

ΜΕΛΕΤΗ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΟΥ
ΓΙΑΟΥΡΤΙΟΥ ΥΠΟ IN VITRO ΣΥΝΘΗΚΕΣ
ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

του/της

ΚΡΙΣΤΕΛ ΜΑΤΣΟΛΛΙ ΚΑΙ ΔΙΟΝΥΣΙΟΥ ΣΕΡΙΦΑΙ

Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων
Σχολή Περιβάλλοντος

ΙΟΝΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ



Αργοστόλι Κεφαλληνίας
Οκτώβριος 2024

ΜΕΛΕΤΗ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΟΥ
ΓΙΑΟΥΡΤΙΟΥ ΥΠΟ IN VITRO ΣΥΝΘΗΚΕΣ
ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

Η πτυχιακή εργασία εγκρίθηκε από

Δημητρέλλου Δήμητρα

Σακαντάνη Ελένη

Σαμαράς Ιωάννης

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

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

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η συγγραφή της πτυχιακής εργασίας αυτής με θέμα την «Μελέτη Βιωσιμότητας Προβιοτικού Γιαουρτιού υπό *in vitro* Συνθήκες Γαστρεντερικού Συστήματος», έγινε στα πλαίσια των υποχρεώσεών μας ως σπουδαστές του τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων σχολής Περιβάλλοντος του Ιόνιου Πανεπιστημίου. Η ανάθεση του θέματος έγινε από την εισηγήτρια της εργασίας κ. Δημητρέλλου Δήμητρα, Επίκουρη Καθηγήτρια του Ιόνιου Πανεπιστημίου. Επιπλέον, θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε για τη συνεχή παρακολούθηση κατά την εκτέλεση του πειραματικού μέρους και για την εκπόνηση της πτυχιακής εργασίας. Ευελπιστούμε, ότι η παρουσίαση όλων των σχετικών στοιχείων δίνουν μια αρκετά σφαιρική εικόνα του θέματος στον αναγνώστη, καθώς επιπροσθέτως μπορεί να αποδειχθεί χρήσιμη σε όποιον μελλοντικά χρειαστεί πληροφορίες για το συγκεκριμένο θέμα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία, μελετήθηκε η βιωσιμότητα των ελεύθερων κυττάρων *Lactobacillus casei* ATCC 393, σε συνθήκες που προσομοιάζουν το γαστρεντερικό σύστημα, με στόχο να αξιολογήσει την ανθεκτικότητά τους σε διαφορετικά επίπεδα pH. Η διαδικασία περιλάμβανε την καλλιέργεια κυττάρων σε γιαούρτι και γιαούρτι με φυτικές ίνες μήλου, καθώς και την έκθεσή τους σε όξινο περιβάλλον και διάλυμα χολικών αλάτων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι σε pH 2 και pH 3, τα ελεύθερα κύτταρα παρουσίασαν σημαντική μείωση της βιωσιμότητας, ενώ τα κύτταρα σε γιαούρτι ήταν πιο ανθεκτικά. Η χρήση ινών μήλου βελτίωσε περαιτέρω την επιβίωση των κυττάρων. Σε δοκιμές με χολικά άλατα, το γιαούρτι και το γιαούρτι με ίνες μήλου μείωσαν τις απώλειες της βιωσιμότητας, επιβεβαιώνοντας τη θετική τους επίδραση. Εν κατακλείδι, η παρούσα μελέτη αναδεικνύει τη σημασία της χρήσης γιαουρτιού και ιδιαίτερα του γιαουρτιού εμπλουτισμένου με φυτικές ίνες μήλου, για τη διατήρηση της βιωσιμότητας του *Lactobacillus casei*, προάγοντας παράλληλα την ευεξία του ανθρώπινου οργανισμού καθ' όλη τη διάρκεια της διέλευσης από το γαστρεντερικό σύστημα.

Λέξεις κλειδιά: *Lactobacillus casei* ATCC 393, προβιοτικά, γιαούρτι

ABSTRACT

This study examined the viability of free *Lactobacillus casei* ATCC 393 cells under simulated gastrointestinal conditions, aiming to assess their resistance to different pH levels. The experiment involved cultivating cells in yogurt and yogurt with apple fibers, followed by their exposure to acidic environments and bile salt solutions. Results showed that at pH 2 and pH 3, the free cells exhibited a significant decrease in viability, while those in yogurt were more resistant. The use of apple fibers further improved cell survival. In bile salt tests, both plain yogurt and yogurt with apple fibers reduced viability losses, confirming their positive effects. In conclusion, the present study highlights the importance of yogurt consumption, particularly yogurt enriched with apple fibers, in maintaining the viability of *Lactobacillus casei*, while also promoting the well-being of the human body throughout its passage through the gastrointestinal system.

Keywords: *Lactobacillus casei* ATCC 393, probiotics, yogurt

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

1.1 Εισαγωγή	12
Κεφάλαιο 1- Γιαούρτι.....	13
1.1 Ιστορική Αναδρομή.....	13
1.2 Ορισμός Γιαουρτιού.....	13
1.3 Παρασκευή Γιαουρτιού.....	14
1.3.1 Προετοιμασία Γάλακτος για Παραγωγή Γιαουρτιού.....	14
1.3.2 Θερμική Επεξεργασία.....	15
1.3.3 Εμβολιασμός και Επώαση.....	15
1.3.4 Ψύξη και Συντήρηση.....	16
1.4 Τύποι Γιαουρτιού.....	16
1.4.1. Παραδοσιακό Γιαουρτιού.....	17
1.4.2 Βιομηχανικό Γιαουρτιού	17
1.4.3 Στραγγιστό Γιαουρτιού	19
1.5 Θρεπτική Αξία Γιαουρτιού	20
Κεφάλαιο 2- Προβιοτικά.....	21
2.1 Προβιοτικά.....	21
2.1.1 Ταξινόμηση Προβιοτικών.....	22
2.1.2 Μηχανισμοί Δράσης Προβιοτικών και ευεργετικές ιδιότητες στην υγεία του ξενιστή.....	22
2.2 Εφαρμογές πρεβιοτικών στα τρόφιμα	24
2.3 Στέλεχος <i>L. casei</i> ATCC 393.....	25
2.3.1 Ευεργετικές Ιδιότητες του <i>L. casei</i> στην υγεία και εφαρμογές σε γαλακτοκομικά προϊόντα.....	25
Κεφάλαιο 3- Φυτικές Ίνες και Ίνες Μήλου.....	27
3.1 Ορισμός Φυτικών Ινών και Προέλευση.....	27
3.2 Φυτικές Ίνες και Υγεία Εντέρου.....	28
3.2.1 Ζύμωση Ινών και Μικροχλωρίδα Εντέρου.....	28
3.3 Ορισμός Μήλου.....	29

3.3.1 Χημική Σύσταση Μήλου	30
3.3.2 Ίνες Μήλου	31
Κεφάλαιο 4-Προσομοίωση Γαστρεντερικού.....	33
4.1 Γαστρεντερικό Σύστημα.....	33
4.1.1 Μάσηση και Πέψη τροφών στο στόμα.....	33
4.1.2 Κατάποση και Οισοφάγος.....	33
4.1.3 Στομάχι- Λεπτό Έντερο- Παχύ Έντερο.....	34
4.2 Ανθρώπινο Μικροβίωμα Εντέρου.....	34
4.3 Συνθήκες Προσομοίωσης του Στελέχους <i>L.casei</i> στο Γαστρεντερικό Σύστημα in vitro.....	36
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	39
5. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	39
5.1 ΥΛΙΚΑ.....	39
5.2 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	40
5.2.1 Βιωσιμότητα ελεύθερων κυττάρων <i>L.casei</i> προσομοίωση γαστρικού υγρού και χολικών αλάτων.....	40
6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	41
6.1 Επιβίωση σε προσομοιωμένο γαστρικό υγρό.....	41
6.2 Επιβίωση σε διαλύματα χολικών αλάτων.....	46
7. ΚΑΘΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ ΤΩΝ ΔΙΑΙΤΗΤΙΚΩΝ ΙΝΩΝ	48
7.1 Υλικά και Μέθοδοι.....	48
7.1.1 Υλικά.....	48
7.1.2 Μέθοδοι.....	48
8. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	51

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας	Σελίδα
Πίνακας 1.1: Συνδυασμοί χρόνου-θερμοκρασίας για παστερίωση γάλακτος.....	15
Πίνακας 1.2. Πίνακας: Σύσταση του γάλακτος διαφόρων θηλαστικών εκφρασμένη (%) κατά βάρος.....	17
Πίνακας 1.3. Θρεπτική αξία συνεκτικού γιαουρτιού.....	20
Πίνακας 2.1. Μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται ως προβιοτικά	22
Πίνακας 2.2. Ευεργετικές Επιδράσεις των προβιοτικών στην υγεία.....	23
Πίνακας 2.3. Εφαρμογές πρεβιοτικών στα τρόφιμα.....	24
Πίνακας 3.1. Χημική Σύσταση Μήλου.....	30
Πίνακας 6.1: Βιωσιμότητα ελεύθερων κυττάρων <i>L.casei</i> , σε διαφορετικές χρονικές φάσεις σε συνθήκες προσομοίωσης γαστρικών υγρών (pH 2 και 3).....	41
Πίνακας 6.2: Βιωσιμότητα ελεύθερων κυττάρων <i>L.casei</i> μαζί με γιαούρτι, σε διαφορετικές χρονικές φάσεις σε συνθήκες προσομοίωσης γαστρικών υγρών (pH 2 και 3).....	42
Πίνακας 6.3: Βιωσιμότητα ελεύθερων κυττάρων <i>L.casei</i> μαζί με γιαούρτι με ίνες μήλου, σε διαφορετικές χρονικές φάσεις σε συνθήκες προσομοίωσης γαστρικών υγρών (pH 2 και 3).....	43
Πίνακας 6.4: Επίδραση του χρόνου έκθεσης σε διάλυμα χολικών αλάτων (3%) στη βιωσιμότητα ελεύθερων κυττάρων <i>L.casei</i> , με γιαούρτι και γιαούρτι με ίνες μήλου.....	46
Πίνακας 7.1: Ικανότητες Συγκράτησης Νερού, Ελαίου και Διόγκωση στο Νερό Ινών Μήλου.....	49

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

Γράφημα	Σελίδα
Γράφημα 1.1. Διάγραμμα ροής παραγωγής συνεκτικού γιαουρτιού	18
Γράφημα 1.2. Διάγραμμα ροής παραγωγής αναμεμιγμένου γιαουρτιού	19

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα	Σελίδα
Διάγραμμα 6.1.1: Βιωσιμότητα <i>L.casei</i> σε Γαστρικά Υγρά (pH 2).....	44
Διάγραμμα 6.1.2: Βιωσιμότητα <i>L.casei</i> σε Γαστρικά Υγρά (pH 3).....	45
Διάγραμμα 6.2: Βιωσιμότητα <i>L.casei</i> σε χολικά άλατα (0,3%).....	46
Διάγραμμα 7.1: Ικανότητες Συγκράτησης Νερού, Ελαίου και Διόγκωση στο Νερό Ινών Μήλου.....	49

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το γιαούρτι κατατάσσεται στα γαλακτοκομικά προϊόντα, τα οποία προέρχονται από γάλα των θηλαστικών, όπως βοοειδή, βουβάλια, αιγοπρόβατα και καμήλες (Shete and Shinkar, 2013). Το γιαούρτι, αποτελεί ένα προϊόν πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά, παρά τις ανησυχίες ορισμένων καταναλωτών σχετικά με τις επιπτώσεις του στην υγεία, όπως η περιεκτικότητα σε λακτόζη και η συμβολή του στην αύξηση του σωματικού βάρους. Παρόλα αυτά, έχει αναγνωριστεί η θετική του συνεισφορά στη λειτουργία του γαστρεντερικού συστήματος κατά τη διέλευσή του από αυτό (Chandan, 2014). Ενδεικτικά, ιδιαίτερη έμφαση δίνεται στα οξυγαλακτικά βακτήρια που αποικίζουν στο παχύ έντερο, τα οποία εξετάζονται για τις ευεργετικές τους επιδράσεις στην υγεία του ξενιστή, μέσω της χορήγησης προβιοτικών. Ένα βακτηριακό στέλεχος χαρακτηρίζεται ως προβιοτικό όταν πληροί συγκεκριμένες προϋποθέσεις, όπως η ανθεκτικότητα σε οξέα και χολικά άλατα, καθώς και η ικανότητα ανοσοδιεγέρσης και καταπολέμησης παθογόνων μικροοργανισμών (Gasbarrini et al., 2016). Ένα από τα προβιοτικά στελέχη που χρησιμοποιήθηκε και στη παρούσα εργασία, ο *Lactobacillus casei*, πρόκειται για ένα μεσόφιλο, Gram θετικό, αναερόβιο βακτήριο που ανευρίσκεται σε ζυμωμένα γαλακτοκομικά προϊόντα όπως το γιαούρτι (Holzapfel et al., 2001). Ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η αξιολόγηση της βιωσιμότητας του προβιοτικού γιαουρτιού υπό συνθήκες που προσομοιώνουν το γαστρεντερικό σύστημα *in vitro*. Για την καλύτερη κατανόηση των αποτελεσμάτων, η εργασία δομείται σε δύο μέρη: το θεωρητικό και το πειραματικό, με το δεύτερο να διεξάγεται στον εργαστηριακό χώρο του Ιδρύματος. Στο πρώτο κεφάλαιο παρουσιάζονται γενικές πληροφορίες με το γιαούρτι, συμπεριλαμβανομένων των βασικών ορισμών και των μεθόδων παρασκευής του. Στο επόμενο κεφάλαιο εξετάζονται τα προβιοτικά, με έμφαση στην περιγραφή, ταξινόμηση και τους μηχανισμούς δράσης τους, όπως το στέλεχος *L. casei* ATCC 393, καθώς και οι ορισμοί των πρεβιοτικών. Το τρίτο κεφάλαιο εστιάζει στους ορισμούς των φυτικών ινών, με ιδιαίτερη έμφαση στις φυτικές ίνες μήλου. Το πρώτο μέρος ολοκληρώνεται με την περιγραφή του γαστρεντερικού συστήματος και της εντερικής μικροχλωρίδας, όπου περιγράφονται τα οφέλη που προσφέρει στην προάσπιση της υγείας του ανθρώπου. Στο δεύτερο και ερευνητικό μέρος περιγράφεται η πειραματική διαδικασία με την ανάλυση της χρησιμοποιούμενης μεθόδου και των παραμέτρων που εξετάστηκαν.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο ΓΙΑΟΥΡΤΙ

1.1 Ιστορική Αναδρομή

Το γιαούρτι είναι ένα από τα πιο δημοφιλή ζυμωμένα τρόφιμα στην ανθρώπινη διατροφή για χιλιετίες, κυρίως λόγω της υψηλής θρεπτικής αξίας, γεγονός που το καθιστά σημαντικό αντικείμενο της μελέτης όσον αφορά τα βασικά κριτήρια κατανάλωσής του (Georgakouli et al., 2016). Η ονομασία «γιαούρτι» προφέρεται διαφορετικά σε όλο τον κόσμο ωστόσο η ετυμολογική της ρίζα ανάγεται στην τουρκική λέξη «yogurtmak», η οποία σημαίνει πήζω (Fisberg and Mochado, 2015). Σύμφωνα με τα αρχαία Ινδικά χειρόγραφα της Αγιουρβέδας, που χρονολογούνται γύρω στις 6.000 π.Χ., καταγράφονται οι ευεργετικές ιδιότητες και τα οφέλη στην υγεία της κατανάλωσης γαλακτοκομικών προϊόντων που έχουν υποστεί ζύμωση (Fisberg and Mochado, 2015). Ιστορικά, οι βοσκοί της Μέσης Ανατολής χρησιμοποιούσαν σακούλες από κατσικίσιο έντερο για να αποθηκεύουν το γάλα και να αποτρέψουν την αλλοίωση του. Κατά τη διαδικασία αυτή, συγκεκριμένα βακτήρια ζύμωναν το γάλα, δημιουργώντας το προϊόν που σήμερα γνωρίζουμε ως «γιαούρτι» (History of Yogurt, 2004). Στις αρχές του 20ου αιώνα, το 1905, ο Stamen Grigorov, ένας νεαρός φοιτητής ιατρικής από τη Βουλγαρία, ανακάλυψε τον *Bacillus bulgaricus*, ένα γαλακτικό βακτήριο το οποίο παραμένει θεμελιώδες για την παραγωγή ζυμωμένων προϊόντων μέχρι και σήμερα (Fisberg και Mochado, 2015). Ταυτόχρονα, η ερευνητική δουλειά του Joseph Lister σχετικά με το γαλακτικό οξύ είχε καθοριστική επιρροή στην κατανόηση της ζύμωσης. Ο Lister μελέτησε το φαινόμενο της οξίνισης του γάλακτος μέσω της γαλακτικής ζύμωσης, καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι η μετατροπή των σακχάρων σε γαλακτικό οξύ οφείλεται στον μικροοργανισμό *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis* (Schleifer et al., 1985), παρά την παλαιότερη άποψη που υποστήριζε ότι η καζεΐνη είχε τον κύριο ρόλο στη ζύμωση (Lister, 1878). Αυτή η ανακάλυψη συνέβαλε στην κατανόηση των διαδικασιών της γαλακτικής ζύμωσης (Aryana and Olson, 2017).

1.2 Ορισμός

Στη σύγχρονη εποχή, με την παγκόσμια κατανάλωση γιαουρτιού, οι διαδικασίες παραγωγής του έχουν κλιμακωθεί για να εξυπηρετήσουν μεγαλύτερους όγκους και οι

έλεγχοι που σχετίζονται με την παραγωγή του είναι ζωτικής σημασίας. Για τον λόγο αυτό, έχει καθοριστεί ένα συγκεκριμένο νομοθετικό πλαίσιο για τη διασφάλιση της ποιότητας του γιαουρτιού και της ασφάλειας των παραγόμενων προϊόντων, με κύριο στόχο την προστασία των καταναλωτών (ΓΧΚ, 2009, ΚΤΠ, 2016). Σύμφωνα με τη Ελληνική Νομοθεσία όπως αναφέρεται στον Κώδικα Τροφίμων και Ποτών (ΚΤΠ), (Άρθρο 82, ΦΕΚ 2457/Β'/09.08.2016) ως «Γιαούρτι» «ορίζεται το γαλακτοκομικό προϊόν το οποίο παράγεται από τη ζύμωση και πήξη αποκλειστικά και μόνο νωπού γάλακτος, της αντίστοιχης προς την ονομασία φύσης και προέλευσης, με τη χρήση υποχρεωτικά των καλλιιεργειών - εκκινητών *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* και *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, ώστε το τελικό ζυμωμένο προϊόν να περιέχει τουλάχιστον 10^7 cfu/g προϊόντος μέχρι την ημερομηνία ανάλωσής του». Για πρώτη ύλη του γιαουρτιού χρησιμοποιείται γάλα αγελαδινό, κατσικίσιο, βουβαλίσιο, προβάτου, καθώς και άλλων θηλαστικών, όπως αυτό ορίζεται στον Κανονισμό (ΕΚ) 1308/2013 (Παράρτημα VII, Μέρος III, παράγραφος 1). Παρά την απαγόρευση χρήσης πλήρως αφυδατωμένου γάλακτος ή παραγώγων του σε μορφή σκόνης, υπάρχει εξαίρεση για τις πρωτεΐνες γάλακτος. Η χρήση τους επιτρέπεται υπό συγκεκριμένους όρους, οι οποίοι καθορίζονται από τεχνολογικές ανάγκες που ρυθμίζονται μέσω του Στερεού Υπολείμματος Άνευ Λίπους (ΣΥΑΛ) (ΓΧΚ, 2009, ΚΤΠ, 2016). Το γάλα που προορίζεται για την παραγωγή γιαουρτιού πρέπει να είναι απαλλαγμένο από αντιβιοτικά και άλλους αντιμικροβιακούς παράγοντες, καθώς αυτοί εμποδίζουν την ανάπτυξη των βακτηρίων που χρησιμοποιούν στην καλλιέργεια εκκίνησης (ΦΕΚ 2457/Β'/09.08.2016). Σε ορισμένες χώρες, όπως η Ελλάδα, απαγορεύεται η προσθήκη πρόσθετων ουσιών (E200-299 και E900-999). Σύμφωνα με τον Codex Alimentarius (FAO/WHO, 2011), το «Γιαούρτι» ή η «Γιαούρτη» ορίζεται ως «πηγμένο γαλακτοκομικό προϊόν που παράγεται με γαλακτική ζύμωση του γάλακτος με τη δράση του *Lactobacillus bulgaricus* και του *Streptococcus thermophilus*. Οι μικροοργανισμοί αυτοί πρέπει να είναι στο τελικό προϊόν άφθονοι και ζωντανοί» (FAO/WHO, 2011).

1.3 Παρασκευή γιαουρτιού

1.3.1 Προετοιμασία γάλακτος για την παρασκευή γιαουρτιού

Το γάλα που προορίζεται για παραγωγή πρέπει πρώτα να απαλλαγεί από τυχόν ξένες ουσίες που μπορεί να περιέχει. Υπάρχουν διάφοροι τρόποι καθαρισμού του γάλακτος, όπως φιλτράρισμα, φυγοκέντρηση και μικροδιήθηση. Ωστόσο, κατά την παραγωγή

γιαουρτιού, η χρήση αυτών των μεθόδων συνήθως δεν είναι απαραίτητη, καθώς η θερμική επεξεργασία που ακολουθεί είναι επαρκής για την εξάλειψη των παθογόνων μικροοργανισμών που ενδέχεται να υπάρχουν στο γάλα (Tamime and Robinson, 1999).

1.3.2 Θερμική Επεξεργασία

Οι θερμοκρασίες θέρμανσης γάλακτος ποικίλουν ευρέως. Σύμφωνα, με τον Πίνακα 1.1 αναγράφονται λεπτομερώς οι τύποι παστερίωσης σε συγκεκριμένη θερμοκρασία και τους αντίστοιχους χρόνους.

Πίνακας 1.1: Συνδυασμοί χρόνου-θερμοκρασίας για παστερίωση γάλακτος (FDA, 2011).

Τύπος παστερίωσης	Επεξεργασία	Θερμοκρασία	Χρόνος
Χαμηλή Θερμοκρασία Μεγάλος Χρόνος (LTLT)	Κατά παρτίδες	62.8	30 min
Υψηλή Θερμοκρασία Μικρός Χρόνος (HTST)	Συνεχούς	71.7	15 s
Υψηλότερη Θερμοκρασία Μικρότερος Χρόνος (HHST)	Συνεχούς	88.3	1 s
Υψηλή παστερίωση	Συνεχούς	137.8	2 s
Αποστείρωση(UHT)	Ασηπτικές	135-150	4-15 s

1.3.3 Εμβολιασμός και Επώαση

Κατά την παρασκευή του γιαουρτιού, το θερμικά επεξεργασμένο γάλα ψύχεται στη θερμοκρασία επώασης της καλλιέργειας εκκίνησης (*S. thermophilus* και *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*), το γάλα ζυμώνεται στους 40-45°C, η οποία είναι η βέλτιστη συνθήκη ανάπτυξης για τη μικτή καλλιέργεια. Σε μερικές περιπτώσεις η περίοδος επώασης μπορεί να είναι πολύ σύντομη, περίπου 2-21 ώρες. Από την άλλη, η μακρύτερη μέθοδος επώασης είναι σε συνθήκες 30°C για περίπου 16-18 ώρες ή μέχρι να επιτευχθεί η επιθυμητή οξύτητα (Tamime & Robinson, 1999). Αμέσως μετά τον εμβολιασμό, η επώαση μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε σε χωριστά για την παραγωγή συνεκτικού (set) γιαουρτιού, είτε μέσα στην δεξαμενή για την παρασκευή αναμειγμένου (stirred) γιαουρτιού. (Tamime & Robinson, 1999, Tamime, 2006).

1.3.4 Ψύξη και Συντήρηση

Η ψύξη είναι μια από τις δημοφιλέστερες μεθόδους που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο της μεταβολικής δραστηριότητας της καλλιέργειας εκκίνησης και των ένζυμων της. Όταν, το προϊόν φτάσει στην επιθυμητή οξύτητα pH 4,6 ή 0,9% γαλακτικό οξύ, ξεκινά η ψύξη του. Επειδή, οι μικροοργανισμοί του γιαουρτιού δυσκολεύονται να αναπτυχθούν γύρω στους 10°C, ο πρωταρχικός στόχος της ψύξης είναι να μειωθεί η θερμοκρασία του πηγματος από 30-45°C σε <10°C όσο τον δυνατόν γρηγορότερα για να ελέγχεται η περαιτέρω ανάπτυξη οξέων (Tamime and Robinson, 1999). Έπειτα, το γιαούρτι μεταφέρεται σε ψυκτικούς θαλάμους ή σε σήραγγες ψύξης και η διαδικασία περιλαμβάνει ψύξη σε ένα στάδιο ή σε δύο στάδια (Tamime & Robinson, 1999; Lee and Lucey, 2010). Το γιαούρτι ψύχεται από την θερμοκρασία επώασης του στους 20°C σε βιομηχανικά ψυγεία ή με ψυχρό αέρα σε τούνελ, σε εναλλάκτες θερμότητας ή με κρύο νερό σε δεξαμενές και συντηρείται σε θερμοκρασία μικρότερη των 5°C. Για να ανασταλεί η όξυνση του προϊόντος, πρέπει η μείωση της θερμοκρασίας να γίνει σε γρήγορο χρόνο για να διατηρηθεί το επιθυμητό pH (4,0-4,6) κάτι που επιτυγχάνεται συνήθως σε 2 ώρες. Με τον συνδυασμό της θερμοκρασίας συντήρησης και την συγκέντρωση της οξύτητας, η δραστηριότητα των οξυγαλακτικών βακτηρίων περιορίζεται σημαντικά (Καμιναρίδης και Μοάτσου 2009; Corrieu and Beal, 2016). Ανάλογα με το παραγόμενο γιαούρτι ο χρόνος συντήρησης παρουσιάζει διακυμάνσεις. Αν μετά την πήξη θερμανθεί στους 60-65°C για μερικά δευτερόλεπτα μέχρι και λίγα λεπτά, επιτυγχάνεται η επιμήκυνση του χρόνου συντήρησης. Με αυτή την μέθοδο, οι μικροοργανισμοί της καλλιέργειας και τα ένζυμα αδρανοποιούνται, παρατείνοντας τη διάρκεια συντήρησης του προϊόντος για μερικές εβδομάδες. Ωστόσο, αυτή η επεξεργασία καθιστά το προϊόν ασύμβατο με τον ορισμό του γιαουρτιού που παρέχει ο Κώδικας Τροφίμων και Ποτών, καθώς και με τον ορισμό των ζυμούμενων γαλακτοκομικών προϊόντων σύμφωνα με τον FAO (Μάντης και συν., 2015).

1.4 Τύποι Γιαουρτιού

Οι τύποι γιαουρτιού μπορούν να διακριθούν βάσει τριών κύριων κριτηρίων: της πρώτης ύλης, της σύστασης σε λιπαρά και τον τρόπο παρασκευής. Στην Ελλάδα, το γάλα που χρησιμοποιείται για την παραγωγή γιαουρτιού προέρχεται κυρίως από αγελαδινό, κατσικίσιο και πρόβειο γάλα. Ανάλογα με την προέλευση του γάλακτος,

όπως φαίνεται στον Πίνακα 1.2, παρατηρείται διαφορετική σύσταση των συστατικών των γιαουρτιών, επηρεάζοντας έτσι και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους.

Πίνακας 1.2: Σύσταση του γάλακτος διαφόρων θηλαστικών (% κατά βάρος) (Chandan 2006).

Προέλευση Γάλακτος	Αγελαδινό	Κατσικίσιο	Πρόβειο
Νερό	87,4	87,0	81,6
Λιπαρά	3,9	4,5	7,5
Πρωτεΐνη	3,3	3,3	10,3
Λακτόζη	4,7	4,6	2,7
Τέφρα	0,7	0,6	1,4

Το είδος του γιαουρτιού που θα παρασκευαστεί εξαρτάται από το είδος του γάλακτος που θα χρησιμοποιηθεί. Για παράδειγμα, για την παρασκευή ενός πλήρους γιαουρτιού θα χρειαστεί πλήρες γάλα, ενώ αντιθέτως για την παρασκευή χαμηλών λιπαρών γιαουρτιού και άπαχου γιαουρτιού θα χρησιμοποιηθεί μερικώς αποβουτυρωμένο γάλα ή αποβουτυρωμένο γάλα, αντίστοιχα (Weerathilake et al, 2014). Τέλος, η ταξινόμηση με βάση τον τρόπο παραγωγής τους γίνεται ως εξής: Παραδοσιακό, Βιομηχανικό και Στραγγισμένο Γιαούρτι.

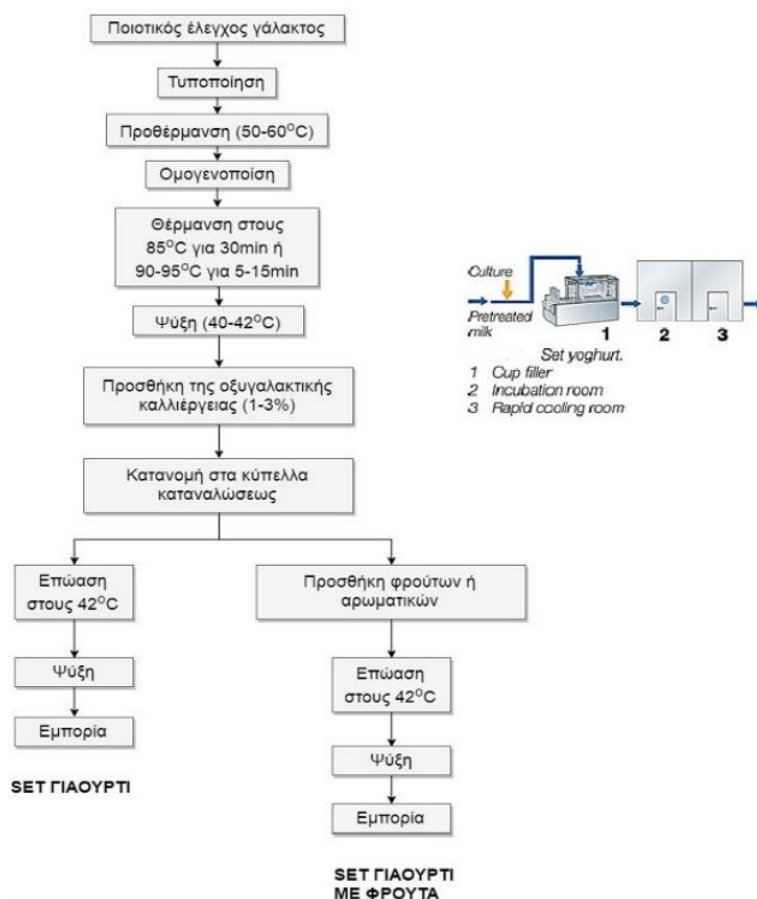
1.4.1 Παραδοσιακό Γιαούρτι

Το παραδοσιακό γιαούρτι είναι εκείνο που φέρει στην επιφάνειά του μια επιδερμίδα (πέτσα), η οποία οφείλεται στην παρασκευή του από βρασμένο νωπό ή παστεριωμένο γάλα, χωρίς προηγούμενη τυποποίηση και ομογενοποίηση. Το γάλα βράζει μέχρι μείωσης του αρχικού όγκου κατά δύο τρίτα. Έπειτα, αυτό διαμοιράζεται σε περιέκτες και αφήνεται σε ηρεμία χωρίς ανάδευση, μέχρι να δημιουργηθεί η στοιβάδα λιποσφαιρίων (πέτσα). Όταν η θερμοκρασία φτάσει στους 45°C, προστίθεται μικρή ποσότητα μαγιάς και γιαουρτιού που είχε παρασκευαστεί την προηγούμενη ημέρα, χρησιμοποιούμενη ως καλλιέργεια εκκίνησης. Στη συνέχεια, το γιαούρτι ωριμάζει σε θερμοκρασία 30-40°C και τέλος ψύχεται και αποθηκεύεται στο ψυγείο σε θερμοκρασία κάτω των 7°C. (Tamime and Deeth 1980, Μάντης και συν., 2000).

1.4.2 Βιομηχανικό Γιαούρτι

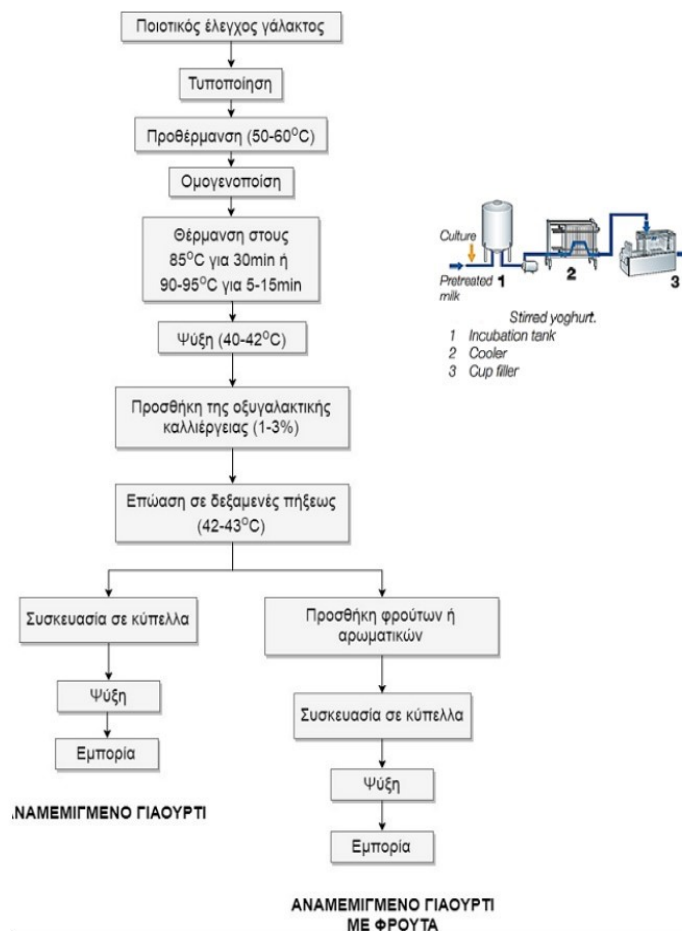
Παγκοσμίως υπάρχουν δύο μεγάλες κατηγορίες βιομηχανικού γιαουρτιού, οι οποίες διακρίνονται ως εξής: στερεή ή συνεκτική δομή (τύπου set) και αναμεμιγμένη ή

ημίρρευστη δομή (τύπου stirred). Στην Ελλάδα, το συνεκτικό γιαούρτι, γνωστό και ως "τύπου set", όπου θα ασχοληθούμε και στο παρόν πείραμα, παράγεται είτε ως φυσικό είτε με προσθήκη φρούτων (γνωστό και ως επιδόρπιο γιαούρτι). Στην επιφάνεια του δεν αναπτύσσεται επιδερμίδα (πέτσα), καθώς το γάλα ομογενοποιείται. Η διαδικασία επώασης και ψύξης λαμβάνει χώρα εντός της τελικής συσκευασίας (σε ερμητικώς κλειστά κύπελλα), διατηρώντας το πήγμα ανέπαφο (Sfakianakis and Tzia, 2014). Αναλυτικότερα, τα στάδια παραγωγής δίνονται στο Διάγραμμα 1.1.



Διάγραμμα 1.1 Διάγραμμα ροής παραγωγής συνεκτικού γιαουρτιού (Κεχαγιάς 1997, Sfakianakis and Tzia, 2014; Lee and Lucey, 2010; Μάντης και συν., 2000).

Αντιθέτως, στην αναμεμιγμένη τύπου Γιαουρτιού (Τύπου stirred), η επώαση γίνεται σε δεξαμενές πήξεως. Ακολουθεί θραύση του πήγματος, ψύξη και συσκευασία σε περιέκτες και αποθήκευση σε θερμοκρασία συντήρησης (Sfakianakis and Tzia, 2014). Το κύριο χαρακτηριστικό αυτού του τύπου γιαουρτιού είναι το αυξημένο ιξώδες που επιτυγχάνεται με pH πήγματος στο 4,3-4,4 και ανάδευση στους 0-7°C. Σε αυτό το τύπου γιαουρτιού, προστίθενται και άλλα συστατικά, όπως φρούτα ή χυμός φρούτων και ζάχαρη (Κεχαγιάς, 1977). Αναλυτικότερα τα στάδια παραγωγής δίνονται στο διάγραμμα 1.2 (Lee and Lucey, 2010; Μάντης και συν., 2000).



Διάγραμμα 1.2 Διάγραμμα ροής παραγωγής αναμεμιγμένου γιαουρτιού (stirred yoghurt) (Μάντης και συν., 2000).

1.4.3 Στραγγιστό Γιαούρτι

Σύμφωνα με τον Κώδικα Τροφίμων και Ποτών (2016) ως «Στραγγιστό γιαούρτι χαρακτηρίζεται το προϊόν που λαμβάνεται από το πλήρες γιαούρτι μετά από απομάκρυνση (αποστράγγιση) μέρους του ορού μετά την πήξη και έχει κατ' ελάχιστο 5,6% πρωτεΐνες για το αγελαδινό ή γίδινο γάλα και 8% για το πρόβειο γάλα». Με την ολοκλήρωση της ζύμωσης ακολουθεί απομάκρυνση του ορού γάλακτος με σκοπό την πήξη του. Η απομάκρυνση του ορού γάλακτος, γίνεται με στράγγιση του γιαουρτιού σε παραδοσιακούς υφασμάτινους σάκους (τουλπάνι) στους 4°C. Οι σύγχρονοι μέθοδοι περιλαμβάνουν τη φυγοκέντρωση και τη συμπύκνωση του γάλατος με υπερδιήθηση πριν την πήξη του (χρήση ημιπερατών μεμβρανών που κατακρατούν το λίπος και τις πρωτεΐνες). Έτσι γίνεται αποβουτύρωση του γάλακτος και θέρμανση στους 90-95°C/10-5 min. Ακολουθεί ψύξη στους 47-50°C και συμπύκνωση με σύστημα υπερδιήθησεως (ultra-filtration) (Μάντης και συν., 2000; Κεχαγιάς 1997).

1.5 Θρεπτική αξία του γιαουρτιού

Η χημική σύσταση του γιαουρτιού που παρασκευάζεται από πλήρες γάλα είναι παρόμοια με εκείνη του γάλακτος που χρησιμοποιείται για την παραγωγή του. Ωστόσο, η χημική ανάλυση αποκαλύπτει σημαντικές διαφορές, οι οποίες οφείλονται κυρίως στην επίδραση της θερμικής επεξεργασίας και στη βιοχημική δραστηριότητα των οξυγαλακτικών βακτηρίων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, να υπάρχουν αυξομειώσεις κάποιων συστατικών του γάλακτος σύμφωνα και με τον Πίνακα 1.2, ενώ παράλληλα παράγονται και νέα προϊόντα ζύμωσης (Tamime & Robinson, 1999, Μάντης και συν., 2000, Nakazawa & Hosono 1992, Walstra et al., 2006).

Πίνακας 1.3: Θρεπτική αξία συνεκτικού γιαουρτιού (Yildiz, 2009).

Είδος γιαουρτιού	Ενέργεια (kcal)	Νερό (g)	Υδατάνθρακες (g)	Λιπαρά (g)	Πρωτεΐνες (g)
Πλήρες	79	81,9	7,8	3,0	5,7
Χαμηλών λιπαρών	56-63	87,2	7,0-7,4	1,0-1,6	3,0-4,8
Χωρίς λιπαρά	54	86,9	8,2	0,2	5,4
Χωρίς λιπαρά – με φρούτα	47	85,4	7,0	0,2	4,8

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΑ

2.1 Προβιοτικά

Η λέξη «προβιοτικό» (προέλευση: από το λατινικό pro που σημαίνει «για» και το ελληνικό bios που σημαίνει «ζωή») χρησιμοποιήθηκε για κάθε ουσία ή οργανισμό που προάγει την ποιότητα της υγείας του ξενιστή (Fatemeh Zendeboodi et al., 2020). Ο πιο διαδεδομένος και αποδεκτός ορισμός είναι αυτός που προτάθηκε από μια κοινή επιτροπή επιστημόνων του Παγκόσμιου Οργανισμού Τροφίμων (FAO) και του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO) (FAO/WHO, 2001) που καθιέρωσαν ότι ως «προβιοτικά» χαρακτηρίζονται οι «ζωντανοί μικροοργανισμοί που, όταν χορηγούνται σε αρκετές ποσότητες, αποφέρουν όφελος για την υγεία του ξενιστή». Τα προβιοτικά των τροφίμων, ως ζωντανοί και μη παθογόνοι μικροοργανισμοί, όταν χορηγούνται από το στόμα, θα πρέπει να επιβιώσουν μέχρι να φτάσουν στο σημείο της γαστρεντερικής οδού όπου ασκούν το επιδιωκόμενο αποτέλεσμα το οποίο είναι να επιδρούν θετικά στην υγεία και να βελτιώνουν την ισορροπία των βακτηρίων στο έντερο (Gasbarrini et al., 2016). Τα προβιοτικά πρέπει να αντιστέκονται στα ένζυμα που περιέχονται στο σάλιο και στο λεπτό έντερο, στα οξέα του στομάχου, καθώς και στις μεταβολές του pH λόγω της κατανάλωσης τροφίμων και ποτών κατά τη διάρκεια της διέλευσής τους κατά μήκος του γαστρεντερικού σωλήνα. Εξίσου, σημαντική είναι η ιδιότητα να ανταγωνίζονται τη μικροβιακή χλωρίδα (Binns, 2013). Αυτό επιτυγχάνεται με την ανταγωνιστική δράση κατά των παθογόνων βακτηρίων, εμποδίζοντας τα να εγκατασταθούν, καταλαμβάνοντας τους υποδοχείς των κυττάρων του εντέρου και καταναλώνοντας τα θρεπτικά συστατικά που θα χρησιμοποιούσαν τα παθογόνα. Για να επιτευχθεί αυτό, τα προβιοτικά πρέπει να προσκολλώνται στα τοιχώματα της βλεννογόνου μεμβράνης του εντέρου, αυξάνοντας τον αριθμό τους σε σχέση με τα παθογόνα βακτήρια. Έτσι εξασφαλίζεται η ισορροπία της εντερικής μικροχλωρίδας, λόγω της έκκρισης αντιβακτηριακών πεπτιδίων (Parvez et al., 2006, Thantsha et al., 2012). Παράλληλα, η λέξη «πρεβιοτικό» καθορίστηκε για πρώτη φορά το 1995 από τους Gibson και Roberfoid, οι οποίοι αντικατέστησαν το πρόθεμα «προ» της λέξης «προβιοτικά» με το ελληνικό πρόθεμα «πρε», για να περιγράψουν τα μη αφομοιώσιμα συστατικά τροφίμων που επηρεάζουν ευεργετικά τον ξενιστή, διεγείροντας εκλεκτικά την ανάπτυξη και/ή τη δραστηριότητα ενός ή περισσότερων συγκεκριμένων βακτηρίων στο κόλον, βελτιώνοντας έτσι την υγεία του ξενιστή. Αυτός ο ορισμός αναθεωρήθηκε το 2004, όποτε και ορίστηκε ότι «ένα πρεβιοτικό

είναι ένα επιλεκτικά ζυμώμενο συστατικό που επιφέρει συγκεκριμένες μεταβολές τόσο στη σύνθεση όσο και/ή στη δραστηριότητα της γαστρεντερικής μικροχλωρίδας, προσδίδοντας οφέλη στην υγεία του ξενιστή» (Gibson et al., 2004)

2.1.1 Ταξινόμηση Προβιοτικών

Τα προβιοτικά ταξινομούνται κυρίως σε μορφή βακτηρίων, ζύμης ή μυκήτων, με τα γαλακτικά βακτήρια (Lactic Acid Bacteria, LAB) να κυριαρχούν, τα οποία κατατάσσονται σε διάφορα γένη και είδη όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.1. Τα γαλακτικά βακτήρια ανήκουν σε μία ετερογενή ομάδα θετικών κατά Gram βακτηρίων, με το γαλακτικό οξύ να αποτελεί το κύριο προϊόν ζύμωσής τους από υδατάνθρακες. Τα πιο μελετημένα προβιοτικά ανήκουν κυρίως στα γένη *Lactobacillus* και *Bifidobacterium* (με έντονες αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες), ενώ χρησιμοποιείται επίσης ο *Saccharomyces cerevisiae* και μερικά είδη των *Escherichia coli* και *Bacillus* (Alok et al., 2017).

Πίνακας 2.1: Μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται ως προβιοτικά (Georgieva et al., 2014).

Lactobacillus		Bifidobacterium	
<i>L. acidophilus</i> <i>L. casei</i> <i>L. reuteri</i> <i>L. bulgaricus</i>	<i>L. plantarum</i> <i>L. johnsonii</i> <i>L. lactis</i>	<i>B. bifidum</i> <i>B. longum</i> <i>B. brevis</i>	<i>B. infantis</i> <i>B. lactis</i> <i>B. adolescentis</i>
Άλλα	<i>Bacillus cereus</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Streptococcus thermophilus</i>	

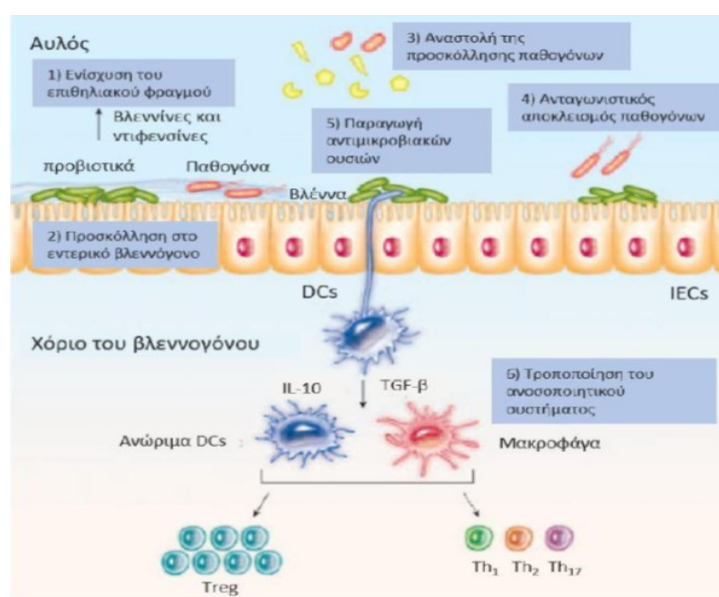
2.1.2 Μηχανισμοί δράσης προβιοτικών και ευεργετικές ιδιότητες στην υγεία του ξενιστή

Οι μηχανισμοί με όπως οποίους δρουν οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί για το κάθε στέλεχος είναι ειδικοί και καθορίζουν όπως ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία του ξενιστή. Τα προβιοτικά, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην εξισορρόπηση του ανοσοποιητικού στον γαστρεντερικό σωλήνα μέσω όπως αλληλεπίδρασης με τα κύτταρα του ανοσοποιητικού. Με αυτόν τον τρόπο, συμβάλλουν στην αντιμετώπιση όπως «δυσβίωσης», αντικαθιστώντας την επιβλαβή μικροχλωρίδα με ευεργετικούς μικροοργανισμούς. Οι κύριοι μηχανισμοί, όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 2.1, περιλαμβάνουν την ενίσχυση του επιθηλιακού φραγμού (προστατεύοντας τον

οργανισμό από το περιβάλλον), την προσκόλληση στον εντερικό βλεννογόνο, τον ανταγωνιστικό αποκλεισμό παθογόνων μικροβίων, την παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών (όπως το γαλακτικό οξύ) και την τροποποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή. Επιπλέον, τα προβιοτικά βακτήρια μπορούν να ασκήσουν ανοσοτροποποιητική δράση μέσω όπως αλληλεπίδρασης όπως με εντερικά επιθηλιακά κύτταρα (IECs) και δενδριτικά κύτταρα (Sharifi-Rad et al., 2020; Bermudez-Brito et al., 2012).

Πίνακας 2.2: Ευεργετικές επιδράσεις των προβιοτικών στην υγεία (Sharifi-Rad et al., 2020).

Μικροχλωρίδα	Ευεργετικές Επιδράσεις	Αναφορά
Στελέχη γαλακτοβάκιλλων	Ανακούφιση των συμπτωμάτων από τη δυσανεξία στη λακτόζη	Wilt et al. (2010)
<i>L. acidophilus</i>	1. Μειωμένα επίπεδα χοληστερόλης ορού 2. Συντήρηση της φυσιολογικής εντερικής μικροχλωρίδας	1. Nazir et al. (2018) 2. Narayan et al. (2010)
<i>L. plantarum</i>	Μείωση της συχνότητας εμφάνισης των υδαρών κοπράνων σε παιδιά	Olek et al. (2017)
<i>L. reuteri</i>	Μείωση της διάρκειας συμπτωμάτων της οξείας γαστρεντερίτιδας	Marteau et al. (2001)
<i>L. rhamnosus</i>	Διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος	Reid et al. (2003)
<i>L. salivarius</i>	Καταστολή και εκρίζωση του ελικοβακτηριδίου του πυλωρού σε καλλιέργειες ιστών και ζωικά μοντέλα με έκκριση γαλακτικού οξέος	Lü et al. (2016)
Είδη <i>Bacteroides</i>	Μείωση εμφάνισης χρόνιας κολίτιδας, γαστρίτιδας, αρθρίτιδας.	Li et al, (2020)



Εικόνα 2.1: Μηχανισμοί δράσης των προβιοτικών (Bermudez-Brito et al., 2012).

Η χρήση προβιοτικών όπως απεικονίζεται και στο Πίνακα 2.2. παρέχει πολλά οφέλη σε παθολογικές καταστάσεις του γαστρεντερικού συστήματος καθώς και σε διαταραχές άλλων συστημάτων, όπως για παράδειγμα οι διαταραχές μεταβολισμού, ανοσολογικές διαταραχές ή διαταραχές του ψυχισμού.

2.2 Εφαρμογές πρεβιοτικών στα τρόφιμα

Λόγω των τεχνολογικών τους χαρακτηριστικών, ορισμένα πρεβιοτικά όπως οι μη εύπεπτοι υδατάνθρακες μπορούν να οδηγήσουν σε βελτιώσεις στην ποιότητα των τελικών προϊόντων όσον αφορά τις οργανοληπτικές ιδιότητες, την υφή και τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά. Αυτές οι βελτιώσεις επιτυγχάνονται με την προσθήκη ινών και τη μερική αντικατάσταση σακχάρων και λιπών. Ο Πίνακας 2.3 δείχνει παραδείγματα εφαρμογών των πρεβιοτικών σε τρόφιμα (Glisic et al., 2019).

Πίνακας 2.3: Εφαρμογές πρεβιοτικών στα τρόφιμα.

Πρεβιοτικό	Τρόφιμα/Περιγραφή	Κύρια Αποτελέσματα	Αναφορά
Ινουλίνη, FOS και λακτουλόζη	Προσθήκη προβιοτικών και πρεβιοτικών στο τυρί κρέμα	Βελτίωση βιωσιμότητας προβιοτικών κυττάρων κατά την αποθήκευση	Speranza et al. (2018)
Ινουλίνη, FOS, GOS, ανθεκτικό άμυλο, διαιτητικός ολιγοσακχαρίτης καλαμποκιού και πολυδεξτρόζη	Προσθήκη πρεβιοτικών σε παγωτό από πρόβειο γάλα	Βελτίωση αισθητηριακών ιδιοτήτων, μικρότερο μέγεθος κρυστάλλων πάγου και μείωση του χρόνου τήξης	Balthazar et al. (2017)
Φρουκτάνες αγαύης, ινουλίνη και FOS	Αφυδατωμένη μήτρα μήλου	Βελτίωση φυσικοχημικών ιδιοτήτων, καλύτερη αισθητηριακή αποδοχή	Gonzalez-Herrera et al. (2016)
Ινουλίνη και FOS	Μύρτιλλα επικαλυμμένα με αλγινικό που περιέχει φρουκτοολιγοσακχαρίτες και προβιοτικούς γαλακτοβάκιλλους	Βελτίωση της διατήρησης βιωσιμότητας των προβιοτικών	Bambace et al. (2019)
FOS	Βιολογικό γιαούρτι με προσθήκη αλευριού από φλούδα σταφυλιού, πρεβιοτικό και χυμό	Αύξηση περιεκτικότητας σε φυτικές ίνες και συνολικού περιεχομένου φαινολών.	Karnopp et al. (2017)
Λακτουλόζη	Εφαρμογή πρεβιοτικών και προβιοτικών στην παρασκευή αλλαντικών που έχουν υποστεί ξηρή ζύμωση	Διατήρηση φυσικής και αισθητηριακής ποιότητας	Coelho et al. (2019)
FOS, GOS και λακτουλόζη	Γιαούρτι	Αύξηση του πληθυσμού των προβιοτικών μικροοργανισμών.	Delgado-Fernandez et al. (2019)

2.3 Στέλεχος *L. casei* ATCC 393

Ο *Lactobacillus casei* είναι ένα από τα πολλά είδη βακτηρίων του γένους *Lactobacillus*. Πρόκειται για ένα μεσόφιλο, Gram θετικό, ραβδωτού σχήματος, μη σπορογόνο και αναερόβιο βακτήριο, του οποίου το κυτταρικό τοίχωμα περιέχει τειχοϊκά οξέα, τα οποία συμβάλουν στην δομική σταθερότητα και την προστασία του από το περιβάλλον, και εντοπίζεται σε ζυμωμένα γαλακτοκομικά προϊόντα (Holzapfel et al., 2001; Sumrall et al., 2020). Το βέλτιστο pH για την ανάπτυξη του *L. casei* είναι 5,5. Επίσης, παράγει γαλακτικό οξύ το οποίο παρεμποδίζει την ανάπτυξη επιβλαβών βακτηρίων διότι δημιουργείται χαμηλότερο επίπεδο pH (Mishra and Prasad, 2005).



Εικόνα 2.2: *Lactobacillus casei* (<https://fineartamerica.com/featured/1-lactobacillus-casei-shirotabacteria-sem-science-photo-library.html?product=greeting-card>).

Ο *L. casei* βρίσκεται φυσικά σε βιομηχανικά τρόφιμα (π.χ. τυρί, κρασί, τουρσί) και είναι το στέλεχος που χρησιμοποιείται πιο συχνά ως προβιοτικό. Μπορεί να προσφέρει πολλά ευεργετικά αποτελέσματα στον ανθρώπινο οργανισμό, καθώς αποτελεί μέρος τόσο του αναπαραγωγικού όσο και του γαστρεντερικού σωλήνα (Aktas et al., 2016).

2.3.1 Ευεργετικές ιδιότητες του *L. casei* στην υγεία και εφαρμογές σε γαλακτοκομικά προϊόντα

Ο *L. casei* έχει αναφερθεί να συμβάλλει στην υγεία σε μια ευρεία ποικιλία παθήσεων, από ατοπική δερματίτιδα έως καρκίνο. Οι μηχανισμοί που επιτρέπουν σε αυτά τα βακτήρια να έχουν ευεργετική επίδραση στην ανθρώπινη υγεία περιλαμβάνουν την παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών, όπως οι βακτηριοσίνες, την ενίσχυση του επιθηλιακού φραγμού μέσω της προσκόλλησης, τον ανταγωνισμό για παθογόνες θέσεις δέσμευσης και τη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος (Bermudez-Brito et al., 2012). Επιπλέον, η μέθοδος επεξεργασίας και συμπερίληψης αυτών των στελεχών έχει τραβήξει το ενδιαφέρον, όπως στην περίπτωση της μήτρας χορήγησης,

που έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζει τα αποτελέσματα του *L. casei* BL23 στη θεραπεία της κολίτιδας (Lee et al., 2015). Ο *L. casei* ATCC 393 είναι πολύ γνωστό προβιοτικό στέλεχος με πολλές εφαρμογές στην παραγωγή τροφίμων. Έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία ως εκκίνηση ή ως συμπληρωματική καλλιέργεια για την παραγωγή πολλών γαλακτοκομικών προϊόντων, όπως το ζυμωμένο γάλα, το γιαούρτι και το τυρί (Abdel-Hamid et al., 2019). Μελέτες δείχνουν πως ο *L. casei* μπορεί να μειώσει τα επίπεδα της χοληστερόλης (Lye et al., 2010), καθώς και να συμβάλλει στην καταπολέμηση του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων (Choi et al., 2006) και οστεοπόρωσης (Lye et al., 2010). Σε in vitro πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε αρουραίους ανιχνεύθηκαν στα κόπρανα τους ο *L. casei*, τεκμηριώνοντας πως το στέλεχος επέζησε της διέλευσης από το στομάχι και το έντερο (Sidira et al., 2010).

3.1 Ορισμός Φυτικών Ίνών και Προέλευση

Η έννοια των φυτικών ινών πρωτοεισήχθη από τον Hispley το 1953, ο οποίος τις περιέγραψε ως τμήματα των φυτών που δεν υποβάλλονται σε πέψη και συνιστούν τη δομή των κυττάρων, περιλαμβάνοντας ουσίες όπως η κυτταρίνη, η ημικυτταρίνη και η λιγνίνη. Στην δεκαετία του 1970, η έννοια αυτή επεκτάθηκε ώστε να συμπεριλάβει και άλλους μη αφομοιώσιμους υδατάνθρακες. Συγκεκριμένα, το 1976, η ομάδα του Trowell πρότεινε την προσθήκη στον ορισμό όλων των πολυσακχαριτών που δεν υπόκειται σε πέψη, όπως η κυτταρίνη, η ημικυτταρίνη, τα κόμμεα, η πηκτίνη, οι ολιγοσακχαρίτες και η λιγνίνη. Με την πάροδο των χρόνων, η ανάλυση και η έρευνα γύρω από τις φυτικές ίνες βελτιώθηκαν, με τον ορισμό τους να ενσωματώνει και τις φυσιολογικές τους επιδράσεις. Κατά συνέπεια, οι φυτικές ίνες ορίζονται ως φυτικοί πολυσακχαρίτες και λιγνίνες που είναι ανθεκτικές στην υδρόλυση από τα πεπτικά ένζυμα του ανθρώπου (Trowell et al., 1976). Το 1990, ο Stear επανέλαβε ότι οι φυτικές ίνες αποτελούν τμήματα φυτικών κυττάρων που δεν υπόκεινται σε πέψη, αποτελούμενα κυρίως από κυτταρίνη και λιγνίνη, αλλά και από άλλους υδατάνθρακες. Παράλληλα, ο Prosky και οι συνεργάτες του (2001) προσδιόρισαν έναν πιο λεπτομερή ορισμό, περιγράφοντας τις φυτικές ίνες ως το βρώσιμο τμήμα των φυτών ή των εκχυλισμάτων τους, καθώς και συνθετικά ανάλογα, τα οποία είναι ανθεκτικά στην πέψη και την απορρόφηση στο λεπτό, με πλήρη ή μερική ζύμωση να γίνεται στο παχύ έντερο (Flamm et al., 2001). Σύμφωνα με τον FAO/WHO, «φυτικές ίνες είναι πολυμερή υδατανθράκων με βαθμό πολυμερισμού ($DP > 3$), τα οποία δεν πέπτονται ούτε απορροφώνται από το λεπτό έντερο. Ο ορισμός αυτός αποκλείει τους μονοσακχαρίτες και δισακχαρίτες και περιλαμβάνει: α) τα εδώδιμα πολυμερή υδατανθράκων που βρίσκονται φυσικά στα τρόφιμα, β) τα πολυμερή υδατανθράκων που προκύπτουν από την επεξεργασία πρώτων υλών των τροφίμων με φυσικά, ενζυμικά ή χημικά μέσα, και γ) τα συνθετικά πολυμερή υδατανθράκων» (FAO/WHO, 2006). Η έλλειψη ενός διεθνούς αποδεκτού ορισμού για τις φυτικές ίνες έχει αντιφατικές απόψεις εντός της επιστημονικής κοινότητας. Ορισμένοι ερευνητές εκφράζουν διαφορετικές απόψεις σχετικά με το αν οι φυτικές ίνες πρέπει να παραμένουν αμετάβλητες μέσα στα τρόφιμα ή αν μπορούν να εκχυλιστούν και να υποβληθούν σε επεξεργασία στα εργαστήρια, διατηρώντας παράλληλα τα χαρακτηριστικά τους ως φυτικές ίνες. Αυτή η συζήτηση βασίζεται στο γεγονός ότι,

παρά την υπάρχουσα έρευνα σχετικά με τις φυσιολογικές επιδράσεις και τα πιθανά αποτελέσματα των φυτικών ινών για την υγεία, δεν είναι πλήρως κατανοητό πώς η επεξεργασία ή η εξαγωγή αυτών των ινών μπορεί να επηρεάσει τις ωφέλιμες ιδιότητές τους. Επιπλέον, η έλλειψη ενός ενιαίου ορισμού για τις φυτικές ίνες προκαλεί ποικίλες ερμηνείες και εφαρμογές των προσφάτων επιστημονικών ορισμών, γεγονός που συμβάλλει σε ασάφειες και διαφορετικές προσεγγίσεις στη μελέτη και χρήση τους (Lupton and Trumbo, 2006).

3.2 Φυτικές Ίνες και Υγεία Εντέρου

Οι ίνες αποτελούνται από μία σειρά μορίων με διαφορετικές ιδιότητες όσον αφορά τη διαλυτότητα, το ιξώδες και τη δυνατότητα ζύμωσης (Gill et al., 2021). Οι μη ζυμώσιμες ίνες φτάνουν αναλλοίωτες στο κατώτερο έντερο, ενώ οι παχύρρευστες ίνες συγκρατούν περισσότερο νερό και έχουν ισχυρή επίδραση στον όγκο των κοπράνων (Chaplin, 2003). Η αύξηση του όγκου αυτών προκαλεί περαιτέρω διάταση του εντέρου και πυροδοτεί τον περισταλτισμό (φυσιολογική κίνηση των μυών του εντέρου που βοηθά στη μεταφορά τροφίμων και αποβολή απόβλητων από το σώμα) (Brownlee, 2011). Οι ζυμώσιμες ίνες αυξάνουν την πληθυσμιακή πυκνότητα της μικροβιακής κοινότητας στο εντερικό σύστημα και αυξάνουν την παραγωγή λιπαρών οξέων βραχείας αλυσίδας (SCFA). Αυτό αυξάνει την περιεκτικότητα σε νερό (Eswaran et al., 2013) των κοπράνων, οδηγώντας σε πιο μαλακή υφή. Πολλές μελέτες έχουν αναφέρει ότι τρόφιμα πλούσια σε φυτικές ίνες μειώνουν το χρόνο που απαιτείται για τη διέλευση του πεπτικού συστήματος (Lupton et al., 1993).

3.2.1 Ζύμωση Ινών και Μικροχλωρίδα Εντέρου

Η ανθρώπινη εντερική κοινότητα φιλοξενεί μια πολύ περίπλοκη βακτηριακή κοινότητα στο παχύ έντερο που αποτελείται από 500 έως και 1000 διαφορετικά είδη παρουσιάζοντας σημαντική ποικιλομορφία μεταξύ των ατόμων. Οι φυτικές ίνες που φτάνουν στο κόλον υφίστανται εκτεταμένη ζύμωση από την μικροχλωρίδα και αποτελούν το κύριο καύσιμο για αυτήν (Flint et al., 2012). Η μικροχλωρίδα του εντέρου διαθέτει ένα ευρύ φάσμα ενζύμων αποικοδόμησης πολυσακχαριτών (CAZymes), που συμπληρώνουν με μεγάλο βαθμό αυτά που εκφράζονται από τον ανθρώπινο ξενιστή (Kurokawa et al., 2007). Η μικροβιακή χλωρίδα μπορεί επομένως να θεωρηθεί ως «πεπτικός συνεργάτης» ή «πρόσθετο πεπτικό όργανο», το οποίο έχει εξελιχθεί μαζί με τον ανθρώπινο ξενιστή και επιτρέπει σε αυτόν να εκμεταλλευτεί

συστατικά τροφής που διαφορετικά θα απορρίπτονταν ως απόβλητα (Tuhooy et al., 2012). Η πολύπλοκη αλληλεπίδραση μεταξύ της διατροφής, της μικροχλωρίδας και της υγείας απεικονίζεται σχηματικά στην Εικόνα 3.1. Η μικροβιακή κοινότητα που κατοικεί στο ανθρώπινο παχύ έντερο είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της ανοσολογικής ομοιόστασης και της λειτουργίας του εντερικού φραγμού. Αυτό μπορεί να συμβεί απευθείας από την οικολογική πίεση της κοινής μικροχλωρίδας έναντι παθογόνων βακτηρίων ή μέσω βακτηριακών προϊόντων, τα οποία διεγείρουν τους έμφυτους υποδοχείς του ανοσοποιητικού που εκφράζονται στα επιθηλιακά κύτταρα για να αποκαταστήσουν της ομοιόσταση του ανοσοποιητικού στο έντερο (Jarchum and Pamer, 2011; Salonen and De Vos, 2014).

Εικόνα 3.1: Η πολύπλοκη αλληλεπίδραση μεταξύ διατροφής και μικροχλωρίδας (Capuano, 2017).

Το μήλο αποτελεί έναν εδώδιμο καρπό που απορρέει από τη μηλιά *Malus x domestica* Borkh. Ανήκει στην οικογένεια *Rosaceae* και στην υποοικογένεια *Pomoideae*, ενώ ανήκει στη φυλή *Pyraea* (Mignard et al., 2021). Η εξημέρωση του μήλου έγινε κυρίως περίπου πριν από 4000–10,000 χρόνια από το *Malus sieversii* (Ldb.) Roem, το οποίο είναι εγγενές στα βουνά Tian Shan της Κεντρικής Ασίας (Abdelfattah et al., 2022). Στη συνέχεια, το μήλο μεταφέρθηκε προς τα δυτικά από ταξιδιώτες κατά μήκος της Διαδρομής του Μεταξιού (Duan et al., 2017), κατά τη διάρκεια της οποίας διάφορα είδη *Malus*, όπως το *M. prunifolia* (Willd.) Borkh στην Ασία, το *M. orientalis* Uglitz στον Καύκασο και το *M. sylvestris* Mill. Στην Ευρώπη, συνέβαλαν στο γονιδίωμα του *M. domestica* μέσω εισαγωγικού υβριδισμού (Volk, 2019). Η εξημέρωση του μήλου οδήγησε σε διάφορες ποικιλίες με μεγάλους καρπούς, υψηλή απόδοση και σφιχτή σάρκα (Duan et al., 2017). Επί του παρόντος, υπάρχουν περισσότερες από 7000

διαφορετικές ποικιλίες μήλων παγκοσμίως, που καταγράφονται από τον πρόγονο *Malus sieversii* (Ldb.) *Roem* (Pereira-Lorenzo et al., 2017). Ωστόσο, παγκοσμίως, η παραγωγή επικεντρώνεται σε λίγες μόνο ποικιλίες. Οι πιο διαδεδομένες ποικιλίες είναι Fuji, Gala και Red Delicious, οι οποίες χαρακτηρίζονται από κόκκινο χρώμα, γλυκιά γεύση και τραγανή υφή, ενώ υπάρχει επίσης η ποικιλία Golden με ξανθό χρώμα και γλυκιά γεύση, καθώς και η Granny Smith με πράσινο χρώμα και ξινή γεύση (Abdelfattah et al., 2021). Η καλλιέργεια των μήλων ευδοκimeί σε εύκρατα, υποτροπικά και τροπικά κλίματα, με την παραγωγή να περιορίζεται γεωγραφικά μεταξύ των 25° και 52° γεωγραφικού πλάτους (Musacchi et al., 2018). Οι καρποί, ανάλογα με την ποικιλία, σπάνια καταναλώνονται αμέσως μετά τη συγκομιδή. Αντιθέτως, αποθηκεύονται για μεσοπρόθεσμες έως μακροπρόθεσμες περιόδους, που μπορούν να φτάσουν τους 10-11 μήνες, με την παράταση της διατήρησης μετά τη συγκομιδή και τη διασφάλιση της σταθερότητας στην αγορά (Buccheri et al., 2021).

3.3.1 Χημική Σύσταση Μήλου

Το μήλο αναδεικνύεται ως ένα από τα πλέον θρεπτικά τρόφιμα σε μια ισορροπημένη και υγιεινή διατροφή, καθώς περιέχει έναν εξαιρετικό συνδυασμό θρεπτικών συστατικών, όπως αποδεικνύεται και από τον Πίνακα 3.1, με ιδιαίτερα ευεργετικά αποτελέσματα για την υγεία (Musacchi et al., 2018).

Πίνακας 3.1: Χημική σύσταση μήλου (Θέρσιος, 2013).

Ενέργεια 229 KJ (54 Kcal)		Υδατάνθρακες		Αμινοξέα	
Νερό	85,3g	Γλυκόζη	2210mg	Λευκίνη	8μg
Πρωτεΐνη	0,3g	Φρουκτόζη	6040mg	Λυσίνη	5μg
Λίπη	0,4g	Σακχαρόζη	2470mg	Μεθειονίνη	3μg
Υδατάνθρακες	11,8g	Άμυλο	600mg	Φαινυλαλανίνη	9μg
Οργανικά οξέα	0,6g	Σορβιτόλη	510mg		
Ίνες	2,3g				
Βιταμίνες		Λιπίδια		Οργανικά Οξέα	
Καροτένια	45μg	Παλμιτικό οξύ	50mg	Μηλικό οξύ	550mg
Βιταμίνη E	490μg	Στεαρικό οξύ	10mg	Κιτρικό οξύ	16mg
Βιταμίνη K	0-5μg	Ελαϊκό οξύ	20mg	Οξαλικό οξύ	500mg
Βιταμίνη B ₁	35μg	Λινολενικό οξύ	100mg	Σαλκυλικό οξύ	310mg
Βιταμίνη B ₂	30μg	Λινολεϊκό οξύ	310mg		
Βιταμίνη B ₆	45μg				
Βιταμίνη C	12μg				
Φολικό οξύ	7μg				

Το μέσο μέγεθος ενός μήλου (περίπου 100g) εμπλουτίζεται με αντιοξειδωτικά, όπως η βιταμίνη C, η κερκετίνη και η κατεχίνη. Τα αντιοξειδωτικά έχουν την ιδιότητα να απενεργοποιούν τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και τις καθιστούν αβλαβείς για τον οργανισμό. Επιπρόσθετα, τα μήλα περιέχουν φλαβονοειδή, ουσίες με εξίσου ισχυρή αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση, που βοηθούν στη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης και στην πρόληψη καρδιαγγειακών προβλημάτων (Θέριος, 2013).

3.3.2 Ίνες Μήλου

Οι ίνες μήλου ορίζονται ως μια πηγή υδατοδιαλυτής πηκτίνης που δεν αφομοιώνεται από ένζυμα στο ανθρώπινο πεπτικό σύστημα (Rabetafika et al., 2014). Οι φυτικές αυτές ίνες, που υπάρχουν ακόμα και στον πυρήνα του μήλου, ο οποίος αποτελείται από δέρμα και σάρκα (95%), ενώ περιλαμβάνουν επίσης 2% έως 4% σπόρους και 1% στελέχη και ο πυρήνας του μήλου περιλαμβάνει το φλοιό, το στέλεχος, τους σπόρους και τον κάλυκα (Bhushan et al., 2008). Είναι γνωστό, ότι περιέχουν καλά ισορροπημένες διαλυτές και αδιάλυτες ίνες (Kruczek et al., 2017). Έχει αναφερθεί, ότι ο πυρήνας μήλου περιέχει από 4,4 έως 47,3 γραμμάρια φυτικών ινών ανά 100 γραμμάρια. Αυτή η διακύμανση στην περιεκτικότητα φυτικών ινών πιθανόν να οφείλεται στη χρήση διαφορετικών ποικιλιών μήλων και σε διαφορετικές μεθόδους μέτρησης ή εξαγωγής των διαιτητικών ινών. Στον πυρήνα του μήλου, οι αδιάλυτες φυτικές ίνες αντιπροσωπεύουν το 33,8%-60,0% των συνολικών ινών, με την κυτταρίνη να αποτελεί το 6,7%-40,4% και τη λιγνίνη το 14,1%-18,9% (Bhushan et al., 2008). Οι διαλυτές φυτικές ίνες, με την πηκτίνη, να αντιστοιχούν στο 13,5%-14,6% των συνολικών φυτικών ινών στο μήλο. Επειδή το μεγαλύτερο ποσοστό των διαλυτών ινών στα μήλα βρίσκεται στον φλοιό, ο πυρήνας του μήλου περιέχει μεγαλύτερη αναλογία αδιάλυτων ινών σε σχέση με το υπόλοιπο μήλο (Shalini et al., 2009). Η παραγωγή των ινών μήλου είναι μια διαδικασία που περιλαμβάνει διάφορα στάδια για να διασφαλιστεί η ποιότητα και η ασφάλεια του τελικού προϊόντος. Οι ίνες μήλου, αρχικά αποκτώνται μέσω συλλογής και καθαρισμού (απομάκρυνση ανεπιθύμητων ουσιών και πιθανών ρύπων από τα μήλα), έπειτα αφυδατώνονται (τα μήλα κόβονται σε λεπτές φέτες και η αφυδάτωση μπορεί να γίνει μέσω ξήρανσης στον αέρα ή άλλων μεθόδων αφυδάτωσης). Στη συνέχεια υπάρχει το στάδιο της μικρονοποίησης (άλεση ή σύνθλιψη του ξηρού μήλου σε πολύ μικρά σωματίδια). Αυτή η διαδικασία, αυξάνει την επιφάνεια των ινών, κάνοντάς τις πιο εύκολες στην πέψη και απορρόφηση από το ανθρώπινο σώμα και αποστείρωσης του ξηρού μήλου

(θερμική επεξεργασία ή χρήση άλλων μεθόδων όπως ακτινοβολιών για την εξάλειψη των μικροοργανισμών και την εξασφάλιση της καθαρότητας και της ασφάλειας των ινών). Οι ίνες έχουν και πρεβιοτικό δυναμικό όπου εκτός από τις φυσικές τους ίνες, μπορούν να υποστηρίξουν την ανάπτυξη ωφέλιμων βακτηρίων στο έντερο. Οι παραγόμενες ίνες συσκευάζονται σε κατάλληλα δοχεία ώστε να διατηρείται η φρεσκάδα τους και να προστατεύονται από την υγρασία και τους άλλους εξωτερικούς παράγοντες. Αφού συσκευάζονται, αποθηκεύονται υπό κατάλληλες συνθήκες μέχρι να διανεμηθούν για κατανάλωση ή για χρήση σε άλλα προϊόντα (Mateos-Aparicio et al., 2020). Συγκεκριμένα, μετά την κατανάλωση, οι ίνες μήλου φτάνουν στο λεπτό και στο παχύ έντερο και παραμένουν σχετικά αμετάβλητες, συμβάλλοντας έτσι στην θρέψη των προβιοτικών που αποικίζουν (Kowalczyk et al., 2021). Βάση μιας μελέτης που αναφέρεται στην απομόνωση ινών από διάφορα μέρη του μήλου (φλούδα - σάρκα, πυρήνα) και σε διαφορετικές ποικιλίες του, υποστηρίζει ότι οι ίνες του μήλου αυξάνουν την παραγωγή κοπράνων (τόσο βάρος όσο και συχνότητα) (Katsirma et al., 2021).

4.1 Γαστρεντερικό Σύστημα

Το γαστρεντερικό σύστημα (GI) αποτελεί τη κύρια οδό εισόδου των θρεπτικών στοιχείων στον οργανισμό. Το γαστρεντερικό σύστημα, απαρτίζεται από την στοματική κοιλότητα, τον φάρυγγα, τον οισοφάγο, το στομάχι, το λεπτό έντερο, το παχύ έντερο, το ορθό καθώς και από τα βοηθητικά όργανα που συνδράμουν στις λειτουργίες του. Αυτά τα βοηθητικά όργανα περιλαμβάνουν τους σιελογόνους αδένες, το ήπαρ, τη χοληδόχο κύστη και το πάγκρεας (Vertzoni et al., 2019). Το μήκος του γαστρεντερικού σωλήνα κυμαίνεται στα 5 έως 8 μέτρα, με το εσωτερικό τμήμα του, γνωστό ως γαστρεντερικός αυλός, να είναι διαχωρισμένο από το εξωτερικό του τμήμα, κυρίως για να προστατεύει τον οργανισμό από μικροοργανισμούς. Οι βασικές λειτουργίες του γαστρεντερικού συστήματος περιλαμβάνουν την κατάποση τροφής, την πέψη των θρεπτικών στοιχείων, την απορρόφηση θρεπτικών ουσιών, την έκκριση ενζύμων και νερού, καθώς και την αποβολή αποβλήτων (Ogobuiro et al., 2023).

4.1.1 Μάσηση και Πέψη τροφών στο στόμα

Η διαδικασία της πέψης ξεκινά με τη μάσηση, μια μηχανική κατάτμηση της τροφής που επιτυγχάνεται μέσω της πολτοποιήσής της από τα δόντια. Αυτή η διαδικασία αυξάνει την επιφάνεια της τροφικής μάζας, διευκολύνοντας την κατάποση και διαμορφώνοντας έναν λιπασμένο βλωμό μέσα στη στοματική κοιλότητα. Παράλληλα, η χημική διάσπαση της τροφής αρχίζει στο στόμα με τη βοήθεια του σάλιου, το οποίο παράγεται από τους σιελογόνους αδένες. Το σάλιο περιέχει το ένζυμο πτυαλίνη, το οποίο έχει σημαντικό ρόλο στη διάσπαση του αμύλου κατά τη διαδικασία της πέψης. Ένας μέσος ενήλικας παράγει περίπου 1,2 έως 1,5 λίτρα σαλίου ημερησίως. Το σάλιο δεν περιορίζεται μόνο στη χώνευση, αλλά επίσης συμβάλλει στη διατήρηση της καθαριότητας της στοματικής κοιλότητας, στη ρύθμιση του pH και στην φυγή των τροφών, διευκολύνοντας έτσι τη μάσηση και την κατάποση (Ogobuiro et al., 2023).

4.1.2 Κατάποση και Οισοφάγος

Η κατάποση είναι μια πολύπλοκη διαδικασία που αρχίζει εκούσια και τελειώνει ακούσια. Όταν η τροφή είναι έτοιμη προς κατάποση, συμπιέζεται προς το πίσω μέρος

του στόματος με τη γλώσσα, η οποία πιέζει προς τα πίσω και πάνω την υπερώα οδηγώντας τον βλωμό προς τον φάρυγγα. Ο φάρυγγας με τις μυϊκές συστολές του λειτουργεί ως δίοδος τροφικού υλικού προς τον οισοφάγο. Στη συνέχεια, η περιοχή του άνω οισοφαγικού σφιγκτήρα χαλαρώνει, επιτρέποντας στην τροφή να εισέλθει στον οισοφάγο. Η βασική λειτουργία του οισοφάγου είναι η μεταφορά του βλωμού στο στομάχι. Η διαδικασία είναι πολύ γρήγορη, διαρκώντας 5 έως 10 δευτερόλεπτα και εκτελείται μέσω πρωτογενών και δευτερογενών περισταλτικών συσπάσεων του οισοφάγου (Vertzoni et al., 2019; Ogobuiro et al., 2023).

4.1.3 Στομάχι - Λεπτό Έντερο - Παχύ Έντερο

Όταν η τροφή εισέρχεται στο στομάχι, αναμιγνύεται με το γαστρικό υγρό και υφίσταται περαιτέρω κατάτμηση εξαιτίας των συσπάσεων του στομάχου (Ζερφυρίδης, 1998). Τα γαστρικά υγρά περιέχουν σημαντικές ποσότητες ενζύμων που συμμετέχουν στην πέψη των τροφών. Δύο από τα βασικά πεπτικά ένζυμα που εντοπίζονται στο στομάχι είναι η πεψίνη και η γαστρική λιπάση. Η πεψίνη εκκρίνεται αρχικά ως το ανενεργό πεψινογόνο, το οποίο μετατρέπεται σε πεψίνη υπό την παρουσία γαστρικού οξέος (O'Connor and O'Morain, 2014). Μετά την ανάμιξη της τροφής με τα γαστρικά υγρά, δημιουργείται ένας πολτός, ο οποίος παραμένει στο στομάχι για περίπου 2 έως 4 ώρες πριν εκχυθεί στο δωδεκαδάκτυλο, το πρώτο τμήμα του λεπτού εντέρου. Το λεπτό έντερο, με μήκος περίπου 3 έως 7 μέτρα, λαμβάνει τροφή συνοδευόμενη από χολή, παγκρεατικό υγρό και εντερικό υγρό, τα οποία συμβάλλουν στη διάσπαση των μακρομορίων της τροφής. Κατά τη διαδικασία αυτής της διαδικασίας, το μεγαλύτερο μέρος των θρεπτικών ουσιών απορροφάται από το λεπτό έντερο (Ζερφυρίδης, 1998). Σε αντίθεση με το στομάχι, το οποίο έχει περιορισμένες ικανότητες απορρόφησης, το 95% των θρεπτικών στοιχείων απορροφάται από το λεπτό έντερο (Fish and Burns, 2022). Αφού ολοκληρωθεί η πέψη, ο χυλός που περιέχει άπεπτα συστατικά μεταφέρεται στο παχύ έντερο, όπου παραμένει για περίπου 10 έως 12 ώρες. Εκεί, υπόκειται σε ζύμωση από τη μικροχλωρίδα, ενώ το νερό απορροφάται και τα υπολείμματα αποβάλλονται από τον πρωκτό με τη μορφή κοπράνων (Ζερφυρίδης, 1998).

4.2 Ανθρώπινο Μικροβίωμα Εντέρου

Τα τελευταία χρόνια, το ανθρώπινο μικροβίωμα έχει κεντρίσει το ενδιαφέρον λόγω της επίδρασής του σε πολλές βιολογικές λειτουργίες του οργανισμού. Το ανθρώπινο

εντερικό μικροβίωμα περιλαμβάνει όλα τα γονίδια της μικροχλωρίδας που κατοικεί σε διάφορες περιοχές του γαστρεντερικού συστήματος (Klanic et al., 2020). Η εντερική μικροχλωρίδα αναφέρεται στην συνολική κοινότητα των μικροοργανισμών της γαστρεντερικής οδού, που περιλαμβάνει βακτήρια, ιούς (φαγούς), μύκητες, αρχαία και ευκαρυωτικά μικρόβια (Fan et al., 2021; Lynch et al., 2016). Όλοι αυτοί οι μικροοργανισμοί σχηματίζουν ένα πολύπλοκο οικοσύστημα, που φιλοξενεί δεκάδες τρισεκατομμύρια μικρόβια από περίπου 400-500 διαφορετικά γένη (Meij et al., 2016). Αυτοί οι μικροοργανισμοί αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και με το ανοσοποιητικό σύστημα του ανθρώπου, συμβάλλοντας στην ομοίωση του οργανισμού (Lozupone et al., 2012). Το μικροβίωμα περιλαμβάνει κοινούς, συμβιωτικούς και παθογόνους μικροοργανισμούς και είναι μοναδικό για κάθε άτομο, δημιουργώντας ένα ιδιαίτερο μικροβιακό προφίλ (Zawada et al., 2020). Η ποικιλομορφία και η σύνθεση του εντερικού μικροβιώματος μεταβάλλονται κατά τη διάρκεια της ζωής του ατόμου, επηρεαζόμενη από παραμέτρους όπως η διατροφή, τα θρεπτικά συστατικά, ο τρόπος παράδοσης, η ηλικία, η γεωγραφική περιοχή, η χρήση αντιβιοτικών και η γενετική προδιάθεση (Yang et al., 2020). Η φυσική μικροχλωρίδα του γαστρεντερικού συστήματος παρουσιάζει σημαντικές διαφοροποιήσεις ανάλογα με την περιοχή. Στο παχύ έντερο, ο πληθυσμός των βακτηρίων είναι ιδιαίτερα υψηλός, με περίπου 10^{12} βακτήρια ανά γραμμάριο. Αντίθετα, το στομάχι και το λεπτό έντερο φιλοξενούν συγκριτικά λιγότερους βακτηριακούς πληθυσμούς (Gomaa et al., 2019; Shapira, 2016). Η φυσιολογική χλωρίδα του παχέος εντέρου περιλαμβάνει Gram-θετικά αερόβια βακτήρια, όπως τα *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter* και *Proteus vulgaris*, καθώς και Gram-θετικούς αερόβιους και αναερόβιους κόκκους, όπως *Staphylococcus aureus*, στρεπτόκοκκους και εντερόκοκκους, καθώς και σπορογόνα βακτήρια, όπως τα *Clostridium perfringens* και *Clostridium difficile* (Gomaa et al., 2019). Η διαταραχή αυτών των υγιών συμβιωτικών σχέσεων μεταξύ των μικροοργανισμών και του ξενιστή μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τη δυσβίωση του εντέρου (Barengolts, 2016). Η εντερική μικροχλωρίδα εκτελεί πολλές σημαντικές λειτουργίες, όπως η πέψη μη-μεταβολίσιμων τροφίμων και η προστασία από την αποίκηση νέων παθογόνων μικροοργανισμών (Lozupone et al., 2012). Επιπλέον, συμμετέχει στη σύνθεση βιταμινών του συμπλέγματος B και K (Vajro et al., 2013), στον καταβολισμό βιομορίων και στον μεταβολισμό άπεπτων υδατανθράκων, όπως η κυτταρίνη, το άμυλο και η πηκτίνη σε βραχείας αλυσίδας λιπαρά οξέα (SCFAs) (Lin

et al., 2017). Παίζει επίσης ρόλο στην αποθήκευση λίπους (Backhed et al., 2004) και στη ρύθμιση φλεγμονωδών αντιδράσεων (Sartor and Wu, 2017).

4.3 Συνθήκες προσομοίωσης του στελέχους *L. casei* στο γαστρεντερικό σύστημα *in vitro*

Ο μικροοργανισμός *L. casei* ATCC 393 συνίσταται για την παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων εξαιτίας των τεχνολογικών του χαρακτηριστικών και των ευεργετικών του επιδράσεων στην υγεία. Η ιδανική προβιοτική καλλιέργεια θα πρέπει να είναι σε ξηρή μορφή ώστε να πληροί τις απαιτήσεις της βιομηχανίας τροφίμων και να αντέχει στις συνθήκες του ανθρώπινου γαστρεντερικού συστήματος. Σε μια μελέτη που είχε πραγματοποιηθεί χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα ακινητοποιημένα με την μέθοδο της ξήρανσης με ψεκασμό για να αξιολογηθεί η επίδραση της ακινητοποίησης στην επιβίωση του *L. casei* σε προσομοιωμένες γαστρεντερικές συνθήκες (Καραθανάση, 2016). Χρησιμοποιήθηκε δείγμα ελεύθερων κυττάρων *L. casei* παράλληλα με τα ακινητοποιημένα κύτταρα. Σε προσομοιωμένο γαστρικό υγρό και συνθήκες χαμηλού pH (2 και 3) και 0,3% πεψίνη, τα ελεύθερα κύτταρα εμφάνισαν σημαντική πτώση της βιωσιμότητας (1,46 logcfu/g σε pH 3 και 3,73 logcfu/g σε pH 2). Αντίθετα, τα ακινητοποιημένα κύτταρα είχαν μικρότερη μείωση (0,35 logcfu/g σε pH 3 και 1,59 logcfu/g σε pH 2), αποδεικνύοντας ότι η ακινητοποίηση προσφέρει σημαντική προστασία στα κύτταρα *L. casei*. Η επιβίωση των προβιοτικών βακτηρίων σε συγκεντρώσεις χολικών αλάτων αξιολογήθηκε επίσης καθώς είναι σημαντικό να εγκατασταθούν και να πολλαπλασιαστούν στο ανθρώπινο έντερο. Αξιολογήθηκε η επίδραση της ακινητοποίησης του *L. casei* σε διαλύματα χολικών αλάτων (0,5% και 1%). Η ακινητοποίηση βελτίωσε σημαντικά τη βιωσιμότητα των κυττάρων, με τα ελεύθερα κύτταρα να μειώνονται κατά 3,15 logcfu/g και 4,13 logcfu/g μετά από 3 ώρες σε διαλύματα 0,5% και 1% αντίστοιχα, ενώ τα ακινητοποιημένα μόνο 1,55log cfu/g και 2,05log cfu/g. Μετά από 6 ώρες, η απώλεια ήταν 6,61 logcfu/g για τα ελεύθερα κύτταρα και 2,85log cfu/g για τα ακινητοποιημένα σε διάλυμα 1%. Τα αποτελέσματα αυτά είναι παρόμοια με παλαιότερες έρευνες που χρησιμοποίησαν κύτταρα *L. casei* ATCC 393 εγκλωβισμένα σε μικροκάψουλες αλγινικών. Συγκεκριμένα, μικροκάψουλες με βάση αλγινικό και ζελατίνη παρασκευάστηκαν μέσω μεθόδου εξώθησης, οδηγώντας σε αύξηση του αριθμού των κυττάρων του *L. casei* στα 10^7 cfu/g σε ξηρή κατάσταση. Τα μικροσωματίδια είχαν ομοιογενή κατανομή και μέγεθος $1,1 \pm 0,2$ mm. Τέσσερα

διαφορετικά είδη μικροκαψουλών εμφάνισαν διόγκωση σε προσομοιωμένο γαστρικό υγρό (SGF), ενώ τα σφαιρίδια διαβρώθηκαν και αποσυντέθηκαν γρήγορα σε προσομοιωμένο εντερικό υγρό (SIF). Κατά την προσομοίωση του γαστρεντερικού σωλήνα, τα κύτταρα του *L. casei* απελευθερώνονταν συνεχώς από τις μικροκάψουλες, με τις ποσότητες και τις ταχύτητες απελευθέρωσης στο SIF να είναι σημαντικά υψηλότερες από εκείνες στο SGF. Η ενθυλάκωση σε μικροκάψουλες αλγινικού-ζελατίνης βελτίωσε σημαντικά την επιβίωση του *L. casei*, καθιστώντας αυτή την προσέγγιση πολλά υποσχόμενη για την παροχή προβιοτικών καλλιέργειών ως λειτουργικά τρόφιμα (Li et al., 2011). Μάλιστα, τα αποτελέσματα αποδείχθηκαν ακόμη πιο ενθαρρυντικά σε σχέση με μελέτες που εξέτασαν ακινητοποιημένα κύτταρα *L. casei* σε κομμάτια μήλου, σε συνδυασμό με γάλα που είχε υποστεί ζύμωση με προβιοτικά, μετά από διέλευση από το γαστρεντερικό σύστημα (GI). Παράλληλα, διερευνήθηκε η πιθανή επίδραση στη ρύθμιση της εντερικής μικροβιακής χλωρίδας σε πειραματικό μοντέλο αρουραίου. Σε *in vitro* δοκιμές αντοχής στο γαστρεντερικό σύστημα, το ακινητοποιημένο *L. casei* εμφάνισε σημαντικά αυξημένη επιβίωση σε σχέση με τα ελεύθερα κύτταρα. Στη συνέχεια, το προβιοτικό ζυμωμένο γάλα που παρήχθη από ελεύθερα ή ακινητοποιημένα κύτταρα χορηγήθηκε από το στόμα σε αρουραίους Wistar, είτε ως μεμονωμένη δόση είτε καθημερινά για 9 ημέρες. Ακόμα και 12 ώρες μετά τη χορήγηση, τόσο τα ελεύθερα όσο και τα ακινητοποιημένα κύτταρα εντοπίστηκαν σε επίπεδα $\geq 6 \log \text{cfu/g}$ στα περιττώματα μέσω μικροβιολογικής και μοριακής ανάλυσης (Sidira et al., 2010). Τέλος, τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης έδειξαν ότι η ακινητοποίηση βελτιώνει την επιβίωση του *L. casei* υπό δυσμενείς συνθήκες του γαστρεντερικού σωλήνα. Ενώ η βιωσιμότητα τόσο των ελεύθερων όσο και των ακινητοποιημένων κυττάρων *L. casei* μειώθηκε σημαντικά σε γαστρικό υγρό και διαλύματα χολικών αλάτων, η ακινητοποίηση προσέφερε σημαντικά υψηλότερη προστασία σε σύγκριση με τα ελεύθερα κύτταρα (Καραθανάση, 2016). Σύμφωνα με μια άλλη μελέτη που πραγματοποιήθηκε, η βιωσιμότητα του *Lactobacillus casei* εξετάστηκε εξίσου σε χαμηλό pH και παρουσίας πεψίνης ώστε να προσομοιωθούν οι συνθήκες που επικρατούν στο γαστρεντερικό σύστημα (Μαράκου, 2020). Συγκεκριμένα, τα ελεύθερα κύτταρα εμφάνισαν συνεχή πτώση της βιωσιμότητας τους, υπογραμμίζοντας την ανάγκη προστασίας μέσω μικροενθυλάκωσης. Τα ζωντανά κύτταρα μειώθηκαν σημαντικά σε χαμηλό pH, κάτι που συμφωνεί με προηγούμενες έρευνες της ίδιας καλλιέργειας. Η χρήση της μικροενθυλάκωσης παρείχε σημαντική

προστασία στα κύτταρα του *L. casei* καθώς η μείωση της βιωσιμότητας τους ήταν πολύ μικρότερη σε σύγκριση με τα ελεύθερα. Επιπλέον, εξετάστηκε η ικανότητα των *L. casei* να επιβιώνουν σε συγκεντρώσεις χολικών αλάτων, που παράγονται στο ανθρώπινο λεπτό έντερο, με σκοπό να εγκατασταθούν και να πολλαπλασιαστούν στο ανθρώπινο παχύ έντερο. Πιο συγκεκριμένα, τα ελεύθερα κύτταρα παρουσίασαν σημαντική απώλεια σε διαλύματα χολικών αλάτων, ενώ τα μικροενθυλακωμένα κύτταρα παρουσίασαν πολύ μικρότερη απώλεια. Η διαφορά ήταν ακόμη πιο εμφανής μετά από παρατεταμένη παραμονή σε διάλυμα χολικών αλάτων, όπου η απώλεια για τα ελεύθερα κύτταρα ήταν πολύ μεγαλύτερη σε σύγκριση με τα μικροενθυλακωμένα κύτταρα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

5. Υλικά και Μέθοδοι

5.1 Υλικά

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω υλικά-αντιδραστήρια:

- Στέλεχος *Lactobacillus casei* ATCC 393
- Θρεπτικό υπόστρωμα MRS Broth και Άγαρ
- Γιαούρτι το οποίο παρασκευάστηκε στο εργαστήριο
- 2 % Ίνες μήλου
- Πεψίνη
- Λιπάση
- Παγκρεατίνη
- Χολικά Άλατα
- Ultra Pure H₂O
- Διάλυμα NaOH
- Διάλυμα NaCl
- Διάλυμα HCl
- Υάλινα σκεύη όπως ποτήρια ζέσεως, φιάλες Durant των 350 mL και 500 mL καθώς και σιφόνια για την προσθήκη άλλων συστατικών
- Σωληνάκια Falcon
- Τρυβλία Petri για μικροβιολογικές αναλύσεις
- Αποστειρωμένους σωληνίσκους
- Διάλυμα Ringer (KCl, NaCl, CaCl₂, NaHCO₃)
- Διάφορων όγκων πιπέτες
- Υδροβολείς
- Σπάτουλες ζύγισης
- Ηλεκτρονικός ζυγός
- Ηλεκτρονικό pH-μετρο
- Υδατόλουτρο
- Ομογενοποιητής τύπου Vortex
- Συσκευή ανάδευσης
- Επωαστικός κλίβανος 37°C

5.2 Μεθοδολογία

5.2.1 Βιωσιμότητα ελεύθερων κυττάρων *L. casei* σε προσομοίωση γαστρικού υγρού και χολικών αλάτων

Το προσομοιωμένο γαστρικό διάλυμα, με περιεκτικότητα 0,2%w/v NaCl, παρασκευάστηκε με τη διάλυση πεψίνης (3 g/L) σε αλατούχο διάλυμα και ρύθμιση του pH στο 2 ή 3 με διάλυμα 1 N HCl. Στη συνέχεια, το διάλυμα διήλθε από φίλτρο 0,45 μ m για την απομάκρυνση πιθανών ξένων υλών (αποστείρωση). Σε δύο Falcon, ζυγίστηκαν 1 g σκέτου γιαουρτιού με *L. casei* και 1 g γιαουρτιού με *L. casei* και ίνες μήλου, αντίστοιχα. Προστέθηκαν 9 mL γαστρικού υγρού, ανακινήθηκαν για 10s σε Vortex και τοποθετήθηκαν σε κλίβανο στους 37°C υπό ανάδευση. Από κάθε Falcon σε χρονικά διαστήματα 0, 1min, 30min, 1h, 2h, 3h ελήφθησαν 1 mL δείγματος, το οποίο τοποθετήθηκε σε αποστειρωμένους δοκιμαστικούς σωλήνες με διάλυμα Ringer. Τα δείγματα αραιώθηκαν διαδοχικά και τοποθετήθηκαν σε τρυβλία Petri με θρεπτικό MRS Broth και άγαρ, το οποίο είναι εκλεκτικό για τον συγκεκριμένο μικροοργανισμό. Ακολούθησε επώαση των τρυβλίων σε κλίβανο με ελεγχόμενη θερμοκρασία στους 37°C για 48 ώρες. Τέλος, πραγματοποιήθηκε η καταμέτρηση των χαρακτηριστικών αποικιών που αναπτύχθηκαν σε όλα τα τρυβλία, μετρώντας αποικίες μεταξύ 30-300. Η βιωσιμότητα των ελεύθερων κυττάρων του *L. casei* σε προσομοίωση χολικών αλάτων αξιολογήθηκε με την ίδια διαδικασία όπως προηγουμένως, με τη διαφορά όμως εδώ να προστίθενται παγκρεατίνη (1g/L) και χολικά άλατα (3g/L) και η ρύθμιση του pH να γίνεται στο 7 με την χρήση 0,1 N NaOH.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6° ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μελέτη πρόκειται να αξιολογηθεί η ικανότητα επιβίωσης του *L. casei* σε ελεύθερη μορφή, υπό προσομοιωμένες γαστρεντερικές συνθήκες χωρίς τη χρήση μικροενθυλάκωσης ή άλλου προστατευτικού μέσου για τον μικροοργανισμό.

6.1 Επιβίωση σε προσομοιωμένο γαστρικό υγρό

Η βιωσιμότητα των ελεύθερων κυττάρων *L. casei* αξιολογήθηκε υπό συνθήκες προσομοίωσης του γαστρικού περιβάλλοντος σε ελεύθερη μορφή, μέσα σε γιαούρτι και μέσα σε γιαούρτι με ίνες μήλου, με τα αποτελέσματα να συνοψίζονται στους παρακάτω πίνακες.

Πίνακας 6.1: Βιωσιμότητα ελεύθερων κυττάρων *L. casei*, σε διαφορετικές χρονικές φάσεις σε συνθήκες προσομοίωσης γαστρικών υγρών (pH 2 και 3).

Βιωσιμότητα (logcfu/g)	
pH2	
0	9,40±0,05
1	8,65±0,09
30	7,60±0,10
60	7,20±0,07
120	5,45±0,05
180	4,25±0,10
pH3	
0	9,40±0,05
1	8,84±0,10
30	8,74±0,04
60	7,61±0,09
120	5,55±0,05
180	4,70±0,03

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε με τη χρήση πεψίνης 0,3% w/v και χαμηλών τιμών pH (2 και 3). Καθ'όλη τη διάρκεια των χρονικών διαστημάτων του πειράματος, παρατηρήθηκε σταθερή μείωση της βιωσιμότητας των ελεύθερων κυττάρων, γεγονός που υποδεικνύει την ανάγκη για περεταίρω προστασία. Συγκεκριμένα, όπως φαίνεται στον πίνακα 6.1, η βιωσιμότητα των ελεύθερων κυττάρων μειώθηκε κατά 5,15 logcfu/g σε pH 2 και 4,70 logcfu/g σε pH 3 μετά από 180 min. Αυτά τα αποτελέσματα συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες που χρησιμοποίησαν την ίδια

καλλιέργεια, όπου αναφέρθηκε επίσης μειωμένη βιωσιμότητα των ελεύθερων κυττάρων *L. casei* σε χαμηλές τιμές pH (Li et al., 2011; Sidira et al., 2010).

Πίνακας 6.2: Βιωσιμότητα κυττάρων *L. casei* σε γιαούρτι, σε διαφορετικές χρονικές φάσεις σε συνθήκες προσομοίωσης γαστρικών υγρών (pH 2 και 3).

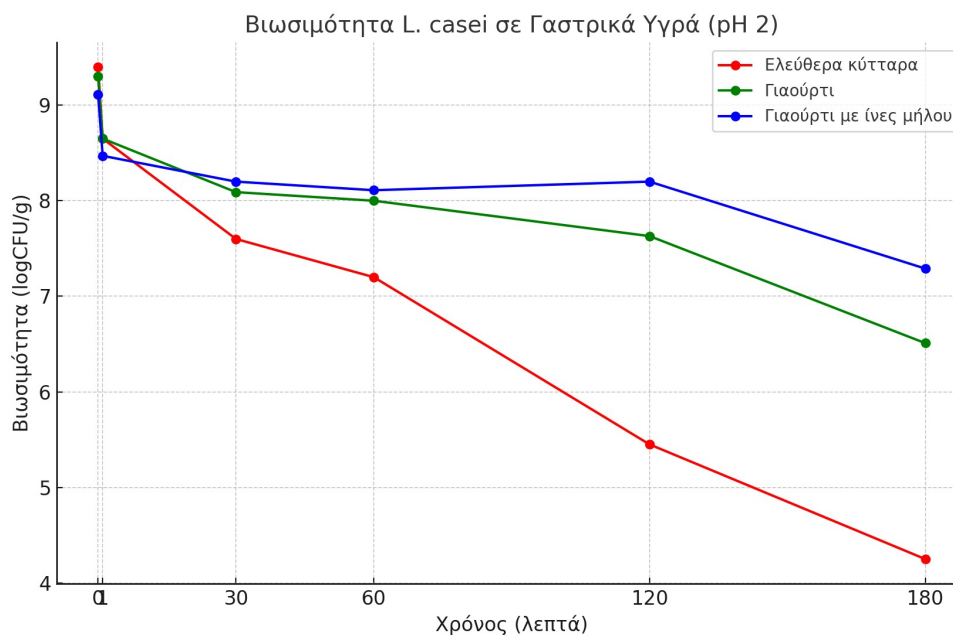
Βιωσιμότητα (logcfu/g)	
pH2	
0	9,30± 0,10
1	8,65 ±0,11
30	8,09± 0,09
60	8,00±0,04
120	7,63±0,10
180	6,51±0,06
pH3	
0	9,30±0,10
1	8,74±0,08
30	8,73±0,10
60	8,74±0,04
120	8,70±0,06
180	8,56±0,05

Στον παραπάνω πίνακα αποτυπώνεται το ίδιο πείραμα, με τη διαφορά ότι τα κύτταρα βρίσκονται μέσα σε γιαούρτι. Σε αυτή την περίπτωση, τα κύτταρα παρουσίασαν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα, επιβεβαιώνοντας την απαίτησή τους για προστασία. Ακριβέστερα, τα ζωντανά κύτταρα μειώθηκαν κατά 2,79 logcfu/g σε pH 2 ενώ σε pH 3 μειώθηκαν κατά 0,74 logcfu/g. Οι ενδείξεις αυτές επιβεβαιώνονται και από άλλες μελέτες, όπου συγκεκριμένα χρησιμοποίησαν ακινητοποιημένα προβιοτικά σε νιφάδες βρώμης, αφυδατωμένη μπανάνα και αφυδατωμένο μήλο. Τα αποτελέσματα τους έδειξαν υψηλή προστασία σε σχέση με τα ελεύθερα κύτταρα προβιοτικών, γεγονός που επιβεβαιώνει τα αποτελέσματα της δικής μας μελέτης (Χριστοπούλου, 2022). Στο pH 2 παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της βιωσιμότητας των ζωντανών κυττάρων σε αντίθεση με το pH 3 όπου η μείωση της βιωσιμότητας ήταν πολύ μικρότερη, υποδεικνύοντας ότι τα κύτταρα διατηρούνται καλύτερα σε ελαφρώς υψηλότερο pH.

Πίνακας 6.3: Βιωσιμότητα κυττάρων *L. casei* μαζί με γιαούρτι με ίνες μήλου, σε διαφορετικές χρονικές φάσεις σε συνθήκες προσομοίωσης γαστρικών υγρών (pH 2 και 3).

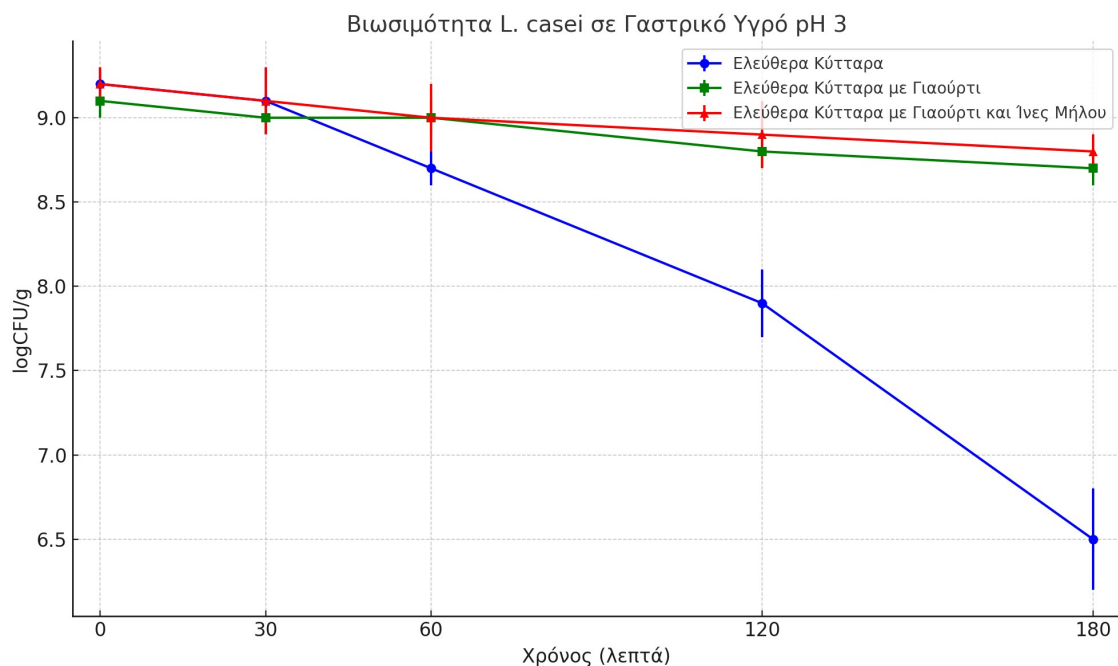
Βιωσιμότητα (logcfu/g)	
pH2	
0	9,11±0,07
1	8,47±0,11
30	8,20±0,10
60	8,11±0,05
120	8,20±0,09
180	7,29±0,04
pH3	
0	9,11±0,07
1	8,93±0,04
30	8,89±0,05
60	8,75±0,10
120	8,65±0,09
180	8,56±0,11

Παρομοίως, στον παραπάνω πίνακα αποτυπώνεται το ίδιο πείραμα, με τη διαφορά ότι τα κύτταρα βρίσκονται ενσωματωμένα σε γιαούρτι με ίνες μήλου. Και σε αυτή την περίπτωση, τα κύτταρα παρουσίασαν σημαντικά μεγαλύτερη ανθεκτικότητα σε σύγκριση με τις δύο προηγούμενες περιπτώσεις. Πιο συγκεκριμένα, η μείωση των ελεύθερων κυττάρων, με βάση και το διάγραμμα 6.1, σε pH 2 ήταν 1,82 logcfu/g ενώ σε pH 3 ήταν 0,55 logcfu/g. Αυτό δείχνει ότι τα ελεύθερα κύτταρα διατηρούνται καλύτερα σε υψηλότερο pH και η βιωσιμότητα τους είναι καλύτερη συγκριτικά με το πιο χαμηλό pH. Επίσης, το γιαούρτι με τις ίνες μήλου προσφέρει σημαντική βοήθεια για την επιβίωση των κυττάρων υπό τις όξινες συνθήκες που φυσικά επικρατούν στα γαστρικά υγρά. Αυτό επιβεβαιώνεται κιόλας από μια μελέτη που χρησιμοποίησαν ίνες κάστανου σε διάφορα προβιοτικά στελέχη τα οποία παρουσίασαν σημαντική ανθεκτικότητα κατά την προέλευση τους στα γαστρικά υγρά (Blaiotta et al., 2013).



Διάγραμμα 6.1.1: Βιωσιμότητα *L. casei* σε γαστρικά υγρά (pH 2).

Στο διάγραμμα 6.1.1 απεικονίζονται τα αποτελέσματα, που αναφέρθηκαν και προηγουμένως, για την βιωσιμότητα του *Lactobacillus casei* σε συνθήκες προσομοιωμένου γαστρικού υγρού (pH 2) για 180 λεπτά, με σύγκριση τριών μορφών: ελεύθερα κύτταρα (κόκκινη καμπύλη), κύτταρα ενσωματωμένα σε γιαούρτι (πράσινη καμπύλη) και κύτταρα ενσωματωμένα σε γιαούρτι με ίνες μήλου (μπλε καμπύλη). Παρατηρείται, ότι η βιωσιμότητα των ελεύθερων κυττάρων μειώνεται δραματικά, ιδιαίτερα στα πρώτα 30 λεπτά, καταδεικνύοντας την ευαισθησία τους στο όξινο περιβάλλον. Αντίθετα, η ενσωμάτωση των κυττάρων σε γιαούρτι, και ειδικά σε γιαούρτι με ίνες μήλου, παρέχει αυξημένη σταθερότητα, μειώνοντας σημαντικά την απώλεια βιωσιμότητας. Η προσθήκη ινών μήλου φαίνεται να προσφέρει περαιτέρω προστασία, διατηρώντας τα επίπεδα βιωσιμότητας σε υψηλότερα επίπεδα από το απλό γιαούρτι.



Διάγραμμα 6.1.2: Βιωσιμότητα *L. casei* σε γαστρικά υγρά (pH 3).

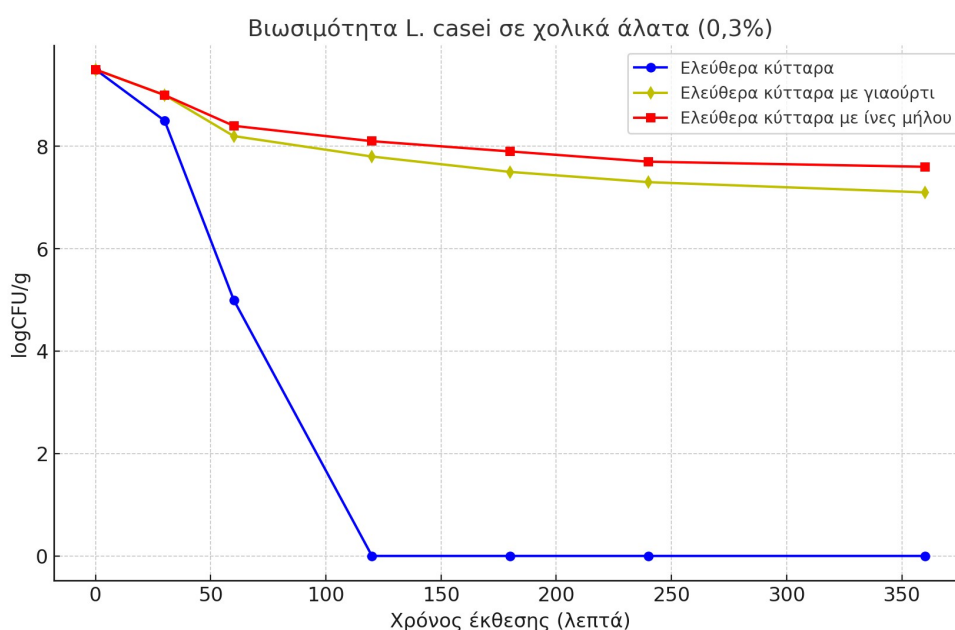
Στο διάγραμμα 6.1.2 παρουσιάζονται συμπυκνωμένα τα αποτελέσματα της βιωσιμότητας του *L. casei* σε συνθήκες προσομοιωμένου γαστρικού υγρού (pH 3) για 180 λεπτά, με σύγκριση τριών μορφών: ελεύθερα κύτταρα (μπλε καμπύλη), κύτταρα ενσωματωμένα σε γιαούρτι (πράσινη καμπύλη) και κύτταρα ενσωματωμένα σε γιαούρτι με ίνες μήλου (κόκκινη καμπύλη). Συγκρίνοντας τα δύο διαγράμματα για τη βιωσιμότητα του *Lactobacillus casei* σε γαστρικά υγρά pH 2 και pH 3, παρατηρείται ότι στο pH 2 η μείωση της βιωσιμότητας είναι πολύ πιο έντονη, ιδιαίτερα στα ελεύθερα κύτταρα, όπου η βιωσιμότητα φτάνει σχεδόν τα 5 logcfu/g μετά από 180 λεπτά. Αντίθετα, στο pH 3 η μείωση είναι πιο ήπια, με τα ελεύθερα κύτταρα να φτάνουν τα 7 logcfu/g. Τα κύτταρα ενσωματωμένα σε γιαούρτι και γιαούρτι με ίνες μήλου παρουσιάζουν μικρότερη μείωση και στα δύο pH, ωστόσο στο pH 3 η σταθερότητα των κυττάρων είναι εμφανώς καλύτερη, με τη βιωσιμότητα να διατηρείται σχεδόν στα αρχικά επίπεδα (9 logcfu/g). Οι ίνες μήλου παρέχουν επιπλέον προστασία και στις δύο περιπτώσεις, αλλά η διαφορά τους με το απλό γιαούρτι είναι μικρότερη στο pH 3.

6.2 Επιβίωση σε διαλύματα χολικών αλάτων

Μια άλλη σημαντική ιδιότητα των δυνητικών προβιοτικών βακτηρίων είναι η ικανότητα τους να αντέχουν σε συγκεντρώσεις χολικών αλάτων που παράγονται στο ανθρώπινο λεπτό έντερο, επιτρέποντας τους να εγκαθίστανται και να πολλαπλασιάζονται στο παχύ έντερο. Για αυτό τον λόγο, στην παρούσα έρευνα, εξετάστηκε η ανθεκτικότητα των ελεύθερων κυττάρων *L. casei* χωρίς προστασία, με γιαούρτι και με γιαούρτι με ίνες μήλου σε χολικά άλατα 0,3% w/v με τα αποτελέσματα να παρουσιάζονται στον πίνακα.

Πίνακας 6.4: Επίδραση του χρόνου έκθεσης σε διάλυμα χολικών αλάτων (0,3% w/v) στη βιωσιμότητα ελεύθερων κυττάρων *L. casei*, κυττάρων με γιαούρτι και κυττάρων με γιαούρτι με ίνες μήλου.

Βιωσιμότητα (logcfu/g)			
	Ελεύθερα κύτταρα <i>L. casei</i>	Γιαούρτι με <i>L. casei</i>	Γιαούρτι με <i>L. casei</i> και ίνες
0	9,40 ± 0,05	9,30±0,10	9,11±0,07
1	-	8,18±0,05	8,20±0,10
120	-	7,25±0,09	7,93±0,09
180	-	7,07±0,11	7,74±0,10
240	-	6,98±0,12	7,47±0,04
360	-	6,70±0,05	7,29±0,11



Διάγραμμα 6.2: Βιωσιμότητα *L. casei* σε χολικά άλατα (0,3%).

Όπως, γίνεται αντιληπτό από τον παραπάνω πίνακα και το διάγραμμα 6.2, τόσο το σκέτο γιαούρτι όσο και το γιαούρτι με ίνες μήλου επηρέασαν θετικά τη βιωσιμότητα των κύτταρων *L. casei* σε διάλυμα χολικών αλάτων. Οι απώλειες που σημειώθηκαν στις 3 ακόμη και στις 6 ώρες ήταν μικρές, γεγονός που υποδεικνύει την θετική επίδραση του γιαουρτιού και των ινών μήλου. Πιο συγκεκριμένα, τα ελεύθερα κύτταρα παρουσίασαν απώλεια 2,23 logcfu/g στο σκέτο γιαούρτι και 1,37 logcfu/g στο γιαούρτι με ίνες μήλου μετά από 3 ώρες έκθεσης σε χολικά άλατα 3% και σε σχέση με παρόμοια μελέτη που έχει πραγματοποιηθεί σε διάλυμα χολικών αλάτων 0,5% και 1% που η βιωσιμότητα εκεί ήταν χαμηλότερη σημειώνοντας ότι τα διαλύματα χολικών αλάτων ήταν ηπιότερα. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και μετά από 6 ώρες, όπου η απώλεια ήταν 2,6 logcfu/g στο σκέτο γιαούρτι και 1,82 logcfu/g στο γιαούρτι με ίνες μήλου τονίζοντας ξανά τα αποτελέσματα αυτά είναι καλύτερα σε σχέση με την παρόμοια μελέτη που πραγματοποιήθηκε από την Μαρακού (2020). Η μικρή διαφορά στις τιμές μεταξύ των 3 και 6 ωρών υποδεικνύει την καλή ανθεκτικότητα των κυττάρων, με την προϋπόθεση ότι πρέπει να υπάρχει κάποιου είδους προστασίας, καθώς τα κύτταρα στην ελεύθερη μορφή τους δεν κατάφεραν να επιβιώσουν σε καμία χρονική στιγμή κατά την διάρκεια του πειράματος. Τέλος τα αποτελέσματα είναι συγκρίσιμα με αυτά προηγούμενης μελέτης, η οποία χρησιμοποίησε κύτταρα *L. casei* εγκλωβισμένα σε μικροκάψουλες αλγινικών (Li et al., 2011), και ακινητοποιημένο *L. casei* σε κομμάτια μήλου (Sidira et al., 2010).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7^ο ΚΑΘΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ ΤΩΝ ΔΙΑΙΤΗΤΙΚΩΝ ΙΝΩΝ

Η ικανότητα συγκράτησης νερού/ελαίου και η ικανότητα διόγκωσης των διαιτητικών ινών υποδηλώνουν τις ιδιότητες ενυδάτωσης του συστατικού των ινών. Αυτές οι ιδιότητες παίζουν σημαντικό ρόλο στην παροχή κατάλληλης υφής στο τελικό προϊόν.

7.1 Υλικά και Μέθοδοι

7.1.1 Υλικά

- Σκόνη ίνας μήλου
- Απιονισμένο H₂O
- Σογιέλαιο
- Φιάλες Falcon
- Υδροβολείς
- Υάλινα σκεύη όπως ποτήρια ζέσεως, ογκομετρικοί κύλινδροι, ράβδος ανάδευσης και σιφώνι πλήρωσης
- Πουάρ τριών βαλβιδών
- Σπάτουλα εργαστηρίου διπλή
- Πλαστικές κάψες για ζύγισμα ινών
- Ηλεκτρονικός-ψηφιακός ζυγός ακριβείας
- Φυγόκεντρος

7.1.2 Μέθοδοι

Στην παρούσα μελέτη, έγινε έρευνα για τον καθορισμό ορισμένων λειτουργικών χαρακτηριστικών όπως η ικανότητα συγκράτησης νερού (WHC), η ικανότητα συγκράτησης ελαίου (OHC) και η ικανότητα διόγκωσης (WSC) ινών μήλου. Η ικανότητα συγκράτησης νερού (WHC) και η ικανότητα συγκράτησης ελαίου (OHC) προσδιορίστηκαν με ανάμειξη του ξηρού δείγματος με απεσταγμένο νερό (1:10, w/v) για 2 ώρες στους 25°C και με σογιέλαιο (1:10 w/v) για 2 ώρες στους 25°C, αντίστοιχα, και ακολούθησε φυγοκέντρωση στα 5000 x g για 10 λεπτά το δείγμα του WHC και στα 1500 x g για 10 λεπτά το δείγμα για το OHC (Dong et al., 2022). Μετά την απόρριψη του υπερκείμενου ακολούθησε ζύγισμα του υπολείμματος. Η ικανότητα διόγκωσης (WSC) προσδιορίστηκε με την προσθήκη 0,5 g δείγματος σε 10

mL απεσταγμένου νερού για 18 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου (Ma & Mu et al., 2016). Τα WHC/OHC και WSC υπολογίστηκαν σύμφωνα με τις Εξ. 1 και 2 , αντίστοιχα.

WHC/ OHC (g/g) = $W2-W1/W1$, όπου ισχύει ότι: (1)

W2:Υπόλειμμα Διαιτητικών Ινών μετά την Φυγόκεντρο

W1:Ξηρό Δείγμα Διαιτητικών Ινών

WSC(mL/g): $V1-Vo/Wo$, όπου ισχύει ότι: (2)

VI: ml Ενυδατωμένων Ινών Μήλου

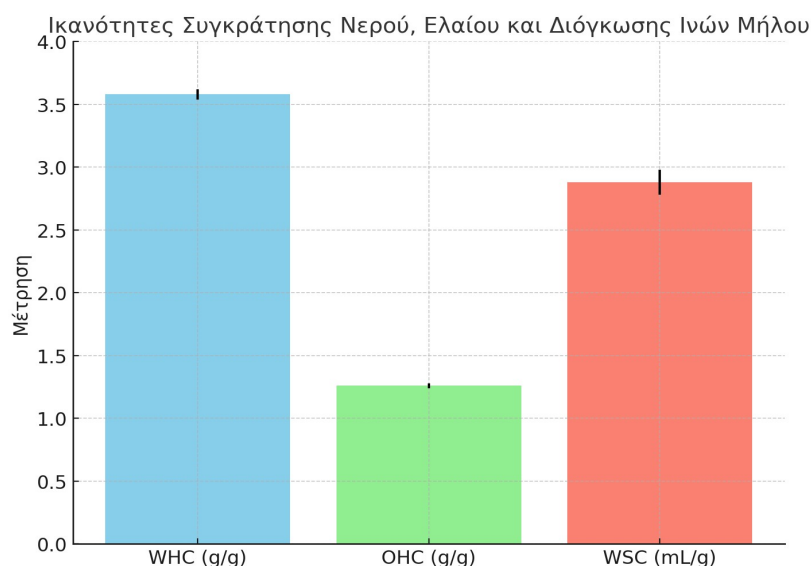
Vo: mL πριν την ενυδάτωση των Ινών Μήλου

Wo: g πριν την ενυδάτωση των Ινών Μήλου

Εφαρμόζοντας, τους παραπάνω τύπους για τους αντίστοιχους μεθόδους ελήφθησαν στα παρακάτω αποτελέσματα, όπως φαίνονται στον Πίνακα 7.1.

Πίνακας 7.1: Ικανότητες Συγκράτησης Νερού, Ελαίου και Διόγκωση στο Νερό Ινών Μήλου.

Χαρακτηριστικά ινών μήλου	
WHC (g/g)	$3,58 \pm 0,04$
OHC (g/g)	$1,26 \pm 0,02$
WSC (mL/g)	$2,88 \pm 0,10$



Διάγραμμα 7.1: Ικανότητες Συγκράτησης Νερού, Ελαίου και Διόγκωση στο Νερό Ινών Μήλου.

Στον Πίνακα 7.1 αποτυπώνονται οι μέσοι όροι καθώς και οι τυπικές αποκλίσεις για το κάθε χαρακτηριστικό των ινών που μελετήθηκε. Αναφορικά με την τιμή της WHC, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι οι ίνες μήλου παρουσιάζουν υψηλή ικανότητα συγκράτησης νερού, φτάνοντας σχεδόν στο τριπλάσιο του βάρους τους σε νερό. Η ικανότητα συγκράτησης υγρασίας (WHC) και ελαίου (OHC) είναι κρίσιμη για βιομηχανικές εφαρμογές, ειδικά στη βιομηχανία τροφίμων, καθώς βελτιώνουν τη σταθερότητα και την υφή των προϊόντων. Το OHC δείχνει την ικανότητα απορρόφησης λίπους, η οποία μπορεί να συμβάλλει στη μείωση της χοληστερόλης (Elleuch et al., 2011; Tadayoni et al., 2015). Οι μετρήσεις δείχνουν υψηλή ακρίβεια, με μικρές τυπικές αποκλίσεις (0,04 για WHC και 0,02 για OHC). Όπως παρουσιάζεται και στο διάγραμμα 7.1, οι ίνες μήλου παρουσιάζουν καλή, αν και χαμηλότερη, ικανότητα δέσμευσης ελαίου σε σχέση με το νερό. Συγκριτικά, η μελέτη των Liu et al. (2021) έδειξε ότι η τροποποίηση διαιτητικών ινών από πίτουρο σιταριού με ένζυμο σαλιγκαριού αύξησε σημαντικά την ικανότητα συγκράτησης νερού και ελαίου, καθώς και την προσρόφηση χοληστερόλης. Τέλος, η WSC των ινών μήλου σύμφωνα με το διάγραμμα 7.1 αποκαλύπτει μια μέτρια διόγκωση στο νερό, με τις μετρήσεις να παρουσιάζουν σχετικά μεγάλη διασπορά. Στην συγκεκριμένη μέθοδο η τυπική απόκλιση εδώ είναι μεγαλύτερη (0,10), πράγμα που σημαίνει ότι οι μετρήσεις για την ικανότητα διαλυτότητας νερού έχουν μεγαλύτερη διασπορά γύρω από τον μέσο όρο, υποδεικνύοντας ότι υπάρχει μεγαλύτερη ποικιλία στις μετρήσεις.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8^ο ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το γιαούρτι, καθώς και το γιαούρτι με ίνες μήλου, προσφέρουν ικανοποιητική προστασία στα κύτταρα του *L. casei* υπό τις δυσμενείς συνθήκες του γαστρεντερικού σωλήνα. Η προστατευτική δράση αυτή μπορεί να αποδοθεί στην ικανότητα των πρωτεϊνών του γιαουρτιού να δημιουργούν ένα προστατευτικό φράγμα γύρω από τα κύτταρα, ενώ οι ίνες μήλου ενισχύουν περαιτέρω αυτήν την προστασία, πιθανόν μέσω της αλληλεπίδρασης τους με τη μικροχλωρίδα του εντέρου ή λόγω της ικανότητας τους να διατηρούν το pH σε πιο ευνοϊκά επίπεδα. Παρόλο που η βιωσιμότητα των ελεύθερων κυττάρων του *L. casei*, καθώς και εκείνων που συνδυάστηκαν με γιαούρτι ή γιαούρτι με ίνες μήλου, μειώθηκε σημαντικά σε διαλύματα χολικών αλάτων και σε γαστρικό υγρό, η χρήση γιαουρτιού, ιδίως σε συνδυασμό με ίνες μήλου, παρουσίασε σημαντικά υψηλότερη προστασία σε σύγκριση με τα ελεύθερα κύτταρα. Συνολικά, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης ενδέχεται να αξιοποιηθούν για την ενίσχυση της παροχής προβιοτικών καλλιεργειών στον ανθρώπινο γαστρεντερικό σωλήνα μέσω της ενσωμάτωσης τους σε ζυμωμένα γαλακτοκομικά προϊόντα. Ωστόσο, απαιτείται πιο συστηματική μελέτη στον τομέα αυτό. Οι φυτικές ίνες, ειδικά οι ίνες μήλου στην παρούσα μελέτη, αποτελούν αναπόσπαστο στοιχείο της διατροφής, με τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες να παίζουν καθοριστικό ρόλο στη λειτουργία του γαστρεντερικού συστήματος. Σε πείραμα που πραγματοποιήθηκε, η δράση τους εξαρτάται από την ικανότητα συγκράτησης νερού (WHC), τη διόγκωση (WSC) και τη συγκράτηση ελαίου (OHC). Η WHC σύμφωνα και με άλλες μελέτες μετράται μέσω φυγοκέντρησης και αναφέρεται στην ποσότητα νερού που συγκρατείται από συγκεκριμένο βάρος ξηρών ινών, λειτουργώντας ως σφουγγάρι υπό προκαθορισμένες συνθήκες (Fleury et al., 1993). Η WHC, OHC και WSC προσφέρουν μια συνολική εικόνα της ικανότητας ενυδάτωσης των ινών. Τα πολυσακχαριτικά συστατικά των φυτικών ινών είναι ιδιαίτερα υδρόφιλα, συγκρατώντας νερό είτε σε υδρόφιλες θέσεις είτε σε κενά της μοριακής δομής τους. Παρόλο, που οι αδιάλυτες ίνες δεν έχουν σημαντική αλληλεπίδραση με το νερό (McRorie, 2015), οι διαλυτές ίνες, όπως οι ίνες μήλου όπου και χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα, εμφάνισαν καλύτερες επιδόσεις. Ωστόσο, απαιτείται συστηματικότερη μελέτη με περισσότερα δείγματα για την αύξηση της

αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων και την διερεύνηση της συμπεριφοράς των ινών μήλου υπό διάφορες συνθήκες, όπως διαφορετικές θερμοκρασίες και επίπεδα pH.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ

- Abdel-Hamid, E. Romeih, R.R. Gamba, E. Nagai, T. Suzuki, T. Koyanagi, *et al.* The biological activity of fermented milk produced by *Lactobacillus casei* ATCC 393 during cold storage. *International Dairy Journal*, 91 (2019), pp. 1-8.
- Abdelfattah, A., Freilich, S., Bartuv, R., Zhimo, V. Y., Kumar, A., Biasi, A., ... & Droby, S. (2021). Global analysis of the apple fruit microbiome: are all apples the same? *Environmental Microbiology*, 23(10), 6038-6055.
- Abdelfattah, A., Tack, A. J., Wasserman, B., Liu, J., Berg, G., Norelli, J., ... & Wisniewski, M. (2022). Evidence for host-microbiome co-evolution in apple. *New Phytologist*, 234(6), 2088-2100.
- Aktas, B., De Wolfe, T. J., Safdar, N., Darien, B. J., & Steele, J. L. (2016). The impact of *Lactobacillus casei* on the composition of the cecal microbiota and innate immune system is strain specific. *PloS One*, 11(5), e0156374.
- Alok A., Singh I.D., Singh S., Kishore M., Jha P.K., Iqbal Md.P. «Probiotics: A New Era of Biotherapy». *Advanced Biomedical Research*, 6, 2017: 31.
- Aryana, KJ, & Olson, DW (2017) A 100-year review: Yogurt and other cultured dairy products. *Journal of Dairy Science*, 100 (12), 9987-10013.
- Bäckhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L. V., Koh, G. Y., Nagy, A., ... & Gordon, J. I. (2004). The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(44), 15718-15723.
- Balthazar, C. F., Silva, H. L., Esmerino, E. A., Rocha, R. S., Moraes, J., Carmo, M. A., Cruz, A. G. (2018). The addition of inulin and *Lactobacillus casei* 01 in sheep milk ice cream. *Food Chemistry*, 246, 464-472.
- Balthazar, C. F., Silva, H. A., Vieira, A. H., Neto, R. P. C., Cappato, L. P., Coimbra, P. T., ... & Cruz, A. G. (2017). Assessing the effects of different prebiotic dietary oligosaccharides in sheep milk ice cream. *Food Research International*, 91, 38-46.
- Bambace, M. F., Alvarez, M. V., & del Rosario Moreira, M. (2019). Novel functional blueberries: Fructo-oligosaccharides and probiotic lactobacilli incorporated into alginate edible coatings. *Food Research International*, 122, 653-660.

- Barengolts E. (2016) Gut microbiota, prebiotics, probiotics, and synbiotics in management of obesity and prediabetes: Review of randomized controlled trials. *Endocrine Practice*, 22(10), 1224–34.
- Bermudez-Brito, M., Plaza-Díaz, J., Muñoz-Quezada, S., Gómez-Llorente, C., & Gil, A. (2012). Probiotic mechanisms of action. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 61(2), 160-174.
- Bhushan, S., Kalia, K., Sharma, M., Singh, B., & Ahuja, P. S. (2008). Processing of apple pomace for bioactive molecules. *Critical Reviews in Biotechnology*, 28(4), 285-296.
- Binns, N. (2013). Probiotics, prebiotics and the gut microbiota (pp. vi+32). *International Life Sciences Institute*. Europe.
- Blaiotta, G., La Gatta, B., Di Capua, M., Di Luccia, A., Coppola, R., & Aponte, M. (2013). Effect of chestnut extract and chestnut fiber on viability of potential probiotic *Lactobacillus* strains under gastrointestinal tract conditions. *Food Microbiology*, 36(2), 161-169.
- Brownlee, I. A. (2011). The physiological roles of dietary fibre. *Food Hydrocolloids*, 25(2), 238-250.
- Buccheri, M., Picchi, V., Grassi, M., Gandin, D., Bianchi, G., & Scalzo, R. L. (2021). Dynamic changes of antioxidants and fermentative metabolites in apple peel in relation to storage, controlled atmosphere, and initial low oxygen stress. *Scientia Horticulturae*, 288, 110312.
- Capuano, E. (2017). The behavior of dietary fiber in the gastrointestinal tract determines its physiological effect. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(16), 3543–3564.
- Chandan, R. C. (2014). Dairy–fermented products. *Food processing: principles and applications*, 405-436.
- Chaplin, M. F. (2003). Fibre and water binding. *Proceedings of the Nutrition Society*, 62(1), 223-227.
- Choi S.S., Kim Y., Han K.S., You S., Oh S., & Kim S.H (2006). «Effects of *Lactobacillus* strains on cancer cell proliferation and oxidative stress in vitro». *Letters in Applied Microbiology*, 42 (5), 2006: 452-458.
- Coelho, S. R., Lima, Í. A., Martins, M. L., Júnior, A. A. B., de Almeida Torres Filho, R., Ramos, A. D. L. S., & Ramos, E. M. (2019). Application of *Lactobacillus*

- paracasei LPC02 and lactulose as a potential symbiotic system in the manufacture of dry-fermented sausage. *Lwt*, 102, 254-259.
- Corrieu G. and Béal C. (2016). Yogurt: The Product and its Manufacture, In: *The Encyclopedia of Food and Health*, 5, 617-624.
- Delgado-Fernández, P., Corzo, N., Olano, A., Hernández-Hernández, O., & Moreno, F. J. (2019). Effect of selected prebiotics on the growth of lactic acid bacteria and physicochemical properties of yoghurts. *International Dairy Journal*, 89, 77-85.
- Duan, N., Bai, Y., Sun, H., Wang, N., Ma, Y., Li, M., ... & Chen, X. (2017). Genome re-sequencing reveals the history of apple and supports a two-stage model for fruit enlargement. *Nature Communications*, 8(1), 249.
- Elleuch, M., Bedigian, D., Roiseux, O., Besbes, S., Blecker, C., & Attia, H. (2011). Dietary fibre and fibre-rich by-products of food processing: Characterisation, technological functionality and commercial applications: A review. *Food Chemistry*, 124(2), 411-421.
- Eswaran, S., Muir, J., & Chey, W. D. (2013). Fiber and functional gastrointestinal disorders. *Official journal of the American College of Gastroenterology|ACG*, 108(5), 718-727.
- FAO/WHO (Food and Agricultural Organisation/World Health Organization) (2006). Report of the 27th Session of the Codex Committee on Nutrition and Foods for Special Dietary Uses. Bonn, Germany.
- FAO/WHO (Food and Agricultural Organisation/World Health Organization) (2001). Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. *Prevention*, 5(1), 1-10. Hotel, A. C. P., & Cordoba, A.
- Fan Y, Pedersen O. (2021) Gut microbiota in human metabolic health and disease. *Nature Reviews Microbiology*, 19(1) 55–71.
- Fisberg, M., & Machado, R. (2015). History of yogurt and current patterns of consumption. *Nutrition Reviews*, 73(suppl_1), 4-7.
- Fish, E. M., & Burns, B. (2022). Physiology, small bowel. In *StatPearls* [Internet]. StatPearls Publishing.
- Flamm, G., Glinsmann, W., Kritchevsky, D., Prosky, L., & Roberfroid, M. (2001). Inulin and oligofructose as dietary fiber: a review of the evidence. *Critical reviews in food science and nutrition*, 41(5), 353-362.

- Fleury, N., & Lahaye, M. (1993). Studies on by-products from the industrial extraction of alginate: 1. Chemical and physical-chemical characteristics of dietary fibres from flotation cellulose. *Journal of applied phycology*, 5, 63-69.
- Flint, H. J., Scott, K. P., Duncan, S. H., Louis, P. and Forano, E. (2012). Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut. *Gut Microbes*, 3(4), 289–306.
- Gasbarrini, G., Bonvicini, F., & Gramenzi, A. (2016). Probiotics history. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 50, S116-S119.
- Georgakouli, K., Mpesios, A., Kouretas, D., Petrotos, K., Mitsagga, C., Giavasis, I., & Jamurtas, A. Z. (2016). The effects of an olive fruit polyphenol-enriched yogurt on body composition, blood redox status, physiological and metabolic parameters and yogurt microflora. *Nutrients*, 8(6), 344.
- Georgieva, M., Andonova, L., Peikova, L., & Zlatkov, A. (2014). Probiotics–Health benefits, classification, quality assurance and quality control–Review. *Pharmacia*, 61(4), 22-31.
- Gibson G.R. and Roberfroid M.B. (1995). Dietary modulation of the human colonie microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*, 125,1401-1412.
- Gibson, G. R., Probert, H. M., Van Loo, J., Rastall, R. A., & Roberfroid, M. B. (2004). Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews*, 17(2), 259-275.
- Gill, S. K., Rossi, M., Bajka, B., & Whelan, K. (2021). Dietary fibre in gastrointestinal health and disease. *Nature Reviews Gastroenterology Hepatology*, 18(2), 101-116.
- Glisic, M., Baltic, M., Glisic, M., Trbovic, D., Jokanovic, M., Parunovic, N., ... & Vasilev, D. (2019). Inulin-based emulsion-filled gel as a fat replacer in prebiotic-and PUFA-enriched dry fermented sausages. *International Journal of Food Science & Technology*, 54(3), 787-797.
- Gomaa, E. Z. (2020). Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 113(12), 2019-2040.
- Gonzalez, N. J., Adhikari, K., & Sancho-Madriz, M. F. (2011). Sensory characteristics of peach-flavored yogurt drinks containing prebiotics and synbiotics. *LWT-food science and technology*, 44(1), 158-163.

- Hipsley, E. H. (1953). Dietary “fibre” and pregnancy toxemia. *British Medical Journal*, 2(4833), 420-422.
- Holzapfel, W.H., Haberer, P., Geisen, R., Bjorkroth, J., and Schillinger, U. (2001), Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 365S-373S.
- Jarchum, I. and Pamer, E. G. (2011). Regulation of innate and adaptive immunity by the commensal microbiota. *Current Opinion in Immunology*, 23, 353–360.
- Kandler, O. and Weiss, N. 1986. Genus *Lactobacillus*, pp. 1063-1065. In, P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol 2, 9th ed. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Katsirma, Z., Dimidi, E., Rodriguez-Mateos, A., & Whelan, K. (2021). Fruits and their impact on the gut microbiota, gut motility and constipation. *Food & Function*, 12(19), 8850-8866.
- Karnopp, A. R., Oliveira, K. G., de Andrade, E. F., Postingher, B. M., & Granato, D. (2017). Optimization of an organic yogurt based on sensorial, nutritional, and functional perspectives. *Food Chemistry*, 233, 401-411.
- Klancic, T., & Reimer, R. A. (2020). Gut microbiota and obesity: Impact of antibiotics and prebiotics and potential for musculoskeletal health. *Journal of Sport and Health Science*, 9(2), 110-118.
- Kowalczyk, M., Znamirska, A., & Buniowska, M. (2021). Probiotic sheep milk ice cream with inulin and apple fiber. *Foods*, 10(3), 678.
- Kruczek, M., Gumul, D., IvaniÅ, E., & GambuÅ, H. (2017). Industrial by products of apple pomace as a potential source of pro-health compounds in functional foods. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 7 (1), 22-26.
- Kurokawa, K., Itoh, T., Kuwahara, T., Oshima, K., Toh, H., Toyoda, A., Takami, H., Morita, H., Sharma, V. K., Srivastava, T. P., Taylor, T. D., Noguchi, H., Mori, H., Ogura, Y., Ehrlich, D. S., Itoh, K., Takagi, T., Sakaki, Y., Hayashi, T. & Hattori, M. (2007). Comparative metagenomics revealed commonly enriched gene sets in human gut microbiomes. *DNA Research*, 14:169–181.
- Lee, B., Yin, X., Griffey, S. M., & Marco, M. L. (2015). Attenuation of colitis by *Lactobacillus casei* BL23 is dependent on the dairy delivery matrix. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(18), 6425-6435.

- Lee, W. J., & Lucey, J. A. (2010). Formation and physical properties of yogurt. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 23(9), 1127-1136.
- Liao, A. M., Zhang, J., Yang, Z. L., Huang, J. H., Pan, L., Hou, Y. C., ... & Hui, M. (2022). Structural, physicochemical, and functional properties of wheat bran insoluble dietary fiber modified with probiotic fermentation. *Frontiers in Nutrition*, 9, 803440.
- Li, B., Liang, L., Deng, H., Guo, J., Shu, H., & Zhang, L. (2020). Efficacy and safety of probiotics in irritable bowel syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Frontiers in pharmacology*, 11, 332.
- 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.
- Lister, J. (1878). *On the lactic fermentation and its bearings on pathology*. JE Adlard.
- Lin, L., & Zhang, J. (2017). Role of intestinal microbiota and metabolites on gut homeostasis and human diseases. *BMC Immunology*, 18, 1-25.
- Liu, X., Suo, K., Wang, P., Li, X., Hao, L., Zhu, J., ... & Lu, J. (2021). Modification of wheat bran insoluble and soluble dietary fibers with snail enzyme. *Food Science and Human Wellness*, 10(3), 356-361.
- Lozupone, C. A., Stombaugh, J. I., Gordon, J. I., Jansson, J. K., & Knight, R. (2012). Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature*, 489(7415), 220-230.
- Lü, M., Yu, S., Deng, J., Yan, Q., Yang, C., Xia, G., & Zhou, X. (2016). Efficacy of probiotic supplementation therapy for *Helicobacter pylori* eradication: a meta-analysis of randomized controlled trials. *PloS one*, 11(10), e0163743.
- Lupton JR, Trumbo PR, 2006. Dietary Fiber. In: Shils ME, Shike M., Ross AC, Caballero B, Cousins RI, eds. *Modern Nutrition in health and disease*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. p83-91.
- Lupton, J. R., Morin, J. L., & Robinson, M. C. (1993). Barley bran flour accelerates gastrointestinal transit time. *Journal of the American Dietetic Association*, 93(8), 881-885.
- 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.

- Ma, M. M., & Mu, T. H. (2016). Effects of extraction methods and particle size distribution on the structural, physicochemical, and functional properties of dietary fiber from deoiled cumin. *Food Chemistry*, 194, 237-246.
- Marteau, P. R., de Vrese, M., Cellier, C. J., & Schrezenmeir, J. (2001). Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. *The American journal of clinical nutrition*, 73(2), 430s-436s.
- Mateos-Aparicio, I., De la Peña Armada, R., Pérez-Cózar, M. L., Rupérez, P., Redondo-Cuenca, A., & Villanueva-Suárez, M. J. (2020). Apple by-product dietary fibre exhibits potential prebiotic and hypolipidemic effects in high-fat fed Wistar rats. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 23, 100219.
- McRorie Jr, J. W. (2015). Evidence-based approach to fiber supplements and clinically meaningful health benefits, part 2: what to look for and how to recommend an effective fiber therapy. *Nutrition today*, 50(2), 90-97.
- de Meij, T. G., de Groot, E. F., Eck, A., Budding, A. E., Kneepkens, C. F., Benninga, M. A., ... & Savelkoul, P. H. (2016). Characterization of microbiota in children with chronic functional constipation. *PloS One*, 11(10), e0164731.
- Mignard, P., Beguería, S., Reig, G., Forcada, C. F., & Moreno, M. A. (2021). Genetic origin and climate determine fruit quality and antioxidant traits on apple (*Malus x domestica* Borkh). *Scientia Horticulturae*, 285, 110142.
- Mishra, V., & Prasad, D. N. (2005). Application of in vitro methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 103(1), 109-115.
- Moschopoulou, E., Moatsou, G., Syrokou, M. K., Paramithiotis, S., & Drosinos, E. H. (2019). Food quality changes during shelf life. In *Food quality and shelf life* (pp. 1-31). Academic Press.
- Musacchi, S., & Serra, S. (2018). Apple fruit quality: Overview on pre-harvest factors. *Scientia Horticulturae*, 234, 409-430.
- Nakazawa Y., Hosono A. (1992). Functions of fermented milk – challenges for the health science. Elsevier Applied Science.
- Narayan, S. S., Jalgaonkar, S., Shahani, S., & Kulkarni, V. N. (2010). Probiotics: current trends in the treatment of diarrhoea. *Hong Kong medical journal*, 16(3), 213.
- Nazir, Y., Hussain, S. A., Abdul Hamid, A., & Song, Y. (2018). Probiotics and their potential preventive and therapeutic role for cancer, high serum cholesterol,

- and allergic and HIV diseases. *BioMed research international*, 2018(1), 3428437.
- O'Connor, A., & O'Moráin, C. (2014). Digestive function of the stomach. *Digestive Diseases*, 32(3), 186-191.
- Ogobuiro, I., Gonzales, J., Shumway, K. R., & Tuma, F. (2023). Physiology, gastrointestinal. In *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing.
- Olek, A., Woynarowski, M., Ahrén, I. L., Kierkuś, J., Socha, P., Larsson, N., & Önning, G. (2017). Efficacy and safety of *Lactobacillus plantarum* DSM 9843 (LP299V) in the prevention of antibiotic-associated gastrointestinal symptoms in children—randomized, double-blind, placebo-controlled study. *The Journal of pediatrics*, 186, 82-86.
- Parvez, S., Malik, K. A., Ah Kang, S., & Kim, H. Y. (2006). Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal of Applied Microbiology*, 100(6), 1171-1185.
- Pereira-Lorenzo, S., Urrestarazu, J., Ramos-Cabrer, A. M., Miranda, C., Pina, A., Dapena, E., ... & Royo, J. B. (2017). Analysis of the genetic diversity and structure of the Spanish apple genetic resources suggests the existence of an Iberian genepool. *Annals of Applied Biology*, 171(3), 424-440.
- Rabetafika, H. N., Bchir, B., Blecker, C., & Richel, A. (2014). Fractionation of apple by-products as source of new ingredients: Current situation and perspectives. *Trends in Food Science & Technology*, 40(1), 99-114.
- Reid, G., Jass, J., Sebulsky, M. T., & McCormick, J. K. (2003). Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clinical microbiology reviews*, 16(4), 658-672.
- Robinson R.K. and Tamime A.Y. (2006). Types of Fermented Milk, In: Fermented Milks, Tamime A.Y. Ed. Blackwell Science.
- Robinson R.K., Lucey J.A., and Tamime A.Y. (2006). Manufacture of Yogurt, In: Fermented Milks, Tamime A.Y. Ed. Blackwell Science.
- Salonen, A., & de Vos, W. M. (2014). Impact of diet on human intestinal microbiota and health. *Annual Review of Food Science and Technology*, 5(1), 239-262.
- Sartor, R. B., & Wu, G. D. (2017). Roles for intestinal bacteria, viruses, and fungi in pathogenesis of inflammatory bowel diseases and therapeutic approaches. *Gastroenterology*, 152(2), 327-339.

- Schleifer, K. H., Kraus, J., Dvorak, C., Kilpper-Bälz, R., Collins, M. D., & Fischer, W. (1985). Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 6(2), 183-195.
- Sfakianakis, P., & Tzia, C. (2014). Conventional and innovative processing of milk for yogurt manufacture; development of texture and flavor: A review. *Foods*, 3(1), 176-193.
- Shalini, R., Gupta, D. K., & Singh, A. (2009). Drying kinetics of apple pomace cake. *Journal of Food Science and Technology*, 46(5), 477.
- Sharifi-Rad, J., Rodrigues, C. F., Stojanović-Radić, Z., Dimitrijević, M., Aleksić, A., Neffe-Skocińska, K., ... & Calina, D. (2020). Probiotics: versatile bioactive components in promoting human health. *Medicina*, 56(9), 433.
- Shete, BS, & Shinkar, NP (2013). Πηγές λυμάτων γαλαктоbioμηχανίας, χαρακτηριστικά και επιπτώσεις στο περιβάλλον. *International Journal of Current Engineering and Technology* , 3 (5), 1611-1615.
- Sidira, M., Galanis, A., Ypsilantis, P., Karapetsas, A., Progaki, Z., Simopoulos, C., & Kourkoutas, Y. (2011). Effect of probiotic-fermented milk administration on gastrointestinal survival of *Lactobacillus casei* ATCC 393 and modulation of intestinal microbial flora. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 19, 224–230.
- Speranza, B., Campaniello, D., Monacis, N., Bevilacqua, A., Sinigaglia, M., & Corbo, M. R. (2018). Functional cream cheese supplemented with *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* DSM 10140 and *Lactobacillus reuteri* DSM 20016 and prebiotics. *Food microbiology*, 72, 16-22.
- Sumrall, E. T., Keller, A. P., Shen, Y., & Loessner, M. J. (2020). Structure and function of *Listeria* teichoic acids and their implications. *Molecular microbiology*, 113(3), 627-637.
- Tadayoni, M., Sheikh-Zeinoddin, M., & Soleimani-Zad, S. (2015). Isolation of bioactive polysaccharide from acorn and evaluation of its functional properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 179-184.
- Tamime, A. Y., & Deeth, H. C. (1980). Yogurt: technology and biochemistry. *Journal of Food Protection*, 43(12), 939-977.
- Tamime A.Y., Robinson R. K. (1999). *Yogurt Science and Technology* , Woodhead Publishing. Cambridge, England.

- Thantsha, M. S., Mamvura, C. I., & Booyens, J. (2012). Probiotics—what they are, their benefits and challenges. *New Advances in the Basic and Clinical Gastroenterology*, 21.
- Tuohy, K. M., Conterno, L., Gasperotti, M., & Viola, R. (2012). Up-regulating the human intestinal microbiome using whole plant foods, polyphenols, and/or fiber. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(36), 8776-8782.
- Trowell H, Southgate DAT, Wolever TMS et al., 1976. Dietary fibre redefined. *The Lancet*, 307(7966), 967.
- Tribby, D. (2009). 8.1 A Brief History of Yogurt. *The Sensory Evaluation of Dairy Products*, 191.
- Vajro, P., Paoletta, G., & Fasano, A. (2013). Microbiota and gut–liver axis: their influences on obesity and obesity-related liver disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 56(5), 461-468.
- Vertzoni, M., Augustijns, P., Grimm, M., Koziolk, M., Lemmens, G., Parrott, N., ... & Wilson, C. G. (2019). Impact of regional differences along the gastrointestinal tract of healthy adults on oral drug absorption: An UNGAP review. *European journal of pharmaceutical sciences*, 134, 153-175.
- Volk, G. M. (2019). Temperate Tree Fruits of North America: *Malus* Mill., *Prunus* L., *Diospyros* L., and *Asimina* Adans. *North American Crop Wild Relatives, Volume 2: Important Species*, 353-386.
- Walstra P., Wouters J. T. M., Geurts T. J. (2006). Dairy Science and technology. Taylor & Francis Group, New York.
- Weerathilake, W. A. D. V., Rasika, D. M. D., Ruwanmali, J. K. U., & Munasinghe, M. A. D. D. (2014). The evolution, processing, varieties and health benefits of yogurt. *International Journal of Scientific and Research Publications*, 4(4), 1-10.
- Wilt, T. J., Shaukat, A., Shamliyan, T., Taylor, B. C., MacDonald, R., Tacklind, J., ... & Levitt, M. (2010). Lactose intolerance and health. *Evidence report/technology assessment*, (192), 1-410.
- Yang, Q., Liang, Q., Balakrishnan, B., Belobrajdic, D. P., Feng, Q. J., & Zhang, W. (2020). Role of dietary nutrients in the modulation of gut microbiota: a narrative review. *Nutrients*, 12(2), 381.
- Yildez, F. (2009) *Development and Manufacture of Yogurt and Other Functional Dairy Products*. CRC Press.

Zawada, A., Rychter, A. M., Ratajczak, A. E., Lisiecka-Masian, A., Dobrowolska, A., & Krela-Kaźmierczak, I. (2020). Does gut-microbiome interaction protect against obesity and obesity-associated metabolic disorders? *Microorganisms*, 9(1), 18.

ΕΛΛΗΝΟΓΛΩΣΣΗ

Κώδικας τροφίμων και Ποτών. Γενικό Χημείο Κράτους. (2009). Άρθρο 82: Γιαούρτι(1).

Κώδικας τροφίμων και Ποτών. Γενικό Χημείο Κράτους. (2016). Άρθρο 82: Γιαούρτι(1).

Ζερφυρίδης Γ. (1998). Διατροφή του Ανθρώπου, 4 η Έκδοση, Εκδόσεις Τσότρας, Θεσσαλονίκη.

Ιωάννης Ν. Θέριος (2013). Ειδική Δενδροκομία Φυλλοβόλα- Οπωροφόρα Δένδρα , Εκδόσεις Γαρταδάκη, Θεσσαλονίκη.

Καμιναρίδης Σ. και Μοάτσου Γ. (2009). Γαλακτοκομία, Εκδόσεις Έμβρυο, Αθήνα.

Καραθανάση Μ. (2016). “Μελέτη Βιωσιμότητας Ακινητοποιημένων Κυττάρων *L. casei* σε συνθήκες Προσομοίωσης του Γαστρεντερικού Συστήματος”. Πτυχιακή Εργασία Τεχνολογίας Τροφίμων και διατροφής. ΤΕΙ Καλαμάτας.
Κεχαγιάς, Χ. (1997). Ποιότητα Γάλακτος και Γαλακτοκομικών προϊόντων. Αθήνα, ΙΟΝ.

Μαντής, Α., Παπαγεωργίου, Δ., Φλετούρης, Δ., & Αγγελίδης, Α. (2000). Υγιεινή και τεχνολογία του γάλακτος και των προϊόντων του. *Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Κτηνιατρικής ΑΠΘ Αφοί Κυριακίδη, Εκδόσεις ΑΕ Θεσσαλονίκη*.

Μάντης Α., Παπαγεωργίου Δ., Φλετούρης Δ., Αγγελίδης Α., (2015). Υγιεινή και Τεχνολογία του Γάλακτος και των Προϊόντων του. Εκδόσεις Αφοί Κυριακίδη, Θεσσαλονίκη.

Μαράκου, Α. (2020). Μελέτη βιωσιμότητας μικροενθυλακωμένων κυττάρων *Lactobacillus casei* σε συνθήκες προσομοίωσης του Γαστρεντερικού συστήματος. Πτυχιακή Εργασία Τεχνολογίας Γεωπονίας και Τεχνολογίας Τροφίμων και Διατροφής. ΤΕΙ Πελοποννήσου.

Χριστοπούλου, Σ. (2022). Εφαρμογή μοντέλου in vitro γαστρεντερικής πέψης για διερεύνηση της επιβίωσης προβιοτικών σε επιλεγμένα λειτουργικά τρόφιμα. Πτυχιακή Εργασία Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής. Αιγαίου Πανεπιστημίου.