ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ IV: ΣΥΝΘΕΣΗ & ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΣ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΚΑΙ ΧΡΗΣΗ ΕΓΚΛΕΙΣΜΕΝΩΝ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΓΙΑΟΥΡΤΙΟΥ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΠΕΤΡΟΠΟΥΛΟΥ ΗΛΙΟΥ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΤΖΙΑ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ

ΑΘΗΝΑ 2016

Ευχαριστίες

Για την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας θα ήθελα, πρωτίστως, να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια της σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσοβίου Πολυτεχνείου, κυρία Τζιά Κωνσταντίνα. Η καθοδήγησή της κατά το στήσιμο του πειράματος, οι συμβουλές της κατά την διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων και οι εύστοχες παρατηρήσεις της κατά την μελέτη και διόρθωση της συγκεκριμένης εργασίας, αποτέλεσαν καταλυτικούς παράγοντες, τόσο για την ολοκλήρωση της διπλωματικής εργασίας, όσο και για την απόκτηση επιπλέον γνώσεων και κατάρτισης. Θα ήταν όμως παράληψη να μην ευχαριστούσα τον υποψήφιο διδάκτορα Σφακιανάκη Παναγιώτη για την αμέριστη βοήθειά του και την μεταλαμπάδευση των γνώσεων και της εμπειρίας του σε θέματα που αφορούσαν στην διεξαγωγή των πειραμάτων, αλλά και εν συνεχεία στην επεξεργασία των μετρήσεων. Επίσης, πολύτιμη ήταν η βοήθεια της Γιάννου Βιργινίας η οποία ήταν παρούσα σε κάθε δύσκολη στιγμή και παρείχε της γνώσεις της και την βοήθειά της για την επίλυση των προκύπτοντων θεμάτων και για τον λόγο αυτό την ευχαριστώ ιδιαιτέρως. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσοι εργάζονται στο εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων καθώς, ο καθένας τους ξεχωριστά, μου προσέφερε τις γνώσεις και τις βοήθειά του στο θέμα στο οποίο ειδικευόταν και ιδιαιτέρως την Τσεβδού Μαρία. Την ευγνωμοσύνη μου θα ήθελα να αναφέρω και στην ΦΑΓΕ Α.Ε. για την δωρεάν παροχή του γάλακτος και της προβιοτικής καλλιέργειας εκκίνησης και ιδιαιτέρως θα ήθελα να ευχαριστήσω την κυρία Κουρέλη Ρούλα με την οποία συνεργάστηκα άριστα τόσο κατά την πρακτική μου άσκηση στο εργοστάσιο της εταιρείας, όσο και έπειτα κατά την διεξαγωγή της παρούσας εργασίας.

Δράττομαι της ευκαιρίας που μου δίδεται μέσω αυτής της διπλωματικής και εκφράζω τις θερμές ευχαριστίες μου στην οικογένειά μου, η οποία με στήριξε και με στηρίζει όλα τα χρόνια της ζωής μου. Χάρη σ ’αυτούς κατάφερα να πραγματοποιήσω όλα τα όνειρα και τις επιθυμίες μου και φυσικά να σπουδάσω. Σημαντική, βεβαίως ήταν και η βοήθεια όλων των φίλων και των δικών μου ανθρώπων, οι οποίοι σε κάθε δύσκολη στιγμή στέκονταν δίπλα μου και μου έδιναν δύναμη και έτσι νιώθω την ανάγκη να τους πω ένα μεγάλο ευχαριστώ.

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες 1

1. Περίληψη 7

Abstract 10

3.1 Γάλα 15

3.1.1 Σύσταση του γάλακτος 16

3.1.2 Δομή και δομικά στοιχεία του γάλακτος 20

3.1.3 Φυσικές Ιδιότητες Γάλακτος 21

3.1.4 Διατροφική Αξία του Γάλακτος 24

3.1.5 Ζυμωμένα προϊόντα γάλακτος 24

3.2 Γιαούρτι 26

3.2.1 Σχηματισμός πήγματος του γιαουρτιού 27

3.2.2 Είδη γιαουρτιού 28

3.2.3 Παραγωγή Γιαουρτιού 28

3.2.4 Σύσταση του Γιαουρτιού 30

3.2.5 Δομή και Φυσικές ιδιότητες γιαουρτιού 31

3.2.6 Διατροφική αξία γιαουρτιού 32

3.2.7 Συμβατική καλλιέργεια εκκίνησης και βακτήρια του γιαουρτιού 33

3.2.8 Καλλιέργειες εκκίνησης με προβιοτικά και συμβατικά βακτήρια 37

4.1 Γαλακτικά βακτήρια 38

4.1.1 Κατάταξη των γαλακτικών βακτηρίων 38

4.1.2 Μεταβολισμός 38

4.1.3 Τα κύρια γένη γαλακτικών βακτηρίων 41

4.2 Προβιοτικά βακτήρια 42

4.2.1 Προβιοτικά βακτήρια, προέλευση και κυριότερα είδη 43

4.2.2 Το γένος *Bifidobacterium* 46

4.2.3 Ασφάλεια προβιοτικών 49

4.2.4 Δράσεις στην υγεία και λειτουργικές ικανότητες προβιοτικών 50

4.2.5 Χρήση των προβιοτικών σε καλλιέργειες εκκίνησης 53

4.2.6 Τα προβιοτικά τρόφιμα 54

3.2.7 Προβιοτικό γιαούρτι 56

4.2.8 Βιωσιμότητα προβιοτικών μικροοργανισμών 56

4.2.9 Τεχνικές ενίσχυσης της βιωσιμότητας των προβιοτικών 58

5.1 Η τεχνολογία του εγκλεισμού 60

5.2 Τεχνικές εγκλεισμού 62
Ξήρανση με ψεκασμό (spray drying) 62
Γαλακτοματωποίηση (emulsification) 62
Ψεκασμός με ψύξη (spray-chilling ή spray-cooling) 62
Ατομοποίηση 62
Επικάλυψη ρευστοποιημένης κλίνης (fluid bed coating) 63
Η τεχνική electrospinning 63
5.3 Η τεχνική της ξήρανσης με κατάψυξη (freeze drying) 63
5.4 Η τεχνική της εξώθησης 64
5.5 Μέσα εγκλεισμού 66
5.5.1 Αλγινικό νάτριο 66
5.5.2 κ-καραγενάνη 67
5.5.3 Χιτοζάνη 67
5.5.4 Μαλτοδεξτρίνη 67
5.5.5 Πηκτίνη 68
5.5.6 Άμυλο 68
5.5.7 Ξανθάνη και Τζελάνη 68
5.5.8 Καζεΐνη 69
5.6 Εφαρμογή του εγκλεισμού στα προβιοτικά βακτήρια και παραγωγή προβιοτικού γιαουρτιού 69
6.1 Σκοπός των πειραμάτων 72
6.2 Υλικά και μέθοδοι 72
6.2.1 Πρώτες ύλες 72
6.2.2 Εργαστηριακά όργανα και συσκευές 73
6.3 Πειραματική διαδικασία 75
6.3.1 Εγκλεισμός προβιοτικών βακτηρίων με την τεχνική της ξήρανσης με κατάψυξη (freeze drying) 75
6.3.2 Εγκλεισμός προβιοτικών βακτηρίων με την τεχνική της εξώθησης (extrusion) 77
6.3.3 Παραγωγή γιαουρτιού 79
6.5 Μετρήσεις 83
6.5.1 Μετρήσεις στις τεχνικές ξήρανσης με κατάψυξη 83
6.5.2 Μετρήσεις στις τεχνικές εγκλεισμού με εξώθηση 83
6.5.3 Μετρήσεις κατά την ζύμωση του γάλακτος και στο γιαούρτι 83
6.6 Στατιστική επεξεργασία 86

7. Αποτελέσματα και συζήτηση αποτελεσμάτων 87
7.1 Πρώτη σειρά πειραμάτων (προκαταρκτικά) 88
7.1.1 Αποτελέσματα μετρήσεων πρώτης σειράς πειραμάτων (τεχνική εγκλεισμού ξήρανση με κατάψυξη και θερμοκρασία ζύμωσης 40°C) 88
7.1.2 Σύγκριση αποτελεσμάτων 1^{ης} σειράς πειραμάτων (προκαταρκτικών) 94
7.2 Δεύτερη σειρά πειραμάτων 102
7.2.1 Αποτελέσματα μετρήσεων δεύτερης σειράς πειραμάτων (τεχνική εγκλεισμού ξήρανση με κατάψυξη και θερμοκρασία ζύμωσης 45°C) 102
7.2.2 Σύγκριση αποτελεσμάτων 2^{ης} σειράς πειραμάτων 118
7.3 Τρίτη σειρά πειραμάτων 128
7.3.1 Αποτελέσματα μετρήσεων τρίτης σειράς πειραμάτων (τεχνική εγκλεισμού με εξώθηση και θερμοκρασία ζύμωσης 45°C) 128
7.3.1.1 Ζύμωση με μη εγκλεισμένη καλλιέργεια (Direct ή τυφλό δείγμα) 128
7.3.2 Σύγκριση αποτελεσμάτων 3^{ης} σειράς πειραμάτων 136
7.4 Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) 143
8. Συμπεράσματα και προτάσεις 146
8.1 Συμπεράσματα 146
8.2 Προτάσεις 150
Βιβλιογραφία 151
Παράρτημα Ι. Πίνακες μεταβολής του pH συναρτήσει του χρόνου ζύμωσης των γιαουρτιών 158
Ι.1 Πίνακες 1^{ης} σειράς πειραμάτων 158
Ι.1.1 Ζύμωση με μη εγκλεισμένη καλλιέργεια 158
Ι.1.2 Μαλτοδεξτρίνη 159
Ι.1.3 κ-καραγενάνη 160
Ι.1.4 Ινουλίνη 161
Ι.1.5 Κυκλοδεξτρίνη 162
Ι.2 Πίνακες 2^{ης} σειράς πειραμάτων 163
Ι.2.1 Ζύμωση με μη εγκλεισμένη καλλιέργεια 163
Ι.2.2 Χιτοζάνη 164
Ι.2.3 Μαλτοδεξτρίνη 166
Ι.2.4 κ-καραγενάνη 169
Ι.2.5 Ινουλίνη 170
Ι.2.6 Κυκλοδεξτρίνη 172
Ι.2.7 Αλγινικό νάτριο 175

I.2.8 Μείγμα πηκτίνης/καζεΐνης 177
I.2.9 Μείγμα αλγινικού νατρίου/ξανθάνης 180
I.2.10 Μείγμα ινουλίνης/κυκλοδεξτρίνης 183
I.2.11 Άμυλο 186
I.3 Πίνακες 3ης σειράς πειραμάτων 189
I.3.1 1ο μείγμα εγκλεισμού 189
I.3.2 2ο μείγμα εγκλεισμού 191
I.3.3 3ο μείγμα εγκλεισμού 193
I.3.4 4ο μείγμα εγκλεισμού 195
Παράρτημα ΙΙ. Πίνακες στατιστικής επεξεργασίας 197
ΙΙ.1 Αποτελέσματα 2η σειράς πειραμάτων 197
ΙΙ.1.1 Χρονική διάρκεια 197
ΙΙ.1.2 Ιξώδες παραγωγής 198
ΙΙ.1.3 Ιξώδες επόμενης ημέρας 198
ΙΙ.1.4 Προσκολλησιμότητα 198
ΙΙ.1.5 Συνεκτικότητα 199
ΙΙ.1.6 Σκληρότητα 199
ΙΙ.1.7 Κομμιώδες 199
ΙΙ.1.8 Μικροβιακό φορτίο 200
ΙΙ.1.9 Μέγιστος ρυθμός μείωσης μ 200
ΙΙ.1.10 Διάρκεια λανθάνουσας φάσης (λ) 200
ΙΙ.2 Αποτελέσματα 3ης σειράς πειραμάτων 201
ΙΙ.2.1 Χρονική διάρκεια 201
ΙΙ.2.2 Ιξώδες παραγωγής 201
ΙΙ.2.3 Ιξώδες επόμενης ημέρας 201
ΙΙ.2.4 Προσκολλησιμότητα 202
ΙΙ.2.5 Συνεκτικότητα 202
ΙΙ.2.6 Σκληρότητα 202
ΙΙ.2.7 Κομμιώδες 202
ΙΙ.2.8 Μικροβιολογικό φορτίο 202
ΙΙ.2.9 Μέγιστος ρυθμός μείωσης 203
ΙΙ.2.10 Διάρκεια λανθάνουσας φάσης 203

1. Περίληψη

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσοβίου Πολυτεχνείου. Τα πειράματα εκτελέστηκαν κατά την διάρκεια του εαρινού εξαμήνου του ακαδημαϊκού έτους 2015-2016. Σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας ήταν, αρχικά, ο εγκλεισμός προβιοτικών βακτηρίων προβιοτικής καλλιέργειας που περιελάμβανε το στέλεχος *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis* και εν συνεχεία η χρήση τους στην παραγωγή γιαουρτιού. Τα προβιοτικά βακτήρια αποτελούν συμπληρώματα διατροφής που ωφελούν την υγεία των καταναλωτών, με την προϋπόθεση ότι παραμένουν ζωντανά σε ικανοποιητικούς αριθμούς, τόσο κατά την αποθήκευση του τροφίμου, όσο και κατά την διέλευσή τους μέσω της γαστρεντερικής οδού. Ο εγκλεισμός αποτελεί μία μέθοδο προστασίας των ευαίσθητων αυτών βακτηρίων που εξασφαλίζει την βιωσιμότητα και την σταθερότητά τους. Ο εγκλεισμός, στην παρούσα εργασία, πραγματοποιήθηκε με δύο μεθόδους, την τεχνική της ξήρανσης με κατάψυξη και την τεχνική της εξώθησης, ενώ χρησιμοποιήθηκαν διάφορα εγκλειστικά μέσα. Μετά το πέρας των πειραμάτων εγκλεισμού, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ζύμωσης γάλακτος με την χρήση των προκυπτόντων εγκλεισμένων προβιοτικών βακτηρίων, θεωρώντας ότι όλα τα προβιοτικά βακτήρια που υπήρχαν στην καλλιέργεια είχαν εγκλειστεί και είχαν επιβιώσει. Συνολικά σχεδιάστηκαν και εκτελέστηκαν 3 σειρές πειραμάτων.

Τα πειράματα της 1^{ης} σειράς ήταν προκαταρκτικά και περιελάμβαναν τον εμβολιασμό δειγμάτων γάλακτος με εγκλεισμένη, με διάφορα εγκλειστικά μέσα, προβιοτική καλλιέργεια, ο εγκλεισμός της οποίας είχε πραγματοποιηθεί με την τεχνική της ξήρανσης με κατάψυξη. Τα δείγματα εμβολιάζονταν με 10^{11}μικρ/L, ενώ η θερμοκρασία ζύμωσης ήταν 40°C. Στην 2^{η} σειρά πειραμάτων, τα δείγματα εμβολιάζονταν με εγκλεισμένη, με διάφορα εγκλειστικά μέσα, προβιοτική καλλιέργεια (10^{11}μικρ/L), ο εγκλεισμός της οποίας είχε πραγματοποιηθεί με την τεχνική της ξήρανσης με κατάψυξη, όπως και προηγουμένως. Επιπροσθέτως, όμως, παρασκευάστηκαν και δείγματα τα οποία είχαν εμβολιαστεί με μείγμα εγκλεισμένης, με το εκάστοτε εγκλειστικό μέσον και μη εγκλεισμένης προβιοτικής καλλιέργειας σε αναλογία 4:1. Η αναλογία αυτή αφορούσε στους μικροοργανισμούς και όχι στην μάζα της εγκλεισμένης ή μη καλλιέργειας, γνωρίζοντας ότι η αρχική προβιοτική καλλιέργεια περιέχει 5x10^{10}μικροοργανισμούς/g και θεωρώντας ότι όλοι οι μικροοργανισμοί επεβίωναν και ήταν εγκλεισμένοι πλήρως μετά από κάθε διαδικασία εγκλεισμού. Επιπλέον, παρασκευάστηκαν δείγματα τα οποία εμβολιάστηκαν με μη εγκλεισμένη προβιοτική καλλιέργεια (10^{11}μικρ/L) και στα οποία απλά προστέθηκε ισοδύναμη ποσότητα του εκάστοτε μέσου εγκλεισμού. Η θερμοκρασία ζύμωσης σε αυτήν την σειρά ήταν 45°C. Στην 3^{η} σειρά πειραμάτων, πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός δειγμάτων με εγκλεισμένη, με διάφορα εγκλειστικά μέσα, προβιοτική καλλιέργεια (10^{11}μικρ/L), ο εγκλεισμός της οποίας είχε πραγματοποιηθεί με την τεχνική της εξώθησης. Επίσης, παρασκευάστηκαν και δείγματα τα οποία είχαν εμβολιαστεί με μείγμα εγκλεισμένης, με το εκάστοτε εγκλειστικό μέσον και μη εγκλεισμένης προβιοτικής καλλιέργειας σε αναλογία 4:1, όπως και στην 2^{η} σειρά. Και σε αυτήν την σειρά, η θερμοκρασία ζύμωσης ήταν 45°C. Τέλος, γάλα εμβολιάστηκε και με μη εγκλεισμένη προβιοτική καλλιέργεια και το δείγμα αυτό θεωρήθηκε ως τυφλό. Σε όλα τα πειράματα παραγωγής του γιαουρτιού έγινε παρακολούθηση της εξέλιξης της ζύμωσης μέσω

μεταβολής του pH και εκτιμήθηκε ο χρόνος ζύμωσης (μέχρι τελική τιμή pH-4,5). Επίσης σε όλα τα παραπάνω δείγματα, μετά το πέρας των ζυμώσεων, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις των φυσικοχημικών και μικροβιολογικών χαρακτηριστικών των γιαουρτιών.

Σύμφωνα με τις μετρήσεις που διεξήχθησαν και την μετέπειτα στατιστική τους επεξεργασία με το πρόγραμμα STATISTICA 12.0 (StatSoft, Inc.) προέκυψαν αρκετά συμπεράσματα. Αρχικά βρέθηκε ότι η διάρκεια ζύμωσης των δειγμάτων που είχαν εμβολιαστεί με εγκλεισμένη καλλιέργεια αυξανόταν σε κάθε περίπτωση σε σύγκριση με το τυφλό.

Στα πειράματα κατά στα οποία η ζύμωση γινόταν με εγκλεισμένη καλλιέργεια προερχόμενη από την διαδικασία ξήρανσης με κατάψυξη ($2^{η}$ σειρά πειραμάτων), μεγαλύτερη διάρκεια παρουσίασαν τα δείγματα που είχαν εμβολιαστεί με εγκλεισμένη, με άμυλο, καλλιέργεια και με εγκλεισμένη, με μείγμα αλγινικού νατρίου/ξανθάνης καλλιέργεια, με συνολική διάρκεια ζύμωσης 375 και 300min αντιστοίχως. Για λόγους σύγκρισης σημειώνεται ότι η διάρκεια ζύμωσης του τυφλού δείγματος ήταν 130min. Σε αυτά τα πειράματα, ακόμη, η προσαρμογή της καμπύλης μείωσης του pH συναρτήσει του χρόνου στο μαθηματικό μοντέλο που περιγράφει την πτώση του pH συναρτήσει του χρόνου για τις συμβατικές καλλιέργειες δεν ήταν ικανοποιητική, στις περισσότερες περιπτώσεις. Αξίζει να σημειωθεί ότι το ίδιο ίσχυε και για την περίπτωση του τυφλού δείγματος. Όπου μπορούσε να γίνει προσαρμογή υπολογίζονταν ο μέγιστος ρυθμός μείωσης του pH (μ) καθώς και η διάρκεια λανθάνουσας φάσης της ζύμωσης (λ). Επίσης, σε ότι αφοράς στο ιξώδες των έτοιμων προϊόντων της σειράς αυτής, προέκυψε ότι το ιξώδες που μετρήθηκε αμέσως μετά την λήξη της ζύμωσης ήταν μικρότερο στα περισσότερα δείγματα, από το αντίστοιχο του τυφλού, το οποίο έχει τιμή ίση με 4780cPs με εξαίρεση ορισμένα δείγματα. Σχετικά με το ιξώδες που μετρήθηκε έπειτα από μία ημέρα αποθήκευσης του γιαουρτιού στους 4°C, βρέθηκε ότι ήταν μικρότερο από το αντίστοιχο του τυφλού, για όλα τα δείγματα της $2^{ης}$ σειράς πειραμάτων, εκτός από εκείνα που είχαν εμβολιαστεί με μη εγκλεισμένη καλλιέργεια και στα οποία είχε προστεθεί ισοδύναμη ποσότητα εγκλειστικού μέσου. Αντίθετα, η συνεκτικότητα, ένα χαρακτηριστικό υφής εξέχουσας εμπορικής σημασίας για το γιαούρτι, αποτελεί μία μεταβλητή που αυξάνεται με την χρήση εγκλεισμένης καλλιέργειας. Επίσης, από τις μικροβιολογικές αναλύσεις βρέθηκε ότι τα περισσότερα δείγματα είχαν μικρότερο αριθμό προβιοτικών που είχαν επιβιώσει, σε σύγκριση με το τυφλό δείγμα που είχε 4,8 10^{5}cfu/g. Το γιαούρτι που προερχόταν από ζύμωση με εγκλεισμένη προβιοτική καλλιέργεια, με κυκλοδεξτρίνη, είχε 9 10^{5}cfu/g, τον υψηλότερο αριθμό από τα δείγματα που προέρχονταν από ζύμωση με εγκλεισμένη καλλιέργεια. Τέλος, η χιτοζάνη ήταν ένα εγκλειστικό μέσον το οποίο δεν οδήγησε σε ζύμωση του γάλακτος προς παραγωγή γιαουρτιού.

Στα πειράματα στα οποία η ζύμωση γινόταν με εγκλεισμένη καλλιέργεια, προερχόμενη από την τεχνική της εξώθησης ($3^{η}$ σειρά πειραμάτων), παρατηρήθηκαν γενικά πιο μεγάλοι χρόνοι ζύμωσης, ενώ τον μεγαλύτερο χρόνο παρουσίασε το εμβολιασμένο με εγκλεισμένη, με το 3° μείγμα της μεθόδου εξώθησης, προβιοτική καλλιέργεια, που ήταν 485min. Σε αυτά τα πειράματα η προσαρμογή των καμπυλών μείωσης του pH συναρτήσει του χρόνου ήταν καλή σε όλες τις περιπτώσεις ζυμώσεων με εγκλεισμένη καλλιέργεια. Τα δείγματα της $3^{ης}$ σειράς παρουσίαζαν όλα μικρότερο ιξώδες από αυτό του τυφλού δείγματος. Επιπροσθέτως, η στατιστική επεξεργασία έδειξε ότι κανένας παράγοντας δεν επηρέαζε την συνεκτικότητα

των δειγμάτων, ωστόσο όμως, η τιμή της σε όλα τα δείγματα ήταν ελαφρώς μεγαλύτερη από την αντίστοιχη του τυφλού δείγματος. Σε ότι αφορά στο μικροβιακό φορτίο, οι μετρήσεις σε αυτήν την σειρά δεν έδωσαν ικανοποιητικά αποτελέσματα, καθώς στην πλειονότητα των περιπτώσεων το φορτίο ήταν μικρό, με εξαίρεση την περίπτωση του προϊόντος που είχε εμβολιαστεί με εγκλεισμένη, με μείγμα αλγινικού νατρίου/ξανθάνης/μαλτοδεξτρίνης/φρουκτόζης/MRS broth/γλυκερόλη, καλλιέργεια, το οποίο βρέθηκε ότι είχε 2 10^7cfu/g, δηλαδή μεγαλύτερο αριθμό ζώντων προβιοτικών μικροοργανισμών από τον ελάχιστο συνιστώμενο (10^7cfu/g). Επίσης, στις περιπτώσεις, του δείγματος που προερχόταν από ζύμωση εγκλεισμένης καλλιέργειας με μείγμα εγκλεισμένης, με το 1° μείγμα εγκλεισμού, καλλιέργειας και μη εγκλεισμένης, όπως επίσης και αυτό που προερχόταν από ζύμωση με μείγμα εγκλεισμένης, με το 2° μείγμα, καλλιέργειας και μη εγκλεισμένης, ο αριθμός των ζώντων προβιοτικών ήταν άνω του 10^6cfu/g, αριθμός αποδεκτός για την περίπτωση των βακτηρίων του γένους *Bifidobacterium.*

Γενικά, με βάση τα αποτελέσματα των μετρήσεων και την επεξεργασία αυτών, που πραγματοποιήθηκε στην παρούσα εργασία, εξάγεται το συμπέρασμα ότι η τεχνική της ξήρανσης με κατάψυξη μπορεί να θεωρηθεί μία αρκετά καλή μέθοδος εγκλεισμού καθώς δίνει γενικά μικρούς χρόνους ζύμωσης, κάτι το οποίο έχει μεγάλο ενδιαφέρον σε βιομηχανική κλίμακα, ενώ με την χρήση κατάλληλων μέσων εγκλεισμού, όπως της κυκλοδεξτρίνης, οι εγκλεισμένες καλλιέργειες με αυτήν την μέθοδο μπορούν να προσδώσουν στο γιαούρτι τα επιθυμητά χαρακτηριστικά και επιπροσθέτως υψηλό αριθμό ζώντων προβιοτικών στο τελικό προϊόν. Από την άλλη, η τεχνική της εξώθησης μπορεί επίσης να δώσει τα επιθυμητά χαρακτηριστικά στο προϊόν και να εξασφαλίσει την υψηλή επιβίωση των προβιοτικών στο γιαούρτι, με την χρήση, πάντα, κατάλληλων μέσων εγκλεισμού, αλλά η εφαρμογή της σε βιομηχανική κλίμακα προϋποθέτει κάποια μείωση των χρόνων ζύμωσης.

Abstract

The present thesis has been conducted in the laboratory of Food Chemistry and Technology of the National Technical University of Athens. The experiments were performed during the spring semester of the academic year 2015-2016. The initial purpose of this study was the encapsulation of probiotic bacteria that have been taken from a lyophilized probiotic starter culture containing the strain *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis.* Then, these encapsulated probiotic bacteria, were used in the production of yoghurt. Probiotic bacteria are nutritional supplements that benefit the health of the consumer, provided that they remain alive in sufficient numbers, both during the storage of the food, and during their passage through the gastrointestinal tract. Encapsulation is a method of protection of these sensitive bacteria that ensures their viability and stability. At this study, encapsulation was performed with two methods: freeze-drying and extrusion. Many encapsulation agents had been used. After the completion of the encapsulation experiments, fermentation of milk was performed using the probiotic bacteria that had been encapsulated, assuming that all probiotic bacteria that were in lyophilized culture were encapsulated and had survived. Three set of experiments were planted and performed.

The first set included pilot experiments. Milk samples were injected with encapsulated probiotic culture in different encapsulated agents. In this set encapsulation of the culture had been made by the technique of freeze-drying. Samples were injected with 10^{11}microorganisms/L while the fermentation temperature was 40°C. In the second set of experiments, samples were injected with encapsulated probiotic culture. Many encapsulation agents were used. Samples were injected with 10^{11}microorganisms/L and encapsulation of the culture had been made by the technique of freeze-drying, as before. However, additional samples were prepared. These additional samples were injected with mixture of encapsulated and non encapsulated culture at a ratio 4:1. This ratio was related to the microorganisms and not to the mass of encapsulated or non encapsulated culture knowing that the original probiotic culture contains $5x10^{10}$ microorganisms / g and assuming that all microorganisms survived and were completely confined after each encapsulation process. Additionally samples were prepared. These samples were injected with non encapsulated culture and an amount of encapsulating agent was also added. Samples were prepared for each encapsulating agent. The fermentation temperature at this set was 45°C. In the third set of experiments, samples were injected with encapsulated probiotic culture and many encapsulation agents were used too. In this set the encapsulation of culture had been made by the technique of extrusion. Samples were also injected with a mixture of encapsulated and non encapsulated culture at a ratio 4:1 as in the second set. The fermentation temperature was again 45^{0}C. Finally, milk was injected with non-encapsulated probiotic culture and this sample was considered as a blank. In all the above samples, the physicochemical and microbiological characteristics of yogurt were measured after the fermentation completion.

Several findings were raised after the statistical analysis of the measurements. The statistical analysis was made by STATISTICA 12.0 program (StatSoft, Inc). Initially, it was found that fermentation time was increased in all samples that were inoculated with encapsulated cultures compared with the blank.

In experiments in which fermentation was done with encapsulated culture derived from the freeze-drying process (2nd series of experiments), longer fermentation time showed the samples were inoculated with encapsulated culture with starch and encapsulated culture with a mixture of sodium / xanthan alginate and the total duration of fermentation 375 and 300min respectively. For comparison it is noted that during fermentation of the blank was 130min.in Most of these experiments, the adjustment of the curve of pH reduction over time in the mathematical model describing the fall of pH over time for conventional practices were not satisfactory. The maximum adjustment of pH reduction rate and the duration of latent phase of fermentation were calculated in cases of good adjustment of the curve. Also, the viscosity was measured immediately after the end of fermentation was lower in most samples, the equivalent of the blind, which has a value equal to 4780cPs except for some samples. Regarding the viscosity was measured after a yogurt day of storage at 4oC, it was found to be smaller than that of the blank, all the samples of the second series of experiments, except those vaccinated with unencapsulated culture and which had been added equivalent amount of encapsulating agent. Conversely, the consistency, a characteristic texture of outstanding commercial importance for yogurt, is a variable which is increased by the use of encapsulated culture. Also, from the microbiological analyzes found that most samples had a lower number of probiotic which had survived, compared to the blank sample (4,8 10^5cfu / g). Yogurt fermented with encapsulated probiotic culture with cyclodextrin had the highest number of samples derived from fermentation enclosed cultivation (9 10^5cfu / g). Finally, it was found that chitosan was an encapsulating agent which has not resulted in fermentation of milk to produce yogurt.

In experiments in which the fermentation is done with encapsulated culture derived from the technique of extrusion (the third series of experiments), they were generally observed longest fermentation time than the first set. The sample was inoculated with encapsulated culture with the third mixture of the extrusion process, had the longest fermentation time (485min). In these experiments, the adjustment of the pH reduction as a function of time was good in all cases fermentations with encapsulated culture. Samples of 3 series presented lower viscosity than that of the blank sample. In addition, the statistical analysis showed that no factor did not affect the consistency of the samples, but nevertheless, the value of all samples was slightly higher than that of the blank. . With respect to the microbial load, the measurements in this range did not give satisfactory results, as in the majority of cases, the load was small, except in the case of the product that had been inoculated with encapsulated culture with a mixture of sodium alginate / xanthan / maltodextrin / fructose / MRS broth / glycerol, which was found to have 2 10^7cfu / g. It is noted that the lower limit of live probiotic yogurt is 10^7cfu/g. Also, in cases of the sample came from fermentation with encapsulated culture, with the 1^{est} encapsulating mixture, and non-encapsulated encapsulated culture, as well as those from fermentation with encapsulated culture, with the 2nd encapsulating mixture, and non-encapsulated encapsulated culture, the number of living probiotic was more than 10^6cfu / g, number of recipients in the case of bacteria of the genus *Bifidobacterium*.

Generally, based on the results of measurements and their processing, carried out in this work it is concluded that the technique of freeze-drying can be considered a fairly good encapsulation method as generally gives short fermentation times, something which is of

great interest to industrial scale, while the use of appropriate encapsulating agents such as cyclodextrin, the encapsulated cultures by this method can impart the desired characteristics of yogurt, and additionally a high number of live probiotics in the final product. On the other hand, the technique of extrusion may also give the desired characteristics to the product and to ensure a high survival of probiotic yoghurt, using always suitable encapsulating agents, but its implementation on an industrial scale requires a reduction in fermentation times.

2. Εισαγωγή

Το γάλα και τα γαλακτοκομικά, αποτελούν προϊόντα, σημαντικά για τον άνθρωπο ήδη από το 4000 π.Χ., όπως αποδεικνύεται από παραστάσεις σε βράχους που βρέθηκαν στην Σαχάρα. Τα γαλακτοκομικά φαίνεται πως συνδέονται άρρηκτα από τότε με την ανθρώπινη ιστορία. Υπολείμματα γαλακτοκομικών προϊόντων έχουν βρεθεί σε τάφους της Αιγύπτου, αναφορές υπάρχουν στην Αγία Γραφή, μεγάλη ήταν η αξία τους κατά τον μεσαίωνα στην Ευρώπη, ενώ πολλές παρομοιώσεις και μεταφορές στο καθημερινό λεξιλόγιο των ανθρώπων σχετίζονται με το γάλα και τα γαλακτοκομικά. Όλα τα παραπάνω μαρτυρούν την σπουδαιότητά τους για τον άνθρωπο διαχρονικά (Jensen & Kroger, 2000).

Μία σημαντική κατηγορία γαλακτοκομικών συνιστούν τα προϊόντα ζύμωσης. Η ζύμωση αποτέλεσε μία από τις αρχαιότερες μεθόδους και πρακτικές διατήρησης και διευκόλυνσης της μεταφοράς γάλακτος, υπό την μορφή των ζυμωμένων προϊόντων. Θεωρείται ότι η τεχνική αυτή άρχισε να χρησιμοποιείται μόλις οι άνθρωποι σταμάτησαν να κυνηγούν και ξεκίνησαν να παράγουν την τροφή τους, δηλαδή πριν από περίπου 10000-15000 χρόνια. Στην διάρκεια αυτής της περιόδου εξημερώνονται και πολλά ζώο, μαζί και τα γαλακτοφόρα. Σύμφωνα με αρχαιολογικές ανακαλύψεις, βρέθηκε ότι ορισμένοι αρχαίοι πολιτισμοί, παρήγαγαν και γιαούρτι. Αν και δεν υπάρχουν σαφείς αποδείξεις για την καταγωγή του γιαουρτιού, η διατροφική του αξία και οι θετικές επιδράσεις του στην ανθρώπινη υγεία, αναγνωρίζονταν από πολλούς πολιτισμούς. Ωστόσο, είναι πολύ πιθανό, το γιαούρτι να προέρχεται από την περιοχή της Μέσης Ανατολής (Tamime & Robinson, 1999).

Το παραδοσιακό γιαούρτι παραγόταν με φυσική ζύμωση, δίχως την χρήση καλλιέργειας εκκίνησης. Έτσι, για την παραγωγή μιας νέας παρτίδας γιαουρτιού προστίθετο μία ποσότητα προϊόντος από προηγούμενη παρτίδα. Οι ζυμώσεις αυτού του τύπου δεν είναι προβλέψιμες και εξελίξιμες, ιδιαίτερα για την παραγωγή μεγάλης κλίμακας (Yildiz, 2010). Έτσι, δημιουργήθηκαν οι καλλιέργειες εκκίνησης, οι οποίες χρησιμοποιούνται στην βιομηχανία, καθώς παρέχουν τυποποίηση και ασφάλεια του προϊόντος. Στις συμβατικές καλλιέργειες εκκίνησης χρησιμοποιούνται γαλακτικά βακτήρια όπως ο *Lactobacillus delbryeckii ssp. Bulgaricus* και ο *Streptococcus thermophilus* (Yildiz, 2010). Τα τελευταία χρόνια προστίθενται στις καλλιέργειες εκκίνησης και προβιοτικά στελέχη, ως θρεπτικά συμπληρώματα (Tamine et al, 2005).

Τα προβιοτικά βακτήρια είναι ζωντανοί μικροοργανισμοί οι οποίοι, όταν χορηγούνται σε επαρκείς ποσότητες, ωφελούν την υγεία των καταναλωτών (Reid, 2016). Τα προβιοτικά βακτήρια έχουν πολλές θετικές δράσεις στην ανθρώπινη υγεία και κυρίως στο εντερικό σύστημα. Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιούνται κατά κόρον στο γιαούρτι και σε άλλα προϊόντα ζύμωσης του γάλακτος. Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα βακτήρια είναι οι λακτοβάκκιλοι, όπως τα *Lactobacillus acidophilus* και τα bifidobacteria, τα οποία αναφέρονται πολλές φορές απλά ως «bifidus». Τα τρόφιμα που περιέχουν προβιοτικά και χαρακτηρίζονται ως λειτουργικά (Saarela et al, 2000).

Όμως, τα προβιοτικά βακτήρια παρουσιάζουν μεγάλη ευαισθησία και επηρεάζονται από το οξυγόνο, την θερμοκρασία και την οξύτητα του περιβάλλοντος (Soccol et al, 2010). Η βιωσιμότητα και η δραστικότητα των προβιοτικών είναι σημαντικά στοιχεία, καθώς αυτά πρέπει να επιβιώσουν στα τρόφιμα που προστίθενται κατά την διάρκεια ζωής τους και κατά

την διέλευσή τους μέσω του στομάχου και επιπλέον να ανθίστανται στην αποδόμηση που προκαλούν τα υδρολυτικά ένζυμα και τα χολικά άλατα στο λεπτό έντερο (Tamine et al, 2005). Για την ενίσχυση και την αύξηση της βιωσιμότητας των προβιοτικών, έχουν εφαρμοστεί διάφορες τεχνικές. Μία από αυτές αποτελεί ο εγκλεισμός. Ως εγκλεισμός ή μικροεγκλεισμός, ορίζεται η τεχνολογία συσκευασίας στερεών, υγρών ή αερίων υλικών σε μικροσκοπικές σφραγισμένες κάψουλες, οι οποίες μπορούν να απελευθερώσουν το περιεχόμενό τους σε ελεγχόμενες τιμές, υπό την επίδραση ειδικών συνθηκών. Ο εγκλεισμός μπορεί να γίνει σε υδροκολλοειδή σφαιρίδια που παγιδεύουν και ακινητοποιούν τα ένζυμα εντός τους και παράλληλα παρέχουν προστασία από το περιβάλλον. Υπάρχουν επίσης και άλλες τεχνικές όπως η ξήρανση με κατάψυξη, με την οποία τα εγκλεισμένα κύτταρα έχουν την μορφή συμπυκνωμένης σκόνης. Τα μέσα εγκλεισμού που χρησιμοποιούνται στις παραπάνω τεχνικές είναι ποικίλα (Soccol et al, 2010).

3. Γάλα-Γιαούρτι

3.1 Γάλα

Το γάλα μπορεί να οριστεί ως το έκκριμα των μαστικών αδένων των θηλαστικών, του οποίου πρωταρχική και φυσική λειτουργία αποτελεί η διατροφή των νεογνών (Walstra et al, 2006). Σύμφωνα με τον ελληνικό Κώδικα Τροφίμων και Ποτών, γάλα είναι το απαλλαγμένο πρωτογάλακτος προϊόν, που προέρχεται από την ολοσχερή και χωρίς διακοπή άμελξη γαλακτοφόρου ζώου, που είναι υγιές, διαβιώνει και διατρέφεται κάτω από υγιεινούς όρους και δεν ευρίσκεται σε κατάσταση υπερκόπωσης (Κώδικας Τροφίμων και Ποτών). Πρωτόγαλα ονομάζεται το έκκριμα του μαστού των γαλακτοπαραγωγών ζώων κατά τις πρώτες 5-6 ημέρες μετά τον τοκετό (Μάντης, 2000). Το γάλα ορισμένων θηλαστικών, όπως των αιγών, των βουβαλιών, των αγελάδων και των προβάτων καταναλώνεται από τους ανθρώπους, είτε ως έχει, είτε μέσω των γαλακτοκομικών προϊόντων, των οποίων αποτελεί κυρίαρχο συστατικό. Σύμφωνα με τον Κώδικα Τροφίμων και Ποτών, για τα διάφορα είδη γάλακτος ορίζονται ανώτατα και κατώτατα όρια των φυσικών και χημικών σταθερών:

Πίνακας 3.1 Όρια φυσικών και χημικών σταθερών (Κώδικας Τροφίμων και Ποτών, 2009)

Προέλευση	Ειδικό βάρος σε 15°C (g/L)	Λίπος % (ελάχιστο)	Σ.Υ.Α.Λ. %(ελάχιστο)
Αγελάδας	1,028	3,5	0,2
Κατσίκας	1,032	4	9
Προβάτου	1,035	6	10,2
Βουβάλου	1,033	6	9,7
Ανάμεικτο προβάτου/κατσίκας	1,033	5	9,6

Ως Στερεό Υπόλειμμα Άνευ Λίπους (Σ.Υ.Α.Λ.) νοείται αυτό που προκύπτει από την εφαρμογή του τύπου του FLEISCHMAN, με βάση τις τιμές του παραπάνω πίνακα για το ειδικό βάρος και το λίπος. Έτσι ο τύπος έχει ως εξής:

$$\Sigma.Υ.Α.Λ. = 1{,}2Λ + 2{,}665\frac{100(Ε.Β.-1)}{Ε.Β.} - Λ$$

Όπου, Λ= λίπος % και Ε.Β.= ειδικό βάρος σε 15°C (Κώδικας Τροφίμων και Ποτών, 2009)

3.1.1 Σύσταση του γάλακτος

Τα συστατικά του γάλακτος καθώς και το ποσοστό αυτών ποικίλουν, ανάλογα με την προέλευσή του (το είδος του γαλακτοφόρου ζώου) (Saxelin, 2003). Παρακάτω, στον Πίνακα 3.1 παρουσιάζονται τα κύρια συστατικά τυπικού γάλακτος, προερχόμενου από πεδινές φυλές, όπως και το αντίστοιχο % w/w ποσοστό τους. Τα κυριότερα χημικά συστατικά είναι αυτά που βρίσκονται σε μεγάλες ποσότητες. Βέβαια, πρέπει να σημειωθεί ότι η ποσότητα (σε g) δεν διαδραματίζει πάντα εξέχοντα ρόλο. Οι βιταμίνες, επί παραδείγματι, είναι σημαντικές σε ότι αφορά στην θρεπτική αξία, τα ένζυμα αποτελούν τους καταλύτες των διαφόρων αντιδράσεων, ενώ μερικά δευτερεύοντα συστατικά συμβάλλουν σημαντικά στην γεύση του γάλακτος (Fox, 2003).

Πίνακας 3.2 Κύρια συστατικά γάλακτος

Συστατικό	Μέση περιεκτικότητα στο γάλα (%w/w)	Εύρος (% w/w)	Μέση περιεκτικότητα επί ξηρής μάζας (% w/w)
Νερό	87,1	85,3-88,7	-
Στερεά-μη λιπαρά	8,9	7,9-10,0	-
Λιπαρά επί ξηρής μάζας	31	22-38	-
Λακτόζη	4,6	3,8-5,3	36
Λιπίδια	4	2,5-5,5	31
Πρωτεΐνες	3,3	2,3-4,4	25
Καζεΐνη	2,6	1,7-3,5	20
Ανόργανα συστατικά	0,7	0,57-0,83	5,4
Οργανικά οξέα	0,17	0,12-0,21	1,3
Λοιπά συστατικά	0,15	-	1,2

Το νερό

Το νερό είναι το μέσον στο οποίον είναι διαλυμένα ή διεσπαρμένα όλα τα άλλα συστατικά του γάλακτος (ολικά στερεά). Μικρές ποσότητες νερού ενυδατώνουν ή δεσμεύονται χημικά από την λακτόζη και τα άλατα, ενώ και οι πρωτεΐνες μπορούν να δεσμεύσουν χημικά ποσότητες νερού (Kailasapathy, 2008).

Η λακτόζη

Η λακτόζη είναι χαρακτηριστικός υδατάνθρακας του γάλακτος. Είναι δισακχαρίτητς και αποτελείται από γλυκόζη και γαλακτόζη. Η λακτόζη είναι ένα αναγωγικό σάκχαρο (Walstra et al, 2006). Το γάλα των βοοειδών περιέχει περίπου 4,8% λακτόζη. Η συγκέντρωση της λακτόζης στο γάλα είναι ανεξάρτητη της φυλής και των διατροφικών συνθηκών των ζώων. Η συγκέντρωση όμως αυτή μειώνεται σταδιακά με τον χρόνο θηλασμού. Επίσης μείωση της συγκέντρωσης μπορεί να προκληθεί, αν το ζώο προσβληθεί από μαστίτιδα (Fox, 2003).

Τα λιπίδια

Τα λιπίδια αποτελούνται, σε μεγάλο βαθμό, από τριγλυκερίδια. Τα συστατικά των λιπαρών οξέων παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλία τόσο στο μήκος της αλυσίδας (κυμαίνεται μεταξύ 2 και 20 ατόμων άνθρακα), όσο και στον βαθμό κορεσμού (από 0 έως και 4 διπλούς δεσμούς). Άλλα λιπίδια περιλαμβάνουν τα φωσφολιπίδια, την χοληστερόλη, τα ελεύθερα λιπαρά οξέα, τα μονογλυκερίδια και τα διγλυκερίδια (Walstra et al, 2006). Τα λίπη είναι διαλυτά σε μη πολικούς διαλύτες (αιθυλεστέρας/πετρελαϊκός αιθέρας ή χλωροφόρμιο/μεθανόλη). Εμφανίζονται σε σφαιρική μορφή με διάμετρο 0,1-20 μm (Fox, 2003).

Τα λιπαρά του γάλακτος αποτελούν τα πιο σύνθετα λιπαρά των τροφίμων. Τα λιπαρά συνεισφέρουν σε ποσοστό 49% στην συνολική ενέργεια του πλήρους γάλακτος, 35% στην συνολική ενέργεια του γάλακτος με μειωμένα λιπαρά (2%) και 21% στην συνολική ενέργεια του γάλακτος χαμηλών λιπαρών (1%). Παίζουν, επίσης, σπουδαίο ρόλο στην εμφάνιση, στην υφή, στην γεύση, στο άρωμα και την σταθερότητα των γαλακτοκομικών προϊόντων. Τα λιπαρά του γάλακτος θεωρούνται μοναδικά καθώς αποτελούνται από ένα σχετικά υψηλό αριθμό κορεσμένων λιπαρών μικρής και μεσαίας αλυσίδας. Η σύσταση των λιπαρών του γάλακτος ποικίλει ανάλογα με την φυλή του γαλακτοφόρου ζώου, την εποχή, την γεωγραφική περιοχή, το χρόνο θηλασμού, την προσβολή του μαστού από διάφορες λοιμώξεις, την διατροφή και το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί μεταξύ των διαδοχικών αμέλξεων. Γενικά, στο πλήρες γάλα περίπου το 57% των λιπαρών είναι κορεσμένα, 25% είναι μονοακόρεστα, ενώ το 6% είναι πολυακόρεστα. Το μεγαλύτερο ποσοστό των κορεσμένων αποτελείται από παλμιτικό, στεατικό και μυριστικό οξύ (Jensen & Kroger, 2000, Fox, 2003).

Οι πρωτεΐνες

Οι πρωτεΐνες αποτελούν πολύ σημαντικά συστατικά του γάλακτος, και αυτό διότι ο ρόλος τους στα περισσότερα γαλακτοκομικά προϊόντα είναι αρκετά σημαντικός (Fox, 2013). Οι πρωτεΐνες του γάλακτος ανήκουν σε δύο διακριτούς τύπους, τις πρωτεΐνες ορού γάλακτος και τις καζεΐνες (Kailasapathy, 2008). Περίπου τα 4/5 των περιεχόμενων πρωτεϊνών ανήκουν στην κατηγορία των καζεϊνών, που στην πραγματικότητα αποτελούν ένα μείγμα 4 πρωτεϊνών: α_{s1}-, α_{S2}-, β-, και κ-καζεΐνη. Οι καζεΐνες του γάλακτος είναι σε κάποιο βαθμό φωσφορυλιωμένες και έχουν περιορισμένη ή καθόλου δευτεροταγή δομή. Οι καζεΐνες καταβυθίζονται σε pH κοντά στο 4,6. Επιπροσθέτως, αξίζει να σημειωθεί ότι η καζεΐνη δεν μετουσιώνεται, αλλά η θέρμανσή της πάνω από τους 120°C μπορεί να προκαλέσει μείωση της διαλυτότητάς της λόγω χημικών αλλαγών. Τα περισσότερα μόρια της κ-καζεΐνης είναι, σε ένα βαθμό, γλυκοζυλιωμένα. Μέρος της β-καζεΐνης χωρίζεται από τα πρωτεολυτικά ένζυμα σε γ-καζεΐνη και πρωτεάση πεπτόνης. Οι α_{s1}- και α_{s2}-καζεΐνες αποτελούν

φωσφοπρωτεΐνες που έχουν έναν αριθμό φωσφορικών ομάδων οι οποίες εστεροποιούνται προς μόρια σερίνης. Τα μόρια σερίνης καθιζάνουν με τα ιόντα Ca^{2+} , αλλά η παρουσία της κ-καζεΐνης εμποδίζει την καταβύθισή τους. Ωστόσο, το ένζυμο χυμοσίνη, που υπάρχει στην πυτιά, δρα στο μόριο της κ-καζεΐνης, διασπώντας ένα μέρος της. Έτσι, η κ-καζεΐνη χάνει την ικανότητα να εμποδίζει την καθίζηση των μόρια σερίνης. Αποτέλεσμα αυτού είναι να πραγματοποιείται καταβύθιση των μορίων σερίνης υπό την παρουσία Ca^{2+}. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η πήξη του γάλακτος με την χρήση πυτιάς (Walstra et al, 2006).

Πίνακας 3.3 Πρωτεΐνες γάλακτος (Walstra et al, 2006)

Πρωτεΐνη	$mmol/m^3$ Γάλακτος	g/Kg Γάλακτος	g/100g Πρωτεΐνης	Μοριακή μάζα
Καζεΐνη	1120	26	78,3	-
αs1-καζεΐνη	450	10,7	32	23600
α_{s2}-καζεΐνη	110	2,8	8,4	25200
β-καζεΐνη	360	8,6	26	23983
κ-καζεΐνη	160	3,1	9,3	19550
γ-καζεΐνη	40	0,8	2,4	20500
Πρωτεΐνες ορού	320	6,3	19	-
β-λακτοσφαιρίνη	180	3,2	9,8	18283
α-λακταλβουμίνη	90	1,2	3,7	14176
αλβουμίνη ορού	6	0,4	1,2	66267
πρωτεάση-πεπτόνη	40	0,8	2,4	4000-40000
Ανοσοσφαιρίνες	4	0,8	1,8	-
IgGl, IgG2	-	0,65	0,4	150000
IgA	-	0,14	0,2	385000
Gm	-	0,05	2,7	900000
Άλλες	-	0,9	-	-
Λακτοσφαιρίνη	1	0,1	-	86000
Τρανσφερίνη	1	0,01	2	76000
πρωτεΐνες μεμβράνης	-	0,7	-	-
ένζυμα	-	-		-

Από τις πρωτεΐνες ορού γάλακτος, η κυριότερη είναι η β-λακτοσφαιρίνη (Walstra et al, 2006). Άλλες πρωτεΐνες ορού γάλακτος είναι α-λακταλβουμίνη, η πρωτεάση-πεπτόνη (προέρχεται εν μέρει από την υδρόλυση της β-καζεΐνης), πρωτεΐνες του αίματος (σε μικρές ποσότητες), αλβουμίνη ορού και ανοσοσφαιρίνες (Kailasapathy, 2008). Επιπροσθέτως, το γάλα περιέχει πολλές άλλες δευτερεύουσες πρωτεΐνες καθώς και ένα ευρύ φάσμα ενζύμων (Walstra et al, 2006).

Τα ένζυμα

Το γάλα περιέχει περίπου 60 ένζυμα. Αν και αποτελούν μικρό τμήμα των συνολικών πρωτεϊνών του γάλακτος, εντούτοις ο ρόλος τους είναι πολύ σημαντικός (Fox, 2013). Τα ένζυμα του γάλακτος προέρχονται από τον μαστό του γαλακτοφόρου ζώου ή είναι βακτηριακά ένζυμα. Μερικά από αυτά συνδέονται με τα σωματικά κύτταρα του ζώου και έτσι η παρουσία τους στο γάλα σχετίζεται με διάφορες ασθένειες του μαστού και ιδιαίτερα με την μαστίτιδα. Μερικά σημαντικά, από τεχνολογικής άποψης, ένζυμα είναι η πλασμίνη, η λιποπρωτεϊνική λιπάση, η αλκαλική φωσφατάση, η λακτοϋπεροξειδάση, η σουλφυδρυλική οξειδάση, η N-ακετυλ-β-D-γλυκοσαμινιδάση, η καταλάση, η οξειδάση της ξανθίνης, η υπεροξειδική δισμουτάση, η γ-γλουταμυλτρανσφεράση και η συνθάση της λακτόζης (Kailasapathy, 2008).

Οι βιταμίνες

Το γάλα περιέχει σχεδόν όλες τις βιταμίνες, τόσο τις λιποδιαλυτές, όσο και τις υδατοδιαλυτές. Σε ότι αφορά στις λιποδιαλυτές βιταμίνες, το γάλα αποτελεί σημαντική πηγή της βιταμίνης A, η οποία απαντάται κυρίως ως εστέρας του παλμιτικού οξέος. Περιέχει ακόμη την βιταμίνη D, ως μείγμα των βιταμινών D_2 και D_3, την βιταμίνη E η οποία απαντάται ως α-τοκοφερόλη καθώς και την βιταμίνη K η οποία όμως βρίσκεται σε ίχνη. Από τις υδατοδιαλυτές βιταμίνες, αυτές του συμπλέγματος B βρίσκονται σε σταθερές ποσότητες στο γάλα των μηρυκαστικών. Η ποσότητα των πρωτεϊνών που υπάρχει στο άπαχο, στο πλήρες καθώς και στο γάλα με λίγα λιπαρά είναι ίδια (Kailasapathy, 2008, Χατζηϊωάννου, 2012).

Οι ανόργανες ουσίες

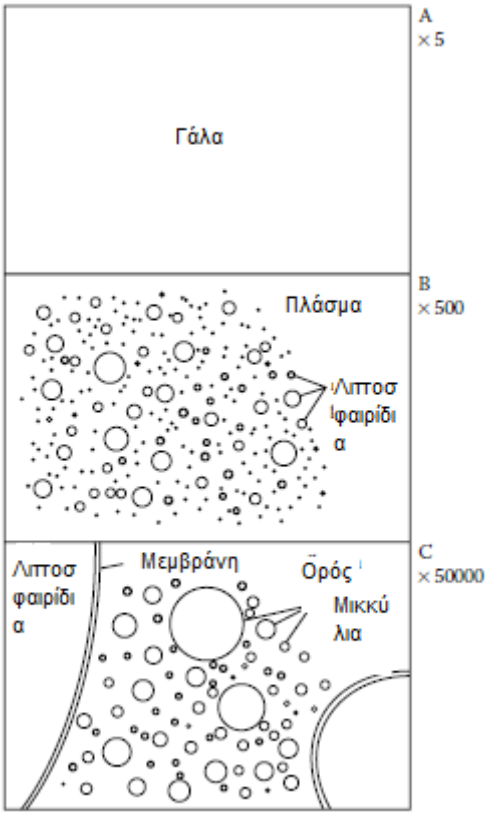
Οι ανόργανες ουσίες που περιέχονται στο γάλα είναι κατά κύριο λόγο ενώσεις του K, Na, Ca, Mg, Cl, τα φωσφορικά και τα άλατα. Τα άλατα του γάλακτος είναι εν μέρει ιονισμένα. Τα οργανικά οξέα απαντώνται σε μεγάλο βαθμό είτε ως ιόντα είτε ως άλατα. Κυριότερο εξ αυτών είναι το κιτρικό οξύ. Επιπλέον, το γάλα περιέχει πολλές άλλες ουσίες οι οποίες όμως βρίσκονται σε ίχνη.

Η συνολική περιεκτικότητα του γάλακτος σε όλες τις ουσίες εκτός του νερού καλείται περιεκτικότητα ξηρής μάζας. Ένας επιπρόσθετος διαχωρισμός είναι η διάκριση μεταξύ στερεών μη λιπαρών και λιπαρών και η περιεκτικότητά τους επί της ξηρής μάζας.

Η χημική σύνθεση του γάλακτος καθορίζει σε μεγάλο βαθμό την θρεπτική αξία του, τα περιθώρια ανάπτυξης μικροοργανισμών σε αυτό, την γεύση του καθώς και τις χημικές αντιδράσεις που δύναται να λάβουν χώρα και μπορούν να προκαλέσουν διάφορες οσμές στο γάλα (Walstra et al, 2006).

3.1.2 Δομή και δομικά στοιχεία του γάλακτος

Η δομή, δηλαδή η γεωμετρική κατανομή των χημικών συστατικών, είναι πολύ σημαντική στην περίπτωση του γάλακτος. Η δράση των χημικών αυτών στοιχείων καθώς και οι δυνάμεις αλληλεπίδρασης μεταξύ τους προσδίδουν, στο γάλα, την σταθερότητα αλλά και τις συγκεκριμένες φυσικές ιδιότητές του. Στην Εικόνα 1 παρουσιάζονται τα κύρια δομικά συστατικά του γάλακτος. Μέσω τριών διαφορετικών εστιάσεων φανερώνεται η δομή και τα δομικά στοιχεία του. Στην εστίαση x5 το γάλα παρουσιάζεται ως υγρό, το οποίο όμως είναι θολό, πράγμα το οποίο υποδηλώνει την έλλειψη ομοιογένειας. Στην εστίαση x500 παρατηρούνται τα λιποσφαιρίδια. Τα σφαιρίδια αυτά αιωρούνται σε ένα υγρό, το πλάσμα, το οποίο είναι επίσης θολό. Στην x50000 εστίαση διακρίνονται πρωτεϊνούχα σωματίδια, τα μικκύλια της καζεΐνης. Το υπόλοιπο υγρό, που αντιστοιχεί στον ορό του γάλακτος, περιέχει και άλλα σωματίδια. Επίσης, φαίνεται ότι τα λιποσφαιρίδια καλύπτονται από ένα λεπτό εξωτερικό στρώμα (μεμβράνη) (Walstra et al, 2006).



Εικόνα 3.1 Το γάλα σε 3 διαφορετικές εστιάσεις

Το γάλα αποτελεί, ουσιαστικά, ένα γαλάκτωμα. Τα περισσότερα λιπίδια του γάλακτος περιβάλλονται από μεμβράνη. Η μεμβράνη των λιποσφαιριδίων αποτελείται από πολλά συστατικά και η δομή της είναι αρκετά περίπλοκη. Σε θερμοκρασίες μικρότερες των 35°C, μέρος των λιπιδίων εντός των σφαιριδίων, είναι δυνατόν να κρυσταλλωθεί. Τα υπόλοιπα συστατικά του γάλακτος, εκτός των λιποσφαιριδίων, αποτελούν το πλάσμα του γάλακτος, εντός του οποίου βρίσκονται τα λιποσφαιρίδια.

Τα καζεϊνικά μικκύλια, άλλο ένα σημαντικό δομικό στοιχείο του γάλακτος, αποτελούνται από νερό, πρωτεΐνες (καζεΐνη) και άλατα. Η καζεΐνη μπορεί να δεσμεύει κατιόντα και με τον

τρόπο αυτό σχηματίζει ενώσεις με τα ιόντα ασβεστίου και μαγνησίου. Τα άλατα των μικκυλίων είναι το φωσφορικό ασβέστιο και το κιτρικό άλας, με το δεύτερο να βρίσκεται σε μικρότερο ποσοστό. Τα καζεϊνικά μικκύλια δεν είναι μικκύλια με την αυστηρή έννοια του όρου, αλλά απλά, μικροσκοπικά σωματίδια, διεσπαρμένα στον ορό γάλακτος. Ως ορός γάλακτος, ονομάζεται το σύνολο του πλάσματος εκτός των καζεϊνικών μικκυλίων.

Ο ορός του γάλακτος περιέχει πρωτεΐνες, που έχουν κατά κύριο λόγο μοριακή μορφή ή μορφή μικρών πρωτεϊνικών συμπλόκων. Ακόμη, στον ορό υπάρχουν λιποπρωτεΐνες οι οποίες εμφανίζουν ποικιλία σχημάτων και διακυμάνσεις στην ποσότητά τους και αποτελούν, κατά πάσα πιθανότητα, υπολείμματα των κυτταρικών μεμβρανών του μαστού. Τέλος, στον ορό υπάρχουν και κύτταρα, πιο συγκεκριμένα λευκοκκύταρα, σε ποσοστό περίπου 0,01% του συνολικού όγκου του γάλακτος. Τα κύτταρα αυτά περιέχουν όλα τα κυτταροπλασματικά συστατικά, όπως ένζυμα και μάλιστα είναι πλούσια σε καταλάση (Walstra et al, 2006).

3.1.3 Φυσικές Ιδιότητες Γάλακτος

Οι φυσικές ιδιότητες του γάλακτος έχουν ύψιστη σημασία για τον κλάδο της γαλακτοκομίας καθώς επηρεάζουν την διαδικασία επεξεργασίας του και την ποιότητα των τελικών προϊόντων (Kailasapathy, 2008). Ακολούθως παρουσιάζονται μερικές από τις κυριότερες φυσικές ιδιότητες του γάλακτος.

Χρώμα

Το γάλα είναι ένα θολό, αδιαφανές υγρό λευκού χρώματος. Το χρώμα αυτό του γάλακτος οφείλεται στην σκέδαση του φωτός από την διεσπαρμένη φάση που περιλαμβάνει τα λιποσφαιρίδια, τα καζεϊνικά μικκύλια και το φωσφορικό ασβέστιο. Η ένταση του χρώματος είναι ανάλογη του μεγέθους και του αριθμού των διεσπαρμένων των σωματιδίων. Πολλές φορές, ανάλογα με την φυλή του γαλακτοφόρου ζώου από το οποίο λαμβάνεται, το γάλα μπορεί να περιέχει Β-καροτένιο με συνέπεια το χρώμα του να είναι υποκίτρινο αντί για λευκό. Η εκτεταμένη θερμική επεξεργασία προσδίδει στο γάλα ένα ελαφρώς καφετί χρώμα, ως αποτέλεσμα της αντίδρασης Maillard μεταξύ της λακτόζης και των πρωτεϊνών του. Επίσης, η απουσία λιποσφαιριδίων σε συνδυασμό με την παρουσία της χρωστικής ριβοφλαβίνη έχει ως συνέπεια το γάλα να αποκτά ένα κυανοπράσινο χρώμα (Chandan, 2006).

Γεύση και Άρωμα

Η γεύση του γάλακτος είναι ήπια και έχει μία ελαφρά γλυκύτητα, ενώ η οσμή του είναι αρκετά ιδιαίτερη. Η γλυκύτητα που προσδίδει στο γάλα η λακτόζη εξισορροπείται από την αλμυρή γεύση που προσδίδουν τα άλατα. Εξαιτίας αυτής της ήπιας γεύσης και της ιδιαίτερης οσμής του γάλακτος, είναι ευδιάκριτες οι διαφορές και οι αποκλίσεις από την συνηθισμένη κατάσταση. Οι διαφορές στην γεύση και το άρωμα οφείλονται σε μικροβιολογικούς παράγοντες, σε χημικές ή βιοχημικές δράσεις και σε οποιαδήποτε επεξεργασία που μπορεί να επηρεάσει την ισορροπία στα συστατικά του. Επιπροσθέτως, τα λιποσφαιρίδια τείνουν να απορροφούν εύκολα οσμές που προέρχονται από το περιβάλλον, λόγω του μεγάλου εμβαδού της εξωτερικής τους επιφάνειας, αλλοιώνοντας έτσι την χαρακτηριστική οσμή του γάλακτος (Chandan, 2006). Στον πίνακα 3.4. παρουσιάζονται

ορισμένες μη επιθυμητές γεύσεις και οσμές που αποκτά το γάλα καθώς και η προέλευσή τους.

Πίνακας 3.4 Μη επιθυμητές γεύσεις και οσμές (Chandan, 2006)

Προέλευση	Γεύση και οσμή	Περιγραφή	Πιθανή αιτία
τροφές και περιβάλλον	τροφής	κρεμμύδι, σκόρδο	τάισμα των γελάδων 0,5-3h πριν την άμελξη
	βοοειδούς	οσμή χνώτου αγελάδας	αγελάδες με κέτοση/ακετοναιμία
	στάβλου	θυμίζει στάβλο, ή χορτάρι	ελλιπής εξαερισμός, συσσώρευση αρωματικών χόρτων/οσμών στάβλου
μικροοργανισμοί	βύνης	σταφύλι, κριθάρι	ανθυγιεινός εξοπλισμός, ανεπαρκής ψύξη κατά την αποθήκευση
	πικρή/μη καθαρή	μπαγιάτικο, χαλασμένο	έκθεση σε υψηλή θερμοκρασία, βρώμικα σκεύη, ζιζάνια
	φρουτώδης/ζύμωσης	οσμή που μοιάζει με φρούτα	παλαιωμένο γάλα, μεγάλος χρόνος αποθήκευσης του νωπού γάλακτος
	ξινή	όξινη γεύση	αύξηση της συγκέντρωσης του γαλακτικού οξέος, ανάπτυξη μικροοργανισμών
βιοχημική	ταγγισμού	πικρή, αποκρουστική μυρωδιά	μεγάλος χρόνος αποθήκευσης του ομογενοποιημένου γάλακτος
	οξειδωμένη	γεύση που θυμίζει φάρμακο/ χημική γεύση	έκθεση των διαφανών περιεκτών του γάλακτος στην ακτινοβολία UV

Δείκτης Διάθλασης

Σε θερμοκρασία 20°C και με μήκος κύματος του φωτός στα 589,3nm ο δείκτης διάθλασης του αγελαδινού γάλακτος κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 1,3440 και 1,3485 (Chandan, 2006).

Οξύτητα –pH

Το φρέσκο γάλα παρουσιάζει κάποια οξύτητα εξ αιτίας της παρουσίας της καζεΐνης, των φωσφορικών οξέων και των κιτρικών αλάτων. Η οξύτητα αυτή, καλείται φυσική οξύτητα και ποικίλει ανάλογα με το είδος και την φυλή του γαλακτοφόρου ζώου, το στάδιο άμελξης και την φυσική κατάσταση του μαστού. Επίσης, όσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση των μη λιπαρών στερεών στο γάλα, τόσο μεγαλύτερη είναι η οξύτητα και το αντίστροφο. Η φυσική οξύτητα του αγελαδινού γάλακτος κυμαίνεται από 0,12% έως 0,18%. Από την άλλη, η πραγματική οξύτητα του γάλακτος οφείλεται στο γαλακτικό οξύ που σχηματίζεται λόγω της

βακτηριακής δράσης στην λακτόζη. Ως εκ τούτου, η συνολική οξύτητα του γάλακτος ισούται με το άθροισμα της φυσικής και της πραγματικής οξύτητας. Η οξύτητα εκφράζεται ως ποσοστό του γαλακτικού οξέος. Όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση των στερεών του ορού, τόσο μεγαλύτερη είναι και η ογκομετρούμενη οξύτητα. Δεν συμβαίνει όμως το ίδιο και με το pH, το οποίο είναι ανεξάρτητο της συγκέντρωσης των στερεών του ορού. Το pH του φρέσκου γάλακτος έχει τιμές στο εύρος 6,6-6,8. Υψηλότερες, από αυτές, τιμές του pH υποδεικνύουν ότι το ζώο έχει μαστίτιδα, ενώ χαμηλότερες ότι υπάρχει βακτηριακή δράση (Chandan, 2006).

Δυναμικό Οξειδοαναγωγής

Το δυναμικό οξειδοαναγωγής (Eh) του γάλακτος επηρεάζεται από παράγοντες όπως το διαλυμένο οξυγόνο, το ασκορβικό οξύ, η ριβοφλαμίνη, η περιεκτικότητα σε κυστίνη-κυστεΐνη και το pH. Στο νωπό βόειο γάλα το δυναμικό Eh έχει τιμή μεταξύ 0,2 και 0,3V στους 30°C (Kailasapathy, 2008).

Ηλεκτρική Αγωγιμότητα

Η ειδική ηλεκτρική αγωγιμότητα του γάλακτος κυμαίνεται μεταξύ 0,004 και 0,0055$\Omega^{-1}cm^{-1}$ και αντιστοιχεί περίπου σε εκείνη ενός διαλύματος NaCl 0,25% w/w (Chandan, 2006, Kailasapathy).

Πυκνότητα και Ειδικό Βάρος

Η πυκνότητα του γάλακτος εκφράζεται σε μονάδες μάζας ανά μονάδα όγκου (Kg/m^3) και προκύπτει από το συνολικό άθροισμα των πυκνοτήτων των συστατικών του γάλακτος (Chandan, 2006). Επομένως, εξαρτάται από την συγκέντρωση των συστατικών, τον βαθμό ενυδάτωσης των πρωτεϊνών και τον ειδικό όγκο της λιπαρής φάσης του γάλακτος (Χατζηϊωάννου, 2012). Η πυκνότητα του γάλακτος είναι μία πολύ χρήσιμη φυσική του ιδιότητα, διότι επιτρέπει την μετατροπή των σταθμικών μετρήσεων σε ογκομετρικές. Το γεγονός αυτό είναι εξέχουσας σημασίας, αν ληφθεί υπόψιν ότι οι βιομηχανίες αγοράζουν το φυσικό γάλα από τους παραγωγούς μετρώντας την μάζα του, ενώ το πωλούν σε περιέκτες συγκεκριμένου όγκου. Η πυκνότητα του γάλακτος στους 20°C βρίσκεται μεταξύ των τιμών 1,027 και 1,033g/cm^3, ενώ η μέση τιμή του είναι 1,030g/cm^3 (Chandan, 2006).

Ειδικό βάρος καλείται ο λόγος της μάζας ενός διαλύματος ή μίας ουσίας προς την μάζα του νερού που έχει τον ίδιο όγκο. Τα λιπαρά του γάλακτος, όντας ελαφρύτερα του νερού, τείνουν να μειώνουν το ειδικό βάρος του γάλακτος με την αύξηση της συγκέντρωσής τους (Kailasapathy, 2008).

Ιξώδες

Το ιξώδες στο γάλα και στα γαλακτοκομικά μετράται σε cP ή poise x 10^{-2}. Εξαρτάται από την θερμοκρασία, τα καζεϊνικά μικκύλια και τα λιποσφαιρίδια που υπάρχουν στο γάλα. Για το πλήρες γάλα, το ιξώδες στους 20°C είναι 1,9cP, ενώ η αντίστοιχη τιμή για το αποβουτυρωμένο είναι 1,5cP. Τα καζεϊνικά μικκύλια επηρεάζουν, περισσότερο από οποιοδήποτε άλλο συστατικό, το ιξώδες του γάλακτος. Η τιμή του μεταβάλλεται με τις αλλαγές στην φυσική κατάσταση των λιπαρών και με τον βαθμό ενυδάτωσης των πρωτεϊνών. Επίσης, μεταβολές στο μέγεθος των συστατικών μεταβάλλουν αντίστοιχα και το ιξώδες (Kailasapathy, 2008).

Σημείο Πήξης

Το σημείο πήξης του γάλακτος είναι χαμηλότερο από αυτό του νερού, λόγω των συστατικών του. Η λακτόζη, τα ιόντα καλίου, νατρίου και χλωρίου είναι τα συστατικά που ευθύνονται σε ποσοστό 75-80% για την ταπείνωση του σημείου πήξης του γάλακτος. Η ιδιότητα αυτή του γάλακτος είναι σχετικά σταθερή και αμετάβλητη. Το φρέσκο γάλα έχει ένα σημείο πήξης κοντά στους -0,540^{o}C (Kailasapathy, 2008).

Σημείο Ζέσης

Όπως το σημείο πήξης, έτσι και το σημείο ζέσης του γάλακτος διαφέρει από εκείνο του νερού εξ αιτίας των διαλυμένων συστατικών του. Το σημείο ζέσης, λοιπόν, είναι ελαφρώς υψηλότερο των 100^{0}C και ανέρχεται στους 100,17^{0}C (Chandan, 2006).

3.1.4 Διατροφική Αξία του Γάλακτος

Το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα έχουν υψηλή ενεργειακή αξία, αποτελούν πηγή ιχνοστοιχείων και πρωτεϊνών, ενώ η κατανάλωσή τους έχει θετικές συνέπειες στα άτομα. Η ενέργεια 100g γάλακτος ανέρχεται στα 252KJ (60Kcal) (FAO 2013), ενώ η θερμιδική αξία του γάλακτος είναι περίπου 700Kcal/L και οφείλεται στα λιπαρά του. Η λακτόζη από την άλλη, συμβάλλει στην ενίσχυση της μικροχλωρίδας του εντέρου. Παρόλα αυτά, υπάρχει ένα μεγάλο ποσοστό του πληθυσμού το οποίο εμφανίζει δυσανεξία στην λακτόζη και συνεπώς δεν δύναται να καταναλώσει μεγάλη ποσότητα γάλακτος και γαλακτοκομικών (Walstra et al, 2006).

Μεγάλη θρεπτική αξία παρουσιάζουν και οι πρωτεΐνες του γάλακτος, ιδιαίτερα οι πλούσιες σε θειούχα αμινοξέα, γαλακτοαλβουμίνη και γαλακτογλοβουλίνη. Τα ανόργανα συστατικά διαδραματίζουν εξίσου σπουδαίο ρόλο. Επί παραδείγματι, η φωσφατάση του ασβεστίου είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη και την διατήρηση των οστών, ενώ το ασβέστιο, με την συμβολή της βιταμίνης D και της λακτόζης, απορροφάται ικανοποιητικά από το έντερο (Walstra et al, 2006). Επίσης, το γάλα αποτελεί καλή πηγή ψευδαργύρου αλλά όχι σιδήρου και φυλλικού οξέος (FAO 2013). Τέλος, όπως έχει επισημανθεί, στο γάλα εμπεριέχονται όλες οι υδατοδιαλυτές και λιποδιαλυτές βιταμίνες. Η βιταμίνη Α ενισχύει την αύξηση των ιστών και βοηθά στην διαμόρφωσή τους κατά το στάδιο της ανάπτυξης των παιδιών, ενώ επιπροσθέτως, συμβάλλει στην διατήρηση της υγείας των ματιών και του δέρματος. Η ριβοφλαμίνη, με την σειρά της, παίζει σημαντικό ρόλο τόσο στην ανάπτυξη των παιδιών όσο και στην διαδικασία μετατροπής της τροφής σε ενέργεια (Walstra et al, 2006).

3.1.5 Ζυμωμένα προϊόντα γάλακτος

Έπειτα από εμβολιασμό του γάλακτος με καλλιέργειες εκκίνησης, λαμβάνει χώρα η ζύμωση του γάλακτος και παράγονται τα προϊόντα ζύμωσης. Με την ζύμωση, μέρος της λακτόζης μετατρέπεται σε γαλακτικό οξύ χάρις στην μεταβολική δραστηριότητα της καλλιέργειας εμβολιασμού. Κατά την ζύμωση παράγεται, επίσης, διοξείδιο του άνθρακα, οξικό οξύ, διακετύλιο, ακεταλδεΰδη, ακετοΐνη, 2-βουτανόνη καθώς και άλλες ουσίες που προσδίδουν τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά στο τελικό προϊόν (Bylund, 2003).

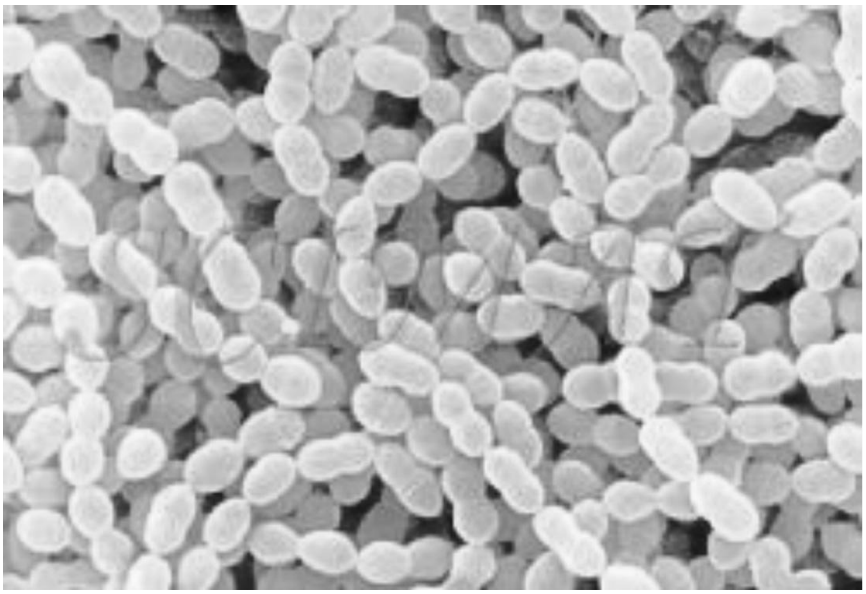
Υπάρχουν 4 διαφορετικά είδη ζυμωμένων προϊόντων γάλακτος: i) αυτά που προέρχονται από οξυγαλακτική ζύμωση και ως καλλιέργεια εκκίνησης επιλέγονται μεσόφιλα βακτηριακά στελέχη, ii) αυτά στα οποία για την ζύμωση επιλέγονται θερμόφιλα βακτηριακά στελέχη, iii) αυτά που προέρχονται από αλκοολική οξυγαλακτική ζύμωση και ως καλλιέργεια εκκίνησης

επιλέγονται ζύμες και βακτήρια γαλακτικού οξέος και iv) αυτά που λαμβάνονται από τις περιπτώσεις (i) και (ii) και ταυτόχρονα αναπτύσσονται μύκητες.

Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν το ζυμωμένο βουτυρόγαλα, η κρέμα γάλακτος και σκανδιναβικά ζυμωμένα γάλατα, όπως το langfil, το filmjolk και το lactofil από τη Σουηδία, και το Ymet από τη Δανία. Στη δεύτερη κατηγορία ανήκει το γιαούρτι, το βουλγαρικό βουτυρόγαλα και τα ζυμωμένα γάλατα με προβιοτικούς μικροοργανισμούς. Στην τρίτη κατηγορία ανήκει το kefir και το kumiss, με προέλευση από την Ρωσία και την δυτική Ασία, ενώ στην τελευταία κατηγορία ανήκει το villi από την Φινλανδία (Walstra et al, 2006).

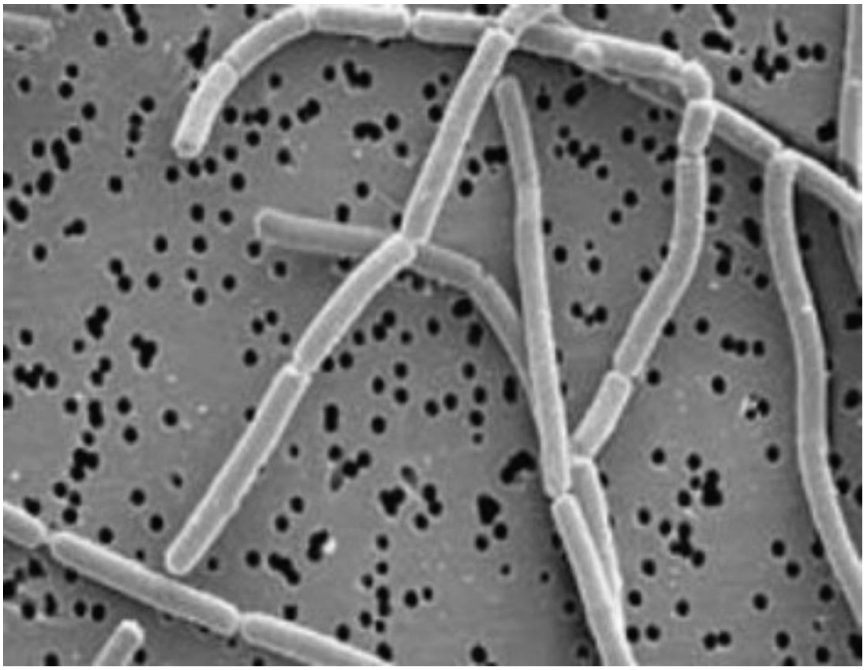
3.2 Γιαούρτι

Το γιαούρτι είναι ένα ημιστερεό προϊόν ζύμωσης του γάλακτος. Η λέξη γιαούρτι προέρχεται από την τουρκική λέξη yog˘urt και συνδέεται με τις λέξεις yog˘ urmak που σχετίζεται με την ζύμωση και yog˘un που σχετίζεται με τις λέξεις «πυκνό» ή «χοντρό» (Yildiz, 2010). Σύμφωνα με το άρθρο 82 του Ελληνικού Κώδικα Τροφίμων και Ποτών (2009), «γιαούρτι (πλήρες ή, κατά περίπτωση, ημι-αποβουτυρωμένο)...(όνομα ζώου)" χαρακτηρίζεται το προϊόν, το οποίο προκύπτει μετά από πήξη αποκλειστικά και μόνο νωπού γάλακτος της αντίστοιχης προς την ονομασία φύσης και προέλευσης, με την επίδραση καλλιέργειας ζύμης που προκαλεί ειδική για αυτό ζύμωση. Το γιαούρτι πρέπει να περιέχει λίπος και στερεό υπόλειμμα άνευ λίπους (ΣΥΑΛ) σε ποσοστό ανώτερο κατά 10% τουλάχιστον από τα όρια που καθορίζονται στο άρθρο 80 (παράγραφος 3) των αντίστοιχων ειδών γάλακτος, από τα οποία παρασκευάστηκε αυτό. Εκτός από τα είδη γάλακτος που περιλαμβάνονται στο άρθρο 80 (παράγραφος 3), επιτρέπεται η παρασκευή πλήρους γιαουρτιού από μίγμα ίσων μερών νωπού γάλακτος αγελάδας και βουβάλου ή προβάτου» (Κώδικας Τροφίμων και Ποτών, 2009)



Εικόνα 1 *Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus*

Το γιαούρτι παράγεται με τον εμβολιασμό του γάλακτος με ειδικά στελέχη βακτηρίων. Εν συνεχεία το γάλα υφίσταται ζύμωση σε συγκεκριμένες συνθήκες θερμοκρασίας (40-45°C). Τα βακτήρια καταναλώνουν τα σάκχαρα του γάλακτος και παράγουν γαλακτικό οξύ. Αυτό προκαλεί αύξηση της οξύτητας με συνέπεια την μετουσίωση των πρωτεϊνών του γάλακτος και τον σχηματισμό πήγματος. Η αύξηση της οξύτητας επιπλέον αποτρέπει τον πολλαπλασιασμό των δυνητικά παθογόνων μικροοργανισμών. Στις περισσότερες χώρες, για την παραγωγή γιαουρτιού χρησιμοποιούνται τα βακτήρια *Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus* (ST) και *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus (εικόνες 3.2 και 3.3)*. Συχνά, τα δύο αυτά βακτήρια χρησιμοποιούνται, πολλές φορές, μαζί με άλλα γαλακτικά βακτήρια όπως *Lactobacillus acidorhilus* (LA), *Lactobacillus casei* και είδη των *Bifidobacterium* (Yildiz, 2010).



Εικόνα 3.3 *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*

Τόσο στις ΗΠΑ, όσο και στις χώρες τις Ευρωπαϊκής Ένωσης, ένα προϊόν μπορεί να ονομαστεί γιαούρτι, μόνο εάν στο τελικό προϊόν έχουν επιβιώσει βακτήρια. Στις ΗΠΑ, τα μη παστεριωμένα γιαούρτια μπορούν να διατίθενται στην αγορά ως «ζωντανές καλλιέργειες» που περιέχουν ενεργά βακτήρια. Μία ποσότητα αυτών των γιαουρτιών μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον εμβολιασμό γάλακτος, με σκοπό την παραγωγή νέας παρτίδας γιαουρτιού, καθώς κατά την διάρκεια της ζύμωσης τα βακτήρια αναπαράγονται και πολλαπλασιάζονται.

Σημαντικές παράμετροι για την παρασκευή του γιαουρτιού αποτελούν τα συστατικά, οι καλλιέργειες εκκίνησης και οι μέθοδοι παραγωγής. Τα τελευταία χρόνια η απήχηση του γιαουρτιού στους καταναλωτές έχει αυξηθεί και όλο περισσότεροι άνθρωποι από διάφορα μέρη του πλανήτη καταναλώνουν γιαούρτι (Yildiz, 2010).

3.2.1 Σχηματισμός πήγματος του γιαουρτιού

Ο σχηματισμός του πήγματος στο γιαούρτι, όπως και στα περισσότερα γαλακτοκομικά προϊόντα, οφείλεται στην αποσταθεροποίηση του συμπλέγματος της καζεΐνης. Υπάρχουν διάφοροι τρόποι να σχηματιστεί ένα πήγμα, μέσω ενζυματικής δράσης, θερμικής κατεργασίας ή όξινης ζύμωσης. Αν και ο σχηματισμός του πήγματος του γιαουρτιού γίνεται μέσω όξινης ζύμωσης, με την χρήση κυρίως των βακτηρίων *S. thermophilus* και *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* σε θερμοκρασία 30-45°C και δεν προστίθενται πρωτεολυτικά πηκτικά ένζυμα, εντούτοις οι πρωτεϊνάσες που προέρχονται από τις καλλιέργειες εκκίνησης που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή του γιαουρτιού μπορούν να παίζουν κάποιο ρόλο στην διαδικασία σχηματισμού του πήγματος. Τα μικκύλια της καζεΐνης συνδέονται μεταξύ τους με γέφυρες φωσφορικού ασβεστίου. Κατά την διάρκεια της ζύμωσης του γάλακτος, λοιπόν, η συγκέντρωση των ιόντων Ca^{2+} αυξάνεται στον ορό καθώς διασπώνται οι δεσμοί φωσφορικού ασβεστίου των μικκυλίων της καζεΐνης. Η αποσταθεροποίηση, αυτή, της καζεΐνης εξαρτάται από την μείωση του pH, την αύξηση της συγκέντρωσης των ιόντων και

εξαρτάται επίσης από την θερμοκρασία. Ο μηχανισμός αποσταθεροποίησης και διάσπασης του καζεϊνικού συμπλέγματος έχει διάφορα στάδια. Σε pH 5,6, όλες οι μεγάλες καζεΐνες διασπώνται εύκολα από το εξωτερικό μέρος του συμπλέγματος, ενώ η διάλυση των δεσμών φωσφορικού ασβεστίου λαμβάνει χώρα σε pH κοντά στο 5,3. Σε pH 4,8 τα διασπασμένα μέρη του καζεϊνικού συμπλέγματος μπορούν να επανασυνδεθούν για να σχηματίσουν μεγαλύτερα συσσωματώματα καζεΐνης. Καθώς πραγματοποιείται ο σχηματισμός των νέων συσσωματωμάτων, που αποτελούνται από μικκυλιακές αλυσίδες, παγιδεύονται σε αυτά άλλα συστατικά που υπάρχουν στο γάλα και δημιουργείται, κατ' αυτόν τον τρόπο, το πήγμα του γιαουρτιού (Tamime & Robinson, 2007).

Καθόλην την διάρκεια της ζύμωσης του γάλακτος και του σχηματισμού του πήγματος του γιαουρτιού το pH μειώνεται. Η εξίσωση που περιγράφει γενικά την μεταβολή αυτή του pH συναρτήσει του χρόνου έχει την εξής μορφή:

$$y = y_0 + (y_0 - y_\infty)\exp\left[-\exp\left[\frac{\mu\, e}{y_0 - y_\infty}(\lambda - t)t\right]\right] \qquad (3.1)$$

Όπου, y_0, y_∞, το pH έναρξης και λήξης της ζύμωσης αντίστοιχα, t η συνολική διάρκεια της ζύμωσης και μ, λ ο μέγιστος ρυθμός μείωσης και η διάρκεια λανθάνουσας φάσης.

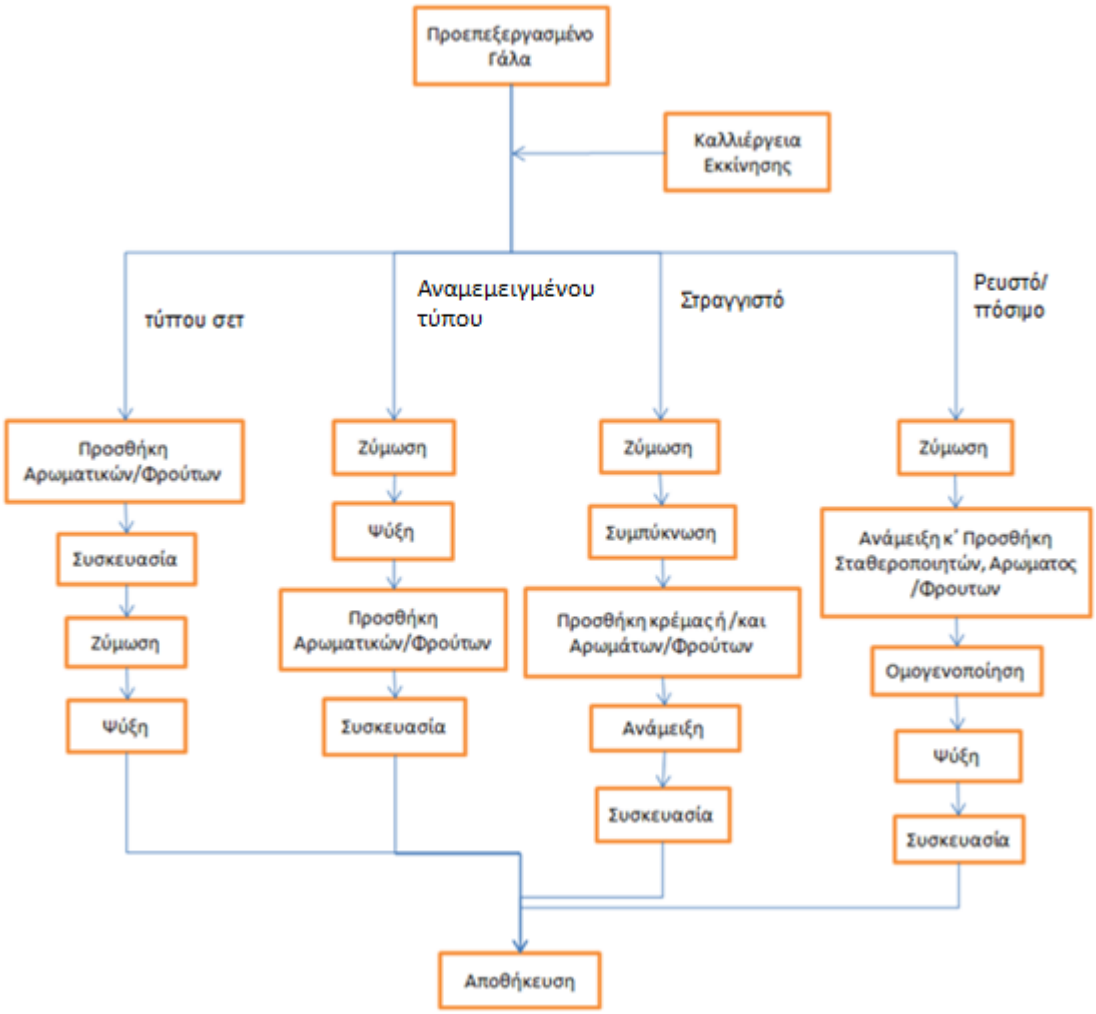
3.2.2 Είδη γιαουρτιού

Το γιαούρτι παρασκευάζεται σε πολλές χώρες του κόσμου, στις οποίες χρησιμοποιούνται διαφορετικές τεχνικές και μέθοδοι, ενώ παράλληλα χρησιμοποιείται ως πρώτη ύλη γάλα διαφόρων ζώων. Ως εκ τούτου, υπάρχει μεγάλη ποικιλία στην σύσταση και στην γεύση του γιαουρτιού. Το γιαούρτι απαντάται στις ακόλουθες μορφές ή τύπους:

- Τύπου σετ, στο οποίο η δράση των μικροοργανισμών και η ψύξη του προϊόντος πραγματοποιείται εντός της συσκευασίας του.
    - Αναμεμειγμένου τύπου, στο οποίο η επώαση και η ψύξη πραγματοποιείται πριν τη συσκευασία.
    - Συμπυκνωμένο ή στραγγιστό, στο οποίο η επώαση πραγματοποιείται σε ζυμωτήρα, ενώ ακολουθεί συμπύκνωση και ψύξη πριν συσκευαστεί.
    - Πόσιμο, το οποίο είναι όμοιο με το ανακατεμένου τύπου, αλλά το πήγμα σε αυτήν την περίπτωση διαρρηγνύεται ώστε να γίνει υγρής φύσης και μετά συσκευάζεται.
    - Παγωμένο, το οποίο επωάζεται σε ζυμωτήρα και έπειτα καταψύχεται, όπως το παγωτό (Bylund 2003).
    - Προβιοτικό γιαούρτι.

3.2.3 Παραγωγή Γιαουρτιού

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η διαδικασία παραγωγής του γιαουρτιού διαφέρει από χώρα σε χώρα αλλά και ανάλογα με τον τύπο γιαουρτιού και το είδος γάλακτος που χρησιμοποιείται ως πρώτη ύλη. Τα στάδια για την παραγωγή κάθε τύπου γιαουρτιού παρουσιάζονται στο κάτωθι διάγραμμα ροής:



Σχήμα 3.1 Διάγραμμα ροής της διαδικασίας παραγωγής των 4 τύπων γιαουρτιού (Bylund 2003)

Εντούτοις, παρά τις όποιες διαφορές, η παραγωγή του γιαουρτιού διέπεται από μία σειρά κοινών πρακτικών που συνοψίζονται ως εξής:

- Τυποποίηση του περιεχομένου του γάλακτος σε πρωτεΐνη και λίπος
- Ομογενοποίηση του γάλακτος στα 15-20MPa στους 50-55°C
- Θερμική επεξεργασία του γάλακτος για 30min περίπου, στους 80-85°C
- Ψύξη στην θερμοκρασία επώασης και εμβολιασμός με την καλλιέργεια εκκίνησης
- Ψύξη του προϊόντος, αφού έχει πήξει, στους 20-25°C και προσθήκη (προαιρετικά) κατάλληλων συστατικών
- Συσκευασία και αποθήκευση υπό συνθήκες ψύξης (Tamime & Robinson 1999).

Η προσθήκη αρωματικών και γεύσεων φρούτων στο γιαούρτι είναι πολύ συνηθισμένη, όμως το τελευταίο διάστημα παρατηρείται στην αγορά μία στροφή προς το παραδοσιακό γιαούρτι. Τα ευρέως χρησιμοποιούμενα πρόσθετα είναι το σιρόπι φρούτων και τα επεξεργασμένα κομμάτια φρούτων. Το ποσοστό των επεξεργασμένων φρούτων ανέρχεται στο 15% περίπου του συνολικού προϊόντος, ενώ το 50% αυτών είναι σάκχαρα. Τα σάκχαρα

αυτά, αποτελούν γλυκαντικές ουσίες και είναι είτε δισακχαρίτες (σακχαρόζη), είτε μονοσακχαρίτες (γλυκόζη). Μπορούν να προστεθούν μόνα τους ή μαζί με τα φρούτα. Γενικά προτιμώνται οι γλυκαντικές ουσίες έναντι των φρούτων, διότι ακόμα και η προσθήκη μίας πολύ μικρής ποσότητας προσδίδει αρκετά γλυκιά γεύση στο προϊόν. Τα φρούτα μπορεί να προστεθούν στο κάτω μέρος του κυπέλου πριν την προσθήκη του πήγματος ή ακόμα πριν ή και κατά την συσκευασία του γιαουρτιού. Πολλές φορές τα διάφορα πρόσθετα συστατικά τοποθετούνται σε ένα κύπελλο που βρίσκεται προσκολλημένο σε αυτό του γιαουρτιού, προκειμένου η προσθήκη τους στο προϊόν να πραγματοποιηθεί από τον καταναλωτή. Τα αρωματικά όπως και τα πρόσθετα που προσδίδουν γεύσεις στο γιαούρτι είναι συνήθως βανίλια, φράουλα, καραμέλα, μέλι κ.α. Μαζί με αυτά προστίθενται και τα συστατικά βελτίωσης του χρώματος όπως επίσης και τα σάκχαρα (σακχαρόζη, γλυκόζη ή ασπαρτάμη) (Bylund 2003).

- Τα τελευταία χρόνια υπάρχει μία τάση για γιαούρτι με χαμηλά λιπαρά. Αυτό επιτυγχάνεται με τρεις τρόπους: με αντικατάσταση των σακχάρων με άλλα συνθετικά σάκχαρα που περιέχουν λιγότερες θερμίδες, με αντικατάσταση του στερεού υπολείμματος άνευ λίπους με σταθεροποιητές και επίσης, με συνδυασμό των δύο αυτών τεχνικών (Tamime & Robinson 1999). Οι σταθεροποιητές επιπροσθέτως, μεταβάλλουν την συνοχή του γιαουρτιού, αυξάνοντας το ιξώδες και αποτρέποντας την συναίρεση. Για τον λόγο αυτό χρειάζεται προσοχή κατά την επιλογή του εκάστοτε σταθεροποιητή, καθώς μία λάθος επιλογή μπορεί να οδηγήσει σε ένα πολύ σκληρό ή πολύ ελαστικό τελικό προϊόν. Στο γιαούρτι δίχως φρούτα δεν κρίνεται απαραίτητη η χρήση σταθεροποιητών, κάτι το οποίο δεν ισχύει στην περίπτωση των γιαουρτιών με φρούτα. Ως σταθεροποιητές χρησιμοποιούνται, συχνότερα, η ζελατίνη, η πηκτίνη και το άμυλο, ενώ το ποσοστό τους στο πήγμα κυμαίνεται από 0,1-0,5% (Bylund 2003).

3.2.4 Σύσταση του Γιαουρτιού

Τα βασικά συστατικά του γιαουρτιού είναι ίδια, ανεξαρτήτως του είδους γάλακτος. Το γιαούρτι αποτελείται από λίπη, πρωτεΐνες σάκχαρα και ανόργανα άλατα. Στην βιομηχανική παραγωγή του γιαουρτιού χρησιμοποιείται, ως επί το πλείστον, αγελαδινό γάλα. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί πλήρες, μερικώς αποβουτυρωμένο ή αποβουτυρωμένο γάλα, ακόμη και κρέμα γάλακτος. Υπάρχουν ορισμένες προϋποθέσεις που θα πρέπει να πληροί το γάλα, προκειμένου να εξασφαλιστεί η ζύμωσή του και να επιτευχθεί, κατ' αυτόν τον τρόπο, η παραγωγή του γιαουρτιού. Έτσι το γάλα θα πρέπει να έχει χαμηλό αριθμό βακτηρίων, να είναι απαλλαγμένο από αντιβιοτικά και χημικά, να μην είναι ταγγισμένο, να μην περιέχει ποσότητες πρωτογάλακτος και να μην είναι επιμολυσμένο με βακτηριοφάγους (Βογδάνη, 2015).

Επιπλέον, το γιαούρτι μπορεί να έχει εμπλουτιστεί με πρόσθετα συστατικά:

- Βιταμίνες. Εάν έχει προστεθεί βιταμίνη Α τότε η ποσότητα αυτής ανά 946mL (1/4 gal) δεν θα πρέπει να ξεπερνά τα 2000 IU (International Units),ενώ στην περίπτωση που προστίθεται βιταμίνη D, η ποσότητα αυτής ανά 946mL, δεν θα πρέπει να ξεπερνά τα 400 IU.

- Άλλα γαλακτοκομικά συστατικά. Η κρέμα γάλακτος και το αποβουτυρωμένο ή μερικώς αποβουτυρωμένο γάλα είναι συστατικά που προστίθενται στο γιαούρτι μόνα τους ή σε συνδυασμό μεταξύ τους.

- Άλλα συστατικά. Συμπυκνωμένο αποβουτυρωμένο γάλα, άπαχο γάλα, βουτυρόγαλα, ορός γάλακτος, λακτόζη, λακτοαλβουμίνες, λακτοσφαιρίνες, ορός γάλακτος με μερική ή πλήρη απομάκρυνση λακτόζης και ανόργανα άλατα, προστίθενται στο γιαούρτι με στόχο την αύξηση των μη λιπαρών στερεών του τροφίμου. Επίσης προστίθενται θρεπτικές γλυκαντικές ουσίες από υδατάνθρακες όπως ζάχαρη, ιμβερτοσάκχαρο (σε μορφή πάστας ή σιροπιού), ακατέργαστη ζάχαρη, μελάσα, σιρόπι καλαμποκιού υψηλής περιεκτικότητας σε φρουκτόζη, φρουκτόζη ή σιρόπι φρουκτόζης, μαλτόζη ή σιρόπι μαλτόζης, εκχύλισμα βύνης, σιρόπι βύνης, μέλι, και ζάχαρη σφενδάμου. Τέλος, προστίθενται διάφορα συστατικά για την βελτίωση της γεύσης, του αρώματος και του χρώματος καθώς και διάφοροι σταθεροποιητές (Hui, 1993).

3.2.5 Δομή και Φυσικές ιδιότητες γιαουρτιού

Το γιαούρτι αποτελεί ένα δίκτυο συσσωματωμένων σωματιδίων καζεΐνης στο οποίο εμπεριέχονται και οι μετουσιωμένες πρωτεΐνες. Το δίκτυο αυτό περικλείει επίσης τα λιποσφαιρίδια και τον ορό. Η ύπαρξη αυτού του δικτύου δίνει την μορφή γέλης στο γιαούρτι. Το γιαούρτι αποτελεί, λοιπόν, ένα ιξωδοελαστικό υλικό που παρουσιάζει μικρή τάση διαρροής (περίπου 100 Pa). Εάν η πηκτίνη έχει απομακρυνθεί, όπως συμβαίνει στο αναμεμειγμένο γιαούρτι, τότε το προϊόν που προκύπτει, είναι ένα αρκετά παχύρευστο μη νευτωνικό ρευστό. Το γιαούρτι τύπου set και το αναμεμειγμένο έχουν σημαντικές διαφορές στην υφή (Waltra et al, 2006). Η δομή του γιαουρτιού επηρεάζει, σε σημαντικό βαθμό, τις φυσικές του ιδιότητες.

Συνεκτικότητα

Η συνεκτικότητα του γιαουρτιού προσδιορίζεται, συνήθως, με μέτρηση της βύθισης ενός αντικειμένου, συγκεκριμένου βάρους και διαστάσεων, εντός του προϊόντος, για καθορισμένο χρόνο. Το αντίστροφο του βάθους διείσδυσης εκφράζει την συνεκτικότητα. Η συνεκτικότητα δεν σχετίζεται στενά με τον συντελεστή ελαστικότητας, αλλά περισσότερο με την τάση διαρροής.

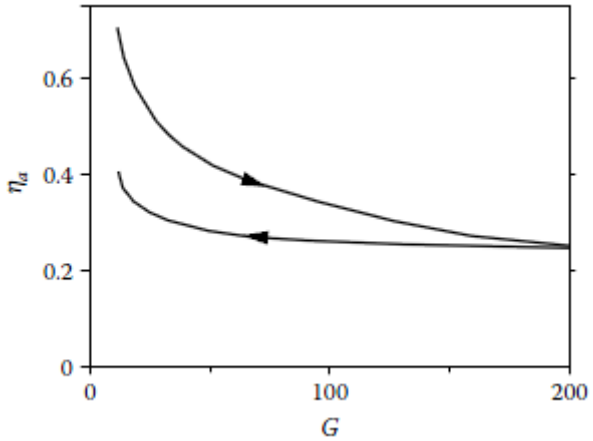
Συναίρεση

Η συναίρεση οφείλεται σε μία αναδιάταξη του δικτύου συσσωμάτων της καζεΐνης, που οδηγεί σε αύξηση των διασυνδέσεων μεταξύ των σωματιδίων. Έτσι, το δίκτυο συρρικνώνεται με αποτέλεσμα την αποβολή του υγρού (ορού) που εμπεριέχεται σε αυτό. Στο γιαούρτι η συναίρεση αποτελεί ένα ανεπιθύμητο γεγονός. Η συναίρεση εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την θερμοκρασία επώασης. Εάν το γάλα επωάζεται στους 20°C (με μεσόφιλα βακτήρια εκκίνησης), τότε δεν πραγματοποιείται συναίρεση, ενώ εάν επωάζεται στους 32°C η συναίρεση είναι δυνατή. Στην περίπτωση που η επώαση πραγματοποιηθεί στους 45°C, τότε η συναίρεση μπορεί να αποφευχθεί μόνο εάν το γάλα έχει θερμανθεί εντατικά πριν τον εμβολιασμό, εάν έχει αυξηθεί η περιεκτικότητά του σε καζεΐνη και αν η θερμοκρασία αποθήκευσης του γιαουρτιού είναι χαμηλή. Ωστόσο, εάν η συσκευασία του προϊόντος ανακινηθεί, έστω και ελαφρώς, στην φάση που το πήγμα σχηματίζεται, τότε το

πήγμα μπορεί να διαρρηχθεί και να συμβεί συναίρεση. Επίσης, συναίρεση μπορεί να προκύψει, εάν το pH κατά την επώαση πέσει κάτω από 4.

Ιξώδες αναμεμειγμένου γιαουρτιού

Το αναμεμειγμένο γιαούρτι θα πρέπει να είναι λείο και αρκετά παχύρευστο. Ένα καλό προϊόν θα πρέπει να έχει ινώδη μορφή καθώς ρέει, και να σχηματίζει μία λεπτή κλωστή. Το ιξώδες μπορεί να προσδιοριστεί με την βοήθεια ενός κυπέλλου Ford. Το κύπελλο Ford έχει ένα κωνικό κάτω άκρο, στο οποίο αφήνεται να ρέει το γιαούρτι. Ο χρόνος που απαιτείται γι' αυτό αποτελεί μέτρο του ιξώδους. Το ιξώδες εξαρτάται και από τον ρυθμό διάτμησης του προϊόντος. Αν αρχικά εφαρμοστεί υψηλός ρυθμός διάτμησης και εν συνεχεία εφαρμοστεί μία χαμηλότερη ταχύτητα διάτμησης, τότε το φαινόμενο ιξώδες διαρκώς θα μειώνεται και η ιξώδης συμπεριφορά του προϊόντος θα προσεγγίζει αυτήν των νευτωνικών ρευστών. Επίσης, το ιξώδες αυξάνεται με την αντίστοιχη αύξηση του περιεχόμενου υγρού (ορός γάλακτος) (Waltra et al, 2006).



Διάγραμμα 3.1. Φαινόμενο ιξώδες (η_a σε Pa*s) γιαουρτιού αναμεμειγμένου τύπου συναρτήσει του ρυθμού ανάδευσης (G σε s^{-1}) πριν και μετά την ανάδευση (Waltra et al, 2006)

3.2.6 Διατροφική αξία γιαουρτιού

Το γάλα, όπως έχει επισημανθεί σε προηγούμενη ενότητα, έχει πολύ μεγάλη διατροφική αξία. Η ζύμωση του γάλακτος, αν και επιφέρει αρκετές αλλαγές στην σύσταση του τελικού προϊόντος, παρόλα αυτά φαίνεται να μην επηρεάζει την διατροφική αξία του. Ο μεταβολισμός της λακτόζης που λαμβάνει χώρα κατά την ζύμωση του γάλακτος προς παραγωγή γιαουρτιού, δεν επηρεάζει την περιεχόμενη ενέργεια. Έτσι, η περιεχόμενη ενέργεια του γάλακτος και του γιαουρτιού είναι περίπου ίδιες (252KJ/100g). Στον Πίνακα 3.2 παρουσιάζονται οι τιμές κάποιον συστατικών του γιαουρτιού με υψηλή διατροφική αξία.

Οι ομάδες ανθρώπων που παρουσιάζουν δυσανεξία στην λακτόζη, φαίνεται ότι μπορούν να καταναλώνουν το γιαούρτι, λόγω της χαμηλής περιεκτικότητάς του σε αυτήν. Ένας, ακόμη, παράγοντας που συμβάλλει σε αυτό, είναι και τα βακτήρια που περιέχει το γιαούρτι, τα οποία έχουν την ικανότητα να δρουν στο έντερο. Επίσης, υπάρχει μία ακόμη εξήγηση για το γεγονός αυτό και συνίσταται στην θεωρία ότι το γιαούρτι καθυστερεί την εξάντληση των περιεχομένων του στομάχου, με αποτέλεσμα ο χρόνος επαφής των ενζύμων που

υδρολύουν την λακτόζη με το υπόστρωμα να αυξάνεται και κατ' αυτόν τον τρόπο να πραγματοποιείται η καλλίτερη πέψη της λακτόζης.

Πίνακας 3.5 Τιμές συστατικών γιαουρτιού με υψηλή διατροφική αξία, για διάφορους τύπος του (ανά 100g) (Tamime & Robinson 1999)

Συστατικά	Γιαούρτι		
	Πλήρες	Χαμηλών λιπαρών	Χαμηλών λιπαρών με φρούτα
Νερό (g)	81,9	84,9	77
Ενέργεια (Kcal)	79	56	90
Πρωτεΐνη (g)	5,7	5,1	4,1
Λιπαρά (g)	3	0,8	0,7
Υδατάνθρακες (g)	7,8	7,5	17,9
Ασβέστιο (mg)	200	190	150
Φωσφόρος (mg)	170	160	120
Νάτριο (mg)	80	83	64
Κάλιο (mg)	280	250	210
Ψευδάργυρος (mg)	0,7	0,6	0,5

Επιπροσθέτως, τα ζυμωμένα γάλατα, έχοντας όξινο χαρακτήρα, μειώνουν το pH του στομάχου. Αυτό έχει ως συνέπεια την μείωση της πιθανότητας διέλευσης παθογόνων μικροοργανισμών μέσω του στομάχου, γεγονός ιδιαιτέρως σημαντικό για ηλικιωμένους και βρέφη, των οποίων η έκκριση γαστρικών υγρών είναι γενικώς περιορισμένη. Ακόμη, έρευνες έχουν δείξει ότι τα γαλακτικά βακτήρια που εμπεριέχονται στο γιαούρτι μπορούν να σχηματίσουν αντιβιοτικές ενώσεις, αντιμετωπίζοντας έτσι τους παθογόνους μικροοργανισμούς (Walstra et al, 2006).

3.2.7 Συμβατική καλλιέργεια εκκίνησης και βακτήρια του γιαουρτιού

3.2.7.1 Παραδοσιακή μέθοδος εκκίνησης της ζύμωσης

Πολλά τρόφιμα που υφίστανται ζύμωση εξακολουθούν να παράγονται είτε με αυθόρμητη ζύμωση είτε με την διαδικασία του back-slopping. Η φυσική ζύμωση πραγματοποιείται χωρίς την χρήση καλλιέργειας εκκίνησης και είναι αποτέλεσμα των ανταγωνιστικών δραστηριοτήτων των οργανισμών, με τους οποίους έχει επιμολυνθεί το γάλα. Σε μικρής κλίμακας παραγωγές και στις αγροτικές περιοχές, στις χώρες κυρίως από οποίες ξεκίνησε η παραγωγή του γιαουρτιού, για την παραγωγή μίας νέας παρτίδας του προϊόντος προστίθεται μία ποσότητα προϊόντος από προηγούμενη παρτίδα. Η έναρξη της ζύμωσης, λοιπόν, πραγματοποιείται από τα βακτήρια που υπάρχουν στο γιαούρτι της προηγούμενης παρτίδας, τα οποία αναπτύσσονται και αναπαράγονται στο γάλα που προορίζεται για την

παραγωγή της νέας παρτίδας. Η μέθοδος αυτή ονομάζεται back-slopping. Μέσω της συνεχούς επανάληψης αυτής της πρακτικής, είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί φυσική επιλογή των καλλίτερα προσαρμοζόμενων στελεχών.

Ωστόσο, οι αυθόρμητες ζυμώσεις τροφίμων δεν είναι ούτε προβλέψιμες, ούτε εξελίξιμες, ιδιαίτερα για την παραγωγή μεγάλης κλίμακας. Συνεπώς, στην βιομηχανία προτιμώνται οι εμπορικές καλλιέργειες εκκίνησης για λόγους τυποποίησης και ασφάλειας κατά την παραγωγή του γιαουρτιού (Yildiz, 2010).

3.2.7.2 Μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται στις συμβατικές καλλιέργειες εκκίνησης

Lactobacillus delbrueckii ssp. Bulgaricus

Τα βακτήρια του γένους *Lactobacillus* χαρακτηρίζονται ως θετικά κατά Gram και έχουν ραβδοειδή μορφή. Το υποείδος *L. bulgaricus* είναι ένα από τα τρία υποείδη του *L.* delbrueckii ssp. που ανήκει στο γένος *Lactobacillus.* Τα άλλα δύο υποείδη είναι τα *Lactobacillus delbrueckii ssp. lactis (L. lactis)* και *Lactobacillus delbrueckii ssp. Delbrueckii. Τα L. bulgaricus* και *L. Lactis* είναι παρόντα στο γάλα και στα γαλακτοκομικά προϊόντα. Το γένος *Lactobacillus* χωρίζεται σε 3 ομάδες: τα υποχρεωτικά ομόζυμα, τα προαιρετικά ετερόζυμα και τα υποχρεωτικά ετερόζυμα. Τα βακτήρια *L. bulgaricus* ανήκουν στην κατηγορία των υποχρεωτικών ομόζυμων μαζί με τα *Lactobacillus acidophilus, L. lactis* και *lactobacillus helveticus.* Η βέλτιστη θερμοκρασία για την ανάπτυξη του *L. bulgaricus* είναι 45°C (Yildiz, 2010).

Streptococcus thermophilus

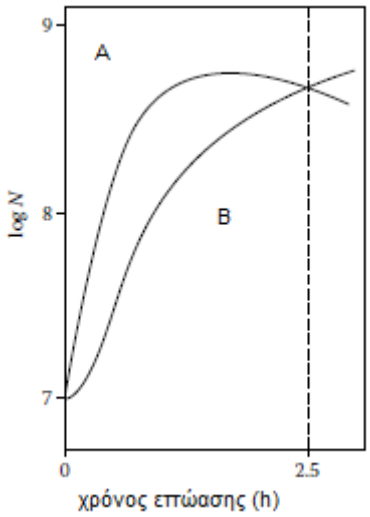
Τα βακτήρια του *S. thermophilus* ανήκουν στην κατηγορία των στρεπτόκοκκων. Υπάρχουν 5 μεγάλες ομάδες σε αυτήν την κατηγορία, που ονομάζονται ομάδα mutants, andinosus, sanguinus, mints και salivarius. Η τελευταία περιλαμβάνει τα *S. thermophilus, S. salivarius* και *Streptococcus vestibularis.* Τα βακτήρια αυτά, είναι θετικά κατά Gram, έχουν σφαιρικό σχήμα και βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 37°C. Ωστόσο, ορισμένες μεταβολικές δραστηριότητες, όπως η παραγωγή πολυσακχαρίτη ή η σύνθεση της ακεταλδεΰδης, μπορεί να λάβουν χώρα σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Η ανάπτυξή τους σταματά στους 10°C (Yildiz, 2010).

Συμβιωτική καλλιέργεια εκκίνησης

Οι εμπορικές καλλιέργειες εκκίνησης για την παραγωγή γιαουρτιού αποτελούνται, συνήθως, από συμβιωτικές καλλιέργειες του *Streptococcus thermophilus* και του *Lactobacillus delbrueckii ssp.bulgaricus.* Αυτοί οι μικροοργανισμοί εκκίνησης δίνουν την χαρακτηριστική υφή, γεύση και άρωμα στο γιαούρτι (Yildiz, 2010). Τα βακτήρια του γιαουρτιού, *Streptococcus thermophilus* και τα ραβδόμορφα *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus,* αναπτύσσονται στο γάλα καλλίτερα στην περίπτωση που και τα δύο είναι παρόντα, παρά στην περίπτωση που βρίσκονται το καθένα ξεχωριστά. Τα ραβδόμορφα πρωτεολυτικά βακτήρια επιδρούν θετικά στην ανάπτυξη των στρεπτόκκοκων, ενισχύοντας των σχηματισμό μικρών πεπτιδίων και αμινοξέων. Από την άλλη, και τα βακτήρια του γένους *Streptococcus* συμβάλλουν στην ανάπτυξη των ραβδόμορφων βακτηρίων σχηματίζοντας μυρμηκικό οξύ από το πυροσταφυλικό, υπό αναερόβιες συνθήκες, ενώ παράλληλα παράγεται CO_2. Αυτή η θετική αλληλεπίδραση στην ανάπτυξη μεταξύ των δύο

βακτηρίων έχει ως αποτέλεσμα την ταχεία παραγωγή γαλακτικού οξέος. Το γιαούρτι, μπορεί να ειπωθεί ότι παρουσιάζει μία αντιβιοτική δράση, αφού τα βακτήρια του γένους *Streptococcus* σταματούν να αναπτύσσονται μετά από μία συγκεκριμένη τιμή οξύτητας, κάτι το οποίο όμως δεν συμβαίνει με τα βακτήρια του γένους *Lactobacillus.* Η «συνεργασία» των βακτηρίων καθώς και η αντιβιοτική δράση του γιαουρτιού διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο τόσο στην ανάπτυξη των βακτηρίων του, όσο και στην ποιότητά του (Walstra et al, 2006).

Οι ιδιότητες των στελεχών που επιλέγονται να χρησιμοποιηθούν ως συμβιωτική καλλιέργεια εκκίνησης θα πρέπει να ταιριάζουν. Επιπλέον, θα πρέπει να βρίσκονται σε μεγάλους αριθμούς στο τελικό προϊόν και ως εκ τούτου και στην καλλιέργεια εκκίνησης. Η αναλογία μεταξύ των δύο ειδών εξαρτάται από τις ιδιότητες των στελεχών και συχνά είναι περίπου 1:1. Αυτή η αναλογία μπορεί να διατηρηθεί και στο τελικό προϊόν, εάν η θερμοκρασία και ο χρόνος επώασης είναι αντιστοίχως 45°C και 2h, ενώ το τελικό pH είναι στο 4,2 (Walstra et al, 2006, Yildiz, 2010). Στο παρακάτω διάγραμμα φαίνεται η ανάπτυξη των δύο στελεχών, όταν κατά την επώαση, επικρατούν οι ανωτέρω περιγραφείσες συνθήκες:



Διάγραμμα 3.2 Ανάπτυξη των βακτηρίων καλλιέργειας εκκίνησης, A = *S. thermophilus* **B=** *L. Bulgaricus* **N= αριθμός βακτ./mL (Waltra et al, 2006)**

Όπως διακρίνεται από το παραπάνω διάγραμμα, η αναλογία των στελεχών αλλάζει συνεχώς. Αρχικά, τα βακτήρια του *S. Thermorhilus* αναπτύσσονται ταχύτερα λόγω του σχηματισμού των παραγόντων που συμβάλλουν στην ανάπτυξή τους από το συμβιωτικό στέλεχος. Εν συνεχεία, η ανάπτυξη των βακτηρίων *S. thermorhilus* επιβραδύνεται λόγω του οξέος που παράγεται. Εν τω μεταξύ, τα βακτήρια του *L. Bulgaricus* αρχίζουν να αναπτύσσονται ταχύτερα εξ αιτίας των παραγόντων που συμβάλλουν σε αυτή την κατεύθυνση, όπως του CO_2 και του μυρμηκικού οξέος που παράγονται από την δράση των συμβιωτικών βακτηρίων. Αυτές οι μεταβολές έχουν ως αποτέλεσμα η αρχική αναλογία των βακτηρίων να επανακτάται (Walstra et al, 2006).

3.2.7.3 Μεταβολικά προϊόντα της δράσης των βακτηρίων κατά την ζύμωση

Τα βακτήρια που χρησιμοποιούνται ως καλλιέργειες εκκίνησης για την ζύμωση του γάλακτος προς γιαούρτι, παράγουν μεταβολικά προϊόντα που επηρεάζουν την γεύση, το άρωμα, την δομή και την σύσταση του γιαουρτιού (Walstra et al, 2006). Και τα δύο βακτήρια διαθέτουν το ένζυμο β-γαλακτοζιδάση και γι' αυτό μπορούν να υδρολύσουν την λακτόζη σε γλυκόζη και γαλακτόζη. Η γλυκόζη, με την σειρά της μεταβολίζεται σε πυροσταφυλικό οξύ, ακολουθώντας το μονοπάτι Embden-Meyerhoff, ενώ στην συνέχεια το πυροσταφυλικό μετατρέπεται σε γαλακτικό οξύ από τα κατάλληλα ένζυμα. Από την άλλη πλευρά, η γαλακτόζη μεταβολίζεται κατά ένα μέρος μόνο από τα ένζυμα του *L. Bulgaricus.* Τα περισσότερα στελέχη του *S. thermophilus* δεν περιέχουν τα κατάλληλα ένζυμα για τον μεταβολισμό της γαλακτόζης. Έτσι, στο τελικό προϊόν υπάρχει γαλακτικό οξύ και μία ποσότητα γαλακτόζης, η οποία δεν έχει υποστεί μεταβολισμό (Yildiz, 2010). Μετά το πέρας της διαδικασίας, παράγονται τα ακόλουθα κύρια προϊόντα:

- Γαλακτικό οξύ
- Ακεταλδεΰδη
- Οξικό οξύ
- Διακετύλιο
- Πολυσακχαρίτες
- Μυρμηκικό οξύ (Walstra et al, 2006, Yildiz, 2010)

Γαλακτικό οξύ

Το γαλακτικό οξύ είναι ένα μεταβολικό προϊόν που αναστέλλει την δράση άλλων μικροοργανισμών που είναι παρόντες στο ίδιο περιβάλλον, λόγω της μείωσης του pH. Η παραγωγή του εξαρτάται από τα στελέχη που χρησιμοποιούνται στην καλλιέργεια εκκίνησης. Κατά την ζύμωση του γάλακτος, η λακτόζη μεταβολίζεται σε γαλακτικό οξύ σε ποσοστό 1,2-1,4% σε pH που κυμαίνεται μεταξύ 4,2 και 4,3 περίπου. Σε αυτό το pH, οι πρωτεΐνες του γάλακτος έχουν σχηματίσει ένα σταθερό πήγμα (Walstra et al, 2006). Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το γαλακτικό οξύ προέρχεται από τον μεταβολισμό της γλυκόζης, ενώ και τα δύο βακτήρια που χρησιμοποιούνται στην καλλιέργεια εκκίνησης συμβάλλουν σε αυτό. Το μεγαλύτερο μέρος της γλυκόζης μεταβολίζεται με ομοζυμωτικό τρόπο. Τα βακτήρια του *S. thermophilus* σχηματίζουν L(+) γαλακτικό οξύ, ενώ του *L. Bulgaricus* D(-). Τα δύο αυτά ισομερή παράγονται σε σχεδόν ίδιες ποσότητες. Επίσης, παράγονται σε μικρές ποσότητες CO_2 και αιθανόλη. Η περιεκτικότητα του τελικού προϊόντος σε αιθανόλη ανέρχεται σε 10 έως 40mg/Kg. Η αιθανόλη δεν συμβάλλει στην γεύση του γιαουρτιού, καθώς το ποσοστό της στο τελικό προϊόν βρίσκεται κάτω του ορίου ανίχνευσης από τις αισθήσεις. Τέλος, η περιεκτικότητα του τελικού προϊόντος σε γαλακτικό οξύ κυμαίνεται από 0,7-0,9%w/w (Yildiz, 2010).

Ακεταλδεΰδη

Η ακεταλδεΰδη, σε ποσότητες άνω των 40mg/Kg, αποτελεί το συστατικό του γιαουρτιού με την μεγαλύτερη επίδραση στην γεύση και το άρωμά του (Walstra et al, 2006, Yildiz, 2010). Το μεγαλύτερο μέρος της ακεταλδεΰδης σχηματίζεται από τα βακτήρια του *L. Bulgaricus.*

Επίσης, σημαντικό ρόλο για τον σχηματισμό της διαδραματίζει η θρεονίνη, ένα φυσικό συστατικό του γάλακτος. Η θρεονίνη, όμως, παράγεται και από την πρωτεολυτική δράση των γαλακτοβάκιλλων (Walstra et al, 2006).

Οξικό οξύ

Το οξικό οξύ αποτελεί άλλο ένα μεταβολικό προϊόν με σημαντικές αρωματικές και γευστικές ιδιότητες. Το οξικό οξύ μπορεί να παραχθεί και από τα δύο βακτήρια που χρησιμοποιούνται στις καλλιέργειες του γιαουρτιού, ωστόσο, η ποσότητα που παράγεται από τα βακτήρια *L. Bulgaricus* είναι υψηλότερη από την αντίστοιχη των βακτηρίων *S. thermophilus* (Yildiz, 2010).

Διακετύλιο

Το διακετύλιο αποτελεί ακόμη ένα ακόμη μεταβολικό παράγωγο, σημαντικό για την γεύση και το άρωμα του γιαουρτιού. Στον σχηματισμό του συνεισφέρουν τα βακτήρια του *S. thermophilus* και σε μικρότερο βαθμό τα βακτήρια του *L. Bulgaricus.* Το κιτρικό οξύ μετατρέπεται σε διακετύλιο μέσω του μεταβολισμού του πυροσταφυλικού οξέος. Η περιεκτικότητα του γιαουρτιού σε διακετύλιο κυμαίνεται από 0,8 μέχρι 1,5mg/Kg (Walstra et al, 2006, Yildiz, 2010).

Πολυσακχαρίτες

Οι πολυσακχαρίτες που σχηματίζονται από τα βακτήρια του γιαουρτιού μπορούν να βρίσκονται είτε σε ελεύθερη μορφή, οπότε ονομάζονται εξωπολυσακχαρίτες, είτε να σχηματίζουν αλυσίδες μαζί με την γαλακτόζη και άλλα γλυκίδια. Ο ρόλος τους είναι πολύ σημαντικός, ιδιαίτερα για την συνοχή του γιαουρτιού (Walstra et al, 2006).

Μυρμηκικό οξύ

Το μυρμηκικό οξύ παράγεται από τα βακτήρια του *S. thermophilus* από το πυροσταφυλικό οξύ μέσω της λακτόζης. Η παρουσία του κατά την ζύμωση βοηθά στην ανάπτυξη του *L. Bulgaricus* (Yildiz, 2010).

3.2.8 Καλλιέργειες εκκίνησης με προβιοτικά και συμβατικά βακτήρια

Κάθε προβιοτικό στέλεχος που χρησιμοποιείται σε μία καλλιέργεια εκκίνησης μόνο του ή σε μείγμα μαζί με συμβατικά στελέχη, θα πρέπει καταρχάς να μην είναι επικίνδυνο για την δημόσια υγεία. Πέρα από αυτό, τα προβιοτικά στελέχη θα πρέπει να μπορούν να αναπτύσσονται και να αναπαράγονται, όταν βρεθούν στο κατάλληλο υπόστρωμα, να έχουν αντοχή στα διάφορα στάδια ξήρανσης και κατάψυξης και να επιβιώνουν στις συνθήκες του στομάχου και γενικά κατά την διέλευσή τους μέσω της γαστρεντερικής οδού. Για την εξασφάλιση ενός επιθυμητού αποτελέσματος στο τελικό προϊόν, βασικό ρόλο διαδραματίζουν τόσο η επιλογή των κατάλληλων στελεχών, όσο και το ποσοστό τους στην καλλιέργεια εκκίνησης. Οι δύο αυτοί παράγοντες είναι δυνατόν να επηρεάσουν τον χρόνο ζύμωσης, την υφή την γλυκύτητα και άλλα χαρακτηριστικά. Δύο πολύ σημαντικά χαρακτηριστικά, που θα πρέπει να έχουν τα χρησιμοποιούμενα προβιοτικά στελέχη, είναι η σταθερότητα και η αυξημένη διάρκεια ζωής τους, η οποία θα πρέπει να φτάνει τις 52 ημέρες (Tamine et al, 2005).

4. Προβιοτικά βακτήρια και εφαρμογές στα τρόφιμα

4.1 Γαλακτικά βακτήρια

Τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος (Lactic Acid Bacteria, LAB), ή αλλιώς γαλακτικά βακτήρια, αποτελούν μία ομάδα θετικών κατά Gram βακτηρίων που σχετίζονται μεταξύ τους μέσω κοινών μορφολογικών, μεταβολικών και φυσιολογικών χαρακτηριστικών. Τα βακτήρια αυτά είναι μη σποριογόνα, δεν παρουσιάζουν κίνηση (εκτός από ορισμένες περιπτώσεις) και έχουν την μορφή κόκκων ή ράβδων. Τα γαλακτικά βακτήρια μεταβολίζουν τα σάκχαρα και ως κύριο προϊόν αυτής της διαδικασίας ζύμωσης λαμβάνεται το γαλακτικό οξύ. Κατά συνέπεια, τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος είναι συνυφασμένα με τρόφιμα που προέρχονται από διαδικασίες ζύμωσης. Επίσης, εντοπίζονται στις υγιείς βλεννογόνες επιφάνειες των ανθρώπων και των ζώων.

Αν και δεν υπάρχουν κάποια σαφή και κοινώς αποδεκτά όρια της ομάδας, τα κυριότερα γένη, από ιστορικής άποψης, θεωρούνται τα *Lactobacillus, Leuconostoc, Pediococcus* και *Streptococcus,* ενώ οι διάφορες αναθεωρήσεις στην ταξινόμηση έχουν συμπεριλάβει και άλλα γένη όπως τα *Aerococcus, Carnobacterium, Enterecoccus, Lactococcus, Oenococcus, Tetragenococcus, Vagococcus* και *Weissella*. Η ταξινόμηση των γαλακτικών βακτηρίων σε διάφορα γένη βασίζεται, σε μεγάλο βαθμό, στην μορφολογία τους, την διαδικασία μεταβολισμού της γλυκόζης, την ανάπτυξη σε διαφορετικές θερμοκρασίες, την διαμόρφωση του παραγόμενου γαλακτικού οξέος και την ικανότητά τους να αναπτύσσονται σε υψηλές συγκεντρώσεις οξέων, βάσεων και αλάτων. Επίσης, διάφοροι άλλοι παράγοντες όπως η σύσταση των λιπαρών οξέων και τα συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος, λαμβάνονται υπόψιν στην κατάταξη. Για την αναγνώριση των γαλακτικών βακτηρίων έχουν χρησιμοποιηθεί πολλές μέθοδοι, με πιο πρόσφατες αυτές που βασίζονται σε γενετικές τεχνικές, όπως ο προσδιορισμός της αλληλουχίας 16S στο rRNA (Axelsson, 2004).

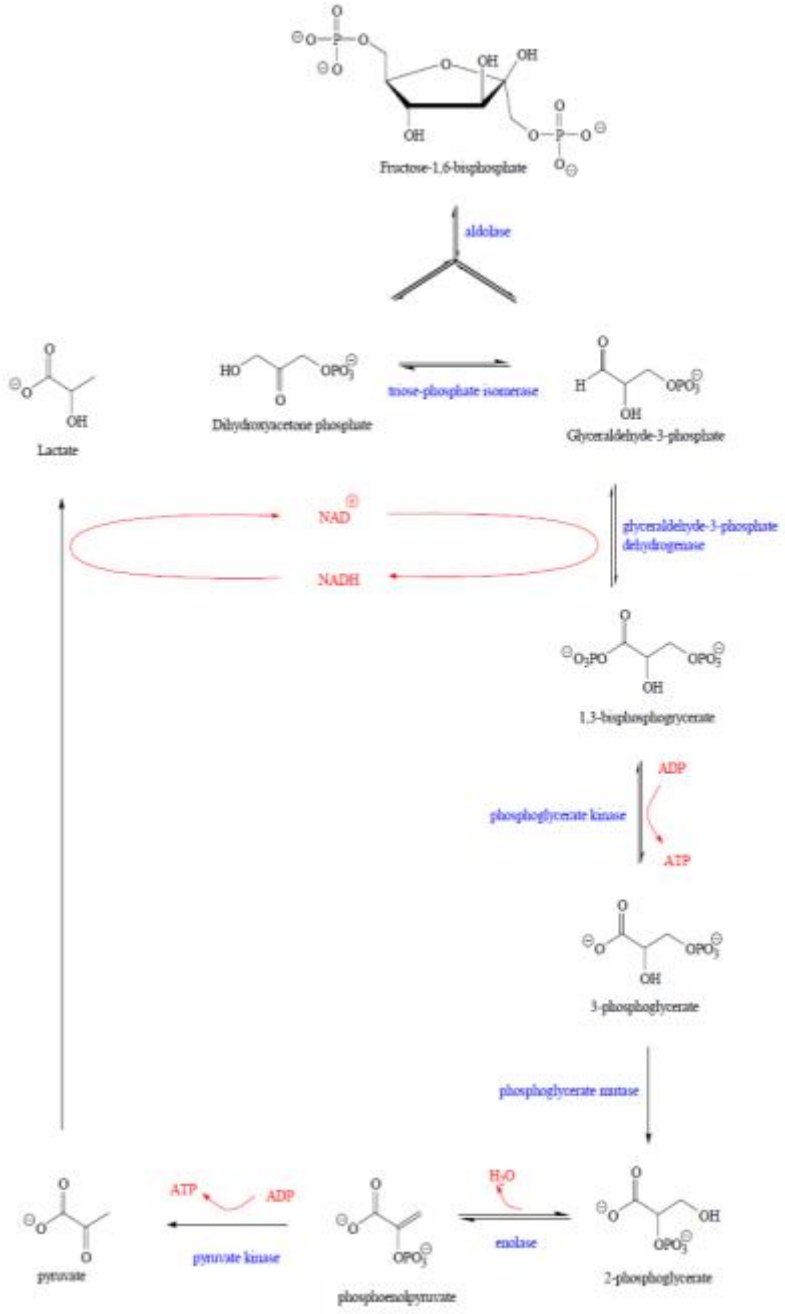
4.1.1 Κατάταξη των γαλακτικών βακτηρίων

Μια πρώτη κατάταξη των γενών των βακτηρίων γαλακτικού οξέος μπορεί να γίνει με βάση τα μορφολογικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά τους. Έτσι, διακρίνονται σε δύο επιμέρους κατηγορίες, τους βακίλους, που περιλαμβάνουν τα *Lactobacillus* και *Carnobacterium* και τους κόκκους, που περιλαμβάνουν όλα τα άλλα γένη. Μπορεί όμως να πραγματοποιηθεί και μία ακόμα κατηγοριοποίηση, ανάλογα με τον τρόπο με τον οποίο μεταβολίζουν την λακτόζη. Χωρίζονται, βάσει αυτής της λογικής, σε δύο ομάδες, τα ομοζυμωτικά και τα ετεροζυμωτικά. Τα βακτήρια που ανήκουν στην πρώτη κατηγορία μετατρέπουν τις εξόζες σχεδόν στοιχειομετρικά σε γαλακτικό οξύ, ενώ αυτά της δεύτερης μετατρέπουν τις εξόζες σε γαλακτικό οξύ, αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα (Axelsson, 2004).

4.1.2 Μεταβολισμός

Όπως ήδη αναφέρθηκε, ο μεταβολισμός των σακχάρων από τα γαλακτικά οξέα, μπορεί να γίνει με δύο τρόπους, τον ομοζυμωτικό και τον ετεροζυμωτικό. Τα ομοζυμωτικά βακτήρια μεταβολίζουν σχεδόν όλο το σύνολο των σακχάρων σε γαλακτικό οξύ. Το μεταβολικό μονοπάτι που ακολουθείται περιλαμβάνει αντιδράσεις γλυκόλυσης των εξοζών. Η 1,6-διφωσφο-φρουκτόζη διασπάται σε δύο ισο-τριόζες, την 3-φωσφογλυκεριναλδεΰδη και την

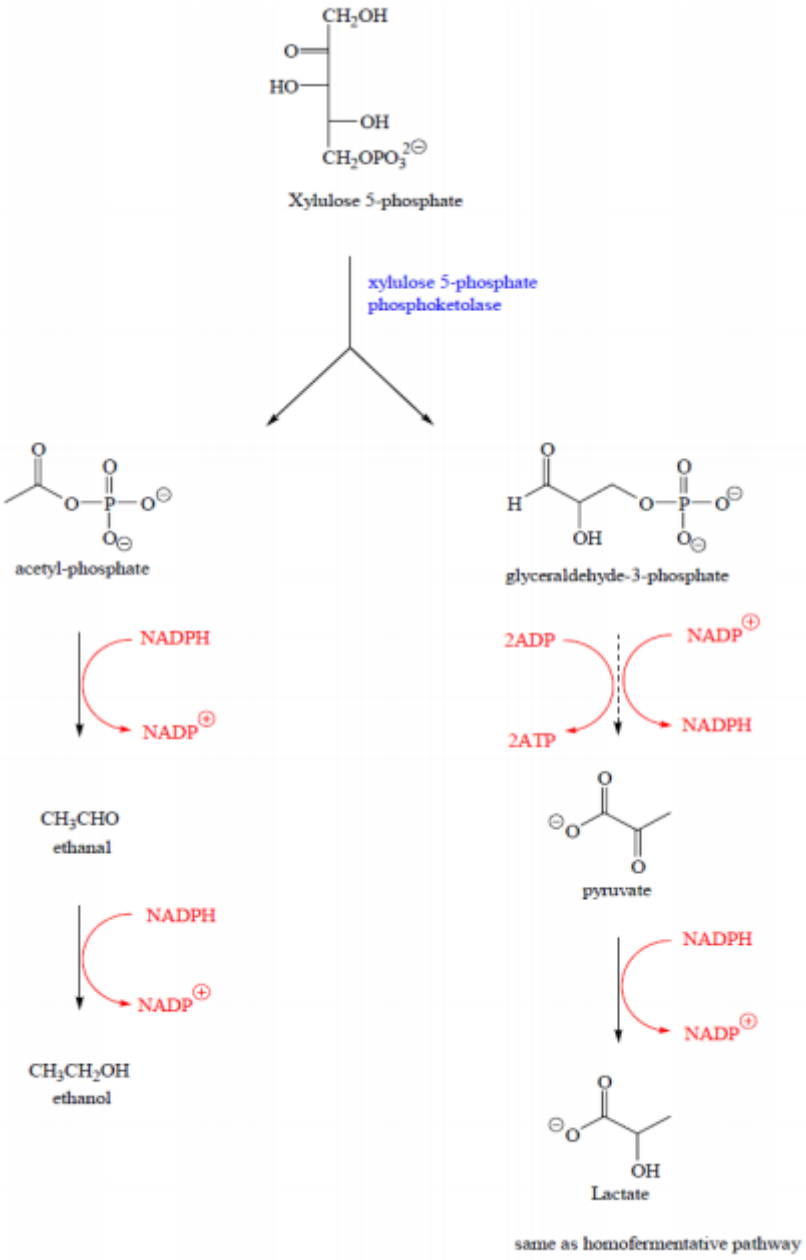
3-φωσφο-διυδροξυακετόνη. Από την πρώτη ισο-τριόζη σχηματίζεται το πυροσταφυλικό οξύ, το οποίο τελικά ανάγεται σε γαλακτικό οξύ. Στο σχήμα 4.1 που ακολουθεί παρουσιάζεται συνοπτικά το μεταβολικό μονοπάτι της ομοζυμωτικής διάσπασης.



Σχήμα 4.1 Ομοζυμωτική διάσπαση (Khailid, 2011)

Από την άλλη, τα ετεροζυμωτικά βακτήρια, στα οποία ανήκουν τα στελέχη του γένους *Leuconostoc* όπως και μερικά στελέχη του γένους *Lactobacillus,* οξειδώνουν την γλυκόζη προς 6-φωσφορογλυκονικό οξύ το οποίο εν συνεχεία αποκαρβοξυλιώνεται και έτσι, παράγεται διοξείδιο του άνθρακα και μία πεντόζη. Η ακολουθούμενη διάσπαση της πεντόζης σε 3-φωσφορο-γλυκεριναλδεΰδη και ακετυλο-φωσφορικό οξύ, γίνεται με την συμβολή μίας φωσφοκετολάσης. Έπειτα, ακολουθείται το ίδιο μονοπάτι, όπως ακριβώς και

στην περίπτωση της ομοζυμωτικής διάσπασης, για τον μεταβολισμό της 3-φωσφορο-γλυκεριναλδεΰδης σε γαλακτικό οξύ, ενώ το ακέτυλο-φωσφορικό οξύ μετατρέπεται σε αιθανόλη. Στο τέλος, λοιπόν, της ετεροζυμωτικής ζύμωσης παράγονται διοξείδιο του άνθρακα, αιθανόλη και γαλακτικό οξύ σε ίσες ποσότητες. Παρακάτω, στο σχήμα 4.2, παρουσιάζεται με συνοπτικό τρόπο η ετεροζυμωτική διάσπαση (Khailid, 2011).



Σχήμα 4.2 Ετεροζυμωτική διάσπαση (Khailid, 2011)

4.1.3 Τα κύρια γένη γαλακτικών βακτηρίων

Όπως έχει επισημανθεί, τα κυριότερα γένη που απαρτίζουν τα γαλακτικά βακτήρια είναι τα *Lactobacillus, Leuconostoc, Pediococcus* και *Streptococcus.* Ακολούθως, περιγράφονται μερικά χαρακτηριστικά αυτών των βασικών γενών:

Το γένος Lactobacillus

Το 1990 ο Moro απομόνωσε για πρώτη φορά ένα στέλεχος το οποίο χαρακτήρισε ως *Bacillus acidophilous,* ένα γενικό όνομα για τους εντερικούς γαλακτοβάκιλλους (Soccol et al, 2010).Τα βακτήρια του γένους αυτού είναι θετικά κατά Gram, μη σποριογόνα, ενώ εμφανίζονται με δύο μορφές, είτε ως ράβδοι, είτε ως κοκκοβάκιλλοι. Στις περισσότερες περιπτώσεις δεν κινούνται, αν και υπάρχουν κάποιες εξαιρέσεις. Είναι μικροαερόφιλα και για την ανάπτυξή τους απαιτούν όξινο περιβάλλον, ενώ παράλληλα αναπτύσσονται καλλίτερα σε θερμοκρασίες μεταξύ των 30-40°C. Σε ότι αφορά στην σύνθεση των βάσεων του DNA τους, έχουν ένα ποσοστό βάσεων GC μικρότερο του 54%. Τα βακτήρια του γένους αυτού, που ανήκουν στην οικογένεια *Lactobacillaceae*, ξεπερνούν τα 100. Τα πιο κοντινά γένη της ίδιας οικογενείας είναι τα *Paralactobacillus* και *Pediococcus,* ενώ η πιο κοντινή, φυλογενετικά, οικογένεια είναι αυτή των *Leuconostocaceae.* Τα βακτήρια του γένους *Lactobacillus* χρησιμοποιούνται ως προβιοτικά και ως στελέχη των καλλιεργειών εκκίνησης των ζυμωμένων τροφίμων (Giraffa et al, 2010).

Οι γαλακτοβάκιλλοι είναι κατανεμημένοι σε διάφορα σημεία του γαστρεντερικού και γενετικού συστήματος και αποτελούν σημαντικό τμήμα της μικροχλωρίδας του ανθρώπου και των ανώτερων ζώων. Η κατανομή τους επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες όπως το pH, η διαθεσιμότητα του οξυγόνου, το είδος του υποστρώματος και οι βακτηριακές αλληλεπιδράσεις. Σπανίως συνδέονται με περιπτώσεις γαστρεντερικών μολύνσεων και τα χρησιμοποιούμενα στελέχη θεωρούνται ως ασφαλή και μη παθογόνα. Επιπλέον, προάγουν την υγεία του ανθρώπινου γαστρεντερικού και ουροποιητικού συστήματος (Soccol et al, 2010).

Το γένος Leuconostoc

Τα βακτήρια αυτού του γένους είναι θετικά κατά Gram, μη σποριογόνα, ως επί το πλείστον ακίνητα, παρουσιάζουν σφαιρικό σχήμα και απαντώνται, συνήθως, σε ζεύγη ή αλυσίδες μικρού μήκους. Είναι προαιρετικά αναερόβια και μπορούν να αναπτυχθούν σε θερμοκρασίες μεταξύ 5-30°C, άρα χαρακτηρίζονται ως μεσόφιλα, ενώ η βέλτιστη θερμοκρασιακή περιοχή ανάπτυξής τους είναι μεταξύ 20-30°C (Hemme et al, 2004).

Το γένος Streptococcus

Το γένος *Streptococcus* αποτελείται από θετικά κατά Gram, μη σποριογόνα βακτήρια, που έχουν σφαιρική ή ωοειδή μορφή και σχηματίζουν αλυσίδες ή ζεύγη μεταξύ τους. Τα περισσότερα βακτήρια αυτού του γένους είναι προαιρετικά αναερόβια, ενώ αναπτύσσονται στο θερμοκρασιακό εύρος 20-42°C, με βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξη, τις περισσότερες φορές, τους 37°C. Η συγκέντρωση G+C στο DNA των βακτηρίων αυτών κυμαίνεται από 34-46% mol (Gobbetti &Corsetti, 1999). Το S. thermophilus είναι το είδος που ενδιαφέρει πιο πολύ την βιομηχανία τροφίμων, καθώς αποτελεί το μοναδικό στέλεχος που χρησιμοποιείται ως καλλιέργεια εκκίνησης για την παραγωγή γιαουρτιού και τυριού (Axelsson, 2004).

Το γένος Pediococcus

Τα βακτήρια του γένους αυτού είναι θετικά κατά Gram, ομοζυμωτικά, αποτελούν τα μόνα οξεόφιλα βακτήρια γαλακτικού οξέος και μπορούν να σχηματίσουν τετράδες. Τα βακτήρια αυτά ενδιαφέρουν ιδιαίτερα την βιομηχανία τροφίμων. Κάποια στελέχη, που ανήκουν στην κατηγορία αυτήν των, χαρακτηρίζονται ως βακτήρια μη εκκίνησης (nonstarter) και εμπλέκονται στην διαδικασία ωρίμανσης του τυριού (Axelsson, 2004).

4.2 Προβιοτικά βακτήρια

Η λέξη προβιοτικό (probiotic) έχει ελληνική ρίζα και σχετίζεται με την ζωή (Caramia & Silvi, 2011).Τα προβιοτικά βακτήρια αποτελούν ζωντανά συμπληρώματα διατροφής, τα οποία ωφελούν την υγεία των καταναλωτών, διατηρώντας ή βελτιώνοντας την εντερική μικροβιακή τους ισορροπία (Saarela et al, 2000). Σύμφωνα με την ομάδα εμπειρογνωμόνων του Οργανισμού Τροφίμων και Γεωργίας των Ηνωμένων Εθνών, προβιοτικά βακτήρια είναι οι «ζωντανοί μικροοργανισμοί οι οποίοι όταν χορηγούνται σε επαρκείς ποσότητες αποφέρουν όφελος για την υγεία του ξενιστή» (Reid, 2016). Λόγω των ευεργετικών τους επιδράσεων στην υγεία των καταναλωτών, τα προβιοτικά βακτήρια χρησιμοποιούνται ευρέως στο γιαούρτι και στα άλλα ζυμωμένα γάλατα (Saarela et al, 2000). Τα τρόφιμα που περιέχουν προβιοτικά βακτήρια ορίζονται ως «τρόφιμα που περιέχουν ζωντανούς μικροοργανισμούς, οι οποίοι πιστεύεται ότι ενισχύουν ενεργά την υγεία μέσω της βελτίωσης της υγείας του εντέρου» (Shah, 2000).

Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα βακτήρια είναι οι λακτοβάκκιλοι, όπως τα *Lactobacillus acidophilus* και τα bifidobacteria, τα οποία αναφέρονται πολλές φορές απλά ως «bifidus». Τα τρόφιμα που περιέχουν προβιοτικά και πρεβιοτικά, χαρακτηρίζονται ως λειτουργικά. Πρεβιοτικά, ονομάζονται τα συστατικά που ενισχύουν την ανάπτυξη της μικροβιακής χλωρίδας του εντέρου. Η χρήση των προβιοτικών σε καλλιέργειες εκκίνησης της ζύμωσης οδηγεί στην ανάπτυξη των επιθυμητών μικροοργανισμών, αποτρέπει την ανάπτυξη δυνητικά επιβλαβών βακτηρίων και ενισχύει τους φυσικούς μηχανισμούς άμυνας του σώματος. Τα προβιοτικά που εμπεριέχονται στα τρόφιμα θα πρέπει να πληρούν ορισμένες προϋποθέσεις, ώστε να ωφελούν την υγεία των καταναλωτών (Saarela et al, 2000). Έτσι, θα πρέπει:

- Να έχουν καλές τεχνολογικές ιδιότητες, προκειμένου να μπορούν να υφίστανται τις κατάλληλες επεξεργασίες και να ενσωματώνονται στα τρόφιμα, χωρίς να χάνουν την βιωσιμότητα ή την λειτουργικότητά τους και να μην προσδίδουν δυσάρεστες οσμές ή μη αποδεκτή υφή στο προϊόν.
- Να μην χάνουν τις ιδιότητές τους κατά την αποθήκευση.
- Να επιβιώνουν κατά την διέλευσή τους μέσω της γαστρεντερικής οδού και να φτάνουν ζωντανά στο σημείο δράσης τους.
- Να είναι σε θέση να λειτουργούν και να αναπτύσσονται στο εντερικό περιβάλλον.
- Να πραγματοποιούν μεταβολικές λειτουργίες εντός του εντέρου.
- Να ανταγωνίζονται τους παθογόνους μικροοργανισμούς με την παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών.

- Να μην προκαλούν επιβλαβείς για τον οργανισμό δράσεις.
- Να χορηγούνται σε επαρκείς δόσεις και να έχουν ευνοϊκή σχέση κόστους/αποτελεσματικότητας (Saarela et al, 2000, Caramia & Silvi, 2011).

4.2.1 Προβιοτικά βακτήρια, προέλευση και κυριότερα είδη

Η προέλευση των προβιοτικών βακτηρίων είναι πολύ σημαντική. Τα περισσότερα βακτήρια έχουν ανθρώπινη προέλευση, ενώ υπάρχουν ελάχιστες περιπτώσεις προβιοτικών στελεχών τα οποία προέρχονται από πεπτικά συστήματα ζώων ή από προϊόντα ζύμωσης. Τα προβιοτικά που θεωρούνται κατάλληλα για κατανάλωση από τον άνθρωπο είναι αυτά που ανήκουν στα γένη *Lactobacillus, Bifidobacterium, Enterecoccus, Streptococcus* και *Saccharomyces.* Από αυτά, τα πιο συχνά προοριζόμενα για ανθρώπινη χρήση, αποτελούν τα *Lactobacillus* και *Bifidobacterium.* Στον πίνακα 4.1 παρουσιάζονται ορισμένα στελέχη που χρησιμοποιούνται ως προβιοτικά, καθώς και τα οφέλη τους στον άνθρωπο, ενώ στον πίνακα 4.2 παρουσιάζονται τα εμπορικώς χρησιμοποιούμενα είδη.

Τα βακτήρια του γένους *Lactobacillus* βρίσκονται στον άνθρωπο και στα φυτά και διαδραματίζουν ένα πολύ σημαντικό ρόλο στα τρόφιμα στα οποία προστίθενται, καθώς συμβάλλουν στην αύξηση της οξύτητας, στην συντήρηση, στο άρωμα και στην υφή των ζυμωμένων τροφίμων. Οι γαλακτοβάκιλλοι έχουν περίπλοκες απαιτήσεις σε θρεπτικό υπόστρωμα, είναι προαιρετικά αερόβιοι ή αναερόβιοι και οξεόφιλοι. Τα Bifidobacteria, από την άλλη, είναι παρόντα σχεδόν παντού στο πεπτικό οικοσύστημα του ανθρώπου, ενώ νέα στελέχη συνεχώς ανιχνεύονται και απομονώνονται (Gagnon et al, 2011).

Τα βακτήρια των γενών *Bifidobacterium* και *Lactobacillus* προστίθενται σε πληθώρα λειτουργικών τροφίμων. Τα οφέλη και οι ιδιότητες κάθε προβιοτικού στελέχους είναι μοναδικά και συνεπώς, δεν μπορεί να διατυπωθεί ένας γενικός κανόνας που αφορά στα οφέλη των προβιοτικών στην ανθρώπινη υγεία (Gagnon et al, 2011, Soccol et al, 2010).

Πίνακας 4.1 Προβιοτικά στελέχη και παρατηρούμενα οφέλη (Gagnon et al, 2011)

Οργανισμός	Επίδραση	Μηχανισμός
Lactobacilli		
*L.rhamnosus*R0011	Βελτίωση του επιθηλιακού ιστού	Αναστολή του παθογόνου μικροοργανισμού που προκαλεί πτώση της διεπιθηλιακής αντίστασης
L.rhamnosus GG	Αναστολή της παθογενούς έκφρασης-Βελτίωση ανοσοποιητικού	Αναστολή της έκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούν την shiga τοξίνη-Ενεργοποίηση NF-κB και ρύθμιση της φλεγμονώδους απόκρισης μακροφάγων
*L.plantarum*299v	Βελτίωση του επιθηλιακού ιστού	Αύξηση της εξωκυτταρικής έκρισης βλεννίνης MUC3
*L.plantarum*ITM21B	Αναστολή της παθογενούς έκφρασης	Αναστολή της δραστικότητας της ουρεάσης στο Y. enterocolica
*L.johnsonii*NCC533	Έκκριση ανασταλτικών ουσιών	Παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου
*L.salivarius*UCC118	Έκκριση ανασταλτικών ουσιών	Παραγωγή βακτηριολκύνης
*L.casei*NCDO1205	Βελτίωση ανοσοποιητικού	Μείωση της απόκρισης IL-8 και αύξηση της απόκρισης IL-10
Bifidobacteria		
*B.breve*Yakult	Έκκριση ανασταλτικών ουσιών	Παραγωγή οξικού οξέος και μείωση του pH
*B.lactis*Bb-12	Βελτίωση ανοσοποιητικού	Διέγερση της slgA
Άλλα		
*E.coli*strain Nissle 1917	Βελτίωση του επιθηλιακού ιστού	Αύξηση της έκφρασης της πρωτεΐνης ΖΩ-2
VSL#3 προβιοτικό μείγμα	Βελτίωση του επιθηλιακού ιστού	Διέγερση της γονιδιακής έκφρασης β-ντιφενσίνης και hBD-2

Πίνακας 4.2 Τα πιο εμπορικώς χρησιμοποιούμενα προβιοτικά είδη (Soccol et al, 2010)

Μικροοργανισμός	Στέλεχος	Μικροοργανισμός	Στέλεχος
Bifidobacterium adolescentis	ATCC 15703	*Lactobacillus bulgaricus*	Lb12
Bifidobacterium animalis	Bb-12	*Lactobacillus casei*	Shirota
Bifidobacterium bifidum	Bb-11	*Lactobacillus casei*	Immunitas
Bifidobacterium breve	-	*Lactobacillus delbrueckii ssp. Bulgaricus*	-
Bifidobacterium essensis	-	*Lactobacillus fermentum*	RC-14
	Shirota	*Lactobacillus GG*	-
Bifidobacterium ifantis	Immunitas	*Lactobacillus helveticus*	B02
	Bb-02	*Lactobacillus lactis*	L1A
	Lafti	*Lactobacillus paracasei*	CRL 431
Bifidobacterium lactis	B94		GG
Bifidobacterium	CRL 431		GR-1
	BB536		LB21
	SBT-2928	*Lactobacillus rhamnosus*	271
Bifidobacterium longum	UCC 35624		299v
Bacillus lactis	DR10	*Lactobacillus plantarum*	Lp01
Enterococcus faecium	-		SD2112
	LA-1/LA-5	*Lactobacillus reuteri*	MM2
	NCFM	*Lactobacillus salivarius*	-
	DDS-1	*Saccharomyces boulardii*	-
Lactobacillus acidophius	SBT-2062		

4.2.2 Το γένος *Bifidobacterium*

Τα bifidobacteria αποτελούν μία σημαντική κατηγορία προβιοτικών βακτηρίων, που συχνά χρησιμοποιούνται σε γαλακτοκομικά προϊόντα. Τα βακτήρια αυτά, που απομονώθηκαν για πρώτη φορά από τον Henry Tassier, είναι θετικοί κατά Gram, αναερόβιοι μικροοργανισμοί. (Alp & Aslim, 2010, Wei, et al, 2008). Η μορφολογία τους γενικά ποικίλει. Έτσι, μπορούν να έχουν μορφή απλής ή διχαλωτής ράβδου (σε σχήμα Y) (Shah, 2006). Σε μη ευνοϊκές, γι αυτά, συνθήκες μπορεί να παρουσιάσουν διακλαδώσεις και πλειομορφία, παρά το γεγονός ότι στο φυσικό τους περιβάλλον έχουν ραβδοειδή μορφή. Επιπλέον, ανάλογα με την σύσταση του μέσου ανάπτυξής τους, ορισμένα στελέχη του γένους Bifidobacterium ενδεχομένως, εκτός από την διχαλωτή μορφή, να παρουσιάζουν μορφή σχήματος V ή X (Ballongue, 2004).

Τα bifidobacteria αποτελούν κυρίαρχο τμήμα της εντερικής χλωρίδας του ανθρώπου. Θεωρείται ότι αναστέλλουν την ανάπτυξη των κολοβακτηριδίων και των κλωστριδίων και έχουν την δυνατότητα να διορθώσουν τυχόν ανωμαλίες της εντερικής μικροχλωρίδας σε ενήλικα και ηλικιωμένα άτομα (Ventling and Mistry, 1993). Επιπροσθέτως, μπορούν να βελτιώσουν την διαδικασία υδρόλυσης της λακτόζης, έχουν αντικαρκινική δράση, μειώνουν τα επίπεδα της χοληστερόλης και ενισχύουν την απορρόφηση του ασβεστίου από τον οργανισμό (Xu, et al, 2011). Επομένως, η παρουσία bifidobacteria στο εντερικό σύστημα είναι επιθυμητή και η αύξηση του αριθμού τους επιδιωκόμενη. Η αύξηση αυτή είναι δυνατόν να επιτευχθεί μέσω γαλακτοκομικών προϊόντων, εμπλουτισμένων με bifidobacteria.

4.2.2.1 Τα είδη του γένους Bifidobacterium

Τα bifidobacteria που έχουν απομονωθεί, προέρχονται από το έντερο, την στοματική κοιλότητα, τα τρόφιμα και από άλλες «βιολογικές πηγές». Μερικά από τα είδη των bifidobacteria παρουσιάζονται στον ακόλουθο Πίνακα 4.3, στον οποίο παρατίθενται και τα συστήματα προέλευσής τους. Από αυτά, τα πλέον συνήθη είδη που απαντώνται στο γαστρεντερικό σύστημα, είναι το Bifidobacterium adolescentis, το Bifidobacterium bifidum, το Bifidobacterium breve, το *Bifidobacterium catenulatum*, το *Bifidobacterium pseudocatenulatum*, το Bifidobacterium *longum subsp. infantis* (*B. infantis*), το *Bifidobacterium longum subsp. longum* (*B. longum*), το *Bifidobacterium angulatum* και το *Bifidobacterium dentium*. (Ishizuka et al., 2012, Leivers et al., 2011).

4.2.2.2 Συνθήκες ανάπτυξης

Η βέλτιστη θερμοκρασιακή περιοχή για την ανάπτυξη των bifidobacteria κυμαίνεται μεταξύ 37 και 41°C, ενώ η ελάχιστη και η μέγιστη κυμαίνονται, αντιστοίχως, μεταξύ 25-28 ^{o}C και 43-45 ^{o}C (Shah, 2007). Τα περισσότερα στελέχη bifidobacteria που προέρχονται από τον άνθρωπο, παρουσιάζουν βέλτιστη ανάπτυξη στις θερμοκρασίες 36-38 ^{o}C, ενώ εκείνα που προέρχονται από ζώα στο θερμοκρασιακό εύρος μεταξύ 41 και 43 ^{o}C (Dong, Xin, Jian, Liu, & Ling, 2000). Για τα βακτήρια αυτά, το οξυγόνο θεωρείται ένας ιδιαίτερα τοξικός παράγοντας. Η βιωσιμότητα των bifidobacteria σε γαλακτοκομικά προϊόντα ζύμωσης εξαρτάται άμεσα από την απουσία του οξυγόνου (Li, Chen, Ruan, Zhu, & He, 2010). Υπάρχουν όμως και μερικά στελέχη των bifidobacteria τα οποία μπορούν να επιβιώσουν ακόμα και υπό συνθήκες παρουσίας οξυγόνου (Kawasaki et al, 2006). Ωστόσο, τα επίπεδα ανοχής παρουσίας οξυγόνου εξαρτώνται τόσο από το στέλεχος και την μορφολογία του,

όσο και από μέσον καλλιέργειας (Boylsto et al, 2004). Σε ότι αφορά στο pH, ως βέλτιστες τιμές για την ανάπτυξη των bifidobacteria, θεωρούνται αυτές μεταξύ 6-7. Μάλιστα για τιμές κάτω από το εύρος 4,5-5 και πάνω από 8,0-8,5, η ανάπτυξή τους καθίσταται αδύνατη (Shah, 2007). Εξαίρεση αποτελούν τα Bifidobacterium lactis και Bifidobacterium animalis, τα οποία φαίνεται ότι αναπτύσσονται ακόμη και σε pH=3.5 (Matsumoto et al, 2004). Για την προστασία και την εξασφάλιση της βιωσιμότητας των bifidobacteria στα γαλακτοκομικά προϊόντα χρησιμοποιούνται διάφορες τεχνικές, όπως ο εγκλεισμός, η οξειδωτική προσαρμογή και οι αδιαπέραστες, από το οξυγόνο, συσκευασίες των προϊόντων (Talwalkar & Kailasapathy, 2004).

4.2.2.3 Δομή του κυτταρικού τοιχώματος

Τα βακτήρια του γένους *Bifidobacteria* εμφανίζουν, στο κυτταρικό τους τοίχωμα, την τυπική δομή των θετικών κατά Gram βακτηρίων (Gomes & Malcata, 1999). Το κυτταρικό τοίχωμα αποτελείται από διάφορα συστατικά, όπως η πεπτιδογλυκάνη, διάφορα οξέα και πολυσακχαρίτες. Οι πολυσακχαρίτες του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων αυτών, αποτελούνται από γλυκόζη, γαλακτόζη και ραμνόζη (Biavati et al, 2000). Οι κυτταρικές επιφάνειες των βακτηρίων παίζουν σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδρασή τους με τα κύτταρα και τους ιστούς των ξενιστών και για τον λόγο αυτό χρήζουν ιδιαίτερης μελέτης.

4.2.2.4 Γαλακτοκομικά τρόφιμα με στελέχη του γένους Bifidobacterium

Υπάρχουν πολλά γαλακτοκομικά τρόφιμα, είτε ζυμωμένα, είτε όχι που εμπεριέχουν στελέχη του γένους *Bifidobacterium.* Σε ότι αφορά στα ζυμωμένα, τα προβιοτικά στελέχη του συγκεκριμένου γένους μπορούν να χρησιμοποιηθούν μόνα τους ή μαζί με στελέχη άλλων βακτηρίων και έτσι τα τελικά προϊόντα διαφοροποιούνται και χαρακτηρίζονται με διαφορετικές ονομασίες. Μερικά τέτοια γαλακτοκομικά τρόφιμα είναι τα εξής:

- Bifidus γιαούρτι
- Bifidus γάλα
- Acidophilus bifidus γάλα
- Bifighurt (παρόμοιο με τα δύο πρώτα προϊόντα)
- Βιο-γιαούρτι
- Παγωτό με στελέχη του *Bifidobacterium*
- Τυρί με στελέχη του *Bifidobacterium* (Santon et al, 2003, Heller, 2001, Arunachalam, 1999, Lourens & Viljoen, 2001, Akin et al, 2007, Albenzio et al, 2013).

Αναφορικά με το Bifidus γιαούρτι, αυτό παράγεται χρησιμοποιώντας καλλιέργεια εκκίνησης που περιέχει μείγμα των *B. bifidum* ή *B. longum*, *S. thermophilus* και *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* με ή χωρίς βακτήρια του γένους *L. acidophilus* (Santon et al, 2003). Το βιογιαούρτι, από την άλλη μεριά, παράγεται χρησιμοποιώντας τα στελέχη *L. acidophilus* και είδη του γένους *Bifidobacterium* μαζί με συμβατικούς μικροοργανισμούς του γιαουρτιού, όπως τον *S. thermophilus* και τον *L. bulgaricus.* Η διαδικασία που ακολουθείται σε αυτήν την περίπτωση είναι παρόμοια με αυτήν του

Πίνακας 4.3 Είδη και προέλευση Bifidobacteria

Είδη	**Προέλευση**
Bifidobacterium adolescentis	Εντερικό σύστημα ενηλίκων
Bifidobacterium animalis subsp. animalis	Ζωικά κόπρανα
Bifidobacterium animalis subsp. lactis	Γιαούρτι
Bifidobacterium asteroids	Επιγάστριο μελισσών
Bifidobacterium bifidum	Βρεφικά κόπρανα
Bifidobacterium breve	Βρεφικά κόπρανα
Bifidobacterium catenulatum	Εντερικό σύστημα ενηλίκων
Bifidobacterium coryneforme	Επιγάστριο μελισσών
Bifidobacterium cuniculi	Κόπρανα κονίκλων
Bifidobacterium gallicum	Ανθρώπινα κόπρανα
Bifidobacterium gallinarum	Εντερικό σύστημα κοτόπουλων
Bifidobacterium indicum	Επιγάστριο μελισσών
Bifidobacterium longum biotype longum	Εντερικό σύστημα ενηλίκων
Bifidobacterium longum biotype infantis	Εντερικό σύστημα βρεφών
Bifidobacterium magnum	Κόπρανα κονίκλων
Bifidobacterium merycicum	Προστόμαχος βοοειδών
Bifidobacterium minimum	Υγρά απόβλητα
Bifidobacterium pseudocatenulatum	Βρεφικά κόπρανα
Bifidobacterium pseudolongum subsp. Pseudolongum	Κόπρανα χοίρων
Bifidobacterium pseudolongum subsp. globosum	Προστόμαχος βοοειδών
Bifidobacterium psychraerophilum	Κόπρανα χοίρων
Bifidobacterium pullorum	Εντερικό σύστημα κοτόπουλων
Bifidobacterium ruminantium	Προστόμαχος βοοειδών
Bifidobacterium scardovii	Ανθρώπινο αίμα
Bifidobacterium subtile	Υγρά απόβλητα
Bifidobacterium thermacidophilum subsp. Thermacidophilum	Λύματα
Bifidobacterium thermacidophilum subsp. porcinum	Κόπρανα χοίρων
Bifidobacterium thermophilum	Κόπρανα χοίρων

παραδοσιακού γιαουρτιού με ορισμένες διαφοροποιήσεις. Το περιεχόμενο του γάλακτος σε πρωτεΐνη αυξάνεται στο 3,6-3,8% και ύστερα το γάλα θερμαίνεται στους 80-85°C για 20-30 min. Ακολούθως, το γάλα εμβολιάζεται με την συμβατική καλλιέργεια στους 45 ή 37°C και επωάζεται για 3,5 ή 9h, αντιστοίχως. Οι προβιοτικές καλλιέργειες μπορεί να προστεθούν είτε μαζί με την συμβατική, είτε μετά την ψύξη του προϊόντος και πριν την συσκευασία του (Lourens & Viljoen, 2001).

4.2.2.5 Διατροφική αξία γαλακτοκομικών προϊόντων που περιέχουν Bifidobacteria

Όπως έχει αναφερθεί ήδη στο προηγούμενο κεφάλαιο, η θρεπτική αξία των γαλακτοκομικών προϊόντων επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες, όπως τον τύπο του γάλακτος, την συμπλήρωσή του με άλλα συστατικά, τον τύπο των μικροοργανισμών και την διαδικασία παραγωγής που σχετίζεται κυρίως με το εάν το τελικό προϊόν προέρχεται από την ζύμωση ή μη του γάλακτος. Η διατροφική και γευστική ιδιότητα των ζυμωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από το είδος των μικροοργανισμών που χρησιμοποιούνται για την ζύμωση. Τα ζυμωμένα, με στελέχη του γένους *Bifidobacterium,* προϊόντα, διακρίνονται από χαμηλά επίπεδα εναπομείνασας μη υδρολυμένης λακτόζης και από υψηλό ποσοστό ελεύθερων αμινοξέων και βιταμινών, που προέρχονται από το γάλα.

Πιο αναλυτικά, μερικά bifidobacteria είναι ικανά να απελευθερώσουν πολλών ειδών πρωτεΐνες όπως θειαμίνη, πυριδοξίνη, βιταμίνη Β12 και βιταμίνη Κ. Η παραγωγή, ωστόσο, των βιταμινών φαίνεται να σχετίζεται με το συγκεκριμένο στέλεχος *B. Bifidum.* Επιπλέον, η κατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων ζύμωσης με Bifidobacteria μπορεί να αυξήσει την διαθεσιμότητα των μετάλλων στον οργανισμό, όπως του ασβεστίου, του ψευδαργύρου, του σιδήρου, του μαγγανίου, του χαλκού και του φωσφόρου μέσω της μείωσης του γαστρικού pH. Τέλος, η κατανάλωση τέτοιων προϊόντων φαίνεται να σχετίζεται με την αύξηση της πεπτικότητας των πρωτεϊνών του γάλακτος (Gomew & Malcata, 1999, Hou & Chou, 2000).

4.2.3 Ασφάλεια προβιοτικών

Τα προβιοτικά χαρακτηρίζονται, γενικά, ως ασφαλή για κατανάλωση, αφού τα κυριότερα γένη προβιοτικών προέρχονται από τον ανθρώπινο οργανισμό. Εντούτοις, υπάρχουν προβιοτικά τα οποία δεν έχουν μακρόχρονη ιστορία ασφαλούς χρήσης.

Τα προβιοτικά, όπως όλοι οι μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται στον ανθρώπινο οργανισμό μπορούν, από κλινικής άποψης, να εξελιχθούν σε παθογόνα στελέχη γι αυτόν. Ιστορικά, όμως, έχουν αναφερθεί μόνον δύο περιστατικά λοίμωξης που συνδέονται με την κατανάλωση προβιοτικών βακτηρίων. Το ένα αφορούσε σε μία φλεγμονή του ήπατος η οποία προκλήθηκε από το στέλεχος *L. Rhamnosus* GG και το άλλο σε μία περίπτωση ενδοκαρδίτιδας που σχετίζεται πάλι με τον *L. Rhamnosus.* Επίσης, είναι πιθανό οι μικροοργανισμοί που κατοικούν στο γαστρεντερικό σύστημα, υπό συγκεκριμένες συνθήκες (ασθένεια ή τραυματισμός), να εισβάλουν στο σώμα. Στο παρελθόν, έχουν αναφερθεί περιπτώσεις κατά τις οποίες καταναλωτές είχαν υποστεί λοίμωξη από γαλακτικά βακτήρια. Θα πρέπει, όμως να τονιστεί ότι οι οργανισμοί αυτών των ατόμων, τα οποία ήταν μεγάλης ηλικίας, ήταν εξασθενημένοι λόγω ασθενειών. Επιπροσθέτως, κρίνεται απαραίτητο να επισημανθεί ότι ο προστατευτικός ιστός του εντερικού συστήματος γίνεται ευάλωτος σε

περιόδους ανάρρωσης από κάποια ασθένεια, κατά την χρήση αντιβιοτικών και όταν τα άτομα πάσχουν από σοβαρά νοσήματα. Η ευαισθησία αυτή είναι υπαρκτή και στα βρέφη, διότι δεν έχουν ισχυρό ανοσοποιητικό σύστημα.

Η ταυτοποίηση και η ταξινόμηση των προβιοτικών στελεχών μπορούν να συμβάλουν στην ασφαλή χρήση τους και τούτο διότι με την ομαδοποίησή τους σε είδη, τα προβιοτικά μπορούν να ελέγχονται καλλίτερα. Όπως, ήδη πολλές φορές, έχει αναφερθεί, τα προβιοτικά ανήκουν κατά κύριο λόγο στα γένη *Bifidobacterium* και *Lactobacillus*. Η σωστή κατάταξη των γενών και των ειδών εξασφαλίζει τον αποτελεσματικό ποιοτικό έλεγχο του προϊόντος, του οποίου αποτελούν συστατικά, την ενημέρωση των καταναλωτών και την διάγνωση ή και θεραπεία των εν δυνάμει επιβλαβών περιπτώσεων. Για τον διαχωρισμό των διάφορων μικροοργανισμών έχουν αναπτυχθεί μοριακές τεχνικές και χρωματομετρικές μέθοδοι.

Ακόμη, βρίσκεται υπό επιστημονική μελέτη η εφαρμογή της γενετικής τροποποίησης και στους προβιοτικούς μικροοργανισμούς. Υπάρχουν όμως, πολλά ακόμα ερωτηματικά που αφορούν στην ασφάλεια των μεταλλαγμένων προβιοτικών, όπως γενικά συμβαίνει σε κάθε περίπτωση γενετικά τροποποιημένων μικροοργανισμών. Λόγω της καχυποψίας των καταναλωτών, ιδιαίτερα στην ευρωπαϊκή ήπειρο, είναι πολύ δύσκολο οι μεταλλαγμένοι προβιοτικοί μικροοργανισμοί να διατεθούν στην αγορά, οπότε το ζήτημα της ασφάλειας αυτού του είδους των προβιοτικών δεν απασχολεί ιδιαίτερα, τουλάχιστον επί του παρόντος.

Τέλος, υπάρχουν επιστήμονες που επισημαίνουν κάποιους επικίνδυνους παράγοντες στην χρήση γαλακτικών βακτηρίων. Έτσι, θα πρέπει να πραγματοποιηθεί ενδελεχής έλεγχος της ασφάλειας όλων των εμπορικώς χρησιμοποιούμενων στελεχών (Takeda and Okura, 2007, Morimoto et al, 2005, Kusaka et al, 1992, Asou et al, 1992).

4.2.4 Δράσεις στην υγεία και λειτουργικές ικανότητες προβιοτικών

Τα τελευταία χρόνια, οι καταναλωτές έχουν κατανοήσει την σχέση μεταξύ του τρόπου ζωής, της διατροφής και της καλής υγείας και για τον λόγο αυτό υπάρχει μία όλο και αυξανόμενη ζήτηση σε προϊόντα που πέρα από την βασική κάλυψη των διατροφικών αναγκών, ενισχύουν και την υγεία. Τα λειτουργικά τρόφιμα ικανοποιούν αυτού του είδους τις σύγχρονες ανάγκες των καταναλωτών, ενώ τα τρόφιμα με προβιοτικά αποτελούν μία κατηγορία που οι επιστημονικές έρευνες έχουν δείξει ότι συμβάλλουν στην υγεία των καταναλωτών (Soccol et al, 2010). Μερικές από τις δράσεις των προβιοτικών στην υγεία των ανθρώπων παρουσιάζονται ακολούθως:

Διάρροια

Η διάρροια προσβάλλει πολλά άτομα, ιδιαίτερα κατά την παιδική ηλικία, με την πιο κοινή αιτία τον ροταϊό. Πολλά προβιοτικά στελέχη και ειδικά αυτό του *Lactobacillus Rhamnosus GG* συνδράμουν στην πρόληψη και την καταπολέμηση της βρεφικής διάρροιας. Επίσης, πολλά στελέχη δύναται να αντιμετωπίσουν τις διαταραχές που προκαλούνται από τα αντιβιοτικά. Αμφιλεγόμενα είναι, όμως, τα στοιχεία που σχετίζονται με την συμβολή των προβιοτικών στην πρόληψη της διάρροιας των ταξιδιωτών, καθώς τα αποτελέσματα των ερευνών είναι αντικρουόμενα (Fung et al, 2011).

Δυσανεξία στην λακτόζη

Ορισμένα γαλακτικά βακτήρια, όπως τα *Lactobacillus, Bifidobacterium* και *Streptococcus,* φαίνεται πως έχουν την ικανότητα να μειώνουν τα συμπτώματα της δυσανεξίας στην λακτόζη και λόγο αυτού του γεγονότος προστίθενται στα γαλακτοκομικά με στόχο την αύξηση της υδρόλυσης της λακτόζης. Τα άτομα που πάσχουν από δυσανεξία στην λακτόζη έχουν χαμηλή συγκέντρωση του ενζύμου β-γαλακτοζιδάση. Τα βακτήρια των γαλακτοκομικών προϊόντων, απελευθερώνουν την β-γαλακτοζιδάση στο λεπτό έντερο και έτσι, υποστηρίζεται η διαδικασία πέψης της λακτόζης (Fung et al, 2011).

Σύνδρομο του ευαίσθητου εντέρου

Η πιο κοινή αιτία του συνδρόμου του ευαίσθητου εντέρου είναι ο υπερτροφισμός των βακτηρίων του λεπτού εντέρου. Τα προβιοτικά ανακουφίζουν τα άτομα που πάσχουν από το σύνδρομο του ευαίσθητου εντέρου μέσω της διατήρησης μιας υγιούς μικροχλωρίδας στο παχύ έντερο και της παραγωγής βακτηριοκυνών και λιπαρών οξέων μικρής αλυσίδας (Sort-chain fatty acids). Όλα αυτά έχουν ως αποτέλεσμα την αναστολή των παθογόνων βακτηρίων και την βελτίωση της εντερικής λειτουργίας (Fung et al, 2011).

Φλεγμονώδης νόσος του εντέρου

Τα προβιοτικά έχουν την δυνατότητα να μετριάσουν τα συμπτώματα της φλεγμονώδους νόσου του εντέρου, καθώς αναστέλλουν την ανάπτυξη των παθογόνων βακτηρίων. Αυτό το επιτυγχάνουν εκκρίνοντας βακτηριοκτόνες ενώσεις, μειώνοντας το pH εντός του εντέρου και παράγοντας λιπαρά οξέα μικρής αλυσίδας. Τα προβιοτικά, επίσης, προστατεύουν και βελτιώνουν την εντερική λειτουργία του επιθηλιακού φραγμού με την παραγωγή λιπαρών οξέων και άλλων μεταβολιτών και ενισχύουν την παραγωγή βλέννας. Τέλος επηρεάζουν την διαπερατότητα του εντέρου, καθιστώντας πιο δύσκολη την είσοδο παθογόνων μικροοργανισμών, βοηθούν στην αύξηση των επιθηλιακών κυττάρων γλυκοζυλίωσης και διεγείρουν της αυτό-επούλωση των επιθηλιακών κυττάρων (Fung et al, 2011).

Ανταγωνιστική ικανότητα

Προκειμένου να έχουν θετικό αντίκτυπο στην χλωρίδα του παχέος εντέρου, τα προβιοτικά θα πρέπει να έχουν ανταγωνιστική ικανότητα έναντι των παθογόνων μικροοργανισμών. Αυτό το καταφέρνουν με δύο τρόπους, με την παραγωγή ουσιών και με τον ανταγωνιστικό αποκλεισμό. Επίσης, οι χαμηλού μοριακού βάρους μεταβολίτες (όπως το υδρογόνο, το υπεροξείδιο, το γαλακτικό και οξικό οξύ και άλλες αρωματικές ενώσεις), αλλά και άλλοι δευτερεύοντες μεταβολίτες, παρουσιάζουν ανασταλτική δράση σε ένα ευρύ φάσμα επιβλαβών οργανισμών (Saarela et al, 2000).

Αντικαρκινική δράση

Πολλές μελέτες σχετικά με την αντικαρκινική δράση των προβιοτικών βακτηρίων, τόσο σε ανθρώπους, όσο και σε ζώα έχουν δώσει αξιόλογα αποτελέσματα. Επίσης, διάφορες έρευνες σε εργαστηριακό επίπεδο που αφορούσαν στις αντι-μεταλλαξιγενετικές ικανότητες των προβιοτικών, είχαν θετικά αποτελέσματα. Η αντικαρκινική ικανότητα των προβιοτικών ίσως αποδίδεται σε έναν συνδυασμό μηχανισμών, όπως η προφλεγμονώδης και η αντιφλεγμονώδης δράση και η έκκριση ουσιών που αναστέλλουν την καρκινογένεση. Παρά ταύτα, απαιτείται περαιτέρω έρευνα για την αξιολόγηση των μακροπρόθεσμων επιπτώσεων των προβιοτικών στην καταπολέμηση της καρκινογένεσης (Soccol et al, 2010).

Ανοσοποιητική ικανότητα

Μελέτες στον ανθρώπινο οργανισμό έχουν δείξει ότι τα προβιοτικά βακτήρια δύναται να έχουν θετικές επιδράσεις στο ανοσοποιητικό σύστημα των ξενιστών τους. Ορισμένες μελέτες έχουν επικεντρωθεί στο εντερικό ανοσοποιητικό σύστημα, ενώ άλλες στην συστημική ανοσία. Σύμφωνα με αυτές τις μελέτες, τα προβιοτικά ενισχύουν τόσο την έμφυτη, όσο και την επίκτητη ανοσία με αύξηση της δραστικότητας των κυττάρων που εξουδετερώνουν τους παθογόνους μικροοργανισμούς και της φαγοκυττάρωσης, μεταβάλλοντας το προφίλ της κυτοκίνης και αυξάνοντας το επίπεδο των ανοσοσφαιρινών (Saarela et al, 2000).

Υψηλή χοληστερόλη

Πολλές έρευνες σε διαφορετικά προβιοτικά στελέχη, έχουν δείξει ότι αυτά έχουν την ικανότητα να μειώνουν τα επίπεδα της χοληστερόλης. Υπάρχουν διάφορες θεωρίες που επιχειρούν να εξηγήσουν αυτήν την δράση. Μία πρώτη προσέγγιση είναι ότι ορισμένα προβιοτικά στελέχη έχουν την δυνατότητα να απορροφούν την χοληστερόλη. Μια άλλη υπόθεση συνδέει την μείωση της χοληστερόλης με την ικανότητα ορισμένων προβιοτικών να διασπούν ενζυματικώς τα χολικά οξέα, μέσω των υδρολασών των χολικών αλάτων. Η χοληστερόλη αποτελεί πρόδρομο μόριο για την σύνθεση χολικών αλάτων. Τα διεσπασμένα, πλέον, χολικά οξέα απορροφώνται λιγότερο από το έντερο και αυτό έχει ως συνέπεια την αποβολή τους μαζί με τα περιττώματα. Για την αντικατάσταση αυτών τον χολικών αλάτων που έχουν αποβληθεί, το ήπαρ συνθέτει νέες ποσότητες χοληστερόλης και ως εκ τούτου, αξιοποιούνται περισσότερες ποσότητες χοληστερόλης για την σύνθεση νέων χολικών αλάτων και δεν δημιουργούνται προβλήματα στον οργανισμό. Μία τρίτη θεωρία εξηγεί πως η χοληστερόλη συγκαταβυθίζεται με τα ελεύθερα χολικά οξέα και αυτό οδηγεί στην μείωσή της. Τέλος, ο συνδυασμός πρεβιοτικών και προβιοτικών, εξισορροπεί και εξυγιαίνει την μικροχλωρίδα του εντέρου. Τα παραπροϊόντα της ζύμωσης, στην οποία συμβάλλουν τα ένζυμα των προβιοτικών, ενδεχομένως να ρυθμίζουν την σύνθεση της χοληστερόλης από το ήπαρ και να οδηγούν στην μείωσή της (Mandal & Mandal, 2011).

Αντιυπερτασική δράση

Μελέτες τόσο σε πειραματόζωα, όσο και σε έναν άνθρωπο, παρείχαν ενδιαφέροντα αποτελέσματα, δείχνοντας την συσχέτιση των προβιοτικών με την μείωση της υπέρτασης. Αυτή η ικανότητα οφείλεται στα βιοενεργά πεπτίδια, τα οποία είναι αποτέλεσμα της πρωτεολυτικής δράσης των προβιοτικών βακτηρίων στην καζεΐνη και στον ορό του γάλακτος και τα οποία μπορούν να μειώσουν την πίεση του αίματος των υπερτασικών ατόμων (Mandal & Mandal, 2011).

Αντιαλλεργική δράση

Υπάρχουν μελέτες που αφορούν στο προβιοτικό στέλεχος *Lactobacillus Rhamnosus GG* και δείχνουν ότι αυτό μπορεί να διεγείρει την ανοσοδιεγερτική δράση σε ενήλικα άτομα και να ελαττώσει την έκφραση της ανοσοαντίδρασης σε άτομα που παρουσιάζουν ευαισθησία στο γάλα. Το ίδιο στέλεχος μπορεί να συμβάλλει στην αποτελεσματική πρόληψη της πρόωρης ατοπικής νόσου σε παιδιά. Επίσης, τα προβιοτικά καταπολεμούν το ατοπικό έκζεμα των βρεφών (Mandal & Mandal, 2011).

Παρά την μεγάλη πρόοδο, οι επιστημονικές γνώσεις για το εντερικό οικοσύστημα είναι ακόμη περιορισμένες. Έτσι, η επίδραση ενός προβιοτικού στελέχους στην υγεία και την εξισορρόπηση του εντέρου, δεν μπορεί να προσδιοριστεί με μεγάλη ακρίβεια (Holzapfel, 2006, Schmid et al, 2006). Κάποιες δράσεις όπως η μείωση της χοληστερόλης, δεν έχουν ακόμη σαφή επιστημονικά ερείσματα. Όμως η επίδραση ορισμένων στελεχών στην βελτίωση του ανοσοποιητικού συστήματος και στην αντιμετώπιση της διάρροιας είναι εξακριβωμένη. Επιπροσθέτως, τεκμηριωμένη θεωρείται η θετική συμβολή των προβιοτικών στην καταπολέμηση της δυσανεξίας στην λακτόζη, στην ανακούφιση των ατόμων που πάσχουν από το σύνδρομο του ευερέθιστου εντέρου και στην πρόληψη του καρκίνου του εντέρου (Holzapfel, 2006).

4.2.5 Χρήση των προβιοτικών σε καλλιέργειες εκκίνησης

Η παρασκευή του γιαουρτιού γίνεται με την χρήση καλλιεργειών εκκίνησης που περιέχουν βακτήρια *Streptococcus thermophilus* και *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus.* Οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί αναπτύσσονται αργά στο γάλα. Κατά συνέπεια, οι συμβατικοί μικροοργανισμοί εκκίνησης της ζύμωσης του γιαουρτιού προστίθενται προκειμένου να επιταχύνουν την διαδικασία ζύμωσης, ενώ οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί ενσωματώνονται ως θρεπτικά συμπληρώματα. Η ζύμωση μπορεί να γίνει με καλλιέργειες που περιέχουν μόνο *Lb. acidophilus* ή *Lb. acidophilus* και *Bifidobacterium ssp.* (γνωστές και ως AB καλλιέργειες), *Lb. acidophilus, Bifidobacterium ssp.* και *Lb. casei* (γνωστές ως ABC καλλιέργειες) ή *Lb. acidophilus, Bifidobacterium ssp.* και *S. thermophilus* (γνωστές ως ABT καλλιέργειες). Στον Πίνακα 4.4 παρουσιάζονται κάποιοι προβιοτικοί μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται στα γαλακτοκομικά προϊόντα.

Πίνακας 4.4 Χαρακτηριστικοί προβιοτικοί μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται στα γαλακτοκομικά προϊόντα και βασικά μεταβολικά τους προϊόντα (Tamine et al, 2005)

Μικροοργανισμός	Μεταβολικό προϊόν	Ζύμωση λακτόζης
Γαλακτικά βακτήρια		
Pediococcus acidilactici	DL γαλακτικό	Ομοζυμωτική
Lactobacillus acidophilus, gasseri, helveticus and johnsonii	DL γαλακτικό	Ομοζυμωτική
Lactobacillus casei, reuteri, plantarum, rhamnosus and fermantum	DL γαλακτικό	Ετεροζυμωτική
Bifidobacterium adolescentis, animalis subsp. animalis, bifidum, breve, infantis, animalis subsp. lactis and longum	L(+) γαλακτικό, οξικό	Ετεροζυμωτική
Enterococcus facecium and faecalis	L(+) γαλακτικό	Ομοζυμωτική
Ζύμες		
Saccharomyces boulardii	Αιθανόλη, CO_2	-

Τα θετικά οφέλη στην ανθρώπινη υγεία, η ικανότητα ανάπτυξης και αναπαραγωγής σε θρεπτικό μέσον, η αντοχή και η επιβίωση τόσο κατά τα στάδια κατάψυξης και ξήρανσης, όσο και κατά την διέλευσή τους από την γαστρεντερική οδό, αποτελούν παράγοντες εξαιρετικά κρίσιμοι και σημαντικοί για την χρήση ενός προβιοτικού στελέχους σε καλλιέργειες εκκίνησης. Η εκλογή και το εύρος των προβιοτικών στελεχών που χρησιμοποιούνται ως συστατικά των καλλιεργειών εκκίνησης επηρεάζουν την διάρκεια της ζύμωσης, την υφή, την γλυκύτητα, και την οξύτητα. Επίσης, σπουδαίο ρόλο διαδραματίζει η σταθερότητα των προβιοτικών καθώς και η διάρκεια ζωής τους, η οποία πρέπει να υπερβαίνει τις 52 ημέρες. Η βιωσιμότητα εξαρτάται και από την αλληλεπίδραση μεταξύ των προβιοτικών βακτηρίων και των συμβατικών βακτηρίων που χρησιμοποιούνται στην ζύμωση (Tamine et al, 2005).

4.2.6 Τα προβιοτικά τρόφιμα

Τα προβιοτικά τρόφιμα είχαν χαρακτηριστεί στο παρελθόν ως τα τρόφιμα εκείνα που «περιέχουν ζωντανούς μικροοργανισμούς και πιστεύεται ότι ενισχύουν την υγεία μέσω της εξισορρόπησης της μικροχλωρίδας του εντέρου». Ένας νεότερος ορισμός χαρακτηρίζει τα τρόφιμα αυτά ως σκευάσματα μικροβιακών κυττάρων ή συστατικών τους, με ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία του ξενιστή (Tamine et al, 2005). Υπάρχουν αρκετές μελέτες που υποστηρίζουν ότι η χρήση των προβιοτικών πιθανώς να συμβάλλει στην πρόληψη φλεγμονωδών ασθενειών, αλλεργιών, ορισμένων ειδών καρκίνου, γαστρεντερικών διαταραχών και στην μείωση της χοληστερίνης (Yamaguishi et al, 2011). Τα πρώτα προβιοτικά τρόφιμα είχαν διατεθεί στην ιαπωνική αγορά, ήδη από την δεκαετία του 1920, ενώ σήμερα κυκλοφορούν στην αγορά αρκετά σκευάσματα που περιέχουν προβιοτικά βακτήρια *Lactobacillus ssp., Bifidobacterium ssp.* και *Enterococcus ssp.*Τα προβιοτικά βακτήρια έχουν εφαρμογή σε πολλά και διαφορετικά προϊόντα. Υπάρχει ένα ευρύ φάσμα γαλακτοκομικών προϊόντων που είναι διαθέσιμα στην αγορά, όπως τα παστεριωμένα γάλατα, το παγωτό, τα ζυμωμένα γάλατα, τα τυριά και η βρεφική σκόνη γάλακτος. Η χρήση τους επεκτείνεται πέρα από τα τρόφιμα, στα φάρμακα καις τις ζωοτροφές. Τα προβιοτικά, σύμφωνα με τον ορισμό που τους έχει δοθεί, είναι ζωντανά βακτήρια τα οποία ωφελούν την υγεία του καταναλωτή. Άρα, γίνεται αντιληπτό ότι στο τελικό προϊόν θα πρέπει να υπάρχει ένας ικανοποιητικός αριθμός ζώντων προβιοτικών βακτηρίων. Βέβαια, υπάρχουν και κάποιες κατηγορίες προϊόντων, όπως τα φάρμακα, στα οποία τα προβιοτικά δεν απαιτείται να είναι ζωντανά προκειμένου να ωφελήσουν την υγεία των καταναλωτών (Tamine et al, 2005, Smit et al, 2006).

Τα προβιοτικά τρόφιμα θεωρούνται λειτουργικά τρόφιμα. Λειτουργικά τρόφιμα είναι αυτά που περιέχουν κάποιο συστατικό τα οποία προάγουν την υγεία, πέρα από την παροχή των παραδοσιακών θρεπτικών συστατικών. Γενικά ο όρος αναφέρεται σε ένα τρόφιμο που έχει υποστεί κάποια τροποποίηση για να γίνει «λειτουργικό». Ένας τρόπος να συμβεί αυτό είναι με την προσθήκη προβιοτικών (Soccol et al, 2010).

Γαλακτοκομικά προϊόντα

Τα προβιοτικά βακτήρια βρίσκουν εφαρμογή στα ζυμωμένα γαλακτοκομικά προϊόντα εδώ και πολλά χρόνια. Σε κάποιες περιπτώσεις τα γαλακτοκομικά προϊόντα που έχουν υποστεί ζύμωση είναι μονοκαλλιέργειες προβιοτικών βακτηρίων, αλλά στις περισσότερες περιπτώσεις χρησιμοποιούνται πληθυσμοί υποστήριξης για την επιτάχυνση της οξίνησης

και την επίτευξη της επιθυμητής υφής και γεύσης (Smit et al, 2006). Τα γαλακτοκομικά προϊόντα θεωρούνται ιδανικό μέσον για την μεταφορά προβιοτικών βακτηρίων στο ανθρώπινο γαστρεντερικό σύστημα (Yeo et al, 2011). Και τούτο διότι αρκετοί παράγοντες όπως η δομή του τυριού, η υψηλή περιεκτικότητα σε λίπος και η ρυθμιστικές ιδιότητες του γάλακτος υποστηρίζουν την ανάπτυξη των βακτηρίων έναντι επιβλαβών παραγόντων συμπεριλαμβανομένων των «αφιλόξενων» συνθηκών που επικρατούν στο γαστρεντερικό σύστημα (De Prisco & Mauriello, 2016). Τα προϊόντα που χρησιμοποιούνται συχνότερα είναι το τυρί, το γιαούρτι, το παγωτό καθώς και άλλα γαλακτοκομικά, όπως φαίνεται στον Πίνακα 4.5.

Πίνακας 4.5 Εμπορικά προβιοτικά προϊόντα στην ευρωπαϊκή αγορά (Soccol et al, 2010)

Τύπος προϊόντος	Προβιοτικός μικροοργανισμός
Ζυμωμένα γαλακτοκομικά μεγάλου ιξώδους	L. acidophilus, L. acidophilus LA5, L. rhamnosus (LGG, LB21 και 271), L. casei, L. casei L19, L. johnsonii, L. plantarum 299v, L. reuteri, Lactococcus lactis ssp. lactis L1A, B. bifidum, B. animalis ssp. lactis BB-12, B. animalis ssp. Animalis
Ζυμωμένα γαλακτοκομικά μικρού ιξώδους (π.χ. βουτυρόγαλα, πόσιμο γιαούρτι)	L. acidophilus, L. acidophilus LA5, L. casei (F19, 431, Immunitas, Shirota), L. rhamnosus (LGG, LB21 και 271), L. johnsonii, L. plantarum 299v, L. reuteri, L. fortis, Lactococcus lactis ssp. lactis L1A, B. bifidum, B. animalis ssp. lactis BB-12, B. animalis ssp. animalis, B. longum BB536,
Μη ζυμωμένα γαλακτοκομικά προϊόντα (π.χ. γάλα, παγωτό)	L. rhamnosus LGG, L. plantarum 299v, L. reuteri

Υπάρχουν πολλοί τρόποι για την ενσωμάτωση των προβιοτικών βακτηρίων στα προϊόντα ζύμωσης. Οι πιο κοινοί από αυτούς είναι οι ακόλουθοι:

- Προσθήκη προβιοτικών βακτηρίων μαζί με τις καλλιέργειες εκκίνησης
- Παραγωγή δύο ξεχωριστών παρτίδων, εκ των οποίων στη μία έχουν προστεθεί προβιοτικοί μικροοργανισμοί στο γάλα, ενώ στην άλλη μόνο συμβατικοί μικροοργανισμοί εκκίνησης. Μετά το πέρας της ζύμωσης, οι δύο ξεχωριστές παρτίδες αναμειγνύονται.
- Χρήση, αποκλειστικά, των προβιοτικών βακτηρίων ως καλλιέργειες εκκίνησης.

Σε κάθε περίπτωση η καλλιέργεια και οι συνθήκες παραγωγής παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο, καθώς πολλές φορές τα μεταβολικά προϊόντα που προέρχονται από την ζύμωση με προβιοτικά στελέχη, είναι πιθανό να προκαλέσουν μη αποδεκτές οσμές και γεύση στο τελικό προϊόν. Ένας, ακόμη, κρίσιμος παράγοντας είναι η συμβατότητα των προβιοτικών στελεχών με τις παραδοσιακές καλλιέργειες εκκίνησης καθώς αυτές μπορεί να παράξουν ανασταλτικά συστατικά που θα καταστρέψουν τα προβιοτικά (Soccol et al, 2010).

Από την μεγάλη ποικιλία των ζυμωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων, το γιαούρτι χρησιμοποιείται κατά κύριο λόγο ως φορέας προβιοτικών (Yeo et al, 2011). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το γιαούρτι είναι ένα προϊόν ευρείας κατανάλωσης σε παγκόσμιο επίπεδο με υψηλή διατροφική αξία. Υπάρχουν, όμως, ορισμένα εμπόδια όπως η παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου, το χαμηλό pH, η υψηλή ενεργότητα του νερού, το υψηλό ποσοστό οξυγόνου, η περιεκτικότητα σε οργανικά οξέα και οι ανταγωνιστικοί μικροοργανισμοί που αποτελούν τροχοπέδη για την επιβίωση των προβιοτικών καλλιεργειών στο γιαούρτι (De Prisco & Mauriello, 2016). Τα στάδια παραγωγής του προβιοτικού γιαουρτιού δεν διαφέρουν κατά πολύ από τα αντίστοιχα στάδια παραγωγής του «κλασικού» γιαουρτιού. Ωστόσο, το προβιοτικό γιαούρτι είναι ελαφρώς πιο γλυκό και ο χρόνος ζύμωσής ελάχιστα πιο μεγάλος σε σχέση με το «κλασικό» (Tamine et al, 2005).

Άλλα προβιοτικά τρόφιμα

Η δυνατότητα εφαρμογής των προβιοτικών στα τρόφιμα εξαρτάται, όπως ήδη έχει αναφερθεί από πολλούς παράγοντες. Σε πολλά προϊόντα, η ενεργότητα του νερού αποτελεί ιδιαιτέρως κρίσιμη παράμετρο, καθώς ευθύνεται για τον θάνατο των προβιοτικών. Κάποια τέτοια προϊόντα είναι η σοκολάτα, οι μαρμελάδες, το μέλι και οι καραμέλες. Τα προϊόντα αυτά, από την μία έχουν μικρή ενεργότητα για την ανάπτυξη ζωντανών βακτηρίων και από την άλλη υψηλή για την προσθήκη λυοφιλιωμένων βακτηρίων. Στα λυοφιλιωμένα βακτήρια, ακόμα και οι μικρές ποσότητες υγρασίας μπορεί να αποβούν μοιραίες για την δραστικότητά τους. Οι χυμοί φρούτων μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φορείς προβιοτικών βακτηρίων. Ο μόνος παράγοντας που επηρεάζει, σε αυτήν την περίπτωση, την βιωσιμότητα των προβιοτικών είναι το χαμηλό pH. Επίσης, προβιοτικά μπορούν να προστεθούν και στο κρέας. Η χρήση των προβιοτικών στην ζύμωση των προϊόντων κρέατος, πραγματοποιείται τα τελευταία χρόνια, ενώ κάποια στελέχη χρησιμοποιούνται ως προστατευτικές καλλιέργειες (Goktepe et al, 2005, Schmid et al, 2006).

3.2.7 Προβιοτικό γιαούρτι

Τεράστια αύξηση παρουσιάζει, τα τελευταία χρόνια, ο αριθμός των μικροβιακών ειδών που χρησιμοποιούνται στα γαλακτοκομικά και ιδιαίτερα στα προϊόντα που προέρχονται από την ζύμωση του γάλακτος. Το γιαούρτι αποτελεί το κατεξοχήν προϊόν ζύμωσης του γάλακτος που περιέχει προβιοτικούς μικροοργανισμούς (Tamine et al, 2005). Στο γιαούρτι, τα προβιοτικά βακτήρια που χρησιμοποιούνται είναι κυρίως στελέχη του *L. acidophilus* και είδη του *Bifidobacterium.* Αυτού του τύπου τα γιαούρτια, που εκτός από τα βακτήρια που εμπεριέχονται στις συμβατικές καλλιέργειες, περιέχουν και τα προαναφερθέντα προβιοτικά, συχνά χαρακτηρίζονται ως βιογιαούρτια (Lourens-Hattingh and Viljoen, 2001). Η αδιάλειπτη κατανάλωση 400-500g/week γιαουρτιού που περιέχει 106 βιώσιμα κύτταρα προβιοτικών/ mL, μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη, εντός του εντέρου, τουλάχιστον 108 ζωντανών προβιοτικών/day (Gurakan and Atley, 2010).

4.2.8 Βιωσιμότητα προβιοτικών μικροοργανισμών

Τα προβιοτικά βακτήρια παρουσιάζουν μεγάλη ευαισθησία και επηρεάζονται από το οξυγόνο, την θερμοκρασία και την οξύτητα του περιβάλλοντος. Για να έχει θετικές συνέπειες στην υγεία του καταναλωτή, ένα προβιοτικό θα πρέπει να πληροί μία σειρά κριτηρίων που σχετίζονται με την ασφάλεια, την σταθερότητα και την λειτουργικότητα (Soccol et al, 2010). Η βιωσιμότητα των προβιοτικών, αποτελεί μία βασική παράμετρο για

την ανάπτυξη των προβιοτικών τροφίμων, ενώ πολλοί είναι οι παράγοντες που την επηρεάζουν σε διάφορα στάδια, όπως φαίνεται στο σχήμα 4.3. Οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί θα πρέπει να είναι παρόντες στα τρόφιμα σε συγκέντρωση πάνω από 10^6 cfu/g ή αλλιώς η ημερήσια πρόσληψη θα πρέπει να είναι γύρω στα 10^9 cfu/g. Τέτοιοι αριθμοί μικροοργανισμών θεωρείται ότι μπορούν να αντισταθμίσουν τις απώλειες κατά την διέλευση από το στομάχι και το εντερικό σύστημα. Πολλοί προβιοτικοί μικροοργανισμοί αναπτύσσονται ελάχιστα στο γάλα, ενώ η βιωσιμότητά τους στο γιαούρτι είναι μικρή. Η βιωσιμότητα και η δραστικότητα των προβιοτικών είναι σημαντικά στοιχεία, καθώς αυτά πρέπει να επιβιώσουν στα τρόφιμα που προστίθενται κατά την διάρκεια ζωής τους και κατά την διέλευσή τους μέσω του στομάχου και επιπλέον να ανθίστανται στην αποδόμηση που προκαλούν τα υδρολυτικά ένζυμα και τα χολικά άλατα στο λεπτό έντερο (Tamine et al, 2005).

Σχήμα 4.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την σταθερότητα των προβιοτικών σε διάφορα στάδια (Soccol et al, 2010)

Η βιωσιμότητα των προβιοτικών βακτηρίων στο γιαούρτι εξαρτάται από τα στελέχη που χρησιμοποιούνται, την αλληλεπίδραση μεταξύ των ειδών, την παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου λόγω της μεταβολικής δράσης των ενζύμων και από την οξύτητα του τελιού προϊόντος. Επίσης εξαρτάται από την διαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών, τα συστατικά που προωθούν ή ανακόπτουν την ανάπτυξη, την συγκέντρωση των σακχάρων, το διαλυμένο οξυγόνο και την διαπερατότητα της συσκευασίας από το οξυγόνο, την ποσότητα εμβολιασμού και τον χρόνο ζύμωσης (Tamine et al, 2005). Επιπροσθέτως, ο συνδυασμός πρεβιοτικών και προβιοτικών έχει ευνοϊκή επίδραση στην σταθερότητα των δεύτερων. Ο όρος πρεβιοτικά χρησιμοποιείται για να δηλώσει τα μη εύπεπτα συστατικά τροφίμων. Τέλος, διάφορες άλλες τεχνικές, όπως αυτή του εγκλεισμού, έχουν αναπτυχθεί για την

ενίσχυση της σταθερότητας και της βιωσιμότητας των προβιοτικών προβιοτικών (R. Fondén et al, 2003, María Chávarri et al, 2010, S. Sathyabama et al, 2013).

4.2.9 Τεχνικές ενίσχυσης της βιωσιμότητας των προβιοτικών

Έχουν εφαρμοστεί διάφορες τεχνικές, τόσο σε βιομηχανικό, όσο και σε εργαστηριακό επίπεδο, με σκοπό την ενίσχυση και την αύξηση της βιωσιμότητας των προβιοτικών βακτηρίων.

4.2.9.1 Επιλογή των βακτηριακών στελεχών

Τα προβιοτικά στελέχη, για να παρουσιάζουν κάποιο ενδιαφέρον, θα πρέπει καταρχάς, να έχουν την δυνατότητα να επιβιώνουν και να παραμένουν μεταβολικά ενεργά εντός του γαστρεντερικού σωλήνα. Προφανώς όμως, τα στελέχη αυτά θα πρέπει, επιπλέον, να διατηρούν τα επιθυμητά χαρακτηριστικά τους κατά την παραγωγή και την αποθήκευση του προϊόντος. Υπάρχουν πολλά στελέχη του *Lb. acidophilus* και του *Bifidobacteria ssp.* τα οποία αδυνατούν να επιβιώσουν εντός του γαστρεντερικού συστήματος, ενώ άλλα στελέχη του *Lb. aacidophilus* και ορισμένα του *B. longum* και *Bifidobacterium pseudolongum,* παρουσιάζουν αντοχή στα οξέα και τα χολικά άλατα. Συνεπώς, η εκλογή των κατάλληλων στελεχών είναι αναγκαία για την επίτευξη της προσδοκώμενης βιωσιμότητας (Tamine et al, 2005, Yeo et al, 2011).

4.2.9.2 Το είδος της συσκευασίας

Τα βακτήρια του γένους Bifidobacterium, όπως ήδη έχει αναφερθεί προηγουμένως, είναι αναερόβια, ενώ ο *Lb. acidophilus* είναι μικροαερόφιλος. Το οξυγόνο, το οποίο μπορεί εύκολα να διαλυθεί στο γάλα, αποτελεί συνεπώς ένα ανασταλτικό στοιχείο της βιωσιμότητας των αναερόβιων στελεχών. Έτσι, η χρήση κατάλληλης, ανάλογα με την περίπτωση, συσκευασίας μπορεί να προφυλάξει τα περιεχόμενα στο τρόφιμο, προβιοτικά βακτήρια (Tamine et al, 2005).

4.2.9.3 Ζύμωση δύο σταδίων

Όπως έχει επισημανθεί, τα συμβατικά βακτήρια του γιαουρτιού αναπτύσσονται πιο γρήγορα σε σχέση με τα προβιοτικά. Επομένως, μία τεχνική που στηρίζεται στο γεγονός αυτό, είναι η μέθοδος της ζύμωσης δύο σταδίων. Σύμφωνα με αυτήν την μέθοδο, η ζύμωση ξεκινά με τους προβιοτικούς μικροοργανισμούς, ενώ μετά από 2h περίπου προστίθενται και οι συμβατικοί μικροοργανισμοί. Με αυτόν τον τρόπο, τα προβιοτικά βακτήρια μπορούν να προσαρμοστούν εύκολα στο περιβάλλον και να αναπτυχθούν καλλίτερα (Tamine et al, 2005).

4.2.9.4 Εμπλουτισμός με θρεπτικά συστατικά

Ο εμπλουτισμός με θρεπτικά συστατικά που ενισχύουν την ανάπτυξη, έχει αποδειχθεί ότι αυξάνει την βιωσιμότητα των προβιοτικών βακτηρίων που έχουν προστεθεί σε γαλακτοκομικά προϊόντα (Yeo et al, 2011).

4.2.9.5 Ποσότητα εμβολιασμού

Η ποσότητα των μικροοργανισμών της καλλιέργειας εκκίνησης που εμβολιάζονται στο γάλα, μπορεί να επηρεάσει τον πληθυσμό των προβιοτικών βακτηρίων. Μια μικρή ποσότητα εμβολιασμού, μπορεί να οδηγήσει σε υπερβολική οξίνιση του γιαουρτιού και αυτό να έχει αρνητικές συνέπειες στην επιβίωση των προβιοτικών βακτηρίων.

Επιπροσθέτως, το pH τερματισμού της ζύμωσης είναι κρίσιμος παράγοντας για την επιβίωση των μικροοργανισμών καθώς τελικό pH κάτω του 4,4 ενδεχομένως να προκαλέσει μείωση των μικροοργανισμών (Tamine et al, 2005).

4.2.9.6 Εγκλεισμός προβιοτικών βακτηρίων

Για την εξασφάλιση της βιωσιμότητας των προβιοτικών βακτηρίων κατά τα διάφορα στάδια της ανάπτυξής τους εντός του τροφίμου, αλλά και κατά την διάρκεια των διαφόρων διεργασιών στις οποίες αυτό υπόκειται, έχει αναπτυχθεί η τεχνική του εγκλεισμού των προβιοτικών κυττάρων (Yeo et al, 2011). Ως εγκλεισμός ή μικροεγκλεισμός, ορίζεται η τεχνολογία συσκευασίας στερεών, υγρών ή αερίων υλικών σε μικροσκοπικές σφραγισμένες κάψουλες, οι οποίες μπορούν να απελευθερώσουν το περιεχόμενό τους σε ελεγχόμενες τιμές, υπό την επίδραση ειδικών συνθηκών. Μία κάψουλα αποτελείται από ημιπερατή σφαιρική, λεπτή και συνάμα ισχυρή μεμβράνη που περιβάλλει έναν στερεό, υγρό ή αέριο πυρήνα, του οποίου η διάμετρος κυμαίνεται από μερικά μm, έως 1mm. Ο εγκλεισμός μπορεί να γίνει σε υδροκολλοειδή σφαιρίδια που παγιδεύουν και ακινητοποιούν τα ένζυμα εντός τους και παράλληλα παρέχουν προστασία από το περιβάλλον. Υπάρχουν επίσης και άλλες τεχνικές όπως η ξήρανση με ψεκασμό, η ξήρανση με κατάψυξη και η ξήρανση ρευστοποιημένης κλίνης. Με τις τεχνικές αυτές τα εγκλεισμένα κύτταρα έχουν την μορφή συμπυκνωμένης σκόνης. Τα μέσα εγκλεισμού που χρησιμοποιούνται στις παραπάνω τεχνικές είναι πολλά, ενώ το πιο διαδεδομένο μέσον είναι το αλγινικό νάτριο (Soccol et al, 2010). Στο επόμενο κεφάλαιο θα παρουσιαστούν αναλυτικά οι διάφορες μέθοδοι εγκλεισμού καθώς και τα εγκλειστικά μέσα που χρησιμοποιούνται για την προστασία των προβιοτικών μικροοργανισμών.

5. Εγκλεισμός προβιοτικών βακτηρίων

Προκειμένου τα προβιοτικά βακτήρια να έχουν θετικές επιδράσεις στην υγεία των καταναλωτών, θα πρέπει, όπως έχει ήδη τονιστεί, να επιβιώνουν και να είναι σε θέση να αναπαράγονται μόλις βρεθούν στον ξενιστή. Έτσι, τα προβιοτικά θα πρέπει να είναι μεταβολικά σταθερά και ενεργά στο προϊόν, να είναι ικανά να επιβιώνουν κατά το πέρασμά τους μέσω του στομάχου και να φτάνουν τελικώς στο έντερο σε μεγάλες ποσότητες. Υπάρχουν αρκετοί παράγοντες που επηρεάζουν την βιωσιμότητά τους και έχουν αναπτυχθεί διάφορες τεχνικές με σκοπό την αύξηση της αντοχής των ευαίσθητων αυτών μικροοργανισμών ενάντια στις δυσμενείς, γι' αυτά συνθήκες. Μία από της πιο αποτελεσματικές μεθόδους, που εκπληρώνουν αυτόν τον σκοπό, αποτελεί η τεχνική του εγκλεισμού (Martin et al, 2015).

Ο εγκλεισμός αποτελεί μία φυσικοχημική ή μηχανική διαδικασία που έχει ως αποτέλεσμα τον εγκλωβισμό μίας ουσίας σ' ένα υλικό. Με τον τρόπο αυτόν, σχηματίζονται σωματίδια με διάμετρο που κυμαίνεται από μερικά nm έως μερικά χιλιοστά. Ο εγκλεισμός βιοενεργών συστατικών βρίσκει πολλές εφαρμογές στην βιομηχανία τροφίμων, όπως για τον έλεγχο της οξειδωτικής αντίδρασης, την εξουδετέρωση δυσάρεστων οσμών, γεύσεων και χρωμάτων, για την ενίσχυση της σταθερότητας, την αύξηση του χρόνου ζωής και την ελεγχόμενη απελευθέρωση (Burgain et al, 2011).

Ο εγκλεισμός των προβιοτικών χρησιμοποιείται για να προστατεύσει τα κύτταρα από τις καταστρεπτικές, πολλές φορές γι' αυτά, συνθήκες του περιβάλλοντος, από τους διάφορους τραυματισμούς και τις όποιες απώλειες, ενώ οδηγεί στην απελευθέρωση των κατάλληλων μικροοργανισμών στο έντερο (Burgain et al, 2011, Martin et al, 2015). Η εγκλεισμένη ουσία ονομάζεται πυρήνας, ενώ το υλικό εντός του οποίου εγκλείεται ονομάζεται περίβλημα ή κέλυφος. Το υλικό που χρησιμοποιείται για τον εγκλεισμό θα πρέπει να ανήκει στην κατηγορία των τροφίμων, εάν χρησιμοποιείται στην βιομηχανία τροφίμων, ενώ προφανώς είναι απαραίτητο να έχει την ικανότητα να προφυλάσσει τον πυρήνα (Burgain et al, 2011).

Υπάρχουν πολλές τεχνικές εγκλεισμού, όπως η ξήρανση με κατάψυξη (freeze drying), η ξήρανση με ψεκασμό (spray drying) και η ξήρανση ρευστοποιημένης κλίνης. Με αυτές τις μεθόδους οι καλλιέργειες αποκτούν την μορφή συμπυκνωμένης σκόνης (Krasaekoop et al, 2003). Η μορφή αυτή διευκολύνει την αποθήκευση και την χρήση τους και βοηθά να κατανέμονται τα προβιοτικά βακτήρια, ομοιόμορφα σε όλο το προϊόν (Martin et al, 2015). Με άλλες τεχνικές, τα βακτήρια εγκλείονται εντός σφαιριδίων. Αυτού του τύπου οι μέθοδοι διακρίνονται σε δύο κατηγορίες, τις τεχνικές εξώθησης ή σταγονιδίου και τα συστήματα γαλακτώματος ή δύο φάσεων (Yamaguishi et al, 2011).

5.1 Η τεχνολογία του εγκλεισμού

Στην βιομηχανία τροφίμων, η διεργασία του εγκλεισμού μπορεί να εφαρμοστεί σε πολλές περιπτώσεις. Η τεχνική αυτή αποτελεί χρήσιμο εργαλείο για την μεταφορά βιοενεργών μορίων (π.χ. αντιοξειδωτικών, μετάλλων, βιταμινών, φυτοστερολών, λιπαρών οξέων) και ζωντανών κυττάρων (π.χ. προβιοτικών) στα τρόφιμα (Wandrey et al, 2010, de Vos et al, 2010). Ως επί το πλείστον, τα βιοενεργά συστατικά είναι πλήρως καλυμμένα και προστατευμένα από ένα φυσικό υλικό (de Vos et al, 2010). Τα μόρια που εγκλείονται στις κάψουλες είναι, είτε στερεά, είτε υγρά, είτε αέρια και μπορούν να απελευθερώνονται σε

ελεγχόμενους ρυθμούς για μεγάλες χρονικές περιόδους, κάτω από ειδικές συνθήκες (Martin et al, 2015). Τα σωματίδια που προκύπτουν από τον εγκλεισμό έχουν διάμετρο από λίγα nm μέχρι μερικά mm (Wandrey et al, 2010).

Αρχικά, η τεχνολογία του εγκλεισμού εφαρμόστηκε στην βιοτεχνολογία προκειμένου να καταστήσει τις παραγωγικές διεργασίες πιο αποτελεσματικές, καθώς το περίβλημα ή μήτρα γύρω από τα εγκλεισμένα κύτταρα επέτρεπε τον διαχωρισμό τους από τα παράγωγα και τους μεταβολίτες τους. Η τεχνολογία αυτή που αναπτύχθηκε πριν από 60 περίπου, χρόνια, βρίσκει εφαρμογή και στον φαρμακευτικό τομέα, αλλά ενδιαφέρει ιδιαιτέρως και την βιομηχανία τροφίμων. Τα τελευταία χρόνια υπάρχει μία τάση για προσθήκη στα τρόφιμα λειτουργικών ενώσεων. Οι ενώσεις αυτές, συνήθως, είναι πολύ ευαίσθητες και επηρεάζονται άμεσα από το περιβάλλον, τις διεργασίες επεξεργασίας των τροφίμων και τις συνθήκες που επικρατούν στο γαστρεντερικό σύστημα. Ο εγκλεισμός, λοιπόν, μπορεί να προστατέψει αποτελεσματικά αυτά τα ευαίσθητα συστατικά. Επιπροσθέτως, η τεχνολογία του εγκλεισμού έχει στόχο την διατήρηση της σταθερότητας των βιοδραστικών ενώσεων κατά τα στάδια της επεξεργασίας και της αποθήκευσης καθώς και την αποφυγή ανεπιθύμητων αλληλεπιδράσεων των βιοδραστικών ενώσεων με τα τρόφιμα. Οι βιοενεργές ενώσεις, όπως τα προβιοτικά, μπορούν να αδρανοποιηθούν πολύ εύκολα. Συνεπώς, μέσω του εγκλεισμού τους, είναι δυνατόν να επωφεληθούν, διότι αυτός θα επιφέρει επιβράδυνση των διεργασιών υποβάθμισης (π.χ. οξείδωση ή υδρόλυση) και μείωση της υποβάθμισης, έως ότου οι ενώσεις αυτές να βρεθούν στην επιθυμητή περιοχή δράσης τους (Lesmes & McClements, 2009). Γίνεται, επομένως, αντιληπτό ότι με την τεχνολογία του εγκλεισμού τα βιοενεργά συστατικά μπορούν να διατηρήσουν την λειτουργικότητά τους και να προστατευτούν από το περιβάλλον τους.

Σε ότι αφορά στα προβιοτικά, το όφελος για την υγεία του καταναλωτή εξαρτάται, όπως πολλές φορές έχει ήδη διατυπωθεί, από την ικανότητά τους να επιβιώνουν και να πολλαπλασιάζονται εντός του ξενιστή. Στα γαλακτοκομικά προϊόντα, όπως στο γιαούρτι, η βιωσιμότητα των προβιοτικών είναι χαμηλή λόγω των συγκεντρώσεων γαλακτικού και οξικού οξέος, του χαμηλού pH, της παρουσίας υπεροξειδίου του υδρογόνου και της περιεκτικότητας σε οξυγόνο. Ο εγκλεισμός αυξάνει την βιωσιμότητα των προβιοτικών τόσο όταν αυτά βρίσκονται στο γιαούρτι, όσο και μετά την κατανάλωσή τους όταν εισέρχονται στον γαστρεντερικό σωλήνα. Η βιωσιμότητα των εγκλεισμένων προβιοτικών κυττάρων είναι συνάρτηση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των καψουλών. Ο τύπος και η συγκέντρωση του υλικού επικάλυψης, το μέγεθος του σωματιδίου, ο αρχικός αριθμός των κυττάρων και τα βακτηριακά στελέχη αποτελούν βασικές παραμέτρους που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα του εγκλεισμού. Στην περίπτωση των προβιοτικών, εκτός από την προστασία τους από τις δυσμενείς συνθήκες του περιβάλλοντος, στόχος είναι και η απελευθέρωσή τους στο έντερο ενώ ακόμη είναι ενεργά. Έτσι, μετά τον εγκλεισμό, τα σωματίδια που προκύπτουν θα πρέπει να διατηρούν την ακεραιότητά και τις ιδιότητές τους και να επιτρέπουν την προοδευτική απελευθέρωση των κυττάρων στο έντερο (Burgain et al, 2011).

Η τεχνολογία του εγκλεισμού περιλαμβάνει 3 στάδια. Στο πρώτο στάδιο, το βιοενεργό συστατικό ενσωματώνεται σε μία μήτρα που μπορεί να είναι στερεή ή υγρή. Στην περίπτωση που ο πυρήνας είναι υγρός, η ενσωμάτωση θα προκύψει με την διάλυση ή την

διασπορά του στην μήτρα, ενώ αν ο πυρήνας είναι στερεός η ενσωμάτωση θα γίνει με την συσσωμάτωση ή την προσρόφησή του από την μήτρα. Στο δεύτερο στάδιο, πραγματοποιείται διασπορά της μήτρας, εάν αυτή είναι υγρή ή κονιορτοποίηση, στην περίπτωση που η μήτρα είναι στερεή. Τέλος, το τελευταίο στάδιο περιλαμβάνει την σταθεροποίηση του προκύπτοντος σωματιδίου με χημική (πολυμερισμός), φυσικοχημική (ζελατινοποίηση) ή φυσική (εξάτμιση, στερεοποίηση, συνένωση) διαδικασία (Burgain et al, 2011).

5.2 Τεχνικές εγκλεισμού

Υπάρχουν πολλές διαθέσιμες μέθοδοι για τον εγκλεισμό συστατικών που χρησιμοποιούνται στα τρόφιμα, μερικές από τις οποίες παρατίθενται ακολούθως:

Ξήρανση με ψεκασμό (spray drying)

Η τεχνική της ξήρανσης με ψεκασμό είναι μία από τις παλαιότερες και τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους εγκλεισμού στην βιομηχανία τροφίμων. Είναι μία ευέλικτη, αδιάλειπτη και οικονομική μέθοδος. Με την τεχνική αυτή δημιουργούνται σωματίδια καλής ποιότητας με διάμετρο μικρότερη των 40μm. Το γεγονός αυτό είναι πολύ σημαντικό για την αισθητική και την υφή του τελικού προϊόντος. Παρά την εκτεταμένη εφαρμογή της στην βιομηχανία τροφίμων, υπάρχουν ορισμένα προβλήματα που σχετίζονται μαζί της όπως ο περίπλοκος εξοπλισμός, οι μη ομοιόμορφες συνθήκες στον θάλαμο ξήρανσης και η δυσκολία ελέγχου του μεγέθους των σωματιδίων (Milanovic et al, 2010).

Γαλακτοματωποίηση (emulsification)

Μία εξίσου συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος είναι η τεχνική της γαλακτωματοποίησης. Χρησιμοποιείται στην περίπτωση εγκλεισμού υδατοδιαλυτών δραστικών συστατικών. Υπάρχουν δύο δυνατοί συνδυασμοί γαλακτωμάτων: γαλακτώματα νερού/ελαίου ή ελαίου νερού και διπλά γαλακτώματα νερού/ελαίου/νερού. Ένα γαλάκτωμα ελαίου σε νερό μπορεί να ξηρανθεί με διάφορες τεχνικές όπως με ξήρανση με ψεκασμό ή ξήρανση με κατάψυξη και με αυτόν τον τρόπο δημιουργείται μία σκόνη. Τα ξηραμένα αυτά γαλακτώματα είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν σε πληθώρα τροφίμων (Zuidam & Shimoni, 2010).

Ψεκασμός με ψύξη (spray-chilling ή spray-cooling)

Αυτές οι μέθοδοι χρησιμοποιούνται για τον εγκλεισμό των δραστικών στοιχείων με λιπίδια. Οι δύο μέθοδοι, spray-chilling και spray-cooling, διαφέρουν μεταξύ τους ως προς το σημείο τήξης των λιπιδίων. Στην πρώτη περίπτωση το σημείο τήξης κυμαίνεται μεταξύ 34-42°C, ενώ στην δεύτερη η αντίστοιχη θερμοκρασία κυμαίνεται σε υψηλότερες τιμές. Τα βιοενεργά συστατικά που εγκλείονται με αυτήν την μέθοδο μπορεί να είναι, είτε ξηρά μόρια, είτε υδατικά γαλακτώματα (Zuidam & Shimoni, 2010, Gouin, 2004).

Ατομοποίηση

Ατομοποίηση ονομάζεται ο σχηματισμός ενός αερολύματος ή εναιωρήματος μικρών σταγονιδίων στην αέρια φάση. Στην περίπτωση που η μέθοδος χρησιμοποιείται για την επίτευξη εγκλεισμού, η αέρια φάση είναι συνήθως ατμοσφαιρικός αέρας, ενώ τα σταγονίδια αποτελούν μείγμα του υλικού του κελύφους και του υλικού του πυρήνα. Η διαδικασία που ακολουθείται σε αυτήν την μέθοδο αποτελεί θεμέλιο λίθο για άλλες πιο εξειδικευμένες τεχνικές εγκλεισμού. Το μείγμα που υφίσταται ατομοποίηση μπορεί να αποτελείται από το υλικό του πυρήνα, το οποίο είναι διεσπαρμένο σε έναν διαλύτη, που

στην περίπτωση των τροφίμων είναι νερό, και ένα διαλυμένο ή εναιωρημένο υλικό κελύφους της κάψουλας (Gaonkar et al, 2014).

Επικάλυψη ρευστοποιημένης κλίνης (fluid bed coating)

Η μέθοδος της επικάλυψης ρευστοποιημένης κλίνης είναι μία τεχνική εγκλεισμού κατά την οποία επικαλύπτονται σωματίδια σκόνης, είτε με μία ασυνεχή διεργασία σε παρτίδες, είτε με μία συνεχή διεργασία. Τα σωματίδια σκόνης εξαναγκάζονται σε αιώρηση υπό την επίδραση ενός ρεύματος αέρα, σε συγκεκριμένη θερμοκρασία και εν συνεχεία ψεκάζονται με ένα υλικό επικάλυψης. Το υλικό αυτό μπορεί να είναι ένα υδατικό διάλυμα κυτταρίνης, παραγώγων αμύλου, πρωτεϊνών και άλλων κόμμεων (Dewettinck & Hughebaert, 1999).

Η τεχνική electrospinning

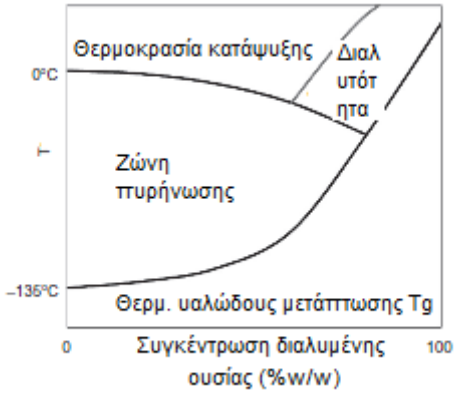
Η μέθοδος αυτή αποτελεί συνδυασμό δύο άλλων τεχνικών, του ηλεκτροψεκασμού (electrospray) και της νηματοποίησης (spinning). Σε αυτήν την τεχνική, εφαρμόζεται ένα υψηλό ηλεκτρικό πεδίο σε ένα ρευστό τήγμα ή διάλυμα, που βγαίνει από την άκρη μίας μήτρας και το οποίο δρα ως ηλεκτρόδιο. Έτσι, τα σταγονίδια παραμορφώνονται και δημιουργείται ένας φορτισμένος πίδακας που εκτινάσσεται από την μία άκρη προς το αντίθετο ηλεκτρόδιο και με αυτόν τον τρόπο σχηματίζονται συνεχείς ίνες (Martin et al, 2015).

5.3 Η τεχνική της ξήρανσης με κατάψυξη (freeze drying)

Η τεχνική της ξήρανσης με κατάψυξη αποτελεί παραδοσιακά, μία κοινή μέθοδο για την διατήρηση ευαίσθητων βιολογικών ουσιών, όπως είναι τα ζωντανά βακτήρια και οι πρωτεΐνες, όπου άλλες μέθοδοι, όπως η ξήρανση με ψεκασμό (spray drying), η ξήρανση ρευστοποιημένης κλίνης με ψεκασμό (fluidized spray drying) και η αποξήρανση (desiccation), δεν είναι κατάλληλες (Gaonkar et al, 2014). Η τεχνική αυτή, χρησιμοποιείτο επί δεκαετίες για την παραγωγή προβιοτικών σκονών, αλλά μόνον τα τελευταία χρόνια αξιοποιείται ως τεχνική εγκλεισμού. Η διαδικασία βασίζεται στην εξάχνωση του διαλύτη, η οποία συμβαίνει σε 3 φάσεις: κατά την κατάψυξη, κατά την πρωτογενή και κατά την δευτερογενή ξήρανση. Συνήθως, τα κύτταρα πρώτα καταψύχονται και έπειτα ξηραίνονται με εξάχνωση υπό συνθήκες υψηλού κενού. Δεδομένου ότι οι συνθήκες επεξεργασίας με την τεχνική της ξήρανσης με κατάψυξη είναι ηπιότερες, εν συγκρίσει με άλλες τεχνικές, όπως της ξήρανσης με ψεκασμό, επιτυγχάνονται υψηλότερα ποσοστά επιβίωσης των προβιοτικών.

Ωστόσο, είναι γεγονός ότι η κατάψυξη μπορεί να προκαλέσει βλάβη στην κυτταρική μεμβράνη λόγω του σχηματισμού κρυστάλλων (Martin et al, 2015). Δυσκολίες προκύπτουν επίσης από την θερμοκρασία κατάψυξης κατά την ξήρανση, η οποία κυμαίνεται από τους -30 έως τους -80°C. Επομένως, η θερμοκρασία βρίσκεται χαμηλότερα από το σημείο πήξης του νερού, αλλά πολύ υψηλότερο από την θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης ενός τυπικού κατεψυγμένου διαλύματος. Ως εκ τούτου, η ξήρανση με κατάψυξη σε αυτό το θερμοκρασιακό εύρος, θα έχει ως αποτέλεσμα την ανεπιθύμητη κρυστάλλωση των μορίων του νερού (διάγραμμα 5.1) (Gaonkar et al, 2014). Για την αποφυγή αυτών των μη επιθυμητών αποτελεσμάτων και την προστασία της βιωσιμότητας των προβιοτικών, προστίθενται διάφορα κρυοπροστατευτικά συστατικά όπως η πρωτεΐνη ορού γάλακτος, η γλυκόζη, η μαλτοδεξτρίνη η τρεχαλόζη και άλλες ουσίες. Ο μηχανισμός με τον οποίο δρουν

τα κρυοπροστατευτικά έγκειται στην συσσώρευσή τους εντός των κυττάρων, με αποτέλεσμα να μειώνεται η ωσμωτική πίεση μεταξύ του εσωτερικού και του εξωτερικού κυτταρικού περιβάλλοντος (Martin et al, 2015).



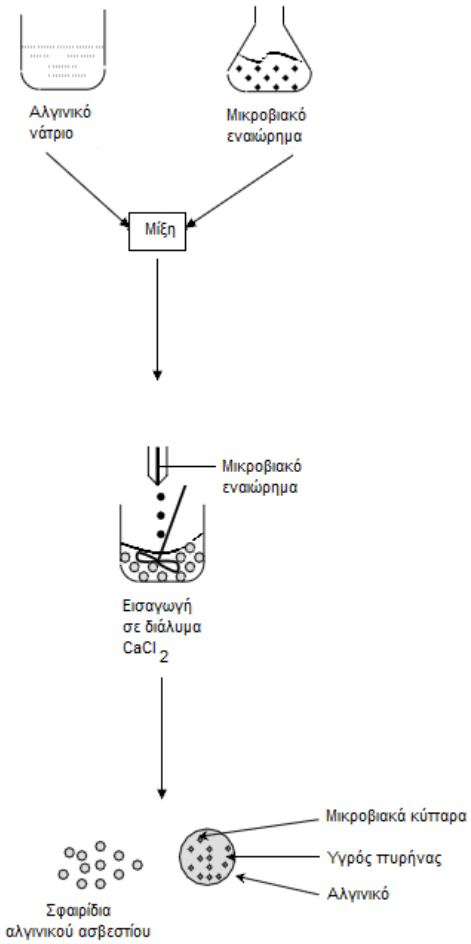
Διάγραμμα 5.1 Τυπικό διάγραμμα ισορροπίας φάσεων διαλύματος (Gaonkar et al, 2014)

5.4 Η τεχνική της εξώθησης

Η τεχνική της εξώθησης είναι η πιο παλιά και η πιο κοινή πρακτική δημιουργίας καψουλών με υδροκολλοειδή (Krasaekoopt et al, 2003). Η τεχνική αυτή είναι πολύ δημοφιλής καθώς έχει μικρό κόστος και είναι σχετικά απλή, ενώ παράλληλα εξασφαλίζει υψηλή βιωσιμότητα των κυττάρων (Martin et al, 2015). Μάλιστα το ποσοστό επιβίωσης των προβιοτικών βακτηρίων που εγκλείονται με την τεχνική αυτή, κυμαίνεται από 80-95%. Με την τεχνική αυτή παρασκευάζεται ένα διάλυμα υδροκολλοειδούς στο οποίο προστίθενται οι μικροοργανισμοί. Το κυτταρικό εναιώρημα, ακολούθως εξωθείται μέσω μίας σύριγγας και εισάγεται στάγδην σε ρυθμιστικό διάλυμα. Η διαδικασία που ακολουθείται παρουσιάζεται στο διάγραμμα 5.2 (Krasaekoopt et al, 2003).

Για την παρασκευή του υδροκολλοειδούς διαλύματος χρησιμοποιείται, κατά κόρον, αλγινικό, το οποίο είναι ένας γραμμικός ετεροπολυσακχαρίτης του D-μαννουρονικού και του L-γουλουρονικού οξέος, που εξάγεται από διάφορα είδη φυκιών. Ανάλογα με την πηγή προέλευσης, η σύνθεση και η ακολουθία του L-γουλουρονικού και του D-μαννουρονικού οξέος ποικίλουν, ενώ οι λειτουργικές ιδιότητες του αλγινικού σχετίζονται στενά με την αλληλουχία των δύο αυτών οξέων. Δισθενή κατιόντα, όπως του Ca^{2+}, συνδέονται κατά προτίμηση με το πολυμερές του L-γουλουρονικού οξέος. Από την άλλη, το μήκος του πολυμερούς του D-μαννουρονικού οξέος, αποτελεί το κύριο δομικό χαρακτηριστικό που επηρεάζει τον σχηματισμό του πηκτώματος.

Το ρυθμιστικό διάλυμα, εντός του οποίου ρίπτεται στάγδην το μείγμα του κυτταρικού εναιωρήματος με το αλγινικό νάτριο (συνήθως), περιέχει ένα πολυσθενές κατιόν, το οποίο στις περισσότερες περιπτώσεις είναι το Ca^{2+} στην μορφή του $CaCl_2$. Τα σταγονίδια σχηματίζουν, ακαριαία μόλις βρεθούν στο ρυθμιστικό διάλυμα, σφαίρες που έχουν την υφή γέλης. Τα κύτταρα των προβιοτικών βακτηρίων παγιδεύονται εντός ενός εγκάρσιου, τρισδιάστατου, ιοντικού αλγινικού πλέγματος (Krasaekoopt et al, 2003).



Διάγραμμα 5.2 Διάγραμμα ροής της τεχνικής εγκλεισμού με εξώθηση (τροποποίηση από Krasaekoopt et al, 2003)

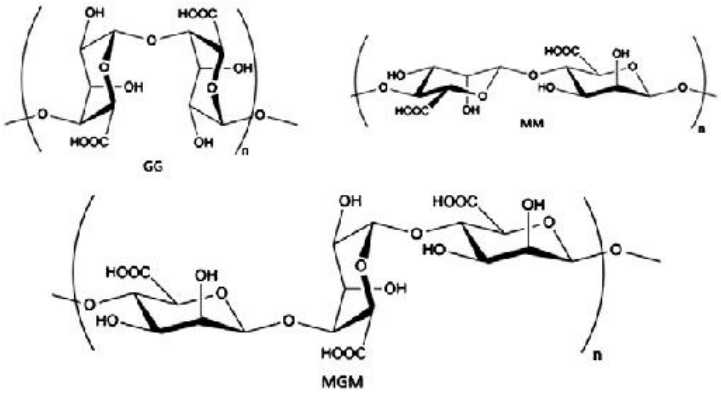
Η συγκέντρωση του υδροκολλοειδούς διαλύματος σε αλγινικό νάτριο, κυμαίνεται από 0,6-3%w/v, ενώ του ρυθμιστικού διαλύματος σε $CaCl_2$, από 0,05-1,5M (Wandrey et al, 2010). Η διάμετρος των σφαιριδίων που προκύπτουν με την μέθοδο της εξώθησης είναι περίπου 2-3mm. Το μέγεθος και η σφαιρικότητά τους εξαρτάται από το ιξώδες του διαλύματος του αλγινικού νατρίου και την απόσταση μεταξύ της σύριγγας και του ρυθμιστικού διαλύματος. Όσο η συγκέντρωση και κατά συνέπεια και το ιξώδες του διαλύματος αλγινικού νατρίου αυξάνεται, το μέγεθος των σφαιριδίων μειώνεται. Η διάμετρος του στομίου της σύριγγας επηρεάζει, με την σειρά της, το μέγεθος των σταγονιδίων και επακόλουθα και των σχηματιζόμενων σφαιριδίων. Τέλος, η σύνθεση του αλγινικού αποτελεί παράγοντα που ασκεί σημαντική επιρροή στο μέγεθος των σφαιριδίων, καθώς από αλγινικό «χαμηλού γουλουρονικού» προκύπτουν μικρές σφαίρες (Krasaekoopt et al, 2003).

5.5 Μέσα εγκλεισμού

Η επιλογή του μέσου εγκλεισμού είναι πολύ σημαντική για την αποτελεσματικότητα του εγκλεισμού και την σταθερότητα της κάψουλας. Τα κριτήρια επιλογής του κατάλληλου μέσου σχετίζονται με τις φυσικοχημικές ιδιότητες, τόσο της προς εγκλεισμό ουσίας όσο και του ίδιου του μέσου, την συμβατότητα μεταξύ του πυρήνα και του περιβλήματος (για παράδειγμα το εγκλειστικό μέσον θα πρέπει να είναι αδιάλυτο και να μην αντιδρά με τον πυρήνα) το κόστος και το επιθυμητό μέγεθος της κάψουλας. Επιπλέον, παράγοντες όπως η τοξικότητα, η αποτελεσματικότητα του εγκλεισμού, η σταθερότητα, ο βαθμός προστασίας του πυρήνα και οι ιδιότητες της επιφάνειας των μικροσωματιδίων, θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψιν. Τα εγκλειστικά μέσα, ανάλογα με τον πυρήνα και το επιδιωκόμενο αποτέλεσμα στο τελικό προϊόν, μπορεί να είναι είτε φυσικά, είτα συνθετικά. Επειδή, πολλές φορές ένα μόνον μέσον δεν έχει όλα τα απαραίτητα χαρακτηριστικά, μπορεί να δημιουργηθεί ένα εγκλειστικό μείγμα περισσότερων υλικών. Ο εγκλεισμός των συστατικών των τροφίμων επιτυγχάνεται συχνά με την χρήση βιοπολυμερών που προέρχονται από διαφορετικές πηγές. Κάποια από αυτά ανήκουν στην κατηγορία των υδατανθράκων, όπως το άμυλο, η μαλτοδεξτρίνη, η δεξτρόζη, άλλα είναι κόμμεα όπως το αραβικό κόμμι, η καραγενάνη, ενώ άλλα μπορεί να είναι πρωτεΐνες όπως το γάλα, ο ορός γάλακτος και η ζελατίνη (Estevinho et al, 2013).

5.5.1 Αλγινικό νάτριο

Το αλγινικό είναι ένας πολυσακχαρίτης που εξάγεται από διάφορα είδη φυκιών και αποτελείται, όπως έχει αναφερθεί και πιο πάνω, από D-μαννουρονικό και L-γουλουρονικό οξύ. Ανάλογα με την προέλευσή του, το αλγινικό παρουσιάζει διαφορές τόσο στην πολυμερή του αλυσίδα, όσο και στις λειτουργικές ιδιότητές του (Rowley et al, 1999). Το αλγινικό χρησιμοποιείται εκτενώς ως μέσον εγκλεισμού των κυττάρων, ενώ προτιμάται ιδιαιτέρως στην περίπτωση των προβιοτικών λόγω της απλότητάς του, της βιοσυμβατότητας, του χαμηλού κόστους και της μη τοξικότητάς του (Krasaekoopt et al,2003).



Εικόνα 5.1 Δομή του αλγινικού (Cook et al, 2012)

Ωστόσο, υπάρχουν ορισμένα μειονεκτήματα, όπως η ευαισθησία των αλγινικών σφαιριδίων στο όξινο περιβάλλον (Mortazavian et al, 2008). Το γεγονός αυτό είναι πού σημαντικό, καθώς εντός του στομάχου επικρατούν εξαιρετικά όξινες συνθήκες. Επίσης, ένα ακόμη μειονέκτημα αποτελεί η αδυναμία κλιμάκωσης της διαδικασίας εγκλεισμού με αλγινικό.

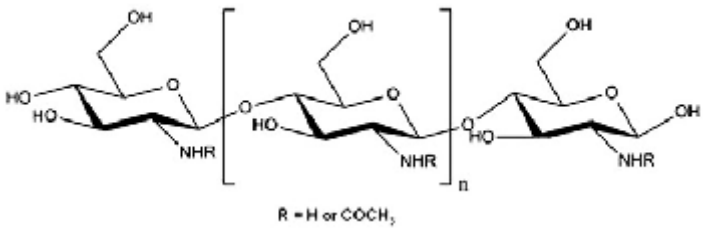
Επιπροσθέτως, τα μικροσωματίδια που λαμβάνονται είναι αρκετά πορώδη, οπότε υπάρχει αστοχία στην εξολοκλήρου προστασία των κυττάρων από το περιβάλλον. Όλα, όμως, αυτά τα ελαττώματα μπορούν να αντισταθμιστούν με την ανάμειξη του αλγινικού με πολυμερείς ενώσεις, με την επικάλυψη των καψουλών από μία άλλη ένωση ή με την χρήση διάφορων πρόσθετων συστατικών (Krasaekoopt et al, 2003).

5.5.2 κ-καραγενάνη

Η κ-καραγενάνη είναι ένα φυσικό πολυμερές που χρησιμοποιείται συχνά στην βιομηχανία τροφίμων (Krasaekoopt et al, 2003). Για την διάλυση ενός διαλύματος κ-καραγενάνης, συγκέντρωσης 2-5%, απαιτούνται υψηλές θερμοκρασίες που κυμαίνονται από 60 έως 80°C. Στην συνέχεια, τα προς εγκλεισμό κύτταρα προστίθενται στο διάλυμα, αφού αυτό πρώτα ψυχθεί σε θερμοκρασία 40-45°C (Anal & Singh, 2007). Ο εγκλεισμός των προβιοτικών κυττάρων με κ-καραγενάνη αυξάνει την βιωσιμότητά τους, αλλά τα παραγόμενα σφαιρίδια είναι εύθραυστα και δεν είναι σε θέση να αντέχουν ισχυρές καταπονήσεις (Krasaekoopt et al, 2003).

5.5.3 Χιτοζάνη

Η χιτοζάνη είναι ένας γραμμικός πολυσακχαρίτης που αποτελείται από μονάδες που αποτελείται από μονάδες γλυκοζαμίνης οι οποίες μπορούν να πολυμεριστούν. Η χιτοζάνη είναι διαλυτή στο νερό σε pH μικρότερο του 6 (Krasaekoopt et al, 2003). Η χιτοζάνη δεν συμβάλει αρκετά στην αύξηση της βιωσιμότητας των κυττάρων που εγκλείονται σε αυτήν και γι' αυτόν τον λόγο χρησιμοποιείται κυρίως ως επικαλυπτικό των σφαιριδίων και όχι τόσο ως εγκλειστικό μέσον (Mortazavian et al, 2008). Η επικάλυψη σφαιριδίων αλγινικού με χιτοζάνη φαίνεται πως παρέχει υψηλή προστασία στα εγκλεισμένα προβιοτικά βακτήρια, έναντι των όξινων συνθηκών που επικρατούν στο γαστρεντερικό σύστημα. Επομένως, αν τα βακτήρια εγκλειστούν με αλγινικό και εν συνεχεία, τα σφαιρίδια επικαλυφθούν με χιτοζάνη, τότε μπορεί να εξασφαλιστεί ότι αυτά θα επιβιώσουν και θα είναι ενεργά όταν φθάσουν στον τελικό προορισμό-στόχο, που δεν είναι άλλος από το ανθρώπινο έντερο (Chavarri et al, 2010). Τέλος, φαίνεται πως η χιτοζάνη παρουσιάζει κάποια ανασταλτικά χαρακτηριστικά για ορισμένα γαλακτικά βακτήρια (Krasaekoopt et al, 2003).



Εικόνα 5.2 Χημική δομή χιτοζάνης (Cook et al, 2012)

5.5.4 Μαλτοδεξτρίνη

Η μαλτοδεξτρίνη, όπως και οι υπόλοιποι υδατάνθρακες θεωρούνται καλά μέσα εγκλεισμού επειδή εμφανίζουν χαμηλό ιξώδες ακόμα και σε υψηλές συγκεντρώσεις και έχουν καλή διαλυτότητα (Yoshii et al, 2001). Επιπλέον, η μαλτοδεξτρίνη έχει την ικανότητα να δημιουργεί πήγματα, οπότε συμβάλλει στην σταθεροποίηση του εγκλειστικού διαλύματος (Dalgleish, 2006). Όμως, οι υδατάνθρακες παρουσιάζουν έλλειψη διεπιφανειακών ιδιοτήτων, οι οποίες είναι απαραίτητες για την καλλίτερη απόδοση του εγκλεισμού και γι'

αυτόν τον λόγο συνδυάζονται με άλλα μέσα, όπως οι πρωτεΐνες και τα κόμμεα (Yoshii et al, 2001).

5.5.5 Πηκτίνη

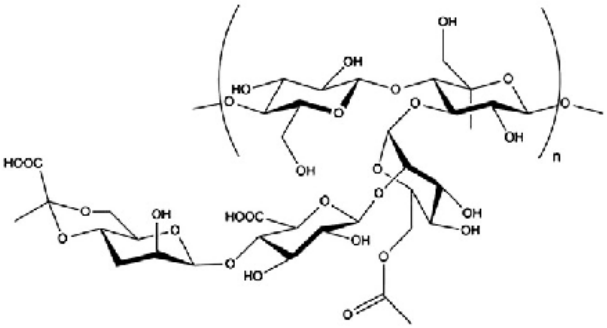
Η πηκτίνη είναι ένα πρόσθετο των τροφίμων που είναι γνωστό για την ικανότητά της να δημιουργεί σταθερά πηκτώματα. Η πηκτίνη έχει πολύπλοκη δομή η οποία επηρεάζεται από την πηγή προέλευσής της και τον τρόπο εξαγωγής της. Βασικά, πρόκειται για ένα πολυμερές a-d-γαλακτουρονικού οξέος με δεσμούς 1-4. Στην αλυσίδα του πολυμερούς παρεμβάλλονται τμήματα ραμνογαλακτουρονάνης (Leroux et al, 2003). Μία περιεκτικότητα της τάξης του 1-2% σε πηκτίνη, θεωρείται επαρκής για την παρασκευή ενός σταθερού εγκλειστικού διαλύματος (Drusch et al, 2006).

5.5.6 Άμυλο

Το άμυλο είναι ένας πολυσακχαρίτης που περιέχει έναν μεγάλο αριθμό μονάδων γλυκόζης που συνδέονται μεταξύ τους με γλυκοζιδικούς δεσμούς. Το άμυλο αποτελείται κυρίως από αμυλόζη, ένα γραμμικό πολυμερές της D- γλυκοπυρανόζης που συνδέεται με 1-4 γλυκοζιδικό δεσμό. Το άμυλο τύπου Resistant δεν αφομοιώνεται από τα παγκρεατικά ένζυμα (αμυλάσες) του λεπτού εντέρου. Για τον λόγο αυτόν, το άμυλο αυτού του τύπου μπορεί να φτάσει στο παχύ έντερο όπου και θα υποστεί υδρόλυση. Το χαρακτηριστικό αυτό του αμύλου το καθιστά ένα πολύ καλό μέσον εγκλεισμού, καθώς τα προβιοτικά βακτήρια μπορούν να περάσουν, προστατευμένα από αυτό, όλο το υπόλοιπο γαστρεντερικό σύστημα και τελικά να απελευθερωθούν στο παχύ έντερο. Επιπροσθέτως, η επιφάνεια του αμύλου είναι ιδανική για την προσκόλληση των προβιοτικών βακτηρίων, γεγονός που αποτελεί ένα ακόμη πλεονέκτημα αυτού του εγκλειστικού μέσου (Burgain et al, 2011). Τέλος, ένα μειονέκτημα που πρέπει να ληφθεί υπόψιν στην επιλογή του αμύλου ως εγκλειστικού μέσου, είναι ότι το εγκλειστικό διάλυμα έχει, τις περισσότερες φορές, υψηλό ιξώδες, κάτι το οποίο αποτελεί τροχοπέδη για τις περισσότερες διεργασίες εγκλεισμού (Singh & O'Hagan, 1998).

5.5.7 Ξανθάνη και Τζελάνη

Το κόμμι ξανθάνη είναι ένας ετεροπολυσακχαρίτης αποτελούμενος από ομάδες πολυ-πεντασακχαρίτη, που σχηματίζεται από μονάδες 2-γλυκόζης, 2-μαννόζης και μία γλυκουρονική μονάδα, ενώ ο σκελετός αυτού του πολυμερούς αποτελείται από μονάδες D-γλυκόζης που συνδέονται με 1?4 δεσμούς. Η ξανθάνη θεωρείται ως ένα αποτελεσματικό μέσον εγκλεισμού. Οι μικροκάψουλες που σχηματίζονται από αυτό το κόμμι προσφέρουν υψηλή προστασία στα εγκλεισμένα προβιοτικά έναντι των χολικών αλάτων και των οξέων του στομάχου. Η ξανθάνη, όπως και το αλγινικό, έχει την ικανότητα να σχηματίζει δεσμούς με τα ιόντα ασβεστίου. Συνεπώς, μπορεί να επιλεγεί ως μέσον εγκλεισμού και στην μέθοδο της εξώθησης. Τέλος, η ξανθάνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με το κόμμι τζελάνη (Cook et al, 2012). Η τζελάνη είναι ένας μικροβιακός πολυσακχαρίτης που προέρχεται από το *Pseudomonas elodea*, ο οποίος αποτελείται από μία επαναλαμβανόμενη μονάδα 3 μονομερών, της γλυκόζης, του γλυκουρονικού οξέος και της ραμνόζης. Ο συνδυασμός των δύο κόμμεων έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία ανθεκτικών, στην οξύτητα, μικροκαψουλών, σε αντίθεση με ότι συμβαίνει με τα σφαιρίδια του αλγινικού, τα οποία παρουσιάζουν μεγάλη ευαισθησία στα οξέα (Burgain et al, 2011).



Εικόνα 5.3 Χημική δομή ξανθάνης (Cook et al, 2012)

5.5.8 Καζεΐνη

Οι πρωτεΐνες, ιδιαίτερα τα τελευταία χρόνια, αποτελούν πολύ δημοφιλή μέσα για τον εγκλεισμό των προβιοτικών βακτηρίων. Οι πρωτεΐνες είναι μεγάλες, σύνθετες δομές που μπορούν πάρουν την μορφή γέλης έπειτα από την επεξεργασία τους με διαδικασίες όπως, η ενζυματική διασταυρούμενη σύνδεση (cross-linking) και η χημική εγκάρσια σύνδεση (chemical cross-linking). Η καζεΐνη είναι μία πρωτεΐνη του γάλακτος, η οποία είναι αδιάλυτη στο νερό σε pH<6. Ως εκ τούτου, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μήτρα για την προστασία των προβιοτικών βακτηρίων κατά την διέλευσή τους από το στομάχι. Πειράματα προσομοίωσης των συνθηκών του γαστρεντερικού συστήματος, έχουν δείξει ότι η βιωσιμότητα των προβιοτικών, που έχουν εγκλειστεί σε μείγματα καζεΐνης και άλλων συστατικών, μπορεί να αυξηθεί έως και κατά 20% σε σχέση με τα μη εγκλεισμένα κύτταρα. Η καζεΐνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με την πηκτίνη προκειμένου να δημιουργηθούν συσσωματώματα. Ο εγκλεισμός με συνδυασμό των ανωτέρω συστατικών επιφέρει μεγάλη αύξηση στο επίπεδο επιβίωσης των κυττάρων ακόμη και σε πολύ χαμηλό pH (Cook et al, 2012).

5.6 Εφαρμογή του εγκλεισμού στα προβιοτικά βακτήρια και παραγωγή προβιοτικού γιαουρτιού

Προκειμένου να αυξηθεί το ποσοστό επιβίωσης των προβιοτικών, έχει αναπτυχθεί και εφαρμόζεται η τεχνική του εγκλεισμού. Με την τεχνική αυτή, όπως έχει ήδη σημειωθεί, τα βακτηριακά κύτταρα εγκλείονται σε σφαιρίδια με σκοπό την προφύλαξή τους από κάθε είδους τραυματισμό και απώλεια. Επίσης, μέσω του εγκλεισμού τους, τα προβιοτικά που εμπεριέχονται σε ένα προϊόν μπορούν να επιβιώσουν τόσο κατά την διάρκεια της αποθήκευσης του, όσο και κατά την διέλευσή τους από το γαστρεντερικό σύστημα, μετά την κατανάλωση από τον αγοραστή (Yamaguishi et al, 2011, Tamine et al, 2005). Όπως γίνεται εύκολα αντιληπτό λοιπόν, ο εγκλεισμός μπορεί να αυξήσει την λειτουργικότητα των προβιοτικών τροφίμων, που ήδη κυκλοφορούν στο εμπόριο και ιδιαίτερα του προβιοτικού γιαουρτιού, καθιστώντας το ένα προϊόν με μεγαλύτερη διάρκεια ζωής, στο οποίο επιβιώνουν υψηλότεροι αριθμοί προβιοτικών βακτηρίων και το οποίο θα είναι πιο αποτελεσματικό, καθώς μετά την κατανάλωσή του θα εξασφαλίζει την στοχευμένη δράση των βακτηρίων στον ανθρώπινο οργανισμό.

Υπάρχουν πολλές έρευνες που αφορούν στον εγκλεισμό των προβιοτικών βακτηρίων και στην μετέπειτα χρήση τους στο γιαούρτι. Τα προβιοτικά στελέχη στα οποία έχει εφαρμοστεί

η τεχνολογία του εγκλεισμού και τα οποία, εν συνεχεία, χρησιμοποιούνται στο γιαούρτι ποικίλουν. Μεγάλη είναι επίσης και η ποικιλία των εγκλειστικών μέσων που έχουν χρησιμοποιηθεί. Μερικά παραδείγματα ερευνών που αφορούν στην μελέτη του εγκλεισμού προβιοτικών που έχουν χρησιμοποιηθεί στο γιαούρτι παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα:

Πίνακας 5.1 Παραδείγματα εγκλεισμένων προβιοτικών στελεχών που έχουν χρησιμοποιηθεί σε γιαούρτι

Προβιοτικό στέλεχος	Τεχνολογία εγκλεισμού	Μέσα εγκλεισμού	Βιβλιογραφική πηγή
L. acidophilus	Ξήρανση με κατάψυξη	Πηκτίνη/καζεΐνη	Shoji et al, 2013
L. casei	Εξώθηση	Αλγινικό νάτριο/πηκτίνη	Sandoval-Castilla et al, 2010
B. infantis	Εξώθηση	Ξανθάνη/τζελάνη	Sun and Griffiths, 2000
L.acidophilus	Ξήρανση με κατάψυξη	Αλγινικό νάτριο/ξανθάνη	Kim et al, 2008
B. bifidum, *L. acidophilus, L. casei*	Εξώθηση	Αλγινικό νάτριο	Krasaekoopt et al, 2006

Σε μία μελέτη που αφορούσε στο εγκλεισμένο προβιοτικό στελέχους *L. acidophilus,* το οποίο είχε ενσωματωθεί σε γιαούρτι, προερχόμενο από βουβαλίσιο γάλα, αξιολογήθηκε η βιωσιμότητα του εγκλεισμένου στελέχους, τόσο κατά την αποθήκευση, όσο και σε συνθήκες προσομοίωσης του γαστρεντερικού περιβάλλοντος. Στα πειράματα που έγιναν παρασκευάστηκαν 4 δείγματα τα οποία εμβολιάστηκαν με εγκλεισμένα και μη προβιοτικά βακτήρια, ενώ επίσης το pH λήξης της ζύμωσης ήταν 4,5 και 5. Οι μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν αφορούσαν στην οξύτητα, στο pH και στην βιωσιμότητα των μικροοργανισμών στα γιαούρτια. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η τεχνική του εγκλεισμού με κατάψυξη και εγκλειστικό μέσον μείγμα πηκτίνης/καζεΐνης μπορούσε να διατηρήσει το μικροβιακό φορτίο σε επίπεδα, υψηλότερα του 10^7 cfu/g, σε συνθήκες ψύξης (αποθήκευση σε ψυγείο), ωστόσο όμως δεν μπορούσε να τους προστατέψει σε συνθήκες χαμηλού pH, όπως αυτές που επικρατούν στο ανθρώπινο στομάχι. Επιπροσθέτως, προέκυψε ότι τα γιαούρτια που ζυμώνονταν με εγκλεισμένα προβιοτικά παρουσίαζαν χαμηλότερες τιμές μεταοξίνισης και μεγαλύτερη σταθερότητα σε σχέση με τα δείγματα που είχαν εμβολιαστεί με μη εγκλεισμένη καλλιέργεια (Shoji et al, 2013). Το ίδιο στέλεχος αποτέλεσε προβιοτικό το οποίο εγκλείστηκε και του οποίου η βιωσιμότητα μελετήθηκε και σε μία ακόμη έρευνα. Σε αυτήν την περίπτωση όμως το μέσον εγκλεισμού διέφερε. Έτσι το στέλεχος *L. acidophilus,* εγκλείστηκε με την μέθοδο της ξήρανσης με κατάψυξη, όπως και στην προηγούμενη περίπτωση, αυτή την φορά όμως χρησιμοποιήθηκε ως εγκλειστικό μέσον μείγμα αλγινικού νατρίου και ξανθάνης. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων, που αφορούσαν

στην επιβίωση των προβιοτικών βακτηρίων, έδειξαν ότι τα εγκλεισμένα βακτήρια είχαν πολύ μεγαλύτερη αντοχή όταν εκτίθεντο σε τεχνητό γαστρικό υγρό, εν συγκρίσει με τα μη εγκλεισμένα τα οποία δεν κατάφεραν να επιβιώσουν (Kim et al, 2008). Από τα δύο αυτά παραδείγματα, φαίνεται η σημαντικότητα του μέσου εγκλεισμού καθώς το ένα προβιοτικό στέλεχος μπορεί να εγκλειστεί με την ίδια μέθοδο, όμως ανάλογα με το είδος του εγκλειστικού που χρησιμοποιείται, η επιβίωσή, του σε συνθήκες παρόμοιες με εκείνες του στομάχου, διαφέρει.

Σε μία άλλη μελέτη, το προβιοτικό στέλεχος *L. casei* εγκλείστηκε με μείγμα αλγινικού νατρίου και πηκτίνης με την τεχνική της εξώθησης. Ο εγκλεισμός έγινε με διαφορετικής αναλογίας μείγματα αλγινικού νατρίου/πηκτίνης (1:2, 1:4, 1:6). Οι μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν αφορούσαν στην διάμετρο των σφαιριδίων εγκλεισμού και στην βιωσιμότητα του προβιοτικού τόσο στο γιαούρτι, όσο και σε συνθήκες προσομοίωσης του γαστρεντερικού περιβάλλοντος. Η στατιστική ανάλυση των μετρήσεων έδειξε ότι η επιβίωση των εγκλεισμένων μικροοργανισμών, σε συνθήκες παρόμοιες με αυτές του γαστρεντερικού συστήματος, έχει θετική συσχέτιση με την διάμετρο των σφαιριδίων, δηλαδή αυξάνεται με την αύξηση της διαμέτρου. Μάλιστα τα σφαιρίδια των μειγμάτων με αναλογία αλγινικού νατρίου/πηκτίνης 1:4 και 1:6 παρείχαν σημαντική προστασία στα προβιοτικά βακτήρια (Sandoval-Castilla et al, 2010).

Το εγκλειστικό μείγμα ξανθάνης/τζελάνης μπορεί να αυξήσει την βιωσιμότητα των προβιοτικών σε όξινα περιβάλλοντα. Από την άλλη το στέλεχος *B. infantis* ATCC 15697 θεωρείται ως το πιο ανθεκτικό σε όξινες συνθήκες. Γι' αυτό σε μία έρευνα επιχειρήθηκε ο εγκλεισμός του με μείγμα ξανθάνης/τζελάνης με την μέθοδο της εξώθησης. Η βιωσιμότητα των εγκλεισμένων μικροοργανισμών ελέγχθηκε τόσο στο γιαούρτι όσο και σε συνθήκες παρόμοιες με εκείνες του γαστρεντερικού συστήματος. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η επιβίωση των εγκλεισμένων προβιοτικών δεν είχε μεγάλες διαφορές σε σχέση με την επιβίωση των μη εγκλεισμένων κατά την αποθήκευση των δειγμάτων γιαουρτιού στους 4°C, για 6 εβδομάδες. Αντίθετα, τα ποσοστά επιβίωσης των εγκλεισμένων προβιοτικών βακτηρίων ήταν σημαντικά υψηλότερα των μη εγκλεισμένων, σε συνθήκες προσομοίωσης του γαστρεντερικού περιβάλλοντος (Sun and Griffiths, 2000).

Τέλος, η βιωσιμότητα των εγκλεισμένων προβιοτικών στελεχών *L. acidophilus* 547*, B. bifidum* ATCC 1994 και *L. casei* 01, τα οποία προστέθηκαν σε γιαούρτια, μελετήθηκε σε μία άλλη έρευνα. Τα δείγματα γιαουρτιού προέρχονταν από ζύμωση γάλακτος που προερχόταν από υψηλή θερμική κατεργασία (UHT) αλλά και από ζύμωση συμβατικού γάλακτος. Τα προβιοτικά στελέχη εγκλείστηκαν με την μέθοδο της εξώθησης χρησιμοποιώντας ως μέσον εγκλεισμού αλγινικό νάτριο. Τα δείγματα προβιοτικού γιαουρτιού αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία 4°C για 4 εβδομάδες. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων έδειξαν ότι η επιβίωση των εγκλεισμένων προβιοτικών ήταν αρκετά υψηλότερος σε σχέση με αυτήν τον μη εγκλεισμένων. Επίσης ο αριθμός των ζωντανών μικροοργανισμός ήταν μεγαλύτερος από τον ελάχιστα συνιστώμενο (10^{7} cfu/g) καθόλην την διάρκεια της αποθήκευσης με εξαίρεση το στέλεχος *B. bifidum.* Η βιωσιμότητα των στελεχών φαίνεται ότι δεν επηρεάστηκε από το είδος του γάλακτος (Krasaekoopt et al, 2006).

6. Πειραματικό μέρος

6.1 Σκοπός των πειραμάτων

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν αρχικά ο εγκλεισμός προβιοτικών βακτηρίων προβιοτικής καλλιέργειας που περιελάμβανε το στέλεχος *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis.* Ο αριθμός των ζωντανών βακτηρίων της συγκεκριμένης καλλιέργειας ήταν $5*10^{10}$ cfu/g. Η επιλογή ενός είδους του γένους των *Bifidobacterium* δεν ήταν τυχαία, καθώς όπως έχει αναφερθεί στο κεφάλαιο 2, έχουν πολλά οφέλη για την ανθρώπινη υγεία και συνάμα η εμπορική τους χρήση είναι εκτεταμένη. Ο εγκλεισμός πραγματοποιήθηκε με δύο μεθόδους, την τεχνική της ξήρανσης με κατάψυξη και την τεχνική της εξώθησης. Η πρώτη τεχνική αποτελεί μία, παραδοσιακά, κοινή μέθοδο εγκλεισμού, ενώ με την δεύτερη επιτυγχάνονται υψηλά ποσοστά επιβίωσης των εγκλεισμένων μικροοργανισμών, που φθάνουν ακόμα και το 80-95%. Μετά το πέρας των πειραμάτων εγκλεισμού, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ζύμωσης γάλακτος με την χρήση των προκυπτόντων εγκλεισμένων προβιοτικών βακτηρίων, ελέγχοντας τη βιωσιμότητα των προβιοτικών βακτηρίων που υπήρχαν στην καλλιέργεια είχαν εγκλειστεί και είχαν επιβιώσει. Η ζυμωτική διεργασία πήξης του γιαουρτιού παρακολουθήθηκε ως προς την εξέλιξή της, ενώ στα γιαούρτια που παρασκευάστηκαν πραγματοποιήθηκαν διάφορες μετρήσεις των ποιοτικών τους χαρακτηριστικών. Παράλληλα παρασκευάστηκε και αξιολογήθηκε και τυφλό δείγμα, δηλαδή γιαούρτι που προήλθε ύστερα από ζύμωση του γάλακτος με την αρχική, μη εγκλεισμένη καλλιέργεια (direct). Η επίτευξη του εγκλεισμού διαπιστώθηκε εμμέσως, μέσω της σύγκρισης της εξέλιξης της ζύμωσης και των φυσικοχημικών και μικροβιολογικών χαρακτηριστικών των δειγμάτων που είχαν εμβολιαστεί με εγκλεισμένη καλλιέργεια, με μείγμα εγκλεισμένης και μη εγκλεισμένης καλλιέργειας και με μη εγκλεισμένη καλλιέργειας μαζί με ποσότητα εγκλειστικού μέσου, τόσο μεταξύ τους όσο και με το τυφλό δείγμα.

6.2 Υλικά και μέθοδοι

6.2.1 Πρώτες ύλες

Κατά την πειραματική διαδικασία έγινε χρήση των ακολούθων συστατικών:

Καλλιέργεια

- Προβιοτική καλλιέργεια που περιλαμβάνει το στέλεχος *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis* (BB-12/Chr. Hansen)

Γάλα

- Πλήρες αγελαδινό γάλα υψηλής παστερίωσης ΦΑΓΕ ΑΕ.

Μέσα εγκλεισμού

- Αλγινικό νάτριο (Acros prganics)
- Μαλτοδεξτρίνη (Astron)
- κ-καραγενάνη (Astron)
- Ινουλίνη (Fibruline Instant)
- Κυκλοδεξτρίνη (Roquette)

- Πηκτίνη (Sigma)
- Καζεΐνη (Sigma)
- Ξανθάνη (Sigma)
- Τζελάνη (Gellan gum) (Sigma)
- Άμυλο ταπιόκας (Astron)

Επιπλέον συστατικά σε εγκλειστικά μείγματα

- Φρουκτόζη (Riedel-de Haen)
- Υπόστρωμα Man-Rogosa-Sharpe Broth (MRS Broth) (Biolife)
- Γλυκερόλη
- Απιονισμένο νερό
- Άνυδρο οξικό οξύ 1%

Ρυθμιστικό διάλυμα για την τεχνική εγκλεισμού με εξώθηση

- Διάλυμα $CaCl_2$ σε συγκεντρώσεις 0,45M,0,1 M και 0,05M

Μικροβιολογικός έλεγχος

- MRS Agar (BCBG9919V / Fluka Analytical - Sigma-Aldrich)
- Transoligosaccharide propionate agar medium (TOS) agar (Chem-100045/ Merck Millipore) σε συνδυασμό με Lithium Mupirocin (MUP) (Chem-100045/ Merck Millipore)
- Διάλυμα Ringer (Maximum Recovery Diluent for microbiology) (VM278035 126 / Merck Millipore)
- Απιονισμένο νερό

6.2.2 Εργαστηριακά όργανα και συσκευές

Για την παρασκευή των εγκλειστικών μειγμάτων και του γιαουρτιού, όπως επίσης και για την επεξεργασία των δειγμάτων έγινε χρήση των παρακάτω εργαστηριακών συσκευών και οργάνων:

- Συσκευή Freeze Drying (Christ/Alpha 1-4DL, UK)
- Περιστροφικό ιξωδόμετρο (Brookfield/DV-II+ Pro, USA)
- Αναλυτής υφής (Stable Micro Systems/TA-XT2i, UK)
- Συσκευή υπερδιήθησης (Millipore)
- Συσκευή μικροδιήθησης (Millipore/Amicon 8400, France)
- Φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης Υπεριώδους-Ορατού (Hitachi/U-2900, Japan)

- Διαθλασίμετρο (Abbe)
- Ηλεκτρονικός ζυγός (620C, Precisa Instruments, Switzerland)
- Υδατόλουτρο (GFL 1083, Labortechnik GmbH, Burgwedel, Germany)
- Αναδευτήρες (IKA-WERKE EURO-ST PVC, GmbH & CO.KG, Staufen, Germany)
- Επωαστήρας (SANYO, Japan)
- Ηλεκτρονικά pH-μετρα
- Ηλεκτρικός Αποστειρωτήρας Ατμού (αυτόκλειστο της Webeco)
- Συσκευή ομογενοποίησης (bagmixer)
- Συσκευή μέτρησης Z-potential (Zetasizer nano-zs 2000, Malvern Instruments Ltd., UK)
- Θάλαμος επώασης μικροβιολογικών αναλύσεων
- Υαλικά σκεύη (Ποτήρια ζέσεως, Κωνικές φιάλες, Ογκομετρικοί κύλινδροι, Σιφόνια, Μικροφίλτρο Millipore, Θερμόμετρο, Σύριγγες των 5mL, Καμινέτο γκαζιού, Ψεκαστήρας με οινόπνευμα, Τρυβλία για μικροβιολογικές αναλύσεις, Ειδικές αποστειρωμένες σακούλες για ομογενοποίηση, Αποστειρωμένα σωληνάκια των 10 mL με αντίστοιχο στατό, Πουάρ, 2 Πιπέτες σε 1000μL και 100μL με τα αντίστοιχα tips, Αλουμινόχαρτο).

6.3 Πειραματική διαδικασία

6.3.1 Εγκλεισμός προβιοτικών βακτηρίων με την τεχνική της ξήρανσης με κατάψυξη (freeze drying)

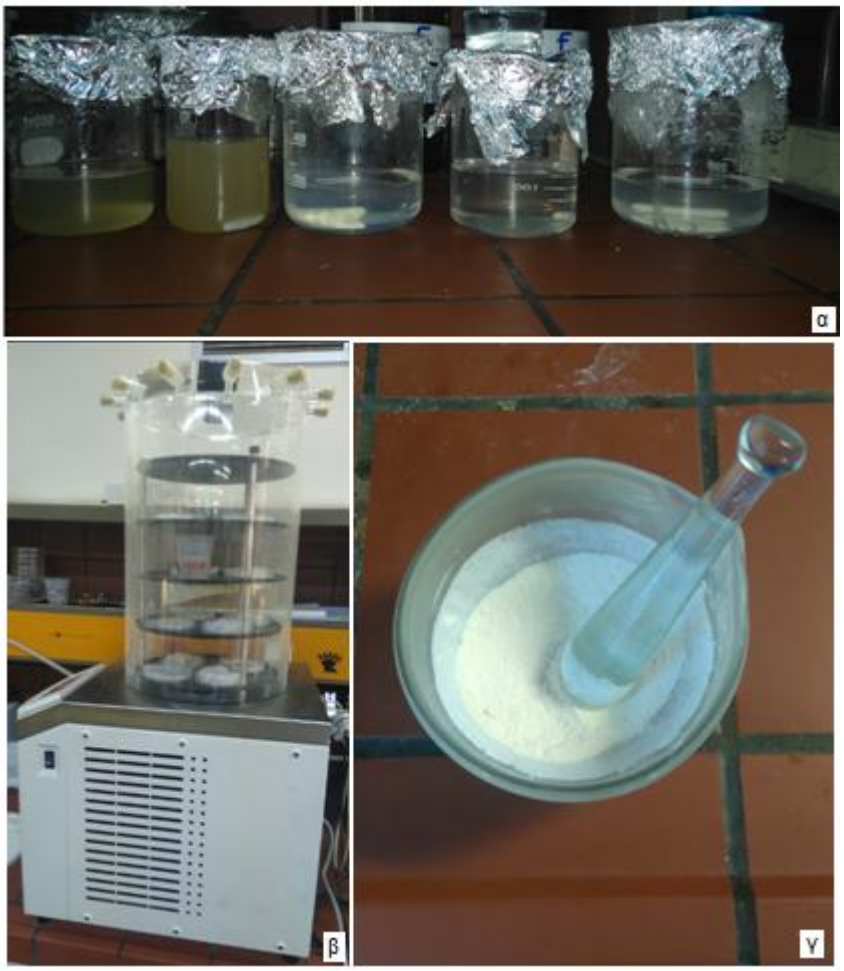
Για τον εγκλεισμό των προβιοτικών βακτηρίων με την τεχνική της ξήρανσης με κατάψυξη δοκιμάστηκαν αρκετά μέσα καθώς και μείγματα αυτών. Το ποσοστό της καλλιέργειας προβιοτικών βακτηρίων που προστίθεται σε κάθε εγκλειστικό διάλυμα ανέρχεται στο 3%w/v. Τα εγκλειστικά μέσα ή μείγματα αυτών, που χρησιμοποιήθηκαν στην συγκεκριμένη μέθοδο, όπως επίσης και τα ποσοστά τους στα μείγματα εγκλεισμού, παρουσιάζονται παρακάτω, στον πίνακα 6.1. Όλα τα ποσοστά, τόσο της προβιοτικής καλλιέργειας, όσο και των εγκλειστικών μέσων, προέκυψαν ύστερα από βιβλιογραφική έρευνα αλλά και από δοκιμαστικά πειράματα.

Πίνακας 6.1 Συστατικά και συγκεντρώσεις εγκλειστικών μειγμάτων της τεχνικής ξήρανσης με κατάψυξη

Πείραμα	Μέσον εγκλεισμού (%w/v)	Άλλα συστατικά (%w/v)	Προβιοτική καλλιέργεια (%w/v)
1	Χιτοζάνη(2%)	Άνυδρο οξικό οξύ (1%)	3%
2	Μαλτοδεξτρίνη (15%)	-	3%
3	κ-καραγενάνη (2%)	-	3%
4	Ινουλίνη (15%)	-	3%
5	Κυκλοδεξτρίνη (2%)	-	3%
6	Αλγινικό νάτριο (2%)	-	3%
7	Πηκτίνη/καζεΐνη (8%/8%)	-	3%
8	Αλγινικό νάτριο/ξανθάνη (0,5%/0,5%)	-	3%
9	Ινουλίνη (15%)/Κυκλοδεξτρίνη (2%)	-	3%
10	Άμυλο (5%)	-	3%

Μετά την επιλογή των κατάλληλων συγκεντρώσεων των συστατικών των μειγμάτων εγκλεισμού, σειρά είχε η παρασκευή τους. Για τον λόγο αυτό, ζυγίστηκε η απαραίτητη ποσότητα του κάθε συστατικού και τοποθετήθηκε σε ανάλογη ογκομετρημένη ποσότητα απιονισμένου νερού, το οποίο βρισκόταν εντός ποτηρίου ζέσεως, προκειμένου να προκύψουν οι συγκεντρώσεις του πίνακα 6.1 για κάθε περίπτωση. Στην περίπτωση της χιτοζάνης ογκομετρήθηκε με πιπέτα των 1000μL και προστέθηκε, επιπλέον, άνυδρο οξικό οξύ, όπως φαίνεται στον πίνακα 6.1. Όλες οι ζυγίσεις πραγματοποιήθηκαν στον ζυγό ακριβείας 2 δεκαδικών ψηφίων, ενώ οι ογκομετρήσεις του απιονισμένου νερού έγιναν με

τον ογκομετρικό κύλινδρο των 100mL. Εν συνεχεία, τα διαλύματα τοποθετήθηκαν σε θερμαινόμενη πλάκα, στους 80°C περίπου, και αναδεύονταν με την βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα, μέχρι να διαλυθούν πλήρως τα συστατικά τους. Για να μην υπάρχουν απώλειες ή τυχόν επιμολύνσεις στα διαλύματα, τα ποτήρια ζέσεως καλύφθηκαν με αλουμινόχαρτο. Επίσης, με την θέρμανση και ανάδευση, εκτός από την διάλυση των συστατικών, επιτεύχθηκε και αποστείρωση των διαλυμάτων. Μετά την διάλυση των συστατικών, η θέρμανση και ανάδευση των διαλυμάτων τερματίστηκε. Ακολούθως, τα διαλύματα τοποθετήθηκαν εντός παγόλουτρου μέχρι να αποκτήσουν θερμοκρασία 35-40°C. Στην θερμοκρασία αυτή, τοποθετήθηκε, εντός κάθε διαλύματος, η κατάλληλα ζυγισμένη ποσότητα προβιοτικής καλλιέργειας, ώστε να προκύψει συγκέντρωση 3%w/v. Αφού, λοιπόν, τοποθετήθηκε και η ποσότητα προβιοτικής καλλιέργειας, το τελικό εγκλειστικό μείγμα αναδεύτηκε, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, μέχρι να πραγματοποιηθεί ομογενοποίηση.



Εικόνα 6.1 Στάδια εγκλεισμού με την τεχνική ξήρανσης με κατάψυξη: α) εγκλειστικά μείγματα, β)ξήρανση με κατάψυξη στην συσκευή freeze drying, γ) λειοτρίβηση ξηραμένων και εγκλεισμένων προβιοτικών καλλιεργειών

Μόλις επετεύχθη αυτό, τα προκύπτοντα διαλύματα τοποθετήθηκαν εντός αποστειρωμένων τρυβλίων. Τα τρυβλία με τα εγκλειστικά διαλύματα καταψύχθηκαν στους -40°C για 24h. Έπειτα, τα τρυβλία μεταφέρθηκαν στην συσκευή ξήρανσης με κατάψυξη, όπου και παρέμειναν για 48h. Μετά την λήξη της ξήρανσης με κατάψυξη, τα τρυβλία ζυγίστηκαν στον

ζυγό ακριβείας 4 δεκαδικών ψηφίων και μετά το περιεχόμενό τους τοποθετήθηκε εντός μύλου άλεσης (ο οποίος είχε καθαριστεί καταλλήλως), όπου και λειοτριβήθηκε. Τα άδεια χρησιμοποιημένα τρυβλία, ζυγίστηκαν ξανά στον ζυγό ακριβείας 4 δεκαδικών ψηφίων. Το λειοτριβημένο, πλέον προϊόν που περιείχε τα εγκλεισμένα προβιοτικά βακτήρια, τοποθετήθηκε εκ νέου σε τρυβλία, τα οποία σφραγίστηκαν με ταινία παραφίνης, για την ελαχιστοποίηση απορρόφησης υγρασίας και αποθηκεύτηκαν στους -40°C.

6.3.2 Εγκλεισμός προβιοτικών βακτηρίων με την τεχνική της εξώθησης (extrusion)

Για τον εγκλεισμό των προβιοτικών βακτηρίων με την μέθοδο της εξώθησης χρησιμοποιήθηκαν 4 εγκλειστικά μείγματα. Τα συστατικά και οι συγκεντρώσεις των μειγμάτων, καθώς επίσης και των αντίστοιχων διαλυμάτων $CaCl_2$, προέκυψαν ύστερα από βιβλιογραφική έρευνα. Ακόμη, όπως και στην τεχνική της ξήρανσης με κατάψυξη, η συγκέντρωση της προβιοτικής καλλιέργειας ήταν 3%w/v. Αναλυτικά, η προετοιμασία κάθε μείγματος παρουσιάζεται ακολούθως.

1° μείγμα: μείγμα αλγινικού νατρίου και άλλων συστατικών

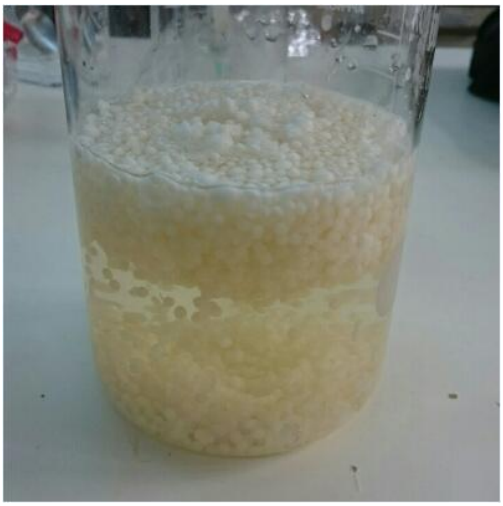
Το 1° εγκλειστικό μείγμα που παρασκευάστηκε για την τεχνική της εξώθησης περιείχε τα ακόλουθα συστατικά στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις:

- Αλγινικό νάτριο 2%w/v
- Ξανθάνη 0,15%w/v
- Φρουκτόζη 3%w/v
- Μαλτοδεξτρίνη 3%w/v
- Υπόστρωμα Man-Rogosa-Sharpe Broth (MRS Broth) 11%v/v
- Γλυκερόλη 5,5% v/v

Από τα ανωτέρω συστατικά ζυγίστηκαν (στον ζυγό με ακρίβεια 0,1g) ή ογκομετρήθηκαν (με σιφώνιο των 20mL για την περίπτωση του MRS Broth και με σιφώνιο των 10mL για την γλυκερόλη) κατάλληλες ποσότητες και τοποθετήθηκαν σε ποτήρι ζέσεως που περιείχε ποσότητα νερού τέτοια, ώστε να προκύψουν οι απαιτούμενες συγκεντρώσεις. Το μείγμα τοποθετήθηκε σε θερμαινόμενη πλάκα, στους 80°C περίπου, και αναδευόταν με την βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα, μέχρι να διαλυθούν πλήρως τα συστατικά του. Για να μην υπάρχουν απώλειες ή τυχόν επιμολύνσεις στο μείγμα, το ποτήρι ζέσεως καλύφθηκε με αλουμινόχαρτο. Επίσης, με την θέρμανση και ανάδευση, εκτός από την διάλυση των συστατικών, επιτεύχθηκε και αποστείρωση του μείγματος.

Μετά την διάλυση των συστατικών, η θέρμανση και ανάδευση τερματίστηκε. Ακολούθως, το μείγμα τοποθετήθηκε εντός παγόλουτρου μέχρι να αποκτήσει θερμοκρασία 35-40°C. Στην θερμοκρασία αυτή, τοποθετήθηκε, η κατάλληλα ζυγισμένη ποσότητα προβιοτικής καλλιέργειας, ώστε να προκύψει συγκέντρωση 3%w/v. Αφού, λοιπόν, τοποθετήθηκε και η ποσότητα προβιοτικής καλλιέργειας, το τελικό εγκλειστικό μείγμα αναδεύτηκε, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, μέχρι να πραγματοποιηθεί η ομογενοποίηση του μείγματος.

Παράλληλα, είχε προετοιμαστεί και αποστειρωθεί επαρκής ποσότητα διαλύματος $CaCl_2$ 0,45M. Το εγκλειστικό μείγμα, μεταφέρθηκε στάγδην εντός ποτηρίου ζέσεως που περιείχε το διάλυμα $CaCl_2$, με την βοήθεια σύριγγας των 10mL. Η απόσταση μεταξύ του στομίου εξόδου της βελόνας της σύριγγας και της επιφάνειας του διαλύματος ήταν περίπου 50cm. Οι σταγόνες του μείγματος σχημάτισαν, ακαριαία μόλις ήρθαν σ' επαφή με το διάλυμα $CaCl_2$, εγκλειστικά σφαιρίδια. Τα σφαιρίδια αυτά διαχωρίστηκαν από το διάλυμα με την διαδικασία της διήθησης υπό κενό. Μετά το πέρας της διήθησης, τα σφαιρίδια, αφού προηγουμένως ξεπλύθηκαν 2 φορές με αποστειρωμένο νερό, μεταφέρθηκαν σε διάλυμα χιτοζάνης 0,8%w/v. Το διάλυμα χιτοζάνης μαζί με τα σφαιρίδια αναδεύτηκε ήπια για 15min, με την χρήση μαγνητικού αναδευτήρα, προκειμένου να πραγματοποιηθεί επικάλυψη των σφαιριδίων αλγινικού με χιτοζάνη. Αμέσως μετά, τα σφαιρίδια διαχωρίστηκαν από το υπόλοιπο διάλυμα, πάλι με διήθηση υπό κενό, ξεπλύθηκαν 2 φορές με αποστειρωμένο νερό και τοποθετήθηκαν σε τρυβλία με σκοπό την αποθήκευσή τους στους 4^oC.



Εικόνα 6.2 Εγκλειστικά σφαιρίδια αλγινικού μείγματος εντός διαλύματος $CaCl_2$

2ο μείγμα: μείγμα αλγινικού νατρίου

Το 2° εγκλειστικό μείγμα που παρασκευάστηκε για την τεχνική της εξώθησης περιείχε μόνον αλγινικό νάτριο σε συγκέντρωση 2%w/v. Στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιήθηκε διάλυμα $CaCl_2$ 0,05M. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν όμοια με την ανωτέρω περιγραφείσα για το 1° μείγμα, με μόνη διαφορά ότι το διάλυμα επικάλυψης των προκυπτόντων σφαιριδίων ήταν διάλυμα πεπτόνης 0,1%w/v.

3ο μείγμα: μείγμα αλγινικού με πηκτίνη

Το 3° εγκλειστικό μείγμα που παρασκευάστηκε για την τεχνική της εξώθησης περιείχε αλγινικό νάτριο σε συγκέντρωση 0,5%w/v και πηκτίνη 3%w/v. Στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιήθηκε διάλυμα $CaCl_2$ 0,5M. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν όμοια με την ανωτέρω περιγραφείσα για το 1° μείγμα, με μόνη διαφορά ότι δεν χρησιμοποιήθηκε κάποιο διάλυμα για την επικάλυψη των εγκλειστικών σφαιριδίων, οπότε η διαδικασία έλαβε τέλος μετά το αρχικό ξέπλυμα των σφαιριδίων με αποστειρωμένο νερό.

4ο μείγμα: μείγμα ξανθάνης και τζελάνης

Για την παρασκευή του εγκλειστικού μείγματος ξανθάνης/τζελάνης αρχικά παρασκευάστηκαν δύο ξεχωριστά διαλύματα: ένα διάλυμα ξανθάνης συγκέντρωσης 1%w/v και ένα δεύτερο διάλυμα τζελάνης, συγκέντρωσης 0,75%w/v. Τα δύο αυτά διαλύματα θερμάνθηκαν και αναδεύτηκαν ξεχωριστά, μέχρι να επιτευχθεί διάλυση των συστατικών τους. Μόλις συνέβη αυτό, τα δύο διαλύματα αναμείχθηκαν μεταξύ τους σε αναλογία δ. ξανθάνης/δ. τζελάνης 1:15. Αμέσως μετά, το μείγμα που προέκυψε αναδεύτηκε υπό θέρμανση για 15min περίπου. Έπειτα, ψύχθηκε στους 35-40°C και προστέθηκε η προβιοτική καλλιέργεια. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε, εν συνεχεία, ήταν όμοια με αυτήν του 1^{ου} μείγματος με μόνες διαφορές ότι το διάλυμα $CaCl_2$ είχε συγκέντρωση 0,1M και ότι δεν χρησιμοποιήθηκε κάποιο διάλυμα για την επικάλυψη των εγκλειστικών σφαιριδίων, οπότε η διαδικασία έλαβε τέλος μετά το αρχικό ξέπλυμα των σφαιριδίων με αποστειρωμένο νερό.

6.3.3 Παραγωγή γιαουρτιού

Το ομογενοποιημένο πλήρες γάλα θερμαινόταν στους 80°C για 20min. Η θέρμανση γινόταν εντός υδατόλουτρου, ενώ η ανάδευση πραγματοποιείτο με την χρήση περιστρεφόμενων μηχανικών αναδευτήρων. Ακολούθως, το γάλα ψυχόταν στους 45°C, θερμοκρασία στην οποία πραγματοποιείτο ο εμβολιασμός με εγκλεισμένη ή μη προβιοτική καλλιέργεια. Για την καλλίτερη και πιο ομοιόμορφη διάλυση της καλλιέργειας, έπειτα από τον εμβολιασμό, το γάλα υφίστατο ανάδευση. Μετά την διάλυση της καλλιέργειας, το γάλα τοποθετείτο σε κατάλληλα κύπελλα τα οποία και μεταφέρονταν σε ρυθμισμένο, στους 45°C (στους 40°C για τα αρχικά πειράματα), θάλαμο επώασης. Εκεί παρέμεναν μέχρι την λήξη της ζύμωσης, η οποία σηματοδοτείτο μόλις το pH έφθανε στην τιμή 4,5. Στο σημείο αυτό πρέπει να τονιστεί ότι το pH καταγραφόταν ανά 5min, καθόλην την διάρκεια της ζύμωσης. Εν συνεχεία και ενώ το γιαούρτι είχε σχεδόν την θερμοκρασία ζύμωσης, λαμβανόταν η μέτρηση του ιξώδους του, με την βοήθεια του ιξωδομέτρου Brookfield. Ύστερα, τα κύπελλα αποθηκεύονταν στους 4°C. Μετά από 24h γινόταν, πάλι, μέτρηση του ιξώδους και ανάλυση υφής του γιαουρτιού, ενόσω αυτό είχε θερμοκρασία περίπου 4°C.

Εικόνα 6.3 Παραγωγή γιαουρτιού: α) θέρμανση του γάλακτος υπό ανάδευση στο υδατόλουτρο, β) τελικό προϊόν σε κύπελλο

6.4 Σχεδιασμός πειραμάτων

Στην παρούσα διπλωματική εργασία επιχειρήθηκε ο εγκλεισμός των προβιοτικών βακτηρίων του στελέχους *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis.* Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν 2 τεχνικές εγκλεισμού, η τεχνική της ξήρανσης με κατάψυξη και η τεχνική της εξώθησης. Επίσης, για κάθε μέθοδο χρησιμοποιήθηκαν διάφορα μέσα εγκλεισμού και παρασκευάστηκαν εγκλειστικά μείγματα. Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός γάλακτος με τις καλλιέργειες που προέκυψαν έπειτα από τις δύο μεθόδους και τα διάφορα μέσα εγκλεισμού και παρασκευάστηκαν δείγματα γιαουρτιού. Ο βαθμός στον οποίο επετεύχθη ο εγκλεισμός προσδιορίστηκε εμμέσως, μέσω της εξέλιξης της ζύμωσης και της μελέτης των φυσικοχημικών και μικροβιολογικών χαρακτηριστικών του κάθε δείγματος γιαουρτιού. Για τον σκοπό αυτό, πέρα από τις εγκλεισμένες καλλιέργειες, πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός γάλακτος και με μείγμα εγκλεισμένης/μη εγκλεισμένης προβιοτικής καλλιέργειας σε αναλογία 4:1. Στο σημείο αυτό πρέπει να τονιστεί ότι η αναλογία αυτή αφορά στους μικροοργανισμούς και όχι στην μάζα της εγκλεισμένης ή μη καλλιέργειας, γνωρίζοντας ότι η αρχική προβιοτική καλλιέργεια περιέχει $5x10^{10}$μικροοργανισμούς/g και θεωρώντας ότι όλοι οι μικροοργανισμοί επιβιώνουν και είναι εγκλεισμένοι πλήρως μετά από κάθε διαδικασία εγκλεισμού. Επίσης, διενεργήθηκαν πειράματα στα οποία το γάλα εμβολιάστηκε με την απαραίτητη ποσότητα μη εγκλεισμένης καλλιέργειας, η οποία είναι 2g καλλιέργειας /L γάλακτος (ή 10^8μικροοργανισμοί/g γάλακτος θεωρώντας ότι $\rho_{\gamma\alpha\lambda\alpha\kappa\tau o\varsigma} \approx \rho_{\nu\varepsilon\rho o\acute{\upsilon}}$), προσθέτοντας επίσης και την ισοδύναμη ποσότητα εγκλειστικού μέσου ή μείγματος (δίχως να έχει προηγηθεί εγκλεισμός προβιοτικής καλλιέργειας). Αυτό έγινε στην περίπτωση των εγκλειστικών που εφαρμόστηκαν στην τεχνική της ξήρανσης με κατάψυξη. Τέλος, γάλα εμβολιάστηκε και με μη εγκλεισμένη προβιοτική καλλιέργεια και το δείγμα αυτό θεωρήθηκε ως τυφλό.

Η ζύμωση του γάλακτος για την παραγωγή γιαουρτιού, σε όλα τα πειράματα που περιεγράφησαν ανωτέρω, πραγματοποιήθηκε στους 45°C. Όμως, είχαν προηγηθεί κάποιες δοκιμαστικές σειρές πειραμάτων, στις οποίες είχε πραγματοποιηθεί εμβολιασμός του γάλακτος με μη εγκλεισμένη προβιοτική καλλιέργεια και με εγκλεισμένη με την μέθοδο της ξήρανσης με κατάψυξη, με την χρήση κ-καραγενάνης, κυκλοδεξτρίνης, ινουλίνης, χιτοζάνης και μαλτοδεξτρίνης ως εγκλειστικών μέσων. Για την δοκιμαστική αυτή σειρά πειραμάτων, η θερμοκρασία ζύμωσης του γάλακτος ήταν 40°C.

Για την καλλίτερη κατανόηση της πειραματικής διαδικασίας που ακολουθήθηκε παρατίθενται οι ακόλουθοι πίνακες:

Πίνακας 6.2 1η σειρά πειραμάτων (δοκιμαστικά) με την τεχνική εγκλεισμού ξήρανσης με κατάψυξη και θερμοκρασία ζύμωσης γάλακτος τους 40°C

Μέσον εγκλεισμού	Πείραμα	Εμβολιασμός
-	1	μη εγκλεισμένη
Χιτοζάνη	2	εγκλεισμένη
Μαλτοδεξτρίνη	3	εγκλεισμένη
κ-καραγενάνη	4	εγκλεισμένη
Ινουλίνη	5	εγκλεισμένη
Κυκλοδεξτρίνη	6	εγκλεισμένη

Πίνακας 6.3 2η σειρά πειραμάτων με την τεχνική εγκλεισμού ξήρανσης με κατάψυξη

Μέσον ή μείγμα εγκλεισμού	Πείραμα	Εμβολιασμός
-	1	μη εγκλεισμένη
Χιτοζάνη	2	εγκλεισμένη
	3	εγκλεισμένη/μη εγκλεισμένη 4:1
	4	εγκλειστικό μέσον/μη εγκλεισμένη
Μαλτοδεξτρίνη	5	εγκλεισμένη
	6	Εγκλεισμένη/μη εγκλεισμένη 4:1
	7	εγκλειστικό μέσον/μη εγκλεισμένη
κ-καραγενάνη	8	εγκλεισμένη
	9	εγκλεισμένη/μη εγκλεισμένη 4:1
	10	εγκλειστικό μέσον/μη εγκλεισμένη
Ινουλίνη	11	εγκλεισμένη
	12	εγκλεισμένη/μη εγκλεισμένη 4:1
	13	εγκλειστικό μέσον/μη εγκλεισμένη
Κυκλοδεξτρίνη	14	εγκλεισμένη
	15	εγκλεισμένη/μη εγκλεισμένη 4:1
	16	εγκλειστικό μέσον/μη εγκλεισμένη

Αλγινικό νάτριο	17	εγκλεισμένη
	18	εγκλεισμένη/μη εγκλεισμένη 4:1
	19	εγκλειστικό μέσον/μη εγκλεισμένη
Πηκτίνη/καζεΐνη	20	εγκλεισμένη
	21	εγκλεισμένη/μη εγκλεισμένη 4:1
	22	εγκλειστικό μέσον/μη εγκλεισμένη
Αλγινικό νάτριο/ξανθάνη	23	εγκλεισμένη
	24	εγκλεισμένη/μη εγκλεισμένη 4:1
	25	εγκλειστικό μέσον/μη εγκλεισμένη
Ινουλίνη/Κυκλοδεξτρίνη	26	εγκλεισμένη
	27	εγκλεισμένη/μη εγκλεισμένη 4:1
	28	εγκλειστικό μέσον/μη εγκλεισμένη
Άμυλο	29	εγκλεισμένη
	30	εγκλεισμένη/μη εγκλεισμένη 4:1
	31	εγκλειστικό μέσον/μη εγκλεισμένη

Πίνακας 6.4 3η σειρά πειραμάτων με την τεχνική εγκλεισμού εξώθησης και θερμοκρασία ζύμωσης τους 45°C

Κωδικοποίηση	Μέσον ή μείγμα εγκλεισμού	Πείραμα	Εμβολιασμός
1° μείγμα	Αλγινικό/ξανθάνη/μαλτοδεξτρίνη/φρουκτόζη/MRS broth/γλυκερόλη	1	εγκλεισμένα σφαιρίδια
		2	εγκλεισμένα σφαιρίδια/μη εγκλεισμένη 4:1
2° μείγμα	Αλγινικό	3	εγκλεισμένα σφαιρίδια
		4	εγκλεισμένα σφαιρίδια/μη εγκλεισμένη 4:1
3° μείγμα	Αλγινικό/πηκτίνη	5	εγκλεισμένα σφαιρίδια
		6	εγκλεισμένα σφαιρίδια/μη εγκλεισμένη 4:1
4° μείγμα	Ξανθάνη/τζελάνη	7	εγκλεισμένα σφαιρίδια
		8	εγκλεισμένα σφαιρίδια/μη εγκλεισμένη 4:1

6.5 Μετρήσεις

6.5.1 Μετρήσεις στις τεχνικές ξήρανσης με κατάψυξη

Μετά την λήξη της ξήρανσης με κατάψυξη, τα τρυβλία ζυγίστηκαν στον ζυγό ακριβείας 0,001g και μετά το περιεχόμενό τους τοποθετήθηκε εντός μύλου άλεσης (ο οποίος είχε καθαριστεί καταλλήλως), όπου και λειοτριβήθηκε. Τα άδεια χρησιμοποιημένα τρυβλία, ζυγίστηκαν ξανά στον ζυγό ακριβείας 4 δεκαδικών ψηφίων, οπότε προσδιορίστηκαν τυχόν απώλειες.

6.5.2 Μετρήσεις στις τεχνικές εγκλεισμού με εξώθηση

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί μέτρηση ζ-δυναμικού στα 4, παραπάνω, εγκλειστικά μείγματα και στα αντίστοιχα διαλύματα $CaCl_2$, έγιναν αρχικά μετρήσεις απορρόφησης και δείκτη διάθλασης. Πιο συγκεκριμένα, σε κάθε εγκλειστικό μείγμα της μεθόδου εξώθησης, μετρήθηκε η απορρόφηση στα 633nm και ο δείκτης διάθλασης. Για τα διαλύματα $CaCl_2$ τόσο η απορρόφηση στα 633nm, όσο και ο δείκτης διάθλασης θεωρήθηκε ότι έχουν ίδιες τιμές με τις αντίστοιχες του νερού, συνεπώς δεν πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις. Τα αποτελέσματα των παραπάνω μετρήσεων εισήχθησαν ως δεδομένα στο πρόγραμμα της συσκευής μέτρησης ζ-δυναμικού και εν συνεχεία πραγματοποιήθηκε μέτρηση ζ-δυναμικού των 3 εγκλειστικών μειγμάτων και των αντίστοιχων διαλυμάτων $CaCl_2$.

6.5.3 Μετρήσεις κατά την ζύμωση του γάλακτος και στο γιαούρτι

Τόσο κατά την διαδικασία παραγωγής του γιαουρτιού, όσο και μετά την ολοκλήρωσή της πραγματοποιήθηκαν οι ακόλουθες μετρήσεις:

- Μέτρηση του pH ζύμωσης καθόλην την διάρκεια ζύμωσης του γιαουρτιού ανά 5min, με την χρήση ηλεκτρονικού pH-μέτρου (εξέλιξη της ζύμωσης).
- Μέτρηση της συνολικής χρονικής διάρκειας της ζύμωσης (ως σημείο λήξης της ζύμωσης θεωρείται η χρονική στιγμή που το pH λαμβάνει την τιμή 4,5).
- Μέτρηση του ιξώδους του γιαουρτιού αμέσως μετά τον τερματισμό της ζύμωσης (θεωρείται ότι το γιαούρτι έχει ακόμη την θερμοκρασία ζύμωσης), με την χρήση περιστροφικού ιξωδομέτρου.
- Μέτρηση του ιξώδους του γιαουρτιού την επόμενη ημέρα της ζύμωσης (θεωρείται ότι το γιαούρτι έχει την θερμοκρασία αποθήκευσής του, που είναι 4°C) με τη χρήση περιστροφικού ιξωδομέτρου.
- Ανάλυση υφής του γιαουρτιού, την επόμενη ημέρα της ζύμωσης (μέτρηση σκληρότητας, προσκολλησιμότητας και υπολογισμός της συνεκτικότητας και του κομμιώδους), με την βοήθεια του αναλυτή υφής.
- Μικροβιολογικός έλεγχος των γιαουρτιών (σε διάστημα μικρότερο της μίας εβδομάδας από την ζύμωση του δείγματος).

Αναλυτικά η διαδικασία του μικροβιολογικού ελέγχου περιγράφεται ως εξής:

Για την μέτρηση των προβιοτικών *Bifidobacterium Animalis subps. Lactis,* χρησιμοποιήθηκε το εξειδικευμένο υπόστρωμα TOS-MUP. Για την παρασκευή του, για κάθε 475mL TOS άγαρ απαιτούνταν 25mL MUP ή ένα σφραγισμένο φιαλίδιο εμπορίου και 25mL απιονισμένου και αποστειρωμένου νερού. Για κάθε τρυβλίο χρειάζονταν περίπου 10mL TOS-MUP. Επίσης παρασκευαζόταν και διάλυμα Ringer, σύμφωνα με τις οδηγίες του προμηθευτή. Για κάθε δείγμα γιαουρτιού χρειάζονταν 22,5mL Ringer, ενώ άλλα 9mL ήταν αναγκαία για κάθε αραίωση. Γνωρίζοντας αυτά, υπολογιζόταν η ποσότητα Ringer που έπρεπε να παρασκευαστεί κάθε φορά. Ακόμη, τοποθετούνταν 100mL περίπου απιονισμένου νερού σε κωνική φιάλη, η οποία σφραγιζόταν με χαρτί κουζίνας και αλουμινόχαρτο. Με αλουμινόχαρτο καλύπτονταν, επίσης, οι βάσεις των tips, το σιφώνιο και η κωνική φιάλη που περιείχε το TOS άγαρ. Όλα τα ανωτέρω (πλην του εμπορικού σκευάσματος MUP) μεταφέρονταν στην συσκευή αποστείρωσης όπου και αποστειρώνονταν στους 121°C για 15min. Κατά την διάρκεια της αποστείρωσης πραγματοποιείτο προετοιμασία και καθαρισμός του πάγκου εργασίας με οινόπνευμα.

Μετά τον τερματισμό της αποστείρωσης, το TOS άγαρ μεταφερόταν στον πάγκο μαζί με το αποστειρωμένο νερό, 1 σφραγισμένο φιαλίδιο εμπορίου MUP το οποίο διατηρείτο στο ψυγείο, 1 σφραγισμένη σύριγγα των 5mL και ένα μικροφίλτρο Millipore 0.22μm. Με την βοήθεια της σύριγγας μεταφέρονταν στο φιαλίδιο του MUP 25 mL απιονισμένου και αποστειρωμένου νερού, ανακινούνταν ελαφρώς για να ομογενοποιηθεί το διάλυμα και στη συνέχεια μέσω της σύριγγας και αφού είχε προστεθεί το φίλτρο Millipore, μεταφερόταν το διάλυμα στην κωνική φιάλη που περιείχε το άγαρ TOS. Η κωνική φιάλη αναδευόταν καθόλην την διάρκεια της προσθήκης του διαλύματος MUP, για την καλύτερη διάλυσή του εντός του TOS. Το υπόστρωμα TOS-MUP, όταν ήταν πλέον έτοιμο, τοποθετείτο σε υδατόλουτρο στους 50°C έως ότου να χρησιμοποιηθεί.

Μέσα στον αποστειρωμένο θάλαμο ζυγίζονταν, σε αποστειρωμένο περιέκτη, 2,5g γιαουρτιού και προσετίθενταν άλλα 22,5g Ringer. Έπειτα από αυτό, γινόταν ομογενοποίηση του δείγματος στον ομογενοποιητή bagmixer για 1min περίπου. Το ομογενοποιημένο δείγμα αντιστοιχούσε στην πρώτη αραίωση. Από το δείγμα αυτό ελαμβάνετο 1mL και τοποθετείτο στον πρώτο αποστειρωμένο σωλήνα, στον οποίο προσετίθενταν επιπλέον 9mL Ringer. Ύστερα ελαμβάνετο 1mL από τον πρώτο σωλήνα και τοποθετείτο στον δεύτερο, στον οποίο προσετίθενταν 9mL Ringer. Οι διαδοχικές αραιώσεις επαναλαμβάνονταν έως ότου να επιτευχθεί ο επιθυμητός αριθμός αραιώσεων.

Εικόνα 6.4 Τρυβλία με δείγματα και TOS-MUP στεγνώνουν δίπλα στην φλόγα εντός του πάγκου εργασίας

Ακολούθως, 1mL δείγματος ελαμβάνετο από συγκεκριμένους σωλήνες και τοποθετείτο σε τρυβλίο. Σε κάθε τρυβλίο τοποθετούνταν επίσης και 10mL TOS-MUP. Τα τρυβλία που περιείχαν το δείγμα μαζί με TOS-MUP, αφήνονταν κοντά στην φλόγα του καμινέτου με ανοιγμένο το κάλυμμα, προκειμένου να στεγνώσουν. Μόλις ολοκληρωνόταν όλη η ανωτέρω διεργασία, τα τρυβλία τοποθετούνταν, με το κάλυμμα προς τα κάτω, μέσα σε αεροστεγή δοχεία (τζάρες), τα οποία και μεταφέρονταν σε επωαστήρα στους 37°C, για 72h.

6.6 Στατιστική επεξεργασία

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων γίνεται με τη βοήθεια του προγράμματος STATISTICA 12.0 (StatSoft, Inc.). Για την εύρεση των παραγόντων με σημαντική επίδραση σε κάθε ένα από τα παραπάνω εξεταζόμενα χαρακτηριστικά ποιότητας των γιαουρτιών πραγματοποιούνται αναλύσεις διακύμανσης (ANOVA). Σε κάθε χαρακτηριστικό εξετάζεται η επίδραση των παραγόντων είδος εγκλειστικού και τύπος (ή είδος) εμβολιασμού. Μόλις ευρεθεί ότι υπάρχει επίδραση από κάποιο ή κάποιους παράγοντες, τότε γίνεται και έλεγχος Duncan (Duncan test) ως προς τις σημαντικές διαφορές των μέσων όρων των παραμέτρων και τις ομογενείς ομάδες αυτών. Τέλος, γίνεται ανάλυση του πειράματος στις κύριες συνιστώσες (PCA) για τον προσδιορισμό των παραμέτρων με τη μεγαλύτερη επίδραση στο πείραμα, αλλά και τον έλεγχο για ύπαρξη θετικών ή αρνητικών συσχετίσεων μεταξύ τους.

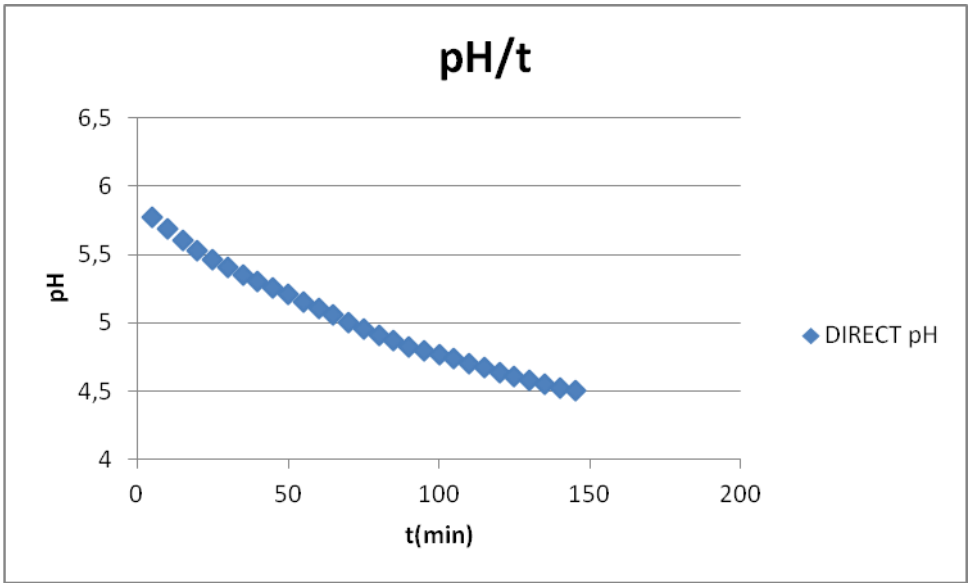
7. Αποτελέσματα και συζήτηση αποτελεσμάτων

Στην ενότητα αυτή παρουσιάζονται τα αποτελέσματα, όπως προέκυψαν από την διεξαγωγή των πειραμάτων σε πίνακες και διαγράμματα που κατασκευάστηκαν από αυτά. Σε ότι αφορά στα πειράματα του εγκλεισμού, θεωρήθηκε ότι διατηρείτο η αναλογία της προβιοτικής καλλιέργειας στο μείγμα της με το εγκλειστικό μέσον και δεν ελέγχθηκε ο αριθμός των προβιοτικών που επιβίωναν. Αρχικά έγιναν μετρήσεις που αφορούσαν στην εξέλιξη της ζύμωσης του γάλακτος προς γιαούρτι μέσω παρακολούθησης της μεταβολής του pH του εμβολιασμένου γάλακτος. Μετρήθηκε η χρονική διάρκεια της ζύμωσης, το τέλος της οποίας και τερμάτιζε μόλις το pH έφτανε την τιμή 4,5. Επίσης ελεγχόταν η προσαρμογή της καμπύλης πτώσης του pH συναρτήσει του χρόνου στο μαθηματικό μοντέλο (σχέση 3.1). Στις περιπτώσεις που η προσαρμογή ήταν καλή ευρίσκονταν η διάρκεια λανθάνουσας φάσης (λ) και ο μέγιστος ρυθμός μείωσης (μ). Τα δύο τελευταία μεγέθη (λ, μ) υπολογίστηκαν με την βοήθεια του προγράμματος SigmaPlot 10.0. Εν συνεχεία, έγιναν μετρήσεις ιξώδους, υφής και μικροβιακού φορτίου στα τελικά γιαούρτια που εμβολιάστηκαν με αυτές και με μη εγκλεισμένη καλλιέργεια όπως και με μείγματα εγκλεισμένων και μη καλλιεργειών και έτσι μέσω της επεξεργασίας αυτών των μετρήσεων εξάγονται συμπεράσματα τόσο για τον εγκλεισμό, όσο και για την διατήρηση της δραστικότητας και την αποτελεσματικότητα αυτών στην ζύμωση του γιαουρτιού με εγκλεισμένα βακτήρια. Επίσης, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέρχονται μετά την στατιστική επεξεργασία των παραπάνω μετρήσεων.

7.1 Πρώτη σειρά πειραμάτων (προκαταρκτικά)

7.1.1 Αποτελέσματα μετρήσεων πρώτης σειράς πειραμάτων (τεχνική εγκλεισμού ξήρανση με κατάψυξη και θερμοκρασία ζύμωσης 40°C)

7.1.1.1 Ζύμωση με μη εγκλεισμένη καλλιέργεια (Direct ή τυφλό δείγμα)



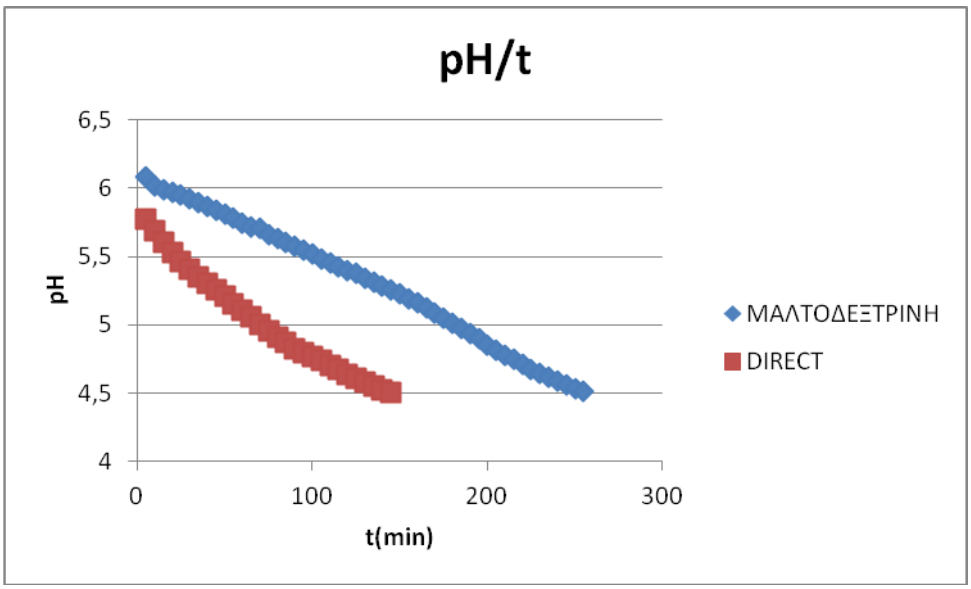
Διάγραμμα 7.1 Μεταβολή pH συναρτήσει του χρόνου κατά την ζύμωση του γάλακτος προς παραγωγή γιαουρτιού με μη εγκλεισμένη (direct) καλλιέργεια

Παρατηρείται ότι κατά την ζύμωση του γάλακτος με προβιοτική (μη εγκλεισμένη) καλλιέργεια εκκίνησης στους 40°C, δεν παρουσιάζεται λανθάνουσα φάση. Το γεγονός αυτό, είναι πολύ πιθανόν να οφείλεται στην ταχεία δράση των προβιοτικών βακτηρίων.

7.1.1.2 Ζύμωση με εγκλεισμένη, με χιτοζάνη, καλλιέργεια

Η εγκλεισμένη προβιοτική καλλιέργεια με χιτοζάνη δεν οδήγησε σε πήξη του γάλακτος κατά την επώαση και το pH του γάλακτος έμεινε σταθερό και κυμαινόταν από 5,7-5,8. Η χιτοζάνη, όπως έχει αναφερθεί και στο 5° κεφάλαιο, έχει αντιμικροβιακό χαρακτήρα και η αποτυχία ζύμωσης του γάλακτος οφείλεται, ενδεχομένως, στην αναστολή της δράσης των προβιοτικών βακτηρίων τα οποία έχει εγκλείσει. Παρόλα αυτά, επειδή η χιτοζάνη θεωρείται καλό εγκελιστικό μέσο, για το λόγο αυτό προτείνεται συνήθως να χρησιμοποιείται σε μίγματα με άλλα εγκλειστικά μέσα.

7.1.1.3 Ζύμωση με εγκλεισμένη, με μαλτοδεξτρίνη, καλλιέργεια



Διάγραμμα 7.2 Μεταβολή του pH συναρτήσει του χρόνου κατά την ζύμωση του γάλακτος προς παραγωγή γιαουρτιού με εγκλεισμένη, με μαλτοδεξτρίνη, προβιοτική καλλιέργεια

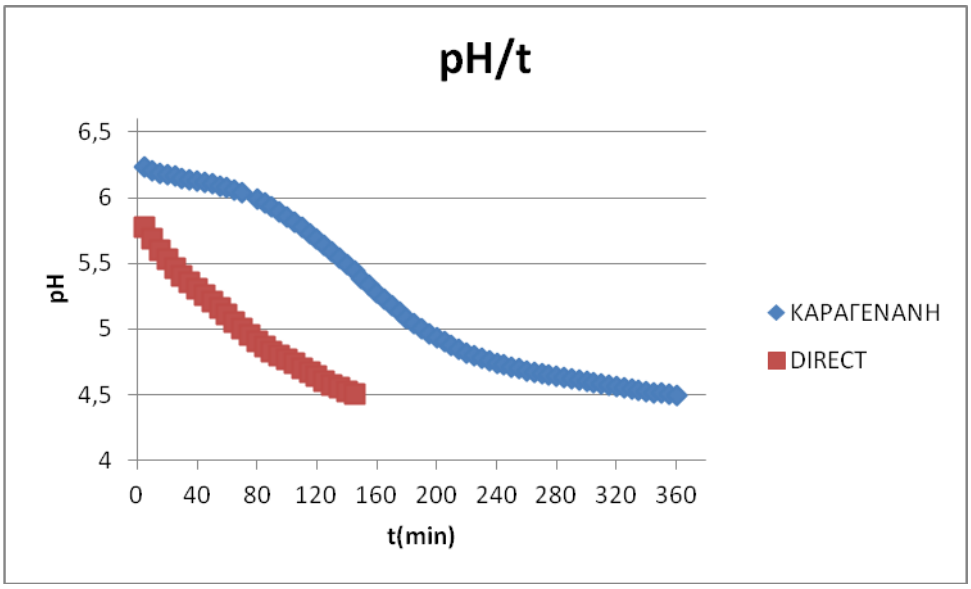
Η ζύμωση με εγκλεισμένη καλλιέργεια με μαλτοδεξτρίνη παρουσιάζει κάποια υστέρηση σε σχέση με το τυφλό δείγμα (direct). Και σε αυτήν την περίπτωση δεν φαίνεται να υπάρχει λανθάνουσα φάση, καθώς το pH μειώνεται με μεγάλο ρυθμό εξ αρχής, σχεδόν αμέσως μετά τον εμβολιασμό.

Πίνακας 7.Αποτελέσματα μετρήσεων κατά την ζύμωση γάλακτος προς γιαούρτι με εγκλεισμένη, με μαλτοδεξτρίνη, καλλιέργεια

Χαρακτηριστικό	Τυφλό	Εγκλεισμένη καλλιέργεια
Συνολική διάρκεια (min)	145	255
Μέγιστος ρυθμός μείωσης, μ	-0,29	-0,04
Διάρκεια λανθάνουσας φάσης, λ (min)	(-1304,8)	(507)
Προσαρμογή στο μοντέλο	Όχι	Όχι
Ιξώδες μετά την ζύμωση (cPs)	5000	5340
Ιξώδες μετά από 24h αποθήκευση στους 4°C (cPs)	13400	10150
Προσκολλησιμότητα (N*s)	0,211	0,309
Συνεκτικότητα	0,211	0,309
Σκληρότητα (N)	0,536	0,510
Κομμιώδες (N)	0,8248	0,8790
Μικροβιολογικά (cfu/g)	0,442	0,448

Στο σημείο αυτό, το μέγεθος που κρίνεται σκόπιμο να σχολιαστεί, είναι η διάρκεια της λανθάνουσας φάσης. Η διάρκεια της λανθάνουσας φάσης (λ) έχει, για το μεν τυφλό δείγμα αρνητική τιμή, κάτι το οποίο δεν έχει φυσικό νόημα καθώς δεν υφίσταται αρνητικός χρόνος, για το δε δείγμα που έχει εμβολιαστεί με εγκλεισμένη με μαλτοδεξτρίνη καλλιέργεια, τιμή που υπερβαίνει την διάρκεια ζύμωσης. Η αστοχία αυτή δεν οφείλεται σε λάθος επιλογή της εξίσωσης προσαρμογής στην καμπύλη μεταβολής του pH συναρτήσει του χρόνου ζύμωσης, καθώς αυτή έχει προκύψει ύστερα από βιβλιογραφική έρευνα των μελών της επιστημονικής ομάδας του εργαστηρίου. Η διαφορά αυτή της μη ύπαρξης λανθάνουσας φάσης στα δείγματα αυτά ενδεχομένως να οφείλεται στο ότι το μοντέλο αναφέρεται σε συμβατική καλλιέργεια ή να προκύπτει λόγω της ταχείας δράσης της προβιοτικής καλλιέργειας εκκίνησης με την οποία έχουν εμβολιαστεί τα δείγματα. Η συγκεκριμένη εξίσωση λοιπόν, ισχύει στις περιπτώσεις που εντοπίζεται λανθάνουσα φάση στο διάγραμμα μεταβολής του pH συναρτήσει του χρόνου. Η εξήγηση αυτή μπορεί να δοθεί και σε κάθε περίπτωση εμφάνισης τέτοιων παράδοξων τιμών στους πίνακες που ακολουθούν και αφορούν πειράματα, είτε αυτής της σειράς, είτε των άλλων δύο σειρών. Έτσι, παρακάτω τα αποτελέσματα αυτά δεν σχολιάζονται και στους πίνακες, τα μη αποδεκτά αποτελέσματα παρατίθενται εντός παρένθεσης.

7.1.1.4 Ζύμωση με εγκλεισμένη, με κ-καραγενάνη, καλλιέργεια



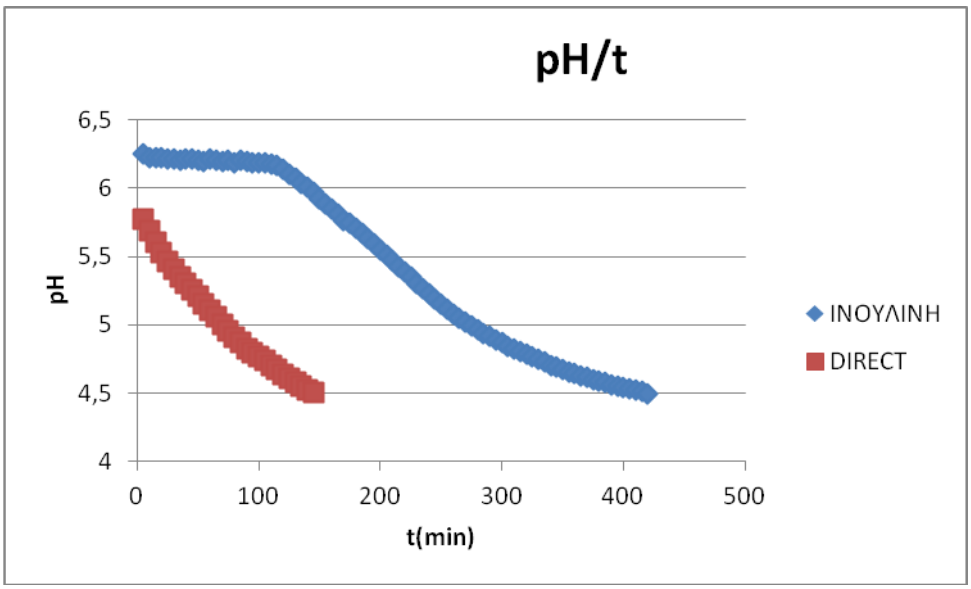
Διάγραμμα 7.3 Μεταβολή του pH συναρτήσει του χρόνου κατά την ζύμωση του γάλακτος προς παραγωγή γιαουρτιού με εγκλεισμένη, με κ-καραγενάνη, προβιοτική καλλιέργεια και σύγκριση με direct

Στο ανωτέρω διάγραμμα παρατηρείται ότι η καμπύλη μεταβολής του pH σε σχέση με τον χρόνο, για το εμβολιασμένο γάλα με εγκλεισμένη προβιοτική καλλιέργεια με κ-καραγενάνη, παρουσιάζει υστέρηση σε σχέση με το τυφλό δείγμα. Επίσης, εμφανίζεται λανθάνουσα φάση με διάρκεια 82,61 min.

Πίνακας 7.2 Αποτελέσματα μετρήσεων κατά την ζύμωση γάλακτος προς παραγωγή γιαουρτιού με εγκλεισμένη, με κ-καραγενάνη, καλλιέργεια

Χαρακτηριστικό	Τυφλό	Εγκλεισμένη καλλιέργεια
Συνολική διάρκεια (min)	145	360
Μέγιστος ρυθμός μείωσης, μ	-0,29	-3,17
Διάρκεια λανθάνουσας φάσης, λ (min)	(-1304,8)	82,61
Προσαρμογή στο μοντέλο 3.1	όχι	Ναι
Ιξώδες μετά την ζύμωση (cPs)	5000	10300
Ιξώδες μετά από 24h αποθήκευση στους 4°C (cPs)	13400	17100
Προσκολλησιμότητα (N*s)	0,211	0,026
Συνεκτικότητα	0,536	0,641
Σκληρότητα (N)	0,8248	0,8387
Κομμιώδες (N)	0,442	0,538
Μικροβιολογικά (cfu/g)	$5*10^5$	$2*10^5$

7.1.1.5 Ζύμωση με εγκλεισμένη, με ινουλίνη, καλλιέργεια



Διάγραμμα 7.4 Μεταβολή pH συναρτήσει του χρόνου κατά την ζύμωση γάλακτος προς παραγωγή γιαουρτιού με εγκλεισμένη, με ινουλίνη, προβιοτική καλλιέργεια και σύγκριση με direct

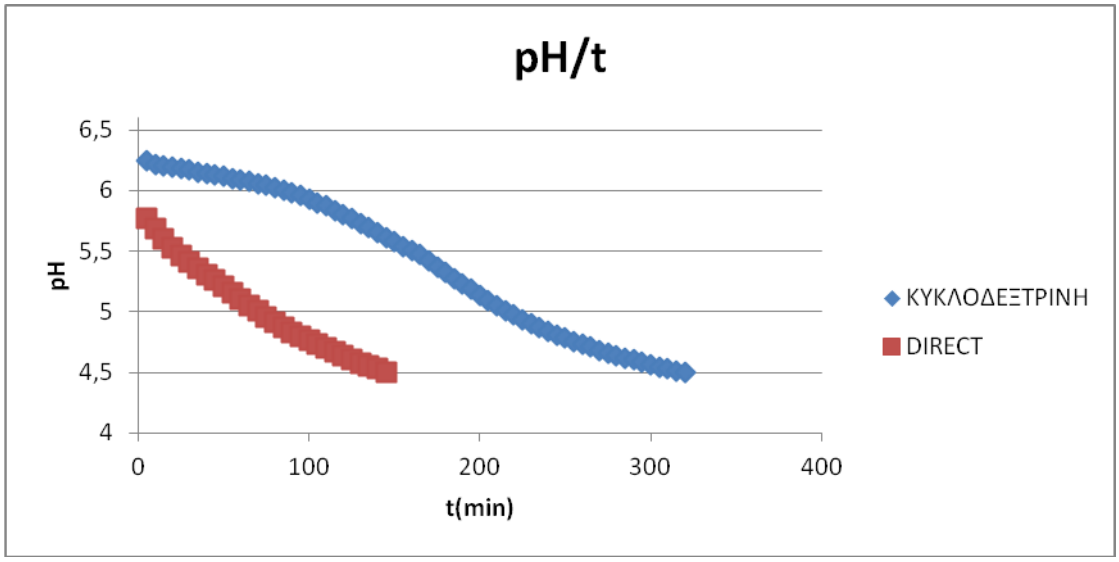
Από την ανωτέρω καμπύλη, φαίνεται πως ο χρόνος ολοκλήρωσης της ζύμωσης είναι μεγαλύτερος στο εμβολιασμένο με εγκλεισμένη προβιοτική καλλιέργεια με ινουλίνη, εν

συγκρίσει με το τυφλό δείγμα. Η λανθάνουσα φάση διαρκεί 160,33min ενώ μέγιστος ρυθμός μείωσης έχει τιμή μ= 0,02.

Πίνακας 7.3 Αποτελέσματα μετρήσεων κατά την ζύμωση γάλακτος προς γιαούρτι με εγκλεισμένη, με ινουλίνη, καλλιέργεια

Χαρακτηριστικό	Τυφλό	Εγκλεισμένη καλλιέργεια
Συνολική διάρκεια (min)	145	420
Μέγιστος ρυθμός μείωσης, μ	-0,29	-0,02
Διάρκεια λανθάνουσας φάσης, λ (min)	(-1304,8)	160,33
Προσαρμογή στο μοντέλο 3.1	Όχι	Ναι
Ιξώδες μετά την ζύμωση (cPs)	5000	5900
Ιξώδες μετά από 24h αποθήκευση στους 4°C (cPs)	13400	14134
Προσκολλησιμότητα (N*s)	0,211	0,232
Συνεκτικότητα	0,536	0,500
Σκληρότητα (N)	0,8248	0,6150
Κομμιώδες (N)	0,442	0,308
Μικροβιολογικά (cfu/g)	$5*10^5$	$2*10^5$

7.1.1.6 Ζύμωση με εγκλεισμένη, με κυκλοδεξτρίνη, καλλιέργεια



Διάγραμμα 7.5 Μεταβολή του pH συναρτήσει του χρόνου κατά την ζύμωση γάλακτος προς παραγωγή γιαουρτιού με εγκλεισμένη, με κυκλοδεξτρίνη, προβιοτική καλλιέργεια

Η καμπύλη πτώσης του pH συναρτήσει του χρόνου παρουσιάζει και στην περίπτωση του εμβολιασμένου δείγματος με εγκλεισμένη προβιοτική καλλιέργεια με κυκλοδεξτρίνη, σημαντικές διαφορές σε σχέση με το τυφλό δείγμα. Η αρκετά μεγαλύτερη διάρκεια

ζύμωσης, η διαφορετική μορφή της καμπύλης και η ύπαρξη λανθάνουσας φάσης, γίνονται πλήρως αντιληπτές μέσω του διαγράμματος 7.5.

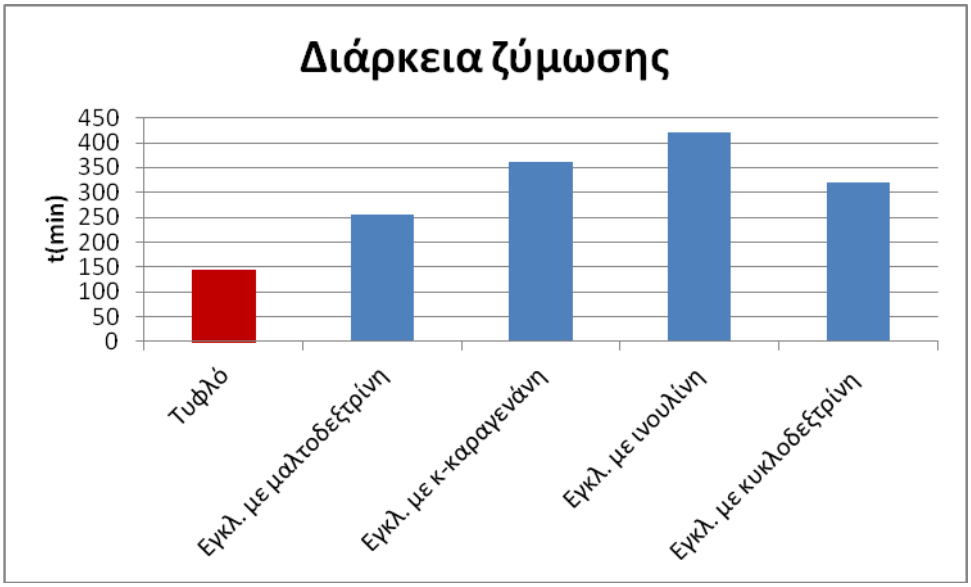
Πίνακας 7.4 Αποτελέσματα μετρήσεων κατά την ζύμωση γάλακτος προς γιαούρτι με εγκλεισμένη, με κυκλοδεξτρίνη, καλλιέργεια

Χαρακτηριστικό	Τυφλό	Εγκλεισμένη καλλιέργεια
Συνολική διάρκεια (min)	145	320
Μέγιστος ρυθμός μείωσης, μ	-0,29	-0,02
Διάρκεια λανθάνουσας φάσης, λ (min)	(-1304,8)	114,92
Προσαρμογή στο μοντέλο 3.1	όχι	Ναι
Ιξώδες μετά την ζύμωση (cPs)	5000	5800
Ιξώδες μετά από 24h αποθήκευση στους 4°C (cPs)	13400	13300
Προσκολλησιμότητα (N*s)	0,211	0,163
Συνεκτικότητα	0,536	0,614
Σκληρότητα (N)	0,8248	0,6147
Κομμιώδες (N)	0,442	0,377
Μικροβιολογικά (cfu/g)	$5*10^5$	$4*10^5$

7.1.2 Σύγκριση αποτελεσμάτων 1ης σειράς πειραμάτων (προκαταρκτικών)

Σε αυτήν την σειρά παρατίθενται διαγράμματα σύγκρισης με σκοπό την κατανόηση της επιρροής κάθε μέσου εγκλεισμού στις διάφορες παραμέτρους.

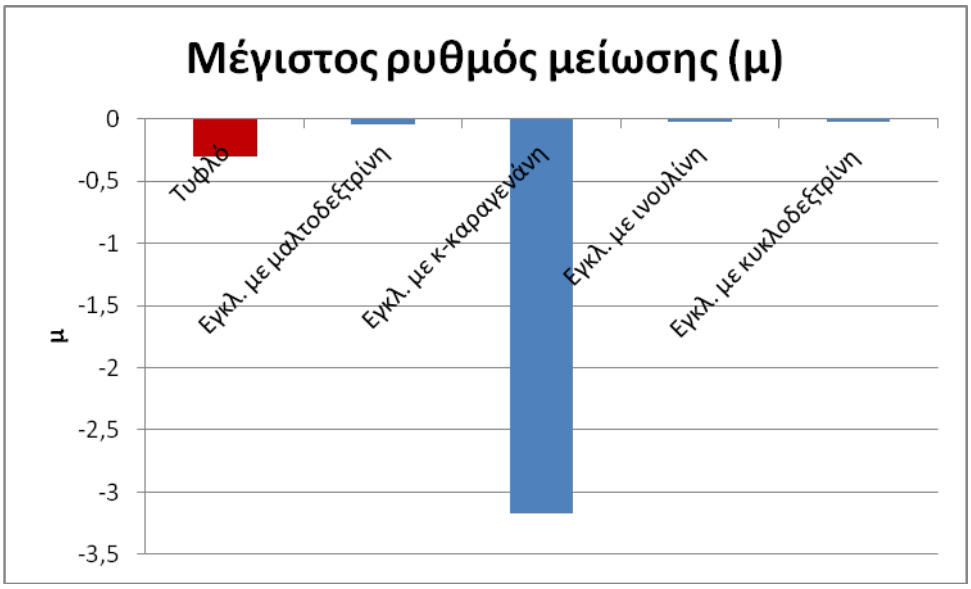
7.2.1.1 Χρονική διάρκεια ζύμωσης



Διάγραμμα 7.6 Η διάρκεια ζύμωσης του γάλακτος προς γιαούρτι με εγκλεισμένη καλλιέργεια με διάφορα μέσα

Από το ανωτέρω διάγραμμα γίνεται αντιληπτό ότι η διάρκεια ζύμωσης όλων των δειγμάτων που έχουν εμβολιαστεί με εγκλεισμένη καλλιέργεια είναι μεγαλύτερη από την αντίστοιχη του τυφλού (μη εγκλεισμένη direct καλλιέργεια). Μάλιστα την μεγαλύτερη χρονική διάρκεια ζύμωσης παρουσιάζει το δείγμα που έχει εμβολιαστεί με εγκλεισμένη, με ινουλίνη, προβιοτική καλλιέργεια. Η καθυστέρηση που παρουσιάζουν όλα τα εμβολιασμένα, με εγκλεισμένη καλλιέργεια, δείγματα, είναι πολύ πιθανό να οφείλεται, στην επιτυχία εγκλεισμού των προβιοτικών βακτηρίων με την συγκεκριμένη μέθοδο και τα μέσα που χρησιμοποιήθηκαν κάτι το οποίο θα εξακριβωθεί αν ισχύει και στις επόμενες σειρές.

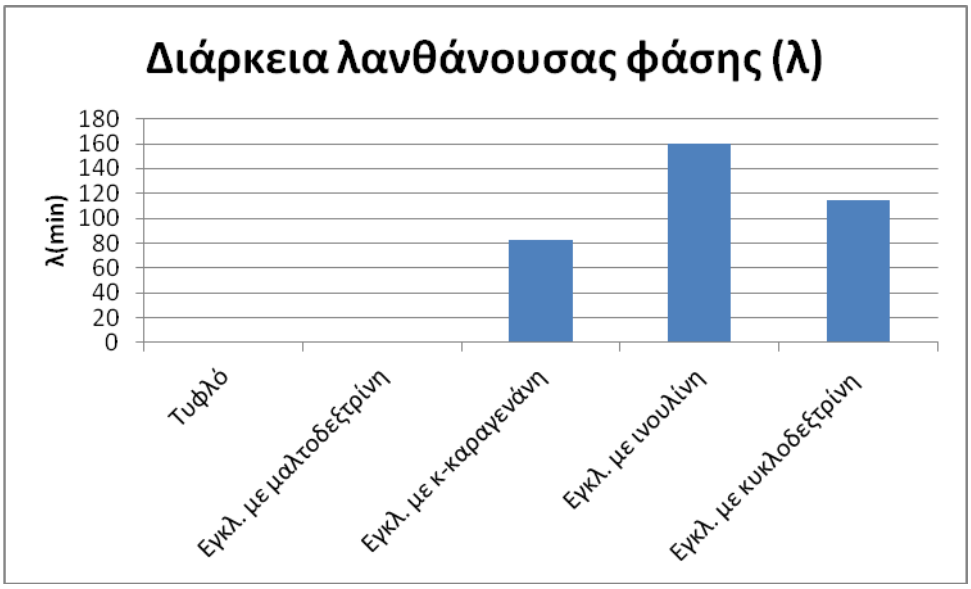
7.2.1.2 Μέγιστος ρυθμός μείωσης pH



Διάγραμμα 7.7 Ο μέγιστος ρυθμός μείωσης (μ) των γιαουρτιών που προέρχονται από ζύμωση γάλακτος με εγκλεισμένη καλλιέργεια με διάφορα μέσα εγκλεισμού

Μεγάλη είναι η επίδραση του μέσου εγκλεισμού στην μεταβλητή του μέγιστου ρυθμού μείωσης του pH μ, όπως γίνεται αντιληπτό από το παραπάνω διάγραμμα. Μεγαλύτερη αύξηση (κατ' απόλυτη τιμή) επιφέρει η κ-καραγενάνη.

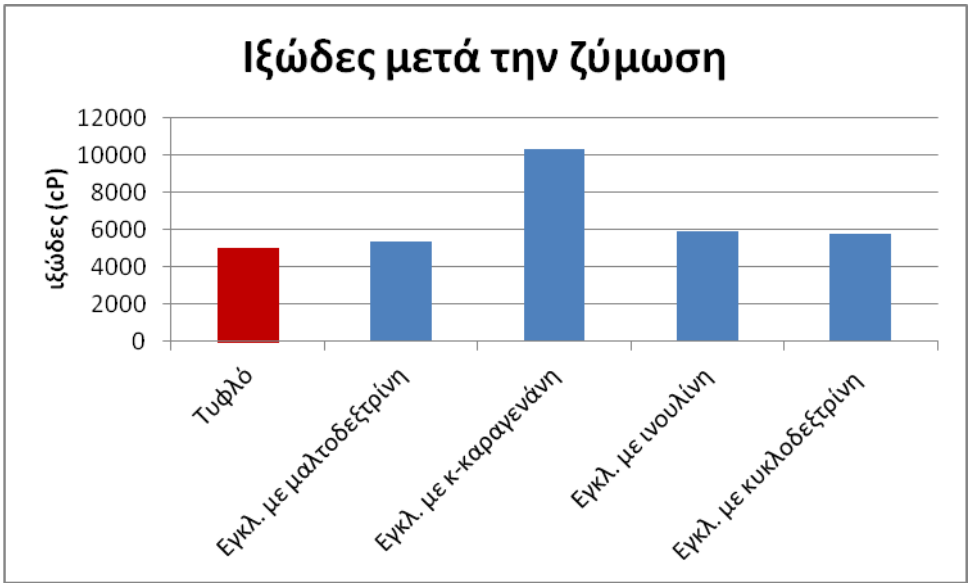
7.2.1.3 Διάρκεια λανθάνουσας φάσης ζύμωσης



Διάγραμμα 7.8 Η διάρκεια λανθάνουσας φάσης (λ) κατά την ζύμωση γάλακτος προς γιαούρτι με εγκλεισμένη καλλιέργεια με διάφορα μέσα εγκλεισμού

Τόσο το τυφλό, όσο και το δείγμα που έχει εμβολιαστεί με εγκλεισμένη καλλιέργεια με μαλτοδεξτρίνη, δεν παρουσιάζουν λανθάνουσα φάση όπως ήδη έχει αναφερθεί. Για τα 3 υπόλοιπα δείγματα, η λανθάνουσα φάση καθενός παρουσιάζει μεγάλες διαφορές, εν συγκρίσει με των υπολοίπων, όπως μπορεί να διαπιστωθεί από το ανωτέρω διάγραμμα. Η ύπαρξη λανθάνουσας φάσης σημαίνει ότι τα προβιοτικά βακτήρια δρουν πιο αργά στα δείγματα αυτά, σε σχέση με το τυφλό δείγμα. Η καθυστέρηση αυτή ενδεχομένως να είναι αποτέλεσμα του εγκλεισμού. Στις υπόλοιπες περιπτώσεις δεν υπήρχε προσαρμογή της καμπύλης μείωσης του pH στο μαθηματικό μοντέλο (σχέση 3.1) και κατά συνέπεια η λανθάνουσα φάση θεωρήθηκε ότι έχει μηδενική τιμή, πράγμα το οποίο βέβαια φαίνεται και από τα αντίστοιχα διαγράμματα μείωσης του pH συναρτήσει του χρόνου.

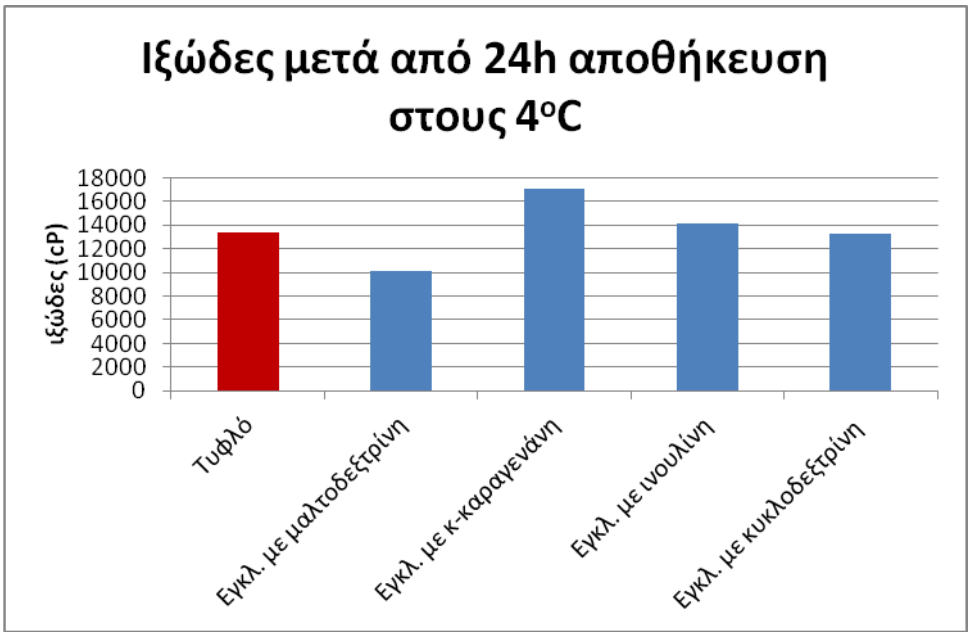
7.2.1.4 Ιξώδες γιαουρτιού μετά την ζύμωση (45°C)



Διάγραμμα 7.9 Το ιξώδες αμέσως μετά την λήξη της ζύμωσης των γιαουρτιών που προέρχονται από ζύμωση γάλακτος με εγκλεισμένη καλλιέργεια με διάφορα μέσα εγκλεισμού

Από το διάγραμμα 7.9 εξάγεται το συμπέρασμα ότι δεν υπάρχουν μεγάλες διαφορές στο μετρούμενο, αμέσως μετά το πέρας της ζύμωσης, ιξώδες των δειγμάτων, για τα διάφορα δείγματα. Εξαίρεση αποτελεί το δείγμα που έχει εμβολιαστεί με εγκλεισμένη, με κ-καραγενάνη, καλλιέργεια.

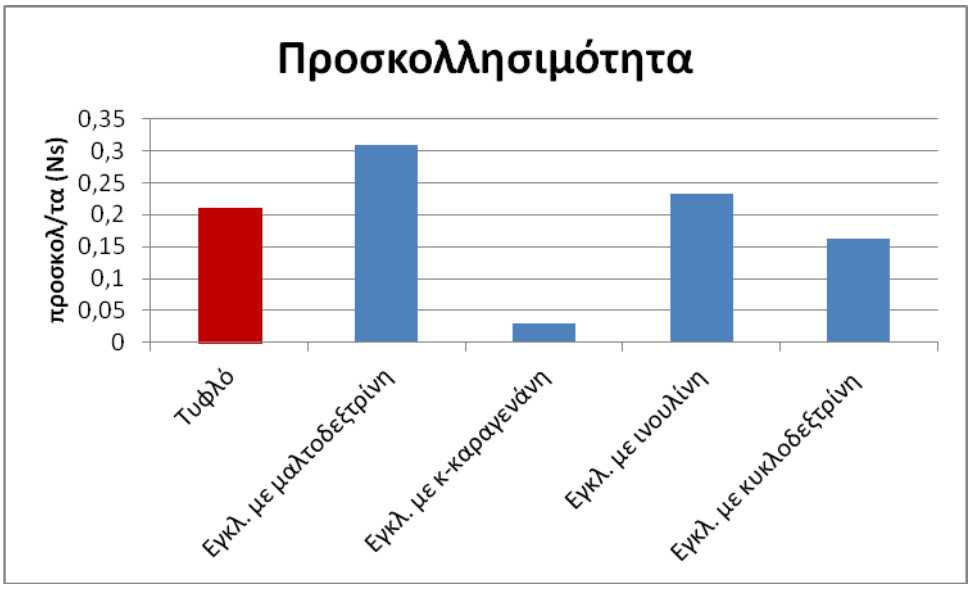
7.2.1.5 Ιξώδες γιαουρτιού μετά από 24h αποθήκευση στους 4°C



Διάγραμμα 7.10 Το ιξώδες μία ημέρα μετά την λήξη της ζύμωσης των γιαουρτιών που προέρχονται από ζύμωση γάλακτος με εγκλεισμένη καλλιέργεια με διάφορα μέσα εγκλεισμού

Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα, τα διάφορα μέσα εγκλεισμού επηρεάζουν το ιξώδες του τελικού προϊόντος, το οποίο μετράται αφού έχει πραγματοποιηθεί αποθήκευσή του στους 4°C, για 1 ημέρα. Μάλιστα, κάποια εγκλειστικά μέσα φαίνεται πως επιφέρουν αύξηση του ιξώδους του γιαουρτιού, ενώ υπάρχει και ένα μέσον (μαλτοδεξτρίνη) το οποίον επιφέρει μείωση του ιξώδους, συγκριτικά με το τυφλό δείγμα. Η αύξηση που επιφέρουν τα εγκλειστικά κυκλοδεξτρίνη και ινουλίνη είναι μικρή, ενώ μεγαλύτερη αύξηση του ιξώδους παρατηρήθηκε στο εμβολιασμένο με εγκλεισμένη, με κ-καραγενάνη, προβιοτική καλλιέργεια, δείγμα.

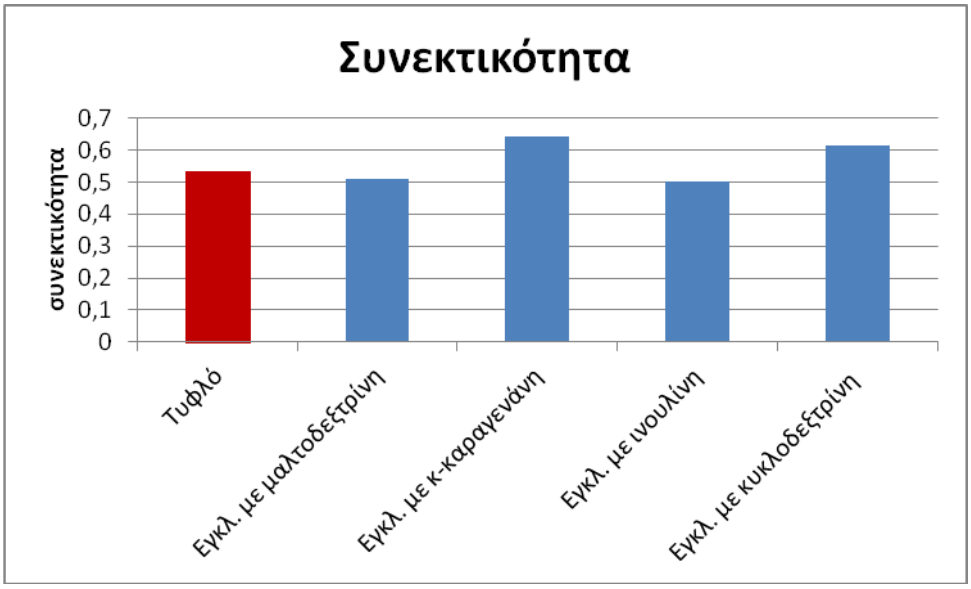
7.2.1.6 Προσκολλησιμότητα γιαουρτιού



Διάγραμμα 7.11 Η προσκολλησιμότητα των γιαουρτιών που προέρχονται από ζύμωση γάλακτος με εγκλεισμένη καλλιέργεια με διάφορα μέσα εγκλεισμού

Από το διάγραμμα 7.11 διακρίνεται η μεγάλη επίδραση του μέσου εγκλεισμού στην προσκολλησιμότητα του γιαουρτιού. Η προσκολλησιμότητα όλων των δειγμάτων διαφέρει από εκείνη του τυφλού, ενώ άλλοτε είναι μεγαλύτερη από αυτό και άλλοτε αρκετά μικτότερη, όπως στην περίπτωση του δείγματος που έχει εμβολιαστεί με εγκλεισμένη καλλιέργεια με κ-καραγενάνη.

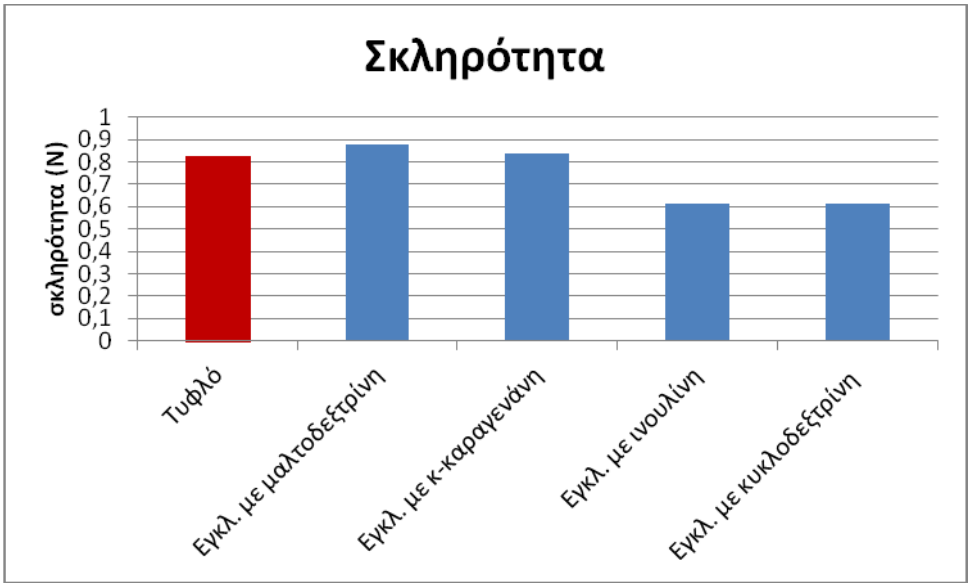
7.2.1.7 Συνεκτικότητα γιαουρτιού



Διάγραμμα 7.12 Η συνεκτικότητα των γιαουρτιών που προέρχονται από ζύμωση γάλακτος με εγκλεισμένη καλλιέργεια με διάφορα μέσα εγκλεισμού

Η συνεκτικότητα, φαίνεται πως αποτελεί μία μεταβλητή η οποία δεν επηρεάζεται ιδιαίτερα από την χρήση διαφορετικών εγκλειστικών μέσων, όπως μαρτυρά το ανωτέρω διάγραμμα. Αξίζει να σημειωθεί ότι η συνεκτικότητα είναι ένα χαρακτηριστικό υφής του γιαουρτιού που ενδιαφέρει, από εμπορικής άποψης.

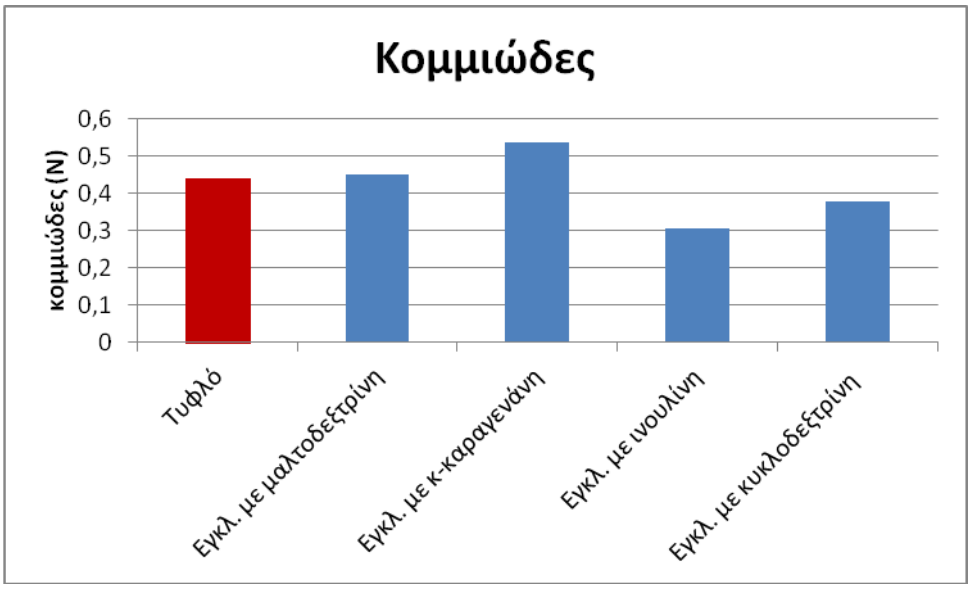
7.2.1.8 Σκληρότητα γιαουρτιού



Διάγραμμα 7.13 Η σκληρότητα των γιαουρτιών που προέρχονται από ζύμωση γάλακτος με εγκλεισμένη καλλιέργεια με διάφορα μέσα εγκλεισμού

Τα διάφορα μέσα εγκλεισμού φαίνεται ότι ασκούν κάποια επίδραση στην σκληρότητα του τελικού προϊόντος. Η επίδραση όμως, αυτή, δεν μπορεί να θεωρηθεί αρκετά σημαντική, στις περισσότερες περιπτώσεις, εκτός από τα δείγματα που έχουν εμβολιαστεί με εγκλεισμένη καλλιέργεια με ινουλίνη και με κυκλοδεξτρίνη, καθώς και στις δύο περιπτώσεις παρατηρείται μία πιο αξιοσημείωτη μείωση της σκληρότητας.

7.2.1.9 Κομμιώδες γιαουρτιού



Διάγραμμα 7.14 Το κομμιώδες των γιαουρτιών που προέρχονται από ζύμωση γάλακτος με εγκλεισμένη καλλιέργεια με διάφορα μέσα εγκλεισμού

Από το παραπάνω διάγραμμα εξάγεται το συμπέρασμα ότι το κομμιώδες μεταβάλλεται ανάλογα με το είδος του εγκλειστικού μέσου που χρησιμοποιείται. Και εδώ οι διάφορες μεταβολές δεν είναι πολύ μεγάλες.

7.2.1.10 Μικροβιακό φορτίο γιαουρτιού

Διάγραμμα 7.15 Το μικροβιακό φορτίο των γιαουρτιών που προέρχονται από ζύμωση γάλακτος με εγκλεισμένη καλλιέργεια με διάφορα μέσα εγκλεισμού

Το μικροβιακό φορτίο του γιαουρτιού φαίνεται ότι επηρεάζεται, σε μεγάλο βαθμό, από το είδος του εγκλειστικού μέσου που χρησιμοποιείται. Όπως, λοιπόν, παρατηρείται από το διάγραμμα, τα χρησιμοποιούμενα εγκλειστικά μέσα μειώνουν το μικροβιακό φορτίο του

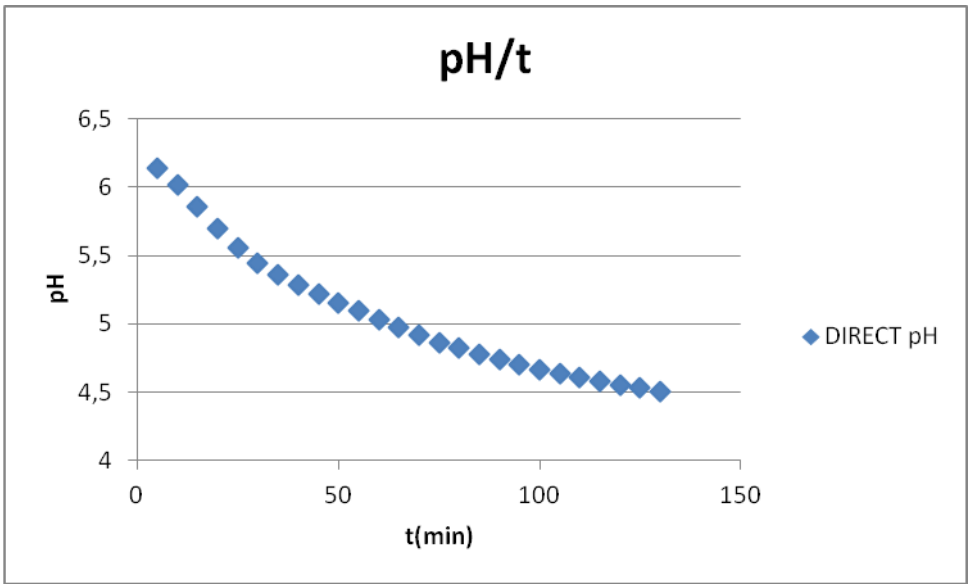
τελικού προϊόντος. Μεγαλύτερη μείωση του μετρούμενου μικροβιακού φορτίου επιφέρει ο εγκλεισμός με μαλτοδεξτρίνη, ενώ μικρότερη η κυκλοδεξτρίνη, συγκριτικά, πάντα με το τυφλό δείγμα. Το μικροβιακό φορτίο στο τελικό προϊόν είναι ένας πολύ σημαντικός παράγοντας. Τα προβιοτικά γιαούρτια θα πρέπει να έχουν τιμή ζώντων προβιοτικών άνω των 10^7cfu/g. Μάλιστα, στην παρούσα εργασία, αφού δεν πραγματοποιείται μικροβιακός έλεγχος απευθείας στις εγκλεισμένες καλλιέργειες, είναι ένας σημαντικός τρόπος ελέγχου της επίτευξης του εγκλεισμού αλλά και της δράσης των προβιοτικών.

Από τα προκαταρτικά πειράματα παρατηρείται ότι η διάρκεια ζύμωσης ήταν αρκετά μεγάλη. Για τον λόγο αυτό, στα επόμενα πειράματα η θερμοκρασία ζύμωσης επιλέχθηκε στους 45°C, γεγονός που κατέστησε πιο γρήγορη την διαδικασία ζύμωσης.

7.2 Δεύτερη σειρά πειραμάτων

7.2.1 Αποτελέσματα μετρήσεων δεύτερης σειράς πειραμάτων (τεχνική εγκλεισμού ξήρανση με κατάψυξη και θερμοκρασία ζύμωσης 45ºC)

7.2.1.1 Ζύμωση με μη εγκλεισμένη καλλιέργεια (Direct ή τυφλό δείγμα)

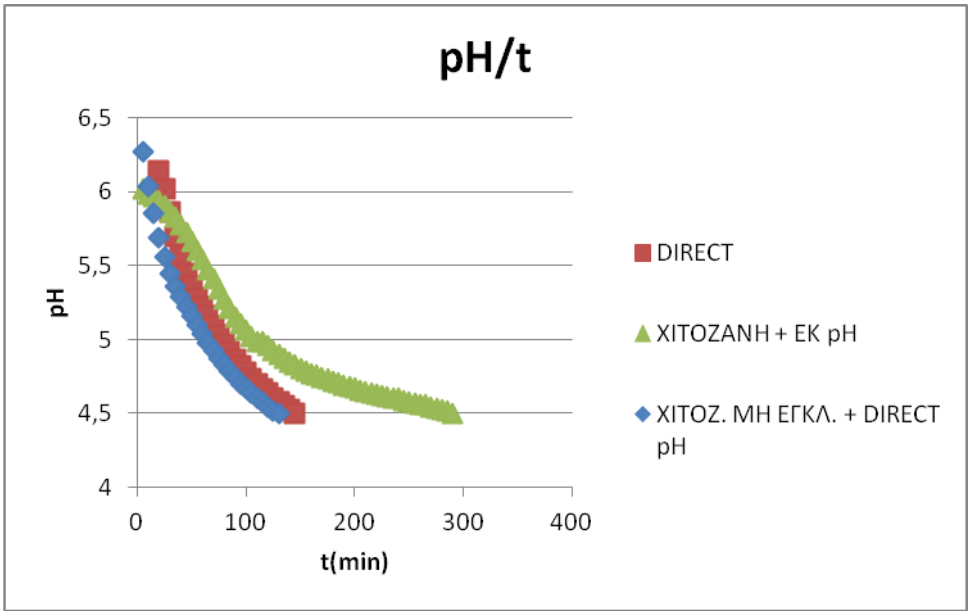


Διάγραμμα 7.16 Μεταβολή pH συναρτήσει του χρόνου κατά την ζύμωση γάλακτος προς γιαούρτι με μη εγκλεισμένη (direct) καλλιέργεια

Στο παραπάνω διάγραμμα παρουσιάζεται η καμπύλη μεταβολής του pH συναρτήσει του χρόνου κατά την ζύμωση γάλακτος με μη εγκλεισμένη προβιοτική καλλιέργεια εκκίνησης. Η ζύμωση λαμβάνει χώρα στους 45°C. Γίνεται φανερό ότι δεν υπάρχει λανθάνουσα φάση. Η πτώση του pH του γάλακτος αρχίζει σχεδόν αμέσως μετά τον εμβολιασμό του με την ποσότητα μη εγκλεισμένης καλλιέργειας. Το γεγονός αυτό πιθανώς οφείλεται στην ταχεία δράση των προβιοτικών βακτηρίων.

7.2.1.2 Ζύμωση με εγκλεισμένη, με χιτοζάνη, καλλιέργεια, με μείγμα εγκλεισμένης/μη εγκλεισμένης καλλιέργειας και με μη εγκλεισμένη καλλιέργεια και ισοδύναμη ποσότητα εγκλειστικού μέσου

Η εγκλεισμένη προβιοτική καλλιέργεια με χιτοζάνη δεν οδήγησε σε πήξη του γάλακτος κατά την επώαση και μία εξήγηση γι' αυτό έχει ήδη δοθεί στην παράγραφο 7.1.1.2. Αντίθετα, ο εμβολιασμός με μείγμα ποσότητας εγκλεισμένης, με χιτοζάνη, προβιοτικής καλλιέργειας και ποσότητας μη εγκλεισμένης, όπως και ο εμβολιασμός με μη εγκλεισμένη καλλιέργεια σε συνδυασμό με προσθήκη ποσότητας χιτοζάνης, είχαν αποτελέσματα, δηλαδή οδήγησαν σε επιτυχή ζύμωση του γιαουρτιού. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ακολούθως:



Διάγραμμα 7.17 Μεταβολή pH συναρτήσει του χρόνου κατά την ζύμωση γάλακτος προς γιαούρτι με μείγμα εγκλεισμένης, με χιτοζάνη, και μη εγκλεισμένης προβιοτικής καλλιέργειας εκκίνησης και με χιτοζάνη και προβιοτική καλλιέργεια εκκίνησης

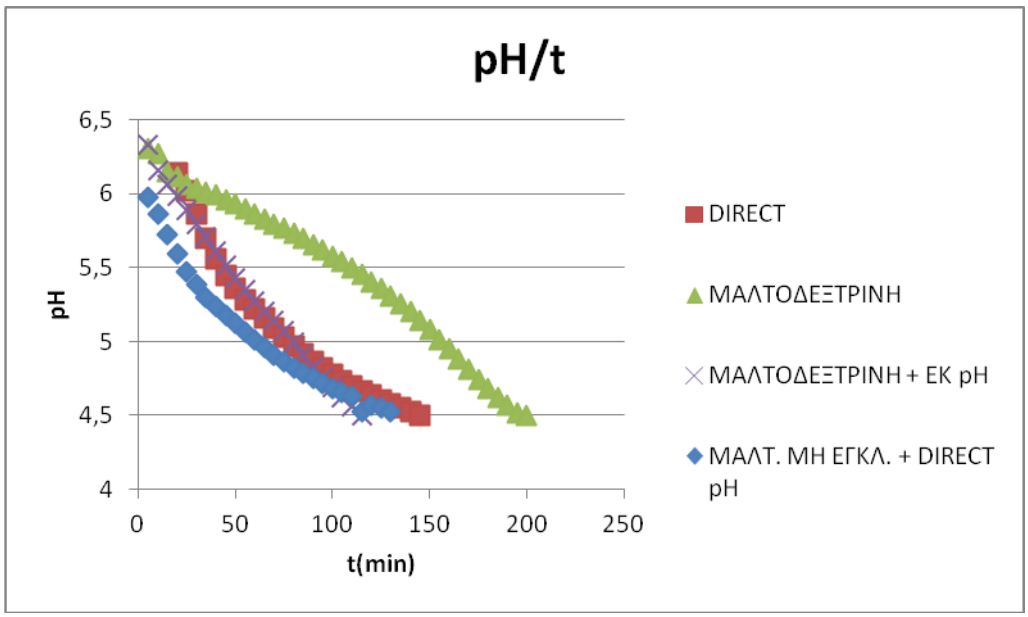
Στο διάγραμμα 7.17 παρουσιάζονται οι καμπύλες μεταβολής του pH συναρτήσει του χρόνου ζύμωσης του γάλακτος. Παρατηρείται ότι οι καμπύλες του τυφλού δείγματος και του δείγματος με μη εγκλεισμένη προβιοτική καλλιέργεια και ισοδύναμη ποσότητα χιτοζάνης εμφανίζουν ομοιότητες, πράγμα που ίσως σημαίνει ότι η χιτοζάνη δεν παρεμποδίζει την δράση των μη εγκλεισμένων προβιοτικών βακτηρίων κατά την διαδικασία ζύμωσης, σε αντίθεση με ότι συμβαίνει με τα εγκλεισμένα με το μέσο αυτό προβιοτικά. Από την άλλη, η καμπύλη που αντιστοιχεί στο δείγμα που έχει εμβολιαστεί με ποσότητα μη εγκλεισμένης και εγκλεισμένης, με χιτοζάνη, προβιοτικής καλλιέργειας παρουσιάζει διαφορές σε σχέση με τις άλλες δύο καμπύλες, ενώ η συνολική διάρκεια της ζύμωσης είναι μεγαλύτερη. Επίσης, σε καμία από τις καμπύλες δεν υπάρχει λανθάνουσα φάση.

Στον ακόλουθο πίνακα παρουσιάζονται οι μετρήσεις των ποιοτικών χαρακτηριστικών των γιαουρτιών που προέκυψαν.

Πίνακας 7.5 Αποτελέσματα μετρήσεων κατά την ζύμωση γάλακτος προς γιαούρτι με εγκλεισμένη, με κυκλοδεξτρίνη, καλλιέργεια, με μείγμα εγκλεισμένης/μη εγκλεισμένης καλλιέργειας και με μη εγκλεισμένη καλλιέργεια και ποσότητα εγκλειστικού

Χαρακτηριστικό	Τυφλό	Εγκλεισμένη καλλιέργεια	Μείγμα εγκλεισμένης/ μη εγκλεισμένης	Μη εγκλεισμένη καλλιέργεια και εγκλειστικό
Συνολική διάρκεια (min)	130	-	290	130
Μέγιστος ρυθμός μείωσης, μ	-10,96	-	-0,03	-30,11
Διάρκεια λανθάνουσας φάσης, λ (min)	(-1375,30)	-	(-156,24)	(-1521,30)
Προσαρμογή στο μοντέλο 3.1	όχι	-	όχι	όχι
Ιξώδες μετά την ζύμωση (cPs)	4780	-	2606	3768
Ιξώδες μετά από 24h αποθήκευση στους 4°C (cPs)	17902	-	6870	16360
Προσκολλησιμότητα (N*s)	0,468	-	0,111	0,378
Συνεκτικότητα	0,487	-	0,618	0,540
Σκληρότητα (N)	0,9731	-	0,3988	0,8332
Κομμιώδες (N)	0,474	-	0,246	0,450
Μικροβιολογικά (cfu/g)	$5*10^5$	-	10^4	$7*10^3$

7.2.1.3 Ζύμωση με εγκλεισμένη, με μαλτοδεξτρίνη, καλλιέργεια, με μείγμα εγκλεισμένης/μη εγκλεισμένης καλλιέργειας και με μη εγκλεισμένη καλλιέργεια και ισοδύναμη ποσότητα εγκλειστικού μέσου



Διάγραμμα 7.18 Μεταβολή pH συναρτήσει του χρόνου κατά την ζύμωση γάλακτος προς γιαούρτι με εγκλεισμένη με μαλτοδεξτρίνη, με μείγμα εγκλεισμένης, και μη εγκλεισμένης προβιοτικής καλλιέργειας εκκίνησης και με μαλτοδεξτρίνη και προβιοτική καλλιέργεια εκκίνησης

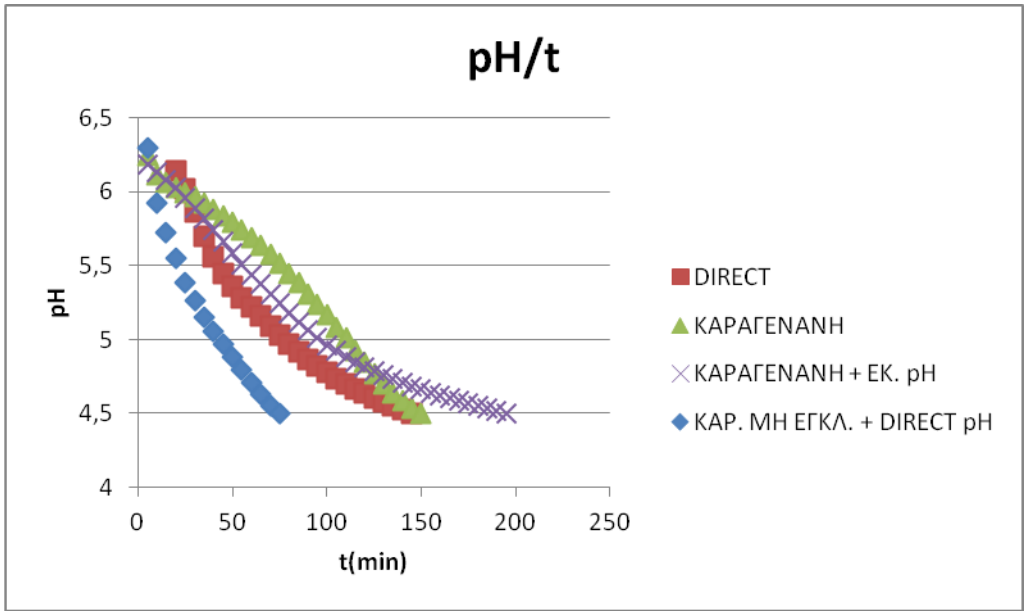
Στο παραπάνω διάγραμμα παρουσιάζονται οι καμπύλες μεταβολής του pH συναρτήσει του χρόνου ζύμωσης. Οι καμπύλες που αντιστοιχούν στο δείγμα που έχει εμβολιαστεί με ποσότητα μη εγκλεισμένης και ποσότητα εγκλεισμένης, με μαλτοδεξτρίνη, προβιοτικής καλλιέργειας και στο δείγμα που έχει εμβολιαστεί με μη εγκλεισμένη προβιοτική καλλιέργεια και στο οποίο έχει, επιπλέον, προστεθεί ισοδύναμη ποσότητα μαλτοδεξτρίνης, φαίνεται να παρουσιάζουν κοινά χαρακτηριστικά τόσο μεταξύ τους, όσο και με την καμπύλη του τυφλού δείγματος (direct) καθώς έχουν παρόμοια μορφή, ενώ η ζύμωση διαρκεί παραπλήσιο χρόνο. Αντίθετα, η καμπύλη που αντιστοιχεί στο εμβολιασμένο με εγκλεισμένη, με μαλτοδεξτρίνη, προβιοτική καλλιέργεια έχει μορφή που διαφέρει από εκείνη των άλλων καμπυλών και η ζύμωση παρουσιάζει μεγαλύτερη διάρκεια. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε καμία από τις παραπάνω καμπύλες δεν υπάρχει λανθάνουσα φάση.

Στον ακόλουθο πίνακα παρουσιάζονται οι μετρήσεις των ποιοτικών χαρακτηριστικών των γιαουρτιών που προέκυψαν.

Πίνακας 7.6 Αποτελέσματα μετρήσεων κατά την ζύμωση γάλακτος προς γιαούρτι με εγκλεισμένη, με μαλτοδεξτρίνη, καλλιέργεια, με μείγμα εγκλεισμένης/μη εγκλεισμένης καλλιέργειας και με μη εγκλεισμένη καλλιέργεια και ποσότητα εγκλειστικού μέσου και σύγκριση με direct

Χαρακτηριστικό	Τυφλό	Εγκλεισμένη καλλιέργεια	Μείγμα εγκλεισμένης/ μη εγκλεισμένης	Μη εγκλεισμένη καλλιέργεια και εγκλειστικό
Συνολική διάρκεια (min)	130	200	115	130
Μέγιστος ρυθμός μείωσης, μ	-10,96	-0,21	-0,23	-7,42
Διάρκεια λανθάνουσας φάσης, λ (min)	(-1375,30)	(507,50)	(-1482,90)	(-1458,4)
Προσαρμογή στο μοντέλο 3.1	όχι	όχι	όχι	όχι
Ιξώδες μετά την ζύμωση (cPs)	4780	1930	3149	4087
Ιξώδες μετά από 24h αποθήκευση στους 4^oC (cPs)	17902	6317	1360	16800
Προσκολλησιμότητα (N*s)	0,468	0,332	0,272	0,278
Συνεκτικότητα	0,487	0,551	0,644	0,482
Σκληρότητα (N)	0,9731	0,7734	0,8084	0,8840
Κομμιώδες (N)	0,474	0,426	0,521	0,426
Μικροβιολογικά (cfu/g)	$5*10^5$	$4*10^4$	$4*10^4$	10^6

7.2.1.4 Ζύμωση με εγκλεισμένη, με κ-καραγενάνη, καλλιέργεια, με μείγμα εγκλεισμένης/μη εγκλεισμένης καλλιέργειας και με μη εγκλεισμένη καλλιέργεια και ισοδύναμη ποσότητα εγκλειστικού μέσου



Διάγραμμα 7.19 Μεταβολή pH συναρτήσει του χρόνου κατά την ζύμωση γάλακτος προς γιαούρτι με εγκλεισμένη με κ-καραγενάνη, με μείγμα εγκλεισμένης, και μη εγκλεισμένης προβιοτικής καλλιέργειας εκκίνησης και με κ-καραγενάνη και προβιοτική καλλιέργεια

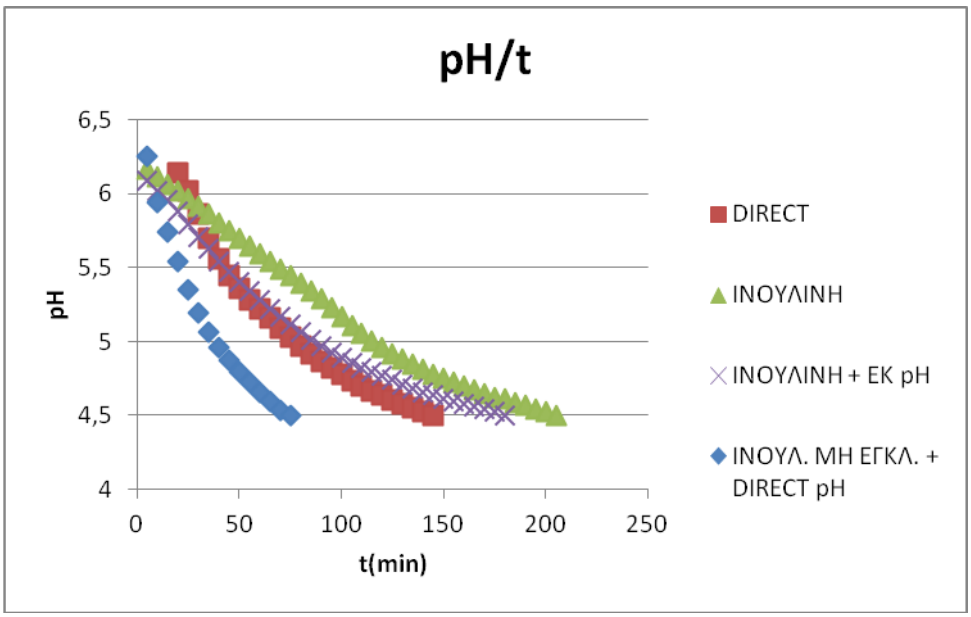
Στο ανωτέρω διάγραμμα παρουσιάζονται οι καμπύλες μεταβολής του pH συναρτήσει του χρόνου ζύμωσης. Οι καμπύλες που αντιστοιχούν στο δείγμα που έχει εμβολιαστεί με ποσότητα μη εγκλεισμένης και ποσότητα εγκλεισμένης, με κ-καραγενάνη, προβιοτικής καλλιέργειας και στο δείγμα που έχει εμβολιαστεί με μη εγκλεισμένη προβιοτική καλλιέργεια και στο οποίο έχει προστεθεί ισοδύναμη ποσότητα κ-καραγενάνης, φαίνεται να έχουν παρόμοια μορφή μεταξύ τους αλλά και με την καμπύλη που αντιστοιχεί στο τυφλό δείγμα, ενώ η καμπύλη του δείγματος που έχει εμβολιαστεί με εγκλεισμένη, με κ-καραγενάνη, προβιοτική καλλιέργεια παρουσιάζει διαφορές, με ύπαρξη και λανθάνουσας φάσης που διαρκεί 50,3min. Ωστόσο, η διάρκεια της ζύμωσης του δείγματος αυτού προκύπτει παραπλήσια με εκείνη του τυφλού. Μικρότερη διάρκεια ζύμωσης εμφανίζει το δείγμα που έχει εμβολιαστεί με μη εγκλεισμένη προβιοτική καλλιέργεια εκκίνησης και στο οποίο έχει προστεθεί ισοδύναμη ποσότητα κ-καραγενάνης, ενώ μεγαλύτερη διάρκεια το εμβολιασμένο με ποσότητα μη εγκλεισμένης και ποσότητα εγκλεισμένης με κ-καραγενάνη προβιοτικής καλλιέργειας εκκίνησης.

Στον ακόλουθο πίνακα παρουσιάζονται οι μετρήσεις των ποιοτικών χαρακτηριστικών των γιαουρτιών που προέκυψαν.

Πίνακας 7.7 Αποτελέσματα μετρήσεων κατά την ζύμωση γάλακτος προς γιαούρτι με εγκλεισμένη, με κ-καραγενάνη, καλλιέργεια, με μείγμα εγκλεισμένης/μη εγκλεισμένης καλλιέργειας και με μη εγκλεισμένη καλλιέργεια και ποσότητα εγκλειστικού

Χαρακτηριστικό	Τυφλό	Εγκλεισμένη καλλιέργεια	Μείγμα εγκλεισμένης/ μη εγκλεισμένης	Μη εγκλεισμένη καλλιέργεια και εγκλειστικό
Συνολική διάρκεια (min)	130	150	195	75
Μέγιστος ρυθμός μείωσης, μ	-10,96	-0,04	-0,04	-17,61
Διάρκεια λανθάνουσας φάσης, λ (min)	(-1375,30)	50,30	(-90,07)	(-938,50)
Προσαρμογή στο μοντέλο 3.1	όχι	ναι	όχι	όχι
Ιξώδες μετά την ζύμωση (cPs)	4780	2325	4143	2587
Ιξώδες μετά από 24h αποθήκευση στους 4°C (cPs)	17902	8511	14172	13303
Προσκολλησιμότητα (N*s)	0,468	0,1220	0,224	0,414
Συνεκτικότητα	0,487	0,564	0,775	0,493
Σκληρότητα (N)	0,9731	0,4696	0,8174	0,7347
Κομμιώδες (N)	0,474	0,265	0,633	0,362
Μικροβιολογικά (cfu/g)	$5*10^5$	$2*10^5$	$5*10^5$	$7*10^5$

7.2.1.5 Ζύμωση με εγκλεισμένη, με ινουλίνη, καλλιέργεια, με μείγμα εγκλεισμένης/μη εγκλεισμένης καλλιέργειας και με μη εγκλεισμένη καλλιέργεια και ισοδύναμη ποσότητα εγκλειστικού μέσου



Διάγραμμα 7.20 Μεταβολή pH συναρτήσει του χρόνου κατά την ζύμωση γάλακτος προς γιαούρτι με εγκλεισμένη, με ινουλίνη, με μείγμα εγκλεισμένης, και μη εγκλεισμένης προβιοτικής καλλιέργειας εκκίνησης και με ινουλίνη και προβιοτική καλλιέργεια εκκίνησης

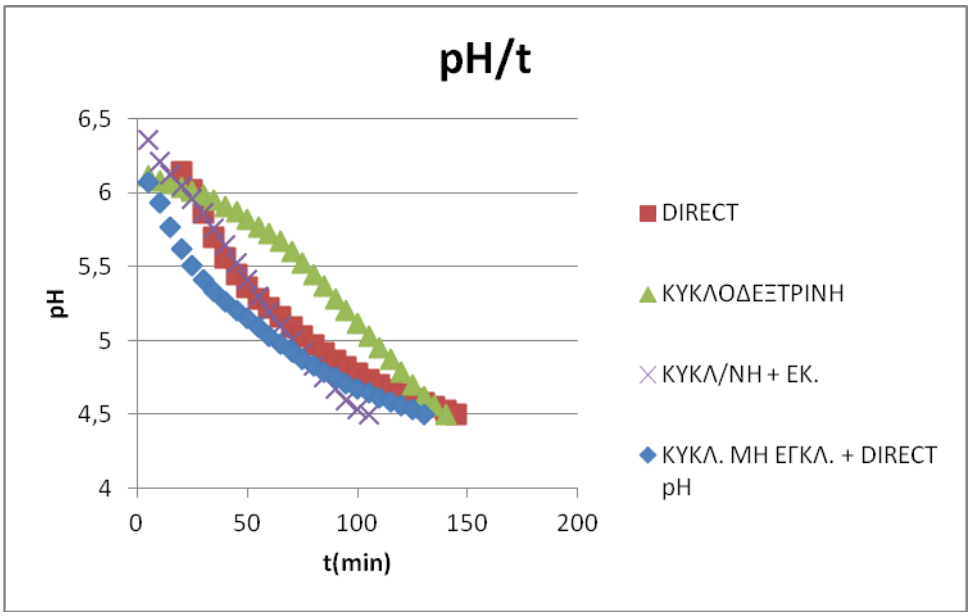
Στο διάγραμμα 7.20 παρουσιάζονται οι καμπύλες μεταβολής του pH συναρτήσει του χρόνου ζύμωσης. Σε καμία από τις ανωτέρω καμπύλες δεν υπάρχει λανθάνουσα φάση. Πιο σύντομη φαίνεται πως είναι η ζύμωση του δείγματος το οποίο έχει εμβολιαστεί με μη εγκλεισμένη προβιοτική καλλιέργεια και ισοδύναμη ποσότητα ινουλίνης, ενώ πιο αργή το δείγμα που έχει εμβολιαστεί με εγκλεισμένη, με ινουλίνη, προβιοτική καλλιέργεια.

Στον ακόλουθο πίνακα παρουσιάζονται οι μετρήσεις των ποιοτικών χαρακτηριστικών των γιαουρτιών που προέκυψαν.

Πίνακας 7.8 Αποτελέσματα μετρήσεων κατά την ζύμωση γάλακτος προς γιαούρτι με εγκλεισμένη, με ινουλίνη, καλλιέργεια, με μείγμα εγκλεισμένης/μη εγκλεισμένης καλλιέργειας και με μη εγκλεισμένη καλλιέργεια και ποσότητα εγκλειστικού μέσου

Χαρακτηριστικό	Τυφλό	Εγκλεισμένη καλλιέργεια	Μείγμα εγκλεισμένης/ μη εγκλεισμένης	Μη εγκλεισμένη καλλιέργεια και εγκλειστικό
Συνολική διάρκεια (min)	130	205	180	75
Μέγιστος ρυθμός μείωσης, μ	-10,96	-0,03	-0,10	-8,79
Διάρκεια λανθάνουσας φάσης, λ (min)	(-1375,30)	(-39,40)	(-479,80)	(-687,60)
Προσαρμογή στο μοντέλο 3.1	όχι	όχι	όχι	όχι
Ιξώδες μετά την ζύμωση (cPs)	4780	2270	4462	3206
Ιξώδες μετά από 24h αποθήκευση στους 4°C (cPs)	17902	7864	15870	13378
Προσκολλησιμότητα (N*s)	0,468	0,423	0,311	0,236
Συνεκτικότητα	0,487	0,573	0,583	0,569
Σκληρότητα (N)	0,9731	1,0910	0,8891	0,6715
Κομμιώδες (N)	0,474	0,6254	0,518	0,382
Μικροβιολογικά (cfu/g)	$5*10^5$	$4*10^5$	$4*10^6$	$2*10^6$

7.2.1.6 Ζύμωση με εγκλεισμένη, με κυκλοδεξτρίνη, καλλιέργεια, με μείγμα εγκλεισμένης/μη εγκλεισμένης καλλιέργειας και με μη εγκλεισμένη καλλιέργεια και ισοδύναμη ποσότητα εγκλειστικού μέσου



Διάγραμμα 7.21 Μεταβολή pH συναρτήσει του χρόνου κατά την ζύμωση γάλακτος προς γιαούρτι με εγκλεισμένη, με κυκλοδεξτρίνη, με μείγμα εγκλεισμένης, και μη εγκλεισμένης προβιοτικής καλλιέργειας εκκίνησης και με κυκλοδεξτρίνη και προβιοτική καλλιέργεια εκκίνησης και σύγκριση με direct

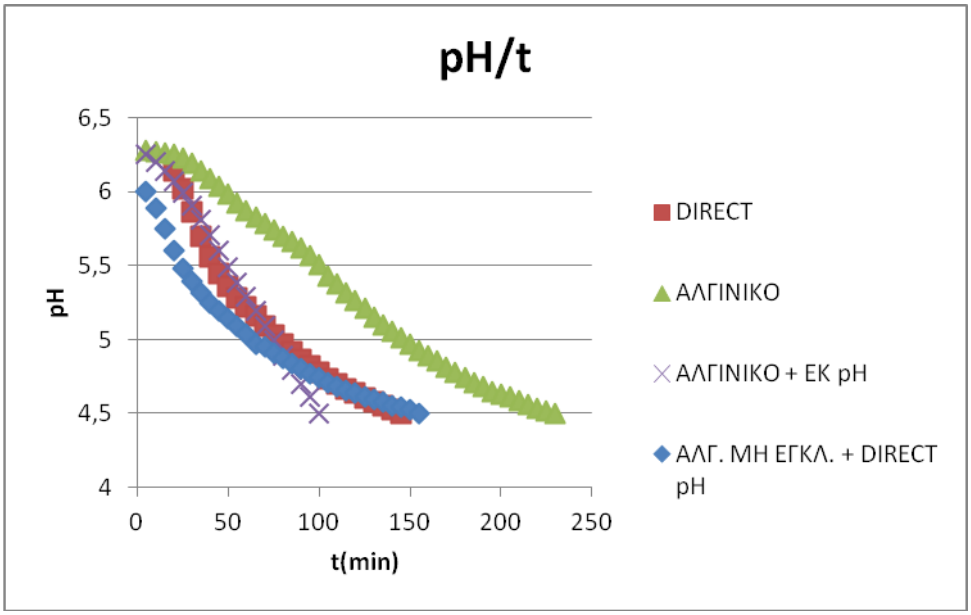
Στο παραπάνω διάγραμμα παρουσιάζονται οι καμπύλες μεταβολής του pH συναρτήσει του χρόνου ζύμωσης. Η καμπύλη που αντιστοιχεί στο δείγμα που έχει εμβολιαστεί με μη εγκλεισμένη προβιοτική καλλιέργεια και στο οποίο έχει προστεθεί ισοδύναμη ποσότητα κυκλοδεξτρίνης, παρουσιάζει ομοιότητες, ως προς την μορφή, με την καμπύλη του τυφλού δείγματος, ενώ παρουσιάζουν μεταξύ τους διαφορές στην χρονική διάρκεια της ζύμωσης, με μεγαλύτερη αυτήν του τυφλού δείγματος. Οι άλλες δύο καμπύλες, αν και έχουν διαφορετική μορφή, τόσο μεταξύ τους, όσο και με την καμπύλη του τυφλού δείγματος, εντούτοις τα αντίστοιχα δείγματα παρουσιάζουν παρόμοιους χρόνους ζύμωσης. Επιπροσθέτως, η καμπύλη του δείγματος που έχει εμβολιαστεί με εγκλεισμένη, με κυκλοδεξτρίνη, καλλιέργεια έχει λανθάνουσα φάση με χρονική διάρκεια 64,1min.

Στον ακόλουθο πίνακα παρουσιάζονται οι μετρήσεις των ποιοτικών χαρακτηριστικών των γιαουρτιών που προέκυψαν.

Πίνακας 7.9 Αποτελέσματα μετρήσεων κατά την ζύμωση γάλακτος με εγκλεισμένη, με κυκλοδεξτρίνη, καλλιέργεια, με μείγμα εγκλεισμένης/μη εγκλεισμένης καλλιέργειας και με μη εγκλεισμένη καλλιέργεια και ποσότητα εγκλειστικού μέσου

Χαρακτηριστικό	Τυφλό	Εγκλεισμένη καλλιέργεια	Μείγμα εγκλεισμένης/ μη εγκλεισμένης	Μη εγκλεισμένη καλλιέργεια και εγκλειστικό
Συνολική διάρκεια (min)	130	140	105	130
Μέγιστος ρυθμός μείωσης, μ	-10,96	-0,05	-0,06	-10,03
Διάρκεια λανθάνουσας φάσης, λ (min)	(-1375,30)	64,08	(-9,37)	(-1496,90)
Προσαρμογή στο μοντέλο 3.1	όχι	ναι	όχι	όχι
Ιξώδες μετά την ζύμωση (cPs)	4780	5800	2606	3805
Ιξώδες μετά από 24h αποθήκευση στους 4°C (cPs)	17902	13300	11100	13303
Προσκολλησιμότητα (N*s)	0,468	0,163	0,253	0,572
Συνεκτικότητα	0,487	0,614	0,684	0,496
Σκληρότητα (N)	0,9731	0,6147	0,5646	0,9279
Κομμιώδες (N)	0,474	0,377	0,386	0,461
Μικροβιολογικά (cfu/g)	$5*10^5$	$9*10^5$	$6*10^5$	$4*10^4$

7.2.1.7 Ζύμωση με εγκλεισμένη, με αλγινικό νάτριο, καλλιέργεια, με μείγμα εγκλεισμένης/μη εγκλεισμένης καλλιέργειας και με μη εγκλεισμένη καλλιέργεια και ισοδύναμη ποσότητα εγκλειστικού μέσου



Διάγραμμα 7.22 Μεταβολή pH συναρτήσει του χρόνου κατά την ζύμωση γάλακτος προς γιαούρτι με εγκλεισμένη, με αλγινικό νάτριο, με μείγμα εγκλεισμένης, και μη εγκλεισμένης προβιοτικής καλλιέργειας εκκίνησης και με αλγινικό νάτριο και προβιοτική καλλιέργεια εκκίνησης

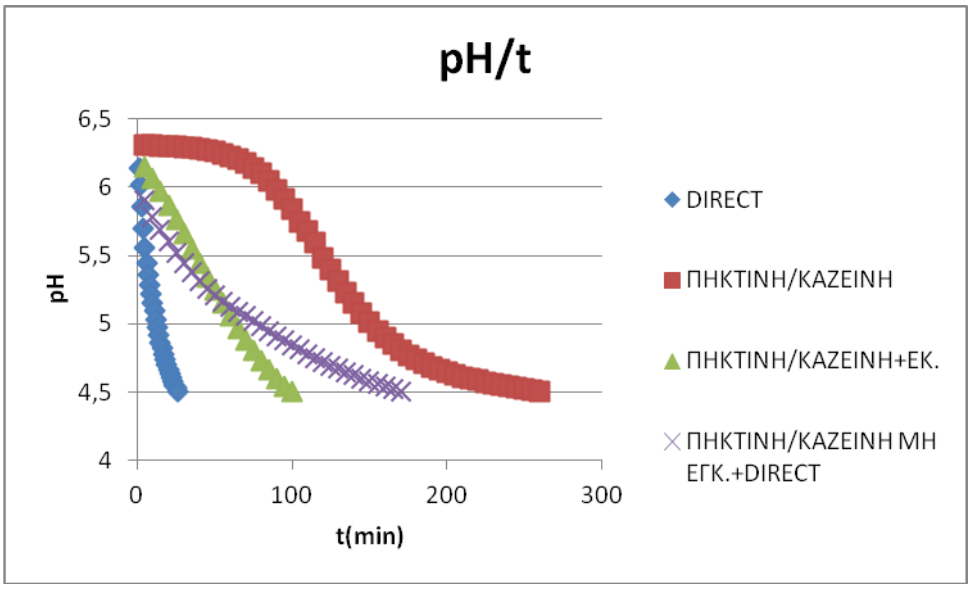
Στο ανωτέρω διάγραμμα παρουσιάζονται οι καμπύλες μεταβολής του pH συναρτήσει του χρόνου ζύμωσης. Το δείγμα που έχει εμβολιαστεί με εγκλεισμένη, με αλγινικό νάτριο, προβιοτική καλλιέργεια έχει τον μεγαλύτερο χρόνο ζύμωσης, ενώ η καμπύλη του παρουσιάζει λανθάνουσα φάση διάρκειας 21,2min. Τέλος, μικρότερο χρόνο ζύμωσης παρουσιάζει το δείγμα που έχει εμβολιαστεί με ποσότητα μη εγκλεισμένης και ποσότητα εγκλεισμένης, με αλγινικό νάτριο, προβιοτικής καλλιέργειας.

Στον ακόλουθο πίνακα παρουσιάζονται οι μετρήσεις των ποιοτικών χαρακτηριστικών των γιαουρτιών που προέκυψαν.

Πίνακας 7.10 Αποτελέσματα μετρήσεων κατά την ζύμωση γάλακτος προς γιαούρτι με εγκλεισμένη, με αλγινικό νάτριο, καλλιέργεια, με μείγμα εγκλεισμένης/μη εγκλεισμένης καλλιέργειας και με μη εγκλεισμένη καλλιέργεια και ποσότητα εγκλειστικού

Χαρακτηριστικό	Τυφλό	Εγκλεισμένη καλλιέργεια	Μείγμα εγκλεισμένης/ μη εγκλεισμένης	Μη εγκλεισμένη καλλιέργεια και εγκλειστικό
Συνολική διάρκεια (min)	130	230	100	155
Μέγιστος ρυθμός μείωσης, μ	-10,96	-0,03	-0,06	-20,77
Διάρκεια λανθάνουσας φάσης, λ (min)	(-1375,30)	21,15	13,94	(-1666,90)
Προσαρμογή στο μοντέλο 3.1	όχι	ναι	ναι	όχι
Ιξώδες μετά την ζύμωση (cPs)	4780	1086	3084	5980
Ιξώδες μετά από 24h αποθήκευση στους 4°C (cPs)	17902	4680	13275	1308
Προσκολλησιμότητα (N*s)	0,468	0,049	0,177	0,212
Συνεκτικότητα	0,487	0,664	0,530	0,640
Σκληρότητα (N)	0,9731	0,2016	0,8397	0,9708
Κομμιώδες (N)	0,474	0,134	0,445	0,622
Μικροβιολογικά (cfu/g)	$5*10^5$	$8*10^3$	$3*10^5$	$2*10^5$

7.2.1.8 Ζύμωση με εγκλεισμένη, με μείγμα πηκτίνης/καζεΐνης, καλλιέργεια, με μείγμα εγκλεισμένης/μη εγκλεισμένης καλλιέργειας και με μη εγκλεισμένη καλλιέργεια και ισοδύναμη ποσότητα εγκλειστικού μέσου



Διάγραμμα 7.23 Μεταβολή pH συναρτήσει του χρόνου κατά την ζύμωση γάλακτος προς γιαούρτι με εγκλεισμένη με πηκτίνη/καζεΐνη, με μείγμα εγκλεισμένης, και μη εγκλεισμένης προβιοτικής καλλιέργειας εκκίνησης και με πηκτίνη/καζεΐνη και προβιοτική καλλιέργεια εκκίνησης

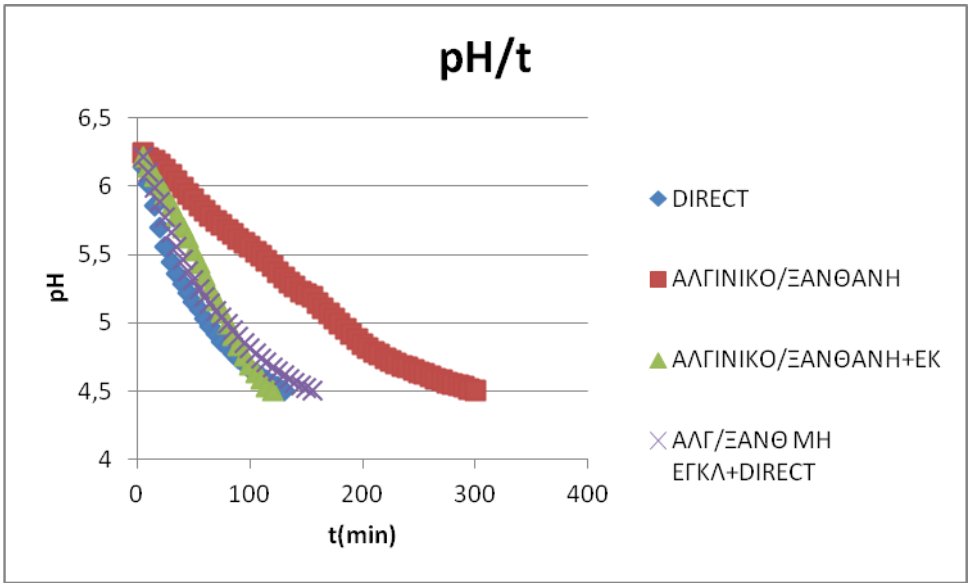
Στο ανωτέρω διάγραμμα παρουσιάζονται οι καμπύλες μεταβολής του pH συναρτήσει του χρόνου ζύμωσης. Η καμπύλη του δείγματος που έχει εμβολιαστεί με μη εγκλεισμένη καλλιέργεια και ισοδύναμη ποσότητα του εγκλειστικού μείγματος, δεν παρουσιάζει την ίδια μορφή, ούτε η διάρκεια της ζύμωσης είναι ίδια, με αυτήν του τυφλού. Αυτό μπορεί να σημαίνει ότι το συγκεκριμένο μείγμα εγκλεισμού λειτουργεί παρεμποδιστικά στην δράση των προβιοτικών βακτηρίων. Τέλος, η καμπύλη του εμβολιασμένου με την εγκλεισμένη προβιοτική καλλιέργεια με το μείγμα πηκτίνης/καζεΐνης εμφανίζει λανθάνουσα φάση με διάρκεια 97,4min.

Στον ακόλουθο πίνακα παρουσιάζονται οι μετρήσεις των ποιοτικών χαρακτηριστικών των γιαουρτιών που προέκυψαν.

Πίνακας 7.11 Αποτελέσματα μετρήσεων κατά την ζύμωση γάλακτος προς γιαούρτι με εγκλεισμένη, με μείγμα πηκτίνης/καζεΐνης, καλλιέργεια, με μείγμα εγκλεισμένης/μη εγκλεισμένης καλλιέργειας και με μη εγκλεισμένη καλλιέργεια και ποσότητα εγκλειστικού μέσου

Χαρακτηριστικό	Τυφλό	Εγκλεισμένη καλλιέργεια	Μείγμα εγκλεισμένης/ μη εγκλεισμένης	Μη εγκλεισμένη καλλιέργεια και εγκλειστικό
Συνολική διάρκεια (min)	130	260	100	170
Μέγιστος ρυθμός μείωσης, μ	-10,96	-0,05	-0,06	-4.46
Διάρκεια λανθάνουσας φάσης, λ (min)	(-1375,30)	97,41	(-33,96)	(-2063,90)
Προσαρμογή στο μοντέλο 3.1	όχι	ναι	όχι	όχι
Ιξώδες μετά την ζύμωση (cPs)	4780	2699	2437	6523
Ιξώδες μετά από 24h αποθήκευση στους 4°C (cPs)	17902	5867	5905	15109
Προσκολλησιμότητα (N*s)	0,468	0,095	0,122	0,664
Συνεκτικότητα	0,487	0,659	0,693	0,559
Σκληρότητα (N)	0,9731	0,2376	0,2546	0,6640
Κομμιώδες (N)	0,474	0,157	0,177	0,371
Μικροβιολογικά (cfu/g)	$5*10^5$	$3*10^4$	$4*10^4$	$2*10^4$

7.2.1.9 Ζύμωση με εγκλεισμένη, με μείγμα αλγινικού νατρίου/ξανθάνης, καλλιέργεια, με μείγμα εγκλεισμένης/μη εγκλεισμένης καλλιέργειας και με μη εγκλεισμένη καλλιέργεια και ισοδύναμη ποσότητα εγκλειστικού μέσου



Διάγραμμα 7.24 Μεταβολή pH συναρτήσει του χρόνου κατά την ζύμωση γάλακτος προς γιαούρτι με εγκλεισμένη με αλγινικό νάτριο/ξανθάνη, με μείγμα εγκλεισμένης και μη εγκλεισμένης προβιοτικής καλλιέργειας εκκίνησης και με αλγινικό νάτριο /ξανθάνη και προβιοτική καλλιέργεια εκκίνησης

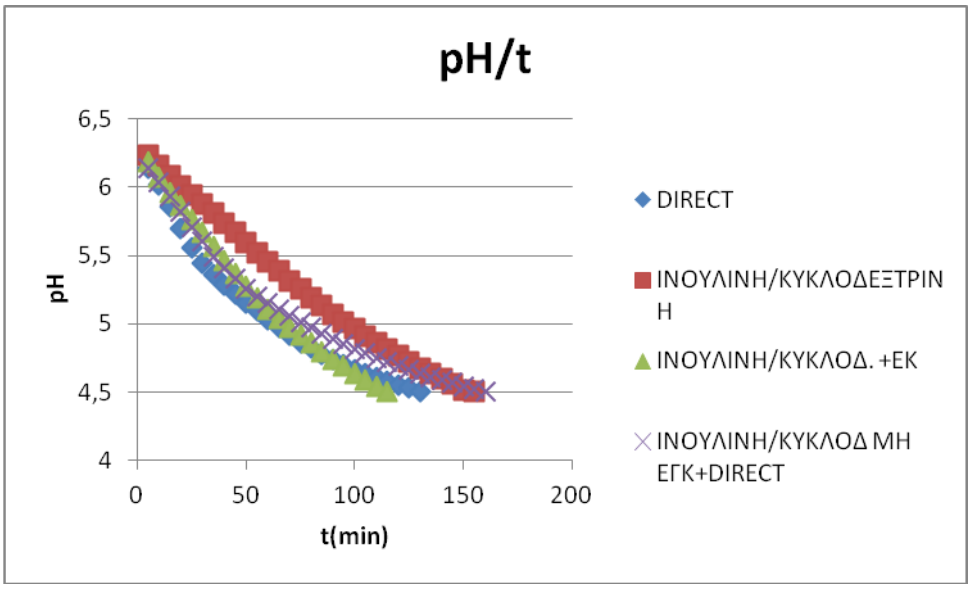
Στο ανωτέρω διάγραμμα παρουσιάζονται οι καμπύλες μεταβολής του pH συναρτήσει του χρόνου ζύμωσης. Παρατηρείται ότι οι καμπύλες που αντιστοιχούν στο δείγμα που έχει εμβολιαστεί με ποσότητα μη εγκλεισμένης και ποσότητα εγκλεισμένης, με μείγμα αλγινικού νατρίου/ξανθάνης, προβιοτικής καλλιέργειας και στο δείγμα που έχει εμβολιαστεί με μη εγκλεισμένη προβιοτική καλλιέργεια και στο οποίο έχει προστεθεί ισοδύναμη ποσότητα μείγματος αλγινικού νατρίου/ξανθάνης, έχουν ομοιότητες, τόσο μεταξύ τους, όσο και με την καμπύλη του τυφλού δείγματος, ενώ ο χρόνος ζύμωσης των αντίστοιχων δειγμάτων φαίνεται να είναι παραπλήσιος. Μεγαλύτερο χρόνο διήρκησε η ζύμωση του δείγματος που έχει εμβολιαστεί με εγκλεισμένη, με μείγμα αλγινικού νατρίου/ξανθάνης. Πρέπει, επίσης, να τονιστεί ότι λανθάνουσα φάση υπάρχει μόνον στην καμπύλη που αντιστοιχεί στο δείγμα που έχει εμβολιαστεί με ποσότητα εγκλεισμένης και με ποσότητα μη εγκλεισμένης προβιοτικής καλλιέργειας, με διάρκεια 7,8min.

Στον ακόλουθο πίνακα παρουσιάζονται οι μετρήσεις των ποιοτικών χαρακτηριστικών των γιαουρτιών που προέκυψαν.

Πίνακας 7.12 Αποτελέσματα μετρήσεων κατά την ζύμωση γάλακτος προς γιαούρτι με εγκλεισμένη, με μείγμα αλγινικού νατρίου/ξανθάνης, καλλιέργεια, με μείγμα εγκλεισμένης/μη εγκλεισμένης καλλιέργειας και με μη εγκλεισμένη καλλιέργεια και ποσότητα εγκλειστικού μέσου

Χαρακτηριστικό	Τυφλό	Εγκλεισμένη καλλιέργεια	Μείγμα εγκλεισμένης/ μη εγκλεισμένης	Μη εγκλεισμένη καλλιέργεια και εγκλειστικό
Συνολική διάρκεια (min)	130	300	120	155
Μέγιστος ρυθμός μείωσης, μ	-10,96	-0,02	-0,05	-4.41
Διάρκεια λανθάνουσας φάσης, λ (min)	(-1375,30)	(-67,95)	7,80	(-1570,60)
Προσαρμογή στο μοντέλο 3.1	όχι	όχι	ναι	όχι
Ιξώδες μετά την ζύμωση (cPs)	4780	2891	3643	4649
Ιξώδες μετά από 24h αποθήκευση στους $4^{o}C$ (cPs)	17902	11191	14591	17405
Προσκολλησιμότητα (N*s)	0,468	0,217	0,221	0,292
Συνεκτικότητα	0,487	0,731	0,697	0,577
Σκληρότητα (N)	0,9731	O,6424	0,6873	0,8684
Κομμιώδες (N)	0,474	0,469	0,479	0,501
Μικροβιολογικά (cfu/g)	$5*10^5$	$4*10^4$	$4*10^4$	$2*10^4$

7.2.1.10 Ζύμωση με εγκλεισμένη, με μείγμα ινουλίνης/κυκλοδεξτρίνης, καλλιέργεια, με μείγμα εγκλεισμένης/μη εγκλεισμένης καλλιέργειας και με μη εγκλεισμένη καλλιέργεια και ισοδύναμη ποσότητα εγκλειστικού μέσου



Διάγραμμα 7.25 Μεταβολή pH συναρτήσει του χρόνου κατά την ζύμωση γάλακτος προς γιαούρτι με εγκλεισμένη με μείγμα ινουλίνης/κυκλοδεξτρίνης, με μείγμα εγκλεισμένης, και μη εγκλεισμένης προβιοτικής καλλιέργειας εκκίνησης και με μείγμα ινουλίνης/κυκλοδεξτρίνης και προβιοτική καλλιέργεια εκκίνησης

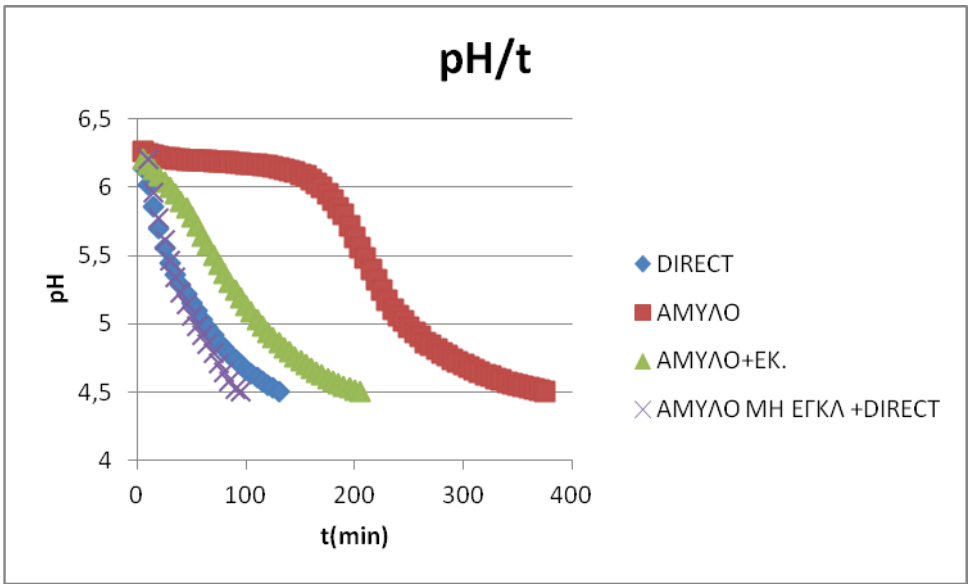
Στο πιο πάνω διάγραμμα παρουσιάζονται οι καμπύλες μεταβολής του pH συναρτήσει του χρόνου ζύμωσης. Οι παραπάνω καμπύλες μείωσης του pH σε σχέση με τον χρόνο δεν εμφανίζουν μεγάλες διαφορές, τόσο στην μορφή όσο και στον συνολικό χρόνο ζύμωσης των αντίστοιχων δειγμάτων, ενώ καμία δεν παρουσιάζει λανθάνουσα φάση.

Στον ακόλουθο πίνακα παρουσιάζονται οι μετρήσεις των ποιοτικών χαρακτηριστικών των γιαουρτιών που προέκυψαν.

Πίνακας 7.13 Αποτελέσματα μετρήσεων κατά την ζύμωση γάλακτος προς γιαούρτι με εγκλεισμένη, με μείγμα ινουλίνης/κυκλοδεξτρίνης, καλλιέργεια, με μείγμα εγκλεισμένης/μη εγκλεισμένης καλλιέργειας και με μη εγκλεισμένη καλλιέργεια και ποσότητα εγκλειστικού μέσου

Χαρακτηριστικό	Τυφλό	Εγκλεισμένη καλλιέργεια	Μείγμα εγκλεισμένης/ μη εγκλεισμένης	Μη εγκλεισμένη καλλιέργεια και εγκλειστικό
Συνολική διάρκεια (min)	130	155	115	160
Μέγιστος ρυθμός μείωσης, μ	-10,96	-0,04	-0,08	-7,14
Διάρκεια λανθάνουσας φάσης, λ (min)	(-1375,30)	(-113,86)	(-224,02)	(-1648,60)
Προσαρμογή στο μοντέλο 3.1	όχι	όχι	Όχι	όχι
Ιξώδες μετά την ζύμωση (cPs)	4780	2849	3187	3899
Ιξώδες μετά από 24h αποθήκευση στους 4°C (cPs)	17902	11972	13910	13647
Προσκολλησιμότητα (N*s)	0,468	0,6495	0,220	0,283
Συνεκτικότητα	0,487	0,583	0,739	0,557
Σκληρότητα (N)	0,9731	0,6495	0,7364	0,6853
Κομμιώδες (N)	0,474	0,379	0,542	0,382
Μικροβιολογικά (cfu/g)	$5*10^5$	$6*10^4$	$3*10^4$	$4*10^4$

7.2.1.11 Ζύμωση με εγκλεισμένη, με άμυλο, καλλιέργεια, με μείγμα εγκλεισμένης/μη εγκλεισμένης καλλιέργειας και με μη εγκλεισμένη καλλιέργεια και ισοδύναμη ποσότητα εγκλειστικού μέσου



Διάγραμμα 7.26 Μεταβολή pH συναρτήσει του χρόνου κατά την ζύμωση γάλακτος προς γιαούρτι με εγκλεισμένη με άμυλο, με μείγμα εγκλεισμένης, και μη εγκλεισμένης προβιοτικής καλλιέργειας εκκίνησης και με άμυλο και προβιοτική καλλιέργεια εκκίνησης

Στο διάγραμμα 7.26 παρουσιάζονται οι καμπύλες μεταβολής του pH συναρτήσει του χρόνου ζύμωσης. Από τις καμπύλες αυτές, λανθάνουσα φάση υπάρχει μόνον σε αυτήν που

αντιστοιχεί στο εμβολιασμένο με εγκλεισμένη με άμυλο καλλιέργεια, με διάρκεια 191,4min.

Στον ακόλουθο πίνακα παρουσιάζονται οι μετρήσεις των ποιοτικών χαρακτηριστικών των γιαουρτιών που προέκυψαν.

Πίνακας 7.14 Αποτελέσματα μετρήσεων κατά την ζύμωση γάλακτος προς γιαούρτι με εγκλεισμένη, με άμυλο, καλλιέργεια, με μείγμα εγκλεισμένης/μη εγκλεισμένης καλλιέργειας και με μη εγκλεισμένη καλλιέργεια και ποσότητα εγκλειστικού μέσου

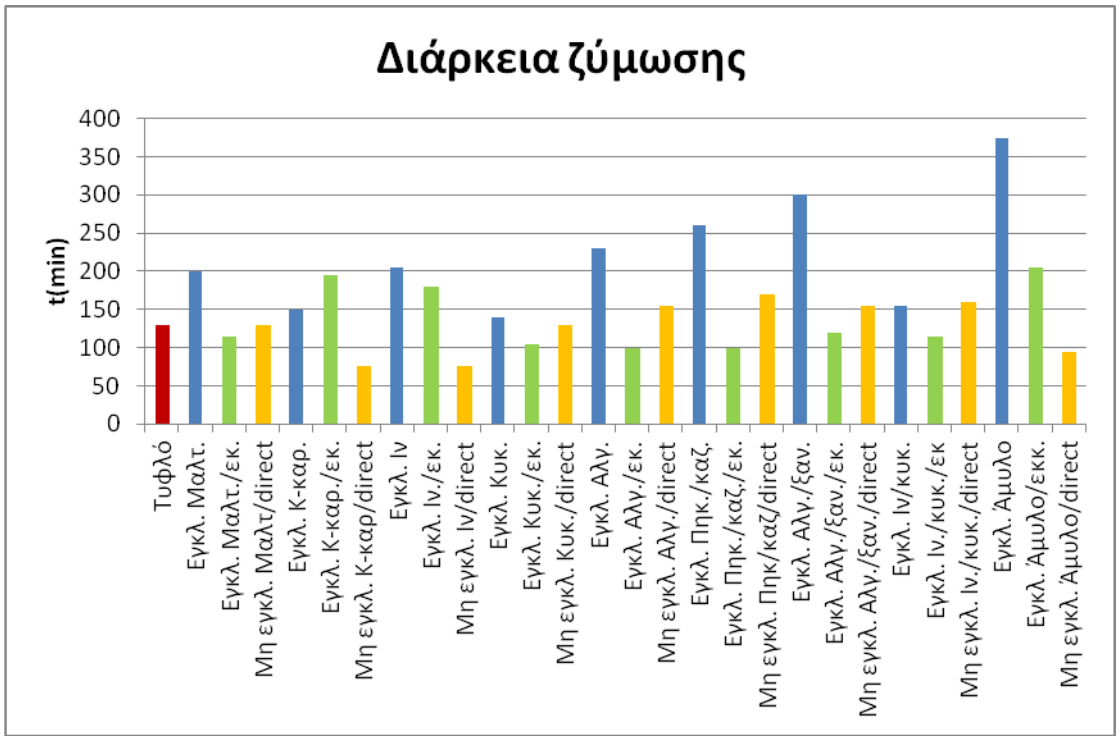
Χαρακτηριστικό	Τυφλό	Εγκλεισμένη καλλιέργεια	Μείγμα εγκλεισμένης/ μη εγκλεισμένης	Μη εγκλεισμένη καλλιέργεια και εγκλειστικό
Συνολική διάρκεια (min)	130	375	205	95
Μέγιστος ρυθμός μείωσης, μ	-10,96	-0,04	-0,03	-24,28
Διάρκεια λανθάνουσας φάσης, λ (min)	(-1375,30)	191,38	(-16,71)	(-1123,90)
Προσαρμογή στο μοντέλο 3.1	όχι	ναι	όχι	όχι
Ιξώδες μετά την ζύμωση (cPs)	4780	4668	5211	2756
Ιξώδες μετά από 24h αποθήκευση στους $4^{o}C$ (cPs)	17902	12587	14351	13160
Προσκολλησιμότητα (N*s)	0,468	0,160	0,271	0,252
Συνεκτικότητα	0,487	0,612	0,614	0,530
Σκληρότητα (N)	0,9731	0,6370	0,7820	0,6109
Κομμιώδες (N)	0,474	0,390	0,480	0,324
Μικροβιολογικά (cfu/g)	$5*10^5$	$4*10^4$	$2*10^4$	$2*10^3$

7.2.2 Σύγκριση αποτελεσμάτων 2ης σειράς πειραμάτων

Στην ενότητα αυτή πραγματοποιείται, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, στατιστική επεξεργασία των μετρήσεων που αφορούν στην εξέλιξη της ζύμωσης και στα χαρακτηριστικά του γιαουρτιού της 2ης σειράς πειραμάτων. Για την εύρεση των παραγόντων με σημαντική επίδραση σε κάθε ένα από τα παραπάνω εξεταζόμενα χαρακτηριστικά ποιότητας των γιαουρτιών πραγματοποιούνται αναλύσεις διακύμανσης (ANOVA). Σε κάθε χαρακτηριστικό εξετάζεται η επίδραση των παραγόντων είδος εγκλειστικού και τύπος/είδος εμβολιασμού. Μόλις ευρεθεί αν υπάρχει σημαντική επίδραση και προσδιοριστεί ο ή οι παράγοντες που την ασκούν, τότε γίνεται και έλεγχος Duncan (Duncan test) ως προς τις σημαντικές διαφορές των μέσω όρων των παραμέτρων και βρίσκονται οι ομογενείς ομάδες για κάθε παράμετρο. Οι πίνακες που προκύπτουν από την ανάλυση διακύμανσης και τον έλεγχο Duncan παρουσιάζονται στο παράρτημα ΙΙ.

7.2.2.1 Χρονική διάρκεια ζύμωσης

Από την ανάλυση διακύμανσης που πραγματοποιήθηκε, διαπιστώνεται ότι υπάρχει επίδραση του τύπου εμβολιασμού στην χρονική διάρκεια της ζύμωσης ($p<0,05$). Δηλαδή, σύμφωνα με την στατιστική ανάλυση των πειραματικών αποτελεσμάτων σχετικά με την διάρκεια της ζύμωσης, βρέθηκε ότι ο εμβολιασμός των δειγμάτων με εγκλεισμένη, με μείγμα εγκλεισμένης/ μη εγκλεισμένης ή με μη εγκλεισμένη και προσθήκη ποσότητας εγκλειστικού μέσου, επηρεάζει σημαντικά την παράμετρο αυτή. Από την άλλη η χρονική διάρκεια φαίνεται ότι δεν επηρεάζεται, σε μεγάλο βαθμό, από το είδος του χρησιμοποιούμενου εγκλειστικού μέσου.



Διάγραμμα 7.27 Η διάρκεια ζύμωσης γάλακτος προς γιαούρτι στην 2η σειρά και στο τυφλό δείγμα

Από το ανωτέρω διάγραμμα φαίνεται σαφώς ότι τα δείγματα που έχουν εμβολιαστεί με εγκλεισμένους προβιοτικούς μικροοργανισμούς παρουσιάζουν και μεγαλύτερη διάρκεια ζύμωσης και αυτό υποδηλώνει και την επιτυχία της διαδικασίας εγκλεισμού που είχε προηγηθεί, καθώς ο εμβολιασμός ενδεχομένως καθυστερεί την δράση των μικροοργανισμών.

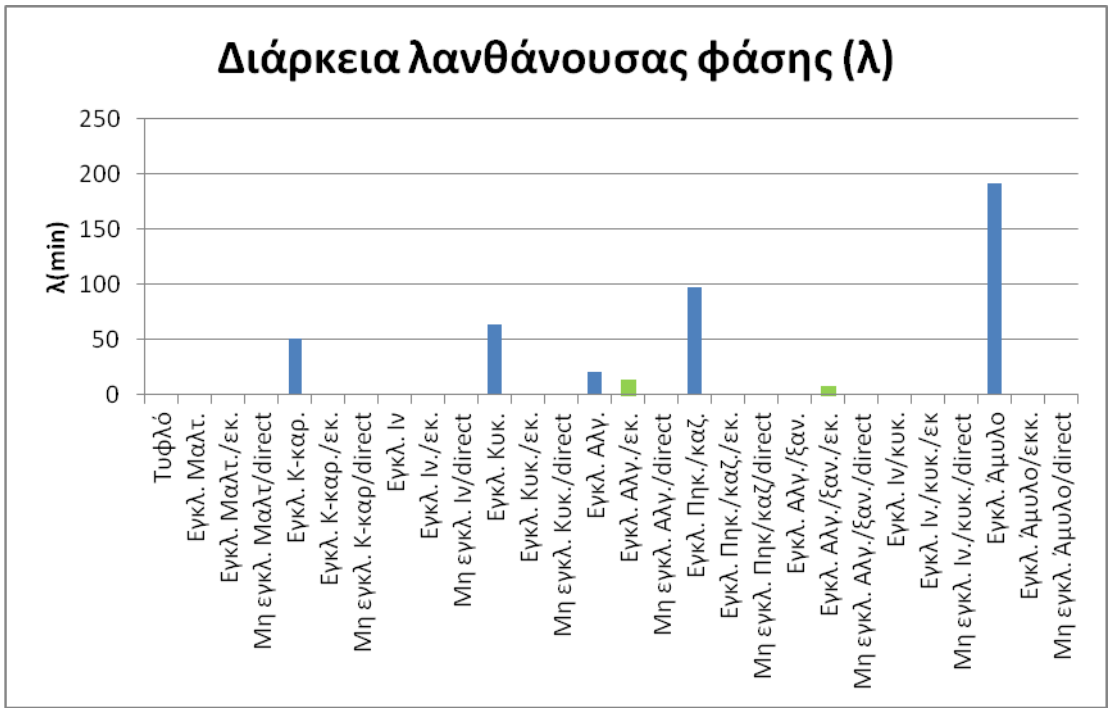
7.2.2.2 Μέγιστος ρυθμός μείωσης pH

Ο μέγιστος ρυθμός μείωσης pH (μ) επηρεάζεται σημαντικά μόνον από τον τύπο εμβολιασμού του δείγματος ($p<0,05$) και όχι από το μέσον που χρησιμοποιείται για τον εμβολιασμό, όπως προκύπτει από την ανάλυση διακύμανσης (ANOVA). Όπως παρατηρείται στο ακόλουθο διάγραμμα, ο μέγιστος ρυθμός μείωσης pH έχει αξιοσημείωτες τιμές μόνον στην περίπτωση του εμβολιασμού με μη εγκλεισμένη προβιοτική καλλιέργεια και με ποσότητα εγκλειστικού μέσου, ενώ σε όλες τις άλλες περιπτώσεις η τιμή του είναι αρκετά μικρή.

Διάγραμμα 7.28 Ο μέγιστος ρυθμός μείωσης pH (μ) των δειγμάτων της 2^{ης} σειράς και του τυφλού δείγματος

7.2.2.3 Διάρκεια λανθάνουσας φάσης ζύμωσης

Όπως φαίνεται από την στατιστική επεξεργασία, η χρονική διάρκεια της λανθάνουσας φάσης της ζύμωσης επηρεάζεται σε σημαντικό βαθμό ($p<0,05$) από το είδος του εμβολιασμού του εκάστοτε δείγματος. Αντίθετα, δεν παρατηρείται αξιοσημείωτη επίδραση της παραμέτρου αυτής από το είδος του εγκλειστικού. Τα περισσότερα βέβαια δείγματα δεν παρουσίαζαν λανθάνουσα φάση και ως εκ τούτου δεν μπορούν να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα από την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

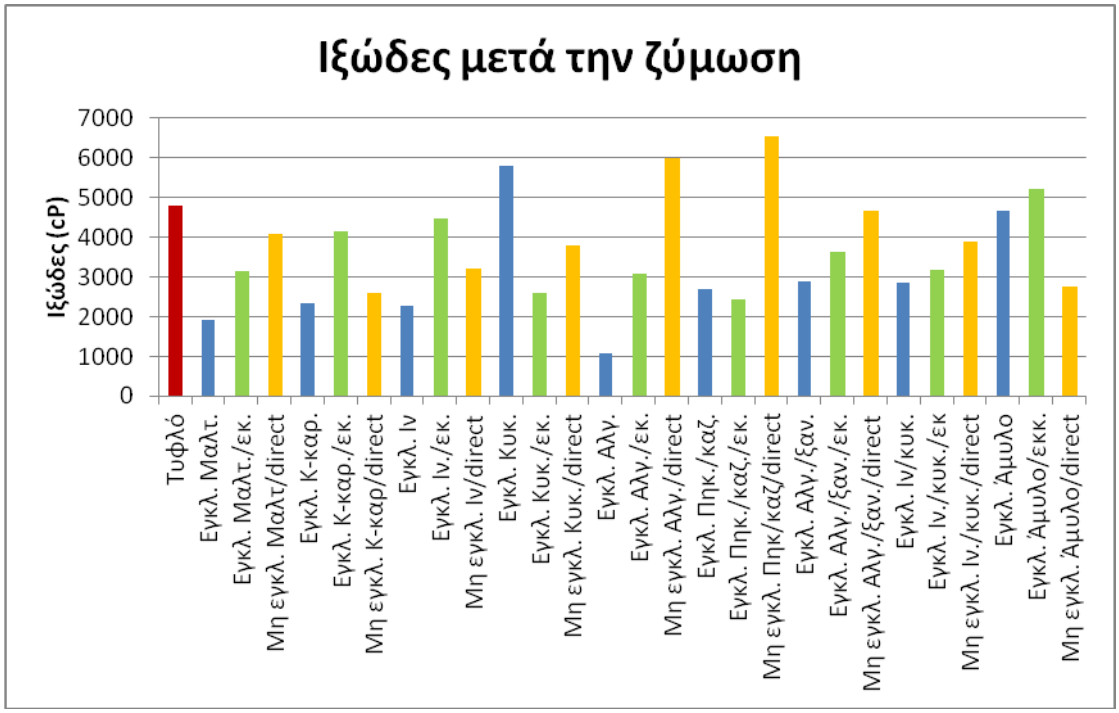


Διάγραμμα 7.29 Η διάρκεια λανθάνουσας φάσης της ζύμωσης (λ) των δειγμάτων της 2^{ης} σειράς και του τυφλού δείγματος

Όπως φαίνεται λανθάνουσα φάση υπάρχει κυρίως σε περιπτώσεις ζύμωσης με εγκλεισμένη καλλιέργεια. Η ύπαρξη λανθάνουσας φάσης σημαίνει ότι τα προβιοτικά βακτήρια δρουν πιο αργά στα δείγματα αυτά, σε σχέση με το τυφλό δείγμα. Η καθυστέρηση αυτή ενδεχομένως να είναι αποτέλεσμα του εγκλεισμού. Στις υπόλοιπες περιπτώσεις δεν υπήρχε προσαρμογή της καμπύλης μείωσης του pH στο μαθηματικό μοντέλο (σχέση 3.1) και κατά συνέπεια η λανθάνουσα φάση θεωρήθηκε ότι έχει μηδενική τιμή, πράγμα το οποίο βέβαια φαίνεται και από τα αντίστοιχα διαγράμματα μείωσης του pH συναρτήσει του χρόνου.

7.2.2.4 Ιξώδες γιαουρτιού μετά την ζύμωση (45°C)

Το ιξώδες που μετράται αμέσως μετά το πέρας της ζύμωσης των δειγμάτων, είναι μία παράμετρος η οποία δεν επηρεάζεται σημαντικά, ούτε από το είδος του εγκλειστικού μέσου, ούτε και από το είδος του εμβολιασμού, όπως προέκυψε στατιστικά.

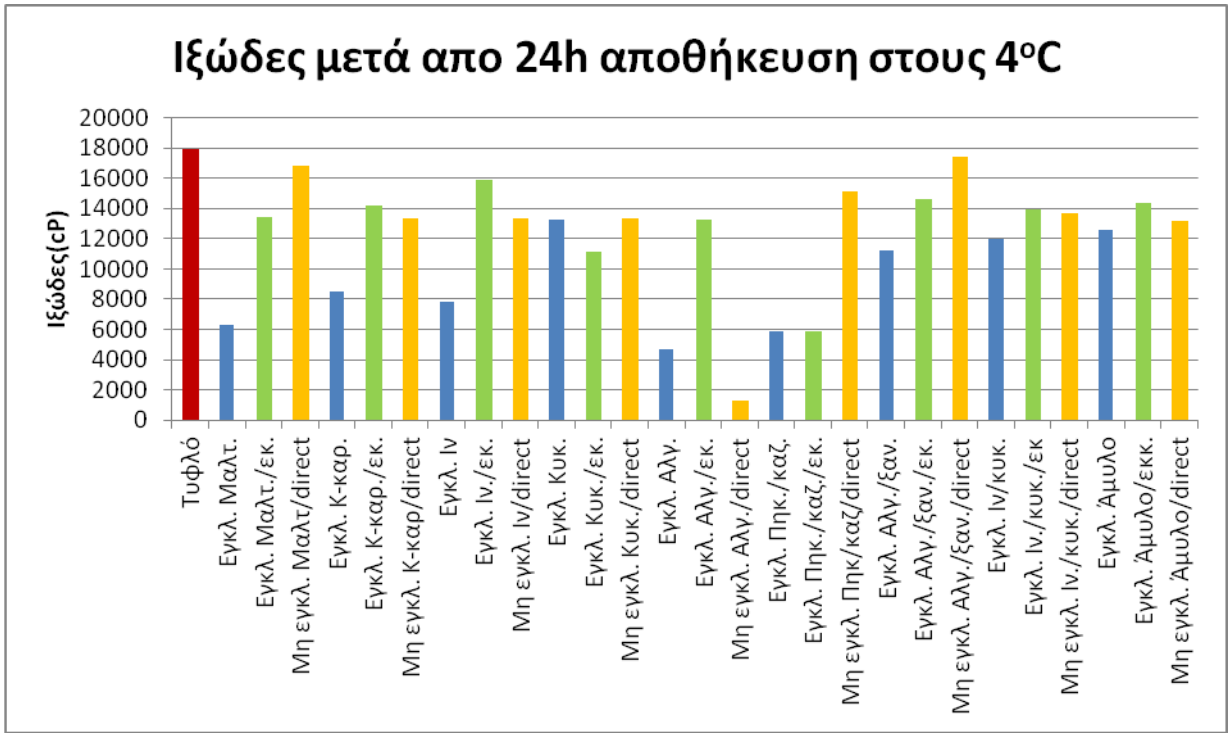


Διάγραμμα 7.30 Το ιξώδες αμέσως μετά το πέρας της ζύμωσης των δειγμάτων της 2^{ης} σειράς και του τυφλού δείγματος

Όπως φαίνεται, το ιξώδες των δειγμάτων κυμαίνεται από 1000cPs περίπου έως 6500cPs περίπου. Στις περισσότερες περιπτώσεις το ιξώδες των δειγμάτων είναι μικρότερο του τυφλού δείγματος, με εξαίρεση το δείγμα που έχει εμβολιαστεί με εγκλεισμένη, με κυκλοδεξτρίνη, καλλιέργεια και τα δείγματα που έχουν εμβολιαστεί με μη εγκλεισμένη καλλιέργεια και στα οποία έχουν προστεθεί σε ισοδύναμες ποσότητες τα εγκλειστικά μέσα αλγινικό νάτριο, και μείγμα πηκτίνης/καζεΐνης. Επίσης, το εμβολιασμένο με μείγμα εγκλεισμένης, με άμυλο και μη εγκλεισμένης καλλιέργειας παρουσιάζει ελαφρώς υψηλότερο ιξώδες, συγκριτικά με το ιξώδες του τυφλού δείγματος.

7.2.2.5 Ιξώδες γιαουρτιού μετά από 24h αποθήκευση στους 4°C

Σε αντίθεση με το ιξώδες που μετράται αμέσως μετά την λήξη της ζύμωσης των δειγμάτων, το ιξώδες που μετράται ύστερα από 1 ημέρα αποθήκευσης των δειγμάτων στους 4°C, φαίνεται πως εξαρτάται από τον τύπο του εμβολιασμού ($p<0,05$). Σύμφωνα όμως με τα αποτελέσματα της ανάλυσης διακύμανσης, αυτή η τιμή του ιξώδους, δεν επηρεάζεται σημαντικά από το είδος του εγκλειστικού μέσου που χρησιμοποιείται σε κάθε περίπτωση.

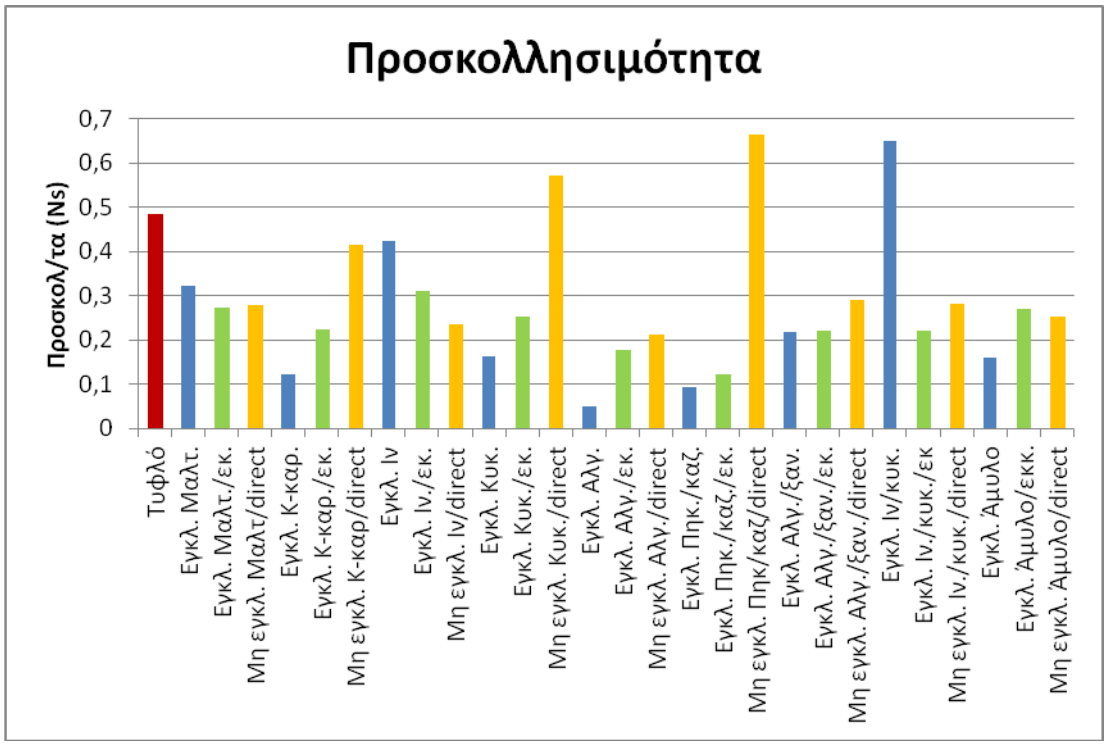


Διάγραμμα 7.31 Το ιξώδες που μετρήθηκε μετά από 1 ημέρα αποθήκευσης των δειγμάτων στους 4°C, για την 2η σειρά και το τυφλό δείγμα.

Σύμφωνα με το διάγραμμα 7.31, στις περισσότερες περιπτώσεις τα δείγματα που έχουν εμβολιαστεί με μη εγκλεισμένη καλλιέργεια και αντίστοιχη ποσότητα εγκλειστικού μέσου παρουσιάζουν υψηλότερες τιμές ιξώδους από τα υπόλοιπα δείγματα. Μάλιστα οι τιμές αυτές προσεγγίζουν την τιμή του τυφλού δείγματος. Αυτό μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι, ενώ τα βακτήρια είναι εγκλεισμένα, εντούτοις μπορούν να δράσουν και να δώσουν αποτελέσματα ιξώδους παραπλήσιες του τυφλού.

7.2.2.6 Προσκολλησιμότητα γιαουρτιού

Η παράμετρος προσκολλησιμότητα, όπως προκύπτει από την στατιστική επεξεργασία, δεν επηρεάζεται σε αξιοσημείωτο βαθμό από κανέναν απ' τους δύο μελετώμενους παράγοντες.

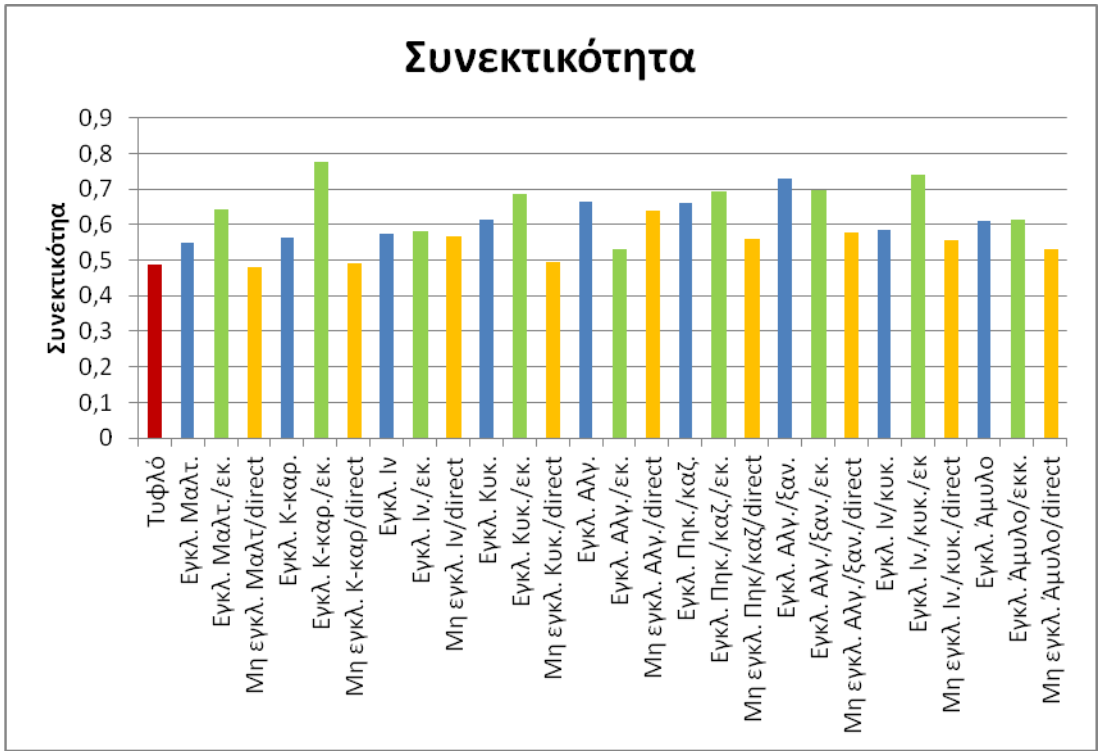


Διάγραμμα 7.32 Η προσκολλησιμότητα των δειγμάτων της 2^{ης} σειράς και του τυφλού δείγματος

Από το πιο πάνω διάγραμμα δεν εξάγεται κάποιο σαφές συμπέρασμα σχετικά με την επίδραση που έχει το εγκλειστικό μέσον ή ο τρόπος εμβολιασμού στην προσκολλησιμότητα των δειγμάτων.

7.2.2.7 Συνεκτικότητα γιαουρτιού

Σημαντική, φαίνεται να είναι η επίδραση του τύπου εμβολιασμού στην συνεκτικότητα του τελικού δείγματος ($p<0,05$). Από την άλλη μεριά όμως, το μέσον που χρησιμοποιείται για τον εγκλεισμό της προβιοτικής καλλιέργειας δεν επιδρά σημαντικά στην συνεκτικότητα του γιαουρτιού.

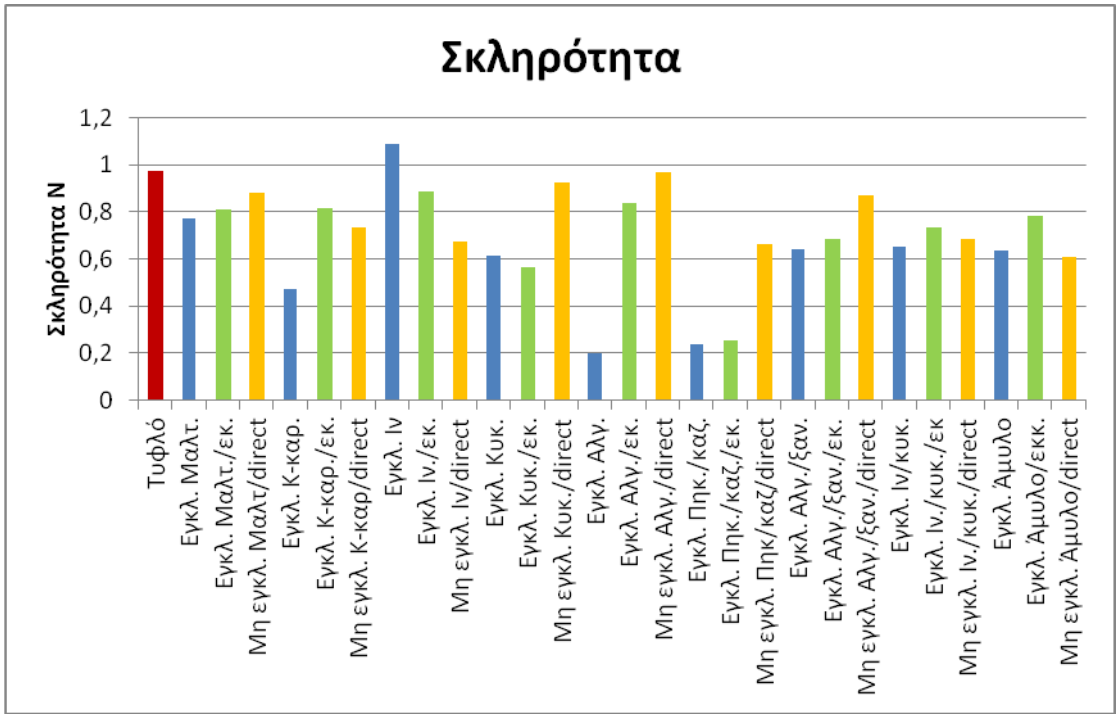


Διάγραμμα 7.33 Η συνεκτικότητα των δειγμάτων της 2^{ης} σειράς και του τυφλού δείγματος

Η συνεκτικότητα όλων των δειγμάτων είναι μεγαλύτερη ή πολύ κοντά με την τιμή του τυφλού δείγματος. Επίσης φαίνεται πως η συνεκτικότητα στα περισσότερα είναι μεγαλύτερη στα δείγματα που έχουν εμβολιαστεί με μείγμα εγκλεισμένης και μη εγκλεισμένης καλλιέργειας εκκίνησης. Η συνεκτικότητα είναι ένα χαρακτηριστικό υφής με πολύ μεγάλη σημασία από εμπορική άποψη και κατά συνέπεια οι υψηλές τιμές είναι ικανοποιητικές.

7.2.2.8 Σκληρότητα γιαουρτιού

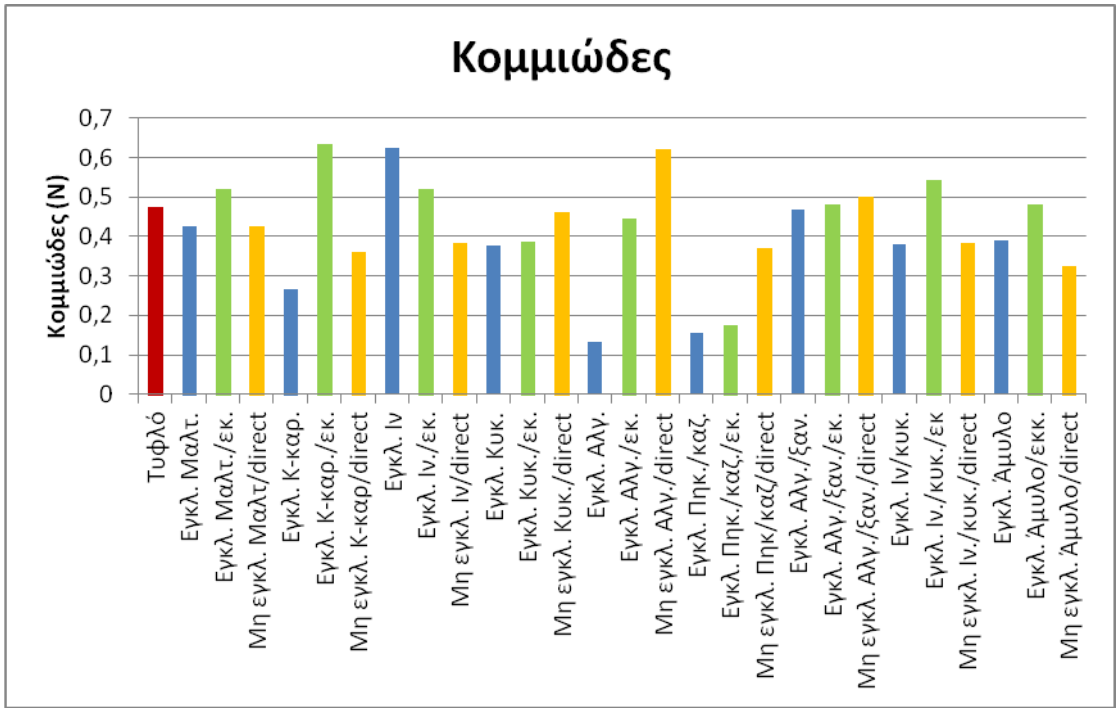
Η σκληρότητα αποτελεί μία παράμετρο η οποία δεν επηρεάζεται σημαντικά από κανέναν παράγοντα, όπως φαίνεται από την ανάλυση διακύμανσης αλλά και από το ακόλουθο ραβδόγραμμα.



Διάγραμμα 7.34 Η σκληρότητα των δειγμάτων της 2^{ης} σειράς και του τυφλού δείγματος

7.2.2.9 Κομμιώδες γιαουρτιού

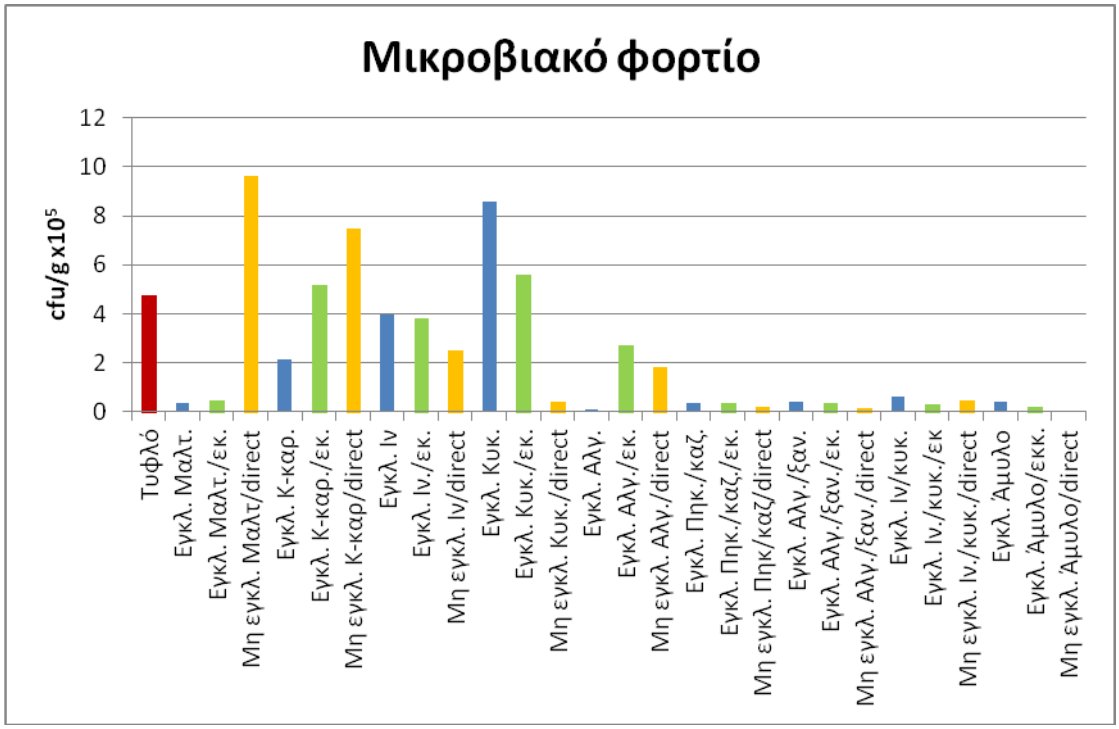
Το κομμιώδες είναι μία, ακόμη, μετρούμενη παράμετρος η οποία δεν υφίσταται αξιοσημείωτη επίδραση από κανέναν, από τους δύο, παράγοντες, κάτι το οποίο επιβεβαιώνεται και από το διάγραμμα 7.35.



Διάγραμμα 7.35 Το κομμιώδες των δειγμάτων της 2^{ης} σειράς και του τυφλού δείγματος

7.2.2.10 Μικροβιακό φορτίο γιαουρτιού

Δεν υπάρχει σημαντική επίδραση, τόσο του μέσου εγκλεισμού, όσο και του τύπου εμβολιασμού, στο μετρούμενο μικροβιακό φορτίο των δειγμάτων γιαουρτιού.



Διάγραμμα 7.34 Το μικροβιακό φορτίο των δειγμάτων της 2^{ης} σειράς και του τυφλού δείγματος

Από το ανωτέρω διάγραμμα γίνεται εμφανές ότι υπάρχουν δείγματα στα οποία ο μετρούμενος πληθυσμός των προβιοτικών στο γιαούρτι ήταν μεγαλύτερος από τον αντίστοιχο του τυφλού δείγματος και άλλα στα οποία ήταν αρκετά μικρότερος. Σε αρκετά όμως δείγματα ο αριθμός των ζώντων προβιοτικών είναι παραπλήσιος, αλλά όχι μεγαλύτερος του κατώτατου ορίου 10^7cfu/g που ισχύει γενικά για τα προβιοτικά βακτήρια. Επισημαίνεται ότι για τα βακτήρια του γένους *Bifidobacterium,* αποδεκτός θεωρείται ο αριθμός των ζώντων μικροοργανισμών άνω του 10^6cfu/g.

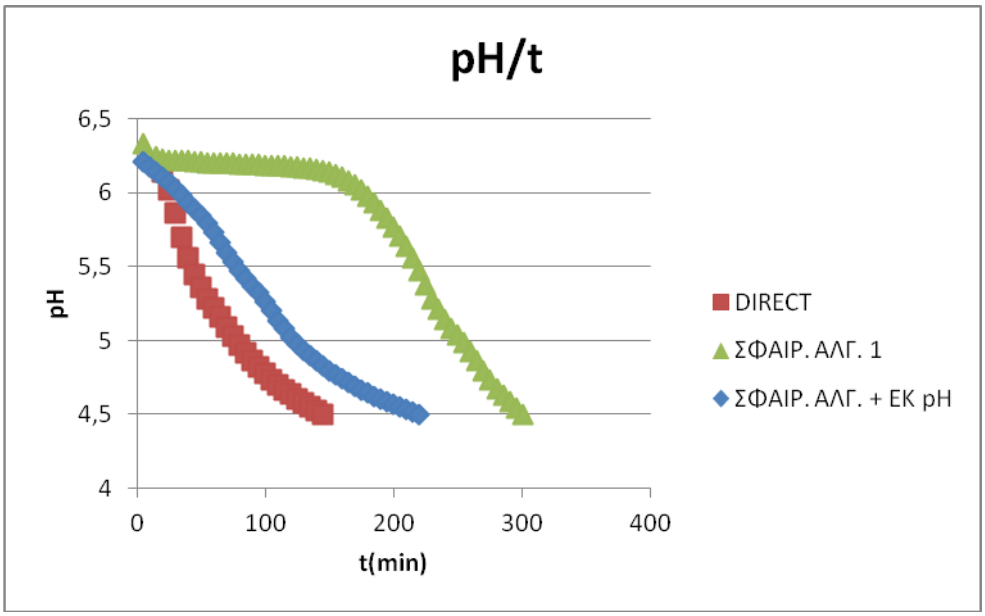
7.3 Τρίτη σειρά πειραμάτων

7.3.1 Αποτελέσματα μετρήσεων τρίτης σειράς πειραμάτων (τεχνική εγκλεισμού με εξώθηση και θερμοκρασία ζύμωσης 45°C)

7.3.1.1 Ζύμωση με μη εγκλεισμένη καλλιέργεια (Direct ή τυφλό δείγμα)

Σε αυτήν την σειρά πειραμάτων το τυφλό δείγμα που χρησιμοποιείται ως αναφορά, δηλαδή το δείγμα που έχει ζυμωθεί μόνον με μη εγκλεισμένη προβιοτική καλλιέργεια εκκίνησης (direct), είναι το ίδιο με αυτό της προηγούμενης σειράς πειραμάτων (2^{ης}) καθώς δεν υπάρχει καμία αλλαγή στις συνθήκες. Επομένως, η μείωση του pH με την πάροδο του χρόνου και η αντίστοιχη καμπύλη έχουν ήδη παρουσιαστεί ανωτέρω στο διάγραμμα 7.16.

7.3.1.2 Ζύμωση με εγκλεισμένη καλλιέργεια, με μείγμα αλγινικού νατρίου/ξανθάνης/μαλτοδεξτρίνης/φρουκτόζης/MRS broth/γλυκερόλη (1° μείγμα της τεχνικής εξώθησης) και με μείγμα εγκλεισμένης/ μη εγκλεισμένης καλλιέργειας



Διάγραμμα 7.37 Μεταβολή pH συναρτήσει του χρόνου κατά την ζύμωση γάλακτος προς γιαούρτι με εγκλεισμένη με το 1° μείγμα και με μείγμα εγκλεισμένης και μη εγκλεισμένης προβιοτικής καλλιέργειας εκκίνησης

Στο ανωτέρω διάγραμμα παρουσιάζονται οι καμπύλες μεταβολής του pH συναρτήσει του χρόνου ζύμωσης. Είναι εμφανές ότι η μορφή των δύο καμπυλών που αντιστοιχούν, στο δείγμα που έχει εμβολιαστεί με εγκλεισμένη προβιοτική καλλιέργεια εκκίνησης και στο δείγμα που έχει εμβολιαστεί με ποσότητα εγκλεισμένης και με ποσότητα μη εγκλεισμένης προβιοτικής καλλιέργειας εκκίνησης, διαφέρει από εκείνη της πρώτης καμπύλης που αντιστοιχεί στο τυφλό δείγμα. Επίσης, οι χρόνοι ζύμωσης είναι αρκετά διαφορετικοί μεταξύ των τριών δειγμάτων, με μικρότερο χρόνο αυτόν του τυφλού και μεγαλύτερο αυτόν του εμβολιασμένου με εγκλεισμένη καλλιέργεια δείγματος. Οι διαφορές αυτές ενδεχομένως να οφείλονται στην επίτευξη εγκλεισμού των προβιοτικών βακτηρίων.

Στον ακόλουθο πίνακα παρουσιάζονται οι μετρήσεις των ποιοτικών χαρακτηριστικών των γιαουρτιών που προέκυψαν.

Πίνακας 7.15 Αποτελέσματα μετρήσεων κατά την ζύμωση γάλακτος προς γιαούρτι με εγκλεισμένη, με το 1^{ο} μείγμα, καλλιέργεια, και με μείγμα εγκλεισμένης/μη εγκλεισμένης καλλιέργειας

Χαρακτηριστικό	Τυφλό	Εγκλεισμένη καλλιέργεια	Μείγμα εγκλεισμένης/ μη εγκλεισμένης
Συνολική διάρκεια (min)	130	300	220
Μέγιστος ρυθμός μείωσης, μ	-10,96	-0,05	-0,03
Διάρκεια λανθάνουσας φάσης, λ (min)	(-1375,30)	203, 77	0,92
Προσαρμογή στο μοντέλο 3.1	όχι	ναι	ναι
Ιξώδες μετά την ζύμωση (cPs)	4780	2584	4312
Ιξώδες μετά από 24h αποθήκευση στους 4°C (cPs)	17902	12522	13066
Προσκολλησιμότητα (N*s)	0,468	0,203	0,196
Συνεκτικότητα	0,487	0,654	0,609
Σκληρότητα (N)	0,9731	0,6196	0,7490
Κομμιώδες (N)	0,474	0,405	0,456
Μικροβιολογικά (cfu/g)	$5*10^5$	$2*10^7$	$9*10^6$

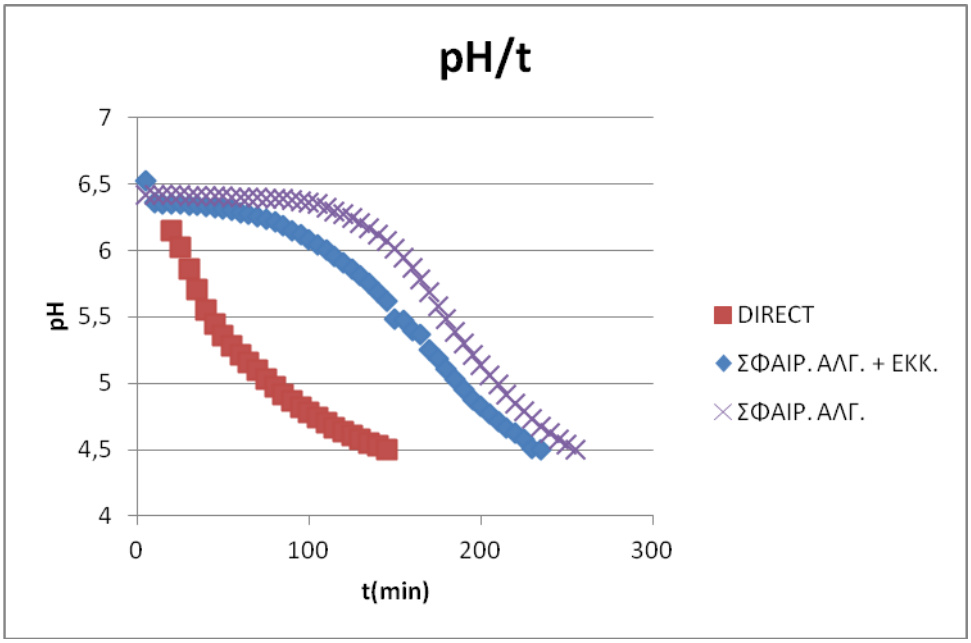
Το ζ-δυναμικό είναι ένα μέγεθος το οποίο δείχνει την δυνατότητα σχηματισμού κροκιδωμάτων κατά την επαφή δύο διαλυμάτων. Όσο μικρότερη (κατ' απόλυτη τιμή) είναι η τιμή του ζ-δυναμικού, τόσο πιο ταχεία είναι η δημιουργία κροκιδωμάτων και τόσο πιο σταθερά είναι αυτά. Άρα, στην συγκεκριμένη μέθοδο είναι πολύ σημαντικός παράγοντας για την επιτυχή επιλογή του κατάλληλου μέσου εγκλεισμού και του αντίστοιχου ρυθμιστικού διαλύματος.

Πίνακας 7.16 Μετρήσεις ζ-δυναμικού για το 1^{ο} εγκλειστικό μείγμα της μεθόδου εξώθησης

Δείγμα	Απορρόφηση (ABS)	Δείκτης διάθλασης	Αγωγιμότητα (ms/cm)	ζ-δυναμικό (mV)
$CaCl_2$ 0,45M	ίδια με του νερού	ίδια με του νερού	45,9	-4,48
1^{ο} μείγμα εγκλεισμού	0,318	1,3643	13,9	-12

Παρατηρείται ότι τόσο το ζ-δυναμικό του διαλύματος $CaCl_2$, όσο και του μείγματος εγκλεισμού έχουν μικρή (απόλυτο) τιμή. Αυτό σημαίνει ότι μόλις το μείγμα έρθει σ' επαφή με το διάλυμα $CaCl_2$ τότε αυτό αμέσως θα δημιουργήσει κροκιδώματα (σφαιρίδια εγκλεισμού), κάτι το οποίο και επιβεβαιώνεται από το ίδιο το πείραμα.

7.3.1.3 Ζύμωση με εγκλεισμένη, με αλγινικό νάτριο (2ο μείγμα της τεχνικής εξώθησης), καλλιέργεια και με μείγμα εγκλεισμένης/ μη εγκλεισμένης καλλιέργειας



Διάγραμμα 7.38 Μεταβολή pH συναρτήσει του χρόνου κατά την ζύμωση γάλακτος προς γιαούρτι με εγκλεισμένη με το 2° μείγμα και με μείγμα εγκλεισμένης και μη εγκλεισμένης προβιοτικής καλλιέργειας εκκίνησης

Στο διάγραμμα 7.38 παρουσιάζονται οι καμπύλες μεταβολής του pH συναρτήσει του χρόνου ζύμωσης. Η καμπύλη που αντιστοιχεί στο τυφλό δείγμα εμφανίζει σημαντικές διαφορές συγκριτικά με τις άλλες δύο καμπύλες, οι οποίες έχουν αρκετές ομοιότητες μεταξύ τους. Παρουσιάζουν λανθάνουσα φάση, με χρονική διάρκεια για την καμπύλη του εμβολιασμένου με εγκλεισμένη καλλιέργεια 159,6min, ενώ για την καμπύλη του εμβολιασμένου με ποσότητα εγκλεισμένης και ποσότητα μη εγκλεισμένης προβιοτικής καλλιέργειας 126,0min αντίστοιχα. Παραπλήσιοι είναι, ακόμη και οι χρόνοι ζύμωση των δειγμάτων αυτών.

Στον ακόλουθο πίνακα παρουσιάζονται οι μετρήσεις των ποιοτικών χαρακτηριστικών των γιαουρτιών που προέκυψαν.

Πίνακας 7.17 Αποτελέσματα μετρήσεων κατά την ζύμωση γάλακτος προς γιαούρτι με εγκλεισμένη, με το 2^{ο} μείγμα, καλλιέργεια, και με μείγμα εγκλεισμένης/μη εγκλεισμένης καλλιέργειας

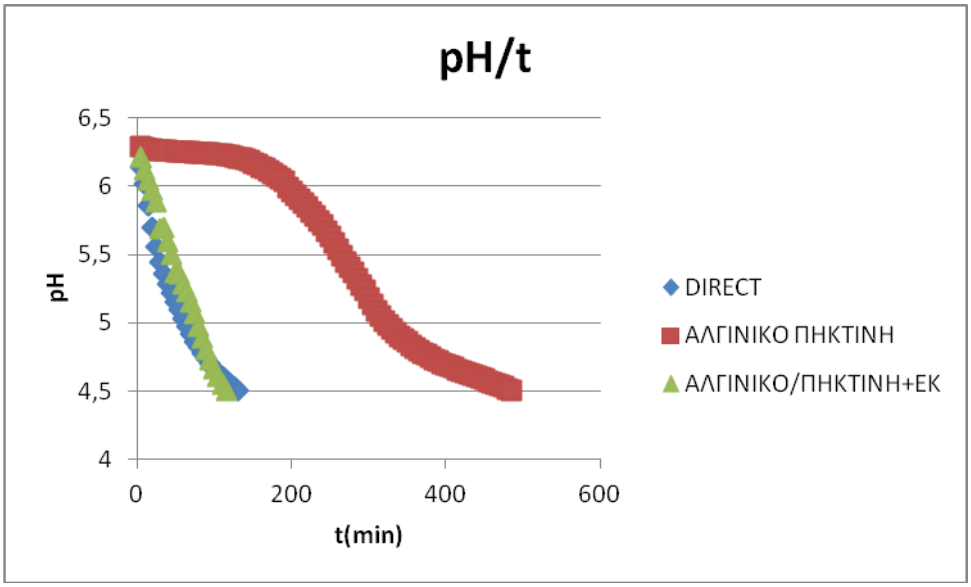
Χαρακτηριστικό	Τυφλό	Εγκλεισμένη καλλιέργεια	Μείγμα εγκλεισμένης/ μη εγκλεισμένης
Συνολική διάρκεια (min)	130	255	235
Μέγιστος ρυθμός μείωσης, μ	-10,96	-0,05	-0,04
Διάρκεια λανθάνουσας φάσης, λ (min)	(-1375,30)	159,63	126,02
Προσαρμογή στο μοντέλο 3.1	όχι	ναι	ναι
Ιξώδες μετά την ζύμωση (cPs)	4780	2531	4030
Ιξώδες μετά από 24h αποθήκευση στους 4°C (cPs)	17902	9333	15615
Προσκολλησιμότητα (N*s)	0,468	0,139	0,316
Συνεκτικότητα	0,487	0,541	0,546
Σκληρότητα (N)	0,9731	0,4846	0,9025
Κομμιώδες (N)	0,474	0,262	0,496
Μικροβιολογικά (cfu/g)	$5*10^5$	10^5	10^6

7.18 Μετρήσεις ζ-δυναμικού για το 2^{ο} εγκλειστικό μείγμα της τεχνικής εξώθησης

Δείγμα	Απορρόφηση (ABS)	Δείκτης διάθλασης	Αγωγιμότητα (ms/cm)	ζ-δυναμικό (mV)
$CaCl_2$ 0,05M	ίδια με του νερού	ίδια με του νερού	7,28	-6,95
2^{ο} μείγμα εγκλεισμού	0,136	1,358	4,71	-89,6

Από τον παραπάνω πίνακα είναι εμφανές ότι η τιμή του ζ-δυναμικού, για το μεν διάλυμα $CaCl_2$ είναι μικρή, για το δε μείγμα εγκλεισμού αρκετά μεγάλη (κατ' απόλυτο τιμή). Η μεγάλη τιμή του ζ-δυναμικού που παρουσιάζει το μείγμα δείχνει ότι το κολλοειδές αυτό έχει μεγάλη σταθερότητα και δεν σχηματίζει ταχέως συσσωματώματα. Αυτό το συμπέρασμα επιβεβαιώθηκε και από το πείραμα, καθώς παρατηρήθηκε ότι τα σφαιρίδια που σχηματίζοντας, μόλις το μείγμα ήρθε σ' επαφή με το διάλυμα $CaCl_2$, δεν ήταν αρκετά σταθερά και ομοιόμορφα, όπως συνέβη στην περίπτωση του 1^{ου} μείγματος.

7.3.1.4 Ζύμωση με εγκλεισμένη, με μείγμα αλγινικού νατρίου/πηκτίνης (3ο μείγμα της τεχνικής εξώθησης), καλλιέργεια και με μείγμα εγκλεισμένης/μη εγκλεισμένης καλλιέργειας



Διάγραμμα 7.39 Μεταβολή pH συναρτήσει του χρόνου κατά την ζύμωση γάλακτος προς γιαούρτι με εγκλεισμένη με το 3° μείγμα και με μείγμα εγκλεισμένης και μη εγκλεισμένης προβιοτικής καλλιέργειας εκκίνησης

Στο παραπάνω διάγραμμα παρουσιάζονται 3 καμπύλες μεταβολής του pH συναρτήσει του χρόνου ζύμωσης. Η καμπύλη που αντιστοιχεί στο δείγμα που έχει εμβολιαστεί με ποσότητα εγκλεισμένης και με ποσότητα μη εγκλεισμένης προβιοτικής καλλιέργειας εκκίνησης, έχει σχεδόν γραμμική μορφή ενώ ο χρόνος ζύμωσης του αντίστοιχου δείγματος είναι παραπλήσιος του χρόνου ζύμωσης του τυφλού. Διαφορετική είναι, από την άλλη, η μορφή της καμπύλης που αντιστοιχεί στο εμβολιασμένο με εγκλεισμένη προβιοτική καλλιέργεια δείγμα, η οποία έχει λανθάνουσα φάση με χρονική διάρκεια 223,2min.

Στον ακόλουθο πίνακα παρουσιάζονται οι μετρήσεις των ποιοτικών χαρακτηριστικών των γιαουρτιών που προέκυψαν.

Πίνακας 7.19 Μετρήσεις και αποτελέσματα για τα εμβολιασμένα με εγκλεισμένη, με το 3° μείγμα, καλλιέργεια, και με μείγμα εγκλεισμένης/μη εγκλεισμένης καλλιέργειας και σύγκριση με direct

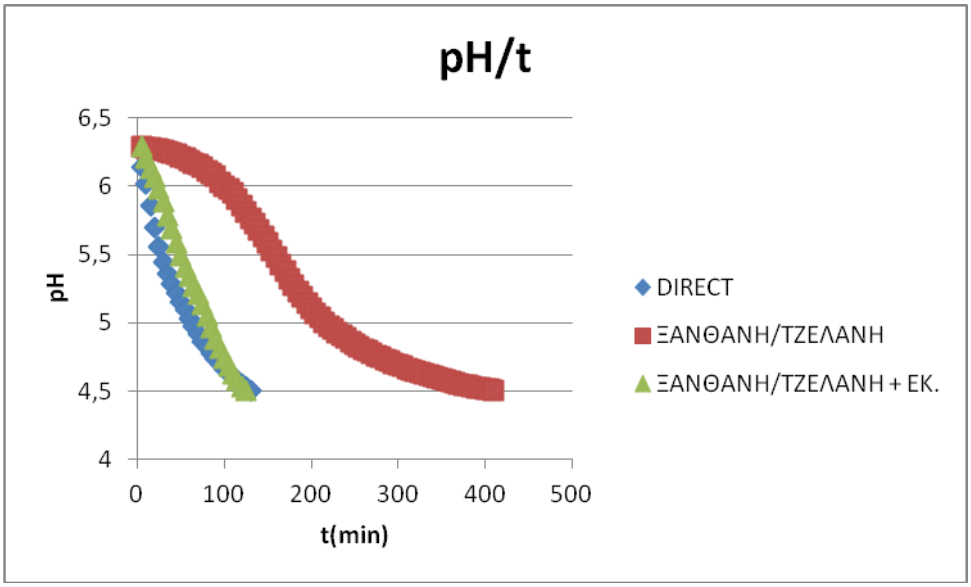
Χαρακτηριστικό	Τυφλό	Εγκλεισμένη καλλιέργεια	Μείγμα εγκλεισμένης/ μη εγκλεισμένης
Συνολική διάρκεια (min)	130	485	115
Μέγιστος ρυθμός μείωσης, μ	-10,96	-0,02	-0,11
Διάρκεια λανθάνουσας φάσης, λ (min)	(-1375,30)	223,24	(-1262,10)
Προσαρμογή στο μοντέλο 3.1	όχι	όχι	ναι
Ιξώδες μετά την ζύμωση (cPs)	4780	3431	2929
Ιξώδες μετά από 24h αποθήκευση στους 4°C (cPs)	17902	10779	13103
Προσκολλησιμότητα (N*s)	0,468	0,246	0,397
Συνεκτικότητα	0,487	0,467	0,564
Σκληρότητα (N)	0,9731	0,6908	0,6376
Κομμιώδες (N)	0,474	0,323	0,360
Μικροβιολογικά (cfu/g)	$5*10^5$	$5*10^4$	10^5

7.20 Μετρήσεις ζ-δυναμικού για το 3° εγκλειστικό μείγμα της τεχνικής εξώθησης

Δείγμα	Απορρόφηση (ABS)	Δείκτης διάθλασης	Αγωγιμότητα (ms/cm)	ζ-δυναμικό (mV)
$CaCl_2$ 0,5M	ίδια με του νερού	ίδια με του νερού	51,7	-3,15
3° μείγμα εγκλεισμού	3,116	1,3402	7,15	-11,4

Σε αυτήν την περίπτωση, το ζ-δυναμικό του μείγματος εγκλεισμού είναι αρκετά μικρό (κατ' απόλυτο τιμή), άρα σχηματίζονται εύκολα και σταθερά συσσωματώματα (σφαιρίδια εγκλεισμού).

7.3.1.5 Ζύμωση με εγκλεισμένη, με μείγμα ξανθάνης/τζελάνης (4ο μείγμα της τεχνικής εξώθησης), καλλιέργεια και με μείγμα εγκλεισμένης/ μη εγκλεισμένης καλλιέργειας



Διάγραμμα 7.40 Μεταβολή pH συναρτήσει του χρόνου κατά την ζύμωση γάλακτος προς γιαούρτι με εγκλεισμένη με το 4° μείγμα και με μείγμα εγκλεισμένης και μη εγκλεισμένης προβιοτικής καλλιέργειας εκκίνησης

Στο πιο πάνω διάγραμμα παρουσιάζονται οι καμπύλες μεταβολής του pH συναρτήσει του χρόνου ζύμωσης. Η καμπύλη που αντιστοιχεί στο δείγμα που έχει εμβολιαστεί με ποσότητα εγκλεισμένης και με ποσότητα μη εγκλεισμένης προβιοτικής καλλιέργειας εκκίνησης, έχει σχεδόν γραμμική μορφή, ενώ η χρονική διάρκεια της ζύμωσης είναι παραπλήσια με αυτήν του τυφλού. Η καμπύλη του εμβολιασμένου με εγκλεισμένη προβιοτική καλλιέργεια δείγματος παρουσιάζει διαφορετική μορφή, ενώ η λανθάνουσα φάση της διαρκεί 90,0min.

Στον ακόλουθο πίνακα παρουσιάζονται οι μετρήσεις των ποιοτικών χαρακτηριστικών των γιαουρτιών που προέκυψαν.

Πίνακας 7.21 Αποτελέσματα μετρήσεων κατά την ζύμωση γάλακτος προς γιαούρτι με εγκλεισμένη, με το 4° μείγμα, καλλιέργεια, και με μείγμα εγκλεισμένης/μη εγκλεισμένης καλλιέργειας

Χαρακτηριστικό	Τυφλό	Εγκλεισμένη καλλιέργεια	Μείγμα εγκλεισμένης/ μη εγκλεισμένης
Συνολική διάρκεια (min)	130	410	125
Μέγιστος ρυθμός μείωσης, μ	-10,96	-0,02	-0,05
Διάρκεια λανθάνουσας φάσης, λ (min)	(-1375,30)	90,03	(-62,58)
Προσαρμογή στο μοντέλο 3.1	όχι	ναι	όχι
Ιξώδες μετά την ζύμωση (cPs)	4780	4555	2850
Ιξώδες μετά από 24h αποθήκευση στους 4°C (cPs)	17902	9842	9757
Προσκολλησιμότητα (N*s)	0,468	0,159	0,155
Συνεκτικότητα	0,487	0,652	0,774
Σκληρότητα (N)	0,9731	0,5026	0,4253
Κομμιώδες (N)	0,474	0,328	0,329
Μικροβιολογικά (cfu/g)	$5*10^5$	$4*10^4$	$2*10^4$

7.22 Μετρήσεις ζ-δυναμικού για το 4° εγκλειστικό μείγμα της τεχνικής εξώθησης

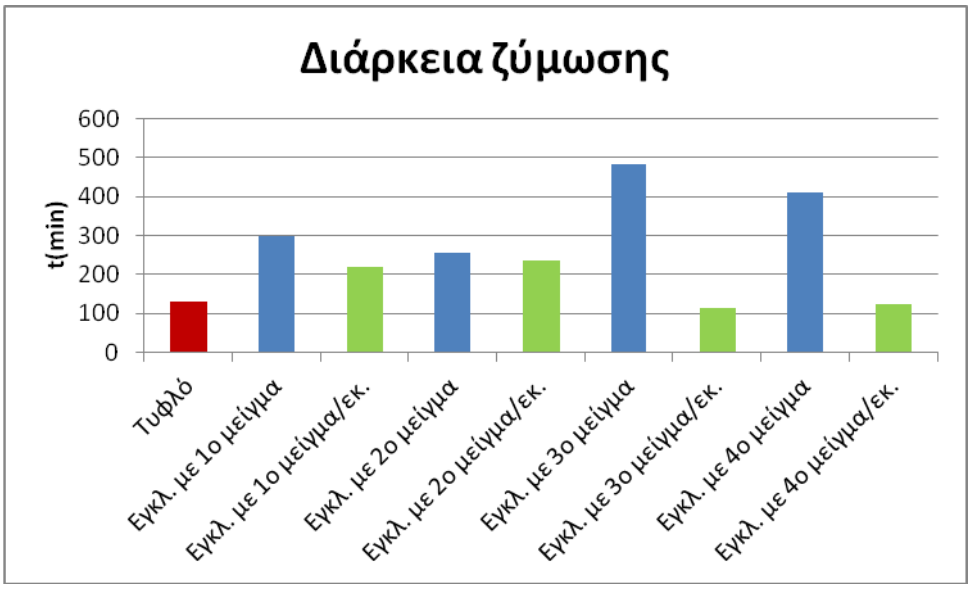
Δείγμα	Απορρόφηση (ABS)	Δείκτης διάθλασης	Αγωγιμότητα (ms/cm)	ζ-δυναμικό(mV)
$CaCl_2$ 0,1M	ίδια με του νερού	ίδια με του νερού	10,6	-5,52
4° μείγμα εγκλεισμού	0,18	1,3342	1,22	-42,6

Είναι εμφανές ότι το ζ-δυναμικό του μείγματος εγκλεισμού είναι υψηλό (κατ' απόλυτο τιμή), σε αντίθεση με εκείνο του διαλύματος $CaCl_2$. Η υψηλή απόλυτος τιμή του ζ-δυναμικού δείχνει ότι το κολλοειδές διάλυμα παρουσιάζει μία σταθερότητα και συνεπώς δεν σχηματίζει ταχέως και καλής ποιότητας συσσωματώματα κατά την επαφή του με το διάλυμα $CaCl_2$.

7.3.2 Σύγκριση αποτελεσμάτων 3ης σειράς πειραμάτων

Σε αυτήν την ενότητα γίνεται στατιστική επεξεργασία των μετρήσεων και αποτελεσμάτων της 3ης σειράς πειραμάτων, με τον ίδιο ακριβώς τρόπο που πραγματοποιήθηκε και στην προηγούμενη ενότητα, για την 2η σειρά πειραμάτων. Από την ανάλυση διακύμανσης, για κάθε μία εξεταζόμενη παράμετρο ξεχωριστά, προέκυψε ότι καμία παράμετρος δεν επηρεάζεται σημαντικά από τον τύπο εμβολιασμού και το μέσον εγκλεισμού. Παρακάτω παρουσιάζονται τα ραβδογράμματα με τις τιμές κάθε παραμέτρου για τα διάφορα μέσα εγκλεισμού και τους διάφορους εμβολιασμούς.

7.3.2.1 Χρονική διάρκεια ζύμωσης



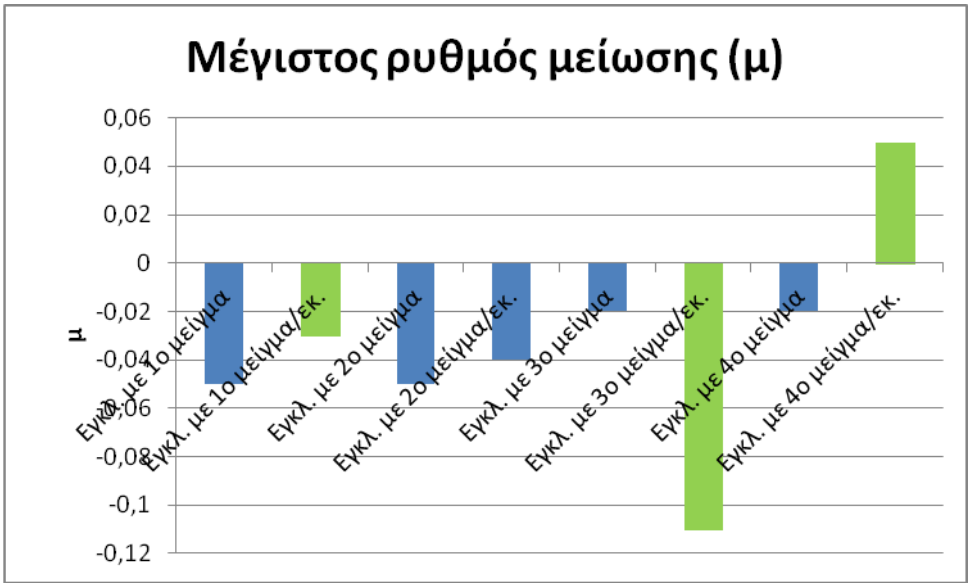
Διάγραμμα 7.41 Η διάρκεια ζύμωσης των δειγμάτων της 3ης σειράς και του τυφλού δείγματος

Σύμφωνα με το ανωτέρω διάγραμμα η διάρκεια της ζύμωσης είναι μεγαλύτερη σχεδόν σε όλα τα δείγματα, σε σχέση με την διάρκεια του τυφλού δείγματος. Μάλιστα, αρκετά μεγαλύτερη διάρκεια παρουσιάζουν τα δείγματα που έχουν εμβολιαστεί με εγκλεισμένη προβιοτική καλλιέργεια εκκίνησης.

7.3.2.2 Μέγιστος ρυθμός μείωσης pH

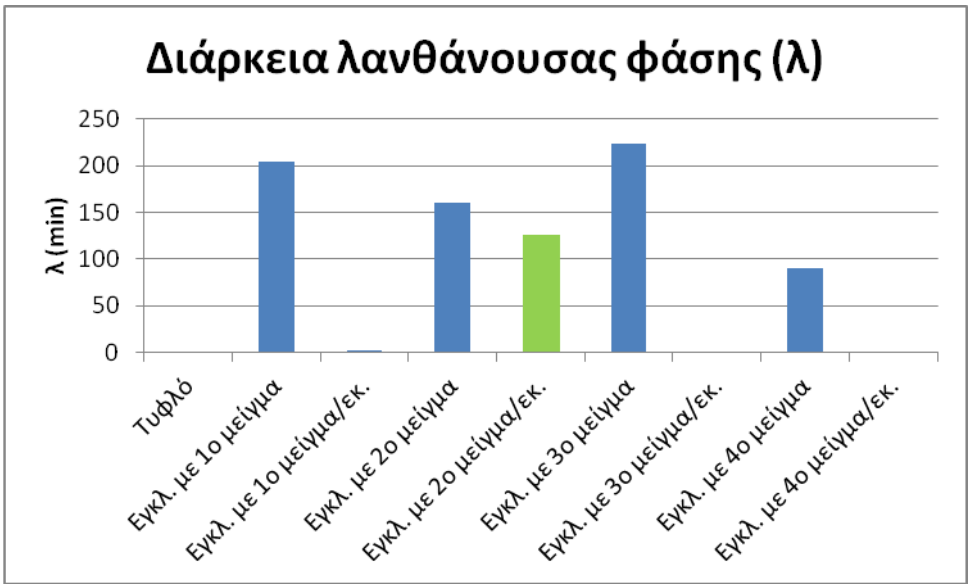
Διάγραμμα 7.42α Ο μέγιστος ρυθμός μείωσης pH (μ) των δειγμάτων της 3^{ης} σειράς και του τυφλού δείγματος

Σύμφωνα με το διάγραμμα 7.42α, όλα τα δείγματα παρουσίασαν πολύ πιο μικρές, κατ' απόλυτο τιμή, τιμές μέγιστου ρυθμού μείωσης pH, συγκριτικά με το τυφλό δείγμα. Αυτό δηλαδή σημαίνει ότι το pH των υπόλοιπων δειγμάτων μειωνόταν με πολύ βραδείς ρυθμούς, κάτι το οποίο μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι είχε επιτευχθεί ο εγκλεισμός των προβιοτικών με την συγκεκριμένη μέθοδο (τεχνική της εξώθησης). Στην περίπτωση του εμβολιασμένου με μείγμα εγκλεισμένης, με το 4^{ο} μείγμα και μη εγκλεισμένης καλλιέργειας ο μέγιστος ρυθμός μείωσης pH μ, παρουσιάζει θετική τιμή (~0,05) που λόγω της εγκύτητάς της στην τιμή 0, μπορεί να θεωρηθεί ίση με αυτήν και ενδεχομένως να οφείλεται σε σφάλμα του οργάνου. Για καλλίτερη σύγκριση παρατίθεται και το ακόλουθο διάγραμμα στο οποίο δεν υπάρχει ο μέγιστος ρυθμός μείωσης μ του τυφλού δείγματος.



Διάγραμμα 7.42.β Ο μέγιστος ρυθμός μείωσης (μ) των δειγμάτων της 3^{ης} σειράς

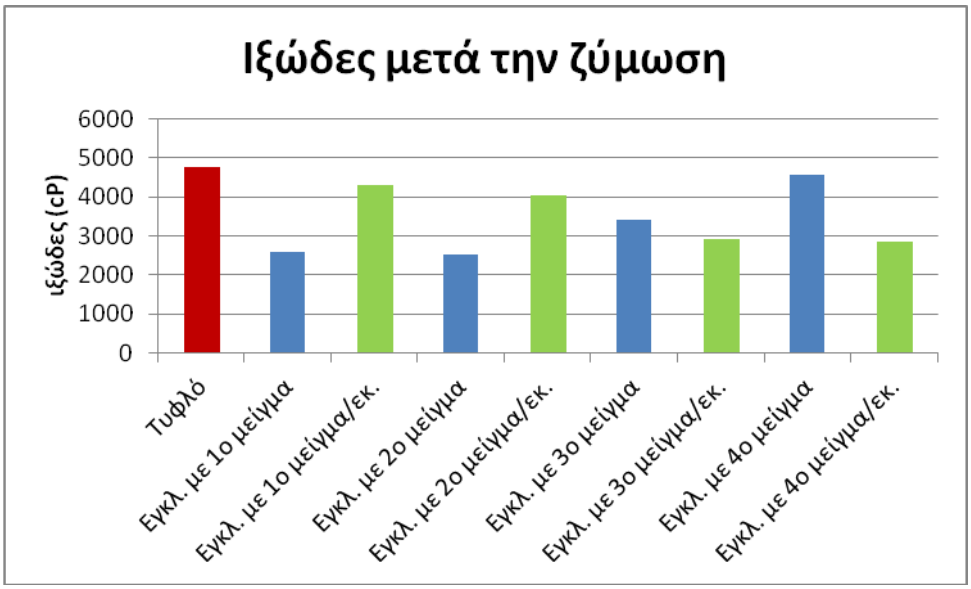
7.3.2.3 Διάρκεια λανθάνουσας φάσης pH



Διάγραμμα 7.43 Η διάρκεια λανθάνουσας φάσης ζύμωσης (λ) των δειγμάτων της 3^{ης} σειράς και του τυφλού δείγματος

Από το παραπάνω διάγραμμα φαίνεται πως όλα τα δείγματα που έχουν εμβολιαστεί με εγκλεισμένη προβιοτική καλλιέργεια παρουσιάζουν λανθάνουσα φάση ζύμωσης, κάτι το οποίο δεν συμβαίνει με τα όλα τα υπόλοιπα δείγματα συμπεριλαμβανομένου και του τυφλού.

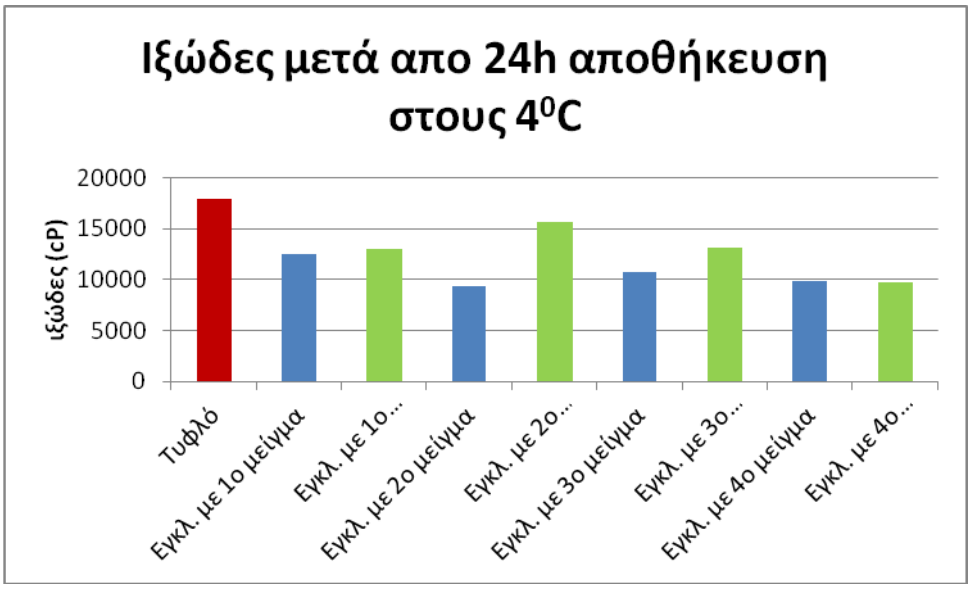
7.3.2.4 Ιξώδες γιαουρτιού μετά την ζύμωση (45°C)



Διάγραμμα 7.44 Το ιξώδες αμέσως μετά το πέρας της ζύμωσης των δειγμάτων της 3^{ης} σειράς και του τυφλού δείγματος

Το ιξώδες των γιαουρτιών που μετράται αμέσως μετά το πέρας της ζύμωσης, είναι σε όλες, σχεδόν, τις περιπτώσεις μικρότερο από το αντίστοιχο του τυφλού δείγματος.

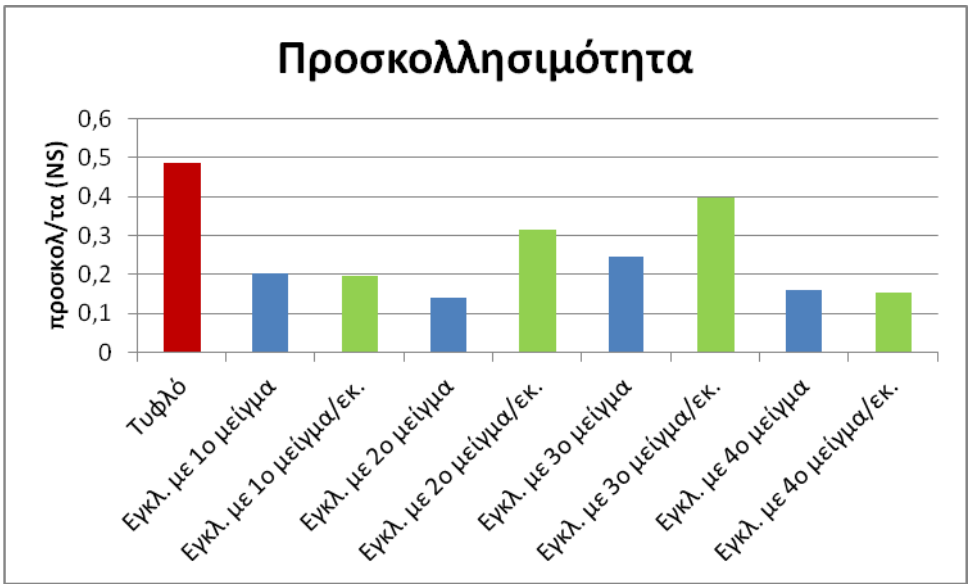
7.3.2.5 Ιξώδες γιαουρτιού μετά από 24h αποθήκευση στους 4°C



Διάγραμμα 7.45 Το ιξώδες έπειτα από 1 ημέρα αποθήκευσης, των δειγμάτων της 3^{ης} σειράς και του τυφλού δείγματος, στους 4°C

Από το διάγραμμα 7.45 φαίνεται ότι και το ιξώδες των γιαουρτιών που μετράται έπειτα από μία ημέρα αποθήκευσης των δειγμάτων στους 4°C, είναι μικρότερο σε σχέση με το ιξώδες του τυφλού δείγματος.

7.3.2.6 Προσκολλησιμότητα γιαουρτιού

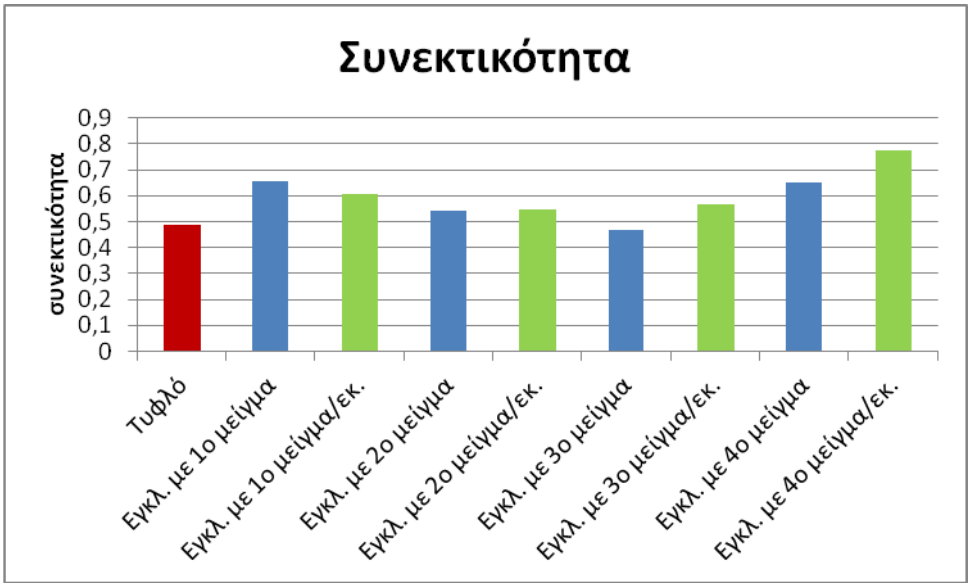


Διάγραμμα 7.46 Η προσκολλησιμότητα των δειγμάτων της 3^{ης} σειράς και του τυφλού δείγματος

Η προσκολλησιμότητα των περισσότερων δειγμάτων είναι αρκετά μικρότερη από αυτήν του τυφλού. Μικρότερες, ωστόσο είναι οι διαφορές μεταξύ του τυφλού και των δειγμάτων που

έχουν εμβολιαστεί με εγκλεισμένη με το 2^{ο} και το 3^{ο} εγκλειστικό μείγμα και με μη εγκλεισμένη προβιοτική καλλιέργεια.

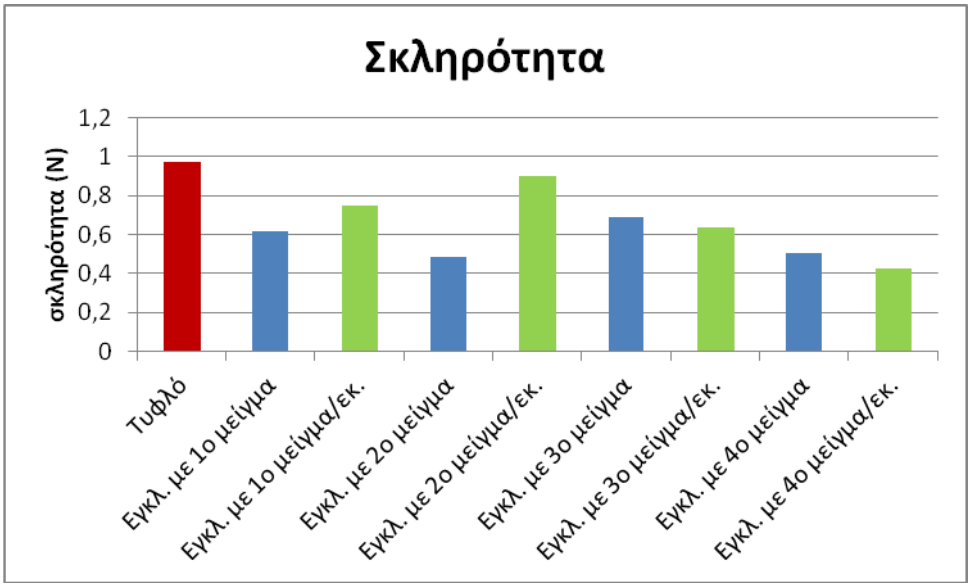
7.3.2.7 Συνεκτικότητα γιαουρτιού



Διάγραμμα 7.47 Η συνεκτικότητα των δειγμάτων της 3^{ης} σειράς και του τυφλού δείγματος

Μικρές είναι, σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα, οι διαφορές μεταξύ της τιμής της συνεκτικότητας του τυφλού και των υπόλοιπων δειγμάτων, στις περισσότερες περιπτώσεις. Να σημειωθεί, ακόμη, ότι οι τιμές των δειγμάτων είναι σε όλες τις περιπτώσεις μεγαλύτερες και αυτό είναι επιθυμητό από εμπορική άποψη.

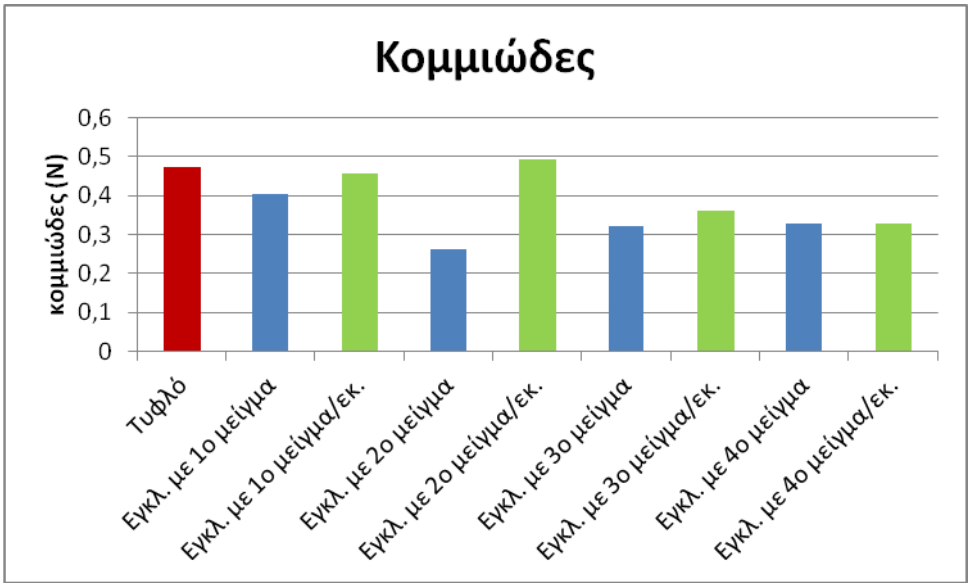
7.3.2.8 Σκληρότητα γιαουρτιού



Διάγραμμα 7.48 Η σκληρότητα των δειγμάτων της 3^{ης} σειράς και του τυφλού δείγματος

Από το διάγραμμα 7.48 παρατηρείται ότι η τιμή της σκληρότητας όλων των δειγμάτων είναι μικρότερη από εκείνη του τυφλού δείγματος.

7.3.2.9 Κομμιώδες γιαουρτιού



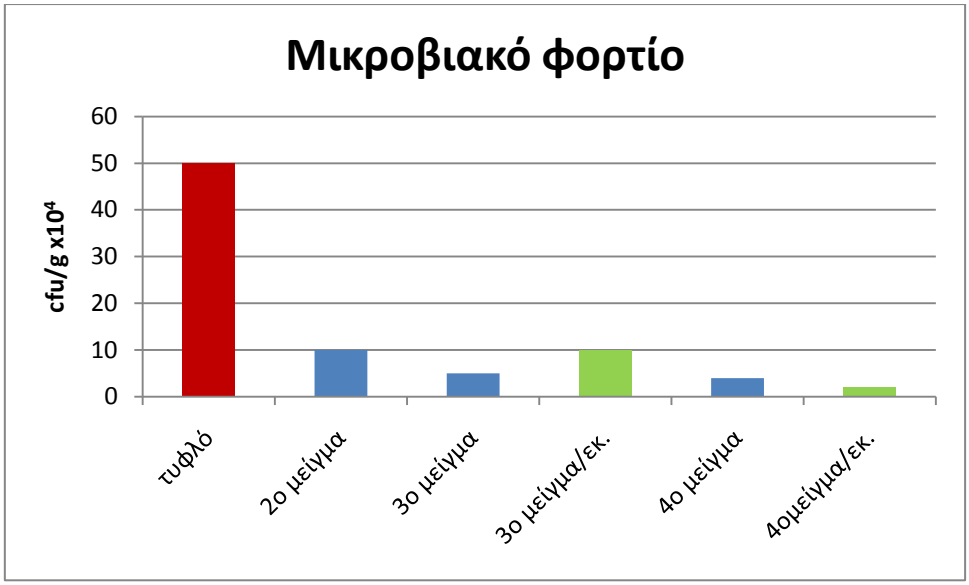
Διάγραμμα 7.49 Το κομμιώδες των δειγμάτων της 3^{ης} σειράς και του τυφλού δείγματος

Στις περισσότερες περιπτώσεις το κομμιώδες των δειγμάτων είναι μικρότερο από το αντίστοιχο του τυφλού δείγματος. Εξαίρεση αποτελεί το δείγμα που έχει εμβολιαστεί με εγκλεισμένη με το 2^{ο} εγκλειστικό μείγμα και μη εγκλεισμένη προβιοτική καλλιέργεια εκκίνησης και το οποίο παρουσιάζει ελαφρώς μεγαλύτερη τιμή κομμιώδους από την αντίστοιχή του τυφλού δείγματος.

7.3.2.10 Μικροβιακό φορτίο γιαουρτιού

Διάγραμμα 7.50 α. Το μικροβιακό φορτίο των δειγμάτων της 3^{ης} σειράς και του τυφλού δείγματος

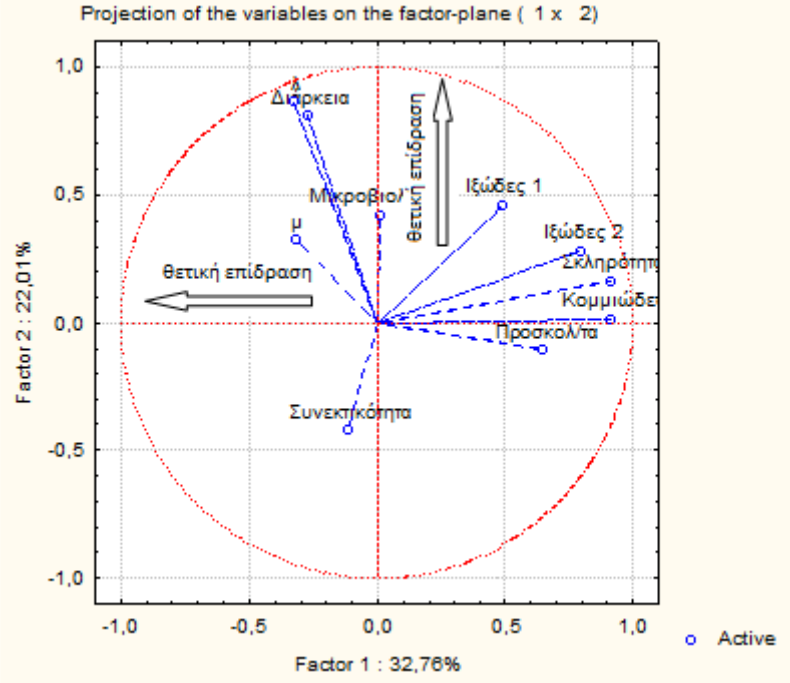
Από το ανωτέρω διάγραμμα, εκείνο που αξίζει να σημειωθεί είναι ότι από όλα τα δείγματα που μελετήθηκαν μόνο σε αυτό που είχε εμβολιαστεί με εγκλεισμένη καλλιέργεια με το 1^{0} εγκλειστικό μείγμα της μεθόδου εξώθησης, μετρήθηκαν μετά από μικροβιολογική ανάλυση, προβιοτικοί μικροοργανισμοί που ο αριθμός τους ξεπερνούσε το ελάχιστο συνιστώμενο όριο των 10^{7} cfu/g. Επίσης υψηλή τιμή είχε και το γιαούρτι που προέκυψε από ζύμωση με μείγμα εγκλεισμένης, με το 1° μείγμα και μη εγκλεισμένης καλλιέργειας, καθώς και αυτό που προέκυψε με ζύμωση το 2° μείγμα και μη εγκλεισμένης καλλιέργειας. Και τα δύο αυτά γιαούρτια είχαν αριθμό ζώντων προβιοτικών άνω του 10^{6} cfu/g, αριθμός ο οποίος είναι αποδεκτός για την περίπτωση των βακτηρίων του γένους *Bifidobacterium.* Για λόγους καλλίτερης ανάγνωσης του ανωτέρου διαγράμματος παρατίθεται το ακόλουθο διάγραμμα που περιέχει τα υπόλοιπα δείγματα, εκτός των ανωτέρω αναφερθέντων, που είχαν μικρότερο αριθμό ζώντων προβιοτικών.



Διάγραμμα 7.50 β. Το μικροβιακό φορτίο δειγμάτων της $3^{ης}$ σειράς και του τυφλού δείγματος

7.4 Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA)

Στο παρακάτω διάγραμμα φαίνεται η γραφική παράσταση των συντελεστών συσχέτισης των δύο πρώτων κύριων συνιστωσών με τις μεταβλητές. Οι δύο κύριες συνιστώσες εξηγούν το 54,78% της συνολικής διακύμανσης. Στην ανάλυση κύριων συνιστωσών συμπεριελήφθησαν τα δείγματα που είχαν εγκλειστεί εγκλεισμένη προβιοτική καλλιέργεια και τα εμβολιασμένα δείγματα με μείγμα εγκλεισμένης και μη εγκλεισμένης προβιοτική καλλιέργεια.

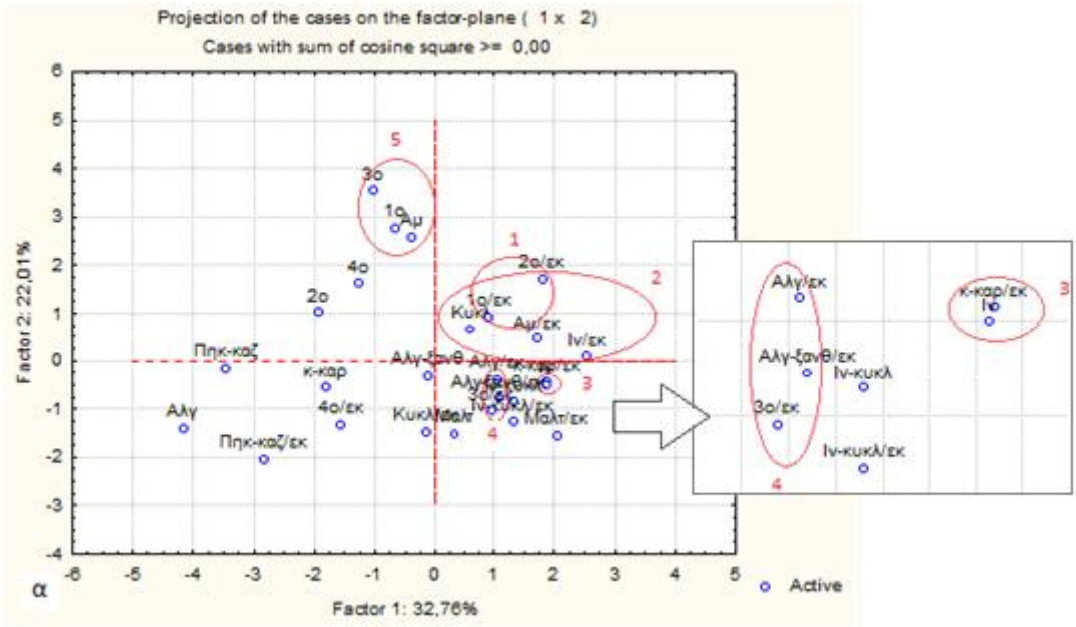


Διάγραμμα 7.51 Γραφική παράσταση συντελεστών συσχέτισης των δύο πρώτων κύριων συνιστωσών με τις μεταβλητές

Από το ανωτέρω διάγραμμα εξάγονται τα ακόλουθα συμπεράσματα:

- Η διάρκεια λανθάνουσας φάσης έχει θετική επίδραση στην πρώτη κύρια συνιστώσα. Ακόμη, σχετίζεται θετικά με την χρονική διάρκεια της ζύμωσης.
- Η χρονική διάρκεια της ζύμωσης έχει θετική επίδραση, επίσης, στην πρώτη κύρια συνιστώσα.
- Η σκληρότητα έχει αρνητική επίδραση στην δεύτερη κύρια συνιστώσα και σχετίζεται θετικά με το κομμιώδες.
- Το κομμιώδες έχει αρνητική επίδραση στην δεύτερη κύρια συνιστώσα.

Στο διάγραμμα 7.52 παρουσιάζονται οι δύο πρώτες κύριες συνιστώσες των δειγμάτων που μελετήθηκαν.



Διάγραμμα 7.52 Γραφική παράσταση των δύο πρώτων κύριων συνιστωσών για τα δείγματα που μελετήθηκαν

Από το παραπάνω διάγραμμα φαίνεται ότι σχηματίζονται 5 ομάδες δειγμάτων με κοινά χαρακτηριστικά.

Στην πρώτη ομάδα ανήκουν το δείγμα που έχει εμβολιαστεί με εγκλεισμένη καλλιέργεια με το 1^{ο} μείγμα της τεχνικής εξώθησης και με μη εγκλεισμένη καλλιέργεια καθώς και το δείγμα που έχει εμβολιαστεί με εγκλεισμένη με το 2^{ο} μείγμα της τεχνικής εξώθησης και με μη εγκλεισμένη προβιοτική καλλιέργεια εκκίνησης. Τα δείγματα γιαουρτιού αυτής της ομάδας παρουσιάζουν υψηλή τιμή σκληρότητας.

Την δεύτερη ομάδα αποτελούν το δείγμα που έχει εμβολιαστεί με εγκλεισμένη, με ινουλίνη και μη εγκλεισμένη καλλιέργεια εκκίνησης, το δείγμα που έχει εμβολιαστεί με εγκλεισμένη, με άμυλο και μη εγκλεισμένη καλλιέργεια, το δείγμα που έχει εμβολιαστεί με εγκλεισμένη, με κυκλοδεξτρίνη, προβιοτική καλλιέργεια, το δείγμα που έχει εμβολιαστεί με εγκλεισμένη καλλιέργεια με το 1^{ο} μείγμα της τεχνικής εξώθησης και με μη εγκλεισμένη καλλιέργεια καθώς και το δείγμα που έχει εμβολιαστεί με εγκλεισμένη με το 2^{ο} μείγμα της τεχνικής εξώθησης και με μη εγκλεισμένη προβιοτική καλλιέργεια εκκίνησης. Όλα τα δείγματα αυτής της ομάδας εμφανίζουν υψηλές τιμές κομμιώδους, ιξώδους μετά το πέρας της παραγωγής και ιξώδους μετά από μία ημέρα αποθήκευσης στους 4°C.

Τα δείγματα της τρίτης ομάδας, δηλαδή το δείγμα που έχει εμβολιαστεί με εγκλεισμένη, με κ-καραγενάνη και μη εγκλεισμένη καλλιέργεια καθώς και το δείγμα που έχει εμβολιαστεί με εγκλεισμένη, με ινουλίνη προβιοτική καλλιέργεια έχουν μεγάλο κομμιώδες.

Το δείγμα που έχει εμβολιαστεί με εγκλεισμένη, με αλγινικό νάτριο και με μη εγκλεισμένη καλλιέργεια, το δείγμα που έχει εμβολιαστεί με εγκλεισμένη, με το μείγμα αλγινικού νατρίου/ξανθάνης και με μη εγκλεισμένη καλλιέργεια, όπως και το εμβολιασμένο με εγκλεισμένη, με το 3^{ο} μείγμα της τεχνικής εξώθησης και με μη εγκλεισμένη καλλιέργεια

εκκίνησης, συναποτελούν την τέταρτη ομάδα. Χαρακτηριστικό της ομάδας αυτής είναι οι υψηλές τιμές προσκολλησιμότητας των δειγμάτων της.

Την πέμπτη και τελευταία ομάδα ανήκουν το δείγμα που έχει εμβολιαστεί με εγκλεισμένη, με άμυλο προβιοτική καλλιέργεια, το εμβολιασμένο δείγμα με εγκλεισμένη, με το 1° μείγμα της τεχνικής εξώθησης καλλιέργεια και το μείγμα που έχει εμβολιαστεί με εγκλεισμένη, με το 3° μείγμα της μεθόδου εξώθησης, προβιοτική καλλιέργεια εκκίνησης. Τα δείγματα αυτά παρουσιάζουν μεγάλη διάρκεια λανθάνουσας φάσης.

8. Συμπεράσματα και προτάσεις

8.1 Συμπεράσματα

Στην συγκεκριμένη διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκαν πειράματα με στόχο τον εγκλεισμό προβιοτικής καλλιέργειας εκκίνησης που περιείχε το στέλεχος *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis.* Ο εγκλεισμός επιχειρήθηκε με δύο μεθόδους, την τεχνική της ξήρανσης με κατάψυξη και την τεχνική της εξώθησης, και με την χρήση διαφόρων εγκλειστικών μέσων. Τα εγκλεισμένα βακτήρια, χρησιμοποιήθηκαν, μετέπειτα, για την ζύμωση γάλακτος με σκοπό την παραγωγή προβιοτικού γιαουρτιού. Επίσης, πέρα από τον εμβολιασμό γάλακτος με εγκλεισμένη καλλιέργεια, δείγματα εμβολιάστηκαν και με μείγμα εγκλεισμένης και μη εγκλεισμένης καλλιέργειας εκκίνησης και με μη εγκλεισμένη προβιοτική καλλιέργεια εκκίνησης και ισοδύναμη ποσότητα εγκλειστικού μέσου. Ακόμη, παρασκευάστηκε τυφλό δείγμα, το οποίο προερχόταν από ζύμωση γάλακτος με μη εγκλεισμένη προβιοτική καλλιέργεια εκκίνησης. Σκοπός όλων αυτών των πειραμάτων ήταν να μελετηθεί η επιτυχία του εγκλεισμού και η δραστικότητα των εγκλεισμένων προβιοτικών, εμμέσως μέσω της σύγκρισης των μετρήσεων που αφορούν στην ζύμωση (διάρκεια ζύμωσης, προσαρμογή στο μοντέλο μείωσης του pH, διάρκεια λανθάνουσας φάσης λ, μέγιστος ρυθμός μείωσης pH μ) του γάλακτος με τις ανωτέρω καλλιέργειες μεταξύ τους και με το τυφλό, αλλά και μέσω της σύγκρισης μεταξύ των χαρακτηριστικών των τελικών προϊόντων γιαουρτιού (ιξώδες, υφή, μικροβιακό φορτίο), καθώς αυτά που ενδιαφέρουν, από εμπορικής κυρίως άποψης.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των πειραματικών μετρήσεων, αρχικά βρέθηκε ότι η διάρκεια ζύμωσης των δειγμάτων που είχαν εμβολιαστεί με εγκλεισμένη καλλιέργεια αυξανόταν σε κάθε περίπτωση σε σύγκριση με το τυφλό.

Στα πειράματα κατά στα οποία η ζύμωση γινόταν με εγκλεισμένη καλλιέργεια, προερχόμενη από την διαδικασία ξήρανσης με κατάψυξη, ($2^η$ σειρά πειραμάτων) μεγαλύτερη διάρκεια παρουσιάζουν τα δείγματα που είχαν εμβολιαστεί με εγκλεισμένη, με άμυλο, καλλιέργεια και με εγκλεισμένη, με μείγμα αλγινικού νατρίου/ξανθάνης καλλιέργεια, με συνολική διάρκεια ζύμωσης 375 και 300min αντιστοίχως. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε όλες της περιπτώσεις (εκτός από την περίπτωση του δείγματος που είχε εμβολιαστεί με εγκλεισμένη, με κ-καραγενάνη και μη εγκλεισμένη καλλιέργεια) τα υπόλοιπα δείγματα παρουσίασαν μικρότερους χρόνους ζύμωσης, που ήταν σε πολλές περιπτώσεις παραπλήσιοι με αυτόν του τυφλού δείγματος. Για λόγους σύγκρισης σημειώνεται ότι η διάρκεια ζύμωσης του τυφλού δείγματος ήταν 130min. Το γεγονός αυτό μπορεί να οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι η καθυστέρηση δεν οφειλόταν στο εκάστοτε εγκλειστικό μείγμα, αλλά ενδεχομένως στην επιτυχία της διεργασίας εγκλεισμού των προβιοτικών βακτηρίων που είχε προηγηθεί.

Σε αυτά τα πειράματα, ακόμη, η προσαρμογή της καμπύλης μείωσης του pH συναρτήσει του χρόνου δεν ήταν ικανοποιητική, στις περισσότερες περιπτώσεις. Αξίζει να σημειωθεί ότι το ίδιο ίσχυε και για την περίπτωση του τυφλού δείγματος. Έτσι υπολογίστηκε η διάρκεια λανθάνουσας φάσης (λ) μόνο στις περιπτώσεις των ζυμώσεων γάλακτος με εγκλεισμένη καλλιέργεια με κ-καραγενάνη, με κυκλοδεξτρίνη, με αλγινικό νάτριο, με πηκτίνη/καζεΐνη και με άμυλο καθώς και με μείγματα εγκλεισμένης και μη εγκλεισμένης καλλιέργειας στην

περίπτωση που ως εγκλειστικά χρησιμοποιούνταν αλγινικό νάτριο ή αλγινικό νάτριο/ξανθάνη. Σε ότι αφορά στον μέγιστο ρυθμό μείωσης pH (μ) στις περιπτώσεις των δειγμάτων της 2^{ης} σειράς πειραμάτων, η τιμή του ήταν αρκετά μικρότερη από εκείνη του τυφλού εκτός από τις περιπτώσεις ζύμωσης γάλακτος με μη εγκλεισμένη καλλιέργεια και στα οποία είχε προστεθεί ποσότητα εγκλειστικού μέσου, όπου οι τιμές του μεγέθους ήταν συγκρίσιμες με αυτήν του τυφλού.

Ενδιαφέρον παρουσιάζουν και οι μετρήσεις που αφορούν στο ιξώδες των τελικών προϊόντων. Το ιξώδες που μετρήθηκε αμέσως μετά την λήξη της ζύμωσης ήταν μικρότερο στα περισσότερα δείγματα, από το αντίστοιχο του τυφλού, το οποίο έχει τιμή ίση με 4780cPs. Εξαίρεση αποτελούσαν το δείγμα που είχε εμβολιαστεί με εγκλεισμένη, με κυκλοδεξτρίνη, καλλιέργεια (τιμή ιξώδους 5800cPs), το δείγμα που είχε εμβολιαστεί με μη εγκλεισμένη καλλιέργεια και στο οποίο είχε προστεθεί ποσότητα αλγινικού νατρίου (τιμή ιξώδους 1086cPs) και το δείγμα που είχε εμβολιαστεί με μη εγκλεισμένη καλλιέργεια και στο οποίο είχε προστεθεί ποσότητα εγκλειστικού μείγματος πηκτίνης/ καζεΐνης (τιμή ιξώδους 6523cPs). Σχετικά με το ιξώδες που μετρήθηκε έπειτα από μία ημέρα αποθήκευσης του γιαουρτιού στους 4°C, βρέθηκε ότι ήταν μικρότερο από το αντίστοιχο του τυφλού, για όλα τα δείγματα της 2^{ης} σειράς πειραμάτων, εκτός από εκείνα που είχαν εμβολιαστεί με μη εγκλεισμένη καλλιέργεια και στα οποία είχε προστεθεί ποσότητα εγκλειστικού μέσου. Φαίνεται, επομένως, ότι το ιξώδες του γιαουρτιού μειώνεται, όταν χρησιμοποιείται εγκλεισμένη καλλιέργεια.

Αντίθετα με ότι συμβαίνει στο ιξώδες του γιαουρτιού, όπως προέκυψε από τα πειράματα, η συνεκτικότητά του αποτελεί μία μεταβλητή που αυξάνεται με την χρήση εγκλεισμένης καλλιέργειας, κάτι το οποίο αποτελεί θετικό στοιχείο καθώς η συνεκτικότητα είναι ένα χαρακτηριστικό με σημαντική εμπορική αξία για το γιαούρτι. Η στατιστική επεξεργασία έδειξε ότι το είδος του εμβολιασμού επηρεάζει σημαντικά την συνεκτικότητα. Μάλιστα η συνεκτικότητα ήταν πολύ μεγαλύτερη στην περίπτωση των δειγμάτων που είχαν εμβολιαστεί με μείγμα εγκλεισμένης και μη εγκλεισμένης προβιοτικής καλλιέργειας εκκίνησης.

Σε ότι αφορά στις μικροβιολογικές μετρήσεις, βρέθηκε ότι στην 2^{η} σειρά μετρήσεων τα περισσότερα δείγματα είχαν μικρότερο αριθμό προβιοτικών που είχαν επιβιώσει, σε σύγκριση με το τυφλό δείγμα που είχε 4,8 10^5cfu/g. Υπήρχαν και άλλα δείγματα γιαουρτιού, προερχόμενα από ζυμώσεις γάλακτος με μείγματα εγκλεισμένων και μη εγκλεισμένων καλλιεργειών με μεγαλύτερο αριθμό ζώντων προβιοτικών μικροοργανισμών που προσέγγιζαν την τάξη μεγέθους 10^6cfu/g (ανεκτό όριο για την περίπτωση των βακτηρίων του γένους *Bifidobacterium)*, όμως κανένα από αυτά δεν είχε μεγαλύτερο αριθμό προβιοτικών από τον ελάχιστο προτεινόμενο, που ανέρχεται σε 10^7cfu/g. Το γιαούρτι που προερχόταν από ζύμωση με εγκλεισμένη προβιοτική καλλιέργεια με κυκλοδεξτρίνη είχε 9 10^5cfu/g, τον υψηλότερο αριθμό από τα δείγματα που προέρχονταν από ζύμωση με εγκλεισμένη καλλιέργεια. Επιπροσθέτως, και το μείγμα εγκλεισμένης, με κυκλοδεξτρίνη και μη εγκλεισμένη καλλιέργειας έδωσε υψηλό αριθμό ζώντων προβιοτικών (6 10^5 cfu/g).

Τέλος, πρέπει να σημειωθεί ότι η χιτοζάνη είναι ένα μέσον εγκλεισμού το οποίο δεν μπορεί να οδηγήσει στην επίτευξη της ζύμωσης του γάλακτος και κατά συνέπεια, στην παρασκευή προβιοτικού γιαουρτιού, καθώς όπως έδειξαν τα πειράματα ήταν αδύνατο να συμβεί κάτι τέτοιο. Το γεγονός αυτό οφείλεται, κατά πάσα πιθανότητα, στην αντιμικροβιακή δράση της χιτοζάνης που αναφέρεται και βιβλιογραφικά. Για τον λόγο αυτό η χιτοζάνη, τα τελευταία χρόνια, δεν χρησιμοποιείται ως εγκλειστικό αυτό καθ' αυτό, αλλά είτε ως συστατικό μειγμάτων εγκλεισμού, είτε ως επικαλυπτικό των σφαιριδίων που εγκλείουν τους μικροοργανισμούς.

Στα πειράματα στα οποία η ζύμωση γινόταν με εγκλεισμένη καλλιέργεια προερχόμενη από την τεχνική της εξώθησης (3η σειρά πειραμάτων), παρατηρήθηκαν γενικά πιο μεγάλοι χρόνοι ζύμωσης, ενώ τον μεγαλύτερο χρόνο παρουσίασε το εμβολιασμένο με εγκλεισμένη, με το 3ο μείγμα της μεθόδου εξώθησης, προβιοτική καλλιέργεια, που ήταν 485min. Τα δείγματα της 3ης σειράς παρουσίασαν όλα μικρότερο ιξώδες από αυτό του τυφλού δείγματος.

Σε αυτά τα πειράματα η προσαρμογή των καμπυλών μείωσης του pH συναρτήσει του χρόνου ήταν καλή σε όλες τις περιπτώσεις ζυμώσεων με εγκλεισμένη καλλιέργεια. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται στην επιτυχία του εγκλεισμού, καθώς ο εγκλεισμός ενδεχομένως καθυστερεί την δράση των προβιοτικών. Έτσι, όπου υπήρχε καλή προσαρμογή, υπολογίστηκε η διάρκεια λανθάνουσας φάσης της ζύμωσης (λ). Επιπροσθέτως, σε όλα τα δείγματα, η απόλυτη τιμή του μέγιστου ρυθμού μείωσης pH (μ) ήταν πολύ μικρότερη από την αντίστοιχη του τυφλού διαλύματος. Συνεπώς, φαίνεται ότι το pH κατά την ζύμωση των δειγμάτων που εμβολιάζονται με εγκλεισμένη καλλιέργεια μειώνεται με πιο αργούς ρυθμούς, γεγονός που πιθανώς να υποδηλώνει και την επιτυχία του εγκλεισμού των προβιοτικών που είχε προηγηθεί.

Για την 3η σειρά, η στατιστική επεξεργασία έδειξε ότι κανένας παράγοντας δεν επηρεάζει την συνεκτικότητα των δειγμάτων, ωστόσο όμως, η τιμή της σε όλα τα δείγματα ήταν ελαφρώς μεγαλύτερη από την αντίστοιχη του τυφλού δείγματος, κάτι το οποίο έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς το συγκεκριμένο χαρακτηριστικό έχει μεγάλη εμπορική σημασία για το γιαούρτι.

Σε ότι αφορά στο μικροβιακό φορτίο, οι μετρήσεις σε αυτήν την σειρά δεν έδωσαν ικανοποιητικά αποτελέσματα καθώς στην πλειονότητα των περιπτώσεων το φορτίο ήταν μικρό, με εξαίρεση την περίπτωση του προϊόντος που είχε εμβολιαστεί με εγκλεισμένη, με το 1ο μείγμα εγκλεισμού, καλλιέργεια βρέθηκε να έχει 2 10^7cfu/g, δηλαδή μεγαλύτερο αριθμό ζώντων προβιοτικών μικροοργανισμών από τον ελάχιστο συνιστώμενο. Επίσης, στις περιπτώσεις του δείγματος που προερχόταν από ζύμωση εγκλεισμένης καλλιέργειας με μείγμα εγκλεισμένης, με το 1ο μείγμα εγκλεισμού, καλλιέργειας και μη εγκλεισμένης, όπως επίσης και αυτό που προερχόταν από ζύμωση με μείγμα εγκλεισμένης, με το 2ο μείγμα, καλλιέργειας και μη εγκλεισμένης, ο αριθμός των ζώντων προβιοτικών ήταν άνω του 10^6cfu/g, αριθμός αποδεκτός για την περίπτωση των βακτηρίων του γένους *Bifidobacterium.*

Εν κατακλείδι, φαίνεται πως η ζύμωση με εγκλεισμένη καλλιέργεια προερχόμενη από την τεχνική της ξήρανσης με κατάψυξη δίνει μικρότερους χρόνους ζύμωσης σε σχέση με την

ζύμωση με εγκλεισμένη καλλιέργεια που προέρχεται από την τεχνική της εξώθησης. Πολλά χαρακτηριστικά των προϊόντων είναι σε αρκετά πειράματα παραπλήσια με τα αντίστοιχα του προϊόντος που προέρχεται από ζύμωση με μη εγκλεισμένη καλλιέργεια. Λαμβάνοντας υπόψιν τα ανωτέρω, προκύπτει ότι για την πρώτη περίπτωση το προϊόν που προέρχεται από ζύμωση με εγκλεισμένη καλλιέργεια με την χρήση της κυκλοδεξτρίνης, ως μέσον εγκλεισμού, δίνει μικρό, σε σύγκριση με τα υπόλοιπα ελεγχθέντα μέσα, χρόνο ζύμωσης, τιμές ιξώδους μετά από 24h αποθήκευσης στους 4^0C, σκληρότητας και κομμιώδους παραπλήσιες με αυτές του δείγματος που προέρχεται από ζύμωση με μη εγκλεισμένη καλλιέργεια και επιπλέον υψηλή βιωσιμότητα των προβιοτικών στο τελικό προϊόν. Από την άλλη, για την δεύτερη περίπτωση εγκλεισμού προκύπτει ότι το γιαούρτι που προέρχεται από εγκλεισμένη καλλιέργεια με την χρήση του εγκλειστικού μείγματος αλγινικού νατρίου/ξανθάνης/μαλτοδεξτρίνης/φρουκτόζης/MRS broth/γλυκερόλη δίνει τον μικρότερο χρόνο ζύμωσης, εν συγκρίσει με τα υπόλοιπα μέσα της μεθόδου εξώθησης και ικανοποιητικές τιμές ιξώδους αποθήκευσης μετά από 24h αποθήκευσης στους 4^oC, συνεκτικότητας και κομμιώδους, ενώ παρέχει και την υψηλότερη βιωσιμότητα προβιοτικών βακτηρίων στο τελικό γιαούρτι, άνω του κατώτερου συνιστώμενου ορίου (10^7cfu/). Συμπερασματικά λοιπόν, η τεχνική της ξήρανσης με κατάψυξη μπορεί να θεωρηθεί μία αρκετά καλή μέθοδος εγκλεισμού καθώς δίνει γενικά μικρούς χρόνους ζύμωσης, κάτι το οποίο έχει μεγάλο ενδιαφέρον σε βιομηχανική κλίμακα. Επίσης, με την χρήση κατάλληλων μέσων εγκλεισμού και η κυκλοδεξτρίνη φαίνεται από την παρούσα μελέτη ότι μπορεί να αποτελέσει τέτοιο, μπορεί οι εγκλεισμένες, καλλιέργειες να προσδώσουν στο γιαούρτι τα επιθυμητά χαρακτηριστικά και επιπροσθέτως υψηλό αριθμό ζώντων προβιοτικών στο τελικό προϊόν. Η τεχνική της εξώθησης μπορεί επίσης να δώσει τα επιθυμητά χαρακτηριστικά στο προϊόν και να εξασφαλίσει την υψηλή επιβίωση των προβιοτικών στο γιαούρτι, με την χρήση πάντα κατάλληλων μέσω εγκλεισμού, πλην όμως για την εφαρμογή της σε βιομηχανικό επίπεδο χρειάζεται να πραγματοποιηθεί άρση του εμποδίου των υψηλών χρόνων ζύμωσης.

8.2 Προτάσεις

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, η επιτυχία του εγκλεισμού ελέγχθηκε εμμέσως, μέσω των μετρήσεων που πραγματοποιήθηκαν στο γιαούρτι, από τις διαφορές μεταξύ των δειγμάτων που είχαν εμβολιαστεί με εγκλεισμένη καλλιέργεια με διάφορα μέσα και τεχνικές εγκλεισμού, με μείγμα εγκλεισμένης και μη εγκλεισμένης καλλιέργειας και με μη εγκλεισμένη καλλιέργεια και ποσότητα εγκλειστικού μείγματος (μόνο για την 2^{η} σειρά πειραμάτων). Επιπροσθέτως, σύγκριση έγινε μεταξύ των προαναφερθέντων δειγμάτων και του τυφλού δείγματος, το οποίο ήταν γιαούρτι προερχόμενο από ζύμωση γάλακτος με μη εγκλεισμένη προβιοτική καλλιέργεια εκκίνησης. Ένας άλλος τρόπος ελέγχου της επίτευξης ή μη του εγκλεισμού, για κάθε μέσον και μέθοδο, θα μπορούσε να είναι ο μικροβιολογικός έλεγχος των εγκλεισμένων καλλιεργειών. Ακόμη, η σάρωση με το ηλεκτρικό μικροσκόπιο, θα μπορούσε ν' αποτελέσει μία ακόμη μέθοδο ελέγχου της επίτευξης και της αποτελεσματικότητας του εγκλεισμού. Επιπλέον, χρήσιμες πληροφορίες για την αποτελεσματικότητα του εγκλεισμού θα έδινε η μελέτη της επιβίωσης των εγκλεισμένων προβιοτικών βακτηρίων σε συνθήκες προσομοίωσης του ανθρώπινου γαστρεντερικού συστήματος.

Επίσης, όπως έχει αναφερθεί και στην παραπάνω παράγραφο, πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός δειγμάτων με μείγμα εγκλεισμένης και μη εγκλεισμένης προβιοτικής καλλιέργειας εκκίνησης. Σκοπός ήταν με αυτόν τον τρόπο να ελεγχθεί το κατά πόσο ένα γιαούρτι που προέρχεται από ζύμωση γάλακτος με ένα ποσοστό εγκλεισμένης και ένα ποσοστό μη εγκλεισμένης καλλιέργειας, μπορεί να έχει χαρακτηριστικά που να είναι πιο κοντά στο τυφλό δείγμα, τα οποία αποτελούν και τα αποδεκτά χαρακτηριστικά για ένα γιαούρτι. Η συγκεκριμένη αναλογία εμβολιασμού προέκυψε ύστερα από βιβλιογραφική έρευνα. Αντικείμενο, όμως, μελέτης θα μπορούσε ν' αποτελέσει η εύρεση, εκείνης της αναλογίας εμβολιασμού εγκλεισμένης/ μη εγκλεισμένης προβιοτικής καλλιέργειας εκκίνησης που δύναται να επιφέρει χαρακτηριστικά στο γιαούρτι, που είναι πιο κοντά σε αυτά του τυφλού δείγματος.

Τέλος, όπως διαπιστώθηκε από την επεξεργασία των μετρήσεων, η προσαρμογή των καμπυλών μείωσης του pH συναρτήσει του χρόνου στο υπάρχον μαθηματικό μοντέλο ήταν αδύνατη. Αυτό συνέβαινε διότι, οι καμπύλες μείωσης του pH συναρτήσει του χρόνου ζύμωσης, δεν είχαν πάντοτε σιγμοειδή μορφή και στην πραγματικότητα δεν παρουσίαζαν λανθάνουσα φάση. Έτσι, θα μπορούσε να διερευνηθεί η δυνατότητα, είτε εύρεσης από βιβλιογραφικές πηγές, είτε κατασκευής ενός άλλου μοντέλου που να προσαρμόζεται καλλίτερα στις συγκεκριμένες καμπύλες.

Βιβλιογραφία

Βογδάνη, Κ. (2015). Προβιοτικό και Συμβατικό Γιαούρτι Παγωτό με Γλυκαντικό με Βάση την Στέβια, Επίδραση της Στέβιας στις Ιδιότητες του Προϊόντος, Διπλωματική εργασία

Κώδικας Τροφίμων, Ποτών και Αντικειμένων Κοινής Χρήσης. (2009). Μέρος Α, Άρθρο 80, Έκδοση 4.

Μάντης, Α.Ι.(2000). Υγιεινή και τεχνολογία του γάλακτος και των προϊόντων του. Κυριακίδης.

Akın, M. B., Akın, M. S., & Kırmacı, Z. (2007). Effects of inulin and sugar levels on the viability of yogurt and probiotic bacteria and the physical and sensory characteristics in probiotic ice-cream. *Food chemistry*, *104*(1), 93-99.

Alp, G., & Aslim, B. (2010). Relationship between the resistance to bile salts and low pH with exopolysaccharide (EPS) production of Bifidobacterium spp. isolated from infants feces and breast milk. *Anaerobe*, *16*(2), 101-105.

Anal, A. K., & Singh, H. (2007). Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science & Technology*, *18*(5), 240-251.

Arunachalam, K. D. (1999). Role of bifidobacteria in nutrition, medicine and technology. *Nutrition research*, *19*(10), 1559-1597.

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.

Axelsson, L. (2004). Lactic acid bacteria: classification and physiology. *FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY-NEW YORK-MARCEL DEKKER-*, *139*, 1-66.

Ballongue, J. E. A. N. (2004). Bifidobacteria and probiotic action. *FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY-NEW YORK-MARCEL DEKKER-*, *139*, 67-124.

Biavati, B., Vescovo, M., Torriani, S., & Bottazzi, V. (2000). Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications. *Annals of microbiology*, *50*(2), 117-132.

Boylston, T. D., Vinderola, C. G., Ghoddusi, H. B., & Reinheimer, J. A. (2004). Incorporation of bifidobacteria into cheeses: challenges and rewards.*International Dairy Journal*, *14*(5), 375-387.

Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M., & Scher, J. (2011). Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering*, *104*(4), 467-483.

Bylund, G. (2003). *Dairy processing handbook*. Tetra Pak Processing Systems AB.

Caramia, G., & Silvi, S. (2011). Probiotics: from the ancient wisdom to the actual therapeutical and nutraceutical perspective. In *Probiotic bacteria and enteric infections* (pp. 3-37). Springer Netherlands.

Chandan, R. C. (2006). Milk composition, physical and processing characteristics. *Manufacturing yogurt and fermented milks*, 17-40.

Chávarri, M., Marañón, I., Ares, R., Ibáñez, F. C., Marzo, F., & del Carmen Villarán, M. (2010). Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions.*International journal of food microbiology*, *142*(1), 185-189.

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.

Dalgleish, D. G. (2006). Food emulsions—their structures and structure-forming properties. *Food hydrocolloids*, *20*(4), 415-422.

De Prisco, A., & Mauriello, G. (2016). Probiotication of foods: A focus on microencapsulation tool. *Trends in Food Science & Technology*, *48*, 27-39.

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

Dong, X., Xin, Y., Jian, W., Liu, X., & Ling, D. (2000). Bifidobacterium thermacidophilum sp. nov., isolated from an anaerobic digester. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *50*(1), 119-125.

Drusch, S., Serfert, Y., Van Den Heuvel, A., & Schwarz, K. (2006). Physicochemical characterization and oxidative stability of fish oil encapsulated in an amorphous matrix containing trehalose. *Food Research International*,*39*(7), 807-815.

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

FAO (2013). Milk and Dairy Products in Human Nutrition.

Fonden, R., Saarela, M., Mättö, J., & Mattila-Sandholm, T. (2003). Lactic acid bacteria (LAB) in functional dairy products. *Functional dairy products*, 244-262.

Fox, P. F. (2003). *The major constituents of milk* (pp. 5-41). Woodhead Publishing Limited, Cambridge.

Fung, W. Y., Lye, H. S., Lim, T. J., Kuan, C. Y., & Liong, M. T. (2011). Roles of Probiotic on Gut Health. In *Probiotics* (pp. 139-165). Springer Berlin Heidelberg.

Gagnon, M., Zihler, A., Chassard, C., & Lacroix, C. (2011). Ecology of probiotics and enteric protection. In *Probiotic Bacteria and Enteric Infections*(pp. 65-85). Springer Netherlands.

Gaonkar, A. G., Vasisht, N., Khare, A. R., & Sobel, R. (Eds.). (2014).*Microencapsulation in the food industry: a practical implementation guide*. Elsevier.

Giraffa, G., Chanishvili, N., & Widyastuti, Y. (2010). Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology. *Research in Microbiology*, *161*(6), 480-487.

Gobbetti, M., Corsetti, A. (1999). STREPTOCOCCUS. *Encyclopedia of Food Microbiology,* 2117-2127.

Goktepe, I., Juneja, V. K., & Ahmedna, M. (Eds.). (2005). *Probiotics in food safety and human health*. CRC Press.

Gomes, A. M., & Malcata, F. X. (1999). Bifidobacterium spp. and Lactobacillus acidophilus: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in Food Science & Technology*, *10*(4), 139-157.

Gouin, S. (2004). Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in food science & technology*, *15*(7), 330-347.

Groboillot, A. F., Champagne, C. P., Darling, G. D., Poncelet, D., & Neufeld, R. J. (1993). Membrane formation by interfacial cross-linking of chitosan for microencapsulation of Lactococcus lactis. *Biotechnology and bioengineering*,*42*(10), 1157-1163.

Gürakan, G. C., & Altay, N. (2010). Yogurt microbiology and biochemistry.*Development and Manufacture of Yogurt and Other Functional Dairy Products". F. Yildiz (Ed.)*, 97-121.

Heller, K. J. (2001). Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *73*(2), 374s-379s.

Hemme, D., & Foucaud-Scheunemann, C. (2004). Leuconostoc, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods.*International Dairy Journal*, *14*(6), 467-494.

Hou, J. W., Yu, R. C., & Chou, C. C. (2000). Changes in some components of soymilk during fermentation with bifidobacteria. *Food Research International*,*33*(5), 393-397.

Hui, Y. H. (1993). Dairy science and technology handbook. 2: Product manufacturing.

Jensen, R. G., & Kroger, M. (2000). The importance of milk and milk products in the diet. *Handbook of dairy foods and nutrition*, 1-64.

Ishizuka, A., Tomizuka, K., Aoki, R., Nishijima, T., Saito, Y., Inoue, R., ... & Ikeda, T. (2012). Effects of administration of Bifidobacterium animalis subsp. lactis GCL2505 on defecation frequency and bifidobacterial microbiota composition in humans. *Journal of bioscience and bioengineering*, *113*(5), 587-591.

Kailasapathy, K. Chemical Composition, Physical and Functional Properties of Milk and Milk Ingredients. *Dairy Processing & Quality Assurance*, 75-103.

Kawasaki, S., Mimura, T., Satoh, T., Takeda, K., & Niimura, Y. (2006). Response of the microaerophilic Bifidobacterium species, B. boum and B. thermophilum, to oxygen. *Applied and environmental microbiology*, *72*(10), 6854-6858.

Khalid, K. (2011). An overview of lactic acid bacteria. *International Journal of Biosciences*, *1*(3), 1-13.

Kim, S. J., Cho, S. Y., Kim, S. H., Song, O. J., Shin, I. S., Cha, D. S., & Park, H. J. (2008). Effect of microencapsulation on viability and other characteristics in Lactobacillus acidophilus ATCC 43121. *LWT-Food Science and Technology*,*41*(3), 493-500.

Krasaekoopt, W., Bhandari, B., & Deeth, H. (2003). Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal*, *13*(1), 3-13.

Krasaekoopt, W., Bhandari, B., & Deeth, H. C. (2006). Survival of probiotics encapsulated in chitosan-coated alginate beads in yoghurt from UHT-and conventionally treated milk during storage. *LWT-Food Science and Technology*,*39*(2), 177-183.

Kusaka, Y., Kondou, H., & Morimoto, K. (1992). Healthy lifestyles are associated with higher natural killer cell activity. *Preventive Medicine*, *21*(5), 602-615.

Leroux, J., Langendorff, V., Schick, G., Vaishnav, V., & Mazoyer, J. (2003). Emulsion stabilizing properties of pectin. *Food Hydrocolloids*, *17*(4), 455-462.

Lesmes, U., & McClements, D. J. (2009). Structure–function relationships to guide rational design and fabrication of particulate food delivery systems.*Trends in Food Science & Technology*, *20*(10), 448-457.

Li, Q., Chen, Q., Ruan, H., Zhu, D., & He, G. (2010). Isolation and characterisation of an oxygen, acid and bile resistant Bifidobacterium animalis subsp. lactis Qq08. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *90*(8), 1340-1346.

Lourens-Hattingh, A., & Viljoen, B. C. (2001). Yogurt as probiotic carrier food.*International dairy journal*, *11*(1), 1-17.

Lourens-Hattingh, A., & Viljoen, B. C. (2001). Yogurt as probiotic carrier food.*International dairy journal*, *11*(1), 1-17.

Mandal, V., & Mandal, N. C. (2011). New health potentials of orally consumed probiotic microorganisms. In *Probiotics* (pp. 167-189). Springer Berlin Heidelberg.

Martín, M. J., Lara-Villoslada, F., Ruiz, M. A., & Morales, M. E. (2015). Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic eff Oliveira, A. C., Moretti, T. S., Boschini, C., Baliero, J. C. C., Freitas, L. A. P., Freitas, O., & Favaro-Trindade, C. S. (2007). Microencapsulation of B. lactis (BI 01) and L. acidophilus (LAC 4) by complex coacervation followed by spouted-bed drying. *Drying Technology*, *25*(10), 1687-1693.ects. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *27*, 15-25.

Matsumoto, M., Ohishi, H., & Benno, Y. (2004). H+-ATPase activity in Bifidobacterium with special reference to acid tolerance. *International journal of food microbiology*, *93*(1), 109-113.

Milanovic, J., Manojlovic, V., Levic, S., Rajic, N., Nedovic, V., & Bugarski, B. (2010). Microencapsulation of flavors in carnauba wax. *Sensors*, *10*(1), 901-912.

Morimoto, K., Takeshita, T., Nanno, M., Tokudome, S., & Nakayama, K. (2005). Modulation of natural killer cell activity by supplementation of fermented milk containing Lactobacillus casei in habitual smokers. *Preventive medicine*, *40*(5), 589-594.

Mortazavian, A. M., Azizi, A., Ehsani, M. R., Razavi, S. H., Mousavi, S. M., Sohrabvandi, S., & Reinheimer, J. A. (2008). Survival of encapsulated probiotic bacteria in Iranian yogurt drink (Doogh) after the product exposure to simulated gastrointestinal conditions. *Milchwissenschaft*, *63*(4), 427.

Reid, G. (2016). Probiotics: definition, scope and mechanisms of action. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, *30*(1), 17-25.

Rowley, J. A., Madlambayan, G., & Mooney, D. J. (1999). Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials. *Biomaterials*, *20*(1), 45-53.

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.

Sandoval-Castilla, O., Lobato-Calleros, C., García-Galindo, H. S., Alvarez-Ramírez, J., & Vernon-Carter, E. J. (2010). Textural properties of alginate–pectin beads and survivability of entrapped Lb. casei in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *Food Research International*, *43*(1), 111-117.

Sathyabama, S., & Vijayabharathi, R. (2014). Co-encapsulation of probiotics with prebiotics on alginate matrix and its effect on viability in simulated gastric environment. *LWT-Food Science and Technology*, *57*(1), 419-425.

Saxelin, M., Korpela, R., Mäyrä-Mäkinen, A., Mattila-Sandholm, T., & Saarela, M. (2003). Introduction: classifying functional dairy products. *Functional dairy products*, 1-16.

Schmid, K., Schlothauer, R. C., Friedrich, U., Staudt, C., Apajalahti, J., & Hansen, E. B. (2006). Development of probiotic food ingredients. *Probiotics in food safety and human health*, 35e66.

Shah, N. P. (2000). Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. *Journal of dairy science*, *83*(4), 894-907.

Shah, N. P. (2006). Health benefits of yogurt and fermented milks.*Manufacturing yogurt and fermented milks*, 327-254.

Shah, N. P. (2007). Functional cultures and health benefits. *International Dairy Journal*, *17*(11), 1262-1277.

Shoji, A. S., Oliveira, A. C., Balieiro, J. C. C., Freitas, O., Thomazini, M., Heinemann, R. J. B., ... & Favaro-Trindade, C. S. (2013). Viability of L. acidophilus microcapsules and their application to buffalo milk yoghurt. *Food and bioproducts processing*, *91*(2), 83-88.

Singh, M., & O'Hagan, D. (1998). The preparation and characterization of polymeric antigen delivery systems for oral administration. *Advanced drug delivery reviews*, *34*(2), 285-304.

Soccol, C. R., Vandenberghe, L. P. D. S., Spier, M. R., Medeiros, A. B. P., Yamaguishi, C. T., Lindner, J. D. D., Pandey, A. & Thomaz-Soccol, V. (2010). The potential of probiotics: a review. *Food Technology and Biotechnology*, *48*(4), 413-434.

Stanton, C., Desmond, C., Coakley, M., Collins, J. K., Fitzgerald, G., & Ross, R. P. (2003). Challenges facing development of probiotic-containing functional foods. *Handbook of fermented functional foods*, *27*.

Sun, W., & Griffiths, M. W. (2000). Survival of bifidobacteria in yogurt and simulated gastric juice following immobilization in gellan–xanthan beads.*International Journal of Food Microbiology*, *61*(1), 17-25.

Takeda, K., & Okumura, K. (2007). Effects of a fermented milk drink containing Lactobacillus casei strain Shirota on the human NK-cell activity. *The Journal of nutrition*, *137*(3), 791S-793S.

Talwalkar, A., & Kailasapathy, K. (2004). A review of oxygen toxicity in probiotic yogurts: influence on the survival of probiotic bacteria and protective techniques.*Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *3*(3), 117-124.

Tamime, A. Y., & Robinson, R. K. (1999). *Yoghurt: science and technology*. Woodhead Publishing.

Tamime, A. Y., & Robinson, R. K. (2007). Background to manufacturing practice. *Tamime and Robinson's yoghurt: science and technology*, (Ed. 3), 13-161.

Tamime, A. Y., Saarela, M. A. K. S., Sondergaard, A. K., Mistry, V. V., & Shah, N. P. (2005). Production and maintenance of viability of probiotic micro-organisms in dairy products. *Probiotic dairy products*, 39-72.

Walstra, P., Walstra, P., Wouters, J. T., & Geurts, T. J. (2006). *Dairy science and technology*. CRC press.

Wandrey, C., Bartkowiak, A., & Harding, S. E. (2010). Materials for encapsulation. In *Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing* (pp. 31-100). Springer New York.

Wei, M. Q., Mengesha, A., Good, D., & Anné, J. (2008). Bacterial targeted tumour therapy-dawn of a new era. *Cancer letters*, *259*(1), 16-27.

Xu, R., Shang, N., & Li, P. (2011). In vitro and in vivo antioxidant activity of exopolysaccharide fractions from Bifidobacterium animalis RH. *Anaerobe*,*17*(5), 226-231.

Yamaguishi, C. T., Spier, M. R., Lindner, J. D. D., Soccol, V. T., & Soccol, C. R. (2011). Current market trends and future directions. In *Probiotics* (pp. 299-319). Springer Berlin Heidelberg.

Yeo, S. K., Ewe, J. A., Tham, C. S. C., & Liong, M. T. (2011). Carriers of probiotic microorganisms. In *Probiotics* (pp. 191-220). Springer Berlin Heidelberg.

Yıldız, F. (2010). Overview of yogurt and other fermented dairy products.*Development and Manufacture of Yogurt and Other Functional Dairy Products*, 1-46.

Yoshii, H., Soottitantawat, A., Liu, X. D., Atarashi, T., Furuta, T., Aishima, S., ... & Linko, P. (2001). Flavor release from spray-dried maltodextrin/gum arabic or soy matrices as a function of storage relative humidity. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *2*(1), 55-61.

Zuidam, N. J., & Shimoni, E. (2010). Overview of microencapsulates for use in food products or processes and methods to make them. In *Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing* (pp. 3-29). Springer New York.

Παράρτημα Ι. Πίνακες μεταβολής του pH συναρτήσει του χρόνου ζύμωσης των γιαουρτιών

Ι.1 Πίνακες 1ης σειράς πειραμάτων

Ι.1.1 Ζύμωση με μη εγκλεισμένη καλλιέργεια

Πίνακας Ι.1 pH ζύμωσης

t(min)	pH	t(min)	pH
5	5,771	80	4,909
10	5,684	85	4,867
15	5,6	90	4,825
20	5,527	95	4,795
25	5,461	100	4,77
30	5,406	105	4,738
35	5,354	110	4,703
40	5,307	115	4,669
45	5,259	120	4,637
50	5,208	125	4,606
55	5,156	130	4,578
60	5,106	135	4,552
65	5,054	140	4,527
70	5,003	145	4,505
75	4,955		

I.1.2 Μαλτοδεξτρίνη

Πίνακας I.2 pH ζύμωσης με εγκλεισμένη καλλιέργεια με μαλτοδεξτρίνη

t(min)	pH	t(min)	pH	t(min)	pH
5	6,215	90	5,573	175	5,048
10	6,016	95	5,546	180	5,01
15	5,985	100	5,515	185	4,971
20	5,971	105	5,486	190	4,933
25	5,951	110	5,457	195	4,895
30	5,925	115	5,429	200	4,856
35	5,898	120	5,401	205	4,818
40	5,87	125	5,374	210	4,781
45	5,841	130	5,344	215	4,745
50	5,812	135	5,316	220	4,712
55	5,781	140	5,286	225	4,678
60	5,749	145	5,255	230	4,646
65	5,719	150	5,225	235	4,616
70	5,704	155	5,192	240	4,588
75	5,664	160	5,159	245	4,561
80	5,633	165	5,123	250	4,537
85	5,602	170	5,084	255	4,511

I.1.3 κ-καραγενάνη

Πίνακας I.3 pH ζύμωσης με εγκλεισμένη καλλιέργεια με κ-καραγενάνη

t (min)	pH	t (min)	pH	t (min)	pH
5	6,238	125	5,638	245	4,727
10	6,205	130	5,593	250	4,709
15	6,187	135	5,544	255	4,697
20	6,173	140	5,493	260	4,685
25	6,163	145	5,439	265	4,674
30	6,151	150	5,388	270	4,663
35	6,141	155	5,331	275	4,652
40	6,13	160	5,277	280	4,641
45	6,118	165	5,227	285	4,632
50	6,106	170	5,179	290	4,622
55	6,091	175	5,13	295	4,611
60	6,076	180	5,085	300	4,6
65	6,058	185	5,042	305	4,592
70	6,038	190	5,005	310	4,582
75	60,15	195	4,969	315	4,573
80	5,989	200	4,935	320	4,563
85	5,96	205	4,902	325	4,554
90	5,929	210	4,874	330	4,546
95	5,893	215	4,847	335	4,537
100	5,856	220	4,822	340	4,528
105	5,815	225	4,798	345	4,519
110	5,773	230	4,777	350	4,512
115	5,728	235	4,758	355	4,504
120	5,683	240	4,742	360	4,497

I.1.4 Ινουλίνη

Πίνακας I.4 pH ζύμωσης με εγκλεισμένη καλλιέργεια με ινουλίνη

t(min)	pH	t(min)	pH	t(min)	pH	t(min)	pH
5	6,249	110	6,18	215	5,427	320	4,786
10	6,223	115	6,172	220	5,385	325	4,768
15	6,225	120	6,139	225	5,346	330	4,749
20	6,222	125	6,104	230	5,305	335	4,732
25	6,211	130	6,074	235	5,264	340	4,706
30	6,218	135	6,04	240	5,229	345	4,689
35	6,205	140	6,009	245	5,186	350	4,674
40	6,213	145	5,97	250	5,149	355	4,658
45	6,215	150	5,928	255	5,114	360	4,644
50	6,207	155	5,889	260	5,081	365	4,629
55	6,193	160	5,847	265	5,05	370	4,615
60	6,215	165	5,807	270	5,019	375	4,601
65	6,201	170	5,76	275	4,992	380	4,589
70	6,2	175	5,743	280	4,964	385	4,575
75	6,201	180	5,711	285	4,938	390	4,565
80	6,184	185	5,673	290	4,914	395	4,553
85	6,201	190	5,632	295	4,892	400	4,543
90	6,196	195	5,59	300	4,869	405	4,531
95	6,188	200	5,55	305	4,846	410	4,521
100	6,188	205	5,51	310	4,826	415	4,509
105	6,187	210	5,468	315	4,805	420	4,499

I.1.5 Κυκλοδεξτρίνη

Πίνακας I.5 pH ζύμωσης με εγκλεισμένη καλλιέργεια με κυκλοδεξτρίνη

t(min)	pH	t(min)	pH	t(min)	pH	t(min)	pH
5	6,252	85	6,006	165	5,47	245	4,81
10	6,219	90	5,978	170	5,418	250	4,782
15	6,202	95	5,958	175	5,373	255	4,757
20	6,19	100	5,932	180	5,325	260	4,731
25	6,179	105	5,901	185	5,275	265	4,708
30	6,17	110	5,878	190	5,226	270	4,684
35	6,157	115	5,836	195	5,183	275	4,663
40	6,14	120	5,803	200	5,139	280	4,642
45	6,128	125	5,767	205	5,097	285	4,621
50	6,115	130	5,727	210	5,054	290	4,601
55	6,102	135	5,693	215	5,013	295	4,583
60	6,09	140	5,652	220	4,974	300	4,564
65	6,075	145	5,611	225	4,937	305	4,547
70	6,06	150	5,575	230	4,902	310	4,529
75	6,044	155	5,54	235	4,87	315	4,513
80	6,023	160	5,505	240	4,839	320	4,497

I.2 Πίνακες 2ης σειράς πειραμάτων

I.2.1 Ζύμωση με μη εγκλεισμένη καλλιέργεια

Πίνακας I.6 pH ζύμωσης

t(min)	pH
5	6,144
10	6,022
15	5,861
20	5,702
25	5,555
30	5,444
35	5,357
40	5,283
45	5,217
50	5,156
55	5,094
60	5,032
65	4,971
70	4,915
75	4,864
80	4,82
85	4,776
90	4,738
95	4,703
100	4,667
105	4,637
110	4,607
115	4,579
120	4,553
125	4,528
130	4,5

I.2.2 Χιτοζάνη

Πίνακας I.7 pH ζύμωσης με μείγμα εγκλεισμένης καλλιέργειας με χιτοζάνη και μη εγκλεισμένης καλλιέργειας

t(min)	pH	t(min)	pH
5	6,016	150	4,807
10	5,986	155	4,789
15	5,964	160	4,772
20	5,937	165	4,758
25	5,903	170	4,743
30	5,865	175	4,73
35	5,824	180	4,716
40	5,775	185	4,704
45	5,721	190	4,621
50	5,664	195	4,681
55	5,604	200	4,67
60	5,543	205	4,66
65	5,476	210	4,651
70	5,41	215	4,641
75	5,34	220	4,633
80	5,271	225	4,624
85	5,209	230	4,616
90	5,153	235	4,607
95	5,105	240	4,6
100	5,061	245	4,59
105	5,02	250	4,581
110	4,984	255	4,573
115	4,987	260	4,561
120	4,956	265	4,556
125	4,925	270	4,544
130	4,896	275	4,533
135	4,87	280	4,522
140	4,848	285	4,514
145	4,827	290	4,5

Πίνακας Ι.8 pH ζύμωσης με μη εγκλεισμένη καλλιέργεια και ποσότητα χιτοζάνης

t(min)	pH
5	6,274
10	6,035
15	5,851
20	5,693
25	5,558
30	5,445
35	5,356
40	5,286
45	5,222
50	5,159
55	5,097
60	5,037
65	4,979
70	4,925
75	4,874
80	4,826
85	4,783
90	4,743
95	4,703
100	4,669
105	4,635
110	4,604
115	4,574
120	4,545
125	4,519
130	4,5

I.2.3 Μαλτοδεξτρίνη

Πίνακας I.9 pH ζύμωσης με εγκλεισμένη καλλιέργεια με μαλτοδεξτρίνη

t(min)	pH	t(min)	pH
5	6,303	105	5,539
10	6,267	110	5,495
15	6,153	115	5,453
20	6,115	120	5,405
25	6,059	125	5,357
30	6,037	130	5,307
35	6,015	135	5,255
40	5,989	140	5,202
45	5,96	145	5,143
50	5,929	150	5,082
55	5,898	155	5,015
60	5,865	160	4,952
65	5,831	165	4,881
70	5,797	170	4,81
75	5,765	175	4,744
80	5,73	180	4,683
85	5,694	185	4,624
90	5,655	190	4,568
95	5,618	195	4,516
100	5,578	200	4,5

Πίνακας Ι.10 pH ζύμωσης με μείγμα εγκλεισμένης καλλιέργειας με χιτοζάνη και μη εγκλεισμένης καλλιέργειας

t(min)	**pH**
5	6,334
10	6,159
15	6,061
20	5,981
25	5,891
30	5,795
35	5,703
40	5,608
45	5,518
50	5,432
55	5,349
60	5,274
65	5,205
70	5,139
75	5,071
80	4,994
85	4,911
90	4,83
95	4,755
100	4,687
105	4,623
110	4,563
115	4,5

Πίνακας Ι.11 pH ζύμωσης με μη εγκλεισμένη καλλιέργεια και ποσότητα μαλτοδεξτρίνης

t(min)	pH
5	5,972
10	5,864
15	5,724
20	5,597
25	5,474
30	5,384
35	5,302
40	5,236
45	5,177
50	5,121
55	5,066
60	5,011
65	4,959
70	4,906
75	4,866
80	4,825
85	4,788
90	4,753
95	4,718
100	4,685
105	4,654
110	4,626
115	4,528
120	4,572
125	4,549
130	4,526

I.2.4 κ-καραγενάνη

Πίνακας I.12 pH ζύμωσης με εγκλεισμένη καλλιέργεια κ-καραγενάνη

t(min)	**pH**	**t(min)**	**pH**
5	6,245	80	5,45
10	6,112	85	5,382
15	6,064	90	5,311
20	6,029	95	5,239
25	5,997	100	5,164
30	5,963	105	5,084
35	5,926	110	5,008
40	5,883	115	4,929
45	5,839	120	4,85
50	5,795	125	4,773
55	5,745	130	4,699
60	5,692	135	4,636
65	5,636	140	4,582
70	5,577	145	4,533
75	5,514	150	4,5

Πίνακας I.13 pH ζύμωσης με μείγμα εγκλεισμένης καλλιέργειας με κ-καραγενάνη και μη εγκλεισμένης καλλιέργειας

t(min)	pH	t(min)	pH	t(min)	pH
5	6,181	70	5,311	135	4,73
10	6,134	75	5,244	140	4,707
15	6,08	80	5,181	145	4,684
20	6,026	85	5,118	150	4,662
25	5,961	90	5,061	155	4,642
30	5,89	95	5,009	160	4,622
35	5,817	100	4,964	165	4,603
40	5,74	105	4,921	170	4,585
45	5,662	110	4,882	175	4,567
50	5,585	115	4,846	180	4,552
55	5,511	120	4,814	185	4,536
60	5,439	125	4,784	190	4,521
65	5,374	130	4,757	195	4,5

Πίνακας Ι.14 pH ζύμωσης με μη εγκλεισμένη καλλιέργεια και ποσότητα κ-καραγενάνης

t(min)	pH
5	6,296
10	5,926
15	5,726
20	5,548
25	5,386
30	5,262
35	5,151
40	5,053
45	4,967
50	4,881
55	4,796
60	4,712
65	4,63
70	4,554
75	4,5

Ι.2.5 Ινουλίνη

Πίνακας Ι.15 pH ζύμωσης με εγκλεισμένη καλλιέργεια ινουλίνη

t(min)	pH	t(min)	pH
5	6,169	110	5,054
10	6,117	115	5,005
15	6,067	120	4,96
20	6,017	125	4,919
25	5,964	130	4,881
30	5,913	135	4,844
35	5,859	140	4,811
40	5,804	145	4,781
45	5,747	150	4,752
50	5,694	155	4,723
55	5,642	160	4,698
60	5,59	165	4,672
65	5,54	170	4,647
70	5,491	175	4,625
75	5,443	180	4,613
80	5,393	185	4,587
85	5,343	190	4,565
90	5,289	195	4,544
95	5,228	200	4,525
100	5,165	205	4,5
105	5,108		

Πίνακας Ι.16 pH ζύμωσης με μείγμα εγκλεισμένης καλλιέργειας με ινουλίνη και μη εγκλεισμένης καλλιέργειας

t(min)	pH	t(min)	pH
5	6,087	95	4,929
10	6,023	100	4,89
15	5,955	105	4,855
20	5,878	110	4,822
25	5,793	115	4,792
30	5,708	120	4,765
35	5,627	125	4,741
40	5,545	130	4,712
45	5,475	135	4,685
50	5,407	140	4,66
55	5,341	145	4,637
60	5,278	150	4,614
65	5,222	155	4,595
70	5,167	160	4,574
75	5,114	165	4,557
80	5,064	170	4,539
85	5,016	175	4,522
90	4,971	180	4,5

Πίνακας Ι.17 pH ζύμωσης με μη εγκλεισμένη καλλιέργεια και ποσότητα ινουλίνης

t(min)	pH
5	6,253
10	5,939
15	5,745
20	5,544
25	5,353
30	5,194
35	5,064
40	4,96
45	4,873
50	4,796
55	4,727
60	4,66
65	4,595
70	4,535
75	4,5

I.2.6 Κυκλοδεξτρίνη

Πίνακας I.18 pH ζύμωσης με εγκλεισμένη καλλιέργεια με κυκλοδεξτρίνη

t(min)	pH
5	6,114
10	6,084
15	6,061
20	6,038
25	6,014
30	5,982
35	5,948
40	5,91
45	5,868
50	5,819
55	5,771
60	5,722
65	5,675
70	5,604
75	5,528
80	5,447
85	5,371
90	5,281
95	5,203
100	5,113
105	5,032
110	4,948
115	4,869
120	4,787
125	4,702
130	4,624
135	4,557
140	4,5

Πίνακας Ι.19 pH ζύμωσης με μείγμα εγκλεισμένης καλλιέργειας με κυκλοδεξτρίνη και μη εγκλεισμένης καλλιέργειας

t(min)	pH
5	6,36
10	6,209
15	6,123
20	6,045
25	5,96
30	5,864
35	5,759
40	5,645
45	5,524
50	5,411
55	5,299
60	5,196
65	5,099
70	5,007
75	4,918
80	4,832
85	4,748
90	4,671
95	4,597
100	4,531
105	4,5

Πίνακας Ι.20 pH ζύμωσης με μη εγκλεισμένη καλλιέργεια και ποσότητα κυκλοδεξτρίνης

t(min)	pH
5	6,075
10	5,936
15	5,769
20	5,624
25	5,506
30	5,412
35	5,334
40	5,267
45	5,205
50	5,148
55	5,091
60	5,033
65	4,976
70	4,924
75	4,875
80	4,829
85	4,788
90	4,748
95	4,711
100	4,676
105	4,644
110	4,612
115	4,583
120	4,556
125	4,53
130	4,5

I.2.7 Αλγινικό νάτριο

Πίνακας I.21 pH ζύμωσης με εγκλεισμένη καλλιέργεια με αλγινικό νάτριο

t(min)	pH	t(min)	pH
5	6,276	120	5,261
10	6,27	125	5,208
15	6,265	130	5,152
20	6,252	135	5,103
25	6,226	140	5,058
30	6,189	145	5,015
35	6,142	150	4,97
40	6,089	155	4,929
45	6,034	160	4,889
50	5,981	165	4,858
55	5,928	170	4,811
60	5,875	175	4,776
65	5,827	180	4,742
70	5,781	185	4,709
75	5,741	190	4,678
80	5,702	195	4,651
85	5,66	200	4,633
90	5,619	205	4,614
95	5,566	210	4,59
100	5,505	215	4,562
105	5,427	220	4,536
110	5,378	225	4,515
115	5,32	230	4,5

Πίνακας Ι.22 pH ζύμωσης με μείγμα εγκλεισμένης καλλιέργειας με αλγινικό νάτριο και μη εγκλεισμένης καλλιέργειας

t(min)	**pH**
5	6,251
10	6,2
15	6,142
20	6,075
25	5,997
30	5,909
35	5,809
40	5,707
45	5,6
50	5,491
55	5,389
60	5,289
65	5,195
70	5,094
75	4,997
80	4,892
85	4,791
90	4,697
95	4,609
100	4,5

Πίνακας Ι.23 pH ζύμωσης με μη εγκλεισμένη καλλιέργεια και ποσότητα αλγινικού νατρίου

t(min)	pH	t(min)	pH
5	6	85	4,834
10	5,888	90	4,8
15	5,747	95	4,768
20	5,605	100	4,74
25	5,485	105	4,711
30	5,391	110	4,685
35	5,314	115	4,66
40	5,249	120	4,635
45	5,195	125	4,613
50	5,143	130	4,593
55	5,092	135	4,574
60	5,041	140	4,555
65	4,924	145	4,539
70	4,949	150	4,522
75	4,907	155	4,5
80	4,869		

I.2.8 Μείγμα πηκτίνης/καζεΐνης

Πίνακας I.24 pH ζύμωσης με εγκλεισμένη καλλιέργεια με μείγμα πηκτίνης/καζεΐνης

t(min)	pH	t(min)	pH
5	6,309	135	5,228
10	6,308	140	5,148
15	6,304	145	5,079
20	6,302	150	5,013
25	6,299	155	4,95
30	6,294	160	4,901
35	6,288	165	4,852
40	6,281	170	4,809
45	6,27	175	4,772
50	6,259	180	4,74
55	6,243	185	4,711
60	6,223	190	4,686
65	6,204	195	4,662
70	6,176	200	4,643
75	6,14	205	4,626
80	6,099	210	4,61
85	6,048	215	4,597
90	5,981	220	4,585
95	5,914	225	4,574
100	5,836	230	4,562
105	5,749	235	4,55
110	5,665	240	4,539
115	5,676	245	4,529
120	5,485	250	4,52
125	5,397	255	4,511
130	5,311	260	4,5

Πίνακας Ι.25 pH ζύμωσης με μείγμα εγκλεισμένης καλλιέργειας με πηκτίνη/καζεΐνη και μη εγκλεισμένης καλλιέργειας

t(min)	pH
5	6,15
10	6,067
15	5,969
20	5,864
25	5,759
30	5,656
35	5,55
40	5,443
45	5,342
50	5,244
55	5,15
60	5,056
65	4,967
70	4,881
75	4,804
80	4,731
85	4,665
90	4,598
95	4,539
100	4,5

Πίνακας Ι.26 pH ζύμωσης με μη εγκλεισμένη καλλιέργεια και ποσότητα μείγματος πηκτίνης/καζεΐνης

t(min)	pH	t(min)	pH
5	5,909	90	4,912
10	5,782	95	4,877
15	5,693	100	4,844
20	5,606	105	4,811
25	5,521	110	4,78
30	5,446	115	4,749
35	5,378	120	4,722
40	5,313	125	4,695
45	5,258	130	4,669
50	5,209	135	4,645
55	5,164	140	4,622
60	5,125	145	4,598
65	5,09	150	4,577
70	5,054	155	4,557
75	5,018	160	4,539
80	4,983	165	4,522
85	4,947	170	4,5

I.2.9 Μείγμα αλγινικού νατρίου/ξανθάνης

Πίνακας I.27 pH ζύμωσης με εγκλεισμένη καλλιέργεια με μείγμα αλγινικού/ξανθάνης

t(min)	pH	t(min)	pH	t(min)	pH
5	6,244	105	5,522	205	4,817
10	6,206	110	5,488	210	4,79
15	6,186	115	5,453	215	4,764
20	6,156	120	5,415	220	4,742
25	6,121	125	5,371	225	4,723
30	6,08	130	5,333	230	4,704
35	6,035	135	5,296	235	4,687
40	5,991	140	5,261	240	4,67
45	5,946	145	5,225	245	4,654
50	5,901	150	5,207	250	4,638
55	5,859	155	5,19	255	4,622
60	5,819	160	5,147	260	4,607
65	5,782	165	5,108	265	4,593
70	5,748	170	5,068	270	4,579
75	5,714	175	5,027	275	4,564
80	5,681	180	4,989	280	4,552
85	5,647	185	4,954	285	4,54
90	5,616	190	4,918	290	4,529
95	5,583	195	4,882	295	4,518
100	5,553	200	4,847	300	4,5

Πίνακας Ι.28 pH ζύμωσης με μείγμα εγκλεισμένης καλλιέργειας με αλγινικού/ξανθάνης και μη εγκλεισμένης καλλιέργειας

t(min)	pH
5	6,219
10	6,139
15	6,075
20	6,012
25	5,943
30	5,862
35	5,78
40	5,7
45	5,621
50	5,528
55	5,432
60	5,34
65	5,248
70	5,159
75	5,076
80	4,994
85	4,911
90	4,832
95	4,762
100	4,695
105	4,638
110	4,585
115	4,533
120	4,5

Πίνακας Ι.29 pH ζύμωσης με μη εγκλεισμένη καλλιέργεια και ποσότητα μείγματος αλγινικού/ξανθάνης

t(min)	pH	t(min)	pH
5	6,219	80	4,991
10	6,105	85	4,944
15	5,993	90	4,899
20	5,889	95	4,855
25	5,774	100	4,817
30	5,66	105	4,778
35	5,553	110	4,741
40	5,459	115	4,707
45	5,379	120	4,675
50	5,309	125	4,644
55	5,247	130	4,616
60	5,192	135	4,589
65	5,141	140	4,564
70	5,09	145	4,541
75	5,04		

I.2.10 Μείγμα ινουλίνης/κυκλοδεξτρίνης

Πίνακας I.30. pH ζύμωσης με εγκλεισμένη καλλιέργεια με μείγμα ινουλίνης/κυκλοδεξτρίνης

t(min)	pH	t(min)	pH
5	6,238	85	5,132
10	6,158	90	5,072
15	6,083	95	5,016
20	6,008	100	4,961
25	5,94	105	4,911
30	5,873	110	4,858
35	5,806	115	4,811
40	5,737	120	4,766
45	5,667	125	4,721
50	5,596	130	4,676
55	5,523	135	4,634
60	5,454	140	4,595
65	5,385	145	4,563
70	5,316	150	4,518
75	5,252	155	4,5
80	5,192		

Πίνακας Ι.31 pH ζύμωσης με μείγμα εγκλεισμένης καλλιέργειας με ινουλίνη/κυκλοδεξτρίνη και μη εγκλεισμένης καλλιέργειας

t(min)	pH
5	6,189
10	6,074
15	5,964
20	5,865
25	5,767
30	5,667
35	5,566
40	5,467
45	5,37
50	5,277
55	5,188
60	5,108
65	5,037
70	4,975
75	4,915
80	4,858
85	4,798
90	4,743
95	4,688
100	4,637
105	4,589
110	4,542
115	4,5

Πίνακας Ι.32 pH ζύμωσης με μη εγκλεισμένη καλλιέργεια και ποσότητα μείγματος ινουλίνης/κυκλοδεξτρίνης

t(min)	pH	t(min)	pH
5	6,138	85	4,93
10	6,039	90	4,891
15	5,931	95	4,853
20	5,817	100	4,818
25	5,706	105	4,783
30	5,602	110	4,75
35	5,494	115	4,719
40	5,404	120	4,689
45	5,327	125	4,661
50	5,26	130	4,635
55	5,202	135	4,61
60	5,148	140	4,587
65	5,101	145	4,566
70	5,056	150	4,544
75	5,012	155	4,524
80	4,971	160	4,5

I.2.11 Άμυλο

Πίνακας I.32 pH ζύμωσης με εγκλεισμένη καλλιέργεια με άμυλο

t(min)	pH	t(min)	pH	t(min)	pH
5	6,262	130	6,142	255	4,941
10	6,242	135	6,134	260	4,906
15	6,236	140	6,124	265	4,857
20	6,227	145	6,112	270	4,845
25	6,217	150	6,097	275	4,817
30	6,212	155	6,079	280	4,79
35	6,206	160	6,057	285	4,766
40	6,202	165	6,031	290	4,743
45	6,2	170	5,998	295	4,72
50	6,197	175	5,956	300	4,699
55	6,196	180	5,909	305	4,68
60	6,195	185	5,851	310	4,661
65	6,192	190	5,799	315	4,644
70	6,19	195	5,713	320	4,628
75	6,188	200	5,633	325	4,613
80	6,185	205	5,555	330	4,599
85	6,182	210	5,477	335	4,586
90	6,178	215	5,394	340	4,572
95	6,176	220	5,318	345	4,561
100	6,172	225	5,243	350	4,55
105	6,168	230	5,174	355	4,54
110	6,164	235	5,11	360	4,531
115	6,16	240	5,059	365	4,522
120	6,155	245	5,017	370	4,512
125	6,149	250	4,978	375	4,5

Πίνακας Ι.33 pH ζύμωσης με μείγμα εγκλεισμένης καλλιέργειας με άμυλο και μη εγκλεισμένης καλλιέργειας

t(min)	pH	t(min)	pH
5	6,206	110	5,032
10	6,169	115	4,985
15	6,126	120	4,94
20	6,083	125	4,899
25	6,038	130	4,86
30	5,996	135	4,825
35	5,949	140	4,792
40	5,899	145	4,76
45	5,844	150	4,729
50	5,782	155	4,7
55	5,716	160	4,673
60	5,645	165	4,648
65	5,574	170	4,624
70	5,502	175	4,602
75	5,431	180	4,582
80	5,365	185	4,562
85	5,304	190	4,545
90	5,247	195	4,528
95	5,191	200	4,512
100	5,137	205	4,5
105	5,083		

Πίνακας Ι.34 pH ζύμωσης με μη εγκλεισμένη καλλιέργεια και ποσότητα μείγματος αμύλου

t(min)	pH
5	6,508
10	6,21
15	5,963
20	5,772
25	5,613
30	5,467
35	5,342
40	5,23
45	5,139
50	5,06
55	4,987
60	4,916
65	4,85
70	4,787
75	4,712
80	4,642
85	4,579
90	4,519
95	4,5

I.3 Πίνακες 3ης σειράς πειραμάτων

I.3.1 1ο μείγμα εγκλεισμού

Πίνακας I.35 pH ζύμωσης με εγκλεισμένη καλλιέργεια με το 1ο μείγμα της τεχνικής εξώθησης

t(min)	pH	t(min)	pH	t(min)	pH
5	6,331	105	6,185	205	5,707
10	6,233	110	6,183	210	5,636
15	6,241	115	6,181	215	5,557
20	6,226	120	6,179	220	5,468
25	6,223	125	6,174	225	5,377
30	6,221	130	6,17	230	5,285
35	6,218	135	6,166	235	5,209
40	6,215	140	6,158	240	5,142
45	6,21	145	6,15	245	5,083
50	6,209	150	6,139	250	5,034
55	6,206	155	6,124	255	4,985
60	6,204	160	6,105	260	4,929
65	6,2	165	6,082	265	4,865
70	6,199	170	6,053	270	4,798
75	6,198	175	6,018	275	4,733
80	6,195	180	5,978	280	4,677
85	6,194	185	5,933	285	4,627
90	6,192	190	5,88	290	4,583
95	6,189	195	5,824	295	4,544
100	6,188	200	5,767	300	4,5

Πίνακας Ι.36 pH ζύμωσης με ποσότητα εγκλεισμένης καλλιέργειας με το 1^{ο} μείγμα της τεχνικής εξώθησης και με ποσότητα μη εγκλεισμένης καλλιέργειας

t(min)	pH	t(min)	pH
5	6,208	115	5,078
10	6,177	120	5,024
15	6,142	125	4,977
20	6,11	130	4,936
25	6,071	135	4,897
30	6,028	140	4,86
35	5,985	145	4,827
40	5,935	150	4,796
45	5,886	155	4,768
50	5,843	160	4,74
55	5,792	165	4,713
60	5,729	170	4,689
65	5,664	175	4,666
70	5,594	180	4,644
75	5,53	185	4,624
80	5,471	190	4,603
85	5,42	195	4,585
90	5,372	200	4,568
95	5,321	205	4,551
100	5,262	210	4,536
105	5,2	215	4,521
110	5,136	220	4,5

I.3.2 2ο μείγμα εγκλεισμού

Πίνακας I.37 pH ζύμωσης με εγκλεισμένη καλλιέργεια με το 2ο μείγμα της τεχνικής εξώθησης

t(min)	pH	t(min)	pH	t(min)	pH
5	6,422	90	6,379	175	5,581
10	6,42	95	6,371	180	5,482
15	6,418	100	6,362	185	5,387
20	6,417	105	6,352	190	5,299
25	6,414	110	6,32	195	5,214
30	6,413	115	6,298	200	5,134
35	6,412	120	6,273	205	5,058
40	6,409	125	6,241	210	4,989
45	6,407	130	6,204	215	4,919
50	6,405	135	6,168	220	4,852
55	6,403	140	6,124	225	4,788
60	6,401	145	6,074	230	4,729
65	6,398	150	6,016	235	4,676
70	6,395	155	5,949	240	4,627
75	6,392	160	5,872	245	4,582
80	6,388	165	5,782	250	4,541
85	6,386	170	5,684	255	4,5

Πίνακας Ι.38 pH ζύμωσης με ποσότητα εγκλεισμένης καλλιέργειας με το 2° μείγμα της τεχνικής εξώθησης και με ποσότητα μη εγκλεισμένης καλλιέργειας

t(min)	pH	t(min)	pH
5	6,52	125	5,862
10	6,364	130	5,808
15	6,353	135	5,75
20	6,352	140	5,689
25	6,349	145	5,622
30	6,345	150	5,48
35	6,339	155	5,472
40	6,334	160	5,4
45	6,326	165	5,372
50	6,316	170	5,255
55	6,307	175	5,183
60	6,282	180	5,106
65	6,27	185	5,028
70	6,253	190	4,951
75	6,234	195	4,875
80	6,213	200	4,832
85	6,184	205	4,77
90	6,15	210	4,717
95	6,116	215	4,669
100	6,08	220	4,623
105	6,044	225	4,58
110	6,004	230	4,511
115	5,959	235	4,5
120	5,911		

I.3.3 3ο μείγμα εγκλεισμού

Πίνακας I.39 pH ζύμωσης με εγκλεισμένη καλλιέργεια με το 3ο μείγμα της τεχνικής εξώθησης

t(min)	pH	t(min)	pH	t(min)	pH	t(min)	pH
5	6,294	130	6,21	255	5,585	380	4,749
10	6,278	135	6,203	260	5,536	385	4,734
15	6,272	140	6,194	265	5,491	390	4,719
20	6,268	145	6,183	270	5,447	395	4,706
25	6,264	150	6,171	275	5,408	400	4,693
30	6,261	155	6,158	280	5,367	405	4,681
35	6,259	160	6,143	285	5,323	410	4,669
40	6,258	165	6,127	290	5,279	415	4,658
45	6,556	170	6,113	295	5,233	420	4,646
50	6,253	175	6,094	300	5,184	425	4,636
55	6,254	180	6,076	305	5,136	430	4,626
60	6,253	185	6,057	310	5,091	435	4,615
65	6,25	190	6,033	315	5,049	440	4,605
70	6,249	195	5,985	320	5,015	445	4,596
75	6,247	200	5,959	325	4,984	450	4,585
80	6,246	205	5,932	330	4,954	455	4,574
85	6,245	210	5,903	335	4,927	460	4,565
90	6,244	215	5,875	340	4,903	465	4,55
95	6,241	220	5,845	345	4,88	470	4,54
100	6,238	225	5,815	350	4,858	475	4,529
105	6,235	230	5,782	355	4,837	480	4,513
110	6,232	235	5,746	360	4,817	485	4,5
115	6,228	240	5,712	365	4,799		
120	6,223	245	5,674	370	4,781		
125	6,217	250	5,631	375	4,765		

Πίνακας Ι.40 pH ζύμωσης με ποσότητα εγκλεισμένης καλλιέργειας με το 3° μείγμα της τεχνικής εξώθησης και με ποσότητα μη εγκλεισμένης καλλιέργειας

t(min)	pH
5	6,217
10	6,124
15	6,05
20	5,974
25	5,884
30	5,692
35	5,699
40	5,593
45	5,505
50	5,372
55	5,36
60	5,288
65	5,226
70	5,149
75	5,065
80	4,974
85	4,886
90	4,806
95	4,732
100	4,666
105	4,605
110	4,553
115	4,5

I.3.4 4ο μείγμα εγκλεισμού

Πίνακας I.41 pH ζύμωσης με εγκλεισμένη καλλιέργεια με το 4° μείγμα της τεχνικής εξώθησης

t(min)	pH	t(min)	pH	t(min)	pH	t(min)	pH
5	6,289	110	5,95	215	5,004	320	4,644
10	6,285	115	5,906	220	4,977	325	4,635
15	6,28	120	5,853	225	4,952	330	4,624
20	6,275	125	5,81	230	4,927	335	4,614
25	6,268	130	5,767	235	4,905	340	4,604
30	6,262	135	5,725	240	4,885	345	4,595
35	6,254	140	5,68	245	4,864	350	4,587
40	6,244	145	5,632	250	4,845	355	4,578
45	6,232	150	5,582	255	4,826	360	4,57
50	6,219	155	5,532	260	4,809	365	4,562
55	6,203	160	5,479	265	4,793	370	4,555
60	6,188	165	5,426	270	4,776	375	4,546
65	6,169	170	5,375	275	4,761	380	4,54
70	6,154	175	5,325	280	4,746	385	4,533
75	6,135	180	5,277	285	4,731	390	4,527
80	6,115	185	5,232	290	4,717	395	4,521
85	6,094	190	5,187	295	4,705	400	4,515
90	6,07	195	5,144	300	4,691	405	4,509
95	6,029	200	5,104	305	4,679	410	4,5
100	6,001	205	5,069	310	4,667		
105	5,978	210	5,036	315	4,655		

Πίνακας Ι.42. pH ζύμωσης με ποσότητα εγκλεισμένης καλλιέργειας με το 4° μείγμα της τεχνικής εξώθησης και με ποσότητα μη εγκλεισμένης καλλιέργειας

t(min)	pH
5	6,293
10	6,206
15	6,132
20	6,064
25	5,982
30	5,889
35	5,787
40	5,684
45	5,584
50	5,491
55	5,411
60	5,336
65	5,269
70	5,205
75	5,134
80	5,053
85	4,968
90	4,884
95	4,81
100	4,743
105	4,682
110	4,627
115	4,575
120	4,529
125	4,5

Παράρτημα ΙΙ. Πίνακες στατιστικής επεξεργασίας

ΙΙ.1 Αποτελέσματα 2η σειράς πειραμάτων

Στους παρακάτω πίνακες που παρουσιάζουν τα αποτελέσματα του Duncan test υπάρχει κωδικοποίηση των δειγμάτων. Για την κατανόηση της κωδικοποίησης ακολουθεί ο πίνακας ΙΙ.1

Πίνακας ΙΙ.1 Αντιστοιχία αριθμών-δειγμάτων

Αριθμός	Εμβολιασμός
1	εγκλεισμένη καλλιέργεια
2	μείγμα εγκλεισμένης/μη εγκλεισμένης καλλιέργειας εκκίνησης
3	μη εγκλεισμένη καλλιέργεια και εγκλειστικό μέσον

ΙΙ.1.1 Χρονική διάρκεια

Πίνακας ΙΙ.2 Αποτελέσματα ANOVA για την χρονική διάρκεια

	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	715408,3	1	715408,3	222,7674	0,000000
Εγκλειστικό	22566,7	8	2820,8	0,8784	0,554417
Εμβολιασμός	50866,7	2	25433,3	7,9196	0,004067
Error	51383,3	16	3211,5		

Πίνακας ΙΙ.3 Duncan test: προσέγγιση της πιθανότητας με μεταβλητή την χρονική διάρκεια

	Εμβολιασμός	{1}	{2}	{3}
1	1		0,005222	0,003145
2	2	0,005222		0,713207
3	3	0,003145	0,713207	

Πίνακας ΙΙ.4 Duncan test: Ομογενείς ομάδες με μεταβλητή την χρονική διάρκεια

	Εμβολιασμός	Διάρκεια	1	2
3	3	127,2222	****	
2	2	137,2222	****	
1	1	223,8889		****

II.1.2 Ιξώδες παραγωγής

Πίνακας II.5 Αποτελέσματα ANOVA για το ιξώδες παραγωγής

	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	340849949	1	340849949	164,0927	0,000000
Εγκλειστικό	4564273	8	570534	0,2747	0,965188
Εμβολιασμός	6690992	2	3345496	1,6106	0,230525
Error	33234874	16	2077180		

II.1.3 Ιξώδες επόμενης ημέρας

Πίνακας II.6 Αποτελέσματα ANOVA για το ιξώδες της επόμενης ημέρας

	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	3,706239E+09	1	3,706239E+09	330,5479	0,000000
Εγκλειστικό	1,473758E+08	8	1,842197E+07	1,6430	0,189294
Εμβολιασμός	8,940301E+07	2	4,470150E+07	3,9868	0,039364
Error	1,793986E+08	16	1,121241E+07		

Πίνακας II.7 Duncan test: προσέγγιση της πιθανότητας με μεταβλητή το ιξώδες της επόμενης ημέρας

	Εμβολιασμός	{1}	{2}	{3}
1	1		0,028056	0,031265
2	2	0,028056		0,957055
3	3	0,031265	0,957055	

Πίνακας II.8 Duncan test: Ομογενείς ομάδες με μεταβλητή το ιξώδες της επόμενης ημέρας

	Εμβολιασμός	Ιξώδες 2	1	2
1	1	9143,22		****
2	2	12959,33	****	
3	3	13045,89	****	

II.1.4 Προσκολλησιμότητα

Πίνακας II.9 Αποτελέσματα ANOVA για την προσκολλησιμότητα

	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	2,069191	1	2,069191	80,90478	0,000000
Εγκλειστικό	0,114369	8	0,014296	0,55897	0,795794
Εμβολιασμός	0,085304	2	0,042652	1,66768	0,219859
Error	0,409210	16	0,025576		

II.1.5 Συνεκτικότητα

Πίνακας II.10 Αποτελέσματα ANOVA για την συνεκτικότητα

	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	9,976916	1	9,976916	2338,704	0,000000
Εγκλειστικό	0,026841	8	0,003355	0,786	0,621540
Εμβολιασμός	0,063007	2	0,031503	7,385	0,005346
Error	0,068256	16	0,004266		

Πίνακας II.11 Duncan test: προσέγγιση της πιθανότητας με μεταβλητή την συνεκτικότητα

	Εμβολιασμός	{1}	{2}	{3}
1	1		0,159133	0,033103
2	2	0,159133		0,002130
3	3	0,033103	0,002130	

Πίνακας II.12. Duncan test: Ομογενείς ομάδες με μεταβλητή την συνεκτικότητα

	Εμβολιασμός	Συνεκτικότητα	1	2
3	3	0,544811		****
1	1	0,616667	****	
2	2	0,662156	****	

II.1.6 Σκληρότητα

Πίνακας II.13 Αποτελέσματα ANOVA για την σκληρότητα

	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	12,97074	1	12,97074	358,6403	0,000000
Εγκλειστικό	0,45141	8	0,05643	1,5602	0,213437
Εμβολιασμός	0,16403	2	0,08202	2,2677	0,135808
Error	0,57866	16	0,03617		

II.1.7 Κομμιώδες

Πίνακας II.14 Αποτελέσματα ANOVA για το κομμιώδες

	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	4,673927	1	4,673927	310,4449	0,000000
Εγκλειστικό	0,145910	8	0,018239	1,2114	0,352594
Εμβολιασμός	0,052433	2	0,026216	1,7413	0,206910
Error	0,240889	16	0,015056		

II.1.8 Μικροβιακό φορτίο

Πίνακας II.15 Αποτελέσματα ANOVA για το μικροβιολογικό φορτίο

	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	1,271056E+12	1	1,271056E+12	18,74324	0,000518
Εγκλειστικό	9,683434E+11	8	1,210429E+11	1,78492	0,154173
Εμβολιασμός	1,830018E+10	2	9,150090E+09	0,13493	0,874762
Error	1,085025E+12	16	6,781409E+10		

II.1.9 Μέγιστος ρυθμός μείωσης μ

Πίνακας II.16 Αποτελέσματα ANOVA για τον μέγιστο ρυθμό μείωσης (μ)

	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	417,1695	1	417,1695	23,09748	0,000194
Εγκλειστικό	142,4394	8	17,8049	0,98581	0,481645
Εμβολιασμός	805,8163	2	402,9081	22,30787	0,000024
Error	288,9801	16	18,0613		

Πίνακας II.17 Duncan test: προσέγγιση της πιθανότητας με μεταβλητή τον μέγιστο ρυθμό μείωσης (μ)

	Εμβολιασμός	{1}	{2}	{3}
1	1		0,991403	0,000114
2	2	0,991403		0,000180
3	3	0,000114	0,000180	

Πίνακας II.18 Duncan test: Ομογενείς ομάδες με μεταβλητή τον μέγιστο ρυθμό μείωσης (μ)

	Εμβολιασμός	μ	1	2
3	3	-11,6567		****
2	2	-0,0789	****	
1	1	-0,0567	****	

II.1.10 Διάρκεια λανθάνουσας φάσης (λ)

Πίνακας II.19 Αποτελέσματα ANOVA για την διάρκεια λανθάνουσας φάσης (λ)

	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	7369,24	1	7369,242	5,182583	0,036907
Εγκλειστικό	10645,26	8	1330,657	0,935814	0,514656
Εμβολιασμός	12688,55	2	6344,273	4,461751	0,028846
Error	22750,79	16	1421,924		

Πίνακας II.20 Duncan test: προσέγγιση της πιθανότητας με μεταβλητή την διάρκεια λανθάνουσας φάσης (λ)

	Εμβολιασμός	{1}	{2}	{3}
1	1		0,023043	0,022059
2	2	0,023043		0,893735
3	3	0,022059	0,893735	

Πίνακας II.21 Duncan test: Ομογενείς ομάδες με μεταβλητή την διάρκεια λανθάνουσας φάσης (λ)

	Εμβολιασμός	λ	1	2
3	3	0,00000	****	
2	2	2,41556	****	
1	1	47,14667		****

II.2 Αποτελέσματα 3ης σειράς πειραμάτων

II.2.1 Χρονική διάρκεια

Πίνακας II.22 Αποτελέσματα ANOVA για την χρονική διάρκεια

	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	575128,1	1	575128,1	41,86873	0,007490
Εγκλειστικό	3234,4	3	1078,1	0,07849	0,967409
Εμβολιασμός	71253,1	1	71253,1	5,18715	0,107178
Error	41209,4	3	13736,5		

II.2.2 Ιξώδες παραγωγής

Πίνακας II.23 Αποτελέσματα ANOVA για το ιξώδες παραγωγής

	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	92629661	1	92629661	68,34528	0,003707
Εγκλειστικό	312920	3	104307	0,07696	0,968274
Εμβολιασμός	130050	1	130050	0,09596	0,777009
Error	4065957	3	1355319		

II.2.3 Ιξώδες επόμενης ημέρας

Πίνακας II.24 Αποτελέσματα ANOVA για το ιξώδες της επόμενης ημέρας

	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	1,104900E+09	1	1,104900E+09	269,2239	0,000493
Εγκλειστικό	1,091005E+07	3	3,636683E+06	0,8861	0,538412
Εμβολιασμός	1,027178E+07	1	1,027178E+07	2,5029	0,211788
Error	1,231205E+07	3	4,104017E+06		

II.2.4 Προσκολλησιμότητα

Πίνακας II.25 Αποτελέσματα ANOVA για την προσκολλησιμότητα

	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	0,409965	1	0,409965	84,60812	0,002718
Εγκλειστικό	0,029170	3	0,009723	2,00672	0,290898
Εμβολιασμός	0,012561	1	0,012561	2,59235	0,205760
Error	0,014536	3	0,004845		

II.2.5 Συνεκτικότητα

Πίνακας II.26 Αποτελέσματα ANOVA για την συνεκτικότητα

	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	2,888166	1	2,888166	939,3035	0,000076
Εγκλειστικό	0,048081	3	0,016027	5,2124	0,104181
Εμβολιασμός	0,004005	1	0,004005	1,3026	0,336596
Error	0,009224	3	0,003075		

II.2.6 Σκληρότητα

Πίνακας II.27 Αποτελέσματα ANOVA για την σκληρότητα

	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	3,140018	1	3,140018	120,1846	0,001625
Εγκλειστικό	0,071361	3	0,023787	0,9104	0,529831
Εμβολιασμός	0,021715	1	0,021715	0,8312	0,429158
Error	0,078380	3	0,026127		

II.2.7 Κομμιώδες

Πίνακας II.28 Αποτελέσματα ANOVA για το κομμιώδες

	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	1,091355	1	1,091355	208,5511	0,000720
Εγκλειστικό	0,012520	3	0,004173	0,7975	0,571570
Εμβολιασμός	0,012784	1	0,012784	2,4429	0,215996
Error	0,015699	3	0,005233		

II.2.8 Μικροβιολογικό φορτίο

Πίνακας II.29 Αποτελέσματα ANOVA για το μικροβιολογικό φορτίο

	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	9,331146E+13	1	9,331146E+13	9,508968	0,053981
Εγκλειστικό	2,355361E+14	3	7,851205E+13	8,000824	0,060729
Εμβολιασμός	6,276425E+12	1	6,276425E+12	0,639603	0,482323
Error	2,943899E+13	3	9,812995E+12		

II.2.9 Μέγιστος ρυθμός μείωσης

Πίνακας II.30 Αποτελέσματα ANOVA για τον μέγιστο ρυθμό μείωσης (μ)

	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	0,009112	1	0,009112	4,057514	0,137407
Εγκλειστικό	0,007038	3	0,002346	1,044527	0,486136
Εμβολιασμός	0,000012	1	0,000012	0,005566	0,945225
Error	0,006737	3	0,002246		

II.2.10 Διάρκεια λανθάνουσας φάσης

Πίνακας II.31 Αποτελέσματα ANOVA για την διάρκεια λανθάνουσας φάσης (λ)

	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	80723,63	1	80723,63	19,63403	0,021358
Εγκλειστικό	9994,08	3	3331,36	0,81027	0,566600
Εμβολιασμός	37775,38	1	37775,38	9,18793	0,056259
Error	12334,24	3	4111,41		