



**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**  
**ΠΜΣ ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ**  
**ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**Μελέτη γλυκαντικών υλών: Αξιολόγηση της μικροβιακής χλωρίδας  
γλυκαντικών προϊόντων και επίδρασή τους στη μικροβιακή ανάπτυξη**



**ΝΙΚΗ Μ. ΠΑΠΑΠΟΣΤΟΛΟΥ**

**Αθήνα 2017**

**Επιβλέπων καθηγητής: ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΙΩΑΝΝΗΣ ΝΥΧΑΣ**



**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

**ΠΜΣ ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ**

**ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**Μελέτη γλυκαντικών υλών: Αξιολόγηση της μικροβιακής χλωρίδας  
γλυκαντικών προϊόντων και επίδρασή τους στη μικροβιακή ανάπτυξη**



**ΝΙΚΗ Μ. ΠΑΠΑΠΟΣΤΟΛΟΥ**

**Αθήνα 2017**

**Επιβλέπων καθηγητής: ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΙΩΑΝΝΗΣ ΝΥΧΑΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**Μελέτη γλυκαντικών υλών: Αξιολόγηση της μικροβιακής χλωρίδας  
γλυκαντικών προϊόντων και επίδρασή τους στη μικροβιακή ανάπτυξη**



**ΝΙΚΗ Μ. ΠΑΠΑΠΟΣΤΟΛΟΥ**

**Επιβλέπων καθηγητής: ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΙΩΑΝΝΗΣ ΝΥΧΑΣ**

**Εξεταστική επιτροπή**

**Γεώργιος-Ιωάννης Νυχάς, Καθηγητής**

**Αιμιλία Παπακωνσταντίνου, Λέκτορας**

**Ευστάθιος Πανάγου, Επίκουρος καθηγητής**

**Μελέτη γλυκαντικών υλών: Αξιολόγηση της μικροβιακής χλωρίδας  
γλυκαντικών προϊόντων και επίδρασή τους στη μικροβιακή ανάπτυξη**

**Study of sweeteners: Evaluation of microbial flora of sweeteners and their effect on microbial growth**

## Περίληψη

Η αυξανόμενη τάση κατανάλωσης γλυκαντικών υλών, παράλληλα με την ανεπαρκή ερευνητική βιβλιογραφία, δημιούργησε την ανάγκη για έρευνα. Στην παρούσα διπλωματική εργασία εξετάστηκε η μικροβιακή χλωρίδα πενήντα πέντε εμπορικών γλυκαντικών υλών και αξιολογήθηκε η επίδραση επιλεγμένων υποκατάστατων ζάχαρης (σακχαρόζης) στην ανάπτυξη τόσο παθογόνων όσο και ευεργετικών για τον άνθρωπο μικροοργανισμών.

Αρχικά, προσδιορίστηκε το μικροβιακό φορτίο των δειγμάτων με καταμέτρηση της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας (Ο.Μ.Χ.) καθώς και των πληθυσμών των κολοβακτηρίοειδών (coliforms), των εντεροβακτηρίων (βακτήρια της οικογένειας Enterobacteriaceae), και των *Staphylococcus* spp., *Listeria* spp. και *Salmonella* spp.. Σύμφωνα με τα ληφθέντα αποτελέσματα, γενικά χαμηλή Ο.Μ.Χ. ( $\leq 2,00 \log \text{ cfu}$ ) προσδιορίστηκε σχεδόν στο σύνολο των εξετασθέντων προϊόντων, ενώ σε εννέα από αυτά καταμετρήθηκαν και χαμηλοί πληθυσμοί βακτηρίων του γένους *Staphylococcus*. Ακολούθησαν διαδικασίες εμπλουτισμού με στόχο την ανίχνευση των παθογόνων *Staphylococcus aureus* (στο σύνολο των δειγμάτων) και *Listeria monocytogenes* και *Salmonella* spp. (σε επιλεγμένα δείγματα). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του εμπλουτισμού, η παρουσία *Staphylococcus* spp. διαπιστώθηκε σε 12 προϊόντα, από τα οποία μόνο οι απομονώσεις από δύο προϊόντα θεωρήθηκαν ως πιθανές αποικίες του παθογόνου *S. aureus* μέσω ταχείας δοκιμής συγκόλλησης ορρού.

Στη συνέχεια, αξιολογήθηκε ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης ( $\mu_{\max}$ ) των παθογόνων βακτηρίων *L. monocytogenes* και *S. aureus* και του βακτηρίου με προβιοτικό δυναμικό *Lactobacillus pentosus*, μέσω μετρήσεων οπτικής πυκνότητας (OD) στους 30°C για 48h, παρουσία γλυκοζιτών στεβιόλης και ξυλιτόλης σε συγκέντρωση 0, 2,5, 5 και 10% (w/v) σε θρεπτικό ζωμό. Τα ληφθέντα αποτελέσματα, υπέδειξαν μείωση του  $\mu_{\max}$  της *L. monocytogenes* σε θρεπτικό ζωμό περιεκτικότητας 10% (w/v) σε ξυλιτόλη και αύξηση του  $\mu_{\max}$  του *S. aureus* σε ζωμό περιεκτικότητας 2,5% (w/v) σε ξυλιτόλη. Από την άλλη πλευρά, δεν σημειώθηκε κάποια αξιοσημείωτη επίδραση των γλυκαντικών στον  $\mu_{\max}$  του *Lb. pentosus*. Τέλος, προκειμένου να εκτιμηθεί η αντιλειτουργική δράση των γλυκοζιτών στεβιόλης, η ανάπτυξη του παθογόνου *L. monocytogenes* αξιολογήθηκε στους 10°C σε θρεπτικό ζωμό (i) απουσία γλυκοζιτών στεβιόλης (μάρτυρας), (ii) παρουσία γλυκοζιτών στεβιόλης σε συγκέντρωση 10 % (w/v) και (iii) παρουσία σακχαρόζης στην ίδια συγκέντρωση (10% w/v). Πιο συγκεκριμένα, προσδιορίστηκαν οι καμπύλες ανάπτυξης του παθογόνου στις τρεις παραπάνω συνθήκες, και εν συνεχεία εκτιμήθηκαν οι κινητικές παράμετροι αύξησης μέσω προσαρμογής του πρωτογενούς μοντέλου

των Baranyi and Roberts στα ληφθέντα μικροβιολογικά δεδομένα. Η μικρότερη τιμή  $\mu_{\max}$  προσδιορίστηκε παρουσία γλυκοζιτών στεβιόλης, ενώ ακολούθησαν η σακχαρόζη και ο μάρτυρας. Επίσης, με βάση τις τιμές οι οποίες προσδιορίστηκαν για τη φάση προσαρμογής, η *L. monocytogenes* φάνηκε να προσαρμόζεται περίπου 1,5 φορές γρηγορότερα στο ζυμό-μάρτυρα συγκριτικά με τον ζυμό σακχαρόζης, ενώ στην περίπτωση των γλυκοζιτών στεβιόλης πέρασε κατευθείαν στην εκθετική φάση ανάπτυξης.

Τα ευρήματα αυτής της μελέτης θα μπορούσαν να αποτελέσουν τη βάση για περαιτέρω έρευνα σχετικά με τον μεταβολισμό των γλυκαντικών από βακτήρια, τόσο παθογόνων όσο και ευεργετικών βακτηρίων με διατροφικό (προβιοτικά) ή/και τεχνολογικό ενδιαφέρον για την παραγωγή ζυμωμένων τροφίμων. Εξίσου μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης και η διεξαγωγή έρευνας μικροβιακής οικολογίας η οποία θα εστιάζει στην επίδραση γλυκαντικών υλών στις αλληλεπιδράσεις παθογόνων-ευεργετικών βακτηρίων σε σχέση με την αντίστοιχη επίδραση της σακχαρόζης.

**Κύρια επιστημονικά πεδία:** Γεωπονικές Επιστήμες, Μικροβιολογία Τροφίμων.

**Λέξεις-κλειδιά:** γλυκαντικές ουσίες, γλυκοζίτες στεβιόλης, ξυλιτόλη, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus pentosus*, εμπλουτισμός, μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης, οπτική πυκνότητα, κινητικές παράμετροι αύξησης

## Abstract

The increase in the consumption of sweeteners, along with the insufficient literature on the subject, has created the need for research. In this M.Sc thesis the microbial flora of 55 commercial sweeteners was examined and the influence of selected sugar (saccharose) substitutes on the development of both pathogenic and beneficial microorganisms was evaluated.

Initially, the microbial load of the samples was determined by counting the total mesophiles, as well as the coliforms, enterobacteria (bacteria of the Enterobacteriaceae family), and *Staphylococcus* spp., *Listeria* spp. and *Salmonella* spp. According to the results, total mesophiles were generally determined at low populations ( $\leq 2.00$  log cfu) in almost all of the tested products, whereas nine of them were also counted with low bacterial populations of the genus *Staphylococcus*. Enrichment procedures were followed to detect the pathogen *Staphylococcus aureus* (in all samples) and *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. (in selected samples). According to the enrichment results, the presence of *Staphylococcus* spp. was noted in 12 products, of which only the isolates of two products were considered as possible colonies of *S. aureus* though a rapid serum agglutination test.

The maximum specific growth rate ( $\mu_{\max}$ ) of the pathogens *L. monocytogenes* and *S. aureus* and the presumptive probiotic *Lactobacillus pentosus* was assessed by optical density (OD) measurements at 30 ° C for 48h in the presence of steviol glycosides and xylitol at concentration of 0, 2.5, 5 and 10% (w/v) in nutrient broth. The obtained results indicated decrease of *L. monocytogenes*  $\mu_{\max}$  in 10% (w/v) broth in xylitol and increase of  $\mu_{\max}$  of *S. aureus* in 2.5% (w/v) broth in xylitol. On the other hand, there was no noticeable effect of the sweeteners on the  $\mu_{\max}$  of *Lb. pentosus*. Finally, in order to assess the antilisterial activity of steviol glycosides, the growth of *L. monocytogenes* was evaluated at 10 ° C in culture broth (i) in the absence of steviol glycosides (control); (ii) in the presence of steviol glycosides at concentration of 10% w/v and (iii) in the presence of sucrose at the same concentration (10% w / v). In particular, the pathogen's growth curves were determined at the three mentioned conditions, and then the growth kinetic parameters were estimated by fitting the primary model of Baranyi and Roberts to the obtained microbiological data. The lowest  $\mu_{\max}$  value was determined in the presence of steviol



glycosides, followed by succharose and control. Also, based on the values determined for the lag phase, *L. monocytogenes* appeared to adapt approximately 1.5 times faster to the control broth compared to the succharose broth, whereas in the case of the steviol glucosides it appear to enter directly into the exponential growth phase.

The findings of this study could be the basis for further research into the metabolism of sweeteners by bacteria, both pathogenic and beneficial bacteria with nutritional (probiotic) and/or technological interest in the production of fermented foods. Equally interesting is also the design and conductance of microbial ecology research which will focus on the interactions between pathogenic and beneficial bacterial species compared to the corresponding interactions observed in the presence of saccharose.

**Main Scientific Disciplines:** Agricultural Sciences, Food Microbiology.

**Keywords:** sweeteners, steviol glucosides, xylitol, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus pentosus*, enrichment, maximum specific growth rate, optical density, growth kinetics

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο των μεταπτυχιακών σπουδών με τίτλο Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων και Διατροφή του ανθρώπου στο τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του ανθρώπου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή Γεώργιο-Ιωάννη Νυχά που με στήριξε στην προσπάθεια αυτή παρέχοντας μου ταυτόχρονα την πολύτιμη και καταλυτική καθοδήγηση του μέσα από ένα ευχάριστο κλίμα συνεργασίας για την εκπόνηση της παρούσας μελέτης. Επίσης, θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για το χρόνο που μου αφιέρωσε καθώς και για τις πολύτιμες συμβουλές και υποδείξεις του καθ' όλη τη διάρκεια της διπλωματικής εργασίας. Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την μεταδιδακτορική ερευνήτρια Αλεξάνδρα Λιανού της οποίας η βοήθεια, οι συμβουλές και η καθοδήγηση καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων ήταν καταλυτική. Από τις ευχαριστίες δεν θα μπορούσαν να λείψουν οι συμφοιτητές και το υπόλοιπο προσωπικό του εργαστηρίου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για τη συμπαράσταση, οικονομική και ηθική, και την κατανόηση τους σε όλο το διάστημα των σπουδών μου καθώς και για την ανελλιπή στήριξη και υπομονή που μου έδειξαν όλα αυτά τα χρόνια ούτως ώστε να πετύχω τους στόχους μου.

## Περιεχόμενα

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	11
1.1 Πρόσθετα τροφίμων .....	12
1.1.1 Συντηρητικά.....	12
1.1.2 Θρεπτικά πρόσθετα .....	14
1.1.3 Χρωστικοί παράγοντες .....	15
1.1.4 Γευστικοί παράγοντες .....	15
1.1.5 Παράγοντες δημιουργίας υφής (Texturizing agents) .....	15
1.1.6 Άλλοι παράγοντες .....	16
1.2 Γλυκαντικές Ουσίες.....	16
1.2.1 Νομοθετικό πλαίσιο.....	17
1.2.2 Κατηγορίες γλυκαντικών υλών .....	20
1.3 Σακχαρόζη, μεταβολισμός και σωματικό βάρος.....	37
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	39
2.1 Μικροβιολογικές αναλύσεις εμπορικών προϊόντων γλυκαντικών υλών.....	39
2.1.1 Καταμέτρηση μικροοργανισμών .....	39
2.1.2 Ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών με εμπλουτισμό .....	41
2.1.3 Ταχεία δοκιμή συγκόλλησης ορρού σε τυπικές αποικίες <i>Staphylococcus aureus</i> .....	43
2.2 Αξιολόγηση της βακτηριακής ανάπτυξης παρουσία γλυκαντικών υλών.....	45
2.2.1 Προσδιορισμός του μέγιστου ειδικού ρυθμού αύξησης ( $\mu_{max}$ ) με μετρήσεις οπτικής πυκνότητας (OD) .....	45
2.2.2 Αξιολόγηση της αυξητικής συμπεριφοράς του παθογόνου <i>L. monocytogenes</i> μέσω κλασικών μικροβιολογικών μεθόδων (καμπύλη ανάπτυξης).....	50
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	51
3.1 Μικροβιολογικές αναλύσεις εμπορικών προϊόντων γλυκαντικών υλών .....	54
3.1.1 Καταμέτρηση μικροοργανισμών .....	54
3.1.2 Ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών με εμπλουτισμό.....	56
3.2 Αξιολόγηση της βακτηριακής ανάπτυξης παρουσία γλυκαντικών υλών .....	60
3.2.2 Αξιολόγηση της αυξητικής συμπεριφοράς του παθογόνου <i>L. monocytogenes</i> παρουσία γλυκοζιτών στεβιόλης μέσω κλασικών μικροβιολογικών μεθόδων (καμπύλη ανάπτυξης) .....	66
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	75
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	77
Πίνακας 1.1: Οι κατηγορίες των γλυκαντικών υλών, το αντίστοιχο E, η γλυκαντική ισχύς τους συγκριτικά με τη σακχαρόζη, η ADI και η χρονιά που εγκρίθηκαν/αξιολογήθηκαν .....	16

Πίνακας 1.2: Ιδιότητες γλυκαντικών υλών συγκριτικά με τη στεβιοσίδη.....	35
Πίνακας 2.1: Τα εμπορικά προϊόντα γλυκαντικών υλών που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη, η σύσταση και η μορφή τους.....	40
Πίνακας 2.2: Βακτηριακά στελέχη τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία .....	47
Πίνακας 3.1: Αποτελέσματα μικροβιολογικών αναλύσεων των προϊόντων γλυκαντικών υλών .....	54
Πίνακας 3.2: Αποτελέσματα εμπλουτισμού για την ανίχνευση <i>Salmonella</i> spp. ....	57
Πίνακας 3.3: Αποτελέσματα εμπλουτισμού για την ανίχνευση <i>Staphylococcus aureus</i> .....	57
Πίνακας 3.4: Αποτελέσματα εμπλουτισμού για την ανίχνευση <i>Listeria monocytogenes</i> .....	59
Πίνακας 3.5: Αποτελέσματα δοκιμής συγκόλλησης ορρού για τις απομονώσεις από προϊόντα γλυκαντικών υλών στα οποία ανιχνεύθηκε παρουσία τυπικών αποικιών <i>Staphylococcus aureus</i> ..	59
Πίνακας 3.6: Κινητικές παράμετροι σε ζωμό καλλιέργειας απουσία γλυκαντικών μέσω προσαρμογής του μοντέλου Baranyi και Roberts στα μικροβιολογικά δεδομένα.....	69
Πίνακας 3.7: Κινητικές παράμετροι σε ζωμό καλλιέργειας 10% (w/v) γλυκοζιτών στεβιόλης μέσω προσαρμογής του μοντέλου Baranyi και Roberts στα μικροβιολογικά δεδομένα.....	70
Πίνακας 3.8: Κινητικές παράμετροι σε ζωμό καλλιέργειας 10% (w/v) σακχαρόζης μέσω προσαρμογής του μοντέλου Baranyi και Roberts στα μικροβιολογικά δεδομένα.....	70
Εικόνα 1.1: Χημική δομή ξυλιτόλης .....	24
Εικόνα 1.2: Η χημική δομή της ακεσουλφάμης καλίου.....	26
Εικόνα 1.3: Η χημική δομή του ασπαρτικού οξέος και της φαινυλαλανίνης.....	27
Εικόνα 1.4: Η χημική δομή του κυκλαμικού οξέος.....	29
Εικόνα 1.5: Η χημική δομή της σακχαρίνης .....	31
Εικόνα 1.6: Χημική δομή σουκραλόζης.....	32
Εικόνα 1.7: Χημική δομή της στεβιόλης, της στεβιοσίδης και της ρεμπαουδιοσίδης A.....	33
Εικόνα 2.1: Τυπικές αποικίες <i>S. aureus</i> σε θρεπτικό υπόστρωμα Baird Parker .....	44
Εικόνα 2.2: Τυπικές αποικίες <i>S. aureus</i> σε θρεπτικό υπόστρωμα TSA .....	45
Εικόνα 2.3: Αντιδραστήρια και εξοπλισμός της δοκιμής Microscreen Staph .....	45
Εικόνα 2.4: Θετικό και αρνητικό αποτέλεσμα ταχείας δοκιμής συγκόλλησης ορρού .....	45
Εικόνα 2.5: Πλανόγραμμα πλάκας μικροτιτλοδότησης (microtiter plate) με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις γλυκαντικών ουσιών. S: στέβια, X: ξυλιτόλη, dil: αραιώση.....	49
Εικόνα 2.6: Πλάκα μικροτιτλοδότησης (microtiter plate) .....	49

Γράφημα 3.1: Επίδραση γλυκαντικών ουσιών στο μέγιστο ειδικό ρυθμό αύξησης ( $\mu_{max}$ ) του παθογόνου βακτηρίου <i>Listeria monocytogenes</i> .....	62
Γράφημα 3.2: Επίδραση γλυκαντικών ουσιών στο μέγιστο ειδικό ρυθμό αύξησης ( $\mu_{max}$ ) του παθογόνου βακτηρίου <i>Staphylococcus aureus</i> .....	64
Γράφημα 3.3: Επίδραση γλυκαντικών ουσιών στο μέγιστο ειδικό ρυθμό αύξησης ( $\mu_{max}$ ) του προβιοτικού βακτηρίου <i>Lactobacillus pentosus</i> .....	65
Γράφημα 3.4: Καμπύλη ανάπτυξης του παθογόνου <i>Listeria monocytogenes</i> σε θρεπτικό ζωμό απουσία γλυκαντικών υλών στους 10°C και τιμές pH του ζωμού κατά τη διάρκεια της επώασης...	67
Γράφημα 3.5: Καμπύλη ανάπτυξης του παθογόνου <i>Listeria monocytogenes</i> σε θρεπτικό ζωμό με 10% (w/v) γλυκοζίτες στεβιόλης στους 10°C, και τιμές pH του ζωμού κατά τη διάρκεια της επώασης .....	68
Γράφημα 3.6: Καμπύλη ανάπτυξης του παθογόνου <i>Listeria monocytogenes</i> σε θρεπτικό ζωμό με 10% (w/v) σακχαρόζη στους 10°C, και τιμές pH του ζωμού κατά τη διάρκεια της επώασης.....	68
Γράφημα 3.7: Καμπύλη ανάπτυξης <i>L. monocytogenes</i> στις διάφορες συνθήκες ανάπτυξης σε σχέση με τον χρόνο (h).....	69
Γράφημα 3.8: Καμπύλη πρόβλεψης σε ζωμό καλλιέργειας απουσία γλυκαντικών μέσω προσαρμογής του μοντέλου Baranyi και Roberts στα μικροβιολογικά δεδομένα.....	71
Γράφημα 3.9: Καμπύλη πρόβλεψης σε ζωμό καλλιέργειας 10% (w/v) γλυκοζιτών στεβιόλης μέσω προσαρμογής του μοντέλου Baranyi και Roberts στα μικροβιολογικά δεδομένα.....	71
Γράφημα 4: Καμπύλη πρόβλεψης σε ζωμό καλλιέργειας 10% (w/v) σακχαρόζης μέσω προσαρμογής του μοντέλου Baranyi και Roberts στα μικροβιολογικά δεδομένα.....	72

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Είναι γεγονός ότι η αναζήτηση της γλυκιάς γεύσης είναι μια έμφυτη ανάγκη του ανθρώπινου είδους. Αναμφισβήτητα, η βασική «φυσική πηγή» της γλυκιάς γεύσης δεν είναι άλλη από τη ζάχαρη (σακχαρόζη). Δυστυχώς, όμως, υπάρχουν ορισμένες ευαίσθητες ομάδες του πληθυσμού που οφείλουν να είναι ιδιαίτερα προσεκτικοί με την κατανάλωσή της, όπως για παράδειγμα οι διαβητικοί, με συνέπεια να υποχρεώνονται να στερούνται την απόλαυση που προσφέρει η γλυκιά γεύση. Επιπλέον, οι διατροφικές συνήθειες τα τελευταία χρόνια έχουν αλλάξει με αποτέλεσμα οι περισσότεροι να ακολουθούν ένα μοντέλο ισορροπημένης διατροφής, χαμηλή σε λιπαρά και θερμιδική αξία. Κυρίως αυτοί οι λόγοι οδήγησαν στην χρήση γλυκαντικών ουσιών είτε σαν τελικό προϊόν προς κατανάλωση είτε σαν πρόσθετο σε πληθώρα προϊόντων με μειωμένες θερμίδες.

Τα γλυκαντικά είναι ουσίες που προστίθενται στα τρόφιμα με σκοπό να προσδώσουν γλυκιά γεύση, αντικαθιστώντας μερικώς ή εξολοκλήρου τη ζάχαρη (σακχαρόζη). Ανήκουν σε μια ευρύτερη ομάδα ουσιών που ονομάζονται πρόσθετα τροφίμων και στόχος τους είναι η βελτίωση του προϊόντος με οποιοδήποτε τρόπο. Τα γλυκαντικά που χρησιμοποιούνται περισσότερο στο λιανικό εμπόριο είναι η δεξτρόζη, η μαλτοδεξτρίνη, οι γλυκοζίτες στεβιόλης, η ερυθριτόλη, η σουκραλόζη, η φρουκτόζη, η ασπαρτάμη, η σακχαρίνη, το κυκλαμικό οξύ, η ξυλιτόλη και η ακεσουλφάμη-Κ ή Να.

Σύμφωνα με έρευνες που γίνονται σχετικά με την ασφάλεια των γλυκαντικών υλών αποδεικνύεται ότι η κατανάλωση ορισμένων ουσιών, όπως η ασπαρτάμη, χρήζει προσοχής καθώς έχουν κατηγορηθεί επανειλημμένα για παρενέργειες μετά από αλόγιστη χρήση. Ωστόσο, η ευρωπαϊκή ένωση μέσω της αυστηρής νομοθεσίας περί γλυκαντικών προστατεύει τον καταναλωτή θεσπίζοντας ως όριο κατανάλωσης την αποδεκτή ημερήσια πρόσληψη (ADI). Παρ' όλα ταύτα, οι έρευνες στο συγκεκριμένο κλάδο είναι ακόμα σε αρχικό στάδιο, δεδομένου ότι χρειάζεται να περάσουν αρκετά χρόνια ώστε να αξιολογηθούν οι επιδημιολογικές μελέτες στον πληθυσμό για πιθανότητα χρόνιων νοσημάτων που οφείλονται στη παρατεταμένη χρήση γλυκαντικών.

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι ο προβληματισμός σχετικά με την ασφάλεια των εμπορικών γλυκαντικών ουσιών συγκριτικά με τη σακχαρόζη και η αξιολόγηση της επίδρασης τέτοιων προϊόντων στην ανάπτυξη τόσο παθογόνων όσο και εν δυνάμει ευεργετικών για τον άνθρωπο μικροοργανισμών.

## **1.1 Πρόσθετα τροφίμων**

Η ανάγκη για την διατήρηση των τροφίμων φάνηκε από την πρώτη στιγμή που ο άνθρωπος άρχισε να οργανώνεται σε κοινωνίες. Αυτή η ανάγκη για την διατήρηση των τροφίμων, την βελτίωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών τους, την εξυπηρέτηση ειδικών διαιτητικών αναγκών οδήγησε στην χρήση των προσθέτων. Τα πρόσθετα που χρησιμοποιούνται στα τρόφιμα μπορεί να είναι φυσικές ουσίες, δηλαδή ουσίες που υπάρχουν από μόνες τους στη φύση ή συνθετικές ουσίες, δηλαδή ουσίες που συντίθενται από τον άνθρωπο εργαστηριακά. Η χρήση των προσθέτων στα τρόφιμα ρυθμίζεται από Νομοθεσίες και Κανονισμούς, σύμφωνα με τους οποίους επιτρέπεται η χρήση ουσιών που θεωρούνται ασφαλείς, δεδομένου ότι χρησιμοποιούνται σε καθορισμένες συγκεντρώσεις και είδη τροφίμων.

Τα πρόσθετα χωρίζονται σε κατηγορίες σύμφωνα με την λειτουργία τους στα τρόφιμα που χρησιμοποιούνται. Μια κατηγορία που ανήκει στα πρόσθετα είναι τα γλυκαντικά. Τα γλυκαντικά δημιουργήθηκαν για να καλύψουν την επιθυμία του σύγχρονου ανθρώπου για γλυκιά γεύση, συμβάλλοντας στον καλύτερο έλεγχο του σωματικού του βάρους, αφού δίνουν μια πολύ γλυκιά γεύση με πολύ λίγες ή καθόλου θερμίδες και παράλληλα καθιστώντας δυνατή την κατανάλωση «γλυκών» τροφίμων και ροφημάτων από διαβητικούς, αφού δεν επηρεάζουν τα επίπεδα γλυκόζης και ινσουλίνης στο αίμα.

Εφόσον τα γλυκαντικά ανήκουν στα πρόσθετα έπρεπε να ορίσουμε τι είναι τα πρόσθετα, για ποιους λόγους χρησιμοποιούνται, ποιοι είναι οι τεχνολογικοί σκοποί που εξυπηρετούν, αν είναι ασφαλή στη χρήση τους, να αναλύσουμε τις κατηγορίες και τη λειτουργία τους, τον τρόπο που κωδικοποιούνται.

### **1.1.1 Συντηρητικά**

Σε αυτή την ομάδα των προσθέτων ανήκουν τα αντιμικροβιακά, τα αντιοξειδωτικά και οι παράγοντες που εμποδίζουν την αμαύρωση στα τρόφιμα. Οι αριθμοί E των συντηρητικών κυμαίνονται από το E200 έως το E399. Ο Ελληνικός Κώδικας Τροφίμων και Ποτών επιτρέπει συνολικά 49 συντηρητικά. Από αυτά τα 4 (E230, E231, E232, E233), επιτρέπονται αποκλειστικά για επιφανειακή χρήση στα εσπεριδοειδή και την μπανάνα, ενώ το E239 επιτρέπεται μόνο σε διατηρημένα ψάρια και προϊόντα αλιείας (με pH πάνω

από το 4,5) στο χαβιάρι και άλλα αυγά ψαριών και στο τυρί (Κώδικας τροφίμων και ποτών).

#### **1.1.1.1 Αντιμικροβιακά**

Τα αντιμικροβιακά προστίθενται στα τρόφιμα για δύο λόγους, (i) για τον έλεγχο της φυσικής αλλοίωσης των τροφίμων (έλεγχος των τροφίμων) και / ή (ii) να αποφεύγεται / ελέγχεται η μόλυνση από μικροοργανισμούς, συμπεριλαμβανομένων των παθογόνων (ανησυχία για την ασφάλεια των τροφίμων) (Tajkarimi et al., 2010).

Τα κύρια χημικά αντιμικροβιακά που χρησιμοποιούνται στα τρόφιμα χωρίς περιορισμό χρήσης (*quantum satis*) είναι το οξικό οξύ (E260), το οξικό κάλιο (E261), το οξικό ασβέστιο (E263), το γαλακτικό οξύ (E270), το διοξείδιο του άνθρακα (E209) και το μηλικό οξύ (E296). Τα αντιμικροβιακά πρόσθετα με περιορισμό χρήσης είναι το βενζοϊκό οξύ και τα βενζοϊκά (E210-E219, ADI 5 mg / kg/ bw), σορβικό οξύ και σορβικά (E200-E209, ADI 25 mg / kg/ bw), το προπιονικό οξύ και προπιονικά (E280-E289, *quantum satis*), τα νιτρώδη άλατα (Νιτρώδες κάλιο (E249), ADI 0,07 mg / kg/ bw), νιτρώδες νάτριο (E250, ADI 0,1 mg / kg / bw), τα νιτρικά (νιτρικό νάτριο (E251) και το νιτρικό κάλιο (E252), ADI 3,7 mg / kg/ bw), και τα Parabens (E214-E219, ADI 10 mg / kg/ bw).

#### **1.1.1.2 Αντιοξειδωτικά**

Τα αντιοξειδωτικά είναι η δεύτερη υποομάδα των συντηρητικών, απαραίτητα για την παράταση της διάρκειας ζωής και την διατήρηση της ποιότητας πολλών τροφίμων. Τα αντιοξειδωτικά προλαμβάνουν την οξείδωση μορίων με δωρεά ενός ατόμου υδρογόνου ή ηλεκτρονίου. Με τον τρόπο αυτό μετατρέπονται σε ρίζες με την ιδιότητα όμως να είναι σταθερά και να μην επιτρέπουν περαιτέρω αντιδράσεις, εν αντιθέσει με τις κοινές ριζικές μορφές άλλων ουσιών.

Τα αντιοξειδωτικά τροφίμων χρησιμοποιούνται για την επέκταση της διάρκειας ζωής και εμποδίζουν την αποσύνθεση χωρίς να προσθέτουν γεύση, οσμές ή να τροποποιούν την εμφάνιση των τροφίμων (Nanditha and Prabhasankar, 2009). Η υπεροξείδωση των λιπιδίων και η ταχυκάλυψη είναι οι πιο συνηθισμένοι τύποι της οξείδωσης που εμφανίζονται στα τρόφιμα ενώ αποθηκεύονται.

Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα αντιοξειδωτικά με είναι ασκορβικό οξύ (E300), ασκορβικό νάτριο (E301), ασκορβικό ασβέστιο (E302), εστέρες λιπαρών οξέων με



ασκορβικό οξύ (E304), τοκοφερόλες (E306), α-τοκοφερόλη (E307), γ-τοκοφερόλη (E308), δ-τοκοφερόλη (E309), λεκιθίνες (E322), γαλακτικό νάτριο (E325), λακτάτη καλίου (E326), γαλακτικό ασβέστιο (E327), κιτρικό οξύ (E330), κιτρικό νάτριο (E331), κιτρικό κάλιο (E332), κιτρικό ασβέστιο (E333), Τρυγικό οξύ (E334), τρυγικό νάτριο (E335), τρυγικό κάλιο (E336), τρυγικό κάλιο (E337), μηλικό νάτριο (E350), Μηλεϊνικό κάλιο (E351), μηλικό ασβέστιο (E352), τρυγικό ασβέστιο (E354) και κιτρικό τριαμμώνιο (E380). Επίσης τα πιο κοινά χημικά αντιοξειδωτικά που προστίθενται στα τρόφιμα για να αναστέλλουν την υπεροξειδωση λιπιδίων και τη τάγγιση είναι η βουτυλιωμένη υδροξυανισόλη (BHA, E320, ADI 0,5 mg / kg/ bw), το βουτυλιωμένο υδροξυτολουόλιο (BHT, E321, ADI 0,05 mg / kg/ bw), ο γαλλικός προπυλεστέρα, (PG, E310, ADI 1,4 mg / kg/ bw), η αιθοξυκίνη (EQ, E324, ADI 0,005 mg / kg/ bw) και η τριτ βουτυλυδροκινόνη (TBHQ, E319, ADI 0,7 mg / kg/ bw).

### **1.1.1.3 Παράγοντες που εμποδίζουν την αμαύρωση**

Οι παράγοντες που εμποδίζουν την αμαύρωση χρησιμοποιούνται ως πρόσθετα τροφίμων για την αποφυγή της αμαύρωσης, η οποία μπορεί να συμβεί ανά πάσα στιγμή κατά τη διάρκεια του χειρισμού, της επεξεργασίας και της αποθήκευσης. Υπάρχουν δυο τύποι αμαύρωσης η ενζυμική και η μη-ενζυμική. Στην πρώτη, το ένζυμο οξειδάση των πολυφαινολών καταλύει τη μετατροπή των πολυφαινολών προς κινόνες με περαιτέρω διάσπαση αυτών των ενώσεων που προκαλούν αμαύρωση των τροφίμων (Branen et al., 2001). Η μη-ενζυμική αμαύρωση εμφανίζεται στην καραμελοποίηση των σακχάρων, γνωστή ως αντίδραση Maillard μεταξύ καρβονυλίου και ελεύθερης αμινομάδας που παράγουν μελανοϊδινικές χρωστικές σε διάφορα τρόφιμα (Branen et al., 2001). Μεταξύ των άλλων χρησιμοποιούμενων παραγόντων που εμποδίζουν την αμαύρωση είναι τα θειώδη. Οι εναλλακτικές λύσεις για τα θειώδη είναι φυσικές ενώσεις, όπως οι σχηματισμοί με βάση το ασκορβικό οξύ, το ερυθροβικό οξύ (E315, ADI 5 mg / kg/ bw), η κυστεΐνη (E920; Quantum satis) και μερικά φαινολικά οξέα (Branen et al., 2001, Oms-Oliu et al., 2010).

### **1.1.2 Θρεπτικά πρόσθετα**

Αν και θεωρείται από ορισμένους συγγραφείς, διατροφικά πρόσθετα δεν πρέπει να θεωρούνται ως τέτοια, δεδομένου ότι παρέχουν θρεπτική αξία στο τρόφιμο όπου ενσωματώνονται, επομένως, μπορούν να θεωρηθούν ως εμπλουτισμοί στα τρόφιμα. Η

κατανάλωση αυτών των εμπλουτιστικών ουσιών αυξάνονται τα τελευταία χρόνια λόγω της ανησυχίας της υγείας του πληθυσμού που σχετίζεται με τη διατροφή. Αυτοί οι διατροφικοί εμπλουτισμοί είναι φυσικοί και γίνονται με ενσωμάτωση βιταμινών, αμινοξέων, ινών, λιπαρών οξέων και πολυφαινόλων, μεταξύ άλλων, στα τρόφιμα (Branen and et al., 2001).

### **1.1.3 Χρωστικοί παράγοντες**

Οι χρωστικές ουσίες ή οι χρωστικές τροφίμων χρησιμοποιούνται για να μεταβάλλουν ή να προσδώσουν χρώματα στα τρόφιμα, προκειμένου να αυξηθεί η ελκυστικότητά τους προς τους καταναλωτές. Η μόνη χρωστική με την ιδιότητα quantum satis είναι το ανθρακικό ασβέστιο (E170), το οποίο προσδίδει λευκό χρώμα στα τρόφιμα. Οι χρωστικές χρησιμοποιούνται εδώ και πολλά χρόνια από τις βιομηχανίες τροφίμων, χωρίς αυτό να σημαίνει ότι δεν υπάρχουν διαφωνίες σχετικά με τις επιπτώσεις στην υγεία του καταναλωτή (Branen et al., 2001; Msagati 2013). Μερικές χρωστικές, όπως το αμαράνθιο (E123, ADI 0,15 mg / kg / bw), η καρομοσίνη (E122, ADI 4 mg / kg/ bw) και άλλες έχουν απαγορευτεί σε ορισμένες χώρες. (Sarikaya et al., 2012).

### **1.1.4 Γευστικοί παράγοντες**

Οι γευστικοί παράγοντες είναι πρόσθετα που χρησιμοποιούνται για τη μεταβολή της γεύσης των τροφίμων είτε με την ενίσχυση, την γλύκανση είτε με την πλήρη αλλαγή της γεύσης του παραγόμενου τροφίμου. Η ομάδα των γευστικών παραγόντων είναι διαιρούμενη σε τρεις υποομάδες, τα γλυκαντικά, τις φυσικές και συνθετικές γεύσεις και τους ενισχυτές γεύσης. Στην παρούσα εργασία θα αναλυθεί εκτενώς μόνο η υποομάδα των γλυκαντικών σε επόμενη παράγραφο.

### **1.1.5 Παράγοντες δημιουργίας υφής (Texturizing agents)**

Οι παράγοντες αυτοί είναι χημικές ουσίες που προστίθενται στα τρόφιμα για να τροποποιηθεί η συνολική υφή ή αίσθηση στο στόμα κατά την κατανάλωση τους. Οι δυο κύριες ομάδες είναι οι γαλακτωματοποιητές και οι σταθεροποιητές. Ο πρωταρχικός ρόλος των γαλακτωματοποιητών είναι να διατηρηθούν γαλακτώματα, δηλαδή το μείγμα δυο μη αναμίξιμων υγρών, σε καλή διασπορά, παρουσιάζοντας μια ισορροπία μεταξύ υδρόφοβης και υδρόφιλης ομάδας. Ενώ, οι σταθεροποιητές προστίθενται για να

προσδώσουν και να διατηρήσουν την επιθυμητή υφή τροφής, καθώς επίσης να αποτρέψουν την εξάτμιση και επιδείνωση των πτητικών αρωματικών ελαίων.

### **1.1.6 Άλλοι παράγοντες**

Είναι πρόσθετα που προστίθενται σε ορισμένα τρόφιμα για ένα συγκεκριμένο αποτέλεσμα και που δεν περιλαμβάνονται στις προηγούμενες ομάδες προσθέτων. Παραδείγματα διαφόρων προσθέτων είναι παράγοντες χηλοποίησης, ένζυμα, αντιαφριστικά μέσα, παράγοντες που χρησιμοποιούνται στο φινίρισμα επιφανειών, καταλύτες, διαλύτες, λιπαντικά και προωθητικά (Branen et al., 2001).

## **1.2 Γλυκαντικές Ουσίες**

Ως γλυκαντικά χαρακτηρίζονται πρόσθετες ύλες που αντικαθιστούν πλήρως ή μερικώς τη ζάχαρη (σακχαρόζη) με σκοπό να προσδώσουν στα τρόφιμα γλυκιά γεύση με καθόλου ή χαμηλή θερμιδική αξία και προορίζονται κυρίως για ανθρώπους με ειδικές διατροφικές ανάγκες, όπως οι διαβητικοί.

Τα γλυκαντικά διαφέρουν ως προς τη δραστικότητα γλυκύτητάς τους. Με βάση τη σχετική τους γλυκύτητα σε σύγκριση με τη σακχαρόζη χωρίζονται σε δύο κατηγορίες (Πίνακας 1.1). Τα γλυκαντικά που, λόγω της έντονης γλυκύτητάς τους, παράγουν το απαιτούμενο αποτέλεσμα όταν καταναλώνονται σε μικρές ποσότητες, ονομάζονται «έντονα» γλυκαντικά (Intense sweeteners). Τα έντονα γλυκαντικά κάποιοι τα αποκαλούν «τεχνητά» για να τονίσουν ότι η πλειονότητα αυτών παράγεται με χημική σύνθεση, ενώ η σακχαρόζη και άλλα σάκχαρα που απαντώνται φυσικά στα φυτά θεωρούνται «φυσικά». Σημειώνεται ότι κανένα από τα έντονα γλυκαντικά δεν συμβάλλει σημαντικά στην ενεργειακή αξία του τροφίμου στο οποίο είναι ενσωματωμένο καθώς τα επίπεδα χρήσης είναι πολύ χαμηλά (SCF, 1985).

**Πίνακας 1.1:** Οι κατηγορίες των γλυκαντικών υλών, το αντίστοιχο E, η γλυκαντική ισχύς τους συγκριτικά με τη σακχαρόζη, η ADI και η χρονιά που εγκρίθηκαν/αξιολογήθηκαν.

	Αριθμός E	Γλυκύτητα συγκριτικά με σακχαρόζη	ADI (mg/kg/bw)	<sup>α</sup> Χρόνος έγκρισης	<sup>β</sup> Χρόνος τελευταίας αξιολόγησης
<b>Έντονα Γλυκαντικά</b>					
Ακεσουλφάμη K	E950	200	0-9	1984	2000
Ασπαρτάμη	E951	180-200	0-40	1984	2002
Κυκλαμικό: κυκλαμικό οξύ και άλατα	E952	30	0-7	1984	2000
Σακχαρίνη και άλατα	E954	300-500	0-5	1977	1995
Σουκραλόζη	E955	600	0-15	2000	2000
Θραυματίνη	E957	2000-3000	Αποδ.	1984	1988
<b>Ογκώδη Γλυκαντικά</b>					
Ερυθριτόλη	E968	0,6-0,8	Αποδ.	2003	2003
Ισομάλτ	E953	0,5	Αποδ.	1984	1988
Λακτιτόλη	E966	0,5	Αποδ.	1984	1988
Μαλτιτόλη	E965	1	Αποδ.	1984	1999
Μαννιτόλη	E421	0,7	Αποδ.	1984	1999
Σορβιτόλη	E420	0,5-1	Αποδ.	1984	1984
Ξυλιτόλη	E967	1	Αποδ.	1984	1984

<sup>α</sup>βΣύμφωνα με το SCF

Αποδ.: αποδεκτό.

Η δεύτερη κατηγορία γλυκαντικών ουσιών περιλαμβάνει ουσίες με μικρότερη ή συγκρίσιμη γλυκύτητα από αυτή της σακχαρόζης. Αυτά τα γλυκαντικά ονομάζονται "ογκώδη" (Bulk sweeteners) και χρησιμοποιούνται σε επιδόρπια, παγωτά, μαρμελάδες, κονσέρβες, γλυκά, ψητά, δημητριακά για πρωινό, μουςτάρδα και σάλτσες στα απαραίτητα επίπεδα επίτευξης του επιθυμητού αποτελέσματος. Τα ογκώδη γλυκαντικά είναι υδρογονωμένοι υδατάνθρακες, που συχνά αναφέρονται και ως αλκοόλες σακχάρου ή πολυόλες. Αξίζει να αναφερθεί ότι αυτή η κατηγορία γλυκαντικών προσφέρει ορισμένα τεχνολογικά πλεονεκτήματα όταν χρησιμοποιείται ως πρόσθετο της παρασκευής τροφίμων συγκριτικά με τη σακχαρόζη, όπως η μείωση της καραμελοποίησης και η μείωση του σημείου κατάψυξης ενός μίγματος παγωτού. Σε αντίθεση με τα έντονα γλυκαντικά, τα ογκώδη δεν παρέχουν σημαντική μείωση της ενεργειακής αξίας στα

τρόφιμα, αφού η ενεργειακή τους αξία είναι περίπου 10 kJ / g, ενώ η σακχαρόζη είναι 17 kJ / g (SCF,1985).

### 1.2.1 Νομοθετικό πλαίσιο

Η εναρμονισμένη νομοθεσία για τις ολιγοθερμιδικές γλυκαντικές ύλες στα τρόφιμα υιοθετήθηκε από την Ε.Ε. το 1994. Η σχετική Ευρωπαϊκή Οδηγία είναι γνωστή ως Οδηγία 94/35/EC του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και της Ευρωπαϊκής Επιτροπής για τις Γλυκαντικές Ύλες στα Τρόφιμα. Η συγκεκριμένη Οδηγία, η οποία αναθεωρείται σε τακτική βάση, έχει δεχτεί μέχρι σήμερα τρεις προσθήκες, ώστε να συμβαδίζει με την τεχνολογική και επιστημονική πρόοδο στο χώρο των γλυκαντικών υλών. Η νομοθεσία για τις γλυκαντικές ύλες και οι ειδικές διατάξεις που ρυθμίζουν τη χρήση τους σε τρόφιμα και ποτά, παρέχουν ξεκάθαρα κριτήρια με τα οποία θα πρέπει να συμμορφώνονται όσοι τα χρησιμοποιούν και παράλληλα καθορίζουν πρόσθετες προδιαγραφές για τη σήμανση των προϊόντων που περιέχουν ολιγοθερμιδικές γλυκαντικές ύλες. Στο προσάρτημα της Οδηγίας 94/35 υποδεικνύονται τα μέγιστα επιτρεπόμενα επίπεδα για κάθε ολιγοθερμιδική γλυκαντική ύλη, ανά κατηγορία τροφίμου.

Πιο πρόσφατα, το Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο και η Επιτροπή υιοθέτησαν ένα κανονιστικό πλαίσιο (Κανονισμός 1333/2008), στο οποίο ενοποιούνται σε ένα ενιαίο νομικό κείμενο όλες οι ισχύουσες εγκρίσεις και άδειες αναφορικά με τις ολιγοθερμιδικές γλυκαντικές ύλες και τα άλλα πρόσθετα των τροφίμων. Όπως συμβαίνει με όλα τα συστατικά των τροφίμων, οι ολιγοθερμιδικές γλυκαντικές ύλες αναγράφονται στις ετικέτες και τους πίνακες των συστατικών κάθε προϊόντος με το πλήρες τους όνομα, το οποίο μερικές φορές συνοδεύεται και από τον κωδικό Ε.

Το γράμμα «Ε» σε κάθε πρόσθετο προέρχεται από τη λέξη Ευρώπη και δείχνει ότι η πρόσθετη αυτή ουσία θεωρείται ασφαλής και έχει επιτραπεί να χρησιμοποιείται στην Ευρώπη. Πρακτικά, το Ε αποτελεί εγγύηση ασφαλείας, αφού επιβεβαιώνει ότι η συγκεκριμένη ουσία έχει περάσει από αυστηρούς ελέγχους και η χρήση της έχει εγκριθεί για ολόκληρη την Ε.Ε. Η άδεια αυτή βρίσκεται υπό έλεγχο, επανεξετάζεται και συμπληρώνεται στην περίπτωση που προκύπτουν νέα επιστημονικά δεδομένα. Για να δοθεί έγκριση για τη χρήση μιας πρόσθετης ουσίας, θα πρέπει να παρουσιαστούν στοιχεία τόσο για την ασφάλεια, όσο και για τη χρησιμότητά της.

Εντός της Ε.Ε., επιτρέπεται αυτή τη στιγμή η χρήση των παρακάτω ολιγοθερμιδικών γλυκαντικών υλών, εκτός των άλλων, οι οποίες είναι: η ακεσουλφάμη-Κ (E950), η ασπαρτάμη (E951), το άλας ασπαρτάμης - ακεσουλφάμης (E962), το κυκλαμικό και τα άλατά του (E952), η νεοεσπεριδίνη DC (E959), η σακχαρίνη και τα άλατά της (E954), η σουκραλόζη (E955), η θαυματίνη (E957), η νεοτάμη (E961) και οι γλυκοζίτες στεβιόλης (E960). Αναλυτικά αναφέρεται παρακάτω η ξυλιτόλη και η στέβια ([Οδηγία 94/35/ΕΚ, 1994](#)).

Σύμφωνα με τον νόμο της ΕΕ, οι γλυκαντικές ουσίες πρέπει να εγκριθούν πριν από τη χρήση τους. Οι γλυκαντικές ουσίες που χρησιμοποιούνται από τους κατασκευαστές τροφίμων υπόκεινται συνήθως σε ορισμένους όρους χρησιμοποίησης. Δηλαδή, ο νόμος διευκρινίζει σε ποια τρόφιμα και σε ποιες ποσότητες μπορούν να προστεθούν οι επιτρεπόμενες και εγκεκριμένες γλυκαντικές ουσίες. Η αξιολόγηση των γλυκαντικών ουσιών είναι ίδια όπως για όλες τις πρόσθετες ουσίες τροφίμων και είναι βασισμένη σε αναθεωρήσεις των διαθέσιμων τοξικολογικών στοιχείων. Από τα διαθέσιμα στοιχεία καθορίζεται ένα ανώτατο όριο μιας πρόσθετης ουσίας που δεν έχει καμία αποδεδειγμένη τοξική επίδραση. Αυτό καλείται «Επίπεδο στο οποίο δεν παρατηρούνται δυσμενείς επιδράσεις» (NOAEL) και χρησιμοποιείται για να καθορίσει την «Αποδεκτή Ημερήσια Πρόσληψη» (ADI) για κάθε πρόσθετη ουσία τροφίμων, συμπεριλαμβάνοντας και τις έντονες γλυκαντικές ουσίες. Η ADI παρέχει ένα μεγάλο περιθώριο ασφάλειας και αναφέρεται στην ποσότητα μιας πρόσθετης ουσίας τροφίμων που μπορεί να λαμβάνεται καθημερινά στη δίαιτα, καθ' όλη τη διάρκεια ζωής, χωρίς οποιαδήποτε αρνητική επίπτωση στην υγεία. Με άλλα λόγια, η υπέρβαση της ADI για μια ορισμένη έντονη γλυκαντική ουσία, δεν θα προκαλέσει κανένα αρνητικό αποτέλεσμα, επειδή αυτή η πιθανότητα έχει ήδη ληφθεί υπόψη στον υπολογισμό της ADI. Σε ορισμένες περιπτώσεις, όπως οι πολυόλες, ο νόμος δεν διευκρινίζει ένα ανώτατο όριο (ADI «μη διευκρινισμένο»), αλλά ορίζει ότι οι γλυκαντικές αυτές ουσίες πρέπει να χρησιμοποιηθούν σύμφωνα με την «καλή πρακτική από την πλευρά της βιομηχανίας», η οποία μερικές φορές αναφέρεται στις τεχνικές προδιαγραφές ως «quantum satis». Οι βιομηχανίες δεν πρέπει να χρησιμοποιήσουν περισσότερο απ' όσο απαιτείται για την επίτευξη του σκοπού τους.

Προκειμένου να εξασφαλιστεί ότι οι καταναλωτές γνωρίζουν ποιες γλυκαντικές ουσίες έχουν χρησιμοποιηθεί στα διάφορα τρόφιμα, αυτές πρέπει να αναγράφονται στην ετικέτα με έναν ορισμένο τρόπο. Τα τρόφιμα που περιέχουν έντονες γλυκαντικές ουσίες

πρέπει επίσης να δηλώνουν αυτό το γεγονός στην ετικέτα και να ονομάζουν τη γλυκαντική ουσία στα συστατικά. Οι επιτραπέζιες γλυκαντικές ουσίες που περιέχουν πολυόλες πρέπει να αναφέρουν τις καθαρτικές επιδράσεις τους, ενώ εκείνες που περιέχουν την έντονη γλυκαντική ουσία ασπαρτάμη πρέπει να αναφέρουν ότι πρόκειται για πηγή φαινυλαλανίνης, επειδή οι άνθρωποι που πάσχουν από φαινυλκετονουρία δεν μπορούν να μεταβολίσουν αυτό το αμινοξύ που περιέχει η ασπαρτάμη.

## **1.2.2 Κατηγορίες γλυκαντικών υλών**

### **1.2.2.1 Ογκώδη γλυκαντικά (bulk sweeteners)**

Τα ογκώδη γλυκαντικά έχουν καθαρτικό αποτέλεσμα όταν καταναλώνονται σε υπερβολικά υψηλές δόσεις από τους ανθρώπους ή τα ζώα, λόγω των ωσμωτικών επιδράσεων των μη απορροφηθέντων πολυολών που φθάνουν στο κόλον του παχέος εντέρου. Έχει αποδειχθεί ότι η καθαρτική δράση εξαρτάται από το γλυκαντικό και ότι ανεπιθύμητα συμπτώματα είναι πιθανόν να δημιουργηθούν μετά από συνεχή κατανάλωση 20 g ανά άτομο ανά ημέρα πολυολών (SCF,1985; SCF, 1989). Για τον λόγο αυτό κρίθηκε αναγκαίο από την Επιστημονική Επιτροπή Τροφίμων της Ευρώπης (ΕΕΤ) να αποσαφηνιστεί ότι η συνεχόμενη χρήση πολυολών, δεν πρέπει να ερμηνεύεται ως απεριόριστη αποδοχής χρήσης τους σε όλα τα τρόφιμα και σε κάθε τεχνολογικό επίπεδο (SCF, 1985).

Στα ογκώδη γλυκαντικά περιλαμβάνονται τα ακόλουθα: ερυθριτόλη (E968), μαννιτόλη (E421), σορβιτόλη (E420), ισομάλτ (E953), ξυλιτόλη (E967) λακτιτόλη (E966), μαλτιτόλη και σιρόπι μαλτιτόλης (E965)

#### **Ερυθριτόλη (E968)**

Η ερυθριτόλη εμφανίζεται φυσιολογικά σε μικρές ποσότητες στα καρπούζια, αχλάδια, σταφύλια, μανιτάρια, και ζυμωμένα τρόφιμα όπως σάλτσα σόγιας, μπύρα, σακέ, κρασί και τυρί. Η ερυθριτόλη παρασκευάζεται από σιτάρι ή άμυλο αραβοσίτου με ενζυμική υδρόλυση αποδίδοντας γλυκόζη, η οποία ζυμώνεται με ζυμομύκητες. Είναι πολύ διαλυτή στο νερό και ελαφρώς διαλυτή στην αιθανόλη.

Σύμφωνα με έρευνες σε ζώα και ανθρώπους, ανάλογα με τη δόση, το 60-90% της απορροφούμενης ερυθριτόλης απορροφάται ταχέως από το λεπτό έντερο και αποβάλλεται αμετάβλητα με τα ούρα. Η μη απορροφημένη ερυθριτόλη υφίσταται

μικροβιακή ζύμωση στο παχύ έντερο με παράγωγα λιπαρά οξέα βραχείας αλυσίδας ή εκκρίνεται με τα κόπρανα. Οι μελέτες σε ανθρώπους δεν δείχνουν το γλυκαντικό να επιδρά στο μεταβολισμό των υδατανθράκων. Επίσης, η ερυθριτόλη σε υψηλότερες δόσεις από άλλες πολυόλες προκαλεί καθαρτικό αποτέλεσμα.

### **Ισομάλτ (E953)**

Το ισομάλτ (Isomalt) είναι μια συνθετική γλυκαντική ουσία άοσμη σε μορφή λευκής κρυσταλλικής σκόνης. Πιο συγκεκριμένα, είναι ένα ισομοριακό μείγμα γλυκόζης-σορβιτόλης και γλυκόζης-μαννιτόλης. Το προϊόν περιέχει επίσης μικρές ποσότητες D-μαννιτόλης και υ-σορβιτόλης. Το ισομάλτ παράγεται με καταλυτική υδρογόνωση της ισομαλτουλόζης που παρασκευάζεται με ενζυμικό ισομερισμό σακχαρόζης. Το ισομάλτ είναι διαλυτό στο νερό και πολύ ελαφρώς διαλυτό στην αιθανόλη.

Μετά την κατάποση, το ισομάλτ υδρολύεται ατελώς στο λεπτό έντερο σε γλυκόζη, σορβιτόλη και μαννιτόλη και υποβάλλεται σε μικροβιακή ζύμωση στο παχύ έντερο.

Οι μελέτες ανεκτικότητας σε ανθρώπους δείχνουν ότι η κατάποση 10-20 g ημερησίως δεν έχει καθαρτικό αποτέλεσμα (SCF, 1985) και ότι μετά από λίγες ημέρες προσαρμογής ακόμα και 50 g ανά ημέρα του ισομάλτ θα μπορούσε να είναι ανεκτή (SCF, 1989).

Χρησιμοποιείται ως γλυκαντικό διότι είναι 50% πιο γλυκό από τη ζάχαρη (σακχαρόζη) και επιπλέον αντίθετα από την ξυλιτόλη και τη σορβιτόλη δεν προκαλεί πάγωμα στο στόμα. Εκτός από τη γλυκιά γεύση έχει την ιδιότητα να ελαττώνει την αμαύρωση σε μαγειρεμένα φαγητά και δεν αποσυντίθεται από την πλειοψηφία των ζυμομυκητών που υπάρχουν στις τροφές. Τυπικά προϊόντα στα οποία επιτρέπεται η χρήση του ισομάλτ είναι προϊόντα με μειωμένες θερμίδες ή χωρίς πρόσθετα σάκχαρα όπως μαρμελάδες, ζελέδες, παγωτά, είδη ζαχαροπλαστικής σε συμπληρώματα διατροφής κ.ά.

### **Λακτιτόλη (E966)**

Η λακτιτόλη, που ονομάζεται επίσης γαλακτοσιτόλη, λακτίτη και λακτοβιόζη, αποτελείται από γαλακτόζη και γλυκιτόλη. Λαμβάνεται από καταλυτική υδρογόνωση της λακτόζης. Η λακτιτόλη είναι πολύ διαλυτή στο νερό.



Μελέτες σε ανθρώπους δείχνουν ότι η λακτιτόλη δεν υδρολύεται στο λεπτό έντερο, αλλά ζυμώνεται από τη μικροχλωρίδα του παχέος εντέρου (SFC, 1989). Έχει παρατηρηθεί το ενδεχόμενο διάρροιας με πρόσληψη περίπου 50 g ημερησίως.

Παρ' όλο που το 1988 η ΕΕΤ εξέτασε τα νέα στοιχεία για το μεταβολισμό της λακτιτόλης και τις γαστρικές επιδράσεις που προκαλεί, διατηρήθηκε η προηγούμενη αξιολόγηση από το 1984 (SFC, 1989).

### **Μαλτιτόλη (E965)**

Η μαλτιτόλη και το σιρόπι μαλτιτόλης είναι επίσης γνωστά ως D- μαλτιτόλη και υδρογονωμένη μαλτόζη ή υδρογονωμένο σιρόπι γλυκόζης υψηλής μαλτόζης, σιρόπι υδρογονωμένης γλυκόζης και λυκασίνη, αντίστοιχα. Η μαλτιτόλη μπορεί να περιέχουν πολύ μικρές ποσότητες άλλων πολυολών, ενώ το σιρόπι μαλτιτόλης περιέχει σημαντικές ποσότητες άλλων πολυολών, που κυμαίνονται από σορβιτόλη έως υδρογονωμένους πολυσακχαρίτες που περιέχουν περισσότερα από τρία μόρια γλυκιτόλης. Το σιρόπι μαλτιτόλης και μαλτιτόλης είναι πολύ διαλυτό στο νερό.

Η μαλτιτόλη και το σιρόπι μαλτιτόλης παράγονται από την καταλυτική υδρογόνωση του σιροπιού της γλυκόζης που περιέχει υψηλά ποσοστά μαλτόζης. Η μαλτιτόλη απομονώνεται με κρυστάλλωση. Μετά την κατάποση μεταβολίζεται το σιρόπι μαλτιτόλης / μαλτιτόλη σε γλυκόζη και σορβιτόλη, ιδίως από την εντερική χλωρίδα. Μελέτες ανθρώπινης ανοχής έδειξαν καθαρικό αποτέλεσμα σε επίπεδα πρόσληψης 30-50 g ανά ημέρα (SFC, 1989).

Το 1999 η ΕΕΤ αξιολόγησε το σιρόπι της μαλτιτόλης με νέα προδιαγραφή και βρήκε τη συνεχή χρήση της αποδεκτή καθώς είναι ασφαλή (SFC, 1999).

Αυτό το ογκώδες γλυκαντικό προσδίδει στα τρόφιμα γλυκιά γεύση παρόμοια με εκείνη της σακχαρόζης. Χρησιμοποιείται ως γλυκαντικό στα τρόφιμα, ιδιαίτερα σε εκείνα που προορίζονται για διαβητικούς.

### **Μαννιτόλη (E421)**

Η μαννιτόλη, επίσης γνωστή ως μαννίτης, είναι πολύ διαλυτή στο νερό και ελαφρώς διαλυτή στην αιθανόλη. Παράγεται είτε με καταλυτική υδρογόνωση της γλυκόζης και φρουκτόζης που παρασκευάζονται από σάκχαρα ή άμυλο είτε με ασυνεχή ζύμωση σε αερόβιες συνθήκες..

Μετά την κατάποση η μαννιτόλη απορροφάται ελάχιστα και οι καθαρτικές επιδράσεις της έχουν αναφερθεί με χαμηλές δόσεις της τάξεως των 10 - 20 g ημερησίως (SCF, 1985).

Η μαννιτόλη απαντά φυσικά στον κορμό των κωνοφόρων δέντρων και είναι κρυσταλλική, άοσμη, λευκή σκόνη με γλυκιά γεύση. Χρησιμοποιείται ως γλυκαντικό σε προϊόντα χωρίς ζάχαρη (σακχαρόζη). Η θερμιδική αξία των τροφίμων που παρασκευάζονται με μαννιτόλη είναι μειωμένη σε σχέση με αυτά που παρασκευάζονται με ζάχαρη (σακχαρόζη). Κάποια από προϊόντα που προστίθεται η μαννιτόλη είναι επιδόρπια με βάση φρούτα και λαχανικά, μαρμελάδες, παγωτά, κομπόστες, ζελέ κ.ά. Επίσης, χρησιμοποιείται ως αντισβολωτικό και αντικολλητικό και ως υγροσκοπική ουσία.

Ακόμα, έχει αποδειχθεί ότι ελαττώνει την εμφάνιση τερηδόνας. Όμως, η κατανάλωση αυτού του γλυκαντικού σε πολύ μεγάλες ποσότητες μπορεί να προκαλέσει ναυτία, τάση για εμετό και διάρροια.

### **Σορβιτόλη (E420)**

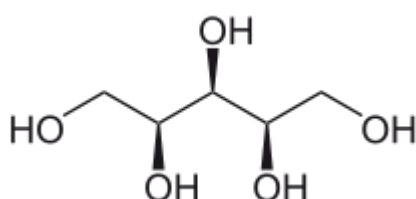
Η σορβιτόλη λαμβάνεται με καταλυτική υδρογόνωση της γλυκόζης. Το σιρόπι σορβιτόλης είναι ένα μείγμα πολυολών, που αποτελείται κυρίως από D-σορβιτόλη και μεταβλητές ποσότητες D-μαννιτόλης και υδρογονωμένους ολιγοσακχαρίτες. Λαμβάνεται με καταλυτική υδρογόνωση του σιροπιού γλυκόζης. Η σορβιτόλη και το σιρόπι σορβιτόλης είναι πολύ διαλυτά στο νερό και ελαφρώς διαλυτά στην αιθανόλη. Οι μελέτες αντοχής που έχουν γίνει για τις καθαρτικές επιδράσεις της μαννιτόλης στον άνθρωπο έδειξαν επίπεδα πρόσληψης πάνω από 50 g ημερησίως (SCF, 1985).

Απαντά σε φρούτα των δέντρων που ανήκουν στην οικογένεια Rosaceae και κυρίως στα κεράσια, αχλάδια, μήλα και δαμάσκηνα. Χρησιμοποιείται ως υποκατάστατο της γλυκόζης ή της σακχαρόζης. Έχει την ίδια περίπου θερμιδική αξία με την κοινή ζάχαρη. Όταν προστίθεται σε σιρόπια που περιέχουν σακχαρόζη ελαττώνει την τάση τους να κρυσταλλώνονται. Καλύπτει την πικρή επίγευση της σακχαρίνης στα ποτά. Η σορβιτόλη απορροφάται αργά από το έντερο και μετατρέπεται σε σάκχαρο στο αίμα. Αποτελεί πολύτιμη πηγή σακχάρου για τους διαβητικούς και επιπλέον ελαττώνει την εμφάνιση τερηδόνας. Χρησιμοποιείται, επίσης, ως υγροσκοπική ουσία και σταθεροποιητής. Σημειώνεται ότι η κατανάλωση μεγάλων ποσοτήτων σορβιτόλης ενδέχεται να προκαλέσει φούσκωμα ή να δράσει ως καθαρτικό.

## Ξυλιτόλη (E967)

Η ξυλιτόλη (Xylitol) πωλείται σε μορφή επιτραπέζιου γλυκαντικού και επειδή είναι ανθεκτική στη θερμότητα, μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί στην ζαχαροπλαστική.

Πρόκειται για αλκοόλη σακχάρου, με τύπο  $(\text{CHOH})_3(\text{CH}_2\text{OH})_2$ , η χημική δομή της μοιάζει τόσο με σάκχαρο όσο και με αλκοόλη, αλλά τελικά δεν είναι τίποτα απ' τα δύο. Η ξυλιτόλη χρησιμοποιείται ως φυσικό υποκατάστατο της σακχαρόζης και ανευρίσκεται σε πολλά φρούτα και λαχανικά, όπως στα βατόμουρα, το φλοιό του καλαμποκιού, τη βρώμη και τα μανιτάρια.



**Εικόνα 1.1:** Χημική δομή ξυλιτόλης

Παράγεται με καταλυτική υδρογόνωση ξυλάνης, που λαμβάνεται από φυτό πλούσιο σε ξυλάνη με όξινη υδρόλυση. Το προϊόν περιέχει μικρές ποσότητες άλλων πολυολών. Επίσης, είναι πολύ διαλυτή στο νερό και ελάχιστα διαλυτή στην αιθανόλη.

Η ξυλιτόλη είναι ένα φυσικό συστατικό που έχει λάβει από τον Αμερικανικό Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων την ένδειξη GRAS (Generally Recognized As Safe) και επομένως έχει εξαιρεθεί από την διαδικασία έγκρισης κυκλοφορίας των τεχνητών υποκατάστατων. Έχει εξίσου γλυκιά γεύση με τη ζάχαρη (σακχαρόζη).

Ο οργανισμός απορροφά την ξυλιτόλη, αλλά όχι πλήρως, γι' αυτό παρέχει μόνο δύο θερμίδες ανά μερίδα και επίσης μπορεί να προκαλέσει πεπτικά προβλήματα σε ορισμένους ανθρώπους. Τα άτομα που προσπαθούν να ελέγξουν τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα τους δεν θα πρέπει να καταναλώνουν ξυλιτόλη, εν αφθονία. Η Αμερικανική Διαβητολογική Εταιρεία συμβουλεύει τους πάσχοντες από διαβήτη να υπολογίζουν τα μισά γραμμάρια αλκοόλης σακχάρου ως υδατάνθρακες.

Μελέτες έδειξαν ότι σκυλιά που κατανάλωσαν τροφές με υψηλά ποσοστά ξυλιτόλης (περισσότερο από 100mg ξυλιτόλης ανά κιλό σωματικού βάρους) εμφάνισαν χαμηλό σάκχαρο (υπογλυκαιμία) κάτι που μπορεί να αποβεί και θανατηφόρο ([Dunayer](#)

E.K. and Gwaltney-Brant S.M., 2006). Το χαμηλό σάκχαρο μπορεί έχει σαν επίπτωση τη ξαφνική απώλεια συντονισμού, τη κατάθλιψη και τη γενική κατάρρευση έως και 30 λεπτά μετά την χρήση της αντίστοιχης ουσίας, όπως η ξυλιτόλη (Dunayer E.K, 2004). Η κατανάλωση υψηλών δόσεων ξυλιτόλης, μεγαλύτερων από 500-1000mg ανά κιλό σωματικού βάρους, έχει βρεθεί επίσης ότι προκαλεί προβλήματα λειτουργίας στο συκώτι των σκύλων (Dunayer E.K, 2006).

Έρευνες έχουν δείξει ότι η ξυλιτόλη που εμπεριέχεται κυρίως σε τσίχλες και καραμέλες, μπορεί, επίσης, να προκαλέσει τερηδόνα στα δόντια μειώνοντας τα οξέα του στόματος. Από την άλλη πλευρά, υπάρχουν έρευνες που υποστηρίζουν ότι η ξυλιτόλη, έχοντας παρόμοιες ιδιότητες με τη σακχαρόζη, μειώνει την οδοντική πλάκα και, αφού προσελκύσει τους επιβλαβείς μικροοργανισμούς, τους "σκοτώνει" μέσω αθρεψίας, επιτρέποντας έτσι στο στόμα να αναδομήσει τα δόντια που έχουν φθαρεί με λιγότερη ενόχληση.

Μια πρόσφατη έρευνα ανακοίνωσε ότι ένα προσθετικό του νερού για τα ζώα που περιέχει ξυλιτόλη ήταν αποτελεσματικό στη μείωση της πλάκας στις γάτες. Επίσης, μελέτες έδειξαν ότι ένα προσθετικό του νερού για τα ζώα που περιέχει ξυλιτόλη ήταν αποτελεσματικό στη μείωση της πλάκας στις γάτες. Ακόμα, η ξυλιτόλη επίσης φαίνεται να έχει και την ιδιότητα να θεραπεύει την οστεοπόρωση σύμφωνα με μια Φιλανδούς ερευνητές που έκαναν πειράματα σε κόκαλα αρουραίων (Mattila PT et al., 2002; Mattila PT, 1999).

Οργανοληπτικά τεστ χαρακτήρισαν την ξυλιτόλη ως αποδεκτή, με ελάχιστα άτομα να αναφέρουν ότι αφήνει μια ήπια, όχι όμως δυσάρεστη, επίγευση στα ζεστά και κρύα ροφήματα (Gare, 2003).

Μελέτες αντοχής σε ανθρώπους δείχνουν ότι όταν η κατανάλωση ξυλιτόλης υπερβαίνει τα 50 g ημερησίως οδηγεί σε διάρροια (SCF, 1985).

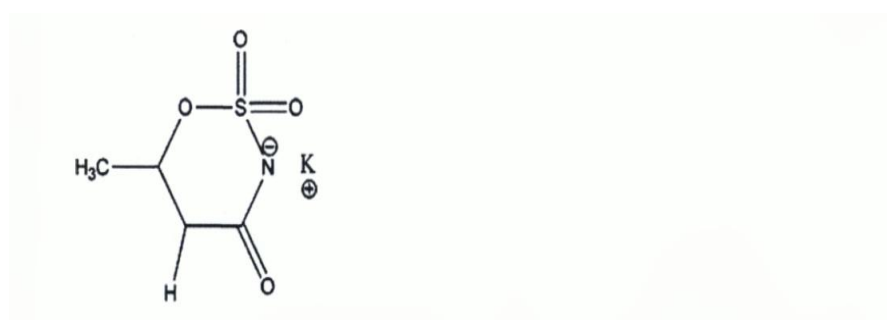
### **1.2.2.2 Έντονα γλυκαντικά (intense sweeteners)**

Η γλυκύτητά των έντονων γλυκαντικών είναι κατά πολύ μεγαλύτερη (30 μέχρι 3000 φορές) από αυτή της ζάχαρης (σακχαρόζης) και γι' αυτό προστιθέμενα σε πολύ μικρές ποσότητες στα τρόφιμα μπορούν να δώσουν την απαιτούμενη γλυκιά γεύση χωρίς να προσθέτουν στη θερμική αξία του τροφίμου. Αυτός είναι ο λόγος που

χρησιμοποιούνται σε τρόφιμα χαμηλών ή μειωμένων θερμίδων και σε τρόφιμα κατάλληλα για διαβητικούς.

Στα έντονα γλυκαντικά περιλαμβάνονται τα ακόλουθα: ακεσουλφάμη καλίου (E950), ασπαρτάμη (E951), κυκλαμικό οξύ και τα άλατά του (E952), σακχαρίνη και τα άλατά της (E954), σουκραλόζη (E955) και θαυματίνη (E957).

### Ακεσουλφάμη Κ (E950)



**Εικόνα 1.2:** Η χημική δομή της ακεσουλφάμης καλίου

Η ακεσουλφάμη Κ λαμβάνεται με χημική σύνθεση και καθαρίζεται μέσω ανακρυστάλλωσης. Η ένωση είναι διαλυτή στο νερό και ελαφρώς διαλυτή στην αιθανόλη. Επίσης, η χημική δομή της ακεσουλφάμης Κ παραμένει σταθερή στο πέρας του χρόνου σε σταθερή θερμοκρασία και pH. Τα παραπάνω πλεονέκτημα του γλυκαντικού διευκολύνουν τη χρήση του στα τρόφιμα (Mayer D.G. and Kemper F.H., 1991). Ιδιαίτερα σε ποτά στα οποία έχει προστεθεί δεν έχουν βρεθεί παραπροϊόντα της ένωσης υπό κανονικές συνθήκες χρήσης και αποθήκευσης.

Σημειώνεται ότι όταν η ακεσουλφάμη Κ χρησιμοποιείται μόνη της, στις ποσότητες που απαιτούνται για την επίτευξη της απαιτούμενης γλυκύτητας, αφήνει μια επίγευση. Επομένως, συνήθως χρησιμοποιείται ως μέρος μείγματος γλυκαντικών, τα οποία παράγουν γλυκιά γεύση που προσομοιάζεται με τη ζάχαρη (σακχαρόζης).

Η ακεσουλφάμη Κ δεν μεταβολίζεται ούτε αποθηκεύεται στο σώμα. Αφού καταναλωθεί, απορροφάται γρήγορα και στη συνέχεια εκκρίνεται ταχέως με τα ούρα (Walker 2003). Αφού δεν μεταβολίζεται, δεν προσδίδει καμία θερμιδική αξία και η συγκεκριμένη της ιδιότητα την κάνει περιζήτητη από καταναλωτές οι οποίοι ακολουθούν

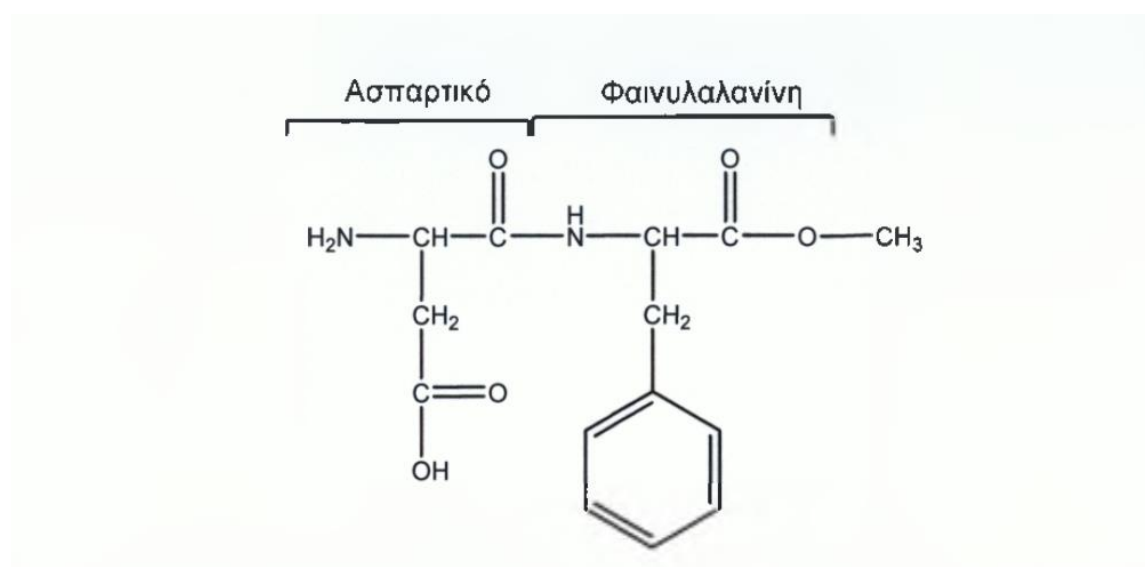
μια διατροφή με χαμηλό ποσοστό πρόσληψης θερμίδων που επιβάλλει ο σύγχρονος τρόπος ζωής (Ophardt C., 2003).

Μετά από απόφαση της EET το 1984, καθιερώθηκε η ADI της ακεσουλφάμη Κ στα 0 - 9 mg / kg σωματικού βάρους (SCF, 1985). Ωστόσο, τα επόμενα χρόνια υπήρξαν έντονες συζητήσεις στον επιστημονικό χώρο για αλλαγή της ADI, δεδομένου ότι κάποιες μελέτες έδειξαν τοξικότητα της ουσίας σε αρουραίους και εμφάνιση καρκινογένεσης. Οι ισχυρισμοί αυτοί, όμως, δεν μπορούσαν να τεκμηριωθούν με βάση τα διαθέσιμα στοιχεία με αποτέλεσμα η επιτροπή να διατηρήσει το ADI.

Σήμερα, η ακεσουλφάμη Κ επιτρέπεται σε ένα ευρύ φάσμα τροφίμων και ποτών, μεταξύ αυτών είναι τα επιτραπέζια γλυκαντικά, το γιαούρτι, τα παγωτά, οι μαρμελάδες, οι κονσέρβες, τα αναψυκτικά, τα γλυκά, η μουστάρδα και οι σάλτσες. Τα επιτρεπόμενα επίπεδα χρήσης της κυμαίνονται από 350 έως 1000 mg / kg ανάλογα με την κατηγορία τροφίμων. Χρειάζεται περίπου 0,5 kg μαρμελάδας που περιέχει 1000 mg / kg ή 1,5 λίτρο αναψυκτικού που περιέχει 350 mg / l ακεσουλφάμης Κ για την επίτευξη της ADI που καθιέρωσε η EET (Zinck O and Hallas-Møller T, 2005).

### Ασπαρτάμη (E951)

Η ασπαρτάμη είναι μια έντονη γλυκαντική ουσία χαμηλής περιεκτικότητας σε θερμίδες που αποτελείται από δύο αμινοξέα, L-φαινυλαλανίνη και το L-ασπαρτικό οξύ εστεροποιημένα σε μεθυλική αλκοόλη.



Εικόνα 1.3: Η χημική δομή του ασπαρτικού οξέος και της φαινυλαλανίνης

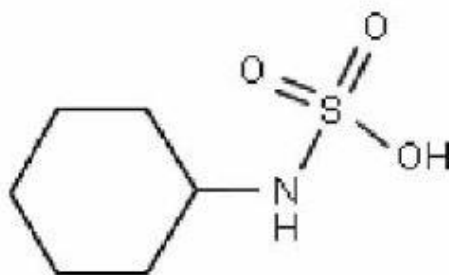
Είναι ασταθής σε υψηλή θερμότητα για παρατεταμένη χρονική περίοδο και επομένως δεν είναι κατάλληλη για το μαγείρεμα ή το ψήσιμο. Επιπροσθέτως, η ένωση είναι ασταθής σε υδατικά διαλύματα, καθώς μετατρέπεται σταδιακά σε δικετοπιπεραζίνη (diketopiperazine, DKP). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια της γλυκιάς γεύσης. Η ασπαρτάμη είναι περίπου 200 φορές πιο γλυκιά από τη σακχαρόζη και συχνά συνδυάζεται με άλλα έντονα γλυκαντικά, όπως η σακχαρίνη και/ή το κυκλαμικό οξύ, ώστε να επιτευχθεί το αναμενόμενο αποτέλεσμα.

Όταν μεταβολίζεται στο σώμα, η ασπαρτάμη αποδίδει περίπου 50% φαινυλαλανίνη, 40% ασπαρτικό οξύ και 10% μεθυλική αλκοόλη κατά βάρος (Roberts HJ, 2001). Το σώμα χρησιμοποιεί τα τρία στοιχεία με τον ίδιο τρόπο όπως όταν προέρχονται από τρόφιμα, όπως το γάλα, τα φρούτα και τα λαχανικά. Έχει παρατηρηθεί ότι ο ανθρώπινος οργανισμός προσλαμβάνει τα συστατικά της ασπαρτάμης σε πολύ μεγαλύτερες ποσότητες από κοινά τρόφιμα συγκριτικά με γλυκά ή ποτά στα οποία έχει προστεθεί ασπαρτάμη (Roberts HJ, 2001).

Η ασπαρτάμη εγκρίθηκε ως ασφαλής για το ευρύ κοινό – συμπεριλαμβανομένων των διαβητικών, των εγκύων και των γαλουχουσών γυναικών, και των παιδιών – από περισσότερες από 90 χώρες παγκοσμίως και από ρυθμιστικά όργανα, όπως η κοινή επιτροπή εμπειρογνομώνων (FAO/WHO) των Ηνωμένων Εθνών, με αντικείμενο τα πρόσθετα τροφίμων (JEFCA), και η αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA). Η κοινή επιτροπή εμπειρογνομώνων του FAO / WHO για τα πρόσθετα τροφίμων και η ΕΕΤ έχει καθορίσει την ADI για την ασπαρτάμη 40 mg / kg σωματικού βάρους.

### **Κυκλαμικό (E952)**

Τρεις διαφορετικές ενώσεις αναφέρονται ως κυκλαμικά άλατα: κυκλαμικό οξύ, κυκλαμικό ασβέστιο και κυκλαμικό νάτριο. Τα κυκλαμικά άλατα, είτε με τη μορφή κυκλαμικού νατρίου ή κυκλαμικού ασβεστίου, είναι ενώσεις σταθερές στη χαμηλή και υψηλή θερμοκρασία και έχουν μακρά διάρκεια ζωής. Η σταθερότητα και η διαλυτότητα τους στο νερό διευκολύνουν τη χρήση τους στα τρόφιμα και τα ποτά.



**Εικόνα 1.4:** Η χημική δομή του κυκλαμικού οξέος

Τα κυκλαμικά άλατα έχουν τη χαμηλότερη γλυκαντική ισχύ από τα υπόλοιπα έντονα γλυκαντικά, δηλαδή έχουν 30-50 φορές πιο γλυκιά γεύση από τη ζάχαρη (σακχαρόζη), αλλά σε συνδυασμό με άλλα έντονα γλυκαντικά δίνει το απαραίτητο επιθυμητό αποτέλεσμα τόσο γλυκύτητας όσο και επίγευσης.

Τα κυκλαμικά άλατα έχουν εγκριθεί ως γλυκαντικές ουσίες σε περισσότερες από 55 χώρες, με εξαίρεση την Αμερική και την Αγγλία. Για αυτό το λόγο τα προϊόντα που περιέχουν κυκλαμικά άλατα έχουν διαφορετική σύσταση από χώρα σε χώρα. Αυτές οι γλυκαντικές ουσίες χρησιμοποιούνται ευρέως σε προϊόντα όπως: (1) μη αλκοολούχα ποτά: αρωματισμένα ποτά με βάση το νερό ή το γάλα και τα παράγωγά του ή/και χυμούς φρούτων, (2) επιδόρπια και παρόμοια προϊόντα: αρωματισμένα επιδόρπια με βάση το νερό, το γάλα, τα παράγωγά του, χυμούς φρούτων, φρούτα, λαχανικά, αυγά, σιτηρά ή λιπαρές ουσίες, (3) είδη ζαχαροπλαστικής: γλυκίσματα με βάση κακάο ή ξηρούς καρπούς ή άμυλο, πολτοί για άλειμμα με βάση το κακάο, γάλα, ξηρούς καρπούς ή λιπαρές ουσίες, φρούτα σε κονσέρβες ή γυάλινα δοχεία, κομπόστες, ζελέ μαρμελάδες και γλυκά κουταλιού, τσίχλες, ζαχαρώδη μικροπροϊόντα που δροσίζουν την αναπνοή και εκλεκτά αρτοσκευάσματα προοριζόμενα για ειδική διατροφή.

Τα κυκλαμικά άλατα δεν αποτελούν μία νέα γλυκαντική ουσία, καθώς έχουν ανακαλυφθεί από το 1937. Παρ' όλα ταύτα, η ADI για τα κυκλαμικά άλατα για πολλά χρόνια ήταν υπό συζήτηση καθώς αποδείχτηκε ότι η κατανάλωση από πειραματόζωα έχει ως επίπτωση τη μη αντιστρεπτή ατροφία των όρχεων, με αποτέλεσμα την μη παραγωγή σπερματοζωαρίων, τη δημιουργία όγκων στους όρχεις και στην ουροδόχο κύστη, βλάβες στο νευρικό σύστημα και ημικρανίες. Ωστόσο, υπάρχει και αντίλογος ως προς τις

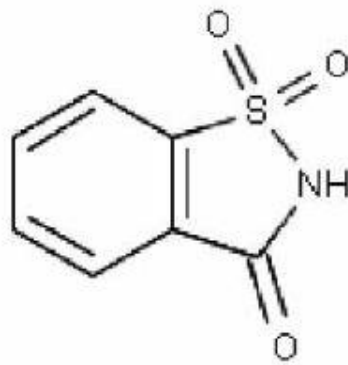


καρκινογένεσις, δεδομένου ότι η μείωση των επιπέδων τεστοστερόνης στα αρσενικά σχετίζεται με μειωμένη συχνότητα εμφάνισης καρκίνου των όρχεων, οπότε θα μπορούσε να χαρακτηριστεί και ως ασφαλές για καρκινογένεση βάσει αυτού. Αφού αναθεωρήθηκε πολλές φορές, από το 2000 ισχύει ότι η ADI για τα κυκλαμικά άλατα είναι 0-7 mg / kg σωματικού βάρους (SCF, 2000).

Σύμφωνα με την Οδηγία 2003/115/ΕΚ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου σχετικά με την τροποποίηση της οδηγίας 94/35/ΕΚ για τα γλυκαντικά, η γνωμοδότηση της επιστημονικής επιτροπής τροφίμων για το κυκλαμινικό οξύ και τα μετά νατρίου και ασβεστίου άλατά του και πρόσφατες μελέτες της πρόσληψης κυκλαμινικών ενώσεων, οδηγούν στη μείωση των ανώτατων δόσεων χρήσης τους για αρωματισμένα ποτά με βάση το νερό, με μειωμένες θερμίδες ή χωρίς πρόσθετα σάκχαρα ή ποτά με βάση το γάλα και τα παράγωγά του ή χυμούς φρούτων, με μειωμένες θερμίδες ή χωρίς πρόσθετα σάκχαρα. Τελικά, στον αριθμό E952 «κυκλαμινικό οξύ και τα μετά νατρίου και ασβεστίου άλατά του» η ανώτατη δόση «400 mg/l» αντικαθίσταται από τη δόση «250 mg/l». Αυτή η τροποποίηση συνέβη λόγω του ότι τα παιδιά μπορούν να καταναλώσουν αδιάκριτα τότε τη κατηγορία προϊόντων με βάση το γάλα και τότε με βάση το νερό κατά τη διάρκεια της ημέρας και κατά συνέπεια να υπερβούν πολύ γρήγορα την ADI, γεγονός που μπορεί να παρουσιάσει κίνδυνο για την υγεία τους.

### **Σακχαρίνη (E954)**

Το E954 καλύπτει τα ακόλουθα: σακχαρίνη, νατριούχο σακχαρίνη, ασβέστιο Σακχαρίνη και σακχαρίνη καλίου. Η σακχαρίνη λαμβάνεται με χημική σύνθεση, είναι ελαφρώς διαλυτή σε νερό, διαλυτή σε αλκάλια και ελάχιστα διαλυτή στην αιθανόλη. Επιπλέον, η σακχαρίνη έχει σταθερή διάρκεια ζωής. Η χρήση της στα τρόφιμα χρονολογείται από το 1907. Ωστόσο, αυτό το γλυκαντικό αφήνει μια πικρή/μεταλλική επίγευση.



**Εικόνα 1.5:** Η χημική δομή της σακχαρίνης

Η σακχαρίνη δεν γίνεται ανιχνεύσιμη ούτε στον ανθρώπινο οργανισμό ούτε στον οργανισμό των ζώων (Renwick A.G., 1986). Παρ' όλα ταύτα, η ασφάλεια αυτού του γλυκαντικού, από το παρελθόν, αποτελούσε αντικείμενο μελέτης καθώς ορισμένες έρευνες έδειξαν ότι οι υψηλές δόσεις του προκαλούν όγκους στην ουροδόχο κύστη του αρσενικού αρουραίου (SCF, 1977). Σήμερα, το γλυκαντικό χρησιμοποιείται ευρέως καθώς θεωρείται ασφαλές μετά από εκτεταμένες έρευνες σε ανθρώπινους πληθυσμούς που δεν έχουν καθιερώσει καμία σχέση μεταξύ σακχαρίνης και καρκίνου.

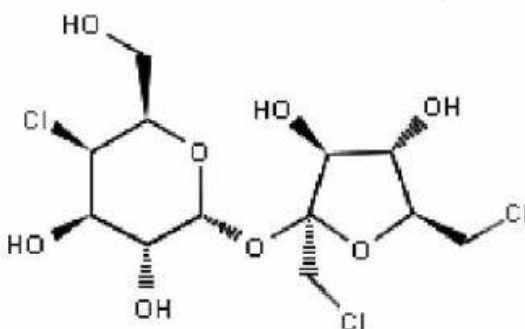
Η σακχαρίνη και τα άλατα της αξιολογήθηκαν αρχικά από τη EET το 1977, όπου καθιερώθηκε η ADI από 0 έως 2,5 mg / kg σωματικού βάρους (SCF, 1977). Η EET εξέτασε εκ νέου την σακχαρίνη το 1984 και αποφάσισε να διατηρήσει την προσωρινή ADI που τέθηκε το 1977 μέχρι να αποσαφηνίσει ο μηχανισμός μεταβολισμού της και η σχέση της με τη δημιουργία καρκίνου στην ουροδόχο κύστη σε αρουραίους (SCF, 1985). Στη συνέχεια, υποβλήθηκαν αρκετές αιτήσεις με σκοπό την αλλαγή της ADI, η οποία καθιερώθηκε, τελικά, το 1995 στα 0-5 mg / kg σωματικού βάρους αφού δεν βρέθηκε καμία βάσιμη υποψία ότι πρόκειται για καρκινογόνο ουσία..

Η σακχαρίνη επιτρέπεται σε ένα ευρύ φάσμα τροφίμων και ποτών, συμπεριλαμβανομένων των επιτραπέζιων γλυκαντικών, των επιδόρπιων, των γιαουρτιών, των παγωτών, των ψητών, των μαρμελάδων, των κονσερβών, των γλυκών, των αναψυκτικών, των μουσταρδών και των σαλτσων. Τα επιτρεπόμενα επίπεδα χρήσης κυμαίνονται από 100 έως 500 mg / kg ανάλογα με την κατηγορία τροφίμων. Χρειάζονται περίπου 0,5 κιλά γλυκά που περιέχουν 500 mg / kg ή 3,5 λίτρα αναψυκτικού που

περιέχουν 500 mg / l σακχαρίνης για την επίτευξη της καθιερωμένης ADI από την ΕΕΤ (Zinck O and Hallas-Møller T, 2005).

### Σουκραλόζη (E955)

Η σουκραλόζη είναι επίσης γνωστή ως 4,1α,6α-τριχλωροσακχαρόζη (TGS) ή τριχλωροσακχαρόζη. Η σουκραλόζη προέρχεται από την σακχαρόζη με την επιλεκτική αντικατάσταση τριών υδροξυλικών ομάδων με άτομα χλωρίου.



Εικόνα 1.6: Χημική δομή σουκραλόζης

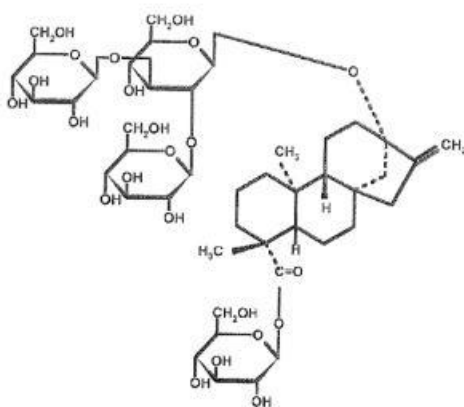
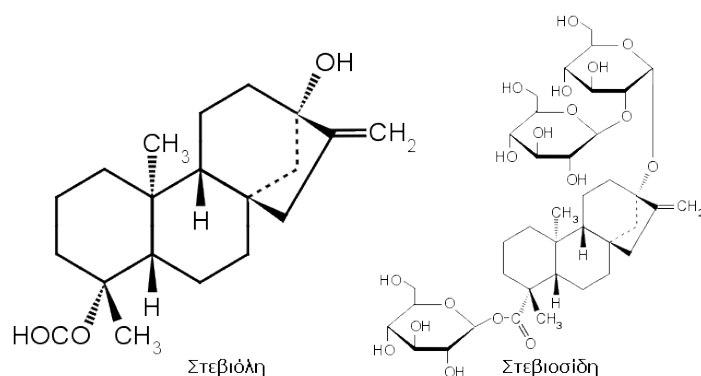
Η σουκραλόζη είναι εύκολα διαλυτή στο νερό, λιγότερο διαλυτή σε αλκοόλη και άλλους πολικούς διαλύτες, δίνοντας διαλύματα με ουδέτερο pH. Επίσης, το γλυκαντικό δεν μεταβολίζεται ή δεν αποθηκεύεται στο σώμα. Αφού καταναλωθεί, απορροφάται γρήγορα και στη συνέχεια εκκρίνεται ταχέως αμετάβλητα.

Η ΕΕΤ εξέφρασε την πρώτη της γνώμη σχετικά με τη σουκραλόζη το 1989 (SFC, 1989). Την εποχή εκείνη, η σουκραλόζη θεωρήθηκε τοξικολογικά μη αποδεκτή από την ΕΕΤ. Γεννήθηκαν πολλά ερωτήματα μετά από συνεχείς αξιολογήσεις των διαθέσιμων δεδομένων που σχετίζονταν με τη ασφάλεια της ουσίας. Τελικά, το 2000, η ΕΕΤ εξέτασε ενδελεχώς τις μελέτες που είχαν γίνει και καθόρισε την ADI από 0 έως 15 mg / kg σωματικού βάρους (SCF, 2000).

Η σουκραλόζη επιτρέπεται σε ένα ευρύ φάσμα τροφίμων και ποτών. Μεταξύ αυτών είναι τα μη αλκοολούχα ποτά, τα επιδόρπια, τα παγωτά, τα είδη ζαχαροπλαστικής και οι κονσέρβες. Τα επιτρεπόμενα επίπεδα χρήσης κυμαίνονται από 10 mg / l έως 1000 mg / kg ανάλογα με το κατηγορία τροφίμων. Χρειάζονται περίπου 2 κιλά επιδόρπιο που περιέχουν 400 mg / kg ή 3 λίτρα αναψυκτικού που περιέχει 300 mg / l σουκραλόζης για να επιτευχθεί η ADI που έχει καθιερώσει από την ΕΕΤ.

## Στέβια (E960)

Η γλυκαντική δύναμη που έχει το φυτό Στέβια οφείλεται στη χημική του σύσταση, και πιο συγκεκριμένα στους γλυκοζίτες (Καπόγλου, 2009). Οι γλυκοζίτες είναι ενώσεις που περιέχουν ένα μόριο υδατάνθρακα (σάκχαρο) συνδεδεμένο με μια μη-υδατανθρακική μονάδα (αγλυκόνη) (Lemus- Mondaca et.al, 2011). Οι γλυκοζίτες αυτοί έχουν την ίδια χημική δομή κορμού, την Στεβιόλη, αλλά διαφέρουν ως προς τα υπολείμματα υδατανθράκων που συνδέονται πάνω σε αυτή (Chatsudthipong & Muanprasat, 2008). Η Στεβιόλη είναι ένα τετρακυκλικό διτερπενιο με σκελετό entkaurene. Ο μοριακός τύπος της είναι  $C_{20}H_{30}O_3$ , και η συστηματική ονομασία (4α)-13-υδροξυρ-καουρ-16-εν-19-οϊκό οξύ. Αποτελεί το άγλυκο τμήμα των γλυκοζιτών και αναφέρεται γενικώς ως αγλυκόνη (aglycone).



Ρεμπαουδισίδη Α

**Εικόνα 1.7:** Χημική δομή της στεβιόλης, της στεβιοσίδης και της ρεμπαουδισίδης Α

Η Στέβια είναι ένα βότανο που χρησιμοποιείται ευρέως σε διάφορες περιοχές του κόσμου ως μη θερμιδικό υποκατάστατο της ζάχαρης (σακχαρόζης). Η Στέβια, με βοτανικό όνομα *Stevia rebaudiana Bertoni* είναι είδος φυτού, το οποίο ανήκει στην οικογένεια *Asteraceae*, και ξεχωρίζει λόγω της υψηλής περιεκτικότητας σε γλυκαντικές ενώσεις (Soejarto et al. 1982; Kinghorn et al. 1984). Το γένος *Stevia* περιλαμβάνει τουλάχιστον 110 είδη (Rajbhandari and Roberts 1983) και ενδεχομένως να φτάνουν τα 300. Η *Stevia rebaudiana Bertoni* είναι ένας μικρός πολυετής θάμνος, εγγενής στην Νότια Αμερική, καλλιεργείται στην Παραγουάη, τη Βραζιλία, τη Κολομβία, το Μεξικό, την Ουρουγουάη, τη Γουατεμάλα, το Περού, την Ιαπωνία και τη Νότια Κορέα (Kobylewski SEC, 2014; Prakash I et al., 2014). Δεν θεωρείται ιδιαίτερα απαιτητικό φυτό όσον αφορά τις συνθήκες ανάπτυξης του, καθώς φυσικά αναπτύσσεται σε άγονα και όξινα (pH 4-5) εδάφη, ενώ φτάνει τα 60-80 cm ύψος.

Τα αποστάγματα από τα φύλλα του φυτού στέβια έχουν χρησιμοποιηθεί για αιώνες για να γλυκάνουν τα τρόφιμα και τα ποτά στη Νότια Αμερική, την Ιαπωνία και την Κίνα (Geuns, 2003; Soejarto et al. 1982; Gardana et al., 2003). Τα κύρια συστατικά που είναι υπεύθυνα για τις γλυκές ιδιότητες του φυτού είναι οι γλυκοζίτες στεβιόλης, κυρίως η ρεμπαουδιοσίδη Α και η στεβιοσίδη σε ποσοστό 9,1% και 3,8%, αντίστοιχα. Ωστόσο, υπάρχουν και άλλα συστατικά σε μικρότερο ποσοστό, ρεμπαουδιοσίδη C, δουλκοσίση, ρεμπαουδιοσίδη B, D και E και στεβιοδιοσίδη. Η γλυκαντική δυνατότητα των συστατικών της στέβια είναι 200-300 φορές μεγαλύτερη από της σακχαρόζης (Soejarto et al., 1982; Hanson and De Oliveira, 1993; JECFA, 1999). Επιπλέον, τα φύλλα του φυτού περιέχουν ανόργανα συστατικά, όπως ο σίδηρος, το μαγγάνιο και κοβάλτιο, βιταμίνες, φαινολικές ενώσεις, φλαβονοειδή και άλλες αντιοξειδωτικές ενώσεις (Lemus-Mondaca et al, 2012; Tadhani, Patel and Subhash, 2007; Dhiman A. et al., 2011).

Η στεβιοσίδη που είναι ο κύριος γλυκοζίτης μαζί με την ρεμπαουδιοσίδη Α και χρησιμοποιείται ως γλυκαντικό μέσο, δείχνει καλή σταθερότητα υπό κανονικές συνθήκες εφαρμογής. Ωστόσο, ακραίες τιμές θερμοκρασίας και pH μπορεί να υποβαθμίσουν την ουσία. Επιπλέον, κατά την εφαρμογή της σε διάφορες κατηγορίες τροφίμων θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη πιθανές αλληλεπιδράσεις με άλλα συστατικά (Kroyer, 2010). Στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 1.2) παρουσιάζονται κάποιες ιδιότητες από μερικές γλυκαντικές ουσίες σε σύγκριση με την στεβιοσίση.

**Πίνακας 1.2:** Ιδιότητες γλυκαντικών υλών συγκριτικά με τη στεβιοσίδη.

<b>Ιδιότητα</b>	<b>Ασπαρτάμη</b>	<b>Ακεσουλφάμη Κ</b>	<b>Κυκλαμικά</b>	<b>Σακχαρίνη</b>	<b>Στεβιοσίδη</b>
<i>Τρόπος παρασκευής</i>	Συνθετική	Συνθετική	Συνθετική	Συνθετική	<b>Φυσική</b>
<i>Γλυκαντική ισχύς</i>	200	150	30	250	<b>200</b>
<i>Σταθερότητα στη θέρμανση</i>	Μέτρια	Σταθερή	Σταθερή	Σταθερή	<b>Σταθερή</b>
<i>Σταθερότητα σε διάφορα pH</i>	Μέτρια	Σταθερή	Σταθερή	Σταθερή	<b>Σταθερή</b>
<i>Σταθερότητα στο ψήσιμο</i>	Όχι	Ναι	Ναι	Ναι	<b>Ναι</b>
<i>Διαλυτότητα στην αλκοόλη</i>	Όχι	Μέτρια	Όχι	Όχι	<b>Ναι</b>
<i>Σταθερότητα στο μαγείρεμα</i>	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι	<b>Ναι</b>
<i>Αίσθηση πλήρωσης του στόματος</i>	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι	<b>Ναι</b>
<i>Χρησιμοποιείται από</i>	το 1981	το 1988	το 1938	το 1879	<b>Αιώνες</b>

Πηγή: Prof. Dr. Ahmed M. Ebieda, Stevia Plant, Egypt, Chemistry Structure

Η στεβιοσίδη εξετάστηκε για πρώτη φορά το 1984 από την ΕΕΤ και ακολούθησαν αρκετές επανεξετάσεις, καθώς το εκχύλισμα της έδειξε ότι προκαλεί δυσμενείς επιπτώσεις στο αναπαραγωγικό σύστημα των αρσενικών αρουραίων και ο μεταβολίτης της, στεβιόλη, που παράγεται από τον μεταβολισμό της μικροχλωρίδας του ανθρώπινου εντέρου είναι γονιοτοξικός (SCF, 1985). Το 1998 ζητήθηκε από την ΕΕΤ να αξιολογήσει την ασφάλεια των φύλλων της *S. rebaudiana Bertoni* ως νέο τρόφιμο. Τελικά, η κοινή επιτροπή εμπειρογνομόνων των FAO / WHO για τα πρόσθετα τροφίμων (JECFA) (JECFA, 2005) κατέληξε στο συμπέρασμα ότι τα δεδομένα που είχε αξιολογήσει ήταν ανεπαρκή και το 2005 αφού επανααξιολόγησε τα δεδομένα τοξικολογίας της στεβιοσίδης όρισε ως προσωρινή αποδεκτή ημερήσια πρόσληψη (ADI) για τους γλυκοζίτες στεβιόλης την ποσότητα 0-2 mg / kg σωματικού βάρους εκφραζόμενη σε ισοδύναμα στεβιόλης. Η ADI εκφράστηκε σε ισοδύναμα στεβιόλης δεδομένου ότι αυτός είναι ο κοινός δυνητικά τοξικός μεταβολίτης των διαφόρων γλυκοζιτών (Renwick A. G. and Tarka S. M., 2008). Ωστόσο, η επιστημονική κοινότητα ακόμα εξετάζει το ενδεχόμενο χρόνιας τοξικότητας, γονοτοξικότητας, καρκινογένεσης, και επιδράσεις στο αναπαραγωγικό και

καργειαγγειακό σύστημα του ανθρώπου και στην ομοιόσταση της γλυκόζης ([Renwick A. G. and Tarka S. M., 2008](#)).

Μελέτες με γλυκοζίτες στεβιόλης σε ζώα και ανθρώπους έδειξαν ότι δεν απορροφώνται αυτούσιοι από τον οργανισμό με χορήγηση από το στόμα αλλά υδρολύονται από την μικροχλωρίδα του παχέως εντέρου σε στεβιόλη. Ένα μεγάλο μέρος την στεβιόλης απορροφάται, ενώ το υπόλοιπο αποβάλλεται από τα κόπρανα. Καμία συσσώρευση των παραγώγων των γλυκοζιτών δεν συμβαίνει στο σώμα.

Οι *in vitro* μελέτες αποδεικνύουν ότι τα ανθρώπινα πεπτικά ένζυμα δεν είναι ικανά να υδρολύσουν τους β- γλυκοσιδικούς δεσμούς των γλυκοζιτών στεβιόλης αλλά η εντερική χλωρίδα είναι αυτή που μετατρέπει τους γλυκοζίτες σε στεβιόλη σε ανθρώπους και αρουραίους.

Από την άλλη, οι *in vivo* μελέτες σε αρουραίους που κατανάλωσαν στεβιοσίδη έδειξαν ότι η ελεύθερη στεβιόλη ήταν ο κύριος μεταβολίτης στο πλάσμα και έφτασε στη μέγιστη συγκέντρωση του μέσα σε 24 ώρες μετά την χορήγηση. Στο ήπαρ των ζώων η στεβιόλη υπόκειται κυρίως σε σύζευξη με γλυκουρονικό οξύ για να σχηματίσει γλυκουρονίδιο στεβιόλης, το οποίο προσδιορίζεται ως ο βασικός μεταβολίτης στη χολή. Από τα αποτελέσματα της χολής και των κοπράνων μπορεί να συνταχθεί το αποτέλεσμα ότι στα ποντίκια συμβαίνει έντερο-ηπατική κυκλοφορία. Στους αρουραίους, η στεβιόλη έχει αποδειχθεί ότι εκκρίνεται κυρίως στα κόπρανα μέσω της χολής και σε μικρότερες ποσότητες στα ούρα.

Σε ανθρώπου εθελοντές που εκτίθενται σε χορήγηση από του στόματος στεβιοσίδη ή ρεμπαουδιοσίδη Α, δεν ανιχνεύτηκε ελεύθερη στεβιόλη στο αίμα αλλά το γλυκουρονίδιο στεβιόλης, ως κύριος μεταβολίτης. Επίσης, και για τον άνθρωπο ισχύει η έντερο-ηπατική κυκλοφορία της στεβιόλης. Το γλυκουρονίδιο στεβιόλης ήταν, ακόμη, ο κύριος μεταβολίτης που βρέθηκε στα ούρα των εθελοντών ενώ η στεβιόλη είναι ο κύριος μεταβολίτης που βρέθηκε στα κόπρανα.

Υπολογίζεται ότι το ανθρώπινο παχύ έντερο περιέχει περίπου 10<sup>12</sup> οργανισμών / g νωπού βάρους και έχει μέσο συνολικό βάρος 1 kg ([Steer et al., 2000](#)). Από αυτά τα δεδομένα, υπολογίστηκε ότι *in vivo*, το ανθρώπινο έντερο θα μπορούσε υδρολύσει πάνω από 0,4 g ρεμπαουδιοσίδη Α σε στεβιόλης ανά ώρα ([Wingard et al., 1980](#)). Επιπλέον, μελέτες έχουν αποδείξει ότι η μικροβιακή υδρόλυση της στεβιοσίδης σε στεβιόλη γίνεται

με γρηγορότερο ρυθμό από ότι στην περίπτωση της ρεμπαουδιοσίδη A (Wingard et al., 1980; Koyama et al., 2003).

Οι γλυκοζίτες στεβιόλης βάση των ιδιοτήτων τους μπορούν να χρησιμοποιηθεί στα ακόλουθα: επιτραπέζια γλυκαντική ύλη, αναψυκτικά, χυμούς φρούτων, παγωτά, γιαούρτια, κέικ, μπισκότα, γλυκά και γενικά στο ψήσιμο, μαρμελάδες, σάλτσες, σιρόπια, ζελέδες, τσίχλες, καραμέλες, ενισχυτής αλκοολούχων ποτών, οδοντόκρεμες και στοματικά διαλύματα, καλλυντικά προϊόντα και φαρμακευτικά προϊόντα.

### **1.3 Ζάχαρη, μεταβολισμός και σωματικό βάρος**

Ο οργανισμός προσαρμόζεται στην συστηματική κατανάλωση τροφίμων και ποτών με ζάχαρη και προετοιμάζεται για τη μελλοντική διατροφή αλλάζοντας τον μεταβολισμό των μυών μέσω της τροποποίησης της δραστηριότητας των γονιδίων.

Οι αλλαγές αυτές είναι παρόμοιες με εκείνες που έχουν παρατηρηθεί σε πάσχοντες από παχυσαρκία και διαβήτη τύπου 2 και ουσιαστικά σημαίνουν ότι η αύξηση του σωματικού βάρους σε όσους πίνουν π.χ. αναψυκτικά με ζάχαρη δεν οφείλεται στις θερμίδες της ζάχαρης αλλά στον τρόπο με τον οποίο κάνει τον οργανισμό να αποθηκεύει ολοένα περισσότερη, δηλαδή στις αλλαγές που επέρχονται στον μεταβολισμό.

Η πέψη των σακχάρων αρχίζει στο στόμα με την δράση του ενζύμου της α-αμυλάσης του σιέλου που διασπά το άμυλο σε ολιγοσακχαρίτες και δισακχαρίτες. Στην συνέχεια, αφού περάσουν από το στομάχι και φθάσουν στον ειλεό του λεπτού εντέρου με την βοήθεια του βλεννογόνου του λεπτού εντέρου και την δράση των ενζύμων του παγκρεατικού υγρού (μαλτάσες και ισομαλτάσες), διασπώνται σε μονοσακχαρίτες, ώστε να μπορούν πλέον να απορροφηθούν. Η σακχαρόζη διασπάται από τη σακχαράση του εντερικού βλεννογόνου σε γλυκόζη και φρουκτόζη, ενώ η φρουκτόζη που λαμβάνεται με την διατροφή είναι ήδη μονοσακχαρίτης, οπότε δεν υφίσταται διάσπαση.

Η γλυκόζη διαπερνά τα κύτταρα του βλεννογόνου και μπαίνει στην κυκλοφορία με ενεργητική μεταφορά και με την βοήθεια νατριοεξαρτώμενων μεταφορέων. Οι μεταφορείς (SGLR-I) αυτοί ακολουθούν την κίνηση του νατρίου. Επομένως, μεταφέρουν το νάτριο από τον εξωκυττάριο χώρο στον εσωκυττάριο συμπαρασύροντας μόρια γλυκόζης.



Από την άλλη πλευρά, η φρουκτόζη απορροφάται στο δωδεκαδάκτυλο και την νησίδα μέσω της διευκολυνόμενης διάχυσης (από υψηλότερες συγκεντρώσεις, σε χαμηλότερες) και μεταφέρεται στην κυκλοφορία με μη νατριοεξαρτώμενους μεταφορείς. Η φρουκτόζη απορροφάται με πιο αργό ρυθμό από τον βλεννογόνο του εντέρου από ότι η γλυκόζη.

Ο μεταβολισμός, επομένως, είναι η κύρια διαφορά της κοινής ζάχαρης με τις εμπορικές γλυκαντικές ουσίες. Αφού, τα γλυκαντικά δεν απορροφούνται κατά κύριο λόγο, όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενη παράγραφο, από το έντερο αλλά μεταβολίζονται από τη μικροβιακή του χλωρίδα του και αποβάλλονται από το ανθρώπινο σώμα μέσω κοπράνων και ούρων με αποτέλεσμα να μην συμβάλλουν σημαντικά ή καθόλου στην πρόσληψη θερμίδων.

## 2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 2.1 Μικροβιολογικές αναλύσεις εμπορικών προϊόντων γλυκαντικών υλών

#### 2.1.1 Καταμέτρηση μικροοργανισμών

Στοχεύοντας στην αξιολόγηση του μικροβιακού φορτίου γλυκαντικών υλών που διατίθενται στο λιανικό εμπόριο, αναλύθηκαν 55 προϊόντα σε διάφορες μορφές (Πίνακας 2.1). Το εκάστοτε προϊόν προς εξέταση ζυγίστηκε και ομογενοποιήθηκε με αλατούχο διάλυμα Ringer (Lab M Limited, Lancashire, United Kingdom) σε συσκευή Stomacher (Lab Blender 400, Seward Medical) για 60 sec. Η συνήθης αναλογία μάζας δείγματος εξεταζόμενου τροφίμου προς τον όγκο του αλατούχου διαλύματος Ringer ήταν 25g προς 225ml, με εξαίρεση προϊόντα που λόγω περιορισμένης διαθεσιμότητάς τους ζυγίζονταν σε μικρότερες ποσότητες (κρατώντας την αναλογία 1:10 στην αρχική αραιώση του δείγματος). Λόγω μικρού μικροβιακού φορτίου των προϊόντων δεν πραγματοποιούνται διαδοχικές αραιώσεις, αλλά λαμβάνονται απευθείας 100 μL από τη σακούλα Stomacher και επιστρώνονται με τη μέθοδο της διασποράς σε τρυβλία ανάλογα με τον μικροοργανισμό-στόχο.

Η ολική μεσόφιλη μικροβιακή χλωρίδα προσδιορίστηκε με καταμέτρηση σε θρεπτικό υλικό Tryptone Soy Agar (TSA, Biolife Italiana S.r.l., Milan, Italy), και οι μικροβιακές αποικίες καταμετρήθηκαν μετά από επώαση των τρυβλίων στους 30°C για 48 h. Ο προσδιορισμός κολοβακτηριδίων πραγματοποιήθηκε με καταμέτρηση σε θρεπτικό υλικό Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA, Biolife Italiana S.r.l.), ενώ τα βακτήρια της οικογένειας Enterobacteriaceae καταμετρήθηκαν σε τρυβλία Mac Conkey Agar (Lab M Limited, Lancashire, United Kingdom), μετά από επώαση των τρυβλίων στους 37°C για 24 h. Επίσης, με καταμέτρηση σε θρεπτικό μέσο Palcam agar (Biolife Italiana S.r.l.) προσδιορίστηκαν βακτήρια του γένους *Listeria* μετά από επώαση των τρυβλίων στους 37°C για 48 h. Ακόμη, οι γλυκαντικές ουσίες αναλύθηκαν ως προς το περιεχόμενό τους σε *Staphylococcus* spp. σε θρεπτικό υλικό Baird Parker agar (Lab M Limited) μετά από επώαση των τρυβλίων στους 37°C για 48 h. Τέλος, για την καταμέτρηση των πληθυσμών του παθογόνου *Salmonella* spp. χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υλικό Xylose Lysine Desoxycholate (XLD) agar (Biolife Italiana S.r.l.) μετά από επώαση των τρυβλίων στους 37°C για 24 h. Τα μικροβιολογικά δεδομένα που λήφθηκαν με την καταμέτρηση των αναπτυχθέντων αποικιών (colony forming units, cfu) σε κάθε θρεπτικό υπόστρωμα μετασχηματίστηκαν σε log cfu ανά γραμμάριο του δείγματος (log cfu/g).

**Πίνακας 2.1:** Τα εμπορικά προϊόντα γλυκαντικών υλών που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη, η σύσταση και η μορφή τους.

Α/Α	Συστατικά										Μορφή						
	Δεξτρόζη	Μαλτοδεξτρίνη	Γλυκοζίτες στεβιόλης	Ερυθριτόλη	Σουκραλόζη	Φρουκτόζη	Ασπαρτάμη	Σακχαρίνη	Κυκλαμικό οξύ	Ξυλιτόλη	Ακεσουλφάμη-Κ ή Να	Ινσουλίνη	Σακχαρόζη	Κρυσταλλική	Σκόνη	Πακέτα	Δισκία
1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
2	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
3	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
4	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
5	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
6	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0
7	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
8	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
9	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
10	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
11	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
12	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
13	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
14	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
16	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
17	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
18	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
20	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
21	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
22	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
23	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
24	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
25	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0
26	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
27	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
28	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
29	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
30	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1
31	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1
32	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0

33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
34	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
35	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
36	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
37	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
38	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
39	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
40	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
41	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
42	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
43	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
44	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
45	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
46	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
47	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
48	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
49	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
50	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
51	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
52	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
53	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
54	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
55	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1

## 2.1.2 Ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών με εμπλουτισμό

### 2.1.2.1 *Salmonella* spp.

Στην παρούσα μελέτη επιλέχθηκαν 16 προϊόντα γλυκαντικών υλών λιανικής πώλησης προς εμπλουτισμό με στόχο την ανίχνευση του παθογόνου βακτηρίου *Salmonella*. Τα επιλεγμένα προϊόντα ήταν τα 5, 11, 13, 14, 16, 17, 25, 29, 32, 33, 34, 35, 40, 41, 42, 44 (Πίνακας 2.1), αποτελούμενα από 4 προϊόντα σε κρυσταλλική μορφή, 4 προϊόντα σε μορφή δισκίων, 4 προϊόντα σε μορφή σκόνης, 3 προϊόντα σε υγρή μορφή και 1 προϊόν σε μορφή πακέτου.

Στο πρώτο στάδιο της διαδικασίας του εμπλουτισμού έλαβε χώρα ανάνηψη ενδεχομένως καταπονημένων κυττάρων του παθογόνου σε Buffered Peptone water (BPW) (Biolife Italiana S.r.l.) με στόχο στο επόμενο στάδιο να καταστεί δυνατή η ανάπτυξη και καλλιέργειά τους. Η συνήθης αναλογία βάρους δείγματος εξεταζόμενου τροφίμου προς τον όγκο του προεμπλουτιστικού υποστρώματος ήταν 25g προς 225ml, με εξαίρεση προϊόντα που λόγω

περιορισμένης διαθεσιμότητάς τους ζυγίζονταν σε μικρότερες ποσότητες (κρατώντας την αναλογία 1:10 στην αρχική αραίωση του δείγματος). Μετά από την ομογενοποίηση σε συσκευή Stomacher για 60 sec, τα δείγματα επώαστηκαν για 18 – 20 h στους 37°C. Στην συνέχεια, έλαβε χώρα ο εκλεκτικός εμπλουτισμός με τη χρήση εκλεκτικού υποστρώματος Rappaport-Vassiliadis Soya (RVS) broth (Biolife Italiana S.r.l.), όπου μεταφέρθηκαν 0,1 ml από το διάλυμα σε σωληνάκι με 10 ml RVS broth. Ακολούθησε ανάδευση και επώαση για 24 h στους 41,5°C. Στο τρίτο στάδιο, μετά την επώαση του RVS broth, μικρή ποσότητα εναιωρήματος επιστρώθηκε με αποστειρωμένο μικροβιολογικό κρίκο (streaking) και με τη μέθοδο της διασποράς σε εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα XLD agar. Τέλος, τα ενοφθαλμισμένα τρυβλία XLD agar επώαστηκαν στους 37°C για 24 h και παρατηρήθηκε και καταγράφηκε η απουσία/παρουσία τυπικών αποικιών *Salmonella* spp..

#### **2.1.2.2 *Staphylococcus aureus***

Από το σύνολο των αναλυθέντων προϊόντων (n=55), 48 προϊόντα γλυκαντικών υλών λιανικής πώλησης (λόγω περιορισμένης διαθεσιμότητας των υπολοίπων), εξετάστηκαν με τη διαδικασία του εμπλουτισμού για την παρουσία του παθογόνου *Staphylococcus aureus*. Τα προϊόντα αυτά ήταν τα 1-13, 15-26, 29, 32-51 και 54-55 (Πίνακας 2.1), αποτελούμενα από 17 προϊόντα σε κρυσταλλική μορφή, 11 προϊόντα σε μορφή σκόνης, 7 προϊόντα σε μορφή δισκίων, 8 προϊόντα σε μορφή πακέτων και 4 προϊόντα σε υγρή μορφή.

Ομοίως με παραπάνω, κατά το στάδιο του προεμπλουτισμού, έλαβε χώρα ανάνηψη των ενδεχομένων καταπονημένων κυττάρων του παθογόνου, εφόσον υπήρχαν, σε BPW, με στόχο στο επόμενο στάδιο του εμπλουτισμού να καταφέρουν να αναπτυχθούν και να καλλιεργηθούν. Η συνήθης αναλογία μάζας δείγματος εξεταζόμενου τροφίμου προς τον όγκο του προεμπλουτιστικού υποστρώματος ήταν 25g προς 225ml, με εξαίρεση προϊόντα που λόγω περιορισμένης διαθεσιμότητάς τους ζυγίζονταν σε μικρότερες ποσότητες (κρατώντας την αναλογία 1:10 στην αρχική αραίωση του δείγματος). Μετά από ομογενοποίηση σε συσκευή Stomacher για 60 sec, τα δείγματα επώαστηκαν για 18 – 20 h στους 37°C. Στην συνέχεια, λήφθηκε μικρή ποσότητα εναιωρήματος με αποστειρωμένο μικροβιολογικό κρίκο και επιστρώθηκε με τη μέθοδο της διασποράς σε εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα Baird Parker agar (Lab M Limited). Τέλος, τα ενοφθαλμισμένα τρυβλία Baird Parker επώαστηκαν στους 37°C για 24 h και παρατηρήθηκε και καταγράφηκε η απουσία/παρουσία τυπικών αποικιών *S. aureus*.

### **2.1.2.3 *Listeria monocytogenes***

Επιλεγμένα (n=16) προϊόντα γλυκαντικών υλών λιανικής πώλησης, ελέγχθηκαν επίσης με τη μέθοδο του εμπλουτισμού για την παρουσία/απουσία του παθογόνου *Listeria monocytogenes*. Τα επιλεγμένα αυτά προϊόντα ήταν τα 5, 11, 13, 14, 16, 17, 25, 29, 32, 33, 34, 35, 40, 41, 42, 44 (Πίνακας 2.1), αποτελούμενα από 4 προϊόντα σε κρυσταλλική μορφή, 4 προϊόντα σε μορφή δισκίων, 4 προϊόντα σε μορφή σκόνης, 3 προϊόντα σε υγρή μορφή και 1 προϊόν σε μορφή πακέτου.

Η ανίχνευση έγινε με δύο μεθόδους εμπλουτισμού. Στο πρώτο στάδιο της διαδικασίας που ακολουθήθηκε, το οποίο είναι κοινό, έλαβε χώρα ανάνηψη των ενδεχομένως καταπονημένων κυττάρων του παθογόνου, εφόσον υπήρχαν, σε διάλυμα ½ Fraser (Biolife Italiana S.r.l.) με στόχο τη μετέπειτα ανάπτυξη και καλλιέργειά τους. Ομοίως με παραπάνω, η συνήθης αναλογία μάζας δείγματος εξεταζόμενου τροφίμου προς τον όγκο του προεμπλουτιστικού υποστρώματος ήταν 25g προς 225ml, με εξαίρεση προϊόντα που λόγω περιορισμένης διαθεσιμότητάς τους ζυγίζονταν σε μικρότερες ποσότητες (κρατώντας την αναλογία 1:10 στην αρχική αραιώση του δείγματος). Μετά από ομογενοποίηση σε συσκευή Stomacher για 60 sec, τα δείγματα επώαστηκαν στους 30°C για 24 h. Στην συνέχεια, σύμφωνα με την πρώτη μέθοδο, επιστρώθηκαν τρυβλία Palcam (Biolife Italiana S.r.l.) και ALOA (Biolife Italiana S.r.l.) με μικροβιολογικό κρίκο με τη μέθοδο της διασποράς (streaking), τα τρυβλία επώαστηκαν στους 30°C και 37°C, αντίστοιχα, για 48 h, και τέλος, παρατηρήθηκε και καταγράφηκε η απουσία/ παρουσία τυπικών αποικιών *L. monocytogenes*. Κατά την δεύτερη μέθοδο, έλαβε χώρα, εν συνεχεία, εκλεκτικός εμπλουτισμός με τη χρήση υποστρώματος Fraser broth (Biolife Italiana S.r.l.), όπου μεταφέρθηκαν 0,1 ml από το διάλυμα σε σωληνάκι με 10 ml Fraser broth. Ακολούθησε ανάδευση και επώαση για στους 37°C για 48 h. Όπως και στην πρώτη μέθοδο, λήφθηκε μικρή ποσότητα κυττάρων με αποστειρωμένο μικροβιολογικό κρίκο και επιστρώθηκε με τη μέθοδο της διασποράς (streaking) σε τρυβλία Palcam agar και ALOA τα οποία επώαστηκαν στους 30°C και 37°C, αντίστοιχα, για 48 h, και τέλος, παρατηρήθηκε και καταγράφηκε η απουσία/ παρουσία τυπικών αποικιών του παθογόνου μικροοργανισμού.

### **2.1.3 Ταχεία δοκιμή συγκόλλησης ορρού σε τυπικές αποικίες *Staphylococcus aureus***

Η βιοχημική δοκιμή πηκτάσης/πρωτεΐνης Α εφαρμόστηκε στα προϊόντα εμπλουτισμού που αφορούσαν σε 12 προϊόντα γλυκαντικών υλών λιανικής πώλησης, τα προϊόντα 4, 5, 10, 11, 12, 13, 16, 17, 24, 35, 41 και 48 (Πίνακας 2.1). Οι πιθανές αποικίες *S. aureus* (αποικίες με τυπική

εμφάνιση αυτών του παθογόνου) (Εικόνα 2.1), αναπτύχθηκαν στο μη εκλεκτικό υπόστρωμα TSA (Εικόνα 2.2) (37°C, 48 h) και εν συνεχεία ελέγχθηκαν με τη δοκιμή Microscreen Staph (M43, Microgen Bioproducts Ltd, Camberley, UK) (Εικόνα 2.3).

Πιο συγκεκριμένα, η κάθε αποικία που δοκιμάστηκε, λήφθηκε από το τρυβλίο με αποστειρωμένο πλαστικό ραβδί και με κυκλικές κινήσεις διαλύθηκε σε μια σταγόνα αραιωτικού μέσου που έχει τοποθετηθεί στις ειδικές θέσεις της δοκιμής. Στην συνέχεια, προστέθηκε το αντιδραστήριο της βιοχημικής δοκιμής και αναμίχθηκε με τη βοήθεια του πλαστικού ραβδίου. Μετά από 1 – 2 min, αν η δοκιμασθείσα αποικία ήταν θετική στην πηκτάση/πρωτεΐνη Α, ήταν ορατή η δημιουργία συσσωματωμάτων και η συγκεκριμένη αποικία θεωρούνταν ως πιθανή αποικία *S. aureus* (Εικόνα 2.4).

Η συσσωμάτωση οφείλεται στο περιεχόμενο του αντιδραστηρίου, δηλαδή στα σωματίδια latex τα οποία είναι επικαλυμμένα με μία υδατοδιαλυτή γλυκοπρωτεΐνη πλάσματος (fibrinogen) στην οποία δεσμεύεται η κοαγκουλάση και με την ανοσογλοβουλίνη-IgG που ενώνεται με την πρωτεΐνη Α. Όταν ο ορρός αυτός αναμιχθεί με το εναίωρημα του *S. aureus*, γρήγορα συγκολλούνται και δημιουργείται ορατή σχηματιζόμενη συμπαγής μάζα (κροκκίδωση). Το φαινόμενο αυτό δεν παρατηρείται κατά την απουσία κοαγκουλάσης/πρωτεΐνης Α-θετικών σταφυλοκόκκων. Στην περίπτωση μη- κροκκίδωσης (απουσία ορατών συσσωματωμάτων), η επιλεγμένη δοκιμασθείσα αποικία δεν θεωρούνταν πιθανή αποικία του συγκεκριμένου παθογόνου.



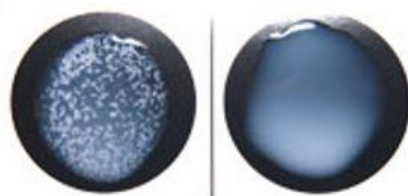
**Εικόνα 2.1:** Τυπικές αποικίες *S. aureus* σε θρεπτικό υπόστρωμα Baird Parker



**Εικόνα 2.2:** Τυπικές αποικίες *S. aureus* σε θρεπτικό υπόστρωμα TSA



**Εικόνα 2.3:** Αντιδραστήρια και εξοπλισμός της δοκιμής Microscreen Staph



**Εικόνα 2.4:** Θετικό και αρνητικό αποτέλεσμα ταχείας δοκιμής συγκόλλησης ορρού



## 2.2 Αξιολόγηση της βακτηριακής ανάπτυξης παρουσία γλυκαντικών υλών

### 2.2.1 Προσδιορισμός του μέγιστου ειδικού ρυθμού αύξησης ( $\mu_{max}$ ) με μετρήσεις οπτικής πυκνότητας (OD)

#### 2.2.1.1 Βακτηριακά στελέχη και παρασκευή εμβολίου

Στην παρούσα μελέτη εκτιμήθηκαν επιλεγμένα στελέχη των παθογόνων βακτηρίων *L. monocytogenes* (B-124, B-157, B-411) και *S. aureus* (B-134, B-135), τα οποία αποτελούν κυρίως απομονώσεις ανθρώπινης προέλευσης, καθώς και επιλεγμένα στελέχη του οξυγαλακτικού βακτηριακού είδους *Lactobacillus pentosus* (B-281, B-313 και B-329) με προβιοτικό χαρακτήρα τα οποία αποτελούν απομονώσεις από άλμη ελιών και σάρκα ζυμωμένων ελιών (Πίνακας 2.2). Τα παραπάνω επιλεγμένα στελέχη προήλθαν από την τράπεζα μικροοργανισμών του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών (EMBT, ΤΕΤΔΑ, ΓΠΑ, Αθήνα, Ελλάδα). Οι καλλιέργειες των στελεχών υπήρχαν σε απόθεμα (stock cultures) και ήταν αποθηκευμένες υπό κατάψυξη (-80 °C). Τα κύτταρα των παθογόνων και του οξυγαλακτικού βακτηρίου ανακτήθηκαν σε θρεπτικό ζωμό Tryptone Soy Broth (TSB, Lab M Limited) και de Man Rogosa and Sharpe (MRS) broth (Lab M Limited), αντίστοιχα (30°C για 24 h για *L. monocytogenes*/*Lb. pentosus* και 37°C για 24 h για *S. aureus*) και δημιουργήθηκαν καλλιέργειες εργασίας αυτών (working cultures) σε τρυβλία TSA και MRS agar (Lab M Limited), αντίστοιχα, οι οποίες ανανεώνονταν ανά δύο εβδομάδες.

Τα στελέχη των παθογόνων *L. monocytogenes* και *S. aureus*, ενεργοποιούνταν με μεταφορά μέσω μικροβιολογικού κρίκου μεμονωμένων αποικιών από τρυβλία TSA σε 10 ml TSB και επώζονταν στους 30°C και 37 °C, αντίστοιχα, για 24 h. Κατά την δεύτερη ανανέωση, 0,1 ml 24-h καλλιεργείων μεταφέρονταν σε 10 ml φρέσκου TSB και επώζονταν στις ίδιες για τον κάθε παθογόνο μικροοργανισμό συνθήκες. Στην συνέχεια, οι 24-h καλλιέργειες στελεχών κάθε μικροοργανισμού χρησιμοποιούνταν για την παρασκευή των εμβολίων. Αυτό συμβαίνει με ένωση των καλλιεργείων σε σωλήνα φυγοκέντρησης (falcon) των 50ml με βιδωτό πώμα και ανάδευση για 10 sec. Ύστερα, 1 ml από τον σωλήνα φυγοκέντρησης μεταφέρθηκε σε σωληνάκι με 9 ml Ringer και αναδεύτηκε για 10 sec. Από το τελευταίο σωληνάκι μεταφέρθηκε 1 ml σε επόμενο σωληνάκι με 9 ml Ringer που αποτέλεσε το εμβόλιο από το οποίο ελήφθησαν τα 20 ml που προστέθηκαν στο πρώτο βοθρίο όπως θα αναφερθεί στην επόμενη παράγραφο 2.2.1.2. Οι αρχικές συγκεντρώσεις των εμβολίων προσδιορίζονταν με επιφανειακή επίστρωση κατάλληλων δεκαδικών αραιώσεων σε

τρυβλία TSA μετά από επώαση αυτών στους 30°C για 48 και στους 37°C για 24 h για τα στελέχη *L. monocytogenes* και *S. aureus*, αντίστοιχα.

Τα στελέχη του οξυγαλακτικού βακτηρίου *Lb. pentosus* ενεργοποιούνται με τη μεταφορά μέσω μικροβιολογικού κρίκου μεμονωμένων αποικιών από τρυβλία MRS agar σε 10 ml ζυμού Brain Heart Infusion (BHI) broth (Lab M Limited) και επωάζονταν στους 30°C για 24 h. Κατά την δεύτερη ανανέωση, μεταφέρονταν 0,1 ml από τις 24-h καλλιέργειες σε 10 ml φρέσκου BHI broth και επωάζονταν στις ίδιες συνθήκες. Στη συνέχεια, οι 24-h καλλιέργειες των στελεχών χρησιμοποιούνταν για την παρασκευή του εμβολίου, ομοίως με τη *L. monocytogenes*/*S. aureus*, η αρχική συγκέντρωση του οποίου προσδιορίζονταν με επίστρωση κατάλληλων δεκαδικών αραιώσεων σε τρυβλία BHI agar (Lab M Limited) μετά από επώαση αυτών στους 30°C για 48 h.

**Πίνακας 2.2:** Βακτηριακά στελέχη τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία.

Στέλεχος	Περιγραφή	Προσδιορισμός	Απομόνωση	Συνθήκες ανάπτυξης
B-124	<i>Listeria monocytogenes</i> (Murray et al.) Pirie	NCTC 10527 [1071/53, LMG 21264, ATCC 13932]	Νωτιαίος μυελός παιδιού με μηνιγγίτιδα, Γερμανία	BHI, 37 °C
B-157	<i>Listeria monocytogenes</i> (Murray et al.) Pirie	23UD	Επεξεργασμένο τρόφιμο φυτικής παραγωγής	BHI agar/ BHI broth, 30 / 37°C
B-411	<i>Listeria monocytogenes</i>	H7550	Τροφική δηλητηρίαση από hot dog, 1998-1999	TSA/TSB, 37°C
B-134	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> Rosenbach	FDA 209 [ATCC 6538]	Ανθρώπινη πληγή	TSB, 37 °C
B-135	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> Rosenbach	NCBF 1499	-	Nutrient agar or nutrient broth, 37 °C
B-281	<i>Lactobacillus pentosus</i>	674	Ζύμωση μαύρης ελιάς, Ελλάδα	MRS medium, 30°C
B-313	<i>Lactobacillus pentosus</i>	E104	Άλμη από πράσινες και μαύρες ελιές	MRS medium, 30°C
B-329	<i>Lactobacillus pentosus</i>	E108	Εισαγωμενη άλμη από ελιές, Συρία	MRS medium, 30°C

### 2.2.1.2 Διαλύματα γλυκαντικών υλών και ανάπτυξη πειράματος

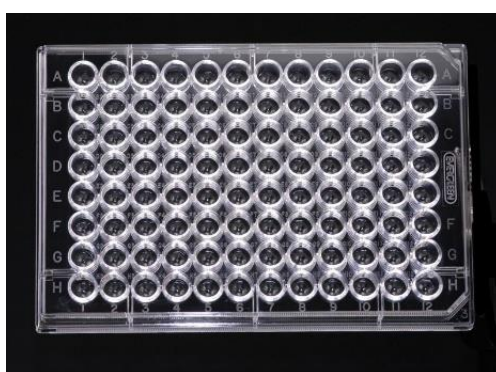
Στοχεύοντας στην αξιολόγηση της επίδρασης γλυκαντικών ουσιών στην κινητική αύξησης των *L. monocytogenes* και *S. aureus*, επιλέχθηκαν δύο από τα πιο ευρέως καταναλώσιμα γλυκαντικά: οι γλυκοζίτες στεβιόλης (Stevia, Reb A- 98%) και η ξυλιτόλη (Xylitol). Οι συγκεντρώσεις (w/v) των γλυκαντικών ουσιών που επιλέχθηκαν να αξιολογηθούν ήταν οι 0, 2,5, 5 και 10% (Εικόνα 2.5). Ο ζωμός ανάπτυξης που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή τη μελέτη ήταν TSB (με αρχικό pH  $7,3 \pm 0,2$ ). Επίσης, μετρήθηκαν οι τιμές του pH μέσω ψηφιακού μετρητή pH (Thermo Scientific Russell RL150, Corporation, Beverly, MA, USA) και της ενεργότητας νερού ( $a_w$ ) μέσω Aqualab μετρητή ενεργότητας νερού των μέσων ανάπτυξης μετά την αποστείρωση τους σε αυτόκαυστο (121 °C για 15min) για να εξασφαλιστεί ότι δεν είχαν μεταβληθεί σημαντικά μετά από την διαδικασία.

Επικεντρώνοντας το ενδιαφέρον στην έρευνα προς τις ελάχιστες απαιτήσεις ανάπτυξης αυτών των δύο παθογόνων, πέρα από το εύρος συγκεντρώσεων που μελετήθηκαν, αξιοποιήθηκε η μέθοδος των δεκαδικών αραιώσεων. Όπου, κάθε 24ωρη καλλιέργεια στελέχους που δοκιμάστηκε ήταν δεκαδικά αραιωμένη σε TSB, ανάλογα με το πείραμα ανάπτυξης που διεξήχθη, σε μία συγκέντρωση περίπου  $10^7$  cfu / ml. Στη συνέχεια, εμβόλιο των 20 μl από δύο διαδοχικά δεκαδικά αραιωμένες καλλιέργειες προστέθηκαν σε 180 μl TSB με τα εκάστοτε χαρακτηριστικά το οποίο είχε διανεμηθεί εντός βοθρίων (wells) πλάκας μικροτιτλοδότησης (microtiter plate) (Εικόνα 2.6). Με εξαίρεση την πρώτη αραιώση, οι υπόλοιπες αραιώσεις για κάθε καλλιέργεια επιτεύχθηκαν με μεταφορά 20 μl από το ένα βοθρίο στο επόμενο, ενώ 20 μl της πέμπτης αραιώσης απορρίφθηκαν ούτως ώστε όλα τα βοθρία να περιέχουν τον ίδιο όγκο καλλιέργειας, δηλαδή 180 μl. Με τον τρόπο αυτό, το εύρος της αρχικής βακτηριακής συγκέντρωσης που λήφθηκε για κάθε παθογόνο μικροοργανισμό στις πλάκες μικροτιτλοδότησης ήταν περίπου  $10^5$ - $10^7$  cfu/well. Οι πλάκες μικροτιτλοδότησης τοποθετήθηκαν στον αυτοματοποιημένο μετρητή οπτικής πυκνότητας Synergy HT (multi-mode microplate reader Synergy HT, Biotek®, Winooski, VT, USA) σε θερμοκρασία επώασης 30 °C. Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις της οπτικής πυκνότητας (OD) ανά τακτά χρονικά διαστήματα (15 min) στα 580 nm, για συνολικό χρονικό διάστημα επώασης 48 h, χρονικό διάστημα επαρκές ώστε να παρατηρηθεί μια σημαντική αλλαγή OD και για τις πέντε δεκαδικές αραιώσεις των καλλιεργειών. Για κάθε στέλεχος και σε κάθε συνθήκη ανάπτυξης (συγκέντρωση και είδος γλυκαντικού) πραγματοποιήθηκαν δύο ανεξάρτητα πειράματα, και δύο δείγματα (διπλά

βοθρία) για κάθε μία από τις πέντε διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις αναλύθηκαν σε κάθε πείραμα (n= 4).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0% (dil. 1)	0% (dil. 2)	0% (dil. 3)	0% (dil. 4)	0% (dil. 5)		0% (dil. 1)	0% (dil. 2)	0% (dil. 3)	0% (dil. 4)	0% (dil. 5)	
B	2,5% S (dil. 1)	2,5% S (dil. 2)	2,5% S (dil. 3)	2,5% S (dil. 4)	2,5% S (dil. 5)		2,5% S (dil. 1)	2,5% S (dil. 2)	2,5% S (dil. 3)	2,5% S (dil. 4)	2,5% S (dil. 5)	
C	5% S (dil. 1)	5% S (dil. 2)	5% S (dil. 3)	5% S (dil. 4)	5% S (dil. 5)		5% S (dil. 1)	5% S (dil. 2)	5% S (dil. 3)	5% S (dil. 4)	5% S (dil. 5)	
D	10% S (dil. 1)	10% S (dil. 2)	10% S (dil. 3)	10% S (dil. 4)	10% S (dil. 5)		10% S (dil. 1)	10% S (dil. 2)	10% S (dil. 3)	10% S (dil. 4)	10% S (dil. 5)	
E												
F	2,5% X (dil. 1)	2,5% X (dil. 2)	2,5% X (dil. 3)	2,5% X (dil. 4)	2,5% X (dil. 5)		2,5% X (dil. 1)	2,5% X (dil. 2)	2,5% X (dil. 3)	2,5% X (dil. 4)	2,5% X (dil. 5)	
G	5% X (dil. 1)	5% X (dil. 2)	5% X (dil. 3)	5% X (dil. 4)	5% X (dil. 5)		5% X (dil. 1)	5% X (dil. 2)	5% X (dil. 3)	5% X (dil. 4)	5% X (dil. 5)	
H	10% X (dil. 1)	10% X (dil. 2)	10% X (dil. 3)	10% X (dil. 4)	10% X (dil. 5)		10% X (dil. 1)	10% X (dil. 2)	10% X (dil. 3)	10% X (dil. 4)	10% X (dil. 5)	

**Εικόνα 2.5:** Πλανόγραμμα πλάκας μικροτιτλοδότησης (microtiter plate) με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις γλυκαντικών ουσιών. S: στέβια, X: ξυλιτόλη, dil: αραιώση.



**Εικόνα 2.6:** Πλάκα μικροτιτλοδότησης (microtiter plate)

Αναφορικά με την αξιολόγηση της επίδρασης γλυκαντικών ουσιών στην κινητική αύξησης του *Lb. pentosus*, χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιες σευγκεντρώσεις στέβιας και ξυλιτόλης καθώς και

οι ίδιες διαδικασίες οι οποίες περιγράφηκαν παραπάνω. Η μόνη διαφορά σε σχέση με τα όσα αναφέρονται προηγουμένως ήταν ο ζυμός ανάπτυξης που χρησιμοποιήθηκε και ο οποίος ήταν το BHI broth (με αρχικό pH  $7,4 \pm 0,2$ ).

### **2.2.1.3. Υπολογισμός $\mu_{max}$**

Ο μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης ( $\mu_{max}$ ) του κάθε στελέχους σε κάθε συνθήκη ανάπτυξης (είδος και συγκέντρωση γλυκαντικού) εκτιμήθηκε από τους χρόνους ανίχνευσης της μεταβολής της απορρόφησης (detection times, DTs) των διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων των καλλιιεργειών, όπως περιγράφεται από τους Dalgaard και Koutsoumanis (2001). Χρησιμοποιώντας την προσέγγιση των δεκαδικών αραιώσεων, η οποία έχει αποδειχθεί ότι παρέχει ακριβείς εκτιμήσεις των τιμών  $\mu_{max}$  (Dalgaard και Κουτσουμανής, 2001; Lindqvist, 2006), τα DTs (h) από τις πέντε διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις της καλλιέργειας του κάθε στελέχους σχεδιάστηκε έναντι του φυσικού λογαρίθμου της αρχικής βακτηριακής συγκέντρωσης (ln cfu / well), και οι τιμές  $\mu_{max}$  προσδιορίστηκαν με γραμμική παλινδρόμηση σύμφωνα με την ακόλουθη εξίσωση:

$$\ln(N_i) = k - \mu_{max} \cdot DT_i$$

όπου, το DT ορίζεται ως ο χρόνος που απαιτείται για μια ορισμένη αύξηση της απορρόφησης (οπτικής πυκνότητας).

## **2.2.2 Αξιολόγηση της αυξητικής συμπεριφοράς του παθογόνου *L. monocytogenes* μέσω κλασικών μικροβιολογικών μεθόδων (καμπύλη ανάπτυξης)**

### **2.2.2.1 Βακτηριακά στελέχη και παρασκευή εμβολίου**

Για την αξιολόγηση της αυξητικής συμπεριφοράς του παθογόνου *L. monocytogenes* επιλέχθηκαν να χρησιμοποιηθούν τρία στελέχη αυτού σε μίγμα: τα στελέχη B-124, B-157, B-και 411 (Πίνακας 2). Για την ανάκτηση των βακτηριακών στελεχών από κατεψυγμένες αποθεματικές καλλιέργειες ακολουθήθηκαν οι διαδικασίες που περιγράφηκαν και προηγουμένως. Καλλιέργειες 24-h του καθενός από τα τρία παραπάνω στελέχη σε θρεπτικό ζυμό BHI broth συνενώθηκαν σε αποστειρωμένο πλαστικό σωλήνα φυγοκέντρου με βιδωτό καπάκι και φυγοκεντρήθηκαν ( $5000 \times g$ , 10 min,  $4^\circ C$ ) δύο φορές. Στη συνέχεια, τα

φυγοκεντρημένα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε αλατούχο διάλυμα Ringer και, μετά από τις απαραίτητες δεκαδικές αραιώσεις, το μίγμα των τριών στελεχών του παθογόνου χρησιμοποιήθηκε για τον εμβολιασμό αποστειρωμένων ζυμών με διαφορετική συγκέντρωση σακχαρόζης ή στέβιας. Η αρχική συγκέντρωση των 24-h καλλιέργειών των στελεχών ήταν περίπου μικροοργανισμών υπολογίζεται περίπου  $10^9$  cfu/ml, ενώ το επίπεδο εμβολιασμού των ζυμών με τις διαφορετικές συγκεντρώσεις σακχάρων στο οποίο στοχεύσαμε ήταν κατά προσέγγιση  $10^2$  cfu/ml. Οι αρχικές συγκεντρώσεις των βακτηριακών καλλιέργειών αλλά και του αραιωμένου μίγματος των στελεχών προσδιορίστηκε με επιφανειακή επίστρωση τρυβλίων BHI agar και επώαση των τελευταίων στους  $30^{\circ}\text{C}$  για 48 h.

### **2.2.2.2 Διαλύματα γλυκαντικών υλών και ανάπτυξη πειράματος**

Η αυξητική συμπεριφορά της *L. monocytogenes* αξιολογήθηκε παρουσία γλυκοζιτών στεβιόλης (Stevia, Reb A- 98%) και συγκριτικά με την αντίστοιχη συμπεριφορά αύξησης παρουσία ίδιων συγκεντρώσεων σακχαρόζης. Πιο συγκεκριμένα, αξιολογήθηκε η αύξηση του παθογόνου σε θρεπτικό ζωμό BHI broth απουσία (0% w/v) η παρουσία (10% w/v) του καθενός από τα δύο παραπάνω σάκχαρα. Σημειώνεται ότι λόγω ενδεχόμενης κασάνωσης των ζυμών που περιείχαν 10% (w/v) σάκχαρο, επιλέχθηκε η προσθήκη του να γίνει μετά τη διαδικασία αποστείρωσης των υλικών, δηλαδή με συγχώνευση αποστειρωμένου πυκνού υδατικού διαλύματος σακχάρου (50% w/v) σε διάλυμα BHI broth που περιείχε 60% θρεπτικό υλικό BHI broth και 20% BHI broth με διπλάσια ποσότητα υλικού (double strength BHI broth). Ο συνολικός όγκος της κάθε μίας φιάλης Duran των διαλυμάτων εργασίας ήταν 100mL. Επίσης, μετρήθηκαν οι τιμές του pH και της  $a_w$  των μέσων ανάπτυξης μετά την αποστείρωση τους και την προσθήκη των διαλυμάτων των σακχάρων, ούτως ώστε να επιβεβαιωθεί ότι και οι δύο αυτές παράμετροι δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ των εξεταζόμενων μεταχειρίσεων.

Αφού προετοιμάστηκαν τα θρεπτικά υποστρώματα με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις σακχάρων, ακολούθησε ο εμβολιασμός τους με 500 μl από το μίγμα των τριών στελεχών του παθογόνου *L. monocytogenes*. Οι εμβολιασμένοι ζωμοί επώαστηκαν στους  $10^{\circ}\text{C}$  για 9 μέρες, δηλαδή μέχρι ο πληθυσμός να φτάσει τη στατική φάση ανάπτυξης. Αρχικά, λαμβάνονταν δείγμα προς ανάλυση ανά 4 h κατά την πρώτη ημέρα του πειράματος, με σκοπό να υπάρχει σαφής εικόνα της λανθάνουσας φάσης ανάπτυξης του μικροοργανισμού. Στη συνέχεια, οι δειγματοληψίες και οι μικροβιολογικές αναλύσεις πραγματοποιούνταν ανά 24 h, δεδομένου ότι μικροοργανισμός θα έχει φτάσει ήδη στην εκθετική φάση ανάπτυξης. Ταυτόχρονα με τις

μικροβιολογικές αναλύσεις, λάμβαναν χώρα και μετρήσεις pH. Οι μικροβιολογικές αναλύσεις γίνονται με την μέθοδο των διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων και την επιφανειακή επίστρωση 0,1 ml από την αντίστοιχη αραιώση σε τρυβλία Palcam agar, τα οποία επωάζονταν στους 30°C για 48 h. Τα μικροβιολογικά δεδομένα που λήφθηκαν με καταμέτρηση των σχηματιζόμενων αποικιών (cfu) στα τρυβλία, μετασχηματίστηκαν σε log cfu/ml.

### 2.2.2.3 Υπολογισμός $\mu_{\max}$ και $\lambda$ με πρωτογενή μοντέλο ανάπτυξης Baranyi και Roberts

Ένα από τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα πρωτογενή μοντέλα μικροβιακής ανάπτυξης είναι το μοντέλο Baranyi και Roberts (1994). Το μοντέλο αυτό είναι μηχανιστικό, σύμφωνα με το οποίο η φάση προσαρμογής του κυττάρου οφείλεται στην αναγκαιότητα σύνθεσης μιας ουσίας  $q(t)$  η οποία είναι κρίσιμη για την αύξηση του κυττάρου. Από τη στιγμή που τα κύτταρα προσαρμόστουν στο καινούργιο περιβάλλον αυξάνονται εκθετικά μέχρι να περιοριστεί η αύξησή τους λόγω περιορισμού π.χ. των θρεπτικών στοιχείων ή συγκέντρωση τοξικών προϊόντων μεταβολισμού. Η εξίσωση είναι η παρακάτω:

$$\frac{dN}{dt} = \mu_{\max} \cdot \frac{q(t)}{1+q(t)} \cdot \left(1 - \left(\frac{N(t)}{N_{\max}}\right)^m\right) \cdot N(t) \quad (1)$$

Όπου  $N(t)$  είναι ο αριθμός των κυττάρων σε χρόνο  $t$ ,  $N_{\max}$  η μέγιστη πυκνότητα των κυττάρων, η παράμετρος  $m$  χαρακτηρίζει την καμπυλότητα πριν τη στατική φάση και  $q(t)$  η συγκέντρωση του περιοριστικού παράγοντα που μεταβάλλεται με το χρόνο:

$$\frac{dq}{dt} = \mu_{\max} \cdot q(t) \quad (2)$$

Η αρχική τιμή του  $q$  ( $q_0$ ) είναι ένα μέτρο της αρχικής φυσιολογικής κατάστασης των κυττάρων. Μια πιο σταθερή μετατροπή του όρου  $q_0$  μπορεί να περιγραφεί από τη σχέση:

$$h_0 = \ln\left(1 + \frac{1}{q_0}\right) = \mu_{\max} \cdot \lambda \quad (3)$$

Όπου  $h_0$  είναι το έργο προσαρμογής (adaptation work) που θα πρέπει να καταβληθεί από το κύτταρο για να βγει από τη φάση προσαρμογής.

Μια άλλη εκδοχή που απορρέει από το μοντέλο του Baranyi είναι η εξής:

$$y(t) = y_0 + \mu_{max} A(t) - \frac{1}{m} \ln \left( 1 + \frac{e^{m\mu_{max} A(t)} - 1}{e^{m(y_{max} - y_0)}} \right) \quad (4)$$

Η παράμετρος  $m$  χαρακτηρίζει την καμπυλότητα πριν τη στατική φάση. Όταν  $m = 1$  τότε η συνάρτηση υποβιβάζεται σε λογιστική καμπύλη, μια απλοποίηση του μοντέλου που συχνά πραγματοποιείται.  $A(t)$  είναι παράμετρος καθυστέρησης (delay function) που δίνεται από τη σχέση:

$$A(t) = t + \frac{\ln(e^{-\mu_{max} t} + e^{-h_0} - e^{-\nu t - h_0})}{\mu_{max}}$$

Όπου η παράμετρος  $\nu$  χαρακτηρίζει τον ρυθμό αύξησης του κρίσιμου υποστρώματος (limiting substrate) που γενικά θεωρείται ίσο με το  $\mu_{max}$ .

Στην παρούσα διπλωματική εργασία το μοντέλο χρησιμοποιήθηκε μέσω ενός πρόσθετου προγράμματος του Excel, το DMfit, με σκοπό τον εύκολο υπολογισμό των κινητικών παραμέτρων ανάπτυξης του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes* σε διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης.



### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

#### 3.1 Μικροβιολογικές αναλύσεις εμπορικών προϊόντων γλυκαντικών υλών

##### 3.1.1 Καταμέτρηση μικροοργανισμών

Ο μικροβιακός προσδιορισμός των εμπορικών γλυκαντικών υλών υπό μελέτη πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της καταμέτρησης στο εκάστοτε εξειδικευμένο θρεπτικό υλικό ανάπτυξης. Τα τελικά αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα είναι εκφρασμένα σε log cfu/g δείγματος.

Ωστόσο, η καταμέτρηση μικροοργανισμών σε αποικίες (cfu) δεν ήταν δυνατή στα περισσότερα γλυκαντικά που μελετήθηκαν, εξαιτίας απουσίας ή αδυναμίας ανίχνευσης λόγω μικροβιακού φορτίου κάτω από το όριο ανίχνευσης (Limit of Detection, LOD). Όριο ανίχνευσης ορίζεται η ελάχιστη συγκέντρωση της προς μελέτη ουσίας που μπορεί να προσδιοριστεί σε ικανοποιητικό επίπεδο εμπιστοσύνης σε μια συγκεκριμένη μέθοδο. Στην παρούσα μελέτη ως όριο ανίχνευσης ορίστηκαν τα 10 ή 100 cfu/g δείγματος, ανάλογα με τον όγκο που λαμβάνονταν από την αποστειρωμένη σακούλα Stomacher στην οποία έγινε η δειγματοληψία και ομογενοποίηση, δηλαδή 1 ή 0,1mL, αντίστοιχα.

Στον Πίνακα 3.1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που αφορούν μόνο στα δείγματα στα οποία ήταν δυνατός ο προσδιορισμός του μικροβιακού τους φορτίου. Στην παρούσα μελέτη καταμετρήθηκαν η ολική μεσόφιλη χλωρίδα (O.M.X.) σε 24 δείγματα και οι πληθυσμοί *Staphylococcus* spp. σε 9 δείγματα. Συνεπώς, δεν καταμετρήθηκαν (δεν προσδιορίστηκαν σε ανιχνεύσιμα επίπεδα) σε κανένα από τα δείγματα υπό ανάλυση οι εξής κατηγορίες βακτηρίων: κολοβακτηρίδια (coliforms), Enterobacteriaceae, *Listeria* spp. και *Salmonella* spp..

**Πίνακας 3.1:** Αποτελέσματα μικροβιολογικών αναλύσεων των προϊόντων γλυκαντικών υλών

No δείγματος	Μικροβιολογικά αποτελέσματα (log cfu/g)	
	O.M.X. (PCA, 30°C/72h)	<i>Staphylococcus</i> spp. (B. Parker, 37°C/48h)
5	1,98	
9		1,48
13	2,00	2,08
15	2,00	
16	2,08	
17	1,95	
18	1,00	
19	2,00	
20	1,00	
21		1,48
23	1,00	1,48
25		1,78
28	1,30	
32	3,16	
35	1,00	
36	1,60	
37	1,30	
40	2,15	
41	2,11	1,60
42	2,79	
44	3,49	
45	1,85	1,00
46	1,48	1,00
47	2,11	
48	1,48	
50	1,30	
52	1,70	
55		1,00

Σύμφωνα με τα μικροβιολογικά αποτελέσματα της O.M.X., 10 δείγματα, εκ των οποίων 4 σε κρυσταλλική μορφή, 3 δισκία, 2 σε υγρή μορφή και 1 σε μορφή πακέτου, υπολογίστηκε ότι περιέχουν  $\geq 2,00$  log cfu/g ή log cfu/ml για τα υγρά, αντίστοιχα. Το προϊόν με το μεγαλύτερο μικροβιακό φορτίο (3,49 log cfu/g) ήταν το 44, ενώ τα προϊόντα 20, 23 και 45, είχαν τη μικρότερη O.M.X. (1,00 log cfu/g).

Η καταμέτρηση του *Staphylococcus* spp. σε Baird Parker έδειξε ότι το δείγμα 13 είχε 2,08 log cfu/g, τον μεγαλύτερο πληθυσμό που σημειώθηκε στο σύνολο των δειγμάτων. Από την άλλη πλευρά, τα δείγματα 45, 46, 55 είχαν το μικρότερο μικροβιακό πληθυσμό ίσο με 1,00 log cfu/g.

Υπογραμμίζεται ότι εκτός από τα εμπορικά προϊόντα γλυκαντικών υλών αναλύθηκαν πέντε επιπλέον προϊόντα κρυσταλλικής ζάχαρης με σκοπό να προσδιοριστεί το μικροβιακό φορτίο τους συγκριτικά με τις υπό μελέτη ουσίες. Τα αποτελέσματα ήταν αρνητικά, αφού δεν καταμετρήθηκαν σε κανένα από τα δείγματα ζάχαρης O.M.X, *Staphylococcus* spp., κολοβακτηρίδια, Enterobacteriaceae, *Listeria* spp. και *Salmonella* spp..

Το χαμηλό μικροβιακό φορτίο των προϊόντων που εξετάστηκαν οφείλεται στο βασικό φυσικοχημικό χαρακτηριστικό τους που είναι η πολύ χαμηλή ενεργότητα νερού ( $a_w$ ). Η  $a_w$  αποτελεί ένα φυσικό εμπόδιο για τα παραπάνω παθογόνα βακτήρια, αφού ακόμα και σε περίπτωση επιμόλυνσης από μη-τήρηση των κανόνων υγιεινής, δεν βρίσκονται σε κατάλληλο περιβάλλον για να αναπτυχθούν. Έτσι, οι γλυκαντικές ουσίες χαρακτηρίζονται ως προϊόντα με μακρά διάρκεια ζωής χωρίς κίνδυνο από μικροβιακή αλλοίωση, όταν έχουν παραχθεί και αποθηκευτεί σύμφωνα με τις ορθές βιομηχανικές πρακτικές και πρακτικές υγιεινής. Ωστόσο, αλλοίωση σε αυτά τα προϊόντα είναι πιθανό να συμβεί κατά την συντήρησή τους σε υψηλή σχετική υγρασία (RH).

Η έρευνα του Niroomand και των συνεργατών του απέδειξε ότι τα μικροβιακά παθογόνα σε υγρές γλυκαντικές ύλες δεν παρουσιάζουν κίνδυνο για τη δημόσια υγεία. Η μελέτη υποστηρίζει ότι τα δείγματα, ανάμεσα τους και η υγρή σακχαρόζη, εμβολιάστηκαν με *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* και κολοβακτηρίδια σε επίπεδο  $10^5$  cfu/g σε θερμοκρασία δωματίου, με αποτέλεσμα την μείωση του αριθμού των βακτηρίων κάτω από το όριο ανίχνευσης σε 3 έως 6 ημέρες. Ωστόσο, στην περίπτωση της σακχαρόζης υπογραμμίζεται ότι ο *S. aureus* επιβίωσε μέχρι 1 μήνα (Niroomand et al., 1998).

Επόμενη έρευνα απέδειξε ότι το μικροβιακό φορτίο (O.M.X.) των μπισκότων που περιείχαν 100% ξυλιτόλη ήταν ικανοποιητικά χαμηλότερο συγκριτικά με μπισκότα που περιείχαν 100% σακχαρόζη, με αποτέλεσμα την επιμήκυνση της διάρκειας ζωής των προϊόντων με ξυλιτόλη (Mushtaq et al., 2010).

Δυστυχώς, το ενδιαφέρον των ερευνητών σχετικά με αυτή την κατηγορία προσθέτων έχει στραφεί στους χημικούς κινδύνους στους οποίους ενδέχεται να εκτεθεί ο καταναλωτής κατά την αλόγιστη χρήση τους, θεωρώντας τα εμπορικά προϊόντα μικροβιακά ασφαλή για όλες τις κοινωνικές ομάδες του πληθυσμού. Επομένως, δεν έχει βρεθεί πληθώρα ερευνών που να αποδεικνύουν του λόγου το αληθές.

### 3.1.2 Ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών με εμπλουτισμό

#### 3.1.2.1 *Salmonella* spp.

Η ανίχνευση *Salmonella* spp. των εμπορικών γλυκαντικών υλών υπό μελέτη πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο του εμπλουτισμού (ISO 6579: 1993), όπως αναλύθηκε στην προηγούμενη ενότητα. Με βάση τα ληφθέντα αποτελέσματα, σε κανένα από τα 16 εξετασθέντα προϊόντα γλυκαντικών υλών δεν σημειώθηκε παρουσία *Salmonella* spp. (Πίνακας 3.2).

**Πίνακας 3.2:** Αποτελέσματα εμπλουτισμού για την ανίχνευση *Salmonella* spp.

A/A	Εμπλουτισμός <i>Salmonella</i> spp. [Παρουσία (+) ή Απουσία (-)]
5	-
11	-
13	-
14	-
16	-
17	-
25	-
29	-
32	-
33	-
34	-
35	-
40	-
41	-
42	-
44	-

#### 3.1.2.2 *Staphylococcus aureus*

Η ανίχνευση *S. aureus* των εμπορικών γλυκαντικών υλών υπό μελέτη πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο του εμπλουτισμού (ISO 6579: 1993), όπως αναλύθηκε στην προηγούμενη ενότητα. Σύμφωνα με τα ληφθέντα αποτελέσματα, από τα 48 προϊόντα γλυκαντικών υλών που αναλύθηκαν, η παρουσία του παθογόνου *S. aureus* ανιχνεύθηκε σε 12. Ειδικότερα, θετικά στον εμπλουτισμό προϊόντα ήταν τα 4, 5, 10, 11, 12, 13, 16, 17, 24, 35, 41 και 48 (Πίνακας 3.3).

**Πίνακας 3.3:** Αποτελέσματα εμπλουτισμού για την ανίχνευση *Staphylococcus aureus*

A/A	Εμπλουτισμός <i>S. aureus</i> [Παρουσία (+) ή Απουσία (-)]
1	-
2	-
3	-
4	+
5	+
6	-
7	-
8	
9	-
10	+
11	+
12	+
13	+
15	-
16	+
17	+
18	-
19	-
20	-
21	-
22	-
23	-
24	+
25	-
26	-
29	-
32	-
33	-
34	-
35	+
36	-
37	-
38	-
39	-
40	-
41	+
42	-
43	-
44	-
45	-
46	-
47	-
48	+
49	-
50	-
51	-
54	-
55	-

### 3.1.2.3 *Listeria monocytogenes*

Η ανίχνευση *L. monocytogenes* των εμπορικών γλυκαντικών υλών υπό μελέτη πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο του εμπλουτισμού (ISO 11290-1: 1996), όπως αναλύθηκε στην προηγούμενη ενότητα. Σύμφωνα με τα ληφθέντα αποτελέσματα (Πίνακας 3.4), σε κανένα από τα 16 εξετασθέντα προϊόντα γλυκαντικών υλών δεν ανιχνεύθηκε παρουσία του παθογόνου *L. monocytogenes*.

**Πίνακας 3.4:** Αποτελέσματα εμπλουτισμού για την ανίχνευση *Listeria monocytogenes*

A/A	Εμπλουτισμός <i>L. monocytogenes</i> (Palcam, A10a) [Παρουσία (+) ή Απουσία (-)]
5	-
11	-
13	-
14	-
16	-
17	-
25	-
29	-
32	-
33	-
34	-
35	-
40	-
41	-
42	-
44	-

### 3.1.2.4 Ταχεία δοκιμή συγκόλλησης ορρού σε τυπικές αποικίες *S. aureus*

Σε συνέχεια του εμπλουτισμού για ανίχνευση *S. aureus* των εμπορικών γλυκαντικών υλών, οι απομονώσεις από προϊόντα στα οποία ανιχνεύθηκε παρουσία τυπικών αποικιών *Staphylococcus aureus* (τυπικές αποικίες σε Baird Parker agar) εξετάστηκαν περαιτέρω μέσω επιβεβαιωτικής δοκιμής πηκτάσης-πρωτεΐνης Α. Σύμφωνα με τα ληφθέντα αποτελέσματα (Πίνακας 3.5), από τις απομονώσεις των 12 προϊόντων που ήταν θετικά στον εμπλουτισμό για την ανίχνευση του *S. aureus* μόλις οι απομονώσεις που αντιστοιχούσαν σε δυο προϊόντα (το 10

και το 41), είχαν θετική αντίδραση στη συγκεκριμένη βιοχημική δοκιμή και, ως εκ τούτου, θα μπορούσαν να θεωρηθούν ως εν δυνάμει απομονώσεις του παθογόνου *S. aureus*.

**Πίνακας 3.5:** Αποτελέσματα δοκιμής συγκόλλησης ορρού για τις απομονώσεις από προϊόντα γλυκαντικών υλών στα οποία ανιχνεύθηκε παρουσία τυπικών αποικιών *Staphylococcus aureus*

A/A	Δοκιμής πηκτάσης - πρωτεΐνης A [θετική (+) ή αρνητική (-)]
4	-
5	-
10	+
11	-
12	-
13	-
16	-
17	-
24	-
35	-
41	+
48	-

### 3.2 Αξιολόγηση της βακτηριακής ανάπτυξης παρουσία γλυκαντικών υλών

#### 3.2.1 Προσδιορισμός του μέγιστου ειδικού ρυθμού αύξησης ( $\mu_{max}$ ) με μετρήσεις οπτικής πυκνότητας (OD)

##### 3.2.1.1 *Listeria monocytogenes*

Στην παρούσα ερευνητική εργασία διεξήχθησαν δύο πειράματα σε κάθε συνθήκη ανάπτυξης και δύο δείγματα (διπλά βοθρία για κάθε πέντε διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις) για το μίγμα στελεχών *L. monocytogenes* που αναλύθηκε σε κάθε πείραμα (n= 4). Οι τιμές του μέγιστου ειδικού ρυθμού αύξησης ( $\mu_{max}$ ) που προσδιορίστηκαν σε κάθε συγκέντρωση της κάθε γλυκαντικής ουσίας παρουσιάζεται στο Γράφημα 3.1.

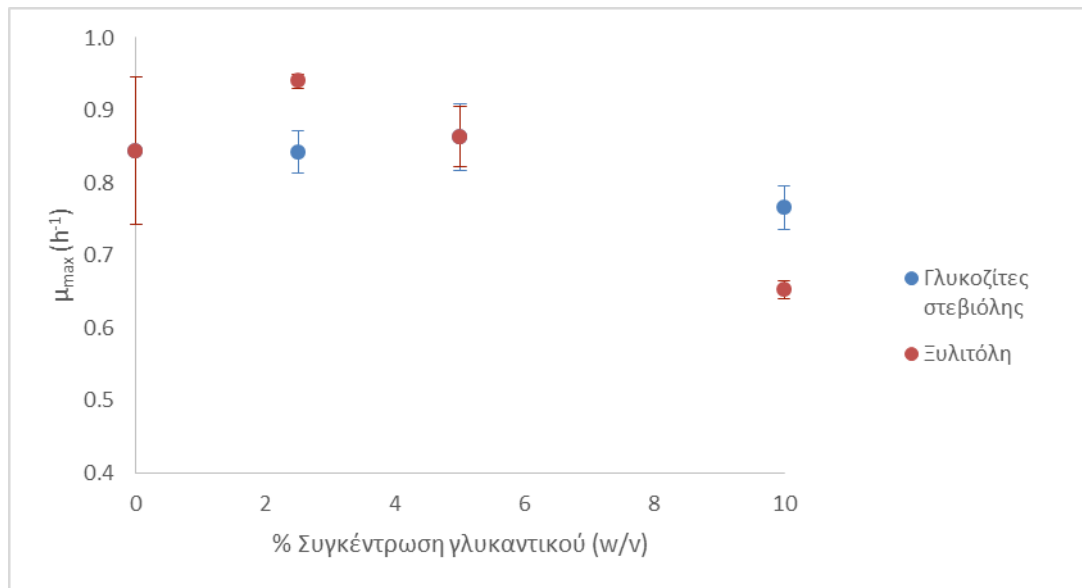
Πιο αναλυτικά, η μέση τιμή  $\mu_{max}$  του εμβολιασμένου ζωμού καλλιέργειας TSB απουσία γλυκοζιτών στεβιόλης υπολογίστηκε  $0,844 \pm 0,102 \text{ h}^{-1}$ . Σε θρεπτικό ζωμό με συγκέντρωση γλυκοζιτών στεβιόλης (*Stevia*, Reb A- 98%) 2,5% (w/v), η μέση τιμή  $\mu_{max}$  υπολογίστηκε  $0,842 \pm 0,029 \text{ h}^{-1}$ , σε συγκέντρωση 5% (w/v)  $0,863 \pm 0,046 \text{ h}^{-1}$  και σε συγκέντρωση 10% (w/v)  $0,766 \pm 0,031 \text{ h}^{-1}$ . Από την άλλη πλευρά, ο  $\mu_{max}$  του εμβολιασμένου ζωμού καλλιέργειας TSB με ξυλιτόλη

(Xylitol) σε συγκέντρωση 2,5% (w/v) υπολογίστηκε  $0,940 \pm 0,010 \text{ h}^{-1}$ , σε συγκέντρωση 5% (w/v)  $0,863 \pm 0,042 \text{ h}^{-1}$  και σε συγκέντρωση 10% (w/v)  $0,652 \pm 0,012 \text{ h}^{-1}$ .

Συμπερασματικά, οι γλυκοζίτες στεβιόλης φαίνεται να μην έχουν καμία αξιοσημείωτη επίδραση στον  $\mu_{\max}$  της *L. monocytogenes* σε συγκεντρώσεις 2,5% και 5% (w/v), και μόνο στην υψηλότερη συγκέντρωση που εξετάστηκε στην παρούσα μελέτη, αυτή του 10% (w/v), παρατηρήθηκε μείωση του  $\mu_{\max}$  σε σχέση με την ανάπτυξη του παθογόνου στο θρεπτικό ζωμό-μάρτυρα (απουσία γλυκοζιτών στεβιόλης). Από την άλλη πλευρά, η ξυλιτόλη φάνηκε να ευνοεί την ανάπτυξη του παθογόνου σε συγκέντρωση 2,5% (w/v) σε σύγκριση με την απουσία αυτής από το ζωμό καλλιέργειας (0% w/v), με διαφορά στη μέση τιμή του  $\mu_{\max}$  που ανέρχεται στο  $0,096 \text{ h}^{-1}$ . Παρόλα αυτά, παρόμοια φάνηκε να είναι η επίδραση της ξυλιτόλης με αυτή των γλυκοζιτών στεβιόλης στις άλλες δύο συγκεντρώσεις του γλυκαντικού που εξετάστηκαν: η ξυλιτόλη σε συγκέντρωση 5% (w/v) δεν είχε καμία επίδραση στον  $\mu_{\max}$  της *L. monocytogenes*. Αντίθετα, η συγκέντρωση 10% (w/v) οδήγησε σε σημαντική μείωση του μέσου  $\mu_{\max}$  σε σχέση με την ανάπτυξη στο θρεπτικό ζωμό-μάρτυρα (απουσία ξυλιτόλης), με διαφορά ίση με 0,192.

Συγκρίνοντας τις γλυκαντικές ουσίες μεταξύ τους, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι σε συγκέντρωση 2,5% (w/v) αυτών σε θρεπτικό ζωμό παρουσιάζεται μικρή διαφορά στη μέση τιμή  $\mu_{\max}$  της τάξης του 0,098. Ομοίως, σε συγκέντρωση 5% (w/v) οι γλυκαντικές ύλες δεν φαίνεται να διαφέρουν σε ότι αφορά στην επίδραση τους στον  $\mu_{\max}$  της *L. monocytogenes*, ενώ σε συγκέντρωση 10% (w/v) και οι δύο γλυκαντικές ύλες επέδειξαν αντιλισταεριακή δράση (μείωση στον  $\mu_{\max}$  σε σχέση με το θρεπτικό ζωμό-μάρτυρα), με τη δράση αυτή της ξυλιτόλης, ωστόσο, να διαφαίνεται μεγαλύτερη αυτή των γλυκοζιτών στεβιόλης (Γράφημα 3.1).





**Γράφημα 3.1:** Επίδραση γλυκαντικών ουσιών στο μέγιστο ειδικό ρυθμό αύξησης ( $\mu_{\max}$ ) του παθογόνου βακτηρίου *Listeria monocytogenes*.

Μετά από ανασκόπηση της βιβλιογραφίας, επιβεβαιώνεται η αντιλιστεριακή δράση της στέβιας, όπως αποδείχτηκε μέσω μέτρησης παραγωγής λιστεριοσίνης στη μελέτη του Sansano και των συνεργατών του. Σύμφωνα με τους ερευνητές, η δραστηριότητα του παθογόνου σχετίζεται άμεσα με τη συγκέντρωση του γλυκαντικού, τη θερμοκρασία επώασης και το χρόνο έκθεσης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι σε διάλυμα περιεκτικότητας 0% (w/v) γλυκοζιτών στεβιόλης το αιμολυτικό δυναμικό του βακτηρίου μειώθηκε σημαντικά από 100% στους 37 °C σε 8% στους 10 °C μετά από 65 ώρες επώασης. Επίσης, η αιμολυτική δραστηριότητα του βακτηρίου μειώθηκε έως και 100%, ανεξάρτητα τη θερμοκρασία, σε μέσο με 2,5% (w/v) γλυκοζιτών στεβιόλης. Ακόμα, ο χρόνος έκθεσης σε συγκέντρωση 2,5% (w/v) γλυκοζιτών στεβιόλης ήταν επίσης ένας σημαντικός παράγοντας που μείωσε την αιμολυτική ικανότητα της *L. monocytogenes* (Sansano et al., 2017).

Μια ακόμη έρευνα διερεύνησε την επίδραση της ξυλιτόλης, σε συγκέντρωση 2%, 4%, 6%, 8% και 10% σε TSB, στην ανάπτυξη των *Escherichia coli*, *Salmonella Enteritidis*, *Staphylococcus aureus* και *Listeria monocytogenes* στους 22 και 37 °C. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν, τα τέσσερα βακτήρια έδειξαν έντονη αναστολή ανάπτυξής τους παρουσία του γλυκαντικού στους 22 °C, με την παρατηρούμενη αναστολή να αυξάνεται γραμμικά με τη αυξανόμενη συγκέντρωση ξυλιτόλης. Παρόλα αυτά, δεν παρατηρήθηκε κάτι αντίστοιχο στους 37 °C (Szili et al., 2014).

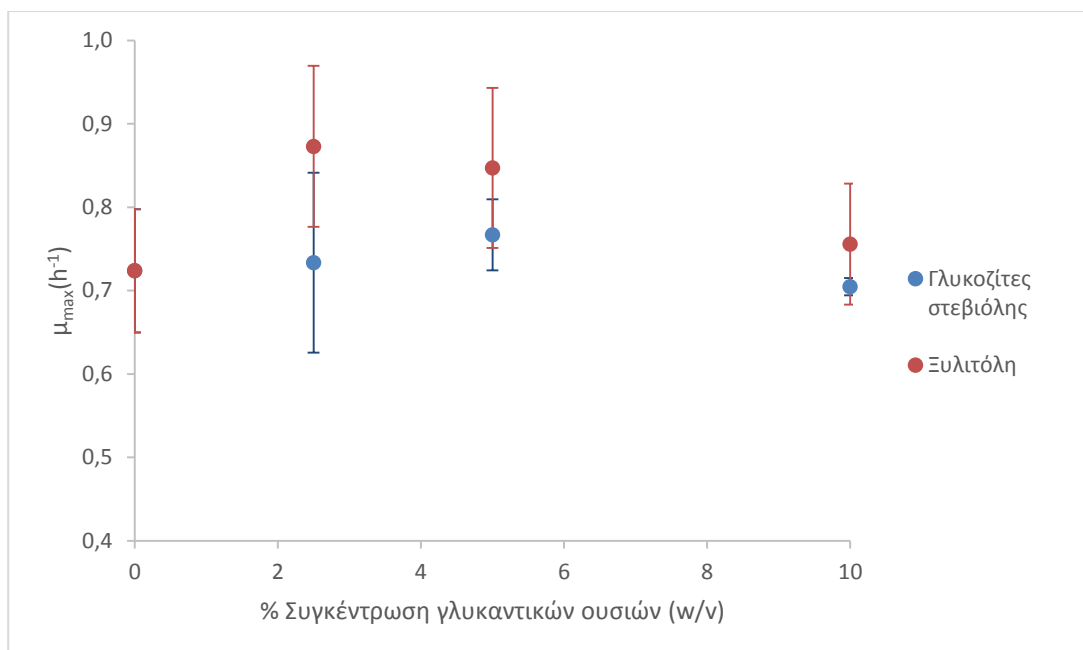
### 3.2.1.2 *Staphylococcus aureus*

Στην παρούσα ερευνητική εργασία διεξήχθησαν δύο πειράματα σε κάθε συνθήκη ανάπτυξης και δύο δείγματα (δηλ. διπλά βοθρία για κάθε πέντε διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις) για το μίγμα στελεχών *S. aureus* που αναλύθηκε σε κάθε πείραμα ( $n=4$ ). Οι τιμές του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης ( $\mu_{\max}$ ) που προσδιορίστηκαν σε κάθε συγκέντρωση της γλυκαντικής ουσίας παρουσιάζεται στο Γράφημα 3.2.

Πιο αναλυτικά, η μέση τιμή  $\mu_{\max}$  του εμβολιασμένου ζυμού καλλιέργειας TSB απουσία γλυκοζιτών στεβιόλης υπολογίστηκε  $0,724 \pm 0,074 \text{ h}^{-1}$ . Αντίστοιχα, σε θρεπτικό ζυμό με συγκέντρωση γλυκοζιτών στεβιόλης (*Stevia*, Reb A- 98%) 2,5% (w/v) η μέση τιμή  $\mu_{\max}$  υπολογίστηκε  $0,734 \pm 0,108 \text{ h}^{-1}$ , σε συγκέντρωση 5% (w/v)  $0,767 \pm 0,043 \text{ h}^{-1}$  και σε συγκέντρωση 10% (w/v)  $0,705 \pm 0,010 \text{ h}^{-1}$ . Από την άλλη πλευρά, η μέση τιμή  $\mu_{\max}$  του εμβολιασμένου ζυμού καλλιέργειας TSB με ξυλιτόλη (*Xylitol*) σε συγκέντρωση 2,5% (w/v) υπολογίστηκε  $0,873 \pm 0,097 \text{ h}^{-1}$ , σε συγκέντρωση 5% (w/v) μετρήθηκε  $0,847 \pm 0,096 \text{ h}^{-1}$  και σε 10% (w/v)  $0,756 \pm 0,073 \text{ h}^{-1}$ .

Συμπερασματικά, οι γλυκοζίτες στεβιόλης φαίνεται να μην έχουν καμία αξιοσημείωτη επίδραση στο  $\mu_{\max}$  του *S. aureus* σε συγκέντρωση 2,5% (w/v), 5% (w/v) και 10% (w/v), συγκριτικά με την ανάπτυξη του παθογόνου στο θρεπτικό ζυμό-μάρτυρα (απουσία γλυκοζιτών στεβιόλης). Από την άλλη πλευρά, η ξυλιτόλη φάνηκε να επιδρά θετικά στη μέση τιμή του  $\mu_{\max}$  σε συγκέντρωση 2,5% (w/v) και 5% (w/v) σε σύγκριση με ζυμό καλλιέργειας απουσίας γλυκαντικής ύλης, με διαφορά που ανέρχεται στο 0,149 και 0,123, αντίστοιχα.

Συγκρίνοντας τις γλυκαντικές ουσίες μεταξύ τους καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι παρουσιάζεται διαφορά στην μέση τιμή  $\mu_{\max}$  της τάξης του 0,139 σε συγκέντρωση 2,5% (w/v) αυτών σε θρεπτικό ζυμό εργασίας. Στην εν λόγω συγκέντρωση, η ξυλιτόλη φαίνεται πως υπερέιχε των γλυκοζιτών στεβιόλης, καθώς αύξησε τον  $\mu_{\max}$  του παθογόνου μικροοργανισμού. Επίσης, η ξυλιτόλη σε συγκέντρωση 5% (w/v) και 10% (w/v) αυξάνει τη μέση τιμή του  $\mu_{\max}$  του υπό μελέτη μικροοργανισμού κατά 0,080 και 0,051, αντίστοιχα, σε σχέση με τους γλυκοζίτες στεβιόλης (Γράφημα 3.2).



**Γράφημα 3.2:** Επίδραση γλυκαντικών ουσιών στο μέγιστο ειδικό ρυθμό αύξησης ( $\mu_{\max}$ ) του παθογόνου βακτηρίου *Staphylococcus aureus*.

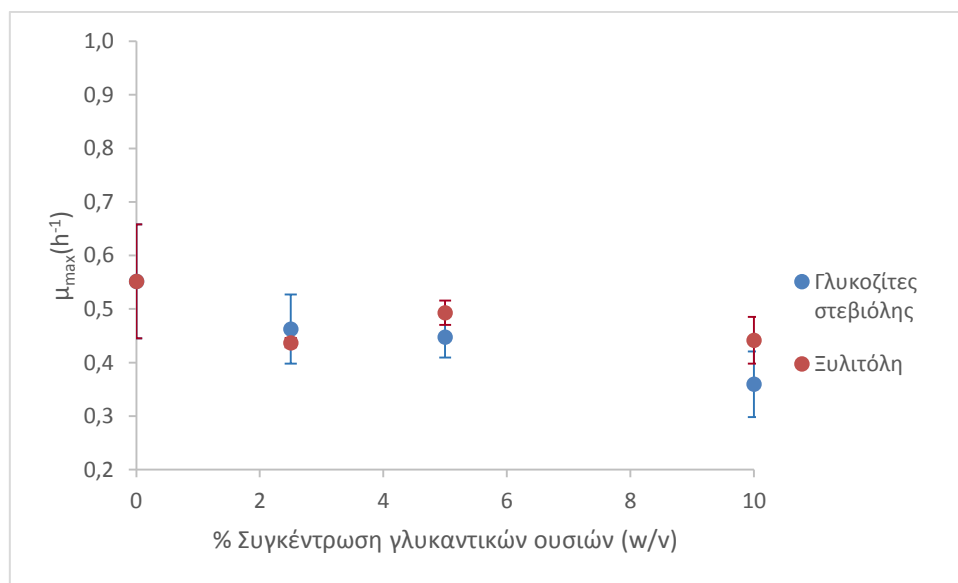
### 3.2.1.3 *Lactobacillus pentosus*

Στην παρούσα ερευνητική εργασία διεξήχθησαν δύο πειράματα σε κάθε συνθήκη ανάπτυξης και δύο δείγματα (δηλ. διπλά βοθρία για κάθε πέντε διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις) για το μίγμα στελεχών *Lactobacillus pentosus* που αναλύθηκε σε κάθε πείραμα ( $n=4$ ). Οι τιμές του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης ( $\mu_{\max}$ ) που προσδιορίστηκαν σε κάθε συγκέντρωση της κάθε γλυκαντικής ουσίας παρουσιάζεται στο Γράφημα 3.3.

Πιο αναλυτικά, η μέση τιμή  $\mu_{\max}$  του εμβολιασμένου ζυμού καλλιέργειας TSB απουσία γλυκοζιτών στεβιόλης υπολογίστηκε  $0,552 \pm 0,106 \text{ h}^{-1}$ . Σε θρεπτικό ζυμό με συγκέντρωση γλυκοζιτών στεβιόλης (Stevia, Reb A- 98%) 2,5% (w/v), η μέση τιμή  $\mu_{\max}$  υπολογίστηκε  $0,462 \pm 0,065 \text{ h}^{-1}$ , σε συγκέντρωση 5% (w/v) γλυκοζιτών στεβιόλης υπολογίστηκε  $0,448 \pm 0,038 \text{ h}^{-1}$  και σε συγκέντρωση 10% (w/v)  $0,360 \pm 0,061 \text{ h}^{-1}$ . Από την άλλη πλευρά, ο  $\mu_{\max}$  του εμβολιασμένου ζυμού καλλιέργειας TSB με ξυλιτόλη (Xylitol) σε συγκέντρωση 2,5% (w/v) υπολογίστηκε  $0,437 \pm 0,009 \text{ h}^{-1}$ , σε συγκέντρωση 5% (w/v)  $0,493 \pm 0,023 \text{ h}^{-1}$  και σε συγκέντρωση 10% (w/v)  $0,442 \pm 0,043 \text{ h}^{-1}$ .

Συμπερασματικά, οι γλυκοζίτες στεβιόλης φαίνεται να προκάλεσαν μικρή μείωση, χωρίς να θεωρείται σημαντική, στη μέση τιμή  $\mu_{\max}$  του *Lb pentosus* συγκριτικά με ζυμό καλλιέργειας

στον οποίο απουσίασαν οι γλυκοζίτες στεβιόλης σε συγκέντρωση 2,5, 5 και 10% (w/v), δηλαδή διαφορά ίση με 0,089, 0,104 και 0,192 h<sup>-1</sup>, αντίστοιχα. Ίδιας σημαντικότητας μείωση σημειώθηκε και από πλευράς ξυλιτόλης σε συγκέντρωση 2,5, 5 και 10% (w/v) συγκριτικά με την ανάπτυξη στο θρεπτικό ζωμό-μάρτυρα (απουσία ξυλιτόλης), με διαφορά 0,115, 0,059 και 0,110, αντίστοιχα. Επομένως, καταλήγουμε ότι τα δυο γλυκαντικά δεν επηρεάζουν σημαντικά την επίδραση στον ρυθμό ανάπτυξης του *Lb pentosus*, καθώς οι όποιες διαφορές εντοπίζονται στη μέση τιμή  $\mu_{max}$  των δύο γλυκαντικών σε όλες τις συγκεντρώσεις δεν θεωρούνται αξιόλογες (Γράφημα 3.3).



**Γράφημα 3.3:** Επίδραση γλυκαντικών ουσιών στο μέγιστο ειδικό ρυθμό αύξησης ( $\mu_{max}$ ) του προβιοτικού βακτηρίου *Lactobacillus pentosus*.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, μελέτη ανάπτυξης στελεχών *Lactobacillus reuteri* απέδειξε την αναστολή του βακτηρίου παρουσία γλυκοζιτών στεβιόλης (Denina I. et al., 2013). Επίσης, αντίστοιχα αποτελέσματα είχε η έρευνα της Kunová και των συνεργατών της, που απέδειξε ότι η πλειονότητα των προβιοτικών στελεχών bifidobacteria και lactobacilli που μελετήθηκαν παρουσία γλυκοζιτών στεβιόλης αναπτύχθηκαν λιγότερο σε σύγκριση με τον ζωμό μάρτυρα (Kunová et al., 2014). Δυστυχώς, τα αποτελέσματα δεν ήταν τα επιθυμητά, ωστόσο κρίνεται απαραίτητο να συνεχιστούν οι έρευνες για την επίδραση των γλυκοζιτών στεβιόλης στην ανάπτυξη των προβιοτικών βακτηρίων καθώς τα δεδομένα είναι ανεπαρκή.

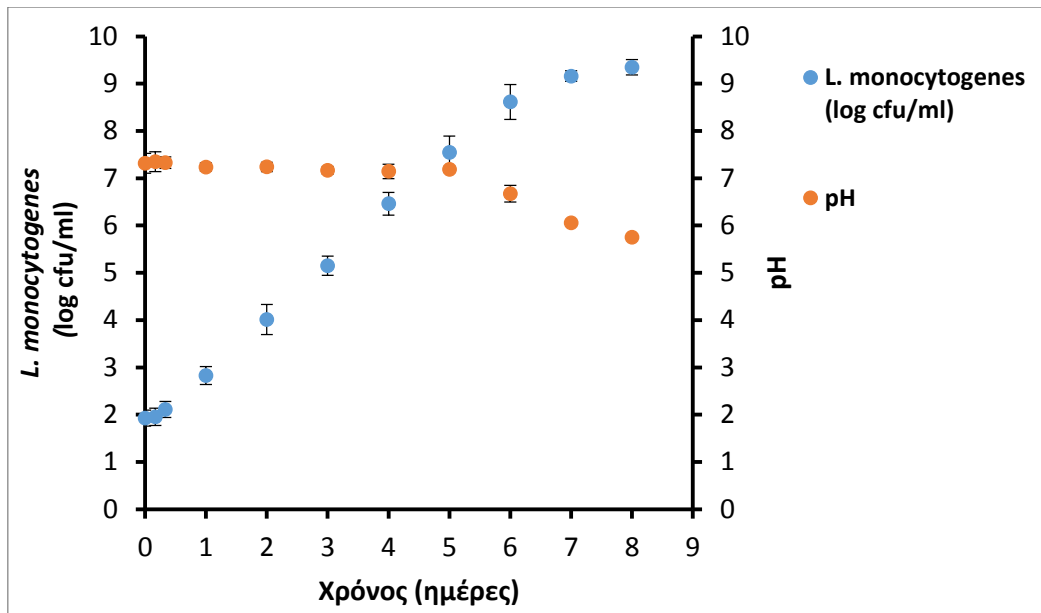
### 3.2.2 Αξιολόγηση της αυξητικής συμπεριφοράς του παθογόνου *L. monocytogenes* παρουσία γλυκοζιτών στεβιόλης μέσω κλασικών μικροβιολογικών μεθόδων (καμπύλη ανάπτυξης)

Η επίδραση των γλυκοζιτών στεβιόλης και της σακχαρόζης στην ανάπτυξη της *L. monocytogenes* εξετάστηκε μέσω καμπύλων ανάπτυξης του μικροοργανισμού σε θρεπτικό ζωμό (i) παρουσία 10% (w/v) γλυτοζίτες στεβιόλης, (ii) παρουσία 10% (w/v) σακχαρόζης και (iii) απουσία των γλυκαντικών αυτών, κατά τη διάρκεια επώασης στους 10 °C. Παράλληλα με τον πληθυσμό του μικροοργανισμού (log cfu/ml) ο οποίος προσδιορίζονταν ανά τακτά χρονικά διαστήματα κατά τη διάρκεια της επώασης, σε κάθε συνθήκη ανάπτυξης λάμβαναν χώρα και μετρήσεις του pH του ζωμού καλλιέργειας. Τόσο οι μεταβολές σε επίπεδο μικροβιακού πληθυσμού όσο και σε επίπεδο τιμών pH παρουσιάζονται στα Γραφήματα 3.4-3.6.

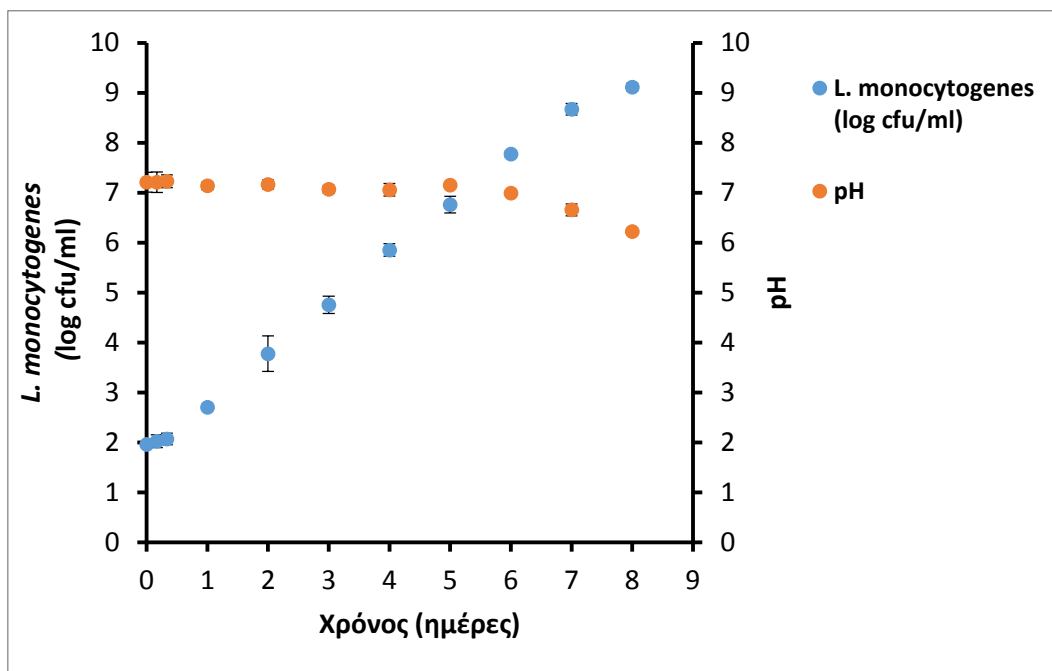
Σε θρεπτικό ζωμό χωρίς γλυκαντικές ύλες το παθογόνο *L. monocytogenes* είχε αρχικό πληθυσμό ( $N_0$ )  $1,927 \pm 0,168$  log cfu/ml, ενώ ο μέγιστος πληθυσμός ( $N_{max}$ ) ήταν  $9,347 \pm 0,163$  (192h). Παρατηρώντας παράλληλα το pH, σημειώνεται ότι η πρώτη μέτρηση (0h) ήταν  $7,32 \pm 0,21$  με μικρές αποκλίσεις μέχρι τις 120h. Από τις 144h, όπου ο πληθυσμός είχε φτάσει τους  $8,614 \pm 0,369$  log cfu/ml, το pH μειώθηκε στο  $6,67 \pm 0,18$ . Η χαμηλότερη τιμή pH που καταγράφηκε ήταν  $5,75 \pm 0,04$  στις 192h (Γράφημα 3.4).

Παρατηρώντας την καμπύλη ανάπτυξης του μικροοργανισμού παρουσία 10% (w/v) γλυκοζιτών στεβιόλης δείχνει ότι ο  $N_0$  που μετρήθηκε ήταν  $1,960 \pm 0,052$  log cfu/ml, ενώ ο  $N_{max}$  ήταν  $9,115 \pm 0,074$  (192h). Παρατηρώντας παράλληλα το pH, σημειώνεται ότι η πρώτη μέτρηση (0h) ήταν  $7,21 \pm 0,20$  με μικρές αποκλίσεις μέχρι τις 144h. Η μέτρηση των 168h έδειξε μείωση στο  $6,66 \pm 0,12$ , ενώ παράλληλα ο πληθυσμός είχε φτάσει στους  $8,673 \pm 0,116$  log cfu/ml. Η χαμηλότερη τιμή pH που καταγράφηκε ήταν  $6,22 \pm 0,04$  στις 192h (Γράφημα 3.5).

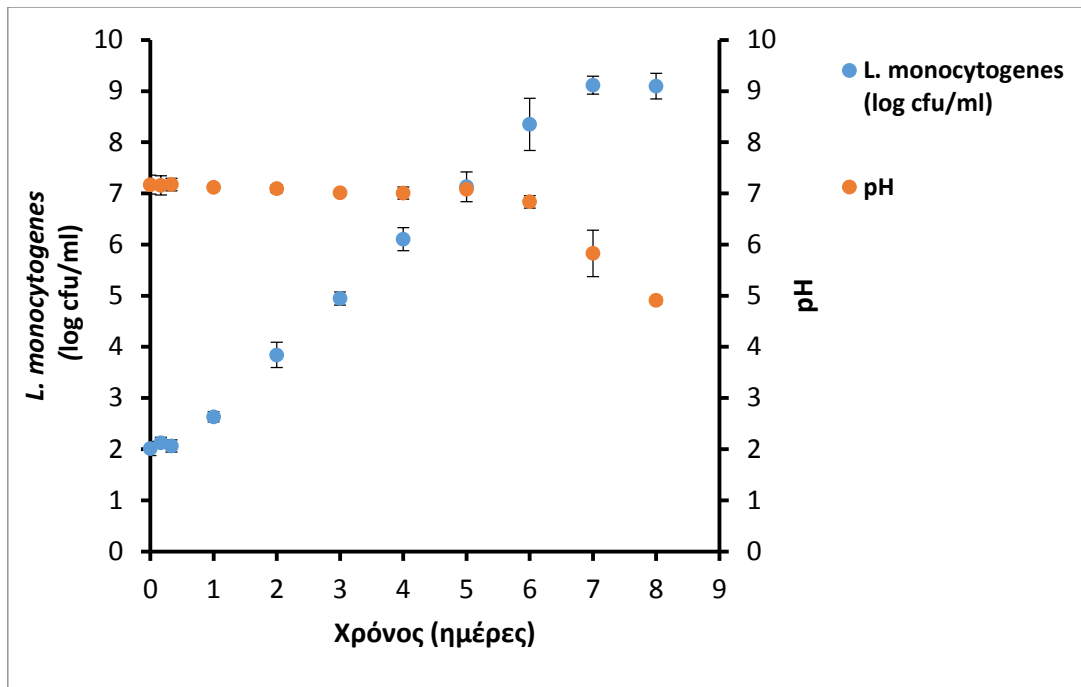
Στο θρεπτικό ζωμό καλλιέργειας με 10% (w/v) σακχαρόζη, ο  $N_0$  που μετρήθηκε ήταν  $2,015 \pm 0,137$  log cfu/ml, ενώ ο  $N_{max}$  ήταν  $9,116 \pm 0,174$  (168h). Παρατηρώντας παράλληλα το pH, σημειώνεται ότι η πρώτη μέτρηση (0h) ήταν  $7,17 \pm 0,18$  με μικρές αποκλίσεις μέχρι τις 120h. Μετά τις 120h που ο πληθυσμός είχε φτάσει  $8,350 \pm 0,511$  log cfu/ml, το pH μειώθηκε στο  $6,84 \pm 0,12$ , ενώ η χαμηλότερη τιμή αυτού καταγράφηκε στις 192h και ήταν  $4,91 \pm 0,07$  (Γράφημα 3.6).



**Γράφημα 3.4:** Καμπύλη ανάπτυξης του παθογόνου *Listeria monocytogenes* σε θρεπτικό ζωμό απουσία γλυκαντικών υλών στους 10°C και τιμές pH του ζωμού κατά τη διάρκεια της επώασης.

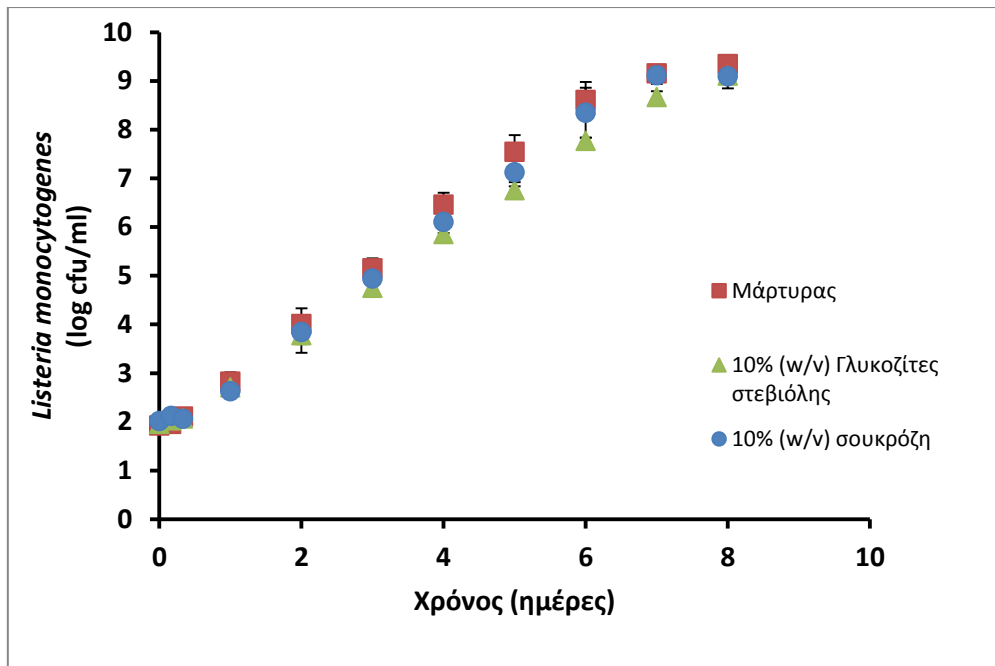


**Γράφημα 3.5:** Καμπύλη ανάπτυξης του παθογόνου *Listeria monocytogenes* σε θρεπτικό ζωμό με 10% (w/v) γλυκοζίτες σεβιόλης στους 10°C, και τιμές pH του ζωμού κατά τη διάρκεια της επώασης.



**Γράφημα 3.6:** Καμπύλη ανάπτυξης του παθογόνου *Listeria monocytogenes* σε θρεπτικό ζωμό με 10% (w/v) σακχαρόζη στους 10°C, και τιμές pH του ζωμού κατά τη διάρκεια της επώασης.

Ακόμη, κρίθηκε αναγκαίο να παρουσιαστεί το σύνολο των αποτελεσμάτων σε ένα Γράφημα (Γράφημα 3.7), ώστε να γίνουν κατανοητές οι όποιες διαφορές μεταξύ των χειρισμών. Όπως, λοιπόν, αποτυπώνεται γραφικά η κλίση της ευθείας είναι μικρότερη όταν ο παθογόνος μικροοργανισμός αναπτύσσεται σε ζωμό καλλιέργειας 10% (w/v) γλυκοζιτών στεβιόλης. Παρατηρείται ότι την αμέσως μεγαλύτερη κλίση έχει ο ζωμός 10% (w/v) σακχαρόζης και ακολουθεί ο ζωμός-μάρτυρας με τον μέγιστο ρυθμό ανάπτυξης.



**Γράφημα 3.7:** Καμπύλη ανάπτυξης *L. monocytogenes* στις διάφορες συνθήκες ανάπτυξης σε σχέση με τον χρόνο (h).

Στη συνέχεια, το πρωτογενές μοντέλο των Baranyi και Roberts (1994) προσαρμόστηκε στα μικροβιολογικά δεδομένα για τον προσδιορισμό των κινητικών παραμέτρων αύξησης: τη φάση προσαρμογής ( $\lambda$ ) και το μέγιστο ειδικό ρυθμό αύξησης ( $\mu_{max}$ ) (Πίνακες 3.6-3.8). Επιπλέον, παρουσιάζονται ενδεικτικά προσαρμογές του παραπάνω πρωτογενούς μοντέλου για κάθε περίπτωση θρεπτικού ζωμού ζωμού (Γράφηματα 3.8-3.10).

**Πίνακας 3.6:** Κινητικές παράμετροι σε ζωμό καλλιέργειας απουσία γλυκαντικών μέσω προσαρμογής του μοντέλου Baranyi και Roberts στα μικροβιολογικά δεδομένα.

Ζωμός καλλιέργειας	Μάρτυρας				Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση
	A	B	Γ	Δ		
$\mu_{max} (h^{-1})$	0,048	0,049	0,052	0,055	<b>0,051</b>	<b>0,003</b>
$\lambda (h)$		6,081	5,623	11,137	<b>7,614</b>	<b>3,060</b>
$N_0$	1,563	1,773	1,977	2,043	<b>1,839</b>	<b>0,217</b>
$N_{max}$	9,845	9,372	9,376	9,326	<b>9,480</b>	<b>0,245</b>
$R^2$	0,998	0,999	0,999	0,999	<b>0,999</b>	<b>0,001</b>
Standar error (fit)	0,120	0,092	0,082	0,110	<b>0,101</b>	<b>0,017</b>

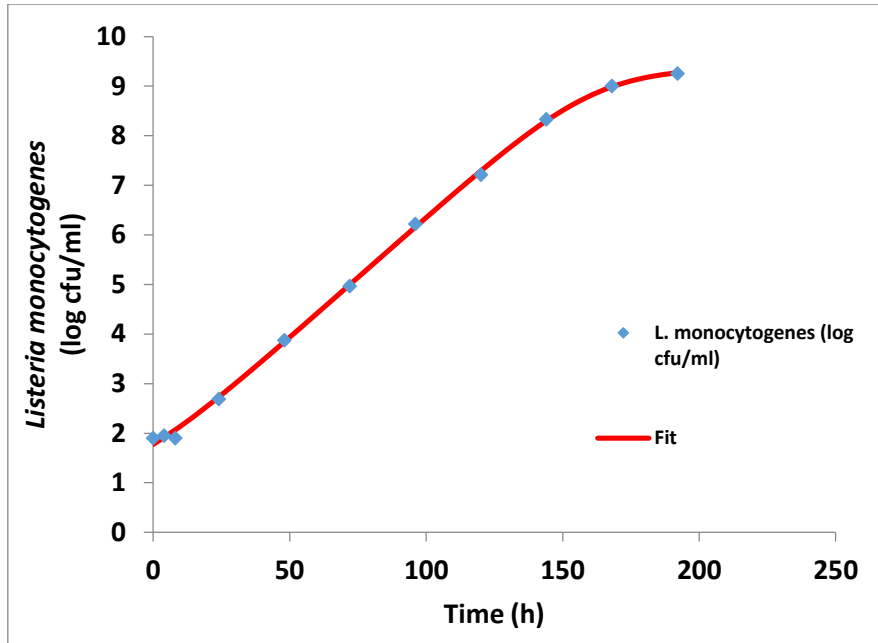


**Πίνακας 3.7:** Κινητικές παράμετροι σε ζυμό καλλιέργειας 10% (w/v) γλυκοζιτών στεβιόλης μέσω προσαρμογής του μοντέλου Baranyi και Roberts στα μικροβιολογικά δεδομένα.

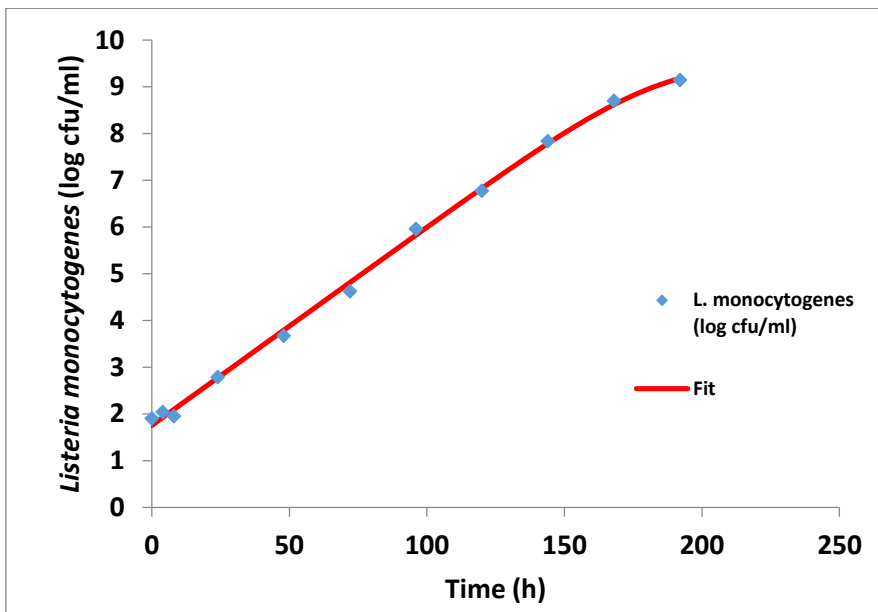
Ζυμός καλλιέργειας		10% (w/v) Γλυκοζίτες στεβιόλης					
Δείγμα	A	B	Γ	Δ	Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση	
$\mu_{max} (h^{-1})$	0,042	0,042	0,042	0,041	<b>0,042</b>	<b>0,000</b>	
$\lambda (h)$							
$N_o$	1,755	1,687	1,927	1,856	<b>1,806</b>	<b>0,106</b>	
$N_{max}$	9,579	9,491	9,632	9,585	<b>9,572</b>	<b>0,059</b>	
$R^2$	0,999	0,995	0,997	0,997	<b>0,997</b>	<b>0,001</b>	
Standar error (fit)	0,131	0,193	0,140	0,138	<b>0,151</b>	<b>0,026</b>	

**Πίνακας 3.8:** Κινητικές παράμετροι σε ζυμό καλλιέργειας 10% (w/v) σακχαρόζης μέσω προσαρμογής του μοντέλου Baranyi και Roberts στα μικροβιολογικά δεδομένα.

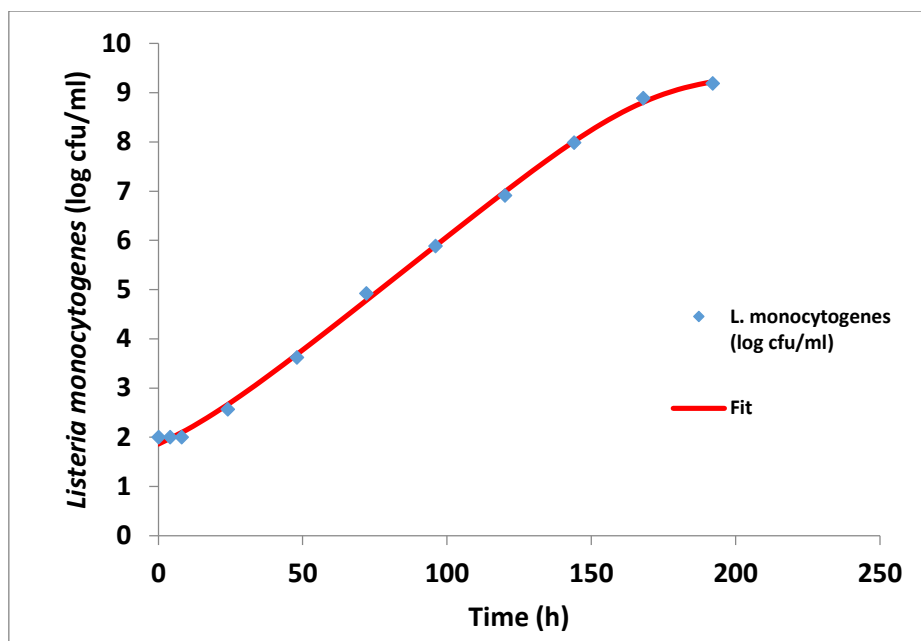
Ζυμός καλλιέργειας		10% (w/v) Σακχαρόζη					
Δείγμα	A	B	Γ	Δ	Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση	
$\mu_{max} (h^{-1})$	0,047	0,047	0,051	0,048	<b>0,048</b>	<b>0,002</b>	
$\lambda (h)$	13,483	9,783	10,651		<b>11,306</b>	<b>1,935</b>	
$N_o$	1,935	1,862	1,956	1,807	<b>1,890</b>	<b>0,068</b>	
$N_{max}$	9,555	9,406	9,400	9,153	<b>9,378</b>	<b>0,166</b>	
$R^2$	0,998	0,999	0,997	0,986	<b>0,995</b>	<b>0,006</b>	
Standar error (fit)	0,133	0,104	0,147	0,343	<b>0,182</b>	<b>0,109</b>	



**Γράφημα 3.8:** Προσαρμογή του μοντέλου Baranyi και Roberts (γραμμή) στα μικροβιολογικά δεδομένα (σημεία) σε θρεπτικό ζωμό απουσία γλυκαντικών.



**Γράφημα 3.9:** Προσαρμογή του μοντέλου Baranyi και Roberts (γραμμή) στα μικροβιολογικά δεδομένα (σημεία) σε θρεπτικό ζωμό με 10% (w/v) γλυκοζίτες στεβιόλης.



**Γράφημα 3.10:** Προσαρμογή του μοντέλου Baranyi και Roberts (γραμμή) στα μικροβιολογικά δεδομένα (σημεία) σε θρεπτικό ζωμό με 10% (w/v) σακχαρόζη.

Όπως υπολογίστηκε από το πρόγραμμα DMfit του excel για κάθε χειρισμό ξεχωριστά, παρατηρείται ότι η *L. monocytogenes* είχε τη μικρότερη μέση τιμή  $\lambda$  σε ζωμό καλλιέργειας 10% (w/v) γλυκοζιτών στεβιόλης (Πίνακας 3.7), αφού δεν μπόρεσε να προσδιοριστεί καθώς εισέρχεται απευθείας στην εκθετική φάση ανάπτυξης. Ο μάρτυρας (Πίνακας 3.6) έδειξε μέση τιμή ( $\pm$  τυπική απόκλιση)  $\lambda$  ίση με 7,614 ( $\pm$  3,060) h, ενώ η μεγαλύτερη μέση τιμή  $\lambda$  προσδιορίστηκε στο ζωμό καλλιέργειας με 10% (w/v) σακχαρόζη (Πίνακας 3.8), και ήταν 11,306 ( $\pm$  1,935) h. Επομένως, η *L. monocytogenes* προσαρμόζεται περίπου 1,5 φορές πιο αργά σε ζωμό καλλιέργειας με 10% (w/v) σακχαρόζη συγκριτικά με ζωμό που δεν περιέχει κάποια γλυκαντική ουσία. Ακόμα, από τους παραπάνω Πίνακες προκύπτει ότι ο ζωμός καλλιέργειας περιεκτικότητας 10% (w/v) σε γλυκοζίτες στεβιόλης σημείωσε τον μικρότερο  $\mu_{\max}$  με μέση τιμή 0,042h<sup>-1</sup>. Ακολουθεί ο  $\mu_{\max}$  του ζωμού που περιέχει σακχαρόζη 10% (w/v), 0,048 ( $\pm$  0,002) h<sup>-1</sup> και ο  $\mu_{\max}$  του ζωμού-μάρτυρα, 0,051 ( $\pm$  0,003) h<sup>-1</sup>. Παρόλα αυτά, οι παρατηρούμενες διαφορές σε επίπεδο  $\mu_{\max}$  δεν θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν ως σημαντικές.

Επιπλέον, το πρωτογενές μοντέλο Baranyi και Roberts μας δίνει την δυνατότητα προσδιορισμού των  $N_0$  και  $N_{\max}$  που συμφωνούν με τα διαγράμματα καμπυλών ανάπτυξης. Πιο αναλυτικά, το μοντέλο υπολόγισε για το ζωμό-μάρτυρα μέση τιμή  $N_0$  1,839 ( $\pm$  0,217) log cfu/ml

και  $N_{max}$  9,480 ( $\pm$  0,245) log cfu/ml. Αντίστοιχα, το μοντέλο υπέδειξε ως μέση τιμή ( $\pm$  τυπική απόκλιση)  $N_0$  1,806 ( $\pm$  0,106) log cfu/ml και  $N_{max}$  9,572 ( $\pm$  0,059) log cfu/ml για ζυμό καλλιέργειας 10% (w/v) γλυκοζιτών στεβιόλης, ενώ για ζυμό καλλιέργειας 10% (w/v) σακχαρόζης μέση τιμή ( $\pm$  τυπική απόκλιση)  $N_0$  1,890 ( $\pm$  0,068) log cfu/ml και  $N_{max}$  9,378 ( $\pm$  0,166) log cfu/ml.

Τέλος, υπολογίστηκαν μέσω του προγράμματος DMfit οι τιμές του συντελεστή προσδιορισμού ( $R^2$ ) και του τυπικού σφάλματος της προσαρμογής (standar error (fit)) για κάθε δείγμα και κάθε χειρισμό (τύπο ζυμού), όπου παρατηρήθηκε η ακρίβεια και η αξιοπιστία του μοντέλου που χρησιμοποιήθηκε. Το ιδανικό μοντέλο έχει τιμή  $R^2$  ίση με 1 και τυπική απόκλιση προσαρμογής ίση με 0. Σύμφωνα με αποτελέσματα που παρουσιάζονται στους παραπάνω πίνακες, το πρωτογενές μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε για τα ληφθέντα μικροβιολογικά δεδομένα ήταν σε όλες τις περιπτώσεις και ακριβές και αξιόπιστο, με τις τιμές του  $R^2$  να προσεγγίζουν τη μονάδα ενώ το τυπικό σφάλμα της προσαρμογής να είναι χαμηλό ( $\sim$ 0,1-0,2).

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, ο Belda-Galbis και οι συνεργάτες του μέσω του τροποποιημένου μοντέλου Gompertz προσδιόρισαν την αντιλιστεριακή δράση της στέβιας με βάση τη  $\lambda$  και τον  $\mu_{max}$  που επετεύχθη, ανάλογα με τις συνθήκες επώασης. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα απορρέει το συμπέρασμα ότι όσο χαμηλότερη είναι η θερμοκρασία ή όσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση του γλυκαντικού, τόσο μεγαλύτερη είναι η  $\lambda$  και τόσο μικρότερος ο  $\mu_{max}$ . Ειδικότερα, στατιστικά σημαντική ήταν η μείωση της θερμοκρασίας από 37, 22 έως 10 °C, η αύξηση της συγκέντρωσης της στέβιας από 0, 0,5 έως 1,5, 2,5% (w/v) στους 37 °C και η επιμήκυνση της  $\lambda$  παρουσία 1,5 και 2,5% (w/v) στέβια στους 22 °C (Belda-Galbis et al., 2014).

Σε μια ακόμα έρευνα, αποδείχτηκε ότι ο  $\mu_{max}$  της *L. monocytogenes* παρουσιάζει υψηλότερες τιμές παρουσία επιτραπέζιας ζάχαρης και εργαστηριακής σακχαρόζης (3, 9 και 15% w/v) και εμπορικής στέβιας (0,3, 0,9 και 1,5% w/v), συγκριτικά με τους γλυκοζίτες στεβιόλης και το μάρτυρα στους 4 °C. Από την άλλη πλευρά, σε θερμοκρασία 8 και 20 °C η ανάπτυξη του παθογόνου δεν επηρεάζεται από το γλυκαντικό που προστίθενται στο γενικό υπόστρωμα ανάπτυξης (Lobete et al., 2017).

#### 4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Αναμφισβήτητα, τα τελευταία χρόνια έχει αυξηθεί η κατανάλωση γλυκαντικών ουσιών από όλες τις κοινωνικές ομάδες. Η τάση των καταναλωτών για υγιεινή και χαμηλή σε θερμίδες δίαιτα δημιούργησε την ανάγκη στις βιομηχανίες τροφίμων για παραγωγή προϊόντων με υποκατάστατα ζάχαρης. Ωστόσο, οι καταναλωτές δεν πρέπει να καταναλώνουν σε αφθονία αυτά τα προϊόντα, δεδομένου ότι υπάρχει πιθανότητα παρενεργειών όταν παραβιαστούν τα ημερήσια όρια κατανάλωσης (ADI) που έχει θέσει η Ευρωπαϊκή νομοθεσία τροφίμων.

Τα αποτελέσματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας επιβεβαίωσαν ότι τα εμπορικά γλυκαντικά προϊόντα είναι μικροβιακά ασφαλή, λόγω φυσικοχημικών χαρακτηριστικών αλλά και τεχνολογικής επεξεργασίας. Αυτό σημαίνει ότι η Ο.Μ.Χ των προϊόντων που καταμετρήθηκε ήταν σε εξαιρετικά χαμηλά επίπεδα ( $\leq 2,00 \log \text{ cfu/g}$  ή  $\log \text{ cfu/ml}$ ). Επιπλέον, δεν καταμετρήθηκε/ ανιχνεύτηκε σε κανένα από τα δείγματα πληθυσμός παθογόνων μικροοργανισμών, με εξαίρεση δυο γλυκαντικά στα οποία επιβεβαιώθηκε η παρουσία *S. aureus*. Το γεγονός αυτό προκαλεί ανησυχία, αφού σε συνθήκες ευνοϊκές για την ανάπτυξή του (π.χ. θερμοκρασιακή κακομεταχείριση ενός έτοιμου προς κατανάλωση τροφίμου) ο συγκεκριμένος παθογόνος μικροοργανισμός είναι δυνατόν να αναπτυχθεί και να παράγει θερμοανθεκτική εντεροτοξίνη, προκαλώντας τροφοδοξίνωση η οποία δύναται να έχει δυσμενείς επιπτώσεις για την υγεία ευπαθών πληθυσμιακών ομάδων.

Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί *L. monocytogenes* και *S. aureus* είναι πιθανόν να βρεθούν σε εμπορικά προϊόντα γλυκαντικών, κυρίως από κακή πρακτική και μη τήρηση των κανόνων υγιεινής. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μεθόδου μέτρησης οπτικής πυκνότητας (OD) ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης ( $\mu_{\max}$ ) της *L. monocytogenes* στους 30°C σε θρεπτικό ζωμό περιεκτικότητας 10% (w/v) σε ξυλιτόλη μειώνεται, ενώ παρατηρήθηκε αύξηση του  $\mu_{\max}$  για τον *S. aureus* σε θρεπτικό ζωμό περιεκτικότητας 2,5% (w/v) σε ξυλιτόλη. Αυτό σημαίνει ότι σε περίπτωση επιμόλυνσης με *L. monocytogenes* ενός τροφίμου που περιέχει αυτό το ποσοστό (ή πιθανόν μεγαλύτερο) σε ξυλιτόλη, ενδεχομένως να επιτυγχάνεται ενισχυμένη ασφάλεια για τον καταναλωτή σε σχέση με τρόφιμα που δεν περιέχουν το συγκεκριμένο γλυκαντικό. Από την άλλη πλευρά, το ίδιο γλυκαντικό σε μικρότερη συγκέντρωση πιθανόν να οδηγήσει σε τροφική δηλητηρίαση εξαιτίας της ευνοϊκής ανάπτυξης του *S. aureus*. Σε αντίθεση με την ξυλιτόλη, οι γλυκοζίτες στεβιόλης δεν σημείωσαν καμία σημαντική επίδραση στον ρυθμό ανάπτυξης των παθογόνων μικροοργανισμών. Επίσης, σύμφωνα με τα αποτελέσματα που ελήφθησαν από το ίδιο πείραμα για το προβιοτικό βακτήριο *Lb. pentosus*, κανένα από τα δυο γλυκαντικά δεν

φάνηκε να έχει κάποια αξιοσημείωτη επίδραση (ούτε θετική ούτε αρνητική) στον  $\mu_{\max}$  του βακτηρίου σε καμία από τις συγκεντρώσεις που ερευνήθηκαν. Ωστόσο, χρειάζεται περαιτέρω έρευνα προκειμένου να μπορεί κανείς να καταλήξει σε ασφαλή συμπεράσματα σε σχέση με τα παραπάνω, τόσο σε σχέση με τα παθογόνα βακτήρια *L. monocytogenes* και *S. aureus* όσο και με οξυγαλακτικά βακτήρια με προβιοτικό δυναμικό. Είναι σημαντικό να αξιολογηθεί η επίδραση των γλυκαντικών υλών στη συμπεριφορά ανάπτυξης και άλλων ευεργετικών βακτηρίων, ανθρώπινης ή φυτικής προέλευσης, καθώς τέτοιου είδους αποτελέσματα θα ήταν ιδιαίτερος χρήσιμα για την παραγωγή ζυμωμένων τροφίμων χαμηλής θερμιδικής αξίας.

Επιπροσθέτως, τα ευρήματα του πειράματος για την ανάπτυξη της *L. monocytogenes* στους 10°C παρουσία γλυκοζιτών στεβιόλης συγκριτικά με την ανάπτυξή της παρουσία σακχαρόζης, απέδειξαν ότι οι γλυκοζίτες στεβιόλης σε συγκέντρωση 10% (w/v) δεν μείωσαν σημαντικά τον ρυθμό ανάπτυξης του παθογόνου συγκριτικά με τον μάρτυρα και τη σακχαρόζη στην ίδια συγκέντρωση. Ωστόσο, η *L. monocytogenes* φάνηκε να προσαρμόζεται στο περιβάλλον του ζυμού-μάρτυρα περίπου 1,5 φορές ταχύτερα συγκριτικά με τον ζυμό σακχαρόζης. Εξίσου αξιοσημείωτο είναι ότι το παθογόνο βακτήριο προσαρμόζεται απευθείας σε ζυμό με 10% (w/v) γλυκοζίτες στεβιόλης εισερχόμενο άμεσα στην εκθετική φάση ανάπτυξης. Το γεγονός αυτό δημιουργεί ανησυχία και χρήζει περαιτέρω αξιολόγησης καθώς η *L. monocytogenes* φαίνεται ότι χρησιμοποιεί απευθείας τους γλυκοζίτες στεβιόλης σαν πηγή ενέργειας χωρίς να χρειάζεται να τους μεταβολίσει, όπως συμβαίνει στην περίπτωση της σακχαρόζης.

Εν κατακλείδι, θα ήταν χρήσιμο να συνεχιστούν οι έρευνες τόσο για την ασφάλεια των γλυκαντικών ουσιών, όσο και για τον μεταβολισμό τους από τα παθογόνα βακτήρια. Οι γλυκοζίτες αν και αποτελούν ένα γλυκαντικό ιδιαίτερα δημοφιλές τα τελευταία χρόνια, έχουν ακόμη πολλές ανεξερεύνητες πτυχές που χρήζουν έρευνας και αποσαφήνισης. Τα ευρήματα αυτής της μελέτης θα μπορούσαν να αποτελέσουν τη βάση για περαιτέρω έρευνα σχετικά με τον μεταβολισμό των γλυκαντικών από βακτήρια, τόσο παθογόνων όσο και ευεργετικών βακτηρίων με διατροφικό (προβιοτικά βακτήρια) ή/και τεχνολογικό ενδιαφέρον για την παραγωγή ζυμωμένων τροφίμων (καλλιέργειες εκκίνησης). Εξίσου μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης και η διεξαγωγή έρευνας μικροβιακής οικολογίας η οποία θα εστιάζει στην επίδραση γλυκαντικών υλών στις αλληλεπιδράσεις παθογόνων-ευεργετικών βακτηρίων σε σχέση με την αντίστοιχη επίδραση της σακχαρόζης.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Belda-Galbis C. M., Pina-Pérez M. C., Espinos J., Marco-Celdrán A., Martínez A. (2014). Use of the modified Gompertz equation to assess the *Stevia rebaudiana* Bertoni antilisterial kinetics. *Food Microbiology*, 38, 56-61.

Branen AL, Davidson PM, Salminen S, Thorngate J. 2001. *Food additives*. New York: Taylor & Francis.

Chatsudthipong,V., Muanprasat, C., 2008. Stevioside and related compounds: Therapeutic benefits beyond sweetness. US national library of medicine, National institute of health. Διαθέσιμο online <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19000919>>.

Denina I., Semjonovs P., Fomina A., Treimane R. and Linde R. (2013). The influence of stevia glycosides on the growth of *Lactobacillus reuteri* strains. *Letters in Applied Microbiology* 58, 278–284.

Dhiman A, Lal R. Phytochemical and pharmacological status of *Datura fastuosa* Linn. *Int J Res Ayurveda Pharm* 2011; 2(1): 145-150.

Dunayer, E.K (2004) Hypoglycemia following canine ingestion of xylitol-containing gum, *Veterinary and Human Toxicology* 46(2):87-88.

Dunayer, E.K (2006) New findings on the effects of xylitol ingestion in dogs *Veterinary Medicine* 101(12):791-797.

Dunayer, E.K., Gwaltney-Brant, S.M. (2006) Acute hepatic failure and coagulopathy associated with xylitol ingestion in dogs, *Journal of the American Veterinary Medical Association* (229)7:1113-1117.

Gardana, C., Simonetti, P., Canzi, E., Zanchi, R., Pietta, P., 2003. Metabolism of stevioside and rebaudioside A from *Stevia rebaudiana* extracts by human microflora. *J. Agric. Food Chem.* 51, 6618–6622.

Gare, Fran (February 1, 2003). *The Sweet Miracle of Xylitol*. Basic Health Publications, Inc.. ISBN 1-59120-038-5.

Gemos: Μαλιτόλη-E965: Σιρόπιμαλιχιτόλης, 13/1/2012, Πληροφορίες.

Geuns, J.M., 2003. Stevioside. *Phytochemistry* 64, 913–921.

Higginbotham, J.D. In: T.H. Grenby et al. (eds). *Developments in Sweeteners*, Vol. 2, London: Applied Science Publishers, 1983, pp. 119-156.

JECFA, 1999. Safety evaluation of certain food additives. WHO food additive series: 42. In: Prepared by the Fifty-first Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), International Programme on Chemical Safety, World Health Organization, Geneva.

Kinghorn AD, Soejarto NPD, Nanayakkara CM. 1984. A phytochemical screening procedure for sweet entkaurene glycosides in the genus *Stevia*. *J Nat Prod* 47(3):439–444.

Kobylewskil SEC. Toxicology of rebaudioside A: a review. California: Department of Environmental Health Sciences and Molecular Toxicology UCLA School of Public health Los Angeles; 2014. p. 1e26.

Koyama, E., Kitazawa, K., Ohori, Y., Izawaa, O., Kakegawa, K., Fujino, A., Ui, M., 2003. In vitro metabolism of the glycosidic sweeteners, stevia, stevia mixture and enzymatically modified stevia in human intestinal microflora. *Food Chem. Toxicol.* 41, 359–374.

Kroyer, G., 2010. Stevioside and *Stevia*-sweetener in food: application, stability and interaction with food ingredients. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*. [http://publik.tuwien.ac.at/files/PubDat\\_190293.pdf](http://publik.tuwien.ac.at/files/PubDat_190293.pdf).

Kunová G., Rada V., Vidailac A., Lisova I. (2014). Utilisation of steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* (Bertoni) by lactobacilli and bifidobacteria in in vitro conditions. *Folia Microbiol* 59:251–255.

Lemus-mondaca R, Vega-gálvez A, Zura-bravo L, Ah-hen K (2012). *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a highpotency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. *Food Chem* 132: 1121–1132 <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.140>.



Lemus-Mondaca, R., Vega-Gálvez, A., Zura-Bravo, L., & Ah-Hen, K. (2012). Stevia rebaudiana Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: a comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. *Food Chemistry*, 132(3), 1121–1132.

Lemus-Mondaca, R., Vega-Galvez, A., Zura-Bravo, L., Ah-Hen, K., 2011. Stevia rebaudiana Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. *Science direct*.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814611017559>

Lobete M.M., b, Baka M., b, Noriega E., Jooken E., Monballiu A., Sam de Beurmea, Boudewijn Meesschaert, Jan F. Van Impe (2017). Stevia-based sweeteners as a promising alternative to table sugar: The effect on *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Typhimurium* growth dynamics. *International Journal of Food Microbiology*, 245, 38–52.

Mattila PT, Svanberg MJ, Jämsä T, Knuutila ML (2002). Improved bone biomechanical properties in xylitol-fed aged rats. *Metabolism* 51(1):92-6. (περίληψη).

Mattila, PT (1999). Dietary xylitol in the prevention of experimental osteoporosis: Beneficial effects on bone resorption, structure and biomechanics. Dissertation, Institute of Dentistry, University of Oulu.

Mayer DG, Kemper FH, eds. Acesulfame K. New York:Marcel Dekker; 1991.

Msagati TAM. 2013. The chemistry of food additives and preservatives. West Sussex, UK: John Wiley & Sons.

Mushtaq Z., Rehman S., Zahoor T., Jamil A. (2010). Impact of xylitol replacement on physicochemical, sensory and microbial quality of cookies. *Pakistan Journal of Nutrition* 9 (6): 605-610.

Nanditha B, Prabhasankar P. 2009. Antioxidants in bakery products: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 49:1–27.

Niroomand F., Sperber W., Lewandowski V. J., Hobbs L. J. (1998). Fate of Bacterial Pathogens and Indicator Organisms in Liquid Sweeteners. *Journal of Food Protection*, 61 (3): 295-299.

Oms-Oliu G, Rojas-Graña MA, González LA, Varela P, Soliva-Fortuny R, Hernando MIH, Munuera IP, Fiszman S, Martín-Belloso O. 2010. Recent approaches using chemical treatments to preserve quality of fresh-cut fruit: a review. *Postharvest Biol Tec* 57:139–48.

Prakash I, Bunders C, Devkota KP, Charan RD, Ramirez C, Priedemann C, et al. Isolation and characterization of a novel rebaudioside M isomer from a bioconversion reaction of rebaudioside A and NMR comparison studies of rebaudioside M isolated from *Stevia rebaudiana* Bertoni and *Stevia rebaudiana* Morita. *Biomolecules* 2014;4:374-89.

Rajbhandari A, Roberts M. 1983. The flavonoids of *Stevia nepetifolia* *J Nat Prod* 47:559–560.

Renwick A. G. And Tarka S. M., (2008). Microbial hydrolysis of steviol glycosides. *Food and Chemical Toxicology*, 46: S70–S74.

Renwick AG. The metabolism of intense sweeteners. *Xenobiotica* 1986; 16: 1057\_71.

Roberts HJ. Reactions attributed to aspartame-containing products: 551 cases. *J Appl Nutr* 1988; 40: 8593. SCF. Revised opinion of the Scientific Committee on Food on cyclamic acid and its sodium and calcium salts (expressed on 9 March 2000). SCF; 2000.

[http://ec.europa.eu/comm/food/fs/sc/scf/out53\\_en.Pdf](http://ec.europa.eu/comm/food/fs/sc/scf/out53_en.Pdf).

Sansano S., Rivas A., Pina-Pérez M., Martínez A., Rodrigo D. (2017). *Stevia rebaudiana* Bertoni effect on the hemolytic potential of *Listeria monocytogenes* *Int J Food Microbiol*. 250:7-11.

Sarikaya R, Selvi M, Erkoç, F. 2012. Evaluation of potential geotoxicity of five food dyes using the somatic mutation and recombination test. *Chemosphere* 88:974–9.

SCF. A maltitol syrup not covered by current specifications (opinion expressed on 2 December 1999). SCF; 1999.

[http://europa.eu/comm/food/fs/sc/scf/out48\\_en.html](http://europa.eu/comm/food/fs/sc/scf/out48_en.html).

SCF. Saccharin (opinion expressed on 24 June 1977). Reports from the Scientific Committee on Food (4<sup>th</sup> series). SCF; 1977. CB-AH-77-004 EN-C. [http://ec.europa.eu/comm/food/fs/sc/scf/reports/scf\\_reports\\_04.pdf](http://ec.europa.eu/comm/food/fs/sc/scf/reports/scf_reports_04.pdf).

SCF. Sucralose (opinion adopted by the SCF on 7 September 2000). SCF; 2000. Available from: [http://ec.europa.eu/comm/food/fs/sc/scf/out68\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/comm/food/fs/sc/scf/out68_en.pdf).

SCF. Sweeteners (opinion expressed on 11 December 1987 and 10 November 1988). Reports of the Scientific on Food (21st series). SCF; 1989. EUR 11617 EN. Luxembourg: Commission of the European Communities.

[http://ec.europa.eu/comm/food/fs/sc/scf/reports/scf\\_reports\\_21.pdf](http://ec.europa.eu/comm/food/fs/sc/scf/reports/scf_reports_21.pdf).

SCF. Sweeteners (opinion expressed on 11 December 1987 and 10 November 1988). Reports of the Scientific Committee on Food (21st series). SCF; 1989. EUR 11617 EN. Luxembourg: Commission of the European Communities.

[http://ec.europa.eu/comm/food/fs/sc/scf/reports/scf\\_reports\\_21.pdf](http://ec.europa.eu/comm/food/fs/sc/scf/reports/scf_reports_21.pdf).

SCF. Sweeteners (opinion expressed on 14 September 1984). Reports of the Scientific Committee on Food (16th series). SCF; 1985. EUR 10210 EN. Luxembourg: Commission of the European Communities.

[http://ec.europa.eu/comm/food/fs/sc/scf/reports/scf\\_reports\\_16.pdf](http://ec.europa.eu/comm/food/fs/sc/scf/reports/scf_reports_16.pdf).

Soejarto DD, Douglas K, Farnsworth NR. 1982. Potential sweetening agents of plant origin—III. Organoleptic evaluation of Stevia leaf herbarium samples for sweetness. *J Nat Prod* 45(5):590–599.

Soejarto DD, Douglas K, Farnsworth NR. 1982. Potential sweetening agents of plant origin—III. evaluation of Stevia leaf herbarium samples for sweetness. *J Nat Prod* 45(5):590–599.

Steer, T., Carpenter, H., Tuohy, K., Gibson, G.R., 2000. Perspectives on the role of the human gut microbiota and its modulation by pro- and prebiotics. *Nutr. Res. Rev.* 13, 229–254.

Szili Z., Szakmar K., Erdosi O., Szita G., Horvath J., Laszlo N. (2014). Investigation of the antimicrobial effect of xylitol. *136,10: 623-629*.

Tadhani, M. B., Patel, V. H., & Subhash, R. (2007). In vitro antioxidant activities of Stevia rebaudiana leaves and callus. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(3–4), 323–329

Tajkarimi MM, Ibrahim SA, Cliver DO. 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control* 21:1199–218.

Wingard, R.E., Brown, J.P., Enderlin, F., Dale, J., Hale, R., Seitz, C.T., 1980. Intestinal degradation and absorption of the glycosidic sweeteners stevioside and rebaudioside A. *Experientia* 36, 519–520.

Zinck O, Hallas-Møller T. E-nummerbogen. Tilsætningsstoffer i maden: virkninger og bivirkninger. 6<sup>th</sup> edn, 1st issue, 2004 (Danish edn); E-nummerboken (Tørrngren K, transl.),

Fitnessforlaget; 2005 (Swedish edn) [E-number book. Food additives in foods: effects and adverse effects].

Γρηγορίου Ε., Συνέπειες της υπερκατανάλωσης ζάχαρης, Health + Wellness: διατροφή, Τεύχος 27, Σεπτέμβριος-Οκτώβριος 2009, σελ. 21-22.

Καπακόγλου Π., 2008. Η επιχειρηματική καλλιέργεια της Στέβιας. Εκδόσεις Καπόγλου, Θεσσαλονίκη. Σελ: 17-26, 31-78, 81-120, 126-139, 143-162, 166- 168.

Οδηγία 94/35/ΕΚ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 30'ης Ιουνίου 1994 για τα γλυκαντικά που προορίζονται να χρησιμοποιηθούν στα τρόφιμα, Επίσημη Εφημερίδα αρθ. L 237 της 10/09/1994 σελ. 0003-0012