

ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΣ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΚΑΙ
ΕΝΣΩΜΑΤΩΣΗ ΤΟΥΣ ΣΕ ΓΙΑΟΥΡΤΙ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΣΤΥΛΙΑΝΗ ΚΑΡΑΜΠΑΤΑΚΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ ΤΖΙΑ

ΑΘΗΝΑ 2021

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, υπό την επίβλεψη της καθηγήτριας Κωνσταντίνας Τζιά.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κυρία Τζιά Κωνσταντίνα για την καθοδήγηση κατά την διάρκεια της εκτέλεσης των πειραμάτων, αλλά και στη συγγραφή της διπλωματικής εργασίας. Οι συμβουλές και οι διορθώσεις της ήταν υψίστης σημασίας για την επιτυχή ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας.

Έπειτα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Υποψήφια Διδάκτορα Φρακολάκη Γεωργία, για την καθημερινή της βοήθεια και υποστήριξη στην διεξαγωγή των πειραμάτων, αλλά και στην τελική επεξεργασία των μετρήσεων. Εκτιμώ ιδιαίτερα τόσο τον χρόνο που αφιέρωσε ώστε να επιλύει τυχόν απορίες και ανησυχίες, όσο και την άριστη συνεργασία που είχαμε κατά το χρονικό διάστημα των πειραμάτων που εκπονήθηκαν.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλο το επιστημονικό προσωπικό του εργαστηρίου για την βοήθεια και τις γνώσεις που μου προσέφεραν, καθ' όλη την διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας.

Καραμπατάκη Στυλιανή

Αθήνα 2021

Περιεχόμενα

1. Περίληψη	8
Abstract.....	11
2. Εισαγωγή.....	14
3. Ζυμωμένο γαλακτοκομικό προϊόν-Γιαούρτι.....	15
3.1 Νομοθεσία γιαουρτιού στην Ελλάδα	16
3.2 Τύποι γιαουρτιού	17
3.3 Διαδικασία παραγωγής γιαουρτιού	18
3.4 Διαδικασία ζύμωσης	21
3.5 Διατροφική αξία γιαουρτιού	23
3.6 Οφέλη του γιαουρτιού στην υγεία.....	24
3.6.1 Διαβήτης τύπου 2	24
3.6.2 Παχυσαρκία & Διαχείριση του βάρους	24
3.6.3 Γαστρεντελογικά οφέλη	25
3.6.4 Μείωση των καρδιομεταβολικών νόσων και της χοληστερόλης.....	26
3.6.5 Δομή και ακεραιότητα οστών.....	26
3.6.6 Ανοσοποιητικές επιπτώσεις	27
3.6.7 Αντιαλλεργική επίδραση & μείωση της διάρκειας του κοινού κρυολογήματος	27
3.6.8 Πρόληψη και θεραπεία της κολπίτιδας.....	27
3.6.9 Προστασία από τον καρκίνο	28
3.7 Φυσικές ιδιότητες του γιαουρτιού.....	28
3.7.1 Συνεκτικότητα σκετ γιαουρτιού.....	28
3.7.2 Συναίρεση.....	29
3.7.3 Ιξώδες αναμεμιγμένου γιαουρτιού	29
4. Προβιοτικά βακτήρια	31
4.1 Προβιοτικά στελέχη	31
4.1.1 Βακτήρια γαλακτικού οξέος.....	32
4.1.2 Γένος <i>Lactobacillus</i>	32
4.1.3 Γένος <i>Bifidobacterium</i>	33
4.1.4 Κριτήρια επιλογής προβιοτικού βακτηρίου.....	33
4.1.5 Φορείς προβιοτικών βακτηρίων	34

4.2	<i>Επιθυμητές ιδιότητες των προβιοτικών</i>	35
4.2.1	<i>Ιδιότητες παραγωγής</i>	35
4.2.2	<i>Αναγνώριση στελέχους</i>	35
4.2.3	<i>Δραστικότητα</i>	35
4.2.4	<i>Σταθερότητα</i>	36
4.2.5	<i>Δοσολογία</i>	36
4.2.6	<i>Παραγωγή προϊόντων σε εμπορική κλίμακα & ποιοτικός τους έλεγχος</i>	36
4.2.7	<i>Ενδογενείς ιδιότητες</i>	36
4.3	<i>Οφέλη των προβιοτικών στην υγεία</i>	37
4.3.1	<i>Διάρροια</i>	37
4.3.2	<i>Σύνδρομο ευερέθιστου εντέρου-Δυσανεξία στη λακτόζη</i>	38
4.3.3	<i>Αλλεργίες</i>	38
4.3.4	<i>Καρκίνος</i>	38
4.3.5	<i>Χοληστερόλη στο αίμα-στεφανιαία νόσος</i>	39
4.3.6	<i>Διαβήτης και παχυσαρκία</i>	39
4.3.7	<i>Λοιπά οφέλη</i>	39
4.4	<i>Εφαρμογές προβιοτικών βακτηρίων σε τρόφιμα</i>	39
4.5	<i>Βιωσιμότητα προβιοτικών βακτηρίων</i>	40
4.5.1	<i>Παράγοντες επίδρασης της βιωσιμότητας των βακτηρίων</i>	40
4.5.1.3	<i>Φυσικοί παράγοντες</i>	42
4.5.2	<i>Τρόποι αύξησης της επιβίωσης των <i>L. acidophilus</i> και <i>bifidobacteria</i> σε ζυμωμένα γαλακτοκομικά προϊόντα</i>	43
4.6	<i>Προβιοτικό γιαούρτι</i>	43
4.7	<i>Νομοθεσία και ασφάλεια</i>	44
4.8	<i>Πρεβιοτικά βακτήρια</i>	45
4.9	<i>Συμβιωτικά</i>	46
4.10	<i>Μελλοντικές προοπτικές</i>	47
4.11	<i>Στρατηγικές ενίσχυσης της προβιοτικής βιωσιμότητας</i>	48
4.11.1	<i>Επιλογή των προβιοτικών</i>	48
4.11.2	<i>Επιλογή της συσκευασίας των τροφίμων</i>	48
4.11.3	<i>Προσθήκη συστατικών ως ‘προβιοτικών προαγωγών’</i>	48
4.11.4	<i>Εγκλεισμός προβιοτικών βακτηρίων</i>	48
5.	<i>Εγκλεισμός και ενσωμάτωση σε μεμβράνες των προβιοτικών βακτηρίων</i>	49

5.1 Τεχνικές εγκλεισμού	51
5.1.1 Ξήρανση με ψεκασμό (<i>spray drying</i>)	51
5.1.2 Ψύξη με ψεκασμό (<i>Spray cooling/spray chilling</i>)	52
5.1.3 Ξήρανση με κατάψυξη (<i>Freeze drying/lyophilisation</i>)	53
5.1.4 Επικάλυψη με ψεκασμό (<i>Spray coating</i>)	54
5.1.5 Γαλακτωματοποίηση (<i>emulsification</i>)	55
5.1.6 Εξώθηση (<i>extrusion</i>)	56
5.1.7 Συν-εξώθηση (<i>Co-extrusion</i>)	58
5.1.8 Επικάλυψη ρευστοποιημένης κλίνης (<i>Fluid Bed Coating</i>)	59
5.1.9 Συνσωμάτωση (<i>Coacervation</i>)	60
5.1.10 Λιπασώματα (<i>Liposomes</i>)	61
5.2 Σύγκριση μεθόδων εγκλεισμού	61
5.3 Ενσωμάτωση προβιοτικών βακτηρίων σε εδώδιμες μεμβράνες	63
5.4 Μέσα εδώδιμων μεμβρανών	64
5.4.1 Παράγωγα κυτταρίνης	64
5.4.2 Άμυλο	65
5.4.3 Αλγινικό οξύ	65
5.5 Εγκλειστικά μέσα	65
5.5.1 Αλγινικό οξύ	66
5.5.2 Χιτοζάνη	67
5.5.3 κ-καραγενάνη	68
5.5.4 Άμυλο	69
5.5.5 Πρωτεΐνες γάλακτος	70
5.5.6 Ζελατίνη	70
5.5.7 Κόμμι ξανθάνης και ζελάνης	71
5.5.8 Φθαλμική οξική κυτταρίνη	72
5.6 Πλεονεκτήματα & μειονεκτήματα εγκλεισμού	72
5.7 Εγκλεισμένα προβιοτικά βακτήρια σε τρόφιμα	73
5.7.1 Τυρί	74
5.7.2 Γιαούρτι	75
5.7.3 Κατεψυγμένα γαλακτοκομικά επιδόρπια	75
5.7.4 Ζυμωμένα προβιοτικά προϊόντα φυτικής προέλευσης (<i>Vegetarian</i>)	76
5.7.5 Άλλα προϊόντα διατροφής	77

5.8 Μελλοντικές προοπτικές	77
5.9 Προϊόντα γιαουρτιού εμπλουτισμένα με εγκλεισμένα και μη προβιοτικά βακτήρια	79
6. Πειραματικό Μέρος	81
6.1 Σκοπός των πειραμάτων	81
6.2 Υλικά και μέθοδοι	81
6.2.1 Πρώτες Ύλες	81
6.2.2 Εργαστηριακός εξοπλισμός	82
6.3 Πειραματική διαδικασία	83
6.3.1 Παρασκευή εγκλειστικών μειγμάτων	83
6.3.2 Εγκλεισμός προβιοτικής καλλιέργειας με την μέθοδο της εξώθησης (extrusion)	84
6.3.3 Εγκλεισμός προβιοτικής καλλιέργειας με την μέθοδο της γαλακτωματοποίησης (emulsion)	84
6.3.4 Ενσωμάτωση του προβιοτικού στελέχους σε βρώσιμη μεμβράνη	85
6.3.5 Ζύμωση γιαουρτιού	85
6.4 Αναλύσεις-Μετρήσεις	86
6.4.1 Μικροβιολογικές αναλύσεις	86
6.4.2 Μετρήσεις κατά τη ζύμωση του γάλακτος και στο τελικό προϊόν γιαουρτιού	87
6.5 Σχεδιασμός πειραμάτων	87
7. Αποτελέσματα & συζήτηση	89
7.1 Αποτελέσματα εγκλεισμένων βακτηρίων & προβιοτικών γιαουρτιών	89
7.1.1 Προσδιορισμός αποδόσεων εγκλεισμού προβιοτικών βακτηρίων με τις μεθόδους της εξώθησης και της γαλακτωματοποίησης	89
7.1.2 Προσδιορισμός του ποσοστού επιβίωσης του προβιοτικού βακτηρίου στα προϊόντα γιαουρτιού κατά την αποθήκευση για 30 ημέρες στους 4°C	91
7.1.3 Προσδιορισμός της διάρκειας ζύμωσης για κάθε προϊόν γιαουρτιού	93
7.1.4 Διάρκεια λανθάνουσας φάσης pH (λ) & μέγιστος ρυθμός μείωσης του pH (μ) για τα προϊόντα γιαουρτιού	94
7.1.5 Ιξώδες προϊόντων γιαουρτιού μετά το πέρας της ζύμωσης	96
7.1.6 Ιξώδες προϊόντων γιαουρτιού μετά από μία ημέρα αποθήκευσης στους 4°C	98
7.1.7 Ανάλυση υφής των προϊόντων γιαουρτιού μετά από μία ημέρα αποθήκευσης στους 4°C	99
7.2 Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA)	102

<i>7.2.1 Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) για τα προϊόντα γιαουρτιού με τα εγκλεισμένα βακτήρια</i>	102
<i>7.2.2 Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) για τα όλα τα προϊόντα γιαουρτιού (με εγκλεισμένα και μη προβιοτικά βακτήρια)</i>	105
<i>7.2.3 Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) για τα τελικά προϊόντα γιαουρτιού με εγκλεισμένα βακτήρια</i>	108
<i>7.3 Αποτελέσματα ενσωμάτωσης του προβιοτικού στελέχους BB-12 σε μία edώδιμη μεμβράνη</i>	111
8. Συμπεράσματα	113
9. Προτάσεις	116
Βιβλιογραφία	117
Παράρτημα	121

1. Περίληψη

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου. Τα πειράματα διεξήχθησαν κατά τη διάρκεια του εαρινού εξαμήνου του ακαδημαϊκού έτους 2020-2021. Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν ο εγκλεισμός του προβιοτικού στελέχους *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* (BB-12) και η ενσωμάτωση των εγκλεισμένων και μη βακτηρίων σε εμβολιασμένο με συμβατική καλλιέργεια γάλα για την παρασκευή προβιοτικού προϊόντος γιαουρτιού. Επίσης, το προβιοτικό στέλεχος BB-12 ενσωματώθηκε σε εδώδιμη μεμβράνη, η οποία μετά τον σχηματισμό της τοποθετήθηκε πάνω στην επιφάνεια του γιαουρτιού. Τα προβιοτικά είναι «ζωντανοί μικροοργανισμοί που όταν χορηγηθούν σε επαρκείς ποσότητες, παρέχουν πλεονεκτήματα στην υγεία του ανθρώπου» (FAO/WHO). Όμως, τα προβιοτικά βακτήρια επηρεάζονται από την έκθεση σε διάφορες συνθήκες, όπως το οξυγόνο, το όξινο περιβάλλον και τη θερμοκρασία. Αυτό φέρει ως αποτέλεσμα την μείωση της βιωσιμότητάς τους τόσο κατά την αποθήκευση του προβιοτικού προϊόντος, όσο και κατά την κατανάλωση αυτού ιδιαίτερα κατά τη διέλευση μέσω της γαστρεντερικής οδού. Για τον λόγο αυτό πραγματοποιείται η ενθυλάκωση σε εγκλειστικά μέσα και η ενσωμάτωσή τους σε εδώδιμες μεμβράνες μεμβράνη.

Στο πρώτο μέρος της παρούσας εργασίας, πραγματοποιήθηκε ο εγκλεισμός των προβιοτικών βακτηρίων με την χρήση διαφόρων εγκλειστικών μέσων, μέσω της μεθόδου της εξώθησης και της γαλακτωματοποίησης. Η ποσότητα του προβιοτικού στελέχους BB-12 που εγκλείστηκε ήταν 5 % w/v με κάθε εφαρμοσμένη μέθοδο και εγκλειστικό μίγμα. Τα εγκλειστικά μίγματα που χρησιμοποιήθηκαν και στις δύο μεθόδους ήταν: αλγινικό νάτριο-CNC-γλυκόζη (ACNC), αλγινικό νάτριο-CNC-γλυκόζη-ινουλίνη (ACNCI), αλγινικό νάτριο-γλυκόζη σε γάλα (AM), αλγινικό νάτριο-γλυκόζη-ινουλίνη σε γάλα (AMI). Αφού ολοκληρωθεί η διαδικασία του εγκλεισμού πραγματοποιείται μικροβιολογική ανάλυση του εγκλεισμένου προϊόντος ούτως ώστε να προσδιοριστεί η απόδοση του εγκλεισμού σε κάθε περίπτωση. Έπειτα, τα εγκλεισμένα βακτήρια ενσωματώνονται σε παστεριωμένο γάλα εμβολιασμένο με συμβατική καλλιέργεια και ακολουθεί η διαδικασία της ζύμωσης, μέχρι το pH του μίγματος να φτάσει την τιμή 4,6. Ταυτόχρονα, για λόγους σύγκρισης παρασκευάζονται τρία ακόμα προϊόντα γιαουρτιού. Το πρώτο προϊόν γιαουρτιού έχει εμπλουτιστεί με το μη εγκλεισμένο προβιοτικό στέλεχος *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* (BB-12), ενώ το δεύτερο έχει εμπλουτιστεί με μία εμπορική καλλιέργεια σε συνδυασμό με τη συμβατική. Τέλος, παρασκευάζεται ως τυφλό δείγμα και το συμβατικό δείγμα γιαουρτιού. Κατά τη διάρκεια της διεργασίας της ζύμωσης σε όλα τα προϊόντα γίνεται παρακολούθηση της εξέλιξης του pH, ενώ στα τελικά προϊόντα των γιαουρτιών εξετάζεται το μικροβιακό τους φορτίο, όπως επίσης και τα ποιοτικά τους χαρακτηριστικά (ιξώδες, υφή) ενώ ελέγχεται και η βιωσιμότητα των προβιοτικών βακτηρίων κατά την αποθήκευση των προϊόντων σε ψύξη.

Στο δεύτερο μέρος της εργασίας, επιχειρήθηκε η ενσωμάτωση του προβιοτικού στελέχους BB-12 σε μία εδώδιμη μεμβράνη. Η μεμβράνη δημιουργήθηκε προσθέτοντας την κατάλληλη ποσότητα καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης (CMC),

γλυκερόλης, γλυκόζης και του προβιοτικού βακτηρίου. Αφού ολοκληρώθηκε η διαδικασία της ξήρανσής της σε λεία επιφάνεια, απομακρύνθηκε με προσοχή και τοποθετήθηκε επάνω στην επιφάνεια έτοιμου ζυμωμένου γιαουρτιού. Στα προϊόντα γιαουρτιού με μεμβράνη με ενσωματωμένα προβιοτικά βακτήρια έγιναν μετρήσεις του μικροβιακού φορτίου για τον έλεγχο της βιωσιμότητας των προβιοτικών βακτηρίων.

Από τα αποτελέσματα που ελήφθησαν για τον εγκλεισμό των προβιοτικών βακτηρίων με τις δύο μεθόδους εγκλεισμού, προέκυψαν υψηλές αποδόσεις που ανέρχονταν περίπου στο 90 %. Όμως, υψηλότερες αποδόσεις εγκλεισμού επιτυγχάνονται με τη μέθοδο της γαλακτωματοποίησης σε σχέση με τη μέθοδο της εξώθησης. Μάλιστα η υψηλότερη τιμή απόδοσης εγκλεισμού των προβιοτικών βακτηρίων επιτυγχάνεται όταν χρησιμοποιείται το εγκλειστικό μίγμα αλγινικού νατρίου-γλυκόζης-ινουλίνης σε γάλα (AMI), φτάνοντας την τιμή 97,13 %. Μετά τον εγκλεισμό των βακτηρίων, πραγματοποιείται παρασκευή προϊόντων γιαουρτιού με εγκλεισμένα και μη προβιοτικά βακτήρια, τα οποία παρακολουθούνται ως προς την επιβίωση των προβιοτικών βακτηρίων κατά την αποθήκευσή τους για 30 ημέρες σε ψύξη. Με την παρακολούθηση των προϊόντων γιαουρτιού, εξάγεται το συμπέρασμα ότι τα προϊόντα που περιέχουν εγκλεισμένα βακτήρια εμφανίζουν υψηλότερα ποσοστά επιβίωσης σε σχέση με εκείνα που περιέχουν ελεύθερα βακτήρια. Μάλιστα χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της εξώθησης επιτυγχάνεται μεγαλύτερο ποσοστό βιωσιμότητας του προβιοτικού στελέχους BB-12 από ότι με τη γαλακτωματοποίηση. Η υψηλότερη τιμή του ποσοστού επιβίωσης γενικά επιτυγχάνεται στο προϊόν γιαουρτιού με τα εγκλεισμένα προβιοτικά βακτήρια με το μίγμα αλγινικού νατρίου-γλυκόζης-ινουλίνης σε γάλα (AMI).

Όσον αφορά τα χαρακτηριστικά της ζύμωσης των προβιοτικών γιαουρτιών, αρχικά, η χρήση προβιοτικών βακτηρίων εγκλεισμένων και μη αποδεικνύεται ότι επιτυγχάνει τη μικρότερη διάρκεια της ζύμωσης συγκριτικά με το τυφλό δείγμα (μόνο με συμβατική καλλιέργεια χωρίς προβιοτικά βακτήρια). Οπότε, εξάγεται το αποτέλεσμα ότι τα προβιοτικά βακτήρια συμβάλλουν στη διαδικασία της ζύμωσης. Μάλιστα, η χαμηλότερη τιμή της διάρκειας ζύμωσης εμφανίζεται στην περίπτωση του γιαουρτιού με το ελεύθερο προβιοτικό στέλεχος BB-12 (195 min), ενώ υψηλότερες τιμές διάρκειας ζύμωσης εμφανίζονται στις περιπτώσεις των γιαουρτιών με τα εγκλεισμένα βακτήρια και κυρίως όταν αυτά έχουν εγκλειστεί με τη μέθοδο της εξώθησης. Η διάρκεια της λανθάνουσας φάσης (λ) του pH παρουσιάζει τις υψηλότερες τιμές στα προϊόντα γιαουρτιού που έχουν εμπλουτιστεί με προβιοτικά βακτήρια εγκλεισμένα με τη μέθοδο της εξώθησης, αλλά και στο τυφλό δείγμα. Αντίστοιχα, ο μέγιστος ρυθμός μείωσης (μ) του pH παρουσιάζει παρόμοιες τιμές σε όλα τα προϊόντα γιαουρτιού.

Επιπλέον, οι τιμές του ιξώδους των γιαουρτιών τόσο μετά το τέλος της ζύμωσης (στους 45 °C), όσο και μετά από μία ημέρα αποθήκευσης σε ψύξη παρουσιάζουν παρόμοια συμπεριφορά. Οι υψηλότερες τιμές του ιξώδους εμφανίζονται στα προϊόντα γιαουρτιού με τα εγκλεισμένα βακτήρια κυρίως με τη μέθοδο της εξώθησης. Συγκεκριμένα, τα προϊόντα γιαουρτιού με τα εγκλεισμένα σφαιρίδια στα οποία έχει χρησιμοποιηθεί το μίγμα αλγινικού νατρίου-γλυκόζης σε γάλα (AM) εμφανίζουν τις υψηλότερες τιμές ιξώδους, ενώ η χαμηλότερη τιμή του ιξώδους εμφανίζεται στο τυφλό δείγμα γιαουρτιού. Αυτό αποδεικνύει ότι το εγκλειστικό μέσο συνεισφέρει ως πηκτικό

μέσο, αυξάνοντας το ιξώδες των προϊόντων γιαουρτιού. Τέλος, πραγματοποιήθηκε ανάλυση υφής (σκληρότητα, προσκολλησιμότητα) των προϊόντων γιαουρτιού μετά από μία ημέρα αποθήκευσης στους 4°C. Η σκληρότητα παρουσίασε παρόμοιες τιμές για όλα τα προϊόντα γιαουρτιού, ενώ η τιμή της προσκολλησιμότητας φάνηκε ότι επηρεάζεται σημαντικά από το χρησιμοποιούμενο εγκλειστικό μέσο που χρησιμοποιείται για τον εγκλεισμό των προβιοτικών βακτηρίων. Πάντως την υψηλότερη τιμή προσκολλησιμότητας εμφανίζει το συμβατικό γιαούρτι (0,382 N*s).

Η βιωσιμότητα των προβιοτικών βακτηρίων σε έτοιμο γιαούρτι στο οποίο τα εφαρμόστηκε στην επιφάνειά του εδώδιμη μεμβράνη με ενσωματωμένα προβιοτικά βακτήρια μειώθηκε σημαντικά με την πάροδο των 10 ημερών αποθήκευσης. Συγκεκριμένα, το μικροβιακό φορτίο στα προϊόντα γιαουρτιού φτάνει σε μη αποδεκτά όρια, καθώς η κατανάλωση των προβιοτικών προϊόντων επιτρέπεται εφόσον το φορτίο ξεπερνά την τιμή $6 \log(\text{CFU/g})$. Συγκρίνοντας το ποσοστό επιβίωσης των προβιοτικών βακτηρίων στα γιαούρτια που περιέχουν μία εδώδιμη μεμβράνη στην επιφάνειά τους με ενσωματωμένα προβιοτικά βακτήρια με τα αντίστοιχα γιαούρτια που περιέχουν εγκλεισμένα προβιοτικά βακτήρια στα καλύτερα εγκλειστικά μίγματα μέσω των δύο μεθόδων εγκλεισμού, δεν προκύπτουν τόσο ικανοποιητικά αποτελέσματα. Συγκεκριμένα, ενώ στην περίπτωση της προσθήκης σε γιαούρτια εγκλεισμένων προβιοτικών βακτηρίων κατά τις πρώτες 10 ημέρες το ποσοστό επιβίωσης αυτών είναι σχεδόν 90%, στην περίπτωση της χρήσης προβιοτικών βακτηρίων ενσωματωμένων σε εδώδιμη μεμβράνη το ποσοστό επιβίωσης φτάνει αντίστοιχα μόλις 60%.

Με βάση τα αποτελέσματα των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία, εξάγεται το συμπέρασμα ότι ο εγκλεισμός των προβιοτικών βακτηρίων και με τις δύο μεθόδους και η ενσωμάτωσή τους σε γιαούρτια είναι μία αποτελεσματική μέθοδος για την επιβίωσή τους και την παραγωγή περαιτέρω λειτουργικών προβιοτικών προϊόντων γιαουρτιού. Βέβαια, με την επιλογή συγκεκριμένων εγκλειστικών μιγμάτων ανάλογα με τη μέθοδο εγκλεισμού επιτυγχάνεται η βέλτιστη επιβίωση των προβιοτικών βακτηρίων και η επίτευξη των επιθυμητών ποιοτικών χαρακτηριστικών στα τελικά προβιοτικά γιαούρτια. Από την άλλη πλευρά, η ενσωμάτωση των προβιοτικών βακτηρίων σε εδώδιμη μεμβράνη και η τοποθέτησή της σε γιαούρτι δεν είχε τα ίδια ικανοποιητικά αποτελέσματα, συνεπώς χρειάζεται περαιτέρω έρευνα.

Abstract

The present thesis has been conducted in the Laboratory of Chemistry and Food Technology of the School of Chemical Engineering of the National Technical University of Athens. The experiments were performed during the spring semester of the academic year 2020-2021. The purpose of this thesis was the encapsulation of the probiotic strain *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* (BB-12) and the incorporation of encapsulated and non-encapsulated bacteria into conventionally inoculated milk in order to produce a probiotic product. Also, the probiotic strain BB-12 was incorporated into an edible membrane, which after its formation was placed on yogurt. Probiotics are "living microorganisms that, when given in sufficient quantities, offer a health benefit to humans" (FAO / WHO). However, probiotic bacteria are affected from the exposure to various conditions like oxygen, acidity and temperature. This results in their sustainability's decrease not only during the probiotic product's storage but also during its passage through the gastrointestinal tract. That is the reason why their encapsulation and their integration into an edible membrane happens.

For the first part of this thesis, the encapsulation of the probiotic bacteria was performed using various encapsulating means and the methods of extrusion and emulsification. The quantity that was encapsulated was 5 % w/v for every method and every encapsulating mixture. The encapsulating mixtures that were used for both methods were: sodium alginate-CNC-glucose (ACNC), sodium alginate-CNC-glucose-inulin (ACNCI), sodium alginate-glucose in milk (AM), sodium alginate-glucose-inulin in milk (AMI). After the procedure of encapsulation is completed, the microbiological analysis of the encapsulated product is done in order to determine the performance of the encapsulation in each case. Afterwards, the encapsulated bacteria get integrated in conventionally inoculated milk and the procedure of the fermentation begins and continues until the pH reaches the value of 4,6. At the same time, three more products of yogurt are being prepared for comparison purposes. The first product of yogurt has been enriched with the non-encapsulated probiotic strain *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* (BB-12), whereas the second one has been enriched with the combination of a trade culture and the conventional one. Finally, the conventional yogurt is being prepared as a blank sample. Not only during the fermentation of all the products, but also when the final yogurt products are ready, there are measurements that are being taken concerning the fermentation progress, the microbial load and the texture's characteristics.

For the second part of this thesis, the integration of the probiotic strain BB-12 to an edible membrane was attempted. The membrane was created by adding the appropriate amounts of carboxymethylcellulose (CMC), glycerol and the probiotic bacterium in order for its concentration to be 5 % w/v. After the procedure of the membrane's drying was completed, the membrane was peeled off and placed on top of the yogurts. For the products of yogurt with membrane the only measurements that followed were measurements of the microbial load for the inspection of the sustainability of the probiotic bacteria.

From the results that were provided about the encapsulation of the probiotic bacteria with the two encapsulation methods, emerged high returns that run up to around 90%. However, it was shown that the higher returns of encapsulation were achieved through the method of emulsification. In fact, the highest return, that reaches the value of 97,13%, is achieved when the encapsulating mixture that is being used is sodium alginate-glucose-inulin in milk (AMI). After the bacteria's encapsulation, the preparation of yogurt products with encapsulated and non-probiotic bacteria follows, which are being monitored for 30 days during their storage in refrigeration. After the monitoring of the yogurt products, the conclusion that is exported is that the products with encapsulated bacteria show the highest percentages of survival. In fact, by using the method of extrusion rather than the method of emulsification, a greater percentage of sustainability is achieved for the probiotic strain BB-12. The highest percentage of sustainability is achieved in the yogurt product with the encapsulated probiotic bacteria and the mixture sodium alginate-glucose-inulin in milk (AMI).

Regarding the fermentation's characteristics, the use of encapsulated or non-encapsulated probiotic bacteria is proven to achieve the smallest duration of fermentation comparatively to the blank sample. So, it is concluded that the probiotic bacteria contribute to the procedure of fermentation. In fact, the lowest value appears in the case of the yogurt with the free probiotic strain BB-12 (195 min). Whereas, during fermentation of the yogurts with the encapsulated bacteria and especially through the method of extrusion, the duration of the fermentation appears to be higher. The duration of the pH's latent phase (λ) shows the highest values in the products of yogurt that have been enriched with probiotic bacteria encapsulated through the method of extrusion and in the blank sample. However, the maximum rhythm of the pH's reduction (μ) shows similar values for all the yogurt products.

Moreover, the values of the yogurts' viscosity at the end of the fermentation at 45 °C and one day after their storage in refrigeration display similar behaviors but with an increase in the value of the viscosity the next day. The highest values of the viscosity appear at the yogurt products with the encapsulated bacteria especially through the method of extrusion. Specifically, the yogurt products with the encapsulated globules with the mixture of sodium alginate-glucose in milk (AM) show the highest values of viscosity, whereas the highest appear in the blank sample. This proves that the encapsulating media and the presence of encapsulated bacteria contribute as coagulants by increasing the viscosity. At last, a texture analysis of the yogurt products was performed (hardness, attachment) after one day of storage at 4°C. At first, the hardness showed similar values for all the yogurt products, whereas the attachment's value seems to be significantly affected by the encapsulating media that is being used. The highest attachment's value appears at the conventional yogurt (0,382 N*s).

The results of the microbial load's sustainability of the application of an edible membrane that contains probiotic bacteria on top of yogurts were fairly decreased after 10 days. Specifically, the microbial load reaches non-acceptable limits, as the consumption of probiotic products is allowed as long as the load surpasses the value 6 log(CFU/g). By comparing the percentage of sustainability of the probiotic bacteria in an edible membrane that is applied on the surface of the yogurt with the best encapsulating mixtures of the two methods of encapsulation, satisfactory results arise.

In particular, although in the case of the encapsulated probiotic bacteria, for the 10 first days, the percentage of sustainability is almost 90%, in the case of the integration of the probiotic bacteria in an edible membrane the percentage is only at 60%.

According to the experiments that were performed during the present thesis, it is concluded that the encapsulation of probiotic bacteria, with both methods, and their integration in yogurts is an effective method of sustainability for the microbial load. Of course, the maximum survival of probiotic bacteria and the achievement of the desirable quality characteristics depends on the selection of specific encapsulating mixtures for each method. On the contrary, the integration of probiotic bacteria in an edible membrane and its application on yogurt did not have the same satisfactory results.

2. Εισαγωγή

Η οξίνιση του γάλακτος με ζύμωση αποτελεί μία από τις παλαιότερες μεθόδους συντήρησής του, μέσω της οποίας το προϊόν αποκτά και διάφορες επιθυμητές οργανοληπτικές ιδιότητες. Η διαδικασία της ζύμωσης υπολογίζεται ότι ξεκίνησε περίπου πριν από 10000-15000 χρόνια. Εξαιτίας της αναγκαιότητας για παράταση της διάρκειας ζωής του γάλακτος, αναπτύχθηκαν διάφορα προϊόντα ζύμωσης, όπως το κεφίρ, το γιαούρτι, η κρέμα γάλακτος αλλά και πολλά άλλα προϊόντα διαφορετικά ανά χώρα. Τα προϊόντα διαφέρουν σημαντικά ως προς τη σύνθεση, τη γεύση και την υφή, ανάλογα με τη φύση των βακτηρίων ζύμωσης, τον τύπο του γάλακτος, όπως και τη χρησιμοποιούμενη διαδικασία παραγωγής.

Σήμερα, τα ζυμωμένα γαλακτοκομικά προϊόντα είναι αρκετά δημοφιλή και ολοένα αυξανόμενη είναι η ποικιλία τους στην καταναλωτική αγορά. Αυτό δικαιολογείται εξαιτίας της στροφής των καταναλωτών σε τρόφιμα που είναι υγιεινά και προάγουν την προσωπική τους υγεία, αποτρέποντας τους από ασθένειες (Mattila-Sandholm et al., 2002). Γενικά, η υγεία του εντέρου έχει αποδειχθεί ότι είναι ο βασικός τομέας για τα λειτουργικά τρόφιμα στην Ευρώπη.

Τα ζυμωμένα γαλάτα αποτελούν κατάλληλους φορείς για την ενσωμάτωση των βακτηρίων. Η ενσωμάτωση τους εντείνει τις ευεργετικές ιδιότητες των τροφίμων, για αυτό το λόγο υπάρχει μεγάλη ανάπτυξη των προβιοτικών προϊόντων. Όμως, υπάρχουν αρκετές δυσκολίες οι οποίες πρέπει να ξεπεραστούν ούτως ώστε τα ζυμωμένα γαλακτοκομικά προϊόντα με προβιοτικά βακτήρια να είναι κατάλληλα προς κατανάλωση. Αρχικά, πρέπει τα προβιοτικά προϊόντα να διατηρούν σε ένα κατάλληλο επίπεδο την βιωσιμότητα των κυττάρων κατά τη διάρκεια ζωής του προϊόντος. Ενώ επίσης, πρέπει να επιβιώνουν στις συνθήκες που επικρατούν στην γαστρεντερική οδό, διατηρώντας την λειτουργικότητά τους. Βέβαια, σημαντική παράμετρο για την κατανάλωση των προβιοτικών προϊόντων αποτελεί η ενσωμάτωση των βακτηρίων, χωρίς να επηρεάζει τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του προϊόντος.

Το πιο γνωστό ζυμωμένο γαλακτοκομικό προϊόν αποτελεί το γιαούρτι. το παραδοσιακό γιαούρτι παραγόταν με φυσική ζύμωση, δηλαδή χωρίς την προσθήκη κάποιας καλλιέργειας εκκίνησης. Συγκεκριμένα για την παραγωγή του γιαουρτιού προστιγόταν κάθε φορά μία ποσότητα από την προηγούμενη παρτίδα. Όμως, αυτός ο τρόπος παραγωγής του γιαουρτιού είναι μη ελεγχόμενος και δύσκολο να χρησιμοποιηθεί σε βιομηχανική κλίμακα (Yildiz, 2010). Για τον λόγο αυτό δημιουργήθηκαν οι καλλιέργειες εκκίνησης, όπου παρέχει ασφάλεια και τυποποίηση στο προϊόν .

3. Ζυμωμένο γαλακτοκομικό προϊόν-Γιαούρτι

Το γιαούρτι αποτελεί ένα ζυμωμένο γαλακτοκομικό προϊόν που είναι διαδεδομένο παγκοσμίως. Αποτελεί μέρος της ανθρώπινης διατροφής εδώ και αρκετές χιλιετίες, ενώ ανάλογα με την περιοχή έχει διαφορετικές ονομασίες. Η προέλευση της λέξης ‘yogurt’ πιστεύεται ότι είναι από την τουρκική λέξη ‘yoğurtmak’, που σημαίνει παχύρευστο, πήξη, ζύμωση (Yildiz, 2010). Υπολογίζεται ότι τα γαλακτοκομικά προϊόντα ενσωματώθηκαν στην ανθρώπινη διατροφή περίπου 10.000-5.000 π.Χ., με την εξημέρωση των γαλακτοπαραγωγών ζώων.

Το γιαούρτι είναι ένα παραδοσιακό τρόφιμο ή ποτό στα Βαλκάνια και τη Μέση Ανατολή. Όμως, τις τελευταίες δεκαετίες, η δημοτικότητά του αυξάνεται ολοένα και περισσότερο παγκοσμίως έχοντας αποκτήσει σημαντικό ρόλο στην διατροφή ορισμένων ευρωπαϊκών χωρών, όπως η Βουλγαρία. Αυτό οφείλεται κατά κύριο λόγο, στα οφέλη για την υγεία που σχετίζονται με την κατανάλωση του γιαουρτιού αλλά και στην στροφή των καταναλωτών σε πιο υγιεινές επιλογές στη διατροφή τους (Shah and Champagne, 2016; Chandan, 2015). Έτσι, στα τέλη του 20^{ου} αιώνα όταν το γιαούρτι έγινε κερδοφόρο εμπορικό προϊόν, η παρασκευή του βιομηχανοποιήθηκε και η διαδικασία παραγωγής του τυποποιήθηκε. Φυσικά, σημαντικό ρόλο στην αύξηση της κατανάλωσης του γιαουρτιού έχει η καινοτομία των προϊόντων, αλλά και η διαθέσιμη ποικιλία σε γεύσεις.

Το γιαούρτι ορίζεται ως το προϊόν που παράγεται από γάλα, με μία δομή πηκτής/πήγματος που προκύπτει από την πήξη των πρωτεϊνών του γάλακτος, λόγω του γαλακτικού οξέος που εκκρίνεται από ορισμένα είδη καλλιέργειών βακτηρίων. Συγκεκριμένα, παρασκευάζεται με ζύμωση του γάλακτος με βακτηριακές καλλιέργειες ή αλλιώς καλλιέργειες εκκίνησης, οι οποίες κατά βάση αποτελούνται από τα βακτήρια *Streptococcus thermophilus* και *Lactobacillus bulgaricus*. Τις τελευταίες δεκαετίες έχουν χρησιμοποιηθεί και άλλα βακτήρια εκτός των *S. thermophilus* και *L. bulgaricus* για την παραγωγή του γιαουρτιού. Μερικά από τα αυτά είναι τα *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus casei* και *Lactobacillus jugurti* και διάφορα είδη *Bifidobacterium* (Yildiz, 2010). Βέβαια, πρέπει τα βακτήρια που χρησιμοποιούνται να είναι ‘βιώσιμα και να βρίσκονται σε αφθονία’ μέχρι την ημέρα κατανάλωσης του γιαουρτιού. Οι καλλιέργειες εκκίνησης ζυμώνουν τη λακτόζη παράγοντας γαλακτικό οξύ, με αποτέλεσμα το προϊόν να αποκτά την υφή και τις χαρακτηριστικές ιδιότητές του. Συγκεκριμένα, το γιαούρτι αποκτά μία όξινη γεύση και είναι ένα προϊόν με βελτιωμένη εμφάνιση, γεύση και πεπτικότητα.

Το γιαούρτι αποτελεί πηγή βασικών θρεπτικών συστατικών, όπως οι πρωτεΐνες, το ασβέστιο, το κάλιο, ο φωσφόρος και οι βιταμίνες B2 και B12. Επίσης, το γιαούρτι αποτελεί ένα τρόφιμο το οποίο μπορεί να εμπλουτιστεί με την προσθήκη προβιοτικών βακτηρίων, διαιτητικών ινών, μετάλλων και βιταμινών. Είναι ένα προϊόν, το οποίο συνήθως αρωματίζεται και μπορεί να τροποποιηθεί εύκολα με την προσθήκη γλυκαντικών, φρούτων και γευστικών ουσιών. Το γιαούρτι μπορεί επίσης να παραχθεί από άλλες πρώτες ύλες πλην του γάλακτος, όπως ρύζι, σόγια ή και ξηρούς καρπούς.

3.1 Νομοθεσία γιαουρτιού στην Ελλάδα

Σύμφωνα με το Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης & Τροφίμων, άρθρο 82 «Γιαούρτι» του Κώδικα Τροφίμων και Ποτών:

«Γιαούρτι» ορίζεται ως το γαλακτοκομικό προϊόν το οποίο παράγεται από τη ζύμωση και πήξη του γάλακτος, με τη χρήση υποχρεωτικά των καλλιιεργειών – εκκινητών *Streptococcus thermophilus* και *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*, ώστε το τελικό ζυμωμένο προϊόν να περιέχει τουλάχιστον 10^7 cfu/g ζώντων οξυγαλακτικών βακτηρίων μέχρι την ημερομηνία ανάλωσής του.

Όμως, σε περίπτωση που χρησιμοποιηθούν για τη ζύμωση και άλλοι μικροοργανισμοί επιπλέον της χαρακτηριστικής καλλιέργειας του γιαουρτιού, αναγράφονται στην επισήμανση υπό την προϋπόθεση ότι ο πληθυσμός τους θα είναι τουλάχιστον 10^6 cfu/g προϊόντος κατά την ημερομηνία ανάλωσης.

Η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη στο γιαούρτι από αγελαδινό ή γίδινο γάλα πρέπει να είναι τουλάχιστον 3,2% και από πρόβειο γάλα τουλάχιστον 5,5%. Σε περίπτωση χρήσης μιγμάτων γάλακτος, η ελάχιστη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη υπολογίζεται από την αναλογία των ειδών του γάλακτος.

Σύμφωνα με τον Κώδικα Τροφίμων και Ποτών, άρθρο 85 ‘Ειδικόί όροι Συσκευασίας και Διάθεσης Γαλακτοκομικών Προϊόντων στην Κατανάλωση’:

Η συσκευασία του γιαουρτιού που διατίθεται στην κατανάλωση πρέπει να γίνεται ως εξής:

- a. Μέσα σε δοχεία από πλαστική εγκεκριμένη ύλη, γυαλί, ξύλο ή πήλινα εφυσωμένα, με την προϋπόθεση ότι η υάλωσή τους θα είναι συνεχής ή μέσα σε σάκους από επιτρεπόμενο πλαστικό υλικό, λευκό ύφασμα, ή ειδικό χαρτί που φέρει εσωτερική επένδυση από πλαστικό εγκεκριμένο υλικό.
- b. Όλα τα είδη συσκευασίας, εκτός από τα δοχεία από πλαστικό υλικό και τα είδη χάρτινης συσκευασίας του γιαουρτιού, μπορούν να επαναχρησιμοποιηθούν για την συσκευασία γιαουρτιού μετά από προηγούμενο επιμελή καθαρισμό τους.
- c. Όταν το γιαούρτι προσφέρεται χύμα, τα όργανα που χρησιμοποιούνται για τη διάθεσή του στην κατανάλωση πρέπει να είναι απόλυτης καθαριότητας και να φέρει επιγραφή που δηλώνει το είδος του.
- d. Το γιαούρτι, ανεξαρτήτως της συσκευασίας, πρέπει να διατηρείται μέσα σε χώρους που προστατεύονται από τις εξωτερικές επιδράσεις, δηλαδή μέσα σε ψυγεία και προθήκες κατάλληλες για το σκοπό αυτό.

3.2 Τύποι γιαουρτιού

Οι τύποι γιαουρτιού διακρίνονται ανάλογα με τη χημική τους σύνθεση, τη μέθοδο παραγωγής, τη γεύση αλλά και τη διαδικασία που ακολουθείται μετά την επώαση. Σύμφωνα με τη χημική σύνθεση, τα γιαούρτια μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις τύπους με βάση την περιεκτικότητά τους σε λιπαρά. Συγκεκριμένα, διαχωρίζονται σε πλήρη, και μεσαίας ή χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά (FAO/WHO, 1973). Αυτή η ταξινόμηση διευκολύνει την τυποποίηση του προϊόντος και την προστασία του καταναλωτή.

Βέβαια, με βάση τη μέθοδο παραγωγής και τη φυσική δομή του πήγματος, τα γιαούρτια διακρίνονται σε δύο βασικούς τύπους: στο γιαούρτι τύπου σεντ και στο αναμειγμένο (stirred). Στο γιαούρτι σεντ, η ζύμωση και η ψύξη του πραγματοποιείται εντός της συσκευασίας, ενώ στο αναμειγμένο έχει προηγηθεί η ζύμωση και ακολουθεί η συσκευασία. Επίσης, η υφή των δύο ειδών διαφέρει σημαντικά, καθώς στο γιαούρτι σεντ η υφή είναι στιβαρή, ενώ στο αναμειγμένο η υφή είναι λιγότερο σταθερή, καθώς έχει προηγηθεί η ανάδευση.

Ανάλογα με τη γεύση, τα γιαούρτια χωρίζονται σε τρεις κύριες κατηγορίες. Η πρώτη κατηγορία είναι η απλή ή φυσική, στην οποία ανήκουν τα παραδοσιακά γιαούρτια. Η δεύτερη κατηγορία είναι τα γιαούρτια με φρούτα, τα οποία παρασκευάζονται προσθέτοντας φρούτα, υπό την μορφή κομπόστας, πουρέ ή μαρμελάδας. Τέλος, υπάρχουν και τα αρωματισμένα γιαούρτια, τα οποία παρασκευάζονται με προσθήκη ζάχαρης ή άλλων γλυκαντικών, συνθετικών αρωματικών και χρωστικών σε φυσικό γιαούρτι.

Ανάλογα με την επεξεργασία μετά την επώαση μπορούν να δημιουργηθούν διάφοροι τύποι γιαουρτιού. Κυρίως χάρη σε αυτή την επεξεργασία υπάρχουν εξελίξεις στον τομέα και κάποια τυπικά παραδείγματα αυτών είναι το παστεριωμένο, το συμπυκνωμένο, το κατεψυγμένο και το αφυδατωμένο γιαούρτι.

Το ‘στραγγιστό’ γιαούρτι είναι αυτό που συχνά ονομάζεται και ‘Greek yogurt’. Η διαδικασία του εμβολιασμού και της ζύμωσής του είναι παρόμοια με αυτή του αναμειγμένου γιαουρτιού. Όμως, υπάρχει μερικός διαχωρισμός της υγρής φάσης που επιτυγχάνεται με θέρμανση. Η δημοτικότητά του βασίζεται κυρίως στην υψηλή του περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες. Μερικές φορές σχηματίζεται κρούστα στην επιφάνεια του δοχείου η οποία χαρακτηρίζει το παραδοσιακό ελληνικό γιαούρτι. Η κρούστα αυτή αποτελείται από λίπος και πρωτεΐνες και η δημιουργία της οφείλεται στο γεγονός ότι έχει χρησιμοποιηθεί μη ομογενοποιημένο γάλα (Desai et al., 2013).

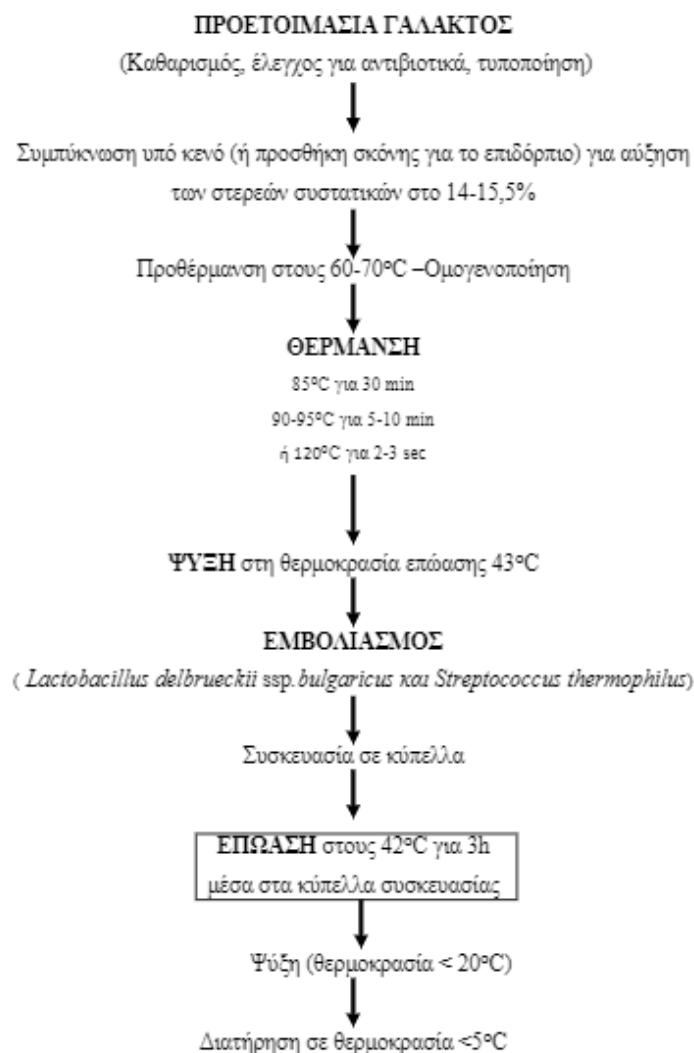
Το παγωμένο γιαούρτι (frozen yogurt) είναι ένα προϊόν του οποίου η φυσική κατάσταση μοιάζει περισσότερο με παγωτό και λιγότερο με γιαούρτι. Όμως, ως προς τη χημική σύνθεση και στη δημιουργία του μέχρι το στάδιο της κατάψυξης μοιάζει με εκείνη του συμβατικού γιαουρτιού. Ωστόσο, στο κατεψυγμένο γιαούρτι, απαιτούνται υψηλές ποσότητες ζάχαρης και σταθεροποιητών ή/και γαλακτοματοποιητών, έτσι ώστε να διατηρηθεί η δομή του κατά τη διάρκεια της διαδικασίας κατάψυξης. Γενικά, ο τρόπος παρασκευής του παγωμένου γιαουρτιού διαφέρει ανάλογα με την χώρα. Για παράδειγμα, στις Ηνωμένες Πολιτείες το κατεψυγμένο γιαούρτι είναι ένα μείγμα 90%

μείγματος παγωτού και μόνο 10% απλού γιαουρτιού, του οποίου το pH κυμαίνεται γύρω στο 6 και έχει περισσότερο γεύση παγωτού (Chandan and Kilara, 2013). Ενώ σε κάποιες άλλες αγορές, το κατεψυγμένο γιαούρτι παρασκευάζεται από 100% απλό γιαούρτι και έχει pH χαμηλότερο από 4,5.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το αφυδατωμένο γιαούρτι το οποίο μπορεί να παραχθεί με ξήρανση με ψεκασμό ή ξήρανση με κατάψυξη (Robinson and Tamime, 1975). Παράγεται σε πολλές αγροτικές περιοχές στη Μέση Ανατολή όπου το γάλα που περισσεύει κατά τους καλοκαιρινούς μήνες μετατρέπεται σε γιαούρτι και διατηρείται για κατανάλωση κατά τους χειμερινούς μήνες.

3.3 Διαδικασία παραγωγής γιαουρτιού

Γενικά, η παραγωγική διαδικασία του γιαουρτιού ακολουθεί κάποια βασικά βήματα, ανεξαρτήτως του τύπου του γιαουρτιού. Φυσικά, ανάλογα με τον τύπο του γιαουρτιού η διαδικασία διαφοροποιείται ελαφρώς. Παρακάτω απεικονίζεται το διάγραμμα ροής για το παραδοσιακό γιαούρτι.



Διάγραμμα 3.3.1: Διάγραμμα ροής παραγωγής γιαουρτιού

i. Παραλαβή του γάλακτος

Αρχικά, συλλέγεται το γάλα που θα χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή του γιαουρτιού. Η πρώτη ύλη που θα χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή του γιαουρτιού είναι ζωτικής σημασίας, καθώς η ποιότητα του γάλακτος μπορεί να επηρεάσει τη χημική και μικροβιολογική ποιότητα του γιαουρτιού. Κατά τη διαδικασία άμελης και μέχρι το γάλα να παραληφθεί στη γαλακτοβιομηχανία, υπάρχει κίνδυνος μόλυνσης αυτού, καθώς σε εκείνα τα στάδια πραγματοποιείται ανάπτυξη βακτηρίων. Όμως, αν τηρηθούν τα απαραίτητα μέτρα μπορεί να αποφευχθεί η μόλυνση του γάλακτος.

ii. Τυποποίηση της περιεκτικότητας σε λιπαρά στο γάλα

Η περιεκτικότητα σε λιπαρά στο γάλα μπορεί να ποικίλει ανάλογα με την εποχή και για αυτό είναι απαραίτητη η τυποποίησή τους, ώστε να πληρούνται ικανοποιούνται τα όρια για τα λιπαρά που έχουν οριστεί για το γιαούρτι. Σύμφωνα με τους κανονισμούς, η περιεκτικότητα σε λιπαρά πρέπει να είναι από 0,1% έως 10% (Yildiz 2016). Η τυποποίηση μπορεί να επιτευχθεί με τους εξής τρόπους:

- αφαίρεση μέρους των λιπαρών από το γάλα, ώστε να μειωθεί η περιεκτικότητα σε λιπαρά
- ανάμειξη πλήρους γάλακτος με αποβουτυρωμένο γάλα,
- και / ή προσθήκη κρέμας σε γάλα πλήρους λίπους ή αποβουτυρωμένο γάλα.

iii. Τυποποίηση της περιεκτικότητας σε SNF στο γάλα

Ο όρος SNF αναφέρεται στα στερεά του γάλακτος εκτός του λίπους, δηλαδή στα υπόλοιπα συστατικά του γάλακτος, όπως είναι οι πρωτεΐνες, η λακτόζη και οι βιταμίνες.

iv. Ομογενοποίηση

Η ομογενοποίηση αποτελεί σημαντικό στάδιο επεξεργασίας για τα γιαούρτια που περιέχουν λιπαρά. Μετά το στάδιο της τυποποίησης, το γάλα οδηγείται στον ομογενοποιητή όπου τα μεγάλα λιποσφαιρίδια διαχωρίζονται σε αντίστοιχα μικρότερης διαμέτρου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να αποτρέπεται η δημιουργία της κρέμας του λίπους του γάλακτος, αλλά και η τάση των σφαιριδίων λίπους προς συνένωση ή συσσώρευση (Vedamuthu, 1991). Η ομογενοποίηση του γάλακτος πραγματοποιείται σε πιέσεις 100 έως 250 bar, ενώ η θερμοκρασία κυμαίνεται μεταξύ 55 και 80 °C. Η βέλτιστη θερμοκρασία για ομογενοποίηση είναι στους 60-70 °C, όπου τα λιπαρά του γάλακτος βρίσκονται σε υγρή μορφή. Η ομογενοποίηση συμβάλλει σε αύξηση του λευκού χρώματος του γάλακτος, στη βελτίωση της αίσθησης στο στόμα του προϊόντος, και στην αύξηση του ιξώδους και της σταθερότητας αυτού.

Ωστόσο, σε κάποια γιαούρτια ελληνικά παραδοσιακά όπως και στα φυσικά γιαούρτια πλήρους γάλακτος, δεν πραγματοποιείται ομογενοποίηση, επειδή η δημιουργία στρώματος κρέμας στην κορυφή είναι επιθυμητή.

v. Θερμική κατεργασία γάλακτος

Το γάλα θα υποστεί θέρμανση για ένα χρονικό διάστημα, ώστε να εξαλειφθούν οι παθογόνοι και άλλοι ανεπιθύμητοι μικροοργανισμοί. Το στάδιο αυτό επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό τις φυσικές ιδιότητες και την μικροδομή του γιαουρτιού. Οι συνδυασμοί θερμοκρασίας/χρόνου για τις θερμικές επεξεργασίες που χρησιμοποιούνται συνήθως στη βιομηχανία γιαουρτιού είναι στους 85 ° C για 30 min (Tamime and Robinson, 1999). Βέβαια, πέραν της παστερίωσης, η θερμική επεξεργασία συνεισφέρει και στην

απομάκρυνση του διαλυμένου οξυγόνου, βοηθώντας έτσι την ανάπτυξη της καλλιέργειας εκκίνησης του γιαουρτιού, που είναι ευαίσθητη στο οξυγόνο.

vi. Επώαση/ζύμωση

Μετά από τη θερμική κατεργασία, το γάλα ψύχεται στη θερμοκρασία επώασης που είναι κατάλληλη για την ανάπτυξη της καλλιέργειας εκκίνησης και έπειτα εμβολιάζεται με την καλλιέργεια εκκίνησης. Η βέλτιστη θερμοκρασία των θερμοφίλων βακτηρίων γαλακτικού οξέος (*Streptococcus thermophilus* και *Lactobacillus bulgaricus*) είναι περίπου 40-45 ° C. Κατά τη διάρκεια της επώασης, η ανάπτυξη της καλλιέργειας εκκίνησης οδηγεί σε αύξηση του μικροβιακού περιεχομένου του συστήματος από 10^8 σε 10^{10} CFU g⁻¹. Η βακτηριακή ζύμωση μετατρέπει τη λακτόζη σε γαλακτικό οξύ, το οποίο μειώνει το pH του γάλακτος, από 6,7 σε τουλάχιστον 4,6. Ο χρόνος της ζύμωσης ποικίλλει ανάλογα με τη θερμοκρασία, τον τύπο του τελικού προϊόντος και τη συγκέντρωση των καλλιεργείων εκκίνησης στο μείγμα. Να σημειωθεί ότι το γιαούρτι τύπου σετ θα υποστεί το στάδιο της ζύμωσης μετά την συσκευασία.

vii. Ψύξη και αποθήκευση

Η δραστηριότητα της καλλιέργειας εκκίνησης μπορεί να ελεγχθεί γρήγορα ψύχοντας το γιαούρτι σε θερμοκρασία χαμηλότερη των 10 °C. Έτσι, ελέγχεται η ανάπτυξη των οξέων, αφού έχει επιτευχθεί η επιθυμητή τιμή pH (Tamime and Robinson, 1999).

Η προσθήκη φρούτων ή άλλων αρωματικών συστατικών, εάν περιέχονται, γίνονται σε αυτό το στάδιο και έπειτα ακολουθεί ψύξη για 10 με 12 h σε θερμοκρασία χαμηλότερη των 10 °C. Ο ρυθμός με τον οποίο πραγματοποιείται η ψύξη είναι αρκετά σημαντικός παράγοντας, καθώς η υπερβολικά γρήγορη ψύξη μπορεί να προκαλέσει τον διαχωρισμό του ορού γάλακτος κατά την αποθήκευση.

Τα φρούτα τα οποία προστίθενται στα γιαούρτια είναι κατά βάση επεξεργασμένα, καθώς τα φρέσκα φρούτα είναι ευαλλοιώτα.

viii. Συσκευασία και αποθήκευση

Έπειτα ακολουθεί η συσκευασία του γιαουρτιού και η αποθήκευσή του σε θερμοκρασία ψύξης (Tamime & Robinson 1999).

3.4 Διαδικασία ζύμωσης

Η διαδικασία της ζύμωσης αποτελεί το πιο σημαντικό στάδιο για την παραγωγή του γιαουρτιού. Το στάδιο αυτό ευθύνεται για την πήξη, την ιδιαίτερη γεύση και τα

χαρακτηριστικά του γιαουρτιού. Η διαδικασία της ζύμωσης βασίζεται στην καλλιέργεια εκκίνησης, που συνήθως είναι τα βακτήρια *Streptococcus thermophilus* και *Lactobacillus bulgaricus*, που προκαλούν την πήξη και την ανάπτυξη της χαρακτηριστικής γεύσης (Radke-Mitchell, 1984).

Το βακτηριακό στέλεχος *Streptococcus thermophilus* είναι Gram θετικό και συνήθως θεωρείται θερμοφιλό, όμως καθώς η βέλτιστη θερμοκρασία για την ανάπτυξή του είναι 35-53 ° C, μπορεί να θεωρηθεί ως θερμοανθεκτικό. Τα κύτταρά του έχουν σφαιρικό σχήμα και στο αρχικό στάδιο σχηματίζουν αλυσίδες και καθώς ωριμάζουν αναπτύσσουν μία μορφολογία τύπου ράβδου ευνοώντας την αποικιακή ανάπτυξη. Το βακτηριακό στέλεχος *Lactobacillus bulgaricus* έχει σχήμα ράβδου, είναι θετικό κατά Gram, και αναερόβιο, ενώ η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης είναι 40–44 ° C. Τέλος, είναι ικανό να παράγει μεγάλες ποσότητες γαλακτικού οξέος μεταβολίζοντας τη λακτόζη. Αυτά τα δύο είδη στο περιβάλλον του γάλακτος συνεργάζονται μεταβολίζοντας τη λακτόζη προς γαλακτικό οξύ και προκαλώντας τη μείωση του pH του γάλακτος.

Η συνεργασία (συνέργεια) μεταξύ των βακτηρίων αυτών βασίζεται στα ατομικά χαρακτηριστικά τους επιτυγχάνοντας καλύτερο μεταβολισμό της λακτόζης και περισσότερη παραγωγή γαλακτικού οξέος από ότι εάν δρούσαν χωριστά. Το στέλεχος *Streptococcus thermophilus* διαθέτει μεγαλύτερη δραστηριότητα πεπτιδάσης, αλλά στερείται καλής πρωτεολυτικής ικανότητας σε σύγκριση με το στέλεχος *Lactobacillus bulgaricus*. (Tamine A.Y and Robinson R.K, 1999).

Στο γάλα η ανάπτυξη των δύο βακτηρίων γίνεται σταδιακά. Αρχικά, το βακτήριο *Streptococcus thermophilus* αναπτύσσεται έντονα, ενώ το *Lactobacillus bulgaricus* αναπτύσσεται αργά. Κατά την ανάπτυξη του *S.thermophilus*, λόγω της μεγάλης πρωτεολυτικής του δράσης, δημιουργεί μια αφθονία πεπτιδίων για να διεγείρει την ανάπτυξη του *L.bulgaricus*. Έπειτα, όταν το pH του γιαουρτιού πλησιάζει την τιμή 5.0, η δραστηριότητα του *S.thermophilus* υποχωρεί και το *L. bulgaricus* κυριαρχεί σταδιακά στη διαδικασία της ζύμωσης έως ότου επιτευχθεί η τιμή στόχου του pH και η διαδικασία ζύμωσης σταματήσει. Κανονικά, η διαδικασία της ζύμωσης σταματά μειώνοντας τη θερμοκρασία στους 4 ° C, καθώς σε αυτή την θερμοκρασία ναί μεν η καλλιέργεια είναι ακόμα ζωντανή, αλλά η δραστηριότητά της περιορίζεται δραστικά ώστε να είναι υπό έλεγχο τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά κατά την αποθήκευση και τη διανομή του γιαουρτιού.

Η διαδικασία της ζύμωσης του γάλακτος του γιαουρτιού μπορεί να περιγραφεί με την εξέλιξη του pH και του ιζώδους σε σχέση με τον χρόνο. Το μοντέλο που εκφράζει την εξέλιξη του pH κατά τη διάρκεια της ζύμωσης είναι το τροποποιημένο μοντέλο Gompertz of de Brabandere και de Baerdemaeker (1999):

$$pH = pH_0 + (pH_0 - pH_\infty) \left\{ - \exp \left[\frac{\mu_{pH}}{(pH_0 - pH_\infty)} (\lambda_{pH} - t) + 1 \right] \right\}$$

Όπου: pH_0 , pH_∞ = αρχική και τελική τιμή του pH, αντίστοιχα

μ_{pH} (min^{-1}) = μέγιστος ρυθμός μείωσης του pH

λ_{pH} (min) = διάρκεια της λανθάνουσας φάσης του pH

3.5 Διατροφική αξία γιαουρτιού

Το γιαούρτι έχει παρόμοια σύνθεση με αυτή του γάλακτος από το οποίο παρασκευάζεται και έτσι είναι μία εξαιρετική πηγή υψηλής ποιότητας πρωτεΐνης, ασβεστίου, φωσφόρου, μαγνησίου, ψευδαργύρου και των βιταμινών Β (Β2, Β12 και Β3). Ωστόσο, υπάρχουν κάποιες διαφορές μεταξύ γάλακτος και γιαουρτιού, οι οποίες φαίνονται στην παρακάτω εικόνα:

Nutrients	Whole milk	Whole milk plain yogurt	Low fat plain yogurt	Very low fat/low calorie flavoured yogurt	Greek yogurt	Plain fromage frais
Energy (kcal)	66	79	56	41	115	113
Protein (g)	3.1	5.7	5.1	4.3	6.4	6.8
Fat (g)	3.9	3.0	0.8	0.2	9.1	7.1
Calcium (mg)	115	200	190	130	150	89
Zinc (mg)	0.4	0.7	0.6	0.4	0.5	0.3
Phosphorus (mg)	92	170	160	110	130	110
Magnesium (mg)	11	19	19	13	12	8
Vitamin A (µg)	56	31	9	Trace	121	100
Thiamin (mg)	0.04	0.06	0.05	0.04	0.03	0.04
Riboflavin (mg)	0.17	0.27	0.25	0.29	0.36	0.40
Niacin (mg)	0.83	1.51	1.35	1.13	1.57	1.72
Folate (µg)	6	18	17	8	6	15
Vitamin B12 (µg)	0.4	0.2	0.2	0.2	0.2	1.4

Source: The 4th supplement (Milk Products and Eggs) to McCance and Widdowson's *The Composition of Foods* (1989).

Εικόνα 3.5.1: Σύσταση γάλακτος και γιαουρτιού

Οι διαφορές αυτές στη σύσταση μπορεί να οφείλονται σε αλλαγές που έχουν προκληθεί από τα βακτήρια της καλλιέργειας εκκίνησης κατά την ζύμωση, ή σε απελευθέρωση θρεπτικών ουσιών ή άλλων ουσιών από τα βακτήρια της καλλιέργειας εκκίνησης, ή/και στην προσθήκη άλλων συστατικών κατά τη διάρκεια της παρασκευής του γιαουρτιού (π.χ. φρούτων) ή στις συνθήκες αποθήκευσης.

Βέβαια, οι θρεπτικές ιδιότητες του γιαουρτιού παραμένουν παρόμοιες, ανεξαρτήτως του είδους του γιαουρτιού σύμφωνα με τη μέθοδο παραγωγής, δηλαδή ανεξαρτήτως αν είναι αναμεμιγμένο ή τύπου σεντ. Όμως, η σύσταση του εκάστοτε γιαουρτιού μπορεί να επηρεαστεί από την επιλογή της καλλιέργειας εκκίνησης που χρησιμοποιείται σε κάθε περίπτωση.

Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, ένα ποσοστό της λακτόζης του γάλακτος (περίπου το 20-30%) υδρολύεται στα συστατικά της σάκχαρα, γλυκόζη και γαλακτόζη, από τα βακτήρια της καλλιέργειας. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, τα επίπεδα λακτόζης στο γιαούρτι να είναι χαμηλότερα από ότι στο γάλα, εκτός και αν έχει προστεθεί αποβουτυρωμένο γάλα σε σκόνη ή στερεά γάλακτος χωρίς λιπαρά.

Γενικά, όπως γίνεται αντιληπτό από τη σύσταση του γάλακτος και του γιαουρτιού (εικόνα 3.5.1), το γιαούρτι έχει μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες, το οποίο κυρίως αποδίδεται σε προσθήκη συστατικών κατά την παρασκευή του (π.χ. σκόνη από άπαχο γάλα). Οι πρωτεΐνες (καζεΐνες και ορού γάλακτος) συσσωματώνονται, αυξάνοντας τη συνοχή του γιαουρτιού.

Η πρωτεΐνη είναι γνωστό ότι αποτελείται από αμινοξέα. Σχεδόν η συνολική συγκέντρωση των αμινοξέων είναι παρόμοια στο γιαούρτι και στο γάλα, αλλά λόγω της πρωτεολυτικής δράσης της βακτηριακής καλλιέργειας κατά τη ζύμωση αφομοιώνεται μερικώς η πρωτεΐνη, με αποτέλεσμα να υπάρχει μεγαλύτερη αναλογία ελεύθερων αμινοξέων στο γιαούρτι, κατά κύριο λόγο προλίνης και γλυκίνης. Κατά την ζύμωση μετατρέπεται η πρωτεΐνη του γιαουρτιού σε πιο εύπεπτη μορφή.

Το συνολικό περιεχόμενο ενέργειας (Energy) του γιαουρτιού αντικατοπτρίζει την περιεκτικότητα σε λιπαρά του γάλακτος που χρησιμοποιήθηκε για να παρασκευαστεί, αλλά και την προσθήκη τυχόν συστατικών όπως κρέμας ή ζάχαρης.

Η περιεκτικότητα σε βιταμίνες του γιαουρτιού ποικίλλει ανάλογα με τον τύπο του γάλακτος που χρησιμοποιείται, με το στέλεχος των βακτηρίων και με τις συνθήκες ζύμωσης. Η περιεκτικότητα του γάλακτος σε μέταλλα παρότι δεν επηρεάζεται ιδιαίτερα από την ζύμωση, αλλά λόγω της μείωσης του pH αυτά τα μέταλλα είναι σε ιοντική αντί για κolloειδή μορφή. Έτσι, το γιαούρτι είναι μία εξαιρετική πηγή πολλών ανόργανων συστατικών, κυρίως ασβεστίου, ψευδαργύρου, φωσφόρου και μαγνησίου.

3.6 Οφέλη του γιαουρτιού στην υγεία

Τα γαλακτοκομικά προϊόντα που έχουν υποστεί ζύμωση, όπως τα γιαούρτια καταναλώνονται για αρκετές χιλιάδες χρόνια και η πεποίθηση ότι είναι ευεργετικά για την υγεία του ανθρώπου ανάγεται στην αρχαιότητα. Τα ζυμωμένα γαλακτοκομικά προϊόντα διαθέτουν βελτιωμένη διατροφική αξία συγκριτικά με το γάλα, αυξάνοντας την πεπτικότητα και την αφομοίωση των θρεπτικών συστατικών. Τα κυριότερα οφέλη κατανάλωσης του γιαουρτιού για την υγεία των ανθρώπων αναλύονται παρακάτω.

3.6.1 Διαβήτης τύπου 2

Η κατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων ανά τακτά διαστήματα μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης διαβήτη τύπου 2. Υπεύθυνα για αυτό το αποτέλεσμα είναι η περιεκτικότητα του γιαουρτιού σε ασβέστιο και μαγνήσιο.

3.6.2 Παχυσαρκία & Διαχείριση του βάρους

Η κατανάλωση του γιαουρτιού μπορεί να συμβάλλει στη μείωση της πιθανότητας για αύξηση του βάρους αλλά και για εμφάνιση παχυσαρκίας, καθώς βοηθάει στον έλεγχο του σωματικού βάρους.

Η υγεία του εντέρου και η παχυσαρκία φαίνεται να σχετίζονται (Re et al. 2006). Το γιαούρτι αποτελεί μία καλή τροφή για την σωστή λειτουργία του εντέρου. Μελέτες έχουν δείξει ότι η κατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων ως μέρος της καθημερινής διαίτας σχετίζεται με αυξημένη απώλεια βάρους.

3.6.3 Γαστρεντελογικά οφέλη

I. Πέψη λακτόζης

Το ένζυμο λακτάση είναι υπεύθυνο για την πέψη της λακτόζης. Κανονικά, η δισακχαρίτης λακτόζη υδρολύεται σε γλυκόζη και γαλακτόζη με λακτάση και στη συνέχεια απορροφάται στο λεπτό έντερο. Άτομα με δυσανεξία στη λακτόζη ανέχονται τη λακτόζη στο γιαούρτι καλύτερα από την ίδια ποσότητα λακτόζης στο γάλα, γεγονός που συμβαίνει διότι μέρος της λακτόζης μεταβολίζεται κατά την ζύμωση. Βέβαια, η πλειονότητα της λακτόζης παραμένει άθικτη, όμως διασπάται εύκολα σε απορροφήσιμη γλυκόζη και γαλακτόζη από το ένζυμο λακτάση της καλλιέργειας (Morelli, 2014). Τέλος, κλινικές μελέτες σε ανθρώπους έχουν δείξει ότι μετά την κατανάλωση γιαουρτιού από άτομα με δυσανεξία στη λακτόζη, παρατηρείται αυξημένη δραστηριότητα λακτάσης στο λεπτό έντερο των ανθρώπων (Savaiano, 2014; Prentice, 2014).

II. Συνολική πέψη και διατροφική ενίσχυση

Το γιαούρτι είναι πλούσιο σε βιταμίνες A, B2, B1, B6 και B12, (Chandan, 2016) ενώ επίσης τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος διαθέτουν την ικανότητα να συνθέτουν βιταμίνες της ομάδας B, όπως το φολικό οξύ, κατά την ζύμωση (Le Blanc et al., 2013). Το γιαούρτι είναι πιο εύπεπτο γιατί βοηθά στην πέψη της λακτόζης και των πρωτεϊνών. Σε σύγκριση με το γάλα, η περιεκτικότητα του γιαουρτιού σε γαλακτικό οξύ και σε βιταμίνη B βοηθούν στην περαιτέρω συνολική πέψη.

III. Πρόληψη και θεραπεία της διάρροιας

Η καθιέρωση προβιοτικών στη γαστρεντερική οδό μπορεί να παρέχει προφυλακτικά και θεραπευτικά οφέλη κατά των εντερικών λοιμώξεων. Η διάρροια είναι συνήθης σε ασθενείς που λαμβάνουν αντιβιοτικά. Αυτό οφείλεται σε μία μικροβιακή ανισορροπία που οδηγεί σε μείωση της ικανότητας ζύμωσης στο παχέος παχύ έντερο. Εκτός από τα αντιβιοτικά, η διάρροια είναι η πιο συχνή λοίμωξη που σχετίζεται με τα ταξίδια, γνωστή ως 'η διάρροια των ταξιδιωτών'. Επισκέπτες από χώρες με εύκρατα κλίματα σε περιοχές με τροπικά ή υποτροπικά κλίματα παρουσιάζουν υψηλό βαθμό διάρροιας. Το ποσοστό που εμφανίσει προσεγγίζει συχνά το 50%. Τα προβιοτικά μπορεί να έχουν ρόλο στην παράκαμψη της διάρροιας των ταξιδιωτών. Ενώ επιπλέον, το γιαούρτι ενισχυμένο με προβιοτικά μειώνει την διάρκεια ορισμένων τύπων διάρροιας.

IV. Λιπώδης ηπατική νόσος

Μελέτες έχουν προτείνει ότι τα προβιοτικά μπορεί να έχουν ευεργετικά αποτελέσματα στη θεραπεία και πρόληψη της μη αλκοολικής λιπώδους ηπατικής νόσου (NAFLD) και άλλων ηπατικών επιπλοκών (Mohammadmoradi et al., 2014). Αυτό οφείλεται στην ικανότητά τους να αυξάνουν τη λειτουργία του εντερικού φραγμού, να αποτρέπουν την παραγωγή λιποπολυσακχαριτών (LPSs) και να ρυθμίζουν το ανοσοποιητικό σύστημα. Η κατανάλωση γιαουρτιού εμπλουτισμένου με προβιοτικά βελτίωσε τα επίπεδα ηπατικών ενζύμων, χοληστερόλης στον ορό και χοληστερόλης LDL. Η προβιοτική θεραπεία μπορεί να μειώσει την αμινοτρανσφεράση του ήπατος, τη συνολική χοληστερόλη και να βελτιώσει την αντίσταση στην ινσουλίνη σε ασθενείς με NAFLD (Ma et al. 2013).

3.6.4 Μείωση των καρδιομεταβολικών νόσων και της χοληστερόλης

Η κατανάλωση του γιαουρτιού ως μέρος μιας υγιούς διατροφής μπορεί να συμβάλλει στην πρόληψη των καρδιαγγειακών παθήσεων (Astrup, 2014; Marette and Pickard-Deland, 2014). Λόγω της βιοδιαθεσιμότητας του ασβεστίου και καλίου, το γιαούρτι αποτρέπει την υψηλή αρτηριακή πίεση.

Τα προβιοτικά βακτήρια βοηθούν στη μείωση μερικών επιπέδων χοληστερόλης στο αίμα. Συγκεκριμένα έχει αποδειχθεί ότι ορισμένα είδη βακτηρίων γαλακτικού οξέος, ιδίως οι λακτοβάκιλλοι, μπορούν να μειώσουν τη συνολική χοληστερόλη και τη λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας (LDL) χοληστερόλη (Beserra et al 2014).

3.6.5 Δομή και ακεραιότητα οστών

Η κατανάλωση του γιαουρτιού βελτιώνει την υγεία των οστών και μειώνει τον κίνδυνο καταγμάτων στη μετέπειτα ζωή. Το γάλα είναι μία από τις πλουσιότερες πηγές ασβεστίου και η απορρόφηση του ασβεστίου από το γάλα είναι καλύτερη από άλλα προϊόντα. Αν και η ζύμωση δεν μεταβάλλει την περιεκτικότητα σε μέταλλα, η αξιοποίηση ορισμένων μετάλλων στο ανθρώπινο σώμα επιτυγχάνεται καλύτερα από το γιαούρτι από ότι με το γάλα. Πιστεύεται ότι απελευθερώνονται πεπτίδια από τη διάσπαση της καζεΐνης και επιταχύνεται η απορρόφηση των μετάλλων.

Το γαλακτικό οξύ έχει καθοριστικό ρόλο στην περιεκτικότητα σε ασβέστιο στα οστά και στην αντοχή των οστών. Είναι αποδεδειγμένο ότι η απορρόφηση ασβεστίου είναι υψηλότερη από το γάλα που έχει υποστεί ζύμωση σε σύγκριση με το πλήρες γάλα που δεν έχει υποστεί ζύμωση. Τα οφέλη για την υγεία του ανθρώπου από το ασβέστιο που περιέχει το γάλα είναι κυρίως η πρόληψη της οστεοπόρωσης και η ρύθμιση του μεταβολισμού των οστών. Ωστόσο, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι οι ποσότητες σε νάτριο και κάλιο καθιστούν το γιαούρτι ακατάλληλο για κατανάλωση από βρέφη.

Το γιαούρτι έχει βρεθεί ότι έχει υψηλότερη πεπτικότητα από το γάλα, το οποίο οφείλεται στο μειωμένο μέγεθος των σωματιδίων της πρωτεΐνης, στο αυξημένο διαλυτό άζωτο και στα ελεύθερα αμινοξέα που απελευθερώνονται κατά τη θερμική επεξεργασία του γάλακτος και κατά τη ζύμωση. Μία από τις βασικές λειτουργίες του

ασβεστίου μαζί με την πρωτεΐνη είναι η παροχή αντοχής και δομικών ιδιοτήτων στα οστά και τα δόντια (Zittermann, 2011).

3.6.6 Ανοσοποιητικές επιπτώσεις

Τα αρχικά βακτήρια που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή του γιαουρτιού μπορούν να επιβιώσουν στο γαστρεντερικό σωλήνα και έχουν ανιχνευτεί στα κόπρανα. Αυτό δείχνει ότι τα αρχικά βακτήρια μπορούν να συμβάλλουν στην προώθηση της υγείας του ανθρώπου με την κατανάλωση γιαουρτιού ή άλλων ζυμωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων.

Το έντερο είναι υπεύθυνο για την υγεία του μεγαλύτερου ποσοστού του ανοσοποιητικού συστήματος στο ανθρώπινο σώμα και το εντερικό σύστημα προστατεύει το σώμα από βακτηριακή και ιογενή λοίμωξη, καρκίνο και αλλεργίες. Η γαστρεντερική οδός περιλαμβάνει περίπου το 80% των κυττάρων που παράγουν αντισώματα και αποτελεί ζωτικό μέρος του αμυντικού μας συστήματος. Η εντερική οδός, που φιλοξενεί το μεγαλύτερο μέρος της εντερικής μικροχλωρίδας, προστατεύει από λοιμώξεις και έχει σημαντικό ρόλο στη συστηματική ανοσολογική λειτουργία.

Τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος έχει θεωρηθεί ότι κατέχουν καθοριστικό ρόλο στη διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος τροποποιώντας τη λειτουργία των ανοσοκυττάρων και ενεργοποιώντας τα μακροφάγα και τα κύτταρα 'φυσικοί δολοφόνοι', που είναι υπεύθυνα για την προστασία του οργανισμού από ξένους εισβολείς, όπως ο καρκίνος. Η κατανάλωση γιαουρτιού έχει συσχετιστεί με τη διέγερση της παραγωγής κυτοκινών στα κύτταρα του αίματος και την ενεργοποίηση των μακροφάγων.

3.6.7 Αντιαλλεργική επίδραση & μείωση της διάρκειας του κοινού κρυολογήματος

Η καθημερινή κατανάλωση στελεχών *B. lactis* μπορεί να βοηθήσει στη διαχείριση των αλλεργικών αντιδράσεων που αποδίδονται στην ύπαρξη γύρης (Singh et al 2013). Ενώ, επίσης, θεωρείται ότι το γιαούρτι είναι χρήσιμο για άτομα με αλλεργίες στις πρωτεΐνες του γάλακτος, καθώς οι πρωτεΐνες του γιαουρτιού έχουν μειωμένη αλλεργιογένεση (Stefka et al. 2014).

Το γάλα που έχει υποστεί ζύμωση με *L. bulgaricus* βρέθηκε ότι μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης του κοινού κρυολογήματος και της γρίπης (Makino et al. 2006)

3.6.8 Πρόληψη και θεραπεία της κολπίτιδας

Η κολπική μικροχλωρίδα αλλάζει δραστικά κατά τη διάρκεια της βακτηριακής λοίμωξης. Η φυσιολογική ουρηθρική, κολπική και τραχηλική χλωρίδα υγιών γυναικών μπορεί να εμποδίσει τη προσκόλληση ουροπαθογόνων βακτηρίων, σε αυτό φαίνεται ότι συμβάλλουν τα στελέχη *Lactobacillus*.

3.6.9 Προστασία από τον καρκίνο

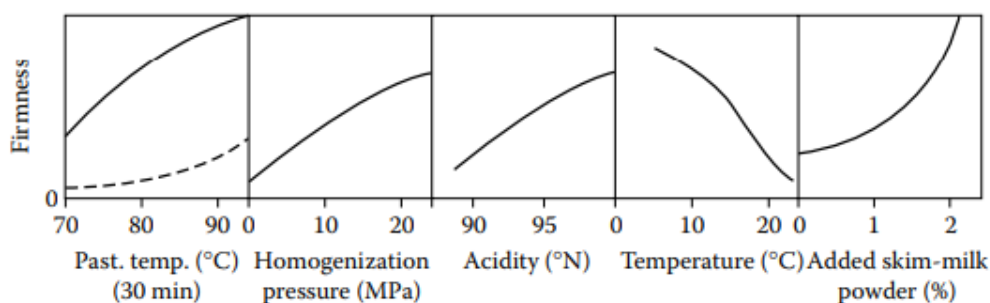
Ο καρκίνος αποτελεί μια από τις κυριότερες αιτίες θανάτων παγκοσμίως. Έχει αποδειχθεί ότι οι περιβαλλοντικοί παράγοντες και οι συνθήκες του τρόπου ζωής, όπως η διατροφή, παίζουν σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση του καρκίνου. Υπάρχουν αναφορές που υποδηλώνουν ότι τα γαλακτοκομικά προϊόντα που έχουν υποστεί ζύμωση ενδέχεται να προστατεύουν από ορισμένους τύπους καρκίνου. Αυτές οι αντικαρκινικές ιδιότητες αποδίδονται στη διέγερση των ανοσολογικών λειτουργιών του σώματος, καθώς και στη βελτίωση του πληθυσμού της εντερικής μικροχλωρίδας. Το *Bifidobacterium* και το *Lactobacillus*, ειδικά το *L. acidophilus*, έχει αποδειχθεί ότι έχουν ισχύ αντικαρκινογόνα, που τα καθιστά να είναι δραστικά έναντι ορισμένων όγκων (Lee et al., 1996).

3.7 Φυσικές ιδιότητες του γιαουρτιού

Η φυσική δομή του γιαουρτιού αποτελείται από ένα δίκτυο συσσωματωμένων σωματιδίων καζεΐνης, πάνω στο οποίο μέρος των πρωτεϊνών του ορού γάλακτος έχουν εναποτεθεί λόγω της θερμικής μετουσίωσής τους. Το δίκτυο περικλείει λιποσφαιρίδια και ορό γάλακτος και οι μεγαλύτεροι πόροι του είναι της τάξης των 10 μm. Η ύπαρξη ενός συνεχούς δικτύου υποδηλώνει ότι το γιαούρτι είναι ένα πήγμα ή αλλιώς ένα ιξωδοελαστικό υλικό που ενεργοποιείται από μία αρκετά μικρή τάση απόδοσης, περίπου 100 Pa. Στην περίπτωση του αναμεμειγμένου γιαουρτιού, το πήγμα διαλύεται και μπορεί να σχηματιστεί ένα παχύρρευστο γιαούρτι με υψηλό ιξώδες. Τα δύο διαφορετικά είδη γιαουρτιού, το σετ και το αναμεμειγμένο γιαούρτι, έχουν πολύ διαφορετική υφή.

3.7.1 Συνεκτικότητα σετ γιαουρτιού

Η σταθερότητα του σετ γιαουρτιού συνήθως μετριέται με την καταβύθιση ενός στελέχους δεδομένου βάρους και διαστάσεων στο προϊόν για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Η τιμή της συνεκτικότητας εξαρτάται από τη μέθοδο μέτρησης, ειδικά το χρονοδιάγραμμα, και από τα παρακάτω (Walstra et al. 2005):



Εικόνα 3.7.1: Εξάρτηση συνεκτικότητας από διάφορους παράγοντες

1. *Περιεκτικότητα του γάλακτος σε καζεΐνη*: Η συνεκτικότητα είναι ανάλογη με την περιεκτικότητα σε καζεΐνη. Η εξάτμιση του γάλακτος, η προσθήκη αποβουτυρωμένου γάλακτος σε σκόνη και η υπερδιήθηση αυξάνουν τη συνεκτικότητα.
2. *Περιεκτικότητα σε λιπαρά*: Όσο υψηλότερη είναι η περιεκτικότητα σε λιπαρά, τόσο ασθενέστερη είναι το πήγμα, καθώς τα λιποσφαίρια διακόπτουν το δίκτυο.
3. *Ομογενοποίηση*: Η ομογενοποίηση του γάλακτος έχει ως αποτέλεσμα την ενισχυμένη συνεκτικότητα.
4. *Θερμική επεξεργασία*: Η θερμική επεξεργασία του γάλακτος ενισχύει σημαντικά τη συνεκτικότητα. Το γάλα, γενικά, θερμαίνεται για 5 έως 10 min στους 85 ° C έως 90 ° C.
5. *Οξύτητα*: Γενικά, όσο χαμηλότερο είναι το pH, τόσο μεγαλύτερη η συνεκτικότητα του γιαουρτιού. Βέβαια, το pH πρέπει κυμαίνεται από 4,1 έως 4,6.
6. *Θερμοκρασία επώασης*: Όσο χαμηλότερη είναι η θερμοκρασία επώασης, τόσο περισσότερο χρόνο χρειάζεται για να επιτευχθεί ένα ορισμένο pH, και επομένως η συνεκτικότητα, όμως το τελικό το προϊόν είναι πολύ πιο σταθερό.

3.7.2 Συναίρεση

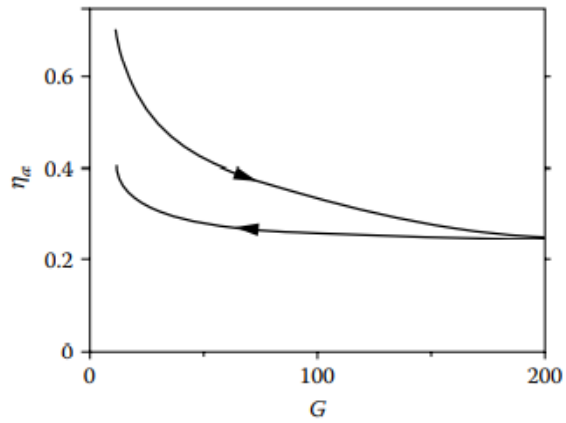
Η συναίρεση οφείλεται κατά κύριο λόγο στην αποβολή του υγρού αυθόρμητα από τα πήγματα. Όμως, στο γιαούρτι η συναίρεση είναι ανεπιθύμητη.

Η τάση εκδήλωσης της συναίρεσης εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη θερμοκρασία επώασης. Στην περίπτωση που το γάλα επωάζεται στους 20 ° C, με μεσοφιλικό εκκινητή, όπου τα βακτήρια του γιαουρτιού αναπτύσσονται σε αυτή τη θερμοκρασία, τότε το πήγμα σχηματίζεται σε αυτή τη θερμοκρασία και δεν εμφανίζεται συναίρεση. Ενώ κατά την επώαση στους 32 ° C, η συναίρεση είναι δυνατόν να εμφανιστεί. Κατά την επώαση στους 45 ° C, η συναίρεση μπορεί να προληφθεί εάν το γάλα έχει θερμανθεί έντονα, εάν έχει αυξηθεί η περιεκτικότητα σε καζεΐνη και εάν η θερμοκρασία αποθήκευσης είναι χαμηλή. Βέβαια, για να αποφευχθεί η συναίρεση είναι απαραίτητο να ληφθούν ορισμένα μέτρα σε όλη τη διαδικασία παραγωγής του γιαουρτιού (Walstra et al. 2005).

3.7.3 Ιξώδες αναμειγμένου γιαουρτιού

Το αναμειγμένο γιαούρτι είναι λείο και έχει μεγάλο ιξώδες. Το ιξώδες προσδιορίζεται εύκολα μέσω ενός κυπέλλου Ford. Η διαδικασία που ακολουθείται για την μέτρηση αρχίζει με μία δεδομένη ποσότητα γιαουρτιού, η οποία μπορεί να ρέει από ένα άνοιγμα στο κωνικό κάτω άκρο ενός κυπέλλου, και ο χρόνος που απαιτείται για αυτό είναι ένα μέτρο για το ιξώδες.

Αφού εφαρμοστεί υψηλός ρυθμός διάτμησης και έπειτα χαμηλότερος ρυθμός διάτμησης, παρατηρείται διαρκή μείωση του φαινομένου ιξώδους και η συμπεριφορά τείνει αυτή των νευτωνικών ρευστών. Ακόμα, το ιξώδες αυξάνεται με το ιξώδες του συνεχούς υγρού, διαλύτη ή ορού γάλακτος (Walstra et al. 2005). Στην εικόνα παρακάτω φαίνεται η εξάρτηση του φαινομένου ιξώδους με τον ρυθμό ανάδευσης:



Εικόνα 3.7.3.1: Φαινόμενο ιξώδες (η_a)-ρυθμός διάτμησης(G) πριν και μετά την ανάδευση

Σημαντικό είναι να αναφερθεί η αποφυγή της έντονης ανάδευσης του αναμειγμένου γιαουρτιού κατά τη διάρκεια περαιτέρω επεξεργασίας, με σκοπό την αποφυγή της υπερβολικής αραιώσης του προϊόντος.

4. Προβιοτικά βακτήρια

Ο όρος ‘προβιοτικά’ προέρχεται από την λατινική λέξη pro και την ελληνική λέξη βίος και σημαίνει ‘για τη ζωή’. Ο όρος αυτός θεωρείται ότι ορίστηκε από τον Kollath το 1953 για πρώτη φορά και χρησιμοποιήθηκε για να ορίσει όλα τα συμπλέγματα των τροφίμων, σε αντίθεση με τα επιβλαβή αντιβιοτικά. Το 1965 από τους Lilly και Stillwell, χρησιμοποιήθηκε ο όρος ‘προβιοτικά’ και προσδιόριζε τους ‘μικροοργανισμούς που προωθούν την ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών’. Ενώ, ο ορισμός, ο οποίος είναι περισσότερο ικανοποιητικός και προτείνεται, ορίζει τα βακτήρια ως ζωντανούς μικροοργανισμούς που είναι ευεργετικοί για την εντερική ισορροπία, εφόσον είναι επαρκείς σε αριθμό (FAO/WHO, 2002).

Τα προβιοτικά είναι κυρίως γνωστά από τον μέσο καταναλωτή ως ‘βιώσιμα παρασκευάσματα σε τρόφιμα ή σε συμπληρώματα διατροφής με σκοπό την βελτίωση της υγείας των ανθρώπων αλλά και των ζώων’. Ενώ, επίσης είναι γνωστά ως φαρμακευτικά σκευάσματα που περιέχονται σε κάψουλες και χρησιμοποιούνται για την αποκατάσταση του γαστρεντερικού πληθυσμού, π.χ. μετά ή κατά την διάρκεια μίας θεραπείας με αντιβιοτικά.

Βιώσιμα στελέχη, κυρίως του *Lactobacillus acidophilus* και του βακτηρίου *Bifidobacterium*, εισήχθησαν σε γαλακτοκομικά προϊόντα στη Γερμανία στα τέλη της δεκαετίας του 1960, λόγω της ευεργετικής τους ιδιότητας στο έντερο και της ικανότητας παραγωγής ελαφρώς οξινομένων γαουρτών.

4.1 Προβιοτικά στελέχη

Σήμερα, χρησιμοποιούνται εμπορικά πολλά είδη βακτηρίων, ενώ οι συνηθέστεροι οργανισμοί που χρησιμοποιούνται σε προβιοτικά παρασκευάσματα (τρόφιμα, φάρμακα) για χρήση σε ανθρώπους είναι βακτήρια του γαλακτικού οξέος (εικόνα 2.1.1). Στην περίπτωση των τροφίμων κατά βάση χρησιμοποιούνται στελέχη που ανήκουν στα γένη *Bifidobacterium* και *Lactobacillus*. Σε ορισμένες περιπτώσεις, χρησιμοποιούνται στελέχη που δεν ανήκουν στα βακτήρια γαλακτικού οξέος, για την παρασκευή φαρμακευτικών ειδών και συμπληρώματα ζωοτροφών.

<i>Lactobacillus</i> sp.	<i>Bifidobacterium</i> sp.	<i>Enterococcus</i> sp.	<i>Streptococcus</i> sp.
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Ent. faecalis</i>	<i>S. cremoris</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Ent. faecium</i>	<i>S. salivarius</i>
<i>L. delbrueckii</i> ssp. (<i>bulgaricus</i>)	<i>B. animalis</i>		<i>S. diacetylactis</i>
<i>L. cellobiosus</i>	<i>B. infantis</i>		<i>S. intermedius</i>
<i>L. curvatus</i>	<i>B. thermophilum</i>		
<i>L. fermentum</i>	<i>B. longum</i>		
<i>L. lactis</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. brevis</i>			

Εικόνα 4.1.1: Συνηθέστερα βακτήρια γαλακτικού οξέος σε προβιοτικά παρασκευάσματα

4.1.1 Βακτήρια γαλακτικού οξέος

Ο όρος βακτήρια γαλακτικού οξέος χρησιμοποιήθηκε αρχικά για τους ‘οργανισμούς που προέρχονται από γάλα’. Τα βακτήρια γαλακτικού οξέος (LAB) αποτελούν μια ομάδα θετικών κατά Gram βακτηρίων που έχουν παρόμοια μορφολογικά, μεταβολικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά. Είναι βακτήρια μη σποριογόνα, δεν παρουσιάζουν κίνηση συνήθως και έχουν την μορφή κόκκων ή ράβδων. Επίσης, μεταβολίζουν τα σάκχαρα και παράγουν γαλακτικό οξύ ως κύριο τελικό προϊόν κατά τη ζύμωση των υδατανθράκων. Τα γαλακτικά βακτήρια εντοπίζονται σε βλεννογόνες επιφάνειες υγιών ανθρώπων και ζώων.

Τα κύρια γένη των γαλακτικών βακτηρίων είναι τα *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* και *Streptococcus*. Η ταξινόμηση των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος σε γένη βασίζεται κυρίως στη μορφολογία, στον τρόπο ζύμωσης της γλυκόζης, στην ανάπτυξη σε διαφορετικές θερμοκρασίες, στη διαμόρφωση του μορίου του παραγόμενου γαλακτικού οξέος, στην ικανότητα να αναπτύσσονται σε υψηλές συγκεντρώσεις άλατος, και στην ανοχή σε οξέα ή αλκάλια.

4.1.2 Γένος *Lactobacillus*

Οι γαλακτοβάκιλλοι είναι από τους πιο διάσημους προβιοτικούς μικροοργανισμούς, λόγω της σχέσης τους με δημοφιλή ζυμωμένα γαλακτοκομικά προϊόντα και τα προϊόντα αυτά έχουν ευεργετικά αποτελέσματα για την υγεία. Επίσης, αποτελούν σημαντικό μέρος της βιομηχανίας τροφίμων, αφού συμβάλλουν στην παραγωγή τυριού και γιαουρτιού.

Οι λακτοβάκιλλοι είναι θετικοί κατά Gram και παράγουν γαλακτικό οξύ. Αν και είναι αναερόβιοι μπορούν να επιβιώσουν παρουσία οξυγόνου, ενώ ακόμα επιβιώνουν και σε χαμηλό pH. Οι γαλακτοβάκιλλοι έχουν ως τελικό προϊόν γαλακτικό οξύ, το οποίο κάνει το γένος *Lactobacillus* να είναι πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά. Τέλος,

σπάνια είναι παθογόνοι, ενώ τα ανθρώπινα στελέχη των γαλακτοβάκτιλλων αποτελούν μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του στόματος και του εντέρου.

4.1.3 Γένος *Bifidobacterium*

Το γένος *Bifidobacterium* είναι αναερόβια βακτήρια που παράγουν Gram θετικές ράβδους ή διακλαδισμένες ράβδους. Αποτελούν φυσιολογική χλωρίδα και είναι το κύριο μέλος της εντερικής χλωρίδας του βρέφους που θηλάζεται, ενώ μετά τον θηλασμό τα επίπεδα του μειώνονται. Τα *Bifidobacterium* μπορούν να αναπτυχθούν εύκολα στο γάλα, για αυτό τα προβιοτικά γαλακτοκομικά προϊόντα που περιέχουν *bifidobacterium* παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον. Τέλος, διαθέτουν την ικανότητα να επιβιώνουν κατά την διέλευση από την γαστρεντερική οδό και να επηρεάζουν ευεργετικά την λειτουργία του εντέρου.

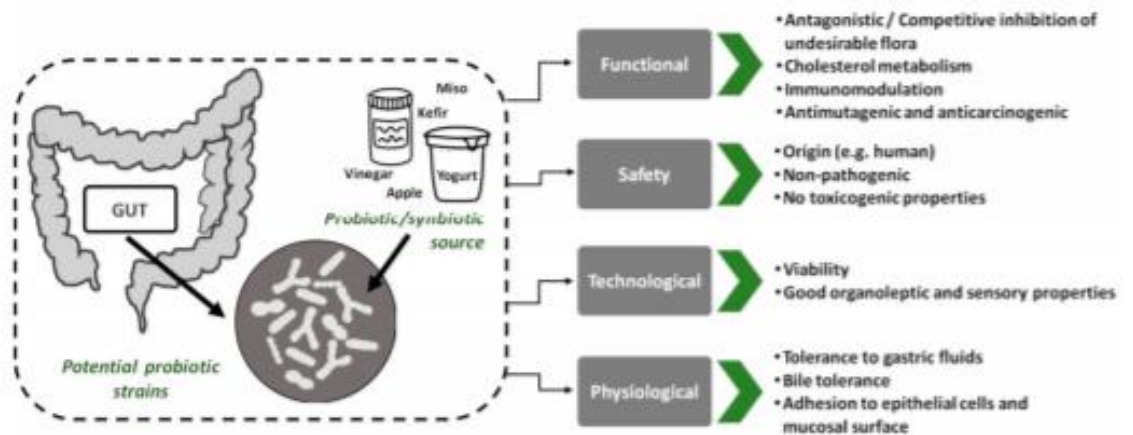
4.1.4 Κριτήρια επιλογής προβιοτικού βακτηρίου

Γενικά, τα προβιοτικά βακτήρια που χρησιμοποιούνται συνήθως ανήκουν στα γένη *Bifidobacterium* και *Lactobacillus*, αλλά και σε ένα ευρύ φάσμα βακτηρίων του γαλακτικού οξέος και άλλων μικροοργανισμών. Τα δύο αυτά γένη έχουν χρησιμοποιηθεί αρκετά ήδη με ασφάλεια και έχουν χαρακτηριστεί ως "γενικά αναγνωρισμένα ως ασφαλή" (GRAS). Τα προϊόντα διατροφής που συμπληρώνονται με προβιοτικά μπορούν να φέρουν ένα μόνο ή πολλά διαφορετικά βακτηριακά στελέχη.

Για να θεωρηθεί ένα βακτήριο ως προβιοτικό πρέπει να πληροί τα παρακάτω κριτήρια (FAO/WHO):

1. Γνώση των γενικών χαρακτηριστικών: ταυτοποίηση του είδους και γένους, καθώς είναι απαραίτητο για την ασφαλή χρήση τους και την γνώση των ιδιοτήτων τους.
2. Ιδιότητες ανάπτυξης τους *in vitro*, αλλά και κατά την επεξεργασία.
3. Βιωσιμότητα και επιβίωση κατά την μεταφορά και αποθήκευση τους.
4. Δυνατότητα επιβίωσης στις αντιμικροβιακές συνθήκες που επικρατούν στον γαστρεντερικό σωλήνα (pH 2,5, γαστρικό οξύ, χολικά άλατα, παγκρεατικά υγρά).
5. Ευεργετική επίδραση στον ξενιστή.
6. Σταθεροποίηση της εντερικής μικροχλωρίδας, παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών που καταπολεμούν του παθογόνους μικροοργανισμούς και δυνατότητα προσκόλλησης στα επιθηλιακά κύτταρα.
7. Παροχή ασφάλειας κατά την κατανάλωση από τον άνθρωπο. Πραγματοποίηση πειραμάτων για απουσία παθογόνου και τοξικής δράσης.

Τέλος, τα προβιοτικά προϊόντα για να είναι αποδεκτά προς κατανάλωση πρέπει να έχουν συγκέντρωση στο προϊόν τουλάχιστον 10^6 CFU/mL ή g.



Εικόνα 4.1.4.1: Κριτήρια επιλογής προβιοτικού βακτηρίου

4.1.5 Φορείς προβιοτικών βακτηρίων

Τα προβιοτικά βακτήρια προστίθενται συνήθως στα τρόφιμα ως μέρος της διαδικασίας ζύμωσης. Προκειμένου τα βακτήρια να είναι ωφέλιμα για την υγεία του καταναλωτή, τα προβιοτικά βακτήρια πρέπει να παραμείνουν βιώσιμα στους φορείς και να επιβιώσουν από τον γαστρεντερικό σωλήνα, με ελάχιστο αριθμό 10^6 CFU g. Η φύση του φορέα μπορεί να επηρεάσει τη σταθερότητα των προβιοτικών μικροοργανισμών κατά τη διέλευση μέσω του γαστρεντερικού σωλήνα.

Παρόλο που τα γαλακτοκομικά προϊόντα είναι οι κύριοι φορείς για τον εμπλουτισμό με προβιοτικά βακτήρια, άλλα μη γαλακτοκομικά προϊόντα, όπως η σόγια και τα φρούτα, μπορούν να αξιοποιηθούν στο μέλλον ως φορείς προβιοτικών μικροοργανισμών λόγω της αυξανόμενης ζήτησης για καινοτόμα προϊόντα. Οι κύριοι φορείς προβιοτικών βακτηρίων φαίνονται και στην παρακάτω εικόνα.

Carrier	Products	Probiotics	References
Dairy based	Sweet-acidophilus milk	<i>L. gasseri</i>	Usman & Hosono (1999)
	Ice cream	<i>L. johnsonii</i>	Alamprese et al. (2002)
	Whey drink	<i>L. casei</i>	Drgalić et al. (2005)
	Whey cheese	<i>B. animalis</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. paracasei</i>	Madudeira et al. (2005)
	Natural-set yogurt	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>Bifidobacterium</i>	Donkor et al. (2007)
Soy based	Low-fat cheddar cheese	<i>L. casei</i>	Sharp et al. (2008)
	Yogurt	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>B. bifidum</i>	Sendra et al. (2008)
	Soymilk	<i>Lactobacillus</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>	Donkor et al. (2007)
	Soy cream cheese	<i>L. acidophilus</i>	Liong et al. (2009)
	Soymilk	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>Bifidobacterium</i>	Yeo & Liong (2010)
Juice based	Soymilk	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. gasseri</i>	Ewe et al. (2010)
	Soymilk	<i>L. plantarum</i>	Bao et al. (2011)
	Tomato juices	<i>L. casei</i> A4, <i>L. delbrueckii</i> D7	Yoon et al. (2004)
	Cabbage juices	<i>L. plantarum</i> , <i>L. acidophilus</i>	Yoon et al. (2005)
	Beet juice	<i>L. plantarum</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. delbrueckii</i>	Yoon et al. (2006)
	Orange and pineapple juice	<i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosus</i> GG, <i>L. paracasei</i> , <i>L. acidophilus</i> LA39	Sheehan et al. (2007)
	Carrot juice	<i>B. lactis</i> Bb-12, <i>B. bifidum</i> B7.1, B3.2	Kun et al. (2008)
Tomato, orange, and grape juice	<i>L. plantarum</i> , <i>L. acidophilus</i>	Nagpal et al. (2012)	

Εικόνα 4.1.5.1: Φορείς προβιοτικών

4.2 Επιθυμητές ιδιότητες των προβιοτικών

4.2.1 Ιδιότητες παραγωγής

Η διαδικασία παραγωγής των προβιοτικών προϊόντων πρέπει να είναι τυποποιημένη και να αποφέρει κέρδος. Γενικά, η παραγωγή των προβιοτικών προϊόντων είναι απλή και σχετικά φθηνή, καθώς βασίζεται σε διαδικασίες ζύμωσης.

4.2.2 Αναγνώριση στελεχών

Η ταυτοποίηση των προβιοτικών στελεχών αποτελεί απαραίτητο στάδιο, έτσι ώστε να επιτυγχάνεται εύκολα ο προσδιορισμός των χαρακτηριστικών και των ευεργετικών λειτουργιών των διαφορετικών στελεχών. Οι μέθοδοι ταυτοποίησης βασίζονται κυρίως σε μοριακές τεχνικές και όπου γίνεται σύγκριση και ανάλυση ειδικών ακολουθιών στο γονιδίωμα, ολόκληρων γονιδίων ή και ολόκληρου του γονιδιώματος.

4.2.3 Δραστικότητα

Το τρόφιμο που θα εμπλουτιστεί με προβιοτικά πρέπει να επιτρέπει την επιβίωσή τους σε υψηλά ποσοστά και να έχει χαρακτηριστικά συμβατά με αυτά των προβιοτικών.

4.2.4 Σταθερότητα

Τα προβιοτικά προϊόντα πρέπει να έχουν μεγάλη διάρκεια ζωής για να εξασφαλίζονται οι υψηλές συγκεντρώσεις των προβιοτικών βακτηρίων όταν φθάνουν στον καταναλωτή και να επιβιώνουν

4.2.5 Δοσολογία

Δεν υπάρχει ακριβής ελάχιστη δόση προβιοτικών στα προϊόντα της αγοράς. Για να επιτευχθούν τα ευεργετικά αποτελέσματα των προβιοτικών πρέπει η ημερήσια ποσότητα να κυμαίνεται από 10^8 έως 10^{10} CFU.

4.2.6 Παραγωγή προϊόντων σε εμπορική κλίμακα & ποιοτικός τους έλεγχος

Πολλά υποσχόμενα προβιοτικά προϊόντα λειτουργούν σε εργαστηριακή κλίμακα, ενώ όταν μεταφέρονται σε μαζική παραγωγή δεν είναι το ίδιο αποτελεσματικά, πιθανώς λόγω των αυστηρών προδιαγραφών. Συγκεκριμένα, τα προβιοτικά απαιτούν υψηλό βαθμό σταθερότητας, ικανότητα αντοχής στην ξήρανση, στην έκθεση στον αέρα και επιβίωση των προβιοτικών βακτηρίων κατά τη διαδικασία παραγωγής και συσκευασίας. Τέλος, στις διαδικασίες παραγωγής πρέπει να υπάρχει έλεγχος ποιότητας για να εγκρίνονται τα προϊόντα.

4.2.7 Ενδογενείς ιδιότητες

4.2.7.1 Μετάβαση στο όργανο-στόχο

Αρχικά, τα προβιοτικά βακτήρια πρέπει να επιβιώσουν και έπειτα να φτάσουν στο επιθυμητό όργανο του οργανισμού. Για τον έλεγχο της επιβίωσής τους, τα προβιοτικά βακτήρια δοκιμάζονται για:

- Αμυλάση για την επιβίωση από την διέλευση μέσω του στόματος,
- Όξινη αντίσταση για την επιβίωση στο στομάχι.
- Και τέλος, αντοχή σε χολικά οξέα για επιβίωση μετά την διέλευση από το δωδεκαδάκτυλο και το έντερο.

4.2.7.2 Ανθεκτικότητα & αναπαραγωγή εντός του οργάνου-στόχου

Η γαστρεντερική οδός περιέχει πάνω από 500 είδη βακτηρίων και ζυμομυκήτων, τα οποία όταν διαταράσσονται από αντιβιοτικά ή άλλες διεργασίες μπορεί να προκαλέσουν φλεγμονή ή συμπτώματα ασθένειας. Τα περισσότερα προβιοτικά στοχεύουν το έντερο οπότε πρέπει να επιβιώνουν στο σύνθετο μικροβιακό περιβάλλον του. Τα μικρόβια που υπάρχουν στο έντερο αντιστέκονται στην ανάπτυξη νέων μικροβίων χρησιμοποιώντας διάφορους μηχανισμούς, φαινόμενο το οποίο είναι γνωστό παγκοσμίως ως 'αντίσταση αποικισμού'. Επομένως, τα προβιοτικά πρέπει να είναι ικανά να παρακάμπτουν αυτούς τους μηχανισμούς και να παραμένουν στο έντερο.

Η ικανότητα αποικισμού, αλλά και αναπαραγωγής του προβιοτικού βακτηρίου στο έντερο είναι ένα ακόμη χαρακτηριστικό για να επιτευχθούν τα αποτελέσματα του προβιοτικού αυτού.

4.2.7.3 Προσκόλληση στον βλεννογόνο

Η επιβίωση στο όργανο-στόχο υποβοηθάται από την προσκόλληση στις επιφάνειες του βλεννογόνου του οργάνου

4.2.7.4 Επεξεργασία μεταβολικού μονοπατιού

Η ικανότητα του προβιοτικού να επηρεάζει τις μεταβολικές δραστηριότητες, όπως την αφομοίωση της χοληστερόλης, την παραγωγή καρκινογόνων, τη δραστηριότητα της λακτάσης ή την παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου είναι μία ιδιότητα που επιτυγχάνει αποτελεσματικότερα τα ευεργετικά του αποτελέσματα.

4.2.7.5 Διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος

Τα προβιοτικά χρησιμοποιούνται για την πρόληψη και αντιμετώπιση σε πολλές ασθένειες και για το λόγο αυτό μία σημαντική ιδιότητα είναι η ικανότητα διέγερσης της ανοσολογικής απόκρισης.

4.2.7.6 Ασφάλεια

Ένα προβιοτικό πρέπει να είναι ασφαλές για να χορηγείται σε υγιείς ανθρώπους προληπτικά, αλλά και σε ασθενείς ως θεραπεία. Όμως, η λήψη προβιοτικών σε ασθενείς που λαμβάνουν ταυτόχρονα και άλλα φάρμακα ή έχουν διαταραγμένο ανοσοποιητικό σύστημα θα πρέπει να δίνεται κάτω από ορισμένα κριτήρια. Το προβιοτικό βακτήριο θα πρέπει να επιβιώνει αλλά για ορισμένο χρονικό διάστημα.

Γενικά, τα προβιοτικά βακτήρια έχουν κατά βάση υψηλό επίπεδο ανοχής και χαμηλή συχνότητα παρενεργειών. Σε σπάνιες περιπτώσεις έχουν εμφανιστεί ανεπιθύμητες συνέπειες, οι οποίες κυρίως είναι σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς.

4.3 Οφέλη των προβιοτικών στην υγεία

Τα προβιοτικά βακτήρια αρχικά διαπιστώθηκε ότι είχαν ευεργετικές λειτουργίες για την μικροχλωρίδα του εντέρου, ενώ αργότερα ανακαλύφθηκαν επιπλέον οφέλη ακόμα και αν τα βακτήρια είναι νεκρά. Τα κυριότερα ευεργετικά οφέλη των προβιοτικών αναλύονται παρακάτω.

4.3.1 Διάρροια

Τα προβιοτικά βακτήρια είναι ευρέως αποδεκτά για τα οφέλη στη θεραπεία και πρόληψη της λοιμώδους διάρροιας. Κάποια προβιοτικά στελέχη, και ειδικά το

Lactobacillus rhamnosus GG, έχει αποδειχθεί ότι έχουν τη δυνατότητα να ανακουφίζουν ή ακόμα και να προσλαμβάνουν τη βρεφική διάρροια. Ο ροταϊός είναι η πιο κοινή αιτία ανάπτυξης οξείας βρεφικής διάρροιας στον κόσμο και ευθύνεται για μεγάλο ποσοστό θανάτων κυρίως στις αναπτυσσόμενες χώρες. Επίσης, τα προβιοτικά βακτήρια έχει αποδειχθεί ότι αντιμετωπίζουν τις παρενέργειες από τη λήψη αντιβιοτικών, ενώ ορισμένα στελέχη, ανακουφίζουν από τη διάρροια των ταξιδιωτών (Fung et al, 2011).

4.3.2 Σύνδρομο ευερέθιστου εντέρου-Δυσανεξία στη λακτόζη

Το σύνδρομο του ευερέθιστου εντέρου είναι μία από τις πιο κοινές εντερικές διαταραχές που παρατηρείται στις αναπτυσσόμενες χώρες. Τα πιο συνήθη συμπτώματα είναι το κοιλιακό άλγος και το πρήξιμο της κοιλιακής χώρας, τα οποία υποχωρούν ή βελτιώνονται με την κατανάλωση προβιοτικών βακτηρίων (De Prisco, 2016; Schmid et al., 2006).

Άτομα με δυσανεξία στη λακτόζη αναπτύσσουν κατά βάση διάρροια και κοιλιακό πόνο μετά την κατανάλωση γάλακτος ή μη ζυμωμένων προϊόντων γάλακτος. Το γιαούρτι αποτελεί ένα προϊόν που βοηθάει στην πέψη της λακτόζης, γεγονός που επιτυγχάνεται χάρη στην δράση των προβιοτικών βακτηρίων. Αυτή η ωφέλιμη επίδραση φαίνεται να βασίζεται στα βακτήρια γαλακτικού οξέος που αυξάνουν την δραστηριότητα της λακτάσης στο λεπτό έντερο (Schmid et al., 2006).

4.3.3 Αλλεργίες

Σύμφωνα με τις τελευταίες μελέτες, η έκθεση σε βακτήρια στην πρώιμη ζωή μπορεί να εμφανίσει προστατευτικό ρόλο έναντι της αλλεργίας. Τα οφέλη των προβιοτικών επηρεάζουν θετικά τις τροφικές αλλεργίες, αλλά και την τοπική δερματίτιδα/έκζεμα. Η τοπική δερματίτιδα αποτελεί μία κοινή δερματική διαταραχή που εμφανίζεται κυρίως στην βρεφική και παιδική ηλικία. Η κληρονομικότητα αποτελεί βασικό συστατικό της εμφάνισης της σε συνδυασμό βέβαια με την έκθεση του ατόμου σε αλλεργιογόνα. Στα άτομα που έχουν οικογενειακό ιστορικό σε αλλεργίες, προτείνεται να χρησιμοποιούνται από νωρίς προβιοτικά με σκοπό την πρόληψη. Τέλος, τα προβιοτικά προσφέρουν ανακούφιση σε ορισμένα συμπτώματα τροφικών αλλεργιών, όπως σε αυτά που σχετίζονται με την πρωτεΐνη του γάλακτος (Peltó, 1998).

4.3.4 Καρκίνος

Τα προβιοτικά βακτήρια φαίνεται ότι μπορούν μειώσουν την πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου. Αυτό δικαιολογείται γιατί τα στελέχη *Lactobacillus* και *Bifidobacterium* spp. μειώνουν τα επίπεδα των καρκινογενετικών ενζύμων του παχέος εντέρου, ενώ αυξάνουν την δραστηριότητα των κυττάρων γνωστών ως 'φυσικοί δολοφόνοι', που είναι υπεύθυνα για την προστασία του οργανισμού από ξένους εισβολείς (Soccol et al, 2010).

4.3.5 Χοληστερόλη στο αίμα-στεφανιαία νόσος

Τα προβιοτικά βακτήρια μειώνουν τα επίπεδα χοληστερόλης στο αίμα, το οποίο διαπιστώθηκε σε μελέτες όπου άνθρωποι με αυξημένα επίπεδα χοληστερόλης κατανάλωσαν γαλακτοκομικά προϊόντα που περιείχαν προβιοτικά και μειώθηκαν τα επίπεδά της στο αίμα. Τέλος, τα τρόφιμα που περιέχουν προβιοτικά βακτήρια συμβάλλουν στην πρόληψη της στεφανιαίας νόσου μειώνοντας τα επίπεδα χοληστερόλης στο αίμα και ελέγχοντας την αρτηριακή πίεση.

4.3.6 Διαβήτης και παχυσαρκία

Η διαμόρφωση της χλωρίδας του εντέρου έχει θεωρηθεί πιθανός στόχος για τη θεραπεία κατά της παχυσαρκίας και του διαβήτη. Τα προβιοτικά αποτελούν ρυθμιστές της χλωρίδας του εντέρου και έχουν την ικανότητα πρόληψης θεραπείας της παχυσαρκίας και του διαβήτη.

4.3.7 Λοιπά οφέλη

Η ύπαρξη προβιοτικών σε γαλακτοκομικά προϊόντα έχει αποδειχθεί ότι συμβάλλει στην θεραπεία των γυναικών με βακτηριακή κολπίτιδα, καθώς εντείνει την φυσιολογική ανάπτυξη στον κόλπο. Τέλος, τα προβιοτικά βακτήρια συμβάλλουν στην διάρκεια αλλά και συχνότητα των γαστρικών και εντερικών παθήσεων

4.4 Εφαρμογές προβιοτικών βακτηρίων σε τρόφιμα

Η αυξανόμενη ευαισθητοποίηση του κόσμου για ζητήματα υγείας έχει στρέψει αρκετό κόσμο να ασχοληθεί με τη διατροφή. Στη στροφή αυτή προς υγιεινότερα τρόφιμα, τα οφέλη για την υγεία των προβιοτικών έχουν αυξήσει τη ζήτηση των καταναλωτών για προβιοτικά τρόφιμα, ενώ, ορισμένα προϊόντα διατροφής κατά βάση γαλακτοκομικά, όπως γιαούρτι, τυρί, κατεψυγμένα γαλακτοκομικά ζυμωμένα επιδόρπια, είτε έχει προταθεί να εμπλουτιστούν με προβιοτικά ή αποτελούν ήδη προβιοτικά προϊόντα. Βέβαια, το γιαούρτι και το ζυμωμένο γάλα αποτελούν τα δημοφιλέστερα προβιοτικά προϊόντα στην αγορά.

Τα τυριά φαίνεται να μπορούν ευκολότερα να χρησιμοποιηθούν ως προβιοτικά προϊόντα έναντι σε άλλα ζυμωμένα γαλακτοκομικά προϊόντα, όπως το γιαούρτι. Αυτό δικαιολογείται γιατί τα τυριά παρουσιάζουν υψηλότερο pH, είναι πιο συμπαγή, σταθερά και έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά, με αποτέλεσμα να προστατεύουν τα προβιοτικά βακτήρια κατά τη διέλευσή τους από τον γαστρεντερικό σωλήνα. Επίσης, το τυρί έχει υψηλότερη ικανότητα αποθήκευσης από ότι το γιαούρτι.

Για τον εμπλουτισμό με προβιοτικά, θα πρέπει να ληφθούν υπόψη κάποια κριτήρια. Αρχικά, η επιλογή ενός συμβατού προβιοτικού στελεχούς πρέπει να γίνεται ανάλογα με τον τύπο του τροφίμου και οι συνθήκες επεξεργασίας του τροφίμου να είναι συμβατές με την επιβίωση των προβιοτικών. Τέλος, εξίσου σημαντικό είναι η συσκευασία και οι συνθήκες περιβάλλοντος που πρέπει να διατηρούνται κατά την

αποθήκευση. Βέβαια πρέπει να λαμβάνεται πάντα υπόψη ότι η προσθήκη κάποιου προβιοτικού στελεχούς δεν επηρεάζει αρνητικά τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά.

Τα προβιοτικά τρόφιμα ανήκουν στα λειτουργικά τρόφιμα, καθώς έχουν υποστεί τροποποίηση για να γίνουν 'λειτουργικά'. Ως λειτουργικά τρόφιμα θεωρούνται τα επεξεργασμένα τρόφιμα που προάγουν την υγεία και παρασκευάζονται με την προσθήκη συστατικών (π.χ. προβιοτικών) που τα ίδια τα τρόφιμα δεν περιέχουν ή με ενίσχυση των ήδη υπαρχόντων.

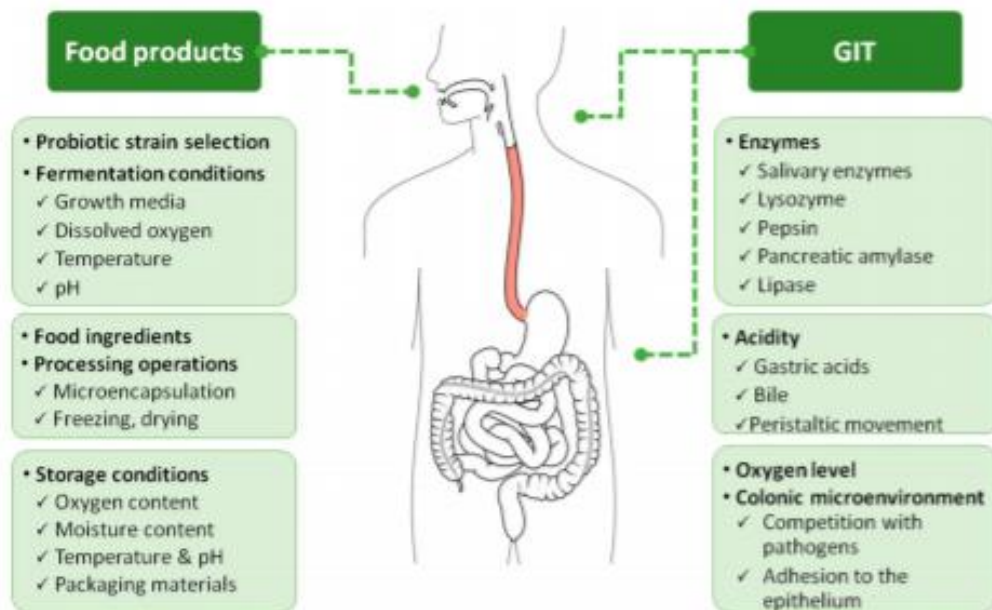
Η απαραίτητη ημερήσια ποσότητα προβιοτικών είναι 10^9 CFU, έτσι ώστε να παρέχουν τις ευεργετικές ιδιότητές τους στον καταναλωτή. Με την ημερήσια κατανάλωση 100 g τροφίμων εμπλουτισμένων με προβιοτικά, έχει προταθεί ότι ένα προϊόν πρέπει να περιέχουν τουλάχιστον 10^6 CFU ανά g τροφίμου.

4.5 Βιωσιμότητα προβιοτικών βακτηρίων

Τα προβιοτικά βακτήρια είναι μικροοργανισμοί που επηρεάζονται από την έκθεση σε οξυγόνο, όξινο περιβάλλον αλλά και σε θερμοκρασία. Για το λόγο αυτό είναι αρκετά σημαντική η επιλογή του κατάλληλου προβιοτικού ώστε να μπορέσει να ωφελήσει την ανθρώπινη υγεία. Το προβιοτικό βακτήριο που θα επιλεγθεί πρέπει να μπορεί να παρασκευαστεί και να ενσωματωθεί σε προϊόντα τροφίμων χωρίς να χαθεί η βιωσιμότητα και η λειτουργικότητα και χωρίς να δημιουργηθούν δυσάρεστες γεύσεις ή υφές.

4.5.1 Παράγοντες επίδρασης της βιωσιμότητας των βακτηρίων

Έχουν εντοπιστεί πολλοί παράγοντες που επηρεάζουν τη βιωσιμότητα των προβιοτικών βακτηρίων στα τρόφιμα κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας και αποθήκευσής τους (Εικόνα 4.5.1.1). Αυτοί οι παράγοντες περιλαμβάνουν εγγενείς παραμέτρους του προϊόντος όπως το pH, η οξύτητα, το οξυγόνο, η ενεργότητα του νερού, η παρουσία αλατιού, ζάχαρης και άλλων ενώσεων (υπεροξειδίου του υδρογόνου, τεχνητά αρωματικά, χρωστικές ουσίες κ.λπ.), παραμέτρους της επεξεργασίας συμπεριλαμβανομένων των συνθηκών ζύμωσης (θερμοκρασία επώασης, συνθήκες θερμικής επεξεργασίας, ψύξης και αποθήκευσης του προϊόντος, υλικά συσκευασίας, κλίμακα παραγωγής) και τέλος, μικροβιολογικές παραμέτρους (το χρησιμοποιούμενο προβιοτικό στέλεχος και η ποσότητα του εμβολίου).



Εικόνα 4.5.1.1: Παράγοντες που επηρεάζουν τη βιωσιμότητα των προβιοτικών βακτηρίων στα τρόφιμα και στο γαστρεντερικό σωλήνα (GIT)

4.5.1.1 Χημικοί παράγοντες

Τα συστατικά των τροφίμων, όπως τα πρόσθετα (σάκχαρα, αλάτι, αντιμικροβιακά, αρωματικές ενώσεις) μπορούν να επηρεάσουν θετικά ή αρνητικά τη βιωσιμότητα των προβιοτικών κυττάρων. Σίγουρη θετική συνεισφορά στην βιωσιμότητα των προβιοτικών σε ένα τρόφιμο έχει η προσθήκη πρεβιοτικών.

Τα επίπεδα οξυγόνου είναι ένας σημαντικός παράγοντας για αναερόβια βακτήρια (όπως bifidobacteria) καθώς επηρεάζει την βιωσιμότητα, κυρίως κατά την αποθήκευση. Επομένως, η συγκέντρωση του οξυγόνου και η διαπερατότητα οξυγόνου της συσκευασίας πρέπει να διατηρούνται σε χαμηλά επίπεδα για τον αποτελεσματικό έλεγχο των απωλειών στη βιωσιμότητα των προβιοτικών. Αρκετές μέθοδοι έχουν προταθεί για τη μείωση της περιεκτικότητας σε οξυγόνο σε συσκευασμένα προβιοτικά τρόφιμα, όπως η συσκευασία υπό κενό και η προσθήκη αντιοξειδωτικών, όπως το ασκορβικό οξύ. Η ευαισθησία στο οξυγόνο, συμπεριλαμβανομένων των bifidobacteria που είναι υποχρεωτικά αναερόβια, περιορίζει την επιβίωσή τους και τη χρήση τους σε βιομηχανικές εφαρμογές. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιούνται αρκετές μέθοδοι για τη μείωση των επιπέδων οξυγόνου κατά τη διάρκεια της ζύμωσης των προϊόντων, όπως η ζύμωση υπό κενό.

Η ενεργότητα του νερού αλλά και οι τιμές pH αποτελούν παράγοντες επιρροής της επιβίωσης των προβιοτικών, αφού η βιωσιμότητα των κυττάρων επηρεάζεται ιδιαίτερα όταν ένα αφυδατωμένο τρόφιμο έχει αυξημένη ενεργότητα νερού ($a_w > 0,25$) και όταν το pH έχει χαμηλές τιμές. Αρνητική επιρροή στη βιωσιμότητα των κυττάρων έχει βρεθεί ότι έχουν το pH (3,2–4,0), το κιτρικό οξύ (2–15 g/L), η πρωτεΐνη (0–10 g/L) και οι διαιτητικές ίνες (0–8 g/L) (Terrou et al. 2019).

4.5.1.2 Βιολογικοί παράγοντες

Η βιωσιμότητα εξαρτάται από πολλούς βιολογικούς παράγοντες, όπως ο τύπος του προβιοτικού στελέχους, ο ανταγωνισμός με τις καλλιέργειες εκκίνησης, η φυσική μικροχλωρίδα του προϊόντος, τα παραγόμενα ένζυμα και η εμφάνιση διαφόρων παθογόνων ή αλλοιώσεων μετά την οξίνιση. Ένα επιθυμητό κριτήριο για την επιλογή του προβιοτικού είναι να παρουσιάζει λειτουργικές και τεχνολογικές ιδιότητες, χωρίς να επιφέρει αρνητικά χαρακτηριστικά. Το επιλεγμένο προβιοτικό στέλεχος μπορεί να παρουσιάζει ανταγωνιστικές επιδράσεις έναντι διαφόρων μικροοργανισμών, με αποτέλεσμα την απώλεια κυτταρικής βιωσιμότητας. Σε πολλές περιπτώσεις, η προστιθέμενη προβιοτική καλλιέργεια μπορεί να επηρεαστεί από την καλλιέργεια εκκίνησης που χρησιμοποιείται για την ζύμωση των τροφίμων. Από την άλλη πλευρά, το κατάλληλο προβιοτικό στέλεχος μπορεί να αποδείξει αρκετούς ανταγωνιστικούς μηχανισμούς, περιλαμβανομένων του ανταγωνισμού για τα θρεπτικά συστατικά, της συσσωμάτωσης με παθογόνους παράγοντες και της διέγερσης του ανοσοποιητικού συστήματος (Terrou et al. 2019).

4.5.1.3 Φυσικοί παράγοντες

Οι φυσικοί παράγοντες που επηρεάζουν την επιβίωση των προβιοτικών βακτηρίων περιλαμβάνουν τη θερμοκρασία αποθήκευσης, τις συνθήκες ξήρανσης και τα επίπεδα του οξυγόνου. Η θερμοκρασία ζύμωσης επηρεάζει, επίσης, τη βιωσιμότητα των προβιοτικών μικροοργανισμών όπου το βέλτιστο εύρος θερμοκρασίας για ανάπτυξη για την πλειονότητα του βακτηρίων γαλακτικού οξέος κυμαίνεται από 30-43 °C. Ωστόσο, ορισμένα βακτήρια, όπως αυτά των καλλιεργειών γιαουρτιού και του *L. acidophilus* μπορούν να αναπτυχθούν στους 45 °C. Τα είδη *Bifidobacteria* που απομονώνονται από την ανθρώπινη εντερική οδό, όπως το *B. longum* subsp. *infantis*, *B. breve*, *B. bifidum* και *B. adolescentis* εμφανίζουν ως βέλτιστες θερμοκρασίες ανάπτυξης την περιοχή των 36-38 °C, ενώ το *B. animalis* subsp. *lactis* μπορεί να αναπτυχθεί σε υψηλότερες θερμοκρασίες 41-43 °C. Συνήθως, θερμοκρασίες άνω των 45 °C κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας έχουν αρνητικό αντίκτυπο στην επιβίωση των προβιοτικών.

Ένας τρόπος διατήρησης των καλλιεργειών είναι η ξήρανση, όπου τα προβιοτικά τρόφιμα ξηραίνονται προκειμένου να αυξηθεί η διάρκεια ζωής τους σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ωστόσο, μπορούν να εφαρμοστούν διάφορες μέθοδοι ξήρανσης, ενώ οι πιο εφαρμόσιμες μέθοδοι για τη διατήρηση της βακτηριακής καλλιέργειας είναι η ξήρανση με κατάψυξη, η ξήρανση με ψεκασμό και η ξήρανση υπό κενό.

Αναλυτικότερα, η ξήρανση με ψεκασμό είναι μια οικονομική και ευέλικτη μέθοδος για την ξήρανση υγρών τροφίμων, όμως η εφαρμογή της σε προβιοτικές καλλιέργειες συνεπάγεται συνήθως σημαντικές απώλειες στη βιωσιμότητα των κυττάρων λόγω των υψηλών θερμοκρασιών, της αφυδάτωσης και των ωσμωτικών φαινομένων. Η επιβίωση των προβιοτικών κατά τη διάρκεια της ξήρανσης με ψεκασμό εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως το είδος και το στέλεχος των προβιοτικών που χρησιμοποιούνται, οι παραμέτροι ξήρανσης (θερμοκρασία αέρα εξόδου, τύπος ψεκασμού) και το μέσο ξήρανσης. Από την άλλη πλευρά, όμως η ξήρανση με κατάψυξη είναι μία δαπανηρή διαδικασία που διατηρεί σε μεγάλο βαθμό το βιωσιμότητα των προβιοτικών κυττάρων.

4.5.2 Τρόποι αύξησης της επιβίωσης των *L. acidophilus* και *bifidobacteria* σε ζυμωμένα γαλακτοκομικά προϊόντα

Τα προβιοτικά βακτήρια χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο σε ζυμωμένα γαλακτοκομικά προϊόντα, αλλά η ανεπαρκής βιωσιμότητά τους σε εμπορικά προϊόντα διατροφής παραμένει πρόβλημα. Μερικοί τρόποι για την επίτευξη της επιβίωσης των προβιοτικών βακτηρίων είναι:

- ✓ Ο τερματισμός της ζύμωσης σε υψηλότερο pH (> 5), καθώς επιτρέπει καλύτερα την επιβίωση των bifidobacteria.
- ✓ Η μείωση της θερμοκρασίας αποθήκευσης χαμηλότερα των 3–4 ° C, γιατί αυξάνει την επιβίωση της καλλιέργειας *L. acidophilus* και bifidobacteria.
- ✓ Ο εμπλουτισμός του μίγματος γιαουρτιού με συμπύκνωμα πρωτεΐνης ορού γάλακτος, το οποίο αυξάνει την ικανότητα αποθήκευσης του γιαουρτιού, επιβραδύνει τη μείωση του pH και αποτρέπει την αλλαγή του pH κατά την αποθήκευση του γιαουρτιού.
- ✓ Η εφαρμογή πίεσης 200-300 MPa για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου, που αποτρέπει στο γιαούρτι την οξίνιση και διατηρεί τον αρχικό αριθμό βιώσιμων βακτηρίων γαλακτικού οξέος.
- ✓ Θερμικό σοκ (58 ° C για 5 min) του γιαουρτιού, όπου μειώνεται η πιθανότητα υπερπαραγωγής οξέων κι έτσι επιτυγχάνεται η οξύτητα να παραμένει σταθερή κατά τη διάρκεια αποθήκευσης.
- ✓ Η μείωση της θερμοκρασίας επώασης στους 37 ° C, ευνοεί την ανάπτυξη των bifidobacteria αυξάνοντας το χρόνο επώασης

Επίσης, πρέπει να δίνεται προσοχή στην επιλογή των οργανισμών καλλιέργειας, επειδή η σύνθεση και η σταθερότητα της καλλιέργειας, το μέγεθος του εμβολίου, οι συνθήκες ζύμωσης και οι αλληλεπιδράσεις των ειδών επηρεάζουν την επιβίωση των προβιοτικών βακτηρίων. Ωφέλιμες αλληλεπιδράσεις συμβαίνουν μεταξύ των βακτηρίων *S. thermophilus* και του *Bifidobacterium*, όπου το ένα βακτήριο δρα απορροφώντας το οξυγόνο με αποτέλεσμα να δημιουργούνται αναερόβιες συνθήκες που ενισχύουν την ανάπτυξη και την επιβίωση του άλλου.

4.6 Προβιοτικό γιαούρτι

Υπάρχει ολοένα και αυξανόμενο ενδιαφέρον για προβιοτικά τρόφιμα, εξαιτίας των θεραπευτικών αποτελεσμάτων τους με αποτέλεσμα οι καταναλωτές να αναζητούν εμπορικά προϊόντα που θα μπορούσαν να λάβουν μεγάλες ποσότητες προβιοτικών βακτηρίων. Το γιαούρτι αποτελεί ένα προϊόν που είναι αρκετά δημοφιλές τα τελευταία χρόνια για την διατροφική του σημασία και είναι αποδεκτό στον κόσμο καθώς προάγει την υγεία.

Το γιαούρτι αποτελεί ένα τρόφιμο που είναι εύκολη η ενσωμάτωση των προβιοτικών, καθώς επιτυγχάνεται υψηλή βιωσιμότητά τους. Το προβιοτικό γιαούρτι ονομάζεται αλλιώς και ως βιο-γιαούρτι. Το τυπικό γιαούρτι παρασκευάζεται με την ζύμωση των βακτηρίων *L. bulgaricus* και *S. thermophilus*, τα οποία όμως δεν μπορούν

να επιβιώσουν στο πεπτικό σύστημα (Mater et al., 2005). Τα βακτήρια αυτά καταστρέφονται στις όξινες συνθήκες που επικρατούν στο πεπτικό σύστημα, με αποτέλεσμα να μην μπορούν να προσδώσουν προβιοτικές ιδιότητες (McFarland, 2015).

Τα βακτήρια που χρησιμοποιούνται στα προβιοτικά γιαούρτια πρέπει να είναι ανθεκτικά σε όξινες συνθήκες. Στα προβιοτικά γιαούρτια εκτός από τα βακτήρια της καλλιέργειας εκκίνησης προστίθενται και άλλα προβιοτικά στελέχη μαζί. Τα πιο συνήθη προβιοτικά στελέχη που χρησιμοποιούνται στα γαλακτοκομικά προϊόντα είναι το *L. acidophilus* και το *Bifidobacterium bifidum* (Chen et al., 2017). Γενικά, η αποτελεσματικότητα των προστιθέμενων προβιοτικών βακτηρίων στο γιαούρτι εξαρτάται από τη δόση και τη βιωσιμότητά τους καθ' όλη τη διάρκεια της αποθήκευσης και την επιβίωση στο περιβάλλον του εντέρου (Aryana, Plauche, Rao, McGrew, & Shah, 2007).

Τα προβιοτικά προϊόντα για να θεωρηθούν αποδεκτά προς κατανάλωση πρέπει να περιέχουν επαρκή αριθμό βιώσιμων κυττάρων, συγκεκριμένα 10^6 CFU/mL έως τη στιγμή της κατανάλωσης, έτσι ώστε να δύναται να παρέχουν τα ευεργετικά τους αποτελέσματα (Sohail, Turner, Coombes, & Bhandari, 2013). Για τον λόγο αυτό τα προβιοτικά προστίθενται πολλές φορές ως εγκλεισμένα.

4.7 Νομοθεσία και ασφάλεια

Η νομοθεσία που σχετίζεται με την χρήση των προβιοτικών ως συστατικά στα τρόφιμα πρέπει να καθοριστεί σε παγκόσμιο επίπεδο. Πρέπει να θεσπιστεί ένα νομοθετικό πλαίσιο για την καλύτερη αντιμετώπιση των ζητημάτων που προκύπτουν με την χρήση τους, συμπεριλαμβανομένης της αποτελεσματικότητας, της ασφάλειας, της ετικέτας, και των ισχυρισμών υγείας. Τα προβιοτικά προϊόντα που αποδεικνύεται ότι παρέχουν ορισμένα οφέλη για την υγεία του καταναλωτή θα πρέπει να επιτρέπεται να περιγράφονται.

Επιπλέον, θα πρέπει να πραγματοποιείται επιτήρηση ανά κάποια χρονικά διαστήματα, ώστε να καταγράφονται και να αναλύονται τυχόν ανεπιθύμητα αποτελέσματα που σχετίζονται με την κατανάλωση προβιοτικών, αλλά και η παρακολούθηση των μακροπρόθεσμων οφελών για την υγεία. Τα προβιοτικά προϊόντα πρέπει να είναι ευρέως διαθέσιμα, ειδικά για πληθυσμούς με υψηλά ποσοστά νοσηρότητας και θνησιμότητας.

Η Αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) καθόρισε τέσσερις κατηγορίες τροφίμων. Τα συμβατικά τρόφιμα, όπου πρόκειται για την μεγαλύτερη κατηγορία και περιλαμβάνουν είδη τροφίμων και ποτών που δεν εμπίπτουν στις άλλες τρεις κατηγορίες, όπως για παράδειγμα τρόφιμα που προορίζονται για ειδική διατροφική χρήση, ιατρικά τρόφιμα και συμπληρώματα διατροφής. Από νομοθετική άποψη, τα τρόφιμα που περιέχουν προβιοτικά θα μπορούσαν να χωρέσουν σε πολλές από τις τέσσερις κατηγορίες τροφίμων που περιγράφονται από την FDA. Ωστόσο, οι κανονισμοί, συμπεριλαμβανομένων και της ασφάλειας, διαφέρουν ανά χώρα, και τα

προβιοτικά ως συστατικά στα τρόφιμα δεν καθορίζονται επί του παρόντος σε διεθνές επίπεδο. Κατά βάση, τα προβιοτικά ορίζονται ως συμπληρώματα διατροφής, επειδή τα περισσότερα χορηγούνται από το στόμα ως τρόφιμα και έχουν γενικά οφέλη στην υγεία.

Οι παράγοντες που πρέπει να αντιμετωπιστούν για την εκτίμηση της ασφάλειας των προβιοτικών περιλαμβάνουν την παθογένεια, τη μολυσματικότητα και τους παράγοντες μολυσματικότητας μεταξύ των οποίων την τοξικότητα, τη μεταβολική δραστηριότητα και τις εγγενείς ιδιότητες των μικροοργανισμών. Ο Donohue & Salminen (1996) παρείχε μερικές μεθόδους για την αξιολόγηση της ασφάλειας των βακτηρίων γαλακτικού οξέος μέσω της χρήσης τους σε *in vitro* μελέτες σε ζώα και κλινικές μελέτες σε ανθρώπους και συμπέρανε ότι ορισμένα προβιοτικά στελέχη πληρούν τα απαιτούμενα πρότυπα ασφαλείας. Ο Salminen & Marteau (1997) πρότεινε επίσης μελέτες σχετικά με τις εγγενείς ιδιότητες, τη φαρμακοκινητική και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ του ξενιστή και των προβιοτικών ως μέσο για την αξιολόγηση της ασφάλειας των προβιοτικών.

Κρίθηκε αναγκαία η ακριβής καταμέτρηση των προβιοτικών βακτηρίων στα τρόφιμα ώστε να συμπεριληφθούν στην ετικέτα και η χρήση κατάλληλων διαδικασιών παρασκευής και χειρισμού, για τη διασφάλιση της διατήρησης της βιωσιμότητας και της προβιοτικής δραστηριότητας, ενώ θα υποστούν διαδικασίες επεξεργασίας, χειρισμού και αποθήκευσης. Μελέτες έχουν δείξει ότι συγκεκριμένα προβιοτικά στελέχη είναι ασφαλή για ανθρώπινη χρήση και είναι σε θέση να προσδώσουν ορισμένα οφέλη για την υγεία στον ξενιστή.

4.8 Πρεβιοτικά βακτήρια

Τα πρεβιοτικά είναι μη ενεργά συστατικά του τροφίμου που δεν είναι εύπεπτα και επηρεάζουν ευεργετικά την υγεία του ξενιστή, διεγείροντας επιλεκτικά την ανάπτυξη και τη δραστηριότητα ορισμένων βακτηρίων στο παχύ έντερο (Gibson & Roberfroid, 1995). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή στην συνολική μικροβιακή ισορροπία του εντέρου, αυξάνοντας τα ωφέλιμα βακτήρια και μειώνοντας πιθανούς επιβλαβείς μικροοργανισμούς. Τα πρεβιοτικά βακτήρια ανήκουν στην ευρύτερη κατηγορία των υδατανθράκων και μερικές από τις πηγές των πρεβιοτικών είναι το μητρικό γάλα, η σόγια, η ωμή βρώμη και οι μη εύπεπτοι υδατάνθρακες.

Η λακτουλόζη, οι γαλακτο-ολιγοσακχαρίτες (GOS), οι φρουκτο-ολιγοσακχαρίτες (FOS), η ινουλίνη, οι μαλτο-ολιγοσακχαρίτες και το ανθεκτικό άμυλο είναι πρεβιοτικά που χρησιμοποιούνται συχνά στη διατροφή του ανθρώπου. Παρακάτω φαίνονται κάποιοι τύποι πρεβιοτικών, αλλά και οι πηγές τους.

Table 1 – Types and sources of prebiotics.

Type of prebiotic	Sources of prebiotic
Fructooligosaccharides	Asparagus, sugar beet, garlic, chicory, onion, Jerusalem artichoke, wheat, honey, banana, barley, tomato and rye
Isomaltulose	Honey, sugarcane juice
Xylooligosaccharides	Bamboo shoots, fruits, vegetables, milk, honey and wheat bran
Galactooligosaccharides	Human's milk and cow's milk
Cyclodextrins	Water-soluble glucans
Raffinose oligosaccharides	Seeds of legumes, lentils, peas, beans, chickpeas, mallow composite, and mustard
Soybean oligosaccharide	Soybean
Lactulose	Lactose (Milk)
Lactosucrose	Lactose
Isomaltulose	Sucrose
Palatinose	Sucrose
Maltooligosaccharides	Starch
Isomaltooligosaccharides	Starch
Arabinoxylooligosaccharides	Wheat bran
Enzyme-resistant dextrin	Potato starch

Εικόνα 4.8.1: Τύποι και πηγές πρεβιοτικών

Ένα ιδανικό πρεβιοτικό για να χρησιμοποιηθεί πρέπει να είναι:

1. Ανθεκτικό στη δράση των οξέων στο στομάχι, στα χολικά άλατα και σε άλλα υδρολυτικά ένζυμα στο έντερο.
2. Μη απορροφήσιμο στην άνω γαστρεντερική οδό.
3. Εύκολα ζυμώσιμο από την εντερική μικροχλωρίδα.
4. Ενεργό σε χαμηλή δόση και να μην έχει παρενέργειες.
5. Σταθερό στις συνθήκες αποθήκευσης και επεξεργασίας.

Τα πρεβιοτικά παρουσιάζουν διάφορα οφέλη για την υγεία του ανθρώπου, όπως η μείωση της διάρκειας της διάρροιας, η ανακούφιση από τη φλεγμονή και άλλα συμπτώματα που σχετίζονται με τη διαταραχή του εντέρου, ενώ επίσης αποτελούν πρόληψη για την εμφάνιση του καρκίνου του παχέος εντέρου. Επιπλέον, βοηθούν στη μείωση της εμφάνισης καρδιαγγειακών παθήσεων και στην προώθηση του κορεσμού, επιτυγχάνοντας την απώλεια βάρους και αποτρέποντας έτσι την παχυσαρκία.

4.9 Συμβιωτικά

Μία δυνατότητα διαχείρισης της μικροβιακής κοινότητας του εντέρου είναι η χρήση συμβιωτικών, δηλαδή προβιοτικά και πρεβιοτικά που χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό (Fooks, Fuller & Gibson, 1999). Ένα πρεβιοτικό είναι ένα μη αφομοιώσιμο συστατικό τροφίμου που επηρεάζει ευεργετικά τον ξενιστή διεγείροντας επιλεκτικά την ανάπτυξη και τη δραστηριότητα ενός ή περιορισμένου αριθμού βακτηρίων στο έντερο, βελτιώνοντας την υγεία του ξενιστή. Ο συνδυασμός κατάλληλων προβιοτικών και πρεβιοτικών ενισχύει την επιβίωση και τη δραστηριότητα του οργανισμού.

Τα συμβιωτικά φαίνεται ότι αναπτύχθηκαν αρχικά για να ξεπεράσουν πιθανές δυσκολίες επιβίωσης των προβιοτικών. Η χρήση των συμβιωτικών βασίζεται σε παρατηρήσεις που δείχνουν τη βελτίωση της επιβίωσης των προβιοτικών βακτηρίων κατά τη διέλευσή τους μέσω της άνω γαστρεντερική οδού. Τα προβιοτικά στελέχη που χρησιμοποιούνται σε συμβιωτικά σκευάσματα περιλαμβάνουν στελέχη, όπως *Lactobacilli*, *Bifidobacteria* spp, *S.boulardii*, *B. Coagulans*, ενώ τα κύρια πρεβιοτικά που χρησιμοποιούνται περιλαμβάνουν ολιγοσακχαρίτες, όπως φρουκτο-ολιγοσακχαρίτης (FOS), γαλακτο-ολιγοσακχαρίτες (GOS), ινουλίνη και πρεβιοτικά από φυσικές πηγές (Pandey, Naik & Vakil, 2015).

Ο συνδυασμός πρεβιοτικών και προβιοτικών έχει κι άλλα επιθυμητά αποτελέσματα, καθώς εκτός από την προώθηση της ανάπτυξης των υπαρχόντων στελεχών στο παχύ έντερο, τα συμβιωτικά δρουν επίσης για τη βελτίωση της επιβίωσης και της ανάπτυξης νέων προβιοτικών στελεχών. Η ιδέα για τα συμβιωτικά έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως από ευρωπαϊούς παρασκευαστές ποτών γαλακτοκομικών προϊόντων και γιαουρτιού.

Όσον αφορά την ασφάλεια των πρεβιοτικών δεν υπάρχει καμία ανησυχία, κυρίως για την ινουλίνη και τον φρουκτο-ολιγοσακχαρίτη, καθώς είναι ουσίες που απαντώνται φυσικά στα τρόφιμα και δεν είναι μεταλλαξιογόνες, καρκινογόνες ή τερατογόνες.

4.10 Μελλοντικές προοπτικές

Η στροφή της σημερινής κοινωνίας σε όλο και πιο υγιεινές επιλογές έχει ως αποτέλεσμα την διέγερση της καινοτομίας και της ανάπτυξης νέων προϊόντων στη βιομηχανία τροφίμων διεθνώς. Συγκεκριμένα, η διατροφή στοχεύει στην διατήρηση της βέλτιστης υγείας, την πρόληψη της πρόωμης εμφάνισης χρόνιων παθήσεων, όπως γαστρεντερικές διαταραχές, καρδιαγγειακές παθήσεις, καρκίνο, οστεοπόρωση, καθώς και την προώθηση της υγιέστερης γήρανσης. Ωστόσο, υπάρχει σύγχυση μεταξύ των καταναλωτών, των οργανώσεων των καταναλωτών, των επιστημονικών κοινοτήτων και των μέσων ενημέρωσης σχετικά με τα προβιοτικά προϊόντα.

Αρκετό ενδιαφέρον υπάρχει μελλοντικά για γενετική τροποποίηση των προβιοτικών, καθώς φαίνεται ότι έτσι ενισχύονται οι ήδη υπάρχουσες ιδιότητες των βακτηρίων (Steidler, 2003). Η διευκρίνιση των μηχανισμών δραστηριότητας ενός προβιοτικού θα μπορούσε να επιτρέψει τον χειρισμό των οργανισμών για τη δημιουργία συγκεκριμένων και στοχευμένων προβιοτικών. Βέβαια, οι καταναλωτές έχουν μία γενική αντίσταση απέναντι σε γενετικά τροποποιημένους οργανισμούς. Όμως, πιστεύεται ότι η δημόσια αποδοχή των γενετικά τροποποιημένων προβιοτικών θα βελτιωθεί ταυτόχρονα με τη σταδιακή έκθεση σε μικροβιακά προϊόντα βιοτεχνολογίας που είναι πλεονεκτικά και παρέχουν οφέλη. Αυτό επιβεβαιώνεται από διάφορες μελέτες που έδειξαν ότι οι καταναλωτές στις ανεπτυγμένες χώρες είναι πρόθυμοι να αποδεχθούν τέτοια προϊόντα εάν προσφέρουν οφέλη για την υγεία του ανθρώπου ή στην ποιότητα των προϊόντων.

4.11 Στρατηγικές ενίσχυσης της προβιοτικής βιωσιμότητας

4.11.1 Επιλογή των προβιοτικών

Τα προβιοτικά που χρησιμοποιούνται στα τρόφιμα θα πρέπει να έχουν υψηλή βιωσιμότητα κατά την επεξεργασία και την αποθήκευσή τους, καθώς επίσης και μετά την διέλευση τους στην άνω εντερική διέλευση, ενώ ταυτόχρονα πρέπει να ασκούν οφέλη για την υγεία του ανθρώπου. Πολλά στελέχη του *Lb. acidophilus* και του *Bifidobacteria* ssp. αδυνατούν να επιβιώσουν στις συνθήκες που επικρατούν στο γαστρεντερικό σύστημα.

4.11.2 Επιλογή της συσκευασίας των τροφίμων

Οι φυσικές ιδιότητες του υλικού συσκευασίας και οι τεχνικές συσκευασίας μπορούν να επηρεάσουν την επιβίωση των προβιοτικών βακτηρίων. Κατά τη πλειοψηφία τα γαλακτοκομικά προβιοτικά προϊόντα αποθηκεύονται και πωλούνται στην αγορά σε πλαστικές συσκευασίες με υψηλή διαπερατότητα οξυγόνου. Όμως, το γένος *Bifidobacteria*, είναι αναερόβιο με υψηλή ευαισθησία στο οξυγόνο, επομένως η συσκευασία αυτή μπορεί να επηρεάσει αρνητικά την επιβίωση των βακτηρίων. Σε περίπτωση αναερόβιου βακτηρίου, η συσκευασία για να έχει ευνοϊκές συνθήκες πρέπει να είναι από υλικό με ιδιότητες φραγμού του οξυγόνου.

4.11.3 Προσθήκη συστατικών ως ‘προβιοτικών προαγωγών’

Διάφορες ενώσεις μπορούν να προστεθούν σε προβιοτικά προϊόντα και να λειτουργήσουν ως προαγωγείς ανάπτυξης (π.χ. σάκχαρα, βιταμίνες, μέταλλα, πρεβιοτικά) ή ως προστατευτικά έναντι συνθηκών επεξεργασίας (π.χ. άπαχο γάλα σε σκόνη, πρωτεΐνη ορού γάλακτος, γλυκερόλη, λακτόζη). Νέες προσεγγίσεις έχουν αποδείξει ότι η χρήση εδωδιμων μεμβρανών προβιοτικών προαγωγών εμπλουτισμένων με προβιοτικά επιφέρει βελτίωση στην επιβίωση του κυτταρικού πληθυσμού.

4.11.4 Εγκλεισμός προβιοτικών βακτηρίων

Ο εγκλεισμός των προβιοτικών βακτηρίων αποτελεί την πιο διαδεδομένη μέθοδο για την βελτίωση της βιωσιμότητας των βακτηρίων και την χορήγηση βιοενεργών ενώσεων. Η ενθυλάκωση ή αλλιώς ο εγκλεισμός μπορεί να οριστεί ως μία διαδικασία παγίδευσης μίας ουσίας (δραστικού παράγοντα) μέσα σε άλλη ουσία (υλικό τοιχώματος). Η ενθυλάκωση των προβιοτικών ενισχύει τη σταθερότητα, ενώ ακόμα διευκολύνει το χειρισμό και την αποθήκευση των προβιοτικών καλλιιεργειών. Επίσης, προστατεύει τα προβιοτικά βακτήρια του γαλακτικού οξέος από το οξυγόνο, την κατάψυξη και τις όξιμες συνθήκες που επικρατούν κατά την παραγωγή, την αποθήκευση και την διέλευση από το γαστρεντερικό σύστημα. Παρακάτω θα αναλυθεί περισσότερο η διαδικασία του εγκλεισμού.

5.Εγκλεισμός και ενσωμάτωση σε μεμβράνες των προβιοτικών βακτηρίων

Η τεχνολογία του εγκλεισμού ή της ενθυλάκωσης χρησιμοποιείται από τη βιομηχανία τροφίμων εδώ και αρκετά χρόνια. Η τεχνολογία ενθυλάκωσης έχει αποδειχθεί ότι είναι ένας από τους πιο αποτελεσματικούς τρόπους προστασίας των προβιοτικών κατά την επεξεργασία και την επακόλουθη αποθήκευση. Επιπλέον, τα συστήματα ενθυλάκωσης έχουν την δυνατότητα να παραδίδουν τα προβιοτικά σε συγκεκριμένο στόχο και να τα απελευθερώσουν την κατάλληλη στιγμή. Μία μορφή εγκλεισμού, αλλά όχι με την κλασική έννοια, αποτελεί και η ενσωμάτωση των προβιοτικών βακτηρίων σε εδώδιμες μεμβράνες. Η μέθοδος αυτή αποτελεί μία νέα προσέγγιση για τη βελτίωση της επιβίωσης των προβιοτικών βακτηρίων.

Με τον όρο ‘εδώδιμες μεμβράνες’ αναφέρεται ένα λεπτό στρώμα φυσικών πολυμερών που χρησιμοποιούνται απευθείας στην επιφάνεια των υλικών για επικάλυψη στα τρόφιμα ή ως φράγμα μεταξύ των τροφίμων και του περιβάλλοντος (Emmambux & Standing, 2007 & Gomez-Gullern et al, 2009). Οι μεμβράνες προστατεύουν τα τρόφιμα από την αλλοίωση και βελτιώνουν την ποιότητα των τροφίμων, λόγω της ικανότητας μείωσης της υγρασίας αλλά και της αλληλεπίδρασης με το περιβάλλον. Επιπλέον, οι μεμβράνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για την παροχή λειτουργικών ενώσεων (Emmambux, Stading, 2007 & Falguera, Quintero, Jimenez, Munoz&Ibarz, 2011). Με βάση τα συστατικά τα οποία περιέχουν μπορούν να ταξινομηθούν ως εξής (Garavand, RouhRazavi, Cacciotti, Mohammadi, 2017 & Jridi et al., 2014 & Skurtys et al., 2010):

1. Υδροκολλοειδή, όπως πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες και αλγινικά,
2. Λιπίδια, όπως λιπαρά οξέα, ακυλογλυκερόλες και κηροί και
3. Σύνθετα φιλμ (σύνθετες μεμβράνες)

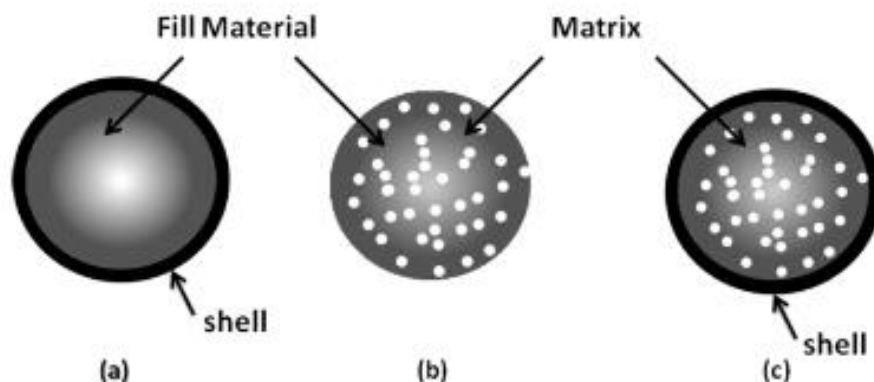
Η μικροενθυλάκωση, όπου τα κύτταρα διατηρούνται μέσα σε μία μήτρα ενθυλάκωσης ή μεμβράνη, έχει αναδειχθεί ως εναλλακτική λύση για την προστασία των προβιοτικών, παρέχοντας ένα μικροπεριβάλλον για τον ενθυλακωμένο μικροοργανισμό καταφέροντας έτσι την ενίσχυση της βιωσιμότητάς τους και ενεργοποιώντας την ελεγχόμενη απελευθέρωση των κυττάρων του στην εντερική οδό (Anal and Singh 2007). Βέβαια, οι κάψουλες θα πρέπει να είναι σε θέση να διατηρηθούν όταν εισέλθουν μέσω του γαστρεντερικού σωλήνα, μέχρι να φτάσουν στο παχύ έντερο, όπου θα πρέπει να θρυμματιστούν και να απελευθερώσουν τα προβιοτικά βακτήρια.

Η ενθυλάκωση ή αλλιώς ο εγκλεισμός είναι μια φυσικοχημική ή μηχανική διαδικασία για την παγίδευση μιας ουσίας σε ένα υλικό προκειμένου να παραχθούν σωματίδια διαμέτρου μερικών νανομέτρων έως μερικών χιλιοστών (Chen and Chen, 2007). Η ουσία που ενθυλακώνει συχνά ονομάζεται επικάλυψη, μεμβράνη, κέλυφος, κάψουλα, υλικό φορέα, εξωτερική φάση ή μήτρα. Ενώ, η ενθυλακωμένη ουσία ονομάζεται ενεργός παράγοντας, πυρήνας, ενεργή, εσωτερική ή ωφέλιμη φάση.

Συνήθως, η τεχνολογία ενθυλάκωσης πραγματοποιείται σε τρία στάδια. Τα στάδια αυτά είναι:

1. Αρχικά, συνιστάται η ενσωμάτωση του βιοδραστικού συστατικού σε μία μήτρα, η οποία μπορεί να είναι υγρή ή στερεή. Στην περίπτωση που το βιοδραστικό συστατικό είναι υγρό, η ενσωμάτωση γίνεται με διάλυση ή διασπορά στη μήτρα, ενώ αν είναι στερεό η ενσωμάτωση γίνεται με συσσωμάτωση ή προσρόφηση.
2. Έπειτα, εάν η μήτρα είναι υγρή διασκορπίζεται, ενώ εάν είναι στερεή πραγματοποιείται κονιοποίηση, δηλαδή η μετατροπή του σε σκόνη.
3. Τέλος, πραγματοποιείται σταθεροποίηση του σωματιδίου με χημική (πολυμερισμό), φυσικοχημική (πήξη/ζελατινοποίηση) ή φυσική (εξάτμιση, στερεοποίηση, συνένωση) διαδικασία.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 5.1, μπορούν να δημιουργηθούν διαφορετικοί τύποι εγκλωβισμού, όπως ο τύπος δεξαμενής και ο τύπος μήτρας. Στην περίπτωση του τύπου δεξαμενής, υπάρχει ένα κέλυφος γύρω από το υλικό του πυρήνα και για αυτό μπορεί επίσης να ονομαστεί κάψουλα. Στην περίπτωση του τύπου μήτρας, ο δραστικός παράγοντας διασκορπίζεται πάνω στο υλικό φορέα και μπορεί επίσης να βρεθεί στην επιφάνεια. Ένας συνδυασμός αυτών των δύο τύπων δημιουργεί έναν τρίτο τύπο κάψουλας, τη μήτρα όπου ο δραστικός παράγοντας ανακτάται με μια επικάλυψη (Zuidam and Shimoni, 2009).



Εικόνα 5.1: Σχηματική αναπαράσταση των συστημάτων ενθυλάκωσης: (α) τύπος δεξαμενής, (β) τύπος μήτρας και (γ) τύπος μήτρας με επίστρωση.

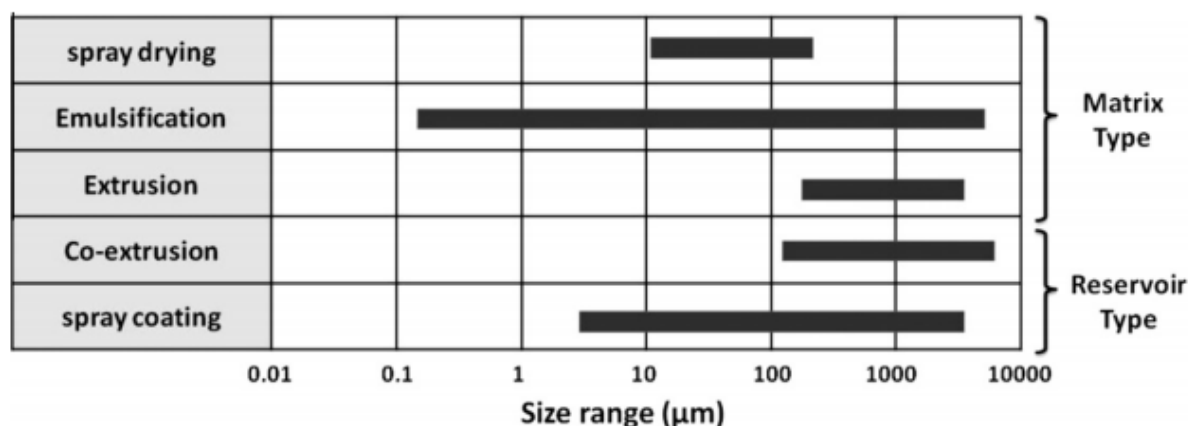
Κατά την επεξεργασία, αλλά και μέχρι την κατανάλωση ενός προϊόντος διατροφής, τα προβιοτικά που περιέχονται πρέπει να προστατεύονται από τα ακόλουθα:

- Συνθήκες επεξεργασίας, όπως είναι η υψηλή θερμοκρασία και η διάτμηση.
- Ξήρανση, εάν εφαρμόζεται σε ξηρό προϊόν τροφής.
- Συνθήκες αποθήκευσης του τροφίμου καθ'όλη την διάρκεια ζωής τους, όπως η συσκευασία και το περιβάλλον (θερμοκρασία, υγρασία, οξυγόνο).
- Υποβάθμιση στο γαστρεντερικό σωλήνα, κυρίως λόγω παρουσίας χαμηλού pH στο στομάχι (pH=2,5-3,5) και των χολικών αλάτων στο λεπτό έντερο.

5.1 Τεχνικές εγκλεισμού

Ως διαδικασία εγκλεισμού μπορεί να οριστεί η διαδικασία στην οποία συσκευάζονται τα ζωντανά κύτταρα μέσα σε ένα κέλυφος για προστασία από δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες, επιτρέποντας την ελεγχόμενη απελευθέρωσή τους υπό εντερικές συνθήκες. Προς το παρόν, έχουν χρησιμοποιηθεί αρκετές μέθοδοι για την ενθυλάκωση προβιοτικών, όπως η ξήρανση με ψεκασμό, η εξώθηση, η γαλακτωματοποίηση και η ξήρανση με ψύξη.

Τα προβιοτικά παρουσιάζουν δύο προβλήματα κατά την διαδικασία της ενθυλάκωσης. Αρχικά, το μέγεθός τους, που συνήθως είναι σε διάμετρο μεταξύ 1 και 5 μm , γεγονός που τα αποκλείει αμέσως από τα νανοτεχνολογικά προϊόντα, και κατά δεύτερον το γεγονός ότι πρέπει να διατηρηθούν ζωντανά (Champagne and Fustier, 2007, Zuidam and Shimoni, 2009). Πολλές τεχνολογίες μπορούν να εφαρμοστούν στην ενθυλάκωση προβιοτικών και να παράγουν μικροκάψουλες με διαφορετικά χαρακτηριστικά όσον αφορά το εύρος του μεγέθους των σωματιδίων και του τύπου της κάψουλας. Στην παρακάτω εικόνα, παρουσιάζονται οι διαφορετικοί τύποι σωματιδίων που λαμβάνονται με κάθε σύστημα ενθυλάκωσης (τύπος μήτρας ή δεξαμενής).



Εικόνα 5.1.1: Εύρος μεγέθους που παρέχεται ανάλογα με την τεχνική ενθυλάκωσης προβιοτικών.

5.1.1 Ξήρανση με ψεκασμό (spray drying)

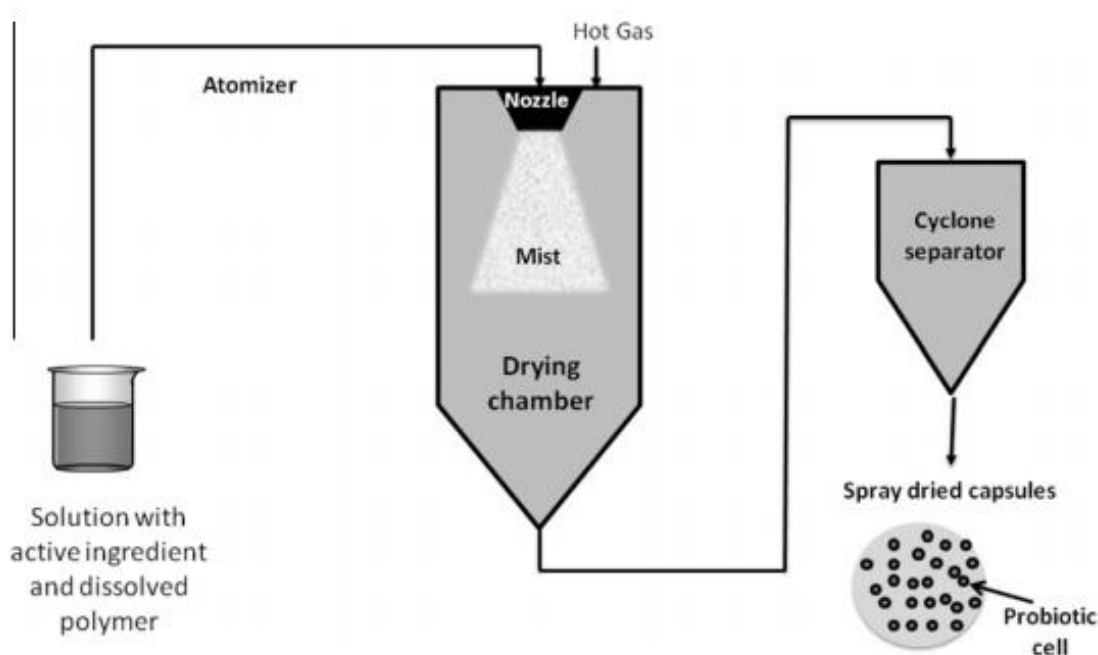
Η ξήρανση με ψεκασμό είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική ενθυλάκωσης στη βιομηχανία τροφίμων, λόγω της δυνατότητας συνεχούς παραγωγής και της δυνατότητας εφαρμογής σε βιομηχανική κλίμακα των τροφίμων. Επιπλέον, αποτελεί μία οικονομική και ταχεία τεχνική που παράγει μικρά σωματίδια καλής ποιότητας που δημιουργούν ένα προϊόν, χωρίς ελαττώματα υφής και ποιότητας. Η ξήρανση με ψεκασμό χρησιμοποιείται συχνά για την ενθυλάκωση ελαίων, αρωμάτων, ενζύμων και φαρμάκων.

Ένα μειονέκτημα της ξήρανσης με ψεκασμό είναι η χρήση υψηλής θερμοκρασίας που δεν είναι συμβατή με την επιβίωση των βακτηρίων. Προκειμένου να βελτιωθεί η επιβίωση των προβιοτικών, μπορούν να προστεθούν προστατευτικά μέσα στο διάλυμα πριν από την ξήρανση. Για παράδειγμα, το κοκκώδες άμυλο βελτιώνει τη βιωσιμότητα

της καλλιέργειας κατά την ξήρανση και την αποθήκευση. Ενώ ακόμα, οι κάψουλες που έχουν αφηδατωθεί με ψεκασμό μπορούν να επικαλυφθούν με ένα πρόσθετο στρώμα προκειμένου να προστατευθούν από το όξινο περιβάλλον του στομάχου ή να μειωθεί η επιβλαβής επίδραση των χολικών αλάτων (Semyonov et al., 2010).

Η διαδικασία που ακολουθείται κατά την ξήρανση με ψεκασμό είναι:

- i. Παρασκευάζεται ένα διάλυμα που περιέχει τα προβιοτικά κύτταρα και τη διαλυμένη μήτρα πολυμερούς. Συνήθως, ως πολυμερείς μήτρες χρησιμοποιούνται αραβικό κόμμα και άμυλο, επειδή έχουν την τάση να σχηματίζουν σφαιρικά μικροσωματίδια κατά τη διαδικασία ξήρανσης (Chen and Chen, 2007, Kailasapathy, 2009, De Vos et al., 2010).
- ii. Το διάλυμα πιέζεται και στη συνέχεια ψεκάζεται για να σχηματίσει μια «νέφος» στο θάλαμο ξήρανσης. Το θερμό αέριο (αέρας ή άζωτο) διογκώνεται επίσης στον θάλαμο ξήρανσης. Αυτό το θερμό αέριο επιτρέπει την εξάτμιση του διαλύτη και την δημιουργία λεπτών ξηραμένων σταγονιδίων. Ο βιομηχανικός εξοπλισμός έχει ρυθμούς εξάτμισης από 0,1 έως 12 tn/h.
- iii. Τέλος, οι κάψουλες μεταφέρονται σε διαχωριστή κυκλώνα για ανάκτηση από όπου προκύπτουν τα επιθυμητά σφαιρίδια.



Εικόνα 5.1.1.1: Σχηματική παράσταση της διαδικασίας ξήρανσης με ψεκασμό.

5.1.2 Ψύξη με ψεκασμό (*Spray cooling/spray chilling*)

Η τεχνική της ψύξης με ψεκασμό είναι παρόμοια με αυτή της ξήρανσης με ψεκασμό που αναλύθηκε στο 5.1.1. Συγκεκριμένα, στην ψύξη με ψεκασμό, το δραστικό συστατικό διασκορπίζεται σε τετηγμένο υλικό, που συνήθως είναι λίπος που χρησιμεύει ως φορέας. Ο κρύος αέρας που διέρχεται στον θάλαμο πραγματοποιεί τη στερεοποίηση των μικροκαψουλών. Συνήθως, η ψύξη με ψεκασμό αναφέρεται σε

ενθυλάκωση τύπου μήτρας (εικόνα 3.1 (β)), λόγω της συσσωμάτωσης των δραστικών συστατικών, τα οποία μπορεί να βρεθούν στην επιφάνεια της σφαίρας και να απελευθερωθούν εύκολα.

Η μέθοδος αυτή είναι η πιο οικονομική, ενώ παρέχει τη δυνατότητα αύξησης του μικροβιακού πληθυσμού των προβιοτικών. Επίσης, στη συγκεκριμένη τεχνική χρησιμοποιούνται χαμηλές θερμοκρασίες, που διευκολύνουν την εφαρμογή της με θερμοευαίσθητους μικροοργανισμούς. Τέλος, οι κάψουλες που παρασκευάζονται είναι αδιάλυτες στο νερό, λόγω της χρήσης κηρού ή ελαίου ως φορέων. Σε αυτήν τη διαδικασία, τριγλυκερίδια, λιπαρά οξέα, έλαια, κηροί και άλλα λιπίδια θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως υλικά εγκλεισμού.

Από την άλλη πλευρά, η ψύξη με κατάψυξη έχει χαμηλή ικανότητα ενθυλάκωσης και πιθανή αποβολή των εγκλεισμένων κυττάρων από τη μήτρα κατά την αποθήκευση, λόγω των διαδικασιών στερεοποίησης και κρυστάλλωσης των λιπιδίων. Βέβαια, παρόλα αυτά, υπάρχουν αρκετά παραδείγματα στα οποία χρησιμοποιήθηκαν προβιοτικά εγκλεισμένα με ψύξη με ψεκάσμο και είχαν θετικά αποτελέσματα. Ένα παράδειγμα είναι η ενθυλάκωση *Lactobacillus acidophilus* και *Bifidobacterium animalis* subsp. χρησιμοποιώντας ως υλικό εγκλεισμού φυτικό λίπος. Έπειτα, έγινε προσθήκη σε αλμυρές μπάρες δημητριακών και δεν παρατηρήθηκε αλλαγή στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του προϊόντος, ενώ οι εγκλεισμένοι μικροοργανισμοί παρουσίασαν υψηλά ποσοστά βιωσιμότητας κατά την αποθήκευση στο ψυγείο τουλάχιστον για 90 ημέρες.

5.1.3 Ξήρανση με κατάψυξη (*Freeze drying/lyophilisation*)

Η ξήρανση με κατάψυξη ή αλλιώς λυοφιλίωση είναι μία διαδικασία, κατά την οποία ένα προϊόν καταψύχεται πρώτα και στη συνέχεια ξηραίνεται με εξάχνωση του πάγου. Η διαδικασία της ξήρανσης με κατάψυξη πραγματοποιείται σε τέσσερα στάδια:

1. Κατάψυξη.
2. Εξάχνωση του πάγου, που ονομάζεται κύρια ξήρανση (MD).
3. Εκρόφηση του νερού που συνδέεται με το στερεό, που ονομάζεται δευτερογενής ξήρανση.
4. Συσκευασία σε δοχεία για να αποκλείεται η απορρόφηση νερού και οξυγόνου από την ατμόσφαιρα.

Η ξήρανση με κατάψυξη έχει το πλεονέκτημα ότι όταν χρησιμοποιείται αποφεύγεται η οξείδωση και το στάδιο ξήρανσης είναι λιγότερο επιζήμιο για τα κύτταρα σε σύγκριση με τις υψηλές θερμοκρασίες ξήρανσης που χρησιμοποιούνται συνήθως. Όμως, η ξήρανση με κατάψυξη αποτελεί μία ενεργειακά δαπανηρή διαδικασία (Chavez and Ledebouer, 2007) και υπάρχει ανησυχία διότι είναι πιθανός ο σχηματισμός κρυστάλλων κατά τη βραδεία κατάψυξη. Οι κρύσταλλοι αυτοί μπορούν να επιφέρουν βλάβη στα κύτταρα αν δεν υπάρχει η σωστή αντιμετώπιση. Συγκεκριμένα, πρέπει να προστίθενται αντιψυκτικά, ή αλλιώς κρυοπροστατευτικά υλικά, ούτως ώστε να μειώνεται το σημείο πήξης του νερού και κατά συνέπεια η πίεση

ατμών του. Τα ιδανικά κρυοπροστατευτικά πρέπει να είναι κατάλληλα για τρόφιμα, να διαπερνούν το κυτταρικό τοίχωμα και να μην περιέχουν τοξικές ουσίες.

5.1.4 Επικάλυψη με ψεκασμό (Spray coating)

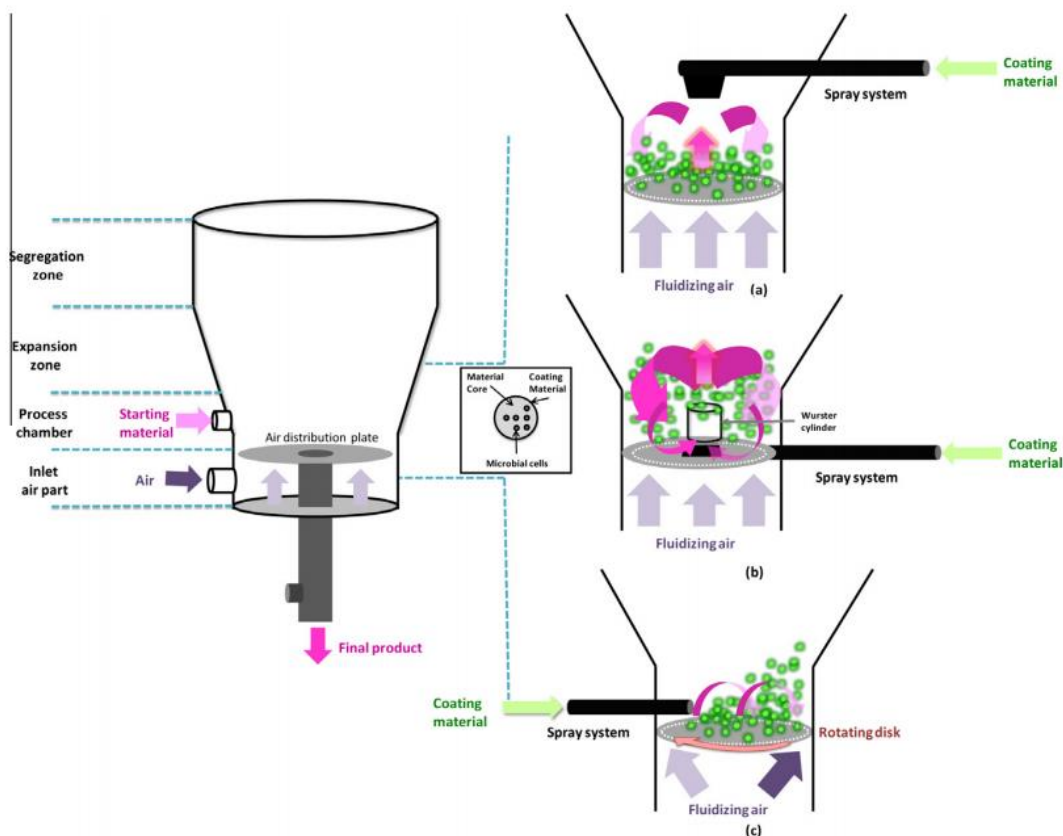
Η επικάλυψη με ψεκασμό βασίζεται στο σχηματισμό ενός ομοιόμορφου στρώματος πάνω σε στερεά σωματίδια. Για να πραγματοποιηθεί η επικάλυψη πρέπει το υλικό του πυρήνα να είναι σε στερεή μορφή και να διατηρείται σε κίνηση σε ένα ειδικά σχεδιασμένο δοχείο, όπως φαίνεται και στην εικόνα 3.1.4.1. (Champagne and Fustier, 2007, De Vos et al., 2010). Συγκεκριμένα, ένα υγρό υλικό επικάλυψης ψεκάζεται πάνω στο υλικό του πυρήνα και στερεοποιείται για να σχηματίσει ένα στρώμα στην επιφάνεια. Το υγρό υλικό της επικάλυψης μπορεί να εγχυθεί από πολλές γωνίες πάνω στο υλικό του πυρήνα:

(α) με επένδυση υγρού στρώματος για την επικάλυψη με ψεκασμό,

(β) με πυθμένα ρευστοποιημένης κλίνης με τη συσκευή Wurster για την επικάλυψη με ψεκασμό,

(γ) με εφαπτομενική ρευστοποιημένη κλίνη για επικάλυψη με ψεκασμό.

Παρά τις τρεις διαφορετικές θέσεις εισόδου αέρα, η βασική λειτουργία είναι η ίδια. Τα προβιοτικά βακτήρια σε σκόνη διατηρούνται σε κίνηση στο θάλαμο και μια επίστρωση ψεκάζεται πάνω τους. Το τελικό υλικό θα έχει διαφορετικά χαρακτηριστικά ανάλογα με τη διαμόρφωση της επικάλυψης με σπρέι που εφαρμόζεται.



Εικόνα 5.1.4.1: Σχηματική αναπαράσταση της επικάλυψης με ψεκάσμο.

Χρησιμοποιείται με μια τεράστια ποικιλία υλικών κελύφους, όπως πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες, λίπη, εκχύλισμα κυττάρων ζύμης ή ακόμη και πολύπλοκες συνθέσεις.

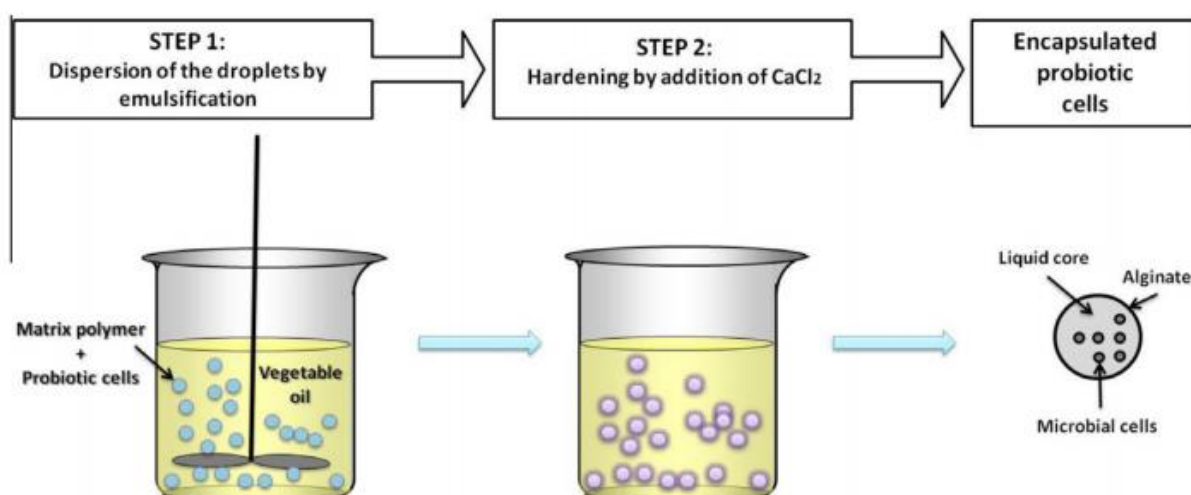
Το πλεονέκτημα της επικάλυψης με ψεκάσμο είναι ότι μπορεί εύκολα να κλιμακωθεί και για αυτό τον λόγο χρησιμοποιείται για την ενθυλάκωση των προβιοτικών βακτηρίων. Η επικάλυψη με ψεκάσμο είναι κατάλληλη για να δίνει πολλές επιστρώσεις. Ωστόσο, η επικάλυψη με ψεκάσμο είναι μια τεχνολογία που είναι δύσκολο να εφαρμοστεί.

5.1.5 Γαλακτωματοποίηση (emulsification)

Με τον όρο γαλακτώμα αναφέρεται ένα μείγμα δύο ή περισσότερων μη αναμίξιμων υγρών όπου το ένα υγρό (δισπαρμένη φάση) διασκορπίζεται στο άλλο (συνεχής φάση). Τα πιο συνήθη γαλακτώματα είναι νερό σε έλαιο (w/o), έλαιο σε νερό (o/w) και νερό σε έλαιο σε νερό (w/o/w) (Goibier, Pillement, Monteil, Faure, & Leal-Calderon, 2020). Τα γαλακτώματα έχουν χρησιμοποιηθεί σε βιομηχανίες φαρμάκων και τροφίμων, καθώς βελτιώνουν τη διαλυτότητα, τη φυσιολογική δραστηριότητα και τη σταθερότητα των ενδιαφερόμενων ενώσεων. Η γαλακτωματοποίηση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον εγκλεισμό προβιοτικών βακτηρίων, αφού έχει παρατηρηθεί αύξηση της επιβίωσης των βακτηρίων και είναι κατάλληλη για ελεγχόμενη απελευθέρωση των εγκλεισμένων παραγόντων.

Η γαλακτωματοποίηση είναι μία τεχνική για την ενθυλάκωση προβιοτικών ζωντανών κυττάρων με τη χρήση υδροκολλοειδών (αλγινικό, καραγενάνη και πηκτίνη) ως υλικά ενθυλάκωσης. Η αρχή αυτής της τεχνικής βασίζεται στη σχέση μεταξύ μίας ασυνεχούς και μίας συνεχούς φάσης. Για την ενθυλάκωση με γαλακτωματοποίησης, απαιτείται ένας γαλακτωματοποιητής, ένα επιφανειοδραστικό και έπειτα ένας παράγοντας στερεοποίησης (CaCl_2). (Chen and Chen, 2007; Kailasapathy, 2009; De Vos et al., 2010). Η χρήση υδροκολλοειδών σε γαλακτωματοποιητικά συστήματα για την ενθυλάκωση προβιοτικών είναι γνωστή ως εσωτερική ιοντική πηκτωματοποίηση

Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η προσθήκη ενός μικρού όγκου αιωρήματος κυτταρικού πολυμερούς, δηλαδή η ασυνεχής φάση, σε μεγάλο όγκο φυτικού ελαίου, που είναι η συνεχής φάση. Έπειτα ακολουθεί ομογενοποίηση του μίγματος ώστε να σχηματιστεί γαλάκτωμα νερού σε έλαιο. Μόλις δημιουργηθεί το γαλάκτωμα, το υδατοδιαλυτό πολυμερές πρέπει να διαχωριστεί ώστε να σχηματιστούν μικροσκοπικά σωματίδια εντός της ελαιώδους φάσης.



Εικόνα 5.1.5.1: Σχηματική παράσταση της γαλακτωματοποίησης

Η τεχνική της γαλακτωματοποίησης είναι εύκολο να κλιμακωθεί και δίνει υψηλό ρυθμό επιβίωσης των βακτηρίων. Όμως, το κύριο μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι παρέχει μεγάλο εύρος στο σχήμα και το μέγεθος των σφαιριδίων (Burgain et al., 2011). Η διαδικασία γαλακτωματοποίησης επιτρέπει την ρύθμιση του μεγέθους των μικροσφαιριδίων με μεταβολή της ταχύτητας ανάδευσης και της αναλογίας νερού/ελαίου. Το μέγεθος των σωματιδίων είναι μεταξύ 0,2-5000 μm .

5.1.6 Εξώθηση (*extrusion*)

Η εξώθηση είναι μία φυσική τεχνική που επιτυγχάνει την ενθυλάκωση των προβιοτικών ζωντανών κυττάρων, χρησιμοποιώντας υδροκολλοειδή (αλγινικό, καραγενάνη) ως υλικά ενθυλάκωσης. Η εξώθηση περιλαμβάνει τη χρήση υδροκολλοειδών διαλυμάτων που περιέχουν μικροβιακές καλλιέργειες, οι οποίες

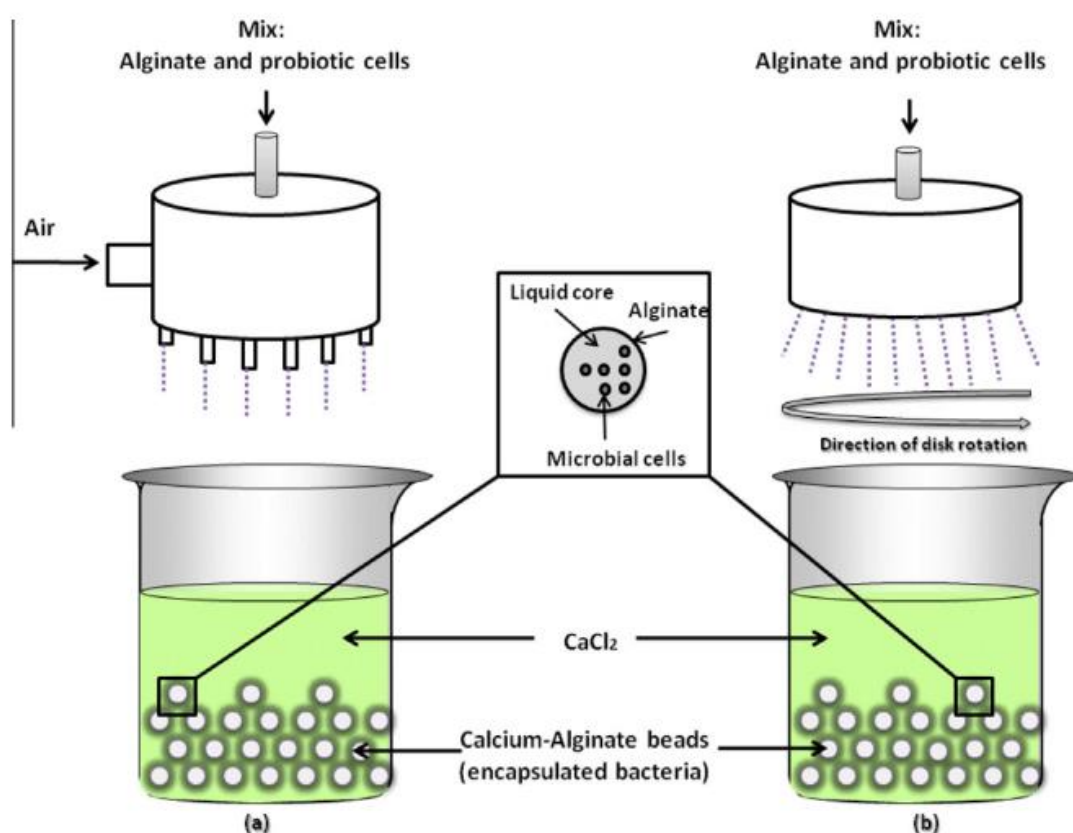
εξωθούνται μέσω ενός ακροφυσίου σε ένα διάλυμα σκλήρυνσης, μετατρέποντάς τα σε πήγμα (gel) και δημιουργώντας σφαιρίδια. Το προκύπτον πήκτωμα είναι κατά βάση σταθερό σε όξινο περιβάλλον κι όχι σε αλκαλικό.

Στην εικόνα 5.1.6.1, παρουσιάζονται δύο τεχνολογίες εξώθησης,

(a) η απλή γεννήτρια σταγονιδίων βελόνας, που συνήθως κινείται με αέρα

(b) και η στερεομένη συσκευή δίσκου.

Συγκεκριμένα, και στις δύο τεχνολογίες τα προβιοτικά κύτταρα προστίθενται σε ένα υδροκολλοειδές διάλυμα και προστίθενται μέσα από μια βελόνα σύριγγας ή μια μηχανή ψεκασμού ακροφυσίου με τη μορφή σταγονιδίων τα οποία αφήνονται να πέσουν σε ένα διάλυμα σκλήρυνσης, όπως το χλωριούχο ασβέστιο, και να δημιουργήσουν τα εγκλεισμένα βακτήρια.



Εικόνα 5.1.6.1: Σχηματική παράσταση της εξώθησης

Η εξώθηση είναι μία απλή, εύκολη μέθοδος με χαμηλό κόστος που δεν προκαλεί βλάβη στα προβιοτικά κύτταρα και έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή εγκλεισμένων προβιοτικών βακτηρίων με υψηλή βιωσιμότητα κατά την αποθήκευση και κατά την προσομοίωση σε γαστρικά και εντερικά υγρά (Krasaekoort et al., 2003). Επιπλέον, δεν περιλαμβάνει επιβλαβείς διαλύτες και μπορεί να πραγματοποιηθεί τόσο υπό αερόβιες όσο και υπό αναερόβιες συνθήκες. Τέλος, με την μέθοδο της εξώθησης σχηματίζονται ομοιόμορφα εγκλεισμένα σωματίδια, ενώ χρησιμοποιούνται ήπιες θερμοκρασίες.

Όμως, παρόλα αυτά η μέθοδος της εξώθησης είναι χρονοβόρα διαδικασία, γεγονός που την καθιστά μη εφαρμόσιμη σε βιομηχανική κλίμακα. Ακόμα, με τη μέθοδο της εξώθησης, δεν είναι δυνατή η παραγωγή μικροσφαιρών μικρότερων των 500 μm, ενώ επίσης απαιτείται η χρήση υδροκολλοειδών διαλυμάτων χαμηλού έως μέτριου ιξώδους (Reis, Neufeld, Vilela, Ribeiro, & Veiga, 2006).

Το μέγεθος των παραγόμενων σφαιριδίων εξαρτάται από (Dong et al., 2013):

- τη διάμετρο του ακροφύσιου,
- την απόσταση μεταξύ της εξόδου του υδροκολλοειδούς διαλύματος και του διαλύματος σκλήρυνσης,
- τον ρυθμό ροής του μίγματος υδροκολλοειδούς και μικροβιακών κυττάρων.

Διάφοροι πολυσακχαρίτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ενθυλάκωση βακτηρίων με εξώθηση, συμπεριλαμβανομένου του αλγινικού και της χιτοζάνης. Η επιλογή του πολυσακχαρίτη πρέπει να γίνεται με προσοχή, καθώς η συγκέντρωσή του μπορεί να επηρεάσει τόσο το σχήμα όσο και το μέγεθος των παραγόμενων σφαιριδίων, καθώς επίσης και την προστασία των εγκλεισμένων κυττάρων.

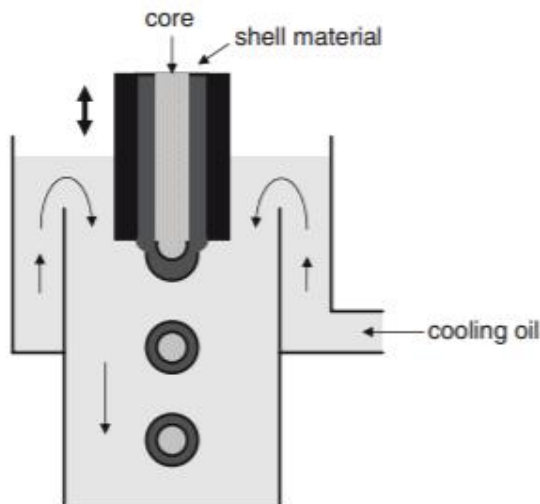
Η τεχνική της εξώθησης μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω διαφόρων μεθόδων, όπως το στάξιμο από τη βαρύτητα, το ηλεκτροστατικό δυναμικό και άλλων. Ο ηλεκτροψεκασμός είναι μία αναδυόμενη τεχνολογία μικροενθυλάκωσης που βασίζεται στην εφαρμογή υψηλού δυναμικού ηλεκτρικού πεδίου για τη λήψη των σφαιρών.

5.1.7 Συν-εξώθηση (Co-extrusion)

Η συνεξώθηση είναι μια τεχνολογία εξώθησης που χρησιμοποιεί ένα ομόκεντρο, ακροφύσιο, το οποίο μπορεί να είναι ακίνητο, περιστρεφόμενο ή δονητικό. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για παρασκευή σφαιρικών μικροσφαιριδίων με υδρόφοβο πυρήνα και υδρόφιλο ή υδρόφοβο κέλυφος που παράγεται με επιφανειακή πηκτωματοποίηση (π.χ., με αλγινικό ασβέστιο ή κάλιο-καραγενάνη) ή με ψύξη (π.χ. ζελατίνη ή λίπος).

Η διαδικασία πραγματοποίησης της εξώθησης μπορεί να είναι:

- i. Εξοπλισμός που χρησιμοποιεί ένα δονούμενο ακροφύσιο πολλών ρευστών με στόχο την παραγωγή σωματιδίων 80-1.500 μm. Η τεχνολογία αυτή βασίζεται στην αρχή ότι ένας στρωτός πίδακας υγρού διασπάται σε σταγονίδια ίσου μεγέθους από μια επάλληλη δόνηση.
- ii. Άλλος εξοπλισμός βασίζεται σε φυγόκεντρη με συνεξώθηση, η οποία οδηγεί στο σχηματισμό στρογγυλών σφαιριδίων στην άκρη του ακροφυσίου.
- iii. Το ακροφύσιο μπορεί επίσης να βυθιστεί σε κινούμενο φορέα και σε υγρό ψύξης, όπως φαίνεται και στην εικόνα 3.1.7.1. Οι κάψουλες μπορεί να είναι περίπου 1-8 mm με τυπικό φορτίο 70-95% (άρωμα, ιχθυέλαιο, βιταμίνες, λυοφιλιωμένα προβιοτικά διασκορπισμένα σε έλαιο κ.λπ.).

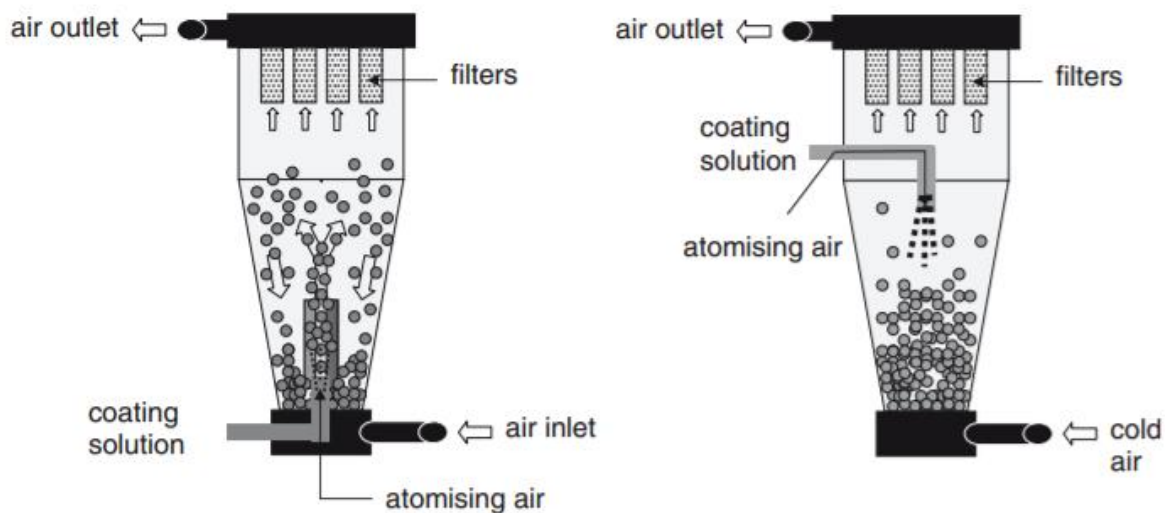


Εικόνα 5.1.7.1: εξοπλισμός βυθισμένης συν-εξώθησης με ένα δονητικό ακροφύσιο στο φορέα και με έλαιο ψύξης

5.1.8 Επικάλυση ρευστοποιημένης κλίνης (*Fluid Bed Coating*)

Η τεχνική της ρευστοποιημένης κλίνης χρησιμοποιείται για επικάλυψη, κοκκοποίηση ή ξήρανση, κατά την οποία μία επικάλυψη ψεκάζεται σε στερεά σωματίδια σε εναιώρημα. Η επίστρωση εφαρμόζεται σε σωματίδια σκόνης είτε σε παρτίδες είτε σε μία συνεχή εγκατάσταση. Τα σωματίδια αιωρούνται εξαιτίας ενός ρεύματος αέρα σε μια συγκεκριμένη θερμοκρασία και ψεκάζονται από ένα υλικό επικάλυψης. Το υλικό της επικάλυψης πρέπει να έχει αποδεκτό ιξώδες ώστε να επιτρέπει την άντληση και τον ψεκασμό, ενώ ακόμα πρέπει να είναι θερμικά σταθερό και να μπορεί να σχηματίζει φιλμ πάνω από μία επιφάνεια σωματιδίων. Το υλικό επικάλυψης μπορεί να είναι ένα υδατικό διάλυμα παραγώγων κυτταρίνης, δεξτρίνης, πρωτεϊνών, κόμμεων και/ή παραγώγων αμύλου (Martin et al, 2015).

Η διαδικασία αποτελείται από ένα θερμαινόμενο θάλαμο, όπου τα σωματίδια που θα καλυφθούν διατηρούνται σε συνεχή κίνηση λόγω της ροής του αέρα. Στην εικόνα 5.1.8.1 παρουσιάζεται η διάταξη επικάλυψης Würster στα αριστερά, στην οποία το υλικό επικάλυψης ψεκάζεται στα σωματίδια μέσα από μία εσωτερική στήλη που φέρνει τα σωματίδια σε κυκλοφορία. Στα δεξιά της εικόνα 5.1.8.1, εμφανίζεται μία διάταξη στην οποία ένα διάλυμα επικάλυψης ψεκάζεται από την κορυφή στα σωματίδια. Αυτές οι δύο χρησιμοποιούνται συνήθως αλλά υπάρχουν και άλλες διατάξεις, οι οποίες περιλαμβάνουν ψεκασμό στον πυθμένα χωρίς την εσωτερική στήλη, ψεκασμό στο πλάι με περιστρεφόμενο δίσκο.



Εικόνα 5.1.8.1: επικάλυψη ρευστοποιημένης κλίνης

Η τεχνική της ρευστοποιημένης κλίνης είναι μία γρήγορη διαδικασία με χαμηλό κόστος και ικανότητα μεγάλων ποσοτήτων προϊόντων. Επιπλέον, μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφορα υλικά ενθυλάκωσης, όπως λιπίδια, πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες. Τέλος, είναι δυνατή η επικάλυψη των σωματιδίων με πολλαπλές επικαλύψεις, αυξάνοντας όμως το κόστος.

5.1.9 Συσσωμάτωση (Coacervation)

Η συσσωμάτωση αποτελεί μία τεχνική ευρέως γνωστή και μελετημένη, που εφαρμόζεται με πολλά υδροκολλοειδή συστήματα, όπως κόμμι ζελατίνης/ακακίας, καραγενάνη, χιτοζάνη, πρωτεΐνη σόγιας και ζελατίνη/καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη.

Η μέθοδος της συσσωμάτωσης βασίζεται στον διαχωρισμό της υγρής-υγρής φάσης ενός υδατικού διαλύματος σε μία φάση πλούσια σε πολυμερές και σε μία 'φτωχή' σε πολυμερές. Σύμφωνα με τον αριθμό των πολυμερών τύπων που υπάρχουν, η διαδικασία μπορεί να αναγνωριστεί ως απλή συσσωμάτωση, όταν εμπλέκεται μόνο ένας τύπος πολυμερούς ή πολύπλοκη συσσωμάτωση, όταν είναι δύο ή περισσότερα είδη πολυμερών με αντίθετα ιοντικά φορτία. Με μία αλλαγή στο pH, τα αντίθετα φορτισμένα κολλοειδή συνδέονται μεταξύ τους σχηματίζοντας ένα στρώμα γύρω από τη δραστική ουσία.

Η τεχνική της συσσωμάτωσης αποτελεί μία διαδικασία που επιτυγχάνει υψηλό φορτίο, όμως το κόστος της διαδικασίας είναι υψηλό και δεν είναι δυνατή η παραγωγή μικροσωματιδίων.

5.1.10 Λιποσώματα (Liposomes)

Τα λιποσώματα είναι σφαιρικές διπλές στοιβάδες που αποτελούνται από φωσφολιπίδια που είναι παρόμοια με τις κυτταρικές μεμβράνες. Τα λιποσώματα χρησιμοποιούνται σε μια ποικιλία προϊόντων στη βιομηχανία ποτών, τυριών και στην επεξεργασία εμβολίων. Υδρόφιλα μόρια παγιδεύονται στο υδατοδιαλυτό εσωτερικό του λιποσώματος και υδρόφοβα στο τμήμα που συμπεριφέρεται ως έλαιο.

Όμως, το κόστος αναβάθμισης είναι αρκετά υψηλό και συχνά τα σκευάσματα διατηρούνται σε αρκετά αραιά υδατικά εναιωρήματα, το οποίο αυξάνει ακόμα περισσότερο το κόστος της διαδικασίας.

5.2 Σύγκριση μεθόδων εγκλεισμού

Στον παρακάτω πίνακα αναφέρονται συνοπτικά τα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της κάθε τεχνικής εγκλεισμού που αναφέρθηκαν και στο κεφάλαιο 5.1.

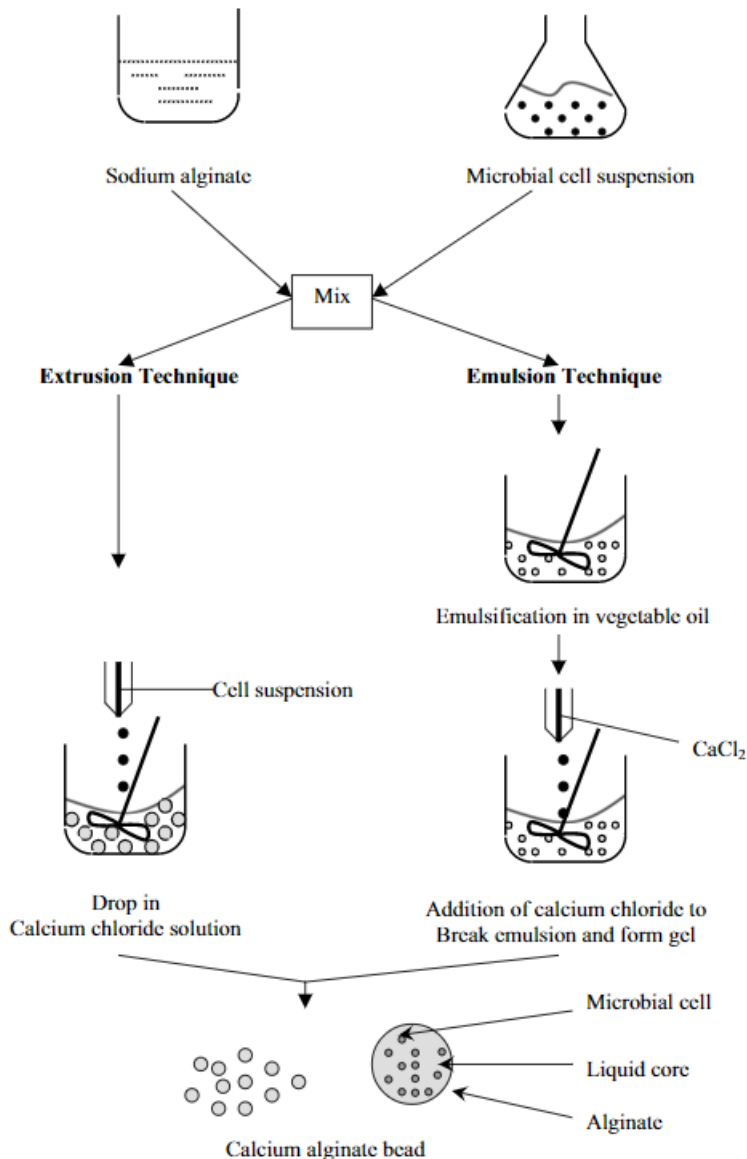
Πίνακας 5.2.1: Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των μεθόδων εγκλεισμού

Μέθοδος εγκλεισμού	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Ξήρανση με ψεκασμό (spray drying)	<ol style="list-style-type: none">1. Μαζική παραγωγή2. Συνεχής διαδικασία3. Κατάλληλο για βιομηχανική κλίμακα4. Φθηνή & γρήγορη μέθοδος	<ol style="list-style-type: none">1. Απώλεια βιωσιμότητας των προβιοτικών λόγω της υψηλής θερμοκρασίας2. Χρησιμοποιείται κυρίως με υδατικά εναιωρήματα, δηλαδή το υλικό κελύφους πρέπει να είναι διαλυτό στο νερό
Ψύξη με ψεκασμό (Spray cooling)	<ol style="list-style-type: none">1. Μαζική παραγωγή2. Συνεχής διαδικασία3. Λιγότερο δαπανηρή τεχνική ενθυλάκωσης4. Ήπιες θερμοκρασίες	<ol style="list-style-type: none">1. Χαμηλή ικανότητα ενθυλάκωσης2. Αποβολή των εγκλεισμένων κυττάρων από τη μήτρα κατά την αποθήκευση
Ξήρανση με κατάψυξη (Freeze drying/lyophilisation)	<ol style="list-style-type: none">1. Ιδανικό τελικό αφυδατωμένο υλικό κατάλληλο για εφαρμογές σε τρόφιμα2. Κατάλληλο για ευαίσθητα υλικά, όπως τα προβιοτικά	<ol style="list-style-type: none">1. Υψηλό κόστος2. Βλάβη κυττάρων, λόγω πιθανής δημιουργίας κρυστάλλων3. Ανάγκη κρυοπροστατευτικών
Επικάλυψη με ψεκασμό (Spray coating)	<ol style="list-style-type: none">1. Έλεγχος απελευθέρωσης με προσθήκη διαφορετικών επικαλύψεων2. Αύξηση σταθερότητας κατά την αποθήκευση	<ol style="list-style-type: none">1. Μπορεί να προκαλέσει βλάβη στα κύτταρα
Γαλακτωματοποίηση (emulsification)	<ol style="list-style-type: none">1. Εύκολη τεχνική2. Υψηλό ποσοστό βιωσιμότητας των βακτηρίων	<ol style="list-style-type: none">1. Κόστος για επέκταση της εγκατάστασης2. Μεγάλο εύρος στο σχήμα και στο μέγεθος των σφαιριδίων
Εξώθηση (extrusion)	<ol style="list-style-type: none">1. Ήπιες συνθήκες2. Συνεχής διαδικασία	<ol style="list-style-type: none">1. Μη δυνατή παραγωγή μικροσφαιριδίων

		<ul style="list-style-type: none"> 2. Χρονοβόρα και μη εφαρμόσιμη σε βιομηχανική κλίμακα 3. απαραίτητα η χρήση υδροκolloειδών διαλυμάτων
Συν-εξώθηση (Co-extrusion)	<ul style="list-style-type: none"> 1. Έλεγχος μεγέθους σωματιδίων 2. προστασία κατά τη γαστρεντερική οδό 	
Επικάλυψη ρευστοποιημένης κλίνης (Fluid Bed Coating)	<ul style="list-style-type: none"> 1. Γρήγορη, οικονομική διαδικασία 2. Μεγάλη παραγωγή προϊόντων 3. Εύρος χρήσης υλικών ενθυλάκωσης 	<ul style="list-style-type: none"> 1. Αύξηση κόστους για πολλαπλές επικαλύψεις
Συσσωμάτωση (Coacervation)	<ul style="list-style-type: none"> 1. Υψηλό ωφέλιμο φορτίο 2. Ήπια συνθήκες κατά την προετοιμασία 3. Υψηλή ακεραιότητα κελύφους. 	<ul style="list-style-type: none"> 1. Ακριβή μέθοδος 2. Μικρές διαφορές στη δομή των πολυσακχαριτών μπορεί να επηρεάζει την τελική δομή της κάψουλας (ποιοτικός έλεγχος)
Λιπώματα (Liposomes)	<ul style="list-style-type: none"> 1. Βελτίωση θεμάτων γεύσης 2. Καλή προστασία σε ευαίσθητους παράγοντες 3. Μπορεί να μεταφέρει υδρόφοβα και υδρόφιλα μόρια στο ίδιο φορτίο, 	<ul style="list-style-type: none"> 1. Η πιο δαπανηρή, πολύπλοκη τεχνική 2. Χρησιμοποιούνται οργανικοί διαλύτες 3. Οι διαμορφώσεις διατηρούνται σε αραιό υδατικό διάλυμα, 4. Θέματα σταθερότητας σε θερμοκρασία δωματίου, καθώς και σε χαμηλό pH

Γενικά, οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται ιδιαίτερος σε έρευνες για τα προβιοτικά είναι η ξήρανση με ψεκασμό, η γαλακτωματοποίηση και η εξώθηση. Όμως, προς το παρόν η τεχνική της ξήρανσης με ψεκασμό βλάπτει τα κύτταρα λόγω της υψηλής θερμοκρασίας που εφαρμόζεται κατά τη διάρκεια της διαδικασίας με αποτέλεσμα την κακή τελική βιωσιμότητα των κυττάρων. Αυτό την καθιστά μη εφαρμόσιμη για εγκλεισμό προβιοτικών βακτηρίων προς το παρόν.

Όσον αφορά τη μέθοδο της γαλακτωματοποίησης και της εξώθησης, η γαλακτωματοποίηση έχει τη δυνατότητα να παράγει μικρότερες σφαίρες (10mm -1 mm) από τη μέθοδο εξώθησης (0,2-5 mm), ενώ ακόμα είναι ευκολότερη η μαζική παραγωγή με γαλακτωματοποίηση. Όμως, η μέθοδος της γαλακτωματοποίησης μπορεί να είναι πιο ακριβή εάν το φυτικό έλαιο πρέπει να αφαιρεθεί (και να ανακυκλωθεί) και εάν οι μικροσφαίρες πρέπει να πλυθούν για να εξαλειφθεί το υπολειμματικό φυτικό έλαιο από την επιφάνειά τους. Παρακάτω παρουσιάζεται ένα κοινό διάγραμμα ροής για της δύο αυτές μεθόδους:



Διάγραμμα 5.2.1: Διάγραμμα ροής για την μέθοδο της εξώθησης και της γαλακτωματοποίησης αντίστοιχα.

5.3 Ενσωμάτωση προβιοτικών βακτηρίων σε εδώδιμες μεμβράνες

Η ολοένα αυξανόμενη στροφή των καταναλωτών σε πιο υγιεινές επιλογές, έχει οδηγήσει την αγορά σε αναζήτηση νέων τρόπων ενσωμάτωσης των προβιοτικών βακτηρίων στην καθημερινότητα των καταναλωτών. Όμως, τα προβιοτικά προϊόντα αντιμετωπίζουν προβλήματα όσον αφορά την βιωσιμότητά τους με την πάροδο του χρόνου. Για τον λόγο αυτό επιχειρείται να ενταχθούν στο γιαούρτι ως μία εδώδιμη μεμβράνη (Altamirano-Fortoul, Moreno-Terrazas, Quezada-Gallo, & Rosell, 2012).

Οι εδώδιμες μεμβράνες δεν αντικαθιστούν μία εξωτερική συσκευασία, αλλά την βοηθούν να μειώσει την είσοδο του οξυγόνου, δεδομένου ότι μειώνουν τη μεταφορά υγρασίας μεταξύ του τροφίμου και του περιβάλλοντος, συμβάλλοντας έτσι στην επέκταση της σταθερότητας των τροφίμων. Βέβαια, εκτός από τη διασφάλιση καλύτερης ποιότητας και βιωσιμότητας, οι εδώδιμες μεμβράνες μπορούν να μειώσουν την απαιτούμενη ποσότητα συσκευασίας, συμβάλλοντας στη μείωση των αρνητικών περιβαλλοντικών επιπτώσεων που προκαλούνται από την απόρριψη μη βιοαποικοδομήσιμων υλικών.

Η παραγωγή εδώδιμων μεμβρανών πρέπει να γίνεται με τρόπο τέτοιο, ώστε να παρέχεται η ικανότητα επιβίωσης των προβιοτικών βρακτηρίων κατά τη διέλευσή τους μέσω του γαστρεντερικού σωλήνα. Τα υλικά σύνθεσης της μεμβράνης, καθώς και η διαδικασία σχηματισμού της είναι κρίσιμης σημασίας, καθώς σχετίζεται άμεσα με την επιβίωση των βακτηρίων μετά την επεξεργασία και την κατάποση.

5.4 Μέσα εδώδιμων μεμβρανών

Οι εδώδιμες μεμβράνες μπορούν να παραχθούν από υλικά με ικανότητα σχηματισμού φιλμ. Τα συστατικά που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή εδώδιμων μεμβρανών μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις κατηγορίες: υδροκολλοειδή, λιπίδια και σύνθετα υλικά (Garavand, Rouhi, Razavi, Cacciotti, & Mohammadi, 2017 & Jridi et al., 2014; & Skurtys et al., 2010). Συνήθως, προστίθενται και άλλες ενώσεις, όπως πλαστικοποιητές, γαλακτωματοποιητές, με σκοπό να βελτιώσουν τις μηχανικές τους ιδιότητες ή να ενισχύσουν τη σταθερότητα. Οι πλαστικοποιητές κατά βάση απαιτούνται για την παραγωγή εδώδιμων μεμβρανών, ιδίως όταν χρησιμοποιούνται πολυσακχαρίτες ή πρωτεΐνες ως υλικά. Η προσθήκη πλαστικοποιητών ενισχύει την ευκαμψία, τη σκληρότητα και την αντοχή στο σχίσμο της μεμβράνης. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι πλαστικοποιητές είναι η γλυκερόλη, η σορβιτόλη, η σακχαρόζη και η πολυαιθυλενογλυκόλη.

Οι πολυσακχαρίτες που χρησιμοποιούνται συνήθως για την παραγωγή εδώδιμων μεμβρανών είναι παράγωγα κυτταρίνης, δεξτράνες, ινουλίνη, αλγινικό, καραγενάνη, παράγωγα αμύλου, παράγωγα πηκτίνης και χιτοζάνη. Ενώ, οι πρωτεΐνες που χρησιμοποιούνται είναι ζελατίνη, γλουτένη σίτου, πρωτεΐνη σόγιας, κολλαγόνο και καζεΐνη. Μερικά από τα μέσα παραγωγής εδώδιμων μεμβρανών είναι:

5.4.1 Παράγωγα κυτταρίνης

Η κυτταρίνη είναι ο πιο ευρέως χρησιμοποιούμενος πολυσακχαρίτης και το κύριο δομικό συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος των φυτών, που σχετίζεται με τη δομική ακεραιότητα του κυττάρου (Zugenmaier, 2006). Ο πιο σημαντικός περιορισμός των εφαρμογών της κυτταρίνης στην τεχνολογία των τροφίμων είναι το γεγονός ότι είναι αδιάλυτη στο νερό. Αρκετά συχνά χρησιμοποιούνται στις εδώδιμες μεμβράνες τα παράγωγα κυτταρίνης, όπως η μεθυλοκυτταρίνη (MC) και υδροξυπροπυλομεθυλοκυτταρίνη (HPMC). Οι μεμβράνες με βάση την κυτταρίνη και τα παράγωγά της είναι διαφανείς, εύκαμπτες, άοσμες και άγευστες.

Η καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη (CMC) είναι ένα από τα υδατοδιαλυτά κυτταρινικά παράγωγα με μεγάλη ποικιλία εφαρμογών στην βιομηχανία τροφίμων και όχι μόνο. Μερικά χαρακτηριστικά παραδείγματα της εφαρμογής της καρβοξυλομεθυλοκυτταρίνης είναι ως τροποποιητές ιξώδους, και σε λιπαντικά, χαρτιά, φαρμακευτικές εφαρμογές και edώδιμες μεμβράνες (Biswal & Singh, 2004).

5.4.2 Άμυλο

Το άμυλο και τα παράγωγά του έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως ως υδροκολλοειδή τροφίμων, επειδή είναι φθηνό, άφθονο, βιοδιασπώμενο και εύκολα να χρησιμοποιηθεί. Οι μεμβράνες από άμυλο είναι διαφανείς, άοσμες, άγευστες με χαμηλή διαπερατότητα στο οξυγόνο, ενώ επίσης, διαθέτουν εξαιρετικές ιδιότητες φραγμού στο οξυγόνο και το διοξείδιο του άνθρακα, αλλά όχι στο νερό.

5.4.3 Αλγινικό οξύ

Ένας από τους πιο συχνά χρησιμοποιούμενους πολυσακχαρίτες είναι το αλγινικό οξύ. Το αλγινικό έχει την ικανότητα να σχηματίζει μεμβράνες διαφανείς και υδατοδιαλυτές. Στην βιομηχανία, έχει χρησιμοποιηθεί σε προϊόντα κρέατο, αφού έχει τη δυνατότητα να καθυστερεί την αφυδάτωση και να εξαλείφει την οξείδωση των λιπιδίων.

5.5 Εγκλειστικά μέσα

Η επιλογή του κατάλληλου παράγοντα ενθυλάκωσης για την πραγματοποίηση του εγκλεισμού των μικροβιακών κυττάρων είναι απαραίτητη για τη σταθερότητα και τις ιδιότητες των παραγόμενων εγκλεισμένων σωματιδίων. Το υλικό ενθυλάκωσης δεν πρέπει να παρουσιάζει τοξικότητα, καθώς μπορεί να επηρεάσει άμεσα τη μορφολογία, τη διάμετρο και τη διαπερατότητα των σωματιδίων. Επιπλέον, θα πρέπει να προστατεύει τα μικροβιακά κύτταρα από περιβαλλοντικούς παράγοντες και να είναι δυνατή η ελεγχόμενη απελευθέρωση των βακτηρίων. Ακόμα, είναι σημαντικό τα υλικά να έχουν την ικανότητα συγκράτησης της υγρασίας, καθώς μπορεί να επηρεάσει την βιωσιμότητα των κυττάρων.

Τα υλικά που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως υλικά ενθυλάκωσης σε εφαρμογές τροφίμων πρέπει να ανήκουν στα γενικά αναγνωρισμένα ως ασφαλή συστατικά (Generally Recognized as Safe (GRAS)). Αξίζει να αναφερθεί ότι οι κανονισμοί για τα πρόσθετα τροφίμων είναι πολύ πιο αυστηροί από ό, τι για τα φαρμακευτικά προϊόντα ή τα καλλυντικά. Κατά συνέπεια, ορισμένες ενώσεις, οι οποίες είναι ευρέως αποδεκτές για την ενθυλάκωση φαρμάκων, δεν έχουν εγκριθεί για χρήση στη βιομηχανία τροφίμων. Ενώ, υπάρχουν διαφορετικοί κανονισμοί για διαφορετικές ηπείρους, οικονομίες ή χώρες, πρόβλημα το οποίο πρέπει να αντιμετωπίσουν οι παραγωγοί τροφίμων που επιθυμούν να εξάγουν τα προϊόντα τους ή που σκοπεύουν να επεκτείνουν τις αγορές τους.

Κατά βάση για τα τρόφιμα, προτιμώνται φυσικά πολυμερή υλικά, λόγω της βιοδιασπασιμότητάς τους, της συμβατότητάς τους με τη φύση των τροφίμων και την ευρεία διαθεσιμότητα, ενώ επίσης χρησιμοποιείται ο συνδυασμός μέσωσ εγκλεισμού για την επίτευξη των επιθυμητών αποτελεσμάτων. Για την παραγωγή εγκλεισμένων βακτηρίων έχουν χρησιμοποιηθεί αρκετά υλικά, συμπεριλαμβανομένων των πολυσακχαριτών (αλγινικό, φυτικό/μικροβιακό κόμμι, χιτοζάνη, άμυλο, κ-καραγενάνη, κυτταρίνη), πρωτεϊνών (ζελατίνη, πρωτεΐνες γάλακτος) και λιπών.

Στον παρακάτω πίνακα, παρατίθενται ομάδες βιομορίων που είναι πιο κατάλληλες για χρήση σε τρόφιμα, όπου μερικά από αυτά θα αναλυθούν και παρακάτω.

Πίνακας 5.5.1: Υλικά κατάλληλα για μικροενθυλάκωση στη βιομηχανία τροφίμων

Origin	Carbohydrate polymer	Protein	Lipid
Plant	Starch	Gluten (corn)	Fatty acids/alcohols
	– Derivatives	Isolates (pea, soy)	Glycerides
	Cellulose		Waxes
	– Derivatives		Phospholipids
	Plant exudates		
	– Gum arabic		
	– Gum karaya		
	– Mesquite gum		
	Plant extracts		
	– Galactomannans		
– Soluble soybean Polysaccharide			
Marine	Carrageenan		
	Alginate		
Microbial/animal	Xanthan	Cascons	Fatty acids/alcohols
	Gellan	Whey proteins	Glycerides
	Dextran	Gelatin	Waxes
	Chitosan		Phospholipids (Shellac)

5.5.1 Αλγινικό οξύ

Το αλγινικό άλας είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μήτρα ενθυλάκωσης για διάφορες ενώσεις τροφίμων και μη. Το αλγινικό χρησιμοποιείται υπό την μορφή του άλατος αλγινικού οξέος. Το αλγινικό οξύ είναι ένας φυσικός πολυσακχαρίτης που εξάγεται από διάφορα είδη φυκιών και αποτελείται από b-D-μαννουρονικό και α-L-γουλουρονικό οξύ. Η σύνθεση της πολυμερούς αλυσίδας ποικίλλει σε ποσότητα και σε κατανομή σύμφωνα με την πηγή του αλγινικού άλατος (καφέ φύκια, ορισμένα βακτήρια) και αυτό επηρεάζει τις λειτουργικές ιδιότητες του αλγινικού (Martinsen et al. 1989; Gombotz and Wee 1998).

Το αλγινικό σχηματίζει μικροσφαίρες τύπου μήτρας που μπορούν να ληφθούν με εξώθηση. Όταν εφαρμόζεται μία υδρόφοβη επίστρωση πάνω από την αλγινική μήτρα, το αποτέλεσμα είναι μία μικροκάψουλα μήτρας κελύφους (shell-matrix microcapsule) και εάν η μήτρα είναι χύμα, τότε η μικροκάψουλα είναι τύπου κελύφους-πυρήνα (shell-core microcapsule). Οι υδροπηκτές αλγινικού χρησιμοποιούνται ευρέως στον εγκλεισμό κυττάρων (Rowley et al., 1999) και το αλγινικό ασβέστιο προτιμάται για τον

εγκλεισμό προβιοτικών λόγω της απλότητας, της μη τοξικότητας, της βιοσυμβατότητας και του χαμηλού κόστους (Krasaekoort et al, 2003).

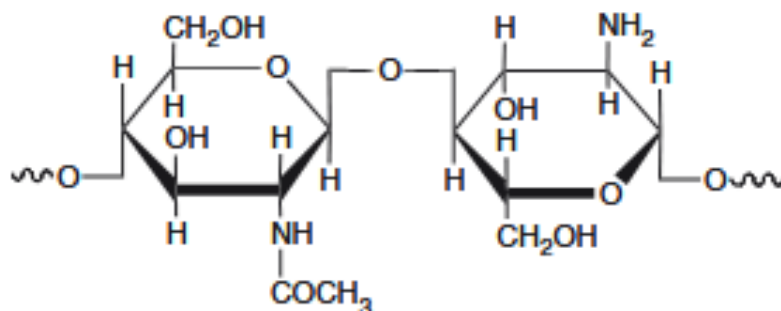
Τα υδατικά διαλύματα πολυσακχαριτών σχηματίζουν υδροπηκτές παρουσία δισθενών ιόντων Ca^{2+} , μέσω ιοντικών αλληλεπιδράσεων. Τα πηκτώματα αλγινικού ασβεστίου είναι φυσικά πολυμερή με μηχανικές ιδιότητες και ικανότητα εγκλεισμού, που εξαρτώνται από τη σύνθεση του αλγινικού άλατος. Ο εγκλεισμός με αλγινικό ασβέστιο μπορεί να πραγματοποιηθεί και με την μεθόδο της εξώθησης, αλλά και της γαλακτωματοποίησης. Στην περίπτωση της γαλακτωματοποίησης, είναι απαραίτητη η προσθήκη ενός λιποδιαλυτού οξέος, όπως το οξικό οξύ, έτσι ώστε να μειωθεί το pH του αλγινικού από 7,5 σε περίπου 6,5, επιτρέποντας την έναρξη της πήξης με Ca^{2+} (Poncelet et al. 1993). Γενικά, η επιβίωση των προβιοτικών βακτηρίων εγκλεισμένων σε σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως η συγκέντρωση του αλγινικού και του διαλύματος πηκτωματοποίησης ($CaCl_2$), η διάρκεια της πήξης και η συγκέντρωση των κυττάρων (Chandramouli et al. 2004, Lee et al. 2004, Lee and Heo 2000, Sheu et al. 1993). Για παράδειγμα, η αύξηση της συγκέντρωσης του αλγινικού από 2% σε 4%, οδήγησε σε αύξηση της βιωσιμότητας του *Lactobacillus casei* (Mandal et al. 2006).

Η ενθυλάκωση σε σφαιρίδια πηκτής αλγινικού ελαχιστοποιεί αποτελεσματικά τις βακτηριοκτόνες επιδράσεις του γαστρικού pH και μεγιστοποιεί τον αριθμό των εγκλεισμένων βακτηριακών κυττάρων που φθάνουν στο έντερο. Η διαδεδομένη χρήση του αλγινικού άλατος σε μελέτες ενθυλάκωσης προβιοτικών, στις βιομηχανίες τροφίμων και φαρμάκων, οφείλεται και στο γεγονός ότι ταξινομείται ως ασφαλές για χρήση στην Ευρωπαϊκή Ένωση και στις Ηνωμένες Πολιτείες, και ως εκ τούτου, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως λειτουργικό συστατικό.

Όμως, παρόλα αυτά η χρήση του αλγινικού οξέος παρουσιάζει και ορισμένα μειονεκτήματα. Αρχικά, τα σφαιρίδια που έχουν δημιουργηθεί με αλγινικό είναι ευαίσθητα σε συνθήκες όξινου περιβάλλοντος, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την δύσκολη βιωσιμότητα στις συνθήκες που επικρατούν στο στομάχι. Ενώ ακόμα, να σημειωθεί ότι από έρευνες που πραγματοποιήθηκαν σε διάφορα στελέχη *Bifidobacterium* spp εγκλεισμένων σε αλγινικό ασβέστιο, διαπιστώθηκε ότι μόνο το *B. Lactis* Bb-12 είναι ανθεκτικό σε συνθήκες χαμηλού pH και σε χολικά άλατα.

5.5.2 Χιτοζάνη

Η χιτοζάνη είναι ένας γραμμικός πολυσακχαρίτης, ο οποίος μπορεί να θεωρηθεί ως συμπολυμερές αποτελούμενο από μονάδες γλυκοζαμίνης, όπως φαίνεται και στο σχήμα 3.3.2.1. Έχει χαρακτηριστεί ως ασφαλές συστατικό (Generally Recognized as Safe (GRAS)) από την Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) και είναι βιοσυμβατό και διαλυτό σε όξινο pH.



Εικόνα 5.5.2.1: Κύρια χημική δομή της χιτοζάνης

Η χιτοζάνη μπορεί να ταξινομηθεί ως μη μόνιμα φορτισμένος κατιονικός πολυηλεκτρολύτης. Λόγω της τιμής της σταθεράς pK_a , που είναι περίπου 6,5, η χιτοζάνη είναι θετικά φορτισμένη και διαλυτή σε όξινο έως ουδέτερο μέσο.

Η κυριότερη πηγή προέλευσης της χιτοζάνης είναι η χιτίνη, η οποία είναι διαθέσιμη σε αφθονία, καθώς έχει ετήσια παραγωγή 10^{10} - 10^{12} τόνους βιομάζας. Στη φύση η χιτοζάνη φαίνεται ότι υπάρχει σε ορισμένους μικροοργανισμούς και σε ορισμένους μύκητες.

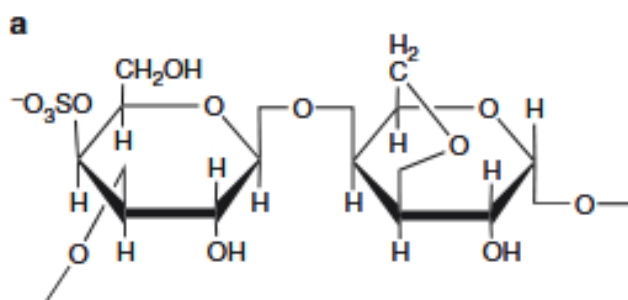
Η χιτοζάνη αποτελεί ένα σημαντικό βιοϋλικό σε τρόφιμα και φαρμακευτικές εφαρμογές λόγω των ευνοϊκών ιδιοτήτων του, όπως η καλή βιοσυμβατότητα, η βιοδιασπασιμότητα και η μη τοξικότητα. Επιπλέον, η χιτοζάνη έχει την ικανότητα να σχηματίζει ποιοτικά φιλμ. Σε περιπτώσεις χρήσης της χιτοζάνης για επικάλυψη σωματιδίων με ψεκασμό, έχουν σημειωθεί εντυπωσιακά αποτελέσματα όσον αφορά την βιωσιμότητα στο ψυγείο αλλά και στο έντερο (Chávarri et al., 2010).

Η χρήση της χιτοζάνης ως υλικό ενθυλάκωσης για προβιοτικά βακτήρια μπορεί να παρουσιάσει μειονεκτήματα, καθώς αυτός ο πολυσακχαρίτης έχει ανασταλτική δράση έναντι μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένων των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος (Groboillot et al., 1993). Έτσι, η χιτοζάνη χρησιμοποιείται κυρίως ως επικάλυψη σε σφαιρίδια πηκτής αλγινικού άλατος (Mortazavian et al., 2008).

Η χιτοζάνη σε συνδυασμό με αλγινικό άλας μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την επίτευξη υψηλών κυτταρικών φορτίων. Ωστόσο, η βιωσιμότητα των εγκλωβισμένων μικροοργανισμών εξαρτάται από τον τρόπο με τον οποίο η χιτοζάνη διασυνδέεται με το αλγινικό άλας. Δηλαδή εξαρτάται εάν αλληλεπιδρούν και σχηματίζουν μήτρα μαζί, δηλαδή η χιτοζάνη είναι το εσωτερικό πολυμερές, ή εάν η χιτοζάνη δημιουργεί ένα εξωτερικό στρώμα γύρω από την αλγινική σφαίρα, δηλαδή, η χιτοζάνη είναι το εξωτερικό πολυμερές.

5.5.3 κ-καραγενάνη

Η κ-καραγενάνη είναι ένας φυσικός πολυσακχαρίτης απομονωμένος από θαλάσσια μακροφύκη, που χρησιμοποιείται συνήθως ως πρόσθετο τροφίμων. Είναι υψηλής μοριακής μάζας, ενώ οι επιμέρους δομές εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από την πηγή που προέρχεται η κ-καραγενάνη και τις συνθήκες που επικρατούν κατά την εκχύλιση και τον καθαρισμό.



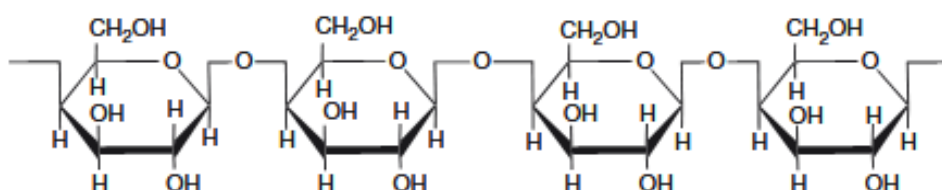
Εικόνα 5.5.3.1: Κύρια χημική δομή της κ-καραγενάνης

Η κ-καραγενάνη έχει την ικανότητα διάλυσης στο νερό σε θερμοκρασία υψηλότερη από τους 70°C. Επιπλέον, η κ-καραγενάνη μπορεί να σχηματίσει πηκτή, παρουσία του κατάλληλου κατιόντος, όπως το K^+ και το Ca^{2+} . Η διασπορά της πηκτής της κ-καραγενάνης σε μικρά σταγονίδια πρέπει να πραγματοποιηθεί σε υψηλές θερμοκρασίες (40-45 °C) και η πήξη συμβαίνει κατά τη διαδικασία ψύξης σε θερμοκρασία δωματίου. Ενώ τέλος, γίνεται προσθήκη ιόντων καλίου ή ασβεστίου για τη σταθεροποίησή (Krasaekoort et al. 2003).

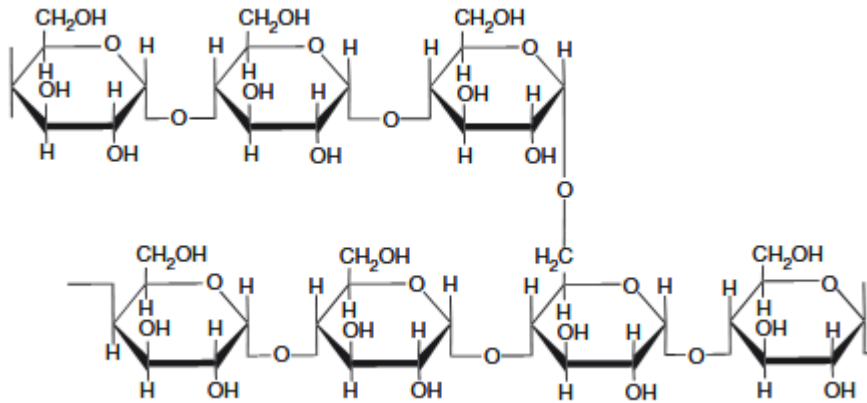
5.5.4 Άμυλο

Το άμυλο είναι ένας πολυσακχαρίτης που αποτελείται από μονάδες γλυκόζης, οι οποίες ενώνονται μεταξύ τους με γλυκοζιτικούς δεσμούς. Αποτελείται κυρίως από αμυλόζη και η αμυλοπηκτίνη. Κανονικά, η περιεκτικότητα σε αμυλόζη κυμαίνεται από 20 έως 30%, ενώ η αναλογία αμυλοπηκτίνης είναι περίπου 70-80%. Η δομή και η σύνθεση ποικίλλει ανάλογα με την πηγή του αμύλου. Μπορεί να είναι άοσμο και άγευστο, ενώ είναι αδιάλυτο σε κρύο νερό, αιθανόλη και στους πιο κοινούς διαλύτες.

Το άμυλο είναι ο δεύτερος σε αφθονία πολυσακχαρίτης μετά την κυτταρίνη. Περιέχεται σε διάφορες φυσικές πηγές, όπως ρίζες, σπόρους, φρούτα, ακόμα και σε κόκκους γύρης. Από έρευνες έχει παρατηρηθεί αύξηση της βιωσιμότητας των προβιοτικών βακτηρίων όταν προστεθεί σε μήτρα και άμυλο.



Εικόνα 5.5.4.1: Κύρια χημική δομή της αμυλόζης



Εικόνα 5.5.4.1: Κύρια χημική δομή της αμυλοπηκτίνης

Το ανθεκτικό άμυλο είναι το άμυλο που δεν αφομοιώνεται από τα παγκρεατικά ένζυμα στο λεπτό έντερο. Το ανθεκτικό άμυλο μπορεί να φτάσει στο παχύ έντερο, όπου θα υποστεί ζύμωση (Sajilata et al., 2006; Anal and Singh, 2007). Αυτό το χαρακτηριστικό αποτελεί σημαντική ιδιότητα για την καλύτερη απελευθέρωση των βακτηριακών κυττάρων στο παχύ έντερο. Επιπλέον, λόγω της πρεβιοτικής του λειτουργικότητας, το ανθεκτικό άμυλο μπορεί να χρησιμοποιηθεί από τα προβιοτικά βακτήρια στο παχύ έντερο (Mortazavian et al., 2008).

5.5.5 Πρωτεΐνες γάλακτος

Το βόειο γάλα περιέχει, εκτός από νερό, λακτόζη, λίπος και άλλα δευτερεύοντα συστατικά, περίπου 3,0 έως 3,6% κατά βάρος πρωτεΐνες. Από το κλάσμα αυτό ένα μέρος αποτελούν οι καζεΐνες και ένα άλλο μέρος οι πρωτεΐνες ορού γάλακτος.

Οι πρωτεΐνες γάλακτος είναι φυσικά οχήματα για τα προβιοτικά κύτταρα και λόγω των δομικών και φυσικοχημικών ιδιοτήτων τους, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μήτρες για τον εγκλεισμό των προβιοτικών (Linvney, 2010). Για παράδειγμα, οι πρωτεΐνες έχουν εξαιρετικές ιδιότητες πήξης, για τον λόγο αυτό διερευνάται ώστε να διαπιστωθεί αν είναι κατάλληλες για ενθυλάκωση προβιοτικών κυττάρων (Heidebach et al. 2009).

5.5.6 Ζελατίνη

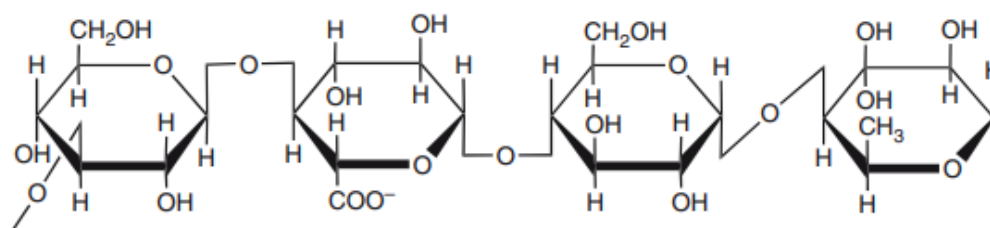
Η ζελατίνη είναι ένα κόμμα πρωτεΐνης, το οποίο δημιουργεί μία θερμοαναστρέψιμη πηκτή και χρησιμοποιήθηκε για την ενθυλάκωση προβιοτικών, μόνο του ή σε συνδυασμό με άλλες ενώσεις. Οι ζελατίνες στην καθαρή τους μορφή είναι ημιδιαφανείς, εύθραυστες στερεές ουσίες, οι οποίες είναι άχρωμες ή ελαφρώς κίτρινες, ενώ τέλος είναι σχεδόν άγευστες και άοσμες. Η ζελατίνη είναι, επίσης, διαλυτή στους περισσότερους πολικούς διαλύτες, ενώ διαλυτότητά της καθορίζεται από την πηγή και

τη μέθοδο παρασκευής. Με την θέρμανση οι ζελατίνες μπορούν να τακούν, ενώ με την ψύξη επαναστερεοποιούνται (Krasaekoort et al., 2003; Anal and Singh, 2007).

Οι ζελατίνες δεν εμφανίζονται φυσικά αλλά παράγονται από κολλαγόνο με διαδικασίες που καταστρέφουν τη δομή του κολλαγόνου. Η διαδικασία παρασκευής είναι αρκετά πολύπλοκη και πραγματοποιείται με χρήση δερμάτων και οστών από εξημερωμένα βοοειδή, χοίρους και άλογα ως προτιμώμενες πηγές, αλλά και δέρμα ψαριού έχει επίσης χρησιμοποιηθεί. Δύο κύριες διεργασίες διακρίνονται τελικά, αποδίδοντας δύο κυρίως διαφορετικούς τύπους ζελατίνης: ζελατίνες τύπου Α με επεξεργασία με οξύ (pH 1,5-3,0) και τύπου Β με αλκαλική επεξεργασία (pH 12) κολλαγόνου. Συνολικά, η πηγή και η διαδικασία καθορίζουν τις τελικές ιδιότητες της ζελατίνης.

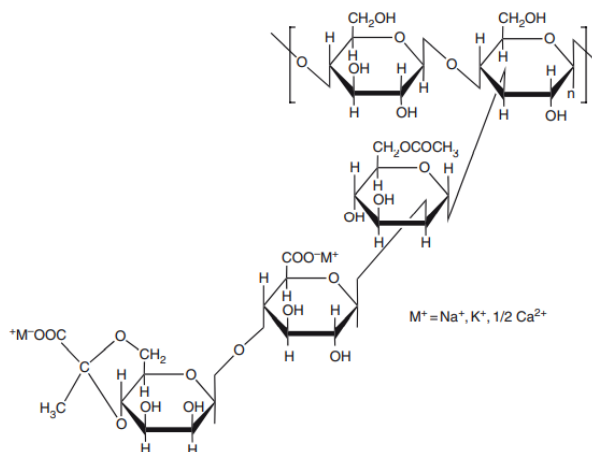
5.5.7 Κόμμι ξανθάνης και ζελάνης

Το κόμμι τζελάνης (Gellan) είναι ένας μικροβιακός πολυσακχαρίτης που προέρχεται από το *Pseudo monas elodea* και αποτελείται από μία επαναλαμβανόμενη μονάδα τεσσάρων μονομερών, που είναι οι δύο μονάδες γλυκόζης και οι άλλες δύο το γλυκουρονικό οξύ και η ραμνόζη, όπως φαίνεται και στην εικόνα 5.5.7.1 (Chen and Chen, 2007).



Εικόνα 5.5.7.1: Κύρια χημική δομή του κόμμεος τζελάνης

Το κόμμι ξανθάνη είναι ένας ανιονικός πολυηλεκτρολύτης υψηλής μοριακής μάζας, ο οποίος είναι άλας νατρίου, καλίου και ασβεστίου, όπως φαίνεται και στην εικόνα 5.5.7.2. Το βακτήριο *Xanthomonas campestris* παράγει το κόμμι ξανθάνης σε καθαρή καλλιέργεια του βακτηρίου με μία αερόβια διαδικασία ζύμωσης σε μέσο γλυκόζης, ενώ αλλαγή στο στέλεχος ή στις συνθήκες ζύμωσης μπορεί να προκαλέσει σημαντικές αλλαγές στα χαρακτηριστικά του κόμμεος.



Εικόνα 5.5.7.2: Κύρια χημική δομή του κόμμεος ξανθάνης

Παρατηρήθηκε ότι η περίπτωση συνέργειας του κόμμεος της ξανθάνης και της ζελάνης για την ενθλάκωση προβιοτικών κυττάρων (Sultana et al., 2000; Sun and Griffiths, 2000) το μίγμα απέτυχε να έχει υψηλή αντοχή σε όξινες συνθήκες σε αντίθεση με το αλγινικό.

5.5.8 Φθαλμική οξική κυτταρίνη

Λόγω του ότι έχει ασφαλή φύση, η φθαλμική οξική κυτταρίνη χρησιμοποιείται για ελεγχόμενη απελευθέρωση φαρμάκων στο έντερο. Το πλεονέκτημα αυτού του συστατικού είναι ότι δεν είναι διαλυτό σε όξινο pH (μικρότερο από 5), αλλά είναι διαλυτό σε pH υψηλότερο από 6. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την επιβίωση των εγκλεισμένων προβιοτικών βακτηρίων στο γαστρεντερικό σύστημα.

5.6 Πλεονεκτήματα & μειονεκτήματα εγκλεισμού

Τα οφέλη της χρήσης του εγκλεισμού στη βιομηχανία τροφίμων είναι:

- Η βελτιωμένη σταθερότητα στο τελικό προϊόν και κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας, δηλαδή λιγότερη εξάτμιση πτητικού δραστικού παράγοντα ή καμία αποικοδόμηση ή αντίδραση με άλλα συστατικά του προϊόντος τροφίμων, όπως το οξυγόνο ή το νερό.
- Βελτιωμένη ασφάλεια, όπως μειωμένος κίνδυνος ευφλεκτικότητας των πτητικών.
- Ακίνησια του ενεργού παράγοντα στα συστήματα επεξεργασίας τροφίμων.
- Αποτελέσματα στην υφή και εμφάνιση του προϊόντος.
- Ρυθμιζόμενες ιδιότητες των ενεργών συστατικών και συγκεκριμένα ως προς το μέγεθος των σωματιδίων, την δομή και το χρώμα.
- Εγκλεισμός, χωρίς προσθήκη γεύσης.
- Ελεγχόμενη απελευθέρωση της ουσίας.

- Μετατροπή της κατάστασης της δραστικής ουσίας, για παράδειγμα από υγρό σε σκόνη, διότι μπορεί να διαθέτει καλύτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά.

Ωστόσο, η ενθυλάκωση έχει και ορισμένα μειονεκτήματα. Συγκεκριμένα:

- Επιπλέον κόστος παραγωγής.
- Πολυπλοκότητα παραγωγικής διαδικασίας.
- Οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τροφίμου αλλοιωμένα που μπορεί να προκαλέσουν ανεπιθύμητες παρατηρήσεις καταναλωτών, οπτικές ή αφής.
- Δυσκολίες για τον έλεγχο της σταθερότητας του τροφίμου.

5.7 Εγκλεισμένα προβιοτικά βακτήρια σε τρόφιμα

Η τεχνολογία της ενθυλάκωσης χρησιμοποιείται ευρέως για διάφορες εφαρμογές στην βιομηχανία τροφίμων. Ενδεικτικά αναφέρονται μερικές, όπως η σταθεροποίηση ενώσεων των τροφίμων, ο έλεγχος των οξειδωτικών αντιδράσεων, η παρατεταμένη ή ελεγχόμενη απελευθέρωση δραστικών συστατικών (προβιοτικά, μέταλλα, βιταμίνες, φυτοστερόλες, ένζυμα λιπαρά οξέα και αντιοξειδωτικά), η κάλυψη δυσάρεστων γεύσεων και οσμών.

Η τεχνική του εγκλεισμού επιφέρει θετικά αποτελέσματα στη βιωσιμότητα των προβιοτικών βακτηρίων και κατά την αποθήκευση, αλλά και κατά τη διέλευσή τους από τη γαστρεντερική οδό. Για αυτόν τον λόγο, η βιομηχανία τροφίμων ερευνά πάνω στην τεχνική της ενθυλάκωσης. Όμως, η προσθήκη μικροκαψουλών μπορεί να επηρεάσει τις οργανοληπτικές ιδιότητες του τροφίμου. Με στόχο την αποφυγή τέτοιων αρνητικών επιπτώσεων, προτείνεται τα εγκλεισμένα να δημιουργούνται σε μέγεθος μικρότερο από 100 μm. Μερικά παραδείγματα εγκλεισμένων προβιοτικών και η εφαρμογή τους σε τρόφιμα παρουσιάζονται παρακάτω.

Food	Probiotic strains	ME technology	Materials
Cream	<i>L. lactis</i>	extrusion	Ca-alginate
Mayonnaise	<i>B. bifidum</i> <i>B. infantis</i>	emulsification	alginate
Dry beverage	<i>Bifidobacterium</i> PL1	spray drying	starch
Banana	<i>L. acidophilus</i>	extrusion	k-Carageenan
Soft foods	<i>B. lactis</i>	extrusion	gellan/xanthan gum
Tomato juice	<i>L. acidophilus</i>		Ca-alginate
Sausages	<i>L. reuteri</i>	extrusion	alginate
		emulsion	
Sausages	<i>L. reuteri</i> <i>B. longum</i>	extrusion	alginate
Biscuits	<i>L. rhamnosus</i>	extrusion	whey protein
Cranberry and vegetable juices			
Oranges and apple juices	<i>L. rhamnosus</i> <i>L. salivarius</i> <i>B. longum</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. acidophilus</i> <i>L. paracasei</i> <i>B. lactis</i>	emulsification	
Chocolate	<i>L. helveticus</i> <i>B. longum</i>	spray-coating	fatty acids
Swine feeding	LAB	extrusion	Ca-alginate
Tomato juice	<i>L. acidophilus</i>	extrusion	
Chocolate	<i>L. helveticus</i> <i>B. longum</i>	spray-coating	
Fresh cheese	<i>L. bulgaricus</i> <i>S. thermophilus</i>	extrusion	Ca-alginate
Cheddar	<i>B. bifidum</i>	emulsification	k-Carageenan
Fresh	<i>L. lactis</i> spp. <i>lactis</i>	emulsification	k-Carageenan
Crescenza	<i>B. bifidum</i> <i>B. infantis</i> <i>B. longum</i>	freeze drying	Ca-alginate
Cheddar	<i>L. paracasei</i>	spray drying	skim milk
Cheddar	<i>L. acidophilus</i> <i>B. infantis</i>	emulsification	alginate/starch
Feta	<i>L. acidophilus</i> <i>B. lactis</i>		alginate
Kasar	<i>L. acidophilus</i> <i>B. bifidum</i>	extrusion and emulsification	alginate
White brined	<i>L. acidophilus</i> <i>B. lactis</i>	extrusion and emulsification	alginate
Yoghurt	<i>L. acidophilus</i> <i>B. longum</i>	spray-drying	maltodextrin/gum arabic
Yoghurt	<i>L. acidophilus</i>	extrusion	alginate-chitosan
Yoghurt	<i>L. casei</i>	extrusion	alginate/pectin

Εικόνα 5.7.1: Παραδείγματα εγκλεισμένων προβιοτικών βακτηρίων και οι εφαρμογές τους σε διάφορα συστήματα τροφίμων

5.7.1 Τυρί

Διάφορες μελέτες έχουν χρησιμοποιήσει ενθυλακωμένα προβιοτικά βακτήρια σε τυριά. Κατά βάση έχει χρησιμοποιηθεί το τυρί Cheddar, εξαιτίας του υψηλού pH του, καθώς συγκεκριμένα έχει την τιμή 5,5, το τυρί Cheddar παρουσιάζει το πλεονέκτημα ότι είναι καλός φορέας προβιοτικών μικροοργανισμών. Ακόμα, διαθέτει καλή ρυθμιστική ικανότητα και σχετικά υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά τα οποία μπορούν

να προσφέρουν προστασία στα προβιοτικά βακτήρια έναντι της ενζυματικής διάσπασης και του όξινου περιβάλλοντος της γαστρεντερικής οδού.

Οι Dinakar and Mistry (1994) ενθυλάκωσαν κύτταρα *Bifidobacterium bifidum* με την τεχνική της γαλακτωματοποίησης και τα σφαιρίδια που παράχθηκαν, καταψύχθηκαν και λυοφιλοποιήθηκαν. Η προσθήκη των αυτών των κυττάρων στο τυρί δεν ήταν ομοιόμορφα κατανεμημένη, αλλά η επιβίωσή τους στο τυρί δεν επηρεάστηκε. Μάλιστα, τα κύτταρα παρέμειναν βιώσιμα για 24 εβδομάδες, χωρίς να επηρεάσουν τη γεύση, την ένταση της γεύσης, την υφή και την εμφάνιση του τυριού. Η χαμηλή θερμοκρασία ωρίμανσης (6-7 ° C) δεν ευνοεί την ανάπτυξη των bifidobacteria, καθώς η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης είναι οι 37 ° C, αλλά παραμένουν βιώσιμα.

5.7.2 Γιαούρτι

Το γιαούρτι αποτελεί ένα από τα δημοφιλέστερα ζυμωμένα γαλακτοκομικά προϊόντα που έχουν ενισχυθεί με προβιοτικά βακτήρια. Η ενσωμάτωση των προβιοτικών βακτηρίων στο γιαούρτι ενισχύει τη θεραπευτική του αξία (Chen and Chen, 2007; Weichselbaum, 2009), ωστόσο, υπάρχει χαμηλό επίπεδο προβιοτικής βιωσιμότητας των προβιοτικών στο γιαούρτι λόγω του χαμηλού pH (4,2-4,6). Για τον λόγο αυτό, η προσθήκη των προβιοτικών βακτηρίων γίνεται αφού πρώτα ενθυλακωθούν, καθώς με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται υψηλότερη βιωσιμότητα. Περαιτέρω, η ενσωμάτωση προβιοτικών κυττάρων σε γιαούρτια θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί χωρίς να γίνουν πολλές τροποποιήσεις από τη συνήθη διαδικασία (Kailasapathy, 2009). Πολλοί χρησιμοποίησαν προβιοτικά κύτταρα που έχουν ενθυλακωθεί για να τα ενσωματώσουν σε γιαούρτια.

Τέλος, η προσθήκη εγκλεισμένων προβιοτικών βακτηρίων σε γιαούρτια αλλοιώνει τα χαρακτηριστικά που γιαουρτιού με αποτέλεσμα να είναι ανιχνεύσιμα στο στόμα από τον καταναλωτή. Ωστόσο, σύμφωνα με τους Campagne και Fustier (2007b), οι επιδράσεις στις οργανοληπτικές ιδιότητες μπορούν να γίνουν επιθυμητές εάν ο καταναλωτής γνωρίζει και αναμένει την παρουσία των σωματιδίων.

5.7.3 Κατεψυγμένα γαλακτοκομικά επιδόρπια

Η ενσωμάτωση των προβιοτικών μικροοργανισμών σε κατεψυγμένα επιδόρπια αποτελεί μία αρκετά δύσκολη διαδικασία, λόγω της υψηλής οξύτητας του προϊόντος, της υψηλής ωσμωτικής πίεσης, της διεργασίας κατάψυξης και της έκθεσης στον αέρα κατά την κατάψυξη (Chen and Chen, 2007). Η εισαγωγή εγκλεισμένων προβιοτικών βακτηρίων σε κατεψυγμένα επιδόρπια μπορεί έπειτα από έρευνα να ξεπεράσει τις παραπάνω δυσκολίες και να δημιουργήσει μία ενδιαφέρουσα καινοτομία που θα έχει οφέλη για την υγεία του καταναλωτή (Chen and Chen, 2007). Κατά την κατάψυξη του παγωτού, ενσωματώθηκαν ενθυλακωμένοι σε ασβέστιο-αλγινικό γαλακτοβάκιλλοι, αλλά και ελεύθερα κύτταρα ξεχωριστά. Αποδείχθηκε ότι ο εγκλεισμός παρέχει υψηλότερο ποσοστό βιωσιμότητας (40%) σε σύγκριση με τα ελεύθερα κύτταρα, κατά την κατάψυξη του παγωτού (Sheu and Marshall, 1993, Sheu et al., 1993).

Οι Godward και Kailasapathy μελέτησαν την ενσωμάτωση προβιοτικών κυττάρων στο παγωτό σε διαφορετικές καταστάσεις. Στην πραγματικότητα, τα κύτταρα μπορούν να είναι ελεύθερα, πρόσφατα ενθυλακωμένα, ενθυλακωμένα και λυοφιλωμένα και τελικά συνενθυλακωμένα και λυοφιλωμένα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα ελεύθερα κύτταρα επιβιώνουν καλύτερα από τα ενθυλακωμένα κύτταρα. Ενώ, τα πρόσφατα ενθυλακωμένα είχαν μεγαλύτερη επιβίωση από εκείνα που ξηράθηκαν με κατάψυξη μετά από ενθυλάκωση και συν-ενθυλάκωση των *L. acidophilus* και *B. Bifidum*. Τέλος, η προσθήκη προβιοτικών δεν επηρεάζει την ενσωμάτωση του αέρα στο παγωτό.

Μία άλλη μελέτη έδειξε ότι δεν υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ της βιωσιμότητας των εγκλεισμένων προβιοτικών βακτηρίων και των ελεύθερων κυττάρων. Η προστασία των ελεύθερων κυττάρων στο παγωτό μπορεί να οφείλεται στα υψηλά συνολικά στερεά που καθιστούν το παγωτό κατάλληλη τροφή για την παροχή προβιοτικών ζωντανών κυττάρων στον καταναλωτή (Kailasapathy and Sultana, 2003). Η ενθυλάκωση των προβιοτικών κυττάρων αυξάνει τη βιωσιμότητά τους όταν ενσωματώνονται στο παγωτό, χωρίς να επηρεάζει τις οργανοληπτικές ιδιότητες του προϊόντος. Το παγωτό διαθέτει υψηλό ποσοστό συνολικού στερεού και με την προσθήκη ως πρεβιοτικό του ανθεκτικού αμύλου, παρέχεται περισσότερη προστασία για τα προβιοτικά (Homayouni et al., 2008). Ο αριθμός των βιώσιμων προβιοτικών κυττάρων βρέθηκε ότι ήταν μεταξύ 10^8 και 10^9 CFU/g μετά από τρεις μήνες αποθήκευσης, ενώ η Διεθνής Ομοσπονδία Γάλακτος (IDF) έχει συστήσει έναν βιώσιμο αριθμό 10^7 CFU/g σε τρόφιμα κατά τη στιγμή της κατανάλωσης.

5.7.4 Ζυμωμένα προβιοτικά προϊόντα φυτικής προέλευσης (Vegetarian)

Τα τελευταία χρόνια, όλο και περισσότεροι καταναλωτές στρέφονται στην κατανάλωση προϊόντων φυτικής προέλευσης και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αναζήτηση φυτικών φορέων που θα εμπλουτιστούν με προβιοτικά. Όσον αφορά τα φυτικά προϊόντα που έχουν υποστεί ζύμωση, τα προβιοτικά ενσωματώνονται συχνότερα σε προϊόντα σόγιας, αν και αυξάνεται το ενδιαφέρον για τη χρήση προβιοτικών σε ζυμωμένα δημητριακά και τουρσιά λαχανικών.

Παρόλο που τα προβιοτικά βακτήρια δείχνουν καλή σταθερότητα σε προϊόντα με χαμηλή ενεργότητα νερού, όπως το φυστικοβούτυρο ($a_w = 0,24$), η επικάλυψη με σπρέι του *L. rhamnosus* με σκληρό λίπος και η ενσωμάτωση σε σκευάσματα φυστικοβούτυρου (επωασμένο στους 21°C), έδειξε μειωμένη κυτταρική βιωσιμότητα (Belvis et al. 2006). Ενώ η ένταξη εγκλεισμένων προβιοτικών σε σκευάσματα αρτοποιίας είναι μία δύσκολη διαδικασία, λόγω των υψηλών θερμοκρασιών που επικρατούν. Η μικροενθυλάκωση με την τεχνική της επικάλυψης με σπρέι σε σκληρό λίπος δεν βελτίωσε την επιβίωση και τη σταθερότητα των προστιθέμενων γαλακτοβάκιλλων κατά την παρασκευή ψωμιού (Belvis et al. 2006). Ωστόσο, η μικροενθυλάκωση σε σωματίδια πρωτεΐνης ορού γάλακτος ερευνήθηκε και αποδείχθηκε ότι είναι αποτελεσματική στην ενίσχυση της βιωσιμότητας των γαλακτοβάκιλλων κατά τη διάρκεια της θερμικής επεξεργασίας που εφαρμόζεται κατά την κατασκευή μπισκότων (Reid et al. 2006).

5.7.5 Άλλα προϊόντα διατροφής

Κατά βάση τα προϊόντα που εμπλουτίζονται με προβιοτικά βακτήρια είναι γαλακτοκομικά προϊόντα. Όμως, επειδή μία μερίδα του πληθυσμού έχει δυσανεξία στη λακτόζη είναι σημαντική η εύρεση διαφορετικών φορέων (Ranadheera et al., 2010). Όπως φαίνεται και στην εικόνα 4.1, έχουν εξεταστεί νέοι φορές τροφίμων, όπως η μαγιονέζα, η μπανάνα και ο χυμός ντομάτας. Συγκεκριμένα, η ενσωμάτωση εγκλεισμένων προβιοτικών βακτηρίων δημιούργησε μία μαγιονέζα καλής ποιότητας, καθώς το αλγινικό ασβέστιο παρείχε προστασία στα bifidobacteria έναντι των βακτηριοκτόνων επιδράσεων του ξυδιού (συστατικό μαγιονέζας). Επίσης, η προσθήκη των ενθυλακωμένων φέρε ως αποτέλεσμα την αναστολή ανάπτυξης ζυμομυκήτων για 10 εβδομάδες (πιθανώς λόγω της αντιβακτηριακής επίδρασης των προβιοτικών) και της βελτίωσης των οργανοληπτικών ιδιοτήτων της μαγιονέζας (Khalil and Mansour, 1998).

Η χρήση εγκλεισμένων βακτηρίων μπορεί να αποφέρει θετικά αποτελέσματα και κατά τη ζύμωση του χυμού ντομάτας. Ο εγκλεισμός επιτρέπει στα προβιοτικά κύτταρα να επιβιώσουν παρά τις δυσμενείς συνθήκες pH που επικρατούν στο χυμό ντομάτας. Ενώ ακόμα, παρατηρήθηκε βελτίωση της ποιότητας του προϊόντος με την ενσωμάτωση των ενθυλακωμένων βακτηρίων (An-Erl King et al., 2007 & Tsen et al., 2008).

Επιπλέον, διερευνήθηκε η χρήση εγκλεισμένων προβιοτικών βακτηρίων σε προϊόντα κρέατος (Muthukumarasamy and Holley, 2006, 2007). Συγκεκριμένα, προστέθηκαν εγκλεισμένα προβιοτικά βακτήρια σε ξηρά ζυμωμένα λουκάνικα, όπου παρατηρήθηκε ότι δεν αλλοιώνουν τις οργανοληπτικές ιδιότητες του προϊόντος, ενώ αυξάνουν την επιβίωση των βακτηρίων.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε ενθυλάκωση προβιοτικών κυττάρων με τεχνολογία επικάλυψης με σπρέι και έπειτα προστέθηκαν σε σοκολάτα (Maillard and Landuyt, 2008). Σύμφωνα με έρευνες, η βιωσιμότητα των προβιοτικών στο λεπτό έντερο ήταν τρεις φορές υψηλότερη όταν ενσωματώθηκε στη σοκολάτα από ό,τι σε γαλακτοκομικό προϊόν. Όμως, όταν μεταφερθεί σε εργοστασιακή κλίμακα υπάρχει δυσκολία, καθώς η διαδικασία παραγωγής της σοκολάτας απαιτεί υψηλές θερμοκρασίες που δεν συμβαδίζουν με την επιβίωση των προβιοτικών.

5.8 Μελλοντικές προοπτικές

Η τεχνολογία της ενθυλάκωσης αποτελεί μία μέθοδο ενίσχυσης της βιωσιμότητας των μικροοργανισμών, για το λόγο αυτό έχει χρησιμοποιηθεί από διάφορες βιομηχανίες, κυρίως φαρμάκων και τροφίμων. Ανά τα χρόνια, ολοένα και περισσότερες είναι οι έρευνες που πραγματοποιούνται, ώστε να ελαχιστοποιηθεί το κόστος παραγωγής, και να επιτευχθεί η βέλτιστη βιωσιμότητα των βακτηρίων. Η ενσωμάτωση των προβιοτικών βακτηρίων σε βιομηχανική κλίμακα περιλαμβάνει πολλές μικροβιολογικές, τεχνολογικές και οικονομικές δυσκολίες. Για την αντιμετώπιση αυτών, η έρευνα προσπαθεί να εντοπίσει και να χαρακτηρίσει τα ήδη υπάρχοντα στελέχη προβιοτικών, να εντοπίζει τις ιδιότητες που σχετίζονται με το κάθε στέλεχος, να καθορίσει τις βέλτιστες δόσεις που απαιτούνται για τα επιδιωκόμενα αποτελέσματα και να αξιολογήσει τη σταθερότητά τους μέσω επεξεργασίας και πέψης.

Ωστόσο, αν και τα αποτελέσματα είναι ελπιδοφόρα σε εργαστηριακή κλίμακα, οι τεχνολογίες που χρησιμοποιούνται παρουσιάζουν δυσκολίες όσον αφορά την εφαρμογή σε μαζική παραγωγή.

Η τεχνολογία της ενθυλάκωσης, πρέπει να αντιμετωπίσει πολλές προκλήσεις για να κατορθώσει την εφαρμογή της σε βιομηχανική κλίμακα. Αφενός, οι προσπάθειες για την απόκτηση μικροκαψουλών με τις καλύτερες ιδιότητες πρέπει να ενισχυθούν, αφετέρου θα πρέπει να ληφθεί υπόψη η συμπεριφορά των καταναλωτών απέναντι στα καινοτόμα τρόφιμα. Στην πραγματικότητα, τα προβιοτικά βακτήρια μπορούν να βρεθούν όχι μόνο σε γαλακτοκομικά προϊόντα, αλλά και σε σοκολάτα ή σε δημητριακά. Όμως, είναι σημαντική η μείωση του μεγέθους των σωματιδίων, καθώς μπορεί να επηρεάσει αρνητικά την υφή και τις οργανοληπτικές ιδιότητες του προϊόντος.

Όμως, εκτός από τις κλασικές μεθόδους εγκλεισμού των προβιοτικών βακτηρίων, μία αναδύομενη τεχνολογία που έχει αρχίσει να γίνεται δημοφιλής πρόσφατα, είναι η ενσωμάτωσή τους σε εδώδιμες μεμβράνες. Λόγω της σύντομης ανακάλυψής τους και της μικρής έρευνας πάνω στις μεμβράνες, είναι απαραίτητο να βελτιστοποιηθούν διάφορες τεχνολογικές και οικονομικές πτυχές των διαδικασιών παραγωγής. Συγκεκριμένα, είναι σημαντικό να διερευνηθούν λεπτομερώς οι ιδιότητες των υλικών που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή εδώδιμων μεμβρανών προκειμένου να προστατευθούν επαρκώς τα προβιοτικά βακτήρια. Τα προβιοτικά βακτήρια είναι απαραίτητο να επιβιώνουν, όχι μόνο κατά την αποθήκευση, αλλά και στις γαστρεντερικές συνθήκες.

Τα τελευταία χρόνια, η χρήση πρεβιοτικών και φυτικών ινών ως προστατευτικών για τα προβιοτικά κύτταρα έχει κερδίσει ολοένα και περισσότερο ενδιαφέρον. Η ανάπτυξη νέων λειτουργικών τροφίμων είναι μια καινοτόμα ιδέα, καθώς αρκετοί καταναλωτές έχουν στραφεί σε τρόφιμα που προάγουν την υγεία τους.

Εν κατακλείδι, η αγορά των προβιοτικών προϊόντων είναι ένας κλάδος που αποκτά ολοένα και περισσότερη ανάπτυξη, καθώς η ζήτηση των καταναλωτών αυξάνεται. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι πλέον τα οφέλη που παρέχονται από τα προβιοτικά είναι τεκμηριωμένα. Οπότε, οι απαιτήσεις των καταναλωτών για τρόφιμα, ποτά και συμπληρωματικά προϊόντα εμπλουτισμένα με αυτά τα συστατικά αυξάνονται. Βέβαια, είναι υψίστης σημασίας οι μέθοδοι ενθυλάκωσης και ενσωμάτωσης σε μεμβράνες να είναι αποτελεσματικές, βιώσιμες και φιλικές προς το περιβάλλον. Η μελλοντική έρευνα θα πρέπει να επικεντρωθεί στη βελτιστοποίηση της χρήσης προβιοτικών κυττάρων, θεωρώντας ως βασικούς παράγοντες την ασφάλεια και την οικολογική παραγωγή.

5.9 Προϊόντα γιαουρτιού εμπλουτισμένα με εγκλεισμένα και μη προβιοτικά βακτήρια

Διάφορες έρευνες έχουν διεξαχθεί ανά τα χρόνια όπου γιαούρτια εμπλουτίζονται με εγκλεισμένα προβιοτικά βακτήρια. Διάφορα εγκλειστικά μέσα, αλλά και μέθοδοι εγκλεισμού έχουν χρησιμοποιηθεί για την προστασία κατά την αποθήκευση διαφόρων προβιοτικών στελεχών που έχουν ενσωματωθεί σε γιαούρτια. Ο συνδιασμός πρεβιωτικών και προβιοτικών βακτηρίων επιτυγχάνει υψηλότερα ποσοστά βιωσιμότητας (Capela, Hay & Shah, 2006). Τα πιο γνωστά πρεβιοτικά είναι η ινουλίνη και οι γαλακτοολιγοσακχαρίτες (GOS) παρουσιάζοντας υψηλή επιβίωση κατά την αποθήκευση (Donkor, Nilmini, Stolic, Vasiljevic, & Shah, 2007). Στην ενότητα αυτή, αναφέρονται ορισμένα χαρακτηριστικά παραδείγματα που είναι παρόμοια με το πειραματικό σκέλος της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Πραγματοποιήθηκε εγκλεισμός του στελέχους *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS και του *Bifidobacterium animalis* subsp. *laptis* BB-12 σε αλγινικό νάτριο-ανθεκτικό άμυλο με την μέθοδο της γαλακτωματοποίησης (Hasnia Ziar, 2012). Έπειτα, ακολούθησε η ενσωμάτωση των εγκλεισμένων και μη προβιοτικών βακτηρίων στο γάλα με την συμβατική μαγιά και πραγματοποιήθηκε η ζύμωση του γιαουρτιού. Τα προϊόντα γιαουρτιού παρακολουθήθηκαν για 4 εβδομάδες κατά την αποθήκευσή τους. Παρακάτω παρουσιάζονται οι μετρήσεις των μικροβιακών φορτίων για κάθε προϊόν:

Πίνακας 5.9.1: Μικροβιακό φορτίο του προβιοτικού προϊόντος με τα εγκλεισμένα και μη προβιοτικά στελέχη κατά την πάροδο των εβδομάδων

Εβδομάδες	Γιαούρι με ελεύθερο BB-12	Γιαούρι με εγκλεισμένο BB-12	Γιαούρι με ελεύθερο <i>L.rhamnosus</i>	Γιαούρι με εγκλεισμένο <i>L.rhamnosus</i>
	<i>Μικροβιακό φορτίο (log(cfu/g))</i>	<i>Μικροβιακό φορτίο (log(cfu/g))</i>	<i>Μικροβιακό φορτίο (log(cfu/g))</i>	<i>Μικροβιακό φορτίο (log(cfu/g))</i>
0	10,2	10,2	10,4	10,4
1	6,9	9,7	8,8	9,3
2	5,6	9,1	8,7	9,2
3	5,3	9,3	8,4	9,1
4	5,1	8,9	7,2	8,6

Αρχικά, στην αρχή της αποθήκευσης δεν υπάρχουν διαφορές στο μικροβιακό φορτίο στα προϊόντα με τα εγκλεισμένα και μη βακτήρια. Ενώ, από την πρώτη εβδομάδα και έπειτα, υψίστης σημασίας για το μικροβιακό φορτίο φαίνεται ότι έχει ο εγκλεισμός των βακτηρίων. Ο μικροβιακός πληθυσμός διατηρείται υψηλότερος με την πάροδο του χρόνου στα προϊόντα με τα εγκλεισμένα βακτήρια, όπου μεγάλη διαφορά στο φορτίο παρατηρείται στα γιαούρτια με το στέλεχος BB-12.

Σε άλλη έρευνα, το στέλεχος *Lactobacillus acidophilus* έχει ενθυλακωθεί με την μέθοδο της εξώθησης σε αλγινικό νάτριο 4% (F.Ortakci, 2012). Στην συγκεκριμένη έρευνα, το στέλεχος ενσωματώθηκε στο γιαούρτι μετά τη διαδικασία της ζύμωσης για την εξασφάλιση ομοιογενούς ανάμιξης και την αποφυγή της καθίζησης τους. Το ποσοστό επιβίωσης παρουσιάζει μείωση με την πάροδο των ημερών, όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 5.9.2: Ποσοστό επιβίωσης και μικροβιακό φορτίο του προβιοτικού προϊόντος κατά την πάροδο των ημερών

Ημέρες	Μικροβιακό φορτίο (log(cfu/g))	Ποσοστό επιβίωσης (%)
0	8,26	100
7	7,83	94,79
14	7,53	91,16
21	7,42	89,83
28	7,16	86,68

Σε άλλη έρευνα, ενθυλακώθηκαν τα στελέχη *L.acidophilus* και *L.casei* με την μέθοδο της εξώθησης (W.Krasaekoort, 2014). Τα εγκλειστικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αλγινικό νάτριο-ινουλίνη και αλγινικό νάτριο-γαλακτοολιγοσακχαρίτες (GOS) και τα εγκλεισμένα βακτήρια επικαλύφθηκαν με χιτοζάνη. Το μικροβιακό τους φορτίο ανά τις εβδομάδες παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 5.9.3: Μικροβιακό φορτίο του προβιοτικού προϊόντος με τα εγκλεισμένα προβιοτικά στελέχη κατά την πάροδο των εβδομάδων

Εβδομάδες	Γιαούρι με εγκλεισμένο <i>L.acidophilus</i>	Γιαούρι με εγκλεισμένο <i>L.acidophilus</i> - GOS	Γιαούρι με εγκλεισμένο <i>L.casei</i>	Γιαούρι με εγκλεισμένο <i>L.casei</i> -GOS
	Μικροβιακό φορτίο (log(cfu/mL))	Μικροβιακό φορτίο (log(cfu/mL))	Μικροβιακό φορτίο (log(cfu/mL))	Μικροβιακό φορτίο (log(cfu/mL))
0	10,1	10,3	9,5	9,2
1	7,5	9,8	9,6	9,1
2	7,3	7,9	7,8	8,4
3	7,9	8,1	8,1	8,3
4	7,4	8,5	7,9	8,3

Από τα αποτελέσματα του πίνακα 5.9.3, φαίνεται ότι το μικροβιακό φορτίο σε όλα τα γιαούρτια είναι πάνω από το επιτρεπτό όριο μετά την πάροδο των τεσσάρων εβδομάδων. Όμως, η προσθήκη του GOS φαίνεται να αυξάνει την βιωσιμότητα των προβιοτικών βακτηρίων, ειδικά στην περίπτωση του *L.acidophilus*.

6. Πειραματικό Μέρος

6.1 Σκοπός των πειραμάτων

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι ο εγκλεισμός του προβιοτικού στελέχους *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis* και η ενσωματωσή του σε γιαούρτι, όπως και η ενσωμάτωση του προβιοτικού στελέχους σε εδώδιμη μεμβράνη. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε ο εγκλεισμός του προβιοτικού βακτηρίου με τη μέθοδο της εξώθησης και της γαλακτωματοποίησης, χρησιμοποιώντας διάφορα εγλειστικά μείγματα. Οι δύο αυτές μέθοδοι αποτελούν τις πιο κοινές μεθόδους ενθυλάκωσης που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων, αλλά και σε ερευνητικό επίπεδο. Όμως, και οι δύο μέθοδοι εμφανίζουν κάποια μειονεκτήματα κατά τη χρήση/εφαρμογή τους. Το κυριότερο μειονέκτημα της γαλακτωματοποίησης είναι ότι αποτελεί μία διαδικασία με υψηλό κόστος, ενώ της εξώθησης είναι το γεγονός ότι δεν είναι ακόμη εφαρμόσιμη σε βιομηχανική κλίμακα. Επίσης, όσον αφορά τη δημιουργία της βρώσιμης μεμβράνης, τα υλικά τα οποία χρησιμοποιούνται επιλέγονται, ώστε η μεμβράνη να είναι ανθεκτική και να εντείνει τη βιωσιμότητα των προβιοτικών βακτηρίων, χωρίς να αλλοιώνει τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του γιαουρτιού. Επίσης, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι δεν επιλέγεται κάποιο υλικό εγκλεισμού με αντιμικροβιακή δράση, καθώς δεν ενδείκνυται αφού ενσωματώνονται βακτήρια.

Κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων, αξιολογείται η απόδοση του εγκλεισμού, ενώ πραγματοποιούνται μικροβιολογικές και ποιοτικές αναλύσεις σε γιαούρτια που περιέχουν εγκλεισμένα και ελεύθερα βακτήρια. Επίσης, πραγματοποιούνται μικροβιολογικές αναλύσεις στην εδώδιμη μεμβράνη, αλλά και σε γιαούρτια που την περιέχουν.

6.2 Υλικά και μέθοδοι

6.2.1 Πρώτες Ύλες

Καλλιέργειες

- Προβιοτική καλλιέργεια που περιλαμβάνει το στέλεχος *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis* (BB-12/Chr. Hansen)
- Συμβατική καλλιέργεια εκκίνησης που περιλαμβάνει τα στελέχη *S. Thermophilus* και *L. Delbrueckii ssp. bulgaricus* (Chr. Hansen).
- Εμπορική προβιοτική καλλιέργεια (ΦΑΓΕ) που περιλαμβάνει τα στελέχη *Streptococcus Thermophilus* και *Lactobacillus bulgaricus* (Dalton).

Γάλα

- Φρέσκο γάλα πλήρες σε λιπαρά

Εγκλειστικά μέσα

- Αλγινικό νάτριο (Acros organics)
- Ινουλίνη (Fibruline Instant)

Μέσα (υλικά) μεμβράνης

- Καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη (CMC)

Επιπλέον συστατικά

- Γλυκόζη (Sigma-Aldrich Chemie GmbH)
- Γλυκερόλη (Lach-Ner)
- Νανοκρυσταλλική κυτταρίνη, CNC (CelluForce)
- Απιονισμένο νερό
- Γάλα φρέσκο πλήρες σε λιπαρά
- Διάλυμα CaCl₂ συγκέντρωσης 0,5 M
- Γαλακτωματοποιητής Tween 80
- Ελαιόλαδο
- Αιθανόλη

Μικροβιολογικός έλεγχος

- MRS Agar (Merck Millipore)
- Διάλυμα Ringer (Merck Millipore)
- Ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού οξέος συγκέντρωσης 0,1 M και Na₂HPO₄ συγκέντρωσης 0,2 M (Merck Millipore)
- L-cystein-HCl (Thermo Fischer Scientific)
- Lithium Chloride (Thermo Fischer Scientific)
- Sodium propionate
- Απιονισμένο νερό

6.2.2 Εργαστηριακός εξοπλισμός

Κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε ο παρακάτω εξοπλισμός:

- Υδατόλουτρο (GFL 1083, Labortechnik GmbH, Burgwedel, Germany)
- Αναδευτήρες (IKA – WERKE EURO – ST PVC, GmbH & CO.KG, Staufen, Germany)
- Επωαστήρας (SANYO, Japan)
- Θάλαμος επώασης μικροβιολογικών αναλύσεων
- Ηλεκτρονικά pH-μετρα
- Περιστροφικό ιξωδόμετρο Brookfield (DV – II+ Pro, USA)
- Αναλυτής υφής (Stable Micro Systems / TA-XT2i, UK)
- Ηλεκτρονικός ζυγός (620C, Precisa Instruments, Switzerland)

- Ομογενοποιητής υψηλής ταχύτητας (High intensity ultrasonic processor, Microprocessor controlled, 400W)
- Συσκευή ομογενοποίησης (bagmixer)
- Υάλινα σκεύη και λοιπά (Ποτήρια ζέσεως, κωνικές φιάλες, ογκομετρικοί κύλινδροι, σιφόνια, μικροφίλτρο Millipore 0,22 μm, θερμομέτρο, σπαθίδα, μαγνητικοί αναδευτήρες, σύριγγες των 5 mL, καμινέτο γκαζιού, ειδικές αποστειρωμένες σακούλες για ομογενοποίηση, αποστειρωμένα τρυβλία για μικροβιολογικές αναλύσεις, σωληνάκια των 10 mL, πούαρ, πιπέτες των 1000 μL και 100 μL με τα αντίστοιχα tips, αλουμινόφυλλο).

6.3 Πειραματική διαδικασία

6.3.1 Παρασκευή εγκλειστικών μειγμάτων

Τα μίγματα ενθυλάκωσης που παρασκευάστηκαν για τις δύο μεθόδους εγκλεισμού, της εξώθησης και της γαλακτωματοποίησης είναι τα ίδια. Η ποσότητα του προβιοτικού στελέχους *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* (BB-12) που προστέθηκε σε κάθε εγκλειστικό μίγμα ήταν τόση, ώστε να έχει συγκέντρωση προβιοτική καλλιέργειας 5% w/v. Η επιλογή των πρώτων υλών, αλλά και των συγκεντρώσεων πραγματοποιήθηκε έπειτα από έρευνα σε βιβλιογραφικές πηγές και εφαρμογή με δοκιμαστικά πειράματα. Παρακάτω παρουσιάζονται τα εγκλειστικά μίγματα και η διαδικασία που ακολουθήθηκε.

1^ο εγκλειστικό μίγμα: μίγμα αλγινικού νατρίου -CNC-γλυκόζης (ACNC)

- Αλγινικό νάτριο 2% w/v
- Νανοκρυσταλλική κυτταρίνη (CNC) 2% w/v
- Γλυκόζη 5% w/v

2^ο εγκλειστικό μίγμα: μίγμα αλγινικού νατρίου-CNC-γλυκόζης-ινουλίνης (ACNCI)

- Αλγινικό νάτριο 2% w/v
- Νανοκρυσταλλική κυτταρίνη (CNC) 2% w/v
- Γλυκόζη 5% w/v
- Ινουλίνη 2% w/v

3^ο εγκλειστικό μίγμα σε γάλα: μίγμα αλγινικού νατρίου -γλυκόζης (AM)

- Αλγινικό νάτριο 2% w/v
- Γλυκόζη 5% w/v

4^ο εγκλειστικό μίγμα σε γάλα: μίγμα αλγινικού νατρίου -γλυκόζης-ινουλίνης (AMI)

- Αλγινικό νάτριο 2% w/v
- Γλυκόζη 5% w/v
- Ινουλίνη 2% w/v

Αρχικά, για την παρασκευή των εγκλειστικών μιγμάτων, ζυγίστηκαν σε ζυγό ακρίβειας 0,1 g όλα τα στερεά συστατικά που θα χρησιμοποιηθούν. Τα συστατικά αυτά προστέθηκαν σε ποτήρι ζέσεως το οποίο περιείχε την κατάλληλη ποσότητα νερού για τα εγκλειστικά 1 και 2, ενώ για τα 3 και 4 την κατάλληλη ποσότητα γάλακτος. Έπειτα, τα μίγματα τοποθετήθηκαν σε θερμαινόμενη πλάκα στους 80°C υπό ανάδευση με μαγνητικό αναδευτήρα (500 rpm) μέχρις ότου τα υλικά να έχουν ομογενοποιηθεί πλήρως. Τα μίγματα 1 και 2, όλα τα διαλύματα CaCl₂, αλλά και όλα τα γυάλινα σκεύη που θα χρησιμοποιηθούν τοποθετήθηκαν για αποστείρωση στους 121 °C για 15 min. Τα μίγματα 3 και 4 που περιείχαν το γάλα παστεριώθηκαν στους 95 °C για 15 min. Έπειτα, τα εγκλειστικά μίγματα και τα διαλύματα CaCl₂ τοποθετήθηκαν σε παγόλουτρο, ώστε η θερμοκρασία τους να γίνει ίση με του περιβάλλοντος. Τέλος, προστέθηκε στα μίγματα υπό μαγνητική ανάδευση και χωρίς θέρμανση, η κατάλληλη ποσότητα προβιοτικής καλλιέργειας, ώστε η τελική συγκέντρωση αυτής στο μίγμα να είναι 5% w/v.

6.3.2 Εγκλεισμός προβιοτικής καλλιέργειας με την μέθοδο της εξώθησης (extrusion)

Το μίγμα, το οποίο παράχθηκε στην ενότητα 4.3.2 τοποθετείται εντός μίας αποστειρωμένης σύριγγας των 50 mL και μεταφέρεται στάγδην μέσα από μία βελόνα 0,8 mm (21 G) στο διάλυμα CaCl₂ 0,5 M, ενώ ταυτόχρονα πραγματοποιείται μαγνητική ανάδευση. Η απόσταση μεταξύ του στομίου εξόδου της σύριγγας και της επιφάνειας του διαλύματος μετράται περίπου ίση με 50 cm. Η επαφή του μίγματος με το διάλυμα CaCl₂ προκαλεί απευθείας τον σχηματισμό ενθυλακωμένων σφαιριδίων, τα οποία αφήνονται για 30 min υπό ανάδευση για να σκληρύνουν. Έπειτα, ακολουθεί ο διαχωρισμός τους με διήθηση και μετά πλύση τους με απιονισμένο νερό. Τέλος, τοποθετούνται σε αποστειρωμένα ποτήρια ζέσεως και αποθηκεύονται στους 4°C.

6.3.3 Εγκλεισμός προβιοτικής καλλιέργειας με την μέθοδο της γαλακτωματοποίησης (emulsion)

Αρχικά, ογκομετρείται κατάλληλη ποσότητα ελαιόλαδου και γαλακτωματοποιητή, ώστε η αναλογία γαλακτωματοποιητή στο έλαιο είναι: 0,2% v/v και αναδεύεται με μαγνητικό αναδευτήρα μέχρι να ομογενοποιηθεί το μίγμα. Έπειτα, ογκομετρείται κατάλληλη ποσότητα μίγματος ελαίου-γαλακτωματοποιητή, ώστε να υπάρξει αναλογία 1:3 με το εγκλειστικό μίγμα. Το μίγμα τοποθετείται σε ποτήρι ζέσεως και ομογενοποιείται με ομογενοποιητή στις 1000 – 1200 rpm για 5 min. Κατά την ομογενοποίηση πραγματοποιείται διασπορά της υδατικής φάσης (εγκλειστικό μίγμα) στη λιπαρή φάση (έλαιο), με αποτέλεσμα το σχηματισμό γαλακτώματος. Αφού ολοκληρωθεί η διαδικασία της ομογενοποίησης, ακολουθεί η προσθήκη υπό ανάδευση διαλύματος CaCl₂ στο γαλάκτωμα με αποτέλεσμα το σχηματισμό εγκλεισμένων σφαιριδίων. Για τον διαχωρισμό των δύο φάσεων του μίγματος ακολουθεί φυγοκέντρωση και έκπλυση των σωματιδίων με απιονισμένο νερό. Έτσι, παραλαμβάνονται τα εγκλεισμένα σφαιρίδια, τα οποία φυλάσσονται σε ένα ποτήρι ζέσεως στους 4°C.

6.3.4 Ενσωμάτωση του προβιοτικού στελέχους σε βρώσιμη μεμβράνη

Αρχικά, ζυγίζονται 2 g σκόνης καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης (CMC) και σε μία κωνική φιάλη προστίθενται 100 mL απεσταγμένου νερού. Η φιάλη θερμαίνεται στους 70°C, ενώ ταυτόχρονα τίθεται υπό μαγνητική ανάδευση στις 500 rpm. Τότε, πραγματοποιείται σταδιακή προσθήκη της καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης και αφήνεται για 40 min να αναδεύεται με θέρμανση, ώστε να εξασφαλιστεί ομοιόμορφη διασπορά. Έπειτα, ακολουθεί η προσθήκη της γλυκερόλης, ως πλαστικοποιητής η οποία αποτελεί το 50% του βάρους της καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης. Επίσης προστίθεται και 5% w/v γλυκόζη και αφήνεται ξανά για 20 min υπό μαγνητική ανάδευση και θέρμανση. Για την θανάτωση πιθανών παθογόνων μικροοργανισμών, το διάλυμα θερμαίνεται σε υδατόλουτρο στους 80°C για 10 min. Έπειτα, ακολουθεί ψύξη του διαλύματος στους 37 °C, ώστε να προστεθεί το προβιοτικό στέλεχος *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis* (BB-12). Πραγματοποιείται προσθήκη κατάλληλης ποσότητας του στελέχους, ώστε να προκύψει διάλυμα με συγκέντρωση 5 % w/v. Τέλος, τα φιλμ σχηματίστηκαν με χύτευση 30 ml των τελικών διαλυμάτων στο κέντρο αποστειρωμένων τρυβλίων και ξήρανση στους 37 °C για 15 h σε αεριζόμενο επωαστήριο. Στη συνέχεια, οι μεμβράνες απομακρύνθηκαν με προσοχή για να μην διαρράγουν και τοποθετήθηκαν πάνω σε γιαούρτια.

6.3.5 Ζύμωση γιαουρτιού

Η παραγωγή του γιαουρτιού πραγματοποιείται με συγκεκριμένα διαδικασία. Αρχικά, ογκομετρείται 1 L ομογενοποιημένου πλήρους γάλακτος και τοποθετείται σε ένα μεταλλικό σκεύος. Έπειτα, θερμαίνεται (παστεριώνεται) μέσα σε υδατόλουτρο στους 85°C για 15 min, ενώ ταυτόχρονα αναδεύεται ήπια με μαγνητικό αναδευτήρα. Αφού ολοκληρωθεί η διαδικασία της παστερίωσης, ακολουθεί ψύξη του γάλακτος στους 45 °C και εμβολιασμός του με 1,2 g συμβατικής καλλιέργειας εκκίνησης. Για την ομοιόμορφη διασπορά της καλλιέργειας στο γάλα, πραγματοποιείται ήπια ανάδευση του μίγματος με μηχανικό αναδευτήρα. Στην περίπτωση της προσθήκης εγκλεισμένων βακτηρίων, ακολουθεί ζύγιση των προβιοτικών βακτηρίων σε αποστειρωμένα κύπελλα, στα οποία θα προστεθεί και η κατάλληλη ποσότητα γάλακτος που περιέχει τη συμβατική καλλιέργεια, ενώ, εκείνα που δεν περιέχουν εγκλεισμένα βακτήρια, το εμβολιασμένο γάλα θα προστεθεί απευθείας στα αποστειρωμένα κύπελλα. Τα κύπελλα μεταφέρονται σε θάλαμο επώασης ρυθμισμένο στους 45°C, όπου και παραμένουν μέχρι τη λήξη της ζύμωσης, δηλαδή μέχρι το pH να φθάσει την τιμή 4,6.

Με τη βοήθεια ηλεκτρονικών pH-μετρων γίνεται η καταγραφή του pH αυτόματα ανά 5 min. Επιπλέον, πραγματοποιούνται μετρήσεις του ιξώδους ανά 20 λεπτά με το ιξωδόμετρο Brookfield στη θερμοκρασία ζύμωσης (45°C). Μόλις, ολοκληρωθεί η ζύμωση του γιαουρτιού, λαμβάνεται μία ακόμα μέτρηση του ιξώδους και τα κύπελλα αποθηκεύονται στους 4°C. Μετά από 24 h, πραγματοποιείται άλλη μία μέτρηση του ιξώδους, καθώς και ανάλυση υφής του γιαουρτιού στη θερμοκρασία αποθήκευσης, τους 4°C.

6.4 Αναλύσεις-Μετρήσεις

6.4.1 Μικροβιολογικές αναλύσεις

Οι μικροβιολογικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν στα εγκλεισμένα βακτήρια και στα γιαούρτια εμπλουτισμένα με προβιοτικά βακτήρια, εγκλεισμένα και μη. Επίσης, αναλύθηκαν οι εδώδιμες μεμβράνες που περιέχουν το προβιοτικό στέλεχος, αλλά και τα γιαούρτια πάνω στα οποία έχουν τοποθετηθεί.

Αρχικά, παρασκευάζεται η κατάλληλη ποσότητα υποστρώματος MRS Agar, λαμβάνοντας υπόψιν ότι κάθε τρυβλίο απαιτεί περίπου 15 mL υποστρώματος. Ταυτόχρονα, παρασκευάζεται κατάλληλη ποσότητα διαλύματος Ringer, ώστε να πραγματοποιηθούν οι απαιτούμενες αραιώσεις. Είναι γνωστό ότι για κάθε αραιώση απαιτούνται 9 mL διαλύματος Ringer. Ακόμα, παρασκευάζεται ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού οξέος 0,1 M- Na_2HPO_4 0,2 M, όπου απαιτείται περίπου 10 mL ρυθμιστικού για κάθε 1 g δείγματος εγκλειστικού προϊόντος ή μεμβράνης. Το ρυθμιστικό διάλυμα χρησιμοποιείται ώστε να διαλυτοποιηθούν τα εγκλεισμένα σφαιρίδια ή η μεμβράνη, να απελευθερωθούν τα βακτήρια και να ομογενοποιηθεί το προς ανάλυση δείγμα.

Πριν την εισαγωγή τους στον αποστειρωτήρα, οι φιάλες που περιείχαν το υπόστρωμα, το διάλυμα Ringer και το ρυθμιστικό διάλυμα καλύφθηκαν με υδρόφοβο βαμβάκι και αλουμινόφυλλο. Επίσης, με αλουμινόχαρτο καλύφθηκαν και οι βάσεις των tips, το σιφώνιο και ένα μικρόφιλτρο Millipore 0,22 μm . Μετά, μεταφέρονται στον αποστειρωτήρα, όπου και τοποθετούνται στους 121°C για 15 min. Μέχρι να ολοκληρωθεί η διαδικασία της αποστείρωσης, πραγματοποιείται προετοιμασία και καθαρισμός του πάγκου εργασίας με οινόπνευμα. Επίσης, ετοιμάζεται η κατάλληλη ποσότητα L-κυστεΐνης και LP που θα προστεθεί αργότερα. Για την παρασκευή της κατάλληλης ποσότητας διαλύματος LP δίνονται οι αναλογίες 0,2 % w/v lithium chloride και 0,3 % w/v sodium propionate.

Μετά το πέρας της αποστείρωσης, το διάλυμα Ringer και το ρυθμιστικό διάλυμα ψύχονται σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, ενώ το υπόστρωμα MRS-Agar τοποθετείται σε υδατόλουτρο στους 50 °C. Έπειτα, ζυγίζεται το δείγμα που θα αναλυθεί εντός του αποστειρωμένου θαλάμου και τοποθετείται, μαζί με την κατάλληλη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος, σε μία αποστειρωμένη σακούλα. Ακολουθεί ομογενοποίηση τους μίγματος στον ομογενοποιητή bagmixer έως ότου ομογενοποιηθεί πλήρως. Το μίγμα αυτό αντιστοιχεί στην πρώτη αραιώση. Για την δεύτερη αραιώση, λαμβάνεται 1 mL από την αποστειρωμένη σακούλα και προστίθεται σε αποστειρωμένο σωλήνα που περιέχει 9 mL Ringer. Για την τρίτη αραιώση, λαμβάνεται 1 mL από τον σωλήνα και προστίθεται σε άλλον σωλήνα που περιέχει 9 mL Ringer. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται έως ότου ληφθεί ο επιθυμητός αριθμός αραιώσεων. Ακολουθεί η παραλαβή 1 mL από έναν συγκεκριμένο σωλήνα και η τοποθέτησή του σε αποστειρωμένο τρυβλίο. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται δύο φορές για κάθε σωλήνα για την καλύτερη επαναληψιμότητα της μέτρησης.

Αφού ολοκληρωθούν όλα τα παραπάνω βήματα και το υπόστρωμα έχει φτάσει στην επιθυμητή θερμοκρασία, γίνεται προσθήκη του διαλύματος της L-κυστεΐνης και του διαλύματος NNLP, με τη βοήθεια αποστειρωμένης σύριγγας και ενός

μικρόφιλτρου Millipore 0,22 μm. Σε κάθε τρυβλίο τοποθετούνται περίπου 15 mL υποστρώματος, μοιρασμένα σε δύο στρώσεις, προκειμένου να εξασφαλισθούν αναερόβιες συνθήκες. Τέλος, μόλις ολοκληρωθεί η παραπάνω διαδικασία, τα τρυβλία τοποθετούνται μέσα σε θάλαμο επώασης στους 37°C, για 72 h κι έπειτα αναλύονται.

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

Οι μετρήσεις οι οποίες πραγματοποιούνται κατά τη διαδικασία ζύμωσης του γάλακτος, αλλά και στα τελικά προϊόντα είναι:

1. Παρακολούθηση της εξέλιξης της ζύμωσης του γάλακτος με τη μέτρηση του pH ανά 5 min, με τη χρήση ηλεκτρονικού pH-μετρου.
2. Παρακολούθηση της εξέλιξης της ζύμωσης του γάλακτος με τη μέτρηση του ιξώδους ανά 20 min, με χρήση του ιξωδόμετρου Brookfield και του στλέχους F στις 50 RPM.
3. Μέτρηση της συνολικής χρονικής διάρκειας της ζύμωσης, δηλαδή έως ότου η τιμή του pH του ζυμωμένου γάλακτος να αποκτήσει τιμή ίση με 4,6.
4. Μέτρηση του ιξώδους του γιαουρτιού αμέσως μετά τον τερματισμό της ζύμωσης, με χρήση του ιξωδόμετρου Brookfield.
5. Μέτρηση του ιξώδους του γιαουρτιού μετά από 24 h αποθήκευσής του σε θερμοκρασία 4°C, με χρήση του ιξωδόμετρου Brookfield.
6. Ανάλυση της υφής του γιαουρτιού μετά από 24 h αποθήκευσής του σε θερμοκρασία 4°C.
7. Μικροβιολογικός έλεγχος του γιαουρτιού, όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 4.4.1.

6.5 Σχεδιασμός πειραμάτων

Η παρούσα διπλωματική εργασία περιλαμβάνει 2 σειρές πειραμάτων.

Στην 1^η σειρά επιχειρήθηκε ο εγκλεισμός του προβιοτικού στελέχους *Bifidobacterium Animalis subsp. Lactis* (BB-12), στο πρώτο σκέλος μέσω της τεχνικής της εξώθησης. Ενώ στο δεύτερο σκέλος, επιχειρήθηκε μέσω της τεχνικής της γαλακτωματοποίησης. Η 1^η σειρά πειραμάτων περιλάμβανε μετά την ολοκλήρωση των εγκλεισμών, μικροβιολογική ανάλυση του εγκλεισμένου προϊόντος για τον υπολογισμό της απόδοσης 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, όπως παρουσιάστηκαν στο κεφάλαιο 4.3.1. τα πειράματα εγκλεισμού πραγματοποιήθηκαν δύο φορές για μεγαλύτερη ακρίβεια.

Στην 2^η σειρά πειραμάτων επιχειρήθηκε η ενσωμάτωση του προβιοτικού στελέχους *Bifidobacterium Animalis subsp. Lactis* (BB-12) σε μία εδώδιμη μεμβράνη. Η 2^η σειρά πειραμάτων περιλάμβανε την μικροβιολογική ανάλυση της μεμβράνης έπειτα από 24

h, για τον υπολογισμό της βιωσιμότητας των βακτηρίων στο γιαούρτι σε θερμοκρασία αποθήκευσης, τους 4°C.

Επίσης, πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός γάλακτος με συμβατική καλλιέργεια εκκίνησης και με τις εγκλεισμένες καλλιέργειες που προέκυψαν έπειτα από κάθε μέθοδο εγκλεισμού. Βέβαια, πραγματοποιήθηκαν και πειράματα στα οποία προστέθηκε στο εμβολιασμένο γάλα, το προβιοτικό στέλεχος *Bifidobacterium Animalis* subps. *Lactis* (BB-12), χωρίς να είναι εγκλεισμένο. Επίσης, προστέθηκε στο εμβολιασμένο γάλα και η εμπορική προβιοτική καλλιέργεια. Τέλος, επιχειρήθηκε η τοποθέτηση μίας εδώδιμης μεμβράνης με προβιοτικά βακτήρια πάνω στην επιφάνεια του γιαουρτιού.

Όλα τα παραπάνω πειράματα, αποσκοπούν στην παραγωγή προβιοτικού γιαουρτιού, και στη μελέτη της επίδρασης των εγκλεισμένων και μη εγκλεισμένων βακτηρίων στη διαδικασία της ζύμωσης του γιαουρτιού. Τέλος, παρασκευάστηκε και τυφλό δείγμα, στο οποίο το γάλα εμβολιάστηκε μόνο με την συμβατική καλλιέργεια εκκίνησης.

7. Αποτελέσματα & συζήτηση

Στο κεφάλαιο αυτό, θα πραγματοποιηθεί η παρουσίαση των αποτελεσμάτων των μετρήσεων, αλλά και η επεξεργασία τους. Κατά βάση πραγματοποιήθηκαν πειράματα εγκλεισμού με δύο μεθόδους και διάφορα εγκλειστικά μέσα και στη συνέχεια μελετήθηκε η παραγωγή προβιοτικών γιαουρτιών με χρήση των εγκλεισμένων βακτηρίων, ενώ επιπλέον εξετάζεται και η ενσωμάτωση των βακτηρίων σε εδώδιμη μεμβράνη και η εφαρμογή της επίσης σε γιαούρτι.

Στο πρώτο μέρος, παρουσιάζονται οι μετρήσεις του βακτηριακού φορτίου στα προϊόντα εγκλεισμού, ώστε να προσδιοριστεί η απόδοση εγκλεισμού με έκαστη μέθοδο για κάθε μέσο εγκλεισμού. Ακολουθεί σύγκριση των αποδόσεων των δύο μεθόδων για να προσδιοριστεί ποια επιτυγχάνει υψηλότερη απόδοση και με ποιο εγκλειστικό μέσο. Έπειτα, παρουσιάζονται και συγκρίνονται τα χαρακτηριστικά ποιότητας (pH, ιξώδες, μικροβιολογικά χαρακτηριστικά για εκτίμηση της επιβίωσης των προβιοτικών βακτηρίων, υφή και χρόνος ζύμωσης) όλων των παραγόμενων γιαουρτιών. Οι συγκρίσεις πραγματοποιούνται με παρουσίαση των μετρήσεων σε διαγράμματα, αλλά και μέσω της στατιστικής επεξεργασίας των μετρήσεων (ANOVA). Τέλος, θα πραγματοποιηθεί και ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) για συχέτιση όλων των μετρούμενων παραμέτρων που σχετίζονται με τη μέθοδο εγκλεισμού των προβιοτικών βακτηρίων και τη διεργασία ζύμωσης και τα ποιοτικά χαρακτηριστικά των παραγόμενων προϊόντων γιαουρτιού.

Στο δεύτερο μέρος, προσδιορίστηκε το ποσοστό επιβίωσης των προβιοτικών βακτηρίων που έχουν ενσωματωθεί σε βρώσιμη μεμβράνη πάνω σε γιαούρτι, έπειτα από την πάροδο χρόνου 10 ημερών. Ακολουθεί σύγκριση του αποτελέσματος με το αντίστοιχο καλύτερο εγκλειστικό μέσο από κάθε μέθοδο εγκλεισμού.

7.1 Αποτελέσματα εγκλεισμένων βακτηρίων & προβιοτικών γιαουρτιών

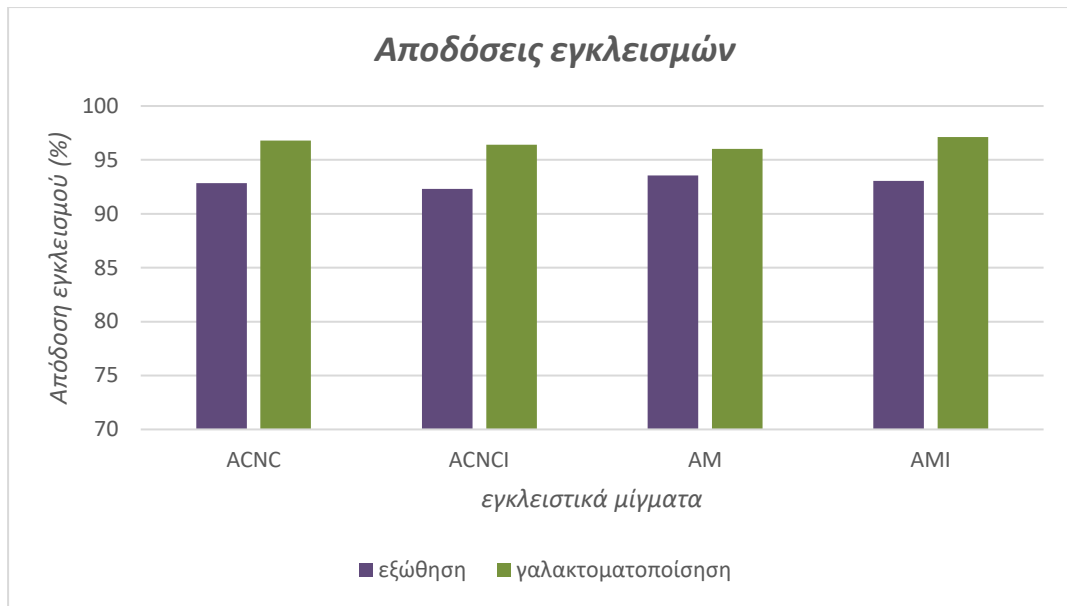
7.1.1 Προσδιορισμός αποδόσεων εγκλεισμού προβιοτικών βακτηρίων με τις μεθόδους της εξώθησης και της γαλακτωματοποίησης

Η απόδοση του εγκλεισμού (EY) υπολογίζεται από τον τύπο:

$$EY = \frac{\log N}{\log N_0} \times 100$$

όπου N είναι ο αριθμός των βιώσιμων εγκλεισμένων κυττάρων που απελευθερώνονται από τα εγκλεισμένα σφαιρίδια και N_0 είναι ο θεωρητικός αριθμός κυττάρων που προστέθηκε στο μίγμα εγκλεισμού πριν από την ενθυλάκωση.

Στο παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζονται όλες οι αποδόσεις που επιτυγχάνονται με τις δύο μεθόδους για κάθε χρησιμοποιούμενο εγκλειστικό μέσο.



Διάγραμμα 7.1.1.1: Αποδόσεις εγκλεισμών για κάθε μέθοδο και εγκλειστικό μίγμα

Από το παραπάνω διάγραμμα, παρατηρείται ότι με όλα τα εγκλειστικά μίγματα και στις δύο μεθόδους εγκλεισμού, επιτεύχθηκαν υψηλές αποδόσεις εγκλεισμού, που ανέρχονται περίπου στο 90%. Συγκεκριμένα, η υψηλότερη τιμή απόδοσης εγκλεισμού επιτυγχάνεται στην περίπτωση χρήσης του εγκλειστικού μίγματος αλγινικού νατρίου-γλυκόζης-ινουλίνης σε γάλα (AMI) όταν έχει εφαρμοστεί για ενθυλάκωση η μέθοδος με γαλακτοματοποίηση (97,13%). Από την άλλη πλευρά, η χαμηλότερη τιμή απόδοσης εγκλεισμού παρουσιάζεται όταν χρησιμοποιείται το εγκλειστικό μίγμα αλγινικού νατρίου-CNC-γλυκόζης-ινουλίνης (ACNCI) με εφαρμογή της μεθόδου της εξώθησης (92,3%).

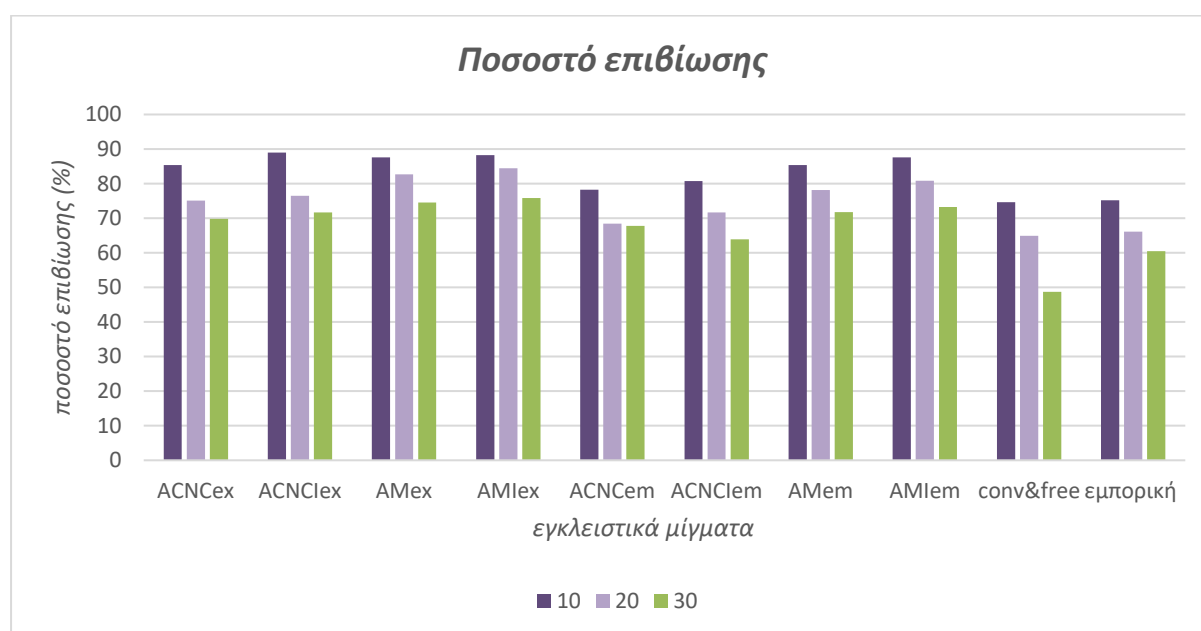
Γενικά, από το διάγραμμα 7.1.1.1, παρατηρείται ότι οι αποδόσεις εγκλεισμού που επιτυγχάνονται με τη μέθοδο της γαλακτοματοποίησης είναι υψηλότερες σε σχέση με τις αντίστοιχες με τη μέθοδο της εξώθησης με όλα τα χρησιμοποιούμενα εγκλειστικά μίγματα. Όσον αφορά το είδος του εγκλειστικού μέσου που χρησιμοποιείται, αυτό δεν φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά την τιμή της απόδοσης του εγκλεισμού.

Για την επιβεβαίωση των παραπάνω, πραγματοποιείται στατιστική επεξεργασία των μετρήσεων της απόδοσης με ανάλυση διακύμανσης (ANOVA). Από την επεξεργασία αυτή, προκύπτει ότι η μέθοδος εγκλεισμού επιφέρει στατιστικά σημαντική επίδραση στην απόδοση εγκλεισμού στα πειράματα εγκλεισμού των προβιοτικών βακτηρίων.

7.1.2 Προσδιορισμός του ποσοστού επιβίωσης του προβιοτικού βακτηρίου στα προϊόντα γιαουρτιού κατά την αποθήκευση για 30 ημέρες στους 4°C

Τα εγκλεισμένα προβιοτικά βακτήρια που ενθυλακώθηκαν με την μέθοδο της εξώθησης, αλλά και της γαλακτωματοποίησης ενσωματώθηκαν σε εμβολιασμένο γάλα και έπειτα ακολούθησε η ζύμωση του γιαουρτιού. Επίσης, παρασκευάστηκε με παρόμοιο τρόπο γιαούρτι εμπλουτισμένο με το προβιοτικό βακτήριο BB-12 ελεύθερο(conv&free), αλλά και γιαούρτι με την εμπορική προβιοτική καλλιέργεια. Σε αυτά τα γιαούρτια πραγματοποιήθηκε μικροβιολογική ανάλυση κατά τη διάρκεια αποθήκευσής τους στους 4°C για 30 ημέρες, έτσι ώστε να προσδιοριστεί το μικροβιακό φορτίο, καθώς και το ποσοστό επιβίωσης του προβιοτικού στελέχους με την πάροδο του χρόνου.

Στο παρακάτω διάγραμμα, παρουσιάζεται η βιωσιμότητα των προβιοτικών βακτηρίων στα δείγματα γιαουρτιού κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης σε ψύξη.



Διάγραμμα 7.1.2.1: Ποσοστό επιβίωσης του προβιοτικού στελέχους στα προϊόντα γιαουρτιού

Από το διάγραμμα 7.1.2.1, συγκρίνοντας τα ποσοστά επιβίωσης των προβιοτικών βακτηρίων με χρήση των διαφόρων εγκλειστικών μιγμάτων και με τις δύο μεθόδους εγκλεισμού ως προς τον χρόνο, γίνεται αντιληπτό ότι με τη μέθοδο της εξώθησης επιτυγχάνεται μεγαλύτερο ποσοστό επιβίωσης του προβιοτικού στελέχους BB-12. Συγκεκριμένα, το υψηλότερο ποσοστό επιβίωσης εμφανίζεται στις πρώτες 10 ημέρες στην περίπτωση που χρησιμοποιείται το εγκλειστικό μίγμα αλγινικού νατρίου-CNC-γλυκόζης-ινουλίνης (ACNCI) με εφαρμογή της μεθόδου ενθυλάκωσης με εξώθηση.

Όμως στη συνέχεια και μέχρι το τέλος της αποθήκευσης, το μεγαλύτερο ποσοστό επιβίωσης του προβιοτικού στελέχους εμφανίζεται με το εγκλειστικό μίγμα αλγινικού νατρίου-γλυκόζης-ινουλίνης σε γάλα (AMI) που έχει χρησιμοποιηθεί σε ενθυλάκωση με τη μέθοδο της εξώθησης.

Επίσης, τις πρώτες 10 ημέρες τα δύο γιαούρτια που περιέχουν τη μη εγκλεισμένη καλλιέργεια (con&free, εμπορική καλλιέργεια) παρατηρείται ότι έχουν παρόμοιο ποσοστό επιβίωσης μεταξύ τους, περίπου 75%. Όμως, συγκριτικά με τα προϊόντα γιαουρτιού που περιέχουν τα εγκλεισμένα βακτήρια παρουσιάζουν καθ' όλη τη διάρκεια της αποθήκευσης μικρότερο ποσοστό επιβίωσης. Συγκεκριμένα, το γιαούρτι που περιέχει το ελεύθερο προβιοτικό βακτήριο BB-12 (con&free) παρουσιάζει τη χαμηλότερη τιμή επιβίωσης προβιοτικών βακτηρίων καθ' όλη τη διάρκεια της αποθήκευσης. Μετά το πέρας το 30 ημερών, το ποσοστό επιβίωσης του BB-12 στο συγκεκριμένο γιαούρτι είναι χαμηλότερο από 50%. Ενώ, το δείγμα με την εμπορική καλλιέργεια πάντως εμφανίζει υψηλότερη βιωσιμότητα, αφού στις 30 ημέρες το ποσοστό επιβίωσης ανέρχεται σε 60,48%.

Επίσης, από το διάγραμμα παρατηρείται ότι μετά την πάροδο των 10 πρώτων ημερών τα εγκλειστικά που έχουν χρησιμοποιηθεί και έχουν ως βάση το γάλα, δηλαδή τα μίγματα αλγινικού νατρίου-γλυκόζης σε γάλα (AM) και αλγινικού νατρίου-γλυκόζης-ινουλίνης σε γάλα (AMI), συνεισφέρουν σε υψηλότερα ποσοστά επιβίωσης συγκριτικά με τα άλλα δύο δείγματα και αυτά αφορούν και στις δύο μεθόδους εγκλεισμού.

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων με ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) επιβεβαίωσε ότι το ποσοστό επιβίωσης του προβιοτικού βακτηρίου επηρεάζεται από το χρησιμοποιούμενο εγκλειστικό μέσο, την εφαρμοζόμενη μέθοδο εγκλεισμού, όπως επίσης και με το χρόνο αποθήκευσης του προϊόντος γιαουρτιού. Από τη δοκιμή Duncan, προέκυψε ότι το προϊόν γιαουρτιού με την μη εγκλεισμένη καλλιέργεια BB-12 (con&free) διαφοροποιείται σημαντικά όσον αφορά το ποσοστό επιβίωσης των βακτηρίων συγκριτικά με τα άλλα προϊόντα γιαουρτιού, καθώς εμφανίζει τη μικρότερη τιμή ποσοστού επιβίωσης. Ενώ, και το προϊόν γιαουρτιού με εγκλεισμένα προβιοτικά βακτήρια με το εγκλειστικό μίγμα αλγινικού νατρίου-γλυκόζης-ινουλίνης σε γάλα (AMI) διαφοροποιείται σημαντικά από τα υπόλοιπα, εμφανίζοντας την υψηλότερη τιμή του ποσοστού επιβίωσης των βακτηρίων.

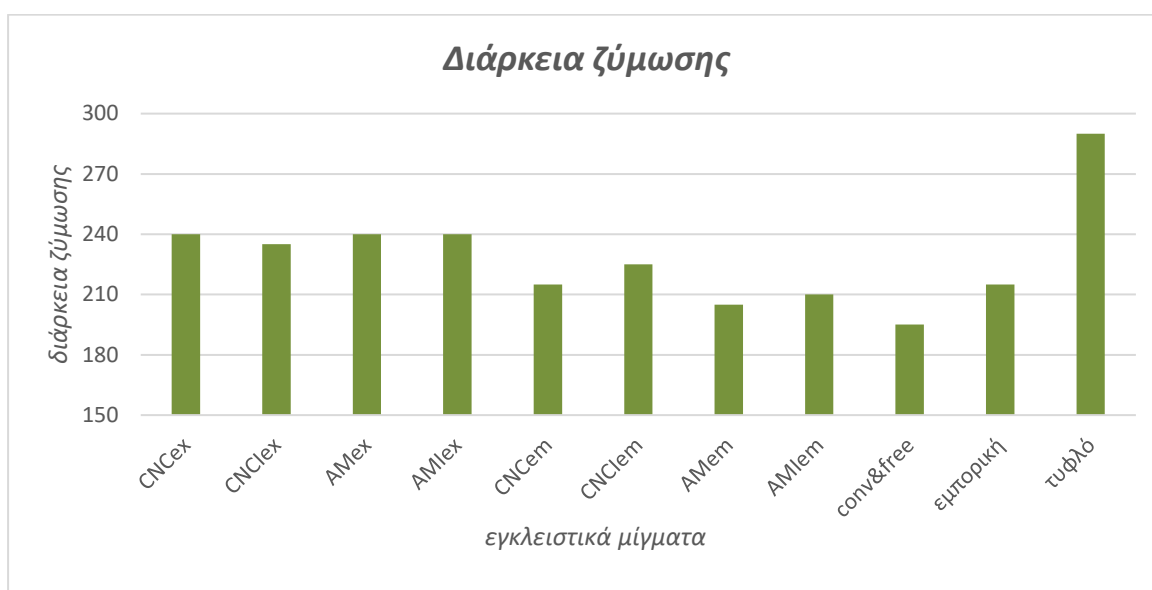
Επίσης, από τον έλεγχο Duncan αποδεικνύεται ότι σημαντικά στατιστική διαφορά στο ποσοστό επιβίωσης των προβιοτικών βακτηρίων εμφανίζεται στις 30 ημέρες αποθήκευσης των γιαουρτιών, όπου επιτυγχάνεται το χαμηλότερο ποσοστό επιβίωσης του προβιοτικού στελέχους. Ενώ, επίσης, το ποσοστό επιβίωσης διαφοροποιείται σημαντικά στατιστικά και στις πρώτες 10 ημέρες αποθήκευσης, εμφανίζοντας μεγαλύτερη τιμή.

Τέλος, όσον αφορά τις μεθόδους εγκλεισμού, η μέθοδος της εξώθησης διαφοροποιείται σημαντικά από τη γαλακτωματοποίηση, καθώς με αυτή επιτυγχάνεται το υψηλότερο ποσοστό επιβίωσης των προβιοτικών βακτηρίων στο γιαούρτι.

7.1.3 Προσδιορισμός της διάρκειας ζύμωσης για κάθε προϊόν γιαουρτιού

Η ζύμωση του γιαουρτιού πραγματοποιείται με εμβολιασμό του γάλακτος με την συμβατική καλλιέργεια εκκίνησης και την προσθήκη των εγκλεισμένων ή μη προβιοτικών βακτηρίων. Στην περίπτωση του τυφλού, η ζύμωση πραγματοποιείται χωρίς την προσθήκη των βακτηρίων. Η ολοκλήρωση της ζύμωσης πραγματοποιείται όταν η τιμή του pH φτάσει 4,6.

Στο παρακάτω διάγραμμα, παρουσιάζεται η διάρκεια της ζύμωσης των προϊόντων γιαουρτιού.



Διάγραμμα 7.1.3.1: Διάρκεια ζύμωσης των προϊόντων γιαουρτιού

Από το διάγραμμα, συγκρίνοντας τα αποτελέσματα ως προς τις δύο μεθόδους εγκλεισμού, παρατηρείται ότι με τη μέθοδο της γαλακτωματοποίησης επιτυγχάνεται η ζύμωση γρηγορότερα, καθώς όλοι οι χρόνοι είναι εμφανώς μικρότεροι. Τη μικρότερη τιμή χρόνου ζύμωσης την παρουσιάζει το γιαούρτι που έχει εμπλουτιστεί με τα εγκλεισμένα σφαιρίδια με το εγκλειστικό μίγμα αλγινικού νατρίου-γλυκόζης σε γάλα (AM) με χρήση της μεθόδου γαλακτωματοποίησης.

Βέβαια, η μικρότερη διάρκεια ζύμωσης είναι στην περίπτωση του εμπλουτισμένου γιαουρτιού με ελεύθερο (μη εγκλεισμένο) το προβιοτικού στέλεχος BB-12 (con&free) και η διάρκεια είναι μόλις 195 min. Ενώ, το προϊόν γιαουρτιού με τα βακτήρια της εμπορικής καλλιέργειας παρουσιάζει υψηλότερη τιμή (215 min) και πλησιάζει εκείνη των εμπλουτισμένων γιαουρτιών που περιέχουν τα εγκλεισμένα μέσω γαλακτωματοποίησης βακτήρια. Τέλος, η μεγαλύτερη διάρκεια ζύμωσης του γιαουρτιού εμφανίζεται στο συμβατικό γιαούρτι (τυφλό), η οποία είναι 290 min.

Για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, χρησιμοποιήθηκαν όλες οι μετρήσεις εκτός από εκείνες του τυφλού. Από την ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) συμπεραίνεται ότι η διάρκεια της ζύμωσης του γιαουρτιού επηρεάζεται από το χρησιμοποιούμενο μέσο εγκλεισμού, αλλά όχι από το εγκλειστικό μίγμα. Σύμφωνα με τη δοκιμή Duncan, τα προϊόντα γιαουρτιού με τα εγκλεισμένα βακτήρια που έχουν ενθυλακωθεί με εξώθηση διαφοροποιούνται σημαντικά από εκείνα της γαλακτωματοποίησης. Αυτό δικαιολογείται, καθώς με χρήση εγκλεισμένων βακτηρίων με τη μέθοδο της εξώθησης παρατηρούνται μεγαλύτεροι χρόνοι ζύμωσης, με τον μεγαλύτερο να ισούται με 240 min. Η τιμή αυτή αντιστοιχεί σε τρία προϊόντα γιαουρτιού και συγκεκριμένα στα γιαούρτια με εγκλεισμένα προβιοτικά βακτήρια με το εγκλειστικό μίγμα αλγινικού νατρίου-CNC-γλυκόζης (ACNC), το εγκλειστικό μίγμα αλγινικού νατρίου-γλυκόζης σε γάλα (AM) και το εγκλειστικό μίγμα αλγινικού νατρίου-γλυκόζης-ινουλίνης σε γάλα (AMI).

7.1.4 Διάρκεια λανθάνουσας φάσης pH (λ) & μέγιστος ρυθμός μείωσης του pH (μ) για τα προϊόντα γιαουρτιού

Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του γιαουρτιού, λαμβάνονται μετρήσεις του pH ανά 5 min από ένα ηλεκτρονικό pH-μετρο. Οι μετρήσεις αυτές επεξεργάζονται και έπειτα θεωρώντας ότι ακολουθούν την παρακάτω εξίσωση Gompertz των 4 παραμέτρων προκύπτουν οι τιμές της λανθάνουσας φάσης pH (λ), αλλά και ο μέγιστος ρυθμός μείωσης του pH (μ). Οι παράμετροι αυτές περιγράφουν την εξέλιξη της ζύμωσης του γιαουρτιού ως προς τις χαρακτηριστικές φάσεις, όπως αναφέρεται και στο κεφάλαιο 3.4.

$$pH = pH_0 + (pH_0 - pH_\infty) \left\{ - \exp \left[\frac{\mu_{pH}}{(pH_0 - pH_\infty)} (\lambda_{pH} - t) + 1 \right] \right\}$$

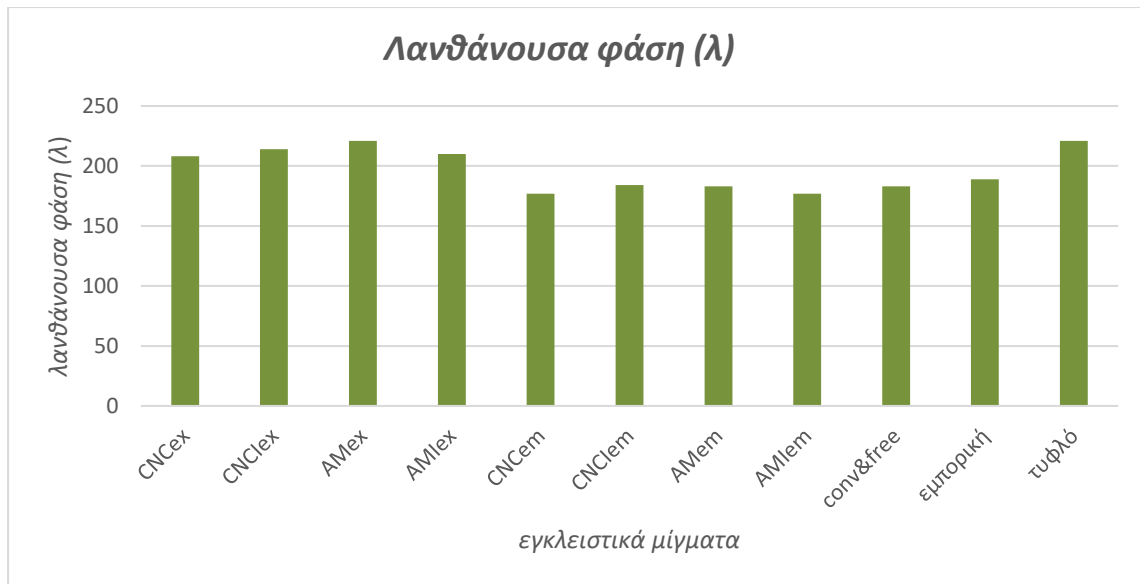
Όπου: pH_0 , pH_∞ = αρχική και τελική τιμή του pH, αντίστοιχα

μ_{pH} (min^{-1}) = μέγιστος ρυθμός μείωσης του pH

λ_{pH} (min) = διάρκεια της λανθάνουσας φάσης του pH

Διάρκεια λανθάνουσας φάσης pH (λ)

Στο παρακάτω διάγραμμα, παρουσιάζεται η διάρκεια της λανθάνουσας φάσης του pH των προϊόντων γιαουρτιού.



Διάγραμμα 7.1.4.1: Διάρκεια λανθάνουσας φάσης του pH των προϊόντων γιαουρτιού

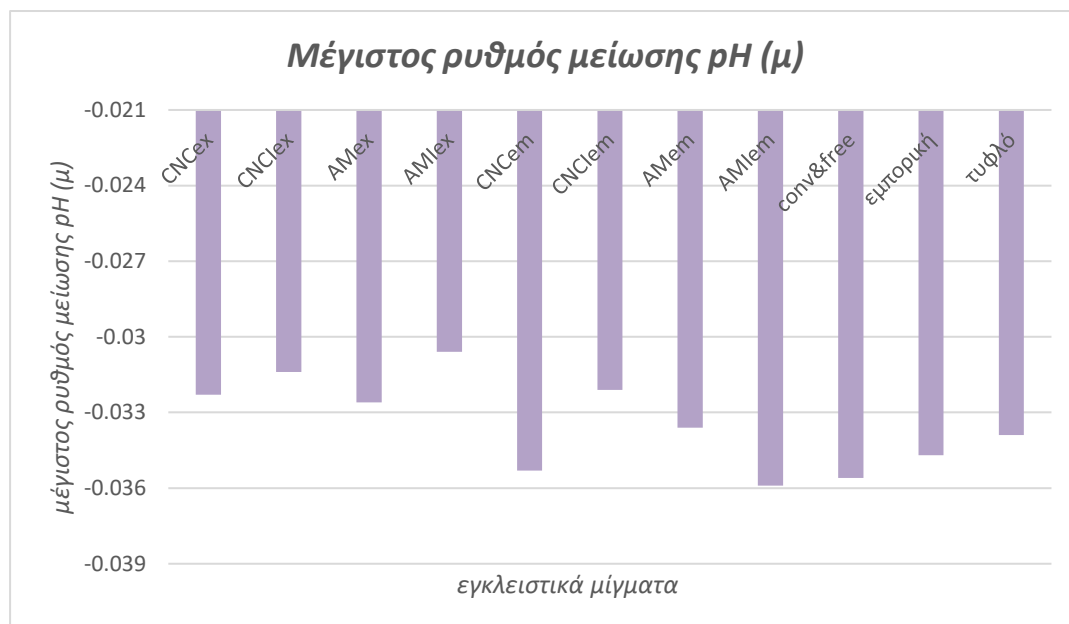
Από το παραπάνω διάγραμμα, γίνεται αντιληπτό ότι τα προϊόντα γιαουρτιού που έχουν εμπλουτιστεί με σφαιρίδια εγκλεισμένα με την μέθοδο της εξώθησης αλλά και το τυφλό, παρουσιάζουν παρόμοιες και υψηλότερες τιμές λανθάνουσας φάσης συγκριτικά με εκείνα που περιέχουν εγκλεισμένα βακτήρια με τη μέθοδο της γαλακτωματοποίησης και με τα μη εγκλεισμένα προβιοτικά βακτήρια (conv&free, εμπορική καλλιέργεια), που εμφανίζουν παρόμοιες τιμές και αυτά μεταξύ τους.

Η υψηλότερη τιμή (221 min) της λανθάνουσας φάσης του pH εμφανίζεται στο γιαούρτι που περιέχει τα εγκλεισμένα σφαιρίδια με το εγκλειστικό μίγμα αλγινικού νατρίου-γλυκόζης σε γάλα (AM) με εφαρμογή της μεθόδου εξώθησης και στο τυφλό. Αντίστοιχα, η μικρότερη τιμή λανθάνουσας φάσης του pH (177min) εμφανίζεται στο γιαούρτι με εγκλεισμένα προβιοτικά βακτήρια με το εγκλειστικό μίγμα αλγινικού νατρίου-γλυκόζης-ινουλίνης σε γάλα (AMI) και το μίγμα αλγινικού νατρίου-CNC-γλυκόζης (ACNC) με εφαρμογή της μεθόδου ενθυλάκωσης με γαλακτωματοποίηση.

Για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, χρησιμοποιήθηκαν όλες οι μετρήσεις εκτός του τυφλού. Από την ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) συμπεραίνεται ότι η λανθάνουσα φάση του pH διαφοροποιείται εξαρτώμενη από τη μέθοδο εγκλεισμού που εφαρμόζεται στον εγκλεισμό των προβιοτικών βακτηρίων, αλλά όχι από τα χρησιμοποιούμενα διαφορετικά εγκλειστικά μέσα. Από τον έλεγχο Duncan, επιβεβαιώνεται η διαπίστωση ότι τα προϊόντα γιαουρτιού με τα εγκλεισμένα βακτήρια με τα εγκλειστικά μίγματα μέσω της εξώθησης διαφέρουν σημαντικά στατιστικά από τα αντίστοιχα προϊόντα με τα εγκλεισμένα βακτήρια μέσω της γαλακτωματοποίησης, παρουσιάζοντας υψηλότερες τιμές.

Μέγιστος ρυθμός μείωσης του pH (μ)

Ακολουθεί διάγραμμα, όπου εμφανίζονται οι μέγιστοι ρυθμοί μείωσης του pH των γιαουρτιών.



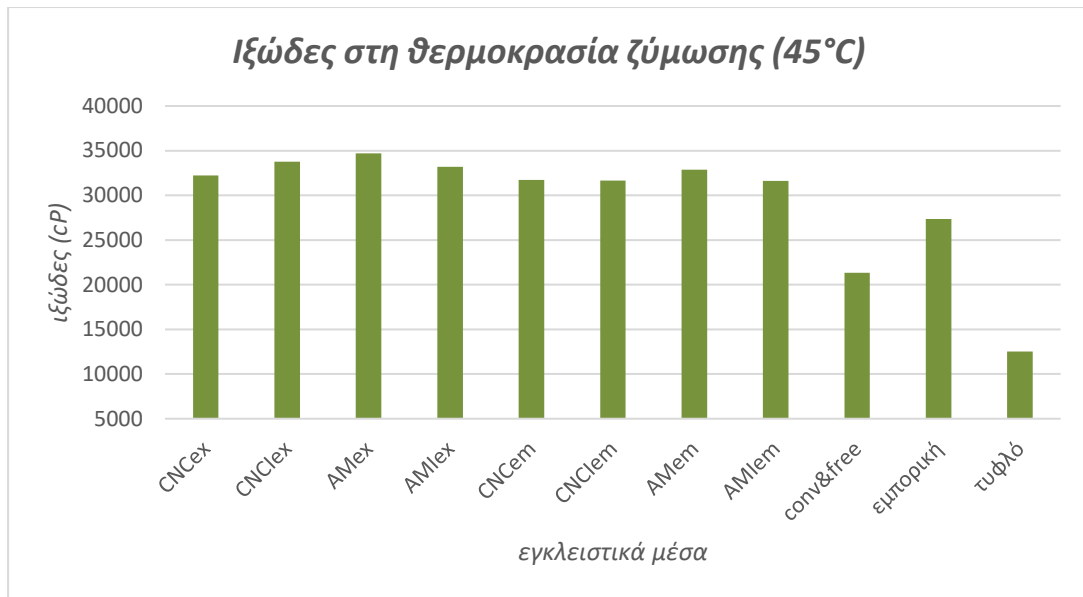
Διάγραμμα 7.1.4.2: Μέγιστος ρυθμός μείωσης pH των προϊόντων γιαουρτιού

Από το παραπάνω διάγραμμα, γίνεται αντιληπτό ότι οι τιμές του μέγιστου ρυθμού μείωσης του pH διαφοροποιούνται σε πολύ μικρό βαθμό μεταξύ των διαφόρων προϊόντων γιαουρτιού.

Μάλιστα, η μη ύπαρξη σημαντικά στατιστικής διαφοράς επιβεβαιώνεται από την στατιστική επεξεργασία των μετρήσεων με ανάλυση διακύμανσης (ANOVA). Από την επεξεργασία αυτή, προκύπτει δηλαδή ότι ούτε η μέθοδος εγκλεισμού των προβιοτικών βακτηρίων ούτε το χρησιμοποιούμενο εγκλειστικό μέσο επιφέρει στατιστικά σημαντική επίδραση στο μέγιστο ρυθμό μείωσης του pH κατά τη ζύμωση του γιαουρτιού.

7.1.5 Ιξώδες προϊόντων γιαουρτιού μετά το πέρας της ζύμωσης

Η διαδικασία της ζύμωσης του γιαουρτιού πραγματοποιείται σε θάλαμο επώασης στους 45°C. Μόλις ολοκληρωθεί η ζύμωση, λαμβάνεται μία μέτρηση του ιξώδους με το ιξωδόμετρο Brookfield. Στο παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζονται όλες οι τιμές του ιξώδους των γιαουρτιών.



Διάγραμμα 7.1.5.1: Ιξώδες μετά το πέρας της ζύμωσης (45°C) των προϊόντων γιαουρτιού

Από το διάγραμμα 7.1.5.1, παρατηρείται ότι οι υψηλότερες τιμές ιξώδους εμφανίζονται στα προϊόντα γιαουρτιού που έχουν εμπλουτιστεί με εγκλεισμένα βακτήρια. Η μεγαλύτερη τιμή του ιξώδους (34695cP) εμφανίζεται στο γιαούρτι που περιέχει τα εγκλεισμένα σφαιρίδια με μίγμα αλγινικού νατρίου-γλυκόζης σε γάλα (AM) και τα οποία είναι ενθυλακωμένα μέσω εξώθησης. Αντίστοιχα, η μικρότερη τιμή ιξώδους (12509cP) εμφανίζεται στο συμβατικό γιαούρτι (τυφλό). Επίσης, από το διάγραμμα γίνεται αντιληπτό ότι οι τιμές του ιξώδους των γιαουρτιών είναι ελαφρώς μικρότερες στα δείγματα με τα εγκλεισμένα βακτήρια μέσω εφαρμογής της μεθόδου γαλακτωματοποίησης.

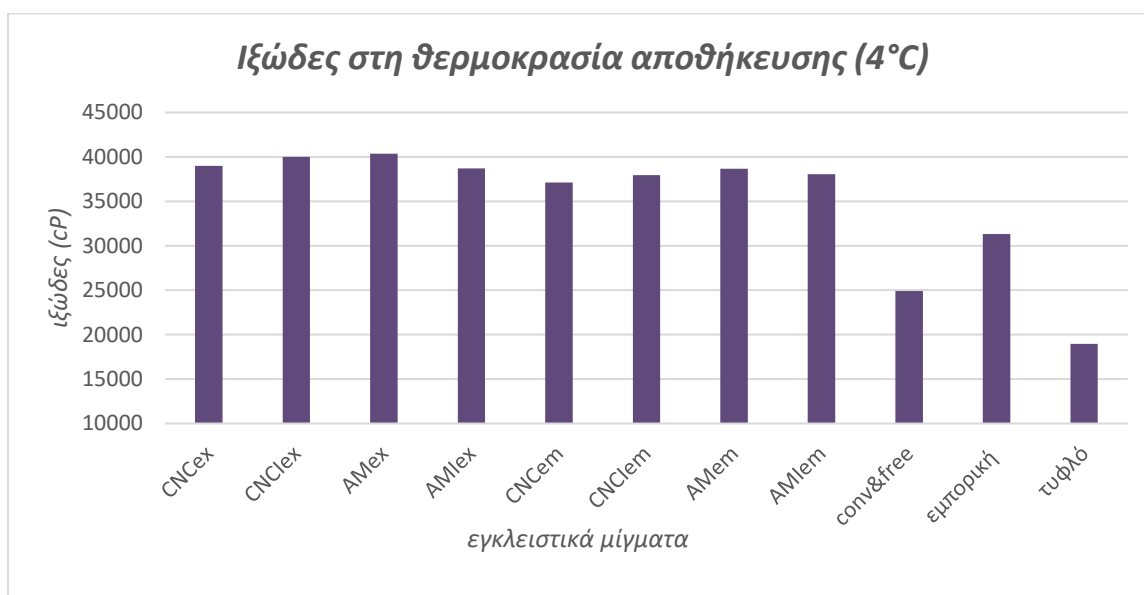
Συγκρίνοντας με το τυφλό δείγμα, παρατηρείται ότι η προσθήκη στο συμβατικό γιαούρτι του μη εγκλεισμένου προβιοτικού στελέχους BB-12 (conv&free) επιφέρει αύξηση στην τιμή του ιξώδους των γιαουρτιών και συγκεκριμένα η τιμή τους ισούται με 21349 cP από 12509cP αντίστοιχα. Ακόμα μεγαλύτερη αύξηση στο ιξώδες των γιαουρτιών επιφέρει η προσθήκη της εμπορικής προβιοτικής καλλιέργειας, αφού η τιμή του ανέρχεται σε 27361 cP.

Ακολούθησε στατιστική επεξεργασία των τιμών του ιξώδους, όπου χρησιμοποιήθηκαν όλες οι μετρήσεις εκτός του τυφλού. Από την ανάλυση διακύμανσης (ANOVA), προέκυψε ότι η τιμή του ιξώδους των γιαουρτιών επηρεάζεται και από την μέθοδο εγκλεισμού των χρησιμοποιούμενων εγκλεισμένων σφαιριδίων και από το εγκλειστικό μέσο κατά τον εγκλεισμό τους. Έπειτα ακολούθησε έλεγχος Duncan, όπου επιβεβαιώθηκε ότι τα γιαούρτια με τα εγκλεισμένα βακτήρια μέσω των δύο μεθόδων εγκλεισμού, το γιαούρτι με τα ελεύθερα βακτήρια (conv&free) και το γιαούρτι με την εμπορική καλλιέργεια εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους ως προς το ιξώδες τους. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, προκύπτει ότι η χαμηλότερη τιμή ιξώδους εμφανίζεται στο προϊόν γιαουρτιού με το μη εγκλεισμένο προβιοτικό στέλεχος BB-12 (conv&free), ενώ οι υψηλότερες τιμές ιξώδους εμφανίζονται στα προϊόντα γιαουρτιού με τα εγκλεισμένα βακτήρια.

Τέλος, από την δοκιμή Duncan για τις δύο μεθόδους εγκλεισμού των προβιοτικών βακτηρίων, προέκυψε ότι η μέθοδος εγκλεισμού επιφέρει σημαντικά στατιστική διαφορά, καθώς στην περίπτωση της εξώθησης επιτυγχάνονται υψηλότερες τιμές ιξώδους.

7.1.6 Ιξώδες προϊόντων γιαουρτιού μετά από μία ημέρα αποθήκευσης στους 4°C

Αφού ολοκληρωθεί η διαδικασία της ζύμωσης τα προϊόντα γιαουρτιού αποθηκεύονται στο ψυγείο, όπου η θερμοκρασία που επικρατεί είναι ίση με 4 °C, και μία ημέρα μετά μετράται το ιξώδες τους. Παρακάτω παρατίθεται διάγραμμα με τις μετρήσεις.



Διάγραμμα 7.1.6.1: Ιξώδες των προϊόντων γιαουρτιού μετά από μία ημέρα αποθήκευσης στους 4°C

Από το διάγραμμα, παρατηρείται ότι τα ιξώδη των γιαουρτιών που έχουν εμπλουτιστεί με τα εγκλεισμένα σφαιρίδια εμφανίζουν μεγαλύτερες τιμές, όπως παρατηρήθηκε και αμέσως μετά την ζύμωση. Βέβαια, φαίνεται ότι ελαφρώς υψηλότερες τιμές ιξώδους εμφανίζονται στην περίπτωση των γιαουρτιών με χρήση εγκλεισμένων βακτηρίων μέσω εξώθησης. Συγκεκριμένα, η μεγαλύτερη τιμή του ιξώδους (40337 cP) εμφανίζεται στο γιαούρτι που περιέχει τα εγκλεισμένα σφαιρίδια με μίγμα αλγινικού νατρίου-γλυκόζης σε γάλα (AM) και στα οποία εφαρμόστηκε η μέθοδος της ενθυλάκωσης με εξώθηση. Ενώ, τη μικρότερη τιμή ιξώδους εμφανίζει το τυφλό δείγμα (18954 cP).

Το προϊόν γιαουρτιού με την εμπορική προβιοτική καλλιέργεια, παρατηρείται ότι φέρει αρκετά υψηλότερη τιμή ιξώδους από ότι το προϊόν γιαουρτιού με το μη εγκλεισμένο προβιοτικό στελέχους BB-12 (conν&free), με τιμές 31308 cP και 24916 cP, αντίστοιχα.

Για την επιβεβαίωση των παραπάνω, πραγματοποιείται στατιστική επεξεργασία των τιμών του ιξώδους, όπου χρησιμοποιήθηκαν όλες οι μετρήσεις εκτός του τυφλού. Από την ανάλυση διακύμανσης (ANOVA), προέκυψε ότι η τιμή του ιξώδους διαφοροποιείται σημαντικά στα δείγματα γιαουρτιού όσον αφορά τις εφαρμοζόμενες μεθόδους εγκλεισμού των προβιοτικών βακτηρίων, αλλά ως προς τα χρησιμοποιούμενα εγκλειστικά μέσα.

Από τον έλεγχο Duncan, επιβεβαιώνεται αρχικά η σημαντικά στατιστική διαφορά ανάμεσα στα προϊόντα γιαουρτιού μεταξύ των χρησιμοποιούμενων εγκλεισμένων προβιοτικών βακτηρίων μέσω των δύο μεθόδων εγκλεισμού. Ενώ, από έναν δεύτερο έλεγχο ως προς το εγκλειστικό μέσο, προέκυψε ότι τα γιαούρτια που περιέχουν τα εγκλεισμένα βακτήρια μέσω των δύο μεθόδων, το γιαούρτι με τα ελεύθερα βακτήρια (conν&free) και το γιαούρτι με την εμπορική καλλιέργεια διαφοροποιούνται σημαντικά στατιστικά μεταξύ τους ως προς το ιξώδες. Μάλιστα, τα γιαούρτια με τα εγκλεισμένα βακτήρια επιτυγχάνουν τις υψηλότερες τιμές ιξώδους, ενώ το προϊόν γιαουρτιού με το μη εγκλεισμένο προβιοτικό στελέχους BB-12 (conν&free) έχει τη χαμηλότερη τιμή ιξώδους.

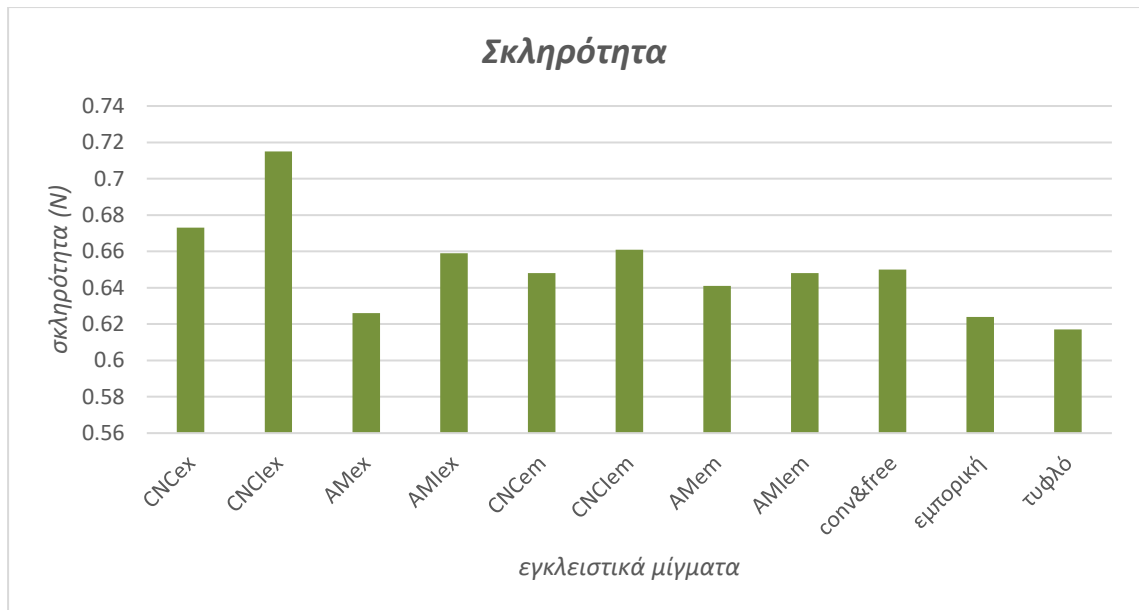
Από την το ιξώδες μετά το τέλος της ζύμωσης αλλά και την επόμενη μέρα από την αποθήκευση στους 4°C προκύπτει ότι η ύπαρξη εγκλεισμένων ή ελεύθερων προβιοτικών βακτηρίων αλλά και το εγκλειστικό μέσο που χρησιμοποιείται σε κάθε περίπτωση στα προϊόντα γιαουρτιού παίζει σημαντικό ρόλο στις μετρήσεις που λαμβάνονται. Αυτό δικαιολογείται διότι το εγκλειστικό μέσο και τα προβιοτικά βακτήρια συνεισφέρουν ως πηκτικά μέσα στο γιαούρτι.

7.1.7 Ανάλυση υφής των προϊόντων γιαουρτιού μετά από μία ημέρα αποθήκευσης στους 4°C

Τα προϊόντα γιαουρτιού παραλαμβάνονται έπειτα από μία ημέρα αποθήκευσης στους 4°C και αναλύονται στον αναλυτή υφής. Από τα αποτελέσματα του αναλυτή υφής προκύπτει η σκληρότητα και η προσκολλησιμότητα των δειγμάτων.

Σκληρότητα

Στο παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζονται οι τιμές της σκληρότητας των δειγμάτων γιαουρτιού.



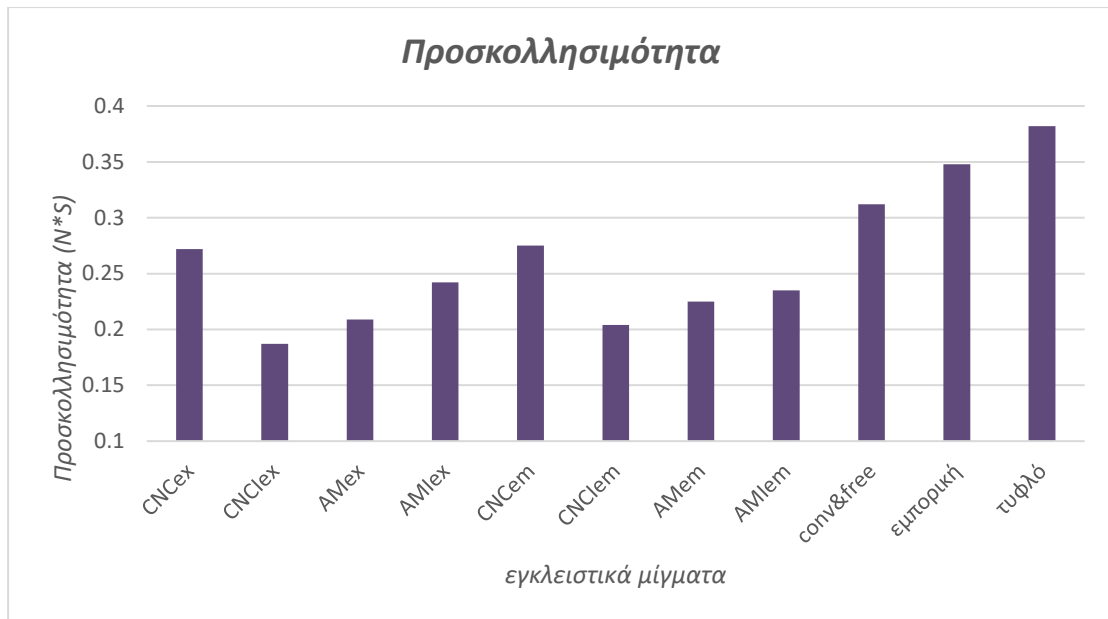
Διάγραμμα 7.1.7.1: Σκληρότητα του κάθε προϊόντος γιαουρτιού μετά από μία ημέρα αποθήκευσης στους 4°C

Από το παραπάνω διάγραμμα, παρατηρείται ότι όλες οι τιμές της σκληρότητας των δειγμάτων γιαουρτιού είναι παραπλήσιες, καθώς κυμαίνονται ανάμεσα σε 0,61 έως 0,72 N. Η χαμηλότερη τιμή σκληρότητας εμφανίζεται στο τυφλό δείγμα (0,617 N), ενώ η υψηλότερη στο γιαούρτι με εγκλεισμένα προβιοτικά βακτήρια με το μίγμα αλγινικού νατρίου-CNC-γλυκόζης-ινουλίνης (ACNCI) με ενθυλάκωση μέσω εξώθησης (0,715 N). Φαίνεται ότι η προσθήκη προβιοτικών βακτηρίων, εγκλεισμένων και μη, αυξάνει μερικώς τη σκληρότητα του δείγματος γιαουρτιού.

Στη συνέχεια, πραγματοποιείται στατιστική επεξεργασία των τιμών της σκληρότητας, όπου χρησιμοποιήθηκαν όλες οι μετρήσεις εκτός του τυφλού. Από την ανάλυση διακύμανσης (ANOVA), προέκυψε ότι η τιμή της σκληρότητας των γιαουρτιών δεν επηρεάζεται σημαντικά ούτε από τα χρησιμοποιούμενα εγκλειστικά μίγματα στον εγκλεισμό των προβιοτικών βακτηρίων, ούτε από τις εφαρμοζόμενες μεθόδους εγκλεισμού.

Προσκολλησιμότητα

Στο παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζονται οι απόλυτες τιμές της προσκολλησιμότητας των προϊόντων γιαουρτιού.



Διάγραμμα 7.1.7.2: Προσκολλησιμότητα του κάθε προϊόντος γιαουρτιού μετά από μία ημέρα αποθήκευσης στους 4°C

Από το παραπάνω διάγραμμα, γίνεται αντιληπτή μία συσχέτιση των τιμών της προσκολλησιμότητας των γιαουρτιών ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο εγκλειστικό μέσο για τον εγκλεισμό των προβιοτικών βακτηρίων. Συγκεκριμένα, όσον αφορά τις δύο μεθόδους εγκλεισμού των βακτηρίων που εφαρμόστηκαν, η κατάταξη με βάση τις τιμές προσκολλησιμότητας είναι ίδια και για τα δύο μέσα εγκλεισμού. Και στις δύο μεθόδους εγκλεισμού, τη χαμηλότερη τιμή παρουσιάζει το γιαούρτι με εγκλεισμένα βακτήρια με το μίγμα αλγινικού νατρίου-CNC-γλυκόζης-ινουλίνης (ACNCI) και την υψηλότερη το γιαούρτι με εγκλεισμένα βακτήρια με το μίγμα αλγινικού νατρίου-CNC-γλυκόζης (ACNC).

Βέβαια, στα δείγματα στα οποία έχουν προστεθεί μη εγκλεισμένα βακτήρια και στο τυφλό δείγμα, η προσκολλησιμότητα είναι μεγαλύτερη συγκριτικά με εκείνα που περιέχουν εγκλεισμένα προβιοτικά βακτήρια. Η υψηλότερη τιμή προσκολλησιμότητας εμφανίζεται στο τυφλό δείγμα (0,382 N*s).

Από τη στατιστική επεξεργασία όλων των μιγμάτων εκτός του τυφλού, προέκυψε ότι η προσκολλησιμότητα διαφοροποιείται σημαντικά ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο εγκλειστικό μίγμα στη διαδικασία εγκλεισμού των προβιοτικών βακτηρίων. Από τον έλεγχο Duncan, προκύπτει ότι όλα τα προϊόντα γιαουρτιού εμφανίζουν σημαντικά στατιστικές διαφορές μεταξύ τους. Η χαμηλότερη τιμή της προσκολλησιμότητας (0,187 N*s) προκύπτει στην περίπτωση του γιαουρτιού με εγκλεισμένα προβιοτικά βακτήρια με το μίγμα αλγινικού νατρίου-CNC-γλυκόζης-ινουλίνης (ACNCI), ενώ η υψηλότερη (0,348 N*s) εμφανίζεται στο προϊόν με την εμπορική προβιοτική καλλιέργεια.

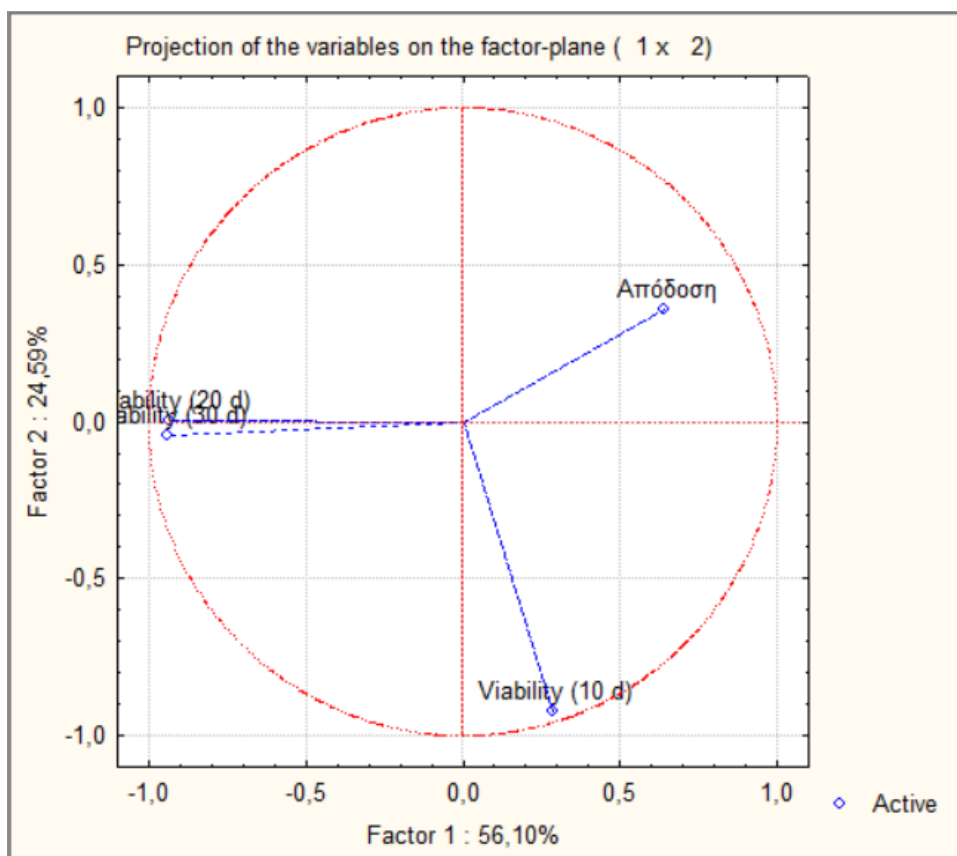
7.2 Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA)

Η ανάλυση κυρίων συνιστώσεων (PCA) χρησιμοποιείται ούτως ώστε να γίνει συσχέτιση όλων των εξεταζόμενων παραμέτρων μεταξύ τους, δηλαδή παραμέτρων που αφορούν τον εγκλεισμό των προβιοτικών βακτηρίων (μέθοδος εγκλεισμού, εγκλειστικό μεσο ως προς απόδοση εγκλεισμού) και των παραμέτρων εξέλιξης της ζύμωσης των γιαουρτιών, καθώς και των ποιοτικών χαρακτηριστικών αυτών (ποσοστό επιβίωσης βακτηρίων, ιξώδες, σκληρότητα, προσκολλησιμότητα). Παρακάτω, θα πραγματοποιηθούν τρεις διαφορετικές αναλύσεις, όπου σε κάθε περίπτωση συσχετίζονται διαφορετικοί παράμετροι.

7.2.1 Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) για τα προϊόντα γιαουρτιού με τα εγκλεισμένα βακτήρια

Αρχικά, πραγματοποιείται ανάλυση κύριων συνιστωσών για τα προϊόντα γιαουρτιού, τα οποία έχουν εμπλουτιστεί με τα εγκλεισμένα βακτήρια μέσω των δύο μεθόδων εγκλεισμού με χρήση διαφόρων εγκλειστικών μιγμάτων. Οι παράμετροι που συσχετίζονται στη συγκεκριμένη ανάλυση είναι η απόδοση του εγκλεισμού με τις δύο μεθόδους και τα διάφορα εγκλειστικά μέσα και το ποσοστό επιβίωσης των προβιοτικών βακτηρίων που ενσωματώνονται σε γιαούρτια μετά την πάροδο 10, 20 και 30 ημερών αποθήκευσης αυτών σε ψύξη.

Παρακάτω παρουσιάζεται η γραφική παράσταση των συντελεστών συσχέτισης των δύο πρώτων κύριων συνιστωσών με τις μεταβλητές. Η πρώτη κύρια συνιστώσα έχει συνεισφορά στη συνολική διακύμανση του πειράματος 56,10%, ενώ η δεύτερη έχει 24,59 % αντίστοιχα. Συνολικά, οι δύο κύριες συνιστώσες εξηγούν το 80,69% της συνολικής διακύμανσης των πειραμάτων παραγωγής γιαουρτιού με εγκλεισμένα προβιοτικά βακτήρια.



Διάγραμμα 7.2.1.1: Γραφική παράσταση συσχέτισης των δύο πρώτων κύριων συνιστωσών με τις μεταβλητές των πειραμάτων παραγωγής γιαουριού με εγκλεισμένα προβιοτικά βακτήρια

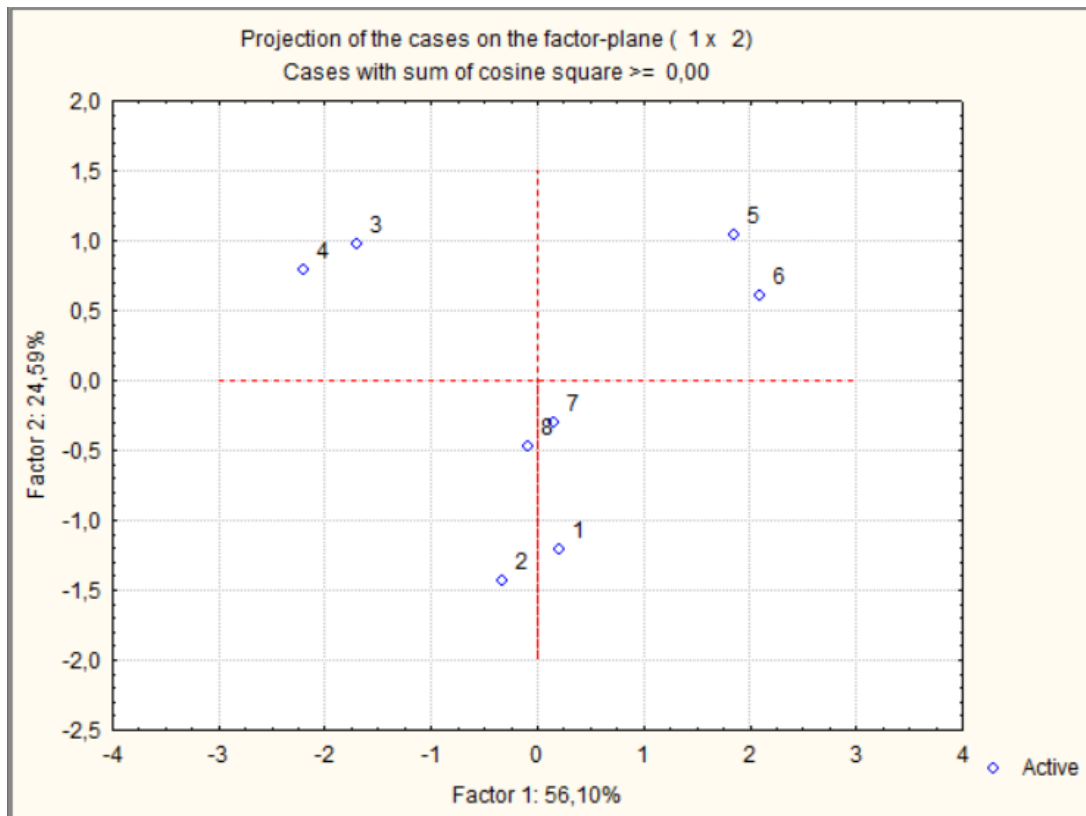
Από το διάγραμμα 7.2.1.1, μπορούν να αντλήθούν τα εξής συμπεράσματα:

1. Το ποσοστό επιβίωσης των προβιοτικών βακτηρίων μετά το πέρας των 20 και 30 ημερών έχει αρνητική επίδραση στην πρώτη κύρια συνιστώσα. Επιπλέον, τα δύο αυτά ποσοστά παρουσιάζουν θετική συσχέτιση μεταξύ τους, καθώς τείνουν να ταυτιστούν.
2. Το ποσοστό επιβίωσης των προβιοτικών βακτηρίων μετά το πέρας των 10 ημερών έχει αρνητική επίδραση στην δεύτερη κύρια συνιστώσα.
3. Η απόδοση των εγκλεισμένων βακτηρίων δεν παρουσιάζει σημαντική επίδραση σε καμία από τις δύο κύριες συνιστώσες.

Στο διάγραμμα 7.2.1.2, παρουσιάζεται η γραφική παράσταση των δύο κύριων συνιστωσών για τα δείγματα γιαουριών με εγκλεισμένα προβιοτικά βακτήρια που μελετήθηκαν. Συγκεκριμένα, τα δείγματα που μελετήθηκαν είναι:

- Το προϊόν γιαουριού με εγκλεισμένα προβιοτικά βακτήρια με το εγκλειστικό μίγμα αλγινικού νατρίου-CNC-γλυκόζης (ACNC) και με ενθυλάκωση μέσω εξώθησης (1) και γαλακτωματοποίησης (5).

- Το προϊόν γιαουρτιού με εγκλεισμένα προβιοτικά βακτήρια με το εγκλειστικό μίγμα αλγινικού νατρίου-CNC-γλυκόζης-ινουλίνης (ACNCI) και με ενθυλάκωση μέσω εξώθησης (2) και γαλακτωματοποίησης (6).
- Το προϊόν γιαουρτιού με εγκλεισμένα προβιοτικά βακτήρια με το εγκλειστικό μίγμα αλγινικού νατρίου-γλυκόζης σε γάλα (AM) και με ενθυλάκωση μέσω εξώθησης (3) και γαλακτωματοποίησης (7).
- Το προϊόν γιαουρτιού με εγκλεισμένα προβιοτικά βακτήρια με το εγκλειστικό μίγμα αλγινικού νατρίου-γλυκόζης-ινουλίνης σε γάλα (AMI) και με ενθυλάκωση μέσω εξώθησης (4) και γαλακτωματοποίησης (8).



Διάγραμμα 7.2.1.2: Γραφική παράσταση των δύο πρώτων κύριων συνιστωσών για τα δείγματα γιαουρτιών με εγκλεισμένα προβιοτικά βακτήρια που μελετήθηκαν

Από το παραπάνω διάγραμμα, φαίνεται ότι σχηματίζονται τέσσερις ομάδες με κοινά χαρακτηριστικά. Συγκεκριμένα, δημιουργείται μία ομάδα (A) με τα προϊόντα γιαουρτιού με εγκλεισμένα βακτήρια στο εγκλειστικό μίγμα αλγινικού νατρίου-CNC-γλυκόζης (ACNC) και στο εγκλειστικό μίγμα αλγινικού νατρίου-CNC-γλυκόζης-ινουλίνης (ACNCI) που έχουν ενθυλακωθεί με εξώθηση.

Η δεύτερη ομάδα (B) αποτελείται από τα προϊόντα γιαουρτιού εγκλεισμένα βακτήρια στο εγκλειστικό μίγμα αλγινικού νατρίου-γλυκόζης σε γάλα (AM) και στο

εγκλειστικό μίγμα αλγινικού νατρίου-γλυκόζης-ινουλίνης σε γάλα (AMI) που έχουν ενθυλακωθεί με γαλακτωματοποίηση.

Η τρίτη ομάδα (Γ) δημιουργείται από τα προϊόντα γιαουρτιού με εγκλεισμένα βακτήρια στο εγκλειστικό μίγμα αλγινικού νατρίου-γλυκόζης σε γάλα (AM) και στο εγκλειστικό μίγμα αλγινικού νατρίου-γλυκόζης-ινουλίνης σε γάλα (AMI) που έχουν ενθυλακωθεί με εξώθηση.

Και τέλος, στην τέταρτη ομάδα (Δ) βρίσκονται τα προϊόντα γιαουρτιού με με τα εγκλεισμένα βακτήρια με το εγκλειστικό μίγμα αλγινικού νατρίου-CNC-γλυκόζης (ACNC) και το εγκλειστικό μίγμα αλγινικού νατρίου-CNC-γλυκόζης-ινουλίνης (ACNCI) που έχουν ενθυλακωθεί με γαλακτωματοποίηση.

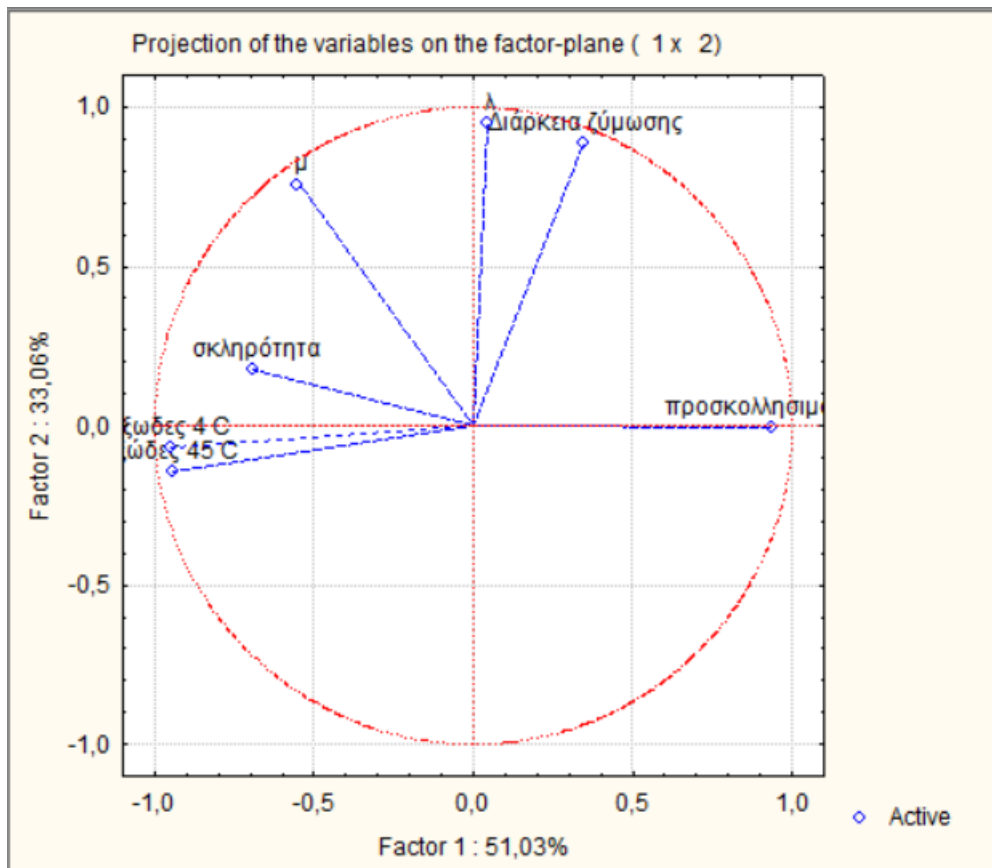
Η παραπάνω ομαδοποίηση φαίνεται ότι πραγματοποιείται χάρη στις παρόμοιες τιμές της απόδοσης εγκλεισμού και του ποσοστού βιωσιμότητας (10, 20, 30 ημερών αποθήκευσης), που παρουσιάζουν τα δείγματα κάθε ομάδας μεταξύ τους.

Μάλιστα, αξίζει να σημειωθεί ότι οι δύο πρώτες ομάδες (A & B) πρόκειται για προϊόντα με εγκλεισμένα βακτήρια στα εγκλειστικά μέσα που παρουσιάζουν τις χειρότερες επιδόσεις στις παραμέτρους που μελετήθηκαν. Συγκεκριμένα, η ομάδα A αποτελείται από τα προϊόντα με τη χαμηλότερη απόδοση και βιωσιμότητα. Επίσης, η ομάδα B παρουσιάζει τις υψηλότερες αποδόσεις, αλλά έχει μικρότερη βιωσιμότητα κατά τη διάρκεια των ημερών αποθήκευσης. Τέλος, οι ομάδες Γ και Δ αφορούν στα προϊόντα που παρουσιάζουν τα καλύτερα αποτελέσματα όσον αφορά τις εξεταζόμενες παραμέτρους.

7.2.2 Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) για τα όλα τα προϊόντα γιαουρτιού (με εγκλεισμένα και μη προβιοτικά βακτήρια)

Πρώτα από όλα, πραγματοποιείται ανάλυση κύριων συνιστωσών για όλα τα προϊόντα γιαουρτιού που παρήχθησαν από τα πειράματα, δηλαδή για τα προϊόντα γιαουρτιού με τα εγκλεισμένα βακτήρια, με τα ελεύθερα βακτήρια, με την εμπορική καλλιέργεια, όπως και για το συμβατικό γιαούρτι (τυφλό). Οι παράμετροι που συσχετίζονται στη συγκεκριμένη ανάλυση είναι εκείνα που αφορούν τη διεργασία ζύμωσης και τα ποιοτικά χαρακτηριστικά των γιαουρτιών, δηλαδή η λανθάνουσα φάση του pH (λ), ο μέγιστος ρυθμός μείωσης του pH (μ), το ιξώδες μετά την ζύμωση και την επόμενη ημέρα, η διάρκεια της ζύμωσης και τα χαρακτηριστικά της υφής (σκληρότητα, προσκολλησιμότητα) των τελικών προϊόντων γιαουρτιού.

Στο διάγραμμα 7.2.2.1, παρουσιάζεται η γραφική παράσταση των συντελεστών συσχέτισης των δύο πρώτων κύριων συνιστωσών με τις μεταβλητές. Φαίνεται ότι η πρώτη κύρια συνιστώσα έχει συνεισφορά στη συνολική διακύμανση του πειράματος 51,03 %, ενώ η δεύτερη έχει 33,06 % αντίστοιχα. Συνολικά, οι δύο κύριες συνιστώσες εξηγούν το 84.09% της συνολικής διακύμανσης των πειραμάτων παραγωγής γιαουρτιού με εγκλεισμένα και μη προβιοτικά βακτήρια.

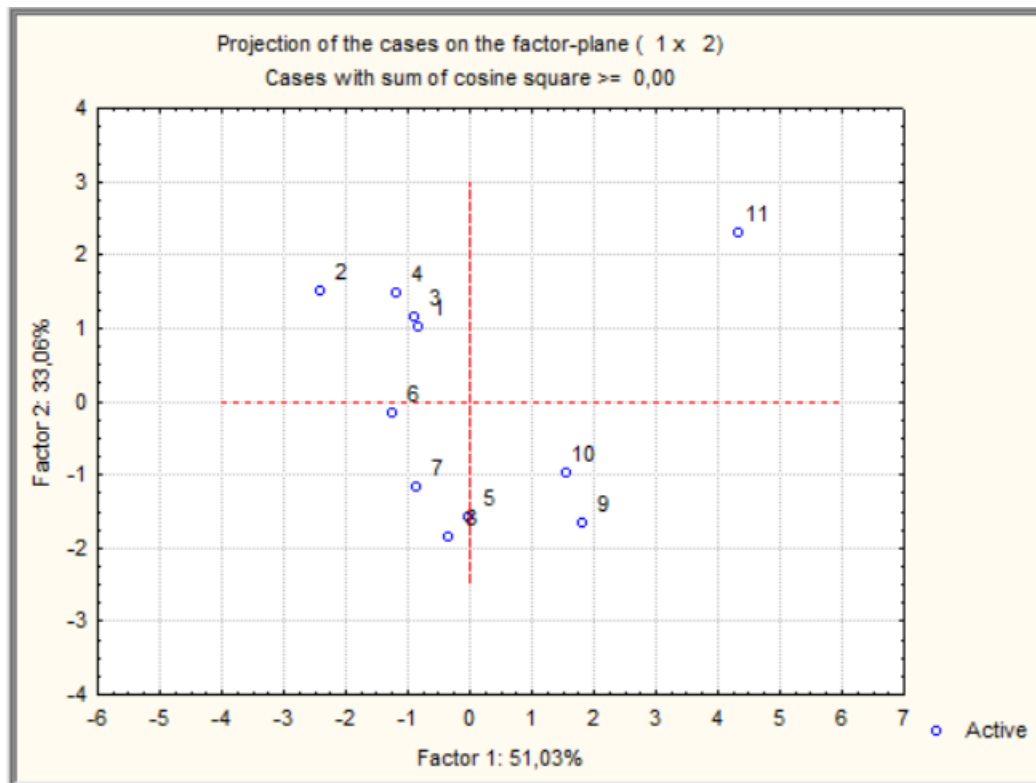


Διάγραμμα 7.2.2.1: Γραφική παράσταση συσχέτισης των δύο πρώτων κύριων συνιστωσών με τις μεταβλητές των πειραμάτων παραγωγής γιαουρτιού με εγκλεισμένα και μη προβιοτικά βακτήρια

Από το παραπάνω διάγραμμα, μπορούν να αντληθούν τα εξής συμπεράσματα:

1. Το ξώδες των γιαουρτιών αμέσως μετά την ζύμωση (στους 45°C) όπως και την επόμενη ημέρα (στους 4°C) παρουσιάζει αρνητική επίδραση στην πρώτη κύρια συνιστώσα, ενώ, τα δύο παραπάνω ιξώδη μεταξύ τους παρουσιάζουν θετική συσχέτιση.
2. Επίσης, η προσκολλησιμότητα των γιαουρτιών παρουσιάζει αρνητική επίδραση στην πρώτη κύρια συνιστώσα.
3. Τέλος, η διάρκεια της λανθάνουσας φάσης του pH και η διάρκεια της ζύμωσης των γιαουρτιών παρουσιάζουν έχουν θετική επίδραση στην δεύτερη κύρια συνιστώσα.

Στο διάγραμμα 7.2.2.2, παρουσιάζεται η γραφική παράσταση των δύο κύριων συνιστωσών για τα δείγματα γιαουρτιών με εγκλεισμένα και μη προβιοτικά βακτήρια που μελετήθηκαν. Τα δείγματα με τα εγκλεισμένα βακτήρια είναι τα ίδια με εκείνα της ενότητας 7.2.1, και εξετάζονται επιπλέον και αυτά με τα ελεύθερα βακτήρια (9), με την εμπορική καλλιέργεια (10) όπως και το συμβατικό γιαούρτι (11).



Διάγραμμα 7.2.2.2: Γραφική παράσταση των δύο πρώτων κύριων συνιστωσών για τα δείγματα γιαουρτιών με εγκλεισμένα και μη προβιοτικά βακτήρια που μελετήθηκαν

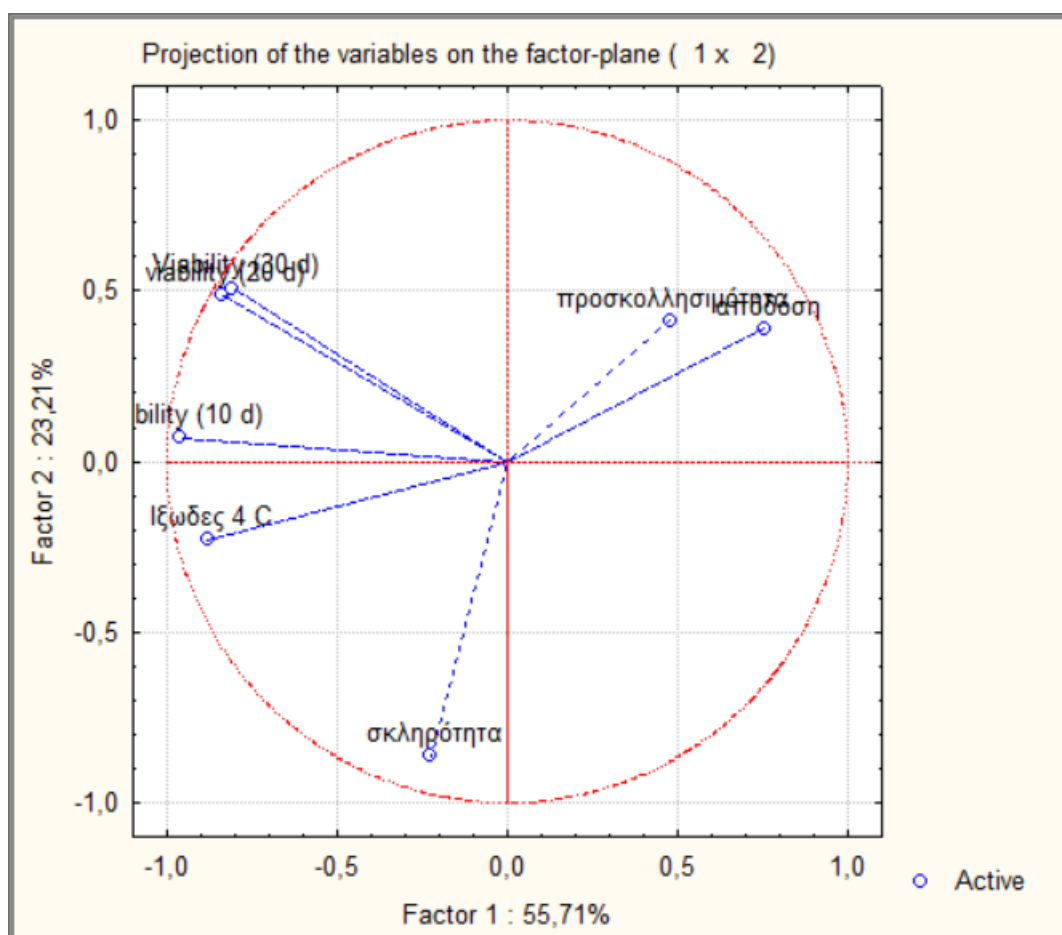
Από το παραπάνω διάγραμμα, φαίνεται ότι σχηματίζονται τρεις ομάδες με κοινά χαρακτηριστικά. Αρχικά, παρατηρείται μία ομάδα (Α) με τα προϊόντα γιαουρτιού με τα ελεύθερα βακτήρια (con&free) και με την εμπορική καλλιέργεια. Έπειτα, μία ακόμα ομάδα (Β) διακρίνεται με τα προϊόντα γιαουρτιού με εγκλεισμένα προβιοτικά βακτήρια στο εγκλειστικό μίγμα αλγινικού νατρίου-CNC-γλυκόζης (ACNC), στο εγκλειστικό μίγμα αλγινικού νατρίου-γλυκόζης σε γάλα (AM) και στο εγκλειστικό μίγμα αλγινικού νατρίου-γλυκόζης-ινουλίνης σε γάλα (AMI) που έχουν ενθυλακωθεί μέσω γαλακτωματοποίησης. Τέλος, δημιουργείται μία ακόμα ομάδα (Γ) όπου αποτελείται από τα προϊόντα γιαουρτιού με εγκλεισμένα προβιοτικά βακτήρια σε όλα τα εγκλειστικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν με τη μέθοδο ενθυλάκωσης μέσω εξώθηση.

Από την άλλη πλευρά, παρατηρείται από το διάγραμμα ότι το συμβατικό δείγμα διαφέρει αρκετά από τα υπόλοιπα προϊόντα γιαουρτιού. Η διαφοροποίηση του αυτή είναι λογική, καθώς οι τιμές όλων των παραμέτρων αποκλίνουν από αυτές των υπόλοιπων δειγμάτων. Βέβαια, από το διάγραμμα προκύπτει και μία απόκλιση των δειγμάτων γιαουρτιού που έχουν παραχθεί με την ελεύθερη καλλιέργεια (con&free) και την εμπορική καλλιέργεια. Η απόκλιση αυτή είναι αναμενόμενη, λόγω των διαφορετικών τιμών που παρουσιάζουν στις μελετώμενες ιδιότητες, κυρίως στα ιξώδη, στη διάρκεια ζύμωσης και στα χαρακτηριστικά υφής των γιαουρτιών.

7.2.3 Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) για τα τελικά προϊόντα γιαουρτιού με εγκλεισμένα βακτήρια

Πραγματοποιείται ανάλυση κύριων συνιστωσών για τα προϊόντα γιαουρτιού με τα εγκλεισμένα βακτήρια, όπως και στην ενότητα 7.2.1. Όμως, στη συγκεκριμένη ανάλυση οι παράμετροι που συσχετίζονται είναι το ιξώδες στα τελικά ψυγμένα γιαούρτια (την επόμενη ημέρα μετά την παραγωγή τους), η απόδοση του εγκλεισμού, τα χαρακτηριστικά της υφής (σκληρότητα, προσκολλησιμότητα) των τελικών ψυγμένων γιαουρτιών και το ποσοστό βιωσιμότητας των προβιοτικών βακτηρίων στα γιαούρτια με την πάροδο του χρόνου (10, 20, 30 ημέρες) αποθήκευσης αυτών.

Στο παρακάτω διάγραμμα, παρουσιάζεται η γραφική παράσταση των συντελεστών συσχέτισης των δύο πρώτων κύριων συνιστωσών με τις μεταβλητές. Φαίνεται ότι η πρώτη κύρια συνιστώσα έχει συνεισφορά στη συνολική διακύμανση του πειράματος 55,71%, ενώ η δεύτερη έχει 23,21 % αντίστοιχα. Συνολικά, οι δύο κύριες συνιστώσες εξηγούν το 78,92% της συνολικής διακύμανσης των πειραμάτων παραγωγής γιαουρτιών με εγκλεισμένα προβιοτικά βακτήρια και διατήρησης της βιωσιμότητά τους.

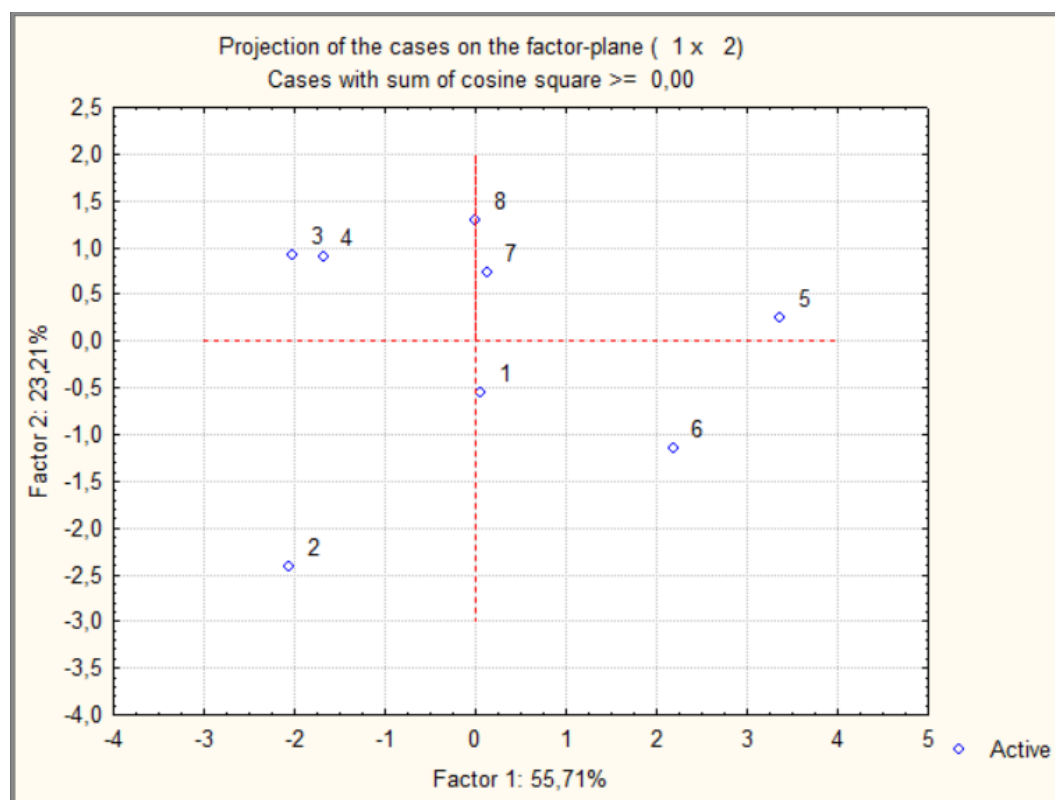


Διάγραμμα 7.2.3.1: Γραφική παράσταση συσχέτισης των δύο πρώτων κύριων συνιστωσών με τις μεταβλητές των γιαουρτιών με εγκλεισμένα προβιοτικά βακτήρια και διατήρησης της βιωσιμότητάς τους

Από το παραπάνω διάγραμμα, μπορούν να αντληθούν τα εξής συμπεράσματα:

1. Το ποσοστό βιωσιμότητας των εγκλεισμένων προβιοτικών βακτηρίων και ενσωματωμένων εντός των γιαουρτιών για 10, 20 και 30 ημέρες και η απόδοση της διεργασίας εγκλεισμού που έχει προηγηθεί παρουσιάζουν θετική επίδραση προς την πρώτη κύρια συνιστώσα. Επίσης, παρατηρείται ότι τα ποσοστά βιωσιμότητας των εγκλεισμένων προβιοτικών βακτηρίων και ενσωματωμένων εντός των γιαουρτιών για 20 και 30 ημέρες παρουσιάζουν θετική συσχέτιση μεταξύ τους, καθώς τείνουν να ταυτιστούν.
2. Το ιξώδες των έτοιμων ψυγμένων γιαουρτιών στους 4°C (την επόμενη ημέρα της παταγωγής τους)) έχει αρνητική επίδραση στην πρώτη κύρια συνιστώσα.
3. Τέλος, η σκληρότητα των έτοιμων ψυγμένων γιαουρτιών στους 4°C παρουσιάζει αρνητική επίδραση στη δεύτερη κύρια συνιστώσα.

Στο διάγραμμα παρακάτω, παρουσιάζεται η γραφική παράσταση των δύο κύριων συνιστωσών για τα δείγματα γιαουρτιών με εγκλεισμένα προβιοτικά βακτήρια και τη διατήρηση της βιωσιμότητά τους που μελετήθηκαν. Τα δείγματα είναι τα ίδια με εκείνα της ενότητας 7.2.1, καθώς άλλαξαν μόνο οι μελετώμενες παράμετροι.



Διάγραμμα 7.2.3.2: Γραφική παράσταση των δύο πρώτων κύριων συνιστωσών για τα δείγματα γιαουρτιών με εγκλεισμένα προβιοτικά βακτήρια και διατήρηση της βιωσιμότητάς τους που μελετήθηκαν

Από το παραπάνω διάγραμμα, φαίνεται ότι σχηματίζονται δύο ομάδες με κοινά χαρακτηριστικά. Η πρώτη ομάδα (A) αποτελείται από τα προϊόντα γιαουρτιού με εγκλεισμένα προβιοτικά βακτήρια στο εγκλειστικό μίγμα αλγινικού νατρίου-γλυκόζης σε γάλα (AM) και στο εγκλειστικό μίγμα αλγινικού νατρίου-γλυκόζης-ινουλίνης σε γάλα (AMI) που έχουν ενθυλακωθεί με τη μέθοδο της εξώθησης. Η δεύτερη ομάδα (B) αποτελείται από τα προϊόντα γιαουρτιού με εγκλεισμένα προβιοτικά βακτήρια στο εγκλειστικό μίγμα αλγινικού νατρίου-γλυκόζης σε γάλα (AM) και στο εγκλειστικό μίγμα αλγινικού νατρίου-γλυκόζης-ινουλίνης σε γάλα (AMI) που έχουν ενθυλακωθεί με τη μέθοδο της γαλακτωματοποίησης.

Η ομαδοποίηση αυτή των δειγμάτων προέκυψε χάρη στις παρόμοιες τιμές των παραμέτρων που παρουσιάζουν τα δείγματα κάθε ομάδας μεταξύ τους. Μάλιστα, αξίζει να σημειωθεί ότι οι δύο αυτές ομάδες περιλαμβάνουν γιαούρτια που παρουσιάζουν τα υψηλότερα ποσοστά βιωσιμότητας των εγκλεισμένων προβιοτικών βακτηρίων που περιέχουν καθ' όλη τη διάρκεια των 30 ημερών αποθήκευσης.

7.3 Αποτελέσματα ενσωμάτωσης του προβιοτικού στελέχους BB-12 σε μία εδωδιμη μεμβράνη

Στο δεύτερο σκέλος της παρούσας διπλωματικής εργασίας, επιχειρήθηκε η ενσωμάτωση του προβιοτικού στελέχους *Bifidobacterium Animalis subsp. Lactis* (BB-12) σε μία εδωδιμη μεμβράνη. Η μεμβράνη εμπλουτισμένη με το προβιοτικό στέλεχος, σχηματίζεται πάνω σε λεία επιφάνεια και αφού απομακρυνθεί με προσοχή τοποθετείται επάνω στην επιφάνεια έτοιμου ζυμωμένου γιαουρτιού για την παρακολούθηση της βιωσιμότητας των προβιοτικών βακτηρίων κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης σε ψύξη. Μικροβιολογικές αναλύσεις πραγματοποιούνται την ημέρα του εφαρμογής της μεμβράνης με τα ενσωματωμένα προβιοτικά βακτήρια στην επιφάνεια του γιαουρτιού (1^η ημέρα), αλλά και έπειτα από 10 ημέρες αποθήκευσης αυτού σε ψύξη (στους 4°C). Η διαδικασία αυτή ακολουθείται για τον προσδιορισμό του μικροβιακού φορτίου και του ποσοστού επιβίωσης των προβιοτικών βακτηρίων.

Οι μετρήσεις που έγιναν στη μεμβράνη παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 7.3.1: Μικροβιακό φορτίο & ποσοστό επιβίωσης έπειτα από 10 ημέρες, για την μεμβράνη

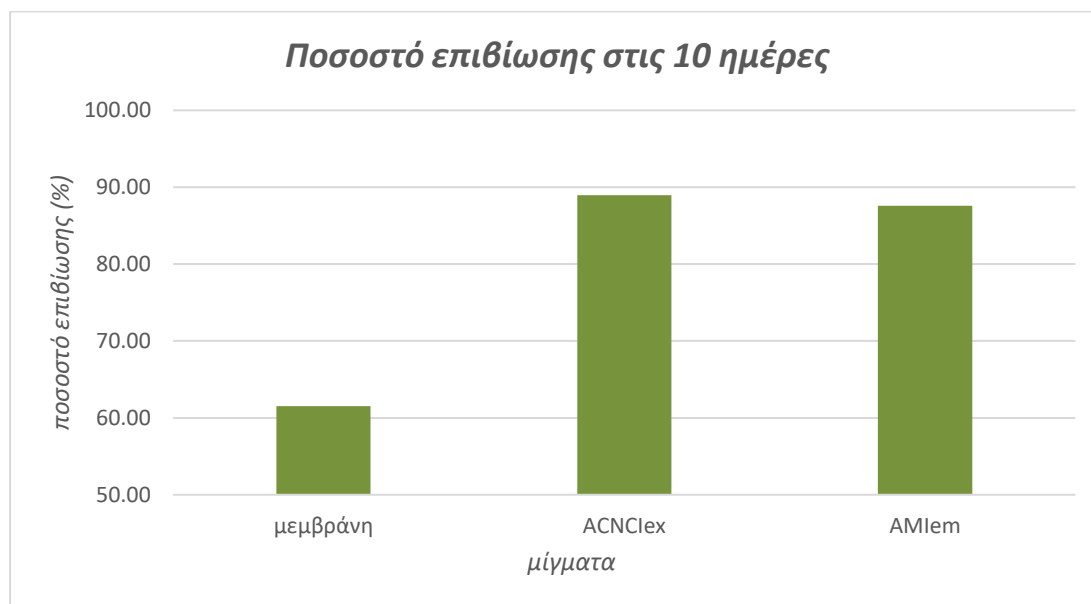
	MA Day 1	MA Day 10	Ποσοστό επιβίωσης
Μεμβράνη	7,93	4,88	61,54

Από τις μετρήσεις που ελήφθησαν, οι οποίες παρουσιάζονται και στον πίνακα 7.3.1 παρατηρείται ότι το μικροβιακό φορτίο με την πάροδο των 10 ημερών έχει μειωθεί αρκετά, φτάνοντας σε μη αποδεκτά όρια για την ενσωμάτωση της μεμβράνης σε προβιοτικά γιαούρτια και τα αντίστοιχα αναμενόμενα οφέλη για τον καταναλωτή. Η κατανάλωση των προβιοτικών προϊόντων γίνεται όσο το μικροβιακό φορτίο είναι μεγαλύτερο από 6 log(CFU/g).

Το ποσοστό επιβίωσης του πληθυσμού στη μεμβράνη που είναι τοποθετημένη επάνω στην επιφάνεια του γιαουρτιού φαίνεται να είναι αρκετά μικρό στις 10 πρώτες ημέρες αποθήκευσης σε ψύξη. Για την αξιολόγηση των παραπάνω αποτελεσμάτων θα παρουσιαστούν σε ένα διάγραμμα και θα συγκριθούν με τα προϊόντα γιαουρτιού εμπλουτισμένα με προβιοτικά βακτήρια με το καλύτερο εγκλειστικό μέσο για κάθε μέθοδο εγκλεισμού.

Συγκεκριμένα, το υψηλότερο ποσοστό επιβίωσης των προβιοτικών βακτηρίων στα προϊόντα γιαουρτιών στην περίπτωση που εφαρμόζεται η μέθοδος της εξώθησης για τον εγκλεισμό των βακτηρίων εμφανίζεται με χρήση του εγκλειστικού μίγματος αλγινικού νατρίου-CNC-γλυκόζης-ινουλίνης (ACNCI). Ενώ για την περίπτωση που ως μέθοδος εγκλεισμού των προβιοτικών βακτηρίων εφαρμόζεται η γαλακτωματοποίηση εμφανίζεται υψηλότερο ποσοστό επιβίωσης των προβιοτικών βακτηρίων με χρήση του εγκλειστικού μίγματος αλγινικού νατρίου-γλυκόζης-ινουλίνης σε γάλα (AMI). Τα ποσοστά επιβίωσης είναι 88,97% και 87,57%, αντίστοιχα.

Στο παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζονται τα ποσοστά επιβίωσης των προϊόντων γιαουρτιών με εφαρμογή εδώδιμης μεμβράνης στην επιφάνειά τους με ενσωματωμένα προβιοτικά βακτήρια όπως και των καλύτερων με εγκλεισμένα προβιοτικά βακτήρια έπειτα από 10 ημέρες αποθήκευσης σε ψύξη.



Διάγραμμα 7.3.1: Ποσοστό επιβίωσης του προβιοτικού στελέχους των προϊόντων γιαουρτιών με ενσωματωμένη εδώδιμη μεμβράνη με ενσωματωμένα προβιοτικά βακτήρια και των καλύτερων με εγκλεισμένα προβιοτικά βακτήρια μετά την πάροδο των 10 ημερών

Από το διάγραμμα 7.3.1, συμπεραίνεται ότι η ενσωμάτωση του προβιοτικού στελέχους BB-12 σε μία εδώδιμη μεμβράνη και στη συνέχεια η εφαρμογή της στην επιφάνεια του γιαουρτιού δεν δίνει τόσο ικανοποιητικά αποτελέσματα, όπως στην περίπτωση του γιαουρτιού με ενσωματωμένα προβιοτικά βακτήρια εγκλεισμένα με τα καλύτερα εγκλειστικά μίγματα και με τις δύο μεθόδους εγκλεισμού. Μάλιστα, ενώ στην περίπτωση των εγκλεισμένων προβιοτικών βακτηρίων το ποσοστό επιβίωσης είναι σχεδόν 90%, στην περίπτωση της ενσωμάτωσης των προβιοτικών βακτηρίων σε εδώδιμη μεμβράνη φτάνει μόλις 60%.

Βέβαια, η διαδικασία ενσωμάτωσης των προβιοτικών βακτηρίων σε εδώδιμες μεμβράνες αποτελεί ένα καινούριο/καινοτόμο τρόπο χορήγησης των προβιοτικών. Οι έρευνες γύρω από την ενσωμάτωση σε εδώδιμη μεμβράνη είναι σε πρώιμο στάδιο, οπότε οι απώλειες του μικροβιακού πληθυσμού κατά την αποθήκευση του γιαουρτιού ήταν εν μέρει αναμενόμενες. Απαιτείται περαιτέρω έρευνα, ώστε να βρεθούν τα βέλτιστα υλικά για τον σχηματισμό της μεμβράνης, να βελτιστοποιηθεί η διαδικασία παραγωγής και να αποφευχθούν τυχόν λάθη.

8. Συμπεράσματα

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκαν πειράματα που είχαν ως στόχο τον εγκλεισμό του προβιοτικού στελεχούς *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis* (BB-12) είτε σε σφαιρίδια μέσω εγκλεισμού είτε σε μία εδώδιμη μεμβράνη και στη συνέχεια την ενσωμάτωσή τους σε γιαούρτι. Ο εγκλεισμός πραγματοποιήθηκε με τη χρήση διαφόρων εγκλειστικών μέσων με εφαρμογή δύο μεθόδων εγκλεισμού, της εξώθησης και της γαλακτωματοποίησης. Στη συνέχεια, τα προϊόντα εγκλεισμού προστέθηκαν σε γάλα εμβολιασμένο με συμβατική καλλιέργεια εκκίνησης και ακολούθησε η ζύμωση προς παραγωγή του προϊόντος γιαουρτιού. Επίσης, για λόγους σύγκρισης παρασκευάστηκαν και προϊόντα γιαουρτιού με ελεύθερη προβιοτική καλλιέργεια σε συνδυασμό με τη συμβατική καλλιέργεια εκκίνησης, όπως επίσης και συμβατικό γιαούρτι (χωρίς προβιοτική καλλιέργεια). Σκοπός των πειραμάτων ήταν ο προσδιορισμός της απόδοσης του εγκλεισμού για κάθε μέθοδο που εφαρμόστηκε και κάθε εγκλειστικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε, η μελέτη της μεταβολής του μικροβιακού φορτίου των προβιοτικών προϊόντων γιαουρτιού κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης σε ψύξη, όπως επίσης και της μεταβολής των ποιοτικών χαρακτηριστικών των έτοιμων προϊόντων γιαουρτιού. Συγκεκριμένα, συγκρίθηκαν όλα τα προϊόντα που προέκυψαν από τα πειράματα εγκλεισμού ως προς τις αποδόσεις εγκλεισμού που επέτυχαν, όπως επίσης η επίδραση αυτών αντίστοιχα στη διεργασία της ζύμωσης του γιαουρτιού (διάρκεια ζύμωσης, διάρκεια λανθάνουσας φάσης pH και μέγιστος ρυθμός μείωσης pH) και στα χαρακτηριστικά ποιότητας των τελικών προϊόντων γιαουρτιών που παρήχθησαν (ιξώδες, μικροβιακό φορτίο, υφή). Τέλος, επιχειρήθηκε η ενσωμάτωση του προβιοτικού στελεχούς BB-12 σε εδώδιμη μεμβράνη και η εφαρμογή της στο γιαούρτι, ενώ ακολούθως ελέγχθηκε η επιβίωση του προβιοτικού στελεχούς μέσω προσδιορισμού του μικροβιακού φορτίου του προβιοτικού γιαουρτιού κατά την αποθήκευσή του σε ψύξη. Για την αξιολόγηση της βιωσιμότητας του προβιοτικού στελεχούς ενσωματωμένου στη μεμβράνη, τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με τα αντίστοιχα που προέκυψαν στα προβιοτικά γιαούρτια με εγκλεισμένα προβιοτικά βακτήρια με τα καλύτερα εγκλειστικά μέσα για καθεμία μέθοδο εγκλεισμού.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν για τα προϊόντα γιαουρτιού με εγκλεισμένα και μη προβιοτικά βακτήρια συγκρίθηκαν ανάλογα με την εφαρμοζόμενη μέθοδο εγκλεισμού και το χρησιμοποιούμενο εγκλειστικό μέσο. Αρχικά, οι αποδόσεις εγκλεισμού που προσδιορίστηκαν για κάθε μέθοδο εγκλεισμού και κάθε μέσο εγκλεισμού παρατηρήθηκε ότι είναι γενικώς πολύ υψηλές ανερχόμενες περίπου στο 90 %. Συγκεκριμένα, η υψηλότερη απόδοση εγκλεισμού επιτυγχάνεται όταν χρησιμοποιείται το εγκλειστικό μίγμα αλγινικού νατρίου-γλυκόζης-ινουλίνης σε γάλα (AMI) με ενθλάκωση μέσω της μεθόδου γαλακτωματοποίησης (97,13 %). Από την άλλη πλευρά η χαμηλότερη τιμή απόδοσης παρουσιάζεται με τη μέθοδο της εξώθησης όταν ως εγκλειστικό μίγμα χρησιμοποιείται το αλγινικό νάτριο-CNC-γλυκόζη-ινουλίνη (ACNCI) (92,13 %). Από τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων προέκυψε το συμπέρασμα ότι η μέθοδος εγκλεισμού που εφαρμόζεται επιδρά στην απόδοση εγκλεισμού των προβιοτικών βακτηρίων και μάλιστα με τη μέθοδο της

γαλακτωματοποίησης επιτυγχάνονται υψηλότερες τιμές απόδοσης συγκριτικά με τις αντίστοιχες μέσω της μεθόδου εξώθησης.

Όσον αφορά το ποσοστό επιβίωσης του βακτηριακού στελέχους BB-12 στα προϊόντα γιαουρτιού που είναι εμπλουτισμένα με εγκλεισμένα και μη προβιοτικά βακτήρια ικανοποιητικά ήταν τα αποτελέσματα κατά την αποθήκευση των προϊόντων για τις 10 πρώτες ημέρες. Συγκρίνοντας τα ποσοστά επιβίωσης των προβιοτικών βακτηρίων στα προβιοτικά γιαούρτια ανάλογα με τη χρήση των διαφόρων εγκλειστικών μιγμάτων και τις δύο εφαρμοσθείσες μεθόδους εγκλεισμού ως προς τον χρόνο αποθήκευσης, εξάγεται το συμπέρασμα ότι με τη μέθοδο της εξώθησης επιτυγχάνεται μεγαλύτερο ποσοστό επιβίωσης του προβιοτικού στελέχους BB-12 στα προϊόντα γιαουρτιού. Αντίστοιχα, στις περιπτώσεις χρήσης της μη εγκλεισμένης καλλιέργειας παρουσιάζονται τα χαμηλότερα ποσοστά επιβίωσης του προβιοτικού στελέχους. Συγκεκριμένα, μετά την αποθήκευση σε ψύξη για 30 ημέρες, το γιαούρτι που περιέχει το ελεύθερο προβιοτικό βακτήριο BB-12 εμφανίζει ποσοστό επιβίωσης χαμηλότερο από 50%. Όμως, η υψηλότερη τιμή ποσοστού επιβίωσης του προβιοτικού στελέχους επιτυγχάνεται στο προϊόν γιαουρτιού με εγκλεισμένα προβιοτικά βακτήρια με το εγκλειστικό μίγμα αλγινικού νατρίου-γλυκόζης-ινουλίνης σε γάλα (AMI). Από τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων με ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) συμπεραίνεται ότι το ποσοστό επιβίωσης του προβιοτικού βακτηρίου στα γιαούρτια επηρεάζεται τόσο από το χρησιμοποιούμενο εγκλειστικό μέσο, όσο και την εφαρμοζόμενη μέθοδο εγκλεισμού των βακτηρίων, όπως επίσης και από το χρόνο αποθήκευσης του προβιοτικού προϊόντος γιαουρτιού.

Από τα αποτελέσματα της διάρκειας της ζύμωσης των προϊόντων γιαουρτιού γίνεται αντιληπτό ότι η χρήση προβιοτικών βακτηρίων είτε εγκλεισμένων είτε μη εγκλεισμένων επιτυγχάνει μικρότερη διάρκεια της ζύμωσης συγκριτικά με το τυφλό (μόνο με συμβατική καλλιέργεια) δείγμα γιαουρτιού, καθώς τα προβιοτικά βακτήρια συνεισφέρουν στη διαδικασία της ζύμωσης. Η μικρότερη τιμή συνολικού χρόνου ζύμωσης εμφανίζεται στην περίπτωση του γιαουρτιού με το ελεύθερο προβιοτικό στέλεχος BB-12 (195 min), ενώ μεγαλύτερες τιμές αυτού εμφανίζονται στην περίπτωση των γιαουρτιών με τα εγκλεισμένα προβιοτικά βακτήρια. Από τη στατιστική επεξεργασία των μετρήσεων (ANOVA) συμπεραίνεται ότι η διάρκεια της ζύμωσης των προβιοτικών γιαουρτιών επηρεάζεται από τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο του εγκλεισμού των βακτηρίων και συγκεκριμένα, με τη μέθοδο της εξώθησης παρέχει υψηλότερες τιμές χρόνου ζύμωσης συγκριτικά από ότι η μέθοδος της γαλακτωματοποίησης.

Όσον αφορά τη διάρκεια της λανθάνουσας φάσης (λ) του pH κατά τη ζύμωση των γιαουρτιών, οι υψηλότερες τιμές εμφανίζονται στα προϊόντα γιαουρτιού που έχουν εμπλουτιστεί με προβιοτικά βακτήρια εγκλεισμένα με τη μέθοδο της εξώθησης, αλλά και στο τυφλό δείγμα. Από τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων (ANOVA), συμπεραίνεται ότι η λανθάνουσα φάση του pH των προβιοτικών γιαουρτιών διαφοροποιείται ανάλογα με την εφαρμοζόμενη μέθοδο που εφαρμόζεται για τον εγκλεισμό των προβιοτικών βακτηρίων. Αντίστοιχα, ο μέγιστος ρυθμός μείωσης (μ) του pH κατά τη ζύμωση των προβιοτικών γιαουρτιών δεν επηρεάζεται από τη μέθοδο του εγκλεισμού των προβιοτικών βακτηρίων ούτε από το χρησιμοποιούμενο εγκλειστικό μέσο.

Οι τιμές του ιξώδους των προβιοτικών γιαουρτιών με χρήση εγκλεισμένων βακτηρίων τόσο μετά το τέλος της ζύμωσης στους 45 °C, όσο και την πρώτη ημέρα αποθήκευσης σε ψύξη παρουσιάζουν παρόμοια συμπεριφορά, με τις υψηλότερες τιμές του ιξώδους να εμφανίζονται στα προϊόντα γιαουρτιού με τα εγκλεισμένα βακτήρια. Από την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων (ANOVA) προέκυψε ότι η τιμή του ιξώδους στους 45°C και στους 4°C των προβιοτικών γιαουρτιών επηρεάζεται τόσο από την εφαρμοζόμενη μέθοδο εγκλεισμού των βακτηρίων, όσο και από το χρησιμοποιούμενο εγκλειστικό μέσο κατά τον εγκλεισμό των προβιοτικών βακτηρίων. Συγκεκριμένα, οι υψηλότερες τιμές του ιξώδους επιτυγχάνονται όταν για τον εγκλεισμό των βακτηρίων εφαρμόζεται η μέθοδος της εξώθησης και χρησιμοποιείται ως εγκλειστικό μέσο το μίγμα αλγινικού νατρίου-γλυκόζης σε γάλα (AM), ενώ, οι μικρότερες τιμές του ιξώδους εμφανίζονται στο τυφλό δείγμα γιαουρτιού. Αυτή η σχέση ήταν αναμενόμενη καθώς το εγκλειστικό μέσο συνεισφέρει ως πηκτικό μέσο στο ιξώδες των προϊόντων.

Από τα αποτελέσματα ανάλυση της υφής (σκληρότητα, προσκολλησιμότητα) κατά την πρώτη ημέρα αποθήκευσης σε ψύξη των προβιοτικών προϊόντων γιαουρτιού με χρήση εγκλεισμένων βακτηρίων προέκυψε ότι η τιμή της σκληρότητας δεν εξαρτάται ούτε από τα χρησιμοποιούμενα εγκλειστικά μίγματα, ούτε από τις εφαρμοζόμενες μεθόδους εγκλεισμού. Η τιμή της προσκολλησιμότητας όμως επηρεάζεται σημαντικά από το χρησιμοποιούμενο εγκλειστικό μέσο. Η υψηλότερη τιμή προσκολλησιμότητας εμφανίζεται στο συμβατικό γιαούρτι (0,382 N*s).

Όσον αφορά την εφαρμογή μίας εδώδιμης μεμβράνης που περιέχει προβιοτικά βακτήρια επάνω σε γιαούρτια, τα αποτελέσματα της βιωσιμότητας του μικροβιακού πληθυσμού μειώθηκαν αρκετά με την πάροδο των 10 ημερών αποθήκευσης σε ψύξη. Συγκεκριμένα, το μικροβιακό φορτίο κατά το χρονικό αυτό διάστημα έφτασε σε μη αποδεκτά όρια, καθώς η κατανάλωση των προβιοτικών προϊόντων επιτρέπεται όσο το φορτίο διατηρείται πάνω από την τιμή 6 log(CFU/g). Συγκρίνοντας το ποσοστό επιβίωσης των προβιοτικών βακτηρίων ενσωματωμένων σε μία εδώδιμη μεμβράνη που εφαρμόζεται στην επιφάνεια του γιαουρτιού με το αντίστοιχο που επιτυγχάνεται με τα εγκλεισμένα βακτήρια στο γιαούρτι με χρήση των καλύτερων εγκλειστικών μιγμάτων και με εφαρμογή των δύο μεθόδων εγκλεισμού, δεν προκύπτουν τόσο ικανοποιητικά αποτελέσματα. Συγκεκριμένα, ενώ κατά τις πρώτες 10 ημέρες αποθήκευσης των γιαουρτιών στην περίπτωση των εγκλεισμένων προβιοτικών βακτηρίων το ποσοστό επιβίωσης είναι σχεδόν 90%, στην περίπτωση της ενσωμάτωσης των προβιοτικών βακτηρίων σε εδώδιμη μεμβράνη φτάνει μόλις 60%.

9. Προτάσεις

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, ελέγχθηκε η επίδραση των εγκλεισμένων και μη προβιοτικών βακτηρίων στα χαρακτηριστικά της ζύμωσης γιαουρτιού, όπως επίσης και στα χαρακτηριστικά ποιότητας του τελικού παραγόμενου προϊόντος. Ο εγκλεισμός στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε με δύο μεθόδους σε 4 διαφορετικά εγκλειστικά μέσα. Μελλοντικά, θα μπορούσε να εφαρμοστεί συνδυασμός των μεθόδων ή/και κάποια διαφορετική μέθοδος, όπως επίσης και να δοκιμαστούν διάφορα άλλα εγκλειστικά μέσα για την επίτευξη καλύτερου εγκλεισμού. Επιπλέον, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η δοκιμή σχηματισμού εδώδιμης μεμβράνης στην επιφάνεια του γιαουρτιού με χρήση διαφορετικών υλικών για την ενσωμάτωση των προβιοτικών βακτηρίων και παρακολούθηση της επιβίωσής τους κατά την αποθήκευση του προϊόντος σε ψύξη. Σημειώνεται πως, η ενσωμάτωση προβιοτικών βακτηρίων σε εδώδιμες μεμβράνες και η εφαρμογή τους σε γιαούρτι αποτελεί ένα καινοτόμο τρόπο χορήγησης των προβιοτικών βακτηρίων.

Βιβλιογραφία

Κώδικας Τροφίμων, Ποτών και Αντικειμένων Κοινής Χρήσης, Μέρος Α', Τρόφιμα και Ποτά, Κεφάλαιο ΙΧ Άρθρο 82, Έκδοση 2, Αύγουστος 2016.

Κώδικας Τροφίμων, Ποτών και Αντικειμένων Κοινής Χρήσης Άρθρο 85, 2009.

Analie Lourens-Hattingh, Bennie C. Viljoen (2001). 'Yogurt as probiotic carrier food'. *International Dairy Journal* 11, 1–17.

Pieter Walstra, Jan T.M.Wouters, Tom J.Geurts (2006). *Dairy Science and Technology*, Second Edition.

Faith, Yildiz (2010) *Development and Manufacture of Yogurt and Other Functional Dairy Products*.

Panagiotis Sfakianakis, Constantina Tzia. 'Conventional and Innovative Processing of Milk for Yogurt Manufacture; Development of Texture and Flavor: A Review'.

W. J. Lee and J. A. Lucey (2010). 'Formation and Physical Properties of Yogurt'. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 23(9) Vol. 23, No. 9, pp. 1127-1136.

Mauro Fisberg and Rachel Machado. 'History of yogurt and current patterns of consumption'. *Nutrition Reviews*, Vol. 73 (S1): 4–7

Young W. Park, Ph.D and George F.W. Haenlein, D.Sci.Ag., Ph.D. (2013) 'Milk and Dairy Products in Human Nutrition'.

Judith Buttriss (1997). 'Nutritional properties of fermented milk products'. *International Journal of Dairy Technology*, Vol 50, No 1.

Georgios M. Kopanos, Luis Puigjaner, and Michael C. Georgiadis (2010). 'Optimal Production Scheduling and Lot-Sizing in Dairy Plants: The Yogurt Production Line', *Ind. Eng. Chem. Res.* 2010, 49, pp. 701–718.

Nagendra P. Shah (2017). 'Yogurt in Health and Disease Prevention'.

H.C.Deeth and A.Y.Tamime (1981). 'Yogurt: Nutritive and Therapeutic Aspects'. *Journal of Food Protection*. Vol. 44, No.1, Pages 78-86.

H.C.Deeth and A.Y.Tamime (1980). 'Yogurt: Technology and Biochemistry'. *Journal of Food Protection* Vol. 43, No.12. Pages 939-977.

Liliana Serna-Cock* and Vladimir Vallejo-Castillo (2013). 'Review Probiotic encapsulation'. *African Journal of Microbiology Research* Vol 7 [40], pp. 4743-4753.

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

Nurul Farhana Fazilah, Arbakariya B. Ariff, Mohd Ezuan Khayat, Leonardo Rios-Solis, Murni Halim (2018). 'Influence of probiotics, prebiotics, synbiotics and bioactive

phytochemicals on the formulation of functional yogurt'. *Journal of Functional Foods* 48, pp 387-399.

Priscilla Magro Reque, Adriano Brandelli (2021). 'Encapsulation of probiotics and nutraceuticals: Applications in functional food industry'. *Trend in Food Science & Technology* 114, pp. 1-10.

Wunwisa Krasaekoopt, Bhesh Bhandari, Hilton Deeth (2003). 'Review: Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt'. *International Dairy Journal* 13 pp. 3–13.

Nicolaas Jan Zuidam Viktor A. Nedovic (2010). 'Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing'.

Bernard F. Gibbs, Selim Kermasha, Intezaz Alli, Catherine N. Mulligan (1999). 'Encapsulation in the food industry: a review'. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 50, pp. 213-224.

Fernanda B Haffner, Roudayna Diab, Andreea Pasc (2016). 'Encapsulation of probiotics: insights into academic and industrial approaches' Volume 3, Issue 1, pp. 114-136.

Antonia Terpou, Aikaterini Papadaki, Iliada K. Lappa, Vasiliki Kachrimanidou, Loulouda A. Bosnea and Nikolaos Kopsahelis (2019). 'Review: Probiotics in Food Systems: Significance and Emerging Strategies Towards Improved Viability and Delivery of Enhanced Beneficial Value'. *Nutrients*, 11, 1591.

V. Hazal Ozyurt, Semih Otles (2014). 'PROPERTIES OF PROBIOTICS AND ENCAPSULATED PROBIOTICS IN FOOD'. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.* 13(4), pp. 413-424.

F.J. Rodrigues, M.F. Cedran, J.L. Bicas, H.H. Sato (2020). 'Review: Encapsulated probiotic cells: Relevant techniques, natural sources as encapsulating materials and food applications – A narrative review'. *Food Research International* 137.

Ravinder Nagpa, Ashwani Kumar, Manoj Kumar, Pradip V. Behare, Shalini Jain & Hariom Yadav (2012). 'Probiotics, their health benefits and applications for developing healthier foods: a review'. *Probiotics and human health*.

Sadeq Hasan Al-Sheraji, Amin Ismail, Mohd Yazid Manap, Shuhaimi Mustafa, Rokiah Mohd Yusof, Fouad Abdulrahman Hassan (2013). 'Prebiotics as functional foods: A review'. *Journal of Functional Foods*, pp. 1542-1553.

Kavita. R. Pandey & Suresh. R. Naik & Babu. V. Vakil (2015). 'Probiotics, prebiotics and synbiotics- a review'. *J Food Sci Technol* 52(12): pp. 7577–7587.

Maria Saarela, Gunnar Mogensen, Rangne Fonde n, Jaana Matto, Tiina Mattila-Sandholm (2000). 'Review Article: Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties'. *Journal of Biotechnology* 84, pp. 197 – 215.

International Journal of Scientific and Research Publications (2014), Volume 4, Issue 4.

Mary Ellen Sanders, Francisco Guarner, Richard Guerrant, Peter R Holt, Eamonn MM Quigley, R Balfour Sartor, Philip M Sherman, Emeran A Mayer (2013). 'An update on the use and investigation of probiotics in health and disease'. *Gut*, 62, pp. 787–796.

Varun Pratap Singh, Jagannath Sharma, Shankar Babu, Rizwanulla, Anshul Singla (2013), 'Role of probiotics in health and disease: A review', Vol 63, No 2.

Maria Kechagia, Dimitrios Basoulis, Stavroula Konstantopoulou, Dimitra Dimitriadi, Konstantina Gyftopoulou, Nikoletta Skarmoutsou, and Eleni Maria Fakiri (2012). 'Review Article Health Benefits of Probiotics: A Review'. *ISRN Nutrition*.

S. Parvez, K.A. Malik, S. Ah Kangn and H.-Y. Kim (2006). 'Probiotics and their fermented food products are beneficial for health'. *Journal of Applied Microbiology*, pp. 1171-1185.

Kaila Kailasapathy and James Chin (2000). 'Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium spp.*'. *Immunology and Cell Biology* 78, pp. 80–88.

Giovanni Gasbarrini, MD, PhD,* Fiorenza Bonvicini, MD,w and Annagiulia Gramenzi, MD (2016). 'Probiotics History'. *J Clin Gastroenterol*, Volume 50.

Seppo Salminen, Atter von Wright, Artur Ouwehand (2004). *Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects, Third Edition, Revised and Expanded*.

Georgia Frakolaki a, Virginia Giannou a, Evangelos Topakas b, Constantina Tzia (2021). 'Effect of various encapsulating agents on the beads' morphology and the viability of cells during BB-12 encapsulation through extrusion'.

M.S. Taria, M.A.Roias-Grad, F.J.Rodriguez, J. R Amirez, A. C Armona, and O. Martin-Belloso (2007). 'Alginate and Gellan-Based Edible Films for Probiotic Coatings on Fresh-Cut Fruits'. *Journal of food science*, Vol 72, pp. 190-196.

Behzad Ebrahimi, Reza Mohammadi, Milad Rouhi, Amir Mohammad Mortazavian, Saeedeh Shojaee-Aliabadi, Mohammad Reza Koushki (2018). 'Survival of probiotic bacteria in carboxymethyl cellulose-based edible film and assessment of quality parameters'. *Food Science and Technology*, pp.54-60.

Joana Odila Pereira, JoséSoares, Eduardo Costa, Sara Silva, Ana Gomes and Manuela Pintado (2019). 'Characterization of Edible Films Based on Alginate or Whey Protein Incorporated with *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 and Prebiotics'.

Foteini Pavli, Chrysoula Tassou, George-John E. Nychas and Nikos Chorianopoulos (2017). 'Probiotic Incorporation in Edible Films and Coatings: Bioactive Solution for Functional Foods'. *International journal of Molecular Sciences*.

Joana Odila Pereira, Jose Soares, Sergio Sousa, Ana Raquel Madureira, Ana Gomes, Manuela Pintado (2016). 'Edible films as carrier for lactic acid bacteria'. *Food Science and Technology*, pp. 543-550

Paula J.P. Espitia, Rejane A. Batista, Henriette M.C. Azeredo, Caio G. Otoni (2016). 'Probiotics and their potential applications in active edible films and coatings'. Food Research International pp. 42–52.

Hasnia Ziar, Philippe Gérard, Ali Riazi (2012). 'Calcium alginate-resistant starch mixed gel improved the survival of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 and *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS in yogurt and simulated gastrointestinal conditions'.

F. Ortakci and S. Sert (2012). 'Stability of free and encapsulated *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 in yogurt and in an artificial human gastric digestion system'.

Παράρτημα

1. Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης των αποδόσεων των μεθόδων εγκλεισμού

Πίνακας 1.1 Αποτελέσματα ανάλυσης διακύμανσης (Main effects ANOVA) για την επίδραση του εγκλειστικού μέσου και της μεθόδου εγκλεισμού στην απόδοση της ενθυλάκωσης.

Effect	Univariate Tests of Significance for Απόδοση (απόδοση) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	71847,03	1	71847,03	221283,4	0,000000
Εγκλειστικό μέσο	0,56	3	0,19	0,6	0,667870
Μέθοδος εγκλεισμού	26,57	1	26,57	81,8	0,002853
Error	0,97	3	0,32		

Πίνακας 1.2 Αποτελέσματα Duncan's test για την επίδραση της μεθόδου εγκλεισμού στην απόδοση της ενθυλάκωσης.

Cell No.	Μέθοδος εγκλεισμού	Duncan test; variable Απόδοση (απόδοση) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = ,32468, df = 3,0000	
		{1}	{2}
1	1	92,945	96,590
2	2	0,003052	

2. Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης της διεργασίας ζύμωσης και των ποιοτικών χαρακτηριστικών των παραγόμενων προϊόντων γιαουρτιού

Πίνακας 2.1 Αποτελέσματα ανάλυσης διακύμανσης (Main effects ANOVA) για την επίδραση του εγκλειστικού μέσου, της μεθόδου εγκλεισμού και του χρόνου αποθήκευσης στο ποσοστό επιβίωσης του προβιοτικού στελέχους για κάθε προϊόν γιαουρτιού.

Univariate Tests of Significance for Ποσοστό επιβίωσης (viability) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	194841,3	1	194841,3	21708,13	0,000000
Εγκλειστικό Μέσο	1613,1	5	322,6	35,94	0,000000
Μέθοδος εγκλεισμού	78,5	1	78,5	8,75	0,006368
Χρόνος (d)	1582,2	2	791,1	88,14	0,000000
Error	242,3	27	9,0		

Πίνακας 2.2 Αποτελέσματα Duncan's test για την επίδραση του εγκλειστικού μέσου στο ποσοστό επιβίωσης του προβιοτικού στελέχους για κάθε προϊόν γιαουρτιού.

Duncan test; variable Ποσοστό επιβίωσης (viability) Homogenous Groups, alpha = ,05000 Error: Between MS = 8,9755, df = 27,000						
Cell No.	Εγκλειστικό Μέσο	Ποσοστό επιβίωσης Mean	1	2	3	4
5	5	62,76333			****	
6	6	67,24000				****
1	1	74,11500	****			
2	2	75,57000	****			
3	3	80,02167		****		
4	4	81,69833		****		

Πίνακας 2.3 Αποτελέσματα Duncan's test για την επίδραση της μεθόδου εγκλεισμού στο ποσοστό επιβίωσης του προβιοτικού στελέχους για κάθε προϊόν γιαουρτιού.

Duncan test; variable Ποσοστό επιβίωσης (viability)			
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests			
Error: Between MS = 8,9755, df = 27,000			
Cell No.	Μέθοδος εγκλεισμού	{1} 75,045	{2} 72,091
1	1		0,006520
2	2	0,006520	

Πίνακας 2.4 Αποτελέσματα Duncan's test για την επίδραση του χρόνου αποθήκευσης στο ποσοστό επιβίωσης του προβιοτικού στελέχους για κάθε προϊόν γιαουρτιού.

Duncan test; variable Ποσοστό επιβίωσης (viability)					
Homogenous Groups, alpha = ,05000					
Error: Between MS = 8,9755, df = 27,000					
Cell No.	Χρόνος (d)	Ποσοστό επιβίωσης Mean	1	2	3
3	30	65,57500	****		
2	20	73,32083		****	
1	10	81,80833			****

Πίνακας 2.5 Αποτελέσματα ανάλυσης διακύμανσης (Main effects ANOVA) για την επίδραση του εγκλειστικού μέσου και της μεθόδου εγκλεισμού στη διάρκεια της ζύμωσης για κάθε προϊόν γιαουρτιού.

Univariate Tests of Significance for Διάρκεια ζύμωσης (διάρκεια ζύμωσης)					
Sigma-restricted parameterization					
Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	576408,3	1	576408,3	4871,056	0,000000
Εγκλειστικό μέσο	1666,7	5	333,3	2,817	0,140122
Μέθοδος εγκλεισμού	833,3	1	833,3	7,042	0,045224
Error	591,7	5	118,3		

Πίνακας 2.6 Αποτελέσματα Duncan's test για την επίδραση της μεθόδου εγκλεισμού στη διάρκεια της ζύμωσης για κάθε προϊόν γιαουρτιού.

Duncan test; variable Διάρκεια ζύμωσης (διάρκεια ζύμωσης)			
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests			
Error: Between MS = 118,33, df = 5,0000			
Cell No.	Μέθοδος εγκλεισμού	{1}	{2}
1	1	227,50	210,83
2	2	0,045409	

Πίνακας 2.7 Αποτελέσματα ανάλυσης διακύμανσης (Main effects ANOVA) για την επίδραση του εγκλειστικού μέσου και της μεθόδου εγκλεισμού στη διάρκεια της λανθάνουσας φάσης pH (λ) κάθε προϊόντος γιαουρτιού.

Univariate Tests of Significance for Λανθάνουσα φάση pH (λ)					
Sigma-restricted parameterization					
Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	447760,3	1	447760,3	3005,103	0,000000
Εγκλειστικό μέσο	466,7	5	93,3	0,626	0,689881
Μέθοδος εγκλεισμού	1452,0	1	1452,0	9,745	0,026202
Error	745,0	5	149,0		

Πίνακας 2.8 Αποτελέσματα Duncan's test για την επίδραση της μεθόδου εγκλεισμού στη διάρκεια της λανθάνουσας φάσης του pH (λ) κάθε προϊόντος γιαουρτιού.

Duncan test; variable Λανθάνουσα φάση pH (λ)			
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests			
Error: Between MS = 149,00, df = 5,0000			
Cell No.	Μέθοδος εγκλεισμού	{1}	{2}
1	1	204,17	182,17
2	2	0,026388	0,026388

Πίνακας 2.10 Αποτελέσματα ανάλυσης διακύμανσης (Main effects ANOVA) για την επίδραση του εγκλειστικού μέσου και της μεθόδου εγκλεισμού στο μέγιστο ρυθμό μείωσης του pH (μ) για τα προϊόντα γαουρτιού.

Univariate Tests of Significance for Μέγιστος ρυθμός μείωσης pH (μ)					
Sigma-restricted parameterization					
Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	0,013628	1	0,013628	6219,172	0,000000
Εγκλειστικό μέσο	0,000018	5	0,000004	1,640	0,300195
Μέθοδος εγκλεισμού	0,000008	1	0,000008	3,803	0,108657
Error	0,000011	5	0,000002		

Πίνακας 2.11 Αποτελέσματα ανάλυσης διακύμανσης (Main effects ANOVA) για την επίδραση του εγκλειστικού μέσου και της μεθόδου εγκλεισμού στο ιξώδες των προϊόντων γαουρτιού μετά το πέρας της ζύμωσης.

Univariate Tests of Significance for Ιξώδες 45°C (ιξωδς 45)					
Sigma-restricted parameterization					
Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	1,074918E+10	1	1,074918E+10	23518,19	0,000000
Εγκλειστικό μέσο	2,261470E+08	5	4,522940E+07	98,96	0,000054
Μέθοδος εγκλεισμού	3,062320E+06	1	3,062320E+06	6,70	0,048929
Error	2,285291E+06	5	4,570581E+05		

Πίνακας 2.12 Αποτελέσματα Duncan's test για την επίδραση της μεθόδου εγκλεισμού στο ιξώδες των προϊόντων γιαουρτιού μετά το πέρας της ζύμωσης.

Duncan test; variable Ιξώδες 45°C (ιξωδς 45)				
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests				
Error: Between MS = 4571E2, df = 5,0000				
Cell No.	Μέθοδος εγκλεισμού	{1}	{2}	
1	1	30435,	29424,	
2	2	0,049110	0,049110	

Πίνακας 2.13 Αποτελέσματα Duncan's test για την επίδραση του εγκλειστικού μέσου στο ιξώδες των προϊόντων γιαουρτιού μετά το πέρας της ζύμωσης.

Duncan test; variable Ιξώδες 45°C (ιξωδς 45)					
Homogenous Groups, alpha = ,05000					
Error: Between MS = 4571E2, df = 5,0000					
Cell No.	Εγκλειστικό μέσο	Ιξώδες 45°C Mean	1	2	3
5	5	21349,00		****	
6	6	27361,00			****
1	1	31970,00	****		
4	4	32405,50	****		
2	2	32712,00	****		
3	3	33778,50	****		

Πίνακας 2.14 Αποτελέσματα ανάλυσης διακύμανσης (Main effects ANOVA) για την επίδραση του εγκλειστικού μέσου και της μεθόδου εγκλεισμού στο ιξώδες των προϊόντων γιαουρτιού μετά από μία ημέρα αποθήκευσης στους 4°C.

Univariate Tests of Significance for Ιξώδες 4°C (ιξωδς 4)						
Sigma-restricted parameterization						
Effective hypothesis decomposition						
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p	
Intercept	1,485778E+10	1	1,485778E+10	32751,59	0,000000	
Εγκλειστικό μέσο	3,436910E+08	5	6,873819E+07	151,52	0,000019	
Μέθοδος εγκλεισμού	3,290721E+06	1	3,290721E+06	7,25	0,043128	
Error	2,268254E+06	5	4,536507E+05			

Πίνακας 2.15 Αποτελέσματα Duncan's test για την επίδραση εγκλειστικού μέσου στο ιξώδες των προϊόντων γιαουρτιού μετά από μία ημέρα αποθήκευσης στους 4°C.

Duncan test; variable Ιξώδες 4°C (ιξωδς 4)						
Homogenous Groups, alpha = ,05000						
Error: Between MS = 4537E2, df = 5,0000						
Cell No.	Εγκλειστικό μέσο	Ιξώδες 4°C Mean	1	2	3	
5	5	24916,00		****		
6	6	31308,00			****	
1	1	38049,00	****			
4	4	38379,50	****			
2	2	38973,50	****			
3	3	39498,00	****			

Πίνακας 2.16 Αποτελέσματα Duncan's test για την επίδραση της μεθόδου εγκλεισμού στο ιξώδες των προϊόντων γιαουρτιού μετά από μία ημέρα αποθήκευσης στους 4°C.

Duncan test; variable Ιξώδες 4°C (ιξωδς 4)				
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests				
Error: Between MS = 4537E2, df = 5,0000				
Cell No.	Μέθοδος εγκλεισμού	{1}	{2}	
1	1	35711,	34664,	0,043317
2	2	0,043317		

Πίνακας 2.17 Αποτελέσματα ανάλυσης διακύμανσης (Main effects ANOVA) για την επίδραση του εγκλειστικού μέσου και της μεθόδου εγκλεισμού στη σκληρότητα των προϊόντων γιαουρτιού μετά από μία ημέρα αποθήκευσης στους 4°C.

Univariate Tests of Significance for Σκληρότητα (Σκληρότητα)					
Sigma-restricted parameterization					
Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	5,094730	1	5,094730	17273,20	0,000000
Εγκλειστικό μέσο	0,004999	5	0,001000	3,39	0,103203
Μέθοδος εγκλεισμού	0,000469	1	0,000469	1,59	0,263060
Error	0,001475	5	0,000295		

Πίνακας 2.18 Αποτελέσματα ανάλυσης διακύμανσης (Main effects ANOVA) για την επίδραση του εγκλειστικού μέσου και της μεθόδου εγκλεισμού στην προσκολλησιμότητα των προϊόντων γιαουρτιού μετά από μία ημέρα αποθήκευσης στους 4°C.

Univariate Tests of Significance for Προσκολλησιμότητα (Προσκολλησιμότητα)					
Sigma-restricted parameterization					
Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	0,836880	1	0,836880	18081,67	0,000000
Εγκλειστικό μέσο	0,034003	5	0,006801	146,94	0,000020
Μέθοδος εγκλεισμού	0,000070	1	0,000070	1,51	0,273224
Error	0,000231	5	0,000046		

Πίνακας 2.19 Αποτελέσματα Duncan's test για την επίδραση του εγκλειστικού μέσου στην προσκολλησιμότητα των προϊόντων γιαουρτιού μετά από μία ημέρα αποθήκευσης στους 4°C.

Duncan test; variable Προσκολλησιμότητα (Προσκολλησιμότητα)							
Homogenous Groups, alpha = ,05000							
Error: Between MS = ,00005, df = 5,0000							
Cell No.	Εγκλειστικό μέσο	Προσκολλησιμότητα Mean	1	2	3	4	5
2	2	0,195500	****				
3	3	0,217000		****			
4	4	0,238500			****		
1	1	0,273500				****	
5	5	0,312000					****
6	6	0,348000					****

3. Μεταβολή pH κατά τη ζύμωση του γιαουρτιού με τη χρήση εγκλεισμένων προβιοτικών βακτηρίων με τη μέθοδο της εξώθησης

Πίνακας 3.1 Μεταβολή pH συναρτήσει του χρόνου ζύμωσης του γιαουρτιού με εγκλεισμένα προϊόντα προβιοτικών βακτηρίων με εγκλειστικό μίγμα αλγινικού νατρίου -CNC-γλυκόζης (ACNC) που έχουν ενθυλακωθεί με εξώθηση.

<i>t (min)</i>	<i>pH</i>	<i>t (min)</i>	<i>pH</i>
0	6.530	125	5.709
5	6.490	130	5.700
10	6.465	135	5.633
15	6.430	140	5.503
20	6.403	145	5.421
25	6.349	150	5.331
30	6.261	155	5.160
35	6.139	160	5.016
40	6.122	165	4.918
45	6.103	170	4.874
50	6.050	175	4.858
55	5.947	180	4.834
60	5.921	185	4.746
65	5.903	190	4.726
70	5.883	195	4.719
75	5.872	200	4.696
80	5.869	205	4.685
85	5.852	210	4.685
90	5.839	215	4.676
95	5.813	220	4.664
100	5.799	225	4.654
105	5.787	230	4.629
110	5.770	235	4.621
115	5.741	240	4.608
120	5.729		

Πίνακας 3.2 Μεταβολή pH συναρτήσει του χρόνου ζύμωσης του γιαουρτιού με εγκλεισμένα προϊόντα προβιοτικών βακτηρίων με εγκλειστικό μίγμα αλγινικού νατρίου -CNC-γλυκόζης-ινουλίνης (ACNCI) που έχουν ενθυλακωθεί με εξώθηση.

<i>t (min)</i>	<i>pH</i>	<i>t (min)</i>	<i>pH</i>
0	6.550	125	5.605
5	6.520	130	5.590
10	6.498	135	5.550
15	6.466	140	5.474
20	6.437	145	5.415
25	6.391	150	5.306
30	6.354	155	5.244
35	6.302	160	5.162
40	6.251	165	4.911
45	6.188	170	4.852
50	6.067	175	4.746
55	5.973	180	4.728
60	5.955	185	4.715
65	5.904	190	4.700
70	5.890	195	4.673
75	5.876	200	4.666
80	5.853	205	4.662
85	5.841	210	4.647
90	5.826	215	4.631
95	5.798	220	4.628
100	5.775	225	4.622
105	5.754	230	4.616
110	5.736	235	4.608
115	5.703	240	4.600
120	5.687		

Πίνακας 3.3 Μεταβολή pH συναρτήσει του χρόνου ζύμωσης του γιαουρτιού με εγκλεισμένα προϊόντα προβιοτικών βακτηρίων με εγκλειστικό μίγμα αλγινικού νατρίου -γλυκόζης (AM) που έχουν ενθυλακωθεί με εξώθηση.

<i>t (min)</i>	<i>pH</i>	<i>t (min)</i>	<i>pH</i>
0	6.797	125	5.675
5	6.758	130	5.651
10	6.736	135	5.521
15	6.706	140	5.451
20	6.686	145	5.379
25	6.654	150	5.283
30	6.639	155	5.202
35	6.567	160	5.160
40	6.490	165	5.114
45	6.461	170	5.057
50	6.366	175	4.995
55	6.277	180	4.942
60	6.202	185	4.930
65	6.151	190	4.856
70	6.121	195	4.787
75	6.085	200	4.759
80	6.055	205	4.706
85	6.030	210	4.676
90	5.999	215	4.657
95	5.955	220	4.642
100	5.921	225	4.630
105	5.892	230	4.619
110	5.866	235	4.606
115	5.777	240	4.602
120	5.742		

Πίνακας 3.4 Μεταβολή pH συναρτήσει του χρόνου ζύμωσης του γιαουρτιού με εγκλεισμένα προϊόντα προβιοτικών βακτηρίων με εγκλειστικό μίγμα αλγινικού νατρίου –γλυκόζης-ινουλίνης (AMI) που έχουν ενθυλακωθεί με εξώθηση.

<i>t (min)</i>	<i>pH</i>	<i>t (min)</i>	<i>pH</i>
0	6.668	125	5.531
5	6.631	130	5.507
10	6.594	135	5.463
15	6.562	140	5.346
20	6.531	145	5.279
25	6.497	150	5.214
30	6.460	155	5.140
35	6.432	160	4.979
40	6.301	165	4.923
45	6.178	170	4.869
50	6.149	175	4.827
55	6.122	180	4.786
60	6.043	185	4.749
65	5.998	190	4.718
70	5.946	195	4.697
75	5.901	200	4.681
80	5.875	205	4.660
85	5.823	210	4.651
90	5.786	215	4.633
95	5.732	220	4.627
100	5.707	225	4.619
105	5.650	230	4.611
110	5.623	235	4.605
115	5.589	240	4.600
120	5.552		

4. Μεταβολή pH κατά τη ζύμωση του γιαουρτιού με τη χρήση εγκλεισμένων προβιοτικών βακτηρίων με τη μέθοδο της γαλακτωματοποίησης

Πίνακας 4.1 Μεταβολή pH συναρτήσει του χρόνου ζύμωσης του γιαουρτιού με εγκλεισμένα προϊόντα προβιοτικών βακτηρίων με εγκλειστικό μίγμα αλγινικού νατρίου -CNC-γλυκόζης (ACNC) που έχουν ενθυλακωθεί με γαλακτωματοποίηση.

<i>t (min)</i>	<i>pH</i>	<i>t (min)</i>	<i>pH</i>
0	6.533	120	5.327
5	6.476	125	5.266
10	6.447	130	5.232
15	6.416	135	5.075
20	6.392	140	5.044
25	6.359	145	4.984
30	6.331	150	4.902
35	6.248	155	4.862
40	6.120	160	4.817
45	6.093	165	4.771
50	6.038	170	4.742
55	5.976	175	4.715
60	5.924	180	4.693
65	5.935	185	4.679
70	5.897	190	4.664
75	5.865	195	4.648
80	5.831	200	4.634
85	5.804	205	4.624
90	5.752	210	4.616
95	5.709	215	4.608
100	5.616		
105	5.571		
110	5.514		
115	5.374		

Πίνακας 4.2 Μεταβολή pH συναρτήσει του χρόνου ζύμωσης του γιαουρτιού με εγκλεισμένα προϊόντα προβιοτικών βακτηρίων με εγκλειστικό μίγμα αλγινικού νατρίου -CNC-γλυκόζης-ινουλίνης (ACNCI) που έχουν ενθυλακωθεί με γαλακτωματοποίηση.

<i>t (min)</i>	<i>pH</i>	<i>t (min)</i>	<i>pH</i>
0	6.556	120	5.319
5	6.523	125	5.282
10	6.491	130	5.253
15	6.467	135	5.128
20	6.435	140	5.087
25	6.399	145	5.010
30	6.369	150	4.954
35	6.286	155	4.897
40	6.158	160	4.878
45	6.127	165	4.846
50	6.028	170	4.799
55	5.967	175	4.773
60	5.920	180	4.755
65	5.891	185	4.731
70	5.853	190	4.709
75	5.819	195	4.685
80	5.781	200	4.666
85	5.740	205	4.644
90	5.703	210	4.630
95	5.662	215	4.621
100	5.639	220	4.615
105	5.605	225	4.603
110	5.488		
115	5.372		

Πίνακας 4.3 Μεταβολή pH συναρτήσει του χρόνου ζύμωσης του γιαουρτιού με εγκλεισμένα προϊόντα προβιοτικών βακτηρίων με εγκλειστικό μίγμα αλγινικού νατρίου –γλυκόζης (AM) που έχουν ενθυλακωθεί με γαλακτωματοποίηση.

<i>t (min)</i>	<i>pH</i>	<i>t (min)</i>	<i>pH</i>
0	6.516	120	5.331
5	6.475	125	5.291
10	6.451	130	5.251
15	6.422	135	5.072
20	6.392	140	4.971
25	6.361	145	4.910
30	6.335	150	4.872
35	6.196	155	4.785
40	6.093	160	4.758
45	6.059	165	4.726
50	6.009	170	4.698
55	5.940	175	4.686
60	5.891	180	4.670
65	5.852	185	4.653
70	5.816	190	4.640
75	5.777	195	4.626
80	5.736	200	4.616
85	5.704	205	4.607
90	5.660		
95	5.612		
100	5.581		
105	5.561		
110	5.508		
115	5.385		

Πίνακας 4.4 Μεταβολή pH συναρτήσει του χρόνου ζύμωσης του γιαουρτιού με εγκλεισμένα προϊόντα προβιοτικών βακτηρίων με εγκλειστικό μίγμα αλγινικού νατρίου–γλυκόζης-ινουλίνης (AMI) που έχουν ενθυλακωθεί με γαλακτωματοποίηση.

<i>t (min)</i>	<i>pH</i>	<i>t (min)</i>	<i>pH</i>
0	6.570	120	5.370
5	6.518	125	5.315
10	6.492	130	5.228
15	6.463	135	5.056
20	6.420	140	4.972
25	6.395	145	4.909
30	6.338	150	4.864
35	6.272	155	4.815
40	6.191	160	4.783
45	6.111	165	4.746
50	6.076	170	4.718
55	5.997	175	4.699
60	5.964	180	4.684
65	5.903	185	4.671
70	5.875	190	4.650
75	5.852	195	4.633
80	5.791	200	4.618
85	5.740	205	4.609
90	5.707	210	4.601
95	5.658		
100	5.631		
105	5.609		
110	5.572		
115	5.449		

5. Μεταβολή pH κατά τη ζύμωση του γιαουρτιού με τη χρήση του μη εγκλεισμένου προβιοτικού στελέχους *Bifidobacterium Animalis subps. Lactis* (BB-12).

Πίνακας 5.1 Μεταβολή pH συναρτήσει του χρόνου ζύμωσης του γιαουρτιού με το μη εγκλεισμένο προβιοτικό στέλεχος BB-12.

<i>t</i> (min)	pH	<i>t</i> (min)	pH
0	6.617	105	5.486
5	6.591	110	5.413
10	6.545	115	5.352
15	6.499	120	5.295
20	6.488	125	5.275
25	6.399	130	5.193
30	6.292	135	5.099
35	6.248	140	4.990
40	6.201	145	4.882
45	6.161	150	4.813
50	6.117	155	4.751
55	6.025	160	4.706
60	5.973	165	4.699
65	5.898	170	4.676
70	5.836	175	4.661
75	5.786	180	4.645
80	5.750	185	4.627
85	5.717	190	4.616
90	5.678	195	4.606
95	5.619		
100	5.571		

6. Μεταβολή pH κατά τη ζύμωση του γιαουρτιού με χρήση της εμπορικής προβιοτικής καλλιέργειας

Πίνακας 6.1 Μεταβολή pH συναρτήσει του χρόνου ζύμωσης του γιαουρτιού με την εμπορική προβιοτική καλλιέργεια.

<i>t (min)</i>	<i>pH</i>	<i>t (min)</i>	<i>pH</i>
0	6.642	110	5.541
5	6.619	115	5.470
10	6.576	120	5.405
15	6.536	125	5.352
20	6.497	130	5.301
25	6.466	135	5.272
30	6.383	140	5.201
35	6.364	145	5.128
40	6.296	150	4.999
45	6.255	155	4.917
50	6.201	160	4.840
55	6.132	165	4.771
60	6.096	170	4.710
65	6.005	175	4.694
70	5.929	180	4.676
75	5.860	185	4.659
80	5.795	190	4.649
85	5.756	195	4.638
90	5.718	200	4.626
95	5.686	205	4.620
100	5.637	210	4.612
105	5.596	215	4.605

7. Μεταβολή pH κατά τη ζύμωση του συμβατικού γιαουρτιού (τυφλού)

Πίνακας 7.1 Μεταβολή pH συναρτήσει του χρόνου ζύμωσης του συμβατικού γιαουρτιού.

<i>t (min)</i>	<i>pH</i>	<i>t (min)</i>	<i>pH</i>
0	6.440	150	5.563
5	6.405	155	5.506
10	6.397	160	5.433
15	6.396	165	5.364
20	6.391	170	5.300
25	6.389	175	5.236
30	6.384	180	5.177
35	6.377	185	5.126
40	6.362	190	5.081
45	6.349	195	5.040
50	6.332	200	4.997
55	6.312	205	4.972
60	6.291	210	4.951
65	6.268	215	4.903
70	6.247	220	4.875
75	6.219	225	4.871
80	6.203	230	4.855
85	6.185	235	4.830
90	6.172	240	4.811
95	6.148	245	4.794
100	6.123	250	4.782
105	6.096	255	4.756
110	6.060	260	4.732
115	6.011	265	4.696
120	5.958	270	4.676
125	5.888	275	4.655
130	5.813	280	4.636
135	5.762	285	4.621
140	5.701	290	4.607
145	5.644		

8. Αποδόσεις εγκλεισμένων προβιοτικών βακτηρίων με την μέθοδο της εξώθησης και της γαλακτωματοποίησης

Πίνακας 8.1: Απόδοση εγκλεισμού που επιτυγχάνεται για κάθε χρησιμοποιούμενο μέσο εγκλεισμού και εφαρμοσμένη μέθοδο εγκλεισμού.

<i>Εγκλειστικό μέσο</i>	<i>εξώθηση</i>	<i>γαλακτωματοποίηση</i>
ACNC	92,85	96,81
ACNCI	92,3	96,41
AM	93,57	96,01
AMI	93,06	97,13

9. Ποσοστό επιβίωσης του κάθε προϊόντος γιαουρτιού με την πάροδο των ημερών (10, 20, 30 ημέρες)

Πίνακας 9.1: Ποσοστό επιβίωσης για προϊόν γιαουρτιού κατά την πάροδο 10, 20, 30 ημερών.

<i>Εγκλειστικό μέσο</i>	<i>10 ημέρες</i>	<i>20 ημέρες</i>	<i>30 ημέρες</i>
ACNCex	85,33	75,12	69,84
ACNCIex	88,97	76,5	71,64
AMex	87,62	82,67	74,55
AMlex	88,21	84,49	75,86
ACNCem	78,24	68,42	67,74
ACNCIem	80,74	71,67	63,9
AMem	85,4	78,11	71,78
AMlem	87,57	80,81	73,25
conv&free	74,66	64,94	48,69
Εμπορική καλλιέργεια	75,15	66,09	60,48

10. Διάρκεια ζύμωσης του κάθε προϊόντος γιαουρτιού

Πίνακας 10.1: Διάρκεια ζύμωσης κάθε προϊόντος γιαουρτιού

<i>Εγκλειστικό μέσο</i>	<i>Διάρκεια ζύμωσης (s)</i>
-------------------------	-----------------------------

ACNCex	240
ACNCIex	235
AMex	240
AMIex	240
ACNCem	215
ACNCIem	225
AMem	205
AMIem	210
con&free	195
Εμπορική καλλιέργεια	215
Τυφλό	290

11. Διάρκεια λανθάνουσας φάσης του pH (λ) του κάθε προϊόντος γιαουρτιού

Πίνακας 11.1: Διάρκεια λανθάνουσας φάσης του pH του κάθε προϊόντος γιαουρτιού

Εγκλειστικό μέσο	Διάρκεια λανθάνουσας φάσης pH (λ)
ACNCex	208
ACNCIex	214
AMex	221
AMIex	210
ACNCem	177
ACNCIem	184
AMem	183
AMIem	177
con&free	183
Εμπορική καλλιέργεια	189
Τυφλό	221

12. Μέγιστος ρυθμός μείωσης pH (μ) του κάθε προϊόντος γιαουρτιού

Πίνακας 12.1: Μέγιστος ρυθμός μείωσης pH (μ) του κάθε προϊόντος γιαουρτιού

Εγκλειστικό μέσο	Διάρκεια λανθάνουσας φάσης pH (λ)
------------------	---

ACNCex	-0,0323
ACNCIex	-0,0314
AMex	-0,0326
AMIex	-0,0306
ACNCem	-0,0353
ACNCIem	-0,0321
AMem	-0,0336
AMIem	-0,0359
conv&free	-0,0356
Εμπορική καλλιέργεια	-0,0347
Τυφλό	-0,0339

13. *Ιξώδες μετά την ολοκλήρωση της ζύμωσης στους 45°C του κάθε προϊόντος γιαουρτιού*

Πίνακας 13.1: Ιξώδες μετά την ολοκλήρωση της ζύμωσης στους 45°C του κάθε προϊόντος γιαουρτιού

Εγκλειστικό μέσο	ιξώδες στους 45°C
ACNCex	32220
ACNCIex	33773
AMex	34695
AMIex	33209
ACNCem	31720
ACNCIem	31651
AMem	32862
AMIem	31602
conv&free	21349
Εμπορική καλλιέργεια	27361
Τυφλό	12509

14. *Ιξώδες μετά την αποθήκευση για μία ημέρα σε ψύξη (4°C) του κάθε προϊόντος γιαουρτιού*

Πίνακας 14.1: Ιξώδες στους 4°C του κάθε προϊόντος γιαουρτιού

Εγκλειστικό μέσο	ιξώδες στους 4°C
-------------------------	-------------------------

ACNCex	38999
ACNCIex	40009
AMex	40337
AMIex	38697
ACNCem	37099
ACNCIem	37938
AMem	38659
AMIem	38062
conv&free	24916
Εμπορική καλλιέργεια	31308
Τυφλό	18954

15. *Ανάλυση υφης (σκληρότητα, προσκολλησιμότητα) μετά από μία μέρα αποθήκευσης σε ψύξη (4°C) για κάθε προϊόν γιαουρτιού*

Πίνακας 15.1: Ανάλυση υφης (σκληρότητα, προσκολλησιμότητα) μετά από μία μέρα αποθήκευσης σε ψύξη για κάθε προϊόν γιαουρτιού

<i>Εγκλειστικό μέσο</i>	<i>Σκληρότητα</i>	<i>Προσκολλησιμότητα</i>
ACNCex	0,673	0,272
ACNCIex	0,715	0,187
AMex	0,626	0,209
AMIex	0,659	0,242
ACNCem	0,648	0,275
ACNCIem	0,661	0,204
AMem	0,641	0,225
AMIem	0,648	0,235
conv&free	0,65	0,312
Εμπορική καλλιέργεια	0,624	0,348
Τυφλό	0,617	0,382