian PDO Cheeses. *Foods*, 12(6), 1182.
- Meyers, C. E., Walter, E. L., & Green, L. B. (1958). Isolation of a bacteriophage specific for a *Lactobacillus casei* from human oral material. *Journal of Dental Research*, 37(1), 175-178.
- Mishra, M. (2016). Overview of encapsulation and controlled release. *Handbook of encapsulation and controlled release*, 3-19.
- Mishra, S. S., Behera, P. K., Kar, B., & Ray, R. C. (2018). Advances in probiotics, prebiotics and nutraceuticals. *Innovations in technologies for fermented food and beverage industries*, 121-141.
- Misra, S., Pandey, P., Dalbhagat, C. G., & Mishra, H. N. (2022). Emerging technologies and coating materials for improved probiotication in food products: A review. *Food and Bioprocess Technology*, 15(5), 998-1039.
- Morales-Medina, R., Drusch, S., Acevedo, F., Castro-Alvarez, A., Benie, A., Poncelet, D., ... & de Vos, P. (2022). Structure, controlled release mechanisms and health benefits of pectins as an encapsulation material for bioactive food components. *Food & Function*, 13(21), 10870-10881.
- Moulik, S. P., Rakshit, A. K., Pan, A., & Naskar, B. (2022). An overview of coacervates: The special disperse state of amphiphilic and polymeric materials in solution. *Colloids and Interfaces*, 6(3), 45.
- Nag, A., & Das, S. (2013). Improving ambient temperature stability of probiotics with stress adaptation and fluidized bed drying. *Journal of functional foods*, 5(1), 170-177.

- Optibac Probiotics^{o)}. (n.d.). *Lactobacillus casei* (*Lactocaseibacillus casei*). <https://www.optibacprobiotics.com/professionals/probiotics-database/lactobacillus/lactobacillus-casei>
- Optibac Probiotics^{b)}. (n.d.). What is *Lactobacillus*?. <https://www.optibacprobiotics.com/faqs/probiotics/what-is-lactobacillus>
- Paucean, A., Vodnar, D. C., Socaci, S. A., & Socaciu, C. (2013). Carbohydrate metabolic conversions to lactic acid and volatile derivatives, as influenced by *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 and *Lactobacillus casei* ATCC 393 efficiency during in vitro and sourdough fermentation. *European Food Research and Technology*, 237, 679-689.
- Perez, R. H., Zendo, T., & Sonomoto, K. (2014). Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. *Microbial cell factories*, 13(1), 1-13.
- Pessione, E. (2012). Lactic acid bacteria contribution to gut microbiota complexity: lights and shadows. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 2, 86.
- Pras, N. and Woerdenbag, H. J., 1999, Production of Secondary Metabolites by Bioconversion, in *Biotechnology: Secondary Metabolites*, Ramawat, K. G. and Merillon, J. M., (Editors), Science Publisher, Inc., USA.
- Oey, I., Lille, M., Van Loey, A., & Hendrickx, M. (2008). Effect of high-pressure processing on colour, texture and flavour of fruit-and vegetable-based food products: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 19(6), 320-328.
- Qiao, L., Chen, Y., Song, X., Dou, X., & Xu, C. (2022). Selenium nanoparticles-enriched *Lactobacillus casei* ATCC 393 prevents cognitive dysfunction in mice through modulating microbiota-gut-brain axis. *International Journal of Nanomedicine*, 4807-4827.
- Qiao, N., Wittouck, S., Mattarelli, P., Zheng, J., Lebeer, S., Felis, G. E., & Gänzle, M. G. (2022). After the storm-Perspectives on the taxonomy of *Lactobacillaceae*. *JDS communications*, 3(3), 222–227. <https://doi.org/10.3168/jdsc.2021-0183>.
- Rajam, R., & Subramanian, P. (2022). Encapsulation of probiotics: Past, present and future. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 11(1), 46.
- Rather, S. A., Akhter, R., Masoodi, F. A., Gani, A., & Wani, S. M. (2017). Effect of double alginate microencapsulation on in vitro digestibility and thermal tolerance of *Lactobacillus plantarum* NCDC201 and *L. casei* NCDC297. *LWT-Food Science and Technology*, 83, 50-58.
- Research and Markets (2023, July 31). *Europe Probiotics Market Outlook & Forecasts 2023-2028 - Vendors' Increasing Focus on Developing Non-Dairy-Based Probiotics*. GlobeNewswire. <https://www.globenewswire.com/en/news-release/2023/07/31/2714683/28124/en/Europe-Probiotics-Market-Outlook-Forecasts-2023-2028-Vendors-Increasing-Focus-on-Developing-Non-Dairy-Based-Probiotics.html>.
- Rokka, S., & Rantamäki, P. (2010). Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: challenges for industrial applications. *European Food Research and Technology*, 231, 1-12.
- Rousi, Z., Malhiac, C., Fatouros, D. G., & Paraskevopoulou, A. (2019). Complex coacervates formation between gelatin and gum Arabic with different arabinogalactan protein fraction content and their characterization. *Food Hydrocolloids*, 96, 577-588.
- Saikiran, K. C. H. S., Perli, M., Reddy, N. S., & Venkatachalapathy, N. (2018). Mechanical methods of microencapsulation: a review. *Int J Curr Microbiol App Sci*, 7, 1251-1260.
- Saravanan, M., & Rao, K. P. (2010). Pectin–gelatin and alginate–gelatin complex coacervation for controlled drug delivery: Influence of anionic polysaccharides and drugs being encapsulated on physicochemical properties of microcapsules. *Carbohydrate Polymers*, 80(3), 808-816.
- Sánchez, B., Delgado, S., Blanco-Míguez, A., Lourenço, A., Gueimonde, M., & Margolles, A. (2017). Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease. *Molecular nutrition & food research*, 61(1), 10.1002/mnfr.201600240. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201600240>

- Sanchez, M., Darimont, C., Drapeau, V., Emady-Azar, S., Lepage, M., Rezzonico, E., ... & Tremblay, A. (2014). Effect of *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC1.3724 supplementation on weight loss and maintenance in obese men and women. *British Journal of Nutrition*, 111(8), 1507-1519.
- Sanders, M. E., Merenstein, D. J., Reid, G., Gibson, G. R., & Rastall, R. A. (2019). Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 16(10), 605-616.
- Schreck Bird, A., Gregory, P. J., Jalloh, M. A., Risoldi Cochrane, Z., & Hein, D. J. (2017). Probiotics for the treatment of infantile colic: a systematic review. *Journal of pharmacy practice*, 30(3), 366-374.
- Serna, L., & Vallejo-Castillo, V. (2013). Probiotic encapsulation. *African Journal of Microbiology Research*, 7, 4743. <https://doi.org/10.5897/AJMR2013.5718>
- Shafizadeh, A., Golestan, L., Ahmadi, M., Darjani, P., & Ghorbani-HasanSaraei, A. (2020). Encapsulation of *Lactobacillus casei* in alginate microcapsules: improvement of the bacterial viability under simulated gastrointestinal conditions using flaxseed mucilage. *Journal of food measurement and characterization*, 14, 1901-1908.
- Shori, A. B., Baba, A. S., & Muniandy, P. (2019). Potential health-promoting effects of probiotics in dairy beverages. *Value-added ingredients and enrichments of beverages*, 173-204.
- Shokryazdan, P., Sieo, C. C., Kalavathy, R., Liang, J. B., Alitheen, N. B., Faseleh Jahromi, M., & Ho, Y. W. (2014). Probiotic potential of *Lactobacillus* strains with antimicrobial activity against some human pathogenic strains. *BioMed research international*, 2014, 927268. <https://doi.org/10.1155/2014/927268>
- Singh, S., Gupta, R., Chawla, S., Gauba, P., Singh, M., Tiwari, R. K., ... Gaur, S. (2022). Natural sources and encapsulating materials for probiotics delivery systems: Recent applications and challenges in functional food development. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnut.2022.971784/full#B6>
- Smidsrød, O., & Skja, G. (1990). Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends in biotechnology*, 8, 71-78.
- Song, X., Qiao, L., Chang, J., Dou, X., Zhang, X., Pi, S., & Xu, C. (2022). Dietary supplementation with selenium nanoparticles-enriched *Lactobacillus casei* ATCC 393 alleviates intestinal barrier dysfunction of mice exposed to deoxynivalenol by regulating endoplasmic reticulum stress and gut microbiota. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 248, 114276.
- Spyridopoulou, K., Tryfonopoulou, E., Ainelis, G., Ypsilantis, P., Sarafidis, C., Kalogirou, O., & Chlichlia, K. (2021). Biogenic selenium nanoparticles produced by *Lactobacillus casei* ATCC 393 inhibit colon cancer cell growth in vitro and in vivo. *Nanoscale Advances*, 3(9), 2516-2528.
- Stewart, L. (2020, September 10). 12 Lactic Acid Probiotics: *Lactobacillus Reuteri*, *L Casei* And More. Atlas Biomed Blog. <https://atlasbiomed.com/blog/top-12-lactobacillus-probiotics/>
- Sultana, M., Chan, E. S., Pushpamalar, J., & Choo, W. S. (2022). Advances in extrusion-dripping encapsulation of probiotics and omega-3 rich oils. *Trends in Food Science & Technology*, 123, 69-86.
- Suissa, R., Oved, R., Maan, H., Hadad, U., Gilhar, O., Meijler, M. M., ... & Kolodkin-Gal, I. (2022). Context-dependent differences in the functional responses of Lactobacillaceae strains to fermentable sugars. *Frontiers in Microbiology*, 13, 949932.
- Taye, Y., Degu, T., Fesseha, H., & Mathewos, M. (2021). Isolation and identification of lactic acid bacteria from cow milk and milk products. *The Scientific World Journal*, 2021.
- Thies, C. (2016). Encapsulation by complex coacervation. *Encapsulation and controlled release technologies in food systems*, 41-77.
- Thomas, D., Sharma, A., & Sankar, M. J. (2023). Probiotics for the prevention of mortality and sepsis in preterm very low birth weight neonates from low-and middle-income countries: a Bayesian network meta-analysis. *Frontiers in Nutrition*, 10, 1133293.

- Timilsena, Y. P., Akanbi, T. O., Khalid, N., Adhikari, B., & Barrow, C. J. (2019). Complex coacervation: Principles, mechanisms and applications in microencapsulation. *International journal of biological macromolecules*, 121, 1276-1286.
- Tiptiri-Kourpeti, A., Spyridopoulou, K., Santarmaki, V., Aindelis, G., Tompoulidou, E., Lamprianidou, E. E., Saxami, G., Ypsilantis, P., Lampri, E. S., Simopoulos, C., Kotsianidis, I., Galanis, A., Kourkoutas, Y., Dimitrellou, D., & Chlichlia, K. (2016). *Lactobacillus casei* Exerts Anti-Proliferative Effects Accompanied by Apoptotic Cell Death and Up-Regulation of TRAIL in Colon Carcinoma Cells. *PloS one*, 11(2), e0147960. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147960>
- Tokmakov, A. A., Kurotani, A., & Sato, K. I. (2021). Protein pI and Intracellular Localization. *Frontiers in molecular biosciences*, 8, 775736. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.775736>.
- Tripathi, A., Pandey, V. K., Tiwari, V., Mishra, R., Dash, K. K., Harsányi, E., ... & Shaikh, A. M. (2023). Exploring the Fermentation-Driven Functionalities of Lactobacillaceae-Originated Probiotics in Preventive Measures of Alzheimer's Disease: A Review. *Fermentation*, 9(8), 762.
- Tursi, A., Brandimarte, G., Giorgetti, G. M., & Elisei, W. (2008). Mesalazine and/or *Lactobacillus casei* in maintaining long-term remission of symptomatic uncomplicated diverticular disease of the colon. *Hepato-gastroenterology*, 55(84), 916-920.
- Twomey, D., Ross, R. P., Ryan, M., Meaney, B., & Hill, C. (2002). Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 82, 165-185.
- Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). (2019). *coacervation*. <https://goldbook.iupac.org/terms/view/C01116>
- Uraz, G., Simsek, H., & Maras, Y. (2001). The inhibitory effects of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus helveticus* on *Bacillus* species isolated from raw milk in various salt concentrations. *International journal of dairy technology*, 54(4), 146-150.
- Uribe-Lorio, L., Brenes-Guillén, L., Hernández-Ascencio, W., Mora-Amador, R., González, G., Ramírez-Umaña, C. J., ... & Pedrós-Alió, C. (2019). The influence of temperature and pH on bacterial community composition of microbial mats in hot springs from Costa Rica. *Microbiologyopen*, 8(10), e893.
- Vassileva, A., Burhan, N., Beschkov, V., Spasova, D., Radoevska, S., Ivanova, V., & Tonkova, A. (2003). Cyclodextrin glucanotransferase production by free and agar gel immobilized cells of *Bacillus circulans* ATCC 21783. *Process Biochemistry*, 38(11), 1585-1591.
- Verbelen, P. J., De Schutter, D. P., Delvaux, F., Verstrepen, K. J., & Delvaux, F. R. (2006). Immobilized yeast cell systems for continuous fermentation applications. *Biotechnology letters*, 28, 1515-1525. <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9132-5>.
- Vinot, N. and Pane, M. (2020). *The Lactobacillus taxonomy change has arrived! What do you need to know?* [online] Microbiome Times Magazine. Available at: <https://www.microbiometimes.com/the-lactobacillus-taxonomy-change-has-arrived-what-do-you-need-to-know/>.
- Vieco-Saiz, N., Belguesmia, Y., Raspoet, R., Auclair, E., Gancel, F., Kempf, I., & Drider, D. (2019). Benefits and Inputs From Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins as Alternatives to Antibiotic Growth Promoters During Food-Animal Production. *Frontiers in microbiology*, 10, 57. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00057>.
- Vivek, K., Mishra, S., Pradhan, R. C., Nagarajan, M., Kumar, P. K., Singh, S. S., ... & Gowda, N. N. (2023). A comprehensive review on microencapsulation of probiotics: Technology, carriers and current trends. *Applied Food Research*, 3(1), 100248.
- Walter, J., & O'Toole, P. W. (2023). Microbe Profile: The *Lactobacillaceae*. *Microbiology (Reading, England)*, 169(12), 001414. <https://doi.org/10.1099/mic.0.001414>.
- Wang, B., Akanbi, T. O., Agyei, D., Holland, B. J., & Barrow, C. J. (2018). Coacervation technique as an encapsulation and delivery tool for hydrophobic biofunctional compounds. In *Role of materials science in food bioengineering* (pp. 235-261). Academic Press.

- Wang, Y. and Shurtleff, D. (2019). *Probiotics: What You Need To Know*. NCCIH. <https://www.nccih.nih.gov/health/probiotics-what-you-need-to-know>
- WebMD Editorial Contributors. (2023, April 7). Best Probiotic Strains for Older Adults. WebMD. <https://www.webmd.com/healthy-aging/best-probiotic-strains-older-adults>
- Willaert, R. G. (2018). Cell immobilization and its applications in biotechnology: current trends and future prospects. In *Fermentation Microbiology and Biotechnology, Fourth Edition* (pp. 323-358). CRC press.
- Wong, S., Jamous, A., O'Driscoll, J., Sekhar, R., Weldon, M., Yau, C. Y., Hirani, S. P., Grimble, G., & Forbes, A. (2014). A *Lactobacillus casei* Shirota probiotic drink reduces antibiotic-associated diarrhoea in patients with spinal cord injuries: a randomised controlled trial. *The British journal of nutrition*, 111(4), 672–678. <https://doi.org/10.1017/S0007114513002973>.
- Xu, C., Qiao, L., Ma, L., Guo, Y., Dou, X., Yan, S., Zhang, B., & Roman, A. (2019). Biogenic selenium nanoparticles synthesized by *Lactobacillus casei* ATCC 393 alleviate intestinal epithelial barrier dysfunction caused by oxidative stress via Nrf2 signaling-mediated mitochondrial pathway. *International journal of nanomedicine*, 14, 4491–4502. <https://doi.org/10.2147/IJN.S199193>.
- Xu, M., Gagné-Bourque, F., Dumont, M. J., & Jabaji, S. (2016). Encapsulation of *Lactobacillus casei* ATCC 393 cells and evaluation of their survival after freeze-drying, storage and under gastrointestinal conditions. *Journal of food engineering*, 168, 52-59.
- Xu, Z., Luo, Y., Mao, Y., Peng, R., Chen, J., Soteyome, T., Bai, C., Chen, L., Liang, Y., Su, J., Wang, K., Liu, J., & Kjellerup, B. V. (2020). Spoilage Lactic Acid Bacteria in the Brewing Industry. *Journal of microbiology and biotechnology*, 30(7), 955–961. <https://doi.org/10.4014/jmb.1908.08069>.
- Yang, S. C., Lin, C. H., Sung, C. T., & Fang, J. Y. (2014). Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. *Frontiers in microbiology*, 5, 241.
- Yang, S. T., Zhang, K., Zhang, B., & Huang, H. (2011). 3.16-Fumaric acid. in: *Chief: Murray MY (ed) Comprehensive Biotechnology, 2nd edn. Academic Press, Burlington*, 163-177.
- Yavuz-Düzgün, M., Ayar, E. N., Şensu, E., Topkaya, C., & Özçelik, B. (2023). A comparative study on the encapsulation of black carrot extract in potato protein–pectin complexes. *Journal of Food Science and Technology*, 60(10), 2628-2638.
- Yeo, Y., & Park, K. (2004). Control of encapsulation efficiency and initial burst in polymeric microparticle systems. *Archives of pharmacal research*, 27, 1-12.
- Zarour, K., Vieco, N., Pérez-Ramos, A., Nacher-Vázquez, M., Mohedano, M. L., & López, P. (2017). Food ingredients synthesized by lactic acid bacteria. In *Microbial production of food ingredients and additives* (pp. 89-124). Academic Press.
- Zhang, S., & Vardhanabhuti, B. (2014). Effect of initial protein concentration and pH on in vitro gastric digestion of heated whey proteins. *Food Chemistry*, 145, 473-480.
- Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M. A. P., Harris, H. M. B., Mattarelli, P., O'Toole, P. W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G. E., Gänzle, M. G., & Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 70(4), 2782–2858. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>
- Zhu, L., Qiao, L., Dou, X., Song, X., Chang, J., Zeng, X., & Xu, C. (2023). *Lactobacillus casei* ATCC 393 combined with vasoactive intestinal peptide alleviates dextran sodium sulfate-induced ulcerative colitis in C57BL/6 mice via NF-κB and Nrf2 signaling pathways. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 165, 115033.
- Zhu, Y. (2007). Immobilized cell fermentation for production of chemicals and fuels. *Bioprocessing for value-added products from renewable resources*, 373-396.

Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης (n.d.). Ακίνητοποιημένοι Βιοκαταλύτες.
<https://eclass.duth.gr/modules/document/file.php/ALEX01115/Immobilized%20Biocatalysts.pdf>