

ΑΝΩΤΑΤΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΡΗΤΗΣ

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΣΗΤΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΘΕΜΑ : *« Η χρήση των προβιοτικών στα τρόφιμα και πως η επεξεργασία των τροφίμων ,με τη μέθοδο της μικροενθυλάκωσης επηρεάζει τη δραστηκότητά τους»*

ΦΟΙΤΗΤΡΙΕΣ: ΑΠΟΣΤΟΛΙΔΟΥ ΚΑΣΣΑΝΔΡΑ  
ΚΑΝΕΛΛΗ ΚΑΤΕΡΙΝΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ : ΛΑΠΙΔΑΚΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ

Α.Τ.Ε.Ι. Κρήτης– Παράρτημα Σητείας 2014

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα προβιοτικά περιγράφονται από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας( WHO) ως « οι ζωντανοί οργανισμοί, οι οποίοι όταν χορηγούνται σε επαρκή ποσά προσφέρουν πολλά οφέλη στην υγεία του ξενιστή"(FAO / WHO). Με αυτή την έννοια, τα προβιοτικά, έχουν δείξει σε μερικές μελέτες να αποτελούν αποτελεσματική θεραπεία πολλών εντερικών διαταραχών και να επηρεάζουν θετικά στο ανοσοποιητικό σύστημα (Kurmman & Rasic, 1991). Λαμβάνοντας υπόψη ότι οι μικροοργανισμοί αυτοί καταναλώνονται κυρίως από το στόμα, θα ήταν λογικό να θεωρηθεί ότι τα ευεργετικά αποτελέσματά τους θα ήταν κυρίως εμφανή σε εντερικές παθολογικές καταστάσεις. Ωστόσο οι καθοριστικές τους αυτές επιδράσεις στη συστηματική ανοσοαπόκριση, μπορεί να επιφέρει θετικά αποτελέσματα σε συστηματικές διαταραχές, όπως οι αλλεργίες ή οι φλεγμονώδεις νόσοι και έχουν επίσης επιδείξει μία ευεργετική δράση στη θεραπεία της κολπίτιδας (Reid, 2000).

Οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται συχνότερα είναι οι λακτοβάκιλοι και τα στελέχη μπιφιδοβακτηριδίων (Solanki et al.,2013). Ωστόσο, άλλα είδη, όπως *Escherichia coli* και *Bacillus cereus* έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για να επιτύχουν τους ίδιους στόχους, μαζί με κάποια ζύμη, κυρίως την *Saccharomyces cerevisiae* (Burgain, Gaiani, Linder & Scher, 2011). Μερικά από αυτά τα είδη έχουν ενσωματωθεί στα τρόφιμα, μετατρέποντάς τα σε λειτουργικά τρόφιμα (Champagne, Gardner & Roy, 2005). Αυτά τα είδη των τροφίμων ορίζονται ως τροποποιημένα τρόφιμα ή συστατικά τροφίμων που παρέχουν ένα όφελος για την υγεία πέρα από την ικανοποίηση των παραδοσιακών απαιτήσεων σε θρεπτικά συστατικά (Reid, 2000).

Για να παραχθούν αυτές οι ευεργετικές επιδράσεις για την υγεία, τα προβιοτικά πρέπει να έχουν την ικανότητα να επιβιώσουν και να πολλαπλασιαστούν μέσα στον ξενιστή. Στο πλαίσιο αυτό, τα προβιοτικά πρέπει να είναι μεταβολικώς σταθερά και ενεργά στο προϊόν, να επιβιώνουν κατά τη διέλευση μέσω του στομάχου και να φτάνουν στο έντερο σε ικανοποιητική ποσότητα (Sanz, 2007). Ωστόσο, διάφοροι παράγοντες έχουν αναφερθεί ότι επηρεάζουν τη βιωσιμότητα των προβιοτικών, συμπεριλαμβανομένου του pH, το υπεροξειδίο του υδρογόνου, το οξυγόνο, η θερμοκρασία αποθήκευση. Διαφορετικές προσεγγίσεις που αυξάνουν την αντίσταση αυτών των ευαίσθητων

μικροοργανισμών ενάντια δυσμενείς συνθήκες έχει προταθεί, όπως η κατάλληλη επιλογή του οξέος και οι ανθεκτικές πιέσεις των χολικών, η χρήση δοχείων αδιαπέραστων σε οξυγόνο, η ζύμωσης δύο σταδίων, η προσαρμογή της πίεσης, η ενσωμάτωση των μικροθρεπτικών συστατικών όπως είναι τα πεπτίδια και τα αμινοξέα, και η μικροενθυλάκωση (Sarkar, 2010).

Η τελευταία περίπτωση, δηλαδή η μικροενθυλάκωση, είναι μία από τις πιο αποτελεσματικές μεθόδους και ενδείκνυται για περαιτέρω μελέτη και έρευνα. Η μικροενθυλάκωση μπορεί να οριστεί ως η διαδικασία στην οποία τα κύτταρα διατηρούνται μέσα σε μια μεμβράνη ενθυλάκωσης για να μειώσουν την φθορά ή την απώλεια των προβιοτικών κυττάρων, με τέτοιο τρόπο ώστε να οδηγήσει στην απελευθέρωση των κατάλληλων μικροοργανισμών στο έντερο (Sultana et al., 2010). Μερικά οφέλη της μικροενθυλάκωσης των κυττάρων περιλαμβάνουν: προστασία από τους βακτηριακούς και καταστρεπτικούς παράγοντες, αυξάνοντας την επιβίωση των ενθυλακωμένων κυττάρων κατά τη της λυοφιλοποίησης, την ψύξη και την αποθήκευση και μετατρέποντας τους σε μια μορφή σκόνης για ευκολότερη χρήση, δεδομένου ότι βελτιώνει την ομοιόμορφη κατανομή τους σε όλο το προϊόν (Mortazavian, Razavi, Ehsani & Sohrabvandi, 2007).

Λαμβάνοντας υπόψη τη σημασία της μικροενθυλάκωσης, ο στόχος αυτής της εργασίας είναι να αναφερθούν, τα οφέλη των προβιοτικών για την υγεία του ανθρώπου, οι τεχνικές για τη μικροενθυλάκωση των προβιοτικών, καθώς επίσης και οι επιπτώσεις που μπορεί να επιφέρουν στην βιοδιαθεσιμότητα των προβιοτικών οι τεχνικές αυτές.

**Λέξεις κλειδιά:** προβιοτικά, πρεβιοτικά, συμβιοτικά, μικροενθυλάκωση, Ξήρανση με ψεκασμό, Λυοφιλίωση, Ψύξη με ψεκασμό

## ABSTRACT

Probiotics are described by the World Health Organization (WHO) as “live organism, which when administered in adequate amounts confer health benefits to the host” (FAO/WHO). In this sense, probiotics have shown in some studies, to be effective in the treatment of several intestinal disorders and to have an impact on the immune system (Kurmann & Rasic, 1991). Considering that these microorganisms are mainly consumed orally, it would be reasonable to believe that its beneficial effects would be mainly apparent in these intestinal pathologies. However, their modulatory effects on systemic immune response may lead to positive effects in systemic disorders such as allergy (Majamaa & Isolauri, 1997) or inflammatory diseases (Malchow, 1997) and they also have demonstrated a beneficial effect in the treatment of vaginitis (Reid, 2000).

The most used probiotics microorganisms are lactobacillus and bifidobacteria strains (Solanki et al., 2013). However, other species, such as *Escherichia coli* and *Bacillus cereus* have also been used to achieve the same objectives, together with some yeast, mainly *Saccharomyces cerevisiae* (Burgain, Gaiani, Linder & Scher, 2011). Some of these species have been incorporated in foods converting them in functional food (Champagne, Gardner & Roy, 2005). These kinds of aliments are defined as modified food or food ingredient that provides a health benefit beyond satisfying traditional nutrient requirements (Reid, 2000).

To produce these beneficial effects in health, probiotic have to be able to survive and multiply in the host. In this respect, probiotic should be metabolically stable and active in the product, survive passage through the stomach and reach the intestine in large amount (Sanz, 2007). However, several factors have been reported to affect the viability of probiotics, including pH, hydrogen peroxide, oxygen, storage temperature, among others (Shah, Lankaputhra, Britz & Kyle, 1995). Different approaches that increase the resistance of these sensitive microorganisms against adverse conditions have been proposed, including appropriate selection of acid and bile resistant strains, use of oxygen-impermeable containers, two step fermentation, stress adaptation, incorporation of micronutrients such as peptides and aminoacids, and microencapsulation (Sarkar, 2010). The last option, microencapsulation, is one of the most efficient methods, and has been under especial consideration and investigation. Microencapsulation can be defined as the process in which cells are retained within an encapsulating membrane to reduce cell injury or cell lost, in a way that result in appropriate microorganisms release in the gut

(Sultana et al., 2010). Some benefits of microencapsulation of cells include: protection from bacteriophages and detrimental factors increasing survival during freeze drying, freezing and storage and converting them into a powder form easier to use, since it enhance their homogeneous distribution throughout the product (Mortazavian, Razavi, Ehsani & Sohrabvandi, 2007)

Considering the importance of microencapsulation, the goal of this work is to mention the benefits of probiotics for human health, the techniques for microencapsulation of probiotics, as well as the impact may cause the bioavailability of probiotics these techniques

**Key word:** probiotics, prebiotics, synbiotics, microencapsulation, spray drying , yophilisation, spray cooling/chilling

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 - ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΑ

- 1.1 Ορισμός των προβιοτικών οργανισμών
- 1.2 Περιγραφή των προβιοτικών οργανισμών
- 1.3 Που συναντάμε τους προβιοτικούς οργανισμούς
  - 1.3.1 Γάλα
  - 1.3.2 Γιαούρτι
  - 1.3.3 Τυρί
  - 1.3.4 Κεφίρ
  - 1.3.5 Dahi
  - 1.3.6 Kumys
- 1.4 Μορφές προβιοτικών
- 1.5 Τρόπος δράσης των προβιοτικών
- 1.6 Προβιοτικοί μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται στο εμπόριο
- 1.7 Κριτήρια επιλογής των προβιοτικών μικροοργανισμών
- 1.8 Θετικές επιδράσεις των προβιοτικών μικροοργανισμών
- 1.9 Παράγοντες που επηρεάζουν τον εντερικό μικροβιόκοσμο
  - 1.9.3. Στρες*
  - 1.9.2. Ηλικία*
  - 1.9.1 Διατροφή*
- 1.10 Πρεβιοτικά και Συμβιοτικά
  - 1.10.1. Προβιοτικά
  - 1.10.2 Συμβιοτικά

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 – ΜΙΚΡΟΕΝΘΥΛΑΚΩΣΗ

- 2.1 Ορισμός Μικροενθυλάκωσης
- 2.2 Πλεονεκτήματα ενθυλάκωσης συστατικών
- 2.3 Μέθοδοι Μικροενθυλάκωσης
- 2.4 Μέσα εγκλεισμού
- 2.5 Μέθοδοι μελέτης μικροενθυλάκωσης

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 – ΕΝΘΥΛΑΚΩΣΗ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ**

- 3.1 Γενικά
- 3.2. Υλικά για την ενθυλάκωση των προβιοτικών
  - 3.2.1 Πολυσακχαρίτες
  - 3.2.2 *Ολιγοσακχαρίτες*
  - 3.2.3 *Λιπίδια*
  - 3.2.4 *Πρωτεΐνες*
- 3.3 Τεχνικές ενθυλάκωσης: Λειτουργούσες παράμετροι, πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα
- 3.4. Κύριες Τεχνικές για την ενθυλάκωση των προβιοτικών
  - 3.4.1 Ξήρανση με ψεκασμό (spray drying)
  - 3.4.2 Ψύξη με ψεκασμό (spray cooling/chilling)
  - 3.4.3. Επικάλυση σε ρευστοποιημένη κλίνη (fluidized bed coating)
  - 3.4.4. Λυοφιλίωση ή ξήρανση με κατάψυξη (lyophilisation)
  - 3.4.5. Εξώθηση ή εκβολή (extrusion)
  - 3.4.6. Γαλακτωματοποίηση (Emulsion Method)
  - 3.4.7. Συγκρυστάλλωση (cocrystallization)
  - 3.4.8. Εγκλεισμός σε τροποποιημένο άμυλο
  - 3.4.9. Εγκλεισμός σε λιποσώματα (liposome entrapment)
  - 3.4.10. Ενθυλάκωση σε ζύμες (yeast encapsulation)
- 3.5. Υλικά επικάλυψης κατά την ενθυλάκωση των προβιοτικών
  - 3.5.1 Ενθυλάκωση Προβιοτικών με τη χρήση Αλγινικού
  - 3.5.2 Ενθυλάκωση προβιοτικών με τη χρήση κόμμι τζελάν και κόμμι ξανθάνης
  - 3.5.3 Ενθυλάκωση προβιοτικών με τη χρήση χιτοζάνης
  - 3.5.4 Ενθυλάκωση προβιοτικών με τη χρήση Κ Καραγενάνης
  - 3.5.5 Ενθυλάκωση προβιοτικών με τη χρήση ζελατίνης
  - 3.5.6. Ενθυλάκωση προβιοτικών με τη χρήση αμύλου
  - 3.5.7. Ενθυλάκωση των προβιοτικών με τη χρήση οξικής φθαλικής κυτταρίνης
  - 3.5.8. Ενθυλάκωση προβιοτικών με τη χρήση πρωτεϊνών γάλακτος
  - 3.5.9. Ενθυλάκωση των προβιοτικών Μαζί Με πρεβιοτικά
- 3.6. Μέθοδοι για τον έλεγχο της απελευθέρωσης των ενθυλακωμένων συστατικών
- 3.7. Μελέτες αποτελεσμάτων των ενθυλακωμένων βακτηρίων σε ορισμένες παθολογικές καταστάσεις

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ**

- 4.1 Συμπεράσματα και μελλοντικές κατευθύνσεις

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

---

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

## ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΑ

---



## **1.1 Ορισμός των προβιοτικών οργανισμών**

Τα προβιοτικά ορίζονται ως οι ζωντανοί μικροοργανισμοί που όταν χορηγούνται σε επαρκή ποσότητα παρέχουν πολλά οφέλη για την υγεία του ξενιστή, δηλαδή στον ανθρώπινο ζωντανό οργανισμό, (WHO, 2006). Επειδή μπορούν να μένουν ζωντανοί μέσα στο έντερο και να παρέχουν ευεργετικά αποτελέσματα για την υγεία του ξενιστή, τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος (LAB), τα βακτήρια μη γαλακτικού οξέος και οι ζύμες μπορούν να θεωρηθούν προβιοτικά. Τα LAB θεωρούνται τα σημαντικότερα προβιοτικά με ευεργετικά αποτελέσματα στον ανθρώπινο γαστρεντερικό σωλήνα (GI), (Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M., & Scher, J. 2011)

## **1.2 Περιγραφή των προβιοτικών οργανισμών**

Αρκετοί ωφέλιμοι μικροοργανισμοί είναι εγκατεστημένοι στον γαστρεντερικό σωλήνα του ανθρώπου. Οι οργανισμοί FAO/WHO, 2002 ορίζουν τα προβιοτικά ως ζωντανούς μικροοργανισμούς οι οποίοι όταν χορηγούνται σε κατάλληλες ποσότητες βελτιώνουν την υγεία του ξενιστή. Σύμφωνα με τον Fuller (1989) προβιοτικό είναι ένα συμπλήρωμα διατροφής με ζωντανά μικρόβια, το οποίο επιδρά θετικά στο ξενιστή ζώο, βελτιώνοντας τη μικροβιακή ισορροπία του εντέρου του. Σύμφωνα με τους Huis in 't Veld και Havenaar (1991) τα προβιοτικά ορίζονται ως απλές ή μεικτές καλλιέργειες ζωντανών οργανισμών, οι οποίες όταν χορηγηθούν σε άνθρωπο ή σε ζώο επιδρούν θετικά, βελτιώνοντας τις ιδιότητες της ενδογενούς τους μικροχλωρίδας. Σύμφωνα με ομάδα επιστημόνων υπό την αιγίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Salminen et al. 1998), ως προβιοτικά ορίζονται τα συστατικά των τροφίμων που αποτελούνται από ζωντανούς μικροοργανισμούς και δρουν ευεργετικά στην υγεία. Πρόσφατα τα προβιοτικά χαρακτηρίστηκαν ως ζωντανοί μικροοργανισμοί που παρουσιάζουν αντοχή στις γαστρικές, χολικές και παγκρεατικές εκκρίσεις, προσκολλώνται στα επιθηλιακά κύτταρα και δημιουργούν αποικίες στο έντερο του ανθρώπου (Del Piano et al. 2006). Έτσι, ο ορισμός των προβιοτικών άλλαξε από την αρχική του περιγραφή ως ζωντανή καλλιέργεια που επιδρά θετικά στην υγεία του ξενιστή επηρεάζοντας τη μικροβιακή ισορροπία του εντέρου, και εξελίχθηκε στη συνέχεια να περιλαμβάνει και κλινικές επιδράσεις ( Isolauri et al., 2004 ). Οι καλλιέργειες και το γάλα με προβιοτικές ιδιότητες που έχουν υποστεί ζύμωση έχουν μακρά ιστορική

διαδρομή. Στη Βίβλο υπάρχουν αρκετές αναφορές στα όξινα γάλατα ενώ το 1908 ο Metchnikoff αναφέρεται στη διατροφή των Βουλγάρων, η οποία περιλάμβανε γιαούρτι εμπλουτισμένο με λακτοβάκιλλους, και τη συσχέτιζε με την παράταση του χρόνου ζωής (Azizpour et al., 2009).

Οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί είναι συνήθως ανθρώπινης προέλευσης και δεν είναι παθογόνοι. Είναι απαραίτητο να διατηρούν τη ζωτικότητα τους κατά τη διάρκεια των τεχνολογικών διεργασιών που υφίσταται το τρόφιμο αλλά και κατά τη διάρκεια της διέλευσής τους από το γαστρεντερικό σωλήνα. Επίσης, είναι επιθυμητή η ακινητοποίησή τους στο επιθήλιο του εντέρου, η ανταγωνιστική δράση έναντι των παθογόνων μικροοργανισμών καθώς και η ανθεκτικότητά τους σε αντιβιοτικές ουσίες. Οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί διατηρούνται ζωντανοί όταν βρίσκονται σε λυοφιλιωμένη μορφή καθώς και όταν εμβολιάζονται σε ζυμωμένα γαλακτοκομικά προϊόντα. Η περισσότερο αποδεκτή μορφή χορήγησης των προβιοτικών μικροοργανισμών από τους καταναλωτές είναι αυτοί που περιέχονται σε ζυμωμένα τρόφιμα και αναψυκτικά, όπως ζυμωμένα προϊόντα γάλακτος (Lee and Salminen, 1995).

Σήμερα, τα προβιοτικά προϊόντα διευρύνουν διαρκώς το μερίδιό τους στη αγορά κυρίως στις ανεπτυγμένες χώρες της Ευρώπης, της Ιαπωνίας, της Αυστραλίας και της Αμερικής. Στην Ευρώπη, ο τομέας των γαλακτοκομικών καταλαμβάνει το μεγαλύτερο μέρος στην αγορά των προβιοτικών. Τα προϊόντα με τη μεγαλύτερη κατανάλωση είναι τα προβιοτικά γιαούρτια και τα προϊόντα γάλακτος που έχουν υποστεί ζύμωση. Μερικά από τα προβιοτικά τρόφιμα περιέχουν επιπλέον βιοενεργά συστατικά όπως φυτικές στανόλες και στερόλες που μειώνουν τα επίπεδα της χοληστερόλης (Hilliam, 1998).

### **1.3 Που συναντάμε τους προβιοτικούς οργανισμούς**

Πηγές προβιοτικών αποτελούν τα γαλακτοκομικά που υπάρχουν στην διατροφή του ανθρώπου από την αρχαιότητα.

### *1.3.1 Γάλα*

Στη λιβυκή έρημο ανακαλύφθηκαν σε βράχους χαραγμένα σχέδια που έχουν γίνει το 9000πχ και απεικονίζουν λατρεία στις αγελάδες. Μερικά από τα παλαιότερα αρχαία προτείνουν την ανάπτυξη της γαλακτοπαραγωγής στην αρχαία Ινδία, την Μεσοποταμία και την Αίγυπτο απ' το 6000 πχ. Ένα γλυπτό στη μέση Ανατολή που χρονολογείται γύρω στο 2900-2460πχ δείχνει την ανάπτυξη ενός συστήματος επεξεργασίας γάλακτος, στο εργοστάσιο Teil Ubaid.(IDF, 1984)

### *1.3.2 Γιαούρτι*

Ο Elie Metchnikoff υπέθεσε την έννοια προβιοτικών γύρω στο έτος 1900, όταν παρατήρησε ότι η μακρά, υγιή ζωή των Βούλγαρων αγροτών ήταν το αποτέλεσμα της κατανάλωσης γαλακτοκομικών προϊόντων ζύμωσης. Αργότερα διαπιστώθηκε ότι το γιαούρτι περιείχε τα αναγκαία για την προστασία των οργανισμών του εντέρου από τις βλαβερές συνέπειες των άλλων επιβλαβών βακτηρίων. Το γιαούρτι παρασκευάζεται με την προσθήκη βακτηρίων στο γάλα, τα οποία έχουν πρωτεολυτική δραστηριότητα. Αποτέλεσμα αυτής της δραστηριότητας είναι η κατανομή της πρωτεΐνης του γάλακτος, η οποία είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη των βακτηρίων που προκαλεί την απελευθέρωση μικρών πεπτιδίων και αμινοξέων. Η πρωτεολυτική δράση δεν μεταβάλλει σημαντικά την θρεπτική αξία των πρωτεϊνών του γάλακτος

### *1.3.3Τυρί*

Έγινε για πρώτη φορά κατά λάθος όταν ένας Άραβας έμπορος έβαλε μία ποσότητα γάλακτος σε μία σακούλα από το στομάχι ενός προβάτου και η πυτιά σε συνδυασμό με τη θερμότητα του ήλιου προκάλεσε το διαχωρισμό του γάλακτος σε τυρόπηγμα. Αυτό καταγράφεται στο 7000 π.Χ. . Περίπου το 1878 ο Hansen στη Δανία ένταξε στο εμπόριο τη διαδικασία για την προετοιμασία της πυτιάς και στις αρχές του 1900 εισήγαγε στην αγορά καλλιέργειες για παραγωγή τυροκομικών. Αυτό έδωσε ώθηση στην παρασκευή τυριού ( Storch, V., 1985).

Πολλές ποικιλίες τυριών χρειάζονται παραπάνω από 6 μήνες για να ωριμάσουν με αποτέλεσμα την ανάπτυξη προβιοτικών. Ορισμένες ποικιλίες τυριών έχουν ερευνηθεί ως φορείς προβιοτικών μικροοργανισμών συμπεριλαμβανομένων cheddar,( Mahalakshmi, R. and Murthy, 2000,), λευκά αλμυρά, κατσικίσιο, crescenza (Gobbetti, M., et al. 1998.), παραδοσιακό cottage, kariesh, cunestrato pugliese (Edward R. Farnworth, Ph.D.,2003).

#### 1.3.4 Κεφίρ

Παρασκευάστηκε αρχικά στις βόρειες πλαγιές του Καυκάσου. Παραδοσιακά φτιάχνεται με προσθήκη κόκκων κεφίρ στο γάλα. Το τελικό προϊόν έχει αυξημένη οξύτητα, υψηλή συγκέντρωση σε πολυσακχαρίτες και διοξείδιο του άνθρακα. Σήμερα παρασκευάζεται και καταναλώνεται κυρίως στην Ανατολική Ευρώπη, από τη δράση βακτηριδίων γαλακτικού οξέος, ζυμομυκήτων. (Koroleva, N.S.1988, IDF 1991) Αυτό το μίγμα μικροοργανισμών παράγει ένα γαλακτοκομικό προϊόν με μοναδικές ιδιότητες, από γάλα προβατίνας, αγελάδας, αιγών και βουβαλιού (Edward R. Farnworth, Ph.D., 2003).

#### 1.3.5 Dahi

Ένα μεγάλο μέρος των γαλακτοκομικών προϊόντων αναπτύχθηκαν από νομαδικές εκτροφές βοοειδών στην Ασία. Σχεδόν κάθε πολιτισμός έχει αναπτύξει ζύμωση κάποιου τύπου γάλακτος. Dahi ονομάζεται το δημοφιλές ινδικό προϊόν ζύμωσης που παρασκευάζεται από το γάλα βουβαλιού, το οποίο είναι ανάλογο με το απλό γιαούρτι σε εμφάνιση και συνοχή. (Yegna Narayan Aiyar, A.K, 2003)

#### 1.3.6 Kumys

Παρασκευάζεται από φοράδες και καταναλώνεται ευρέως σε όλη την Ανατολική Ευρώπη και στις ασιατικές περιοχές. Η ονομασία προέρχεται από την φυλή Kumanes που ζούσαν κατά μήκος του ποταμού Kumane στις ασιατικές στέπες. (Koroleva, N.S.1988)

### 1.4 Μορφές προβιοτικών

Τα προβιοτικά μπορούν να καταναλωθούν είτε ως προϊόντα διατροφής (που έχουν υποστεί ζύμωση ή δεν έχουν υποστεί ζύμωση) ή ως διαιτητικά συμπληρώματα (προϊόντα σε σκόνη, κάψουλα ή δισκίο μορφές).

Η κατανάλωση προβιοτικών κυττάρων μέσω των προϊόντων διατροφής είναι η πιο δημοφιλή προσέγγιση προς το παρόν. Τα τρόφιμα στα οποία βρίσκονται αναφέρονται ως λειτουργικά τρόφιμα και η αναζήτησή τους αυξάνεται με ταχείς ρυθμούς λόγω της αύξησης της ευαισθητοποίησης των καταναλωτών.

Σημαντική επιτυχία έχει επιτευχθεί κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών στην ανάπτυξη των γαλακτοκομικών προϊόντων που περιέχουν προβιοτικά

βακτήρια, όπως γάλατα που έχουν υποστεί ζύμωση, παγωτό, διάφορα είδη τυριών, παιδικές τροφές, γάλα σε σκόνη, κατεψυγμένα γαλακτοκομικά επιδόρπια, κρέμα γάλακτος, βουτυρόγαλα, (Mohammadi & Mortazavian, 2011). Ωστόσο, έχοντας κατά νου το υψηλό ποσοστό της δυσανεξίας στη λακτόζη καθώς και τους χορτοφάγους άρχισαν να κυκλοφορούν στο εμπόριο διάφορα μη-γαλακτοκομικά προβιοτικά προϊόντα, με βάση τα δημητριακά, όπως ζυμωμένα προϊόντα βρώμης, οι χυμοί φρούτων και τα ζυμωμένα προϊόντα σόγιας. (Anekella & Orsat, 2013, Chen & Mustapha, 2012, Granato et al. 2010, Gupta & Abu-Ghannam, 2012, Lee & Salminen, 1995, Mortazavian, Khosrokhvar, Rastegar, & Mortazaei, 2010, Noorbakhsh, Yaghmaee, & Durance, 2013, Rivera-Espinoza & Gallardo-Navarro, 2010)

## **1.5 Τρόπος δράσης των προβιοτικών**

Τα προβιοτικά τρόφιμα πρέπει να είναι ασφαλή και να περιλαμβάνουν τον κατάλληλο αριθμό προβιοτικών μικροοργανισμών σε επαρκή ποσότητα την στιγμή της κατανάλωσης. Τότε παρέχουν μια σειρά από οφέλη για την υγεία, κυρίως μέσω της διατήρησης της φυσιολογικής εντερικής μικροχλωρίδας και την προστασία έναντι γαστρεντερικών παθογόνων (D'Aimmo, Modesto, & Biavati, 2007, Lourens-Hattingh & Viljoen, 2001), της ενίσχυσης του ανοσοποιητικού συστήματος (Gilliland, 1990), την μείωση του επιπέδου της χοληστερόλης στον ορό και της αρτηριακής πίεσης (Rasic, 2003), της αντι-καρκινογόνου δράσης (Rasic 2003), της βελτίωσης της χρησιμοποίησης των θρεπτικών ουσιών και της διατροφικής αξίας των τροφίμων (Lourens-Hattingh & Viljoen, 2001), διατήρηση της υγείας της εντερικής χλωρίδας, στη διέγερση του ανοσοποιητικού τη σύνθεση βιταμινών και αντιμικροβιακών παραγόντων, διευκόλυνση στη πέψη των πρωτεϊνών. (Rafter, J. 2003).

Κάθε είδος προβιοτικών βακτηρίων έχει διαφορετικά οφέλη για την υγεία. (Lee, Nomoto, Salminen, & Gorbach, 1999). Η ποσότητα που χρειάζεται να λαμβάνεται καθημερινά εξαρτάται από το είδος του προβιοτικού. Θεωρείται ότι στόχος είναι η κατανάλωση 10<sup>6</sup> – 10<sup>7</sup> CFU/g προϊόντος ανά ημέρα, ώστε να επωφεληθεί ο ξενιστής από τις ευεργετικές του ιδιότητες. (Krasaekoopt, W., Bhandari, B., Deeth, H. 2003) Οι Mann και Sroerry (1974) ανακάλυψαν ότι τα επίπεδα της χοληστερόλης στον ορό του αίματος μειώνονται σημαντικά από το γιαούρτι που έχει υποστεί ζύμωση με άγρια στελέχη του

Lactobacillus. Ο Heese (1975) διαπίστωσε μειωμένα επίπεδα της χοληστερόλης του ορού με την κατανάλωση βρεφικής φόρμουλας που περιέχει κύτταρα του Lactobacillus acidophilus.

Υποτίθεται ότι αυτά τα οφέλη μπορεί να προκύψουν από την ανάπτυξη και την δράση των προβιοτικών κατά την παρασκευή των τροφίμων, ενώ μερικά μπορεί να προκύψουν από την ανάπτυξη και τη δράση ορισμένων ειδών των προβιοτικών στην εντερική οδό (Rasic, 2003). Ο Stanton το 2005, ανέφερε ότι τα οφέλη για την υγεία από τα λειτουργικά τρόφιμα που έχουν υποστεί ζύμωση είναι είτε λόγω της προβιοτικής δράσης (μέσω της αλληλεπίδρασης των ζωντανών μικροοργανισμών με τον ξενιστή), ή έμμεσα λόγω βιογενών αποτελεσμάτων ως συνέπεια της αφομοίωσης των μικροβιακών μεταβολιτών που παράγονται κατά τη διαδικασία της ζύμωσης.

## 1.6 Προβιοτικοί μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται στο εμπόριο

Αν και μια ευρεία ποικιλία από διάφορα είδη μικροοργανισμών θεωρούνται ως πιθανοί προβιοτικοί (Holzapfel, Haberer, Snel, Schillinger, & Huisin't Veld, 1998 Shah & Ravula, 2004) εκείνοι που χρησιμοποιούνται στα προβιοτικά τρόφιμα είναι κυρίως βακτηρίδια από την γένη Lactobacillus και Bifidobacterium. Ο κύριος λόγος είναι τόσο για την μακρά ιστορία ασφαλούς χρήσης τους κι επειδή τα μικρόβια του γένους Lactobacillus είναι κυρίαρχοι μικροοργανισμοί στο λεπτό έντερο και του γένους Bifidobacterium κυρίαρχοι στο παχύ έντερο. Μικροοργανισμοί που συνήθως χρησιμοποιούνται ως προβιοτικές καλλιέργειες δίνονται στον πίνακα 1

Πίνακας 1. *Είδη μικροοργανισμών που χρησιμοποιούνται ως προβιοτικά (Shortt, 1999).*

Λακτοβάκιλλοι	Bifidobacteria	Άλλα γαλακτικά βακτήρια	Άλλοι μικροοργανισμοί
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Bifidobacterium animalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Bifidobacterium breve</i>		<i>Saccharo myces</i>

			<i>boulardi</i>
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	<i>Bifidobacterium infantii</i>		<i>Clostridium butyricum</i>
<i>Lactobacillus reuter</i>	<i>Bifidobacterium longum</i>		
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>		
<i>Lactobacillus salvarius</i>	<i>Bifidobacterium lactis</i>		
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Bifidobacterium bifidum</i>		
<i>Lactobacillus crispatus</i>			

Οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί είναι συνήθως ανθρώπινης προέλευσης και δεν είναι παθογόνοι. Είναι απαραίτητο να διατηρούν τη ζωτικότητα τους κατά τη διάρκεια των τεχνολογικών διεργασιών που υφίσταται το τρόφιμο αλλά και κατά τη διάρκεια της διέλευσής τους από το γαστρεντερικό σωλήνα. Επίσης, είναι επιθυμητή η ακινητοποίησή τους στο επιθήλιο του εντέρου, η ανταγωνιστική δράση έναντι των παθογόνων μικροοργανισμών καθώς και η ανθεκτικότητά τους σε αντιβιοτικές ουσίες. Οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί διατηρούνται ζωντανοί όταν βρίσκονται σε λυοφιλιωμένη μορφή καθώς και όταν εμβολιάζονται σε ζυμωμένα γαλακτοκομικά προϊόντα. Η περισσότερο αποδεκτή μορφή χορήγησης των προβιοτικών μικροοργανισμών από τους καταναλωτές είναι αυτοί να περιέχονται σε ζυμωμένα τρόφιμα και αναψυκτικά, όπως ζυμωμένα προϊόντα γάλακτος (Lee and Salminen, 1995). Εκτός των γαλακτοκομικών προϊόντων, εξετάζεται η προσθήκη προβιοτικών μικροοργανισμών σε τρόφιμα που δεν περιέχουν γάλα, όπως ειδικές τροφές για βρέφη, παιδικές τροφές, χυμοί φρούτων που έχουν υποστεί ζύμωση, ζυμωμένα προϊόντα σόγιας και προϊόντα με βάση τα δημητριακά, όπως ζυμωμένα προϊόντα βρώμης. Σήμερα, τα προβιοτικά προϊόντα διευρύνουν διαρκώς το μερίδιό τους στην αγορά, κυρίως στις ανεπτυγμένες χώρες της Ευρώπης, της Ιαπωνίας, της Αυστραλίας και της Αμερικής. Στην Ευρώπη, ο τομέας των γαλακτοκομικών καταλαμβάνει το μεγαλύτερο μέρος στην αγορά των προβιοτικών. Τα προϊόντα με τη μεγαλύτερη κατανάλωση είναι τα προβιοτικά γιαούρτια και τα προϊόντα γάλακτος που έχουν υποστεί ζύμωση. Μερικά από τα προβιοτικά τρόφιμα περιέχουν επιπλέον βιοενεργά συστατικά όπως φυτικές στανόλες και στερόλες που μειώνουν τα επίπεδα της χοληστερόλης (Hilliam, 1998).

## 1.7 Κριτήρια επιλογής των προβιοτικών μικροοργανισμών

Διαφορετικά είδη προβιοτικών μικροοργανισμών καθώς και διαφορετικά στελέχη του ίδιου είδους, έχουν χαρακτηριστικές ιδιότητες οι οποίες επηρεάζουν σημαντικά την επιβίωσή τους στα τρόφιμα, τις ζυμωτικές και προβιοτικές τους ιδιότητες (Klaenhammer, 2001). Η επιλογή των κατάλληλων κάθε φορά στελεχών έχει ιδιαίτερη σημασία τόσο για την συμπεριφορά της καλλιέργειας όσο και για την εκδήλωση των προβιοτικών ιδιοτήτων της (Πίνακας 2).

Πίνακας 2. Κριτήρια επιλογής μικροοργανισμών με προβιοτικές ιδιότητες (Ouwehand *et al.*, 1999; Klenhammer, 2001).

---

<b>Καταλληλότητα</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Ασφάλεια, μη τοξικότητα, η παθογένεια, γενικά αναγνωρισμένο ως ασφαλές (GRAS)</li><li>• Προέλευση από τη φυσιολογική μικροχλωρίδα του οργανισμού</li></ul>
<b>Τεχνολογική καταλληλότητα</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Επαρκής ανάπτυξη</li><li>• Επιβίωση πληθυσμού (<math>10^7</math> έως <math>10^9</math> cfu/g)</li><li>• Συντήρηση των επιθυμητών χαρακτηριστικών κατά την προετομασία και τη συντήρηση της καλλιέργειας</li><li>• Επιθυμητά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά στα τρόφιμα</li><li>• Διατήρηση φαινοτυπικών ιδιοτήτων</li></ul>
<b>Αντοχή</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Ικανότητα επιβίωσης, ανάπτυξης και μεταβολικής δραστηριότητας σε συνθήκες <i>in vivo</i></li><li>• Αντοχή στα χολικά άλατα</li><li>• Αντοχή σε χαμηλό pH και σε συνθήκες στομαχίου (γαστρικό</li></ul>

---



---

υγρό)

- Ικανότητα ανταγωνισμού με τη φυσιολογική μικροχλωρίδα, ανθεκτικότητα στις βακτηριοσίνες καθώς και στις αντικροβιακές ουσίες που παράγονται από τη
- μικροχλωρίδα του εντέρου
- Ακίνητοποίηση στο επιθήλιο του εντέρου

### **Επίδραση στην υγεία**

- Ικανότητα έκφρασης μίας ή περισσότερων κλινικά αποδεδειγμένων ευεργετικών για την υγεία ιδιοτήτων
- Ανταγωνισμός στους παθογόνους μικροοργανισμούς
- Παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών
- Αντικαρκινικές - αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες
- Διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος και παραγωγή βιοενεργών ενώσεων

---

Παρά την αναφορά σε μεγάλο αριθμό κριτηρίων επιλογής στη βιβλιογραφία, υπάρχει ταύτιση απόψεων για τη διάκριση των σημαντικότερων κριτηρίων στην επιλογή των προβιοτικών μικροοργανισμών. Αυτά είναι (i) η ανθρώπινη προέλευση των στελεχών, (ii) η ανθεκτικότητά τους σε οξύ και χολικά άλατα, (iii) η σταθερότητά τους στις τεχνολογικές επεξεργασίες του τροφίμου, (iv) η διατήρηση της ζωτικότητάς τους κατά τη συντήρηση του τροφίμου καθώς και (v) η ύπαρξη αποδεδειγμένων ευεργετικών στην υγεία αποτελεσμάτων (Shortt, 1999). Σύμφωνα με τους οργανισμούς FAO/WHO (2002), οι σημαντικότερες *in vitro* δοκιμές για την επιλογή προβιοτικών μικροοργανισμών είναι (α) η αντοχή στην οξύτητα του στομάχου και στα χολικά άλατα, (β) η ακίνητοποίηση στα επιθηλιακά κύτταρα, (γ) η αντιμικροβιακή δραστηριότητα έναντι δυνητικά παθογόνων μικροοργανισμών, (δ) η ικανότητα περιορισμού της ακίνητοποίησης των παθογόνων μικροοργανισμών, (ε) η δραστηριότητα στην υδρόλυση των χολικών αλάτων καθώς και (στ) η αντοχή στις φαρμακευτικές ουσίες στην περίπτωση που η χορήγηση των

προβιοτικών μικροοργανισμών πραγματοποιηθεί ενδοκολπικά (FAO/WHO, 2002). Ιδιαίτερα σημαντικό για την αποτελεσματικότητα του προβιοτικού μικροοργανισμού είναι το πέρασμά του από τον γαστρεντερικό σωλήνα. Κι αυτό επειδή το περιβάλλον του στομάχου, με την παρουσία του γαστρικού υγρού σαν άμυνα του οργανισμού στους μικροοργανισμούς, είναι πιθανόν να αποκλείσει τη μεταφορά των ζωντανών κυττάρων στο έντερο. Η προστασία και η επιβίωση της καλλιέργειας επιτυγχάνεται ως ένα βαθμό με την προσθήκη τους σε γαλακτοκομικά προϊόντα και με τη προσθήκη παραγόντων που εμποδίζουν τη μείωση του pH.

Οι τεχνολογικές ιδιότητες των βακτηρίων παίζουν εξίσου σημαντικό ρόλο στην παραγωγή των προβιοτικών τροφίμων (Saarela et al., 2000). Στα πλαίσια αυτά πρέπει να προσδίδουν τα επιθυμητά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά στο προϊόν, ικανοποιητικούς ρυθμούς ζύμωσης, υψηλή βιωσιμότητα, τόσο κατά τις μεθόδους ξήρανσής τους, όπως είναι η λυοφιλίωση, όσο και κατά την παραγωγή των τροφίμων. Επίσης πρέπει να παρουσιάζουν σταθερότητα στη μακρόχρονη αποθήκευσή τους (Grajek et al., 2005). Τα κριτήρια επιλογής που εξετάζουν την αντοχή των μικροοργανισμών, την ακινητοποίησή τους στο έντερο, τις αντικαρκινικές ιδιότητες και τη διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος, είναι ιδιαίτερα σύνθετα επειδή οι μηχανισμοί με τους οποίους οι μικροοργανισμοί εκφράζουν τις συγκεκριμένες ιδιότητες δεν έχουν μελετηθεί επαρκώς. Έτσι, είναι δύσκολο τη συγκεκριμένη χρονική στιγμή να οριστούν οι χαρακτήρες των προβιοτικών μικροοργανισμών που συνδέονται με τα παραπάνω κριτήρια. Η μελέτη των μηχανισμών που συνδέουν τα χαρακτηριστικά των μικροοργανισμών σε συνθήκες *in vitro* με την λειτουργικότητά τους σε συνθήκες *in vivo*, αποτελεί τον κύριο μελλοντικό τομέα έρευνας για τους προβιοτικούς μικροοργανισμούς (MattilaC Sandholm et al., 2002; Olejnik et al., 2003; Lewandowska et al., 2005)

## **1.8 Θετικές επιδράσεις των προβιοτικών μικροοργανισμών**

Ο ρόλος της εντερικής μικροχλωρίδας στην υγεία και την αντοχή στις ασθένειες είναι ιδιαίτερα σημαντικός. Κλινικές μελέτες με καλλιέργειες που έχουν εξεταστεί κατ' επανάληψη, έδωσαν αποτελέσματα που στηρίζουν την άποψη ότι οι προβιοτικοί

μικροοργανισμοί έχουν θετική επίδραση στη χλωρίδα του εντέρου, καθώς και ότι προσφέρουν προστασία έναντι των γαστρεντερικών λοιμώξεων και των φλεγμονών του εντέρου. Όμως, οι ευεργετικές επιδράσεις των προβιοτικών συχνά αμφισβητούνται, αν και ένα πλήθος κλινικών μελετών με τη χρήση συγκεκριμένων προβιοτικών μικροοργανισμών, αποδεικνύει αρκετές από αυτές (Shahani and Chandan, 1979; Oksanen et al., 1990; Siitonen et al., 1990; Isolauri et al., 1991; Nanji et al., 1994; Majamaa and Isolauri, 1997; Dunne et al., 1999; Lee et al., 2008). Για την εμφάνιση του ευεργετικού αποτελέσματος απαιτείται συγκεκριμένος αριθμός κυττάρων του προβιοτικού μικροοργανισμού. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, για την καθημερινή κατανάλωση προβιοτικών μικροοργανισμών ο προτεινόμενος αριθμός είναι  $10^8$  έως  $10^9$  κύτταρα/mL ή και  $10^9$  έως  $10^{10}$  κύτταρα/mL όταν αναμένονται σημαντικές απώλειες ύστερα από την παραμονή στο περιβάλλον του στομάχου (Sanders and Huis in't Veld, 1999). Οι καλλιέργειες που περιέχουν προβιοτικούς μικροοργανισμούς επιδρούν τόσο στη μικροχλωρίδα όσο και στις μεταβολικές και ενζυμικές δραστηριότητες των παθογόνων μικροοργανισμών. Οι αλλαγές στη μικροχλωρίδα έχουν σχέση με τη μείωση της παραγωγής των προκαρκινικών ενζύμων καθώς και των καρκινογόνων ουσιών από τους μικροοργανισμούς του γαστρεντερικού σωλήνα. Επιπρόσθετα, οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί με την ακινητοποίηση στο επιθήλιο του εντέρου, τα κυτταρικά τους συστατικά και την επίδραση στη μικροχλωρίδα του εντέρου, βελτιώνουν τη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος στο γαστρεντερικό σωλήνα. Οι θετικές επιδράσεις των προβιοτικών μικροοργανισμών καθώς και οι πιθανοί μηχανισμοί τους δίνονται στο πίνακα .

Πίνακας 3. Πιθανές θετικές επιδράσεις των προβιοτικών και οι μηχανισμοί τους (Ouwehand et al., 1999; Zubillaga et al., 2001; Klaenhammer, 2001; Holzapfel and Schillinger, 2002).

Πιθανή θετική επίδραση	Μηχανισμοί
Αντιμετώπιση δυσανεξίας στη λακτόζη	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Δράση των ενζύμων λακτασών των μικροοργανισμών</li> <li>• Απελευθέρωση των ενζύμων λακτασών των μικροοργανισμών στο έντερο</li> </ul>

Αντίσταση στους παθογόνους μικροοργανισμούς του εντέρου	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ανταγωνισμός στην αποίκηση</li> <li>• Δημιουργία αντίξοων συνθηκών για τους παθογόνους μικροοργανισμούς όπως είναι το χαμηλό pH και η παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών</li> </ul>
Αντικαρκινικές ιδιότητες	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Αντιμεταλλαξιογόνος δράση</li> <li>• Περιορισμός της δράσης προκαρκινικών ενζύμων</li> </ul>
Ενίσχυση ανοσοποιητικού συστήματος	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ενδυνάμωση της άμυνας του ανθρώπινου οργανισμού έναντι των λοιμώξεων</li> </ul>
Καρδιαγγειακά νοσήματα	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Μείωση της χοληστερόλης</li> </ul>
Περιορισμός της δράσης του <i>Helicobacter pylori</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών</li> </ul>
Περιορισμός λοιμώξεων του ουροποιητικού και του γεννητικού συστήματος	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ανταγωνισμός με τους παθογόνους μικροοργανισμούς</li> <li>• Επικόλληση στα επιθηλιακά κύτταρα</li> <li>• Παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών</li> </ul>

Το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού (*Helicobacter pylori*) εγκαθίσταται στο επιθήλιο του στομάχου και προκαλεί γαστρικές διαταραχές όπως γαστρίτιδα, έλκος και σε ορισμένες περιπτώσεις καρκινώματα (Gibson, 1998). Συγκεκριμένοι προβιοτικοί μικροοργανισμοί περιορίζουν τη δράση του ελικοβακτηριδίου του πυλωρού με την παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών. Αυτό συμβαίνει με τον ανταγωνισμό με το ελικοβακτηρίδιο και την ακινητοποίησή τους στο επιθήλιο του στομάχου. Σύμφωνα με τους Oh et al. (2002), συμβιωτική καλλιέργεια λακτοβακίλλων και ζυμών είχε θανατηφόρο αποτέλεσμα έναντι του *H. pylori*, όταν η καλλιέργεια εμβολιάστηκε σε αγελαδινό γάλα και σε άλλα υποστρώματα. Σύμφωνα με τους Salminen et al. (1998), οι θετικές επιδράσεις των προβιοτικών μικροοργανισμών, η ακρίβεια των οποίων στηρίζεται σε τουλάχιστον δύο επιστημονικές εργασίες που έγιναν με αντικείμενο τον άνθρωπο, είναι η ανακούφιση των συμπτωμάτων της δυσανεξίας στη λακτόζη, ο περιορισμός της ενζυμικής δραστηριότητας των μη ωφέλιμων μικροοργανισμών του γαστρεντερικού σωλήνα και η ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος. Οι δοκιμές *in vitro* είναι ιδιαίτερα χρήσιμες για τη μελέτη

των υποψήφιων μικροοργανισμών για προβιοτική χρήση καθώς και για την κατανόηση των μηχανισμών των προβιοτικών δράσεων. Όμως, οι δοκιμές αυτές δεν επαρκούν για να γίνει πρόβλεψη της λειτουργικότητας του μικροοργανισμού στον ανθρώπινο οργανισμό (FAO/WHO, 2002).

Ιδιαίτερα σημαντική είναι η επίδραση των προβιοτικών μικροοργανισμών στον έλεγχο των λοιμώξεων του ουροποιητικού και του γεννητικού συστήματος από παθογόνους μικροοργανισμούς όπως *Candida*, *Trichomonas*, *Mycoplasma*, *Chlamydia* και *E. coli*. Ένα επιπλέον πλεονέκτημα για τη χρήση των προβιοτικών μικροοργανισμών στην πρόληψη αυτού του είδους των λοιμώξεων, είναι η απουσία εμφάνισης παρενεργειών από τη χορήγηση, καθώς και η πιθανή χρήση των μικροοργανισμών ως πρόσθετο σε συγκεκριμένα τρόφιμα (Rowland, 1999). Επιπλέον, προβιοτικοί μικροοργανισμοί επιδρούν προληπτικά και θεραπευτικά στη διάρροια (Rowland, 1999). Η δράση των προβιοτικών μικροοργανισμών έναντι της διάρροιας αποτελεί την πιο μελετημένη επίδραση στην υγεία που έγινε με κλινικές δοκιμές σε ανθρώπους. Προβιοτικοί μικροοργανισμοί όπως ο *L. rhamnosus* και ο *S. Boulardii* δρουν τόσο στην κοινή διάρροια, που προέρχεται από τη χρήση αντιβιοτικών και η οποία προκαλείται από διατάραξη της ισορροπίας της φυσιολογικής χλωρίδας του εντέρου, όσο και έναντι της διάρροιας που προκαλείται όταν το άτομο έχει μολυνθεί από παθογόνους μικροοργανισμούς (Elmer, 2001). Επίσης, η χρήση των προβιοτικών βοηθά στην πρόληψη της διάρροιας που εμφανίζεται σε παιδιά των αναπτυσσόμενων χωρών που δεν τρέφονται επαρκώς, αλλά και στην οξεία διάρροια προκαλώντας μείωση του χρόνου των διαρροϊκών επεισοδίων (Oberhelman et al., 1999).

Προβιοτικοί μικροοργανισμοί χρησιμοποιήθηκαν στη διατροφή των ζώων ως ενισχυτές ανάπτυξης, αντικαθιστώντας έτσι τις αντιβιοτικές ουσίες στο σιτηρέσιο των ζώων (Fuller, 1989). Η προσθήκη μικροοργανισμών στην τροφή των ζώων, όπως είναι τα στελέχη του γένους *Lactobacillus*, είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της ημερήσιας απόκτησης βάρους καθώς και τη βελτίωση του μεταβολισμού των συστατικών της τροφής (Baird, 1977). Στη διατροφή των ζώων, εκτός των στελεχών του είδους *Lactobacillus*, χρησιμοποιήθηκαν και στελέχη των ειδών *Saccharomyces* καθώς και *Clostridium* ως συμπληρώματα με προβιοτικές ιδιότητες. Τα βακτηριακά προβιοτικά πρόσθετα διατροφής είναι αποτελεσματικά σε πουλερικά, χοίρους και νεαρά βοοειδή, ενώ τα προβιοτικά πρόσθετα διατροφής που περιέχουν μύκητες έχουν καλύτερα αποτελέσματα σε ενήλικα μηρυκαστικά. Η έρευνα στον τομέα των προβιοτικών μικροοργανισμών συνεχίζεται και

σύμφωνα με πρόσφατη μελέτη (Owehand et al., 2003) διερευνάται η χρήση των προβιοτικών μικροοργανισμών στο δέρμα για την ανταγωνιστική απομάκρυνση διάφορων παθογόνων μικροοργανισμών που προσβάλλουν το δέρμα όπως είναι ο *S. aureus*, η *C. albicans* και ο *Malassezia furfur*.

## 1.9 Παράγοντες που επηρεάζουν τον εντερικό μικροβιόκοσμο

Η σύσταση του εντερικού μικροβιόκοσμου είναι συγκεκριμένη για τον κάθε ξενιστή, εξελίσσεται καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής ενός ατόμου και είναι ευάλωτη σε πολλές ενδογενείς και εξωγενείς τροποποιήσεις (Sekirov, I. et al., 2010). Ορισμένοι από τους παράγοντες που την επηρεάζουν είναι η διατροφή, η ηλικία, ο γονότυπος του ξενιστή, το περιβάλλον και η έκθεση σε διάφορα βακτήρια, το στρες, η κατανάλωση προβιοτικών και πρεβιοτικών, οι κλινικές παρεμβάσεις με αντιβιοτικά φάρμακα και οι χειρουργικές επεμβάσεις (Dethlefsen, L. et al. 2006; Zhang, H, et al. , 2009).

### 1.9.1 Διατροφή

Ανάλογα το πρότυπο διατροφής, η σύσταση του εντερικού μικροβιόκοσμου μεταβάλλεται σημαντικά. Έχει φανεί ότι οι άνθρωποι που καταναλώνουν συχνότερα τρόφιμα από την ομάδα του κρέατος συγκριτικά με τους χορτοφάγους έχουν υψηλότερες συγκεντρώσεις ειδών του γένους *Bacteroides* και χαμηλότερες συγκεντρώσεις οξυγαλακτικών βακτηρίων και κολίμορφων βακτηρίων (Madigan, M.T. et al., 2007). Δίαιτα με υψηλό ποσοστό πρωτεΐνης και χαμηλό ποσοστό υδατανθράκων φάνηκε να μειώνει σημαντικά το σύνολο των παραγόμενων λιπαρών οξέων βραχέως αλύσου (SCFAs) και ιδιαίτερα την συγκέντρωση βουτυρικού οξέος στα κόπρανα των εθελοντών που ακολουθούσαν αυτή τη δίαιτα σε σύγκριση με τη συγκέντρωση αυτών στα κόπρανα άλλων εθελοντών που ακολουθούσαν δίαιτα πλούσια σε πρωτεΐνες/μέτρια σε υδατάνθρακες και δίαιτα διατήρησης σωματικού βάρους. Επίσης παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στις μετρήσεις των μικροβιακών πληθυσμών *Roseburia spp.*, *Eubacterium rectale* (υποομάδα του συμπλέγματος XIVa) και *Bifidobacteria* όσο μειώνονταν οι υδατάνθρακες της διατροφής (Duncan, S.H et al., 2007). Τα αποτελέσματα μίας έρευνας που έγινε με δείγματα αφροαμερικανών και καυκάσιων Αμερικανών έδειξαν ότι τα άτομα που κατανάλωναν περισσότερες θερμίδες είχαν

μικρότερο πληθυσμό κλωστριδίων. Επίσης ότι η κατανάλωση φυτικών ινών συσχετίζεται θετικά με τους πληθυσμούς οξυγαλακτικών βακτηρίων, οι οποίοι πιστεύεται ότι δρουν ευεργετικά για την υγεία του ξενιστή. Οι ίνες των σιτηρών και των φρούτων αλλά όχι των οσπρίων συσχετίστηκαν με τα οξυγαλακτικά βακτήρια. Τα άτομα με μεγαλύτερη πρόσληψη ετεροκυκλικών αμίνων φάνηκαν να έχουν μεγαλύτερο πληθυσμό κλωστριδίων συμπλέγματος XIVa. Αυτές οι συγκρίσεις έγιναν με τα δεδομένα των μη λογαριθμημένων μετρούμενων πληθυσμών κάθε είδους μικροοργανισμών και ήταν στατιστικά σημαντικές ( $p < 0.05$ ). Βέβαια, η στατιστική σημαντικότητα δεν παρέμεινε και μετά την μετατροπή σε λογαρίθμους των μετρούμενων μικροβιακών πληθυσμών (Mai, V et al., 2009).

Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε ποντίκια τα οποία τρέφονταν με δυτικού τύπου δίαιτα μέχρι να γίνουν παχύσαρκα βρέθηκε μία αύξηση πληθυσμού της Τάξης Mollicutes του φύλου Firmicutes, η οποία έγινε η επικρατέστερη στον εντερικό μικροβιόκοσμο των ποντικών. Παρατηρήθηκε επίσης ότι με διαιτητικούς χειρισμούς που απέβλεπαν στην απώλεια βάρους και στη μείωση λιπώδους ιστού μειώνονταν και οι πληθυσμοί της Τάξης Mollicutes (Turnabaugh, P.J, et al., 2008).

Διατροφή υψηλή σε απλά σάκχαρα προκαλεί αύξηση της δραστηριότητας του εντερικού μικροβιόκοσμου, μέσω της οποίας παράγονται τοξικά μεταβολικά προϊόντα όπως οξικό οξύ και αλκοόλη. Μειώνεται ο χρόνος διέλευσης της τροφής από το έντερο, το οποίο αυξάνει την έκθεση του εντερικού επιθηλίου σε δυνητικά τοξικά προϊόντα και επίσης αυξάνεται η συγκέντρωση των δευτερογενών χολικών οξέων που οδηγούν στην αύξηση των ευκαιριακών βακτηριακών ειδών που χρησιμοποιούν τα χολικά οξέα στο μεταβολισμό τους.

Φθορά του εντερικού επιθηλίου και της βλέννης που το προστατεύει παρατηρείται μετά από δίαιτα ανεπαρκή σε υδατάνθρακες. Η αυξημένη χρησιμοποίηση και η πρόκληση φθοράς του επιθηλίου έχει συνέπειες για τον ξενιστή καθώς μετά οδηγείται σε αυξημένη προσκόλληση εντερικών βακτηρίων, δημιουργία χρόνιας φλεγμονής και τελικά βλάβη του επιθηλίου (Salminen, S., et al., 1998; Hawrelak, J.A and S.P Myer, 2004).

### 1.9.2. Ηλικία

Ο αποικισμός του εντέρου ξεκινάει με τη γέννηση του ανθρώπου, όπου ο τρόπος γέννησης (φυσιολογικός τοκετός ή καισαρική) διαδραματίζει ρόλο στο ποιοί θα είναι οι πρώτοι μικροοργανισμοί που θα αναπτυχθούν στο έντερο του νεογνού. Οι πηγές από τις οποίες προέρχονται οι μικροοργανισμοί του εντερικού μικροβιόκοσμου των νεογνών είναι ο κόλπος, το δέρμα και τα κόπρανα της μητέρας ενώ αν γίνει η γέννηση με καισαρική τομή τότε πηγές μπορεί να είναι τα μηχανήματα του νοσοκομείου, τα άλλα νεογνά, ο αέρας, το νοσηλευτικό προσωπικό και μάλιστα πιθανό είναι να επικρατήσουν αυτά τα περιβαλλοντικά βακτήρια έναντι των βακτηρίων που μεταδίδονται από τον μικροβιόκοσμο της μητέρας ( Favier, C.F, et al., 2004). Οι μικροοργανισμοί των γενών *Bifidobacterium* και *Lactobacillus* εμφανίζονται μετά από 2-3 μέρες από τη γέννηση του νεογνού. Στα νεογνά που γεννιούνται με φυσιολογικό τοκετό κατά τους πρώτους 2-3 μήνες ζωής τους παρατηρείται ανάπτυξη των αναερόβιων βακτηρίων των ειδών *Enterobacteriaceae*, *Streptococci* και *Staphylococci* στο έντερο τους. Αυτά τα είδη είναι δυνητικά παθογόνα και προέρχονται από το εξωτερικό περιβάλλον, αλλά πιστεύεται ότι συμβάλλουν στη σύσταση ενός ωφέλιμου για την υγεία του ξενιστή μικροβιόκοσμου ( Favier, C.F, et al., 2004). Στα νεογνά που γεννιούνται με καισαρική τομή παρατηρείται μειωμένος συνολικός πληθυσμός βακτηρίων συγκριτικά με τα νεογνά που γεννιούνται με φυσιολογικό τοκετό και επίσης το γένος *Bifidobacterium* αργεί να εμφανιστεί έως και τους πρώτους 6 μήνες ζωής του βρέφους( Favier, C.F, et al., 2004). Στη συνέχεια της ζωής του νεογνού πηγή μικροοργανισμών αποτελεί ο θηλασμός, οι αγκαλιές και τα φιλιά που έτσι μεταδίδονται επιδερμικά, περιβαλλοντικά και στοματικά βακτήρια. Ο θηλασμός συμβάλει στη μετάδοση μικροοργανισμών καθώς το μητρικό γάλα έχει υπολογιστεί ότι περιέχει περισσότερους από 10<sup>9</sup> μικροοργανισμούς/λίτρο στις υγιείς μητέρες. Τα είδη που έχουν για πηγή τη θηλή και το δέρμα της μητέρας και συναντούνται συχνότερα είναι τα *Staphylococci*, *Streptococci*, *Corynebacteria*, *Lactobacilli*, *Micrococci*, *Propionibacteria* και *Bifidobacterium*. Τα βρέφη που θηλάζουν και είχαν γεννηθεί με φυσιολογικό τοκετό έχουν ως επικρατές είδος στον εντερικό τους μικροβιόκοσμο το *Bifidobacterium spp.* ενώ τα βρέφη που τρέφονται με υποκατάστατο μητρικού γάλακτος έχουν πιο ετερογενή σύσταση εντερικού μικροβιόκοσμου ( Morelli, L., 2008). Μεγαλώνοντας το άτομο τείνει να έχει στον εντερικό μικροβιόκοσμο



του 2 φύλα μικροοργανισμών που επικρατούν και παραμένουν σταθερά, το φύλο Bacteroidetes και το φύλο Firmicutes, ενώ τα φύλα Proteobacteria, Verrucomicrobia, Actinobacteria, Fusobacteria και Cyanobacteria είναι παρόντα σε χαμηλότερους πληθυσμούς ( Eckburg, P.B., et al., 2005).

Στην τρίτη ηλικία φαίνεται ότι επέρχεται μία μείωση στους πληθυσμούς των συνολικών αναερόβιων βακτηρίων και του είδους Bifidobacterium ( O' Tool PW, C.M., 2010 ; Hopkins, M.J., et al., 2001) και ακόμα παρατηρείται ένα χαρακτηριστικό πρότυπο σύστασης μικροοργανισμών του φύλου Firmicutes στους ηλικιωμένους και τους εκατοχρονίτες σε σύγκριση με τους νεαρούς ενήλικες (O' Tool PW, C.M., 2012). Επίσης, σημειώνεται αύξηση των πληθυσμών Enterobacteriaceae και E.coli όπως και στις ενδοτοξίνες που παράγονται από τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια. Δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως αν αυτές οι αλλαγές του μικροβιόκοσμου γίνονται λόγω της παρόδου της ηλικίας εξ' ολοκλήρου ή συμβάλουν σε αυτό και οι αλλαγές των διατροφικών συνηθειών ( O' Tool PW, C.M., 2010 ; Hopkins, M.J., et al., 2001) .Τέλος, σε ηλικιωμένους έχουν βρεθεί μεγαλύτεροι πληθυσμοί του είδους Clostridium difficile, το οποίο σχετίζεται με αυξημένη συχνότητα νοσηλείας και χορήγησης αντιβιοτικών ( Ljungberg, B., et al., 1990)

### 1.9.3. Στρες

Οι κύριες αλλαγές που επιφέρει το στρες στο γαστρεντερικό σύστημα είναι μεταβολή της κινητικότητας του εντέρου, αύξηση της αντίληψης των σπλάχνων, αλλαγές στις γαστρεντερικές εκκρίσεις, αύξηση της εντερικής διαπερατότητας, αρνητική επίδραση στην ικανότητα που έχει η βλέννα του εντέρου να αναγεννιέται και στην αιμάτωση του βλεννογόνου, αρνητική επίδραση στον εντερικό μικροβιόκοσμο ( Konturek, P.C., et al., 2011). Το στρες μπορεί να αλλάξει τη σύσταση του εντερικού μικροβιόκοσμου επηρεάζοντας αρνητικά τους πληθυσμούς ωφέλιμων προβιοτικών βακτηρίων όπως είναι τα γένη Lactobacillus spp. και Bifidobacterium spp. και θετικά την ανάπτυξη των δυνητικά παθογόνων. Το συναισθηματικό στρες μπορεί να αυξήσει την αποβολή των λακτοβακίλλων έως και 6 μέρες μετά το επεισόδιο. Η μείωση του πληθυσμού των λακτοβακίλλων καθιστά ευκολότερη την αποίκηση εξωγενών βακτηρίων στον εντερικό επιθήλιο (Hawrelak, J.A and S.P Myer, 2004) . Έχει παρατηρηθεί επίσης, ότι η νορεπινεφρίνη, νευροδιαβιβαστής που αυξάνεται στο αίμα με το στρες, αυξάνει την μολυσματικότητα των ειδών E. coli και C. Jejuni ( Lyte, M.L., et al., 2011).

## 1.10 Πρεβιοτικά και Συνβιοτικά

### 1.10.1. Προβιοτικά

Οι πρεβιοτικές ουσίες (prebiotics) είναι τα η πεπτόμενα συστατικά ενός τροφίμου, τα οποία επιδρούν θετικά στην υγεία του ξενιστή, τροποποιούν την ισορροπία της εντερικής μικροχλωρίδας και διεγείρουν επιλεκτικά την ανάπτυξη ή/και την δραστηριότητα ενός ή περισσοτέρων μικροοργανισμών του εντέρου (Grittenden, 1999; Klaenhammer, 2001; Manning and Gibson, 2004). Οι πρεβιοτικές ουσίες τροποποιούν τη σύνθεση της μικροχλωρίδας του εντέρου, έτσι ώστε να ευνοηθεί η ανάπτυξη των πιθανών προβιοτικών μικροοργανισμών και να αποτελέσουν την κύρια χλωρίδα (Roberfroid, 1998; Zimmer and Gibson, 1998). Επιπλέον αναστέλλουν την ανάπτυξη ανεπιθύμητων μικροοργανισμών (Grittenden, 1999). Ολιγοσακχαρίτες, όπως εκείνοι που περιέχουν μαννόζη, επιδρούν ευνοϊκά στην ανάπτυξη των προβιοτικών μικροοργανισμών και περιορίζουν την επιφάνεια ακινητοποίησης, που στην αντίθετη περίπτωση θα είχε καταληφθεί από παθογόνους μικροοργανισμούς, όπως η *E. coli*. Ως πρεβιοτικές ουσίες χρησιμοποιούνται με επιτυχία κυρίως ολιγοσακχαρίτες που περιέχουν φρουκτόζη. Είναι επίσης δυνατή η χρησιμοποίηση και άλλων ολιγομερών από αλκοόλες συγκεκριμένων σακχάρων, η λακτουλόζη, η σόγια και η μαλτόζη καθώς και ολιγοσακχαρίτες που περιέχουν ξυλόζη, μαννόζη και γαλακτόζη (Gibson, 1998). Επιπλέον εξετάζεται το μέλι ως πρεβιοτικό τρόφιμο για την ενίσχυση της ανάπτυξης των προβιοτικών μικροοργανισμών (Ustunol and Gandhi, 2001; Kajiwara et al., 2002; Macedo et al., 2008). Οι κυριότερες ουσίες που χρησιμοποιούνται ως πρεβιοτικές παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα .

Πίνακας 4. Ουσίες και τρόφιμα που χρησιμοποιούνται ως πρεβιοτικά.

(Roberfroid, 2000; Probert et al., 2004; Grajek et al., 2005; Macedo et al., 2008).

Δισακχαρίτες	<ul style="list-style-type: none"><li>• Λακτουλόζη</li><li>• Λακτιτόλη</li></ul>
Ολιγοσακχαρίτες	<ul style="list-style-type: none"><li>• Φρουκτοολιγοσακχαρίτες</li><li>• Γαλακτοολιγοσακχαρίτες</li><li>• Ολιγοσακχαρίτες της σόγιας</li><li>• Μη πεπτόμενοι ολιγοσακχαρίτες (ξυλοολιγοσακχαρίτες, ισοαλτοολιγοσακχαρίτες, λακτοσουκρόζη, παλατινόζη)</li></ul>

Πολυσακχαρίτες	• Ινουλίνη
----------------	------------

Οι πρεβιοτικοί ολιγοσακχαρίτες μπορούν να παραχθούν με τρεις διαφορετικούς τρόπους. (i) Με λήψη από φυτικές πρώτες ύλες, (ii) ε βιοτεχνολογική παραγωγή ή ενζυμική σύνθεση και (iii) ε ενζυμική υδρόλυση πολυσακχαριτών (Crittenden and Playne, 1996; Gulewicz et al., 2003). Πολλοί πρεβιοτικοί ολιγοσακχαρίτες παράγονται σε βιομηχανική κλίμακα και διατίθενται στην αγορά. Έχουν γίνει αρκετές έρευνες και έχουν δοθεί αρκετά διπλώματα ευρεσιτεχνίας στον τομέα αυτό (Crittenden and Playne, 1996). Στην πράξη, εφαρμόζεται συνήθως η συνδυασμένη χρήση προβιοτικών και πρεβιοτικών συστατικών εξαιτίας της συνεργιστικής τους δράσης στα τρόφιμα. Έτσι δημιουργούνται τα συμβιωτικά (synbiotics) προϊόντα τα οποία ωφελούν τον καταναλωτή μέσω της επιβίωσης και της εγκατάστασης επιλεγμένων ζωντανών μικροοργανισμών στο πεπτικό σύστημα (Schrezenmeir and de Vrese, 2001).

### 1.10.2 Συμβιωτικά

Μια ανερχόμενη εξέλιξη στην βελτίωση των λειτουργικών τροφίμων είναι η δημιουργία των συμβιωτικών. Η ονομασία προέρχεται από τον όρο symbiotics = συνύπαρξη ή συνδυασμός ενός προβιοτικού και ενός πρεβιοτικού, προσδίδοντας μια άλλη αντίληψη στην βιομηχανία του τροφίμου, (Gibson & Roberfroid, 1995).

Εκτός από τον συγκεκριμένο όρο, πολλές φορές θα το βρούμε σε διάφορες μελέτες και με το όρο eubiotics που προέρχεται από το ελληνικό 'ευ' και φανερώνει πως ένα τρόφιμο μπορεί να συντελέσει στην ευμάρεια του ανθρώπου.

Απο πρόσφατες έρευνες, τα συμβιωτικά μπορούν να βοηθήσουν στην αύξηση των ευεργετικών μπιφιδοβακτηρίων ιδιαίτερα εξαιτίας της σύνθεσης του πρεβιοτικού. Πιο συγκεκριμένα, σε in vitro μελέτη των Bielecka και συν. (2002) συμπέραναν ότι διάφορα στελέχη του γένους Bifidobacterium όπως τα B.longum, B.catenulatum, B.animalis αναπτύσσονται καλύτερα στους φρουκτο-ολιγοσακχαρίτες, οι οποίοι ανήκουν στη κατηγορία των πρεβιοτικών.

Τα συμβιοτικά όταν δόθηκαν ως τρόφιμο – φορέας σε αρουραίους αυτό που προέκυψε από τις μικροβιολογικές αναλύσεις κοπράνων ήταν ότι διάφοροι μικροοργανισμοί όπως bifidobacteria, coliforms καθώς και ο ολικός αριθμός άλλων πληθυσμών υπέστη κάποιες αλλαγές. Ειδικότερα, οι αρουραίοι που διατράφηκαν με το συμβιοτικό είχαν υψηλότερα ποσοστά από τα ευεργετικά bifidobacteria και χαμηλότερους πληθυσμούς από παθογόνους μικροοργανισμούς όπως ολικά κολίμορφα, (Grittenden et al.,2001).

Ένα από τα κυρίαρχα οφέλη των συμβιοτικών θεωρείται η αυξανόμενη παραμονή του προβιοτικού στο γαστρεντερικό οικοσύστημα. Μια συμβιοτική προετοιμασία του *Lactobacillus acidophilus* (προβιοτικό στέλεχος 74-2) & των FOS έχει μελετηθεί σε in vitro μοντέλο για το γαστρεντερικό σύστημα. Το μοντέλο αυτό είχε ως αποτέλεσμα υψηλά επίπεδα λακτοβακίλλων ( μια αύξηση της τάξεως 0.89 log), ενώ μια τάση αύξησης στα bifidobacteria (της τάξεως των 1.27 log) αποδόθηκε στην σύνθεση του πρεβιοτικού που είναι εμπλουτισμένο το συμβιοτικό προϊόν, (Gmeiner M.et al.,2000)

Η ικανότητα της συμβιοτικής προετοιμασίας (*Bifidobacterium breve* μαζί με τα GOS) στην προστασία εναντίον της σαλμονέλλωσης σε ποντίκια επιβεβαιώθηκε σε ανάλογη μελέτη. Τα ποντίκια που διατράφηκαν με το παραπάνω συμβιοτικό συνδυασμό κατάφεραν να μπλοκάρουν την διέλευση παθογόνων όπως τη σαλμονέλλα, ενώ η διατροφή τους αποκλειστικά με γαλακτο-ολιγοσακχαρίτες(GOS), δεν φαίνεται να ασκεί την ίδια κατασταλτική επίδραση,(Asahara T.,& Nomoto K.,2001).

---

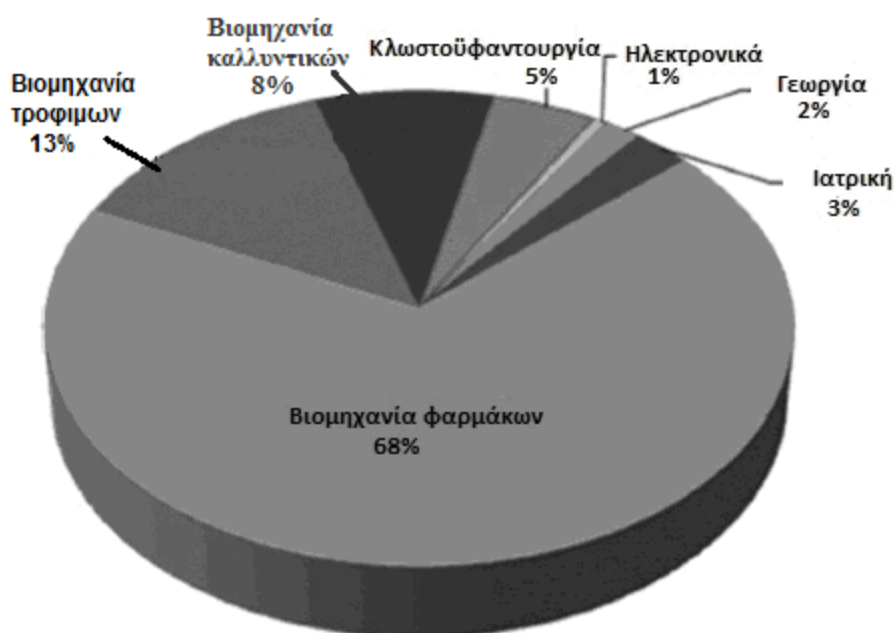
# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

## ΜΙΚΡΟΕΝΘΥΛΑΚΩΣΗ

---

## 2.1. Ορισμός Μικροενθυλάκωσης

Ως μικροενθυλάκωση, αλλιώς (microencapsulation), ορίζεται η τεχνική κατά την οποία μια ουσία ή μίγμα ουσιών, περιβάλλεται από ένα άλλο υλικό, το οποίο ονομάζεται μέσο εγκλεισμού, ή ενσωματώνεται σε μια ομοιογενή ή ετερογενή μήτρα, καταλήγοντας τελικά στο σχηματισμό μικρών καψουλών. Εδώ και πολλές δεκαετίες, η τεχνική της ενθυλάκωσης βρίσκει ποικίλες εφαρμογές στη φαρμακοβιομηχανία, ενώ τα τελευταία χρόνια συναντάται και στη βιομηχανία των τροφίμων. Τα συστατικά που ενδιαφέρουν τη βιομηχανία τροφίμων από άποψη εγκλεισμού είναι π.χ. αρωματικά συστατικά, αιθέρια έλαια, γλυκαντικά, βιταμίνες, αντιοξειδωτικά, συντηρητικά, ένζυμα, ιχνοστοιχεία, μικροοργανισμοί, χρωστικές ουσίες, κ.α. Με τη συγκεκριμένη τεχνική μπορούν να προστατευτούν από ενδεχόμενη εξάτμιση, οξείδωση, απορρόφηση υγρασίας και θέρμανση. Όλες αυτές αποτελούν πιθανές φυσικοχημικές μεταβολές που μπορούν να συμβούν κατά την αποθήκευση ή και επεξεργασία του τροφίμου (Gibbs et al., 1999; Zeller et al., 1999; Παραμέρα, 2011).



Σχήμα 1: Σχηματική απεικόνιση της κατανομής της εφαρμογής της μικροενθυλάκωσης σε διάφορους τομείς (Martins et al., 2013)

Η ενθυλακωμένη ουσία καλείται, επίσης, και πυρήνας, συμπλήρωμα, ενεργή ή εσωτερική φάση, καθώς και φάση ωφέλιμου φορτίου, ενώ ο παράγοντας ενθυλάκωσης καλείται επένδυση, μεμβράνη, κέλυφος, εξωτερικό κάλυμμα, κάψουλα, υλικό μεταφοράς, εξωτερική φάση ή μήτρα (Nedovic et al., 2011). Ο πυρήνας της κάψουλας περιέχει την ενεργή ουσία, ενώ το εξωτερικό κάλυμμα προστατεύει την ενεργή ουσία μόνιμα ή παροδικά από την εξωτερική ατμόσφαιρα. Με άλλα λόγια, το εξωτερικό κάλυμμα αποτελεί ένα φυσικό εμπόδιο ανάμεσα στην ενθυλακωμένη ουσία και των άλλων συστατικών του προϊόντος. Το υλικό του πυρήνα μπορεί να αποτελείται από ένα ή περισσότερα συστατικά και το εξωτερικό κάλυμμα μπορεί να έχει ένα ή δύο στρώματα (Ghosh, 2006). Η απελευθέρωση του περιεχομένου της μικροκάψουλας με συγκεκριμένο ρυθμό μπορεί να επιτευχθεί με διάτμηση του μορίου, θέρμανση, αλλαγή του pH, διαλυτοποίηση ή ενζυμική δράση (Nesterenko et al., 2013).

Περιγραφικά, η διαδικασία της μικροενθυλάκωσης περιλαμβάνει:

- τον σχηματισμό του εξωτερικού καλύμματος γύρω από το πυρηνικό υλικό
- τη διατήρηση του πυρηνικού υλικού εντός της κάψουλας, ώστε να μην διαφύγουν και να μην εισέλθουν ανεπιθύμητα συστατικά
- την απελευθέρωση του πυρηνικού υλικού τον σωστό χρόνο και με προκαθορισμένο ρυθμό απελευθέρωσης (Shahidi and Han, 1993).

## 2.2. Πλεονεκτήματα ενθυλάκωσης συστατικών

Τα πλεονεκτήματα του εγκλεισμού που αναφέρονται στη βιβλιογραφία είναι τα εξής:

- Αύξηση της διαλυτότητας των ουσιών σε συγκεκριμένο μέσο εγκλεισμού
- Αύξηση του χρόνου αποθήκευσης των ουσιών, και συνεπώς του χρόνου ζωής τους
- Κάλυψη επιθυμητής οσμής και γεύσης
- Διατήρηση του αρώματος των ουσιών κατά τη διάρκεια αποθήκευσης τους
- Προστασία από μικροβιολογικές μολύνσεις
- Δημιουργία σταθερών και τυποποιημένων συστατικών

- Μετατροπή υγρών ουσιών σε στερεή σκόνη, με αποτέλεσμα ευκολότερο χειρισμό και χορήγηση των ουσιών, χαμηλό κόστος αποθήκευσης και συσκευασίας και εξοικονόμηση ανθρώπινου δυναμικού
- Προστασία των δραστικών συστατικών από τη θερμότητα και το φως
- Ελεγχόμενη απελευθέρωση των ουσιών
- Μείωση της οξειδωσης και των τοξικών προϊόντων που αυτή παράγει
- Αποφυγή αλληλεπίδρασης των συστατικών (Baranauskiene et al., 2007; Μουρτζίνος, 2007; Madene et al., 2006; Szent and Szejtli, 2004; Bertolini et al., 2001; Schrooyen et al., 2001).



Σχήμα 2: Σχηματική απεικόνιση της απελευθέρωσης της ενθυλακωμένης ουσίας από μία μικροκάψουλα (Martins et al., 2013).

### 2.3 Μέθοδοι Μικροενθυλάκωσης

Ποικίλες τεχνικές μικροενθυλάκωσης έχουν αναφερθεί, ωστόσο η κατάλληλη επιλογή τεχνικής εξαρτάται από το μέγεθος, τη βιοσυμβατότητα, την επιθυμητή ικανότητα βιοαποικοδόμησης του τελικού προϊόντος, τις φυσικοχημικές ιδιότητες του πυρηνικού υλικού και του εξωτερικού καλύμματος, τον τρόπο εφαρμογής των μικροκάψουλων, τον τρόπο απελευθέρωσης του πυρηνικού υλικού και το κόστος της παραγωγής (Nesterenko et al., 2013).



Οι συνήθεις τεχνικές που περιγράφονται στη διεθνή βιβλιογραφία και βρίσκουν εφαρμογή είναι (Gouin, 2004, Fang and Bhandari, 2010):

- ❖ ξήρανση με ψεκασμό (spray drying)
- ❖ λυοφιλίωση ή ξήρανση με κατάψυξη (lyophilisation)
- ❖ ψύξη με ψεκασμό (spray cooling/chilling)
- ❖ εξώθηση ή εκβολή (extrusion)
- ❖ επικάλυψη σε ρευστοποιημένη κλίνη (fluidized bed coating)
- ❖ συγκρυστάλλωση (cocrystallization)
- ❖ εγκλεισμός σε λιποσώματα (liposome entrapment)
- ❖ ενθυλάκωση σε ζύμες (yeast encapsulation)
- ❖ σχηματισμός συμπλόκων εγκλεισμού (inclusion complexation)
- ❖ γαλακτωματοποίηση (emulsion)
- ❖ περιστρεφόμενος δίσκος (spinning disk)
- ❖ διαχωρισμός φάσεων (coacervation)

## **2.4 Μέσα εγκλεισμού**

Ως μέσα εγκλεισμού μπορούν να χρησιμοποιηθούν πολλά και διάφορα υλικά, το καθένα από τα οποία παρουσιάζει τόσο πλεονεκτήματα, όσο και μειονεκτήματα.

Οι πρωτεΐνες, τα λίπη, οι υδατάνθρακες, η κυτταρίνη, τα κόμμεα, αλλά και άλλες συνθετικές ενώσεις που προκύπτουν από συνδυασμούς των παραπάνω, αποτελούν παραδείγματα τέτοιων υλικών. Η επιλογή της ουσίας που θα χρησιμοποιηθεί ως μέσο εγκλεισμού είναι πολύ σημαντική και δεν γίνεται τυχαία, αλλά εξαρτάται από τη φύση του προς ενθυλάκωση συστατικού και άλλους σημαντικούς παράγοντες. Οι παράγοντες αυτοί έγκεινται στο ότι το μέσο θα πρέπει να μην αντιδρά με το συστατικό, να παρέχει τη καλύτερη δυνατή προστασία του συστατικού από τους περιβαλλοντικούς παράγοντες, να

έχει εύχρηστη μορφή (π.χ. χαμηλό ιξώδες ακόμα και σε υψηλές συγκεντρώσεις), να γαλακτωματοποιείται εύκολα και τέλος, να παρέχει τη δυνατότητα απελευθέρωσης των συστατικών σε συγκεκριμένο χρόνο και χώρο. Επιπλέον, η επιλογή είδους του μέσου εγκλεισμού επηρεάζεται από τις προαπαιτήσεις των τροφίμων, όταν αυτά αποτελούν μέρος του συμπλόκου εγκλεισμού, αλλά και από τους οικονομικούς παράγοντες. Τέλος, η ουσία που θα χρησιμοποιηθεί ως μέσο εγκλεισμού, είναι αναγκαίο να έχει την απαραίτητη έγκριση από τον αμερικανικό οργανισμό τροφίμων και φαρμάκων (FDA) ή την ευρωπαϊκή αρχή για την ασφάλεια των τροφίμων (EFSA) (Madene et al., 2006)

## 2.5 Μέθοδοι μελέτης μικροενθυλάκωσης

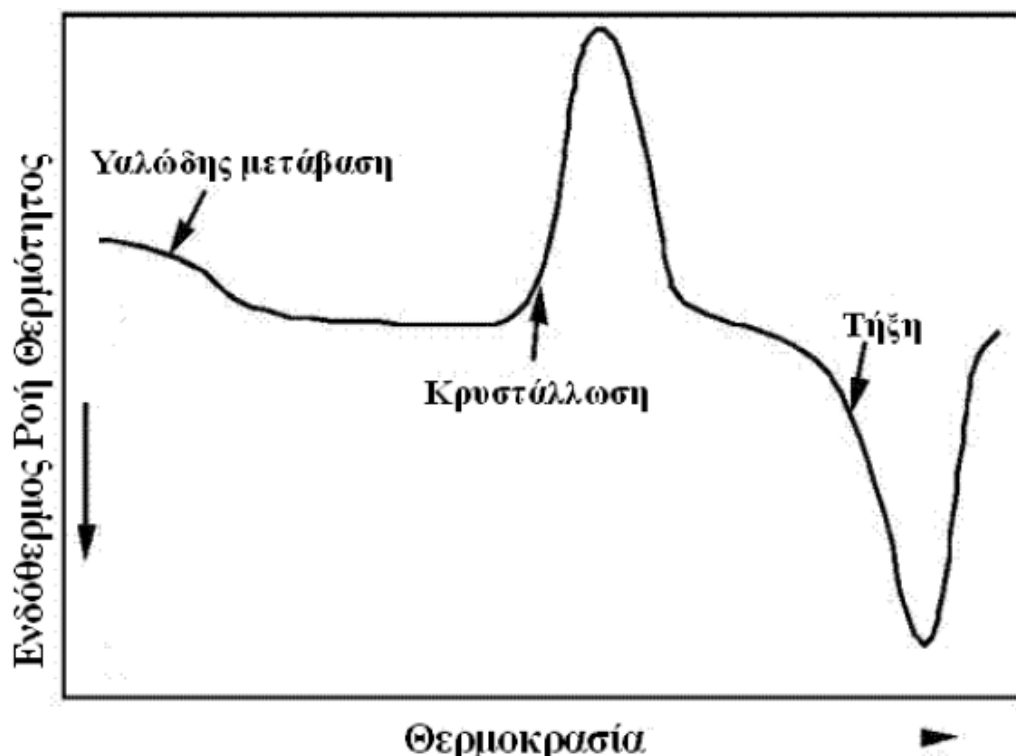
Η αξιολόγηση του σχηματισμού των συμπλόκων εγκλεισμού και ο πλήρης χαρακτηρισμός τους είναι ιδιαίτερα δύσκολο εγχείρημα. Διάφορες μέθοδοι και τεχνικές έχουν αναπτυχθεί προς αυτή την κατεύθυνση, με σημαντικότερες τις φασματοσκοπικές τεχνικές (π.χ. φασματομετρία UV-VIS, φασματομετρία φθορισμού, φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού), τις ηλεκτροαναλυτικές τεχνικές (π.χ. πολαρογραφία, βολταμετρικές τεχνικές, ποτενσιομετρία, αγωγιμετρία) και τις αναλυτικές τεχνικές (π.χ. HPLC, ηλεκτροφόρηση υγρής φάσης) (Mura, 2014).

Μια ιδιαίτερα δημοφιλής και ευρέως διαδεδομένη μέθοδος μελέτης των συμπλόκων εγκλεισμού είναι η Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (Differential Calorimetry Scanning, DSC). Η μέθοδος DSC είναι εργαλείο πρώτης επιλογής για τον φυσικοχημικό χαρακτηρισμό των συμπλόκων εγκλεισμού, όταν αυτά βρίσκονται στη στερεή τους κατάσταση και χρησιμοποιείται ως μέθοδος ρουτίνας για τη γρήγορη πρωταρχική ποιοτική διερεύνησή τους (Giordano et al., 2001).

Πιο συγκεκριμένα, η μέθοδος DSC έχει τη δυνατότητα να μελετά τις μεταβολές της ενθαλπίας που πραγματοποιούνται στο υπό εξέταση δείγμα, όταν αυτό θερμαίνεται ή ψύχεται με προκαθορισμένο θερμοκρασιακό πρόγραμμα. Επιπλέον, δίνει τη δυνατότητα μελέτης εξώθερμων ή ενδόθερμων φαινομένων, όπως η τήξη, η κρυστάλλωση, η εξάχνωση, η υαλώδης μετάπτωση κ.ά. (Roos, 1995).

Μια τυπική καμπύλη της DSC απεικονίζει τη διαφορική ροή της θερμότητας στο υπό εξέταση δείγμα ( $dH/dt$  ή  $mJ/s$  ή  $mcal/s$ ) ως προς τη θερμοκρασία (T) ή τον χρόνο (t). Στο

παρακάτω σχήμα παρουσιάζονται οι κύριες μεταβολές που μπορούν να μελετηθούν με τη μέθοδο DSC.



Σχήμα 3: Κύριες παρατηρηθείσες μεταβολές με τη χρήση της Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης (Clas et al., 1999)

Μία τυπική διάταξη DSC αποτελείται από τα παρακάτω:

- Δύο υποδοχείς. Σε αυτούς τους υποδοχείς τοποθετούνται το υπό εξέταση δείγμα και το δείγμα αναφοράς. Μικρή ποσότητα (3 - 10 mg) από κάθε δείγμα τοποθετείται σε ειδικό καψίδιο αλουμινίου, το οποίο ανάλογα με το σκοπό της μελέτης είτε παραμένει ανοιχτό, είτε κλείνεται ερμητικά, είτε έχει μια μικρή οπή στο άνω μέρος. Τα μεταλλικά καψίδια έχουν καλή θερμική αγωγιμότητα και εξυπηρετούν στην ομοιόμορφη κατανομή της θερμότητας σε όλο το δείγμα. Η θερμότητα από τον κλίβανο παρέχεται εξίσου και με τον ίδιο ρυθμό και στους δύο υποδοχείς.

- Κλίβανος. Ο κλίβανος είναι μικρός σε μάζα και όγκο και πρέπει να παρέχει ομοιόμορφη θέρμανση με γραμμικό ρυθμό. Επιπλέον, ο σχεδιασμός του δεν επιτρέπει αλληλεπιδράσεις με το υπό εξέταση δείγμα.
- Σύστημα ψύξης. Το σύστημα καθιστά δυνατή την επίτευξη θερμοκρασιών, χαμηλότερων από τη θερμοκρασία δωματίου.
- Φιάλες παροχής αερίων. Τα αέρια (άζωτο ή οξυγόνο) παρέχονται με ρυθμιζόμενη ροή.
- Λογισμικό. Μέσω του ειδικού λογισμικού καθορίζονται εκ των προτέρων οι επιθυμητές συνθήκες θέρμανσης/ψύξης που θα επικρατούν στον κλίβανο.
- Καταγραφικό σύστημα. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας καταγράφεται το θερμογράφημα DSC, από το οποίο προκύπτουν τα συμπεράσματα της μελέτης των δειγμάτων (Μουρτζίνος, 2007).

Η μέθοδος DSC χρησιμοποιείται συχνά για τη μελέτη των συμπλόκων εγκλεισμού. Σε αδρανείς συνθήκες Αζώτου, η επιβεβαίωση του εγκλεισμού των μορίων στην κοιλότητα της β-κυκλοδεξτρίνης βασίζεται στην εξαφάνιση της ενδόθερμης καμπύλης του εγκλειόμενου μορίου ή στην αλλαγή της μεφάνισης της τιμής της θερμοκρασίας τήξεως σε υψηλότερες ή χαμηλότερες θερμοκρασίες (Marques et al., 1990). Επιπλέον, η μέθοδος DSC μπορεί να εφαρμοστεί για τη μελέτη της σταθερότητας των σχηματιζόμενων συμπλόκων εγκλεισμού σε συνθήκες οξείδωσης. Όσο μεγαλύτερη είναι η θερμοκρασία έναρξης της οξείδωσης, τόσο μεγαλύτερη είναι η οξειδωτική σταθερότητα της ενθυλακωμένης ουσίας, εξαιτίας της προστασίας έναντι της οξείδωσης που προσφέρει η ενθυλάκωσή της στην κοιλότητα της β-κυκλοδεξτρίνης (Clas, 1999).

---

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΕΝΘΥΛΑΚΩΣΗ

ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ

---

### 3.1 Γενικά

Η μικροενθυλάκωση είναι μια ισχυρή τεχνολογία που έχει αναπτυχθεί για χρήση στη βιομηχανία τροφίμων και επιτρέπει την προστασία των βακτηριακών κυττάρων (Borgogna et al., 2010). Δημιουργείται μια μικροκάψουλα, η οποία αποτελείται από μία ημιπερατή, σφαιρική, λεπτή και ισχυρή μεμβράνη που περιβάλλει ένα στερεό ή υγρό πυρήνα, με μία διάμετρο που ποικίλλει, από μερικά μικρόμετρα έως 1 χιλιοστό (Anal και Singh, 2007). Τα μικροσωματίδια που προκύπτουν, πρέπει να είναι αδιάλυτα στο νερό για να διατηρούν την ακεραιότητά τους στη μήτρα των τροφίμων και στο άνω τμήμα της γαστρεντερικής οδού και, τέλος, οι ιδιότητες των σωματιδίων πρέπει να επιτρέπουν τη σταδιακή απελευθέρωση των κυττάρων κατά τη διάρκεια της εντερικής φάσης (Picot and Lacroix, 2004, Ding and Shah, 2007).

Το επίστρωμα προστατεύει το ενεργό συστατικό από τις περιβαλλοντικές πιέσεις όπως η οξύτητα, το οξυγόνο και οι γαστρικοί οροί, και μπορεί να χρησιμοποιηθεί, παραδείγματος χάριν, για να βοηθήσει το πέρασμα του περιεχομένου μέσω του στομαχιού. Το σημαντικότερο όφελος αυτής της τεχνολογίας είναι το γεγονός ότι τα προβιοτικά βακτηρίδια μπορούν να παραδοθούν άμεσα και συνεχώς στο έντερο, όπου αποσυντίθενται αποτελεσματικά αφήνοντας βιώσιμες ποσότητες βακτηριδίων για να παρέχουν τα ευεργετικά τους αποτελέσματα επάνω στον οικοδεσπότη (Gbassi and Van Damme, 2012). Η ενθυλάκωση στις υδροκολλοειδείς χάντρες παγιδεύει ή ακινητοποιεί τα κύτταρα μέσα στη μήτρα των χαντρών, η οποία παρέχει με τη σειρά την προστασία σε ένα περιβάλλον που χρησιμοποιείται στη ζύμωση, στα γαλακτοκομικά προϊόντα και στο γαστρεντερικό σωλήνα (Krasaekoopt *et al.*, 2003; Picot and Lacroix, 2004).

Η μικροενθυλάκωση παρέχει προστασία στα ευαίσθητα προβιοτικά βακτηρίδια γαλακτικού οξέος από το οξυγόνο, την ψυξη και τις όξινες συνθήκες κατά τη διάρκεια της κατασκευής, της αποθήκευσης και της γαστρεντερικής διέλευσης και η αποτελεσματικότητά της ενισχύεται με το pH, τη σύνθεση και τη σύσταση της μήτρας των τροφίμων, τον αρχικό πληθυσμό των κυττάρων, τη μέθοδο ενθυλάκωσης και το χρησιμοποιούμενο υλικό τοιχωμάτων ( Vivek K. B. 2013, )

### 3.2. Υλικά για την ενθυλάκωση των προβιοτικών

Τα υλικά μεταφοράς που χρησιμοποιούνται ως προστασία για τα προβιοτικά πρέπει να είναι ασφαλή για κατανάλωση, δηλαδή, Γενικώς Αναγνωρισμένα ως Ασφαλή (Generally Recognized As Safe - GRAS) και οικονομικά, δεδομένου ότι ένα υψηλό κόστος θα επηρεάσει άμεσα την τιμή του τελικού προϊόντος. Τα χαμηλού κόστους υλικά περιλαμβάνουν άμυλα, ινουλίνη, πηκτίνη και κυρίως υδατάνθρακες (De Vos et al., 2010). Άλλα υλικά όπως αλγινικό και τρεχαλόζη χρησιμοποιούνται συχνά αλλά με υψηλότερο κόστος. Τα κύρια υλικά για ενθυλάκωση περιγράφονται παρακάτω:

#### 3.2.1 Πολυσακχαρίτες

Άγαρ, αλγινικό νάτριο, καραγενάνη, αραβικό κόμμι, χιτοζάνη, δεξτράνη, άμυλο και κυτταρίνη, είναι τα κύρια υλικά μεταφορέων που χρησιμοποιούνται για την ενθυλάκωση. Το αλγινικό νάτριο είναι το συνηθέστερα χρησιμοποιημένο υλικό, συμβατό με σχεδόν όλες τις μεθόδους ενθυλάκωσης, και συνήθως χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με άλλα συστατικά (Burgain et al., 2011). Χρησιμοποιείται ευρέως ως πηκτικός παράγοντας λόγω της δυνατότητάς του να δημιουργεί υδροπηκτώματα με δισθενή κατιόντα όπως τα  $Ca^{+2}$ ,  $Ba^{+2}$ ,  $Sr^{+2}$  κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες.

Τα αποτελέσματα δείχνουν τα ενθυλακωμένα στελέχη των βακτηρίων που επωάζονται στο γαστρικό περιβάλλον έχουν μεγαλύτερη βιωσιμότητα από το ελεύθερο βακτήρια και μπορούν να επιβιώσουν στο εντερικό περιβάλλον (Gbassi et al., 2010).

Ένα μείγμα αλγινικού και τροποποιημένου άμυλου χρησιμοποιούνται για να ενθυλακώσει τα προβιοτικά *L. acidophilus* και *B. Lactis* με τη μέθοδο της γαλκτωματοποίησης για την ενσωμάτωσή τους σε γιαούρτι. Ενθυλακωμένα προβιοτικά έδειξαν μεγαλύτερη βιωσιμότητα κατά την αποθήκευση σε σύγκριση με τα ελεύθερα κύτταρα. Μια οργανοληπτική ανάλυση διαπίστωσε ότι τα ενθυλακωμένα βακτήρια στο γιαούρτι δεν μετέβαλλαν το χρώμα, την οξύτητα ή τη γεύση του (Kailasapathy, 2006).

#### 3.2.2 Ολιγοσακχαρίτες

Χρησιμοποιούνται συνήθως το σιρόπι αραβοσίτου, η σακχαρόζη και η μαλτοδεξτρίνη. Όταν ένα κατάλληλο μίγμα μαλτοδεξτρίνης και τρεαλόζης χρησιμοποιείται ως μέσα μεταφοράς για την ενθυλάκωση του λακτοβακίλλου *L. Paracasei* με τη μέθοδο της ψύξης με ψεκάσμο ή της λυοφιλίωσης προκύπτουν

βακτήρια με υψηλή βιωσιμότητα. Η συγκέντρωση της τριαλόζης βοηθάει στην αύξηση της βιωσιμότητας των κυττάρων λόγω της υψηλής οσμωτικής πίεσης (Semyonov et al., 2010).

### 3.2.3 Λιπίδια

Κυρίως χρησιμοποιούνται κήροι, παραφίνη, διγλυκερίδια, μονογλυκερίδια, λίπη, στεατικό οξύ και έλαια. Όταν σησαμέλαιο χρησιμοποιείται για τον εγκλεισμό *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* με τη μέθοδο της γαλακτωματοποίησης, παρατηρείται αύξηση 5.4% στη βιωσιμότητα των κυττάρων υπό συνθήκες ψύξης σε σχέση με τα ελεύθερα κύτταρα. Επίσης παρατηρήθηκε καλύτερη κυτταρική βιωσιμότητα των ενθυλακωμένων βακτηρίων υπό συνθήκες προσομοίωσης εντερικού περιβάλλοντος (Hou et al., 2003).

### 3.2.4 Πρωτεΐνες

Γλουτένη, καζεΐνη, πρωτεΐνη ορού γάλακτος, αλβουμίνη, χρησιμοποιούνται συνήθως ως υλικά ενθυλάκωσης που έχουν ως βάση πρωτεΐνες. Οι Picot και Lacroix (2004) εργάστηκε με πρωτεΐνη ορού γάλακτος ως υλικό μεταφορέα για την ενθυλάκωση *Bifidobacterium breve* και *Bifidobacterium longum* R070 R023 εφαρμόζοντας ξήρανση με ψεκασμό. Για να συμπεριληφθεί έπειτα σε γιαούρτι. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η πρωτεΐνη ορού γάλακτος μπορεί να αυξήσει την ανοχή των βακτηρίων σε όξινο pH, ως εκ τούτου, πρωτεΐνες ορού γάλακτος έχουν μια μεγάλη δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί σε προβιοτικά και τα προϊόντα να περιέχουν βιώσιμα βακτήρια όταν φτάσουν στο γαστρεντερικό σωλήνα (Picot και Lacroix, 2004).

Επίσης, όταν οι πρωτεΐνες ορού γάλακτος χρησιμοποιήθηκαν για την ενθυλάκωση *L. rhamnosus* με εξώθηση σε προσομοιωμένο γαστρεντερικό περιβάλλον, οι πρωτεϊνικές κάψες διαμόρφωσαν μια μήτρα που παρέχει την προστασία στο *L. Rhamnosu* σε όξινο pH και παράγαγαν μια αποδοτική ελεγχόμενη απελευθέρωση βιομορίων.

## **3.3 Τεχνικές ενθυλάκωσης: Λειτουργούσες παράμετροι, πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα**

Οι Τεχνικές μικροενθυλάκωσης αναπτύχθηκαν και εφαρμόζονται με επιτυχία για την προστασία των προβιοτικών βακτηρίων από τη βλάβες που προκαλούνται από τους



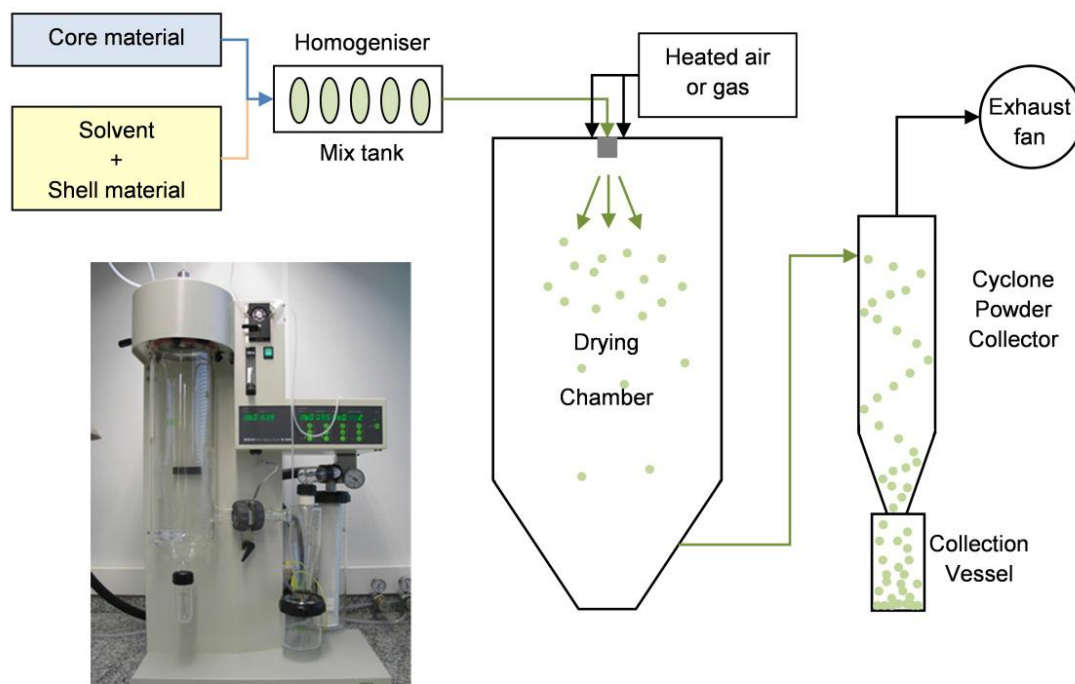
εξωτερικούς παράγοντες, όπως η ξήρανση, συνθήκες συσκευασίας και η αποθήκευσης, (π.χ., χρόνος, θερμοκρασία, υγρασία και οξυγόνο) και η διάσπαση στο γαστρεντερικό σωλήνα, ειδικά λόγω των ακραίων τιμών του pH (2.5 έως 3.5) στα γαστρικά υγρά και τα χολικά άλατα (Kailasapathy, 2006).

Η επιλογή της μεθόδου ενθυλάκωσης εξαρτάται το απαιτούμενο μέσο μέγεθος σωματιδίων, τις φυσικές και χημικές ιδιότητες του υλικού επικάλυψης, τις απαιτήσεις του εγκλεισμένου υλικού, τον απαιτούμενο μηχανισμός απελευθέρωσης και το κόστος. Αυτές οι παράμετροι πρέπει να μελετηθούν για κάθε συγκεκριμένους οργανισμό και διαδικασία. (Parra-Huertas, 2010; Burgain et al., 2011).

### **3.4. Κύριες Τεχνικές για την ενθυλάκωση των προβιοτικών**

#### *3.4.1. Ξήρανση με ψεκασμό (spray drying)*

Η μικροενθυλάκωση με την τεχνική της ξήρανσης με ψεκασμό χρησιμοποιείται στη βιομηχανία τροφίμων, από τα τέλη της δεκαετίας του 1950, για την ενθυλάκωση αρωματικών ελαίων παρέχοντας προστασία έναντι της οξείδωσης/υποβάθμισης, καθώς και για τη μετατροπή υγρών ουσιών σε στερεή μορφή (Gouin, 2004). Η ξήρανση με ψεκασμό είναι οικονομική, ευέλικτη, συνεχούς λειτουργίας τεχνική που παράγει σωματίδια καλής ποιότητας. Επίσης, είναι εύκολα αναπαραγώγιμη και μπορεί να εφαρμοστεί σε πιο ευρεία κλίμακα στις συνθήκες της βιομηχανίας τροφίμων. Τα χαρακτηριστικά αυτά καθιστούν τη μέθοδο αυτή, την πιο πλέον διαδεδομένη τεχνική μικροενθυλάκωσης στο χώρο της βιομηχανίας τροφίμων (Fang and Bhandari, 2010, Estevinho et al., 2013).



Σχήμα 4: Σχηματικό διάγραμμα μίας διαδικασίας ενθυλάκωσης ξηρού ψεκασμού

Η ξήρανση με ψεκασμό είναι μία διαδικασία κατά την οποία ένα υγρό προϊόν ψεκάζεται σε ένα ρεύμα ζεστού αέρα, ώστε να προκύψει, στιγμιαίως, μία σκόνη (Gharsallaoui et al., 2007). Η βασική αρχή της μεθόδου περιλαμβάνει τη διάλυση του πυρηνικού υλικού και του επιλεγμένου εξωτερικού καλύμματος προς τη δημιουργία ενός εναιωρήματος, γαλακτώματος ή διαλύματος. Το παρασκεύασμα αυτό, ακολούθως, ψεκάζεται υπό συνθήκες θερμού αέρα, επιτείνοντας την ταχεία απομάκρυνση του διαλύτη. Οι θερμοκρασίες που συνήθως χρησιμοποιούνται στην τεχνική αυτή κυμαίνονται από 150 έως 220°C, ενώ στη συνέχεια η θερμοκρασία πέφτει στους 50 – 80°C. Τα σωματίδια που προκύπτουν είναι σε μορφή σκόνης (Schrooyen et al., 2001, de Vos et al., 2010). Πιο αναλυτικά, για τους σκοπούς της μικροενθυλάκωσης, τροποποιημένο άμυλο, μαλτοδεξτρίνες, κόμμεα ή άλλες ουσίες διαλύονται, σε πρώτο βήμα, σε νερό, ώστε να χρησιμοποιηθούν ως υλικά του εξωτερικού καλύμματος. Στη συνέχεια, το πυρηνικό υλικό ομογενοποιείται με το υλικό του εξωτερικού καλύμματος. Το μίγμα παροχετεύεται στη συσκευή της ξήρανσης με ψεκασμό και ψεκάζεται από τον εκνεφωτή ή τον περιστρεφόμενο δίσκο της συσκευής. Οι υψηλές θερμοκρασίες που επικρατούν επισπεύδουν την εξάτμιση του νερού, και οι μικροκάψουλες εναποτίθενται στον πυθμένα του ξηραντήρα, από όπου και παραλαμβάνονται στο τέλος της διαδικασίας. Το τυπικό σχήμα των παραγόμενων σωματιδίων είναι σφαιρικό,

και το μέσο μέγεθος κυμαίνεται από 10 nm έως 100 nm (Fang and Bhandari, 2010). Σημειώνεται ότι η το πυρηνικό υλικό και το υλικό του εξωτερικού καλύμματος θα πρέπει να βρίσκονται σε αναλογία 1:4 (Gibbs et al., 1999). Επιπλέον, η ταχεία εξάτμιση του νερού από του υλικό του καλύμματος διατηρεί τη θερμοκρασία του πυρήνα χαμηλότερη από τους 100°C, παρά τις υψηλές θερμοκρασίες (150 - 220°C) που επικρατούν στη μέθοδο αυτή, ενώ η έκθεση του μορίου στις θερμοκρασίες αυτές διαρκεί λίγα δευτερόλεπτα. Έτσι, η ξήρανση με ψεκασμό θεωρείται ιδανική για τη διαχείριση μορίων, ασταθή σε υψηλές θερμοκρασίες (Shahidi and Han, 1993).

Η αφαίρεση του νερού με τη μέθοδο της ξήρανσης με ψεκασμό είναι συνήθως βιομηχανική πρακτική. Μειώνοντας το περιεχόμενο νερό και την ενεργότητα νερού, η ξήρανση με ψεκασμό χρησιμοποιείται στη βιομηχανία τροφίμων για να διασφαλίσει τη μικροβιολογική σταθερότητα των προϊόντων, να ελαττώσει τον κίνδυνο για χημική και βιολογική υποβάθμιση, να μειώσει το κόστος αποθήκευσης και μεταφοράς και να αποκτήσει το τελικό προϊόν κάποιες επιθυμητές ιδιότητες, όπως η αυξημένη διαλυτότητα (Estevinho et al., 2013). Από την άλλη πλευρά, ένας περιορισμός της μεθόδου είναι η αναγκαία προϋπόθεση το υλικό του εξωτερικού καλύμματος να είναι υδατοδιαλυτό σε αποδεκτά όρια. Ως αποτέλεσμα, υπάρχει ένας περιορισμός στα υλικά καλύμματος που μπορούν να χρησιμοποιηθούν (Gouin, 2004, Estevinho et al., 2013). Άλλος ένας περιορισμός, κυρίως στην ενθυλάκωση προβιοτικών, είναι πως οι υψηλές θερμοκρασίες (>60°C) μπορεί να επηρεάσουν αρνητικά την επιβίωση των μικροοργανισμών (de Vos et al., 2010).

Το εξωτερικό κάλυμμα είναι σχεδιασμένο για να προστατεύει το πυρηνικό υλικό από ποικίλους παράγοντες που μπορούν να το υποβαθμίσουν, να εμποδίζει την αλληλεπίδραση του πυρηνικού υλικού με άλλα συστατικά του τροφίμου, να περιορίζει την απώλεια λόγω πτητικότητας και να επιτρέπει την ελεγχόμενη απελευθέρωση του πυρηνικού υλικού υπό καθορισμένες συνθήκες. Βάσει των ιδιοτήτων του πυρηνικού υλικού, αλλά και των επιδιωκόμενων χαρακτηριστικών του τελικού προϊόντος, το εξωτερικό κάλυμμα θα πρέπει να πληροί κάποια κριτήρια. Αναφορικά οι φυσικοχημικές ιδιότητες που λαμβάνονται υπόψη είναι η διαλυτότητα σε νερό σε αποδεκτά όρια, το μοριακό βάρος, η υαλώδης μετάπτωση, η κρυσταλλικότητα, η ικανότητα διάχυσης, η ικανότητα γαλακτωματοποίησης, η μηχανική αντοχή, η συμβατότητα με το τρόφιμο και το κατάλληλο μέγεθος των παραγόμενων μικροκάψουλων. Τέλος, το κόστος παίζει πάντοτε σημαντικό ρόλο στην επιλογή του κατάλληλου υλικού. Η μικροενθυλάκωση με την τεχνική ξήρανση με ψεκασμό πραγματοποιείται με τη χρήση βιοπολυμερών όπως οι

πρωτεΐνες, οι κηροί, τα κόμμεα και μαλτοδεξτρίνες, ως εξωτερικά καλύμματα (Gharsallaoui et al., 2007).

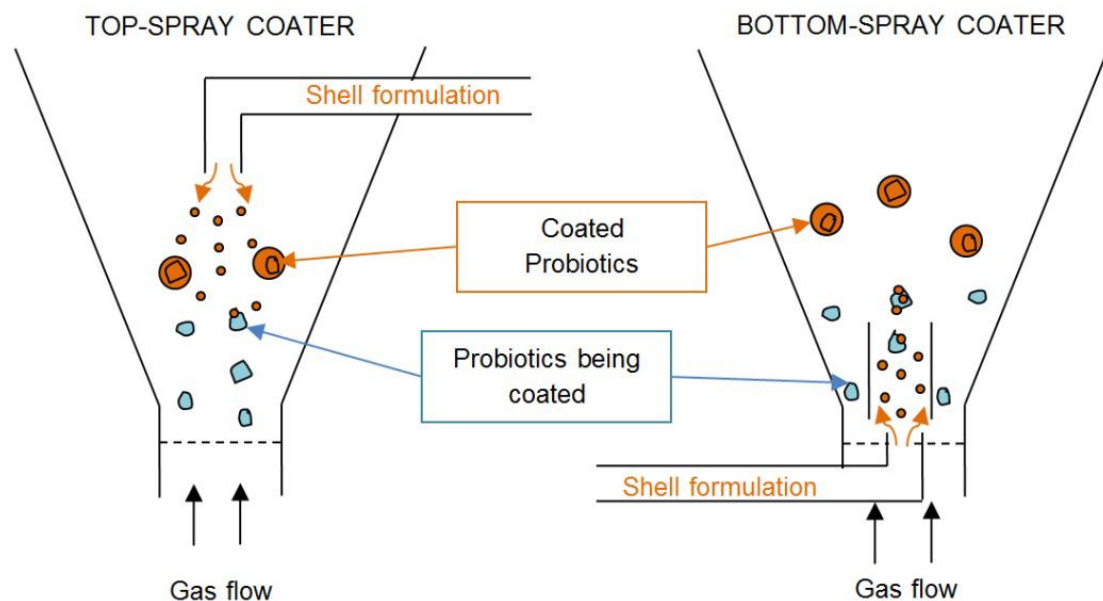
#### 3.4.2. Ψύξη με ψεκασμό (*spray cooling/chilling*)

Η ψύξη με ψεκασμό είναι μία μέθοδος ενθυλάκωσης η οποία προσομοιάζει την ξήρανση με ψεκασμό, όσον αφορά το γεγονός ότι περιλαμβάνει τη διάλυση του πυρηνικού υλικού σε ένα διάλυμα που ήδη έχει διαλυθεί το υλικό του εξωτερικού καλύμματος με στόχο την παραγωγή ενός εναιωρήματος, γαλακτώματος ή διαλύματος. Είναι εύλογο ότι και ο ψεκασμός από θερμασμένο εκνεφωτή σε ένα ελεγχόμενο περιβάλλον είναι ένα άλλο κοινό χαρακτηριστικό τους. Οι βασικές διαφορές τους, όμως, έγκεινται στη θερμοκρασία του αέρα που χρησιμοποιείται στον θάλαμο ξήρανσης και στο υλικό εξωτερικού καλύμματος που χρησιμοποιείται. Ενώ η ξήρανση με ψεκασμό χρησιμοποιεί θερμό αέρα για την εξάτμιση του διαλύτη, στη μέθοδο της ψύξης με ψεκασμό χρησιμοποιείται κρύος αέρας χαμηλότερης θερμοκρασίας από τη θερμοκρασία πήξης των τετηγμένων λιποειδών ή κηρών που χρησιμοποιούνται ως εξωτερικά καλύμματα. Πιο συγκεκριμένα, συνήθως χρησιμοποιούνται φυτικά λιπαρά ή παράγωγά τους ως εξωτερικά καλύμματα. Επιπλέον, οι μικροσωματίδια που δημιουργούνται είναι λιπόφιλα, λόγω του λιποειδικού εξωτερικού καλύμματος. Συνεπώς, η μέθοδος αυτή είναι κατάλληλη για την ενθυλάκωση υδατοδιαλυτών συστατικών όπως υδατοδιαλυτές βιταμίνες, μέταλλα, ένζυμα ή μερικά αρώματα (Shahidi and Han, 1993). Τέλος, αξίζει να αναφέρουμε ότι η μέθοδος αναφέρεται στη βιβλιογραφία ως ενθυλάκωση «μήτρας», καθώς τα μόρια του πυρηνικού υλικού χαρακτηρίζονται ως ένα σύνολο συστατικών μορίων «βυθισμένων» σε μία λιπαρή «μήτρα», ενώ δεν σχηματίζεται η γνωστή μορφή της μικροκάψουλας (Gouin, 2004).

#### 3.4.3. Επικάλυψη σε ρευστοποιημένη κλίνη (*fluidized bed coating*)

Η μέθοδος της επικάλυψης σε ρευστοποιημένη κλίνη αποτελεί έναν τρόπο δημιουργίας μιας ομοιόμορφης στοιβάδας γύρω από στερεά σωματίδια. Τα στερεά σωματίδια προς ενθυλάκωση, παρασύρονται από ένα σταθερό ρεύμα θερμού ή κρύου αέρα από τον πυθμένα του θαλάμου επικάλυψης προς το ανώτερο τμήμα του θαλάμου. Στο ανώτερο τμήμα του θαλάμου υπάρχει ένας εκνεφωτής, ο οποίος ψεκάζει το υλικό του εξωτερικού καλύμματος. Το εξωτερικό κάλυμμα είτε είναι διαλυμένο σε κάποιον διαλύτη ή βρίσκεται σε «τετηγμένη» μορφή. Το εξωτερικό κάλυμμα επικαλύπτει το πυρηνικό υλικό

καθώς το πλησιάζει, και δημιουργείται μια εξωτερική στοιβάδα. Στη συνέχεια, το πυρηνικό υλικό επικαλυμμένο με το εξωτερικό κάλυμμα, λόγω της βαρύτητας και του εξασθενημένου ρεύματος αέρα που επικρατεί στο ανώτερο τμήμα του θαλάμου, πέφτει προς τα κάτω. Η διαδικασία αυτή γίνεται αρκετές φορές μέχρι να σχηματιστεί πλήρως η επιθυμητή εξωτερική στοιβάδα. Στο τέλος, μετά την παύση του ρεύματος αέρα, τα σχηματισμένα σωματίδια συλλέγονται από τον πυθμένα του θαλάμου. Η μέθοδος αυτή είναι η δεύτερη πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος για την παραγωγή ενθυλακωμένων προϊόντων στη βιομηχανία τροφίμων, μιας και καθιστά δυνατή τη χρήση μεγάλης ποικιλίας υλικών εξωτερικού καλύμματος(Barbosa-Canovas et al., 2005)



Σχήμα 5: Γραφική απεικόνιση των δύο τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενων επιστρωτών ρευστοποιημένης κλίνης.

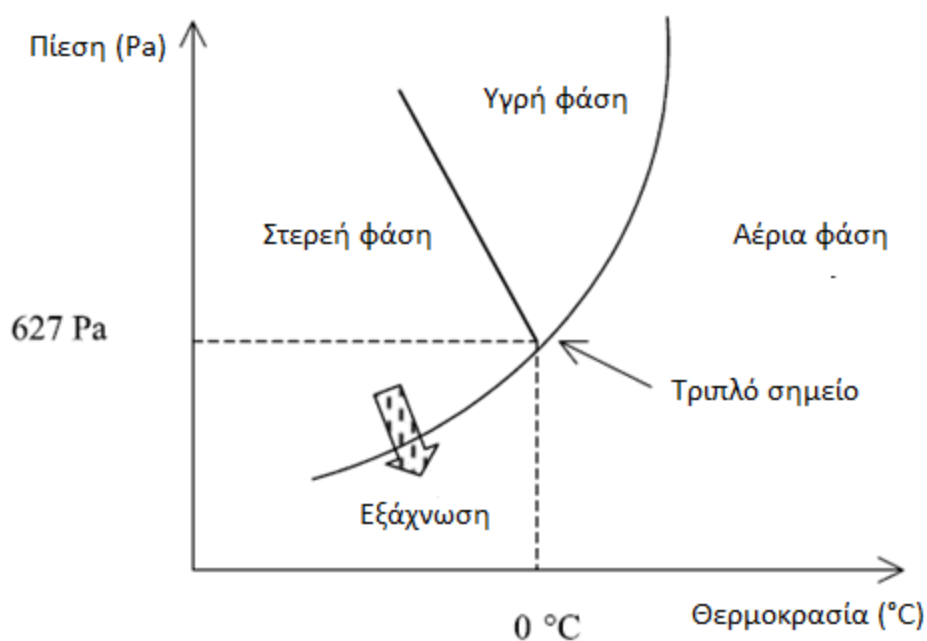
#### 3.4.4. Λυοφιλίωση ή ξήρανση με κατάψυξη (Lyophilisation)

Η λυοφιλίωση, ή αλλιώς ξήρανση με κατάψυξη, είναι μια διαδικασία ξήρανσης που χρησιμοποιείται συχνά, κυρίως για θερμο-ευαίσθητα συστατικά. Η ξήρανση με κατάψυξη είναι μια πολύ-επίπεδη διαδικασία για τη σταθεροποίηση των συστατικών. Η διαδικασία αυτή έχει τέσσερα στάδια: την ψύξη, την εξάχνωση (πρώτο στάδιο ξήρανσης), το στάδιο

της εκρόφησης (δεύτερο στάδιο ξήρανσης) και την αποθήκευση. Τα προϊόντα της λυοφιλίωσης είναι υψηλής ποιότητας, ανασυντίθενται εύκολα και έχουν μεγάλο χρόνο ζωής (Ezhilarasik et al., 2013).

Η λυοφιλίωση περιλαμβάνει αρχικά την ψύξη των υλικών, έπειτα τη μείωση της πίεσης και τέλος την παροχή θερμότητας από το εξωτερικό περιβάλλον. Η διαδικασία αυτή επιτρέπει τη διαφυγή του νερού από τη στερεή φάση κατευθείαν στην αέρια (Fang and Bhandari, 2010). Για τη μείωση της πίεσης, αλλά και την απομάκρυνση των ήδη υπάρχοντων αερίων στο θάλαμο της λυοφιλίωσης, τίθεται σε λειτουργία μία αντλία κενού. Επίσης, όταν ο πάγος αρχίζει να εξαχνώνεται, οι υδρατμοί διοχετεύονται σε ένα ψυγείο-συμπυκνωτή, εμποδίζοντας έτσι, την επιστροφή των υδρατμών στο θάλαμο της λυοφιλίωσης. Επιπλέον, μειώνεται ο τελικός όγκος των αερίων όπου η αντλία κενού πρέπει να απομακρύνει.

Το υγρό στοιχείο που συνήθως εξαχνώνεται είναι το νερό. Μιας και η πίεση ατμών του πάγου είναι πολύ χαμηλή, η ύπαρξη πολύ χαμηλής πίεσης ή υψηλού κενού είναι απαραίτητη για την επίτευξη της ξήρανσης με κατάψυξη. Το παρακάτω σχήμα απεικονίζει διαγραμματικά τις φάσεις του νερού σε διάφορες θερμοκρασίες και πιέσεις.



Σχήμα 6: Διάγραμμα φάσεων του καθαρού νερού (Barbosa-Canovas et al., 2005).

Όπως φαίνεται από το διάγραμμα, όταν το νερό είναι στην καθαρή του μορφή, η πίεση στο θάλαμο ξήρανσης πρέπει να είναι μικρότερη από 627 kPa και η θερμοκρασία ίση ή χαμηλότερη από τους 0°C ώστε να πραγματοποιηθεί η εξάχνωση του πάγου επιτυχώς. Στην περίπτωση των τροφίμων, αναμεμιγμένα στο νερό βρίσκονται και άλλα συστατικά.

Ως αποτέλεσμα, μειώνεται η θερμοκρασία πήξης και χαμηλότερες θερμοκρασίες απαιτούνται ώστε να ψυχθεί το τρόφιμο. Στις περισσότερες περιπτώσεις λυοφιλίωσης, οι θερμοκρασίες που επικρατούν είναι χαμηλότερες από τους  $-10^{\circ}\text{C}$  και η πίεση χαμηλότερη από τα 2 mmHg (Barbosa-Canovas et al., 2005).

Τα προϊόντα της λυοφιλίωσης είναι ξηρά, ελαφρά, πορώδη και διατηρούν σχεδόν εξ ολοκλήρου το αρχικό τους σχήμα και δομή. Τα κατάλληλα συσκευασμένα αποξηραμένα προϊόντα μπορούν να διατηρηθούν για μεγάλο χρονικό διάστημα χωρίς να χάσουν τις φυσικοχημικές, βιολογικές και οργανοληπτικές ιδιότητες που είχαν πριν την ξήρανση. Επίσης, οι χαμηλές θερμοκρασίες που επικρατούν στη μέθοδο αυτή, ελαχιστοποιούν τις αντιδράσεις υποβάθμισης που παρατηρούνται συχνά στις υπόλοιπες τεχνικές ξήρανσης. Το προφανές πλεονέκτημα της μεθόδου είναι πως η δομή κρυστάλλου κατά την κατάψυξη ελαχιστοποιεί τη συρρίκνωση του προϊόντος και έτσι, καθιστά εφικτή τη γρήγορη και ολοκληρωμένη επανενυδάτωση του προϊόντος. Οι καλές ανοικοδομητικές ιδιότητές του παραγόμενου αποξηραμένου προϊόντος επιτρέπουν την επανάκτηση της αρχικής μορφής και δομής, παρουσιάζοντας χαρακτηριστικά παρόμοια με το αρχικό νωπό προϊόν (Barbosa-Canovas et al., 2005). Επιπλέον, η λυοφιλίωση οδηγεί στο σχηματισμό προϊόντων πάρα πολύ καλής ποιότητας, τα οποία μάλιστα αποκτούν μεγαλύτερο χρόνο ζωής κατά την αποθήκευσή τους. Από την άλλη πλευρά, μειονέκτημα της μεθόδου είναι ο μεγάλος χρόνος αναμονής και το υψηλό ενεργειακό - οικονομικό κόστος μέχρι την ολοκλήρωσή της, μιας και η βαθιά κατάψυξη των προϊόντων και η δημιουργία κενού απαιτούν υψηλή παροχή ενέργειας (Ezhilarasi et al., 2013). Η μικροενθυλάκωση πραγματοποιείται έπειτα από την ομογενοποίηση του πυρηνικού υλικού σε διάλυμα που περιέχει το εξωτερικό κάλυμμα, και τη συνλυοφιλίωσή τους (Desai and Jin Park, 2005).

#### 3.4.5. Εξώθηση ή εκβολή (*extrusion*)

Η διαδικασία της εξώθησης περιλαμβάνει την εφαρμογή πίεσης σε μία άμορφη μάζα, ώστε να ρεύσει διαμέσου ενός στομίου ή καλουπιού υπό ελεγχόμενες συνθήκες. Η συσκευή της εξώθησης για την ενθυλάκωση αποτελείται από μια συσκευή παραγωγής και σκλήρυνσης σταγονιδίων. Η μικροενθυλάκωση με εξώθηση λαμβάνει χώρα σε υψηλές θερμοκρασίες, και περιλαμβάνει εκβολή ενός γαλακτώματος του πυρηνικού υλικού και του εξωτερικού καλύμματος μέσω ενός στομίου υπό υψηλή πίεση (Augustin and Sanguansri, 2008). Επίσης, χρησιμοποιείται σχεδόν αποκλειστικά για την ενθυλάκωση πτητικών και ασταθών

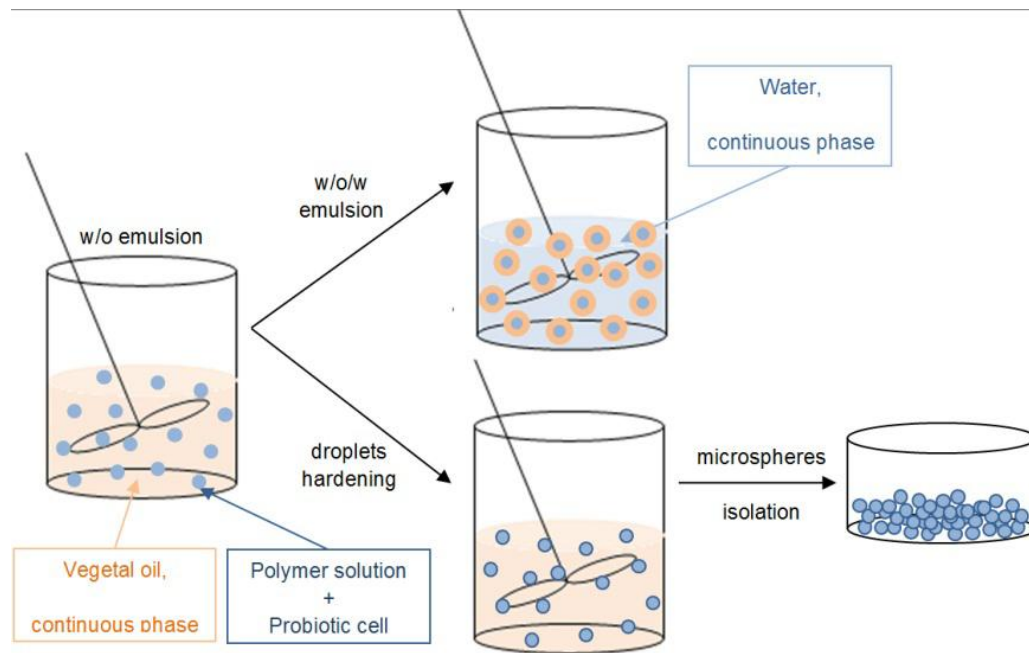
αρωματικών συστατικών σε υδατάνθρακες που βρίσκονται στην υαλώδη κατάσταση. Το κύριο πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η μεγάλη διάρκεια ζωής των παραγόμενων προϊόντων σε μόρια που είναι επιρρεπή στην οξείδωση. Από την άλλη πλευρά, ένα σημαντικό μειονέκτημα είναι ο σχηματισμός αρκετά μεγάλων σωματιδίων μεγέθους 500 - 1000 μm, ο οποίος περιορίζει τη χρήση των εξωθημένων αρωματικών συστατικών σε εφαρμογές όπου το mouthfulling είναι σημαντικό χαρακτηριστικό του τροφίμου. Επιπλέον, υπάρχει περιορισμένος αριθμός υλικών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εξωτερικά καλύμματα για μικροενθυλάκωση με εξώθηση (Gouin, 2004).

#### 3.4.6. Γαλακτωματοποίηση (Emulsion Method)

Η Γαλακτωματοποίηση είναι μια χημική τεχνολογία για την ενθυλάκωση προβιοτικών ζωντανών κύτταρων και χρησιμοποιεί υδροκολλοειδή (αλγινικό, καραγενάνη και πηκτίνη) ως υλικά ενθυλάκωσης. Η αρχή αυτής της τεχνολογίας βασίζεται στη σχέση μεταξύ των ασυνεχών και συνεχών φάσεων. Για την ενθυλάκωση σε ένα γαλάκτωμα, απαιτούνται ένας γαλακτωματοποιητής κι ένα επιφανειοδραστικό μέσο. Ένας παράγοντας στερεοποίησης (χλωριούχο ασβέστιο) προστίθεται έπειτα στο γαλάκτωμα. (Chen and Chen, 2007; Kailasapathy, 2009; De Vos *et al.*, 2010).

Η τεχνική γαλάκτωμα είναι εύκολο να διαβαθμιστεί και αποδίδει ένα υψηλό ποσοστό επιβίωσης των βακτηρίων (Chen και Chen, 2007). Οι κάψουλες που προκύπτουν έχουν μικρή διάμετρο αλλά το βασικό μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι προσφέρει ευρύ φάσμα μεγέθους και μορφής. Η διαδικασία γαλακτωματοποίησης επιτρέπει την παραγωγή του επιθυμητού μεγέθους μικροκάψουλων με τη μεταβολή της ταχύτητας ανάδευσης και της αναλογίας νερού / ελαίου (Kailasapathy, 2009).





Σχήμα 7: Εγκλεισμός προβιοτικών κυττάρων από το νερό-σε-λάδι και νερό-σε-έλαιο-σε-νερό γαλακτώματα

Σε αντίθεση με την τεχνολογία εξώθησης, μπορεί εύκολα να κλιμακωθεί και η διάμετρος των σφαιριδίων που παράγονται είναι σημαντικά μικρότερη (25μm -2 mm). Αλλά αυτή η μέθοδος απαιτεί περισσότερο κόστος για την απόδοση σε σύγκριση με τη μέθοδο της εξώθησης, που οφείλεται στην αναγκαιότητα χρησιμοποίησης φυτικού ελαίου για τον σχηματισμό γαλακτώματος (Krasaekoort et al., 2003). Τα μικροσωματίδια που δημιουργούνται με τη μέθοδο της γαλακτωματοποίησης ανακτήθηκαν από την τεχνολογία διήθησης με μεμβράνη. Έχει αναφερθεί ότι η συγκέντρωση και το ιξώδες της ενθυλάκωσης προτού τον σχηματισμό πηκτώματος και η ταχύτητα ανάδευσης οι κύριες παράμετροι που επηρεάζουν τη διάμετρο των τελικών μικροσφαιριδίων. (Hansen *et al.*, 2002).

#### 3.4.7. Συγκρυστάλλωση (cocrystallization)

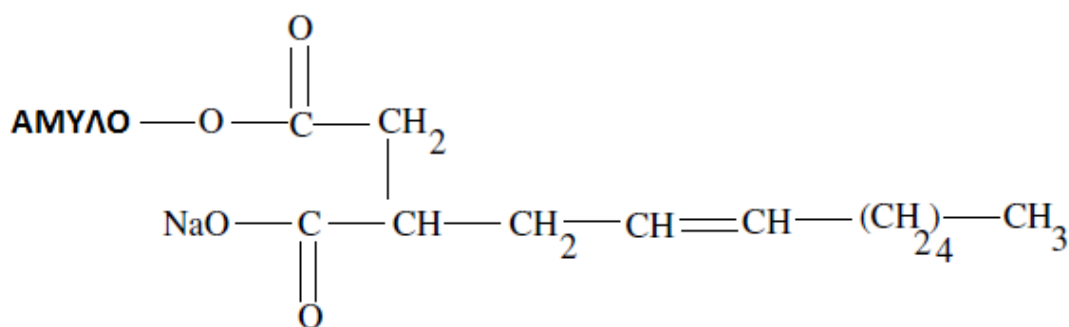
Η συγκρυστάλλωση είναι μια διαδικασία ενθυλάκωσης κατά την οποία η κρυσταλλική μορφή της σουκρόζης τροποποιείται από ένα τέλει σε ένα ακανόνιστο συσσωματωμένο κρύσταλλο, με αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας πορώδους μήτρας όπου καθιστά δυνατή την ενσωμάτωση ενός δεύτερου συστατικού. Η αυθόρμητη κρυστάλλωση του υπέρκορου διαλύματος σουκρόζης πραγματοποιείται σε συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας (άνω των 120°C) και χαμηλής υγρασίας. Εάν ένα δεύτερο συστατικό προστεθεί τη στιγμή της

κρυστάλλωσης, η αυθόρμητη κρυστάλλωση έχει ως αποτέλεσμα την ενσωμάτωση του δεύτερου συστατικού στον κενό χώρο ανάμεσα στα συσσωματώματα των μικροκρυστάλλων. Το κύριο πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η βελτιωμένη διαλυτότητα, ομοιογένεια, ικανότητα διασποράς, ενυδάτωση, αντισυσσωμάτωση, σταθερότητα και ρευστότητα των ενθυλακωμένων συστατικών (Fang and Bhandari, 2010).

#### 3.4.8. Εγκλεισμός σε τροποποιημένο άμυλο

Ένα συχνά χρησιμοποιούμενο μέσο εγκλεισμού στη βιομηχανία τροφίμων αποτελεί το οκτενυλο-ηλεκτρικό τροποποιημένο άμυλο. Η τροποποίηση του αμύλου έγκειται στην προσθήκη μιας λιπόφιλης ομάδας στην αλυσίδα του αμύλου. Η προσθήκη, λοιπόν, της οκτενυλο-ηλεκτρικής ομάδας τροποποιεί τον υδρόφιλο χαρακτήρα του αμύλου και αυξάνει τη γαλακτωματοποιητική ικανότητά του. Η αύξηση του υδρόφοβου χαρακτήρα του αμύλου καθιστά το τροποποιημένο άμυλο ιδανικό για τη συγκράτηση των πτητικών συστατικών κατά την ξήρανση με ψεκασμό (Fernandes et al., 2014).

Η χρήση του οκτενυλο-ηλεκτρικού τροποποιημένου αμύλου στη βιομηχανία τροφίμων ως πρόσθετο τροφίμων είναι εγκεκριμένη από τον Οργανισμό Φαρμάκων και Τροφίμων των ΗΠΑ (FDA), με την προϋπόθεση η συγκέντρωσή του να μην ξεπερνά το 3% (Borrmann et al., 2013). Επίσης, η χρήση του οκτενυλο-ηλεκτρικού τροποποιημένου αμύλου εγκρίθηκε από την Ευρωπαϊκή Ένωση προς χρήση σε παιδικές φόρμουλες και παιδικές τροφές μετά του απογαλακτισμού (Barroso et al., 2013).



Σχήμα 8: Σχηματική απεικόνιση του οκτενυλο-ηλεκτρικού τροποποιημένου αμύλου (Bhosale et al., 2006)

Το τροποποιημένο άμυλο ανήκει στην κατηγορία του ανθεκτικού αμύλου, δηλαδή είναι ανθεκτικό στην ενζυμική υδρόλυση του πραγματοποιείται στο λεπτό έντερο κατά την πέψη του, και μεταβολίζεται από την εντερική μικροχλωρίδα του παχέος εντέρου (Aí et al., 2013). Επιπλέον, οι He et al. (2008) έδειξαν ότι η κατανάλωση του τροποποιημένου αμύλου από υγιείς εθελοντές οδήγησε σε καθυστερημένη μεταγευματική γλυκαιμική απόκριση και σε σημαντική μείωση (32,2%) της μέγιστης τιμής γλυκόζης αίματος μεταγευματικά, εν συγκρίσει με το μη-τροποποιημένο άμυλο. Το γεγονός αυτό αποτελεί ένδειξη της βραδείας απορρόφησής του από τον ανθρώπινο οργανισμό

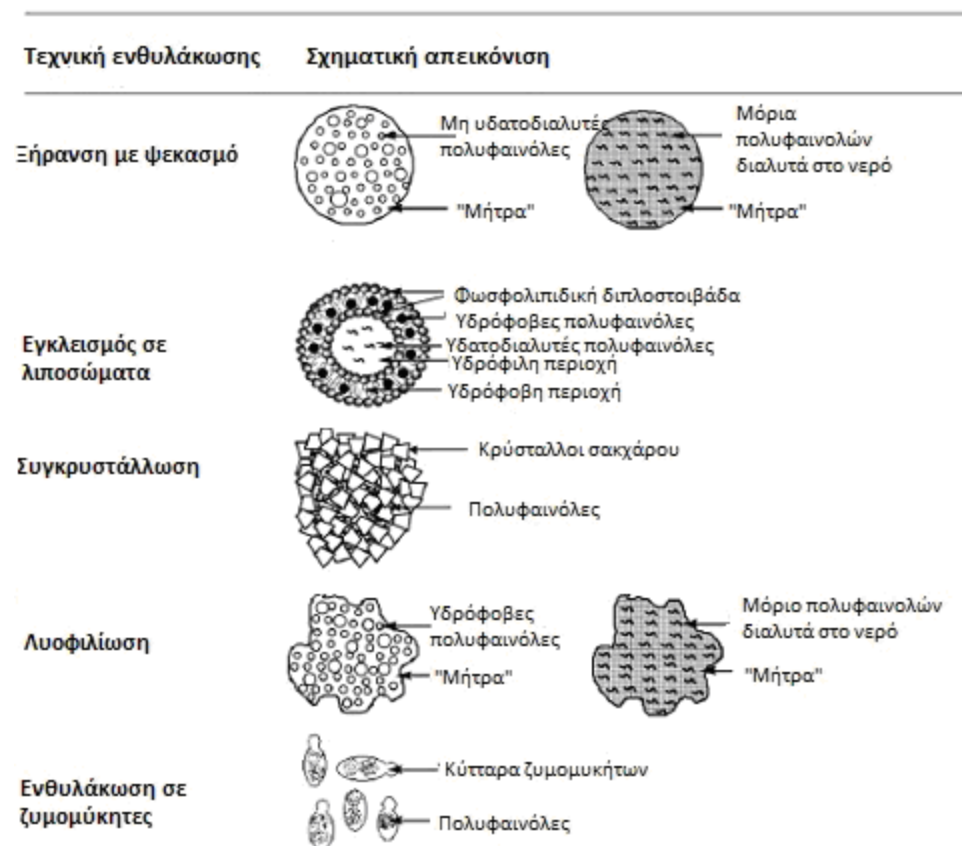
#### 3.4.9. Εγκλεισμός σε λιποσώματα (*liposome entrapment*)

Τα λιποσώματα αποτελούνται από τουλάχιστον ένα κυστίδιο και συντίθενται από λιπιδικές μεμβράνες, μίας ή δύο στοιβάδων. Οι στοιβάδες απαρτίζονται από λιπίδια όπως τα φωσφολιπίδια και η χοληστερόλη. Τα λιποσώματα σχηματίζονται αφότου τα λιπίδια διασπαρθούν σε ένα υδατικό μέσο. Ο υποκείμενος μηχανισμός της δημιουργίας των λιποσωμάτων απαιτεί την παροχή ενέργειας και έγκειται στις υδροφιλικές - υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στα λιπίδια και τα μόρια του νερού. Το πυρηνικό υλικό μπορεί είτε να εγκλειστεί στην κοιλότητα του λιποσώματος τη στιγμή του σχηματισμού του είτε να προσκολληθεί στην επιφάνειά του ή ενδομεμβρανικά. Η χρήση της τεχνικής αυτής στη βιομηχανία τροφίμων είναι ιδιαίτερα περιορισμένη εξαιτίας της χαμηλής απόδοσης της ενθυλάκωσης, το υψηλό κόστος και της αυξημένης πιθανότητας «διαφυγής» υδατοδιαλυτών εγκλεισμένων μορίων κατά την αποθήκευση του προϊόντος (Zuidam , 2010).

#### 3.4.10. Ενθυλάκωση σε ζύμες (*yeast encapsulation*)

Από την πρώτη παρατήρηση, πριν 40 χρόνια, ότι τα κύτταρα των ζυμομυκήτων ήταν ικανές προστατευτικές δομές που μπορούσαν να έχουν διάφορες βιομηχανικές εφαρμογές, πολλές τεχνικές έχουν αναπτυχθεί, ώστε οι τεχνολόγοι να είναι σε θέση να ενσωματώνουν διάφορα συστατικά στα κύτταρα. Ο κυτταρικός φάκελος των ζυμομυκήτων μπορεί να λειτουργήσει ως εξωτερικό κάλυμμα και δρα ως μία προστατευτική κάψουλα, ελέγχοντας την οσμωτική πίεση και την ανταλλαγή συστατικών με το εξωτερικό περιβάλλον του κυττάρου. Μελέτες έχουν δείξει ότι είναι εφικτός ο μικροεγκλεισμός τόσο υδρόφοβων όσο και υδρόφιλων συστατικών στα κύτταρα των ζυμομυκήτων. Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι το ομοιόμορφο μέγεθος όλων των

μικροκάψουλων, η υψηλή απόδοση της ενθυλάκωσης, ενώ το κόστος της δεν διαφέρει εν συγκρίσει με τις υπόλοιπες τεχνικές μικροενθυλάκωσης. (Pham-Hoang et al., 2013).



Σχήμα 9: Συγκεντρωτική σχηματική απεικόνιση ενθυλακωμένων πολυφαινολών με διαφορετικές τεχνικές μικροενθυλάκωσης (Fang et al., 2010)

### 3.5. Υλικά επικάλυψης κατά την ενθυλάκωση των προβιοτικών

Η ενθυλάκωση των προβιοτικών βασίζεται σχεδόν εξ ολοκλήρου στην χρήση των φυσικών και συνθετικών πολυμερών (Gbassi και Van Damme, 2012). Η αποτελεσματικότητα της ενθυλάκωσης και η σταθερότητα της κάψουλας εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από το υλικό ενθυλάκωσης, το οποίο είναι γνωστό ως υλικό τοιχώματος. Ιδανικά, το υλικό του τοιχώματος πρέπει να είναι υδατοδιαλυτό δεδομένου ότι τα περισσότερα εναιωρήματα που προκύπτουν από τη μέθοδο της ξήρανσης με ψεκάσμο έχουν βάση το νερό και καλή μηχανική αντοχή, συμβατότητα με τα υλικά του πυρήνα, ιδιότητες γαλακτωματοποίησης και σχηματισμού φιλμ και ιδιότητες χαμηλού ιζώδους (Reineccius, 2004). Η βιωσιμότητα των προβιοτικών ενθυλακωμένων κυττάρων εξαρτάται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες των καψουλών. Στην πραγματικότητα, ο

τύπος και η συγκέντρωση του υλικού επικάλυψης, το μέγεθος των σωματιδίων, ο αρχικός αριθμούς κυττάρων και τα βακτηριακά στελέχη είναι μερικές παράμετροι, οι οποίες είναι πολύ σημαντικές (Al και Chen, 2007). Τα βιοπολυμερή, τα φυσικά κόμμεα (αραβικό κόμμι, k-καρραγενάνη, αλγινικά άλατα, κλπ), οι υδατάνθρακες χαμηλού μοριακού βάρους και οι πρωτεΐνες (πρωτεΐνη ορού γάλακτος, ζελατίνη, κ.λ.π.) γενικά θεωρούνται ως καλά υλικά τοιχώματος (Reineccius, 2004).

### **3.5.1 Ενθυλάκωση Προβιοτικών με τη χρήση Αλγινικού**

Το αλγινικό είναι το βιο-πολυμερές που χρησιμοποιείται περισσότερο για την ενθυλάκωση. Αποτελεί ένα φυσικά προερχόμενο πολυσακχαρίτη, ο οποίος εκχυλίζεται από διάφορα είδη φυκιών και αποτελείται από β-D-μαννουρονικού και α-L-γουλουρονικού οξύ. Αλγινικό υδρογέλες χρησιμοποιείται εκτενώς στην κυτταρική ενθυλάκωση (Rowley et al., 1999), και αλγινικό ασβέστιο προτιμάται σε συγκέντρωση 0.5-4% για τον εγκλεισμό των προβιοτικών.

Η ζελατινοποίηση του Αλγινικού σφαιριδίου χρησιμοποιείται λόγω της απλότητάς του, της δυνατότητας που έχουν να σχηματίζουν εύκολα μήτρες γέλης γύρω από τα βακτηριακά κύτταρα, είναι μη-τοξικά, απαιτούνται ήπιες συνθήκες επεξεργασίας για την εκτέλεση τους, απελευθερώνοντας παγιδευμένα κύτταρα, της βιοσυμβατότητα και του χαμηλού κόστους (Krasaekoort et al, 2003?. Chandramouli et al., 2004). Αλλά έχει μειονεκτήματα που αφορούν την κλιμάκωση της διεργασίας που είναι πολύ δύσκολη. Επιπλέον, τα μικροσωματίδια που λαμβάνονται είναι πολύ πορώδες το και αποτελεί μειονέκτημα στο να προστατεύουν τα κύτταρα από το περιβάλλον τους (Gouin, 2004). Τα ελαττώματα μπορούν να αντισταθμιστούν με ανάμιξη των αλγινικών αλάτων με άλλες πολυμερείς ενώσεις, ή επικάλυψη των καψουλών με μια άλλη ένωση ή εφαρμόζοντας δομική τροποποίηση του αλγινικού άλατος με τη χρήση διαφόρων προσθέτων (Krasaekoort et al., 2003).

Η δυνατότητα επιβίωσης των μικρο-ενθυλακωμένων *Bifidobacterium longum* BB-46 με τη χρήση αλγινικού ως υλικό επικάλυψης ήταν καλύτερη από το ελεύθερο κύτταρο κατά την αποθήκευση υπό ψύξη σε γάλα με 2% λιπαρά (Hansen et al., 2002).

### 3.5.2 Ενθυλάκωση προβιοτικών με τη χρήση κόμμι τζελάν και κόμμι ξανθάνης

Το Κόμμι τζελάν είναι ένας μικροβιακός πολυσακχαρίτης που προέρχεται από *Pseudomonas elodea* το οποίο αποτελείται από μία επαναλαμβανόμενη μονάδα που αποτελείται από τέσσερα μονομερή τα οποία είναι γλυκόζη, γλυκουρονικό οξύ, γλυκόζη και ραμνόζη (Chen και Chen, 2007). Είναι πιθανό να προκαλέσει μία θερμο-αναστρέψιμη ζελατινοποίηση κατά την ψύξη διαλύματος γελλάνης και η θερμοκρασία ζελατινοποίησης θα εξαρτάται από τη συγκέντρωση του πολυμερούς, την ιοντική ισχύ και το είδος των αντίθετων ιόντων παρουσιάζει στο μέσο.

Η Ξανθάνη είναι ένας μικροβιακός πολυσακχαρίτης που προέρχεται από *Xanthomonas campestris* που συγκροτείται από μία επαναλαμβανόμενη μονάδα πεντασακχαρίτη που σχηματίζεται από δύο μονάδες γλυκόζης, δύο μονάδες μαννόζης και μία μονάδα γλυκουρονικού οξέως. Αυτό το πολυμερές είναι διαλυτό σε κρύο νερό και ενυδατώνεται ταχέως. Αν και το κόμμι γελλάνης μπορεί να παράγει τη σφαιρική δομή πηκτώματος για μικροενθυλάκωση, ένα μειονέκτημα είναι ότι δεν χρησιμοποιείται με αυτόν τον τρόπο για το σκοπό αυτό, διότι απαιτούνται υψηλές θερμοκρασίες ζελατινοποίησης (80-90 ° C για περίπου 1 ώρα), η οποία οδηγεί σε θερμικό τραυματισμό τα προβιοτικά κύτταρα (Sun and Griffiths, 2000).

Ένα μίγμα ξανθάνης- κόμμι τζελάνης έχει χρησιμοποιηθεί για την ενθυλάκωση προβιοτικών κυττάρων (Sultana *et al.*, 2000; Sun and Griffiths, 2000), και σε αντίθεση με το αλγινικό, το μίγμα παρουσιάζει υψηλή αντοχή σε όξινες συνθήκες.

### 3.5.3 Ενθυλάκωση προβιοτικών με τη χρήση χιτοζάνης

Η χιτοζάνη είναι ένας γραμμικός πολυσακχαρίτης ο οποίος αποτελείται από μονάδες γλυκοζαμίνης η οποία μπορεί να πολυμεριστεί με τη βοήθεια ενός σχηματισμού σταυροδεσμών παρουσία ανιόντων και πολυανιόντων. Είναι δυνατόν να απομονωθεί από μαλακά όστρακα κοχύλια, επιδερμίδες εντόμων και μεμβράνες μυκήτων. Επειδή μπορεί να έχει αρνητικές επιπτώσεις στη βιωσιμότητα των βακτηρίων, καθώς και ότι η χιτοζάνη έχει μια πολύ καλή ικανότητα σχηματισμού φιλμ, χρησιμοποιείται περισσότερο ως εξωτερικό κέλυφος σε κάψουλες που κατασκευάζονται με ανιονικά πολυμερή, όπως αλγινικό άλας. Το συστατικό αυτό δεν έχει καλή αποδοτικότητα για την αύξηση της κυτταρικής βιωσιμότητας με ενθυλάκωση και κατά προτίμηση χρησιμοποιεί ως

επικάλυψη, αλλά όχι ως μια κάψουλα (Mortazavian et al., 2008). Προκειμένου να επιτευχθεί επαρκής σταθερότητα, σφαιρίδια γέλης χιτοζάνης και μικροσφαιρίδια μπορεί να είναι ιονικά εγκάρσια-συνδεδεμένο με τα πολυφωσφορικά (Anal and Stevens, 2005) και αλγινικό νάτριο (Anal et al., 2003). Οι Lee et al., (2004), κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η μικροενθυλάκωση LAB με αλγινικό και επικάλυψη χιτοζάνης προσφέρει ένα αποτελεσματικό μέσο για την παροχή βιώσιμων βακτηριακών κυττάρων στο παχύ έντερο, εξασφαλίζοντας την επιβίωσή τους κατά τη διάρκεια αποθήκευσης σε ψύξη. Ο εγκλεισμός των προβιοτικών βακτηρίων με αλγινικό και επικάλυψη χιτοζάνης παρέχει προστασία σε προσομοιωμένες συνθήκες του γαστρεντερικού σωλήνα και ως εκ τούτου, είναι ένας καλός τρόπος χορήγησης των βιώσιμων βακτηριακών κυττάρων στο παχύ έντερο (Chávarri et al., 2010).

#### **3.5.4 Ενθυλάκωση προβιοτικών με τη χρήση Κ Καραγενάνης**

Η Καραγενάνη είναι ένας φυσικός πολυσακχαρίτης που εξάγεται από τα θαλάσσια μακροφύκη και χρησιμοποιείται συνήθως ως πρόσθετο τροφίμων. Η κ-Καραγενάνη είναι ένα φυσικό πολυμερές που περιέχει θειικής ομάδας πολυσακχαρίδια. Αυτό το πολυμερές χρησιμοποιείται ευρέως ως πυκνωτικό, παράγοντας πηκτωματοποίησης, ενισχυτής υφής ή σταθεροποιητής σε τρόφιμα, φαρμακευτικά και καλλυντικά σκευάσματα. Η πηκτωματοποίηση της κ-carrageenan εξαρτάται γενικά από μια αλλαγή στη θερμοκρασία. Η τεχνολογία που χρησιμοποιεί την ενωποίηση απαιτεί μια θερμοκρασία που κυμαίνεται μεταξύ 40 και 50°C κατά την οποία προστίθενται τα κύτταρα στο πολυμερές διάλυμα. Με ψύξη του μίγματος σε θερμοκρασία δωματίου η πραγματοποιείται πηκτωματοποίηση και μετά τα μικροσωματίδια σταθεροποιούνται με προσθήκη ιόντων καλίου (Krasaekoort et al., 2003). Ο εγκλεισμός των προβιοτικών κυττάρων σε κ-carrageenan σφαιρίδια διατηρεί τα βακτήρια σε ένα βιώσιμο περιβάλλον, αλλά τα παραγόμενα τζελ είναι εύθραυστα και δεν είναι σε θέση να αντέχουν σε πιέσεις (Chen και Chen, 2007). Τα κ-carrageenan σφαιρίδια για την ενθυλάκωση προβιοτικών μπορούν να παραχθούν χρησιμοποιώντας εξώθηση, καθώς και τεχνικές γαλακτωματοποίησης.

### 3.5.5 Ενθυλάκωση προβιοτικών με τη χρήση ζελατίνης

Η ζελατίνη είναι ένα ετερογενές μίγμα που αποτελείται από ένα ή περισσότερα ελικοπεπτίδια κόμμι πρωτεΐνης, οποία δημιουργεί μια θερμοαναστρέψιμη γέλη και χρησιμοποιήθηκε για την ενθυλάκωση προβιοτικών, μόνη της ή σε συνδυασμό με άλλες ενώσεις. Προσφέρει εξαιρετικές δυνατότητες για συνεργασία με ανιονικά πολυσακχαρίδια όπως Η κόμμι γελλάνης, λόγω του αμφοτερικού της χαρακτήρα. Το υλικό αυτό είναι χρήσιμο για τη λήψη σφαιριδίων που χρησιμοποιούν τεχνολογίες εξώθησης ή μορφή w / o γαλάκτωμα με ψύξη, αλλά για τη σταθεροποίηση της γέλης τα σφαιρίδια μπορεί να χρειαστεί να διασυνδεθούν χρησιμοποιώντας γλουταραλδεύδη ή άλατα χρωμίου. Αυτά τα υδροκολλοειδή αναμειγνύονται σε pH μεγαλύτερο του 6, επειδή και τα δύο φέρουν καθαρά αρνητικά φορτία και απωθούνται. Ωστόσο, το καθαρό φορτίο ζελατίνης γίνεται θετική όταν το pH ρυθμίζεται κάτω από το ισοηλεκτρικό σημείο και αυτό προκαλεί το σχηματισμό μίας ισχυρής αλληλεπίδρασης με την αρνητικά φορτισμένη κόμμι τζελάνης (Krasaekoort *et al.*, 2003; Anal and Singh, 2007).

### 3.5.6. Ενθυλάκωση προβιοτικών με τη χρήση αμύλου

Το άμυλο είναι ένας πολυσακχαρίτης ο οποίος αποτελείται από μονάδες α-D-γλυκόζη που συνδέονται με γλυκοσιδικούς δεσμούς, που παράγεται από όλα τα πράσινα φυτά. Ανθεκτικό άμυλο είναι το άμυλο το οποίο δεν έχει υποστεί πέψη από τα παγκρεατικά ένζυμα (αμυλάσες) στο λεπτό έντερο. Το ανθεκτικό άμυλο μπορεί να φτάσει στο παχύ έντερο όπου θα υποστεί ζύμωση (Sajilata *et al.*, 2006; Anal and Singh, 2007). Αυτή η ιδιαιτερότητα προσφέρει καλή εντερική παράδοση που είναι η καλύτερη απελευθέρωση των βακτηριακών κυττάρων στο παχύ έντερο. Με αυτή την προβιοτική λειτουργικότητα, το ανθεκτικό άμυλο μπορεί να χρησιμοποιηθεί από τα προβιοτικά βακτήρια στο παχύ έντερο (Mortazavian *et al.*, 2008). Τέλος, το ανθεκτικό άμυλο αποτελεί την ιδανική επιφάνεια για την προσκόλληση των προβιοτικών κυττάρων στους κόκκους αμύλου (Anal and Singh, 2007) και αυτό μπορεί να ενισχύσει την απελευθέρωση των προβιοτικών σε μια βιώσιμη και μεταβολικά ενεργή κατάσταση στο έντερο (Crittenden *et al.*, 2001). Το ανθεκτικό άμυλο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να εξασφαλιστεί η βιωσιμότητα των προβιοτικών πληθυσμών από τα τρόφιμα στο παχύ έντερο. Η ενσωμάτωση του αμύλου αραβοσίτου βελτίωσε την ενθυλάκωση των βιώσιμων



βακτηρίων σε σύγκριση με τα βακτήρια που είχαν ενθυλακωθεί χωρίς άμυλο (Sultana *et al.*, 2000; Iyer and Kailasapathy, 2005).

### **3.5.7. Ενθυλάκωση των προβιοτικών με τη χρήση οξικής φθαλικής κυτταρίνης**

Η οξική φθαλική κυτταρίνη χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της απελευθέρωσης του φαρμάκου στο έντερο λόγω της φυσικής του ιδιότητας και να είναι αδρανές (Mortazavian *et al.*, 2008). Το πλεονέκτημα αυτού του συστατικού είναι το ότι δεν είναι διαλυτό σε όξινο pH (λιγότερο από 5), αλλά είναι διαλυτό σε pH μεγαλύτερο από 6 λόγω των ιονιζόμενων ομάδων φθαλικού στο μόριο του. Η ενθυλάκωση των προβιοτικών βακτηρίων χρησιμοποιώντας φθαλική οξική κυτταρίνη προσφέρει καλή προστασία για μικροοργανισμούς σε προσομοιωμένες συνθήκες γαστρικού περιβάλλοντος (Favaro-Trindade and Grosso, 2002).

### **3.5.8. Ενθυλάκωση προβιοτικών με τη χρήση πρωτεϊνών γάλακτος**

Μεταξύ άλλων, οι πρωτεΐνες γάλακτος είναι πολύ ενδιαφέρουσες ως ένα υλικό ενθυλάκωσης λόγω των φυσικοχημικών ιδιοτήτων τους. Ακριβώς όπως η ζελατίνη, πρωτεΐνες γάλακτος είναι σε θέση να σχηματίσουν πηκτώματα σε κατάλληλες συνθήκες. Οι πρωτεΐνες του γάλακτος είναι φυσικοί μεταφορείς για τα προβιοτικά κύτταρα και λόγω των διαρθρωτικών και φυσικοχημικών ιδιοτήτων τους, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ένα σύστημα μεταφοράς (Livney, 2010). Για παράδειγμα, οι πρωτεΐνες έχουν εξαιρετικές ιδιότητες ζελατινοποίησης και αυτή η ιδιαιτερότητα έχει αξιοποιηθεί πρόσφατα από του Heidebach *et al.*, (2009) για να ενθυλακώσει τα προβιοτικά κύτταρα. Τα αποτελέσματα αυτών των μελετών είναι πολλά υποσχόμενα και η χρήση πρωτεϊνών γάλακτος είναι ένας ενδιαφέρων τρόπος λόγω των βιοσυμβατότητά τους (Livney, 2010).

### **3.5.9. Ενθυλάκωση των προβιοτικών Μαζί Με πρεβιοτικά**

Τα προβιοτικά κύτταρα μπορούν να ενθυλακώνονται με πρεβιοτικά συστατικά (π.χ. ανθεκτικό άμυλο) ή κρουπροστατευτικά (π.χ. γλυκερίνη) για τη βελτίωση της

βιωσιμότητας τους (Sultana et al., 2000). Έχει αποδειχθεί ότι αυτή η τεχνική βελτιώνει την επιβίωση των προβιοτικών στο προϊόν, αλλά όχι σε προσομοιωμένες γαστρεντερικές συνθήκες (Sultana et al., 2000). Η συν-ενθυλάκωση είναι ένας άλλος τρόπος για να ενισχυθεί η βιωσιμότητα των προβιοτικών (Godward and Kailasapathy, 2003). Η ενθυλάκωση με αλγινικό μαζί με πρεβιοτικά είναι γνωστή ως συν-ενθυλάκωση. Ενσωματώνοντας πρεβιοτικά και αλγινικό ασβέστιο ως υλικά επικάλυψης μπορεί να προστατευτούν καλύτερα τα προβιοτικά σε συστήματα τροφίμων και της γαστρεντερικής οδού λόγω της συνένωσης (Chen et al., 2005). Οι Chen et al., (2005) παρατήρησαν ότι 1% αλγινικό νάτριο όταν αναμιγνύεται με 1% πεπτιδίου και 3% FOS ως υλικό επικάλυψης δίνει την υψηλότερη καταμέτρηση προβιοτικών που έχουν επιβιώσει. Η συν-ενθυλάκωση των διαφορετικών προβιοτικών βακτηρίων με άμυλο Hi-maize (πρεβιοτικό) και η περαιτέρω επικάλυψη με χιτοζάνη ενίσχυσε σημαντικά την επιβίωση των ενθυλακωμένων προβιοτικών βακτηρίων (Iyer και Kailasapathy, 2005).

### **3.6. Μέθοδοι για τον έλεγχο της απελευθέρωσης των ενθυλακωμένων συστατικών**

Τα ενθυλακωμένα προβιοτικά πρέπει να απελευθερωθούν από τα προϊόντα διατροφής κατά τον επιθυμητό χρόνο και τόπο. Η κατανόηση της χημικής σύστασης του υλικού επικάλυψης επιτρέπει τον έλεγχο της απελευθέρωσης σε ένα συγκεκριμένο pH, θερμοκρασία και / ή συγκέντρωσης άλατος. Η απελευθέρωση των μικροκαψουλών πρέπει να πραγματοποιηθεί μετά τη διέλευση απ' τον γαστρεντερικό σωλήνα, απελευθερώνοντας βιώσιμα και μεταβολικώς ενεργά βακτήρια (Picot and Lacroix, 2004). Αδιάλυτα στο νερό μικροσωματίδια μπορεί να αυξήσουν την ανοχή τους σε υψηλά όξινο περιβάλλον ευνοώντας την απελευθέρωση των προβιοτικών καλλιεργειών στο γαστρεντερικό σωλήνα (Ding and Shah, 2007). Η θερμική, φυσική και η μέθοδος διάλυσης είναι οι πιο κοινοί μηχανισμοί.

Στο μηχανισμό θερμική απελευθέρωση, το προστατευτικό υλικού εγκλεισμού τήκεται σε κάποια ορισμένη θερμοκρασία συνήθως απελευθερώνοντας το συστατικό κατά τη διάρκεια του μαγειρέματος. Μεταβάλλοντας το είδος του υλικού επικάλυψης και το πάχος του, είναι δυνατόν να εξασφαλιστεί η απελευθέρωση του συστατικού μέσα σε

λίγους βαθμούς πάνω από τη θερμοκρασία του στόχου. Η φυσική απελευθέρωση πραγματοποιείται με τη φυσική διάσπαση των μικροδουλειών. Αυτός ο μηχανισμός είναι σχεδιασμένος για συστατικά που θα πρέπει να απελευθερώνονται κατά τη μάσηση. Παράγοντες που πρέπει να εξεταστούν είναι το μέγεθος της κάψουλας, η αντοχή και η ευελιξία της επικάλυψης. Στην μέθοδο διάλυσης, η πλειοψηφία των προϊόντων διατροφής περιέχουν τουλάχιστον μία μικρή ποσότητα νερού, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να εξασφαλίσει την απελευθέρωση του συστατικού που είναι παγιδευμένο σε μια υδατοδιαλυτή μεμβράνη επικάλυψης (Lakkis, 2007).

### **3.7. Μελέτες αποτελεσμάτων των ενθυλακωμένων βακτηρίων σε ορισμένες παθολογικές καταστάσεις**

Όπως έχουμε αναφέρει και παραπάνω, τα προβιοτικά μπορούν να έχουν ευεργετική επίδραση σε ορισμένες παθολογικές καταστάσεις. Ωστόσο, για να έχουμε αυτά τα ευεργετικά αποτελέσματα, θα πρέπει να φτάσουν στο έντερο σε επαρκείς ποσότητες. Εξαιτίας των ιδιαίτερων συνθηκών που επικρατούν στην γαστρεντερική οδό, η χρήση ενθυλακωμένων προβιοτικών θα μπορούσε να είναι μια ενδιαφέρουσα επιλογή. Ωστόσο, μόνο μερικές in vivo μελέτες έχουν διεξαχθεί για να δοκιμαστεί η ευεργετική επίδραση των ενθυλακωμένων σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις.

Από την άποψη αυτή, τα προβιοτικά έχουν χρησιμοποιηθεί για τη ρύθμιση της συγκέντρωσης της γλυκόζης. Αυτοί οι μικροοργανισμοί είναι γνωστό ότι έχουν επιπτώσεις στην υγεία καθώς μειώνουν τα επίπεδα της χοληστερόλης (Bhatia, Rana, Sharma, Singla & Randhawa, 2012) και επιδρούν στην ανοσορρύθμιση (Kumar, Arora & Bhatia, 2011). Στην πραγματικότητα, υπάρχει μια άμεση συσχέτιση μεταξύ του διαβήτη και την ανοσορρύθμιση. Το αποτέλεσμα που προκύπτει από τις μελέτες των Bhatia, Sharma, Sood και Singla, (2013) χρησιμοποιώντας ενθυλακωμένα *Lactobacillus* (*Lactobacillus* (LB10), τα οποία απομονώθηκαν από υγιές βουβαλίσσιου γάλα και κοινά προβιοτικά από LeeBiotic Capsule (LCap) έδειξαν ότι τα ενθυλακωμένα προβιοτικά έχουν καλύτερη αποτελεσματικότητα ως αντιδιαβητικοί παράγοντες από ίδια τα προβιοτικά σε μη ενθυλακωμένη μορφή.

Ένα άλλο στοιχείο που μπορεί να είναι υπεύθυνο για τα οφέλη των προβιοτικών στην υγεία, είναι η επαγωγή της μετατροπής του λινελαϊκού οξέος (LA) προς συζευγμένο

λινελαϊκό οξύ (CLA). Αυτό το λιπαρό οξύ έχει αποδειχθεί ότι έχει αντιχοληστεριναιμική δράση (Schlegel, Ringseis, Windisch, Schwarz & Eder, 2012). Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τις έρευνες των Bhatia, Rana, Sharma, Singla και Randhawa (2012), δείχνουν ότι ενθυλακωμένα και μη ενθυλακωμένα *Lactobacillus* ( που απομονώθηκαν από υγιές γάλα βουβάλου), όπως και το φάρμακο (Atorvastatin) μείωσαν το επίπεδο της χοληστερόλης. Μικροσωματίδια δημιουργήθηκαν χρησιμοποιώντας τη διαδικασία εξώθησης. Το ποσοστό της μείωσης του επιπέδου της χοληστερόλης στα ενθυλακωμένα και μη ενθυλακωμένα βακτηρίδια ήταν σχεδόν παράλληλο με το αποτέλεσμα που λαμβάνεται από ποντικούς που έλαβαν φαρμακευτική αγωγή. Η μελέτη έδειξε επίσης ότι η επίδραση των προβιοτικών είναι ανεξάρτητη από την ενθυλάκωση. Σύμφωνα με τους συγγραφείς, αυτό το αποτέλεσμα προέκυψε επειδή τα ενθυλακωμένα βακτήρια θα χρειαζόταν μεγαλύτερο χρονικό διάστημα για να ασκήσουν την επίδραση τους, δεδομένου ότι απελευθερώνονται πιο αργά αλλά διατηρούνται σε καλύτερη κατάσταση από τα μη ενθυλακωμένα βακτήρια.

Περαιτέρω, είναι γνωστό ότι το μικροπεριβάλλον του καρκινικού όγκου παρέχει ένα ιδανικό περιβάλλον για την ανάπτυξη προαιρετικών και αυστηρώς αναερόβια βακτήρια (Cheng, et al., 2008). Έχει δειχθεί ότι ορισμένα είδη, συμπεριλαμβανομένων των *Lactobacillus* και *Clostridium* μπορούν να αποικίζουν σε τέτοιο περιβάλλον που οδηγεί σε υποχώρηση της ανάπτυξης του όγκου (Cheng, et al., 2008; Matsuzaki, 1998; Tuo, et al., 2010; Zabala, et al., 2001; Kim, Oh, Yun, Oh & Kim, 2010). Αυτές οι παρατηρήσεις έχουν οδηγήσει στην έννοια της βακτηριολυτικής θεραπείας όπου ζωντανοί μικροοργανισμοί θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για να αποικίζουν στον όγκο και ασκούν ογκολυτική τους επίδραση. Ωστόσο, αυτές οι "αποικοδομητικές" ιδιότητες μερικών βακτηρίων θα μπορούσαν επίσης να είναι επιβλαβής για τα κύτταρα εκτός της περιοχής του όγκου. Για το λόγο αυτό, θα ήταν ωφέλιμο να διερευνηθεί ένα σχετικώς μη παθογόνο στέλεχος και να παράσχετε κάποια μορφή περιορισμού συγκεκριμένο χώρο με τη χρήση ένεσης ώστε να ελαχιστοποιήσει τη διασπορά του μικροοργανισμού σε όλο τον ξενιστή. Εξετάζοντας τη δυνατότητα μιας τέτοιας προσέγγισης, οι Dwivedi, Nomikou, Nigam, and McHale, (2012), παρασκεύασαν σκευάσματα μικροενθυλάκωσης του *Lactobacillus casei* NCDO 161 με την εξώθηση ζελατίνης. Απέδειξαν ότι αυτά τα σκευάσματα ήταν τοξικά για τα κύτταρα του όγκου *in vitro*. Οι συγγραφείς ερεύνησαν επίσης τις επιπτώσεις των μικροενθυλακωμένων σκευάσματα για την ανάπτυξη όγκου *in vivo* μετά από άμεση ενδοκαρκινική ένεση. Η μελέτη έδειξε σημαντική αναστολή της

ανάπτυξης του όγκου και εισηγήθηκε την πιθανή θεραπευτική ωφέλεια αυτής της προσέγγισης για τη θεραπεία των όγκων.

Επιπλέον, οι Ruan et al., (2007) δημιούργησαν μικροσωματίδια ζελατίνης με σκοπό να δοκιμαστούν σε συνθήκες αιμορραγικού σοκ, χρησιμοποιώντας *B. longum*, *B. bifidum*, και *B. adolescentis*. Οι συγγραφείς απέδειξαν ότι αρουραίος σε συνθήκες πειράματος με ενθυλακωμένα και μη ενθυλακωμένα μπιφιδοβακτήρια, παρουσίασε μείωση του συνολικού αριθμού αερόβιων μικροβίων στο τυφλό έντερο, αύξηση των συνολικών αερόβιων μικροβίων σε επίπεδα βακτηρίων μετατόπιση της ενδοτοξίνης στο πλάσμα, και στο ποσοστό βλάβη των λαχνών του ειλεού σε σύγκριση με τους αρουραίους που έλαβαν θεραπεία με αλατούχο φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα. Ενθυλακωμένα μπιφιλοβακτηρίδια προκάλεσαν μεγαλύτερη μείωση σε σύγκριση με τα άθικτα Μπιφιλοβακτηρίδια σε αυτό το μοντέλο, με εξαίρεση μια παρόμοια επίδραση σε πιθανή βλάβη στις λάχνες του ειλεού. Επιπλέον, η συχνότητα εμφάνισης της βακτηριακής μετατόπισης μειώθηκε κατά το αιμορραγικό σοκ των εξεταζόμενων αρουραίων με Μπιφιλοβακτηρίδια. Ωστόσο, το μέγεθος των συνολικών αναερόβιων οργανισμών και Μπιφιλοβακτηριδίων ήταν παρόμοιο μεταξύ αρουραίων στη διάρκεια του αιμορραγικό σοκ που έλαβαν τις διαφορετικά συμπληρώματα.

---

# **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4**

# **ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ**

---

#### **4.1. Συμπεράσματα και μελλοντικές κατευθύνσεις**

Εξελιγμένα υλικά επικάλυψης και τεχνολογίες έχουν αναπτυχθεί και μια εξαιρετικά μεγάλη ποικιλία λειτουργιών μπορεί πλέον να επιτευχθεί μέσω της μικροενθυλάκωσης. Οποιοσδήποτε τύπος ενεργοποίησης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να παρακινήσει την απελευθέρωση των ενθυλακωμένων συστατικών, όπως αλλαγές του pH, η μηχανική καταπόνηση, η θερμοκρασία, η ενζυματική δραστηριότητα, ο χρόνος, η οσμωτική δύναμη, κλπ. Ενθυλακωμένα προβιοτικά βακτήρια μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε πολλά ζυμωμένα γαλακτοκομικά προϊόντα, όπως γιαούρτι, τυρί, και κατεψυγμένα γαλακτοκομικά επιδόρπια. Σε ενθυλακωμένη μορφή, τα προβιοτικά προστατεύονται από βακτηριοφάγα και σκληρά περιβάλλοντα, όπως η κατάψυξη και το γαστρικό υγρό. Έτσι, η ενθυλάκωση διευκολύνει την παρασκευή ζυμωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων στα οποία τα βακτήρια έχουν σταθερά χαρακτηριστικά και μεγαλύτερη σταθερότητα κατά την αποθήκευση και την υψηλότερη παραγωγικότητα από μη ενθυλακωμένα βακτήρια. Με τα ενθυλακωμένα προϊόντα, ο χρόνος παραμονής, η οξύτητα και ο συνεχής εμβολιασμός του γάλακτος με μία σταθερή αναλογία βακίλων / κόκκων μπορούν να επιτευχθούν σε ένα επιθυμητό pH.

Η χρήση των προβιοτικών μικροενθυλακωμένων για εφαρμογές ελεγχόμενης αποδέσμευσης είναι μια πολλά υποσχόμενη εναλλακτική λύση για την επίλυση των σοβαρών προβλημάτων των οργανισμών αυτών που αντιμετωπίζουν οι βιομηχανίες τροφίμων. Ακόμα κι έτσι, η πρόκληση είναι να επιλεγεί η κατάλληλη τεχνική μικροενθυλάκωσης και τα υλικά εγκλεισμού. Μέχρι σήμερα, η έρευνα για την ενθυλάκωση των προβιοτικών έχει επικεντρωθεί κυρίως στη διατήρηση της βιωσιμότητας των προβιοτικών βακτηριακών κυττάρων σε χαμηλό pH και υψηλές συγκεντρώσεις χολικών.

Μια σημαντική πρόκληση για την κυτταρική ενθυλάκωση είναι το μεγάλο μέγεθος των μικροβιακών κυττάρων (τυπικά  $1\text{e}4\text{ nm}$ ) ή σωματίδια λυοφιλιωμένη καλλιέργειας (άνω των  $100\text{ nm}$ ). Αυτό το χαρακτηριστικό όριο των κυττάρων για μικρές κάψουλες ή, όταν παράγονται κάψουλες μεγάλου μεγέθους, μπορεί να επηρεάσει αρνητικά την υφή και τις αισθητικές ιδιότητες των τροφίμων στα οποία προστίθενται. Σε όλες σχεδόν τις

περιπτώσεις, η παγίδευση γέλης χρησιμοποιώντας φυσικά βιοπολυμερή, όπως αλγινικό ασβέστιο, καραγενάνη, κόμμι γελλάνης, και χιτοζάνη προτιμούνται από τους ερευνητές. Ωστόσο, αν και πολλά υποσχόμενες σε εργαστηριακή κλίμακα, οι αναπτυγμένες τεχνολογίες για την παραγωγή σφαιριδίων γέλης εξακολουθούν να έχουν σοβαρές δυσκολίες για μεγάλης κλίμακας παραγωγή τροφίμων υψηλής ποιότητας με την προσθήκη μικροενθλακωμένων μικροοργανισμών.

Μια άλλη σημαντική πρόκληση είναι να βελτιωθεί η βιωσιμότητα των προβιοτικών κατά τη διάρκεια των διαδικασιών παραγωγής, ιδιαίτερα κατά τη θερμική επεξεργασία. Κατά συνέπεια, φαίνεται να μην υπάρχει καμία εμπορική παραγωγή προβιοτικών προϊόντων διαθέσιμη, η οποία να είναι σταθερή σε υψηλές θερμοκρασίες. Έχοντας υπόψη τη σημασία της παραγωγής θερμοηλεκτρικών προβιοτικών μικροοργανισμών, καθώς και τα συμφέροντα των εταιριών τροφίμων και φαρμάκων, απαιτούνται νέες προσεγγίσεις στις περαιτέρω έρευνες. Υπάρχουν τουλάχιστον δύο επιλογές: 1) την ανακάλυψη νέων στελεχών προβιοτικών βακτηρίων που να είναι εκ φύσεως σταθερά στη θέρμανση ή που έχουν τροποποιηθεί γενετικά και 2) την ανάπτυξη ενός συστήματος ενθυλάκωση που να δρα αποτελεσματικά σαν ένα " μονωτικό υλικό ".

Μια άλλη πρόκληση θα είναι ο προσδιορισμός των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών των υλικών ενθυλάκωσης να προβλέψει τους μηχανισμούς διάσπασης ή διάλυσης υπό μεταβαλλόμενες συνθήκες pH και αλατότητας και τις αλληλεπιδράσεις τους με προβιοτικά κύτταρα ή άλλα συστατικά που υπάρχουν στον πεπτικό σωλήνα. Η μικροενθυλάκωση τότε θα είναι σημαντική στην παροχή βιώσιμων στελεχών προβιοτικών για τους καταναλωτές στο εγγύς μέλλον



---

# **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

---

Agerholm - Larsen, L., Raben, A., Haulrik, N., Hansen, A.S., Manders, M., Astrup, A. (2000), *Effect of 8 week intake of probiotic milk products on risk factors for cardiovascular diseases*. Eur. J. Clin. Nutr. 54: 288–297.

Anal A.K and Singh H (2007). Recent advances in microen-capsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science and Technology* 18 240-251

Asahara T .Nomoto K, (2001), ‘*Increased resistance omice to Salmonella enterica serovar Typhiurium infection by synbiotic administration of bifidobacteria and transgalactosylated oligosaccharides*’.J.Appl.Microb. 91:985-996

Augustin, M.A. & Sanguansri, L. (2008). Encapsulation of Bioactives. *Food Materials Science*, J. Aguilera and P. Lillford, Springer New York: 577-601.

Barbosa-Cánovas, G.V., et al. (2005). *Food Engineering*.

Baranauskiene, R., Bylaite, E., Ukauskaite, J., & Venskutonis, R., (2007). *Flavor retention of peppermint (Mentha piperita L.) essential oil spray-dried in modified starches during encapsulation and storage*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55, 3027-3036.

Barroso, A.M.K., Pierucci, A.P.T.R., Freitas, S.P., Torres,A.G., & da Rocha-Leao, M.H.M. (2013). *Oxidative stability and sensory evaluation of microencapsulated flaxseed oil*. Journal of Microencapsulation, 31(2): 193-201.

Bertolini, A. C., Siani, A. C., & Grosso, C. R. F., (2001). *Stability of monoterpenes encapsulated in gum arabic by spray-drying*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49,780-785.

Bezkorovainy, A., ( 2001), Probiotics: determinants of survival and growth in the gut, *Am. J. Clin. Nutr.* 73 :399S–405S.

- Bhosale, R., Singhal, R. (2006). *Process optimization for the synthesis of octenyl succinyl derivative of waxy corn and amaranth starches*. Carbohydrate polymers, 66(4): 521-527.
- Bhatia, A., Sharma, A., Sood, A., & Singla, R. ,(2013). *Hypoglycemic effect of Encapsulated CLA producing probiotic isolate: An in vivo study*. Journal of Microbiology and Biotechnology Research, 3:157-161.
- Borgogna M, Bellich B, Zorzin L, Lapasin R and Cesàro A ( 2010), *Food microencapsulation of bioactive compounds: rheological and thermal characterisation of non-conventional gelling system*. Food Chemistry 122(2) 416-423.
- Borrmann, D., Pierucci, A.P.T.R., Leite, S., & Leaa, M.H. (2013). *Microencapsulation of passion fruit (Passiflora) juice with n-octenylsuccinate-derivatised starch using spray-drying*. Food and Bioproducts Processing, 91(1): 23-27
- Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M., & Scher, J. (2011). *Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications*. Journal of Food Engineering, 104, 467–483
- Ceconi, C., Boraso, A., Cargoni, A., & Ferrari, R. (2003). *Oxidative stress in cardiovascular disease: myth or fact?* Archives of Biochemistry and Biophysics, 420(2): 217-221.
- Chandan, R.C., Argyle, P.J., and Mathison, G.E. (1982). *Action of Lactobacillus bulgaricus proteinase preparations on milk proteins*, J. Dairy Sci., 65, 1408–1413,
- Champagne, C.P., Gardner, N.J., & Roy, D. (2005). *Challenges in the addition of probiotic cultures to foods*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 45, 61–84
- Chassard C., Grattepanche F., Lacroix C. (2011), *Chapter 4 Probiotics and Health Claims: Challenges for Tailoring their Efficacy*. In: Kneifel W, Salminen S (Eds) Probio
- Chen, M.J., Chen, K.N. (2007) *Applications of probiotic encapsulation in dairy products*. In: Lakkis, Jamileh M. (Ed.), Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems. Wiley-Blackwell, USA, 83–107.
- Cheng, C.M., Chuang, K.H., Hung, W.C., Shiea, J., Su, Y.C., Kao, C.H., Chen, B.M., Roffler, S., & Cheng, T.L. (2008). *Tumor-targeting prodrug-activation bacteria for cancer therapy*. Cancer Gene Therapy, 15, 393–401.

Chomakow, H., (1973). *The Dairy Industry in the People's Republic of Bulgaria*, booklet, Agric. Acad., Bulgaria,

Clas, S.D., Dlaton, C.R., Hancock, B.C. (1999). *Differential scanning calorimetry: Applications in drug development*. *Pharmaceutical Science & Technology Today*, 2: 311-320.

Corbo, M.R., Albenzio, M., De-Angelis, M., Sevi, A., and Gobbetti, M., (2001) *Microbiological and chemical properties of Canestro Pugliese hard cheese supplemented with bifidobacteria*, *J. Dairy Sci.*, 84, 551–561

Crittenden, R.G., & Playne, M.J. (1996). *Production, properties and applications of food - grade oligosaccharides*. *Trends in Food Science and Technology*, 7, 353 - 360.

De Vos, P., Faas, M.M., Spasojevic, M., & Sikkema, J. (2010). Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal*, 20(4): 292-302.

De Vrese, M., Stegelmann, A., Richter, B., Fenselau, S., Laue, C., and Schrezenmeir, J., (2001) *Probiotics: compensation for lactase insufficiency*, *Am. J. Clin. Nutr.*, 73, 421S–429S

Deeth, H.C. and Tamime, A.Y., (1981) Yogurt: nutritive and therapeutic aspects, *J. Food Prot.*, 44, 78–86

Dethlefsen, L., (2006). *Assembly of the human intestinal microbiota*. *Trends Ecol Evol*, , 21(9): p. 517- 23

Desai, K.G.H. & Jin Park H. (2005). Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients. *Drying Technology*, 23(7): 1361-1394.

Ding WK and Shah NP (2007). *Acid, bile and heat tolerance of free and microencapsulated probiotic bacteria*. *Journal of Food Science* 72 446-450.

Duncan, S.H., (2007), *Reduced dietary intake of carbohydrates by obese subjects results in decreased concentrations of butyrate and butyrate - producing bacteria in feces*. Appl Environ Microbiol 73 (4): p. 1073-8.

Edward R. Farnworth, Ph.D. (2003), *Handbook of Fermented Functional Foods*,

Eckburg, P.B., (, 2005), *Diversity of the human intestinal microbial flora*.

Science 308 (5728): p. 1635 – 8

Elmer, G.W., (2001), *Probiotics: “living drugs,”* Am. J. Health-Syst. Pharm., 58, 1101–1109,

El Zayatt, A.I. and Osman, M.M., (2001), *the use of probiotics in Tallaga cheese*, Egypt. J. Dairy Sci., 29, 99–106

Estevinho, B.N., Rocha, F., Santos, L., & Alves. A. (2013). *Microencapsulation with chitosan by spray drying for industry applications – A review*. Trends in Food Science & Technology, 31(2): 138-155.

Ezhilarasi, P. N., Karthik, P., & Anandharamakrishnan, C. (2013). *Nanoencapsulation Techniques for Food Bioactive Components: A Review*. Food and Bioprocess Technology, 6(3): 628-647.

Fang, Z. & Bhandari B. (2010). *Encapsulation of polyphenols – a review*. Trends in Food Science & Technology, 21(10): 510-523.

FAO/WHO (2006). *Probiotics in Food. Health and Nutritional Properties and Guidelines for Evaluation*, FAO Food and Nutrition Paper No. 85. World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome

Fernandes, R.V., Borges, S.V., & Botrel, D.A. (2014). *Gum arabic/starch/maltodextrin/inulin as wall materials on the microencapsulation of rosemary essential oil*. Carbohydrates Polymers, 101: 524-532.

Gbassi GK and Vandamme T (2012). Probiotic Encapsulation Technology: From Microencapsulation to Release into the Gut. *Pharmaceutics* 4 149-163.

Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., & Saurel, R. (2007). *Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview.* *Food Research International*, 40(9): 1107-1121.

Ghosh, S.K. (2006). *Functional Coatings and Microencapsulation: A General Perspective.* *Functional Coatings*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGa A: 1-28.

Gibbs, B. F., Kermasha, S., Alli, I., & Mulligan, N., 1999. Encapsulation in the food industry: A review. *International Journal of Food Science & Nutrition*, 50, 213-224.

Gibson GR, Beatty ER, Wang X, Cummings JH. 'Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin' *Gastroenterology*.1995; 108:975–82.

Giordano, F., Novak, C., & Moyano, J.R. (2001). Thermal analysis of cyclodextrins and their inclusion compounds. *Thermochimica Acta*, 380(2): 123-151.

Gibson, G.R. (1998). Dietary modulation of the human gut microflora using prebiotics. *British Journal of Nutrition*, 80, 209C212

Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., & Saurel, R. (2007). *Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview.* *Food Research International*, 40(9): 1107-1121.

Gildas K. Gbassi and Thierry Vandamme (2012), *Probiotic Encapsulation Technology: From Microencapsulation to Release into the Gut*, 155-157

Gilliland, S.E.,( 1991), *Properties of yogurt*, in *Therapeutic Properties of Fermented Milks*,Robinson, R.K., Ed., Elsevier Applied Science, London, p. 75.

Gmeiner M., Kneifel W., Kulbe K.D., 'Influence of the symbiotic mixture consisting of *Lactobacillus acidophilus* 74-2 and a fructooligosaccharide preparation on the microbial ecology sustained in a simulation of the human intestinal microbial ecosystem (SHIME reactor)'. *Appl. Microb. Biotechnol.* 2000, 53:219-223

Gobbetti, M., Corsetti, A., Smacchi, E., Zocchetti, Z., and de Angelis, M., Production of Crescenza cheese by incorporation of bifidobacteria, *J. Dairy Sci.*, 81, 37–47, 1998

Gomes A.M.P., Malcata F.X. (1999) *Bifidobacterium* spp and *Lactobacillus acidophilus*: biological and therapeutical relevant for use as probiotics. *Trends Food Sci Technol.*, 10: 139-157

Gotcheva, V., Hristozova, E., Hrostozova, T., Guo, M., Roshkova, Z., Angelov, A. (2002) Assessment of potential probiotic properties of lactic acid bacteria and yeast strains. *Food Biotechnol.*, 16: 211–225

Gouin, S. (2004). *Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends*. *Trends in Food Science & Technology*, 15(7–8): 330-347.

Grajek, W., Olejnik, A., & Sip, A. (2005). *Probiotics, prebiotics and antioxidants as functional foods*. *Acta Biochimica Polonica*, 52, 665C671.

Grittenden, R.G. (1999). *Prebiotics*, In: G. Tannock (Ed.), *Probiotics: a critical review* (pp. 231C238). Wymondham, UK: Horizon Scientific Press.

Gulewicz, P., Ciesioka, D., Frias, J., Vidal-Cervera, C., Frejnagel, S., Trojanowska, K., & Gulewicz, K. (2003). *Simple method of isolation and purification of galactosides from legumes*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3120C3123.

Hae-Soo Kwak (2014), *Nano-and Microencapsulation for foods*, 56

Heller, K.J., (2001), *Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms*, *Am. J. Clin. Nutr.* 73, 374S–379S

Hopkins, M.J., R. Sharp, and G.T. Macfarlane, ( 2001 ), *Age and disease related changes in intestinal bacterial populations assessed by cell culture, 16S rRNA abundance, and community cellular fatty acid profiles*. *Gut*, 48(2): p. 198 -205.

IDF, Cultured dairy products in human nutrition, *IDF Bull.*, No. 225, 1–32, 1991

Ilic, D.B. and Ashoor, S.H., (1998), *Stability of vitamins A and C in fortified yogurt*, *J. Dairy Sci.*, 71, 1492–1498

Imasse, K., Tanaka, A., Tokunaga, K., Sugano, H., Ishida, H., Takahashi, S. (2007) *Lactobacillus reuteri* tablets suppress *Helicobacter pylori* infection on a double-blind randomised placebo-controlled cross-over clinical study, *Kansenshogaku zasshi. J. Jpn. Assoc. Infect. Dis.*, 81: 387–393.

Jones, P. J., & Jew, S. (2007) *Functional food development: concept to reality*. *Trends in Food Science and Technology*, 18: 387-390.

Kailasapathy, K., & Chin, J. (2000) *Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium spp.* *Immunology and Cell Biology*, 78: 80-88.

Kajiwara, S., Gandhi, H., & Ustunol, Z. (2002). *Effect of honey on the growth of and acid production by human intestinal Bifidobacterium spp.: an in vitro comparison with commercial oligosaccharides and inulin*. *Journal of Food Protection*, 65, 214C218.

Kim, Y., Oh, S., Yun, H.S., Oh, S., & Kim, S.H. (2010). *Cell-bound exopolysaccharide from probiotic bacteria induces autophagic cell death of tumour cells*. *Letters in Applied Microbiology*, 51, 123–130.

Klaenhammer, T.R. (2001). *Probiotics and Prebiotics*. In: M.P. Doyle (Ed.), *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers* (pp. 87C95). Washington, DC, USA: ASM Press.



Konturek, P.C., T. Brzozowski, and S.J. Konturek, (2011). *Stress and the gut: pathophysiology, clinical consequences, diagnostic approach and treatment options*. J Physiol Pharmacol, 62 (6): p. 591 - 9.

Koroleva, N.S., Technology of kefir and kumys, *IDF Bull.*, No. 227, 96–100, 1988.

Krasaekoopt W, Bhandari B and Deeth H (2003). *Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt*. International Dairy Journal 13 3-13.

Krasaekoopt W, Lakkis JM (2007). *Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems*. Blackwell Publishing.

Kurmann, J. A., & Rasic, J.L. (1991). *Therapeutic properties of fermented milks*. London, UK: Elsevier Applied Science Publishers

Kumar R., Arora D., & Bhatia, A.(2011). *Therapeutic potential of bioconverted conjugated linoleic acid in drug induced immunosuppressed and infective organism induced plasmodium Berghei*. International Journal of Pharmaceutical Science, 3, 212-214

Ljungberg, B., ( 1990), *Influence of ciprofloxacin on the colonic microflora in young and elderly volunteers: no impact of the altered drug absorption*. Scand J Infect Dis, 22(2): p. 205 - 8.

Lyte, M., L. Vulchanova, and D.R. Brown, ( 2011), *Stress at the intestinal surface: catecholamines and mucosa -bacteria interactions*. Cell Tissue Res, 343 (1): p. 23 - 32.

Macedo, L.N., Luchese, R.H., Guerra, A.F., & Barbosa, C.G. (2008). *Efeito prebiotico do mel sobre o crescimento e viabilidade de Bifidobacterium spp. e Lactobacillus spp. em leite*. Ciencia e Tecnologia de Alimentos, 28, 935C942.

McDonough, F.E., Hitchins, A.D., and Wong, N.P., (1982 ). *Effect of yogurt and freeze-dried yogurt on growth stimulation rate*, J. Food Sci., 47, 1463–1465,

Madene, A., Jacquot, M., Scher, J., & Desobry, S., (2006). *Flavor encapsulation and controlled release –a review*. International Journal of Food Science and Technology, 41, 1–21.

Madureira, A. R., Pereira, C. I., Truszkowska, K., Gomes, A. M., Pintado, M. E., & Malcata, F. X. (2005) *Survival of probiotic bacteria in a whey cheese vector submitted to environmental conditions prevailing in the gastrointestinal tract*. International Dairy Journal, 15: 921-927

Madigan M.T., M.J.M., Parker J., (2007), *Βιολογία των μικροοργανισμών*. Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης

Mahalakshmi, R. and Murthy, V.V.P.S., ( 200), *Growth of Bifidobacterium bifidum in wheybased media*, J. Ind. Microbiol. Biotechnology. 25(4), 177–179

Mai, V., ( 2009 ), *Associations between dietary habits and body mass index with gut microbiota composition and fecal water genotoxicity: an observational study in African American and Caucasian American volunteers*. Nutr J, 8: p. 49

Manning, T.S., & Gibson, G.R. (2004). Prebiotics. *Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology*, 18, 287C298.

Marques, H.C., Hadgraft, J., & Kellaway, I. (1990). *Studies of cyclodextrin inclusion complexes. I. The salbutamol-cyclodextrin complex as studied by phase solubility and DSC*. International Journal of Pharmaceutics, 63: 259–266.

Martins I.M., Barreiro, M.F., Coelho, M., & Rodrigues, A.E. (2013). *Microencapsulation of essential oils with biodegradable polymeric carriers for cosmetic applications*. Chemical Engineering Journal, 245(0): 191-200.

Morelli, L., (2008), *Postnatal development of intestinal microflora as influenced by infant nutrition*. J Nutr, 138 (9): p. 1791S - 1795S.

Mortazavian, A.M., Sohrabvandi S. (2006) *Probiotics and food Probiotic products*. Eta Publication, Iran, (In Farsi).

Mortazavian, A., Razavi, S. H., Ehsani, M. R., & Sohrabvandi, S. (2007). Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. Iranian Journal of Biotechnology, 5, 1- 18.

Mura, P. (2014). *Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in aqueous solution: A review*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. (14): 113-117

Nedovic, V., Kalusevic, A., Manojlovic, V., Levic, S., & Bugarski, B. (2011). *An overview of encapsulation technologies for food applications*. Procedia Food Science, 1(0): 1806-1815.

Nesterenko, A., Alric, I., Silvestre, F., & Durrieu, V. (2013). *Vegetable proteins in microencapsulation: A review of recent interventions and their effectiveness*. Industrial Crops and Products, 42(0): 469-479.

Nomoto, K. (2005) *Review prevention of infections by probiotics*. J. Biosci. Bioeng., 100: 583–592.

Hawrelak, J.A. and S.P. Myers, (2004), *The causes of intestinal dysbiosis: a review*. Altern Med Rev, 9 (2): p. 180 – 97

Ouwehand A.C., Salminen S.J. (1998) *The health effects of cultured milk products with viable and non-viable bacteria*. Int Dairy J., 8: 749-758. *tics and Health Claims*, Wiley-Black

Ouwehand, A.C., Salminen, S., Isolauri, E. (2002) *Probiotics: an overview of beneficial effects*. Antonie Van Leeuwenhoek, 82: 279–289.

O'Toole PW, C.M., (2010), *Gut microbiota: Changes throughout the lifespan from infancy to elderly*. Elsevier Ltd, 20(4): p. 281–291.

O'Toole, P.W., (2012) *Changes in the intestinal micro biota from adulthood through to old age*. Clin Microbiol Infect, 18 Suppl 4: p. 44 -6

Perdigón, G., Alvarez, S., Rachid, M., Agüero, G., and Gobbato, N., (1995), *Immune system stimulation by probiotics*, J. Dairy Sci., 78, 1597–1606

Pham-Hoang, B.N., Romero-Guido, C., Phan-Thi, H., & Wavhe, Y. (2013). *Encapsulation in a natural, preformed, multi-component and complex capsule: yeast cells*. Applied Microbiology and Biotechnology, 97(15): 6635-6645.

Probert, H.M., Apajalahti, J.H.A., Rautonen, N., Stowell, J., & Gibson, G.R. (2004). *Polydextrose, lactitol, and fructoColigosaccharide fermentation by colonic bacteria in a threeCstage continuous culture system*. Applied and Environmental Microbiology, 70, 4505C4511.

Rasic, J.L. and Kurmann, J.A., (1978). *Yogurt*, Technical Dairy Publishing House, Copenhagen

Roy, D., Mainville, I., and Mondou, F., (1997), *Selective enumeration and survival of bifidobacteria in fresh cheese*, Int. Dairy J., 7, 785–793

Picot A and Lacroix C (2004). *Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yogurt*. International Dairy Journal 14 505-515.

Pham-Hoang, B.N., Romero-Guido, C., Phan-Thi, H., & Wavhe, Y. (2013). *Encapsulation in a natural, preformed, multi-component and complex capsule: yeast cells*. Applied Microbiology and Biotechnology, 97(15): 6635-6645.

Rafter, J. (2003) *Probiotics and colon cancer*. Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol. 17: 849-859

Ramesh C. Chandan Associate Editors Charles H. White Arun Kilara Y. H. Hui  
2006, *Manufacturing Yogurt and Fermented Milks*, 32-34

Raza, S., Graham, S.M., Allen, S.J., Sultana, S., Cuevas, L., Hart, C.A., Kaila, M. Isolauri, E., Saxelin, M., Arvilommi, H. (1995), *Lactobacillus GG in acute diarrhea*, Indian Pediatr., 32, 1140–1142

Reid G. Probiotic agents to protect the urogenital tract against infection. (2000). *American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 437-443

Roberfroid, M.B. (1998). *Prebiotics and synbiotics: concepts and nutritional properties*. British Journal of Nutrition, 80, 197 - 202.

Roberfroid, M.B., (2000), *Prebiotics and probiotics: are they functional foods?* Am. J. Clin. Nutr., 71, 1682S–1687S, 1688S–1690S

Roos, Y.H. ( 1995 ), *Phase Transitions in Foods*, Academic Press

Salminen, S., et al., ( 1998 ), *Demonstration of safety of probiotics -- a review*. Int J Food Microbiol, 44 (1-2): p. 93 - 106.

- Sanders, M.E. (2008) *Probiotics: definition, sources, selection and uses*. *Clinical Infectious Diseases*, 46 (Suppl.): S58–S61.
- Sanders, M.E., Gibson, G., Gill, H.S. & Guarner, F. (2007) *Probiotics: their potential to impact human health*. CAST issue paper No. 36, October 2007.
- Sanz, Y. (2007). *Ecological and functional implications of the acid-adaptation ability of Bifidobacterium: A way of selecting improved probiotic strains*. *International Dairy Journal*, 17, 1284-1289.
- Sarkar, S. (2010). *Approaches for enhancing the viability of probiotics: a review*. *British food Journal*, 112, 329-349.
- Saldaña, M.D.A. & Martínez-Monteagudo, S. I. (2013). *Oxidative Stability of Fats and Oils Measured by Differential Scanning Calorimetry for Food and Industrial Applications*. ISBN 978-953-51-0947-1
- Savaiano, D.A., Abouelanouar, A., Smith, D.E., and Levitt, M.D., ( 1984 ), *Lactose malabsorption from yogurt, pasteurized yogurt, sweet acidophilus milk, and cultured milk in lactase-deficient individuals*, *Am. J. Clin. Nutr.*, 40, 1219–1223
- Schrezenmeir, J., & de Vrese, M. (2001). *Probiotics, prebiotics, and synbiotics - approaching a definition*. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 361 - 364.
- Schrooyen, P. M. M., Van der Meer, R., & De Kruif, C. G., (2001). *Microencapsulation: its application in nutrition*. *Proceedings of the Nutrition Society*, 60, 475 – 479.
- Shah, N.P. (2007) *Functional cultures and health benefits*. *Int. Dairy J.*, 17: 1262–1277
- Shahidi, F. & Han, X. Q. (1993). *Encapsulation of food ingredients*. *Critical Reviews of Food Science and Nutrition*, 33(6): 501-547.

Sekirov, I., (2010), *Gut microbiota in health and disease*. Physiology Rev 90 (3): p. 859 - 904.

Solanki, H.K., Pawar, D.D., Shah, D.A., Prajapati, V.D., Jani, G.K., Mulla, A. M., & Thakar, P. M. (2013). *Development of Microencapsulation Delivery System for Long-Term Preservation of Probiotics as Biotherapeutics Agent*. BioMed Research International, 1- 21.

Storch, V., *Nogle Undersogelser over Flodens, Syrning*, Fra Forsoglab, ( 1890). *Cited in Galloway and Crawford*,(reference 21).

Sultana, K., Godward, G., Reynolds, N., Arumugaswamy, R., Peiris, P., & Kailasapathy, K. (2000). *Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt*. International Journal of Food Microbiology, 62, 47–55.

Szente, L., & Szejtli, J., 2004. *Cyclodextrins as food ingredients*. Trends in Food Science & Technology, 15, 137– 142.

Turnbaugh, P.J., et al., Diet - induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. Cell Host Microbe, 2008. 3 (4): p. 213 –

Tripathi M.K. , Giri S.K. (2014), *Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage*, 227

Ustunol, Z., & Gandhi, H. (2001). *Growth and viability of commercial Bifidobacterium spp. in honey - sweetened skim milk*. Journal of Food Protection, 64, 1775 – 1779

Vinderola, C.G., Prosello, W., Ghiberto, D., and Reinheimer, J.A., (2000 ) *Viability of probiotic(Bifidobacterium, Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus casei) and nonprobiotic microflora in Argentinian fresco cheese*, J. Dairy Sci., 83, 1905–1911

Vivek K. B.( 2013), *Use of encapsulated probiotics in dairy base foods*, 190-193

Wohlgemuth, S., Loh, G., Blaut, M. (2010) *Recent developments and perspectives in the investigation of probiotic effects*. International Journal of Medical Microbiology, 300 (1):3–10.

Yegna Narayan Aiyar, A.K., (2003) *Dairying in ancient India*, Indian Dairyman, 5, 77–83

Zabala, A., Martin, M.R., Haza, A.I., Fernandex, L., Rodriguez, J.M., & Morales, P. (2001). Antiproliferative effect of two lactic acid bacteria strains of human origin on the growth of a myeloma cell line. *Letters in Applied Microbiology*, 32, 287–292.

Zeller, B. L., Saleeb, F. Z., & Ludescher, R. D., 1999. Trends in development of porous carbohydrate food ingredients for use in flavor encapsulation. *Trends in Food Science & Technology*, 9, 389-394

Zhang, H., et al., Human gut micro biota in obesity and after gastric bypass. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. 106 (7): p. 2365 -70.

Zimmer, C.J., & Gibson, G.R. (1998). *An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies*. International Dairy Journal, 8, 473C479

Zuidam N. & Shimoni, E. (2010). *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food processings*, ISBN 978-1-4419-1008-0



## Ελληνική βιβλιογραφία

Μουρτζίνος, Ι., 2007. Προστασία & ελεγχόμενη απελευθέρωση διατροφοδραστικών ουσιών μικροενθλακωμένων σε δομές βιοπολυμερών. Διδακτορική Διατριβή, Χαροκόπειο πανεπιστήμιο

Παραμέρα, Ε., 2011. Βιοενθλάκωση της κουρκουμίνης σε κύτταρα *Saccharomyces Cerevisiae*: Μελέτη φυσικοχημικών παραμέτρων και εφαρμογή σε τρόφιμα. Διδακτορικά Διατριβή, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο