

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ
ΑΝΘΡΩΠΟΥ
&
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ &
ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΟΛΟΚΛΗΡΩΜΕΝΗ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΓΑΛΑΚΤΟΣ
ΚΑΙ ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ»
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΑΣ

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΟΥ ΠΑΓΩΤΟΥ ΤΥΠΟΥ «ΚΑΪΜΑΚΙ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

που εκπονήθηκε στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΜΥΡΟΦΟΡΑ ΙΩΑΝΝΟΥ

Γεωπόνος - Τεχνολόγος Τροφίμων

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΤΣΑΚΑΛΙΔΟΥ ΕΦΗ

ΑΘΗΝΑ 2016

**ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΟΛΟΚΛΗΡΩΜΕΝΗ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΓΑΛΑΚΤΟΣ
ΚΑΙ ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ»**

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΟΥ ΠΑΓΩΤΟΥ ΤΥΠΟΥ «ΚΑΪΜΑΚΙ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ
που εκπονήθηκε στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΜΥΡΟΦΟΡΑ ΙΩΑΝΝΟΥ
Γεωπόνος - Τεχνολόγος Τροφίμων

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΤΣΑΚΑΛΙΔΟΥ ΕΦΗ

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Ε. Τσακαλίδου (Καθηγήτρια ΓΠΑ, επιβλέπουσα)
Α. Μοσχοπούλου (Λέκτορας ΓΠΑ)
Γ. Ζέρβας (Καθηγητής ΓΠΑ)

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η μεταπτυχιακή αυτή μελέτη, εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Γαλακτοκομίας του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, στα πλαίσια του Διατμηματικού Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών "Ολοκληρωμένη Διαχείριση Παραγωγής Γάλακτος και Γαλακτοκομικών Προϊόντων".

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στα πρόσωπα που συντέλεσαν στην πραγματοποίηση της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την κ. Έφη Τσακαλίδου, διευθύντρια του Εργαστηρίου Γαλακτοκομίας του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και επιβλέπουσα της παρούσας μελέτης, για την ανάθεση του θέματος και την αμέριστη συμπαράστασή της καθ' όλη την διάρκεια της εκπόνησης της μελέτης. Επίσης την ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη που έδειξε προς το πρόσωπό μου καθ' όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας και για την πολύτιμη καθοδήγηση της όλες τις φορές που της ζητήθηκε.

Ιδιαίτερος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Δρ. Γεωργία Ζουμποπούλου για την αμέριστη συμπαράσταση που μου παρείχε όλο αυτό το διάστημα. Μου έδειξε απόλυτη εμπιστοσύνη και ανά πάσα στιγμή είχε την καλή διάθεση να με βοηθήσει και να λύσει οποιαδήποτε απορία που μου είχε δημιουργηθεί. Την ευχαριστώ για τις πολύτιμες συμβουλές τις και την καθοδήγηση της κατά την διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων. Επιπλέον την ευχαριστώ για το χρόνο που μου διέθεσε και για όλα όσα με δίδαξε.

Επιπρόσθετα, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην Λέκτορα κα. Μοσχοπούλου, μέλος της εξεταστικής επιτροπής, η οποία με την επιστημονική κατάρτιση και τις υποδείξεις της με βοήθησε σημαντικά κατά την διάρκεια του πειράματος και των εργαστηριακών αναλύσεων καθώς και με τη διόρθωση του κειμένου της παρούσας μελέτης. Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Ζέρβα για την συμμετοχή του στην εξεταστική επιτροπή της παρούσας μελέτης αλλά και για τις παρατηρήσεις του στο κείμενο.

Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω και στην Δρ. Ράνια Αναστασίου για τη πολύτιμη βοήθειά της κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων ταυτοποίησης της μικροχλωρίδας των παγωτών.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου, τη Δρ. Μαρίνα Γεωργαλάκη, καθώς και τις υποψήφιες διδάκτορες Βούλα Αλεξανδράκη και Μαρία Κάζου για

τη συνεργασία μας καθ' όλη την διάρκεια της παραμονής μου στο εργαστήριο αλλά και όσους όλους συμμετείχαν στο κομμάτι της οργανοληπτικής αξιολόγησης των παγωτών. Χωρίς αυτούς δεν θα ήταν δυνατή η εκπόνηση της πιο πάνω αξιολόγησης.

Αθήνα, Μάιος 2016

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το παγωτό είναι ένα ιδανικό προϊόν για την παράδοση των προβιοτικών οργανισμών στο ανθρώπινο σώμα σε σύγκριση με τα ζυμωμένα γαλακτοκομικά προϊόντα. Το pH του παγωτού είναι σχεδόν ουδέτερο, ενώ των ζυμωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων είναι πολύ χαμηλότερο. Το χαμηλό pH μπορεί να επηρεάσει την επιβίωση και την μεταβολική δραστηριότητα των προβιοτικών βακτηρίων. Παρ' όλα αυτά, η κατάψυξη και η απόψυξη του, μπορεί να προκαλέσουν ζημιά στα κύτταρα, προκαλώντας το θάνατο ή την αναστολή της ανάπτυξής τους και μειώνοντας έτσι τα πιθανά οφέλη των προβιοτικών μικροοργανισμών. Στην παρούσα μελέτη το προβιοτικό στέλεχος *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179, χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή προβιοτικού παγωτού τύπου Καϊμάκι. Ακολούθως, μελετήθηκε η επιβίωση του στελέχους καθ' όλη την διάρκεια της παρασκευής και αποθήκευσης του. Επίσης, προσδιορίστηκαν οι φυσικοχημικές και οργανοληπτικές ιδιότητες του τελικού προϊόντος. Το παγωτό παρασκευάστηκε από πλήρες γάλα υψηλής θερμικής επεξεργασίας, κρέμα γάλακτος, κρυσταλλική ζάχαρη, γαλακτωματοποιητές/σταθεροποιητές, σαλέπι και μαστίχα Χίου. Η ενσωμάτωση του εμβολιασμένου γάλακτος (10% v/v) με το προβιοτικό στέλεχος *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 (10^7 cfu/g) στο μίγμα παγωτού, διεξήχθη πριν και μετά την ωρίμανση του μίγματος. Στην μια περίπτωση το μίγμα είχε υποστεί ζύμωση και στην άλλη όχι. Η μικροβιολογική ανάλυση των παγωτών πραγματοποιήθηκε 0^η, 7^η, 14^η και 28^η ημέρα. Το τελικό προϊόν υποβλήθηκε σε φυσικοχημικές αναλύσεις, όπως οξύτητα, pH, περιεκτικότητα σε λίπος και πρωτεΐνες, ενώ εξετάστηκαν επίσης, ο ρυθμός τήξης, η διόγκωση και τα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά. Μετά από 28 ημέρες αποθήκευσης, τα επίπεδα του *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 παρέμειναν σε υψηλά επίπεδα (10^6 - 10^7 cfu/g), ειδικά στην περίπτωση των προϊόντων που είχαν υποστεί ζύμωση. Παρόλο που τα ζυμωμένα δείγματα παγωτού εμφάνισαν υψηλότερη οξύτητα σε σύγκριση με τα μη ζυμωμένα, οι φυσικοχημικές του ιδιότητες ήταν συνολικά αποδεκτές. Επίσης, το μη ζυμωμένο παγωτό συνδύασε την άριστη επιβίωση του στελέχους *L.fermentum* ACA-DC 179 με αποδεκτές φυσικοχημικές και οργανοληπτικές ιδιότητες χωρίς να μεταβάλλει τα δομικά χαρακτηριστικά του προϊόντος. Αυτή είναι η πρώτη μελέτη σχετικά με την εφαρμογή του προβιοτικού *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 στην παραγωγή παγωτού, με το τελικό προϊόν να είναι οργανοληπτικά αποδεκτό.

SUMMARY

Ice cream is an ideal matrix for delivery of probiotic organisms to the human body compared to fermented dairy products. The pH of ice cream is almost neutral, whereas that of fermented dairy products could be much lower, and low pH may affect the survival and metabolic activity of probiotic bacteria. Nevertheless, freezing and thawing may seriously damage the cells, causing death or growth inhibition and thus diminishing the potential advantages of probiotics. In the present study the probiotic strain *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 was used for the production of probiotic Kaimaki type ice cream. The survival of the strain throughout production as well as the physicochemical and sensorial features of the final product were determined. Ice cream was produced using full fat high temperature pasteurized milk. Incorporation (10% v/v) of *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 milk cultures (10^7 cfu/g) was performed either before or after ice cream mix ripening, while both fermented (16 h) and not fermented mixtures were considered. Microbiological analysis was performed on day 0, 7, 14 and 28. The final product was subjected to physicochemical analysis, i.e. acidity, pH, fat and protein content, while melting rate, overrun and sensorial characteristics were also examined. After 28 days of storage, levels of *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 remained high (10^6 - 10^7 cfu/g), especially in the case of the fermented products. Although fermented ice cream samples showed higher acidity in comparison to the non-fermented ones, their physicochemical properties were overall acceptable. This is the first study on the application of the probiotic *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 in ice cream production, with the final product being organoleptic appreciated.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	2
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	4
SUMMARY.....	5
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	13
1.1 Παγωτό.....	13
1.1.1 Ορισμοί.....	14
1.1.1.1 Ορισμός Νομοθετικός.....	14
1.1.2 Παγωτό και Ιστορία.....	15
1.1.3 Ειδικές κατηγορίες παγωτών και τα κύρια χαρακτηριστικά τους.....	17
1.1.3.1 Παγωτό Γάλακτος.....	17
1.1.3.2 Παγωτό Κρέμας.....	17
1.1.3.3 Παγωτό Καϊμάκι.....	18
1.1.3.4 Παγωτό γρανίτα ή γρανίτα με άρωμα.....	18
1.1.3.5 Παγωτό γρανίτα φρούτου ή γρανίτα φρούτου.....	18
1.1.3.6 Παγωτό Σορμπέ.....	18
1.1.3.7 Παγωτό Στιγμαϊάς παρασκευής.....	18
1.1.3.8 Μίγμα για την παρασκευή παγωτού.....	18
1.1.4 Συστατικά παγωτού.....	19
1.1.5 Ταξινόμηση παγωτών.....	19
1.1.6 Παραγωγική Διαδικασία παγωτού.....	21
1.1.6.1 Επεξεργασία του μίγματος.....	22
1.1.6.2 Ζύγιση και Ανάμιξη των πρώτων υλών.....	22
1.1.6.3 Παστερίωση.....	22
1.1.6.4 Ομογενοποίηση.....	23
1.1.6.5 Ψύξη και Ωρίμανση.....	23
1.1.6.6 Ενσωμάτωση αρωματικών υλών.....	23
1.1.6.7 Κατάψυξη με ανάδευση.....	24
1.1.6.8 Σκλήρυνση και Διατήρηση.....	24
1.1.7 Μικροβιολογικά κριτήρια για το παγωτό.....	26
1.1.8 Παγωτό Καϊμάκι.....	26
1.1.8.1 Ιστορία για το παγωτό Καϊμάκι.....	26
1.1.8.2 Γενικά για το Παγωτό Καϊμάκι.....	27
1.1.8.3 Σαλέπι.....	27

1.1.8.4	Μαστίχα της Χίου.....	28
1.1.8.5	Νομοθεσία για το Καϊμάκι	29
1.2	Οξυγαλακτικά βακτήρια	30
1.3	Προβιοτικά	31
1.3.1	Ιστορία και Ορισμοί.....	31
1.3.2	Κριτήρια επιλογής προβιοτικών	32
1.3.2.1	Ιδιότητες των προβιοτικών	33
1.3.2.2	Ασφάλεια των προβιοτικών στελεχών ως προς τον ανθρώπινο οργανισμό....	33
1.3.2.3	Σταθερότητα των προβιοτικών και τεχνολογικά κριτήρια επιλογής.....	34
1.3.3	Μηχανισμοί δράσης των προβιοτικών μικροοργανισμών.....	34
1.3.4	Ευεργετικές επιδράσεις των προβιοτικών στον ανθρώπινο οργανισμό.....	35
1.3.5	Προβιοτικοί μικροοργανισμοί και οι εφαρμογές τους.....	36
1.3.6	Νομοθετικό πλαίσιο και ισχυρισμοί υγείας (health claims) για τα προβιοτικά.....	38
1.3.7	Προβιοτικά προϊόντα	39
1.3.7.1	Γαλακτοκομικά προβιοτικά προϊόντα	40
1.3.7.2	Προβιοτικό παγωτό	41
1.3.7.3	Τεχνολογία παρασκευής προβιοτικού παγωτού	45
1.4	Σκοπός της μελέτης.....	46
2.	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	48
2.1	Βακτηριακά στελέχη	48
2.2	Θρεπτικά υποστρώματα	48
2.3	Προετοιμασία καλλιέργειας.....	49
2.4	Παρασκευή προβιοτικού παγωτού τύπου Καϊμάκι.....	49
2.4.1	Σύσταση παγωτού και πρώτες ύλες	49
2.4.2	Προετοιμασία και επεξεργασία των μιγμάτων παγωτού	50
2.5	Μικροβιολογικές Αναλύσεις.....	52
2.6	Μοριακή μέθοδος ταυτοποίησης	54
2.6.1	Απομόνωση γενωμικού DNA (gDNA).....	54
2.6.2	Μέτρηση της συγκέντρωσης του DNA	55
2.6.3	Ενίσχυση της αλληλουχίας 16S rDNA μέσω της τεχνικής PCR	55
2.6.4	Ανάλυση των τμημάτων DNA σε πηκτική αгарόζης.....	56
2.6.5	Καθαρισμός των προϊόντων της PCR.....	56
2.7	Φυσικοχημικές αναλύσεις.....	58
2.7.1	Προσδιορισμός του pH.....	58

2.7.2	Προσδιορισμός της οξύτητας.....	58
2.7.3	Προσδιορισμός του ποσοστού διόγκωσης/εναέρωσης (overrun).....	59
2.7.4	Προσδιορισμός του ρυθμού τήξης.....	59
2.7.5	Προσδιορισμός του λίπους	60
2.7.6	Προσδιορισμός πρωτεΐνης στο παγωτό με τη μέθοδο Kjeldahl	61
2.8	Οργανοληπτικός Έλεγχος	62
2.9	Στατιστική Επεξεργασία	63
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	64
3.1	Βακτηριακά στελέχη και θρεπτικά υποστρώματα ανάπτυξής τους.....	64
3.2	Έλεγχος ανάπτυξης σε γάλα.....	65
3.3	Μικροβιολογικές Αναλύσεις.....	68
3.4	Μοριακή μέθοδος ταυτοποίησης	76
3.4.1	Αποτελέσματα στοίχισης αλληλουχιών 16S rDNA των στελεχών μέσω του προγράμματος BLAST	76
3.5	Φυσικοχημικές αναλύσεις.....	79
3.5.1	pH.....	79
3.5.2	Οξύτητα	81
3.5.3	Διόγκωση (overrun)	83
3.5.4	Ρυθμός τήξης.....	84
3.5.5	Λίπος.....	85
3.5.6	Πρωτεΐνη.....	86
3.6	Οργανοληπτικός έλεγχος.....	87
4.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	92
5.	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	95
5.1	Έντυπο Οργανοληπτικού Ελέγχου Προβιοτικό Παγωτό τύπου ``Καϊμάκι ``	95
6.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	96

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

ΠΙΝΑΚΑΣ 1. 1: Σύγκριση της σύστασης (%) διαφόρων κατεψυγμένων επιδόρπιων	20
ΠΙΝΑΚΑΣ 1. 2 : Μέση σύσταση διαφορών κατεψυγμένων επιδόρπιων γάλακτος.....	21
ΠΙΝΑΚΑΣ 1. 3: Μικροοργανισμοί των οποίων τα στελέχη χρησιμοποιούνται ή θεωρούνται για χρήση ως προβιοτικά.	37
ΠΙΝΑΚΑΣ 2. 1: Αντιδραστήρια για την ενίσχυση της γονιδιακής περιοχής του 16S rDNA	56
ΠΙΝΑΚΑΣ 3. 1 : Ανίχνευση και επιλεκτική αρίθμηση του στελέχους <i>L. fermentum</i> ACA-DC 179 στα παρακάτω θρεπτικά υποστρώματα (α) MRS agar pH=7.0, (β) MRS agar pH=5.2, (γ) YEL agar, (δ) YEL agar + cloxacillin, (ε) RCM agar, (στ) BHI agar και (ζ) M ₁₇ agar.....	65
ΠΙΝΑΚΑΣ 3. 2: Επιβίωση της προβιοτικής καλλιέργειας <i>L.fermentum</i> ACA-DC 179 πριν και μετά την ωρίμανση του μίγματος, μετά την κατάψυξη (day-0) και κατά την αποθήκευση των μη ζυμωμένων παγωτών	73
ΠΙΝΑΚΑΣ 3. 3: Επιβίωση της προβιοτικής καλλιέργειας <i>L.fermentum</i> ACA-DC 179 πριν και μετά την ωρίμανση και ζύμωση του μίγματος, μετά την κατάψυξη (day-0) και κατά την αποθήκευση των ζυμωμένων παγωτών	75
ΠΙΝΑΚΑΣ 3. 4: Είδη μικροοργανισμών που προέκυψαν από το πρόγραμμα αλληλούχησης BLAST.....	76
ΠΙΝΑΚΑΣ 3. 5: Περιεκτικότητα των παγωτών σε λίπος (%).....	86
ΠΙΝΑΚΑΣ 3. 6: Περιεκτικότητα των παγωτών σε πρωτεΐνη (%)	86
ΠΙΝΑΚΑΣ 3. 7: Αποτελέσματα οργανοληπτικής αξιολόγησης των παγωτών ως προς την αποδοχή τους	91

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

ΓΡΑΦΗΜΑ 1Α: Πτώση pH του στελέχους <i>L.fermentum</i> ACA-DC 179 σε χρονικό διάστημα 48h.....	66
ΓΡΑΦΗΜΑ 1B: Μεταβολή του πληθυσμού του στελέχους <i>L.fermentum</i> ACA-DC 179 σε χρονικό διάστημα 48h.....	66
ΓΡΑΦΗΜΑ 2Α: Πτώση pH του στελέχους <i>P.shermanii</i> LMG16424 σε χρονικό διάστημα 72h	67
ΓΡΑΦΗΜΑ 2B: Μεταβολή του πληθυσμού του στελέχους <i>P.shermanii</i> LMG 16424 σε χρονικό διάστημα 72h.....	67
ΓΡΑΦΗΜΑ 3: Μεταβολή της ολικής μικροβιακής χλωρίδας κατά την διάρκεια της συντήρησης των παγωτών (α) Control, (β) Control F-BR : Control Fermented Before Ripening, (γ) Control F-AR : Control Fermented After Ripening, (δ) NF-BR : Not Fermented Before Ripening, (ε) NF-AR : Not Fermented After Ripening, (στ) F-BR : Fermented Before Ripening και (ζ) F-AR : Fermented After Ripening	69
ΓΡΑΦΗΜΑ 4: Μεταβολή μικρόκοκκων και σταφυλόκοκκων κατά την διάρκεια της συντήρησης των παγωτών (α) Control, (β) Control F-BR : Control Fermented Before Ripening, (γ) Control F-AR : Control Fermented After Ripening, (δ) NF-BR : Not Fermented Before Ripening, (ε) NF-AR : Not Fermented After Ripening, (στ) F-BR : Fermented Before Ripening και (ζ) F-AR : Fermented After Ripening	70
ΓΡΑΦΗΜΑ 5 : Μεταβολή των μεσόφιλων βακίλλων και του προβιοτικού στελέχους <i>Lactobacillus fermentum</i> ACA-DC 179, κατά την διάρκεια της συντήρησης των παγωτών (α) Control, (β) Control F-BR : Control Fermented Before Ripening, (γ) Control F-AR : Control Fermented After Ripening, (δ) NF-BR : Not Fermented Before Ripening, (ε) NF-AR : Not Fermented After Ripening, (στ) F-BR : Fermented Before Ripening και (ζ) F-AR : Fermented After Ripening	72
ΓΡΑΦΗΜΑ 6 : Μεταβολή του pH των παγωτών κατά την διάρκεια της συντήρησης τους : (α) Control, (β) Control F-BR : Control Fermented Before Ripening, (γ) Control F-AR : Control Fermented After Ripening, (δ) NF-BR : Not Fermented Before Ripening, (ε) NF-AR : Not Fermented After Ripening, (στ) F-BR : Fermented Before Ripening και (ζ) F-AR : Fermented After Ripening	80
ΓΡΑΦΗΜΑ 7: Μεταβολή της οξύτητας των παγωτών κατά την διάρκεια της συντήρησης τους : (α) Control, (β) Control F-BR : Control Fermented Before Ripening, (γ) Control F-AR : Control Fermented After Ripening, (δ) NF-BR : Not Fermented Before Ripening, (ε) NF-AR : Not Fermented After Ripening, (στ) F-BR : Fermented Before Ripening και (ζ) F-AR : Fermented After Ripening	82
ΓΡΑΦΗΜΑ 8 : Ποσοστό της διόγκωσης των δειγμάτων παγωτού: (α) Control, (β) Control F-BR : Control Fermented Before Ripening, (γ) Control F-AR : Control Fermented After Ripening, (δ) NF-BR : Not Fermented Before Ripening, (ε) NF-AR : Not Fermented After Ripening, (στ) F-BR : Fermented Before Ripening και (ζ) F-AR : Fermented After Ripening	84
ΓΡΑΦΗΜΑ 9: Ρυθμός τήξης των δειγμάτων παγωτού ανά 2 λεπτά για χρονικό διάστημα 100 λεπτών: (α) Control, (β) Control F-BR: Control Fermented Before Ripening, (γ) Control F-AR : Control Fermented After Ripening, (δ) NF-BR: Not Fermented Before Ripening, (ε) NF-AR : Not Fermented After Ripening, (στ) F-BR: Fermented Before Ripening και (ζ) F-AR : Fermented After Ripening	85

ΓΡΑΦΗΜΑ 10: Παράγοντες που καθορίζουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της γεύσης και του αρώματος των παγωτών: (α) Control, (β) Παγωτό Εμπορίου, (γ) NF-BR: Not Fermented Before Ripening και (δ) NF-AR: Not Fermented After Ripening.....	88
ΓΡΑΦΗΜΑ 11: Παράγοντες που καθορίζουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της δομής και της υφής των παγωτών: (α) Control, (β) Παγωτό Εμπορίου, (γ) NF-BR: Not Fermented Before Ripening και (δ) NF-AR: Not Fermented After Ripening.....	89
ΓΡΑΦΗΜΑ 12: Παράγοντες που καθορίζουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του χρώματος και της εμφάνισης των παγωτών: (α) Control, (β) Παγωτό Εμπορίου, (γ) NF-BR: Not Fermented Before Ripening και (δ) NF-AR: Not Fermented After Ripening.....	90

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ACA-DC: Agricultural College Collection-Dairy Collection

CFU: Colony Forming Unit

Control F-AR: Control Fermented After Ripening

Control F-BR: Control Fermented Before Ripening

EFSA: European Food Safety Authority

FAO: Food and Agriculture Organization

F-AR: Fermented After Ripening

F-BR: Fermented Before Ripening

FDA: U.S. Food and Drug Administration

IDF: International Dairy Federation

LAB: Lactic Acid Bacteria

MSA: Mannitol Salt Agar

NF-AR: Not Fermented After Ripening

NF-BR: Not Fermented Before Ripening

PCA: Plate Count Agar

VRBA: Violet Red Bile Agar

XLD Agar: Xylose Lysine Deoxycholate Agar

WHO: World Health Organization

ΚΤΠ: Κώδικας Τροφίμων και Ποτών

ΟΜΧ: Ολική Μικροβιακή Χλωρίδα

ΠΟΠ: Προστατευόμενη Ονομασία Προέλευσης

ΣΥΑΛ: Στερεό Υπόλειμμα Άνευ Λίπους

ΥΘΕ: Υψηλής Θερμικής Επεξεργασίας

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Παγωτό

Το παγωτό είναι ένα σύνθετο προϊόν που αποτελείται από παγοκρυστάλλους, φυσαλίδες αέρα, πρωτεΐνες, λίπος, σάκχαρα και ανόργανα άλατα, ενσωματωμένα όλα μαζί σε ένα κατεψυγμένο συμπυκνωμένο υγρό με υψηλό ιξώδες (**Eisner, Wildmoser, & Windhab, 2005**). Είναι ένα κατεψυγμένο μίγμα ενός συνδυασμού συστατικών, όπως το γάλα, τα γλυκαντικά, γαλακτωματοποιητές/σταθεροποιητές και βελτιωτικά γεύσης (**Goff & Hartel, 2013**). Μπορεί να γίνει προσθήκη και άλλων συστατικών, όπως προϊόντα αυγών, χρωστικές ύλες και προϊόντα υδρόλυσης του αμύλου (**Marshall, Goff, & Hartel, 2003**). Ακολούθως, το μίγμα παγωτού παστεριώνεται και ομογενοποιείται πριν από την κατάψυξή του. Η κατάψυξη συνίσταται στην ταχεία απομάκρυνση της θερμότητας, ενώ η ταυτόχρονη ανάδευση του μίγματος για την ενσωμάτωση αέρα, επιτυγχάνει την επιθυμητή δομή και υφή του κατεψυγμένου προϊόντος.

Ο όρος, παγωμένα επιδόρπια, αναφέρεται στο παγωτό και στα συναφή προϊόντα του. Η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει διάφορα προϊόντα, όπως το απλό παγωτό (plain), παγωτό με μειωμένα λιπαρά, με χαμηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά, άπαχο, με φρούτα και ξηρούς καρπούς, πουτίγκες, μους, σορμπέ (**Marshall & Arbuckle, 1996**), παγωτό-γιαούρτι, mellorine (κατεψυγμένο επιδόρπιο με φυτικά λιπαρά), γρανίτες και κατεψυγμένα γλυκίσματα. Μερικά από αυτά τα επιδόρπια σερβίρονται είτε σε μαλακή είτε σε σκληρή μορφή. Το παγωτό είναι διαθέσιμο σε πολλές μορφές, γεύσεις και συσκευασίες (**Marshall et al., 2003**). Ο ορισμός του όμως ποικίλλει σε παγκόσμιο επίπεδο λόγω των διαφορετικών κανονισμών και παραδόσεων της σύνθεσής του, και ως εκ τούτου μπορεί να βρεθούν πολλές παραλλαγές του τρόπου παρασκευής του (**Goff & Hartel, 2013**). Η ευρύτερη κατηγορία, κατεψυγμένα επιδόρπια, που ονομάζεται επίσης και ως βρώσιμος πάγος (edible ice), περιλαμβάνει τα προϊόντα που δεν περιέχουν συστατικά γάλακτος π.χ. γρανίτες (**Marshall et al., 2003**).

Το παγωτό είναι τροφή υψηλής διατροφικής αξίας με σημαντικές θρεπτικές ιδιότητες και αφομοιώνεται πολύ καλά από τον ανθρώπινο οργανισμό (**Hekmat & McMahon, 1992**). Είναι ένα ιδιαίτερα δημοφιλές προϊόν για τα παιδιά, τους εφήβους και τους ενήλικες. Λόγω μάλλον του δροσιστικού χαρακτήρα του, καταναλώνεται περισσότερο το καλοκαίρι, αν και ένας μεγάλος αριθμός ανθρώπων έχει τη συνήθεια να το καταναλώνει όλες τις εποχές του χρόνου (**Goff & Griffith, 2006**). Τα μακρομόρια που υπάρχουν στο μίγμα παγωτού (λίπος γάλακτος,

πρωτεΐνη και σύνθετοι υδατάνθρακες) συμβάλλουν σημαντικά στην αίσθηση της υφής και της γεύσης. Ο προσδιορισμός της υφής μπορεί να επιτευχθεί με τον καθορισμό των ιδιοτήτων που σχετίζονται με τις κολλώδεις πτυχές του παγωτού, όπως η μικροδομή, η ιξώδοελαστικότητα, τα χαρακτηριστικά του γαλακτώματος και οι θερμικές ιδιότητες του (Soukoulis et al., 2010). Για παράδειγμα, το ιξώδες, ο ρυθμός τήξης και η σκληρότητα του παγωτού μπορούν να τροποποιηθούν από την περιεκτικότητα του σε πρωτεΐνες. Αυτές οι ιδιότητες μπορούν να αυξηθούν με την αντικατάσταση σκόνης αποκορυφωμένου γάλακτος με πρωτεΐνη σόγιας (Akesowan, 2009). Μεταγενέστερη μελέτη έχει δείξει την ικανότητα της πρωτεΐνης της σόγιας για την βελτίωση περαιτέρω της υφής, της σταθερότητας και του ιξώδες σε παγωτό γιαούρτι (Mahdian, Mazaheri Tehrani, & Nobahari, 2012).

Η βιομηχανία παραγωγής παγωτού χρησιμοποιεί την μεγαλύτερη ποσότητα πρώτων υλών, όπως φρέσκα ή/και αποξηραμένα φρούτα, χυμούς φρούτων, μαρμελάδες, προβιοτικά και άλλα πρόσθετα. Επιπρόσθετα όμως, η βιομηχανία παραγωγής παγωτού έχει επωφεληθεί και από την πρόσφατη ταχεία πρόοδο της τεχνολογίας στον τομέα της επεξεργασίας των τροφίμων και πλέον ανήκει στις πιο κερδοφόρες βιομηχανίες τροφίμων (Cakmakci et al., 2015; Erkaya, Daugdemir, & Csengül, 2012; Lourens-Hattingh & Viljoen, 2001; Sagdic et al., 2012; Turgut & Cakmakci, 2009). Η ποιότητα του παγωτού εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την σύνθεση και την επεξεργασία του μίγματος. Η έρευνα έχει δείξει ότι τα πρόσθετα επηρεάζουν την θρεπτική αξία και τις οργανοληπτικές ιδιότητες του παγωτού (Prindiville, Marshall, & Heymann, 1999; Sagdic et al., 2012; Turgut & Cakmakci, 2009).

1.1.1 Ορισμοί

1.1.1.1 Ορισμός Νομοθετικός

Ένας γενικός ορισμός για το παγωτό θα μπορούσε να είναι «το παγωτό είναι τρόφιμο σε κατάσταση κατάψυξης αποτελούμενο από μίγμα λίπους γάλακτος, σταθερό υπόλειμμα γάλακτος άνευ λίπους (ΣΥΑΛ) μαζί με σάκχαρα, σταθεροποιητές-γαλακτωματοποιητές, με ή χωρίς χρωστικές και ουσίες γεύσης καθώς και με ή χωρίς άλλα πρόσθετα όπως φρούτα, ξηρούς καρπούς κλπ. » (Ζερφυρίδης, 2001).

Η νομοθεσία όμως διαφέρει σημαντικά από χώρα σε χώρα ως προς τον ορισμό του παγωτού. Έτσι κατά το Άρθρο 137 του Ελληνικού Κώδικα Τροφίμων του 2012 ως Παγωτό νοείται «το προϊόν το οποίο παράγεται με κατάψυξη και στη συνέχεια αποθηκεύεται,

διακινείται, μεταφέρεται, διανέμεται και καταναλώνεται ως κατεψυγμένο προϊόν και για την παρασκευή του οποίου μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιοδήποτε βρώσιμο συστατικό που επιτρέπεται από την ισχύουσα νομοθεσία» (Κ.Τ.Π., 2012).

1.1.2 Παγωτό και Ιστορία

Το παγωτό, όπως το γνωρίζουμε σήμερα υπάρχει εδώ και τουλάχιστον 300 χρόνια, αν και η πρώτη παρασκευή του πιθανότατα χρονολογείται αιώνες πριν (Clarke, 2004). Η βιομηχανία παγωτού, όπως τη γνωρίζουμε σήμερα, έχει αναπτυχθεί κυρίως στις Ηνωμένες Πολιτείες. Το παγωτό εισήχθη στις Ηνωμένες Πολιτείες από την Ευρώπη, και πολλές Ευρωπαϊκές χώρες δεν έχουν μόνο μια μακρά ιστορία με το παγωτό αλλά έχουν επίσης μια μακροχρόνια κοινωνιολογική, «ερωτική» σχέση, η οποία αντικατοπτρίζει την Αμερικανική εμπειρία (Goff & Hartel, 2013). Το παγωτό πιθανότατα εξελίχθηκε από τα παγωμένα ποτά και τον πάγο που ήταν δημοφιλής στην Ευρώπη κατά τη διάρκεια του Μεσαίωνα (Arbuckle, 1986). Το παγωτό δεν εφευρέθηκε, αλλά πιθανότατα εξελίχθηκε από πρακτικές αιώνων συμπεριλαμβανομένων της ψύξης των τροφίμων και των ποτών με το χιόνι, η οποία περιγράφεται στα Ρωμαϊκά ιστορικά συγγράμματα πίσω στο 1^{ov} αιώνα μ. Χ. (Goff & Hartel, 2013). Υπάρχουν πολλοί μύθοι και ιστορίες για την παρασκευή του παγωτού όμως λίγα είναι τα αποδεικτικά στοιχεία για την υποστήριξή τους (Clarke, 2004). Η πρώτη φορά που συναντάμε το παγωτό στην ιστορία είναι επί του Ρωμαίου αυτοκράτορα Νέρωνα (37-68 μ. Χ.), ο οποίος λέγεται ότι συνήθιζε να τρώει τα φρούτα παγωμένα με χιόνι, το οποίο μετέφερναν οι σκλάβοι του από τα βουνά (Clarke, 2004; Arbuckle, 1986). Δυστυχώς, δεν υπάρχει σαφής περιγραφή, εκτός από το γεγονός ότι το χιόνι και ο πάγος χρησιμοποιήθηκαν για την ψύξη του χυμού φρούτων και των κρασιών και ενδεχομένως για να παγώνουν τα επιδόρπια. Είναι κατανοητό ότι η ιδέα αυτή προήλθε από την αρχαία Αίγυπτο ή τη Βαβυλώνα, όπου τα γλυκίσματα και άλλες λιχουδιές ενδέχεται να ήταν παγωμένα (Arbuckle, 1986). Ένας άλλος μύθος αναφέρει ότι οι ιππείς στην Μογγολία παρασκεύασαν το παγωτό από κρέμα γάλακτος που μετέφεραν μαζί τους σε ασκούς. Καθώς κάλπαζαν, η κρέμα γάλακτος ανακινείτο έντονα, ενώ η θερμοκρασία υπό το μηδέν προκάλεσε ταυτόχρονα την ψύξη της. Συνεπώς, η ανατάραξη της κρέμας σε συνδυασμό με τις χαμηλές θερμοκρασίες οδηγούσε στην κρυστάλλωση του νερού προς πάγο και τη δημιουργία ενός αφρώδους κατεψυγμένου προϊόντος. Η εξάπλωση της Μογγολικής αυτοκρατορίας διέδωσε το παγωτό στην Κίνα (Clarke, 2004). Ο Βενετός έμπορος Marco Polo

πιστεύεται ότι επιστρέφοντας στην Ιταλία, από το ταξίδι του στην Ανατολή το 1296, έφερε μαζί του συνταγές για το παγωτό, που λέγεται ότι είχαν χρησιμοποιηθεί στην Ασία χιλιάδες χρόνια πριν. Αυτός ο μύθος, όμως, δεν ευσταθεί σύμφωνα με άλλα ιστορικά συγγράμματα (**Goff & Hartel, 2013**). Μια άλλη ιστορική καταγραφή αναφέρει ότι το παγωτό εισήχθη στη Γαλλία από την Ιταλία όταν η Αικατερίνη των Μεδίκων παντρεύτηκε τον δούκα Ερρίκο II το 1533 μ.Χ. Την συνόδευαν εκπαιδευμένοι μάγειρες από την Ιταλία που έφεραν μαζί τους την συνταγή του παγωτού. Το μυστικό της παρασκευής του παγωτού παρέμεινε γνωστό μόνο σε λίγους. Παρόλα αυτά, δεν υπάρχει επαρκής αριθμός ιστορικών δεδομένων που να υποστηρίζουν τις παραπάνω ιστορίες περί της καταγωγής του παγωτού (**Clarke, 2004**). Το παγωτό λοιπόν, ήταν αποκλειστικό προνόμιο των πλουσίων. Όμως γύρω στο 1560 μ.Χ. ένας Ισπανός γιατρός που ζούσε στη Ρώμη, ο Μπλάσιους Βιλαφράνκα, ανακάλυψε ότι προσθέτοντας νιτρική ποτάσα στο χιόνι και στον πάγο μπορούσε να καταψύξει οτιδήποτε πολύ γρήγορα. Αυτή η εφεύρεση έδωσε μεγάλη ώθηση στην παραγωγή παγωτού και ήταν το πρώτο βήμα για την ευρεία κατανάλωση (**Μάντης, 2005**). Κατά τη διάρκεια των επόμενων αιώνων, η τέχνη της παραγωγής του παγωτού διαδόθηκε στη Γαλλία, στη Γερμανία, και στην Αγγλία. Το παγωτό πιθανότατα ήρθε στις Ηνωμένες Πολιτείες με τους πρώτους Άγγλους έποικους. Το 1851 δημιουργήθηκε η πρώτη βιομηχανία παραγωγής παγωτού στη Βαλτιμόρη των Ηνωμένων Πολιτειών από τον Jacob Fussell. Η ανάπτυξη της παραγωγής του συμπυκνωμένου γάλακτος και της σκόνης γάλακτος, η εισαγωγή του παστεριωτήρα και του ομογενοποιητή, οι βελτιωμένοι καταψύκτες και ο υπόλοιπος εξοπλισμός επεξεργασίας είχε ως αποτέλεσμα την αργή ανάπτυξη του κλάδου μετά το 1900. Η σόδα παγωτού (ice cream soda) εισήχθη το 1879, το χωνάκι παγωτού το 1904 και το παγωτό πλάκα το 1921. Γύρω στο 1920 η αξία του παγωτού ως βασικό φαγητό ήταν γενικά αναγνωρισμένη και το προϊόν έχει γίνει ασυνήθιστα δημοφιλές από την εποχή εκείνη. Η ανάπτυξη των βελτιωμένων συστημάτων ψύξης και μεταφοράς των τροφίμων, η βελτιωμένη συσκευασία, η αποθήκευση σε χαμηλή θερμοκρασία στο σπίτι, η εμπορία μέσω αλυσίδας καταστημάτων και τα βελτιωμένα πρότυπα των προϊόντων έχουν κάνει το παγωτό ευρέως διαθέσιμο στον καταναλωτή (**Arbuckle, 1986**). Παρόλα αυτά, δεν μπορούμε να είμαστε απολύτως σίγουροι ποιος εφηύρε το παγωτό, πού και πότε. Στην πραγματικότητα, η ιστορία του παγωτού είναι στενά συνδεδεμένη με την εφεύρεση των πρώτων τεχνικών ψύξης και η χρονική του εξέλιξη μπορεί να συσχετιστεί με τα παρακάτω επιστημονικά ευρήματα:

1. Η ψύξη των τροφίμων και ποτών με την ανάμιξή τους με το χιόνι ή τον πάγο

2. Η ανακάλυψη ότι η διάλυση των αλάτων σε νερό προκαλούσε ψύξη
3. Η ανακάλυψη και η διάδοση της γνώσης, ότι η ανάμιξη αλάτων και χιονιού ή πάγου ψύχει ακόμη περισσότερο
4. Η εφεύρεση της παγωτομηχανής στα μέσα του 19ου αιώνα
5. Η ανάπτυξη της μηχανικής ψύξης στα τέλη του 19ου και στις αρχές του 20ου αιώνα

Παράλληλα με αυτά, είχε αναπτυχθεί μια μεγάλη ποικιλία συνταγών, που κάλυπτε όλο το φάσμα από τους παγωμένους χυμούς φρούτων μέχρι το ό,τι αντιλαμβανόμαστε σήμερα ως παγωτό (Clarke, 2004).

Στα τέλη της δεκαετίας του '70, το παγωτό-γιαούρτι εισήχθη στην Αμερικάνική αγορά ως ένα καινοτόμο κατεψυγμένο επιδόρπιο γάλακτος με ευχάριστα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και υψηλή διατροφική αξία. Η αποδοχή του προϊόντος από τους καταναλωτές παρουσίασε μία σταθερά ανοδική πορεία έως και τις αρχές της δεκαετίας του '90 ενώ σήμερα διατηρεί ένα σημαντικό μερίδιο της αγοράς που αντιστοιχεί στο 7-9% των συνολικών προϊόντων παγωτού. Στα μέσα της δεκαετίας του '90 παρουσιάστηκαν οι πρώτες πατέντες για την παραγωγή προβιοτικού παγωτού ενδιάμεσης ή χαμηλής οξύτητας με ενσωμάτωση διαφορετικών στελεχών προβιοτικών βακτηρίων, όπως π.χ. ο *Lactobacillus acidophilus*, το *Bifidobacterium bifidum*, ο *Lactococcus lactis* κ.ά. Την ίδια δεκαετία ξεκίνησε και η χρήση πρεβιοτικών υλικών (π.χ. μέλι, διαιτητικές ίνες κ.ά.) ή προηγμένων μέσων ελέγχου της ανακρυστάλλωσης, όπως π.χ. κρυοπρωτεΐνες (Clarke, 2004).

1.1.3 Ειδικές κατηγορίες παγωτών και τα κύρια χαρακτηριστικά τους

Ο ελληνικός κώδικας τροφίμων (Κ.Τ.Π., 2012) καθορίζει τα διάφορα είδη παγωτών ως εξής:

1.1.3.1 Παγωτό Γάλακτος

Το προϊόν που συμφωνεί με τον γενικό ορισμό και περιέχει τουλάχιστον 2,5% λιπαρά γάλακτος και τουλάχιστον 6% στερεό υπόλειμμα γάλακτος άνευ λίπους, αποκλειόμενης της προσθήκης λιπαρών ή πρωτεϊνών προέλευσης άλλης από αυτής του γάλακτος.

1.1.3.2 Παγωτό Κρέμας

Το παγωτό γάλακτος που συμφωνεί με τον γενικό ορισμό και πρέπει να περιέχει τουλάχιστον 5% λιπαρά γάλακτος, αποκλειόμενης της προσθήκης λιπαρών ή πρωτεϊνών προέλευσης άλλης από αυτής του γάλακτος.

1.1.3.3 Παγωτό Καϊμάκι

Το παγωτό γάλακτος με γεύση μαστίχας, ή/και κανέλας, ή/και σαλέπι που περιέχει τουλάχιστον 8% λιπαρά γάλακτος, στερεό υπόλειμμα γάλακτος άνευ λίπους τουλάχιστον 7%, ολικά στερεά τουλάχιστον 34%, αποκλειόμενης της προσθήκης λιπαρών ή πρωτεϊνών προέλευσης άλλης από αυτής του γάλακτος.

1.1.3.4 Παγωτό γρανίτα ή γρανίτα με άρωμα

Είναι το προϊόν που συμφωνεί με τον γενικό ορισμό και περιέχει κυρίως νερό και γλυκαντικές ύλες. Σε περίπτωση χρησιμοποίησης αρώματος τα παγωτά αυτά θα πρέπει να δηλώνονται με το χαρακτηριστικό άρωμα που περιέχουν π.χ. «Γρανίτα με άρωμα λεμονιού» απαγορευμένης της χρησιμοποίησης κατ' ευθείαν του ονόματος του φρούτου π.χ. «Γρανίτα λεμόνι», προς αποφυγή παραπλάνησης του καταναλωτικού κοινού.

1.1.3.5 Παγωτό γρανίτα φρούτου ή γρανίτα φρούτου

Είναι το προϊόν που συμφωνεί με τον ορισμό της παραπάνω κατηγορίας (1.1.3.4) και περιέχει τουλάχιστον 15% φρούτα.

1.1.3.6 Παγωτό Σορμπέ

Είναι το προϊόν που συμφωνεί με τον ορισμό της κατηγορίας 1.1.3.4 και περιέχει τουλάχιστον 25% φρούτα.

1.1.3.7 Παγωτό Στιγμαϊάς παρασκευής

Είναι το προϊόν που συμφωνεί με το γενικό ορισμό και με την κατά περίπτωση ειδική κατηγορία παγωτού και προσφέρεται στον καταναλωτή αμέσως μετά την παρασκευή του από ειδικό μηχάνημα αυτόματης ψύξης.

1.1.3.8 Μίγμα για την παρασκευή παγωτού

Είναι προϊόντα (σε υγρή, πολτώδη, στερεή ή μορφή σκόνης) που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή παγωτού σύμφωνα με τις οδηγίες χρήσης και τα οποία περιλαμβάνουν πρώτες και πρόσθετες ύλες από τις επιτρεπόμενες, κατά περίπτωση, για την παρασκευή παγωτού (Κ.Τ.Π., 2012).

1.1.4 Συστατικά παγωτού

Τα συστατικά (πρώτες ύλες), που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή του παγωτού διακρίνονται σε βασικά, τα οποία υπεισέρχονται σε όλους σχεδόν τους τύπους παγωτού, και σε πρόσθετα, τα οποία χρησιμοποιούνται επιπλέον των βασικών, για την παρασκευή ορισμένων μόνων τύπων παγωτού. Τα βασικά συστατικά είναι το γάλα (πλήρες παστεριωμένο, αποστειρωμένο ή αραιωμένο συμπυκνωμένο, αποβουτυρωμένο κ.ά.), κρέμα γάλακτος ή βούτυρο, γλυκαντική ύλη (σακχαρόζη, σιρόπι γλυκόζης, φρουκτόζη κ.ά.) και σταθεροποιητής (ζελατίνη, άγαρ, σαλέπι, αλγινικό νάτριο, καραγενάνες κ.ά.). Από την άλλη, τα πρόσθετα συστατικά που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή ορισμένων τύπων παγωτού, είναι οι αρωματικές ύλες (π.χ. βανιλίνη, άρωμα φράουλας κ.ά.), ο καφές, το κακάο, η σοκολάτα, οι φυσικές χρωστικές και οι γαλακτωματοποιητές (π.χ. μονοστεαρική γλυκερόλη, λεκιθίνη, εστέρες γλυκερόλης, εστέρες σορβιτόλης, εστέρες σακχαρόζης κ.ά.) (**Ζερφυρίδης, 2001; Μάντης, 2005**).

1.1.5 Ταξινόμηση παγωτών

Με την ευρύτερη έννοια τα παγωτά ανήκουν στα επιδόρπια με γλυκιά γεύση τα οποία σερβίρονται σε κατάσταση κατάψυξης. Τα επιδόρπια αυτά περιλαμβάνουν (α) τα παγωτά, (β) τις γρανίτες, (γ) τα σορμπέ φρούτων και (δ) τις τούρτες παγωτού (**Ζερφυρίδης, 2001**). Στον Πίνακα 1.1. παρατίθεται η σύγκριση των διαφόρων κατεψυγμένων επιδόρπιων με ή χωρίς την παρουσία γάλακτος (**Kilara & Chandan, 2013**).

ΠΙΝΑΚΑΣ 1. 1: Σύγκριση της σύστασης (%) διαφόρων κατεψυγμένων επιδόρπιων,

Συστατικό	Παγωτό			Σορμπέ	Γρανίτες	Παγωτό Γιαούρτι
	Χωρίς Λιπαρά	Χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά	Με μειωμένα λιπαρά			
Λίπος γάλακτος	0.5	3	6	1.5	0	2.16
Στερεό υπόλειμμα άνευ λίπους (ΣΥΑΛ) γάλακτος	13.5	13	12.5	3.5	0	10.11
Σακχαρόζη	10	9	10	23	23	12.6
Σιρόπι καλαμποκιού 34/42 DE*	10	9	8	7	7	5.4
Μαλτοδεξτρίνες 10 DE*	0	0	0	0	0	3.6
Πρωτεΐνες ορού	0	0	0	0	0	2.4
Γαλακτωματοποιητές/Σταθεροποιητές	1	0.8	0.6	0.4	0.4	0.6
Ολικά Στερεά	35	34.8	37.1	35.4	30.4	36.87

* DE: είναι ισοδύναμο δεξτρόζης, υποδεικνύει τον βαθμό υδρόλυσης του αμύλου.

Πηγή: **Kilara & Chandan, (2013)**

Επίσης, τα κατεψυγμένα επιδόρπια γάλακτος μπορούν να ταξινομηθούν με βάση: α) την περιεκτικότητά τους σε λιπαρές ύλες, β) το ποσοστό της εναέρωσης (overrun), γ) την προσθήκη οξυγαλακτικών ή προβιοτικών καλλιεργειών, δ) τη φυσιολογική δράση και διατροφική τους αξία. Με βάση την περιεκτικότητά τους σε λιπαρά γάλακτος διακρίνονται σε premium (ανώτερης ποιότητας), τυπικά (economy), χαμηλών λιπαρών και άπαχα, με βάση το ποσοστό της εναέρωσης, τα προϊόντα διακρίνονται σε βιοτεχνικού τύπου (gelato) και βιομηχανικού. Επίσης,

τα κατεψυγμένα επιδόρπια γάλακτος μπορούν να ταξινομηθούν και με την προσθήκη οξυγαλακτικών ή προβιοτικών καλλιεργειών σε α) παγωτό-γιαούρτι και β) προβιοτικό παγωτό. Το παγωτό-γιαούρτι είναι ένα μερικώς ή πλήρως ζυμωμένο προϊόν που περιέχει οξυγαλακτικά βακτήρια, τα οποία χρησιμοποιούνται για την οξύνιση του προϊόντος και την αύξηση του φορτίου της μικροχλωρίδας. Το προβιοτικό παγωτό είναι ένα μερικώς ζυμωμένο ή μη προϊόν με χαμηλότερη οξύτητα σε σχέση με το παγωτό-γιαούρτι, το οποίο περιέχει προβιοτικά βακτήρια. Τέλος, υπάρχει και η κατηγορία των κατεψυγμένων επιδόρπιων γάλακτος με συγκεκριμένα φυσιολογικά και διατροφικά χαρακτηριστικά. Τα προϊόντα αυτά εισήχθησαν στην αγορά την τελευταία δεκαετία λόγω της συνεχώς αυξανόμενης ζήτησης για λειτουργικά τρόφιμα και

προϊόντα με υψηλή διατροφική αξία. Μερικές από τις κύριες τάσεις στη βιομηχανία παγωτού είναι: α) παγωτό με πρεβιοτικά υλικά, όπως διαιτητικές ίνες, μέλι, εναλλακτικά σάκχαρα κ.α., β)

παγωτό κατάλληλο για διαβητικά άτομα, το οποίο περιέχει γλυκαντικές ύλες με χαμηλό γλυκαιμικό δείκτη και γ) παγωτό χωρίς λακτόζη, στο οποίο τα πρωτεϊνικά υλικά, τα οποία περιέχουν σημαντικά υψηλό ποσοστό λακτόζης, αντικαθίσταται από πρωτεΐνες φυτικής προέλευσης π.χ. γάλα ή πρωτεΐνες σόγιας Η σύσταση των διαφόρων ειδών κατεψυγμένων επιδόρπιων γάλακτος παρατίθεται στον Πίνακα 1.2. (Marshall et al., 2003).

ΠΙΝΑΚΑΣ 1.2 : Μέση σύσταση διαφόρων κατεψυγμένων επιδόρπιων γάλακτος

Είδος παγωτού	Λιπαρά γάλακτος	Στερεό υπόλειμμα άνευ λίπους	Γλυκαντικές ύλες	Γαλακτοματοποιητές Σταθεροποιητές	Ολικά στερεά
Άπαχο παγωτό	<0.7	12-14	18-22	1.0	31.7 - 37.7
Παγωτό με χαμηλά λιπαρά	2-4	12-14	18-22	0.8	32.8-38.8
Παγωτό μειωμένης λιποπεριεκτικότητας	5-6	11-12	18-20	0.5	34.5-37.5
Στιγμαϊαίας παρασκευής	3-4	12-14	13-16	0.4	28.4-33.4
Παγωτό (τυπικό)	10-11	10-11	14-17	0.4	34.4-39.4
Premium παγωτό	14-16	7-8	13-17	0.3	34.3-41.3
Superpremium παγωτό	17-20	6-8	16-17	0.2	39.2-45.2
Παγωτό γιαούρτι	3.3-6	8.3-13	16-20	0.5	28.1-39.5
Παγωτό γιαούρτι μειωμένης λιποπεριεκτικότητας	2-4	8.3-13	17-21	0.6	27.9-38.6
Άπαχο παγωτό γιαούρτι	<0.7	8.3-13	17-21	0.6	26.6-35.3
Σορπέ	1-3	1-3	26-35	0.5	28.5-41.5
Κατεψυγμένο γάλα	-	-	26-35	0.5	26.5-35.5

Πηγή : Marshall et al., (2003)

1.1.6 Παραγωγική Διαδικασία παγωτού

Η επεξεργασία του παγωτού περιλαμβάνει την ανάμιξη των συστατικών, την ομογενοποίηση του μίγματος, την παστερίωση και την ωρίμανσή του στους 4 °C για ένα χρονικό διάστημα 4-24h πριν από την κατάψυξη του σε παγωτομηχανή και ακολουθεί η σκλήρυνση και η διατήρηση του μέχρι να πουληθεί (Berger et al., 1990). Όλες οι διαδικασίες που εμπλέκονται, συμβάλουν στη μετατροπή των συστατικών του μίγματος στο τελικό δομημένο προϊόν του

παγωτού. Τα δομικά στοιχεία του παγωτού είναι οι φυσαλίδες αέρα, οι παγοκρύσταλλοι, το λίπος και έχουν σημαντική επίδραση στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και στις ιδιότητες της υφής του παγωτού (Gelin et al., 1996).

1.1.6.1 Επεξεργασία του μίγματος

Η σύνθεση του μίγματος, η ποιότητα των πρώτων υλών και οι ακριβείς υπολογισμοί και μετρήσεις είναι απαραίτητες προϋποθέσεις για την παρασκευή του επιθυμητού παγωτού. Η επεξεργασία του μίγματος ξεκινάει με την ανάμιξη των συστατικών δημιουργώντας ένα ομογενές υγρό που μπορεί να παστεριωθεί, να ομογενοποιηθεί, να ψηχθεί, να ωριμάσει, να γίνει η προσθήκη αρωματικών υλών και να καταψυχθεί (Goff & Hartel, 2013).

1.1.6.2 Ζύγιση και Ανάμιξη των πρώτων υλών

Το πρώτο βήμα στην επεξεργασία του μίγματος είναι η σύνθεσή του, η ζύγιση και η ανάμιξη των πρώτων υλών (Goff & Hartel, 2013). Αρχικά, οι πρώτες ύλες ζυγίζονται ή δοσομετρούνται και οδηγούνται στη δεξαμενή ανάμιξης. Πρώτα γίνεται η ανάμιξη των υγρών συστατικών και κατόπιν προστίθενται τα στερεά συστατικά για να διαλυθούν στην δεξαμενή αναμίξεως (Ζερφυρίδης, 2001). Όλα τα υγρά συστατικά (γάλα, κρέμα γάλακτος, συμπυκνωμένο γάλα, σιρόπι, κλπ) τοποθετούνται στη δεξαμενή και ταυτόχρονα αρχίζει η θέρμανση υπό συνεχή ανάδευση (Goff & Hartel, 2013). Συνήθως μετά τα υγρά συστατικά ακολουθεί η προσθήκη της ζάχαρης γιατί η παρουσία της στο μίγμα διευκολύνει τη διάλυση των λοιπών στερεών συστατικών. Η προσθήκη των λοιπών στερεών συστατικών πρέπει να γίνεται σε μικρές δόσεις υπό συνεχή ανάδευση και πρέπει η προσθήκη και η διάλυση να ολοκληρωθούν πριν φθάσει η θερμοκρασία στους 50°C (Ζερφυρίδης, 2001).

1.1.6.3 Παστερίωση

Οι διάφορες θερμικές επεξεργασίες (π.χ. 70°C για 30 min ή 73-75°C για 10 min ή 82 °C για 35 s ή UHT) εφαρμόζονται για να καταστρέψουν ανεπιθύμητους μικροοργανισμούς. Η παστερίωση προκαλεί την καταστροφή των παθογόνων μικροοργανισμών στο μίγμα παγωτού, τη βελτίωση της διαλυτότητας των συστατικών και την τήξη του λίπους. Η εφαρμογή θερμικής επεξεργασίας εντονότερης από την παστερίωση μπορεί να επηρεάσει τις ιδιότητες του παγωτού. Η παστερίωση σε χαμηλότερες θερμοκρασίες για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα έχει ως

αποτέλεσμα την βελτίωση της διαλυτότητας των σταθεροποιητών και της αύξησης της ικανότητας του παγωτού να ανθίσταται στο λιώσιμο (**Loewenstein & Haddad, 1972a, 1972b**).

1.1.6.4 Ομογενοποίηση

Η ομογενοποίηση του μίγματος παγωτού τεμαχίζει τα λιποσφαίρια στο γάλα και αυτό έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό μικρότερων σφαιριδίων. Τα τεμαχισμένα λιποσφαίρια σταθεροποιούνται από τις πρωτεΐνες και τους γαλακτωματοποιητές χαμηλού μοριακού βάρους (**White, 1981**).

1.1.6.5 Ψύξη και Ωρίμανση

Μετά το πέρας της παστερίωσης και της ομογενοποίησης, το μίγμα ψύχεται ταχέως σε θερμοκρασία $< 5^{\circ}\text{C}$ για ένα χρονικό διάστημα 4-24 h, ανάλογα με τη σύσταση του μίγματος του παγωτού. Εάν η ψύξη ξεπεράσει τις 24 ώρες, το μίγμα αποκτά μεγάλο ιξώδες και το παγωτό δεν λιώνει ομοιόμορφα. Στη θερμοκρασία $< 5^{\circ}\text{C}$ το μίγμα διατηρείται σε δεξαμενές για ωρίμανση. Επίσης η χαμηλή θερμοκρασία αναστέλλει την βακτηριακή ανάπτυξη (**Ζερφυρίδης, 2001**).

1.1.6.6 Ενσωμάτωση αρωματικών υλών

Οι περισσότερες βιομηχανίες επιλέγουν να προσθέσουν αρωματικές ύλες στο απλό μίγμα παγωτού κατά την διάρκεια της κατάψυξης του. Επιπλέον, οι περισσότερες αρωματικές ύλες αγοράζονται σε έτοιμη μορφή προς χρήση από ειδικούς στον τομέα αυτό, αντί να τις παρασκευάζουν στο εργοστάσιο παγωτού. Οι αρωματικές ύλες επιλέγονται με βάση τις προτιμήσεις του καταναλωτή, το κόστος, τη διαθεσιμότητα, τον απαιτούμενο εξοπλισμό για την ενσωμάτωσή τους στο παγωτό, την ετικέτα, τη σταθερότητα της πρώτης ύλης καθώς και τα υλικά της συσκευασίας. Ο χρόνος και ο ρυθμός ανάδευσης κατά τη κατάψυξη καθορίζουν τα χαρακτηριστικά των αρωματικών υλών π.χ. μέγεθος τεμαχίων (**Goff & Hartel, 2013**). Οι αρωματικές ύλες προστίθενται τουλάχιστον με τρεις διαφορετικούς τρόπους: (1) απευθείας στο μίγμα παγωτού πριν από την κατάψυξη (π.χ., βανίλια, σοκολάτα, μέντα), (2) αμέσως μετά την κατάψυξη (κομμάτια φρούτων, ξηρών καρπών, καραμέλα, κομμάτια ζαχαροπλαστικής), (3) μετά την κατάψυξη πριν από τη συσκευασία (ripples and variegates) (**Kilara & Chandan, 2013**).

1.1.6.7 Κατάψυξη με ανάδευση

Η κατάψυξη του μίγματος του παγωτού είναι μία δυναμική διεργασία, κατά την οποία το μίγμα παγωτού καταψύχεται ταχέως, ενώ ταυτόχρονα υποβάλλεται σε απόδραση με στόχο την ενσωμάτωση αέρα και την παρεμπόδιση σχηματισμού παγοκρυστάλλων μεγάλου μεγέθους. Κατά το στάδιο αυτό, λαμβάνουν χώρα τρία διαφορετικά φαινόμενα: η αποσταθεροποίηση των λιποσφαιρίων, η κρυστάλλωση του νερού, ο σχηματισμός και σταθεροποίηση των φυσαλίδων αέρα (**Marshall et al., 2003**). Κατά την διαδικασία της κατάψυξης, η ταυτόχρονη ανάδευση του μίγματος βοηθά στην ενσωμάτωση του αέρα μέσα στο παγωτό. Η ενσωμάτωση του αέρα οδηγεί σε αύξηση του όγκου του παγωτού. Ο όρος «εναέρωση» (overrun) χρησιμοποιείται για να περιγράψει την αύξηση του όγκου του παγωτού. Για παράδειγμα, όταν 3,75 L μίγματος μετατρέπονται σε 7.5 L παγωτού, και άρα ο όγκος του μίγματος διπλασιάζεται, η εναέρωση-διόγκωση του παγωτού είναι 100% (**Kilara & Chandan, 2013**).

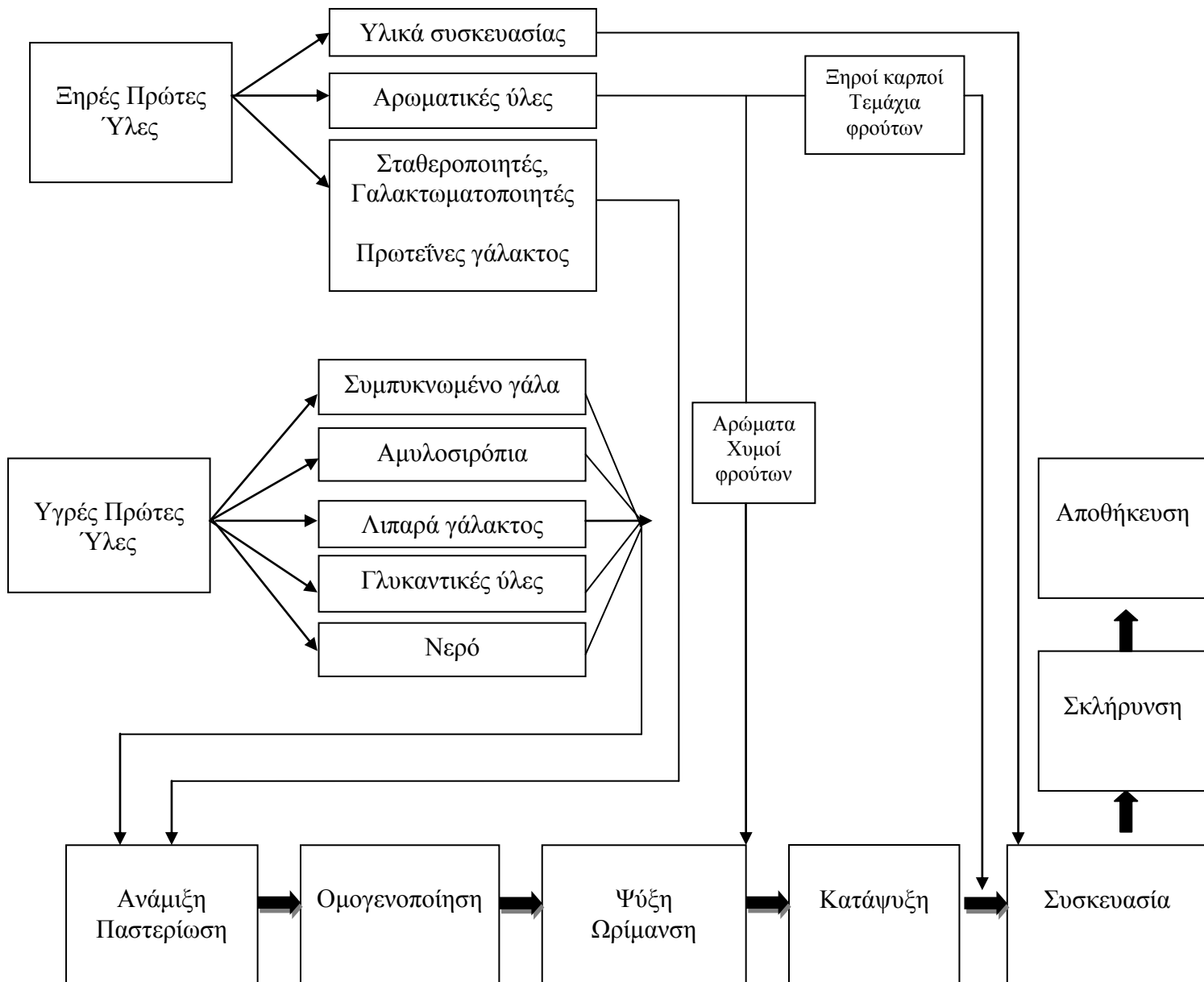
Η φάση της κατάψυξης μετατρέπει το ρευστό μίγμα στο τελικό προϊόν, το παγωτό, γι' αυτό και είναι καθοριστική για την ποιότητα και σταθερότητά του. Περίπου το 50% του νερού του μίγματος παγώνει στους -5°C . Ο αέρας ενσωματώνεται υπό μορφή μικρών φυσαλίδων μέσα στο παγωτό. Τα λιποσφαίρια κατά την επεξεργασία της κατάψυξης χάνουν μέρος της μεμβράνης τους και τείνουν να συσσωματώνονται στην περιφέρεια των φυσαλίδων αέρα, κάνοντας το παγωτό μαλακό, αφρώδες και κρεμώδες. Σημασία επίσης έχει ο αριθμός, το μέγεθος και το σχήμα των παγοκρυστάλλων που σχηματίζονται, οι οποίοι πρέπει να είναι πολλοί και μικροί ώστε να μη γίνονται αισθητοί στο στόμα (**Ζερφυρίδης, 2001**).

1.1.6.8 Σκλήρυνση και Διατήρηση

Το παγωτό βγαίνοντας από τον κύλινδρο κατάψυξης έχει θερμοκρασία περίπου -5°C γι' αυτό και είναι μαλακό. Το παγωτό συσκευάζεται στη θερμοκρασία αυτή και οδηγείται σε σήραγγα καταψύξεως ή σε άλλο χώρο σε -35°C για χρονικό διάστημα μίας ώρας ή και περισσότερο εάν η συσκευασία είναι μεγάλη, μέχρι να αποκτήσει το παγωτό θερμοκρασία -20 έως -25°C (**Ζερφυρίδης, 2001**). Κατόπιν, το παγωτό αποθηκεύεται σε χώρο με θερμοκρασία -20 έως -25°C για την διατήρηση του πριν από τη διανομή του (**Kilara & Chandan, 2008**).

Η γρήγορη σκλήρυνση είναι επιθυμητή, για την αποφυγή ανάπτυξης παγοκρυστάλλων και κυττάρων αέρα (air cells). Ο χρόνος που χρειάζεται για να ολοκληρωθεί το στάδιο της σκλήρυνσης του παγωτού έχει οριστεί ως ο χρόνος που χρειάζεται μέχρι η θερμοκρασία στο

κέντρο της συσκευασίας του παγωτού να έχει μειωθεί στους $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ο χρόνος σκλήρυνσης μπορεί να διαρκέσει από 30 λεπτά για συσκευασία χωρητικότητας 100 mL έως και 24 ώρες για συσκευασία παγωτού 10L. Το μικρότερο χρονικό διάστημα σκλήρυνσης οδηγεί πάντα σε μαλακότερο παγωτό. Ο στόχος της ταχείας σκλήρυνσης είναι η επίτευξη της επιθυμητής θερμοκρασίας στο κέντρο της συσκευασίας μέσα σε 4 ώρες, ανεξάρτητα από το μέγεθος της συσκευασίας (Goff & Hartel, 2013).



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 1 : Διάγραμμα ροής παρασκευής παγωτού (Marshall et al., 2003).

1.1.7 Μικροβιολογικά κριτήρια για το παγωτό

Το παγωτό είναι τρόφιμο που καταναλώνεται από όλες τις ηλικίες και ιδιαίτερα από παιδιά, γι' αυτό πρέπει από μικροβιολογικής άποψης να είναι άριστης ποιότητας (**Μάντης, 2005**). Με βάση τον Κανονισμό (ΕΚ) αριθ.2073/2005 της Ευρωπαϊκής Ένωσης, περί μικροβιολογικών κριτηρίων για το παγωτό, θα πρέπει να διαπιστώνεται απουσία σαλμονέλας στα 25 g παγωτού και τα κολοβακτηριοειδή (*Enterobacteriaceae*) επιτρέπονται να είναι μέχρι 10 cfu/g, αλλά δύο από τα πέντε δείγματα επιτρέπεται να έχουν μέχρι και 100 cfu/g (**Κανονισμός 2073/2005**). Επιπρόσθετα, η Ολική Μικροβιακή Χλωρίδα (ΟΜΧ) πρέπει να είναι κάτω από <100.000 cfu/g, αλλά τα δύο από τα πέντε δείγματα επιτρέπεται να έχουν μέχρι και 500.000 cfu/g, οι σταφυλόκοκκοι θετικοί στην κοαγκουλάση (παθογόνοι) να απουσιάζουν στο 1g, οι ζύμες και μύκητες να είναι ανεκτοί μέχρι 50 cfu/g και το *E.coli* είναι μέχρι 1g παγωτού (**Ζερφυρίδης, 2001**).

1.1.8 Παγωτό Καϊμάκι

1.1.8.1 Ιστορία για το παγωτό Καϊμάκι

Οι Οθωμανοί συνήθιζαν να αφομοιώνουν τις πλούσιες γαστρονομικές παραδόσεις των λαών που κατακτούσαν και μεταξύ άλλων έμαθαν και την τέχνη της παρασκευής παγωτού. Η δική τους συνεισφορά στη συνταγή ήταν αρχικά να προσθέτουν καϊμάκι στο γάλα. Ήδη, από την εποχή που ζούσαν στις στέπες της Κεντρικής Ασίας, γνώριζαν την τεχνική αφαίρεσης του καϊμακιού από το γάλα που παραμένει ακόμα και σήμερα ένα από τα αγαπημένα τους γαλακτοκομικά προϊόντα. Στην πορεία προσθέσανε σαλέπι (αντί για αραβικό κόμμα που χρησιμοποιούσαν οι Άραβες) και λίγο αργότερα μαστίχα. Έτσι δημιουργήθηκε το γνωστό Καϊμάκι-Dondurma το παραδοσιακό παγωτό των Τούρκων, που παρασκευάστηκε πολύ πριν τον 14^ο αιώνα μ.Χ. Στην Τουρκία, με τη λέξη Dondurma (που σημαίνει να παγώσει), εννοούν όλα τα παγωτά. Το πιο διάσημο είναι το Kahramanmaras Kaimkasi Dondurma. Παρασκευάζεται σε μια πόλη της Νοτιοανατολικής Τουρκίας, όπου υπάρχει το καλύτερο σαλέπι και παράγεται από ένα ιδιαίτερα αρωματικό κατσικίσιο γάλα. Τους παγωτατζήδες από το Kahramanmaras τους συναντά κανείς μέχρι και σήμερα σε πολλές περιοχές της Τουρκίας, ντυμένους με παραδοσιακές στολές, να πουλάνε παγωτό σε χωνάκι από τα στολισμένα καρότσια τους (**Καραγιάννης, 2014**).

1.1.8.2 Γενικά για το Παγωτό Καϊμάκι

Το Καϊμάκι είναι παγωτό με μαστιχωτή υφή, λόγω του ότι περιέχει σαλέπι. Είναι αρκετά δημοφιλές σε όλο τον κόσμο και πήρε το όνομά του από την αυθεντική συνταγή που περιέχει γάλα, σαλέπι, μαστίχα και καϊμάκι. Το Καϊμάκι είναι ένα ανατολίτικο γαλακτοκομικό προϊόν, με υπέροχο άρωμα και ξεχωριστή γεύση, που παρασκευάζεται από γάλα το οποίο θερμαίνεται και αφυδατώνεται μέχρι να μετατραπεί σε παχύρρευστη κρέμα ή ακόμα σε συμπαγές υλικό που κόβεται με το μαχαίρι. Το παγωτό Καϊμάκι έχει μοναδική γεύση και άρωμα, είναι πολύ υγιεινό και άριστο χωνευτικό (Καραγιάννης, 2014).

Σήμερα γνωρίζουμε από επιστημονικές μελέτες ότι το παγωτό τύπου Καϊμάκι είναι ένα μικρό ελιξίριο που ενισχύει τη μακροζωία. Αποτελείται από φρέσκο πρόβειο γάλα πηγή με το μεγαλύτερο ποσοστό ασβεστίου και υψηλό ποσοστό βιταμινών A, B1 και C, μαστίχα γνωστή για την αντιοξειδωτική της δράση, την καταπραϋντική της ιδιότητα κατά της δυσπεψίας και άλλων στομαχικών διαταραχών, τις αντικαρκινικές, αντιμικροβιακές, και αντιαλλεργικές της ιδιότητες, καθώς και σαλέπι που ανακουφίζει από τον βήχα, το άσθμα και τον στομαχόπονο, τονώνει το ανοσοποιητικό σύστημα, χαρίζει ενέργεια και πνευματική διαύγεια (Internet 1).

Το παγωτό αυτό διαφέρει από τα κοινά (common) παγωτά, λόγω της υψηλής περιεκτικότητας σε σάκχαρα, της φυσικής του γεύσης και του κολλώδους σώματος. Αυτά τα χαρακτηριστικά της γεύσης και του σώματος του παγωτού Καϊμάκι ή αλλιώς Kahramanmaras εξαρτώνται κυρίως από τη χρήση του σαλεπιού που είναι ένα από τα κύρια συστατικά του (Güven, Karaca, & Kacar, 2003). Η χαρακτηριστική σκληρή υφή του, το κάνει μοναδικό, επειδή σερβίρεται δύσκολα και συνήθως κατά τη διάρκεια της κατανάλωσης του μπορεί να χρειαστεί μαχαίρι (Karaca et al., 2009).

1.1.8.3 Σαλέπι

Το σαλέπι είναι ένα λευκό αλευρώδες προϊόν που προέρχεται από την άλεση των αποξηραμένων ριζών ή κονδύλων της άγριας ορχιδέας *Orchis morio* var. *mascula* της οικογένειας Orchidaceae. (Kaya & Tekin, 2001). Το σαλέπι περιέχει υγρασία (12%), άμυλο (2.7%), μεταλλικά στοιχεία (2.4%), τέφρα (2.1-3.8%), αζωτούχες ενώσεις (3.1-7.3%), λιπίδια (2%) και γλυκομαννάνη (16-55%) (Tekinsen & Güner, 2010). Το χαρακτηριστικό του σαλεπιού είναι η βλεννώδης υφή του, η οποία γίνεται έντονα αντιληπτή κατά την θερμική του επεξεργασία. Η υφή αυτή σχετίζεται με την παρουσία μιας σειράς πολυσακχαριτών, οι οποίοι

διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τη σύσταση και το φορτίο που φέρουν, το οποίο οφείλεται κυρίως στην παρουσία γαλακτουρονικού οξέος (Sengkhampan et al., 2009). Η βασικότερη λειτουργική ιδιότητα των πολυσακχαριτών είναι η ιδιότητα τους να αυξάνουν το ιξώδες ή να προκαλούν την πήξη υδατικών διαλυμάτων (Dickinson, 1992).

Οι ρίζες ή κόνδυλοι ορχιδέας από τις οποίες παρασκευάζεται το σαλέπι, πλένονται και ζεσταίνονται σε γάλα ή σε αριάνι πιθανόν για να αναστείλουν την δράση των ενδογενών ενζύμων και να μειώσουν την απώλεια των υδατοδιαλυτών συστατικών του. Εν συνεχεία, ξηραίνεται και αλέθεται για να δώσει μία κιτρινωπή σκόνη (Kaya & Tekin, 2001). Το φυτό αυτό αναπτύσσεται κατά τις πρώτες ημέρες του καλοκαιριού και έχει διάφορες χρήσεις (Cozzolino & Widmer, 2005; Freudenstein & Rasmussen, 1997). Χρησιμοποιείται ως πρώτη ύλη στην παρασκευή ορισμένων τροφίμων και φαρμάκων (Dogan & Kayacier, 2004) και για την προετοιμασία ποτών, γλυκών και παγωτών (Farhoosh & Riazi, 2007; Kaya & Tekin, 2001). Με την ονομασία σαλέπι είναι επίσης γνωστό ένα πηχτό αφέψημα, το οποίο παράγεται από ζεστά εκχυλίσματα του φυτού της άγριας ορχιδέας. Διάφορα σκευάσματα του εν λόγω αφεψημάτος είναι δημοφιλή στη Νοτιοανατολική Ευρώπη και στη Μέση Ανατολή. Το σαλέπι ως αφέψημα παρασκευάζεται συνήθως με ανάμιξη ζεστού νερού ή γάλακτος με σκόνη ορχιδέας (Georgiadis et al., 2012) και σερβίρεται με πασπαλισμένη κανέλα (Alpaslan & Hayta, 2007; Dogan & Kayacier, 2004). Η χρήση του είναι επίσης δημοφιλής στη Δυτική Ευρώπη πριν από την έλευση του καφέ και του τσαγιού (Davidson, 1987). Χρησιμοποιείται επίσης ως τροποποιητής των ρεολογικών ιδιοτήτων στο παγωτό Καϊμάκι (dondurma), ένα δημοφιλές παγωτό στις βόρειο-ανατολικές χώρες της Μεσόγειου όπως στην Ελλάδα και στην Τουρκία (Georgiadis et al., 2012). Στην ιατρική, χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της διάρροιας, του βήχα ενώ του αποδίδουν και αφροδισιακές ιδιότητες (Farhoosh & Riazi, 2007; Kaya & Tekin, 2001).

1.1.8.4 Μαστίχα της Χίου

Η μαστίχα της Χίου παράγεται από το μαστιχοφόρο σχίνο (αλλιώς μαστιχόδενδρο), ο οποίος περιλαμβάνει διάφορους κλώνους της ποικιλίας *Pistacia lentiscus* var. *chia* της οικογένειας Anacardiaceae. Το μαστιχόδενδρο καλλιεργείται ή συναντάται αυτοφυές στα νότια του νησιού της Χίου, που είναι και η μοναδική περιοχή που μπορεί να καρποφορήσει και να ευδοκιμήσει. Η μαστίχα εκκρίνεται, υπό μορφή ρητίνης, από τις «πληγές» που δημιουργούνται

στον κορμό του δένδρου με αιχμηρό εργαλείο (κεντητήρι), στην φυσική της κατάσταση (**Koutsoudaki, Krsek, & Rodger, 2005**). Αξίζει να σημειωθεί ότι η Μαστίχα Χίου από το 1997, έχει χαρακτηριστεί ως Προϊόν Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης (ΠΟΠ), βάσει του υπ' αριθμ. 123/1997 Κανονισμού (L0224/24-1-97) της Ευρωπαϊκής Ένωσης και έχει καταχωρηθεί στον σχετικό Κοινοτικό Κατάλογο των Προϊόντων ΠΟΠ (**Αρχείο EMX, 2010**).

Η μαστίχα έχει πολλές χρήσεις στη μαγειρική, στην ζαχαροπλαστική και στην ποτοποιία. Στη ζαχαροπλαστική, η μαστίχα χρησιμοποιείται ως πρόσθετη ύλη στην παρασκευή μεγάλου αριθμού γλυκών, ζαχαρωτών και αρωματικών αρτοσκευασμάτων. Επίσης χρησιμοποιείται στο λουστράρισμα της σοκολάτας, στα λουκούμια, τα μπισκότα, τα παγωτά, τις καραμέλες κτλ. Στην μαγειρική χρησιμοποιείται ως μπαχαρικό και προσδίδει διακριτικό άρωμα σε πολλές τροφές, όπως το κρέας και το τυρί. Επιπλέον, αποτελεί σημαντικό διαιτητικό συμπλήρωμα, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις έλλειψης ιχνοστοιχείων (**Σαββίδης, 2000**). Στην ποτοποιία η μαστίχα χρησιμοποιείται ευρύτατα για την παρασκευή λικέρ (λικέρ μαστίχας Χίου), ούζου (ούζο Χίου) και ρακής. Το ποτό μαστίχα πίνεται ως aperitif. Με την προσθήκη μαστίχας το ποτό αποκτά το άρωμα της και περιορίζεται η βλαπτική επίδραση της αλκοόλης στο στομάχι (**Μπελλές, 2006**). Εκτός από τις χρήσεις της ως συστατικού στην παρασκευή προϊόντων διατροφής, καλλυντικών, αρωμάτων, κοσμημάτων κ.ά., είναι ένα φυσικό προϊόν με πολλές φαρμακευτικές και θεραπευτικές ιδιότητες καθώς:

- (α) συμβάλλει στην μείωση των επιπέδων χοληστερίνης σακχάρου και πίεσης στον οργανισμό,
- (β) διευκολύνει την πέψη,
- (γ) καταπολεμά το έλκος και το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού,
- (δ) έχει αντικαρκινικές ιδιότητες και
- (ε) αυξάνει την αντίδραση του ανοσοποιητικού συστήματος (**Περίκος, 2006**).

1.1.8.5 Νομοθεσία για το Καϊμάκι

Το παγωτό γάλακτος με γεύση μαστίχας, ή/και κανέλας, ή/και σαλέπι που περιέχει τουλάχιστον 8% λιπαρά γάλακτος, στερεό υπόλειμμα γάλακτος άνευ λίπους τουλάχιστον 7%, ολικά στερεά τουλάχιστον 34%, αποκλειόμενης της προσθήκης λιπαρών ή πρωτεϊνών προέλευσης άλλης από αυτής του γάλακτος. Απαγορεύεται η προσθήκη στην κυρίως μάζα του «παγωτού καϊμάκι», χυμών φρούτων ή σιροπιών τους ή σπασμένων ξηρών καρπών, επιτρέπεται όμως να προστίθενται αυτά στο τελικό προϊόν κατά τη συσκευασία. Απαγορεύεται η χρώση της

κυρίως μάζας του παγωτού για την παρασκευή του «παγωτού καϊμάκι» με οποιονδήποτε τρόπο (Κ.Τ.Π, 2012).

1.2 Οξυγαλακτικά βακτήρια

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια ανήκουν στην τάξη *Lactobacillales* της κλάσης *Bacilli* του φύλου *Firmicutes* (Garrity & Holt, 2001). Αποτελούν μια ομάδα βακτηρίων που επεκτείνεται ταχέως και επί του παρόντος περιλαμβάνει έξι οικογένειες και περίπου 40 γένη. Αυτά που σχετίζονται με τα τρόφιμα ανήκουν κυρίως στα γένη: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* και *Leuconostoc* (Kandler & Weiss, 1986).

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια είναι Gram θετικά, αρνητικά στην καταλάση, μη σπορογόνα, με χαμηλή αναλογία G+C (γουανίνης + κυτοσίνης), προαιρετικά αναερόβια και είναι σε θέση να παράγουν γαλακτικό οξύ ως το κύριο τελικό προϊόν της ζύμωσης των υδατανθράκων (Holzapfel et al., 2001).

Το γένος *Lactobacillus* αποτελεί την μεγαλύτερη ομάδα των οξυγαλακτικών βακτηρίων (LAB). Με πάνω από 100 είδη και υποείδη, το γένος *Lactobacillus* αντιπροσωπεύει τη μεγαλύτερη ομάδα μέσα στην οικογένεια *Lactobacillaceae*. Τα κύτταρα των μελών *Lactobacillus* είναι σχήματος ράβδου και συχνά οργανώνονται σε αλυσίδες. Είναι απολύτως ζυμωτικοί μικροοργανισμοί (fermentative). Αναπτύσσονται παρουσία και απουσία οξυγόνου αλλά δεν διαθέτουν αναπνευστική αλυσίδα. Τα είδη διακρίνονται σε δύο ομάδες ανάλογα με τον τρόπο καταβολισμού της λακτόζης: (α) τα ομοζυμωτικά σε γαλακτικό οξύ και (β) τα ετεροζυμωτικά σε γαλακτικό οξύ, οξικό οξύ ή αιθανόλη και CO₂. Επειδή το κύριο προϊόν της ζύμωσης είναι το γαλακτικό οξύ, οι γαλακτοβάκιλλοι προτιμούν σχετικώς όξινες συνθήκες (pH 5.5-6.5) (Giraffa, Chanishvili, & Widyastuti, 2010).

Τα βακτήρια που ανήκουν στο γένος *Lactobacillus* απαντώνται στο οικοσύστημα των φυτών, των ζώων ακόμη και στο νωπό γάλα (Hammes & Vogel, 1995). Επιπλέον, οι γαλακτοβάκιλλοι μπορούν να βρεθούν στα έντομα. Η ικανότητα τους να αποικίσουν μια τέτοια ποικιλία βιοτόπων αποτελεί άμεση συνέπεια της ευρείας μεταβολικής τους ευελιξίας. Ως εκ τούτου, δεν είναι καθόλου παράξενο το γεγονός ότι οι γαλακτοβάκιλλοι έχουν χρησιμοποιηθεί για δεκαετίες στη συντήρηση των τροφίμων, ως εναρκτήριες καλλιέργειες στα γαλακτοκομικά προϊόντα, σε ζυμωμένα λαχανικά, στα ψάρια και στα λουκάνικα, καθώς και ως καλλιέργειες ενσίρωσης. Λόγω των πιθανών θεραπευτικών και προληπτικών ιδιοτήτων τους, οι γαλακτοβάκιλλοι έχουν επίσης προταθεί ως προβιοτικά (Giraffa et al., 2010).

1.3 Προβιοτικά

1.3.1 Ιστορία και Ορισμοί

Η έννοια των προβιοτικών χρονολογείται πιθανόν πίσω στο 1908, όταν ο βραβευμένος με Νόμπελ Ιατρικής Elie Metchnikoff συσχέτισε την μακροζωία των Βούλγαρων αγροτών και την καλή τους υγεία με την κατανάλωση ζυμωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων (**Metchnikoff, 1908**). Ανέπτυξε την θεωρία ότι τα οξυγαλακτικά βακτήρια είναι υπεύθυνα για την αποτροπή της εντερικής σήψης, την προαγωγή της υγείας και την επιμήκυνση της ζωής. Επιπρόσθετα, σύνδεσε την υγεία και τη μακροζωία με την κατάποση των βακτηρίων που υπάρχουν στο γιαούρτι (**Metchnikoff, 2004**). Το 1907, ο Elie Metchnikoff διατύπωσε το αξίωμα ότι τα βακτήρια που εμπλέκονται στην ζύμωση του γιαουρτιού, *Lactobacillus bulgaricus* και *Streptococcus thermophilus*, καταστέλλουν τυχόν διαταραχές της εντερικής χλωρίδας του ανθρώπου και ότι η κατανάλωση τους ήταν σημαντική για τη διατήρηση της ανθρώπινης υγείας (**Gismondo, Drago, & Lombardi, 1999**). Παράλληλα με τον Metchnikoff, ο Henry Tissier, Γάλλος παιδίατρος, παρατήρησε ότι στα κόπρανα των υγιών παιδιών υπήρχαν σε αφθονία τα βακτήρια bifidobacteria κάτι που απουσίαζε από τα κόπρανα των παιδιών που έπασχαν από διάρροια. Ο Tissier λοιπόν, συμπέρανε ότι, οι μικροοργανισμοί αυτοί διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της υγείας και για τον λόγο αυτό πρότεινε να χορηγηθούν σε ασθενείς με διάρροια για να βοηθήσουν στην αποκατάσταση της εντερικής χλωρίδας (**Butel, 2014**).

Η λέξη «προβιοτικό» προέρχεται από τη λατινική λέξη *pro* και την ελληνική λέξη *βίος* (*pro bios*, «πέραν της ζωής») και αρχικά προτάθηκε για να περιγράψει τις ουσίες που παράγονται από ένα πρωτόζωο προς όφελος ενός άλλου (**Leory et al., 2008**). Μέχρι πρόσφατα ο πιο ευρέως χρησιμοποιούμενος ορισμός που συνέβαλε στην ανάπτυξη της προβιοτικής έννοιας με διάφορους τρόπους ήταν αυτός του Fuller: «τα προβιοτικά είναι ζωντανά μικροβιακά συμπληρώματα διατροφής τα οποία επιδρούν ευεργετικά στο ζώο-ξενιστή βελτιώνοντας την μικροβιακή του ισορροπία" (**Fuller, 1989**). Σήμερα, ο πλέον έγκυρος και αποδεκτός ορισμός είναι αυτός που προτάθηκε από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας (**Food and Agriculture Organization, FAO**) και τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (**World Health Organization, WHO**). Έτσι, ορίζουν τα προβιοτικά βακτήρια ως "ζωντανούς μικροοργανισμούς που όταν χορηγούνται σε επαρκείς ποσότητες παρέχουν οφέλη για την υγεία του ξενιστή" (**FAO/WHO, 2006**).

Τα προβιοτικά χρησιμοποιούνται ως συμπληρώματα διατροφής που έχουν ευεργετική επίδραση στην υγεία του ξενιστή (Pineiro & Stanton, 2007). Ο όρος " προβιοτικά " περιλαμβάνει ένα μεγάλο φάσμα μικροοργανισμών, κυρίως βακτήρια αλλά και ζύμες. Τα βακτήρια, οξυγαλακτικά και μη, του γαλακτικού οξέος (lactic acid bacteria) και οι ζύμες, λόγω του ότι μπορούν να παραμείνουν ζωντανά στο έντερο και να παρέχουν ευεργετικά αποτελέσματα στην υγεία του ξενιστή, μπορούν να θεωρηθούν ως προβιοτικά. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB) είναι τα πιο σημαντικά προβιοτικά και είναι γνωστό ότι έχουν ευεργετικές επιδράσεις στον ανθρώπινο γαστρεντερικό σωλήνα (Anal & Singh, 2007; Holzapfel et al., 2001).

Ένα άλλο ορόσημο στην ιστορία των προβιοτικών είναι αναμφίβολα το έργο του Minoru Shirota. Στις αρχές της δεκαετίας του 1930, στην Ιαπωνία, ο Minoru Shirota κατάφερε να απομονώσει στελέχη που υπάρχουν στο έντερο υγιών ανθρώπων. Τέτοια στελέχη μπορούν να επιβιώσουν και να περάσουν δια μέσου της εντερικής οδού. Ο Shirota είχε χρησιμοποιήσει τέτοια στελέχη για την ανάπτυξη ζυμωμένου γάλακτος και ακολούθως τα χορήγησε σε ασθενείς μελετώντας την επίδρασή τους. Η εταιρία του, Yakult Honsha Company, εισήγαγε το πρώτο προβιοτικό προϊόν στην αγορά, με το όνομα Yakult. Το προϊόν αυτό είναι ένα ζυμωμένο γαλακτοκομικό ρόφημα το οποίο παράγεται από τη ζύμωση αποβουτυρωμένου γάλακτος με το στέλεχος του *Lactobacillus casei* Shirota (Gismondo et al., 1999).

Ο όρος «προβιοτικά» χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1965, από τους Lilly και Stillwell για να περιγράψει τις ουσίες που προάγουν την ανάπτυξη και που παράγονται από ένα πρωτόζωο προς όφελος ενός άλλου (Lilly & Stillwell, 1965). Ο Parker (1974), στο έργο του σχετικά με τα συμπληρώματα διατροφής των ζώων με ευεργετικές επιπτώσεις στην υγεία του ξενιστή πρότεινε ότι, τα προβιοτικά είναι «οργανισμοί και ουσίες τα οποία συμβάλλουν στην εντερική μικροβιακή ισορροπία». Σταδιακά ο ορισμός των προβιοτικών αλλάζει καθώς νέα δεδομένα υποδεικνύουν ότι ακόμη και νεκρά κύτταρα προβιοτικών μικροοργανισμών έχουν ευεργετικά αποτελέσματα στην υγεία. Με αυτή την έννοια, ήδη πρέπει να αρχίσουμε να μιλάμε για τα προβιοτικά του μέλλοντος (Salminen et al.,1999).

1.3.2 Κριτήρια επιλογής προβιοτικών

Για να μπορεί ένα προβιοτικό στέλεχος να παρέχει οφέλη στην υγεία του ανθρώπου, πρέπει να πληροί ορισμένα κριτήρια. Επειδή όμως το εύρος των λειτουργικών και τεχνολογικών

ιδιοτήτων των προβιοτικών στελεχών είναι μεγάλο, κάθε φορά απαιτείται η αξιολόγηση των κριτήριων επιλογής τους. Κατά τη διαδικασία της επιλογής των προβιοτικών στελεχών, αρκετά είναι τα ζητήματα που πρέπει να ληφθούν υπόψη συμπεριλαμβανομένων της επιβίωσης τους σε αντίξοες συνθήκες, της ασφαλείας, της προέλευσης, των λειτουργικών και τεχνολογικών χαρακτηριστικών τους (Chassard, Grattepanche, & Lacroix, 2011). Η τελική επιλογή των στελεχών γίνεται πάντα ύστερα από συνδυασμό των αποτελεσμάτων καλά σχεδιασμένων τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* μελετών, οι οποίες στηρίζονται στα παραπάνω κριτήρια (Morelli, 2000).

1.3.2.1 Ιδιότητες των προβιοτικών

Προκειμένου ένα πιθανό προβιοτικό στέλεχος να είναι σε θέση να ασκήσει ευεργετικές επιδράσεις, αναμένεται να παρουσιάσει ορισμένες επιθυμητές ιδιότητες. Αυτές που επί του παρόντος καθορίζονται από *in vitro* δοκιμές είναι:

- (1) αντοχή στην οξύτητα του στομάχου, στα χολικά άλατα και στο ανθρώπινο γαστρικό υγρό που φαίνεται να είναι ζωτικής σημασίας για την χορήγηση δια μέσου του στόματος,
- (2) προσκόλληση στο βλεννογόνο και στις επιθηλιακές επιφάνειες, είναι μια σημαντική ιδιότητα για την επιτυχή διαφοροποίηση του ανοσοποιητικού, για τον ανταγωνιστικό αποκλεισμό των παθογόνων, καθώς και για την αποτροπή της προσκόλλησης παθογόνων,
- (3) αντιμικροβιακή δράση έναντι παθογόνων βακτηρίων όπως το *Helicobacter pylori*, τη *Salmonella sp.*, τη *Listeria monocytogenes* και το *Clostridium difficile*,
- (4) δραστηριότητα υδρολάσης χολικών αλάτων και
- (5) παραγωγή αντιμεταλλαξιογόνων και αντικαρκινικών ουσιών

Παρ' όλα αυτά, οι πιο πάνω ιδιότητες είναι ακόμα υπό συζήτηση, καθώς υπάρχουν θέματα που πρέπει να ληφθούν υπόψη, όπως οι διαφορές μεταξύ των *in vivo* και *in vitro* δοκιμών. Η καλύτερη προσέγγιση για να καθιερωθούν οι ιδιότητες ενός στελέχους είναι να καθοριστεί ο πληθυσμός-στόχος (target population) και να γίνουν ειδικές μελέτες για την φυσιολογική τους λειτουργία (Mercenier, Lenoir-Wijnkoop, & Sanders, 2008; Saarela et al., 2000).

1.3.2.2 Ασφάλεια των προβιοτικών στελεχών ως προς τον ανθρώπινο οργανισμό

Η ασφάλεια των προβιοτικών στελεχών ως προς τον ανθρώπινο οργανισμό είναι πρωταρχικής σημασίας. Τα στελέχη των ειδών *Lactobacillus* και *Bifidobacterium* έχουν μακρύ ιστορικό ασφαλούς χρήσης στα τρόφιμα με συνέπεια οι μικροοργανισμοί αυτοί να έχουν

χαρακτηριστεί ως GRAS (Generally Recognized As Safe). Ωστόσο, υπάρχουν και μεμονωμένες αναφορές που έχουν συνδέσει τα οξυγαλακτικά (LAB) με περιπτώσεις λοιμώξεων στον ανθρώπινο οργανισμό όπως περιστατικά βακτηριαμίας και ενδοκαρδίτιδας (**Giraffa, 2012**).

Συνεπώς, σχετικά με τα κριτήρια ασφάλειας των προβιοτικών μικροοργανισμών προτείνεται να χρησιμοποιούνται στελέχη, τα οποία:

1. Έχουν απομονωθεί από τη γαστρεντερική οδό υγιών ανθρώπων (ανθρώπινη προέλευση),
2. Θεωρούνται ασφαλή προς κατανάλωση (GRAS),
3. Έχουν μακρύ ιστορικό ασφαλούς χρήσης και δεν έχουν συσχετισθεί με γαστρεντερικές διαταραχές ή ενδοκαρδίτιδα,
4. Δεν παρουσιάζουν αιμολυτική δραστηριότητα,
5. Δεν προκαλούν αποσύζευξη ή αφυδροξυλίωση των χολικών αλάτων και
6. Δεν διαθέτουν ανθεκτικότητα ή δυνατότητα μεταφοράς ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά.

(**Saarela et al., 2000**)

1.3.2.3 Σταθερότητα των προβιοτικών και τεχνολογικά κριτήρια επιλογής

Οι τεχνολογικές ιδιότητες και η σταθερότητα των στελεχών πρέπει επίσης να ληφθούν υπόψη στην επιλογή των προβιοτικών καθώς παίζουν εξίσου σημαντικό ρόλο στην παραγωγή των προβιοτικών τροφίμων (**Saarela et al., 2000**). Στην περίπτωση που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή προϊόντων ζύμωσης πρέπει να προσδίδουν επιθυμητές οργανοληπτικές ιδιότητες στο προϊόν, να έχουν ικανοποιητικό ρυθμό ζύμωσης και να παραμένουν ζωντανοί κατά την διάρκεια της επεξεργασίας (**Grajek, Olejnik, & Sip, 2005**). Επίσης πρέπει να παρουσιάζουν σταθερότητα τόσο κατά τη διαδικασία της παρασκευής, όσο και κατά την αποθήκευση του προϊόντος (**Grajek et al., 2005; Mattila-Sandholm et al., 2002**).

1.3.3 Μηχανισμοί δράσης των προβιοτικών μικροοργανισμών

Τα προβιοτικά έχουν διάφορους μηχανισμούς δράσης παρόλο δεν έχουν ακόμη διευκρινιστεί πλήρως. Πιθανοί μηχανισμοί δράσης είναι: (α) η ρύθμιση της εντερικής χλωρίδας, (β) η παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών, (γ) ο ανταγωνισμός σε θρεπτικά συστατικά διεγείροντας την λειτουργία του φραγμού του βλεννογόνου, (δ) η μείωση του pH στο έντερο και (ε) η ανοσορυθμιστική δράση. Η τελευταία ειδικότερα έχει αποτελέσει το αντικείμενο πολυάριθμων μελετών και υπάρχουν σημαντικές ενδείξεις ότι τα προβιοτικά επηρεάζουν διάφορες πτυχές της επίκτητης ανοσίας και της έμφυτης ανοσολογικής απόκρισης, επάγοντας τη

φαγοκυττάρωση και την έκκριση της ανοσοσφαιρίνης Α (IgA), τροποποιώντας τις αποκρίσεις των Τ-κυττάρων (Guarner & Malagelada, 2003; Isolauri et al., 2001; McNaught & MacFie, 2001).

1.3.4 Ευεργετικές επιδράσεις των προβιοτικών στον ανθρώπινον οργανισμό

Μία ευρεία ποικιλία από πιθανές ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία έχουν αποδοθεί στα προβιοτικά. Μερικά από αυτά έχουν αποδειχθεί επιστημονικά και άλλα εξακολουθούν να χρήζουν περαιτέρω μελέτης σε ανθρώπους (Shah, 2007). Παραδοσιακά, τα προβιοτικά έχουν συσχετιστεί με την υγεία του εντέρου, και το κλινικό ενδιαφέρον έχει επικεντρωθεί περισσότερο στη θεραπεία της οξείας γαστρεντερίτιδας, στην πρόληψη της διάρροιας αλλά και στην ανακούφιση των συμπτωμάτων που προκαλούνται από την δυσανεξία στη λακτόζη. Όμως κατά τη διάρκεια της τελευταίας δεκαετίας, έχει αναφερθεί ένας αυξανόμενος αριθμός ευεργετικών επιδράσεων στην υγεία του ανθρώπου από την κατανάλωση προβιοτικών βακτηρίων, όπως η μείωση της χοληστερόλης του αίματος (McFarland, 2006; Sazawal et al., 2006), η ενίσχυση της ανοσολογικής απόκρισης, η θεραπεία ή η πρόληψη των λοιμώξεων του ουρογεννητικού και αναπνευστικού συστήματος, η πρόληψη ή η ανακούφιση αλλεργιών (Saxelin et al., 2005; Stahl, Donalies, & Nevoigt, 2008), η αντιμικροβιακή δράση και η ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος.

Επιπρόσθετα, τα οφέλη για την υγεία του ξενιστή από την κατανάλωση προβιοτικών δεν περιορίζονται σε εκείνα που προαναφέρθηκαν μέχρι στιγμής καθώς περιλαμβάνουν μια σειρά από πολλά υποσχόμενες επιδράσεις οι οποίες χρειάζονται περαιτέρω ανθρώπινες μελέτες, προκειμένου να τεκμηριωθούν πλήρως. Υπάρχουν ενδείξεις ότι τα τρόφιμα που περιέχουν προβιοτικά βακτήρια μπορεί να παίζουν ρόλο στη μείωση της εμφάνισης του καρκίνου. Οι ακριβείς μηχανισμοί είναι υπό διερεύνηση, αλλά μελέτες έχουν δείξει ότι ορισμένα στελέχη των γενών *Lactobacillus* και *Bifidobacterium* μειώνουν τα επίπεδα των καρκινογόνων ενώσεων που παράγονται από την γλωρίδα του παχέος εντέρου μέσω της ομαλοποίησης της εντερικής διαπερατότητας, της ισορροπίας της εντερικής μικρογλωρίδας καθώς και της παραγωγής των αντιμεταλλαξιογόνων οργανικών οξέων και της ενίσχυσης του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή (Hirayama & Rafter, 1999; Kumar et al., 2010).

Επιπλέον, μπορούν να συμβάλουν στην πρόληψη της στεφανιαίας νόσου με τη μείωση των επιπέδων της χοληστερόλης καθώς και στον έλεγχο της αρτηριακής πίεσης (Sanders, 1999).

Τελευταίο αλλά εξίσου σημαντικό, τα προβιοτικά στελέχη που εμπεριέχονται σε γαλακτοκομικά προϊόντα έχουν αποδειχθεί ότι βελτιώνουν τη θεραπευτική έκβαση σε γυναίκες με βακτηριακή κολπίτιδα, πιθανότατα λόγω της ενίσχυσης της φυσιολογικής κολπικής μικροχλωρίδας σε γαλακτοβακίλλους (**Falagas, Betsi, & Athanasiou, 2007**).

Για τα περισσότερα από τα πιο πάνω οφέλη, απαιτείται η τακτική και επαρκής πρόσληψη $10^6 - 10^9$ cfu/g ζωντανών προβιοτικών κυττάρων κατά την κατανάλωση του προϊόντος (**Lee & Salminen, 1995; Vinderola, Bailo, & Reinheimer, 2000**).

Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι οι ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία εξαρτώνται από το στέλεχος. Δεν υπάρχει όμως ένα προβιοτικό στέλεχος ικανό να παρέχει όλα τα πλεονεκτήματα που αναφέρθηκαν πιο πάνω (**Shah, 2007**).

1.3.5 Προβιοτικοί μικροοργανισμοί και οι εφαρμογές τους

Λαμβάνοντας υπ' όψιν τον ορισμό, ο αριθμός των μικροβιακών ειδών με προβιοτικές ιδιότητες είναι εντυπωσιακός (**Holzapfel et al., 2001**). Μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται ως προβιοτικά αντιπροσωπεύουν διαφορετικούς τύπους όπως, βακτήρια, ζύμες ή μύκητες (**Amara & Shibl, 2015**). Τα διάφορα γένη βακτηρίων που χρησιμοποιούνται πιο συχνά σε προβιοτικά σκευάσματα είναι *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus* και *Streptococcus*. Έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί ορισμένα στελέχη μυκήτων που ανήκουν στο γένος *Saccharomyces*. Μερικοί από τους σημαντικότερους εκπροσώπους παρατίθενται στον Πίνακα 1.3. (**Alvarez-Olmos & Oberhelman, 2001**).

ΠΙΝΑΚΑΣ 1. 3: Μικροοργανισμοί των οποίων τα στελέχη χρησιμοποιούνται ή θεωρούνται για χρήση ως προβιοτικά.

Μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται ως προβιοτικά			
<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Bifidobacterium</i> spp.	Λοιπά οξυγαλακτικά βακτήρια	Λοιποί μικροοργανισμοί
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Bacillus cereus</i> var. <i>to yoi</i>
<i>L. amylovorus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Escherichia coli</i> strain <i>nissle</i>
<i>L. brevis</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. breve</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. eriksonii</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. curvatus</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Sprolactobacillus inulinus</i>	
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>B. longum</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	
<i>L. fermentum</i>	<i>B. pseudolongum</i>		
<i>L. gallinarum</i>	<i>B. thermophilum</i>		
<i>L. gasseri</i>			
<i>L. johnsonii</i>			
<i>L. paracasei</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. rhamnosus</i>			
<i>L. salivarius</i>			

Πηγή: **Holzappel et al., (2001); Leroy, Falony, & Vuyst, (2008)**

Τα πιο ευρέως χρησιμοποιημένα οξυγαλακτικά ως προβιοτικά σκευάσματα, ανήκουν στο γένος *Lactobacillus* (**Holzappel et al., 2001**). Για παράδειγμα, ο *Lactobacillus acidophilus* και ο *Lactobacillus rhamnosus* είναι τα είδη που χρησιμοποιούνται πιο συχνά στις εμπορικές εφαρμογές των προβιοτικών (**Goktepe, Juneja, & Ahmedna, 2005**). Δύο άλλα είδη που παίζουν σημαντικό ρόλο στη γαλακτοβιομηχανία και ιδιαίτερα στην παραγωγή γιαουρτιού αλλά δεν θεωρούνται αυστηρά ως προβιοτικά είναι ο *Streptococcus thermophilus* και ο *Lactobacillus bulgaricus*, δύο από τα πιο σημαντικά από εμπορικής άποψης οξυγαλακτικά (**Felis & Dellaglio, 2007**).

Σε ότι αφορά τη σχέση διατροφής και υγείας, είναι αξιοσημείωτη η ραγδαία ανάπτυξη της αγοράς των αποκαλούμενων «λειτουργικών τροφίμων» που παρατηρείται τα τελευταία χρόνια. Κυρίαρχο κομμάτι αυτής της αγοράς αποτελούν τα προβιοτικά οξυγαλακτικά βακτήρια καθώς και οι εφαρμογές τους (**Mercenier, Pavan, & Pot, 2002**). Συγκεκριμένα έχουν

χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή διαφόρων τύπων τυριών, γιαουρτιών, ροφημάτων με ή χωρίς αλκοόλ και άλλων προϊόντων (Amara, 2013). Επίσης, τα προβιοτικά προ-υπήρχαν παραδοσιακά στα φαγητά, ποτά, αλμυρά ψάρια, στο γιαούρτι, στα διάφορα είδη τυριών και ούτω καθεξής (Amara, 2012).

1.3.6 Νομοθετικό πλαίσιο και ισχυρισμοί υγείας (health claims) για τα προβιοτικά

Τα προβιοτικά βακτήρια γίνονται ολοένα και πιο σημαντικά στο πλαίσιο της ανθρώπινης διατροφής καθώς τα επιστημονικά στοιχεία ολοένα και αυξάνονται σχετικά με τις ιδιότητες, τη λειτουργικότητα και τα οφέλη που μπορούν να παρέχουν στην υγεία του ανθρώπου (Pineiro & Stanton, 2007). Τα προβιοτικά είναι τα μικρόβια που ισχυρίζονται ότι προάγουν την υγεία και την ευημερία του ξενιστή όταν προστίθενται στα τρόφιμα (Katan, 2012).

Στην Ευρωπαϊκή Ένωση, τα προβιοτικά διέπονται από τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 1924/2006 της Ευρωπαϊκής Ένωσης σχετικά με τους ισχυρισμούς επί θεμάτων διατροφής και υγείας που διατυπώνονται για τα τρόφιμα. Στον κανονισμό αυτό αναφέρεται ότι, οι παρασκευαστές των προβιοτικών πρέπει να καταθέτουν οποιονδήποτε ισχυρισμό υγείας στην Ευρωπαϊκή Επιτροπή (ΕΚ), όπου τα αιτήματά τους θα αξιολογούνται επιστημονικά από την Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (European Food Safety Authority, EFSA) και, είτε θα γίνονται δεκτά είτε θα απορρίπτονται (Κανονισμός 1924/2006). Μέχρι και σήμερα, οι ισχυρισμοί υγείας για τα προβιοτικά έχουν απορριφθεί από την Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA), λόγω της έλλειψης αποδεικτικών στοιχείων των ισχυριζόμενων ευεργετικών επιδράσεων στην ανθρώπινη υγεία και ευημερία. Η απόρριψη των ισχυρισμών υγείας για τα προβιοτικά προϊόντα οφείλεται κυρίως σε 2 πιθανές εξηγήσεις (Katan, 2012).

Η πρώτη ίσως να οφείλεται στο ότι το προϊόν δεν παρουσιάζει κάποια ουσιαστική ευεργετική επίδραση στην υγεία του ανθρώπου (Katan, 2012). Το δεύτερο πρόβλημα που αντιμετωπίζουν οι κατασκευαστές των προβιοτικών προϊόντων είναι ότι, ακόμη και αν ένα προβιοτικό συμβάλει στην πρόληψη ή στην θεραπεία ασθένειας, δεν επιτρέπεται το όφελος αυτό να διαφημίζεται. Συγκεκριμένα, στο άρθρο 2.1 της Οδηγίας 2000/13/ΕΚ της Ευρωπαϊκής Ένωσης περιέχονται όλοι οι κανόνες που προστατεύουν τους καταναλωτές από παραπλάνηση. Έχει απαγορευθεί η χρήση του όρου «ιατρικοί ισχυρισμοί» οι οποίοι εκφράζουν το εξής « Η ετικέτα και η χρησιμοποιούμενες μέθοδοι δεν θα πρέπει να προσδίδουν σε οποιαδήποτε τροφή

την ιδιότητα της πρόληψης, θεραπείας ή ίασης κάποιας ασθένειας ή να αναφέρονται σε παρόμοιες ιδιότητες». Σύμφωνα λοιπόν με τη Οδηγία 2000/13/EK της Ε.Ε., δεν επιτρέπεται κατά την επισήμανση, παρουσίαση ή διαφήμιση του προϊόντος η αναφορά σε πρόληψη ή θεραπεία κάποιας ασθένειας (**Οδηγία 2000/13**). Συνεπώς, ο κανονισμός της Ε.Ε. καθιστά δύσκολο το έργο της έγκρισης των προβιοτικών λόγω της απαγόρευσης των «ιατρικών ισχυρισμών» (medical claims). Οι παραγωγοί των προβιοτικών έχουν διαμαρτυρηθεί ότι δεν μπορούν να αποδείξουν την αποτελεσματικότητα των προβιοτικών κατά της έκβασης της νόσου, όταν οι κανονισμοί της Ε.Ε. απαγορεύουν την αναφορά των «ιατρικών ισχυρισμών». Αν και υπάρχουν άφθονες ενδείξεις ότι η κατανάλωση προβιοτικών προϊόντων προκαλεί αύξηση του αριθμού των προβιοτικών βακτηρίων στο έντερο και στα κόπρανα, η EFSA δεν θεωρεί ότι αυτό μπορεί να κριθεί ως ευεργετική επίδραση στην υγεία του ξενιστή (**Katan, 2012**).

1.3.7 Προβιοτικά προϊόντα

Προβιοτικό τρόφιμο ορίζεται αυτό που περιέχει ζωντανούς προβιοτικούς μικροοργανισμούς σε επαρκείς πληθυσμούς ενσωματωμένους σε ένα κατάλληλο πλέγμα (**Gibson et al., 2004; Saxelin et al., 2003**). Αυτό σημαίνει ότι η βιωσιμότητα και η μεταβολική τους δραστηριότητα πρέπει να διατηρούνται σε όλα τα στάδια της επεξεργασίας των τροφίμων, από την παραγωγή μέχρι τη κατανάλωσή του, καθώς επίσης θα πρέπει να είναι σε θέση να επιβιώνουν στο γαστρεντερικό σωλήνα (**Sanz, 2007**). Οι πληροφορίες που υπάρχουν σχετικά με την απαιτούμενη συγκέντρωση των προβιοτικών μικροοργανισμών για τις βιολογικές τους δράσεις, οδηγούν στο συμπέρασμα ότι ποικίλει η σχέση συνάρτησης του στελέχους και του επιθυμητού αποτελέσματος για την υγεία του ξενιστή (**Champagne et al., 2005**). Η αποτελεσματικότητα των προβιοτικών βακτηρίων εξαρτάται από την δοσολογία. Για να έχουν θετικές επιδράσεις στην υγεία του ξενιστή, θα πρέπει να εγκατασταθούν σε συγκεκριμένους αριθμούς στο γαστρεντερικό σωλήνα (**Kailasapathy & Sultana, 2003**). Παρ' όλα αυτά, οι πληθυσμοί της τάξης των 10^6 - 10^7 cfu/g στο τελικό προϊόν έχει καθιερωθεί ως η επαρκής ποσότητα προβιοτικών καλλιιεργειών στα τρόφιμα (**Talwalkar et al., 2004**), φθάνοντας 10^8 - 10^9 cfu/g, το οποίο παρέχεται από την ημερήσια πρόσληψη 100 g ή 100 ml τροφής, προς όφελος της ανθρώπινης υγείας (**Jayamanne & Adams, 2006**).

Το εύρος των τροφίμων που περιέχουν προβιοτικά στελέχη είναι μεγάλο και εξακολουθεί να αυξάνεται. Τα κύρια προβιοτικά προϊόντα που υπάρχουν στην αγορά είναι τα γαλακτοκομικά

προϊόντα, συμπεριλαμβανομένων, τα ζυμωμένα γάλατα, το τυρί, το παγωτό, το βουτυρόγαλα, το γάλα σε σκόνη, και το γιαούρτι, το οποίο έχει το μεγαλύτερο μερίδιο των πωλήσεων (Stanton et al., 2001). Εφαρμογές προβιοτικών σε μη γαλακτοκομικά τρόφιμα περιλαμβάνουν προϊόντα σόγιας, μπάρες δημητριακών, δημητριακά και μια ποικιλία από χυμούς ως κατάλληλα μέσα προβιοτικών (Ewe et al., 2007).

Ως εκ τούτου, προκειμένου να διατηρηθεί η εμπιστοσύνη των καταναλωτών στα προβιοτικά προϊόντα, είναι σημαντικό να διασφαλιστεί ένα υψηλό ποσοστό επιβίωσης των προβιοτικών βακτηρίων κατά την διάρκεια της ζωής του προϊόντος στο ράφι (Saxelin et al., 1999).

1.3.7.1 Γαλακτοκομικά προβιοτικά προϊόντα

Τα γαλακτοκομικά προϊόντα με ενσωματωμένα προβιοτικά βακτήρια έχουν κερδίσει το ενδιαφέρον των καταναλωτών και τα προβιοτικά αποτελούν περίπου το 65% της παγκόσμιας αγοράς των ``λειτουργικών τροφίμων`` (Agrawal, 2005). Η γαλακτοβιομηχανία, ειδικότερα, έχει βρει προβιοτικές καλλιέργειες οι οποίες είναι εργαλείο για την ανάπτυξη νέων λειτουργικών προϊόντων (Champagne et al., 2005). Το γιαούρτι και τα ζυμωμένα γάλατα είναι τα κύρια οχήματα για προβιοτικές καλλιέργειες. Ωστόσο, νέα προϊόντα εισάγονται στη διεθνή αγορά, όπως επιδόρπια με βάση το γάλα, γάλα σε μορφή σκόνης για νεογέννητα βρέφη, παγωτά, βούτυρο, μαγιονέζα, διάφορα είδη τυριών καθώς και σκευάσματα με τη μορφή καψουλών ή σκόνης που πρόκειται να διαλυθούν σε κρύα ποτά (Champagne et al., 2005; Komatsu, Buriti, & Saad, 2008; Saad, 2006). Υπάρχει έτσι μια αύξηση της ποικιλίας των προϊόντων που διατίθενται στην αγορά και οι καταναλωτές έρχονται όλο και πιο κοντά στα προβιοτικά, με συνεπακόλουθο την αύξηση της ζήτησης των προϊόντων αυτών (Cruz et al., 2009).

Σημαντική είναι η άποψη ότι η έκθεση σε μικρή ηλικία μπορεί να διευκολύνει την μόνιμη εγκατάσταση των προβιοτικών προάγοντας την υγεία του ξενιστή. Το προβιοτικό τρόφιμο πρέπει να είναι κατάλληλο για όλες τις ηλικίες και ιδιαίτερα για τα μικρά παιδιά. Η ευχάριστη γεύση και η ελκυστική υφή είναι απαραίτητα για όλα τα προβιοτικά προϊόντα διατροφής, ανεξάρτητα από τον ισχυρισμό υγείας ('health message') που συνδέονται με αυτά (Champagne et al., 2005; Saxelin et al., 2005).

Σε αυτό το πλαίσιο, το παγωτό είναι ένα ενδιαφέρον προβιοτικό τρόφιμο (Singh, Damle, & Chawla, 2011), γι' αυτό και στην παρούσα μελέτη έγινε προσπάθεια της παρασκευής

προβιοτικού παγωτού τύπου Καϊμάκι με την προσθήκη του προβιοτικού στελέχους *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179.

1.3.7.2 Προβιοτικό παγωτό

Ανάμεσα στα γαλακτοκομικά προϊόντα με ζωντανές καλλιέργειες, τα προβιοτικά παγωτά και τα παγωμένα ζυμωμένα επιδόρπια έχουν κερδίσει το ενδιαφέρον των καταναλωτών και έχουν γίνει δημοφιλή τα τελευταία χρόνια (**Kailasapathy & Sultana, 2003**). Η ενσωμάτωση προβιοτικών βακτηρίων στο παγωτό είναι ιδιαίτερα πλεονεκτική δεδομένου ότι, εκτός του γεγονότος ότι είναι τροφή πλούσια σε θρεπτικά συστατικά (π.χ. πρωτεΐνες γάλακτος, λίπος, λακτόζη, βιταμίνες, ανόργανα συστατικά κ.ά.), το παγωτό είναι ευρέως αποδεκτή τροφή από το κοινό (**Çaglar et al., 2008; Viana et al., 2008**). Παρόλο που πολλά παγωτά είναι πλούσια σε ζάχαρη και λίπος, το παγωτό θεωρείται γενικά ως μια θρεπτική τροφή, αφού περιέχει γάλα και μερικές φορές φρούτα. Η προσθήκη προβιοτικών καλλιεργειών στα παγωτά, εκτός από την αύξηση της αξίας του προϊόντος, παρέχει το πλεονέκτημα του να είναι λειτουργικό (**Çaglar et al., 2008**).

Η περίπτωση των προβιοτικών παγωτών είναι πρόκληση καθώς το παγωτό δεν καταναλώνεται όλες τις εποχές του χρόνου από την πλειοψηφία των καταναλωτών, εξαιτίας της φύσης του (παγωμένο επιδόρπιο) και συνήθως στις περισσότερες χώρες καταναλώνεται κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού, και ως εκ τούτου θεωρείται ως περιστασιακή τροφή. Η έναρξη της παραγωγής παγωτών με προβιοτικές καλλιέργειες θα πρέπει να συνοδεύεται από εκπαιδευτικές εκστρατείες με στόχο να ενθαρρύνουν τους καταναλωτές προς μια πιο σταθερή κατανάλωση δείχνοντάς τους τα οφέλη που θα παρέχονται από την προσθήκη προβιοτικών βακτηρίων στο παγωτό. Πρόσφατα, έχει αναφερθεί το γεγονός ότι οι καταναλωτές δεν γνωρίζουν τα οφέλη από την κατανάλωση τροφίμων που περιέχουν προβιοτικά βακτήρια (**Viana et al., 2008**).

Επιπλέον, το γεγονός ότι είναι ένα κατεψυγμένο προϊόν θα μπορούσε συμβάλλει και αυτό με την σειρά του, λόγω της μεγάλης διάρκειας ζωής του. Ωστόσο, το προϊόν θα πρέπει να έχει σχετικά υψηλές τιμές pH - από 5,5 έως 6,5, το οποίο οδηγεί στην επιβίωση των οξυγαλακτικών καλλιεργειών κατά την αποθήκευση του προϊόντος, ενώ η χαμηλή οξύτητα (**Çaglar et al., 2008**), η ευχάριστη γεύση και η ελκυστική του υφή (**Davies & Obafemi, 1985**), αυξάνουν την αποδοχή του προϊόντος από τους καταναλωτές (**Çaglar et al., 2008**).

Ορισμένες μελέτες έχουν αποδείξει την καταλληλότητα του παγωτού για την παροχή προβιοτικών μικροοργανισμών στη διατροφή του ανθρώπου (Haynes & Playne, 2002; Hekmat & McMahon, 1992; Kailasapathy & Sultana, 2003). Μερικές μελέτες έχουν επικεντρωθεί στον έλεγχο της επιβίωσης των προβιοτικών βακτηρίων στο παγωτό που παράγεται με διάφορες μεθόδους όπως: (α) με τη ζύμωση του μίγματος παγωτού (Davidson et al., 2000; Favaro-Trindade et al., 2006; Hekmat & McMahon, 1992; Akin, 2005), (β) χωρίς την ζύμωση του μίγματος (Alamprese et al., 2002; Haynes & Playne, 2002), (γ) χρησιμοποιώντας διαφορετικές αναλογίες μιγμάτων που έχουν υποστεί ζύμωση (Christiansen, Edelsten, Kristiansen, & Nielsen, 1996; Hagen & Narvhus, 1999; Hekmat & McMahon, 1992; Inoue, Shiota, & Ito, 1998) και (δ) στην προσθήκη ζυμωμένου γάλακτος σε μίγμα παγωτού (Christiansen et al., 1996; Hagen & Narvhus, 1999). Προκειμένου να εξασφαλιστεί ότι το προϊόν θα παρέχει επαρκή αριθμό μικροοργανισμών, τα κύτταρα θα πρέπει να έχουν επιβιώσει στην κατάψυξη και στην αποθήκευση υπό συνθήκες κατάψυξης -20 °C έως -25 °C (Alamprese et al., 2002).

Το παγωτό που έχει υποστεί ζύμωση είναι ένα σύνθετο ζυμωμένο παγωμένο γαλακτοκομικό επιδόρπιο που συνδυάζει τα φυσικά χαρακτηριστικά του παγωτού με τις οργανοληπτικές και θρεπτικές ιδιότητες των ζυμωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων (Pinto et al., 2012). Ο Donkor (2007) ανέφερε ότι τα γένη *Bifidobacterium* και *Lactobacillus* θα μπορούσαν να απελευθερώσουν βιοδραστικές ενώσεις (πεπτίδια και ισοφλαβόνες) κατά τη διάρκεια της ζύμωσης στο αγελαδινό γάλα και το γάλα της σόγιας. Η ζύμωση των μιγμάτων παγωτού μπορεί να μεταβάλει σημαντικά τις ιδιότητες του παγωτού, όπως τις κολλώδεις, φυσικοχημικές, οργανοληπτικές (γεύση, άρωμα, υφή) και την θρεπτική του αξία (Aboufazli, Baba, & Misran, 2015; Soukoulis, Fisk, & Bohn, 2014). Ο Salem et al., (2006) διαπίστωσαν ότι η ανάμιξη του μίγματος παγωτού με γάλα ενισχυμένο με προβιοτικά στελέχη αύξησαν το ιξώδες στα ωριμασμένα μίγματα παγωτού (που έχουν υποστεί την ωρίμανση στους 4°C/24h). Το ποσό της αύξησης του ιξώδους ήταν υψηλότερο σε παγωτά που περιέχουν *L. gasseri*, *L. rhamnosus* και *L. reuteri* από εκείνα που περιέχουν *L. acidophilus* και *B. bifidum* (Salem, Fathi, & Awad, 2006).

Λίγες δημοσιεύσεις έχουν αξιολογήσει την αποτελεσματικότητα των μη-ζυμωμένων παγωτών για να μεταφέρουν είδη *Lactobacillus*. Συγκεκριμένα, οι Abghari et al., (2011), αναφέρουν ότι, ο αριθμός των κυττάρων του είδους *L. rhamnosus* δεν μειώθηκε σημαντικά κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης μη ζυμωμένου προβιοτικού παγωτού. Παρόμοια αποτελέσματα

ελήφθησαν και από τους Alamprese et al., (2005), οι οποίοι αναφέρουν πως δεν παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στην επιβίωση των *L. acidophilus* και *L. rhamnosus* GG κατά την διάρκεια της αποθήκευσης του προϊόντος για 30 ημέρες στους -16°C.

Οι Çaglar et al., (2008), αναφέρουν ότι η τακτική κατανάλωση προβιοτικού παγωτού που περιέχει *Bifidobacterium lactis* Bb-12, αναφέρθηκε ότι μειώνει τον αριθμό των ζωντανών στρεπτόκοκκων και γαλακτοβάκιλλων του σιελογόνου. Οι μικροοργανισμοί αυτοί σχετίζονται με την τερηδόνα, πιθανό λόγω της προσκόλλησης στο στοματικό βλεννογόνο και στους οδοντικούς ιστούς, ως μέρος ενός βιοφίλμ, καθώς επίσης τα προβιοτικά ανταγωνίζονται με τους παθογόνους μικροοργανισμούς του στόματος.

Η χρήση φυτικών συστατικών μπορεί να επηρεάσει και την ανάπτυξη και την επιβίωση των προβιοτικών βακτηρίων εκτός από τις φυσικές ιδιότητες του παγωτού (π.χ. ιξώδες, ρυθμός τήξης, σκληρότητα). Για παράδειγμα, οι Hermanto & Masdiana (2011) έδειξαν ότι, η προσθήκη εκχυλίσματος σόγιας υπό μορφή σκόνης στο παγωτό αύξησε τον πληθυσμό των οξυγαλακτικών, αύξηση η οποία οφείλεται στο περιεχόμενο των ολιγοσακχαρίτων και των κρυο-προστατευτικών τους ιδιοτήτων (Hermanto & Masdiana, 2011). Ο Heenan et al. (2004) ανέφεραν ότι το γάλα της σόγιας θα μπορούσε να βελτιώσει το pH του προβιοτικού παγωτού με αποτέλεσμα την αυξημένη επιβίωση των προβιοτικών μικροοργανισμών (Heenan et al., 2004).

Η σοκολάτα έχει προταθεί ως ένας καλός φορέας για τη χορήγηση των προβιοτικών βακτηρίων (Possemiers, Marzorati, Verstraete, & de Wiele, 2010) και οι λυοφιλιωμένες καλλιέργειες όταν συμπιέζονται σε μικρά δισκία μπορεί να είναι πιο σταθερές κατά την αποθήκευση του παγωτού (Chan & Zhang, 2002).

Επίσης, η μικροενθυλάκωση (ME), έχει συχνά προταθεί για την ενίσχυση της επιβίωσης των προβιοτικών βακτηρίων στην κατάψυξη κατά τη διάρκεια της παρασκευής (Ahmadi et al., 2014; Sheu, Marshall, & Heymann, 1993), και αποθήκευσης του προϊόντος. Οι τεχνολογίες μικροενθυλάκωσης οι οποίες έχουν δοκιμαστεί στο παρελθόν βασίστηκαν σε σωματίδια πηκτώματος (gel particles) είτε με αλγινικό είτε με καραγενάνη (Ahmadi et al., 2014; Shah & Ravula, 2000; Sheu et al., 1993) στην λυοφιλίωση (Pinto et al., 2012) ή στη χρήση γαλακτώματος (Song et al., 2011).

Η απώλεια της βιωσιμότητας των προβιοτικών μικροοργανισμών στο παγωτό γιαούρτι μπορεί να οφείλεται στην οξύτητα, σε τραυματισμό των κυττάρων λόγω της χαμηλής θερμοκρασίας (κατάψυξη) και λόγω της τοξικότητας του οξυγόνου στο στάδιο της διόγκωσης

(overrun) του παγωτού (**Hekmat & McMahon, 1992; Ravula & Shah, 1998**). Η ενσωμάτωση του αέρα είναι απαραίτητη για να αποκτήσει την επιθυμητή διόγκωση το παγωτό, ωστόσο, η περίσσεια οξυγόνου θα επηρεάσει την ανάπτυξη του μικρο-αερόφιλου *Lactobacillus acidophilus* και των αναερόβιων bifidobacteria (**Kailasapathy & Sultana, 2003**). Οι Laroia και Martin (1991), οι Hekmat και McMahon (1992), και οι Haynes και Playne (2002), ανέφεραν ικανοποιητική επιβίωση προβιοτικών βακτηρίων σε παγωμένα γαλακτοκομικά επιδόρπια (**Haynes & Playne, 2002; Hekmat & McMahon, 1992; Laroia & Martin, 1991**). Κατά συνέπεια, οι βιομηχανίες ενδιαφέρονται να αναπτύξουν μία μέθοδο που να μπορεί να παρέχει υψηλή συγκέντρωση προβιοτικών στελεχών στο προϊόν (**Talwalkar & Kailasapathy, 2004**).

Ωστόσο, οι μικροοργανισμοί αυτοί ανάλογα με τα χαρακτηριστικά τους θα μπορούσε να είναι ασταθείς σε αυτό το προϊόν λόγω των μηχανικών επεμβάσεων κατά την παρασκευή του προϊόντος. Προκειμένου να διασφαλιστεί ότι το προϊόν παρέχει μια επαρκή περιεκτικότητα σε προβιοτικούς μικροοργανισμούς, τα κύτταρα θα πρέπει να επιβιώνουν στην κατάψυξη και στην αποθήκευση του προϊόντος σε χαμηλές θερμοκρασίες (-18°C έως -25° C). Η κατάψυξη και η απόψυξη είναι από τις κύριες αιτίες που προκαλούν διαφόρων βαθμών βλάβες στα κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων τον θάνατο των μικροοργανισμών, την αναστολή της ανάπτυξης τους, την μείωση ή την διακοπή της μεταβολικής τους δραστηριότητας (**Davies & Obafemi, 1985; Speck & Cowman, 1969**). Πολλές μελέτες έχουν αποδείξει ότι, οι χαμηλότερες θερμοκρασίες μπορούν να εξασφαλίσουν ένα υψηλότερο ποσοστό επιβίωσης και αύξηση της θνησιμότητας με την πάροδο του χρόνου αποθήκευσης (**Thunell, Sandine, & Bodyfelt, 1984**).

Συνεπώς, κατά τη διάρκεια της παρασκευής του προβιοτικού παγωτού, θα πρέπει να βελτιωθεί η διαδικασία παραγωγής, με στόχο την αυξημένη επιβίωση των προβιοτικών βακτηρίων, έτσι ώστε να διασφαλίζονται οι λειτουργικές ιδιότητες του προϊόντος. Αυτό σημαίνει ότι οι κύριες προκλήσεις που εμπλέκονται στην παραγωγή του συμβατικού παγωτού θα πρέπει να ληφθούν επίσης υπόψη κατά την ανάπτυξη των προβιοτικών παγωτών. Οι προκλήσεις αυτές περιλαμβάνουν: (α) την συμβολή της μικροδομής και των κolloειδών ιδιοτήτων του που παρέχονται από τα συστατικά της συνταγής, (β) την γνώση και τον έλεγχο της κρυστάλλωσης του νερού, (γ) την επιλογή των κατάλληλων σταθεροποιητών, (δ) την κατανόηση και τον έλεγχο της αποσταθεροποίησης του λίπους και (ε) τέλος τη λειτουργικότητα του γαλακτωματοποιητή (**Goff, 2008**). Με άλλα λόγια, η ενσωμάτωση των προβιοτικών βακτηρίων σε ένα σκεύασμα παγωτού δεν πρέπει να επηρεάζει την ποιότητα του προϊόντος. Συνεπώς, οι φυσικοχημικές

ιδιότητες που εμπλέκονται στον έλεγχο της ποιότητας του προϊόντος όπως ο ρυθμός τήξης και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, θα πρέπει να είναι τα ίδια ή ακόμα καλύτερα, σε σύγκριση με ένα συμβατικό παγωτό (Cruz et al., 2009).

Πολυάριθμες στρατηγικές έχουν προταθεί για τη βελτίωση της επιβίωσης των προβιοτικών στο παγωτό. Οι πιο ευρέως μελετημένες στρατηγικές είναι η επιλογή του στελέχους, η προσθήκη πρεβιοτικών ή άλλων σακχάρων, η μικροενθυλάκωση της προβιοτικής καλλιέργειας, η προσθήκη γλυκερόλης, το μέγεθος του εμβολίου της καλλιέργειας, η χρήση των υποκατάστατων της ζάχαρης, η ρύθμιση του pH, το ποσοστό της διόγκωσης, η υγρή καλλιέργεια σε σχέση την λυοφιλιωμένη καλλιέργεια, το επίπεδο της ζύμωσης του παγωτού και οι συνθήκες κατάψυξης (Abghari et al., 2011; Ahmadi et al., 2014; Akalin & Erisir, 2008; Akin, 2005; Alamprese et al., 2005; Alamprese et al., 2002; Christiansen et al., 1996; Di Criscio et al., 2010; Ferraz et al., 2012; Godward & Kailasapathy, 2003; Haynes & Playne, 2002; Hekmat & McMahon, 1992; Homayouni et al., 2008; Margarinos et al., 2007; Pinto et al., 2012; Song et al., 2011; Turgut & Cakmakci, 2009).

1.3.7.3 Τεχνολογία παρασκευής προβιοτικού παγωτού

Σε γενικές γραμμές τα στάδια παρασκευής προβιοτικού παγωτού είναι: η ζύγιση των συστατικών (γάλα, γαλακτωματοποιητές/σταθεροποιητές, γάλα σε σκόνη, ζάχαρη), η ανάμιξη, η παστερίωση, η ψύξη σε μια θερμοκρασία περίπου 37-40 °C για την προσθήκη της προβιοτικής καλλιέργειας, ακολούθως η ζύμωση μέχρι να φθάσει σε ένα pH 4.7 έως 4.8, ή η προσθήκη ενός ζυμωμένου εμβολίου που περιέχει την προβιοτική καλλιέργεια, ψύξη στους 4°C και ωρίμανση του μίγματος στους 4°C για 24 h. Τα στάδια της παρασκευής μέχρι το σημείο αυτό έχουν ως αποτέλεσμα την παραγωγή του μίγματος παγωτού. Το μίγμα ακολούθως αναδεύεται και καταψύχεται στην παγωτομηχανή ώστε να παραχθεί το τελικό προϊόν, συσκευάζεται και διατηρείται στη κατάψυξη καθ' όλη τη μεταφορά του, την εμπορική διανομή και συντήρησή του, και την αποθήκευσή του για κατανάλωση. Κατά τη διάρκεια όλων αυτών των σταδίων μετά την κατάψυξη, η θερμοκρασία του κατεψυγμένου προϊόντος θα πρέπει να ελέγχεται αυστηρά (Viana et al., 2008).

1.4 Σκοπός της μελέτης

Ο σκοπός της μελέτης ήταν η παρασκευή προβιοτικού παγωτού τύπου «Καϊμάκι» που να περιέχει υψηλά επίπεδα του προβιοτικού μικροοργανισμού *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 ($>10^6$ - 10^7 cfu/g, η επαρκής ποσότητα προβιοτικού μικροοργανισμού ανά g προϊόντος). Το στέλεχος αυτό ανήκει στη συλλογή μικροοργανισμών ACA-DC (Agricultural College Collection-Dairy Collection) του Εργαστηρίου Γαλακτοκομίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και έχει απομονωθεί από τυρί Κασέρι, αυθόρμητης ζύμωσης.

Από μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί, έχει διαπιστωθεί ότι το συγκεκριμένο στέλεχος παρουσιάζει αντιμικροβιακή δράση εναντίον του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella spp* τόσο σε *in vitro* όσο και σε *in vivo* δοκιμές (Zoumproulou et al., 2008; Zoumproulou et al., 2010). Επιπλέον, από δοκιμές *in vivo* που έχουν γίνει, έχει διαπιστωθεί ότι το στέλεχος *L.fermentum* ACA-DC 179 παρουσίασε αντιμικροβιακή δράση σε πέντε στελέχη *Streptococcus* μεταξύ των οποίων οι δύο ήταν παθογόνοι μικροοργανισμοί, όπως ο *Streptococcus oralis* και ο *Streptococcus pneumoniae*. Η ευαισθησία αυτής της αντιμικροβιακής δραστηριότητας σε πρωτεολυτικά ένζυμα αποκάλυψε νέα αντιμικροβιακή ένωση (εις) από το στέλεχος αυτό, διαφορετική από την ένωση (εις), που είναι υπεύθυνη για την ανασταλτική δράση έναντι της *Salmonella* (De Vuyst et al., 2004; Makras et al., 2006; Zoumproulou et al., 2008). Επίσης το στέλεχος *L. fermentum* ACA-DC 179 παρουσίασε ισχυρό αντιφλεγμονώδη δυναμικό, τόσο σε *in vitro* όσο και σε *in vivo* δοκιμές (De Vuyst et al., 2004). Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι όχι μόνο η αντιμικροβιακή ένωση (εις), αλλά κυρίως οι ανοσορυθμιστικές ιδιότητες του *L. fermentum* ACA-DC 179 είναι υπεύθυνες για την αντιμικροβιακή δράση έναντι του γένους *Salmonella* σε *in vivo* δοκιμές (Zoumproulou et al., 2008).

Επιπρόσθετα, το στέλεχος *L. fermentum* ACA-DC 179 μελετήθηκε προκειμένου να αξιολογηθεί το προβιοτικό δυναμικό του. Με βάση τα αποτελέσματα, οι Zoumproulou et al., (2008), αναφέρουν ότι το συγκεκριμένο στέλεχος πληρούσε τα κριτήρια ασφαλείας σχετικά με την αιμολυτική δραστηριότητα και την αντίσταση του στα αντιβιοτικά.

Τελευταίο αλλά εξίσου σημαντικό, το στέλεχος *L. fermentum* ACA-DC 179 παρουσίασε πολλά υποσχόμενες ανοσορυθμιστικές ιδιότητες, οι οποίες συσχετίστηκαν με την προστασία έναντι της κολίτιδας σε δοκιμές που έγιναν σε ζώα και φαίνεται επίσης να συσχετίζονται και με την αντιμικροβιακή δράση έναντι του γένους *Salmonella* που ασκείται από το συγκεκριμένο στέλεχος σε *in vivo* δοκιμές. Κατά συνέπεια, τα πιο πάνω αποτελέσματα χρήζουν περαιτέρω

μελέτης, συμπεριλαμβανομένων των κλινικών δοκιμών, για την αξιολόγηση του δυναμικού του *L. fermentum* ACA-DC 179 ως ένα νέο προβιοτικό στέλεχος στη βιομηχανία τροφίμων (Zoumpoulou et al., 2008).

Συγκεκριμένα, για την παρασκευή των προβιοτικών παγωτών εφαρμόστηκαν 4 διαφορετικές παραλλαγές μεθόδου παραγωγής όπως αναφέρονται παρακάτω:

1. χωρίς ζύμωση του μίγματος παγωτού και προσθήκη της καλλιέργειας πριν την ωρίμανσή του (Not Fermented Before Ripening, NF-BR),
2. με ζύμωση του μίγματος παγωτού και προσθήκη της καλλιέργειας πριν την ωρίμανσή του (Fermented Before Ripening, F-BR),
3. χωρίς ζύμωση του μίγματος παγωτού και προσθήκη της καλλιέργειας μετά την ωρίμανσή του (Not Fermented After Ripening, NF-AR) και
4. με ζύμωση του μίγματος παγωτού και προσθήκη της καλλιέργειας μετά την ωρίμανσή του (Fermented After Ripening, F-AR).

Κατά τη διάρκεια της συντήρησης του προϊόντος στους -20 °C, μελετήθηκε η επιβίωση του προβιοτικού μικροοργανισμού *L. fermentum* ACA-DC 179 για το χρονικό διάστημα 28 ημερών. Επιπρόσθετα πραγματοποιήθηκε μοριακή μέθοδος ταυτοποίησης του στελέχους *L. fermentum* ACA-DC 179 καθώς και της μικροβιακής χλωρίδας των παγωτών. Τέλος, τα δείγματα παγωτού αξιολογήθηκαν ως προς τις φυσικοχημικές (pH, οξύτητα, διόγκωση, ρυθμός τήξης, λίπος και πρωτεΐνη) και οργανοληπτικές τους ιδιότητες.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Βακτηριακά στελέχη

Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη ήταν ο *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 και το *Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii* LMG 16424. Το στέλεχος *L. fermentum* ACA-DC 179 ανήκει στη συλλογή μικροοργανισμών ACA-DC (Agricultural College Collection-Dairy Collection) του Εργαστηρίου Γαλακτοκομίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και έχει απομονωθεί παλαιότερα από Κασέρι, ένα παραδοσιακό ελληνικό τυρί, που παρασκευάστηκε χωρίς την χρήση εναρκτήριων καλλιιεργειών. Το στέλεχος *P. shermanii* LMG 16424 ανήκει στην συλλογή BCCM/LMG Bacteria Collection του εργαστηρίου της Μικροβιολογίας του Πανεπιστημίου της Γάνδης στο Βέλγιο (Laboratory of Microbiology, University of Gent, Gent, Belgium) και έχει απομονωθεί από τυρί Gruyère.

Τα στελέχη συντηρούνταν στους -80°C σε vials που περιείχαν θρεπτικό υλικό MRS broth για το στέλεχος *L. fermentum* ACA-DC 179 και RCM broth για το στέλεχος *P. shermanii* LMG 16424 και 20% γλυκερόλη αντίστοιχα.

2.2 Θρεπτικά υποστρώματα

Πριν την παρασκευή του παγωτού, πραγματοποιήθηκε η μελέτη για την ανίχνευση και την επιλεκτική αρίθμηση των στελεχών *L. fermentum* ACA-DC 179 και *P. shermanii* LMG 16424 που προορίζονταν να χρησιμοποιηθούν για την παρασκευή του προβιοτικού παγωτού. Τα ανωτέρω στελέχη αναπτύχθηκαν σε διάφορους συνδυασμούς συνθηκών (σε κλίβανο 5% CO₂ ή Gas Pack ή μικροαερόφιλα) και θερμοκρασίας (30°C ή 37°C), για χρονικό διάστημα 3 ημερών (72h) στα εν δυνάμει επιλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα: (α) MRS agar pH=7.0, (β) MRS agar pH=5.2, (γ) BHI agar, (δ) YEL agar, (ε) YEL agar + cloxacillin, (στ) RCM agar, (ζ) M₁₇ agar, και (η) Pal Propiobac στους 30°C, αναερόβια για 6 ημέρες. Συγκεκριμένα, τα δυο στελέχη αναπτύχθηκαν μεμονωμένα σε όλα τα παραπάνω θρεπτικά υποστρώματα και σε όλους τους συνδυασμούς συνθηκών και θερμοκρασίας.

2.3 Προετοιμασία καλλιέργειας

Τα στελέχη *L. fermentum* ACA-DC 179 και *P. shermanii* LMG 16424 αναπτύχθηκαν σε γάλα, προκειμένου να επιλεγθούν οι συνθήκες για την προετοιμασία της καλλιέργειας για την παρασκευή του παγωτού στο γάλα.

Συγκεκριμένα, το στέλεχος *L. fermentum* ACA-DC 179 αναπτύχθηκε σε πλήρες αγελαδινό γάλα υψηλής θερμικής επεξεργασίας (ΥΘΕ) και σε θρεπτικό μέσο MRS broth για διάστημα 2 ημερών (48h). Στο χρονικό αυτό διάστημα, μετρήθηκε το pH (0 h έως 48 h) και καταμετρήθηκαν οι πληθυσμοί (0h έως 48 h).

Από την άλλη πλευρά, το προπιονικό στέλεχος *P. shermanii* LMG 16424 αναπτύχθηκε σε πλήρες αγελαδινό γάλα (ΥΘΕ) + yeast extract.0.3% και σε θρεπτικό μέσο RCM broth + yeast extract.0.3% για διάστημα 4 ημερών (96 h). Το pH του στελέχους *P. shermanii* LMG 16424 μετρήθηκε για διάστημα 4 ημερών (0 h έως 96 h) και καταμετρήθηκαν οι πληθυσμοί για διάστημα 5 ημερών (0h έως 120 h).

Με βάση τα αποτελέσματα των παραπάνω προκαταρκτικών πειραμάτων, τελικά, για την προετοιμασία της προβιοτικής καλλιέργειας *L. fermentum* ACA-DC 179 ακολουθήθηκαν τα εξής στάδια:

(α) ανανέωση σε γάλα ΥΘΕ (5ml) με 2% v/v (100μL) εμβόλιο και επώαση στους 37°C για 2 ημέρες και

(β) τελική ανάπτυξη σε γάλα (32.5 ml) με 2% v/v εμβόλιο και επώαση στους 37°C για 16h ($\sim 2 \times 10^7$ cfu/g).

2.4 Παρασκευή προβιοτικού παγωτού τύπου Καϊμάκι

2.4.1 Σύσταση παγωτού και πρώτες ύλες

Σκοπός της μελέτης ήταν η παρασκευή παγωτού τύπου Καϊμάκι, το οποίο να πληρεί τις προδιαγραφές για το συγκεκριμένο είδος παγωτού. Με βάση τη νομοθεσία, το παγωτό Καϊμάκι είναι το προϊόν με γεύση μαστίχας, ή/και κανέλας, ή/και σαλέπι που πρέπει να περιέχει τουλάχιστον 8% λιπαρά γάλακτος, στερεό υπόλειμμα γάλακτος άνευ λίπους τουλάχιστον 7% και ολικά στερεά τουλάχιστον 34%.

Στην παρούσα μελέτη οι πρώτες ύλες που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του παγωτού τύπου Καϊμάκι (500 g) ήταν οι εξής:

1. 96.05 g κρέμα γάλακτος με 35% λιπαρά
2. 325 g πλήρες αγελαδινό γάλα υψηλής θερμικής επεξεργασίας (ΥΘΕ) με 3,5% λιπαρά
3. 65 g κρυσταλλική ζάχαρη
4. 3.5 g γαλακτωματοποιητές - σταθεροποιητές
5. 7 g σαλέπι Όλυμπος
6. 2-3 δάκρυα μαστίχας Χίου

2.4.2 Προετοιμασία και επεξεργασία των μιγμάτων παγωτού

Για την παρασκευή των μιγμάτων παγωτού τύπου Καϊμάκι, αρχικά ζυγίστηκαν σε αναλυτικό ζυγό ακριβείας οι ξηρές πρώτες ύλες (κρυσταλλική ζάχαρη, σαλέπι, δάκρυα μαστίχας Χίου και μίγμα γαλακτωματοποιητών/σταθεροποιητών) και ογκομετρήθηκαν οι υγρές πρώτες ύλες (πλήρες γάλα και κρέμα γάλακτος) σε αποστειρωμένα μιας χρήσης falcon tubes των 50ml. Οι ξηρές πρώτες ύλες απαιτούν μια διαδικασία προετοιμασίας πριν από την προσθήκη τους στο μίγμα παγωτού. Συγκεκριμένα, τα δάκρυα μαστίχας συνθλίβονται σε γουδί μαζί με μια κουταλιά της σούπας κρυσταλλική ζάχαρη και η υπόλοιπη εναπομένουσα ποσότητα ζάχαρης αναμιγνύεται πολύ καλά με τους γαλακτωματοποιητές/σταθεροποιητές. Ακολούθως, η παρασκευή του μίγματος παγωτού αρχίζει με την ανάμιξη των υγρών πρώτων υλών σε ανοξείδωτο κατσαρολάκι υπό συνεχή θέρμανση σε θερμαντική πλάκα και υπό έντονη ανάδευση με τη χρήση ραβδομπλέντερ. Η θερμοκρασία του μίγματος ελέγχεται συνεχώς καθ' όλη τη διάρκεια της παρασκευής του, με την χρήση θερμομέτρου. Σε θερμοκρασία 42°C διασπείρονται οι ξηρές πρώτες ύλες στο μίγμα υπό συνεχή ανάδευση μέχρι να ομογενοποιηθούν τελείως. Η συνεχής ανάδευση του μίγματος παγωτού έχει ως απώτερο στόχο να ενωθούν όλα τα υλικά μεταξύ τους και να αποκτήσει το μίγμα μια ομοιόμορφη κατανομή των συστατικών του. Αφού τα υλικά διαλυτοποιηθούν πλήρως, ακολουθεί η παστερίωση του μίγματος στους 73°C για 10 λεπτά υπό συνεχή ανάδευση. Μετά την παστερίωση, το μίγμα ψύχεται ταχέως με χρήση παγόλουτρου σε θερμοκρασία 4°-6°C και ακολούθως το μίγμα ωριμάζει στους 4°C για 24h σε θάλαμο ψύξης. Αφότου περάσουν οι 24 ώρες, το μίγμα τοποθετείται στην παγωτομηχανή οικιακού τύπου με εσωτερικό αποδάρτη (Krups GVS1). Κατά την διάρκεια της παρασκευής του παγωτού στην παγωτομηχανή πραγματοποιείται ενσωμάτωση φυσαλίδων αέρος οι οποίες αυξάνουν τον όγκο του. Το μίγμα παγωτού καταψύχεται στην παγωτομηχανή έως ότου η θερμοκρασία εξόδου κατέλθει στους -4°C έως -5°C. Συγκεκριμένα, η διάρκεια της παρασκευής του παγωτού

διήρησε περίπου 30 λεπτά. Στη συνέχεια το παγωτό συσκευάζεται ταχέως σε αποστειρωμένους περιέκτες χωρητικότητας 100 ml, σκληρύνεται και αποθηκεύεται στους -20°C σε οικιακό καταψύκτη. Η πιο πάνω περιγραφική διαδικασία της παραγωγής παγωτού τύπου Καϊμάκι αναφέρεται αποκλειστικά στην παρασκευή του παγωτού μάρτυρα (control) στον οποίο δεν έχει γίνει η προσθήκη του προβιοτικού μικροοργανισμού *L.fermentum* ACA-DC 179.

Στην περίπτωση της παρασκευής των προβιοτικών παγωτών τύπου Καϊμάκι, το μίγμα παρασκευάστηκε με βάση τη διαδικασία που έχει ήδη αναφερθεί. Όσον αφορά την παρασκευή του προβιοτικού παγωτού, εφαρμόστηκαν 4 διαφορετικές παραλλαγές μεθόδου παρασκευής. Σε κάθε παραλλαγή μεθόδου παραγωγής, ο εμβολιασμός της προβιοτικής καλλιέργειας πραγματοποιήθηκε στο 10% (32.5 ml) του γάλακτος της συνταγής με τρόπο που εξασφαλίζει μια τελική συγκέντρωση περίπου 10^7 cfu/g του *L. fermentum* ACA-DC 179 στο μίγμα παγωτού. Η προσθήκη της καλλιέργειας στο μίγμα και στις 4 διαφορετικές περιπτώσεις παρασκευής των προβιοτικών παγωτών ανεξαρτήτου της μεθόδου που εφαρμόστηκε, πραγματοποιήθηκε στους 37°C.

1. **Not Fermented Before Ripening (NF-BR):** Στην πρώτη μέθοδο, η καλλιέργεια του *L. fermentum* ACA-DC 179 μετά την τελική ανάπτυξη, εμβολιάστηκε (10%) άμεσα στο μίγμα παγωτού μετά την παστερίωση και ψύξη του μίγματος στους 37°C πριν από το στάδιο της ωρίμανσης. Σε αυτή την περίπτωση το μίγμα δεν ζυμώθηκε. Μετά την ωρίμανση του, το μίγμα καταψύχθηκε σε παγωτομηχανή.
2. **Fermented Before Ripening (F-BR):** Στην δεύτερη μέθοδο, η καλλιέργεια του *L. fermentum* ACA-DC 179 μετά την τελική ανάπτυξη, εμβολιάστηκε (10%) άμεσα στο μίγμα παγωτού μετά την παστερίωση και ψύξη του μίγματος στους 37°C. Το μίγμα ακολούθως επώασθη στους 37°C κατά την διάρκεια της νύχτας (16h). Μετά την ζύμωση του, το παγωτό ωρίμασε για 24h στους 4°C και την επόμενη ημέρα καταψύχθηκε σε παγωτομηχανή.
3. **Not Fermented After Ripening (NF-AR):** Στην τρίτη μέθοδο, μετά την ωρίμανσή του, το μίγμα παγωτού θερμάνθηκε μέχρι τους 37°C και στη συνέχεια εμβολιάστηκε (10%) με την καλλιέργεια του *L. fermentum* ACA-DC 179. Σε αυτή την περίπτωση, μετά την

προσθήκη της προβιοτικής καλλιέργειας, το μίγμα ψύχθηκε στους 4°C και ακολούθως καταψύχθηκε σε παγωτομηχανή.

4. **Fermented After Ripening (F-AR):** Στην τέταρτη μέθοδο, μετά την ωρίμανσή του, το μίγμα παγωτού θερμάνθηκε μέχρι τους 37°C και στη συνέχεια εμβολιάστηκε (10%) με την καλλιέργεια του *L. fermentum* ACA-DC 179. Το μίγμα ακολούθως επώασθηκε στους 37°C κατά την διάρκεια της νύχτας (16h). Μετά την ζύμωση του, οδηγήθηκε σε θάλαμο ψύξης στους 4°C και μετά από λίγες ώρες καταψύχθηκε σε παγωτομηχανή.

Εκτός από τα δείγματα προβιοτικού παγωτού, παρήχθησαν και παγωτά χωρίς την προσθήκη του στελέχους *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179, με βάση τις μεθόδους παραγωγής των παγωτών 2 και 4 που περιγράφονται πιο πάνω, προκειμένου να υπάρχουν και δείγματα παγωτού μάρτυρα για όλους του τύπους παγωτών που παρασκευάστηκαν.

1. **Control Fermented Before Ripening (Control F-BR):** Όπως και στη δεύτερη μέθοδο, το γάλα (10%) χωρίς την προβιοτική καλλιέργεια εμβολιάστηκε άμεσα στο μίγμα παγωτού μετά την παστερίωση και ψύξη του μίγματος στους 37°C. Το μίγμα ακολούθως επώασθηκε στους 37°C κατά την διάρκεια της νύχτας (16h). Μετά την ζύμωση του, ωρίμασε για 24h στους 4°C και την επόμενη ημέρα καταψύχθηκε σε παγωτομηχανή.
2. **Control Fermented After Ripening (Control F-AR):** Όπως και στη τέταρτη μέθοδο, μετά την ωρίμανσή του, το μίγμα παγωτού θερμάνθηκε μέχρι τους 37°C και στη συνέχεια εμβολιάστηκε με το γάλα (10%) χωρίς την προβιοτική καλλιέργεια. Το μίγμα ακολούθως επώασθηκε στους 37°C κατά την διάρκεια της νύχτας (16h). Μετά την ζύμωση του, οδηγήθηκε σε θάλαμο ψύξης στους 4°C και μετά από λίγες ώρες καταψύχθηκε σε παγωτομηχανή.

2.5 Μικροβιολογικές Αναλύσεις

Για τον προσδιορισμό της μικροβιακής χλωρίδας του παγωτού χρησιμοποιήθηκε η πρότυπη μέθοδος τρυβλίων. Βασίστηκε κυρίως στην αρίθμηση των μονάδων που σχηματίζουν αποικίες (colony forming unit ή cfu) βακτηρίων που υπήρχαν στο δείγμα. Για την μέθοδο αυτή

απαιτήθηκαν τα κατάλληλα θρεπτικά υποστρώματα ανάλογα κάθε φορά με τους μικροοργανισμούς που επιθυμούνταν να απομονωθούν (Μάντης, 2008).

Για τις μικροβιολογικές αναλύσεις, αρχικά ζυγίστηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες 5 g δείγματος παγωτού μέσα σε στείρα πλαστική σακούλα ομογενοποίησης (stomacher bag) και προστέθηκαν 45 ml αποστειρωμένου διαλύματος Ringer. Στην συνέχεια ομογενοποιήθηκαν σε συσκευή περιστατικού ομογενοποιητή (Stomacher 400- Seward-Laboratory Blender, BA 7021, London SE1 1PP, UK) για 1 λεπτό. Όταν το δείγμα πλέον είχε γίνει ένα ομοιογενές μίγμα υγρού, ακολούθησαν διαδοχικές αραιώσεις σε αποστειρωμένο διάλυμα Ringer και η εξάπλωση τους σε τρυβλία (IDF Standard No 122C, 1996). Οι πληθυσμοί των μικροοργανισμών που καταμετρήθηκαν, εκφράστηκαν σε cfu/g. Οι ομάδες των μικροοργανισμών και οι συνθήκες ανάπτυξης που εξετάστηκαν ήταν:

(α) η ολική μικροβιακή χλωρίδα σε PCA agar στους 30°C για 72 h,

(β) οι μεσόφιλοι γαλακτοβάκιλλοι και το προβιοτικό στέλεχος *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 σε MRS agar στους 37°C για 48 h,

(γ) μικρόκοκκοι και *Staphylococcus aureus* σε MSA agar στους 30°C για 48 h,

(δ) τα κολοβακτηρίδια σε VRBA agar στους 37°C για 24 h,

(ε) η *Salmonella* σε XLD agar στους 37°C για 24 h, και

(στ) οι ζύμες και οι μύκητες σε YGC agar στους 25°C για 5d.

Οι μικροβιολογικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν σε όλα τα παγωτά την 0^η, 7^η, 14^η και 28^η ημέρα και για κάθε δείγμα παγωτού πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν. Εξετάστηκε και καταμετρήθηκε ο πληθυσμός του προβιοτικού μικροοργανισμού *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 (MRS agar-37°C/48 h) στα μίγματα παγωτού: (α) πριν από την προσθήκη της καλλιέργειας, (β) μετά από την προσθήκη της καλλιέργειας, (γ) μετά την 16h επώαση και (δ) στο εμβόλιο.

Στο σημείο αυτό, αξίζει να σημειωθεί ότι από τα τρυβλία με επιλεκτικό υπόστρωμα (MRS agar) για τον προσδιορισμό του στελέχους *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 απομονώθηκαν αποικίες, στις οποίες πραγματοποιήθηκε χρώση Gram και στη συνέχεια μικροσκοπική παρατήρηση του με στόχο την επιβεβαίωση της ταυτοποίησής του με βάση τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του. Επίσης, πραγματοποιήθηκε η ταυτοποίηση του στελέχους *L. fermentum* ACA-DC 179 και της μικροβιακής χλωρίδας των παγωτών από αποικίες που

απομονώθηκαν από τα θρεπτικά υποστρώματα MRS agar, MSA agar και PCA agar, με την αλληλούχηση του γονιδίου 16S rDNA όπως αναφέρεται αναλυτικά πιο κάτω (Παρ.2.6.).

2.6 Μοριακή μέθοδος ταυτοποίησης

2.6.1 Απομόνωση γενωμικού DNA (gDNA)

Η απομόνωση του γενωμικού DNA (gDNA) του στελέχους *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 και της μικροβιακής χλωρίδας των παγωτών πραγματοποιήθηκε με το GenElute™ Bacterial Genomic DNA της εταιρείας Sigma σύμφωνα με το κάτωθι πρωτόκολλο:

1. Σε σωληνάριο erpendorf μικροφυγοκέντρωσης των 2 ml εισήχθησαν ανά 1.6 ml, περίπου 5 ml καλλιέργειας επωασμένης για 24h (o/n). Φυγοκεντρήθηκαν, για 2 min σε $12.000 \times g$ και το υπερκείμενο απορρίφθηκε.
2. Τα κύτταρα (ιζήμα) επαναιωρήθηκαν σε 200 μL διαλύματος Gram⁺ lysis solution που περιείχε λυσοζύμη συγκέντρωσης 20 mg/ml και επώαστηκαν στους 37°C για 1 h.
3. Προστέθηκαν 20 μL διαλύματος RNάσης (RNase A) και τα δείγματα επώαστηκαν στους 37°C για 10 min.
4. Προστέθηκαν 20 μL πρωτεϊνάσης K (Proteinase K, συγκέντρωσης 20 mg/ml). Τα δείγματα επώαστηκαν για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου και κατόπιν προστέθηκαν 200 μL διαλύματος λύσης, Lysis C. Ακολούθησε επώαση για άλλα 15 min, ανακίνηση για 15 sec και επώαση στους 55°C για 10 min προκειμένου να ληφθεί ένα ομογενοποιημένο μείγμα.
5. Σε στήλες πρόσδεσης που συναρμολογήθηκαν, προστέθηκαν 500 μL διαλύματος προετοιμασίας της στήλης. Ακολούθησε φυγοκέντρωση σε $12.000 \times g$ για 1 min και απορρίφθηκε το υγρό που διαπέρασε τη στήλη.
6. Στα δείγματα με το διάλυμα λύσης, προστέθηκαν 200 μL αιθανόλης (EtOH, 95-100%) και ακολούθησε ανακίνηση για 5-10 sec.
7. Τα δείγματα μεταφέρθηκαν με απόχυση στις στήλες πρόσδεσης, φυγοκεντρήθηκαν σε $6.500 \times g$ για 1 min και η στήλη μεταφέρθηκε σε νέο σωληνάριο συλλογής (collection tube).
8. Προστέθηκαν 500 μL διαλύματος έκπλυσης (Wash Solution I) στη στήλη πρόσδεσης, φυγοκεντρήθηκαν για 1 min σε $6.500 \times g$ και η στήλη μεταφέρθηκε σε νέο σωληνάριο συλλογής.

9. Προστέθηκαν 500 μL διαλύματος έκπλυσης (Wash Solution) και τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν σε $13.000 \times g$ για 3 min προκειμένου να στεγνώσουν οι στήλες. Ακολούθησε επιπλέον φυγοκέντρωση για 1 min σε $13.000 \times g$ και οι στήλες μεταφέρθηκαν σε νέο σωληνάριο συλλογής.
10. Προστέθηκαν 40 μL διαλύματος έκλουσης (Elution Solution) στο κέντρο της κάθε στήλης και φυγοκεντρήθηκαν σε $6.500 \times g$ για 2 min. Προστέθηκαν άλλα 20 μL διαλύματος έκπλυσης και φυγοκεντρήθηκαν σε $6.500 \times g$ για 2 min.
11. Το προϊόν της έκλουσης περιείχε καθαρό γενωμικό DNA, το οποίο αποθηκεύτηκε στους 4°C .

2.6.2 Μέτρηση της συγκέντρωσης του DNA

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του DNA των δειγμάτων που προέκυψαν, έγινε με φωτομέτρηση σε φωτόμετρο μικροποσοτήτων Quawell Q5000 UV-Vis Spectrophotometer (Quawell Technology Inc., San Jose, USA) το οποίο μετράει τη συγκέντρωση νουκλεϊκών οξέων ή πρωτεϊνών σε ένα διάλυμα. Ο μηδενισμός της συσκευής γινόταν με διάλυμα έκλουσης και στη συνέχεια τοποθετούνταν σταγόνες 2 μL από κάθε δείγμα. Η φωτομέτρηση για το DNA γινόταν σε μήκος κύματος 260nm και από την τιμή της οπτικής απορρόφησης (O.D.) υπολογίσθηκε αυτόματα η συγκέντρωση.

2.6.3 Ενίσχυση της αλληλουχίας 16S rDNA μέσω της τεχνικής PCR

Κατόπιν, πραγματοποιήθηκε 16S rDNA-PCR με τους εκκινητές 16S F και 16S R (VBC-Biotech, Vienna, Austria) (Ntougias et al., 2006) και έγινε χρήση του One Taq Quick-Load 2x Master Mix (NEB, Ipswich, MA, USA). Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν οι ακόλουθες: 2 min στους 94°C , 30 κύκλοι με 30 sec στους 94°C , 30 sec στους 56°C , 1 min και 20 sec στους 72°C . Με το πέρας των 30 κύκλων, ακολούθησε παραμονή για 5min στους 72°C . Στον Πίνακα 2.1. αναφέρονται αναλυτικά τα αντιδραστήρια και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2. 1: Αντιδραστήρια για την ενίσχυση της γονιδιακής περιοχής του 16S rDNA

Αντιδραστήριο	Ποσότητα ανά αντίδραση
One Taq Quick-Load Mix	25 μ l
DNA template	200 ng
Primer F (10 pmol/ μ l)	1 μ l
Primer R (10 pmol/ μ l)	1 μ l
ddH ₂ O	
Τελικός όγκος	50 μl

2.6.4 Ανάλυση των τμημάτων DNA σε πηκτή αγαρόζης

Ακολουθως, τμήματα αναλύθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1% σύμφωνα με την ακόλουθη διαδικασία:

1. Σε διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1 × TAE (40 mM Tris, 1 mM EDTA (pH 8,0), 20 mM acetic acid), προστέθηκε 1% w/v αγαρόζη.
2. Το διάλυμα θερμάνθηκε μέχρι να διαλυτοποιηθεί η αγαρόζη.
3. Έπειτα ψύχθηκε μέχρι τους 60°C και προστέθηκε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου 10mg/ml (Sigma, Taufkirchen, Germany). Η τελική συγκέντρωση στην πηκτή ήταν 10 μ g/ml.
4. Το διάλυμα της αγαρόζης τοποθετήθηκε σε κατάλληλη συσκευή για να σταθεροποιηθεί, η οποία είχε ειδική "χτένα" κάθετα βυθισμένη στο υγρό, για να δημιουργηθούν τα κατάλληλα "πηγαδάκια", στα οποία θα τοποθετηθούν τα προς διαχωρισμό δείγματα DNA. Η αγαρόζη έπηξε σε θερμοκρασία δωματίου σχηματίζοντας την πηκτή.
5. Η χτένα απομακρύνθηκε και η πηκτή βυθίστηκε σε διάλυμα 1 × TAE. Στα κενά πηγαδάκια που σχηματίστηκαν από τη χτένα τοποθετήθηκαν τα δείγματα.
6. Η πηκτή ηλεκτροφορείται στα 120 V για περίπου 45 min.
7. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης ακολουθεί φωτογράφιση της πηκτής σε ειδικό UV θάλαμο.

2.6.5 Καθαρισμός των προϊόντων της PCR

Μετά τον πολλαπλασιασμό του γονιδίου 16S rDNA και πριν σταλούν τα δείγματα για αλληλούχηση, απαιτείται ο καθαρισμός των προϊόντων της PCR από τα υπολείμματα εκκινητών, των δεοξυνουκλεοτιδίων, των μη ειδικών προϊόντων μικρού μοριακού μεγέθους και του ρυθμιστικού διαλύματος. Ο καθαρισμός πραγματοποιήθηκε με το Nucleospin gel and PCR

clean-up (Macherey-Nagel,Duren,Germany).

Η διαδικασία καθαρισμού στηρίζεται στο γεγονός ότι τα νουκλεϊκά οξέα προσδένονται στη στήλη silica, σε περιβάλλον υψηλής ιοντικής ισχύος και χαμηλού pH που δημιουργείται από την προσθήκη χαιτροπικού παράγοντα, ενώ η έκλουσή του γίνεται με νερό ή με ρυθμιστικό διάλυμα TE σε pH 8,3.

Η διαδικασία έγινε σε θερμοκρασία δωματίου και περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

1. Προσθήκη διπλάσιου όγκου προσδετικού ρυθμιστικού παράγοντα NTI στο φιαλίδιο με το προϊόν της PCR, αφού είχε ελεγχθεί προηγουμένως η ενίσχυση του γονιδίου 16S σε όλα τα στελέχη, με τη τεχνική της ηλεκτροφόρησης.
2. Φόρτωση του διαλύματος στη στήλη χαλαζία "PCR Clean-up Column" για την πρόσδεση του DNA σε αυτή και φυγοκέντρηση της στήλης σε $11.000 \times g$, για 1 min, σε θερμοκρασία δωματίου.
3. Απόρριψη του διηθήματος.
4. Φόρτωση στη στήλη 700μL διαλύματος NT3 για καθαρισμό της μεμβράνης silica, στο οποίο έχει προστεθεί εξαρχής αιθανόλη και φυγοκέντρηση της στήλης, σε θερμοκρασία δωματίου, σε ταχύτητα $11.000 \times g$, για 1 min.
5. Η φυγοκέντρηση της στήλης επαναλαμβάνεται σε μέγιστη ταχύτητα, σε θερμοκρασία δωματίου για να απομακρυνθεί όλη η ποσότητα του ρυθμιστικού διαλύματος καθαρισμού.
6. Επώαση σε κλίβανο στους 37°C για 2 min για την εξάτμιση της αιθανόλης.
7. Τοποθέτηση στήλης σε καθαρό φιαλίδιο και προσθήκη 16 μL από το διάλυμα έκλουσης NE στη στήλη. Επώαση για 5min, σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση της στήλης για 2 min, στις $11.000 \times g$.
8. Επανάληψη του παραπάνω βήματος για πλήρη ανάκτηση του DNA.
9. Το διήθημα περιέχει πλέον το καθαρό προϊόν και φυλάσσεται στους -20°C μέχρι την περαιτέρω χρησιμοποίησή του.

Συγκεκριμένα, επιλέχθηκαν 14 αποικίες οι οποίες απομονώθηκαν από τα θρεπτικά υποστρώματα MRS agar, MSA agar και PCA agar. Από το θρεπτικό υπόστρωμα MRS agar απομονώθηκαν αποικίες με στόχο την επιβεβαίωση της ύπαρξης του στελέχους *L. fermentum* ACA-DC 179 στα προβιοτικά παγωτά. Από την άλλη πλευρά, οι αποικίες που απομονώθηκαν από τα θρεπτικά υποστρώματα MSA agar και PCA agar είχαν ως στόχο τον έλεγχο της

μικροβιακής χλωρίδας των παγωτών και συγκεκριμένα της ανάπτυξης παθογόνων μικροοργανισμών στη διάρκεια της παρασκευής του παγωτού.

Τα 14 δείγματα που επιλέχθηκαν για ενίσχυση του γονιδίου 16S rDNA, στάλθηκαν για αλληλούχηση του γονιδίου αυτού στη VBC-BIOTECH Service GmbH (Biocenter Campus Vienna 6/5A-1030, Wien).

Κατόπιν, πραγματοποιήθηκε η στοίχιση και η ταυτοποίηση των αλληλουχιών. Συγκεκριμένα έγινε η σύγκριση των αποτελεσμάτων της ταυτοποίησης με τις διαθέσιμες αλληλουχίες της βάσης δεδομένων GenBank του NCBI (National Center for Biotechnology Information), χρησιμοποιώντας τη μηχανή αναζήτησης του προγράμματος BLAST (Basic Local Alignment Tool)(<http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST/>).

2.7 Φυσικοχημικές αναλύσεις

2.7.1 Προσδιορισμός του pH

Το pH μετρήθηκε με πεχάμετρο μέσω εμβάπτισης του ηλεκτρόδιου (Metrohm Herisau, 632 pH-Meter, Switzerland) στο δείγμα παγωτού. Πριν από την μέτρηση του pH, το πεχάμετρο ρυθμίστηκε με τα πρότυπα διαλύματα σε pH=7.0 και pH= 4.0 αντίστοιχα. Οι μετρήσεις του pH πραγματοποιήθηκαν στα μίγματα παγωτού πριν την προσθήκη της καλλιέργειας, μετά την προσθήκη της καλλιέργειας, μετά την 16h επώαση, στο εμβόλιο και σε όλα τα παγωτά την 0^η, 7^η, 14^η και 28^η ημέρα και για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν.

2.7.2 Προσδιορισμός της οξύτητας

Για τον προσδιορισμό της οξύτητας, ο πιο συνηθισμένος τρόπος είναι η εξουδετέρωση των οξέων του δείγματος με διάλυμα καυστικού νατρίου γνωστής κανονικότητας. Οι πιο συνηθισμένες τεχνικές οι οποίες στηρίζουν την παραπάνω αρχή ονομάζονται ογκομετρικές μέθοδοι (**Καμμένου & Μοάτσου, 2009**).

Για την μέτρηση της οξύτητας των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε τιτλοδότηση με διάλυμα καυστικού νατρίου (NaOH) συγκέντρωσης 0.1 M και δείκτη φαινολοφθαλεΐνης 1% (w/v). Το τέλος της τιτλοδότησης σηματοδοτήθηκε με τη αλλαγή του χρώματος από λευκό σε ελαφρά ρόδινο και καταγράφονται τα ml του καυστικού νατρίου που καταναλώθηκαν. Το αποτέλεσμα εκφράζεται σε γαλακτικό οξύ % με βάση τη σχέση ότι 1 ml NaOH 0.1 M αντιστοιχεί σε 9 mg γαλακτικού οξέος. Οι μετρήσεις της οξύτητας πραγματοποιήθηκαν στα

μίγματα παγωτού πριν την προσθήκη της καλλιέργειας, μετά την προσθήκη της καλλιέργειας, μετά την 16h επώασης και σε όλα τα παγωτά την 0^η, 7^η, 14^η και 28^η ημέρα. Για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν.

2.7.3 Προσδιορισμός του ποσοστού διόγκωσης/εναέρωσης (overrun)

Ο όγκος του παγωτού ο οποίος λαμβάνεται επιπλέον του όγκου που είχε το αρχικό μίγμα πριν από την κατάψυξη ονομάζεται εναέρωση (overrun) και εκφράζεται ως το ποσοστό επί τοις εκατό του όγκου που είχε το αρχικό μίγμα (**Ζερφυρίδης, 2001**).

Το ποσοστό της διόγκωσης/εναέρωσης προσδιορίστηκε σε όλα τα δείγματα παγωτού εις διπλούν αμέσως μετά την έξοδο τους από τη κατάψυξη. Η ποσότητα του μη αποδαρμένου μίγματος παγωτού (40ml) και η ίση ποσότητα παγωτού ζυγίζονται σε ηλεκτρονικό ζυγό ακριβείας. Το ποσοστό της διόγκωσης προσδιορίζεται κατόπιν, σύμφωνα με τη σχέση:

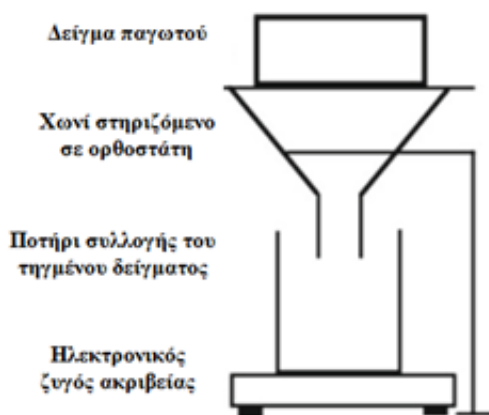
$$\text{Διόγκωση \%} = \frac{\text{Βάρος μίγματος παγωτού (g)} - \text{Βάρος παγωτού (g)}}{\text{Βάρος παγωτού (g)}} \times 100$$

2.7.4 Προσδιορισμός του ρυθμού τήξης

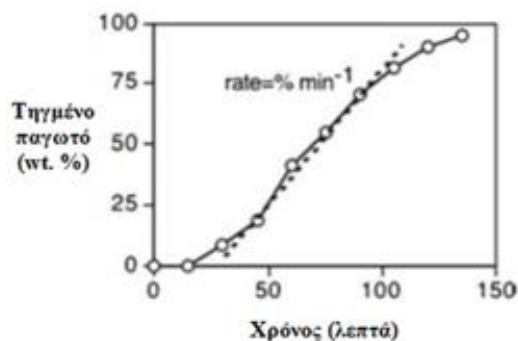
Ο ρυθμός τήξης του παγωτού μπορεί να ποσοτικοποιηθεί με τον προσδιορισμό του βάρους που στάζει από το προϊόν μέσω ενός διάτρητου μεταλλικού πλαισίου ως συνάρτηση του χρόνου, όταν το προϊόν αφήνεται να λιώσει ενώ διατηρείται σε μια επιλεγμένη θερμοκρασία (**Bolliger, Goff, & Tharp, 2000**). Το προϊόν πρέπει να είναι ομοιόμορφο, να έχει τυποποιημένο μέγεθος για όλες τις συγκρίσεις. Η δοκιμή πρέπει να διεξάγεται σε χώρο απαλλαγμένο από κάθε μεταβολή ρευμάτων αέρα που μπορεί να επηρεάσουν τη μεταφορά της θερμότητας (**Goff & Spagnuolo, 2001**).

Ο ρυθμός τήξης των παγωτών προσδιορίστηκε σύμφωνα με τη μεθοδολογία που έχει περιγραφεί από τους Goff & Hartel (2013). Αρχικά, 50 g δείγματος τοποθετήθηκαν μέσα σε πλαστικό χωνί, το οποίο ήταν τοποθετημένο σε στήριγμα-ορθοστάτη, όπως φαίνεται και στην παρακάτω Εικόνα 1. Το τήγμα συλλέγεται σε ποτήρι ζέσεως, το οποίο είναι τοποθετημένο σε ηλεκτρονικό ζυγό ακριβείας και ανά δυο λεπτά καταγράφεται το βάρος του τηγμένου δείγματος. Με την πτώση της τελευταίας σταγόνας σταματάει η καταγραφή του βάρους του τήγματος και ο ρυθμός της τήξης του δείγματος απεικονίζεται σε γραφική παράσταση (Εικόνα 2) με το βάρος του τηγμένου δείγματος σε συνάρτηση του χρόνου. Η πειραματική διαδικασία για τον

προσδιορισμό του ρυθμού τήξης των παγωτών πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ($25\pm 1^\circ\text{C}$). Η δοκιμή αυτή πραγματοποιήθηκε εις διπλούν στο τελικό προϊόν όλων των μεθόδων παραγωγής παγωτού.



Εικόνα 1 : Συσκευή τήξης παγωτού



Εικόνα 2: Τυπική καμπύλη τήξης παγωτού

2.7.5 Προσδιορισμός του λίπους

Για τον προσδιορισμό του λίπους χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Gerber η οποία ανήκει στην κατηγορία των ογκομετρικών μεθόδων. Με την προσθήκη του θειικού οξέος ορισμένης πυκνότητας στο δείγμα, διαλύονται τα συστατικά του προϊόντος εκτός από το λίπος. Η θερμότητα που εκλύεται κατά την ανάμιξη, ρευστοποιεί το λίπος, το οποίο διαχωρίζεται ως ανώτερη στριβάδα μέσα στο οξύ μετά από την φυγοκέντρωση και την προσθήκη αμυλικής αλκοόλης (Καμινारीδης & Μοάτσου, 2009).

Αρχικά ζυγίστηκαν στον υποδοχέα του βουτυρομέτρου παγωτού 5 g παγωτού με ακρίβεια 4 δεκαδικών ψηφίων. Ακολούθως τοποθετήθηκε ο υποδοχέας στο βουτυρόμετρο και από το ανώτερο άκρο του βουτυρομέτρου με ένα μικρό ποτήρι ζέσεως προστέθηκε με προσοχή θειικό οξύ ειδικού βάρους $1,522 \pm 0.005 \text{ g/ml}$ (H_2SO_4) έως ότου να καλυφθεί όλη η μάζα του παγωτού που βρίσκεται στον υποδοχέα. Στην συνέχεια το βουτυρόμετρο τοποθετήθηκε στο υδατόλουτρο των $65^\circ\text{C}\pm 1$ για 15 λεπτά. Απομάκρυνση του βουτυρομέτρου από το υδατόλουτρο και από το άνω άκρο του βουτυρομέτρου προσθήκη 1ml ισοαμυλικής αλκοόλης με τη βοήθεια δοσομετρικής φιάλης και θειικού οξέος ώστε να καλύψει τα 3/4 της βαθμολογημένης κλίμακας του βουτυρόμετρου. Η στριβάδα του λίπους πρέπει να βρίσκεται μέσα στην βαθμολογημένη κλίμακα του βουτυρόμετρου και αυτό ρυθμίζεται με την προσθήκη του θειικού οξέος. Άμεση

επανατοποθέτηση στο υδατόλουτρο των $65^{\circ}\text{C}\pm 1$ για 10 λεπτά. Στην συνέχεια τοποθετήθηκε το ελαστικό πώμα στο άνω άκρο του βουτυρόμετρου και με ελαφρά κίνηση κρατώντας το και από τις δυο άκρες πραγματοποιήθηκε ανάδευση μέχρι να διαλυθεί τελείως το δείγμα. Ακολούθησε φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 5 λεπτά σε 1100 στροφές/λεπτό. Στην συνέχεια τα βουτυρόμετρα επανατοποθετήθηκαν στο υδατόλουτρο ($65^{\circ}\text{C}\pm 1$) για 5 λεπτά και ακολούθως γίνεται η ανάγνωση του αποτελέσματος. Η δοκιμή αυτή πραγματοποιήθηκε στο τελικό προϊόν όλων των δειγμάτων παγωτού εις διπλούν.

2.7.6 Προσδιορισμός πρωτεΐνης στο παγωτό με τη μέθοδο Kjeldahl

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της πρωτεΐνης στο παγωτό. Η μέθοδος Kjeldahl περιλαμβάνει την καύση του δείγματος, την απόσταξη και την τιτλοδότηση (Καμιναρίδης & Μοάτσου, 2009; Μάντης, 2008).

Για τον προσδιορισμό της πρωτεΐνης, αρχικά ζυγίστηκαν με ακρίβεια 4 δεκαδικών ψηφίων 3 g παγωτού από το κάθε δείγμα. Στην συνέχεια σε κάθε φιάλη Kjeldahl τοποθετήθηκαν 2 ταμπλέτες καταλυτών καύσης Kjeldahl (3.5 g K_2SO_4 και 0.1 g $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ και 0.105 g $\text{TiO}_2\cdot 5\text{H}_2\text{O}$) και 3g παγωτού από το κάθε δείγμα. Ακολούθως οι φιάλες τοποθετήθηκαν στις ειδικές θέσεις της απαγωγού εστίας και προστέθηκαν 20 ml πυκνού θεικού οξέος (95-97%) H_2SO_4 και 2-3 σταγόνες αντιαφριστικού παράγοντα (υδατικό διάλυμα σιλικόνη-silicon-antifoam agent). Ακολούθησε η περιστροφή της κάθε φιάλης για την ανάμιξη του περιεχομένου και αφέθηκαν για 5 λεπτά σε ηρεμία. Προστέθηκαν 5 ml υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2 30% w/v) και αφέθηκαν ξανά για 10-15 λεπτά σε ηρεμία. Έπειτα οι φιάλες τοποθετήθηκαν στις ειδικές εστίες με σύστημα απαγωγής ατμών για την καύση του δείγματος με την θερμοκρασία έναρξης στους 100°C όπου και παρέμεινε για 30 λεπτά. Τέλος, η θερμοκρασία αυξανόταν ελεγχόμενα ανά 20°C κάθε 15 λεπτά μέχρι την αλλαγή του χρώματος του δείγματος σε πράσινο διαυγές (410°C). Συνολικά, χρησιμοποιήθηκαν 20 φιάλες Kjeldahl, εκ των οποίων οι 2 χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του μάρτυρα ο οποίος περιείχε τις 2 ταμπλέτες καταλυτών καύσης Kjeldahl, 0,85 g σουκρόζης, 5 ml αποσταγμένου νερού, 20 ml πυκνού θεικού οξέος, 2-3 σταγόνες αντιαφριστικού παράγοντα και 5 ml H_2O_2 30% w/v. Μετά από το τέλος της καύσης, οι φιάλες αφέθηκαν στην συσκευή καύσης για να κρυώσουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος σε απαγωγό, για περίπου 1 ώρα. Αφού τα δείγματα κρύωσαν, ακολούθησε η απόσταξη τους σε μονάδα απόσταξης της συσκευής Kjeldahl. Η συγκεκριμένη συσκευή

αποτελείται από δυο υποδοχείς. Στον πρώτο υποδοχέα τοποθετήθηκε η φιάλη Kjeldahl η οποία περιέχει το δείγμα που ήταν προς απόσταξη το οποίο είχε αποκτήσει από την καύση ένα διαυγές κυανοπράσινο χρώμα. Κατά το στάδιο της απόσταξης, στην φιάλη Kjeldahl προστέθηκαν αυτόματα από την συσκευή απόσταξης 50 ml απιονισμένου νερού και ακολούθως αναμίχθηκαν με το περιεχόμενο ώστε να διαλυθούν τυχόν κρύσταλλοι που είχαν δημιουργηθεί. Στην συνέχεια προστέθηκαν αυτόματα 75 ml διαλύματος καυστικού νατρίου. Στον δεύτερο υποδοχέα τοποθετήθηκε η κωνική φιάλη η οποία περιέχει 50 ml διαλύματος βορικού οξέος και 2-3 σταγόνες φαινολοφθαλεΐνης. Στην κωνική φιάλη λήφθηκε το απόσταγμα το οποίο είχε χρώμα ανοικτό πράσινο προς καφέ. Το περιεχόμενο της κωνικής φιάλης τιτλοδοτήθηκε με διάλυμα υδροχλωρικού οξέος 0,1 M μέχρι την πρώτη αλλαγή του χρώματος σε ανοικτό ροζ. Παράλληλα στην αρχή του πειράματος τιτλοδοτήθηκε ο μάρτυρας ο οποίος περιείχε μόνο 2 ταμπλέτες καταλυτών καύσης Kjeldahl και 25 ml πυκνού θειικού οξέος. Ο προσδιορισμός αυτός πραγματοποιήθηκε εις διπλούν στο τελικό προϊόν όλων των μεθόδων παραγωγής παγωτού.

2.8 Οργανοληπτικός Έλεγχος

Τα δείγματα παγωτού αξιολογήθηκαν ως προς τα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά την 90^η ημέρα της παρασκευής τους. Ο οργανοληπτικός έλεγχος των δειγμάτων παγωτού πραγματοποιήθηκε από μια 12-μελή ομάδα του Εργαστηρίου της Γαλακτοκομίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Σε κάθε δοκιμαστή προσφέρονταν δύο δείγματα παγωτού, ένα για την εκτίμηση του χρώματος και των χαρακτηριστικών της υφής και ένα για την αξιολόγηση της γεύσης, του αρώματος και των χαρακτηριστικών της υφής κατά την κατανάλωσή τους. Ακολούθως, ο κάθε δοκιμαστής συμπλήρωνε το ερωτηματολόγιο αξιολόγησης το οποίο επισυνάπτεται ως παράρτημα. Η εκτίμηση και η βαθμολόγηση των περιγραφικών όρων έγινε με χρήση 6-βάθμιας κλίμακας όπου: 1= καθόλου, 2=οριακά, 3=ελαφρά, 4=μέτρια, 5=πολύ και 6=υπερβολικά. Σε κάθε περιέκτη παγωτού αναγραφόταν ο κωδικός του κάθε δείγματος. Τέλος, τα παγωτά αξιολογήθηκαν και ως προς την αγοραστική τους δύναμη αφού πραγματοποιήθηκε σύγκριση των δειγμάτων παγωτού τόσο μεταξύ τους όσο και με ένα παγωτό τύπου Καϊμάκι του εμπορίου.

Για τους περιγραφικούς όρους, για τις παραμέτρους αξιολόγησης, για την βαθμολογία της κάθε κατηγορίας του ερωτηματολογίου, για την προετοιμασία και για την κωδικοποίηση των δειγμάτων ελήφθησαν υπόψη οι μεθοδολογίες που περιγράφονται από τους **Aboufazli et al.**,

(2015); Akin et al., (2007); Silva et al., (2015); Di Criscio et al., (2010); Ferraz et al., (2012); Ranadheera et al.,(2013); Salem et al.,(2005); Turgut & Cakmakci, (2009); Ζερφυρίδης, (2001).

2.9 Στατιστική Επεξεργασία

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε χρησιμοποιώντας το λογισμικό πακέτο IBM SPSS Statistics 20. Οι συγκρίσεις μεταξύ πολλαπλών μέσων τιμών πραγματοποιήθηκαν με την ανάλυση της διακύμανσης (analysis of variance) κατά ANOVA με εκτίμηση της σημαντικότητας των διαφορών κατά Duncan Multiple Range Test (MRT). Οι συγκρίσεις μεταξύ των μέσων τιμών των δειγμάτων πραγματοποιήθηκαν με t-test ($p < 0,05$).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 Βακτηριακά στελέχη και θρεπτικά υποστρώματα ανάπτυξής τους

Ο βασικός σκοπός του πειράματος αυτού, ήταν να γίνει η επιλογή του κατάλληλου θρεπτικού υλικού για την επιλεκτική αρίθμηση των πληθυσμών των εξεταζόμενων στελεχών (α) *L. fermentum* ACA-DC 179 και (β) *P. shermanii* LMG 16424 κατά την μικροβιολογική ανάλυση του κάθε προβιοτικού παγωτού ξεχωριστά.

Με βάση τα αποτελέσματα του εν λόγω πειράματος, παρατηρήθηκε ότι, τα θρεπτικά υλικά MRS agar pH=7.0 και MRS agar pH=5.2 λειτούργησαν ως επιλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα για το στέλεχος *L. fermentum* ACA-DC 179 λόγω της πολύ καλής του ανάπτυξης μετά από 24h στους 37°C. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε όλα τα θρεπτικά μέσα (Παρ.2.2.), σε όλους τους συνδυασμούς συνθηκών (Παρ.2.2.) που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή των πειραμάτων και σε θερμοκρασία 37°C, το στέλεχος *L. fermentum* ACA-DC 179 αναπτύχθηκε στις 24h. Εκεί που παρατηρήθηκε πολύ μικρή έως ανύπαρκτη ανάπτυξη του, ήταν στο θρεπτικό υπόστρωμα YEL agar με το αντιβιοτικό cloxacillin. Από την άλλη, στο θρεπτικό υπόστρωμα YEL agar χωρίς το αντιβιοτικό cloxacillin παρατηρήθηκε καλύτερη ανάπτυξη η οποία μπορούσε να μετρηθεί. Συνεπώς καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι το αντιβιοτικό cloxacillin παρεμπόδισε την ανάπτυξη του στελέχους *L. fermentum* ACA-DC 179.

Τα αποτελέσματα του εν λόγω πειράματος για το στέλεχος *P. shermanii* LMG 16424 δεν ήταν τα αναμενόμενα και λόγω πολλών πειραματικών δυσκολιών το στέλεχος δεν χρησιμοποιήθηκε στην παρασκευή των παγωτών. Υπήρχαν προβλήματα στην ανάπτυξη του στελέχους *P. shermanii* LMG 16424. Συγκεκριμένα, η ανάπτυξη του εν λόγω στελέχους δεν ήταν ευδιάκριτη στα θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή των πειραμάτων (Παρ.2.2.), με εξαίρεση μια μικρή του ανάπτυξη την 6^η ημέρα στο θρεπτικό υπόστρωμα Pal Propriobac στους 30°C, αναερόβια. Συνεπώς, η πολύ αργή ανάπτυξη του στελέχους *P. shermanii* LMG 16424 ήταν και ο κύριος λόγος που προτιμήθηκε το στέλεχος αυτό να μην χρησιμοποιηθεί στην παρασκευή των παγωτών.

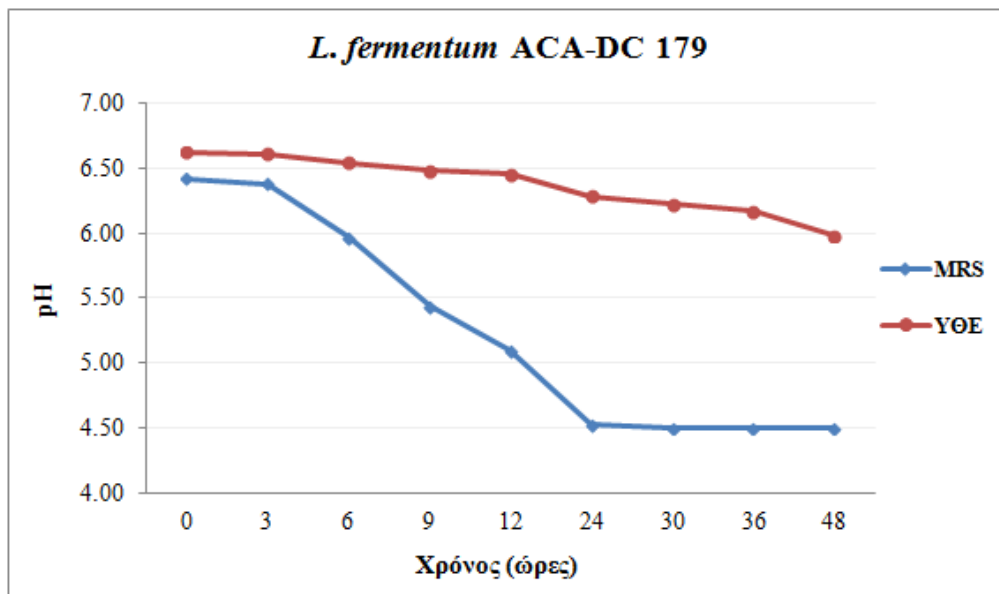
ΠΙΝΑΚΑΣ 3. 1 : Ανίχνευση και επιλεκτική αρίθμηση του στελέχους *L. fermentum* ACA-DC 179 στα παρακάτω θρεπτικά υποστρώματα (α) MRS agar pH=7.0, (β) MRS agar pH=5.2, (γ) YEL agar, (δ) YEL agar + cloxacillin, (ε) RCM agar, (στ) BHI agar και (ζ) M17 agar.

Υποστρώματα	Παρατήρηση Τρυβλίων			
	Συνθήκες Επώασης (37°C)	Χρόνος (24 h)	Χρόνος (48 h)	Χρόνος (72 h)
MRS pH = 7.0	GP	πολύ καλή ανάπτυξη	πολύ καλή ανάπτυξη	ανάπτυξη
	-	πολύ καλή ανάπτυξη	ανάπτυξη	ανάπτυξη
MRS pH = 5.2	GP	πολύ καλή ανάπτυξη	πολύ καλή ανάπτυξη	ανάπτυξη
	-	πολύ καλή ανάπτυξη	ανάπτυξη	ανάπτυξη
YEL	GP	ανάπτυξη	καλή ανάπτυξη	ανάπτυξη
	-	ανάπτυξη	ανάπτυξη	ανάπτυξη
YEL+ cloxacillin	GP	Λιγότερη ανάπτυξη από το YEL χωρίς cloxacillin	Λιγότερη ανάπτυξη από το YEL χωρίς cloxacillin	Λιγότερη ανάπτυξη από το YEL χωρίς cloxacillin
	-	ανάπτυξη	ανάπτυξη	ανάπτυξη
RCM	GP	ανάπτυξη	πολύ καλή ανάπτυξη	ανάπτυξη
	-	ανάπτυξη	ανάπτυξη	ανάπτυξη
BHI	GP	ανάπτυξη	καλή ανάπτυξη	ανάπτυξη
	-	ανάπτυξη	ανάπτυξη	ανάπτυξη
M17	GP	ανάπτυξη	καλή ανάπτυξη	ανάπτυξη
	-	ανάπτυξη	ανάπτυξη	ανάπτυξη

3.2 Έλεγχος ανάπτυξης σε γάλα

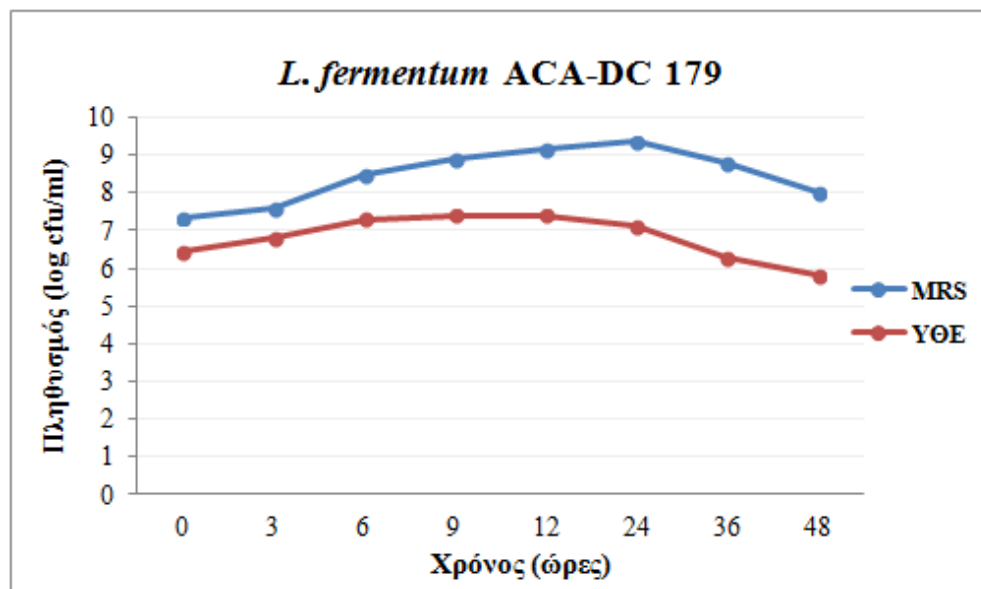
Κατά την διάρκεια της ανάπτυξης του στελέχους *L. fermentum* ACA-DC 179 σε πλήρες γάλα ΥΘΕ και σε θρεπτικό μέσο MRS broth για το χρονικό διάστημα 2 ημερών (48h) σε θερμοκρασία 37°C, πραγματοποιήθηκε η μέτρηση του pH (Γράφημα 1A) και η καταμέτρηση των πληθυσμών (Γράφημα 1B) του σε MRS agar.

Το στέλεχος *L. fermentum* ACA-DC 179 οδήγησε σε σημαντική πτώση του pH στο θρεπτικό μέσο MRS broth και λιγότερη στο γάλα (ΥΘΕ). Η μέγιστη πτώση του pH παρατηρήθηκε το πρώτο 24ωρο τόσο στο θρεπτικό μέσο MRS broth όσο και στο γάλα (ΥΘΕ), όπως φαίνεται και στο Γράφημα 1A.



ΓΡΑΦΗΜΑ 1Α: Πτώση pH του στελέχους *L. fermentum* ACA-DC 179 σε χρονικό διάστημα 48h.

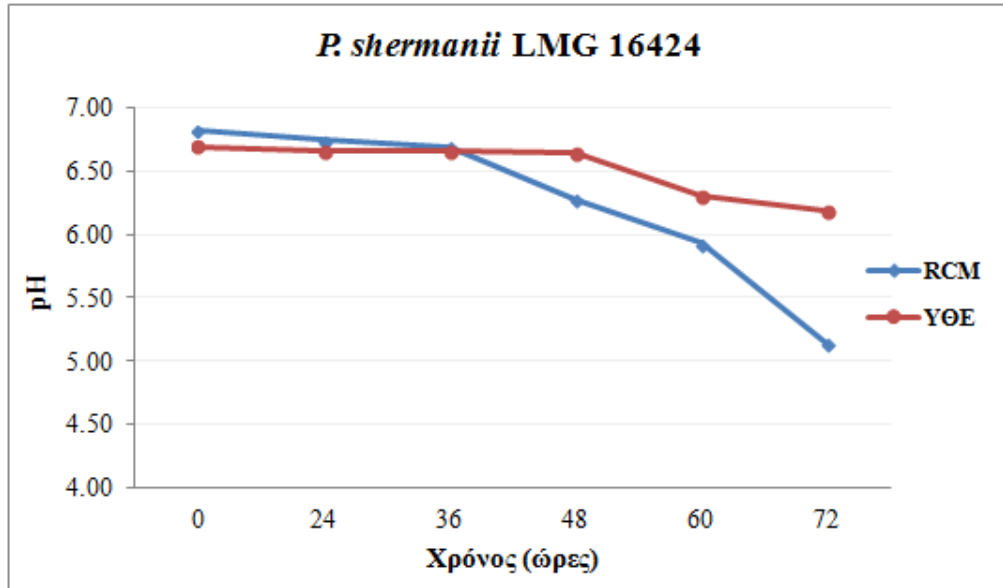
Όσον αφορά τον πληθυσμό του στελέχους *L. fermentum* ACA-DC 179 στο θρεπτικό μέσο MRS broth, παρουσίασε την μεγαλύτερη ανάπτυξη του στις 24h και ακολούθως εμφάνισε σταδιακή πτώση. Αντιθέτως, στο γάλα (YOE) εμφάνισε την μέγιστη ανάπτυξη του στις 16h και στην συνέχεια παρουσίασε σταδιακή πτώση, όπως φαίνεται και στο Γράφημα 1B.



ΓΡΑΦΗΜΑ 1B: Μεταβολή του πληθυσμού του στελέχους *L. fermentum* ACA-DC 179 σε χρονικό διάστημα 48h.

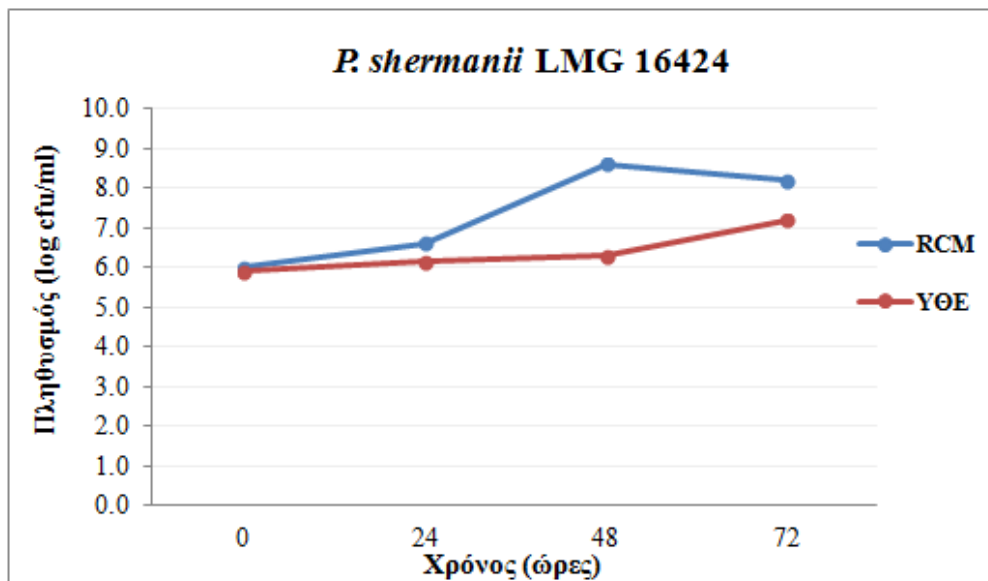
Από την άλλη πλευρά, το στέλεχος *P. shermanii* LMG 16424 εμφάνισε σημαντική πτώση του pH στο θρεπτικό μέσο RCM broth + yeast extract.0.3% και λιγότερη στο γάλα (YOE)

+ y.e.0.3% στο χρονικό διάστημα των 3 ημερών. Συγκεκριμένα, η μέγιστη πτώση του pH στο θρεπτικό μέσο MRS broth παρατηρήθηκε στις 48h και στο γάλα (ΥΘΕ) + y.e 0.3% στις 60h, όπως φαίνεται και στο Γράφημα 2Α.



ΓΡΑΦΗΜΑ 2Α: Πτώση pH του στελέχους *P.shermanii* LMG 16424 σε χρονικό διάστημα 72h.

Σχετικά με τον πληθυσμό του στελέχους *P.shermanii* LMG 16424, παρουσίασε την μέγιστή του ανάπτυξη τόσο στο θρεπτικό μέσο RCM broth όσο και στο γάλα (ΥΘΕ) στις 72h και ακολούθως εμφάνισε σταδιακή πτώση, όπως φαίνεται στο Γράφημα 2B.



ΓΡΑΦΗΜΑ 2B: Μεταβολή του πληθυσμού του στελέχους *P.shermanii* LMG 16424 σε χρονικό διάστημα 72h.

3.3 Μικροβιολογικές Αναλύσεις

Οι ομάδες των μικροοργανισμών που εξετάστηκαν ήταν: (α) η ολική μικροβιακή χλωρίδα (OMX), (β) οι μικρόκοκκοι και *Staphylococcus aureus*, (γ) τα κολοβακτηρίδια, (δ) η *Salmonella*, (ε) οι ζύμες και οι μύκητες και (στ) οι μεσόφιλοι γαλακτοβάκιλλοι και το προβιοτικό στέλεχος *L. fermentum* ACA-DC 179 και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται αναλυτικά παρακάτω.

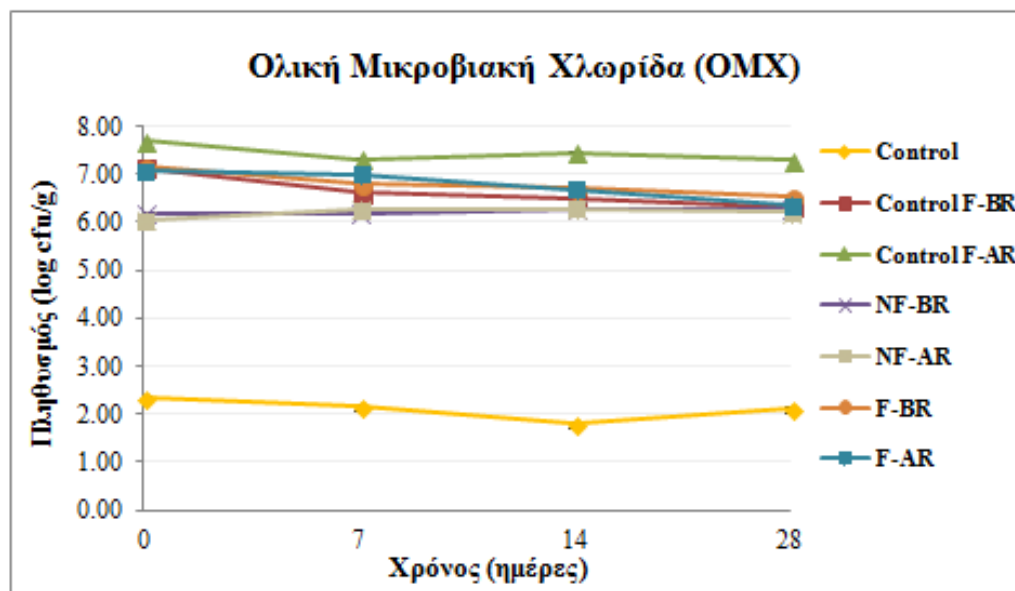
Στο Γράφημα 3 απεικονίζεται η μεταβολή του πληθυσμού της ολικής μικροβιακής χλωρίδας των παγωτών κατά την διάρκεια της συντήρησης του προϊόντος την 0^η, 7^η, 14^η και 28^η ημέρα αντίστοιχα.

Αρχικά, όπως φαίνεται και στο Γράφημα 3, ο πληθυσμός της ολικής μικροβιακής χλωρίδας των ζυμωμένων προβιοτικών παγωτών (α) F-BR και (β) F-AR καθώς και των ζυμωμένων δειγμάτων του παγωτού μάρτυρα (α) Control F-BR και (β) Control F-AR, ήταν της τάξης 10⁷ cfu/g, ενώ των μη ζυμωμένων προβιοτικών παγωτών (α) NF-BR και (β) NF-AR ήταν της τάξης 10⁶ cfu/g. Συνεπώς, παρατηρήθηκε μια αύξηση του πληθυσμού της ολικής μικροβιακής χλωρίδας κατά 1 λογαριθμική μονάδα στα δείγματα παγωτού που είχαν υποστεί 16h ζύμωση. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι, η προβιοτική καλλιέργεια *L.fermentum* ACA-DC 179 κατά την διάρκεια της ζύμωσης (16h) του μίγματος παγωτού στους 37°C, θερμοκρασία η οποία είναι βέλτιστη για την ανάπτυξή της, βρήκε το χρόνο και τις βέλτιστες συνθήκες για την περαιτέρω ανάπτυξή της. Από την άλλη, ο πληθυσμός (10⁷ cfu/g) των ζυμωμένων δειγμάτων παγωτού του μάρτυρα (Control F-BR, Control F-AR), οφείλεται κυρίως στην μικροβιακή χλωρίδα των πρώτων υλών και κυρίως στο σαλέπι, στη ζάχαρη και στη μαστίχα.

Ο πληθυσμός των μη ζυμωμένων προβιοτικών παγωτών (NF-BR, NF-AR), της τάξης 10⁶ cfu/g, οφείλεται στον πληθυσμό του εμβολίου του προβιοτικού μικροοργανισμού *L.fermentum* ACA-DC 179.

Επιπρόσθετα, ο χαμηλός πληθυσμός του μάρτυρα (control), που ήταν της τάξης 10² cfu/g, αιτιολογείται στο γεγονός ότι δεν είχε γίνει η προσθήκη της προβιοτικής καλλιέργειας και οφείλεται κυρίως στην μικροβιακή χλωρίδα των πρώτων υλών αλλά και σε τυχόν επιμολύνσεις κατά τον χειρισμό της παρασκευής του προϊόντος.

Σε γενικές γραμμές, παρατηρήθηκε μια γενική τάση μικρής μείωσης της ολικής μικροβιακής χλωρίδας των παγωτών την 28^η ημέρα με εξαίρεση το μάρτυρα (control) που απεικονίζεται με κίτρινο χρώμα στο Γράφημα 3.

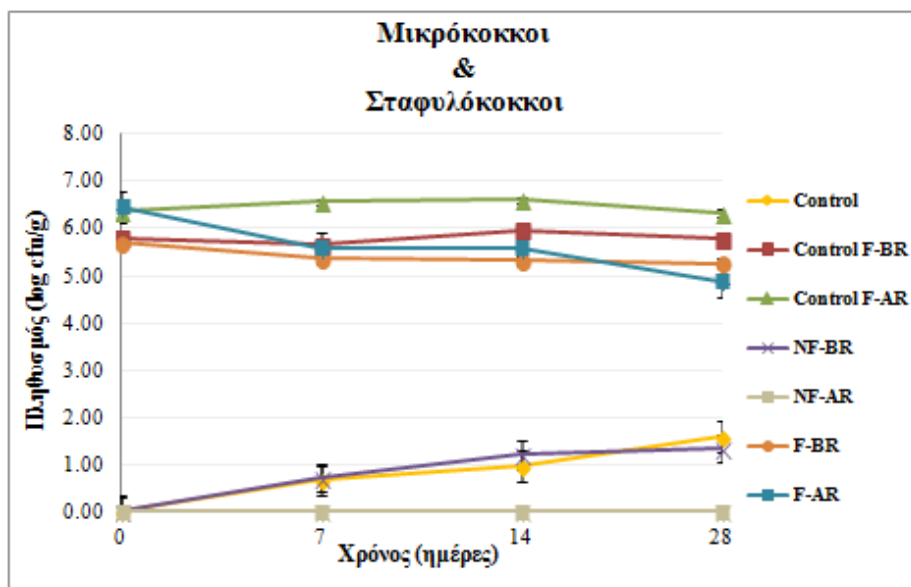


ΓΡΑΦΗΜΑ 3: Μεταβολή της ολικής μικροβιακής χλωρίδας κατά την διάρκεια της συντήρησης των παγωτών (α) Control, (β) Control F-BR : Control Fermented Before Ripening, (γ) Control F-AR : Control Fermented After Ripening, (δ) NF-BR : Not Fermented Before Ripening, (ε) NF-AR : Not Fermented After Ripening, (στ) F-BR : Fermented Before Ripening και (ζ) F-AR : Fermented After Ripening

Στο Γράφημα 4 απεικονίζεται η καταμέτρηση του πληθυσμού των παγωτών που αναπτύσσεται σε θρεπτικό υπόστρωμα MSA agar κατά την διάρκεια της συντήρησης του προϊόντος την 0^η, 7^η, 14^η και 28^η ημέρα αντίστοιχα. Το θρεπτικό υπόστρωμα MSA agar χρησιμοποιήθηκε ως επιλεκτικό για την απαρίθμηση μικρόκοκκων και σταφυλόκοκκων και πιο συγκεκριμένα του παθογόνου βακτηρίου *Staphylococcus aureus*.

Αρχικά, όπως φαίνεται και στο Γράφημα 4, ο πληθυσμός των ζυμωμένων προβιοτικών παγωτών (F-BR και F-AR) καθώς και των ζυμωμένων παγωτών του μάρτυρα (Control F-BR και Control F-AR) ήταν πολύ υψηλότερος σε σχέση με των μη ζυμωμένων προβιοτικών παγωτών (NF-BR και NF-AR) και του μάρτυρα (control). Το γεγονός αυτό οφείλεται στην ζύμωση του μίγματος καθώς έδωσε την δυνατότητα στην προϋπάρχουσα μικροβιακή χλωρίδα των πρώτων υλών να αναπτυχθεί. Στο σημείο αυτό αξίζει να τονιστεί η απουσία σταφυλόκοκκων καθώς και του παθογόνου βακτηρίου *Staphylococcus aureus* από την μικροβιακή χλωρίδα των παγωτών. Το αποτέλεσμα αυτό είχε επιβεβαιωθεί από την ταυτοποίηση επιλεγμένων αποικιών από το θρεπτικό υπόστρωμα MSA agar το οποίο όπως προαναφέρθηκε και πιο πάνω είχε χρησιμοποιηθεί ως επιλεκτικό υπόστρωμα για την απαρίθμηση τους.

Με βάση τα αποτελέσματα της ταυτοποίησης (Πίνακας 3.4.), οι αλληλουχίες των ταυτοποιηθέντων μικροοργανισμών δεν άνηκαν σε παθογόνα αλλά σε βακτήρια μη παθογόνα όπως περιγράφονται αναλυτικά στην Παράγραφο 3.4.



ΓΡΑΦΗΜΑ 4: Μεταβολή μικρόκοκκων και σταφυλόκοκκων κατά την διάρκεια της συντήρησης των παγωτών (α) Control, (β) Control F-BR : Control Fermented Before Ripening, (γ) Control F-AR : Control Fermented After Ripening, (δ) NF-BR : Not Fermented Before Ripening, (ε) NF-AR : Not Fermented After Ripening, (στ) F-BR : Fermented Before Ripening και (ζ) F-AR : Fermented After Ripening

Επιπρόσθετα, κατά την διάρκεια της συντήρησης των παγωτών πραγματοποιήθηκε και η καταμέτρηση του πληθυσμού τους σε: (α) κολοβακτηρίδια, (β) *Salmonella*, (γ) ζύμες και μύκητες. Σε καμία από τις πιο πάνω ομάδες μικροοργανισμών δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη κατά την διάρκεια της συντήρησης των παγωτών στους -20°C την 0^η, 7^η, 14^η και 28^η ημέρα αντίστοιχα. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί και από άλλες μελέτες για τα κολοβακτηρίδια (Di Criscio et al., 2010; Ranadheera et al., 2013), για τις ζύμες και τους μύκητες (Ranadheera et al., 2013).

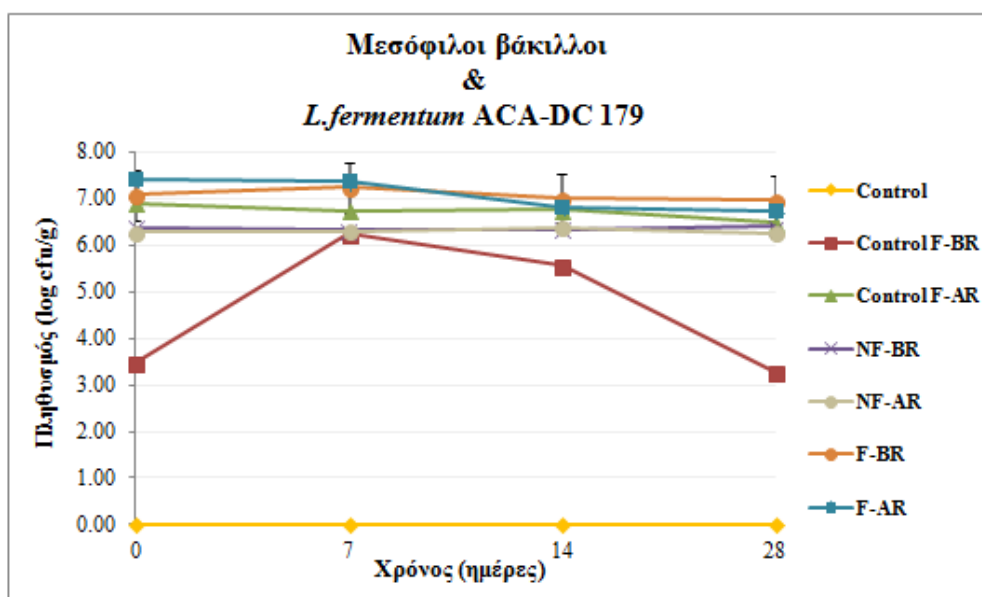
Για τον προσδιορισμό της μεταβολής του πληθυσμού των μεσόφιλων γαλακτοβακίλλων και του προβιοτικού στελέχους *L.fermentum* ACA-DC 179 των παγωτών χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υπόστρωμα MRS agar pH=7.0. Συγκεκριμένα, το θρεπτικό αυτό χρησιμοποιείται για την απαρίθμηση οξυγαλακτικών βακτηρίων, αλλά όπως προαναφέρθηκε και πιο πάνω (Παρ. 3.1.) λειτούργησε και ως επιλεκτικό για την ανάπτυξη του προβιοτικού στελέχους *L.fermentum* ACA-DC 179. Όπως γνωρίζουμε, τα επιλεκτικά υποστρώματα χρησιμοποιούνται για την απομόνωση και απαρίθμηση ορισμένων ομάδων μικροοργανισμών, δηλαδή η σύνθεσή τους δρα παρεμποδιστικά στην ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών. Συνεπώς, η μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε είχε ως στόχο να ευνοήσει τον επιλεκτικό πολλαπλασιασμό μερικών οξυγαλακτικών βακτηρίων αλλά και του προβιοτικού στελέχους *L.fermentum* ACA-DC 179 το οποίο είχε εμβολιαστεί στα προβιοτικά παγωτά, παρεμποδίζοντας ταυτόχρονα την αύξηση της υπόλοιπης μικροχλωρίδας που συνυπήρχε στο ίδιο περιβάλλον.

Στο Γράφημα 5 απεικονίζεται η μεταβολή του πληθυσμού των μεσόφιλων γαλακτοβακίλλων και του προβιοτικού στελέχους *L.fermentum* ACA-DC 179 των παγωτών, κατά την διάρκεια της συντήρησης του προϊόντος την 0^η, 7^η, 14^η και 28^η ημέρα αντίστοιχα

Αρχικά, όπως φαίνεται και στο Γράφημα 5, ο πληθυσμός των ζυμωμένων προβιοτικών παγωτών (F-BR και F-AR) ήταν της τάξης 10⁷ cfu/g (Πίνακας 3.3.), ενώ των μη ζυμωμένων προβιοτικών παγωτών (NF-BR και NF-AR) ήταν της τάξης 10⁶ cfu/g (Πίνακας 3.2.). Συνεπώς, παρατηρήθηκε μια αύξηση του πληθυσμού του προβιοτικού στελέχους *L.fermentum* ACA-DC 179 κατά 1 λογαριθμική μονάδα στα δείγματα παγωτού που είχαν υποστεί 16h ζύμωση. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι η προβιοτική καλλιέργεια *L.fermentum* ACA-DC 179 κατά την διάρκεια της ζύμωσης (16h) του μίγματος παγωτού στους 37°C, θερμοκρασία η οποία είναι βέλτιστη για την ανάπτυξή της, βρήκε τον χρόνο και τις βέλτιστες συνθήκες για την περαιτέρω ανάπτυξή της.

Ο μάρτυρας (control), δεν παρουσίασε ανάπτυξη γεγονός το οποίο αιτιολογείται στο ότι δεν είχε εμβολιαστεί με το προβιοτικό στέλεχος. Το θρεπτικό μέσο MRS agar το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως το επιλεκτικό υπόστρωμα (Παρ. 3.1.) για την προβιοτική καλλιέργεια *L.fermentum* ACA-DC 179, αιτιολογεί και αυτό με την σειρά του τη μηδενική ανάπτυξη του μάρτυρα. Όσον αφορά τα ζυμωμένα δείγματα παγωτού του μάρτυρα: (α) Control F-BR και (β) Control F-AR, παρατηρήθηκε ότι ο πληθυσμός τους ήταν υψηλότερος σε σχέση με το μάρτυρα (control) που είχε μηδενική ανάπτυξη. Το γεγονός ότι και οι ζυμωμένοι μάρτυρες (Control F-BR και Control F-AR) και ο μάρτυρας (control) δεν είχαν εμβολιαστεί με το προβιοτικό στέλεχος, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ο πληθυσμός των ζυμωμένων μαρτύρων οφείλεται στην ζύμωση του μίγματος. Η 16h ζύμωση του μίγματος παγωτού έδωσε την δυνατότητα στην προϋπάρχουσα μικροβιακή χλωρίδα των πρώτων υλών να αναπτυχθεί.

Τέλος, στα προβιοτικά παγωτά, ο πληθυσμός του στελέχους *L.fermentum* ACA-DC 179 παρουσίασε πολύ μικρή μείωση από την 14^η μέχρι την 28^η ημέρα.



ΓΡΑΦΗΜΑ 5 : Μεταβολή των μεσόφιλων βακίλλων και του προβιοτικού στελέχους *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179, κατά την διάρκεια της συντήρησης των παγωτών (α) Control, (β) Control F-BR : Control Fermented Before Ripening, (γ) Control F-AR : Control Fermented After Ripening, (δ) NF-BR : Not Fermented Before Ripening, (ε) NF-AR : Not Fermented After Ripening, (στ) F-BR : Fermented Before Ripening και (ζ) F-AR : Fermented After Ripening

Τα προβιοτικά παγωτά που παρασκευαστήκαν με την μέθοδο προσθήκης της προβιοτικής καλλιέργειας μετά την ωρίμανση του μίγματος παγωτού (NF-AR, F-AR), παρουσίασαν μικρότερη ικανότητα επιβίωσης του στελέχους *L.fermentum* ACA-DC 179 κατά την διάρκεια της συντήρησης τους, σε σχέση με τα προβιοτικά παγωτά NF-BR και F-BR που παρασκευαστήκαν με την προσθήκη της καλλιέργειας πριν την ωρίμανση του μίγματος. Η αύξηση αυτή (της επιβίωσης), ίσως να οφείλεται στην αντοχή των μικροοργανισμών στο κρύο (cryotolerance), λόγω/ως αποτέλεσμα της έκθεσής τους σε αυτό κατά την διάρκεια της ωρίμανσης στους 4°C. Το φαινόμενο αυτό (cryotolerance), φαίνεται να ενισχύεται με την προετοιμασία (preconditioning) των οξυγαλακτικών βακτηρίων (LAB) σε χαμηλή θερμοκρασία (+4°C) (Girgis, Smith, Luchansky, & Klaenhammer, 2003).

Ο πληθυσμός του *L.fermentum* ACA-DC 179 στο μη ζυμωμένο παγωτό NF-BR, δεν μειώθηκε κατά την διάρκεια της αποθήκευσης του προϊόντος για χρονικό το διάστημα των 28 ημερών (Γράφημα 5, Πίνακας 3.2.). Παρόμοια αποτελέσματα ελήφθησαν και από άλλες μελέτες που παρασκεύασαν μη ζυμωμένο προβιοτικό παγωτό NF-BR. Οι Abghari et al., (2011), αναφέρουν ότι, ο αριθμός των κυττάρων του είδους *L. rhamnosus* δεν μειώθηκε σημαντικά κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης του προϊόντος. Ομοίως, οι Alamprese et al., (2005), αναφέρουν ότι, ο πληθυσμός των *L. acidophilus* και *L. rhamnosus* GG δεν μειώθηκε σημαντικά κατά την διάρκεια της αποθήκευσης του προϊόντος για 30 ημέρες στους -16°C.

Ο πληθυσμός του στελεχούς *L.fermentum* ACA-DC 179 παρέμεινε σταθερός αμέσως μετά την κατάψυξη του μίγματος σε παγωτομηχανή στα μη ζυμωμένα προβιοτικά παγωτά NF-BR και NF-AR (ημέρα 0), σε σχέση με τον πληθυσμό των εμβολιασμένων μιγμάτων παγωτού (Πίνακας 3.2.) Αντιθέτως, σε άλλες μελέτες παρατηρήθηκε ότι, οι πληθυσμοί των ειδών *L. acidophilus* και *L. rhamnosus* μειώθηκαν αμέσως μετά την κατάψυξη του μίγματος σε παγωτομηχανή (ημέρα 0), περίπου 0,2 και 0,3 λογαριθμικές μονάδες, αντίστοιχα (Abghari et al., 2011). Ομοίως, είχε αναφερθεί στο παρελθόν ότι, η διαδικασία της μετατροπής του ρευστού μίγματος στο τελικό προϊόν (κατάψυξη σε παγωτομηχανή) σε μη ζυμωμένο προβιοτικό παγωτό, προκάλεσε μια μείωση της τάξης των 0,2-0,3 λογαριθμικών μονάδων του πληθυσμού των στελεχών *L. johnsonii* La1 και *L. rhamnosus* GG (Alamprese et al., 2002, 2005). Συνεπώς, στην μελέτη αυτή η ικανότητα των προβιοτικών βακτηρίων να επιβιώνουν κατά την διαδικασία της κατάψυξης σε παγωτομηχανή, ήταν υψηλότερη από ότι άλλοι συγγραφείς ανέφεραν (Akin et al., 2007; Christiansen et al., 1996; Hagen & Narvhus, 1999; Hekmat & McMahon, 1992; Magarinos et al., 2007), για διαφορετικούς μικροοργανισμούς, διαφορετικές τεχνολογίες παρασκευής, διαφορετικές συνταγές και διαφορετικό pH μιγμάτων.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3. 2: Επιβίωση της προβιοτικής καλλιέργειας *L.fermentum* ACA-DC 179 πριν και μετά την ωρίμανση του μίγματος, μετά την κατάψυξη (day-0) και κατά την αποθήκευση των μη ζυμωμένων παγωτών

Παγωτό	Πληθυσμός <i>L.fermentum</i> ACA-DC 179 (log cfu/g)
	Παγωτό NF-BR
Εμβολιασμένο μίγμα παγωτού	6.30±0.06
Παγωτό (day-0)	6.37±0.08
Παγωτό (day-7)	6.32±0.01
Παγωτό (day-14)	6.33±0.01
Παγωτό (day-28)	6.39±0.01
	Παγωτό NF-AR
Εμβολιασμένο μίγμα παγωτού	6.16±0.19
Παγωτό (day-0)	6.28±0.09
Παγωτό (day-7)	6.30±0.10
Παγωτό (day-14)	6.39±0.04
Παγωτό (day-28)	6.27±0.05

Ο πληθυσμός του προβιοτικού στελεχούς *L.fermentum* ACA-DC 179 στα ζυμωμένα μίγματα παγωτού ήταν $7,70 \pm 0,00 \log \text{ cfu/g}$ στο F-BR και $7,87 \pm 0,02 \log \text{ cfu/g}$ στο F-AR (Πίνακας 3.3.), αποτέλεσμα το οποίο μπορεί να συσχετιστεί και με παρόμοιες μελέτες. Συγκεκριμένα, σε μια άλλη μελέτη, ο πληθυσμός των προβιοτικών βακτηρίων σε ζυμωμένο μίγμα παγωτού ήταν

7,74 ± 0,51 log cfu/g για το στέλεχος *L. acidophilus* La-5 και 7.58 ± 0,62 log cfu/g για το στέλεχος *B.animalis* Bb-12 (Akalin & Erisir, 2008). Ωστόσο, η κατάψυξη του μίγματος στην παγωτομηχανή υπό συνεχή ανάδευση μείωσε τον πληθυσμό του προβιοτικού στελέχους κατά 0.44 log cfu/g στο παγωτό F-AR και 0.62 log cfu/g στο παγωτό F-BR, αποτέλεσμα το οποίο έχει παρατηρηθεί και σε άλλες μελέτες. Ένα παρόμοιο εύρημα αναφέρθηκε από τους Hagen & Narvhus (1999), Alamprese et al., (2002) και Haynes & Playne (2002), αλλά όχι από τους Hekmat & McMahon (1992). Επίσης, κατά την διάρκεια της αποθήκευσης του προϊόντος στους -20°C παρατηρήθηκε ότι, ο πληθυσμός της προβιοτικής καλλιέργειας στα ζυμωμένα προβιοτικά παγωτά μειώθηκε κατά 0,26 log cfu/g στο παγωτό F-BR και 0,68 log cfu/g στο παγωτό F-AR.

Τα πιο πάνω αποτελέσματα έχουν επίσης αναφερθεί και σε άλλες μελέτες με περισσότερη ή λιγότερη μείωση στην επιβίωση των προβιοτικών βακτηρίων τόσο κατά τη διάρκεια της κατάψυξης όσο και κατά την αποθήκευση του προϊόντος (Christiansen et al., 1996; Hagen & Narvhus, 1999; Hekmat & McMahon, 1992). Από την άλλη πλευρά, οι Davidson et al.,(2000) και Alamprese et al., (2002) ανέφεραν ότι, εναρκτήρια καλλιέργεια βακτηρίων η οποία χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή παγωτού με χαμηλά λιπαρά δεν μεταβλήθηκε σημαντικά κατά τη διάρκεια της αποθήκευσής του προϊόντος.

Η μικρή αυτή μείωση του πληθυσμού των βακτηρίων πιθανόν να οφείλεται στον τραυματισμό των κυττάρων από την κατάψυξη σε παγωτομηχανή, που οδηγεί τελικά στον θάνατο τους. Επιπλέον, η ενσωμάτωση του οξυγόνου στο μίγμα παγωτού μπορεί να οδηγήσει σε περαιτέρω μείωση του αριθμού των ζωντανών κυττάρων, καθώς επίσης και οι μηχανικές καταπονήσεις των κυττάρων κατά την διαδικασία της ανάμιξης και της κατάψυξης του μίγματος σε παγωτομηχανή (Akalin & Erisir, 2008). Συγκεκριμένα, τα κύτταρα τραυματίζονται κατά τη διάρκεια της κατάψυξης, πεθαίνουν σταδιακά κατά την αποθήκευση του προϊόντος και το ποσοστό θανάτου αυξάνεται με την παρατεταμένη αποθήκευση του παγωτού (Magarinos et al., 2007).

ΠΙΝΑΚΑΣ 3. 3: Επιβίωση της προβιοτικής καλλιέργειας *L.fermentum* ACA-DC 179 πριν και μετά την ωρίμανση και ζύμωση του μίγματος, μετά την κατάψυξη (day-0) και κατά την αποθήκευση των ζυμωμένων παγωτών

Παγωτό	Πληθυσμός <i>L.fermentum</i> ACA-DC 179 (log cfu/g)
	Παγωτό F-BR
Εμβολιασμένο μίγμα παγωτού	6.40±0.15
Ζυμωμένο μίγμα παγωτού	7.70±0.00
Παγωτό (day-0)	7.08±0.53
Παγωτό (day-7)	7.24±0.50
Παγωτό (day-14)	7.00±0.57
Παγωτό (day-28)	6.98±0.61
Παγωτό F-AR	
Εμβολιασμένο μίγμα παγωτού	6.48±0.03
Ζυμωμένο μίγμα παγωτού	7.87±0.02
Παγωτό (day-0)	7.43±0.03
Παγωτό (day-7)	7.38±0.08
Παγωτό (day-14)	6.83±0.11
Παγωτό (day-28)	6.75±0.07

Παρά την μικρή μείωση του πληθυσμού της προβιοτικής καλλιέργειας *L.fermentum* ACA-DC 179 στα ζυμωμένα προβιοτικά παγωτά (Πίνακας 3.3.), η τελική συγκέντρωση του ήταν μεγαλύτερη από την ελάχιστη συνιστώμενη θεραπευτική δόση (10^6 - 10^7 cfu/g) μέχρι και την 28^η ημέρα αποθήκευσής του.

Με βάση τα πιο πάνω αποτελέσματα, παρατηρήθηκε ότι πολλοί είναι οι παράγοντες που μπορεί να επηρεάσουν αρνητικά τη βιωσιμότητα των βακτηρίων κατά την παρασκευή και την αποθήκευση του κατεψυγμένου προϊόντος. Για παράδειγμα, η φυσική αποσύνθεση των κυττάρων κατά τη διάρκεια της κατάψυξης με ανάδευση συμβάλλει στο θάνατο των προβιοτικών βακτηρίων (**Foley & Sheuring, 1966**). Η μεγέθυνση των παγοκρυστάλλων, που προκύπτει λόγω των διακυμάνσεων της θερμοκρασίας, ειδικά σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των -25°C, επηρεάζει τη βιωσιμότητα των μικροοργανισμών λόγω της μηχανικής της επίδρασης (**Weiser & Osterud, 1945**). Για παράδειγμα, η διαφορά της βιωσιμότητας μεταξύ των ειδών *L. acidophilus* και *L. rhamnosus* οφείλεται σε διάφορους λόγους. Για παράδειγμα ο *L. acidophilus* είναι θερμόφιλος (**Archibald & Fridovich, 1981**) και κατά συνέπεια θα μπορούσε να είναι πιο ευαίσθητος στο κρύο από τον *L. rhamnosus* (**Talwalkar et al., 2004**). Σε άλλη μελέτη αναφέρεται ότι, τα είδη του γένους *Bifidobacterium* spp. είναι αυστηρά αναερόβια και για το λόγο αυτό είναι και πιο ευαίσθητα στο οξυγόνο από το είδος *L. acidophilus* (**Talwalkar & Kailasapathy, 2003**).

3.4 Μοριακή μέθοδος ταυτοποίησης

3.4.1 Αποτελέσματα στοίχισης αλληλουχιών 16S rDNA των στελεχών μέσω του προγράμματος BLAST

Η μοριακή μέθοδος ταυτοποίησης στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε την 11 εβδομάδα με σκοπό την επιβεβαίωση της ύπαρξης του στελέχους *L. fermentum* ACA-DC 179 στα προβιοτικά παγωτά καθώς και για τον έλεγχο ανάπτυξης παθογόνων μικροοργανισμών στη διάρκεια της παρασκευής του παγωτού.

Η διαδικασία που εφαρμόστηκε για την ταυτοποίηση της μικροβιακής χλωρίδας των παγωτών, βασίστηκε στην ενίσχυση της περιοχής DNA που κωδικοποιεί το ριβοσωμικό RNA, (γονίδιο 16S rDNA), με τη μέθοδο της PCR. Τα προϊόντα των αντιδράσεων στάλθηκαν για αλληλούχηση και τα αποτελέσματα ταυτοποιήθηκαν με την βοήθεια του προγράμματος BLAST του NCBI (<http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST/>). Στον Πίνακα 3.4., παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της στοίχισης των αλληλουχιών των ταυτοποιηθέντων μικροοργανισμών από το πρόγραμμα αλληλούχησης BLAST καθώς και το ποσοστό ομοιότητας της στοίχισης για κάθε είδος μικροοργανισμού.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3. 4: Είδη μικροοργανισμών που προέκυψαν από το πρόγραμμα αλληλούχησης BLAST.

No	Είδος παγωτού	Υπόστρωμα	Είδος μικροοργανισμού	Ποσοστό ομοιότητας στοίχισης % (BLAST)
1	Control	PCA	<i>Bacillus aryabhatai</i> <i>Bacillus megaterium</i>	(99%) (99%)
2	Control	PCA	<i>Paenibacillus xylanexedens</i> <i>Paenibacillus pabuli</i>	(99%) (99%)
4	Control	MSA	<i>Bacillus kochii</i> <i>Bacillus pocheonensis</i> <i>Bacillus purgationiresistens</i>	(99%) (99%) (99%)
5	NF-BR	MSA	<i>Bacillus cereus</i> <i>Bacillus toyonensis</i>	(99%) (99%)
7	F-BR	PCA	<i>Bacillus cereus</i> <i>Bacillus thuringiensis</i>	(99%) (99%)
8	F-BR	MSA	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus tequilensis</i>	(99%) (99%)
10	F-AR	MSA	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus tequilensis</i>	(99%) (99%)
A	NF-BR	PCA	<i>Lactobacillus fermentum</i>	(99%)
B	NF-AR	MRS	<i>Lactobacillus fermentum</i>	(99%)
C	NF-AR	PCA	<i>Lactobacillus fermentum</i>	(99%)
D	F-AR	MRS	<i>Lactobacillus fermentum</i>	(99%)
E	Control F-BR	MRS	<i>Enterococcus faecium</i>	(99%)
F	Control F-BR	MRS	<i>Enterococcus faecium</i>	(99%)
G	Control F-BR	MRS	<i>Terribacillus sp.</i> <i>Bacillus racemilacticus</i>	(98%) (97%)

Οι 14 αλληλουχίες που αναλύθηκαν παρουσίασαν σημαντική ομοιότητα με βακτηριακές αλληλουχίες που υπάρχουν στη βάση δεδομένων του NCBI. Τα αποτελέσματα της ταυτοποίησης δείχνουν πως τα είδη ανήκουν στις εξής οικογένειες: (α) Bacillaceae, (β) Lactobacillaceae, (γ) Paenibacillaceae και (δ) Enterococcaceae. Στην οικογένεια Bacillaceae περιλαμβάνονταν 2 γένη και στις υπόλοιπες οικογένειες από 1 γένος. Συγκεκριμένα στην οικογένεια Bacillaceae περιλαμβάνονταν τα γένη *Bacillus* και *Terribacillus*, και τα είδη *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus tequilensis*, *Bacillus aryabhattai*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus racemilacticus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus toyonensis*, *Bacillus kochi*, *Bacillus pocheonensis*, *Bacillus purgationiresistens* και *Terribacillus sp.* Στην οικογένεια Lactobacillaceae περιλαμβανόταν μόνο το είδος *Lactobacillus fermentum*, στην οικογένεια Paenibacillaceae τα είδη *Paenibacillus xylanexedens* και *Paenibacillus pabuli*, και στην οικογένεια Enterococcaceae το είδος *Enterococcus faecium*.

Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 3.4., το μεγαλύτερο ποσοστό της μικροβιακής χλωρίδας των προβιοτικών παγωτών έδειξε ότι άνηκε στο είδος *L. fermentum* με την ομοιότητα στην στοίχιση των αλληλουχιών να είναι αρκετά υψηλή της τάξεως του 99% σύμφωνα με τον αλγόριθμο ευθυγράμμισης του προγράμματος BLAST. Συγκεκριμένα το είδος *Lactobacillus fermentum* ταυτοποιήθηκε στα προβιοτικά παγωτά: (α) NF-BR, από αποικία που απομονώθηκε από το θρεπτικό υπόστρωμα PCA agar, (β) NF-AR, από αποικίες που απομονώθηκαν από τα θρεπτικά υποστρώματα MRS agar και PCA agar και (γ) F-AR, από αποικία που απομονώθηκε από το θρεπτικό υπόστρωμα MRS agar. Συνεπώς, συμπεραίνουμε ότι, οι χειρισμοί και οι συνθήκες παραγωγής των προβιοτικών παγωτών: (α) κατά την προετοιμασία της προβιοτικής καλλιέργειας, (β) κατά τον εμβολιασμό της στο μίγμα παγωτού (π.χ. σε θερμοκρασία 37°C), (γ) κατά την διάρκεια της παρασκευής και (δ) αποθήκευσης των παγωτών ήταν οι κατάλληλες.

Επιπρόσθετα 2 μικροοργανισμοί άνηκαν στο είδος *Enterococcus faecium*, 2 στο είδος *Bacillus cereus*, 2 στο είδος *Bacillus subtilis*, 2 στο είδος *Bacillus tequilensis* και από τα υπόλοιπα είδη από μια φορά. Η ομοιότητα στη στοίχιση των αλληλουχιών για όλα τα είδη μικροοργανισμών ήταν αρκετά υψηλή, της τάξεως του 99%, με εξαίρεση τα είδη της οικογένειας Bacillaceae, *Bacillus racemilacticus* και *Terribacillus sp.* με ποσοστό ομοιότητας στοίχισης 97% και 98% αντίστοιχα.

Όσον αφορά την οικογένεια Lactobacillaceae, η ταυτοποίηση του μικροοργανισμού *Lactobacillus fermentum*, επιβεβαίωσε την παρουσία του προβιοτικού στελέχους *L. fermentum*

ACA-DC 179 που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη για την παρασκευή των προβιοτικών παγωτών. Πέρα από την οικογένεια Lactobacillaceae, αρκετοί εντερόκοκκοι έχουν χρησιμοποιηθεί επίσης ως προβιοτικά, όπως και το είδος *Enterococcus faecium* το οποίο απομονώθηκε στη παρούσα μελέτη (Moreno et al., 2006). Από την άλλη όμως, καλό θα ήταν να εξεταστούν και οι παράγοντες παθογένειας του είδους αυτού καθώς οι εντερόκοκκοι έχουν ενοχοποιηθεί για περιπτώσεις ενδοκαρδίτιδας, βακτηριαιμίας, λοιμώξεις του ουροποιητικού, του αναπνευστικού και του κεντρικού νευρικού συστήματος (Jia, Li, & Wang, 2014; Moreno et al., 2006).

Μεταξύ των ειδών της οικογένειας Bacillaceae, το βακτήριο *Bacillus cereus* το οποίο απομονώθηκε στην παρούσα μελέτη, είναι ευρέως κατανεμημένο στο περιβάλλον. Το βακτήριο αυτό υπάρχει στη φύση υπό μορφή βλαστικών κυττάρων ή σπορίων. Τα σπόρια του βακτηρίου *Bacillus cereus* είναι ανθεκτικά σε ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες, μεταξύ άλλων της θερμότητας, της ψύξης, της ξήρανσης και της ακτινοβολίας και μπορεί να θεωρηθεί ως ο μολυσματικός παράγοντας για το βακτήριο αυτό. Υπό την μορφή βλαστικού κυττάρου μπορεί να αποικίσει το ανθρώπινο σώμα (Bottone, 2010). Το βακτήριο *Bacillus aryabhattai* το οποίο απομονώθηκε στην παρούσα μελέτη, ανακαλύφθηκε μόλις πρόσφατα (Shivaji et al., 2009) από την ανώτερη στρατόσφαιρα, σε ύψος περίπου 40 χιλιομέτρων πάνω από την ινδική χερσόνησο. Το ίδιο είδος έχει επίσης πρόσφατα απομονωθεί από ιζήματα και από δείγματα νερού λίμνης (Dr. K.P. Krishnan, αδημοσίευτα δεδομένα) (Pearce et al., 2009). Όσον αφορά τα υπόλοιπα είδη του γένους *Bacillus* που απομονώθηκαν, το είδος *Bacillus thuringiensis* είναι ένα μοναδικό βακτήριο που χρησιμοποιείται στην γεωργία ως μικροβιακό εντομοκτόνο. Είναι ασφαλές για τον άνθρωπο και είναι το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο βιολογικό φυτοφάρμακο σε όλο τον κόσμο (Ibrahim, Griko, Junker, & Bulla, 2010). Το είδος *Bacillus subtilis*, αν και υπάρχουν πολυάριθμες απομονώσεις του από το έδαφος και το νερό (Fall, Kinsinger, & Wheeler, 2004), αρκετές μελέτες αναφέρουν ότι το είδος αυτό έχει απομονωθεί από τις ρίζες των φυτών (Vullo, Coto, & Sineriz, 1991). Το *Bacillus megaterium* είναι κυρίως βακτήριο του εδάφους, αλλά βρίσκεται επίσης σε καλλιέργεια ρυζιού, σε ξηρά τροφή, στο θαλασσίνο νερό, στα ψάρια, στη φυσιολογική χλωρίδα, ακόμα και στην μέλισσα (Vary, 1994). Όσον αφορά το είδος *Bacillus racemilacticus*, υπάρχουν πολυάριθμες απομονώσεις του από το έδαφος και την ριζόσφαιρα (Andersch, Pianka, Fritze, & Claus, 1994). Το *Bacillus toyonensis* χρησιμοποιείται στη διατροφή των ζώων ως προβιοτικό για πάνω από τριάντα χρόνια σε όλο τον κόσμο (Jiménez et

al., 2013). Επιπλέον, τα είδη του γένους *Bacillus* έχουν αναφερθεί ότι είναι βασικά συστατικά της ριζόσφαιρας, των ζαχαρότευτλων (**Lilley et al.,1996**) του σιταριού και της ελαιοκράμβης (**Germida et al.,1998**).

Τα βακτήρια που ανήκουν στο γένος *Paenibacillus* έχουν απομονωθεί από το έδαφος, από το νερό, από φυτική ύλη και από την ριζόσφαιρα. Μερικά είδη του γένους *Paenibacillus* είναι προσαρμοσμένα στο κρύο και σε υγρές συνθήκες (**Nelson et al.,2009**).

Με βάση τα πιο πάνω αποτελέσματα παρατηρήθηκε ότι η βακτηριακή ποικιλότητα παγωτών ήταν υψηλή και κυρίως προερχόταν από το έδαφος, από τον περιβάλλοντα χώρο, από το νερό και κυρίως από φυτά. Συνεπώς, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η μικροβιακή χλωρίδα των παγωτών προήλθε από τη χρήση πρώτων υλών φυτικής προέλευσης όπως το σαλέπι, τη μαστίχα και τη ζάχαρη.

3.5 Φυσικοχημικές αναλύσεις

Οι φυσικοχημικές ιδιότητες που μελετήθηκαν ήταν: (α) το pH, (β) η οξύτητα, (γ) η διόγκωση (overrun), (δ) ο ρυθμός τήξης και η (ε) η χημική σύσταση των παγωτών (λίπος, πρωτεΐνη) και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται αναλυτικά παρακάτω.

3.5.1 pH

Το pH των παγωτών μετρήθηκε κατά την διάρκεια της συντήρησης τους σε θερμοκρασία -20 °C και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται αναλυτικά πιο κάτω.

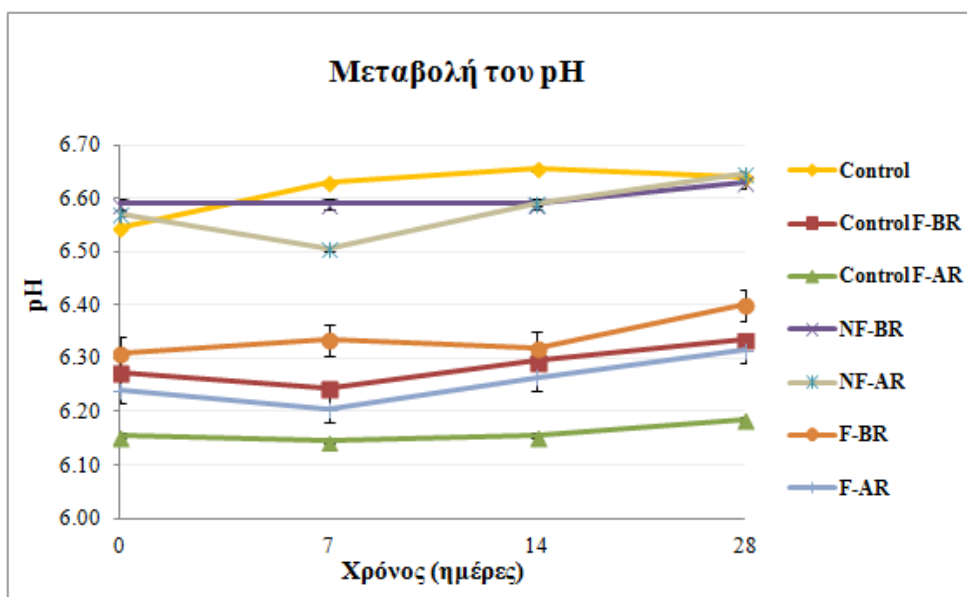
Στο Γράφημα 6 απεικονίζεται η μεταβολή του pH των παγωτών κατά την διάρκεια της συντήρησης του προϊόντος την 0^η, 7^η, 14^η και 28^η ημέρα αντίστοιχα. Σύμφωνα με το Γράφημα 6, η προσθήκη της προβιοτικής καλλιέργειας μετάβαλε το pH των παγωτών, το οποίο έχει παρατηρηθεί και σε άλλες μελέτες (**Abghari et al., 2011; Akalin & Erisir, 2008**).

Το pH των παγωτών κυμαινόταν από pH=6.14 έως pH=6.66. Όπως ήταν αναμενόμενο, οι τιμές pH του μάρτυρα και των προβιοτικών παγωτών διέφεραν σημαντικά, ενώ παρόμοιες ήταν οι τιμές του pH που προσδιορίστηκαν σε όλα τα ζυμωμένα προβιοτικά παγωτά (**Akalin & Erisir, 2008**). Παρατηρήθηκε ότι, οι τιμές του pH στα ζυμωμένα προβιοτικά παγωτά (F-BR και F-AR) καθώς και στα ζυμωμένα παγωτά του μάρτυρα (Control F-BR και Control F-AR) ήταν χαμηλότερες σε σχέση με τα μη ζυμωμένα προβιοτικά παγωτά (NF-BR και NF-AR) και το μάρτυρα (control). Η διαφορά του pH μεταξύ των προβιοτικών παγωτών ζυμωμένων (F-BR και F-AR) ή μη (NF-BR και NF-AR), οφείλεται στην ζύμωση του μίγματος του παγωτού.

Συγκεκριμένα, η προβιοτική καλλιέργεια *L.fermentum* ACA-DC 179 κατά την διάρκεια της ζύμωσης (16h) του μίγματος στους 37°C βρήκε τον χρόνο και τις βέλτιστες συνθήκες για την περαιτέρω ανάπτυξή της και ως επακόλουθο την περαιτέρω μείωση του pH.

Όσον αφορά τα ζυμωμένα δείγματα του παγωτού μάρτυρα (α) Control F-BR και (β) Control F-AR, παρατηρήθηκε ότι το pH τους ήταν χαμηλότερο σε σχέση με το μάρτυρα (control). Το γεγονός ότι και οι ζυμωμένοι μάρτυρες (Control F-BR και Control F-AR) και ο μάρτυρας (control) δεν είχαν εμβολιαστεί με το προβιοτικό στέλεχος, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ο πληθυσμός των ζυμωμένων μαρτύρων οφείλεται στην ζύμωση του μίγματος. Η 16h ζύμωση του μίγματος παγωτού έδωσε την δυνατότητα στην προϋπάρχουσα μικροβιακή χλωρίδα των πρώτων υλών να αναπτυχθεί περαιτέρω και να παράγει μεγαλύτερη ποσότητα γαλακτικού οξέος και ως αποτέλεσμα την περαιτέρω μείωση του pH. Αυτό επιβεβαιώνεται και από άλλες μελέτες που αναφέρουν ότι η ζύμωση μεταβάλλει το pH των παγωτών (Aboufazli et al., 2015). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η ζύμωση του γάλακτος από προβιοτικούς μικροοργανισμούς, αυξάνει την υδρόλυση των πρωτεϊνών του γάλακτος, αυξάνει την συσσώρευση του γαλακτικού οξέος και κατά συνέπεια μειώνει το pH του παγωτού (Lucey, 2004).

Τέλος, σε όλα τα προβιοτικά παγωτά, το pH παρουσίασε μια ελάχιστη αύξηση από την 14^η μέχρι την 28^η ημέρα το οποίο μπορεί να συσχετιστεί με την μικρή μείωση του προβιοτικού στελέχους στα παγωτά από την 14^η μέχρι την 28^η ημέρα όπως φαίνεται στο Γράφημα 5.



ΓΡΑΦΗΜΑ 6 : Μεταβολή του pH των παγωτών κατά την διάρκεια της συντήρησής τους : (α) Control, (β) Control F-BR : Control Fermented Before Ripening, (γ) Control F-AR : Control Fermented After Ripening, (δ) NF-BR : Not Fermented Before Ripening, (ε) NF-AR : Not Fermented After Ripening, (στ) F-BR : Fermented Before Ripening και (ζ) F-AR : Fermented After Ripening

Όπως προαναφέρθηκε, το pH των ζυμωμένων παγωτών ήταν χαμηλότερο καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης του προϊόντος στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, σε σχέση με τα μη ζυμωμένα προβιοτικά παγωτά. Συνεπώς, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι, το υψηλότερο pH των μη ζυμωμένων προβιοτικών παγωτών προσδίδει στο προϊόν το πλεονέκτημα του να είναι οργανοληπτικά πιο αποδεκτό από τα ζυμωμένα προβιοτικά παγωτά ή από το παγωτό-γιαούρτι. Επίσης, παρέχει και τη δυνατότητα για ικανοποιητική επιβίωση των προβιοτικών βακτηρίων στο προϊόν (**Christiansen et al., 1996**). Επιπλέον, οι κρυοπροστατευτικές ενώσεις που περιλαμβάνονται στο παγωτό όπως, το λίπος του γάλακτος, η καζεΐνη, η λακτόζη και η σακχαρόζη, προστατεύουν τα κύτταρα των προβιοτικών μικροοργανισμών από τους τραυματισμούς που μπορεί να προκληθούν κατά την διαδικασία της κατάψυξης του μίγματος σε παγωτομηχανή (**Holcomb, Frank, & McGregor, 1991; Moss & Speck, 1963**). Ωστόσο, υπάρχουν ορισμένες πηγές στρες κατά την διαδικασία της παρασκευής του παγωτού, όπως ενσωμάτωση του αέρα στο παγωτό, η οποία θα μπορούσε να επηρεάσει τη συμπεριφορά τους, γεγονός το οποίο χρειάζεται περαιτέρω μελέτη (**Abghari et al., 2011**).

Σε γενικές γραμμές, παρατήθηκε ότι το pH των παγωτών δεν μεταβλήθηκε σημαντικά κατά την διάρκεια της αποθήκευσής τους, και αυτό ίσως να οφείλεται στην χαμηλή θερμοκρασία αποθήκευσής τους αλλά και στην ρυθμιστική ικανότητα των συστατικών του γάλακτος (**Abghari et al., 2011**).

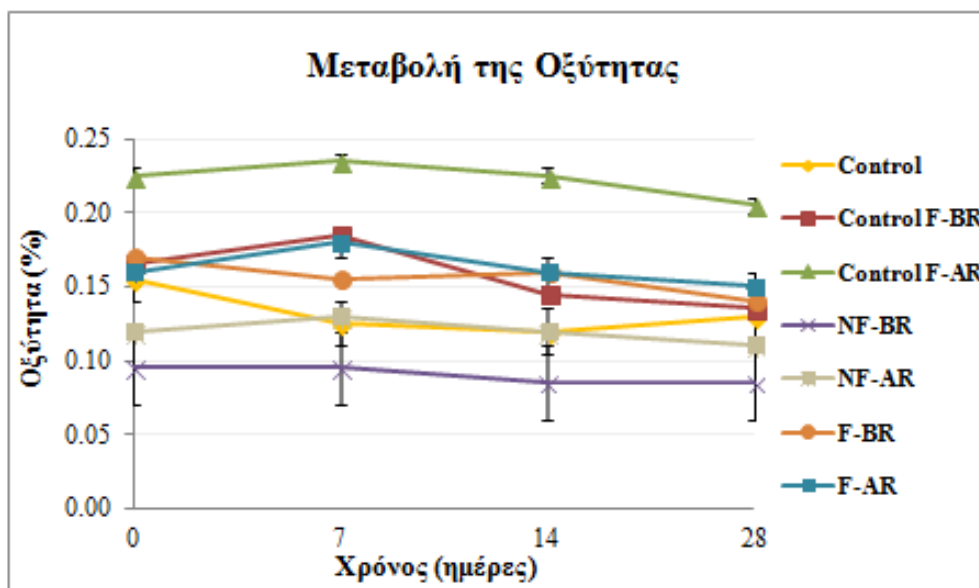
3.5.2 Οξύτητα

Η οξύτητα μετρήθηκε σε όλα τα παγωτά κατά την διάρκεια της συντήρησης τους σε θερμοκρασία $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται αναλυτικά πιο κάτω.

Στο Γράφημα 7 απεικονίζεται η μεταβολή της οξύτητας των παγωτών κατά την διάρκεια της συντήρησης του προϊόντος την 0^η, 7^η, 14^η και 28^η ημέρα αντίστοιχα. Αρχικά, όπως φαίνεται και στο Γράφημα 7, η οξύτητα των παγωτών κυμαινόταν από 0.09% έως 0.24%. Όπως ήταν αναμενόμενο, η οξύτητα του μάρτυρα (control) και των προβιοτικών παγωτών διέφερε σημαντικά, ενώ παρόμοια ήταν η οξύτητα που προσδιορίστηκε σε όλα τα ζυμωμένα προβιοτικά παγωτά, αποτέλεσμα το οποίο έχει παρατηρηθεί και σε άλλη μελέτη (**Akalin & Erisir, 2008**). Παρατηρήθηκε ότι, τα ζυμωμένα προβιοτικά παγωτά (F-BR και F-AR) καθώς και τα ζυμωμένα παγωτά του μάρτυρα (Control F-BR και Control F-AR) είχαν υψηλότερη οξύτητα σε σχέση με τα μη ζυμωμένα προβιοτικά παγωτά (NF-BR και NF-AR) και το μάρτυρα (control). Η διαφορά

της οξύτητας μεταξύ των προβιοτικών παγωτών ζυμωμένων (F-BR και F-AR) ή μη (NF-BR και NF-AR), οφείλεται στην ζύμωση του μίγματος. Αυτό επιβεβαιώνεται και από άλλες μελέτες που αναφέρουν ότι η ζύμωση μεταβάλλει την οξύτητα του παγωτού (Aboufazli et al., 2015). Η υψηλότερη οξύτητα των ζυμωμένων παγωτών μπορεί να εξηγηθεί από τη μετατροπή της λακτόζης σε γαλακτικό οξύ κατά τη διάρκεια της ζύμωσης.

Σε αυτή την μελέτη, η οξύτητα όλων των δειγμάτων παγωτού παρουσίασε μια ελάχιστη μείωση κατά τη διάρκεια των 28 ημερών αποθήκευσης, πιθανό λόγω της χαμηλής θερμοκρασίας αποθήκευσης (-20°C), αποτέλεσμα το οποίο έχει αναφερθεί και από άλλους συγγραφείς (Basyigit, Kuleaoan, & Karahan, 2006). Τελευταίο αλλά εξίσου σημαντικό είναι ότι, οι προβιοτικές καλλιέργειες αναμένεται ότι θα μπορούν να επιβιώσουν κατά τη δίοδό τους από τις αντίξοες συνθήκες (υψηλής οξύτητας) του ανθρώπινου γαστρεντερικού συστήματος και θα καταφέρουν να φτάσουν σε ικανούς πληθυσμούς σε σημεία όπου μπορεί να επιφέρουν τις ευεργετικές τους επιδράσεις στην υγεία του ξενιστή (Dunne et al., 1999; Fernandez, Boris, & Barbes, 2003; Kaila Kailasapathy & Chin, 2000).



ΓΡΑΦΗΜΑ 7: Μεταβολή της οξύτητας των παγωτών κατά την διάρκεια της συντήρησής τους : (α) Control, (β) Control F-BR : Control Fermented Before Ripening, (γ) Control F-AR : Control Fermented After Ripening, (δ) NF-BR : Not Fermented Before Ripening, (ε) NF-AR : Not Fermented After Ripening, (στ) F-BR : Fermented Before Ripening και (ζ) F-AR : Fermented After Ripening

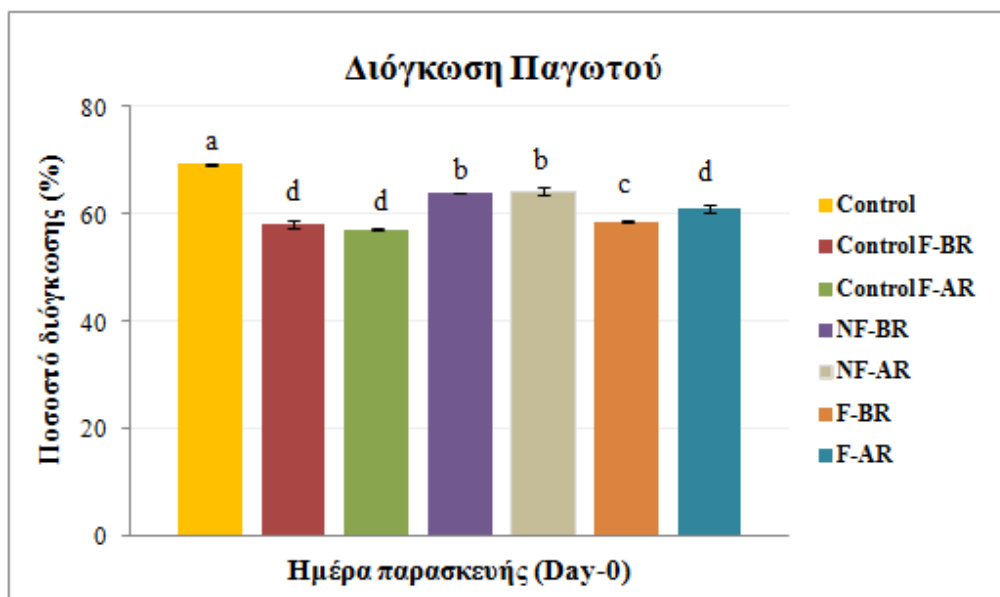
Όπως φαίνεται και στο Γράφημα 7, σε όλα τα προβιοτικά παγωτά η οξύτητα παρουσίασε μια ελάχιστη μείωση από την 14^η μέχρι την 28^η ημέρα το οποίο μπορεί να συσχετιστεί με την

μικρή μείωση της προβιοτικής καλλιέργειας από την 14^η μέχρι την 28^η ημέρα όπως φαίνεται στο Γράφημα 5. Σε γενικές όμως γραμμές, παρατήθηκε ότι το pH και η οξύτητα όλων των παγωτών δεν μεταβλήθηκαν σε μεγάλο βαθμό κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης του προϊόντος (Abghari et al., 2011).

3.5.3 Διόγκωση (overrun)

Το ποσοστό της διόγκωσης προσδιορίστηκε σε όλα τα παγωτά αμέσως μετά την έξοδο τους από τη κατάψυξη σε παγωτομηχανή. Στο Γράφημα 8 απεικονίζονται τα αποτελέσματα του ποσοστού της διόγκωσης (overrun) στα δείγματα παγωτού. Όπως φαίνεται και στο παρακάτω γράφημα, η προσθήκη του προβιοτικού μικροοργανισμού *L.fermentum* ACA-DC 179 καθώς και η ζύμωση του μίγματος, επηρέασαν το ποσοστό της διόγκωσης των παγωτών, μειώνοντας το. Παρατηρήθηκε ότι ο μάρτυρας (control) είχε το υψηλότερο ποσοστό διόγκωσης, ακολούθως τα μη ζυμωμένα προβιοτικά παγωτά (α) NF-BR, (β) NF-AR και τέλος τα ζυμωμένα παγωτά ανεξαρτήτως της παρουσίας του προβιοτικού μικροοργανισμού (F-BR, F-AR, Control F-BR και Control F-AR). Τα παγωτά που περιέχουν υψηλό ποσοστό διόγκωσης τείνουν να λιώνουν και πιο αργά λόγω του ότι οι φυσαλίδες αέρα δρουν ως μονωτές στο προϊόν (Marshall et al., 2003).

Η ζύμωση του μίγματος του παγωτού φαίνεται να είχε επηρεάσει σε μεγαλύτερο βαθμό την διόγκωση των παγωτών σε σχέση με την παρουσία του στελέχους *L.fermentum* ACA-DC 179 στα προβιοτικά παγωτά. Το εύρημα αυτό μπορεί να συσχετίσει και με άλλες μελέτες με διαφορετικά όμως στελέχη. Για παράδειγμα, η προσθήκη των στελεχών *L. acidophilus* La-5 και *B.animalis* Bb-12 δεν επηρέασε σημαντικά το ποσοστό της διόγκωσης του παγωτού (Akalin & Erisir, 2008). Επιπρόσθετα, οι Alamprese et al., (2002), ανέφεραν ότι το στέλεχος *Lactobacillus johnsonii* La1 δεν μετέβαλε την διόγκωση του παγωτού (Alamprese et al., 2002).



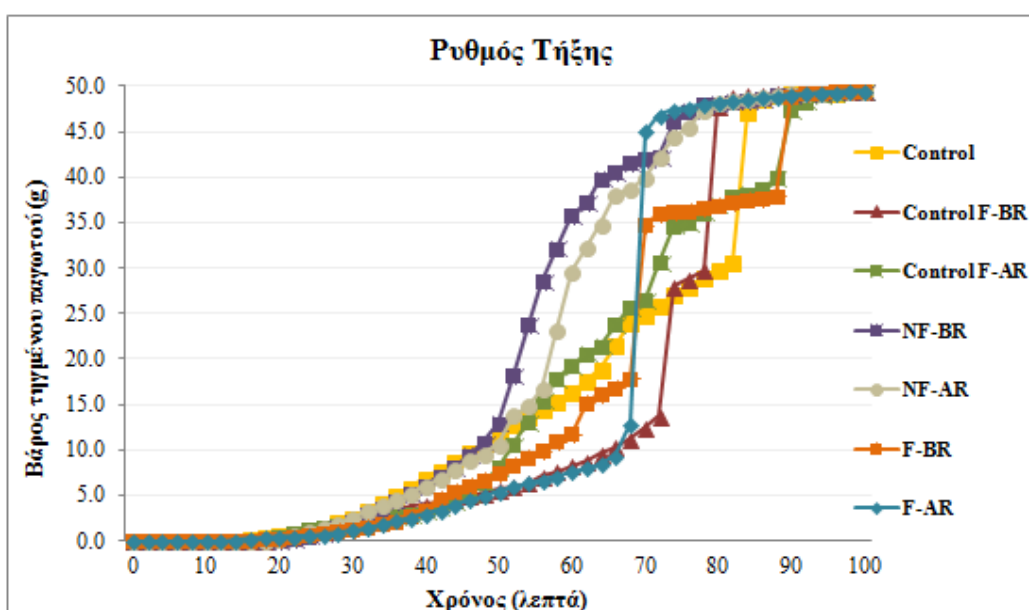
ΓΡΑΦΗΜΑ 8 : Ποσοστό της διόγκωσης των δειγμάτων παγωτού: (α) Control, (β) Control F-BR : Control Fermented Before Ripening, (γ) Control F-AR : Control Fermented After Ripening, (δ) NF-BR : Not Fermented Before Ripening, (ε) NF-AR : Not Fermented After Ripening, (στ) F-BR : Fermented Before Ripening και (ζ) F-AR : Fermented After Ripening

3.5.4 Ρυθμός τήξης

Ο ρυθμός της τήξης των παγωτών προσδιορίστηκε με την μέτρηση του βάρους του τηγμένου δείγματος παγωτού σε συνάρτηση του χρόνου. Συγκεκριμένα, ο προσδιορισμός του ρυθμού τήξης των παγωτών πραγματοποιήθηκε την 12 εβδομάδα αποθήκευσής τους.

Στο Γράφημα 9 απεικονίζονται τα αποτελέσματα του ρυθμού τήξης των παγωτών και συγκεκριμένα το βάρος του τηγμένου δείγματος παγωτού ανά 2 λεπτά για το συνολικό χρονικό διάστημα των 100 λεπτών. Τα μη ζυμωμένα προβιοτικά παγωτά (NF-BR και NF-AR) αν και παρουσίασαν τον νωρίτερο χρόνο πτώσης της 1^{ης} σταγόνας, είχαν όμως τον πιο σταθερό και ομοιόμορφο ρυθμό τήξης σε σχέση με τα υπόλοιπα παγωτά. Ο χρόνος πτώσης της 1^{ης} σταγόνας ήταν μεγαλύτερος στα ζυμωμένα προβιοτικά παγωτά σε σύγκριση με το δείγμα του μάρτυρα (control), το οποίο παρατηρήθηκε και σε άλλες μελέτες (Akalin & Erisir, 2008). Οι πιο αργοί χρόνοι πτώσης της 1^{ης} σταγόνας, παρατηρήθηκαν στα ζυμωμένα παγωτά Control F-BR και F-AR, στην συνέχεια όμως έλιωσαν πολύ γρήγορα το οποίο δεν ήταν επιθυμητό. Αυτό έχει αναφερθεί και από άλλες μελέτες που αφορούν την παρασκευή ζυμωμένων προβιοτικών παγωτών, στις οποίες παρατηρήθηκε ότι ο ρυθμός της τήξης μειώθηκε στα ζυμωμένα παγωτά. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η ζύμωση του γάλακτος από προβιοτικούς μικροοργανισμούς,

αυξάνει την υδρόλυση των πρωτεϊνών του γάλακτος, αυξάνει την συσσώρευση του γαλακτικού οξέος και κατά συνέπεια μειώνει το pH, το οποίο επάγει το σχηματισμό του δικτύου της πρωτεΐνης (acid milk gel). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του ιξώδους και την αντίσταση του παγωτού να λιώνει (Lucey, 2004). Οι Salem et al., (2006), αναφέρουν ότι ο ρυθμός τήξης θα μπορούσε να επηρεαστεί από το ιξώδες της συνταγής του παγωτού. Επιπρόσθετα, ο ρυθμός τήξης δεν επηρεάζεται σημαντικά από το χρόνο αποθήκευσης του παγωτού (Marshall et al., 2003). Δεν αποτελεί έκπληξη, ότι τα λειτουργικά χαρακτηριστικά του παγωτού π.χ. η διόγκωση, η σταθερότητα και ο ρυθμός τήξης, επηρεάζονται ιδιαίτερα από τη σύσταση της συνταγής του παγωτού (Alamprese et al., 2002).



ΓΡΑΦΗΜΑ 9: Ρυθμός τήξης των δειγμάτων παγωτού ανά 2 λεπτά για χρονικό διάστημα 100 λεπτών : (α) Control, (β) Control F-BR : Control Fermented Before Ripening, (γ) Control F-AR : Control Fermented After Ripening, (δ) NF-BR : Not Fermented Before Ripening, (ε) NF-AR : Not Fermented After Ripening, (στ) F-BR : Fermented Before Ripening και (ζ) F-AR : Fermented After Ripening

3.5.5 Λίπος

Ο προσδιορισμός της λιποπεριεκτικότητας των παγωτών πραγματοποιήθηκε την 12 εβδομάδα αποθήκευσής τους και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται αναλυτικά παρακάτω.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρατίθενται στον Πίνακα 3.5., η λιποπεριεκτικότητα των παγωτών δεν μεταβλήθηκε κατά την διάρκεια της αποθήκευσης των παγωτών. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι όλα τα μίγματα παγωτού παρασκευάστηκαν από τις ίδιες πρώτες ύλες, από την ίδια συνταγή και με την ίδια τεχνολογία παρασκευής. Το αποτέλεσμα αυτό έχει

αναφερθεί και από άλλες μελέτες που αφορούν την παρασκευή προβιοτικού παγωτού. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι, κατά την διάρκεια της συντήρησης των παγωτών, το λίπος παρέμεινε αμετάβλητο τόσο από την διαδικασία της ζύμωσης του μίγματος όσο και από την αποθήκευση του προϊόντος για μεγάλο χρονικό διάστημα (Aboufazli et al., 2015; Akalin & Erisir, 2008; Ranadheera et al., 2013; Turgut & Cakmakci, 2009). Συνεπώς, το παγωτό είναι ένα γαλακτοκομικό προϊόν το οποίο μπορεί να αποθηκευτεί για μεγάλο χρονικό διάστημα χωρίς καμία αλλαγή στη χημική του σύσταση (Basyigit et al., 2006).

ΠΙΝΑΚΑΣ 3. 5: Περιεκτικότητα των παγωτών σε λίπος (%)

Παγωτά	Λίπος (%)
Control	11± 0.00
Control F-BR	11± 0.00
Control F-AR	11± 0.00
NF-BR	11± 0.00
NF-AR	11± 0.00
F-BR	11± 0.00
F-AR	11± 0.00

3.5.6 Πρωτεΐνη

Ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας των παγωτών σε πρωτεΐνη πραγματοποιήθηκε την 20 εβδομάδα αποθήκευσής τους και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται αναλυτικά παρακάτω.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρατίθενται στον Πίνακα 3.6., η περιεκτικότητα των παγωτών σε πρωτεΐνη δεν μεταβλήθηκε σημαντικά κατά την διάρκεια της αποθήκευσης των παγωτών. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι όλα τα μίγματα παγωτού παρασκευάστηκαν από τις ίδιες πρώτες ύλες, από την ίδια συνταγή και με την ίδια τεχνολογία παρασκευής. Το αποτέλεσμα αυτό έχει αναφερθεί και από άλλες μελέτες που αφορούν την παρασκευή προβιοτικού παγωτού. Συγκεκριμένα, οι Di Criscio et al., (2010), οι Ranadheera et al., (2013), οι Silva et al., (2015) και οι Turgut & Cakmakci, (2009), αναφέρουν ότι, δεν παρατηρήθηκε μεταβολή της περιεκτικότητας των παγωτών σε πρωτεΐνη κατά την διάρκεια της αποθήκευσής τους.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3. 6: Περιεκτικότητα των παγωτών σε πρωτεΐνη (%)

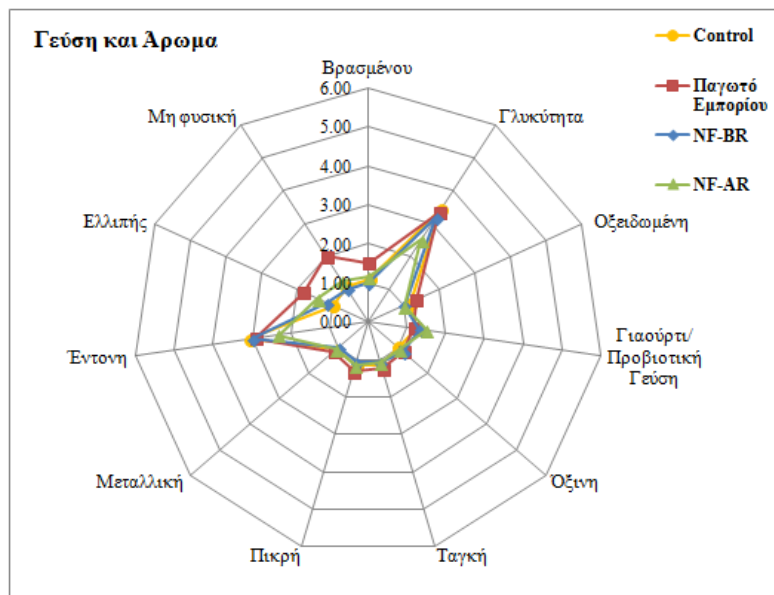
Παγωτά	Πρωτεΐνη (%)
Control	3.42±0.13
NF-BR	2.65±0.16
NF-AR	3.24±0.28
F-BR	3.57±0.11
F-AR	3.13±0.19

3.6 Οργανοληπτικός έλεγχος

Όσον αφορά την οργανοληπτική αξιολόγηση των παγωτών, παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές ως προς τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους. Οι διαφορές οι οποίες παρατηρήθηκαν στην μικροβιακή τους χλωρίδα καθώς και στις φυσικοχημικές τους ιδιότητες, είναι άρρηκτα συνδεδεμένες με τις διαφορές που παρατηρήθηκαν στον οργανοληπτικό έλεγχο των παγωτών.

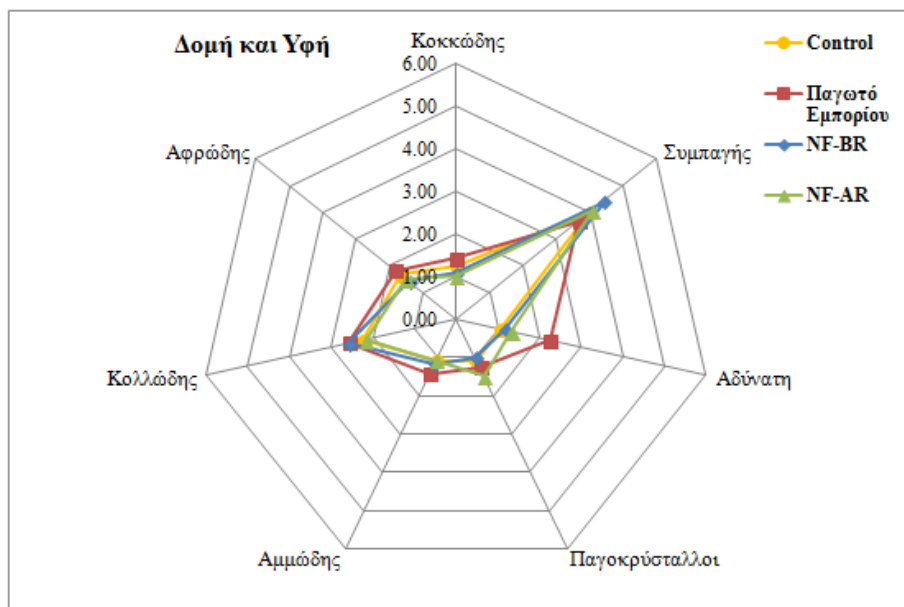
Για την οργανοληπτική αξιολόγηση χρησιμοποιήθηκαν τα εξής παγωτά: (α) Μάρτυρας (control), (β) Παγωτό εμπορίου, και τα προβιοτικά παγωτά που δεν είχαν υποστεί ζύμωση (γ) NF-BR και (δ) NF-AR. Τα ζυμωμένα παγωτά Control F-BR, Control F-AR, F-BR και F-AR όπως προαναφέρθηκε πιο πάνω ήταν πιο επιβαρυνμένα μικροβιολογικά από τα υπόλοιπα παγωτά και καθαρά για προληπτικούς λόγους, προτιμήθηκαν να μην χρησιμοποιηθούν στον οργανοληπτικό έλεγχο. Στα Διαγράμματα Αράχνης 10-12, παρατίθενται τα αποτελέσματα της οργανοληπτικής αξιολόγησης των παγωτών που απεικονίζονται με την μορφή διαγράμματος αράχνης (spider diagram).

Στο Διάγραμμα αράχνης 10 απεικονίζονται οι παράγοντες που καθορίζουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της γεύσης και του αρώματος του παγωτού. Αρχικά, το παγωτό του εμπορίου κρίθηκε για το άρωμα και για την γεύση του, οριακά ως: (α) μη φυσική, (β) ελλιπής, (γ) οξειδωμένη και (στ) βρασμένου γάλακτος. Το μη ζυμωμένο προβιοτικό παγωτό NF-AR έλαβε την υψηλότερη βαθμολογία στην παράμετρο προβιοτική γεύση/ γεύση γιαούρτι. Στα υπόλοιπα χαρακτηριστικά της γεύσης και του αρώματος δεν παρουσιάστηκαν εμφανείς διαφορές μεταξύ των παγωτών.



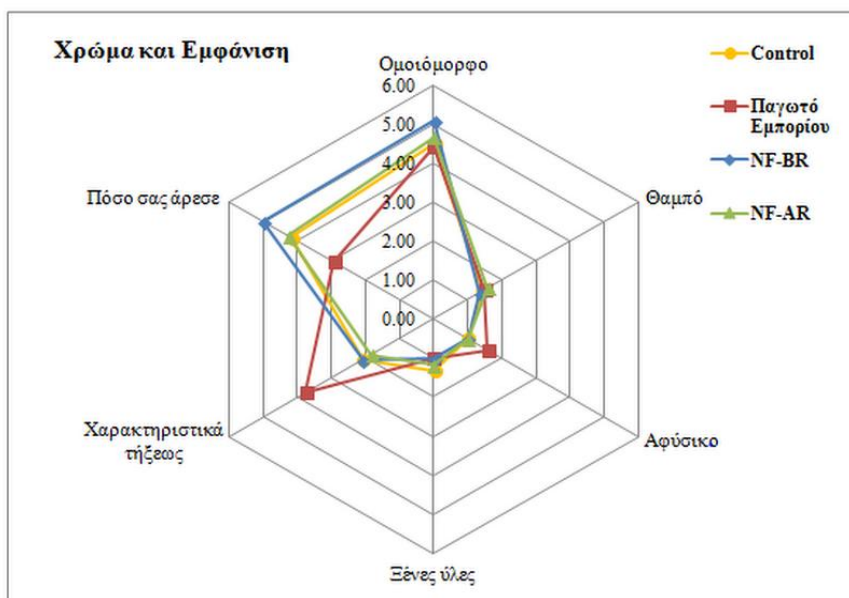
ΓΡΑΦΗΜΑ 10: Παράγοντες που καθορίζουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της γεύσης και του αρώματος των παγωτών: (α) Control, (β) Παγωτό Εμπορίου, (γ) NF-BR: Not Fermented Before Ripening και (δ) NF-AR: Not Fermented After Ripening.

Στο Διάγραμμα αράχνης 11 απεικονίζονται οι παράγοντες που καθορίζουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της δομής και της υφής του παγωτού. Αρχικά, το παγωτό του εμπορίου κρίθηκε για την δομή και την υφή του ως: (α) ελαφρά αδύνατη, (β) οριακά αμμώδης και (γ) ελαφρά κοκκώδης, χαρακτηριστικά τα οποία είναι ανεπιθύμητα υποβαθμίζοντας την ποιότητα του ίδιου του προϊόντος. Το μη ζυμωμένο προβιοτικό παγωτό NF-BR έλαβε την υψηλότερη βαθμολογία στην παράμετρο συμπαγής δομή, ενώ από την άλλη, το προβιοτικό παγωτό NF-AR κρίθηκε για την δομή και την εμφάνισή του, οριακά για παρουσία παγοκρυστάλλων. Στα υπόλοιπα χαρακτηριστικά της δομής και της υφής δεν παρουσιάστηκαν εμφανείς διαφορές μεταξύ των παγωτών.



ΓΡΑΦΗΜΑ 11: Παράγοντες που καθορίζουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της δομής και της υφής των παγωτών: (α) Control, (β) Παγωτό Εμπορίου, (γ) NF-BR: Not Fermented Before Ripening και (δ) NF-AR: Not Fermented After Ripening

Στο Διάγραμμα αράχνης 12 απεικονίζονται οι παράγοντες που καθορίζουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του χρώματος και της εμφάνισης του παγωτού. Αρχικά, το παγωτό του εμπορίου κρίθηκε για το χρώμα και την εμφάνισή του ως: (α) οριακά αφύσικο και (β) μέτρια για τα χαρακτηριστικά της τήξης του, δηλαδή για το πόσο γρήγορα έλιωσε. Σε γενικές γραμμές, δεν είναι επιθυμητό χαρακτηριστικό για ένα παγωτό να τήκεται γρήγορα. Το μη ζυμωμένο προβιοτικό παγωτό NF-BR έλαβε την υψηλότερη βαθμολογία για το ομοιόμορφο του χρώμα αλλά και για την εμφάνισή του και ήταν και το παγωτό που άρεσε περισσότερο παίρνοντας την υψηλότερη βαθμολογία, 5 από τα 6 (Πίνακας 3.7.). Στα υπόλοιπα χαρακτηριστικά του χρώματος και της εμφάνισης δεν παρουσιάστηκαν εμφανείς διαφορές μεταξύ των παγωτών.



ΓΡΑΦΗΜΑ 12: Παράγοντες που καθορίζουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του χρώματος και της εμφάνισης των παγωτών: (α) Control, (β) Παγωτό Εμπορίου, (γ) NF-BR: Not Fermented Before Ripening και (δ) NF-AR: Not Fermented After Ripening

Σύμφωνα με τις βαθμολογίες που προέκυψαν από την οργανοληπτική αξιολόγηση των προβιοτικών παγωτών, παρατηρήθηκαν παρόμοια αποτελέσματα και σε άλλες μελέτες. Για παράδειγμα, το θαμπό και αφύσικο χρώμα και η ελλειπής γεύση συσχετίστηκαν θετικά μεταξύ τους. Με εξαίρεση το παγωτό του εμπορίου, τα υπόλοιπα παγωτά δεν κρίθηκαν αδύνατα ως προς την δομή τους, αμμόδης και αφρώδες ως προς την υφή τους ή βρασμένο ως προς την γεύση τους (Aboufazli et al., 2015).

Όσον αφορά το ερώτημα εάν θα αγόραζαν το προϊόν (Πίνακας 3.7.), 6 από τους 12 δοκιμαστές θα αγόραζαν το παγωτό μάρτυρα (control), 3 δοκιμαστές δεν θα το αγόραζαν και οι άλλοι 2 δοκιμαστές ίσως. Το παγωτό του εμπορίου, 3 από τους 12 δοκιμαστές θα το αγόραζαν, 7 δεν θα το αγόραζαν και οι άλλοι 2 ίσως. Όσον αφορά τα προβιοτικά παγωτά, 9 από τους 12 δοκιμαστές θα αγόραζαν το προβιοτικό παγωτό NF-BR και οι άλλοι 3 ίσως. Τέλος, το προβιοτικό παγωτό NF-AR θα το αγόραζαν οι 7 από τους 12 δοκιμαστές, 3 δεν θα το αγόραζαν και οι άλλοι 2 δοκιμαστές ίσως να το αγόραζαν.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3. 7: Αποτελέσματα οργανοληπτικής αξιολόγησης των παγωτών ως προς την αποδοχή τους

Παγωτά	Πόσο σας άρεσε;		
Control	4.17 ± 0.31		
Εμπορίου	2.92 ± 0.49		
NF-BR	5.00 ± 0.22		
NF-AR	4.25 ± 0.34		
	Θα αγοράζατε το προϊόν;		
Παγωτά	ΟΧΙ	ΙΣΩΣ	ΝΑΙ
Control	3/12	3/12	6/12
Εμπορίου	7/12	2/12	3/12
NF-BR	0/12	3/12	9/12
NF-AR	3/12	2/12	7/12

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στη παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη εξετάστηκαν οι διαφορές ανάμεσα στους διαφορετικούς τύπους των προβιοτικών παγωτών ως προς τα μικροβιολογικά, φυσικοχημικά και οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά. Συγκρίνοντας λοιπόν τα αποτελέσματα των παραπάνω αναλύσεων, διαπιστώθηκαν κάποια συμπεράσματα τα οποία σχετίζονται άμεσα με την διαφορετική τεχνολογία παρασκευής που χρησιμοποιήθηκε σε κάθε παγωτό αντίστοιχα.

Μελετώντας την μεταβολή της μικροβιακής χλωρίδας των παγωτών, σημαντικές ήταν οι παρατηρήσεις που αφορούν το προβιοτικό στέλεχος *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179. Η χρήση του υποστρώματος MRS agar ως επιλεκτικού, είχε σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση των μικρών χαρακτηριστικών αποικιών του *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179. Η επιβεβαίωση πραγματοποιήθηκε με την παρατήρηση στο μικροσκόπιο και με την ταυτοποίηση του γονιδίου 16S rDNA με τη μέθοδο της PCR, ενέργειες που επαλήθευσαν την παρουσία του στελέχους καθ' όλη την διάρκεια της αποθήκευσης των παγωτών.

Τα στοιχεία που παρουσιάζονται στην παρούσα μελέτη επιβεβαιώνουν ορισμένα σημεία που έχουν ήδη αναφερθεί στη βιβλιογραφία, δηλαδή, ότι υπάρχει μια μικρή απώλεια βιωσιμότητας κατά την διάρκεια της αποθήκευσης του παγωτού σε συνθήκες κατάψυξης, ποσοστό θνησιμότητας το οποίο διαφέρει μεταξύ των στελεχών. Παρά όμως την μικρή μείωση του πληθυσμού του στελέχους *L.fermentum* ACA-DC 179, η τελική του συγκέντρωση ήταν μεγαλύτερη από την ελάχιστη συνιστώμενη θεραπευτική δόση (10^6 - 10^7 cfu/g) μέχρι και την 28^η ημέρα της αποθήκευσης του.

Λαμβάνοντας λοιπόν υπόψη την ικανοποιητική βιωσιμότητα του *L.fermentum* ACA-DC 179, το παγωτό, το οποίο μπορεί να αποθηκευτεί για μεγάλο χρονικό διάστημα, φάνηκε να είναι κατάλληλο για την παράδοση των ειδών *Lactobacillus* σε παιδιά αλλά και σε καταναλωτές όλων των ηλικιακών ομάδων. Επίσης, σε αυτή τη μελέτη, ο πληθυσμός του προβιοτικού στα μη ζυμωμένα παγωτά ήταν αμετάβλητος κατά την αποθήκευση, αποδεικνύοντας έτσι την σταθερότητά του. Ορισμένα προϊόντα τα οποία διατηρούνται σε υψηλότερες θερμοκρασίες (1-4°C), όπως το γιαούρτι, μπορεί να αποτελέσει πρόβλημα στη βιωσιμότητα των καλλιιεργειών. Έτσι, το παγωτό μπορεί να αποτελέσει ένα εξαιρετικό περιβάλλον για την παροχή προβιοτικών, χωρίς να υπάρχει απώλεια της ευεργετικής τους επίδρασης. Από την άποψη αυτή, το παγωτό έχει ένα πλεονέκτημα ως "μεταφορέας" προβιοτικών σε σχέση με οποιαδήποτε άλλη τροφή.

Οι φυσικοχημικές ιδιότητες του παγωτού έδειξαν σημαντικές αλλαγές ως αποτέλεσμα της ζύμωσης. Η ζύμωση αύξησε το ιξώδες και την αντίσταση της τήξης του παγωτού. Επιπρόσθετα, ο πληθυσμός του προβιοτικού στελέχους *L.fermentum* ACA-DC 179 ήταν σημαντικά υψηλότερος σε όλα τα ζυμωμένα παγωτά. Η προσθήκη της προβιοτικής καλλιέργειας *L.fermentum* ACA-DC 179 μετέβαλε το pH και την οξύτητα των παγωτών, ενώ η επίδραση της στις φυσικοχημικές ιδιότητες του παγωτού ήταν μικρή (π.χ. διόγκωση, ρυθμός τήξης, λίπος, πρωτεΐνη). Η ζύμωση είχε μεγαλύτερη επίδραση στις φυσικοχημικές ιδιότητες και συγκεκριμένα παράτεινε τον χρόνο τήξης των ζυμωμένων παγωτών για τους λόγους που αναφέρθηκαν πιο πάνω. Η καλύτερη συμπεριφορά ως προς τον ρυθμό τήξης του παγωτού παρατηρήθηκε στο ζυμωμένο προβιοτικό παγωτό F-AR το οποίο παρουσίασε τον μεγαλύτερο χρόνο πτώσης της 1^{ης} σταγόνας. Αν και τα μη ζυμωμένα προβιοτικά παγωτά παρουσίασαν τον νωρίτερο χρόνο πτώσης της 1^{ης} σταγόνας, είχαν όμως τον πιο σταθερό και ομοιόμορφο ρυθμό τήξης σε σχέση με τα υπόλοιπα παγωτά. Από την άλλη, υψηλότερο ποσοστό διόγκωσης παρατηρήθηκε στο δείγμα του μάρτυρα. Τέλος, το παγωτό είναι ένα γαλακτοκομικό προϊόν το οποίο μπορεί να αποθηκευτεί για μεγάλο χρονικό διάστημα χωρίς καμία αλλαγή στη χημική του σύνθεση.

Όσον αφορά την οργανοληπτική αξιολόγηση των παγωτών, συνολικά το πιο αποδεκτό από τους δοκιμαστές ήταν το μη ζυμωμένο προβιοτικό παγωτό NF-BR, το οποίο άρεσε περισσότερο παίρνοντας την υψηλότερη βαθμολογία. Όσον αφορά το ερώτημα “θα αγοράζατε το προϊόν;” 9 από τους 12 δοκιμαστές (75%) απάντησαν πως θα αγόραζαν το προϊόν και οι υπόλοιποι 3, ίσως να το αγόραζαν.

Αυτή η μελέτη απέδειξε ότι το μη ζυμωμένο παγωτό ενδεχομένως είναι ένα κατάλληλο προϊόν για την παροχή προβιοτικών βακτηρίων στον καταναλωτή καθώς συνδύαζε την άριστη επιβίωση του στελέχους *L.fermentum* ACA-DC 179 με αποδεκτές φυσικοχημικές και οργανοληπτικές ιδιότητες χωρίς να μεταβάλλει τα δομικά χαρακτηριστικά του προϊόντος. Το υψηλότερο pH του, του προσδίδει το πλεονέκτημα του να είναι οργανοληπτικά πιο αποδεκτό σε σχέση με τα ζυμωμένα προβιοτικά παγωτά ή σε σχέση με το παγωτό-γιαούρτι και παρέχει και τη δυνατότητα για την ικανοποιητική επιβίωση των προβιοτικών βακτηρίων στο προϊόν.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης απέδειξαν ότι η προβιοτική συμπεριφορά του στελέχους *L.fermentum* ACA-DC 179 θα μπορούσε να επηρεαστεί από τις συνθήκες επεξεργασίας και αποθήκευσης του παγωτού. Αυτό απαιτεί περαιτέρω μελέτη σχετικά με την επιλογή του ανθεκτικότερου στελέχους ή χρησιμοποιώντας τεχνικές για να αυξηθεί η αντίσταση

των στελεχών στους διάφορους χειρισμούς κατά την παρασκευή και αποθήκευση του προϊόντος. Οι βιομηχανίες και οι ρυθμιστικοί φορείς θα πρέπει να εξετάσουν αυτά τα δεδομένα για την βελτίωση της σταθερότητας των προβιοτικών μικροοργανισμών κατά την συντήρηση των προϊόντων στο ράφι, όταν στην ετικέτα των προϊόντων αυτών χρησιμοποιούνται λειτουργικοί όροι.

5. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

5.1 Έντυπο Οργανοληπτικού Ελέγχου Προβιοτικό Παγωτό τύπου ``Καϊμάκι``

Με τη βοήθεια της παρακάτω κλίμακας των 6 βαθμίδων βαθμολογείστε τα χαρακτηριστικά του κάθε δείγματος :

Κλίμακα: 1. Καθόλου 2. Οριακά 3. Ελαφρά 4. Μέτρια 5. Πολύ 6. Υπερβολικά

Αριθμός Δείγματος	1	2	3	4	5
A) Γεύση και Άρωμα					
Βρασμένου					
Γλυκύτητα					
Οξειδωμένη					
Γιαούρτι/Προβιοτική Γεύση					
Όξινη					
Ταγκή					
Πικρή					
Μεταλλική					
Έντονη					
Ελλιπής					
Μη φυσική					
Άλλη					
B) Δομή και υφή					
Κοκκώδης					
Συμπαγής					
Αδύνατη					
Παγοκρύσταλλοι					
Αμμώδης					
Κολλώδης					
Αφρώδης					
Άλλη					
Γ) Χρώμα και Εμφάνιση					
Ομοιόμορφο					
Θαμπό					
Αφύσικο					
Δ) Ξένες Ύλες					
Ε) Χαρακτηριστικά Τήξεως					
ΣΤ) Πόσο σας άρεσε;					
Ζ) Θα αγοράζετε το προϊόν;					

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abghari, A., Sheikh-Zeinoddin, M., & Soleimanian-Zad, S. (2011). Nonfermented ice cream as a carrier for *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus rhamnosus*. *International Journal of Food Science & Technology*, *46*(1), 84–92.
- Aboufazli, F., Baba, A. S., & Misran, M. (2015). Effects of fermentation by *Bifidobacterium bifidum* on the rheology and physical properties of ice cream mixes made with cow and vegetable milks. *International Journal of Food Science & Technology*, *50*(4), 942–949.
- Agrawal, R. (2005). Probiotics: an emerging food supplement with health benefits. *Food Biotechnology*, *19*(3), 227–246.
- Ahmadi, A., Milani, E., Madadlou, A., Mortazavi, S. A., Mokarram, R. R., & Salarbashi, D. (2014). Synbiotic yogurt-ice cream produced via incorporation of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* (la-5) and fructooligosaccharide. *Journal of Food Science and Technology*, *51*(8), 1568–1574.
- Akalin, A. S., & Erisir, D. (2008). Effects of Inulin and Oligofructose on the Rheological Characteristics and Probiotic Culture Survival in Low-Fat Probiotic Ice Cream. *Journal of Food Science*, *73*(4), M184–M188.
- Akesowan, A. (2009). Influence of soy protein isolate on physical and sensory properties of ice cream. *Thai J Agric Sci*, *42*(1), 1–6.
- Akin, M. B., Akin, M. S., & Kirmaci, Z. (2007). Effects of inulin and sugar levels on the viability of yogurt and probiotic bacteria and the physical and sensory characteristics in probiotic ice-cream. *Food Chemistry*, *104*(1), 93–99.
- Alamprese, C., Foschino, R., Rossi, M., Pompei, C., & Corti, S. (2005). Effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG addition in ice cream. *International Journal of Dairy Technology*, *58*(4), 200–206.
- Alamprese, C., Foschino, R., Rossi, M., Pompei, C., & Savani, L. (2002). Survival of *Lactobacillus johnsonii* La1 and influence of its addition in retail-manufactured ice cream produced with different sugar and fat concentrations. *International Dairy Journal*, *12*(2), 201–208.
- Alpaslan, M., & Hayta, M. (2007). Effect of soymilk substitution on the rheological and sensory properties of salep (traditional Turkish milk beverage). *International Journal of Food Properties*, *10*(3), 413–420.
- Alvarez-Olmos, M. I., & Oberhelman, R. A. (2001). Probiotic agents and infectious diseases: a modern perspective on a traditional therapy. *Clinical Infectious Diseases*, *32*(11), 1567–1576.

- Amara, A. A. (2012). Toward healthy genes Ed. *Amro Amara*.
- Amara, A. A. (2013). The inevitability of balanced lives: genes–foods–action–interactions. *IIOBJ*, 4(2), 1–27.
- Amara, A. A., & Shibl, A. (2015). Role of Probiotics in health improvement, infection control and disease treatment and management. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 23(2), 107–114.
- Anal, A. K., & Singh, H. (2007). Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science & Technology*, 18(5), 240–251. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2007.01.004>
- Andersch, I., Pianka, S., Fritze, D., & Claus, D. (1994). Description of *Bacillus laevolacticus* (ex Nakayama and Yanoshi 1967) sp. nov., nom. rev. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 44(4), 659–664.
- Archibald, F. S., & Fridovich, I. (1981). Manganese, superoxide dismutase, and oxygen tolerance in some lactic acid bacteria. *Journal of Bacteriology*, 146(3), 928–936.
- Basyigit, G., Kuleaon, H., & Karahan, A. G. (2006). Viability of human-derived probiotic lactobacilli in ice cream produced with sucrose and aspartame. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33(9), 796–800.
- Berger, K. G., Larsson, K., Friberg, S. E., & others. (1990). Ice cream. *Food Emulsions.*, (Ed. 2), 367–444.
- Bolliger, S., Goff, H. D., & Tharp, B. W. (2000). Correlation between colloidal properties of ice cream mix and ice cream. *International Dairy Journal*, 10(4), 303–309.
- Bottone, E. J. (2010). *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(2), 382–398.
- Butel, M.-J. (2014). Probiotics, gut microbiota and health. *M{é}decine et Maladies Infectieuses*, 44(1), 1–8.
- Çaglar, E., Onder Kuscu, O., Selvi Kuvvetli, S., Kavaloglu Cildir, S., Sandalli, N., & Twetman, S. (2008). Short-term effect of ice-cream containing *Bifidobacterium lactis* Bb-12 on the number of salivary mutans streptococci and lactobacilli. *Acta Odontologica Scandinavica*, 66(3), 154–158.
- Çakmakçı, S., Topdacs, E. F., Kalin, P., Han, H., cSekerci, P., P Köse, L., & Gülçin, \.Ilhami. (2015). Antioxidant capacity and functionality of oleaster (*Elaeagnus angustifolia* L.) flour and crust in a new kind of fruity ice cream. *International Journal of Food Science & Technology*, 50(2), 472–481.

- Champagne, C. P., Gardner, N. J., & Roy, D. (2005). Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(1), 61–84.
- Chan, E. S., & Zhang, Z. (2002). Encapsulation of probiotic bacteria *Lactobacillus acidophilus* by direct compression. *Food and Bioproducts Processing*, 80(2), 78–82.
- Chassard, C., Grattepanche, F., & Lacroix, C. (2011). Probiotics and health claims: challenges for tailoring their efficacy. *Probiotics and Health Claims*, 49–74.
- Christiansen, P. S., Edelsten, D., Kristiansen, J. R., & Nielsen, E. W. (1996). Some properties of ice cream containing *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus*. *Milchwissenschaft*, 51(9), 502–504.
- Clarke, C. (2004). *The Science of ice cream*. (p. 208). Cambridge : Royal Society of Chemistry : [distributor] RSC Distribution Services : [distributor] Central Book Services : [distributor] Central Book Services, 2004. Retrieved from <https://vpn.cut.ac.cy/>
- Cozzolino, S., & Widmer, A. (2005). Orchid diversity: an evolutionary consequence of deception? *Trends in Ecology & Evolution*, 20(9), 487–494.
- Cruz, A. G., Antunes, A. E. C., Sousa, A. L. O. P., Faria, J. A. F., & Saad, S. M. I. (2009). Ice-cream as a probiotic food carrier. *Food Research International*, 42(9), 1233–1239.
- Da Silva, P. D. L., de Fátima Bezerra, M., dos Santos, K. M. O., & Correia, R. T. P. (2015). Potentially probiotic ice cream from goat's milk: Characterization and cell viability during processing, storage and simulated gastrointestinal conditions. *LWT-Food Science and Technology*, 62(1), 452–457.
- Davidson, R. H., Duncan, S. E., Hackney, C. R., Eigel, W. N., & Boling, J. W. (2000). Probiotic Culture Survival and Implications in Fermented Frozen Yogurt Characteristics. *Journal of Dairy Science*, 83(4), 666–673. doi:[http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)74927-7](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)74927-7)
- Davies, R., & Obafemi, A. (1985). Response of micro-organisms to freeze-thaw stress. *Microbiology of Frozen Foods*, 83–107.
- De Vuyst, L., Makras, L., Avonts, L., Holo, H., Yi, Q., Servin, A., ... Others. (2004). Antimicrobial potential of probiotic or potentially probiotic lactic acid bacteria, the first results of the international European research project PROPATH of the PROEUHEALTH cluster. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 16(2-3), 125–130.
- Di Criscio, T., Fratianni, A., Mignogna, R., Cinquanta, L., Coppola, R., Sorrentino, E., & Panfili, G. (2010). Production of functional probiotic, prebiotic, and synbiotic ice creams. *Journal of Dairy Science*, 93(10), 4555–4564.
- Dickinson, E. (1992). Introduction to food colloids. *Oxford University Press*.

- Dogan, M., & Kayacier, A. (2004). Rheological properties of reconstituted hot salep beverage. *International Journal of Food Properties*, 7(3), 683–691.
- Dunne, C., Murphy, L., Flynn, S., O'Mahony, L., O'Halloran, S., Feeney, M., ... others. (1999). Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. In *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications* (pp. 279–292). Springer.
- Eisner, M. D., Wildmoser, H., & Windhab, E. J. (2005). Air cell microstructuring in a high viscous ice cream matrix. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 263(1), 390–399.
- Erkaya, T., Daugdemir, E., & cSengül, M. (2012). Influence of Cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) addition on the chemical and sensory characteristics and mineral concentrations of ice cream. *Food Research International*, 45(1), 331–335.
- Ewe, J.-A., Wan-Nadiah, W. ., & Liong, M.-T. (2010). Viability and growth characteristics of *Lactobacillus* in soymilk supplemented with B-vitamins. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 61(1), 87–107.
- Falagas, M. E., Betsi, G. I., & Athanasiou, S. (2007). Probiotics for the treatment of women with bacterial vaginosis. *Clinical Microbiology and Infection*, 13(7), 657–664.
- Fall, R., Kinsinger, R. F., & Wheeler, K. A. (2004). A simple method to isolate biofilm-forming *Bacillus subtilis* and related species from plant roots. *Systematic and Applied Microbiology*, 27(3), 372.
- FAO (Food and Agricultural Organization)/WHO (World Health Organization), (2006). *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*
- Farhoosh, R., & Riazi, A. (2007). A compositional study on two current types of salep in Iran and their rheological properties as a function of concentration and temperature. *Food Hydrocolloids*, 21(4), 660–666.
- Favaro-Trindade, C. S., Bernardi, S., Bodini, R. B., De Carvalho Balieiro, J. C., & De Almeida, E. (2006). Sensory acceptability and stability of probiotic microorganisms and vitamin C in fermented acerola (*Malpighia emarginata* DC.) ice cream. *Journal of Food Science*, 71(6), S492–S495.
- Felis, G. E., & Dellaglio, F. (2007). Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 8(2), 44–61.
- Fernandez, M. F., Boris, S., & Barbes, C. (2003). Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology*, 94(3), 449–455.

- Ferraz, J. L., Cruz, A. G., Cadena, R. S., Freitas, M. Q., Pinto, U. M., Carvalho, C. C., ... Bolini, H. (2012). Sensory acceptance and survival of probiotic bacteria in ice cream produced with different overrun levels. *Journal of Food Science*, 77(1), S24–S28.
- Foley, J., & Sheuring, J. J. (1966). Cause of microbial death during freezing in a soft-serve ice cream freezer. *Journal of Dairy Science*, 49(8), 928–932.
- Freudenstein, J. V., & Rasmussen, F. N. (1997). Sessile pollinia and relationships in the Orchidaceae. *Plant Systematics and Evolution*, 205(3-4), 125–146.
- Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 66(5), 365–378.
- Garrity, G. M., & Holt, J. G. (2001). The road map to the manual. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (pp. 119–166). Springer.
- Gelin, J.-L., Poyen, L., Rizzotti, R., Dacremont, C., Meste, M., & Lorient, D. (1996). Interactions between food components in ice-cream. Part ii: Structure-Texture Relationships. *Journal of Texture Studies*, 27(2), 199–215.
- Georgiadis, N., Ritzoulis, C., Charchari, E., Koukiotis, C., Tsiptsias, C., & Vasiliadou, C. (2012). Isolation, characterization and emulsion stabilizing properties of polysaccharides from orchid roots (salep). *Food Hydrocolloids*, 28(1), 68–74.
- Germida, J. J., Siciliano, S. D., de Freitas, J. R., & Seib, A. M. (1998). Diversity of root-associated bacteria associated with field-grown canola (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). *FEMS Microbiology Ecology*, 26(1), 43–50.
- Gibson, G. R., Probert, H. M., Van Loo, J., Rastall, R. A., & Roberfroid, M. B. (2004). Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews*, 17(02), 259–275.
- Giraffa, G. (2012). Selection and design of lactic acid bacteria probiotic cultures. *Engineering in Life Sciences*, 12(4), 391–398.
- Giraffa, G., Chanishvili, N., & Widyastuti, Y. (2010). Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology. *Research in Microbiology*, 161(6), 480–487.
- Girgis, H. S., Smith, J., Luchansky, J. B., & Klaenhammer, T. R. (2003). Stress adaptations of lactic acid bacteria. *Microbial Stress Adaptation and Food Safety*, 159–211.
- Gismondo, M. R., Drago, L., & Lombardi, A. (1999). Review of probiotics available to modify gastrointestinal flora. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 12(4), 287–292.
- Godward, G., & Kailasapathy, K. (2003). Viability and survival of free, encapsulated and co-encapsulated probiotic bacteria in ice cream. *Milchwissenschaft*, 58(3-4), 161–164.

- Goff, H. D. (2008). 65 Years of ice cream science. *International Dairy Journal*, 18(7), 754–758.
- Goff, H. D., & Hartel, R. W. (2013). *Ice Cream*. Springer eBooks. Boston, MA : Springer US : Imprint: Springer, 2013. Retrieved from <https://vpn.cut.ac.cy/>
- Goff, H. D., & Spagnuolo, P. (2001). Effect of stabilizers on fat destabilization measurements in ice cream. *Milchwissenschaft*, 56(8), 450–453.
- Goff, H., & Griffiths, M. (2006). Major advances in fresh milk and milk products: fluid milk products and frozen desserts. *Journal of Dairy Science*, 89(4), 1163–1173.
- Goktepe, I., Juneja, V. K., & Ahmedna, M. (2005). *Probiotics in food safety and human health* (pp. 1–33). CRC Press.
- Grajek, W., Olejnik, A., & Sip, A. (2005). Probiotics, prebiotics and antioxidants as functional foods. *Acta Biochimica Polonica*, 52(3), 665.
- Grygorczyk, A. (2012). *A novel approach to structure generation for texture improvement in a soymilk-dairy gel*.
- Guarner, F., & Malagelada, J.-R. (2003). Gut flora in health and disease. *The Lancet*, 361(9356), 512–519.
- Guven, M., Karaca, O. B., & Kacar, A. (2003). The effects of the combined use of stabilizers containing locust bean gum and of the storage time on Kahramanmaraş-type ice creams. *International Journal of Dairy Technology*, 56(4), 223–228.
- Hagen, M., & Narvhus, J. A. (1999). Production of ice cream containing probiotic bacteria. *Milchwissenschaft*, 54(5), 265–268.
- Hammes, W. P., & Vogel, R. F. (1995). The genus lactobacillus. In *The genera of lactic acid bacteria* (pp. 19–54). Springer.
- Haynes, I. N., & Playne, M. J. (2002). Survival of probiotic cultures in low-fat ice-cream. *Australian Journal of Dairy Technology*, 57(1), 10.
- Heenan, C. N., Adams, M. C., Hosken, R. W., & Fleet, G. H. (2004). Survival and sensory acceptability of probiotic microorganisms in a nonfermented frozen vegetarian dessert. *LWT - Food Science and Technology*, 37(4), 461–466. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2003.11.001>
- Hekmat, S., & McMahon, D. J. (1992). Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in ice cream for use as a probiotic food. *Journal of Dairy Science*, 75(6), 1415–1422.

- Hermanto, M. P., & Masdiana, P. (2011). Fate of yoghurt bacteria in functional ice cream in the presence of soy extract powder as prebiotic. *The 12th Asean Food Conference, Thailand, 16-18 June*, 263–269.
- Hirayama, K., & Rafter, J. (1999). The role of lactic acid bacteria in colon cancer prevention: mechanistic considerations. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76(1-4), 391–394.
- Holcomb, J. E., Frank, J. F., & McGregor, J. U. (1991). Viability of *Lactobacillus acidophilus* of *Bifidobacterium bifidum* in soft-serve frozen yogurt. *Cultured Dairy Products Journal (USA)*, 26, 4–5.
- Holzappel, W. H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J., & Schillinger, U. (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2), 365s–373s.
- Homayouni, A., Azizi, A., Ehsani, M. R., Yarmand, M. S., & Razavi, S. H. (2008). Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream. *Food Chemistry*, 111(1), 50–55.
- Ibrahim, M. A., Griko, N., Junker, M., & Bulla, L. A. (2010). *Bacillus thuringiensis*: a genomics and proteomics perspective. *Bioengineered Bugs*, 1(1), 31–50.
- Inoue, K., Shiota, K., & Ito, T. (1998). Preparation and properties of ice cream type frozen yogurt. *International Journal of Dairy Technology*, 51(2), 44–50.
- Isolauri, E., Sütas, Y., Kankaanpää, P., Arvilommi, H., & Salminen, S. (2001). Probiotics: effects on immunity. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2), 444s–450s.
- Jayamanne, V. S., & Adams, M. R. (2006). Determination of survival, identity and stress resistance of probiotic bifidobacteria in bio-yoghurts. *Letters in Applied Microbiology*, 42(3), 189–194.
- Jia, W., Li, G., & Wang, W. (2014). Prevalence and antimicrobial resistance of *Enterococcus* species: a hospital-based study in China. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11(3), 3424–3442.
- Jiménez, G., Urdiain, M., Cifuentes, A., López-López, A., Blanch, A. R., Tamames, J., ... Rosselló-Móra, R. (2013). Description of *Bacillus toyonensis* sp. nov., a novel species of the *Bacillus cereus* group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by means of ANI calculations. *Systematic and Applied Microbiology*, 36(6), 383–391. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2013.04.008>
- Kailasapathy, K., & Chin, J. (2000). Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Immunology and Cell Biology*, 78(1), 80–88.

- Kailasapathy, K., & Sultana, K. (2003). Survival and [beta]-D-galactosidase activity of encapsulated and free *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in ice-cream. *Australian Journal of Dairy Technology*, 58(3), 223–227.
- Kandler, O., & Weiss, N. (1986). Genus *Lactobacillus*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2, 1209–1234.
- Karaca, O. B., Guven, M., Yasar, K., Kaya, S., & Kahyaoglu, T. (2009). The functional, rheological and sensory characteristics of ice creams with various fat replacers. *International Journal of Dairy Technology*, 36(1), 93–99.
- Katan, M. B. (2012). Why the European Food Safety Authority was right to reject health claims for probiotics. *Beneficial Microbes*, 3(2), 85–89.
- Kaya, S., & Tekin, A. R. (2001). The effect of salep content on the rheological characteristics of a typical ice-cream mix. *Journal of Food Engineering*, 47(1), 59–62.
- Kilara, A., & Chandan, R. C. (2013). Frozen Dairy Foods. *Milk and Dairy Products in Human Nutrition: Production, Composition and Health*, 435–457.
- Klaenhammer, T. R., & Kullen, M. J. (1999). Selection and design of probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 50(1), 45–57.
- Komatsu, T. R., Buriti, F. C. A., & Saad, S. M. I. (2008). Overcoming hurdles through innovation, persistence and creativeness in the development of probiotic foods. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 44(3), 329–347.
- Koutsoudaki, C., Krsek, M., & Rodger, A. (2005). Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil and the gum of *Pistacia lentiscus* Var. *chia*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(20), 7681–7685.
- Kumar, M., Kumar, A., Nagpal, R., Mohania, D., Behare, P., Verma, V., ... others. (2010). Cancer-preventing attributes of probiotics: an update. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 61(5), 473–496.
- Laroia, S., & Martin, J. H. (1991). Effect of pH on survival of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in frozen fermented dairy desserts. *Cultured Dairy Products Journal (USA)*.
- Lee, Y.-K., & Salminen, S. (1995). The coming of age of probiotics. *Trends in Food Science & Technology*, 6(7), 241–245.
- Leroy, F., Falony, G., & de Vuyst, L. (2008). Latest developments in probiotics. In *Meat biotechnology* (pp. 217–229). Springer.

- Lilley, A. K., Fry, J. C., Bailey, M. J., & Day, M. J. (1996). Comparison of aerobic heterotrophic taxa isolated from four root domains of mature sugar beet (*Beta vulgaris*). *FEMS Microbiology Ecology*, *21*(3), 231–242.
- Lilly, D. M., & Stillwell, R. H. (1965). Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science*, *147*(3659), 747–748.
- Loewenstein, M., & Haddad, G. S. (1972a). High-temperature short-time and ultra-high-temperature pasteurization of ice cream. *Amer Dairy Rev*, *34*(9), 82,84.
- Loewenstein, M., & Haddad, G. S. (1972b). HTST and UHT pasteurization of ice cream. II. The influence of barying heat treatments on the effectiveness of some stabilizing agents. *Amer Dairy Rev*, *34*(10), 42–46.
- Lourens-Hattingh, A., & Viljoen, B. C. (2001). Yogurt as probiotic carrier food. *International Dairy Journal*, *11*(1), 1–17.
- Lucey, J. A. (2004). Cultured dairy products: an overview of their gelation and texture properties. *International Journal of Dairy Technology*, *57*(2-3), 77–84.
- Magarinos, H., Selaive, S., Costa, M., Flores, M., & Pizarro, O. (2007). Viability of probiotic micro-organisms (*Lactobacillus acidophilus* la-5 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* bb-12) in ice cream. *International Journal of Dairy Technology*, *60*(2), 128–134.
- Mahdian, E., Mazaheri Tehrani, M., & Nobahari, M. (2012). Optimizing yoghurt-ice cream mix blend in soy based frozen yoghurt. *Journal of Agricultural Science and Technology*, *14*(6), 1275–1284.
- Makras, L., Triantafyllou, V., Fayol-Messaoudi, D., Adriany, T., Zoumpopoulou, G., Tsakalidou, E., ... De Vuyst, L. (2006). Kinetic analysis of the antibacterial activity of probiotic lactobacilli towards *Salmonella enterica* serovar Typhimurium reveals a role for lactic acid and other inhibitory compounds. *Research in Microbiology*, *157*(3), 241–247.
- Margarinos, H., Selaive, S., Costa, M., Flores, M., & Pizarro, O. (2007). Viability of probiotic micro-organisms (*Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis* spp. *lactis* Bb-12) in ice-cream. *International Journal of Dairy Technology*, *60*(2), 128–134.
- Marshall, R. T., Goff, H. D., & Hartel, R. W. (2003). *Ice Cream, 6th Edn/Marshall RT, Goff HD, Hartel RW* (p. 371). New York: Kluwer Academic. ISBN 0-306-47700-9.
- Mattila-Sandholm, T., Myllärinen, P., Crittenden, R., Mogensen, G., Fondén, R., & Saarela, M. (2002). Technological challenges for future probiotic foods. *International Dairy Journal*, *12*(2), 173–182.

- McFarland, L. V. (2006). Meta-analysis of probiotics for the prevention of antibiotic associated diarrhea and the treatment of *Clostridium difficile* disease. *The American Journal of Gastroenterology*, *101*(4), 812–822.
- McNaught, C. E., & MacFie, J. (2001). Probiotics in clinical practice: a critical review of the evidence. *Nutrition Research*, *21*(1), 343–353.
- Mercenier, A., Lenoir-Wijnkoop, I., & Sanders, M. E. (2008). Physiological and functional properties of probiotics. *International Dairy Federation*, *429*(1), 2–6.
- Mercenier, A., Pavan, S., & Pot, B. (2002). Probiotics as biotherapeutic agents: present knowledge and future prospects. *Current Pharmaceutical Design*, *8*(9911), 10.
- Metchnikoff, I. I. (2004). *The prolongation of life: optimistic studies*. Springer Publishing Company.
- Morelli, L. (2000). In vitro selection of probiotic lactobacilli: a critical appraisal. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, *1*(2), 59–67.
- Moreno, M. R. F., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., & De Vuyst, L. (2006). The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*, *106*(1), 1–24.
- Moss, C. W., & Speck, M. L. (1963). Injury and death of *Streptococcus lactis* due to freezing and frozen storage. *Applied Microbiology*, *11*(4), 326–329.
- Nelson, D. M., Glawe, A. J., Labeda, D. P., Cann, I. K. O., & Mackie, R. I. (2009). *Paenibacillus tundrae* sp. nov. and *Paenibacillus xylanexedens* sp. nov., psychrotolerant, xylan-degrading bacteria from Alaskan tundra. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *59*(7), 1708–1714.
- Pearce, D. A., Bridge, P. D., Hughes, K. A., Sattler, B., Psenner, R., & Russell, N. J. (2009). Microorganisms in the atmosphere over Antarctica. *FEMS Microbiology Ecology*, *69*(2), 143–157.
- Pineiro, M., & Stanton, C. (2007). Probiotic bacteria: legislative framework—requirements to evidence basis. *The Journal of Nutrition*, *137*(3), 850S–853S.
- Pinto, S. S., Fritzen-Freire, C. B., Muñoz, I. B., Barreto, P. L. M., Prudêncio, E. S., & Amboni, R. D. M. C. (2012). Effects of the addition of microencapsulated *Bifidobacterium* BB-12 on the properties of frozen yogurt. *Journal of Food Engineering*, *111*(4), 563–569. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.03.016>
- Possemiers, S., Marzorati, M., Verstraete, W., & de Wiele, T. (2010). Bacteria and chocolate: a successful combination for probiotic delivery. *International Journal of Food Microbiology*, *141*(1), 97–103.

- Prindiville, E. A., Marshall, R. T., & Heymann, H. (1999). Effect of milk fat on the sensory properties of chocolate ice cream. *Journal of Dairy Science*, 82(7), 1425–1432.
- Ranadheera, C. S., Evans, C. A., Adams, M. C., & Baines, S. K. (2013). Production of probiotic ice cream from goat's milk and effect of packaging materials on product quality. *Small Ruminant Research*, 112(1), 174–180.
- Ravula, R. R., & Shah, N. P. (1998). Effect of acid casein hydrolysate and cysteine on the viability of yogurt and probiotic bacteria in fermented frozen dairy desserts. *Australian Journal of Dairy Technology*, 53(3), 175.
- Saad, S. M. I. (2006). Probiotics and prebiotics: the state of the art. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 42(1), 1–16.
- Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mättö, J., & Mattila-Sandholm, T. (2000). Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, 84(3), 197–215.
- Sagdic, O., Ozturk, I., Cankurt, H., & Tornuk, F. (2012). Interaction between some phenolic compounds and probiotic bacterium in functional ice cream production. *Food and Bioprocess Technology*, 5(8), 2964–2971.
- Salem, M. M. E., Fathi, F. A., & Awad, R. A. (2006). Production of functional ice cream. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 102(7), 326–330.
- Salem, M. M. E., Fathi, F. A., Awad, R. A., & others. (2005). Production of probiotic ice cream. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 14(3), 267.
- Salminen, S., Ouwehand, A., Benno, Y., & Lee, Y. K. (1999). Probiotics: how should they be defined? *Trends in Food Science & Technology*, 10(3), 107–110. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0924-2244\(99\)00027-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0924-2244(99)00027-8)
- Sanders, M. E. (1999). Probiotics. *Food Technology*, 53(11), 67–77.
- Sanz, Y. (2007). Ecological and functional implications of the acid-adaptation ability of Bifidobacterium: a way of selecting improved probiotic strains. *International Dairy Journal*, 17(11), 1284–1289.
- Saxelin, M., Grenov, B., Svensson, U., Fondén, R., Reniero, R., & Mattila-Sandholm, T. (1999). The technology of probiotics. *Trends in Food Science & Technology*, 10(12), 387–392. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0924-2244\(00\)00027-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0924-2244(00)00027-3)
- Saxelin, M., Korpela, R., Mäyrä-Mäkinen, A., Mattila-Sandholm, T., Saarela, M., & others. (2003). Introduction: classifying functional dairy products. *Functional Dairy Products*, 1–16.

- Saxelin, M., Tynkkynen, S., Mattila-Sandholm, T., & de Vos, W. M. (2005). Probiotic and other functional microbes: from markets to mechanisms. *Current Opinion in Biotechnology*, *16*(2), 204–211.
- Sazawal, S., Hiremath, G., Dhingra, U., Malik, P., Deb, S., & Black, R. E. (2006). Efficacy of probiotics in prevention of acute diarrhoea: a meta-analysis of masked, randomised, placebo-controlled trials. *The Lancet Infectious Diseases*, *6*(6), 374–382.
- Sengkhampan, N., Verhoef, R., Schols, H. A., Sajjaanantakul, T., & Voragen, A. G. J. (2009). Characterisation of cell wall polysaccharides from okra (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench). *Carbohydrate Research*, *344*(14), 1824–1832.
- Serdar Akin, M. (2005). Effects of inulin and different sugar levels on viability of probiotic bacteria and the physical and sensory characteristics of probiotic fermented ice-cream. *Milchwissenschaft*, *60*(3), 297–300.
- Shah, N. P. (2007). Functional cultures and health benefits. *International Dairy Journal*, *17*(11), 1262–1277.
- Shah, N. P., & Ravula, R. R. (2000). Microencapsulation of probiotic bacteria and their survival in frozen fermented dairy desserts. *Australian Journal of Dairy Technology*, *55*(3), 139.
- 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), 279–284.
- Sheu, T.-Y., Marshall, R. T., & Heymann, H. (1993). Improving survival of culture bacteria in frozen desserts by microentrapment. *Journal of Dairy Science*, *76*(7), 1902–1907.
- Shivaji, S., Chaturvedi, P., Begum, Z., Pindi, P. K., Manorama, R., Padmanaban, D. A., ... others. (2009). *Janibacter hoylei* sp. nov., *Bacillus isronensis* sp. nov. and *Bacillus aryabhatai* sp. nov., isolated from cryotubes used for collecting air from the upper atmosphere. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *59*(12), 2977–2986.
- Singh, R., Damle, S. G., & Chawla, A. (2011). Salivary mutans streptococci and lactobacilli modulations in young children on consumption of probiotic ice-cream containing *Bifidobacterium lactis* Bb12 and *Lactobacillus acidophilus* La5. *Acta Odontologica Scandinavica*, *69*(6), 389–394.
- Song, D., Khouryieh, H., Abughazaleh, A. A., Salem, M., Hassan, O., & Ibrahim, S. A. (2011). Sensory properties and viability of probiotic microorganisms in chocolate ice cream supplemented with omega-3 fatty acids. *Milchwissenschaft*, *66*(2), 172–175.
- Soukoulis, C., Fisk, I. D., & Bohn, T. (2014). Ice Cream as a Vehicle for Incorporating Health-Promoting Ingredients: Conceptualization and Overview of Quality and Storage Stability.

Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 13(4), 627–655.
doi:10.1111/1541-4337.12083

- Soukoulis, C., Rontogianni, E., & Tzia, C. (2010). Contribution of thermal, rheological and physical measurements to the determination of sensorially perceived quality of ice cream containing bulk sweeteners. *Journal of Food Engineering*, 100(4), 634–641.
- Speck, M. L., & Cowman, R. A. (1969). Metabolic injury to bacteria resulting from freezing. *Freezing and Drying of Microorganisms*, University of Tokyo Press, Tokyo, 39–51.
- Stahl, U., Donalies, U. E. B., & Nevoigt, E. (2008). *Food Biotechnology*. Springer eBooks (pp. 111:1–66). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2008. Retrieved from <https://vpn.cut.ac.cy/>
- Stanton, C., Gardiner, G., Meehan, H., Collins, K., Fitzgerald, G., Lynch, P. B., & Ross, R. P. (2001). Market potential for probiotics. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2), 476s–483s.
- Talwalkar, A., & Kailasapathy, K. (2003). A review of oxygen toxicity in probiotic yogurts: influence on the survival of probiotic bacteria and protective techniques. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3(3), 117–124.
- Talwalkar, A., & Kailasapathy, K. (2004). Comparison of selective and differential media for the accurate enumeration of strains of *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus casei* complex from commercial yoghurts. *International Dairy Journal*, 14(2), 143–149.
- Talwalkar, A., Miller, C. W., Kailasapathy, K., & Nguyen, M. H. (2004). Effect of packaging materials and dissolved oxygen on the survival of probiotic bacteria in yoghurt. *International Journal of Food Science & Technology*, 39(6), 605–611.
- Tekinsen, K. K., & Güner, A. (2010). Chemical composition and physicochemical properties of tubera salep produced from some Orchidaceae species. *Food Chemistry*, 121(2), 468–471.
- Thunell, R. K., Sandine, W. E., & Bodyfelt, F. W. (1984). Frozen starters from internal-pH-control-grown Cultures. *Journal of Dairy Science*, 67(1), 24–36.
- Turgut, T., & Cakmakci, S. (2009). Investigation of the possible use of probiotics in ice cream manufacture. *International Journal of Dairy Technology*, 62(3), 444–451.
- Vary, P. S. (1994). Prime time for *Bacillus megaterium*. *Microbiology*, 140(5), 1001–1013.
- Viana, J. V, Da Cruz, A. G., Zoellner, S. S., Silva, R., & Batista, A. L. D. (2008). Probiotic foods: consumer perception and attitudes. *International Journal of Food Science & Technology*, 43(9), 1577–1580.

- Vinderola, C. G., Bailo, N., & Reinheimer, J. A. (2000). Survival of probiotic microflora in Argentinian yoghurts during refrigerated storage. *Food Research International*, 33(2), 97–102.
- Vullo, D. L., Coto, C. E., & Sineriz, F. (1991). Characteristics of an inulinase produced by *Bacillus subtilis* 430A, a strain isolated from the rhizosphere of *Vernonia herbacea* (Vell Rusby). *Applied and Environmental Microbiology*, 57(8), 2392–2394.
- Weiser, R. S., & Osterud, C. M. (1945). Studies on the death of bacteria at low temperatures: I. the influence of the intensity of the freezing temperature, repeated fluctuations of temperature, and the period of exposure to freezing temperatures on the mortality of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 50(4), 413.
- White, G. W. (1981). Homogenisation of ice cream mixes. *Dairy Industries International*, 46(2), 29.
- Zoumpopoulou, G., Foligne, B., Christodoulou, K., Grangette, C., Pot, B., & Tsakalidou, E. (2008). *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 displays probiotic potential in vitro and protects against trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced colitis and *Salmonella* infection in murine models. *International Journal of Food Microbiology*, 121(1), 18–26.
- Zoumpopoulou, G., Papadimitriou, K., Polissiou, M. G., Tarantilis, P. A., & Tsakalidou, E. (2010). Detection of changes in the cellular composition of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in the presence of antimicrobial compound (s) of *Lactobacillus* strains using Fourier transform infrared spectroscopy. *International Journal of Food Microbiology*, 144(1), 202–207.
- Ζερφυρίδης, Γ. Κ. (2001). *Τεχνολογία προϊόντων γάλακτος*. (p. 325). Θεσσαλονίκη : Γιαχούδης.
- Καμινारीδης, Σ., & Μοάτσου, Γ. (2009). *Γαλακτοκομία / Στέλιος Καμινारीδης, Γκόλφω Μοάτσου*. Αιγάλεω : Έμβρυο.
- Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 της Επιτροπής της 15ης Νοεμβρίου 2005 περί μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα.
- Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1924/2006 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 20ής Δεκεμβρίου 2006 σχετικά με τους ισχυρισμούς επί θεμάτων διατροφής και υγείας που διατυπώνονται για τα τρόφιμα.
- Μάντης, Α. Ι. (2005). *Υγιεινή και τεχνολογία του γάλακτος και των προϊόντων του / Αντωνίου Ι. Μάντη*. Θεσσαλονίκη : Κυριακίδης.
- Μάντης, Α. Ι. (2008). *Εργαστηριακή εξέταση του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων / Αντώνιος Ι. Μάντης, Δημήτριος Κ. Παπαγεωργίου, Δημήτριος Ι. Φλετούρης*. Θεσσαλονίκη : Κυριακίδης.

Μπελλές, Χ. (2006). «*Το νησί της μαστίχας*». Αθήνα: Ελληνικά Γράμματα.

Οδηγία 2000/13/ΕΚ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 20ής Μαρτίου 2000 για προσέγγιση των νομοθεσιών των κρατών μελών σχετικά με την επισήμανση, την παρουσίαση και τη διαφήμιση των τροφίμων.

Σαββίδης, Θ. (2000). «*Το Μαστιχόδεντρο της Χίου (Pistacia lentiscus var.chia)*».

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ INTERNET

<http://www.kanakis1947.com/#!enoikw/c161y>

<http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST/>