



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

**ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΣ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΚΑΙ
ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΥ ΣΕ
ΓΙΑΟΥΡΤΙ**



**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΑΛΕΞΙΑ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΥ
ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΤΖΙΑ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ**

ΑΘΗΝΑ 2018

Ευχαριστίες

Πρωτίστως, θα ήθελα να ευχαριστήσω βαθύτατα, την επιβλέπουσα καθηγήτρια της σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, κυρία Τζιά Κωνσταντίνα για την ολοκλήρωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Οι ακαδημαϊκές γνώσεις της, η μεγάλη εμπειρία και η στενή καθοδήγησή της, αποτέλεσαν καθοριστικούς παράγοντες για το σχεδιασμό και την εκτέλεση των πειραμάτων, καθώς και για τη μελέτη, διόρθωση και ολοκλήρωση της διπλωματικής εργασίας. Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την υποψήφια διδάκτορα Φρακολάκη Γεωργία για την καθημερινή της υποστήριξη και για τις επιστημονικές αλλά και τις ανρώπινες συμβουλές της, σε θέματα που αφορούσαν την εκτέλεση των πειραμάτων καθώς και την επεξεργασία των μετρήσεων. Επίσης, θα ήθελα να καταθέσω τις ευχαριστίες μου για την ουσιώδη και αποτελεσματική βοήθεια της Γιάννου Βιργινίας, η οποία μέσα από τις γνώσεις και τη μεγάλη εμπειρία της, προσέφερε πολύτιμη βοήθεια σε κάθε προκύπτον θέμα που παρουσιάστηκε κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων. Επιπροσθέτως, θα ήθελα να εκφράσω ιδιαίτερη ευχαρίστηση στην υποψήφια διδάκτορα Κατσούλη Μαρία και στον υποψήφιο διδάκτορα Κεκέ Τρύφωνα, των οποίων οι επιστημονικές γνώσεις και η πολύτιμη στήριξή τους, με βοήθησαν να ολοκληρώσω την παρούσα διπλωματική εργασία. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους εργάζονται στο εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων, καθώς ο καθένας τους ξεχωριστά μου μεταλαμπάδευσε πολύτιμες γνώσεις κατά τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Θα ήταν μεγάλη παράλειψη όμως, αν δεν ευχαριστούσα τη ΦΑΓΕ Α.Ε. για τη δωρεάν παροχή του γάλακτος και των βακτηριακών καλλιιεργειών που χρησιμοποιήθηκαν στη διπλωματική εργασία, ενώ ιδιαίτερος θα ήθελα να ευχαριστήσω την κυρία Κουρέλη Ρούλα για την άριστη συνεργασία μας τόσο κατά την εκπόνηση της πρακτικής μου άσκησης στο εργοστάσιο της εταιρείας, όσο και κατά τη διεξαγωγή της διπλωματικής μου εργασίας.

Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην οικογένειά μου, η οποία δεν έπαψε ποτέ να με στηρίζει σε όποια δυσκολία αντιμετώπισα στην ζωή μου. Χάρη σε αυτούς, στην αγάπη και την υποστήριξή τους κατάφερα να σπουδάσω και να πραγματοποιήσω τα όνειρά μου και αποτελούν τα θεμέλια των μελλοντικών μου φιλοδοξιών. Πολύ σημαντική, τέλος, ήταν και η υποστήριξη των φίλων και των κοντινών μου ανθρώπων, οι οποίοι με βοήθησαν να ξεπεράσω κάθε εμπόδιο και στάθηκαν δίπλα μου σε όλη τη διαδρομή.

Πίνακας περιεχομένων

1. Περίληψη	7
Abstract	12
2. Εισαγωγή.....	17
3. Γάλα - Γαλακτοκομικά Προϊόντα - Παραγωγική Διαδικασία	19
3.1 Γάλα - Σύσταση - Ιδιότητες	19
3.1.1 Σύσταση του γάλακτος	19
3.1.2 Ιδιότητες – Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά γάλακτος.....	24
3.2 Γαλακτοκομικά Προϊόντα - Γιαούρτι	28
3.2.1 Ζυμωμένα προϊόντα - Είδη γαλακτοκομικών.....	28
3.2.2 Γιαούρτι και Είδη Γιαουρτιού.....	29
3.2.3 Σύσταση του Γιαουρτιού	31
3.2.4 Δομή και Ιδιότητες Γιαουρτιού	31
3.2.5 Διατροφική Αξία του Γιαουρτιού	33
3.2.6 Παραγωγική Διαδικασία Γιαουρτιού	34
3.2.7 Γαλακτικά Βακτήρια - Συμβατικοί Μικροοργανισμοί Εκκίνησης Ζύμωσης.....	38
4. Προβιοτικά βακτήρια και εφαρμογές τους στα τρόφιμα	41
4.1 Προβιοτικά βακτήρια.....	41
4.1.1 Προέλευση και Κυριότερα Είδη.....	41
4.1.2 Το γένος <i>Bifidobacterium</i> και τα στελέχη του.....	43
4.1.3 Συνθήκες ανάπτυξης των <i>bifidobacteria</i>	45
4.1.4 Αξιολόγηση της ασφάλειας των προβιοτικών μικροβίων.....	45
4.1.5 Δράση των προβιοτικών βακτηρίων στον ανθρώπινο οργανισμό.....	46
4.2 Εισαγωγή Προβιοτικών σε Τρόφιμα	51
4.2.1 Παράγοντες που επηρεάζουν την επιβίωση των προβιοτικών βακτηρίων ...	53
4.2.2 Η έννοια των πρεβιοτικών.....	53
4.2.3 Συμβατικά: Συνδυασμός Προβιοτικών και Πρεβιοτικών και οφέλη τους ..	54
4.2.4 Προσδιορισμός μικροβιακού φορτίου των προβιοτικών σε γαλακτοκομικά προϊόντα	56
5. Εγκλεισμός προβιοτικών βακτηρίων	60
5.1 Η τεχνολογία του εγκλεισμού και η σημασία της στα τρόφιμα	60
5.2 Τεχνικές Εγκλεισμού	62
5.2.1 Ξήρανση με κατάψυξη (<i>freeze drying</i>)	63
5.2.2 Ξήρανση με ψεκασμό (<i>spray drying</i>).....	63
5.2.3 Ψύξη με ψεκασμό (<i>spray-chilling</i>)	64
5.2.4 Επικάλυψη ρευστοποιημένης κλίνης (<i>fluid bed coating</i>)	64
5.2.5 Η τεχνική <i>electrospinning</i>	65
5.2.6 Η τεχνική επικάλυψης με ψεκασμό (<i>spray-coating</i>)	65
5.3 Τεχνικές εγκλεισμού σε σφαιρίδια πολυμερούς μήτρας.....	65
5.3.1 Η τεχνική της εξώθησης	66
5.3.2 Η τεχνική της γαλακτωματοποίησης	67
5.3.3 Σταθεροποίηση των εγκλειστικών μικροσφαιριδίων με επικάλυψη τους	68
5.3.4 Σύγκριση των μεθόδων εγκλεισμού προβιοτικών	70
5.3.5 Συνδυασμός τεχνικών εγκλεισμού.....	71
5.5 Μέσα Εγκλεισμού	75
5.5.1 Αλγινικό.....	76
5.5.2 Τζελάνη και Ξανθάνη	77
5.5.3 κ-καραγενάνη	78
5.5.4 Φθαλική Οξική Κυτταρίνη.....	78
5.5.5 Χιτοζάνη	79

5.5.6	Αμυλο.....	79
5.6	Εισαγωγή εγκλεισμένων προβιοτικών σε γαλακτοκομικά τρόφιμα.....	82
6.	Πειραματικό μέρος	85
6.1	Σκοπός των πειραμάτων	85
6.2	Υλικά και μέθοδοι.....	85
6.2.1	Πρώτες ύλες.....	85
6.2.2	Εργαστηριακός εξοπλισμός.....	87
6.3	Πειραματική διαδικασία	88
6.3.1	Εγκλεισμός προβιοτικής καλλιέργειας με τη μέθοδο της εξώθησης (<i>extrusion</i>).....	88
6.3.2	Εγκλεισμός προβιοτικής καλλιέργειας με τη μέθοδο της γαλακτωματοποίησης (<i>emulsification</i>)	90
6.3.3	Ζύμωση Γιαουριού	93
6.4	Αναλύσεις - Μετρήσεις.....	94
6.4.1	Μικροβιολογικές Αναλύσεις	94
6.4.2	Μετρήσεις ζ-δυναμικού στα εγκλειστικά μίγματα.....	97
6.4.3	Μετρήσεις κατά τη ζύμωση του γάλακτος και στο τελικό προϊόν γιαουριού	98
6.5	Σχεδιασμός Πειραμάτων	98
7.	Αποτελέσματα και συζήτηση αποτελεσμάτων	101
7.1	Πρώτη σειρά πειραμάτων	102
7.1.1	Αποτελέσματα μετρήσεων πειραματικής σειράς 1α.....	102
	Εγκλεισμός προβιοτικών βακτηρίων με την τεχνική εξώθησης με θερμική επεξεργασία των εγκλειστικών μιγμάτων στους 80 °C και 121 °C	102
	Χρήση εγκλεισμένων προβιοτικών βακτηρίων στην ζύμωση γιαουριού	104
7.1.2	Σύγκριση αποτελεσμάτων πρώτης πειραματικής σειράς 1α	112
7.1.3	Αποτελέσματα μετρήσεων πειραματικής σειράς 1β.....	124
	Εγκλεισμός προβιοτικών βακτηρίων με την τεχνική εξώθησης με θερμική επεξεργασία στους 80 °C και επικάλυψη με χιτοζάνη - Χρήση εγκλεισμένων προβιοτικών βακτηρίων στην ζύμωση γιαουριού	124
7.2	Δεύτερη σειρά πειραμάτων.....	129
7.2.1	Αποτελέσματα μετρήσεων δεύτερης πειραματικής σειράς	129
	Εγκλεισμός προβιοτικών βακτηρίων με την τεχνική γαλακτωματοποίησης με και χωρίς επικάλυψη των προϊόντων εγκλεισμού με χιτοζάνη	129
7.2.2	Σύγκριση αποτελεσμάτων δεύτερης πειραματικής σειράς	139
7.3	Αποτελέσματα μετρήσεων ζ-δυναμικού.....	151
7.3.1	Αποτελέσματα μετρήσεων στα μίγματα της μεθόδου της γαλακτωματοποίησης.....	151
7.3.2	Αποτελέσματα μετρήσεων στα μίγματα της μεθόδου της εξώθησης	151
7.4	Σύγκριση των μεθόδων εξώθησης και γαλακτωματοποίησης.....	152
7.4.1	Σύγκριση αποτελεσμάτων μικροβιολογικών αναλύσεων των προϊόντων εγκλεισμού της μεθόδου της εξώθησης και της μεθόδου της γαλακτωματοποίησης	152
7.4.2	Σύγκριση αποτελεσμάτων απόδοσης εγκλεισμού % της τεχνικής της εξώθησης και της τεχνικής της γαλακτωματοποίησης.....	153
7.4.3	Σύγκριση αποτελεσμάτων ζ-δυναμικού των μιγμάτων της μεθόδου της εξώθησης και της μεθόδου της γαλακτωματοποίησης.....	154
7.4.4	Ανάλυση κύριων συνιστωσών των δειγμάτων της πρώτης και δεύτερης πειραματικής σειράς (PCA)	155
8.	Συμπεράσματα και προτάσεις.....	157

8.1 Συμπεράσματα	157
8.2 Προτάσεις	161
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	163
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1. Πίνακες μεταβολής του pH συναρτήσει του χρόνου ζύμωσης των γιαουρτιών	170
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2. Πίνακες στατιστικής επεξεργασίας.....	179
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3. Αποτελέσματα αναλύσεων για το ζ-δυναμικό	185

1. Περίληψη

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου. Τα πειράματα εκτελέστηκαν κατά τη διάρκεια του εαρινού εξαμήνου του ακαδημαϊκού έτους 2016-2017 και του χειμερινού εξαμήνου του ακαδημαϊκού έτους 2017-2018. Ο σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν ο εγκλεισμός του προβιοτικού στελέχους *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* με δύο μεθόδους, την τεχνική της εξώθησης και την τεχνική της γαλακτωματοποίησης, καθώς και η ενσωμάτωση των εγκλεισμένων προβιοτικών βακτηρίων σε γάλα παράλληλα με τον εμβολιασμό συμβατικής καλλιέργειας εκκίνησης, με στόχο τη παραγωγή τελικού προϊόντος προβιοτικού γιαουρτιού. Σύμφωνα με το Διεθνή Οργανισμό Υγείας, τα προβιοτικά βακτήρια είναι ζωντανοί μικροοργανισμοί οι οποίοι, όταν χορηγούνται σε επαρκείς ποσότητες, ωφελούν την υγεία του καταναλωτή. Απαραίτητη προϋπόθεση για να αποδώσουν τα οφέλη αυτά είναι η διατήρησή τους σε υψηλά επίπεδα βιωσιμότητας τόσο κατά την αποθήκευση του τροφίμου, όσο και κατά τη διέλευσή τους μέσω της γαστρεντερικής οδού. Ένας αποτελεσματικός τρόπος προστασίας των ευαίσθητων αυτών μικροοργανισμών αποτελεί ο εγκλεισμός τους με διάφορες τεχνικές και χρήση διαφορετικών εγκλειστικών υλικών.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία εξετάστηκε ο εγκλεισμός των προβιοτικών μέσω δύο μεθόδων, της τεχνικής της εξώθησης και της τεχνικής της γαλακτωματοποίησης. Η αρχική ποσότητα των προβιοτικών βακτηρίων που εγκλείστηκε με κάθε τεχνική και μέσο εγκλεισμού ήταν σταθερή για όλα τα δείγματα και είχε συγκέντρωση 1,5 % w/v (g προβιοτικής καλλιέργειας ανά mL εγκλειστικού μίγματος). Μετά την ολοκλήρωση των διεργασιών εγκλεισμού, πραγματοποιήθηκαν μικροβιολογικές αναλύσεις στα προϊόντα εγκλεισμού με σκοπό τον προσδιορισμό της απόδοσης του εγκλεισμού σε κάθε περίπτωση. Πραγματοποιήθηκαν συνολικά 2 σειρές πειραμάτων εγκλεισμού προβιοτικής καλλιέργειας και ακολούθως πειράματα ζύμωσης γάλακτος με εμβολιασμό με συμβατική καλλιέργεια εκκίνησης (σε ποσότητα 1 g/L) και ταυτόχρονη ενσωμάτωση των εγκλεισμένων βακτηρίων που προέκυψαν από κάθε σειρά πειραμάτων εγκλεισμού.

Η 1^η σειρά πειραμάτων αφορούσε τον εγκλεισμό προβιοτικών βακτηρίων μέσω της τεχνικής της εξώθησης. Χρησιμοποιήθηκαν τρία εγκλειστικά μίγματα με τους εξής συνδυασμούς: αλγινικό-μαλτοδεξτρίνη, αλγινικό-ινουλίνη και αλγινικό-ολιγοφρουκτόζη. Στα εγκλειστικά μίγματα προστέθηκε και MRS Broth ως αυξητικός παράγοντας των βακτηρίων, καθώς και γλυκερόλη ως κρουπροστατευτικό υλικό, ενώ χρησιμοποιήθηκαν και ιόντα Ca^{2+} προκειμένου να αντιδράσουν με το αλγινικό και να σχηματίσουν ένα τρισδιάστατο πλέγμα αλγινικού ασβεστίου μέσα στο οποίο εγκλείστηκαν τα προβιοτικά βακτήρια. Η 1^η σειρά πειραμάτων περιλάμβανε δύο μέρη. Στο πρώτο μέρος (1α) εξετάστηκε η επίδραση της θερμοκρασίας επεξεργασίας (80°C και 121°C) των εγκλειστικών μέσων στην απόδοση εγκλεισμού και στη διατήρηση της βιωσιμότητας και δραστηριότητας των προβιοτικών βακτηρίων. Στο δεύτερο μέρος (1β) πραγματοποιήθηκε θερμική επεξεργασία των εγκλειστικών μέσων στους 80°C και μελετήθηκαν τα χαρακτηριστικά των εγκλειστικών προϊόντων με και χωρίς επικάλυψη χιτοζάνης. Η θερμοκρασία των 121 °C επιλέχθηκε προκειμένου να εξασφαλιστούν στείρες συνθήκες κατά τον εγκλεισμό των προβιοτικών βακτηρίων, ενώ η επικάλυψη των εγκλειστικών προϊόντων με χιτοζάνη πραγματοποιήθηκε για την δομική ενίσχυση τους.

Η 2^η πειραματική σειρά περιλάμβανε τον εγκλεισμό προβιοτικών βακτηρίων μέσω της τεχνικής της γαλακτωματοποίησης με τέσσερα εγκλειστικά μέσα και τη μελέτη της επικάλυψης ή μη των εγκλειστικών προϊόντων με χιτοζάνη. Ως εγκλειστικά μέσα χρησιμοποιήθηκαν μίγματα αλγινικού-ινουλίνης, αλγινικού-μαλτοδεξτρίνης, αλγινικού-ολιγοφρουκτόζης καθώς και απλό διάλυμα αλγινικού. Στα συγκεκριμένα εγκλειστικά μέσα χρησιμοποιήθηκε και γλυκερόλη ως κρουπροστατευτικός παράγοντας, ενώ χρησιμοποιήθηκαν και σε αυτήν τη μέθοδο ιόντα Ca^{2+} για τον σχηματισμό τρισδιάστατου πλέγματος αλγινικού ασβεστίου γύρω από τα προβιοτικά βακτήρια. Η απόδοση του εγκλεισμού σε κάθε περίπτωση υπολογίστηκε, συσχετίζοντας την πειραματική τιμή βακτηριακού φορτίου που προέκυψε από τις μικροβιολογικές αναλύσεις των εγκλεισμένων προϊόντων με τη θεωρητική τιμή βακτηριακού φορτίου, δεδομένου ότι η αρχική προβιοτική καλλιέργεια που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα εγκλεισμού περιείχε 5×10^{10} μικροοργανισμούς/g. Τα εγκλεισμένα βακτήρια που προέκυψαν από τις δύο μεθόδους (1^η σειρά (α)-(β) και 2^η σειρά) εμβολιάστηκαν μαζί με συμβατική καλλιέργεια εκκίνησης σε γάλα το οποίο ζυμώθηκε στους 45°C για τη παραγωγή γιαουρτιού. Για λόγους σύγκρισης, πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός γάλακτος μόνο με συμβατική καλλιέργεια

εκκίνησης (τυφλό). Σε όλα τα πειράματα παραγωγής γιαουρτιού έγινε παρακολούθηση της εξέλιξης της ζύμωσης (μέχρι τελική τιμή pH 4,5) και μετρήσεις των φυσικοχημικών και μικροβιολογικών χαρακτηριστικών των τελικών προϊόντων γιαουρτιών.

Με βάση τις μετρήσεις που προέκυψαν από κάθε πειραματική σειρά και τη στατιστική τους επεξεργασία μέσω του προγράμματος STATISTICA 7.0 (StatSoft, Inc) προέκυψαν αξιολογικά συμπεράσματα.

Στην 1^η σειρά πειραμάτων εγκλεισμού, βρέθηκε ότι η θερμοκρασία επεξεργασίας των εγκλειστικών μιγμάτων επηρέασε σημαντικά την απόδοση του εγκλεισμού. Συγκεκριμένα τα μίγματα αλγινικού-μαλτοδεξτρίνης ($6,7 \cdot 10^8$ cfu/g) και αλγινικού-ινουλίνης ($6,3 \cdot 10^8$ cfu/g) επεξεργασμένα στους 80°C, εμφάνισαν την υψηλότερη απόδοση εγκλεισμού, 67% και 66% αντίστοιχα, ενώ το μίγμα αλγινικού-ολιγοφρουκτόζης θερμικά επεξεργασμένο στους 121°C παρουσίασε τα χαμηλότερα επίπεδα βακτηριακού φορτίου ($6,8 \cdot 10^3$ cfu/g) και απόδοσης εγκλεισμού (0,1%). Σχετικά με τα προϊόντα γιαουρτιού, τα δείγματα με ενσωματωμένα προϊόντα εγκλεισμού εμφάνισαν μειωμένα ιξώδη σε σύγκριση με το τυφλό, με εξαίρεση το δείγμα του εγκλειστικού μίγματος αλγινικού-ολιγοφρουκτόζης με ιξώδες μετά τη ζύμωση ίσο με 6350 cP (έναντι 6000 cP του τυφλού) και ιξώδες μετά την αποθήκευση στους 4°C για 24 h ίσο με 16860 cP (έναντι 16250 cP του τυφλού). Παρόμοια μείωση παρατηρήθηκε στις τιμές των χαρακτηριστικών υφής των δειγμάτων σε σχέση με το τυφλό. Εξαίρεση αποτέλεσε το δείγμα γιαουρτιού με εγκλεισμένο προϊόν σε μίγμα αλγινικού-ινουλίνης του οποίου οι τιμές του κομμώδους (0,5 N έναντι 0,45 N του τυφλού), της συνεκτικότητας (0,6 έναντι 0,53 του τυφλού) και της σκληρότητας (0,83 N έναντι 0,82 N του τυφλού) βρέθηκαν μεγαλύτερες και από αυτές του τυφλού δείγματος. Με βάση τα παραπάνω, προκύπτει ότι η ινουλίνη, η οποία έχει πρεβιοτικές ιδιότητες, αποφέρει συνεργιστικό αποτέλεσμα με την προβιοτική καλλιέργεια και αποδίδει θετική επίδραση στη βιωσιμότητα των προβιοτικών καλλιιεργειών καθώς και στα ποιοτικά χαρακτηριστικά του γιαουρτιού. Αντίθετα, η ολιγοφρουκτόζη, ενώ έχει επίσης πρεβιοτικές ιδιότητες, δεν παρουσίασε αντίστοιχη θετική επίδραση, τόσο στο βακτηριακό φορτίο του εγκλεισμένου προϊόντος ($3,6 \cdot 10^8$ cfu/g), όσο και στα χαρακτηριστικά υφής και στο βακτηριακό φορτίο του τελικού προϊόντος γιαουρτιού ($2,16 \cdot 10^5$ cfu/g). Επίσης, διαπιστώθηκε ότι η επεξεργασία των εγκλειστικών μέσων στους 80°C απέδωσε καλύτερα αποτελέσματα σε αρκετούς εξεταζόμενους παράγοντες έναντι της

επεξεργασίας στους 121°C. Οι διαφορές στις τιμές των παραμέτρων που εξετάστηκαν, μεταξύ των εγκλειστικών μιγμάτων που επεξεργάστηκαν στους 80 και 121°C αντίστοιχα, οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η διαφορετική θερμοκρασία επεξεργασίας είχε ως αποτέλεσμα την δημιουργία ισχυρότερου τρισδιάστατου πλέγματος αλγινικού ασβεστίου κατά την διαδικασία εγκλεισμού των προβιοτικών βακτηρίων με τα εγκλειστικά μίγματα που επεξεργάστηκαν στους 80°C. Το χαρακτηριστικό αυτό μπορεί να εξηγηθεί, μέσω της επίδρασης της πολύ υψηλής θερμοκρασίας στην πολυμερική αλυσίδα του αλγινικού και κατ'επέκταση της ικανότητας του να δημιουργήσει τρισδιάστατο πλέγμα με τα ιόντα Ca^{2+} .

Στη 2^η σειρά πειραμάτων, βρέθηκαν πολύ χαμηλότερα επίπεδα βακτηριακού φορτίου στα προϊόντα εγκλεισμού και στην απόδοση εγκλεισμού σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές που προέκυψαν με τη μέθοδο της εξώθησης. Μεταξύ των δειγμάτων που επεξεργάστηκαν με τη μέθοδο της γαλακτωματοποίησης, την υψηλότερη απόδοση εγκλεισμού (10%), καθώς και το μεγαλύτερο βακτηριακό φορτίο στο προϊόν εγκλεισμού ($1,16 \cdot 10^8$) παρουσίασε το εγκλειστικό μίγμα αλγινικού-ινουλίνης χωρίς επικάλυψη χιτοζάνης. Επίσης ο συνολικός χρόνος ζύμωσης των δειγμάτων γιαουρτιού προέκυψε ότι επηρεάζεται στατιστικά σημαντικά, τόσο από την επικάλυψη των προϊόντων εγκλεισμού με χιτοζάνη, όσο και από το είδος του χρησιμοποιούμενου μίγματος εγκλεισμού. Συγκεκριμένα, όλα τα δείγματα χωρίς επικάλυψη χιτοζάνης παρουσίασαν μικρότερο χρόνο ζύμωσης από το τυφλό δείγμα (325 min). Το γεγονός αυτό μπορεί να εξηγηθεί από την επίδραση του αντιμικροβιακού χαρακτήρα της χιτοζάνης στην ανάπτυξη και μεταβολική δραστηριότητα της συμβατικής καλλιέργειας εκκίνησης. Τα ιξώδη όλων των δειγμάτων γιαουρτιού αμέσως μετά την ζύμωση στους 45°C, παρουσίασαν χαμηλότερες τιμές από το τυφλό δείγμα γιαουρτιού, ενώ οι τιμές του ιξώδους των δειγμάτων προέκυψαν υψηλότερες στην περίπτωση που τα εγκλεισμένα βακτήρια είχαν επικαλυφθεί με χιτοζάνη. Εν αντιθέσει, τα ιξώδη των δειγμάτων γιαουρτιού μετά την αποθήκευση στους 4°C για 24 h δεν εμφάνισαν σημαντική διαφορά μεταξύ τους. Τέλος, τα χαρακτηριστικά υφής, και συγκεκριμένα η σκληρότητα και η προσκολλησιμότητα των δειγμάτων γιαουρτιού που περιείχαν τα εγκλεισμένα προϊόντα που προέκυψαν από την τεχνική της γαλακτωματοποίησης, εμφάνισαν μικρότερες τιμές από τις αντίστοιχες του τυφλού δείγματος. Ακόμη, το κομμώδες των δειγμάτων προέκυψε ότι επηρεάζεται στατιστικά σημαντικά από την επικάλυψη χιτοζάνης των εγκλειστικών προϊόντων.

Εν κατακλείδι, με βάση τα αποτελέσματα και την επεξεργασία των μετρήσεων που προέκυψαν από τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, εξάγεται το συμπέρασμα ότι η τεχνική του εγκλεισμού μέσω εξώθησης μπορεί να θεωρηθεί μία αποτελεσματική μέθοδος εγκλεισμού των προβιοτικών βακτηρίων, καθώς οδηγεί σε υψηλά επίπεδα βιωσιμότητας και παράλληλα σε μικρές απώλειες αυτών κατά τη διαδικασία εγκλεισμού. Από την άλλη πλευρά, ενώ ο εγκλεισμός με τη μέθοδο της γαλακτωματοποίησης αποδίδει πολύ χαμηλότερα επίπεδα βιωσιμότητας των εγκλεισμένων βακτηρίων και αντίστοιχα υψηλό ποσοστό απωλειών μικροοργανισμών κατά τη διαδικασία εγκλεισμού, πλεονεκτεί έναντι της τεχνικής της εξώθησης όσον αφορά τη δυνατότητα εφαρμογής της μεθόδου σε βιομηχανική κλίμακα. Επιπροσθέτως, η κατάλληλη επιλογή μέσων εγκλεισμού, και στις δύο μεθόδους, παίζει σημαντικό ρόλο τόσο στη διατήρηση της βιωσιμότητας των εγκλεισμένων μικροοργανισμών στο τελικό προϊόν, όσο και στην επίτευξη των επιθυμητών χαρακτηριστικών γεύσης και υφής στο τελικό προϊόν γιαουρτιού.

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 2016-2017 and the winter semester of the academic year 2017-2018. The purpose of this thesis was the encapsulation of the probiotic strain *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* via two distinct encapsulating methods, the extrusion technique and the emulsification technique, as well as the introduction of the encapsulated probiotic bacteria into yogurt along with the introduction of conventional starter culture in order to produce a final probiotic food product. According to the International Health Organization, probiotic bacteria are living microorganisms which, when administered in sufficient quantities, benefit the health of the consumer. A prerequisite for the manifestation of these benefits is to maintain a high level of probiotic cell viability during both storage, and the passing of the food product through the gastrointestinal tract. An effective way to protect these susceptible microorganisms is by encapsulating them with various techniques and encapsulation materials.

In the present thesis, two methods were used in order to study the encapsulation of the probiotic culture: the extrusion technique and the emulsification technique. The initial amount of probiotic bacteria encapsulated by each technique and encapsulation medium was constant for all samples and had a concentration of 1.5% w/v (g of probiotic culture per mL of encapsulation mixture). Following the completion of the encapsulation process, microbiological analyses were performed on the final encapsulated products in order to determine the efficiency of the encapsulation process in each case. Two series of experiments were performed. Milk fermentation experiments were also carried out by inoculation with a conventional starter culture (1 g/L) and simultaneous incorporation of the encapsulated bacteria resulting from each series of inclusion experiments.

The first series of experiments involved the encapsulation of probiotic bacteria via the extrusion technique. Three encapsulation mixtures were used with the following combinations: alginate-maltodextrin, alginate-inulin and alginate-oligofructose. Also, MRS Broth was used as a growth factor of the bacteria, glycerol was added to the inclusion mixtures as a cryoprotectant agent, while Ca^{2+} ions were also used to react with the alginate and form a three-dimensional calcium alginate matrix into which the

probiotic bacteria were encapsulated.. The first series of experiments included two parts. The first part (1a) examined the effect of the processing temperature (80 °C and 121 °C) of the encapsulation mixtures on the encapsulation performance and on the maintenance of the viability and activity of the probiotic bacteria. In the second part (1b) heat treatment of the encapsulation media was performed at 80 °C and the characteristics of the encapsulation products with and without chitosan coating were studied. The temperature of 121°C was chosen to ensure sterile conditions during the encapsulation of the probiotic bacteria, while the coating of the encapsulation products with chitosan was performed to structurally strengthen the encapsulation products.

The 2nd series of experiment included the encapsulation of probiotic bacteria via the emulsification technique and the study of both coated and non-coated encapsulation products with chitosan. In this method, four encapsulation mixtures were used for the encapsulation bacteria. The mixtures were a combination of alginate-inulin, alginate-maltodextrin, alginate-oligofructose as well as simple alginate solution. Glycerol, was also used as a cryoprotectant, while Ca^{2+} ions were used to form a three-dimensional calcium alginate matrix around the probiotic bacteria. The yield of the encapsulation in each case was calculated by correlating the experimental value resulting from the microbiological analyzes of the encapsulated products to the theoretical value, since the initial probiotic culture used in the inclusion experiments contained 5×10^{10} cfu/g. The encapsulated bacteria by the two methods (1st series (a) - (b) and 2nd series) were inoculated, along with a conventional starter culture in milk which was fermented at 45 °C for the production of yogurt. For comparison purposes, milk was inoculated with plain conventional starter culture and the product of the fermentation was considered as blank sample. In all yogurt production experiments, the evolution of fermentation process was monitored (to a final pH of 4.5) and measurements of the physicochemical and microbiological characteristics of the final yoghurt products were performed.

Based on the results obtained from each experimental series and their statistical processing through STATISTICA 7.0 (StatSoft, Inc.), there were some remarkable conclusions.

In the first series of encapsulation experiments, the results showed, that the processing temperature of the encapsulation mixtures significantly affected the encapsulation performance. In particular, the alginate-maltodextrin mixtures (6.7×10^8 cfu/g) and

inulin-alginate (6.3×10^8 cfu/g) which were treated at 80 °C showed the highest encapsulation efficiency (inclusion rate), 67% and 66 % respectively, while the alginate-oligofructose mixture heat treated at 121 °C exhibited lower bacterial load levels (6.8×10^3 cfu/g) and encapsulation efficiency (inclusion rates) (0.1%). Regarding the viscosities of the yoghurt products, these were reduced to the samples which were embedded with encapsulation products as compared to the blank, with the exception of the sample of alginate-oligofructose mixture with a fermentation viscosity of 6350 cP (versus 6000 cP of the blank) and viscosity storage at 4 °C for 24 h equal to 16860 cP (vs. 16250 cP of blank). A similar decrease was observed in the texture values of the samples relative to the blank. The exception was the alginate-inulin mixture whose gumminess (0.5 N versus 0.45 N of the blank), consistency (0.6 vs. 0.53 of the blank) and hardness (0.83 N versus 0.82 N of the blank) values were found to be higher than those of the blank sample, respectively. Based on the above, it appears that inulin, which has prebiotic properties, exhibits a synergistic effect with the probiotic culture and has a positive effect on the viability of the probiotic cultures and on the quality characteristics of the yoghurt. In contrast, oligofructose, while also having prebiotic properties, did not show a positive effect on both the bacterial load of the encapsulated product (3.6×10^8 cfu/g) and the textural characteristics and bacterial load of the yoghurt product (2.16×10^5 cfu/g). Also, it was found that the treatment of the inclusion bodies at 80 °C yielded better results in several test factors than the treatment at 121 °C. The differences in the values of the examined examined between the inclusion mixtures treated at 80 and 121 °C, respectively, lead to the conclusion that the different processing temperature resulted in the creation of a stronger three-dimensional calcium alginate matrix during the encapsulation process of the probiotic bacteria with the inclusion mixtures which were processed at 80 °C. This feature can be explained by the effect of the very high temperature on the polymeric chain of alginate and, by extension, its ability to create a three-dimensional matrix with the Ca^{2+} ions.

In the 2nd series of experiments, much lower levels of bacterial load were found in the encapsulation products and the encapsulation efficiency compared to the corresponding values obtained by the extrusion method. Among the samples processed by the emulsification method, the highest encapsulation efficiency (10%), as well as the higher bacterial load in the inclusion product (1.16×10^8), showed the encapsulation mixture of alginate-inulin without chitosan coating. Also, the total

fermentation time of the yoghurt samples was shown to be statistically affected, both by the coating of the chitosan inclusion products and by the type of encapsulation mixture used. In particular, all samples without chitosan coating showed a shorter fermentation time than the blank sample (325 min). This can be explained by the effect of the antimicrobial character of chitosan on the growth and metabolic activity of the conventional starter culture. The viscosities of all yoghurt samples after fermentation at 45 °C showed lower values than the blank yoghurt sample, while the viscosity values of the samples were higher when the encapsulated bacteria were coated with chitosan. In contrast, the viscosities of the yogurt samples after storage at 4 °C for 24 h showed no significant difference between them. Finally, the texture characteristics, namely the hardness and adherence of the yoghurt samples containing the emulsification products resulting from the emulsification technique, showed lower values than those of the blank sample. Furthermore, the gumminess of the samples was found to be significantly affected by chitosan coating of the inclusion products.

In conclusion, based on the results and the processing of the measurements obtained from the experiments carried out in the present study, it is concluded that the extrusion encapsulation technique can be considered an effective method of encapsulating probiotic bacteria as it leads to high levels of viability and at the same time in small losses during the process of confinement. On the other hand, while emulsification embedding yields much lower levels of viability of encapsulated bacteria and a correspondingly high rate of loss of microorganisms during the encapsulation process, it is advantageous over the extrusion technique as regards to the applicability of the process on an industrial scale. In addition, the appropriate selection of encapsulation agents in both methods plays an important role both in maintaining a high viability level of the encapsulated microorganisms and in achieving the desired taste and texture characteristics in the final yoghurt product.

2. Εισαγωγή

Η πιο συνήθης χρήση των προβιοτικών βακτηρίων στη βιομηχανία τροφίμων απαντάται σε γάλα που έχει υποστεί ζύμωση καθώς και σε διάφορα γαλακτοκομικά προϊόντα. Στην πραγματικότητα, τα γαλακτοκομικά προϊόντα είναι οι κυριότεροι φορείς προβιοτικών βακτηρίων που διατίθενται σήμερα για ευρεία κατανάλωση. Τα προβιοτικά μπορούν να οριστούν ως ζωντανά μικροβιακά συμπληρώματα τα οποία μπορούν να βελτιώσουν την ισορροπία του μικροβιακού φορτίου των μικροοργανισμών που απαντώνται στο γαστρεντερικό σύστημα (Fuller, 1992). Η επωφελής επίδραση των προβιοτικών αποδίδεται στην παραγωγή οξέων, στην ανταγωνιστική δράση τους με παθογόνους μικροοργανισμούς και στην ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος. Τα οφέλη των προβιοτικών περιλαμβάνουν τον έλεγχο των επιπέδων χοληστερόλης, την πρόληψη της εντερικής μόλυνσης από παθογόνους μικροοργανισμούς, τη βελτίωση της πέψης της λακτόζης σε άτομα που εμφανίζουν δυσανεξία στη λακτόζη και η αντικαρκινική δράση.

Τα υψηλά επίπεδα βιωσιμότητας και δραστηριότητας των προβιοτικών βακτηρίων, θεωρούνται απαραίτητα για τη βέλτιστη λειτουργικότητά τους. Επιπλέον, η ικανότητα των μικροοργανισμών να επιβιώνουν και να πολλαπλασιάζονται εντός του ξενιστή επηρεάζει έντονα τα προβιοτικά τους οφέλη. Τα βακτήρια που περιέχονται σε ένα προϊόν τροφίμου πρέπει να παραμένουν μεταβολικά σταθερά και δραστικά, και να είναι ικανά να επιβιώνουν κατά τη διέλευση μέσω του ανώτερου πεπτικού σωλήνα σε επαρκείς αριθμούς, προκειμένου να έχουν ευεργετικά αποτελέσματα στον οργανισμό του ξενιστή. Ένας ελάχιστος αριθμός προβιοτικών βακτηρίων, ή αλλιώς το «θεραπευτικό ελάχιστο», πρέπει να καταναλώνεται τακτικά, προκειμένου να είναι εμφανής η επίδραση των προβιοτικών μικροοργανισμών στους καταναλωτές. Επομένως, η επιβίωση των βακτηρίων κατά τη διάρκεια ζωής του προϊόντος μέχρι και την κατανάλωσή του, αποτελεί σημαντικό θέμα. Το προτεινόμενο ελάχιστο επίπεδο κατανάλωσης βακτηριακού φορτίου για τα προβιοτικά, σε ένα προϊόν γιαουρτιού είναι 10^6 cfu/g, ή αλλιώς η ημερήσια πρόσληψη θα πρέπει να είναι περίπου 10^8 cfu/g. Μελέτες έχουν δείξει ότι ορισμένα προβιοτικά στελέχη, ιδίως το *Bifidobacterium spp.*, δεν έχουν την ικανότητα να επιβιώσουν σε έντονα όξινες συνθήκες, όπως το γαστρεντερικό σύστημα του ανθρώπου.

Επιπρόσθετα, άλλες μελέτες έχουν αναφέρει χαμηλή βιωσιμότητα των προβιοτικών σε γαλακτοκομικά προϊόντα, όπως το γιαούρτι και διάφορα κατεψυγμένα γαλακτοκομικά επιδόρπια, λόγω της υψηλής συγκέντρωσης γαλακτικού οξέος και οξικού οξέος, των χαμηλών τιμών pH, της παρουσίας υπεροξειδίου του υδρογόνου και της παρουσίας οξυγόνου. Μέθοδοι για την προστασία των προβιοτικών βακτηρίων, συμπεριλαμβανομένης της επιλογής προβιοτικών στελεχών ανθεκτικών σε οξέα, τον έλεγχο του επιπέδου οξύτητας των γαλακτοκομικών προϊόντων και την προσθήκη κυστεΐνης ή άλλης ουσίας που μπορεί να δεσμεύσει το οξυγόνο όπως το ασκορβικό οξύ έχουν προταθεί από διάφορες μελέτες. Η τεχνολογία του εγκλεισμού έχει διερευνηθεί με σκοπό τη βελτίωση της βιωσιμότητας των μικροοργανισμών τόσο στα γαλακτοκομικά προϊόντα όσο και στο γαστρεντερικό σύστημα. Ο εγκλεισμός είναι μία φυσικοχημική ή μηχανική διαδικασία στην οποία ένα δραστικό υλικό όπως βιταμίνες ή προβιοτικοί μικροοργανισμοί, επικαλύπτονται από ένα στρώμα άλλου υλικού ή εγκλειστικού μέσου, το οποίο παρέχει προστασία, ελεγχόμενη αποδέσμευση της δραστικής ουσίας, ενώ επιτρέπει την ευκολότερη επεξεργασία των πρώτων υλών. Η επιλογή κατάλληλων εγκλειστικών μέσων εξαρτάται συνήθως από τις επιθυμητές λειτουργικές ιδιότητες των μικροσφαιριδίων και τη μέθοδο εγκλεισμού που χρησιμοποιείται. Η παραγωγή μικροσφαιριδίων είναι εφικτή με μεθόδους εγκλεισμού μεταξύ άλλων, όπως η ξήρανση με ψεκασμό, η εξώθηση και η γαλακτωματοποίηση. Έτσι, μπορεί να πραγματοποιηθεί η ενσωμάτωση των εγκλεισμένων πλέον βακτηρίων σε τρόφιμα (Chen, 2007).

3. Γάλα - Γαλακτοκομικά Προϊόντα - Παραγωγική Διαδικασία

3.1 Γάλα - Σύσταση - Ιδιότητες

Το γάλα αποτελεί το έκκριμα των μαστικών αδένων των θηλαστικών, του οποίου η πρωταρχική και φυσική λειτουργία είναι η διατροφή των νεογνών (Walstra et al, 2006). Ο Ελληνικός Κώδικας Τροφίμων και Ποτών ορίζει ως γάλα το «απηλλαγμένου πρωτογάλακτος προϊόν της ολοσχερούς, άνευ διακοπής αμέλξεως υγιώς έχοντος γαλακτοφόρου ζώου, διαβιούντος και διατρεφομένου υπό υγιεινούς όρους και μη ευρισκομένου εις κατάστασιν υπερκοπώσεως» (Κ.Τ.Π., 2009). Σύμφωνα με τους οργανισμούς FAO/WHO (2013) «γάλα είναι το φυσιολογικό έκκριμα του μαστού που λαμβάνεται από μία ή δύο αμέλξεις, χωρίς να προστεθεί ή να αφαιρεθεί τίποτε». Το γάλα αγελάδων, βουβαλιών, αιγών και προβάτων καταναλώνεται από τους ανθρώπους, είτε ως έχει, είτε ως γαλακτοκομικό προϊόν, αφού υποστεί κάποιου είδους επεξεργασία. Τέλος, πρωτόγαλα ονομάζεται το έκκριμα του μαστού των γαλακτοπαραγωγών ζώων κατά τις πρώτες 5-6 ημέρες μετά τον τοκετό (Μάντης, 2000).

3.1.1 Σύσταση του γάλακτος

Τα συστατικά του γάλακτος καθώς και το ποσοστό τους ποικίλουν ανάλογα με την προέλευσή του (το είδος του γαλακτοφόρου ζώου) (Saxelin, 2003). Τα κύρια χημικά συστατικά ή ομάδες χημικών συστατικών είναι εκείνα που υπάρχουν σε μεγαλύτερες ποσότητες μέσα στο γάλα. Παρόλα αυτά, η ποσότητα δεν παίζει πάντα σημαντικό ρόλο στη σπουδαιότητα ενός συστατικού για τον ανθρώπινο οργανισμό. Για παράδειγμα, οι βιταμίνες είναι σημαντικές όσον αφορά τη θρεπτική τους αξία, τα ένζυμα είναι καταλύτες αντιδράσεων, ενώ μερικά δευτερεύοντα συστατικά τα οποία δεν απαντώνται σε μεγάλες ποσότητες, συμβάλλουν σημαντικά στη γεύση του γάλακτος (Roginski, 2003). Η χημική σύνθεση του γάλακτος καθορίζει σε μεγάλο βαθμό τη θρεπτική αξία του, τα περιθώρια ανάπτυξης μικροοργανισμών σε αυτό, τη γεύση του, καθώς και τις χημικές αντιδράσεις που μπορεί να λάβουν χώρα οδηγώντας στην παραγωγή διαφόρων αρνητικών οσμών στο γάλα (Walstra et al, 2006). Στον πίνακα 3.1, παρουσιάζονται τα κύρια συστατικά τυπικού γάλακτος, το οποίο προέρχεται από θηλαστικά πεδινών φυλών, καθώς και το αντίστοιχο % w/w ποσοστό

τους. Να σημειωθεί ότι η συνολική περιεκτικότητα του γάλακτος σε όλες τις ουσίες εκτός του νερού καλείται περιεκτικότητα ξηρής μάζας. Μία επιπρόσθετη διάκριση είναι μεταξύ των λιπαρών και των μη λιπαρών στερεών καθώς και η περιεκτικότητά τους επί της ξηρής μάζας.

Πίνακας 3.1 Συστατικά γάλακτος (Walstra et al, 2006)

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	4.0	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

Νερό

Το νερό αποτελεί το μέσο στο οποίο είναι διαλυμένα τα διάφορα συστατικά του γάλακτος (ολικά στερεά). Μικρές ποσότητες νερού ενυδατώνουν ή δεσμεύονται χημικά από τη λακτόζη, τα άλατα, αλλά και τις πρωτεΐνες (Kailasapathy, 2008).

Λακτόζη

Η λακτόζη αποτελεί χαρακτηριστικό υδατάνθρακα του γάλακτος. Είναι δισακχαρίτης που αποτελείται από γλυκόζη και γαλακτόζη. Αρκετοί ανθρώπινοι οργανισμοί έχουν δυσανεξία στη λακτόζη, δηλαδή αδυνατούν να την μεταβολίσουν, λόγω έλλειψης του

ενζύμου λακτάση. Η λακτόζη μπορεί να διαχωριστεί από το γάλα ή, στη βιομηχανική πρακτική, από τον ορό γάλακτος, μέσω κρυστάλλωσης. Η κρυσταλλική λακτόζη παράγεται σε μεγάλες ποσότητες και χρησιμοποιείται κυρίως σε τρόφιμα και φαρμακευτικά προϊόντα - σχεδόν όλα τα χάπια περιέχουν λακτόζη ως υλικό πλήρωσης, αλλά και ως πρώτη ύλη για την παραγωγή διαφόρων χημικών ή ενζυμικών παραγώγων, όπως λακτιτόλη, λακτουλόζη και ολιγοσακχαρίτες. Ένα διάλυμα λακτόζης είναι περίπου 0,3 φορές πιο γλυκό από ένα διάλυμα σακχαρόζης της ίδιας συγκέντρωσης.

Λιπίδια

Τα λιπίδια αποτελούν εστέρες λιπαρών οξέων και συναφών συστατικών και είναι διαλυτά σε μη πολικούς οργανικούς διαλύτες και αδιάλυτα στο νερό. Αποτελούνται κυρίως από τριγλυκερίδια. Στην κατηγορία των λιπιδίων συμπεριλαμβάνονται τα φωσφολιπίδια, η χοληστερόλη, τα ελεύθερα λιπαρά οξέα, τα μονογλυκερίδια και τα διγλυκερίδια (Walstra et al, 2006). Τα λιπαρά στο γάλα εμφανίζονται σε σφαιρική μορφή με διάμετρο 0,1-20 μm. Τα λιπαρά του γάλακτος παίζουν σπουδαίο ρόλο όσον αφορά την εμφάνιση, τη γεύση, το άρωμα και τη σταθερότητα των γαλακτοκομικών προϊόντων. Θεωρούνται μοναδικά, καθώς αποτελούνται από ένα σχετικά υψηλό αριθμό κορεσμένων λιπαρών μικρής και μεσαίας αλυσίδας. Η σύσταση των λιπαρών του γάλακτος εξαρτάται από παράγοντες όπως η φυλή του γαλακτοφόρου ζώου, η γεωγραφική περιοχή, η προσβολή του μαστού από διάφορες λοιμώξεις, καθώς και η διατροφή και το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί μεταξύ των διαδοχικών αμέλξεων. Γενικά, στο πλήρες γάλα το 57% των λιπαρών είναι κορεσμένα, το 25% είναι μονοακόρεστα, ενώ το 6% είναι πολυακόρεστα. Το κυριότερο ποσοστό των κορεσμένων αποτελείται από παλμιτικό, στεατικό και μυριστικό οξύ (Champagne et al., 2011; Rathore, 2010).

Πρωτεΐνες

Οι πρωτεΐνες αποτελούν τα σημαντικότερα συστατικά του γάλακτος, καθώς παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο σε πολλά χαρακτηριστικά των περισσότερων γαλακτοκομικών προϊόντων. Διαχωρίζονται σε δύο διακριτούς τύπους: τις πρωτεΐνες ορού γάλακτος και τις καζεΐνες (Kailasapathy, 2008).

Η καζεΐνη ορίζεται ως η πρωτεΐνη που καταβυθίζεται στο γάλα σε pH περίπου 4.6 και κατά συνέπεια δεν είναι διαλυτή στο ισοηλεκτρικό της σημείο (pI). Η καζεΐνη δεν

έχει συγκεκριμένη δομή. Απαντάται στο γάλα σε μεγάλα συσσωματώματα, τα μικύλια καζεΐνης, τα οποία περιέχουν, επίσης, κολλοειδές φωσφορικό ασβέστιο το οποίο διαλύεται κατά την οξίνιση. Στην πραγματικότητα οι καζεΐνες αποτελούν ένα μίγμα τεσσάρων πρωτεϊνών: α₁-, α₂-, β-, και κ-καζεΐνη. Επίσης, 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 στη δομή της.

Σε αντίθεση με τις καζεΐνες, οι πρωτεΐνες του ορού γάλακτος είναι υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες. Η β-λακτοσφαιρίνη, που είναι η κυριότερη πρωτεΐνη στον ορό γάλακτος, υπάρχει ως διμερές στο γάλα. Το διμερές διασπάται σε μονομερή σε pH < 3.5. Σε τιμές pH 3.7-6.5, η πρωτεΐνη συσσωματώνεται για να σχηματίσει ένα οκταμερές. Αυτή η αντίδραση είναι αναστρέψιμη. Σε αντίθεση με τη θερμικά σταθερή καζεΐνη, οι πρωτεΐνες ορού γάλακτος μετουσιώνονται εύκολα με θερμικές κατεργασίες πάνω από τους 70 °C. Ως αποτέλεσμα τέτοιων θερμικών επεξεργασιών, τα μετουσιωμένα συσσωματώματα των πρωτεϊνών του ορού γάλακτος πήζουν ή, ανάλογα με τη συγκέντρωσή τους και τις περιβαλλοντικές συνθήκες όπως το pH και η ιοντική ισχύς, σχηματίζουν πρωτεϊνικό πήγμα (Martín, 2015).

Επιπροσθέτως, το γάλα περιέχει πολλές άλλες δευτερεύουσες πρωτεΐνες καθώς και ένα ευρύ φάσμα ενζύμων (Walstra et al, 2006). Στον πίνακα 3.2 παρουσιάζονται τα διαφορετικά είδη πρωτεϊνών που βρίσκονται στο γάλα.

Πίνακας 3.2 Πρωτεΐνες γάλακτος (Walstra et al, 2006)

Πρωτεΐνη	mmol/m ³ Γάλακτος	g/kg Γάλακτος	g/100g Πρωτεΐνης	Μοριακή μάζα
Καζεΐνη	1120	26	78.3	-
α _{s1} -	450	10.7	32	23600
α _{s2} -	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	2.4	-
IgG1, IgG2	-	0.65	1.8	150000
IgA	-	0.14	0.4	385000
Gm	-	0.05	0.2	900000
Άλλες	-	0.9	2.7	-
Λακτοσφαιρίνη	1	0.1	-	86000
Τρανσφερίνη	1	0.01	-	76000
Πρωτεΐνες Μεμβράνης	-	0.7	2	-
Ένζυμα	-	-	-	-

Ένζυμα

Το γάλα περιέχει πολλά ένζυμα, μερικά από τα οποία (γαλακτοϋπεροξειδάση, οξειδάση ξανθίνης, πρωτεϊνάσες, λιπάση, λυσοζύμη, φωσφατάση) διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ποιότητας του γάλακτος ή των γαλακτοκομικών προϊόντων. Ορισμένα (π.χ. φωσφατάση, οξειδάση ξανθίνης) είναι χρήσιμοι δείκτες της ορθής πρακτικής υγιεινής της επεξεργασίας του γάλακτος. Ωστόσο, δεν φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο ως θρεπτικά συστατικά.

Βιταμίνες

Στο γάλα εμπεριέχονται βιταμίνες, τόσο λιποδιαλυτές, όσο και υδατοδιαλυτές. Η κυριότερη λιποδιαλυτή βιταμίνη είναι η βιταμίνη Α, η οποία βρίσκεται κυρίως σε μορφή εστέρα του παλμιτικού οξέος στο γάλα. Ακόμα, στο γάλα εμπεριέχονται σημαντικές ποσότητες βιταμίνης D, και συγκεκριμένα ως μίγμα βιταμινών D₂ και D₃, βιταμίνης E, η οποία απαντάται ως α-τοκοφερόλη, καθώς και βιταμίνης K η οποία απαντάται σε πολύ μικρές ποσότητες. Όσον αφορά τις υδατοδιαλυτές βιταμίνες που βρίσκονται στο γάλα, υπάρχουν αυτές του συμπλέγματος Β, κυρίως στο γάλα των μηρυκαστικών (Kailasapathy, 2008).

Ανόργανα συστατικά

Τα κυριότερα ανόργανα συστατικά που απαντώνται στο γάλα είναι ενώσεις του Κ, Na, Ca, Mg, Cl καθώς και φωσφορικά άλατα. Τα οργανικά οξέα, επίσης, απαντώνται σε μεγάλο βαθμό είτε ως ιόντα είτε ως άλατα, με κυριότερο εξ αυτών το κιτρικό οξύ.

3.1.2 Ιδιότητες – Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά γάλακτος

Σύμφωνα με τον Κώδικα Τροφίμων και Ποτών, για τα διάφορα είδη γάλακτος ορίζονται ανώτατα και κατώτατα όρια των φυσικοχημικών τους σταθερών (πίνακας 3.3).

Πίνακας 3.3: Όρια φυσικοχημικών σταθερών διαφόρων ειδών γάλακτος (Κώδικας Τροφίμων και Ποτών, 2009)

Προέλευση	Ειδικό βάρος στους 15 °C (g/L)	Λίπος % (ελάχιστο)	Σ.Υ.Α.Λ. % (ελάχιστο)
Αγελάδας	1,028	3,5	8,5
Κατσίκας	1,032	4,0	9,0
Προβάτου	1,035	6,0	10,20
Βουβάλου	1,033	6,0	9,70
Ανάμικτο προβάτου/κατσίκας	1,033	5,0	9,60

Ως Στερεό Υπόλειμμα Άνευ Λίπους (Σ.Υ.Α.Λ.) νοείται αυτό που προκύπτει από την εφαρμογή του τύπου του Fleiselman, με βάση τις τιμές του πίνακα 3.3 για το ειδικό βάρος και το λίπος. Η σχέση που προκύπτει (3.1) παρουσιάζεται παρακάτω.

$$\Sigma.Υ.Α.Λ. = 1,2Λ + 2,665 \frac{100(E.B.-1)}{E.B.} - Λ \quad (3.1)$$

Όπου: Λ= λίπος % και E.B.= ειδικό βάρος στους 15 °C (Κώδικας Τροφίμων και Ποτών, 2009).

Ηλεκτρική Αγωγιμότητα - Διηλεκτρική Σταθερά γάλακτος

Το γάλα είναι καλός διαλύτης για πολλές ενώσεις, συμπεριλαμβανομένων των περισσότερων αλάτων, σακχάρων και πρωτεϊνών. Αυτό οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στη μεγάλη σχετική διηλεκτρική σταθερά του, η οποία είναι σχεδόν ίδια με εκείνη του νερού (περίπου 80 στους 20°C). Η ηλεκτρική αγωγιμότητα του γάλακτος είναι περίπου 0,5 A * V⁻¹ m⁻¹ (μεταβολή ~ 0,4 έως 0,55) στους 25 °C. Αυτό αντιστοιχεί κατά προσέγγιση στην αγωγιμότητα υδατικού διαλύματος NaCl 0,25% (w/w) (Walstra, 2006).

Σημείο Πήξης - Ζέσης

Το σημείο πήξης του γάλακτος ($-0,54^{\circ}\text{C}$) είναι χαμηλότερο από το αντίστοιχο του καθαρού νερού, λόγω των διαλυμένων συστατικών του. Αυτή η ιδιότητα μετράται για να διερευνηθεί εάν το γάλα έχει αραιωθεί με νερό, και χρησιμοποιείται ως νομοθετική προδιαγραφή. Ο κυριότερος παράγοντας που ευθύνεται για την ταπείνωση του σημείου πήξης του γάλακτος είναι η παρουσία λακτόζης και ιόντων χλωρίου. Το σημείο ζέσης του γάλακτος είναι ελαφρώς υψηλότερο από αυτό του καθαρού νερού ($100,17^{\circ}\text{C}$), επίσης λόγω των διαλυμένων σε αυτό συστατικών του (Kailasapathy, 2008).

Δείκτης Διάθλασης

Σε θερμοκρασία 20°C και λαμβάνοντας μέτρηση σε μήκος κύματος φωτός $589,3\text{ nm}$ ο δείκτης διάθλασης του αγελαδινού γάλακτος κυμαίνεται μεταξύ των τιμών $1,3440$ και $1,3485$ (Chandan, 2006).

Οξύτητα - pH

Η οξύτητα είναι μία από τις σημαντικότερες ποιοτικές παραμέτρους του γάλακτος, όσον αφορά την ευχάριστη γεύση, την αποδοχή των καταναλωτών και τη διάρκεια ζωής του προϊόντος. Λόγω της παρουσίας καζεΐνης, φωσφορικών οξέων και κιτρικών αλάτων, το γάλα εμφανίζει μία ελαφρά φυσική οξύτητα. Η οξύτητα αυτή ποικίλει ανάλογα με το είδος και τη φυλή του γαλακτοφόρου ζώου, το στάδιο της άμελης, τη διατροφή και τη φυσική κατάσταση του μαστού του ζώου. Μεγάλη συγκέντρωση μη λιπαρών συστατικών στο γάλα, σημαίνει και μεγάλη οξύτητα, και αντιστρόφως. Η φυσική οξύτητα του αγελαδινού γάλακτος κυμαίνεται από $0,12\%$ έως $0,18\%$. Κατά την επεξεργασία του γάλακτος με σκοπό την παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων όπως το γιαούρτι ή το τυρί, η πραγματική πλέον οξύτητα του γάλακτος οφείλεται στο γαλακτικό οξύ που σχηματίζεται λόγω της βακτηριακής δράσης στη λακτόζη. Η ανάπτυξη γαλακτικού οξέος κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, υπό ελεγχόμενες συνθήκες, είναι απαραίτητη για το σχηματισμό πηγματος. Έτσι, λοιπόν, προκύπτει η συνολική οξύτητα του γάλακτος ως το άθροισμα της φυσικής και πραγματικής οξύτητας. Παρόλα αυτά, η ανάπτυξη της οξύτητας μετά το πέρας της ζύμωσης δεν είναι επιθυμητή, καθώς οδηγεί σε απώλεια βάρους, δομικές ανωμαλίες και υπερβολική οξύτητα, που δυσχεραίνει την αντίληψη των αρωματικών ενώσεων από τους καταναλωτές. Ως εκ τούτου, είναι επιθυμητό ο έλεγχος της οξύτητας να είναι

ακριβής και αποτελεσματικός, ώστε η ποιότητα του προϊόντος να είναι προβλέψιμη. Για αυτόν το λόγο, η Διεθνής Ομοσπονδία Γαλακτοκομικών Προϊόντων (IDF) συνιστά περιεκτικότητα σε γαλακτικό οξύ στα τελικά προϊόντα τουλάχιστον ίση με 0,7% w/v. Όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση των στερεών του ορού, τόσο μεγαλύτερη είναι και η ογκομετρούμενη οξύτητα. Αντίθετα το pH, είναι ανεξάρτητο της συγκέντρωσης των στερεών του ορού. Το pH του φρέσκου γάλακτος κυμαίνεται μεταξύ 6,6-6,8. Υψηλότερες τιμές pH υποδεικνύουν ότι το ζώο πάσχει από μαστίτιδα, ενώ χαμηλότερες τιμές υποδηλώνουν ότι υπάρχει βακτηριακή δράση (Kirmaci-Özer, 2016; Chandan, 2006).

Πυκνότητα

Η πυκνότητα του γάλακτος είναι μία πολύ χρήσιμη φυσική του ιδιότητα, καθώς επιτρέπει τη μετατροπή των σταθμικών μετρήσεων σε ογκομετρικές. Η μετατροπή αυτή είναι σημαντική, αν ληφθεί υπόψη το γεγονός ότι οι βιομηχανίες αγοράζουν το φυσικό γάλα από τους παραγωγούς με βάση τη μάζα του, ενώ το διαθέτουν προς πώληση σε περιέκτες με βάση τον όγκο του. Η πυκνότητα του γάλακτος στους 20 °C βρίσκεται μεταξύ των τιμών 1,027 και 1,033 g/cm³, ενώ η μέση τιμή του είναι 1,030 g/cm³ (Chandan, 2006).

Ιξώδες

Το ιξώδες στο γάλα και στα γαλακτοκομικά μετράται σε cP. Οι παράγοντες από τους οποίους εξαρτάται είναι η θερμοκρασία, τα λιπαρά και τα καζεϊνικά μικκύλια που υπάρχουν στο γάλα. Το ιξώδες του πλήρους γάλακτος στους 20 °C είναι 1,9 cP, ενώ στο αποβουτυρωμένο είναι 1,5 cP. Το μεγαλύτερο ρόλο σε αυτήν την ιδιότητα παίζουν τα καζεϊνικά μικκύλια. Το ιξώδες μεταβάλλεται με τις αλλαγές στη φυσική κατάσταση των λιπαρών και με το βαθμό ενυδάτωσης των πρωτεϊνών (Kailasapathy, 2008).

Οπτικές Ιδιότητες

Το γάλα είναι θολό, αδιαφανές υγρό λευκού χρώματος. Αυτό το χρώμα οφείλεται στη σκέδαση του φωτός που προκαλείται από τη διεσπαρμένη φάση, η οποία περιέχει τα λιποσφαίρια, τα καζεϊνικά μικκύλια και το φωσφορικό ασβέστιο. Ανάλογα με τη φυλή του γαλακτοφόρου ζώου από το οποίο λαμβάνεται, το γάλα μπορεί να περιέχει β-καροτένιο, με συνέπεια το χρώμα του να γίνεται ελαφρά κίτρινο αντί για λευκό. Επίσης, η εκτεταμένη θερμική επεξεργασία του γάλακτος του προσδίδει ένα ελαφρά

καφετί χρώμα, ως αποτέλεσμα αντιδράσεων Maillard μεταξύ της λακτόζης και των πρωτεϊνών του (Walstra, 2006; Chandan, 2006).

Γεύση και Άρωμα

Οι κύριες μη πτητικές ενώσεις που προσδίδουν γεύση στο φρέσκο γάλα είναι η λακτόζη και τα διαλυμένα άλατα, τα οποία προσδίδουν μία γλυκιά και αλμυρή γεύση, αντίστοιχα. Η γλυκύτητα που προκαλείται από τη λακτόζη μειώνεται από τα διαλυμένα άλατα και από τη μυκηλιακή καζεΐνη στο γάλα. Ορισμένες πτητικές ενώσεις, ειδικά το διμεθυλοσουλφίδιο, καθώς και το διακετύλιο, η 2-μεθυλοβουτανόλη και ορισμένες αλδεΐδες είναι υπεύθυνες για τη χαρακτηριστική γεύση του νωπού φρέσκου γάλακτος. Η γεύση του γάλακτος, ειδικά όταν είναι ψυχρό, θεωρείται γενικώς ήπια, και για αυτό το λόγο οποιαδήποτε ελαττώματα ή αποκλίσεις από τη συνηθισμένη γεύση του παρατηρούνται σχετικά εύκολα. Το νωπό γάλα μπορεί να περιέχει αρωματικές ουσίες που προέρχονται από τη διατροφή των αγελάδων. Οι αρωματικές ενώσεις που είναι υπεύθυνες για τυχόν ελαττώματα στη γεύση, εισέρχονται στο γάλα μέσω της αγελάδας ή μέσω του αέρα, και μερικές φορές μέσω και των δύο οδών. Παραδείγματα είναι οι γεύσεις τριφυλλιού και σκόρδου. Εάν, για παράδειγμα, η αγελάδα πάσχει από κέτωση, επειδή η τροφή της είναι ανεπαρκής σε πρωτεΐνες, στο γάλα υπάρχουν αυξημένες συγκεντρώσεις κετονών (ιδιαίτερα ακετόνης) (Chandan, 2006).

3.2 Γαλακτοκομικά Προϊόντα - Γιαούρτι

3.2.1 Ζυμωμένα προϊόντα - Είδη γαλακτοκομικών

Το υγρό γάλα μπορεί να παραδοθεί στον καταναλωτή είτε ανεπεξέργαστο, δηλαδή χωρίς καμία επεξεργασία (νωπό γάλα), είτε μετά από διάφορες θερμικές επεξεργασίες: παστεριωμένο ή αποστειρωμένο και συσκευασμένο. Οι ιδιότητες του υγρού γάλακτος που απαιτούν τη μεγαλύτερη προσοχή είναι η ασφάλεια του καταναλωτή, η διάρκεια ζωής και η γεύση. Η ασφάλεια είναι, φυσικά, απαραίτητη και η κατανάλωση νωπού γάλακτος δεν μπορεί να θεωρηθεί ασφαλής. Κατά συνέπεια, η παράδοση νωπού γάλακτος απαγορεύεται ή περιορίζεται σοβαρά σε πολλές χώρες. Ομοίως, η παράδοση γάλακτος που δεν είναι συσκευασμένο μπορεί να συνεπάγεται κινδύνους για την υγεία.

Εκτός από το υγρό γάλα, ο καταναλωτής μπορεί να καταναλώσει και διάφορα γαλακτοκομικά προϊόντα τα οποία προκύπτουν από αυτό, είτε με διάφορες μεθόδους επεξεργασίας, όπως η φυγοκέντρωση για το διαχωρισμό των λιπαρών από το γάλα και την παραγωγή κρέμας ή άλλων προϊόντων, είτε έπειτα από την ζύμωση του γάλακτος με τη βοήθεια συμβατικών βακτηριακών καλλιεργειών (γιαούρτι). Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, η λακτόζη μετατρέπεται σε γαλακτικό οξύ με την επίδραση των βακτηριακών καλλιεργειών, των οποίων ο πληθυσμός αυξάνει κατά 100 έως 10.000 φορές έως τελική συγκέντρωση περίπου 10^9 μικροοργανισμούς/mL. Εκτός του γαλακτικού οξέος παράγονται, επίσης, διοξείδιο του άνθρακα, οξικό οξύ, διακετύλιο, ακεταλδεΐδη και διάφορες άλλες ουσίες, οι οποίες προσδίδουν τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά στο τελικό ζυμωμένο προϊόν (Farnworth, 2008).

Τα γάλατα που έχουν υποστεί ζύμωση ταξινομούνται σε τέσσερις διαφορετικούς τύπους: (1) προϊόντα γαλακτικής ζύμωσης στα οποία χρησιμοποιούνται στελέχη μεσόφιλων βακτηρίων γαλακτικού οξέος, (2) προϊόντα γαλακτικής ζύμωσης με θερμοφιλά βακτήρια γαλακτικού οξέος, (3) προϊόντα που λαμβάνονται με ζύμωση αλκοόλης-γαλακτικού, που περιλαμβάνει ζύμες και βακτήρια γαλακτικού οξέος και (4) προϊόντα όπου, εκτός από τον τύπο ζύμωσης (1) ή (2), εμφανίζεται ανάπτυξη μούχλας. Ορισμένα παραδείγματα είναι η κρέμα γάλακτος, το γιαούρτι, το kefir, και το Φινλαδικό villi, αντίστοιχα (Walstra et al, 2006). Παρακάτω θα γίνει εκτενέστερη ανάλυση των ιδιοτήτων και της παραγωγικής διαδικασίας του γιαουρτιού, καθώς, είναι το γαλακτοκομικό προϊόν που εστιάζει η παρούσα διπλωματική εργασία.

3.2.2 Γιαούρτι και Είδη Γιαουρτιού

Το γιαούρτι είναι ίσως το πιο δημοφιλές προϊόν ζυμωμένου γάλακτος. Η λέξη προέρχεται από την τουρκική λέξη: yoğurt και σχετίζεται συνήθως με το ρήμα yoğurmak που σημαίνει "να ζυμώνεται" ή "να πήξει". Παράγεται σε ποικίλες συνθέσεις (περιεκτικότητα σε λίπος και ξηρή ουσία), είτε σε απλή, είτε σε πιο σύνθετες με προσθήκη ουσιών όπως φρούτα, ζάχαρη και παράγοντες πηκτωματοποίησης. Το βασικό μίγμα μικροβιακών καλλιεργειών που λαμβάνουν μέρος στην ζύμωση αποτελείται από τα θερμοφιλά βακτήρια *Streptococcus thermophilus* και *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. Για να αναπτυχθεί μία ικανοποιητική γεύση στο τελικό προϊόν, πρέπει να υπάρχουν περίπου ίσοι αριθμοί

αμφοτέρων των ειδών. Αξίζει να σημειωθεί ότι καθένα εξ αυτών έχει ενθαρρυντική επίδραση στην ανάπτυξη του άλλου (Walstra et al, 2006).

Σύμφωνα με τον Ελληνικό Κώδικα Τροφίμων και Ποτών (2009), και συγκεκριμένα βάσει του άρθρου 82 αυτού, «γιαούρτι (πλήρες ή κατά περίπτωση, ημι-αποβουτυρωμένο)...(όνομα ζώου)» χαρακτηρίζεται το προϊόν, το οποίο προκύπτει μετά από πήξη αποκλειστικά και μόνο νοπού γάλακτος της αντίστοιχης προς την ονομασία φύσης και προέλευσης, υπό την επίδραση μικροβιακής καλλιέργειας για την ζύμωση. Το γιαούρτι θα πρέπει να περιέχει λίπος και στερεό υπόλειμμα άνευ λίπους (Σ.Υ.Α.Λ.) σε ποσοστό ανώτερο κατά 10% τουλάχιστον από τα όρια που καθορίζονται στο άρθρο 80 (παράγραφος 3) των αντίστοιχων ειδών γάλακτος από τα οποία παρασκευάστηκε. Εκτός από τα είδη γάλακτος που περιλαμβάνονται στο άρθρο 80 (παράγραφος 3), είναι επιτρεπτή η παρασκευή πλήρους γιαουρτιού από μίγμα ίσων μερών νοπού γάλακτος αγελάδας και βουβάλου ή προβάτου» (Κώδικας Τροφίμων και Ποτών, 2009).

Γιαούρτι και παρόμοια προϊόντα γιαουρτιού παρασκευάζονται ευρέως στη μεσογειακή περιοχή, την Ασία, την Αφρική και την κεντρική Ευρώπη. Είναι, λοιπόν, λογικό να υπάρχει μεγάλη ποικιλία γιαουρτιών, τα οποία διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τη σύσταση και τη γεύση τους. Οι πιο συνήθεις τύποι γιαουρτιού είναι:

- Γιαούρτι τύπου σετ, του οποίου η ζύμωση και ψύξη πραγματοποιείται εντός της συσκευασίας του,
- Αναμεμιγμένου τύπου (stirred), στο οποίο η επώαση και η ψύξη πραγματοποιούνται πριν τη συσκευασία,
- Στραγγιστό ή συμπυκνωμένο, στο οποίο η επώαση πραγματοποιείται σε ζυμωτήρα, ενώ έπειτα πραγματοποιείται συμπύκνωση και ψύξη προτού να συσκευαστεί,
- Πόσιμο γιαούρτι, το οποίο είναι παρόμοιο με το αναμεμιγμένου τύπου, με τη διαφορά ότι το τελικό πήγμα διαρρηγνύεται σε ζυμωτήρα, με αποτέλεσμα τη μείωση του ιξώδους του και έπειτα τη συσκευασία του,
- Παγωμένο γιαούρτι, το οποίο επωάζεται σε ζυμωτήρα και έπειτα καταψύχεται.

3.2.3 Σύσταση του Γιαουρτιού

Ανεξαρτήτως της προέλευσης του γάλακτος που χρησιμοποιείται ως πρώτη ύλη για το γιαούρτι, τα κύρια συστατικά είναι ίδια. Αυτά είναι τα λιπαρά, οι πρωτεΐνες, τα σάκχαρα και τα ανόργανα άλατα. Ως επί το πλείστον, στη βιομηχανία, χρησιμοποιείται αγελαδινό γάλα ως πρώτη ύλη για την παραγωγή γιαουρτιού. Όπως θα αναφερθεί και παρακάτω, στην παραγωγική διαδικασία, μπορεί να χρησιμοποιηθεί πλήρες, αποβουτυρωμένο ή μερικώς αποβουτυρωμένο γάλα, ή ακόμα και κρέμα γάλακτος για την τυποποίηση των λιπαρών του τελικού παραγόμενου γιαουρτιού. Εκτός, από τα κύρια συστατικά, το γιαούρτι μπορεί να εμπλουτιστεί με πρόσθετα συστατικά, όπως:

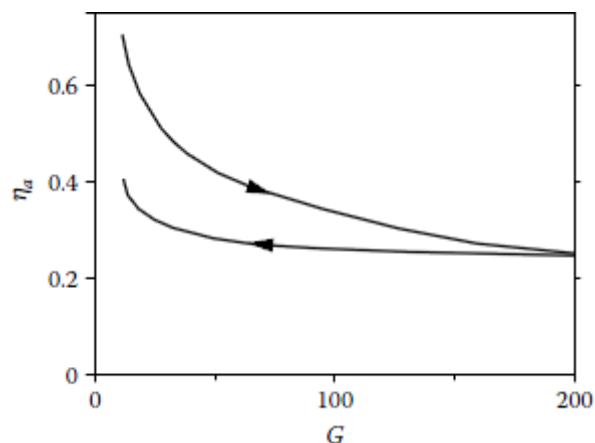
- Βιταμίνη Α, η ποσότητα της οποίας δεν θα πρέπει να ξεπερνά τα 2000 IU (International Units)/ 946mL
- Βιταμίνη D, η ποσότητα της οποίας δεν θα πρέπει να ξεπερνά τα 400 IU/946mL
- Γλυκαντικές ουσίες, όπως ζάχαρη, ιμβερτοσάκχαρο, ακατέργαστη ζάχαρη, μελάσα, σιρόπι καλαμποκιού υψηλής περιεκτικότητας σε φρουκτόζη, μαλτόζη, μέλι, φρούτα και άλλα.
- Διάφοροι σταθεροποιητές και άλλα συστατικά για βελτίωση της γεύσης, του αρώματος και του χρώματος.

3.2.4 Δομή και Ιδιότητες Γιαουρτιού

Η φυσική δομή του γιαουρτιού είναι ένα δίκτυο συσσωματωμένων σωματιδίων καζεΐνης επί του οποίου, μέρος των πρωτεϊνών του ορού έχει καταβυθιστεί λόγω της θερμικής μετουσίωσής τους. Μέσα σε αυτό το δίκτυο περικλείονται σφαιρίδια λίπους και ορός γάλακτος. Οι μεγαλύτεροι πόροι του δικτύου είναι της τάξης των 10 μm. Η ύπαρξη ενός συνεχούς δικτύου υποδηλώνει ότι το γιαούρτι είναι ένα πήκτωμα, ή ένα ιξωδοελαστικό υλικό που χαρακτηρίζεται από αρκετά μικρή τάση διαρροής (δηλαδή η ελάχιστη τάση που απαιτείται για μόνιμη παραμόρφωση του πηγματος, περίπου 100 Pa). Το γιαούρτι τύπου σεν και το αναμεμιγμένο γιαούρτι έχουν σημαντικές διαφορές στην υφή (Walstra et al, 2006). Ακολουθεί, η ανάλυση ορισμένων σημαντικών φυσικών ιδιοτήτων του γιαουρτιού.

Ιξώδες Αναμεμιγμένου Γιαουρτιού

Το αναμεμιγμένο γιαούρτι πρέπει να είναι λείο και αρκετά παχύρευστο. Ένα υψηλής ποιότητας προϊόν θα πρέπει να έχει ινώδη μορφή καθώς ρέει, και να σχηματίζει μία λεπτή γραμμή. Ένας τρόπος προσδιορισμού του ιξώδους είναι με τη χρήση ενός κύπελλου Ford. Το κύπελλο Ford έχει ένα κωνικό κάτω άκρο, στο οποίο αφήνεται να ρέει το γιαούρτι. Το ιξώδες μετράται με βάση το χρόνο που απαιτείται για να βυθιστεί το κύπελλο Ford. Επίσης, το ιξώδες εξαρτάται και από το ρυθμό διάτμησης του προϊόντος. Αν αρχικά εφαρμοστεί υψηλός ρυθμός διάτμησης και στη συνέχεια χαμηλότερη ταχύτητα διάτμησης, τότε το φαινόμενο ιξώδες θα μειώνεται διαρκώς και η ιξώδης συμπεριφορά του προϊόντος, θα προσεγγίζει αυτήν των νευτωνικών ρευστών. Επιπρόσθετα, το ιξώδες αυξάνεται με την αντίστοιχη αύξηση του περιεχόμενου υγρού (ορός γάλακτος) (Walstra et al, 2006).



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

Συνεκτικότητα

Η συνεκτικότητα του σκευάσματος γιαουρτιού εκτιμάται, συνήθως, με τη βύθιση ενός αντικειμένου δεδομένου βάρους και διαστάσεων στο προϊόν γιαουρτιού για καθορισμένο χρόνο και εκφράζεται ως το αντίστροφο του βάθους διείσδυσης. Η συνεκτικότητα δεν σχετίζεται με το συντελεστή ελαστικότητας, αλλά με την τάση διαρροής.

Συναίρεση

Η συναίρεση, οφείλεται κατά το πλείστον στην αναδιάταξη του δικτύου των συσσωματωμάτων της καζεΐνης, με αποτέλεσμα την αύξηση του αριθμού των

διασυνδέσεων μεταξύ των σωματιδίων. Το δίκτυο έπειτα τείνει να συρρικνώνεται, αποβάλλοντας έτσι το περιεχόμενο σε αυτό υγρό. Στο γιαούρτι η συναίρεση είναι ανεπιθύμητη. Η τάση να εμφανίζεται συναίρεση εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη θερμοκρασία επώασης. Εάν το γάλα επωάζεται στους 20°C (με μεσόφιλα βακτήρια εκκίνησης) με σκοπό το σχηματισμό του πήγματος σε αυτή τη θερμοκρασία, δεν υπάρχει απολύτως καμία συναίρεση, ενώ όταν επωάζεται στους 32°C είναι δυνατή η συναίρεση. Κατά την επώαση στους 45°C, η συναίρεση μπορεί να αποτραπεί, μόνο εάν το γάλα έχει θερμανθεί εντατικά, εάν η περιεκτικότητά του σε καζεΐνη έχει αυξηθεί και εάν η θερμοκρασία αποθήκευσης του γιαουρτιού είναι χαμηλή. Ωστόσο, εάν η συσκευασία που περιέχει το προϊόν ανακινηθεί, έστω και ελαφρώς, κατά τη φάση σχηματισμού του πήγματος, τότε το πήγμα μπορεί να διαρρηχθεί και να προκύψει συναίρεση. Επιπλέον, συναίρεση είναι δυνατόν να προκύψει, εάν το pH κατά την επώαση μειωθεί κάτω από την τιμή 4,0.

3.2.5 Διατροφική Αξία του Γιαουρτιού

Το γάλα, όπως έχει ήδη αναφερθεί, είναι ένα τρόφιμο σχεδόν πλήρους διατροφικής αξίας. Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, συμβαίνουν πολλές αλλαγές στα συστατικά του γάλακτος. Παρόλα αυτά η ζύμωση φαίνεται να μην επηρεάζει τη διατροφική αξία του γάλακτος. Όσον αφορά την περιεχόμενη ενέργεια, ο μεταβολισμός της λακτόζης κατά την ζύμωση του γάλακτος, δεν επιφέρει κάποια μεταβολή σε αυτή. Έτσι η περιεχόμενη ενέργεια του γάλακτος είναι περίπου ίση με την αντίστοιχη του γιαουρτιού (252 KJ/100 g). Στον πίνακα 3.4 παρουσιάζονται τα διατροφικά στοιχεία διαφορετικών τύπων γιαουρτιού.

Πίνακας 3.4: Τιμές διατροφικών συστατικών πλήρους γιαουρτιού, χαμηλών λιπαρών με ή χωρίς φρούτα (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

Αξίζει να σημειωθεί, ότι άνθρωποι με δυσανεξία στη λακτόζη μπορούν να αφομοιώσουν ένα προϊόν ζύμωσης γάλακτος όπως το γιαούρτι πολύ καλύτερα απ' ότι το απλό γάλα. Η μειωμένη περιεκτικότητα σε λακτόζη του ζυμωμένου γάλακτος παίζει σημαντικό ρόλο σε αυτό. Επιπρόσθετα, η κατανάλωση γάλακτος που έχει υποστεί ζύμωση διατηρεί σε χαμηλά επίπεδα το pH του στομάχου και έτσι μειώνει τον κίνδυνο μετάβασης παθογόνων μικροοργανισμών. Αυτό έχει ιδιαίτερη σημασία για τους ανθρώπους που πάσχουν από εξασθενημένη έκκριση γαστρικών υγρών, π.χ. πολλούς ηλικιωμένους και μωρά.

3.2.6 Παραγωγική Διαδικασία Γιαουρτιού

Ανάλογα με το είδος γιαουρτιού ακολουθείται και διαφορετική διαδικασία παραγωγής. Διαφορετικά, επίσης, μπορεί να είναι και τα όρια τυποποίησης του γάλακτος που χρησιμοποιείται ως πρώτη ύλη, ανάλογα με τη χώρα που παρασκευάζεται το γιαούρτι. Παρόλα αυτά, μπορούν να επισημανθούν ορισμένα

βασικά βήματα τα οποία πραγματοποιούνται εν γένει κατά την παραγωγή γιαουρτιού σε μία τυπική γραμμή παραγωγής.

Δεξαμενές Αποθήκευσης

Η χρήση συστατικών υψηλής ποιότητας αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την παραγωγή τελικών προϊόντων αντίστοιχης ποιότητας. Υψηλής ποιότητας νωπό γάλα πρέπει να διατηρείται στους 4 °C σε εγκεκριμένα σιλό ή κάθετες δεξαμενές, για λιγότερο από 72 h πριν από τη χρήση του για την παραγωγή γιαουρτιού. Σε περιπτώσεις αποθηκευμένης κρέμας, η ανάδευση στις δεξαμενές (σιλό) θα αποτρέψει το διαχωρισμό της κρέμας λόγω βαρύτητας. Η ανάδευση πρέπει να είναι ομαλή και απαλή. Επίσης, αποτελεί νομοθετική απαίτηση η χρήση θερμοστοιχείων για την καταγραφή με ακρίβεια της θερμοκρασίας εντός των δεξαμενών (Hui, 2004).

Τυποποίηση Λιπαρών

Η περιεκτικότητα του γιαουρτιού σε λιπαρά μπορεί να κυμαίνεται από 0,1% έως άνω του 10% w/w, προκειμένου να τηρούνται οι ισχύοντες κανονισμοί. Επίσης, η περιεκτικότητα του γάλακτος σε λιπαρά εξαρτάται από την εποχή και την περίοδο άμελξης του γαλακτοφόρου ζώου, γεγονός που καθιστά δυσχερή την τυποποίηση του τελικού προϊόντος. Ως εκ τούτου, η τυποποίηση του γάλακτος ως προς τα λιπαρά του πριν από την παρασκευή του γιαουρτιού είναι απαραίτητη. Για να ρυθμιστεί το επίπεδο λίπους γάλακτος, χρησιμοποιούνται διάφοροι πρακτικοί τρόποι:

- Αφαίρεση μέρους του λίπους από το νωπό γάλα μέσω μηχανικού διαχωρισμού
- Προσθήκη κρέμας γάλακτος σε αποβουτυρωμένο, ημιαποβουτυρωμένο ή πλήρες γάλα
- Ανάμιξη πλήρους γάλακτος με αποβουτυρωμένο γάλα
- Συνδυασμός των παραπάνω μεθόδων.

Τις τελευταίες δεκαετίες, έχουν σχεδιαστεί συστήματα για την αυτοματοποιημένη τυποποίηση της περιεκτικότητας του γάλακτος σε λιπαρά (Yildiz, 2016).

Ομογενοποίηση

Η ομογενοποίηση είναι ένα κρίσιμο βήμα στη διαδικασία παραγωγής υψηλής ποιότητας γιαουρτιού. Τα λιποσφαίρια του γάλακτος στο νωπό γάλα μπορεί να έχουν διάμετρο 2,0-20,0 μm (Swaisgood, 1985). Σε αυτό το μέγεθος και στην ακατέργαστη

κατάστασή τους, τα σφαιρίδια λίπους τείνουν να ανέρχονται στην επιφάνεια και να δημιουργούν συσσωματώματα ή να συγχωνεύονται. Η ομογενοποίηση χρησιμοποιείται για την αποτροπή του διαχωρισμού των λιπαρών του γάλακτος λόγω βαρύτητας. Η διαδικασία περιλαμβάνει την άσκηση υψηλής πίεσης στο γάλα και τον εξαναγκασμό των χοντρών σφαιριδίων λίπους μέσω μικροσκοπικών οπών, με αποτέλεσμα τη θραύση των μεγάλων σφαιριδίων σε μικρότερα, διαμέτρου περίπου 0,1-3 μm, γεγονός που καθιστά λιγότερο πιθανή τη συγχώνευση και την άνοδό τους στην επιφάνεια. Η ομογενοποίηση είναι πιο αποτελεσματική, όταν τα σφαιρίδια λίπους είναι σε υγρή κατάσταση, δηλαδή, όταν το γάλα έχει προθερμανθεί. Έτσι, το γάλα θερμαίνεται, συνήθως, μέσω ενός εναλλάκτη θερμότητας, με τη βοήθεια του οποίου η θερμοκρασία φτάνει τουλάχιστον στους 60 °C πριν την ομογενοποίηση (Hui, 2004).

Παστερίωση - Θερμική Επεξεργασία

Η παστερίωση είναι το πιο κρίσιμο τμήμα της γραμμής επεξεργασίας του γάλακτος, καθώς κατά τη διεργασία αυτή καταστρέφονται οι παθογόνοι μικροοργανισμοί που υπάρχουν στο γάλα. Η διαδικασία της παστερίωσης περιλαμβάνει τη θέρμανση του γάλακτος σε συγκεκριμένη θερμοκρασία για ορισμένο χρονικό διάστημα. Συνήθως, η θερμική επεξεργασία του γάλακτος πραγματοποιείται είτε σε ήπια θερμοκρασία (τουλάχιστον 62,8°C) για μεγάλο χρονικό διάστημα (τουλάχιστον 30 min), είτε σε υψηλή θερμοκρασία (τουλάχιστον 72°C) για μικρό χρονικό διάστημα (τουλάχιστον 15 s). Για την παραγωγή γιαουρτιού και κρέμας γάλακτος, χρησιμοποιούνται υψηλότερες θερμοκρασίες επεξεργασίας, με στόχο τη μετουσίωση των πρωτεϊνών του ορού γάλακτος, γεγονός το οποίο αυξάνει την κατακράτηση νερού και το ιξώδες (Hui, 2004).

Προετοιμασία - Εμβολιασμός Μικροβιακών Καλλιιεργειών

Η ποιότητα της μικροβιακής καλλιέργειας είναι υψίστης σημασίας για την παραγωγή ζυμωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων υψηλής ποιότητας. Οι κατασκευαστές καλλιιεργειών συχνά συνεργάζονται στενά με τους φορείς εκμετάλλευσης των εγκαταστάσεων επεξεργασίας για την αποτελεσματική κάλυψη συγκεκριμένων αναγκών. Οι κατασκευαστές καλλιιεργειών, μέσα από σημαντικές ερευνητικές προσπάθειες, αναπτύσσουν μοναδικούς συνδυασμούς καλλιιεργειών για ένα συγκεκριμένο προϊόν. Για παράδειγμα, σχεδόν όλα τα γιαούρτια περιέχουν τις θερμοφίλες καλλιιεργειες *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* και

Streptococcus thermophilus, αλλά τα στελέχη καθενός εξ αυτών συνδυάζονται προσεκτικά σε συγκεκριμένες αναλογίες, προκειμένου να αποδώσουν τις επιθυμητές ιδιότητες στο τελικό προϊόν. Για παράδειγμα, μερικά στελέχη, όπως τα *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ή *S. thermophilus* που παράγουν πολυσακχαρίτες, μπορούν να επιλεγούν για την ικανότητά τους να ενισχύουν το ιξώδες στο γιαούρτι. Υπάρχουν διάφοροι τύποι μορφών βακτηριακής καλλιέργειας, μεταξύ των οποίων:

- υγρή μορφή (σπανίως χρησιμοποιείται σήμερα),
- συμπυκνωμένες καλλιέργειες βαθιάς κατάψυξης
- λυοφιλιωμένες συμπυκνωμένες καλλιέργειες βαθιάς κατάψυξης σε μορφή σκόνης και,
- βαθιά κατεψυγμένες ή λυοφιλιωμένες, υπερ-συμπυκνωμένες καλλιέργειες σε εύκολα διαλυτή μορφή για άμεσο εμβολιασμό του προϊόντος.

Η χρήση κατεψυγμένων ή λυοφιλιωμένων καλλιεργειών εξαλείφει την ανάγκη σε μικρές γαλακτοκομικές βιομηχανίες να καλλιεργούν μικροβιακές καλλιέργειες. Μεγαλύτερες βιομηχανίες τροφοδοτούνται συνήθως με κατεψυγμένες ή λυοφιλιωμένες καλλιέργειες, οι οποίες εμβολιάζονται στο γάλα υπό πλήρως ασηπτικές συνθήκες. Η ποσότητα εμβολιασμού είναι καθοριστική για τα τελικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του γιαουρτιού. Μικρή ποσότητα μικροοργανισμών μπορεί να προκαλέσει αργή ανάπτυξη της οξύτητας κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, επεκτείνοντας την απαιτούμενη περίοδο ζύμωσης και αποδίδοντας εξασθενημένο πήγμα που οδηγεί στο διαχωρισμό του ορού γάλακτος. Αντίθετα, υπερβολικά μεγάλη ποσότητα μικροοργανισμών μπορεί να οδηγήσει σε ταχεία ανάπτυξη της οξύτητας, μείωση της ικανότητας ενυδάτωσης των πρωτεϊνών και έντονη οξίνιση κατά την αποθήκευση. Μόλις το γάλα εμβολιαστεί με την καλλιέργεια εκκίνησης, μπορεί να τοποθετηθεί σε περιέκτες για ζύμωση (γιαούρτι τύπου σετ) ή να ζυμωθεί σε δεξαμενή (αναμεμιγμένο γιαούρτι) (Yildiz, 2016). Έπειτα από την παραγωγή του τελικού προϊόντος είναι δυνατή η προσθήκη γλυκαντικών ή φρουτοπαρασκευασμάτων, ανάλογα με το είδος του παραγόμενου γιαουρτιού. Τέλος, ακολουθεί η συσκευασία και η αποθήκευση του τελικού προϊόντος.

3.2.7 Γαλακτικά Βακτήρια - Συμβατικοί Μικροοργανισμοί Εκκίνησης Ζύμωσης

Γαλακτικά Βακτήρια

Τα γαλακτικά βακτήρια είναι οι κύριοι παράγοντες για την παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων. Αν και ποικίλουν ως προς τα γενετικά χαρακτηριστικά τους, ορισμένα κοινά χαρακτηριστικά αυτής της ομάδας βακτηρίων περιλαμβάνουν το ότι είναι θετικά κατά Gram, δεν κινούνται και δεν σχηματίζουν σπόρια. Τα γαλακτικά βακτήρια, δεν είναι ικανά να παράγουν ενώσεις πορφυρίνης που περιέχουν σίδηρο, όπως η καταλάση και το κυτόχρωμα. Έτσι, αναπτύσσονται αναερόβια, αλλά παρουσιάζουν και ανοχή στο οξυγόνο. Ζυμώνουν αποκλειστικά σάκχαρα, με το γαλακτικό οξύ να είναι το κύριο τελικό προϊόν. Τείνουν να είναι επιλεκτικά ως προς τα θρεπτικά υποστρώματα στα οποία αναπτύσσονται, συχνά απαιτώντας συγκεκριμένα αμινοξέα και βιταμίνες Β ως αυξητικούς παράγοντες (Walstra et al, 2006).

Στην παραγωγή γιαουρτιού, τα στελέχη *Streptococcus thermophilus* και *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* είναι απαραίτητα για τη βασική ζύμωση του μίγματος. Επιπρόσθετοι προαιρετικοί οργανισμοί μπορούν να ενσωματωθούν στο γιαούρτι, είτε μέσω της καλλιέργειας εκκίνησης, είτε μέσω ανάμιξης σε αυτό μετά την ολοκλήρωση της ζύμωσης.

Streptococcus thermophilus

Ο *Streptococcus thermophilus* ανήκει στην κατηγορία των στρεπτόκοκκων. Υπάρχουν 5 μεγάλες ομάδες σε αυτήν την κατηγορία, που ονομάζονται ομάδα *mutants*, *andinus*, *sanguinus*, *mints* και *salivarius*. Αυτός ο οργανισμός είναι θετικός κατά Gram, δεν παράγει καταλάση, είναι αναερόβιος και έχει μορφή κόκκου. Χρησιμοποιείται σε μεγάλο βαθμό στην παρασκευή ποικιλιών σκληρού τυριού, μοτσαρέλας και γιαουρτιού. Δεν αναπτύσσεται στους 10 °C, αλλά αναπτύσσεται καλά στους 45 °C. Τα περισσότερα στελέχη μπορούν να επιβιώσουν στους 60 °C για 30 min. Είναι πολύ ευαίσθητος στα αντιβιοτικά. Όπως αναφέρθηκε, αναπτύσσεται καλά στο γάλα και ζυμώνει τη λακτόζη και τη σακχαρόζη (Hui, 2004).

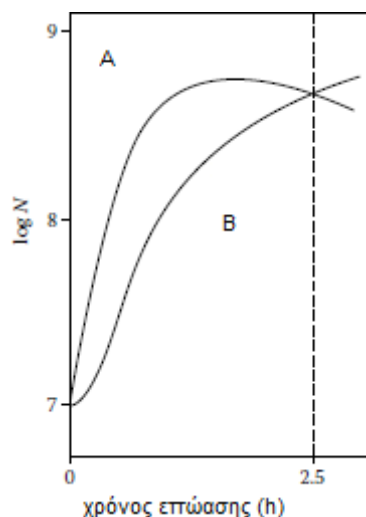
Lactobacillus delbrueckii subsp. *Bulgaricus*

Ο *Lactobacillus Bulgaricus* ανήκει στο γένος *Lactobacillus*, τα στελέχη του οποίου χαρακτηρίζονται ως θετικά κατά Gram και είναι ραβδόμορφα. Το γένος αυτό 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*. Όπως και ο *Streptococcus thermophilus*, ο *L. Bulgaricus* είναι αναερόβιος αλλά εμφανίζει και ανοχή στο οξυγόνο. Η βέλτιστη θερμοκρασία για την ανάπτυξη του *L. bulgaricus* είναι 45 °C (Ustunol, Z. 2013).

Συμβιωτική καλλιέργεια Εκκίνησης

Οι σύγχρονες εμπορικές καλλιέργειες εκκίνησης αποτελούνται, συνήθως, από συμβιωτικές καλλιέργειες του *Streptococcus thermophilus* και του *Lactobacillus delbruecki* ssp. *bulgaricus* (Radke-Mitchell, 1984). Κατά τη διαδικασία της ζύμωσης, διοξείδιο του άνθρακα, μυρμηκικό οξύ, πεπτίδια και πολυάριθμα αμινοξέα απελευθερώνονται από την καζεΐνη. Η συμβιωτική ανάπτυξη των δύο μικροοργανισμών έχει ως αποτέλεσμα μεγαλύτερη παραγωγή οξέος και την απόδοση καλύτερης γεύσης στο τελικό προϊόν, σε σύγκριση με την ανάπτυξη μίας μόνο καλλιέργειας (Hui, 2004). Έχει αποδειχθεί ότι πολυάριθμα αμινοξέα που απελευθερώνονται από τη διάσπαση της καζεΐνης από πρωτεάσες του *L. Bulgaricus* διεγείρουν την ανάπτυξη του *S. Thermophilus* (Nauth, 2006). Με τη σειρά του, ο *S. Thermophilus* παράγει CO₂ και μυρμηκικό οξύ, το οποίο διεγείρει τον *L. Bulgaricus* (Jankovic, 2010). Κατά τη διάρκεια του πρώτου μέρους της επώασης, ο *S. Thermophilus* αυξάνεται ταχύτερα, απομακρύνει την περίσσεια οξυγόνου και παράγει CO₂ και μυρμηκικό οξύ. Μετά την επιβράδυνση της αύξησης του *S. Thermophilus* λόγω της αυξημένης συγκέντρωσης γαλακτικού οξέος, αυξάνεται το πλήθος των βακτηρίων *L. Bulgaricus* που είναι περισσότερο ανεκτικά σε οξύ. Για αναλογία 1:1 των δύο μικροοργανισμών, πρέπει να ελέγχεται η ποσότητα εμβολιασμού, ο χρόνος και η θερμοκρασία επώασης. Αυτή η αναλογία μπορεί να διατηρηθεί και στο τελικό προϊόν, εάν η θερμοκρασία και ο χρόνος επώασης είναι αντιστοίχως 45 °C και 2 h, ενώ το τελικό pH είναι 4,2 (Walstra et al, 2006; Yildiz, 2010). Στο παρακάτω διάγραμμα φαίνεται η ανάπτυξη των δύο στελεχών συναρτήσει του χρόνου επώασης, όταν επικρατούν οι ανωτέρω περιγραφείσες συνθήκες.



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

Από το παραπάνω διάγραμμα, συμπεραίνεται ότι η αναλογία των δύο στελεχών αλλάζει συνεχώς. Όπως προαναφέρθηκε, αρχικά, τα βακτήρια του *S. Thermophilus* αναπτύσσονται ταχύτερα λόγω της περίσσειας οξυγόνου και της έλλειψης γαλακτικού οξέος, παράγοντας CO₂ και μυρμηκικό οξύ. Εν συνεχεία, η ανάπτυξη των βακτηρίων του *S. Thermophilus* επιβραδύνεται λόγω του οξέος που παράγεται, ενώ ταυτόχρονα τα βακτήρια του *L. Bulgaricus* αρχίζουν να αναπτύσσονται ταχύτερα εξ αιτίας του παραγόμενου CO₂ και μυρμηκικού οξέος. Αυτές οι μεταβολές έχουν ως αποτέλεσμα τη διατήρηση της αρχικής αναλογίας των δύο μικροοργανισμών (Walstra et al, 2006). Τα τελευταία χρόνια, εξετάζεται όλο και περισσότερο η προσθήκη προβιοτικών μικροοργανισμών σε συνδυασμό με τις συμβατικές καλλιέργειες εκκίνησης κατά την παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων, καθώς έρευνες δείχνουν ότι ωφελούν σημαντικά την υγεία του καταναλωτή. Παρακάτω θα αναλυθούν τα προβιοτικά βακτήρια και τα διάφορα οφέλη που μπορεί να έχουν στον ανθρώπινο οργανισμό.

4. Προβιοτικά βακτήρια και εφαρμογές τους στα τρόφιμα

4.1 Προβιοτικά βακτήρια

Ο όρος "προβιοτικό" εισήχθη αρχικά από τον Dr. Roy Fuller το 1989, για να αναφερθεί σε ένα "ζωντανό μικροβιακό συμπλήρωμα ζωοτροφής που επηρεάζει επωφελώς το ζώο-ξενιστή, βελτιώνοντας την εντερική του μικροβιακή ισορροπία" (Fuller, 1989). Ο μεγάλος αριθμός μελετών σε ζώα και ανθρώπους που διεξήχθησαν έκτοτε, σχετικά με τα οφέλη στην υγεία που αποδίδουν τα προβιοτικά βακτήρια, πέραν της ικανότητάς τους να βελτιώνουν την εντερική μικροβιακή ισορροπία, οδήγησε σε αναδιατύπωση αυτού του ορισμού. Ένας από τους ευρύτερα χρησιμοποιούμενους ορισμούς των προβιοτικών βακτηρίων είναι αυτός που υιοθετήθηκε από τη συνεργασία των οργανισμών FAO και WHO (FAO/WHO, 2002), η οποία αναφέρει ότι τα προβιοτικά είναι «ζωντανοί μικροοργανισμοί οι οποίοι, όταν χορηγούνται σε επαρκείς ποσότητες, ωφελούν την υγεία του καταναλωτή».

4.1.1 Προέλευση και Κυριότερα Είδη

Τα στελέχη τα οποία έχουν απομονωθεί, χαρακτηρίζονται και προτείνονται ως προβιοτικά είναι τα: *Lactobacillus casei*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. crispatus*, *Bifidobacterium adolescentis*, *B. lactis*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. longum*, *Saccharomyces boulardii*, *S. cerevisiae*, *Enterococcus faecium* και το ασφαλές στέλεχος *E. coli Nissle* (Kayser 2003; Rinkinen et al. 2003).

Το γεγονός ότι στελέχη από τα γένη *Bifidobacterium* και *Lactobacillus* απαντώνται στο ανθρώπινο πεπτικό σύστημα και έχουν ικανοποιητική ανοχή στις γαστρεντερικές συνθήκες, σε συνδυασμό με αποτελέσματα σχετικών μελετών που υποδεικνύουν ότι η δράση τους προάγει την υγεία, οδηγούν στην επιλογή αυτών για την απομόνωση, το χαρακτηρισμό και την εμπορευματοποίησή τους ως προβιοτικά στελέχη. Τα βακτήρια του γένους *Lactobacillus*, έχουν περίπλοκες απαιτήσεις σε θρεπτικό υπόστρωμα, είναι προαιρετικά αερόβια ή αναερόβια και οξεόφιλα. Τα *Bifidobacteria*, από την άλλη, είναι παρόντα σχεδόν παντού στο πεπτικό σύστημα του ανθρώπου, ενώ νέα στελέχη ανιχνεύονται και απομονώνονται συνεχώς (Gagnon et al, 2011). Στον πίνακα 4.1 παρουσιάζονται ορισμένα στελέχη που χρησιμοποιούνται ως προβιοτικά, καθώς και τα οφέλη τους στον άνθρωπο.

Πίνακας 4.1: Προβιοτικά στελέχη και οφέλη στον ανθρώπινο οργανισμό (Gagnon et al, 2011)

Οργανισμός	Επίδραση	Μηχανισμός
<i>Lactobacilli</i>		
<i>L.rhamnosus R0011</i>	Βελτίωση του επιθηλιακού ιστού	Αναστολή του παθογόνου μικροοργανισμού που προκαλεί πτώση της διεπιθηλιακής αντίστασης
<i>L.rhamnosus GG</i>	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
<i>L.plantarum299v</i>	Βελτίωση του επιθηλιακού ιστού	Αύξηση της εξωκυτταρικής έκκρισης βλεννίνης MUC3
<i>L.plantarumITM21B</i>	Αναστολή της παθογενούς έκφρασης	Αναστολή της δραστηριότητας της ουρεάσης στο <i>Y.enterocolica</i>
<i>L.johnsoniiNCC533</i>	Έκκριση ανασταλτικών ουσιών	Παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου
<i>L.salivariusUCC118</i>	Έκκριση ανασταλτικών ουσιών	Παραγωγή βακτηριοκύνης
<i>L.caseiNCDO1205</i>	Βελτίωση ανοσοποιητικού	Μείωση της απόκρισης IL-8 και αύξηση της απόκρισης IL-10
<i>Bifidobacteria</i>		
<i>B.breveYakult</i>	Έκκριση ανασταλτικών ουσιών	Παραγωγή οξικού οξέος και μείωση του pH
<i>B.lactisBb-12</i>	Βελτίωση ανοσοποιητικού	Διέγερση της sIgA
<i>Άλλα</i>		
<i>E.colistrain Nissle 1917</i>	Βελτίωση του επιθηλιακού ιστού	Αύξηση της έκφρασης της πρωτεΐνης ZΩ-2
<i>VSL#3</i> προβιοτικό μίγμα	Βελτίωση του επιθηλιακού ιστού	Διέγερση της γονιδιακής έκφρασης β-ντιφενσίνης και hBD-2

4.1.2 Το γένος *Bifidobacterium* και τα στελέχη του

Τα *bifidobacteria* αποτελούν ένα σημαντικό μέρος των προβιοτικών βακτηρίων και για αυτό το λόγο χρησιμοποιούνται συχνά σε γαλακτοκομικά προϊόντα. Απαντώνται, κυρίως, στην ανθρώπινη στοματική κοιλότητα και το έντερο, τα τρόφιμα, τα λύματα και τις γαστρεντερικές οδούς των εντόμων και των ζώων. Τα συνηθέστερα στελέχη αυτού του γένους είναι τα: *B. bifidum*, *B. longum*, *B. infantis*, *B. breve*, *B. adolescentis*, *B. angulatum*, *B. catenulatum*, *B. pseudocatenulatum*, και *B. Dentium*. Στον πίνακα 4.2 παρουσιάζονται αυτά και μερικά ακόμα από τα στελέχη *bifidobacteria*, καθώς και η προέλευσή τους. Τα βακτήρια του γένους *Bifidobacterium* spp. μπορούν να χρησιμοποιήσουν ένα ευρύ φάσμα υποστρωμάτων για ζύμωση, συμπεριλαμβανομένων διαφόρων εξοζών (λακτόζη, γαλακτόζη, ραφινόζη, σακχαρόζη, μαννιτόλη και σορβιτόλη) και πολυσακχαριτών (αμυλοπηκτίνη, αμυλόζη, ξυλόζη και βλεννίνη). Μπορούν επίσης να μεταβολίζουν υποστρώματα όπως οι φρουκτοολιγοσακχαρίτες, οι οποίοι επιλεκτικά ενθαρρύνουν τον πολλαπλασιασμό τους. Θεωρείται ότι η παρουσία τους αναστέλλει την ανάπτυξη των κολοβακτηριδίων και των κλωστριδίων και μπορεί να συνεισφέρει στην επιδιόρθωση τυχόν ανωμαλιών της εντερικής μικροχλωρίδας σε ενήλικα και ηλικιωμένα άτομα (Gibson, 2008). Ορισμένα από τα βακτήρια αυτά μπορούν, επίσης, να βελτιώσουν τη διαδικασία υδρόλυσης της λακτόζης, να εμφανίσουν αντικαρκινική δράση, να μειώσουν τα επίπεδα της χοληστερόλης και να ενισχύουν την απορρόφηση του ασβεστίου από τον οργανισμό (Xu, et al, 2011). Για αυτούς τους λόγους, επιδιώκεται η παρουσία και η διατήρηση του αριθμού τους σε ικανοποιητικά επίπεδα στο εντερικό σύστημα. Αυτό είναι δυνατόν να επιτευχθεί με τη κατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων εμπλουτισμένων με *bifidobacteria*.

Πίνακας 4.2: Είδη και προέλευση *bifidobacteria*

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

4.1.3 Συνθήκες ανάπτυξης των *bifidobacteria*

Το βέλτιστο εύρος θερμοκρασίας για την ανάπτυξη των *bifidobacteria* είναι στους 37-41 °C, ενώ η ελάχιστη και η μέγιστη θερμοκρασιακή περιοχή κυμαίνεται, αντίστοιχα, μεταξύ 25-28 °C και 43-45 °C (Shah, 2007). Για τα βακτήρια αυτά, το οξυγόνο θεωρείται ένας ιδιαίτερα τοξικός παράγοντας. Για αυτό το λόγο, η βιωσιμότητα των *bifidobacteria* που χρησιμοποιούνται σε γαλακτοκομικά προϊόντα, εξαρτάται άμεσα από την απουσία οξυγόνου. Επίσης, ως βέλτιστες τιμές pH για την ανάπτυξη των *bifidobacteria*, θεωρούνται τιμές μεταξύ 6-7. Σε περιπτώσεις μεγάλων αποκλίσεων από αυτές τις τιμές, πιο συγκεκριμένα για pH μικρότερο του 4,5 και μεγαλύτερο του 8,5, η ανάπτυξή τους καθίσταται αδύνατη (Shah, 2007). Εξαιρέση στον κανόνα αυτόν, αποτελούν τα *Bifidobacterium lactis* και *Bifidobacterium animalis*, τα οποία παρουσιάζουν ανοχή σε συνθήκες με pH=3.5. Προκειμένου να διασφαλισθούν οι συνθήκες αυτές, έτσι ώστε να υπάρχει υψηλό ποσοστό 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 & Kailaspathy, 2004).

4.1.4 Αξιολόγηση της ασφάλειας των προβιοτικών μικροβίων

Τα ζυμωμένα τρόφιμα έχουν μακρά ιστορία στην καθημερινή διατροφή του ανθρώπου. Μέχρι το ένα τέταρτο της προσλαμβανόμενης τροφής αποτελείται από ζυμωμένα τρόφιμα, όπως το γιαούρτι. Δεδομένου ότι τα προβιοτικά έχουν σχεδιαστεί, έτσι ώστε να έχουν ευεργετική επίδραση στην υγεία του καταναλωτή, τα ζητήματα ασφάλειας πρέπει να υπερβαίνουν το ιστορικό της ασφαλούς χρήσης βακτηρίων γαλακτικού οξέος. Διάφοροι βιοδείκτες ασφάλειας έχουν συζητηθεί στη βιβλιογραφία. Ο Straub (Straub, 1995) έδωσε λεπτομερή ανάλυση αρκετών βακτηριακών στελεχών γαλακτικού οξέος, τα οποία έχουν υποβληθεί σε έλεγχο για τη δυνατότητά τους να σχηματίσουν βιογενείς αμίνες. Οι βιογενείς αμίνες είναι ενώσεις του αζώτου που παράγονται με μικροβιακή αποκαρβοξυλίωση των αμινοξέων. Υψηλή πρόσληψη ορισμένων βιογενών αμινών, μπορεί να προκαλέσει τοξικές και βλαβερές συνέπειες για τον οργανισμό. Είναι ενδιαφέρον ότι ορισμένα είδη που είναι γνωστό ότι είναι προβιοτικά (π.χ. *Lactobacillus reuteri*) παράγουν σημαντικές ποσότητες βιογενών αμινών. Ο έλεγχος ασφαλείας των υποψήφιων προβιοτικών μπορεί να περιλαμβάνει τον έλεγχο πιθανών παραγόντων

μολυσματικότητας και ενζυμικών ενεργειών που σχετίζονται με το σχηματισμό υποθετικών γονιδιοτοξικών μεταβολιτών, συμπεριλαμβανομένης της β-γλυκουρονιδάσης, της νιτρο-ρεδουκτάσης και της αζορεδουκτάσης. Ένας περαιτέρω προσδιορισμός ασφαλείας για πιθανά υποψήφια στελέχη προβιοτικών κάνει χρήση ενός *in vitro* μοντέλου αποικοδόμησης βλεννίνης. Σε αυτό το μοντέλο, οποιαδήποτε βλάβη ή διαταραχή του στρώματος βλεννίνης θεωρείται ότι θέτει σε κίνδυνο τη λειτουργία άμυνας του βλεννογόνου του ξενιστή. Πράγματι, έχει αποδειχθεί ότι τα παθογόνα στελέχη *Escherichia coli* και *Salmonella enterica* αναπτύσσονται στην εντερική βλέννα (Ouweland et al, 2006).

Η εξάπλωση παθογόνων μικροοργανισμών που φέρουν πολλαπλές αντιβιοτικές αντιστάσεις αποτελεί σήμερα ένα σοβαρό πρόβλημα ασφάλειας των τροφίμων. Συνεπώς, είναι πολύ σημαντικό να διασφαλιστεί ότι οι βιομηχανικά χρησιμοποιούμενες βακτηριακές καλλιέργειες δεν συμβάλλουν άμεσα ή έμμεσα στην ενίσχυση του προβλήματος αντίστασης στα αντιβιοτικά. Η ενδεχόμενη ανταλλαγή δεικτών αντοχής στα αντιβιοτικά μεταξύ των παθογόνων μικροοργανισμών και των μικροοργανισμών τροφίμων έχει τεθεί ως πιθανό ζήτημα ασφάλειας των τροφίμων. Το έργο αρκετών ερευνητικών ομάδων οι οποίες αξιολογούν τον πραγματικό κίνδυνο προβιοτικών καλλιεργειών που συμμετέχουν στην εξάπλωση της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά έχει αναθεωρηθεί από τους Salminen et al. (Salminen, 1998). Προκειμένου να εξαλειφθεί ακόμη και ένας θεωρητικός κίνδυνος εξάπλωσης της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά μέσω των καλλιεργειών που χρησιμοποιούνται στα τρόφιμα, έχει πλέον γίνει κοινή πρακτική η επαλήθευση των στελεχών για την ευαισθησία στα κοινώς χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά (Makinen, 2012; Nazzaro, 2012). Τα βακτήρια γαλακτικού οξέος είναι εγγενώς ανθεκτικά σε πολλά αντιβιοτικά. Παρόλα αυτά, στις περισσότερες περιπτώσεις η αντίσταση δεν είναι μεταδιδόμενη μεταξύ των πολλαπλασιασμένων βακτηρίων και αυτός ο τύπος εγγενούς αντίστασης δεν πρέπει να θεωρείται πρόβλημα ασφάλειας.

4.1.5 Δράση των προβιοτικών βακτηρίων στον ανθρώπινο οργανισμό

Αρχικά, τα προβιοτικά θεωρήθηκαν ότι εξισορροπούν τις μικροβιολογικές διαταραχές του εντέρου και έτσι αποτρέπουν ή διορθώνουν δυσλειτουργίες συσχετιζόμενες με το γαστρεντερικό σύστημα. Με την πάροδο του χρόνου, πραγματοποιήθηκαν όλο και περισσότερες μελέτες πάνω στους προβιοτικούς

μικροοργανισμούς. Με βάση τα αποτελέσματα αυτών των ερευνών, τα προβιοτικά βακτήρια συσχετίστηκαν με διάφορα οφέλη για την υγεία των ανθρώπων. Ωστόσο, ο μηχανισμός δράσης πίσω από τα περισσότερα από αυτά τα αποτελέσματα μελετάται ακόμη. Μερικές από τις δράσεις των προβιοτικών στην υγεία των ανθρώπων παρουσιάζονται ακολούθως:

Διάρροια

Η πιο συνηθισμένη αιτία οξείας διάρροιας στην παιδική ηλικία είναι η προσβολή από το ροταϊό. Αρκετά προβιοτικά στελέχη, ειδικά το στέλεχος *Lactobacillus rhamnosus GG*, έχει αποδειχθεί ότι προλαμβάνουν ή ανακουφίζουν τη βρεφική διάρροια. Είναι επίσης γεγονός ότι μερικά προβιοτικά στελέχη μπορούν να αποτρέψουν διαταραχές σχετιζόμενες με αντιβιοτικά. Ωστόσο, τα αποδεικτικά στοιχεία για τις επιδράσεις των προβιοτικών στη διάρροια των ταξιδιωτών παραμένουν χαμηλά, διότι έχουν πραγματοποιηθεί λίγες μελέτες και έχουν προκύψει αντιφατικά αποτελέσματα (Cook, 2012; Schmid et al., 2006).

Διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος

Έχουν διεξαχθεί πολλές μελέτες σε ανθρώπους για να διερευνηθούν οι επιδράσεις των προβιοτικών καλλιεργειών στο ανοσοποιητικό σύστημα. Ορισμένες μελέτες επικεντρώθηκαν στο εντερικό ανοσοποιητικό σύστημα, ενώ άλλες στη συστηματική ανοσία. Αυτές οι μελέτες αποκαλύπτουν ότι τα προβιοτικά βακτήρια είναι ικανά να ενισχύσουν τόσο την έμφυτη, όσο και την επίκτητη ανοσία, αυξάνοντας την ενεργότητα των λευκών κυττάρων και το ρυθμό φαγοκυττάρωσης, και κατά συνέπεια τα επίπεδα των ανοσοσφαιρινών. Δύο προβιοτικά στελέχη που αναπτύχθηκαν με ιδιαίτερη έμφαση στις βελτιωτικές τους επιδράσεις στις ανοσολογικές αντιδράσεις είναι τα *HOWARU Bifido (Bifidobacterium lacti HN019)* και *HOWARU Rhamnosus (Lactobacillus rhamnosus HN001)*. Και τα δύο στελέχη έχουν καταδειχθεί σε αρκετές μελέτες για την ενίσχυση της φυσικής ανοσολογικής λειτουργίας τους σε υγιείς ανθρώπους (Schmid et al., 2006).

Φλεγμονώδης νόσος του εντέρου

Υπάρχουν ολοένα και περισσότερες ενδείξεις ότι τα προβιοτικά βακτήρια έχουν πιθανώς θεραπευτικό όφελος για τους ασθενείς που πάσχουν από τη φλεγμονώδη νόσο του εντέρου. Οι ελεγχόμενες κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι τα προβιοτικά έχουν αποτελεσματική συνεισφορά στη διατήρηση της ελκώδους κολίτιδας σε ύφεση

και τη θεραπεία της νόσου του Crohn. Τα προβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτές τις ελεγχόμενες κλινικές δοκιμές είναι δύο μεμονωμένα στελέχη (*Escherichia coli* Nissle 1917, *Saccharomyces boulardii*) και ένα προϊόν που ονομάζεται VSL #3 το οποίο αποτελείται από μίγμα τεσσάρων στελεχών λακτοβακίλλων, τριών στελεχών *bifidobacteria* και ενός στελέχους του *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, όπως έχει παρουσιαστεί από τους Tripathi, (2014) και Cook et al. (2012).

Σύνδρομο ευερέθιστου εντέρου

Τα αποδεικτικά στοιχεία ότι τα προβιοτικά βακτήρια μπορεί να ανακουφίσουν τα συμπτώματα των ατόμων με σύνδρομο ευερέθιστου εντέρου είναι λίγα μέχρι σήμερα. Διάφορα αποτελέσματα έχουν ληφθεί στις δοκιμές που έχουν διεξαχθεί μέχρι στιγμής. Οι περισσότερες μελέτες έχουν επικεντρωθεί στη μείωση ή τη θεραπεία των συμπτωμάτων. Ωστόσο, είναι πιθανό ο ρόλος των προβιοτικών να αφορά περισσότερο στην πρόληψη, παρά στη θεραπεία του συνδρόμου ευερέθιστου εντέρου (De Prisco, 2016; Schmid et al., 2006).

Δυσανεξία στη λακτόζη

Οι βακτηριακές καλλιέργειες - καλλιέργειες εκκίνησης γιαουρτιού καθώς και μερικές προβιοτικές καλλιέργειες - είναι γνωστό ότι συνεισφέρουν στην πέψη της λακτόζης. Η συγκέντρωση του ενζύμου β-γαλακτοζιδάσης που διασπά τη λακτόζη είναι πολύ χαμηλή σε άτομα που υποφέρουν από δυσανεξία στη λακτόζη. Τα βακτήρια σε ζυμωμένα ή μη ζυμωμένα προϊόντα διατροφής απελευθερώνουν β-γαλακτοζιδάση στο λεπτό έντερο, που υποστηρίζει την πέψη της λακτόζης. Ωστόσο, τα προβιοτικά βακτήρια φαίνεται να προάγουν την πέψη της λακτόζης στο λεπτό έντερο λιγότερο αποτελεσματικά από ότι οι συμβατικές καλλιέργειες γιαουρτιού. Παρόλα αυτά, μπορεί να ανακουφίσουν τα κλινικά συμπτώματα που προκύπτουν από τη λακτόζη που δεν έχει αφομοιωθεί από τον ανθρώπινο οργανισμό (Schmid et al., 2006).

Αντιαλλεργική δράση

Οι Pelto et al. (Pelto, 1998) διαπίστωσαν ότι το στέλεχος *Lactobacillus rhamnosus* GG προσδίδει ανοσοδιεγερτικά συμπτώματα σε υγιείς ενήλικες, ενώ το ίδιο στέλεχος μειώνει την ανοσοκατασταλτική απόκριση σε άτομα που παρουσιάζουν υπερευαισθησία στο γάλα. Επιπλέον, τα προβιοτικά βακτήρια έχουν εφαρμοστεί με επιτυχία στη διαχείριση του ατοπικού εκζέματος σε βρέφη, ενώ το στέλεχος *Lactobacillus rhamnosus* GG αποδείχθηκε ότι είναι αποτελεσματικό στην πρόληψη

της πρώιμης ατοπικής νόσου σε παιδιά. Το στέλεχος *Lactobacillus rhamnosus GG* χορηγήθηκε προγεννητικά σε μητέρες και μεταγεννητικά για 6 μήνες στις μητέρες ή άμεσα στα βρέφη. Η συχνότητα του ατοπικού εκζέματος στην ομάδα που ελάμβανε τα προβιοτικά ήταν η μισή συγκριτικά με αυτή της ομάδας που ελάμβανε το εικονικό φάρμακο στην ηλικία των 2 ετών. Το προληπτικό αποτέλεσμα επανεξετάστηκε στην ηλικία των 4 ετών (Schmid et al., 2006).

Αντικαρκινική δράση

Μερικές επιδημιολογικές μελέτες υποδεικνύουν συσχέτιση μεταξύ χαμηλότερης συχνότητας εμφάνισης καρκίνου του παχέος εντέρου και της κατανάλωσης γαλακτοκομικών προϊόντων που έχουν υποστεί ζύμωση και περιέχουν *lactobacilli* ή *bifidobacteria*. Ωστόσο, δεν υπάρχουν άμεσες πειραματικές ενδείξεις ότι τα προβιοτικά μειώνουν τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του παχέος εντέρου στον άνθρωπο, αλλά κάποιες έμμεσες ενδείξεις που βασίζονται σε διάφορους δείκτες που εφαρμόζονται σε μελέτες σε ανθρώπους (π.χ. δραστηριότητες ενζύμων κοπράνων, μεταλλαξιγένεση κοπράνων και γονιδιοτοξικότητα, ανοσολογικοί δείκτες). Η επίδραση του στελέχους *Lactobacillus casei* Shirota στην επανεμφάνιση του υπερτροφικού καρκίνου της ουροδόχου κύστης μελετήθηκε από τους Aso et al. (1995). Οι περιπτώσεις, όπου δεν σημειώθηκε επανεμφάνιση του καρκίνου μετά από την εκτομή του όγκου, ήταν σημαντικά περισσότερες στην ομάδα που ελάμβανε τα προβιοτικά, συγκριτικά με την ομάδα που ελάμβανε το εικονικό φάρμακο. Μία μελέτη περίπτωσης-ελέγχου που διεξήχθη στην Ιαπωνία με 180 περιπτώσεις και 445 μάρτυρες αποκάλυψε ότι η συνήθης πρόσληψη βακτηρίων γαλακτικού οξέος μειώνει τον κίνδυνο καρκίνου της ουροδόχου κύστης (Schmid et al., 2006).

Λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος

Τα στοιχεία για πιθανή θετική επίδραση των προβιοτικών βακτηρίων στις λοιμώξεις της αναπνευστικής οδού ήταν μέχρι τώρα πολύ χαμηλά. Ένα ποτό προβιοτικού γιαουρτιού που περιείχε *Lactobacillus rhamnosus GG*, *Bifibacterium species* 420 και *Lactobacillus acidophilus* 145 φάνηκε να μειώνει σημαντικά την εμφάνιση δυνητικά παθογόνων βακτηρίων στη μύτη, σε σύγκριση με τυφλό δείγμα γιαουρτιού. O Hatakka (2001) διεξήγαγε στη Φινλανδία μία μακροχρόνια μελέτη με 571 παιδιά που επισκεπτόντουσαν κέντρα ημερήσιας φροντίδας. Διαπίστωσαν ελαφρά μείωση της συχνότητας εμφάνισης λοιμώξεων του αναπνευστικού και αντιβιοτικών θεραπειών

μετά από 7 εβδομάδες κατανάλωσης γάλακτος που περιείχε *Lactobacillus rhamnosus* GG (Schmid et al., 2006).

Δυσκοιλιότητα

Έχουν διεξαχθεί μερικές μελέτες σχετικά με τις επιδράσεις των γαλακτικών βακτηρίων στη δυσκοιλιότητα και την εντερική κινητικότητα. Μειωμένη σοβαρότητα δυσκοιλιότητας και βελτιωμένη συχνότητα κίνησης του εντέρου έχει παρατηρηθεί σε ανθρώπους με σχετικό ιστορικό, αλλά κατά τα άλλα υγιείς, μετά από κατανάλωση ενός ζυμωμένου προϊόντος γάλακτος με το στελέχος *Lactobacillus casei* Shirota. Η χορήγηση του στελέχους *Bifidobacterium longum* BB536 σε γυναίκες με δυσκοιλιότητα είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική αύξηση της εντερικής τους κινητικότητας. Θετική επίδραση του *Bifidobacterium longum* BB536 στην αντιμετώπιση της δυσκοιλιότητας αναφέρθηκε επίσης και για τους ηλικιωμένους (Schmid et al., 2006).

Λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος

Εκτός από το έντερο, η ουροποιητική οδός είναι πολλά υποσχόμενη περιοχή εφαρμογής για προβιοτικά βακτήρια. Μία μελέτη περιπτώσιολογικού ελέγχου με 139 γυναίκες με οξεία λοίμωξη του ουροποιητικού συστήματος και 185 μάρτυρες αποκάλυψε ότι η κατανάλωση ζυμωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων που περιέχουν προβιοτικά βακτήρια συσχετίστηκε με μειωμένο κίνδυνο υποτροπής της ουρολοίμωξης. Υπάρχουν λίγες μελέτες με ανθρώπους που δείχνουν θετικά αποτελέσματα των προβιοτικών στις λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος. Παρόλα αυτά, αυτές οι μελέτες υποδεικνύουν ότι τα προβιοτικά παρασκευάσματα που χορηγούνται από το στόμα ή ενδοκολπικά μπορούν να παράσχουν θεραπευτική πηγή λακτοβάκιλλων με στόχο τον έλεγχο των ουρογεννητικών μολύνσεων στις γυναίκες (Schmid et al., 2006).

Λοίμωξη από *Helicobacter pylori*

Η προσβολή του βλεννογόνου του στομάχου από το *Helicobacter pylori* έχει συσχετιστεί με γαστρίτιδα, καρκίνωμα του στομάχου, γαστρικό έλκος και λεμφώματα. Αρκετά προβιοτικά στελέχη έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλουν το *Helicobacter pylori* in vitro. Μελέτες σε ανθρώπους επιβεβαίωσαν αυτό το ανασταλτικό αποτέλεσμα, το οποίο φαίνεται να είναι ανεξάρτητο από τη βιωσιμότητα των βακτηρίων (Schmid et al., 2006).

Υψηλή χοληστερόλη

Πολλές μελέτες έχουν αξιολογήσει τις επιδράσεις των γαλακτοκομικών προϊόντων που περιέχουν καλλιέργειες προβιοτικών βακτηρίων στα επίπεδα χοληστερόλης του ανθρώπινου οργανισμού, χωρίς ωστόσο σημαντικά θετικά αποτελέσματα. Μερικά παραδείγματα δίνονται παρακάτω. Ένα ζυμωμένο γάλα που περιέχει τα στελέχη *Enterococcus faecium* και *Streptococcus thermophilus* αναφέρθηκε ότι προκαλεί μικρή, αλλά σημαντική ελάττωση στην ολική και τη LDL-χοληστερόλη σε ασθενείς με υψηλά επίπεδα χοληστερόλης. Ωστόσο, ορισμένα άτομα δεν ανταποκρίθηκαν στο προϊόν και μάλιστα έδειξαν αύξηση της χοληστερόλης. Ο Richelsen et al. (Richelsen, 1996) διερεύνησε την επίδραση της κατανάλωσης του ίδιου προϊόντος γάλακτος σε βάθος έξι μηνών. Σε άτομα που είχαν φυσιολογικά επίπεδα χοληστερόλης, το ζυμωμένο γάλα είχε ως αποτέλεσμα ταχεία μείωση της LDL-χοληστερόλης, αλλά μετά από 6 μήνες το αποτέλεσμα ήταν παρόμοιο με το εικονικό γάλα. Σε άλλη, παρόμοιας χρονικής διάρκειας μελέτη, ένα γιαούρτι που περιείχε τα στελέχη *Lactobacillus acidophilus* 145, *Bifidobacterium longum* 913 και 1% ολιγοφρουκτόζη δεν είχε σημαντική επίδραση στην ολική χοληστερόλη και τη χοληστερόλη LDL σε γυναίκες με αυξημένα επίπεδα χοληστερόλης. Όμως, καθώς η συγκέντρωση της HDL-χοληστερόλης αυξήθηκε σημαντικά, η αναλογία της LDL προς την HDL χοληστερόλη μειώθηκε (Schmid et al., 2006).

4.2 Εισαγωγή Προβιοτικών σε Τρόφιμα

Τη σημερινή εποχή, οι καταναλωτές έχουν κατανοήσει τη σχέση μεταξύ υγιεινής διατροφής και καλής υγείας και για το λόγο αυτό η ζήτηση προϊόντων που παρέχουν οφέλη στην υγεία τους πέρα από την απλή κάλυψη των βασικών διατροφικών τους αναγκών, ολοένα και αυξάνεται. Τα «λειτουργικά τρόφιμα», όπως αυτά ονομάζονται, ικανοποιούν αυτές τις ανάγκες των καταναλωτών, ενώ τα προβιοτικά τρόφιμα, τα οποία αποτελούν τρόφιμα εμπλουτισμένα και επεξεργασμένα με τη χρήση προβιοτικών βακτηρίων αποτελούν μία κατηγορία που, όπως έχει ήδη αναφερθεί, επιστημονικές μελέτες έχουν δείξει ότι συμβάλλουν στην υγεία των καταναλωτών. Τα προβιοτικά τρόφιμα μπορούν να παραχθούν με δύο τρόπους: (1) με την ζύμωση των πρώτων υλών με τη χρήση προβιοτικών βακτηρίων, με ή χωρίς καλλιέργειες εκκίνησης, και (2) με την προσθήκη κατάλληλων συγκεντρώσεων προβιοτικών βακτηρίων στα τελικά προϊόντα. Όσον αφορά το γιαούρτι, η προβιοτική ζύμωση του γάλακτος επιτρέπει στα βακτήρια να πολλαπλασιάζονται και να μεταδίδουν

διακριτικές γεύσεις και οργανοληπτικές αλλαγές στο τελικό προϊόν. Τα προβιοτικά στελέχη που επιλέγονται για κάθε διαφορετικό σύστημα τροφίμων θα επηρεάσουν τις ιδιότητες του τελικού προϊόντος, ανάλογα με τον τύπο και την ποσότητα των οξέων και άλλων μεταβολιτών που παράγονται. Τα ετερο- και ομο-ζυμωτικά *Lactobacillus* προσδίδουν διαφορετικές γεύσεις κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Τα ομοζυμωτικά παράγουν μία «απαλή όξινη γεύση» από το γαλακτικό οξύ και τα ετεροζυμωτικά προσδίδουν μία «έντονα όξινη γεύση» από την παραγωγή του οξικού οξέος. Όταν προστίθενται προβιοτικά βακτήρια στο τελικό προϊόν αμέσως πριν τη συσκευασία, η επιβίωση των βακτηρίων είναι σημαντικότερος παράγοντας από τη μικροβιακή ανάπτυξη. Τα βακτήρια πρέπει να προστίθενται σε κατάλληλες συγκεντρώσεις, προκειμένου να υπερβαίνουν τα 10^6 cfu/g τροφίμου μέχρι την ημερομηνία λήξης του προϊόντος. Μη προβλεπόμενη βακτηριακή ανάπτυξη έως τότε, μπορεί να προκαλέσει μη επιθυμητές μεταβολές, όπως αύξηση της οξύτητας κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, με αποτέλεσμα ένα λιγότερο αποδεκτό προϊόν.

Ένας από τους πιο σημαντικούς παράγοντες στα προβιοτικά τρόφιμα, είτε όταν προβιοτικά βακτήρια χρησιμοποιούνται για την παραγωγή του προϊόντος, είτε όταν προστίθενται απευθείας στο τελικό προϊόν, είναι η ικανότητα του προϊόντος να αποφέρει τα επιθυμητά οφέλη στην υγεία του καταναλωτή. Η επιλογή στελέχους, η σύσταση του τροφίμου, η χρησιμοποίηση πρεβιοτικών στην παραγωγή του προϊόντος και παράμετροι του τροφίμου όπως το pH θα καθορίσουν την επιτυχή επιβίωση των βακτηρίων. Η γεύση του προϊόντος, η εμφάνιση, η σύνθεση και η διαφήμισή του θα καθορίσουν την επιτυχία που θα έχει το προϊόν στην αγορά. Εκτός από την εφαρμογή τους σε γαλακτοκομικά προϊόντα, τα προβιοτικά βακτήρια χρησιμοποιούνται τα τελευταία χρόνια και σε πολλά άλλα τρόφιμα, όπως για παράδειγμα σε ζυμωμένα δημητριακά, βρεφικές τροφές, αναψυκτικά, και ορισμένα θεραπευτικά τρόφιμα. Πάνω από 70 προϊόντα σε όλο το κόσμο, συμπεριλαμβανομένης της κρέμας, του βουτυρογάλακτος, του γιαουρτιού, του γάλακτος σε σκόνη, και διαφόρων παγωμένων επιδόρπιων, περιέχουν *Bifidobacteria* και *Lactobacilli*. Τις τελευταίες δεκαετίες, ένας μεγάλος αριθμός προϊόντων επεξεργασμένων με προβιοτικά βακτήρια έχει ερευνηθεί. Αυτά, συμπεριλαμβάνουν προϊόντα όπως, ο προβιοτικός χυμός πορτοκάλι, μπάρες δημητριακών με βάση τη βρώμη στις οποίες εμπεριέχεται το στέλεχος *Bifidobacterium lactis* Bb-12, ξηρά ζυμωμένα λουκάνικα που περιέχουν προβιοτικά βακτήρια (στελέχη λακτοβακίλλων), και ένα μη ζυμωμένο κατεψυγμένο επιδόρπιο

χορτοφάγων που περιέχει *B. lactis*, *Lactobacillus rhamnosus*, και *Lactobacillus paracasei* subsp. *Paracasei* (Kailasapathy, 2010).

4.2.1 Παράγοντες που επηρεάζουν την επιβίωση των προβιοτικών βακτηρίων

Διάφορες μελέτες σε πολλές χώρες ανά τον κόσμο, επιβεβαιώνουν το γεγονός ότι τα προβιοτικά στελέχη εμφανίζουν επιπλοκές όσον αφορά την επιβίωσή τους σε τρόφιμα όπως το γιαούρτι και τα προϊόντα ζυμωμένου γάλακτος, με τον αριθμό των ζώντων κυττάρων να είναι πολύ χαμηλότερος από το συνιστώμενο επίπεδο πρόσληψης κατά την ημερομηνία λήξης του τροφίμου. Ορισμένοι παράγοντες όπως το υπεροξειδίο του υδρογόνου που παράγεται από τα βακτήρια γιαουρτιού, η συγκέντρωση γαλακτικού και οξικού οξέος, η αλληλεπίδραση των προβιοτικών στελεχών με τις καλλιέργειες εκκίνησης, οι πρωτεΐνες ορού γάλακτος, τα σάκχαρα, η θερμοκρασία επώασης, ο χρόνος ζύμωσης, και η περιεκτικότητα σε λιπαρά του γιαουρτιού, μπορούν να επηρεάσουν την επιβίωση των προβιοτικών βακτηρίων στα γαλακτοκομικά ζυμωμένα τρόφιμα. Επίσης, κάποιες μέθοδοι επεξεργασίας των προβιοτικών τροφίμων όπως η θερμική επεξεργασία (παστερίωση), η άντληση, η ομογενοποίηση, η υπερδιήθηση, η κατάψυξη (κατεψυγμένα γαλακτοκομικά προϊόντα), η προσθήκη συστατικών με αντιβιοτικές ιδιότητες, η συσκευασία (είσοδος οξυγόνου στο προϊόν κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης), οι δυσμενείς συνθήκες αποθήκευσης, η θερμική καταπληξία και η πιθανή ανάπτυξη αντιμικροβιακών ενώσεων που εκκρίνονται από τις καλλιέργειες εκκίνησης κατά τη διάρκεια της ζύμωσης μπορεί να δημιουργήσουν εμπόδια όσον αφορά την επιβίωση των προβιοτικών μικροοργανισμών, γεγονός μη επιθυμητό για την παραγωγή ενός αποτελεσματικού τελικού προϊόντος. Για να αποφευχθούν τέτοιου είδους εμπόδια, χρησιμοποιούνται διάφορες μέθοδοι επεξεργασίας, όπως μέθοδοι εγκλεισμού των προβιοτικών στελεχών, οι οποίες θα αναλυθούν παρακάτω, αλλά και προσθήκη θρεπτικών συστατικών στο προϊόν τα οποία ενθαρρύνουν την ανάπτυξη και επιβίωση των προβιοτικών μικροοργανισμών, όπως τα πρεβιοτικά (Fritzen et al., 2013).

4.2.2 Η έννοια των πρεβιοτικών

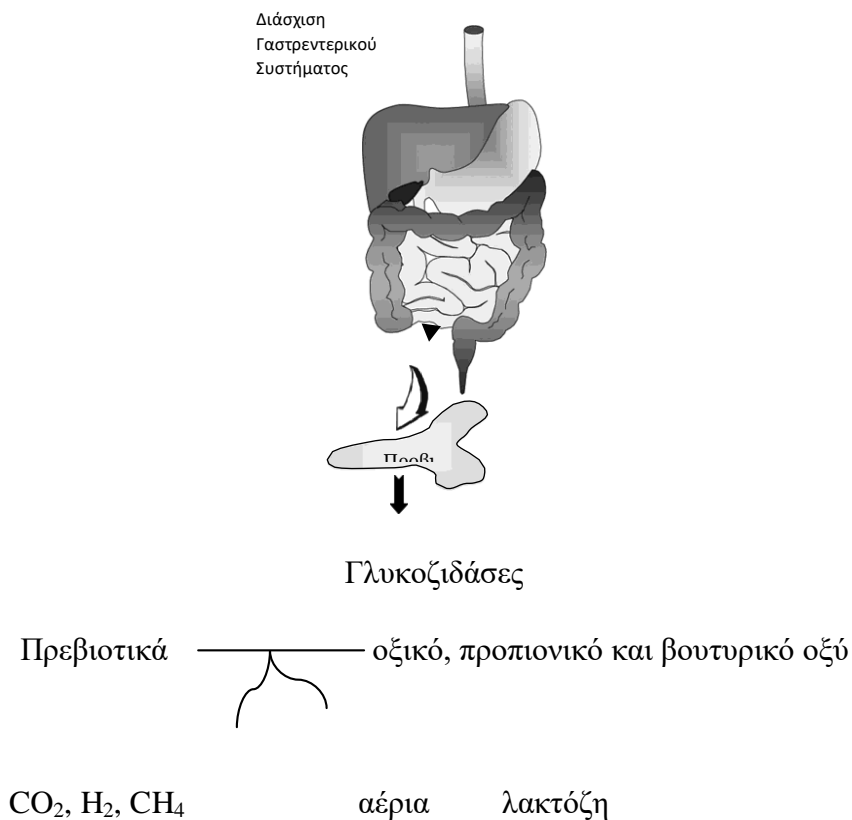
Ένα «πρεβιοτικό» μπορεί να οριστεί ως ένα «μη αφομοιώσιμο συστατικό τροφίμου που επηρεάζει επωφελώς τον ξενιστή εκλεκτικά, διεγείροντας την ανάπτυξη και τη δραστηριότητα ενός αριθμού βακτηρίων στο παχύ έντερο και βελτιώνοντας έτσι την υγεία του ξενιστή». Για να επιτευχθούν αυτά τα αποτελέσματα, ένα πρεβιοτικό

πρέπει να φθάσει στο παχύ έντερο και να παραμείνει εκεί για κάποιο χρονικό διάστημα, καθώς η επίδρασή του στον ανθρώπινο οργανισμό είναι πιο εμφανής μακροχρόνια. Ο τρόπος επίδρασης ενός πρεβιοτικού είναι να διεγείρει την ανάπτυξη και τη μεταβολική δραστηριότητα ενός αριθμού βακτηρίων, οδηγώντας σε αλλαγές στη συνολική μικροβιακή ισορροπία του ανθρώπινου εντέρου προς την αύξηση των ωφέλιμων βακτηρίων (κυρίως *Lactobacillus* και *Bifidobacterium*) και την επιθυμητή μείωση των δυνητικά επιβλαβών μικροοργανισμών. Παρόλο που οποιοδήποτε διαιτητικό συστατικό που φθάνει στο παχύ έντερο θα μπορούσε να είναι ένα πιθανό πρεβιοτικό, στην πράξη, τα περισσότερα πρεβιοτικά υποστρώματα είναι υδατάνθρακες. Η αρχική έννοια του πρεβιοτικού έχει πρόσφατα τεθεί υπό αμφισβήτηση από διάφορα αποτελέσματα που υποδεικνύουν ότι η επίδραση ορισμένων πρεβιοτικών υποστρωμάτων, δεν θα μπορούσε να περιοριστεί σε έναν τόσο μειωμένο αριθμό ωφέλιμων βακτηρίων όπως αρχικά θεωρήθηκε, επηρεάζοντας επίσης και άλλους βακτηριακούς πληθυσμούς που βρίσκονται στο γαστρεντερικό σύστημα του ανθρώπου, των οποίων οι υποθετικές ωφέλιμες επιδράσεις δεν έχουν ακόμη διερευνηθεί. Ενόψει αυτού, μία ομάδα εμπειρογνομόνων του Διεθνούς Οργανισμού Υγείας (WHO) συνέστησε την αναθεώρηση του ορισμού του πρεβιοτικού, λαμβάνοντας υπόψη όχι μόνο την επίδραση επί των *bifidobacteria* και *lactobacilli*, αλλά και τη διεύρυνσή του σε άλλες οικολογικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ και άλλων βακτηρίων μέσα στον ανθρώπινο οργανισμό (Vinderola, 2009).

4.2.3 Συμβιωτικά: Συνδυασμός Προβιοτικών και Πρεβιοτικών και οφέλη τους

Τα «συμβιωτικά» είναι συνδυασμός πρεβιοτικών και προβιοτικών και μπορούν να παρουσιάσουν πρόσθετα ή συνεργιστικά αποτελέσματα σε σχέση με το καθένα χωριστά. Αυτή η ενίσχυση των αποτελεσμάτων μπορεί να αποδοθεί στην αυξημένη επιβίωση των βακτηρίων λόγω προστατευτικού αποτελέσματος του πρεβιοτικού ή στη χρήση του ως εκλεκτικού υποστρώματος από το προβιοτικό. Τα πρεβιοτικά μπορούν επίσης να δράσουν σε ευεργετικά, για τον ανθρώπινο οργανισμό, βακτήρια, ενώ ακόμα και ένα συμβιωτικό μπορεί να σχεδιαστεί για να δρα σε δύο διαφορετικές περιοχές του γαστρεντερικού συστήματος. Όσον αφορά τα γαλακτοκομικά προϊόντα, τα συμβιωτικά έχουν μελετηθεί σε τρόφιμα όπως το τυρί, γάλα που έχει υποστεί ζύμωση και άλλα γαλακτοκομικά παρασκευάσματα (Vinderola, 2009). Μάλιστα, εκτός από τα οφέλη για την υγεία έχει επιδιωχθεί και η βελτίωση διαφόρων οργανοληπτικών και ρεολογικών ιδιοτήτων των προϊόντων. Τα πιο συχνά

χρησιμοποιούμενα πρεβιοτικά στα συμβιωτικά είναι η ινουλίνη, οι γαλακτο-ολιγοσακχαρίτες (GOS) και οι φρουκτο-ολιγοσακχαρίτες (FOS). Ένα παράδειγμα συμβιωτικού προϊόντος, συνδυάζει το *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* επιλεγμένο για αλληλεπίδραση με το ανθεκτικό άμυλο Hi-Maize (Moumita et al., 2017). Τέλος, είναι αξιοσημείωτη η αυξανόμενη χρήση συμβιωτικών σε βρεφικές συνταγές, όπου οι γαλακτο-ολιγοσακχαρίτες είναι συχνά το επιλεγμένο υπόστρωμα. Στο παρακάτω σχήμα παρουσιάζεται ο τρόπος λειτουργίας των συμβιωτικών στο γαστρεντερικό σύστημα καθώς και οι επιπτώσεις που έχουν στην υγεία του ανθρώπου.



Σχήμα 4.1 Αλληλεπίδραση στον ξενιστή μεταξύ των πρεβιοτικών υποστρωμάτων και των προβιοτικών. Τα πρεβιοτικά φθάνουν στο παχύ έντερο και υδρολύονται από τις μικροβιακές γλυκοζιδάσες. Η ζύμωση ελεύθερων ολιγο- ή μονοσακχαριτών προκαλεί την παραγωγή λιπαρών οξέων βραχείας αλυσίδας που μπορούν να επιτύχουν διάφορες ευεργετικές λειτουργίες.

4.2.4 Προσδιορισμός μικροβιακού φορτίου των προβιοτικών σε γαλακτοκομικά προϊόντα

Η απαρίθμηση των προβιοτικών βακτηρίων σε προϊόντα τροφίμων που έχουν υποστεί ζύμωση είναι ένα δύσκολο έργο. Οι ομοιότητες στις συνθήκες ανάπτυξης μεταξύ των προβιοτικών βακτηρίων και των καλλιέργειών εκκίνησης αποτελεί ένα από τα μεγαλύτερα εμπόδια τη στιγμή της διαφοροποίησης των αποικιών των προβιοτικών στελεχών από τις αποικίες των βακτηρίων της καλλιέργειας εκκίνησης. Ωστόσο, οι συνεχείς προσπάθειες σε αυτό τον τομέα τις τελευταίες δεκαετίες έχουν επιτρέψει τη διαμόρφωση μίας μεγάλης ποικιλίας υποστρωμάτων καλλιέργειας για την επιλεκτική απαρίθμηση προβιοτικών βακτηρίων, αν και η τελική χρήση ενός δεδομένου υποστρώματος εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον εκάστοτε συνδυασμό εκκινητών και προβιοτικών στελεχών και από τα τρόφιμα που πρόκειται να αναλυθούν. Ο έλεγχος του επιπέδου των βιώσιμων κυττάρων προβιοτικών βακτηρίων σε καθαρές καλλιέργειες ή στο τελικό προϊόν είναι σημαντικός για διάφορους λόγους, καθώς επιτρέπει:

- τον ποιοτικό έλεγχο των κατεψυγμένων ή λυοφιλιωμένων συμπυκνωμένων καλλιεργειών που προορίζονται για άμεσο εμβολιασμό,
- την παρακολούθηση της βιωσιμότητας των προστιθέμενων προβιοτικών βακτηρίων κατά τα διάφορα στάδια της παραγωγής και της διάρκειας ζωής του τροφίμου που χρησιμοποιείται ως φορέας,
- τον προσδιορισμό μίας λειτουργικής δόσης για ένα συγκεκριμένο αποτέλεσμα προαγωγής της υγείας.

Δεν έχει ακόμη δημοσιευθεί κανένα επίσημο πρωτόκολλο ή καθορισμένη πρότυπη μέθοδος για τον έλεγχο της βιωσιμότητας των προβιοτικών σε τρόφιμα. Το 1990, η Διεθνής Ομοσπονδία Γαλακτοκομικών Προϊόντων (IDF) δημοσίευσε ένα δελτίο (IDF 252/1990) που πρότεινε μέσα καλλιέργειας για την ανίχνευση και απαρίθμηση των *bifidobacteria* στα ζυμωμένα γαλακτοκομικά προϊόντα. Σε αυτό το δελτίο, 14 μέσα καλλιέργειας προτάθηκαν για την ανίχνευσή τους και την απαρίθμηση σε γάλα που έχει υποστεί ζύμωση, σε καλλιέργειες εκκίνησης και άλλα υλικά. Το 1995, ένα άλλο δελτίο IDF (IDF 306/1995) πρότεινε 16 διαφορετικά μέσα καλλιέργειας για την καταμέτρηση αποικιών του *L. acidophilus* σε συνδυασμό με βακτήρια γιαουρτιού ή σε συνδυασμό με τα βακτήρια γιαουρτιού και τα *bifidobacteria*.

Για να αναπτύξει μία τυποποιημένη μέθοδο για την επιλεκτική απαρίθμηση των *bifidobacteria* στα γαλακτοκομικά προϊόντα, ο IDF ξεκίνησε το 2003 μία εξαιρετικά οργανωμένη και ελεγχόμενη δοκιμή, η οποία περιελάμβανε 20 εξειδικευμένα εργαστήρια από την Ευρώπη, την Ιαπωνία και τη Νέα Ζηλανδία (IDF 411/2007). Τα εργαστήρια αυτά έλαβαν επτά τυφλά δείγματα γαλακτοκομικών προϊόντων που περιείχαν *bifidobacteria* αποκλειστικά ή σε συνδυασμό με *L. acidophilus*, *L. gasseri*, *S. thermophilus* και *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Ζητήθηκε να χρησιμοποιηθεί ένα μέσο καλλιέργειας που περιέχει το αντιβιοτικό mupirocin (MUP) και το υπόστρωμα TOS (διαγαλακτοζυλιωμένο ολιγοσακχαρίτη) για την εκλεκτική απαρίθμηση των *bifidobacteria* σε αυτά τα δείγματα. Τα αποτελέσματα των δοκιμών έδειξαν ότι το αντιβιοτικό δεν επηρεάζει την ανάπτυξη των *bifidobacteria*, ενώ αναστέλλει την ανάπτυξη εκκινητών καλλιέργειών γαλακτικών βακτηρίων (LAB). Επιπρόσθετα, ταχύτερη ανάπτυξη, μεγαλύτερες αποικίες *bifidobacteria* και υψηλότερος αριθμός αποικιών προέκυψαν από τη χρήση μέσου TOS-MUP (IDF 411/2007). Με βάση αυτά τα αποτελέσματα των διεξαγόμενων δοκιμών, μία τεχνική για την απαρίθμηση των υποθετικών *bifidobacteria* στα γαλακτοκομικά προϊόντα αναμένεται να εκδοθεί από κοινού από το ISO και τον IDF στο εγγύς μέλλον. Ο Πίνακας 4.3 παραθέτει κάποιες εκλεκτικές ενώσεις που έχουν προταθεί για την απαρίθμηση προβιοτικών βακτηρίων σε μέσα καλλιέργειας.

Πίνακας 4.3: Υποστρώματα για την εκλεκτική καταμέτρηση διαφόρων προβιοτικών βακτηρίων

Έτος	Προβιοτικό Στέλεχος	Εκλεκτικός παράγοντας	Αναφορά
1984	<i>L.Acidophilus</i>	Μαλτόζη, σαλικίνη, μελιβιόζη	Hull and Roberts (1984)
1990	<i>Bifidobacterium</i>	Προπιονικό οξύ-pH 5	Beerens (1990)
1992	<i>Bifidobacterium</i>	Χλωριούχο λίθιο και προπιονικό νάτριο	Lapierre et al. (1992)
1993	<i>L.acidophilus & B.bifidum</i>	Κυανούν χρώμα	Onggo and Fleet (1993)
1993	<i>L.acidophilus</i>	X-Glu	Kneifel and Pacher (1993)
1995	<i>Bifidobacterium</i>	Χλωριούχο λίθιο, προπιονικό νάτριο και ιωδοοξικό άλας	Arroyo et al. (1995)
1995	<i>Bifidobacterium</i>	Χολικά άλατα και γενταμικίνη	Lim et al. (1995)
1996	<i>L.acidophilus & Bifidobacterium</i>	Κυανούν χρώμα-pH 5	Rybka and Kailasapathy (1996)
1996	<i>L.acidophilus</i>	Σαλικίνη	Lankaputhra and Shah (1996)
1996	<i>Bifidobacterium</i>	Νεομυκίνη, ναλιδιξικό οξύ, χλωριούχο λίθιο, προπιονικό νάτριο	Ghoddusi and Robinson (1996)
1996	<i>Bifidobacterium</i>	Αζτρεονάμη, ναλιδιξικό οξύ, νετιλμυκίνη, παρομομυκίνη	Pacher and Kneifel (1996)
1996	<i>L.acidophilus & Bifidobacterium</i>	Μαλτόζη, σαλικίνη, σορβιτόλη, νεομυκίνη, ναλιδιξικό οξύ, χλωριούχο λίθιο	Dave and Shah (1996)
1997	<i>L.casei</i>	Το μέσο ρυθμίστηκε σε pH 5,4 και επωάστηκε για 14 ημέρες στους 15 °C	Champagne et al. (1997)
1998	<i>L.casei</i>	Πράσινη βρωμοκρεσόλη, ριβόζη	Ravula and Shah (1998a)
1999	<i>L.acidophilus & Bifidobacterium</i>	Χολικά άλατα, χλωριούχο λίθιο και προπιονικό νάτριο	Vinderola and Reinheimer (1999)

Πίνακας 4.3 (συνέχεια): Υποστρώματα για την εκλεκτική καταμέτρηση διαφόρων
προβιοτικών βακτηρίων

Έτος	Προβιοτικό Στέλεχος	Εκλεκτικός παράγοντας	Αναφορά
1999	<i>Bifidobacterium</i>	Λακτουλόζη, κυανό μεθυλενίου, χλωριούχο λίθιο και προπιονικό νάτριο	Nebra and Blanch (1999)
1999	<i>L.acidophilus</i> & <i>Bifidobacterium</i>	Οξικό νάτριο, οξικό οξύ, ιωδοοξικό οξύ	Ingham (1999)
1999	<i>Bifidobacterium</i>	Πολυμυξίνη Β, καναμυκίνη, ιωδοοξικό, τριφαινυλτετραζόλιο	Payne et al. (1999)
2000	<i>L.acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium</i> , & <i>L.casei</i>	Χολικά άλατα, χλωριούχο λίθιο και προπιονικό νάτριο	Vinderola and Reinheimer (2000)
2000	<i>Bifidobacterium</i>	Mupirocin	Rada and Koc (2000)
2001	<i>Bifidobacterium</i>	Προπιονικό οξύ-pH 5	Bonaparte et al. (2001)
2003	<i>L.acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium</i> , & <i>L.casei</i>	Αξιολογήθηκαν 19 μέσα βασισμένα σε ζάχαρη, οργανικά και ανόργανα άλατα	Tharmaraj and Shah (2003)
2004	<i>L.acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium</i> , & <i>L.casei</i>	Ριβόζη και επώαση στους 27 °C	Talwalkar and Kailasapathy (2004)
2006	<i>L.acidophilus</i> , <i>L.rhamnosus</i> , <i>L.paracasei</i> , <i>Bifidobacterium</i>	Κλιδαμυκίνη, χλωριούχο λίθιο, προπιονικό νάτριο, νεομυκίνη, ναλιδιξικό οξύ	Van de Castele et al. (2006)
2006	<i>L.acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium</i>	Πράσινο βρωμοκρεσόλης, κλινδαμυκίνη, κυανή ανιλίνη, δικλοξακιλλίνη	Darukaradhya et al. (2006)
2007	<i>L.acidophilus</i> , <i>L.paracasei</i> , <i>B.lactis</i>	Μαλτόζη, χλωριούχο λίθιο	Tabasco et al. (2007)

Όπως έχει ήδη τονιστεί, προκειμένου τα προβιοτικά βακτήρια να έχουν θετικές επιδράσεις στην υγεία των καταναλωτών, θα πρέπει να επιβιώνουν από την έναρξη της διαδικασίας παραγωγής προϊόντος μέχρι και μετά την κατανάλωσή τους, κατά τη διέλευση από το γαστρεντερικό σύστημα του καταναλωτή. Για αυτό το λόγο, οι ερευνητές και οι παραγωγοί προβιοτικών τροφίμων επιδιώκουν την προστασία τους μέσω ορισμένων μεθόδων, μία εκ των οποίων είναι και ο εγκλεισμός στον οποίο εστιάζει η παρούσα διπλωματική. Στο επόμενο κεφάλαιο θα παρουσιαστούν αναλυτικά οι διάφορες μέθοδοι εγκλεισμού, καθώς και τα εγλειστικά μέσα που χρησιμοποιούνται για την προστασία των προβιοτικών μικροοργανισμών (Vinderola, 2009).

5. Εγκλεισμός προβιοτικών βακτηρίων

Η καλή βιωσιμότητα και δραστικότητα των προβιοτικών βακτηρίων θεωρείται απαραίτητη για τη βέλτιστη λειτουργικότητά τους. Επιπλέον, η ικανότητα των μικροοργανισμών να επιβιώνουν και να πολλαπλασιάζονται στον ξενιστή, επηρεάζει σημαντικά οφέλη τους στον ανθρώπινο οργανισμό. Τα βακτήρια σε ένα προϊόν θα πρέπει να παραμείνουν μεταβολικά σταθερά και δραστικά, επιβιώνοντας κατά τη διέλευση μέσω του ανώτερου πεπτικού σωλήνα σε επαρκή αριθμό, ώστε να ωφελούν τον ξενιστή μέσω της δράσης τους. Ένας ελάχιστος αριθμός βιώσιμων κυττάρων, δηλαδή το «θεραπευτικό ελάχιστο», πρέπει να καταναλώνεται τακτικά προκειμένου να διαπιστωθεί η προβιοτική επίδραση στους καταναλωτές. Η επιβίωση αυτών των βακτηρίων κατά τη διάρκεια ζωής του προϊόντος μέχρι και την κατανάλωσή του είναι επομένως ένα σημαντικό στοιχείο. Το προτεινόμενο ελάχιστο επίπεδο για τα προβιοτικά βακτήρια στο γιαούρτι είναι 10^6 cfu/mL (Chen, 2007). Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι ορισμένα στελέχη προβιοτικών, ιδιαίτερα στελέχη του γένους *Bifidobacterium* spp., δεν έχουν την ικανότητα να επιβιώσουν από τις γαστρεντερικές συνθήκες.

5.1 Η τεχνολογία του εγκλεισμού και η σημασία της στα τρόφιμα

Ο εγκλεισμός και οι εφαρμογές του είναι ένα θέμα ενδιαφέροντος για ένα ευρύ φάσμα επιστημονικών και βιομηχανικών κλάδων, από τη φαρμακοβιομηχανία έως τη γεωργία και από τα φυτοφάρμακα έως τα ένζυμα. Η ανάπτυξη αυτών των τεχνολογιών χαρακτηρίζεται από μεγάλη βασική έρευνα και πολλές βιομηχανικές εφαρμογές, όπως αποδεικνύεται και από τον αυξανόμενο αριθμό των επιστημονικών

ερευνών και των εφαρμογών διαφόρων πατεντών. Ο εγκλεισμός περιλαμβάνει την επικάλυψη ή την παγίδευση ενός επιθυμητού συστατικού (ενεργό υλικό ή πυρήνα) μέσα σε ένα δευτερεύον υλικό (μήτρα, υλικό επίστρωσης, κέλυφος ή υλικό τοιχώματος) για την πρόληψη ή την καθυστέρηση της απελευθέρωσης του δραστικού συστατικού ή του πυρήνα για ένα ορισμένο χρονικό διάστημα ή μέχρι να επιτευχθεί ένα σύνολο συνθηκών. Τα σωματίδια που προκύπτουν από τον εγκλεισμό έχουν διάμετρο από λίγα nm μέχρι μερικά mm (Wandrey et al, 2010; Burgain, 2011).

Ο εγκλεισμός μπορεί δυνητικά να προσφέρει πολλά οφέλη στα υλικά που εγκλείονται. Διάφορες ιδιότητες των δραστικών συστατικών μπορούν να μεταβληθούν με τον εγκλεισμό. Για παράδειγμα, ο τρόπος χειρισμού του υλικού και οι ιδιότητες ροής του μπορούν να αλλάξουν με τη μετατροπή ενός υγρού σε στερεή εγκλωβισμένη μορφή και τα υγροσκοπικά υλικά μπορούν να προστατευθούν από την υγρασία. Η βιομηχανία τροφίμων εφαρμόζει τον εγκλεισμό για διάφορους λόγους (Shahidi, 2007):

- Ο εγκλεισμός / ενθυλάκωση μπορεί να προστατεύσει το υλικό του πυρήνα από την αποικοδόμηση, μειώνοντας την αλληλεπίδραση με το εξωτερικό περιβάλλον (π.χ. θερμότητα, υγρασία, αέρα και φως).
- Η ταχύτητα εξάτμισης ή μεταφοράς του δραστικού υλικού στο εξωτερικό περιβάλλον μειώνεται / επιβραδύνεται.
- Τα φυσικά χαρακτηριστικά του δραστικού υλικού μπορούν να τροποποιηθούν και να διευκολύνουν έτσι τον τρόπο μεταχείρισης και επεξεργασίας του. Για παράδειγμα:
 - ο Ένα υγρό συστατικό μπορεί να μετατραπεί σε στερεά σωματίδια.
 - ο Μπορεί να αποτραπεί η συσσωμάτωση του δραστικού υλικού.
 - ο Το δραστικό υλικό μπορεί να διανεμηθεί πιο ομοιόμορφα σε όλο το μίγμα δίνοντάς του ένα συγκεκριμένο μέγεθος και μία εξωτερική επιφάνεια.
 - ο Η απορρόφηση υγρασίας μπορεί να μειωθεί.
 - ο Οι ιδιότητες ροής μπορούν να βελτιωθούν.

- ο Το δραστικό υλικό προστατεύεται από σωματίδια που βρίσκονται στην ατμόσφαιρα ή στο άμεσο περιβάλλον του.
- ο Η πυκνότητα του δραστικού υλικού μπορεί να τροποποιηθεί.
- Το προϊόν μπορεί να σχεδιαστεί για να απελευθερώνεται αργά με την πάροδο του χρόνου.
- Η γεύση του δραστικού υλικού μπορεί να καλυφθεί, σε περίπτωση που δεν είναι αποδεκτή από τους καταναλωτές.
- Το δραστικό υλικό μπορεί να αραιωθεί, όταν χρειάζεται μόνο σε πολύ μικρές ποσότητες.
- Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για το διαχωρισμό των αντιδραστικών συστατικών μέσα σε ένα μίγμα που διαφορετικά θα αντιδρούσαν το ένα με το άλλο.

Η τεχνολογία του εγκλεισμού περιλαμβάνει, συνήθως, 3 στάδια. Στο πρώτο στάδιο, το βιοενεργό συστατικό ενσωματώνεται σε μία μήτρα που μπορεί να είναι στερεή ή υγρή. Εάν το δραστικό υλικό προς εγκλεισμό, είναι σε υγρή μορφή, η ενσωμάτωση θα προκύψει με τη διάλυση ή τη διασπορά του στη μήτρα, ενώ αν το δραστικό συστατικό είναι σε στερεή μορφή η ενσωμάτωση θα πραγματοποιηθεί με τη συσσωμάτωση ή την προσρόφησή του από τη μήτρα. Το δεύτερο στάδιο αποτελείται από τη διασπορά της μήτρας, εάν αυτή είναι υγρή, ή στην περίπτωση όπου η μήτρα είναι σταθερή, πραγματοποιείται κονιοποίησή της. Τέλος, το τρίτο στάδιο περιλαμβάνει τη σταθεροποίηση του προκύπτοντος σωματιδίου με χημικές (πολυμερισμός), φυσικοχημικές (ζελατινοποίηση) ή φυσικές διαδικασίες (εξάτμιση, στερεοποίηση) (Burgain et al, 2011).

5.2 Τεχνικές Εγκλεισμού

Υπάρχουν πολλές τεχνικές εγκλεισμού. Ωστόσο, οι τεχνολογίες που εφαρμόζονται στα προβιοτικά γενικά περιορίζονται σε σχηματισμό ζελατινωδών σωματιδίων, επικάλυψη με ψεκασμό, ξήρανση με ψεκασμό, εξώθηση και γαλακτωματοποίηση. Άλλες πολύτιμες τεχνικές εγκλεισμού όπως τα λιποσώματα, η συσσωμάτωση, η συγκρυστάλλωση ή η μοριακή ένταξη (κυκλοδεξτρίνες) δεν φαίνεται να έχουν εκτεταμένη χρήση στην επεξεργασία προβιοτικών για χρήση τους σε λειτουργικά τρόφιμα λόγω κόστους, μεγάλου μεγέθους βακτηρίων ή της απαγόρευσης ορισμένων χημικών ουσιών για την ασφάλεια των τροφίμων.

5.2.1 Ξήρανση με κατάψυξη (freeze drying)

Η τεχνική της ξήρανσης με κατάψυξη είναι ευρέως διαδεδομένη εδώ και δεκαετίες για την επεξεργασία προβιοτικών καλλιιεργειών. Παρόλα αυτά, μόνο τα τελευταία χρόνια αξιοποιείται ως τεχνική εγκλεισμού. Η χρήση της ενδείκνυται για τη διατήρηση ευαίσθητων ουσιών, όπως για παράδειγμα τα ζωντανά βακτήρια και οι πρωτεΐνες. Η τεχνική αυτή, αποσκοπεί στην εξάχνωση του διαλύτη, η οποία πραγματοποιείται σε 3 φάσεις, την κατάψυξη, την πρωτογενή και τη δευτερογενή ξήρανση. Συνήθως η δραστική ουσία πρώτα καταψύχεται και έπειτα ξηραίνεται με εξάχνωση υπό συνθήκες υψηλού κενού. Συγκριτικά με άλλες μεθόδους εγκλεισμού, οι συνθήκες που επικρατούν κατά την ξήρανση με κατάψυξη είναι ηπιότερες, και για αυτό το λόγο επιτυγχάνονται υψηλά ποσοστά επιβίωσης των προβιοτικών. Επιπρόσθετα, η προσθήκη κρυοπροστατευτικών υλικών κατά τη διάρκεια της ξήρανσης με κατάψυξη για τον εγκλεισμό προβιοτικών βακτηρίων πραγματοποιείται για να αντιμετωπιστεί η πιθανότητα αδρανοποίησης των βακτηρίων λόγω των χαμηλών θερμοκρασιών. Σε μελέτη των Carvalho et al. (2004), το λυοφιλοποιημένο στέλεχος *L. bulgaricus* επέζησε καλύτερα κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης του στους 20°C για 10 μήνες όταν τα κύτταρα είχαν εγκλειστεί παρουσία φρουκτόζης, λακτόζης, μαννόζης ή γλυκόζης με αυτή τη τεχνική. Επίσης, η τρεχαλόζη, η οποία αποτελεί ένα δισακχαρίτη γλυκόζη, έχει βρεθεί ότι είναι αποτελεσματική στην προστασία των βακτηριακών κυττάρων κατά τη διάρκεια της ξήρανσης με κατάψυξη (Singh, 2007).

5.2.2 Ξήρανση με ψεκασμό (spray drying)

Η ξήρανση με ψεκασμό χρησιμοποιείται εκτεταμένα στην παραγωγή εγκλεισμένων συστατικών. Ένα υγρό αιώρημα του βιοδραστικού προϊόντος ψεκάζεται μέσα σε ένα μεγάλο δοχείο, δημιουργώντας νέφος από λεπτά σταγονίδια, σε συνδυασμό με θερμό αέρα. Τα σταγονίδια ξηραίνονται και μετατρέπονται σε στερεά σωματίδια. Η ξήρανση με ψεκασμό παραδοσιακά είχε περιορισμένη βιομηχανική χρήση για προβιοτικά λόγω των υψηλών θερμοκρασιών που αναπτύσσονταν (120-160°C) κατά τη διάρκεια της διαδικασίας, οι οποίες θα προκαλούσαν υψηλές απώλειες βιωσιμότητας. Παρόλα αυτά, η επιτυχής ξήρανση με ψεκασμό των *Lactobacilli* και *Bifidobacteria* έχει αναφερθεί για ένα πλήθος διαφορετικών στελεχών, συμπεριλαμβανομένων των *L. paracasei* από τους Desmond et al. (2002), *Lactobacillus curvatus* από τους Mauriello et al. (1999), *L. rhamnosus* από τους

Corcoran et al. (2004) και *Bifidobacterium ruminantium* από τους O’Riordan et al. (2001). Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι, η χρήση προστατευτικών ενώσεων είναι κρίσιμης σημασίας για την αποτροπή των απωλειών βιωσιμότητας. Μία προσέγγιση που χρησιμοποιεί ένας αριθμός ερευνητών για τη βελτίωση της επιβίωσης των προβιοτικών βακτηρίων κατά τη διαδικασία ξήρανσης με ψεκασμό είναι η προσθήκη προστατευτικών στο μέσο εγκλεισμού πριν από τη διεργασία ξήρανσης. Για παράδειγμα, η ενσωμάτωση θερμοπροστατευτικών, όπως η τρεχαλόζη από τους Conrad et al. (2000), η προσθήκη μη λιπαρών στερεών γάλακτος από τους Selmer-Olsen et al. (1999), ο συνδυασμός προβιοτικών και πρεβιοτικών από τους Desmond et al. (2002) και η προσθήκη άμυλου από τους Moumita et al. (2017) έχει αποδειχθεί ότι βελτιώνουν τη βιωσιμότητα της προβιοτικής καλλιέργειας κατά την ξήρανση και την αποθήκευσή της. Ακόμα, θεωρείται ότι, όταν τα κύτταρα και οι προστατευτικές ενώσεις γαλακτωματοποιούνται με έλαια πριν από την ξήρανση με ψεκασμό ή ότι όταν προβιοτικά γαλακτωματοποιούνται σε ελαιώδη φάση, εγκλείονται επιτυχώς (Champagne, 2008; Singh, 2007).

5.2.3 Ψύξη με ψεκασμό (*spray-chilling*)

Η ψύξη με ψεκασμό είναι παρόμοια με την ξήρανση με ψεκασμό. Αρχικά, το υλικό πυρήνα διασκορπίζεται σε μία μήτρα υγροποιημένου υλικού επικάλυψης και ψεκάζεται. Ωστόσο, σε αντίθεση με την ξήρανση με ψεκασμό, δεν υπάρχει γενικά νερό που πρέπει να εξατμιστεί. Το μίγμα του πυρήνα και του τοιχώματος ψεκάζεται σε ψυχρό αέρα που προκαλεί στερεοποίηση του τοιχώματος γύρω από τον πυρήνα. Αυτή η μέθοδος, χρησιμοποιείται συνήθως για την ενθυλάκωση ουσιών όπως βιταμίνες, ανόργανα άλατα ή αντιοξειδωτικά (Champagne, 2008).

5.2.4 Επικάλυψη ρευστοποιημένης κλίνης (*fluid bed coating*)

Κατά την τεχνική αυτή, σωματίδια σκόνης αναγκάζονται σε αιώρηση υπό την επίδραση ενός ρεύματος αέρα, σε συγκεκριμένη θερμοκρασία, και εν συνεχεία ψεκάζονται με ένα υλικό επικάλυψης. Η επικάλυψη αυτή μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε υπό μορφή ασυνεχούς διεργασίας σε παρτίδες, είτε με τη μορφή συνεχούς διεργασίας. Το υλικό επικάλυψης μπορεί να είναι ένα υδατικό διάλυμα κυτταρίνης, παραγώγων αμύλου και πρωτεϊνών (Martin et al, 2015).

5.2.5 Η τεχνική electrospinning

Η μέθοδος αυτή αποτελεί συνδυασμό δύο άλλων τεχνικών, του ηλεκτροψεκασμού (electrospray) και της νηματοποίησης (spinning). Σε αυτή την τεχνική, εφαρμόζεται ένα υψηλό ηλεκτρικό πεδίο σε ένα ρευστό διάλυμα, που εξέρχεται από την άκρη της μήτρας και το οποίο δρα ως ηλεκτρόδιο. Έτσι, δημιουργείται ένας φορτισμένος πίδακας υγρού που εκτινάσσεται από την μία άκρη προς το αντίθετο ηλεκτρόδιο και με αυτό τον τρόπο προκύπτει ο σχηματισμός συνεχών ινών (Martin et al, 2015).

5.2.6 Η τεχνική επικάλυψης με ψεκασμό (spray-coating)

Στην επικάλυψη με ψεκασμό, το υλικό προς εγκλεισμό πρέπει να είναι σε στερεή μορφή, ενώ δεν είναι απαραίτητο να έχει προηγηθεί ξήρανσή του. Το υλικό διατηρείται σε κίνηση σε ένα ειδικά σχεδιασμένο δοχείο, είτε με την παροχή αέρα σε υψηλή πίεση στον πυθμένα, είτε μέσω της περιστροφής του δοχείου. Ένα υγρό υλικό επικάλυψης ψεκάζεται πάνω στο υλικό του πυρήνα και στερεοποιείται για να σχηματίσει ένα στρώμα (μεμβράνη) στην επιφάνεια. Το υλικό επίστρωσης μπορεί να εγχυθεί από πολλές γωνίες, και αυτό επηρεάζει τις ιδιότητες της επικάλυψης. Στις εφαρμογές τροφίμων η επικάλυψη είναι ως επί το πλείστον βασισμένη σε λιπίδια, αλλά μπορεί να χρησιμοποιηθεί μία ευρεία ποικιλία ενώσεων όπως η παραφίνη, παλμιτικό οξύ, ελαϊκό οξύ, μονο- ή διγλυκερίδια, φωσφολιπίδια, πρωτεΐνες (καζεΐνη, γλουτένη) και υδατάνθρακες όπως η κυτταρίνη, η κ-καρραγενάνη, και το αλγινικό άλας. Η θερμοκρασία του υλικού επικάλυψης διατηρείται συνήθως μεταξύ 60 και 120 °C κατά τη διάρκεια του ψεκασμού, ενώ η θερμοκρασία του παρεχόμενου αέρα μπορεί να κυμαίνεται μεταξύ 10 και 50 °C. Οι συνθήκες της διαδικασίας πρέπει να ρυθμιστούν, ώστε να αποφευχθεί μία ισχυρή αύξηση της θερμοκρασίας του υλικού προς εγκλεισμό. Το αρχικό μέγεθος σωματιδίων κυμαίνεται μεταξύ 100 και 1000 μm και η επικάλυψη αποτελεί το 30%-80% του βάρους του τελικού εγκλεισμένου προϊόντος (Champagne, 2008).

5.3 Τεχνικές εγκλεισμού σε σφαιρίδια πολυμερούς μήτρας

Προβιοτικά βακτήρια μπορούν να εγκλειστούν σε μικροσφαιρίδια (σφαιρίδια πηκτής ή σφαιρίδια πολυμερούς μήτρας), τα οποία συχνά επικαλύπτονται με ένα εξωτερικό στρώμα το οποίο μπορεί να σχεδιαστεί για να διαλύεται κάτω από ειδικές συνθήκες και να πραγματοποιείται έτσι η απελευθέρωση των εγκλεισμένων βακτηρίων. Οι πολυμερείς μήτρες χρησιμοποιούνται κυρίως για την προστασία των προβιοτικών

βακτηρίων έναντι συνθηκών χαμηλού pH και υψηλών συγκεντρώσεων γαστρικών οξέων, ενώ ταυτόχρονα διευκολύνουν το χειρισμό τους και επιτρέπουν την επεξεργασία των προβιοτικών βακτηρίων και την εύκολη εισαγωγή τους σε τρόφιμα.

Μπορούν να εφαρμοστούν τεχνικές εξώθησης ή γαλακτωματοποίησης για την παραγωγή πολυμερών σφαιριδίων που κυμαίνονται από 0,3 έως 3 mm σε διάμετρο (Krasaekoort et al., 2003). Το πρώτο βήμα και στις δύο τεχνικές είναι η ανάμιξη της βακτηριακής καλλιέργειας με ένα διάλυμα πολυμερούς για τη δημιουργία αιωρήματος βακτηρίων-πολυμερούς. Στην περίπτωση της εξώθησης, το αιώρημα εξωθείται μέσω βελόνας για την παραγωγή σταγονιδίων που βυθίζονται σε ρυθμιστικό διάλυμα, μέσα στο οποίο συμβαίνει ζελατινοποίηση, ενώ στην περίπτωση της γαλακτωματοποίησης το αιώρημα διασκορπίζεται σε συνεχή φάση μέσω ομογενοποίησης, προκειμένου να δημιουργηθεί ένα σταθερό γαλάκτωμα νερού σε έλαιο.

5.3.1 Η τεχνική της εξώθησης

Η εξώθηση είναι η παλαιότερη και συνηθέστερη προσέγγιση για την παρασκευή σφαιριδίων με υδροκολλοειδή και μπορεί να επιτευχθεί με την απλή ρίψη σταγονιδίων ενός υδατικού αιωρήματος προβιοτικών-πολυμερούς σε ρυθμιστικό διάλυμα. Το ρυθμιστικό διάλυμα, εντός του οποίου εισέρχονται οι σταγόνες του αιωρήματος του πολυσακχαρίτη, περιέχει ένα πολυσθενές κατιόν, το οποίο στις περισσότερες περιπτώσεις είναι το κατιόν ασβεστίου (Ca^{2+}) σε μορφή χλωριούχου ασβεστίου (CaCl_2). Αφού στερεοποιηθούν τα σταγονίδια, αποκτούν μία ζελώδη υφή. Τα προβιοτικά βακτήρια παγιδεύονται εντός ενός εγκάρσιου, τρισδιάστατου, ιοντικού αλγινικού πλέγματος (Chen, 2007). Υπάρχουν διάφορες τεχνικές παραγωγής σφαιριδίων εξώθησης όπως είναι η ηλεκτροστατική ροή, η τεχνική ομοαξονικού αέρα, η τεχνική εξώθησης με δόνηση και η τεχνική εξώθησης με ψεκάσμο. Οι παραπάνω τεχνικές βασίζονται στην εφαρμογή πίεσης για τη δημιουργία μικρότερων σταγονιδίων σε σύγκριση με αυτά που παράγονται με απλή πτώση μέσω βελόνας. Παράγοντες όπως, το ιξώδες του διαλύματος του πολυσακχαρίτη που εξωθείται, η διάμετρος της βελόνας καθώς και η απόσταση μεταξύ της βελόνας της σύριγγας και του ρυθμιστικού διαλύματος, καθορίζουν το μέγεθος και τη σφαιρικότητα των σφαιριδίων (Krasaekoort et al, 2003). Διάφοροι ερευνητές όπως οι Lee, Cha & Park, (2004), Ying et al., (2016) μελέτησαν παράγοντες που επηρεάζουν τον εγκλεισμό

προβιοτικών με τη μέθοδο της εξώθησης, όπως οι συγκεντρώσεις του αλγινικού και του ρυθμιστικού διαλύματος CaCl_2 , ο χρόνος στερεοποίησης της πολυμερικής μήτρας μόλις έρθει σε επαφή με το ρυθμιστικό διάλυμα, καθώς και η συγκέντρωση της προβιοτικής καλλιέργειας στη πολυμερική μήτρα. Η συμβατική μέθοδος ενθυλάκωσης, με αλγινικό νάτριο σε χλωριούχο ασβέστιο (CaCl_2), έχει χρησιμοποιηθεί για τον εγκλεισμό του *L. Acidophilus*, προκειμένου να προστατευθεί από τις ιδιαίτερα όξινες συνθήκες που επικρατούν στο γαστρολογικό σύστημα. Μελέτες έχουν δείξει ότι οι ακινητοποιημένες κυτταρικές καλλιέργειες ασβεστίου-αλγινικού άλατος προστατεύονται καλύτερα, όπως συμπεραίνεται από την αύξηση του αριθμού των επιζώντων μικροοργανισμών εκτεθειμένων σε διαφορετικές συνθήκες, σε σύγκριση με την μη εγκλεισμένη μορφή τους. Τα αποτελέσματα από αυτές τις μελέτες δείχνουν ότι η βιωσιμότητα των εγκλεισμένων βακτηρίων σε όξινες συνθήκες αυξάνεται αναλογικά με την αύξηση του μεγέθους της κάψουλας. Ωστόσο, οι Hansen, Allan-Wojtas, Jin και Paulson (2002) ανέφεραν ότι πολύ μεγάλα σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου ($> 1\text{mm}$) προκαλούν αλλοίωση της υφής των τροφίμων στα οποία εισάγονται και ότι μικρά σφαιρίδια μεγέθους μικρότερα των $100\ \mu\text{m}$ δεν προστατεύουν σημαντικά τα βακτήρια σε όξινες συνθήκες, σε σχέση με τα μη εγκλεισμένα κύτταρα. Αυτές οι μελέτες υποδεικνύουν ότι κατά τη μέθοδο της εξώθησης τα βακτήρια θα πρέπει να εγκλείονται σε μικροσφαιρίδια, τα οποία βρίσκονται σε ένα συγκεκριμένο εύρος μεγέθους.

Σε έρευνά τους, οι Chen, Chen, Liu, Lin και Chiu (2005), χρησιμοποίησαν ως μέσο εγκλεισμού προβιοτικών βακτηρίων, ένα μίγμα από πρεβιοτικά (φρουκτοολιγοσακχαρίτες ή γαλακτοολιγοσακχαρίτες), αυξητικούς παράγοντες (πεπτίδια) και αλγινικό νάτριο για το μικροεγκλεισμό διαφορετικών προβιοτικών όπως τα *L. acidophilus*, *L. casei*, *B. Bifidum* και *B. Longum*. Ένα μίγμα που περιείχε αλγινικό νάτριο (1% w/w) αναμεμιγμένο με πεπτίδιο (1% w/w) και φρουκτοολιγοσακχαρίτες (3% w/w) ως μέσο εγκλεισμού, εξασφάλισε την υψηλότερη επιβίωση των μικροοργανισμών σε σχέση με άλλα μέσα (Singh, 2007).

5.3.2 Η τεχνική της γαλακτωματοποίησης

Στην τεχνική της γαλακτωματοποίησης, ένας μικρός όγκος αιωρήματος κυττάρων-πολυμερούς (διεσπαρμένη φάση) προστίθεται σε ένα μεγάλο όγκο φυτικού ελαίου (συνεχής φάση) όπως σογιέλαιο, ηλιέλαιο, κραμβέλαιο ή αραβοσιτέλαιο. Το μίγμα ομοιογενοποιείται για να σχηματίσει γαλάκτωμα νερού σε έλαιο (water in oil

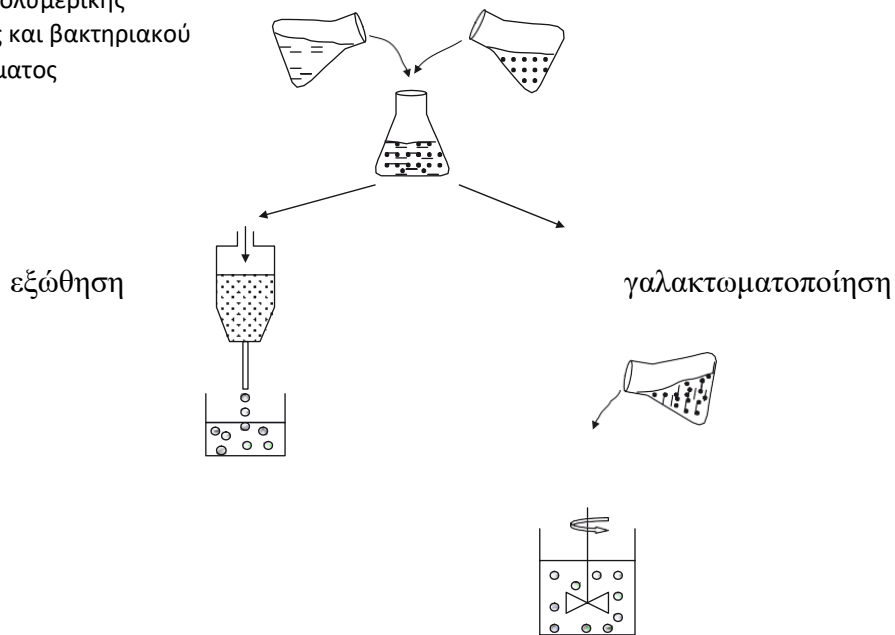
emulsion). Σε μερικές περιπτώσεις προστίθενται γαλακτωματοποιητές για να σχηματίσουν πιο σταθερά γαλακτώματα, αφού αυτά τα μέσα μειώνουν την επιφανειακή τάση των σταγονιδίων της διασκορπισμένης φάσης που οδηγεί σε μικρότερα εγκλειστικά σφαιρίδια. Ο συνηθέστερος γαλακτωματοποιητής που χρησιμοποιείται είναι το Tween 80 σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Οι κυριότεροι παράγοντες που καθορίζουν τις φυσικοχημικές ιδιότητες και τη σταθερότητα του γαλακτώματος, είναι η αναλογία ελαιώδους-υδατικής φάσης, η συγκέντρωση του γαλακτωματοποιητή, το είδος του ελαίου που χρησιμοποιείται, καθώς και η ταχύτητα ομογενοποίησης. Μόλις σχηματιστεί το γαλάκτωμα, προστίθεται ένας κατάλληλος παράγοντας, οδηγώντας στη στερεοποίηση των μικροσφαιριδίων. Στη μέθοδο της γαλακτωματοποίησης, η ρύθμιση της ταχύτητας ομογενοποίησης και της αναλογίας νερού-ελαίου καθιστά δυνατή την παραγωγή μικροσφαιριδίων στοχευμένου μεγέθους. Το μέγεθος των σφαιριδίων μπορεί να κυμαίνεται μεταξύ 25 μm και 2 nm. Η τεχνική διπλού γαλακτώματος (νερό σε έλαιο σε νερό, water in oil in water emulsion), αποτελεί μια τροποποίηση της βασικής τεχνικής στην οποία τα σταγονίδια της διεσπαρμένης φάσης περιέχουν έναν αριθμό μικρότερων διεσπαρμένων σταγονιδίων και μπορεί επίσης να είναι κατάλληλη για ενσωμάτωση προβιοτικών (Zuidam et al., 1998). Έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορα μέσα εγκλεισμού για τον εγκλεισμό προβιοτικών με τη μέθοδο της γαλακτωματοποίησης. Οι Sathyabama et al. (2014), Truelstrup et al. (2002), Shah & Ravla (2004) χρησιμοποίησαν αλγινικό, οι Adhikari et al. (2000) κ-καραγενάνη, ενώ οι Peniche et al. (2003) χρησιμοποίησαν χιτοζάνη ως μέσα εγκλεισμού. Επίσης, εγκλεισμένη καλλιέργεια προβιοτικών βακτηρίων έχει εισαχθεί με επιτυχία σε γιαούρτι από τους Adhikari et al. (2000) και τους Sultana et al., (2000), σε τυρί cheddar από τους Dinakar & Mistry (1994), σε γάλα από τους Truelstrup et al. (2002), καθώς και σε παγωτό από τους Ying et al., (2016) (Chen and Chen, 2007; Holkem et al., 2017).

5.3.3 Σταθεροποίηση των εγκλειστικών μικροσφαιριδίων με επικάλυψη τους

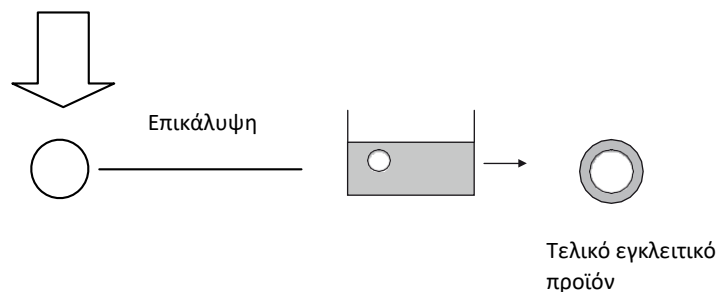
Τα εγκλεισμένα υπό μορφή μικροσφαιριδίων προβιοτικά βακτήρια μπορούν να εισαχθούν σε ένα δεύτερο διάλυμα πολυμερούς, για να δημιουργήσουν ένα στρώμα επικάλυψης, το οποίο θα παρέχει μία επιπλέον προστασία στα κύτταρα ή θα δίνει επιπρόσθετες αισθητικές ιδιότητες στο προϊόν. Ένας άλλος τρόπος για την πραγματοποίηση επικάλυψης είναι η χρήση συσκευών συν-εξώθησης, όπου ο

σχηματισμός και η επικάλυψη των σφαιριδίων συμβαίνουν ταυτόχρονα. Η επίστρωση μπορεί να πραγματοποιηθεί με κατιονικά πολυμερή, όπως η πολυαιθυλενιμίνη, η πολυπροπυλενιμίνη και η χιτοζάνη ή με συνδυασμό αυτών. Ωστόσο, αυτά τα πολυμερή έχουν περιορισμένο ιστορικό χρήσης σε τρόφιμα. Ο σχηματισμός της μεμβράνης γύρω από τα σφαιρίδια έχει ως αποτέλεσμα ισχυρότερες μικροκάψουλες και ελαχιστοποιεί την απελευθέρωση κυττάρων (Zuidam et al., 1998). Η σταθερότητα αποθήκευσης των λαμβανόμενων μικροσφαιριδίων μπορεί επίσης να ενισχυθεί μέσω ξήρανσης με ρευστοποίηση ή ξήρανσης με ψύξη, χρησιμοποιώντας κρυοπροστατευτικά πρόσθετα όπως αποβουτυρωμένο γάλα με ή χωρίς 5% σακχαρόζη και / ή 0,35% ασκορβικό οξύ.

Μίξη πολυμερικής μήτρας και βακτηριακού αιωρήματος



Μικροσφαιρίδια πολυμερικής μήτρας με εγκλεισμένα προβιοτικά βακτήρια



Σχήμα 5.1 Διαδικασία εγκλεισμού με τη μέθοδο της εξώθησης και τη μέθοδο της γαλακτωματοποίησης (Zuidam et al., 1998)

5.3.4 Σύγκριση των μεθόδων εγκλεισμού προβιοτικών

Όπως αναφέρθηκε, για τον εγκλεισμό των προβιοτικών, μεταξύ άλλων, μπορούν να εφαρμοστούν και τεχνικές εξώθησης και γαλακτωματοποίησης. Η εξώθηση είναι μία σχετικά απλή τεχνική σε σχέση με άλλες μεθόδους. Τα μικροσφαιρίδια που παράγονται παγιδεύουν ποσότητα του δραστικού υλικού και δεν το επικαλύπτουν, καθώς το υλικό επικάλυψης (ρυθμιστικό διάλυμα) δρα στην επιφάνεια του όγκου της σταγόνας πολυμερικής μήτρας και όχι στο εσωτερικό της. Αυτή η μέθοδος παρουσιάζει δυσκολίες κατά την εφαρμογή της σε μεγάλη κλίμακα λόγω του αργού ρυθμού σχηματισμού σφαιριδίων σε σχέση με τη μέθοδο της γαλακτωματοποίησης.

Αντιθέτως, η τεχνική της γαλακτωματοποίησης είναι σχετικά νέα στη βιομηχανία τροφίμων και η εφαρμογή της σε παραγωγή μεγάλης κλίμακας δεν εμφανίζει ιδιαίτερες δυσκολίες. Παράγει μικροσφαιρίδια τα οποία εγκλωβίζουν, αλλά και επικαλύπτουν το δραστικό υλικό προς εγκλεισμό, ενώ το μέγεθος των σφαιριδίων που σχηματίζονται με αυτή τη μέθοδο είναι μικρότερο (25 μm έως 2 mm) από τα σφαιρίδια που παράγονται με τη μέθοδο εξώθησης (2-5 mm). Το μέγεθος των σφαιριδίων που παραλαμβάνονται από τη μέθοδο της εξώθησης εξαρτάται κυρίως από τη διάμετρο της βελόνας που χρησιμοποιείται, ενώ το μέγεθος των σφαιριδίων που παραλαμβάνονται από τη μέθοδο γαλακτωματοποίησης εξαρτάται από την ταχύτητα ομογενοποίησης και τη συγκέντρωση του χρησιμοποιούμενου γαλακτωματοποιητή. Λόγω της χρησιμοποίησης φυτικού ελαίου στη μέθοδο της γαλακτωματοποίησης, το λειτουργικό κόστος της τεχνικής αυτής μπορεί να είναι υψηλότερο από αυτό της τεχνικής της εξώθησης (Song, 2013). Στον πίνακα 5.1 παρουσιάζονται και συγκρίνονται ορισμένα από τα βασικότερα χαρακτηριστικά μεταξύ των μεθόδων της εξώθησης και της γαλακτωματοποίησης, αλλά και άλλων τεχνικών που χρησιμοποιούνται για τον εγκλεισμό προβιοτικών βακτηρίων.

Πίνακας 5.1: Σύγκριση μεταξύ βασικών χαρακτηριστικών μεθόδων εγκλεισμού (Castillo, 2013)

Μέθοδος εγκλεισμού	Μηχανισμός	Κόστος	Ευκολία στην εκτέλεση	Τύπος παραγόμενου σωματιδίου	Μέγεθος σωματιδίου (μm)	Δυνατότητα μεταφοράς σε μεγάλη κλίμακα
Ξήρανση με ψεκασμό	Αφυδάτωση	Χαμηλό	Ναι	Σκόνη	3-100	Ναι
Λυοφιλίωση	Ξήρανση με εξάχνωση	Υψηλό	Όχι	Ακανόνιστες μορφές σωματιδίων	-	Ναι
Εξώθηση	Ανάπτυξη πολυμερικής μήτρας	Χαμηλό	Ναι	Μικροσφαιρίδια	1600-5000	Όχι
Γαλακτωματοποίηση	Ανάπτυξη πολυμερικής μήτρας	Χαμηλό	Ναι	Μικροσφαιρίδια	25-2000	Ναι
Ξήρανση με κατάψυξη	Κατάψυξη και εξάχνωση	Υψηλό	Όχι	Σκόνη	400-1400	Ναι

5.3.5 Συνδυασμός τεχνικών εγκλεισμού

Με το συνδυασμό τεχνικών εγκλεισμού μπορεί να προκύψουν ενδιαφέροντα αποτελέσματα. Οι Picot και Lacroix (Picot & Lacroix, 2004) έχουν συνδυάσει τη γαλακτωματοποίηση και την ξήρανση με ψεκασμό, για να αναπτύξουν μία μέθοδο μικροεγκλεισμού χαμηλού κόστους προσαρμόσιμη στην παραγωγή μεγάλης κλίμακας. Σε αυτή τη μέθοδο, επεξεργασμένα προβιοτικά βακτήρια υπό μορφή σκόνης, προστίθενται σε μία υδρόφοβη φάση, η οποία μπορεί να είναι άνυδρο λίπος γάλακτος. Η υδρόφοβη φάση που περιέχει το υλικό προς ενθυλάκωση προστίθεται σε υδρόφιλη φάση, στην περίπτωση αυτή σε διάλυμα πρωτεϊνικού συμπυκνώματος ορού γάλακτος σε συγκέντρωση 10% w/w. Ένα γαλάκτωμα ελαίου σε νερό παρασκευάζεται χρησιμοποιώντας ομογενοποιητή και το γαλάκτωμα στη συνέχεια

ξηραίνεται με ψεκασμό. Το προϊόν περιέχει έναν πυρήνα προβιοτικής σκόνης που έχει ένα πρώτο στρώμα επικάλυψης λίπους γάλακτος και ένα δεύτερο στρώμα επικάλυψης πρωτεϊνών ορού γάλακτος που παράγεται κατά την ξήρανση με ψεκασμό. Μία παρόμοια προσέγγιση έχει προταθεί από τους Crittenden et al. (2005) χρησιμοποιώντας διαφορετικά συστήματα ομογενοποίησης και διαφορετικούς γαλακτωματοποιητές (Champagne, 2008). Στον πίνακα 5.2 παρουσιάζονται μερικές από τις τεχνικές εγκλεισμού που αναφέρθηκαν και τα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματά τους.

Πίνακας 5.2: Τεχνικές εγκλεισμού προβιοτικών βακτηρίων. (Champagne, 2008)

Μέθοδος εγκλεισμού	Χαρακτηριστικά	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Μικροσφαιρίδια πολυμερούς μήτρας	Κύτταρα εγκλεισμένα σε πολυμερική μήτρα	Δυνατότητα ξήρανσης με αέρα	Πιθανότητα αλλοίωσης υφής του τροφίμου
	Δυνατότητα επικάλυψης μικροσφαιριδίων	Δυνατότητα ψύξης με ψεκασμό – χαμηλό κόστος	
	Υψηλό βακτηριακό φορτίο ($> 10^8$ cfu/g) σε μικροσφαιρίδια αλγινικού	Αποδεδειγμένη αντοχή σε όξινα περιβάλλοντα και συνθήκες προσομοίωσης γαστρεντερικού συστήματος	Τα μικροσφαιρίδια μπορούν να διαλυθούν αλληλεπιδρώντας με ουσίες όπως φωσφορικά άλατα και κιτρικό οξύ
		Ελεγχόμενη απελευθέρωση κυττάρων στο στομάχι	
Επικάλυψη ψεκασμό με	Το εγκλειστικό μέσο έχει συνήθως λιπαρό χαρακτήρα	Υψηλή προστασία εγκλεισμένων κυττάρων σε σύντομη έκθεση (μερικές ημέρες) σε οξέα, υγρασία και οξυγόνο	Πιθανότητα αλλοίωσης υφής του τροφίμου
	Υψηλό βακτηριακό φορτίο ($> 10^8$ cfu/g)		Αργή απελευθέρωση κυττάρων σε χαμηλές θερμοκρασίες
	Η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος στο εμπόριο	Δυνατή η επικάλυψη με πολλαπλά στρώματα εγκλειστικού μέσου για την ελεγχόμενη απελευθέρωση κυττάρων	Διαχωρισμός φάσεων σε υγρά τρόφιμα ή ποτά εάν το επικαλυπτικό υλικό έχει λιπαρό χαρακτήρα

Πίνακας 5.2 (συνέχεια): Τεχνικές εγκλεισμού προβιοτικών βακτηρίων. (Champagne, 2008)

Μέθοδος εγκλεισμού	Χαρακτηριστικά	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Ξήρανση με ψεκασμό	Επικάλυψη μεγάλης επιφάνειας κυτταρικού αιωρήματος λόγω της διασποράς του σε σταγονίδια (νέφος)	Δυνατότητα χρήσης πολλών μέσων εγκλεισμού	Αναπτύσσονται υψηλές θερμοκρασίες που καταστρέφουν πολλά βακτηριακά στελέχη.
	Μέτριο βακτηριακό φορτίο (10^7 - 10^8 cfu/g)	Ταχεία απελευθέρωση κυττάρων Ελάχιστες επιπτώσεις στην υφή του τροφίμου	Βραχυχρόνια προστασία (λίγες ώρες) που συνδέεται με τη διάλυση των σωματιδίων
Εξώθηση	Παραγωγή αιωρήματος κυττάρων- πολυμερικής μήτρας και εξώθηση του μέσω βελόνας	Δυνατότητα χρήσης πολλών μέσων εγκλεισμού	Απαιτείται σχετικά μεγάλη ποσότητα βακτηριακής καλλιέργειας για τη παραγωγή αιωρήματος και τον επιτυχή εγκλεισμό ικανοποιητικής ποσότητας βακτηρίων
	Μέτριο βακτηριακό φορτίο (10^7 - 10^8 cfu/g)	Δυνατότητα ξήρανσης των εγκλειστικών σωματιδίων με αέρα Δυνατότητα εγκλεισμού προβιοτικών κυττάρων	
Γαλακτωματοποίηση	Ομογενοποίηση υδατικής και ελαιώδους φάσης	Δυνατότητα συνδυασμού με τη μέθοδο της ξήρανσης με ψεκασμό	Οι γαλακτωματοποιητές μπορεί να είναι επιβλαβείς για τη βιωσιμότητα των κυττάρων
		Καλή προστασία λιπαρών συστημάτων από οξέα και οξυγόνο	

5.5 Μέσα Εγκλεισμού

Μία πολύ σημαντική παράμετρος για τον εγκλεισμό ενός συστατικού λειτουργικού τροφίμου είναι η επιλογή ενός κατάλληλου υλικού επίστρωσης, το οποίο αναφέρεται ως μέσο εγκλεισμού. Οι επικαλυπτικές ουσίες, που κυρίως είναι υλικά που σχηματίζουν φιλμ (μεμβράνη) μπορούν να επιλεγούν από μία ευρεία ποικιλία φυσικών ή συνθετικών πολυμερών, ανάλογα με το προς επικάλυψη υλικό και τα επιθυμητά χαρακτηριστικά των τελικών μικροκαψουλών. Το χαρακτηριστικό που καθορίζει κατά κύριο λόγο τις λειτουργικές ιδιότητες του τελικού εγκλεισμένου σωματιδίου, καθώς και του τρόπου με τον οποίον μπορεί να χρησιμοποιηθεί η εγκλεισμένη ουσία είναι η σύνθεση του υλικού επίστρωσης.

Ένα ιδανικό μέσον εγκλεισμού θα πρέπει να έχει τις ακόλουθες ιδιότητες:

- καλές ρεολογικές ιδιότητες σε υψηλές συγκεντρώσεις
- ικανότητα διασποράς ή γαλακτωματοποίησης του δραστικού υλικού και σταθεροποίηση του προκύπτοντος γαλακτώματος
- μη δυνατότητα αντίδρασης με το υλικό που πρόκειται να εγκλεισθεί, τόσο κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας, όσο και κατά την παρατεταμένη αποθήκευση
- ικανότητα σφράγισης και συγκράτησης του ενεργού υλικού εντός της δομής του κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας και αποθήκευσης
- πλήρης εξάτμιση του διαλύτη ή άλλων υλικών, τα οποία χρησιμοποιούνται κατά τη διάρκεια της διαδικασίας εγκλεισμού σε κάψουλα, υπό συνθήκες ξήρανσης ή άλλων συνθηκών συμπύκνωσης
- ικανότητα να προσφέρει μέγιστη προστασία στο βιοδραστικό υλικό έναντι περιβαλλοντικών συνθηκών (π.χ. οξυγόνο, θερμότητα, φως και υγρασία)
- διαλυτότητα σε διαλύτες αποδεκτούς από τη βιομηχανία τροφίμων (π.χ. νερό και αιθανόλη)
- χαμηλό κόστος.

Επειδή κανένα απλό υλικό επικάλυψης δεν πληρεί στην πράξη όλα τα προαναφερθέντα κριτήρια, τα υλικά επικάλυψης χρησιμοποιούνται είτε σε μεταξύ

τους συνδυασμό, είτε με τροποποιητές όπως αντιοξειδωτικά, χημικοί παράγοντες και επιφανειοδραστικές ουσίες (γαλακτωματοποιητές). Παρακάτω αναφέρονται ορισμένα εγκλειστικά μέσα που χρησιμοποιούνται για τον εγκλεισμό προβιοτικών και οι ιδιότητές τους.

5.5.1 Αλγινικό

Το αλγινικό οξύ, είναι ένας γραμμικός ετεροπολυσακχαρίτης του D-μαννουρονικού και του L-γουλουρονικού οξέος, που εξάγεται από διάφορα είδη φυκιών. Ανάλογα με την πηγή προέλευσης η αναλογία και ακολουθία του D-μαννουρονικού και του L-γουλουρονικού οξέος ποικίλουν. Αυτό είναι σημαντικό καθώς οι λειτουργικές ιδιότητες του αλγινικού σχετίζονται στενά με την αλληλουχία αυτών των δύο οξέων στη πολυμερική αλυσίδα. Επίσης, το μήκος του πολυμερούς του D-μαννουρονικού οξέος, αποτελεί το κύριο δομικό χαρακτηριστικό που επηρεάζει το σχηματισμό πηκτής. Τα δισθενή κατιόντα, όπως το Ca^{2+} κατά προτίμηση, δεσμεύονται στο πολυμερές του L-γουλουρονικού οξέος. Το αλγινικό ασβέστιο προτιμάται έναντι όλων των άλλων υλικών υποστήριξης για την ενθυλάκωση προβιοτικών λόγω της απλότητας, της μη τοξικότητας, της βιοσυμβατότητας και του χαμηλού κόστους.

Οι συγκεντρώσεις αλγινικού νατρίου και χλωριούχου ασβεστίου που χρησιμοποιούνται για το σχηματισμό των σφαιριδίων ποικίλουν και κυμαίνονται μεταξύ 1% και 3% αλγινικού άλατος με τη χρήση CaCl_2 0,05-1,5 M. Ένα πολύ χαμηλό επίπεδο συγκέντρωσης αλγινικού (0.6% αλγινικό με 0.3 M CaCl_2) χρησιμοποιήθηκε για να σχηματίσει εγκλειστικά σφαιρίδια από τους Jankowski et al. (1997). Παρόλα αυτά, τα σφαιρίδια αλγινικού που σχηματίζονται με τη χρήση αλγινικών διαλυμάτων χαμηλού ιξώδους στερούνται μηχανικής και φυσικής σταθερότητας. Η επικάλυψη αλγινικών σφαιριδίων με πολυκατιόντα και η διασύνδεσή τους με ιόντα βαρίου (Ba^{2+}) αντί για ιόντα ασβεστίου (Ca^{2+}) έχουν προταθεί για τη βελτίωση της μηχανικής σταθερότητας των μικροκαψουλών αλγινικού άλατος (Chen, 2007; Chávarri, 2010).

In vitro εργαστηριακές μελέτες σε μικροσφαιρίδια αλγινικού έχουν δείξει ότι, η απελευθέρωση των εγκλεισμένων προβιοτικών βακτηρίων μπορεί να επιτευχθεί με ανακίνηση των εγκλειστικών σφαιριδίων σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,1 M φωσφορικών ή ρυθμιστικό διάλυμα 0,1M κιτρικού οξέος σε αναδευτήρα stomacher. Τα ιόντα ασβεστίου που συγκρατούν τα αλγινικά πολυμερή εξάγονται από τα σφαιρίδια

εξαιτίας της ηλεκτρικής συγγένειάς τους με ιόντα υδροξυλίου και επομένως η οργανωμένη δομή της πηκτής αποσυντίθεται και απελευθερώνει τα προβιοτικά βακτηρίδια. Αυτή η μέθοδος απελευθέρωσης των βακτηρίων χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της αποτελεσματικότητας του εγκλεισμού (Albertini et al., 2010).

Τα επικαλυμμένα μικροσφαιρίδια αλγινικού άλατος αποδεικνύεται ότι έχουν καλύτερα προστατευτικά χαρακτηριστικά σε σύγκριση με τα μη επικαλυμμένα. Οι Krasaekoopt et al. (2004) πραγματοποίησαν τον εγκλεισμό τριών διαφορετικών προβιοτικών στελεχών σε σωματίδια αλγινικού επικαλυμμένα με τρεις τύπους υλικών (χιτοζάνη, αλγινικό νάτριο και πολυ-L-λυσίνη) και διαπίστωσαν ότι τα επικαλυμμένα με χιτοζάνη αλγινικά σφαιρίδια παρείχαν την καλύτερη προστασία για τα στελέχη *L. acidophilus* 547 και *L. casei* 01, ενώ το ευαίσθητο *B. bifidum* ATCC 1994 δεν επιβίωσε σε όξινες συνθήκες. Η χιτοζάνη, μία θετικά φορτισμένη πολυαμίνη, σχηματίζει μία ημιπερατή μεμβράνη γύρω από ένα αρνητικά φορτισμένο πολυμερές όπως το αλγινικό. Ως συνέπεια, η απελευθέρωση των κυττάρων μειώνεται έως και 40%. Η χιτοζάνη χαμηλού μοριακού βάρους διαχέεται ευκολότερα εντός της μήτρας πηκτής αλγινικού ασβεστίου, με αποτέλεσμα πυκνότερη μεμβράνη παρά με χιτοζάνη υψηλού μοριακού βάρους. Μία σύζευξη πρωτεΐνης ορού γάλακτος και πηκτίνης έχει επίσης χρησιμοποιηθεί ως προστατευτική μεμβράνη γύρω από σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου (Zuidam et al., 1998).

Ο Krasaekoopt (2006) μελέτησε την επιβίωση προβιοτικών εγκλεισμένων σε αλγινικά σφαιρίδια επικαλυμμένα με χιτοζάνη και εισηγμένα σε γιαούρτι και διαπίστωσε ότι η επιβίωση των εγκλεισμένων προβιοτικών βακτηρίων ήταν υψηλότερη από τα ελεύθερα κύτταρα κατά περίπου μία τάξη μεγέθους. Επίσης, η υψηλή βιοσυμβατότητα και η αντοχή των σωματιδίων αλγινικού επικαλυμμένων με πολυ-L-λυσίνη τα καθιστούν καλά υποψήφια για εφαρμογές σε τρόφιμα.

5.5.2 Τζελάνη και Ξανθάνη

Η τζελάνη, είναι ένας μικροβιακός πολυσακχαρίτης που προέρχεται από το μικροοργανισμό *Pseudomonas elodea* και αποτελείται από μία επαναλαμβανόμενη μονάδα τεσσάρων μορίων μονοσακχαριτών (γλυκόζη, γλυκουρονικό οξύ, γλυκόζη και ραμνόζη). Ο συνδυασμός των κόμμεων τζελάνης και ξανθάνης οδηγεί σε σχηματισμό σφαιριδίων, τα οποία δεν είναι μόνο ανθεκτικά στα οξέα, αλλά μπορούν επίσης να σταθεροποιηθούν με τη χρήση ιόντων ασβεστίου, τα οποία μπορούν να

προστατεύσουν τα κύτταρα από την όξινη βλάβη. Οι Sun και Griffiths (2000) πραγματοποίησαν εγκλεισμό *Bifidobacterium* spp. με κόμμι τζελάνης-ξανθάνης ως υλικό επικάλυψης και ανέφεραν ότι τα σφαιρίδια που προέκυψαν ήταν πολύ ανθεκτικά σε οξέα. Σε pH 2,5, ο αριθμός ζωντανών ενθυλακωμένων προβιοτικών μειώθηκε μόνο κατά 0,67 log σε 30 min, ενώ η επιβίωση των ελεύθερων κυττάρων μειώθηκε από $1.23 \cdot 10^9$ cfu/mL σε μη ανιχνεύσιμο επίπεδο στον ίδιο χρόνο (Chen, 2007).

5.5.3 κ-καραγενάνη

Η κ-καραγενάνη διαλύεται στο νερό σε θερμοκρασίες μεταξύ 60 και 90°C, ειδικά όταν βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις στο διάλυμα, όπως 2-5% w/w. Η πήξη του διαλύματος κ-καραγενάνης προκαλείται από μεταβολή της θερμοκρασίας. Προβιοτικά στελέχη προστίθενται στο διάλυμα του πολυμερούς στους 40-45°C, και η ζελατινοποίηση πραγματοποιείται με ψύξη του διαλύματος σε θερμοκρασία δωματίου. Αφού σχηματιστούν τα εγκλειστικά σφαιρίδια, χρησιμοποιούνται ιόντα K^+ (με τη μορφή KCl) για τη σταθεροποίηση του πηγματος και για την πρόληψη της διόγκωσης του διαλύματος. Ωστόσο, έχει αναφερθεί ότι το KCl έχει ανασταλτικό αποτέλεσμα σε ορισμένα βακτήρια γαλακτικού οξέος. Ως εναλλακτική λύση στα ιόντα KCl, έχουν προταθεί τα ιόντα Rb^+ , Cs^+ και NH_4^+ . Αυτά τα ιόντα, εκτός από την επίλυση του προαναφερθέντος προβλήματος, παράγουν ισχυρότερα εγκλειστικά σφαιρίδια σε σύγκριση με τα ιόντα καλίου (Martin et al., 2015).

5.5.4 Φθαλική Οξική Κυτταρίνη

Η φθαλική οξική κυτταρίνη (CAP) είναι ένα πολυμερές που χρησιμοποιείται για την ελεγχόμενη απελευθέρωση φαρμακευτικών ουσιών στο γαστρεντερικό σύστημα, λόγω της ασφαλούς για τον άνθρωπο φύσης του. Το πλεονέκτημα της CAP είναι ότι δεν διαλύεται σε όξινες συνθήκες (τιμές pH χαμηλότερες από 5), αλλά είναι διαλυτή σε τιμές pH μεγαλύτερες από 6 ως αποτέλεσμα των παρόντων φθαλικών ομάδων. Υπό αυτή την έννοια, ο μικροεγκλεισμός βακτηρίων με τη χρήση της CAP, μπορεί να προσφέρει έναν αποτελεσματικό τρόπο παράδοσης μεγάλου αριθμού βιώσιμων προβιοτικών βακτηρίων στο παχύ έντερο. Μελέτες έδειξαν ότι, η προετοιμασία γαλακτώματος με τη χρήση άμυλου και ελαίου και τη πρόσθεση φθαλικής οξικής κυτταρίνης, βελτίωσε τη βιωσιμότητα των εγκλεισμένων προβιοτικών στελεχών σε συνθήκες προσομοίωσης του γαστρικού συστήματος (Martin et al., 2015).

5.5.5 Χιτοζάνη

Η χιτοζάνη είναι ένας κατιοντικός γραμμικός πολυσακχαρίτης αποτελούμενος ουσιαστικά από συνδεδεμένες μονάδες β(1-4)-γλυκοζαμίνης και N-ακετυλογλυκοζαμίνης. Μερικές σταγόνες ενός διαλύματος χιτοζάνης αιωρούμενων σε μία ελαιώδη φάση μπορούν να στερεοποιηθούν, αντιδρώντας με γλουταραλδεΐδη, μέσω της εξάτμισης του διαλύτη ή με την προσθήκη πολυσθενών ανιόντων όπως το τριπολυφωσφορικό νάτριο (TPP). Ο ρυθμός ανάδευσης, η θερμοκρασία, η συγκέντρωση του γαλακτωματοποιητή, η συγκέντρωση του επιφανειοδραστικού πολυμερούς και τα ιξώδη των δύο φάσεων αναφέρθηκαν ότι επηρεάζουν το μέγεθος και τη μορφολογία των σωματιδίων που προκύπτουν από τη στερεοποίηση (Chen, 2007). Ωστόσο, ανασταλτικές επιδράσεις της χιτοζάνης σε διαφορετικούς τύπους βακτηρίων γαλακτικού οξέος αναφέρθηκαν από τους Groboillot et al. (1993).

5.5.6 Άμυλο

Το άμυλο είναι ένας πολυσακχαρίτης ο οποίος περιέχει πολλές μονάδες γλυκόζης που συνδέονται μεταξύ τους με γλυκοζιτικούς δεσμούς. Αποτελείται κυρίως από αμυλόζη, ένα γραμμικό πολυμερές της D-γλυκοπυρανόζης που συνδέεται με 1-4 γλυκοζιτικό δεσμό. Έχει παρατηρηθεί, ότι το ανθεκτικό άμυλο δεν αφομοιώνεται από τα ένζυμα του ανώτατου γαστρεντερικού συστήματος και μπορεί να φτάσει στο παχύ έντερο, όπου και υπόκειται σε υδρόλυση. Το χαρακτηριστικό αυτό του αμύλου το καθιστά έναν πολύ καλό υποψήφιο για τη χρήση του ως μέσο εγκλεισμού προβιοτικών βακτηρίων, καθώς αυτά μπορούν να διέλθουν από το γαστρικό σωλήνα και να απελευθερωθούν στο παχύ έντερο. Επίσης, η επιφάνεια του αμύλου είναι ιδανική για την προσκόλληση των προβιοτικών βακτηρίων, πράγμα που αποτελεί μεγάλο πλεονέκτημα αυτού του εγκλειστικού μέσου (Burgain et al, 2011). Τέλος, ένα μειονέκτημα αυτού του πολυσακχαρίτη, είναι ότι το προκύπτον διάλυμά του, έχει τις περισσότερες φορές, υψηλό ιξώδες, κάτι το οποίο δυσκολεύει τις εργασίες εγκλεισμού.

Πίνακας 5.3: Εγκλειστικά μέσα, προέλευση και ιδιότητές τους (Rathore et al. 2013).

Πολυμερές	Πηγή	Χημική δομή	Μηχανισμός ζελατινοποίησης	Ιδιότητες	Αναφορές
Άγαρ	Κόκκινα άλγη	Πολυμερής αλυσίδα με εναλλασσόμενη 1,3-D-γαλακτοπυρανόζη και 1,4-συνδεδεμένη 3,6-ανυδρο-α-γαλακτοπυρανόζη	Θερμική ζελατινοποίηση	Αντίσταση στην υποβάθμιση από τους περισσότερους μικροοργανισμούς Χαμηλή μηχανική αντοχή Υψηλό κόστος	Olguín (2012) & Rosevear (1984)
κ-καραγενάνη	Κόκκινα άλγη	Εναλασσόμενη πολυμερής αλυσίδα μονάδων β-D-γαλακτοπυρανόζης και α-D-γαλακτοπυρανόζης	Θερμική/ ιοντοτροπική ζελατινοποίηση παρουσία ιόντων καλίου ή ασβεστίου	Τοξικό προς κύτταρα λόγω περίσσειας καλίου που χρησιμοποιείται για την εγκάρσια σύνδεση των πολυμερικών αλυσίδων	Adhikari et al. (2000), Olguín (2012), Rokka & Rantamäki (2010) & Yu et al. (2002)
Άμυλο	Αραβόσιτο, πατάτα, κριθάρι, βρώμη	Μονάδες αμυλόζης και αμυλοπηκτικής συνδεδεμένες με γλυκοζιδικούς δεσμούς	Θερμική ζελατινοποίηση	Συνήθως αναμιγνύονται με μικροσφαιρίδια αλγινικού Το ανθεκτικό άμυλο δεν χωνεύεται από τα παγκρεατικά ένζυμα (αμυλάσες) στο λεπτό έντερο και μπορεί να ζυμωθεί στο παχύ έντερο	Mortazavian et al. (2007), Anal & Singh (2007), Jankowski et al. (1997), O’Riordan et al. (2001), Sajilata et al. (2006)
Χιτοζάνη	Κέλυφος οστρακοειδών	Γραμμικός πολυσακχαρίτης μονάδων γλυκοζαμίνης	Ιοντοτροπική ζελατινοποίηση παρουσία ανιόντων	Μειώνει τη βιωσιμότητα των εγκλεισμένων κυττάρων Χρησιμοποιείται κυρίως σε χαμηλή συγκέντρωση ως επικαλυπτικό υλικό για μικροσφαιρίδια	Chávarri et al. (2010), Krasaekoopt et al. (2003) & Olguín (2003)

Πίνακας 5.3 (συνέχεια): Εγκλειστικά μέσα, προέλευση και ιδιότητές τους (Rathore et al. 2013).

Πολυμερές	Πηγή	Χημική δομή	Μηχανισμός ζελατινοποίησης	Ιδιότητες	Αναφορές
Αλγινικό	Καφέ άλγη	Γραμμικός πολυσακχαρίτης του D-μαννουρονικού και του L-γουλουρονικού οξέος	Ιοντοτροπική ζελατινοποίηση παρουσία δισθενών κατιόντων	Μη τοξικότητα και εξαιρετικές ιδιότητες βιοσυμβατότητας Χαμηλό κόστος	Ding & Shah (2007)
Τζελάνη	<i>Sphingomonas elodea</i>	Γραμμικός πολυσακχαρίτης αποτελούμενος από επαναλαμβανόμενες μονάδες γλυκόζης, γλουκουρονικού οξέος	Θερμική/ιοντοτροπική ζελατινοποίηση παρουσία κατιόντων	Δύο κύριοι τύποι τζελάνης, ακετυλιωμένοι και αποακετυλιωμένοι Αντοχή σε όξινες συνθήκες Χρησιμοποιείται για τον εγκλεισμό προβιοτικών βακτηρίων	Moslemy et al. (2002) & Muthukumarasamy et al. (2006)
Ξανθάνη	<i>Xanthomonas campestris</i>	Αποτελείται από γλυκόζη, μαννόζη και γλουκουρονικό οξύ	Ιοντοτροπική ζελατινοποίηση παρουσία δισθενών κατιόντων, συνήθως ιόντων ασβεστίου	Υψηλή αντοχή στην ενζυματική αποικοδόμηση, πολύ ανθεκτική σε μεταβολές του pH	Sun & Griffiths (2000)
Πρωτεΐνες γάλακτος (όπως καζεΐνη και πρωτεΐνες ορού γάλακτος)	Γάλα	Αποτελούνται από λακτόζη και διαλυτές πρωτεΐνες ορού γάλακτος	Ζελατινοποίηση με χρήση οξέων για τις καζεΐνες και θερμική ζελατινοποίηση για τις πρωτεΐνες ορού γάλακτος	Εξαιρετικές ιδιότητες ζελατινοποίησης	Doherty et al. (2011)

5.6 Εισαγωγή εγκλεισμένων προβιοτικών σε γαλακτοκομικά τρόφιμα

Η τεχνολογία του εγκλεισμού είναι σημαντική για την επιβίωση των προβιοτικών κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης των τροφίμων και τη διέλευσή τους από το πεπτικό σύστημα. Η προσθήκη εγκλεισμένων συστατικών δεν πρέπει να επηρεάζει τις οργανοληπτικές ιδιότητες των τροφίμων (Champagne & Fustier, 2007). Για να αποφευχθούν οι αρνητικές οργανοληπτικές επιπτώσεις των μικροσφαιριδίων στα τρόφιμα, είναι επιθυμητό να ληφθεί ένα τελικό μέγεθος σωματιδίων κάτω των 100 μm.

Τυρί

Πολλές μελέτες αναφέρουν τη χρήση εγκλεισμένων προβιοτικών κυττάρων σε διάφορα τυριά και ιδιαίτερα σε τυρί Cheddar. Λόγω του σχετικά υψηλού pH (pH 5.5), το τυρί Cheddar αποτελεί έναν καλό φορέα προβιοτικών μικροοργανισμών. Επιπρόσθετα, η καλή ρυθμιστική του ικανότητα και η σχετικά υψηλή περιεκτικότητά του σε λιπαρά μπορούν να προσφέρουν προστασία στα προβιοτικά βακτήρια έναντι στην ενζυματική αποικοδόμηση και στο όξινο περιβάλλον της γαστρεντερικής οδού. Οι Dinakar και Mistry (1994) ακινητοποίησαν *Bifidobacterium bifidum* με τεχνική γαλακτωματοποίησης και τα ληφθέντα σφαιρίδια πηκτής καταψύχθηκαν και υπέστησαν λυοφιλίωση. Η προσθήκη των ακινητοποιημένων κυττάρων στο τυρί δεν ήταν ομοιόμορφη, αλλά η επιβίωση των *bifidobacteria* στο τυρί δεν επηρεάστηκε. Στην πραγματικότητα, τα κύτταρα παρέμειναν τουλάχιστον 24 εβδομάδες και δεν επηρέασαν τη γεύση και την έντασή της, ούτε την υφή και την εμφάνιση του τυριού. Αυτές οι παρατηρήσεις μπορούν να εξηγηθούν από την έλλειψη των μεταβολιτών που προκύπτουν από το μεταβολισμό των *bifidobacteria*, καθώς για την παραγωγή οξικού και γαλακτικού οξέος, τα *bifidobacteria* χρειάζονται υποστρώματα όπως η λακτόζη. Η ωρίμανση του τυριού σε χαμηλή θερμοκρασία (μεταξύ 6 και 7 °C) αποτρέπει την ανάπτυξη των *bifidobacteria*, των οποίων η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης είναι 37 °C, αλλά παραμένουν βιώσιμα. Η σύνθεση του τυριού δεν επηρεάστηκε από την προβιοτική ενσωμάτωση και η προσθήκη *bifidobacteria* στο Cheddar αποδείχτηκε πολύτιμη, αφού τα βακτήρια μπορούν να παραμείνουν ζωντανά για τουλάχιστον 6 μήνες.

Κατεψυγμένα γαλακτοκομικά επιδόρπια

Δεν είναι εύκολο να ενσωματωθούν προβιοτικοί μικροοργανισμοί σε κατεψυγμένα επιδόρπια λόγω της υψηλής οξύτητας των προϊόντων, της υψηλής ωσμωτικής πίεσης, του τραυματισμού των βακτηρίων λόγω πολύ χαμηλών θερμοκρασιών και της έκθεσης στον αέρα που βρίσκεται ενσωματωμένος στο προϊόν κατά τη διάρκεια της κατάψυξης (Chen, 2007). Η εισαγωγή προβιοτικών βακτηρίων σε εγκλεισμένη μορφή σε κατεψυγμένα επιδόρπια μπορεί να υπερβεί αυτές τις δυσκολίες και να αποφέρει χρήσιμα οφέλη για την υγεία (Chen and Chen, 2007). Η παγίδευση των γαλακτοβακίλλων στο πλέγμα ιόντων ασβεστίου-αλγινικού παρέχει υψηλότερο ποσοστό επιβίωσης (40%) σε σύγκριση με τα ελεύθερα κύτταρα, κατά την ψύξη του παγωτού (Ying et al., 2016). Οι Godward και Kailasapathy (2003) μελέτησαν την ενσωμάτωση προβιοτικών κυττάρων σε παγωτό σε διαφορετικές καταστάσεις. Οι καταστάσεις αυτές περιελάμβαναν την ύπαρξη ελεύθερων κυττάρων μέσα στο προϊόν, πρόσφατα εγκλεισμένων, εγκλεισμένων και λυοφιλιωμένων και τέλος συν-εγκλεισμένων στελεχών και λυοφιλιωμένων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα ελεύθερα κύτταρα επιβιώνουν καλύτερα από τα εγκλεισμένα κύτταρα. Τα φρέσκα ενθυλακωμένα προβιοτικά κύτταρα είχαν μεγαλύτερο ποσοστό επιβίωσης από αυτά που ξηράνθηκαν με κατάψυξη μετά από εγκλεισμό, ενώ και ο συν-εγκλεισμός του *L. acidophilus* και *B. Bifidum* ενισχύει την επιβίωση αμφοτέρων των στελεχών. Τέλος, η προσθήκη προβιοτικών δεν επηρεάζει την ενσωμάτωση του αέρα στο παγωτό.

Γιαούρτι

Η ενσωμάτωση προβιοτικών ζωντανών κυττάρων στο γιαούρτι ενισχύει τη θεραπευτική του αξία (Chen, 2007; Weichselbaum, 2009). Ωστόσο, υπάρχει χαμηλό επίπεδο προβιοτικής βιωσιμότητας στο γιαούρτι λόγω του χαμηλού pH (από 4,2 έως 4,6). Μελέτες έχουν δείξει ότι η χρήση εγκλεισμένων προβιοτικών βακτηρίων βελτιώνει την επιβίωσή τους. Επιπλέον, η ενσωμάτωση των προβιοτικών κυττάρων στα γιαούρτια θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί, χωρίς να γίνουν πολλές τροποποιήσεις στην παραδοσιακή διαδικασία (Kailasapathy, 2009).

Η ενθυλάκωση προβιοτικών κυττάρων σε σφαιρίδια που αποτελούνται από μίγμα τζελάνης-ξανθάνης είναι ένας τρόπος για να αυξηθεί η ανοχή τους σε όξινο περιβάλλον (Krasaekoort, 2014). Η εισαγωγή εγκλεισμένων προβιοτικών κυττάρων σε γιαούρτια τύπου σετ φαίνεται να αυξάνει την επιβίωση του προβιοτικού στο προϊόν. Ωστόσο, τα βακτήρια έχουν χαμηλή μεταβολική δραστηριότητα και

παράγεται μικρή ποσότητα οξικού οξέος. Αυτή η ένωση δίνει μία όξινη γεύση στο γιαούρτι και η έλλειψή της θεωρείται ως ελάττωμα. Σε άλλη μελέτη, οι Adhikari et al. (2003) πραγματοποίησαν εγκλεισμό *bifidobacteria* και ενσωμάτωση των εγκλεισμένων βακτηρίων σε αναμειγμένο γιαούρτι. Ωστόσο, οι καταναλωτές ανίχνευαν μία κοκκώδη υφή σε αυτά τα γιαούρτια (σωματίδια μεγέθους περίπου 22-50 μm). Παρόλο που ο εγκλεισμός παρέχει προστασία στα *bifidobacteria* στο γιαούρτι, η επίπτωση σε ορισμένες οργανοληπτικές ιδιότητες του προϊόντος αποτελεί σημαντικό πρόβλημα για την αποδοχή από τους καταναλωτές.

Τα προβιοτικά κύτταρα μπορούν να εγκλεισθούν μαζί με πρεβιοτικά συστατικά (π.χ. ανθεκτικό άμυλο) ή κρυοπροστατευτικά (π.χ. γλυκερόλη), για να βελτιωθεί η βιωσιμότητά τους (Sathyabama et al., 2014; Peredo et al, 2016). Έχει αποδειχθεί ότι αυτή η τεχνική ενισχύει την προβιοτική επιβίωση στο τελικό προϊόν, όχι όμως και υπό προσομοιωμένες συνθήκες γαστρεντερικών συνθηκών (Sathyabama et al. 2014).

Ο συν-εγκλεισμός είναι ένας άλλος τρόπος για την ενίσχυση της προβιοτικής βιωσιμότητας και συνίσταται στον εγκλεισμό δύο διαφορετικών προβιοτικών βακτηριακών στελεχών μαζί (Godward and Kailasapathy, 2003c). Πραγματοποιώντας σύγκριση μεταξύ επιβίωσης ελεύθερων και εγκλεισμένων κυττάρων, βρέθηκε ότι ο εγκλεισμός και ο συν-εγκλεισμός αυξάνουν την επιβίωση και συγκεκριμένα, τα λυοφιλιωμένα κύτταρα μετά τον εγκλεισμό επέζησαν καλύτερα στο γιαούρτι. Έτσι, το γιαούρτι μπορεί να είναι ένας καλός προβιοτικός φορέας, εάν τα κύτταρα εγκλείονται σε κάψουλα. Τα προστατευόμενα βακτήρια που βρίσκονται σε βιώσιμη κατάσταση κατά τη στιγμή της κατανάλωσης, θα επιβιώσουν μέσω της γαστρεντερικής οδού και θα φτάσουν στο έντερο (Godward and Kailasapathy, 2003).

Άλλες έρευνες συνιστούν τη χρήση συν-ενθυλάκωσης δύο προβιοτικών στελεχών με πρεβιοτικά, για να διεγείρουν την ανάπτυξη των βακτηρίων και να προστατεύσουν τα κύτταρα από δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες. Η έννοια του συν-εγκλεισμού επιτρέπει την αύξηση της λειτουργικής αποτελεσματικότητας των τροφίμων χάρη στη συνέργεια μεταξύ προβιοτικών και πρεβιοτικών. Η χρήση πρεβιοτικών συστατικών είναι ακόμα ένας παράγοντας για την ενίσχυση της προβιοτικής βιωσιμότητας. Έχει επίσης αποδειχθεί, ότι η επικάλυψη της κάψουλας με χιτοζάνη παρείχε καλύτερη προστασία σε προβιοτικά κύτταρα σε σχέση με το αλγινικό, όταν εξετάστηκε η

επιβίωση σε γιαούρτι και σε συνθήκες προσομοίωσης του γαστρεντερικού συστήματος (Anjani et al., 2004).

6. Πειραματικό μέρος

6.1 Σκοπός των πειραμάτων

Ο σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν ο εγκλεισμός του προβιοτικού στελέχους *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* με δύο μεθόδους, την τεχνική της εξώθησης και την τεχνική της γαλακτωματοποίησης, καθώς και η εισαγωγή των εγκλεισμένων προβιοτικών βακτηρίων σε γιαούρτι παράλληλα με την εισαγωγή της συμβατικής καλλιέργειας εκκίνησης, με σκοπό τη δημιουργία του τελικού προϊόντος προβιοτικού τροφίμου.

Η επιλογή του συγκεκριμένου στελέχους αιτιολογείται, σύμφωνα με τα όσα έχουν προαναφερθεί περί του γένους των *Bifidobacterium*, από τα διάφορα οφέλη του για τον ανθρώπινο οργανισμό, αλλά και από την ευρεία εμπορική του χρήση. Όσον αφορά τις μεθόδους εγκλεισμού, η εξώθηση αποτελεί μία τεχνική με υψηλά ποσοστά επιβίωσης των εγκλεισμένων μικροοργανισμών, ενώ η γαλακτωματοποίηση αποτελεί μία τεχνική η οποία δεν έχει μελετηθεί τόσο αναλυτικά σε σχέση με την εξώθηση, παρόλο που είναι εύκολη η δυνατότητα μεταφοράς της σε βιομηχανική κλίμακα. Ο αριθμός των ζώντων βακτηρίων της προβιοτικής καλλιέργειας που χρησιμοποιήθηκε ήταν $5 \cdot 10^{10}$ cfu/g. Η απόδοση του εγκλεισμού προσδιορίστηκε μέσω των μικροβιακών αναλύσεων στα προϊόντα εγκλεισμού. Περαιτέρω μικροβιολογικές και ποιοτικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν στα προϊόντα γιαουρτιού για την αξιολόγησή του ως προβιοτικό τρόφιμο.

6.2 Υλικά και μέθοδοι

6.2.1 Πρώτες ύλες

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 organics)
- Μαλτοδεξτρίνη (Astron)
- Ινουλίνη (Fibruline Instant)
- Φρουκτο-ολιγοσακχαρίτες (FOS) (Fibruline Instant)
- Χιτοζάνη

Επιπλέον συστατικά

- Απιονισμένο νερό
- Υπόστρωμα Man-Rogosa-Sharpe Broth (MRS Broth) (Biolife)
- Γλυκερόλη
- Άνυδρο οξικό οξύ

Ρυθμιστικό διάλυμα για τον εγκλεισμό με την τεχνική της εξώθησης

- Διάλυμα CaCl₂ σε συγκέντρωση 0,5M

Διάλυμα συνεχούς φάσης για τον εγκλεισμό με την τεχνική της γαλακτωματοποίησης

- Ελαιόλαδο
- Γαλακτωματοποιητής Tween 80

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
- Κιτρικό οξύ

6.2.2 Εργαστηριακός εξοπλισμός

Για την παρασκευή και την ανάλυση των προϊόντων εγκλεισμού και του τελικού προβιοτικού γιαουρτιού χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω εργαστηριακές συσκευές και όργανα:

- Περιστροφικό ιξωδόμετρο (Brookfield/DV-II+ Pro, USA)
- Αναλυτής υφής (Stable Micro Systems/TA-XT2i, UK)
- Μικροφίλτρο Millipore 0,22 μm
- 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
- Συσκευή ομογενοποίησης (bagmixer)
- Συσκευή μέτρησης Z-potential (Zetasizer nano-zs 2000, Malvern Instruments Ltd., UK)
- Θάλαμος επώασης μικροβιολογικών αναλύσεων
- Υάλινα σκεύη και άλλα βοηθητικά 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, στατό, Πουάρ, Πιπέτες των 1000μL και 100μL με τα αντίστοιχα tips, Αλουμινόχαρτο).

6.3 Πειραματική διαδικασία

6.3.1 Εγκλεισμός προβιοτικής καλλιέργειας με τη μέθοδο της εξώθησης (*extrusion*)

Για τον εγκλεισμό των προβιοτικών μικροοργανισμών με τη μέθοδο της εξώθησης παρασκευάστηκαν 3 εγκλειστικά μίγματα. Η συγκέντρωση της προβιοτικής καλλιέργειας σε αυτά τα δείγματα ήταν 1,5% w/v. Τα συστατικά και οι συγκεντρώσεις καθενός εκ των τριών μιγμάτων επιλέχθηκαν ύστερα από βιβλιογραφική έρευνα. Πραγματοποιήθηκε θερμική επεξεργασία των παραγόμενων μιγμάτων στους 80 °C και στους 121 °C, προκειμένου να προσδιοριστεί η επίπτωση της θερμοκρασίας επεξεργασίας των μιγμάτων στην ικανότητα εγκλεισμού. Παρακάτω παρουσιάζονται τα τρία εγκλειστικά μίγματα και αναλύεται η διαδικασία προετοιμασίας τους.

1ο εγκλειστικό μίγμα: μίγμα αλγινικού νατρίου-μαλτοδεξτρίνης

- Αλγινικό νάτριο 1,5% w/v
- Μαλτοδεξτρίνη 2% w/v
- Υπόστρωμα Man-Rogosa-Sharpe Broth (MRS Broth) 5,5% w/v
- Γλυκερόλη 5,5% v/v

2ο εγκλειστικό μίγμα: μίγμα αλγινικού νατρίου-ινουλίνης

- Αλγινικό νάτριο 1,5% w/v
- Ινουλίνη 2% w/v
- Υπόστρωμα Man-Rogosa-Sharpe Broth (MRS Broth) 5,5% w/v
- Γλυκερόλη 5,5% v/v

3ο εγκλειστικό μίγμα: μίγμα αλγινικού νατρίου-φρουκτο-ολιγοσακχαριτών (FOS)

- Αλγινικό νάτριο 1,5% w/v
- Φρουκτο-ολιγοσακχαρίτες 2% w/v
- Υπόστρωμα Man-Rogosa-Sharpe Broth (MRS Broth) 5,5% w/v
- Γλυκερόλη 5,5% v/v

Η διαδικασία προετοιμασίας των διαφορετικών εγκλειστικών μέσων της μεθόδου της εξώθησης είχε ως εξής: τα στερεά συστατικά ζυγίστηκαν σε ζυγό ακριβείας 0,1 g, ενώ η γλυκερόλη ογκομετρήθηκε με σιφόνιο των 10 mL και όλα προστέθηκαν σε ποτήρι ζέσεως που περιείχε κατάλληλη ποσότητα νερού. Το προκύπτον μίγμα τοποθετήθηκε σε θερμαινόμενη πλάκα στους 80 °C και αναδεύτηκε με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα, με αποτέλεσμα την ομογενοποίησή του. Προς αποφυγή απωλειών, το ποτήρι ζέσεως που περιείχε το εγκλειστικό μίγμα καλύφθηκε με αλουμινόχαρτο. Παράλληλα με την προετοιμασία του εγκλειστικού μίγματος, είχε προετοιμαστεί και επαρκής ποσότητα διαλύματος CaCl_2 0,5 M στους 80 °C σε ποτήρι ζέσεως. Ακολούθως το εγκλειστικό μίγμα και το ρυθμιστικό διάλυμα τοποθετήθηκαν εντός παγόλουτρου μέχρι να αποκτήσουν θερμοκρασία 35-40 °C. Έπειτα, τοποθετήθηκε στο ποτήρι ζέσεως που περιείχε το εγκλειστικό μίγμα, κατάλληλα ζυγισμένη ποσότητα προβιοτικής καλλιέργειας, ώστε να προκύψει συγκέντρωση 1,5% w/v. Ακολούθησε ανάδευση του μίγματος σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, μέχρι την ομογενοποίησή του. Το εγκλειστικό μίγμα μεταφέρθηκε στάγδην εντός του διαλύματος CaCl_2 , με τη βοήθεια σύριγγας των 10 mL. Η απόσταση μεταξύ του στομίου εξόδου της σύριγγας και της επιφάνειας του διαλύματος ήταν περίπου 50 cm. Το εγκλειστικό μίγμα σχημάτισε ακαριαία, μόλις ήρθε σε επαφή με το διάλυμα CaCl_2 , σφαιρίδια εγκλεισμού. Τα προκύπτοντα σφαιρίδια διαχωρίστηκαν από το διάλυμα με διαδικασία διήθησης υπό κενό. Έπειτα, τα σφαιρίδια ξεπλύθηκαν 2 φορές με απιονισμένο νερό και τοποθετήθηκαν σε τρυβλία για την αποθήκευσή τους στους 4°C.

Η παραπάνω διεργασία εγκλεισμού επαναλήφθηκε δύο φορές για κάθε εγκλειστικό μίγμα που χρησιμοποιήθηκε στη μέθοδο της εξώθησης, με τη διαφορά ότι πραγματοποιήθηκε θερμική επεξεργασία σε αποστειρωτήρα στους 121 °C για 15 min με σκοπό την αποστείρωση, τόσο των εγκλειστικών μιγμάτων, όσο και των αντίστοιχων ρυθμιστικών διαλυμάτων CaCl_2 . Στα εγκλειστικά μίγματα που επεξεργάστηκαν στους 121 °C έγινε επίσης, εκτός των άλλων υλικών, και προσθήκη ξανθάνης συγκέντρωσης 0,5% w/v, και ομογενοποίησή τους σε ήπια θερμοκρασία με τη βοήθεια θερμαινόμενης πλάκας. Η προσθήκη ξανθάνης πραγματοποιήθηκε, προκειμένου το ιξώδες των εγκλειστικών μιγμάτων να διατηρηθεί υψηλό μετά τη θερμική τους επεξεργασία στους 121 °C και να μπορέσει να επιτευχθεί εγκλεισμός.

Εκτός από τη θερμική επεξεργασία στους 80 και στους 121 °C, προετοιμάστηκαν και δείγματα εγκλειστικών μιγμάτων τα οποία επεξεργάστηκαν στους 80 °C και τα

προκύπτοντα σφαιρίδια τοποθετήθηκαν σε διάλυμα χιτοζάνης 0,8% w/v, όπου πραγματοποιήθηκε ήπια ανάδευση για 10 min, με τη χρήση μαγνητικού αναδευτήρα, προκειμένου να πραγματοποιηθεί επικάλυψη των σφαιριδίων αλγινικού με χιζοτάνη. Αμέσως μετά, ακολούθησε ο διαχωρισμός των σωματιδίων από το διάλυμα με διήθηση υπό κενό, έκπλυση με απιονισμένο νερό 2 φορές και αποθήκευση τους στους 4 °C.

6.3.2 Εγκλεισμός προβιοτικής καλλιέργειας με τη μέθοδο της γαλακτωματοποίησης (emulsification)

Για τον εγκλεισμό των προβιοτικών μικροοργανισμών με τη μέθοδο της γαλακτωματοποίησης παρασκευάστηκαν 4 διαφορετικά εγκλειστικά μίγματα. Η συγκέντρωση της προβιοτικής καλλιέργειας σε αυτά τα δείγματα ήταν και εδώ 1,5% w/v. Παρακάτω παρουσιάζονται τα τέσσερα εγκλειστικά μίγματα και αναλύεται η διαδικασία προετοιμασίας τους.

4^ο εγκλειστικό μίγμα: μίγμα αλγινικού

- Αλγινικό νάτριο 2% w/v
- Γλυκερόλη 5,5% v/v

5^ο εγκλειστικό μίγμα: μίγμα αλγινικού νατρίου-ινουλίνης

- Αλγινικό νάτριο 2% w/v
- Ινουλίνη 2% w/v
- Γλυκερόλη 5,5% v/v

6^ο εγκλειστικό μίγμα: μίγμα αλγινικού νατρίου-ολιγοφρουκτόζης (FOS)

- Αλγινικό νάτριο 2% w/v
- Ολιγοφρουκτόζη (FOS) 2% w/v
- Γλυκερόλη 5,5% v/v

7^ο εγκλειστικό μίγμα: μίγμα αλγινικού νατρίου-μαλτοδεξτρίνης

- Αλγινικό νάτριο 2% w/v
- Μαλτοδεξτρίνη 2% w/v
- Γλυκερόλη 5,5% v/v

Η διαδικασία προετοιμασίας των διαφορετικών εγκλειστικών μέσων της μεθόδου γαλακτωματοποίησης είχε ως εξής: αρχικά, ζυγίστηκαν τα στερεά υλικά σε ζυγό ακριβείας, ενώ ογκομετρήθηκε ποσότητα γλυκερόλης με σιφώνιο των 10mL και προστέθηκαν σε ποτήρι ζέσεως, μαζί με κατάλληλη ποσότητα απιονισμένου νερού, έτσι ώστε να προκύψουν οι προαναφερθείσες συγκεντρώσεις. Το προκύπτον μίγμα τοποθετήθηκε σε θερμαινόμενη πλάκα στους 80 °C και αναδεύτηκε με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα, με αποτέλεσμα την ομογενοποίησή του.

Μετά την ολοκλήρωση της ανάδευσης, το εγκλειστικό μίγμα τοποθετήθηκε εντός παγόλουτρου μέχρι να αποκτήσει θερμοκρασία 35-40 °C. Έπειτα ζυγίστηκε σε ζυγό ακριβείας κατάλληλη ποσότητα προβιοτικής καλλιέργειας και τοποθετήθηκε εντός του διαλύματος. Ακολούθησε ήπια ανάδευση του μίγματος μέχρι ομογενοποίησής του.

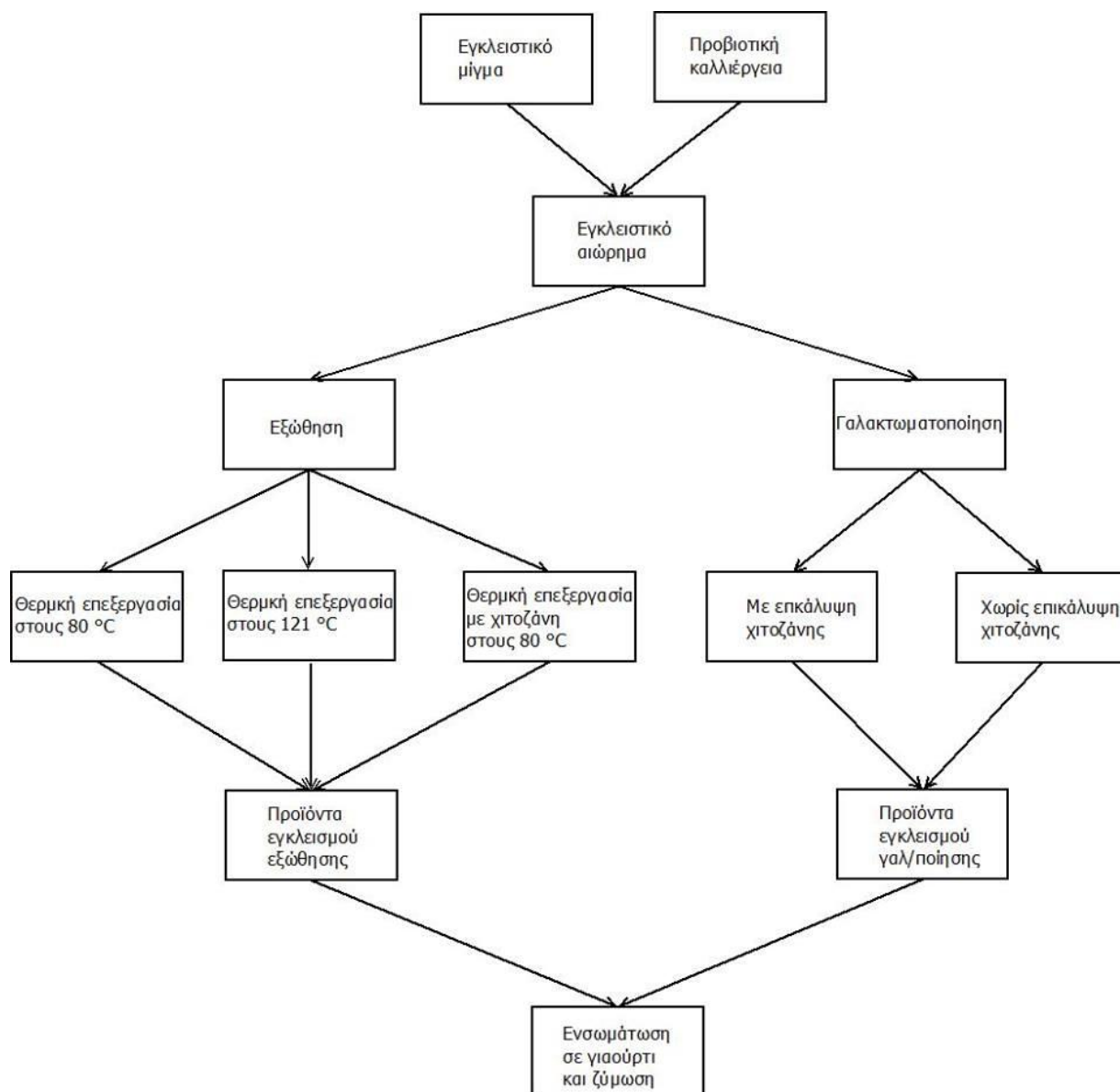
Ταυτόχρονα, ογκομετρήθηκε ποσότητα ελαιόλαδου και κατάλληλη ποσότητα γαλακτωματοποιητή Tween 80, προκειμένου να προκύψει συγκέντρωση γαλακτωματοποιητή στο έλαιο 0,2% v/v, και το μίγμα προστέθηκε σε ποτήρι ζέσεως. Το προκύπτον μίγμα αναδεύτηκε με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα, προκειμένου να ομογενοποιηθεί. Επιπλέον, προετοιμάστηκε επαρκής ποσότητα διαλύματος CaCl₂ 0,5 M.

Ακολούθως, ογκομετρήθηκε κατάλληλη ποσότητα του μίγματος ελαιόλαδου-γαλακτωματοποιητή, έτσι ώστε να τηρηθεί μια αναλογία 1:3 των μιγμάτων αλγινικού και ελαιόλαδου και τα δύο μίγματα τοποθετήθηκαν στο ίδιο ποτήρι ζέσεως. Με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα ακολούθησε η ομογενοποίηση του τελικού πλέον μίγματος στα 1000-1200 rpm για 5 min. Κατά την ομογενοποίηση πραγματοποιήθηκε η διασπορά της υδατικής φάσης (μίγμα αλγινικού) στη λιπαρή φάση (ελαιόλαδο), με αποτέλεσμα το σχηματισμό γαλακτώματος. Μετά την ολοκλήρωση της ομογενοποίησης, προστέθηκε στο γαλάκτωμα το διάλυμα CaCl₂ υπό ήπια ανάδευση, με το οποίο αντέδρασε η διεσπαρμένη υδατική φάση, με αποτέλεσμα τον άμεσο σχηματισμό εγκλεισμένων σωματιδίων. Αφού ολοκληρώθηκε η διαδικασία σχηματισμού των εγκλεισμένων σωματιδίων και διαχωρίστηκαν οι δύο φάσεις, τα προκύπτοντα σωματίδια διαχωρίστηκαν από το μίγμα με φυγοκέντρωση, εκπλύθηκαν 2 φορές με απιονισμένο νερό και αποθηκεύτηκαν σε τρυβλία στους 4 °C.

Η παραπάνω διεργασία εγκλεισμού επαναλήφθηκε δύο φορές για κάθε εγκλειστικό μίγμα που χρησιμοποιήθηκε στη μέθοδο της γαλακτωματοποίησης, με μόνη διαφορά τη μεταφορά των σωματιδίων που προέκυψαν σε διάλυμα χιτοζάνης 0,8% w/v, όπου

πραγματοποιήθηκε ήπια ανάδευση για 10 min, με τη χρήση μαγνητικού αναδευτήρα, προκειμένου να πραγματοποιηθεί επικάλυψη των σφαιριδίων αλγινικού με χιζοτάνη. Αμέσως μετά, ακολούθησε ο διαχωρισμός των σωματιδίων από το διάλυμα με διήθηση υπό κενό, έκπλυση με απιονισμένο νερό 2 φορές και αποθήκευσή τους στους 4 °C. Στα προϊόντα εγκλεισμού προερχόμενα από τις δύο διαφορετικές μεθόδους υπολογίζεται η απόδοση του εγκλεισμού, με βάση την αρχική ποσότητα προβιοτικών βακτηρίων στο εγκλειστικό μίγμα (θεωρητική τιμή) ως προς την αντίστοιχη ποσότητα προβιοτικών βακτηρίων στα εγκλεισμένα προϊόντα και εκφράζεται %. Το πλήθος των προβιοτικών βακτηρίων προσδιορίζεται με εκλεκτική μικροβιολογική ανάλυση όπως παρουσιάζεται παρακάτω.

Παρακάτω παρουσιάζεται το διάγραμμα ροής των δύο μεθόδων εγκλεισμού που εφαρμόστηκαν για τη καλύτερη κατανόηση της πειραματικής διαδικασίας που ακολουθήθηκε.



Διάγραμμα 6.1: Διάγραμμα ροής των μεθόδων εξώθησης και γαλακτωματοποίησης.

6.3.3 Ζύμωση Γιαουρτιού

Η διαδικασία παραγωγής του γιαουρτιού που ακολουθήθηκε σε όλα τα πειράματα ζύμωσης είναι η εξής: Αρχικά, γίνεται η ογκομέτρηση 1 L ομογενοποιημένου πλήρους γάλακτος το οποίο τοποθετείται σε μεταλλικό σκεύος μέσα σε υδατόλουτρο και θερμαίνεται στους 85 °C για 15 min. Παράλληλα, πραγματοποιείται ήπια ανάδευση του θερμαινόμενου γάλακτος με τη χρήση μηχανικού αναδευτήρα. Μετά τη διαδικασία της παστερίωσης, το γάλα ψύχεται στους 45 °C και πραγματοποιείται ο εμβολιασμός του γάλακτος με 1 g συμβατικής καλλιέργειας εκκίνησης. Ακολουθεί ήπια ανάδευση του μίγματος, προκειμένου να επιτευχθεί ομοιόμορφη διάλυση της

καλλιέργειας στο γάλα. Έπειτα, ζυγίζονται σε κατάλληλα κύπελα όμοιες ποσότητες των δειγμάτων των εγκλεισμένων προβιοτικών καλλιεργειών (με βάση το πλήθος των προβιοτικών βακτηρίων που έχει προσδιοριστεί με μικροβιολογική ανάλυση ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο εγκλειστικό μίγμα σε κάθε μέθοδο εγκλεισμού) και προστίθεται σε αυτά ορισμένη ποσότητα από το ήδη εμβολιασμένο με τη συμβατική καλλιέργεια γάλα, ώστε να προκύπτει βακτηριακό φορτίο της εγκλεισμένης προβιοτικής καλλιέργειας $7,5 \cdot 10^{10}$ cfu/L γάλακτος. Τα κύπελα μεταφέρονται σε θάλαμο επώασης ρυθμισμένο στους 45 °C, όπου και παραμένουν μέχρι τη λήξη της ζύμωσης, η οποία σηματοδοτείται μόλις το pH φθάνει στην τιμή 4,5. Η καταγραφή του pH πραγματοποιείται ανά 5 min με τη βοήθεια ηλεκτρονικών pH-μετρων. Μετά τη λήξη της διαδικασίας της ζύμωσης, λαμβάνεται η μέτρηση ιξώδους του παραγόμενου γιαουρτιού με τη βοήθεια ιξωδόμετρου Brookfield στη θερμοκρασία ζύμωσης (45 °C). Έπειτα, τα κύπελα αποθηκεύονται στους 4 °C και μετά από 24 h πραγματοποιείται πάλι μέτρηση του ιξώδους, καθώς και ανάλυση υφής του γιαουρτιού, ενώ αυτό βρίσκεται περίπου στη θερμοκρασία αποθήκευσης (4 °C).

6.4 Αναλύσεις - Μετρήσεις

6.4.1 Μικροβιολογικές Αναλύσεις

Προϊόντα εγκλεισμού (εγκλεισμένα βακτήρια)

Για τη μέτρηση του προβιοτικού στελέχους *Bifidobacterium Animalis* subsp. *Lactis* στα προϊόντα εγκλεισμού και από τις δύο μεθόδους εγκλεισμού, παρασκευαζόταν κατάλληλο υπόστρωμα με τις εξής πρώτες ύλες στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις:

- Πεπτόνη καζεΐνης: 10 g/L
- Εκχύλισμα κρέατος: 5 g/L
- Εκχύλισμα ζωμού: 5 g/L
- Εκχύλισμα σόγιας: 5 g/L
- Γλυκόζη: 10 g/L
- Tween 80: 0,1% v/v
- K_2HPO_4 : 2 g/L

- $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$: 0,2 g/L
- $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$: 0,05 g/L
- NaCl : 5 g/L
- Κυστεΐνη - $\text{HCl} \times \text{H}_2\text{O}$: 0,5 g/L
- Διάλυμα αλάτων 4% v/v
 - $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$: 0,25 g/L
 - $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$: 0,5 g/L
 - K_2HPO_4 : 1 g/L
 - KH_2PO_4 : 1 g/L
 - NaHCO_3 : 10 g/L
 - NaCl : 2 g/L

Η διαδικασία προετοιμασίας που ακολουθείται για τη μικροβιολογική ανάλυση των προϊόντων εγκλεισμού είναι η εξής:

Για κάθε τρυβλίο απαιτούνται περίπου 15 mL υποστρώματος, ενώ παρασκευάζεται και κατάλληλη ποσότητα διαλύματος Ringer, σύμφωνα με τις οδηγίες του προμηθευτή. Για κάθε αραίωση απαιτούνται 9 mL διαλύματος Ringer. Επίσης παρασκευάζεται ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού οξέος 0,05 M, μέσα στο οποίο πρόκειται να τοποθετηθεί το προϊόν εγκλεισμού που προορίζεται για μικροβιολογική ανάλυση. Η χρήση του ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικού οξέος αποσκοπεί στη διαλυτοποίηση των εγκλεισμένων σφαιριδίων, την απελευθέρωση των προβιοτικών μικροοργανισμών και την ομογενοποίηση του προς ανάλυση δείγματος. Για κάθε δείγμα εγκλειστικού προϊόντος απαιτούνται 20 mL ρυθμιστικού διαλύματος. Η φιάλη που περιέχει το υπόστρωμα, χωρίς την προσθήκη της L-κυστεΐνης, και η φιάλη με το ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού οξέος καλύπτονται με υδρόφοβο βαμβάκι και αλουμινόχαρτο πριν την εισαγωγή τους στον αποστειρωτήρα. Ομοίως, με αλουμινόχαρτο καλύπτονται οι βάσεις των tips, το σιφόνιο και ένα μικροφίλτρο Millipore 0.22 μm . Ακολούθως, όλα τα παραπάνω μεταφέρονται σε συσκευή αποστείρωσης όπου και αποστειρώνονται στους 121 °C για 15 min. Κατά τη διάρκεια

της αποστείρωσης, πραγματοποιείται προετοιμασία και καθαρισμός του πάγκου εργασίας με οινόπνευμα.

Μετά την ολοκλήρωση της αποστείρωσης, το δοχείο με το ρυθμιστικό διάλυμα μεταφέρεται σε υδατόλουτρο όπου και ψύχεται στους 40-45 °C. Έπειτα το δείγμα προς ανάλυση ζυγίζεται εντός του αποστειρωμένου θαλάμου, τοποθετείται σε αποστειρωμένο περιέκτη μαζί με το ρυθμιστικό διάλυμα και μεταφέρεται στον ομογενοποιητή bagmixer, όπου και αναδεύεται για περίπου 1 min. Το ομογενοποιημένο μίγμα αντιστοιχεί στην πρώτη αραιώση. Από το δείγμα αυτό λαμβάνεται 1 mL και τοποθετείται στον πρώτο αποστειρωμένο σωλήνα μαζί με επιπλέον 9 mL Ringer. Ύστερα λαμβάνεται 1 mL από τον πρώτο σωλήνα και τοποθετείται στο δεύτερο σωλήνα μαζί με 9 mL Ringer και ούτω καθεξής, έως ότου επιτευχθεί ο επιθυμητός αριθμός αραιώσεων. Έπειτα, 1 mL δείγματος λαμβάνεται εις διπλούν από συγκεκριμένο σωλήνα για καλύτερη επαναληψιμότητα της μέτρησης και τοποθετείται σε τρυβλίο. Η προετοιμασία του υποστρώματος ολοκληρώνεται με την προσθήκη του διαλύματος της κυστεΐνης με τη βοήθεια αποστειρωμένης σύριγγας και ενός φίλτρου Millipore 0,22 μm, αφού το υπόστρωμα φτάσει σε κατάλληλη θερμοκρασία προκειμένου να μην υπάρξει μετουσίωση της κυστεΐνης. Σε κάθε τρυβλίο τοποθετούνται 15 mL από το υπόστρωμα, μοιρασμένα σε δύο στρώσεις, προκειμένου να εξασφαλισθούν αναερόβιες συνθήκες. Μόλις ολοκληρωθεί η ανωτέρω διαδικασία, τα τρυβλία τοποθετούνται μέσα σε θάλαμο επώασης στους 37 °C, για 72 h.

Η διαδικασία προετοιμασίας που ακολουθείται για τη μικροβιολογική ανάλυση των προϊόντων γιαουρτιού είναι η εξής:

Για τη μικροβιακή ανάλυση στα τελικά προϊόντα γιαουρτιού τα οποία εμπεριέχουν τα εγκλεισμένα προβιοτικά βακτήρια χρησιμοποιείται το εξειδικευμένο υπόστρωμα TOS-MUP. Σε 475 mL TOS άγαρ προστίθενται 25 mL MUP ή ένα σφραγισμένο φιαλίδιο εμπορίου και 25 mL απιονισμένου και αποστειρωμένου νερού. Η ποσότητα υποστρώματος που απαιτείται ανά τρυβλίο είναι περίπου 15 mL TOS-MUP. Εκτός από το υπόστρωμα προετοιμάζεται και κατάλληλη ποσότητα διαλύματος Ringer το οποίο χρησιμοποιείται για τις αραιώσεις στους αποστειρωμένους σωλήνες, γνωρίζοντας ότι 9 mL διαλύματος είναι αναγκαία για κάθε αραιώση. Όπως και στη μικροβιακή ανάλυση των προϊόντων εγκλεισμού, παρασκευάζεται ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού οξέος 0,05 M το οποίο χρησιμεύει στην απελευθέρωση των

εγκλεισμένων προβιοτικών βακτηρίων και στην ομογενοποίηση του δείγματος γιαουρτιού. Ακόμη, 100 mL απιονισμένου νερού ογκομετρούνται σε κωνική φιάλη, η οποία σφραγίζεται με υδρόφοβο βαμβάκι και αλουμινόχαρτο. Επίσης, καλύπτονται με αλουμινόχαρτο οι βάσεις των tips, το σιφόνιο, καθώς και ένα μικροφίλτρο Millipore 0,22 μm . Όλα τα παραπάνω, εκτός του εμπορικού σκευάσματος MUP, μεταφέρονται στη συσκευή αποστείρωσης, όπου και αποστειρώνονται στους 120 °C για 15 min. Κατά τη διάρκεια της αποστείρωσης, πραγματοποιείται προετοιμασία και καθαρισμός του πάγκου εργασίας με οινόπνευμα.

Μετά την ολοκλήρωση της αποστείρωσης, μεταφέρονται στον πάγκο το TOS άγαρ, το αποστειρωμένο νερό, 1 σφραγισμένο φιαλίδιο εμπορίου MUP το οποίο διατηρείται στο ψυγείο, 1 σφραγισμένη σύριγγα των 5 mL και το μικροφίλτρο Millipore 0,22 μm . Με τη βοήθεια της σύριγγας μεταφέρονται στο φιαλίδιο του MUP, 25 mL απιονισμένου και αποστειρωμένου νερού και ανακινούνται ελαφρώς. Στη συνέχεια μέσω της σύριγγας και αφού έχει προστεθεί το μικροφίλτρο Millipore, το διάλυμα MUP μεταφέρεται στο δοχείο με το TOS άγαρ. Έπειτα το δοχείο αναδεύεται ήπια, προκειμένου να ομογενοποιηθεί το τελικό υπόστρωμα και αποθηκεύεται σε υδατόλουτρο στους 50 °C μέχρι να χρησιμοποιηθεί.

Μέσα στο θάλαμο ζυγίζονται σε αποστειρωμένο περιέκτη 2 g γιαουρτιού και προστίθενται σε αυτό 18 g ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικού οξέος. Έπειτα ο περιέκτης μεταφέρεται στον ομογενοποιητή bagmixer για 1 min. Το ομογενοποιημένο δείγμα αποτελεί την πρώτη αραιώση. Για τη δεύτερη αραιώση μεταφέρεται 1 mL δείγματος σε αποστειρωμένο σωλήνα και προστίθενται 9 mL Ringer. Αντίστοιχα, πραγματοποιούνται και οι επόμενες αραιώσεις, έως ότου επιτευχθεί ο επιθυμητός αριθμός αραιώσεων. Ακολούθως, 1 mL δείγματος μεταφέρεται από τους σωλήνες με τη βοήθεια πιπέτας στα τρυβλία, όπου και προστίθενται 15 mL υποστρώματος TOS-MUP σε δυο στρώσεις, για να εξασφαλισθούν αναερόβιες συνθήκες. Μόλις ολοκληρωθεί η ανωτέρω διεργασία, τα τρυβλία τοποθετούνται μέσα σε θάλαμο επώασης στους 37 °C για 72 h.

6.4.2 Μετρήσεις ζ-δυναμικού στα εγκλειστικά μίγματα

Πραγματοποιήθηκε μέτρηση ζ-δυναμικού στα διαφορετικά εγκλειστικά μίγματα των δύο μεθόδων εγκλεισμού, καθώς και στα διαλύματα CaCl_2 . Αρχικά, μετρήθηκαν η απορρόφηση και ο δείκτης διάθλασης του κάθε μίγματος. Συγκεκριμένα, μετρήθηκε η απορρόφηση στα 633 nm και ο δείκτης διάθλασης του κάθε εγκλειστικού μίγματος.

Για το διάλυμα CaCl_2 , θεωρήθηκε ότι έχει ίδιες τιμές δείκτη διάθλασης και απορρόφησης στα 633 nm με τις αντίστοιχες του νερού, συνεπώς δεν πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις. Με τη βοήθεια των παραπάνω δεδομένων και της συσκευής μέτρησης ζ-δυναμικού ελήφθησαν οι μετρήσεις του ζ-δυναμικού στα διάφορα εγκλειστικά μίγματα και των δύο μεθόδων εγκλεισμού.

6.4.3 Μετρήσεις κατά τη ζύμωση του γάλακτος και στο τελικό προϊόν γιαουρτιού

Οι μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν κατά τη διαδικασία ζύμωσης του γάλακτος καθώς και οι μετρήσεις στο τελικό προϊόν γιαουρτιού είναι οι εξής:

1. Παρακολούθηση της εξέλιξης της ζύμωσης του γάλακτος με τη μέτρηση του pH ανά 5 min, με τη χρήση ηλεκτρονικού pH-μέτρου.
2. Μέτρηση της συνολικής χρονικής διάρκειας της ζύμωσης, δηλαδή έως την τιμή pH του ζυμωμένου γάλακτος ίσο με 4,5.
3. Μέτρηση του ιξώδους του προϊόντος γιαουρτιού αμέσως μετά τον τερματισμό της ζύμωσης, με τη χρήση περιστροφικού ιξωδόμετρου (θεωρήθηκε ότι το γιαούρτι βρισκόταν περίπου σε θερμοκρασία ζύμωσης, δηλαδή 45 °C).
4. Μέτρηση του ιξώδους του γιαουρτιού μετά από 24 h αποθήκευσής του σε θερμοκρασία 4 °C (θεωρήθηκε ότι το γιαούρτι βρισκόταν περίπου στη θερμοκρασία αποθήκευσής του κατά τη λήψη της μέτρησης).
5. Ανάλυση υφής του γιαουρτιού (μέτρηση σκληρότητας, προσκολλησιμότητας και υπολογισμός της συνεκτικότητας και του κομμιώδους) μετά από 24 h αποθήκευσης του σε θερμοκρασία 4 °C (θεωρήθηκε ότι το γιαούρτι βρισκόταν περίπου στη θερμοκρασία αποθήκευσής του κατά τη λήψη της μέτρησης).
6. Μικροβιολογικός έλεγχος του γιαουρτιού με τη διαδικασία που έχει προαναφερθεί (σε διάστημα μικρότερο της μίας εβδομάδας από την ζύμωση του δείγματος).

6.5 Σχεδιασμός Πειραμάτων

Η παρούσα διπλωματική εργασία περιλαμβάνει 2 σειρές πειραμάτων. Στη 1^η σειρά επιχειρήθηκε ο εγκλεισμός του προβιοτικού στελέχους *Bifidobacterium Animalis* subps. *Lactis* μέσω της τεχνικής της εξώθησης. Στη 2^η σειρά πειραμάτων

επιχειρήθηκε ο εγκλεισμός του ίδιου στελέχους μέσω της τεχνικής της γαλακτωματοποίησης. Επίσης, η κάθε σειρά πειραμάτων περιλάμβανε, μετά την ολοκλήρωση των εγκλεισμών, μικροβιολογική ανάλυση του εγκλεισμένου προϊόντος, μέσω της οποίας υπολογίστηκε η απόδοση του εγκλεισμού, συσχετίζοντας την αρχική ποσότητα προβιοτικών βακτηρίων στο μίγμα (θεωρητική τιμή) με τα προκύπτοντα αποτελέσματα της μικροβιολογικής ανάλυσης των εγκλεισμένων προϊόντων με το εκάστοτε εγκλειστικό μίγμα. Σε κάθε μέθοδο εγκλεισμού χρησιμοποιήθηκαν διάφορα μέσα εγκλεισμού και παρασκευάστηκαν εγκλειστικά μίγματα, τα οποία παρατίθενται στον πίνακα 6.5.1. Επίσης, προστέθηκαν στα διάφορα εγκλειστικά μίγματα και συστατικά (πρεβιοτικά) τα οποία διεγείρουν την ανάπτυξη και μεταβολική δραστηριότητα των προβιοτικών βακτηρίων, προκειμένου να βελτιωθεί το βακτηριακό φορτίο των προβιοτικών τόσο στα προϊόντα εγκλεισμού, όσο και στα προϊόντα γιαουρτιού. Κατά την 1η πειραματική σειρά, που περιλαμβάνει τον εγκλεισμό των βακτηρίων μέσω εξώθησης, έγινε διπλή παρασκευή εγκλειστικών μιγμάτων, με σκοπό τη θερμική επεξεργασία τους σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες: 80 °C και 121 °C. Η θερμοκρασία των 121 °C επιλέχθηκε, προκειμένου να εξασφαλισθούν στείρες συνθήκες στα εγκλειστικά μίγματα μέσα στα οποία προστέθηκε η προβιοτική καλλιέργεια προς εγκλεισμό. Πέρα από την επεξεργασία των εγκλειστικών μιγμάτων σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες πραγματοποιήθηκαν και πειράματα εξώθησης, στα οποία πραγματοποιήθηκε επικάλυψη των προϊόντων εγκλεισμού με χιτοζάνη, με σκοπό τη μελέτη της επίδρασης της χιτοζάνης στη διαδικασία παραγωγής γιαουρτιού, καθώς και την δομική ενίσχυση των προϊόντων εγκλεισμού. Στη 2^η πειραματική σειρά, που περιλαμβάνει τον εγκλεισμό μέσω γαλακτωματοποίησης, πραγματοποιήθηκε πάλι διπλή παρασκευή των εγκλειστικών μιγμάτων, με σκοπό τη μελέτη της βιωσιμότητας των προβιοτικών βακτηρίων στα προϊόντα εγκλεισμού, μετά την επικάλυψη των εγκλειστικών προϊόντων με χιτοζάνη. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός γάλακτος με συμβατική καλλιέργεια εκκίνησης και με τις εγκλεισμένες καλλιέργειες που προέκυψαν έπειτα από κάθε μέθοδο εγκλεισμού, με σκοπό την παραγωγή γιαουρτιού και τη μελέτη της επίδρασης των εγκλεισμένων βακτηρίων στη διαδικασία της ζύμωσης. Επίσης, πραγματοποιήθηκαν πειράματα στα οποία το γάλα εμβολιάστηκε αποκλειστικά με τη συμβατική καλλιέργεια εκκίνησης και τα δείγματα αυτά θεωρήθηκαν ως τυφλά.

Πίνακας 6.5.1: Σύνολο πειραμάτων εγκλεισμού του στελέχους *Bifidobacterium*

Animalis subsp. Lactis

	Κωδικοποίηση	Εγκλειστικό Μίγμα	Πειραματική σειρά 1A (χωρίς επικάλυψη χιτοζάνης)	Πειραματική σειρά 1B (με επικάλυψη χιτοζάνης)
			Θερμοκρασία επεξεργασίας (°C)	
1 ^η πειραματική σειρά: Εγκλεισμός με Εξώθηση	1 ^ο εγκλειστικό μίγμα	<ul style="list-style-type: none"> Αλγινικό νάτριο Μαλτοδεξτρίνη MRS Broth Γλυκερόλη 	80 121	80
	2 ^ο εγκλειστικό μίγμα	<ul style="list-style-type: none"> Αλγινικό νάτριο Ινουλίνη MRS Broth Γλυκερόλη 	80 121	80
	3 ^ο εγκλειστικό μίγμα	<ul style="list-style-type: none"> Αλγινικό νάτριο Φρουκτο-ολιγοσακχαρίτες MRS Broth Γλυκερόλη 	80 121	80
Επικάλυψη Χιτοζάνης				
2 ^η πειραματική σειρά: Εγκλεισμός με Γαλακτωματοποίηση	4 ^ο εγκλειστικό μίγμα (Μίγμα Αλγινικού)	<ul style="list-style-type: none"> Αλγινικό νάτριο Γλυκερόλη 	Με επικάλυψη	Χωρίς επικάλυψη
	5 ^ο εγκλειστικό μίγμα (Μίγμα Αλγινικού - Ινουλίνης)	<ul style="list-style-type: none"> Αλγινικό νάτριο Ινουλίνη Γλυκερόλη 	Με επικάλυψη	Χωρίς επικάλυψη
	6 ^ο εγκλειστικό μίγμα (Μίγμα Αλγινικού - Ολιγοφρουκτόζης)	<ul style="list-style-type: none"> Αλγινικό νάτριο Φρουκτο-ολιγοσακχαρίτες Γλυκερόλη 	Με επικάλυψη	Χωρίς επικάλυψη
	7 ^ο εγκλειστικό μίγμα (Μίγμα Αλγινικού - Μαλτοδεξτρίνης)	<ul style="list-style-type: none"> Αλγινικό νάτριο Μαλτοδεξτρίνη Γλυκερόλη 	Με επικάλυψη	Χωρίς επικάλυψη

7. Αποτελέσματα και συζήτηση αποτελεσμάτων

Στην παρακάτω ενότητα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν ύστερα από τη διεξαγωγή πειραμάτων και την επεξεργασία των δεδομένων των μετρήσεων.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις βακτηριακού φορτίου στα προϊόντα εγκλεισμού (εγκλεισμένα βακτήρια) και ο προσδιορισμός της απόδοσης εγκλεισμού των προβιοτικών, μέσω της σύγκρισης του μικροβιακού φορτίου της εγκλεισμένης καλλιέργειας με την αρχική ποσότητα προβιοτικών που προστέθηκαν στο εγκλειστικό μέσο. Σε αυτό το σημείο θα πρέπει να υπογραμμιστεί ότι η αρχική συγκέντρωση της προβιοτικής καλλιέργειας για όλα τα δείγματα και των δύο μεθόδων ήταν 1,5% w/v (g προβιοτικής καλλιέργειας ανά mL εγκλειστικού μίγματος), ενώ το βακτηριακό φορτίο της προβιοτικής καλλιέργειας που χρησιμοποιήθηκε ήταν 5×10^{10} cfu/g (μικροοργανισμοί ανά g προβιοτικής καλλιέργειας). Δεδομένων αυτών των στοιχείων υπολογίστηκε το αρχικό φορτίο προβιοτικών μικροοργανισμών που εγκλείστηκε σε κάθε δείγμα. Επίσης πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις σχετικά με την εξέλιξη της ζύμωσης του γάλακτος προς γιαούρτι μέσω της παρακολούθησης της μεταβολής του pH του εμβολιασμένου γάλακτος. Η χρονική διάρκεια της ζύμωσης μετρήθηκε μέχρις ότου το pH να λάβει τιμή 4,5. Τα δεδομένα που ελήφθησαν από τη διαδικασία της ζύμωσης προσαρμόστηκαν στο μοντέλο Gompertz τεσσάρων παραμέτρων με τη βοήθεια του προγράμματος SigmaPlot 10.0 και υπολογίστηκαν η διάρκεια λανθάνουσας φάσης (λ) και ο μέγιστος ρυθμός μείωσης του pH (μ) της ζύμωσης. Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκαν ανάλυση υφής και μετρήσεις ιξώδους και μικροβιακού φορτίου στα προϊόντα γιαουρτιού που περιείχαν εγκλεισμένη προβιοτική καλλιέργεια. Από τις παραπάνω αναλύσεις και μετρήσεις εξάγονται συμπεράσματα τόσο για την αποτελεσματικότητα του εγκλεισμού ανάλογα με τη μέθοδο και τις συνθήκες, όσο και για τη διατήρηση της δραστηριότητας των προβιοτικών κατά την ζύμωση του γάλακτος και στο τελικό προϊόν γιαουρτιού. Τέλος, παρατίθενται τα αποτελέσματα που προκύπτουν ύστερα από τη στατιστική επεξεργασία των παραπάνω αποτελεσμάτων, η οποία πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος STATISTICA 7.

7.1 Πρώτη σειρά πειραμάτων

7.1.1 Αποτελέσματα μετρήσεων πειραματικής σειράς 1α

Εγκλεισμός προβιοτικών βακτηρίων με την τεχνική εξώθησης με θερμική επεξεργασία των εγκλειστικών μιγμάτων στους 80 °C και 121 °C

Από τις μικροβιολογικές αναλύσεις των προϊόντων εγκλεισμού πρόκυψαν τα παρακάτω αποτελέσματα για τα πειράματα εγκλεισμού των προβιοτικών μέσω της μεθόδου της εξώθησης.

7.1.1.1 Βακτηριακό φορτίο προϊόντος εγκλεισμού

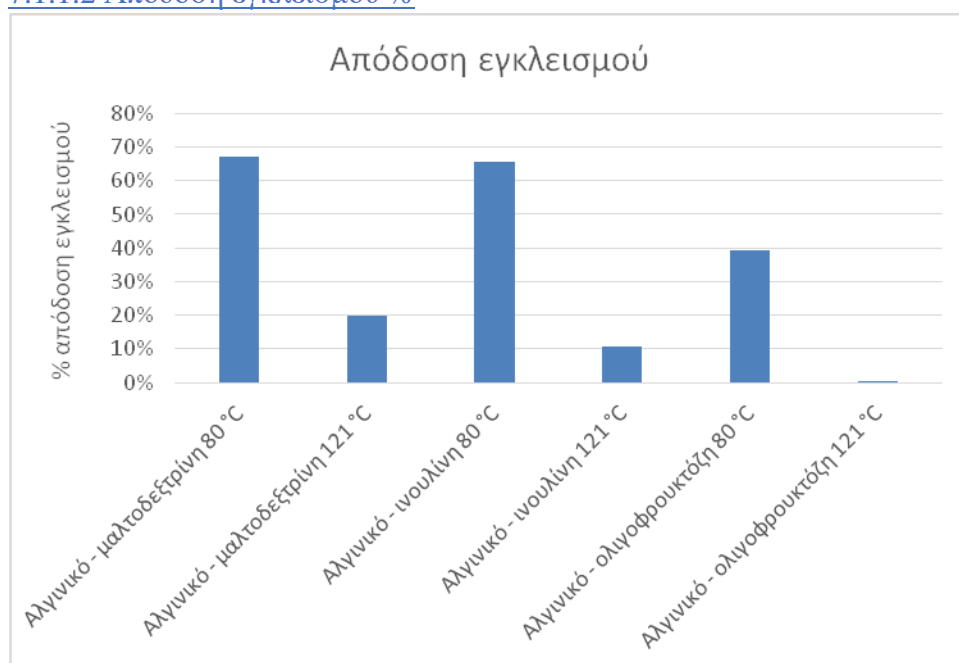


Διάγραμμα 7.1 Βακτηριακό φορτίο προϊόντων εγκλεισμού 1^{ης} πειραματικής σειράς (εξώθηση)

Από διάγραμμα 7.1, παρατηρείται ότι οι τιμές των εγκλεισμένων προϊόντων με μίγματα επεξεργασμένα στους 80 °C εμφανίζουν μεγαλύτερο βακτηριακό φορτίο σε σχέση με τα αντίστοιχα με εγκλειστικά μίγματα επεξεργασμένα στους 121 °C. Συγκεκριμένα, το προϊόν εγκλεισμού με μίγμα αλγινικού-μαλτοδεξτρίνης επεξεργασμένο στους 80 °C εμφανίζει το μεγαλύτερο βακτηριακό φορτίο, εν αντιθέσει με το προϊόν με μίγμα αλγινικού-ολιγοφρουκτόζης επεξεργασμένο στους 121 °C που εμφανίζει το μικρότερο βακτηριακό φορτίο σε σχέση με τα υπόλοιπα εγκλειστικά μίγματα.

Από τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων προκύπτει πως το βακτηριακό φορτίο των προϊόντων εγκλεισμού των δειγμάτων επηρεάζεται σημαντικά από τη θερμοκρασία επεξεργασίας του εγκλειστικού μίγματος. Πιο συγκεκριμένα, όπως παρατηρήθηκε και από το διάγραμμα, μεγαλύτερο βακτηριακό φορτίο προκύπτει για τα δείγματα με εγκλειστικά μίγματα σε θερμοκρασία επεξεργασίας τους 80 °C, λόγω του ότι η επεξεργασία του εγκλειστικού μίγματος σε υψηλή θερμοκρασία φαίνεται να αποδυναμώνει τη σταθερότητα του πλέγματος που δημιουργείται μόλις το αλγινικό έρχεται σε επαφή με τα ιόντα ασβεστίου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την πιθανότητα έκθεσης των προβιοτικών βακτηρίων σε εξωτερικούς παράγοντες (π.χ. οξέα) και την καταστροφή τους.

7.1.1.2 Απόδοση εγκλεισμού %



Διάγραμμα 7.2 Απόδοση εγκλεισμού % δειγμάτων 1^{ης} πειραματικής σειράς

Όπως προέκυψε και από τα διαγράμματα ανάλυσης του βακτηριακού φορτίου των προϊόντων εγκλεισμού, τα δείγματα προϊόντων εγκλεισμού που περιέχουν εγκλεισμένη καλλιέργεια σε μίγματα επεξεργασμένα στους 121 °C, εμφανίζουν μικρότερο ποσοστό απόδοσης εγκλεισμού σε σχέση εκείνα που περιέχουν εγκλεισμένη καλλιέργεια σε μίγματα θερμικά επεξεργασμένα στους 80 °C. Συγκεκριμένα, το μικρότερο ποσοστό απόδοσης εγκλεισμού εμφανίζει το δείγμα αλγινικού-ολιγοφρουκτόζης επεξεργασμένο στους 121 °C, ενώ το μεγαλύτερο

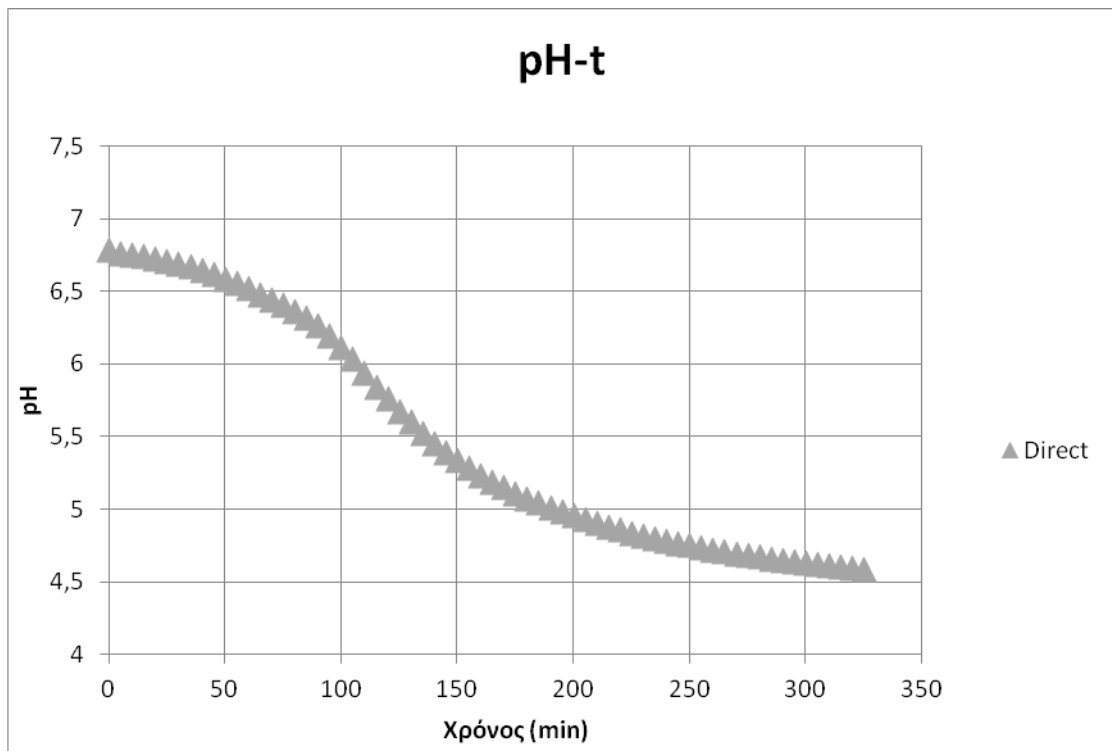
ποσοστό απόδοσης εμφανίζει το δείγμα με το μίγμα αλγινικού-μαλτοδεξτρίνης επεξεργασμένο στους 80 °C.

Από τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων προκύπτει πως το ποσοστό απόδοσης εγκλεισμού των δειγμάτων επηρεάζεται σημαντικά από τη θερμοκρασία επεξεργασίας του εγκλειστικού μίγματος. Πιο συγκεκριμένα, όπως παρατηρήθηκε και από το διάγραμμα μεγαλύτερο ποσοστό απόδοσης προκύπτει για θερμοκρασία επεξεργασίας 80 °C. Το γεγονός αυτό είναι λογικό καθώς, όπως παρατηρήθηκε και από τα αποτελέσματα των βακτηριακών φορτίων των προϊόντων εγκλεισμού, τα εγκλειστικά μίγματα που επεξεργάστηκαν στους 80 °C εμφάνισαν υψηλότερα επίπεδα βιωσιμότητας σε σχέση με εκείνα που επεξεργάστηκαν στους 120 °C. Έτσι, καθώς η απόδοση εγκλεισμού βασίζεται στη συσχέτιση των βακτηριακών φορτίων των προϊόντων εγκλεισμού, με το αρχικό βακτηριακό φορτίο που εμβολιάστηκε στα εγκλειστικά μίγματα το οποίο είναι σταθερό σε όλες τις περιπτώσεις, είναι φυσικό η απόδοση των μιγμάτων που επεξεργάστηκαν στους 80 °C να είναι υψηλότερη.

Χρήση εγκλεισμένων προβιοτικών βακτηρίων στην ζύμωση γιαουρτιού

Μετά την ολοκλήρωση των πειραμάτων εγκλεισμού των προβιοτικών μικροοργανισμών με την τεχνική της εξώθησης, ακολούθησε η ενσωμάτωση των προϊόντων εγκλεισμού σε γάλα το οποίο εμβολιάστηκε και με σταθερή ποσότητα συμβατικής καλλιέργειας εκκίνησης (1g/L) σε κάθε περίπτωση, για την παραγωγή

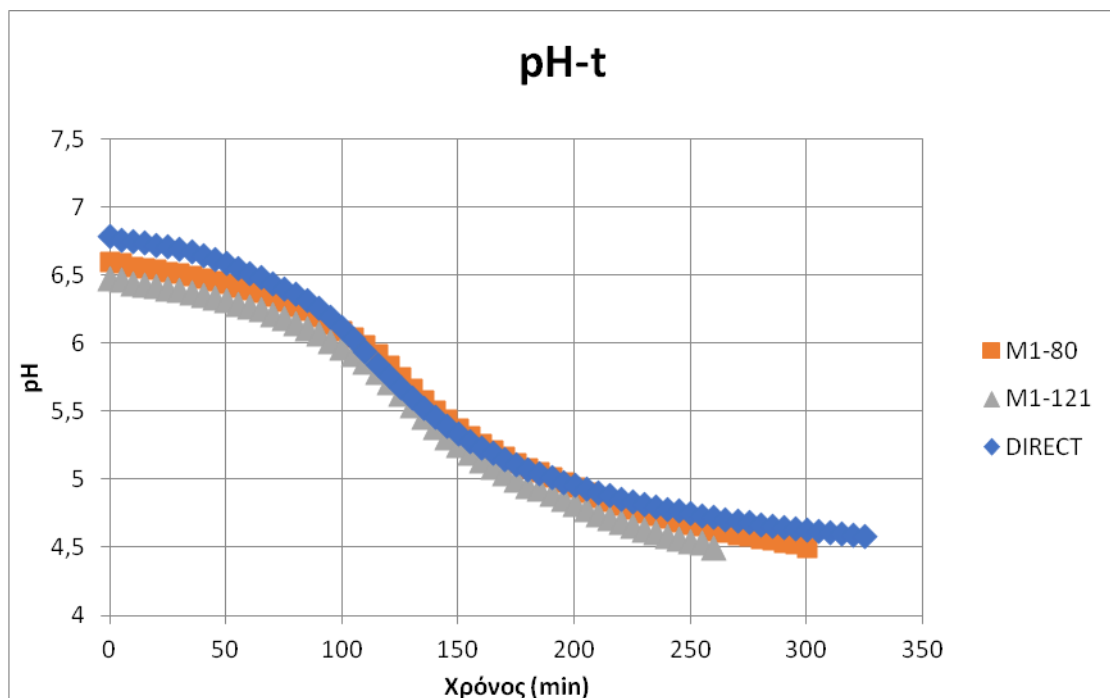
7.1.1.3 Ζύμωση με συμβατική καλλιέργεια εκκίνησης (Direct ή τυφλό δείγμα)



Διάγραμμα 7.3 Μεταβολή pH συναρτήσει του χρόνου κατά την ζύμωση του γάλακτος με μη εγκλεισμένη συμβατική καλλιέργεια εκκίνησης (Direct).

Στο διάγραμμα 7.3 παρουσιάζεται η μεταβολή του pH κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Η καμπύλη εμφανίζει σιγμοειδή μορφή και εφαρμόζεται με ικανοποιητική ακρίβεια στο μοντέλο Gompertz τεσσάρων παραμέτρων ($R^2 > 99\%$). Στο διάγραμμα διακρίνεται η λανθάνουσα φάση, η φάση μέγιστης μείωσης του pH καθώς και η φάση τερματισμού της ζύμωσης.

7.1.1.4 Ζύμωση με εγκλεισμένη καλλιέργεια, με μίγμα αλγινικού νατρίου-μαλτοδεξτρίνης-MRS broth-γλυκερόλης θερμικά επεξεργασμένο στους 80 °C και 121 °C



Διάγραμμα 7.4 Μεταβολή pH συναρτήσει του χρόνου κατά την ζύμωση του γάλακτος με εγκλεισμένη προβιοτική καλλιέργεια σε μίγμα αλγινικού-μαλτοδεξτρίνης θερμικά επεξεργασμένο στους 80 °C και 121 °C

Παρατηρείται από το διάγραμμα 7.4 ότι, η ζύμωση γάλακτος που περιέχει εγκλεισμένη καλλιέργεια σε μίγμα αλγινικού-μαλτοδεξτρίνης, θερμικά επεξεργασμένου τόσο στους 80 °C όσο και στους 121 °C, εμφανίζει μικρότερη διάρκεια σε σχέση με το τυφλό. Επίσης, όσον αφορά τα δείγματα γιαουρτιού με εγκλεισμένη καλλιέργεια αλγινικού-μαλτοδεξτρίνης, η ζύμωση του δείγματος με μίγμα επεξεργασμένο στους 121 °C απαιτεί το λιγότερο χρόνο για την ολοκλήρωσή της.

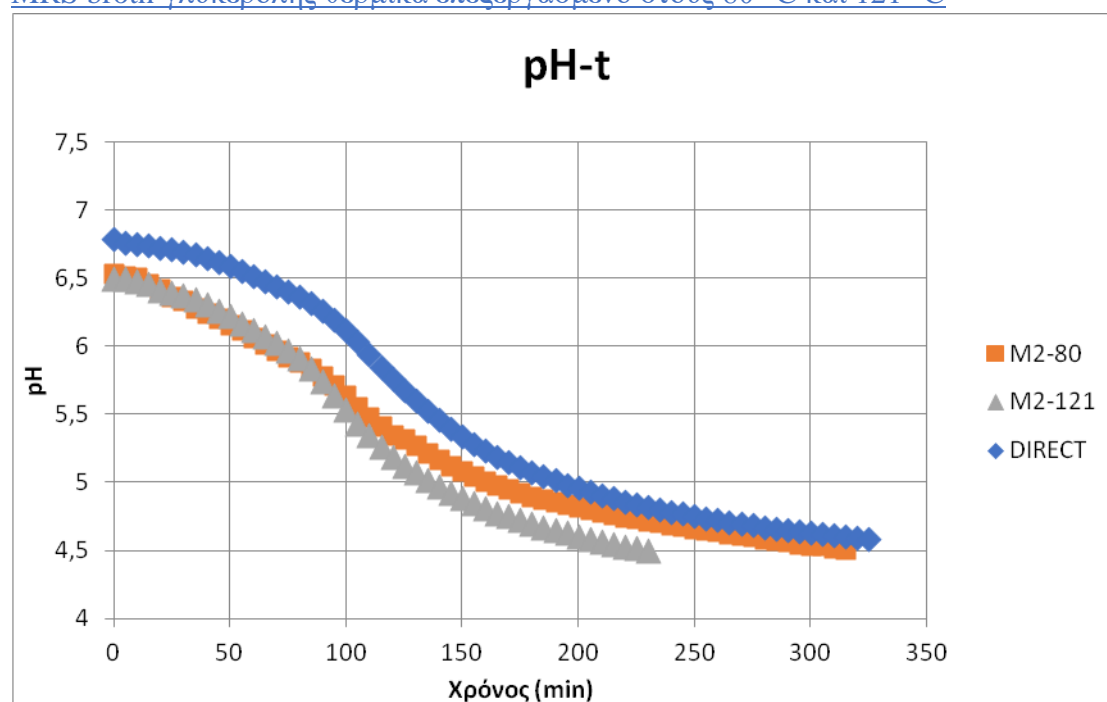
Πίνακας 7.1 Αποτελέσματα μετρήσεων των προϊόντων εγκλεισμού και της ζύμωσης γάλακτος προς γιαούρτι με εγκλεισμένη προβιοτική καλλιέργεια σε μίγμα αλγινικού-μαλτοδεξτρίνης-MRS Broth-γλυκερόλης

Χαρακτηριστικό	Τυφλό	Θερμική επεξεργασία στους 80 °C	Θερμική Επεξεργασία στους 121 °C
Συνολική διάρκεια ζύμωσης (min)	325	300	260
Μέγιστος ρυθμός μείωσης pH, μ	-0,013	-0,0123	-0,0133
Διάρκεια λανθάνουσας φάσης pH, λ (min)	206,11	219,38	205,02
Ιξώδες μετά την ζύμωση στους 45 °C (cP)	6000	5500	4880
Ιξώδες μετά από 24h αποθήκευσης στους 4 °C (cP)	16250	15320	15740
Σκληρότητα (N)	0,853	0,567	0,628
Συνεκτικότητα	0,527	0,510	0,471
Προσκολλησιμότητα (N*s)	0,542	0,357	0,203
Κομμιώδες (N)	0,447	0,262	0,296
Βακτηριακό φορτίο εγκλεισμένου προϊόντος (cfu/g)	-	6,70E+08	1,73E+08
Βακτηριακό φορτίο προϊόντος γιαουρτιού (cfu/g)	-	9,60E+05	1,08E+04
Ποσοστό εγκλεισμένης καλλιέργειας (%)	-	67%	20%

Από τον πίνακα 7.1 εξάγονται κάποια χρήσιμα συμπεράσματα. Η συνολική διάρκεια ζύμωσης εμφανίζει μεγαλύτερη τιμή για το τυφλό δείγμα και ελάχιστη για το γιαούρτι που περιέχει τα προϊόντα εγκλεισμού σε εγκλειστικό μίγμα θερμικά επεξεργασμένο στους 121 °C. Ο μέγιστος ρυθμός μείωσης του pH δεν εμφανίζει αξιόλογη διαφορά μεταξύ των τριών δειγμάτων γιαουρτιού. Επιπλέον, το δείγμα με

επεξεργασμένο μίγμα στους 80 °C παρουσιάζει ελαφρώς μεγαλύτερη διάρκεια λανθάνουσας φάσης του pH. Το ιζώδες μετά την ζύμωση είναι υψηλότερο για το τυφλό και χαμηλότερο για το δείγμα με θερμικά επεξεργασμένο μίγμα στους 121 °C, ενώ αντίστοιχα το ιζώδες, μετά από αποθήκευση για 24h στους 4°C, είναι υψηλότερο στο τυφλό και χαμηλότερο στο δείγμα με θερμικά επεξεργασμένο μίγμα στους 80 °C. Τα χαρακτηριστικά της υφής των δειγμάτων με εγκλεισμένη προβιοτική καλλιέργεια παρουσιάζουν χαμηλότερες τιμές σε σχέση με αυτές του τυφλού. Όσον αφορά το βακτηριακό φορτίο του προϊόντος εγκλεισμού του επεξεργασμένου δείγματος στους 80 °C, εμφανίζει παρόμοια τιμή με αυτή του επεξεργασμένου δείγματος στους 121 °C, αλλά εμφανώς μεγαλύτερη τιμή στο αντίστοιχο βακτηριακό φορτίο του γιαουρτιού. Αυτό υποδεικνύει τον ασθενέστερο εγκλεισμό της προβιοτικής καλλιέργειας στο εγκλειστικό μέσο επεξεργασμένο στους 121 °C σε σχέση με το επεξεργασμένο στους 80 °C. Για το λόγο αυτό η συμβολή των προβιοτικών στη διεργασία της ζύμωσης είναι μεγαλύτερη για το δείγμα που περιέχει το εγκλεισμένο προϊόν με μίγμα επεξεργασμένο στους 121 °C. Τέλος, η απόδοση εγκλεισμού του επεξεργασμένου δείγματος στους 80 °C είναι εμφανώς μεγαλύτερη από την αντίστοιχη απόδοση του έτερου δείγματος.

7.1.1.5 Ζύμωση με εγκλεισμένη καλλιέργεια, σε μίγμα αλγινικού νατρίου-ινουλίνης-MRS broth-γλυκερόλης θερμικά επεξεργασμένο στους 80 °C και 121 °C



Διάγραμμα 7.5 Μεταβολή pH συναρτήσει του χρόνου κατά την ζύμωση του γάλακτος με εγκλεισμένη προβιοτική καλλιέργεια σε μίγμα αλγινικού-ινουλίνης θερμικά επεξεργασμένο στους 80 °C και 121 °C

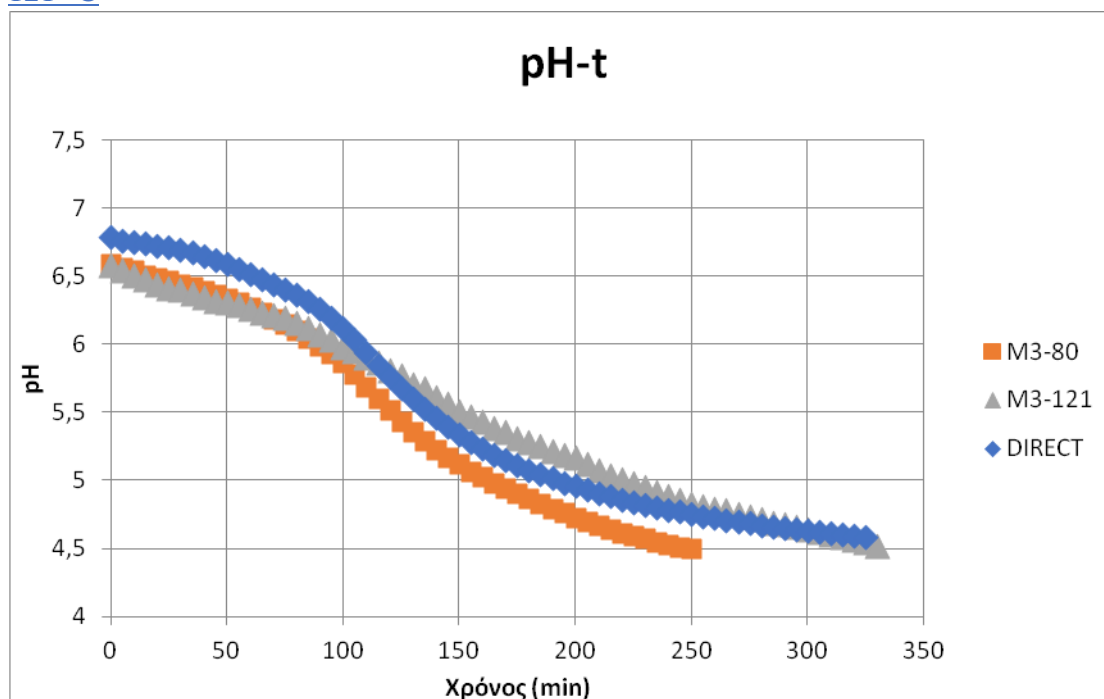
Η ζύμωση γιαουρτιού που περιέχει εγκλεισμένη καλλιέργεια σε μίγμα αλγινικού-ινουλίνης, θερμικά επεξεργασμένο τόσο στους 80 °C όσο και στους 121 °C, εμφανίζει μικρότερη διάρκεια ζύμωσης σε σχέση με το τυφλό. Επίσης, παρατηρείται ότι το δείγμα γιαουρτιού που περιέχει εγκλεισμένη καλλιέργεια σε μίγμα επεξεργασμένο στους 121 °C εμφανίζει υψηλότερη τιμή μέγιστου ρυθμού μείωσης pH, σε σχέση με το δείγμα με μίγμα επεξεργασμένο στους 80 °C.

Πίνακας 7.2 Αποτελέσματα μετρήσεων των προϊόντων εγκλεισμού και της ζύμωσης γάλακτος προς γιαούρτι με εγκλεισμένη προβιοτική καλλιέργεια σε μίγμα αλγινικού-ινουλίνης-MRS Broth-γλυκερόλης

Χαρακτηριστικό	Τυφλό	Θερμική επεξεργασία στους 80 °C	Θερμική Επεξεργασία στους 121 °C
Συνολική διάρκεια ζύμωσης (min)	325	315	230
Μέγιστος ρυθμός μείωσης pH, μ	-0,013	-0,0104	-0,0154
Διάρκεια λανθάνουσας φάσης pH, λ (min)	206,11	198,16	163,57
Ιξώδες μετά την ζύμωση στους 45 °C (cP)	6000	4600	3920
Ιξώδες μετά από 24h αποθήκευσης στους 4 °C (cP)	16250	14380	13020
Σκληρότητα (N)	0,853	0,839	0,661
Συνεκτικότητα	0,527	0,590	0,420
Προσκολλησιμότητα (N*s)	0,542	0,309	0,329
Κομμιώδες (N)	0,447	0,495	0,277
Βακτηριακό φορτίο εγκλεισμένου προϊόντος (cfu/g)	-	6,30E+08	8,20E+07
Βακτηριακό φορτίο προϊόντος γιαουρτιού (cfu/g)	-	1,54E+06	9,10E+03
Ποσοστό εγκλεισμένης καλλιέργειας (%)	-	66%	11%

Από τον πίνακα 7.2 παρατηρείται ότι η συνολική διάρκεια ζύμωσης εμφανίζει μεγαλύτερη τιμή για το τυφλό δείγμα και ελάχιστη για το δείγμα γιαουρτιού που περιέχει εγκλεισμένη καλλιέργεια σε μίγμα θερμικά επεξεργασμένο στους 121 °C. Επίσης, ο μέγιστος ρυθμός μείωσης του pH του επεξεργασμένου δείγματος στους 121 °C είναι ο μεγαλύτερος από τα τρία δείγματα γιαουρτιού, ενώ η αντίστοιχη διάρκεια λανθάνουσας φάσης του pH είναι η μικρότερη. Αυτές οι διαφορές μπορούν να εξηγηθούν με τη μεγαλύτερη συνεισφορά των εγκλεισμένων προβιοτικών βακτηρίων στην ζύμωση του δείγματος με μίγμα επεξεργασμένο στους 121 °C σε σχέση με το αντίστοιχο με μίγμα επεξεργασμένο στους 80 °C. Επιπροσθέτως, τόσο το ιξώδες γιαουρτιού μετά την ζύμωση, όσο και το ιξώδες μετά από 24 h αποθήκευση στους 4 °C παρουσιάζει την ελάχιστη τιμή για το δείγμα με εγκλειστικό μίγμα που έχει υποστεί επεξεργασία στους 121 °C, σε σχέση με τα άλλα δύο δείγματα. Τα χαρακτηριστικά υφής των προϊόντων γιαουρτιού του τυφλού και του δείγματος με εγκλειστικό μίγμα επεξεργασμένο στους 80 °C μίγμα είναι παρεμφερή. Αντίθετα, παρατηρούνται διαφορές των αντίστοιχων χαρακτηριστικών υφής του δείγματος γιαουρτιού με εγκλειστικό μίγμα επεξεργασμένο στους 121 °C σε σχέση με τα άλλα δύο. Τέλος, παρατηρείται εμφανής διαφορά των μικροβιακών φορτίων τόσο του εγκλεισμένου προϊόντος, όσο και του γιαουρτιού, μεταξύ του δείγματος με εγκλειστικό μίγμα στους 80 °C και του δείγματος στους 121 °C. Αυτό εξηγεί και τη χαμηλότερη απόδοση εγκλεισμού του επεξεργασμένου στους 121 °C δείγματος.

7.1.1.6 Ζύμωση με εγκλεισμένη καλλιέργεια, σε μίγμα αλγινικού νατρίου-ολιγοφρουκτόζης-MRS broth-γλυκερόλης θερμικά επεξεργασμένο στους 80 °C και 121 °C



Διάγραμμα 7.6 Μεταβολή pH συναρτήσει του χρόνου κατά την ζύμωση του γάλακτος με εγκλεισμένη προβιοτική καλλιέργεια σε μίγμα αλγινικού-ολιγοφρουκτόζης θερμικά επεξεργασμένο στους 80 °C και 121 °C

Η ζύμωση με εγκλεισμένη καλλιέργεια σε μίγμα αλγινικού-ολιγοφρουκτόζης θερμικά επεξεργασμένο στους 80 °C εμφανίζει μικρότερη διάρκεια σε σχέση με τα άλλα δύο δείγματα. Παρατηρείται ότι, η καμπύλη μείωσης του pH του δείγματος με εγκλειστικό μίγμα επεξεργασμένο στους 121 °C, δεν εμφανίζει τη χαρακτηριστική σιγμοειδή μορφή, παρόλα αυτά το μοντέλο Gompertz, εφαρμόζεται ικανοποιητικά.

Πίνακας 7.3 Αποτελέσματα μετρήσεων των προϊόντων εγκλεισμού και της ζύμωσης γάλακτος προς γιαούρτι με εγκλεισμένη προβιοτική καλλιέργεια σε μίγμα αλγινικού-ολιγοφρουκτόζης-MRS Broth-γλυκερόλης

Χαρακτηριστικό	Τυφλό	Θερμική επεξεργασία στους 80 °C	Θερμική Επεξεργασία στους 120 °C
Συνολική διάρκεια ζύμωσης (min)	325	250	330
Μέγιστος ρυθμός μείωσης pH, μ	-0,013	-0,0136	-0,0083
Διάρκεια λανθάνουσας φάσης pH, λ (min)	206,11	192,90	270,98
Ιξώδες μετά την ζύμωση στους 45 °C (cP)	6000	6350	5890
Ιξώδες μετά από 24h αποθήκευσης στους 4 °C (cP)	16250	16860	13850
Σκληρότητα (N)	0,853	0,564	0,595
Συνεκτικότητα	0,527	0,494	0,505
Προσκολλησιμότητα (N*s)	0,542	0,185	0,229
Κομμιώδες (N)	0,447	0,249	0,281
Βακτηριακό φορτίο εγκλεισμένου προϊόντος (cfu/g)	-	3,60E+08	9,80E+05
Βακτηριακό φορτίο προϊόντος γιαουρτιού (cfu/g)	-	2,16E+05	6,80E+03
Ποσοστό εγκλεισμένης καλλιέργειας (%)	-	39%	0,1%

Με βάση τον πίνακα 7.3 συμπεραίνεται ότι η συνολική διάρκεια ζύμωσης εμφανίζει μεγαλύτερη τιμή για το τυφλό δείγμα και για το δείγμα γιαουρτιού που περιέχει εγκλεισμένη καλλιέργεια σε μίγμα θερμικά επεξεργασμένο στους 121 °C. Παρόλο που ο μέγιστος ρυθμός μείωσης των δύο αυτών δειγμάτων διαφέρει αρκετά, η διαφορά τους στις αντίστοιχες διάρκειες λανθάνουσας φάσης του pH έχει ως αποτέλεσμα την παρεμφερή συνολική διάρκεια ζύμωσης. Στην περίπτωση του δείγματος γιαουρτιού που περιέχει εγκλεισμένη προβιοτική καλλιέργεια σε μίγμα επεξεργασμένο στους 121 °C δείγματος, τόσο ο μικρός ρυθμός μείωσης pH, όσο και η μεγάλη διάρκεια λανθάνουσας φάσης, έχουν ως αποτέλεσμα τη μεγάλη διάρκεια ολοκλήρωσης της ζύμωσης. Όσον αφορά τα ιξώδη των προϊόντων γιαουρτιού των 3 δειγμάτων, αυτά εμφανίζουν παρεμφερείς τιμές αμέσως μετά την ζύμωση, αλλά και μετά από 24 h αποθήκευση στους 4°C. Παρατηρείται ποσοτική διαφορά τριών τάξεων μεγέθους των βακτηριακών φορτίων του εγκλεισμένου προϊόντος και του γιαουρτιού για τα δείγματα που έχουν υποστεί επεξεργασία στους 80 °C και 121 °C αντίστοιχα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το ποσοστό εγκλεισμένης καλλιέργειας στην περίπτωση του επεξεργασμένου δείγματος στους 121 °C να εμφανίζει απόδοση εγκλεισμού 0,1%. Αντίθετα, στην περίπτωση του δείγματος επεξεργασμένου στους 80 °C αντιστοιχεί ποσοστό εγκλεισμένης καλλιέργειας ίσο με 39%.

7.1.2 Σύγκριση αποτελεσμάτων πρώτης πειραματικής σειράς 1α

7.1.2.1 Χρονική διάρκεια ζύμωσης



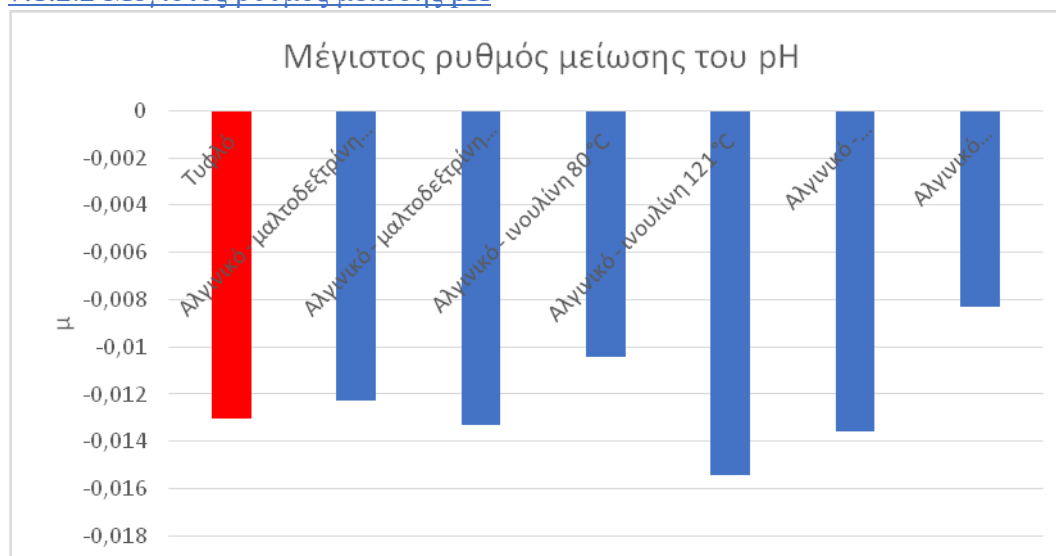
Διάγραμμα 7.7 Συνολική διάρκεια ζύμωσης δειγμάτων 1^{ης} πειραματικής σειράς και τυφλού δείγματος

Στο διάγραμμα 7.7 παρατηρείται πως το τυφλό, το δείγμα γιαουρτιού που περιέχει εγκλεισμένη καλλιέργεια σε μίγμα αλγινικού-μαλτοδεξτρίνης επεξεργασμένο στους 80 °C, το δείγμα γιαουρτιού που περιέχει εγκλεισμένη καλλιέργεια σε μίγμα αλγινικού-ιουλίνης επεξεργασμένο στους 80 °C καθώς και το δείγμα γιαουρτιού που περιέχει εγκλεισμένη καλλιέργεια σε μίγμα αλγινικού-ολιγοφρουκτόζης παρουσιάζουν παρόμοιους συνολικούς χρόνους ζύμωσης, με το τελευταίο δείγμα να εμφανίζει τη μεγαλύτερη συνολική διάρκεια ζύμωσης. Εν αντιθέσει, το δείγμα γιαουρτιού που περιέχει εγκλεισμένη καλλιέργεια σε μίγμα αλγινικού-μαλτοδεξτρίνης επεξεργασμένο στους 121 °C, το δείγμα γιαουρτιού που περιέχει εγκλεισμένη καλλιέργεια σε μίγμα αλγινικού-ιουλίνης επεξεργασμένο στους 121 °C και το δείγμα γιαουρτιού που περιέχει εγκλεισμένη καλλιέργεια σε μίγμα αλγινικού-ολιγοφρουκτόζης επεξεργασμένο στους 80 °C παρουσιάζουν χαμηλότερη συνολική διάρκεια ζύμωσης από τα προαναφερθέντα δείγματα. Συγκεκριμένα, δείγμα γιαουρτιού που περιέχει εγκλεισμένη καλλιέργεια σε μίγμα αλγινικού-ιουλίνης επεξεργασμένο στους 121 °C εμφανίζει συνολικά το μικρότερο χρόνο ζύμωσης.

Από τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων για τη συνολική διάρκεια ζύμωσης προκύπτει το συμπέρασμα πως η συνολική διάρκεια ζύμωσης δεν

επηρεάζεται σημαντικά από τη θερμοκρασία επεξεργασίας ή το είδος του εγκλειστικού μίγματος.

7.1.2.2 Μέγιστος ρυθμός μείωσης pH

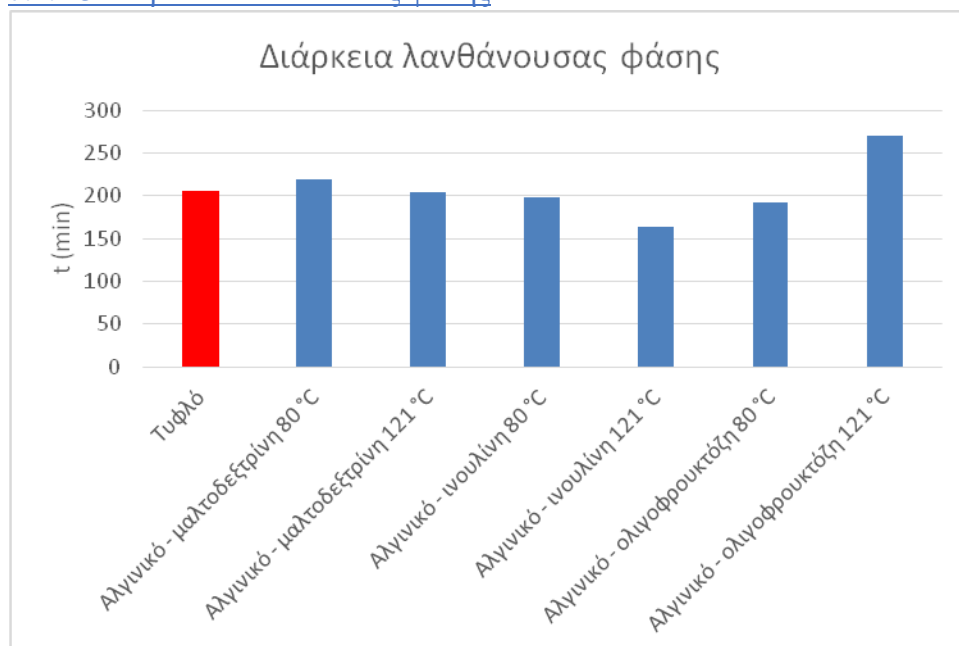


Διάγραμμα 7.8 Μέγιστος ρυθμός μείωσης του pH δειγμάτων 1^{ης} πειραματικής σειράς και τυφλού δείγματος

Από το διάγραμμα 7.8 εξάγεται το συμπέρασμα πως το δείγμα γιαουρτιού που περιέχει εγκλεισμένη καλλιέργεια σε μίγμα αλγινικού-ινουλίνης επεξεργασμένο στους 121 °C παρουσιάζει την υψηλότερη απόλυτη τιμή μέγιστου ρυθμού μείωσης του pH, ενώ το δείγμα γιαουρτιού που περιέχει εγκλεισμένη καλλιέργεια σε μίγμα αλγινικού-ολιγοφρουκτόζης επεξεργασμένο στους 121 °C εμφανίζει τη μικρότερη. Επιπλέον, το τυφλό, δείγμα γιαουρτιού που περιέχει εγκλεισμένη καλλιέργεια σε μίγμα αλγινικού-μαλτοδεξτρίνης και στις δύο θερμοκρασίες επεξεργασίας καθώς και δείγμα γιαουρτιού που περιέχει εγκλεισμένη καλλιέργεια σε μίγμα αλγινικού-ολιγοφρουκτόζης επεξεργασμένο στους 80°C παρουσιάζουν παρεμφερείς μέγιστους ρυθμούς μείωσης του pH.

Από τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων εξάγεται το συμπέρασμα ότι η συγκεκριμένη εξεταζόμενη παράμετρος δεν επηρεάζεται σημαντικά από τη θερμοκρασία επεξεργασίας ή το είδος του εγκλειστικού μίγματος.

7.1.2.3 Διάρκεια λανθάνουσας φάσης

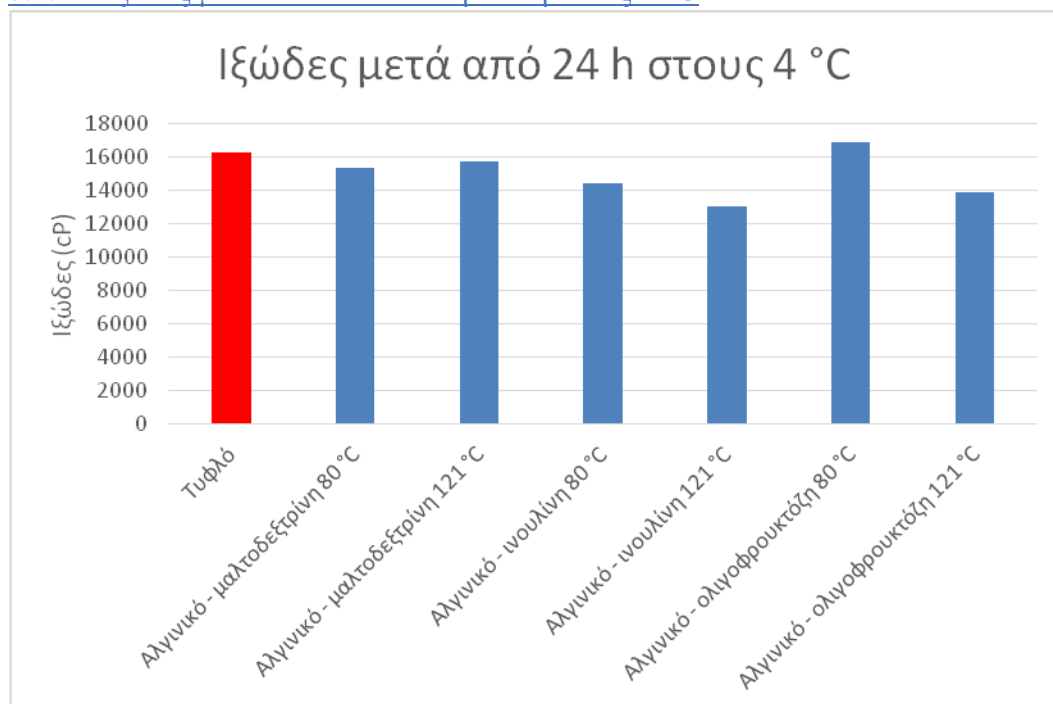


Διάγραμμα 7.9 Διάρκεια λανθάνουσας φάσης δειγμάτων 1^{ης} πειραματικής σειράς και τυφλού δείγματος

Στο διάγραμμα 7.9 παρατηρείται πως η διάρκεια λανθάνουσας φάσης του pH παρουσιάζει τη μεγαλύτερη τιμή για το δείγμα γιαουρτιού που περιέχει εγκλεισμένη καλλιέργεια σε μίγμα αλγινικού-ολιγοφρουκτόζης επεξεργασμένο στους 121 °C και τη μικρότερη για το δείγμα γιαουρτιού που περιέχει εγκλεισμένη καλλιέργεια σε μίγμα αλγινικού-ινοουλίνης επεξεργασμένο στους 121 °C. Τα υπόλοιπα δείγματα εμφανίζουν παραπλήσιες τιμές διάρκειας λανθάνουσας φάσης του pH.

Από τη ανάλυση διακύμανσης των αποτελεσμάτων εξάγεται το συμπέρασμα ότι η διάρκεια λανθάνουσας φάσης δεν επηρεάζεται σημαντικά από τη θερμοκρασία επεξεργασίας ή το είδος του εγκλειστικού μίγματος.

7.1.2.4 Ιξώδες μετά από 24 h αποθήκευση στους 4 °C

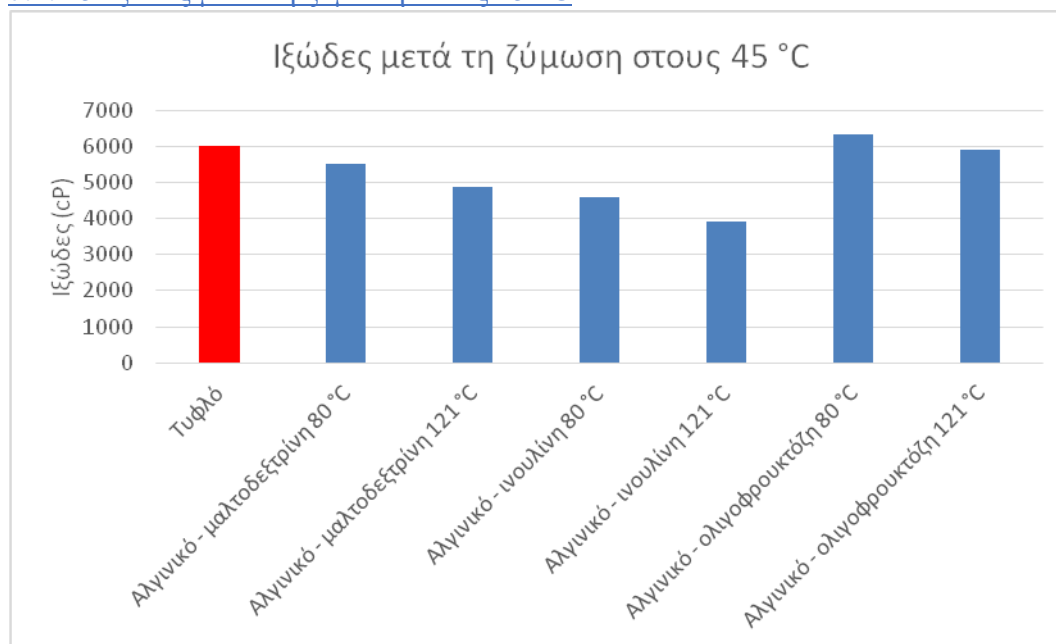


Διάγραμμα 7.10 Ιξώδες δειγμάτων 1^{ης} πειραματικής σειράς και τυφλού δείγματος γιαουρτιού μετά από 24 h αποθήκευση στους 4 °C

Στο διάγραμμα 7.10 παρατηρείται πως το δείγμα γιαουρτιού που περιέχει εγκλεισμένη καλλιέργεια σε μίγμα–ολιγοφρουκτόζης επεξεργασμένο στους 80°C παρουσιάζει τη μεγαλύτερη τιμή ιξώδους, ενώ το τυφλό και τα γιαούρτια που περιέχουν εγκλεισμένη καλλιέργεια σε μίγμα αλγινικού-μαλτοδεξτρίνης επεξεργασμένο στις δύο θερμοκρασίες εμφανίζουν πανομοιότυπες τιμές, ελαφρώς χαμηλότερες σε σχέση με αυτή του δείγματος γιαουρτιού που περιέχει εγκλεισμένη καλλιέργεια σε μίγμα αλγινικού-ολιγοφρουκτόζης επεξεργασμένο στους 80 °C. Τέλος, το γιαούρτι με το μίγμα αλγινικού-ινουλίνης επεξεργασμένο στους 121 °C εμφανίζει τη μικρότερη τιμή ιξώδους μετά την αποθήκευση για 24 h στους 4 °C.

Από τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων εξάγεται το συμπέρασμα ότι το ιξώδες των δειγμάτων γιαουρτιού μετά από 24 h αποθήκευση στους 4 °C δεν επηρεάζεται σημαντικά από τη θερμοκρασία επεξεργασίας ή το είδος του εγκλειστικού μίγματος.

7.1.2.5 Ιξώδες μετά τη ζύμωση στους 45 °C

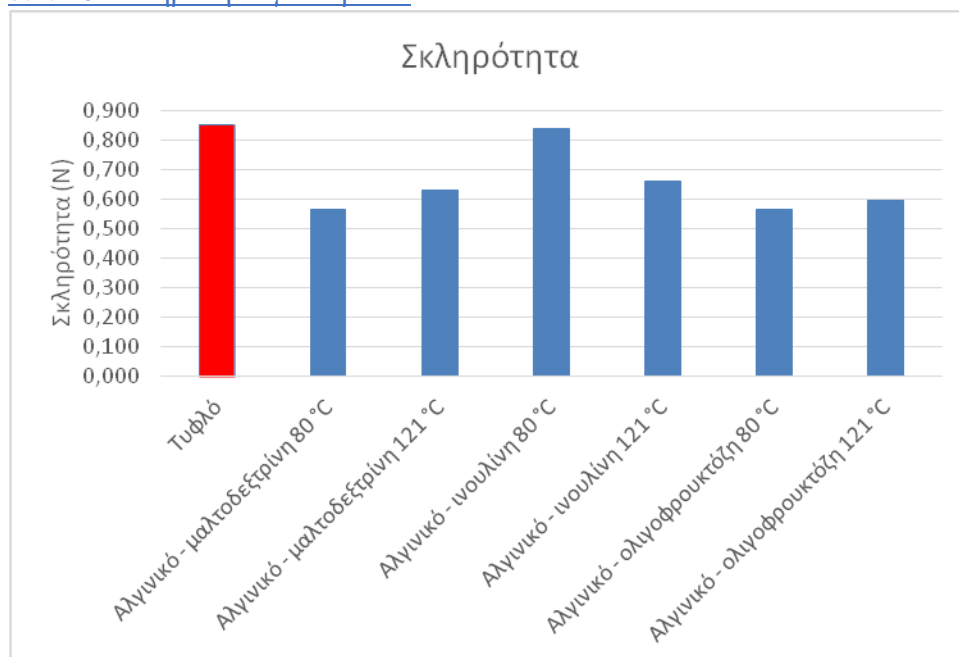


Διάγραμμα 7.11 Ιξώδες δειγμάτων 1^{ης} πειραματικής σειράς και τυφλού δείγματος γιαουρτιού μετά την ζύμωση στους 45 °C

Στο διάγραμμα 7.11 παρατηρείται πως το δείγμα γιαουρτιού που περιέχει εγκλεισμένη καλλιέργεια σε μίγμα αλγινικού-ολιγοφρουκτόζης επεξεργασμένο στους 80 °C παρουσιάζει τη μεγαλύτερη τιμή ιξώδους, ενώ το τυφλό και τα γιαούρτια που περιέχουν τα μίγματα αλγινικού-μαλτοδεξτρίνης επεξεργασμένο στους 80 °C και αλγινικού-ολιγοφρουκτόζης επεξεργασμένο στους 121 °C εμφανίζουν πανομοιότυπες τιμές, ελαφρώς χαμηλότερες σε σχέση με εκείνη του γιαουρτιού που περιέχει το μίγμα αλγινικού-ολιγοφρουκτόζης επεξεργασμένο στους 80°C. Τέλος, το γιαούρτι με το μίγμα αλγινικού-ινοουλίνης επεξεργασμένο στους 121 °C εμφανίζει την μικρότερη τιμή ιξώδους μετά την ζύμωση των δειγμάτων στους 45 °C.

Από την ανάλυση διακύμανσης των αποτελεσμάτων προκύπτει πως το ιξώδες των δειγμάτων γιαουρτιού μετά την ζύμωση επηρεάζεται σημαντικά από το είδος του εγκλειστικού μίγματος που εμπεριέχεται σε αυτά. Πιο συγκεκριμένα, και τα τρία δείγματα γιαουρτιού που περιείχαν εγκλειστικά μίγματα διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους, με το δείγμα με προϊόν εγκλεισμού σε μίγμα αλγινικού-ολιγοφρουκτόζης να παρουσιάζει τις υψηλότερες τιμές και το μίγμα αλγινικού-ινοουλίνης τις μικρότερες.

7.1.2.6 Σκληρότητα γιαουρτιού

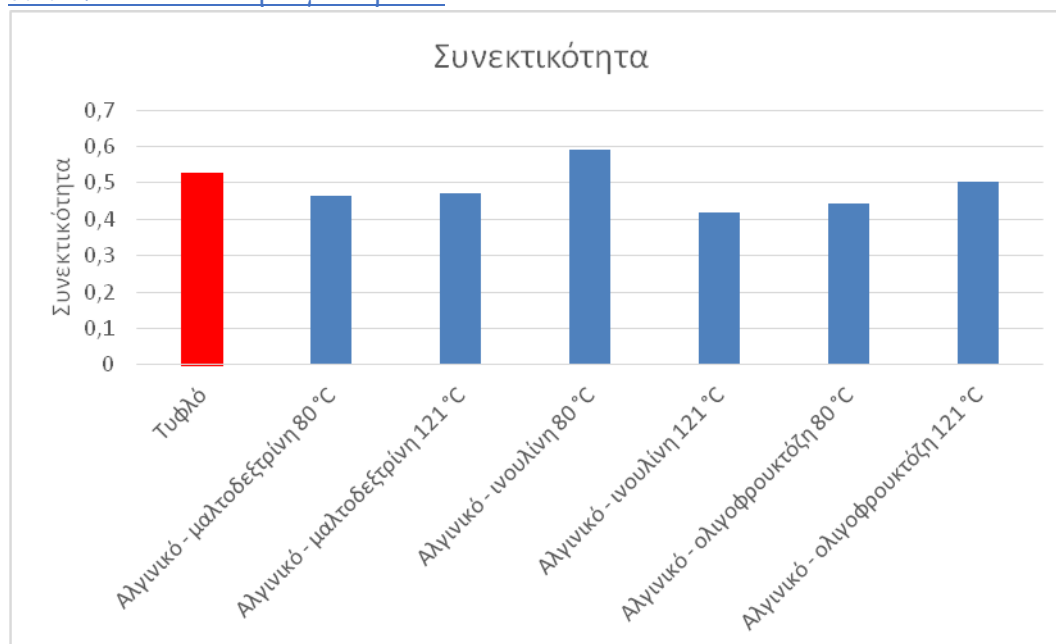


Διάγραμμα 7.12 Σκληρότητα δειγμάτων γιαουρτιού 1^{ης} πειραματικής σειράς και τυφλού δείγματος

Από το διάγραμμα 7.12, παρατηρείται ότι το τυφλό και το γιαούρτι που περιέχει εγκλεισμένη καλλιέργεια σε μίγμα αλγινικού-ινουλίνης επεξεργασμένο στους 80 °C, εμφανίζουν παρεμφερείς τιμές σκληρότητας μετά από την ανάλυση υφής του γιαουρτιού. Τα υπόλοιπα δείγματα γιαουρτιού, παρουσιάζουν αρκετά χαμηλότερες τιμές σκληρότητας.

Από τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων εξάγεται το συμπέρασμα ότι η σκληρότητα των γιαουρτιών δεν επηρεάζεται σημαντικά από τη θερμοκρασία επεξεργασίας ή το είδος του εγκλειστικού μίγματος.

7.1.2.7 Συνεκτικότητα γιαουρτιού

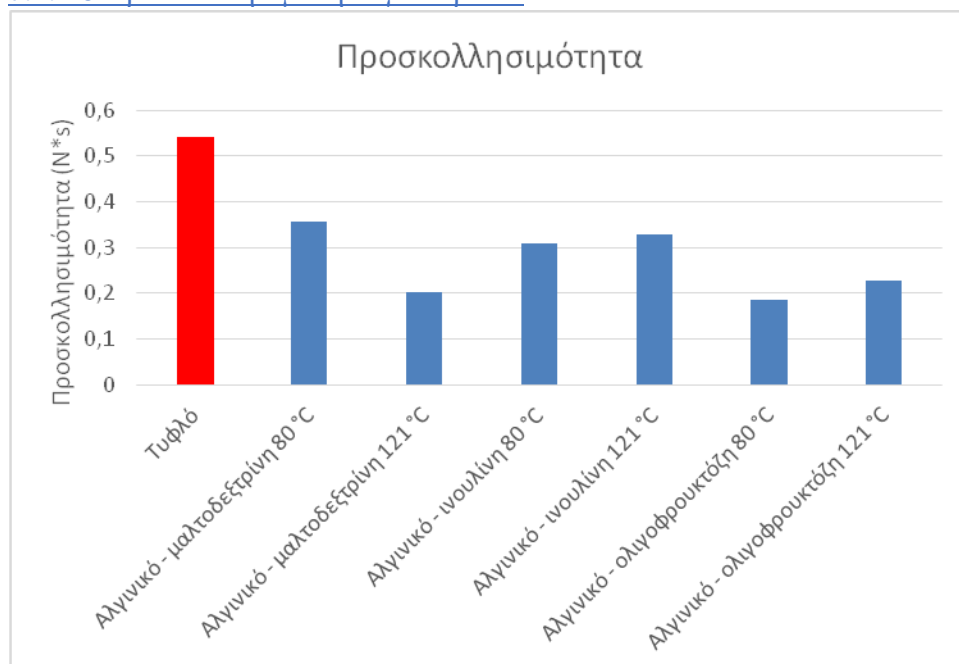


Διάγραμμα 7.13 Συνεκτικότητα δειγμάτων γιαουρτιού 1^{ης} πειραματικής σειράς και τυφλού δείγματος

Σύμφωνα με το διάγραμμα 7.13, οι τιμές της συνεκτικότητας των δειγμάτων γιαουρτιού που περιέχουν εγκλεισμένη καλλιέργεια σε μίγμα αλγινικού-μαλτοδεξτρίνης επεξεργασμένο και στις δύο θερμοκρασίες καθώς και του γιαουρτιού με το μίγμα αλγινικού-ολιγοφρουκτόζης επεξεργασμένο στους 121 °C είναι παραπλήσιες. Τη μεγαλύτερη συνεκτικότητα εμφανίζει το δείγμα γιαουρτιού που περιέχει εγκλεισμένη καλλιέργεια σε μίγμα αλγινικού-ινουλίνης επεξεργασμένο στους 80 °C, ενώ η ελάχιστη συνεκτικότητα προκύπτει στο γιαούρτι που περιέχει το μίγμα αλγινικού-ινουλίνης επεξεργασμένο στους 121 °C.

Από την ανάλυση διακύμανσης που πραγματοποιήθηκε στα αποτελέσματα εξάγεται το συμπέρασμα ότι η συνεκτικότητα των δειγμάτων γιαουρτιού δεν επηρεάζεται σημαντικά από τη θερμοκρασία επεξεργασίας ή το είδος του εγκλειστικού μίγματος.

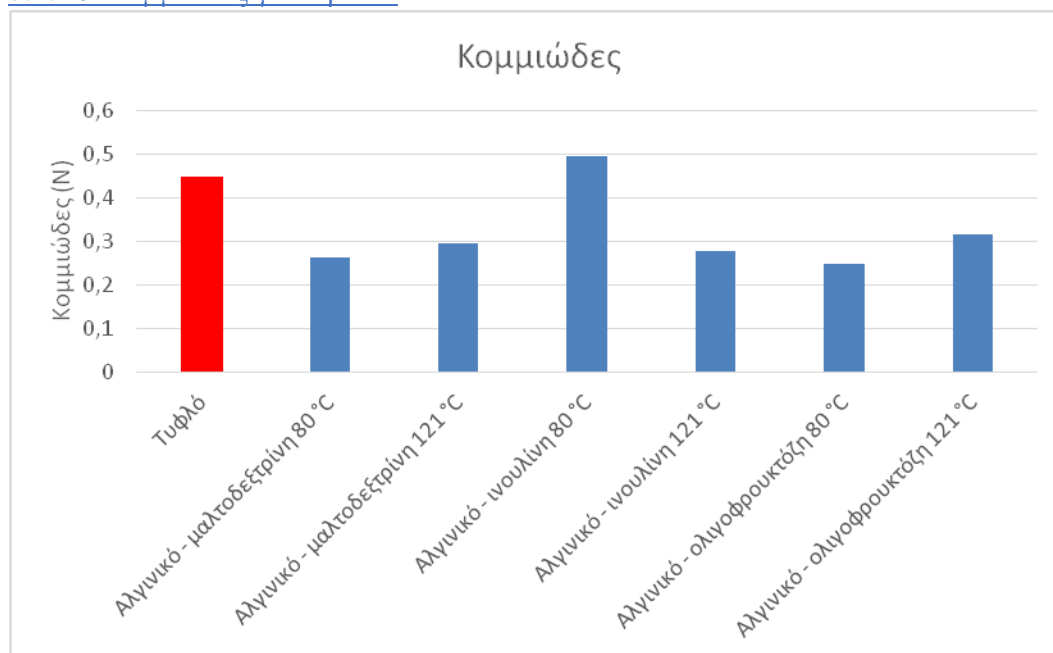
7.1.2.8 Προσκολλησιμότητα γιαουρτιού



Διάγραμμα 7.14 Προσκολλησιμότητα δειγμάτων γιαουρτιού 1^{ης} πειραματικής σειράς και τυφλού δείγματος

Από το διάγραμμα 7.14 γίνεται αντιληπτό ότι η προσκολλησιμότητα όλων των δειγμάτων γιαουρτιού είναι μικρότερη από αυτή του τυφλού δείγματος. Συγκεκριμένα, οι τιμές προσκολλησιμότητας των δειγμάτων γιαουρτιού που περιέχουν εγκλεισμένα προϊόντα με τα μίγματα αλγινικού-μαλτοδεξτρίνης και αλγινικού-ολιγοφρουκτόζης στους 121 °C και 80 °C αντίστοιχα, είναι οι μικρότερες. Παρόλα αυτά, από την ανάλυση διακύμανσης που πραγματοποιήθηκε στα αποτελέσματα εξάγεται το συμπέρασμα ότι η προσκολλησιμότητα των δειγμάτων γιαουρτιού δεν επηρεάζεται σημαντικά από τη θερμοκρασία επεξεργασίας ή το είδος του εγκλειστικού μίγματος.

7.1.2.9 Κομμιώδες γιαουρτιού

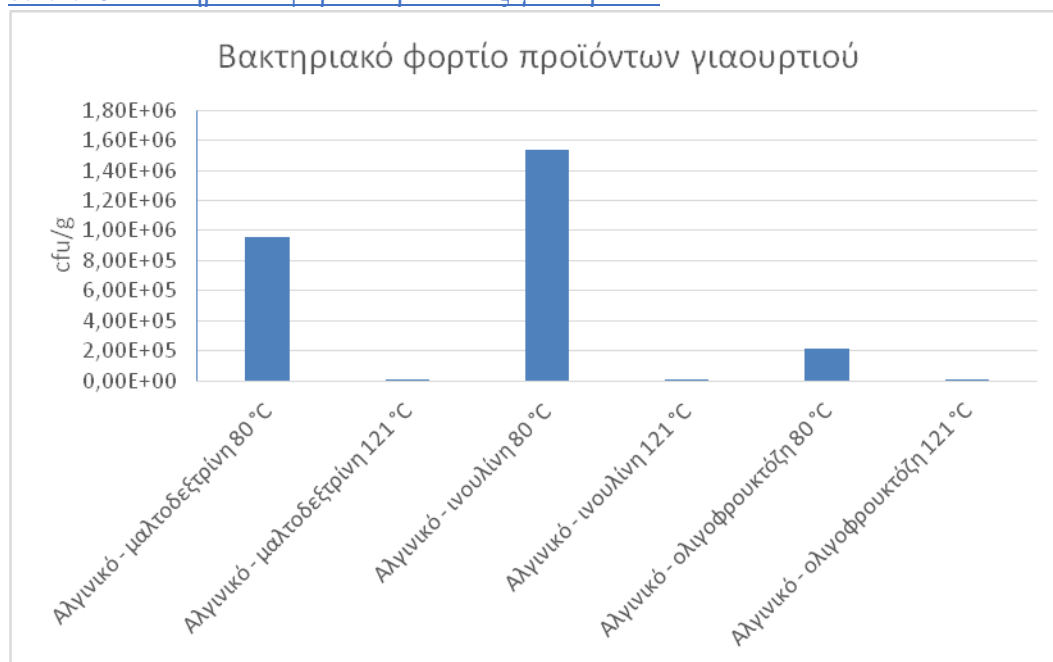


Διάγραμμα 7.15 Κομμιώδες δειγμάτων γιαουρτιού 1^{ης} πειραματικής σειράς και τυφλού δείγματος

Όπως είναι εμφανές από το διάγραμμα 7.15, το γιαούρτι το οποίο περιέχει προϊόντα εγκλεισμού που προέκυψαν με το μίγμα αλγινικού-ιουλίνης επεξεργασμένο στους 80 °C, παρουσιάζει τη μεγαλύτερη τιμή κομμιώδους σε σχέση με όλα τα υπόλοιπα δείγματα. Έπειτα, ακολουθεί το τυφλό, ενώ τα δείγματα γιαουρτιού που περιέχουν εγκλεισμένα βακτήρια σε μίγμα αλγινικού-μαλτοδεξτρίνης και αλγινικού-ολιγοφρουκτόζης επεξεργασμένα και στις δύο θερμοκρασίες εμφανίζουν σχετικά χαμηλές τιμές κομμιώδους.

Από τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων αυτών προέκυψε ότι το κομμιώδες δεν επηρεάζεται σημαντικά από τη θερμοκρασία επεξεργασίας ή το είδος του εγκλειστικού μίγματος.

7.1.2.10 Βακτηριακό φορτίο προϊόντος γιαουρτιού



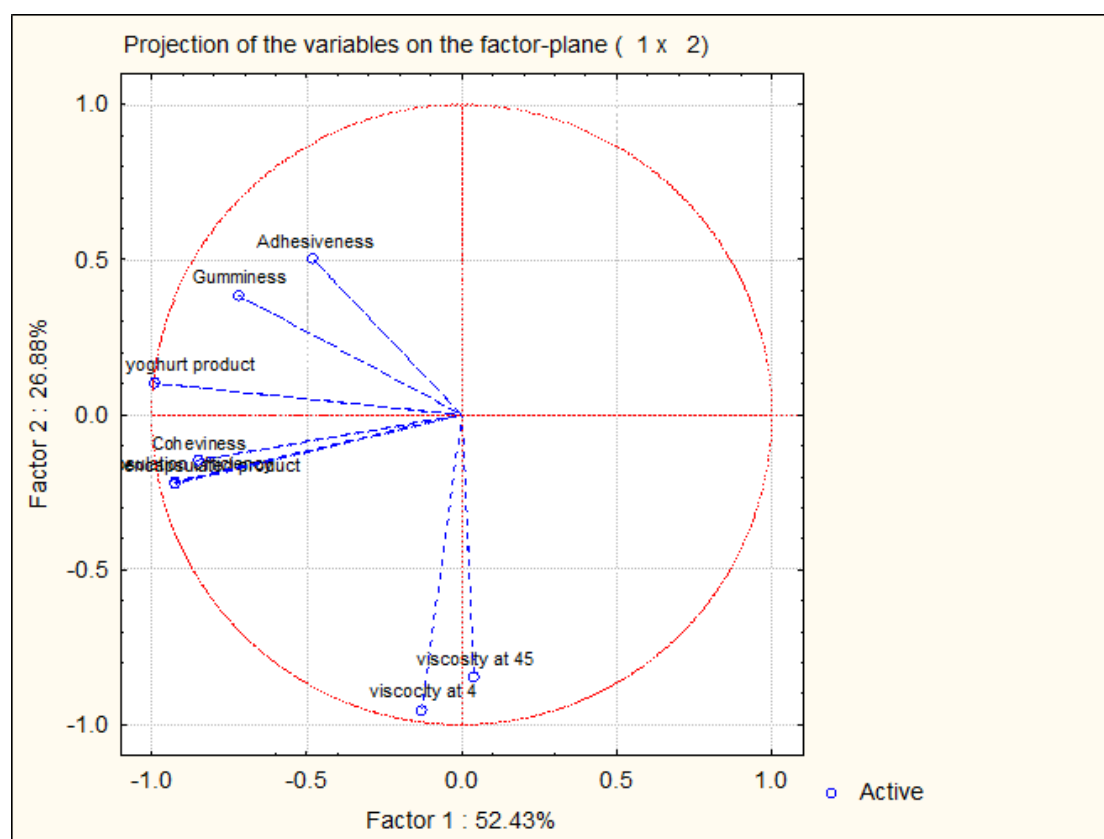
Διάγραμμα 7.16 Βακτηριακό φορτίο προϊόντων γιαουρτιού 1^{ης} πειραματικής σειράς

Από το διάγραμμα 7.16 γίνεται αντιληπτό ότι η βιωσιμότητα των προβιοτικών βακτηρίων στο γιαούρτι που περιέχει εγκλειστικά προϊόντα που προέκυψαν από το εγκλειστικό μίγμα αλγινικού-ινοουλίνης επεξεργασμένο στους 80 °C είναι η υψηλότερη συγκριτικά με τα υπόλοιπα δείγματα. Αντίθετα το βακτηριακό φορτίο των προϊόντων γιαουρτιού με εγκλειστικά μίγματα που επεξεργάστηκαν στους 121 °C προέκυψε τουλάχιστον 5 τάξεις μεγέθους μικρότερο σε σχέση με το βακτηριακό φορτίο του γιαουρτιού με το εγκλειστικό μίγμα αλγινικού-ινοουλίνης.

Παρά τις διαφορές των τιμών, η ανάλυση διακύμανσης των δεδομένων έδειξε ότι το βακτηριακό φορτίο των προϊόντων γιαουρτιού δεν επηρεάζεται σημαντικά από τη θερμοκρασία επεξεργασίας ή το είδος του εγκλειστικού μίγματος.

7.1.2.11 Ανάλυση κύριων συνιστωσών των δειγμάτων της πειραματικής σειράς 1α (PCA)

Η παρακάτω ανάλυση κύριων συνιστωσών αφορά τα δείγματα τα οποία εξετάστηκαν στη πειραματική σειρά 1α. Συγκεκριμένα, αφορά τα δείγματα των προϊόντων εγκλεισμού που παρασκευάστηκαν με τη μέθοδο της εξώθησης με εγκλειστικά μίγματα επεξεργασμένα στους 80 και 120 °C. Επίσης, αναλύονται και τα αντίστοιχα δείγματα γιαουρτιού που προέκυψαν με την ενσωμάτωση των προϊόντων εγκλεισμού. Στο παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζεται η γραφική παράσταση των συντελεστών συσχέτισης των δύο πρώτων κύριων συνιστωσών με τις παραμέτρους που μελετήθηκαν.



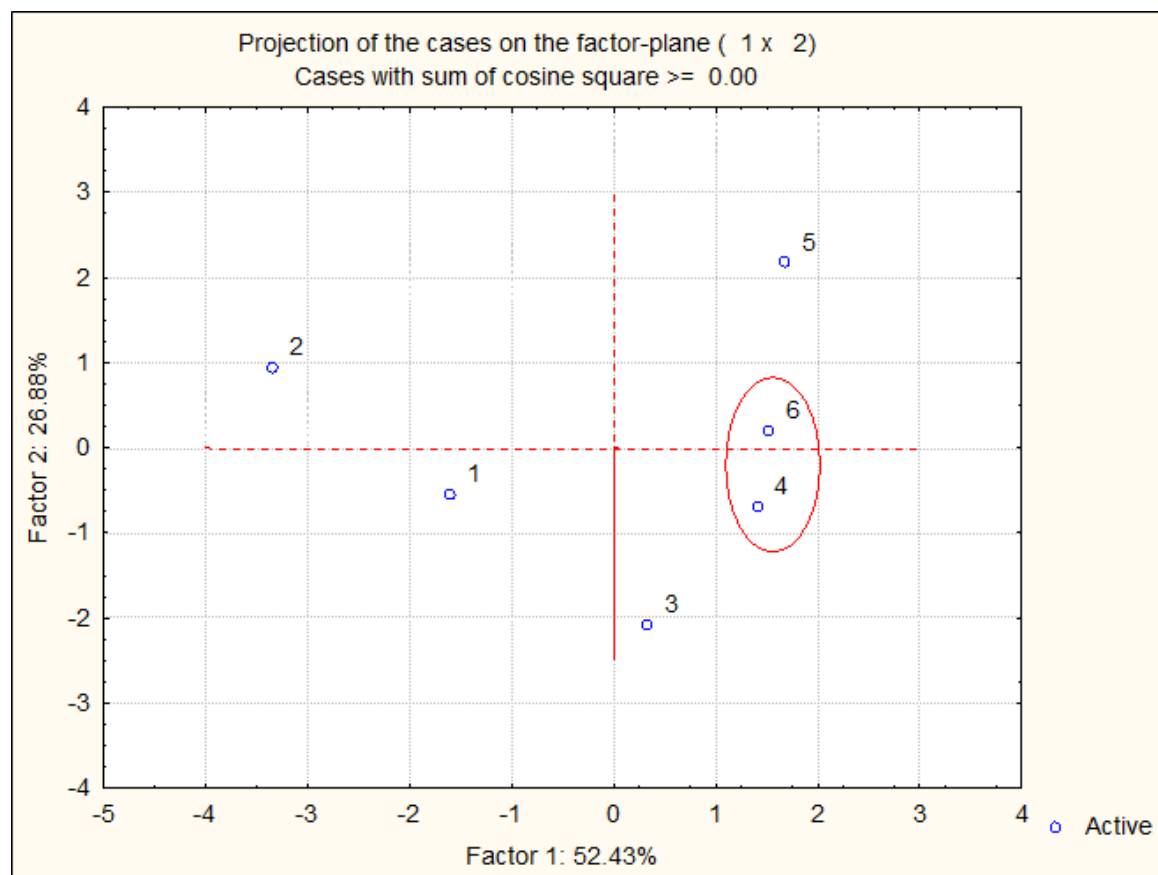
Διάγραμμα 7.17 Γραφική παράσταση συντελεστών συσχέτισης των δύο πρώτων κύριων συνιστωσών με τις παραμέτρους

Το πείραμα του εγκλεισμού προβιοτικών βακτηρίων μέσω εξώθησης και ενσωμάτωσής τους σε γιαούρτι έδωσε δύο κύριες συνιστώσες από τις οποίες η πρώτη έχει 52,43 % και η δεύτερη 26,88 % συνεισφορά στη συνολική διακύμανση του πειράματος.

Από το διάγραμμα 7.17 δύναται να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι αρνητική επίδραση στην πρώτη κύρια συνιστώσα είχαν: η απόδοση εγκλεισμού και το βακτηριακό

φορτίο των προϊόντων εγκλεισμού, καθώς και το βακτηριακό φορτίο και η συνεκτικότητα των δειγμάτων των προϊόντων γιαουρτιού.

Αντίστοιχα αρνητική επίδραση στη δεύτερη κύρια συνιστώσα παρουσίασαν: το ιξώδες των δειγμάτων γιαουρτιού μετά την ζύμωση στους 45 °C αλλά και μετά από 24 h αποθήκευσης στους 4 °C. Ακόμη, διαπιστώνεται ότι το βακτηριακό φορτίο των προϊόντων εγκλεισμού συσχετίζεται αρνητικά με τη συνεκτικότητα των δειγμάτων γιαουρτιού και με την απόδοση εγκλεισμού.



Διάγραμμα 7.18 Γραφική παράσταση των δύο πρώτων κύριων συνιστωσών για τα δείγματα της 1^{ης} πειραματικής σειράς

Από το διάγραμμα 7.18 φαίνεται ότι σχηματίζεται μία ομάδα δειγμάτων με κοινά χαρακτηριστικά. Τα συγκεκριμένα δείγματα εμφανίζουν παρεμφερή χαρακτηριστικά υφής. Το 2^ο δείγμα εμφανίζει πολύ μεγαλύτερο βακτηριακό φορτίο στο γιαούρτι σε σχέση με τα υπόλοιπα. Το 5^ο δείγμα εμφανίζει πολύ χαμηλές τιμές ιξώδους μετά από 24 h αποθήκευση των δειγμάτων, καθώς και μικρούς χρόνους λανθάνουσας φάσης του pH και συνολικής διάρκειας ζύμωσης. Το 1^ο δείγμα εμφανίζει πολύ υψηλές τιμές απόδοσης εγκλεισμού και βακτηριακού φορτίου του γιαουρτιού σε σχέση με τα υπόλοιπα. Τέλος, το 3^ο δείγμα παρουσιάζει το μεγαλύτερο ιξώδες και στις δύο

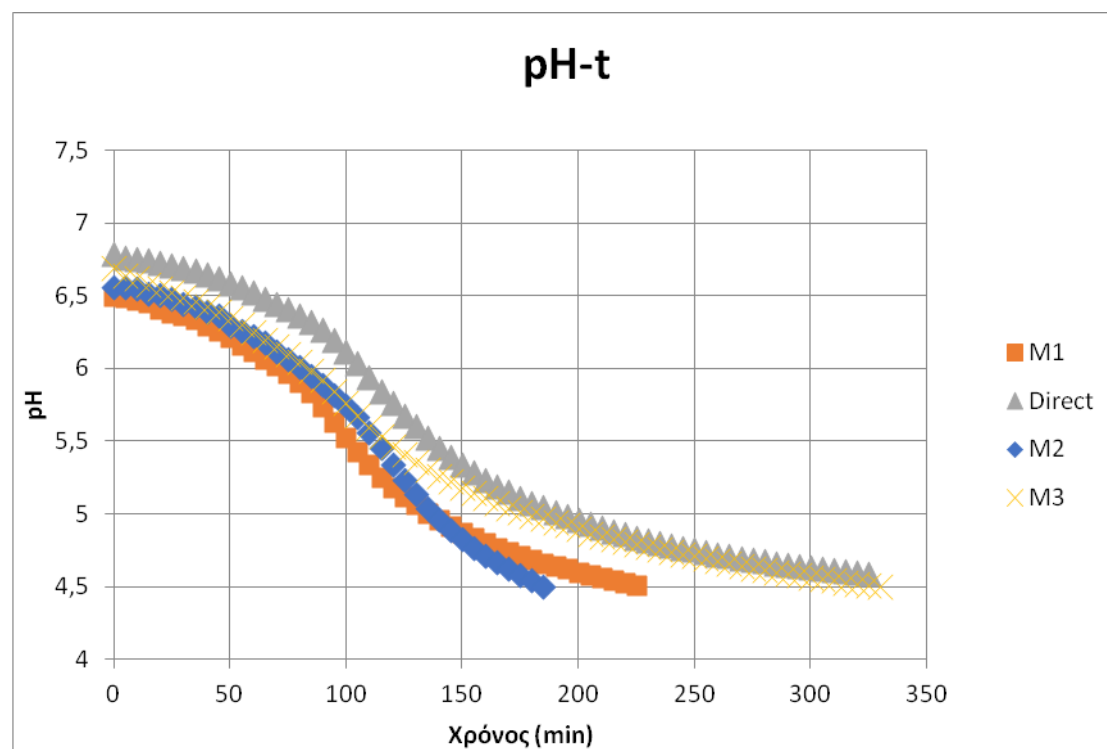
θερμοκρασίες, ενώ παράλληλα εμφανίζει και χαμηλότερες τιμές στα χαρακτηριστικά της υφής των δειγμάτων.

7.1.3 Αποτελέσματα μετρήσεων πειραματικής σειράς 1β

Εγκλεισμός προβιοτικών βακτηρίων με την τεχνική εξώθησης με θερμική επεξεργασία στους 80 °C και επικάλυψη με χιτοζάνη - Χρήση εγκλεισμένων προβιοτικών βακτηρίων στην ζύμωση γιαουρτιού

Στη πειραματική σειρά 1β πραγματοποιήθηκαν πειράματα εγκλεισμού και επικάλυψη των εγκλειστικών προϊόντων με χιτοζάνη με σκοπό τη μελέτη της επίπτωσης της χιτοζάνης στη διαδικασία της ζύμωσης. Για αυτόν το λόγο, δεν πραγματοποιήθηκαν μικροβιολογικές αναλύσεις στα προϊόντα εγκλεισμού αυτής της πειραματικής σειράς, αλλά πραγματοποιήθηκε απευθείας ενσωμάτωση των προϊόντων εγκλεισμού σε γάλα μαζί με ταυτόχρονο εμβολιασμό συμβατικής καλλιέργειας εκκίνησης (1g/L) με σκοπό τη παραγωγή γιαουρτιού. Τα αποτελέσματα των δειγμάτων γιαουρτιού που παρασκευάστηκαν παρουσιάζονται παρακάτω.

7.1.3.1 Ζύμωση με εγκλεισμένη καλλιέργεια με τα τρία διαφορετικά μίγματα που χρησιμοποιήθηκαν ανωτέρω



Διάγραμμα 7.19 Μεταβολή pH συναρτήσει του χρόνου κατά την ζύμωση του γάλακτος με εγκλεισμένη προβιοτική καλλιέργεια με τη μέθοδο της εξώθησης σε μίγματα αλγινικού-μαλτοδεξτρίνης, αλγινικού-ινουλίνης και αλγινικού-ολιγοφρουκτόζης με και χωρίς επικάλυψη χιτοζάνης

Στο διάγραμμα 7.19 παρουσιάζεται η μεταβολή του pH κατά τη διάρκεια της ζύμωσης των δειγμάτων με προσθήκη εγκλεισμένης προβιοτικής καλλιέργειας στα τρία εγκλειστικά μίγματα που χρησιμοποιήθηκαν ανωτέρω, επικαλυμμένα με χιτοζάνη, καθώς και του τυφλού δείγματος. Παρατηρείται ότι όλες οι καμπύλες των δειγμάτων εμφανίζουν σιγμοειδή μορφή και εφαρμόζονται με ικανοποιητική ακρίβεια στο μοντέλο Gompertz τεσσάρων παραμέτρων.

Πίνακας 7.4 Αποτελέσματα μετρήσεων των προϊόντων εγκλεισμού και της ζύμωσης γάλακτος προς γιαούρτι με εγκλεισμένη προβιοτική καλλιέργεια με τα τρία μίγματα που χρησιμοποιήθηκαν και στη πειραματική σειρά 1α

Χαρακτηριστικό	Τυφλό	Μίγμα αλγινικού - μαλτοδεξτρίνης	Μίγμα αλγινικού-ινουλίνης	Μίγμα αλγινικού-ολιγοφρουκτόζης
Συνολική διάρκεια ζύμωσης (min)	325	225	185	330
Μέγιστος ρυθμός μείωσης pH, μ	-0,013	-0,0155	-0,0188	-0,0107
Διάρκεια λανθάνουσας φάσης pH, λ (min)	206,11	161,97	164,50	208,68
Ιξώδες μετά την ζύμωση στους 45 °C (cP)	6000	3860	3950	5800
Ιξώδες μετά από 24 h αποθήκευσης στους 4 °C (cP)	16250	14560	15430	18590
Σκληρότητα (N)	0,853	0,849	0,709	0,802
Συνεκτικότητα	0,527	0,491	0,644	0,846
Προσκολλησιμότητα (N*s)	0,542	0,475	0,176	0,215
Κομμιώδες (N)	0,447	0,417	0,430	0,678

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του πίνακα 7.4 για την ζύμωση των δειγμάτων, προκύπτει ότι ο χρόνος ζύμωσης του δείγματος γιαουρτιού που περιέχει εγκλεισμένη καλλιέργεια σε μίγμα αλγινικού-ινουλίνης είναι ο μικρότερος, ενώ ο αντίστοιχος χρόνος ζύμωσης του δείγματος γιαουρτιού που περιέχει εγκλεισμένη καλλιέργεια σε μίγμα αλγινικού-ολιγοφρουκτόζης ο μεγαλύτερος σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα. Η παρατήρηση αυτή συμφωνεί με τη διαφορά αυτών των δειγμάτων στο μέγιστο ρυθμό μείωσης pH. Συγκεκριμένα, το δείγμα γιαουρτιού που περιέχει εγκλεισμένη καλλιέργεια σε μίγμα αλγινικού-ινουλίνης εμφανίζει το μεγαλύτερο ρυθμό μείωσης

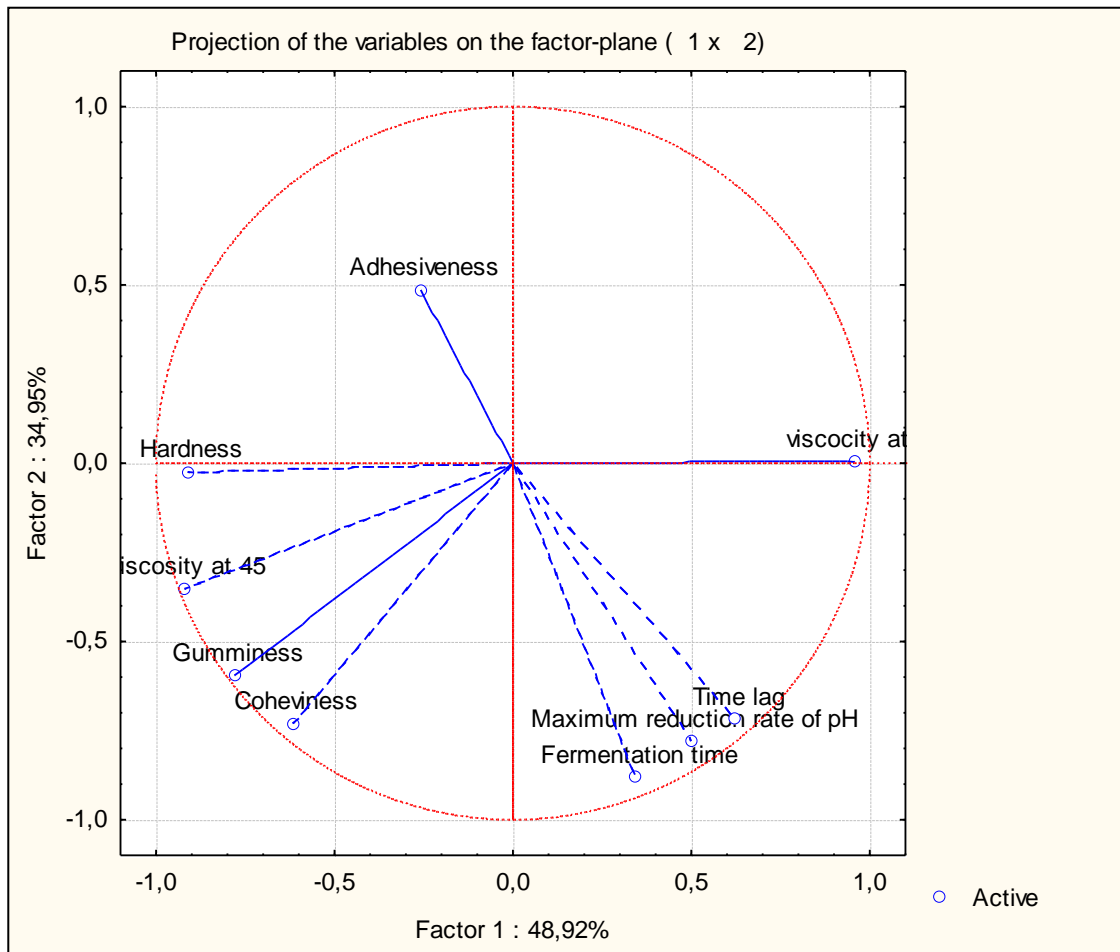
και το δείγμα γιαουρτιού με το μίγμα αλγινικού-ολιγοφρουκτόζης το μικρότερο σε σχέση με τα άλλα δείγματα. Το ιξώδες του γιαουρτιού που περιέχει προϊόντα εγκλεισμού με το μίγμα αλγινικού-ολιγοφρουκτόζης τόσο μετά την ζύμωση όσο και μετά την αποθήκευση στους 4 °C, προσεγγίζει το ιξώδες του τυφλού δείγματος, ενώ τα άλλα δύο δείγματα αντίστοιχα έχουν παραπλήσιες τιμές ιξώδους και χαμηλότερες από αυτή του τυφλού. Όσον αφορά τα χαρακτηριστικά υφής των δειγμάτων τη μεγαλύτερη διαφορά παρουσιάζει η προσκολλησιμότητα του δείγματος γιαουρτιού που περιέχει το μίγμα αλγινικού-ινουλίνης. Επίσης, αρκετή διαφορά παρουσιάζει και η προσκολλησιμότητα του δείγματος με το μίγμα αλγινικού-ολιγοφρουκτόζης σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα.

Από τις παραπάνω μετρήσεις συμπεραίνεται ότι η επικάλυψη με χιτοζάνη των εγκλειστικών προϊόντων δεν επηρεάζει σημαντικά τη διαδικασία ζύμωσης, αλλά ούτε και τα χαρακτηριστικά υφής του τελικού προϊόντος γιαουρτιού.

Ανάλυση κύριων συνιστωσών των δειγμάτων της πειραματικής σειράς 1α και 1β (PCA)

Η παρακάτω ανάλυση κύριων συνιστωσών αφορά τα δείγματα τα οποία εξετάστηκαν στη πειραματική σειρά 1α και 1β . Συγκεκριμένα, αφορά τα δείγματα γιαουρτιού που προέκυψαν με την ενσωμάτωση των προϊόντων εγκλεισμού. με τη μέθοδο τη εξώθησης με εγκλειστικά μίγματα επεξεργασμένα στους 80 °C με και χωρίς επικάλυψη χιτοζάνης. Εξαιρούνται τα δείγματα της πειραματικής σειράς 1α, τα οποία επεξεργάστηκαν στους 121 °C.

Στο παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζεται η γραφική παράσταση των συντελεστών συσχέτισης των δύο πρώτων κύριων συνιστωσών με τις παραμέτρους που μελετήθηκαν.



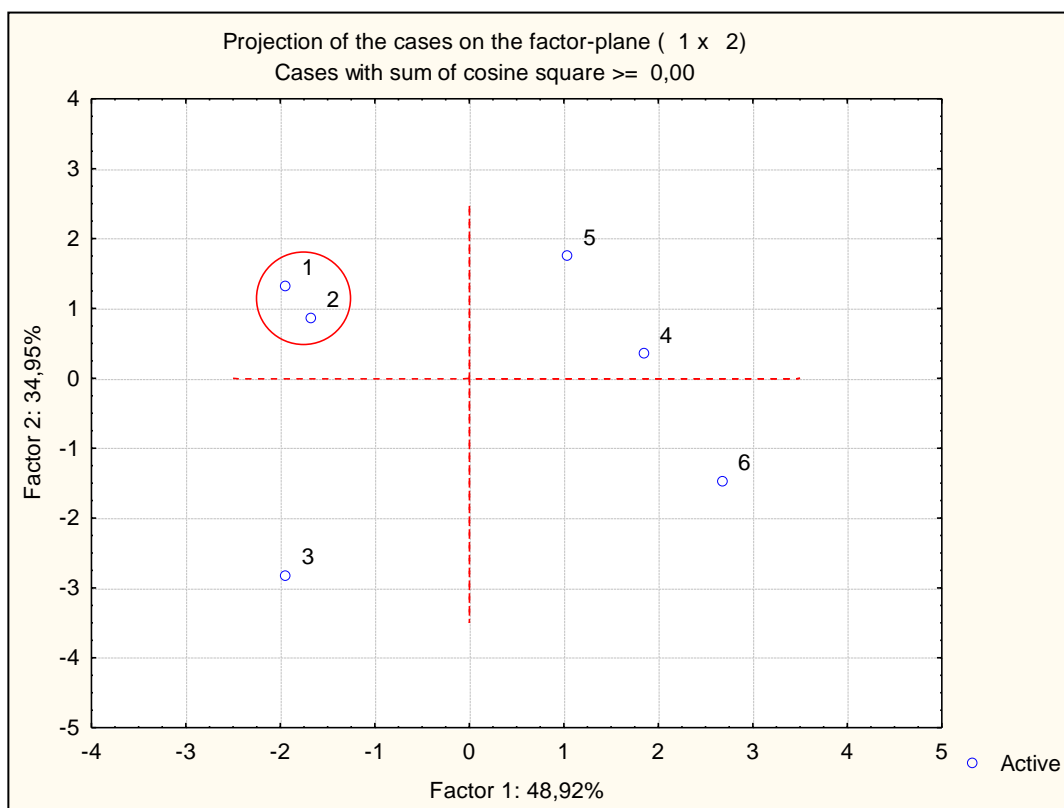
Διάγραμμα 7.20 Γραφική παράσταση συντελεστών συσχέτισης των δύο πρώτων κύριων συνιστωσών με τις παραμέτρους

Το πείραμα του εγκλεισμού προβιοτικών βακτηρίων μέσω εξώθησης και ενσωμάτωσής τους σε γιαούρτι έδωσε δύο κύριες συνιστώσες, από τις οποίες η πρώτη έχει 48,92 % και η δεύτερη 34,95 % συνεισφορά στη συνολική διακύμανση του πειράματος.

Από το διάγραμμα 7.20 εξάγεται το συμπέρασμα ότι αρνητική επίδραση στην πρώτη κύρια συνιστώσα είχαν: το ιξώδες μετά την ζύμωση στους 45 °C, η σκληρότητα και το κομμώδες των δειγμάτων γιαουρτιού. Αντίθετα, θετική επίδραση είχε το ιξώδες των δειγμάτων γιαουρτιού μετά από 24 h αποθήκευση στους 4 °C.

Όσον αφορά τη δεύτερη κύρια συνιστώσα αρνητική επίδραση παρουσίασαν: ο χρόνος ζύμωσης, ο μέγιστος ρυθμός μείωσης του pH, καθώς και η διάρκεια λανθάνουσας φάσης της ζύμωσης, ενώ τα τρία αυτά χαρακτηριστικά συσχετίζονται αρνητικά μεταξύ τους. Από τις παραπάνω παρατηρήσεις μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι η επικάλυψη χιτοζάνης των προϊόντων εγκλεισμού επηρεάζει σε

κάποιο βαθμό τη διεργασία ζύμωσης του γάλακτος καθώς και ορισμένα χαρακτηριστικά υφής του τελικού προϊόντος γιαουρτιού.



Διάγραμμα 7.21 Γραφική παράσταση των δύο πρώτων κύριων συνιστωσών για τα δείγματα των πειραματικών σειρών 1α και 1β.

Από το διάγραμμα 7.21 φαίνεται ότι σχηματίζεται μία ομάδα δειγμάτων με κοινά χαρακτηριστικά. Τα συγκεκριμένα δείγματα εμφανίζουν παρεμφερείς χρόνους ζύμωσης καθώς και μέγιστο ρυθμό μείωσης pH και διάρκεια λανθάνουσας φάσης. Το 3^ο δείγμα γιαουρτιού εμφανίζει ιδιαίτερα υψηλό κομμώδες σε σχέση με τα υπόλοιπα. Το 4^ο και 5^ο δείγμα εμφανίζουν παρόμοια χαρακτηριστικά υφής. Τέλος, το 6^ο δείγμα παρουσιάζει ιδιαίτερα χαμηλή τιμή προσκολλησιμότητας σε σχέση με αυτή των υπόλοιπων δειγμάτων.

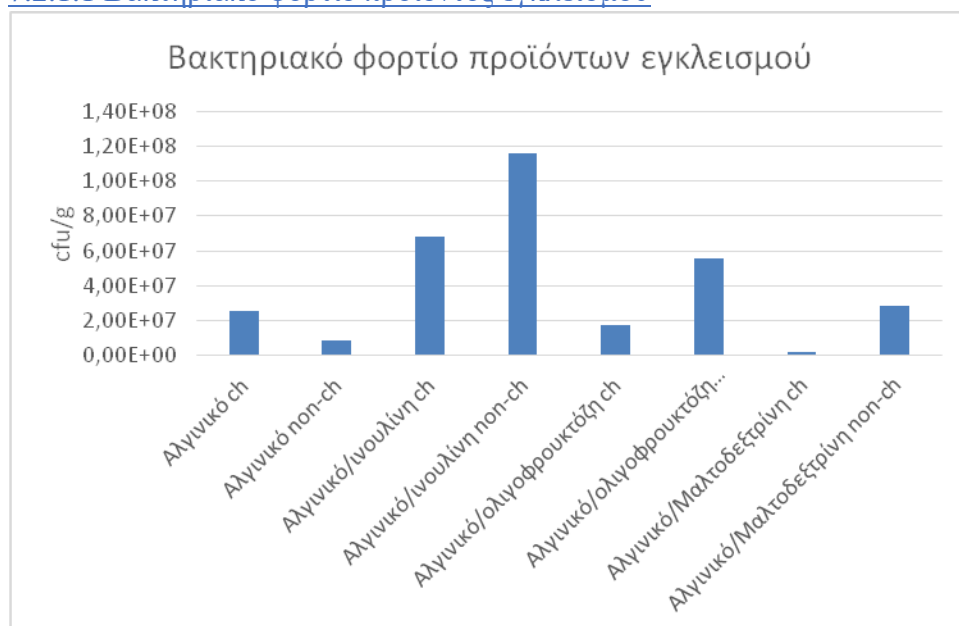
7.2 Δεύτερη σειρά πειραμάτων

7.2.1 Αποτελέσματα μετρήσεων δεύτερης πειραματικής σειράς

Εγκλεισμός προβιοτικών βακτηρίων με την τεχνική γαλακτωματοποίησης με και χωρίς επικάλυψη των προϊόντων εγκλεισμού με χιτοζάνη

Από τις μικροβιολογικές αναλύσεις των προϊόντων εγκλεισμού πρόκυψαν τα παρακάτω αποτελέσματα για τα πειράματα εγκλεισμού των προβιοτικών μέσω της μεθόδου της γαλακτωματοποίησης.

7.2.1.1 Βακτηριακό φορτίο προϊόντος εγκλεισμού

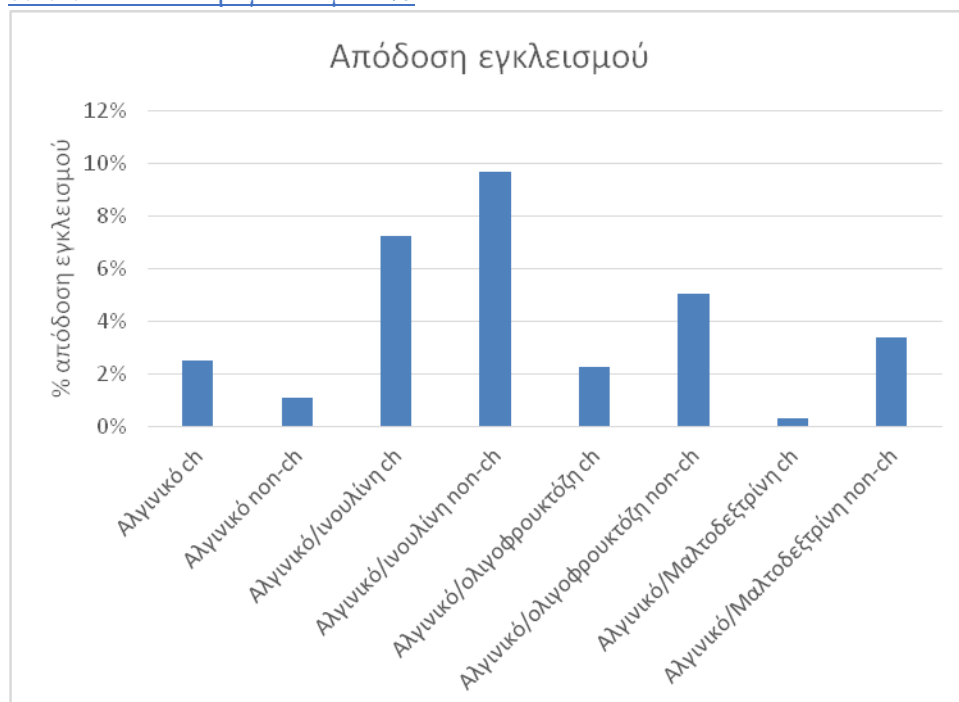


Διάγραμμα 7.22 Βακτηριακό φορτίο προϊόντων εγκλεισμού 2^{ης} πειραματικής σειράς

Από το διάγραμμα 7.22, γίνεται αντιληπτό ότι, το εγκλεισμένο προϊόν με μίγμα αλγινικού-ινουλίνης χωρίς επικάλυψη χιτοζάνης εμφανίζει το υψηλότερο βακτηριακό φορτίο. Εν αντιθέσει, το μίγμα αλγινικού χωρίς επικάλυψη χιτοζάνης και το μίγμα αλγινικού-μαλτοδεξτρίνης με επικάλυψη χιτοζάνης εμφανίζουν τα χαμηλότερα επίπεδα βακτηριακού φορτίου στα προϊόντα εγκλεισμού που προκύπτουν.

Από την ανάλυση διακύμανσης των αποτελεσμάτων εξάγεται το συμπέρασμα ότι το βακτηριακό φορτίο των προϊόντων εγκλεισμού δεν επηρεάζεται σημαντικά από την επικάλυψή τους με χιτοζάνη. Παρόλα αυτά από τη στατιστική επεξεργασία προέκυψε ότι το είδος του εγκλειστικού μίγματος παίζει σε κάποιο βαθμό ρόλο στην επιβίωση των προβιοτικών βακτηρίων.

7.2.1.2 Απόδοση εγκλεισμού %



Διάγραμμα 7.23 Απόδοση εγκλεισμού % δειγμάτων 2^{ης} πειραματικής σειράς

Σύμφωνα με το διάγραμμα 7.23, το μίγμα αλγινικού-ινουλίνης χωρίς επικάλυψη χιτοζάνης εμφανίζει την καλύτερη απόδοση εγκλεισμού σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα. Τη χαμηλότερη απόδοση εμφανίζει το μίγμα αλγινικού-μαλτοδεξτρίνης με επικάλυψη χιτοζάνης.

Από τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων προκύπτει ότι, η απόδοση εγκλεισμού των προβιοτικών βακτηρίων με τη μέθοδο της γαλακτωματοποίησης επηρεάζεται σημαντικά από το είδος του εγκλειστικού μίγματος. Συγκεκριμένα, όπως είναι εμφανές και από το διάγραμμα το εγκλειστικό μίγμα αλγινικού-ινουλίνης είχε την υψηλότερη απόδοση, έναντι του απλού διαλύματος αλγινικού που είχε τη χαμηλότερη.

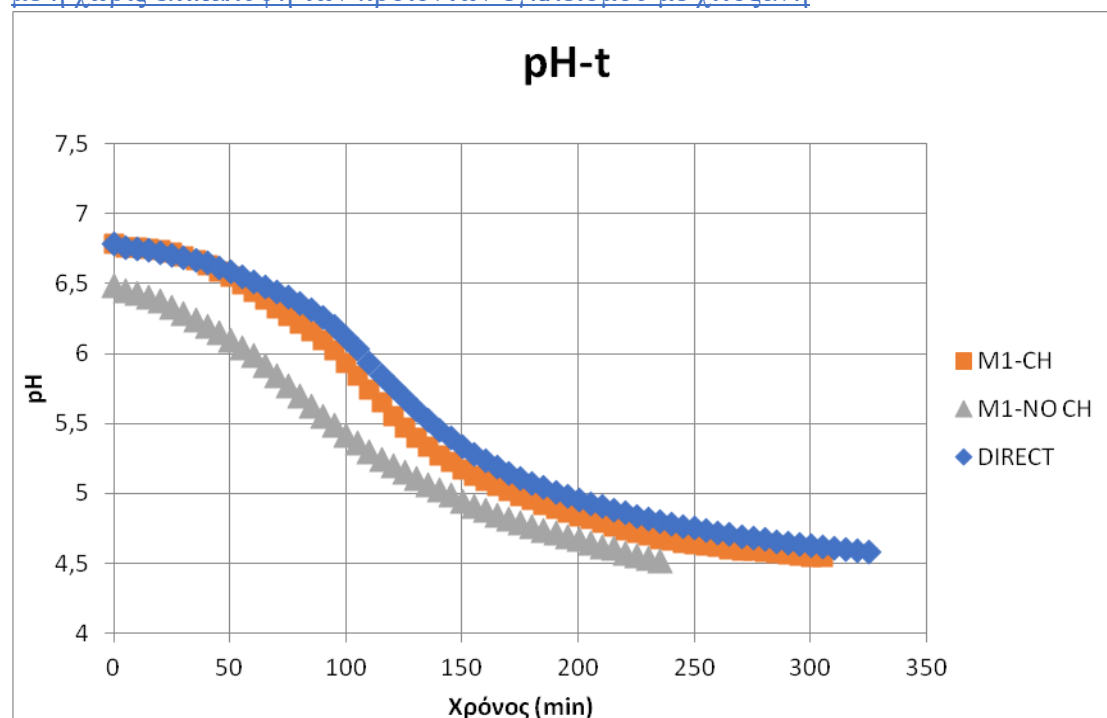
Χρήση εγκλεισμένων προβιοτικών βακτηρίων στην ζύμωση γιαουρτιού

Μετά την ολοκλήρωση των πειραμάτων εγκλεισμού των προβιοτικών μικροοργανισμών με την τεχνική της γαλακτωματοποίησης, ακολούθησε η ενσωμάτωση των προϊόντων εγκλεισμού σε γάλα το οποίο εμβολιάστηκε και με σταθερή ποσότητα συμβατικής καλλιέργειας εκκίνησης (1g/L) σε κάθε περίπτωση, για την παραγωγή προβιοτικού προϊόντος γιαουρτιού. Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων στα προϊόντα γιαουρτιού που παρασκευάστηκαν.

7.2.1.3 Ζύμωση με συμβατική καλλιέργεια εκκίνησης (Direct ή τυφλό δείγμα)

Το τυφλό δείγμα που χρησιμοποιείται ως αναφορά, σε αυτήν τη πειραματική σειρά, δηλαδή το δείγμα που έχει ζυμωθεί με μη εγκλεισμένη συμβατική καλλιέργεια εκκίνησης, είναι το ίδιο με εκείνο της πρώτης σειράς πειραμάτων καθώς δεν υπάρχει κάποια αλλαγή στις συνθήκες. Επομένως η μείωση του pH με τη πάροδο του χρόνου και η αντίστοιχη καμπύλη έχουν ήδη παρουσιαστεί στο διάγραμμα 7.1.

7.2.1.4 Ζύμωση με εγκλεισμένη καλλιέργεια σε μίγμα αλγινικού νατρίου-γλυκερόλης με ή χωρίς επικάλυψη των προϊόντων εγκλεισμού με χιτοζάνη



Διάγραμμα 7.24 Μεταβολή pH συναρτήσει του χρόνου κατά την ζύμωση του γάλακτος με εγκλεισμένη προβιοτική καλλιέργεια σε μίγμα αλγινικού-γλυκερόλης με ή χωρίς επικάλυψη χιτοζάνης

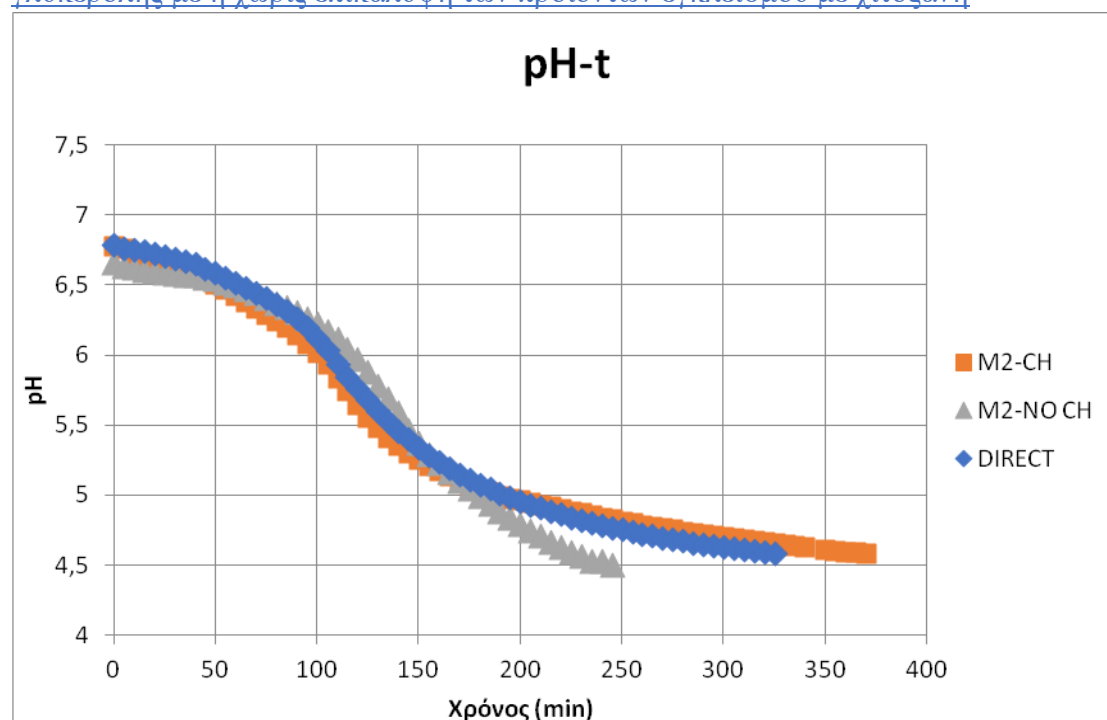
Στο διάγραμμα 7.24 παρουσιάζεται η μεταβολή του pH κατά τη διάρκεια της ζύμωσης για τα δείγματα γιαουρτιού που περιέχουν εγκλεισμένη καλλιέργεια σε μίγμα αλγινικού νατρίου-γλυκερόλης με (M1-CH) και χωρίς επικάλυψη χιτοζάνης (M1-NO CH). Για λόγους σύγκρισης παρατίθεται και η καμπύλη μεταβολής του pH του τυφλού δείγματος γιαουρτιού (DIRECT). Παρατηρείται ότι όλες οι καμπύλες εμφανίζουν σιγμοειδή μορφή και προσαρμόζονται με ικανοποιητική ακρίβεια στο μοντέλο Gompertz τεσσάρων παραμέτρων ($R^2 > 99\%$).

Πίνακας 7.5 Αποτελέσματα μετρήσεων των προϊόντων εγκλεισμού και της ζύμωσης γάλακτος προς γιαούρτι με εγκλεισμένη προβιοτική καλλιέργεια σε μίγμα αλγινικού-γλυκερόλης

Χαρακτηριστικό	Τυφλό	Με επικάλυψη χιτοζάνης	Χωρίς επικάλυψη χιτοζάνης
Συνολική διάρκεια ζύμωσης (min)	325	305	235
Μέγιστος ρυθμός μείωσης pH, μ	-0,013	-0,0146	-0,0119
Διάρκεια λανθάνουσας φάσης pH, λ (min)	206,11	180,87	175,04
Ιξώδες μετά την ζύμωση στους 45 °C (cP)	6000	5320	4550
Ιξώδες μετά από 24 h αποθήκευσης στους 4 °C (cP)	16250	14060	14550
Σκληρότητα (N)	0,853	0,895	0,560
Συνεκτικότητα	0,527	0,493	0,577
Προσκολλησιμότητα (N*s)	0,542	0,336	0,250
Κομμιώδες (N)	0,447	0,441	0,347
Βακτηριακό φορτίο εγκλεισμένου προϊόντος (cfu/g)	-	2,56E+07	8,60E+06
Βακτηριακό φορτίο προϊόντος γιαουρτιού (cfu/g)	-	1,73E+04	7,70E+03
Ποσοστό εγκλεισμένης καλλιέργειας (%)	-	2%	1%

Από την παρατήρηση του πίνακα 7.5 προκύπτει ότι η ζύμωση δείγματος γάλακτος που περιέχει εγκλεισμένη καλλιέργεια σε μίγμα αλγινικού νατρίου-γλυκερόλης χωρίς επικάλυψη χιτοζάνης έχει σημαντικά μικρότερη διάρκεια από την ζύμωση του τυφλού δείγματος, πιθανόν λόγω της συνεισφοράς των προβιοτικών βακτηρίων στη διεργασία της ζύμωσης. Αντίθετα, δεν παρουσιάζεται τόσο σημαντική διαφορά στους χρόνους ζύμωσης του τυφλού και του δείγματος γιαουρτιού που περιέχει εγκλειστικά προϊόντα επικαλυμμένα με χιτοζάνη Αυτό μπορεί να εξηγηθεί μέσω της επίπτωσης του αντιμικροβιακού χαρακτήρα της χιτοζάνης στα προβιοτικά βακτήρια. Σε ότι αφορά τις παραμέτρους που προκύπτουν από το μοντέλο Gompertz, τα τρία δείγματα εμφανίζουν παραπλήσιους μέγιστους ρυθμούς μείωσης pH, ενώ το δείγμα γιαουρτιού με τα εγκλεισμένα βακτήρια χωρίς επικάλυψη χιτοζάνης έχει τη μικρότερη λανθάνουσα φάση. Σχετικά με τα χαρακτηριστικά ρεολογίας και υφής των δειγμάτων γιαουρτιού, παρατηρείται ότι το τυφλό δείγμα εμφανίζει υψηλότερες τιμές ιξώδους και χαρακτηριστικών υφής από τα αντίστοιχα με προσθήκη εγκλεισμένης καλλιέργειας. Σχετικά με το βακτηριακό φορτίο, παρατηρείται ότι οι τιμές του στα εγκλεισμένα προϊόντα με ή χωρίς επικάλυψη χιτοζάνης είναι παραπλήσιες, ενώ μετά τη διεργασία της ζύμωσης μειώνονται τουλάχιστον κατά τρεις τάξεις μεγέθους στα προϊόντα γιαουρτιού. Τέλος, το ποσοστό απόδοσης του εγκλεισμού κυμαίνεται σε χαμηλά επίπεδα και στις δύο περιπτώσεις εγκλεισμού.

7.2.1.5 Ζύμωση με εγκλεισμένη καλλιέργεια σε μίγμα αλγινικού νατρίου-ινουλίνης-γλυκερόλης με ή χωρίς επικάλυψη των προϊόντων εγκλεισμού με χιτοζάνη



Διάγραμμα 7.25 Μεταβολή pH συναρτήσει του χρόνου κατά την ζύμωση του γάλακτος με εγκλεισμένη προβιοτική καλλιέργεια σε μίγμα αλγινικού-ινουλίνης-γλυκερόλης με ή χωρίς επικάλυψη χιτοζάνης

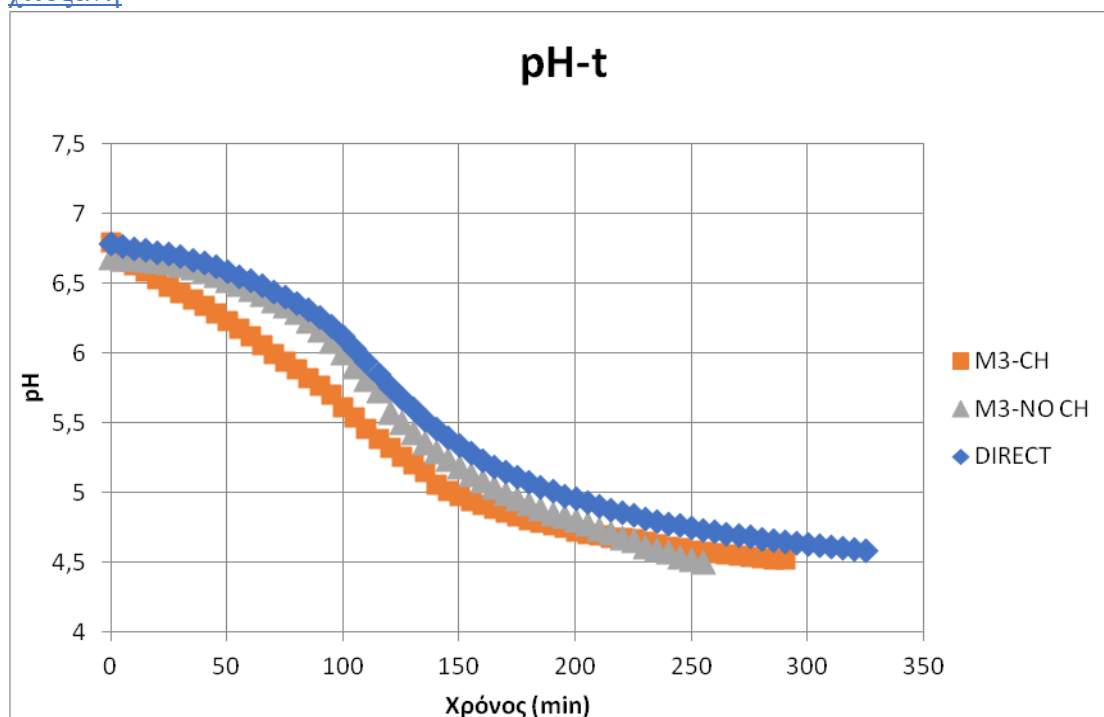
Στο διάγραμμα 7.25 παρουσιάζεται η μεταβολή του pH κατά τη διάρκεια της ζύμωσης για τα δείγματα γιαουρτιού με προσθήκη εγκλεισμένης προβιοτικής καλλιέργειας σε μίγμα αλγινικού νατρίου-ινουλίνης-γλυκερόλης με ή χωρίς επικάλυψη χιτοζάνης. Για λόγους σύγκρισης παρατίθεται και η καμπύλη μεταβολής του pH του τυφλού δείγματος. Παρατηρείται ότι όλες οι καμπύλες εμφανίζουν σιγμοειδή μορφή και εφαρμόζονται με ικανοποιητική ακρίβεια στο μοντέλο Gompertz τεσσάρων παραμέτρων.

Πίνακας 7.6 Αποτελέσματα μετρήσεων των προϊόντων εγκλεισμού και της ζύμωσης γάλακτος προς γιαούρτι με εγκλεισμένη προβιοτική καλλιέργεια σε μίγμα αλγινικού-ινουλίνης-γλυκερόλης

Χαρακτηριστικό	Τυφλό	Με επικάλυψη χιτοζάνης	Χωρίς επικάλυψη χιτοζάνης
Συνολική διάρκεια ζύμωσης (min)	325	355	245
Μέγιστος ρυθμός μείωσης, μ	-0,013	-0,0119	-0,0173
Διάρκεια λανθάνουσας φάσης, λ (min)	206,11	202,88	200,81
Ιξώδες μετά την ζύμωση στους 45 °C (cP)	6000	5540	4440
Ιξώδες μετά από 24 h αποθήκευσης στους 4 °C (cP)	16250	12540	13560
Σκληρότητα (N)	0,853	0,636	0,655
Συνεκτικότητα	0,527	0,489	0,478
Προσκολλησιμότητα (N*s)	0,542	0,278	0,387
Κομμιώδες (N)	0,447	0,333	0,313
Βακτηριακό φορτίο εγκλεισμένου προϊόντος (cfu/g)	-	6,80E+07	1,16E+08
Βακτηριακό φορτίο προϊόντος γιαουρτιού (cfu/g)	-	1,31E+04	8,20E+04
Ποσοστό εγκλεισμένης καλλιέργειας (%)	-	7%	10%

Όπως παρατηρείται από τον πίνακα 7.6 προκύπτει ότι η ζύμωση γιαουρτιού με προσθήκη καλλιέργειας εγκλεισμένης σε μίγμα αλγινικού νατρίου-ινουλίνης-γλυκερόλης χωρίς επικάλυψη χιτοζάνης έχει σημαντικά μικρότερη διάρκεια από την ζύμωση του τυφλού δείγματος, όπως και στην προηγούμενη περίπτωση. Αντίθετα, ο χρόνος ζύμωσης του δείγματος γιαουρτιού με την εγκλεισμένη καλλιέργεια επικαλυμμένη με χιτοζάνη είναι μεγαλύτερος από τον αντίστοιχο του τυφλού δείγματος, πιθανότατα λόγω του αντιμικροβιακού χαρακτήρα της χιτοζάνης. Όσον αφορά τις παραμέτρους που προκύπτουν από το μοντέλο Gompertz, τα τρία δείγματα εμφανίζουν παραπλήσιες τιμές μέγιστου ρυθμού μείωσης pH και λανθάνουσας φάσης, με το δείγμα γιαουρτιού που περιέχει εγκλεισμένη καλλιέργεια χωρίς επικάλυψη χιτοζάνης να έχει ελαφρά μεγαλύτερο ρυθμό μείωσης και μικρότερη λανθάνουσα φάση pH. Σχετικά με τα χαρακτηριστικά ρεολογίας και υφής των δειγμάτων γιαουρτιού, παρατηρείται ότι το τυφλό δείγμα εμφανίζει υψηλότερες τιμές ιξώδους και χαρακτηριστικών υφής από τα αντίστοιχα με προσθήκη εγκλεισμένης καλλιέργειας, όπως και στην προηγούμενη περίπτωση. Σχετικά με το βακτηριακό φορτίο, παρατηρείται όπως και στην προηγούμενη περίπτωση, ότι οι τιμές του και στα δύο εγκλεισμένα προϊόντα, με ή χωρίς επικάλυψη χιτοζάνης, είναι παραπλήσιες, ενώ μειώνονται τουλάχιστον τρεις τάξεις μεγέθους μετά το τέλος της ζύμωσης στα προϊόντα γιαουρτιού. Τέλος, το ποσοστό απόδοσης του εγκλεισμού κυμαίνεται σε χαμηλά επίπεδα, αλλά υψηλότερα από τα αντίστοιχα του προηγούμενου μίγματος.

7.2.1.6 Ζύμωση με εγκλεισμένη καλλιέργεια σε μίγμα αλγινικού νατρίου-ολιγοφρουκτόζης-γλυκερόλης με ή χωρίς επικάλυψη των προϊόντων εγκλεισμού με χιτοζάνη



Διάγραμμα 7.26 Μεταβολή pH συναρτήσει του χρόνου κατά την ζύμωση του γάλακτος με εγκλεισμένη προβιοτική καλλιέργεια σε μίγμα αλγινικού-ολιγοφρουκτόζης-γλυκερόλης με ή χωρίς επικάλυψη χιτοζάνης

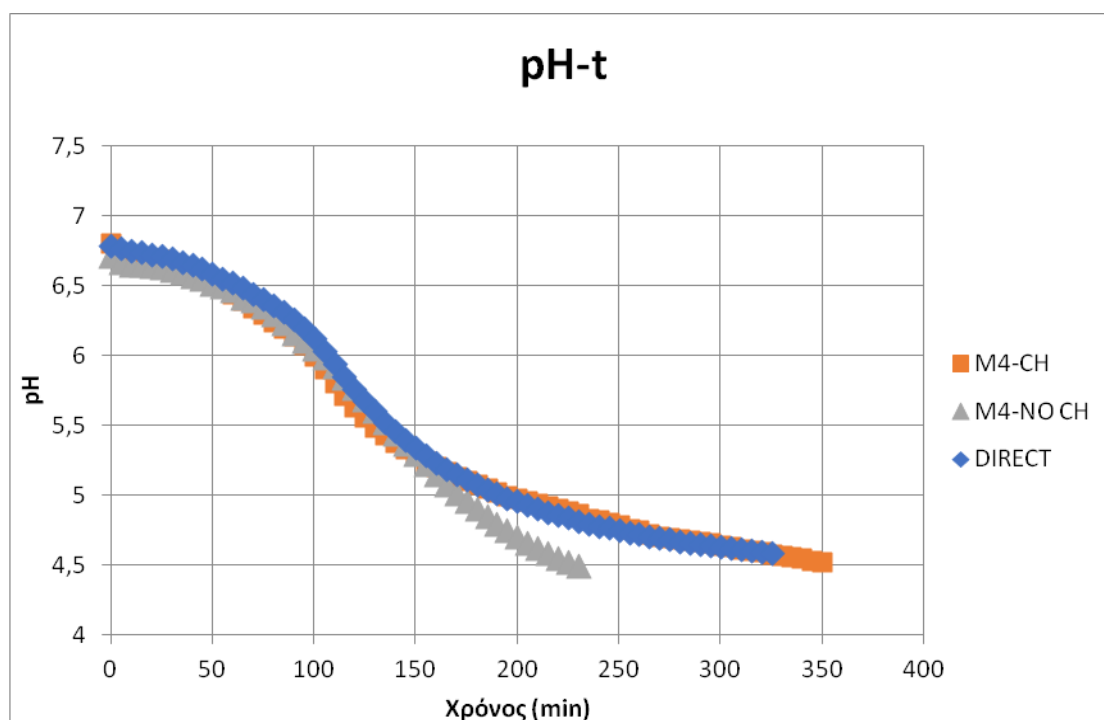
Στο διάγραμμα 7.26 παρουσιάζεται η μεταβολή του pH κατά τη διάρκεια της ζύμωσης για τα δείγματα με προσθήκη εγκλεισμένης προβιοτικής καλλιέργειας σε μίγμα αλγινικού νατρίου-ολιγοφρουκτόζης-γλυκερόλης με ή χωρίς επικάλυψη χιτοζάνης, μαζί με την καμπύλη μεταβολής του pH του τυφλού δείγματος (DIRECT), για λόγους σύγκρισης. Η μορφή όλων των καμπυλών είναι σιγμοειδής και η ακρίβεια προσαρμογής τους στο μοντέλο Gompertz τεσσάρων παραμέτρων είναι ικανοποιητική.

Πίνακας 7.7 Αποτελέσματα μετρήσεων των προϊόντων εγκλεισμού και της ζύμωσης γάλακτος προς γιαούρτι με εγκλεισμένη προβιοτική καλλιέργεια σε μίγμα αλγινικού-ολιγοφρουκτόζης-γλυκερόλης

Χαρακτηριστικό	Τυφλό	Με επικάλυψη χιτοζάνης	Χωρίς επικάλυψη χιτοζάνης
Συνολική διάρκεια ζύμωσης (min)	325	290	255
Μέγιστος ρυθμός μείωσης, μ	-0,013	-0,0127	-0,0152
Διάρκεια λανθάνουσας φάσης, λ (min)	206,11	179,79	189,34
Ιξώδες μετά την ζύμωση στους 45 °C (cP)	6000	5940	4600
Ιξώδες μετά από 24 h αποθήκευσης στους 4 °C (cP)	16250	12120	14380
Σκληρότητα (N)	0,853	0,736	0,593
Συνεκτικότητα	0,527	0,451	0,470
Προσκολλησιμότητα (N*s)	0,542	0,303	0,378
Κομμιώδες (N)	0,447	0,341	0,279
Βακτηριακό φορτίο εγκλεισμένου προϊόντος (cfu/g)	-	1,76E+07	5,60E+07
Βακτηριακό φορτίο προϊόντος γιαουρτιού (cfu/g)	-	8,30E+03	4,70E+04
Ποσοστό εγκλεισμένης καλλιέργειας (%)	-	2%	5%

Από την παρατήρηση του πίνακα 7.7 προκύπτει ότι τα αποτελέσματα έρχονται σε συμφωνία με τα αντίστοιχα των εγκλεισμένων βακτηρίων σε μίγμα αλγινικού νατρίου-γλυκερόλης. Συγκεκριμένα, η ζύμωση δειγμάτων γιαουρτιού με προσθήκη εγκλεισμένης καλλιέργειας χωρίς επικάλυψη χιτοζάνης έχει τη μικρότερη διάρκεια από τις δύο περιπτώσεις, ενώ το τυφλό εμφανίζει τη μεγαλύτερη διάρκεια. Αντίστοιχες παρατηρήσεις ισχύουν και για τα χαρακτηριστικά ρεολογίας και υφής των δειγμάτων γιαουρτιού, όπου το τυφλό δείγμα εμφανίζει τις υψηλότερες τιμές ιξώδους και χαρακτηριστικών υφής. Τέλος, το βακτηριακό φορτίο εμφανίζει παραπλήσιες τιμές και στα δύο είδη εγκλεισμένου προϊόντος (με ή χωρίς επικάλυψη χιτοζάνης), παρουσιάζοντας πτώση μεγαλύτερη των τριών τάξεων μεγέθους μετά το πέρας της ζύμωσης στα προϊόντα γιαουρτιού, ενώ τα ποσοστά απόδοσης του εγκλεισμού κυμαίνονται σε χαμηλά επίπεδα και στις δύο περιπτώσεις.

7.2.1.7 Ζύμωση με εγκλεισμένη καλλιέργεια σε μίγμα αλγινικού νατρίου-μαλτοδεξτρίνης-γλυκερόλης με και χωρίς επικάλυψη των προϊόντων εγκλεισμού με χιτοζάνη



Διάγραμμα 7.27 Μεταβολή pH συναρτήσει του χρόνου κατά την ζύμωση του γάλακτος με εγκλεισμένη προβιοτική καλλιέργεια σε μίγμα αλγινικού-μαλτοδεξτρίνης-γλυκερόλης με ή χωρίς επικάλυψη χιτοζάνης

Στο διάγραμμα 7.27 παρουσιάζεται η μεταβολή του pH κατά τη διάρκεια της ζύμωσης για τα δείγματα γιαουρτιού με προσθήκη εγκλεισμένης προβιοτικής καλλιέργειας σε μίγμα αλγινικού νατρίου-μαλτοδεξτρίνης-γλυκερόλης με ή χωρίς επικάλυψη χιτοζάνης, μαζί με την καμπύλη μεταβολής του pH του τυφλού δείγματος, για λόγους σύγκρισης. Κάθε καμπύλη έχει σιγμοειδή μορφή και προσαρμόζει με υψηλή ακρίβεια στο μοντέλο Gompertz τεσσάρων παραμέτρων.

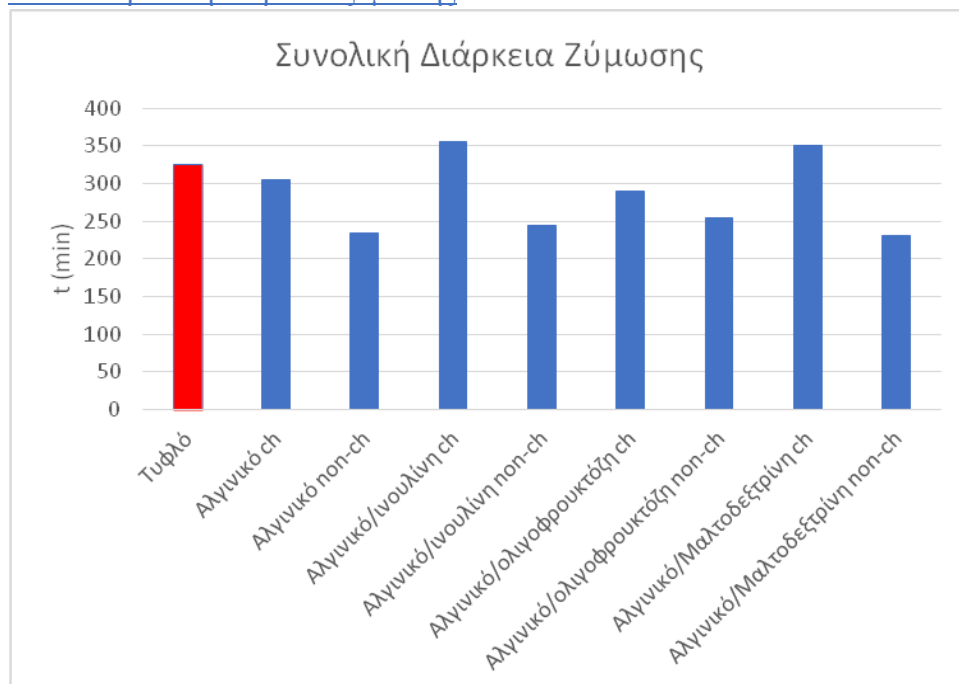
Πίνακας 7.8 Αποτελέσματα μετρήσεων των προϊόντων εγκλεισμού και της ζύμωσης γάλακτος προς γιαούρτι με εγκλεισμένη προβιοτική καλλιέργεια σε μίγμα αλγινικού-μαλτοδεξτρίνης-γλυκερόλης

Χαρακτηριστικό	Τυφλό	Με επικάλυψη χιτοζάνης	Χωρίς επικάλυψη χιτοζάνης
Συνολική διάρκεια ζύμωσης (min)	325	350	230
Μέγιστος ρυθμός μείωσης, μ	-0,013	-0,0111	-0,0158
Διάρκεια λανθάνουσας φάσης, λ (min)	206,11	215,9	199,49
Ιξώδες μετά την ζύμωση στους 45 °C (cP)	6000	5550	4120
Ιξώδες μετά από 24 h αποθήκευσης στους 4 °C (cP)	16250	13760	12650
Σκληρότητα (N)	0,853	0,813	0,593
Συνεκτικότητα	0,527	0,472	0,493
Προσκολλησιμότητα (N*s)	0,542	0,481	0,317
Κομμιώδες (N)	0,447	0,370	0,290
Βακτηριακό φορτίο εγκλεισμένου προϊόντος (cfu/g)	-	2,37E+06	2,88E+07
Βακτηριακό φορτίο προϊόντος γιαουρτιού (cfu/g)	-	4,60E+03	1,74E+04
Ποσοστό εγκλεισμένης καλλιέργειας (%)	-	0,3%	3%

Από την παρατήρηση του πίνακα 7.8 προκύπτει ότι τα αποτελέσματα έρχονται πάλι σε συμφωνία με τα αντίστοιχα των εγκλεισμένων με το πρώτο μίγμα βακτηρίων. Τη μικρότερη χρονική διάρκεια εμφανίζει η ζύμωση γιαουρτιού με προσθήκη εγκλεισμένης καλλιέργειας χωρίς επικάλυψη χιτοζάνης, ενώ τη μεγαλύτερη διάρκεια έχει το τυφλό δείγμα. Ομοίως, τις υψηλότερες τιμές στα χαρακτηριστικά ρεολογίας και υφής εμφανίζει το τυφλό δείγμα. Τέλος, το βακτηριακό φορτίο εμφανίζει παραπλήσιες τιμές και στα δύο είδη εγκλεισμένου προϊόντος, ενώ μετά το τέλος της ζύμωσης εμφανίζει μείωση μεγαλύτερη των τριών τάξεων μεγέθους στα προϊόντα γιαουρτιού. Τα ποσοστά απόδοσης του εγκλεισμού κυμαίνονται σε χαμηλά επίπεδα, ειδικότερα στην περίπτωση εγκλεισμένων δειγμάτων και επικαλυμμένων με χιτοζάνη.

7.2.2 Σύγκριση αποτελεσμάτων δεύτερης πειραματικής σειράς

7.2.2.1 Χρονική διάρκεια ζύμωσης

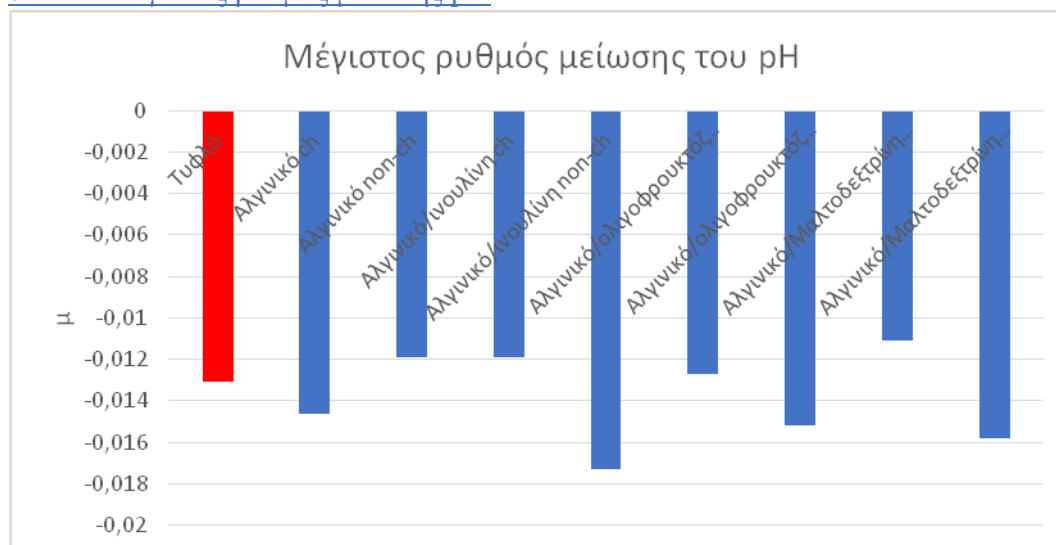


Διάγραμμα 7.28 Συνολική διάρκεια ζύμωσης δειγμάτων 2^{ης} πειραματικής σειράς και τυφλού δείγματος

Από το διάγραμμα 7.28 προκύπτει ότι παραπλήσιους χρόνους ζύμωσης εμφανίζουν το τυφλό και όλα τα δείγματα που περιείχαν προϊόντα εγκλεισμού επικαλυμμένα με χιτοζάνη. Τους μεγαλύτερους ειδικά χρόνους εμφανίζουν το τυφλό δείγμα και το δείγμα γιαουρτιού που περιείχε τα προβιοτικά βακτήρια εγκλεισμένα σε μίγμα αλγινικού-ινουλίνης και επικαλυμμένα με χιτοζάνη. Αντίθετα, τα δείγματα γιαουρτιού που περιείχαν προϊόντα εγκλεισμού τα οποία δεν ήταν επικαλυμμένα με χιτοζάνη παρουσιάζουν σημαντικά μικρότερους χρόνους ζύμωσης, πιθανόν λόγω συνεισφοράς των προβιοτικών βακτηρίων σε αυτή.

Από τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων για τη συνολική διάρκεια ζύμωσης συμπεραίνεται ότι επηρεάζεται σημαντικά από την επικάλυψη των προϊόντων εγκλεισμού με χιτοζάνη αλλά και από το είδος του εγκλειστικού μίγματος.

7.2.2.2 Μέγιστος ρυθμός μείωσης pH

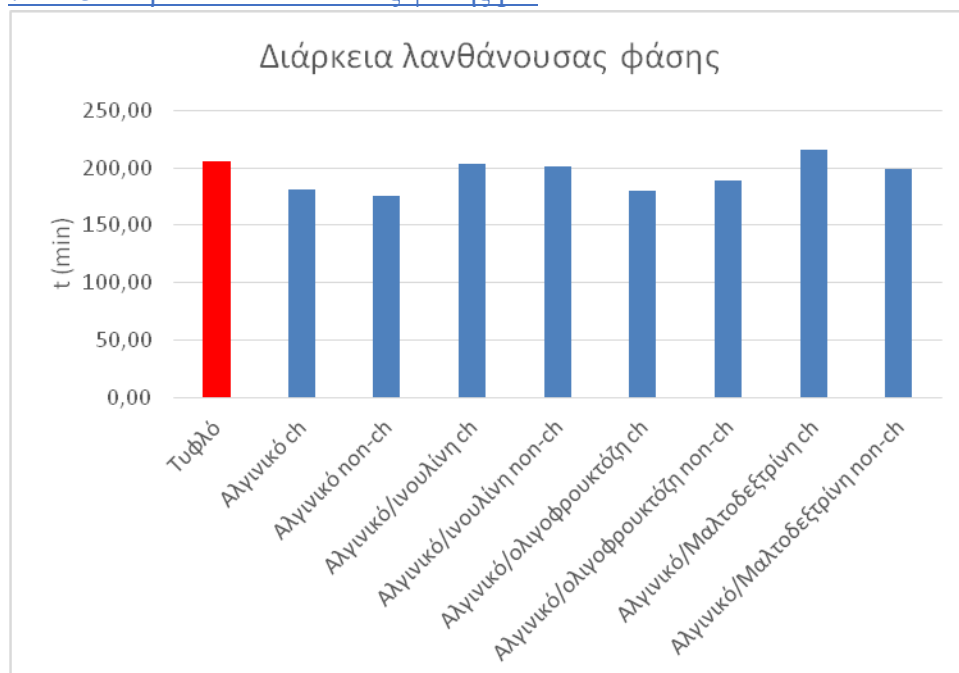


Διάγραμμα 7.29 Μέγιστος ρυθμός μείωσης pH δειγμάτων 2^{ης} πειραματικής σειράς και τυφλού δείγματος

Από το διάγραμμα 7.29 προκύπτει το συμπέρασμα πως το δείγμα γιαουρτιού με τα εγκλεισμένα βακτήρια σε μίγμα αλγινικού-ινουλίνης χωρίς επικάλυψη χιτοζάνης παρουσιάζει την υψηλότερη απόλυτη τιμή μέγιστου ρυθμού μείωσης του pH, ενώ το δείγμα γιαουρτιού με εγκλεισμένα βακτήρια σε μίγμα αλγινικού-μαλτοδεξτρίνης και επικάλυψη με χιτοζάνη εμφανίζει τη μικρότερη τιμή.

Από τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων εξάγεται το συμπέρασμα ότι ο μέγιστος ρυθμός μείωσης του pH των δειγμάτων γιαουρτιού δεν επηρεάζεται σημαντικά από την επικάλυψη των προϊόντων εγκλεισμού με χιτοζάνη ή από το είδος του εγκλειστικού μίγματος.

7.2.2.3 Διάρκεια λανθάνουσας φάσης pH

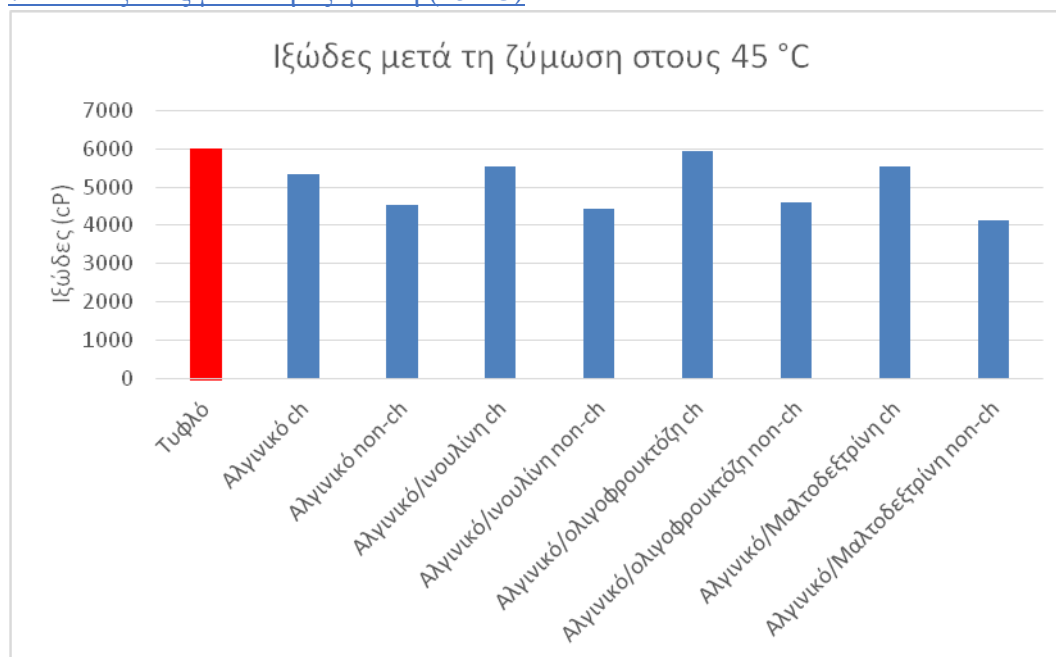


Διάγραμμα 7.30 Διάρκεια λανθάνουσας φάσης δειγμάτων 2^{ης} πειραματικής σειράς και τυφλού δείγματος

Από το διάγραμμα 7.30 παρατηρείται ότι όλα τα δείγματα, συμπεριλαμβανομένου και του τυφλού, δεν εμφανίζουν σημαντικές διαφορές στη διάρκεια λανθάνουσας φάσης της ζύμωσης. Το δείγμα γιαουρτιού με βακτήρια εγκλεισμένα σε μίγμα αλγινικού και μη επικαλυμμένα με χιτοζάνη εμφανίζει τη μικρότερη διάρκεια λανθάνουσας φάσης, ενώ το δείγμα με το εγκλεισμένο προϊόν σε μίγμα αλγινικού-μαλτοδεξτρίνης και επικαλυμμένο με χιτοζάνη εμφανίζει τη μεγαλύτερη διάρκεια ζύμωσης.

Από τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων εξάγεται το συμπέρασμα ότι η συγκεκριμένη εξεταζόμενη παράμετρος δεν επηρεάζεται σημαντικά από την επικάλυψη των προϊόντων εγκλεισμού με χιτοζάνη ή από το είδος του εγκλειστικού μίγματος.

7.2.2.4 Ιξώδες μετά την ζύμωση (45 °C)



Διάγραμμα 7.31 Ιξώδες δειγμάτων 2^{ης} πειραματικής σειράς και τυφλού δείγματος γιαουρτιού μετά την ζύμωση στους 45 °C

Σύμφωνα με το διάγραμμα 7.31 το ιξώδες των δειγμάτων γιαουρτιού μετά την ζύμωση στους 45 °C τα οποία περιέχουν προϊόντα εγκλεισμού επικαλυμμένα με χιτοζάνη προσεγγίζουν καλύτερα το αντίστοιχο ιξώδες του τυφλού δείγματος, σε σχέση με τα δείγματα χωρίς επικάλυψη χιτοζάνης.

Πράγματι, από τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, προκύπτει πως το ιξώδες των δειγμάτων γιαουρτιού αμέσως μετά την ζύμωση στους 45 °C, επηρεάζεται σημαντικά από την ύπαρξη επικάλυψης χιτοζάνης στα προϊόντα εγκλεισμού. Πιο συγκεκριμένα, τα δείγματα γιαουρτιού με προϊόντα εγκλεισμού με επικάλυψη χιτοζάνης εμφανίζουν μεγαλύτερο ιξώδες μετά την ζύμωση σε σχέση με τα δείγματα με προϊόντα εγκλεισμού χωρίς επικάλυψη.

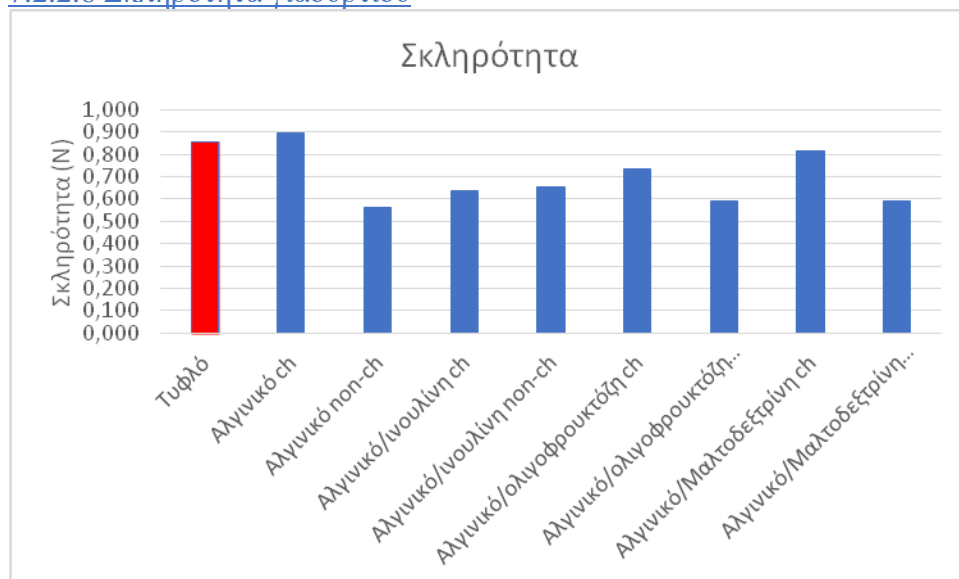
7.2.2.5 Ιξώδες μετά από 24 h αποθήκευση στους 4 °C



Διάγραμμα 7.32 Ιξώδες δειγμάτων 2^{ης} πειραματικής σειράς και τυφλού δείγματος γιαουρτιού μετά από 24 h αποθήκευση στους 4 °C

Από το διάγραμμα 7.32, παρατηρείται ότι το τυφλό δείγμα παρουσιάζει το υψηλότερο ιξώδες μετά την αποθήκευση στους 4 °C για 24 h. Αντίθετα, το δείγμα με το χαμηλότερο ιξώδες μετά την αποθήκευση προκύπτει το δείγμα γιαουρτιού με εγκλεισμένα προϊόντα σε μίγμα αλγινικού-ολιγοφρουκτόζης με επικάλυψη χιτοζάνης. Από την ανάλυση διακύμανσης των αποτελεσμάτων συμπεραίνεται ότι το ιξώδες των δειγμάτων γιαουρτιού μετά από 24 h αποθήκευσης στους 4 °C δεν επηρεάζεται σημαντικά από την επικάλυψη των προϊόντων εγκλεισμού με χιτοζάνη ή από το είδος του εγκλειστικού μίγματος.

7.2.2.6 Σκληρότητα γιαουρτιού



Διάγραμμα 7.33 Σκληρότητα δειγμάτων γιαουρτιού 2^{ης} πειραματικής σειράς και τυφλού δείγματος

Από το διάγραμμα 7.33, παρατηρείται ότι το τυφλό, το δείγμα γιαουρτιού με τα εγκλεισμένα βακτήρια σε αλγινικό και το δείγμα γιαουρτιού με τα εγκλεισμένα βακτήρια σε μίγμα αλγινικού-μαλτοδεξτρίνης επικαλυμμένα με χιτοζάνη εμφανίζουν τις μεγαλύτερες και παρεμφερείς τιμές σκληρότητας μετά από την ανάλυση υφής του γιαουρτιού. Ενώ τα υπόλοιπα δείγματα γιαουρτιού παρουσιάζουν αρκετά χαμηλότερες τιμές σκληρότητας, με τη μικρότερη τιμή να εμφανίζει το δείγμα με το αλγινικό χωρίς επικάλυψη χιτοζάνης.

Από την ανάλυση διακύμανσης των αποτελεσμάτων εξάγεται το συμπέρασμα ότι η σκληρότητα των δειγμάτων γιαουρτιού δεν επηρεάζεται σημαντικά από την επικάλυψη των προϊόντων εγκλεισμού με χιτοζάνη ή από το είδος του εγκλειστικού μίγματος.

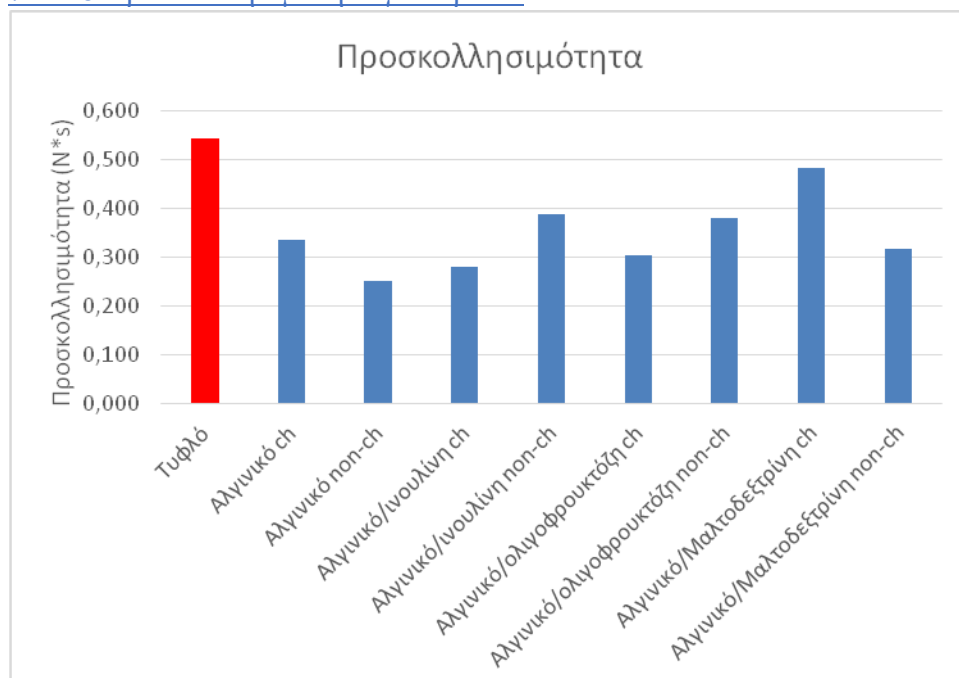
7.2.2.7 Συνεκτικότητα γιαουρτιού



Διάγραμμα 7.34 Συνεκτικότητα δειγμάτων γιαουρτιού 2^{ης} πειραματικής σειράς και τυφλού δείγματος

Σύμφωνα με το διάγραμμα 7.34, συμπεραίνεται ότι οι τιμές της συνεκτικότητας των δειγμάτων γιαουρτιού εμφανίζουν παραπλήσιες τιμές. Παρόλα αυτά, το δείγμα γιαουρτιού με προϊόν εγκλεισμένο σε αλγινικό χωρίς επικάλυψη χιτοζάνης παρουσιάζει τη μεγαλύτερη τιμή συνεκτικότητας σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα. Από την ανάλυση διακύμανσης των αποτελεσμάτων εξάγεται το συμπέρασμα ότι η συνεκτικότητα των δειγμάτων γιαουρτιού δεν επηρεάζεται σημαντικά από την επικάλυψη των προϊόντων εγκλεισμού με χιτοζάνη ή από το είδος του εγκλειστικού μίγματος.

7.2.2.8 Προσκολλησιμότητα γιαουρτιού

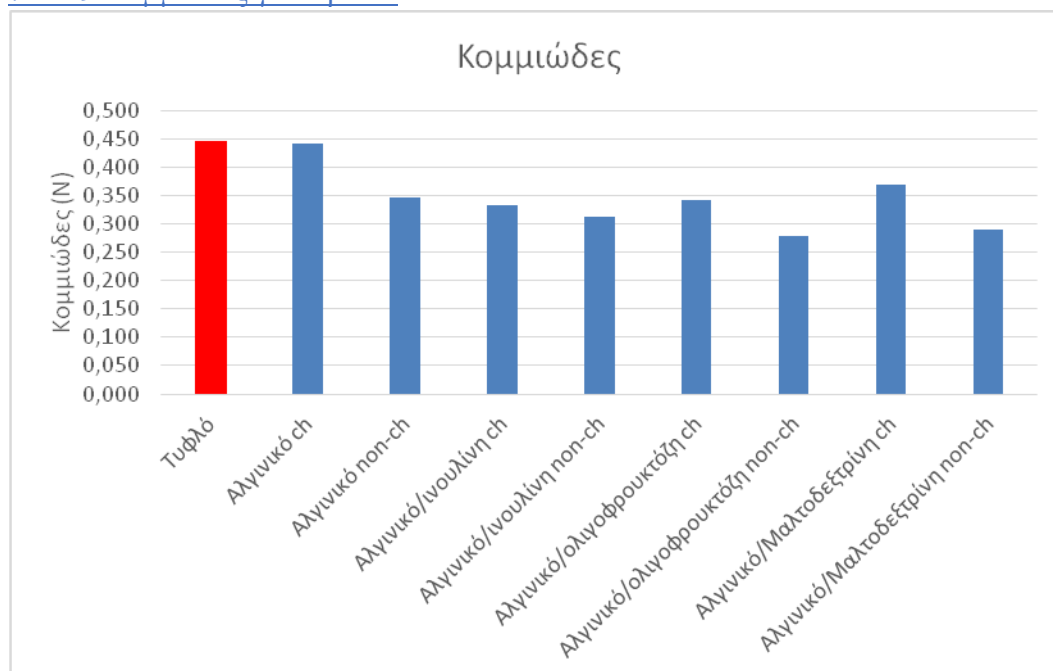


Διάγραμμα 7.35 Προσκολλησιμότητα δειγμάτων γιαουρτιού 2^{ης} πειραματικής σειράς και τυφλού δείγματος

Από το διάγραμμα 7.35 γίνεται αντιληπτό ότι η προσκολλησιμότητα όλων των δειγμάτων γιαουρτιού είναι μικρότερη από αυτή του τυφλού δείγματος γιαουρτιού. Συγκεκριμένα, η τιμή προσκολλησιμότητας του δείγματος με το προϊόν εγκλεισμού σε αλγινικό και χωρίς επικάλυψη χιτοζάνης είναι η μικρότερη.

Παρόλα αυτά, από τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων εξάγεται το συμπέρασμα ότι η προσκολλησιμότητα των δειγμάτων γιαουρτιού δεν επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από την επικάλυψη προϊόντων εγκλεισμού με χιτοζάνη ή από το είδος του εγκλειστικού μίγματος.

7.2.2.9 Κομμιώδες γιαουρτιού

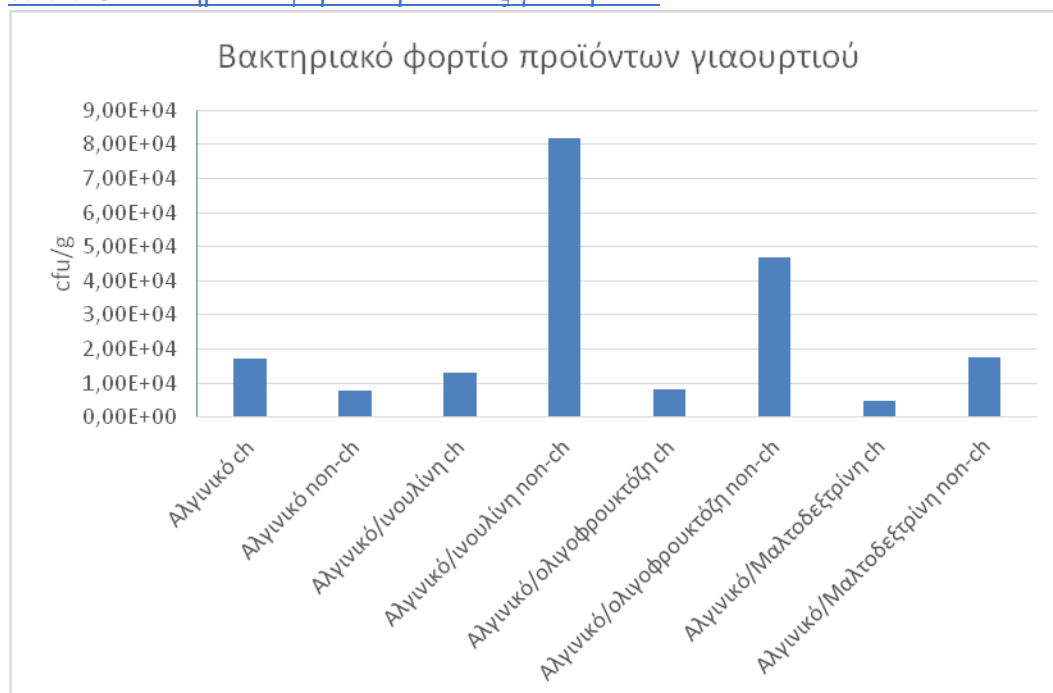


Διάγραμμα 7.36 Κομμιώδες δειγμάτων γιαουρτιού 2^{ης} πειραματικής σειράς και τυφλού δείγματος

Όπως είναι εμφανές από το διάγραμμα 7.36, το τυφλό δείγμα παρουσιάζει την υψηλότερη τιμή κομμιώδους και με μικρή διαφορά ακολουθεί το δείγμα γιαουρτιού με προσθήκη προϊόντος εγκλεισμένου σε αλγινικό και με επικάλυψη χιτοζάνης. Τα υπόλοιπα δείγματα γιαουρτιού εμφανίζουν σχετικά μικρότερο κομμιώδες, ενώ το δείγμα που περιέχει το μίγμα αλγινικού-ολιγοφρουκτόζης χωρίς επικάλυψη χιτοζάνης εμφανίζει την ελάχιστη τιμή κομμιώδους.

Από τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων προκύπτει το συμπέρασμα ότι το κομμιώδες επηρεάζεται σημαντικά από την ύπαρξη ή μη επικάλυψης χιτοζάνης στα προϊόντα εγκλεισμού. Συγκεκριμένα τα προϊόντα εγκλεισμού με επικάλυψη χιτοζάνης εμφανίζουν σημαντικά υψηλότερες τιμές κομμιώδους σε σχέση με τα δείγματα με προϊόντα εγκλεισμού χωρίς επικάλυψη.

7.2.2.10 Βακτηριακό φορτίο προϊόντος γιαουρτιού



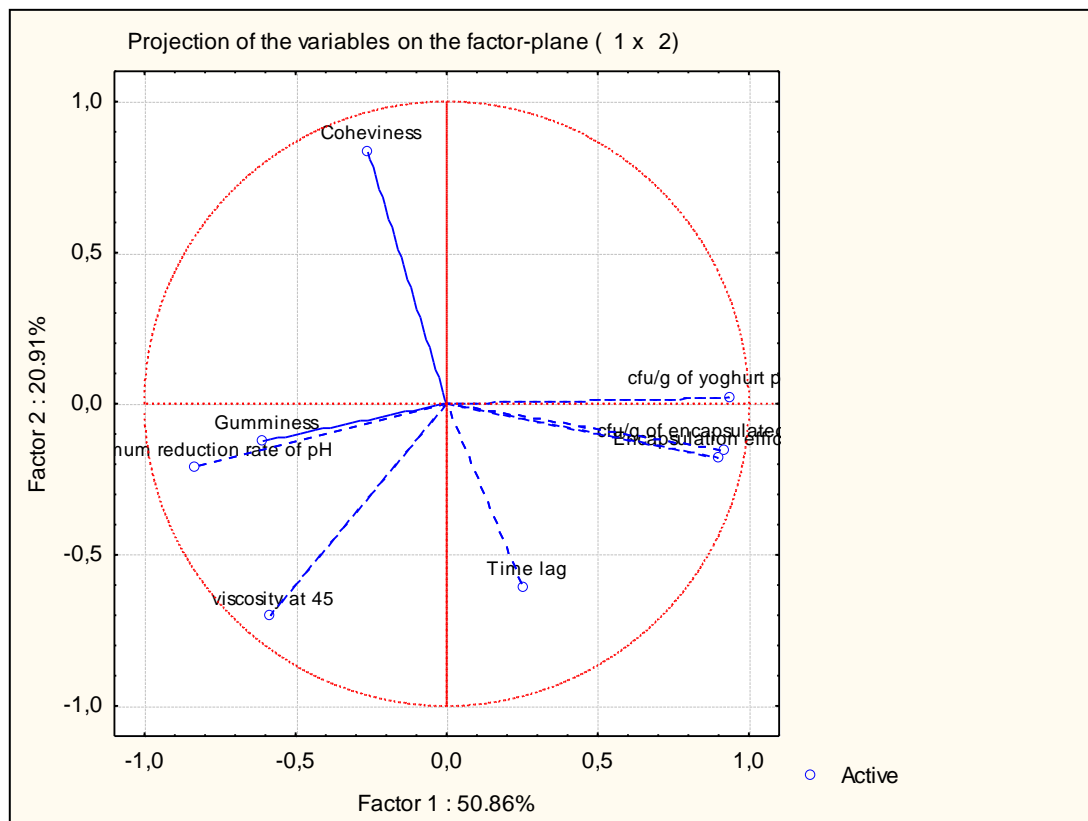
Διάγραμμα 7.37 Βακτηριακό φορτίο δειγμάτων γιαουρτιού 2^{ης} πειραματικής σειράς

Από το διάγραμμα 7.37 συμπεραίνεται ότι το δείγμα γιαουρτιού με το μίγμα αλγινικού-ινουλίνης χωρίς επικάλυψη χιτοζάνης παρουσιάζει το μεγαλύτερο βακτηριακό φορτίο. Τα υπόλοιπα δείγματα γιαουρτιού, με εξαίρεση αυτό με το μίγμα αλγινικού-ολιγοφρουκτόζης, παρουσιάζουν παραπλήσιες τιμές βακτηριακού φορτίου. Από την ανάλυση διακύμανσης των αποτελεσμάτων εξάγεται το συμπέρασμα ότι το βακτηριακό φορτίο των δειγμάτων γιαουρτιού δεν επηρεάζεται σημαντικά από την επικάλυψη των προϊόντων εγκλεισμού με χιτοζάνη ή από το είδος του εγκλειστικού μίγματος.

7.2.2.11 Ανάλυση κύριων συνιστωσών των δειγμάτων της 2ης πειραματικής σειράς (PCA)

Η παρακάτω ανάλυση κύριων συνιστωσών αφορά τα δείγματα τα οποία εξετάστηκαν στη δεύτερη πειραματική σειρά. Συγκεκριμένα, αφορά τα δείγματα των προϊόντων εγκλεισμού που παρασκευάστηκαν με τη μέθοδο της γαλακτωματοποίησης και επεξεργάστηκαν με και χωρίς επικάλυψη χιτοζάνης. Επίσης, αναλύονται και τα αντίστοιχα δείγματα γιαουρτιού που προέκυψαν με την ενσωμάτωση των προϊόντων εγκλεισμού της συγκεκριμένης μεθόδου.

Στο παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζεται η γραφική παράσταση των συντελεστών συσχέτισης των δύο πρώτων κύριων συνιστωσών με τις μεταβλητές που μελετήθηκαν.

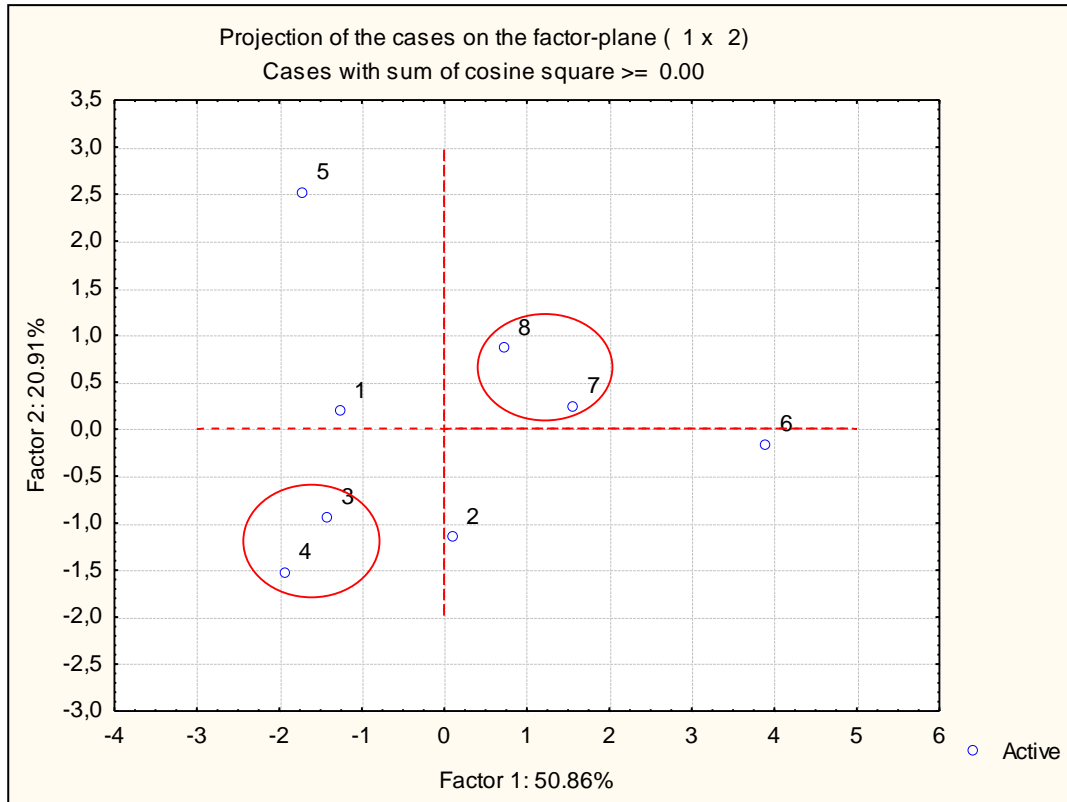


Διάγραμμα 7.38 Γραφική παράσταση συντελεστών συσχέτισης των δύο πρώτων κύριων συνιστωσών με τις παραμέτρους

Το πείραμα του εγκλεισμού προβιοτικών βακτηρίων μέσω γαλακτωματοποίησης και ενσωμάτωσής τους σε γιαούρτι έδωσε δύο κύριες συνιστώσες από τις οποίες η πρώτη έχει 50,86 % και η δεύτερη 20,91 % συνεισφορά στο συνολικό πείραμα.

Από το διάγραμμα 7.38 εξάγεται το συμπέρασμα ότι θετική επίδραση στην πρώτη κύρια συνιστώσα είχαν: η απόδοση εγκλεισμού, το βακτηριακό φορτίο του προϊόντος εγκλεισμού και το βακτηριακό φορτίο των δειγμάτων γιαουρτιού. Αντίθετα, αρνητική επίδραση είχε ο μέγιστος ρυθμός μείωσης του pH των δειγμάτων γιαουρτιού.

Όσον αφορά τη δεύτερη κύρια συνιστώσα αρνητική επίδραση παρουσίασε η συνεκτικότητα των δειγμάτων γιαουρτιού.



Διάγραμμα 7.39 Γραφική παράσταση των δύο πρώτων κύριων συνιστωσών για τα δείγματα που εξετάστηκαν στην δεύτερη πειραματική σειρά

Από το διάγραμμα 7.39 φαίνεται ότι σχηματίζονται δύο ομάδες δειγμάτων με κοινά χαρακτηριστικά. Η μία ομάδα αποτελείται από τα δείγματα: 3^ο και 4^ο, τα οποία παρουσιάζουν ομοιότητες ως προς τα χαρακτηριστικά υφής τους. Η δεύτερη ομάδα αποτελείται από τα δείγματα: 7^ο και 8^ο, τα οποία εμφανίζουν παρόμοιο χρόνο ζύμωσης καθώς και μέγιστο ρυθμό μείωσης pH, διάρκεια λανθάνουσας φάσης και χαρακτηριστικά υφής. Το 6^ο δείγμα, παρουσιάζει μεγαλύτερη απόδοση εγκλεισμού, βακτηριακό φορτίο εγκλειστικού προϊόντος και βακτηριακό φορτίο προϊόντος γιαουρτιού σε σχέση με τα υπόλοιπα μίγματα. Το 5^ο δείγμα εμφανίζει μικρότερη τιμή συνεκτικότητας από αυτές των υπολοίπων δειγμάτων γιαουρτιού, καθώς και μικρότερη διάρκεια λανθάνουσας φάσης.

7.3 Αποτελέσματα μετρήσεων ζ-δυναμικού

Το ζ-δυναμικό καθορίζει την κίνηση των κολλοειδών και τις αλληλεπιδράσεις τους. Προσδιορίζεται με τη βοήθεια της ηλεκτροφόρησης: όταν ένα στερεό σωματίδιο υπόκειται σε ένα ηλεκτρικό πεδίο, σχεδόν αμέσως αποκτά μία ταχύτητα ισορροπίας, μεταξύ της ηλεκτρικής ελκτικής δύναμης και της δύναμης τριβών (λόγω του ιξώδους του μέσου). Η διεργασία της κροκιδώσης αποσκοπεί στο να μηδενίσει το ζ-δυναμικό (που κρατά σε απόσταση τα κολλοειδή στερεά και που δημιουργεί τη σταθερότητα του κολλοειδούς αιωρήματος) και επομένως, να επιτρέψει στα κολλοειδή στερεά να προσεγγίσουν πλησιέστερα τις επιφάνειές τους, δηλαδή αρχικά να αποσταθεροποιηθούν, ώστε στη συνέχεια να γίνει δυνατό να συσσωματωθούν/κροκιδωθούν (δηλαδή να αυξηθούν σε μέγεθος). Όσο, λοιπόν, μικρότερη (κατ' απόλυτη τιμή) είναι η τιμή του ζ-δυναμικού, τόσο πιο ταχεία και εύκολη είναι η δημιουργία κροκιδωμάτων και τόσο πιο σταθερά είναι αυτά. Άρα είναι ένας πολύ σημαντικός παράγοντας για την κατάλληλη επιλογή ενός μέσου εγκλεισμού το οποίο θα χρησιμοποιηθεί στις μεθόδους της εξώθησης και της γαλακτωματοποίησης για την επίτευξη του εγκλεισμού των προβιοτικών βακτηρίων.

7.3.1 Αποτελέσματα μετρήσεων στα μίγματα της μεθόδου της γαλακτωματοποίησης

Πίνακας 7.9 Αποτελέσματα μετρήσεων ζ-δυναμικού για τα μίγματα της τεχνικής γαλακτωματοποίησης

Εγκλειστικό Μίγμα	Αγωγιμότητα (mS/cm)	ζ-δυναμικό (mV)
Αλγινικό-Γλυκερόλη	1,76	-66,9
Αλγινικό-Ινουλίνη-Γλυκερόλη	2,07	-42,5
Αλγινικό-Ολιγοφρουκτόζη-Γλυκερόλη	1,67	-57,1
Αλγινικό-Μαλτοδεξτρίνη-Γλυκερόλη	1,96	-40,3

Από τον πίνακα 7.9 συμπεραίνεται ότι τα μίγματα αλγινικού-ινουλίνης και αλγινικού-μαλτοδεξτρίνης εμφανίζουν τη μικρότερη (απόλυτη) τιμή συγκριτικά με τα άλλα δύο μίγματα και σχηματίζουν ευκολότερα και σταθερότερα πολυμερικά πλέγματα μόλις έρθουν σε επαφή με το διάλυμα CaCl_2 , άρα και ισχυρότερα προϊόντα εγκλεισμού (μικροσφαιρίδια).

7.3.2 Αποτελέσματα μετρήσεων στα μίγματα της μεθόδου της εξώθησης

Πίνακας 7.10 Αποτελέσματα μετρήσεων ζ-δυναμικού για τα μίγματα της τεχνικής εξώθησης

Εγκλειστικό Μίγμα	Αγωγιμότητα (mS/cm)	ζ-δυναμικό (mV)
Αλγινικό-Μαλτοδεξτρίνη-MRS Broth-Γλυκερόλη	3,54	-34
Αλγινικό-Ινουλίνη-MRS Broth-Γλυκερόλη	2,53	-20,8
Αλγινικό-Ολιγοφρουκτόζη-MRS Broth-Γλυκερόλη	2,54	-31,6

Από τον πίνακα 7.10 παρατηρείται ότι το μίγμα αλγινικού-ινουλίνης παρουσιάζει τη μικρότερη (απόλυτη) τιμή συγκριτικά με τα άλλα δύο μίγματα, άρα θα σχηματίσει ευκολότερα και σταθερότερα πολυμερικά πλέγματα μόλις έρθει σε επαφή με το διάλυμα CaCl₂, άρα και ισχυρότερα προϊόντα εγκλεισμού (μικροσφαιρίδια).

7.4 Σύγκριση των μεθόδων εξώθησης και γαλακτωματοποίησης

7.4.1 Σύγκριση αποτελεσμάτων μικροβιολογικών αναλύσεων των προϊόντων εγκλεισμού της μεθόδου της εξώθησης και της μεθόδου της γαλακτωματοποίησης

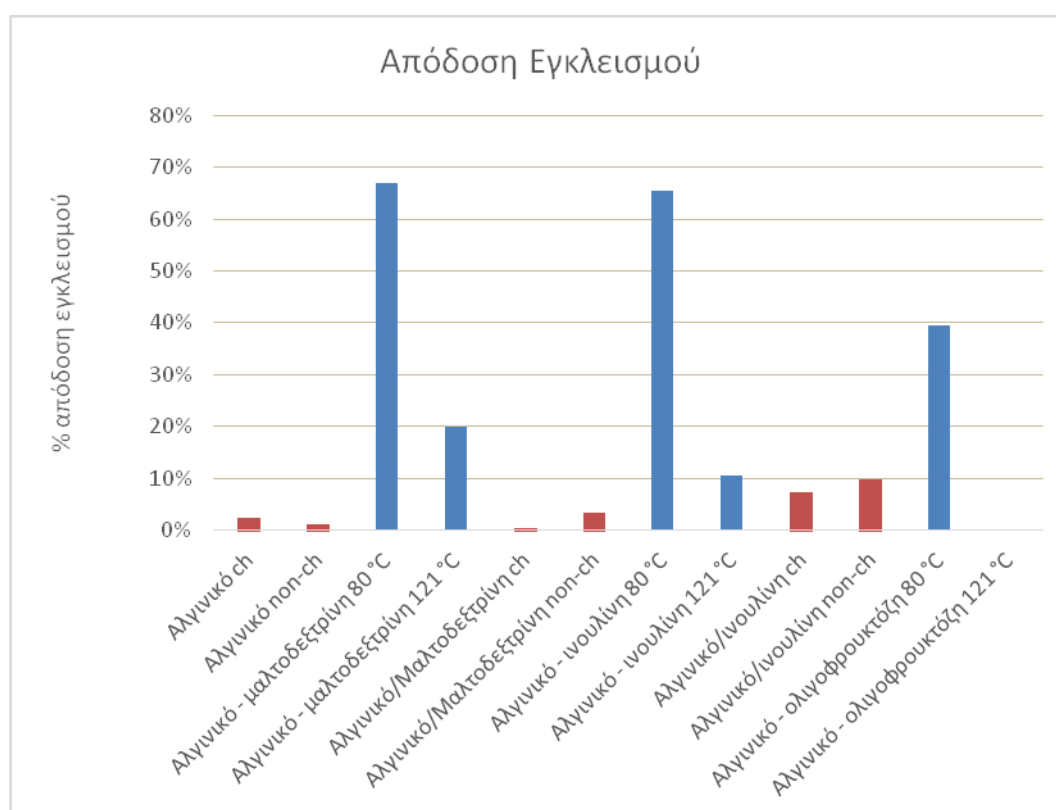


Διάγραμμα 7.40 Βακτηριακό φορτίο των προϊόντων εγκλεισμού της τεχνικής της εξώθησης (μπλέ) και της τεχνικής της γαλακτωματοποίησης (κόκκινο)

Σύμφωνα με το διάγραμμα 7.40, το υψηλότερο βακτηριακό φορτίο παρουσίασαν τα προϊόντα εγκλεισμού τα οποία προέκυψαν μέσω της τεχνικής της εξώθησης. Συγκεκριμένα, τα εγκλειστικά μίγματα αλγινικού-μαλτοδεξτρίνης και αλγινικού-ινουλίνης θερμικά επεξεργασμένα στους 80 °C, εμφάνισαν πολύ μεγαλύτερο

βακτηριακό φορτίο σε σύγκριση με τα υπόλοιπα εγκλειστικά μίγματα μεταξύ και των δύο μεθόδων. Η σημαντική διαφορά στα επίπεδα βακτηριακού φορτίου μεταξύ των δύο μεθόδων εγκλεισμού, οφείλεται στο ότι η εκτέλεση της τεχνικής γαλακτωματοποίησης επιφέρει αρκετές απώλειες κατά τη διαδικασία εγκλεισμού των βακτηρίων σε σχέση με την τεχνική της εξώθησης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα ένα μεγάλο μέρος της αρχικής ποσότητας προβιοτικής καλλιέργειας που εμβολιάστηκε στο εγκλειστικό μίγμα να χαθεί κατά τη διαδικασία εγκλεισμού. Τέλος, παρατηρείται ότι το υψηλότερο βακτηριακό φορτίο στο προϊόν εγκλεισμού που επιτεύχθηκε με την τεχνική της γαλακτωματοποίησης εμφάνισε το μίγμα αλγινικού-ινουλίνης. Επομένως, είναι ασφαλές να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι η ινουλίνη διατηρεί σε υψηλά επίπεδα τη βιωσιμότητα των εγκλεισμένων προβιοτικών βακτηρίων ανεξαρτήτως της μεθόδου εγκλεισμού.

7.4.2 Σύγκριση αποτελεσμάτων απόδοσης εγκλεισμού % της τεχνικής της εξώθησης και της τεχνικής της γαλακτωματοποίησης

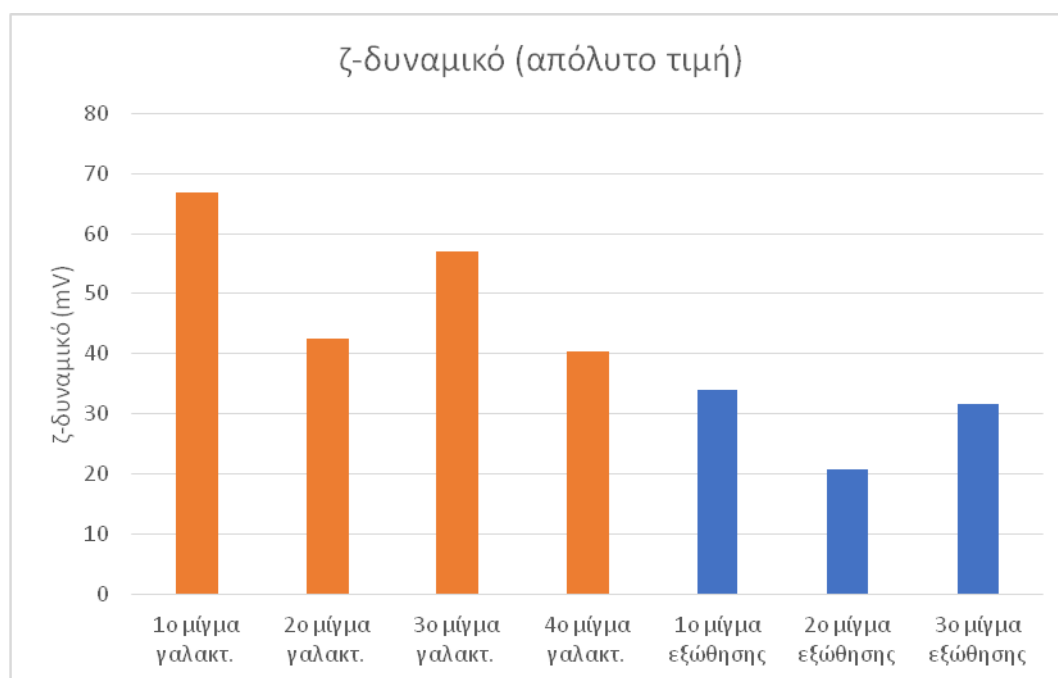


Διάγραμμα 7.41 Απόδοση εγκλεισμού % των προβιοτικών βακτηρίων με την τεχνική της εξώθησης (μπλέ) και με την τεχνική της γαλακτωματοποίησης (κόκκινο)

Στο διάγραμμα 7.41 παρατηρείται ότι, οι τιμές απόδοσης εγκλεισμού των εγκλειστικών μιγμάτων και στις δύο μεθόδους, είναι ανάλογες των αντίστοιχων τιμών βακτηριακού φορτίου των εγκλειστικών προϊόντων του κάθε εγκλειστικού μίγματος.

Η αναλογία αυτή παρατηρείται, λόγω της αναγωγής που πραγματοποιήθηκε, προκειμένου να προκύψει σε κάθε εγκλειστικό μίγμα συγκέντρωση προβιοτικής καλλιέργειας 1,5% w/v ανεξαρτήτως της ποσότητας του μίγματος και της τεχνικής εγκλεισμού που εφαρμόστηκε. Έτσι, σύμφωνα με το διάγραμμα, την υψηλότερη απόδοση εγκλεισμού μεταξύ των δύο μεθόδων παρουσίασε η τεχνική της εξώθησης.

7.4.3 Σύγκριση αποτελεσμάτων ζ-δυναμικού των μιγμάτων της μεθόδου της εξώθησης και της μεθόδου της γαλακτωματοποίησης



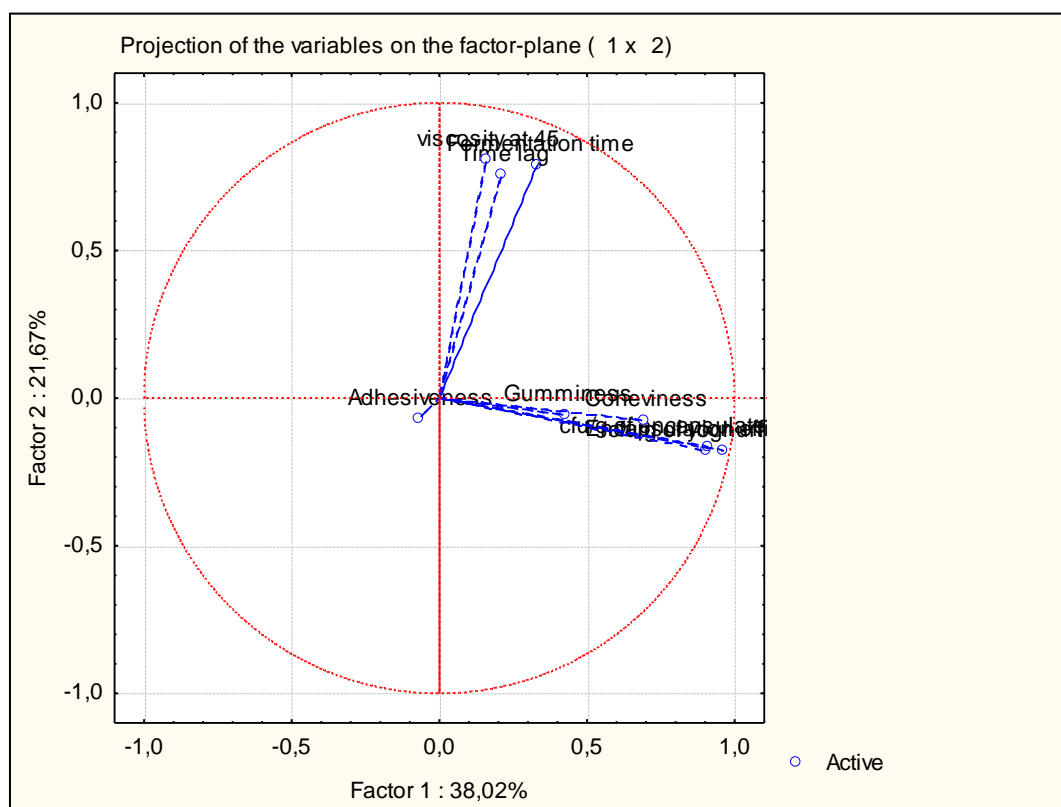
Διάγραμμα 7.42 ζ-δυναμικό των εγκλειστικών μιγμάτων και των δύο μεθόδων εγκλεισμού

Από το διάγραμμα 7.42 παρατηρείται ότι μεταξύ των διαφορετικών μιγμάτων και των δύο μεθόδων εγκλεισμού, το μίγμα αλγινικού-ινουλίνης, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τον εγκλεισμό προβιοτικής καλλιέργειας με την τεχνική εγκλεισμού με εξώθηση, παρουσιάζει τη μικρότερη (απόλυτη) τιμή ζ-δυναμικού και συνεπώς αναμένεται ότι θα σχηματίσει το σταθερότερο προϊόν εγκλεισμού σε σχέση με τα υπόλοιπα μίγματα. Επίσης γίνεται αντιληπτό το γεγονός, ότι τα εγκλειστικά μίγματα που χρησιμοποιήθηκαν στη μέθοδο της εξώθησης, παρουσιάζουν μικρότερες (απόλυτες) τιμές ζ-δυναμικού σε σχέση με τα εγκλειστικά μίγματα της γαλακτωματοποίησης. Έτσι, τα εγκλειστικά μίγματα στη διαδικασία της εξώθησης σχημάτισαν σταθερότερο πολυμερικό πλέγμα, όταν ήρθαν σε επαφή με το διάλυμα CaCl_2 , σε σχέση με τα εγκλειστικά μίγματα στη διαδικασία της γαλακτωματοποίησης.

7.4.4 Ανάλυση κύριων συνιστωσών των δειγμάτων της πρώτης και δεύτερης πειραματικής σειράς (PCA)

Η παρακάτω ανάλυση κύριων συνιστωσών αφορά τα δείγματα τα οποία εξετάστηκαν και στις δύο τεχνικές εγκλεισμού που χρησιμοποιήθηκαν. Συγκεκριμένα, αφορά τα δείγματα των προϊόντων εγκλεισμού που παρασκευάστηκαν με τη μέθοδο της εξώθησης με εγκλειστικά μίγματα επεξεργασμένα στους 80 και 120 °C, καθώς και τα δείγματα των προϊόντων εγκλεισμού που παρασκευάστηκαν με τη μέθοδο της γαλακτωματοποίησης και επεξεργάστηκαν με και χωρίς επικάλυψη χιτοζάνης. Επίσης, αναλύονται και τα αντίστοιχα δείγματα γιαουρτιού που προέκυψαν με την ενσωμάτωση των παραπάνω προϊόντων εγκλεισμού.

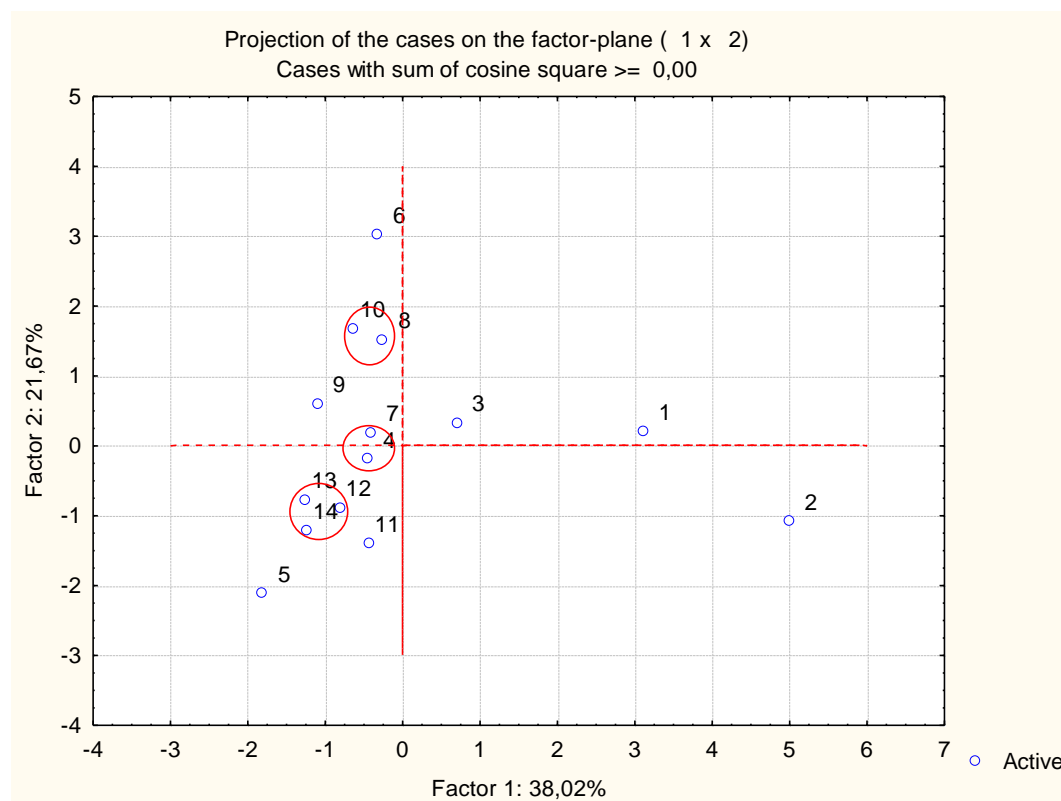
Στο παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζεται η γραφική παράσταση των συντελεστών συσχέτισης των δύο πρώτων κύριων συνιστωσών με τις παραμέτρους που μελετήθηκαν.



Διάγραμμα 7.43 Γραφική παράσταση συντελεστών συσχέτισης των δύο πρώτων κύριων συνιστωσών με τις παραμέτρους

Τα πειράματα του εγκλεισμού προβιοτικών βακτηρίων μέσω εξώθησης και γαλακτωματοποίησης και της ενσωμάτωσής τους σε γιαούρτι έδωσε δύο κύριες συνιστώσες από τις οποίες η πρώτη έχει 38,02 % και η δεύτερη 21,67 % συνεισφορά στη συνολική διακύμανση των πειραμάτων.

Από το διάγραμμα 7.43 εξάγεται το συμπέρασμα ότι θετική επίδραση στην πρώτη κύρια συνιστώσα είχαν: η απόδοση εγκλεισμού, το βακτηριακό φορτίο των προϊόντων εγκλεισμού, καθώς και το βακτηριακό φορτίο των προϊόντων γιαουρτιού. Αντίστοιχα θετική επίδραση στη δεύτερη κύρια συνιστώσα παρουσίασαν: ο χρόνος ζύμωσης του γάλακτος, η διάρκεια λανθάνουσας φάσης της ζύμωσης των δειγμάτων καθώς και το ιζώδες μετά την ζύμωση των δειγμάτων στους 45 °C.



Διάγραμμα 7.44 Γραφική παράσταση των δύο πρώτων κύριων συνιστωσών για τα δείγματα των δύο πειραματικών σειρών που πραγματοποιήθηκαν

Από το διάγραμμα 7.44 φαίνεται ότι σχηματίζονται τρεις ομάδες δειγμάτων με κοινά χαρακτηριστικά. Τα δείγματα 4 και 7 σχηματίζουν μία ομάδα καθώς εμφανίζουν παρεμφερή χαρακτηριστικά υφής. Το δείγμα 4 αποτελεί γιαούρτι το οποίο περιέχει εγκλεισμένη προβιοτική καλλιέργεια μέσω εξώθησης σε εγκλειστικό μίγμα αλγινικού-μαλτοδεξτρίνης θερμικά επεξεργασμένο στους 121 °C. Το δείγμα 7 αποτελεί γιαούρτι το οποίο περιέχει εγκλεισμένη προβιοτική καλλιέργεια μέσω γαλακτωματοποίησης σε εγκλειστικό μίγμα αλγινικού με επικάλυψη χιτοζάνης. Η ομάδα των δειγμάτων 8 και 10 περιλαμβάνει δείγματα που εμφανίζουν παρεμφερή ιζώδη τόσο μετά την ζύμωση, όσο και μετά την αποθήκευση, αλλά και παρεμφερή χαρακτηριστικά υφής. Τα μίγματα 8 και 10 αποτελούν γιαούρτια τα οποία περιέχουν

εγκλεισμένη προβιοτική καλλιέργεια μέσω γαλακτωματοποίησης σε εγκλειστικά μίγματα αλγινικού-ινουλίνης και αλγινικού-μαλτοδεξτρίνης αντίστοιχα, με επικάλυψη χιτοζάνης. Η ομάδα των δειγμάτων 12, 13 και 14 αποτελείται από δείγματα με παρεμφερή χαρακτηριστικά τα εξής: χρόνο ζύμωσης, μέγιστο ρυθμό μείωσης pH, διάρκεια λανθάνουσας φάσης της ζύμωσης και ιξώδη μετά την ζύμωση και αποθήκευσή τους. Και τα 3 δείγματα αποτελούν δείγματα γιαουρτιού τα οποία περιέχουν εγκλεισμένη προβιοτική καλλιέργεια μέσω γαλακτωματοποίησης σε εγκλειστικά μίγματα αλγινικού-ινουλίνης, αλγινικού-ολιγοφρουκτόζης και αλγινικού-μαλτοδεξτρίνης αντίστοιχα, χωρίς επικάλυψη χιτοζάνης.

8. Συμπεράσματα και προτάσεις

8.1 Συμπεράσματα

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκαν πειράματα με στόχο τη μελέτη του εγκλεισμού του προβιοτικού στελέχους *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* και την ενσωμάτωσή του σε προϊόν γιαουρτιού. Ο εγκλεισμός πραγματοποιήθηκε με δύο διαφορετικές μεθόδους, την τεχνική της εξώθησης και την τεχνική της γαλακτωματοποίησης, καθώς και με χρήση διαφόρων εγκλειστικών μέσων. Κατά τη διεργασία της εξώθησης, πραγματοποιήθηκε θερμική κατεργασία των εγκλειστικών μέσων σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες (80 και 120 °C), ενώ κατά τη διεργασία της γαλακτωματοποίησης μελετήθηκαν τα χαρακτηριστικά των προϊόντων εγκλεισμού της μεθόδου μετά την επικάλυψή τους με χιτοζάνη, καθώς και χωρίς την επικάλυψή τους. Μετά την ολοκλήρωση των διαδικασιών εγκλεισμού, ακολούθησε εμβολιασμός γάλακτος με συμβατική καλλιέργεια εκκίνησης, καθώς και η ενσωμάτωση των εγκλεισμένων, πλέον, προβιοτικών βακτηρίων στο γάλα, με σκοπό την παραγωγή προβιοτικού γιαουρτιού. Ακόμη, για λόγους σύγκρισης, παρασκευάστηκε τυφλό δείγμα, μέσω του απλού εμβολιασμού γάλακτος με συμβατική καλλιέργεια εκκίνησης και χωρίς την προσθήκη εγκλεισμένων προβιοτικών βακτηρίων. Σκοπός αυτών των πειραμάτων ήταν η μελέτη της αποτελεσματικότητας εγκλεισμού του προβιοτικού στελέχους με τις δύο μεθόδους εγκλεισμού, καθώς και ο προσδιορισμός της δραστηρότητας των προβιοτικών βακτηρίων τόσο στο προϊόν εγκλεισμού (μικροσφαιρίδια), όσο και στο τελικό προϊόν γιαουρτιού. Ο προσδιορισμός αυτών των χαρακτηριστικών πραγματοποιήθηκε

άμεσα, μέσω των μικροβιολογικών αναλύσεων των προϊόντων εγκλεισμού και των προϊόντων γιαουρτιού, αλλά και έμμεσα μέσω της σύγκρισης των μετρήσεων που αφορούν στην ζύμωση του γάλακτος (διάρκεια ζύμωσης, μέγιστος ρυθμός μείωσης pH (μ), διάρκεια λανθάνουσας φάσης (λ)) και των χαρακτηριστικών υφής του γιαουρτιού (ιξώδες, υφή).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των πειραματικών μετρήσεων, για τα πειράματα στα οποία ο εγκλεισμός των προβιοτικών βακτηρίων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της εξώθησης, αρχικά βρέθηκε ότι τόσο το βακτηριακό φορτίο στα προϊόντα εγκλεισμού, όσο και η απόδοση % της διαδικασίας εγκλεισμού με τη συγκεκριμένη μέθοδο ήταν αρκετά υψηλά για τα περισσότερα εγκλειστικά μίγματα. Συγκεκριμένα τα εγκλειστικά μίγματα αλγινικού-μαλτοδεξτρίνης ($6,7 \cdot 10^8$ cfu/g) και αλγινικού-ινουλίνης ($6,3 \cdot 10^8$ cfu/g) επεξεργασμένα στους 80 °C, εμφάνισαν την υψηλότερη απόδοση εγκλεισμού, 67% και 66% αντίστοιχα. Επίσης, η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έδειξε, ότι η θερμοκρασία επεξεργασίας των εγκλειστικών μιγμάτων επηρεάζει σημαντικά το ποσοστό αυτό. Η ικανοποιητική απόδοση εγκλεισμού σε συνδυασμό με την απλότητα της συγκεκριμένης μεθόδου εγκλεισμού, την καθιστούν μία πολύ καλή επιλογή ανάμεσα σε άλλες μεθόδους για τον εγκλεισμό προβιοτικών στελεχών.

Σχετικά με το συνολικό χρόνο ζύμωσης του γάλακτος, προκύπτει ότι, τα γιαούρτια τα οποία περιείχαν εγκλεισμένα προβιοτικά βακτήρια εμφάνισαν μία μικρή διαφορά στο χρόνο ζύμωσης, σε σχέση με το τυφλό γιαούρτι που εμβολιάστηκε μόνο με τη συμβατική καλλιέργεια εκκίνησης. Με εξαίρεση το δείγμα με το εγκλειστικό μέσο αλγινικού-ολιγοφρουκτόζης επεξεργασμένο στους 121 °C, όλα τα υπόλοιπα δείγματα εμφάνισαν ελαφρώς μικρότερο χρόνο ζύμωσης, γεγονός που σημαίνει ότι οι εγκλεισμένοι προβιοτικοί μικροοργανισμοί μέσα στα δείγματα γιαουρτιού, επηρέασαν σε μικρό βαθμό την ζύμωση του γάλακτος. Επίσης, μικρές διαφορές προέκυψαν και στη διάρκεια της λανθάνουσας φάσης των δειγμάτων γιαουρτιού καθώς και στους μέγιστους ρυθμούς μείωσης του pH.

Όσον αφορά το ιξώδες μετά τη ζύμωση του γιαουρτιού, με εξαίρεση το δείγμα με το μίγμα αλγινικού-ολιγοφρουκτόζης επεξεργασμένου στους 80 °C, όλα τα υπόλοιπα δείγματα εμφανίζουν μικρότερη τιμή ιξώδους από το τυφλό δείγμα. Επομένως μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι, με την προσθήκη εγκλεισμένης προβιοτικής καλλιέργειας το ιξώδες του πηγματος γιαουρτιού μετά την ζύμωσή του μειώνεται.

Παρόμοιο συμπέρασμα μπορεί να εξαχθεί και για το ιξώδες των προϊόντων γιαουρτιού μετά την αποθήκευσή τους για 24 h στους 4 °C. Παρόλα αυτά οι διαφορές στις τιμές των ιξωδών των δειγμάτων δεν είναι τόσο εμφανείς όπως αμέσως μετά την ζύμωση.

Όπως συμβαίνει με το ιξώδες του προϊόντος γιαουρτιού, αντίστοιχο αποτέλεσμα προκύπτει και για τα χαρακτηριστικά υφής. Συγκεκριμένα όλα τα δείγματα εμφάνισαν χαμηλότερη προσκολλησιμότητα σε σχέση με το τυφλό. Ενδιαφέρον δείχνει το δείγμα γιαουρτιού που περιέχει εγκλεισμένα βακτήρια σε μίγμα αλγινικού-ινουλίνης, του οποίου οι τιμές του κομμωδους (0,5), της συνεκτικότητας (0,6) και της σκληρότητας (0,83) είναι μεγαλύτερες και από το τυφλό δείγμα. Η ινουλίνη, η οποία είναι πρεβιοτική ουσία, δείχνει να επιφέρει θετικά αποτελέσματα, τόσο στη βιωσιμότητα των προβιοτικών βακτηρίων, αλλά και στα ποιοτικά χαρακτηριστικά του γιαουρτιού, μέσω της συνεργιστικής της δράσης με το προβιοτικό στέλεχος. Εν αντιθέσει, η ολιγοφρουκτόζη, που είναι επίσης πρεβιοτικό, δεν παρουσιάζει τόσο θετικά αποτελέσματα σε σχέση με την ινουλίνη, τόσο στο βακτηριακό φορτίο του εγκλεισμένου προϊόντος ($3,6 \cdot 10^8$ cfu/g), όσο και στα χαρακτηριστικά υφής και στο βακτηριακό φορτίο του προϊόντος γιαουρτιού ($2,16 \cdot 10^5$ cfu/g).

Τέλος, αξιοσημείωτη είναι η επίδραση της διαφορετικής θερμικής κατεργασίας των εγκλειστικών μιγμάτων, καθώς προκύπτει κυρίως από τις μικροβιολογικές αναλύσεις τόσο στα προϊόντα εγκλεισμού, όσο και στα προϊόντα γιαουρτιού, αλλά και από την απόδοση εγκλεισμού, ότι η επεξεργασία του εγκλειστικού μίγματος στους 121 °C, παρουσιάζει αρνητική επίδραση στην αποτελεσματικότητα του εγκλεισμού και στη βιωσιμότητα των εγκλεισμένων βακτηρίων. Το συμπέρασμα αυτό μπορεί να εξαχθεί και από τη στατιστική επεξεργασία των μετρήσεων των δειγμάτων, η οποία έδειξε αυτή την αρνητική επίπτωση σε αυτά τα χαρακτηριστικά στην περίπτωση των επεξεργασμένων μιγμάτων στους 121 °C, σε σχέση με τα αντίστοιχα επεξεργασμένα στους 80 °C. Το γεγονός αυτό μπορεί να εξηγηθεί, μέσω της επίδρασης της υψηλής θερμοκρασίας στην πολυμερική αλυσίδα του αλγινικού και στην ικανότητά του να σχηματίζει πλέγμα αλγινικού ασβεστίου με ιόντα Ca^{2+} .

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις αναλύσεις των πειραμάτων, στα οποία ο εγκλεισμός των προβιοτικών βακτηρίων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της γαλακτωματοποίησης, βρέθηκαν πολύ χαμηλότερα επίπεδα βακτηριακού φορτίου στα προϊόντα εγκλεισμού σε σχέση με τις τιμές βακτηριακού φορτίου των αντίστοιχων που εγκλείστηκαν με τη μέθοδο της εξώθησης. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα

τη σημαντική διαφορά στις τιμές απόδοσης εγκλεισμού των προβιοτικών βακτηρίων μεταξύ της μεθόδου της γαλακτωματοποίησης και της μεθόδου της εξώθησης. Η τεχνική της γαλακτωματοποίησης εκτός της πολύπλοκης διαδικασίας εκτέλεσής της, περιλαμβάνει και τη διασπορά του εγκλειστικού μέσου σε μία ελαιώδη φάση (π.χ. ελαιόλαδο). Αυτή η διαδικασία προκαλεί την απώλεια προβιοτικών βακτηρίων κατά τη διασπορά τους στην ελαιώδη φάση και έχει ως αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση που παρατηρήθηκε, στο βακτηριακό φορτίο των προϊόντων εγκλεισμού και κατ'επέκταση την εμφάνιση μικρότερων τιμών απόδοσης εγκλεισμού σε σχέση με τις τιμές που προέκυψαν από τη μέθοδο της εξώθησης. Παρόλα αυτά η τεχνική της γαλακτωματοποίησης πλεονεκτεί στο γεγονός ότι, μπορεί να εφαρμοστεί ευκολότερα σε μεγάλη κλίμακα παραγωγής σε σχέση με τη μέθοδο της εξώθησης. Επίσης, οι μικροβιακές αναλύσεις και η στατιστική επεξεργασία αυτών έδειξε ότι, η απόδοση εγκλεισμού επηρεάζεται σημαντικά από το είδος του εγκλειστικού μίγματος. Συγκεκριμένα, το εγκλειστικό μίγμα αλγινικού-ινουλίνης χωρίς επικάλυψη χιτοζάνης, παρουσίασε την υψηλότερη απόδοση εγκλεισμού (10%) σε σχέση με τα υπόλοιπα μίγματα (<7%). Το ίδιο ισχύει και για το βακτηριακό φορτίο των προϊόντων εγκλεισμού ($1,16 \cdot 10^8$ cfu/g), καθώς και για το βακτηριακό φορτίο των προϊόντων γιαουρτιού ($8,2 \cdot 10^4$ cfu/g). Όπως παρατηρήθηκε και από την 1^η σειρά πειραμάτων με την τεχνική της εξώθησης, η ινουλίνη επιφέρει θετική επίδραση όσον αφορά τη βιωσιμότητα των προβιοτικών βακτηρίων και στη τεχνική της γαλακτωματοποίησης. Όσον αφορά τα χαρακτηριστικά ζύμωσης των δειγμάτων, η διάρκεια λανθάνουσας φάσης και ο μέγιστος ρυθμός μείωσης του pH παρουσίασαν μικρές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων και του τυφλού, ενώ ο συνολικός χρόνος ζύμωσης προέκυψε, μέσω της στατιστικής επεξεργασίας των μετρήσεων, ότι επηρεάζεται σημαντικά, τόσο από την επικάλυψη των προϊόντων εγκλεισμού με χιτοζάνη, όσο και από το είδος του μίγματος εγκλεισμού. Συγκεκριμένα, όλα τα δείγματα χωρίς επικάλυψη χιτοζάνης παρουσίασαν μικρότερο χρόνο ζύμωσης από το τυφλό δείγμα (325min). Η χιτοζάνη χαρακτηρίζεται από σχετική αντιμικροβιακή δράση η οποία αναφέρεται και βιβλιογραφικά. Παρόλα αυτά χρησιμοποιείται ως ένα πολύ αποδοτικό μέσο εγκλεισμού. Επομένως, μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι η ύπαρξη χιτοζάνης στο δείγμα γάλακτος κατά την ζύμωση επηρεάζει τη λειτουργία τόσο των εγκλεισμένων προβιοτικών βακτηρίων, αλλά και την λειτουργία της συμβατικής καλλιέργειας εκκίνησης με την οποία εμβολιάζονται όλα τα δείγματα γάλακτος.

Τα ιξώδη όλων των δειγμάτων γιαουρτιού αμέσως μετά την ζύμωση στους 45 °C παρουσίασαν χαμηλότερες τιμές από το τυφλό δείγμα γιαουρτιού. Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι οι τιμές των ιξωδών των δειγμάτων με προϊόντα εγκλεισμού επικαλυμμένα με χιτοζάνη αμέσως μετά την ζύμωση, είναι υψηλότερες από τις τιμές των ιξωδών των δειγμάτων με προϊόντα εγκλεισμού χωρίς επικάλυψη χιτοζάνης. Το συμπέρασμα αυτό προκύπτει και από τη στατιστική επεξεργασία των μετρήσεων. Επομένως, είναι ασφαλές να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι η ύπαρξη χιτοζάνης αυξάνει το ιξώδες του πηγματος κατά την ζύμωση του γάλακτος. Εν αντιθέσει, τα ιξώδη των δειγμάτων γιαουρτιού μετά την αποθήκευση στους 4 °C για 24 h δεν εμφάνισαν σημαντική διαφορά.

Όσον αφορά τα χαρακτηριστικά υφής, προέκυψε από την ανάλυση υφής των δειγμάτων γιαουρτιού ότι η σκληρότητα και η προσκολλησιμότητα αυτών ήταν μικρότερες από του τυφλού δείγματος, ενώ οι τιμές της συνεκτικότητας των δειγμάτων γιαουρτιού προέκυψαν παραπλήσιες με του τυφλού δείγματος. Αξιοσημείωτη είναι η επίπτωση της επικάλυψης των εγκλειστικών προϊόντων με χιτοζάνη στην τιμή του κωμμιώδους του γιαουρτιού. Συγκεκριμένα, από τη στατιστική επεξεργασία των δειγμάτων προέκυψε το συμπέρασμα ότι η επικάλυψη χιτοζάνης των εγκλειστικών προϊόντων έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση υψηλότερων τιμών κωμμιώδους του γιαουρτιού σε σχέση με τις τιμές κωμμιώδους που προέκυψαν από δείγματα γιαουρτιού που περιείχαν εγκλειστικά προϊόντα χωρίς επικάλυψη χιτοζάνης.

8.2 Προτάσεις

Στη παρούσα διπλωματική εργασία, πραγματοποιήθηκε άμεση αξιολόγηση της επιτυχίας και της απόδοσης του εγκλεισμού των προβιοτικών βακτηρίων μέσω μικροβιολογικών αναλύσεων των εγκλειστικών προϊόντων. Ένας άλλος τρόπος ελέγχου της επίτευξης ή μη του εγκλεισμού καθώς και της απόδοσής του, για κάθε τεχνική εγκλεισμού και εγκλειστικό μέσο, θα μπορούσε να είναι η σάρωση των εγκλειστικών προϊόντων με ηλεκτρικό μικροσκόπιο (SEM). Επίσης, ενδιαφέρον θα είναι και η μελέτη της επιβίωσης των εγκλεισμένων προβιοτικών βακτηρίων σε συνθήκες προσομοίωσης του ανθρώπινου γαστρεντερικού συστήματος. Επιπροσθέτως, η μελέτη και άλλων προβιοτικών στελεχών και ο εγκλεισμός τους με αποτελεσματικές μεθόδους εγκλεισμού όπως η επικάλυψη με ψεκασμό ή η ψύξη με ψεκασμό, καθώς και η σύγκρισή τους θα μπορούσε να αποτελέσει αντικείμενο

μελέτης. Τέλος, θα μπορούσε να μελετηθεί η χρήση διαφορετικών υλικών και η μελέτη της συνεργιστικής τους δράσης με προβιοτικά στελέχη σε συνδυασμό με καινοτόμες μεθόδους εγκλεισμού.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Κώδικας Τροφίμων, Ποτών και Αντικειμένων Κοινής Χρήσης, (2009), Μέρος Α, Άρθρο 80, Έκδοση 4.
2. Μάντης, Α.Ι., (2000), Υγιεινή και τεχνολογία του γάλακτος και των προϊόντων του. Κυριακίδης.
3. Albertini, B., Vitali, B., Passerini, N., Cruciani, F., Di Sabatino, M., Rodriguez, L., Brigidi, P., (2010), Development of microparticulate systems for intestinal delivery of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis*, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, Volume 40, Issue 4, Pages 359-366.
4. Anal, Anil & Singh, Harjinder, (2007), Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science & Technology*. 18. 240-251.
5. Anjani, K., Iyer, C., Kailasapathy, K., (2004), Survival of co-encapsulated complementary probiotics and prebiotics in yoghurt. *Milchwissenschaft* 59:396–399
6. 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), 467483.
7. Champagne, C.P., Fustier, P., (2007), Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Food Biotechnology*, 18, 184-190.
8. Champagne, C. P., & Kailasapathy, K. (2008), Encapsulation of probiotics. *Delivery and Controlled Release of Bioactives in Foods and Nutraceuticals*, 344–369.
9. Champagne, C.P., Ross, R.P., Saarela, M., Hansen, K.F., Charalampopoulos, D., (2011), Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices, *International Journal of Food Microbiology*, Volume 149, Issue 3, Pages 185-193.

10. Chandan, R.C., (2006), Milk composition, physical and processing characteristics. Manufacturing yogurt and fermented milks.
11. Chávarri, M., Marañón, I., Ares, R., Ibáñez, F.C., Marzo, F., Villarán, M.C., (2010), Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions, *International Journal of Food Microbiology*, Volume 142, Issues 1–2, Pages 185-189.
12. Chen, M.J., & Chen, K.N., (2007), Applications of Probiotic Encapsulation in Dairy Products, in *Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems* (ed J. M. Lakkis), Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA.
13. Collins English Dictionary, (2012)
14. Cook, M.T., Tzortzis, G., Charalampopoulos, D., Khutoryanskiy, V.V., (2012), Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery, *Journal of Controlled Release*, Volume 162, Issue 1, Pages 56-67.
15. De Prisco, A., Mauriello, G., (2016), Probiotication of foods: A focus on microencapsulation tool, *Trends in Food Science & Technology*, Volume 48, Pages 27-39.
16. Ding, W.K., Shah, N.P., (2007), Acid, bile, and heat tolerance of free and microencapsulated probiotic bacteria. *Journal of Food Science* 72.
17. F.A.O., (2013), *Milk and Dairy Products in Human Nutrition*.
18. Farnworth, E.R., (2008), *Handbook of Fermented Functional Foods. Functional foods and nutraceuticals series*. CRC Press
19. Fritzen-Freire, C.B., Prudêncio, E.S., Pinto, S.S., Muñoz, I.B., Amboni, R., (2013), Effect of microencapsulation on survival of *Bifidobacterium* BB-12 exposed to simulated gastrointestinal conditions and heat treatments, *LWT - Food Science and Technology*, Volume 50, Issue 1, Pages 39-44.
20. Fuller, R., (1989), Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol* 66:365–378.
21. Gagnon, M., Zihler, A., Chassard, C., & Lacroix, C., (2011), Ecology of probiotics and enteric protection. In *Probiotic Bacteria and Enteric Infections*. Springer Netherlands.

22. Gibson, G.R., Roberfroid, M.B., (2008), Handbook of Prebiotics CRC Press
23. Holkem, A.T., Raddatz, G.C., Barin, J.S., Moraes Flores, E.M., Muller, E.I., Codevilla, C.F., Jacob-Lopes, E., Ferreira, C.R., Grosso, Menezes, C.R., (2017), Production of microcapsules containing Bifidobacterium BB-12 by emulsification/internal gelation, LWT - Food Science and Technology, Volume 76, Part B, Pages 216-221.
24. Hui, Y.H., Meunier-Goddik, L., Josephsen, J., Wai-Kit, N., Stanfield, P.S., (2004), Handbook of Food and Beverage Fermentation Technology., CRC Press
25. I.D.F., (1990), Culture media for detection and enumeration of bifi dobacteria in fermented milk products. Bulletin No. 252, International Dairy Federation, Brussels, Belgium.
26. I.D.F., (1995), Detection and enumeration of Lactobacillus acidophilus. Bulletin No. 306, International Dairy Federation, Brussels, Belgium.
27. I.D.F., (2006), Milk products—Enumeration of presumptive Lactobacillus acidophilus on a selective medium—Colony-count technique at 37°C. International Standard ISO 21128, IDF 192.
28. I.D.F., (2007), Selective enumeration of bifi dobacteria in dairy products: Development of a s tandard method. Bulletin No. 411, International Dairy Federation, Brussels, Belgium.
29. Jankovic, I., Sybesma, W., Phothirath, P., Ananta, E., Mercenier, A., (2010) Application of probiotics in food products—challenges and new approaches, Current Opinion in Biotechnology, Volume 21, Issue 2, Pages 175-181.
30. Kailasapathy, K., (2010), Probiotic and Prebiotic Fermented Foods. *Fermented Foods and Beverages of the World*, 377–390.
31. Kailasapathy, K., (2008), Chemical Composition, Physical and Functional Properties of Milk and Milk Ingredients. Dairy Processing & Quality Assurance.
32. Kayser, F.H., (2003), Safety aspects of enterococci from the medical point of view. *Int. J. Food Microbiol.* 88:255–262.

33. Kirmaci, H.A., Özer, B.H., Akcelik, M. & Akcelik, N., (2016), Identification and characterisation of lactic acid bacteria isolated from traditional Urfa cheese. *Int J. Dairy Technol.*
34. Krasaekoopt, W., Bhandari, B., & Deeth, H., (2003), Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal*, 13(1), 3-13.
35. 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.
36. Krasaekoopt, W., Watcharapoka, S., (2014), Effect of addition of inulin and galactooligosaccharide on the survival of microencapsulated probiotics in alginate beads coated with chitosan in simulated digestive system, yogurt and fruit juice, *LWT - Food Science and Technology*, Volume 57, Issue 2, Pages 761-766.
37. Makinen, K., Berger, B., Bel-Rhliid, R., Ananta, E., (2012), Science and technology for the mastership of probiotic applications in food products, *Journal of Biotechnology*, Volume 162, Issue 4, Pages 356-365.
38. 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 effects, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, Volume 27, Pages 15-25.
39. Moumita, S., Goderska, K., Johnson, E.M., Das, B., Indira, D., Yadav, R., Kumari, S., Jayabalan, R., (2017), Evaluation of the viability of free and encapsulated lactic acid bacteria using in-vitro gastro intestinal model and survivability studies of synbiotic microcapsules in dry food matrix during storage, *LWT*, Volume 77, Pages 460-467.
40. Nazzaro, F., Orlando, P., Fratianni, F., Coppola, R., (2012), Microencapsulation in food science and biotechnology, *Current Opinion in Biotechnology*, Volume 23, Issue 2, Pages 182-186.

41. Ouwehand, A.C., Vankerckhoven, V., Goossens, H., Huys, G., Swings, J., Vancanneyt, M. and Lähteenmäki A., (2006), *The Safety of Probiotics in Foods in Europe and Its Legislation*. by Taylor & Francis Group, LLC
42. Peredo, A.G., Beristain, C.I., Pascual L.A., Azuara, E., Jimenez, M., (2016), *The effect of prebiotics on the viability of encapsulated probiotic bacteria*, *LWT - Food Science and Technology*, Volume 73, Pages 191-196.
43. Picot A., Lacroix C., (2004), *Encapsulation of Bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt*. *International Dairy Journal* 14(6), 505-515
44. Radke-Mitchell, L. & Sandine, W.E., (1984), *Journal of Dairy Science*
45. Rathore, S., Desai, P.M., Liew, C.V., Chan, L.W., Heng, P.W.S., (2010), *Microencapsulation of microbial cells*, *Journal of Food Engineering*, Volume 116, Issue 2, 2013, Pages 369-381 R.D.C.S. Ranadheera, S.K. Baines, M.C. Adams, *Importance of food in probiotic efficacy*, *Food Research International*, Volume 43, Issue 1, Pages 1-7.
46. Richelsen, B., Kristensen, K., Pedersen, S.B. , (1996), *Long-term (6 months) effect of a new fermented milk product on the level of plasma lipoproteins — a placebocontrolled and double blind study*. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 50(12): 811–815.
47. Rinkinen, M., Jalava, K., Westermarck, E., Salminen, S., & Ouwehand, A.C., (2003), *Interaction between probiotic lactic acid bacteria and canine enteric pathogens: A risk factor for intestinal Enterococcus faecium colonization?* *Vet. Microbiol.* 92:111–119.
48. Roginski, H., J.W., Fuquay, & P.F., Fox, (2003), Eds., *Encyclopedia of Dairy Sciences*, Vols. 1–4, Academic Press, London.
49. Sathyabama, S., Kumar, M.R., Brunthadevi, P., Vijayabharathi, R., Brindhapriyadharisini, V., (2014), *Co-encapsulation of probiotics with prebiotics on alginate matrix and its effect on viability in simulated gastric environment*, *LWT - Food Science and Technology*, Volume 57, Issue 1, Pages 419-425.

50. Saxelin, M., Korpela, R., Mäyrä-Mäkinen, A., (2003), Introduction: Classifying functional dairy products, *Functional Dairy Products*, in Mattila-Sandholm, T., & Saarela, M., Eds, pp. 1-16, CRC Press
51. Schmid, K., & Schlothauer, R., (2006), Development of probiotic food ingredients. 2006 by Taylor & Francis Group, LLC
52. Shahidi, F., & Pegg, R., (2007), Encapsulation, Stabilization, and Controlled Release of Food Ingredients and Bioactives. *Handbook of Food Preservation*, 509–568.
53. Song, H., Yu, W., Gao, M., Liu, X., Ma, X., (2013), Microencapsulated probiotics using emulsification technique coupled with internal or external gelation process, *Carbohydrate Polymers*, Volume 96, Issue 1, Pages 181-189.
54. Straub, B.W., Kicherer, M., Schilcher, S.M., Hammes, W.P., (1995), The formation of biogenic amines by fermentation organisms. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*
55. Swaisgood, H.E., (1985), Milk. In *Food Chemistry*. (OR Fennema, ed.) New York: Marcel Dekker.
56. 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.
57. Tamime, A.Y., & Robinson, R.K. (1999), *Yoghurt: science and technology*. Woodhead Publishing.
58. Tripathi, M.K., Giri, S.K., (2014), Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage, *Journal of Functional Foods*, Volume 9, Pages 225-241.
59. Ustunol, Z., (2013), *Development and Manufacture of Yogurt and Other Functional Dairy Products (2010)*, edited by F., Yildiz, CRC Press
60. Vinderola, G., & Los, C.G., De. (2009). and Prebiotics in Fermented Dairy Products, 601–634.
61. Walstra, P., Walstra, P., Wouters, J.T., & Geurts, T. J., (2006), *Dairy science and technology*. CRC press.

62. 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.
63. Weichselbaum, E., (2009), Probiotics and health: a review of the evidence. *Nutrition Bulletin* 34(4), 340-373.
64. 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.
65. Yildiz, F., (2010), Overview of yogurt and other fermented dairy products. *Development and Manufacture of Yogurt and Other Functional Dairy Products*, 1-46.
66. Yildiz, F., (2016), *Development and Manufacture of Yogurt and Other Functional Dairy Products*. CRC Press
67. Ying, D.Y., Sanguansri, L., Weerakkody, R., Bull, M., Singh, T.K., Augustin, M.A., (2016), Effect of encapsulant matrix on stability of microencapsulated probiotics, *Journal of Functional Foods*, Volume 25, Pages 447-458.
68. Zuidam, N.J., Nedovic, V.A., Bainbridge, W.S., Koç, B., Sakin-Yilmazer, M., Kaymak-Ertekin, F., Mcsweeney, P.L.H., (1998), *Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing. Dairy Chemistry and Biochemistry* (Vol. 3).

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1. Πίνακες μεταβολής του pH συναρτήσει του χρόνου ζύμωσης των γιαουρτιών

1.1 Πίνακες 1^{ης} σειράς πειραμάτων

1.1.1 Ζύμωση τυφλού δείγματος γιαουρτιού εμβολιασμό με συμβατική καλλιέργεια εκκίνησης

t (min)	pH	t (min)	pH	t (min)	pH	t (min)	pH
0	6,786	85	6,317	170	5,151	255	4,737
5	6,765	90	6,264	175	5,114	260	4,723
10	6,754	95	6,2	180	5,077	265	4,709
15	6,742	100	6,121	185	5,045	270	4,698
20	6,726	105	6,034	190	5,014	275	4,686
25	6,711	110	5,939	195	4,984	280	4,674
30	6,693	115	5,848	200	4,961	285	4,662
35	6,673	120	5,76	205	4,932	290	4,652
40	6,649	125	5,68	210	4,907	295	4,642
45	6,621	130	5,603	215	4,885	300	4,632
50	6,589	135	5,529	220	4,862	305	4,623
55	6,555	140	5,459	225	4,841	310	4,613
60	6,52	145	5,397	230	4,821	315	4,605
65	6,484	150	5,34	235	4,803	320	4,596
70	6,445	155	5,285	240	4,785	325	4,588
75	6,406	160	5,238	245	4,77		
80	6,363	165	5,193	250	4,753		

1.1.2 Ζύμωση γιαουρτιού με εγκλεισμένη καλλιέργεια σε μίγμα αλγινικού νατρίου/ μαλτοδεξτρίνης/ MRS broth/ γλυκερόλης επεξεργασμένο στους 80°C με τη μέθοδο της εξώθησης

t (min)	pH	t (min)	pH	t (min)	pH	t (min)	pH
0	6,601	85	6,24	170	5,166	255	4,658
5	6,594	90	6,199	175	5,121	260	4,626
10	6,564	95	6,143	180	5,08	265	4,609
15	6,556	100	6,095	185	5,058	270	4,596
20	6,547	105	6,044	190	5,021	275	4,583
25	6,529	110	5,988	195	4,981	280	4,57
30	6,514	115	5,919	200	4,942	285	4,559
35	6,498	120	5,838	205	4,903	290	4,542
40	6,48	125	5,754	210	4,867	295	4,526
45	6,459	130	5,672	215	4,836	300	4,504
50	6,441	135	5,588	220	4,808		
55	6,417	140	5,509	225	4,782		
60	6,396	145	5,439	230	4,757		
65	6,373	150	5,377	235	4,734		
70	6,343	155	5,318	240	4,712		
75	6,312	160	5,264	245	4,692		
80	6,275	165	5,213	250	4,674		

1.1.3 Ζύμωση γιαουρτιού με εγκλεισμένη καλλιέργεια σε μίγμα αλγινικού νατρίου/ μαλτοδεξτρίνης/ MRS broth/ γλυκερόλης επεξεργασμένο στους 121°C με τη μέθοδο της εξώθησης

t (min)	pH	t (min)	pH	t (min)	pH	t (min)	pH
0	6,477	85	6,116	170	5,042	255	4,534
5	6,47	90	6,075	175	4,997	260	4,502
10	6,44	95	6,019	180	4,956		
15	6,432	100	5,971	185	4,934		
20	6,423	105	5,92	190	4,897		
25	6,405	110	5,864	195	4,857		
30	6,39	115	5,795	200	4,818		
35	6,374	120	5,714	205	4,779		
40	6,356	125	5,63	210	4,743		
45	6,335	130	5,548	215	4,712		
50	6,317	135	5,464	220	4,684		
55	6,293	140	5,385	225	4,658		
60	6,272	145	5,315	230	4,633		
65	6,249	150	5,253	235	4,61		
70	6,219	155	5,194	240	4,588		
75	6,188	160	5,14	245	4,568		
80	6,151	165	5,089	250	4,55		

1.1.4 Ζύμωση γιαουρτιού με εγκλεισμένη καλλιέργεια σε μίγμα αλγινικού νατρίου/ ινουλίνης/ MRS broth/ γλυκερόλης επεξεργασμένο στους 80°C με τη μέθοδο της εξώθησης

t (min)	pH	t (min)	pH	t (min)	pH	t (min)	pH
0	6,537	85	5,838	170	4,95	255	4,651
5	6,521	90	5,784	175	4,923	260	4,637
10	6,508	95	5,714	180	4,9	265	4,625
15	6,463	100	5,636	185	4,877	270	4,613
20	6,419	105	5,552	190	4,856	275	4,601
25	6,37	110	5,478	195	4,837	280	4,589
30	6,335	115	5,412	200	4,818	285	4,578
35	6,282	120	5,353	205	4,8	290	4,566
40	6,245	125	5,318	210	4,782	295	4,549
45	6,207	130	5,272	215	4,766	300	4,538
50	6,159	135	5,221	220	4,749	305	4,536
55	6,117	140	5,172	225	4,734	310	4,52
60	6,069	145	5,125	230	4,72	315	4,51
65	6,02	150	5,082	235	4,705		
70	5,974	155	5,043	240	4,691		
75	5,928	160	5,009	245	4,678		
80	5,885	165	4,979	250	4,664		

1.1.5 Ζύμωση γιαουρτιού με εγκλεισμένη καλλιέργεια σε μίγμα αλγινικού νατρίου/ ινουλίνης/ MRS broth/ γλυκερόλης επεξεργασμένο στους 121°C με τη μέθοδο της εξώθησης

t (min)	pH	t (min)	pH	t (min)	pH
0	6,503	85	5,841	170	4,751
5	6,495	90	5,745	175	4,724
10	6,476	95	5,64	180	4,7
15	6,458	100	5,536	185	4,673
20	6,415	105	5,434	190	4,651
25	6,394	110	5,347	195	4,63
30	6,375	115	5,264	200	4,608
35	6,343	120	5,19	205	4,589
40	6,307	125	5,127	210	4,569
45	6,264	130	5,072	215	4,551
50	6,222	135	5,017	220	4,533
55	6,173	140	4,969	225	4,515
60	6,125	145	4,926	230	4,499
65	6,077	150	4,884		
70	6,028	155	4,846		
75	5,975	160	4,808		
80	5,916	165	4,778		

1.1.6 Ζύμωση γιαουρτιού με εγκλεισμένη καλλιέργεια σε μίγμα αλγινικού νατρίου/ ολιγοφρουκτόζης/ MRS broth/ γλυκερόλης επεξεργασμένο στους 80°C με τη μέθοδο της εξώθησης

t (min)	pH	t (min)	pH	t (min)	pH
0	6,594	85	6,045	170	4,941
5	6,566	90	5,988	175	4,901
10	6,541	95	5,931	180	4,865
15	6,512	100	5,863	185	4,83
20	6,489	105	5,78	190	4,796
25	6,466	110	5,69	195	4,762
30	6,444	115	5,605	200	4,731
35	6,42	120	5,518	205	4,7
40	6,396	125	5,435	210	4,671
45	6,37	130	5,36	215	4,644
50	6,342	135	5,292	220	4,618
55	6,308	140	5,229	225	4,595
60	6,273	145	5,172	230	4,572
65	6,235	150	5,12	235	4,551
70	6,189	155	5,07	240	4,531
75	6,145	160	5,025	245	4,514
80	6,098	165	4,982	250	4,502

1.1.7 Ζύμωση γιαουρτιού με εγκλεισμένη καλλιέργεια σε μίγμα αλγινικού νατρίου/ ολιγοφρουκτόζης/ MRS broth/ γλυκερόλης επεξεργασμένο στους 121°C με τη μέθοδο της εξώθησης

t (min)	pH	t (min)	pH	t (min)	pH	t (min)	pH
0	6,585	85	6,118	170	5,36	255	4,815
5	6,547	90	6,076	175	5,31	260	4,797
10	6,509	95	6,033	180	5,283	265	4,779
15	6,478	100	5,982	185	5,25	270	4,759
20	6,443	105	5,953	190	5,218	275	4,74
25	6,417	110	5,909	195	5,184	280	4,721
30	6,403	115	5,866	200	5,167	285	4,689
35	6,372	120	5,807	205	5,122	290	4,678
40	6,349	125	5,769	210	5,073	295	4,657
45	6,322	130	5,711	215	5,042	300	4,637
50	6,307	135	5,676	220	5,013	305	4,619
55	6,289	140	5,61	225	4,982	310	4,603
60	6,261	145	5,569	230	4,949	315	4,586
65	6,237	150	5,51	235	4,918	320	4,562
70	6,211	155	5,467	240	4,886	325	4,547
75	6,2	160	5,431	245	4,857	330	4,522
80	6,159	165	5,39	250	4,831		

1.1.8 Ζύμωση γιαουρτιού με εγκλεισμένη καλλιέργεια σε αλγινικού νατρίου/ μαλτοδεξτρίνης/ MRS broth/ γλυκερόλης με επικάλυψη χιτοζάνης επεξεργασμένο στους 80°C με τη μέθοδο της εξώθησης

t (min)	pH	t (min)	pH	t (min)	pH
0	6,494	85	5,832	170	4,742
5	6,486	90	5,736	175	4,715
10	6,467	95	5,631	180	4,691
15	6,449	100	5,527	185	4,664
20	6,406	105	5,425	190	4,642
25	6,385	110	5,338	195	4,621
30	6,366	115	5,255	200	4,599
35	6,334	120	5,181	205	4,58
40	6,298	125	5,118	210	4,56
45	6,255	130	5,063	215	4,542
50	6,213	135	5,008	220	4,524
55	6,164	140	4,96	225	4,506
60	6,116	145	4,917		
65	6,068	150	4,875		
70	6,019	155	4,837		
75	5,966	160	4,799		
80	5,907	165	4,769		

1.1.9 Ζύμωση γιαουρτιού με εγκλεισμένη καλλιέργεια σε αλγινικού νατρίου/ ινουλίνης/ MRS broth/ γλυκερόλης με επικάλυψη χιτοζάνης επεξεργασμένο στους 80°C με τη μέθοδο της εξώθησης

t (min)	pH	t (min)	pH	t (min)	pH
0	6,558	85	5,95	170	4,622
5	6,555	90	5,886	175	4,579
10	6,548	95	5,821	180	4,541
15	6,519	100	5,747	185	4,505
20	6,506	105	5,665		
25	6,483	110	5,564		
30	6,445	115	5,453		
35	6,428	120	5,342		
40	6,394	125	5,235		
45	6,364	130	5,134		
50	6,298	135	5,043		
55	6,263	140	4,961		
60	6,223	145	4,889		
65	6,175	150	4,825		
70	6,121	155	4,77		
75	6,068	160	4,717		
80	6,011	165	4,669		

1.1.10 Ζύμωση γιαουρτιού με εγκλεισμένη καλλιέργεια σε αλγινικού νατρίου/ ολιγοφρουκτόζης/ MRS broth/ γλυκερόλης με επικάλυψη χιτοζάνης επεξεργασμένο στους 80°C με τη μέθοδο της εξώθησης

t (min)	pH	t (min)	pH	t (min)	pH	t (min)	pH
0	6,695	85	5,988	170	5,044	255	4,699
5	6,637	90	5,921	175	5,017	260	4,679
10	6,619	95	5,842	180	4,991	265	4,661
15	6,581	100	5,76	185	4,966	270	4,645
20	6,552	105	5,675	190	4,945	275	4,629
25	6,521	110	5,6	195	4,924	280	4,615
30	6,491	115	5,531	200	4,903	285	4,602
35	6,46	120	5,467	205	4,864	290	4,59
40	6,426	125	5,409	210	4,843	295	4,577
45	6,389	130	5,357	215	4,825	300	4,566
50	6,347	135	5,309	220	4,807	305	4,555
55	6,3	140	5,264	225	4,79	310	4,543
60	6,252	145	5,221	230	4,772	315	4,532
65	6,2	150	5,183	235	4,755	320	4,523
70	6,149	155	5,145	240	4,74	325	4,513
75	6,097	160	5,109	245	4,725	330	4,503
80	6,045	165	5,078	250	4,713		

1.1.11 Ζύμωση γιαουρτιού με εγκλεισμένη καλλιέργεια σε μίγμα αλγινικού νατρίου/γλυκερόλης με επικάλυψη χιτοζάνης με τη μέθοδο της γαλακτωματοποίησης

t (min)	pH	t (min)	pH	t (min)	pH	t (min)	pH
0	6,789	85	6,164	170	5,018	255	254,9
5	6,759	90	6,102	175	4,983	260	259,9
10	6,761	95	6,029	180	4,953	265	264,9
15	6,756	100	5,941	185	4,924	270	269,9
20	6,741	105	5,847	190	4,897	275	274,9
25	6,722	110	5,747	195	4,87	280	279,9
30	6,697	115	5,651	200	4,843	285	284,9
35	6,667	120	5,556	205	4,817	290	289,9
40	6,632	125	5,474	210	4,79	295	294,9
45	6,594	130	5,402	215	4,765	300	299,9
50	6,551	135	5,337	220	4,741	305	304,9
55	6,497	140	5,278	225	4,719		
60	6,447	145	5,226	230	4,699		
65	6,386	150	5,177	235	4,68		
70	6,33	155	5,133	240	4,663		
75	6,274	160	5,094	245	4,649		
80	6,22	165	5,056	250	4,638		

1.1.12 Ζύμωση γιαουρτιού με εγκλεισμένη καλλιέργεια σε μίγμα αλγινικού νατρίου/γλυκερόλης χωρίς επικάλυψη χιτοζάνης με τη μέθοδο της γαλακτωματοποίησης

t (min)	pH	t (min)	pH	t (min)	pH
0	6,49	85	5,626	170	170,2
5	6,454	90	5,558	175	175,2
10	6,438	95	5,488	180	180,2
15	6,411	100	5,423	185	185,2
20	6,377	105	5,361	190	190,2
25	6,337	110	5,303	195	195,2
30	6,293	115	5,25	200	200,2
35	6,248	120	5,201	205	205,2
40	6,2	125	5,153	210	210,2
45	6,152	130	5,11	215	215,2
50	6,099	135	5,067	220	220,2
55	6,045	140	5,027	225	225,2
60	5,988	145	4,989	230	230,2
65	5,922	150	4,95	235	235,2
70	5,848	155	4,915		
75	5,771	160	4,881		
80	5,697	165	4,85		

1.1.13 Ζύμωση γιαουρτιού με εγκλεισμένη καλλιέργεια σε αλγινικού νατρίου/ινουλίνης/γλυκερόλης με επικάλυψη χιτοζάνης με τη μέθοδο της γαλακτωματοποίησης

t (min)	pH	t (min)	pH	t (min)	pH	t (min)	pH	t (min)	pH
0	6,779	85	6,197	170	5,1	255	4,802	340	4,632
5	6,76	90	6,141	175	5,069	260	4,789	345	624
10	6,718	95	6,086	180	5,041	265	4,776	350	4,615
15	6,696	100	6,017	185	5,017	270	4,764	355	4,607
20	6,65	105	5,934	190	4,995	275	4,753	360	4,598
25	6,623	110	5,84	195	4,978	280	4,742	365	4,59
30	6,603	115	5,743	200	4,963	285	4,732	370	4,583
35	6,584	120	5,649	205	4,948	290	4,721		
40	6,565	125	5,557	210	4,933	295	4,712		
45	6,541	130	5,48	215	4,917	300	4,701		
50	6,512	135	5,408	220	4,901	305	4,691		
55	6,475	140	5,353	225	4,886	310	4,682		
60	6,43	145	5,302	230	4,871	315	4,674		
65	6,385	150	5,257	235	4,857	320	4,666		
70	6,338	155	5,215	240	4,842	325	4,658		
75	6,294	160	5,176	245	4,828	330	4,649		
80	6,244	165	5,134	250	4,815	335	4,64		

1.1.14 Ζύμωση γιαουρτιού με εγκλεισμένη καλλιέργεια σε αλγινικού νατρίου/ινουλίνης/γλυκερόλης χωρίς επικάλυψη χιτοζάνης με τη μέθοδο της γαλακτωματοποίησης

t (min)	pH	t (min)	pH	t (min)	pH
0	6,662	85	6,341	170	5,104
5	6,639	90	6,304	175	5,046
10	6,622	95	6,265	180	4,991
15	6,609	100	6,223	185	4,938
20	6,598	105	6,176	190	4,888
25	6,591	110	6,119	195	4,84
30	6,585	115	6,049	200	4,794
35	6,576	120	5,969	205	4,752
40	6,568	125	5,879	210	4,71
45	6,555	130	5,784	215	4,671
50	6,54	135	5,696	220	4,633
55	6,519	140	5,592	225	4,598
60	6,497	145	5,463	230	4,565
65	6,472	150	5,374	235	4,535
70	6,442	155	5,293	240	4,526
75	6,408	160	5,229	245	4,5
80	6,375	165	5,164		

1.1.15 Ζύμωση γιαουρτιού με εγκλεισμένη καλλιέργεια σε μίγμα αλγινικού νατρίου/ολιγοφρουκτόζης/γλυκερόλης με επικάλυψη χιτοζάνης με τη μέθοδο της γαλακτωματοποίησης

t (min)	pH	t (min)	pH	t (min)	pH	t (min)	pH
0	6,795	85	5,827	170	4,86	255	4,577
5	6,663	90	5,773	175	4,835	260	4,568
10	6,634	95	5,706	180	4,812	265	4,561
15	6,589	100	5,619	185	4,789	270	4,553
20	6,532	105	5,54	190	4,769	275	4,544
25	6,477	110	5,465	195	4,749	280	4,537
30	6,433	115	5,392	200	4,73	285	4,529
35	6,391	120	5,323	205	4,712	290	4,522
40	6,339	125	5,26	210	4,696		
45	6,284	130	5,205	215	4,679		
50	6,234	135	5,15	220	4,682		
55	6,178	140	5,059	225	4,674		
60	6,125	145	5,02	230	4,657		
65	6,059	150	4,983	235	4,638		
70	5,995	155	4,947	240	4,62		
75	5,939	160	4,915	245	4,605		
80	5,884	165	4,886		4,59		

1.1.16 Ζύμωση γιαουρτιού με εγκλεισμένη καλλιέργεια σε μίγμα αλγινικού νατρίου/ολιγοφρουκτόζης/γλυκερόλης χωρίς επικάλυψη χιτοζάνης με τη μέθοδο της γαλακτωματοποίησης

t (min)	pH	t (min)	pH	t (min)	pH
0	6,685	85	6,237	170	5,001
5	6,68	90	6,168	175	4,961
10	6,676	95	6,09	180	4,923
15	6,67	100	6,005	185	4,887
20	6,662	105	5,904	190	4,853
25	6,649	110	5,819	195	4,837
30	6,632	115	5,73	200	4,81
35	6,612	120	5,583	205	4,777
40	6,586	125	5,503	210	4,742
45	6,558	130	5,434	215	4,713
50	6,526	135	5,364	220	4,682
55	6,493	140	5,3	225	4,666
60	6,458	145	5,242	230	4,618
65	6,42	150	5,188	235	4,602
70	6,382	155	5,138	240	4,579
75	6,339	160	5,092	245	4,546
80	6,294	165	5,046	250	4,528

1.1.17 Ζύμωση γιαουρτιού με εγκλεισμένη καλλιέργεια σε μίγμα αλγινικού νατρίου/
μαλτοδεξτρίνης/ γλυκερόλης με επικάλυψη χιτοζάνης με τη μέθοδο της
γαλακτωματοποίησης

t (min)	pH	t (min)	pH	t (min)	pH	t (min)	pH	t (min)	pH
0	6,809	85	6,197	170	5,138	255	4,762	340	4,552
5	6,724	90	6,14	175	5,107	260	4,749	345	4,538
10	6,715	95	6,075	180	5,078	265	4,722	350	4,529
15	6,708	100	5,998	185	5,052	270	4,711		
20	6,7	105	5,903	190	5,026	275	4,702		
25	6,685	110	5,81	195	5,003	280	4,69		
30	6,662	115	5,718	200	4,98	285	4,682		
35	6,633	120	5,636	205	4,961	290	4,673		
40	6,606	125	5,558	210	4,944		4,66		
45	6,571	130	5,49	215	4,922		4,648		
50	6,532	135	5,43	220	4,905		4,633		
55	6,489	140	5,379	225	4,89		4,618		
60	6,445	145	5,33	230	4,875		4,609		
65	6,396	150	5,287		4,839		4,595		
70	6,345	155	5,245		4,827		4,584		
75	6,294	160	5,207		4,808		4,574		
80	6,247	165	5,171		4,789		4,564		

1.1.18 Ζύμωση γιαουρτιού με εγκλεισμένη καλλιέργεια σε μίγμα αλγινικού νατρίου/
μαλτοδεξτρίνης/ γλυκερόλης χωρίς επικάλυψη χιτοζάνης με τη μέθοδο της
γαλακτωματοποίησης

t (min)	pH	t (min)	pH	t (min)	pH
0	6,712	85	6,238	170	5,019
5	6,666	90	6,164	175	4,962
10	6,648	95	6,107	180	4,906
15	6,648	100	6,051	185	4,855
20	6,638	105	5,989	190	4,802
25	6,629	110	5,921	195	4,754
30	6,614	115	5,847	200	4,708
35	6,597	120	5,769	205	4,666
40	6,573	125	5,686	210	4,627
45	6,547	130	5,603	215	4,592
50	6,516	135	5,523	220	4,558
55	6,498	140	5,446	225	4,527
60	6,466	145	5,371	230	4,499
65	6,412	150	5,298		
70	6,398	155	5,223		
75	6,35	160	5,149		
80	6,295	165	5,081		

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2. Πίνακες στατιστικής επεξεργασίας

2.1 Αποτελέσματα 1^{ης} σειράς πειραμάτων

2.1.1: Ανάλυση επίδρασης των παραγόντων στην απόδοση εγκλεισμού

Univariate Tests of Significance for Encapsulation efficiency					
	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	6874,935	1	6874,935	212,1784	0,004680
Encapsulation solution	638,470	2	319,235	9,8524	0,092145
Temperature	3308,802	1	3308,802	102,1183	0,009651
Error	64,803	2	32,402		

2.1.2: Δοκιμή Duncan για την θερμοκρασία επεξεργασίας

	Temperature	{1} 57,333	{2} 10,367
1	1		0,009935
2	2	0,009935	

2.1.3: Ανάλυση επίδρασης των παραγόντων στο βακτηριακό φορτίο προϊόντων εγκλεισμού

Univariate Tests of Significance for cfu/g of encapsulated product					
	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	6,12E+17	1	6,12E+17	128,0137	0,007721
Encapsulation solution	6,21E+16	2	3,11E+16	6,4987	0,133356
Temperature	3,29E+17	1	3,29E+17	68,7418	0,014237
Error	9,56E+15	2	4,78E+15		

2.1.4: Δοκιμή Duncan για την θερμοκρασία επεξεργασίας

	Temperature	{1} 5533E5	{2} 8533E4
1	1		0,014531
2	2	0,014531	

2.1.5: Ανάλυση επίδρασης των παραγόντων στο βακτηριακό φορτίο προϊόντων γιαουρτιού

Univariate Tests of Significance for cfu/g of yoghurt product					
	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	1,25E+12	1	1,25E+12	5,714232	0,139338
Encapsulation solution	4,42E+11	2	2,21E+11	1,00765	0,498095
Temperature	1,21E+12	1	1,21E+12	5,493888	0,143778
Error	4,39E+11	2	2,19E+11		

2.1.6: Ανάλυση επίδρασης των παραγόντων στο χρόνο ζύμωσης

Univariate Tests of Significance for Fermentation time					
	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	473204,2	1	473204,2	130,0905	0,007599
Encapsulation solution	308,3	2	154,2	0,0424	0,959341
Temperature	337,5	1	337,5	0,0928	0,789441
Error	7275	2	3637,5		

2.1.7: Ανάλυση επίδρασης των παραγόντων στο μέγιστο ρυθμό μείωσης pH

Univariate Tests of Significance for Maximum reduction rate of pH					
	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	0,000895	1	0,000895	66,42218	0,014724
Encapsulation solution	0,000005	2	0,000002	0,17888	0,848259
Temperature	0	1	0	0,00606	0,945049
Error	0,000027	2	0,000013		

2.1.8: Ανάλυση επίδρασης των παραγόντων στη διάρκεια λανθάνουσας φάσης

Univariate Tests of Significance for Time lag					
	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	260495,8	1	260495,8	144,5659	0,006846
Encapsulation solution	2654,9	2	1327,4	0,7367	0,575811
Temperature	143,2	1	143,2	0,0795	0,804522
Error	3603,8	2	1801,9		

2.1.9: Ανάλυση επίδρασης των παραγόντων στις τιμές ιξώδους μετά από 24h αποθήκευσης των δειγμάτων γιαουρτιού στους 4°C

Univariate Tests of Significance for viscosity at 4°C					
	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	1,33E+09	1	1,33E+09	900,6999	0,001108
Encapsulation solution	4,08E+06	2	2,04E+06	1,3862	0,419079
Temperature	2,60E+06	1	2,60E+06	1,7674	0,315069
Error	2,94E+06	2	1,47E+06		

2.1.10: Ανάλυση επίδρασης των παραγόντων στις τιμές ιξώδους μετά την ζύμωση στους 45°C

Univariate Tests of Significance for viscosity at 45°C					
	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	161616600	1	1,62E+08	24992,26	0,00004
Encapsulation solution	3459600	2	1729800	267,49	0,003724
Temperature	516267	1	516267	79,84	0,012295
Error	12933	2	6467		

2.1.11: Δοκιμή Duncan για το είδος του εγκλειστικού μέσου

Encapsulation solution		{1} 5190.0	{2} 4260.0	{3} 6120.0
1	1		0,007673	0,007673
2	2	0,007673		0,001824
3	3	0,007673	0,001824	

2.1.12: Δοκιμή Duncan για την θερμοκρασία επεξεργασίας

Duncan test; variable viscosity at 45°C			
	Temperature	{1}	{2}
1	1		0,012608
2	2	0,012608	

2.1.13: Ανάλυση επίδρασης των παραγόντων στις τιμές προσκολλησιμότητας των δειγμάτων γιαουρτιού

Univariate Tests of Significance for Adhesiveness					
	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	0,340483	1	0,340483	14,98037	0,060736
Encapsulation solution	0,019915	2	0,009957	0,43809	0,695365
Temperature	0,012394	1	0,012394	0,54531	0,537137
Error	0,045457	2	0,022729		

2.1.14: Ανάλυση επίδρασης των παραγόντων στις τιμές συνεκτικότητας των δειγμάτων γιαουρτιού

Univariate Tests of Significance for Coheviness					
	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	1,490017	1	1,490017	341,082	0,002919
Encapsulation solution	0,000214	2	0,000107	0,0245	0,976056
Temperature	0,006534	1	0,006534	1,4957	0,345882
Error	0,008737	2	0,004369		

2.1.15: Ανάλυση επίδρασης των παραγόντων στις τιμές σκληρότητας των δειγμάτων γιαουρτιού

Univariate Tests of Significance for Hardness					
	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	2,475553	1	2,475553	292,0949	0,003406
Encapsulation solution	0,0351	2	0,01755	2,0708	0,325651
Temperature	0,001233	1	0,001233	0,1454	0,739631
Error	0,01695	2	0,008475		

2.1.16: Ανάλυση επίδρασης των παραγόντων στις τιμές κομμιόδους των δειγμάτων γιαουρτιού

Univariate Tests of Significance for Gumminess					
	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	0,598504	1	0,598504	49,25352	0,019705
Encapsulation solution	0,014782	2	0,007391	0,60825	0,621793
Temperature	0,002281	1	0,002281	0,18775	0,707048
Error	0,024303	2	0,012152		

2.2 Αποτελέσματα 2^{ης} σειράς πειραμάτων

2.2.1: Ανάλυση επίδρασης των παραγόντων στην απόδοση εγκλεισμού

Univariate Tests of Significance for Encapsulation efficiency					
	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	114,7613	1	114,7613	60,04513	0,00447
Encapsulation solution	64,1838	3	21,3946	11,19403	0,038873
Coating with chitosan	7,4112	1	7,4112	3,8777	0,14356
Error	5,7337	3	1,9112		

2.2.2: Ανάλυση επίδρασης της θερμοκρασίας στην απόδοση εγκλεισμού

	Encapsulation solution	{1} 1.5000	{2} 8.5000	{3} 3.5000	{4} 1.6500
1	1		0,014911	0,242484	0,920616
2	2	0,014911		0,036530	0,016111
3	3	0,242484	0,036530		0,273446
4	4	0,920616	0,016111	0,273446	

2.2.3: Ανάλυση επίδρασης των παραγόντων στο βακτηριακό φορτίο προϊόντων εγκλεισμού

Univariate Tests of Significance for cfu/g of encapsulated product					
	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	1,30E+16	1	1,30E+16	31,66966	0,011097
Encapsulation solution	7,67E+15	3	2,56E+15	6,20857	0,083969
Coating with chitosan	1,15E+15	1	1,15E+15	2,78819	0,193554
Error	1,24E+15	3	4,12E+14		

2.2.4: Ανάλυση επίδρασης των παραγόντων στο βακτηριακό φορτίο προϊόντων γιαουρτιού

Univariate Tests of Significance for cfu/g of yoghurt product					
	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	4,87E+09	1	4,87E+09	8,516108	0,061584
Encapsulation solution	1,73E+09	3	5,78E+08	1,010977	0,496525
Coating with chitosan	1,53E+09	1	1,53E+09	2,683035	0,199948
Error	1,72E+09	3	5,72E+08		

2.2.5: Ανάλυση επίδρασης των παραγόντων στο χρόνο ζύμωσης

Univariate Tests of Significance for Fermentation time					
	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	641278,1	1	641278,1	842,171	0,00009
Encapsulation solution	1234,4	3	411,5	0,5404	0,68711
Coating with chitosan	14028,1	1	14028,1	18,4227	0,023253
Error	2284,4	3	761,5		

2.2.6: Δοκιμή Duncan για την επικάλυψη ή μη των εγκλειστικών προϊόντων με χιτοζάνη

	Coating with chitosan	{1} 325.00	{2} 241.25
1	1		0,023468
2	2	0,023468	

2.2.7: Ανάλυση επίδρασης των παραγόντων στο μέγιστο ρυθμό μείωσης pH

Univariate Tests of Significance for Maximum reduction rate of pH					
	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	0,001526	1	0,001526	227,3084	0,000633
Encapsulation solution	0,000002	3	0,000001	0,1079	0,94993
Coating with chitosan	0,000012	1	0,000012	1,8246	0,269621
Error	0,00002	3	0,000007		

2.2.8: Ανάλυση επίδρασης των παραγόντων στη διάρκεια λανθάνουσας φάσης

Univariate Tests of Significance for Time lag					
	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	298038,3	1	298038,3	5193,813	0,000006
Encapsulation solution	1183,4	3	394,5	6,874	0,073837
Coating with chitosan	27,2	1	27,2	0,475	0,54039
Error	172,1	3	57,4		

2.2.9: Ανάλυση επίδρασης των παραγόντων στις τιμές ιξώδους μετά από 24h αποθήκευσης των δειγμάτων γιαουρτιού στους 4°C

Univariate Tests of Significance for viscosity at 4°C					
	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	1,45E+09	1	1,45E+09	1484,55	0,000038
Encapsulation solution	1,98E+06	3	6,61E+05	0,677	0,621644
Coating with chitosan	8,84E+05	1	8,84E+05	0,907	0,411188
Error	2,93E+06	3	9,75E+05		

2.2.10: Ανάλυση επίδρασης των παραγόντων στις τιμές ιξώδους μετά την ζύμωση στους 45°C

Univariate Tests of Significance for viscosity at 45°C					
	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	2,01E+08	1	2,01E+08	4611,505	0,000007
Encapsulation solution	208450	3	69483	1,597	0,354894
Coating with chitosan	2691200	1	2691200	61,867	0,004281
Error	130500	3	43500		

2.2.11: Δοκιμή Duncan για την επικάλυψη ή μη των εγκλειστικών προϊόντων με χιτοζάνη

	Coating with chitosan	{1} 5587.5	{2} 4427.5
1	1		0,004508
2	2	0,004508	

2.2.12: Ανάλυση επίδρασης των παραγόντων στις τιμές προσκολλησιμότητας των δειγμάτων γιαουρτιού

Univariate Tests of Significance for Adhesiveness					
	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	0,931613	1	0,931613	110,2304	0,001845
Encapsulation solution	0,011481	3	0,003827	0,4528	0,733988
Coating with chitosan	0,000545	1	0,000545	0,0644	0,816034
Error	0,025355	3	0,008452		

2.2.13: Ανάλυση επίδρασης των παραγόντων στις τιμές συνεκτικότητας των δειγμάτων γιαουρτιού

Univariate Tests of Significance for Coheviness					
	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	1,923741	1	1,923741	2411,333	0,000019
Encapsulation solution	0,005986	3	0,001995	2,501	0,235647
Coating with chitosan	0,001596	1	0,001596	2,001	0,252152
Error	0,002393	3	0,000798		

2.2.14: Ανάλυση επίδρασης των παραγόντων στις τιμές σκληρότητας των δειγμάτων γιαουρτιού

Univariate Tests of Significance for Hardness					
	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	3,75517	1	3,75517	340,4776	0,000347
Encapsulation solution	0,008221	3	0,00274	0,2485	0,858616
Coating with chitosan	0,05763	1	0,05763	5,2253	0,106358
Error	0,033087	3	0,011029		

2.2.15: Ανάλυση επίδρασης των παραγόντων στις τιμές κωμμιόδους των δειγμάτων γιαουρτιού

Univariate Tests of Significance for Gumminess					
	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	0,920725	1	0,920725	1784,35	0,000029
Encapsulation solution	0,008406	3	0,002802	5,43	0,09912
Coating with chitosan	0,008192	1	0,008192	15,876	0,028295
Error	0,001548	3	0,000516		

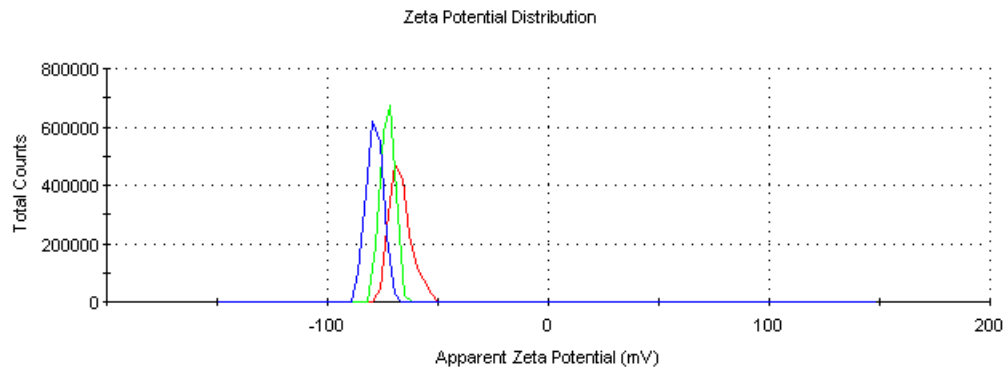
2.2.16: Δοκιμή Duncan για την επικάλυψη ή μη των εγκλειστικών προϊόντων με χιτοζάνη

	Coating with chitosan	{1} .37125	{2} .30725
1	1		0,028513
2	2	0,028513	

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3. Αποτελέσματα αναλύσεων για το ζ-δυναμικό

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -66.9	Peak 1: -66.9	100.0	4.89
Zeta Deviation (mV): 4.89	Peak 2: 0.00	0.0	0.00
Conductivity (mS/cm): 1.76	Peak 3: 0.00	0.0	0.00

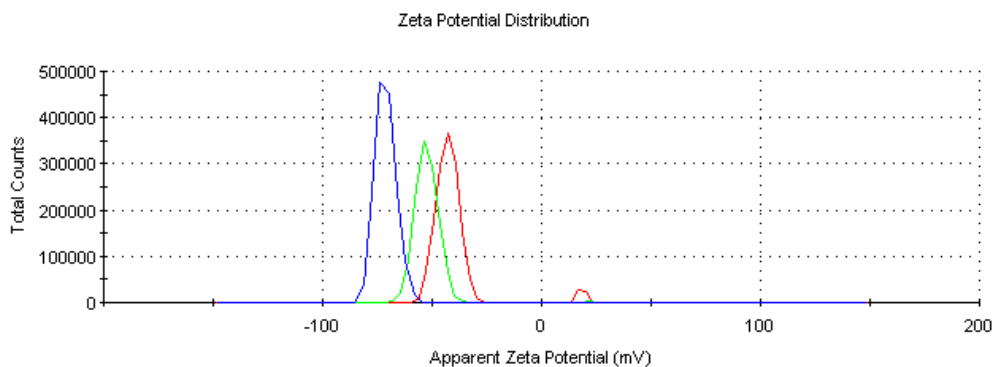
Result quality : Good



Εικόνα 3.1: Μετρήσεις ζ-δυναμικού στο εγκλειστικό μίγμα αλγινικού νατρίου/γλυκερόλης (1^ο μίγμα γαλακτωματοποίησης)

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -42.5	Peak 1: -42.9	96.6	5.03
Zeta Deviation (mV): 21.0	Peak 2: 18.4	3.4	1.65
Conductivity (mS/cm): 2.07	Peak 3: 0.00	0.0	0.00

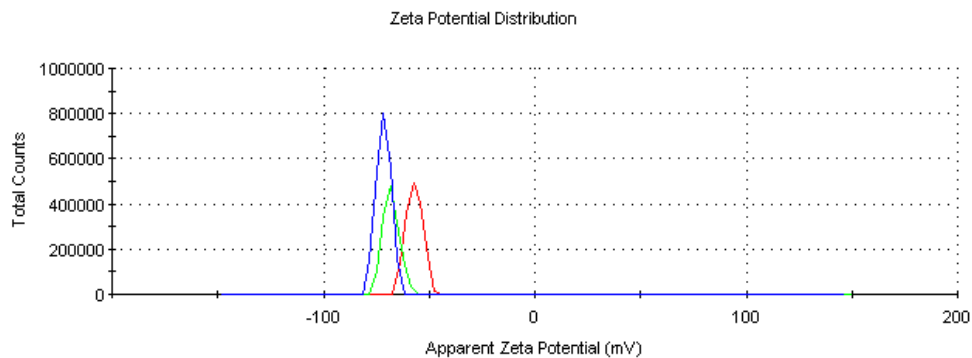
Result quality : Good



Εικόνα 3.2: Μετρήσεις ζ-δυναμικού στο εγκλειστικό μίγμα αλγινικού νατρίου/ινουλίνης/γλυκερόλης (2^ο μίγμα γαλακτωματοποίησης)

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -57.1	Peak 1: -57.1	100.0	3.79
Zeta Deviation (mV): 3.79	Peak 2: 0.00	0.0	0.00
Conductivity (mS/cm): 1.67	Peak 3: 0.00	0.0	0.00

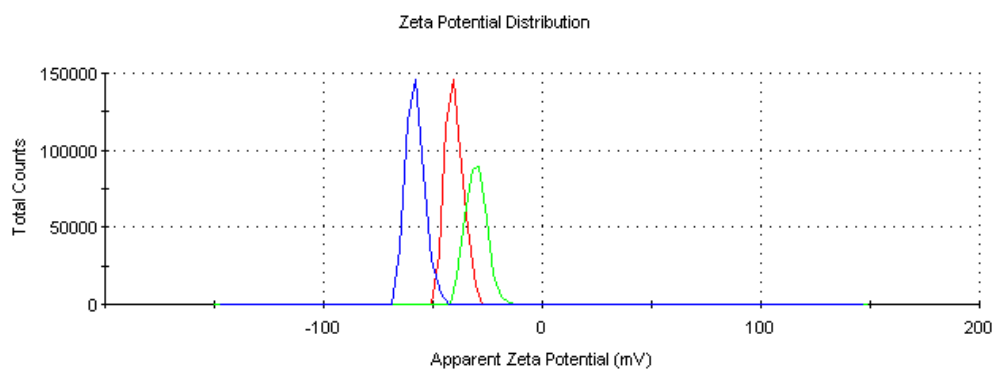
Result quality : Good



Εικόνα 3.3: Μετρήσεις ζ-δυναμικού στο εγκλειστικό μίγμα αλγινικού νατρίου/ολιγοφρουκτόζης/γλυκερόλης (3ο μίγμα γαλακτωματοποίησης)

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -40.3	Peak 1: -40.3	100.0	3.96
Zeta Deviation (mV): 3.96	Peak 2: 0.00	0.0	0.00
Conductivity (mS/cm): 1.96	Peak 3: 0.00	0.0	0.00

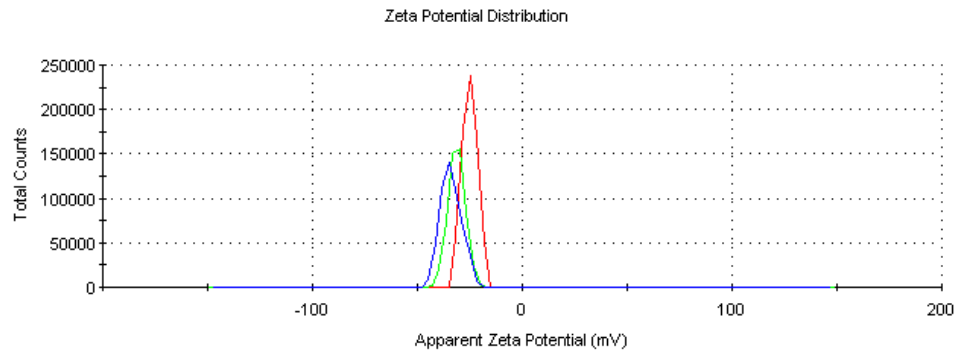
Result quality : Good



Εικόνα 3.4: Μετρήσεις ζ-δυναμικού στο εγκλειστικό μίγμα αλγινικού νατρίου/μαλτοδεξτρίνης/γλυκερόλης (4ο μίγμα γαλακτωματοποίησης)

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -34.0	Peak 1: -34.0	100.0	4.91
Zeta Deviation (mV): 4.91	Peak 2: 0.00	0.0	0.00
Conductivity (mS/cm): 3.54	Peak 3: 0.00	0.0	0.00

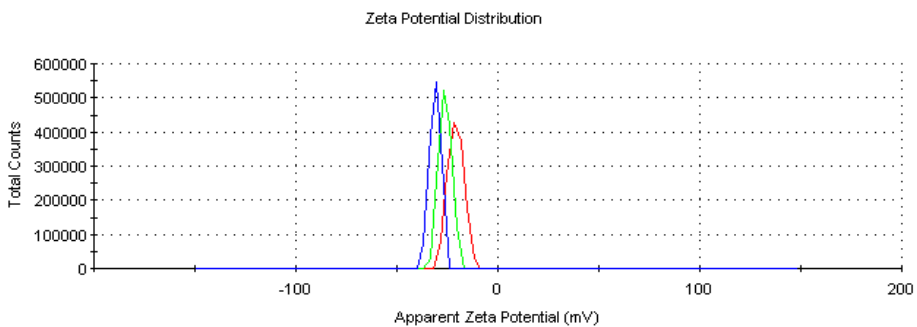
Result quality : Good



Εικόνα 3.5: Μετρήσεις ζ-δυναμικού στο εγκλειστικό μίγμα αλγινικού νατρίου/μαλτοδεξτρίνης/MRS broth/γλυκερόλης (1ο μίγμα εξώθησης)

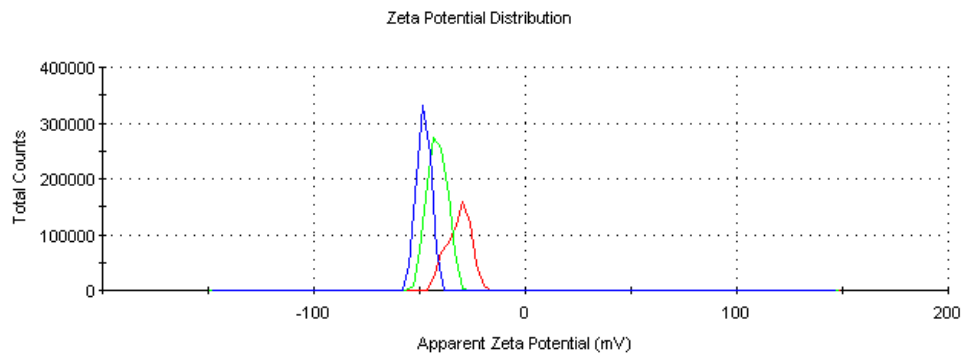
	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -20.8	Peak 1: -20.8	100.0	3.82
Zeta Deviation (mV): 3.82	Peak 2: 0.00	0.0	0.00
Conductivity (mS/cm): 2.53	Peak 3: 0.00	0.0	0.00

Result quality : Good



Εικόνα 3.6: Μετρήσεις ζ-δυναμικού στο εγκλειστικό μίγμα αλγινικού νατρίου/ινουλίνης/MRS broth/γλυκερόλης (2ο μίγμα εξώθησης)

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -31.6	Peak 1: -31.6	100.0	5.46
Zeta Deviation (mV): 5.46	Peak 2: 0.00	0.0	0.00
Conductivity (mS/cm): 2.54	Peak 3: 0.00	0.0	0.00
Result quality : Good			



Εικόνα 3.7: Μετρήσεις ζ-δυναμικού στο εγκλειστικό μίγμα αλγινικού νατρίου/ολιγοφρουκτόζης/MRS broth/γλυκερόλης (3ο μίγμα εξώθησης)