



Τεχνολογικό
Πανεπιστήμιο
Κύπρου

Σχολή Γεωτεχνικών
Επιστημών και Διαχείρισης
Περιβάλλοντος

Πτυχιακή εργασία

**Η ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΚΑΙ ΠΡΕΒΙΟΤΙΚΩΝ
ΣΤΗ ΜΑΥΡΗ ΣΟΚΟΛΑΤΑ ΚΑΙ ΟΙ ΘΕΤΙΚΕΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ
ΤΟΥ ΚΑΤΑΝΑΛΩΤΗ**

Δωροθέα Κλείτου

Λεμεσός, Μάιος 2020

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΤΕΧΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΠΕΡΙΒΑΛΟΝΤΟΣ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ, ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ
ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Πτυχιακή εργασία

**Η ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΚΑΙ ΠΡΕΒΙΟΤΙΚΩΝ
ΣΤΗ ΜΑΥΡΗ ΣΟΚΟΛΑΤΑ ΚΑΙ ΟΙ ΘΕΤΙΚΕΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ
ΤΟΥ ΚΑΤΑΝΑΛΩΤΗ**

της
Δωροθέας Κλείτου

Επιβλέπων Καθηγητής
Δρ. Δημήτρης Τσάλτας

Λεμεσός, Μάιος 2020

Πνευματικά δικαιώματα

Copyright © Δωροθέα Κλείτου, 2020

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Η έγκριση της πτυχιακής εργασίας από το Τμήμα Γεωπονικών Επιστημών,
Βιοτεχνολογίας και Επιστήμης Τροφίμων του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου Κύπρου
δεν υποδηλώνει απαραίτητως και αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα εκ μέρους του
Τμήματος.

Με το τέλος της πτυχιακής μου μελέτης, αισθάνομαι την υποχρέωση να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες, αρχικά στον επιβλέποντα καθηγητή μου Δρ. Δημήτρη Τσάλτα, για τη συνεχή καθοδήγηση και υποστήριξή του, αλλά και για το χρόνο που αφιέρωσε κατά τη συγγραφή της πτυχιακής εργασίας. Τέλος, δεν θα μπορούσα να παραλείψω τους δικούς μου ανθρώπους, οικογένεια και φίλους, για την συνεχή και αμέριστη συμπαράστασή τους μέχρι την ολοκλήρωση της εργασίας μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην εν λόγω εργασία μελετάται η περίπτωση προσθήκης και τυχόν επιβίωσης των προβιοτικών μικροοργανισμών στη μαύρη σοκολάτα και η περιεκτικότητα πρεβιοτικών μετά από παρατεταμένη αποθήκευση, μέσα από σχετικές έρευνες. Μελετήθηκαν όλες οι πιθανές αλλαγές στη σοκολάτα που προέκυψαν, όσο αφορά την επιβίωση των ζωντανών μικροοργανισμών, αλλά και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της. Τα βιοδραστικά συστατικά του κακάο, πολυφαινόλες, και κυρίως τα φλαβονοειδή, οφείλονται στις θετικές επιδράσεις που επιφέρουν στην υγεία του καταναλωτή. Τέλος, με βάση τα αποτελέσματα των μελετών, η εργασία αυτή καταλήγει στο συμπέρασμα ότι η μαύρη σοκολάτα αποτελεί εξαιρετικός φορέας για την επιβίωση των προβιοτικών μικροοργανισμών και πρεβιοτικών, κυρίως των βακτηρίων γαλακτικού οξέος και ινουλίνης αντίστοιχα.

Λέξεις κλειδιά: [προβιοτικά, πρεβιοτικά, μαύρη σοκολάτα, οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, πολυφαινόλες, φλαβονοειδή]

ABSTRACT

In this project the addition and possible survival of probiotics microorganisms in dark chocolate and the content of prebiotics after prolonged storage, which are reported through relevant research, was investigated. All the possible changes in chocolate that occurred, in terms of the survival of living microorganisms, but also its organoleptic characteristics were studied. The bioactive components of cocoa, polyphenols, and especially flavonoids, are due to the positive effects they have on consumer health. Finally, based on the results of the studies, this work concludes that dark chocolate is an excellent carrier for the survival of probiotic microorganisms and prebiotics, mainly lactic acid and inulin bacteria, respectively.

Keywords: [probiotics, prebiotics, dark chocolate, organoleptic characteristics, polyphenols, flavonoids]

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	v
ABSTRACT.....	vi
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	x
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ	xi
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	xii
ΑΠΟΔΟΣΗ ΟΡΩΝ	xiii
1. Εισαγωγή	1
1.1 Το Κακάο	2
1.1.1 Ποικιλίες σπόρων κακάο	3
1.1.1.1 Criollo.....	3
1.1.1.1 Forastero	3
1.1.1.2 Trinitario.....	3
1.2 Η σοκολάτα	4
1.2.1 Τρόπος παραγωγής	5
1.2.2 Τύποι σοκολάτας	6
1.2.2.1 Μαύρη σοκολάτα	7
1.2.2.2 Σοκολάτα γάλακτος.....	7
1.2.2.3 Άσπρη σοκολάτα	7
1.3 Μαύρη σοκολάτα	7
1.3.1 Ιστορικά στοιχεία.....	7
1.3.2 Μαύρη σοκολάτα ως λειτουργικό τρόφιμο	8
1.3.3 Διατροφική αξία.....	9
1.3.4 Θετικές επιδράσεις.....	10
1.3.4.1 Καρδιαγγειακά προβλήματα.....	11

1.3.4.2	Ψυχική υγεία.....	11
1.3.4.3	Καρκίνο	12
1.3.4.4	Παχυσαρκία	12
1.3.4.5	Νευρικό σύστημα	13
1.3.5	Αρνητικές επιδράσεις	13
1.4	Προβιοτικά	14
1.4.1	Ιστορικά στοιχεία.....	14
1.4.2	Ορισμός των προβιοτικών μικροοργανισμών.....	16
1.4.3	Περιγραφή.....	16
1.4.4	Θετικές επιδράσεις.....	18
1.4.4.1	Φλεγμονώδεις ασθένειες του εντέρου	19
1.4.4.2	Αντικαρκινικά.....	20
1.4.4.3	Δυσανεξία στη λακτόζη.....	20
1.4.4.4	Καρδιαγγειακές παθήσεις.....	21
1.4.5	Προβιοτικοί μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν ως προβιοτικές καλλιέργειες.....	22
1.4.6	Τρόφιμα που εισάγονται κυρίως τα προβιοτικά βακτήρια	23
1.4.6.1	Γιαούρτι.....	24
1.4.6.2	Μαύρη σοκολάτα	24
1.4.6.3	Κεφίρ	24
1.4.6.4	Ορισμένα τυρία, όπως τσένταρ, γκούντα, παρμεζάνα	24
1.4.7	Τρόπος δράσης τους και η επίδραση τους στη λειτουργία του εντέρου...	25
1.4.8	Μελλοντικές προβλέψεις	26
1.5	Πρεβιοτικά	27
1.5.1	Είδη πρεβιοτικών	28
1.5.2	Τρόπος δράσης.....	29

1.5.3	Ευεργετικά αποτελέσματα	29
1.5.3.1	Παχυσαρκία	29
1.5.3.2	Ανθεκτικότητα στα παθογόνα	30
1.5.3.3	Αντικαρκινικά.....	30
1.5.4	Κριτήρια ένταξης των πρεβιοτικών	31
1.5.5	Τρόφιμα που εντάσσονται τα πρεβιοτικά	31
2	Σκοπός εργασίας	33
3	Αξιολόγηση των προβιοτικών μικροοργανισμών και πρεβιοτικών συστατικών στη μαύρη σοκολάτα	34
3.1	Παρουσίαση μελετών.....	34
3.1.1	Παρασκευή σοκολάτας με προσθήκη προβιοτικών μικροοργανισμών και πρεβιοτικών συστατικών	34
3.1.2	Μέθοδος μικροβιολογικών αναλύσεων	35
3.1.2.1	Αρίθμηση αποικιών	36
3.1.3	Προσδιορισμός πρεβιοτικών.....	36
3.1.4	Οργανοληπτικές εξετάσεις.....	36
3.1.5	Αποτελέσματα επιβίωση προβιοτικών μικροοργανισμών.....	37
3.1.6	Περιεκτικότητα Πρεβιοτικών	41
3.1.7	Αποτελέσματα οργανοληπτικών χαρακτηριστικών.....	42
	Συμπεράσματα	45
4	Διαγράμματα.....	47
5	Βιβλιογραφία	48

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Προβιοτικές καλλιέργειες που χρησιμοποιούνται	22
Πίνακας 2: Είδη πρεβιοτικών και σε ποια τρόφιμα τα συναντάμε.....	28
Πίνακας 3: Η επιβίωση των προβιοτικών μικροοργανισμών, μετά από παρατεταμένη αποθήκευση στους 4° C και 25° C, για 60 ημέρες.	38

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1:Κορυφαίες χώρες παραγωγής κακάου ανά τον κόσμο	2
Διάγραμμα 2:Κατά κεφαλή κατανάλωση προϊόντων σοκολάτας σε επιλεγμένες χώρες παγκοσμίως το 2012	4
Διάγραμμα 3: Τρόπος παραγωγής σοκολάτας.....	6
Διάγραμμα 4: Αριθμός επιστημονικών μελετών σχετικά με τα προβιοτικά μέχρι το 2014	15
Διάγραμμα 5: Επιδράσεις προβιοτικών μικροοργανισμών στην υγεία	22
Διάγραμμα 6: Αποτελέσματα επιβίωσης <i>L. acidophilus NCFM</i> και <i>B. lactis HN019</i> , μετά από 180 ημέρες αποθήκευσης.....	40
Διάγραμμα 7: Διάρκεια αποθήκευσης προβιοτικής μαύρης σοκολάτας σε σύγκριση με τον έλεγχο	41
Διάγραμμα 8: Μεταβλητές για την παραγωγή προβιοτικών μη γαλακτοκομικών προϊόντων	47

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

g:	Γραμμάριο
cfu:	Μονάδα σχηματισμού αποκίων
mg:	Χιλιοστόγραμμα
ml:	Χιλιοστόλιτρο
log:	Λογάριθμος
w/w:	Όγκος κατ' όγκο
RH:	Σχετική υγρασία
GI:	Γαστρεντερικός σωλήνας
FOS:	Φρουκτολιγোসακχαρίτες
GOS:	Γαλακτολιγোসακχαρίτες
LAB:	Βακτήρια γαλακτικού οξέος
NO:	Μονοξείδιο του αζώτου
ΚΝΣ:	Κεντρικό νευρικό σύστημα
ΔΜΣ:	Δείκτης μάζας σώματος
ROS:	Αντιδραστικό οξυγόνο

ΑΠΟΔΟΣΗ ΟΡΩΝ

FAO:	Διεθνής Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας των Ηνωμένων Εθνών
WHO:	Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας
In vitro:	«εν υάλω» οποιαδήποτε φυσιολογική ή παθολογική ενέργεια που λαμβάνει χώρα εκτός του οργανισμού (εντός του δοκιμαστικού σωλήνα)
In vivo:	«εν ζωή», λαμβάνει χώρα μέσα σε έναν έμβιο οργανισμό

1. Εισαγωγή

Το κακάο, μέσα από τα υποπροϊόντα του, έχει τραβήξει το ενδιαφέρον πάνω από δισεκατομμύρια ανθρώπων. Η σοκολάτα, στις οποίες κύριο συστατικό είναι το κακάο, έχει κερδίσει με την εξαιρετική της γεύση, μεγάλη δημοτικότητα. Επιστήμονες τροφίμων και επιστήμονες στον τομέα της υγείας, έχουν δείξει μεγάλο ενδιαφέρον για τη μαύρη σοκολάτα, λόγω των πιθανών θετικών επιδράσεων στην υγεία.

Δεν είναι όμως μόνο η σοκολάτα που έχει τραβήξει το ενδιαφέρον των επιστημών, αφού πλέον η ένταξη των προβιοτικών μικροοργανισμών και πρεβιοτικών έχει συμβάλλει στην ζωή των καταναλωτών. Η προσθήκη ζωντανών μικροοργανισμών, όπως είναι τα προβιοτικά, προσφέρουν ευεργετικές ιδιότητες στα τρόφιμα για την ανθρώπινη υγεία. Τα τρόφιμα που έχουν επεξεργαστεί με την προσθήκη των προβιοτικών, προωθούνται όλο και περισσότερο στους επαγγελματίες του τομέα της υγείας.

Η βασική ιδέα της παρούσας πτυχιακής, αφορά την επεξεργασία της μαύρης σοκολάτας με την προσθήκη ζωντανών μικροοργανισμών, τα προβιοτικά, και των πρεβιοτικών συστατικών, με σκοπό την διαπίστωση της επιβίωσής τους αλλά και την επίδρασή τους στον ανθρώπινο οργανισμό. Αναφέρονται τόσο οι θετικές επιδράσεις των προβιοτικών μικροοργανισμών, όσο και των πρεβιοτικών στην ανθρώπινη υγεία μέσα από σχετικές έρευνες.

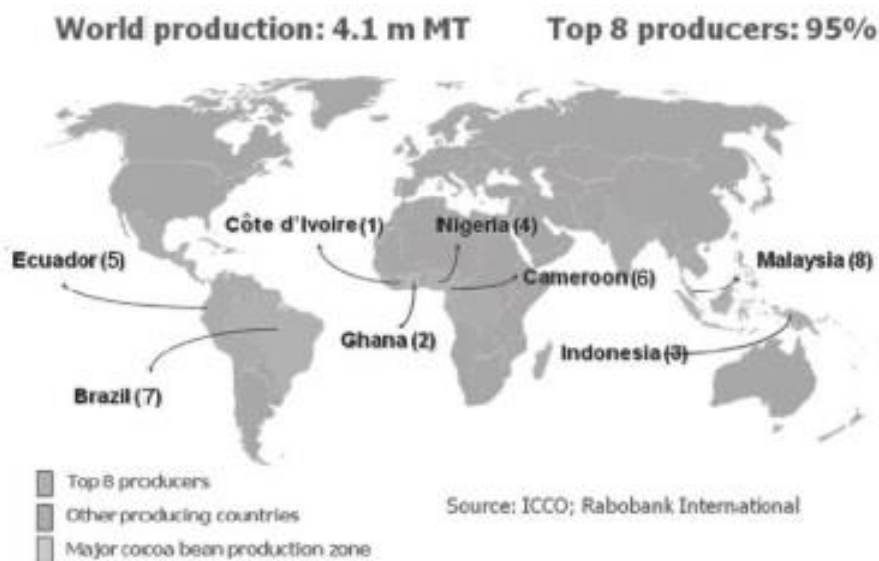
Στο πρώτο κεφάλαιο της εργασίας, αναφέρονται γενικά στοιχεία, με το πρώτο να ασχολείται με την έννοια του βασικού συστατικού της μαύρης σοκολάτας, το κακάο. Γίνεται αναφορά στα ιστορικά στοιχεία και τις ποικιλίες που υπάρχουν για την παρασκευή της σοκολάτας. Προχωρώντας, αναφέρεται η μαύρη σοκολάτα, δίνοντας έμφαση στις θετικές της επιδράσεις στο τομέα της υγείας, αλλά και για τις διατροφικές αξίες που προσφέρει.

Στο επόμενο μέρος του πρώτου κεφαλαίου, παρουσιάζονται τα χαρακτηριστικά των προβιοτικών μικροοργανισμών και πρεβιοτικών, και ακολούθως η σημαντικότητά τους στην ανθρώπινη υγεία. Σημαντικό είναι να γνωρίζουμε σε ποια τρόφιμα βρίσκονται κυρίως αυτοί οι ζωντανοί μικροοργανισμοί και σε ποια τα ενδυνάμη πρεβιοτικά, τα οποία αναφέρονται στην συνέχεια.

Τέλος, αναγράφεται η αξιολόγηση των προβιοτικών μικροοργανισμών μέσα από σχετικές έρευνες, αναλύονται και ερμηνεύονται τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τις πειραματικές μελέτες, καταλήγοντας σε ορισμένα συμπεράσματα.

1.1 Το Κακάο

Το κακάο, και τα υποπροϊόντα του, το απολαμβάνουν δισεκατομμύρια άνθρωποι σε όλο τον κόσμο, αλλά ελάχιστοι από αυτούς γνωρίζουν την ιστορία του. Στην πραγματικότητα, το κακάο εμφανίστηκε σε διάφορους πολιτισμούς παγκοσμίως για εκατοντάδες χρόνια. Η ιστορία του ξεκίνησε με τους Μάγια, πριν από εκατοντάδες χρόνια, οι οποίοι χρησιμοποιούσαν το κακάο, ως φαρμακευτικό προϊόν σε υγρή μορφή. Στην Ευρώπη, εισήχθη από τον Χριστόφορο Κολόμβο, και στη συνέχεια εντάχθηκε στην Ευρώπη. Οι ερευνητές βρήκαν στοιχεία για τα τρόφιμα με βάση το κακάο που χρονολογούνται από αρκετές χιλιάδες χρόνια πριν (World, 2018). Το κακάο, θεωρείται η σκόνη, η οποία προέρχεται από την αφαίρεση του βουτύρου κακάο, και χαρακτηρίζεται από πικρή γεύση. Χαρακτηρίζεται ως μια λειτουργική τροφή επειδή είναι πλούσια σε πολυφαινολικά αντιοξειδωτικά και φλαβονοειδή, μέταλλα, πρωτεΐνες και υδατάνθρακες. Δεδομένου ότι τα φλαβονοειδή βρίσκονται κυρίως στα στερεά κακάου, θεωρείται ευρέως ότι έχει υψηλή βιολογική αποτελεσματικότητα, λόγω αυξημένης περιεκτικότητας σε φλαβονοειδή και συνεπώς, υψηλή αντιοξειδωτική δράση. (Aspri, et al., 2020)



Διάγραμμα 1: Κορυφαίες χώρες παραγωγής κακάου ανά τον κόσμο. (Afoakwa, 2016)

1.1.1. Ποικιλίες σπόρων κακάο

Υπάρχουν 3 διαφορετικές ποικιλίες κακάο, οι οποίες διαφέρουν μεταξύ τους και παίζουν σημαντικό ρόλο στο τελικό προϊόν. Οι λοβοί έχουν διαφορετικά χαρακτηριστικά, καθώς επηρεάζουν την τελική γεύση και ποιότητα της σοκολάτας. Η καλύτερη ποιότητα σοκολάτα φτιάχνεται από την ποικιλία Criollo. (Beckett, 2008)

1.1.1.1 *Criollo* (1-5% της παραγωγής):

Οι κόκκοι της ποικιλίας Criollo είναι πιο σπάνιοι και χαρακτηρίζεται ως η ποικιλία με τη μικρότερη απόδοση.

Τα χαρακτηριστικά της είναι:

- Ελαφρώς πικρή, αλλά όχι δυσάρεστη γεύση(ήπια)
- Μετά την επεξεργασία της, προσφέρει ωραίο άρωμα
- Οι κόκκοι του κακάο θεωρούνται λεπτόκοκκοι
- Είναι λιγότερο ανθεκτικοί σε ασθένειες που προσβάλλουν το φυτό του κακάο, επομένως πολύ λίγες χώρες το παράγουν. (Beckett, 2008)

1.1.1.1 *Forastero* (80-90% της παραγωγής):

Αποτελεί το μεγαλύτερο ποσοστό κακάου, αφού έχει τη δυνατότητα να καλλιεργείται σε μικρές καλλιέργειες.

Το κύριο χαρακτηριστικό αυτής της ποικιλίας είναι η πικρή της γεύση. (Beckett, 2008)

1.1.1.2 *Trinitario* (10-15% της παραγωγής):

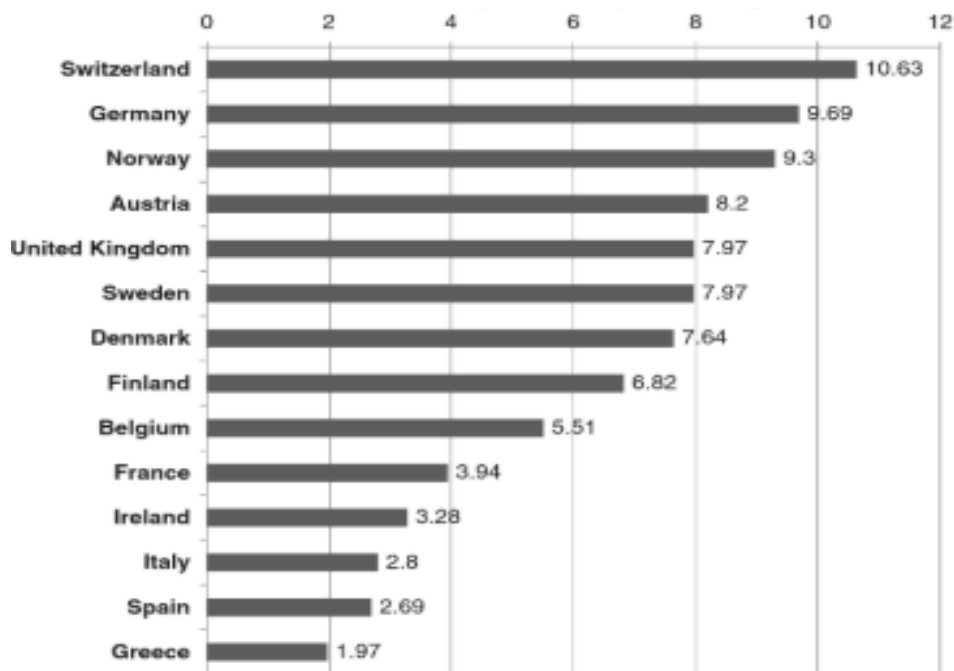
Θεωρείται υβρίδιο των άλλων δύο ποικιλιών. Είναι η διασταύρωση της ποικιλίας Criollo και Forastero. Η ποικιλία αυτή, αντέχει περισσότερο στις ασθένειες σε σχέση με την ποικιλία Criollo, και παρουσιάζει μεγαλύτερη απόδοση. Επιπλέον, θεωρείται ότι έχει καλύτερη ποιότητα από την ποικιλία Forastero.

Η ποικιλία αυτή έχει συνδυαστική γεύση και των δύο ποικιλιών και παρουσιάζει έντονο άρωμα. (Beckett, 2008)

1.2 Η σοκολάτα

Για αρκετά χρόνια, η σοκολάτα καταναλώνεται, με απώτερο σκοπό την απόλαυση παρά για θρεπτικούς λόγους. Για μεγάλο χρονικό διάστημα, η σοκολάτα είχε θεωρηθεί ως μη υγιεινό προϊόν, αφού η περιεκτικότητάς σε λιπαρά και ζάχαρη είναι υψηλή. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια, έχει αναφερθεί ότι η κατανάλωση της μαύρης σοκολάτας επιφέρει οφέλη στην υγεία. Αυτό οφείλεται κυρίως από ορισμένες ενώσεις του κακάου, όπως φλαβονοειδή. Οι ιδιότητες αυτές, βρίσκονται κυρίως στη μαύρη σοκολάτα και έχει επιφέρει σημαντικές ευεργετικές επιδράσεις, όπως στην αρτηριοσκλήρωση και καρδιαγγειακές παθήσεις. (Torres- Moreno, et al., 2011)

Πολλές περιπτώσεις, η σοκολάτα μπορεί να θεωρηθεί ως ένα προϊόν που μπορεί να προκαλέσει εθιστική συμπεριφορά, όπως η κατάχρηση ναρκωτικών ή αλκοόλ. Μια σχετική ανασκόπηση, έχει επιδείξει ότι λόγω της περιεκτικότητας της σοκολάτας σε λίπος, ζάχαρη, υφή και άρωμα, είναι πιθανό να είναι ένας κυρίαρχος παράγοντας γι' αυτή τη συμπεριφορά. Οι ιδιότητες της σοκολάτας ποικίλλουν ανάλογα με την προέλευση του κακάου, τη σύνθεση και τη διαδικασία παρασκευής, οι οποίες επηρεάζουν την αποδοχή των καταναλωτών. (Bruinsma Ms & Taren, 1999)



Διάγραμμα 2: Κατά κεφαλή κατανάλωση προϊόντων σοκολάτας σε επιλεγμένες χώρες παγκοσμίως το 2012. (Afoakwa, 2016)

1.2.1 Τρόπος παραγωγής

Με την άφιξη των καρπών του κακάου στο εργοστάσιο για επεξεργασία, είναι απαραίτητο να καθαριστούν από ξένες ύλες. Μετά τη συγκομιδή των καρπών, οι σπόροι κακάο και ο πολτός αφαιρούνται ενώ το κέλυφος απορρίπτεται. Στη συνέχεια, οι σπόροι και ο πολτός τοποθετούνται σε ειδικούς κάδους για αρκετές μέρες. Στη διάρκεια αυτή, ο πολτός υγροποιείται καθώς ζυμώνεται. Ο ζυμωμένος πολτός απομακρύνεται από τους σπόρους του κακάο. (Petyaev & Bashmakov, 2017)

Απαραίτητο είναι οι σπόροι του κακάο να αποξηραθούν, για περίπου 14 μέρες. Η ξήρανση των σπόρων είναι καλύτερη από τον ήλιο και όχι η τεχνητή ξήρανση, καθώς η γεύση τους δεν θα αλλοιωθεί από άλλους παράγοντες. Όταν οι σπόροι στεγνώσουν πλήρως, τοποθετούνται σε σάκους και ελέγχονται ποιοτικά. (Petyaev & Bashmakov, 2017)

Με την άφιξη των σπόρων, καθαρίζονται και στη συνέχεια ψήνονται σε χαμηλές θερμοκρασίες για να πάρουν την επιθυμητή γεύση. Στη συνέχεια αλέθονται και παίρνουν μια υγρή μορφή κακάου. (Petyaev & Bashmakov, 2017)

Κάτω από εξαιρετικά υψηλή πίεση, το κακάο αποδίδει δύο προϊόντα: σκόνη κακάου και βούτυρο κακάο. Τέλος, για να παραχθεί η σοκολάτα, χρειάζεται μόνο η υγρή μορφή του κακάου, το οποίο μπορεί να συνδυαστεί με περισσότερη ποσότητα βουτύρου και μιας γλυκαντικής ουσίας. Η μαύρη σοκολάτα απαιτεί μόνο κακάο, βούτυρο κακάο και ζάχαρη. Αναλόγως με τον τύπο σοκολάτας, διαφέρουν και τα συστατικά της.

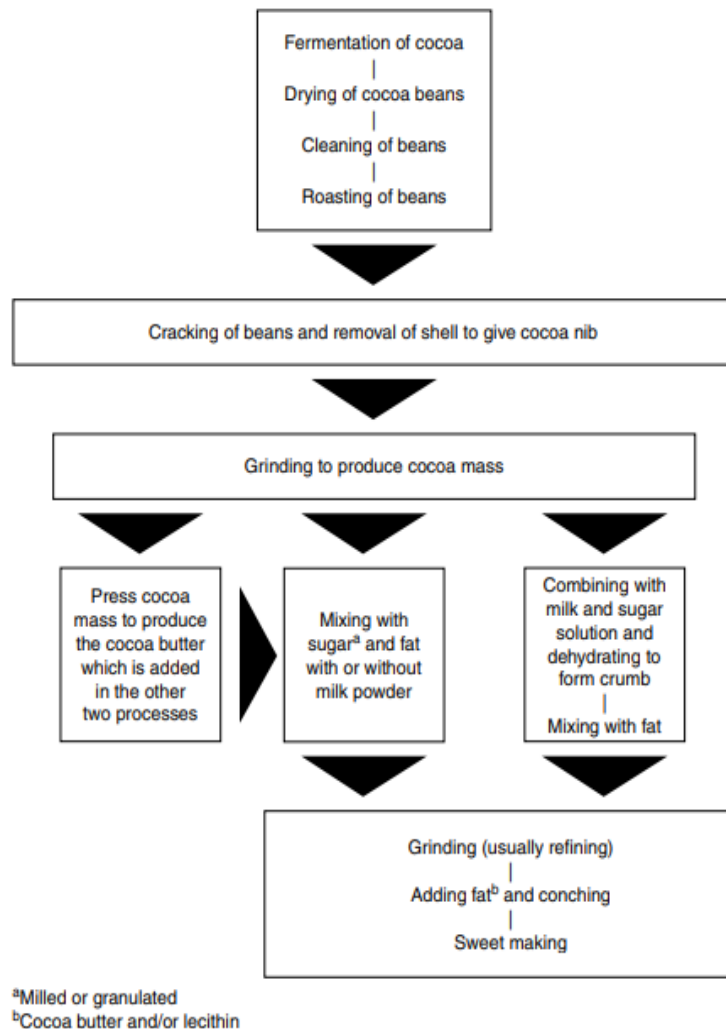


Figure 1.2 Schematic diagram of traditional chocolate-making process.

Διάγραμμα 3: Τρόπος παραγωγής σοκολάτας(Stephen T. Beckett,2009)

1.2.2 Τύποι σοκολάτας

Τα τελευταία χρόνια, η βιομηχανία τροφίμων παράγει τρεις τύπους σοκολάτας: μαύρη, λευκή και σοκολάτα γάλακτος. Η λευκή και η σοκολάτα γάλακτος δεν έχουν σημαντικές ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία, αφού τα περισσότερα οφέλη βρίσκονται στη μαύρη σοκολάτα. Η επιστήμη των τροφίμων έχει επικεντρωθεί κυρίως στη βελτίωση της γεύσης, υφής, εμφάνισης και διάρκειας ζωής των προϊόντων. Μέχρι τα τέλη του περασμένου αιώνα, τα οφέλη για την υγεία παρέμειναν σε μεγάλο βαθμό

άγνωστα, λόγω των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών τους που δεν έδωσαν σημαντική σημασία. (Petyaev & Bashmakov, 2017)

1.2.2.1 Μαύρη σοκολάτα

Για αρκετά χρόνια πριν, είχε ενταχθεί στην ανθρώπινη διατροφή ως φαρμακευτικό προϊόν. Τα κύρια συστατικά της μαύρης σοκολάτας είναι το κακάο, βούτυρο κακάο και ζάχαρη. Έχει πικρή γεύση και ευχάριστο άρωμα. (Verna, 2013)

1.2.2.2 Σοκολάτα γάλακτος

Η σοκολάτα γάλακτος δεν επιφέρει σημαντικές ευεργετικές ιδιότητες, αντιθέτως μπορεί να θεωρηθεί ως προϊόν με αρνητικές επιπτώσεις στην υγεία λόγω της αυξημένης ποσότητας ζάχαρης. Τα κύρια συστατικά της είναι το γάλα υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά, ζάχαρη, λεκιθίνη και μικρή ποσότητα κακάο το οποίο δεν ξεπερνά το 20%. Παρουσιάζει μια ευχάριστη εμφάνιση, έντονο άρωμα και γλυκιά γεύση. (Montagna, et al., 2019)

1.2.2.3 Άσπρη σοκολάτα

Η λευκή σοκολάτα, όπως και η σοκολάτα γάλακτος, δεν επιφέρουν θετικές επιδράσεις. Τα συστατικά της λευκής σοκολάτας είναι κυρίως το βούτυρο κακάο, γάλα και ζάχαρη χωρίς την παρουσία του κακάο. Έχει ευχάριστη και γλυκιά γεύση. (Montagna, et al., 2019)

1.3 Μαύρη σοκολάτα

1.3.1 Ιστορικά στοιχεία

Η σοκολάτα είναι γνωστή για την εξαιρετική της γεύση, στην οποία έγιναν αρκετές προσπάθειες για να κερδίσει όλη αυτή τη δημοτικότητα. Το ενδιαφέρον για τη μαύρη σοκολάτα έχει αυξηθεί λόγω των πιθανών επιπτώσεων στην υγεία (Montagna, et al., 2019). Η ιστορία της σοκολάτας ήταν η εξής:

- Ξεκίνησε με τους Μάγια, οι οποίοι ήταν ίσως οι πρώτοι άνθρωποι στη Νότια Αμερική που καλλιέργησαν το κακάο, πριν από περίπου 300 χρόνια (Waterhouse, et al., 1996). Για τους Μάγια, το διάστημα εκείνο, η σοκολάτα ήταν ένα ρόφημα

παρασκευασμένο από ζεστό νερό. Θεωρούσαν τη σοκολάτα το “Τρόφιμο του Θεού”. (Montagna, et al., 2019; Verna, 2013)

- Στην Ευρώπη, εισήχθη το 1502 από τον Χριστόφορο Κολόμβο.
- Το κακάο εμφανίστηκε στην Ευρώπη το 1528, όταν ο Ισπανός κατακτητής Hernán Cortés, έφερε δείγματα κακάου στον βασιλιά Κάρολο της Ισπανίας.
- Το 1753 ο Σουηδός επιστήμονας Carl Linnaeus ονόμασε το κακάο *Theobroma cacao*, από τη λατινική ονομασία *Theobroma* (κυριολεκτικά «τροφή των θεών»). (Montagna, et al., 2019; Verna, 2013)
- Η μαύρη σοκολάτα, είχε ενταχθεί στην ανθρώπινη διατροφή ως φαρμακευτικό προϊόν.
- Η βιομηχανία τροφίμων, με αρκετές προσπάθειες που χρειάστηκαν αρκετά χρόνια, κατάφεραν να μετατρέψουν τη σοκολάτα σε στερεή μορφή, όπου και καταναλώνεται σήμερα.
- Τα τελευταία χρόνια, η βιομηχανία τροφίμων παράγει τρεις τύπους σοκολάτας: μαύρη, λευκή και σοκολάτα γάλακτος. Η λευκή και η σοκολάτα γάλακτος δεν έχουν σημαντικές ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία, αφού τα περισσότερα οφέλη βρίσκονται στη μαύρη σοκολάτα. (Petyaev & Bashmakov, 2017)

1.3.2 Μαύρη σοκολάτα ως λειτουργικό τρόφιμο

Τόσο το κακάο, όσο και η σοκολάτα έχουν μια μεγάλη ποικιλία ισχυρών αντιοξειδωτικών και άλλων θρεπτικών συστατικών που μπορούν να επηρεάσουν θετικά την υγεία του ανθρώπου. Έχει αποδειχθεί ότι τα φλαβονοειδή στη σοκολάτα ασκούν ισχυρά αντιοξειδωτικά αποτελέσματα, επομένως μπορεί να αποτελέσει σημαντικό νέο προϊόν στον αυξανόμενο αριθμό λειτουργικών τροφίμων (Lippi, et al., 2009). Το κακάο και η σοκολάτα, έχουν προταθεί ως ένα καλό μέσο διατροφής για λειτουργικά υγιή συστατικά, επειδή είναι πλούσιες πηγές κατεχινών, επικατεχίνης και προκυανιδινών, οι οποίες είναι πολυφαινόλες που έχουν την ικανότητα να δρουν ως αντιοξειδωτικά, έχοντας καρδιοπροστατευτικά και αντικαταθλιπτικά αποτελέσματα. (Mirkonjic, et al., 2018)

Η σοκολάτα, όπως και το κακάο έχει αναφερθεί από πολλούς επιστήμονες, ότι μπορεί να θεωρηθεί ως εξαιρετικός φορέας προβιοτικών μικροοργανισμών και πρεβιοτικών συστατικών. Αυτό οφείλεται κυρίως στο βούτυρο του κακάου, το οποίο παρέχει

προστασία στα προβιοτικά βακτήρια, κατά τη διάρκεια αποθήκευσης και κατά την είσοδο στο γαστρεντερικό σωλήνα(GI). Με την προσθήκη των προβιοτικών μικροοργανισμών, η σοκολάτα χαρακτηρίζεται ως λειτουργικό τρόφιμο, το οποίο είναι πολλά υποσχόμενο. Οι αισθητηριακές ιδιότητες των μη γαλακτοκομικών προβιοτικών τροφίμων, όπως είναι η σοκολάτα, πρέπει να παρέχουν τις απαραίτητες οργανοληπτικές ιδιότητες που επιθυμεί ο καταναλωτής. Μέσα από σχετικές έρευνες, οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί μπορούν να επιβιώσουν και να διατηρήσουν τη διάρκεια ζωής του προϊόντος σε επιθυμητά αποτελέσματα. (Aspri, et al., 2020)

1.3.3 Διατροφική αξία

Το Υπουργείο Γεωργίας των Ηνωμένων Πολιτειών, υποστηρίζουν πως ένα κομμάτι μαύρης σοκολάτας με βάρος 101 g με 70-85% στερεά κακάου παρέχει:

- 604 θερμίδες
- 7.87 g πρωτεΐνης
- 43.06 g λίπους
- 46,36 g υδατανθράκων
- 11.00 g διαιτητικών ινών
- 24,23 g ζάχαρης
- 12.02 mg σιδήρου
- 230,00 mg μαγνησίου
- 3,34 mg ψευδαργύρου (USDA, 2019)

Το βασικό συστατικό της μαύρης σοκολάτας είναι το κακάο. Το κακάο περιέχει σημαντική ποσότητα λίπους, αφού το 40-50% αποτελείται από βούτυρο κακάο. Επιπλέον, περιέχει πολυφαινόλες, οι οποίες αποτελούν περίπου το 10% του ξηρού βάρους ολόκληρου του καρπού. Το κακάο αποτελεί μια από τις πιο γνωστές πηγές διαιτητικών πολυφαινολών σε σχέση με τα περισσότερα τρόφιμα. Ωστόσο, προκαλείται πικρή γεύση από τις πολυφαινόλες των ακατέργαστων κόκκων κακάο και αυτό το καθιστά δυσάρεστο. Σε αυτή τη περίπτωση, οι κατασκευαστές της σοκολάτας ανέπτυξαν τεχνικές επεξεργασίες, τις οποίες μειώνουν την περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες έως και 10 φορές. Συνεπώς, το κακάο και η μαύρη σοκολάτα, συνδέονται με ευεργετικά αποτελέσματα, τα οποία περιέχουν υψηλό ποσοστό πολυφαινολών, και

έχουν πάρει σημαντική σημασία. Επιπλέον, το κακάο είναι επίσης πλούσιο σε μέταλλα: κάλιο, φώσφορο, χαλκό, σίδηρο, ψευδάργυρο και μαγνήσιο. (Montagna, et al., 2019)

Είναι δύσκολο να αναφερθεί κανείς στην ποσότητα σοκολάτας που πρέπει να προσλαμβάνεται. Πολλές μελέτες ανέφεραν ότι είναι προτιμότερη η κατανάλωση της μαύρης σοκολάτας με περισσότερη ποσότητα κακάο και λιγότερης ζάχαρης, παρά το γεγονός ότι θα περιέχει περισσότερη ποσότητα λίπους. Καλύτερο για την ανθρώπινη υγεία, είναι η κατανάλωση της σοκολάτας που αποτελείται από 70% περιεκτικότητα κακάο, αφού θα περιέχει περισσότερες ποσότητες φλαβονοειδών. (Marika, et al., 2019)

1.3.4 Θετικές επιδράσεις

Είναι σημαντικό να σημειωθεί πως τα πιθανά οφέλη για την υγεία που θα αναφερθούν, χρειάζονται περαιτέρω έρευνα και μελέτη για να αποδειχθούν σωστά.

Η χρήση του κακάο για τα οφέλη στην υγεία χρονολογείται από τουλάχιστον 3000 χρόνια πριν. Η κατανόηση του κακάο εξελίχθηκε με τη σύγχρονη επιστήμη. Οι περισσότερες από τις τρέχουσες έρευνες επικεντρώνονται στη μαύρη σοκολάτα. Οι επιδημιολογικές και οι κλινικές μελέτες υποδηλώνουν την ευεργετική επίδραση της μαύρης σοκολάτας. Για χιλιάδες χρόνια, έχει χρησιμοποιηθεί για την απόδοση και την ανακούφιση που επιφέρει σε διάφορες νόσους (Higginbotham & Taub, 2015). Τα τελευταία χρόνια, η κατανάλωση σοκολάτας και, ιδιαίτερα, η μαύρη έχει «αποκατασταθεί» λόγω της υψηλής περιεκτικότητας σε πολυφαινόλες. Οι μαύρες σοκολάτες είναι πλούσιες πηγές πολυφαινόλων, αναγνωρισμένες ευρέως για την εμφάνιση αρκετών επωφελών επιδράσεων στην υγεία. (Marika, et al., 2019)

Οι πρώτες μελέτες που είχαν πραγματοποιηθεί για την μαύρη σοκολάτα, επικεντρώθηκαν κυρίως σε πληθυσμό με υψηλό κίνδυνο με καρδιαγγειακές παθήσεις. Έγιναν έρευνες σε διαβητικούς ασθενείς, καπνιστές και σε ασθενείς με καρδιακά νοσήματα. Τα αποτελέσματα παρουσίασαν ευεργετικά οφέλη για τους ασθενείς, αφού η υψηλή περιεκτικότητα των φλαβονοειδών έδειξαν βελτιωμένα κλινικά αποτελέσματα. Οι μελέτες αυτές επικεντρώθηκαν στα άμεσα φυσιολογικά οφέλη από την κατανάλωση της μαύρης σοκολάτας και ανέφεραν τη δυνατότητα μακροχρόνιας κατανάλωσης για τη βελτίωση της καρδιαγγειακής υγείας. Οι πιο σημαντικές επιδράσεις στην υγεία, είναι η βελτίωση της καρδιακής λειτουργίας, στην πίεση του αίματος, στη ψυχική υγεία, στο καρκίνου και στην παχυσαρκία. (Higginbotham & Taub, 2015)

1.3.4.1 Καρδιαγγειακά προβλήματα

Παρά την πολυπλοκότητα του κακάο, υπάρχουν στοιχεία που υποστηρίζουν ότι οι φλαβανόλες, μια ομάδα φυτικών ενώσεων είναι βιοδραστικές και μπορούν να προσφέρουν οφέλη, κυρίως στο καρδιαγγειακό (Kwik-Urbe & Bektash, 2008). Μια σειρά ευεργετικών επιδράσεων στο καρδιαγγειακό σύστημα μπορεί να συμβεί μετά από τακτική λήψη τροφών και ποτών που περιέχουν κακάο (Eske, 2019). Η ευεργετική επίδραση της μαύρης σοκολάτας, οφείλεται στην αύξηση τόσο της αντιοξειδωτικής ικανότητας, όσο και της περιεκτικότητας σε φλαβονοειδή εντός του αίματος (Serafini, et al., 2003). Τα οφέλη που επιφέρει περιλαμβάνουν την επίδραση της αρτηριακής πίεσης, την αντίσταση στην ινσουλίνη και τη λειτουργία των αγγείων και των αιμοπεταλίων. Κατά συνέπεια, η τακτική κατανάλωση της σοκολάτας, μπορεί να ελαττώσει σημαντικά τα επίπεδα της LDL-χοληστερόλης, και να αυξήσει τη χοληστερόλη HDL (Lippi, et al., 2009). Επιπλέον, αρκετές μελέτες ανθρώπινης παρέμβασης υποδηλώνουν ότι η κατανάλωση σοκολάτας, μπορεί να ελαττώσει την πίεση του αίματος, αυξάνοντας την παραγωγή και τη βιοδιαθεσιμότητα του αγγειοδιασταλτικού μονοξειδίου του αζώτου(NO). Τα πρώτα σημαντικά επιδημιολογικά στοιχεία που υποδηλώνουν την πιθανή σχέση της κατανάλωσης της μαύρης σοκολάτας και της καρδιαγγειακής υγείας, προήλθαν το 1992 από την Ολλανδική Μελέτη Ηλικιωμένων Zutphen που δημοσιεύθηκε στο The Lancet. Η μελέτη ανέφερε μια αντίστροφη σχέση μεταξύ της διατροφικής κατανάλωσης φλαβονοειδών, της υπέρτασης και των καρδιαγγειακών ποσοστών θανάτου σε μια μεγάλη ομάδα ηλικιωμένων εθελοντών. (Petyaev & Bashmakov, 2017)

1.3.4.2 Ψυχική υγεία

Η επίδραση της στην ψυχική υγεία του ανθρώπου, συνεισφέρει θετικά, αυξάνοντας τη διάθεση και μειώνοντας το άγχος και το στρες. Μέσα από μελέτες, η κατανάλωση της σοκολάτας, μπορεί να επιδράσει στη διάθεση, παρέχοντας ευχάριστες συνέπειες (Scholey & Owen, 2013). Διεξήχθη μια μελέτη, που αποσκοπούσε στην αξιολόγηση των επιπτώσεων της κατανάλωσης μαύρης σοκολάτας, στο άγχος και στα καταθλιπτικά συμπτώματα στους καρκινοπαθείς. Οι καρκινοπαθείς κατανάλωναν 50g μαύρης σοκολάτας για 3 συνεχόμενες μέρες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η κατανάλωση μαύρης σοκολάτας μπορεί να μειώσει το άγχος, τα καταθλιπτικά συμπτώματα και

συνεπώς να βελτιώσει την κατάσταση της ποιότητας ζωής των ασθενών με καρκίνο. (PL & SY, 2012)

1.3.4.3 Καρκίνο

Οι βλάβες που προκαλούν οι ελεύθερες ρίζες και τα είδη αντιδραστικού οξυγόνου (ROS), απειλούν συνεχώς τα κύτταρα του σώματος, τα οποία παράγονται κατά τη διάρκεια του φυσιολογικού μεταβολισμού του οξυγόνου ή από εξωγενείς παράγοντες. Οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί του σώματος, τα οποία περιλαμβάνουν ένζυμα, συμβάλλουν στην φυσιολογική ισορροπία. Σε παθολογικές καταστάσεις, αυτή η ισορροπία μπορεί να μεταβληθεί και η συσσώρευση ελευθέρων ριζών στα αρχικά στάδια και στην εξέλιξη του καρκίνου μπορεί να οδηγήσει σε οξειδωτική κυτταρική βλάβη. Έτσι, τρόφιμα που περιέχουν αντιοξειδωτικά και εξουδετερώνουν το ROS αναμένεται να είναι προστατευτικά στην αιτία του καρκίνου και στην ανάπτυξη. (Martin, et al., 2013)

Σε μια μελέτη *in vivo*, πραγματοποιήθηκε δίαιτα με μαύρη σοκολάτα σε αρουραίους. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η κατανάλωση μαύρης σοκολάτας μείωσε τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και κάποια γονιδιακή έκφραση που περιλαμβάνει φλεγμονή. Αυτά τα αποτελέσματα οφείλονται στις πολυφαινόλες που βρίσκονται στη σοκολάτα, οδηγώντας στην πρόληψη του καρκίνου του παχέος εντέρου. (Hong, et al., 2013)

1.3.4.4 Παχυσαρκία

Μια μελέτη η οποία διεξήχθη, αξιολογήθηκε πως η μαύρη σοκολάτα, μπορεί δώσει την αίσθηση κορεσμού και να μειώσει την όρεξη λόγω μυρωδιάς. Έτσι, με τη μείωση της όρεξης, αποτρέπει την αύξηση του σωματικού βάρους (Ali, et al., 2014). Τα φλαβονοειδή, υποστηρίζεται ότι μπορούν να προκαλέσουν την μείωση της λιπογένεσης, πρόκληση λιπόλυσης, με αποτέλεσμα να μειώνουν την εναπόθεση λιπιδίων και την αντίσταση στην ινσουλίνη, μειώνοντας έτσι την παχυσαρκία (Montagna, et al., 2019). Μια άλλη σημαντική λειτουργία των φλαβονοειδών του κακάου που σχετίζονται με την παχυσαρκία είναι η καθυστέρηση της οξειδωσης της LDL χοληστερόλης. Αξίζει να σημειωθεί, πως σε υγιείς ανθρώπους, η κατανάλωση κακάου αύξησε την HDL χοληστερόλη πλάσματος, μειώνοντας τα τριγλυκερίδια του πλάσματος (Magrone, et al., 2017). Μια έρευνα, ανέφερε την επίδραση του κακάου και της μαύρης σοκολάτας στο

βάρος, στο δείκτη μάζας σώματος(ΔΜΣ), αλλά και στην περιφέρεια της μέσης. Ωστόσο, τα αποτελέσματα έδειξαν μειωμένο βάρος και ΔΜΣ μετά από συμπλήρωση ≥ 30 g μαύρης σοκολάτας την ημέρα μεταξύ 4-8 εβδομάδες. (Kord-Varkaneh, et al., 2019)

1.3.4.5 Νευρικό σύστημα

Τα τελευταία χρόνια, πολύ ερευνητές έχουν δείξει ενδιαφέρον για την ικανότητα των πολυφαινολών να αντιστρέψουν την μείωση της μνήμης. Οι προστατευτικές δράσεις των πολυφαινολών περιλαμβάνουν μια σειρά επιδράσεων στον εγκέφαλο, συμπεριλαμβανομένου την ικανότητα να καταστέλλει τη νευροφλεγμονή και τη δυνατότητα προώθησης της μνήμης. Αρχικά, αυτό επιτυγχάνεται όταν αλληλοεπιδρούν με σημαντικούς καταρράκτες σηματοδότησης στον εγκέφαλο που οδηγεί σε βελτιωμένη νευρωτική επικοινωνία και προώθηση νευρωτικής επιβίωσης και διαφοροποίησης. Στη συνέχεια, οι πολυφαινόλες προκαλούν ευεργετικά αποτελέσματα, τόσο στο περιφερειακό, όσο και στο εγκεφαλικό αγγειακό σύστημα, που οδηγούν αλλαγές στην εγκεφαλοαγγειακή ροή του αίματος. (Ali, et al., 2014)

Επομένως, οι πολυφαινόλες θα μπορούσαν να δρουν στο κεντρικό νευρικό σύστημα και στις νευρολογικές λειτουργίες, μέσω της παραγωγής NO. Η αγγειοδιαστολή και η αυξημένη εγκεφαλική ροή αίματος, παρέχουν οξυγόνο και γλυκόζη στους νευρώνες, με αποτέλεσμα οι πολυφαινόλες να μπορούν να σχετίζονται με τις ηλικιακές γνωστικές διαταραχές, όπως οι ασθένειες με Αλτς και Πάρκινσον, οι οποίες σχετίζονται με τη συσσώρευση ROS στον εγκέφαλο. (Montagna, et al., 2019)

1.3.5 Αρνητικές επιδράσεις

Επισημαίνεται πως, λόγω του υψηλού θερμιδικού φορτίου της και της υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά, η αυξημένη κατανάλωσή της μπορεί να επιφέρει αντίθετα αποτελέσματα. Η υπερβολική κατανάλωση σοκολάτας, μπορεί να προάγει στην αύξηση του βάρους, έναν παράγοντα κινδύνου για πολλές ασθένειες. Έτσι, η κατανάλωση μεγάλης ποσότητας μαύρης σοκολάτας, πέρα των θετικών επιδράσεων στην υγεία, είναι πολύ πιθανό να προκαλέσει τα αντίθετα αποτελέσματα. Επιπλέον, η κατανάλωση σοκολάτας, μπορεί να προκαλέσει εθισμό, όπως συμβαίνει σε αλκοόλ και ναρκωτικά. Έρευνες έχουν επιδείξει ότι αυτή η εθιστική συμπεριφορά, μπορεί να οφείλεται στην

περιεκτικότητα της σοκολάτας σε λίπος, σάκχαρα, άρωμα και υφή. (Bruinsma Ms & Taren, 1999)

1.4 Προβιοτικά

1.4.1 Ιστορικά στοιχεία

Αρχικά, ο Louis Pasteur, ήταν αυτός που ταυτοποίησε ότι για τη διαδικασία της ζύμωσης είναι υπεύθυνα τα βακτήρια και οι ζύμες, χωρίς όμως να τα συνδέσει με οποιεσδήποτε εμφανείς επιπτώσεις στην υγεία. Έτσι, το 1905, ο Elie Metchnikoff (Ρώσος γεννήτορας του Βραβείου Νόμπελ), συνεργάστηκε με τον Pasteur στη δεκαετία του 1860 και κατάφερε να συνδέσει τη μακροζωία του πληθυσμού με τα γαλακτοκομικά προϊόντα, τα οποία έχουν υποστεί ζύμωση. Ο Eli Metchnikoff, είχε προτείνει ότι «Τα εντερικά μικρόβια, τα οποία παρουσιάζουν εξάρτηση από τα τρόφιμα, μπορεί να οδηγήσουν στη λήψη μέτρων για την τροποποίηση της χλωρίδας στο σώμα μας και την αντικατάσταση των επιβλαβών μικροβίων από χρήσιμα μικρόβια». (Fuller, 1991)

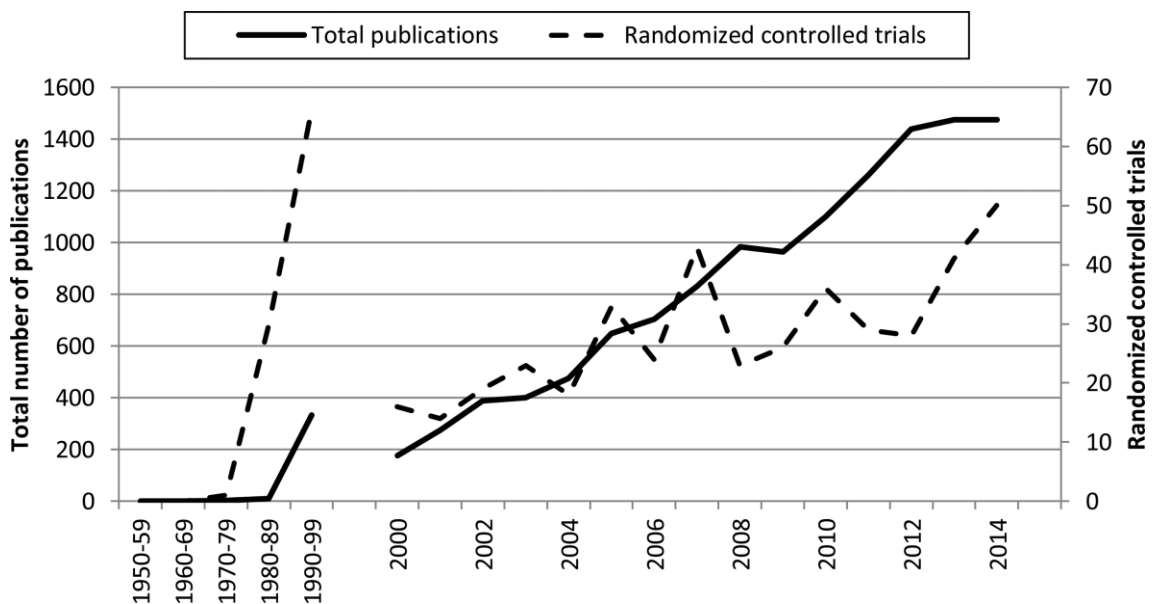
Αργότερα, ο Henry Tissier, γαλλικός παιδίατρος, διαπίστωσε ότι τα παιδιά με διάρροια είχαν μικρό αριθμό βακτηριδίων. Παρατήρησε πως τα βακτηρίδια "bifidobacterium", τα οποία είχε απομονώσει από ένα βρέφος, θα μπορούσαν να χορηγηθούν σε ασθενείς που πάσχουν από διάρροια, για να βοηθήσουν στην αντικατάσταση μιας υγιούς χλωρίδας του εντέρου. (Gasbarrini, et al., 2016; Lauzon, et al., 2014)

Τα έργα του Metchnikoff και του Tissier, ήταν τα πρώτα που έκαναν επιστημονικές προτάσεις σχετικά με την προβιοτική χρήση, ακόμη και αν δεν είχε δημιουργηθεί η λέξη "προβιοτικό", μέχρι και το 1960. Αργότερα, ο Fuller, το 1992, όρισε τα προβιοτικά ως "ένα ζωντανό μικροβιακό συμπλήρωμα διατροφής, το οποίο επηρεάζει ευεργετικά το ζώο ξενιστή βελτιώνοντας την εντερική του μικροβιακή ισορροπία". (Gasbarrini, et al., 2016; Lauzon, et al., 2014)

Ο όρος "προβιοτικό" είχε χρησιμοποιηθεί αρχικά από τους Lilley και Stillwell το 1965 περιγράφοντας ουσίες που εκκρίνονται από ένα μικρόβιο που διεγείρει την ανάπτυξη άλλου. Το 2001, ο WHO επαναπροσδιόρισε τα προβιοτικά ως «οι ζωντανοί μικροοργανισμοί που όταν χορηγούνται σε ικανοποιητικές ποσότητες, προσφέρουν

πολλά οφέλη για την υγεία του ξενιστή». Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Γαστρεντερολογίας, το 2013, παρέδωσε τις απαραίτητες οδηγίες για τις δοσολογίες των προβιοτικών και πρεβιοτικών για να είναι αποτελεσματικά. (McFarland, 2015)

Μια μελέτη η οποία πραγματοποιήθηκε στις πρώτες μελέτες ήταν σε 30 ασθενείς με χρόνια δυσκοιλιότητα και διάρροια, στους οποίους χορηγήθηκε το βακτήριο *Lactobacillus acidophilus*, με αποτέλεσμα να παρουσιαστούν βελτιώσεις και για τις 2 περιπτώσεις. Μόλις 10 χρόνια αργότερα, το 1932, μια μελέτη επιβεβαίωσε την επίδραση του *L. acidophilus* σε ασθενείς με δυσκοιλιότητα και ψυχικές ασθένειες. Οι συνεχείς έρευνες προάγουν στην κατανόηση των αλληλεπιδράσεων της φυσικής μικροχλωρίδας και της ικανότητας της να μπορεί να αντιστέκεται στα παθογόνα βακτήρια (McFarland, 2015). Οι έρευνες συνεχίστηκαν με μεγάλο ενδιαφέρον από τους ερευνητές, όπου παρατηρείται ότι μετά το 2000 έως το 2014 να έχουν διεξαχθεί περισσότερες από 1000 δοκιμές από ανθρώπινη παρέμβαση. (Jankovic , et al., 2010)



Διάγραμμα 4: Αριθμός επιστημονικών μελετών σχετικά με τα προβιοτικά μέχρι το 2014. (McFarland, 2015)

Όπως φαίνεται στο διάγραμμα 4, παρουσιάζεται μια σημαντική έκρηξη μελετών σε προβιοτικά που αντικατοπτρίζεται στην αύξηση του αριθμού των δημοσιεύσεων σχετικά με τα προβιοτικά (από 176 / έτος το 2000 σε 1476 / έτος το 2014). Λόγω των μεγάλων αριθμών δημοσιευμένων δοκιμών με διαφορετικά προβιοτικά, καθιστά δύσκολο στο κοινό να μπορούν να κατανοήσουν ποιο προβιοτικό είναι κατάλληλο για συγκεκριμένες ασθένειες. (McFarland, 2015)

1.4.2 Ορισμός των προβιοτικών μικροοργανισμών

Τα προβιοτικά ορίζονται ως “οι ζωντανοί μικροοργανισμοί που όταν χορηγούνται σε επαρκή ποσότητα, παρέχουν πολλά οφέλη για την υγεία του ξενιστή, δηλαδή στον ανθρώπινο οργανισμό”. (Reid, 2016) Η ετυμολογία της λέξης «προβιοτικό» προέρχεται από τις λέξεις Pro (λατινικά) και Βιοτικός (ελληνικά) και σημαίνει «προάγω τη ζωή». Τα κυριότερα προβιοτικά χαρακτηρίζονται τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος(LAB), τα βακτήρια μη γαλακτικού οξέος και οι ζύμες. Τα συνηθέστερα ανήκουν στα γένη Bifidobacterium και Lactobacillus, τα οποία είναι θετικά βακτήρια κατά Gram, και μερικά από αυτά τα στελέχη εμφανίζουν ισχυρές αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες (Isolauri, 2004). Θεωρούνται τα πιο μελετημένα και ευρέως χρησιμοποιούμενα βακτήρια, τα οποία είναι φυσιολογικά συστατικά του εντερικού μικροβίου και έχουν μακρά παράδοση ασφαλούς εφαρμογής στη βιομηχανία των τροφίμων. Σημαντικότερα θεωρούνται τα γαλακτικά βακτήρια αφού προσφέρουν περισσότερα οφέλη στον GI του ανθρώπου. (Siró, et al., 2008)

1.4.3 Περιγραφή

Το ανθρώπινο έντερο έχει την ικανότητα να διασπάσει την τροφή σε θρεπτικά συστατικά, να διευκολύνει την απορρόφηση των θρεπτικών ουσιών στο αίμα μέσω των εντερικών τοιχωμάτων και να εμποδίζει την είσοδο ξένων και τοξικών μορίων στην κυκλοφορία του αίματος. Η δυσλειτουργία του εντέρου, επομένως, έχει άμεσο αρνητικό αντίκτυπο στην ανθρώπινη υγεία. Αυτή η κριτική επικεντρώνεται στο ρόλο των λειτουργικών τροφίμων. (Cencic & Chingwaru, 2010)

Τα τρόφιμα γενικά, δεν προορίζονται μόνο για να καλύψουν την αίσθηση της πείνας στον άνθρωπο και να παρέχουν τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά, αλλά και για να αποτρέπουν και να μειώνουν την ανάπτυξη των ασθενειών. Σ' αυτό το σημείο επέρχονται τα λειτουργικά τρόφιμα. Τα προβιοτικά τρόφιμα, θεωρούνται ο ταχύτερος αναπτυσσόμενος τομέας της λειτουργικής παραγωγής τροφίμων. Η αγορά των τροφίμων αυτών, αναπτύσσεται παγκοσμίως πολύ γρήγορα, λόγω της ευαισθητοποίησης των καταναλωτών σχετικά με τον αντίκτυπο των τροφίμων στην υγεία. Σήμερα, τα προβιοτικά προϊόντα αντιπροσωπεύουν μέχρι και 60% - 70% της συνολικής λειτουργικής αγοράς των τροφίμων. (Aspri, et al., 2020)

Υπάρχουν περισσότερα από 500 είδη βακτηρίων, που αποτελεί ακόμη και το 95% των κυττάρων στο σώμα του ανθρώπου. Μέσα από έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί, τα προβιοτικά είναι παρόμοια με τα “καλά βακτήρια” που υπάρχουν στο ανθρώπινο σώμα, κυρίως του εντέρου. Η προβιοτική θεραπεία έχει προσελκύσει πολλούς ερευνητές με μεγάλο ενδιαφέρον για τις μολυσματικές, φλεγμονώδεις και αλλεργικές παθήσεις του ανθρώπου. Οι ευεργετικές συνέπειες των τροφίμων με προσθήκη ζωντανών μικροβίων στην ανθρώπινη υγεία και ιδίως στα γαλακτοκομικά προϊόντα για παιδιά και ανθρώπων υψηλού κινδύνου, προωθούνται όλο και περισσότερο από τους επαγγελματίες του τομέα της υγείας. Γι’ αυτό το λόγο, σήμερα, οι αγορές σε αυτά τα προϊόντα έχουν αυξηθεί, αφού ο καταναλωτής προσπαθεί με κάθε τρόπο να προστατεύσει την υγεία του, γνωρίζοντας την επίδραση των προβιοτικών. (Hotel & Cordoba, 2001)

Τα ευεργετικά αποτελέσματα που προσφέρουν τα προβιοτικά, οφείλονται στην ικανότητά τους να παραμένουν ζωντανοί μέσα στο έντερο. Προκειμένου να εκτιμηθούν οι ιδιότητες των προβιοτικών, ο WHO, ανέφερε πως η χρήση τους στα τρόφιμα θα πρέπει να έχουν την ικανότητα να πολλαπλασιάζονται στο έντερο και όχι μόνο να επιβιώνουν (Hotel & Cordoba, 2001). Ως εκ τούτου, η κύρια πρόκληση για την αποτελεσματικότητα των ζωντανών μικροοργανισμών, είναι η βιωσιμότητα τους κατά τα στάδια επεξεργασίας, αποθήκευσης και μεταφοράς. Η επίτευξη των οφελών για την υγεία, εξαρτάται από τον αριθμό των βιώσιμων κυττάρων που υπάρχουν τη στιγμή της κατανάλωσης. Τέλος, μετά την κατάποση, τα προβιοτικά θα πρέπει να επιβιώσουν από τις όξινες καταστάσεις του στομάχου, καθώς και τα χολικά άλατα στο λεπτό έντερο, προτού φθάσουν στην κατώτερη γαστρεντερική οδό όπου θα παρέχουν ευεργετικά αποτελέσματα. (Aspri, et al., 2020)

Τα τελευταία χρόνια η ζήτηση για προβιοτικά μη γαλακτοκομικά προϊόντα είναι αυξημένη, και ο λόγος προέρχεται από τη δυσανεξία στη λακτόζη, την περιεκτικότητα σε χοληστερόλη γάλακτος και τη χορτοφαγία. Επομένως, η ανάπτυξη αυτών των προϊόντων αποτελεί βασική ερευνητική προτεραιότητα για το σχεδιασμό τροφίμων και αποτελεί πρόκληση για τη βιομηχανία και για τους τομείς της επιστήμης. Η εμπορική επιτυχία των προϊόντων αυτών, εξαρτάται από τα τελικά ποιοτικά χαρακτηριστικά του προϊόντος. Τα χαρακτηριστικά αυτά είναι η γεύση, εμφάνιση, οσμή, κόστος και οι ισχυρισμοί στην υγεία του καταναλωτή. Επομένως, για την ανάπτυξη αυτών προϊόντων,

όπως είναι η σοκολάτα, η βιομηχανία τροφίμων λαμβάνει πολλές μεταβλητές, όπως φαίνεται στο διάγραμμα 7. (Granato, et al., 2010)

Η προβιοτική βιωσιμότητα εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως το pH, η θερμοκρασία αποθήκευσης, η παρουσία ανταγωνιστικών μικροοργανισμών και αναστολέων. Είναι σημαντικό το σκεύασμα να διατηρεί τη δραστηριότητα και τη βιωσιμότητα του προβιοτικού και παρατεταμένες χρονικές περιόδους (Granato, et al., 2010). Υπάρχουν δύο κύριες προκλήσεις κατά την κατασκευή: τη διατήρηση της προβιοτικής βιωσιμότητας κατά τη διάρκεια ζωής των προϊόντων και μετά την κατάποση στο GI και τη διατήρηση των φυσικοχημικών και αισθητηριακών χαρακτηριστικών των προϊόντων (Aspri, et al., 2020). Η συγκέντρωση προβιοτικών που απαιτείται για την επίτευξη κλινικής επίδρασης αναφέρεται συχνά ως $\geq 10^6$ μονάδες σχηματισμού αποικίας cfu / ml στο λεπτό έντερο και $\geq 10^8$ cfu / g στο κόλον. (Cencic & Chingwaru, 2010)

Συμπερασματικά, η ανάπτυξη μη γαλακτοκομικών προβιοτικών τροφίμων είναι δυνατή, επιτρέποντας την κατανάλωση αυτών των ωφέλιμων μικροοργανισμών από άτομα που δεν τους αρέσουν τα γαλακτοκομικά προϊόντα ή με δυσανεξία ή αλλεργία στα συστατικά του γάλακτος. (Aspri, et al., 2020)

1.4.4 Θετικές επιδράσεις

Σε αρκετές περιπτώσεις, οι χρόνιες λοιμώξεις, η κόπωση, η άσκηση, η χρήση φαρμάκων, οι ψυχολογικές πιέσεις μπορεί να οδηγήσουν στην αποδυνάμωση της φυσικής άμυνας του οργανισμού. Οι ψυχολογικές πιέσεις, όπως κατάθλιψη και άγχος, μπορούν να επηρεάσουν δυσμενώς την πεπτική λειτουργία, καταλήγοντας στην ενόχληση του εντέρου. (Jankovic , et al., 2010)

Σ' αυτό το σημείο επέρχεται ο ρόλος των λειτουργικών τροφίμων, ο οποίος είναι να ωφελήσουν την ανθρώπινη υγεία. Τα τρόφιμα τα οποία έχουν προστεθεί με προβιοτικά, βοηθούν στη διατήρηση της υγείας και στην αντιμετώπιση των μικρών φυσιολογικών διαταραχών που μπορεί να αντιμετωπίσει το ανθρώπινο σώμα. Ιστορικά, τα προβιοτικά συμβάλουν στην θεραπεία της διάρροιας, στη πρόληψη της διάρροιας που σχετίζεται με αντιβιοτικά, στη διαχείριση του στομάχου και των γαστρεντερικών λοιμώξεων. (Jankovic , et al., 2010)

1.4.4.1 Φλεγμονώδεις ασθένειες του εντέρου

Τα προβιοτικά, συμβάλλουν στην πρόληψη και θεραπεία φλεγμονωδών ασθενειών του εντέρου, όπως είναι η ελκώδη κολίτιδα και η νόσος του Crohn. Η ελκώδη κολίτιδα πάσχει κυρίως στο παχύ έντερο, ενώ η νόσος του Crohn, παρουσιάζει συμπτώματα στο λεπτό έντερο, στομάχι και στόμα. Η νόσος του Crohn, επηρεάζει όλο το πεπτικό σωλήνα, από τη στοματική κοιλότητα μέχρι και τον πρωκτό. Αντιθέτως, η ελκώδη κολίτιδα, προσβάλλει το παχύ έντερο και κυρίως την περιοχή του ορθού. Τα προβιοτικά, έδειξαν θεραπευτικό όφελος στην πρόκληση ύφεσης της ελκώδους κολίτιδας. Ορισμένα αποτελέσματα έχουν δείξει ότι τα προβιοτικά θα μπορούσαν να αποτρέψουν σημαντικά τον αρχικό τραυματισμό της κολίτιδας (Shen, et al., 2014). Τα προβιοτικά δεν θεραπεύουν την ασθένεια, αλλά μπορούν να παρατείνουν την περίοδο ύφεσης, βελτιώνοντας την ποιότητα ζωής των ασθενών. (Shah, 2007)

Το *Helicobacter pylori* είναι ένα παθογόνο βακτήριο, το οποίο προκαλεί πεπτικά έλκη και χρόνια γαστρίτιδα. Συνήθως υπάρχει στο στομάχι χωρίς όμως να προκαλεί συμπτώματα. Ωστόσο, τα αντιβιοτικά συχνά προκαλούν παρενέργειες και κάνουν τα βακτήρια πιο ανθεκτικά στα αντιβιοτικά. Οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί δεν μπορούν να καταστρέφουν το *H. pylori*, αλλά μπορούν να μειώσουν το βακτηριακό φορτίο σε ασθενείς που έχουν μολυνθεί με αυτό (Shah, 2007). Ωστόσο, άλλες μελέτες in vitro, δείχνουν ότι τα LAB μπορούν να αναστέλλουν ή να σκοτώνουν το *H. pylori*, αποτρέποντας την προσκόλληση του σε επιθηλιακά κύτταρα. Τα μοντέλα in vivo δείχνουν ότι η προ επεξεργασία με προβιοτικό μπορεί να αποτρέψει λοιμώξεις από το *H. pylori* και ότι η χορήγηση προβιοτικών μείωσε σημαντικά μια υπάρχουσα λοίμωξη (Hamilton-Miller, 2003). Τα προβιοτικά Bifidobacteria έδειξαν πως ήταν ικανά να αναστέλλουν την ανάπτυξη, τόσο των ευαίσθητων βακτηρίων στα αντιβιοτικά, όσο και των ανθεκτικών στελεχών του *H. pylori*. Έτσι, η σύνθεση αντιμικροβιακών πεπτιδίων θα μπορούσε να είναι ένας από τους μηχανισμούς των Bifidobacteria για την καταπολέμηση των λοιμώξεων από *H. Pylori* (Collado, et al., 2005). Μελέτες σε ζώα έδειξαν ότι η προβιοτική θεραπεία είναι αποτελεσματική στη μείωση της γαστρικής φλεγμονής που σχετίζεται με το παθογόνο βακτήριο. Καμία μελέτη δεν απέδειξε την εξάλειψη της μόλυνσης, επομένως η μακροχρόνια πρόσληψη προβιοτικών προϊόντων μπορεί να παρουσιάζει ευνοϊκή επίδραση στον άνθρωπο, ιδιαίτερα μειώνοντας τον

κίνδυνο εμφάνισης διαταραχών που σχετίζονται με τη γαστρική φλεγμονή. (Harnal & Shah, 2007)

1.4.4.2 Αντικαρκινικά

Τα θετικά αποτελέσματα της αντικαρκινικής δράσης των προβιοτικών τα τελευταία χρόνια, έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον στους κλινικούς διατροφολόγους, βιομηχάνους και επιστήμονες (Suvarna & Bobby, 2005). Οι περισσότερες έρευνες περιορίζονται περισσότερο σε δοκιμές *in vitro*, αν και τα προβιοτικά θα μπορούσαν να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στην πρόληψη και εξουδετέρωση του καρκίνου. (Salminen, et al., 2010)

Η χλωρίδα του παχέος εντέρου αναφέρεται ότι μπορεί να προκαλεί καρκινογένεση που οφείλονται από μικροβιακά ένζυμα όπως η β-γλυκουρονιδάση, η αζωρουκτάση και η νιτρορεδουκτάση, τα οποία μετατρέπουν προ καρκινογόνα σε καρκινογόνα. Ορισμένα στελέχη *L. acidophilus* και *Bifidobacterium spp.* αναφέρονται ότι μειώνουν τα επίπεδα των ενζύμων αυτών στα κόπρανα, που είναι υπεύθυνα για την ενεργοποίηση των προ καρκινογόνων και συνεπώς μειώνουν τον κίνδυνο ανάπτυξης όγκου. Η αντικαρκινική δράση των προβιοτικών βακτηρίων, οφείλεται κυρίως στο αποτέλεσμα απομάκρυνσης των ενζύμων, βελτιώνοντας την ισορροπία της εντερικής μικροχλωρίδας. (Shah, 2007)

Η ηπατίτιδα Β, θεωρείται ένας από τους πιο διαδεδομένους τύπους καρκίνου. Η κατανάλωση τροφίμων, μολυσμένων με αφλατοξίνες, είναι επίσης αποδεδειγμένη αιτία καρκίνου του ήπατος. Η αφλατοξίνη Β1 προκαλεί χαρακτηριστικές γενετικές αλλαγές. Ορισμένα προβιοτικά βακτηριακά στελέχη έχουν αποδειχθεί επιτυχώς ότι δεσμεύουν και εξουδετερώνουν την αφλατοξίνη Β1 *in vivo* και έτσι μειώνουν τη βιοαπορρόφηση της τοξίνης από το έντερο. (Kumar, et al., 2012)

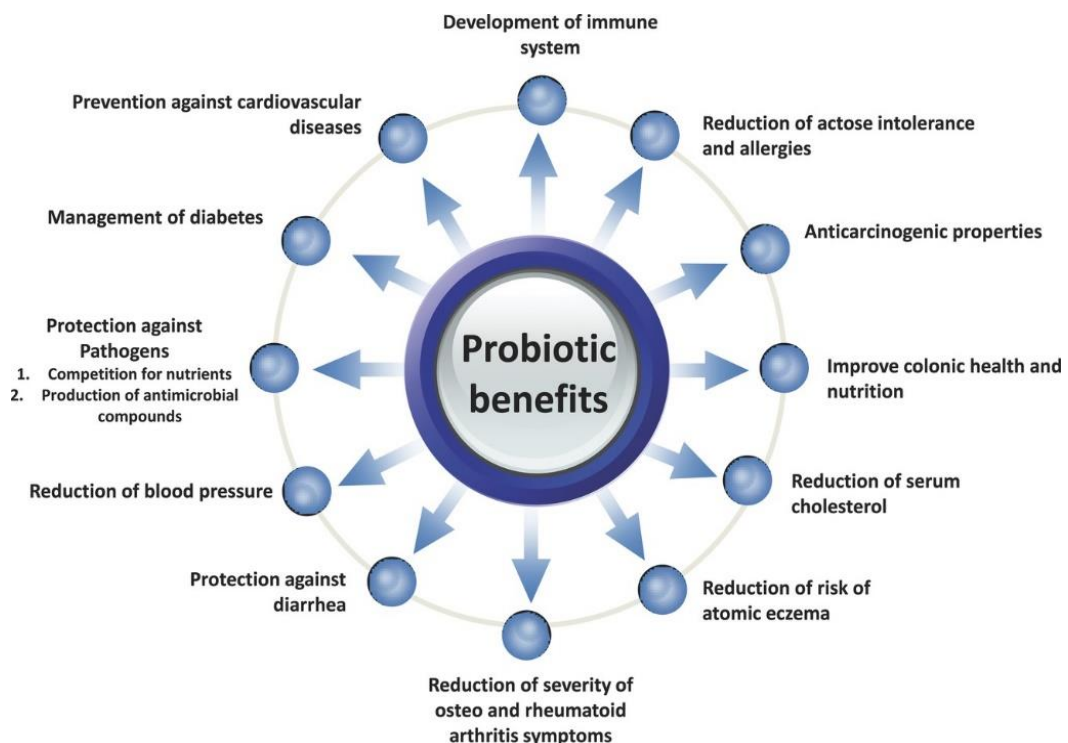
1.4.4.3 Δυσανεξία στη λακτόζη

Η δυσανεξία στη λακτόζη επηρεάζει πάνω από το 60% του ανθρώπινου πληθυσμού. Συμβαίνει όταν δεν υπάρχει η δυνατότητα αφομοίωσης της λακτόζης λόγω των χαμηλών επιπέδων δραστηριότητας του ενζύμου λακτάσης. Τα προβιοτικά στελέχη αποδείχθηκε ότι μπορούν να επιλύσουν το πρόβλημα. (Suvarna & Bobby, 2005)

1.4.4.4 Καρδιαγγειακές παθήσεις

Έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές προσπάθειες για τον εντοπισμό διαιτητικών συστατικών που θα μπορούσαν να μειώσουν τα επίπεδα της χοληστερόλης στο αίμα. Τα άτομα που πάσχουν από καρδιαγγειακές παθήσεις προσπαθούν με διάφορους τρόπους να μειώσουν την συγκέντρωση της LDL-χοληστερόλης, ενώ ταυτόχρονα να αυξήσουν την HDL-χοληστερόλη. Έχει δείξει, ότι η εισαγωγή του στελέχους *L.acidophilus* μπορεί να αυξήσει την HDL-χοληστερόλη, αφού είναι σε θέση να αφομοιώσει τη χοληστερόλη παρουσία χολής στις κυτταρικές μεμβράνες. (Nagpal, et al., 2012)

Η σωστή χρήση των ζωντανών μικροοργανισμών, πρέπει να παρέχεται στις σωστές δοσολογίες και τη διάρκεια χρήσης όπως συνιστάται από τον κατασκευαστή με βάση τα επιστημονικά στοιχεία και όπως έχει εγκριθεί στη χώρα πώλησης, για να παρέχονται οι θετικές επιδράσεις στην υγεία του ξενιστή. Κάθε προϊόν πρέπει να αναφέρει την ελάχιστη δόση που απαιτείται για να προσφέρει τα οφέλη για την υγεία. Τα προβιοτικά πρέπει να είναι σε θέση να ασκούν τα οφέλη τους στον ξενιστή μέσω της ανάπτυξης και της δραστηριότητας στο ανθρώπινο σώμα. Για να πραγματοποιηθούν αυτές οι ευεργετικές επιδράσεις, τα προβιοτικά πρέπει να έχουν την ικανότητα να επιβιώσουν και να πολλαπλασιαστούν στον ξενιστή. Έτσι, θα πρέπει να είναι ενεργά και να φτάνουν στο έντερο σε ικανοποιητικές ποσότητες. (Hotel & Cordoba, 2001)



Διάγραμμα 5: Επιδράσεις προβιοτικών μικροοργανισμών στην υγεία. (Plessas, et al., 2012)

1.4.5 Προβιοτικοί μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν ως προβιοτικές καλλιέργειες

Αν και υπάρχουν διάφορα είδη μικροοργανισμών που μπορούν να θεωρηθούν ως πιθανοί προβιοτικοί μικροοργανισμοί, αυτοί που χρησιμοποιούνται κυρίως στα τρόφιμα είναι τα βακτηρίδια από τα γένη *Lactobacillus* και *Bifidobacterium*. Ο κυριότερος λόγος που χρησιμοποιούνται τα βακτήρια αυτά, είναι για την ασφαλή ιστορική χρήση τους. Επιπλέον, τα μικρόβια του γένους *Lactobacillus* είναι οι κυρίαρχοι μικροοργανισμοί στο λεπτό έντερο και του γένους *Bifidobacterium* κυρίαρχοι στο παχύ έντερο. Τα *bifidobacteria* είναι φυσιολογικά βακτήρια του γαστρεντερικού σωλήνα του ανθρώπου και των ζώων, έχοντας την ικανότητα να αποικίζει την εντερική οδό και να ελέγχει τα ανεπιθύμητα εντερικά βακτήρια (Rivera-Espinoza & Gallardo-Navarro, 2010; Aspri, et al., 2020). Το βέλτιστο pH για την ανάπτυξη των *Bifidobacteria* είναι 6,0-7,0 και ουσιαστικά δεν υπάρχει ανάπτυξη κάτω από 4,5 ή πάνω από 8,5. Οι βέλτιστες θερμοκρασίες ανάπτυξης είναι 37–41 ° C, οι ελάχιστες είναι 25–28 ° C και οι μέγιστες είναι 43–45 ° C. Τα LAB, υπάρχουν ευρέως διαδεδομένα, στα οποία οι φυσικοί τους βιότοποι είναι πολλά φυτά και αποτελούν επίσης μέρος της γαστρεντερικής μικροχλωρίδας. Είναι σημαντικά για τη βιομηχανία τροφίμων λόγω της ικανότητάς τους να αντέχουν τις γαστρεντερικές παθήσεις, να προσκολλώνται στο εντερικό επιθήλιο, και να εμποδίζουν την ανάπτυξη ή την εισβολή παθογόνων βακτηρίων στο έντερο. Η ανάπτυξή του εμφανίζεται σε θερμοκρασία τόσο υψηλή όσο 45 ° C. Ωστόσο, το βέλτιστο βρίσκεται μεταξύ 35 και 40 ° C. Οι οργανισμοί αναπτύσσονται σε ελαφρώς όξινο περιβάλλον, pH 6,4-4,5, αλλά η ανάπτυξη θα σταματήσει σε pH 4,0-3,6, ενώ το βέλτιστο pH είναι 5,5-6,0. (Rivera-Espinoza & Gallardo-Navarro, 2010)

Μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται κυρίως ως προβιοτικές καλλιέργειες δίνονται στον πίνακα 1.

Πίνακας 1: Προβιοτικές καλλιέργειες που χρησιμοποιούνται (Georgieva, et al., 2014)

Lactobacillus species	Bifidobacterium species	Others
------------------------------	--------------------------------	---------------

<i>L. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>L. casei (rhamnosus)</i>	<i>B. longum</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>L. reuteri</i>	<i>B. breve</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>L. bulgaricus</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>L. plantarum</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>L. johnsonii</i>	<i>B. adolescentis</i>	
<i>L. lactis</i>		

Οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί είναι κυρίως ανθρώπινης προέλευσης και δεν χαρακτηρίζονται ως παθογόνοι. Είναι απαραίτητο να διατηρούν τη ζωτικότητα τους στις διεργασίες που υφίσταται το τρόφιμο, αλλά και κατά τη διέλευσή του από το GI. Απαραίτητη θεωρείται και η ανταγωνιστική τους δράση έναντι των παθογόνων μικροοργανισμών, όπως ακόμη και η ανθεκτικότητά τους σε αντιβιοτικές ουσίες. Η χορήγηση των προβιοτικών μικροοργανισμών γίνεται περισσότερο επιθυμητή από τους καταναλωτές, κυρίως σε ζυμωμένα τρόφιμα. Τα βακτηρίδια του LAB, χρησιμοποιούνται κυρίως για την διατήρηση των τροφίμων με ζύμωση, προσφέροντας οφέλη στην υγεία του καταναλωτή. Παρ' όλ' αυτά, εξετάζεται η προσθήκη των ζωντανών μικροοργανισμών σε τρόφιμα που δεν περιέχουν γάλα, όμως έχουν υποστεί ζύμωση. (Hotel & Cordoba, 2001)

1.4.6 Τρόφιμα που εισάγονται κυρίως τα προβιοτικά βακτήρια

Χιλιάδες χρόνια πριν, ο Έλληνας φιλόσοφος και πατέρας της ιατρικής, Ιπποκράτης, είχε γράψει: «Αφήστε το φαγητό να είναι το φάρμακό σας και αφήστε το φάρμακο να είναι η τροφή σας». Αυτή η έννοια, μπορεί να θεωρηθεί πως έχει φθάσει, καθώς έχει ανακαλυφθεί η τροφική αξία των “λειτουργικών τροφίμων”. Η χρήση των προβιοτικών και πρεβιοτικών, θεωρείται ένας από τους πιο υποσχόμενους τομείς για την ανάπτυξη λειτουργικών συστατικών τροφίμων, τα οποία οι επιστημονικές έρευνες έχουν επιδείξει πως έχουν θεραπευτική δράση. (Harnal & Shah, 2007)

Κυριότερες τροφές πλούσιες σε προβιοτικά βακτήρια:

1.4.6.1 Γιαούρτι

Το γιαούρτι θεωρείται ένα από τις κύριες τροφές που περιέχουν προβιοτικά βακτήρια. Έχει αναγνωριστεί από καιρό ως ένα προϊόν με θετικές επιπτώσεις στον καταναλωτή. Σημαντικό είναι, να αναγράφεται πάνω η προσθήκη των προβιοτικών και να μην υπάρχουν πρόσθετα σάκχαρα. (Lourens-Hattingh & Viljoen, 2001)

1.4.6.2 Μαύρη σοκολάτα

Στη μαύρη σοκολάτα δεν υπάρχει μόνο προβιοτικά αλλά και πρεβιοτικά, τα οποία είναι διαιτητικές ίνες, που τρέφονται τα φιλικά βακτήρια του εντέρου. Πολλές έρευνες έδειξαν πως για να έχουν τη θετική επίδραση τα προβιοτικά στη μαύρη σοκολάτα, θα πρέπει το κακάο να μην είναι λιγότερο από 70% σε περιεκτικότητα και να μην περιέχει προστιθέμενη ζάχαρη. (Succi, et al., 2017)

1.4.6.3 Κεφίρ

Το κεφίρ είναι ένα από τα πιο γνωστά προβιοτικά προϊόντα, το οποίο θεωρείται ως ένα ισχυρό συμπλήρωμα διατροφής. Συμπεριλαμβάνει βακτήρια γαλακτικού οξέος (*Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus parabuchneri* και *Acetobacter lovaniensis*) και ζυμομύκητες όπως *Saccharomyces cerevisiae*. Τα τελευταία χρόνια, έρευνες έδειξαν ότι τα διατροφικά προβιοτικά όπως το κεφίρ, έχουν μεγάλες δυνατότητες πρόληψης και θεραπείας του καρκίνου. Επιπλέον, βοηθά στη δυσανεξία των γαλακτοκομικών, οδηγώντας στη σωστή λειτουργία του εντέρου. (Sharifi, et al., 2017)

1.4.6.4 Ορισμένα τυρία, όπως τσένταρ, γκούντα, παρμεζάνα

Το pH, θεωρείται ένα από τα πιο σημαντικά χαρακτηριστικά του τυριού, που επηρεάζει την ανάπτυξη των προβιοτικών βακτηριδίων. Τα βακτήρια που χρησιμοποιούνται στην παραγωγή των τυριών, χρειάζονται λιγότερο όξινο περιβάλλον απ' ότι στο ζυμομύκητα για να αναπτυχθούν. Γι' αυτό το λόγο, τα προβιοτικά βρίσκονται κυρίως στο κέντρο του τυριού, καθώς το pH είναι πιο κοντά στη βέλτιστη τιμή τους. Τέλος, η υψηλή περιεκτικότητα των τυριών σε λίπος, προστατεύει τα βακτηρίδια κατά την διέλευσή

τους στο έντερο. Έτσι, τα ώριμα τυριά, θεωρούνται ωφέλιμα, γιατί διατηρούν τα ευεργετικά βακτήρια που έχουν. (Plessas, et al., 2012)

1.4.7 Τρόπος δράσης τους και η επίδραση τους στη λειτουργία του εντέρου

Είναι σημαντικό να κατανοήσουμε τη φυσιολογία, τη μικροβιολογία του γαστρεντερικού σωλήνα και τη πεπτική διαδικασία, για να κατανοήσουμε τον τρόπο δράσης των προβιοτικών μικροοργανισμών. Η πεπτική διαδικασία αρχίζει με την εισαγωγή του φαγητού στο στόμα και στη συνέχεια στο στομάχι. Η διαδικασία της πέψης μετασχηματίζει τις θρεπτικές ουσίες και τις βιοδραστικές ενώσεις που περιέχονται στο φαγητό σε φυσιολογικές δραστικές ενώσεις. (Kopf-Bolanz, et al., 2012)

Η θετική επίδραση των προβιοτικών, αρχίζει με την εισαγωγή τους στην εντερική μικρολωρίδα. Αυτοί οι ευεργετικοί μικροοργανισμοί, ενώνονται με τα βακτήρια του εντέρου, τα οποία δρουν μαζί με τα θρεπτικά συστατικά και εκτελούν θετικές ενέργειες για την προαγωγή της υγείας στην ανθρώπινη φυσιολογία. (Thantsha, et al., 2012)

Αναλυτικότερα, τα προβιοτικά, όταν προσλαμβάνονται από το στόμα, περνούν από το στομάχι και προσκολλώνται στο εντερικό βλεννογόνο, αποτρέποντας την επιθηλιακή προσκόλληση των παθογόνων βακτηρίων, παρέχοντας ανταγωνιστικό πλεονέκτημα. Τα κυριότερα βακτήρια που χρησιμοποιούνται, LAB και Bifidobacterium, παράγουν γαλακτικό, οξικό και προπιονικό οξύ, με αποτέλεσμα να μειώνουν το pH. Αυτό οδηγεί στην αναστολή της ανάπτυξης των αρνητικών κατά Gram παθογόνων βακτηρίων. Εμποδίζοντας την ανάπτυξη των παθογόνων, βελτιώνεται η φυσιολογική εντερική χλωρίδα, ευνοώντας την ανάπτυξη των καλών βακτηρίων. Ουσιαστικά, τα προβιοτικά ανταγωνίζονται τους παθογόνους μικροοργανισμούς στη γαστρεντερική οδό, παράγοντας “αντιμικροβιακές” ουσίες. (Islam, 2016)

Όταν προστίθενται προβιοτικοί μικροοργανισμοί στα τρόφιμα, είναι σημαντικό να ελέγχονται οι παράγοντες που μπορεί να επηρεάσουν την επιβίωση και τη δραστηριότητα του προϊόντος κατά την είσοδο στο GI του καταναλωτή. Πρώτος παράγοντας θα πρέπει να είναι η φυσιολογική κατάσταση των προβιοτικών μικροοργανισμών που προστίθενται. Δεύτερος παράγοντας, είναι η συγκέντρωση τους τη στιγμή της κατανάλωσης, καθώς μελέτες έχουν αποκαλύψει ότι εμπορικά προϊόντα

δεν διατηρούν το επιθυμητό αριθμό βιώσιμων βακτηρίων. Τρίτος, θεωρείται η συνθήκες αποθήκευσης του προϊόντος, και τελικός παράγοντας αποτελεί η χημική σύσταση του στο οποίο θα προστεθούν τα προβιοτικά βακτήρια, όπως είναι το pH. (Rivera-Espinoza & Gallardo-Navarro, 2010)

Σύμφωνα με μελέτες, η πιο συχνή χρήση προβιοτικών γίνεται για ασθενείς του γαστρεντερικού. Δεν έχει γίνει κάποια αναφορά που να αποδεικνύει ότι η χρήση των προβιοτικών προσφέρει όφελος σε κάποιες άλλες ασθένειες πέρα από του γαστρεντερικού σωλήνα. Χρειάζονται περαιτέρω μελέτες για τον ακριβή τρόπο δράση των προβιοτικών. (Islam, 2016)

1.4.8 Μελλοντικές προβλέψεις

Για να είναι ξεκάθαρη η θετική επίδραση και η αποτελεσματικότητα των προβιοτικών που χρησιμοποιούνται σήμερα στην αγορά, απαιτούνται περισσότερες δοκιμές, έτσι ώστε να αποδείξουν πως τα προβιοτικά χαρακτηρίζονται ως προστατευτικοί παράγοντες και όχι ως θεραπευτικοί. Τα προβιοτικά, δεν μπορούν να αντικαταστήσουν τα αντιβιοτικά, αλλά μπορούν να καταστήσουν τον ξενιστή πιο ανθεκτικό σε ασθένειες, μειώνοντας έτσι τη συχνή χρήση των αντιβιοτικών. (Fuller, 1991)

Πολλές μελέτες, έχουν επιδείξει την αξία των ωφέλιμων μικροβίων με τη χρήση των προβιοτικών, μειώνοντας τη θνησιμότητα και τη νοσηρότητα των πρόωρων νεογνών με χαμηλό βάρος γέννησης. Παρόλο που δεν έχουν δείξει όλες οι μελέτες αποτελεσματικότητα, οι περισσότερες καταλήγουν στην θετική επίδραση των προβιοτικών στην πρόληψη της διάρροιας. (Reid, 2017)

Σύμφωνα με πολυάριθμες μελέτες, οι καταναλωτές είναι επίσης όλο και περισσότερο στοχαστικοί σε θέματα υγείας και είναι πρόθυμοι να υιοθετήσουν αλλαγές στην διατροφή τους με γνώμονα την υγεία (Siró, et al., 2008). Η ανάπτυξη μη γαλακτοκομικών προβιοτικών τροφίμων έχει προσελκύσει πολλούς επιστήμονες, επιτρέποντας την κατανάλωση αυτών των ωφέλιμων μικροοργανισμών από άτομα που δεν τους αρέσουν τα γαλακτοκομικά προϊόντα ή με δυσανεξία στη λακτόζη ή αλλεργία στα συστατικά του γάλακτος. Τα προβιοτικά μη γαλακτοκομικά προϊόντα έχουν μεγάλο μέλλον μάρκετινγκ, καθώς πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει την εφαρμογή στελεχών που προσαρμόζονται καλά σε εναλλακτικά τρόφιμα (Aspri, et al., 2020). Πρέπει να

ληφθεί υπόψη, ότι τα λειτουργικά τρόφιμα πωλούνται σε υψηλότερες τιμές, πράγμα το οποίο επηρεάζει τους καταναλωτές. (Siró, et al., 2008)

1.5 Πρεβιοτικά

Ο όρος “prebiotics” εισήχθη από τους Gibson και Roberfroid που άλλαξαν το "pro" σε "pre", που σημαίνει "πριν" ή "για". Καθορίζονται ως τα "μη εύπεπτα συστατικά των τροφίμων, που επηρεάζουν ευεργετικά τον ξενιστή διεγείροντας την ανάπτυξη και / ή τη δραστηριότητα ενός ή περιορισμένου αριθμού βακτηριδίων, βελτιώνοντας έτσι την υγεία του ξενιστή" (Schrezenmeir & Vrese, 2001). Τα πρεβιοτικά είναι τα άπεπτα συστατικά τροφίμων που προκαλούν την ανάπτυξη και τη δραστηριότητα ευνοϊκών βακτηρίων στο έντερο, ωφελώντας έτσι τον ξενιστή, προσθέτοντας επίσης δυνητικά χαρακτηριστικά υφής στα τρόφιμα. (Aspri, et al., 2020)

Με άλλα λόγια, ένα πρεβιοτικό είναι "ένα επιλεκτικά ζυμωμένο συστατικό, το οποίο επιτρέπει συγκεκριμένες αλλαγές στη σύνθεση αλλά και στη δραστηριότητα της γαστρεντερικής μικροχλωρίδας που προσδίδει οφέλη στην ευημερία και την υγεία του ξενιστή" (Roberfroid, 2007). Είναι ορισμένα θρεπτικά συστατικά που τροποποιούν τη μικροβιακή χλωρίδα του εντέρου, αν και δεν χωνεύονται εύκολα από τον άνθρωπο, αλλά έχουν επιλεκτικό ρόλο στη διέγερση της ανάπτυξης ή της δραστηριότητας ωφέλιμων βακτηριακών ειδών στο έντερο. (George Kerry, et al., 2018)

Σήμερα, μόνο 2 διαιτητικοί μη αφομοιώσιμοι ολιγοσακχαρίτες πληρούν όλα τα κριτήρια για την πρεβιοτική ταξινόμηση. Η ινουλίνη και η ολιγοφρουκτόζη, χαρακτηρίζονται ως τα πιο μελετημένα και καθιερωμένα πρεβιοτικά συστατικά. Τα πρεβιοτικά μπορεί να ωθήσουν την ανάπτυξη και την επιβίωση των προβιοτικών μικροοργανισμών. Λόγω αυτής της συνέργειας, μεταξύ των προβιοτικών και πρεβιοτικών, τα τρόφιμα με αυτόν το συνδυασμό αναφέρονται ως συμβιωτικά. (Siró, et al., 2008)

Η ημερήσια δόση του πρεβιοτικού δεν είναι καθοριστικός παράγοντας της πρεβιοτικής επίδρασης, η οποία επηρεάζεται κυρίως από τον αριθμό των bifidobacteria στα κόπρανα πριν αρχίσει η συμπλήρωση της διαίτας με το πρεβιοτικό. Το εισπνεόμενο πρεβιοτικό διεγείρει ολόκληρο τον αυτόχθον πληθυσμό των bifidobacteria στην ανάπτυξη και όσο μεγαλύτερος είναι ο πληθυσμός, τόσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των νέων βακτηριακών κυττάρων που εμφανίζονται στα κόπρανα. (Tuohy, et al., 2003)

Η βιομηχανία τροφίμων ενδιαφέρεται για τα πρεβιοτικά για την εφαρμογή τους και υπόσχεται ως λειτουργικά συστατικά σε τρόφιμα που απευθύνονται σε καταναλωτές που ενδιαφέρονται για την υγεία. Τα οφέλη, από τη διατήρηση και την ενίσχυση της υγείας του εντέρου, τη διαμόρφωση του ανοσοποιητικού συστήματος, τη μείωση της γλυκαιμικής απόκρισης και τη μείωση της αντίστασης στην ινσουλίνη, ενδιαφέρουν τους καταναλωτές και συνεπώς ελκυστικούς στόχους για νέα λειτουργικά τρόφιμα. (Hutkins, et al., 2016)

1.5.1 Είδη πρεβιοτικών

Τα πρεβιοτικά που υπάρχουν κυρίως στην αγορά είναι συνήθως ολιγοσακχαρίτες, που δρουν ως υποστρώματα ειδικά για τα εγγενή προβιοτικά βακτηρίδια του ξενιστή και ενθαρρύνουν έτσι την ανάπτυξή τους. Οι γαλακτοολιγοσακχαρίτες (GOS), οι φρουκτοολιγοσακχαρίτες (FOS) και η ινουλίνη είναι τα πιο γνωστά πρεβιοτικά. Τα πρεβιοτικά επιλέγονται ως μη εύπεπτα από τον ξενιστή και δεν μεταβολίζονται από τη μικροβιακή χλωρίδα του εντέρου όπως *Bacteroides spp* και *Escherichia coli*. Τα πρεβιοτικά διατίθενται φυσικά στο μητρικό γάλα και σε ορισμένα λαχανικά, κυρίως αγκινάρες και κρεμμύδια, και ως συνθετικοί ολιγοσακχαρίτες που βασίζονται σε φρουκτόζη ή γαλακτόζη, γνωστό ως FOS και GOS αντίστοιχα. Τα τελευταία μπορούν να προστεθούν στα τρόφιμα ή σε συνδυασμό με ένα προβιοτικό (Hamilton-Miller, 2004). Τα είδη πρεβιοτικών τα οποία τα συναντάμε στα τρόφιμα, καταγράφονται στο πίνακα 2.

Πίνακας 2: Είδη πρεβιοτικών και σε ποια τρόφιμα τα συναντάμε (Al-Sheraji, et al., 2013)

ΕΙΔΗ ΠΡΕΒΙΟΤΙΚΩΝ	ΤΡΟΦΙΜΑ
Φρουκτοολιγοσακχαρίτες	Σπαράγγια, κρεμμύδι, σκόρδο, σιτάρι, μέλι, κριθάρι, μπανάνα, ντομάτα
Ισομαλτουλόζη	Μέλι, χυμός ζαχαροκάλαμου
Ξυλοολιγοσακχαρίτες	Φρούτα, γάλα, μέλι,
Γαλακτοολιγοσακχαρίτες	Αγελαδινό και μητρικό γάλα
Κυκλοδεξτρίνες	Υδατοδιαλυτές γλυκάνες
Ολιγοσακχαρίτες ραφινόζης	Σπόροι με όσπρια, φακές, μπιζέλια, φασόλια, ρεβίθια, μουστάρδα

Ολιγοσακχαρίτης σόγιας	Σόγια
Λακτουλόζη	Λακτόζη
Λακτοσακχαρόζη	Λακτόζη
Μαλτοολιγοσακχαρίτες	Άμυλο
Ισομαλτοολιγοσακχαρίτες	Άμυλο

1.5.2 Τρόπος δράσης

Η γαστρεντερική οδός, ιδιαίτερα το κόλον, είναι πολύ πυκνοκατοικημένη με βακτήρια. Τα περισσότερα βακτήρια είναι καλοήθεις. Ωστόσο, ορισμένα είδη εντέρου είναι παθογόνα και μπορεί να εμπλέκονται στην εμφάνιση οξέων και χρόνιων διαταραχών. Το πρεβιοτικό είναι ένα μη ενεργό συστατικό τροφίμων που μετατοπίζεται στο κόλον και στη συνέχεια επιλεκτικά ζυμώνεται. Το όφελος για τον ξενιστή διαμεσολαβείτε κατά τη διάρκεια επιλεκτικής διέγερσης της ανάπτυξης και της δραστηριότητας ενός ή ενός περιορισμένου αριθμού βακτηρίων. Τα πρεβιοτικά περνούν από το λεπτό έντερο στο χαμηλότερο έντερο και γίνονται προσιτά για προβιοτικά βακτήρια χωρίς να χρησιμοποιούνται από άλλα εντερικά βακτηρίδια. Τα πρεβιοτικά φτάνουν στο τυφλό χωρίς να υποβάλλονται σε πέψη εξαιτίας της χημικής τους φύσης. Ένα μέρος του υλικού δεν χωνεύεται από τα ένζυμα του παγκρέατος και του μικρού εντέρου, και κατά συνέπεια φθάνει στο μεγάλο έντερο. (Manning & Gibson, 2004)

1.5.3 Ευεργετικά αποτελέσματα

1.5.3.1 Παχυσαρκία

Οι ολιγοσακχαρίτες παίζουν σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της παχυσαρκίας, αφού προσφέρει αύξηση αίσθησης κορεσμού και μειωμένη την αίσθηση της πείνας (Siró, et al., 2008). Έχει δοκιμαστεί μια θεραπεία παχύσαρκων ατόμων με πρεβιοτικά τύπου φρουκτάνης, η θεραπεία διήρκησε τρεις μήνες, μειώνοντας το σωματικό βάρος και τη μάζα λίπους. Επιπλέον, η κατάποση των πρεβιοτικών πραγματοποιήθηκε και σε μη παχύσαρκα άτομα για ένα χρόνο, με αποτέλεσμα να διατηρεί το ΔΜΣ και τη μάζα λίπους (Delzenne, et al., 2013). Τα πρεβιοτικά της φρουκτάνης θα μπορούσαν να επηρεάσουν τον κορεσμό στους ανθρώπους, επηρεάζοντας την ορμονική ρύθμιση και

επομένως την όρεξη σε υπέρβαρους ανθρώπους (Rastall & Gibson, 2015). Παρόμοια αποτελέσματα έχουν παρατηρηθεί με πρεβιοτικά ολιγοφρουκτόζης για περίοδο δύο εβδομάδων. Αξιολογήθηκαν στο τέλος ως προς την πείνα, τον κορεσμό και την κατανάλωση τροφής, με αποτέλεσμα να αποδειχθεί ότι η θεραπεία αυξάνει τον κορεσμό μετά το πρωινό και το δείπνο και μειώνει την πείνα και την πιθανή κατανάλωση τροφής (Cani, et al., 2006). Οι Parnell & Reimer, 2009, εξέτασαν την ολιγοφρουκτόζη στο σωματικό βάρος και την αίσθηση του κορεσμού σε υπέρβαρους και παχύσαρκους ενήλικες. Καθημερινά προσλάμβαναν 21g ολιγοφρουκτόζης, με αποτέλεσμα να υπάρξει μείωση του βάρους ανεξάρτητα από τον τρόπο ζωής. (Parnell & Reimer, 2009)

1.5.3.2 Ανθεκτικότητα στα παθογόνα

Βελτιώνουν την ανθεκτικότητα στα παθογόνα αυξάνοντας τα bifidobacteria και τα LAB. Τα πρεβιοτικά έχουν την δυνατότητα να βελτιώσουν την υγεία, ελέγχοντας την ανισορροπία των μικροβίων του εντέρου, αυξάνοντας τα υγιή βακτήρια και αναστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό των παθογόνων βακτηρίων, (Farias, et al., 2019). Οι περισσότερες μελέτες για πρεβιοτικά στον άνθρωπο, έχουν ως επίκεντρο την χρήση ινουλίνης και FOS. Η ικανότητα αυτών των πρεβιοτικών συστατικών, είναι η προώθηση συγκεκριμένων ομάδων βακτηρίων, κυρίως των bifidobacteria (Aragon-Alegro, et al., 2007). Τα πρεβιοτικά, καθώς εισέρχονται στο έντερο σε άθικτη μορφή, έχουν στόχο να προσφέρουν οφέλη για την υγεία, παρόμοια με αυτά των προβιοτικών. Επομένως και οι δύο προσεγγίσεις στοχεύουν την ενίσχυση των δραστηριοτήτων να «προάγουν την υγεία». (Fuller & Gibson, 1998)

1.5.3.3 Αντικαρκινικά

Το πρεβιοτικό λακτουλόζη, μπορεί να προστατεύσει άμεσα από βλάβες του DNA σε ζωικά μοντέλα τα οποία έχουν προσβληθεί από ενεργούς καρκινικούς παράγοντες. Τέτοιες μελέτες δείχνουν ότι τα πρεβιοτικά ενδέχεται να έχουν τη δυνατότητα να περιορίσουν τον κίνδυνο του καρκίνου του παχέος εντέρου. Δεν είναι σαφής ο μηχανισμός δράσης των πρεβιοτικών κατά του καρκίνου, αλλά πιθανών να περιλαμβάνει αλλαγές στη μικροχλωρίδα του εντέρου, παράγοντας βουτυρικό οξύ, το οποίο δρα έναντι των καρκινικών κυττάρων. Παρατηρείτε η μείωση της δραστηριότητας των μικροβιακών ενζύμων που εμπλέκονται στην παραγωγή τοξινών και καρκινογόνων μεταβολιτών, όπως και η συγκέντρωσή τους στα κόπρανα. Η

ινουλίνη και η FOS έχουν μειώσει τον αριθμό και το μέγεθος των προ καρκινικών αλλοιώσεων, καθώς και η εμφάνιση όγκων σε αρουραίους που έχουν υποστεί αγωγή καρκινογόνου (Tuohy, et al., 2003). Μια άλλη μελέτη σίτισης του GOS στον άνθρωπο, είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση καρκινογόνων ουσιών και κάποιων προϊόντων πρωτεόλυσης. Οι επιδράσεις αυτές εμφανίστηκαν κατά την προσθήκη του GOS, με αποτέλεσμα να υπάρχει αύξηση των LAB και Bifidobacteria έναντι των παθογόνων. (Al-Sheraji, et al., 2013)

Η ημερήσια συνιστώμενη δόση πρεβιοτικών δεν έχει ακριβώς καταχωρηθεί, αλλά οι δόσεις 4-20 g / ημέρα έχουν δείξει αποτελεσματικότητα. Η ελάχιστη ημερήσια δόση 4 g / ημέρα ινουλίνης ή FOS βοηθά στην αύξηση των bifidobacteria του εντέρου. Παρόλο που τα πρεβιοτικά έχουν αποδειχθεί επανειλημμένα ότι αυξάνουν τον αριθμό των bifidobacteria στο επίπεδο του γένους *in vivo*, λίγες πληροφορίες είναι διαθέσιμες σχετικά με το στέλεχος ή την εξειδίκευση ειδών διαφορετικών πρεβιοτικών στο ανθρώπινο έντερο (Tuohy, et al., 2003). Παρ' όλ' αυτά η ζύμωση του FOS στο κόλον οδηγεί στην παραγωγή υδρογόνου και διοξειδίου του άνθρακα που μπορεί να προκαλέσει δυσφορία στους ανθρώπους. Οπότε, η υπερβολική πρόσληψη πρεβιοτικών, πέρα των 20g/ημέρα, ιδιαίτερα των ολιγοσακχαριτών, μπορεί να προκαλέσει κοιλιακή δυσφορία όπως φούσκωμα και διάταση. (Al-Sheraji, et al., 2013)

1.5.4 Κριτήρια ένταξης των πρεβιοτικών

Πολλά συστατικά τροφίμων έχουν οριστεί ότι έχουν πρεβιοτική δράση, όπως ολιγοσακχαρίτες και πολυσακχαρίτες. Υπάρχουν κριτήρια για την ταξινόμηση ενός συστατικού για να οριστεί ως πρεβιοτικό. Τα κριτήρια αυτά είναι:

- Αντοχή στη γαστρική οξύτητα και γαστρεντερική απορρόφηση
- Ζύμωση από εντερική μικροχλωρίδα
- Εκλεκτική διέγερση την ανάπτυξης και της δραστηριότητας των εντερικών βακτηριδίων που συμβάλλουν στην υγεία και την ευημερία. (Roberfroid, 2007)

1.5.5 Τρόφιμα που εντάσσονται τα πρεβιοτικά

Τα πρεβιοτικά βρίσκονται σε διάφορα λαχανικά και φρούτα και θεωρούνται λειτουργικά συστατικά τροφίμων τα οποία παρουσιάζουν σημαντικά τεχνολογικά πλεονεκτήματα. Βελτιώνουν τα αισθητήρια χαρακτηριστικά και παρέχουν μια πιο

ισορροπημένη διατροφική σύνθεση. Όταν τα πρεβιοτικά χρησιμοποιούνται σε προϊόντα αρτοποιίας και δημητριακά για πρωινό, αυτό αποτελεί σημαντική πρόοδο σε σύγκριση με τις κλασικές διαιτητικές ίνες. (Al-Sheraji, et al., 2013)

Τα πρεβιοτικά βελτιώνουν τα τρόφιμα χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά χωρίς καμία δυσμενή επίδραση στη γεύση ή την υφή. Αυτό είναι σημαντικό σε προϊόντα όπως είναι το βούτυρο, τα γαλακτοκομικά προϊόντα, τα τυριά κρέμας και τα επεξεργασμένα τυριά. Επιπλέον, σχηματίζουν μια ομάδα από διάφορα συστατικά από υδατάνθρακες, που δεν είναι απολύτως κατανοητά ως προς την προέλευσή τους και τις δοσολογίες που απαιτούνται για τις επιπτώσεις στην υγεία. Ορισμένες από τις πηγές πρεβιοτικών περιλαμβάνουν: το μητρικό γάλα, τις σπόρους σόγιας, τις πηγές ινουλίνης, την ωμή βρώμη, το μη επεξεργασμένο σιτάρι, το ακατέργαστο κριθάρι, τους μη εύπεπτες υδατάνθρακες και ιδιαίτερα τους μη εύπεπτες ολιγοσακχαρίτες. (Al-Sheraji, et al., 2013)

2 Σκοπός εργασίας

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να διερευνηθεί η περίπτωση προσθήκης και επιβίωσης των προβιοτικών μικροοργανισμών, αλλά και η περιεκτικότητα πρεβιοτικών στη μαύρη σοκολάτα. Στόχος, ήταν να αναφερθεί η βιωσιμότητα των ζωντανών μικροοργανισμών στη μαύρη σοκολάτα, ώστε να επιδράσουν θετικά στην ανθρώπινη υγεία. Μέσα από τις σχετικές έρευνες, πρέπει να αποδειχθεί κατά πόσο, οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί και τα πρεβιοτικά που επιλέγονται, μπορούν να επιβιώσουν, και εάν θα υπάρξουν αλλαγές στις φυσικοχημικές ιδιότητες του προϊόντος, όσο αφορά τις μικροβιολογικές αναλύσεις και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, γεύση, οσμή, εμφάνιση και υφή. Τέλος, ο λόγος που επιλέχθηκαν όλοι αυτοί οι ζωντανοί μικροοργανισμοί, είναι λόγω της θετικής επίδρασης που προσφέρουν στην ανθρώπινη υγεία και της ικανότητας τους να παραμένουν ζωντανοί μέσα στο έντερο, σύμφωνα με μελέτες της διεθνούς βιβλιογραφίας.

3 Αξιολόγηση των προβιοτικών μικροοργανισμών και πρεβιοτικών συστατικών στη μαύρη σοκολάτα

Για σκοπούς υλοποίησης της πτυχιακής εργασίας, έχουν γίνει συνεχείς μελέτες που να αποδεικνύουν την δραστικότητα και την επιβίωση των προβιοτικών μικροοργανισμών και των πρεβιοτικών. Στις σχετικές έρευνες, έδειξε την ικανότητα επιβίωσης αρκετών στελεχών προβιοτικών μικροοργανισμών του LAB, αλλά κάτω από κατάλληλες συνθήκες αποθήκευσης.

Όπως έχει αναφερθεί στα πιο πάνω, η μαύρη σοκολάτα αναγνωρίζεται ως πηγή διάφορων βιοδραστικών ενώσεων, όπως φλαβονοειδή και πολυφαινόλες που διαθέτουν υψηλές αντιοξειδωτικές δραστικότητες. Χάρη σ' αυτών των αντιοξειδωτικών ενώσεων, η σοκολάτα μπορεί να θεωρηθεί ως καλύτερος προβιοτικός φορέας σε σχέση με τα γαλακτοκομικά προϊόντα για εντερική παράδοση (Succi, et al., 2017). Επιπλέον, οι φαινολικές ενώσεις στη σοκολάτα μπορούν επίσης να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στην καθυστέρηση του οξειδωτικού στρες στα προβιοτικά, η οποία αποτελεί μία από τις κύριες αιτίες του προβιοτικού θανάτου στα τρόφιμα, οδηγώντας σε βελτιωμένη βιωσιμότητα και παρατεταμένη διάρκεια ζωής. (Silva, et al., 2017)

3.1 Παρουσίαση μελετών

3.1.1 Παρασκευή σοκολάτας με προσθήκη προβιοτικών μικροοργανισμών και πρεβιοτικών συστατικών

Οι Kemsawasd, et al., 2016, χρησιμοποίησαν διαφορετικούς τύπους σοκολάτας για την προσθήκη προβιοτικών στελεχών, *L. casei* 01 και *L. acidophilus* LA5. Οι τρεις διαφορετικοί τύποι σοκολάτας που χρησιμοποιήθηκαν, λευκή, σοκολάτα γάλακτος και μαύρη, αναμίχθηκαν με την ίδια ποσότητα προβιοτικών, 10% (w/w), με εξαίρεση τα συστατικά τους ως προς το βούτυρο κακάο και τη σκόνη κακάο. Όλα τα συστατικά, πριν την προσθήκη των προβιοτικών μικροοργανισμών, αναμίχθηκαν, θερμάνθηκαν, αναδεύτηκαν και αμέσως ψύχθηκαν και τελικά εμβολιάστηκαν. Τα προβιοτικά παρασκευάσματα, είχαν προστεθεί στις σοκολάτες, τα οποία είχαν αποθηκευτεί στους 4° C και 25 ° C για 60 ημέρες. (Kemsawasd, et al., 2016). Σε μια άλλη μελέτη των

Mirkonić, et al., 2018, πραγματοποιήθηκε η εξέταση της βιωσιμότητας δύο προβιοτικών μικροοργανισμών *Lactobacillus plantarum* 564 (πιθανό προβιοτικό) και *Lactobacillus plantarum* 299 (εμπορικό προβιοτικό) σε μαύρη σοκολάτα. Η προσθήκη των προβιοτικών στελεχών πραγματοποιήθηκε με τη διαδικασία ενθυλάκωσης χρησιμοποιώντας ξήρανση με ψεκασμό, όπου προστέθηκαν 10% (w/w) σκόνης ξηραμένων με ψεκασμό κυττάρων και αποθηκεύτηκαν για 360 ημέρες σε θερμοκρασία δωματίου. (Mirkonić, et al., 2018). Οι Norhayati, et al., 2013, αναφέρουν την επίδραση των πρεβιοτικών στη μαύρη σοκολάτα, με την προσθήκη ινουλίνης, στη μαύρη σοκολάτα. Η ινουλίνη προστέθηκε για αντικατάσταση σακχάρου, έτσι ώστε να υπάρξει σύγκριση με τον έλεγχο(μαύρη σοκολάτα με υψηλή περιεκτικότητα σακχάρων). Η πρεβιοτική μαύρη σοκολάτα, αποθηκεύτηκε στους 18° C με 60% σχετική υγρασία(RH), και στους 25° C με 80% RH, όπως έγινε και στον έλεγχο, για 12 μήνες (Norhayati, et al., 2013). Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε η προσθήκη προβιοτικού *Lactobacillus paracasei*, σε σοκολάτα, όπως επίσης και πρεβιοτικά συστατικά, ταγατόζη και GOS. Χρησιμοποιήθηκαν διάφορες συγκεντρώσεις των πρεβιοτικών, αντικαθιστώντας την σακχαρόζη. Η βιωσιμότητα των προβιοτικών πραγματοποιήθηκε στους 22° C για έξι μήνες. (Rad, et al., 2018)

3.1.2 Μέθοδος μικροβιολογικών αναλύσεων

Ο στόχος των μικροβιολογικών αναλύσεων ήταν να εξεταστεί η επιβίωση του προβιοτικού που προστέθηκαν στη σοκολάτα. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν αυτή των τρυβλίων.

Παράδειγμα μικροβιολογικών αναλύσεων αντιπροσωπεύει το πείραμα των Mirkonić, et al., 2018, όπου με την προσθήκη των προβιοτικών στελεχών, οι αριθμοί βιώσιμων κυττάρων προσδιορίστηκαν με την τυπική μέθοδο των τρυβλίων και οι τιμές εκφράστηκαν ως μονάδες σχηματισμού αποικιών ανά γραμμάριο (cfu / g) σοκολάτας. Δέκα γραμμάρια μαύρης σοκολάτας ομογενοποιήθηκαν σε 90 ml αλατούχου διαλύματος (0,9% NaCl) σε συσκευή Stomacher. Παρασκευάστηκαν σειριακές αραιώσεις και κατάλληλες αραιώσεις τοποθετήθηκαν σε άγαρ MRS. Οι συνολικοί αριθμοί βακτηρίων προσδιορίστηκαν μετά από 48 ώρες επώασης στους 37 ° C υπό αναερόβιες συνθήκες. Η βιωσιμότητα και των δύο βακτηριακών στελεχών αναλύθηκε εις τριπλούν αμέσως μετά την παραγωγή και μετά από 60, 90, 180, 270 και 360 ημέρες

αποθήκευσης στους 20 ° C (Mirkonić, et al., 2018). Στο πείραμα του Foong, et al.,(2013), πραγματοποιήθηκαν εκατό μικρόλιτρα του εναιωρήματος και απλώθηκαν σε άγαρ MRS και επώαστηκαν αναερόβια στους 37° C για 24-48 ώρες. (Foong, et al., 2013)

3.1.2.1 Αρίθμηση αποικιών

Τα προβιοτικά, πρέπει να ανέχονται και τις διαφορετικές δυσμενείς συνθήκες που συναντώνται στη βιομηχανική παραγωγή και κατά την αποθήκευση, επειδή τα οφέλη για την υγεία οφείλονται στην παρουσία μεγάλου αριθμού βιώσιμων και μη καταπονημένων μικροβιακών κυττάρων. Τα προβιοτικά προϊόντα πρέπει να περιέχουν προβιοτικούς μικροοργανισμούς σε επίπεδα άνω των 10⁶ cfu / g (cfu / mL) έως το τέλος της διάρκειας ζωής τους. Τέλος, στην παραγωγή μαύρης σοκολάτας, οι παράγοντες όπως η θερμοκρασία, το οξυγόνο, η ωσμωτική πίεση, η δραστηριότητα του νερού και ούτω καθεξής θα μπορούσαν να είναι κρίσιμοι για την επιβίωση των βακτηριακών κυττάρων. (Neffe-Skocińska, et al., 2018)

3.1.3 Προσδιορισμός πρεβιοτικών

Με την προσθήκη των πρεβιοτικών, πρέπει να μετρηθεί η περιεκτικότητά τους, έτσι ώστε να παρατηρηθεί και να συγκριθεί η πρεβιοτική μαύρη σοκολάτα με τον έλεγχο. Η περιεκτικότητα ινουλίνης, πριν και μετά την αποθήκευση της σοκολάτας, μετρήθηκε χρησιμοποιώντας HPLC για να παρατηρηθεί εάν η περιεκτικότητα σε ινουλίνη μειώθηκε ή υποβαθμίστηκε μετά από παρατεταμένη αποθήκευση. Περίπου 1,0 g ομογενοποιημένου δείγματος επεξεργάστηκε με 100 ml βραστό νερό σε pH 6-8 και διατηρούνται στους 85° C με συνεχή μαγνητική ανάδευση σε μια καυτή πλάκα για 15 λεπτά. Μετά από ψύξη σε θερμοκρασία δωματίου, διηθήθηκε μέσω φίλτρου μεμβράνης πριν την εισαγωγή του εντός της HPLC. (Norhayati, et al., 2013)

3.1.4 Οργανοληπτικές εξετάσεις

Οι βιομηχανίες της ζαχαροπλαστικής, τα τελευταία χρόνια, κυρίως στον τομέα της σοκολάτας, αναζητούν σημαντικές αλλαγές για δημιουργία λειτουργικών τροφίμων που

μπορούν να βελτιώσουν την υγεία των καταναλωτών. Η σοκολάτα έχει φέρει σημαντική δημοτικότητα και εκτιμάται σε όλο τον κόσμο, το οποίο σχετίζεται με την ικανότητα της ενεργοποίησης των αισθήσεων στον ανθρώπινο εγκέφαλο, όπου και επιφέρει ευχαρίστηση στον καταναλωτή (Succi, et al., 2017). Στη γενική αξιολόγηση της σοκολάτας, η ποιότητα είναι η πιο σημαντική παράμετρος και επομένως είναι απαραίτητο τα αισθητηριακά χαρακτηριστικά να μην μεταβάλλονται με την προσθήκη προβιοτικών βακτηρίων και πρεβιοτικών συστατικών. Οι αισθητηριακές αξιολογήσεις περιλάμβαναν τις ακόλουθες ιδιότητες: εμφάνιση (μορφή, χρώμα και επιφάνεια), μηχανικές ιδιότητες (δομή, θραύση, ανθεκτικότητα), επιφανειακές ιδιότητες (υγρασία), άρωμα (οσμή, γεύση) και άλλες δυναμικές ιδιότητες (διαλυτότητα). (Mirković, et al., 2018)

Η αισθητηριακή αξιολόγηση της σοκολάτας πραγματοποιήθηκε από έμπειρους αξιολογητές εξοικειωμένους με το προϊόν, η οποία πραγματοποιήθηκε μετά από την αποθήκευση του προϊόντος για το εύλογο χρονικό διάστημα. (Mirković, et al., 2018; Lalicic-Petronijevic, et al., 2015)

3.1.5 Αποτελέσματα επιβίωση προβιοτικών μικροοργανισμών

Στην πειραματική μελέτη των Kemsawasd, et al., 2016, επιβεβαίωσαν την δράση των προβιοτικών *L. casei* 01 και *L. acidophilus* LA5 στη μαύρη σοκολάτα και έδειξαν ότι ήταν εξαιρετικός φορέας. Τα αποτελέσματα της μέτρησης αποικίας έδειξαν ότι ο ρυθμός επιβίωσης του *L. casei* 01 ήταν υψηλότερος από εκείνον του *L. acidophilus* LA5, ανεξάρτητα από τους τύπους σοκολάτας. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι η *L. casei* 01 είναι ικανή να αντέξει τις συνθήκες αποθήκευσης καλύτερα από το *L. acidophilus* LA5. Τα *L. acidophilus* LA5 ενσωματωμένα σε όλους τους τύπους σοκολάτας εξαφανίστηκαν πλήρως εντός 40 ημερών από την αποθήκευση στους 25 ° C, ενώ τα *L. casei* 01 σε μαύρη σοκολάτα μπορούσαν να διατηρήσουν την επιβιωσιμότητά τους μέχρι 50 ημέρες αποθήκευσης. Από την άλλη, κατά τις πρώτες 10 ημέρες αποθήκευσης στους 4 ° C, η επιβιωσιμότητα των προβιοτικών σε όλες τις παρτίδες σοκολάτας έφθασε σε παρόμοια επίπεδα. Μετά από 60 ημέρες αποθήκευσης στους 4 ° C, οι ρυθμοί επιβίωσης των προβιοτικών σε παγωμένη σοκολάτα παρέμειναν υψηλοί. (βλέπε πίνακα 3). (Kemsawasd, et al., 2016)

Πίνακας 3: Η επιβίωση των προβιοτικών μικροοργανισμών, μετά από παρατεταμένη αποθήκευση στους 4° C και 25° C, για 60 ημέρες. (Kemsawasd, et al., 2016)

Stability of probiotics in chocolates during storage at 4 and 25 °C for 60 days.

Samples	Numbers of survival cells during refrigerated storage (log CFU/g)							Cell loss(log CFUs)
	Day 0	Day 10	Day 20	Day 30	Day 40	Day 50	Day 60	
<i>Storage at 4 °C</i>								
WLC	6.0 ± 0.6 ^A × 10 ⁸	4.9 ± 0.6 ^A × 10 ⁸	2.8 ± 0.3 ^B × 10 ⁸	1.6 ± 0.5 ^C × 10 ⁸	8.9 ± 0.6 ^D × 10 ⁷	4.5 ± 0.4 ^E × 10 ⁷	8.0 ± 0.6 ^F × 10 ⁶	1.8 ^b
DLC	6.6 ± 0.5 ^A × 10 ⁸	5.5 ± 0.4 ^{AB} × 10 ⁸	4.2 ± 0.4 ^B × 10 ⁸	3.3 ± 0.4 ^C × 10 ⁸	1.1 ± 0.4 ^D × 10 ⁸	7.3 ± 0.9 ^E × 10 ⁷	1.8 ± 0.3 ^F × 10 ⁷	1.5 ^c
MLC	6.5 ± 0.3 ^A × 10 ⁸	5.2 ± 0.5 ^B × 10 ⁸	4.0 ± 0.4 ^B × 10 ⁸	3.0 ± 0.2 ^C × 10 ⁸	9.6 ± 0.5 ^D × 10 ⁷	6.1 ± 0.6 ^E × 10 ⁷	9.0 ± 0.2 ^F × 10 ⁶	1.8 ^b
WLA	5.5 ± 0.4 ^A × 10 ⁸	3.2 ± 0.2 ^B × 10 ⁸	1.5 ± 0.4 ^C × 10 ⁸	8.0 ± 0.6 ^D × 10 ⁷	5.0 ± 0.4 ^E × 10 ⁷	8.4 ± 0.3 ^F × 10 ⁶	2.3 ± 0.5 ^G × 10 ⁶	2.4 ^a
DLA	5.8 ± 0.4 ^A × 10 ⁸	4.0 ± 0.6 ^B × 10 ⁸	2.2 ± 0.2 ^C × 10 ⁸	9.5 ± 0.7 ^D × 10 ⁷	7.0 ± 0.2 ^E × 10 ⁷	1.4 ± 0.4 ^F × 10 ⁷	5.8 ± 0.1 ^G × 10 ⁶	2.0 ^c
MLA	5.6 ± 0.3 ^A × 10 ⁸	3.5 ± 0.1 ^B × 10 ⁸	1.8 ± 0.4 ^C × 10 ⁸	9.1 ± 0.5 ^D × 10 ⁷	5.8 ± 0.4 ^E × 10 ⁷	9.1 ± 0.2 ^F × 10 ⁶	3.4 ± 0.3 ^G × 10 ⁶	2.2 ^b
<i>Storage at 25 °C</i>								
WLC	6.0 ± 0.6 ^A × 10 ⁸	6.1 ± 0.4 ^B × 10 ⁸	8.4 ± 0.3 ^C × 10 ⁴	1.2 ± 0.5 ^D × 10 ³	1.8 ± 0.2 ^E × 10 ²	< 10 ⁷	< 10 ⁷	8.7 ^d
DLC	6.6 ± 0.5 ^A × 10 ⁸	8.1 ± 0.6 ^B × 10 ⁶	5.1 ± 0.3 ^C × 10 ⁵	1.3 ± 0.3 ^D × 10 ⁴	5.2 ± 0.4 ^E × 10 ³	5.0 ± 0.8 ^F × 10 ²	< 10 ⁶	8.8 ^d
MLC	6.5 ± 0.3 ^A × 10 ⁸	6.5 ± 0.4 ^B × 10 ⁶	2.2 ± 0.3 ^C × 10 ⁵	6.1 ± 0.7 ^D × 10 ³	7.1 ± 0.6 ^E × 10 ²	< 10 ⁵	< 10 ⁵	8.8 ^d
WLA	5.5 ± 0.7 ^A × 10 ⁸	9.0 ± 0.8 ^B × 10 ⁷	2.9 ± 0.7 ^C × 10 ³	2.0 ± 0.6 ^D × 10 ²	< 10 ⁵	< 10 ⁵	< 10 ⁵	8.7 ^d
DLA	5.8 ± 0.4 ^A × 10 ⁸	1.9 ± 0.6 ^B × 10 ⁶	6.0 ± 0.6 ^C × 10 ³	8.0 ± 0.4 ^D × 10 ²	< 10 ⁵	< 10 ⁵	< 10 ⁵	8.8 ^d
MLA	5.6 ± 0.3 ^A × 10 ⁸	1.1 ± 0.3 ^B × 10 ⁶	5.1 ± 0.4 ^C × 10 ³	5.2 ± 0.6 ^D × 10 ²	< 10 ⁵	< 10 ⁵	< 10 ⁵	8.8 ^d

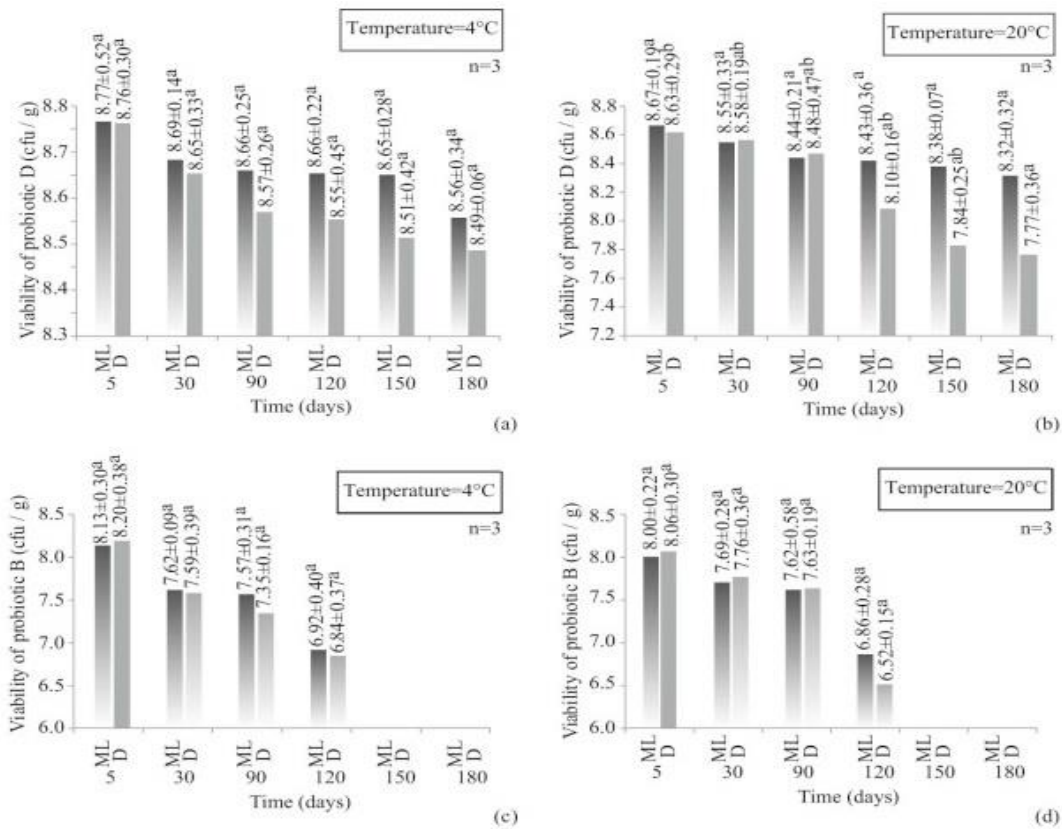
WLC = λευκή σοκολάτα που περιέχει *L. casei* 01, DLC = μαύρη σοκολάτα που περιέχει *L. casei* 01, MLC = σοκολάτα γάλακτος που περιέχει *L. casei* 01, WLA = λευκή σοκολάτα που περιέχει *L. acidophilus* LA5, DLA = μαύρη σοκολάτα που περιέχει *L. acidophilus* LA5 και MLA = σοκολάτα γάλακτος που περιέχει *L. acidophilus* LA5.

Οι Μirkονιό, et al., 2018, έδειξαν πως τα *Lb. plantarum* 564 και *Lb. plantarum* 299ν, παρέμειναν βιώσιμα για έως και 6 μήνες, έχοντας μετρήσεις άνω των 10⁶ cfu /g. Η παρούσα μελέτη έδειξε πολύ καλή επιβίωση και των δύο προβιοτικών στελεχών στη μαύρη σοκολάτα μετά την παραγωγή και κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης σε θερμοκρασία δωματίου, ειδικά στις πρώτες 90 ημέρες. Ακολούθως, παρουσίασαν πολύ καλή βιωσιμότητα στη μαύρη σοκολάτα και κατά τη διάρκεια περιόδου αποθήκευσης 180 ημερών στους 20 ° C, ενώ μειώθηκε σημαντικά μετά από περαιτέρω αποθήκευση 360 ημέρες, μειώνοντας τη διάρκεια ζωής των προβιοτικών (Μirkονιό, et al., 2018).

Αναφορικά με τους Foong, et al., 2013 αξιολόγησαν τη βιωσιμότητα των κυττάρων ενός πιθανού στελέχους, *L. plantarum*. Μετά από 3 μήνες αποθήκευσης στους 4° C, παρατηρήθηκε ελαφρά μείωση του αριθμού των αποικιών. Ωστόσο, το αποτέλεσμα

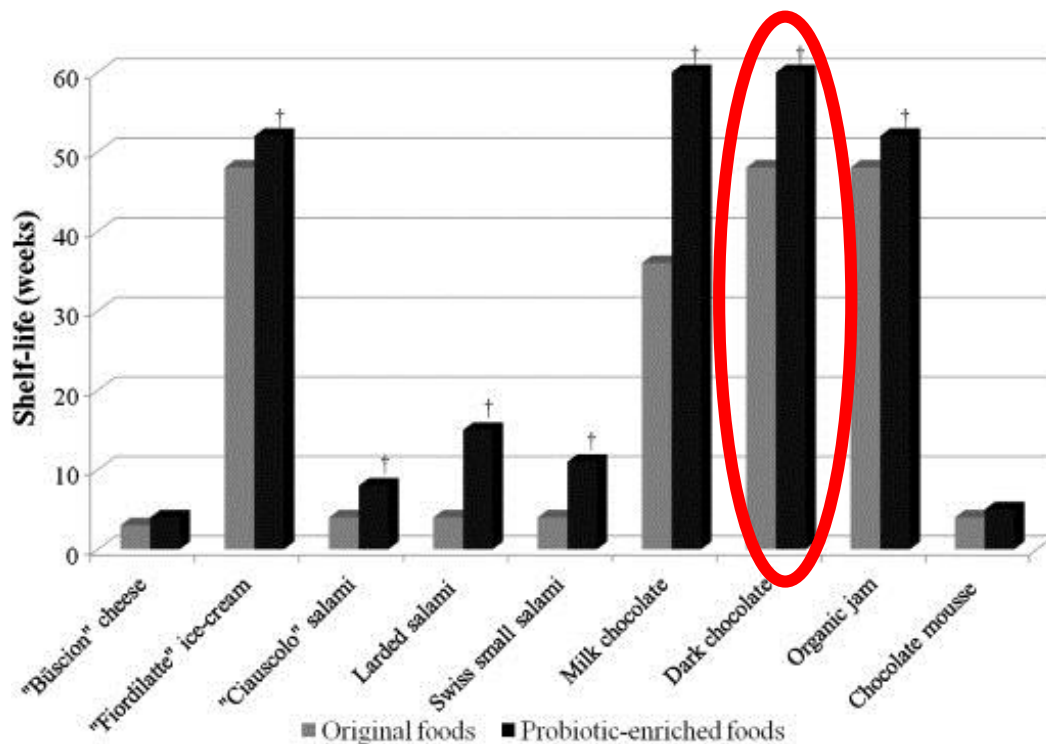
ήταν αποδεκτό καθώς η βιωσιμότητα του στελέχους στη μαύρη σοκολάτα ήταν πάνω από το προτεινόμενο όριο (6 log cfu/g). Σε αυτή τη μελέτη, το πιθανό προβιοτικό *L. plantarum* που απομονώθηκε αποδείχθηκε ότι επιβιώνει καλά στη μαύρη σοκολάτα. (Foong, et al., 2013)

Η επιβίωση του προβιοτικού στελέχους *L. acidophilus NCFM* που επιλέχθηκε για την ενσωμάτωσή του σε δύο τύπους σοκολάτας ήταν αρκετά καλή. Ο αριθμός των βιώσιμων κυττάρων παρέμειναν σε υψηλά επίπεδα, μέσα στα επιτρεπτά όρια, μετά από την αποθήκευσή τους στους 4° C και 20° C. Στους 4° C δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στον αριθμό των βιώσιμων κυττάρων προβιοτικού και στις 2 σοκολάτες. Αντίθετα, κατά την αποθήκευση τους 20° C, σημειώθηκε μείωση στη μαύρη σοκολάτα μέχρι τη τελευταία περίοδο δοκιμών (180 ημέρες). Τα αποτελέσματα του προβιοτικού στελέχους *B. lactis HN019*, εμφάνισε ταχύτερη μείωση του αριθμού των κυττάρων, μετά από 30 ημέρες και στις 2 θερμοκρασίες αποθήκευσης. Ο αριθμός των κυττάρων έφτασε σε επίπεδο 7 log cfu / g, όπου παρέμεινε κατά τη διάρκεια 90 ημερών. Στην επόμενη περίοδο έρευνας, μετά από αποθήκευση 120 ημερών, ο αριθμός των βιώσιμων κυττάρων του προβιοτικού *B. lactis HN019* μειώθηκε σε 6 log cfu / g σε όλους τους τύπους σοκολάτας και στις δύο θερμοκρασίες. Αργότερα, παρατηρήθηκε αυξημένη μείωση των βιώσιμων κυττάρων, κάτω από το επίπεδο που απαιτείται για την επίτευξη θεραπευτικού αποτελέσματος κατά την κατανάλωση. Κατά συνέπεια, η λειτουργικότητα της σοκολάτας που περιέχουν προβιοτικό *B. lactis HN019* περιορίζεται σε 90 ημέρες από την ημέρα παραγωγής, όπως παρουσιάζεται και στο διάγραμμα 5. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, το *B. lactis HN019*, διατηρεί τη λειτουργικότητά του καλύτερα σε θερμοκρασίες δωματίου. (Lalicic-Petronijevic, et al., 2015)



Διάγραμμα 6: Αποτελέσματα επιβίωσης *L. acidophilus* NCFM και *B. lactis* HN019, μετά από 180 ημέρες αποθήκευσης. (Lalicic-Petronijevic, et al., 2015)

Με βάση τους Coman, et al., 2012, πραγματοποιήσαν πειραματική μελέτη με γαλακτοκομικά και μη γαλακτοκομικά προϊόντα, και χρησιμοποιήθηκαν τα προβιοτικά στελέχη *Lactobacillus rhamnosus* IMC 501® και *Lactobacillus paracasei* IMC 502®. Στη μελέτη πραγματοποίησαν πείραμα και για τη μαύρη σοκολάτα, στην οποία έγινε η προσθήκη των προβιοτικών που αποθηκεύτηκε για 12 μήνες σε θερμοκρασία δωματίου. Γίνονταν αναλύσεις κάθε εβδομάδα, όπου και παρατηρήθηκαν θετικά αποτελέσματα μετά από 12 μήνες αποθήκευσης, συγκρίνοντας με τη σοκολάτα αναφοράς. Σημείωσε σημαντική αύξηση στη διάρκεια ζωής της σοκολάτας, περίπου 12 εβδομάδες περισσότερο σε σχέση με τη μαύρη σοκολάτα χωρίς την προσθήκη προβιοτικών, όπως παρουσιάζεται στο διάγραμμα 6. Ελέγχοντας τη βιωσιμότητα των προβιοτικών στελεχών μετά την ημερομηνία λήξης, όλα τα τρόφιμα παρουσίασαν υψηλές τιμές cfu / g. (Coman, et al., 2012)



Διάγραμμα 7: Διάρκεια αποθήκευσης προβιοτικής μαύρης σοκολάτας σε σύγκριση με τον έλεγχο. (Coman, et al., 2012)

3.1.6 Περιεκτικότητα Πρεβιοτικών

Στο επιστημονικό άρθρο από του Norhayati, et al., 2013, αναφέρουν την επίδραση των πρεβιοτικών μικροοργανισμών στη μαύρη σοκολάτα. Η μαύρη σοκολάτα, που περιείχε ινουλίνη, αποθηκεύτηκε στους 18° C με 60% σχετική υγρασία(RH), και στους 25°C, 80% RH, όπως έγινε και στον έλεγχο της μαύρης σοκολάτας. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δεν έδειξε σημαντική διαφορά στην περιεκτικότητα σε ινουλίνη πριν και μετά από την παρατεταμένη αποθήκευση των 12 μηνών στους 18° C, 60% RH. Αντίθετα, το δείγμα το οποίο αποθηκεύτηκε στους 25° C, 80% RH, δεν ήταν αντιπροσωπευτική, αφού παρουσιάστηκαν στην επιφάνεια της σοκολάτας ανάπτυξη μυκήτων. Η θερμοκρασία αποθήκευσης των 18° C με σχετική υγρασία 60%, ήταν μια κατάλληλη συνθήκη αποθήκευσης για πρεβιοτική μαύρη σοκολάτα και σοκολάτα ελέγχου για παράταση της διάρκειας ζωής, χωρίς σημαντική υποβάθμιση της περιεκτικότητας σε ινουλίνη στη σοκολάτα και χωρίς ανάπτυξη μυκήτων (μικροβιολογικά ασφαλής). (Norhayati, et al., 2013)

Οι Aidoo, et al., 2015, αποσκοπούσε στη διερεύνηση των επιπτώσεων της προσθήκης ινουλίνης και πολυδεξτρόζης με την παρουσία γλυκαντικών, stevia και thaumatococcus κατά τη διάρκεια παρασκευής μαύρης σοκολάτας, χωρίς την παρουσία ζάχαρης. Η αντικατάσταση της σακχαρόζης με την ινουλίνη και πολυδεξτρόζη, αποδείχθηκε ότι θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για παρασκευή σοκολάτας χωρίς την παρουσία ζάχαρης με ικανοποιητικές φυσικοχημικές ιδιότητες. (Aidoo, et al., 2015)

Σε ένα επιστημονικό άρθρο, πραγματοποιήθηκε η ένταξη του προβιοτικού στελέχους *L. paracasei*, γαλακτολιγοςακχαρίτη και ταγατόζη, που θεωρούνται πρεβιοτικά. Το αποτέλεσμα αυτής της έρευνας έδειξε να είναι θετικό, αφού η GOS και η ταγατόζη δεν παρεμπόδισαν τη βιωσιμότητα του *L. paracasei*. Η σοκολάτα αποθηκεύτηκε στους 22° C για χρονικό διάστημα έξι μηνών. Η επιβίωση του προβιοτικού στελέχους παρατηρήθηκε ικανή για αυτό το χρονικό διάστημα, επομένως μπορούμε να πούμε ότι η μαύρη σοκολάτα μπορεί να είναι μια εξαιρετική φορέας. Δεδομένου ότι και οι δύο GOS και D-tagatose έχουν πρεβιοτικές ιδιότητες, τα δείγματα σοκολάτας που παρασκευάζονται με αυτές τις ουσίες είναι επίσης επιθυμητά από θρεπτική άποψη. (Rad, et al., 2018)

3.1.7 Αποτελέσματα οργανοληπτικών χαρακτηριστικών

Στην πειραματική μελέτη των Mirkonić, et al., 2018, η αισθητηριακή αξιολόγηση έδειξε ότι η μαύρη σοκολάτα εμπλουτισμένη με προβιοτικά βακτήρια είχε καλά σημάδια εμφάνισης και υφής. Η αισθητηριακή ανάλυση των δειγμάτων προβιοτικών σοκολάτας πραγματοποιήθηκε μετά από αποθήκευση 60 και 180 ημερών σε θερμοκρασία δωματίου 20 ° C. Ορισμένα προβιοτικά βακτήρια θα μπορούσαν να παράγουν συστατικά που μπορεί να οδηγήσουν στην εμφάνιση κάποιας ξένης οσμής και γεύσης, που μπορεί να συμβάλλουν αρνητικά. Σε αυτό το πείραμα, αυτά τα αρνητικά χαρακτηριστικά δεν έχουν ανιχνευθεί, επισημαίνοντας τις μαύρες σοκολάτες ως δείγματα με πολύ καλή μυρωδιά και γεύση καθ' όλη την περίοδο αποθήκευσης των 6 μηνών. Γενικά, μπορεί να συναχθεί το συμπέρασμα ότι και οι δύο προβιοτικές μαύρες σοκολάτες είχαν εξαιρετική αισθητηριακή ποιότητα και ότι τα εγκλεισμένα προβιοτικά βακτήρια δεν είχαν επίδραση στο άρωμα και την υφή των τελικών προϊόντων σε περίοδο αποθήκευσης 6 μηνών. (Mirkonić, et al., 2018). Στο ίδιο συμπέρασμα

κατέληξαν και οι Foong, et al., 2013, όπου η επιλογή του πιθανού στελέχους *L. plantarum*, δεν επηρέασε τις φυσικοχημικές ιδιότητες της μαύρης σοκολάτας σε σύγκριση με τον έλεγχο. Σύμφωνα με μελέτες, το βούτυρο κακάο παρουσιάζει προστατευτική δράση στα βακτήρια LAB. Έτσι, αυτή η μελέτη έδειξε ότι η μαύρη σοκολάτα είναι κατάλληλη ως φορέας για το πιθανό προβιοτικό το οποίο απομονώθηκε από ζυμωμένα φασόλια κακάου. (Foong, et al., 2013)

Στο επιστημονικό άρθρο των Norhayati, et al., 2013, έδειξε ότι η επίδραση των πρεβιοτικών στις αισθητηριακές ιδιότητες που πραγματοποιήθηκε από 12 εκπαιδευτές ήταν αρκετά καλές. Οι αισθητηριακές αναλύσεις της σοκολάτας αποθήκευσης στους 18° C, 60% RH, παρουσίασαν καλύτερη βαθμολογία για σχεδόν όλα τα χαρακτηριστικά σε σύγκριση με τον έλεγχο, ειδικά σε γεύση και οσμή (Norhayati, et al., 2013). Επιπλέον, σε ένα άλλο άρθρο, εξετάστηκαν τα ποιοτικά χαρακτηριστικά της ποιότητας των δειγμάτων, όπου προστέθηκαν ινουλίνη και πολυδεξτρόζη, με αποτέλεσμα να εμφανίσουν παρόμοια χαρακτηριστικά σε σύγκριση με τη σοκολάτα που χρησιμοποιήθηκε ως σοκολάτα αναφοράς. Έτσι, το τελικό προϊόν είναι ένα προϊόν σοκολάτας, όχι μόνο με λιγότερες θερμίδες, αλλά και με βελτιωμένα οφέλη για την υγεία (Aidoo, et al., 2015). Αξίζει να σημειωθεί η χρήση μιας ευρέως διαδεδομένης κλίμακας για την αποδοχή των τροφίμων, η οποία είναι η ηδονική κλίμακα 7 σημείων. Το εκπαιδευτικό πάνελ, ήταν για την αξιολόγηση μιας μαύρης σοκολάτας με προσθήκη ινουλίνης και μιας πρότυπης μαύρης σοκολάτας, μέσα από 100 συμμετέχοντες. Το αποτέλεσμα έδειξε ότι η σημαντική διαφορά υπήρξε μόνο στη γλυκύτητα, ενώ τα άλλα χαρακτηριστικά ήταν παρόμοια. (Norhayati & Ayob, 2014)

Στο πείραμα των Rad, et al., 2018, όπου προστέθηκαν το *L. paracasei*, GOS και ταγατόζη, παρουσίασαν θετικά αποτελέσματα ως προς την ποιότητα του δείγματος. Η αισθητηριακή ποιότητα της σοκολάτας ήταν αποδεκτή, και η παρουσία των πρεβιοτικών δείχνουν την πιθανή χρήση τους για την εν μέρει αντικατάσταση της σακχαρόζης και την επίτευξη των επιθυμητών αισθητηριακών ιδιοτήτων (Rad, et al., 2018). Σε μια άλλη μελέτη, εξετάστηκε η προσθήκη ινουλίνης στα επίπεδα βιωσιμότητας για 90 ημέρες, των προβιοτικών *Lactobacillus paracasei* και *L. acidophilus* και των κύριων παραμέτρων ποιότητας σε άσπρη σοκολάτα. Η ινουλίνη και η παρουσία προβιοτικών είχαν σημαντικές επιδράσεις σε παραμέτρους ποιότητας σοκολάτας εκτός από τις ρεολογικές ιδιότητες, ωστόσο, αυτές οι επιδράσεις βρέθηκαν

να είναι ανεκτές. Επομένως, τα θετικά αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν στη άσπρη σοκολάτα, μπορεί να θεωρηθούν ικανά και στη μαύρη σοκολάτα. (Konar, et al., 2018)

Συμπεράσματα

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα και τις σχετικές έρευνες που πραγματοποιήθηκαν υποστηρίζεται πως η χρήση προβιοτικών μικροοργανισμών σε διαφορετικούς τύπους σοκολάτας, αντιπροσωπεύει μια πολλά υποσχόμενη οδό προς σχηματισμό νέων λειτουργικών προϊόντων, που προσφέρουν θετικές επιδράσεις στην υγεία του καταναλωτή, αλλά και στις καταναλωτικές του ανάγκες (Petyaev & Bashmakov, 2017).

Στις μελέτες που παρουσιάστηκαν για την προσθήκη προβιοτικών μικροοργανισμών, παρατηρήθηκε μεγάλη ζήτηση και χρήση των LAB. Σε σύγκριση με τα *Bifidobacterium*, τα LAB παρουσίαζαν μεγαλύτερη αντοχή και επιβίωση σε μεγάλη διάρκεια αποθήκευσης. Τα *Bifidobacteria*, επιφέρουν θετικά αποτελέσματα ως προς την επιβίωση και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, αλλά σε συγκεκριμένο χρόνο αποθήκευσης (Lalicic-Petronijevic, et al., 2015). Αντίθετα, πολλά στελέχη των LAB, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν παρουσίαζαν μεγάλη αντοχή στην επιβίωσή τους, για μεγάλο χρονικό διάστημα. Το μεγαλύτερο διάστημα επιβίωσης παρουσιάστηκε στη μελέτη των Mirković, et al., 2018, οι οποίοι χρησιμοποίησαν διαφορετικά στελέχη του *Lactobacillus plantarum*, σε χρονικό διάστημα των 360 ημερών. Η επιβίωση των προβιοτικών μικροοργανισμών, παρέμεινε αρκετά ψηλά μέχρι και σε περίοδο 180 ημερών. Στη συνέχεια, μειώθηκε σημαντικά η διάρκεια ζωής των προβιοτικών. Ωστόσο, η αισθητηριακή ποιότητα της μαύρης σοκολάτας μετά από 180 ημέρες αποθήκευσης, παρουσίασε εξαιρετικό αποτέλεσμα. (Mirković, et al., 2018)

Αναφορικά, μια μελέτη σύγκρινε την πρεβιοτική μαύρη σοκολάτα με τη μαύρη σοκολάτα σακχαρόζης, και απέδειξαν πως η προσθήκη ινουλίνης επιφέρει σχεδόν παρόμοια αποτελέσματα με το πρότυπο. Η ινουλίνη, αποδείχθηκε ως ένα καλό υποκατάστατο ζάχαρης, με καλή σταθερότητα στη διάρκεια ζωής της σοκολάτας και χωρίς την αλλοίωση των αισθητηριακών χαρακτηριστικών, επομένως μπορεί να θεωρηθεί ένα εναλλακτικό προϊόν στη ζαχαροπλαστική (Norhayati, et al., 2013). Επιπλέον, αναφέρεται η αντικατάσταση της σακχαρόζης με ινουλίνη και πολυδεξτρόζη, με εκχυλίσματα *stevia* και *thaumatin* με παρόμοια αποτελέσματα όπως και στη μελέτη των Norhayati, et al., 2013. Αυτό αποδεικνύει, πως η πρεβιοτική μαύρη σοκολάτα έχει θετικά αποτελέσματα επιβίωσης, στα επιτρεπτά όρια, ώστε να προσδώσει στον καταναλωτή θετικές επιδράσεις. Έτσι, το τελικό προϊόν, δεν παρουσιάζει μόνο

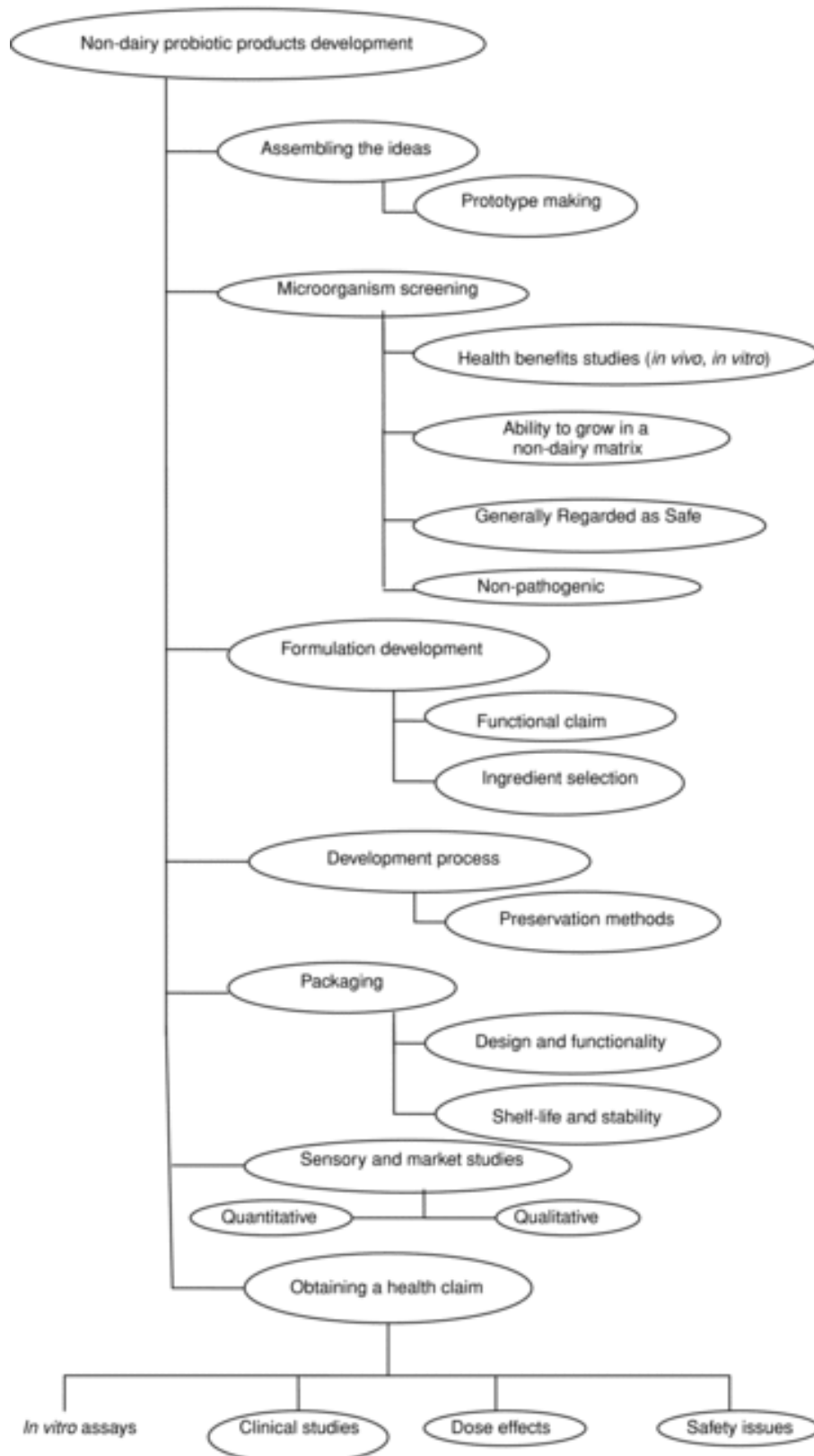
λιγότερες θερμίδες, αλλά και βελτιωμένα οφέλη για την υγεία. Έτσι, η πρεβιοτική σοκολάτα παρουσιάζει παρόμοια σταθερότητα της διάρκειας ζωής του και επομένως μπορεί να είναι ένα εναλλακτικό προϊόν ζαχαροπλαστικής χωρίς ζάχαρη (Aidoo, et al., 2015).

Η ινουλίνη μπορεί να προστεθεί μαζί με προβιοτικό στέλεχος, όπως το *Lactobacillus paracasei subsp. Paracasei LBC 82*, σε μους σοκολάτας, ώστε να αξιολογηθούν οι αισθητικές ιδιότητες. Αποθηκεύτηκε στους 4 ± 1 ° C για έως και 28 ημέρες, και αποδείχθηκε πως το συμβιοτικό, επιφέρει θετικά αποτελέσματα. Επομένως, η προσθήκη συμβιωτικών προϊόντων σοκολάτας, μπορεί να γίνει με μεγάλη επιτυχία. (Coelho, et al., 2007)

Παρ' όλ' αυτά, χρειάζονται περαιτέρω μελέτες και ερευνητική προσοχή, για σίγουρα αποτελέσματα και ένα αποτελεσματικό λειτουργικό τρόφιμο.

Γενικά, μέσα από τις μελέτες, θα πρέπει να βελτιστοποιηθούν διάφοροι παράγοντες στα στάδια επεξεργασίας των προβιοτικών τροφίμων, προκειμένου να διατηρηθούν οι μικροοργανισμοί σε βιώσιμες δόσεις, ικανές για να παρέχουν τις θεραπευτικές δραστηριότητες στους καταναλωτές. Για να επιτευχθεί αυτό, θα πρέπει να γίνεται η σωστή επιλογή των προβιοτικών καλλιιεργειών, αλλά και των πρεβιοτικών συστατικών. Ωστόσο, θα πρέπει να πραγματοποιούνται οι αυστηροί έλεγχοι και οι θερμοκρασίες αποθήκευσης και τέλος, αξίζει να αναφερθεί, πως τα εμπλουτισμένα προβιοτικά και πρεβιοτικά τρόφιμα, προσδίδουν όλα τα θρεπτικά συστατικά που χρειάζεται ο καταναλωτής καθημερινά. Τα λειτουργικά τρόφιμα έχουν παίξει σημαντικό ρόλο στη ζωή του ανθρώπου. Τόσο τα προβιοτικά, όσο και τα πρεβιοτικά, έχουν επιφέρει μεγάλη ζήτηση λόγω των θετικών τους επιδράσεων. Η ζήτηση για χρήση φυσικών γλυκαντικών και πρεβιοτικών ενώσεων για την παρασκευή σοκολάτας χωρίς ζάχαρη έχει αυξηθεί δραματικά κατά την τελευταία δεκαετία. Παρ' όλ' αυτά, η στάση των καταναλωτών απέναντι στα λειτουργικά τρόφιμα δεν εξαρτάται μόνο από την θετική επίδραση του προϊόντος, αλλά και από την αισθητηριακή ποιότητα, την τιμή και την ευκολία, όπως οποιοδήποτε συμβατικό προϊόν (Miraballes, et al., 2014). Ωστόσο, οι καταναλωτές επηρεάζονται σημαντικά από τις πληροφορίες που αναγράφονται στη συσκευασία, ιδιαίτερα από προϊόντα με ισχυρισμούς διατροφής και υγείας με μειωμένες θερμίδες ή λειτουργικά τρόφιμα. (Konar, et al., 2016)

4 Διαγράμματα



Διάγραμμα 8: Μεταβλητές για την παραγωγή προβιοτικών μη γαλακτοκομικών προϊόντων. (Granato, et al., 2010)

5 Βιβλιογραφία

Afoakwa, E. O., 2016. World cocoa production, processing and chocolate consumption pattern. Στο: *Chocolate Science and Technology*. York: Wiley, pp. 18-36.

Aidoo, R. P., Afoakwa, E. O. & Dewettinck, K., 2015. Rheological properties, melting behaviours and physical quality characteristics of sugar-free chocolates processed using inulin/polydextrose bulking mixtures sweetened with stevia and thaumatin extracts. *LWT - Food Science and Technology*, 62(1), pp. 592-597.

Ali, F., Ismail, A. & Kersten, S., 2014. Molecular mechanisms underlying the potential antiobesity-related diseases effect of cocoa polyphenols. *Molecular Nutrition and Food Research*, 58(1), pp. 33-38.

Al-Sheraji, S. H. και συν., 2013. Prebiotics as functional foods: A review. *Journal of Functional Foods*, 5(4), pp. 1542-1550.

Aragon-Alegro, L. C. και συν., 2007. Potentially probiotic and synbiotic chocolate mousse. *LWT - Food Science and Technology*, 40(4), p. 670.

Aspri, M., Papademas, P. & Tsaltas, D., 2020. Review on Non-Dairy Probiotics and Their Use in Non-Dairy Based Products. *Fermentation*, 26 February, pp. 1-20.

Beckett, S., 2008. *The Science of Chocolate 2nd Edition*. - επιμ. York: The Royal Society of Chemistry.

Bruinsma Ms, K. & Taren, D. L., 1999. Chocolate: Food or Drug?. *Journal of the American Dietetic Association*, 99(10), pp. 1249-1250.

Cani, P. D., Joly, E., Horsmans, Y. & Delzenne, N. M., 2006. Oligofructose promotes satiety in healthy human: A pilot study. *European Journal of Clinical Nutrition*, 60(5), pp. 567-571.

Cencic, A. & Chingwaru, W., 2010. The role of functional foods, nutraceuticals, and food supplements in intestinal health. *Nutrients*, 2(6), pp. 611-623.

Coelho, C. M. M. και συν., 2007. Effect of phytate and storage conditions on the development of the ‘ hard-to-cook ’. *Journal of the science of food and agriculture*, Τόμος 88, pp. 1237-1243.

- Collado, M. C. και συν., 2005. Antimicrobial peptides are among the antagonistic metabolites produced by Bifidobacterium against Helicobacter pylori. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 25(5), pp. 389-390.
- Coman, M. M. και συν., 2012. Functional foods as carriers for SYN BIO®, a probiotic bacteria combination. *International Journal of Food Microbiology*, 157(3), pp. 346-352.
- Delzenne, N. M., Neyrinck, A. M. & Cani, P. D., 2013. Gut microbiota and metabolic disorders: How prebiotic can work?. *British Journal of Nutrition*, Τόμος 19, pp. 81-83.
- Eske, J., 2019. *Medical News Today*. [Ηλεκτρονικό]
Available at: <https://www.medicalnewstoday.com/articles/324747>
[Πρόσβαση 19 March 2019].
- Farias, D. d. P., de Araújo, F. F., Neri-Numa, I. A. & Pastore, G. M., 2019. Prebiotics: Trends in food, health and technological applications. *Trends in Food Science and Technology*, Τόμος 93, pp. 23-24.
- Foong, Y. J. και συν., 2013. Incorporation of potential probiotic lactobacillus plantarum isolated from fermented cocoa beans into dark chocolate: Bacterial viability and physicochemical properties analysis. *Journal of Food Quality*, 36(3), pp. 164-171.
- Fuller, R., 1991. Probiotics in human medicine. p. 441.
- Fuller, R. & Gibson, G. R., 1998. Probiotics and prebiotics: Microflora management for improved gut health. *Clinical Microbiology and Infection*, 4(9), pp. 477-479.
- Gasbarrini, G., Bonvicini, F. & Gramenzi, A., 2016. Probiotics History. *Journal of Clinical Gastroenterology*, Τόμος 50, pp. S116-S117.
- George Kerry, R. και συν., 2018. Benefaction of probiotics for human health: A review. *Journal of Food and Drug Analysis*, 26(3), p. 935.
- Georgieva, M., Andonova, L., Peikova, L. & Zlatkov, A., 2014. Probiotics - Health benefits, classification, quality assurance and quality control - Review. *Pharmacia*, 61(4), pp. 23-25.
- Granato, D. και συν., 2010. Functional foods and nondairy probiotic food development: Trends, concepts, and products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(3), pp. 292-296.

- Hamilton-Miller, J. M., 2003. The role of probiotics in the treatment and prevention of *Helicobacter pylori* infection. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 22(4), pp. 360-361.
- Hamilton-Miller, J. M., 2004. Probiotics and prebiotics in the elderly. *Postgraduate Medical Journal*, 80(946), pp. 448-450.
- Harnal, S. & Shah, N. P., 2007. *Helicobacter pylori* and probiotics. *Milchwissenschaft*, 61(3), pp. 812S-815S.
- Harpavat, S. & Shulman, R. J., 2011. Probiotics and Prebiotics : Concepts , Definitions and History. *Clinical Management of Intestinal Failure*, pp. 383-390.
- Harzallah, D. & Belhadj, H., 2013. *Lactic Acid Bacteria as Probiotics: Characteristics, Selection Criteria and Role in Immunomodulation of Human GI Muccosal Barrier*. Croatia: InTech.
- Higginbotham, E. & Taub, P. R., 2015. Cardiovascular Benefits of Dark Chocolate?. *Current Treatment Options in Cardiovascular Medicine*, 17(12), pp. 1-3.
- Hong, M. Y. και συν., 2013. Effects of Dark Chocolate on Azoxymethane-Induced Colonic Aberrant Crypt Foci. *Nutrition and Cancer*, 65(5).
- Hotel, A. & Cordoba, A., 2001. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. *Prevention*, 5(1), pp. 1-13.
- Hutkins, R. W. και συν., 2016. Prebiotics: Why definitions matter. *Current Opinion in Biotechnology*, 37(1), pp. 1-7.
- Islam, S. U., 2016. Clinical Uses of Probiotics. *Medicine*, 95(5), p. 1.
- Isolauri, E., 2004. Manipulation of the gut microbiota: probiotics. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 18(2), pp. 299-300.
- Jankovic , I. και συν., 2010. Application of probiotics in food products-challenges and new approaches. *Current Opinion in Biotechnology*, 21(2), pp. 175-176.
- Kemsawasd, V., Chaikham, P. & Rattanasena, P., 2016. Survival of immobilized probiotics in chocolate during storage and with an in vitro gastrointestinal model. *Food Bioscience*, Τόμος 16, pp. 37-43.

- Konar, N. και συν., 2018. Conventional and sugar-free probiotic white chocolate: Effect of inulin DP on various quality properties and viability of probiotics. *Journal of Functional Foods*, Τόμος 43, pp. 206-213.
- Konar, N., Toker, O. S., Oba, S. & Sagdic, O., 2016. Improving functionality of chocolate: A review on probiotic, prebiotic, and/or synbiotic characteristics. *Trends in Food Science and Technology*, Τόμος 49, pp. 35-44.
- Kopf-Bolanz, K. A. και συν., 2012. Validation of an In Vitro Digestive System for Studying Macronutrient Decomposition in Humans. *The Journal of Nutrition*, 142(2), pp. 245-246.
- Kord-Varkaneh, H. και συν., 2019. Does cocoa/dark chocolate supplementation have favorable effect on body weight, body mass index and waist circumference? A systematic review, meta-analysis and dose-response of randomized clinical trials. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(15).
- Kumar, M. και συν., 2012. Anticarcinogenic effect of probiotic fermented milk and chlorophyllin on aflatoxin-B1-induced liver carcinogenesis in rats.. *The British journal of nutrition*, 107(7), pp. 1006-1015.
- Kwik-Urbe, C. & Bektash, . R. M., 2008. Cocoa flavanols: Measurement, bioavailability and bioactivity. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 17(1), pp. 280-282.
- Lalicic-Petronijevic, J. και συν., 2015. Viability of probiotic strains Lactobacillus acidophilus NCFM® and Bifidobacterium lactis HN019 and their impact on sensory and rheological properties of milk and dark chocolates during storage for 180 days. *Journal of Functional Foods*, Τόμος 15, pp. 541-550.
- Lauzon, H. L. και συν., 2014. Probiotics and Prebiotics: Concepts, Definitions and History. *Aquaculture Nutrition: Gut Health, Probiotics and Prebiotics*, pp. 171-173.
- Lippi, G. και συν., 2009. Dark chocolate: Consumption for pleasure or therapy?. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, 28(4), pp. 482-484.
- Lourens-Hattingh, A. & Viljoen, B. C., 2001. Yogurt as probiotic carrier food. *International Dairy Journal*, 11(1-2).

- Magrone, T., Russo, M. A. & Jirillo, E., 2017. Cocoa and Dark Chocolate Polyphenols: From Biology to Clinical Applications. *Frontiers in Immunology*, 8(1), pp. 1-4.
- Manning, T. S. & Gibson, G. R., 2004. Prebiotics. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 18(2), pp. 287-293.
- Marika, M. και συν., 2019. Effect of cocoa products and its polyphenolic constituents on exercise performance and exercise-induced muscle damage and inflammation: A review of clinical trials. *Nutrients*, 11(7), pp. 1-4.
- Martin, M. A., Goya, L. & Ramos, S., 2013. Potential for preventive effects of cocoa and cocoa polyphenols in cancer. *Food and Chemical Toxicology*, 56(1), pp. 336-338.
- McFarland, L. V., 2015. From yaks to yogurt: The history, development, and current use of probiotics. *Clinical Infectious Diseases*, 60(2), pp. S85-S90.
- Miraballes, M., Fiszman, S., Gámbaro, A. & Varela, P., 2014. Consumer perceptions of satiating and meal replacement bars, built up from cues in packaging information, health claims and nutritional claims. *Food Research International*, Τόμος 64, p. 456.
- Mirković, M. και συν., 2018. The sensory quality and volatile profile of dark chocolate enriched with encapsulated probiotic lactobacillus plantarum bacteria. *Sensors*, 18(8), pp. 1-2.
- Mirković, M. και συν., 2018. The sensory quality and volatile profile of dark chocolate enriched with encapsulated probiotic lactobacillus plantarum bacteria. *Sensors (Switzerland)*, 18(8), pp. 1-16.
- Montagna, M. T. και συν., 2019. Chocolate, “Food of the Gods”: History, Science, and Human Health. *Environmental Research and Public Health*, 16(24), pp. 2-6.
- Nagpal, R. και συν., 2012. Probiotics, their health benefits and applications for developing healthier foods: a review. *FEMS Microbiology Letters*, 334(1), pp. 2-3.
- Neffe-Skocińska, K., Rzepkowska, A., Szydłowska, A. & Kołozyn-Krajewska, D., 2018. Chapter 3 - Trends and Possibilities of the Use of Probiotics in Food Production. Στο: A. M. Holban & A. M. Grumezescu, επιμ. *Alternative and Replacement Foods*. s.l.:Academic Press, pp. 65-94.
- Norhayati, H. & Ayob, M. K., 2014. Sensory quality of pilot-scale prebiotic chocolates in Malaysia. *Sains Malaysiana*, 43(9), pp. 1333-1344.

- Norhayati, H., Suzielawanis, I. R. & Khan, A. M., 2013. Effect of storage conditions on quality of prebiotic dark chocolate. *Malaysian Journal of Nutrition*, 19(1), pp. 111-120.
- Parnell, J. A. & Reimer, R. A., 2009. Weight loss during oligofructose supplementation is associated with decreased ghrelin and increased peptide YY in overweight and obese adults. *American Journal of Clinical Nutrition*, 89(6), pp. 1751-1758.
- Petyaev, I. M. & Bashmakov, Y. K., 2017. Dark Chocolate: Opportunity for an Alliance between Medical Science and the Food Industry?. *Frontiers in Nutrition*, 4(9), p. 2.
- Plessas, S., Bosnea, L., Alexopoulos, A. & Bezirtzoglou, E., 2012. Potential effects of probiotics in cheese and yogurt production: A review. *Engineering in Life Sciences*, 12(4), pp. 433-434.
- PL, L. & SY, W., 2012. Dark Chocolate Consumption on Anxiety, Depression and Health-Related Quality of Life of Patients with Cancer: A Randomised Clinical Investigation. *Malaysian Journal of Psychiatry*, 21(1).
- Rad, A. H. και συν., 2018. Development of synbiotic milk chocolate enriched with *Lactobacillus paracasei*, D-tagatose and galactooligosaccharide. *Applied Food Biotechnology*, 5(2), pp. 57-65.
- Rastall, R. A. & Gibson, G. R., 2015. Recent developments in prebiotics to selectively impact beneficial microbes and promote intestinal health. *Current Opinion in Biotechnology*, 32(1), pp. 42-44.
- Reid, G., 2016. Probiotics: Definition, scope and mechanisms of action. *Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology*, 30(1), pp. 17-18.
- Reid, G., 2017. The development of probiotics for women's health. *Canadian Journal of Microbiology*, 63(4), p. 273.
- Rivera-Espinoza, Y. & Gallardo-Navarro, Y., 2010. Non-dairy probiotic products. *Food Microbiology*, 27(1), pp. 2-3.
- Roberfroid, M., 2007. Prebiotics: The Concept Revisited. *The Journal of Nutrition*, 137(3), p. 830S.
- Rodriguez-Mateos, A. και συν., 2014. Bioavailability, bioactivity and impact on health of dietary flavonoids and related compounds: an update. *Archives of Toxicology*, 88(10), pp. 1824-1832.

- Salminen, S. και συν., 2010. Interaction of probiotics and pathogens-benefits to human health?. *Current Opinion in Biotechnology*, 21(1), pp. 157-158.
- Scholey, A. & Owen, L., 2013. Effects of chocolate on cognitive function and mood: A systematic review. *Nutrition Reviews*, 71(10), pp. 665-678.
- Schrezenmeir, J. & Vrese, M. d., 2001. Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition. *American Society for Clinical Nutrition*, 73(14), p. 363S.
- Serafini, M. και συν., 2003. Plasma antioxidants from chocolate. *Nature*, 424(6952), p. 1013.
- Shah, N. P., 2007. Functional cultures and health benefits. *International Dairy Journal*, 17(11), pp. 1262-1266.
- Sharifi, M. και συν., 2017. Kefir: a powerful probiotics with anticancer properties. *Medical Oncology*, 34(11), pp. 182-183.
- Shen, J., Zuo, Z. X. & Mao, A. P., 2014. Effect of probiotics on inducing remission and maintaining therapy in ulcerative colitis, Crohn's disease, and pouchitis: Meta-analysis of randomized controlled trials. *Inflammatory Bowel Diseases*, 20(1), pp. 21-23.
- Silva, M. P. και συν., 2017. Semisweet chocolate as a vehicle for the probiotics *Lactobacillus acidophilus* LA3 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BLC1: Evaluation of chocolate stability and probiotic survival under in vitro simulated gastrointestinal conditions. *LWT - Food Science and Technology*, Τόμος 75, pp. 640-67.
- Siró, I., Kápolna, E., Kápolna, B. & Lugasi, A., 2008. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance-A review. *Appetite*, 51(3), pp. 456-465.
- Siró, I., Kápolna, E., Kápolna, B. & Lugasi, A., 2008. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance-A review. *Appetite*, 51(3), pp. 457-465.
- Succi, M. και συν., 2017. Survival of commercial probiotic strains in dark chocolate with high cocoa and phenols content during the storage and in a static in vitro digestion model. 35(1), pp. 60-61.
- Suvarna, V. C. & Bobby, V. U., 2005. Probiotics in human health: A current assessment. *Current Science*.

Thantsha, M., Mamvura, C. & Booyens, J., 2012. Probiotics - What They Are, Their Benefits and Challenges. Στο: T. Brzozowski, επιμ. *New Advances in the Basic and Clinical Gastroenterology*. Croatia: InTech, pp. 21-46.

Torres- Moreno, M., Tarrega, A., Costell, E. & Blanch, C., 2011. Dark chocolate acceptability: influence of cocoa origin and processing conditions. *Science of Food and Agriculture*, 92(2), pp. 1-2.

Tuohy, K. M., Probert, H. M., Smejka, C. W. & Gibson, G. R., 2003. Using probiotics and prebiotics to improve gut health. *Drug Discovery Today*, 8(15), pp. 692-698.

USDA, 2019. *Chocolate, dark, 70-85% cacao solids*. [Ηλεκτρονικό]
Available at: <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/170273/nutrients>
[Πρόσβαση 4 January 2019].

Verna, R., 2013. The history and science of chocolate. *Malaysian Journal of Pathology*, 35(2), pp. 111-118.

Waterhouse, A. L., Shirley, J. R. & Donovan, J. L., 1996. Antioxidants in Chocolate. 348(9030), p. 834.

World, C. F., 2018. *History of Cocoa*. [Ηλεκτρονικό]
Available at: <https://www.worldcocoafoundation.org/blog/history-of-cocoa/>
[Πρόσβαση 15 August 2018].