



ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ &
ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Πολλαπλασιασμός κόκκων κεφίρ χρησιμοποιώντας
ως υπόστρωμα αποπρωτεϊνομένο ορό τυρογάλακτος**

**ΘΕΜΙΣΤΟΚΛΕΟΥΣ ΑΝΤΡΕΑΣ
ΦΡΑΓΚΟΥΛΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ**

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2014

Πολλαπλασιασμός κόκκων κεφίρ χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα αποπρωτεϊνομένο
ορό τυρογάλακτος

Θεμιστοκλέους Αντρέας
Φραγκούλης Γεώργιος

Υποβολή Πτυχιακής διατριβής που αποτελεί μέρος των απαιτήσεων για την απονομή
του Πτυχίου του Τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων του ΑΤΕΙ Θεσσαλονίκης.

Ημερομηνία
Οκτώβριος 2014

Εισηγήτρια
Δημητρέλη Γεωργία

Ευχαριστίες

Ευχαριστούμε θερμά την καθηγήτρια Δημητρέλη Γεωργία για την βοήθεια και την υποστήριξη που μας παρείχε. Ευχαριστούμε την κα Ειρήνη Φαντίδου, βοηθό του εργαστηρίου Τεχνολογίας και Έλεγχού Ποιότητας Γάλακτος και Γαλακτοκομικών Προϊόντων. Επίσης, ευχαριστούμε τον Στέλιο Εξαρχόπουλο και τον Τέλλο Ευάγγελο για την βοήθειά τους κατά την διεξαγωγή της πτυχιακής μας εργασίας.

Πολλαπλασιασμός κόκκων κεφίρ χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα αποπρωτεϊνομένο ορό τυρογάλακτος

Θεμιστοκλέους Αντρέας
Φραγκούλης Γεώργιος

ΤΕΙ Θεσσαλονίκης, Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας και Τεχνολογίας Τροφίμων & Διατροφής, Τμήμα Τεχνολογίας Τροφίμων, 57400 Θεσσαλονίκη Τ.Θ. 141

Περίληψη

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη των παραγόντων που επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό των κόκκων κεφίρ, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα αποπρωτεϊνωμένο ορό τυρογάλακτος (DW). Οι παράμετροι που μελετήθηκαν ήταν το ποσοστό των κόκκων (1%, 3%, 5%, 7%), η θερμοκρασία επώασης (20°C, 25°C, 30°C) και το ποσοστό λακτόζης στο διάλυμα τυρογάλακτος (5%, 10%). Επίσης, χρησιμοποιήθηκε γάλα μακράς διάρκειας (Ultra High Temperature-UHT) ως υπόστρωμα για τον πολλαπλασιασμό των κόκκων και ακολούθησε σύγκριση των αποτελεσμάτων με αυτά που προέκυψαν από τη χρήση του DW.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η αύξηση της συγκέντρωσης της λακτόζης στο υπόστρωμα οδήγησε σε αύξηση του ποσοστού των κόκκων κεφίρ. Η αύξηση του ποσοστού εμβολιασμού είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση του ποσοστού αύξησης των κόκκων. Η μεγαλύτερη αύξηση της μάζας των κόκκων παρουσιάστηκε σε ποσοστό εμβολιασμού 1%. Η βέλτιστη θερμοκρασία για την αύξηση του ποσοστού των κόκκων ήταν 25°C, ενώ η μικρότερη αύξηση αυτών παρουσιάστηκε στους 30°C. Το ποσοστό αύξησης των κόκκων ήταν μεγαλύτερο όταν χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα γάλα UHT. Η αύξηση του χρόνου επώασης είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του ποσοστού των κόκκων κεφίρ. Οι διαδοχικές ζυμώσεις (με ρύθμιση της τιμής pH στην αρχική τιμή του) προκάλεσαν την αύξηση της τελικής τιμής pH μετά το τέλος του προβλεπόμενου χρόνου επώασης (22, 44 και 66 ώρες). Ωστόσο, η επώαση σε χαμηλή θερμοκρασία (20°C) αλλά και η χρησιμοποίηση γάλακτος UHT ως υπόστρωμα είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση του pH με την αύξηση του χρόνου επώασης από τις 22 στις 44 ώρες. Η απόδοση σε κεφιράνη είναι μεγαλύτερη όταν οι κόκκοι έχουν πολλαπλασιαστεί σε DW.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | |
|---|----|
| 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ..... | 1 |
| 2. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ..... | 3 |
| 2.1. Κεφίρ..... | 3 |
| 2.2. Κόκκοι κεφίρ..... | 3 |
| 2.2.1. Μικροχλωρίδα..... | 5 |
| 2.2.2. Πολλαπλασιασμός κόκκων κεφίρ..... | 6 |
| 2.2.3. Συντήρηση κόκκων κεφίρ..... | 7 |
| 2.3. Τυρόγαλα..... | 7 |
| 2.3.1. Σύνθεση τυρογάλακτος..... | 8 |
| 2.3.2. Τύποι τυρογάλακτος..... | 9 |
| 2.3.3. Θρεπτική αξία και αξιοποίηση τυρογάλακτος..... | 10 |
| 2.4. Κεφιράνη..... | 11 |
| 3. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ..... | 13 |
| 4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ..... | 14 |
| 4.1. Υλικά..... | 14 |
| 4.2. Σχεδιασμός πειραματικής διαδικασίας..... | 14 |
| 4.3. Παρασκευή τυρογάλακτος..... | 15 |
| 4.4. Πολλαπλασιασμός κόκκων κεφίρ..... | 16 |
| 4.5. Πολλαπλασιασμός κόκκων κεφίρ με τη χρήση εργαστηριακών ζυμωτήρων... 16 | |
| 4.6. Μέτρηση pH..... | 17 |
| 4.7. Προσδιορισμός των αναγόντων σακχάρων (Μέθοδος Nelson-Somogyi)..... | 18 |
| 4.8. Μέθοδος απομόνωσης της κεφιράνης..... | 20 |
| 4.9. Προσδιορισμός της ολικής περιεκτικότητας υδατανθράκων (Μέθοδος Phenol-Sulfuric)..... | 21 |
| 4.10. Στατιστική ανάλυση..... | 23 |
| 5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ..... | 24 |
| 5.1. Επίδραση του ποσοστού λακτόζης στο τυρόγαλα..... | 24 |
| 5.2. Επίδραση του ποσοστού των κόκκων κεφίρ..... | 29 |
| 5.3. Επίδραση της θερμοκρασίας επώασης..... | 32 |
| 5.4. Επίδραση του είδους του υποστρώματος..... | 36 |
| 6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ..... | 40 |
| 7. ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ..... | 41 |
| ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ..... | 42 |
| ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ..... | 46 |

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι κόκκοι κεφίρ (καλλιέργεια εκκίνησης του κεφίρ) περιέχουν οξυγαλακτικά βακτήρια (λακτοβάκιλλους, λακτόκοκκους), οξικά βακτήρια και ζύμες, σε ένα σύμπλεγμα πρωτεϊνών-πολυσακχαριτών. Οι κόκκοι παράγονται μόνο από άλλους κόκκους, τους οποίους σπάνε σε μικρότερους για να μεγαλώσουν. Μέχρι σήμερα δεν κατέστη δυνατό να δημιουργηθούν κόκκοι από τα είδη μικροοργανισμών, οι οποίοι υπάρχουν μέσα σε αυτούς (Arihara et al., 1990).

Ο πλήρης μηχανισμός που εμπλέκεται στην δημιουργία, ή τη σύνθεση των κόκκων κεφίρ δεν είναι απόλυτα κατανοητός σε επιστημονικό επίπεδο. Ωστόσο, φαίνεται να υπάρχει αυξανόμενο ενδιαφέρον σε αυτόν τον τομέα, καθώς στους κόκκους κεφίρ ανακαλύφθηκε ένας μοναδικός υδατοδιαλυτός πολυσακχαρίτης, η κεφιράνη (La Rivière et al., 1967).

Στην παρούσα εργασία μελετάται η ανάπτυξη των κόκκων κεφίρ χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα αποπρωτεϊνωμένο ορό τυρογάλακτος. Το τυρόγαλα είναι το προϊόν που λαμβάνεται από το γάλα ύστερα από την επίδραση οξέων, πρωτεολυτικών ενζύμων (πυτιά), αλλά και φυσικοχημικών μεθόδων κατά την παραγωγή τυριών και καζεΐνης. Κατά την τυροκόμηση αγελαδινού γάλακτος, το 10-20% των συνολικών συστατικών του μεταφέρεται στο τυρί και το 80-90% στο τυρόγαλα (Ανυφαντάκης, 2004). Το τυρόγαλα είναι ένα απόβλητο που προκαλεί μόλυνση όταν διοχετευτεί στο περιβάλλον, αλλά το οποίο έχει θρεπτική αξία εξαιτίας των συστατικών που περιέχει (Prazeres et al., 2012). Η αξιοποίηση επομένως του τυρογάλακτος είναι σημαντική τόσο για το περιβάλλον, όσο και για τα οφέλη που έχει να προσφέρει, όπως όταν π.χ. χρησιμοποιηθεί ως θρεπτικό υπόστρωμα για τον πολλαπλασιασμό επιθυμητών μικροοργανισμών.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη των παραγόντων που επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό των κόκκων κεφίρ, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα αποπρωτεϊνωμένο ορό τυρογάλακτος (DW).

2.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

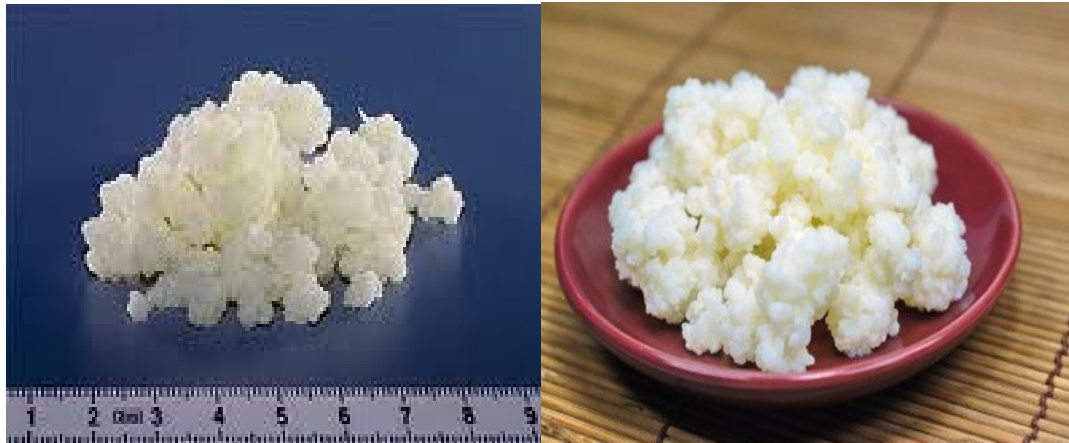
2.1. Κεφίρ

Το κεφίρ είναι ένα γαλακτοκομικό προϊόν, το οποίο θεωρείται φυσικό προβιοτικό και χρησιμοποιείται παραδοσιακά εδώ και αιώνες στις χώρες γύρω από τον Καύκασο. Παράγεται από οποιονδήποτε τύπο γάλακτος, στον οποίο έχει προστεθεί για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα καλλιέργεια από δραστηριοποιημένους κόκκους κεφίρ, προκαλώντας ζύμωση. Έχει υψηλή θρεπτική αξία, ενώ παράλληλα αφομοιώνεται εύκολα από τον οργανισμό. Είναι πλούσιο σε ασβέστιο, μαγνήσιο και φώσφορο, καθώς και σε βιταμίνες, όπως, βιοτίνη, φολικό οξύ και βιταμίνη B12, ενώ και οι πρωτεΐνες του είναι υψηλής βιολογικής αξίας (Farnworth, 2005).

Το κεφίρ θεωρείται ένα ιδιαίτερο ζυμούμενο ποτό γάλακτος, επειδή η καλλιέργεια η οποία χρησιμοποιείται για την παραγωγή του, παρουσιάζει ξεχωριστή ιδιομορφία. Η καλλιέργεια η οποία χρησιμοποιείται για την παραγωγή του κεφίρ, προέρχεται μόνο από κόκκους κεφίρ, ή από μητρικές καλλιέργειες οι οποίες προέρχονται από τους κόκκους αυτούς (Ζερφυρίδης, 2001).

2.2. Κόκκοι κεφίρ

Οι κόκκοι κεφίρ (Σχήμα 2.1) έχουν ένα ζελατινώδες λευκό χρώμα, είναι ακανόνιστοι σε σχήμα και ποικίλουν σε μέγεθος (3-20 mm σε διάμετρο). Είναι αδιάλυτοι στο νερό, ωστόσο διογκώνονται όταν εμβαπτίζονται σε αυτό (Ottles & Cagindi, 2003).



Σχήμα 2.1. Κόκκοι κεφίρ (Otles & Cagindi, 2003)

Το σύνολο των μικροοργανισμών των κόκκων δεν είναι πλήρως διευκρινισμένο. Το πλέγμα των κόκκων αποτελείται από ένα σύμπλεγμα με 13% πρωτεΐνη (επί ξηρής ουσίας), 24% πολυσακχαρίτες, καθώς επίσης, κυτταρικά θραύσματα και άγνωστα συστατικά (Halle et al., 1994). Ο κύριος πολυσακχαρίτης, ο οποίος έχει απομονωθεί από κόκκους κεφίρ είναι μια υδατοδιαλυτή ουσία γνωστή ως κεφιράνη (Arihara et al., 1990).

Ο τρόπος της πρώτης δημιουργίας των κόκκων είναι ακόμα άγνωστος γι' αυτό υπάρχουν διάφορες θεωρίες για την προέλευσή τους. Η πιο πιθανή φαίνεται να είναι εκείνη, σύμφωνα με την οποία το γάλα στη περιοχή του Καυκάσου φυλαγόταν σε ασκούς από κατσικίσιο δέρμα, όπου γινόταν η ζύμωση. Καθώς το ζυμούμενο γάλα καταναλωνόταν, φρέσκο γάλα το αντικαθιστούσε και η ζύμωση συνεχιζόταν για πολλές εβδομάδες. Έτσι, στα τοιχώματα του ασκού δημιουργούνταν μικρά σωματίδια πρωτεϊνικής φύσεως, τα οποία με τον καιρό μεγάλωναν, καθώς σε αυτά προσθέτονταν νέα στρώματα πρωτεΐνης. Συνεπώς, η μικροχλωρίδα στο εσωτερικό του κόκκου βρισκόταν εγκλωβισμένη μέσα σε ένα πρωτεϊνικό πλέγμα, το οποίο δένεται από πολυσακχαρίτες (Libudzisz & Piatkiewicz, 1990).

2.2.1. Μικροχλωρίδα

Η βασική μικροχλωρίδα των κόκκων κεφίρ αποτελείται από βακτήρια γαλακτικού και οξικού οξέος, αλλά και από ζύμες. Υποστηρίζεται ότι ο διαχωρισμός των βακτηρίων και των ζυμών του κεφίρ μειώνει τη βιοχημική τους δραστηριότητα, ή δεν εμφανίζουν καθόλου ανάπτυξη στο γάλα. Αυτό συμβαίνει εξαιτίας της συμβιωτικής σχέσης που χαρακτηρίζει τη μικροχλωρίδα των κόκκων (Koroleva, 1982).

Τα είδη των μικροοργανισμών, αλλά και οι σχέσεις που αναπτύσσονται μεταξύ των ειδών αυτών, διαφέρουν στα ποικίλα στρώματα των κόκκων. Στο κέντρο των κόκκων υπάρχουν ζύμες, οι οποίες δεν ζυμώνουν τη λακτόζη, ενώ οι ζύμες της επιφάνειας των κόκκων, έχουν την ιδιότητα ζύμωσης της λακτόζης. Συμπερασματικά, σε όλα τα στρώματα των κόκκων υπάρχει αφθονία από μεσόφιλους λακτόκοκκους, μεσόφιλους αλλά και θερμόφιλους ομοζυμωτικούς, ετεροζυμωτικούς λακτοβάκιλλους οξικού και γαλακτικού οξέος (Koroleva, 1982).

Τα κολοβακτηριοειδή και άλλα παθογόνα, τα οποία μπορεί να προσκολληθούν αποκλειστικά και μόνο στην επιφάνεια των κόκκων, είναι δυνατόν να απομακρυνθούν εύκολα, με συνεχείς εκπλύσεις με αποστειρωμένο νερό (Ζερφυρίδης, 2001). Η μικροχλωρίδα των κόκκων αποτελείται, πιο συγκεκριμένα, από τους παρακάτω μικροοργανισμούς:

Λακτοβάκιλλοι

Αυξάνουν το ιξώδες, αλλά και τη σταθερότητα του κεφίρ. Βασικά είδη είναι ο *Lactobacillus brevis* ετεροζυμωτικός, ο *L. Casei* προαιρετικά ετεροζυμωτικός μεσόφιλος, και οι *L. Bulgaricus*, και *L. Helveticus*, οι οποίοι είναι ομοζυμωτικοί θερμόφιλοι (Koroleva, 1982).

Λακτόκοκκοι

Κύρια είδη λακτόκοκκων είναι οι *Lactococcus lactis*, *L. Cremoris*, και πολλές φορές οι *L. Durans*, οι οποίοι είναι ομοζυμωτικοί μεσόφιλοι, και παράγουν γαλακτικό οξύ με γρήγορο ρυθμό στα αρχικά στάδια της ζύμωσης. Επιπλέον, υπάρχουν οι *Leuconostoc mesenteroides*, και *L. Dextranicum*, οι οποίοι είναι ετεροζυμωτικοί μεσόφιλοι που συμβάλλουν στην γεύση, αλλά και το άρωμα του κεφίρ (Koroleva, 1982).

Οξικά βακτήρια

Αυξάνουν το ιξώδες, και επίσης, την σταθερότητα του κεφίρ. Τέτοια είδη είναι τα *Acetobacter aceti* και *A. Rascens*, τα οποία παράγουν οξικό οξύ κατά την ζύμωση του γάλακτος και παίζουν καίριο ρόλο στην συμβίωση των μικροοργανισμών του κεφίρ (Koroleva, 1982).

Ζύμες

Τα είδη που έχουν ταυτοποιηθεί είναι οι *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus*, και *Candida kefir*. Οι ζύμες παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στην συμβίωση των διάφορων μικροοργανισμών, στο σχηματισμό CO₂, αλλά και στην ανάπτυξη της χαρακτηριστικής γεύσης, και του αρώματος του κεφίρ. Η υπερβολική ανάπτυξη των ζυμών, μπορεί να προκαλέσει σχηματισμό αερίου σε υψηλά επίπεδα στο προϊόν, και κατά συνέπεια, προβλήματα στη συσκευασία του προϊόντος (Clementi et al., 1989; Kwak et al., 1996; Simova et al., 2002).

2.2.2. Πολλαπλασιασμός κόκκων κεφίρ

Οι κόκκοι κεφίρ παράγονται μόνο από άλλους κόκκους, καθώς δεν είναι δυνατό να δημιουργηθούν από τους μικροοργανισμούς που περιέχουν. Για τον πολλαπλασιασμό των κόκκων, είναι απαραίτητη η χρήση κάποιου υποστρώματος, το οποίο τις

περισσότερες φορές είναι το γάλα (αγελαδινό, κατσικίσιο, πρόβειο, καρύδας, ρυζιού ή σόγιας), ή άλλου είδους υποστρώματα (π.χ. DW). Σημαντικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό των κόκκων, παίζουν οι συνθήκες επώασης τους. Από μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί, βρέθηκε πως η κατάλληλη θερμοκρασία για την ανάπτυξη των κόκκων κεφίρ, είναι 25°C, και η τιμή του pH να κυμαίνεται στο 4,4. Για καλύτερα αποτελέσματα στον πολλαπλασιασμό των κόκκων, συνίσταται η αλλαγή του υποστρώματος σε καθημερινή βάση (Guzel-Seydim et al., 2011).

2.2.3. Συντήρηση κόκκων κεφίρ

Η αδυναμία καθημερινής παραγωγής κεφίρ, καθώς και η συνεχής αύξηση της μάζας των κόκκων κεφίρ, όταν αυτοί εμβολιάζονται στο γάλα, αποτελούν λόγους που κάνουν απαραίτητη την αποθήκευση των κόκκων. Υπάρχουν τρόποι με τους οποίους είναι εφικτή η συντήρηση των κόκκων κεφίρ για μελλοντική τους χρήση. Η αποθήκευση στο ψυγείο (4-8°C) μέσα σε γάλα είναι ένας τρόπος συντήρησης των κόκκων κεφίρ για μικρό χρονικό διάστημα μεταξύ 15-20 ημερών. Μετά το πέρας αυτού του διαστήματος απαιτείται αλλαγή του γάλακτος με νέο και εκ νέου αποθήκευση αυτόν για το ίδιο χρονικό διάστημα. Άλλος τρόπος συντήρησης των κόκκων, αποτελεί η αποθήκευσή τους στην κατάψυξη (< -18°C) μέχρι και 2 μήνες. Τέλος, η αποξήρανση των κόκκων κεφίρ, τους καθιστά υγιείς για χρονικό διάστημα 12-18 μηνών (Garrote et al., 1996).

2.3. Τυρόγαλα

Η μεγάλη αύξηση στην κατανάλωση τυροκομικών προϊόντων τα τελευταία 50 χρόνια, προκάλεσε μεγάλη αύξηση στην παραγωγή τυρογάλακτος. Οι ποσότητες που παράγονται παγκοσμίως είναι τεράστιες, και στο μεγαλύτερό τους ποσοστό

παραμένουν ανεκμετάλλευτες. Βασικοί λόγοι που επιβάλλουν την αξιοποίηση του τυρογάλακτος, αποτελούν η μεγάλη θρεπτική του αξία και η μόλυνση του περιβάλλοντος (Ζερφυρίδης, 2001). Το τυρόγαλα χαρακτηρίζεται ως ένα υποκίτρινο και ημιδιαφανές υγρό που λαμβάνεται από το γάλα μετά την κατακρήμνιση της καζεΐνης (Jelen, 2002).

Οι τεχνολογίες επεξεργασίας του τυρογάλακτος, που έχουν αναπτυχθεί μέχρι πρόσφατα για την παραλαβή των πρωτεϊνών του τυρογάλακτος, αφήνουν τη λακτόζη ανεκμετάλλευτη. Η λακτόζη είναι η ουσία, που ενοχοποιείται κυρίως για το υψηλό Βιολογικά Απαιτούμενο Οξυγόνο (B.O.D. 40000mg kg) που συνοδεύει το τυρόγαλα. Έτσι, το τυρόγαλα μεταφέρεται σε υδάτινους αποδέκτες, προκαλώντας σημαντική μόλυνση, καθώς συνιστά άριστο υπόστρωμα για την ανάπτυξη μικροοργανισμών (Prazeres et al., 2012).

Οι ολοένα και αυξανόμενες πιέσεις από τις οικολογικές οργανώσεις, η ανεπτυγμένη περιβαλλοντική συνείδηση των νέων γενιών και η ανάγκη για αξιοποίηση όλων των φυσικών πόρων της γης, καθιστά επιτακτική την εξεύρεση λύσης από την επιστημονική κοινότητα σε συνεργασία με τις βιομηχανίες γάλακτος (Ανυφαντάκης, 2007).

2.3.1. Σύνθεση τυρογάλακτος

Η σύνθεση του τυρογάλακτος δίνεται στον Πίνακα 2.1. Πέρα από τα συστατικά του γάλακτος που αναφέρονται σε αυτόν, στο τυρόγαλα εμπεριέχονται επίσης, οι υδατοδιαλυτές βιταμίνες, από τις οποίες η B₂ (ριβοφλαβίνη) δίνει σε αυτό το υποκίτρινο χρώμα του. Το τυρόγαλα περιέχει το 45% από τα θρεπτικά συστατικά του γάλακτος, με θερμιδική αξία περίπου 22kcal, σε σχέση με τις 65 kcal που έχουν τα

100g γάλα. Επιπροσθέτως, οι πρωτεΐνες του τυρογάλακτος έχουν μεγαλύτερη θρεπτική αξία από την πρωτεΐνη του τυριού (Ζερφυρίδης, 2001).

Πίνακας 2.1. Σύνθεση τυρογάλακτος (Ζερφυρίδης, 2001).

| Συστατικό | Αναλογία % |
|------------------|-------------------|
| Νερό | 93.00-94.00 |
| Λίπος | 0.09-0.35 |
| Πρωτεΐνη | 0.86-1.00 |
| Λακτόζη | 4.80-5.50 |
| Τέφρα | 0.49-0.68 |
| Σύνολο | 6.24-7.53 |

2.3.2. Τύποι τυρογάλακτος

Η μέθοδος λήψης του τυρογάλακτος, προκαλεί τη διάκρισή του σε τυρόγαλα πυτιάς ή γλυκό τυρόγαλα και σε όξινο τυρόγαλα. Το γλυκό τυρόγαλα, είναι συνήθως υποπροϊόν της τυροκομίας και λαμβάνεται μετά από την πήξη του γάλακτος με την επίδραση πυτιάς (pH 5,9 – 6,6), καθώς επίσης και από την παρασκευή καζεΐνης με τη χρήση πυτιάς. Το όξινο τυρόγαλα (pH 4,3 – 4,6) λαμβάνεται κατά την παρασκευή της καζεΐνης μετά από οξίνιση του γάλακτος με οξέα και από την παρασκευή φρέσκων τυριών, τα οποία πήζουν με τη χρήση οξυγαλακτικών βακτηρίων (Ανυφαντάκης, 2004).

2.3.3. Θρεπτική αξία και αξιοποίηση τυρογάλακτος

Το τυρόγαλα περιέχει το μεγαλύτερο ποσοστό της λακτόζης και των πρωτεϊνών ορού του γάλακτος, όπως επίσης, και διάφορα άλατα. Η αναλογία των συστατικών του τυρογάλακτος, εξαρτάται από το είδος του γάλακτος, αλλά και το είδος του τυριού που παρασκευάζεται. Μερικά από τα θρεπτικά συστατικά που περιέχονται στο τυρόγαλα είναι πρωτεΐνες, πεπτίδια, λιπίδια, βιταμίνες, και λακτόζη, η οποία βρίσκεται και σε μεγαλύτερη αυθονία (4,5-5% w/v) (Guimarães et al., 2010).

Κατά την διαδικασία αξιοποίησης του τυρογάλακτος μπορεί να προκύψουν διάφορες δυσκολίες. Οι πιο σημαντικές έχουν να κάνουν με το μεγάλο μικροβιακό φορτίο του τυρογάλακτος που το καθιστά ευπαθές, όπως επίσης και με τη σύσταση του, η οποία δεν είναι σταθερή. Επιπλέον δυσκολίες που μπορεί να παρουσιαστούν, σχετίζονται με την χαμηλή περιεκτικότητά του τυρογάλακτος σε στερεά συστατικά, καθώς και με την θεώρησή του ως προϊόν ευτελούς αξίας (Jelen, 2002).

Παρά ταύτα, από το τυρόγαλα παρασκευάζεται σήμερα, με διαφορετικούς τρόπους μια μεγάλη ποικιλία προϊόντων. Ο αριθμός των προϊόντων αυτών, αλλά και οι χρήσεις του τυρογάλακτος αυξάνουν συνεχώς με την εφαρμογή νέων εξελιγμένων τεχνολογιών (Ανυφαντάκης, 2004). Περίπου ένα ποσοστό της τάξης του 50% της παγκόσμιας παραγωγής τυρογάλακτος μετατρέπεται σε διάφορα προϊόντα διατροφής, με πιο κοινό προϊόν τη σκόνη τυρογάλακτος, η οποία χρησιμοποιείται κυρίως ως ζωοτροφή, αλλά και ως συστατικό ανθρώπινων τροφίμων (ανάλογα με την ποιότητα της), όπως για παράδειγμα παγωτών, σαλτσών, και προψημένων προϊόντων (Guimarães et al., 2010). Το τυρόγαλα μπορεί να χρησιμοποιηθεί επίσης, ως θρεπτικό μέσο για την ανάπτυξη μικροοργανισμών (π.χ. γένη *Kluyveromyces*, *Candida*, *Trichosporum*, *Torula*), που δίνουν βιομάζα υψηλής βιολογικής αξίας, με συγκέντρωση πρωτεΐνης που μπορεί να φτάσει μέχρι 80% επί της ξηρού βάρους της

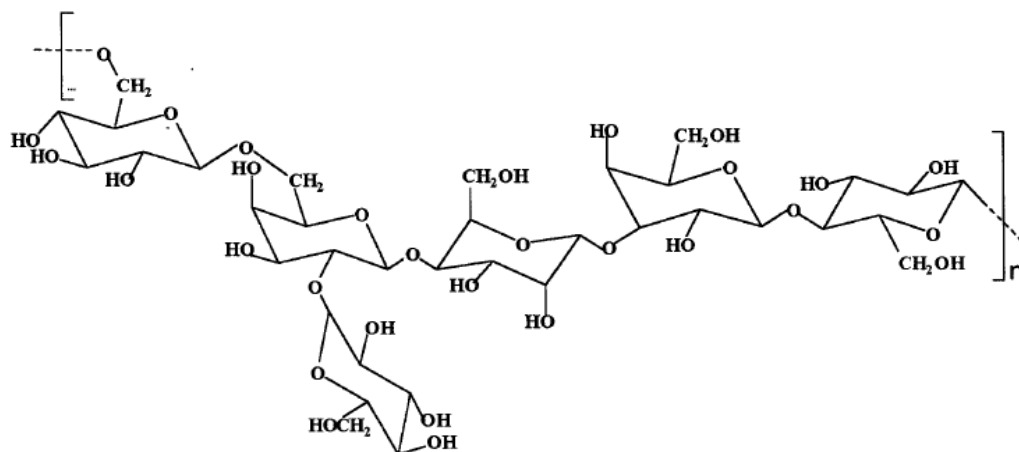
βιομάζας, έπειτα από μόλις λίγες ημέρες ζύμωσης. Η βιομάζα αυτή καλείται μονοκυτταρική πρωτεΐνη (single cell protein) (Αγγελής, 2007).

2.4. Κεφιράνη

Η κεφιράνη είναι ένας υδατοδιαλυτός εξωκυτταρικός πολυσακχαρίτης, που περιέχει περίπου ίσες ποσότητες υπολειμμάτων από D-γλυκόζη, και D-γαλακτόζη. Αυτό το πολυμερές είναι αρκετά ανθεκτικό στην υδρόλυση, αλλά και σε υδατικά διαλύματα που περιέχουν αιθανόλη (Cheirsilp et al., 2001).

Σε επιστημονική βάση, η μοριακή δομή της κεφιράνης δεν είναι πλήρως κατανοητή, καθώς πρόκειται για μια διακλαδισμένη μονάδα εξα-ή επτα-σακχαριδίου. Η μονάδα αυτή αποτελείται από ένα κανονικό πεντασακχαρίτη, στον οποίο τα υπολείμματα σακχάρων είναι τυχαία συνδεδεμένα. Αυτή η σύνδεση του μορίου του πεντασακχαρίτη, μπορεί να είναι ο λόγος για τον οποίο η κεφιράνη είναι ανθεκτική στην ενζυμική προσβολή, στα πεπτικά ένζυμα, και στην γαστρική πέψη (Kooiman, 1968).

Η παραγωγή κεφιράνης από κόκκους κεφίρ σε βιομηχανική κλίμακα είναι μια δύσκολη διαδικασία, η οποία απαιτεί ένα υψηλό οικονομικό κόστος. Πολλές προσπάθειες έχουν γίνει για την απομόνωση βακτηρίων γαλακτικού οξέος, με σκοπό την παραγωγή του εξωπολυσακχαρίτη σε καθαρή μορφή. Διάφορες απομονώσεις έχουν αναφερθεί, και στις οποίες έχουν χρησιμοποιηθεί οι μικροοργανισμοί *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lactobacillus* sp. KPB-167B, *Lactobacillus kefirgranum*, και *Lactobacillus parakefir*. Η χημική δομή της κεφιράνης που εξάγεται από τους κόκκους κεφίρ και από μεμονωμένα είδη λακτοβακίλλων φαίνεται στο Σχήμα 2.2 (Micheli et al., 1999).



Σχήμα 2.2. Η χημική δομή της κεφιράνης (Micheli et al., 1999).

Σε διάφορες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σχετικά με τα οφέλη του κεφίρ στον ανθρώπινο οργανισμό, διατυπώνεται το ερώτημα το κατά πόσο η ευεργετική αυτή δράση, οφείλεται στην κεφιράνη, στους προβιοτικούς μικροοργανισμούς, ή σε άλλες ουσίες που περιέχονται στο κεφίρ. Οπότε, ήταν αναγκαίο, η κεφιράνη να απομονωθεί, και να μελετηθεί ανεξάρτητα από το κεφίρ. Σύμφωνα με διαφορές μελέτες, ποικίλα οφέλη για την υγεία αποδίδονται στην κεφιράνη, όπως η μείωση της αρτηριακής πίεσης, της χοληστερόλης, και του σακχάρου στο αίμα. Επίσης βοηθά στην καταπολέμηση της αθηροσκλήρωσης στον άνθρωπο, όπως και στη μείωση της φλεγμονής των πνευμόνων που προκαλεί το άσθμα. Ακόμη, έχει διαπιστωθεί ότι είναι ένας ισχυρός αντιφλεγμονώδης παράγοντας, που βοηθά στο ανοσοποιητικό σύστημα του ανθρώπου. Τέλος, μελέτες που έγιναν σε πειραματόζωα δείχνουν πως έχει ευεργετικές ιδιότητες, αναστέλλοντας την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων (Shiomi et al., 1982; Maeda et al., 2004).

3. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη των παραγόντων που επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό των κόκκων κεφίρ, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα DW. Οι παράμετροι που μελετήθηκαν ήταν το ποσοστό των κόκκων (1%, 3%, 5%, 7%), η θερμοκρασία επώασης (20°C, 25°C, 30°C) και το ποσοστό λακτόζης στο διάλυμα τυρογάλακτος (5%, 10%). Επίσης, χρησιμοποιήθηκε γάλα μακράς διάρκειας (Ultra High Temperature-UHT) ως υπόστρωμα για τον πολλαπλασιασμό των κόκκων και ακολούθησε σύγκριση των αποτελεσμάτων με αυτά που προέκυψαν από τη χρήση του DW.

4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1. Υλικά

Για την διεξαγωγή του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν κόκκοι κεφίρ οικιακής παραγωγής, σκόνη αποπρωτεϊνομένου τυρογάλακτος (Hellenic Protein S.A., Athens, Greece) (80% λακτόζη, 2% πρωτεΐνη, 1% λίπος και 4,5% υγρασία), καθώς επίσης γάλα UHT με περιεκτικότητα σε λίπος 1,5%.

4.2 Σχεδιασμός πειραματικής διαδικασίας

Στα αρχικά στάδια της μελέτης, πραγματοποιήθηκε η ενεργοποίηση των κόκκων κεφίρ για να αυξηθεί η μεταβολική τους δραστηριότητα αλλά και για να αυξηθεί η μάζα τους σε επαρκή ποσότητα για την έναρξη των πειραμάτων.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν προκαταρκτικά πειράματα, στα οποία οι κόκκοι κεφίρ προσθέτονταν σε DW μέσα σε αποστειρωμένους γυάλινους περιέκτες και επώαζονταν στην επιθυμητή θερμοκρασία για 22 ώρες. Ακολουθούσε μέτρηση της τιμής pH του DW, μέτρηση του βάρους των κόκκων και ρύθμιση της τιμής pH του DW στην αρχική του (με προσθήκη διαλύματος NaOH 5N). Στη συνέχεια το DW μαζί με τους κόκκους τοποθετούνταν πάλι για επώαση. Η διαδικασία αυτή ακολουθήθηκε ακόμη 2 φορές, μετά από 44 και 66 ώρες από την έναρξη της ζύμωσης.

Τα παραπάνω πειράματα επαναλήφθηκαν με τη χρήση δύο εργαστηριακών ζυμωτήρων (Σχήμα 4.1), οι οποίοι διέθεταν σύστημα ανάδευσης με σταθερή ταχύτητα περιστροφής 80 rpm.

Οι διάφορες παράμετροι που μελετήθηκαν ήταν το ποσοστό κόκκων (1%, 3%, 5%, 7%), η θερμοκρασία επώασης (20°C, 25°C, 30°C), το ποσοστό λακτόζης στο διάλυμα

τυρογάλακτος (5%, 10%) και το είδος του υποστρώματος (γάλα UHT και DW). Στο DW συγκέντρωσης σε λακτόζη 5%, τόσο αρχικά όσο και μετά το τέλος της επώασης (μετά από 66 ώρες) προσδιορίστηκε η συγκέντρωση των αναγόντων σακχάρων.

Προκειμένου να βρεθεί η απόδοση σε κεφίρανη που έχουν οι κόκκοι που πολλαπλασιάστηκαν με τη χρήση DW, αλλά και να συγκριθεί με την αντίστοιχη των κόκκων που επώαστηκαν σε γάλα, πραγματοποιήθηκε η απομόνωση του πολυσακχαρίτη από κόκκους κεφίρ και προσδιορίστηκε και η καθαρότητα του (προσδιορισμός της ολικής περιεκτικότητας υδατανθράκων με τη μέθοδο Phenol-Sulfuric).

4.3. Παρασκευή διαλύματος τυρογάλακτος

Παρασκευάστηκαν δείγματα τυρογάλακτος με διαφορετική σύσταση, ως προς τη λακτόζη. Συγκεκριμένα, παρασκευάστηκαν διαλύματα τυρογάλακτος, στα οποία η συγκέντρωση σε λακτόζη ήταν 5% και 10%. Η συγκέντρωση των 5% επιλέχθηκε γιατί σε αυτήν την αναλογία υπάρχει η λακτόζη στο γάλα. Αρχικά, ζυγίστηκε η ανάλογη ποσότητα σκόνης τυρογάλακτος (η οποία υπολογίστηκε βάση της περιεκτικότητας της σκόνης σε λακτόζη) και νερού για την παρασκευή της επιθυμητής συγκέντρωσης λακτόζης στο τελικό διάλυμα. Στη συνέχεια, το νερό τοποθετούνταν σε αποστειρωμένο γυάλινο μπουκαλάκι, το οποίο βρισκόταν πάνω σε μαγνητικό αναδευτήρα και με σταθερό και αργό ρυθμό (υπό συνεχή ανάδευση) προσθέτονταν η σκόνη τυρογάλακτος (για να αποφευχθεί ο σχηματισμός συσσωματωμάτων). Ακολούθησε θερμική επεξεργασία του DW (80°C για 10min), ψύξη αυτού με νερό βρύσης σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και μέτρηση της τιμής pH.

4.4. Πολλαπλασιασμός κόκκων κεφίρ

Για την δραστηριοποίηση των κόκκων, γάλα UHT εμβολιάστηκε με κόκκους κεφίρ σε ποσοστό 3% και επώαστηκε στους 25°C μέχρι τελική τιμή pH περίπου 4.4. Ακολούθησε διαχωρισμός των κόκκων με διήθηση, με τη βοήθεια ηθμού από ανοξείδωτο χάλυβα, στον οποίο κατακρατήθηκαν οι κόκκοι. Για την διαδικασία αυτή αποστειρώνονταν όλα τα σκεύη και γινόταν έκπλυση των κόκκων, αρκετές φορές, με αποστειρωμένο νερό. Οι κόκκοι στη συνέχεια, τοποθετούνταν εκ νέου σε αποστειρωμένα μπουκάλια με UHT γάλα για επώαση. Η δραστηριοποίηση των κόκκων συνεχίστηκε μέχρι ο χρόνος που απαιτούνταν για την επίτευξη της επιθυμητής τιμής pH να είναι περίπου 18-20 ώρες.

Για τον πολλαπλασιασμό των κόκκων, οι δραστηριοποιημένοι κόκκοι κεφίρ προσθέτονταν σε διαφορετικά ποσοστά (1%, 3%, 5% και 7%) στο DW και στη συνέχεια ακολουθούσε η επώαση τους στην επιθυμητή θερμοκρασία (20°C, 25°C και 30°C) για το χρονικό διάστημα που προαναφέρθηκε στην ενότητα 4.2.

4.5. Πολλαπλασιασμός κόκκων κεφίρ με τη χρήση εργαστηριακών ζυμωτήρων

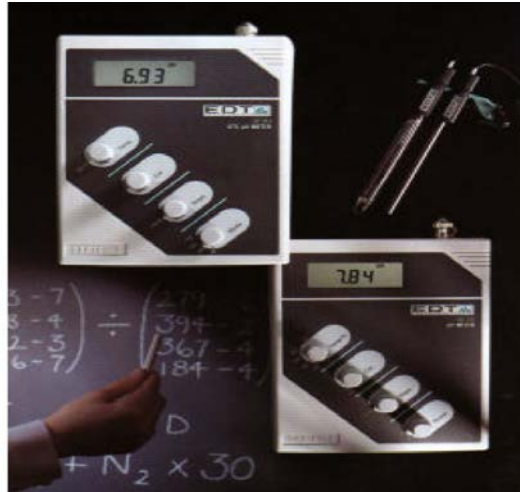
Οι δύο εργαστηριακοί ζυμωτήρες (Σχήμα 4.1) είχαν χωρητικότητα 1 L, ενώ η θερμοκρασία του περιεχομένου τους διατηρούνταν σταθερή με τη βοήθεια κυκλοφορητή, ο οποίος ήταν συνδεδεμένος με εργαστηριακό υδατόλουτρο. Ο περιέκτης των ζυμωτήρων ήταν γυάλινος και αποστειρώνονταν πριν τη χρήση του. Οι κόκκοι μαζί με το DW τοποθετούνταν στους περιέκτες σε διαφορετικά ποσοστά (1%, 3%, 5% και 7%) και στη συνέχεια ακολουθούσε η επώαση τους στην επιθυμητή θερμοκρασία (20°C, 25°C και 30°C) για το χρονικό διάστημα που προαναφέρθηκε στην ενότητα 4.2.



Σχήμα 4.1. Εργαστηριακοί ζυμωτήρες.

4.6. Μέτρηση pH

Το pH των δειγμάτων κεφίρ προσδιορίστηκε με το εργαστηριακό πεχάμετρο EDT Instruments GP353 ATC pH METER (Σχήμα 4.2). Το πεχάμετρο ελέγχεται, και ρυθμίζεται με τη βοήθεια των ρυθμιστικών διαλυμάτων (Buffer 4 και 7). Η θερμοκρασία του πεχαμέτρου προσαρμόζεται στη θερμοκρασία του δείγματος. Το ηλεκτρόδιο του πεχαμέτρου εμβαπτίζεται στο δείγμα του κεφίρ, και σημειώνεται η ένδειξη του οργάνου. Για τη μέτρηση του pH λαμβάνεται ο μέσος όρος δύο μετρήσεων.



Σχήμα 4.2. Εργαστηριακό pH-μετρο.

4.7. Προσδιορισμός των αναγόντων σακχάρων (Μέθοδος Nelson-Somogyi)

Αντιδραστήρια

1. Αντιδραστήριο Α: Διάλυση 12,5g Na_2CO_3 , 12.5g τετραϋδρικό τρυγικό καλιονάτριο, 10g $NaHCO_3$ και 100g Na_2SO_4 σε νερό και αραιώθηκε μέχρι τα 500ml. Αποθήκευση στους 25°C.
2. Αντιδραστήριο Β: Διάλυση 15g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ σε νερό, πρόσθεση μίας σταγόνας H_2SO_4 και αραιώση μέχρι τα 100ml.
3. Αντιδραστήριο Nelson: Ανάμιξη 25ml από το αντιδραστήριο Α και 1ml από το αντιδραστήριο Β.
4. Αρσενομολυβδαινικό αντιδραστήριο: Διάλυση 25g τετραϋδρικό μολυβδαινικό αμμώνιο σε 450ml νερό. Με συνεχή ανάδευση προστέθηκαν 21ml H_2SO_4 με ογκομετρικό κύλινδρο. Διάλυση 3g $Na_2HAsO_4 \cdot 7H_2O$ σε 25ml νερό και πρόσθεση στο προηγούμενο διάλυμα. Μεταφέρθηκε μέσα σε σκουρόχρωμο γυάλινο μπουκάλι και το αφέθηκε στους 37 °C για 24 ώρες. Αποθήκευση προστατευμένο από το φώς.

Διαδικασία

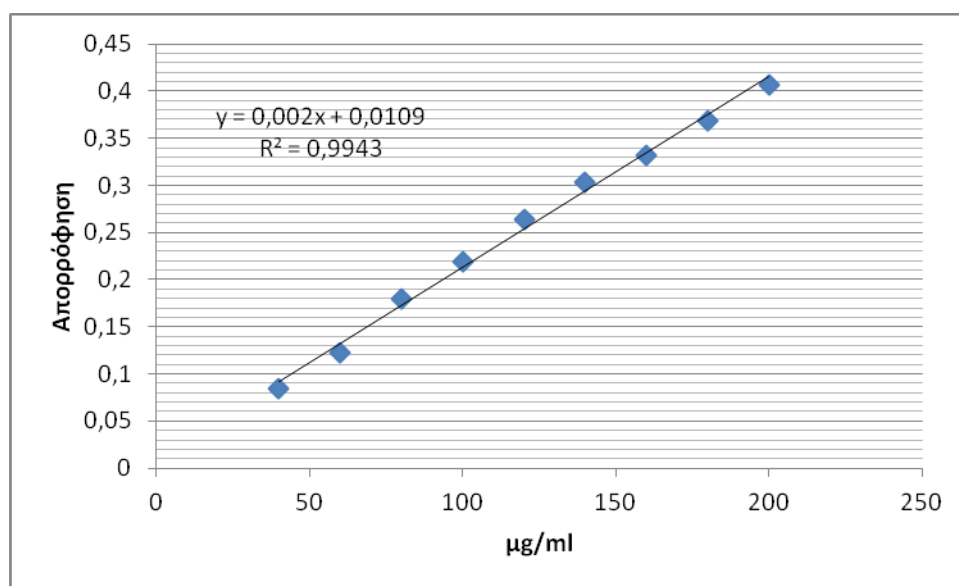
1)Πρότυπο διάλυμα: Διάλυση 200mg καθαρής άνυδρης γλυκόζης σε νερό και αραιώση μέχρι τα 100ml μέσα σε ογκομετρική φιάλη. Με μια προχοίδα έγινε η μεταφορά 1,2,3,4 και 5ml μέσα σε ογκομετρική φιάλη των 50ml. Συμπληρώθηκαν με νερό και ανακινήθηκαν. Τα πρότυπα διαλύματα περιέχουν 40, 80, 120, 160 και 200μg/ml αντίστοιχα.

2)Προσδιορισμός σακχάρων: Πάρθηκαν μια σειρά από πωματισμένους δοκιμαστικούς σωλήνες όπως υποδεικνύεται:

| | 0 | 40μg | 80μg | 120μg | 160μg | 200μg | Άγνωστο |
|-------------------|-----|------|------|-------|-------|-------|---------|
| Νερό | 1ml | - | - | - | - | - | - |
| Πρότυπο | | 1ml | 1ml | 1ml | 1ml | 1ml | - |
| Άγνωστο Δείγμα | - | - | - | - | - | - | 1ml |

Μέσα σε κάθε σωλήνα προστέθηκε 1ml αντιδραστήριο Nelson και ανακινήθηκε χρησιμοποιώντας το Rotamixer. Στη συνέχεια, βυθίστηκαν οι πωματισμένοι σωλήνες σε νερό που βράζει και παρέμειναν για 20min. Έπειτα, ψύχθηκαν, σε τρεχούμενο νερό, για 5min. Μετά προστέθηκε 1ml από το αρσενομολυβδαινικό αντιδραστήριο και ανακινήθηκε στο Rotamixer. Μετά από 3min περίπου, προστέθηκαν ακριβώς 7ml νερό και ανακινήθηκαν μερικές φορές αναστρέφοντας τους σωλήνες. Τέλος, μετρήθηκε η απορρόφηση όλων των δειγμάτων στα 500nm και καταστρώθηκε μία πρότυπη καμπύλη (Απορρόφηση / μg γλυκόζης) (Σχήμα 4.3). Έχοντας την μέτρηση

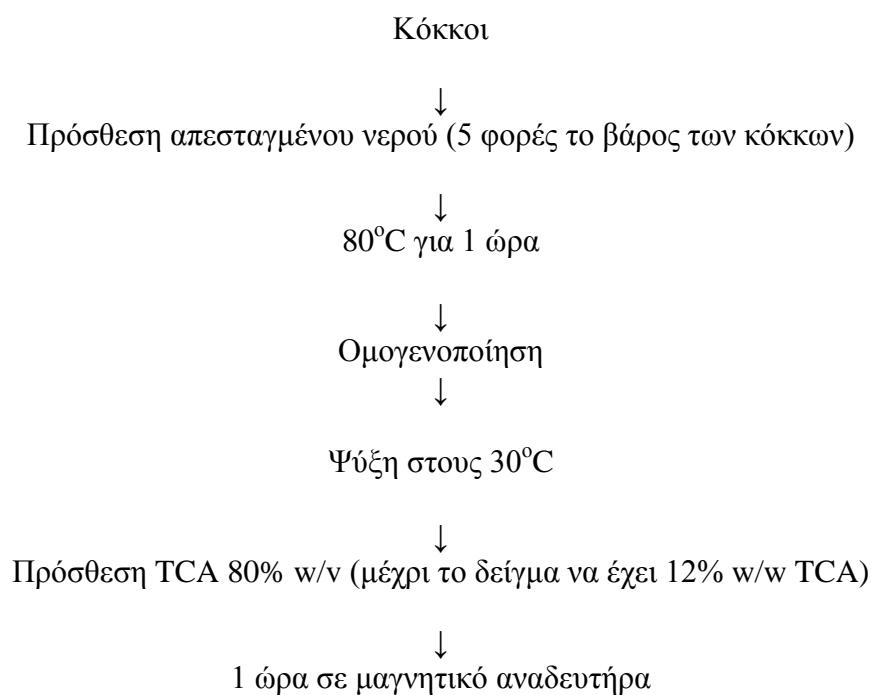
απορρόφησης του αγνώστου δείγματος μπορεί εύκολα να βρεθούν τα μg γλυκόζης που περιέχει (Nelson, 1944).

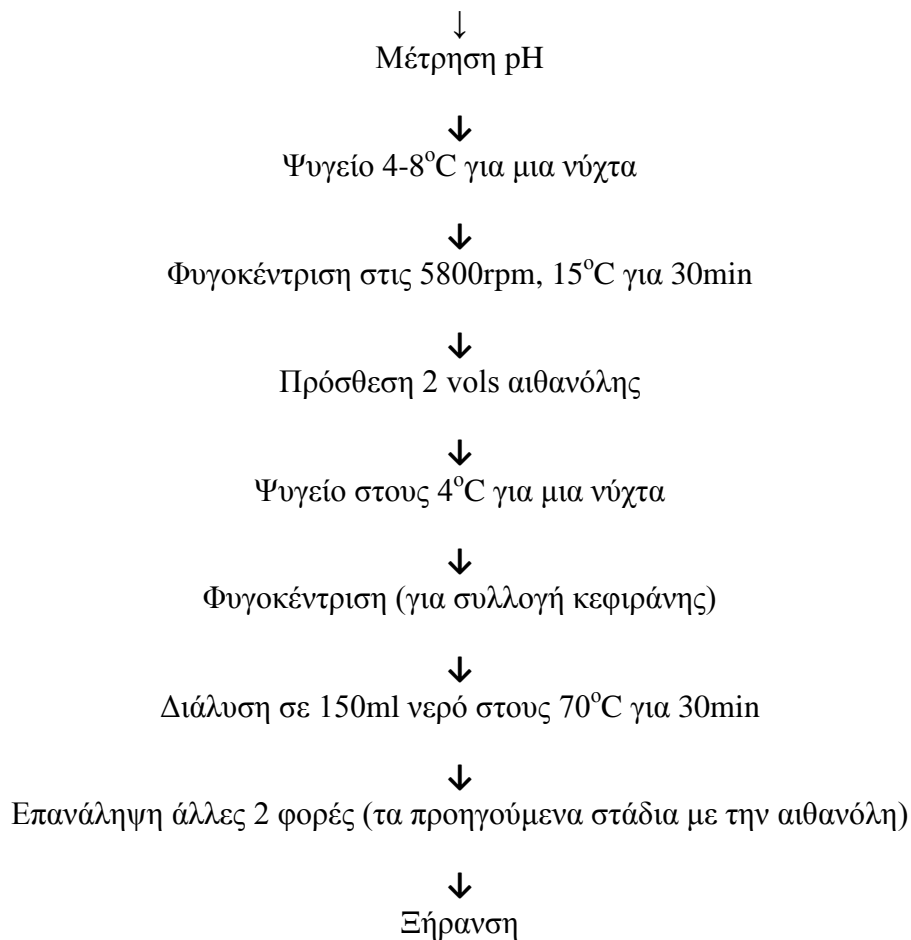


Σχήμα 4.3. Πρότυπη καμπύλη (Μέθοδος Nelson).

4.8. Μέθοδος απομόνωσης κεφειράνης

Για την απομόνωση της κεφειράνης ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα.





4.9. Προσδιορισμός της ολικής περιεκτικότητας υδατανθράκων (Μέθοδος Phenol-Sulfuric)

Αντιδραστήρια

1) Φαινόλη 5% (5g καθαρή φαινόλη σε 100ml νερού)

2) Γλυκόζη

Διαδικασία

Πρότυπο διάλυμα 1: Ζυγίστηκαν 500mg – 0,5mg και διαλύθηκαν σε 500ml νερό.

Μετά πάρθηκαν 10ml και έγινε αραιώση σε ογκομετρική φιάλη (1mg/ml).

Πρότυπο διάλυμα 2: Σε ογκομετρικές φιάλες των 10ml τοποθετήθηκαν τα δείγματα π 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8ml και συμπληρώθηκαν με νερό μέχρι τη χαραγή.

Τεστ φαινόλης – θειικού οξέος

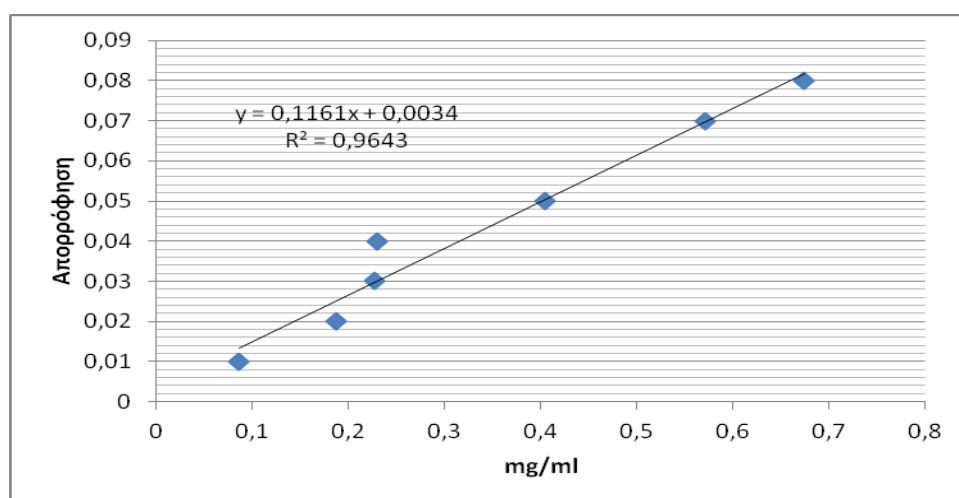
1) Σε 10 πωματισμένους δοκιμαστικούς σωλήνες προστέθηκαν 2ml από κάθε δείγμα γλυκόζης.

2) συμπληρώθηκε 1ml από το διάλυμα φαινόλης 5% και ανακατευτήκαν πολύ προσεκτικά.

3) Στο καθένα από τα δείγματα μας προστέθηκαν 10ml H₂SO₄ πολύ προσεκτικά χωρίς να αγγίζουμε με αυτό, τα τοιχώματα του σωλήνα και ανακατευτήκαν στο Rotamixer.

4) Τοποθετήθηκαν οι δοκιμαστικοί σωλήνες μέσα σε νερό που βράζει για 2min και έπειτα αφέθηκαν να ψυχθούν για 30min.

5) Μετρήθηκε η απορρόφηση στο φασματοφωτόμετρο στα 485nm και κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη (Σχήμα 4.4).



Σχήμα 4.4. Πρότυπη καμπύλη (Μέθοδος Phenol-Sulfuric).

4.10. Στατιστικός ανάλυση

Στα στοιχεία του πειράματος εφαρμόστηκε η ανάλυση της διακύμανσης δύο επιλέξιμων παραγόντων (Two-Way ANOVA). Σε περίπτωση που τα αποτελέσματα της ANOVA εμφάνισαν στατιστική σημαντικότητα του μελετούμενου παράγοντα, εφαρμόστηκε ο έλεγχος των πολλαπλών συγκρίσεων του Tukey ώστε να εντοπιστούν αυτές οι διαφορές (Πετρίδης, 2000). Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων έγινε με τη χρήση του προγράμματος Minitab 16.

5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5.1. Επίδραση του ποσοστού λακτόζης στο διάλυμα τυρογάλακτος

Στους Πίνακες 5.1 και 5.2 φαίνεται το ποσοστό αύξησης των κόκκων και η τιμή pH μετά από 22, 44 και 66 ώρες επώασης, αντίστοιχα, για τις δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις λακτόζης.

Πίνακας 5.1. Ποσοστό αύξησης κόκκων σε σχέση με το χρόνο επώασης για τις δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις λακτόζης

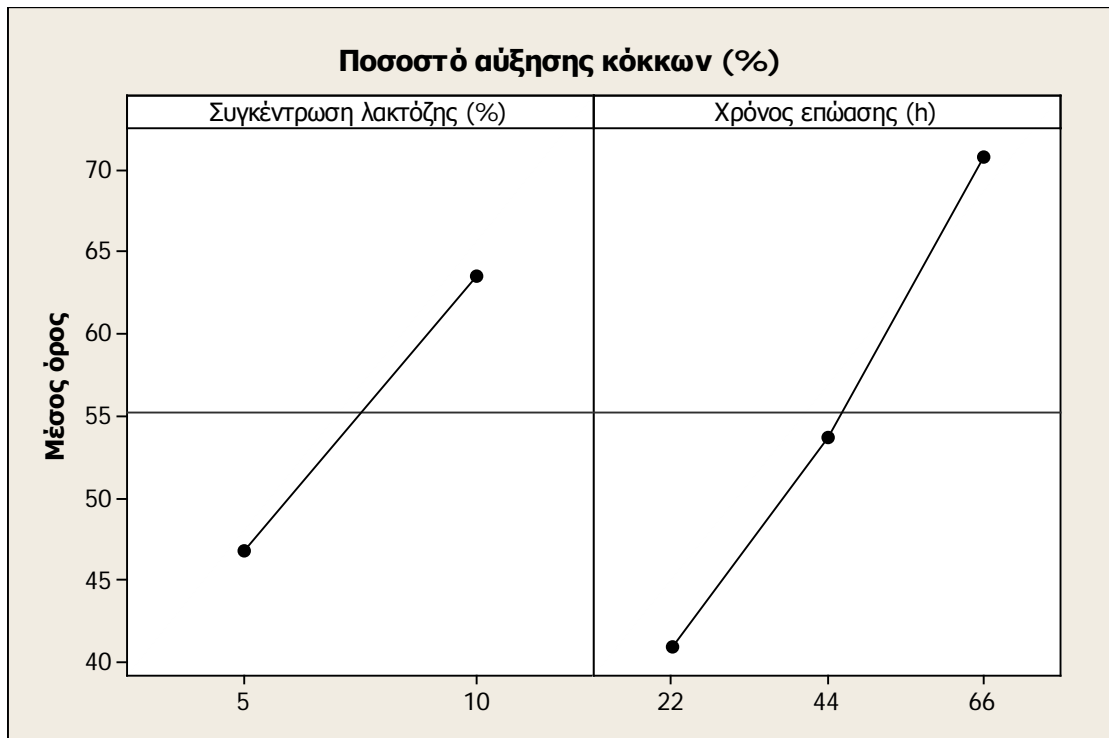
| Χρόνος Επώασης (h) | Συγκέντρωση λακτόζης (%) | |
|-----------------------|-----------------------------|------|
| | 5 | 10 |
| 22 | 30,5 | 51,5 |
| 44 | 46,5 | 61,0 |
| 66 | 63,5 | 78,0 |

Πίνακας 5.2. Τιμή pH στο τέλος της επώασης για τις δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις λακτόζης

| Χρόνος Επώασης (h) | Συγκέντρωση λακτόζης (%) | |
|-----------------------|-----------------------------|------|
| | 5 | 10 |
| 22 | 3,98 | 4,15 |
| 44 | 4,07 | 4,28 |
| 66 | 4,31 | 4,52 |

Η εφαρμογή της ANOVA έδειξε ότι το ποσοστό αύξησης των κόκκων κεφίρ επηρεάζεται στατιστικά σημαντικά τόσο από τη συγκέντρωση της λακτόζης στο υπόστρωμα ($p < 0,05$) όσο και από το χρόνο επώασης ($p < 0,05$) (Παράρτημα). Σύμφωνα με το Σχήμα 5.1 η αύξηση της συγκέντρωσης της λακτόζης είχε ως

αποτέλεσμα την αύξηση του ποσοστού των κόκκων κεφίρ. Η κατάταξη των δειγμάτων σύμφωνα με τον έλεγχο των πολλαπλών συγκρίσεων του Tukey είναι η εξής: $5\% < 10\%$. Η αύξηση της συγκέντρωσης της λακτόζης στο υπόστρωμα οδηγεί σε αύξηση της συγκέντρωσης της γαλακτόζης (η λακτόζη διασπάται από τα ένζυμα των μικροοργανισμών σε γλυκόζη και γαλακτόζη), η οποία σύμφωνα με τους Zajsek et al. (2013) χρησιμοποιείται από τα γαλακτικά βακτήρια για τη βιοσύνθεση της κεφίρανης. Δεδομένου ότι το τυρόγαλα που χρησιμοποιήθηκε ήταν αποπρωτεϊνομένο, η αύξηση του μεγέθους των κόκκων οφείλεται στην εναπόθεση μικροοργανισμών και εξωκυτταρικών πολυσακχαριτών (κεφίρανης) στην επιφάνεια των αρχικών κόκκων. Με την αύξηση επομένως του ποσοστού της παραγόμενης γαλακτόζης, παράγεται μεγαλύτερη ποσότητα κεφίρανης από τους μικροοργανισμούς (κυρίως λακτοβάκιλλους), με αποτέλεσμα να αυξάνεται περισσότερο η μάζα των κόκκων.

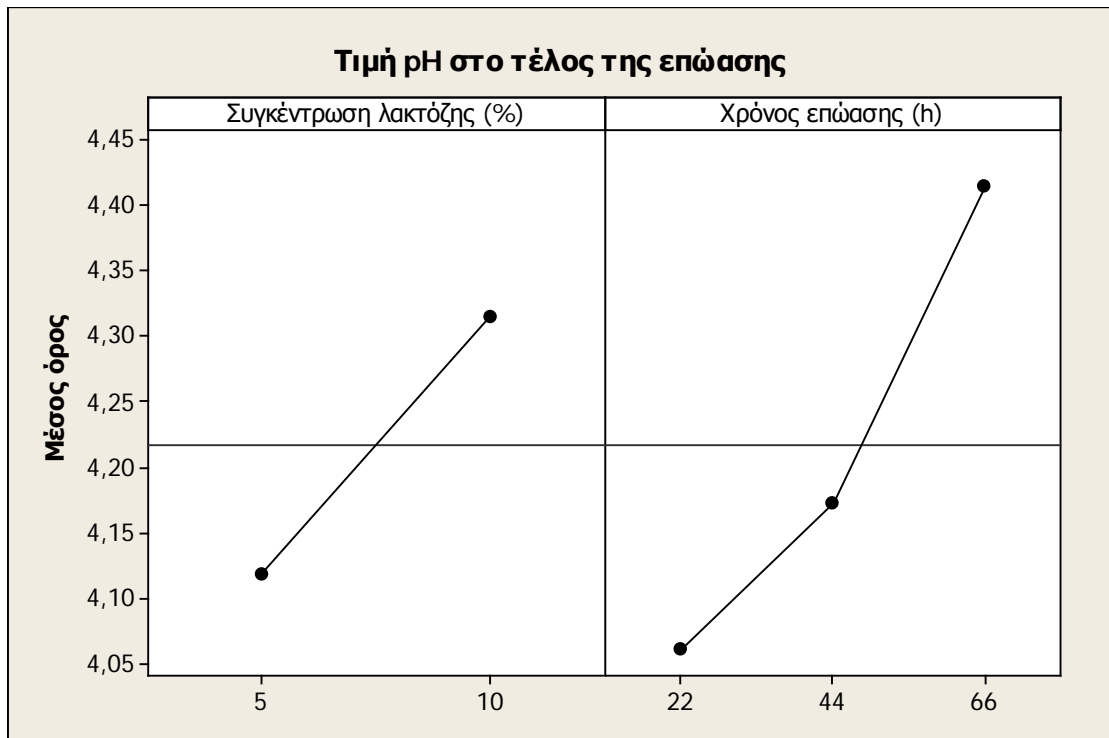


Σχήμα 5.1. Επίδραση της συγκέντρωσης της λακτόζης και του χρόνου επώασης στο ποσοστό αύξησης των κόκκων.

Όσον αφορά τον χρόνο επώασης των δειγμάτων, η αύξηση του προκάλεσε αύξηση του ποσοστού των κόκκων (Σχήμα 5.1). Η κατάταξη των δειγμάτων σύμφωνα με τον έλεγχο των πολλαπλών συγκρίσεων του Tukey είναι η εξής: $22h < 44h < 66h$. Η ρύθμιση του pH στην αρχική τιμή του (6,05 και 5,84 για το DW συγκέντρωσης σε λακτόζη 5% και 10%, αντίστοιχα) είχε ως αποτέλεσμα την έναρξη εκ νέου της ζύμωσης της λακτόζης από τους μικροοργανισμούς. Αυτό οδήγησε σε επιπλέον αύξηση του μεγέθους των κόκκων κεφίρ εξαιτίας της εναπόθεσης επιπλέον ποσότητας μικροοργανισμών και κεφιράνης. Με την έναρξη της ζύμωσης, η λακτόζη διασπάται από τα ένζυμα των μικροοργανισμών σε γλυκόζη και γαλακτόζη. Στη συνέχεια οι μικροοργανισμοί των κόκκων διασπών τη γλυκόζη προς παραγωγή γαλακτικού οξέος. Σε τιμές pH της τάξης του 6,05 και 5,84, οι λακτόκοκκοι είναι αυτοί που διασπών τη γλυκόζη με μεγαλύτερο ρυθμό. Η παραγωγή όμως γαλακτικού οξέος από τους λακτόκοκκους μειώνει το pH του υποστρώματος με αποτέλεσμα να

μειώνεται ο ρυθμός ανάπτυξής τους. Ωστόσο, από τη μείωση του pH ευνοείται η ανάπτυξη των λακτοβακίλλων, οι οποίοι αρχίζουν να αυξάνονται με μεγαλύτερο ρυθμό και να μειώνουν περαιτέρω το pH (Tamine & Robinson, 2007). Με τη ρύθμιση του pH στην αρχική τιμή του, η παραπάνω διεργασία επαναλαμβάνεται με αποτέλεσμα καινούργια ποσότητα μικροοργανισμών να επικάθεται στους κόκκους. Εδώ πρέπει να σημειωθεί ότι η κεφίρανη, η οποία παράγεται από τους λακτοβάκιλλους, αυξάνει περισσότερο τη μάζα των σχηματιζόμενων κόκκων.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ANOVA η τιμή pH στο τέλος της επώασης επηρεάζεται στατιστικά σημαντικά τόσο από τη συγκέντρωση λακτόζης ($p < 0,05$) όσο και από το χρόνο επώασης ($p < 0,05$) (Παράρτημα). Σύμφωνα με το Σχήμα 5.2 η αύξηση της συγκέντρωσης της λακτόζης είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της τιμής του pH. Η κατάταξη των δειγμάτων σύμφωνα με τον έλεγχο των πολλαπλών συγκρίσεων του Tukey είναι η εξής: $5\% < 10\%$. Αυτό μπορεί να αποδοθεί στην υψηλότερη τιμή pH που είχε εξαρχής το DW με συγκέντρωση σε λακτόζη 10 % (6,05) σε σχέση με το DW συγκέντρωσης 5% σε λακτόζη (5,84).



Σχήμα 5.2. Επίδραση της συγκέντρωσης της λακτόζης και του χρόνου επώασης στη τιμή pH στο τέλος της επώασης.

Η τιμή του pH επηρεάζεται και από το χρόνο επώασης. Συγκεκριμένα, αύξηση του χρόνου επώασης των δειγμάτων είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της τιμής του pH στο τέλος της επώασης (Σχήμα 5.2). Η κατάταξη των δειγμάτων σύμφωνα με τον έλεγχο των πολλαπλών συγκρίσεων του Tukey είναι η εξής: $22h < 44h < 66h$. Το ότι η ρύθμιση του pH του υποστρώματος στην αρχική τιμή του δεν οδηγούσε στην ίδια τελική τιμή pH πιθανόν να μπορεί να αποδοθεί σε διατάραξη της δυναμικής κατάστασης συμβίωσης των μικροοργανισμών των κόκκων εξαιτίας των διαδοχικών ζυμώσεων χωρίς προηγουμένως να προηγηθεί ξέπλυμα τους με αποστειρωμένο νερό. Σύμφωνα με την Koroleva (1982), το πλύσιμο των κόκκων μειώνει τον αριθμό των λακτοβακίλλων σε μεγαλύτερο βαθμό από τους λακτόκοκκους. Αυτό σε συνδυασμό με το γεγονός ότι οι μειωμένες τιμές pH αναστέλλουν τη δράση των λακτόκοκκων (οι οποίοι μειώνουν το pH στα αρχικά στάδια της ζύμωσης ώστε να δημιουργηθεί ευνοϊκό περιβάλλον για την ανάπτυξη των λακτοβακίλλων) με αποτέλεσμα να υπερτερούν οι λακτοβάκιλλοι σε

αριθμό, εξηγεί τη σταδιακή αύξηση του pH με τις συνεχιζόμενες ζυμώσεις, κάτι που δε συμβαίνει όταν οι κόκκοι ξεπλυθούν και τοποθετηθούν εκ νέου στο υπόστρωμα.

5.2. Επίδραση του ποσοστού των κόκκων κεφίρ

Στους Πίνακες 5.3 και 5.4 φαίνεται το ποσοστό αύξησης των κόκκων και η τιμή pH μετά από 22, 44 και 66 ώρες επώασης, αντίστοιχα, για τα τέσσερα διαφορετικά ποσοστά εμβολιασμού των κόκκων στο DW.

Πίνακας 5.3. Ποσοστό αύξησης κόκκων σε σχέση με το χρόνο επώασης για τα τέσσερα διαφορετικά ποσοστά εμβολιασμού των κόκκων στο DW

| Χρόνος Επώασης (h) | Ποσοστό εμβολιασμού κόκκων (%) | | | |
|--------------------------|-----------------------------------|------|------|------|
| | 1 | 3 | 5 | 7 |
| 22 | 47,5 | 25,6 | 23,5 | 15,0 |
| 44 | 59,0 | 34,0 | 25,0 | 16,5 |
| 66 | 80,5 | 45,0 | 29,0 | 22,1 |

Πίνακας 5.4. Τιμή pH στο τέλος της επώασης για τα τέσσερα διαφορετικά ποσοστά εμβολιασμού των κόκκων στο DW

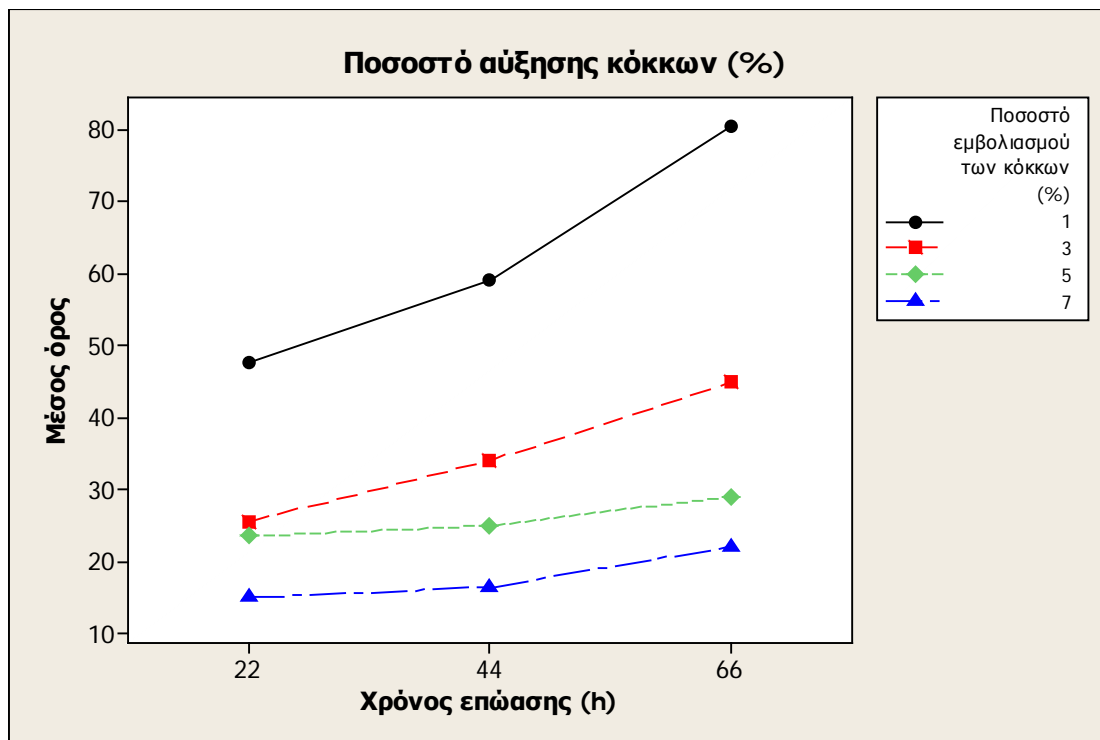
| Χρόνος Επώασης (h) | Ποσοστό εμβολιασμού κόκκων (%) | | | |
|--------------------------|-----------------------------------|------|------|------|
| | 1 | 3 | 5 | 7 |
| 22 | 4,33 | 3,75 | 3,57 | 3,47 |
| 44 | 4,45 | 4,11 | 4,01 | 3,95 |
| 66 | 4,51 | 4,31 | 4,25 | 4,18 |

Το ποσοστό αύξησης των κόκκων κεφίρ, σύμφωνα με την εφαρμογή της ANOVA, έδειξε ότι επηρεάζεται στατιστικά σημαντικά από το ποσοστό εμβολιασμού των κόκκων ($p < 0,05$) από το χρόνο επώασης ($p < 0,05$), αλλά και από την αλληλεπίδρασή

τους ($p < 0,05$) (Παράρτημα). Σύμφωνα με το Σχήμα 5.3 η αύξηση του ποσοστού εμβολιασμού των κόκκων είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση του ποσοστού των κόκκων κεφίρ. Η κατάταξη των δειγμάτων σύμφωνα με τον έλεγχο των πολλαπλών συγκρίσεων του Tukey είναι η εξής: $7\% < 5\% < 3\% < 1\%$. Σύμφωνα με την Koroleva (1982), η αύξηση του ποσοστού των κόκκων οδηγεί σε μείωση του χρόνου επώασης εξαιτίας της γρήγορης παραγωγής γαλακτικού οξέος, γεγονός το οποίο οδηγεί σε μειωμένο πληθυσμό λακτόκοκκων και ζυμών. Επιπλέον, η παρουσία των ζυμών στο πολύπλοκο σύστημα της μικροχλωρίδας των κόκκων κεφίρ είναι σημαντική γιατί προάγει τη σχέση συμβίωσης της. Η μείωση του αριθμού ζυμών, με την αύξηση του ποσοστού των κόκκων, διαταράσσει τη συμβιωτική σχέση των μικροοργανισμών με αποτέλεσμα να μειώνεται ο πληθυσμός τους και πιθανόν και η παραγωγή της κεφίρανης. Όλα τα ανωτέρω συμβάλουν στη μείωση του ποσοστού αύξησης των κόκκων κεφίρ.

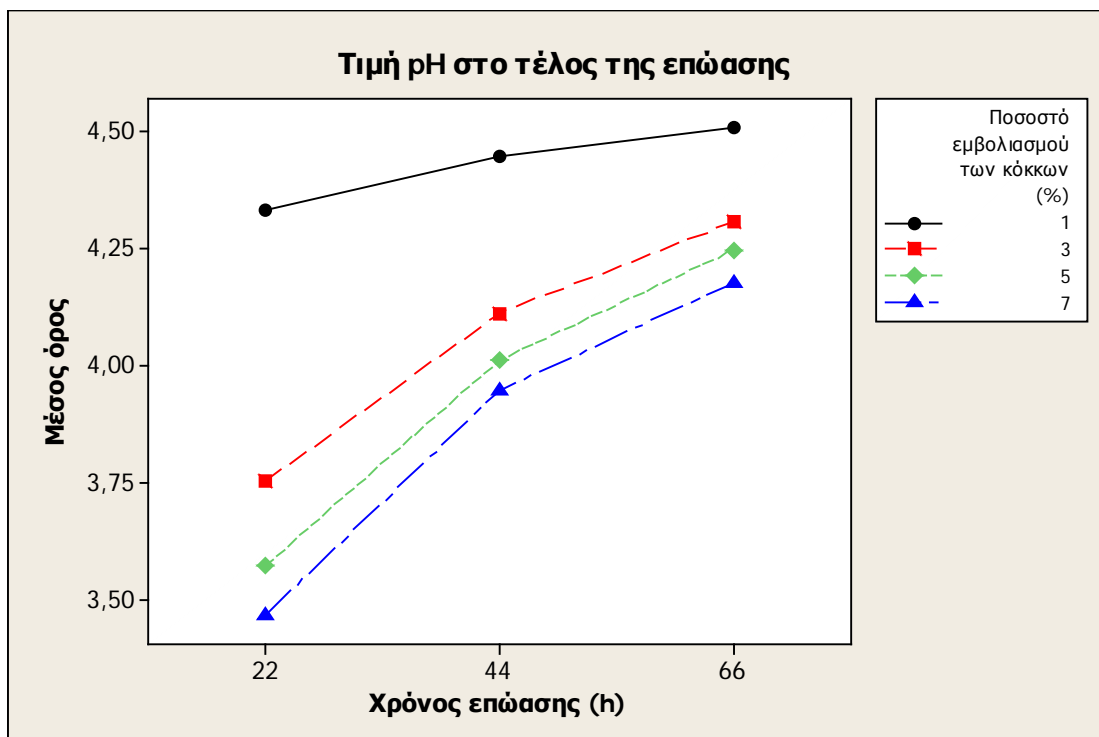
Όσον αφορά τον χρόνο επώασης των δειγμάτων, η αύξηση του προκαλεί αύξηση του ποσοστού των κόκκων (Σχήμα 5.3), γεγονός το οποίο οφείλεται στην εκ νέου έναρξη της ζύμωσης της λακτόζης από τους μικροοργανισμούς με τη ρύθμιση του pH στην αρχική τιμή του, όπως προαναφέρθηκε. Η κατάταξη των δειγμάτων σύμφωνα με τον έλεγχο των πολλαπλών συγκρίσεων του Tukey είναι η εξής: $22h < 44h < 66h$. Ωστόσο, αξιοσημείωτη είναι η αλληλεπίδραση μεταξύ του ποσοστού εμβολιασμού των κόκκων και του χρόνου επώασης. Η μάζα των κόκκων κεφίρ αυξάνεται σημαντικά σε σχέση με το χρόνο επώασης σε ποσοστό εμβολιασμού 1%. Η αύξηση είναι λιγότερο έντονη σε ποσοστό 3%, ενώ σε ποσοστό 5% και 7% είναι πολύ μικρή. Η διατάραξη της δυναμικής κατάστασης συμβίωσης των μικροοργανισμών των κόκκων εξαιτίας των διαδοχικών ζυμώσεων χωρίς προηγουμένως να προηγηθεί ξέπλυμα τους με αποστειρωμένο νερό γίνεται περισσότερο έντονη όταν αυξάνεται το

ποσοστό εμβολιασμού των κόκκων (εξαιτίας της μείωσης του πληθυσμού λακτόκοκκων και ζυμών).



Σχήμα 5.3. Επίδραση του ποσοστού εμβολιασμού των κόκκων και του χρόνου επώασης στο ποσοστό αύξησης των κόκκων.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ANOVA, η τιμή pH στο τέλος της επώασης επηρεάζεται στατιστικά σημαντικά από το ποσοστό εμβολιασμού των κόκκων ($p < 0,05$) από το χρόνο επώασης ($p < 0,05$), αλλά και από την αλληλοεπίδραση τους ($p < 0,05$) (Παράρτημα). Σύμφωνα με το Σχήμα 5.4, οι διαδοχικές ζυμώσεις έχουν ως αποτέλεσμα την μεγαλύτερη αύξηση της τιμής pH (μετά το τέλος του χρόνου επώασης) όταν χρησιμοποιείται ποσοστό εμβολιασμού κόκκων μεγαλύτερο από 3%. Και σε αυτήν την περίπτωση αυτό μπορεί να αποδοθεί σε διατάραξη της δυναμικής της σχέσης συμβίωσης των μικροοργανισμών, η οποία είναι πιο έντονη σε μεγάλα ποσοστά εμβολιασμού κόκκων.



Σχήμα 5.4. Επίδραση του ποσοστού εμβολιασμού των κόκκων και του χρόνου επώασης στη τιμή pH στο τέλος της επώασης.

5.3. Επίδραση της θερμοκρασίας επώασης

Το ποσοστό αύξησης των κόκκων και η τιμή pH μετά από 22, 44 και 66 ώρες επώασης, αντίστοιχα, στις τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες επώασης φαίνονται στους Πίνακες 5.5 και 5.6.

Η εφαρμογή της ANOVA έδειξε ότι το ποσοστό αύξησης των κόκκων κεφίρ επηρεάζεται στατιστικά σημαντικά από τη θερμοκρασία επώασης ($p < 0,05$) από το χρόνο επώασης ($p < 0,05$) αλλά και από την αλληλεπίδρασή τους ($p < 0,05$) (Παράρτημα), όπως φαίνεται στο Σχήμα 5.5. Το μεγαλύτερο ποσοστό αύξησης κόκκων παρουσιάστηκε στους 25°C και το μικρότερο στους 30°C. Η κατάταξη των δειγμάτων, κατά αύξουσα σειρά, σύμφωνα με τον έλεγχο των πολλαπλών συγκρίσεων του Tukey είναι η εξής: 30°C < 20°C < 25°C. Όσον αφορά τον χρόνο

επώασης των δειγμάτων, η αύξηση του, προκαλεί αύξηση του ποσοστού των κόκκων (Σχήμα 5.5). Η κατάταξη των δειγμάτων σύμφωνα με τον έλεγχο των πολλαπλών συγκρίσεων του Tukey είναι η εξής: 22h < 44h < 66h. Ωστόσο, αξιοσημείωτη είναι η αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο παραγόντων. Ο μεγαλύτερος ρυθμός αύξησης κόκκων σε σχέση με το χρόνο επώασης εμφανίστηκε στους 20°C. Σύμφωνα με την Koroleva (1982) επώαση σε υψηλές θερμοκρασίες (25-27°C) οδηγεί σε μείωση του ρυθμού ανάπτυξης των λακτόκοκκων και των ζυμών, κάτι το οποίο δε συμβαίνει όταν η επώαση πραγματοποιείται σε χαμηλότερες θερμοκρασίες (20-22°C). Η αύξηση του αριθμού των συγκεκριμένων μικροοργανισμών συντελεί σε αύξηση της μάζας των κόκκων. Η μεγαλύτερη αύξηση του ποσοστού των κόκκων που εμφανίστηκε στους 25°C συνδέεται με την αυξημένη παραγωγή κεφίράνης, η οποία αυξάνει τη μάζα των κόκκων. Οι Zajsek et al. (2013) αναφέρουν ότι σε αυτήν την θερμοκρασία η ποσότητα της κεφίράνης που παράγεται από τους μικροοργανισμούς και παραμένει στην βιομάζα των κόκκων είναι η μέγιστη.

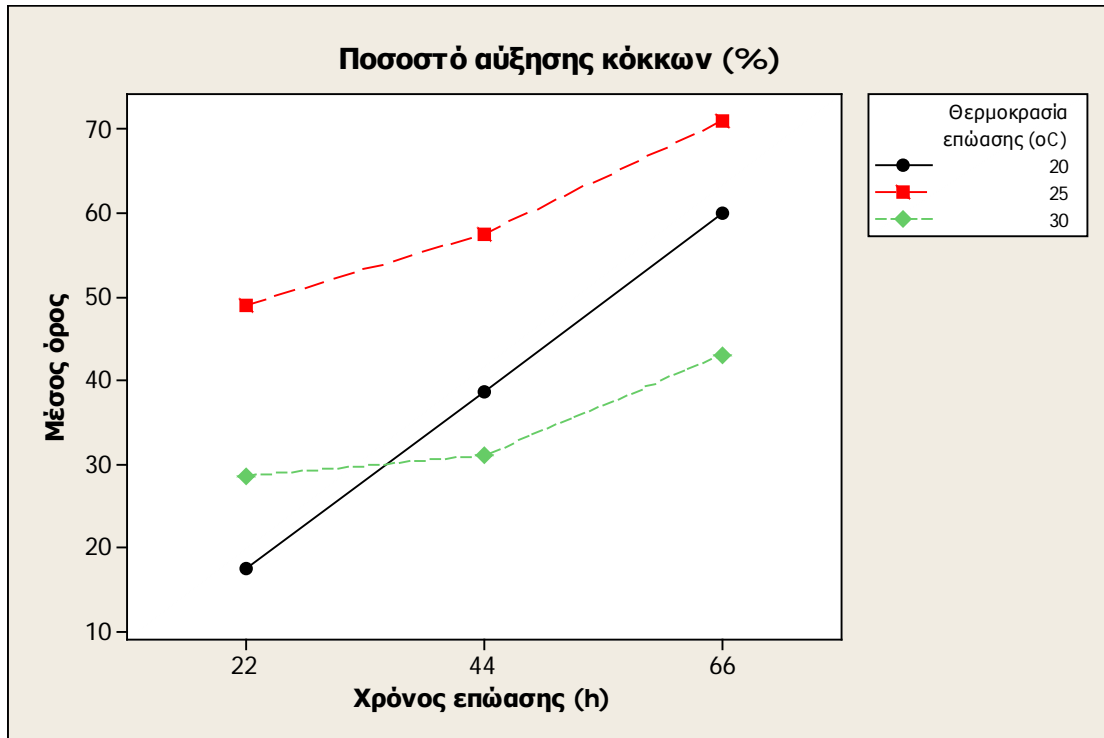
Πίνακας 5.5. Ποσοστό αύξησης κόκκων σε σχέση με το χρόνο επώασης στις τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες επώασης

| Χρόνος Επώασης (h) | Θερμοκρασία επώασης (°C) | | |
|--------------------|--------------------------|------|------|
| | 20 | 25 | 30 |
| 22 | 17,5 | 49,0 | 28,5 |
| 44 | 38,5 | 57,5 | 31,0 |
| 66 | 60,0 | 71,0 | 43,0 |

Πίνακας 5.6. Τιμή pH στο τέλος της επώασης στις τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες επώασης

| | Θερμοκρασία επώασης |
|--|---------------------|
|--|---------------------|

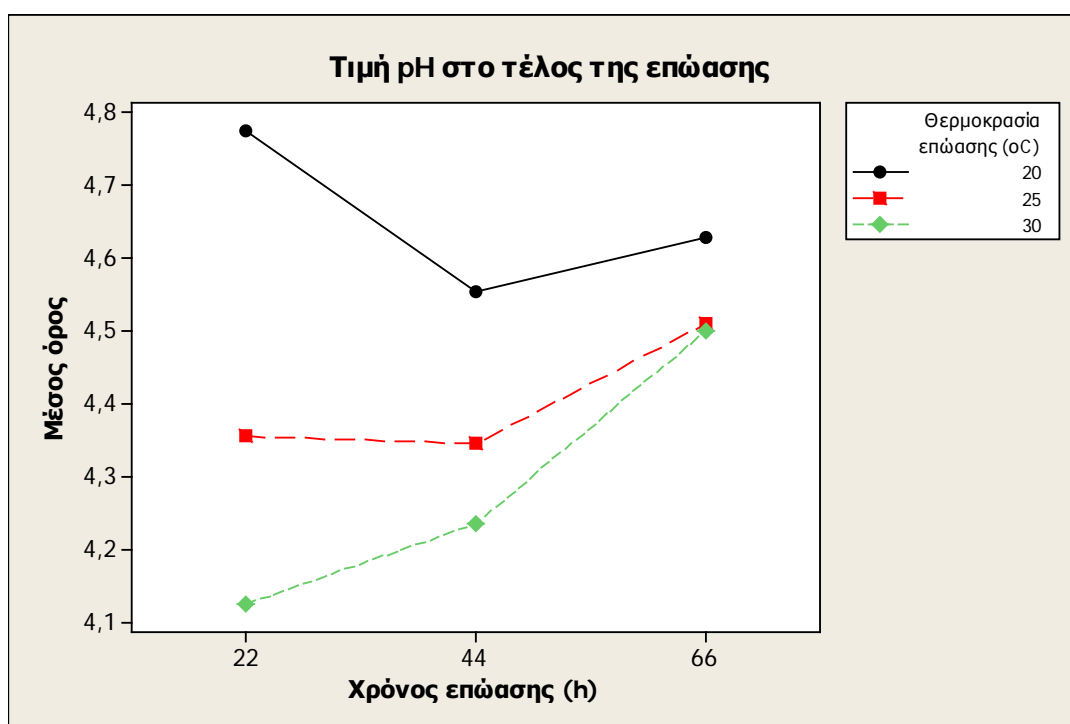
| Χρόνος Επώασης (h) | ($^{\circ}\text{C}$) | | |
|--------------------|------------------------|------|------|
| | 20 | 25 | 30 |
| 22 | 4,78 | 4,36 | 4,13 |
| 44 | 4,56 | 4,35 | 4,24 |
| 66 | 4,63 | 4,51 | 4,50 |



Σχήμα 5.5. Επίδραση της θερμοκρασίας επώασης και του χρόνου επώασης στο ποσοστό αύξησης των κόκκων.

Η τιμή pH στο τέλος της επώασης, σύμφωνα με την εφαρμογή της ANOVA, επηρεάζεται στατιστικά σημαντικά από τη θερμοκρασία επώασης ($p < 0,05$) από το χρόνο επώασης ($p < 0,05$), αλλά και από την αλληλεπίδρασή τους ($p < 0,05$) (Παράρτημα). Όσον αφορά τη θερμοκρασία επώασης, η κατάταξη των δειγμάτων σύμφωνα με τον έλεγχο των πολλαπλών συγκρίσεων του Tukey είναι η εξής: $30^{\circ}\text{C} < 25^{\circ}\text{C} < 20^{\circ}\text{C}$ (Σχήμα 5.6). Η αύξηση της θερμοκρασίας επώασης αυξάνει τη μεταβολική δραστηριότητα των θερμοφίλων λακτοβάκιλλων, οι οποίοι μειώνουν περισσότερο την τελική τιμή pH στο υπόστρωμα. Η τιμή του pH επηρεάζεται και από

το χρόνο επώασης. Συγκεκριμένα, αύξηση του χρόνου επώασης των δειγμάτων έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της τιμής του pH στο τέλος της επώασης (Σχήμα 5.6). Η κατάταξη των δειγμάτων σύμφωνα με τον έλεγχο των πολλαπλών συγκρίσεων του Tukey είναι η εξής: $22h = 44h < 66h$. Σύμφωνα με το Σχήμα 5.6 αξιοσημείωτη είναι η μείωση του pH με την αύξηση του χρόνου επώασης από τις 22 στις 44 ώρες όταν η θερμοκρασία επώασης είναι 20°C. Ωστόσο περαιτέρω αύξηση του χρόνου επώασης στις 66 ώρες προκαλεί αύξηση της τιμής του pH, όπως παρατηρούνταν μέχρι τώρα σε όλες τις συνθήκες επώασης. Αυτό πιθανόν να μπορεί να αποδοθεί στη μειωμένη μεταβολική δραστηριότητα των θερμοφίλων λακτοβάκιλλων, οι οποίοι δεν μειώνουν την τιμή του pH σε χαμηλά επίπεδα κατά τις πρώτες 22 ώρες, κάτι το οποίο συμβαίνει με την αύξηση του χρόνου επώασης.



Σχήμα 5.6. Επίδραση της θερμοκρασίας επώασης και του χρόνου επώασης στη τιμή pH στο τέλος της επώασης.

5.4. Επίδραση του είδους του υποστρώματος

Στους Πίνακες 5.7 και 5.8 φαίνεται το ποσοστό αύξησης των κόκκων και η τιμή pH μετά από 22, 44 και 66 ώρες επώασης, αντίστοιχα, στα δύο διαφορετικά υποστρώματα (γάλα UHT και DW).

Πίνακας 5.7. Ποσοστό αύξησης κόκκων σε σχέση με το χρόνο επώασης στα δύο διαφορετικά υποστρώματα (γάλα μακράς διάρκειας-UHT και DW)

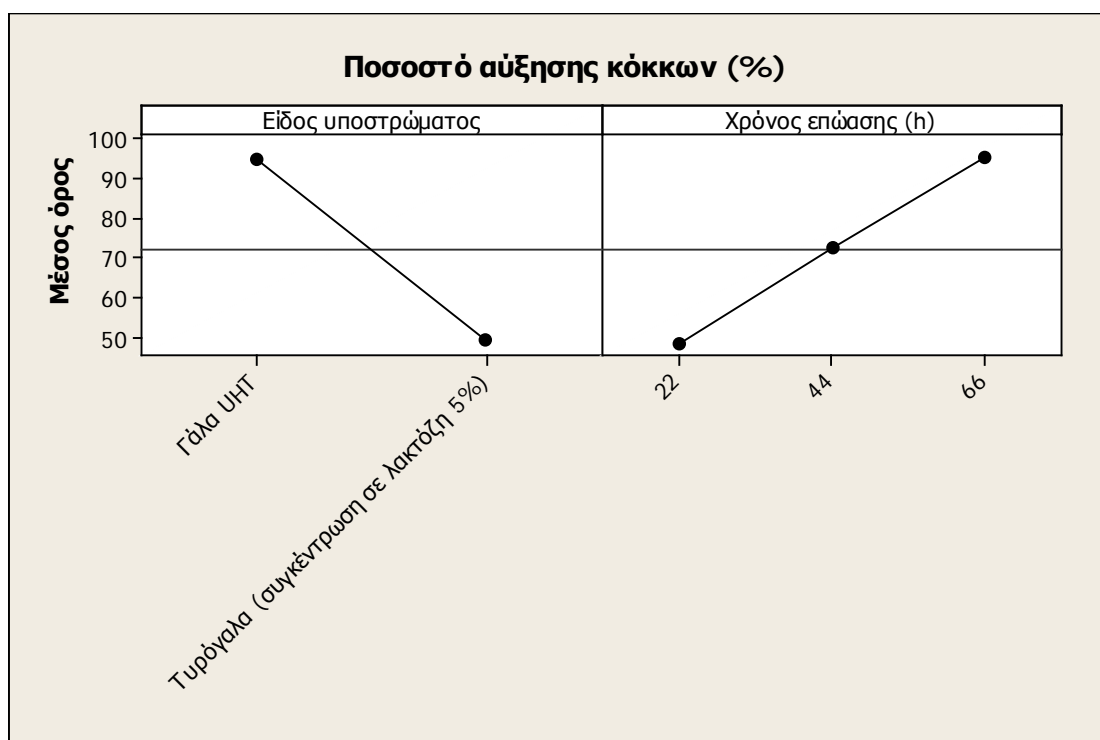
| Χρόνος Επώασης (h) | Είδος υποστρώματος | |
|-----------------------|--------------------|--------------------------------------|
| | Γάλα UHT | Τυρόγαλα (συγκέντρωση σε λακτόζη 5%) |
| 22 | 64,0 | 32,5 |
| 44 | 96,5 | 48,5 |
| 66 | 124,0 | 67,0 |

Πίνακας 5.8. Τιμή pH στο τέλος της επώασης στα δύο διαφορετικά υποστρώματα (γάλα μακράς διάρκειας-UHT και DW)

| Χρόνος Επώασης (h) | Είδος υποστρώματος | |
|-----------------------|--------------------|--------------------------------------|
| | Γάλα UHT | Τυρόγαλα (συγκέντρωση σε λακτόζη 5%) |
| 22 | 4,61 | 3,97 |
| 44 | 4,22 | 4,13 |
| 66 | 4,21 | 4,41 |

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ANOVA το ποσοστό αύξησης των κόκκων κεφίρ επηρεάζεται στατιστικά σημαντικά τόσο από το είδος υποστρώματος ($p < 0,05$) όσο και από το χρόνο επώασης ($p < 0,05$) (Παράρτημα). Σύμφωνα με το Σχήμα 5.7 αλλά και τον έλεγχο των πολλαπλών συγκρίσεων του Tukey, η αύξηση του ποσοστού των κόκκων είναι μεγαλύτερη όταν χρησιμοποιείται γάλα UHT. Αυτό οφείλεται στο ότι οι πρωτεΐνες του γάλακτος κατά τη διάρκεια της επώασης επικάθονται στην επιφάνεια των κόκκων αυξάνοντας κατά πολύ περισσότερο τη μάζα τους.

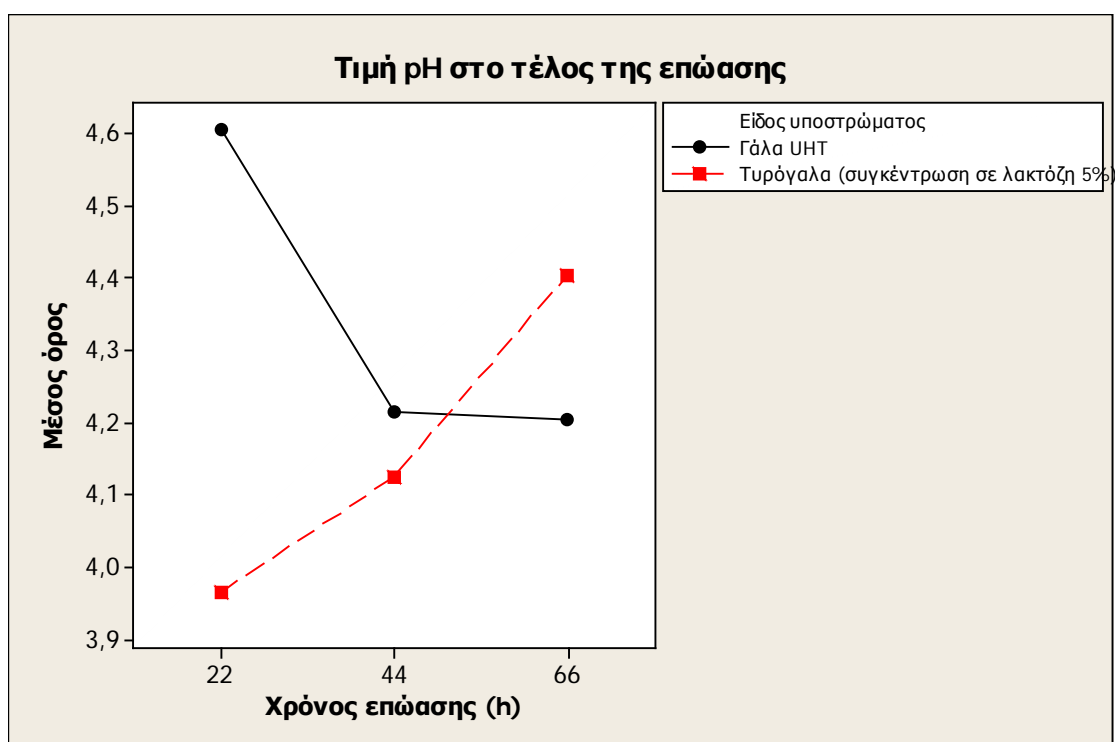
Όσον αφορά τον χρόνο επώασης των δειγμάτων, η αύξηση του, προκαλεί αύξηση του ποσοστού των κόκκων (Σχήμα 5.7), όπως έχει ήδη σχολαστεί παραπάνω. Η κατάταξη των δειγμάτων σύμφωνα με τον έλεγχο των πολλαπλών συγκρίσεων του Tukey είναι η εξής: 22h < 44h < 66h.



Σχήμα 5.7. Επίδραση του είδους του υποστρώματος και του χρόνου επώασης στο ποσοστό αύξησης των κόκκων.

Η τιμή pH στο τέλος της επώασης, σύμφωνα με την εφαρμογή της ANOVA, επηρεάζεται στατιστικά σημαντικά από το είδος του υποστρώματος ($p < 0,05$) από το χρόνο επώασης ($p < 0,05$), αλλά και από την αλληλεπίδρασή τους ($p < 0,05$) (Παράρτημα). Σύμφωνα με το Σχήμα 5.8, το τυρόγαλα (συγκέντρωση σε λακτόζη 5%) εμφάνισε πολύ μικρότερη τιμή pH κατά τις πρώτες 22 ώρες επώασης σε σχέση με το γάλα. Αυτό μπορεί να αποδοθεί στην μεγαλύτερη αρχική τιμή pH του γάλακτος (6,67). Ωστόσο με την αύξηση του χρόνου επώασης από τις 22 στις 44 ώρες, το pH

του γάλακτος μειώνεται ακόμη περισσότερο (σε αντίθεση με ότι συμβαίνει στο DW). Αυτό πιθανόν να μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι η ανάπτυξη των λακτοβάκιλλων δεν διαταράσσει τη δυναμική κατάσταση συμβίωσης των κόκκων παρά μόνο όταν το pH μειωθεί σε σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα. Γεγονός το οποίο συμβαίνει με την αύξηση του χρόνου επώασης χωρίς να πραγματοποιηθεί έκπλυση των κόκκων με απεσταγμένο νερό.



Σχήμα 5.8. Επίδραση του είδους του υποστρώματος και του χρόνου επώασης στη τιμή pH στο τέλος της επώασης.

Από τον προσδιορισμό των αναγόντων υδατανθράκων στο αρχικό διάλυμα DW (49,65 mg/ml) και στο τελικό μετά την επώαση (38,8 mg/ml), παρατηρήθηκε μείωση των τιμών τους γεγονός, το οποίο σημαίνει ότι υπήρχε κατανάλωση του

υποστρώματος από τους μικροοργανισμούς. Ωστόσο, ποσότητα υδατανθράκων παρέμενε στο υπόστρωμα χωρίς να αξιοποιηθεί από τους μικροοργανισμούς.

Από την απομόνωση της κεφिरάνης από τους κόκκους διαφορετικής προέλευσης (πολλαπλασιασμός σε γάλα UHT και σε DW) προέκυψε ότι η χρησιμοποίηση DW οδήγησε σε αύξηση της απόδοσης της κεφिरάνης (5,34%) σε σχέση με τη χρήση του γάλακτος UHT ως υπόστρωμα (3,96%). Και στις δύο περιπτώσεις, η καθαρότητα της κεφिरάνης (προσδιορισμός της ολικής περιεκτικότητας υδατανθράκων με τη μέθοδο Phenol-Sulfuric) ήταν η ίδια (99,6%).

6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η αύξηση της συγκέντρωσης της λακτόζης στο υπόστρωμα είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του ποσοστού των κόκκων κεφίρ. Η αύξηση του ποσοστού εμβολιασμού είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση του ποσοστού αύξησης των κόκκων. Η μεγαλύτερη αύξηση της μάζας των κόκκων παρουσιάστηκε σε ποσοστό εμβολιασμού 1%. Η βέλτιστη θερμοκρασία για την αύξηση του ποσοστού των κόκκων ήταν 25°C, ενώ η μικρότερη αύξηση αυτών παρουσιάστηκε στους 30°C. Το ποσοστό αύξησης των κόκκων ήταν μεγαλύτερο όταν χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα γάλα UHT.

Η αύξηση του χρόνου επώασης είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του ποσοστού των κόκκων κεφίρ.

Οι διαδοχικές ζυμώσεις (με ρύθμιση της τιμής pH στην αρχική τιμή του) προκάλεσαν την αύξηση της τελικής τιμής pH μετά το τέλος του προβλεπόμενου χρόνου επώασης (22, 44 και 66 ώρες). Ωστόσο, η επώαση σε χαμηλή θερμοκρασία (20°C) αλλά και η χρησιμοποίηση γάλακτος UHT ως υπόστρωμα είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση του pH με την αύξηση του χρόνου επώασης από τις 22 στις 44 ώρες.

Η απόδοση σε κεφίρανη είναι μεγαλύτερη όταν οι κόκκοι έχουν πολλαπλασιαστεί σε DW.

7. ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ

Μελέτη της επίδραση της τιμής pH στο ποσοστό αύξησης των κόκκων και στην παραγωγή κεφίρανης

Μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας επώασης, του ποσοστού αύξησης κόκκων και της συγκέντρωσης του υποστρώματος σε λακτόζη στην παραγωγή κεφίρανης

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

A. Ξένη Βιβλιογραφία

Arihana, K., Toba, T. & Adachi, S. (1990). Immunofluorescence microscopic studies on distribution of *L. kefiranofaciens* and *L. kefir* in kefir grains. *International Journal Food Microbiology*, **11**, 127-34.

Cheirsilp, B., Shimizu, H. & Shioya, S. (2003). Enhanced kefir production by mixed culture of *Lactobacillus kefiranofaciens* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biotechnology*, **100**, 43-53.

Clementi, F., Gobbetti, M. & Rossi, J. (1989). Carbon dioxide synthesis by immobilized yeast cells in kefir production. *Milchwissenschaft*, **44**, 70-74.

Farnworth, E. R. (2005). Kefir—a complex probiotic. *Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods*, **2**, 1-17.

Garrote, G., Abraham, A. & De Antoni, G. (1996). Preservation of Kefir Grains, a Comparative Study. *LWT- Food Science and Technology*, **30**, 77–84.

Guimarães, P.M.R., Teixeira, J.A. & Domingues, L. (2010). Fermentation of lactose to bioethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorization of cheese whey. *Biotechnology Advances*, **28**, 375-384.

Guzel-Seydim, Z., Kok-Tas, T., Ertekin-Filiz, B. & Seydim, A. C. (2011). Effect of different growth conditions on biomass increase in kefir grains. *Journal of Dairy Science*, **94**, 1239-1242.

Halle C., Leroil, F., Dousset X. & Pidoux, M. (1994). Les kefirs: des associations bacteries lactiques-levures. In De H. Roissart, and F. M. Luquet (Eds), *Bacteries lactiques: Aspects fondamentaux et technologiques, Vol. 2* (pp. 169-182). Uriage, France, Loriga.

Jelen, P. (2002). Whey Processing. In: Encyclopedia of dairy science, *Utilization and Products*, (pp 2739-2745). Elsevier Science Ltd., Alberta.

Kooiman, P. (1968). The chemical structure of kefirin, the water-soluble polysaccharide of the kefir grain. *Carbohydrate Research*, **7**, 200-211.

Koroleva, N. S. (1982). Special products (kefir, koumis, etc.). *International Dairy Congress Moscow*, **2**, 146-152.

Koroleva, N. S. (1988). Technology of kefir and koumis. *Bulletin of the International Dairy Federation*, **227**, 96-100.

Kwak, H. S., Park, S. K. & Kim, D. S. (1996). Biostabilization of kefir with a nonlactose-fermenting yeast. *Journal of Dairy Science*, **79**, 937-942.

La Rivière, J.W., Kooiman P. & Schmidt K. (1967). Kefiran, a novel polysaccharide produced in the kefir grain by *Lactobacillus brevis*. *Archives of Microbiology*, **59**, 269-278.

Libudzisz, Z. & Piatkiewicz, A. (1990). Kefir production in Poland. *Diary Industries International*, **55**, 31-33.

Maeda, H., Zhu, X., Omura, K., Suzuki, S. & Kitamura, S. (2004). Effects of an exopolysaccharide (kefiran) on lipids, blood pressure, blood glucose, and constipation. *Biofactors*, **22**, 197-200.

Micheli, L., Uccelletti, D., Palleschi, C. & Crescenzi, V. (1999). Isolation and characterization of a ropy *Lactobacillus* strain producing the exopolysaccharide kefiran. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **54**, 69-74.

Nelson, N. (1944). Determination of reducing sugars. *Journal of Biological Chemistry*, **153**, 375-380.

Otles, S. & Cadingi, O. (2003). Kefir: A probiotic dairy-composition, nutritional and therapeutic aspects. *Pakistan Journal of Nutrition*, **2**, 54-59.

Prazeres, R., Carvalho, F. & Rivas, J. (2012). Cheese whey management. *Journal of Environmental Management*, **110**, 48-68.

Shiomi, M., Sasaki, K., Murofushi, M. & Aibara, K. (1982). Antitumor activity in mice of orally administered polysaccharide from Kefir grain. *Japanese Journal of Medical Science and Biology*, **35**, 75-80.

Simona, E., Beshkova, D., Angelov, A., Hristozova, T. S., Frengova. & G., Spasov, Z. (2002). Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **28**, 1-6.

Tamine, A. Y., & Robinson, R. K. (2007). *Tamine and Robinson's yogurt. Science and technology* (3rd ed.). CRC Press, Boca Raton, Boston, New York, Washington, DC.

Zajsek, K., & Gorsek, A., & Kolar, M. (2013). Cultivating conditions effects on Kefiran production by the mixed culture of lactic acid bacteria imbedded within grains. *Food Chemistry*, 139, 970-977.

B. Ελληνική Βιβλιογραφία

Αγγελής, Γ., (2007). Μικροβιολογία και Μικροβιακή Τεχνολογία, *Εκδόσεις Σταμούλη, Α.Ε.*, Αθήνα.

Ανυφαντάκης Ε. Μ., (2004). Τυροκομία, δεύτερη έκδοση, *Εκδόσεις Σταμούλη Α.Ε.*, Αθήνα.

Ζερφυρίδης Κ. Γ., (2001). Τεχνολογία προϊόντων γάλακτος - Τυροκομία, δεύτερη έκδοση, *Εκδόσεις Γιαχούδη*, Θεσσαλονίκη.

Πετρίδης Δ.(2000). Εφαρμοσμένη Στατιστική (με έμφαση στην επιστήμη των τροφίμων). 1η Έκδοση. *Ομηρος Εκδοτική*. Θεσσαλονίκη.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

General Linear Model: Ποσοστό αύξη versus Ποσοστό κόκκ; Ώρες επώασης

| Factor | Type | Levels | Values |
|--------------------|-------|--------|------------|
| Ποσοστό κόκκων (%) | fixed | 4 | 1; 3; 5; 7 |
| Ώρες επώασης | fixed | 3 | 22; 44; 66 |

Analysis of Variance for Ποσοστό αύξησης κόκκων (%), using Adjusted SS for Tests

| Source | DF | Seq SS | Adj SS | Adj MS | F | P |
|-----------------------------------|----|---------|---------|---------|--------|-------|
| Ποσοστό κόκκων (%) | 3 | 6750,65 | 6750,65 | 2250,22 | 837,68 | 0,000 |
| Ώρες επώασης | 2 | 1086,97 | 1086,97 | 543,49 | 202,32 | 0,000 |
| Ποσοστό κόκκων (%) * Ώρες επώασης | 6 | 502,43 | 502,43 | 83,74 | 31,17 | 0,000 |
| Error | 12 | 32,24 | 32,24 | 2,69 | | |
| Total | 23 | 8372,29 | | | | |

S = 1,63898 R-Sq = 99,61% R-Sq(adj) = 99,26%

Unusual Observations for Ποσοστό αύξησης κόκκων (%)

| Obs | Ποσοστό κόκκων (%) | Fit | SE Fit | Residual | St Resid |
|-----|-----------------------|---------|--------|----------|----------|
| 1 | 50,0000 | 47,5000 | 1,1589 | 2,5000 | 2,16 R |
| 2 | 45,0000 | 47,5000 | 1,1589 | -2,5000 | -2,16 R |

R denotes an observation with a large standardized residual.

Grouping Information Using Tukey Method and 95,0% Confidence

| Ποσοστό κόκκων (%) | N | Mean | Grouping |
|--------------------------|---|------|----------|
| 1 | 6 | 62,3 | A |
| 3 | 6 | 34,8 | B |
| 5 | 6 | 25,8 | C |
| 7 | 6 | 17,8 | D |

Means that do not share a letter are significantly different.

Grouping Information Using Tukey Method and 95,0% Confidence

| Ώρες επώασης | N | Mean | Grouping |
|-----------------|---|------|----------|
| 66 | 8 | 44,1 | A |
| 44 | 8 | 33,6 | B |
| 22 | 8 | 27,9 | C |

Means that do not share a letter are significantly different.

General Linear Model: Τιμή pH στο versus Ποσοστό κόκκ; Ώρες επώασης

| Factor | Type | Levels | Values |
|--------------------|-------|--------|------------|
| Ποσοστό κόκκων (%) | fixed | 4 | 1; 3; 5; 7 |
| Ώρες επώασης | fixed | 3 | 22; 44; 66 |

Analysis of Variance for Τιμή pH στο τέλος της επώασης, using Adjusted SS for Tests

| Source | DF | Seq SS | Adj SS | Adj MS | F | P |
|-----------------------------------|----|---------|---------|---------|---------|-------|
| Ποσοστό κόκκων (%) | 3 | 1,12381 | 1,12381 | 0,37460 | 1033,39 | 0,000 |
| Ώρες επώασης | 2 | 1,15627 | 1,15628 | 0,57814 | 1594,86 | 0,000 |
| Ποσοστό κόκκων (%) * Ώρες επώασης | 6 | 0,18702 | 0,18702 | 0,03117 | 85,99 | 0,000 |

| | | | | |
|-------|----|---------|---------|---------|
| Error | 12 | 0,00435 | 0,00435 | 0,00036 |
| Total | 23 | 2,47146 | | |

S = 0,0190394 R-Sq = 99,82% R-Sq(adj) = 99,66%

Unusual Observations for Τιμή pH στο τέλος της επώασης

| Obs | Τιμή pH στο τέλος της επώασης | Fit | SE Fit | Residual | St Resid |
|-----|-------------------------------------|---------|---------|----------|----------|
| 5 | 3,54000 | 3,57000 | 0,01346 | -0,03000 | -2,23 R |
| 6 | 3,60000 | 3,57000 | 0,01346 | 0,03000 | 2,23 R |

R denotes an observation with a large standardized residual.

Grouping Information Using Tukey Method and 95,0% Confidence

| Ποσοστό κόκκων (%) | N | Mean | Grouping |
|--------------------------|---|------|----------|
| 1 | 6 | 4,4 | A |
| 3 | 6 | 4,1 | B |
| 5 | 6 | 3,9 | C |
| 7 | 6 | 3,9 | D |

Means that do not share a letter are significantly different.

Grouping Information Using Tukey Method and 95,0% Confidence

| Ωρες επώασης | N | Mean | Grouping |
|-----------------|---|------|----------|
| 66 | 8 | 4,3 | A |
| 44 | 8 | 4,1 | B |
| 22 | 8 | 3,8 | C |

Means that do not share a letter are significantly different.

Results for: Worksheet 1

General Linear Model: Ποσοστό αύξη versus Συγκέντρωση ; Ωρες επώασης

| Factor | Type | Levels | Values |
|--------------------------|-------|--------|------------|
| Συγκέντρωση λακτόζης (%) | fixed | 2 | 5; 10 |
| Ωρες επώασης | fixed | 3 | 22; 44; 66 |

Analysis of Variance for Ποσοστό αύξησης κόκκων (%), using Adjusted SS for Tests

| Source | DF | Seq SS | Adj SS | Adj MS | F | P |
|--|----|---------|---------|--------|--------|-------|
| Συγκέντρωση λακτόζης (%) | 1 | 833,33 | 833,33 | 833,33 | 96,15 | 0,000 |
| Ωρες επώασης | 2 | 1782,17 | 1782,17 | 891,08 | 102,82 | 0,000 |
| Συγκέντρωση λακτόζης (%) * Ωρες επώασης | 2 | 28,17 | 28,17 | 14,08 | 1,62 | 0,273 |
| Error | 6 | 52,00 | 52,00 | 8,67 | | |
| Total | 11 | 2695,67 | | | | |

S = 2,94392 R-Sq = 98,07% R-Sq(adj) = 96,46%

Grouping Information Using Tukey Method and 95,0% Confidence

| Συγκέντρωση λακτόζης (%) | N | Mean | Grouping |
|-----------------------------|---|------|----------|
| 10 | 6 | 63,5 | A |
| 5 | 6 | 46,8 | B |

Means that do not share a letter are significantly different.

Grouping Information Using Tukey Method and 95,0% Confidence

| Ωρες επώασης | N | Mean | Grouping |
|--------------|---|------|----------|
| 66 | 4 | 70,7 | A |
| 44 | 4 | 53,7 | B |
| 22 | 4 | 41,0 | C |

Means that do not share a letter are significantly different.

General Linear Model: Τιμή pH στο versus Συγκέντρωση ; Ωρες επώασης

| Factor | Type | Levels | Values |
|--------------------------|-------|--------|------------|
| Συγκέντρωση λακτόζης (%) | fixed | 2 | 5; 10 |
| Ωρες επώασης | fixed | 3 | 22; 44; 66 |

Analysis of Variance for Τιμή pH στο τέλος της επώασης, using Adjusted SS for Tests

| Source | DF | Seq SS | Adj SS | Adj MS | F | P |
|--|----|----------|----------|----------|--------|-------|
| Συγκέντρωση λακτόζης (%) | 1 | 0,116033 | 0,116033 | 0,116033 | 278,48 | 0,000 |
| Ωρες επώασης | 2 | 0,260217 | 0,260217 | 0,130108 | 312,26 | 0,000 |
| Συγκέντρωση λακτόζης (%) * Ωρες επώασης | 2 | 0,000717 | 0,000717 | 0,000358 | 0,86 | 0,469 |
| Error | 6 | 0,002500 | 0,002500 | 0,000417 | | |
| Total | 11 | 0,379467 | | | | |

S = 0,0204124 R-Sq = 99,34% R-Sq(adj) = 98,79%

Grouping Information Using Tukey Method and 95,0% Confidence

| Συγκέντρωση λακτόζης (%) | N | Mean | Grouping |
|--------------------------|---|------|----------|
| 10 | 6 | 4,3 | A |
| 5 | 6 | 4,1 | B |

Means that do not share a letter are significantly different.

Grouping Information Using Tukey Method and 95,0% Confidence

| Ωρες επώασης | N | Mean | Grouping |
|--------------|---|------|----------|
| 66 | 4 | 4,4 | A |
| 44 | 4 | 4,2 | B |
| 22 | 4 | 4,1 | C |

Means that do not share a letter are significantly different.

Results for: Worksheet 3

General Linear Model: Ποσοστό αύξησης versus Θερμοκρασία ; Ωρες επώασης

| Factor | Type | Levels | Values |
|--------------------------|-------|--------|------------|
| Θερμοκρασία επώασης (oC) | fixed | 3 | 20; 25; 30 |
| Ωρες επώασης | fixed | 3 | 22; 44; 66 |

Analysis of Variance for Ποσοστό αύξησης κόκκων (%), using Adjusted SS for Tests

| Source | DF | Seq SS | Adj SS | Adj MS | F | P |
|--------|----|--------|--------|--------|---|---|
|--------|----|--------|--------|--------|---|---|

| | | | | | | |
|--|----|---------|---------|---------|--------|-------|
| Θερμοκρασία επώασης (οC) | 2 | 2131,00 | 2131,00 | 1065,50 | 165,34 | 0,000 |
| Ώρες επώασης | 2 | 2105,33 | 2105,33 | 1052,67 | 163,34 | 0,000 |
| Θερμοκρασία επώασης (οC) * Ώρες επώασης | 4 | 433,67 | 433,67 | 108,42 | 16,82 | 0,000 |
| Error | 9 | 58,00 | 58,00 | 6,44 | | |
| Total | 17 | 4728,00 | | | | |

S = 2,53859 R-Sq = 98,77% R-Sq(adj) = 97,68%

Grouping Information Using Tukey Method and 95,0% Confidence

| | | | |
|--------------------------|---|------|----------|
| Θερμοκρασία επώασης (οC) | | | |
| | N | Mean | Grouping |
| 25 | 6 | 59,2 | A |
| 20 | 6 | 38,7 | B |
| 30 | 6 | 34,2 | C |

Means that do not share a letter are significantly different.

Grouping Information Using Tukey Method and 95,0% Confidence

| | | | |
|--------------|---|------|----------|
| Ώρες επώασης | | | |
| | N | Mean | Grouping |
| 66 | 6 | 58,0 | A |
| 44 | 6 | 42,3 | B |
| 22 | 6 | 31,7 | C |

Means that do not share a letter are significantly different.

General Linear Model: Τιμή pH στο versus Θερμοκρασία ; Ώρες επώασης

| | | | |
|--------------------------|-------|--------|------------|
| Factor | Type | Levels | Values |
| Θερμοκρασία επώασης (οC) | fixed | 3 | 20; 25; 30 |
| Ώρες επώασης | fixed | 3 | 22; 44; 66 |

Analysis of Variance for Τιμή pH στο τέλος της επώασης, using Adjusted SS for Tests

| | | | | | | |
|--|----|----------|----------|----------|--------|-------|
| Source | DF | Seq SS | Adj SS | Adj MS | F | P |
| Θερμοκρασία επώασης (οC) | 2 | 0,421111 | 0,421111 | 0,210556 | 191,41 | 0,000 |
| Ώρες επώασης | 2 | 0,092811 | 0,092811 | 0,046406 | 42,19 | 0,000 |
| Θερμοκρασία επώασης (οC) * Ώρες επώασης | 4 | 0,140089 | 0,140089 | 0,035022 | 31,84 | 0,000 |
| Error | 9 | 0,009900 | 0,009900 | 0,001100 | | |
| Total | 17 | 0,663911 | | | | |

S = 0,0331662 R-Sq = 98,51% R-Sq(adj) = 97,18%

Grouping Information Using Tukey Method and 95,0% Confidence

| | | | |
|--------------------------|---|------|----------|
| Θερμοκρασία επώασης (οC) | | | |
| | N | Mean | Grouping |
| 20 | 6 | 4,7 | A |
| 25 | 6 | 4,4 | B |
| 30 | 6 | 4,3 | C |

Means that do not share a letter are significantly different.

Grouping Information Using Tukey Method and 95,0% Confidence

| | | | |
|--------------|---|------|----------|
| Ώρες επώασης | | | |
| | N | Mean | Grouping |
| 66 | 6 | 4,5 | A |
| 22 | 6 | 4,4 | B |
| 44 | 6 | 4,4 | B |

Means that do not share a letter are significantly different.

General Linear Model: Ποσοστό αύξη versus Είδος υποστρ; Ωρες επώασης

| Factor | Type | Levels | Values |
|--------------------|-------|--------|--|
| Είδος υποστρώματος | fixed | 2 | Γάλα UHT; Τυρόγαλα (συγκέντρωση σε λακτόζη 5%) |
| Ωρες επώασης | fixed | 3 | 22; 44; 66 |

Analysis of Variance for Ποσοστό αύξησης κόκκων (%), using Adjusted SS for Tests

| Source | DF | Seq SS | Adj SS | Adj MS | F | P |
|---------------------------------|----|---------|--------|--------|--------|-------|
| Είδος υποστρώματος | 1 | 6210,8 | 6210,8 | 6210,8 | 328,32 | 0,000 |
| Ωρες επώασης | 2 | 4466,2 | 4466,2 | 2233,1 | 118,05 | 0,000 |
| Είδος υποστρώματος*Ωρες επώασης | 2 | 334,5 | 334,5 | 167,2 | 8,84 | 0,016 |
| Error | 6 | 113,5 | 113,5 | 18,9 | | |
| Total | 11 | 11124,9 | | | | |

S = 4,34933 R-Sq = 98,98% R-Sq(adj) = 98,13%

Grouping Information Using Tukey Method and 95,0% Confidence

| Είδος υποστρώματος | N | Mean | Grouping |
|--------------------------------------|---|------|----------|
| Γάλα UHT | 6 | 94,8 | A |
| Τυρόγαλα (συγκέντρωση σε λακτόζη 5%) | 6 | 49,3 | B |

Means that do not share a letter are significantly different.

Grouping Information Using Tukey Method and 95,0% Confidence

| Ωρες επώασης | N | Mean | Grouping |
|--------------|---|------|----------|
| 66 | 4 | 95,5 | A |
| 44 | 4 | 72,5 | B |
| 22 | 4 | 48,3 | C |

Means that do not share a letter are significantly different.

General Linear Model: Τιμή pH στο versus Είδος υποστρ; Ωρες επώασης

| Factor | Type | Levels | Values |
|--------------------|-------|--------|--|
| Είδος υποστρώματος | fixed | 2 | Γάλα UHT; Τυρόγαλα (συγκέντρωση σε λακτόζη 5%) |
| Ωρες επώασης | fixed | 3 | 22; 44; 66 |

Analysis of Variance for Τιμή pH στο τέλος της επώασης, using Adjusted SS for Tests

| Source | DF | Seq SS | Adj SS | Adj MS | F | P |
|---------------------------------|----|---------|---------|---------|--------|-------|
| Είδος υποστρώματος | 1 | 0,09363 | 0,09363 | 0,09363 | 95,22 | 0,000 |
| Ωρες επώασης | 2 | 0,04247 | 0,04247 | 0,02123 | 21,59 | 0,002 |
| Είδος υποστρώματος*Ωρες επώασης | 2 | 0,36407 | 0,36407 | 0,18203 | 185,12 | 0,000 |
| Error | 6 | 0,00590 | 0,00590 | 0,00098 | | |
| Total | 11 | 0,50607 | | | | |

S = 0,0313581 R-Sq = 98,83% R-Sq(adj) = 97,86%

Grouping Information Using Tukey Method and 95,0% Confidence

| Είδος υποστρώματος | N | Mean | Grouping |
|--------------------------------------|---|------|----------|
| Γάλα UHT | 6 | 4,3 | A |
| Τυρόγαλα (συγκέντρωση σε λακτόζη 5%) | 6 | 4,2 | B |

Means that do not share a letter are significantly different.

Grouping Information Using Tukey Method and 95,0% Confidence

| Ωρες επώασης | N | Mean | Grouping |
|--------------|---|------|----------|
| 66 | 4 | 4,3 | A |
| 22 | 4 | 4,3 | A |
| 44 | 4 | 4,2 | B |

Means that do not share a letter are significantly different.