



**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΤΡΟΦΙΜΑ, ΔΙΑΤΡΟΦΗ & ΥΓΕΙΑ**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Λειτουργικά τρόφιμα: μελέτη της σχέσης προβιοτικών και κατάθλιψης
για την ανάπτυξη νέου προϊόντος

Ιωάννα Ι. Κουτσοπούλου

Επιβλέπων Καθηγητής:
Αντώνης Ζαμπέλας, Καθηγητής ΓΠΑ

ΑΘΗΝΑ

2022

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Λειτουργικά τρόφιμα: μελέτη της σχέσης προβιοτικών και κατάθλιψης
για την ανάπτυξη νέου προϊόντος

Functional foods: study of the relationship between probiotics and
depression for development of new product

Ιωάννα Ι. Κουτσοπούλου

Εξεταστική Επιτροπή:

Αντώνιος Ζαμπέλας, Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)

Ελευθέριος Δροσινός, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ

Αιμιλία Παπακωνσταντίνου, Επίκουρη Καθηγήτρια ΓΠΑ

Λειτουργικά τρόφιμα: μελέτη της σχέσης προβιοτικών και κατάθλιψης για την ανάπτυξη νέου προϊόντος

ΠΜΣ Τρόφιμα, Διατροφή & Υγεία

Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: Τα τελευταία χρόνια η κατάθλιψη είναι ένα μείζον πρόβλημα που ταλανίζει σημαντικό ποσοστό του ανθρώπινου συνόλου. Ύστερα από πολυετή και ενδελεχή βιβλιογραφική μελέτη, έχει διερευνηθεί και ερμηνευτεί η σχέση των προβιοτικών με την αντιμετώπιση των συμπτωμάτων της κατάθλιψης θέτοντας τις βάσεις για τις θετικές επιδράσεις διαφόρων προβιοτικών προϊόντων έναντι των καταθλιπτικών περιστατικών. Σύμφωνα με δεδομένα της μελέτης ΠΑ.ΜΕ.Δ.Υ. η κατάθλιψη αφορά περίπου το 7% του ελληνικού πληθυσμού και είναι σημαντικό να γίνουν προσπάθειες εξάλειψής της, καθώς έχει δυσμενείς συνέπειες για την ανθρώπινη υγεία. Σε αυτό το πλαίσιο, είναι καίριας σημασίας η ανάπτυξη και προώθηση εμπλουτισμένων προϊόντων με προβιοτικές καλλιέργειες ώστε να διεξαχθούν βοηθητικές ενέργειες από τις βιομηχανίες τροφίμων.

Σκοπός: Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι ο σχεδιασμός και η δημιουργία ενός προϊόντος με την προσθήκη προβιοτικών, το οποίο θα μπορέσει να χρησιμοποιηθεί σε μια παρέμβαση για την εξάλειψη των συμπτωμάτων κατάθλιψης μέσω των ευεργετικών ιδιοτήτων του εντερικού μικροβιώματος.

Μεθοδολογία: Η μελέτη πραγματοποιήθηκε στην εταιρεία Γιώτης Α.Ε. και ξεκίνησε με μια βιβλιογραφική ανασκόπηση σχετικά με τη δράση των προβιοτικών στην αντιμετώπιση της κατάθλιψης και την χρήση τους στη βιομηχανία των τροφίμων. Δουλεύοντας πάνω σε αυτή τη βάση δεδομένων πραγματοποιήθηκε η ανάπτυξη μιας κρέμας ψυγείου με γεύση βανίλια και σοκολάτα και μιας κρέμας σε μορφή σκόνης σε αντίστοιχες γεύσεις μέσω εργαστηριακών δοκιμών ώστε να αξιολογηθεί η λειτουργικότητά του, ο έλεγχος της βιωσιμότητας των μικροοργανισμών και η εξέταση της διάρκειας ζωής του τελικού προϊόντος.

Αποτελέσματα: Οι κρέμες σε μορφή σκόνης υπέδειξαν καλύτερα αποτελέσματα σχετικά με την χρήση τους ως φορείς προβιοτικών μικροοργανισμών συγκριτικά με τις κρέμες ψυγείου. Εμφανίζουν μεγαλύτερη διάρκεια ζωής και ο πληθυσμός των μικροοργανισμών ήταν μεγαλύτερος από το επιθυμητό ποσοστό ($>10^{6-7}$ CFU/g) καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων, σε αντίθεση με τις κρέμες ψυγείου που είχαν αμφιλεγόμενα ευρήματα. Αναφορικά με τις συντηρητικές ιδιότητες των προβιοτικών δεν παρατηρήθηκαν τέτοιες ενδείξεις στα προϊόντα ψυγείου. Επιπλέον, το κακάο παρόλο που βιβλιογραφικά έχει αναδειχθεί ως ένα υποσχόμενο υπόστρωμα για τέτοιους μικροοργανισμούς, στις κρέμες ψυγείου δεν ευνόησε τη δομή και τη διατήρηση της κρέμας όπως και τη βιωσιμότητα των προβιοτικών ενώ στις κρέμες σε μορφή σκόνης τα αποτελέσματα ήταν αναμενόμενα και σύμφωνα με τη βιβλιογραφία.

Συμπεράσματα: Για το σχεδιασμό μιας επιτυχούς παρέμβασης τα προϊόντα σε μορφή σκόνης φαίνεται να είναι μια προτιμότερη επιλογή λόγω της μεγαλύτερης διάρκειας ζωής που παρέχουν αλλά και των πολύ ενθαρρυντικών αποτελεσμάτων ως φορείς προβιοτικών. Απαιτείται περαιτέρω επιστημονική έρευνα για την κατανόηση της επίδρασης της σκόνης σοκολάτας στα προϊόντα ψυγείου με προβιοτικές καλλιέργειες αλλά και εμπειριστατωμένη κλινική μελέτη για τη διερεύνηση της επίδρασης των προβιοτικών καλλιεργειών στα συμπτώματα της κατάθλιψης, καθώς αυτή ήταν εξ' αρχής η αιτία για το σχεδιασμό του προϊόντος.

Επιστημονική περιοχή: Ανάπτυξη προϊόντος

Λέξεις κλειδιά: Προϊόν, τρόφιμα, προβιοτικά, λειτουργικό, κατάθλιψη, ανάπτυξη

Functional foods: study of the relationship between probiotics and depression for development of new product

Msc Food, Nutrition & Health

Department of food science and human nutrition

ABSTRACT

Introduction: In recent years, depression is a major problem that plagues a significant percentage of the human population. After a multi-year and thorough research, the relation of probiotics to the treatment of depression symptoms has been investigated and interpreted, laying the foundations for the positive effects of various probiotic products against depressive cases. According to data from the study ΠΑ.ΜΕ.Δ.Υ., depression affects approximately 7% of the Greek population and it is important to make efforts to eliminate it, as it has adverse consequences for human health. In conclusion, the development and promotion of enriched products with probiotic cultures is of key importance in order food industries to carry out supportive actions.

Objective: The purpose of the present study is to design and create a product with the addition of probiotics, which can be used in an intervention to eliminate depression symptoms through the beneficial properties of the intestinal microbiome.

Methods: The study was carried out at the company Jotis S.A. and began with a literature review on the action of probiotics in the treatment of depression and their use in the food industry. Working on this database, a vanilla and chocolate ready to eat pudding and an instant pudding were developed through laboratory testing to evaluate its functionality, to test probiotics viability and to examine the shelf life of the final products.

Results: Instant puddings showed better results regarding their use as carriers of probiotic microorganisms compared to ready to eat puddings. They show a longer shelf life and the population of microorganisms was higher than the desired rate ($>10^{6-7}$ CFU/g) throughout the experiments, in contrast to the ready to eat puddings, which had controversial findings. Regarding the preservative properties of probiotics, no such indications were observed in refrigerated products. In addition, cocoa, although in the bibliography has emerged as a promising substrate for such microorganisms, in refrigerated puddings, it did not favor the structure and preservation of the cream as well as the viability of probiotics, while in instant puddings the results were expected and in accordance with previous studies.

Conclusions: For the design of a successful intervention, powder form products seem to be a preferable choice due to the longer shelf life they provide but also to the very encouraging results as probiotic carriers. Further scientific research is needed to understand the effect of chocolate powder in refrigerated products with probiotic cultures as well as a thorough clinical study to investigate the effect of probiotic cultures on symptoms of depression, as this was the reason for the design of the product in the first place.

Scientific area: Product development

Keywords: Product, food, probiotics, functional, depression, development

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η μελέτη για τη συσχέτιση της κατάθλιψης με τα προβιοτικά και την ανάπτυξη ενός προβιοτικού προϊόντος πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της πρακτικής άσκησης στο πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών στην εταιρεία τροφίμων Γιώτης Α.Ε. Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω το τμήμα Έρευνας και Ανάπτυξης της εταιρείας που με φιλοξένησε, με κατεύθυνε και με συμβούλευε σχετικά με το σχεδιασμό για τη σύλληψη μιας ιδέας νέου προϊόντος καθώς και την υλοποίησή της. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα Καθηγητή μου κ. Αντώνη Ζαμπέλα και την Καθηγήτρια κα. Εμμανουέλλα Μαγριπλή τόσο για την ανάθεση του θέματος όσο και για την ευκαιρία που μου προσέφεραν να γνωρίσω και να συνεργαστώ με μια από τις μεγαλύτερες ελληνικές βιομηχανίες τροφίμων. Ευχαριστίες οφείλω επίσης σε όλο το διδακτικό προσωπικό του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών για τις πολύτιμες γνώσεις που μου χάρισαν κατά τη διάρκεια διεξαγωγής των μαθημάτων.

«Με την άδειά μου, η παρούσα εργασία ελέγχθηκε από την Εξεταστική Επιτροπή μέσα από λογισμικό ανίχνευσης λογοκλοπής που διαθέτει το ΓΠΑ και διασταυρώθηκε η εγκυρότητα και η πρωτοτυπία της»

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1.	Εισαγωγή	1
1.1	Λειτουργικά τρόφιμα	1
1.1.1	Ορισμός λειτουργικών τροφίμων	1
1.1.2	Κατηγορίες λειτουργικών τροφίμων & βιοδραστικά συστατικά	1
1.2	Προβιοτικά	2
1.2.1	Ορισμός προβιοτικών	2
1.2.2	Μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται ως προβιοτικές καλλιέργειες	2
1.2.3	Ευεργετικές δράσεις των προβιοτικών μικροοργανισμών	4
1.3	Τα προβιοτικά στη βιομηχανία τροφίμων	7
1.3.1	Μελέτη της αγοράς των προβιοτικών	7
1.3.2	Νομοθεσία για τα λειτουργικά τρόφιμα/προβιοτικά - Ισχυρισμοί υγείας	10
1.3.3	Κριτήρια επιλογής προβιοτικών στα τρόφιμα – επιθυμητά χαρακτηριστικά	11
1.3.4	Συνθήκες - ουσίες που επηρεάζουν την επιβίωση των προβιοτικών	12
1.3.5	Τρόφιμα στα οποία εισάγονται τα προβιοτικά βακτήρια	16
1.4	Κατάθλιψη	19
1.4.1	Ορισμός κατάθλιψης	19
1.4.2	Επιδημιολογικά δεδομένα κατάθλιψης	19
2.	Σκοπός	21
3.	Πειραματικό μέρος	22
3.1	Μελέτη του ανταγωνισμού και των καταναλωτικών τάσεων	22
3.2	Σύλληψη ιδέας	22
3.3	Ανάπτυξη προϊόντος - Κρέμα ψυγείου	22
3.3.1	Εργαστηριακές δοκιμές σύστασης	22
3.3.2	Παραγωγική διαδικασία	23
3.3.3	Εμβολιασμός προβιοτικών	24
3.3.4	Αξιολόγηση διάρκειας ζωής προβιοτικών	24
3.3.5	Οργανοληπτική αξιολόγηση	25
3.4	Ανάπτυξη προϊόντος - Κρέμα στιγμής	26
3.4.1	Εργαστηριακές δοκιμές σύστασης	26
3.4.2	Παραγωγική διαδικασία	27
3.4.3	Εμβολιασμός προβιοτικών	27
3.4.4	Αξιολόγηση διάρκειας ζωής προβιοτικών	27
3.4.5	Οργανοληπτική αξιολόγηση	29
3.5	Μεθοδολογία βιβλιογραφικής ανασκόπησης σχέσης κατάθλιψης & προβιοτικών	29
4.	Αποτελέσματα	30
4.1	Κρέμα ψυγείου	30
4.1.1	Αποτελέσματα αξιολόγησης διάρκειας ζωής προβιοτικών μικροοργανισμών	30
4.1.2	Αποτελέσματα οργανοληπτικής αξιολόγησης	40
4.2	Κρέμα στιγμής	42
4.2.1	Αποτελέσματα αξιολόγησης διάρκειας ζωής προβιοτικών μικροοργανισμών	42
4.2.2	Αποτελέσματα οργανοληπτικής αξιολόγησης	47
4.3	Αποτελέσματα βιβλιογραφικής ανασκόπησης σχέσης κατάθλιψης & προβιοτικών	49
5.	Συμπεράσματα – Συζήτηση	52
6.	Βιβλιογραφία	59

1. Εισαγωγή

1.1 Λειτουργικά τρόφιμα

1.1.1 Ορισμός λειτουργικών τροφίμων

Λειτουργικό είναι ένα τρόφιμο που επιδρά θετικά σε μία ή περισσότερες λειτουργίες του ανθρώπινου σώματος, πέρα από τα αναμενόμενα διατροφικά οφέλη, είτε βελτιώνοντας την κατάσταση υγείας του ατόμου είτε μειώνοντας το ρίσκο εμφάνισης ασθενειών. Δεν είναι χάπι, κάψουλα ή κάποιο άλλο συμπλήρωμα διατροφής αλλά αποτελεί μέρος ενός κανονικού διατροφικού μοτίβου. (European Commission) (1)

Organization	Definition
Academy of Nutrition and Dietetics	"Foods defined as whole foods along with fortified, enriched, or enhanced foods that have a potentially beneficial effect on health when consumed as part of a varied diet on a regular basis at effective levels." [6]
International Food Information Council	"Foods or dietary components that may provide a health benefit beyond basic nutrition and may play a role in reducing or minimizing the risk of certain diseases and other health conditions" [6]
Institute of Food Technologists	"Foods and food components that provide a health benefit beyond basic nutrition (for the intended population)" [6]
International Life Sciences Institute	"Foods that by virtue of the presence of physiologically active food components provide health benefits beyond basic nutrition" [6]
European Commission	"A food that beneficially affects one or more target functions in the body, beyond adequate nutritional effects, in a way that is relevant to either an improved state of health and well-being and/or reduction of risk of disease. It is part of a normal food pattern. It is not a pill, a capsule or any form of dietary supplement" [6]
Health Canada	"A functional food is similar in appearance to, or may be, a conventional food, is consumed as part of a usual diet, and is demonstrated to have physiological benefits and/or reduce the risk of chronic disease beyond basic nutritional functions" [6]
Japanese Ministry of Health, Labour, and Welfare	"FOSHU [food for specified health uses] refers to foods containing ingredient(s) with functions for health and officially approved to claim its physiological effects on the human body. FOSHU is intended to be consumed for the maintenance / promotion of health or special health uses by people who wish to control health conditions, including blood pressure or blood cholesterol" [6]
Functional Food Center	"Natural or processed foods that contains known or unknown biologically-active compounds; which, in defined, effective non-toxic amounts, provide a clinically proven and documented health benefit for the prevention, management, or treatment of chronic disease" [2]

Εικόνα 1: Ορισμός λειτουργικών τροφίμων ανά οργανισμό (1)

1.1.2 Κατηγορίες λειτουργικών τροφίμων & βιοδραστικά συστατικά

Τα λειτουργικά τρόφιμα μπορεί να είναι είτε συμβατικά τρόφιμα όπως φρούτα, λαχανικά, ξηροί καρποί και σιτηρά είτε επεξεργασμένα τρόφιμα όπως γιαούρτι, δημητριακά και χυμοί. (2) Με βάση τη σύστασή τους διακρίνονται στις εξής κατηγορίες:

- i. Τα εμπλουτισμένα τρόφιμα, τα οποία έχουν τροποποιηθεί ώστε να αυξηθεί η συγκέντρωση κάποιου ωφέλιμου συστατικού τους, το οποίο περιέχουν ήδη από τη φύση τους.
- ii. Τα ενισχυμένα τρόφιμα, στα οποία έχει προστεθεί ένα νέο συστατικό με ευεργετική δράση για την υγεία, το οποίο δεν προϋπήρχε στα συμβατικά τρόφιμα.
- iii. Τρόφιμα που έχουν υποστεί αντικατάσταση ή πλήρη αφαίρεση ενός βλαβερού για την υγεία συστατικού.
- iv. Τρόφιμα που έχουν εμπλουτιστεί με ένα νέο συστατικό το οποίο συμβάλλει στη διατήρηση των ωφέλιμων δράσεων του λειτουργικού τροφίμου.

Η ευεργετική δράση των λειτουργικών τροφίμων στον ανθρώπινο οργανισμό οφείλεται στην ύπαρξη βιοενεργών/βιοδραστικών συστατικών. Πρόκειται για χημικές ενώσεις που βρίσκονται σε μικρές συγκεντρώσεις και συμμετέχουν σε βιολογικούς μηχανισμούς του οργανισμού για την πρόληψη ή την θεραπεία ασθενειών και την προαγωγή της καλής υγείας.

(4) Εξαιτίας αυτών των ενώσεων, τα λειτουργικά τρόφιμα πρέπει να καταναλώνονται σε συγκεκριμένες ποσότητες ώστε να μην καταστούν τοξικές για τον άνθρωπο. Οι ασφαλείς και αποτελεσματικές ποσότητες βιοδραστικών ουσιών εξαρτώνται από την ίδια τη βιοδραστική ένωση και τη βιοενεργότητα/βιοδιαθεσιμότητά της, τη φύση και την παθοφυσιολογία της ασθένειας που καταπολεμάει καθώς επίσης και από το τρόφιμο «φορέα» της ένωσης, καθώς το κάθε τρόφιμο απορροφάται διαφορετικά από τον οργανισμό. (3)

Το Κέντρο Λειτουργικών Τροφίμων (Functional Food Center) στον ορισμό που προτείνει σχετικά με τα λειτουργικά τρόφιμα συμπεριέλαβε τον όρο «βιοδραστικές ενώσεις», υποδεικνύοντας έτσι την σπουδαιότητά τους αναφορικά με τα συγκεκριμένα τρόφιμα. (3)

1.2 Προβιοτικά

1.2.1 Ορισμός προβιοτικών

Ως προβιοτικά ορίζουμε τους ζωντανούς μικροοργανισμούς, οι οποίοι όταν χορηγούνται σε επαρκείς ποσότητες στον οργανισμό, παρέχουν οφέλη για την υγεία του ξενιστή. (5) Τα κυριότερα προβιοτικά είναι τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος (LAB), δηλαδή τα βακτήρια που διασπούν τη λακτόζη του γάλακτος και παράγουν γαλακτικό οξύ, τα βακτήρια του μη γαλακτικού οξέος και οι ζύμες. Είναι κυρίως ανθρώπινης προέλευσης και για αυτό δεν χαρακτηρίζονται ως παθογόνα.

1.2.2 Μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται ως προβιοτικές καλλιέργειες

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια είναι Gram θετικά βακτήρια, έχουν δηλαδή ένα ομογενές παχύ κυτταρικό τοίχωμα πεπτιδογλυκάνης και πέραν αυτού δεν υπάρχει κάτι άλλο, καθιστώντας τα πιο απλής δομής από τα Gram αρνητικά βακτήρια. Είναι επίσης κατά κανόνα προαιρετικά αναερόβια, έχουν σχήμα βακίλων ή κόκκων, είναι μη σποριογόνα, μη ικανά για κίνηση και αντέχουν σε χαμηλό pH. Η ταξινόμηση των προβιοτικών βακτηρίων γαλακτικού οξέος έγινε σύμφωνα με μορφολογικά, βιοχημικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά με μοριακές φαινοτυπικές και γονιδιωματικές τεχνικές. Οι περισσότερες μελέτες αφορούν τα γένη *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* και *Enterococcus*. (6)

Με βάση τη θερμοκρασία ανάπτυξής τους, κατατάσσονται σε μεσόφιλα (20-30 °C) και σε θερμόφιλα (35-45 °C) ενώ ανάλογα με το προϊόν ζύμωσης της λακτόζης, διακρίνονται σε ομοζυμωτικά και ετεροζυμωτικά. Αν διαθέτουν το ένζυμο αλδολάση και παράγουν γαλακτικό οξύ ανήκουν στην 1^η κατηγορία ενώ αν διαθέτουν το ένζυμο φωσφοκετολάση και παράγουν και άλλα προϊόντα όπως αιθανόλη, διοξείδιο του άνθρακα και οξικό οξύ ανήκουν στην 2^η κατηγορία. (7)

Οι συνθέστεροι προβιοτικοί μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται ευρέως ανήκουν στα γένη *Lactobacillus* και *Bifidobacterium*. Τα μικρόβια του γένους *Lactobacillus* είναι οι κυρίαρχοι μικροοργανισμοί στο λεπτό έντερο ενώ του γένους *Bifidobacterium* οι κυρίαρχοι στο παχύ έντερο.

Οι γαλακτοβάκιλλοι είναι γηγενή βακτήρια της βλεννογόνου μεμβράνης των ανθρώπων και ζώων, της στοματικής κοιλότητας, του εντέρου ή του κόλπου. Περισσότερα από 150 είδη

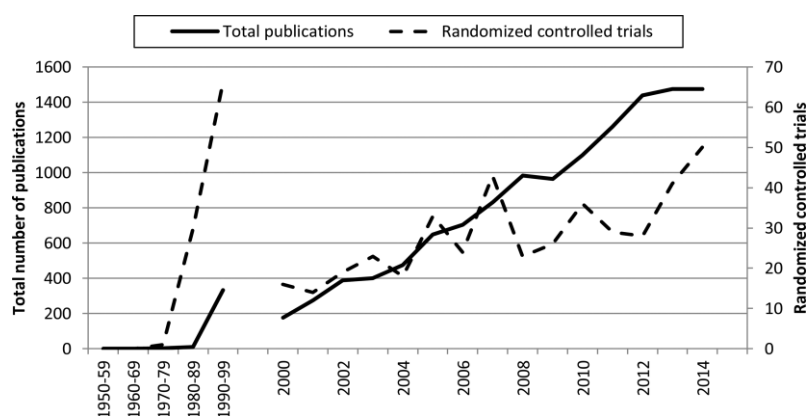
χαρακτηρίστηκαν έγκυρα στις αρχές του 2013. Είναι μικροαναερόβιοι ή αναερόβιοι, οξυάντοχοι ή οξύφιλοι. Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξής τους κυμαίνεται κυρίως από 30 έως 40 °C και οι τιμές pH, στις οποίες μπορούν να αναπτυχθούν ανήκουν στο εύρος 3 έως 8. Γενικά, οι γαλακτοβάκιλλοι έχουν περίπλοκες διατροφικές απαιτήσεις διότι απαιτούν μικρή ποσότητα οξυγόνου, υδατάνθρακες επιδεικτικούς για ζύμωση, πρωτεΐνες και αμινοξέα, βιταμίνες της Β-ομάδας, παράγωγα των νουκλεϊκών οξέων, ακόρεστα ελεύθερα λιπαρά οξέα, και μέταλλα όπως μαγνήσιο. (7)

Τα bifidobacteria είναι φυσιολογικά βακτήρια του γαστρεντερικού σωλήνα του ανθρώπου και των ζώων, έχοντας την ικανότητα να αποικίζει την εντερική οδό και να ελέγχει τα ανεπιθύμητα εντερικά βακτήρια. Το βέλτιστο pH για την ανάπτυξη των Bifidobacteria είναι 6,0-7,0 και ουσιαστικά δεν υπάρχει ανάπτυξη κάτω από 4,5 ή πάνω από 8,5. Οι βέλτιστες θερμοκρασίες ανάπτυξης είναι 37–41 °C, οι ελάχιστες είναι 25–28 °C και οι μέγιστες είναι 43–45 °C. Επίσης είναι υποχρεωτικά αναερόβιοι. Μερικά στελέχη του είναι τα *B. adolescentis*, *B. longum*, *B. infantis*, και *B. breve*. (8)

Πίνακας 1: Κατηγορίες μικροβιακών ειδών που χρησιμοποιούνται ως προβιοτικές καλλιέργειες (6)

Lactobacillus species	Bifidobacterium species	Others
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>L. casei</i> (rhamnosus)	<i>B. longum</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>L. reuteri</i>	<i>B. breve</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>L. bulgaricus</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>L. planarum</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>L. johnsonii</i>	<i>B. adolescentis</i>	
<i>L. lactis</i>		

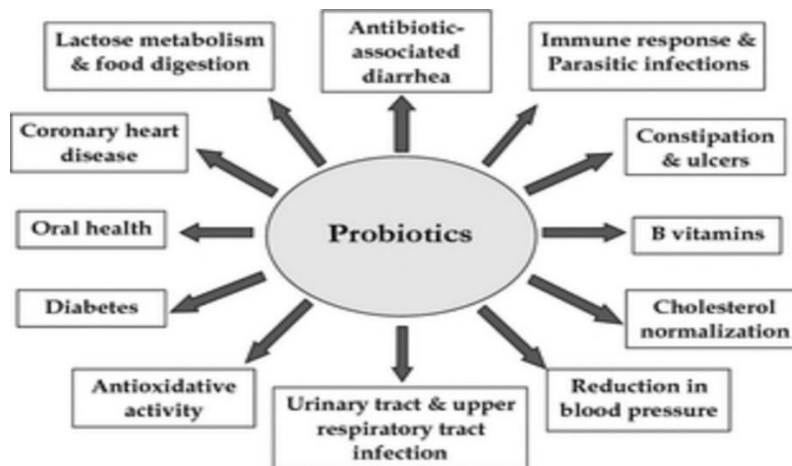
Τα προβιοτικά βακτήρια είναι παρόμοια με τα «καλά βακτήρια» του ανθρώπινου σώματος, κυρίως του εντέρου. Η συγκεκριμένη κατηγορία τροφίμων όπως και η προβιοτική θεραπεία παθήσεων έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον πολλών ερευνητών, με αποτέλεσμα μια μεγάλη αύξηση στον αριθμό των μελετών που διεξήχθησαν μετά το 2000. (9)



Εικόνα 2: Αριθμός επιστημονικών μελετών σχετικά με τα προβιοτικά μέχρι το 2014 (9)

1.2.3 Ευεργετικές δράσεις των προβιοτικών μικροοργανισμών

Τα προβιοτικά βακτήρια έχουν έναν σημαντικό αριθμό θετικών επιδράσεων στην υγεία του ανθρώπου, οι οποίες περιλαμβάνουν την πιθανή αντιμετώπιση χρόνιων ασθενειών, την ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος, τη μείωση των επιπέδων χοληστερόλης στο αίμα και τη διατήρηση της ψυχικής υγείας. (10) Η μελέτη με τίτλο «Human Microbiome Project» (HMP) έχει ως στόχο να κατανοήσει την ποικιλομορφία του μικροβιώματος σε διάφορες ανατομικές περιοχές και να καθορίσει τους ρόλους των μικροοργανισμών στην υγεία και τις ασθένειες. Υποστηρίζεται από τα Εθνικά Ινστιτούτα Υγείας (NIH) και το 2014 περισσότερα από ένα εκατομμύριο δολάρια ΗΠΑ σε πόρους μεταφέρθηκαν στο έργο. (11)



Εικόνα 3: Πολλαπλές δράσεις προβιοτικών (10)

Πολλοί ερευνητές έχουν μελετήσει την πιθανή αντικαρκινική δράση των προβιοτικών. (10) Ορισμένα στελέχη *L. acidophilus* και *Bifidobacterium spp.* αναφέρεται ότι μειώνουν τα επίπεδα ενζύμων στα κόπρανα, που είναι υπεύθυνα για την ενεργοποίηση των προκαρκινογόνων συστατικών σε ενεργές καρκινογόνες ουσίες και συνεπώς μειώνουν τον κίνδυνο ανάπτυξης όγκου. Η αντικαρκινική δράση των προβιοτικών βακτηρίων, οφείλεται κυρίως στο αποτέλεσμα της απομάκρυνσης των ενζύμων αυτών, βελτιώνοντας την ισορροπία της εντερικής μικροχλωρίδας. (12) Σε μελέτη με 48 ασθενείς με καρκίνο της ουροδόχου κύστης χορηγήθηκε συμπλήρωμα του βακτηριακού στελέχους *L. casei*. Μετά από 1 χρόνο χορήγησης συμπληρώματος οι όγκοι είχαν επανεμφανιστεί στην ομάδα ελέγχου σε ποσοστό 83% (19 από τους 23) ενώ στην ομάδα που πήρε το συμπλήρωμα το ποσοστό ήταν 57% (12 από τους 21). (13) Σε μια άλλη μελέτη παρασκευάστηκε γάλα που είχε υποστεί ζύμωση με το προβιοτικό στέλεχος *P. Freudenreichii* και εξετάστηκαν οι δυνατότητες αποφυγής της απόπτωσης των γαστρικών καρκινικών κυττάρων HGT-1. Τα αποτελέσματα κατέδειξαν ότι το ζυμωμένο γάλα που περιείχε αυτό το στέλεχος βακτηρίου ενίσχυσε την κυτταροτοξικότητα της καμπτοθεκίνης, ενός φαρμάκου που χρησιμοποιείται στην χημειοθεραπεία του γαστρικού καρκίνου. (14) Συμπερασματικά, ένα νέο προβιοτικό προϊόν, στη συγκεκριμένη περίπτωση νέο προβιοτικό γάλα, μπορεί να αποτελέσει μέρος μιας διατροφής για την πρόληψη ή την ενίσχυση της θεραπευτικής αγωγής του γαστρικού καρκίνου.

Εκτός από την αντικαρκινική δράση, τα προβιοτικά βοηθούν στην καλύτερη λειτουργία του πεπτικού συστήματος, προφυλάσσοντας τον οργανισμό από την εμφάνιση ασθενειών και συμβάλλοντας στην ανάρρωση από διαταραχές που εντοπίζονται στην κοιλιακή χώρα. (15) Προστατεύουν με φυσικό τρόπο τον οργανισμό, καθώς παράγουν χρήσιμα προϊόντα με τα οποία καταστρέφονται τα βλαβερά, για τον οργανισμό, μικρόβια. Επιπλέον, ενισχύουν τη δράση των πεπτικών ενζύμων και διατηρούν το pH του γαστρεντερικού συστήματος στα φυσιολογικά επίπεδα. (16) Μία μετά-ανάλυση έδειξε πως τα προβιοτικά μειώνουν τον πόνο και τα συμπτώματα στους ασθενείς με σύνδρομο ευερέθιστου εντέρου (Σ.Ε.Ε.) σε σχέση με τους ασθενείς που δε λάμβαναν προβιοτικά. (17) Επίσης, τα αποτελέσματα από μια άλλη μελέτη έδειξαν πως τα προβιοτικά σε συνδυασμό με τη θεραπεία για το πεπτικό έλκος που έχει προέλθει από μόλυνση μέσω του παθογόνου βακτηρίου *Helicobacter pylori* (*H. Pylori*) βελτιώνουν την εκρίζωση αυτού και επιταχύνουν την ανάρρωση με λιγότερες δυσάρεστες αντιδράσεις. (18) Ακόμα και στην περίπτωση της δυσανεξίας στη λακτόζη, τα προβιοτικά φαίνεται να επιδρούν εξίσου θετικά. (19)

Διάφορα στελέχη προβιοτικών βακτηρίων έχουν μελετηθεί και για την εξάλειψη της παχυσαρκίας. (20) Σε μια μελέτη η χορήγηση ζυμωμένου γάλατος με προβιοτικά του στελέχους *L. Gasseri* SBT2055 σε ενήλικες, μείωσε σημαντικά τα επίπεδα κοιλιακού λίπους. Παλιότερες μελέτες σχετικά με το συγκεκριμένο στέλεχος έχουν αναδείξει την ικανότητα μείωσης του υποδόριου λίπους, γεγονός που δεν συνέβη σε αυτή τη μελέτη. Οι ερευνητές απέδωσαν το εύρημα αυτό ως συνέπεια της ποσότητας χορήγησης του στελέχους και της αποτελεσματικότητάς του. (21) Η βιβλιογραφική ανασκόπηση έχει αποκαλύψει την ικανότητα των προβιοτικών να μεταβάλλουν το εντερικό μικροβίωμα, την έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με τη θερμογένεση, την αναδιαμόρφωση του ενεργού μεταβολισμού και του μεταβολισμού της γλυκόζης και των λιπιδίων. Παρόλα αυτά, απαιτείται περαιτέρω έρευνα ώστε να διαπιστωθεί ποιο είναι το προτιμότερο προβιοτικό, η βέλτιστη δοσολογία και η διάρκεια της διατροφικής παρέμβασης για την ανάλογη περίπτωση.

Τα προβιοτικά έχουν εξεταστεί επίσης για την επίδρασή τους στα καρδιαγγειακά νοσήματα. Σε μια μετά-ανάλυση σχετικά με την κατανάλωση προβιοτικών πολλαπλών στελεχών για τουλάχιστον 8 εβδομάδες και τη μείωση λιπιδίων και παραγόντων κινδύνου για τα καρδιαγγειακά, βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές επιδράσεις στη μείωση της ολικής χοληστερόλης, της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (LDL), του δείκτη μάζας σώματος (ΔΜΣ), της περιφέρειας της μέσης και των φλεγμονωδών δεικτών. Σημαντική μείωση βρέθηκε στις συγκεντρώσεις LDL σε δοκιμές που περιείχαν στέλεχος *Lactobacillus Acidophilus* σε σύγκριση με άλλους τύπους στελεχών. Τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι η χρήση προβιοτικών συμπληρωμάτων είναι αρκετά αποτελεσματική σε αυτό το κομμάτι. (23)

Προσεγγίζοντας το νόσημα του σακχαρώδους διαβήτη (Σ.Δ.) παρατηρείται μέσα από μελέτες ότι η παθογένεσή του είναι ένας συνδυασμός παραγόντων, στους οποίους περιλαμβάνονται το οξειδωτικό στρες και η φλεγμονή. Κάποια προβιοτικά, έχει αναφερθεί, πως μειώνουν αυτούς τους παράγοντες και ενισχύουν τις λειτουργίες των T-κυττάρων σε συνδυασμό με τη μείωση των προφλεγμονωδών μορίων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα προβιοτικά να ενισχύουν την εκδήλωση της αντιοξειδωτικής δράσης, της ανοσοποιητικής ρύθμισης και των αντιδιαβητικών αποτελεσμάτων. (24, 25) Μια μετά-ανάλυση σχετική με τα προβιοτικά και

τον ΣΔ τύπου II έδειξε σημαντική επίδραση των προβιοτικών στη μείωση της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης (HbA1c). (26) Το συμπέρασμα αυτό ενισχύεται και από τα αποτελέσματα μιας ακόμα μετά-ανάλυσης, που επισημαίνει πως τα προβιοτικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μείωση των γλυκαιμικών μεταβολικών παραγόντων που σχετίζονται με το διαβήτη, όπως είναι η γλυκόζη πλάσματος, η HbA1c και η ινσουλίνη. (27)

Πίνακας 2: Διάφορες ειδικές θεραπευτικές ή προληπτικές ιδιότητες που αποδίδονται σε προβιοτικούς μικροοργανισμούς (28)

Είδος προβιοτικού μικροοργανισμού	Πιθανές δράσεις
Είδη Bifidobacteria	<ul style="list-style-type: none"> • Μειωμένη επίπτωση της νεογνικής νεκρωτικής εντεροκολίτιδας
Enterococcus faecium	<ul style="list-style-type: none"> • Μειωμένη διάρκεια της οξείας διάρροιας από γαστρεντερίτιδα
Στελέχη Lactobacillus	<ul style="list-style-type: none"> • Αποτελεσματική βελτίωση της εγκοιλωματικής νόσου • Βελτίωση της πέψης της λακτόζης, μειωμένη διάρροια και μείωση των συμπτωμάτων σε άτομα με δυσανεξία στη λακτόζη, σε παιδιά με διάρροια, και σε άτομα με σύνδρομο βραχέος εντέρου • Ως μικροβιακή θεραπεία παρέμβασης για την εξάλειψη των παθογόνων και ως συμπληρωματική μαζί με τα αντιβιοτικά • Βελτίωση της ανοσοποιητικής λειτουργίας του εντερικού βλεννογόνου, της έκκρισης της εντερικής βλέννας και την πρόληψη εντερικής νόσου
Lactobacillus acidophilus	<ul style="list-style-type: none"> • Σημαντική μείωση της διάρροιας σε ασθενείς που υφίστανται ακτινοβολήση της πυέλου • Μειωμένοι πολύποδες, αδενώματα και καρκίνο του παχέος εντέρου σε πειραματόζωα • Αποτροπή ουρογεννητικής λοίμωξης μετά από έκθεση στα παθογόνα Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, και Pseudomonas aeruginosa • Μειωμένα επίπεδα χοληστερόλης στον ορό
Lactobacillus plantarum	<ul style="list-style-type: none"> • Μείωση της συχνότητας εμφάνισης της διάρροιας σε κέντρα ημερήσιας φροντίδας παιδιών, όταν χορηγείται σε παιδιά του παιδικού σταθμού • Αποτελεσματικό στη μείωση της φλεγμονής του εντέρου, π.χ. σε εντεροκολίτιδα στους αρουραίους, σε βακτηριακή υπερανάπτυξη του λεπτού εντέρου σε παιδιά, σε εγκοιλωματική νόσο • Μειωμένος πόνος και δυσκοιλιότητα στο σύνδρομο του ευερέθιστου εντέρου • Μειωμένο φούσκωμα, μετεωρισμός, πόνος στο σύνδρομο ευερέθιστου εντέρου σε ελεγχόμενη δοκιμή • Θετική επίδραση στην ανοσία σε παιδιά με HIV +
Lactobacillus reuteri	<ul style="list-style-type: none"> • Μείωση της διάρκειας της οξείας γαστρεντερίτιδας • Μείωση της οξείας διάρροιας
Lactobacillus rhamnosus	<ul style="list-style-type: none"> • Ενίσχυση της κυτταρικής ανοσίας σε υγιείς ενήλικες σε ελεγχόμενη δοκιμή
Lactobacillus salivarius	<ul style="list-style-type: none"> • Καταστολή και εξάλειψη του ελικοβακτηριδίου του πυλωρού σε καλλιέργειες ιστών και ζωικά μοντέλα με έκκριση γαλακτικού οξέος
Είδη Bacteroides	<ul style="list-style-type: none"> • Χρόνια κολίτιδα, γαστρίτιδα, αρθρίτιδα (αυξημένη βακτηριακή δραστηριότητα ουρεάσης σε χρόνια νεανική αρθρίτιδα)

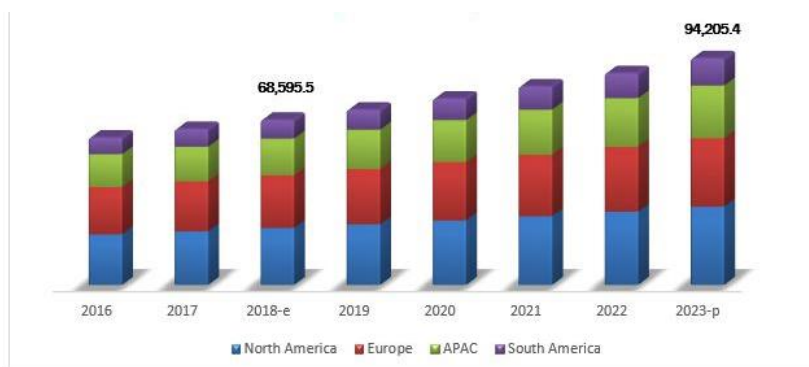
1.3 Τα προβιοτικά στη βιομηχανία τροφίμων

1.3.1 Μελέτη της αγοράς των προβιοτικών

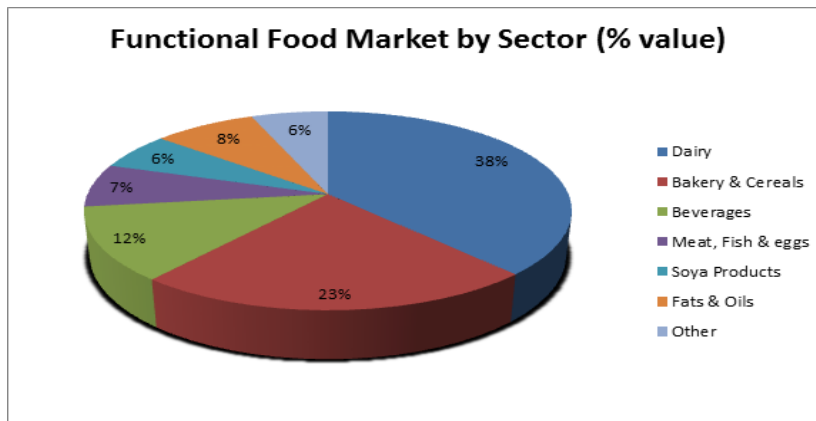
Η παγκόσμια αγορά των λειτουργικών τροφίμων παρουσιάζει ταχεία ανάπτυξη τα τελευταία χρόνια, γεγονός που οφείλεται κυρίως στην ευαισθητοποίηση των καταναλωτών σε θέματα υγείας. Ενώ η αυξανόμενη έμφαση σε υγιεινές δίαιτες με λειτουργικά θρεπτικά συστατικά που προλαμβάνουν την ασθένεια, αυξάνουν τη μακροζωία και προάγουν την υγεία υπήρξαν πάντα βασικοί παράγοντες ανάπτυξης, η τρέχουσα πανδημία προώθησε περαιτέρω την τάση. Έδωσε έμφαση στην ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος για την καταπολέμηση των μολυσματικών ασθενειών. Με περισσότερες πανδημίες που αναμένεται να ακολουθήσουν σε συνδυασμό με την αλλαγή του κλίματος και την εξάντληση των θρεπτικών συστατικών στα βασικά τρόφιμα, τα λειτουργικά τρόφιμα αναδύονται ως η καλύτερη στρατηγική για την ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος και την καταπολέμηση παθήσεων. Βέβαια οι ανησυχίες για την ασφάλεια των τροφίμων και η τήρηση αυστηρών διεθνών προτύπων και κανονισμών ποιότητας περιορίζουν την ανάπτυξη της αγοράς λειτουργικών συστατικών τροφίμων. (29)

Σε παγκόσμιο επίπεδο, η κατανάλωση λειτουργικών τροφίμων αυξάνεται καθώς οι καταναλωτές προτιμούν ισορροπημένες δίαιτες και φαγητό που όχι μόνο φροντίζει την όρεξή τους αλλά και βοηθά στην ενίσχυση της ανοσίας τους. Αυτό, μαζί με τις καινοτομίες των προϊόντων όσον αφορά τις γεύσεις και τις παραλλαγές προσφορών, παρουσιάζει σημαντικές ευκαιρίες για την ανάπτυξη εφαρμογών στη συγκεκριμένη αγορά. Παράγοντες που τροφοδοτούν περαιτέρω το ενδιαφέρον των καταναλωτών για λειτουργικά τρόφιμα είναι η ταχεία πρόοδος στην επιστήμη και στην τεχνολογία, η αύξηση του κόστους υγειονομικής περίθαλψης, η γήρανση και η αύξηση του ενδιαφέροντος για την επίτευξη ευεξίας μέσω της διατροφής. (29)

Η αγορά λειτουργικών συστατικών τροφίμων εκτιμάται ότι εκτιμάται σε 68,60 δισεκατομμύρια δολάρια ΗΠΑ το 2018 και αναμένεται να φθάσει τα 94,21 δισεκατομμύρια δολάρια ΗΠΑ έως το 2023. (29)

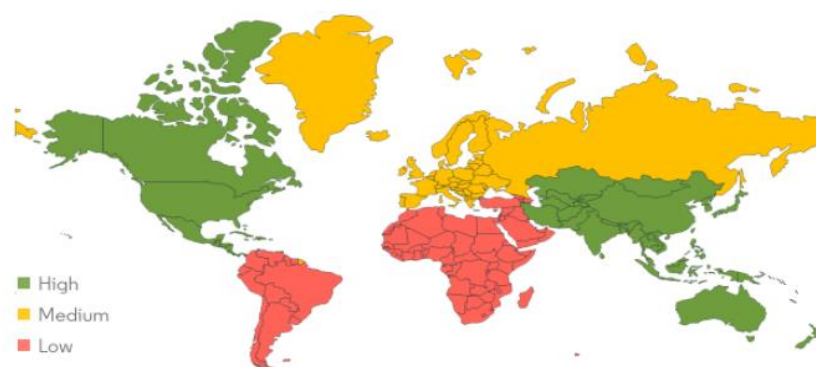


Εικόνα 4: Η αγορά των λειτουργικών τροφίμων ανά έτος και περιοχή (Usd million) (30)

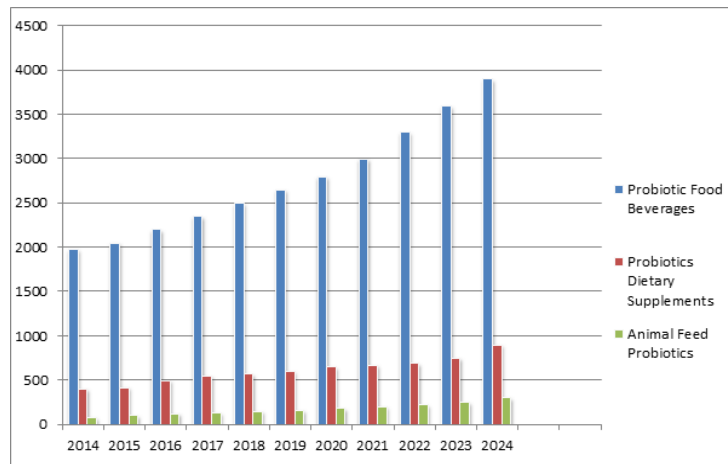


Εικόνα 5: Λειτουργικά προϊόντα ανά κατηγορία τροφίμων 2017 (31)

Αναφορικά με τα προβιοτικά προϊόντα, τα προβιοτικά τρόφιμα και ποτά είχαν τη μεγαλύτερη διείσδυση το 2014 και αυτή η τάση αναμένεται να συνεχιστεί τα επόμενα οκτώ χρόνια, λόγω της συνεχούς καινοτομίας στον τομέα των τροφίμων. Η παγκόσμια αγορά έφτανε τα 47,1 δισεκατομμύρια δολάρια το 2018 (32) και έως το 2022 αναμένεται να ξεπεράσει τα 63 δισεκατομμύρια δολάρια λόγω των αυξανόμενων κλινικών στοιχείων που υποστηρίζουν την αποτελεσματικότητα των προβιοτικών στη γενική συντήρηση της υγείας και τη θεραπεία ασθενειών. Η Ευρώπη και οι Ηνωμένες Πολιτείες αντιπροσωπεύουν σημαντική αγορά παγκοσμίως, ενώ η Νοτιοανατολική Ασία και η Ωκεανία το 2017 ήταν η ταχύτερη αναπτυσσόμενη αγορά. Οι κανονισμοί επισήμανσης, ειδικά στις ΗΠΑ και την Ευρωπαϊκή Ένωση, έχουν σημαντικό αντίκτυπο στην ανάπτυξη της αγοράς. Τα τρόφιμα και τα ποτά κυριάρχησαν στην αγορά εφαρμογών και αντιπροσώπευαν πάνω από το 80% της συνολικής αγοράς προβιοτικών, λόγω της ανάπτυξης κρέατος, γαλακτοκομικών προϊόντων, αρτοποιίας, δημητριακών πρωινού, λιπών και ελαίων, ποτών, ψαριών και αυγών, κρέατος και προϊόντων σόγιας. (31) Προϊόντα τύπου σκόνης και ροφήματος φαίνεται να είναι πρώτα στις προτιμήσεις λόγω της επιθυμίας των καταναλωτών για εύκολα, γρήγορα και καθημερινά λειτουργικά τρόφιμα. (32) Σύμφωνα με την έκθεση της βιομηχανίας ποτών, ο τομέας προβιοτικών ποτών με βάση τα γαλακτοκομικά προϊόντα είναι ο ηγετικός τομέας στην αγορά προβιοτικών, ακολουθούμενος από τον τομέα προβιοτικών ποτών με βάση τα φρούτα. Η Νοτιοανατολική Ασία και η Ωκεανία κατέχουν το μεγαλύτερο μερίδιο της αγοράς προβιοτικών ποτών, ακολουθούμενη από την Ευρώπη. (33)

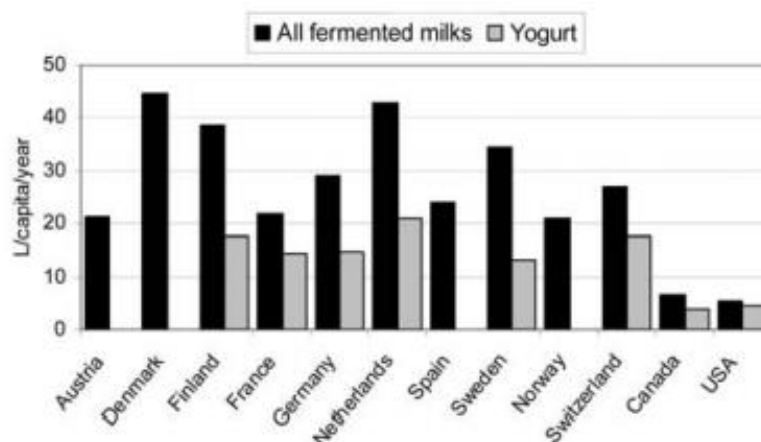


Εικόνα 6: Παγκόσμια αγορά προβιοτικών ποτών, 2018 (33)



Εικόνα 7: Έσοδα της ευρωπαϊκής αγοράς προβιοτικών ανά κατηγορία προϊόντος (εκατομμύρια ευρώ) (31)

Στην Ευρώπη, το μεγαλύτερο κομμάτι των προβιοτικών προϊόντων περιλαμβάνει τα γιαούρτια και τα επιδόρπια με πωλήσεις πάνω από 1 δισεκατομμύριο ευρώ και ακολουθούν τα γάλατα. Από τις σημαντικότερες εφαρμογές είναι ένα «daily-dose» ρόφημα 65-125 ml (γάλα, ρόφημα γιαουρτιού με γεύση ή χυμός), το οποίο φαίνεται να έχει σταθερότητα κατά την αποθήκευση, περιλαμβάνει γνωστά και μελετημένα στελέχη προβιοτικών και ενισχύεται με ενεργά συστατικά όπως πρεβιοτικά, φυτοστερόλες, στανόλες και αντιοξειδωτικά. Η προσθήκη προβιοτικών στους χυμούς φαίνεται εξίσου κερδοφόρα λόγω των θρεπτικών συστατικών των χυμών, της γεύσης και του υγιεινού προφίλ που έχουν στα μάτια του καταναλωτικού κοινού. Προϊόντα όπως το παγωτό, το τυρί, τα γλυκά και οι τσίχλες δεν έχουν σημαντική θέση στη συγκεκριμένη αγορά της Ευρώπης. Κάποιες φορές χρησιμοποιείται ο συνδυασμός προβιοτικών και βρώμης ή σόγιας ως πρόσθετο σε προβιοτικά προϊόντα βασισμένα στο αγελαδινό γάλα. Μια σχετικά νέα και πολλά υποσχόμενη κατηγορία τροφίμων με προβιοτικά είναι οι παιδικές φόρμουλες/γάλατα για τα βρέφη. (34) Συνοπτικά οι 4 κορυφαίες κατηγορίες προβιοτικών προϊόντων στην Ευρώπη είναι το γιαούρτι και τα ροφήματα με βάση το γιαούρτι, οι χυμοί φρούτων/λαχανικών, προϊόντα δημητριακών (μπάρες, προϊόντα πρωινού), γάλα και μη γαλακτοκομικά ποτά. (35)



Εικόνα 8: Ετήσια κατά κεφαλήν κατανάλωση σε χώρες της Ευρώπης και της Βόρειας Αμερικής. (34)

1.3.2 Νομοθεσία για τα λειτουργικά τρόφιμα/προβιοτικά - Ισχυρισμοί υγείας

Αναφορικά με τα λειτουργικά τρόφιμα οι κανονισμοί δεν είναι ξεκάθαροι, καθώς δεν υπάρχει ένας διεθνώς αναγνωρισμένος ορισμός. (1) Μέχρι στιγμής, δεν υπάρχει κανένας εγκεκριμένος ισχυρισμός υγείας στην Ευρώπη για τα λειτουργικά τρόφιμα. Μια υπόθεση γύρω από αυτό το γεγονός φαίνεται να είναι η ανεπαρκής κατανόηση των λειτουργικών προϊόντων στην Ευρωπαϊκή αγορά από την πλευρά των καταναλωτών, με αποτέλεσμα τον αρνητικό αντίκτυπο και την καχυποψία απέναντι στα συγκεκριμένα προϊόντα, παρόλο που ο ρόλος των ισχυρισμών είναι η διευκόλυνση, η ενημέρωση και η ασφάλεια των καταναλωτών όσο αναφορά τις παραπλανητικές ετικέτες της αγοράς τροφίμων. (36) Λόγοι απόρριψης των ισχυρισμών μπορεί να είναι επίσης η έλλειψη πλήρους επιστημονικής τεκμηρίωσης, η ανακρίβεια στη διατύπωση είτε στην ομάδα αναφοράς του ισχυρισμού είτε στο συστατικό του τροφίμου ή η χρήση ακατάλληλου, για τον ισχυρισμό, βιοδείκτη για την αξιολόγηση της ευεργετικής δράσης του τροφίμου.

Συγκεκριμένα για τα προβιοτικά, στην Ευρωπαϊκή Νομοθεσία, δεν υπάρχει μέχρι σήμερα ορισμός του όρου "προβιοτικός", ούτε συγκεκριμένη νομοθεσία που να αφορά τα προβιοτικά τρόφιμα όπως και την ευρύτερη κατηγορία των λειτουργικών τροφίμων στην οποία ανήκουν. Ωστόσο, υπάρχει ένας αριθμός νομοθετικών διατάξεων, που αφορούν κυρίως την ασφάλεια και την επισήμανση των τροφίμων, οι οποίες πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά την παρασκευή και εμπορία ενός προβιοτικού γαλακτοκομικού προϊόντος.

Στο άρθρο 2.1 της οδηγίας 2000/13/ΕΚ της Ευρωπαϊκής Ένωσης περιέχονται όλοι οι κανόνες που προστατεύουν τον καταναλωτή από τυχόν παραπλάνηση. Έχει απαγορευτεί η χρήση του όρου «ιατρικοί ισχυρισμοί» οι οποίοι προσδίδουν σε οποιαδήποτε τροφή την ιδιότητα πρόληψης, θεραπείας, ίασης ασθένειας ή κάποιας άλλης παρόμοιας ιδιότητας. Επομένως, κατά τη σήμανση, παρουσίαση ή διαφήμιση του προϊόντος δεν επιτρέπεται η αναφορά ενός τέτοιου ισχυρισμού. Ο κανονισμός αυτός καθιστά δύσκολη την έγκριση περί προβιοτικών. (37)

Ο ισχυρισμός «περιέχει προβιοτικά» εμπεριέχει μια ευεργετική δράση στην υγεία και θα πρέπει να συνοδεύεται από έναν συγκεκριμένο ισχυρισμό υγείας. Η EFSA το 2010 είχε εκφράσει αρνητική γνώμη για όλες τις αξιώσεις που αφορούσαν τα προβιοτικά, εκτός από τις καλλιέργειες στο ζωντανό γιαούρτι, οι οποίες έδειξαν να βελτιώνουν την πέψη της λακτόζης του γιαουρτιού σε άτομα με δυσανεξία. Πολλοί ισχυρισμοί υγείας για τα προβιοτικά έχουν ήδη τεθεί για επαναξιολόγηση και έχει γίνει έκκληση για περισσότερα τεκμηριωμένα επιστημονικά δεδομένα. Η συζήτηση σχετικά με τα αποτελέσματα της επανεκτίμησης ήταν πολύ κερδοφόρα, αλλά είναι σαφές ότι θα χρειαστεί περαιτέρω έρευνα για την υποστήριξη μιας ευεργετικής φυσιολογικής επίδρασης στον άνθρωπο στις περισσότερες (αν όχι σε όλες) τις περιπτώσεις. Οι συγκεκριμένες λειτουργίες/οφέλη θα πρέπει να οριστούν σωστά. (38)

Προϊόντα που ισχυρίζονται ότι είναι προβιοτικά ή έχουν προβιοτικές ιδιότητες δεν μπορούν αν πουληθούν στην Ευρώπη, αφού ο όρος «προβιοτικό» είναι μη αναγνωρισμένος ισχυρισμός υγείας. Δεδομένου ότι τα προβιοτικά χρησιμοποιούνται σε συμπληρώματα διατροφής, τα οποία περιέχουν μικροθρεπτικά συστατικά, και ότι ο όρος «προβιοτικά» δεν πρέπει να χρησιμοποιείται σε προϊόντα με υψηλή περιεκτικότητα σε θερμίδες τίθεται το ερώτημα αν η Επιτροπή θα μπορούσε να εξετάσει το ενδεχόμενο να επιτρέψει τη χρήση αυτού του όρου ως ισχυρισμού διατροφής με συγκεκριμένους όρους χρήσης, ώστε να

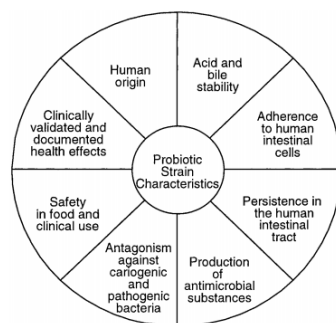
αποφευχθεί η εφαρμογή του σε ανθυγιεινά προϊόντα με υψηλή περιεκτικότητα σε θερμίδες. (39)

Σε παγκόσμιο επίπεδο, η Επιτροπή του Codex Alimentarius (CAC) των οργανισμών FAO/WHO υιοθέτησε, στην 26η Σύνοδό της, ένα νέο πρότυπο για τα ζυμωμένα γάλατα (FAO/WHO 2003). Το νέο αυτό πρότυπο περιλαμβάνει ένα ευρύτερο φάσμα ζυμωμένων γαλάτων, όπως το κεφίρ, το κουμίσ και το γάλα *acidophilus*. Αν και το εν λόγω πρότυπο δεν απευθύνεται ειδικά στα προβιοτικά γαλακτοκομικά προϊόντα, καθορίζει τα χαμηλότερα επίπεδα των μικροοργανισμών της καλλιέργειας εκκίνησης στο τρόφιμο στα 10^7 cfu/g, ενώ όταν υπάρχει επισήμανση για ειδικούς μικροοργανισμούς (εκτός της φυσιολογικής καλλιέργειας εκκίνησης) ορίζει ως χαμηλότερο επίπεδο για τους εν λόγω μικροοργανισμούς εκείνο των 10^6 cfu/g τροφίμου, φτάνοντας τα 10^8 - 10^9 cfu/g τροφίμου το οποίο αντιστοιχεί σε ημερήσια πρόσληψη 100 g ή ml τροφής. (10)

Παρόλο που έχουν κυκλοφορήσει πολλά προϊόντα με την ετικέτα προβιοτικά, δεν έχουν αξιολογηθεί όλα τα στελέχη των μικροοργανισμών σε ανθρώπινες κλινικές έρευνες. Επίσης, σε μερικές περιπτώσεις δεν υπάρχει ταυτοποίηση του στελέχους του μικροοργανισμού, με αποτέλεσμα να μην αναγράφονται στην ετικέτα του προϊόντος. Περισσότερα στελέχη μικροοργανισμών ή μεγαλύτερη δόση από τη συνιστάμενη δεν σημαίνει απαραίτητα ένα πιο αποτελεσματικό προϊόν. Για το λόγο αυτό, είναι σημαντικό οι ισχυρισμοί υγείας προβιοτικών που υποβάλλονται για έγκριση να συνοδεύονται, εκτός από το στέλεχος, από την ευεργετική ημερήσια δόση (προτιμότερα σε μέγεθος μερίδας προϊόντος) και την προτεινόμενη συχνότητα κατανάλωσης. (34)

1.3.3 Κριτήρια επιλογής προβιοτικών στα τρόφιμα – επιθυμητά χαρακτηριστικά

Ένας προβιοτικός μικροοργανισμός προτού χορηγηθεί στον καταναλωτή πρέπει να πληροί ορισμένα κριτήρια. Για την επιτυχή προσθήκη τους στα τρόφιμα, τα προβιοτικά στελέχη πρέπει πρώτα να μπορούν να παρασκευαστούν υπό βιομηχανικές συνθήκες, και στη συνέχεια να επιβιώνουν και να διατηρούν τη λειτουργικότητά τους στα τρόφιμα. Η επιλογή των προβιοτικών στα τρόφιμα βασίζεται σε τρεις βασικούς πυλώνες: την ασφάλεια, τη λειτουργικότητα (επιβίωση, προσκόλληση, αποικισμός, παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών, ανταγωνιστική δράση έναντι παθογόνων) και τα τεχνολογικά χαρακτηριστικά όπως οργανοληπτικές ιδιότητες και βιωσιμότητα στις διαδικασίες παραγωγής και αποθήκευσης. (40)



Εικόνα 9: Θεωρητική βάση για την επιλογή των προβιοτικών (40)

Για να είναι πιο ξεκάθαρο πότε ένας μικροοργανισμός μπορεί να χαρακτηριστεί ως προβιοτικός έχουν θεσπιστεί κάποια κριτήρια με βάση αυτούς τους πυλώνες: (40) (41) (42)

I. Κριτήρια ασφάλειας

- Να αποτελεί γηγενή συστατικό του ανθρώπινου γαστρεντερικού συστήματος, να είναι δηλαδή ανθρώπινης προέλευσης.
- Να μην είναι παθογόνα
- Να μη συνδέονται με ασθένειες του γαστρεντερικού συστήματος
- Τα στελέχη να μη μεταφέρουν γονίδια με αντοχή στα αντιβιοτικά

II. Λειτουργικά κριτήρια:

- Ικανότητα επιβίωσης στα γαστρικά υγρά
- Ικανότητα επιβίωσης στα χολικά άλατα
- Ικανότητα επιβίωσης και πολλαπλασιασμού στο ανώτερο πεπτικό σύστημα
- Ικανότητα προσκόλλησης στα επιθηλιακά κύτταρα του γαστρεντερικού σωλήνα και δυνατότητα αποικισμού
- Ανοσοδιεγερτικές δράσεις αλλά όχι προφλεγμονώδεις ιδιότητες
- Ανταγωνιστική δράση έναντι παθογόνων μικροοργανισμών (παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών/βακτηριοσίνες)
- Αντικαρκινικές ιδιότητες
- Αντιμεταλλαξογόνες ιδιότητες
- Συμβολή στον μεταβολισμό της χοληστερόλης και της λακτόζης

III. Τεχνολογικά κριτήρια:

- Οργανοληπτικές ιδιότητες που αφορούν την εμφάνιση, τη γεύση, την οσμή και την αφή του τελικού προϊόντος
- Βιωσιμότητα κατά το στάδιο της επεξεργασίας του προϊόντος
- Σταθερότητα ώστε να μην αλλοιωθούν τα χαρακτηριστικά του προϊόντος κατά την αποθήκευση
- Αντίσταση κατά των φάγων
- Να διατηρείται η βιωσιμότητα καθ' όλη τη διάρκεια ζωής του προϊόντος πάνω από τα επίπεδα που έχουν οριστεί για τις ευεργετικές δράσεις του εκάστοτε μικροοργανισμού (σε γενικό πλαίσιο $>10^6$ CFU/g)

Είναι σημαντικό οι μικροοργανισμοί να έχουν χαρακτηριστεί ως ασφαλείς για τον ανθρώπινο οργανισμό – GRAS (Generally Recognized As Safe) από την EFSA και τον FDA. Στελέχη του γένους *Lactobacillus* και *Bifidobacterium* έχουν χαρακτηριστεί ως GRAS.

1.3.4 Συνθήκες - ουσίες που επηρεάζουν την επιβίωση των προβιοτικών

Πρώτα από όλα, η βιωσιμότητα του προβιοτικού μικροοργανισμού εξαρτάται από τον ίδιο τον μικροοργανισμό. Κάθε γένος έχει τις δικές του χαρακτηριστικές ιδιότητες, οι οποίες επηρεάζουν την ανάπτυξή του υπό διάφορες συνθήκες και υπό την παρουσία διαφορετικών

ουσιών. Αξίζει να σημειωθεί ότι διαφορές στις ιδιότητες εμφανίζουν ακόμα και διαφορετικά στελέχη του ίδιου είδους.

Για να μπορέσουν να αναπτυχθούν και να παρέχουν τα ευεργετικά αποτελέσματά τους, απαιτείται το κατάλληλο υπόστρωμα ώστε να προσφέρει τις κατάλληλες συνθήκες που θα βοηθήσουν τα προβιοτικά στελέχη να ανταπεξέλθουν τόσο τις αντιξοότητες κατά την παραγωγή/αποθήκευση όσο και του γαστρεντερικού συστήματος. Ο τύπος της τροφής «vehicle» παίζει βασικό ρόλο στην επιβίωση, τη φυσιολογία και την αποτελεσματικότητα των προβιοτικών καλλιέργειών. (43) Ουσιαστικά ρόλος της είναι να προωθεί και να προστατεύει τους ζώντες μικροοργανισμούς αλλά και να διατηρεί τα αισθητήρια χαρακτηριστικά του προϊόντος. (44)

Η ανοχή στις χολικές και όξινες πιέσεις είναι ένας χρήσιμος παράγοντας της τεχνολογικής απόδοσης του στελέχους σε προβιοτικά τρόφιμα.

Το pH είναι ένας από τους παράγοντες που μπορεί να επηρεάσει την βιωσιμότητα των προβιοτικών. Λόγω έκκρισης γαστρικού υγρού, το pH του στομάχου μειώνεται, με αποτέλεσμα ο μικροοργανισμός να εκτίθεται σε όξινο περιβάλλον με pH 1-1.5, στην περίπτωση που υπάρχει τροφή εκείνη τη στιγμή στο στομάχι, και έως 4-4.5 εάν δεν υπάρχει. Κατά τη διάρκεια της πέψης, οι όξινες συνθήκες γίνονται πιο επικίνδυνες για τους προβιοτικούς μικροοργανισμούς. Η τροφή μπορεί να λειτουργήσει προστατευτικά για τους μικροοργανισμούς σε αυτές τις συνθήκες και για αυτό έχει μεγάλη σημασία η επιλογή του τροφίμου «vehicle». (45) Πέρα από το pH στη στομαχική κοιλότητα, προϊόντα κρέατος και ποτά όπως οι χυμοί φρούτων αποτελούν πρόκληση για τα προβιοτικά λόγω της οξύτητας. Μια χαμηλή τιμή pH αυξάνει τη συγκέντρωση οργανικών οξέων σε προϊόντα που έχουν υποστεί ζύμωση, ενισχύοντας έτσι τη βακτηριοκτόνο δράση τους. Τα στελέχη *Lactobacilli* σε προϊόντα που έχουν υποστεί ζύμωση μπορούν να επιβιώσουν και να αναπτυχθούν σε pH 3,7 – 4,3 ενώ τα στελέχη *Bifidobacteria* είναι λιγότερο ανθεκτικά και ένα pH κάτω από 4,6 είναι καταστροφικό. (41)

Η χολή όπως και το pH μπορούν να εμποδίσουν την ανάπτυξη των προβιοτικών στον οργανισμό. Τα χολικά άλατα σχηματίζονται στο ήπαρ με πρόδρομη ένωση την χοληστερόλη και συναντώνται στο λεπτό έντερο με τη μορφή συζευγμένων αλάτων. Βασική τους λειτουργία είναι η γαλακτωματοποίηση του λίπους της τροφής ενώ παράλληλα επιδρούν θετικά στη μείωση των επιπέδων της χοληστερόλης στο αίμα. Η συγκέντρωσή τους στο έντερο εξαρτάται από το είδος και την ποσότητα των τροφίμων που έχει καταναλωθεί και κυμαίνεται από 0,2 έως 2% (w/v). (46)

Η ανοχή των προβιοτικών στο χαμηλό pH και τα χολικά άλατα, αξιολογείται σχετικά γρήγορα και με χαμηλό κόστος στο εργαστήριο με *in vitro* μεθόδους. Τόσο το pH όσο και τα χολικά άλατα επηρεάζουν την ικανότητα πρόσδεσης των προβιοτικών στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου και στον βλενογόνο, η οποία θεωρείται η πιο σημαντική ιδιότητα των συγκεκριμένων μικροοργανισμών γιατί βοηθάει την μεγαλύτερη παραμονή, επιβίωση και την ανάπτυξή τους στο έντερο καθώς επίσης δρα ανοσορυθμιστικά, αποτρέποντας τους παθογόνους μικροοργανισμούς να δημιουργήσουν αποικίες. (44)

Άλλοι παράγοντες κατά τη διαδικασία της παραγωγής, της επεξεργασίας και της αποθήκευσης φαίνεται να επηρεάζουν επίσης τον χρόνο ζωής των προβιοτικών μικροοργανισμών στα τρόφιμα.

Σημαντικό κομμάτι αποτελούν τα συστατικά ενός προϊόντος, τα οποία μπορούν να δρουν θετικά, ουδέτερα ή αρνητικά στη σταθερότητα των προβιοτικών, και επομένως στη βιωσιμότητά τους. Για τον λόγο αυτό, η αντίσταση του στελέχους στην πρόσθετη ουσία πρέπει να αποτελεί κριτήριο επιλογής, ώστε να επιτευχθεί η καλύτερη βιωσιμότητα και ανάπτυξη κατά την επεξεργασία και την αποθήκευση. Ουσίες όπως τα γλυκαντικά (ακετουλφάμη, ακετοΐνη, ασπαρτάμη), η ζάχαρη και τα διάφορα είδη της, το αλάτι, οι χρωστικές και τα αρώματα, οι αρωματικές ενώσεις, η ναταμυκίνη, η νισίνη, η λυσοζύμη και τα νιτρώδη επιδρούν δραστικά στη βιωσιμότητα των προβιοτικών σε ζυμωμένα και μη προϊόντα, αλλά εξαρτάται από το προβιοτικό στέλεχος και την ποσότητα της ουσίας στο τρόφιμο. (47) (41)

Ουσίες όπως η γλυκόζη, οι βιταμίνες, τα μέταλλα, η καζεΐνη, τα προϊόντα υδρόλυσης των πρωτεϊνών ορού γάλακτος και οι αντιοξειδωτικές ουσίες αυξάνουν την βιωσιμότητα των προβιοτικών στελεχών κυρίως κατά την αποθήκευση. Συγκεκριμένα, τα προϊόντα υδρόλυσης των πρωτεϊνών (καζεΐνη, τρυπτόνη, L-κυστεΐνη) προσφέρουν θρεπτικά συστατικά στους μικροοργανισμούς και αποτρέπουν την μεγάλη μείωση του pH. Αναφορικά με τη βιωσιμότητα των *L. acidophilus* και *Bifidobacteria*, οι ουσίες αυτές βελτίωσαν τη βιωσιμότητά τους. Ο ρυθμός ανάπτυξης του προβιοτικού *L. acidophilus* La-5 και *L. rhamnosus* Lr-35 σε ζυμωμένα γάλατα κατά τη διάρκεια των σταδίων παραγωγής μειώθηκε, αλλά η επιβίωση αυτών των βακτηρίων βελτιώθηκε μετά την αποθήκευση. (41)

Έρευνες έχουν εξετάσει και την επίδραση των δισακχαρίτων στη διατήρηση της σταθερότητας των μεμβρανών των κυττάρων κατά την αποθήκευση. Τέτοιες ουσίες, ονομάζονται προστατευτικές ή κρουπροστατευτικές (CPA) και έχουν ως ρόλο την προστασία των μικροβιακών κυττάρων πριν την ξήρανση και κατά την κρία αποθήκευσή τους. Σε αυτές συγκαταλέγονται το αποβουτυρωμένο γάλα σε σκόνη, η πρωτεΐνη ορού γάλακτος, η γλυκερόλη, η γλυκόζη, η σακχαρόζη, η σορβιτόλη, το διμεθυλοσουλφοξείδιο (Me_2SO), η βεταΐνη, η αδονιτόλη, η λακτόζη και πολυμερή όπως η δεξτράνη και η πολυαιθυλενογλυκόλη. Βάσει βιβλιογραφικών ανασκοπήσεων τα καλύτερα αποτελέσματα παρουσιάζονται για τη μεθανόλη, η αιθυλενογλυκόλη, η προπυλενογλυκόλη, η αλβουμίνη και το Me_2SO . (48) Σε μια μελέτη με βάση το στέλεχος *B. Bifidum* BB-12, το αραβικό κόμμα, η ζελατίνη και η πηκτίνη έδειξαν την καλύτερη προστατευτική επίδραση κατά την ξήρανση με ψεκασμό. Κύτταρα που υπέστησαν επεξεργασία με αυτές τις ουσίες έδειξαν μειωμένη βλάβη μεμβράνης, βελτιωμένη σταθερότητα και βελτιωμένη καλλιέργεια κατά τη διάρκεια ενός μήνα αποθήκευσης. (49) Παράδειγμα αποτελεί επίσης η έρευνα, στην οποία το στέλεχος *L. paracasei* NFBC 338 εμφάνισε 10 φορές μεγαλύτερη δυνατότητα επιβίωσης σε σχέση με τα κύτταρα της ομάδας ελέγχου όταν χρησιμοποιήθηκε ένα μείγμα κρουπροστατευτικών ουσιών πριν την ξήρανση με ψεκασμό σε θερμοκρασία 100-105 °C. (50) Η σορβιτόλη αποδείχτηκε η καλύτερη προστατευτική ουσία για το στέλεχος *L. plantarum* και *L. Rhamnosus* κατά την αποθήκευση. (41)

Ορισμένα μη εύπεπτα ή ελάχιστα εύπεπτα συστατικά τροφίμων (υδατάνθρακες) (γνωστά ως πρεβιοτικά) μεταβολίζονται επιλεκτικά από ευεργετικά εντερικά βακτήρια που ενισχύουν την ανάπτυξη ή/και τη δραστηριότητά τους. Μερικές από αυτές τις ενώσεις όπως οι φρουκτο-ολιγοσακχαρίτες (FOS) και οι γαλακτο-ολιγοσακχαρίτες (GOS) έχουν θετική επίδραση στη διατήρηση της βιωσιμότητας των προβιοτικών ειδικά των στελεχών Bifidobacteria σε προϊόντα διατροφής κατά την αποθήκευση. (41) (40)

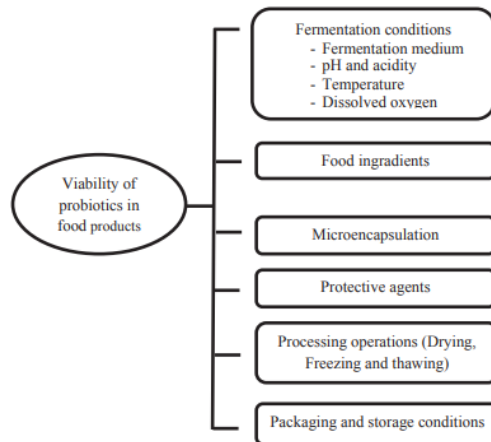
Πέρα από τις πρόσθετες ουσίες και τα συντηρητικά στα τρόφιμα, σπουδαίο ρόλο στην ανάπτυξη των προβιοτικών έχει και το οξυγόνο, το οποίο στις περισσότερες περιπτώσεις είναι επιβλαβές αφού πρόκειται για αναερόβιους μικροοργανισμούς. Οι δράσεις του αφορούν την απευθείας καταστροφή των κυττάρων, την παραγωγή υπεροξειδίων και ελευθέρων ριζών μέσω της οξειδωσης συστατικών, όπως τα λίπη. Το επίπεδο οξυγόνου εντός της συσκευασίας του προϊόντος κατά την αποθήκευση πρέπει να είναι όσο το δυνατόν περισσότερο χαμηλότερο προκειμένου να αποφευχθεί η τοξικότητα και ο θάνατος του μικροοργανισμού και η επακόλουθη απώλεια λειτουργικότητας του προϊόντος. Η ευαισθησία στο οξυγόνο διαφέρει ανάλογα το είδος και το στέλεχος των προβιοτικών. Γενικά τα στελέχη του γένους Lactobacilli είναι πιο ανθεκτικά συγκριτικά με τα στελέχη Bifidobacteria, τόσο ώστε να μην θεωρείται ένας σημαντικός παράγοντας για την επιβίωσή τους. Σε ανθεκτικά, στο οξυγόνο, είδη έχουν βρεθεί παράγοντες όπως η NAD-οξειδάση και η NADH-υπεροξειδάση, οι οποίοι μεταφέρουν οξυγόνο έξω από το εσωτερικό του κυττάρου. Η παρουσία ανριοξειδωτικών ουσιών, όπως οι κατεχίνες, το αεροστεγές συσκευάσμα και η παρακολούθηση της παραγωγικής διαδικασίας είναι κάποιοι προτεινόμενοι τρόποι ελαχιστοποίησης της πιθανότητας εισβολής διαλυμένου οξυγόνου στο προϊόν. (41)

Η ύπαρξη υγρασίας μπορεί να βλάψει εξίσου τους μικροοργανισμούς. Η ποσότητα νερού που απομένει μετά την ξήρανση επηρεάζει όχι μόνο τη βιωσιμότητα των βακτηρίων όπως καθορίζεται αμέσως μετά τη διαδικασία, αλλά και το ποσοστό απώλειας βιωσιμότητας κατά την επόμενη αποθήκευση. (41)

Η θερμοκρασία αποθήκευσης είναι αντιστρόφως ανάλογη της βιωσιμότητας των προβιοτικών. Οι υψηλές θερμοκρασίες καταστρέφουν τους μικροοργανισμούς ενώ ως ιδανική θερμοκρασία αποθήκευσης προτείνονται οι 4-5 °C. Λόγω της χαμηλής αντίστασης των κυττάρων Bifidobacterium σε χαμηλές θερμοκρασίες ψύξης, η προτεινόμενη θερμοκρασία αποθήκευσης είναι οι 8 °C. Ωστόσο, για μακροχρόνια αποθήκευση των προβιοτικών που έχουν αποξηραθεί με ψύξη, συνίσταται μια πολύ χαμηλότερη θερμοκρασία, στις -18 °C, που μεγιστοποίησε τη βιωσιμότητα των Bifidobacteria. Η θερμοκρασία αποθήκευσης 20 °C είχε ως αποτέλεσμα σημαντικές μειώσεις σε βιώσιμες μετρήσεις αυτού του είδους στα αποξηραμένα προϊόντα. (47) Προβιοτικά σε προϊόντα που περιέχουν ζάχαρη παρουσιάζουν επίσης μείωση της βιωσιμότητας σε υψηλές θερμοκρασίες. (41)

Εν κατακλείδι, το ίδιο το προβιοτικό και το υπόστρωμά του, οι διαδικασίες παραγωγής και επεξεργασίας (συνθήκες ζύμωσης, η κατάψυξη, η απόψυξη, η ξήρανση, η επανενυδάτωση των ξηρών προβιοτικών, οι εφαρμογές μικροενθυλάκωσης), οι πρόσθετες ουσίες, η περιεκτικότητα σε οξυγόνο, η παρουσία υγρασίας, οι συνθήκες και η θερμοκρασία αποθήκευσης, η οξύτητα του pH, ο τρόπος συσκευάσματος και τα γαστρεντερικά υγρά είναι

ονομαστικά οι παράγοντες που επηρεάζουν την επιβίωση των προβιοτικών μικροοργανισμών από το στάδιο της παραγωγής έως της κατανάλωσης. (51)

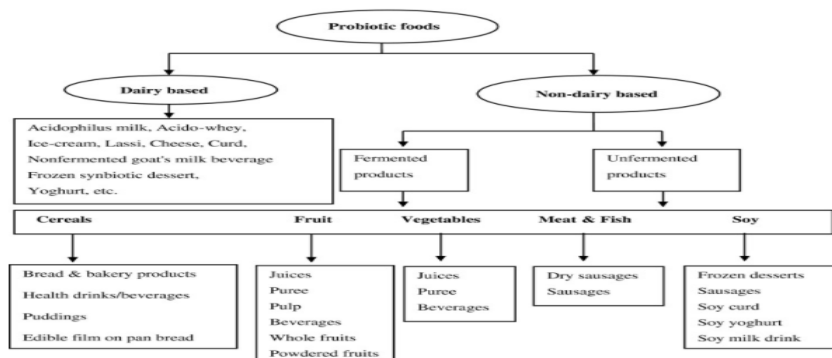


Εικόνα 10: Παράγοντες που καθορίζουν την βιωσιμότητα των προβιοτικών (41)

1.3.5 Τρόφιμα στα οποία εισάγονται τα προβιοτικά βακτήρια

Υπάρχουν αρκετές τροφές, οι οποίες συνιστούν εκ φύσεως μια καλή πηγή προβιοτικών μικροοργανισμών. Σε αυτές συμπεριλαμβάνονται τα γαλακτοκομικά προϊόντα όπως το γάλα, το γιαούρτι, το κεφίρ και τα μαλακά τυριά, τα προϊόντα σόγιας, το ξινολάχανο/μη παστεριωμένο λάχανο τουρσί, οι πίκλες, οι ελιές και το ψωμί με προζύμι.

Λόγω του μεγάλου ενδιαφέροντος γύρω από το θέμα των προβιοτικών και των τεκμηριωμένων επιστημονικών μελετών σχετικά με τις ευεργετικές τους δράσεις, η βιομηχανία τροφίμων στράφηκε στην παραγωγή προϊόντων με προβιοτικά. Παρόλο που τα ζυμωμένα γαλακτοκομικά προϊόντα αποτελούν την συμβατική επιλογή προβιοτικών τροφών, οι αυξανόμενες ανησυχίες σχετικά με τη δυσανεξία στη λακτόζη, την αλλεργία στις πρωτεΐνες γάλακτος και την υψηλή περιεκτικότητα σε χοληστερόλη και σε κορεσμένα λιπαρά οξέα των γαλακτοκομικών τροφών οδήγησαν στην ανάπτυξη νέων τροφίμων, ώστε να διευρυνθεί η αγορά των λειτουργικών τροφίμων και να υπάρχει η δυνατότητα επιλογής από την πλευρά του καταναλωτή. (43)



Εικόνα 11: Κατηγορίες προβιοτικών τροφίμων (43)

Η χρήση χυμού φρούτων/λαχανικών ως βασικό συστατικό προβιοτικών προϊόντων προσφέρει αρκετά πλεονεκτήματα έναντι των γαλακτοκομικών καθώς είναι μια πλούσια πηγή θρεπτικών συστατικών, δεν απαιτεί την χρήση καλλιεργειών εκκίνησης και είναι οικείο σε όλες τις ηλικιακές ομάδες. Εμπλουτίζονται με διάφορα μέσα οξίνισης, τα οποία θα μπορούσαν να αυξήσουν τη διάρκεια ζωής των προβιοτικών, δημιουργώντας ένα αναερόβιο περιβάλλον, δεσμεύοντας το διαθέσιμο οξυγόνο. Βέβαια είναι σημαντικό να μελετηθεί η αντοχή του κάθε στελέχους στο χαμηλό pH, που όπως προαναφέρθηκε αποτελεί κριτήριο για την επιλογή του μικροοργανισμού. Επιπλέον, οι βιταμίνες, τα αμινοξέα, οι διαιτητικές ίνες, τα μέταλλα και τα αντιοξειδωτικά που περιέχουν και ο μικρός χρόνος παραμονής στα γαστρικά υγρά του στομάχου συμβάλλουν στην ανάπτυξη των LAB. Εξετάζεται επίσης η συμβολή των προβιοτικών στα αισθητήρια χαρακτηριστικά του προϊόντος με διάφορες μελέτες να υποστηρίζουν τη θετική επίδρασή τους και άλλες να υπογραμμίζουν τις δυσμενείς επιδράσεις στο άρωμα και στη γεύση. Επιπλέον έχει σημειωθεί η προστασία που παρέχουν τα φρούτα στα προβιοτικά σε κάποια στάδια επεξεργασίας του προϊόντος, όπως στη ξήρανση υπό κενό. (43) (52)

Η χρήση τροφίμων που ανήκουν στην ομάδα δημητριακών, ιδίως του ψωμιού, έχει σημαντικές δυνατότητες ως φορέας προβιοτικών μικροοργανισμών. Τα αλεύρια που λαμβάνονται από συγκεκριμένους κόκκους μπορούν να προστατεύσουν τα προβιοτικά κατά τη διέλευση τους μέσω του GIT και να αυξήσουν τον αποικισμό. Επιπλέον, τα δημητριακά και το ψωμί καταναλώνονται καθημερινά ως ένα βασικό τρόφιμο της διατροφής. (53) Ένα πλεονέκτημα της κατανάλωσης ζυμωμένων τροφίμων με βάση τα δημητριακά είναι η διαθεσιμότητα φυτικών ινών και η παρουσία πρεβιοτικών, μη εύπεπτων υδατανθράκων, όπως οι ολιγοσακχαρίτες, που μπορούν να διεγείρουν την ανάπτυξη προβιοτικών. Περιέχουν επίσης φυτοχυμικά, συμπεριλαμβανομένων των φυτοιστρογόνων, των φαινολικών ενώσεων, των αντιοξειδωτικών, του φυτικού οξύ και των στερολών. Παρόλα αυτά, η χαμηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη και σε ορισμένα βασικά αμινοξέα σε συνδυασμό με την χονδροειδή φύση των σπόρων δημητριακών, ορισμένες φορές καθιστούν τη διατροφική τους αξία χαμηλότερα σε σχέση με των γαλακτοκομικών προϊόντων. Η ζύμωση των δημητριακών μειώνει τον αριθμό των υδατανθράκων, αυξάνει την ποιότητα των πρωτεϊνών και τα επίπεδα της λυσίνης, προωθώντας τη σύνθεση ορισμένων αμινοξέων και τη βελτίωση των επιπέδων βιταμινών Β. Προσφέρει επίσης βέλτιστες συνθήκες pH για ενζυμική αποικοδόμηση φυτικού οξέος και απελευθέρωση μεταλλικών στοιχείων όπως μαγγάνιο (που είναι ένας σημαντικός παράγοντας ανάπτυξης του LAB), σίδηρο, ψευδάργυρο και ασβέστιο. Τα στελέχη του *Lactobacillus* έχουν αναγνωρισθεί ως σύνθετοι μικροοργανισμοί που απαιτούν όλα τα αναφερόμενα θρεπτικά συστατικά για να αναπτυχθούν και επομένως η ζύμωση των δημητριακών μπορεί να αντιπροσωπεύει έναν φτηνό τρόπο απόκτησης ενός κατάλληλου υποστρώματος για τους ευεργετικούς μικροοργανισμούς. Σπόροι ολικής όπως το κριθάρι και το σιτάρι παρουσιάζουν προστατευτική δράση σε κάποια στελέχη μικροοργανισμών απέναντι στο χαμηλό pH. Έχει αναφερθεί ότι η μαγιά μπορεί να παράξει βιταμίνες, οι οποίες βελτιώνουν την ανάπτυξη των LAB. (8)

Η σόγια, το πιο σημαντικό όσπριο στην Ασιατική παραδοσιακή διατροφή, είναι πλούσια σε πρωτεΐνη υψηλής διατροφικής αξίας. Η ζύμωση αποτελεί μια διαδικασία που αυξάνει την πεπτικότητα των προϊόντων σόγιας καθώς και την γευστικότητά τους. Κάποια στελέχη όπως το *Lb. plantarum*, *Streptococcus lactis*, και *Leuc. Lactis* έχουν απομονωθεί από τα φασόλια

σόγιας. Πειράματα που μελετούν την επιβίωση των προβιοτικών έδειξε ότι το γάλα σόγιας είναι ένα καλό υπόστρωμα για στελέχη όπως το *Lactobacillus species Lb. casei*, το *Lb. helveticus*, το *Lb. fermenti*, το *Lb. fermentum*, το *Lb. reuteri* και το *Lb. acidophilus*. (8)

Το κρέας έχει αποδειχθεί ένα καλό τρόφιμο «vehicle» για τα προβιοτικά λόγω της ρυθμιστικής του ικανότητας, η οποία πιθανώς να οφείλεται στο υψηλό pH του μικροπεριβάλλοντος που δημιουργούν τα βακτήρια στην επιφάνεια του κρέατος. Έρευνες έχουν μελετήσει την προστατευτική δράση του ως φορέας των LAB ως προς τα χολικά άλατα. (54) Τα προϊόντα κρέατος που χρησιμοποιούνται συνήθως για φορείς προβιοτικών είναι τα λουκάνικα τα οποία υποβάλλονται σε επεξεργασία με ζύμωση χωρίς θέρμανση. Οι μικροοργανισμοί που εμπλέκονται σε αυτή τη ζύμωση είναι και στελέχη των LAB, τα οποία όταν αποτελούν καλλιέργεια εκκίνησης βελτιώνουν την ποιότητα και την ασφάλεια του τελικού προϊόντος. Οι εναρκτήριες καλλιέργειες στο κρέας προωθούν την επιθυμητή μεταβολική διαδικασία. Τα στελέχη που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι τα *Lb. casei*, *Lb. curvatus*, *Lb. pentosus*, *Lb. plantarum*, *Lb. sakei*, *Pediococcus acidilactici* και *P. Pentosaceus*. Οι λειτουργικές καλλιέργειες εκκίνησης προσφέρουν πλεονεκτήματα συγκριτικά με τις συμβατικές καλλιέργειες, τα οποία αφορούν τη γεύση, την ασφάλεια και τη διατροφική αξία του προϊόντος. Δεδομένου ότι η μικροχλωρίδα ωριμασμένων ωμών ζυμωμένων λουκάνικων ευρωπαϊκού τύπου κυριαρχείται συνήθως από πιο ανταγωνιστικά στελέχη της ομάδας *Lactobacillus sakei/curvatus*, υπάρχει η πρόταση χρήσης κυρίαρχων στελεχών προϊόντων κρέατος ως προβιοτικών, επισημαίνοντας το γεγονός ότι είναι πιο ανταγωνιστικά από τα LAB άλλων πηγών λόγω της προσαρμογής τους στο περιβάλλον του κρέατος. Τα στελέχη *Lb. acidophilus*, *Lb. crispatus*, *Lb. amylovorus*, *Lb. gallinarum*, *Lb. gasseri*, *Lb. johnsonii* *Lb. rhamnosus*, *Lb. paracasei* subsp. *Paracasei* θεωρούνται κατάλληλα για ζύμωση του κρέατος. (55) (56) (8)

Πίνακας 3: Άλλα διαθέσιμα μη γαλακτομικά προϊόντα με προβιοτικά (57)

Προβιοτικό προϊόν	Τύπος προϊόντος	Στέλεχος προβιοτικού	Εταιρεία
Avenly velle	Ρόφημα με βρώμη	<i>Lactobacillus</i> , <i>Bifidobacterium</i>	Avenly Oy Ltd., Finland
Biola	Χυμός	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	Tine BA, Norway
Bioprofit	Χυμός	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG, <i>Probionibacterium freudenreichii</i> , <i>Shermanii</i> JS	Valio Ltd., Finland
Bravo Friscus	Χυμός	<i>Lactobacillus plantarum</i> HEAL9, <i>Lactobacillus paracasei</i> 8700:2	Skandemajerier, Sweden
Gefilus	Χυμός	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	Valio Ltd., Finland
GoodBelly drink	Χυμός	<i>Lactobacillus plantarum</i> 299V	NextFoods, Colorado
Grainfields wholegrain liquid	Σιτηρά, φασόλια και σπόροι	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus delbreuckii</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Saccharomyces boulardii</i>	AGM Foods Pvt. Ltd., Australia
Healthy life probiotics	Χυμός	<i>Lactobacillus paracasei</i> 8700:2, <i>Lactobacillus plantarum</i> Hea19	Golden circle, Australia

Kefir Soy	Φασόλια σόγιας	Kluyveromyces marxianus, Kluyveromyces lactis, Lactobacillus brevis, Lactobacillus. kefir, Leuconostoc mesenteroides, Lactobacillus helveticus	Life way, Greece
KeVita	Ανθρακούχο ρόφημα με λεμόνι και τζίντζερ	Bacillus coagulans GBI-306068, Lactobacillus paracasei 8700:2, Lactobacillus plantarum HEAL9	H-E-B, USA
Mucilon	Βρώμη και ρύζι	Bifidus BL	Nestle
Proviva	Ζυμωμένο ρόφημα φρούτου με βρώμη	Lactobacillus plantarum 299V	Skane Dairy, Sweden
Rela	Χυμός	Lactobacillus reuteri MM53	Biogaia, Sweden

1.4 Κατάθλιψη

1.4.1 Ορισμός κατάθλιψης

Ως κατάθλιψη ορίζεται η ψυχική διαταραχή που συνοδεύεται από το αίσθημα της θλίψης και της απώλειας ενδιαφέροντος για πράγματα και καθημερινές δραστηριότητες που χάριζαν ευχαρίστηση το εκάστοτε άτομο. Μπορεί να οδηγήσει σε μια ποικιλία αρνητικών συναισθηματικών και σωματικών προβλημάτων, τα οποία μειώνουν την ικανότητα του ατόμου να λειτουργήσει στο σπίτι ή στον χώρο εργασίας καθώς επίσης δυσχεραίνουν την ικανότητα του ατόμου για κοινωνικοποίηση. Οι αιτίες της κατάθλιψης περιλαμβάνουν πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις μεταξύ κοινωνικών, ψυχολογικών και βιολογικών παραγόντων. Τα γεγονότα της ζωής όπως η παιδική δυσκολία, η απώλεια και η ανεργία συμβάλλουν και μπορούν να καταλύσουν την ανάπτυξη της κατάθλιψης. (58) (59)

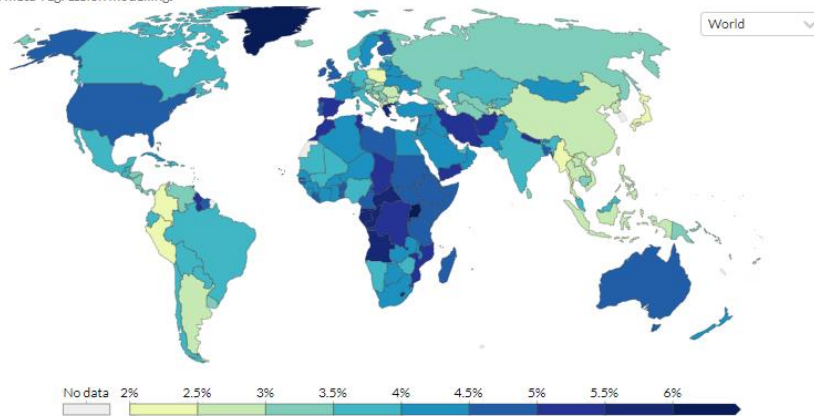
1.4.2 Επιδημιολογικά δεδομένα κατάθλιψης

Η κατάθλιψη πλέον αποτελεί ένα μείζον πρόβλημα, που επηρεάζει περισσότερα από 264 εκατομμύρια άτομα, όλων των ηλικιακών βαθμίδων, παγκοσμίως. Αν και υπάρχουν γνωστές, αποτελεσματικές θεραπείες για τη συγκεκριμένη ασθένεια, εκτιμάται ότι το 76% με 85% των ατόμων σε χώρες χαμηλού και μεσαίου εισοδήματος δεν λαμβάνουν θεραπεία για τη διαταραχή τους. Ανάμεσα σε άντρες και γυναίκες, υπάρχει μια αύξηση στο ποσοστό επιπολασμού κατάθλιψης στις γυναίκες (5,1%) συγκριτικά με το ποσοστό των ανδρών (3,6%). Τα ποσοστά διαφέρουν επίσης κατά ηλικιακή ομάδα. Συγκεκριμένα σε παιδιά έως 15 ετών, τα επίπεδα της κατάθλιψης δεν είναι τόσο υψηλά. Αντίθετα σε ηλικίες 55-74 ετών, τα ποσοστά φτάνουν το 7,5% για τις γυναίκες και το 5,5% για τους άνδρες. Πέρα από μεμονωμένη ασθένεια, η κατάθλιψη μπορεί να αποτελέσει παράγοντα κινδύνου για άλλες νόσους, όπως για παράδειγμα τα καρδιαγγειακά. Καθιστώντας το άτομο δυσλειτουργικό, είναι επίσης η κύρια αιτία της αναπηρίας παγκοσμίως και συμβάλλει σημαντικά στη συνολική παγκόσμια επιβάρυνση της νόσου. Στην χειρότερη εκδοχή της, η κατάθλιψη μπορεί να οδηγήσει σε αυτοκτονία. Περίπου 800.000 άνθρωποι πεθαίνουν λόγω αυτοκτονίας κάθε χρόνο ενώ παράλληλα είναι η δεύτερη κύρια αιτία θανάτου σε άτομα ηλικίας 15-29 ετών. (59) (60)

Share of the population with depression, 2019

Prevalence of depressive disorders in a given population. This is measured as the age-standardized prevalence, which assumes a constant age structure to compare between countries and through time. Figures attempt to provide a true estimate (going beyond reported diagnosis) of depression prevalence based on medical, epidemiological data, surveys and meta-regression modelling.

Our World
in Data



Εικόνα 12: Επιπολασμός κατάθλιψης παγκοσμίως (60)

2. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι καταρχάς η βιβλιογραφική διερεύνηση της δράσης των προβιοτικών στην εξάλειψη των συμπτωμάτων κατάθλιψης και η ανάπτυξη ενός προϊόντος με την προσθήκη προβιοτικών μικροοργανισμών, όπου θα μπορέσει δυνητικά να χρησιμοποιηθεί για τον σχεδιασμό μιας παρέμβασης σε άτομα που πάσχουν από καταθλιπτικά επεισόδια μέσω των ευεργετικών επιδράσεων των προβιοτικών στο εντερικό μικροβίωμα. Πραγματοποιήθηκε εκτενής βιβλιογραφική ανασκόπηση αναφορικά με τα χαρακτηριστικά των προβιοτικών και την χρήση τους στη βιομηχανία των τροφίμων. Αφού συλλέχθηκαν τα απαραίτητα δεδομένα, πραγματοποιήθηκαν οι δοκιμές για την ανάπτυξη ενός προϊόντος εμπλουτισμένο με προβιοτικούς μικροοργανισμούς στην εταιρεία Γιώτης Α.Ε. ώστε να αξιολογηθεί η λειτουργικότητά του.

3. Πειραματικό μέρος

3.1 Μελέτη του ανταγωνισμού και των καταναλωτικών τάσεων

Το 1^ο βήμα για την ανάπτυξη ενός νέου προϊόντος είναι η μελέτη του ανταγωνισμού και της αγοράς, τόσο στην Ελλάδα όσο και στο εξωτερικό. Αρχικά, έγινε καταγραφή των προϊόντων με προβιοτικά και των στελεχών που χρησιμοποιούνται ευρέως, εστιάζοντας στην ελληνική αγορά, ώστε να εντοπίσουμε τις ελλείψεις σε προβιοτικά προϊόντα. Παράλληλα εκτιμήθηκε η ανάγκη και η ζήτηση των καταναλωτών για τα συγκεκριμένα προϊόντα. Συγκριτικά με την παγκόσμια αγορά, στην Ελλάδα τα προϊόντα που είναι εμπλουτισμένα με αυτούς τους μικροοργανισμούς είναι αρκετά περιορισμένα. Καταγράφηκαν γιαούρτια με προβιοτικές καλλιέργειες, τόσο για παιδιά όσο και για ενήλικες, ροφήματα τύπου κεφίρ και σοκολάτες. Στο εξωτερικό τα προϊόντα αυτά ήταν εμφανώς περισσότερα, ενώ βρέθηκαν προϊόντα με προβιοτικά και σε άλλες κατηγορίες τροφίμων όπως επιδόρπια γιαουρτιού, παιδικά γλυκίσματα, προϊόντα αρτοποιίας και ροφήματα ψυγείου.

3.2 Σύλληψη ιδέας

Αφού μελετήθηκαν όλες οι πιθανές επιλογές και εξετάστηκε η δυνατότητα ανάπτυξης των προϊόντων από την εταιρεία, καταλήξαμε σε δύο προϊόντα, ένα προϊόν ψυγείου και ένα προϊόν στιγμής σε 2 γεύσεις, τα οποία θα χρησιμοποιηθούν ως φορέας των προβιοτικών:

- Κρέμα ψυγείου με γεύση βανίλια και με γεύση σοκολάτα
- Κρέμα στιγμής με γεύση βανίλια και με γεύση σοκολάτα

Και οι δύο κρέμες εντάσσονται σε μια σειρά προϊόντων που προωθούν την ανθρώπινη υγεία και ευεξία λόγω των ευεργετικών δράσεων των προβιοτικών στο ανθρώπινο μικροβίωμα. Έχοντας αυτό ως γνώμονα, το επόμενο βήμα είναι ο σχεδιασμός των εργαστηριακών δοκιμών. Στο πλαίσιο αυτό και λόγω της φύσης του προϊόντος που θέλουμε να προωθήσουμε, απορρίφθηκε η χρήση τεχνητών αρωμάτων και χρωστικών καθώς επίσης και συντηρητικών. Επιπλέον, έγιναν προσπάθειες για την ανάπτυξη των προϊόντων χωρίς προσθήκη ζάχαρης με χρήση φυσικών γλυκαντικών όπως σιρόπι αγαύης ή τεχνητών γλυκαντικών, οι οποίες όμως δεν ανταποκρίνονταν στις απαιτήσεις των υποψήφιων καταναλωτών. Οι δοκιμές σύστασης περιλαμβάνουν τόσο δοκιμές για την επίτευξη της επιθυμητής διατροφικής αξίας ενός προϊόντος καθώς επίσης και δοκιμές για τα επιθυμητά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, όπως δομή, γεύση και χρώμα.

3.3 Ανάπτυξη προϊόντος - Κρέμα ψυγείου

3.3.1 Εργαστηριακές δοκιμές σύστασης

Πρόκειται για ένα έτοιμο προϊόν ψυγείου που στηρίζεται στη συνταγή μιας παραδοσιακής κρέμας με ένα όμως βελτιωμένο διατροφικό προφίλ συγκριτικά με την παραδοσιακή συνταγή, η οποία αποτελείται από τα εξής συστατικά:

- Γάλα
- Κρέμα γάλακτος

- Άμυλο
- Πηκτικό
- Πρωτεΐνη
- Κακάο
- Ζάχαρη
- Άρωμα
- Χρωστικές

Αναφορικά με τη δομή του προϊόντος, δοκιμάστηκαν διαφορετικές αναλογίες πηκτικού, πρωτεΐνης και αμύλου, ώστε να επιτύχουμε το επιθυμητό αποτέλεσμα, δηλαδή μια κρεμώδη και ανάλαφρη υφή. Παράλληλα, έγινε πρόταση για αντικατάσταση της ζάχαρης με σιρόπι αγαύης, η οποία όμως απορρίφθηκε λόγω δημιουργίας συσσωματωμάτων στη δομή της κρέμας. Δοκιμάστηκαν επίσης τεχνητά γλυκαντικά, όπως σουκραλόζη και στέβια, τα οποία απορρίφθηκαν λόγω της μεταλλικής επίγευσης που διέθεταν, παρόλο που προσέδιδαν την απαραίτητη γλυκύτητα στο προϊόν. Χρησιμοποιήθηκε λακτάση για υδρόλυση της λακτόζης που προέρχεται από το γάλα, την κρέμα γάλακτος και την πρωτεΐνη, τόσο για ενίσχυση της γλυκύτητας, όσο και για την επίτευξη του ισχυρισμού «Χωρίς λακτόζη». Επιπλέον, το προϊόν εμπλουτίστηκε με φυτικές ίνες, οι οποίες στις δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν έδιναν μια ελαφρώς πιο γλυκιά γεύση ενώ ταυτόχρονα συμβάλλουν στη βιωσιμότητα των προβιοτικών όπως έχει δείξει και η βιβλιογραφία (40)(41). Το προϊόν θα μπορεί να θεωρηθεί «Πηγή φυτικών ινών», αφού καλύπτει το απαιτούμενο ποσοστό. Με αυτό τον τρόπο, παρόλο που δεν καταφέραμε να αφαιρέσουμε τελείως τη ζάχαρη, πετύχαμε μια μείωση κατά 30% συγκριτικά με την παραδοσιακή κρέμα. Αρκετές δοκιμές έγιναν και για το φυσικό άρωμα βανίλιας και σοκολάτας μέχρι να καταλήξουμε στο πιο βανιλένιο και σοκολατένιο, καθώς τα φυσικά αρώματα δεν είναι το ίδιο έντονα με τα τεχνητά. Για το χρώμα της κρέμας βανίλιας βασιστήκαμε στις αναλογίες της παραδοσιακής συνταγής και στη χρήση καροτένιου. Μια ακόμα τροποποίηση ήταν η χρήση ημιαποβουτυρωμένου γάλακτος, ώστε να μειώσουμε τα λιπαρά.

Έτσι, η συνταγή στην οποία καταλήξαμε ήταν η εξής:

- Ημιαποβουτυρωμένο γάλα
- Κρέμα γάλακτος
- Άμυλο
- Πηκτικό
- Πρωτεΐνη
- Μειωμένη ζάχαρη
- Κακάο
- Φυσικό άρωμα βανίλιας σε υγρή μορφή ή φυσικό άρωμα σοκολάτας σε υγρή μορφή
- Φυσική χρωστική ουσία καροτένιο
- Λακτάση
- Φυτικές ίνες

3.3.2 Παραγωγική διαδικασία

Για την παρασκευή της κρέμας το πρώτο βήμα είναι το ζύγισμα των υλικών. Το γάλα, η κρέμα γάλακτος, η πρωτεΐνη και το κάκαο (στην μία περίπτωση) τοποθετούνται σε καζάνι ανάμειξης και αναμειγνύονται ώστε να προστεθεί η λακτάση. Το μείγμα συλλέγεται και αφήνεται στο ψυγείο στους 4 °C για 12 ώρες, για να πραγματοποιηθεί η υδρόλυση της λακτόζης των προαναφερόμενων υλικών. Στη συνέχεια, το μείγμα τοποθετείται ξανά σε καζάνι βρασμού,

όπου υπό ανάδευση λαμβάνει χώρα σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας. Στους 20 – 30 °C γίνεται προσθήκη των υπόλοιπων υλικών ενώ συνεχίζεται η ανάδευση και η αύξηση της θερμοκρασίας έως τους 54 °C, όπου πραγματοποιείται ομογενοποίηση, μέσω ενός μηχανήματος που ονομάζεται ομογενοποιός. Μετά την ομογενοποίηση, το μείγμα αφήνεται ξανά σε καζάνι βρασμού για παστερίωση έως τους 90 °C. Έπειτα, το προϊόν συλλέγεται και συσκευάζεται.

3.3.3 Εμβολιασμός προβιοτικών

Αφού παρασκευαστεί και συλλεχθεί το προϊόν, ακολουθεί ο εμβολιασμός των προβιοτικών μικροοργανισμών, όπου πραγματοποιείται σε laminar, ώστε να επιτύχουμε όσο το δυνατόν στείρες συνθήκες. Χρησιμοποιήσαμε το στέλεχος *Bifidobacterium lactis* BB-12 της εταιρείας Hansen, το οποίο είναι κατάλληλο για τέτοιες παρασκευές και δεν αλλοιώνει τη δομή της κρέμας. Αξιοποιώντας όσα προκύπτουν από τη νομοθεσία των προβιοτικών για τον πληθυσμό των προβιοτικών, στον οποίο πρέπει να βρίσκονται στο τρόφιμο, ώστε να επιφέρουν θετικά αποτελέσματα στην υγεία του καταναλωτή, υπολογίσαμε πόσα γραμμάρια προβιοτικής καλλιέργειας πρέπει να προσθέσουμε στην κρέμα, για να έχουμε πληθυσμό στελεχών $6 \cdot 10^9$ CFU ανά κρέμα, δηλαδή ανά 140 γραμμάρια προϊόντος. Αρχικά, το μείγμα ψύχθηκε στους 40 °C, ώστε να προστεθούν τα προβιοτικά καθώς σε υψηλότερες θερμοκρασίες θα υπήρχε κίνδυνος θανάτωσης των προβιοτικών κυττάρων. Η προσθήκη των προβιοτικών έγινε πρώτα σε μια μικρή ποσότητα κρέμας, όπου υπήρξε ολιγόλεπτη ανάδευση και διάλυση του προβιοτικού. Στη συνέχεια, αυτή η ποσότητα κρέμας προστέθηκε ξανά στο δείγμα της κρέμας προς εμβολιασμό και πραγματοποιήθηκε ανάδευση με σπάτουλα, ώστε τα προβιοτικά να διασκορπιστούν στο μείγμα. Τέλος, η κρέμα χωρίστηκε σε πλαστικούς περιέκτες και συσκευάστηκε αεροστεγώς.

3.3.4 Αξιολόγηση διάρκειας ζωής προβιοτικών

Για να αξιολογήσουμε την επιβίωση των προβιοτικών στο συγκεκριμένο προϊόν, σχεδιάσαμε ένα stability test σε 3 διαφορετικές θερμοκρασίες. Στόχος είναι η μέτρηση του πληθυσμού των προβιοτικών κυττάρων ανά 2 έως 5 μέρες σε κανονικές συνθήκες συντήρησης του προϊόντος αλλά και σε πιο ακραίες συνθήκες (accelerated stability). Πρόκειται για μια διαδικασία, όπου το προϊόν εκτίθεται σε συνθήκες που μπορούν πιο εύκολα να οδηγήσουν στην αλλοίωσή του, όπως εφαρμογή πίεσης ή υψηλότερης θερμοκρασίας και χρησιμοποιείται για πιο άμεσα αποτελέσματα αναφορικά με τη διάρκεια ζωής ενός προϊόντος. Οι πληροφορίες που αντλούμε με αυτόν τον τρόπο, αξιοποιούνται με τη βοήθεια ενός μαθηματικού τύπου με βάση τις κρίσιμες παραμέτρους του προϊόντος και υπολογίζεται ο χρόνος ζωής του προϊόντος στην πραγματική του θερμοκρασία αποθήκευσης. Βασικός περιορισμός είναι να πραγματοποιείται stability test σε 2 θερμοκρασίες τουλάχιστον, με σημαντική απόκλιση, καθώς εντάσσονται στον μαθηματικό τύπο. Οι θερμοκρασίες, στις οποίες αποφασίσαμε να συντηρηθούν τα δείγματα και να γίνουν οι μετρήσεις ήταν στους 4 °C, στους 8 °C και στους 14 °C.

Πίνακας 4: Πλάνο μετρήσεων στις θερμοκρασίες 4 °C, στους 8 °C και στους 14 °C για το στέλεχος BB-12

14 °C	8 °C	4 °C
Ημέρα 0	Ημέρα 6	Ημέρα 6
Ημέρα 1	Ημέρα 10	Ημέρα 10
Ημέρα 2	Ημέρα 15	Ημέρα 15
Ημέρα 3	Ημέρα 20	Ημέρα 20
Ημέρα 6	Ημέρα 24	Ημέρα 24
Ημέρα 8	Ημέρα 30	Ημέρα 30
Ημέρα 10	Ημέρα 35	Ημέρα 35
Ημέρα 16	Ημέρα 41	Ημέρα 41

Ως ημέρα 0 θέτουμε την ημέρα παρασκευής και εμβολιασμού της κρέμας και η μέτρηση είναι κοινή για όλες τις θερμοκρασίες αφού το δείγμα δεν έχει τοποθετηθεί ακόμα σε κάποια θερμοκρασία συντήρησης. Οι μετρήσεις στους 14 °C είναι πιο συχνές καθώς σε αυτή τη θερμοκρασία τόσο οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί όσο και η κρέμα είναι πιο ευαίσθητα. Για κάθε μέτρηση υπήρχε και το αντίστοιχο δείγμα χωρίς προβιοτική καλλιέργεια (control) ώστε να εκτιμηθεί η επίδραση των προβιοτικών στη διάρκεια ζωής του προϊόντος. Για το σκοπό αυτό, πέρα από την ποσότητα του μικροοργανισμού, μετρήθηκαν επίσης το pH και η ολική μεσόφιλη χλωρίδα ενώ παράλληλα διεξήχθηκε οργανοληπτικός έλεγχος για τη δομή της κρέμας. Και τα τρία αυτά χαρακτηριστικά είναι κρίσιμα και υποδηλώνουν πότε ένα προϊόν είναι κατάλληλο προς κατανάλωση. Η ολική μεσόφιλη χλωρίδα αποτελεί την πιο συνηθισμένη μικροβιολογική ανάλυση τροφίμων και αφορά στην καταμέτρηση του συνόλου των αερόβιων μεσόφιλων βακτηρίων, δηλαδή των παθογόνων μικροοργανισμών που έχουν αναπτυχθεί στο προϊόν και συντελούν στην αλλοίωση του. Η μέτρηση του pH βοηθάει στην αξιολόγηση της γεύσης της κρέμας, καθώς χαμηλές τιμές pH υποδηλώνουν ότι η κρέμα έχει ξινίσει.

3.3.5 Οργανοληπτική αξιολόγηση

Όπως σε κάθε προϊόν υπό ανάπτυξη, έτσι και στη συγκεκριμένη κρέμα ψυγείου πραγματοποιήθηκαν οργανοληπτικές δοκιμές για αξιολόγησή της.

Σε κάθε δοκιμή ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα που αποτελείται από εργαζόμενους της εταιρείας καλείται να δοκιμάσει το προϊόν και να το αξιολογήσει ως προς συγκεκριμένες παραμέτρους, όπως για παράδειγμα τη γεύση, η δομή και το άρωμα. Σε ορισμένες περιπτώσεις εκτός από το υπό ανάπτυξη προϊόν, υπάρχουν και ανταγωνιστικά δείγματα τα οποία δοκιμάζονται, αξιολογούνται και συγκρίνονται, ώστε να υπάρχει μια πιο ξεκάθαρη εικόνα ως προς τις αλλαγές που πρέπει να πραγματοποιηθούν για βελτίωση του προϊόντος σύμφωνα με την αρέσκεια του υποψήφιου καταναλωτικού κοινού. Οι μέθοδοι αξιολόγησης διακρίνονται σε οργανοληπτική δοκιμή κλίμακας και οργανοληπτικό έλεγχο συγκριτικής δοκιμής. Στην πρώτη περίπτωση, τα δείγματα δοκιμάζονται και βαθμολογούνται με βάση την κλίμακα 1 έως 10, όπου αποδεκτές τιμές θεωρούνται οι τιμές 6-10. Στη συνέχεια, ακολουθεί ο υπολογισμός του μέσου όρου για κάθε παράμετρο που έχουμε θέσει προς αξιολόγηση αλλά και συνολικά για το προϊόν. Πραγματοποιείται επεξεργασία των και απεικόνιση μέσω γραφημάτων. Η δεύτερη μέθοδος αφορά τη συγκριτική δοκιμή των παραμέτρων αξιολόγησης, από 2 και πάνω δειγμάτων, οι οποίες κατατάσσονται με σειρά προτίμησης από

τους δοκιμαστές. Ακολουθεί ο υπολογισμός του μέσου όρου, ώστε να προκύψει η τελική κατάταξη προτίμησης (πρώτη, δεύτερη, τρίτη κ.τ.λ. σειρά προτίμησης) και δημιουργούνται τα αντίστοιχα γραφήματα. Ανάλογα με τα αποτελέσματα των οργανοληπτικών δοκιμών γίνονται τροποποιήσεις για να επιτευχθεί ένα προϊόν με όσο το δυνατόν καλύτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά.

Καθ' όλη τη διαδικασία ανάπτυξης ανά τακτά χρονικά διαστήματα γινόντουσαν οργανοληπτικές δοκιμές κυρίως για να δούμε κατά πόσο είναι αποδεκτή η δομή της κρέμας, και η γλυκύτητά της, καθώς λόγω της μειωμένης ζάχαρης πιθανώς να υστερεί γευστικά συγκριτικά με την παραδοσιακή συνταγή. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα γινόντουσαν οι απαραίτητες αλλαγές και επαναλαμβανόταν η διαδικασία, μέχρι να υπάρχει ένα ικανοποιητικό ποσοστό αποδοχής. Λόγω έλλειψης αντίστοιχων προϊόντων στην ελληνική αγορά οι οργανοληπτικές δοκιμές γινόντουσαν κυρίως με την πρώτη μέθοδο αξιολόγησης που προαναφέρθηκε και σε κάποιες περιπτώσεις γινόταν σύγκριση με την παραδοσιακή κρέμα της ίδιας εταιρείας. Αφού καταλήξαμε στην τελική συνταγή, μοιράστηκαν δείγματα στους υπαλλήλους της εταιρείας για έναν μεγάλο τελικό οργανοληπτικό έλεγχο με περισσότερα από 30 άτομα.

3.4 Ανάπτυξη προϊόντος - Κρέμα στιγμής

3.4.1 Εργαστηριακές δοκιμές σύστασης

Το συγκεκριμένο προϊόν βασίστηκε στη συνταγή της κρέμας Άνθος Αραβοσίτου. Χρησιμοποιήθηκαν γαλακτωματοποιητές, πηκτικό, άμυλο και πρωτεΐνη για να πετύχουμε μια δομή πιο ανάλαφρη που να παραπέμπει σε μους. Παράλληλα δοκιμάστηκε και η κατάλληλη αναλογία γάλακτος που πρέπει να προστεθεί ώστε να διαλυθεί σωστά το μείγμα χωρίς όμως να ρευστοποιηθεί η κρέμα ως τελικό προϊόν. Ως γλυκαντικό προστέθηκε άχνη ζάχαρη για την αποφυγή κόκκων κατά την παρασκευή της κρέμας με την προσθήκη του γάλακτος. Δοκιμάστηκαν εξίσου αρκετά φυσικά αρώματα βανίλιας και σοκολάτας σε μορφή σκόνης και φυσικές χρωστικές ουσίες. Και σε αυτή την περίπτωση προστέθηκαν φυτικές ίνες στο προϊόν, για να βελτιώσουμε τη διαθρεπτική του αξία.

Η συνταγή που προέκυψε από τις εργαστηριακές δοκιμές ήταν η εξής:

- Άμυλο
- Πηκτικό
- Πρωτεΐνη
- Άχνη ζάχαρη
- Κακάο
- Γαλακτωματοποιητής
- Φυσικό άρωμα βανίλιας και σοκολάτας σε μορφή σκόνης
- Φυσική χρωστική ουσία καροτένιο για την κρέμα βανίλιας
- Φυτικές ίνες
- Γάλα

3.4.2 Παραγωγική διαδικασία

Στην περίπτωση της κρέμας στιγμής, η παρασκευή της είναι αρκετά πιο απλή συγκριτικά με την έτοιμη κρέμα ψυγείου. Αφού ζυγίσουμε τα υλικά σε μορφή σκόνης, τα αναμειγνύουμε και τα κοσκινίζουμε ώστε να ελαχιστοποιήσουμε την πιθανότητα εύρεσης κόκκων στο τελικό προϊόν. Έπειτα, προσθέτουμε την ποσότητα γάλακτος που έχει προκύψει από τις εργαστηριακές δοκιμές και αναδεύουμε με σύρμα για 3 λεπτά. Τέλος, η κρέμα τοποθετείται σε πλαστικούς περιέκτες και αφήνεται στο ψυγείο.

3.4.3 Εμβολιασμός προβιοτικών

Ο εμβολιασμός των προβιοτικών έγινε στο μείγμα της κρέμας στιγμής. Αφού παρασκευάστηκε το μείγμα, χωρίστηκε σε δείγματα των 80 γραμμαρίων, στην ποσότητα δηλαδή που αναμένεται να κυκλοφορήσει το προϊόν, και συσκευάστηκε σε πλαστικά σακουλάκια, τα οποία με θερμοκολλητικό μηχάνημα κλείστηκαν αεροστεγώς. Το κάθε φακελάκι κρέμας των 80 γραμμαρίων αποτελείται από 4 μερίδες των 20 γραμμαρίων. Όπως προαναφέρθηκε, για την ευεργετική δράση των προβιοτικών υπολογίσαμε την ποσότητα που απαιτείται ώστε να έχουμε $6 * 10^9$ CFU/μερίδα, δηλαδή ανά 20 γραμμάρια σκόνης. Χρησιμοποιήθηκαν 3 διαφορετικά στελέχη προβιοτικών σε μορφή σκόνης, ειδικά για προϊόντα αυτής της μορφής, για τον εμβολιασμό της σκόνης κρέμας, τα οποία είναι τα εξής: Bifidobacterium lactis BB-12 και Lactobacillus Rhamnosus LGG της εταιρείας Hansen και Bifidobacterium lactis BB536 της εταιρείας Morinaga. Η προσθήκη των προβιοτικών έγινε σε κάθε σακουλάκι δείγματος ξεχωριστά, το οποίο ανοιγόταν για λίγα δευτερόλεπτα ώστε να προστεθούν οι μικροοργανισμοί και στη συνέχεια κλεινόταν πάλι αεροστεγώς. Για τα στελέχη BB-12 και LGG ο εμβολιασμός πραγματοποιήθηκε σε laminae ενώ για το στέλεχος BB536 ο εμβολιασμός πραγματοποιήθηκε δύο φορές, μία σε laminae και μία σε συνθήκες παραγωγής, για να αξιολογήσουμε την ευαισθησία του προβιοτικού σε μη στειρές συνθήκες παραγωγής.

3.4.4 Αξιολόγηση διάρκειας ζωής προβιοτικών

Όπως και στο προϊόν ψυγείου, έτσι και για την κρέμα στιγμής σχεδιάσαμε stability test σε δύο θερμοκρασίες, θερμοκρασία δωματίου 25 °C και 37 °C (accelerated stability), για να ελέγξουμε την αντοχή των προβιοτικών. Έχοντας τρία διαφορετικά στελέχη, πραγματοποιήσαμε τρία διαφορετικά πειράματα για τον σκοπό αυτόν. Οι μετρήσεις και στις 2 θερμοκρασίες έγιναν ανά 5 μέρες περίπου έως τις 25-30 ημέρες. Για το στέλεχος BB536 πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις τόσο για τα δείγματα που είχαν παρασκευαστεί σε συνθήκες εργαστηρίου (laminae) όσο και για τα δείγματα που δεν παρασκευάστηκαν σε στειρές συνθήκες.

Πίνακας 5: Πλάνο μετρήσεων στις θερμοκρασίες 25 °C και 37 °C για τα στελέχη BB-12 και LGG

25 °C				37 °C			
Στέλεχος BB-12	Στέλεχος LGG	Στέλεχος BB-536 (εργαστηριακές συνθήκες)	Στέλεχος BB-536 (συνθήκες παραγωγής)	Στέλεχος BB-12	Στέλεχος LGG	Στέλεχος BB-536 (εργαστηριακές συνθήκες)	Στέλεχος BB-536 (συνθήκες παραγωγής)
Ημέρα 0		Ημέρα 0		Ημέρα 6		Ημέρα 5	
Ημέρα 6		Ημέρα 5		Ημέρα 12		Ημέρα 10	
Ημέρα 12		Ημέρα 10		Ημέρα 19		Ημέρα 15	

Ημέρα 19	Ημέρα 15	Ημέρα 25	Ημέρα 20
Ημέρα 25	Ημέρα 20		Ημέρα 25
	Ημέρα 25		Ημέρα 30
	Ημέρα 30		

Και σε αυτό το πείραμα, ως ημέρα 0 θέτουμε την ημέρα παρασκευής και εμβολιασμού της σκόνης κρέμας και η μέτρηση είναι κοινή για όλες τις θερμοκρασίες αφού το δείγμα δεν έχει τοποθετηθεί ακόμα σε θερμοκρασία αντίστοιχη συντήρησης. Δεν υπήρχε δείγμα control (χωρίς προβιοτικά), καθώς δεν πρόκειται για ευαλοίωτο προϊόν, όπως η κρέμα ψυγείου. Για τον ίδιο λόγο δε μετρήθηκε ΟΜΧ και pH, καθώς τα προϊόντα σκόνης είναι αρκετά ανθεκτικά. Για να αξιολογήσουμε την εκλεκτικότητα των υποστρωμάτων στα συγκεκριμένα προβιοτικά στελέχη και τις αποκλίσεις που μπορεί να έχουν τα αποτελέσματα των μετρήσεων, για το στέλεχος BB-12 χρησιμοποιήθηκαν 2 υποστρώματα, όπου το ένα είναι εκλεκτικό ως προς Lactobacillus, LAB (MRS), και το TOS-MUP AGAR, που είναι εκλεκτικό ως προς καλλιέργειες Bifidobacterium και το οποίο χρησιμοποιήθηκε και στις μετρήσεις της έτοιμης κρέμας. Με το στέλεχος BB-536 πραγματοποιήθηκε επίσης stability στους 37 °C για να δούμε τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της κρέμας ύστερα από παραμονή για κάποιες ημέρες σε αυτή τη θερμοκρασία. Παρασκευάστηκαν δείγματα και προστέθηκε προβιοτική ποσότητα σε μη στειρές συνθήκες, τα οποία στη συνέχεια συσκευάστηκαν αεροστεγώς και φυλάχθηκαν σε κλίβανο. Το πλάνο των μετρήσεων ήταν το εξής:

Πίνακας 6: Πλάνο μετρήσεων στους 37 °C για τα στέλεχος BB-536

37 °C
Ημέρα 5
Ημέρα 10
Ημέρα 15
Ημέρα 20
Ημέρα 25
Ημέρα 30

Σε κάθε μέτρηση η κρέμα παρασκευαζόταν κανονικά με την προσθήκη γάλακτος και γινόταν έλεγχος με αντίστοιχο δείγμα με προβιοτικά χωρίς παραμονή στους 37 °C για τη διάλυση της σκόνης, τη δομή και τη γεύση για τυχόν αλλοίωση.

Τέλος, με το ίδιο στέλεχος αφού φτιάξαμε το μείγμα της κρέμας και έγινε ο εμβολιασμός, παρασκευάσαμε την κρέμα και την τοποθετήσαμε στο ψυγείο. Σκοπός του πειράματος ήταν αν αξιολογήσουμε τον πληθυσμό των προβιοτικών ακόμα και ύστερα από παραμονή της κρέμας 1 με 2 μέρες στο ψυγείο, δεδομένου ότι ο καταναλωτής δε θέλει να καταναλώσει άμεσα την κρέμα. Ύστερα από 3 μέρες είναι γνωστό ότι η κρέμα αρχίζει να χάνει τη δομή της οπότε οι μετρήσεις έγιναν βάσει αυτού και δε συνεχίστηκαν για περισσότερες μέρες καθώς δεν είχε νόημα να μετρήσουμε προβιοτικά σε μια αλλοιωμένη κρέμα. Η πρώτη μέτρηση έγινε στη σκόνη πριν την παρασκευή της κρέμας και μετά έγιναν μετρήσεις την ημέρα 0, ημέρα 1 και την ημέρα 2 παραμονής στο ψυγείο. Το πλάνο των μετρήσεων ήταν το εξής:

Πίνακας 7: Πλάνο μετρήσεων στους 25 °C & 8 °C για τα στέλεχος BB-536

25 °C
Ημέρα εμβολιασμού

8 °C
Ημέρα 0
Ημέρα 1
Ημέρα 2

3.4.5 Οργανοληπτική αξιολόγηση

Και σε αυτή την περίπτωση πραγματοποιήθηκαν αρκετές οργανοληπτικές δοκιμές με την ίδια διαδικασία που ακολουθήθηκε για την κρέμα ψυγείου. Στις αξιολογήσεις ως αντίστοιχα δείγματα προς σύγκριση δοκιμάστηκαν οι ήδη υπάρχουσες κρέμες στιγμής της εταιρείας. Πραγματοποιήθηκαν τροποποιήσεις στη συνταγή με βάση τα σχόλια των δοκιμαστών και όταν καταλήξαμε στην τελική συνταγή, μοιράστηκαν δείγματα έτοιμης κρέμας στους υπαλλήλους της εταιρείας για έναν μεγάλο τελικό οργανοληπτικό έλεγχο με περισσότερα από 30 άτομα, όπως αντίστοιχα για την κρέμα ψυγείου.

3.5 Μεθοδολογία βιβλιογραφικής ανασκόπησης σχέσης κατάθλιψης & προβιοτικών

Πραγματοποιήθηκε βιβλιογραφική ανασκόπηση για τη διερεύνηση της σχέσης προϊόντων εμπλουτισμένων με προβιοτικά στελέχη με δείκτες κατάθλιψης. Για το σκοπό αυτόν αξιοποιήθηκαν ως βάσεις βιβλιογραφικών δεδομένων το Pubmed & το Google Scholar. Ενδεικτικά αναφέρονται ορισμένες από τις λέξεις κλειδιά που χρησιμοποιήθηκαν ως όροι αναζήτησης: «probiotics», «depression», «Lactobacillus», «Bifidobacterium», «CRP», «psychological factors» κ.α. Για τη βιβλιογραφική ανασκόπηση επιλέχθηκαν μελέτες παρέμβασης και μετα-αναλύσεις αυτών καθώς και ανασκοπήσεις, δημοσιευμένες την τελευταία δεκαετία.

4. Αποτελέσματα

4.1 Κρέμα ψυγείου

4.1.1 Αποτελέσματα αξιολόγησης διάρκειας ζωής προβιοτικών μικροοργανισμών

Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν από το Ελληνικό Κέντρο Έρευνας και Καινοτομίας σύμφωνα με το πρότυπο ISO 29981:2012 που αναφέρεται στην καταμέτρηση στελεχών *Bifidobacterium* σε γαλακτοκομικά προϊόντα. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων ήταν αρκετά ενθαρρυντικά. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν ανά γραμμάριο, για αυτό υπολογίσαμε αναλογικά πόσο αναμένουμε να είναι ο πληθυσμός των προβιοτικών στο 1 γραμμάριο αφού θέλουμε $6 \cdot 10^9$ CFU ανά 140 γραμμάρια προϊόντος, δηλαδή $4 \cdot 10^7$ CFU/g.

- Κρέμα με γεύση βανίλια

Πίνακας 8: Αποτελέσματα μετρήσεων του στελέχους *Bifido* BB-12 στους 14 °C

Δείγμα 1

Κρέμα με Bifido (BF)	14°C	14°C	14°C	14°C	14°C	14°C	14°C	14°C
Ημέρα μέτρησης	t=0	t=1	t=2	t=3	t=6	t=8	t=10	t=16
OMX (petrifilms)	2 E+01	2E+01	5E+01	1 E+03	4 E+04	4 E+06	1 E+07	3 E+08
TOS-MUP agar	2,8 E+06	2,7 E+06	2,3 E+06	2,3 E+06	2,17 E+06	1,78 E+06	1,35 E+06	3,8 E+05
pH	6,58	6,6	6,66	6,66	6,66	6,6	6,5	6,13
Οργανοληπτικός (Δομή)	OK	OK	OK	OK	OK	ΕΚΟΨΕ	ΧΑΛΑΣΕ	ΧΑΛΑΣΕ
Control (χωρίς προβιοτικά)	14°C	14°C	14°C	14°C	14°C	14°C	14°C	14°C
Ημέρα μέτρησης	t=0	t=1	t=2	t=3	t=6	t=8	t=10	t=16
OMX	2E+01	2 E+01	1,2 E+02	2 E+03	4 E+04	8 E+06	3 E+07	7 E+08
pH	6,61	6,62	6,66	6,68	6,7	6,66	6,54	5,76
Οργανοληπτικός (Δομή)	OK	OK	OK	OK	OK	ΕΚΟΨΕ	ΧΑΛΑΣΕ	ΧΑΛΑΣΕ

Πίνακας 9: Αποτελέσματα μετρήσεων του στελέχους Bifido BB-12 στους 4 °C

Δείγμα 1

Κρέμα με Bifido (BF)	4°C	4°C	4°C	4°C	4°C	4°C	4°C	4°C
Ημέρα μέτρησης	t=6	t=10	t=15	t=20	t=24	t=30	t=35	t=41
ΟΜΧ (petrifilms)	2 E+01	4 E+01	6 E+01	3 E+01	5 E+01	4 E+03	1 E+01	<10
TOS-MUP agar	7,6 E+05	6,3 E+05	5,8 E+05	4 E+05	3,5 E+05	1,7 E+05	4,7 E+05	7,7 E+04
pH	6,69	6,66	6,62	6,62	6,58	6,62	6,58	6,66
Οργανοληπτικός (Δομή)	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
Control (χωρίς προβιοτικά)	4°C	4°C	4°C	4°C	4°C	4°C	4°C	4°C
Ημέρα μέτρησης	t=6	t=10	t=15	t=20	t=24	t=30	t=35	t=41
ΟΜΧ	<10	1 E+01	2 E+01	2 E+01	3 E+01	2 E+01	3,5 E+02	2 E+01
pH	6,69	6,66	6,66	6,65	6,62	6,66	6,66	6,66
Οργανοληπτικός (Δομή)	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK

Δείγμα 2

Κρέμα με Bifido (BF)	4°C	4°C	4°C	4°C	4°C	4°C	4°C	4°C
Ημέρα μέτρησης	t=6	t=10	t=15	t=20	t=24	t=30	t=35	t=41
ΟΜΧ (petrifilms)	x	x	x	x	3 E+01	3 E+04	<10	2 E+01
TOS-MUP agar	x	x	x	x	3,7 E+05	2,6 E+05	8 E+04	5E+04
pH	x	x	x	x	6,58	6,5	6,66	6,66
Οργανοληπτικός (Δομή)	x	x	x	x	OK	OK	OK	OK
Control (χωρίς προβιοτικά)	4°C	4°C	4°C	4°C	4°C	4°C	4°C	4°C
Ημέρα μέτρησης	t=6	t=10	t=15	t=20	t=24	t=30	t=35	t=41
ΟΜΧ	x	x	x	x	3 E+01	2 E+01	3,5 E+02	2 E+01
pH	x	x	x	x	6,62	6,66	6,66	6,66
Οργανοληπτικός (Δομή)	x	x	x	x	OK	OK	OK	OK

Δείγμα 3

Κρέμα με Bifido (BF)	4°C	4°C	4°C	4°C	4°C	4°C	4°C	4°C
Ημέρα μέτρησης	t=6	t=10	t=15	t=20	t=24	t=30	t=35	t=41
OMX (petrifilms)	x	x	x	x	3 E+01	8 E+02	2 E+01	1 E+01
TOS-MUP agar	x	x	x	x	2,3 E +05	1,9E +05	1,4 E+05	8,6 E+04
pH	x	x	x	x	6,58	6,62	6,62	6,66
Οργανοληπτικός (Δομή)	x	x	x	x	OK	OK	OK	OK
Control (χωρίς προβιοτικά)	4°C	4°C	4°C	4°C	4°C	4°C	4°C	4°C
Ημέρα μέτρησης	x	x	x	x	t=24	t=30	t=35	t=41
OMX	x	x	x	x	3 E +01	2 E+01	3,5 E+02	2 E+01
pH	x	x	x	x	6,62	6,66	6,66	6,66
Οργανοληπτικός (Δομή)	x	x	x	x	OK	OK	OK	OK

Πίνακας 10: Αποτελέσματα μετρήσεων του στελέχους Bifido BB-12 στους 8 °C

Δείγμα 1

Κρέμα με Bifido (BF)	8°C	8°C	8°C	8°C	8°C	8°C	8°C	8°C
Ημέρα μέτρησης	t=6	t=10	t=15	t=20	t=24	t=30	t=35	t=41
OMX (petrifilms)	1 E+01	3 E+01	5 E +01	2,8 E+04	8,6 E+05	ΕΜΦΑΝΗΣ ΜΥΚΗΤΑΣ	ΕΜΦΑΝΗΣ ΜΥΚΗΤΑΣ	ΕΜΦΑΝΗΣ ΜΥΚΗΤΑΣ
TOS-MUP agar	1,5 E+06	1,45 E+06	1,38 E+06	7 E +05	8 E+05			
pH	6,66	6,66	6,62	5,8	6,66			
Οργανοληπτικός (Δομή)	OK	OK	OK	ΦΟΥΣΚΩΣΕ	OK			
Control (χωρίς προβιοτικά)	8°C	8°C	8°C	8°C	8°C	8°C	8°C	8°C
Ημέρα μέτρησης	t=6	t=10	t=15	t=20	t=24	t=30	t=35	t=41
OMX	1 E+01	3 E+01	7 E+01	1,6 E+05	4 E+06	8 E+06	4 E+06	4 E+06
pH	6,71	6,7	6,66	5,64	5,6	5,6	6.6	6,6
Οργανοληπτικός (Δομή)	OK	OK	OK	ΦΟΥΣΚΩΣΕ	OK	ΧΑΛΑΣΕ	ΧΑΛΑΣΕ	ΧΑΛΑΣΕ

Δείγμα 2

Κρέμα με Bifido (BF)	8°C	8°C	8°C	8°C	8°C	8°C	8°C	8°C
Ημέρα μέτρησης	t=6	t=10	t=15	t=20	t=24	t=30	t=35	t=41
OMX (petrifilms)	x	x	x	x	1 E +04	5,2 E+05	4 E+03	4 E+03
TOS-MUP agar	x	x	x	x	7 E +05	3,6 E+05	4,4 E+05	3,4 E+05
pH	x	x	x	x	6,66	6,54	6,62	6,61
Οργανοληπτικός (Δομή)	x	x	x	x	οκ	ΦΟΥΣΚΩΣΕ	ΧΑΛΑΣΕ	ΧΑΛΑΣΕ
Control (χωρίς προβιοτικά)	8°C	8°C	8°C	8°C	8°C	8°C	8°C	8°C
Ημέρα μέτρησης	t=6	t=10	t=15	t=20	t=24	t=30	t=35	t=41
OMX	x	x	x	x	4 E+06	8 E+06	4 E+06	4 E+06
pH	x	x	x	x	5,6	5,6	6.66	6,66
Οργανοληπτικός (Δομή)	x	x	x	x	οκ	ΧΑΛΑΣΕ	ΧΑΛΑΣΕ	ΧΑΛΑΣΕ

Στους 14 °C πραγματοποιήθηκε μέτρηση σε ένα δείγμα ενώ στους 4 °C και στους 8 °C μετρήθηκαν 2 και 3 δείγματα λόγω των πιο ρεαλιστικών συνθηκών συντήρησης της κρέμας.

Σε χρόνο 0, ο οποίος είναι κοινός για όλες τις θερμοκρασίες του πειράματος, οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί της κρέμας ήταν ήδη έναν λογάριθμο κάτω από τον αναμενόμενο, γεγονός που πιθανώς οφείλεται στις συνθήκες παραγωγής και εμβολιασμού, οι οποίες δεν ήταν απόλυτα στείρες.

Στους 14 °C ο πληθυσμός διατηρήθηκε στον ίδιο λογάριθμο (10^6) έως την ημέρα 16, όπου και έπεσε σε 10^5 . Οι τιμές του pH παρέμειναν σταθερές καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Η ολική μεσόφιλη χλωρίδα ξεκίνησε να αυξάνεται από την ημέρα 3 χωρίς να αποτελεί όμως απαγορευτικό παράγοντα προς κατανάλωση της κρέμας. Από την ημέρα 8 και έπειτα η OMX αυξήθηκε σημαντικά και το δείγμα χάλασε. Παρατηρούμε ότι συγκριτικά με το δείγμα χωρίς τις προβιοτικές καλλιέργειες δεν υπήρχε διαφορά στη διάρκεια ζωής του προϊόντος, επομένως τα προβιοτικά δε συνέβαλαν στη συντήρηση της κρέμας. Επιπλέον, η αύξηση της OMX δεν επηρέασε τη βιωσιμότητα των προβιοτικών μικροοργανισμών, παρά μόνο όταν έφτασε σε πληθυσμό 10^8 , όπου υπήρξε εμφανής πτώση και στο pH της κρέμας.

Στους 4 °C ο πληθυσμός έπεσε έναν λογάριθμο (10^5) από την ημέρα 6 και έπειτα αλλά παρέμεινε έτσι για 35-41 ημέρες, όπου υπήρχε επιπρόσθετη πτώση ενός λογαρίθμου. Οι μετρήσεις αρχικά πραγματοποιήθηκαν σε ένα δείγμα αλλά από την ημέρα 24 και μετά που συνήθως ξεκινάνε οι αλλοιώσεις σε αντίστοιχα προϊόντα ψυγείου, οι μετρήσεις έγιναν εις τριπλούν για πιο έγκυρα και αποδεκτά αποτελέσματα. Οι τιμές OMX ήταν σε πολύ χαμηλά επίπεδα, καθώς κάτω από 10^4 - 10^5 το προϊόν θεωρείται κατάλληλο προς κατανάλωση. Δεν παρατηρήθηκε πτώση ούτε στο pH του προϊόντος που θα συντελούσε στο ξίνισμα της κρέμας. Συγκριτικά με το δείγμα χωρίς προβιοτικά, δεν παρατηρήθηκε εξίσου αλλοίωση της κρέμας.

Στους 8 °C ο πληθυσμός των προβιοτικών διατηρήθηκε στον ίδιο λογάριθμο για 15 ημέρες (10⁶) και από την ημέρα 20 έπεσε σε 10⁵. Για πιο έγκυρα αποτελέσματα πραγματοποιήθηκαν πάλι μετρήσεις σε περισσότερα δείγματα μετά από την ημέρα 24, όπως έγινε αντίστοιχα και στους 4 °C, αλλά λόγω έλλειψης επαρκών δειγμάτων οι μετρήσεις έγιναν σε 2 δείγματα αντί για 3. Από την ημέρα 20 τα δείγματα άρχισαν να παρουσιάζουν αλλοιώσεις οργανοληπτικά. Το φούσκωμα που παρατηρήθηκε οφείλεται στην πτώση του pH και στην ανάπτυξη μικροοργανισμών, που υποδηλώνεται και από την σημαντική αύξηση στην ΟΜΧ. Τόσο στα δείγματα με τις προβιοτικές καλλιέργειες όσο και στα δείγματα χωρίς, αναπτύχθηκαν ορατοί μύκητες και οι κρέμες χάλασαν εμφανώς στις 30 μέρες. Παρατηρούμε ότι την ημέρα 20 ενώ η κρέμα έχει εμφανίσει προβλήματα στη δομή που την καθιστούν μη κατάλληλη προς κατανάλωση, την ημέρα 24 οργανοληπτικά δεν παρατηρήθηκε κάποιο πρόβλημα. Μετρώντας την ΟΜΧ όμως καταλαβαίνουμε ότι υπάρχει μεγάλο μικροβιακό φορτίο, το οποίο πιθανώς δεν έχει προλάβει να εκδηλωθεί ακόμα και να γίνει ορατό. Εντύπωση προκαλεί το γεγονός ότι στο 2^ο δείγμα η κρέμα χάλασε οργανοληπτικά ενώ οι τιμές ΟΜΧ μετρήθηκαν 10³ την ημέρα 35 και 41. Οι τιμές των προβιοτικών δεν επηρεάστηκαν ούτε σε αυτή τη θερμοκρασία από τη μικροβιακή αλλοίωση της κρέμας. Παρόλο που οι κρέμα είχε χαλάσει οι μετρήσεις συνεχίστηκαν για να καταλάβουμε αν πρόκειται για τυχαίο γεγονός και κάποια επιμόλυνση κατά τη διάρκεια της παρασκευής και του εμβολιασμού.

- Κρέμα με γεύση σοκολάτα

Πίνακας 11: Αποτελέσματα μετρήσεων του στελέχους Bifido BB-12 στους 4 °C

Δείγμα 1

Κρέμα με Bifido (BF)	14°C	14°C	14°C
Ημέρα μέτρησης	t=0	t=4	t=6
TOS-MUP agar	<10 ⁵	<10 ⁵	<10 ³
Οργανοληπτικός (Δομή)	OK	OK	OK
Control (χωρίς προβιοτικά)	14°C	14°C	14°C
Ημέρα μέτρησης	t=0	t=4	t=6
ΟΜΧ	X	X	X
pH	X	X	X
Οργανοληπτικός (Δομή)	X	X	X

Δείγμα 2

Κρέμα με Bifido (BF)	14°C	14°C	14°C
Ημέρα μέτρησης	t=0	t=4	t=6
TOS-MUP agar	<10 ⁵	<10 ⁵	<10 ³
Οργανοληπτικός (Δομή)	OK	OK	OK
Control (χωρίς προβιοτικά)	14°C	14°C	14°C
Ημέρα μέτρησης	t=0	t=4	t=6
OMX	X	X	X
pH	X	X	X
Οργανοληπτικός (Δομή)	X	X	X

Δείγμα 3

Κρέμα με Bifido (BF)	14°C	14°C	14°C
Ημέρα μέτρησης	t=0	t=4	t=6
TOS-MUP agar	<10 ⁵	<10 ⁵	<10 ³
Οργανοληπτικός (Δομή)	OK	OK	OK
Control (χωρίς προβιοτικά)	14°C	14°C	14°C
Ημέρα μέτρησης	t=0	t=4	t=6
OMX	X	X	X
pH	X	X	X
Οργανοληπτικός (Δομή)	X	X	X

Πίνακας 12: Αποτελέσματα μετρήσεων του στελέχους Bifido BB-12 στους 4 °C

Δείγμα 1

Κρέμα με Bifido (BF)	4°C	4°C	4°C
Ημέρα μέτρησης	t=0	t=4	t=6
TOS-MUP agar	<10 ⁵	<10 ⁵	<10 ³
Οργανοληπτικός (Δομή)	OK	OK	OK
Control (χωρίς προβιοτικά)	4°C	4°C	4°C
Ημέρα μέτρησης	t=0	t=4	t=6
ΟΜΧ	X	X	X
pH	X	X	X
Οργανοληπτικός (Δομή)	X	X	X

Δείγμα 2

Κρέμα με Bifido (BF)	4°C	4°C	4°C
Ημέρα μέτρησης	t=0	t=4	t=6
TOS-MUP agar	<10 ⁵	<10 ⁵	<10 ³
Οργανοληπτικός (Δομή)	OK	OK	OK
Control (χωρίς προβιοτικά)	4°C	4°C	4°C
Ημέρα μέτρησης	t=0	t=4	t=6
ΟΜΧ	X	X	X
pH	X	X	X
Οργανοληπτικός (Δομή)	X	X	X

Δείγμα 3

Κρέμα με Bifido (BF)	4°C	4°C	4°C
Ημέρα μέτρησης	t=0	t=4	t=6
TOS-MUP agar	<10 ⁵	<10 ⁵	<10 ³
Οργανοληπτικός (Δομή)	OK	OK	OK
Control (χωρίς προβιοτικά)	4°C	4°C	4°C
Ημέρα μέτρησης	t=0	t=4	t=6
ΟΜΧ	X	X	X
pH	X	X	X
Οργανοληπτικός (Δομή)	X	X	X

Πίνακας 13: Αποτελέσματα μετρήσεων του στελέχους Bifido BB-12 στους 8 °C

Δείγμα 1

Κρέμα με Bifido (BF)	8°C	8°C	8°C
Ημέρα μέτρησης	t=0	t=4	t=6
TOS-MUP agar	<10 ⁵	<10 ⁵	<10 ³
Οργανοληπτικός (Δομή)	OK	OK	OK
Control (χωρίς προβιοτικά)	8°C	8°C	8°C
Ημέρα μέτρησης	t=0	t=4	t=6
ΟΜΧ	X	X	X
pH	X	X	X
Οργανοληπτικός (Δομή)	X	X	X

Δείγμα 2

Κρέμα με Bifido (BF)	8°C	8°C	8°C
Ημέρα μέτρησης	t=0	t=4	t=6
TOS-MUP agar	<10 ⁵	<10 ⁵	<10 ³
Οργανοληπτικός (Δομή)	OK	OK	OK
Control (χωρίς προβιοτικά)	8°C	8°C	8°C
Ημέρα μέτρησης	t=0	t=4	t=6
OMX	X	X	X
pH	X	X	X
Οργανοληπτικός (Δομή)	X	X	X

Δείγμα 3

Κρέμα με Bifido (BF)	8°C	8°C	8°C
Ημέρα μέτρησης	t=0	t=4	t=6
TOS-MUP agar	<10 ⁵	<10 ⁵	<10 ³
Οργανοληπτικός (Δομή)	OK	OK	OK
Control (χωρίς προβιοτικά)	8°C	8°C	8°C
Ημέρα μέτρησης	t=0	t=4	t=6
OMX	X	X	X
pH	X	X	X
Οργανοληπτικός (Δομή)	X	X	X

Τα αποτελέσματα στην κρέμα σοκολάτας δεν ήταν καθόλου τα αναμενόμενα σε καμία θερμοκρασία αποθήκευσης. Σε αντίθεση με την κρέμα βανίλιας, εδώ ο πληθυσμός των προβιοτικών ήταν πολύ χαμηλός από την ημέρα 0. Για τον λόγο αυτόν οι μετρήσεις δε συνεχίστηκαν και δεν υπήρξαν μετρήσεις για το pH και την OMX στην κρέμα ούτε στο προβιοτικό δείγμα ούτε στο control. Για να έχουμε μια καλύτερη εικόνα σχετικά με το αν τα αποτελέσματα οφείλονται σε κάποιο τυχαίο γεγονός ή στη σύσταση της κρέμας, προβήκαμε σε 2^ο stability test, στο οποίο βάλαμε περισσότερη ποσότητα προβιοτικού μικροοργανισμού, για να πετύχουμε 6 * 10¹¹ CFU/μερίδα 140g αντί για 6 * 10⁹ CFU και ακόμα και με πτώση του πληθυσμού να επιτύχουμε αυτόν τον πληθυσμό.

Πίνακας 14: Αποτελέσματα μετρήσεων 2^{ου} stability test του στελέχους Bifido BB-12 στους 14 °C

Κρέμα με Bifido (BF)	14°C
Ημέρα μέτρησης	t=8
TOS-MUP agar	2E+06
ΟΜΧ	ΕΜΦΑΝΕΙΣ ΜΥΚΗΤΕΣ
pH	5,5
Οργανοληπτικός (Δομή)	NEPO
Control (χωρίς προβιοτικά)	14°C
Ημέρα μέτρησης	t=8
ΟΜΧ	>10 ⁶
pH	6,4
Οργανοληπτικός (Δομή)	OK

Πίνακας 15: Αποτελέσματα μετρήσεων 2^{ου} stability test του στελέχους Bifido BB-12 στους 4 °C

Κρέμα με Bifido (BF)	4°C
Ημέρα μέτρησης	t=8
TOS-MUP agar	1,9E+07
ΟΜΧ	1E+03
pH	5,78
Οργανοληπτικός (Δομή)	NEPO
Control (χωρίς προβιοτικά)	4°C
Ημέρα μέτρησης	t=8
ΟΜΧ	7E+04
pH	6,53
Οργανοληπτικός (Δομή)	OK

Πίνακας 16: Αποτελέσματα μετρήσεων 2^{ου} stability test του στελέχους Bifido BB-12 στους 8 °C

Κρέμα με Bifido (BF)	8°C
Ημέρα μέτρησης	t=8
TOS-MUP agar	1,6E+05
ΟΜΧ	1E+03
pH	5,8
Οργανοληπτικός (Δομή)	NEPO
Control (χωρίς προβιοτικά)	8°C
Ημέρα μέτρησης	t=8
ΟΜΧ	1E+03
pH	6,49
Οργανοληπτικός (Δομή)	OK ΑΡΑΙΩΣΕ ΛΙΓΟ

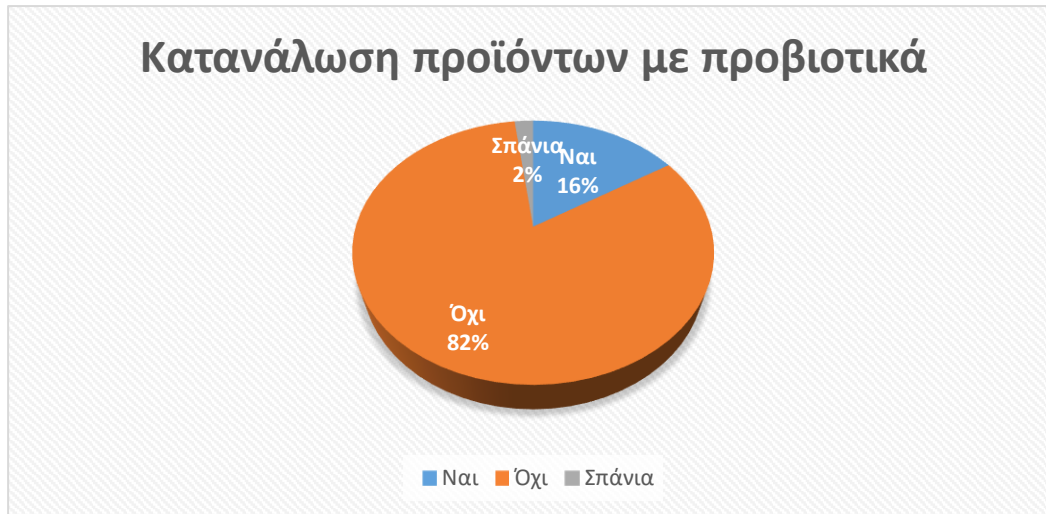
Βλέποντας τα αποτελέσματα παρατηρούμε ότι σε όλες τις θερμοκρασίες υπάρχει παρόμοια εικόνα τόσο στα δείγματα με προβιοτικά όσο και σε αυτά που δεν περιέχουν. Οι μετρήσεις πριν την ημέρα 8 δεν πραγματοποιήθηκαν λόγω έλλειψης υλικών και υποστρώματος και έπειτα από την ημέρα 8 δε συνεχίστηκαν λόγω μη αποδεκτών αποτελεσμάτων. Παρόλο που υπήρχε ένας μεγαλύτερος βαθμός επιβίωσης στους μικροοργανισμούς, υπήρξε μια αισθητή πτώση στο pH, μια σημαντική αλλαγή στη δομή της κρέμας και στην ύπαρξη παθογόνων μικροοργανισμών, τα οποία στα δείγματα control ήταν αμφιλεγόμενα.

4.1.2 Αποτελέσματα οργανοληπτικής αξιολόγησης

Πέρα από τη βιωσιμότητα των προβιοτικών, σημαντικό κομμάτι είναι και η αποδοχή του προϊόντος από το καταναλωτικό κοινό. Για αυτό το λόγο καθ' όλη τη διάρκεια της ανάπτυξης του προϊόντος πραγματοποιούνται οργανοληπτικές δοκιμές όπως προαναφέρθηκε που αφορούν όλα τα χαρακτηριστικά του. Η τελική οργανοληπτική δοκιμή που σχεδιάσαμε πραγματοποιήθηκε για την κρέμα βανίλια βάσει των αποτελεσμάτων των πειραμάτων και ήταν η πιο σημαντική, για αυτό χρησιμοποιήθηκε μεγαλύτερο δείγμα για την αξιολόγηση. Συγκεκριμένα 50 άτομα δοκίμασαν την κρέμα και απάντησαν στο αντίστοιχο ερωτηματολόγιο που περιελάμβανε τις εξής ερωτήσεις:

1. Καταναλώνετε προϊόντα με προβιοτικά;
2. Καταναλώνετε έτοιμες κρέμες ψυγείου;
3. Σας άρεσε το δείγμα που δοκιμάσατε σε γεύση;
4. Σας άρεσε το δείγμα που δοκιμάσατε σε δομή;
5. Σας άρεσε το δείγμα που δοκιμάσατε στο σύνολό του;
6. Θα αγοράζατε το προϊόν λόγω των προβιοτικών που περιέχει;

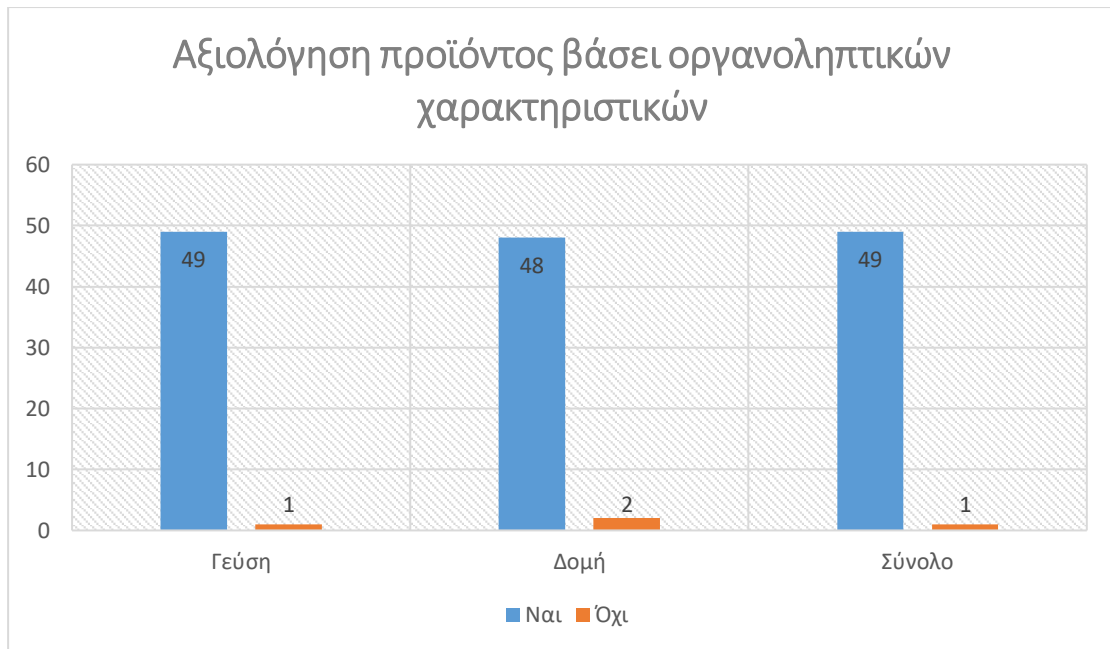
Τα αποτελέσματα διαμορφώθηκαν ως εξής:



Εικόνα 13: Αναπαράσταση αποτελεσμάτων για 1^η ερώτηση



Εικόνα 14: Αναπαράσταση αποτελεσμάτων για 2^η ερώτηση



Εικόνα 15: Αναπαράσταση αποτελεσμάτων για 3^η, 4^η, 5^η ερώτηση



Εικόνα 16: Αναπαράσταση αποτελεσμάτων για 6^η ερώτηση

4.2 Κρέμα στιγμής

4.2.1 Αποτελέσματα αξιολόγησης διάρκειας ζωής προβιοτικών μικροοργανισμών

Όπως και για την έτοιμη κρέμα ψυγείου, και σε αυτή την περίπτωση οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν από το Ελληνικό Κέντρο Έρευνας και Καινοτομίας σύμφωνα με το πρότυπο ISO 29981:2012 ανά γραμμάριο προϊόντος.

- Κρέμα στιγμής με γεύση βανίλια

Πίνακας 17: Αποτελέσματα μετρήσεων του στελέχους Bifido BB-12 στους 25 °C

Κρέμα με Bifido (BB-12)	25°C	25°C	25°C	25°C	25°C
Ημέρα μέτρησης	t=0	t=6	t=12	t=19	t=25
LAB (MRS)	5,20E+08	5,00E+08	3,60E+08	x	1,3E+08
TOS-MUP agar	8,10E+08	5,30E+08	4,30E+08	x	2,6E+08

Πίνακας 18: Αποτελέσματα μετρήσεων του στελέχους Bifido BB-12 στους 37 °C

Κρέμα με Bifido (BB-12)	37°C	37°C	37°C	37°C
Ημέρα μέτρησης	t=6	t=12	t=19	t=25
LAB (MRS)	<10 ⁷	<10 ⁷	<10 ⁴	<10 ⁴
TOS-MUP agar	3,00E+07	<10 ⁷	<10 ⁴	<10 ⁴

Πίνακας 19: Αποτελέσματα μετρήσεων του στελέχους Lactobacillus LGG στους 25 °C

Κρέμα με Lactobacillus (LGG)	25°C	25°C	25°C	25°C	25°C
Ημέρα μέτρησης	t=0	t=6	t=12	t=19	t=25
LAB (MRS)	3,30E+08	3,50E+08	3,00E+08	x	7,8E+07

Πίνακας 20: Αποτελέσματα μετρήσεων του στελέχους Lactobacillus LGG στους 37 °C

Κρέμα με Lactobacillus (LGG)	37°C	37°C	37°C	37°C
Ημέρα μέτρησης	t=6	t=12	t=19	t=25
LAB (MRS)	1,20E+08	5,00E+07	1,30E+07	2,50E+06

Πίνακας 21: Αποτελέσματα μετρήσεων του στελέχους Bifido BB536 στους 25 °C σε συνθήκες εργαστηρίου

Κρέμα με Bifido (BB536)	25°C	25°C	25°C	25°C	25°C	25°C	25°C
Ημέρα μέτρησης	t=0	t=5	t=10	t=15	t=20	t=25	t=30
TOS-MUP agar	7,5 E+07	3,9 E+07	1,35 E+08	1,16 E+08	1,6 E+08	1,1 E+08	1 E+08

Πίνακας 22: Αποτελέσματα μετρήσεων του στελέχους Bifido BB536 στους 37 °C σε συνθήκες εργαστηρίου

Κρέμα με Bifido (BB536)	37°C	37°C	37°C	37°C	37°C	37°C
Ημέρα μέτρησης	t=5	t=10	t=15	t=20	t=25	t=30
TOS-MUP agar	3,9 E +07	1,36 E+07	1,31 E +08	1,18 E+08	1,1 E+08	1,2 E+07

Πίνακας 23: Αποτελέσματα μετρήσεων του στελέχους Bifido BB536 στους 25 °C σε συνθήκες παραγωγής

Κρέμα με Bifido (BB536)	25°C	25°C	25°C	25°C	25°C	25°C	25°C
Ημέρα μέτρησης	t=0	t=5	t=10	t=15	t=20	t=25	t=30
TOS-MUP agar	1,77 E+08	1,64 E+07	1,4 E+08	1,43 E+08	1,33 E+08	1,2 E+08	1,4 E+08

Πίνακας 24: Αποτελέσματα μετρήσεων του στελέχους Bifido BB536 στους 37 °C σε συνθήκες παραγωγής

Κρέμα με Bifido (BB536)	37°C	37°C	37°C	37°C	37°C	37°C
Ημέρα μέτρησης	t=5	t=10	t=15	t=20	t=25	t=30
TOS-MUP agar	3,9 E +07	6,8 E+07	6,3 E +07	6,5 E+07	7 E+07	7,2 E+07

Πίνακας 25: Αποτελέσματα μετρήσεων του στελέχους Bifido BB536 στους 37 °C για οργανοληπτική αξιολόγηση

Κρέμα με Bifido (BB536)	37°C	37°C	37°C	37°C	37°C	37°C
Ημέρα μέτρησης	t=5	t=10	t=15	t=20	t=25	t=30
Διάλυση/δομή κρέμας	Δεν υπήρξε πρόβλημα στη διάλυση της κρέμας στο γάλα ούτε παρατηρήθηκε κάποια διαφοροποίηση στη δομή ή στο σφίξιμο	Δεν υπήρξε πρόβλημα στη διάλυση της κρέμας στο γάλα ούτε παρατηρήθηκε κάποια διαφοροποίηση στη δομή ή στο σφίξιμο	Δεν υπήρξε πρόβλημα στη διάλυση της κρέμας στο γάλα ούτε παρατηρήθηκε κάποια διαφοροποίηση στη δομή ή στο σφίξιμο	Δεν υπήρξε πρόβλημα στη διάλυση της κρέμας στο γάλα ούτε παρατηρήθηκε κάποια διαφοροποίηση στη δομή ή στο σφίξιμο	Δεν υπήρξε πρόβλημα στη διάλυση της κρέμας στο γάλα ούτε παρατηρήθηκε κάποια διαφοροποίηση στη δομή ή στο σφίξιμο	Δεν υπήρξε πρόβλημα στη διάλυση της κρέμας στο γάλα ούτε παρατηρήθηκε κάποια διαφοροποίηση στη δομή ή στο σφίξιμο

Γεύση κρέμας	Δεν παρατηρήθηκε διαφορά στο γευστικό κομμάτι της κρέμας συγκριτικά με το αντίστοιχο δείγμα στους 25 °C	Δεν παρατηρήθηκε διαφορά στο γευστικό κομμάτι της κρέμας συγκριτικά με το αντίστοιχο δείγμα στους 25 °C	Δεν παρατηρήθηκε διαφορά στο γευστικό κομμάτι της κρέμας συγκριτικά με το αντίστοιχο δείγμα στους 25 °C	Δεν παρατηρήθηκε διαφορά στο γευστικό κομμάτι της κρέμας συγκριτικά με το αντίστοιχο δείγμα στους 25 °C	Δεν παρατηρήθηκε διαφορά στο γευστικό κομμάτι της κρέμας συγκριτικά με το αντίστοιχο δείγμα στους 25 °C	Δεν παρατηρήθηκε διαφορά στο γευστικό κομμάτι της κρέμας συγκριτικά με το αντίστοιχο δείγμα στους 25 °C
---------------------	---	---	---	---	---	---

Πίνακας 26: Αποτελέσματα μετρήσεων του στελέχους Bifido BB536 μετά από παραμονή της κρέμας στο ψυγείο

Δείγμα 1

Κρέμα με Bifido (BB536)	25°C	8°C	8°C	8°C
Ημέρα μέτρησης	Εμβολιασμού	t=0	t=1	t=2
TOS-MUP AGAR	1,60E+08	1,8E+07	1,2E+07	1,00E+07

Δείγμα 2

Κρέμα με Bifido (BB536)	25°C	8°C	8°C	8°C
Ημέρα μέτρησης	Εμβολιασμού	t=0	t=1	t=2
TOS-MUP AGAR	1,60E+08	1,9E+07	1,4E+07	1,20E+07

Με δεδομένο ότι ανά μερίδα 20 γραμμαρίων προστέθηκε προβιοτική καλλιέργεια για να πετύχουμε πληθυσμό $6 \cdot 10^9$ CFU, οι μετρήσεις ανά γραμμάριο αναμέναμε να είναι $3 \cdot 10^8$ CFU/g.

Για το στέλεχος BB-12 στους 25 °C παρατηρούμε ότι και στα 2 υποστρώματα από την ημέρα 0 έως την ημέρα 25 ο πληθυσμός των προβιοτικών δεν έπεσε λογάριθμο και ήταν στον αναμενόμενο. Πιο συγκεκριμένα ήταν λίγο περισσότερο από $3 \cdot 10^8$ CFU/g που πιθανώς να οφείλεται σε μεγαλύτερη ποσότητα που τυχόν προστέθηκε στο δείγμα.

Για το στέλεχος BB-12 στους 37 °C από την ημέρα 6 κιάλας παρατηρήθηκε πτώση στον πληθυσμό, η οποία ήταν πιο αισθητή για το υπόστρωμα LAB (MRS). Βέβαια από την ημέρα 12 και έπειτα οι μετρήσεις δεν παρουσίασαν διαφορές. Από την ημέρα 19 ο πληθυσμός των προβιοτικών ήταν πολύ χαμηλός, γεγονός που αποδίδεται στην υψηλή θερμοκρασία.

Για το στέλεχος LGG στους 25 °C ο πληθυσμός ήταν επίσης στο αναμενόμενο από την ημέρα 0 και υπήρξε πτώση ενός λογαρίθμου την ημέρα 25. Στους 37 °C παρουσίασε πτώση ενός λογαρίθμου από τη ημέρα 12 και μετέπειτα την ημέρα 25.

Για το στέλεχος BB536 στους 25 °C σε συνθήκες εργαστηρίου ο πληθυσμός την ημέρα 0 ήταν έναν λογάριθμο κάτω από τον αναμενόμενο αλλά από την ημέρα 10 και έπειτα υπήρξε αύξηση. Σε αντίστοιχες συνθήκες στους 37 °C τα αποτελέσματα ήταν παρόμοια με αύξηση του πληθυσμού των προβιοτικών και πτώση την ημέρα 30.

Στις συνθήκες παραγωγής παρατηρήθηκε επίσης αύξηση του προβιοτικού πληθυσμού στους 25 °C για το ίδιο στέλεχος ενώ η ίδια αύξηση δεν υπήρξε για τους 37 °C. Ο πληθυσμός ξεκίνησε από έναν λογάριθμο χαμηλότερα σε σχέση με το αναμενόμενο και παρέμεινε εκεί μέχρι τη λήξη των μετρήσεων.

Στην οργανοληπτική αξιολόγηση της κρέμας με το στέλεχος BB536 ύστερα από αποθήκευση στους 37 °C τα αποτελέσματα ήταν αρκετά ενθαρρυντικά. Δεν παρατηρήθηκε καμία δυσάρεστη επίγευση ή αλλοίωση της έντασης των αρωμάτων. Επιπλέον, δεν εμφανίστηκαν συσσωματώματα που θα δυσχέραιναν τη διάλυση και την πήξη της κρέμας, ούτε είδαμε κάποιο σημάδι που θα παραπέμπει σε «κόψιμο» της δομής, αμέσως μετά την προσθήκη και την ανάμιξη του γάλατος.

Μετά την παρασκευή και παραμονή της κρέμας στο ψυγείο για 2 μέρες τα αποτελέσματα ήταν επίσης ικανοποιητικά. Ο πληθυσμός των προβιοτικών δεν εμφάνισε πτώση και αν η κρέμα μπορούσε να διατηρηθεί περισσότερο χωρίς το «σπάσιμο» στη δομή, οι μετρήσεις θα μπορούσαν να συνεχιστούν. Η αλλαγή στον λογάριθμο που παρατηρείται είναι λογική καθώς η μερίδα σκόνης, στην οποία έχουμε υπολογίσει την επιθυμητή ποσότητα του προβιοτικού, υφίσταται αραίωση με την προσθήκη του γάλατος.

- Κρέμα στιγμής με γεύση σοκολάτα

Πίνακας 27: Αποτελέσματα μετρήσεων του στελέχους Bifido BB536 στους 25 °C

Δείγμα 1

Κρέμα με Bifido (BB536)	25°C	25°C	25°C	25°C	25°C	25°C	25°C
Ημέρα μέτρησης	t=0	t=5	t=10	t=15	t=20	t=25	t=30
TOS-MUP agar	1,60E+08	8,00E+07	1,33E+07	1,60E+08	1,20E+08	1,00E+08	1,40E+08

Δείγμα 2

Κρέμα με Bifido (BB536)	25°C	25°C	25°C	25°C	25°C	25°C	25°C
Ημέρα μέτρησης	t=0	t=5	t=10	t=15	t=20	t=25	t=30
TOS-MUP agar	1,60E+08	1,00E+08	1,20E+07	1,50E+08	2,20E+08	1,00E+08	2,50E+08

Πίνακας 28: Αποτελέσματα μετρήσεων του στελέχους Bifido BB536 στους 37 °C

Δείγμα 1

Κρέμα με Bifido (BB536)	37°C	37°C	37°C	37°C	37°C	37°C	37°C
Ημέρα μέτρησης	t=0	t=5	t=10	t=15	t=20	t=25	t=30
TOS-MUP agar	1,40E+08	2,00E+08	8,70E+06	1,50E+08	1,80E+08	1,00E+08	1,40E+08

Δείγμα 2

Κρέμα με Bifido (BB536)	37°C	37°C	37°C	37°C	37°C	37°C	37°C
Ημέρα μέτρησης	t=0	t=5	t=10	t=15	t=20	t=25	t=30
TOS-MUP agar	1,40E+08	1,60E+08	5,80E+07	1,00E+08	1,30E+08	1,00E+08	1,30E+08

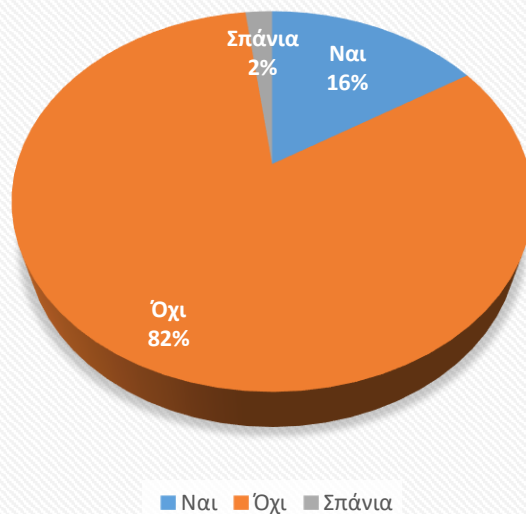
Λόγω των αμφιλεγόμενων αποτελεσμάτων στην κρέμα ψυγείο με γεύση σοκολάτα, οι μετρήσεις γινόντουσαν σε 2 δείγματα. Βέβαια τα αποτελέσματα ήταν πολύ ενθαρρυντικά σε αυτή την περίπτωση καθώς ο πληθυσμός των προβιοτικών παρέμεινε στο αναμενόμενο μέχρι και την ημέρα 30. Στη μέτρηση στην ημέρα 10 υπήρξε μια πτώση και στα 2 δείγματα αλλά αφού δε συνεχίστηκε πιθανώς να ήταν ένα μεμονωμένο γεγονός, όπως για παράδειγμα κάποιο λάθος κατά τη διαδικασία της μέτρησης.

4.2.2 Αποτελέσματα οργανοληπτικής αξιολόγησης

Αντίστοιχο ερωτηματολόγιο και συμμετοχή υπήρξε και για την κρέμα στιγμής. Οι ερωτήσεις που περιελάμβανε ήταν οι ίδιες με κάποιες τροποποιήσεις που αφορούσαν τη φύση του προϊόντος (προϊόν ψυγείου/προϊόν ραφίου). Συγκεκριμένα:

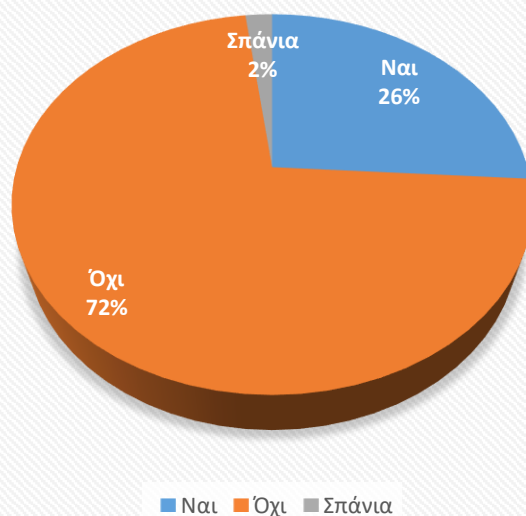
1. Καταναλώνετε προϊόντα με προβιοτικά;
2. Καταναλώνετε κρέμες στιγμής;
3. Σας άρεσε το δείγμα που δοκιμάσατε σε γεύση;
4. Σας άρεσε το δείγμα που δοκιμάσατε σε δομή;
5. Σας άρεσε το δείγμα που δοκιμάσατε στο σύνολό του;
6. Θα αγοράζατε το προϊόν λόγω των προβιοτικών που περιέχει;

Κατανάλωση προϊόντων με προβιοτικά

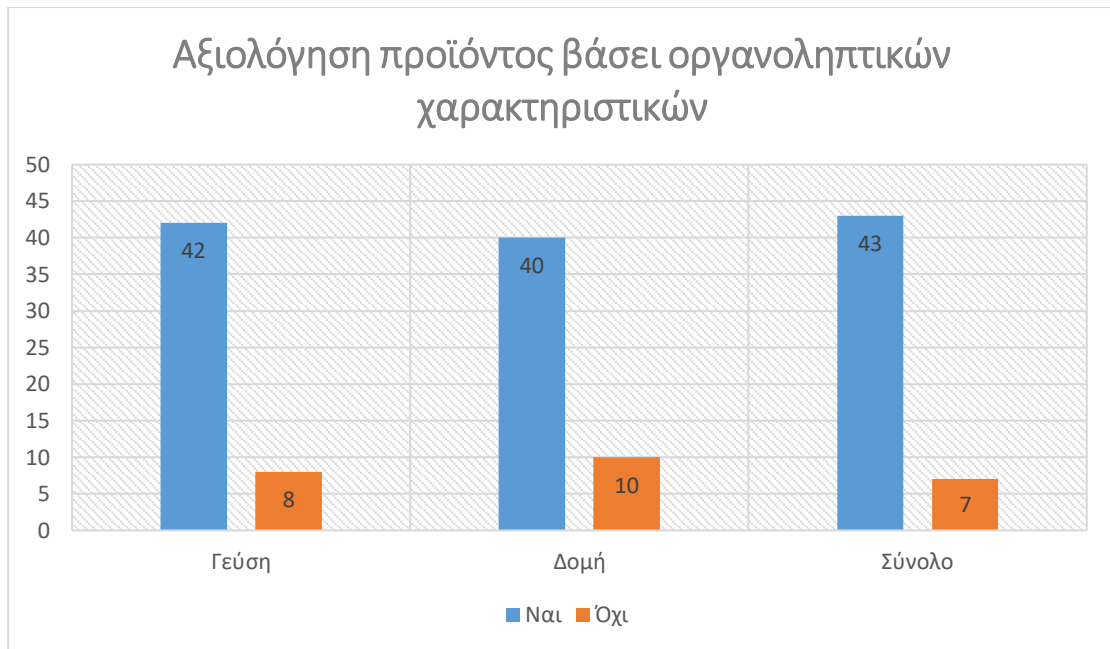


Εικόνα 17: Αναπαράσταση αποτελεσμάτων για 1^η ερώτηση

Κατανάλωση προϊόντων κρέμας στιγμής



Εικόνα 18: Αναπαράσταση αποτελεσμάτων για 2^η ερώτηση



Εικόνα 19: Αναπαράσταση αποτελεσμάτων για 3^η, 4^η, 5^η ερώτηση

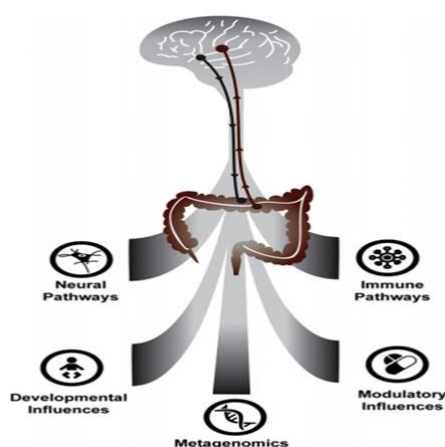


Εικόνα 20: Αναπαράσταση αποτελεσμάτων για 6^η ερώτηση

4.3 Αποτελέσματα βιβλιογραφικής ανασκόπησης σχέσης κατάθλιψης & προβιοτικών

Στην παρούσα ενότητα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ανασκόπηση της βιβλιογραφίας σχετικά με τις επιδράσεις των προβιοτικών μικροοργανισμών στα συμπτώματα της κατάθλιψης.

Ο ρόλος των προβιοτικών στην ψυχική υγεία και τις νευροεκφυλιστικές ασθένειες έχει διευρυνθεί τα τελευταία χρόνια και αποτελεί ένα αναδυόμενο πεδίο ενδιαφέροντος για τους επιστήμονες. Το εντερικό μικροβίωμα είναι απαραίτητο για την ανθρώπινη υγεία και το ανοσοποιητικό σύστημα όπως επίσης και για την αμφίδρομη επικοινωνία μεταξύ εντέρου και εγκεφάλου. Ο άξονας μικροβίου-εντέρου-εγκεφάλου (MGB) απεικονίζει αυτή την επικοινωνία. Αυτή η διαδικασία επικοινωνίας περιλαμβάνει τα συστήματα ενδοκρινών, ανοσοποιητικών και νευροδιαβιβαστών. Η δυσλειτουργία αυτών των συστημάτων, μαζί με την παρουσία δυσκολίας του εντέρου, έχουν ανιχνευθεί σε κλινικά καταθλιπτικούς ασθενείς. Αυτό συνεπάγεται τη συμμετοχή ενός δυσλειτουργικού άξονα MGB στην παθοφυσιολογία της κατάθλιψης. Σχετίζεται επίσης με διάφορες νευροψυχιατρικές παθήσεις όπως η σχιζοφρένεια, ο αυτισμός, το άγχος και οι μείζονες καταθλιπτικές διαταραχές. (61)



Εικόνα 21: Αμφίδρομες πορείες εντέρου-μικροβίου-εγκεφάλου (GBA) που ενσωματώνουν κύριους νευρώνες και οδούς ανοσοποιητικής επικοινωνίας που επηρεάζονται από αναπτυξιακούς, γονιδιακούς και διαμορφωτικούς παράγοντες. (62)

Η κακή διατροφή έχει χαρακτηριστεί ως ένας από τους παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση της κατάθλιψης, ενώ μια υγιεινή και ισορροπημένη διατροφή αναμένεται να έχει προληπτικό ρόλο. (11) Οι μικροοργανισμοί του εντέρου είναι ικανοί να παράγουν και να παρέχουν νευροδραστικές ουσίες όπως η σεροτονίνη και το γ-αμινοβουτυρικό οξύ, που δρουν στον σύστημα εγκεφάλου-εντέρου. Η προκλινική έρευνα σε τρωκτικά έδειξε ότι ορισμένα προβιοτικά έχουν αντικαταθλιπτική και αγχολυτική δράση.(11)

Σε μια μελέτη χορήγησης γάλατος που έχει υποστεί ζύμωση με προβιοτικά βακτήρια, αποδείχθηκε ότι επηρέασε τη δραστηριότητα των περιοχών του εγκεφάλου που ελέγχουν την κεντρική επεξεργασία του συναισθήματος και της αίσθησης. (63) Τη σύνδεση μεταξύ της χρόνιας, φλεγμονώδους κατάστασης χαμηλού επιπέδου, όπως υπάρχει στην κατάθλιψη, και των διαταραχών της μικροχλωρίδας του εντέρου έχουν υποστηρίξει περαιτέρω έρευνες. (64)

Αρκετοί συγγραφείς προτείνουν μικροοργανισμούς ως μια νέα ομάδα φαρμάκων που ονομάζονται «ψυχοβιοτικά» για τη θεραπεία ψυχιατρικών διαταραχών. (65) Η ιδέα των πιθανών οφελών τους στα κεντρικά νευρικά συστήματα (ΚΝΣ) και στην επίπτωση του άγχους, της σχιζοφρένειας, του Αλτσχάιμερ, της κατάθλιψης, του αυτισμού και άλλων ψυχικών διαταραχών έχει στηρίξει αυτή τη νέα κατηγορία φαρμάκων, η οποία αναμένεται να είναι

χαμηλής αντιφλεγμονώδους δράσης, αντικαταθλιπτικό και αντι-αγχολυτικό φάρμακο. (66) Η χρήση πρεβιοτικών και προβιοτικών στην κλινική πρακτική εξακολουθεί να στερείται επαρκών ισχυρών στοιχείων καθώς υπάρχουν μελέτες που αντικρούουν τα ευρήματα αυτά. Επιπλέον κλινική έρευνα είναι απαραίτητη. (67)

Στη μελέτη (68) διερευνήθηκαν οι επιδράσεις των προβιοτικών στην κατάθλιψη. Τα ευρήματα υποδεικνύουν έναν σημαντικό ρόλο των προβιοτικών στη μείωση του κινδύνου εμφάνισης της νόσου σε μη καταθλιπτικά άτομα και των συμπτωμάτων σε πάσχοντες. Ειδικότερα, σε άτομα ηλικίας 60 ετών και κάτω, η χορήγηση προβιοτικών μείωσε σημαντικά τα συμπτώματα της κατάθλιψης ενώ για άτομα ηλικίας 65 ετών και άνω δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση.

Σε μια άλλη μελέτη που πραγματοποιήθηκε για την επίδραση ενός μείγματος συμπληρώματος με προβιοτικά και πρεβιοτικά σε 30 άτομα που εξετάστηκαν για «μέτρια» επίπεδα ψυχολογικού στρες, μετά από 1 μήνα χορήγησης του συμπληρώματος, σημειώθηκε σημαντική αύξηση στους πληθυσμούς «καλών» βακτηρίων στην ομάδα συμπληρώματος (+28% *Lactobacillus*, +30% *Bifidobacterium*) και σημαντική βελτίωση των δεικτών ψυχικής υγείας, όπως το άγχος, η διάθεση, ο θυμός και η κατάθλιψη. (69) Παρ' όλα αυτά, μια μετά-ανάλυση κλινικών δοκιμών με δείγμα ατόμων της κοινότητας και του νοσοκομείου για την αξιολόγηση της επίδρασης των προβιοτικών και των πρεβιοτικών στα συμπτώματα του άγχους και της κατάθλιψης, έδειξε πως τα προβιοτικά έχουν μια μικρή αλλά σημαντική επίδραση ενώ τα πρεβιοτικά όχι. Υπάρχει μια γενική υποστήριξη σχετικά με τη δράση των προβιοτικών αλλά χρειάζονται περισσότερες τυχαίοποιημένες κλινικές μελέτες σε ψυχιατρικά δείγματα για την αξιολόγηση του θεραπευτικού δυναμικού τους. (70) (71)

Σε μια τυχαίοποιημένη, διπλά τυφλή δοκιμή με εικονικό φάρμακο σε δείγμα 40 ασθενών με μείζον καταθλιπτική διαταραχή ηλικίας 20 έως 55 ετών που διήρκεσε 8 εβδομάδες, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στην ομάδα παρέμβασης υπήρχε σημαντική μείωση στις βαθμολογίες κατάθλιψης και στις συγκεντρώσεις hs-CRP στον ορό και σημαντική αύξηση στα επίπεδα γλουταθειόνης στο πλάσμα, η οποία είναι το κύριο αντιοξειδωτικό του οργανισμού. Το προβιοτικό συμπλήρωμα περιείχε τρία βιώσιμα στελέχη: *Lactobacillus acidophilus* (2×10^9 CFU / g), *Lactobacillus casei* (2×10^9 CFU / g) και *Bifidobacterium bifidum* (2×10^9 CFU / g). (72)

5. Συμπεράσματα – Συζήτηση

Αφού έγινε ανάλυση και σύγκριση των δεδομένων με τη βιβλιογραφία και άλλες παρόμοιες εφαρμογές καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι τα αποτελέσματα για τα 2 προϊόντα ήταν αρκετά αμφιλεγόμενα και σε κάποιες περιπτώσεις όχι τα αναμενόμενα.

Μετά από βιβλιογραφική ανασκόπηση είχε προκύψει ότι τα γαλακτοκομικά προϊόντα αποτελούν την πιο συμβατική επιλογή φορέα για τους προβιοτικούς μικροοργανισμούς. Η πρωτεΐνη γάλακτος που περιέχουν, η οποία προστατεύει τα προβιοτικά τόσο κατά την αποθήκευσή τους όσο και κατά τη διέλευση από το γαστρεντερικό σύστημα, (48) καθώς και οι συνθήκες συντήρησης σε θερμοκρασίες ψυγείου προσφέρουν ένα πρόσφορο έδαφος βιωσιμότητας καθώς οι χαμηλές θερμοκρασίες δεν ευνοούν την παραγωγή οξέος που παρατηρείται σε υψηλότερες θερμοκρασίες, χαρακτηριστικές για το κάθε στέλεχος (75). Έτσι, στις κρέμες ψυγείου αναμέναμε μια αρκετά ενθαρρυντική βιωσιμότητα αυτών των στελεχών. Επιπλέον, οι πρεβιοτικές ίνες που προστέθηκαν είχαν στόχο να συμβάλλουν περαιτέρω στη διατήρηση και ανάπτυξή τους. (40) (41) Μελέτες έχουν επιβεβαιώσει την θετική επίδραση αυτών των ουσιών. Πιο συγκεκριμένα σε μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε γάλα, η προσθήκη πρεβιοτικών έφερε τα καλύτερα αποτελέσματα στην βιωσιμότητα των στελεχών *Bifidobacterium Lactis Bb-12* συγκριτικά με τα δείγματα χωρίς πρεβιοτικά. (73). Σε άλλη μελέτη που διερευνήθηκαν διαφορετικά είδη πρεβιοτικών, κάποια από αυτά συνέβαλαν στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών *Bifidobacterium* ενώ άλλα στην ανάπτυξη των *Lactobacillus*. (74)

Στη δική μας μελέτη, τα προϊόντα ψυγείου δεν έδειξαν τόσο καλά αποτελέσματα όσο τα προϊόντα ραφιού, παρόλο που αυτό ήταν το αναμενόμενο, καθώς είχαμε περισσότερα δεδομένα. Σε αντίστοιχη έρευνα με φορέα μια κρέμα ρυζιού, στην οποία προστέθηκαν προβιοτικά *Bifidobacterium*, τα αποτελέσματα δεν έδειξαν απλώς μια καλή επιβίωση μέχρι την τελική μέρα αποθήκευσης αλλά και συμβολή στη διατήρηση της δομής της κρέμας. Επιπλέον, υψηλά ποσοστά προβιοτικών στελεχών είχαν ως συνέπεια χαμηλές συγκεντρώσεις *S.aureus*. (82) Στις 2 ψυγείου επίσης, οι 2 γεύσεις εμφάνισαν εξίσου ανομοιομορφία στα αποτελέσματα. Συγκεκριμένα η κρέμα με γεύση βανίλια έφερε μεγαλύτερα ποσοστά επιβίωσης των προβιοτικών μικροοργανισμών συγκριτικά με την κρέμα με γεύση σοκολάτας. Αυτό αποτελεί επίσης ένα αμφιλεγόμενο εύρημα καθώς σύμφωνα με την βιβλιογραφία το κακάο και η σοκολάτα αποτελούν έναν υποσχόμενο φορέα για τα προβιοτικά.

Έχει αναφερθεί από πολλούς επιστήμονες, ότι μπορούν να θεωρηθούν ως εξαιρετικός φορέας προβιοτικών μικροοργανισμών και πρεβιοτικών συστατικών. Αυτό οφείλεται κυρίως στο βούτυρο του κακάου, το οποίο παρέχει προστασία στα προβιοτικά βακτήρια, κατά τη διάρκεια αποθήκευσης και κατά την είσοδο στο γαστρεντερικό σωλήνα (GI). Επιπλέον, οι φαινολικές ενώσεις διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο στην καθυστέρηση του οξειδωτικού στρες στα προβιοτικά, το οποίο αποτελεί μια από τις κύριες αιτίες του προβιοτικού θανάτου στα τρόφιμα, οδηγώντας σε βελτιωμένη βιωσιμότητα και παρατεταμένη διάρκεια ζωής. Με την προσθήκη των προβιοτικών μικροοργανισμών, η σοκολάτα χαρακτηρίζεται ως λειτουργικό τρόφιμο, το οποίο είναι πολλά υποσχόμενο. Σε μια έρευνα αξιολογήθηκε η βιωσιμότητα ενός μικροενθυλακώμενου μίγματος *Lactobacillus helveticus* CNCM I-1722 και *Bifidobacterium longum* CNCM I-3470 σε σοκολάτα γάλακτος και μαύρη. Συγκριτικά με το γάλα, και τα δύο είδη σοκολάτας προσέφεραν μεγαλύτερη προστασία από τις περιβαλλοντικές και γαστρεντερικές συνθήκες στα προβιοτικά στελέχη, χωρίς να ελαττωθεί σημαντικά η συγκέντρωσή τους. Μεταξύ των δύο ειδών, η σοκολάτα γάλακτος απέδωσε καλύτερα ποσοστά επιβίωσης μικροοργανισμών. Ως υπόστρωμα προβιοτικών, η σοκολάτα

πληροί όλα τα απαραίτητα κριτήρια (ασφαλές για ανθρώπινη κατανάλωση, προστασία στελεχών κατά την παραγωγή, την αποθήκευση και τη διέλευση στο γαστρεντερικό σύστημα, την εναπόθεση στο έντερο) και σε συνδυασμό με τη μέθοδο της μικροενθυλάκωσης η συγκέντρωση των προβιοτικών είναι πάνω από 108 CFU/g, όριο πολύ μεγαλύτερο από το συνιστώμενο 106 CFU/g. (76) Σε μία άλλη μελέτη, εξετάστηκε το κακάο ως μέσο για τα στελέχη *Lactobacillus*. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι αποτελεί μια απλή και εύκολη λύση για την επιβίωση των στελεχών κατά την επεξεργασία και την αποθήκευση ενώ μπορεί να χρησιμοποιηθεί επίσης ως συστατικό του γάλατος, γάλα σόγιας ή μη γαλακτοκομικών ροφημάτων σε ποσότητες που επιτρέπει μια υγιής και ισορροπημένη διατροφή. Περίπου 1-2 γραμμάρια κακάο μπορεί να συναγωνιστεί την ποσότητα προβιοτικών που περιέχουν γαλακτοκομικά προϊόντα. (108/77) Σε μια έρευνα για τις αισθητήριες ιδιότητες της μαύρης σοκολάτας με προβιοτικά *Lb. plantarum* 564 και *Lb. plantarum* 299n, οι προβιοτικές σοκολάτες επέδειξαν εξαιρετικές αισθητήριες ιδιότητες μετά από αποθήκευση 60 και 180 ημερών, καταδεικνύοντας ότι τα προβιοτικά δεν επηρέασαν το άρωμα, την υφή και την εμφάνιση της σοκολάτας, με συγκεντρώσεις προβιοτικών 108 CFU/g και 106 CFU/g. (109/78) Έρευνα επίσης μελέτησε την επιβίωση *Lactobacillus acidophilus* NCFM, *Lactobacillus rhamnosus* HN001 και *Bifidobacterium lactis* HN019 σε σοκολατούχα γάλατα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ύστερα από 6 μήνες αποθήκευσης, τα ποσοστά επιβίωσης ήταν πάνω από 90% για όλα τα στελέχη και οι συγκεντρώσεις ήταν περίπου 108 CFU/g. (110/79) Τόσο το στέλεχος *L. acidophilus* NCFM® όσο και το *B. lactis* HN019 επέδειξαν καλά αποτελέσματα σχετικά με την επιβίωση και τη δραστικότητα των κυττάρων σε υπόστρωμα σοκολάτας γάλακτος και μαύρης μετά από 180 ημέρες αποθήκευσης. Εκτός από αυτά τα στελέχη των προβιοτικών που έχουν μελετηθεί εκτενώς, η χρήση του *Bacillus coagulans* έχει προταθεί επίσης για την ανάπτυξη προβιοτικής μαύρης σοκολάτας. (111/80) Παρόμοια αποτελέσματα έδειξε επίσης και μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε κρέμα σοκολάτας, στην οποία προστέθηκαν και μελετήθηκαν διάφορα στελέχη προβιοτικών ως προς την βιωσιμότητά τους και την επίδραση στις οργανοληπτικές ιδιότητες της κρέμας ύστερα από αποθήκευση στους 4 °C. Στελέχη του γένους *Bifidobacterium* απέδειξαν καλή βιωσιμότητα για 15 μέρες ενώ στελέχη του γένους *Lactobacillus* 25 μέρες, χωρίς επίδραση στις φυσικοχημικές ιδιότητες του προϊόντος όπως το pH, η δομή και η γεύση. (81)

Αναφορικά με τις θερμοκρασίες των πειραμάτων, στους 4 °C η κρέμα άντεξε χωρίς αλλοιώσεις έως και την ημέρα 41 με πτώση όμως δύο λογαρίθμων του προβιοτικού πληθυσμού από το αναμενόμενο. Στις θερμοκρασίες 8 και 14 °C, οι κρέμες άντεξαν 24 και 6 ημέρες αντίστοιχα εμφανίζοντας υψηλότερα ποσοστά μικροβιολογικών αλλοιώσεων αλλά πτώση ενός λογαρίθμου του προβιοτικού πληθυσμού. Στους 4 °C αναμέναμε αυτά τα αποτελέσματα καθώς όλα τα προϊόντα ψυγείου διατηρούνται καλύτερα στις πιο χαμηλές θερμοκρασίες αλλά και όπως προαναφέρθηκε σε αυτές τις θερμοκρασίες τα προβιοτικά δεν παράγουν οξύ. (75) Τόσο οι τιμές OMX όσο και του pH στα προβιοτικά δείγματα και στα control δεν παρουσίασαν διαφορές στα δείγματα για τις κρέμες ψυγείου σε κανένα πείραμα εκτός από το 2^ο stability test για την κρέμα σοκολάτας, στο οποίο το pH στα προβιοτικά δείγματα ήταν εμφανώς χαμηλότερο από τα δείγματα control.

Στα 2 stability test που πραγματοποιήθηκαν στη σοκολάτα τα αποτελέσματα ήταν υπό συζήτηση. Ενώ στο 1^ο πείραμα τα νούμερα για τα προβιοτικά ήταν πολύ χαμηλά, η δομή δεν επηρεάστηκε όπως στο 2^ο πείραμα. Στο 2^ο πείραμα παρατηρήθηκε μια αύξηση στην χλωρίδα της κρέμας, η οποία πιθανώς επηρέασε τους προβιοτικούς μικροοργανισμούς, οι οποίοι προσπαθώντας να επιβιώσουν, παρήγαγαν οξύ, το οποίο έριξε το pH της κρέμας και οδήγησε στην παραμόρφωση της δομής ή αλλιώς στο «κόψιμο» της κρέμας. Πιθανώς επίσης η

μεγαλύτερη ποσότητα της προβιοτικής καλλιέργειας να έχει ως συνέπεια αυτή την αλλαγή στη δομή, γεγονός το οποίο πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω και να τεθούν περιορισμοί στην ποσοτική αναλογία. Σε καμία από τις 2 περιπτώσεις δεν αποκλείουμε το ενδεχόμενο εξωτερικής επιμόλυνσης κατά την παρασκευή και το συσκέασμα των δειγμάτων καθώς οι συνθήκες που μπορούσαμε να πετύχουμε δεν ήταν απόλυτα στείρες.

Πέρα από τη βιωσιμότητα των προβιοτικών στελεχών μελετήθηκε και η επίδρασή τους στη δομή και στον χρόνο συντήρησης της κρέμας, καθώς στην μελέτη που προαναφέρθηκε με την κρέμα ρυζιού υπήρχαν δεδομένα που ευνοούσαν αυτό το σενάριο. (82) Σε καμία από τις 2 γεύσεις ψυγείου η κρέμα με τα προβιοτικά δεν παρουσίασε καλύτερα αποτελέσματα συντήρησης στην εκάστοτε θερμοκρασία αποθήκευσης συγκριτικά με τα δείγματα control. Η δομή επίσης αλλοιωνόταν, «έκοβε» ή φούσκωνε, στους ίδιους χρόνους. Το μόνο δεδομένο που δε συμφωνεί αλλά αντικρούει τα βιβλιογραφικά ευρήματα χωρίς να είναι ξεκάθαρη η αιτία για το γεγονός αυτό, είναι ότι στο 2^ο stability test στην κρέμα σοκολάτας η υψηλή προβιοτική ποσότητα και το χαμηλό pH οδήγησαν σε αλλοίωση στη δομή της κρέμας ενώ τα δείγματα control παρέμεναν άθικτα, με εξαίρεση το δείγμα στους 8 °C, το οποίο εμφάνισε μικρή αραίωση, η οποία όμως ήταν στα όρια του αποδεκτού.

Στα δύο προϊόντα ραφιού τα αποτελέσματα ήταν καλύτερα από τα αντίστοιχα προϊόντα ψυγείου σε όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, παρόλο των πιο υψηλών θερμοκρασιών που ευνοούν την ανάπτυξη και παραγωγή οξέος. Και οι 2 γεύσεις αποτέλεσαν έναν καλό φορέα για τα προβιοτικά σε αντίθεση με τις κρέμες ψυγείου, στις οποίες υπήρξε διαφοροποίηση.

Πιο συγκεκριμένα για την κρέμα στιγμής με γεύση βανίλια, το στέλεχος LGG και το BB-12 επέδειξαν καλά αποτελέσματα στις 25 ημέρες αποθήκευσης στους 25 °C. Για το στέλεχος BB-12, αξιολογήθηκαν 2 υποστρώματα εκλεκτικά ως προς συγκεκριμένα στελέχη και δεν παρατηρήθηκαν διαφορές αναφορικά με την ευαισθησία τους στις μετρήσεις των στελεχών. Για τους 37 °C και τα 2 στελέχη παρουσίασαν μια μείωση μετά τις 25 ημέρες, με μεγαλύτερη τη μείωση για το στέλεχος BB-12. Για το στέλεχος Bifidobacterium BB536 τα αποτελέσματα ήταν επίσης ενθαρρυντικά τόσο στις συνθήκες εργαστηρίου όσο και στις συνθήκες παραγωγής. Στους 37 °C υπήρχε επίσης μια πτώση του πληθυσμού, όπως ήταν αναμενόμενη, κυρίως στις συνθήκες παραγωγής λόγω των μη στειρών συνθηκών πιθανώς. Είναι σημαντικό να πούμε ότι η μείωση του πληθυσμού του BB536 ήταν σημαντικά μικρότερη από την αντίστοιχη που παρατηρήσαμε στο στέλεχος BB12 και LGG. Οι αυξομειώσεις του πληθυσμού που παρατηρήθηκαν στο συγκεκριμένο πείραμα μπορεί να οφείλονται είτε σε λάθος κατά τη ζύγιση του προβιοτικού στα δείγματα είτε σε μεγαλύτερο χρόνο ανάπτυξης που μπορεί να έχει το στέλεχος συγκριτικά με τα προηγούμενα στελέχη. Τα δεδομένα αυτά πιθανώς να οφείλονται στις βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης των προβιοτικών μικροοργανισμών που κυμαίνονται σε τέτοιες θερμοκρασίες (7) (8) και προάγουν την ενεργοποίησή τους, η οποία έχει ως τελικό στάδιο την θανάτωσή τους. Άλλες μελέτες έχουν δείξει επίσης ότι θερμοκρασία αποθήκευσης 20 °C είχε ως αποτέλεσμα σημαντικές μειώσεις σε βιώσιμες μετρήσεις αυτού του είδους στα αποξηραμένα προϊόντα. (83) ενώ προβιοτικά σε προϊόντα που περιέχουν ζάχαρη παρουσιάζουν επίσης μείωση της βιωσιμότητας σε υψηλές θερμοκρασίες. (41)

Η δομή και η γεύση της κρέμας έμειναν αναλλοίωτα ύστερα 30 ημέρες παραμονή τους στους 37 °C, Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με τις καλές μετρήσεις προβιοτικών που λήφθηκαν όταν το δείγμα παρασκευάστηκε και αφέθηκε στο ψυγείο για 2 ημέρες (μέσος όρος

διάρκειας ζωής αντίστοιχων προϊόντων), υποστηρίζει τη χρήση του συγκεκριμένου προϊόντος ως φορέα.

Λόγω των καλύτερων αποτελεσμάτων που εμφάνισε το στέλεχος *Bifidobacterium* BB536, επιλέχθηκε για την αξιολόγηση της βιωσιμότητάς του στην κρέμα στιγμής με γεύση σοκολάτας. Καθώς είχαμε λάβει υπόψιν τα αποτελέσματα από τα stability test στα προϊόντα ψυγείου, αναμέναμε τις μετρήσεις από τα στελέχη που δοκιμάστηκαν στην κρέμα στιγμής με γεύση βανίλια ώστε να αξιολογήσουμε ποιο στέλεχος μπορεί να επιφέρει τα καλύτερα αποτελέσματα. Σε αντίθεση με την κρέμα ψυγείου, σε αυτή την περίπτωση τα αποτελέσματα συμφωνούσαν με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας σχετικά με το κακάο και τα προβιοτικά καθώς μέχρι την ημέρα 30 στους 25 και 37 °C δεν υπήρξε καμία πτώση στον προβιοτικό πληθυσμό. Με βάση αυτά τα αποτελέσματα υπήρξε η σκέψη για δοκιμή του στελέχους στις κρέμες ψυγείου, όμως δεν ήταν εφικτό καθώς μπορούσε να προστεθεί μόνο σε αποξηραμένα προϊόντα.

Τέλος, αξιοσημείωτα ήταν τα δεδομένα που λήφθηκαν από τις οργανοληπτικές αξιολογήσεις των προϊόντων. Είναι αρκετά σημαντικό για την ανάλυση των δεδομένων που λαμβάνονται από τους συμμετέχοντες να γνωρίζουμε το ποσοστό του δείγματος που είναι καταναλωτές τέτοιων προϊόντων, ώστε καταρχάς να εκτιμηθεί η απήχηση των προϊόντων στην αντίστοιχη καταναλωτική κοινότητα και να αξιοποιηθούν ορθότερα τα σχόλια που θα λάβουμε από τους καταναλωτές και μη. Επιπλέον, οι ερωτήσεις που σχετίζονται με την κατανάλωση προβιοτικών προϊόντων αξιολογούν την πρόθεση αγοράς του συγκεκριμένου προϊόντος λόγω όχι μόνο της γεύσης αλλά και της ιδιαιτερότητάς του έναντι άλλων ανταγωνιστικών, ακόμα και αν οργανοληπτικά υπερέχουν. Έτσι μπορούμε να κρίνουμε κατά πόσο ένας πιθανός καταναλωτής επηρεάζεται από τους ισχυρισμούς σε ένα προϊόν και σε αυτή την περίπτωση από την επιθυμία για κατανάλωση προβιοτικών. Η κατανόηση των αναγκών και των επιλογών ενός καταναλωτή, καθορίζει τις καταναλωτικές τάσεις της αγοράς και κατ'επέκταση θέτει τις βάσεις για την ανάπτυξη των νέων προϊόντων.

Η έρευνα έδειξε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό δεν καταναλώνει προϊόντα με προβιοτικά. Μια πιθανή εξήγηση είναι η έλλειψη πληθώρας στη συγκεκριμένη κατηγορία προϊόντων που καθίσταται ανασταλτικός παράγοντας στην κατανάλωση και οικειοποίησή τους από το καταναλωτικό κοινό. Επιπλέον παρόλο που οι περισσότεροι δήλωσαν ότι δεν προτιμούν τις κρέμες, θα επέλεγαν τα συγκεκριμένα προϊόντα για τα προβιοτικά τους οφέλη καθώς τους είναι προϊόντα αποδεκτά στη γεύση, στη δομή και στο σύνολό τους. Συμπερασματικά θα λέγαμε ότι έχει αρχίσει μια ευαισθητοποίηση για τις ευεργετικές ιδιότητες των προβιοτικών, η οποία μπορεί να γίνει η βάση για την παραγωγή τέτοιων προϊόντων, προσφέροντας στον καταναλωτή τη δυνατότητα επιλογής.

Η παραγωγή ενός προβιοτικού προϊόντος δεν είναι εύκολη υπόθεση καθώς επηρεάζεται από αναρίθμητους παράγοντες. Πέρα από την θερμοκρασία, η οποία είναι ένας παράγοντας που επηρεάζει κατά πολύ την επιβίωση των προβιοτικών στο προϊόν, υπάρχουν και άλλα κριτήρια που πρέπει να ληφθούν υπόψιν. Αρχικά, τόσο το ίδιο το στέλεχος και τα χαρακτηριστικά του όσο και το τρόφιμο-φορέας του προβιοτικού είναι εξίσου σημαντικά. Η επιλογή των δύο αυτών στοιχείων είναι κρίσιμοι καθώς οι χαρακτηριστικές ιδιότητες του προβιοτικού, καθορίζουν σε μεγάλο βαθμό την ανάπτυξή του και το προϊόν «vehicle», όπως λέγεται, παίζει βασικό ρόλο στην επιβίωση, τη φυσιολογία και την αποτελεσματικότητα των προβιοτικών καλλιεργειών. Ρόλος του είναι ουσιαστικά να προωθεί και να προστατεύει τους ζώντες μικροοργανισμούς χωρίς να διαταράσσονται τα αισθητήρια χαρακτηριστικά του προϊόντος. Μεγάλου ενδιαφέροντος είναι επίσης η διαδικασία που θα υποστούν τα προβιοτικά κατά

την επεξεργασία τους (π.χ. μικροενθυλάκωση) και η επιλογή των διάφορων ουσιών του προϊόντος και η αλληλεπίδρασή τους με τα προβιοτικά. Υπάρχουν ουσίες που επηρεάζουν αρνητικά ή θετικά τη βιωσιμότητα των προβιοτικών και άλλες που δεν την επηρεάζουν καθόλου. Χαρακτηριστικό παράδειγμα θρεπτικού συστατικού που χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη των προβιοτικών κυττάρων είναι τα πρεβιοτικά. Επιπλέον, τα προβιοτικά πρέπει να αντέχουν στην έκθεση σε οξυγόνο, είτε κατά την παραγωγική διαδικασία είτε κατά την αποθήκευση, και στην έκθεση στα γαστρικά οξέα, δηλαδή σε χαμηλό pH. Τέλος, πρέπει να μην αλλοιώνεται η δομή του προϊόντος (συναίρεση) και οι οργανοληπτικές ιδιότητές του. Αξίζει να σημειωθεί ότι λόγω της διαφορετικότητας που παρουσιάζουν τα προβιοτικά στελέχη μεταξύ τους, μια ουσία ή μια συνθήκη που ευνοεί κάποιο στέλεχος μπορεί να μην είναι το ίδιο αποτελεσματική σε συνδυασμό με κάποιο άλλο προβιοτικό, κάτι που προέκυψε και από τη δική μας έρευνα στα 2 προϊόντα.

Εν κατακλείδι, θα λέγαμε ότι οι κρέμες σε μορφή σκόνης εμφανίζουν πιο υποσχόμενα αποτελέσματα ως φορέας των προβιοτικών ενώ το καλύτερο στέλεχος για τέτοιες εφαρμογές αποδείχθηκε το *Bifidobacterium* BB536. Από τα προϊόντα ψυγείου, η κρέμα βανίλιας με το στέλεχος *Bifidobacterium* BB12 υπέδειξε την καλύτερη διάρκεια ζωής στους 4 °C, ενώ σε καμία θερμοκρασία δεν ενισχύθηκε η άποψη για συντηρητικές ιδιότητες των προβιοτικών. Περαιτέρω μελέτη απαιτεί η περίπτωση της κρέμας σοκολάτας που αντικρούει τα αποτελέσματα παρόμοιων ερευνών και φαίνεται να μην πληροί τα κριτήρια για πιθανό υπόστρωμα προβιοτικών.

Μελλοντικές προοπτικές

Αν και υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα σχετικά με την επίδραση των προϊόντων εμπλουτισμένων με προβιοτικά σε καταθλιπτικά επεισόδια, οι διαθέσιμες μελέτες δεν αξιολογούν τη μακροπρόθεσμη κατανάλωση τους. Συνεπώς, κρίνεται σημαντικός ο σχεδιασμός και η διεξαγωγή μιας κλινικής μελέτης με περίοδο παρακολούθησης όπως αυτή παραγράφεται παρακάτω:

Προτείνεται η κλινική μελέτη να είναι διπλά τυφλή, τυχαιοποιημένη και ελεγχόμενη με χρονικό πλαίσιο τους 6 μήνες. Πιο συγκεκριμένα, το δείγμα θα χωριστεί σε 2 ομάδες, εκ των οποίων η 1^η ομάδα (ομάδα παρέμβασης) στα πλαίσια της συνήθους διατροφής δυτικού τύπου θα καταναλώνει μια μερίδα προβιοτικού προϊόντος ημερησίως, ώστε να μπορεί να λαμβάνει τα $6 \cdot 10^7$ CFU/g, όριο που έχει θεσπιστεί από τη νομοθεσία και ορίζει τις ευεργετικές ιδιότητες των προβιοτικών στελεχών στον ανθρώπινο οργανισμό. Η 2^η ομάδα θα ακολουθήσει επίσης τη συνήθη διατροφή δυτικού τύπου με κατανάλωση αντίστοιχου προϊόντος χωρίς προσθήκη προβιοτικών στελεχών (ομάδα ελέγχου).

Η παρέμβαση θα διερευνά την ευεργετική δράση των προβιοτικών στα συμπτώματα της κατάθλιψης και για αυτό το λόγο κύριο χαρακτηριστικό της παρέμβασης αποτελεί η επιλογή του υπό μελέτη δείγματος, που θα απαρτίζεται από άτομα που έχουν διαγνωστεί με ήπια ή μερίζονα κατάθλιψη. Σημαντικό για την έκβαση της παρέμβασης είναι τα συμμετέχοντα άτομα να μην πάσχουν από άλλες νευροψυχικές διαταραχές ή να λαμβάνουν κάποια θεραπευτική αγωγή για ένα διάστημα τουλάχιστον 6 μηνών πριν την έναρξη της παρέμβασης που θα μπορούσε να επηρεάσει δραστικά την όλη διαδικασία. Άτομα των 2 φύλων ηλικίας 18 ετών και άνω θα έχουν δικαίωμα συμμετοχής ώστε να υπάρχει ένα συμπέρασμα που θα

περιλαμβάνει όλες τις ηλικιακές βαθμίδες. Επιπλέον κριτήρια αποκλεισμού θα αποτελούν τυχόν αλλεργίες στα γαλακτοκομικά προϊόντα ή δυσανεξία στη λακτόζη καθώς το υπό ανάπτυξη προϊόν έχει ως βάση το γάλα.

Αναφορικά με το προϊόν στο οποίο θα στηριχτεί η παρέμβαση, σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την έρευνα που διεξήγαμε, είναι προτιμότερο να επιλεγθεί η κρέμα στιγμής λόγω των σαφέστερων αποτελεσμάτων που απέδωσε και του μεγαλύτερου χρόνου ζωής, που θα μπορούσε να αποτελέσει πλεονέκτημα για τη διεκπεραίωση της παρέμβασης.

Για το σχεδιασμό της μελέτης ως χρονικό πλαίσιο ορίζονται οι 6 μήνες παρακολούθησης, καθώς βιβλιογραφικές μελέτες που προαναφέρθηκαν ορίζουν ως διάστημα της μελέτης τους 1-2 μήνες και καμία περαιτέρω παρακολούθηση. Τα αποτελέσματα από τη μελέτη διατηρησιμότητας που πραγματοποιήσαμε εμείς για την κρέμα στιγμής έδωσαν ικανοποιητικά αποτελέσματα στους 25 °C για 30 ημέρες. Επειδή όμως τα ίδια αποτελέσματα έδωσαν και στους 37 °C, η οποία είναι πιο στρεσογόνη συνθήκη για το προϊόν, το εκτιμώμενο διάστημα της μελέτης μπορεί να φτάσει τους 2 μήνες με αποθήκευση του προϊόντος σε κανονικές συνθήκες δωματίου. Με βάση αυτά τα δεδομένα, ο συμμετέχοντας θα προμηθεύεται το προϊόν για 2 μήνες, όπου θα καταναλώνει καθημερινά μια μερίδα των 20 γραμμάρων με διάλυση στα αντίστοιχα ml γάλακτος και θα λαμβάνει $6 \cdot 10^9$ CFU/μερίδα, και στο τέλος του δίμηνου το προϊόν θα διατίθεται εκ νέου.

Για τη διεκπεραίωση της μελέτης, θα πραγματοποιούνται μικροβιολογικές αναλύσεις καλλιεργειών κοπράνων για την αξιολόγηση του μικροβιώματος και των αλλαγών που αναμένεται να επιφέρουν τα προβιοτικά στελέχη. Επιπλέον, δεδομένα προηγούμενων μελετών που περιεγράφηκαν σε προηγούμενη ενότητα, δηλώνουν σχέση μεταξύ της κατάθλιψης, δεικτών φλεγμονής όπως η CRP και νευροδραστικών ορμονών όπως η σεροτονίνη, επομένως σημαντικές πληροφορίες μπορούν να αντληθούν και από εξετάσεις αίματος για τους συγκεκριμένους δείκτες. Οι μικροβιολογικές αναλύσεις και οι εξετάσεις αίματος θα πραγματοποιηθούν πριν την έναρξη της παρέμβασης, στο τέλος του πρώτου τριμήνου και στο τέλος του 2^{ου} τριμήνου, όπου και θα τερματιστεί η μελέτη.

Για την καλύτερη παρακολούθηση των συμμετεχόντων, οι ίδιοι θα πρέπει να δηλώνουν την κατανάλωση του προϊόντος σε καθημερινή βάση μέσω της καταγραφής ερωτηματολογίου συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων. Επιτυχής προσκόλληση θα θεωρείται όταν ο συμμετέχων έχει καταναλώσει τουλάχιστον το 80% των προϊόντων στον χρόνο που έχει προσδιοριστεί.

Για την αξιολόγηση της επίδρασης των προβιοτικών στα συμπτώματα της κατάθλιψης, έχουν σχεδιαστεί σχετικά ερωτηματολόγια που περιλαμβάνουν ψυχολογικές παραμέτρους όπως θυμός, άγχος, αίσθημα θλίψης και κόπωσης, οι οποίες είναι άμεσα συνδεδεμένες με την κατάθλιψη. Τα αποτελέσματα από τη συμπλήρωση των ερωτηματολογίων θα συγκρίνονται με τα αποτελέσματα από το αρχικό ερωτηματολόγιο του πάσχοντα πριν την λήψη της παρεμβατικής αγωγής.

Στον έναν χρόνο μετά την έναρξη της παρέμβασης, όπου οι συμμετέχοντες πλέον θα έχουν επιστρέψει στις διατροφικές τους συνήθειες, θα κληθούν να επαναλάβουν τις

μικροβιολογικές αναλύσεις, τις εξετάσεις αίματος και το ερωτηματολόγιο για την καταγραφή των ψυχολογικών παραμέτρων. Κατά αυτόν τον τρόπο θα μπορέσει να αξιολογηθεί η συμβολή της παρέμβασης μελλοντικά και κατά πόσο τα ευρήματα της μελέτης είναι παροδικά ή έχουν μακροχρόνια επίδραση στον ασθενή.

Συμπερασματικά, το θέμα της διερεύνησης των προβιοτικών στον τομέα των νευροψυχικών διαταραχών, όπως η κατάθλιψη, είναι αρκετά νέο και απαιτείται περαιτέρω μελέτη ώστε να καταστεί αντιληπτό πόσο μπορούν τα προβιοτικά στελέχη να επηρεάσουν την ψυχική υγεία του ασθενούς, όταν καταναλώνονται στα πλαίσια ενός καθημερινού προγράμματος διατροφής. Επιπλέον υλικό για μετέπειτα στάδια ερευνητικής εργασίας μπορεί να περιλαμβάνει την χρήση άλλων κατηγοριών τροφίμων ως υποστρώματα προβιοτικών πέρα των γαλακτοκομικών προϊόντων σε κλινικές μελέτες, που όπως είδαμε από τη βιβλιογραφία έχουν αρχίσει να αναπτύσσονται, ώστε να εκτιμηθεί η πιθανή ευεργετική δράση του συνδυασμού άλλων θρεπτικών συστατικών, όπως για παράδειγμα βιταμίνες, που περιέχει το τρόφιμο με τα προστιθέμενα προβιοτικά.

6. Βιβλιογραφία

- 1) Martirosyan, D. M., & Singharaj, B. (2016). Health claims and functional food: The future of functional foods under FDA and EFSA regulation. *Functional Foods for Chronic Diseases; Food Science Publisher: Dallas, TX, USA*, 410-424.
- 2) eatright.org/food/nutrition/healthy-eating/functional-foods
- 3) Martirosyan, D. M., & Singh, J. (2015). A new definition of functional food by FFC: what makes a new definition unique?. *Functional foods in health and disease*, 5(6), 209-223.
- 4) Martirosyan, D., & Miller, E. (2018). Bioactive compounds: The key to functional foods. *Bioactive Compounds in Health and Disease*, 1(3), 36-39.
- 5) Sanders, M. E. (2008). Probiotics: definition, sources, selection, and uses. *Clinical infectious diseases*, 46(Supplement_2), S58-S61.
- 6) Georgieva, M., Andonova, L., Peikova, L., & Zlatkov, A. (2014). Probiotics health benefits, classification, quality assurance and quality control review. *Pharmacia*, 61(4), 22-31.
- 7) Pot, B., Felis, G. E., De Bruyne, K., Tsakalidou, E., Papadimitriou, K., Leisner, J., & Vandamme, P. (2014). The genus *Lactobacillus*. *Lactic acid bacteria: biodiversity and taxonomy*, 249-353.
- 8) Rivera-Espinoza, Y., & Gallardo-Navarro, Y. (2010). Non-dairy probiotic products. *Food microbiology*, 27(1), 1-11.
- 9) McFarland, L. V. (2015). From yaks to yogurt: the history, development, and current use of probiotics. *Clinical Infectious Diseases*, 60(suppl_2), S85-S90.
- 10) Nagpal, R., Kumar, A., Kumar, M., Behare, P. V., Jain, S., & Yadav, H. (2012). Probiotics, their health benefits and applications for developing healthier foods: a review. *FEMS microbiology letters*, 334(1), 1-15.
- 11) Evrensel, A., & Ceylan, M. E. (2015). The gut-brain axis: the missing link in depression. *Clinical Psychopharmacology and Neuroscience*, 13(3), 239.
- 12) Shah, N. P. (2007). Functional cultures and health benefits. *International dairy journal*, 17(11), 1262-1277.
- 13) Aso, Y., & Akazan, H. (1992). Prophylactic effect of a *Lactobacillus casei* preparation on the recurrence of superficial bladder cancer. *Urologia internationalis*, 49(3), 125-129.
- 14) Cousin, F. J., Louesdon, S., Maillard, M. B., Parayre, S., Falentin, H., Deutsch, S. M., ... & Jan, G. (2012). The first dairy product exclusively fermented by *Propionibacterium freudenreichii*: A new vector to study probiotic potentialities in vivo. *Food microbiology*, 32(1), 135-146.
- 15) Rabot, S., Rafter, J., Rijkers, G. T., Watzl, B., & Antoine, J. M. (2010). Guidance for substantiating the evidence for beneficial effects of probiotics: impact of probiotics on digestive system metabolism. *The Journal of nutrition*, 140(3), 677S-689S.
- 16) Amara, A. A., & Shibl, A. (2015). Role of Probiotics in health improvement, infection control and disease treatment and management. *Saudi pharmaceutical journal*, 23(2), 107-114.
- 17) Didari, T., Mozaffari, S., Nikfar, S., & Abdollahi, M. (2015). Effectiveness of probiotics in irritable bowel syndrome: Updated systematic review with meta-analysis. *World journal of gastroenterology: WJG*, 21(10), 3072.

- 18) Ma, F., Zhou, C., Wang, J., Liu, T., & Liu, J. (2015). Probiotics in the treatment of peptic ulcer infected by helicobacter pylory and its safety. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 28.
- 19) Suvarna, V. C., & Bobby, V. U. (2005). Probiotics in human health: A current assessment. *Current science*, 88(11), 1744-1748.
- 20) Rouxinol-Dias, A. L., Pinto, A. R., Janeiro, C., Rodrigues, D., Moreira, M., Dias, J., & Pereira, P. (2016). Probiotics for the control of obesity—Its effect on weight change. *Porto Biomedical Journal*, 1(1), 12-24.
- 21) Kadooka, Y., Sato, M., Ogawa, A., Miyoshi, M., Uenishi, H., Ogawa, H., ... & Tsuchida, T. (2013). Effect of Lactobacillus gasseri SBT2055 in fermented milk on abdominal adiposity in adults in a randomised controlled trial. *British Journal of Nutrition*, 110(9), 1696-1703.
- 22) Sivamaruthi, B. S., Kesika, P., Suganthy, N., & Chaiyasut, C. (2019). A review on role of microbiome in obesity and antiobesity properties of probiotic supplements. *BioMed Research International*, 2019.
- 23) Sun, J., & Buys, N. (2015). Effects of probiotics consumption on lowering lipids and CVD risk factors: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Annals of medicine*, 47(6), 430-440.
- 24) Naydenov, K., Anastasov, A., Avramova, M., Mindov, I., Tacheva, T., Tolekova, A., & Vlaykova, T. (2012). Probiotics and diabetes mellitus. *Trakia J Sci*, 10(1), 300-306.
- 25) Gomes, A. C., Bueno, A. A., de Souza, R. G. M., & Mota, J. F. (2014). Gut microbiota, probiotics and diabetes. *Nutrition journal*, 13(1), 60.
- 26) Kasińska, M. A., & Drzewoski, J. (2015). Effectiveness of probiotics in type 2 diabetes: a meta-analysis. *Pol Arch Med Wewn*, 125(11), 803-813.
- 27) Sun, J., & Buys, N. J. (2016). Glucose-and glycaemic factor-lowering effects of probiotics on diabetes: a meta-analysis of randomised placebo-controlled trials. *British Journal of Nutrition*, 115(7), 1167-1177.
- 28) Parvez, S., Malik, K. A., Ah Kang, S., & Kim, H. Y. (2006). Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal of applied microbiology*, 100(6), 1171-1185.
- 29) Global functional foods and drins market outlook 2020-2027 health and wellness trend growth of global functional foods and drinks market. *Research and market*
- 30) Functional Food Ingredients Market by Type (Probiotics, Prebiotics, Proteins & Amino Acids, Phytochemical & Plant Extracts, Omega-3 Fatty Acids, Carotenoids, Fibers & Specialty Carbohydrates), Application, Source, and Region - Global Forecast to 2023
- 31) 6th International Conference and Exhibition on Probiotics, Functional and Baby Foods October 02-03, 2017 Park Inn by Radisson London Heathrow, London, UK
- 32) Probiotics Market Size, Share & Trends Analysis Report By Product (Food & Beverages, Dietary Supplements), By Ingredient (Bacteria, Yeast), By End Use, By Distribution Channel, And Segment Forecasts, 2019 – 2025
- 33) Probiotic Drinks Market - Growth, Trends and Forecast (2020 - 2025)
- 34) Saxelin, M. (2008). Probiotic formulations and applications, the current probiotics market, and changes in the marketplace: a European perspective. *Clinical infectious diseases*, 46(Supplement_2), S76-S79.
- 35) A Guide to Probiotics Market Trends and Opportunities *The Safe, Natural, and Stable Probiotic Ingredient for Foods and Beverages*

- 36) Martirosyan, D. M., & Singharaj, B. (2016). Health claims and functional food: The future of functional foods under FDA and EFSA regulation. *Functional Foods for Chronic Diseases; Food Science Publisher: Dallas, TX, USA*, 410-424.
- 37) Οδηγία 2000/13/EK
<https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2000L0013:20090807:EL:PDF>
- 38) Pravst, I. (2012). Functional foods in Europe: A focus on health claims. *Scientific, health and social aspects of the food industry*, 25, 2À46.
- 39) European Parliament “probiotics” and nutrition claims
- 40) Saarela, M., Mogensen, G., Fonden, R., Mättö, J., & Mattila-Sandholm, T. (2000). Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of biotechnology*, 84(3), 197-215.
- 41) Tripathi, M. K., & Giri, S. K. (2014). Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of functional foods*, 9, 225-241.
- 42) Anadón, A., Martínez-Larrañaga, M. R., Arés, I., & Martínez, M. A. (2016). Prebiotics and probiotics: An assessment of their safety and health benefits. *Probiotics, prebiotics, and synbiotics: Bioactive foods in health promotion*, 1, 3.
- 43) Kumar, B. V., Vijayendra, S. V. N., & Reddy, O. V. S. (2015). Trends in dairy and non-dairy probiotic products-a review. *Journal of food science and technology*, 52(10), 6112-6124.
- 44) Vandenas, Y., Huys, G., & Daube, G. (2015). Probiotics: an update. *Jornal de Pediatria (Versão em português)*, 91(1), 6-21.
- 45) Cook, M. T., Tzortzis, G., Charalampopoulos, D., & Khutoryanskiy, V. V. (2012). Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. *Journal of controlled release*, 162(1), 56-67.
- 46) Kumar, M., Nagpal, R., Kumar, R., Hemalatha, R., Verma, V., Kumar, A., ... & Yadav, H. (2012). Cholesterol-lowering probiotics as potential biotherapeutics for metabolic diseases. *Experimental diabetes research*, 2012
- 47) Bruno, F. A., & Shah, N. P. (2003). Viability of Two Freeze-dried Strains of Bifidobacterium and of Commercial Preparations at Various Temperatures During Prolonged Storage. *Journal of food science*, 68(7), 2336-2339.
- 48) Hubalek, Z. (2003). Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*, 46(3), 205-229.
- 49) Salar-Behzadi, S., Wu, S., Toegel, S., Hofrichter, M., Altenburger, I., Unger, F. M., ... & Viernstein, H. (2013). Impact of heat treatment and spray drying on cellular properties and culturability of Bifidobacterium bifidum BB-12. *Food Research International*, 54(1), 93-101.
- 50) Desmond, C., Stanton, C., Fitzgerald, G. F., Collins, K., & Ross, R. P. (2002). Environmental adaptation of probiotic lactobacilli towards improvement of performance during spray drying. *International Dairy Journal*, 12(2-3), 183-190
- 51) Konuray, G., & Erginkaya, Z. (2018). Potential use of Bacillus coagulans in the food industry. *Foods*, 7(6), 92.
- 52) Betoret, N., Puente, L., Diaz, M. J., Pagan, M. J., Garcia, M. J., Gras, M. L., ... & Fito, P. (2003). Development of probiotic-enriched dried fruits by vacuum impregnation. *Journal of food Engineering*, 56(2-3), 273-277

- 53) Soares, M. B., Martinez, R. C., Pereira, E. P., Balthazar, C. F., Cruz, A. G., Ranadheera, C. S., & Sant'Ana, A. S. (2019). The resistance of Bacillus, Bifidobacterium, and Lactobacillus strains with claimed probiotic properties in different food matrices exposed to simulated gastrointestinal tract conditions. *Food research international*, 125, 108542.
- 54) Gänzle, M. G., Hertel, C., van der Vossen, J. M., & Hammes, W. P. (1999). Effect of bacteriocin-producing lactobacilli on the survival of Escherichia coli and Listeria in a dynamic model of the stomach and the small intestine. *International Journal of Food Microbiology*, 48(1), 21-35.
- 55) Arihara, K., Ota, H., Itoh, M., Kondo, Y., Sameshima, T., Yamanaka, H., ... & Miki, T. (1998). Lactobacillus acidophilus group lactic acid bacteria applied to meat fermentation. *Journal of Food Science*, 63(3), 544-547.
- 56) Sameshima, T., Magome, C., Takeshita, K., Arihara, K., Itoh, M., & Kondo, Y. (1998). Effect of intestinal Lactobacillus starter cultures on the behaviour of Staphylococcus aureus in fermented sausage. *International Journal of Food Microbiology*, 41(1), 1-7.
- 57) Aspri, M., Papademas, P., & Tsaltas, D. (2020). Review on Non-Dairy Probiotics and Their Use in Non-Dairy Based Products. *Fermentation*, 6(1), 30.
- 58) American Psychiatric Association <https://www.psychiatry.org/patients-families/depression/what-is-depression>
- 59) WHO <file:///C:/Users/ioanna/Downloads/WHO-MSD-MER-2017.2-eng.pdf>
- 60) <https://ourworldindata.org/mental-health#depression>
- 61) Yong, S. J., Tong, T., Chew, J., & Lim, W. L. (2020). Antidepressive Mechanisms of Probiotics and Their Therapeutic Potential. *Frontiers in Neuroscience*, 13, 1361.
- 62) Pirbaglou, M., Katz, J., de Souza, R. J., Stearns, J. C., Motamed, M., & Ritvo, P. (2016). Probiotic supplementation can positively affect anxiety and depressive symptoms: a systematic review of randomized controlled trials. *Nutrition research*, 36(9), 889-898.
- 63) Tillisch, K., Labus, J., Kilpatrick, L., Jiang, Z., Stains, J., Ebrat, B., ... & Mayer, E. A. (2013). Consumption of fermented milk product with probiotic modulates brain activity. *Gastroenterology*, 144(7), 1394-1401.
- 64) Berk, M., Williams, L. J., Jacka, F. N., O'Neil, A., Pasco, J. A., Moylan, S., ... & Maes, M. (2013). So depression is an inflammatory disease, but where does the inflammation come from?. *BMC medicine*, 11(1), 1-16.
- 65) Fond, G., Boukouaci, W., Chevalier, G., Regnault, A., Eberl, G., Hamdani, N., ... & Oliveira, J. (2015). The "psychomicrobiotic": Targeting microbiota in major psychiatric disorders: A systematic review. *Pathologie Biologie*, 63(1), 35-42.
- 66) Ansari, F., Pourjafar, H., Tabrizi, A., & Homayouni, A. (2020). The effects of probiotics and prebiotics on mental disorders: a review on depression, anxiety, Alzheimer, and autism spectrum disorders. *Current Pharmaceutical Biotechnology*.
- 67) Barbosa, R. S., & Vieira-Coelho, M. A. (2020). Probiotics and prebiotics: focus on psychiatric disorders—a systematic review. *Nutrition Reviews*, 78(6), 437-450.
- 68) Huang, R., Wang, K., & Hu, J. (2016). Effect of probiotics on depression: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutrients*, 8(8), 483.
- 69) Talbott, S. M., Talbott, J. A., Stephens, B. J., & Oddou, M. P. (2019). Effect of coordinated probiotic/prebiotic/phytobiotic supplementation on microbiome balance and psychological mood state in healthy stressed adults. *Functional Foods in Health and Disease*, 9(4), 265-275.

- 70) Liu, R. T., Walsh, R. F., & Sheehan, A. E. (2019). Prebiotics and probiotics for depression and anxiety: a systematic review and meta-analysis of controlled clinical trials. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 102, 13-23.
- 71) Wallace, C. J., & Milev, R. (2017). The effects of probiotics on depressive symptoms in humans: a systematic review. *Annals of general psychiatry*, 16(1), 14.
- 72) Akkasheh, G., Kashani-Poor, Z., Tajabadi-Ebrahimi, M., Jafari, P., Akbari, H., Taghizadeh, M., ... & Esmailzadeh, A. (2016). Clinical and metabolic response to probiotic administration in patients with major depressive disorder: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Nutrition*, 32(3), 315-320.
- 73) Nobakhti, A. R., Ehsani, M. R., Mousavi, S. M. & Mortazavian, A. M., 2009. Influence of lactulose and Hi-maize addition on viability of probiotic microorganisms in freshly made synbiotic fermented milk drink, s.l.: s.n.
- 74) C.E. Rycroft, M.R. Jones, G.R Gibson, R.A. R, 2001. A comparative in vitro evaluation of the fermentation. *Journal of Applied Microbiology* , December, pp. 878 - 887.
- 75) Donkor, O. N., Henriksson, A., Vasiljevic, T., & Shah, N. P. (2006). Effect of acidification on the activity of probiotics in yoghurt during cold storage. *International Dairy Journal*, 16(10), 1181-1189.
- 76) Possemiers, S., Marzorati, M., Verstraete, W., & Van de Wiele, T. (2010). Bacteria and chocolate: a successful combination for probiotic delivery. *International journal of food microbiology*, 141(1-2), 97-103.
- 77) Ricci, G., Borgo, F. C., Ferrario, C., & Fortina, M. G. (2011). Cocoa powder as delivery medium for probiotic Lactobacillus strains.
- 78) Mirković, M., Seratlić, S., Kilcawley, K., Mannion, D., Mirković, N., & Radulović, Z. (2018). The sensory quality and volatile profile of dark chocolate enriched with encapsulated probiotic Lactobacillus plantarum bacteria. *Sensors*, 18(8), 2570.
- 79) Zarić, D. B., Bulatović, M. L., Rakin, M. B., Krunić, T. Ž., Lončarević, I. S., & Pajin, B. S. (2016). Functional, rheological and sensory properties of probiotic milk chocolate produced in a ball mill. *RSC advances*, 6(17), 13934-13941.
- 80) Kobus-Cisowska, J., Szymanowska, D., Maciejewska, P., Szczepaniak, O., Kmiecik, D., Gramza-Michałowska, A., ... & Cielecka-Piontek, J. (2019). Enriching novel dark chocolate with Bacillus coagulans as a way to provide beneficial nutrients. *Food & function*, 10(2), 997-1006.
- 81) Irkin, Reyhan; Guldaz, Metin (2011). Evaluation of cacao-pudding as a probiotic food carrier and sensory acceptability properties. *Acta agriculturae Slovenica*, 97(3)
- 82) Eman F. Abdel-Latif & M. F. Saad, 2016. Effect of Bifidobacterium lactis on Quality of Rice Pudding. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 17 July, pp. 362-371.
- 83) Bruno, F. A., & Shah, N. P. (2003). Viability of Two Freeze-dried Strains of Bifidobacterium and of Commercial Preparations at Various Temperatures During Prolonged Storage. *Journal of food science*, 68(7), 2336-2339.