ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

ΠΜΣ Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων και Διατροφή του Ανθρώπου

ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΓΕΩΡΓΙΟΣ - ΙΩΑΝΝΗΣ Ε. ΝΥΧΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«Μελέτη της παραγωγής λειτουργικών φρουτοχυμών με τη χρήση νέων τεχνολογιών»

“Production of functional fruit juices using new technologies”

ΙΩΑΝΝΑ Λ. ΑΣΚΑ

ΑΘΗΝΑ, 2018

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«Μελέτη της παραγωγής λειτουργικών φρουτοχυμών με τη χρήση νέων τεχνολογιών»

ΙΩΑΝΝΑ Λ. ΑΣΚΑ

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

1) **Γεώργιος - Ιωάννης Ε. Νυχάς (M.Sc., Ph.D.),** Καθηγητής, Εργαστήριο Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, ***Επιβλέπων***.
2) **Ευστάθιος Ζ. Πανάγου (M.Sc., Ph.D.),** Καθηγητής, Εργαστήριο Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, ***Μέλος***.
3) **Ανθούλα Α. Αργύρη (Ph.D.),** Ερευνήτρια, Ινστιτούτο Τεχνολογίας Αγροτικών Προϊόντων, ΕΛΓΟ – ΔΗΜΗΤΡΑ, ***Μέλος***.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η επανάσταση στο βιοτικό επίπεδο, οι διατροφικές συνήθειες και η αυξημένη ευαισθητοποίηση για την υγεία έχουν μετατοπίσει το ενδιαφέρον των καταναλωτών σε τρόφιμα με ευρύτερα οφέλη για την υγεία. Σκοπός της παρούσας Μεταπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας ήταν η παραγωγή φρουτοχυμών με αυξημένη προστιθέμενη αξία και διατηρησιμότητα. Έτσι αντικείμενο της μελέτης αποτέλεσε ο έλεγχος της δυνατότητας παραγωγής λειτουργικών φρουτοχυμών με τη προσθήκη των οξυγαλακτικών βακτηρίων με προβιοτικό δυναμικό *Lb. plantarum* B282, *Lb. plantarum* E10, *Lb. plantarum* E69, *Lb. pentosus* B281, *Lb. pentosus* E108, *Lb. pentosus* E97, *Lb. pentosus* E104, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* E93, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* E94, *Lb. casei Shirota* και *Lb. ramnosus* GG. Έγινε έλεγχος της επιβίωσής τους καθ' όλη τη διάρκεια ζωής του προϊόντος καθώς και οργανοληπτική αξιολόγηση για τη διασφάλιση της παραγωγής χυμών με αποδεκτά και επιθυμητά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε βιοχημική ανάλυση με την ταχεία μέθοδο της φασματοσκοπίας υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier (FTIR) και ελέγχθηκε η επίδραση της Υψηλής Υδροστατικής Πίεσης (ΥΥΠ) και της Θερμικής Επεξεργασίας (ΘΕ) στην επιβίωση / απενεργοποίηση των σπορίων του αλλοιογόνου μικροοργανισμού *Alicyclobacillus acidoterrestris*.

Αρχικά, ελέγχθηκε η επιβίωση επτά προβιοτικών στελεχών (*Lb. plantarum* E10, *Lb. plantarum* E69, *Lb. pentosus* E108, *Lb. pentosus* E104, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* E93, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* E94 και *Lb. casei Shirota*) σε χυμό ροδάκινο, απορρίφθηκαν όμως οργανοληπτικά την τρίτη ημέρα της συντήρησης και τα πειράματα συνεχίστηκαν με τα έντεκα στελέχη (*Lb. plantarum* B282, *Lb. plantarum* E10, *Lb. plantarum* E69, *Lb. pentosus* B281, *Lb. pentosus* E108, *Lb. pentosus* E97, *Lb. pentosus* E104, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* E93, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* E94, *Lb. casei Shirota* και *Lb. ramnosus* GG) με δύο διαφορετικές τελικές συγκεντρώσεις εμβολίου (χαμηλό 10^7 και υψηλό 10^8) σε χυμό πορτοκάλι. Το στέλεχος *Lb. pentosus* E104 επιλέχθηκε για τα επόμενα πειράματα εφόσον εμφάνισε τα καλύτερα επιθυμητά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά σε συνδυασμό με την επιβίωση του στο χυμό πορτοκαλιού. Το πείραμα συνεχίστηκε με την παραγωγή και τη συντήρηση λειτουργικού πορτοκαλοχυμού με το στέλεχος αυτό, καθώς επίσης και

με την απενεργοποίηση του *Alicyclobacillus acidoterrestris* με την χρήση ΥΠΠ και ΘΕ.

Όλοι οι χυμοί (ροδάκινο και πορτοκάλι) με τα προβιοτικά παρουσίασαν γενικά μικρότερες τιμές pH σε σχέση με τους μάρτυρες και τα οξυγαλακτικά βακτήρια κατάφεραν να επιβιώσουν για τουλάχιστον μια εβδομάδα. Οι χυμοί πορτοκαλιού με χαμηλό εμβόλιο οξυγαλακτικών βακτηρίων (10^7) όμως, παρουσίασαν καλύτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, σε σχέση με τους χυμούς με το υψηλό εμβόλιο (10^8), με τον *Lb. pentosus* E104 να εμφανίζει καλή επιβίωση στους χυμούς, προσδίδοντας παράλληλα και τα επιθυμητά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (γεύση, άρωμα). Με την εφαρμογή της ΥΥΠ σημειώθηκε πτώση της τάξης των 2,00 log στα *Alicyclobacillus* spp. Αντίθετα, η ΘΕ δε φάνηκε να επηρεάζει τους συνολικούς πληθυσμούς του *Alicyclobacillus* spp. και των σπορίων του τόσο στην αρχή όσο και κατά τη διάρκεια της συντήρησης των χυμών. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι τα δείγματα των χυμών με τον αλλοιογόνο μικροοργανισμό *Alicyclobacillus acidoterrestris* παρουσίασαν μια μικρή τάση αύξησης στην τιμή του pH όσο αυξάνονταν οι ημέρες της συντήρησης, σε αντίθεση με τους χυμούς που εμβολιάστηκαν με το στέλεχος *Lb. pentosus* E104, όπου εκεί παρατηρήθηκε μικρή πτώση έως και την $21^η$ ημέρα της συντήρησης. Σύμφωνα με την οργανοληπτική ανάλυση, τα δείγματα χυμών με το στέλεχος *Lb. pentosus* E104 ήταν αποδεκτά για οκτώ (8) ημέρες συντήρησης, οι χυμοί με τον *Alicyclobacillus acidoterrestris* ήταν αποδεκτοί για 12 ημέρες και τα δείγματα που περιείχαν και τα δύο στελέχη για δέκα (10) ημέρες σε όλους τους χειρισμούς. Επομένως, ο μεγαλύτερος χρόνος ζωής των χυμών που εμβολιάστηκαν και με τα δύο στελέχη σε σύγκριση με τα δείγματα που εμβολιάστηκαν με το προβιοτικό στέλεχος E104, είναι πιθανό να οφείλεται σε ανταγωνιστική δράση μεταξύ τους. Όσον αφορά την ταχεία μέθοδο FTIR, τα αποτελέσματα της ανάλυσης έδειξαν ότι είναι μια εν δυνάμει μέθοδος για τον προσδιορισμό της ποιότητας των φρουτοχυμών, απαιτούνται όμως περισσότερα δείγματα και ανάπτυξη νέων μοντέλων (με εφαρμογή διαφορετικών μηκών κύματος και όχι όλου του φάσματος, ανάλυση των διαφορετικών χειρισμών ξεχωριστά κλπ) ώστε να αυξηθεί η ακρίβειά τους, που σε κάποιες περιπτώσεις δε βρέθηκε να είναι υψηλή.

Όσον αφορά το προβιοτικό στέλεχος *Lb. pentosus* E104 φαίνεται ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην παραγωγή λειτουργικού πορτοκαλοχυμού. Απαιτείται όμως περεταίρω έρευνα σχετικά με την αξιολόγηση νέων προβιοτικών στελεχών και την

εφαρμογή τους στα τρόφιμα. Τέλος, τα φρούτα, πέρα από την καταλληλότητά τους ως φορείς προβιοτικών, εφόσον έχουν καλό γευστικό και αρωματικό προφίλ, είναι περιζήτητα ως εναλλακτική βάση για την παραγωγή μη γαλακτοκομικών προβιοτικών προϊόντων. Η παραγωγή μη γαλακτοκομικών προβιοτικών προϊόντων είναι σημαντική, διότι τα γαλακτοκομικά προϊόντα εμφανίζουν υψηλά επίπεδα χοληστερόλης, ο αριθμός των ατόμων με δυσανεξία στη λακτόζη παγκόσμια είναι μεγάλος και οι χορτοφάγοι καταναλωτές συνεχώς αυξάνονται τόσο στις αναπτυσσόμενες όσο και στις ανεπτυγμένες χώρες.

Κύρια επιστημονικά πεδία: Γεωπονικές Επιστήμες, Μικροβιολογία Τροφίμων.

Λέξεις-κλειδιά: *Χυμοί φρούτων, Προβιοτικά, Alicyclobacillus, Υψηλή Υδροστατική Πίεση, Θερμική Επεξεργασία, Μέθοδος ανάλυσης FTIR.*

ABSTRACT

The evolution of living standards, eating habits and increased health awareness have shifted consumers' interest in foods with wider health benefits. The purpose of this thesis was to produce fruit juices with high added value and sustainability. So, the aim of the study was to test the possibility of producing functional fruit juices by adding lactic acid bacteria with probiotic potential; i.e. *Lb. plantarum* B282, *Lb. plantarum* E10, *Lb. plantarum* E69, *Lb. pentosus* B281, *Lb. pentosus* E108, *Lb. pentosus* E97, *Lb. pentosus* E104, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* E93, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* E94, *Lb. casei* Shirota and *Lb. ramnosus* GG. Their survival has been tested through the shelf life of the products and organoleptic assessment of products was performed to ensure juice production with acceptable and desirable organoleptic characteristics. At the same time, biochemical analysis was carried out using the rapid method of Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FTIR). Finally, the effect of High Hydrostatic Pressure (HHP) and Heat Treatment (HT) on the survival / inactivation of spores of *Alicyclobacillus acidoterrestris* was tested.

Initially, the survival of seven probiotic strains (*Lb. plantarum* E10, *Lb. plantarum* E69, *Lb. pentosus* E108, *Lb. pentosus* E104, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* E93, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* E94 and *Lb. casei* Shirota) was tested in peach juice, but since they were organoleptically rejected on the third day of preservation, the experiments were continued with eleven strains (*Lb. plantarum* B282, *Lb plantarum* E10, *Lb. plantarum* E69, *Lb. pentosus* B281, *Lb. pentosus* E108, *Lb. pentosus* E97, *Lb. pentosus* E104, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* E93, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* E94, *Lb. casei* Shirota and *Lb. ramnosus* GG) with two different final inocula concentrations (low 10^7 and high 10^8) in orange juice. After selecting the strain (*Lb. pentosus* E104) that exhibited the most desirable organoleptic characteristics in combination with good survival in juice, the following experiments were performed with the production and preservation of functional orange juice with this strain, as well as with the inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* using HHP and HT.

All juices (peach and orange) with probiotics generally showed lower pH values than controls and lactic acid bacteria managed to survive for at least one week. However, orange juices with low inoculum concentration of lactic acid bacteria (10^7)

showed better values in organoleptic characteristics than juices with high concentration (10^8), with *Lb. pentosus* E104 exhibiting good survival and desirable organoleptic characteristics (flavor, aroma) in juices. After the application of HHP there was a 2.00 log reduction in population of *Alicyclobacillus* spp. In contrast, HT did not affect the total population of *Alicyclobacillus* spp. and its spores, both at the beginning and during preservation of juices. It was also observed that juice samples with the spoilage microorganism *Alicyclobacillus acidoterrestris* showed a light increase in pH value during preservation, in contrast with juices inoculated with strain *Lb. pentosus* E104 that showed a light decrease until the 21st day of preservation. According to the organoleptic analysis, juice samples with strain *Lb. pentosus* E104 were acceptable for eight (8) days of preservation, juices with *Alicyclobacillus acidoterrestris* were acceptable for 12 days and samples containing both strains for ten (10) days in all treatments. Therefore, the longer shelf life of juices inoculated with both strains compared to samples vaccinated with probiotic strain E104 is likely due to antagonistic activity between them. Regarding the rapid analytical method FTIR, the results of the analysis have shown that it is a potential method for determining the quality of fruit juices, but more samples and new models development (applying different wavelengths and not the whole spectrum, analyzing different treatments separately, etc.) are required to increase their accuracy, which in some cases was not found to be high.

With regard to the probiotic strain *Lb. pentosus* E104, it appears that it can be applied in the production of functional orange juice. However, further research is needed on the evaluation of new probiotic strains and their application to food. Finally, fruits, beyond their suitability for probiotics by having a good flavor and aroma profile, they are popular as an alternative basis for the production of non-dairy probiotics, since dairy products have high cholesterol levels, the number of lactose intolerant in the world is great and vegetarian consumers are constantly growing in both developing and developed countries.

Main scientific disciplines: Agricultural Sciences, Food Microbiology.

Keywords: *Fruit Juices, Probiotics, Alicyclobacillus, High Hydrostatic Pressure, Heat Treatment, FTIR Analysis.*

Louis Jean Pasteur (27.12.1822-28.09.1895)

"Science knows no country because knowledge belongs to humanity and is the torch which illuminates the world."

Αφιερώνεται

στην οικογένεια μου…

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Φτάνοντας στο αποτέλεσμα μιας κοπιαστικής προσπάθειας με τη συγγραφή της παρούσας μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας, ολοκληρώθηκε ένας σημαντικός προσωπικός μου στόχος, γι' αυτό και θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους τους ανθρώπους που συνέβαλλαν στην προσπάθεια αυτή.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα της εργασίας αυτής και εξαιρετικό Καθηγητή, κ. Γεώργιο – Ιωάννη Νυχά, για την πολύτιμη βοήθειά του και τη διαρκή υποστήριξή του, τόσο κατά τη διεξαγωγή του πειράματος όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας. Τον ευχαριστώ που μου έδωσε την ευκαιρία να ασχοληθώ με πολύ ενδιαφέροντα ερευνητικά θέματα καθώς και για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου. Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον εξίσου εξαιρετικό καθηγητή και μέλος της εξεταστικής μου επιτροπής κ. Ευστάθιο Ζ. Πανάγου.

Η παρούσα μελέτη εκπονήθηκε στο Ινστιτούτο Αγροτικών Προϊόντων (ΕΛΓΟ–ΔΗΜΗΤΡΑ), στη Λυκόβρυση Αττικής, γι' αυτό και θα ήθελα να ευχαριστήσω βαθύτατα τις Δρ Χρυσούλα Τάσσου (Διευθύντρια Έρευνας), Δρ Ανθούλα Αργύρη (Ερευνήτρια) και κα Πάτρα Σουρρή, για την άμεση και ανιδιοτελή βοήθειά τους, όσον αφορά την προμήθεια εργαστηριακού υλικού, την αμέριστη βοήθειά τους κατά τη διεξαγωγή του πειράματος, καθώς και για τις εξαιρετικά χρήσιμες συμβουλές και την στήριξή τους, τόσο κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, όσο και κατά τη συγγραφή της εργασίας, διαθέτοντας μέρος από τον πολύτιμο χρόνο τους. Επίσης, ευχαριστώ θερμά όλο το προσωπικό του Ινστιτούτου για την άριστη συνεργασία μας και για την προθυμία που έδειξε στην επίλυση κάθε απορίας μου.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω τη συμφοιτήτρια-συναδελφό μου, Χριστίνα Καμαρινού, για την άριστη συνεργασία, την αμοιβαία στήριξη, την καλή παρέα και τις πολύ όμορφες στιγμές που περάσαμε στο εργαστήριο κατά την ταυτόχρονη διεξαγωγή των περαμάτων μας.

Τέλος, θα ήθελα να επισημάνω ότι η συγκεκριμένη εργασία αφιερώνεται στους γονείς μου και στον αγαπημένο μου αδερφό, τους οποίους θα ήθελα να ευχαριστήσω από τα βάθη της καρδιάς μου για την αμέριστη συμπαράσταση, βοήθεια και προ πάντων κατανόηση και ανοχή καθ' όλο το χρονικό διάστημα των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ... 3
ABSTRACT ... 6
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ ... 10
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ... 23
1.1 Χυμοί φρούτων ... 23
1.1.1 Μικροβιακή επιμόλυνση χυμών ... 23
1.1.2 Αλλοίωση χυμών ... 24
1.2 Προβιοτικά ... 24
1.2.1 Ανάγκη για μη γαλακτοκομικά προβιοτικά ... 25
1.2.2 Προϊόντα φρούτων ως φορείς προβιοτικών ... 25
1.2.3 Προκλήσεις στην βιομηχανία σχετικά με τα προβιοτικά ... 28
1.2.3.1 Επιλογή προβιοτικών ... 28
1.2.3.2 Ποσοστό βακτηρίων ... 29
1.2.3.3 Τοξικότητα ... 29
1.2.3.4 Σταθερότητα προβιοτικών κατά την επεξεργασία ... 30
1.2.3.5 Σταθερότητα προβιοτικών κατά την αποθήκευση ... 30
1.2.3.6 Οργανοληπτικά κριτήρια ... 30
1.3 Παστερίωση χυμών φρούτων ... 31
1.4 *Alicyclobacillus acidoterrestris* ... 32
1.4.1 Αλλοίωση ... 33
1.4.2 Σπόρια ... 34
1.4.3 Παράμετροι και μέθοδοι ανίχνευσης ... 35
1.5 Υψηλή Υδροστατική Πίεση (ΥΥΠ) ... 37
1.6 FTIR ... 39
1.6.1 Οργανολογία και λειτουργία του FTIR ... 39
1.6.2 Μαθηματική επεξεργασία των φασματοσκοπικών δεδομένων ... 41
1.6.2.1Μέθοδος των Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (Partial Least Square, PLS) 41
1.6.2.2 Βαθμονόμηση ... 42
1.6.2.3 Επικύρωση ... 43
1.6.2.4 Ο αριθμός των PLS συνιστωσών ... 43
1.6.2.5 Δείκτες επίδοσης ... 44
1.6.3 Εφαρμογές στα τρόφιμα ... 45
1.7 Σκοπός ... 46

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ 47

2.1 Έλεγχος εμπορικά διαθέσιμων χυμών ροδάκινου 47

2.1.1 Έλεγχος μικροβιολογικών χαρακτηριστικών χυμών ροδάκινου 48

2.1.2 Έλεγχος φυσικοχημικών χαρακτηριστικών χυμών ροδάκινου 54

2.1.2.1 FTIR Analysis 54

2.2 Έλεγχος επιβίωσης επτά (7) οξυγαλακτικών βακτηρίων με προβιοτικό δυναμικό σε χυμούς ροδάκινου 56

2.2.1 Προετοιμασία δειγμάτων χυμού ροδάκινου με τα προβιοτικά στελέχη 57

2.2.2 Μικροβιολογική και φυσικοχημική ανάλυση δειγμάτων χυμού ροδάκινου με τα προβιοτικά στελέχη 58

2.2.3 Οργανοληπτική ανάλυση δειγμάτων χυμού ροδάκινου με τα προβιοτικά στελέχη 58

2.3 Έλεγχος επιβίωσης έντεκα (11) οξυγαλακτικών βακτηρίων με προβιοτικό δυναμικό σε χυμούς πορτοκαλιού 58

2.4 Παραγωγή και συντήρηση λειτουργικού πορτοκαλοχυμού και απενεργοποίηση του *Alicyclobacillus Acidoterrestris* με χρήση ΥΠΠ και ΘΕ 60

2.4.1 Συλλογή σπορίων του αλλοιογόνου μικροοργανισμού *Alicyclobacillus acidoterrestris* 60

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ 63

3.1 Μικροβιακή ανάλυση και μετρήσεις pH / Brix εμπορικά διαθέσιμων χυμών ροδάκινου 63

3.1.1 Ανάλυση FTIR εμπορικά διαθέσιμων χυμών ροδάκινου 65

3.2 Επιβίωση επτά (7) οξυγαλακτικών βακτηρίων με προβιοτικό δυναμικό σε χυμό ροδάκινο κατά τη διάρκεια συντήρησης τριών (3) ημερών 72

3.2.1 Ανάλυση FTIR επτά (7) οξυγαλακτικών βακτηρίων με προβιοτικό δυναμικό σε χυμό ροδάκινο 75

3.2.1.1 Συσχέτιση των μικροβιολογικών και φυσικοχημικών δεδομένων με τα φασματικά δεδομένα στα δείγματα χυμού ροδάκινου με τα επτά (7) προβιοτικά στελέχη 77

3.2.1.2 Εκτίμηση της βαθμολογίας της οργανοληπτικής αξιολόγησης στα δείγματα χυμού ροδάκινου με τα επτά (7) προβιοτικά στελέχη 80

3.3 Επιβίωση έντεκα (11) οξυγαλακτικών βακτηρίων με προβιοτικό δυναμικό σε χυμό πορτοκαλιού 81

3.3.1 Ανάλυση FTIR έντεκα (11) οξυγαλακτικών βακτηρίων με προβιοτικό δυναμικό σε χυμό πορτοκαλιού 88

3.3.1.1 Συσχέτιση των μικροβιολογικών και φυσικοχημικών δεδομένων με τα φασματικά δεδομένα στα δείγματα χυμού πορτοκαλιού με τα έντεκα (11) προβιοτικά στελέχη 92

3.3.1.2 Εκτίμηση της βαθμολογίας της οργανοληπτικής αξιολόγησης στα δείγματα χυμού πορτοκαλιού με τα έντεκα (11) προβιοτικά στελέχη 95

3.4 Παραγωγή και συντήρηση λειτουργικού πορτοκαλοχυμού και απενεργοποίηση του *Alicyclobacillus acidoterrestris* με χρήση ΥΠΠ και ΘΕ 96

3.4.1 Ανάλυση FTIR λειτουργικού πορτοκαλοχυμού με *Alicyclobacillus acidoterrestris* μετά τη χρήση ΥΠΠ και ΘΕ 108

3.4.1.1 Συσχέτιση των μικροβιολογικών και φυσικοχημικών δεδομένων με τα φασματικά δεδομένα του λειτουργικού πορτοκαλοχυμού με *Alicyclobacillus acidoterrestris* μετά τη χρήση ΥΠΠ και ΘΕ 110

3.4.1.2 Εκτίμηση βαθμολογίας οργανοληπτικής αξιολόγησης λειτουργικού πορτοκαλοχυμού με *Alicyclobacillus acidoterrestris* μετά τη χρήση ΥΠΠ και ΘΕ 115

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ..... 117

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ..... 120

5.1 Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία 120

5.2 Ελληνική Βιβλιογραφία..... 136

5.3 Ηλεκτρονική Βιβλιογραφία..... 137

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 2.1.1 Χυμοί ροδάκινου από το εμπόριο στους οποίους πραγματοποιήθηκαν μικροβιολογικές και φυσικοχημικές αναλύσεις.

Πίνακας 2.1.1.1 Σύνθεση του θρεπτικού υλικού Plate Count Agar (PCA).

Πίνακας 2.1.1.2 Σύνθεση του θρεπτικού υλικού Rose Bengal Chloramphenicol Agar (RBC).

Πίνακας 2.1.1.3 Σύνθεση του θρεπτικού υλικού BAT Agar.

Πίνακας 2.1.1.4 Σύνθεση του θρεπτικού υλικού M.R.S. (ISO) Agar.

Πίνακας 2.2.1 Οξυγαλακτικά βακτήρια με προβιοτικό δυναμικό, απομονωμένα από παραδοσιακές ζυμούμενες ελληνικές ελιές, τα οποία εμβολιάστηκαν σε χυμό ροδάκινου.

Πίνακας 2.2.1.1 Σύνθεση του θρεπτικού υλικού MRS Broth.

Πίνακας 2.3.1 Οξυγαλακτικά βακτήρια με προβιοτικό δυναμικό, απομονωμένα από παραδοσιακές ζυμούμενες ελληνικές ελιές, τα οποία εμβολιάστηκαν σε χυμούς πορτοκαλιού (με έντονα φαίνονται τα νέα στελέχη που προστέθηκαν στο συγκεκριμένο πείραμα).

Πίνακας 2.4.1.1 Σύνθεση του θρεπτικού υλικού YSG Broth.

Πίνακας 2.4.1.2 Σύνθεση του θρεπτικού υλικού BAT Broth.

Πίνακας 2.4.1.3 Σύνθεση του phosphate buffer KPBs (200ml).

Πίνακας 3.1.1 Μικροβιακή ανάλυση (Ολική Μικροβιακή Χλωρίδα, Οξυγαλακτικά Βακτήρια, Ζύμες-μύκητες, *Alicyclobacillus* spp.) και μετρήσεις pH / Brix εμπορικά διαθέσιμων χυμών ροδάκινου.

Πίνακας 3.1.1.1 Οι συχνότητες που παρατηρήθηκαν στα φάσματα FTIR που συλλέχτηκαν από τα δείγματα χυμού ροδάκινου και οι πιθανές αντιστοιχίσεις των τρόπων δόνησης (προσαρμογή από Argyri, Panagou and Nychas, 2014).

Πίνακας 3.1.1.2 Δείκτες επίδοσης κατά την επικύρωση των μοντέλων PLS-R συσχετίζοντας τα φυσικοχημικά με τα φασματικά δεδομένα που λήφθηκαν από τα δείγματα χυμών ροδάκινου του εμπορίου.

Πίνακας 3.2.1. Οργανοληπτική ανάλυση των δειγμάτων χυμών ροδάκινου που εμβολιάστηκαν με τα επτά (7) οξυγαλακτικά βακτήρια με προβιοτικό δυναμικό και συντηρήθηκαν για τρεις (3) ημέρες (συνολική εκτίμηση του κάθε χυμού με κλίμακα από το ένα (1) έως το πέντε (5): Μη αποδεκτό=1, Αποδεκτό=2, Μέτριο=3, Καλό=4, Άριστο=5).

Πίνακας 3.2.1.1.1 Δείκτες επίδοσης κατά την επικύρωση των μοντέλων PLS-R συσχετίζοντας τα φυσικοχημικά με τα φασματικά δεδομένα που λήφθηκαν από τα δείγματα χυμών ροδάκινου με τα επτά (7) στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων με προβιοτικό δυναμικό.

Πίνακας 3.2.1.2.1α: Πίνακας διπλής εισόδου διασταυρούμενης επικύρωσης για τα δείγματα χυμού ροδάκινου με τα επτά (7) προβιοτικά στελέχη, όπως προέκυψε από την ανάλυση PLS (δεδομένα επικύρωσης) (Μη αποδεκτό=1, Αποδεκτό=2, Μέτριο=3, Καλό=4, Άριστο=5).

Πίνακας 3.2.1.2.1β: Πίνακας διπλής εισόδου διασταυρούμενης επικύρωσης για τα δείγματα χυμού ροδάκινου με τα επτά (7) προβιοτικά στελέχη, όπως προέκυψε από την ανάλυση PLS (δεδομένα επικύρωσης) («Άριστο-Καλό» $3,5 \leq x \leq 5$, «Μέτριο-Αποδεκτό» $2 \leq x < 3,5$ και «Μη αποδεκτό» $1 \leq x < 2$).

Πίνακας 3.3.1. Οργανοληπτική ανάλυση των δειγμάτων χυμών πορτοκαλιού που εμβολιάστηκαν με τα έντεκα (11) οξυγαλακτικά βακτήρια με προβιοτικό δυναμικό με χαμηλό και υψηλό εμβόλιο και συντηρήθηκαν για είκοσι-μια (21) ημέρες (συνολική εκτίμηση του κάθε χυμού με κλίμακα από το ένα (1) έως το πέντε (5): Μη αποδεκτό=1, Αποδεκτό=2, Μέτριο=3, Καλό=4, Άριστο=5, H: υψηλό εμβόλιο L: χαμηλό εμβόλιο).

Πίνακας 3.3.1.1 Οι συχνότητες που παρατηρήθηκαν στα φάσματα FTIR που συλλέχτηκαν από τα δείγματα χυμού πορτοκαλιού και οι πιθανές αντιστοιχίσεις των τρόπων δόνησης (προσαρμογή από Argyri, Panagou and Nychas, 2014).

Πίνακας 3.3.1.1.1 Δείκτες επίδοσης κατά την επικύρωση των μοντέλων PLS-R συσχετίζοντας τα φυσικοχημικά με τα φασματικά δεδομένα που λήφθηκαν από τα δείγματα χυμών πορτοκαλιού με τα έντεκα (11) στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων με προβιοτικό δυναμικό.

Πίνακας 3.3.1.2.1α: Πίνακας διπλής εισόδου διασταυρούμενης επικύρωσης για τα δείγματα χυμού, όπως προέκυψε από την ανάλυση PLS (δεδομένα επικύρωσης) (Μη αποδεκτό=1, Αποδεκτό=2, Μέτριο=3, Καλό=4, Άριστο=5).

Πίνακας 3.3.1.2.1β: Πίνακας διπλής εισόδου διασταυρούμενης επικύρωσης για τα δείγματα χυμού, όπως προέκυψε από την ανάλυση PLS (δεδομένα επικύρωσης) («Άριστο-Καλό» $3,5 \leq x \leq 5$, «Μέτριο-Αποδεκτό» $2 \leq x < 3,5$ και «Μη αποδεκτό» $1 \leq x < 2$).

Πίνακας 3.4.1. Οργανοληπτική ανάλυση των δειγμάτων λειτουργικού πορτοκαλοχυμού με *A. acidoterrestris* μετά τη χρήση ΥΠΠ και ΘΕ, τα οποία συντηρήθηκαν συνολικά για 60 ημέρες (συνολική εκτίμηση του κάθε χυμού με κλίμακα από το ένα (1) έως το πέντε (5): Μη αποδεκτό=1, Αποδεκτό=2, Μέτριο=3, Καλό=4, Άριστο=5).

Πίνακας 3.4.1.1.1 Δείκτες επίδοσης κατά την επικύρωση των μοντέλων PLS-R FTIR που λήφθηκαν από τα δείγματα πορτοκαλοχυμού με όλους τους διαφορετικούς χειρισμούς (με την προσθήκη ή όχι των *A. acidoterrestris* και *Lb. pentosus* E104, χωρίς επεξεργασία ή μετά την εφαρμογή ΥΠΠ και ΘΕ) κατά τη συντήρηση στους 4 ^{o}C.

Πίνακας 3.4.1.2.1α: Πίνακας διπλής εισόδου διασταυρούμενης επικύρωσης από το μοντέλο παλινδρόμησης PLS FTIR που λήφθηκαν από τα δείγματα πορτοκαλοχυμού με όλους τους διαφορετικούς χειρισμούς (με την προσθήκη του *A. acidoterrestris* και *Lb. pentosus* E104, χωρίς επεξεργασία ή μετά την εφαρμογή ΥΠΠ και ΘΕ) κατά τη συντήρηση στους 4 ^{o}C (δεδομένα επικύρωσης) (Μη αποδεκτό=1, Αποδεκτό=2, Μέτριο=3, Καλό=4, Άριστο=5).

Πίνακας 3.4.1.2.1β: Πίνακας διπλής εισόδου διασταυρούμενης επικύρωσης από το μοντέλο παλινδρόμησης PLS FTIR που λήφθηκαν από τα δείγματα πορτοκαλοχυμού με όλους τους διαφορετικούς χειρισμούς (με την προσθήκη του *A. acidoterrestris* και *Lb. pentosus* E104, χωρίς επεξεργασία ή μετά την εφαρμογή ΥΠΠ και ΘΕ) κατά τη συντήρηση στους 4 ^{o}C (δεδομένα επικύρωσης) («Άριστο-Καλό» $3,5 \leq x \leq 5$, «Μέτριο-Αποδεκτό» $2 \leq x < 3,5$ και «Μη αποδεκτό» $1 \leq x < 2$).

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 3.1.1.1 Τυπικά φασματογραφήματα στους κυματαριθμούς 870-4000 cm^{-1} τριών τυχαίων δειγμάτων χυμού ροδάκινο από το εμπόριο (*A2*, *B1*, *D3*).

Διάγραμμα 3.1.1.2 Σύγκριση μεταξύ των παρατηρούμενων και προβλεπόμενων τιμών του pH των δειγμάτων χυμών ροδάκινου του εμπορίου από το μοντέλο παλινδρόμησης PLS (○: δεδομένα εκπαίδευσης, ♦: δεδομένα επικύρωσης).

Διάγραμμα 3.1.1.3 Σύγκριση μεταξύ των παρατηρούμενων και προβλεπόμενων τιμών του Brix των δειγμάτων χυμών ροδάκινου του εμπορίου από το μοντέλο παλινδρόμησης PLS (○: δεδομένα εκπαίδευσης, ♦: δεδομένα επικύρωσης).

Διάγραμμα 3.1.1.4 Σύγκριση μεταξύ των παρατηρούμενων και προβλεπόμενων τιμών της πούλπας των δειγμάτων χυμών ροδάκινου του εμπορίου από το μοντέλο παλινδρόμησης PLS (○: δεδομένα εκπαίδευσης, ♦: δεδομένα επικύρωσης).

Διάγραμμα 3.2.1.1 Τυπικά φασματογραφήματα στους κυματαριθμούς 870-4000 cm^{-1} δειγμάτων χυμού ροδάκινο χωρίς και με το προβιοτικό στέλεχος *Lb. plantarum* E69 στην αρχή και στο τέλος της συντήρησης στους 4 ºC. (*C0*: χυμός-μάρτυρας στην αρχή της συντήρησης, *C3*: χυμός-μάρτυρας στο τέλος της συντήρησης, *E690*: χυμός με *Lb. plantarum* E69 στην αρχή της συντήρησης, *E693*: χυμός με *Lb. plantarum* E69 στο τέλος της συντήρησης).

Διάγραμμα 3.2.1.1.1 Σύγκριση μεταξύ των παρατηρούμενων και προβλεπόμενων τιμών της ΟΜΧ των δειγμάτων χυμών ροδάκινου με τα επτά (7) στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων με προβιοτικό δυναμικό, από το μοντέλο παλινδρόμησης PLS (○: δεδομένα εκπαίδευσης, ♦: δεδομένα επικύρωσης).

Διάγραμμα 3.2.1.1.2 Σύγκριση μεταξύ των παρατηρούμενων και προβλεπόμενων τιμών των οξυγαλακτικών βακτηρίων των δειγμάτων χυμών ροδάκινου με τα επτά (7) στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων με προβιοτικό δυναμικό, από το μοντέλο παλινδρόμησης PLS (○: δεδομένα εκπαίδευσης, ♦: δεδομένα επικύρωσης).

Διάγραμμα 3.2.1.1.3 Σύγκριση μεταξύ των παρατηρούμενων και προβλεπόμενων τιμών του pH των δειγμάτων χυμών ροδάκινου με τα επτά (7) στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων με προβιοτικό δυναμικό, από το μοντέλο παλινδρόμησης PLS (○: δεδομένα εκπαίδευσης, ♦: δεδομένα επικύρωσης).

Διάγραμμα 3.3.1.1 Τυπικά φασματογραφήματα στους κυματαριθμούς 870-4000 cm^{-1} δειγμάτων χυμού πορτοκάλι χωρίς (C) και με το προβιοτικό στέλεχος *Lb. pentosus* E97 (E97) σε χαμηλό (L) (10^7) και σε υψηλό (H) (10^8) εμβόλιο, στην αρχή ($0^η$ ημέρα) και στο τέλος ($7^η$ ημέρα για το υψηλό εμβόλιο, $21^η$ ημέρα για το χαμηλό εμβόλιο) της συντήρησης στους 4 ºC.

Διάγραμμα 3.3.1.1.1 Σύγκριση μεταξύ των παρατηρούμενων και προβλεπόμενων τιμών των οξυγαλακτικών βακτηρίων των δειγμάτων χυμών πορτοκαλιού με τα έντεκα (11) προβιοτικά στελέχη, από το μοντέλο παλινδρόμησης PLS (○: δεδομένα εκπαίδευσης, ♦: δεδομένα επικύρωσης).

Διάγραμμα 3.3.1.1.2 Σύγκριση μεταξύ των παρατηρούμενων και προβλεπόμενων τιμών του pH των δειγμάτων χυμών πορτοκαλιού με τα έντεκα (11) προβιοτικά στελέχη, από το μοντέλο παλινδρόμησης PLS (○: δεδομένα εκπαίδευσης, ♦: δεδομένα επικύρωσης).

Διάγραμμα 3.4.1.1 Τυπικά φασματογραφήματα στους κυματαριθμούς 870-4000 cm^{-1} δειγμάτων χυμού πορτοκάλι α) με τον αλλοιογόνο μικροοργανισμό *Alicyclobacillus acidoterrestris* σε κανονικό (*CA*), πιεσμένο (*PA*) και θερμασμένο χυμό (*HA*), και β) με το προβιοτικό στέλεχος *Lb. pentosus* E104 (*CP*), με τον αλλοιογόνο μικροοργανισμό *Alicyclobacillus acidoterrestris* (*CA*) και με τον συνδυασμό αυτών (*CF*), στην αρχή ($0^η$ ημέρα) και στο τέλος ($22^η$ ημέρα) της συντήρησης στους 4 ºC.

Διάγραμμα 3.4.1.1.1 Σύγκριση μεταξύ των παρατηρούμενων και προβλεπόμενων τιμών της ΟΜΧ από το μοντέλο παλινδρόμησης PLS FTIR που λήφθηκαν από τα δείγματα πορτοκαλοχυμού με όλους τους διαφορετικούς χειρισμούς (με την προσθήκη του *A. acidoterrestris* και *Lb. pentosus* E104, χωρίς επεξεργασία ή μετά την εφαρμογή ΥΠΠ και ΘΕ) κατά τη συντήρηση στους 4 ºC (○: δεδομένα εκπαίδευσης, ♦: δεδομένα επικύρωσης).

Διάγραμμα 3.4.1.1.2 Σύγκριση μεταξύ των παρατηρούμενων και προβλεπόμενων τιμών των οξυγαλακτικών βακτηρίων από το μοντέλο παλινδρόμησης PLS FTIR που λήφθηκαν από τα δείγματα πορτοκαλοχυμού με όλους τους διαφορετικούς χειρισμούς (με την προσθήκη του *A. acidoterrestris* και *Lb. pentosus* E104, χωρίς επεξεργασία ή μετά την εφαρμογή ΥΠΠ και ΘΕ) κατά τη συντήρηση στους 4 ºC (○: δεδομένα εκπαίδευσης, ♦: δεδομένα επικύρωσης).

Διάγραμμα 3.4.1.1.3 Σύγκριση μεταξύ των παρατηρούμενων και προβλεπόμενων τιμών του *Alicyclobacillus* spp. από το μοντέλο παλινδρόμησης PLS FTIR που λήφθηκαν από τα δείγματα πορτοκαλοχυμού με όλους τους διαφορετικούς χειρισμούς (με την προσθήκη του *A. acidoterrestris* και *Lb. pentosus* E104, χωρίς επεξεργασία ή μετά την εφαρμογή ΥΠΠ και ΘΕ) κατά τη συντήρηση στους 4 ºC (○: δεδομένα εκπαίδευσης, ♦: δεδομένα επικύρωσης).

Διάγραμμα 3.4.1.1.4 Σύγκριση μεταξύ των παρατηρούμενων και προβλεπόμενων τιμών των σπορίων του *Alicyclobacillus* spp. από το μοντέλο παλινδρόμησης PLS FTIR που λήφθηκαν από τα δείγματα πορτοκαλοχυμού με όλους τους διαφορετικούς χειρισμούς (με την προσθήκη του *A. acidoterrestris* και *Lb. pentosus* E104, χωρίς επεξεργασία ή μετά την εφαρμογή ΥΠΠ και ΘΕ) κατά τη συντήρηση στους 4 ºC (○: δεδομένα εκπαίδευσης, ♦: δεδομένα επικύρωσης).

Διάγραμμα 3.4.1.1.5 Σύγκριση μεταξύ των παρατηρούμενων και προβλεπόμενων τιμών του pH από το μοντέλο παλινδρόμησης PLS FTIR που λήφθηκαν από τα δείγματα πορτοκαλοχυμού με όλους τους διαφορετικούς χειρισμούς (με την προσθήκη του *A. acidoterrestris* και *Lb. pentosus* E104, χωρίς επεξεργασία ή μετά την εφαρμογή ΥΠΠ και ΘΕ) κατά τη συντήρηση στους 4 ºC (○: δεδομένα εκπαίδευσης, ♦: δεδομένα επικύρωσης).

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 3.2.1. Καταμέτρηση ΟΜΧ των δειγμάτων χυμών ροδάκινου που εμβολιάστηκαν με τα επτά (7) οξυγαλακτικά βακτήρια με προβιοτικό δυναμικό και συντηρήθηκαν για τρεις (3) ημέρες (**E10:** *Lb. plantarum* E10, **E69:** *Lb. plantarum* E69, **E104:** *Lb. pentosus* E104, **E94:** *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* E94, **Sh:** *Lb. casei* Shirota, **E93:** *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* E93, **E108:** *Lb. pentosus* E108).

Σχήμα 3.2.2. Καταμέτρηση οξυγαλακτικών βακτηρίων των δειγμάτων χυμών ροδάκινου που εμβολιάστηκαν με τα επτά (7) οξυγαλακτικά βακτήρια με προβιοτικό δυναμικό και συντηρήθηκαν για τρεις (3) ημέρες (**E10:** *Lb. plantarum* E10, **E69:** *Lb. plantarum* E69, **E104:** *Lb. pentosus* E104, **E94:** *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* E94, **Sh:** *Lb. casei* Shirota, **E93:** *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* E93, **E108:** *Lb. pentosus* E108).

Σχήμα 3.2.3. Τιμές pH των δειγμάτων χυμού ροδάκινου που εμβολιάστηκαν με τα επτά (7) οξυγαλακτικά βακτήρια με προβιοτικό δυναμικό και συντηρήθηκαν για τρεις (3) ημέρες (**E10:** *Lb. plantarum* E10, **E69:** *Lb. plantarum* E69, **E104:** *Lb. pentosus* E104, **E94:** *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* E94, **Sh:** *Lb. casei* Shirota, **E93:** *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* E93, **E108:** *Lb. pentosus* E108).

Σχήμα 3.3.1. Καταμέτρηση ΟΜΧ (■), οξυγαλακτικών βακτηρίων (■) και pH (■) των δειγμάτων χυμών πορτοκαλιού (μάρτυρες) που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα με τον εμβολιασμό των έντεκα (11) οξυγαλακτικών βακτηρίων με προβιοτικό δυναμικό κατά τη διάρκεια συντήρησης 21 ημερών.

Σχήμα 3.3.2. Καταμέτρηση οξυγαλακτικών βακτηρίων των δειγμάτων χυμών πορτοκαλιού που εμβολιάστηκαν με τα έντεκα (11) οξυγαλακτικά βακτήρια, με υψηλό εμβόλιο (10^8) και συντηρήθηκαν για επτά (7) ημέρες (**E10:** *Lb. plantarum* E10, **E69:** *Lb. plantarum* E69, **E93:** *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* E93, **E94:** *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* E94, **E97:** *Lb. pentosus* E97, **E104:** *Lb. pentosus* E104, **E108:** *Lb. pentosus* E108, **B281:** *Lb. Pentosus* B281, **B282:** *Lb. plantarum* B282, **GG:** *Lb. ramnosus* GG, **Sh:** *Lb. casei* Shirota).

Σχήμα 3.3.3. Μέτρηση pH των δειγμάτων χυμών πορτοκαλιού που εμβολιάστηκαν με τα έντεκα (11) οξυγαλακτικά βακτήρια, με υψηλό εμβόλιο (10^8) και συντηρήθηκαν για επτά (7) ημέρες (**E10:** *Lb. plantarum* E10, **E69:** *Lb. plantarum* E69, **E93:** *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* E93, **E94:** *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* E94, **E97:** *Lb. pentosus* E97, **E104:** *Lb. pentosus* E104, **E108:** *Lb. pentosus* E108, **B281:** *Lb. Pentosus* B281, **B282:** *Lb. plantarum* B282, **GG:** *Lb. ramnosus* GG, **Sh:** *Lb. casei* Shirota).

Σχήμα 3.3.4. Καταμέτρηση οξυγαλακτικών βακτηρίων των δειγμάτων χυμών πορτοκαλιού που εμβολιάστηκαν με τα έντεκα (11) οξυγαλακτικά βακτήρια, με χαμηλό εμβόλιο (10^7) και συντηρήθηκαν για είκοσι-μια (21) ημέρες (**E10:** *Lb. plantarum* E10, **E69:** *Lb. plantarum* E69, **E93:** *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* E93, **E94:** *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* E94, **E97:** *Lb. pentosus* E97, **E104:** *Lb. pentosus* E104, **E108:** *Lb. pentosus* E108, **B281:** *Lb. pentosus* B281, **B282:** *Lb. plantarum* B282, **GG:** *Lb. ramnosus* GG, **Sh:** *Lb. casei* Shirota).

Σχήμα 3.3.5. Μέτρηση pH των δειγμάτων χυμών πορτοκαλιού που εμβολιάστηκαν με τα έντεκα (11) οξυγαλακτικά βακτήρια, με χαμηλό εμβόλιο (10^7) και

συντηρήθηκαν για είκοσι-μια (21) ημέρες (**E10:** *Lb. plantarum* E10, **E69:** *Lb. plantarum* E69, **E93:** *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* E93, **E94:** *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* E94, **E97:** *Lb. pentosus* E97, **E104:** *Lb. pentosus* E104, **E108:** *Lb. pentosus* E108, **B281:** *Lb. Pentosus* B281, **B282:** *Lb. plantarum* B282, **GG:** *Lb. ramnosus* GG, **Sh:** *Lb. casei* Shirota).

Σχήμα 3.4.1. Καταμέτρηση ΟΜΧ (♦), οξυγαλακτικών βακτηρίων (■) και *Alicyclobacillus* spp. (▲) των δειγμάτων χυμών πορτοκαλιού (μάρτυρες) που συντηρήθηκαν συνολικά για 60 ημέρες (**α:** μάρτυρας, **β:** μάρτυρας με ΘΕ, **γ:** μάρτυρας με ΥΥΠ).

Σχήμα 3.4.2. Καταμέτρηση ΟΜΧ (♦), οξυγαλακτικών βακτηρίων (■), *Alicyclobacillus* spp. (▲) και *Alicyclobacillus* spp. (σπόρια) (×) των δειγμάτων χυμών πορτοκαλιού που εμβολιάστηκαν με τον αλλοιογόνο μικροοργανισμό *A. acidoterrestris* και συντηρήθηκαν συνολικά για 21 ημέρες (**α:** χυμός με *A. acidoterrestris*, **β:** χυμός με *A. acidoterrestris* με ΘΕ, **γ:** χυμός με *A. acidoterrestris* με ΥΥΠ).

Σχήμα 3.4.3. Καταμέτρηση ΟΜΧ (♦), οξυγαλακτικών βακτηρίων (■) και *Alicyclobacillus* spp. (▲) των δειγμάτων χυμών πορτοκαλιού που εμβολιάστηκαν με το στέλεχος *Lb. pentosus* E104 και συντηρήθηκαν συνολικά για 21 ημέρες (**α:** χυμός με *Lb. pentosus* E104, **β:** χυμός με *Lb. pentosus* E104 με ΘΕ, **γ:** χυμός με *Lb. pentosus* E104 με ΥΥΠ).

Σχήμα 3.4.4. Καταμέτρηση ΟΜΧ (♦), οξυγαλακτικών βακτηρίων (■), *Alicyclobacillus* spp. (▲) και *Alicyclobacillus* spp. (σπόρια) (×) των δειγμάτων χυμών πορτοκαλιού που εμβολιάστηκαν με το στέλεχος *Lb. pentosus* E104 σε συνδυασμό με τον αλλοιογόνο μικροοργανισμό *A. acidoterrestris* και συντηρήθηκαν συνολικά για 21 ημέρες (**α:** χυμός με *Lb. pentosus* E104 & *A. acidoterrestris*, **β:** χυμός με *Lb. pentosus* E104 & *A. acidoterrestris* με ΘΕ, **γ:** χυμός με *Lb. pentosus* E104 & *A. acidoterrestris* με ΥΥΠ).

Σχήμα 3.4.5. Καταμέτρηση pH των δειγμάτων χυμών πορτοκαλιού (μάρτυρες) (♦), των χυμών που εμβολιάστηκαν με τον αλλοιογόνο μικροοργανισμό *A. acidoterrestris* (■), με το στέλεχος *Lb. pentosus* E104 (▲) και με τον συνδυασμό των δύο παραπάνω μικροοργανισμών (×) και συντηρήθηκαν συνολικά για 60 και 21 ημέρες, αντίστοιχα (**α:** χυμός χωρίς επεξεργασία, **β:** χυμός με ΘΕ, **γ:** χυμός με ΥΥΠ).

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικονα 1.6.1.1 Σχηματική αναπαράσταση φασματοφωτόμετρου FTIR με συμβολόμετρο(https://repository.kallipos.gr/bitstream/11419/6175/2/01_chapter_7.pdf).

Εικόνα 2.1.1.1 Μέθοδος διαδοχικών αραιώσεων.

Εικόνα 2.1.1.2 Μέθοδος επίστρωσης σε τρυβλίο.

Εικόνα 2.1.1.3 Τρυβλία με θρεπτικό υλικό Plate Count Agar έτοιμα για χρήση.

Εικόνα 2.1.1.4 Τρυβλία με θρεπτικό υλικό Rose Bengal Chloramphenicol Agar έτοιμα για χρήση.

Εικόνα 2.1.1.5 Τρυβλία με θρεπτικό υλικό M.R.S. (ISO) Agar έτοιμα για χρήση.

Εικόνα 2.1.2.1 Πεχάμετρο τύπου Hanna Instruments HI2211-02 Basic pH/ORP Benchtop Meter.

Εικόνα 2.1.2.2 Διαθλασίμετρο Index Instruments τύπου GPR 12-70, σειράς SN 26-006.

Εικόνα 2.1.2.1.1 FTIR τύπου Frontier Infrared Spectroscopy System της PerkinElmer.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Χυμοί φρούτων

Ο χυμός φρούτων ορίζεται ως το ζυμώσιμο αλλά μη ζυμωθέν προϊόν που λαμβάνεται από το βρώσιμο τμήμα υγιών και ώριμων φρούτων, ενός ή πολλών ειδών, νωπών ή διατηρημένων με ψύξη ή κατάψυξη και έχει το χρώμα, το άρωμα και τη χαρακτηριστική γεύση των χυμών των φρούτων από τα οποία προέρχεται (Οδηγία 2001/112/ΕΚ). Οι χυμοί φρούτων καταναλώνονται ευρέως και θεωρούνται ως ένα προϊόν φυσικής προέλευσης θρεπτικών συστατικών. Ωστόσο, η υψηλή ενεργότητα νερού, η υψηλή περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες και διάφορα άλλα θρεπτικά συστατικά των φρούτων ευνοούν την ανάπτυξη μικροοργανισμών.

1.1.1 Μικροβιακή επιμόλυνση χυμών

Η μικροβιακή επιμόλυνση των χυμών έχει συσχετιστεί με αρκετές περιπτώσεις τροφιμογενών νόσων που έχουν ως αποτέλεσμα την απειλή της ανθρώπινης υγείας, αλλά και με περιπτώσεις μικροβιακής αλλοίωσης και ποιοτικής υποβάθμισης των προϊόντων που έχουν οδηγήσει σε σημαντικές οικονομικές απώλειες. Αρχικά, το pH του χυμού θεωρήθηκε ότι είναι ανασταλτικός παράγοντας για την επιβίωση των παθογόνων βακτηρίων. Το 1991, ωστόσο, μια επιδημία με *Escherichia coli* O157: H7 σε παστεριωμένο χυμό μηλίτη οδήγησε σε αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο (Montville et al.,2010). Σύμφωνα με το Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων των Η.Π.Α., υπάρχουν πολλά περιστατικά τροφιμογενών λοιμώξεων που έχουν συσχετιστεί με την κατανάλωση χυμών. Οι αιτιολογικοί παράγοντες επιδημικών κρίσεων που έχουν αναγνωριστεί περιλαμβάνουν τα βακτήρια *E.coli* O157: H7, *E. coli* O111, *Salmonella enterica*, καθώς και παράσιτα του γένους *Cryptosporidium*. Ο Φορέας Τροφίμων και Φαρμάκων των Η.Π.Α., προέβη το 2001 (FDA, 2001) στη δημοσίευση κανονισμού που αφορά την ανάπτυξη και την εφαρμογή συστημάτων ανάλυσης κινδύνων και κρίσιμων σημείων ελέγχου στη βιομηχανία των χυμών (HACCP Juice Regulation).

Ωστόσο, όπως είναι αναμενόμενο, ο κανονισμός HACCP για τους χυμούς ισχύει μόνο για τους παθογόνους μικροοργανισμούς και δεν υπάρχει σχετικός κανονισμός σχετικά με την αλλοίωση. Επομένως, οι βιομηχανίες χυμών και ποτών είναι εκείνες οι οποίες θα πρέπει να λαμβάνουν τα κατάλληλα μέτρα για να διασφαλίσουν την ποιότητα των προϊόντων τους.

1.1.2 Αλλοίωση χυμών

Οι μικροοργανισμοί που εμφανίζονται στα προϊόντα των χυμών είναι γενικά μη παθογόνοι. Οι τιμές pH του χυμού κυμαίνονται από 2,6 έως 4,4. Ζύμες, μύκητες και οξυγαλακτικά βακτήρια μπορούν να αναπτυχθούν στο χυμό, προκαλώντας την αλλοίωσή του και σχηματίζοντας ενώσεις με δυσάρεστη γεύση.

Όσον αφορά τις ζύμες, αυτές οι οποίες εμφανίζονται συχνότερα στην αλλοίωση χυμών είναι διάφορα είδη του γένους *Saccharomyces* (με την ζύμη *Saccharoinyces cerevisiae* να είναι πιο γνωστή), *Candida* και *Rhodotoroula*. Τα κυριότερα αλλοιογόνα γένη γαλακτικών βακτηρίων είναι τα *Leuconostoc* και *Lactobacillus*, τα οποία προκαλούν το σχηματισμό μιας ανεπιθύμητης βουτυρώδους γεύσης, λόγω της παραγωγής του διακετυλίου σαν μεταβολικό προϊόν (Steyn et al., 2011). Τα τελευταία χρόνια, βακτήρια του γένους *Alicyclobacillus* έχουν βρεθεί σε φρέσκο παστεριωμένο χυμό πορτοκαλιού (Durak et al., 2010, Danyluk et al., 2011, Steyn et al., 2011). Πρόκειται για μη παθογόνα βακτήρια, τα οποία προκαλούν αλλοίωση στο χυμό, προσδίδοντάς του έντονη μυρωδιά, δυσάρεστη γεύση και άσπρο ίζημα.

1.2 Προβιοτικά

Η επανάσταση στο βιοτικό επίπεδο, οι διατροφικές συνήθειες και η αυξημένη ευαισθητοποίηση για την υγεία έχουν μετατοπίσει το ενδιαφέρον των καταναλωτών σε τρόφιμα με ευρύτερα οφέλη για την υγεία. Ο καταναλωτής παρουσιάζει μεγαλύτερο ενδιαφέρον σχετικά με το ρόλο της διατροφής στην παράταση της ζωής και την ευημερία, καθώς και στην πρόληψη των μη μεταδοτικών χρόνιων ασθενειών (Granato et al., 2010). Τα προβιοτικά είναι μέρος αυτών των τροφών και τα οφέλη στην ανθρώπινη υγεία προωθούνται σταδιακά από τους επαγγελματίες του κλάδου της υγείας και του ιατρικού τομέα (Perricone et al., 2015).

Τα προβιοτικά ορίζονται ως οι ζωντανοί μικροοργανισμοί που όταν χορηγούνται σε επαρκή ποσότητα παρέχουν πολλά οφέλη στην υγεία του ξενιστή, δηλαδή στον ανθρώπινο ζωντανό οργανισμό (WHO, 2006). Στο ανθρώπινο έντερο, τα βακτήρια *Lactobacillus*, *Leuconostoc* και *Bifidum* αναπτύσσονται σε καλό βαθμό και έτσι αποτρέπουν την ανάπτυξη δυσμενών εντερικών παθογόνων. Η πρόληψη λοίμωξης του εντερικού συστήματος, η ενισχυμένη ανοσία, η μειωμένη περιεκτικότητα σε χοληστερόλη, η σύνθεση της βιταμίνης Β, των νικοτινικών και φυλλικών οξέων, η διέγερση της απορρόφησης του ασβεστίου, η βελτίωση της

πεπτικότητας των πρωτεϊνών, ο έλεγχος επίδρασης των τροφιμογενών παθογόνων και η θεραπεία της υπερχοληστερολαιμίας, των καρδιαγγειακών παθήσεων και της παγκρεατίτιδας, είναι κάποια από τα οφέλη στον ανθρώπινο οργανισμό (Homayouni et al., 2012, Sanders et al., 2005, Survarna & Boby, 2005, Parvez et al., 2006, Oxman, et al., 2001).

1.2.1 Ανάγκη για μη γαλακτοκομικά προβιοτικά

Η δυσανεξία στη λακτόζη, η περιεκτικότητα σε χοληστερόλη και οι αλλεργικές πρωτεΐνες γάλακτος είναι περιοριστικοί παράγοντες στην ανάπτυξη προβιοτικών γαλακτοκομικών προϊόντων (Yoon et al., 2004). Συνολικά το 75% του παγκόσμιου πληθυσμού πάσχει από ένα επίπεδο δυσανεξίας στη λακτόζη (Silanikove et al., 2015). Η δυσανεξία στη λακτόζη είναι η απουσία παραγωγής του ενζύμου της λακτάσης, που υδρολύει τη λακτόζη σε απορροφήσιμα σάκχαρα (δηλαδή γλυκόζη και γαλακτόζη) για την παροχή ενέργειας. Τα προβιοτικά βοηθούν στην απελευθέρωση της β-γαλακτοσιδάσης στο λεπτό έντερο, η οποία βοηθά στην πέψη / καταστροφή της λακτόζης. Έτσι, η πρόσληψη προβιοτικών μπορεί να μειώσει τη σοβαρότητα της δυσανεξίας στη λακτόζη, αλλά η αποτελεσματικότητα εξαρτάται από τον αριθμό των κυττάρων στο προϊόν καθώς και από την ποσότητα της υπάρχουσας λακτόζης (Deng et al., 2015). Επιπλέον, με την αύξηση των χορτοφάγων καταναλωτών, τόσο στις ανεπτυγμένες, όσο και στις αναπτυσσόμενες χώρες, αυξάνεται και η ζήτηση για προϊόντα με προβιοτικά φυτικής προέλευσης. Τα υψηλά επίπεδα χοληστερόλης των γαλακτοκομικών προϊόντων, ο μεγάλος αριθμός ατόμων με δυσανεξία στη λακτόζη και οι οικονομικοί λόγοι στις αναπτυσσόμενες χώρες οδηγούν στην αναζήτηση εναλλακτικών μη γαλακτοκομικών προβιοτικών προϊόντων που περιέχουν θρεπτικά συστατικά και παράγοντες που προάγουν την υγεία πχ. φρούτα, λαχανικά κλπ. (Panghal et al., 2017b), παρουσιάζουν έλλειψη περιεκτικότητας σε χοληστερόλη και είναι πλούσια σε πρωτεΐνες, άμυλο, μέταλλα, φυτικές ίνες, βιταμίνες και αντιοξειδωτικές ουσίες.

1.2.2 Προϊόντα φρούτων ως φορείς προβιοτικών

Τα φρούτα είναι ιδανικό προϊόν για την παρασκευή λειτουργικών τροφίμων και έχουν υψηλή θρεπτική αξία λόγω της παρουσίας διαφόρων φυτοχημικών και αντιοξειδωτικών συστατικών, βιταμινών, διαιτητικών ινών, απουσίας χοληστερόλης κ.α. (Yoon et al., 2004). Τα φρούτα έχουν καλό γευστικό και αρωματικό προφίλ

επομένως είναι κατάλληλο μέσο για την παραγωγή προβιοτικών τροφίμων (Panghal et al., 2017b). Η εξαιρετικά ευπαθής φύση και η μικρή διάρκεια ζωής τους όμως απαιτεί άμεση επεξεργασία ώστε να μειώνονται οι απώλειες μετά τη συγκομιδή. Η ανάπτυξη των προβιοτικών προϊόντων από φρούτα μπορεί να αποτελέσει μια προσέγγιση για τη βελτίωση της διαθεσιμότητας και της αξίας του προϊόντος στην αγορά (Panghal et al., 2017a). Επίσης, τα αλλεργιογόνα που προέρχονται από τα γαλακτοκομικά προϊόντα εμποδίζουν πολλούς ανθρώπους να καταναλώνουν γαλακτοκομικά με προβιοτικά. Τα φρούτα, όμως, είναι απαλλαγμένα από γαλακτοκομικά αλλεργιογόνα, λακτόζη και χοληστερόλη, γι' αυτό και κρίνονται κατάλληλα ως φορείς (Luckow & Delahunty, 2004). Παρακάτω, παρουσιάζονται διάφορες προσπάθειες που έχουν πραγματοποιηθεί για την παρασκευή προβιοτικών χυμών με βάση τα φρούτα.

Το «hardaliye» είναι ένα μη αλκοολούχο, μη γαλακτοκομικό, προβιοτικό, παραδοσιακό ρόφημα της Τουρκίας από σταφύλια, ζυμωμένο με οξυγαλακτικά βακτήρια, θρυμματισμένους σπόρους μουστάρδας και βενζοϊκά οξέα. Το αιθέριο έλαιο από τους σπόρους της μουστάρδας επηρεάζει τη ζύμωση δίνοντας ένα χαρακτηριστικό άρωμα στο τελικό προϊόν. Το βενζοϊκό οξύ, επίσης, επηρεάζει τη ζύμωση αναστέλλοντας ή μειώνοντας την παραγωγή αλκοόλης. Το pH του «hardaliye» κυμαίνεται από 3,21 έως 3,97 (Malganji et al., 2015) και μπορεί να αυξηθεί ελαφρώς με την προσθήκη γαρίφαλου ή πιπερόριζας. Η ένταση του χρώματος, τα φυτοχημικά και τα αντιοξειδωτικά συστατικά του «hardaliye», αλλάζουν ανάλογα με τις ποικιλίες των σταφυλιών και τη διαδικασία παρασκευής του (Coskun, 2017). Τα προβιοτικά βακτήρια που χρησιμοποιούνται στη ζύμωση του προϊόντος αυτού είναι τα *L. casei* subsp. *pseudoplantarum* και *L. paracasei* subsp. *paracasei* που ακολουθούνται κυρίως από τους *L. sanfranciscensis* (πρώην *L. sanfrancisco*), *L. brevis, L. pontis, L. acetotolerans* και *L. vaccinostercus* (Güven & Aksoy, 2009).

Οι Luckow και Delahunty (2004) σε μια έρευνά τους με βάση τους καταναλωτές, σύγκριναν τις ιδιότητες του προβιοτικού χυμού φραγκοστάφυλου που περιείχε τον *L. plantarum* και του συμβατικού χυμού φραγκοστάφυλου. Το προβιοτικό ποτό ήταν πιο αποδεκτό όσον αφορά την εμφάνιση, το άρωμα, τη γεύση, την υφή και τα θρεπτικά χαρακτηριστικά και προτιμήθηκε περισσότερο από τους καταναλωτές.

Ένα άλλο φρούτο που δοκιμάστηκε ήταν το ροδάκινο. Ο χυμός ροδάκινο μπορεί να ζυμωθεί από τον μικροοργανισμό *L. delbrueckii* και είναι κατάλληλος για την παραγωγή προβιοτικού ποτού (Pakbin et al., 2014). Επίσης, οι Chen et al. (2012) παρασκεύασαν το «Yan-taozih» που είναι τουρσί ροδάκινο με οξυγαλακτικά βακτήρια όπως τα *L. brevis, L. lactis, Weissella cibaria, W. paramesenteroides, W. minor, Leuconostoc mesenteroides* και *Enterococcus faecalis*.

Το φρούτο κάσιους (cashew apple, *Anacardium occidentale L.*) χρησιμοποιήθηκε από τους Pereira, Maciel και Rodrigues (2011) για την παραγωγή προβιοτικών χυμών με βακτήρια *L. casei*. Το κάσιους, το οποίο προέρχεται από βόρειες και βορειοανατολικές περιοχές της Βραζιλίας, έχει υψηλή περιεκτικότητα σε ασκορβικό οξύ, φαινόλη, αντιοξειδωτικά, μέταλλα και είναι πλούσια πηγή γλυκόζης, φρουκτόζης και άνθρακα. Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του κάσιους παράγονται ολιγοσακχαρίτες. Το ποτό κάσιους έδειξε να υποστηρίζει καλύτερα την ανάπτυξη προβιοτικών βακτηρίων *L. casei,* σε σύγκριση με τα γαλακτοκομικά προϊόντα. Το ζυμωμένο προβιοτικό ποτό από κάσιους μπορεί να αποθηκευτεί για 42 ημέρες σε κατάψυξη (Pereira et al., 2011), επομένως έχει τη δυνατότητα να εμπορευματοποιηθεί.

Η παρασκευή χυμού μάνγκο με προβιοτικά έγινε με τη βοήθεια οξυγαλακτικών και άλλων προβιοτικών βακτηρίων (Reddy, Min, & Wee, 2015). Ο χυμός μάνγκο ζυμώθηκε στους 30 °C για 72 ώρες και το pH μειώθηκε στο 3,2 κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Τα προβιοτικά οξυγαλακτικά βακτήρια που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα *L. acidophilus, L. delbrueckii, L. plantarum* και *L.* casei. Μεταξύ αυτών όμως, τα βακτήρια *L. plantarum* κατανάλωσαν τα σάκχαρα με τον ταχύτερο ρυθμό.

Οι Khatoon και Gupta (2015) ανακάλυψαν ότι το μοσχολέμονο και ο χυμός ζαχαροκάλαμου μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη παρασκευή προβιοτικού ποτού. Πραγματοποιήθηκαν διάφοροι συνδυασμοί χυμών με βότανα Aswagandha (*Withania sominifera*), πράσινο τσάι (*Camellia sinensis*), χυμό από το φυτό σιταριού, ορό γάλακτος και βρώμη για να φτιάξουν χυμούς εμπλουτισμένους με φυτοχημικά. Έτσι η μελέτη έδειξε ότι το μοσχολέμονο και ο χυμός ζαχαροκάλαμου μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παρασκεύη λειτουργικού προβιοτικού ποτού, το οποίο θα μπορεί να καταναλώνεται και από άτομα με δυσανεξία στη λακτόζη.

Χυμός πορτοκαλιού με τον προβιοτικό μικροοργανισμό *L. plantarum* παρασκευάστηκε και συγκρίθηκε με συμβατικό προϊόν. Οι Luckow και Delahunty

(2004) ανέφεραν ότι η προσθήκη 10% (v/v) χυμού τροπικών φρούτων, κυρίως ανανά, μάνγκο ή φρούτων του πάθους, οδηγεί στην εμφανή μείωση των μη αποδεκτών αρωμάτων, στα οποία οφείλεται η μειωμένη αποδοχή των προβιοτικών ποτών από τους καταναλωτές.

Ο φρέσκος χυμός ροδιού περιέχει 85,4% νερό και αποτελεί σημαντική πηγή ισχυρών αντιοξειδωτικών όπως βιταμίνη C, βιταμίνη E, ανθοκυανίνες, φαινολικά, ασκορβικό οξύ, συνένζυμο Q-10 και α-λιποϊκό οξύ. Το ποσοστό των αντιοξειδωτικών στο χυμό ροδιού είναι υψηλότερο από αυτό στο πράσινο τσάι και το κόκκινο κρασί (Thakur & Sharma, 2017). Το ρόδι διαθέτει συστατικά που προάγουν την υγεία με αντι-ιικά, αντιμικροβιακά και αντικαρκινικά αποτελέσματα. Οι Thakur και Sharma (2017) παρασκεύασαν χυμό ροδιού, εμβολιασμένο με προβιοτικές καλλιέργειες (10%) των *L. bulgaricus* και *L. plantarum* (1:1), οι οποίες ζυμώθηκαν για 7 ώρες. Η μικροβιολογική ανάλυση έδειξε ότι το ζυμωμένο προβιοτικό ποτό περιείχε το επιθυμητό επίπεδο προβιοτικών καλλιεργειών (10^9 CFU/ml), το οποίο είναι χρήσιμο για τη διατήρηση της υγείας του εντέρου.

1.2.3 Προκλήσεις στην βιομηχανία σχετικά με τα προβιοτικά

Τα φρούτα αντιπροσωπεύουν ένα πολλά υποσχόμενο μέσο για τα προβιοτικά βακτήρια.. Ωστόσο, υπάρχουν ορισμένοι περιορισμοί που θα μπορούσαν να αποκλείσουν την παραγωγή προβιοτικών, μη γαλακτοκομικών προϊόντων σε βιομηχανικό επίπεδο, όπως είναι τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και η γενική αποδοχή, με σημαντικότερο περιορισμό την επιβίωση των προβιοτικών κατά την αποθήκευση (Perricone et al., 2015). Οι επιλεγμένοι μικροοργανισμοί θα πρέπει, επίσης, να έχουν την ικανότητα να επιβιώνουν στο ανθρώπινο έντερο, να έχουν καλά χαρακτηριστικά ανάπτυξης, να μη είναι παθογόνα και να έχουν καλό αντίκτυπο στην υγεία των καταναλωτών (Tripathi & Giri, 2014).

1.2.3.1 Επιλογή προβιοτικών

Για την ανάπτυξη ενός νέου τροφίμου με προβιοτικά, η επιλογή του προβιοτικού μικρργανισμού αποτελεί την κύρια πρόκληση στις βιομηχανίες τροφίμων. Η επιλογή του μικροοργανισμού εξαρτάται από τη βιωσιμότητα κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας και αποθήκευσης, την επιβίωση στο έντερο και τη συνολική επίδραση στην ανθρώπινη υγεία (Ventura & Perozzi, 2011). Άλλα κριτήρια περιλαμβάνουν λειτουργικούς και τεχνολογικούς κανονισμούς, καθώς και

κανονισμούς ασφαλείας. Τα *Bifidobacterium, Lactobacillus, Enterococcus, Saccharomyces, Streptococcus, Pediococcus, Propionibacterium* είναι τα κύρια γένη προβιοτικών βακτηρίων τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παρασκευή προβιοτικών μη γαλακτοκομικών προϊόντων. Τα στελέχη *Bifidobacterium* και *Lactobacillus* αποτελούν φυσική χλωρίδα της ανθρώπινης εντερικής οδού, γι' αυτό και διάφορα στελέχη από *Lactobacillus acidophilus, L. crispatus, L. casei, L. delbrueckii subsp. B. bacidum, B. infantis, B. breve, L. L. fertisum, L. gasseri, L. johnsonii, L. paracasei, L. plantarum, L. rhamnosus, L. reuteri, L. helveticus, B. lactis, B. Longum, B. Essensis, B. Adolescentis, B. Laterosporus* και άλλα είδη όπως τα *Escherichia coli* Nissle, *Saccharomyces cerevisiae var. boulardii, Streptococcus thermophilus, Enterococcus faecium, Propionibacterium spp., Pediococcus spp.* και *Leuconostoc spp.* επιλέγονται κυρίως για ζύμωση. Οι ζύμες ανήκουν κυρίως στους *Saccharomyces cerevisiae var. boulardii* και θεωρούνται ως βασικοί προβιοτικοί μικροοργανισμοί για τα μη γαλακτοκομικά προβιοτικά τρόφιμα (Ranadheera, Baines, & Adams, 2010).

1.2.3.2 Ποσοστό βακτηρίων

Η βιωσιμότητα και η βέλτιστη συγκέντρωση των προβιοτικών μικροοργανισμών είναι πάντοτε σημαντική, αφού η πρόσφατη τάση είναι να υπάρχουν τουλάχιστον ένα δισεκατομμύριο βιώσιμα κύτταρα ανά 100 γραμμάρια προϊόντος, για να δηλωθεί προβιοτικό και λειτουργικό ένα προϊόν (Settanni & Moschetti, 2010). Ανάλογα με την κινητική αύξησης του μικροοργανισμού και λαμβάνοντας υπόψη τις συνθήκες αποθήκευσης και την ανοχή του σε χαμηλό pH και χολή, υπολογίζεται η αρχική συγκέντρωση του εμβολίου. Πρόσφατα, αποκαλύφθηκε ότι η μικροενθυλάκωση βελτιώνει τους ρυθμούς επιβίωσης των προβιοτικών μικροοργανισμών κατά τη διάρκεια της γαστρικής διαμετακόμισης σε in vitro δοκιμές, γι' αυτό και θεωρείται μια πολλά υποσχόμενη μέθοδος.

1.2.3.3 Τοξικότητα

Παράμετροι ασφάλειας όπως η παθογένεια, η μολυσματικότητα, η τοξικότητα, η μεταβολική δραστηριότητα και οι εγγενείς ιδιότητες όπως η αντίσταση στα αντιβιοτικά είναι τα βασικά κριτήρια επιλογής του προβιοτικού οργανισμού (Tripathi & Giri, 2014). Αν και τα περισσότερα προβιοτικά είναι ευεργετικά, αρκετοί

προβιοτικοί μικροοργανισμοί έχουν αρνητικές επιπτώσεις και πρέπει να εξεταστούν πριν την εισαγωγή τους στα τρόφιμα.

1.2.3.4 Σταθερότητα προβιοτικών κατά την επεξεργασία

Οι συνθήκες επεξεργασίας, όπως η υψηλή θερμική επεξεργασία, η θερμοκρασία επώασης, η θερμοκρασία πλήρωσης, ο ρυθμός ψύξης, τα συνολικά στερεά, οι μηχανές συσκευασίας, τα υλικά συσκευασίας και οι συνθήκες αποθήκευσης είναι βασικοί παράγοντες που καθορίζουν τη βιωσιμότητα των προβιοτικών μικροοργανισμών στο τελικό προϊόν (Perricone et al., 2015). Άλλες παράμετροι που επηρεάζουν την βιωσιμότητα των μικροοργανισμών είναι τα στελέχη των προβιοτικών, τα ποσοστά και η αναλογία του εμβολίου, τα επίπεδα οξυγόνου, ο όγκος, το pH, η τιτλοδοτημένη οξύτητα, η ενεργότητα νερού, η παρουσία αλάτων, σακχάρων και χημικών ουσιών, όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου, οι βακτηριοσίνες, οι τεχνητές γεύσεις και οι χρωστικές (Tripathi & Giri, 2014). Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης η έκθεση στο οξυγόνο μπορεί να είναι επιβλαβής για τους προβιοτικούς μικροοργανισμούς, οπότε η διαδικασία θα πρέπει να μεταφέρεται υπό κενό (Gaudreau et al., 2016).

1.2.3.5 Σταθερότητα προβιοτικών κατά την αποθήκευση

Ο επαρκής αριθμός προβιοτικών μικροοργανισμών τη στιγμή της κατανάλωσης αποτελεί μια πρόκληση, καθώς οι συνθήκες αποθήκευσης επηρεάζουν τη βιωσιμότητά τους (Tripathi & Giri, 2014). Τα πρόσθετα και διάφορα συστατικά των τροφίμων, όπως τα σάκχαρα, τα γλυκαντικά, τα άλατα, οι αρωματικές ενώσεις, οι φυσικές ή τεχνητές χρωστικες, οι φυσικές ή τεχνητές αρωματικές ενώσεις, τα συντηρητικά, τα ένζυμα και τα νιτρώδη μπορούν να εμποδίσουν την ανάπτυξη των προβιοτικών (Lee & Salminen, 2009). Τα βακτήρια *Lactobacillus* είναι γενικά πιο ισχυροί προβιοτικοί μικροοργανισμοί από τα *Bifidobacterium* και μπορούν να επιβιώσουν σε δύσκολες συνθήκες αποθήκευσης και επεξεργασίας (Sheehan, Ross, & Fitzgerald, 2007). Τα *Lactobacillus* είναι γενικά ανθεκτικά σε χαμηλό pH, συνεπώς, είναι τεχνολογικά κατάλληλα για εφαρμογές στα τρόφιμα σε σύγκριση με άλλους προβιοτικούς μικροοργανισμούς (Lee & Salminen, 2009).

1.2.3.6 Οργανοληπτικά κριτήρια

Στην παραγωγή μη γαλακτοκομικών προβιοτικών προϊόντων παρατηρούνται οργανοληπτικές αλλαγές μετά την προσθήκη των προβιοτικών βακτηρίων. Η γεύση

και το άρωμα του προϊόντος μεταβάλλονται με την προσθήκη προβιοτικών, λόγω της παραγωγής διαφόρων μεταβολικών συστατικών, όπως είναι το γαλακτικό οξύ και άλλοι μεταβολίτες, κατά τη διάρκεια της ζύμωσης και κατά την αποθήκευση. Σημαντική πρόκληση για τα προβιοτικά προϊόντα είναι και η αποδοχή τους από τους καταναλωτές. Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, τα προβιοτικά βακτήρια ζυμώνουν το υδατανθρακικό περιεχόμενο των φρούτων, με αποτέλεσμα την παραγωγή αερίων και ποσότητας αλκοόλης. Γι' αυτό, η παρουσία της προβιοτικής καλλιέργειας στα τρόφιμα δεν θα πρέπει να επηρεάζει δυσμενώς τις οργανοληπτικές ιδιότητες του προϊόντος (Mohammadi et al., 2011).

1.3 Παστερίωση χυμών φρούτων

Η παστερίωση είναι μια ήπια θερμική μέθοδος επεξεργασίας που στοχεύει στην καταστροφή μέρους των μικροοργανισμών, συχνά των παθογόνων, που υπάρχουν στο τρόφιμο. Η μέθοδος αυτή έχει σχεδιαστεί επίσης, για να αδρανοποιούνται τα βλαστικά κύτταρα των παθογόνων μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένων των βλαστικών κυττάρων των σπορογόνων βακτηρίων. (Ramesh, 1999, Fellows, 2000).

Το FDA δεν έχει ορίσει κάποια συγκεκριμένη μέθοδο παστερίωσης, λόγω των μοναδικών χαρακτηριστικών των διαφόρων τύπων και ειδών των χυμών (FDA, 2001). Ο χυμός αρχικά παστεριωνόταν στους 63 – 65 °C για σχετικά μεγάλο χρονικό διάστημα. Αυτή η μέθοδος αντικαταστάθηκε σταδιακά και ο πλέον συνήθης τρόπος θερμικής επεξεργασίας είναι η παστερίωση υψηλής θερμοκρασίας / μικρού χρόνου (HTST, High Temperature / Short Time), η οποία ελαχιστοποιεί τις ανεπιθύμητες δράσεις της ποιοτικής υποβάθμισης, λόγω της πολύ μικρής διάρκειας θερμικής επεξεργασίας. Συγκεκριμένα, στους χυμούς πορτοκαλιού γίνεται παστερίωση στους 90 - 95 °C για 15 - 30 sec (Walls & Chuyate, 2000).

Στους χυμούς φρούτων, μία από τις σημαντικότερες παραμέτρους είναι τα διαλυτά στερεά (° Brix), δεδομένης της επιρροής τους στην μικροβιακή αντοχή σε πίεση και θερμότητα (Palou et al., 1998, Basak et al., 2002). Η απενεργοποίηση των σπορίων του *A. acidoterrestris* από την εφαρμογή υπερυψηλής πίεσης και υπερυψηλής πίεσης με ταυτόχρονη εφαρμογή θερμότητας, σε φυσικούς και συμπυκνωμένους χυμούς φρούτων απαιτεί παραπάνω έρευνα. Το βακτήριο *A. acidoterrestris* έχει την ικανότητα να επιβιώνει μετά από παστερίωση 2 min στους 95 °C, με αποτέλεσμα την ποιοτική υποβάθμιση των προϊόντων. Τα ενδοσπόρια του

βακτηρίου έχουν τιμές D που κυμαίνονται από 1,5 έως 8,7 min στους 95° C και είναι μεγαλύτερες από αυτές που εφαρμόζονται κατά την παστερίωση των φρουτοχυμών στη βιομηχανία (Steyn et al., 2011, Evelyn & Silva, 2016).

1.4 *Alicyclobacillus acidoterrestris*

Το *Alicyclobacillus* spp. είναι ένα Gram θετικό, μη παθογόνο, υποχρεωτικά αερόβιο, θερμόφιλο και οξεόφιλο σπορογόνο βακτήριο (Walls & Chuyate, 2000). Το ραβδόμορφο αυτό βακτήριο έχει διαστάσεις μήκους 2,9 - 4,3 μm και πλάτους 0,9 - 1,0 μm, ενώ τα σπόρια του έχουν οβάλ σχήμα με μήκος 1,5 - 1,8 μm (Walker & Phillips, 2008). Το *Alicyclobacillus* spp. μπορεί να αναπτυχθεί σε εύρος pH από 2,2 έως 5,8, καθώς και σε θερμοκρασίες από 23 έως 55 °C (Baumgart & Menje, 2000). Η ενεργότητα νερού (a_w) που απαιτείται για την ανάπτυξη του είναι πάνω από 0,9. Ορισμένα είδη έχουν αναφερθεί να αναπτύσσονται σε χυμό φρούτων με έως και 18,2 ° Brix (Splittstoesser et al., 1994). Όλα τα *Alicyclobacillus* spp. έχουν την ικανότητα να μεταβολίζουν σάκχαρα με ακόλουθη παραγωγή οργανικών οξέων (Takahashi, 2007).

Το είδος *Alicyclobacillus* είναι διακριτό από τα βακτήρια του γένους *Bacillus*, λόγω της διαφοράς στην ανάλυση αλληλουχιών 16S rDNA, και της παρουσίας των ω-αλεικυκλικών λιπαρών οξέων στη μεμβράνη λιπιδίων διπλής στιβάδας, στα οποία οφείλεται και η επιβίωσή του σε χαμηλό pH και σε υψηλές θερμοκρασίες (Wisotzkey et al., 1992, Lee et al., 2002, Sinigaglia et al., 2003, Luo et al., 2004). Πάνω από 20 διαφορετικά είδη *Alicyclobacillus* έχουν συσχετιστεί με την αλλοίωση χυμών φρούτων, λαχανικών υψηλής οξύτητας αλλά και ποτών, συμπεριλαμβανομένων των ειδών *A. acidiphilus, A. acidoterrestris, A. herbarius, A. pomorum, A. hesperidium, A. acidocaldarius, A. cyclohaptanicus, A. fastadius*, με το μεγαλύτερο ποσοστό αλλοίωσης να αποδίδεται στο είδος *A. acidoterrestris* (Matsubara et al, 2002, Goto et al., 2002, Goto et al., 2003).

Το είδος *A. acidoterrestris* έχει αναδυθεί ως ένα νέο αλλοιογόνο βακτήριο για τους εμπορικούς χυμούς και προκαλεί ανησυχία στη βιομηχανία των χυμών φρούτων, λόγω της αλλοίωσης παστεριωμένων χυμών φρούτων του εμπορίου, εμφιαλωμένων τσαγιών, ισοτονικών ποτών και άλλων προϊόντων ραφιού με χαμηλό pH (Chang et al., 2004, Sapers et al., 2005). Αυτά τα φαινόμενα αλλοίωσης, όπως έχει ήδη αναφερθεί, οφείλονται στο ότι τα σπόρια του συγκεκριμένου βακτηρίου μπορούν να επιβιώσουν κατά τη διαδικασία της παστερίωσης γι' αυτό και το βακτήριο *A.*

acidoterrestris έχει προταθεί ως ο μικροοργανισμός στόχος για το σχεδιασμό της θερμικής επεξεργασίας στους χυμούς φρούτων (Chang et al., 2004). Λόγω των οικονομικών ζημιών που σχετίζονται με την αλλοίωση από *Alicyclobacillus*, πολυάριθμες μελέτες έχουν επίκεντρο τη συχνότητα εμφάνισης του σε φυσικούς και παστεριωμένους χυμούς (Walls and Chuyate, 2000, Groenewald et al., 2009, Durak et al. 2010, Danyluk et al., 2011, Steyn et al., 2011).

Η κύρια πηγή της απομόνωσης του *Alicyclobacillus* spp. είναι το έδαφος, αν και συνδέεται με διάφορες επιφάνειες φρούτων, χυμούς, όξινα ποτά και διάφορα άλλα αφεψήματα, όπως το τσάι (Smit et al., 2011, Oteiza et al., 2014). Οι εγκαταστάσεις επεξεργασίας, επίσης, έχουν προταθεί ως πηγή μόλυνσης (Chang & Kang, 2004, Steyn et al., 2011). Οι McIntyre et al. (1995) απομόνωσαν ένα στέλεχος του *Alicyclobacillus* από αλλοιωμένο χυμό και βρήκαν το ίδιο στέλεχος σε δείγμα νερού από τις εγκαταστάσεις επεξεργασίας. Η εμφάνιση και η ανάπτυξη του *Alicyclobacillus* spp. ποικίλει ανάλογα με τον τύπο του χυμού, την εποχή επεξεργασίας, τις πρακτικές συγκομιδής και άλλους παράγοντες (Danyluk et al, 2011, Pinhatti et al., 1997). Επιπλέον, έχουν γίνει μελέτες για να αποφευχθεί η εκβλάστηση των σπορίων *Alicyclobacillus* κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης και εμπορίας των τελικών προϊόντων (Bevilacqua et al., 2008, Spinelli et al., 2010).

1.4.1 Αλλοίωση

Τα είδη *Alicyclobacillus* αποτελούν σημαντικό παράγοντα ανησυχίας για τις βιομηχανίες τροφίμων, διότι μπορεί να προκαλέσουν σημαντικές οικονομικές απώλειες. Τα περισσότεροι σπορογόνα βακτήρια δεν μπορούν να εκβλαστήσουν σε χαμηλό pH, και ως εκ τούτου δεν δημιουργούν μεγάλο κίνδυνο αλλοίωσης όξινων τροφίμων. Ωστόσο, τα σπόρια *A. acidoterrestris,* λόγω της ικανότητάς τους να εκβλαστάνουν σε χαμηλό pH (Black et al, 2007, Splittstoesser et al, 1994) δημιουργούν μια νέα πρόκληση για τη βιομηχανία χυμών φρούτων.

Η αλλοίωση των χυμών από *Alicyclobacillus* συμβαίνει πολύ πριν από την ημερομηνία λήξης (Chang et al., 2004), δεν προκαλεί απώλεια θρεπτικών συστατικών και η υποβάθμιση των χυμών είναι δύσκολο να ανιχνευθεί, λόγω του ότι το βακτήριο δεν προξενεί ορατές αλλαγές, όπως η παραγωγή αερίου που θα οδηγήσει σε πρώιμη διόγκωση συσκευασιών (Silva and Gibbs, 2004, Durak et al., 2010). Οι μόνες αλλαγές οι οποίες λαμβάνουν χώρα είναι η δυσάρεστη οσμή και γεύση, αν και σε ορισμένες περιπτώσεις, μπορεί επίσης να λάβει χώρα σχηματισμός ιζήματος,

θολότητα ή αποχρωματισμός. Οι καταγγελίες των καταναλωτών προέρχονται μετά το άνοιγμα της συσκευασίας, όπου αντιλαμβάνονται μια δυσάρεστη γεύση και οσμή που την χαρακτηρίζουν «φαρμακευτική» ή «καπνώδη» (Chang et al., 2004). Η υποβάθμιση των προϊόντων που συνδέεται με δυσάρεστες οσμές οφείλεται στον σχηματισμό της γουαϊακόλης (2-μεθοξυφαινόλη) και αλογονοφαινολικών ενώσεων συμπεριλαμβανομένων της 2,6-διβρωμοφαινόλης (2,6-DBP) και 2,6-διχλωροφαινόλης (2,6-DCP) (Steyn et al., 2011, Witthuhn et al., 2012). Τα πιο γνωστά είδη *Alicyclobacillus* που προκαλούν αλλοίωση είναι τα *A. acidoterrestris, A. contaminans* (Zhang et al., 2013), *A. acidiphilus, A. acidocaldarius, A. cycloheptanicus, A. herbarius, A.hesperidum* και *A. pomorum* (Goto et al., 2003, 2008).

Αν και το *A. acidoterrestris* μπορεί να προκαλέσει σημαντικά προβλήματα αλλοίωσης σε συγκεκριμένες κατηγορίες προϊόντων, δεν τίθεται θέμα ανησυχίας όσον αφορά την ασφάλεια των τροφίμων και των ποτών (Wall and Chuyate, 2000). Οι Wall και Chuyate (2000) εξέτασαν την παθογένεια του *A. acidoterrestris* σε ποντίκια και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δεν υπάρχει καμία ένδειξη ασθένειας ή θανάτου στα πειραματόζωα.

1.4.2 Σπόρια

Τα σπόρια σχηματίζονται από ορισμένα βακτήρια, συνήθως του εδάφους, ως μία διαδικασία απόκρισης στις σκληρές περιβαλλοντικές συνθήκες (Black et al., 2007). Η αντοχή των βακτηρίων αυτών στο στρες, σε συνδυασμό με τα σπόρια, δημιουργούν αλλοιώσεις στα τρόφιμα και κάποιοι από αυτούς μπορούν να προκαλέσουν ακόμα και τροφιμογενή νοσήματα (Setlow, 2006). Τα σπόρια μπορούν να επιβιώσουν για μεγάλο χρονικό διάστημα χωρίς θρεπτικά συστατικά, είναι μεταβολικά αδρανή, περιέχουν ελάχιστους ή καθόλου φορείς χημικής ενέργειας, όπως ATP και NADH, δεν μεταβολίζουν ενδογενείς ή εξωγενείς ενώσεις και παρουσιάζουν ελάχιστη ή και καμία ενζυμική δραστικότητα (Setlow, 2006). Τα σπόρια του *A. acidoterrestris* έχουν αργό κύκλο ανάπτυξης (πάνω από 5 ημέρες) και η ανάπτυξη τους έχει ως αποτέλεσμα την αλλοίωση των προϊόντων από φρούτα. Οι βιομηχανίες δύσκολα ανιχνεύουν τέτοιες περιπτώσεις ανάπτυξης και συνήθως οι αλλοιώσεις των προϊόντων είναι εμφανείς όταν θα έχουν φτάσει ήδη στα χέρια των καταναλωτών (Walls & Chuyate, 1998).

Τα σπόρια είναι εξαιρετικά ανθεκτικά σε θανατηφόρες διεργασίες που καταστρέφουν τα κύτταρα, όπως η έκθεση σε υγρή και ξηρή θερμότητα, υπεριώδη και γ-ακτινοβολία, και σε τοξικές χημικές ουσίες (Black et al., 2007, Setlow, 2006). Μπορούν να εκβλαστήσουν και τα βλαστικά τους κύτταρα να αναπτυχθούν σε pH μικρότερο από 4,0, έχοντας παράλληλα και ισχυρή αντοχή στη θερμότητα. Οι ιδιότητες αυτές, καθιστούν τον έλεγχο του συγκεκριμένου βακτηρίου μια σημαντική πρόκληση για τις βιομηχανίες τροφίμων και ποτών. Η τιμή D του *A. acidoterrestris* σε χυμούς στους 95 ºC κυμαίνεται από 0,06 έως 5,30 min και η τιμή z από 7,2 έως 12,9 ºC (Smit, 2011, Silva and Gibbs, 2001).

1.4.3 Παράμετροι και μέθοδοι ανίχνευσης

Από το 1982, που σημειώθηκε το πρώτο κρούσμα αλλοίωσης παστεριωμένου χυμού μήλου από τον *A. acidoterrestris* στη Γερμανία, αξιολογήθηκαν παγκοσμίως πάνω από 40 διαφορετικές μέθοδοι για την ανίχνευση του βακτηρίου (Cerny, 1984). Το γεγονός ότι τα βακτήρια αυτά είναι θερμόφιλα και οξεόφιλα, προξένησε δυσκολία στην *in vitro* καλλιέργεια τους, συνεπώς και στην ανάπτυξη μιας αποτελεσματικής μεθόδου ανίχνευσής. Η Διεθνής Ομοσπονδία Παραγωγών χυμών φρούτων στο Παρίσι (IFU), το 2001, επιχείρησε συνεταιριστικές προσπάθειες σε διεθνές επίπεδο για ένα ενιαίο πρότυπο μεθόδων για την ανίχνευση θερμο-οξεόφιλων βακτηρίων. Οι προσπάθειες αυτές οδήγησαν τον Απρίλιο του 2003 στη δημοσίευση του εγχειριδίου "Πρώτο Πρότυπο IFU - μέθοδος για την ανίχνευση του *Alicyclobacillus* σε χυμούς". Το Σεπτέμβριο του 2004, αναθεωρήθηκε και δημοσιεύθηκε με τίτλο "Μέθοδος για την ανίχνευση της οσμής που παράγει ο *Alicyclobacillus* στους χυμούς" (IFU Εγχειρίδιο Μικροβιολογικές μέθοδοι, Μέθοδος No.12) (IFU, 2003, 2004).

Τα θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση του *Alicyclobacillus* είναι το yeast starch glucose agar (YSG) και το Bacillus AcidoTerrestris agar (BAT). Ακολουθούν τα modified plate count agar (mPCA), orange serum agar (OSA), potato dextrose agar (PDA) και K-agar (Walls et al., 2000, Chang et al., 2004, Pettipher & Osmundson, 2000). Το βακτήριο αυτό όμως, δεν αναπτύσσεται σε μέσα όπως τα trypticase soy, brain heart infusion (BHI) και veal infusion agars ή τους αντίστοιχους ζωμούς (broths), ακόμα και αν το μέσο υποστεί όξυνση σε pH 3,5 (Chang et al., 2004). Γενικά, υπάρχουν αρκετές διαφωνίες για την επιλογή και την καταλληλότητα των θρεπτικών μέσων μεταξύ των ερευνητών. Οι Pettipher και Osmundson (2000) διαπίστωσαν ότι τα μέσα PDA και OSA

υποστηρίζουν αρκετά καλά την ανάπτυξη του *A. acidoterrestris* και το OSA δίνει υψηλοτέρα ποσοστά ανάκαμψης. Σύμφωνα με τον Jensen (2005), το BAT agar ήταν πιο αποτελεσματικό στην ανάκτηση του *A. acidocaldarius*, ενώ η χρήση του K-agar έδωσε καλά αποτελέσματα στη περίπτωση του *A. acidoterrestris*. Επίσης, η τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης φαίνεται να είναι πιο αποτελεσματική για την ανίχνευση βακτηρίων του γένους *Alicyclobacillus* από αυτήν της ενσωμάτωσης (Murray et al.,2007). Παρόλα αυτά όμως, ο Jensen (2000) διαπίστωσε ότι και οι δύο τεχνικές οδήγησαν σε παρόμοια ανάκτηση ειδών *Alicyclobacillus* κατά τη διάρκεια επώασης χυμού πορτοκαλιού σε περιβάλλον με υψηλή συγκέντρωση οξυγόνου. Ωστόσο, σε περιβάλλον με χαμηλό οξυγόνο, φάνηκε ότι η τεχνική της ενσωμάτωσης έδωσε υψηλότερα ποσοστά ανάκτησης των βακτηρίων από αυτή της επιφανειακής επίστρωσης (Jensen, 2000).

Το εύρος θερμοκρασίας και το βέλτιστο pH για την ανάπτυξη των *Alicyclobacillus* διαφέρουν μεταξύ των στελεχών. Σύμφωνα με τη μέθοδο IFU (2003), η θερμοκρασία επώασης για την ανίχνευση θερμο-οξεόφιλων βακτηρίων είναι οι 45 °C, θερμοκρασία η οποία επιτρέπει την ανάπτυξη όλων των ειδών μέσα σε 3 - 5 ημέρες. Από την στιγμή όμως, που τα περισσότερα είδη *Alicyclobacillus* είναι αερόβια, το διαθέσιμο οξυγόνο στο μέσο ανάπτυξης επηρεάζει επίσης την ανάπτυξη του. Παρόλο που έχει παρατηρηθεί ότι με τη μειωμένη διαθεσιμότητα οξυγόνου μειώνεται ο ρυθμός ανάπτυξης του βακτηρίου, δεν επηρεάζεται η παραγωγή οσμών (Siegmund et al., 2007).

Επίσης, ικανοποιητική αύξηση παρατηρείται όταν μια μεγάλη ποσότητα κυττάρων εμβολιάζονται σε YSG υγρό μέσο και επωάζονται στη βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης για 24 ώρες. Ωστόσο, όταν η συγκέντρωση του εμβολίου είναι πολύ χαμηλή, η ανάπτυξη μπορεί να μην ανιχνευθεί μετά από 24 ώρες. Επομένως, για την ανίχνευση των θερμο-οξεόφιλων βακτηρίων συνίσταται η πρόβλεψη για 5 ημέρες εμπλουτισμού, σύμφωνα με τη μέθοδο IFU (2003). Όσον αφορά το βέλτιστο pH ανάπτυξης του *Alicyclobacillus,* είναι μεταξύ των τιμών 3,5 και 4,5. Το pH του θρεπτικού μέσου YSG ρυθμίζεται με βάση το pH του επιλεγμένου χυμού. Η ανάπτυξη του *Alicyclobacillus* επηρεάζεται ακόμη και από τον τύπο του οξέος που χρησιμοποιείται για τη ρύθμιση του pH. Η ανάπτυξη δεν επηρεάζεται σημαντικά από το θειικό, φουμαρικό, L - ασκορβικό, L - μηλικό ή κιτρικό οξύ, ενώ αναχαίτιση έχει παρατηρηθεί με την χρήση οξικού, αδιπινικού, γαλακτικού και ηλεκτρικού οξέος.

Εκτός από τις συνήθεις παραμέτρους καλλιέργειας, όπως είναι το θρεπτικό μέσο, η θερμοκρασία, η περίοδος ανάπτυξης και το pH, ουσιαστικό ρόλο στην ανίχνευση των βακτηρίων του γένους *Alicyclobacillus* διαδραματίζουν το θερμικό σοκ, το είδος του φρούτου και η συγκέντρωσή του στο χυμό (Danyluk et al., 2011). Το θερμικό σοκ εφαρμόζεται για να ληφθεί μία ομοιόμορφη εκβλάστηση των σπορίων *Alicyclobacillus*. Μια θερμική επεξεργασία των 80 °C για 10 min έχει αποδειχτεί ως η βέλτιστη για την ενεργοποίηση των σπορίων (Walls & Chuyate, 1998). Με το θερμικό σοκ πέρα από την ανάπτυξη, επιτυγχάνεται και η εξάλειψη μικροβιακών επιμολυντών, όπως ζυμών και γαλακτικών βακτηρίων (Previdi et al., 1997). Οι Goto et al. (2002) μελέτησαν τη συμπεριφορά ανάπτυξης αρκετών στελεχών του *A. acidoterrestris* σε μια ποικιλία χυμών φρούτων και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η συμπεριφορά των στελεχών εξαρτάται από τον τύπο του χυμού καθώς επίσης και από την πηγή απομόνωσης των στελεχών. Η ανάπτυξη του *Alicyclobacillus* επηρεάζεται, επίσης, από τη συγκέντρωση του χυμού. Τα μέλη της εταιρίας "Japan Fruit Juice Association" (JFJA) διερεύνησαν τη σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης χυμού με την ανάπτυξη των βακτηρίων σε διάφορους χυμούς φρούτων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι υπήρχε μια ισχυρή συσχέτιση με τον τύπο του χυμού. Ωστόσο, υπήρχε μια τάση προς πλήρη αναστολή της ανάπτυξης, όταν η συγκέντρωση του χυμού ήταν πάνω από 50 - 60 %, ακόμη και με το χυμό πορτοκαλιού, ο οποίος έδειξε καλή ανάπτυξη. Για τους χυμούς με υψηλά ποσοστά πολυφαινολών (π.χ. χυμός από κόκκινο σταφύλι), η ανίχνευση του *Alicyclobacillus* ήταν δύσκολη ακόμη και όταν η συγκέντρωση του χυμού ήταν πάνω από 10 - 20 % (Steyn et al., 2011).

1.5 Υψηλή Υδροστατική Πίεση (ΥΥΠ)

Η βελτιστοποίηση της θερμικής επεξεργασίας θεωρούνταν για μεγάλο χρονικό διάστημα ως ο μόνος τρόπος για τον έλεγχο του *A. acidoterrestris* και για την αναστολή της βλάστησης των σπορίων σε όξινα ποτά (Vieira et al., 2002). Ωστόσο, διαφορετικές τεχνικές έχουν προταθεί για τη μείωση της απώλειας θρεπτικών και οργανοληπτικών χαρακτηριστικών λόγω της θερμικής επεξεργασίας. Μια από αυτές είναι η χρήση της υψηλής υδροστατικής πίεσης (ΥΥΠ), η οποία αδρανοποιεί τα σπόρια και τα κύτταρα του *A. acidoterrestris*, και έχει προταθεί εκτενώς από πολλούς συγγραφείς (Shearer et al., 2000, Alpas et al., 2003, Buzrul et al., 2005, Lee et al., 2006a) σε εύρος πίεσης από 207 έως και 621 MPa. Η αρχή λειτουργίας της

συγκεκριμένης τεχνολογίας βασίζεται στη διάρρηξη των εξωτερικών τοιχωμάτων των μικροοργανισμών εξαιτίας της πολύς υψηλής πίεσης (πιέσεις από 1000 - 10000 bar, ανάλογα με την ένταση της επεξεργασίας). Η πίεση που ασκείται στα τρόφιμα είναι υδροστατική, με αποτέλεσμα να μην αλλοιώνεται η εμφάνιση του τροφίμου (εξαιτίας της μηχανικής πίεσης). Για την επίτευξη τέτοιων πιέσεων απαιτείται κατάλληλος εξοπλισμός που περιλαμβάνει την μονάδα παραγωγής της πίεσης και ένα θάλαμο υπερυψηλής πίεσης, στον οποίο εισάγονται τα προς επεξεργασία τρόφιμα. Συνήθως το μέσο μεταφοράς της πίεσης στο τρόφιμο (μέσω της πλήρωσης του δοχείου με υγρό συμπιεστότητας) είναι το νερό.

Η αδρανοποίηση των κυττάρων εμφανίστηκε στους 50 °C μέσω της επεξεργασίας στα 350 και 450 MPa, με μείωση 3,53 και 4,73 μονάδων log, αντίστοιχα (Alpas et al., 2003). Η αποτελεσματικότητα, όμως, της επεξεργασίας με ΥΥΠ επηρεάζεται αυστηρά από τη θερμοκρασία και το χρόνο, καθώς αυξήθηκε με την αύξηση του χρόνου και της θερμοκρασίας επεξεργασίας από τους 35 °C σε 50 °C (Alpas et al., 2003). Από την άλλη πλευρά, τα σπόρια φαίνεται να είναι πιο ανθεκτικά από τα βλαστικά κύτταρα, καθώς παρουσίασαν αντίσταση σε υψηλότερες πιέσεις και σε μεγαλύτερους χρόνους έκθεσης (Lee et al., 2006a).

Η απενεργοποίηση των σπορίων του *Alicyclobacillus* μέσω της ΥΥΠ πραγματοποιείται, γενικά, σε δύο στάδια: στο πρώτο στάδιο η υψηλή πίεση προκαλεί εκβλάστηση στα σπόρια και στο δεύτερο στάδιο απενεργοποιεί τα βλαστικά κύτταρα (Lee et al., 2006a). Οι Wuytack et al. (2002) ανέφεραν ότι η προκαλούμενη από την πίεση εκβλάστηση εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την θερμοκρασία. Ουσιαστικά απουσιάζει κάτω από τους 10 °C και εμφανίζεται στους 40 - 50 °C. Επιπλέον, οι Lee et al. (2006a) ανέφεραν ότι η επίδραση της ΥΥΠ επηρεάζεται από τα σάκχαρα και τα στερεά συστατικά που περιέχονται στους χυμούς, καθώς καμία επίδραση της ΥΥΠ δεν παρατηρήθηκε σε συμπύκνωμα χυμού (70 ° Brix).

Παρά την ικανότητά του να επιβιώνει στην παστερίωση, το βακτήριο *A. Acidoterrestris,* δεν αναπτύσσεται σε συμπυκνώματα χυμών και επιβιώνει κυρίως σε μορφή σπορίων. Ωστόσο, τα σπόρια του θα μπορούσαν να απενεργοποιηθούν μόνο με υψηλές θερμικές επεξεργασίες (95 °C για λίγα λεπτά) ή ΥΥΠ (> 600 MPa), με αποτέλεσμα την απώλεια θρεπτικών και οργανοληπτικών χαρακτηριστικών, αντίστοιχα. Το γεγονός ότι τα σπόρια μπορεί να μην αδρανοποιούνται από την ΥΥΠ και την θερμική επεξεργασία προκαλεί μεγάλη ανησυχία για τη βιομηχανία

τροφίμων, διότι μόλις ένα συμπύκνωμα αραιώνεται για να παραχθούν χυμοί, το *A. acidoterrestris* αρχίζει γρήγορα να πολλαπλασιάζεται (Lee et al., 2006a).

1.6 FTIR

Η φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR) είναι μια μέθοδος που είναι χρήσιμη για την ταξινόμηση και την ταυτοποίηση των βακτηρίων με ελάχιστη προετοιμασία δείγματος (Naumann, 2000) και παρέχει βιοχημικές πληροφορίες σχετικά με διάφορα συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος και του κυτταροπλάσματος, όπως πρωτεΐνες και πεπτίδια, πολυσακχαρίτες, πεπτιδογλυκάνη (μουρεΐνη), νουκλεϊκά οξέα και φωσφολιπίδια. Επίσης, είναι χρήσιμη ως αναλυτική τεχνική για τον έλεγχο της ποιότητας, της αλλοίωσης και της ασφάλειας των τροφίμων.

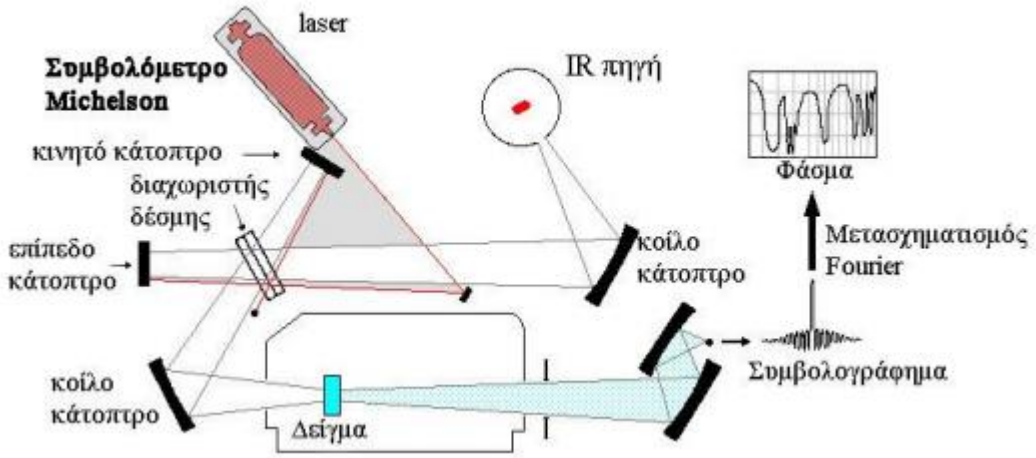
1.6.1 Οργανολογία και λειτουργία του FTIR

Ένα τυπικό φασματοφωτόμετρο υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier περιέχει μια πηγή IR (IR source). Σαν πηγή ακτινοβολίας μπορεί να χρησιμοποιηθεί ράβδος από κεραμικό υλικό, το οποίο μετά από ηλεκτρική θέρμανση, δίνει μεγάλο μέρος σε υπέρυθρη ακτινοβολία. Η πλέον γνωστή πηγή ακτινοβολίας για συστήματα μικρού κόστους είναι η λυχνία νικελίου - χρωμίου (Nicrome), με μικτή ισχύ και αεροψύκτη. Αναπτύσσει θερμοκρασία 1200 - 1250 ^{o}C και εκπέμπει συνεχή ακτινοβολία στην περιοχή του μέσου - υπερύθρου. Το μειονέκτημά της όμως, είναι ότι έχει μικρή σταθερότητα και μικρή περίοδο ζωής. Το FTIR αποτελείται, επίσης, από μια πηγή Laser, όπου η παραγωγή της ακτίνας γίνεται με διέγερση ατόμων ηλίου και νέου (HeNe). Ο ρόλος της πηγής είναι να ελέγχει τη διαδρομή της προσπίπτουσας ακτινοβολίας κατά τη διάρκεια της σάρωσης.

Επιπλέον υπάρχει το συμβολόμετρο Michelson (Interferometer), το οποίο αποτελείται από μία ημιδιαφανή πλάκα διαχωριστή που δεν απορροφά στο υπέρυθρο, και δύο κάτοπτρα, το ένα εκ των οποίων είναι κινούμενο. Το συμβολόμετρο Michelson επί της ουσίας είναι μια διάταξη οπτικών που χωρίζει μια δέσμη ακτινοβολίας σε δύο δέσμες και τις επανασυνθέτει, αφού πρώτα ακολουθήσουν ξεχωριστές διαδρομές που διαφέρουν στο μήκος. Οι μεταβολές της έντασης της επαλληλίας των δύο δεσμών ακτινοβολίας, ως συνάρτηση της διαφοράς των οπτικών διαδρομών καταγράφονται από έναν ανιχνευτή. Χάρις στο συμβολόμετρο τα φασματοφωτόμετρα εξετάζουν πολλά σημεία του φάσματος. Τέλος, ο ανιχνευτής

(detector) καταγράφει την υπέρυθρη ακτινοβολία που διέρχεται μέσα από το δείγμα. Ο πιο κοινός ανιχνευτής είναι ο θερμικός, κατασκευασμένος από δευτεριωμένη τριγλυκερίνη (DTGS). Η αρχή λειτουργίας του βασίζεται στην αύξηση της θερμοκρασίας του, η οποία με τη σειρά της δημιουργεί μια διαφορά δυναμικού. Το τελικό φάσμα που προκύπτει είναι αποτέλεσμα του μέσου όρου των επαναλήψεων των σαρώσεων που έχουν εκτελεστεί (Πολυσίου και Ταραντίλης, 2008).

Η λειτουργία του FTIR βασίζεται στην εξής διαδικασία: Υπέρυθρη ενέργεια εκπέμπεται από μια φωτεινή πηγή μέλανος σώματος. Αυτή η δέσμη περνά μέσω μίας οπής που ελέγχει την ποσότητα της ενέργειας που φτάνει στο δείγμα και, τελικά, στον ανιχνευτή. Η δέσμη εισέρχεται στο συμβολόμετρο, όπου λαμβάνει χώρα η «φασματική κωδικοποίηση». Το προκύπτον σήμα εξέρχεται από το συμβολόμετρο και κατόπιν η δέσμη εισέρχεται στο θάλαμο δείγματος, όπου μεταδίδεται διαμέσου αυτού ή ανακλάται από την επιφάνεια του δείγματος, ανάλογα με τον τύπο της ανάλυσης. Η δέσμη περνά τέλος στον ανιχνευτή για την τελική μέτρηση. Οι ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται είναι ειδικά σχεδιασμένοι για τη μέτρηση του ειδικού σήματος από το συμβολόγραμμα. Το μετρούμενο σήμα ψηφιοποιείται και αποστέλλεται στον υπολογιστή, όπου ο μετασχηματισμός Fourier λαμβάνει χώρα. Ο μετασχηματισμός Fourier είναι μια μαθηματική τεχνική, η οποία κωδικοποιεί το μετρούμενο συμβολόγραμμα που δεν μπορεί να ερμηνευθεί άμεσα. Το τελικό υπέρυθρο φάσμα, στη συνέχεια, παρουσιάζεται στο χρήστη για την ερμηνεία του καθώς και για περαιτέρω χειρισμούς.



Εικονα 1.6.1.1. Σχηματική αναπαράσταση φασματοφωτόμετρου FTIR με συμβολόμετρο (https://repository.kallipos.gr/bitstream/11419/6175/2/01_chapter_7.pdf)

1.6.2 Μαθηματική επεξεργασία των φασματοσκοπικών δεδομένων

Το τεράστιο μέγεθος των πληροφοριών που παρέχονται από τα φάσματα FTIR καθιστά την ερμηνεία τους μη διαχειρίσιμη, όταν γίνεται μέσω της απλής οπτικής παρατήρησης. Έτσι, είναι απαραίτητο να εφαρμοστούν προηγμένες στατιστικές μέθοδοι πολλαπλών μεταβλητών και μέθοδοι ευφυούς μηχανικής εκμάθησης για την ανάλυση αυτών των δεδομένων. Πρέπει να σημειωθεί ότι τα φασματικά δεδομένα υπόκεινται σε προεπεξεργασία, πριν από την εφαρμογή της πολυμεταβλητής ανάλυσης, για να μειωθεί ο θόρυβος, να διορθωθεί η βασική γραμμή και να υπολογιστεί ο μέσος όρος των φασμάτων, ο οποίος είναι πιο αντιπροσωπευτικός.

1.6.2.1 Μέθοδος των Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (Partial Least Square, PLS)

Η PLS είναι μία πολυπαραγοντική τεχνική εκμάθησης με καθοδήγηση, που έχει ως στόχο να καθορίσει τη σχέση ανάμεσα σε ένα σύνολο (πίνακα) δεδομένων X (ανεξάρτητες μεταβλητές, π.χ. κυματαριθμοί από το FTIR) και σε ένα σύνολο (πίνακα) αποκρίσεων Y (εξαρτημένες μεταβλητές, π.χ. πληθυσμοί βακτηρίων, φυσικοχημικές παράμετροι, κατηγορίες ποιότητας κ.α.). Η PLS προβάλει τα αρχικά δεδομένα εισόδου - εξόδου σε έναν λανθάνον (latent) χώρο, εξάγοντας έναν αριθμό κυρίων συνιστωσών, γνωστών, σε αυτή την περίπτωση, ως λανθάνουσες συνιστώσες (latent variables) με ορθογώνια διάταξη, καθώς και εμπερικλείει την μεγαλύτερη διακύμανση των αρχικών δεδομένων. Η πρώτη λανθάνουσα συνιστώσα καλύπτει το μεγαλύτερο μέρος της διακύμανσης των δεδομένων, η δεύτερη καλύπτει όσο το δυνατό περισσότερο από το υπόλοιπο της διακύμανσης και ούτω καθεξής (Nielsen et al, 2002, Xia et al., 2009).

Στόχος της μεθόδου είναι να βρεθεί η γραμμική σχέση μεταξύ των πινάκων X και Y με βάση την εξίσωση:

$$Y = b \cdot X + E$$

Όπου b, ο συντελεστής της PLS παλινδρόμησης και E ο πίνακας των υπολοίπων, όπου τα στοιχεία του εκφράζουν τις αποκλίσεις μεταξύ των παρατηρηθέντων και των προβλεπόμενων τιμών. Αναζητείται ο αλγόριθμος b, ο οποίος εφαρμοζόμενος στον πίνακα X των φασματικών δεδομένων, αποδίδει τον πίνακα των γνωστών ιδιοτήτων Y, ελαχιστοποιώντας το σφάλμα E. Αντί όμως να βρεθεί άμεσα η γραμμική συσχέτιση μεταξύ X και Y, η PLS προτείνει μεθοδολογία

έμμεσης εύρεσης αυτής της συσχέτισης χρησιμοποιώντας τις εικονικές μεταβλητές T, P, U και Q, οι οποίες συνδέονται με τους πίνακες X και Y με τις παρακάτω σχέσεις.

$$X = T \cdot P^T + E_X$$

$$Y = U \cdot Q^T + E_Y$$

Οι πίνακες T, P, U και Q έχουν όλοι τον ίδιο αριθμό στηλών, ο οποίος αντιστοιχεί στον αριθμό των κυρίων συνιστωσών (principal components, PC) που απαιτούνται για την επίλυση των παραπάνω εξισώσεων. Κύριες συνιστώσες καλούνται τα διανύσματα τα οποία αποτελούνται από τις τιμές των στηλών των πινάκων P και Q. Τα διανύσματα του πίνακα T είναι γραμμικοί συνδυασμοί με τα αντίστοιχα του X, ενώ ομοίως, τα διανύσματα του U είναι γραμμικοί συνδυασμοί με τα αντίστοιχα του Y. Οι πίνακες T και U συσχετίζονται μεταξύ τους γραμμικά (Βοσκίδη, 2013).

1.6.2.2 Βαθμονόμηση

Το στάδιο της βαθμονόμησης αφορά τον υπολογισμό της συνάρτησης βαθμονόμησης από γνωστά φασματικά δεδομένα ενός πλήθους δειγμάτων αναφοράς. Στην ανάλυση PLS ο πίνακας των φασματικών δεδομένων X αναλύεται σε άθροισμα παραγόντων, που ονομάζονται “ranks”. Ο κάθε παράγοντας περικλείει μέσα του πληροφορίες που σχετίζονται με μεταβολές των στοιχείων του πίνακα, δηλαδή μεταβολές στα φασματικά δεδομένα. Αυτοί οι παράγοντες επιλέγονται, έτσι ώστε να προσεγγίζουν με όσο το δυνατόν καλύτερο τρόπο τα φασματικά δεδομένα. Οι πρώτοι παράγοντες, που στην υπό μελέτη περίπτωση ονομάζονται λανθάνουσες συνιστώσες, εκφράζουν την κύρια μεταβολή και είναι πολύ σημαντικοί στην διαδικασία της ανάλυσης. Οι τελευταίοι παράγοντες εκφράζουν μικρές αλλαγές στα φασματικά χαρακτηριστικά. Οι παράγοντες είναι γινόμενα των υποτιθέμενων συντελεστών διανυσμάτων ti (score vectors) με τα διανύσματα βάσης pi (loading vectors).

$$X = \underbrace{t_1 p_1^r + t_2 p_2^r + \cdots + t_N p_N^r}_{\text{Ranks}}$$

Για να υπολογιστεί ο βέλτιστος αριθμός λανθανουσών μεταβλητών, ο οποίος μεγιστοποιεί την ποιότητα του μοντέλου χωρίς να στηρίζεται σε άσχετη πληροφορία ή θόρυβο (overfitting), απαιτείται η εφαρμογή ενός σταδίου επικύρωσης του μοντέλου. Αναζητείται συνεπώς ο βέλτιστος αριθμός διανυσμάτων βάσης, αυτός δηλαδή που αξιοποιεί σε μέγιστο βαθμό την φασματική πληροφορία που είναι ουσιαστική για την πρόβλεψη (no underfitting), χωρίς να επηρεάζεται από εκείνη που

δε σχετίζεται με το ζητούμενο (no overfitting). Η εύρεση του βέλτιστου αριθμού προϋποθέτει το διαχωρισμό των δειγμάτων / φασμάτων αναφοράς σε δύο διακριτά υποσύνολα βαθμονόμησης και ελέγχου. (Βοσκίδη, 2013)

1.6.2.3 Επικύρωση

Η επικύρωση γίνεται με την αξιολόγηση φασμάτων για τα οποία είναι γνωστή η τιμή του Y, αλλά δε συμμετέχουν στην κατάστρωση του πίνακα X. Δύο διαφορετικοί τρόποι επικύρωσης υπάρχουν, η εσωτερική και η εξωτερική.

Στην εξωτερική επικύρωση τα δείγματα (φάσματα αναφοράς) χωρίζονται σε δείγματα βαθμονόμησης και δείγματα αξιολόγησης (συνήθως σε αναλογία 2:1). Η βαθμονόμηση (πίνακας X και η ανάλυση του σε γραμμικούς όρους) στηρίζεται αποκλειστικά στο υποσύνολο βαθμονόμησης. Η μέθοδος της επικύρωσης εφαρμόζεται στα φάσματα αξιολόγησης και οδηγεί στην πρόβλεψη των ιδιοτήτων.

Στην εσωτερική επικύρωση (internal validation) ένα μικρό υποσύνολο (συνήθως 95%) χρησιμοποιείται για να προβλέψει την ιδιότητα του υποσυνόλου αξιολόγησης. Κατόπιν, τα φάσματα που απετέλεσαν το υποσύνολο αξιολόγησης επανεντάσσονται στη βαθμονόμηση, ενώ το επόμενο 5% των φασμάτων εξαιρείται από αυτήν και αποτελεί το νέο υποσύνολο αξιολόγησης. Η διαδικασία αυτή τελειώνει όταν όλα τα φάσματα έχουν χρησιμοποιηθεί για την επικύρωση του μοντέλου. Η μέθοδος αυτή είναι γνωστή ως “leave some out”. Στην περίπτωση όπου ένα - ένα τα φάσματα αφήνονται εκτός της διαδικασίας βαθμονόμησης, η μέθοδος είναι γνωστή ως “leave oneout” (Βοσκίδη, 2013).

1.6.2.4 Ο αριθμός των PLS συνιστωσών

Όπως σε κάθε μοντέλο Παλινδρόμησης, έτσι και στην Παλινδρόμηση Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων, απαραίτητος θεωρείται ο καθορισμός της σωστής πολυπλοκότητας (complexity) του μοντέλου. Επομένως είναι απαραίτητη η κατασκευή ενός ελέγχου, όπου θα διαπιστώνεται η σημαντικότητα στην πρόβλεψη κάθε PLS συνιστώσας. Μάλιστα, όταν οι εξαγόμενες συνιστώσες παύουν να είναι σημαντικές, ο έλεγχος θα σταματάει. Αυτός ο έλεγχος λέγεται CV (Cross Validation). Πρόκειται για μια ευρέως διαδεδομένη τεχνική, σημαντική για την ανάλυση της PLSR, μέσω της οποίας τα δεδομένα χωρίζονται σε έναν αριθμό ομάδων, έστω G και ακολούθως αναπτύσσεται ένα πλήθος παράλληλων μοντέλων με μειωμένα δεδομένα, καθώς μία ομάδα διαγράφεται κάθε φορά. Στην περίπτωση όπου ισχύει G=N, δηλαδή

ο αριθμός των ομάδων συμπίπτει με τον αριθμό των παρατηρήσεων, τότε συνιστάται η αποφυγή εφαρμογής της συγκεκριμένης τεχνικής (Wold et al., 2001).

1.6.2.5 Δείκτες επίδοσης

Κάποιοι από τους χρησιμοποιούμενους δείκτες για την αξιολόγηση της επίδοσης των μαθηματικών μοντέλων είναι ο Συντελεστής Προκατάληψης (Bias factor, B_f), ο Συντελεστής Ακρίβειας (Accuracy factor, A_f) (Ross, 1996), το R^2 και η ρίζα του μέσου τετραγωνικού σφάλματος (Root Mean Square Error, RMSE).

$$B_f = 10\left(\frac{\sum log\left(\frac{logN(t)_{predicted}}{logN(t)_{observed}}\right)}{n}\right)$$

$$A_f = 10\left(\frac{\sum log\left(\left|\frac{logN(t)_{predicted}}{logN(t)_{observed}}\right|\right)}{n}\right)$$

Ο δείκτης B_f μετράει τη συστηματική απόκλιση, μεταξύ των παρατηρούμενων και των προβλεπόμενων παρατηρήσεων. Ο συντελεστής προκατάληψης είναι ένας πολλαπλασιαστικός συντελεστής, που εκφράζει το κατά πόσο ένα μοντέλο υπερ- ή υπο- εκτιμά κατά μέσο όρο μια μεταβλητή, ενώ n είναι ο αριθμός των παρατηρήσεων. Συντελεστής προκατάληψης ίσος με ένα υποδηλώνει ένα τέλειο μοντέλο, όπου οι προβλέψεις είναι σε πλήρη συμφωνία με τις παρατηρήσεις. Τιμές μικρότερες του ενός δείχνουν ότι οι παρατηρούμενες τιμές είναι μεγαλύτερες από τις προβλεπόμενες. Ο συντελεστής ακριβείας A_f είναι ένα μέτρο εκτίμησης της μέσης απόκλισης μεταξύ προβλέψεων και παρατηρήσεων. Οι τιμές αυτού του δείκτη είναι μεγαλύτερες του ενός.

Η καταλληλότητα της προσαρμογής της μεθόδου μοντελοποίησης εκτιμάται επίσης από την ρίζα του μέσου τετραγωνικού σφάλματος (Root Mean Square Error, RMSE), η οποία μετρά τη μέση απόκλιση μεταξύ των παρατηρούμενων και προβλεπόμενων τιμών (Ratkowsky, 2004).

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum\left(logN(t)_{predicted} - logN(t)_{observed}\right)^2}{n}}$$

Ακόμα, ο συντελεστής προσδιορισμού R^2 δείχνει πόσο καλά τα δεδομένα ταιριάζουν σε ένα στατιστικό μοντέλο. Το εύρος τιμών του είναι μεταξύ 0 και 1. Τιμή R^2 ίση με το ένα δείχνει ότι η γραμμή παλινδρόμησης ταιριάζει απόλυτα στα

δεδομένα, ενώ τιμή R^2 ίση με το 0 δηλώνει ότι η γραμμή δεν ταιριάζει με τα δεδομένα. Αυτό το τελευταίο μπορεί να είναι επειδή τα δεδομένα είναι απολύτως μη γραμμικά είτε επειδή είναι τυχαία.

$$R^2 = 1 - \frac{SS_{res}}{SS_{tot}}$$

Οι τιμές SS_{res} και SS_{tot} ορίζονται ως:

$$SS_{res} = \sum_i (y_i - f_i)^2$$

$$SS_{tot} = \sum_i (y_i - \bar{y})^2$$

1.6.3 Εφαρμογές στα τρόφιμα

Τα τελευταία χρόνια, η ανάλυση FTIR έχει ευρέως χρησιμοποιηθεί για τη διάκριση, την ταξινόμηση και τον εντοπισμό διαφόρων μικροοργανισμών, όπως τις ζύμες (Lucia et al., 2001), τα κυανοβακτήρια (Kansiz et al., 1999), τα οξυγαλακτικά βακτήρια (Oberreuter et al., 2000), τα *Bacillus* spp. (Lin et al., 1998), τα *Listeria* spp. (Lefier et al., 1997) και τα κορινόμορφα βακτήρια (coryneform bacteria) (Oberreuter et al., 2003), για την παρακολούθηση της μικροβιακής αλλοίωσης του κρέατος (Ellis et al., 2002), και για την έρευνα της ετερογένειας των μικροβιακών αποικιών (Choo-Smith et al., 2001).

Διάφορες προσπάθειες έχουν διεξαχθεί για τη χρήση φασματοσκοπικών τεχνικών για την ανίχνευση συγκεκριμένων βακτηρίων σε χυμούς φρούτων. Για παράδειγμα, οι Rodriguez et al. (2004) χρησιμοποίησαν τη φασματοσκοπία FTIR για να ανιχνεύσουν τη βακτηριακή μόλυνση του χυμού μήλου. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι μέθοδοι PCA και SIMCA θα μπορούσαν να διακρίνουν τα ελεγχόμενα βακτηριακά είδη (*E. coli, Pseudomonas aeruginosa, Bacillus subtilis, Bacillus cereus* και *Bacillus thuringiensis*) σε συγκέντρωση 10^5 CFU / ml, στην περιοχή με μήκος κύματος 4000 - 5100 cm^{-1}. Οι Yu et al. (2004) βελτίωσαν την ακρίβεια με χαμηλό επίπεδο 10^3 log CFU / ml και οκτώ μικροοργανισμοί (*Enterobacter cloacae, Salmonella* Typhimurium, *Enterobacter aerogenes, Salmonella choleraesuis, Serratia marcescens, Pseudomonas vulgaris, Vibrio cholerae* και *Hafnia alvei*) μπόρεσαν να διαφοροποιηθούν και να ποσοτικοποιηθούν σε χυμό μήλου.

Εκτός από τους προαναφερθέντες μικροοργανισμούς, ο *Alicyclobacillus* που παρουσιάστηκε σε χυμό μήλου μελετήθηκε επίσης με την μέθοδο της φασματοσκοπίας. Σε έρευνα που πραγματοποίησαν οι Lin et al. (2005), εξετάστηκαν

οκτώ στελέχη του *Alicyclobacillus* στην περιοχή από 1500 έως 800 cm^{-1}. Με την ανάλυση SIMCA, τα στελέχη *Alicyclobacillus* που παράγουν ή όχι γουαϊακόλη μπόρεσαν να διαφοροποιηθούν έως και 89%, πράγμα που έδειξε ότι η μέθοδος ανάλυσης FTIR μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο για την ταχεία ανίχνευση του *Alicyclobacillus* και για τον έλεγχο του σχηματισμού γουαϊακόλης στους χυμούς φρούτων. Παρόμοια αποτελέσματα βρέθηκαν επίσης από τους Al-Qadiri et al. (2006) στην περιοχή 400-4000 cm^{-1}, με σωστή ταξινόμηση 75,0% για το *Alicyclobacillus acidoterrestris* και 88,3% για τα *Alicyclobacillus* spp., αντίστοιχα. Επιπλέον, το 88,3% των *E. Coli* O157: H7 ταξινομήθηκε σωστά σε αυτή τη μελέτη και τα αποτελέσματα ελήφθησαν από τους Al-Holy et al. (2006), οι οποίοι διαφοροποίησαν τα *E.coli* O157: H7 από τα άλλα βακτήρια του χυμού μήλου, με τη χρήση της φασματοσκοπία FTIR. Πρόσφατα, στην ίδια περιοχή μήκους κύματος FTIR, οι Al-Holy et al. (2015) κατέστησαν δυνατή τη διάκριση μεταξύ απομονώσεων *Bacillus* και *Alicyclobacillus* σε χυμό μήλου. Η μέθοδος SIMCA επέτρεψε την ορθή ταξινόμηση κατά 78% των *Bacillus* και 79% των *Alicyclobacillus*, αντίστοιχα. Αν και η ακρίβεια δεν είναι πολύ υψηλή για τη μικροβιακή διάκριση στα φρούτα, το δυναμικό και η σπουδαιότητα της φασματοσκοπίας FTIR, έχει αποδειχθεί, σύμφωνα με την βιβλιογραφία. Ωστόσο, η υψηλή ακρίβεια και οι κατάλληλες μέθοδοι ανάλυσης εξακολουθούν να αποτελούν προκλήσεις για τους ερευνητές. Προσπάθειες εφαρμογής της μεθόδου αυτής σε θέματα ποιότητας αφορούν τρόφιμα όπως το μάνγκο, τα μοσχαρίσια φιλέτα, τον χοιρινό κιμά, το ξύδι και το ρόδι (Duarte, 2002, Argyri et al., 2010, Papadopoulou et al., 2011, Rios-Reina et al., 2017, Adiani et al., 2018), ενώ δεν έχει πραγματοποιηθεί καμία προσπάθεια μέχρι πρόσφατα για τον έλεγχο της ποιότητας των φρουτοχυμών.

1.7 Σκοπός

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η παραγωγή φρουτοχυμών με αυξημένη προστιθέμενη αξία και διατηρησιμότητα. Έτσι αντικείμενο της μελέτης αποτέλεσε ο έλεγχος της δυνατότητας παραγωγής λειτουργικών φρουτοχυμών με τη προσθήκη οξυγαλακτικών βακτηρίων με προβιοτικό δυναμικό και ο έλεγχος επιβίωσής τους καθ’ όλη τη διάρκεια ζωής του προϊόντος καθώς και η οργανοληπτική τους αξιολόγηση για τη διασφάλιση της παραγωγής χυμών με αποδεκτά και επιθυμητά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε βιοχημική ανάλυση με την ταχεία μέθοδο της φασματοσκοπίας υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier

(FTIR) και ελέγχθηκε η επίδραση της ΥΥΠ στην επιβίωση / απενεργοποίηση των σπορίων του αλλοιογόνου μικροοργανισμού *Alicyclobacillus acidoterrestris*.

Η παραπάνω ολιστική προσέγγιση μελέτης ποιότητας των λειτουργικών φρουτοχυμών εφαρμόστηκε για πρώτη φορά με βάση τη βιβλιογραφία, εφόσον περιλαμβάνει παράλληλη μελέτη του μικροβιολογικού, φυσικοχημικού, οργανοληπτικού και βιοχημικού αποτυπώματος των προϊόντων καθ' όλη τη διάρκεια ζωής των νέων προϊόντων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Έλεγχος εμπορικά διαθέσιμων χυμών ροδάκινου

Αρχικά πραγματοποιήθηκε πείραμα στο οποίο συλλέχθηκαν στο σύνολο σαράντα δύο (42) δείγματα χυμών ροδάκινου από το εμπόριο, τα οποία προέρχονταν από διαφορετικές εταιρείες και παρτίδες και στη συνέχεια αναλύθηκαν μικροβιολογικά και φυσικοχημικά. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται αναλυτικά τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν.

Πίνακας 2.1.1 Χυμοί ροδάκινου από το εμπόριο στους οποίους πραγματοποιήθηκαν μικροβιολογικές και φυσικοχημικές αναλύσεις.

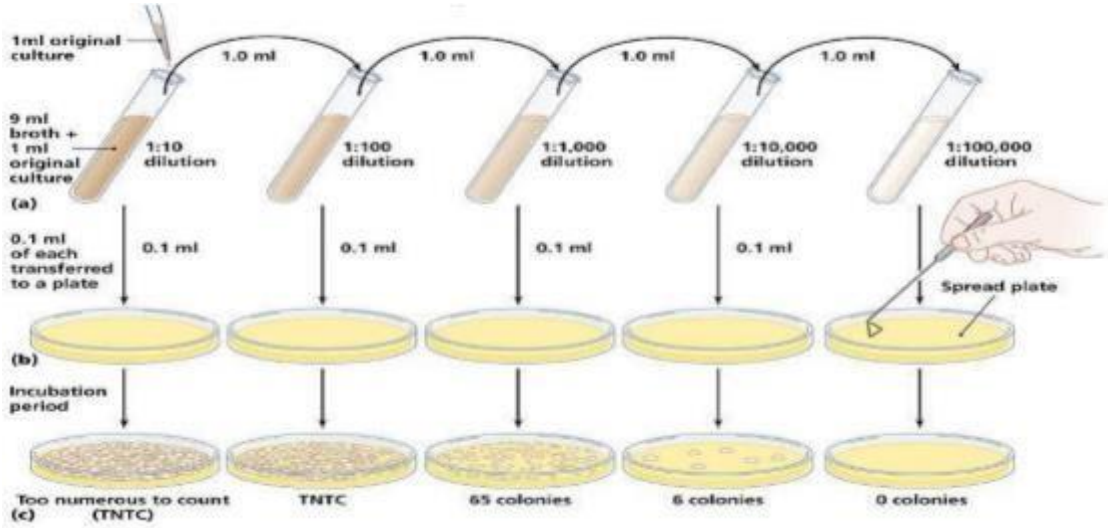
Χυμοί	Παρτίδες	Πούλπα ροδάκινου (%)	Χυμοί	Παρτίδες	Πούλπα ροδάκινου (%)
A1*	Ημ. Λήξ.: 20/04/18	31%	**B4**	Ημ. Λήξ.: 21/04/18 Ημ. Παρ.: 21/02/17	50%
A2	Ημ. Λήξ.: 20/04/18	31%	**B5**	Ημ. Λήξ.: 19/02/18 Ημ. Παρ.: 19/12/16	50%
A3	Ημ. Λήξ.: 18/05/18	31%	**G1**	Ημ. Λήξ.: 30/07/18	50%
A4	Ημ. Λήξ.: 24/01/18	31%	**G2**	Ημ. Παρ.: 29/06/17 Ημ. Λήξ.: 29/08/18	50%
A5	Ημ. Λήξ.: 27/04/18	31%	**G3**	Ημ. Παρ.: 25/10/17 Ημ. Λήξ.: 25/12/18	50%
H1	Ημ. Λήξ.: 02/02/18	30%	**G4**	Ημ. Παρ.: 06/12/17 Ημ. Λήξ.: 06/02/19	50%
H2	Ημ. Λήξ.: 15/02/18	30%	**D1**	Ημ. Λήξ.: 25/01/18	20%
H3	Ημ. Λήξ.: 15/02/18	30%	**D2**	Ημ. Λήξ.: 05/03/18	20%
H4	Ημ. Λήξ.: 20/12/17	30%	**D3**	Ημ. Λήξ.: 18/04/18	20%
H5	Ημ. Λήξ.: 28/03/18	30%	**D4**	Ημ. Λήξ.: 05/03/18	20%

H6	Ημ. Λήξ.: 15/02/18	30%	**D5**	Ημ. Λήξ.: 24/04/18	20%
H7	Ημ. Λήξ.: 28/03/18	30%	**E1**	Ημ. Λήξ.: 24/08/18	31%
H8	Ημ. Λήξ.: 29/03/18	30%	**E2**	Ημ. Λήξ.: 16/08/18	31%
P1	Ημ. Λήξ.: 14/07/18	31,50%	**E3**	Ημ. Λήξ.: 18/12/18	31%
P2	Ημ. Λήξ.: 10/07/18	31,50%	**E4**	Ημ. Λήξ.: 11/12/18	31%
P3	Ημ. Λήξ.: 21/07/18	31,50%	**E5**	Ημ. Λήξ.: 05/10/18	31%
P4	Ημ. Λήξ.: 15/11/18	31,50%	**Z1**	Ημ. Λήξ.: 22/10/18 Ημ. Παρ.: 22/08/17	50%
P5	Ημ. Λήξ.: 18/10/18	31,50%	**Z2**	Ημ. Λήξ.: 06/02/19 Ημ. Παρ.: 06/12/17	50%
B1	Ημ. Λήξ.: 21/04/18 Ημ. Παρ.: 21/02/17	50%	**XR**	Ημ. Λήξ.: 20/07/18	50%
B2	Ημ. Λήξ.: 19/02/18 Ημ. Παρ.: 19/12/16	50%	**L1**	Ημ. Λήξ.: 31/10/18	50%
B3	Ημ. Παρ.: 02/10/17 Ημ. Λήξ.: 02/12/18	50%	**L2**	Ημ. Λήξ.: 04/10/18	50%

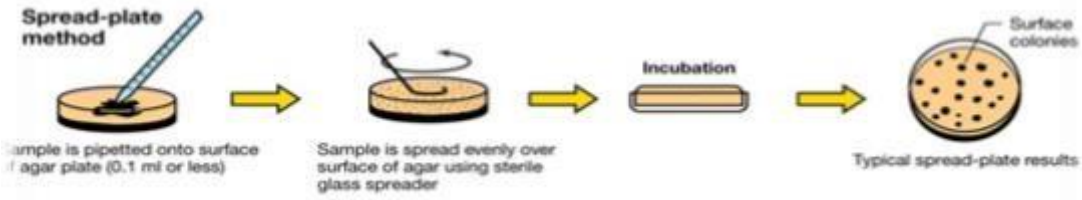
* Σε κάθε κωδικό το ίδιο γράμμα αναφέρεται σε ίδια εταιρεία παραγωγής (ίδιο χυμό), ενώ ο αύξων αριθμός αντιπροσωπεύει τις διαφορετικές παρτίδες.

2.1.1 Έλεγχος μικροβιολογικών χαρακτηριστικών χυμών ροδάκινου

Στους χυμούς ροδάκινου από το εμπόριο πραγματοποιήθηκαν μικροβιολογικές αναλύσεις για τον έλεγχο της Ολικής Μικροβιακής Χλωρίδας (ΟΜΧ), των οξυγαλακτικών βακτηρίων, ζυμών / μυκήτων καθώς και της παρουσίας των σπορίων του αλλοιογόνου μικροοργανισμού *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:



Εικόνα 2.1.1.1 Μέθοδος διαδοχικών αραιώσεων.



Εικόνα 2.1.1.2 Μέθοδος επίστρωσης σε τρυβλίο.

Ένα (1) ml δείγματος μεταφερόταν σε δοκιμαστικούς σωλήνες εις διπλούν (n=2) που περιείχαν 9 ml αποστειρωμένο Ringer και ακολουθούσε ανάδευση σε συσκευή τύπου vortex. Οι πληθυσμοί των μικροοργανισμών απαριθμήθηκαν μετά από επίστρωση (0.1 ml) δείγματος χυμού χωρίς αραίωση και μετά από μια διαδοχική αραίωση, επίστρωση (0.1 ml) ή ενσωμάτωση (1 ml) σε θρεπτικά υποστρώματα και επώαση στις συνθήκες που απαιτούνται για κάθε μέσο. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε σε όλα τα θρεπτικά υποστρώματα ήταν αυτή της επίστρωσης, με εξαίρεση το M.R.S. (ISO) Agar, στο οποίο χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ενσωμάτωσης. Επιπλέον, στην περίπτωση της καταμέτρησης των *Alicyclobacillus* spp., εφαρμόστηκε επιπλέον η επίστρωση 1 ml χυμού σε 3 τρυβλία του κατάλληλου επιλεκτικού υποστρώματος, ώστε το όριο ανίχνευσης της μεθόδου να φθάσει τα 0 log CFU/ml (από 1 log CFU/ml). Τα θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται παρακάτω.

Το Plate Count Agar (PCA) είναι ένα θρεπτικό μέσο, το οποίο χρησιμοποιείται για τον καθορισμό των συνολικών βιώσιμων αερόβιων αποικιών στα τρόφιμα. Το προϊόν αυτό περιέχει άγαρ υψηλής αντοχής πηκτής και μπορεί να

χρησιμοποιηθεί σε τρυβλία επίστρωσης καθώς και σε τεχνικές εμβολιασμού επιφάνειας.

Πίνακας 2.1.1.1 Σύνθεση του θρεπτικού υλικού Plate Count Agar (PCA).

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	g / 1000ml
Tryptone	5.0
Yeast Extract	2.5
Glucose	1.0
Agar No.1	15.0

Διαδικασία παρασκευής:

Σε μια φιάλη ζυγίστηκαν 20.5 g θρεπτικού υλικού και συμπληρώθηκε 1 λίτρο απιονισμένου νερού. Στη συνέχεια η φιάλη τοποθετήθηκε στον αναδευτήρα με συχνή ανάδευση για να διαλυθεί. Ακολούθησε αποστείρωση σε αυτόκλειστο στους 121 °C για 15 λεπτά, τοποθετήθηκε στο λουτρό μέχρι να φτάσει τους 44 - 46 °C και στη συνέχεια ακολούθησε η διαδικασία της ενσωμάτωσης, όπου μικρή ποσότητα θρεπτικού υλικού (15ml περίπου) μοιράστηκε εξίσου σε τρυβλία Petri. Τα τρυβλία ανοίχτηκαν μέσα σε Laminar Flow Cabinet και αφέθηκαν σε κατάσταση ηρεμίας, ώστε να στερεοποιηθεί πλήρως το υλικό και να απομακρυνθεί η υγρασία. Έπειτα ακολούθησε αποθήκευση σε σκιερό μέρος για μελλοντική χρήση. Το τελικό pH του έτοιμου μέσου ήταν 7.0 ± 0.2 στους 25 ºC.

Εικόνα 2.1.1.3 Τρυβλία με θρεπτικό υλικό Plate Count Agar έτοιμα για χρήση.

Επώαση: 30 °C αερόβια για 48 ώρες.

Το Rose Bengal Chloramphenicol Agar (RBC) είναι ένα επιλεκτικό μέσο για την απαρίθμηση ζυμών και μυκήτων σε τρόφιμα. Το αρχικό σκεύασμα του Jarvis (1973) περιείχε “chlortetracycline”, τώρα όμως αυτό έχει αντικατασταθεί από

“chloramphenicol” λόγω της μεγαλύτερης επιλεκτικότητας που παρουσιάζει. Το Rose Bengal καθίσταται ολοένα και πιο τοξικό από την έκθεσή του στο φως, γι’ αυτό και είναι σημαντικό να φυλάσσονται τα τρυβλία σε σκοτεινό μέρος.

Πίνακας 2.1.1.2 Σύνθεση του θρεπτικού υλικού Rose Bengal Chloramphenicol Agar (RBC).

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	g / 1000ml
Papaic digest of soybean meal	5.0
Glucose	10.0
Potassium dihydrogen phosphate	1.0
Magnesium sulphate, 7 H2O	0.5
Rose Bengal	0.05
Chloramphenicol	0.1
Bacteriological agar	13

Διαδικασία παρασκευής:

Σε μια φιάλη ζυγίστηκαν 29.7 g θρεπτικού υλικού και συμπληρώθηκε 1 λίτρο απιονισμένου νερού. Στη συνέχεια η φιάλη τοποθετήθηκε στον αναδευτήρα με συχνή ανάδευση για να διαλυθεί. Ακολούθησε αποστείρωση σε αυτόκλειστο στους 121 °C για 15 λεπτά, τοποθετήθηκε στο λουτρό μέχρι να φτάσει τους 44 - 46 °C και στη συνέχεια ακολούθησε η διαδικασία της ενσωμάτωσης, όπου μικρή ποσότητα θρεπτικού υλικού (15ml περίπου) μοιράστηκε εξίσου σε τρυβλία Petri. Τα τρυβλία ανοίχτηκαν μέσα σε Laminar Flow Cabinet και αφέθηκαν σε κατάσταση ηρεμίας, ώστε να στερεοποιηθεί πλήρως το υλικό και να απομακρυνθεί η υγρασία. Έπειτα ακολούθησε αποθήκευση σε σκιερό μέρος για μελλοντική χρήση. Το τελικό pH του έτοιμου μέσου ήταν 7.2 ± 0.2 στους 25 ºC.

Εικόνα 2.1.1.4 Τρυβλία με θρεπτικό υλικό Rose Bengal Chloramphenicol Agar έτοιμα για χρήση.

Επώαση: 25 °C αερόβια για 24 ώρες με 5 ημέρες.

Το BAT Agar είναι ένα επιλεκτικό μέσο ανάπτυξης για την ανίχνευση του *Alicyclobacillus* spp.

Πίνακας 2.1.1.3 Σύνθεση του θρεπτικού υλικού BAT Agar.

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	g / 1000ml
Peptones	2.0
Glucose	5.0
Magnesium sulphate	0.5
Calcium chloride	0.25
Ammonium sulphate	0.20
Mixture of minerals	0.001
Buffers	3
Agar	18

Διαδικασία παρασκευής:

Σε μια φιάλη ζυγίστηκαν 29 g θρεπτικού υλικού και συμπληρώθηκε 1 λίτρο απιονισμένου νερού. Στη συνέχεια η φιάλη τοποθετήθηκε στον αναδευτήρα με συχνή ανάδευση για να διαλυθεί. Ακολούθησε αποστείρωση σε αυτόκλειστο στους 115 °C για 15 λεπτά, τοποθετήθηκε στο λουτρό μέχρι να φτάσει τους 44 - 46 °C και στη συνέχεια όπου χρειάστηκε έγινε ρύθμιση του pH στο 4, με την προσθήκη H_2SO_4 (1N). Ανακινήθηκε και ακολούθησε η διαδικασία της ενσωμάτωσης, όπου μικρή ποσότητα θρεπτικού υλικού (15ml περίπου) μοιράστηκε εξίσου σε τρυβλία Petri. Τα τρυβλία ανοίχτηκαν μέσα σε Laminar Flow Cabinet και αφέθηκαν σε κατάσταση ηρεμίας, ώστε να στερεοποιηθεί πλήρως το υλικό και να απομακρυνθεί η υγρασία. Έπειτα ακολούθησε αποθήκευση σε σκιερό μέρος για μελλοντική χρήση. Το τελικό pH του έτοιμου μέσου ήταν 5.2 (περίπου) στους 25 ºC.

Επώαση: 45 °C αερόβια για 3-5 ημέρες.

Το M.R.S. (ISO) Agar είναι ένα θρεπτικό μέσο, το οποίο συμβάλλει στην ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων, συμπεριλαμβάνοντας διάφορα είδη από τα γένη: *Lactobacillus, Streptococcus, Pediococcus* και *Leuconostoc*.

Πίνακας 2.1.1.4 Σύνθεση του θρεπτικού υλικού M.R.S. (ISO) Agar.

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	g / 1000ml

Enzymatic digest of casein	10.0
Meat extract	10.0
Yeast extract	4.0
Triammonium citrate	2.0
Sodium acetate	5.0
Magnesium sulphate heptahydrate	0.2
Manganese sulphate tetrahydrate	0.05
Dipotassium hydrogen phosphate	2.0
Glucose	20.0
Polyoxyethylenesorbitan monooleate	1.08
Agar	12.37

Διαδικασία παρασκευής:

Σε μια φιάλη ζυγίστηκαν 66.7 g θρεπτικού υλικού και συμπληρώθηκε 1 λίτρο απιονισμένου νερού. Στη συνέχεια η φιάλη τοποθετήθηκε στον αναδευτήρα με συχνή ανάδευση για να διαλυθεί. Σε αυτό το στάδιο όπου χρειάστηκε έγινε ρύθμιση του pH στο 4.5, με την προσθήκη HCL (4N). Ακολούθησε αποστείρωση σε αυτόκλειστο στους 121 °C για 15 λεπτά, τοποθετήθηκε στο λουτρό μέχρι να φτάσει τους 44 - 46 °C και στη συνέχεια ακολούθησε η διαδικασία της ενσωμάτωσης, όπου μικρή ποσότητα θρεπτικού υλικού (15ml περίπου) μοιράστηκε εξίσου σε τρυβλία Petri. Τα τρυβλία ανοίχτηκαν μέσα σε Laminar Flow Cabinet και αφέθηκαν σε κατάσταση ηρεμίας, ώστε να στερεοποιηθεί πλήρως το υλικό και να απομακρυνθεί η υγρασία. Έπειτα ακολούθησε αποθήκευση σε σκιερό μέρος για μελλοντική χρήση. Το τελικό pH του έτοιμου μέσου (χωρίς τη ρύθμιση) ήταν 5.7 ± 0.1 στους 25 ºC.

Εικόνα 2.1.1.5 Τρυβλία με θρεπτικό υλικό M.R.S. (ISO) Agar έτοιμα για χρήση.

Επώαση: 30 °C αερόβια για 72 ώρες.

<u>Αλατούχο διάλυμα ¼ Ringer</u>

Διαδικασία παρασκευής:

Σε μια φιάλη Duran διαλύθηκε μία ταμπλέτα (Ringer's Solution ¼ strength tablets, LAB100Z, LABM) μέσα σε 500 ml απιονισμένο νερό. Το διάλυμα αποστειρώθηκε στους 121°C για 15 min.

2.1.2 Έλεγχος φυσικοχημικών χαρακτηριστικών χυμών ροδάκινου

Μετά το πέρας των μικροβιολογικών αναλύσεων, σε όλα τα δείγματα μετρήθηκαν διάφορες φυσικές παράμετροι, όπως το pH με ειδικό όργανο τύπου Hanna Instruments (HI2211-02 Basic pH/ORP Benchtop Meter), καθώς και το brix με διαθλασίμετρο Index Instruments (τύπου GPR 12-70, σειράς SN 26-006). Στην συνέχεια, εφαρμόστηκε η φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR) με τριπλή επανάληψη σε κάθε δείγμα, με σκοπό την ανάπτυξη μιας ταχείας μεθόδου για τον έλεγχο της ποιότητας των χυμών.

Εικόνα 2.1.2.1 Πεχάμετρο τύπου Hanna Instruments HI2211-02 Basic pH/ORP Benchtop Meter.

Εικόνα 2.1.2.2 Διαθλασίμετρο Index Instruments τύπου GPR 12-70, σειράς SN 26-006.

2.1.2.1 FTIR Analysis

Η συλλογή φασμάτων απορρόφησης FTIR πραγματοποιήθηκε σε όλα τα δείγματα χυμού. Οι αναλύσεις έγιναν σε φασματοφωτόμετρο τύπου Perkin Elmer

Frontier FTIR Spectrometer, συνδεδεμένο με HATR Sampling Accessory και κρύσταλλο AMTIR 45° ATR through plate 25 ανακλάσεων, με ανιχνευτή DLaTGS Detector με παράθυρο KBr. Η λήψη των φασμάτων έγινε μεταξύ των κυματαριθμών 4000-870 cm^{-1}, ενώ ο αριθμός των σαρώσεων ανά μέτρηση ήταν 10. Κάθε δείγμα αναλύθηκε εις τριπλούν, ενώ η λήψη του φάσματος αναφοράς (background spectra) γινόταν με τη λήψη φάσματος από την καθαρή επιφάνεια του κρυστάλλου, κάθε φορά πριν την τοποθέτηση του δείγματος. Στο τέλος κάθε μέτρησης, γινόταν καθαρισμός της επιφάνειας του κρυστάλλου με απορρυπαντικό, ξέπλυμα με απιονισμένο νερό και αιθανόλη και στέγνωμα με απορροφητικό χαρτί.

Η ανάλυση των δεδομένων από τα φασματογραφήματα πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το στατιστικό πρόγραμμα Unscrambler (version 9.7, CAMO, Norway). Στα φασματικά δεδομένα FTIR, στην περιοχή 870-4000 cm^{-1}, έγινε ο πρώτος μετασχηματισμός χρησιμοποιώντας τη μέθοδο standard normal variate (SNV), η οποία εφαρμόστηκε για να μειώσει την επίδραση του θορύβου, της μετατόπισης της γραμμής βάσης ή όποιες άλλες παρεμβολές θα μπορούσαν να επηρεάσουν την ανάλυση.

Στη συνέχεια, για τον ποσοτικό προσδιορισμό του μικροβιακού φορτίου των διαφορετικών μικροβιακών ομάδων που απαριθμήθηκαν, των φυσικοχημικών παραμέτρων pH και brix, καθώς και της οργανοληπτικής βαθμολογίας, δημιουργήθηκαν μοντέλα, χρησιμοποιώντας την μέθοδο της Γραμμικής Παλινδρόμησης Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (PLS-R). Χρησιμοποιήθηκαν οι τιμές των λανθανουσών μεταβλητών ως μεταβλητές εισόδου και το μικροβιακό φορτίο της κάθε ομάδας μικροοργανισμών, το pH, το brix και οι τιμές της οργανοληπτικής αξιολόγησης, ως μεταβλητές εξόδου. Η επαλήθευση των μοντέλων, έγινε με τη μέθοδο της διασταυρούμενης επικύρωσης των αποτελεσμάτων (leave one out cross validation). Η αξιολόγηση της επίδοσης των μοντέλων που δημιουργήθηκαν με PLS-R ελέγχθηκε με τη χρήση των δεικτών επίδοσης B_f, A_f, R^2 και RMSE. Επιπλέον, η αξιολόγηση του μοντέλου πρόβλεψης της οργανοληπτικής βαθμολογίας των δειγμάτων χυμού έγινε χρησιμοποιώντας τον πίνακα διπλής εισόδου διασταυρούμενης επικύρωσης. Η ακρίβεια της ταξινόμησης καθορίστηκε από τον αριθμό των σωστών προβλέψεων σε κάθε κατηγορία, διαιρεμένο με τον συνολικό αριθμό των δειγμάτων που βρίσκονταν σε αυτή την κατηγορία, όπως και με το σωστό αριθμό ταξινομήσεων (ακρίβεια της πρόβλεψης) σε όλες τις κλάσεις προς το συνολικό αριθμό των δειγμάτων.

Εικόνα 2.1.2.1.1 FTIR τύπου Frontier Infrared Spectroscopy System της PerkinElmer.

2.2 Έλεγχος επιβίωσης επτά (7) οξυγαλακτικών βακτηρίων με προβιοτικό δυναμικό σε χυμούς ροδάκινου

Μετά την ολοκλήρωση του ελέγχου των μικροβιολογικών και των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών των εμπορικά διαθέσιμων χυμών ροδάκινου, επιλέχθηκαν δύο (2) διαφορετικές παρτίδες χυμού ροδάκινου, για την παρασκευή χυμών με προβιοτικά στελέχη. Τα στελέχη που δοκιμάστηκαν ήταν απομονωμένα από παραδοσιακές ζυμούμενες ελληνικές ελιές με προβιοτικές ιδιότητες και δυναμικό επιβίωσης σε όξινα περιβάλλοντα (Argyri et al. 2013) και παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 2.2.1 Οξυγαλακτικά βακτήρια με προβιοτικό δυναμικό, απομονωμένα από παραδοσιακές ζυμούμενες ελληνικές ελιές, τα οποία εμβολιάστηκαν σε χυμό ροδάκινου.

PROBIOTICS
Lb. casei Shirota
Lb. plantarum E10
Lb. plantarum E69
Lb. pentosus E108
Lb. pentosus E104
Lb. paracasei subsp. *paracasei* E93
Lb. *paracasei* subsp. *paracasei* E94

2.2.1 Προετοιμασία δειγμάτων χυμού ροδάκινου με τα προβιοτικά στελέχη

Από την υπερ-κατάψυξη (-80 ºC) ανανεώθηκε η καλλιέργεια των προβιοτικών στελεχών από το θρεπτικό υλικό MRS broth με 20% γλυκερόλη, σε υλικό υλικό MRS broth (0.1ml στα 10ml) και επωάστηκε στους 30 ºC για 18 ώρες. Ακολούθησε δεύτερη ανακαλλιέργεια στο ίδιο υλικό (0.5ml στα 50ml) και επώαση στους 30 ºC για 18 ώρες. Μετά την τελευταία ανανέωση της καλλιέργειας ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 6.000 rpm/min σε θερμοκρασία 4°C για 10 λεπτά. Έγινε απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού και ακολουθούσε πλύση του ιζήματος με αποστειρωμένο διάλυμα φυσιολογικού ορού (Ringer), καλή ανάδευση για να γίνει επαναιώρηση του ιζήματος και επανάληψη της φυγοκέντρησης για 10 λεπτά στις ίδιες συνθήκες. Η παραπάνω διαδικασία έγινε για την πλήρη απομάκρυνση υπολειμμάτων θρεπτικού υλικού από τα κύτταρα. Ακολούθησε επαναιώρηση των κυττάρων με χυμό ροδάκινο έως τα 50ml (αρχικός όγκος καλλιέργειας) του φυγοκεντρικού σωλήνα. Πραγματοποιήθηκαν επαναιωρήσεις με δύο διαφορετικές παρτίδες χυμού για κάθε ένα από τα 7 στελέχη. Συνολικά, παρασκευάστηκαν 16 δείγματα χυμών [(7 στελέχη και 1 μάρτυρας) x2 παρτίδες].

Το MRS Broth είναι ένα μη επιλεκτικό θρεπτικό μέσο, για την άφθονη ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων.

Πίνακας 2.2.1.1 Σύνθεση του θρεπτικού υλικού MRS Broth.

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	g / 1000ml
Peptone	10.0
‘Lab-Lemco’ powder	8.0
Yeast extract	4.0
Glucose	20.0
Sorbitan mono-oleate	1 ml
Dipotassium hydrogen phosphate	2.0
Sodium acetate $3H_2O$	5.0
Triammonium citrate	2.0
Magnesium sulphate $7H_2O$	0.2
Manganese suplphate $4H_2O$	0.05

Διαδικασία παρασκευής:

Σε μια φιάλη ζυγίστηκαν 52 g θρεπτικού υλικού και προστέθηκαν σε 1 λίτρο απιονισμένου νερού στους 60 ºC περίπου. Στη συνέχεια η φιάλη τοποθετήθηκε στον αναδευτήρα με συχνή ανάδευση για να διαλυθεί. Μοιράστηκε σε σωληνάκια (10ml στο καθένα) και ακολούθησε αποστείρωση σε αυτόκλειστο στους 121 °C για 15 λεπτά. Το τελικό pH του έτοιμου μέσου ήταν 6.2 ± 0.2 στους 25 ºC.

Επώαση: 37 °C αερόβια για 3 ημέρες.

2.2.2 Μικροβιολογική και φυσικοχημική ανάλυση δειγμάτων χυμού ροδάκινου με τα προβιοτικά στελέχη

Συνολικά το πείραμα διήρκησε 4 ημέρες (συντήρηση στους 4 ºC) και πραγματοποιήθηκαν τρεις δειγματοληψίες (d0, d1, d3). Σε κάθε δειγματοληψία, ένα (1) ml δείγματος μεταφερόταν σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν 9ml αποστειρωμένο Ringer και ακολουθούσε ανάδευση σε συσκευή τύπου vortex. Οι πληθυσμοί των μικροοργανισμών απαριθμήθηκαν μετά από διαδοχικές αραιώσεις, επίστρωση (0.1 ml) σε PCA (Plate Count Agar), ενσωμάτωση (1ml) σε MRS (M.R.S. ISO Agar) και επώαση στους 30 °C αερόβια για 48 και 72 ώρες, αντίστοιχα. Ταυτόχρονα, για κάθε δείγμα γίνονταν οργανοληπτικός έλεγχος, μετρήσεις pH, brix καθώς και αναλύσεις FTIR με τριπλή επανάληψη.

2.2.3 Οργανοληπτική ανάλυση δειγμάτων χυμού ροδάκινου με τα προβιοτικά στελέχη

Σε όλα τα δείγματα χυμού ροδάκινου με τα προβιοτικά στελέχη πραγματοποιήθηκε οργανοληπτικός έλεγχος. Κάθε δείγμα χυμού βαθμολογήθηκε με βάση την εμφάνιση, το άρωμα και τη γεύση του, με μια συνολική εκτίμηση με κλίμακα από το ένα (1) έως το πέντε (5) (Μη αποδεκτό=1, Αποδεκτό=2, Μέτριο=3, Καλό=4, Άριστο=5), περιλαμβάνοντας και τις ενδιάμεσες τιμές τους (1,5, 2,5, 3,5, 4,5).

2.3 Έλεγχος επιβίωσης έντεκα (11) οξυγαλακτικών βακτηρίων με προβιοτικό δυναμικό σε χυμούς πορτοκαλιού

Από την υπερ-κατάψυξη (-80 ºC) ανανεώθηκε η καλλιέργεια των προβιοτικών στελεχών από το θρεπτικό υλικό MRS broth με 20% γλυκερόλη, σε υλικό υλικό MRS broth (0.1ml στα 10ml) και επωάστηκε στους 30 ºC για 18 ώρες. Ακολούθησε δεύτερη ανακαλλιέργεια στο ίδιο υλικό (0.5ml στα 50ml) και επώαση στους 30 ºC για 18 ώρες. Μετά την τελευταία ανανέωση της καλλιέργειας ακολούθησε φυγοκέντρηση

στις 6.000 rpm/min σε θερμοκρασία 4°C για 10 λεπτά. Έγινε απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού και ακολουθούσε πλύση του ιζήματος με αποστειρωμένο διάλυμα φυσιολογικού ορού (Ringer), καλή ανάδευση για να γίνει επαναιώρηση του ιζήματος και επανάληψη της φυγοκέντρησης για 10 λεπτά στις ίδιες συνθήκες. Η παραπάνω διαδικασία έγινε για την πλήρη απομάκρυνση υπολειμμάτων θρεπτικού υλικού από τα κύτταρα. Ακολούθησε επαναιώρηση των κυττάρων με κατάλληλο όγκο χυμού, ώστε να δώσει την επιθυμητή, για κάθε περίπτωση, ποσότητα εμβολίου ανά ml χυμού. Στη συνέχεια εμβολιάστηκαν καλλιέργειες έντεκα (11) διαφορετικών στελεχών σε χυμό πορτοκαλιού (δύο διαφορετικές παρτίδες) με χαμηλή (10^7) και υψηλή (10^8) τελική συγκέντρωση εμβολίου και οι χυμοί ελέγχθηκαν μικροβιολογικά (PCA, MRS), φυσικοχημικά (pH, FTIR) και οργανοληπτικά. Οι καλλιέργειες που δοκιμάστηκαν ήταν οι επτά που χρησιμοποιήθηκαν στο παραπάνω πείραμα και προστέθηκαν άλλες τέσσερις, απομονωμένες επίσης από παραδοσιακές ζυμούμενες ελληνικές ελιές με προβιοτικό δυναμικό. Τα δείγματα συντηρήθηκαν για 22 ημέρες στους 4 ºC και πραγματοποιήθηκαν συνολικά πέντε δειγματοληψίες (d0, d2, d7, d17, d21).

Πίνακας 2.3.1 Οξυγαλακτικά βακτήρια με προβιοτικό δυναμικό, απομονωμένα από παραδοσιακές ζυμούμενες ελληνικές ελιές, τα οποία εμβολιάστηκαν σε χυμούς πορτοκαλιού (με έντονα φαίνονται τα νέα στελέχη που προστέθηκαν στο συγκεκριμένο πείραμα).

PROBIOTICS
***Lb. plantarum* B282**
Lb. plantarum E10
Lb. plantarum E69
***Lb. pentosus* B281**
Lb. pentosus E108
***Lb. pentosus* E97**
Lb. pentosus E104
Lb. paracasei subsp. *paracasei* E93
Lb. paracasei subsp. *paracasei* E94
Lb. casei Shirota
***Lb. ramnosus* GG**

Από τις δοκιμές αυτές επιλέχθηκε το στέλεχος με την καλύτερη επιβίωση στους χυμούς, που παράλληλα προσέδιδε επιθυμητά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, το οποίο χρησιμοποιήθηκε και στο επόμενο πείραμα.

2.4 Παραγωγή και συντήρηση λειτουργικού πορτοκαλοχυμού και απενεργοποίηση του *Alicyclobacillus Acidoterrestris* με χρήση ΥΠΠ και ΘΕ

Φυσικός πορτοκαλοχυμός εμβολιάστηκε με το στέλεχος *A. acidoterrestris Aac*, με το στέλεχος *Lb. pentosus* E104 (απομονωμένο από ζυμούμενες ελιές) και με το συνδυασμό τους (*Lb. pentosus* E104 και *A. acidoterrestris*). Το στέλεχος *A. acidoterrestris* εμβολιάστηκε (βλ. 2.4.1 για τη συλλογή σπορίων) πριν τις διαφορετικές επεξεργασίες του χυμού, ενώ το προβιοτικό στέλεχος μετά τις επεξεργασίες. Το προβιοτικό στέλεχος εμβολιάστηκε σε χυμό που θερμάνθηκε στους 60 ºC για 10 min και σε χυμό εμβολιασμένο με στέλεχος του *A. acidoterrestris* που θερμάνθηκε στις ίδιες συνθήκες. Επίσης, το προβιοτικό εμβολιάστηκε σε επεξεργασμένο χυμό με ΥΥΠ των 600MPa για 10 min με ταυτόχρονη θέρμανση στους 60 ºC και σε χυμό εμβολιασμένο με στέλεχος του *A. acidoterrestris* που επεξεργάστηκε με τις ίδιες συνθήκες. Δείγματα χωρίς επεξεργασία καθώς και δείγματα που δεν εμβολιάστηκαν χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Στη συνέχεια τα δείγματα συντηρήθηκαν στους 4 ºC για δύο μήνες. Οι μικροβιολογικές αναλύσεις (PCA, MRS, BAT) περιλάμβαναν μετρήσεις πριν την επεξεργασία, μετά την επεξεργασία και μετά από θέρμανση στους 80 ºC για 10 min (για απενεργοποίηση των βλαστικών κυττάρων και καταμέτρηση μόνο των σπορίων *A. acidoterrestris*) και λάμβαναν χώρα δύο φορές την εβδομάδα κατά τη διάρκεια της συντήρησης. Πραγματοποιήθηκαν στο σύνολο εννιά δειγματοληψίες (d0, d5, d8, d12, d15, d18, d22, d26, d60). Καθ' όλη τη διάρκεια συντήρησης των δειγμάτων γινόταν οργανοληπτικός έλεγχος, μετρήσεις pH και ανάλυση FTIR.

2.4.1 Συλλογή σπορίων του αλλοιογόνου μικροοργανισμού *Alicyclobacillus acidoterrestris*

Από την υπερ-κατάψυξη (-80ºC) ανανεώθηκε η καλλιέργεια του *Alicyclobacillus acidoterrestris* από το θρεπτικό υλικό YSG Broth και 20% Glycerol σε υλικό YSG Broth (0.1ml στα 10ml) και επωάστηκε στους 45 ºC για 48 ώρες. Ακολούθησε θέρμανση του εμβολιασμένου Broth στους 80 ºC για 10 λεπτά. Στη

συνέχεια εμβολιάστηκαν τρυβλία με υλικό BAT Agar με ποσότητα 0.2 ml από τα στελέχη ώστε να πραγματοποιηθεί η συλλογή των σπορίων.

Το YSG Broth είναι ένα υλικό το οποίο χρησιμοποιείται για την ανίχνευση του *Alicyclobacillus* σε φρουτοχυμούς σύμφωνα με την επίσημη μέθοδο IFU.

Πίνακας 2.4.1.1 Σύνθεση του θρεπτικού υλικού YSG Broth.

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	g / 1000ml
Yeast Extract	2.0
Glucose	1.0
Soluble starch	2.0

Διαδικασία παρασκευής:

Σε μια φιάλη ζυγίστηκαν 5 g θρεπτικού υλικού και συμπληρώθηκε 1 λίτρο απιονισμένου νερού. Στη συνέχεια η φιάλη τοποθετήθηκε στον αναδευτήρα με συχνή ανάδευση και βρασμό για ένα λεπτό, για την τελική διάλυση. Ρυθμίστηκε το pH στους 3.7 ± 0.1 με την προσθήκη HCL (1N). Ακολούθησε αποστείρωση σε αυτόκλειστο στους 121 °C για 15 λεπτά. Το τελικό pH του έτοιμου μέσου ήταν 3.7 ± 0.1 στους 25 ºC.

Το BAT Broth είναι ένα υλικό, το οποίο χρησιμοποιείται για την ανίχνευση και τον εμπλουτισμό του *Alicyclobacillus* σε φρουτοχυμούς και άλλα όξινα τρόφιμα.

Πίνακας 2.4.1.2 Σύνθεση του θρεπτικού υλικού BAT Broth.

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	g / 1000ml
Dextrose	5.0
Monopotassium Phosphate	3.0
Yeast Extract	2.0
Magnessium Sulfate	0.5
Calcium Chloride	0.25
Amonium Sulfate	0.2
Sodium Molibdate	0.0003
Zinc Sulfate	0.00018
Cobalt Chloride	0.00018
Cooper Sulfate	0.00016

Manganase Sulfate	0.0015
Boric Acid	0.0001

Διαδικασία παρασκευής:

Σε μια φιάλη ζυγίστηκαν 11 g θρεπτικού υλικού και συμπληρώθηκε 1 λίτρο απιονισμένου νερού. Στη συνέχεια η φιάλη τοποθετήθηκε στον αναδευτήρα με συχνή ανάδευση για να διαλυθεί. Έβρασε για ένα λεπτό για την τελική διάλυση. Ακολούθησε αποστείρωση σε αυτόκλειστο στους 121 °C για 15 λεπτά, τοποθετήθηκε στο λουτρό μέχρι να φτάσει τους 45 - 50 °C και στη συνέχεια ρυθμίστηκε το pH στους 4.0 ± 0.2 με την προσθήκη H_2SO_4 (1N). Το τελικό pH του έτοιμου μέσου ήταν 4.0 ± 0.2 στους 25 ºC.

Για την συλλογή των σπορίων η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

Σε κάθε τρυβλίο προστέθηκαν 2.5ml κρύο dH_2O και με τη βοήθεια του τριγώνου αποκολλήθηκαν οι αποικίες. Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε 2 φορές. Έπειτα, συλλέχθηκε το εναιώρημα σε σωληνάκια τύπου Falcon των 50 ml. Πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στις 5000rpm για 10 λεπτά στους 4 ºC. Στη συνέχεια έγινε απόχυση του υπερκείμενου και έγινε δεύτερο ξέπλυμα με dH_2O. Το τρίτο ξέπλυμα έγινε με phosphate buffer KPBs όπως και η τελική επαναιώρηση (10ml). Στη συνέχεια έγινε η καταμέτρηση των σπορίων και τα σπόρια τοποθετήθηκαν στους 4 ºC μέχρι τον εμβολιασμό.

Πίνακας 2.4.1.3 Σύνθεση του phosphate buffer KPBs (200ml).

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	**g / 200ml**
K_2HPO_4	0.282
KH_2PO_4	0.0518
NaCl	1.6

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 Μικροβιακή ανάλυση και μετρήσεις pH / Brix εμπορικά διαθέσιμων χυμών ροδάκινου

Οι μικροβιακοί πληθυσμοί καθώς και οι μετρήσεις pH και Brix που πραγματοποιήθηκαν στα δείγματα χυμών ροδάκινου που είναι διαθέσιμοι στο εμπόριο παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.1.1.

Πίνακας 3.1.1 Μικροβιακή ανάλυση (Ολική Μικροβιακή Χλωρίδα, Οξυγαλακτικά Βακτήρια, Ζύμες-μύκητες, *Alicyclobacillus* spp.) και μετρήσεις pH / Brix εμπορικά διαθέσιμων χυμών ροδάκινου.

Δείγμα	**Ολική Μικροβιακή Χλωρίδα (log CFUml^{-1})**	**Οξυγαλακτικά Βακτήρια (log CFUml^{-1})**	**Ζύμες-μύκητες (log CFUml^{-1})**	***Alicyclobacillus* spp. (log CFUml^{-1})**	**pH**	**Brix**
A1	2,60	0,00	1,00	1,00	3,05	11,6
A2	1,00	0,00	1,00	1,00	3,05	11,6
A3	1,00	0,00	1,00	1,00	3,11	13,0
A4	1,00	0,00	1,00	1,00	3,15	12,8
A5	1,00	0,00	1,00	1,00	3,26	13,0
H1	1,00	0,00	1,00	1,00	3,18	11,9
H2	1,00	0,00	1,00	1,00	3,15	12,0
H3	1,00	0,00	1,00	1,00	3,30	13,2
H4	1,00	0,00	1,00	1,00	3,14	13,1
H5	1,00	0,00	1,00	1,00	3,23	13,2
H6	2,00	0,00	1,00	1,00	3,45	13,7
H7	1,00	0,00	1,00	1,00	3,47	13,1
H8	1,00	0,00	1,00	1,00	3,44	13,9
P1	1,00	0,00	1,00	1,00	3,17	11,0
P2	1,00	0,00	1,00	1,00	3,18	11,0
P3	1,00	0,00	1,00	1,00	3,16	12,3
P4	1,00	0,00	1,00	1,00	3,30	12,6
P5	2,00	0,00	1,00	1,00	3,30	12,6
B1	1,00	0,00	1,00	1,00	2,67	11,8
B2	1,00	0,00	1,30	1,00	2,72	11,5
B3	1,00	0,00	2,00	1,00	3,44	12,3
B4	1,00	0,00	1,00	1,00	2,98	12,3
B5	1,00	0,00	1,00	1,00	3,11	12,3
G1	1,00	0,00	1,00	1,00	3,65	11,8
G2	1,00	0,00	3,86	1,00	3,32	11,7
G3	1,00	0,00	1,00	1,00	3,52	12,1
G4	1,00	0,00	1,00	1,00	3,70	11,8
D1	1,00	0,00	1,00	1,00	3,05	11,9
D2	1,00	0,00	1,00	1,00	3,06	12,0

D3	1,00	0,00	1,00	1,00	3,32	12,4
D4	1,00	0,00	1,00	1,00	3,30	11,0
D5	1,00	0,00	1,00	1,00	3,34	12,5
E1	1,00	0,00	1,00	1,00	3,22	12,4
E2	1,00	0,00	1,00	1,00	3,00	13,1
E3	1,00	0,00	1,00	1,00	3,66	12,7
E4	1,00	0,00	1,00	1,00	3,70	13,0
E5	1,00	0,00	1,00	1,00	3,42	12,8
Z1	1,00	0,00	1,00	1,00	3,20	11,5
Z2	1,00	0,00	1,00	1,00	3,56	12,0
X1	1,00	0,00	1,00	1,00	3,56	13,1
L1	1,00	0,00	1,00	1,00	3,64	12,7
L2	4,28	0,00	1,00	1,30	3,43	12,2

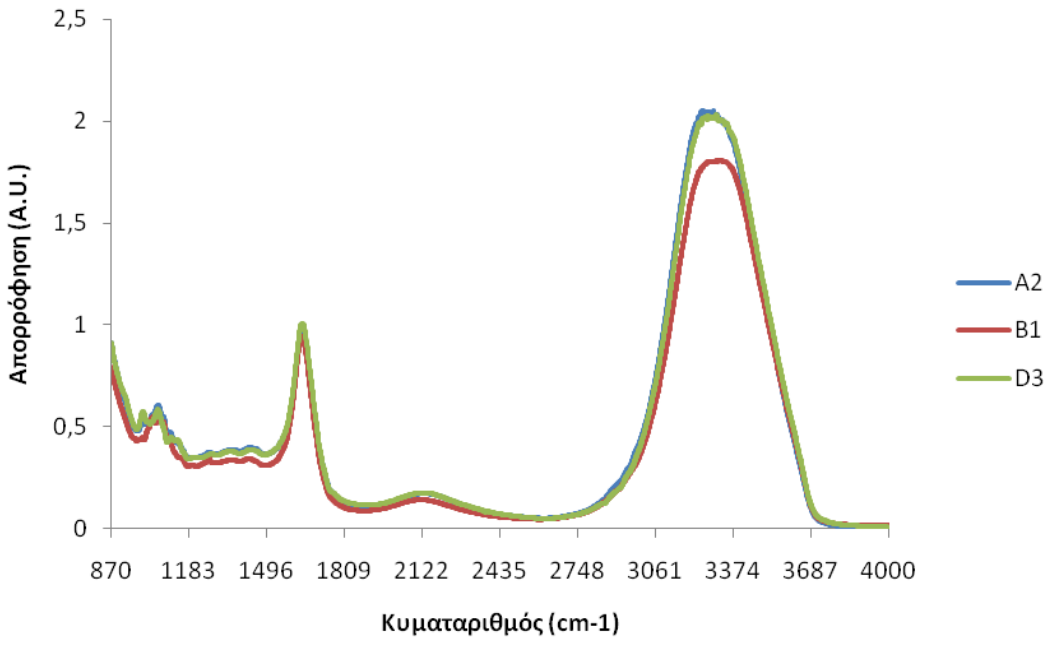
Με βάση τα αποτελέσματα των μικροβιολογικών αναλύσεων, η ολική μικροβιακή χλωρίδα (ΟΜΧ) υπολογίστηκε κάτω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου καταμέτρησης (1,00 log CFU/ml) στην πλειοψηφία των χυμών ροδάκινου του εμπορίου και 2,00 log CFU/ml στους χυμούς Η6 και Ρ5. Η ΟΜΧ του δείγματος Α1 υπολογίστηκε στα 2,60 log CFU/ml, ενώ η υψηλότερη τιμή σημειώθηκε στον χυμό L2 με πληθυσμό 4,28 log CFU/ml.

Σε όλα τα δείγματα χυμών ροδάκινου οι πληθυσμοί των οξυγαλακτικών βακτηρίων καθώς και των *Alicyclobacillus* spp. βρέθηκαν να είναι κάτω από το όριο ανίχνευσης των 0,00 log CFU/ml. Πιο συγκεκριμένα, τα οξυγαλακτικά βακτήρια πήραν μηδενικές τιμές, ενώ τα *Alicyclobacillus* spp. βρέθηκαν στα 1,00 log CFU/ml, με εξαίρεση στον χυμό L2 που εμφάνισε πληθυσμό *Alicyclobacillus* spp. στα 1,30 log CFU/ml. Οι πληθυσμοί των ζυμών / μυκήτων στους χυμούς παρουσίασαν, επίσης, τιμές μικρότερες του 1,00 log CFU/ml στην πλειοψηφία τους, 1,30 και 2,00 log CFU/ml στους Β2 και Β3 αντίστοιχα, ενώ ο χυμός G2 εμφάνισε τον υψηλότερο πληθυσμό (3,86 log CFU/ml) σε ζύμες / μύκητες.

Όσον αφορά το pH των χυμών ροδάκινου του εμπορίου, κατά μέσο όρο εμφάνισαν τιμή 3,28 ± 0,24. Η χαμηλότερη τιμή pH που καταγράφηκε ήταν 2,67 και σημειώθηκε στο δείγμα Β1, ενώ η υψηλότερη τιμή ήταν 3,70 στον χυμό G4. Αντίστοιχα, η τιμή Brix των χυμών κατά μέσο όρο ήταν 12,35 ± 0,70. Οι χυμοί Ρ1, Ρ2 και D4 παρουσίασαν την χαμηλότερη τιμή Brix (11,0) σε αντίθεση με τον χυμό Η8 που εμφάνισε την υψηλότερη τιμή του Brix (13,9).

3.1.1 Ανάλυση FTIR εμπορικά διαθέσιμων χυμών ροδάκινου

Συνολικά αναλύθηκαν 42 δείγματα χυμών ροδάκινου από το εμπόριο, με τριπλή επανάληψη στο κάθε δείγμα, με τη φασματοσκοπία FTIR, τη στιγμή του ανοίγματος του κουτιού. Τυπικά φασματικά δεδομένα FTIR συλλέχθηκαν στην περιοχή 870-4000 cm^{-1} και ενδεικτικά παρουσιάζονται στο διάγραμμα 3.1.1.1 τρία (A2, B1, D3) τυχαία δείγματα από όλους τους χυμούς ροδάκινου που αναλύθηκαν. Παρά τις όποιες εμφανείς ομοιότητες, τα φάσματα που ελήφθησαν για κάθε αναλυθέν δείγμα είναι μοναδικά και χαρακτηρίζονται από συγκεκριμένες διαφορές, μη εμφανείς οπτικά στις περισσότερες περιπτώσεις που καθιστούν δυνατή τη σύγκριση των αποτελεσμάτων. Αναλυτικότερα, οι κύριες περιοχές συχνοτήτων αλλά και οι κορυφές που παρατηρήθηκαν στα αντιπροσωπευτικά φάσματα FTIR που συλλέχθηκαν, παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.1.1.1 μαζί με τις πιθανές αντιστοιχήσεις των ουσιών / χαρακτηριστικών ομάδων ουσιών που μπορεί να απορροφούν σε κάθε μήκος κύματος, όπως έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία.



Διάγραμμα 3.1.1.1 Τυπικά φασματογραφήματα στους κυματαριθμούς 870-4000 cm^{-1} τριών τυχαίων δειγμάτων χυμού ροδάκινο από το εμπόριο (*A2*, *B1*, *D3*).

Πίνακας 3.1.1.1 Οι συχνότητες που παρατηρήθηκαν στα φάσματα FTIR που συλλέχτηκαν από τα δείγματα χυμού ροδάκινου και οι πιθανές αντιστοιχίσεις των τρόπων δόνησης (προσαρμογή από Argyri, Panagou και Nychas, 2014).

Κυματαριθμός (cm^{-1})	Αντιστοίχιση	Πηγή
3730-3000 (3400, 3285)	Πρωτεΐνες (N-H τάση), υδροξυλικές ομάδες από νερό/πρωτεΐνες (O-H τάση)	**Zeroual et al. 1994, Schmitt & Flemming 1998, Kansiz et al. 1999, Maquelin et al. 2002, Subramanian et al. 2011, Nicolaou et al. 2011**
3000-2800 (2960, 2929, 2875, 2850)	Πρωτεΐνες (N-H τάση), υδροξυλικές ομάδες από νερό/πρωτεΐνες (O-H τάση) και -C-Hx αλυσίδα ακυλίου λιπαρών οξέων ή πρωτεϊνών	**Zeroual et al. 1994, Schmitt & Flemming 1998, Kansiz et al. 1999, Maquelin et al. 2002, Martin-del-Campo et al. 2007, Subramanian et al. 2011, Nicolaou et al. 2011**
1780-1745 (1740)	C=O τάση εστέρων και οργανικών οξέων	**Zeroual et al. 1994, Schmitt & Flemming 1998, Kansiz et al. 1999, Maquelin et al. 2002, Martin-del-Campo et al. 2007**
1745-1560 (1650, 1640)	C=O τάση εστέρων και οργανικών οξέων, νερό (H-O-H δόνηση παραμόρφωσης) και περιοχή Αμιδίου I (80% C=O τάση, 10% C-N τάση 10% N-H κάμψη) Περιοχή Αμιδίου II (40% CN τάση, 60% NH δόνηση κάμψης).	**Zeroual et al. 1994, Schmitt & Flemming 1998, Kansiz et al. 1999, Socrates 2001, Maquelin et al. 2002, Wu et al. 2006, Bocker et al. 2007, Martin-del-Campo et al. 2007**
1560-1500 (1550)	Περιοχή Αμιδίου II (40% CN τάση, 60% NH δόνηση κάμψης).	**Zeroual et al. 1994, Schmitt & Flemming 1998, Kansiz et al. 1999, Maquelin et al. 2002, Bocker et al. 2007**
1475-1385 (1455, 1400)	Λιπίδια (CH_3 ασύμμετρη παραμόρφωση, CH_3 ασύμμετρη κάμψη, C-H παραμόρφωση του CH_2, CH_2 ψαλιδοειδής δόνηση, C-H κάμψη) ή αμίνες (ασυμμετρία CH_3 δόνηση παραμόρφωσης), CH_2 κάμψη, αμίδια (C-N τάση) ή λιπίδια (RCOO- *τάση συμμετρίας* COO-, -CH_2-COOR δόνηση παραμόρφωσης του CH_2), πλευρικές αλυσίδες αμινοξέων, λιπίδια, υδατάνθρακες (CH κάμψη ή C-O τάση στις καρβοξυλικές ενώσεις) ή νιτροομάδα (τάση συμμετρίας NO_2)	**Zeroual et al. 1994, Chen et al. 1998, Schmitt & Flemming 1998, Kansiz et al. 1999, Socrates 2001, Maquelin et al. 2002, Bocker et al. 2007, Ellis et al. 2004, Pappas et al. 2008, Pistorius 1995**
1385-1290	Πλευρικές αλυσίδες αμινοξέων, λιπίδια, υδατάνθρακες (CH κάμψη ή C-O τάση στις καρβοξυλικές ενώσεις) ή νιτροομάδα (τάση συμμετρίας NO_2), πρωτοταγείς και δευτεροταγείς αλειφατικές αμίνες (X-sensitive band), αμίνες -CH_2NH_2 (CH_2 δόνηση στρέψης), CH_2 πλευρικής αλυσίδας, ελεύθερα αμινοξέα/αλειφατικά καρβοξυλικά οξέα μακράς αλύσου (CH τάση/CH_2 δόνηση παραμόρφωσης), αμίδιο III (C-N τάση, N-H κάμψη, C=O-N κάμψη)	**Pistorius 1995, Socrates 2001, Ellis et al. 2004, Bocker et al. 2007, Pappas et al. 2008**

1290-1175 (1260, 1240)	Αμίδιο ΙΙΙ (C-N τάση, N-H κάμψη, C=O-N κάμψη) λιπίδια, νουκλεικά οξέα (ασυμ. PO_2- τάση), αμίδιο ΙΙΙ (C-N τάση, N-H κάμψη, C=O-N κάμψη, P=O τάση), αμίνες από ελεύθερα αμινοξέα (C-N τάση) αμίνες –N(CH3)2 (CH3 σείση και ασυμ. CCN τάση) σχετίζεται με λίπος C-O τάση), εστέρες (C-O-C), υδατάνθρακες (C-O τάση), -NH2 παραμόρφωση	**Zeroual et al. 1994, Pistorius 1995, Chen et al. 1998, Schmitt & Flemming 1998, Kansiz et al. 1999, Socrates 2001, Maquelin et al. 2002, Ellis et al. 2002, Bocker et al. 2007, Pappas et al. 2008**
1175-1095 (1105)	Σχετίζεται με λίπος (C-O τάση), εστέρες (C-O-C), υδατάνθρακες (C-O τάση), -NH2 παραμόρφωση, ριβόζες (C-O τάση), αμίνες (NH_2 σείση/στρέψη), νουκλεικά οξέα και φωσφολιπίδια (PO2 συμ. τάσης)/C-O τάση)	**Chen et al. 1998, Socrates 2001, Bocker et al. 2007, Pappas et al. 2008**
1095-1010 (1080, 1055)	Νουκλεικά οξέα και φωσφολιπίδια (PO2 συμ. τάσης)/C-O τάση), λιπίδια και πολυσακχαρίτες (C-O, C-O-P τάση), πολυσακχαρίτες (C-O τάση), αμίνες (CN τάση)	**Zeroual et al. 1994, Schmitt & Flemming 1998, Kansiz et al. 1999, Socrates 2001, Maquelin et al. 2002, Bocker et al., 2007**
1010-975 (995)	Πολυσακχαρίτες (C-O τάση), αμίνες (CN τάση), α,β ενώσεις πυρανόζης (δον. δακτυλίου), αρωματικά καρβοξυλικά οξέα	**Socrates 2001, Bocker et al., 2007**
975-870	α,β ενώσεις πυρανόζης (δον. δακτυλίου), αρωματικά καρβοξυλικά οξέα	**Socrates 2001**

Η γενική εικόνα των φασμάτων που αναλύθηκαν φανερώνει πέντε αντιπροσωπευτικές περιοχές οι οποίες είναι οι ακόλουθες: 900-1183 cm^{-1}, 1183-1496 cm^{-1}, 1496-1809 cm^{-1}, 1809-2748 cm^{-1} και 2748-4000 cm^{-1}. Ένα μοναδικό χαρακτηριστικό του *Alicyclobacillus* είναι τα N-αλικυκλικά λιπαρά οξέα που χρησιμεύουν ως κύρια συστατικά λιπιδίων μεμβράνης, τα οποία συμβάλλουν στην επιβίωσή του μικροοργανισμού σε χαμηλό pH και σε υψηλή θερμοκρασία (Chang 2003, Sinigaglia et al. 2003). Έτσι, οι κορυφές απορρόφησης στα 2960, 2929 και 1740 cm^{-1} μπορεί να οφείλονται και στην παρουσία N-αλικυκλικών λιπαρών οξέων στην κυτταρική μεμράνη του *Alicyclobacillus* (Schmitt & Flemming 1998, Kansiz et al. 1999). Η φασματική περιοχή μεταξύ 1500 και 800 cm^{-1} δίνει ειδικές πληροφορίες για το βακτηριακό στέλεχος (Choo-Smith et al. 2001, Schmitt & Flemming 1998). Αυτή η σειρά περιέχει σημαντικές παραμορφώσεις, κάμψεις και δακτυλιοειδείς δονήσεις από διάφορες βιοχημικές λειτουργικές ομάδες (Schmitt & Flemming 1998). Ο δονητικός συνδυασμός αυτής της περιοχής είναι σημαντικός για την ταυτοποίηση των βιοχημικών ενώσεων γιατί μπορεί να συνδεθεί με έναν μοριακό δεσμό ή με μια συγκεκριμένη λειτουργική ομάδα.

Τα δονητικά χαρακτηριστικά των μονο- και πολυσακχαριτών κυριαρχούν γενικά στην περιοχή μεταξύ 900-1183 cm^{-1}, λόγω δεσμών τάσης C-O, που σχετίζονται με τα σάκχαρα (Sakhamuri et al. 2004, Moros et al. 2006). Αυτή η περιοχή συχνοτήτων χαρακτηρίζεται από τις δονήσεις του δακτυλίου των υδατανθράκων C-O-C, C-O, σύμφωνα με τον Nauman, 2000. Οι κορυφές στα 995, 1055 και 1105 cm^{-1} που παρατηρήθηκαν στα φάσματα των δειγμάτων των χυμών ροδάκινου μπορούν επομένως να αποδοθούν σε σάκχαρα. Σύμφωνα με τους Sakhamuri et al. 2004, οι φωσφορυλιωμένοι υδατάνθρακες έχουν χαρακτηριστική συχνότητα μεταξύ 1100-1300 cm^{-1}, άρα η παρατηρούμενη κορυφή στα 1260 cm^{-1} πιθανόν να αποδίδεται σε φωσφορυλιωμένους υδατάνθρακες στο χυμό.

Το εύρος 1200-1450 cm^{-1} υποδηλώνει καρβοξυλικές ομάδες πρωτεϊνών, ενώ η περιοχή μεταξύ 1500 και 1700 cm^{-1} κυριαρχείται από ζώνες πρωτεϊνών (Sakhamuri S. et al. 2004). Υπάρχουν εννέα ζώνες αμιδίου στο υπέρυθρο φάσμα (Beekes M. et al. 2007), οι οποίες, κατά φθίνουσα σειρά κυματαριθμού, αναφέρονται ως αμίδιο A, αμίδιο B και αμίδιο I έως VII (Miyazawa, 1962). Τρεις από τις ζώνες αμιδίου παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τη μελέτη των πολυπεπτιδικών και των πρωτεϊνικών διαμορφώσεων. Η ζώνη του αμιδίου I, μεταξύ 1600 και 1680 cm^{-1} συνδέεται κυρίως με τη δόνηση τάσης του δεσμού C=O. Οι ζώνες αμιδίου II, που βρίσκεται μεταξύ 1580 και 1480 cm^{-1} και αμιδίου III, μεταξύ 1300 και 1230 cm^{-1}, σχετίζονται με το συνδυασμό C-N δονήσεων τάσης και N-H δονήσεων κάμψης των πεπτιδικών ομάδων (Susi, 1969). Αυτές οι κορυφές είναι χωροδιαταξικώς ευαίσθητες, και οι παρατηρούμενες αυτές θέσεις μπορούν να αποδοθούν σε α έλικες, παράλληλα και αντιπαράλληλα β φύλλα, β στροφές και τυχαίες περιελίξεις (Krimm, 1962, Chen and Lord, 1974 , Lord, 1977, Krimm and Bandeker, 1980). Επομένως η κορυφή στα 1260 μπορεί να αποδοθεί σε αμίδιο III. Η κύρια περιοχή που είναι εμφανής σε κάθε ληφθέν φάσμα FTIR, είναι αυτή των 1560-1745 cm^{-1}, με κορυφή στα 1640 που αντιστοιχεί στην υγρασία των δειγμάτων χυμού (O-H δόνηση τάσης) σύμφωνα με τους Panagou et al. 2011. Εντός της ζώνης των 3000-3730, παρατηρήθηκε κορυφή στα 3285 cm^{-1}, η οποία αποδίδεται σε νερό (Zeroual et al. 1994, Schmitt & Flemming 1998, Kansiz et al. 1999, Maquelin et al. 2002, Subramanian et al. 2011, Nicolaou et al. 2011).

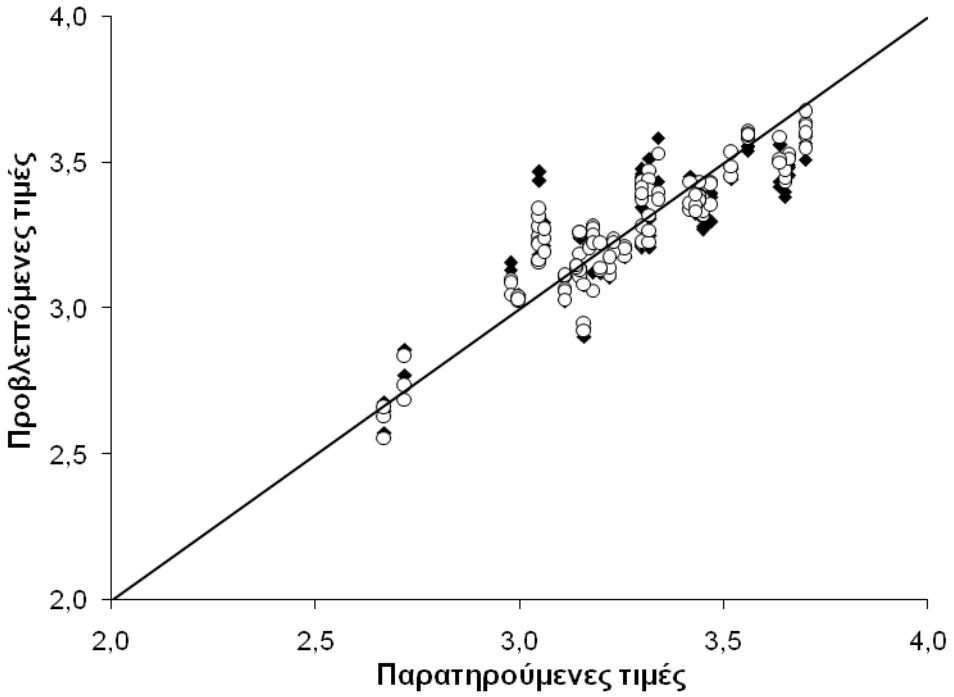
Στη συνέχεια έγινε προσπάθεια συσχέτισης των φασματικών δεδομένων με τα φυσικοχημικά δεδομένα των διαφόρων δειγμάτων χυμών ροδάκινου του εμπορίου που μελετήθηκαν. Εφαρμόστηκε η μέθοδος της Παλινδρόμησης Μερικών Ελαχίστων

τετραγώνων (PLS-R), χρησιμοποιώντας τις τιμές των λανθανουσών μεταβλητών ως μεταβλητές εισόδου (ανεξάρτητες μεταβλητές) και το pH, το brix και την πούλπα των χυμών ροδάκινου ως μεταβλητές εξόδου (εξαρτημένες μεταβλητές). Η αξιολόγηση της επίδοσης των μοντέλων που δημιουργήθηκαν με PLS-R ελέγχθηκε χρησιμοποιώντας τους δείκτες επίδοσης B_f, A_f, RMSE και R^2. Η μέθοδος PLS-R προβάλει τα δεδομένα σε ένα λανθάνον χώρο (latent space), εξάγοντας έναν αριθμό κυρίων συνιστωσών, γνωστών και ως λανθάνουσες μεταβλητές (Latent Variables, LV), σε ορθογώνια δομή. Η πρώτη μεταβλητή φέρει το μεγαλύτερο ποσοστό πληροφοριών, ακολουθούμενη από την δεύτερη κ.ο.κ Ένα σημαντικό βήμα για την ανάπτυξη του μοντέλου ήταν ο καθορισμός του βέλτιστου αριθμού των λανθανουσών μεταβλητών. Χρησιμοποιήθηκε διασταυρούμενη επικύρωση με τη μέθοδο “leave one out cross validation”, για να υπολογιστεί ο σωστός αριθμός των λανθανουσών μεταβλητών.

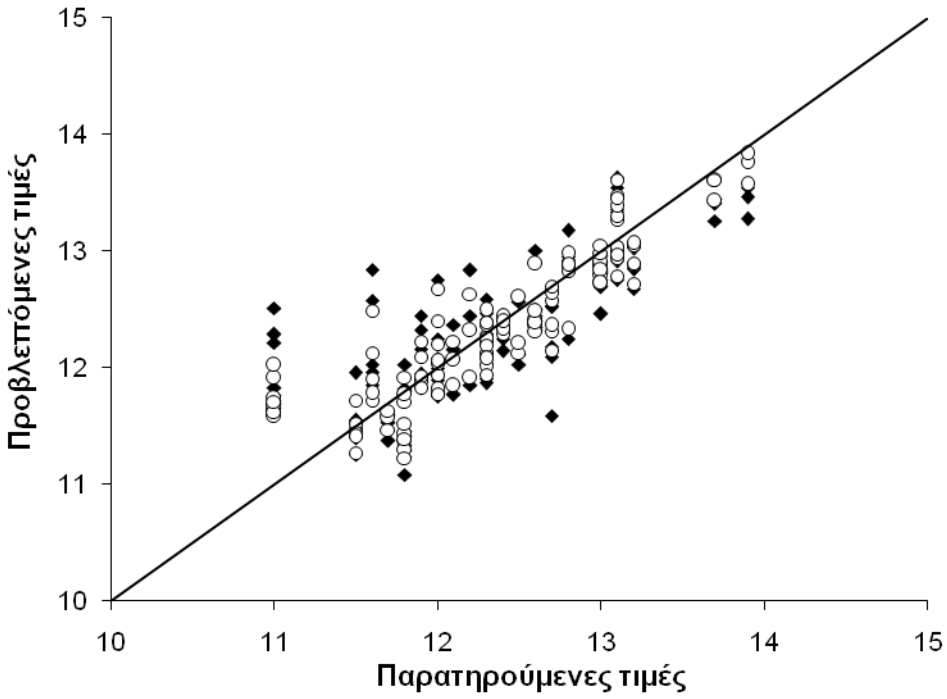
Ο αριθμός των λανθανουσών μεταβλητών και οι δείκτες επίδοσης κατά την επικύρωση του μοντέλου παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.1.1.2. Ο δείκτης προκατάληψης (bias factor, B_f) για όλες τις φυσικοχημικές ομάδες που εξετάστηκαν ήταν στην τιμή 1, αποδεικνύοντας ότι τα μοντέλα δεν παρουσίασαν συστηματική, υπο- ή υπερ- εκτίμηση, των φυσικοχημικών δεδομένων. Αντιθέτως, υποδηλώνεται ένα ικανοποιητικό μοντέλο, όπου οι προβλέψεις είναι σε πλήρη συμφωνία με τις παρατηρήσεις. Επιπλέον, με βάση τις τιμές του συντελεστή ακρίβειας (accuracy factor, A_f), φαίνεται πως η μέση απόκλιση μεταξύ των προβλέψεων και των παρατηρήσεων ήταν 3,2, 2,6 και 14,9 % για το pH, το brix και την πούλπα ροδάκινου, αντίστοιχα, αποδεικνύοντας ότι οι προβλέψεις για το pH και το brix ήταν πολύ κοντά στις παρατηρήσεις, σε αντίθεση με την μέση εκτίμηση της πούλπας ροδάκινου, η οποία ήταν λιγότερο ακριβής. Οι δείκτες RMSE έλαβαν τιμές 0,129, 0,427 και 0,064, ενώ οι συντελεστές R^2 ήταν 0,704, 0,621 και 0,635, για το pH, το brix και την πούλπα ροδάκινου, αντίστοιχα. Έτσι, έδειξαν ικανοποιητικά αποτελέσματα σε όλες τις περιπτώσεις, με μικρές τιμές μέσης απόκλισης μεταξύ των παρατηρούμενων και των προβλεπόμενων τιμών, παρουσιάζοντας καλή προσαρμογή του μοντέλου στα πειραματικά δεδομένα. Οι τιμές των συντελεστών προσδιορισμού R^2 ήταν μέτριες, δείχνοντας ότι η γραμμή παλινδρόμησης ταιριάζει στα δεδομένα, αλλά όχι απόλυτα. Τα αντίστοιχα αποτελέσματα παρουσιάζονται γραφικά στα διαγράμματα 3.1.1.2 έως 3.1.1.4, όπου απεικονίζεται η σύγκριση μεταξύ προβλέψεων και πραγματικών παρατηρήσεων.

Πίνακας 3.1.1.2 Δείκτες επίδοσης κατά την επικύρωση των μοντέλων PLS-R συσχετίζοντας τα φυσικοχημικά με τα φασματικά δεδομένα που λήφθηκαν από τα δείγματα χυμών ροδάκινου του εμπορίου.

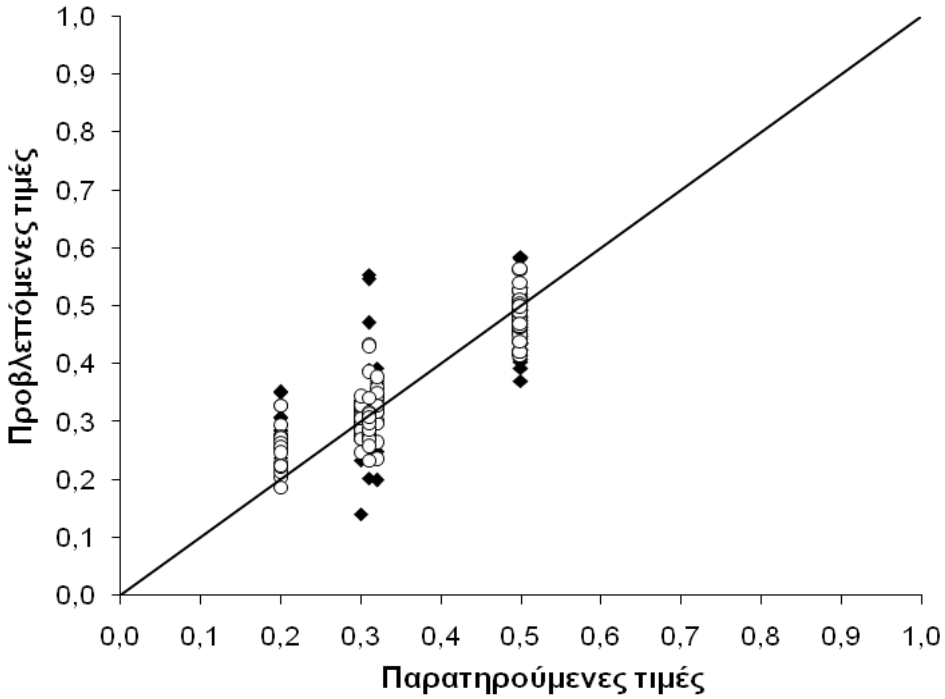
	Αριθμός λανθανουσών μεταβλητών	**Bias factor (B_f)**	**Accuracy factor (A_f)**	**RMSE**	**R^2**
pH	8	1,000	1,032	0,129	0,704
Brix	23	1,000	1,026	0,427	0,621
Πούλπα ροδάκινου	22	1,001	1,149	0,064	0,635



Διάγραμμα 3.1.1.2 Σύγκριση μεταξύ των παρατηρούμενων και προβλεπόμενων τιμών του pH των δειγμάτων χυμών ροδάκινου του εμπορίου από το μοντέλο παλινδρόμησης PLS (○: δεδομένα εκπαίδευσης, ♦: δεδομένα επικύρωσης).



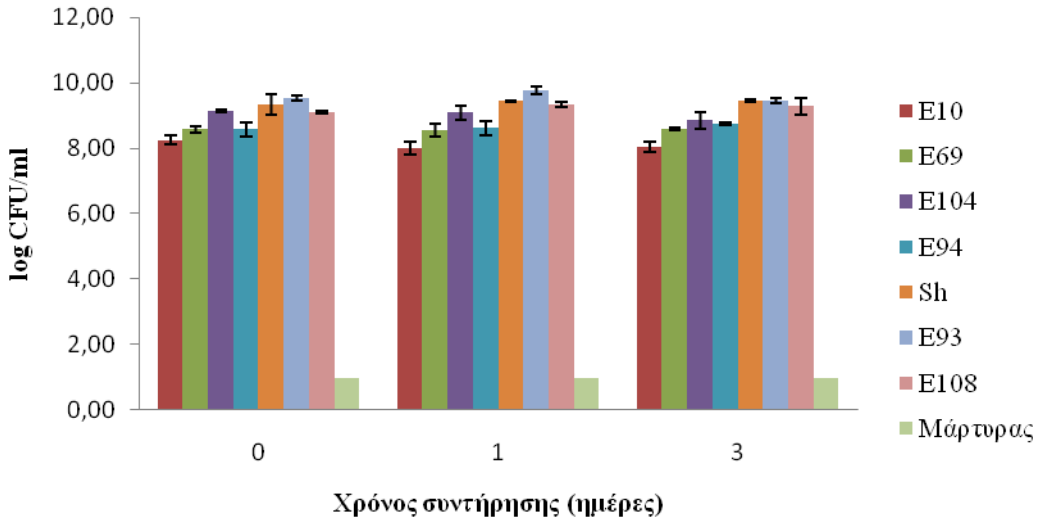
Διάγραμμα 3.1.1.3 Σύγκριση μεταξύ των παρατηρούμενων και προβλεπόμενων τιμών του Brix των δειγμάτων χυμών ροδάκινου του εμπορίου από το μοντέλο παλινδρόμησης PLS (○: δεδομένα εκπαίδευσης, ♦: δεδομένα επικύρωσης).



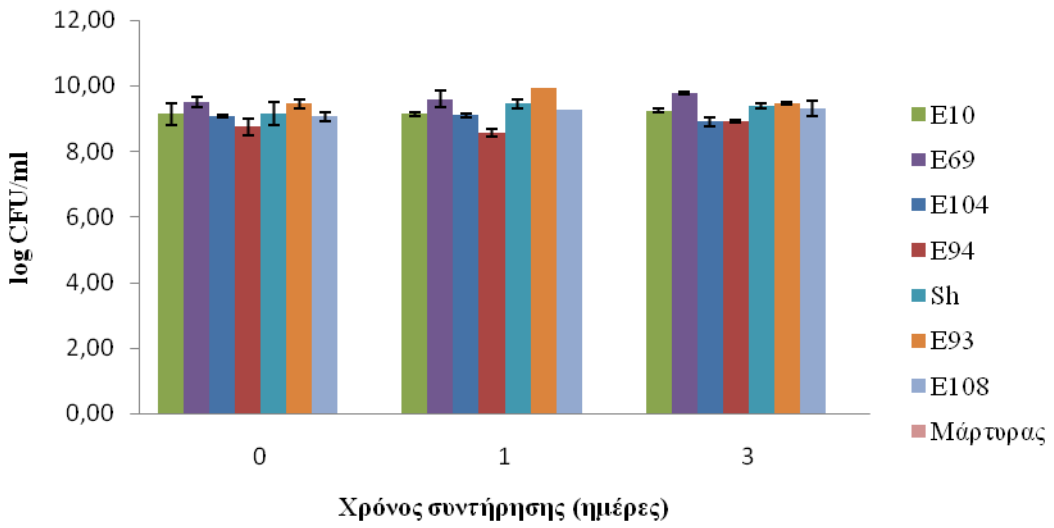
Διάγραμμα 3.1.1.4 Σύγκριση μεταξύ των παρατηρούμενων και προβλεπόμενων τιμών της πούλπας των δειγμάτων χυμών ροδάκινου του εμπορίου από το μοντέλο παλινδρόμησης PLS (○: δεδομένα εκπαίδευσης, ♦: δεδομένα επικύρωσης).

3.2 Επιβίωση επτά (7) οξυγαλακτικών βακτηρίων με προβιοτικό δυναμικό σε χυμό ροδάκινο κατά τη διάρκεια συντήρησης τριών (3) ημερών

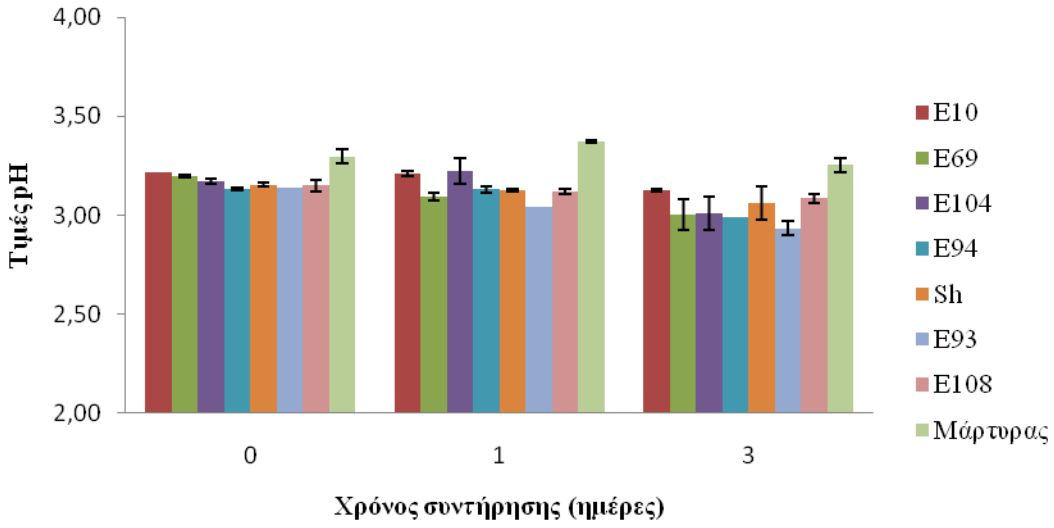
Η ΟΜΧ και των δύο παρτίδων χυμού ροδάκινου που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα (μάρτυρες), βρέθηκε να είναι κάτω από το όριο ανίχνευσης και τις τρεις ημέρες της συντήρησης (Σχ. 3.2.1.) Οι χυμοί οι οποίοι ήταν εμβολιασμένοι με το στέλεχος *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* E93 σημείωσαν τον υψηλότερο πληθυσμό ΟΜΧ τόσο στην αρχή (9,53 log CFU/ml) όσο και στο τέλος της συντήρησης (9,44 log CFU/ml), ενώ οι χυμοί με το στέλεχος *Lb. plantarum* E10 σημείωσαν τον χαμηλότερο πληθυσμό στην αρχή (8,25 log CFU/ml) και στο τέλος (8,03 log CFU/ml), αντίστοιχα (Σχ. 3.2.1).. Οι χυμοί με τα υπόλοιπα στελέχη (*Lb. casei* Shirota, *Lb. plantarum* E69, *Lb. pentosus* E108, *Lb. pentosus* E104, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* E94) παρουσίασαν παρόμοιες τιμές ολικού ΟΜΧ χωρίς κάποια ιδιαίτερα σημαντική πληθυσμιακή μεταβολή κατά τη συντήρηση.



Σχήμα 3.2.1. Καταμέτρηση ΟΜΧ των δειγμάτων χυμών ροδάκινου που εμβολιάστηκαν με τα επτά (7) οξυγαλακτικά βακτήρια με προβιοτικό δυναμικό και συντηρήθηκαν για τρεις (3) ημέρες (**E10:** *Lb. plantarum* E10, **E69:** *Lb. plantarum* E69, **E104:** *Lb. pentosus* E104, **E94:** *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* E94, **Sh:** *Lb. casei* Shirota, **E93:** *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* E93, **E108:** *Lb. pentosus* E108).



Σχήμα 3.2.2. Καταμέτρηση οξυγαλακτικών βακτηρίων των δειγμάτων χυμών ροδάκινου που εμβολιάστηκαν με τα επτά (7) οξυγαλακτικά βακτήρια με προβιοτικό δυναμικό και συντηρήθηκαν για τρεις (3) ημέρες (**E10:** *Lb. plantarum* E10, **E69:** *Lb. plantarum* E69, **E104:** *Lb. pentosus* E104, **E94:** *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* E94, **Sh:** *Lb. casei* Shirota, **E93:** *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* E93, **E108:** *Lb. pentosus* E108).



Σχήμα 3.2.3. Τιμές pH των δειγμάτων χυμού ροδάκινου που εμβολιάστηκαν με τα επτά (7) οξυγαλακτικά βακτήρια με προβιοτικό δυναμικό και συντηρήθηκαν για τρεις (3) ημέρες (**E10:** *Lb. plantarum* E10, **E69:** *Lb. plantarum* E69, **E104:** *Lb. pentosus* E104, **E94:** *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* E94, **Sh:** *Lb. casei* Shirota, **E93:** *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* E93, **E108:** *Lb. pentosus* E108).

Στο σχήμα 3.2.2, παρατηρείται ότι και τα επτά (7) προβιοτικά στελέχη που απομονώθηκαν από ζυμούμενες ελιές και εμβολιάστηκαν στους χυμούς επιβίωσαν σε

υψηλούς πληθυσμούς (≥10^8 CFU/ml). Οι χυμοί με το προβιοτικό στέλεχος *Lb. plantarum* E69 παρουσίασαν τον υψηλότερο αρχικό πληθυσμό οξυγαλακτικών βακτηρίων (9,51 log CFU/ml) και κατάφεραν να διατηρηθούν μέχρι και την τρίτη ημέρα της συντήρησης (9,77 log CFU/ml). Ακολούθησαν οι χυμοί με τα στελέχη *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* E93, *Lb. casei* Shirota, *Lb. pentosus* E108, *Lb. plantarum* E10 και *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* E94 με τιμές πληθυσμών 9,47, 9,39, 9,31, 9,24 και 8,92 log CFU/ml, αντίστοιχα. Ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων στους χυμούς με το στέλεχος *Lb. pentosus* E104 παρουσίασε την χαμηλότερη τιμή (8,90 log CFU/ml) σε σχέση με τους υπόλοιπους χυμούς. Στους μάρτυρες τα οξυγαλακτικά βακτήρια βρέθηκαν να είναι κάτω από το όριο ανίχνευσης (0 log CFU/ml).

Οι Pakbin et al. (2014) σε ένα πείραμα τους κατέληξαν στο αποτελέσμα ότι ο πληθυσμός του *Lactobacillus delbrueckii* παρουσίασε καλή ανάπτυξη σε χυμό ροδάκινου, φτάνοντας σχεδόν 10 x 10^9 CFU / ml μετά από 48 ώρες ζύμωσης στους 30 °C. Μετά από τέσσερις εβδομάδες αποθήκευσης εν ψυχρώ στους 4 °C, ο αριθμός των βιώσιμων κυττάρων του *L. delbrueckii* ήταν 1,72 x 10^7 CFU / ml, στο χυμό, σε αντίθεση με το *Lactobacillus casei* που δεν μπόρεσε να επιβιώσει. Επομένως, το *L. delbrueckii* κρίθηκε κατάλληλο για την παραγωγή προβιοτικού ποτού σε χυμό ροδάκινο και αυτός ο χυμός μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένα υγιεινό ποτό για χορτοφάγους και αλλεργικούς στη λακτόζη καταναλωτές. Άλλη έρευνα με βάση το ροδάκινο πραγματοποίησαν οι Chen et al. (2012), οι οποίοι παρασκεύασαν το «Yan-taozih», τουρσί ροδάκινο με οξυγαλακτικά βακτήρια όπως τα *L. brevis, L. lactis, Weissella cibaria, W. paramesenteroides, W. minor, Leuconostoc mesenteroides* και *Enterococcus faecalis*. Το τουρσί αυτό μπορεί να αποθηκευτεί για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα σε θερμοκρασία 6 - 10 °C. Γενικά, τα πρόσθετα και τα συστατικά των τροφίμων, όπως τα σάκχαρα, τα γλυκαντικά, τα άλατα, οι αρωματικές ενώσεις, οι φυσικές ή τεχνητές χρωστικες, οι φυσικές ή τεχνητές αρωματικές ενώσεις, τα συντηρητικά, τα ένζυμα και τα νιτρώδη μπορούν να εμποδίσουν την ανάπτυξη των προβιοτικών (Lee & Salminen, 2009), επομένως απαιτείται προσοχή.

Οι τιμές pH που σημειώθηκαν στους χυμούς ροδάκινου – μάρτυρες ήταν 3,29 την πρώτη ημέρα και 3,37 την τρίτη ημέρα της συντήρησης (σχ. 3.2.3). Οι χυμοί που εμβολιάστηκαν με τα επτά προβιοτικά στελέχη όμως, παρουσίασαν γενικά χαμηλότερες τιμές pH (3,13 ± 0.1) από αυτές των μαρτύρων, καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης. Οι χυμοί με το στέλεχος *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* E93

βρέθηκαν να είναι πιο όξινοι με pH 2.93, ενώ οι χυμοί με τα *Lb. plantarum* E10 και *Lb. pentosus* E104 παρουσίασαν τις υψηλότερες τιμές pH (≈ 3,22) σε σχέση με τους υπόλοιπους χυμούς. Επίσης, κατά τη διάρκεια της συντήρησης παρατηρείται μια μικρή πτώση των τιμών pH όλων των δειγμάτων των χυμών ροδάκινο από την πρώτη έως και την τρίτη ημέρα.

Πίνακας 3.2.1. Οργανοληπτική ανάλυση των δειγμάτων χυμών ροδάκινου που εμβολιάστηκαν με τα επτά (7) οξυγαλακτικά βακτήρια με προβιοτικό δυναμικό και συντηρήθηκαν για τρεις (3) ημέρες (συνολική εκτίμηση του κάθε χυμού με κλίμακα από το ένα (1) έως το πέντε (5): Μη αποδεκτό=1, Αποδεκτό=2, Μέτριο=3, Καλό=4, Άριστο=5).

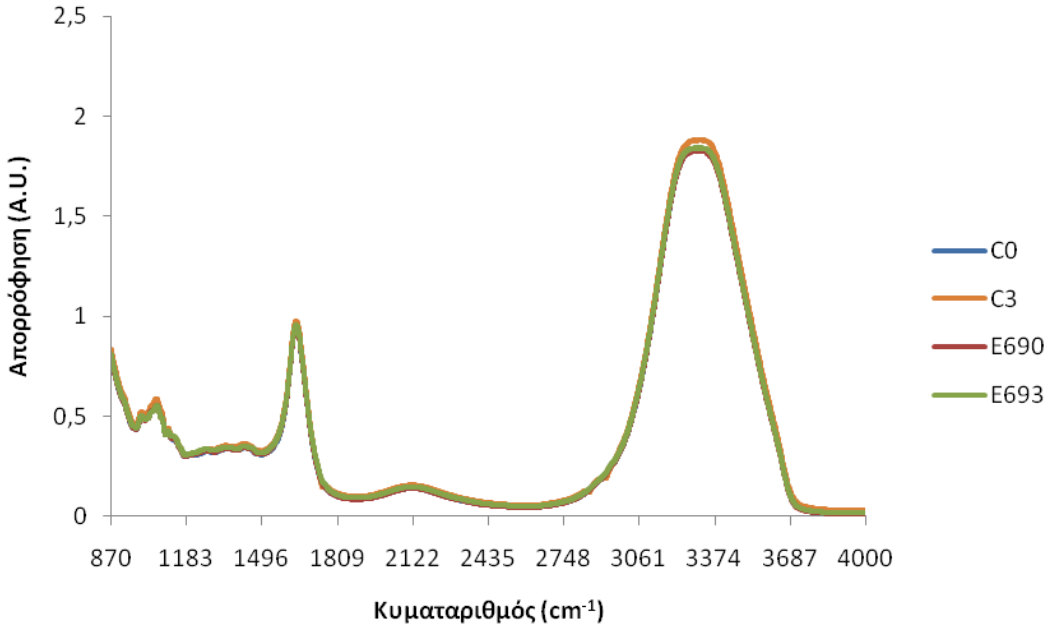
Στελέχη	**Ημέρα 0**	**Ημέρα 3**
Lb. plantarum E10	3,5	1
Lb. plantarum E69	3	1
Lb. paracasei subsp. *paracasei* E93	2,5	1
Lb. paracasei subsp. *paracasei* E94	3	1
Lb. pentosus E104	4	1
Lb. pentosus E108	3	1
Lb. casei Shirota	2	1
Μάρτυρας	5	5

Όσον αφορά τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, από την αρχή του πειράματος, τα δείγματα των χυμών παρουσίασαν συνολική εκτίμηση από αποδεκτή (*Lb. paracasei* subsp. *paracasei* E93, *Lb. casei* Shirota) έως και μέτρια (*Lb. plantarum* E10, *Lb. plantarum* E69, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* E94, *Lb. pentosus* E108), με τον *Lb. pentosus* E104 να εμφανίζει την υψηλότερη βαθμολογία (4=καλή) (Πίνακας 3.2.1). Όλα τα δείγματα των χυμών με τα προβιοτικά στελέχη, όμως, απορρίφθηκαν οργανοληπτικά την 3^{η} ημέρα της συντήρησης. Τα φρούτα γενικά, έχουν καλό γευστικό και αρωματικό προφίλ επομένως είναι κατάλληλα για προβιοτικά (Panghal et al., 2017b). Η παρουσία της προβιοτικής καλλιέργειας στα τρόφιμα όμως, δεν θα πρέπει να επηρεάζει δυσμενώς τις οργανοληπτικές ιδιότητες του προϊόντος (Mohammadi et al., 2011), όπως στην συγκεκριμένη περίπτωση.

3.2.1 Ανάλυση FTIR επτά (7) οξυγαλακτικών βακτηρίων με προβιοτικό δυναμικό σε χυμό ροδάκινο

Συνολικά αναλύθηκαν 16 δείγματα χυμών ροδάκινου (2 διαφορετικές παρτίδες), με τριπλή επανάληψη στο κάθε δείγμα, με τη φασματοσκοπία FTIR, την

$0^{η}$, $1^{η}$ και $3^{η}$ ημέρα της συντήρησης στους 4 ºC. Τυπικά φασματικά δεδομένα FTIR συλλέχθηκαν στην περιοχή 870-4000 cm^{-1} και ενδεικτικά παρουσιάζονται στο διάγραμμα 3.2.1.1, τα δείγματα χυμού ροδάκινο χωρίς και με το προβιοτικό στέλεχος *Lb. plantarum* E69 στην αρχή και στο τέλος της συντήρησης στους 4 ºC. Παρά τις όποιες εμφανείς ομοιότητες, τα φάσματα που ελήφθησαν για κάθε αναλυθέν δείγμα είναι μοναδικά και χαρακτηρίζονται από συγκεκριμένες διαφορές, μη εμφανείς οπτικά στις περισσότερες περιπτώσεις που καθιστούν δυνατή τη σύγκριση των αποτελεσμάτων. Αναλυτικότερα, οι κύριες περιοχές συχνοτήτων αλλά και οι κορυφές που παρατηρήθηκαν στα αντιπροσωπευτικά φάσματα FTIR που συλλέχθηκαν, είναι ίδιες με αυτές των χυμών ροδάκινου του εμπορίου και παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.1.1.1 του προηγούμενου υποκεφαλαίου. Μαζί με αυτές βρίσκονται οι πιθανές αντιστοιχήσεις των τρόπων δόνησης, όπως έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία, καθώς και η περαιτέρω ανάλυση τους.



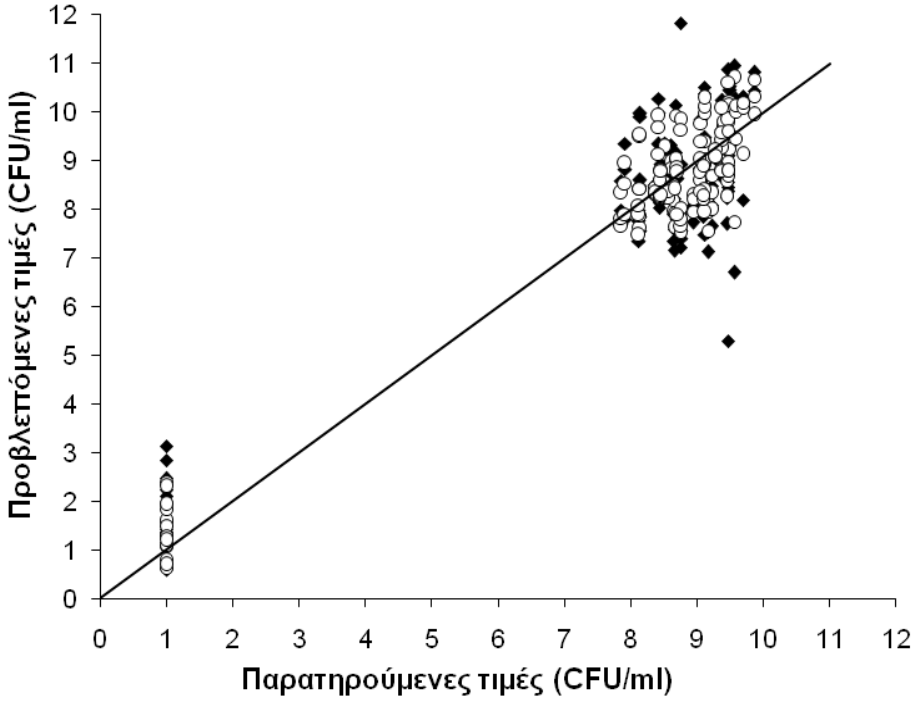
Διάγραμμα 3.2.1.1 Τυπικά φασματογραφήματα στους κυματαριθμούς 870-4000 cm^{-1} δειγμάτων χυμού ροδάκινο χωρίς και με το προβιοτικό στέλεχος *Lb. plantarum* E69 στην αρχή και στο τέλος της συντήρησης στους 4 ºC. (*C0*: χυμός-μάρτυρας στην αρχή της συντήρησης, *C3*: χυμός-μάρτυρας στο τέλος της συντήρησης, *E690*: χυμός με *Lb. plantarum* E69 στην αρχή της συντήρησης, *E693*: χυμός με *Lb. plantarum* E69 στο τέλος της συντήρησης).

3.2.1.1 Συσχέτιση των μικροβιολογικών και φυσικοχημικών δεδομένων με τα φασματικά δεδομένα στα δείγματα χυμού ροδάκινου με τα επτά (7) προβιοτικά στελέχη

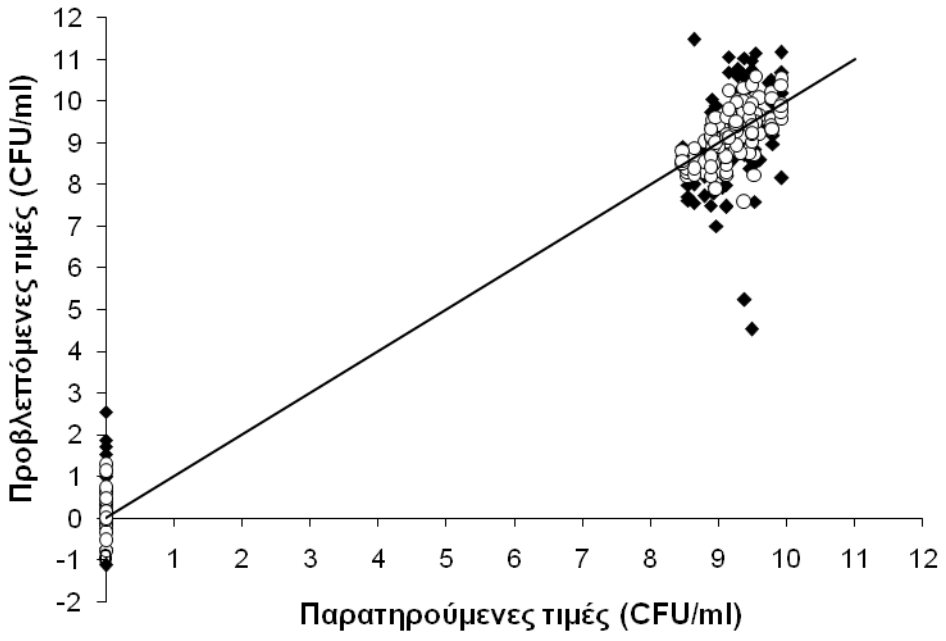
Έπειτα, έγινε προσπάθεια συσχέτισης των φασματικών δεδομένων με τα μικροβιολογικά δεδομένα των διαφόρων ομάδων μικροοργανισμών που μελετήθηκαν στα δείγματα χυμού ροδάκινου με τα επτά (7) προβιοτικά στελέχη, άλλα και με τα φυσικοχημικά δεδομένα που λήφθηκαν παράλληλα με τις μικροβιολογικές αναλύσεις. Ο αριθμός των λανθανουσών μεταβλητών και οι δείκτες επίδοσης κατά την επικύρωση του μοντέλου παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.2.1.1.1 Ο δείκτης προκατάληψης (bias factor, B_f) για όλες τις μικροβιολογικές και φυσικοχημικές ομάδες που εξετάστηκαν ήταν κοντά στην τιμή 1. Πιο συγκεκριμένα η τιμή B_f ήταν 1,033, 0,981 και 1,000 για την ΟΜΧ, τα οξυγαλακτικά βακτήρια και το pH, αντίστοιχα, αποδεικνύοντας ότι τα μοντέλα δεν παρουσίασαν συστηματική, υπο- ή υπερ- εκτίμηση, των φυσικοχημικών δεδομένων. Επιπλέον, με βάση τις τιμές του συντελεστή ακρίβειας (accuracy factor, A_f), φαίνεται πως η μέση απόκλιση μεταξύ των προβλέψεων και των παρατηρήσεων ήταν κοντά στην τιμή ένα σε όλες τις περιπτώσεις (1,157, 1,074 και 1,011, για την ΟΜΧ, τα οξυγαλακτικά βακτήρια και το pH αντίστοιχα) αποδεικνύοντας ότι οι προβλέψεις ήταν κοντά στις παρατηρήσεις. Οι δείκτες RMSE έλαβαν τιμές 1,001, 1,024 και 0,043, ενώ οι συντελεστές R^2 ήταν 0,859, 0,889 και 0,827, για την ΟΜΧ, τα οξυγαλακτικά βακτήρια και το pH, αντίστοιχα. Έτσι, έδειξαν ικανοποιητικά αποτελέσματα σε όλες τις περιπτώσεις, με μικρές τιμές μέσης απόκλισης μεταξύ των παρατηρούμενων και των προβλεπόμενων τιμών, παρουσιάζοντας καλή προσαρμογή του μοντέλου στα πειραματικά δεδομένα, με την καλύτερη προσαρμογή να εμφανίζεται στο pH. Οι τιμές R^2 ήταν κοντά στην τιμή 1, γεγονός που δείχνει ότι η γραμμή παλινδρόμησης ταιριάζει αρκετά καλά στα δεδομένα. Τα αντίστοιχα αποτελέσματα παρουσιάζονται γραφικά στα διαγράμματα 3.2.1.1.1 έως 3.2.1.1.3, όπου απεικονίζεται η σύγκριση μεταξύ προβλέψεων και πραγματικών παρατηρήσεων σε log CFU / ml.

Πίνακας 3.2.1.1.1 Δείκτες επίδοσης κατά την επικύρωση των μοντέλων PLS-R συσχετίζοντας τα φυσικοχημικά με τα φασματικά δεδομένα που λήφθηκαν από τα δείγματα χυμών ροδάκινου με τα επτά (7) στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων με προβιοτικό δυναμικό.

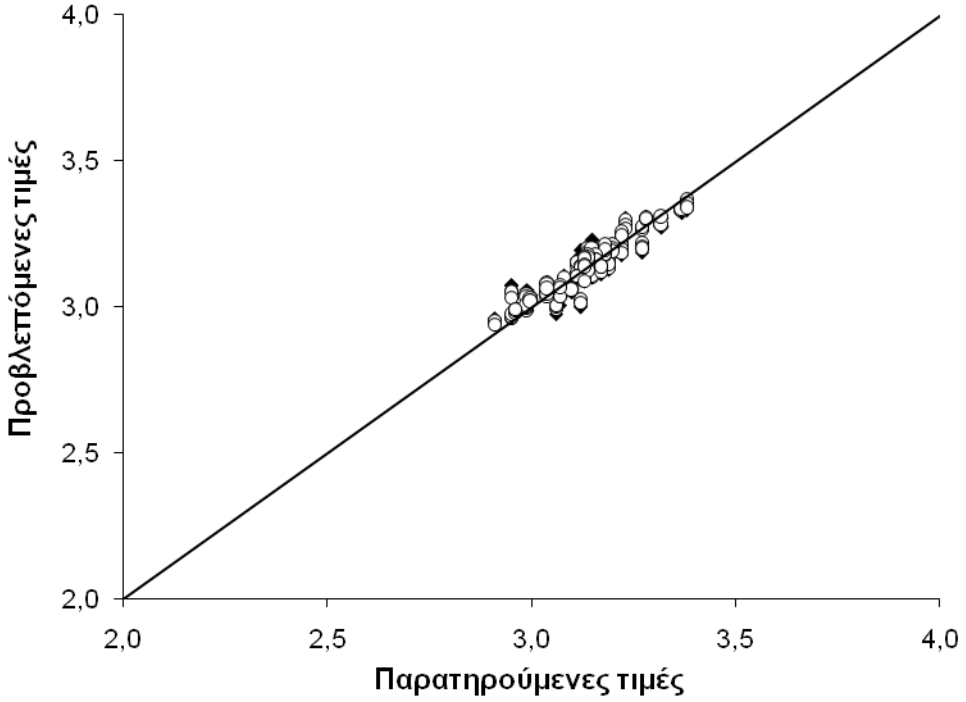
	Αριθμός λανθανουσών μεταβλητών	Bias factor (B_f)	Accuracy factor (A_f)	RMSE	R^2
ΟΜΧ	9	1,033	1,157	1,001	0,859
Οξυγαλακτικά βακτήρια	12	0,981	1,074	1,024	0,889
pH	7	1,000	1,011	0,043	0,827



Διάγραμμα 3.2.1.1.1 Σύγκριση μεταξύ των παρατηρούμενων και προβλεπόμενων τιμών της ΟΜΧ των δειγμάτων χυμών ροδάκινου με τα επτά (7) στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων με προβιοτικό δυναμικό, από το μοντέλο παλινδρόμησης PLS (○: δεδομένα εκπαίδευσης, ♦: δεδομένα επικύρωσης).



Διάγραμμα 3.2.1.1.2 Σύγκριση μεταξύ των παρατηρούμενων και προβλεπόμενων τιμών των οξυγαλακτικών βακτηρίων των δειγμάτων χυμών ροδάκινου με τα επτά (7) στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων με προβιοτικό δυναμικό, από το μοντέλο παλινδρόμησης PLS (○: δεδομένα εκπαίδευσης, ♦: δεδομένα επικύρωσης).



Διάγραμμα 3.2.1.1.3 Σύγκριση μεταξύ των παρατηρούμενων και προβλεπόμενων τιμών του pH των δειγμάτων χυμών ροδάκινου με τα επτά (7) στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων με προβιοτικό δυναμικό, από το μοντέλο παλινδρόμησης PLS (○: δεδομένα εκπαίδευσης, ♦: δεδομένα επικύρωσης).

3.2.1.2 Εκτίμηση της βαθμολογίας της οργανοληπτικής αξιολόγησης στα δείγματα χυμού ροδάκινου με τα επτά (7) προβιοτικά στελέχη

Τα αποτελέσματα των μοντέλων της οργανοληπτικής αξιολόγησης παρουσιάζονται σε πίνακες διπλής εισόδου (Πίνακας 3.2.1.2.1α και 3.2.1.2.1β). Στον πίνακα 3.2.1.2.1α φαίνεται η ταξινόμηση των δειγμάτων σε εννιά κατηγορίες, από το μη αποδεκτό(1) έως και το άριστο (5). Οι μεταβλητές που χρησιμοποιήθηκαν ως δεδομένα εισόδου του μοντέλου, έδωσαν ακρίβεια (ευαισθησία) πρόβλεψης στα δεδομένα επικύρωσης του μοντέλου 43,75%. Συγκεκριμένα, κατά την επικύρωση του μοντέλου PLS, η ανάλυση έδωσε 66,67% σωστές προβλέψεις για τα δείγματα που είχαν χαρακτηριστεί ως «Μη αποδεκτά», 61,11% για τα «Αποδεκτά», 43,33% για τα «Μέτρια», 16,67% για τα «Καλά» και 44,44% για τα «Άριστα» δείγματα, αντίστοιχα. Η εξειδίκευση που παρουσίασε το μοντέλο κατά την επικύρωση ήταν 100% , 50%, 65% 55% και 100% για τις κατηγορίες «Άριστο», «Καλό», «Μέτριο», «Αποδεκτό» και «Μη αποδεκτό», αντίστοιχα (Πίνακας 3.2.1.2.1α).

Στον Πίνακα 3.2.1.2.1β, φαίνεται η ταξινόμηση των δειγμάτων σε τρεις κατηγορίες, οι οποίες είναι: «Άριστο-Καλό» (με βαθμολογίες $3,5 \leq x \leq 5$), «Μέτριο-Αποδεκτό» (με βαθμολογίες $2 \leq x < 3,5$) και «Μη αποδεκτό» (με βαθμολογίες $1 \leq x < 2$). Οι μεταβλητές που χρησιμοποιήθηκαν ως δεδομένα εισόδου του μοντέλου, έδωσαν ακρίβεια (ευαισθησία) πρόβλεψης στα δεδομένα επικύρωσης του μοντέλου 86,81%. Συγκεκριμένα, κατά την επικύρωση του μοντέλου, η ανάλυση PLS έδωσε 72,22% σωστές προβλέψεις για τα δείγματα που είχαν χαρακτηριστεί ως «Άριστα-Καλά», 87,88% για τα δείγματα που είχαν χαρακτηριστεί ως «Μέτρια-Αποδεκτά» και 97,62% για τα δείγματα που είχαν χαρακτηριστεί ως «Μη αποδεκτά». Η εξειδίκευση που παρουσίασε το μοντέλο κατά την επικύρωση ήταν 89,66%, 84,06%, και 89,13% για τις κατηγορίες «Άριστο-Καλό», «Μέτριο-Αποδεκτό» και «Μη αποδεκτό», αντίστοιχα. Πρέπει να τονιστεί πως κανένα μη αποδεκτό δείγμα δεν χαρακτηρίστηκε ως μέτριο, καλό ή άριστο και πως κανένα από τα άριστα δείγματα δεν χαρακτηρίστηκαν ως μέτρια, αποδεκτά ή μη αποδεκτά.

Πίνακας 3.2.1.2.1α: Πίνακας διπλής εισόδου διασταυρούμενης επικύρωσης για τα δείγματα χυμού ροδάκινου με τα επτά (7) προβιοτικά στελέχη, όπως προέκυψε από την ανάλυση PLS (δεδομένα επικύρωσης) (Μη αποδεκτό=1, Αποδεκτό=2, Μέτριο=3, Καλό=4, Άριστο=5).

		Προβλεπόμενη Τάξη Δεδομένα επικύρωσης									
Πραγματική Τάξη	**Σύνολο**	**5**	**4,5**	**4**	**3,5**	**3**	**2,5**	**2**	**1,5**	**1**	**Ευαισθησία (%)**
5	18	8	10	0	0	0	0	0	0	0	44,44
4,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
4	12	0	0	2	7	3	0	0	0	0	16,67
3,5	6	0	0	2	2	2	0	0	0	0	33,33
3	30	0	0	0	11	13	5	1	0	0	43,33
2,5	18	0	0	0	0	2	10	6	0	0	55,56
2	18	0	0	0	1	0	4	11	2	0	61,11
1,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
1	42	0	0	0	0	0	1	2	11	28	66,67
Σύνολο	144	8	10	4	21	20	20	20	13	28	43,75
Εξειδίκευση (%)		100,00	0,00	50,00	9,52	65,00	50,00	55,00	0,00	100,00	

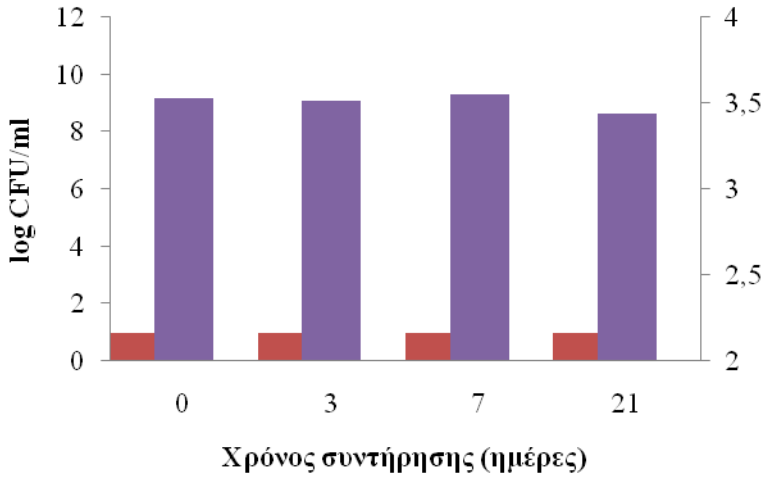
Πίνακας 3.2.1.2.1β: Πίνακας διπλής εισόδου διασταυρούμενης επικύρωσης για τα δείγματα χυμού ροδάκινου με τα επτά (7) προβιοτικά στελέχη, όπως προέκυψε από την ανάλυση PLS (δεδομένα επικύρωσης) («Άριστο-Καλό» $3,5 \leq x \leq 5$, «Μέτριο-Αποδεκτό» $2 \leq x < 3,5$ και «Μη αποδεκτό» $1 \leq x < 2$).

		Προβλεπόμενη Τάξη Δεδομένα επικύρωσης			
Πραγματική Τάξη	**Σύνολο**	**Άριστο-Καλό**	**Μέτριο-Αποδεκτό**	**Μη αποδεκτό**	**Ευαισθησία (%)**
Άριστο-Καλό	36	26	10	0	72,22
Μέτριο-Αποδεκτό	66	3	58	5	87,88
Μη αποδεκτό	42	0	1	41	97,62
Σύνολο	144	29	69	46	86,81
Εξειδίκευση (%)		89,66	84,06	89,13	

3.3 Επιβίωση έντεκα (11) οξυγαλακτικών βακτηρίων με προβιοτικό δυναμικό σε χυμό πορτοκαλιού

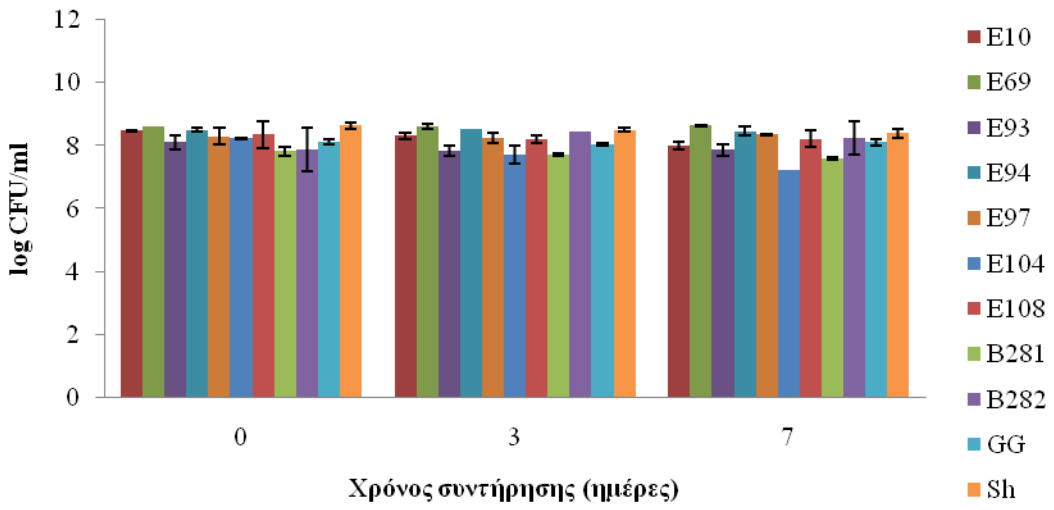
Η ΟΜΧ και των δύο παρτίδων των χυμών πορτοκαλιού (μάρτυρες) που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα, βρέθηκε να είναι κάτω από το όριο ανίχνευσης στο

επίπεδο του 1 log CFU/ml και τις είκοσι-μια (21) ημέρες της συντήρησης (Σχ. 3.3.1). Παρόμοια αποτελέσματα παρουσιάστηκαν και για τα οξυγαλακτικά βακτήρια. Η τιμή pH που σημειώθηκαν στους μάρτυρες στην αρχή της συντήρησης ήταν 3,53 ± 0,19, ενώ στο τέλος παρουσίασαν μια μικρή πτώση (3,44 ± 0,12).



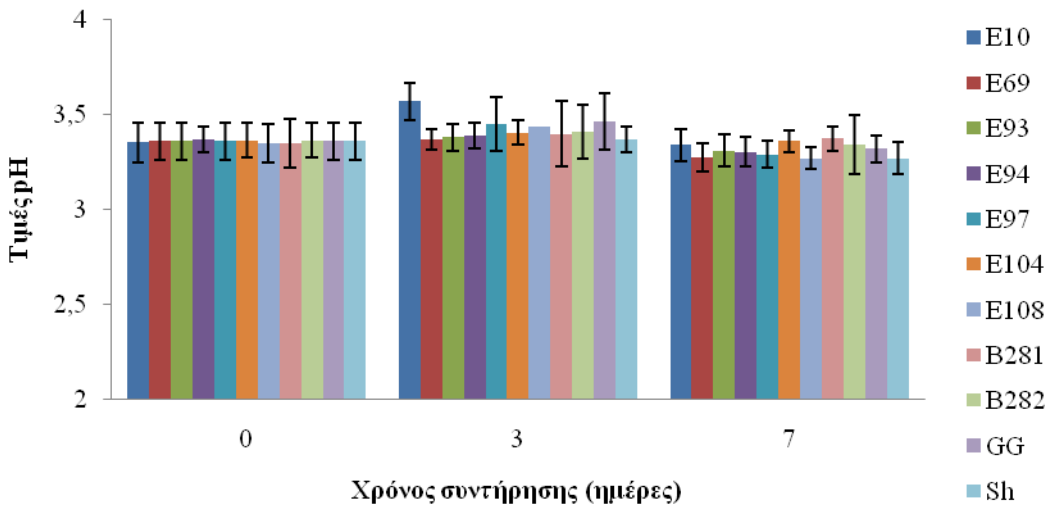
Σχήμα 3.3.1. Καταμέτρηση ΟΜΧ (■), οξυγαλακτικών βακτηρίων (■) και pH (■) των δειγμάτων χυμών πορτοκαλιού (μάρτυρες) που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα με τον εμβολιασμό των έντεκα (11) οξυγαλακτικών βακτηρίων με προβιοτικό δυναμικό κατά τη διάρκεια συντήρησης 21 ημερών.

Στο σχήμα 3.3.2 παρατηρείται ότι και τα έντεκα (11) προβιοτικά στελέχη που απομονώθηκαν από ζυμούμενες ελιές και εμβολιάστηκαν με υψηλό εμβόλιο (≈ 10^8 log CFU/ml) στους χυμούς, κατάφεραν να επιβιώσουν και να διατηρηθούν σε υψηλούς πληθυσμούς (πάνω από 10^8) ακόμα και μετά από μια εβδομάδα συντήρησης. Πιο συγκεκριμένα, στην αρχή του πειράματος οι χυμοί με το στέλεχος *Lb. casei* Shirota εμφάνισαν τον υψηλότερο αρχικό πληθυσμό (8,65 ± 0,10 log CFU/ml), με τον πληθυσμό του *Lb. plantarum* E69 να ακολουθεί (8,61 ± 0,10 log CFU/ml). Οι χυμοί με το *Lb. pentosus* B281 σημείωσαν τον μικρότερο πληθυσμό οξυγαλακτικών βακτηρίων τόσο στην αρχή (7,82 ± 0,15 log CFU/ml), όσο και την 3η ημέρα της συντήρησης (7,72 ± 0,04 log CFU/ml), ενώ οι χυμοί με το στέλεχος *Lb. plantarum* E69 βρέθηκαν να έχουν τον μεγαλύτερο πληθυσμό την 7η ημέρα της συντήρησης (8,64 ± 0,03 log CFU/ml) με τον *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* E94 να ακολουθεί (8,47 ± 0,16 log CFU/ml).



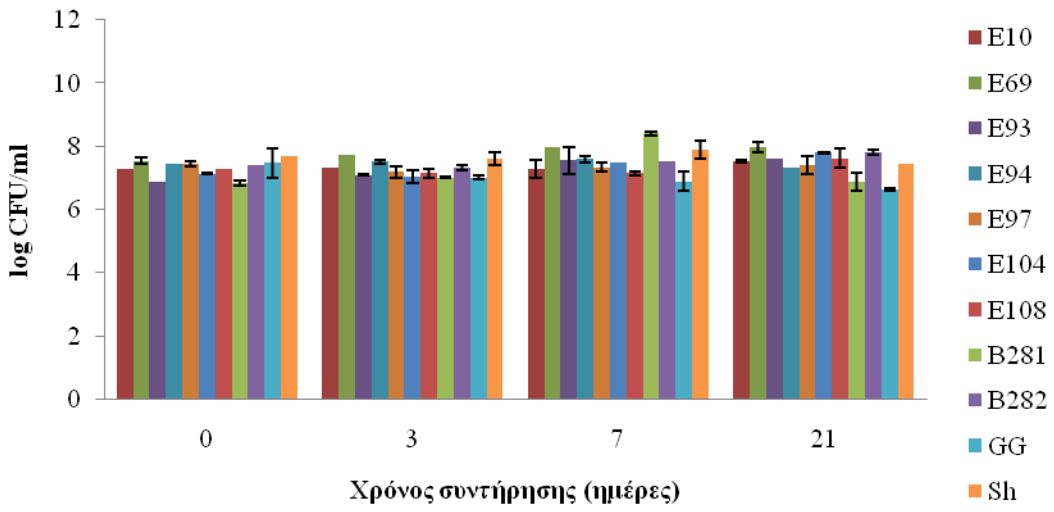
Σχήμα 3.3.2. Καταμέτρηση οξυγαλακτικών βακτηρίων των δειγμάτων χυμών πορτοκαλιού που εμβολιάστηκαν με τα έντεκα (11) οξυγαλακτικά βακτήρια, με υψηλό εμβόλιο (10^8) και συντηρήθηκαν για επτά (7) ημέρες (**E10:** *Lb. plantarum* E10, **E69:** *Lb. plantarum* E69, **E93:** *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* E93, **E94:** *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* E94, **E97:** *Lb. pentosus* E97, **E104:** *Lb. pentosus* E104, **E108:** *Lb. pentosus* E108, **B281:** *Lb. Pentosus* B281, **B282:** *Lb. plantarum* B282, **GG:** *Lb. ramnosus* GG, **Sh:** *Lb. casei* Shirota).

Οι τιμές pH που σημειώθηκαν στους χυμούς πορτοκαλιού που εμβολιάστηκαν με τα έντεκα προβιοτικά στελέχη με υψηλό εμβόλιο (10^8) παρουσίασαν γενικά χαμηλότερες τιμές pH από αυτές των μαρτύρων, καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης (Σχ. 3.3.3). Η χαμηλότερη τιμή pH (3,27) βρέθηκε στους χυμούς με το στέλεχος *Lb. pentosus* E108 την $7^η$ ημέρα της συντήρησης, ενώ η υψηλότερη στο χυμό με το στέλεχος *Lb. plantarum* E10 την $3^η$ ημέρα της συντήρησης (3,57). Κατά τη διάρκεια της συντήρησης, σε όλους τους χυμούς με τα προβιοτικά στελέχη οι τιμές pH μεταξύ των δειγμάτων δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές.



Σχήμα 3.3.3. Μέτρηση pH των δειγμάτων χυμών πορτοκαλιού που εμβολιάστηκαν με τα έντεκα (11) οξυγαλακτικά βακτήρια, με υψηλό εμβόλιο (10^8) και συντηρήθηκαν για επτά (7) ημέρες (**E10:** *Lb. plantarum* E10, **E69:** *Lb. plantarum* E69, **E93:** *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* E93, **E94:** *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* E94, **E97:** *Lb. pentosus* E97, **E104:** *Lb. pentosus* E104, **E108:** *Lb. pentosus* E108, **B281:** *Lb. Pentosus* B281, **B282:** *Lb. plantarum* B282, **GG:** *Lb. ramnosus* GG, **Sh:** *Lb. casei* Shirota).

Όσον αφορά, τους χυμούς πορτοκαλιού που εμβολιάστηκαν με χαμηλότερο εμβόλιο (10^7) με τα έντεκα (11) προβιοτικά στελέχη, παρατηρήθηκε ότι κατάφεραν να επιβιώσουν και να διατηρηθούν σε σταθερά και ικανοποιητικά πληθυσμιακά επίπεδα (η πλειοψηφία τους πάνω από 10^7) ακόμα και μετά από είκοσι-δυο (22) ημέρες συντήρησης. Επιπλέον, λόγω των καλύτερων οργανοληπτικών χαρακτηριστικών σε σύγκριση με τους χυμούς του υψηλού εμβολίου, επιλέχθηκαν να συντηρηθούν στους 4ºC για παραπάνω χρονικό διάστημα (Σχ. 3.3.4). Οι χυμοί με το στέλεχος *Lb. Pentosus* B281 είχαν τον μικρότερο πληθυσμό οξυγαλακτικών βακτηρίων από την αρχή του πειράματος (6,83 ± 0,08 log CFU/ml) έως και την $3^η$ ημέρα της συντήρησης (7,01 ± 0,02 log CFU/ml) και οι χυμοί με τον *Lb. ramnosus* GG από την $7^η$ ημέρα συντήρησης (6,89 ± 0,30 log CFU/ml) έως και τη λήξη του πειράματος (6,63 ± 0,06 log CFU/ml). Επιπλέον, ο πληθυσμός του στελέχους *Lb. plantarum* E69 αυξήθηκε και βρέθηκε υψηλότερος την $21^η$ ημέρα της συντήρησης (7,97 ± 0,15 log CFU/ml). Τα υπόλοιπα στελέχη βρέθηκαν να έχουν ενδιάμεσες τιμές.

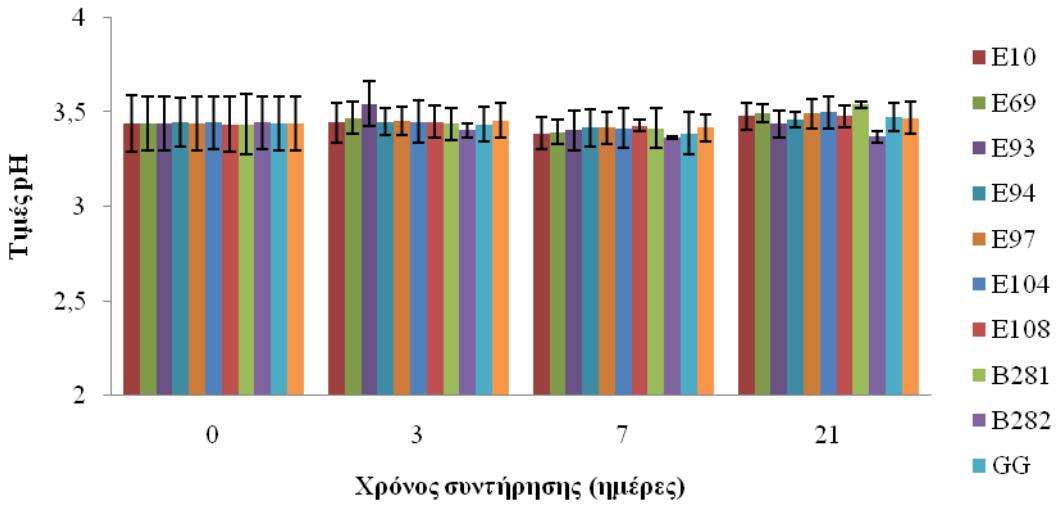


Σχήμα 3.3.4. Καταμέτρηση οξυγαλακτικών βακτηρίων των δειγμάτων χυμών πορτοκαλιού που εμβολιάστηκαν με τα έντεκα (11) οξυγαλακτικά βακτήρια, με χαμηλό εμβόλιο (10^7) και συντηρήθηκαν για είκοσι-μια (21) ημέρες (**E10:** *Lb. plantarum* E10, **E69:** *Lb. plantarum* E69, **E93:** *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* E93, **E94:** *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* E94, **E97:** *Lb. pentosus* E97, **E104:** *Lb. pentosus* E104, **E108:** *Lb. pentosus* E108, **B281:** *Lb. pentosus* B281, **B282:** *Lb. plantarum* B282, **GG:** *Lb. ramnosus* GG, **Sh:** *Lb. casei* Shirota).

Οι τιμές pH που σημειώθηκαν στους χυμούς πορτοκαλιού που εμβολιάστηκαν με τα έντεκα προβιοτικά στελέχη με χαμηλό εμβόλιο (10^7) παρουσίασαν γενικά χαμηλότερες τιμές pH από αυτές των μαρτύρων, καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης (Σχ. 3.3.5). Το χαμηλότερο pH (3,36) βρέθηκε στους χυμούς με το στέλεχος *Lb. plantarum* B282 την 7η ημέρα της συντήρησης, ενώ το υψηλότερο pH (3,54) βρέθηκε στα στελέχη *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* E93 και *Lb. pentosus* B281 την 3η και την 21η ημέρα της συντήρησης, αντίστοιχα. Κατά τη διάρκεια της συντήρησης, σε όλους τους χυμούς με τα προβιοτικά στελέχη οι τιμές pH μεταξύ των δειγμάτων δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές.

Οι Fiore et al. (2005) σύγκριναν διάφορους χυμούς πορτοκαλιού του εμπορίου και διαπίστωσαν ότι το pH στους αποστειρωμένους (μακράς διαρκείας ζωής) χυμούς ήταν ελαφρώς χαμηλότερο (2,66-3,20), σε σχέση με τους παστεριωμένους χυμούς πορτοκαλιού (3,12-3,34). Παρ' όλα αυτά όμως δεν παρατηρούνται σημαντικές μεταβολές στο pH, την οξύτητα, το Brix και την ξηρά ουσία σε φρέσκους χυμούς πορτοκαλιών Shamouti, γκρέιπφρουτ Red Blush και πορτοκαλιών Salustiana, κατά τη διάρκεια αποθήκευσης 15 ημερών στους 4 °C, σύμφωμα με τους Del Caro et al. (2004). Σε παρόμοια αποτελέσματα κατέληξαν και οι Esteve et al. (2005), οι οποίοι

μελέτησαν τα φυσικοχημικά και τα ποιοτικά χαρακτηριστικά διαφόρων παστεριωμένων ισπανικών χυμών πορτοκαλιού, καθώς και τις αλλαγές τους με το χρόνο αποθήκευσης και τη θερμοκρασία. Όλα τα υπόλοιπα χαρακτηριστικά που μελετήθηκαν (αιθέρια έλαια, οξύτητα, χρώμα, αγωγιμότητα, πυκνότητα, δείκτης διακετυλίου και ιξώδες) μεταβάλλονταν με το χρόνο αποθήκευσης στους 4 και 10 °C, εκτός από το pH που παρέμεινε σταθερό και δεν παρουσίασε σημαντικές μεταβολές.



Σχήμα 3.3.5. Μέτρηση pH των δειγμάτων χυμών πορτοκαλιού που εμβολιάστηκαν με τα έντεκα (11) οξυγαλακτικά βακτήρια, με χαμηλό εμβόλιο (10^7) και συντηρήθηκαν για είκοσι-μια (21) ημέρες (**E10:** *Lb. plantarum* E10, **E69:** *Lb. plantarum* E69, **E93:** *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* E93, **E94:** *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* E94, **E97:** *Lb. pentosus* E97, **E104:** *Lb. pentosus* E104, **E108:** *Lb. pentosus* E108, **B281:** *Lb. Pentosus* B281, **B282:** *Lb. plantarum* B282, **GG:** *Lb. ramnosus* GG, **Sh:** *Lb. casei* Shirota).

Πίνακας 3.3.1. Οργανοληπτική ανάλυση των δειγμάτων χυμών πορτοκαλιού που εμβολιάστηκαν με τα έντεκα (11) οξυγαλακτικά βακτήρια με προβιοτικό δυναμικό με χαμηλό και υψηλό εμβόλιο και συντηρήθηκαν για είκοσι-μια (21) ημέρες (συνολική εκτίμηση του κάθε χυμού με κλίμακα από το ένα (1) έως το πέντε (5): Μη αποδεκτό=1, Αποδεκτό=2, Μέτριο=3, Καλό=4, Άριστο=5, H: υψηλό εμβόλιο L: χαμηλό εμβόλιο).

Στελέχη		Ημέρα 0	Ημέρα 3	Ημέρα 7	Ημέρα 21
Lb. plantarum E10	H	4	1	1	-
	L	5	3	1	1
Lb. plantarum E69	H	4	1,5	1	-
	L	5	3	1	1

Lb. paracasei subsp. *Paracasei* E93	H	3,5	1	1	-
	L	4	3,5	1	1
Lb. paracasei subsp. *Paracasei* E94	H	4	2	1	-
	L	4,5	3,5	1	1
Lb. pentosus E97	H	4	1	1	-
	L	4,5	2	1	1
Lb. pentosus E104	H	4,5	2,5	1	-
	L	5	5	2,5	1
Lb. pentosus E108	H	4	1,5	1	-
	L	5	2,5	1	1
Lb. pentosus B281	H	4	2	1	-
	L	5	3,5	1	1
Lb. plantarum B282	H	2,5	1,5	1	-
	L	3,5	2	1	1
Lb. ramnosus GG	H	2	1	1	-
	L	3	2	1	1
Lb. casei Shirota	H	2	1	1	-
	L	3	2,5	1	1
Μάρτυρας		5	5	5	3

Όσον αφορά τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, τα δείγματα χυμών πορτοκάλι με τα προβιοτικά στελέχη με χαμηλό εμβόλιο (10^7) παρουσίασαν καλύτερη βαθμολογία σε σχέση με τα δείγματα χυμών με το υψηλό εμβόλιο (10^8). Την 3η ημέρα του πειράματος, σχεδόν όλα δείγματα των χυμών με το υψηλό εμβόλιο απορρίφθηκαν οργανοληπτικά, με εξαίρεση τους *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* E94, *Lb. pentosus* E104 και *Lb. pentosus* B281, οι οποίοι είχαν αποδεκτή συνολική εκτίμηση και απορρίφθηκαν την 7η ημέρα της συντήρησης. Από την αρχή του πειράματος, τα δείγματα χυμών με το χαμηλό εμβόλιο είχαν καλή έως και άριστη συνολική εκτίμηση εκτός από τους χυμούς με τους *Lb. plantarum* B282, *Lb. ramnosus* GG και *Lb. casei* Shirota που είχαν μέτρια. Την 3η ημέρα της συντήρησης, όλοι οι χυμοί με το χαμηλό εμβόλιο ήταν αποδεκτοί / μέτριοι, με εξαίρεση τον χυμό με το στέλεχος *Lb. pentosus* E104 που παρέμεινε άριστος. Έπειτα από μια βδομάδα συντήρησης, όλοι οι χυμοί με το χαμηλό εμβόλιο απορρίφθηκαν οργανοληπτικά εκτός από το χυμό με το στέλεχος *Lb. pentosus* E104, ο οποίος παρουσίασε αποδεκτή συνολική εκτίμηση. Από τις δοκιμές αυτές επιλέχθηκε το στέλεχος *Lb. pentosus*

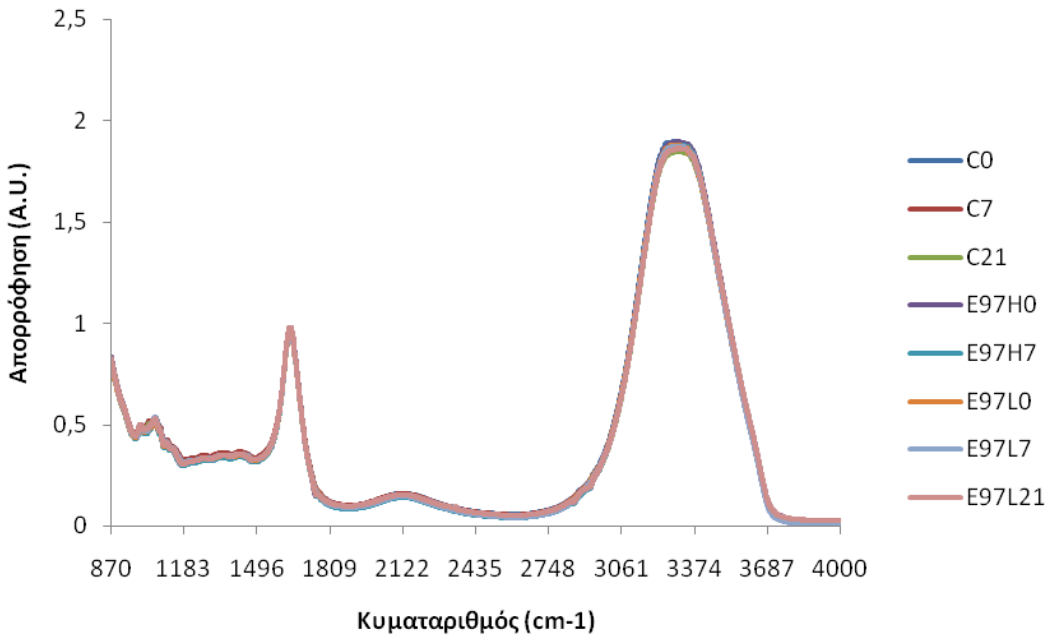
E104, το οποίο εμφάνισε την καλύτερη επιβίωση στους χυμούς και παράλληλα προσέδωσε επιθυμητά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (γεύση, άρωμα), γι' αυτό και χρησιμοποιήθηκε στο επόμενο πείραμα.

Μια προσπάθεια παρασκευής χυμού πορτοκαλιού με πληθυσμό του προβιοτικού μικροοργανισμού *L. plantarum* πραγματοποιήθηκε και συγκρίθηκε με συμβατικό προϊόν. Οι Luckow και Delahunty (2004) ανέφεραν ότι η προσθήκη 10% (v/v) χυμού τροπικών φρούτων, κυρίως ανανά, μάνγκο ή φρούτων του πάθους, οδηγεί στην εμφανή μείωση των μη αποδεκτών αρωμάτων, στα οποία οφείλεται η μειωμένη αποδοχή των προβιοτικών ποτών από τους καταναλωτές. Άλλη προσπάθεια πραγματοποιήθηκε σε χυμό ροδιού από τους Mousavi et al. (2011), οι οποίοι διαπίστωσαν ότι ο ρυθμός ανάπτυξης των *L. delbrueckii* και *L. plantarum* ήταν καλύτερος από άλλα στελέχη. Επίσης, αρκετές αναφορές έχουν δείξει διαφορές μεταξύ των βακτηριακών προβιοτικών στελεχών σε σχέση με την επιβίωση τους σε όξινο περιβάλλον (Shah & Jelen, 1990, Kailasapathy, 2005). Άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι μόνο τα μικροενθυλακωμένα προβιοτικά ήταν σε θέση να διατηρήσουν τη βιωσιμότητα τους σε υψηλούς πληθυσμούς για σχεδόν δύο εβδομάδες, σε όξινους χυμούς φρούτων (Adhikari et al., 2000, Cui et al., 2000, Lee & Heo, 2000, Picot & Lacroix, 2004, Chandramouli et al., 2004, Saarela et al., 2006). Επομένως, η μικροενθυλάκωση είναι μια πολλά υποσχόμενη μέθοδος, διότι μπορεί να παρέχει ένα ευνοϊκότερο αναερόβιο περιβάλλον για τα ευαίσθητα προβιοτικά βακτήρια, καθώς και ένα φυσικό φραγμό από τις αρκετά όξινες συνθήκες του χυμού φρούτων. Παρ' όλα αυτά όμως, σύμφωνα με έρευνα των Pakbin et al. (2014), ο χυμός ροδάκινο με ελεύθερα κύτταρα του *L. delbrueckii* κατάφερε να επιβιώσει μετά από τέσσερις εβδομάδες αποθήκευσης στους 4 °C (ο αριθμός των βιώσιμων κυττάρων ήταν 1,72 * 10^7 CFU / ml).

3.3.1 Ανάλυση FTIR έντεκα (11) οξυγαλακτικών βακτηρίων με προβιοτικό δυναμικό σε χυμό πορτοκαλιού

Συνολικά αναλύθηκαν 24 δείγματα χυμών πορτοκαλιού (2 διαφορετικές παρτίδες), με τριπλή επανάληψη στο κάθε δείγμα, με τη φασματοσκοπία FTIR, κατά τη διάρκεια της συντήρησης στους 4 ºC. Τυπικά φασματικά δεδομένα FTIR συλλέχθηκαν στην περιοχή 870-4000 cm^{-1} και παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 3.3.1.1 για τα δείγματα χυμών πορτοκαλιού χωρίς και με το προβιοτικό στέλεχος *Lb. pentosus* E97, σε χαμηλό και σε υψηλό εμβόλιο, στην αρχή και στο τέλος της

συντήρησης στους 4 ºC. Παρά τις όποιες εμφανείς ομοιότητες, τα φάσματα που ελήφθησαν για κάθε αναλυθέν δείγμα είναι μοναδικά και χαρακτηρίζονται από συγκεκριμένες διαφορές, μη εμφανείς οπτικά στις περισσότερες περιπτώσεις που καθιστούν δυνατή τη σύγκριση των αποτελεσμάτων. Αναλυτικότερα, οι κύριες περιοχές συχνοτήτων αλλά και οι κορυφές που παρατηρήθηκαν στα αντιπροσωπευτικά φάσματα FTIR που συλλέχθηκαν, παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.3.1.1 μαζί με τις πιθανές αντιστοιχήσεις των τρόπων δόνησης, όπως έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία.



Διάγραμμα 3.3.1.1 Τυπικά φασματογραφήματα στους κυματαριθμούς 870-4000 cm^{-1} δειγμάτων χυμού πορτοκάλι χωρίς (C) και με το προβιοτικό στέλεχος *Lb. pentosus* E97 (E97) σε χαμηλό (L) (10^7) και σε υψηλό (H) (10^8) εμβόλιο, στην αρχή ($0^η$ ημέρα) και στο τέλος ($7^η$ ημέρα για το υψηλό εμβόλιο, $21^η$ ημέρα για το χαμηλό εμβόλιο) της συντήρησης στους 4 ºC.

Πίνακας 3.3.1.1 Οι συχνότητες που παρατηρήθηκαν στα φάσματα FTIR που συλλέχτηκαν από τα δείγματα χυμού πορτοκαλιού και οι πιθανές αντιστοιχίσεις των τρόπων δόνησης (προσαρμογή από Argyri, Panagou and Nychas, 2014).

Κυματαριθμός (cm^{-1})	**Αντιστοίχιση**	**Πηγή**
3780-2960 (3400, 3325)	Πρωτεΐνες (N-H τάση), υδροξυλικές ομάδες από νερό/πρωτεΐνες (O-H τάση) και -C-Hx αλυσίδα ακυλίου λιπαρών οξέων ή πρωτεϊνών	**Zeroual et al. 1994, Schmitt & Flemming 1998, Kansiz et al. 1999, Maquelin et al. 2002, Martin-del-Campo et al. 2007, Subramanian et al. 2011, Nicolaou et al. 2011**

2960-2800 (2960, 2929, 2875, 2850)	-C-Hx αλυσίδα ακυλίου λιπαρών οξέων ή πρωτεϊνών	**Zeroual et al. 1994, Schmitt & Flemming 1998, Kansiz et al. 1999, Maquelin et al. 2002, Martin-del-Campo et al. 2007, Nicolaou et al. 2011**
1780-1745 (1740)	C=O τάση εστέρων και οργανικών οξέων	**Zeroual et al. 1994, Schmitt & Flemming 1998, Kansiz et al. 1999, Maquelin et al. 2002, Martin-del-Campo et al. 2007**
1745-1545 (1640)	C=O τάση εστέρων και οργανικών οξέων, νερό (H-O-H δόνηση παραμόρφωσης), περιοχή Αμιδίου I (80% C=O τάση, 10% C-N τάση 10% N-H κάμψη), Περιοχή Αμιδίου II (40% CN τάση, 60% NH δόνηση κάμψης).	**Socrates 2001, Wu et al. 2006, Bocker et al. 2007, Martin-del-Campo et al. 2007**
1465-1370 (1455, 1400)	Λιπίδια (CH_3 ασύμμετρη παραμόρφωση, CH_3 ασύμμετρη κάμψη, C-H παραμόρφωση του CH_2, CH_2 ψαλιδοειδής δόνηση, C-H κάμψη) ή αμίνες (ασυμμετρία CH_3 δόνηση παραμόρφωσης), CH_2 κάμψη, αμίδια (C-N τάση) ή λιπίδια (RCOO-*τάση συμμετρίας* COO-, -CH_2-COOR δόνηση παραμόρφωσης του CH_2), πλευρικές αλυσίδες αμινοξέων, λιπίδια, υδατάνθρακες (CH κάμψη ή C-O τάση στις καρβοξυλικές ενώσεις) ή νιτροομάδα (τάση συμμετρίας NO_2)	**Zeroual et al. 1994, Pistorius 1995, Chen et al. 1998, Schmitt & Flemming 1998, Kansiz et al. 1999, Socrates 2001, Maquelin et al. 2002, Ellis et al. 2004, Bocker et al. 2007, Pappas et al. 2008**
1370-1290	Πρωτοταγείς και δευτεροταγείς αλειφατικές αμίνες (X-sensitive band), αμίνες –CH_2NH_2 (CH_2 δόνηση στρέψης), CH_2 πλευρικής αλυσίδας, ελεύθερα αμινοξέα/αλειφατικά καρβοξυλικά οξέα μακράς αλύσου (CH τάση / CH_2 δόνηση παραμόρφωσης), αμίδιο III (C-N τάση, N-H κάμψη, C=O-N κάμψη)	**Socrates 2001, Bocker et al. 2007**
1290-1175 (1240)	Αμίδιο III (C-N τάση, N-H κάμψη, C=O-N κάμψη), λιπίδια, νουκλεικά οξέα (ασυμ. PO_2- τάση), αμίδιο III (C-N τάση, N-H κάμψη, C=O-N κάμψη, P=O τάση), αμίνες από ελεύθερα αμινοξέα (C-N τάση), αμίνες –$N(CH_3)_2$ (CH_3 σείση και ασυμ. CCN τάση), σχετίζεται με λίπος C-O τάση), εστέρες (C-O-C), υδατάνθρακες (C-O τάση), -NH2 παραμόρφωση	**Zeroual et al. 1994, Pistorius 1995, Chen et al. 1998, Schmitt & Flemming 1998, Kansiz et al. 1999, Socrates 2001, Maquelin et al. 2002, Ellis et al. 2002, Bocker et al. 2007, Pappas et al. 2008**
1175-1095 (1105)	Σχετίζεται με λίπος (C-O τάση), εστέρες (C-O-C), υδατάνθρακες (C-O τάση), -NH2 παραμόρφωση, ριβόζες (C-O τάση), αμίνες (NH_2 σείση/στρέψη), νουκλεικά οξέα και φωσφολιπίδια (PO_2 συμ.τάσης)/C-O τάση	**Chen et al. 1998, Socrates 2001, Bocker et al. 2007, Pappas et al. 2008**
1095-1010 (1080, 1055)	Νουκλεικά οξέα και φωσφολιπίδια (PO_2 συμ. τάσης)/C-O τάση, λιπίδια και πολυσακχαρίτες (C-O, C-O-P τάση), πολυσακχαρίτες (C-O τάση), αμίνες (CN τάση)	**Zeroual et al. 1994, Schmitt & Flemming 1998, Kansiz et al. 1999, Socrates 2001, Maquelin et al. 2002, Bocker et al., 2007**

1010-975 (995)	Πολυσακχαρίτες (C-O τάση) αμίνες (CN τάση), α,β ενώσεις πυρανόζης (δον. δακτυλίου), αρωματικά καρβοξυλικά οξέα	**Socrates 2001, Bocker et al., 2007**
975-870	α,β ενώσεις πυρανόζης (δον. δακτυλίου), αρωματικά καρβοξυλικά οξέα	**Socrates 2001**

Η γενική εικόνα των φασμάτων που αναλύθηκαν φανερώνει πέντε αντιπροσωπευτικές περιοχές οι οποίες είναι οι ακόλουθες: 900-1183 cm^{-1}, 1183-1496 cm^{-1}, 1496-1809 cm^{-1}, 1809-2748 cm^{-1} και 2748-4000 cm^{-1}. Ένα μοναδικό χαρακτηριστικό του *Alicyclobacillus* είναι τα N-αλικυκλικά λιπαρά οξέα που χρησιμεύουν ως κύρια συστατικά λιπιδίων μεμβράνης, τα οποία συμβάλλουν στην επιβίωσή του μικροοργανισμού σε χαμηλό pH και σε υψηλή θερμοκρασία (Chang 2003, Sinigaglia et al. 2003). Έτσι, στις κορυφές απορρόφησης στα 2960, 2929 και 1740 cm^{-1} μπορεί οφείλονται σαι στην παρουσία N-αλικυκλικών λιπαρών οξέων στην κυτταρική μεμβράνη του *Alicyclobacillus* (Schmitt & Flemming 1998, Kansiz et al. 1999). Η φασματική περιοχή μεταξύ 1500 και 800 cm^{-1} δίνει ειδικές πληροφορίες για το βακτηριακό στέλεχος (Choo-Smith et al. 2001, Schmitt & Flemming 1998). Αυτή η σειρά περιέχει σημαντικές παραμορφώσεις, κάμψεις και δακτυλιοειδείς δονήσεις από διάφορες βιοχημικές λειτουργικές ομάδες (Schmitt & Flemming 1998). Ο δονητικός συνδυασμός αυτής της περιοχής είναι σημαντικός για την ταυτοποίηση των βιοχημικών ενώσεων γιατί μπορεί να συνδεθεί με έναν μοριακό δεσμό ή με μια συγκεκριμένη λειτουργική ομάδα.

Τα δονητικά χαρακτηριστικά των μονο- και πολυσακχαριτών κυριαρχούν γενικά στην περιοχή μεταξύ 900-1183 cm^{-1}, λόγω δεσμών τάσης C-O, που σχετίζονται με τα σάκχαρα (Sakhamuri et al., 2004, Moros et al., 2006). Αυτή η περιοχή συχνοτήτων χαρακτηρίζεται από τις δονήσεις του δακτυλίου των υδατανθράκων C-O-C, C-O, σύμφωνα με τον Nauman, 2000. Οι κορυφές στα 995, 1055 και 1105 cm^{-1} που παρατηρήθηκαν στα φάσματα των δειγμάτων των χυμών πορτοκαλιού μπορούν επομένως να αποδοθούν σε σάκχαρα.

Το εύρος 1200-1450 cm^{-1} υποδηλώνει καρβοξυλικές ομάδες πρωτεϊνών, ενώ η περιοχή μεταξύ 1500 και 1700 cm^{-1} κυριαρχείται από ζώνες πρωτεϊνών (Sakhamuri S. et al. 2004). Υπάρχουν εννέα ζώνες αμιδίου στο υπέρυθρο φάσμα (Beekes M. et al. 2007), οι οποίες, κατά φθίνουσα σειρά κυματαριθμού, αναφέρονται ως αμίδιο A, αμίδιο B και αμίδιο I έως VII (Miyazawa, 1962). Τρεις από τις ζώνες αμιδίου

παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τη μελέτη των πολυπεπτιδικών και των πρωτεϊνικών διαμορφώσεων. Η ζώνη του αμιδίου I, μεταξύ 1600 και 1680 cm^{-1} συνδέεται κυρίως με τη δόνηση τάσης του δεσμού C=O. Οι ζώνες αμιδίου II, που βρίσκεται μεταξύ 1580 και 1480 cm^{-1} και αμιδίου III, μεταξύ 1300 και 1230 cm^{-1}, σχετίζονται με το συνδυασμό C-N δονήσεων τάσης και N-H δονήσεων κάμψης των πεπτιδικών ομάδων (Susi, 1969). Αυτές οι κορυφές είναι χωροδιαταξικώς ευαίσθητες, και οι παρατηρούμενες αυτές θέσεις μπορούν να αποδοθούν σε α έλικες, παράλληλα και αντιπαράλληλα β φύλλα, β στροφές και τυχαίες περιελίξεις (Krimm, 1962,Chen and Lord, 1974 , Lord, 1977, Krimm and Bandeker, 1980). Ένα μοναδικό χαρακτηριστικό του Alicyclobacillus είναι το N-αλικυκλικά λιπαρά οξέα που χρησιμεύουν ως κύρια μεμβράνη λιπιδίων, γεγονός που συμβάλλει στην επιβίωσή τους σε χαμηλό pH και υψηλή θερμοκρασία (Chang, 2003, Sinigaglia et al. 2003), παρ' όλα αυτά στα δείγματά μας δεν παρατηρήθηκαν κάθαρες κορυφές απορρόφησης. Η κύρια περιοχή που είναι εμφανής σε κάθε ληφθέν φάσμα FTIR, είναι αυτή των 1560-1745 cm^{-1}, με κορυφή στα 1640 που αντιστοιχεί στην υγρασία των δειγμάτων χυμού (O-H δόνηση τάσης) σύμφωνα με τους Panagou et al. 2011. Εντός της ζώνης των 3000-3730, παρατηρήθηκε κορυφή στα 3325 cm^{-1}, η οποία αποδίδεται κυρίως σε νερό (Zeroual et al. 1994, Schmitt & Flemming 1998, Kansiz et al. 1999, Maquelin et al. 2002, Subramanian et al. 2011, Nicolaou et al. 2011).

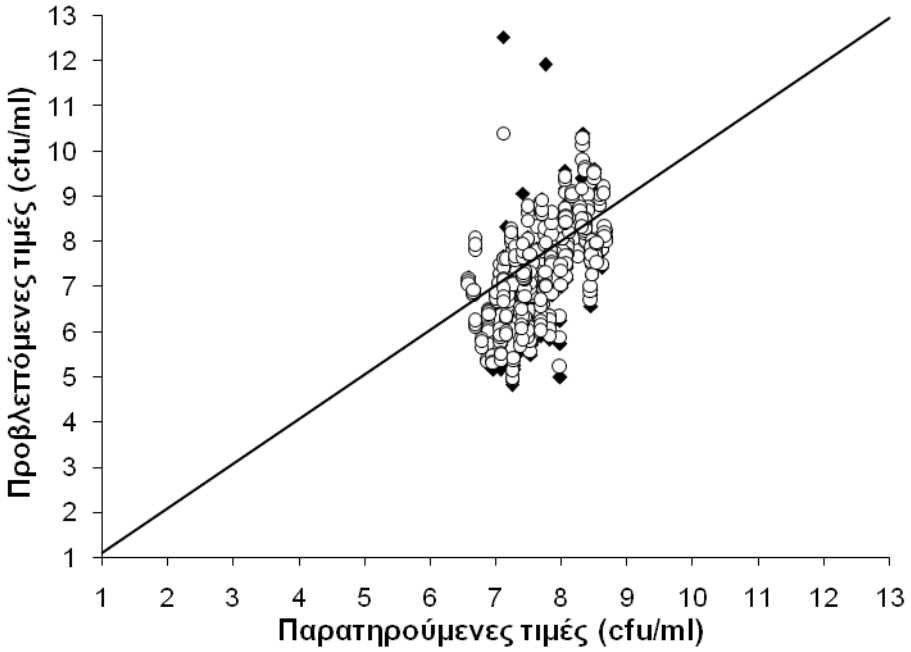
3.3.1.1 Συσχέτιση των μικροβιολογικών και φυσικοχημικών δεδομένων με τα φασματικά δεδομένα στα δείγματα χυμού πορτοκαλιού με τα έντεκα (11) προβιοτικά στελέχη

Σε αυτή την ενότητα έγινε προσπάθεια συσχέτισης των φασματικών δεδομένων με τα μικροβιολογικά δεδομένα των μικροοργανισμών που μελετήθηκαν στα δείγματα χυμού πορτοκαλιού με τα έντεκα (11) προβιοτικά στελέχη, άλλα και με τα φυσικοχημικά δεδομένα που λήφθηκαν παράλληλα με τις μικροβιολογικές αναλύσεις. Ο αριθμός των λανθανουσών μεταβλητών και οι δείκτες επίδοσης κατά την επικύρωση του μοντέλου παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.3.1.1.1. Ο δείκτης προκατάληψης (bias factor, B_f) για τους μικροβιολογικούς πληθυσμούς και τις τιμές pH ήταν κοντά στην τιμή 1. Πιο συγκεκριμένα έλαβε την τιμή 0,954 για τα οξυγαλακτικά βακτήρια και 1,000 για το pH, αποδεικνύοντας ότι τα μοντέλα δεν παρουσίασαν συστηματική, υπο- ή υπερ- εκτίμηση, των φυσικοχημικών δεδομένων. Αντιθέτως, τα μοντέλα δείχνουν να είναι ικανοποιητικά, ιδίως στην περίπτωση του

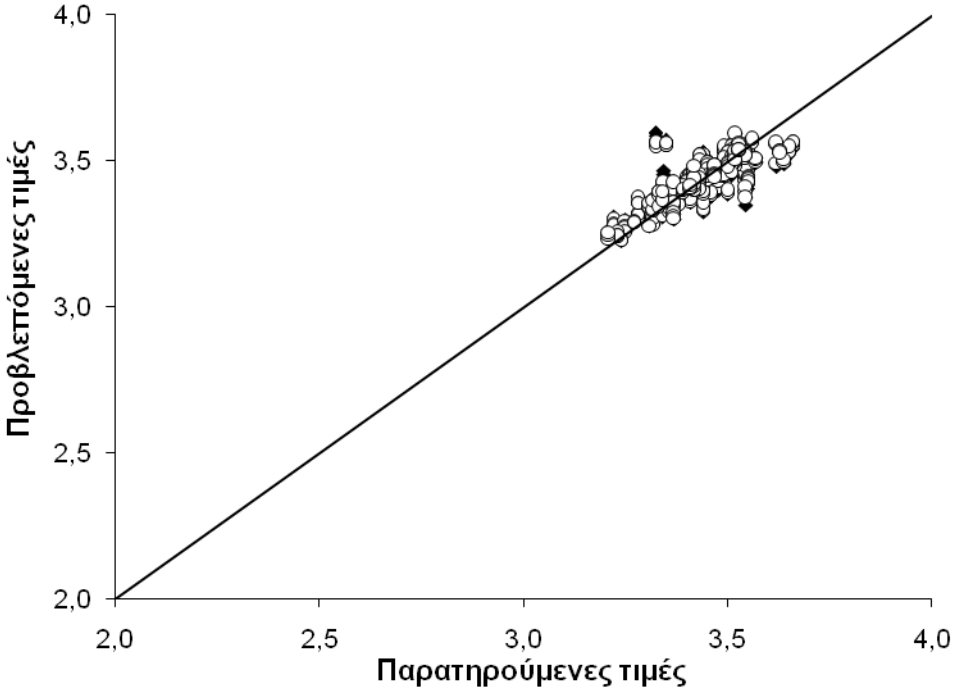
pH, όπου οι προβλέψεις είναι σε πλήρη συμφωνία με τις παρατηρήσεις. Επιπλέον, με βάση τις τιμές του συντελεστή ακρίβειας (accuracy factor, A_f), φαίνεται πως η μέση απόκλιση μεταξύ των προβλέψεων και των παρατηρήσεων ήταν κοντά στο ένα σε όλες τις περιπτώσεις (1,101 και 1,012, για τα οξυγαλακτικά βακτήρια και το pH αντίστοιχα) υποδεικνύοντας ότι οι προβλέψεις ήταν κοντά στις παρατηρήσεις. Οι δείκτες RMSE έλαβαν τιμές 1,595 και 0,058, ενώ οι συντελεστές R^2 ήταν 0,258 και 0,641, για τα οξυγαλακτικά βακτήρια και το pH, αντίστοιχα.. Στα οξυγαλακτικά βακτήρια η προσαρμογή του μοντέλου στα πειραματικά δεδομένα δεν ήταν τόσο καλή, αφού εμφανίστηκε υψηλή τιμή του δείκτη RMSE (1,595) και παρουσιάστηκε μικρή τιμή του συντελεστή προσδιορισμού R^2 (0,258), γεγονός που υποδηλώνει ότι η γραμμή παλινδρόμησης δεν ταιριάζει καλά στα δεδομένα. Αυτό ίσως να οφείλεται στα πολλά διαφορετικά στελέχη που μελετήθηκαν και ενδεχομένως να παράγουν διαφορετικά μεταβολικά προϊόντα έχοντας ως υπόστρωμα το χυμό πορτοκαλιού, σε αντίθεση με τους πληθυσμούς τους που ήταν παρόμοιοι, επομένως και το μοντέλο εκπαιδεύτηκε με διαφορετικά δεδομένα FTIR για παρόμοιους μικροβιακούς πληθυσμούς. Αντιθέτως, το pH έδειξε ικανοποιητικά αποτελέσματα με μικρή τιμή μέσης απόκλισης μεταξύ των παρατηρούμενων και των προβλεπόμενων τιμών, παρουσιάζοντας καλή προσαρμογή του μοντέλου στα πειραματικά δεδομένα Τα αντίστοιχα αποτελέσματα παρουσιάζονται γραφικά στα διαγράμματα 3.3.1.1.1 και 3.3.1.1.2, όπου απεικονίζεται η σύγκριση μεταξύ προβλέψεων και πραγματικών παρατηρήσεων σε log CFU / ml.

Πίνακας 3.3.1.1.1 Δείκτες επίδοσης κατά την επικύρωση των μοντέλων PLS-R συσχετίζοντας τα φυσικοχημικά με τα φασματικά δεδομένα που λήφθηκαν από τα δείγματα χυμών πορτοκαλιού με τα έντεκα (11) στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων με προβιοτικό δυναμικό.

	Αριθμός λανθανουσών μεταβλητών	**Bias factor (B_f)**	**Accuracy factor (A_f)**	**RMSE**	**R^2**
Οξυγαλακτικά βακτήρια	6	0,954	1,101	1,595	0,258
pH	8	1,000	1,012	0,058	0,641



Διάγραμμα 3.3.1.1.1 Σύγκριση μεταξύ των παρατηρούμενων και προβλεπόμενων τιμών των οξυγαλακτικών βακτηρίων των δειγμάτων χυμών πορτοκαλιού με τα έντεκα (11) προβιοτικά στελέχη, από το μοντέλο παλινδρόμησης PLS (○: δεδομένα εκπαίδευσης, ♦: δεδομένα επικύρωσης).



Διάγραμμα 3.3.1.1.2 Σύγκριση μεταξύ των παρατηρούμενων και προβλεπόμενων τιμών του pH των δειγμάτων χυμών πορτοκαλιού με τα έντεκα (11) προβιοτικά στελέχη, από το μοντέλο παλινδρόμησης PLS (○: δεδομένα εκπαίδευσης, ♦: δεδομένα επικύρωσης).

3.3.1.2 Εκτίμηση της βαθμολογίας της οργανοληπτικής αξιολόγησης στα δείγματα χυμού πορτοκαλιού με τα έντεκα (11) προβιοτικά στελέχη

Τα αποτελέσματα των μοντέλων της οργανοληπτικής αξιολόγησης παρουσιάζονται σε πίνακες διπλής εισόδου (Πίνακες 3.3.1.2.1α και 3.3.1.2.1β). Στον Πίνακα 3.3.1.2.1α φαίνεται η ταξινόμηση των δειγμάτων σε εννιά κατηγορίες, από το μη αποδεκτό(1) έως και το άριστο (5). Η συνολική ακρίβεια (ευαισθησία) πρόβλεψης στα δεδομένα επικύρωσης του μοντέλου ήταν 41,35%. Συγκεκριμένα, κατά την επικύρωση του μοντέλου, η ανάλυση PLS έδωσε 56,11% σωστές προβλέψεις για τα δείγματα που είχαν χαρακτηριστεί ως «Μη αποδεκτά», 13,33% για τα «Αποδεκτά», 23,33% για τα «Μέτρια», 50,00% για τα «Καλά» και 31,48% για τα «Άριστα» δείγματα, αντίστοιχα. Η εξειδίκευση που παρουσίασε το μοντέλο κατά την επικύρωση ήταν 80,95%, 13,64%, 25,00%, 8,16% και 93,23% για τις κατηγορίες «Άριστο», «Καλό», «Μέτριο», «Αποδεκτό» και «Μη αποδεκτό», αντίστοιχα (Πίνακας 3.3.1.2.1α).

Στον Πίνακα 3.3.1.2.1β, φαίνεται η ταξινόμηση των δειγμάτων σε τρεις κατηγορίες, οι οποίες είναι: «Άριστο-Καλό» (με βαθμολογίες $3,5 \leq x \leq 5$), «Μέτριο-Αποδεκτό» (με βαθμολογίες $2 \leq x < 3,5$) και «Μη αποδεκτό» (με βαθμολογίες $1 \leq x < 2$). Η συνολική ακρίβεια (ευαισθησία) πρόβλεψης στα δεδομένα επικύρωσης του μοντέλου ήταν 78,13%. Συγκεκριμένα, κατά την επικύρωση του μοντέλου, η ανάλυση PLS έδωσε 65,59% σωστές προβλέψεις για τα δείγματα που είχαν χαρακτηριστεί ως «Άριστα-Καλά», 61,90% για τα δείγματα που είχαν χαρακτηριστεί ως «Μέτρια-Αποδεκτά» και 88,70% για τα δείγματα που είχαν χαρακτηριστεί ως «Μη αποδεκτά». Η εξειδίκευση που παρουσίασε το μοντέλο κατά την επικύρωση ήταν 82,43%, 48,15%, και 90,60% για τις κατηγορίες «Άριστο-Καλό», «Μέτριο-Αποδεκτό» και «Μη αποδεκτό», αντίστοιχα. Πρέπει να τονιστεί πως κανένα μη αποδεκτό δείγμα δεν χαρακτηρίστηκε ως καλό ή άριστο και πως η πλειοψηφία των άριστων δειγμάτων δεν χαρακτηρίστηκε ως μη αποδεκτό (μόνο 3 από τα 93 άριστα δείγματα εκτιμήθηκαν ως μη αποδεκτά).

Πίνακας 3.3.1.2.1α: Πίνακας διπλής εισόδου διασταυρούμενης επικύρωσης για τα δείγματα χυμού, όπως προέκυψε από την ανάλυση PLS (δεδομένα επικύρωσης) (Μη αποδεκτό=1, Αποδεκτό=2, Μέτριο=3, Καλό=4, Άριστο=5).

		Προβλεπόμενη Τάξη Δεδομένα επικύρωσης									
Πραγματική Τάξη	**Σύνολο**	**5**	**4,5**	**4**	**3,5**	**3**	**2,5**	**2**	**1,5**	**1**	**Ευαισθησία (%)**
5	54	17	8	15	10	2	1	1	0	0	31,48
4,5	12	2	3	1	5	1	0	0	0	0	25,00
4	6	1	1	3	0	1	0	0	0	0	50,00
3,5	21	0	1	2	8	3	2	4	1	0	38,09
3	30	1	3	1	7	7	10	0	1	0	23,33
2,5	24	0	0	0	4	4	2	10	2	2	8,33
2	30	0	0	0	2	9	9	4	3	3	13,33
1,5	18	0	0	0	0	1	2	3	8	4	44,44
1	221	0	0	0	0	3	11	27	56	124	56,11
Σύνολο	416	21	16	22	36	28	37	49	71	133	41,35
Εξειδίκευση (%)		80,95	18,75	13,64	22,22	25,00	5,40	8,16	11,27	93,23	

Πίνακας 3.3.1.2.1β: Πίνακας διπλής εισόδου διασταυρούμενης επικύρωσης για τα δείγματα χυμού, όπως προέκυψε από την ανάλυση PLS (δεδομένα επικύρωσης) («Άριστο-Καλό» $3,5 \leq x \leq 5$, «Μέτριο-Αποδεκτό» $2 \leq x < 3,5$ και «Μη αποδεκτό» $1 \leq x < 2$).

		Προβλεπόμενη Τάξη Δεδομένα επικύρωσης			
Πραγματική Τάξη	**Σύνολο**	**Άριστο-Καλό**	**Μέτριο-Αποδεκτό**	**Μη αποδεκτό**	**Ευαισθησία (%)**
Άριστο-Καλό	93	61	29	3	65,59
Μέτριο-Αποδεκτό	84	13	52	19	61,90
Μη αποδεκτό	239	0	27	212	88,70
Σύνολο	416	74	108	234	78,13
Εξειδίκευση (%)		82,43	48,15	90,60	

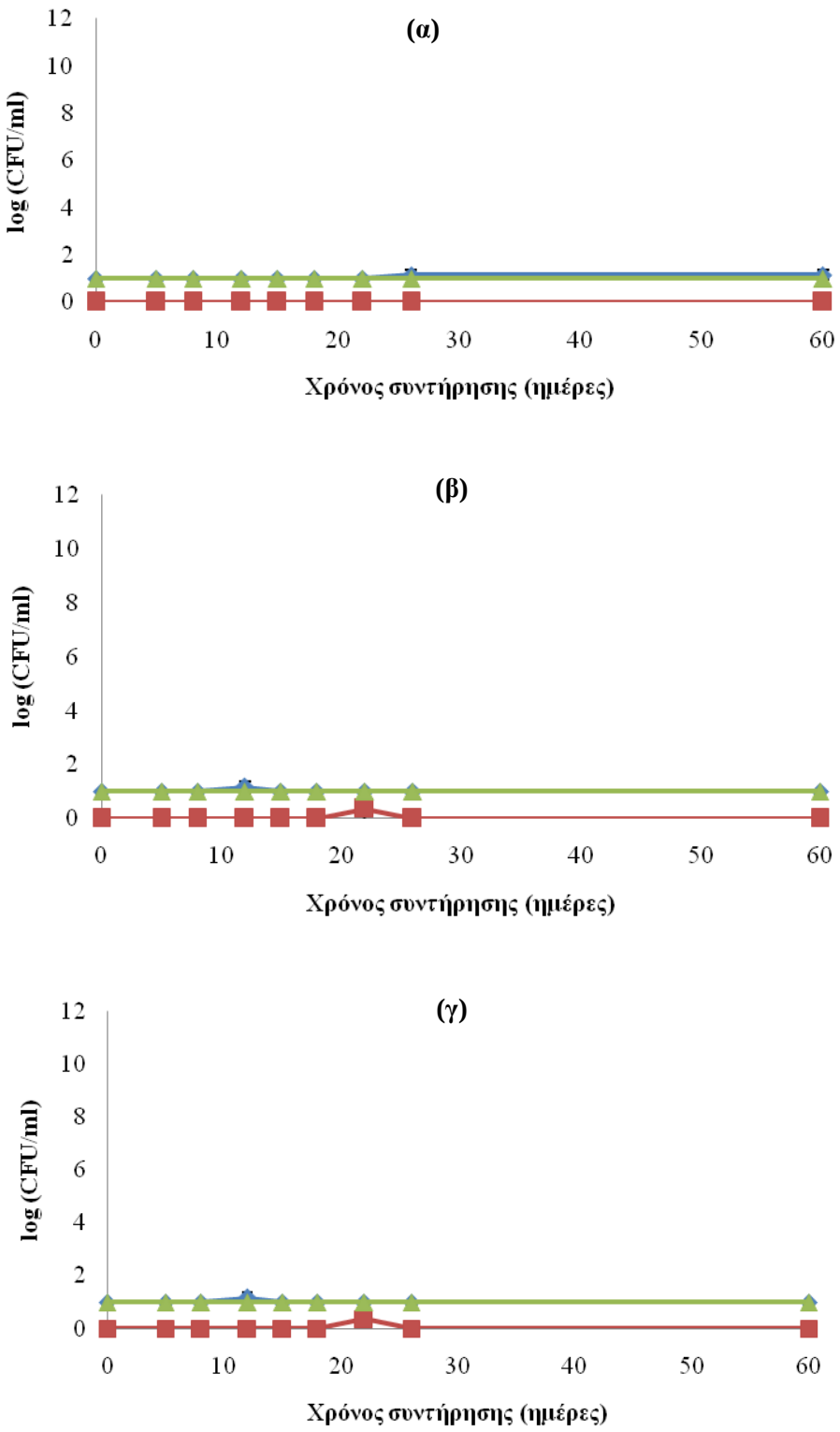
3.4 Παραγωγή και συντήρηση λειτουργικού πορτοκαλοχυμού και απενεργοποίηση του *Alicyclobacillus acidoterrestris* με χρήση ΥΠΠ και ΘΕ

Η ΟΜΧ, τα οξυγαλακτικά βακτήρια και ο *Alicyclobacillus* spp. των δειγμάτων χυμών (μάρτυρες) που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα, βρέθηκε να είναι

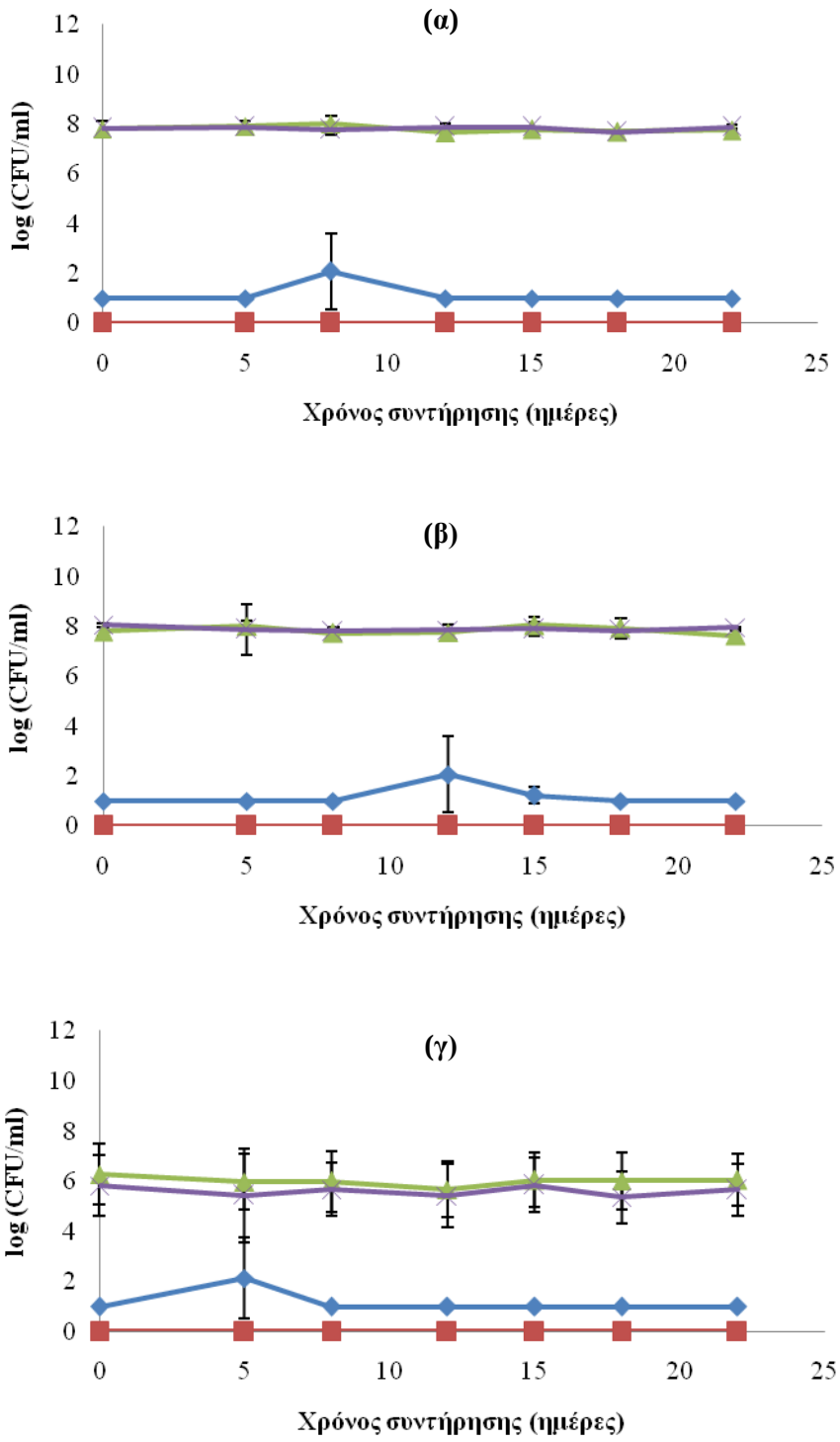
κάτω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου καταμέτρησης (0,00 log CFU/ml για τα οξυγαλακτικά βακτήρια και τον *Alicyclobacillus* spp., 1,00 log CFU/ml για την ΟΜΧ) και τις εξήντα ημέρες της συντήρησης τόσο πριν την επεξεργασία, όσο και μετά από την θερμική επεξεργασία (ΘΕ) και την υψηλή υδροστατική πίεση (ΥΥΠ) (Σχ. 3.4.1.).

Στην περίπτωση όπου δείγματα χυμών πορτοκαλιού εμβολιάστηκαν μόνο με τον αλλοιογόνο μικροοργανισμό *Alicyclobacillus acidoterrestris*, η ΟΜΧ καθώς και τα οξυγαλακτικά βακτήρια βρέθηκαν κάτω από το όριο ανίχνευσης σε όλους τους χειρισμούς, και καθ' όλη τη διάρκεια συντήρησης (Σχ. 3.4.2). Αντιθέτως, ο μικροοργανισμός *Alicyclobacillus* spp. (σύνολο βλαστικών μορφών και σπορίων) παρουσίασε τιμές ≈ 8,00 log CFU/ml κατά τη συντήρηση στα δείγματα χωρίς και μετά από ΘΕ, ενώ παρατηρήθηκε μια πτώση της τάξης των 2,00 log έπειτα από την εφαρμογή ΥΥΠ στα δείγματα.

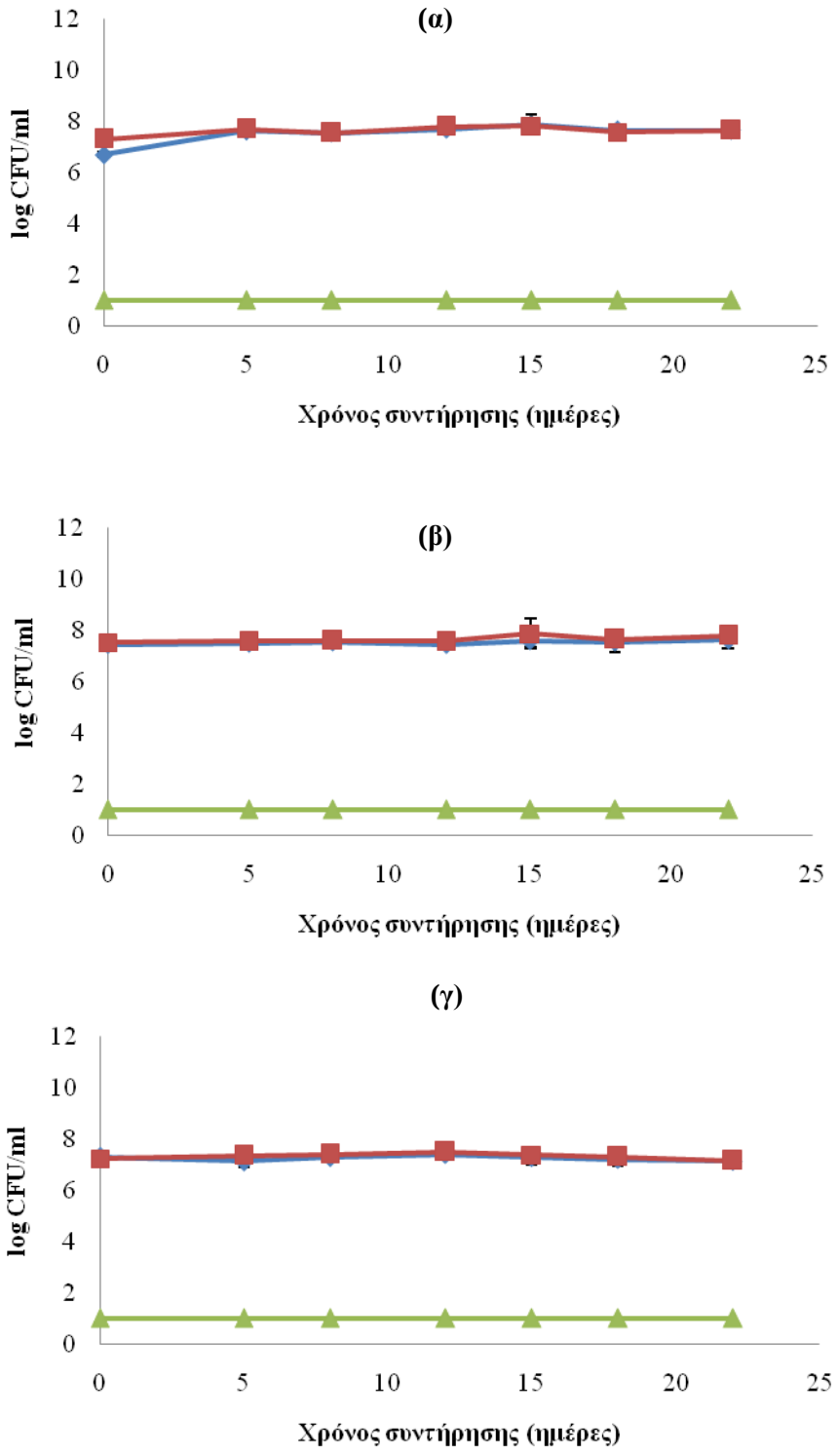
Στην περίπτωση των δειγμάτων των χυμών που ήταν εμβολιασμένοι μόνο με το προβιοτικό στέλεχος *Lb. pentosus* E104, ο πληθυσμός των *Alicyclobacillus* spp. βρέθηκε να είναι κάτω από το όριο ανίχνευσης (0,00 log CFU/ml) σε όλες τις περιπτώσεις έως και την 21^{η} ημέρα συντήρησης (Σχ. 3.4.3). Η ΟΜΧ των χυμών αυτών παρουσίασε τιμές από 6,71 έως 7,88 log CFU/ml και τα οξυγαλακτικά βακτήρια από 7,16 έως 7,88 log CFU/ml. Το προβιοτικό στέλεχος παρέμεινε σταθερό σε όλες τις περιπτώσεις κατά την συντήρηση, αφού προστέθηκε στον χυμό μετά την θερμική επεξεργασία (ΘΕ) ή την υψηλή υδροστατική πίεση (ΥΥΠ).



Σχήμα 3.4.1. Καταμέτρηση ΟΜΧ (♦), οξυγαλακτικών βακτηρίων (■) και *Alicyclobacillus* spp. (▲) των δειγμάτων χυμών πορτοκαλιού (μάρτυρες) που συντηρήθηκαν συνολικά για 60 ημέρες (**α:** μάρτυρας, **β:** μάρτυρας με ΘΕ, **γ:** μάρτυρας με ΥΥΠ).

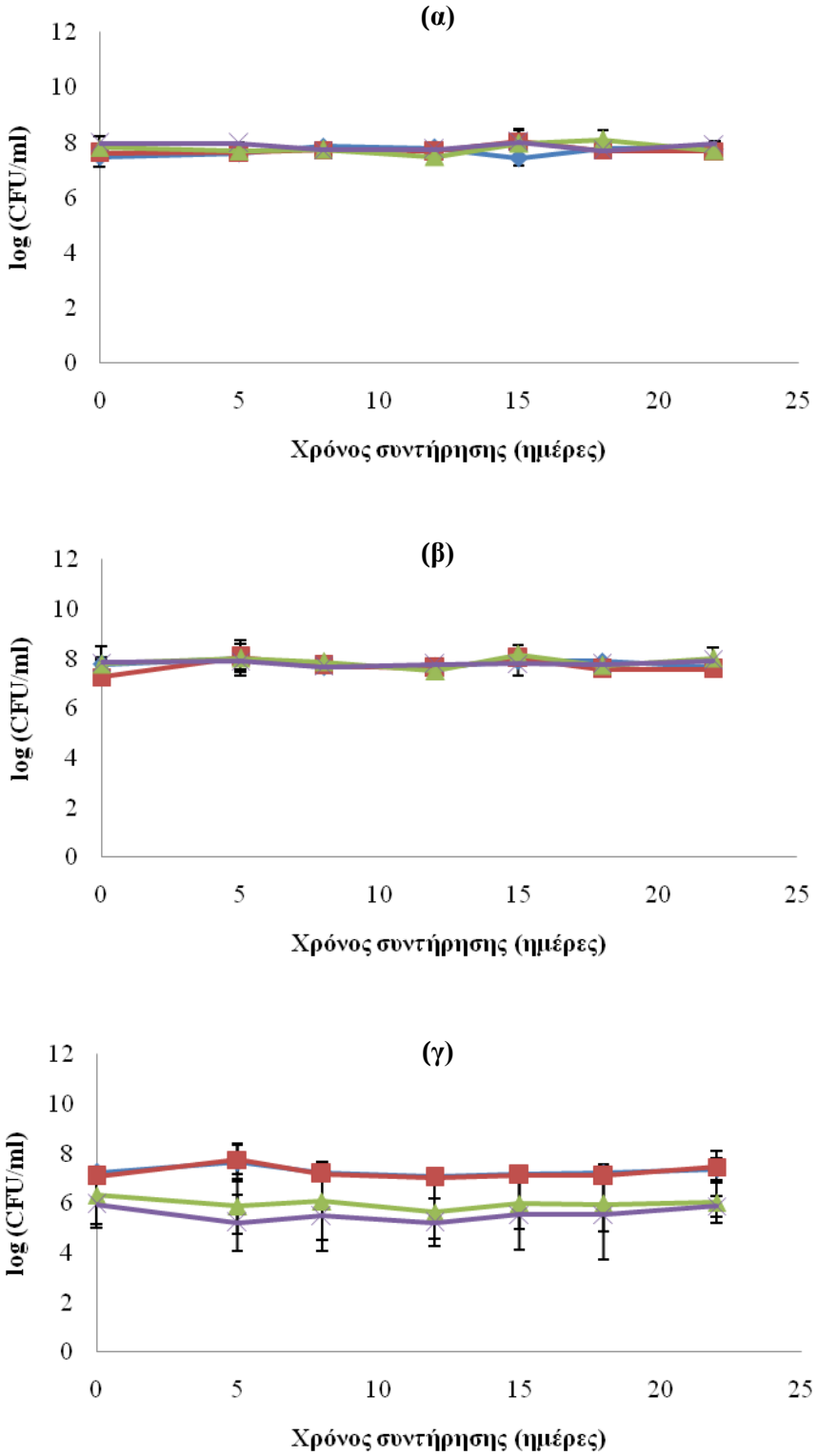


Σχήμα 3.4.2. Καταμέτρηση ΟΜΧ (♦), οξυγαλακτικών βακτηρίων (■), *Alicyclobacillus* spp. (▲) και *Alicyclobacillus* spp. (σπόρια) (×) των δειγμάτων χυμών πορτοκαλιού που εμβολιάστηκαν με τον αλλοιογόνο μικροοργανισμό *A. acidoterrestris* και συντηρήθηκαν συνολικά για 21 ημέρες (**α:** χυμός με *A. acidoterrestris*, **β:** χυμός με *A. acidoterrestris* με ΘΕ, **γ:** χυμός με *A. acidoterrestris* με ΥΥΠ).



Σχήμα 3.4.3. Καταμέτρηση ΟΜΧ (♦), οξυγαλακτικών βακτηρίων (■) και *Alicyclobacillus* spp. (▲) των δειγμάτων χυμών πορτοκαλιού που εμβολιάστηκαν με το στέλεχος *Lb. pentosus* E104 και συντηρήθηκαν συνολικά για 21 ημέρες (**α:** χυμός με *Lb. pentosus* E104, **β:** χυμός με *Lb. pentosus* E104 με ΘΕ, **γ:** χυμός με *Lb. pentosus* E104 με ΥΥΠ).

Η ΟΜΧ και ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων του συνδυασμού των *A. acidoterrestris* Aac και *Lb. pentosus* E104 παρουσίασαν παρόμοιες τιμές με αυτές των δειγμάτων των χυμών που ήταν εμβολιασμένοι μόνο με τον *Lb. pentosus* E104, με την χαμηλότερη να είναι 7,06 log CFU/ml και την υψηλότερη τιμή να φτάνει τα 8,03 log CFU/ml (Σχ. 3.4.4.). Αντίστοιχα ο πληθυσμός του *Alicyclobacillus* spp. (σπόρια και βλαστικές μορφές) και των σπορίων του έλαβε παρόμοιες τιμές με αυτές των δειγμάτων των χυμών που ήταν εμβολιασμένοι μόνο με τον *A. acidoterrestris*, δηλαδή τιμές κοντά στους 8,00 log CFU/ml πριν, με πτώση 2,00 log μετά την εφαρμογή της ΥΥΠ στα δείγματα. Η ΘΕ δε φάνηκε να επηρεάζει τους συνολικούς πληθυσμούς του *Alicyclobacillus* spp. και των σπορίων του στην αρχή όσο και κατά τη διάρκεια της συντήρησης των χυμών (21 ημέρες). Τα βλαστικά κύτταρα υπολογίζονται από τη διαφορά των πληθυσμών του *Alicyclobacillus* spp. (σπόρια και βλαστικές μορφές) από τα σπόριά του. Η διαφορά αυτή βρέθηκε να είναι μικρότερη από 1,00 log έως και μηδενική, ενώ δεν παρατηρήθηκε κάποια τάση εμφάνισης εκβλάστησης στους διαφορετικούς χειρισμούς. Επομένως ο πληθυσμός του *Alicyclobacillus* spp. (σπόρια και βλαστικές μορφές) και των σπορίων του έλαβε τιμές κοντά στους 8,00 log CFU/ml πριν, με πτώση 2,00 log μετά την εφαρμογή της ΥΥΠ στα δείγματα και με καμία μείωση ή / και αύξηση έπειτα από την εφαρμογή της ΘΕ.

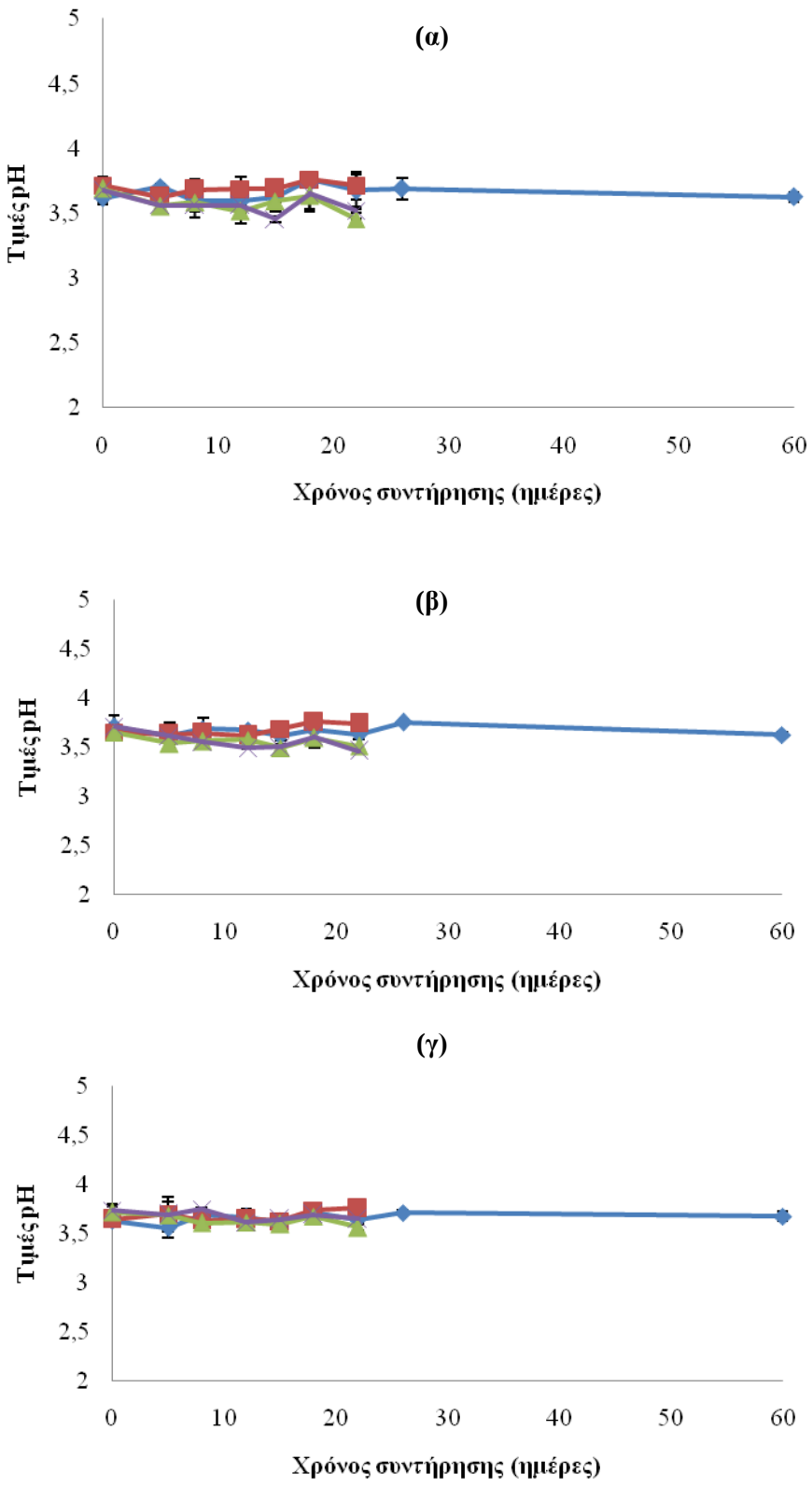


Σχήμα 3.4.4. Καταμέτρηση ΟΜΧ (♦), οξυγαλακτικών βακτηρίων (■), *Alicyclobacillus* spp. (▲) και *Alicyclobacillus* spp. (σπόρια) (×) των δειγμάτων χυμών πορτοκαλιού που εμβολιάστηκαν με το στέλεχος *Lb. pentosus* E104 σε συνδυασμό με τον αλλοιογόνο μικροοργανισμό *A. acidoterrestris* και συντηρήθηκαν συνολικά για 21 ημέρες (**α:** χυμός με

Lb. pentosus E104 & *A. acidoterrestris*, **β:** χυμός με *Lb. pentosus* E104 & *A. acidoterrestris* με ΘΕ, **γ:** χυμός με *Lb. pentosus* E104 & *A. acidoterrestris* με ΥΥΠ).

Οι τιμές pH των δειγμάτων των χυμών πορτοκαλιού χωρίς επεξεργασία κυμάνθηκαν από 3,45 έως 3,76 με μέσο όρο τιμών 3,63 ± 0,08. (Σχ. 3.4.5). Αντίστοιχα, οι χυμοί με ΘΕ παρουσίασαν τιμές από 3,46 έως 3,76 (3,62 ± 0,08) και οι χυμοί με ΥΥΠ από 3,56 έως 3,76 (3,66 ± 0,05). Επίσης, παρατηρήθηκε ότι τα δείγματα των χυμών με τον αλλοιογόνο μικροοργανισμό *A. acidoterrestris* παρουσίασαν μια μικρή τάση αύξησης στην τιμή του pH όσο αυξάνονταν οι ημέρες της συντήρησης, σε αντίθεση με τους χυμούς που εμβολιάστηκαν με το στέλεχος *Lb. pentosus* E104, όπου εκεί παρατηρήθηκε μικρή πτώση έως και την 21^{η} ημέρα της συντήρησης.

Σύμφωνα με την οργανοληπτική ανάλυση, τα δείγματα χυμών με το στέλεχος *Lb. pentosus* E104 ήταν αποδεκτά για οκτώ (8) ημέρες συντήρησης, και τα δείγματα που περιείχαν και τα δύο στελέχη για δέκα (10) ημέρες σε όλους τους χειρισμούς. Οι χυμοί με τον *A. acidoterrestris* ήταν αποδεκτοί για 12 ημέρες, ενώ τα δείγματα χυμών με τον *A. acidoterrestris* που υπέστησαν επεξεργασία με ΥΥΠ για 18 ημέρες. Όλα τα μη εμβολιασμένα δείγματα ήταν αποδεκτά μέχρι και την 60^{η} ημέρα της συντήρησης.



Σχήμα 3.4.5. Καταμέτρηση pH των δειγμάτων χυμών πορτοκαλιού (μάρτυρες) (♦), των χυμών που εμβολιάστηκαν με τον αλλοιογόνο μικροοργανισμό *A. acidoterrestris* (■), με το στέλεχος *Lb. pentosus* E104 (▲) και με τον συνδυασμό των δύο παραπάνω μικροοργανισμών

(×) και συντηρήθηκαν συνολικά για 60 και 21 ημέρες, αντίστοιχα (**α:** χυμός χωρίς επεξεργασία, **β:** χυμός με ΘΕ, **γ:** χυμός με ΥΥΠ).

Πίνακας 3.4.1. Οργανοληπτική ανάλυση των δειγμάτων λειτουργικού πορτοκαλοχυμού με *A. acidoterrestris* μετά τη χρήση ΥΠΠ και ΘΕ, τα οποία συντηρήθηκαν συνολικά για 60 ημέρες (συνολική εκτίμηση του κάθε χυμού με κλίμακα από το ένα (1) έως το πέντε (5): Μη αποδεκτό=1, Αποδεκτό=2, Μέτριο=3, Καλό=4, Άριστο=5).

ΔΕΙΓΜΑΤΑ	0	5	8	10	12	15	18	22	26	60
P	5	5	5	4,5	4,5	4	4,5	4	4,5	2
C	5	5	5	4,5	4	3	3	3	3	1
H	5	5	5	4,5	4	3,5	3,5	3,5	3,5	1,5
PP	5	3,5	2	1	1	1	1	1	-	-
-CP	5	3,5	2	1	1	1	1	1	-	-
HP	5	3,5	2	1	1	1	1	1	-	-
PF	5	3,5	2,5	2	1	1	1	1	-	-
CF	5	4	2,5	2	1	1	1	1	-	-
HF	5	4	2,5	2	1	1	1	1	-	-
PA	5	5	3	2,5	2,5	2	2	1	-	-
CA	5	5	3	2	2	1	1	1	-	-
HA	5	5	3	2	2	1	1	1	-	-

Οι Ding και Shah (2008) διερεύνησαν την επιβίωση των ελεύθερων και μικροενθυλακωμένων προβιοτικών βακτηρίων σε χυμό πορτοκαλί και μήλο. Στην μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν οκτώ διαφορετικά στελέχη προβιοτικών βακτηρίων (*Lactobacillus rhamnosus, Bifidobacterium longum, L. salivarius, L. plantarum, L. acidophilus, L. paracasei, B. lactis* τύπου Bi-04 και *B. lactis* τύπου Bi-07). Τα ενθυλακωμένα προβιοτικά βακτήρια επιβίωσαν στους χυμούς φρούτων κατά τη διάρκεια έξι εβδομάδων αποθήκευσης, ενώ τα ελεύθερα προβιοτικά βακτήρια έχασαν τη βιωσιμότητά τους μέσα σε πέντε εβδομάδες. Γενικά, οι χυμοί φρούτων που περιέχουν μικροενθυλακωμένα προβιοτικά βακτήρια, είναι πιο σταθεροί από αυτούς που περιέχουν ελεύθερους προβιοτικούς μικροοργανισμούς. Οι μικροενθυλακωμένοι προβιοτικοί μικροοργανισμοί έδειξαν να έχουν καλύτερη επιβίωση σε χυμούς φρούτων σε σύγκριση με τα ελεύθερα προβιοτικά βακτήρια. Σε γενικές γραμμές, οι προβιοτικοί χυμοί φρούτων παρουσίασαν μείωση του brix και αύξηση του pH κατά την αποθήκευση. Παρόμοια αποτελέσματα με τη μελέτη αυτή εμφάνισε και ο χυμός

πορτοκάλι με το στέλεχος *Lb. pentosus* E104, αφού επιβίωσε σε παρόμοιους πληθυσμούς στους αντίστοιχους χρόνους συντήρησης στους 4 ºC. Ο χυμός αυτός όμως, απορρίφθηκε οργανοληπτικά την 8η ημέρα της συντήρησης. Επομένως, η εφαρμογή της μικροενθυλάκωσης πέρα από την βελτίωση που προσφέρει στην επιβίωση του προβιοτικού μικροοργανισμού, ίσως μπορεί να συνεισφέρει στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του χυμού.

Η μικροβιολογική σταθερότητα των συμπυκνωμάτων χυμού οφείλεται στην υψηλή περιεκτικότητα σε διαλυτά στερεά και στην παρουσία οργανικών οξέων και φυσικών αντιμικροβιακών ενώσεων σε ποσότητες επαρκείς για την αναστολή της βλάστησης των σπορίων του *Alicyclobacillus* (Bevilacqua et al., 2013, 2008, Maldonado et al., 2008, Walls & Chuyate, 2000). Είναι γνωστό ότι πολλά φυτοχημικά όπως τα φλαβονοειδή, τα αιθέρια έλαια και τα οργανικά οξέα, που περιέχονται στα διάφορα φρούτα και τους χυμούς, έχουν αντιμικροβιακές ιδιότητες και θα μπορούσαν να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στην αναστολή της βλάστησης και της ανάπτυξης του *A. acidoterrestris* (Oteiza & Gianuzzi, 2015). Η θερμο-οξεόφιλη φύση του γένους *Alicyclobacillus* επιτρέπει την επιβίωσή του κατά την παραγωγή συμπυκνωμένων φρούτων με υψηλή περιεκτικότητα σε οξύ. Παρ' όλα αυτά όμως, η αποτελεσματική πλύση στα πρώιμα στάδια της επεξεργασίας χυμού μπορεί να συμβάλει στη μείωση του πληθυσμού *Alicyclobacillus* στο τελικό προϊόν (Bahçeci et al., 2003).

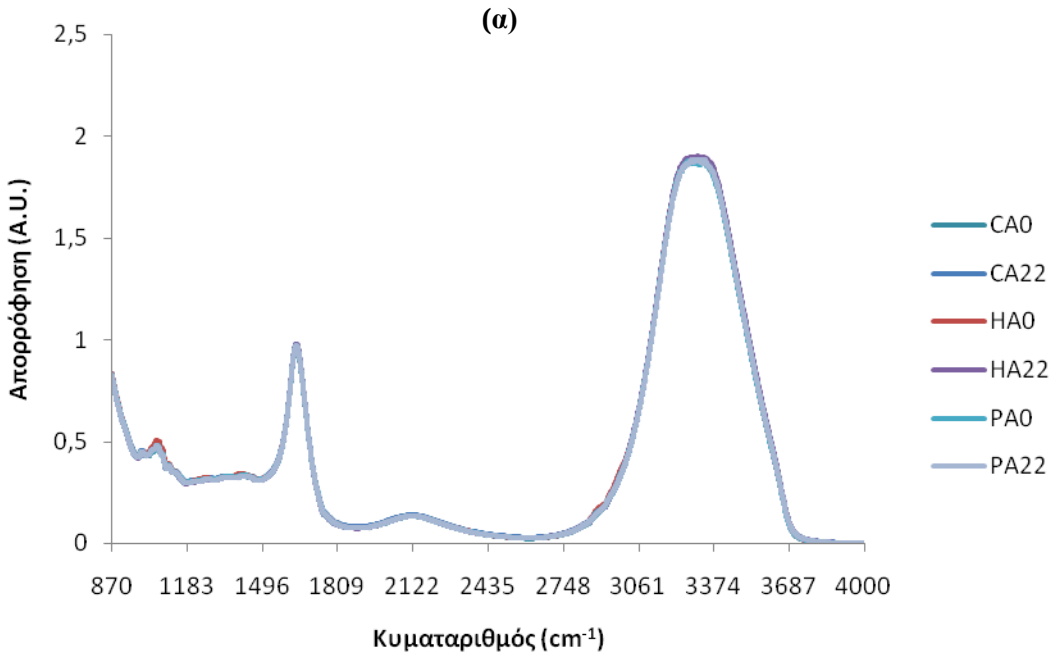
Η απενεργοποίηση των σπορίων του *A. acidoterrestris* από την εφαρμογή υπερυψηλής πίεσης και υπερυψηλής πίεσης παρουσία θερμότητας σε φυσικούς και συμπυκνωμένους χυμούς φρούτων δεν έχει μελετηθεί αρκετά. Το βακτήριο *A. acidoterrestris* είναι δυνατόν να επιβιώσει της παστερίωσης των 2 min στους 95° C, και έχει ως αποτέλεσμα την υποβάθμιση των προϊόντων με τον σχηματισμό της γουαϊακόλης και αλογονοφαινολών. Τα ενδοσπόρια του βακτηρίου έχουν τιμές D που κυμαίνονται από 1.5 έως 8.7 min στους 95° C, μεγαλύτερες δηλαδή από αυτές που εφαρμόζονται κατά την παστερίωση των φρουτοχυμών στη βιομηχανία (Steyn et al., 2011). Διάφορες έρευνες σχετικά με την απενεργοποίηση και καταστροφή του *Alicyclobacillus* έχουν πραγματοποιηθεί. Σύμφωνα με τους Alpas et al. (2003), η αδρανοποίηση των κυττάρων εμφανίστηκε στους 50 °C μέσω της επεξεργασίας στα 350 και 450 MPa, με μείωση 3,53 και 4,73 μονάδων log, αντίστοιχα. Από την άλλη πλευρά, τα σπόρια φαίνεται να είναι πιο ανθεκτικά από τα βλαστικά κύτταρα, καθώς αντιστάθηκαν σε υψηλότερες πιέσεις και σε μεγαλύτερους χρόνους έκθεσης (Lee et

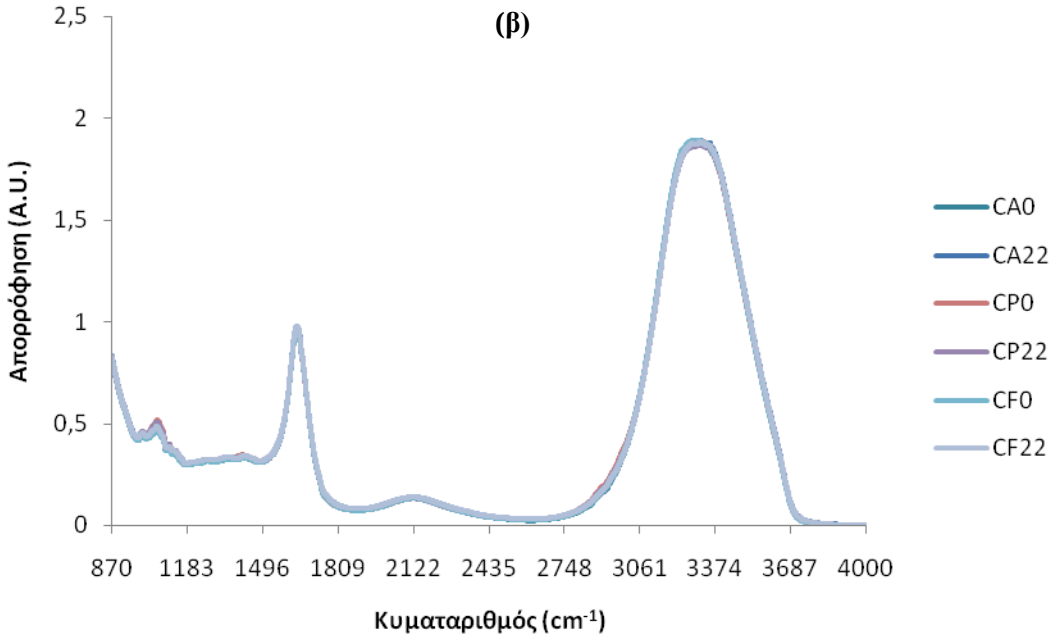
al., 2006a). Ωστόσο, τα σπόρια του θα μπορούσαν να απενεργοποιηθούν μόνο με υψηλές θερμικές επεξεργασίες (95 °C για λίγα λεπτά) ή ΥΥΠ (> 600 MPa), με αποτέλεσμα την απώλεια θρεπτικών και οργανοληπτικών χαρακτηριστικών, αντίστοιχα. Οι Silva et al. (2012) απέδειξαν ότι η ΥΥΠ επέτρεψε την αδρανοποίηση σπορίων *A. acidoterrestris* σε χαμηλότερες θερμοκρασίες (45 - 65 °C) από τη συμβατική θερμική επεξεργασία (85 - 95 °C) χωρίς πίεση, αποδίδοντας πιο φρέσκο και διατηρημένο τρόφιμο υψηλότερης ποιότητας. Παρά το γεγονός ότι η θερμοκρασία των 121 °C χρησιμοποιήθηκε ως αναφορά για την καταστροφή των σπορίων στη θερμική αποστείρωση των τροφίμων για πολλές δεκαετίες, τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η αποστείρωση είναι δυνατή και σε χαμηλότερες θερμοκρασίες εάν εφαρμοστεί υψηλή πίεση. Αυτό θα επιτρέπει την καλύτερη διατήρηση των αρχικών οργανοληπτικών ιδιοτήτων των τροφίμων, των θρεπτικών ουσιών και των βιοδραστικών συστατικών, που καταστρέφονται εύκολα από τη θερμότητα (121 °C) που χρησιμοποιείται για τη θανάτωση των μικροβιακών σπορίων, με αποτέλεσμα την παραγωγή ασφαλών και ανθεκτικών τροφίμων υψηλότερης ποιότητας.

Η γεύση του χυμού πορτοκαλιού μεταβάλλεται εύκολα κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας και της αποθήκευσης. Οι μη αναστρέψιμες μεταβολές που παρουσιάζονται στη γεύση του χυμού είναι αποτέλεσμα χημικών αντιδράσεων που ξεκινούν ή συμβαίνουν κατά τη θερμική επεξεργασία (Braddock, 1999). Οι αλλαγές στη γεύση σχετίζονται επίσης με έναν αριθμό αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, γεγονός που προκαλεί την εμφάνιση δυσάρεστης γεύσης. Η μη-ενζυματική αμαύρωση, όπως η αποικοδόμηση του ασκορβικού οξέος, προκαλεί επιδείνωση της γεύσης, απώλεια των θρεπτικών ουσιών και σκούρα χρώση (Kaanane et al., 1988). Σε μια μελέτη που εκπονήθηκε από τους Butz και Tauscher (2002) σε χυμό πορτοκαλιού υψηλής πίεσης, οι μεταβολές στο άρωμα, στη γεύση και στη γενική ποιότητα μετά από 21 ημέρες αποθήκευσης, ήταν ανεπιθύμητες. Ωστόσο, οι Baxter et al. (2005) διαπίστωσαν ότι η οσμή και η γεύση του χυμού που υπέστη υπερυψηλή πίεση, ήταν αποδεκτή από τους καταναλωτές, μετά από αποθήκευση για 12 εβδομάδες σε θερμοκρασίες έως και 10 °C. Οι Polydera et al. (2003, 2005a) διαπίστωσαν ότι η εφαρμογή υψηλής πίεσης σε χυμούς πορτοκαλιού είχε σαν αποτέλεσμα καλύτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά σε σύγκριση με τη θερμική παστερίωση.

3.4.1 Ανάλυση FTIR λειτουργικού πορτοκαλοχυμού με *Alicyclobacillus acidoterrestris* μετά τη χρήση ΥΠΠ και ΘΕ

Συνολικά αναλύθηκαν 24 δείγματα χυμών πορτοκαλιού (2 διαφορετικές παρτίδες), με τριπλή επανάληψη στο κάθε δείγμα, με τη φασματοσκοπία FTIR, κατά τη διάρκεια της συντήρησης στους 4 ºC. Τυπικά φασματικά δεδομένα FTIR συλλέχθηκαν στην περιοχή 870-4000 cm^{-1} και ενδεικτικά παρουσιάζονται στο διάγραμμα 3.4.1.1 τα δείγματα χυμών πορτοκαλιού α) με τον αλλοιογόνο μικροοργανισμό *A. acidoterrestris* σε χυμό χωρίς (μάρτυρας) επεξεργασία, με θερμική επεξεργασία και με ΥΥΠ, και β) με το προβιοτικό στέλεχος *Lb. pentosus* E104, με τον αλλοιογόνο μικροοργανισμό *A. acidoterrestris* και με τον συνδυασμό αυτών, στην αρχή και στο τέλος της συντήρησης στους 4 ºC. Παρά τις όποιες εμφανείς ομοιότητες, τα φάσματα που ελήφθησαν για κάθε αναλυθέν δείγμα είναι μοναδικά και χαρακτηρίζονται από συγκεκριμένες διαφορές, μη εμφανείς οπτικά στις περισσότερες περιπτώσεις που καθιστούν δυνατή τη σύγκριση των αποτελεσμάτων. Οι κύριες περιοχές συχνοτήτων αλλά και οι κορυφές που παρατηρήθηκαν στα αντιπροσωπευτικά φάσματα FTIR που συλλέχθηκαν, καθώς και η πιθανή αντιστοίχιση / ταυτοποίησή τους με ουσίες / χαρακτηριστικές ομάδες ουσιών, είναι ίδιες με αυτές των χυμών πορτοκαλιού με τα έντεκα (11) προβιοτικά στελέχη και παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.3.1.1 του προηγούμενου υποκεφαλαίου.





Διάγραμμα 3.4.1.1 Τυπικά φασματογραφήματα στους κυματαριθμούς 870-4000 cm^{-1} δειγμάτων χυμού πορτοκάλι α) με τον αλλοιογόνο μικροοργανισμό *Alicyclobacillus acidoterrestris* σε κανονικό (*CA*), πιεσμένο (*PA*) και θερμασμένο χυμό (*HA*), και β) με το προβιοτικό στέλεχος *Lb. pentosus* E104 (*CP*), με τον αλλοιογόνο μικροοργανισμό *Alicyclobacillus acidoterrestris* (*CA*) και με τον συνδυασμό αυτών (*CF*), στην αρχή ($0^{η}$ ημέρα) και στο τέλος ($22^{η}$ ημέρα) της συντήρησης στους 4 ºC.

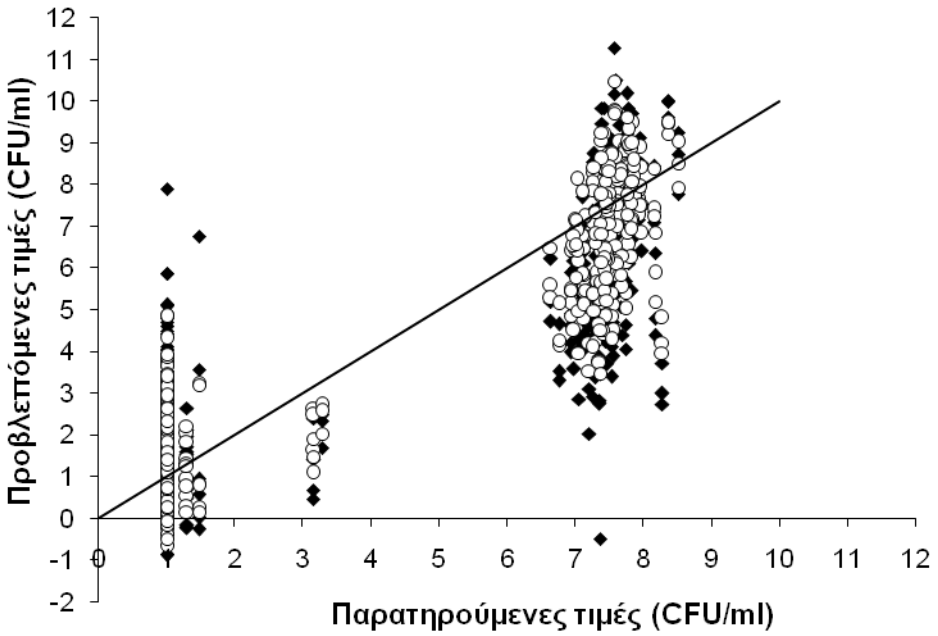
3.4.1.1 Συσχέτιση των μικροβιολογικών και φυσικοχημικών δεδομένων με τα φασματικά δεδομένα του λειτουργικού πορτοκαλοχυμού με *Alicyclobacillus acidoterrestris* μετά τη χρήση ΥΠΠ και ΘΕ

Στη συνέχεια, έγινε προσπάθεια συσχέτισης των φασματικών δεδομένων με τα μικροβιολογικά δεδομένα των διαφόρων ομάδων μικροοργανισμών που μελετήθηκαν στα δείγματα χυμού πορτοκαλιού με το προβιοτικό στέλεχος σε συνδυασμό με ή χωρίς τον αλλοιογόνο μικροοργανισμό *A. acidoterrestris*, με παράλληλη εφαρμογή ΥΥΠ / ΘΕ, άλλα και με τα φυσικοχημικά δεδομένα που λήφθηκαν παράλληλα με τις μικροβιολογικές αναλύσεις. Ο αριθμός των λανθανουσών μεταβλητών και οι δείκτες επίδοσης κατά την επικύρωση του μοντέλου παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.4.2. Ο δείκτης προκατάληψης (bias factor, B_f) για όλες τις μικροβιολογικές και φυσικοχημικές ομάδες που εξετάστηκαν ήταν κοντά στην τιμή 1, εκτός από τα οξυγαλακτικά βακτήρια. Πιο συγκεκριμένα έλαβε τιμή 1,116, 11,437, 1,008, 1,006 και 1,000 για την ΟΜΧ, τα οξυγαλακτικά βακτήρια, τα *Alicyclobacillus* spp., τα σπόρια των *Alicyclobacillus* spp. και το pH, αντίστοιχα. Αυτό δείχνει ότι τα μοντέλα δεν παρουσίασαν συστηματική, υπο- ή υπερ- εκτίμηση, των φυσικοχημικών δεδομένων, με εξαίρεση τα οξυγαλακτικά βακτήρια όπου το μοντέλο δε είχε καλή προσαρμογή. Επιπλέον, με βάση τις τιμές του συντελεστή ακρίβειας (accuracy factor, A_f), φαίνεται πως η μέση απόκλιση μεταξύ των προβλέψεων και των παρατηρήσεων ήταν κοντά στο ένα για το pH (1,014), αποδεικνύοντας ότι οι προβλέψεις ήταν πολύ κοντά στις παρατηρήσεις. Λίγο υψηλότερη του ενός παρατηρήθηκε για την ΟΜΧ, τα *Alicyclobacillus* spp. και τα σπόρια τους (1,658, 1,368 και 1,395 αντίστοιχα) και αρκετά πιο υψηλή βρέθηκε για τα οξυγαλακτικά βακτήρια (14,565). Παρατηρείται ότι όσο απομακρύνεται η τιμή από το ένα, τόσο λιγότερο ακριβής είναι η μέση εκτίμηση. Οι δείκτες RMSE πήραν τιμές 1,793, 2,092, 0,990, 1,070 και 0,062, ενώ οι συντελεστές R^2 ήταν 0,691, 0,698, 0,903, 0,885 και 0,466, για την ΟΜΧ, τα οξυγαλακτικά βακτήρια, τα *Alicyclobacillus* spp., τα σπόρια των *Alicyclobacillus* spp. και το pH, αντίστοιχα. Γενικά, τα αποτελέσματα δεν ήταν σε όλες τις περιπτώσεις ικανοποιητικά, διότι παρουσίαζαν αποκλίσεις μεταξύ των παρατηρούμενων και των προβλεπόμενων τιμών, συνεπώς τα μοντέλα δεν είχαν καλή προσαρμογή στα πειραματικά δεδομένα. Πιο συγκεκριμένα, το μοντέλο στα οξυγαλακτικά βακτήρια εμφάνισε την πιο χαμηλή απόδοση και αυτό ίσως να οφείλεται στους διαφορετικούς χειρισμούς των χυμών (ΥΥΠ / ΘΕ), οι οποίοι

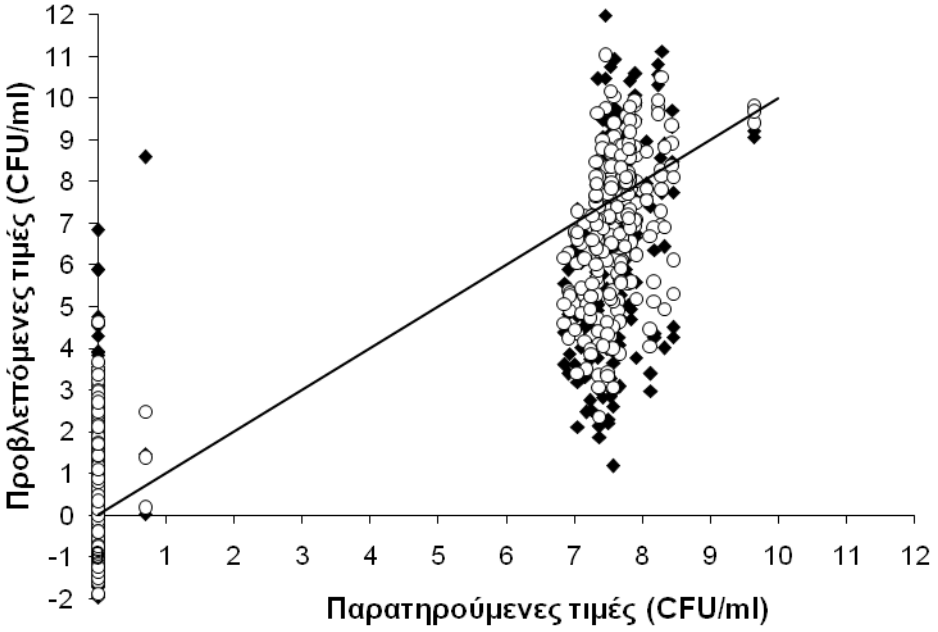
καθιστούσαν διαφορετικό το υπόστρωμα που είχαν διαθέσιμο να μεταβολίσουν τα οξυγαλακτικά βακτήρια. Έτσι, παρ' όλο που το χημικό αποτύπωμα των χυμών ήταν διαφορετικό μετά από κάθε χειρισμό και διαφοροποιήθηκε περαιτέρω λόγω του μεταβολισμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων, ο πληθυσμός τους ήταν ίδιος σε όλες τις περιπτώσεις των χειρισμών αφού προστέθηκαν στον χυμό μετά την ΘΕ ή την ΥΥΠ και παρέμεινε σταθερός τους ίδιους πληθυσμούς. Επομένως, το μοντέλο 'εκπαιδεύτηκε' ώστε να προβλέπει ίδιους αριθμούς με διαφορετικό χημικό αποτύπωμα, καθιστώντας δύσκολη την πρόβλεψη του πληθυσμού των οξυγαλακτικών με ακρίβεια. Επίσης, πρέπει να τονιστεί ότι σε όλα τα μοντέλα πρόβλεψης, όλων των ομάδων μικροοργανισμών, υπήρχε μεγάλη απόκλιση στην πρόβλεψη των τιμών εκείνων που ήταν 0 ή 1 log CFU/ml. Τα αντίστοιχα αποτελέσματα παρουσιάζονται γραφικά στα διαγράμματα 3.4.2.1 έως 3.4.2.6, όπου απεικονίζεται η σύγκριση μεταξύ προβλέψεων και πραγματικών παρατηρήσεων σε log CFU/ml.

Πίνακας 3.4.1.1.1 Δείκτες επίδοσης κατά την επικύρωση των μοντέλων PLS-R FTIR που λήφθηκαν από τα δείγματα πορτοκαλοχυμού με όλους τους διαφορετικούς χειρισμούς (με την προσθήκη ή όχι των *A. acidoterrestris* και *Lb. pentosus* E104, χωρίς επεξεργασία ή μετά την εφαρμογή ΥΠΠ και ΘΕ) κατά τη συντήρηση στους 4 ºC.

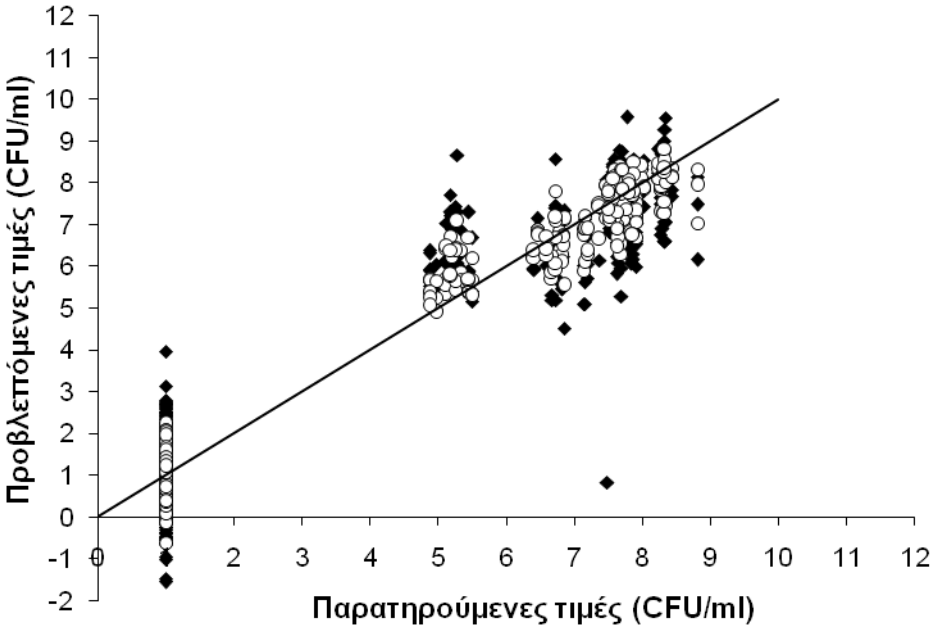
	Αριθμός λανθανουσών μεταβλητών	**Bias factor (B_f)**	**Accuracy factor (A_f)**	**RMSE**	**R^2**
ΟΜΧ	15	1,116	1,658	1,793	0,691
Οξυγαλακτικά βακτήρια	15	11,437	14,565	2,092	0,698
***Alicyclobacillus* spp.**	23	1,008	1,368	0,990	0,903
***Alicyclobacillus* spp. (σπόρια)**	23	1,006	1,395	1,070	0,885
pH	8	1,000	1,014	0,062	0,466



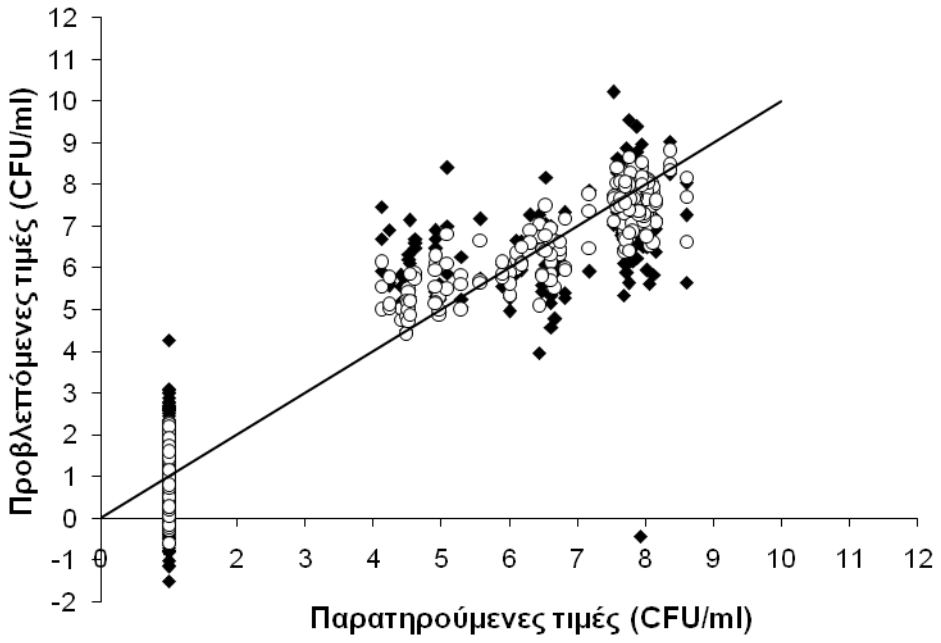
Διάγραμμα 3.4.1.1.1 Σύγκριση μεταξύ των παρατηρούμενων και προβλεπόμενων τιμών της ΟΜΧ από το μοντέλο παλινδρόμησης PLS FTIR που λήφθηκαν από τα δείγματα πορτοκαλοχυμού με όλους τους διαφορετικούς χειρισμούς (με την προσθήκη του *A. acidoterrestris* και *Lb. pentosus* E104, χωρίς επεξεργασία ή μετά την εφαρμογή ΥΠΠ και ΘΕ) κατά τη συντήρηση στους 4 ºC (○: δεδομένα εκπαίδευσης, ♦: δεδομένα επικύρωσης).



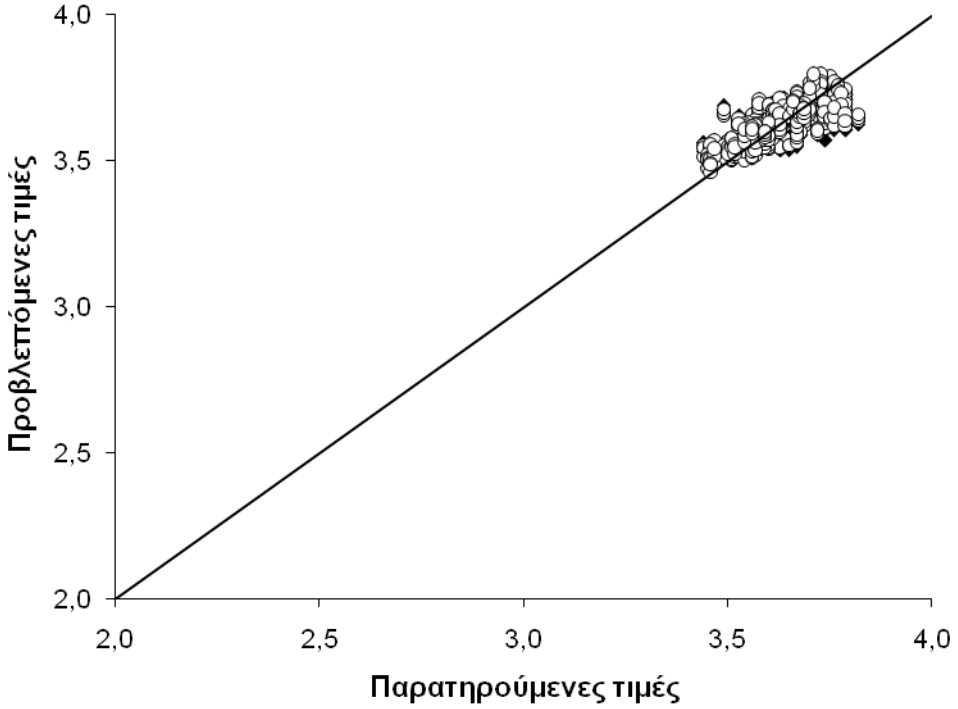
Διάγραμμα 3.4.1.1.2 Σύγκριση μεταξύ των παρατηρούμενων και προβλεπόμενων τιμών των οξυγαλακτικών βακτηρίων από το μοντέλο παλινδρόμησης PLS FTIR που λήφθηκαν από τα δείγματα πορτοκαλοχυμού με όλους τους διαφορετικούς χειρισμούς (με την προσθήκη του *A. acidoterrestris* και *Lb. pentosus* E104, χωρίς επεξεργασία ή μετά την εφαρμογή ΥΠΠ και ΘΕ) κατά τη συντήρηση στους 4 ºC (○: δεδομένα εκπαίδευσης, ♦: δεδομένα επικύρωσης).



Διάγραμμα 3.4.1.1.3 Σύγκριση μεταξύ των παρατηρούμενων και προβλεπόμενων τιμών του *Alicyclobacillus* spp. από το μοντέλο παλινδρόμησης PLS FTIR που λήφθηκαν από τα δείγματα πορτοκαλοχυμού με όλους τους διαφορετικούς χειρισμούς (με την προσθήκη του *A. acidoterrestris* και *Lb. pentosus* E104, χωρίς επεξεργασία ή μετά την εφαρμογή ΥΠΠ και ΘΕ) κατά τη συντήρηση στους 4 ºC (○: δεδομένα εκπαίδευσης, ♦: δεδομένα επικύρωσης).



Διάγραμμα 3.4.1.1.4 Σύγκριση μεταξύ των παρατηρούμενων και προβλεπόμενων τιμών των σπορίων του *Alicyclobacillus* spp. από το μοντέλο παλινδρόμησης PLS FTIR που λήφθηκαν από τα δείγματα πορτοκαλοχυμού με όλους τους διαφορετικούς χειρισμούς (με την προσθήκη του *A. acidoterrestris* και *Lb. pentosus* E104, χωρίς επεξεργασία ή μετά την εφαρμογή ΥΠΠ και ΘΕ) κατά τη συντήρηση στους 4 ºC (○: δεδομένα εκπαίδευσης, ♦: δεδομένα επικύρωσης).



Διάγραμμα 3.4.1.1.5 Σύγκριση μεταξύ των παρατηρούμενων και προβλεπόμενων τιμών του pH από το μοντέλο παλινδρόμησης PLS FTIR που λήφθηκαν από τα δείγματα πορτοκαλοχυμού με όλους τους διαφορετικούς χειρισμούς (με την προσθήκη του *A. acidoterrestris* και *Lb. pentosus* E104, χωρίς επεξεργασία ή μετά την εφαρμογή ΥΠΠ και ΘΕ) κατά τη συντήρηση στους 4 ºC (○: δεδομένα εκπαίδευσης, ♦: δεδομένα επικύρωσης).

3.4.1.2 Εκτίμηση βαθμολογίας οργανοληπτικής αξιολόγησης λειτουργικού πορτοκαλοχυμού με *Alicyclobacillus acidoterrestris* μετά τη χρήση ΥΠΠ και ΘΕ

Τα αποτελέσματα των μοντέλων της οργανοληπτικής αξιολόγησης παρουσιάζονται σε πίνακες διπλής εισόδου (Πίνακας 3.4.1.2.1α και 3.4.1.2.1β). Στον πίνακα 3.4.1.2.1α φαίνεται η ταξινόμηση των δειγμάτων σε εννιά κατηγορίες, από το μη αποδεκτό(1) έως και το άριστο (5). Οι μεταβλητές που χρησιμοποιήθηκαν ως δεδομένα εισόδου του μοντέλου, έδωσαν ακρίβεια (ευαισθησία) πρόβλεψης στα δεδομένα επικύρωσης του μοντέλου 32,96%. Συγκεκριμένα, κατά την επικύρωση του μοντέλου, η ανάλυση PLS έδωσε 46,03% σωστές προβλέψεις για τα δείγματα που είχαν χαρακτηριστεί ως «Μη αποδεκτά», 20,83% για τα «Αποδεκτά», 16,67% για τα «Μέτρια», 22,22% για τα «Καλά» και 40,48% για τα «Άριστα» δείγματα, αντίστοιχα. Η εξειδίκευση που παρουσίασε το μοντέλο κατά την επικύρωση ήταν 91,07% , 10,81%, 20,59% 14,08% και 92,55% για τις κατηγορίες «Άριστο», «Καλό», «Μέτριο», «Αποδεκτό» και «Μη αποδεκτό», αντίστοιχα (Πίνακας 3.4.1.2.1α).

Στον Πίνακα 3.4.1.2.1β, φαίνεται η ταξινόμηση των δειγμάτων σε τρεις κατηγορίες, οι οποίες είναι: «Άριστο-Καλό» (με βαθμολογίες $3,5 \leq x \leq 5$), «Μέτριο-Αποδεκτό» (με βαθμολογίες $2 \leq x < 3,5$) και «Μη αποδεκτό» (με βαθμολογίες $1 \leq x < 2$). Οι μεταβλητές που χρησιμοποιήθηκαν ως δεδομένα εισόδου του μοντέλου, έδωσαν ακρίβεια (ευαισθησία) πρόβλεψης στα δεδομένα επικύρωσης του μοντέλου 68,34%. Συγκεκριμένα, κατά την επικύρωση του μοντέλου, η ανάλυση PLS έδωσε 73,68% σωστές προβλέψεις για τα δείγματα που είχαν χαρακτηριστεί ως «Άριστα-Καλά», 50,88% για τα δείγματα που είχαν χαρακτηριστεί ως «Μέτρια-Αποδεκτά» και 72,31% για τα δείγματα που είχαν χαρακτηριστεί ως «Μη αποδεκτά». Η εξειδίκευση που παρουσίασε το μοντέλο κατά την επικύρωση ήταν 87,96%, 35,58%, και 77,05% για τις κατηγορίες «Άριστο-Καλό», «Μέτριο-Αποδεκτό» και «Μη αποδεκτό», αντίστοιχα. Πρέπει να τονιστεί πως η πλειοψηφία των μη αποδεκτών δειγμάτων δεν χαρακτηρίστηκε ως «Άριστο-Καλό» (μόνο 3 από τα 195 «Μη αποδεκτά»

εκτιμήθηκαν ως «Άριστα-Καλά») και πως η πλειοψηφία των «Άριστων-Καλών» δειγμάτων δεν χαρακτηρίστηκε ως «Μη αποδεκτά» (μόνο 6 από τα 228 «Άριστα-Καλά» εκτιμήθηκαν ως «Μη αποδεκτά»).

Πίνακας 3.4.1.2.1α: Πίνακας διπλής εισόδου διασταυρούμενης επικύρωσης από το μοντέλο παλινδρόμησης PLS FTIR που λήφθηκαν από τα δείγματα πορτοκαλοχυμού με όλους τους διαφορετικούς χειρισμούς (με την προσθήκη του *A. acidoterrestris* και *Lb. pentosus* E104, χωρίς επεξεργασία ή μετά την εφαρμογή ΥΠΠ και ΘΕ) κατά τη συντήρηση στους 4 ºC (δεδομένα επικύρωσης) (Μη αποδεκτό=1, Αποδεκτό=2, Μέτριο=3, Καλό=4, Άριστο=5).

		Προβλεπόμενη Τάξη Δεδομένα επικύρωσης									
Πραγματική Τάξη	**Σύνολο**	**5**	**4,5**	**4**	**3,5**	**3**	**2,5**	**2**	**1,5**	**1**	**Ευαισθησία (%)**
5	126	51	34	29	8	3	0	0	0	1	40,48
4,5	18	0	0	6	3	4	4	1	0	0	0,00
4	36	2	7	8	6	4	6	3	0	0	22,22
3,5	48	2	4	15	7	8	6	5	1	0	14,58
3	42	1	1	13	12	7	4	2	1	1	16,67
2,5	24	0	0	0	1	2	6	9	5	1	25,00
2	48	0	0	0	6	6	13	10	9	4	20,83
1,5	6	0	0	0	0	0	2	4	0	0	0,00
1	189	0	0	3	2	13	13	37	34	87	46,03
Σύνολο	537	56	46	74	45	34	54	71	50	94	32,96
Εξειδίκευση (%)		91,07	0,00	10,81	15,56	20,59	11,11	14,08	0,00	92,55	

Πίνακας 3.4.1.2.1β: Πίνακας διπλής εισόδου διασταυρούμενης επικύρωσης από το μοντέλο παλινδρόμησης PLS FTIR που λήφθηκαν από τα δείγματα πορτοκαλοχυμού με όλους τους διαφορετικούς χειρισμούς (με την προσθήκη του *A. acidoterrestris* και *Lb. pentosus* E104, χωρίς επεξεργασία ή μετά την εφαρμογή ΥΠΠ και ΘΕ) κατά τη συντήρηση στους 4 ºC (δεδομένα επικύρωσης) («Άριστο-Καλό» $3,5 \leq x \leq 5$, «Μέτριο-Αποδεκτό» $2 \leq x < 3,5$ και «Μη αποδεκτό» $1 \leq x < 2$).

		Προβλεπόμενη Τάξη Δεδομένα επικύρωσης			
Πραγματική Τάξη	**Σύνολο**	**Άριστο-Καλό**	**Μέτριο-Αποδεκτό**	**Μη αποδεκτό**	**Ευαισθησία (%)**
Άριστο-Καλό	228	168	54	6	73,68
Μέτριο-Αποδεκτό	114	20	58	36	50,88

Μη αποδεκτό	195	3	51	141	72,31
Σύνολο	537	191	163	183	68,34
Εξειδίκευση (%)		87,96	35,58	77,05	

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Με βάση τα αποτελέσματα των μικροβιολογικών αναλύσεων, τα δείγματα χυμών ροδάκινου βρέθηκαν κάτω από το όριο ανίχνευσης με εξαίρεση τους χυμούς H6 και P5 (2,00 log CFU/ml), A1 (2,60 log CFU/ml) και L2 (4,28 log CFU/ml) για την ΟΜΧ, τον χυμό L2 (1,30 log CFU/ml) για τα οξυγαλακτικά βακτήρια και τους B2 (1,30 log CFU/ml), B3 (2,00 log CFU/ml) και G2 (3,86 log CFU/ml) για τις ζύμες / μύκητες, αντίστοιχα. Οι χυμοί (ροδάκινο και πορτοκάλι) με τα προβιοτικά παρουσίασαν γενικά μικρότερες τιμές pH σε σχέση με τους μάρτυρες. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια με προβιοτικό δυναμικό (*Lb. plantarum* B282, *Lb. plantarum* E10, *Lb. plantarum* E69, *Lb. pentosus* B281, *Lb. pentosus* E108, *Lb. pentosus* E97, *Lb. pentosus* E104, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* E93, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* E94, *Lb. casei* Shirota και *Lb. ramnosus* GG) κατάφεραν να επιβιώσουν για τουλάχιστον μια εβδομάδα. Οι χυμοί πορτοκαλιού με το χαμηλό εμβόλιο (10^7) όμως, παρουσίασαν καλύτερες τιμές στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους, σε σχέση με τους χυμούς με το υψηλό εμβόλιο (10^8), με τον *Lb. pentosus* E104 να προσδίδει παράλληλα τα πιο επιθυμητά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (γεύση, άρωμα) και μεγαλύτερο χρόνο ζωής.

Επιπλέον, ελέγχθηκε η απενεργοποίηση του *A. acidoterrestris* με την χρήση ΥΠΠ και ΘΕ και βρέθηκε ότι με την εφαρμογή της ΥΥΠ σημειώθηκε πτώση της τάξης των 2,00 log στα *Alicyclobacillus* spp. Αντίθετα, η ΘΕ δε φάνηκε να επηρεάζει τους συνολικούς πληθυσμούς του *Alicyclobacillus* spp. και των σπορίων του, τόσο στην αρχή, όσο και κατά τη διάρκεια της συντήρησης των χυμών πορτοκαλιού (21 ημέρες).

Επίσης, παρατηρήθηκε ότι τα δείγματα των χυμών με τον αλλοιογόνο μικροοργανισμό *A. acidoterrestris* παρουσίασαν μια μικρή τάση αύξησης στην τιμή του pH όσο αυξάνονταν οι ημέρες της συντήρησης, σε αντίθεση με τους χυμούς που εμβολιάστηκαν με το στέλεχος *Lb. pentosus* E104, όπου εκεί παρατηρήθηκε μικρή πτώση έως και την $21^η$ ημέρα της συντήρησης.

Σύμφωνα με την οργανοληπτική ανάλυση, τα δείγματα χυμών με το στέλεχος *Lb. pentosus* E104 ήταν αποδεκτά για οκτώ (8) ημέρες συντήρησης, και τα δείγματα που περιείχαν και τα δύο στελέχη για δέκα (10) ημέρες σε όλους τους χειρισμούς. Οι χυμοί με τον *A. acidoterrestris* ήταν αποδεκτοί για 12 ημέρες, ενώ τα δείγματα χυμών με τον *A. acidoterrestris* που υπέστησαν επεξεργασία με ΥΥΠ ήταν αποδεκτοί για 18 ημέρες. Έτσι, συμπεραίνεται ότι ο μεγαλύτερος χρόνος ζωής των χυμών που εμβολιάστηκαν και με τα 2 στελέχη σε σύγκριση με τα δείγματα που εμβολιάστηκαν με το προβιοτικό στέλεχος E104, είναι πιθανό να οφείλεται σε ανταγωνιστική δράση μεταξύ τους.

Όσον αφορά την ταχεία μέθοδο ανάλυσης FTIR, φάνηκε να είναι μια υποσχόμενη μέθοδος για την ποσοτική και ποιοτική ανάλυση των χυμών φρούτων, παρ' όλο που τα αποτελέσματα της ανάλυσης δεν ήταν σε όλες τις περιπτώσεις τόσο ικανοποιητικά. Γι' αυτό, μια μελλοντική τάση θα ήταν η χρήση περισσότερων δειγμάτων χυμού στην ανάλυση, καθώς και η δημιουργία μοντέλων για κάθε χειρισμό ή / και μικροοργανισμό ξεχωριστά, και για διαφορετικά μήκη κύματος. Η χρήση μη συμβατικών προσεγγίσεων για τη μείωση της αλλοίωσης από τον *Alicyclobacillus*, θα μπορούσε να θεωρηθεί ως ένας πολλά υποσχόμενος τρόπος επεξεργασίας για τη βιομηχανία χυμών. Ωστόσο, σύμφωνα με την βιβλιογραφία, τα δεδομένα αναφέρονται σε εργαστηριακά μέσα ή / και σε πειράματα που εκτελούνται σε εργαστηριακή κλίμακα. Μια πρόταση για μελλοντική έρευνα θα ήταν η αύξηση αυτών των αποτελεσμάτων στο επίπεδο της βιομηχανίας, προκειμένου να εξακριβωθεί εάν οι προτεινόμενες προσεγγίσεις θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν με επιτυχία σε πραγματικά συστήματα και συνθήκες.

Επιπλέον, η χρήση των προβιοτικών στα τρόφιμα είναι ένας σημαντικό και νέο κομμάτι για την έρευνα και τη βιομηχανία. Ως εκ τούτου, η επιστήμη θα πρέπει να επικεντρωθεί στην αξιολόγηση νέων προβιοτικών στελεχών και στην εφαρμογή τους στα τρόφιμα, όπως και σε μη γαλακτοκομικά προϊόντα, για να καλύπτονται όλες οι ομάδες καταναλωτών (π.χ. άτομα με δυσανεξία στη λακτόζη κλπ.). Επίσης, απαιτείται έρευνα σε νέες μεθόδους ενσωμάτωσης των προβιοτικών στα τρόφιμα, όπως και στην ήδη υπάρχουσα μέθοδο της μικροενθυλάκωσης. Επιπλέον, θα πρέπει να ερευνηθούν και νέες τεχνολογίες, όπως η προσθήκη συστατικών τροφίμων που προάγουν την ανάπτυξη, τα υλικά συσκευασίας φραγμού οξυγόνου, τα αντιοξειδωτικά και η τροποποίηση του περιβάλλοντος αποθήκευσης για την καλύτερη επιβίωση των μικροοργανισμών. Έτσι, τα προβιοτικά θα ερευνηθούν και θα

αξιοποιηθούν, με στόχο την παραγωγή νέων λειτουργικών τροφίμων υψηλής θρεπτικής αξίας και τη βελτίωση της ανθρώπινης υγείας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

5.1 Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία

Adhikari K., Mustapha A., Grun I.U., Fernando L. (2000) Viability of microencapsulated bifidobacteria in set yoghurt during refrigerated storage, Journal of Dairy Science, 83, pp. 1946-51.

Adiani V., Gupta S., Ambolikar R., Variyar P.S. (2018) Development of rapid method to assess microbial quality of minimally processed pomegranate arils using FTIR, Sensors and Actuators B: Chemical, Volume 260, pp. 800-807.

Al-Holy M.A., Lin M., Alhaj O.A., Abu-Goush M.H. (2015) Discrimination between Bacillus and Alicyclobacillus isolates in apple juice by fourier transform infrared spectroscopy and multivariate analysis. Journal of Food Science, 80, pp. M399-M404.

Al-Holy M.A., Lin M., Cavinato A.G., Rasco B.A. (2006) The use of Fourier transform infrared spectroscopy to differentiate Escherichia coli O157:H7 from other bacteria inoculated into apple juice. Food Microbiology, 23, pp. 162-168.

Alpas H., Alma L., Bozoglu F. (2003) Inactivation of Alicyclobacillus acidoterrestris vegetative cells in model system, apple, orange and tomato juices by high hydrostatic pressure. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 19, pp. 619-623.

Al-Qadiri H.M., Lin M., Cavinato A.G., Rasco B.A. (2006) Fourier transform infrared spectroscopy, detection and identification of Escherichia coliO157:H7 and Alicyclobacillus strains in apple juice. International Journal of Food Microbiology, 111, pp. 73-80.

Argyri A.A., Panagou E.Z., Tarantilis P.A., Polysiou M., Nychas G.J.E. (2010) Rapid qualitative and quantitative detection of beef fillets spoilage based on Fourier transform infrared spectroscopy data and artificial neural networks, Sensors and Actuators B-Chem., 145, pp. 146-154.

Argyri A.A., Zoumpopoulou G., Karatzas K.A.G., Tsakalidou E., Nychas G.J.E., Panagou E.Z., Tassou C.C. (2013) Selection of potential probiotic lactic acid

bacteria from fermented olives by in vitro tests. Food Microbiology, 33 (2), pp. 282-291.

Bahçeci K.S., Gökmen V., Serpen A., Acar J. (2003) The effects of different technologies on Alicyclobacillus acidoterrestris during apple juice production, European Food Research and Technology, 217, pp. 249-252.

Basak S., Ramaswamy H.S., Piette J.P.G. (2002) High pressure destruction kinetics of Leuconostoc mesenteroides and Saccharomyces cerevisiae in single strength and concentrated orange juice. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 3(3), pp. 223-231.

Baumgart J., Menje S. (2000) The role of acidoterrestris on the quality of juices and soft drinks. Fruit Process, 7, pp. 251-254.

Baxter I.A., Easton K., Schneebeli K., Whitfield F.B. (2005) High pressure processing of Australian Navel orange juices: Sensory analysis and volatile flavor profiling, Innovative Food Science Emerging Technologies, 6, pp. 372-387.

Beekes M, Lasch P, Naumann D. (2007) Analytical applications of Fourier transform-infrared (FT-IR) spectroscopy in microbiology and prion research, Veterinary Microbiology 123(4), pp. 305-19.

Bevilacqua A., Corbo M.R., Sinigaglia M. (2008) Inhibition of acidoterrestris spores by natural compounds. International Journal of Food Science Technology, 43, pp. 1271–5.

Bevilacqua A., Campaniello D., Speranza B., Sinigaglia M., Corbo M. R. (2013) Control of Alicyclobacillus acidoterrestris in apple juice by citrus extracts and mild heat-treatment, Food Control, 31, pp. 553-559.

Bevilacqua A., Sinigaglia M., Corbo M. R. (2008) Alicyclobacillus acidoterrestris: New methods for inhibiting spore germination, International Journal Food Microbiology, 125, pp. 103-110.

Bicas J.L., Molina G., Dionísio A.P., Barros F.F.C., Wagner R., Maróstica M.R., Pastore G.M. (2011) Volatile constituents of exotic fruits from Brazil. Food Research International., 44, pp. 1843–1855.

Black E.P., Setlow P., Hocking A.D., Stewart C.M., Kelly A.L., Hoover D.G. (2007) Response of Spores to High-Pressure Processing,. Food Science and Food Safety, 6, pp. 103-119.

Bocker U., Ofstad R., Wu Z., Bertram H.C., Sockalingum G.D., Manfait M., Egelandsdal B., Kohler A. (2007) Revealing covariance structures in Fourier transform infrared and Raman microspectroscopy spectra: a study on pork muscle fiber tissue subjected to different processing parameters, Applied Spectrometry, 61, pp. 1032-1039.

Boziaris I.S. (2014) Novel Food Preservation and Microbial Assessment Technique. CRC Press, Taylor & Francis Group. Boca Raton, Florida, USA, chapter 14, pp. 386-422.

Braddock R.J. (1999) Single strength orange juices and concentrate J. Wiley (Ed.), "Handbook of Citrus by-Products and Processing Technology", John Wiley & Sons, New York, pp. 53-83.

Butz P., Tauscher B. (2002) Emerging technologies: Chemical aspects, Food Research International, 35, pp. 279-284.

Buzrul S., Alpas H., Bozoglu F. (2005) Use of Weibull frequency distribution model to describe the inactivation of Alicyclobacillus acidoterrestris by high pressure at different temperatures. Food Research International, 38, pp. 151-157.

Cerny G., Hennlich W., Poralla K. (1984) Spoilage of fruit juice by bacilli: isolation and characterization of the spoiling microorganism. Zeitschrift feur Lebensmittel Untersuchung und Forsuchung, 179, pp. 224–227.

Chandramouli V., Kailaspathy K., Peiris P., Jones M. (2004) An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect Lactobacillus spp. in simulated gastric conditions, Journal of Microbiological Methods, 56, pp. 27-35.

Chang S.S. (2003) Optimization of *Alicyclobacillus* spp. isolation procedures, Pullman, WA: Washington State University.

Chang S.S., Kang D.H. (2004) *Alicyclobacillus spp*. in the fruit juice industry: history, characteristics, and current isolation/detection procedures, Critical Reviews in Microbiology, 30, pp. 55-74.

Chen M., Irudayaraj J., McMahon D.J. (1998) Examination of full fat and reduced fat cheddar cheese during ripening by Fourier Transform Infrared Spectroscopy, Journal of Dairy Science, 81, pp. 2791-2797.

Chen M.C., Lord R.C. (1974) Journal of the American Chemical Society, 96, pp. 4750.

Chen Y.S., Wu H.C., Lo H.Y., Yanagida F. (2012) Isolation and characterisation of lactic acid bacteria from jiang-gua (fermented cucumbers), a traditional fermented food in Taiwan. Journal of the Science of Food and Agriculture, 92 (10), pp. 2069-2075.

Choo-Smith L.P., Maquelin K., Vreeswijk T.V., Bruining H.A., Puppels G.J., Ngo Thi N.A., Krischner C., Naumann D., Ami D., Villa A.M., Orsini F., Doglia S.M., Lamfarraj H., Sockalingum G.D., Manfait M., Allouch P., Endtz H.P. (2001) Investigating microbial (micro)colony heterogeneity by vibrational spectroscopy. Applied and Environmental Microbiology, 67, pp. 1461 – 1469.

Coskun F. (2017) A traditional Turkish fermented non-alcoholic grape-based beverage, “Hardaliye”, Beverages, 3 (1), 2; doi:10.3390/beverages3010002.

Cui J.H., Goh J.S., Dim P.H., Choi S.H., Lee B.J. (2000) Survival and stability of bifidobacteria loaded in alginate poly-l-lysine microparticles, International Journal of Pharmaceutics, 210, pp. 51-9.

Danyluk M.D., Friedrich L.M., Jouquand C., Goodrich-Schneider R., Parish M.E., Rouseff R. (2011) Prevalence, concentration, spoilage, and mitigation of Alicyclobacillus spp. in tropical and subtropical fruit juice concentrates. Food Microbiology, 28, pp. 472-477.

Del Caro A., Piga A., Vacca V., Agabbio M. (2004) Changes of flavonoids, vitamin C and antioxidant capacity in minimally processed citrus segments and juices during storage, Food Chemistry, 84, pp. 99-105.

Deng Y., Misselwitz B., Dai N., Fox M. (2015) Lactose intolerance in adults: biological mechanism and dietary management. Nutrients, 7 (9), pp. 8020-8035.

Ding W. K. & Shah N. P. (2008) Survival of Free and Microencapsulated Probiotic Bacteria in Orange and Apple Juices, International Food Research Journal, chapter 15 (2), pp. 219-232.

Duarte I.F., Barros A.N., Delgadillo I., Almeida C.U., Gil A.M. (2002) Application of FTIR Spectroscopy for the quantification of sugars in mango juice as a function of ripening, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50, pp. 3104-3111.

Durak M.Z., Churey J.J., Danyluk M.D., Worobo R.W. (2010) Identification and haplotype distribution of Alicyclobacillus spp. from different juices and beverages. International Journal of Food Microbiology, 142, pp. 286-291.

Ellis D.I., Broadhurst D., Kell D.B., Rolwland J.J., Goodacre R. (2002) Rapid and quantitative detection of the microbial spoilage of meat by Fourier transform infrared spectroscopy and machine learning. Applied and Environmental Microbiology, 68, pp. 2822-2828.

Ellis D.I., Broadhurst D.I., Goodacre R. (2004) Rapid and quantitative detection of the microbial spoilage of beef by Fourier transform infrared spectroscopy and machine learning, Analytica Chimica Acta, 514, pp. 193-201.

Esteve M.J., Frígola A., Rodrigo C., Rodrigo D. (2005) Effect of storage period under variable conditions on the chemical and physical composition and colour of Spanish refrigerated orange juice, Food Chemistry and Toxicology, 43, pp. 1413-1422.

FDA (2001) Hazard analysis and critical control point (HACCP), procedures for the safe and sanitary processing and importing of juice: final rule (21 CFR Part 120) Federal Register, pp. 6137-6202.

Fellows, P.J. (2000) Food processing technology-Principles and practice. 2nd edn. Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, pp. 241-249.

Fiore A., LaFauci L., Cervellati R., Guerra M.C., Speroni E., Costa S., Galvano G., De Lorenzo A., Bacchelli V., Fogliano V., Galvano F. (2005) Antioxidant activity of

pasteurized and sterilized commercial red orange juices, Molecular Nutrition & Food Research, 49, pp. 1129-1135.

Gaudreau H., Champagne C.P., Remondetto G.E., Alvarez P.A., Gomaa A., Subirade M. (2016) Tea extract render probiotic Lactobacillus helveticus more resistant to oxygen exposure through lipid modification mechanism. Food Research International, 81, pp. 141-148.

Goto K., Mochida K., Asahara M., Suzuki M., Kasai H., Yokota A. (2003) Pomorum sp. nov., a novel thermo-acidophilic, endospore-forming bacterium that does not possess ω-alicyclic fatty acids, and emended description of the genus. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 53, pp. 1537–44.

Goto K., Nishibori A., Wasada Y., Furuhata K., Fukuyama M., Hara M. (2008) Identification of thermo-acidophilic bacteria isolated from the soil of several Japanese fruit orchards. Letters in Applied Microbiology, 46, pp. 289–94.

Goto K., Tanimoto Y., Tamura T., Mochida K., Arai D., Asahara M., Suzuki M., Tanaka H., Inagaki K. (2002) Identification of thermoacidophilic bacteria and a new Alicyclobacillus genomic species isolated from acidic environments in Japan. Extremophiles, 6, pp. 333–40.

Granato D., Branco G.F., Nazzaro F., Cruz A.G., Faria J.A. (2010) Functional foods and non dairy probiotic food development: Trends, concepts, and products. Food science and Food Safety, 9 (3), pp. 292-302.

Groenewald W.H., Gouws P.A., Witthuhn R.C. (2009) Isolation, identification and typification of Alicyclobacillus acidoterrestris and Alicyclobacillus acidocaldarius strains from orchard soil and the fruit processing environment in South Africa. Food Microbiology, 26, pp. 71–76.

Güven S., Aksoy M. (2009) Some modifications in hardaliye production, In Traditional Foods Symposium, Abstract Book. Van, Turkey, pp. 675–678.

Homayouni L., Payahoo A., Azizi (2012) Effects of probiotics on lipid profile: A review. American Journal of Food Technology, 7 (5), pp. 251-265.

IFU Method on the Detection of taint producing in Fruit Juices, revision 1, September 2004 (IFU Handbook Microbiological Methods, Method No.12).

IFU Working Group Microbiology: First Standard IFU-Method on the Detection of Alicyclobacillus in Fruit Juices. (April 2003).

Jensen N. (2000) Alicyclobacillus in Australia..Food Australia, 52, pp. 282-285.

Jensen N. (2005) Evaluation of detection methods for Alicyclobacillus in fruit juice concentrates in Australia. In: 14th International Federation of Fruit Juice Producers (IFU) Congress, Beijing, China, 14-18 August 2005.

Kaanane A., Kane D., Labuza T.P. (1988) Time and temperature effect on stability of Moroccan processed orange juice during storage, Journal of Food Science, 53, pp. 1470-1473.

Kailasapathy K. (2005) Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and effect on the sensory properties of yoghurt, Food Science and Technology, 1, pp. 1-2.

Kansiz M., Heraud P., Wood B., Burden F., Beardall J., McNaughton D. (1999) Fourier transform infrared microspectroscopy and chemometrics as a tool for the discrimination of cyanobacterial strains, Phytochemistry, 52, pp. 407-417.

Khatoon N., Gupta R.K. (2015) Probiotics beverages of sweet lime and sugarcane juices and its physiochemical, microbiological & shelf-life studies. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 4 (3), pp. 25-34.

Krimm S., Bandeker, J. (1980) Biopolymers, 19, pp. 1.

Krimm, S. (1962) Journal of Molecular Biology, 4, pp. 528.

Lee K.Y. & Heo T.R. (2000) Survival of Bifidobacterium longum immobilized in calcium alginate beads in simulated gastric juices and bile salt solution. Applied Environmental Microbiology, 66, pp. 869-73.

Lee Y.K. , Salminen S. (2009) Handbook of probiotics and prebiotics, John Wiley & Sons, part 1, pp. 3-135.

Lee S.Y., Chung H.J., Kang D.H. (2006) Combined treatment of high pressure and heat on killing spores of Alicyclobacillus acidoterrestris in apple juice concentrate. Journal of Food Protection, 69, pp. 1056-1060.

Lefier D., Hirst D., Holt C., Williams A.G. (1997) Effect of sampling procedure and strain variation in Listeria monocytogenes on the discrimination of species in the genus Listeria by Fourier transform infrared spectroscopy and canonical variates analysis. FEMS Microbiology Letters, 147, pp. 45-50.

Lin M., Al-Holy M., Chang S., Huang Y., Cavinato A.G., Kang D.H. (2005) Rapid discrimination of Alicyclobacillus strains in apple juice by Fourier transform infrared spectroscopy. International Journal of Food Microbiology, 105, pp. 369-376.

Lin S.F., Schraft J.H., Griffiths M.W. (1998) Identification of Bacillus cereus by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). Journal of Food Protection, 61, pp. 921-923.

Lord R.C. (1977) Applied Spectroscopy, 31, pp. 187.

Lucia V., Daniela B., Rosalba L., (2001) Use of Fourier transform infrared spectroscopy to evaluate the proteolytic activity of Yarrowia lipolytica and its contribution to cheese ripening. International Journal of Food Microbiology, 69, pp. 113-123.

Luckow T., Delahunty C. (2004) Which juice is 'healthier'? A consumer study of probiotic non-dairy juice drinks. Food Quality and Preference, 15 (7), pp. 751-759.

Maldonado M.C., Belfiore C., Navarro A. R. (2008) Temperature, soluble solids and pH effect on Alicyclobacillus acidoterrestris viability in lemon juice concentrate, Journal International Microbiology and Biotechnology, 35 (2), pp. 141-148.

Malganji S., Sohrabvandi S., Jahadi M., Nematollahi A., Sarmadi B. (2015) Effect of refrigerated storage on sensory properties and viability of probiotic in grape drink. Applied Food Biotechnology, 3 (1), pp. 59-62.

Maquelin K., Kirschner C., Choo-Smith L.P., Van Den Braak N., Endtz H.Ph., Naumann D., Puppels G.J. (2002) Identification of medically relevant

microorganisms by vibrational spectroscopy, Journal of Microbiological Methods, 51, pp. 255-271.

Martin-del-Campo S.T., Pícque D., Cosio-Ramírez R., Corrieu G. (2007) Middle infrared spectroscopy characterization of ripening stages of Camembert-type cheeses, International Dairy Journal, 17, pp. 835-845.

Matsubara H., Goto K., Matsumura T., Mochida K., Iwaki M., Niwa M., Yamasato K. (2002) Acidophilus sp., a novel thermo-acidophilic, ω-alicyclic fatty acid-containing bacterium isolated from acidic beverages. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 52, pp. 1681-5.

McIntyre S., Ikawa J.Y., Parkinson N., Haglund J., Lee J. (1995) Characteristics of an acidophilic strain isolated from shelf-stable juices. Journal of Food Protection, 58, pp. 319-321.

Miyazawa T. (1962) In: Polyamino acids, polypeptides and proteins. Ed: Stahmann MA.University Wisconsin Press Madison.

Mohammadi R., Mortazavian A.M., Khosrokhavar R., da Cruz A.G. (2011) Probiotic ice cream: viability of probiotic bacteria and sensory properties. Annals of Microbiology, 61 (3), pp. 411-424.

Montville, T.J. & Matthews, K.R. (2010). Μικροβιολογία Τροφίμων. Κολλιοπούλου, Α. (μτφ.), Σπηλιώτης, Β. (επιμ.), Γιαβάσης, Ι. (επιμ.). Αθήνα: Εκδόσεις ΙΩΝ Σ. Παρίκου & ΣΙΑ Ο.Ε., pp. 135-148.

Moros J., Iñón F. A., Khanmohammadi M., Garrigues S., de la Guardia M. (2006) Evaluation of the application of attenuated total reflectance–Fourier transform infrared spectrometry (ATR–FTIR) and chemometrics to the determination of nutritional parameters of yogurt samples, Analytical Bioanalytical Chemistry, 385, pp. 708-715.

Mousavi Z.E., Mousavi S.M., Razavi S.H., Emam-Djomeh Z., Kiani H. (2011) Fermentation of pomegranate juice by probiotic lactic acid bacteria. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 27(1), pp. 123-8.

Murray M.B., Gurtler J.B., Ryu J., Harrison M.A., Beuchat L.R. (2007) Evaluation of direct plating methods to enumerate Alicyclobacillus in beverages. International Journal of Food Microbiology, 115, pp. 59–69.

Naumann D. (2000) FT-infrared and FT-Raman spectroscopy in biomedical research. Applied Spectroscopy Reviews, 36 (2 & 3), pp. 239-298.

Naumann D. (2000) Infrared Spectroscopy in Microbiology. In: Encyclopedia of Analytical Chemistry. Ed: Meyers, R.A. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, pp. 102–131.

Nicolaou N., Xu Y., Goodacre R. (2011) Fourier transform infrared and Raman spectroscopies for the rapid detection, enumeration, and growth interaction of the bacteria Staphylococcus aureus and Lactococcus lactis ssp. cremoris in milk, Analytical Chemistry, 83, pp. 5681-5687.

Nielsen H., Esaiassen M., Heia K., Sigernes S. (2002) Visible/near infrared spectroscopy: A new tool for evaluation of fish freshness. Journal of food Science. 67, pp. 1821-1826.

Oberreuter H., Brodbeck A., Stetten S.V., Goerges S., Scherer S. (2003) Fourier-transform infrared (FT-IR) spectroscopy is a promising tool for monitoring the population dynamics of microorganisms in food stuff. European Food Research and Technology, 216, pp. 434-439.

Oberreuter H., Mertens F., Seiler H., Scherer S. (2000) Quantification of micro-organisms in binary mixed populations by Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy. Letters in Applied Microbiology, 30, pp. 85-89.

Oteiza J.M., Soto S., Ortiz A.V., Sant'Ana A.S., Giannuzzi L. (2014) Flavorings as new sources of contamination by deteriogenic Alicyclobacillus of fruit juices and beverages. International Journal of Food Microbiology, 172, pp. 119-124.

Oteiza J.M., Soto S., Alvarenga V.O., San’Ana A.S., Gianuzzi L. (2015) Fate of Alicyclobacillus spp. in enrichment broth and in juice concentrates, International Journal of Microbiology, pp. 73-78.

Oxman T., Shapira M., Klein R., Avazov N., Rabinowitz B. (2001) Oral administration of Lactobacillus induces cardioprotection. The Journal of Alternative & Complementary Medicine, 7 (4), pp. 345-354.

Pakbin B., Razavi S.H., Mahmoudi R., Gajarbeygi P. (2014) Producing Probiotic Peach Juice, Biotechnology and Health Sciences, 1(3), pp. 24683.

Palou E., Lopez-Malo A., Barbosa-Canovas G. V., Welti-Chanes J., Davidson P.M., Swanson B.G. (1998) Effect of oscillatory high hydrostatic pressure treatments on Byssochlamys nivea ascospores suspended in fruit juice concentrates. Letters in Applied Microbiology, 27(6), pp. 375-378.

Panagou E.Z., Mohareb F.R., Argyri A.A., Bessant C.M., Nychas G.J.E. (2011) A comparison of artificial neural networks and partial least squares modelling for the rapid detection of the microbial spoilage of beef fillets based on Fourier transform infrared spectral fingerprints, Food Microbiology, Volume 28, Issue 4, pp. 782-790.

Panghal A., Kumar V., Dhull S.B., Gat Y., Chhikara N. (2017a) Utilization of Dairy Industry Waste - Whey in Formulation of Papaya RTS Beverage. Nutrition and Food Science Journal, 5 (2), pp. 168-174.

Panghal A., Virkar K., Kumar V., Dhull S.B., Gat Y., Chhikara N. (2017b) Development of probiotic beetroot drink. Nutrition and Food Science Journal, 5 (3), pp. 257-262.

Papadopoulou O., Panagou E.Z., Tassou C.C., Nychas G.J.E. (2011) Contribution of Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy data on the quantitative determination of minced pork meat spoilage, Food Research International, 44, pp. 3264-3271.

Pappas C.S., Tarantilis P.A., Moschopoulou E., Moatsou G., Kandarakis I., Polisiou M.G. (2008) Identification and differentiation of goat and sheep milk based on diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy (DRIFTS) using cluster analysis, Food Chemistry, 106, pp. 1271-1277.

Parvez S., Malik K.A., Ah Kang S., Kim H.Y. (2006) Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. Journal of Applied Microbiology, 100 (6), pp. 1171-1185.

Pereira A.L.F., Maciel T.C., Rodrigues S. (2011) Probiotic beverage from cashew apple juice fermented with Lactobacillus casei. Food Research International, 44 (5), pp. 1276-1283.

Perricone M., Bevilacqua A., Altieri C., Sinigaglia M., Corbo M.R. (2015) Challenges for the production of probiotic fruit juices. Beverages, 1 (2), pp. 95-103.

Pettipher G.L., Osmundson M.E. (2000) Methods for the detection, enumeration and identification of Alicyclobacillus acidoterrestris. Food Australia, 52, pp. 293-295.

Picot A. and Lacroix C. (2002) Encapsulation of Bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. International Dairy Journal, 14, pp. 505-15.

Pinhatti M., Variane S., Eguchi S.Y., Manfio G.P. (1997) Detection of acidothermophilic bacilli in industrialized fruit juices. Fruit Process, 9, pp. 350–3.

Pistorius A.M.A. (1995) Biochemical applications of FTIR spectroscopy, Spectroscopy Europe, 7, pp. 8-15.

Polydera A.C., Stoforos N.G., Taoukis P.S. (2003) Comparative shelf life study and vitamin C loss kinetics in pasteurised and high pressure processed reconstituted orange juice, Journal of Food Engineering, 60, pp. 21-29.

Polydera A.C., Stoforos N.G., Taoukis P.S. (2005) Quality degradation kinetics of pasteurised and high pressure processed fresh Navel orange juice: Nutritional parameters and shelf life, Innovative Food Science and Emerging Technologies, 6, pp. 1-9.

Previdi M.P., Quintavalla S., Lusardi C., Vicini E. (1997) Heat resistance of Alicyclobacillus spores in fruit juices. Industria Conserve, 72, pp. 353–358.

Ramesh, N.M. (1999) Food preservation by heat treatment. In “Handbook of food preservation”. M. S. Rahman (Ed). Marcel Dekker, Inc. New York, pp. 95-172.

Ranadheera R.D.C.S., Baines S.K., Adams M.C. (2010) Importance of food in probiotic efficacy. Food Research International, 43 (1), pp. 1-7.

Ratkowsky D.A. (2004) Model fitting and uncertainty. In: McKellar, R.C., Lu, X. Eds: Modeling Microbial Responses in Food, CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 152-196.

Reddy L.V., Min J.H., Wee Y.J. (2015) Production of probiotic mango juice by fermentation of lactic acid bacteria. Microbiology and Biotechnology Letters, 43, pp. 120-125.

Ríos-Reina R., Callejón R.M., Oliver-Pozo C., Amigo J.M., García-González D.L. (2017) ATR-FTIR as a potential tool for controlling high quality vinegar categories Food Control, Volume 78, pp. 230-237.

Rodriguez-aona L.E., Khambaty F.M., Fry F.S., Dubois J., Calvey E.M. (2004) Detection and identification of bacteria in a juice matrix with Fourier transform-near infrared spectroscopy and multivariate analysis. Journal of Food Protection, 67, pp. 2555-2559.

Ross T. (1996) Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. Letters in Applied Bacteriology, 81, pp. 501-508.

Saarela M., Virkajarvi I., Nohynek L., Vaari A., Matto J. (2006) Fibres as carriers for Lactobacillus rhamnosus during freeze-drying and storage in apple juice and chocolate-coated breakfast cereals. International Journal of Food Microbiology, 112, pp. 171–178.

Sakhamuri S., Bober J., Irudayaraj J., Demirci A. (2004) Simultaneous Determination of Multiple Components in Nisin Fermentation Using FTIR Spectroscopy. Agricultural Engineering International: the CIGR, Journal of Scientific Research and Development.

Sanders M.E., Tompkins T., Heimbach J.T., Kolida S. (2005) Weight of evidence needed to substantiate a health effect for probiotics and prebiotics. European Journal of Nutrition, 44 (5), pp. 303-310.

Schmitt J., Flemming H.C. (1998) FTIR-spectroscopy in microbial and material analysis, International Biodeterioration & Biodegradation, 41, pp. 1-11.

Setlow P. (2006) Spores of Bacillus subtilis: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. Journal of Applied Microbiology, 101, pp. 514-525.

Settanni L., Moschetti G. (2010) Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. Food Microbiology, 27 (6), pp. 691-697.

Shah N.P. and Jelen, P. (1990) Survival of lactic acid bacteria and their lactases under acidic conditions. Journal of Food Science, 55, pp. 506-9.

Shearer A.E.H., Dunne C.P., Sikes A., Hoover D.G. (2000) Bacterial spore inhibition and inactivation in foods by pressure, chemical preservatives, and mild heat. Journal of Food Protection, 63, pp. 1503-1510.

Sheehan V.M., Ross P., Fitzgerald G.F. (2007) Assessing the acid tolerance and the technological robustness of probiotic cultures for fortification in fruit juices. Innovative Food Science & Emerging Technologies. 8 (2), pp. 279-284.

Siegmund B., Pöllinger-Zierler B. (2007) Growth behavior of off-flavor-forming microorganisms in apple juice. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55, pp. 6692- 6699.

Silanikove N., Leitner G., Merin U. (2015) The interrelationships between lactose intolerance and the modern dairy industry: Global perspectives in evolutional and historical backgrounds. Nutrients, 7 (9), pp. 7312-7331.

Silva E.F.V.M. (2016) High pressure processing pretreatment enhanced the thermosonication inactivation of Alicyclobacillus acidoterrestris spores in orange juice. Food Control, 62, pp. 365-372.

Silva F. V. M., Tan E. K., Farid M. (2012) Bacterial spore inactivation at 45–65 °C using high pressure processing: Study of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in orange juice, Food Microbiology, Volume 32, Issue 1, pp. 206-211.

Silva F.V.M., Gibbs P. (2001) Alicyclobacillus acidoterrestris spores in fruit products and design of pasteurization processes. Trends in Food Science and Technology, 12, pp. 68–74.

Silva F.V.M., Gibbs P. (2004) Target selection in designing pasteurization processes for shelf-stable high-acid fruit products. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 44, pp. 353–360.

Sinigaglia M., Corbo M.R., Altieri C., Campaniello D., D'Amato D., Bevilacque A. (2003) Combined effects of temperature, water activity, and pH on *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores, Journal of Food Protrction, 66, pp. 2216–2221.

Smit Y., Cameron M., Venter P., Witthuhn R.C. (2011) Alicyclobacillus spoilage and isolation e a review. Food Microbiology, 28, pp. 331-349.

Socrates G. (2001) Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies: Tables and Charts, third ed. John Wiley and Sons, West Sussex, UK.

Spinelli ACNF., Sant'Ana1 A.S., Pacheco-Sanchez C.P., Massaguer P.R. (2010) Influence of the hot-fill water-spray-cooling process after continuous pasteurization on the number of decimal reductions and on Alicyclobacillus acidoterrestris CRA 7152 growth in orange juice stored at 35 °C. International Journal of Food Microbiology, 137, pp. 295–8.

Steyn C., Cameron M., Witthuhn R. (2011) Occurrence of Alicyclobacillus in the fruit processing environment - a review. International Journal of Food Microbiology, vol.147, pp. 1-11.

Subramanian A., Alvarez V.B., Harper W.J., Rodriguez-Saona L.E. (2011) Monitoring amino acids, organic acids, and ripening changes in Cheddar cheese using Fourier-transform infrared spectroscopy, International Dairy Journal, 21, pp. 434-440.

Susi H. (1969) In: Structure and Stability of Biological Macro-molecules, vol 2 Eds: Timasheff SN, Fasman CD. M Dekker Pub Co, New York.

Suvarna V.C., Boby V.U. (2005) Probiotics in human health: A current assessment. Current Science, 88 (11), pp. 1744-1748.

Takahashi K., Goto K., Tanaka T., Tanada S., Sawaki T., Yamamoto R. (2007) Factors of spoilage caused by Alicyclobacillus and prevention measures. Science and Business Media, pp. 117-48.

Thakur M., Sharma R.K. (2017) Development of probiotic pomegranate beverage and its physico-chemical and microbial characterization. International Journal of Pure & Applied Bioscience, 5 (1), pp. 35-41.

Tripathi M.K., Giri S.K. (2014) Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. Journal of Functional Foods, 9, pp. 225-241.

Ventura M., Perozzi G. (2011) Introduction to the special issue “probiotic bacteria and human gut microbiota”. Genes & Nutrition, 6 (3), pp. 203.

Vieira M.C., Teixeira A.A., Silva F.M., Gaspar N., Silva C.L.M. (2002) Alicyclobacillus acidoterrestris spores as a target for Cupuaçu (Theobroma grandiflorum) nectar thermal processing: kinetic parameters and experimental methods. International Journal of Food Microbiology, 77, pp. 71-81.

Walker M., Phillips C.A. (2008) Alicyclobacillus acidoterrestris: An increasing threat to the fruit juice industry. International Journal of Food Science and Technology, 43(2), pp. 250-260.

Walker M., Phillips C.A. (2008) The effect of preservatives on Alicyclobacillus acidoterrestris and Propionibacterium cyclohexanicum in fruit juice. Food Control, 19, pp. 974-981.

Walls I., Chuyate R. (2000) Spoilage of fruit juices by *Alicyclobacillus acidoterrestris*: *Alicyclobacillus* in the food industry, Food Australian, chapter 52, pp. 286-288.

Wisotzkey J.D., Jurtshuk G.E., Fox J., Deinhard G., Poralla K. (1992) Comparative sequence analyses on the 16S rRNS (rDNA) of Bacillus acidocaldarious, Bacillus acidoterestris, and Bacillus cycloheptanicus and proposal for creation of a new genus, Alicyclobacillus. International Journal of Systematic Bacteriology, 42, pp. 263-269.

Witthuhn R. C., Merwe E., Venter P., Cameron M. (2012) Guaiacol production from ferulic acid, vanillin and vanillic acid by Alicyclobacillus acidoterrestris. International Journal of Food Microbiology, 157, pp. 113-117.

Wold S., Sjostrom M., Eriksson L. (2001) Pls-regression: a basic tool of chemometrics. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 58, pp. 109-130.

World Health Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 2006.

Wu Z., Bertram H.C., Kohler A., Bocker U., Ofstad R., Andersen H.J. (2006) Influence of aging and salting on protein secondary structures and water distribution in uncooked and cooked pork. A combined FT-IR microspectroscopy and H NMR study, Journal Agricultural Food Chemistry, 54, pp. 8589-8597.

Wuytack E.J., Diels A.M.J., Michiels C.W. (2002) Bacterial inactivation by high-pressure homogenisation and high hydrostatic pressure. International Journal of Food Microbiology, 77, pp. 205-212.

Xia J., Psychogios N., Young N., Wishart D.S. (2009) MetaboAnalyst: a web server for metabolomics data analysis and interpretation. Nucleid Acid Research. W652-60. doi: 10.1093/nar/gkp356.

Yoon K.Y., Woodams E.E., Hang Y.D. (2004) Probiotication of tomato juice by lactic acid bacteria. Journal of Microbiology, 42 (4), pp. 315-318.

Yu C., Irudayaraj J., Debroy C., Schmilovtich Z., Mizrach A. (2004) Spectroscopic differentiation and quantification of microorganisms in apple juice. Journal of Food Science, 69, pp. 268-272.

Zeroual W., Choisy C., Doglia S.M., Bobichon J.H., Angiboust J.R., Manfait M. (1994) Monitoring of bacterial growth and structural analysis as probed by FR-IR spectroscopy, Biochimica et Biophysica Acta, 112, pp. 171-178.

Zhang J., Yue T., Yuan Y. (2013) Contamination in the production line of kiwi products in China. PLpS One, 8(7):e67704. doi: 10.1371/journal.pone.0067704.

5.2 Ελληνική Βιβλιογραφία

Βοσκίδη Γ.Ε. (2013) Εφαρμογή της τεχνικής της υπέρυθρης φασματοσκοπίας με ανάλυση κατά Fourier (FT-IR) για την εκτίμηση του τανικού περιεχομένου γιαγάρτων σταφυλής των ποικιλιών Ξινόμαυρο και Μαυροτράγανο, Μεταπτυχιακή Εργασία, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων.

ΟΔΗΓΙΑ 2001/112/ΕΚ ΤΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ της 20ής Δεκεμβρίου 2001.

Πολυσίου Μ.Γ., Ταραντίλης Π.Α. (2008) Πανεπιστημιακές Σημειώσεις Ενόργανης Ανάλυσης.

5.3 Ηλεκτρονική Βιβλιογραφία

https://repository.kallipos.gr/bitstream/11419/6175/2/01_chapter_7.pdf (29/3/2018, 12:47) - Ελληνικά Ακαδημαϊκά Ηλεκτρονικά Συγγράμματα και Βοηθήματα.