



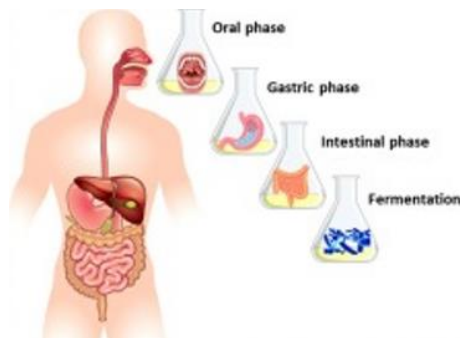
Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής  
Σχολή Επιστημών Τροφίμων  
Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών  
**ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ, ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ  
**Μελέτη της μεταβολής της αντιοξειδωτικής ικανότητας  
φυτικών συστατικών σε προσομοίωση γαστρεντερικού  
συστήματος**

MSc Thesis

**Variations of antioxidant capacity of plant ingredients in a in  
simulated gastrointestinal digestion and colonic fermentation  
system**



ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΗ/NAME OF STUDENT

**Χριστίνα Κώστα / Christina Kosta**

ΟΝΟΜΑ ΕΙΣΗΓΗΤΗ/NAME OF THE SUPERVISOR

**Ανθιμία Μπατρίνου / Anthimia Batrinou**

ΑΙΓΑΛΕΩ/AIGALEO 2023



Faculty of Food Sciences

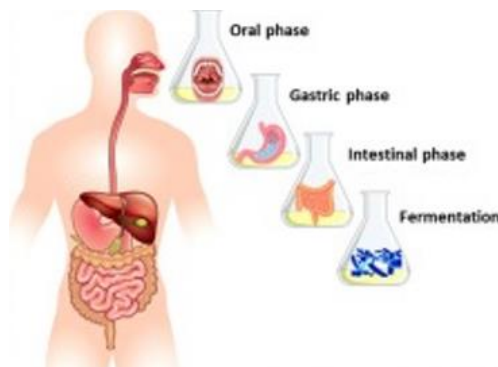
Department of Food Science and Technology

Master of Science

**FOOD INNOVATION, QUALITY AND SAFETY**

MSc THESIS

**Variations of antioxidant capacity of plant ingredients in a in simulated gastrointestinal digestion and colonic fermentation**



NAME OF STUDENT

**Christina Kosta**

NAME OF SUPERVISOR

**Anthimia Batrinou**

AIGALEO 2023

### **Επιτροπή Αξιολόγησης Μεταπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας**

Οι υπογράφωντες δηλώνουμε ότι έχουμε εξετάσει τη μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία (master thesis) με τίτλο **‘Μελέτη της μεταβολής των πολυφαινολών σε σιρόπι χαρουπιού(χαρουπόμελο) σε προσομοίωση γαστρεντερικού συστήματος’** που παρουσιάσθηκε από την **Χριστίνα Κώστα**, υποψηφίου για τον μεταπτυχιακό τίτλο σπουδών στην **ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ, ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ** και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.

Ημερομηνία: 02 Μαρτίου 2023

Επιβλέπων καθηγητής: Μπατρίνου Ανθιμία, Επίκουρη Καθηγήτρια, Τμήμα Τεχνολογίας Τροφίμων, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

Μέλος επιτροπής: Κοντελές Σπυρίδων, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Τεχνολογίας Τροφίμων, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

Μέλος επιτροπής: Στρατή Ειρήνη, Επίκουρη καθηγήτρια, Τμήμα Τεχνολογίας Τροφίμων, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

### **Δήλωση περί λογοκλοπής/Copyright**

Έχοντας πλήρη επίγνωση των συνεπειών του νόμου περί πνευματικής ιδιοκτησίας, δηλώνω ότι είμαι αποκλειστική συγγραφέας της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Δηλώνω, επίσης, ότι αναλαμβάνω όλες τις συνέπειες, όπως αυτές νομίμως ορίζονται, στην περίπτωση που διαπιστωθεί διαχρονικά ότι η εργασία μου αυτή ή τμήμα αυτής αποτελεί προϊόν λογοκλοπής.

Χριστίνα Κώστα

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Χ. Κώστα', with a long horizontal line drawn underneath it.

## **Ευχαριστίες**

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια Μπατρίνου Ανθιμία για την καθοδήγησή της καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας εργασίας.

Παράλληλα θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτωρ Πυροβόλου Αικατερίνη για τη βοήθεια και την συνεργασία που είχαμε κατά τη διάρκεια της διεξαγωγής του πειράματος.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την γραμματέα του ΠΜΣ Παπαπαύλου Ευανθία για την ωφέλιμη βοήθειά της και τη συνεχή υποστήριξή της καθ' όλη τη διάρκεια της φοίτησης.

Τέλος, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στους δικούς μου ανθρώπους που με στήριξαν και με ενθάρρυναν σε αυτή μου την προσπάθεια.

## Περίληψη

Το χαρουπόμελο θεωρείται πλούσια πηγή φαινολικών ουσιών που συνδέονται με ισχυρές επιδράσεις στην ανθρώπινη υγεία.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση της βιοδιαθεσιμότητας των πολυφαινολών του σιροπιού από χαρούπι (χαρουπόμελο) σε προσομοίωση γαστρεντερικού συστήματος, σε δύο διαφορετικά εντερικά μικροβιώματα, ενός ασθενούς με νόσο του Crohn και ενός υγιούς.

Το πείραμα χωρίστηκε σε πέντε φάσεις, την αρχική ( $t=0h$ ), την γαστρική ( $t=1.5h$ ), την εντερική ( $t=2h$ ), τη φάση της πρώιμης εντερικής ζύμωσης ( $t=4h$ ) και την φάση της όψιμης εντερικής ζύμωσης ( $t=18h$ ). Στις δύο τελευταίες φάσεις είχαν προστεθεί τα κόπρανα των υποψηφίων. Τα δείγματα του ασθενούς με νόσο του Crohn και του υγιούς υποβλήθηκαν στις πέντε *in vitro* φάσεις. Στο τέλος κάθε φάσης λήφθηκαν δείγματα, ώστε να γίνει ο προσδιορισμός των ολικών φαινολικών ουσιών σε αυτά τα δείγματα, με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu. Παράλληλα έγιναν και μικροβιολογικές αναλύσεις, ώστε να ελεγχθεί πόσο «μικροβιακά ενεργό» είναι το μικροβίωμα των δύο δειγμάτων.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στο τέλος της εντερικής ζύμωσης η περιεκτικότητα των ολικών φαινολικών ουσιών μειώθηκε σημαντικά και στα δύο δείγματα (ασθενούς και υγιούς) σε σχέση με τη αρχική φάση, με τον υγιή όμως να εμφανίζει μεγαλύτερο ποσοστό μείωσης. Η μεγαλύτερη πτώση στη συγκέντρωση των πολυφαινολών συνέβη κατά τη διάρκεια της πρώιμης ζύμωσης και στα δύο δείγματα, ενώ κατά τη διάρκεια της όψιμης ζύμωσης η περιεκτικότητα των πολυφαινολών δεν μεταβλήθηκε σημαντικά.

Τέλος, από τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης φαίνεται πως οι πολυφαινόλες από το χαρουπόμελο είχαν αλληλεπίδραση με το εντερικό μικροβίωμα και του ασθενούς και του υγιούς, με αποτέλεσμα το μικροβίωμα και των δύο δειγμάτων να μεταβολίσει τις πολυφαινόλες.

Αποτελέσματα από την παρούσα μελέτη δημοσιεύτηκαν στο 1<sup>ο</sup> Διεθνές Συνέδριο για τα τρόφιμα, τη διατροφή και τη δημόσια υγεία, που διεξήχθη στο Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, I.P., Lisbon, Portugal, 17/11/2022 (Pyrovolou *et al.*, 2022).

## **Abstract**

Carobsyrop considered as a rich source of phenolics that are linked with potent health effects.

The aim of this study was to explore the bioavailability of polyphenols of carob syrup, in simulated gastrointestinal digestion and colonic fermentation system. Two different stool samples were studied, one from a volunteer with Crohn's disease and one from a healthy volunteer.

The phases of the system were: initial phase(t=0h), gastric phase(t=1.5h), enteric phase(t=2h), early colonic fermentation(t=4h) and late colonic fermentation(t=18h). In the last two phases, the fecal homogenate was added to the system. The samples were subjected to simulated gastrointestinal digestion and gut microbiota fermentation. The TPC from the samples (Crohn's disease and healthy) in all phases of the system was estimated using Folin–Ciocalteu assay (FC). Also, were performed microbiological analyzes on the feces of Crohn's disease and healthy volunteers.

Results have shown that at the end of the late colonic fermentation TPC was reduced in both samples (Crohn's disease and healthy) as compared to the initial phase. The bigger decrease was in the healthy volunteer. Moreover, in both samples, TPC was reduced more during early fermentation. During the late fermentation the TPC does not differed significantly.

These results indicate that polyphenols of carobsyrop interacted with the gut microbiome of both samples (Crohn's disease and healthy).

Results from the present study were published in the 1st International Conference on Food, Nutrition and Public Health - Towards a Sustainable Future, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, I.P., Lisbon, Portugal, November 17, 2022 (Pyrovolou *et al.*, 2022).



## Περιεχόμενα

Δήλωση περί λογοκλοπής/Copyright.....	4
Ευχαριστίες .....	5
Περίληψη .....	6
Abstract .....	8
1. Εισαγωγή.....	11
2. Θεωρητικό υπόβαθρο.....	13
<b>2.1 Χαρουπιά .....</b>	<b>13</b>
<b>2.1.1 Ιστορική αναδρομή .....</b>	<b>13</b>
<b>2.1.2 Βοτανική περιγραφή.....</b>	<b>13</b>
<b>2.1.3 Θρεπτική αξία της χαρουπιάς .....</b>	<b>16</b>
<b>2.1.4 Χρήσεις χαρουπιού .....</b>	<b>18</b>
<b>2.1.5 Ευεργετικές ιδιότητες χαρουπιού .....</b>	<b>21</b>
<b>2.1.6 Οι πολυφαινόλες στο χαρούπι και στα προϊόντα του .....</b>	<b>24</b>
<b>2.2 Μικροβίωμα .....</b>	<b>32</b>
<b>2.2.1 Ανθρώπινο μικροβίωμα.....</b>	<b>33</b>
<b>2.2.2 Μικροβίωμα εντέρου.....</b>	<b>36</b>
<b>2.2.3 Οφέλη του εντερικού μικροβιώματος στον οργανισμό.....</b>	<b>37</b>
<b>2.2.4 Διαμόρφωση και ρυθμιστικοί παράγοντες του εντερικού μικροβιώματος .....</b>	<b>38</b>
<b>2.2.5 Εντερικό μικροβίωμα και ο ρόλος του στην ανθρώπινη υγεία και στις ασθένειες .....</b>	<b>41</b>
<b>2.2.6 Εντερικό μικροβίωμα και Ιδιοπαθείς Φλεγμονώδεις Νόσοι του Εντέρου (ΙΦΝΕ) .....</b>	<b>44</b>
<b>2.2.7 Νόσος του Crohn .....</b>	<b>45</b>
<b>2.2.8 Προβιοτικά και νόσος του Crohn.....</b>	<b>45</b>
<b>2.2.9 Πολυφαινόλες και εντερικό μικροβίωμα .....</b>	<b>46</b>
3. Υλικά & Μέθοδοι.....	49
<b>3.1 Σχεδιασμός πειράματος.....</b>	<b>49</b>
<b>3.2 Παρασκευή Χαρουπόμελου .....</b>	<b>49</b>
<b>3.2.1 Υλικά &amp; εξοπλισμός.....</b>	<b>49</b>
<b>3.2.2 Διαδικασία παρασκευής χαρουπόμελου .....</b>	<b>49</b>
<b>3.3 Μικροβιολογικές αναλύσεις.....</b>	<b>50</b>
<b>3.3.1 Υλικά και εξοπλισμός.....</b>	<b>51</b>
<b>3.3.2 Προετοιμασία μικροβιολογικών αναλύσεων .....</b>	<b>52</b>
<b>3.3.3 Μέθοδος εμβολιασμού.....</b>	<b>53</b>
<b>3.3.4 Καταμέτρηση αποικιών .....</b>	<b>55</b>

<b>3.4 Προσομοίωση in vitro γαστρεντερικού συστήματος .....</b>	<b>55</b>
<b>3.4.1 Υλικά και εξοπλισμός.....</b>	<b>55</b>
<b>3.4.2 Πειραματική πορεία in vitro γαστρεντερικού συστήματος.....</b>	<b>56</b>
<b>3.5 Προσδιορισμός των ολικών φαινολικών συστατικών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu.....</b>	<b>58</b>
<b>3.5.1 Υλικά και εξοπλισμός.....</b>	<b>58</b>
<b>3.5.2 Μέθοδος Folin-Ciocalteu.....</b>	<b>59</b>
<b>4. Αποτελέσματα &amp; Συζήτηση.....</b>	<b>63</b>
<b>4.1 Μικροβιολογικές αναλύσεις.....</b>	<b>63</b>
<b>4.2 Αποτελέσματα ολικών φαινολικών ουσιών.....</b>	<b>64</b>
<b>5. Συμπεράσματα .....</b>	<b>71</b>
<b>Βιβλιογραφία .....</b>	<b>72</b>
<b>Πηγές εικόνων .....</b>	<b>78</b>
<b>Παράρτημα Α .....</b>	<b>80</b>

## 1. Εισαγωγή

Η χαρουπιιά (*Ceratonia siliqua L.*) είναι ένα αειθαλές δένδρο, που βρίσκεται κυρίως στη λεκάνη της Μεσογείου. Ο καρπός της χαρουπιιάς είναι πλούσιος σε βιοδραστικές ουσίες και γι' αυτό το λόγο θα μπορούσε να θεωρηθεί ως λειτουργική τροφή. Σύμφωνα με μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί το χαρούπι παρουσιάζει αντιοξειδωτική, αντικαρκινική, αντιδιαβητική, αντιμικροβιακή και αντιφλεγμονώδη δράση (Nasar-abbas *et al.*, 2016; Benchikh & Louail`eche, 2014; Goulas & Georgiou, 2020).

Ένα από τα πιο διαδεδομένα προϊόντα που παράγονται τα τελευταία χρόνια στο εμπόριο από τον καρπό της χαρουπιιάς είναι το σιρόπι χαρουπιού (χαρουπόμελο). Το σιρόπι χαρουπιού λαμβάνεται από τον πολτό του καρπού και έχει υψηλή περιεκτικότητα σε βιταμίνες, σάκχαρα και πολυφαινόλες.

Οι πολυφαινόλες έχουν πολλαπλά οφέλη για τη υγεία, ενώ επιδημιολογικές μελέτες έχουν αναφέρει πως οι πολυφαινόλες μπορούν να μειώσουν τον κίνδυνο του διαβήτη, της παχυσαρκίας, καθώς και καρδιοαγγειακών νόσων (Kumar *et al.*, 2017; Sanchez-Patan *et al.*, 2012). Ωστόσο, είναι γνωστό πως αυτές οι ευεργετικές ιδιότητες των πολυφαινολών στον οργανισμό εξαρτώνται από τον μεταβολισμό και την απορρόφησή τους. Όμως, οι πολυφαινόλες δεν απορροφώνται πλήρως από το λεπτό έντερο. Οι μη απορροφημένες από το λεπτό έντερο πολυφαινόλες περνούν στο κόλον, όπου εκεί μετασχηματίζονται από τη μικροχλωρίδα του παχέος εντέρου σε απλούστερες φαινολικές ενώσεις. Στη φάση αυτή μπορεί να επηρεαστεί η βιοδιαθεσιμότητά των πολυφαινολών στον οργανισμό. Υπό την έννοια αυτή, είναι σημαντικό να μελετηθεί η διερεύνηση της βιοδιαθεσιμότητας των πολυφαινολών, και η αλληλεπίδρασή τους με το εντερικό μικροβίωμα, ώστε να κατανοηθεί καλύτερα η επίδραση των φαινολικών ουσιών στην υγεία του ανθρώπου. Γενικά, ο μεταβολισμός των πολυφαινολών από την μικροχλωρίδα του εντέρου φαίνεται να εξαρτάται σε κάποιο βαθμό από τον συνολικό πληθυσμό, αλλά και το είδος των μικροοργανισμών του εντέρου.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση της βιοδιαθεσιμότητας των πολυφαινολών του σιροπιού από χαρούπι (χαρουπόμελο), το οποίο είναι πλούσιο σε πολυφαινόλες, σε προσομοίωση γαστρεντερικού συστήματος, σε δύο

διαφορετικά εντερικά μικροβιώματα, ενός ασθενούς με νόσο του Crohn και ενός υγιούς.

## **2. Θεωρητικό υπόβαθρο**

### **2.1 Χαρουπιά**

#### **2.1.1 Ιστορική αναδρομή**

Η χαρουπιά (*Ceratonia siliqua*) ανήκει στην οικογένεια των οσπρίων (οικογένεια Fabaceae). Είναι δένδρο αειθαλές, το οποίο συναντάται σε πολλές χώρες της Μεσογείου, όπως η Ελλάδα, η Ιταλία, η Ισπανία, η Τουρκία, το Μαρόκο και η Συρία. Στη χώρα μας η κύρια περιοχή παραγωγής της χαρουπιάς είναι η Κρήτη. Η επιστημονική ονομασία του δένδρου προέρχεται από την ελληνική λέξη «keras» ή στην σύγχρονη «κέρατο» και την λατινική λέξη «siliqua», που συνολικά παραπέμπει στο σχήμα και την σκληρότητα του λοβού αντίστοιχα. Το κοινό όνομα προέρχεται από την εβραϊκή λέξη «kharun» (Battle & Tous, 1997). Ιστορικά, το χαρούπι, φαίνεται να διαδόθηκε από τους αρχαίους Έλληνες, οι οποίοι το έφεραν από τη Μέση Ανατολή στην Ελλάδα και στην Ιταλία, καθώς και από τους Άραβες, οι οποίοι το έκαναν γνωστό στη βόρεια Αφρική, στην Ισπανία, στην Πορτογαλία και στη Γαλλία. Επίσης, στη σύγχρονη εποχή η χαρουπιά έχει καλλιεργηθεί και σε άλλες χώρες, οι οποίες έχουν παρόμοιο κλίμα με το μεσογειακό, όπως είναι η Καλιφόρνια, το Μεξικό και η Αργεντινή (Battle & Tous, 1997). Παραδοσιακά το χαρούπι θεωρείται τροφή κυρίως για τα ζώα και έπειτα για τον άνθρωπο, ενώ υπάρχουν και αναφορές της χρήσης του ως φάρμακο στην παραδοσιακή ιατρική πολλών περιοχών της Μεσογείου (Aissani *et al.*, 2012).

Αξίζει να αναφερθεί πως σε παγκόσμια κλίμακα η παραγωγή χαρουπιών υπολογίζεται ότι φθάνει περίπου τους 310.000 τόνους ετησίως. Συγκεκριμένα, για την χρονική περίοδο από το 1994 έως το 2018 και λαμβάνοντας υπόψη τις μέσες τιμές παραγωγής, κορυφαία χώρα παραγωγής χαρουπιού είναι η Πορτογαλία με μέση ετήσια παραγωγή 40.007,88 τόνους, ενώ ακολουθεί η Ιταλία (30.992,48 τόνοι) (FAOSTAT, 2020).

#### **2.1.2 Βοτανική περιγραφή**

Η χαρουπιά είναι πολυετές δένδρο και μπορεί να ζήσει έως και 150 χρόνια. Αναπτύσσεται αργά και δεν έχει υψηλές απαιτήσεις σε φροντίδα και νερό. Μπορεί να καλλιεργηθεί σε περιοχές με λίγες βροχοπτώσεις, καθώς και σε φτωχά σε θρεπτικά συστατικά εδάφη. Η χαρουπιά μπορεί να επιβιώσει σε υψηλές θερμοκρασίες, που

ξεπερνούν τους 40°C χωρίς να υπόκειται οποιαδήποτε ζημιά. Έχει μεγάλη ανθεκτικότητα και ανοχή στην φωτιά, και αυτός είναι ο λόγος που προσαρμόζεται εύκολα σε διαφορετικά εδάφη (Gübbük *et al.*, 2013). Ωστόσο, είναι δένδρο ευαίσθητο στον παγετό. Συγκεκριμένα, θερμοκρασίες μεταξύ -4°C και -7°C είναι δυνατό να προκαλέσουν ζημιές στο φυτό, με ξηράνσεις όχι μόνο των νεαρών βλαστών αλλά και των παλαιότερων ή ακόμη και ολόκληρης της κόμης.

Κατάλληλες περιοχές για τη φύτευσή της θεωρούνται οι περιοχές με ήπιους χειμώνες, ήπια- ζεστή άνοιξη και θερμά- ξηρά καλοκαιρία, αποφεύγοντας κατά το δυνατό, περιοχές που πλήττονται από παγετούς ή περιοχές με υψόμετρο μεγαλύτερο των 600 μέτρων. Οι καλύτερες συνθήκες ανάπτυξης για τη χαρουπιά εντοπίζονται στις παράλιες περιοχές λόγω ευνοϊκότερων κλιματικών συνθηκών. Σε χρονιές με έντονες φθινοπωρινές βροχές είναι δυνατό να παρατηρηθεί μειωμένη καρπόδεση καθώς η βροχή παρεμποδίζει τη μεταφορά γύρης και, κατ' επέκταση, τη μη ικανοποιητική επικονίαση (Υπουργείο Γεωργίας Κύπρου, 2016).

Οι χαρουπιές αναπτύσσονται ως δέντρα ύψους έως 10 m με μια ευρεία ημισφαιρική κόμη και ένα παχύ κορμό με τραχύ καφέ φλοιό και ανθεκτικά κλαδιά. Τα φύλλα είναι 10-20 cm σε μήκος, σκούρο πράσινο στην πλευρά της ράχης και ανοιχτό πράσινο στην κοιλιακή πλευρά. Έχουν μια παχιά κηρώδη επίστρωση που αποτρέπει την υπερβολική απώλεια υγρασίας σε ημίξηρα κλίματα. Τα κύτταρα των φύλλων περιέχουν φαινολικές ενώσεις. Οι οφθαλμοί της διακρίνονται σε βλαστοφόρους και ανθοφόρους (απλοί). Οι ανθοφόροι που βρίσκονται σε ξύλο του προηγούμενου χρόνου εκπτύσσονται το φθινόπωρο και δίνουν μονοστέλεχες ταξιανθίες, ενώ αυτοί που βρίσκονται σε ξύλο μεγαλύτερης ηλικίας, 3-15 ετών, δίνουν πολυστέλεχες ταξιανθίες.

Η χαρουπιά είναι αείφυλλο δένδρο, δηλαδή δεν ρίχνει τα φύλλα της το φθινόπωρο, αλλά μόνο κάθε δεύτερη άνοιξη ανανεώνει το φύλλωμά της. Τα χαρουπόδενδρα διαχωρίζονται σε θηλυκά, αρσενικά και ερμαφρόδιτα, ανάλογα με τα άνθη που σχηματίζουν. Ανθίζουν μία φορά το έτος, το φθινόπωρο (Σεπτέμβριος έως Νοέμβριος), ενώ ο χρόνος και η διάρκεια της περιόδου της άνθησης τους εξαρτάται από τις τοπικές κλιματικές συνθήκες που επικρατούν, όπως και σε όλα τα καρποφόρα φυτά. Τα άνθη της είναι μικρά και πολυάριθμα, 6-12 mm σε μήκος, σπειροειδώς διατεταγμένα κατά μήκος του άξονα της ταξιανθίας, αναπτύσσονται

σαν τσαμπιά σε παρακλάδια από παλιό ξύλο, ακόμη και στον κορμό. Τα λουλούδια έχουν πράσινο-κόκκινη απόχρωση. Μόνο λίγα άνθη αποδίδουν καρπούς και σπάνια δημιουργούνται περισσότεροι από δύο καρποί ανά ανθό. Οι θηλυκές ποικιλίες των δέντρων της χαρουπιάς έχουν την υψηλότερη εμπορική σημασία σε όλες τις χώρες της Μεσογείου, λόγω της ανάπτυξης του καρπού, σε αντίθεση με τις αρσενικές και ερμαφρόδιτες ποικιλίες που χρησιμοποιούνται συνήθως ως επικονιαστές (Battle and Tous, 1997).

Ο καρπός της χαρουπιάς, το χαρούπι, αρχικά είναι ένας μακρύς πράσινος λοβός, ο οποίος όταν ωριμάσει συρρικνώνεται και γίνεται καφέ, αφού αποβάλλει μεγάλο ποσοστό υγρασίας και τροποποιείται χημικά η δομή της χλωροφύλλης (Nasar-Abbas *et al.*, 2016; Gübbük *et al.*, 2013). Ο ανώριμος λοβός έχει μικρότερες διαστάσεις και ανοιχτό πράσινο χρώμα (Εικ. 1).



Εικόνα 1: Ο καρπός της χαρουπιάς σε ανώριμη και ώριμη μορφή.

Ο ώριμος λοβός του χαρουπιού αποτελείται κατά 90% από τον πολτό και κατά 10% από τους σπόρους. Ο πολτός, επί της ουσίας είναι ο λοβός, απαλλαγμένος από τους σπόρους, του οποίου το εξωτερικό δερματώδες στρώμα ονομάζεται περικάρπιο (σκληρό, δερματώδες περίβλημα), ενώ η εσωτερική μαλακή περιοχή ονομάζεται μεσοκάρπιο (σαρκώδες). Οι σπόροι αποτελούνται από το φλοιό (30-33%), το ενδοσπέρμιο (42-46%) και το φυτό (23-25%), ενώ είναι εγκάρσια τοποθετημένοι ως προς τον λοβό και χωρίζονται με το μεσοκάρπιο (Εικ. 2). Οι σπόροι είναι σκληροί με συμπιεσμένο ωοειδές-μακρόστενο σχήμα (Battle & Tous, 1997; Naghmouchi *et al.*, 2009) και έχουν όλοι το ίδιο βάρος.



Εικόνα 2: Ανατομικά χαρακτηριστικά του σπόρου χαρουπιού.

Γενικά, η ποιότητα των καρπών εξαρτάται κυρίως από τους σπόρους και τον πολτό στον οποίο είναι ενσωματωμένοι αυτοί. Οι σπόροι θεωρούνται ως το πιο σημαντικό μέρος των χαρουπιών. Το περίβλημά τους χρησιμοποιείται για την εξαγωγή ταννινών και για την παρασκευή διαιτητικών γευμάτων για ανθρώπους και ζώα (Gübbük *et al.*, 2013).

### 2.1.3 Θρεπτική αξία της χαρουπιάς

Όλα τα μέρη του καρπού της χαρουπιάς είναι πλούσια σε θρεπτικά συστατικά (Εικ. 3). Συγκεκριμένα, ο καρπός του χαρουπιού περιέχει υψηλές ποσότητες υδατανθράκων (48 –56%), και είναι πλούσιος σε ευκόλως ζυμώσιμα σάκχαρα, με κύριους αντιπροσώπους τη σακχαρόζη (32-38%), τη φρουκτόζη (5-7%) και τη γλυκόζη (5-6%). Ακόμα έχει υψηλή περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες, με κύριες φαινολικές ενώσεις τα φαινολικά οξέα, τις ταννίνες και τα флаβονοειδή, ενώ είναι πλούσιος και σε διαιτητικές ίνες. Ωστόσο, οι ποσότητες πρωτεϊνών και λιπιδίων που περιέχονται στον καρπό κρίνονται χαμηλές ( 3–4% και 0,2–0,6% αντίστοιχα) (Stavrou *et al.*, 2018).

Ο καρπός, περιέχει, επίσης, πολλά μέταλλα και αμινοξέα. Πιο συγκεκριμένα, περιέχονται 17 είδη αμινοξέων, συμπεριλαμβανομένων και των απαραίτητων αμινοξέων που δεν μπορεί να συνθέσει ο οργανισμός (λευκίνη, ισολευκίνη, βαλίνη, θρεονίνη, μεθειονίνη, φαινυλαλανίνη και λυσίνη), τα οποία πληρούν τις συγκεντρώσεις, τις οποίες ορίζει ο παγκόσμιος οργανισμός υγείας (Goulas *et al.*, 2016).

Ο πολτός έχει υψηλή περιεκτικότητα σε διαλυτά σάκχαρα (περίπου 40-50% επί ξηράς ουσίας) και σε πολυφαινόλες, με κύριες τις ταννίνες. Αναφορικά με τις

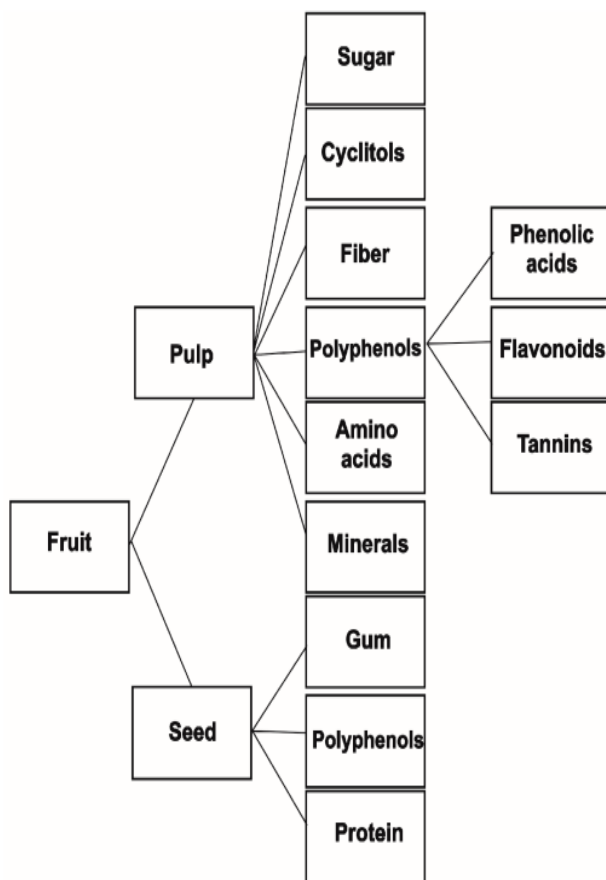


τανίνες, σχολιάζεται ότι οι ώριμοι λοβοί χαρουπιών φαίνεται να είναι αυτοί που περιέχουν ιδιαίτερα μεγάλη ποσότητα (16-20% των ξηρών βάρους) (Batlle & Tous, 1997). Επίσης, ο πολτός είναι πηγή βιταμινών E, D, C, B6, νιασίνης και φολικού οξέος. Ένα ακόμα στοιχείο του πολτού του χαρουπιού που έχει ενδιαφέρον είναι ότι περιέχει τη D-πινιτόλη, η οποία ανήκει στην οικογένεια των κυκλιτόλων και επηρεάζει τον γλυκαιμικό έλεγχο σε ασθενείς με διαβήτη τύπου II. Συγκεκριμένα, η έρευνα των Nasar-Abbas και των συνεργατών του έδειξε υψηλή περιεκτικότητα D-πινιτόλης (113mg/gr) στο χαρούπι σε σχέση με άλλα όσπρια (Nasar-Abbas *et al.*, 2016).

Όσον αφορά τους σπόρους του χαρουπιού, έχουν μικρότερη περιεκτικότητα σακχάρων και μεγαλύτερη περιεκτικότητα λιπιδίων και πρωτεϊνών σε σύγκριση με τον πολτό, ενώ περιέχουν μέταλλα, όπως το ασβέστιο, ο φώσφορος και το κάλιο, καθώς και διαιτητικές ίνες ( 18% κυτταρίνη και ημικυτταρίνη).

Πιο συγκεκριμένα στο ενδοσπέρμιο των σπόρων εντοπίζεται ο πολυσακχαρίτης «γαλακτομαννάνη». Από το ενδοσπέρμιο προέρχεται το κόμμα του χαρουπιού ή αλλιώς locust bean gum. Το κόμμα είναι ένα λευκό εκχύλισμα σκόνης, το οποίο κατατάσσεται από τον Ευρωπαϊκό κώδικα ως πλήρως αποδεκτή πρόσθετη τροφή για ανθρώπινη χρήση (E-410). Τέλος το φυτό του σπόρου, που αντιπροσωπεύει το 23 έως 25% του βάρους των σπόρων αποτελείται κατά κύριο λόγο από πρωτεΐνες με ισορροπημένη περιεκτικότητα σε αμινοξέα (Christou *et al.*, 2021).

Στη μελέτη των Sigge *et al.*, (2011), αναλύθηκε η θρεπτική σύσταση πέντε ποικιλιών χαρουπιού που αναπτύσσονται στη Νότια Αφρική. Ειδικότερα, αναλύθηκαν οι συγκεντρώσεις των πολυφαινολών, των ιχνοστοιχείων, των αμινοξέων και των λιπιδίων, μέσω ειδικών τυποποιημένων μεθόδων. Συγκεκριμένα, η μέση περιεκτικότητα των λοβών των χαρουπιών σε υγρασία κυμάνθηκε από 8.17 έως 9.56% επί ξηρού βάρους σώματος, η περιεκτικότητα των ολικών πρωτεϊνών τους από 3.07 έως 4.42%, η περιεκτικότητα τους σε ολικές λιπαρές ουσίες από 0.45 έως 0.86%, η περιεκτικότητα τους σε τέφρα από 2.13 έως 2.69%, η περιεκτικότητα τους σε σάκχαρα από 40.69 έως 54.74%, η περιεκτικότητα τους σε διαιτητικές ίνες από 29.88 έως 36.07% και η περιεκτικότητα τους σε πολυφαινόλες από 2.58 έως 3.08%. Οι ερευνητές επεσήμαναν την υψηλή θρεπτική αξία του χαρουπιού και το γεγονός ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως σημαντικό εναλλακτικό τρόφιμο.



Εικόνα 3: Η θρεπτική σύσταση του καρπού της χαρουπιάς.

Ωστόσο πρέπει να αναφερθεί ότι οι διαφορετικοί πληθυσμοί των χαρουπόδενδρων, η περιοχή, το κλίμα και το έδαφος στα οποία καλλιεργούνται, καθώς και η εποχή της συγκομιδής επηρεάζουν τη χημική σύνθεση και τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του καρπού. Η υγρασία, τα σάκχαρα, οι διαιτητικές ίνες, οι πρωτεΐνες, τα λιπαρά, η τέφρα και οι πολυφαινόλες είναι τα ποιοτικά χαρακτηριστικά που επηρεάζονται κυρίως.

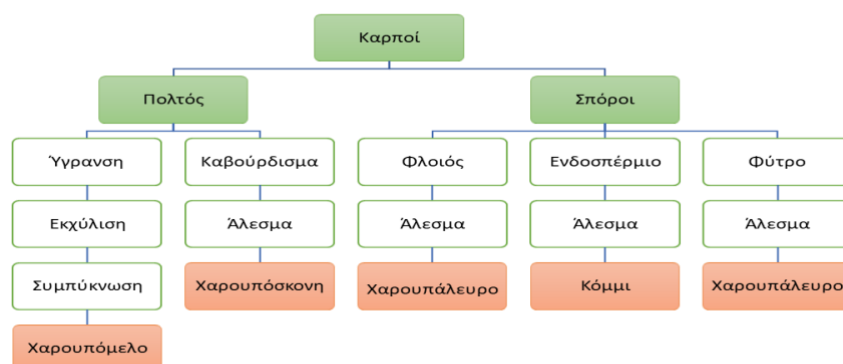
Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι χημικές αναλύσεις έχουν καταδείξει ότι τα παράγωγα του χαρουπιού περιλαμβάνουν όλα τα θρεπτικά συστατικά του καρπού και ότι πάνω από το 75% των προϊόντων χαρουπιού που κυκλοφορούν στην αγορά περιέχουν ό,τι αναγράφει η συσκευασία στα συστατικά (Papaefstathiou *et al.*, 2018).

#### 2.1.4 Χρήσεις χαρουπιού

Παραδοσιακά το χαρούπι χρησιμοποιούταν κυρίως ως ζωοτροφή. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια παρουσιάζει όλο και μεγαλύτερο ενδιαφέρον από τη βιομηχανία

τροφίμων, για τη δημιουργία προϊόντων, για ανθρώπινη κατανάλωση, λόγω της πολύτιμης σύνθεσης των καρπών της. Ο καρπός της χαρουπιάς είναι ένας καρπός πλούσιος σε θρεπτικά συστατικά, ενώ ταυτόχρονα αποτελεί και φθηνή πρώτη ύλη, εύκολα αξιοποιήσιμη από τις βιομηχανίες. Χρησιμοποιείται στις βιομηχανίες τροφίμων, φαρμακευτικών και καλλυντικών.

Όπως έχει αναφερθεί και πιο πάνω, ο καρπός του χαρουπιού είναι πλούσιος σε σάκχαρα και φυτικές ίνες, ενώ είναι φτωχότερος σε πρωτεΐνη. Οι λοβοί έχουν υψηλή περιεκτικότητα σακχάρων και πολυφαινολών, ενώ οι σπόροι είναι πλούσιοι σε πρωτεΐνη. Το μεγαλύτερο ποσοστό της πρωτεΐνης βρίσκεται στο φύτρο, ενώ το ενδοσπέρμιο είναι πλούσιο σε γλυκομαννάνη. Εξαιτίας, των διαφορών που υπάρχουν στη σύσταση και συνεπώς και στη θρεπτική αξία ανά τα διάφορα μέρη του καρπού, είναι σημαντικός ο διαχωρισμός του λοβού από τους σπόρους, ώστε να παραχθούν ποικίλα προϊόντα για διαφορετικές χρήσεις. Τα προϊόντα που παράγονται από τη βιομηχανία τροφίμων καθώς και οι τρόποι επεξεργασίας τους φαίνονται στην εικόνα 4, ενώ οι χρήσεις και η σύσταση των προϊόντων παρουσιάζονται στην εικόνα 5.

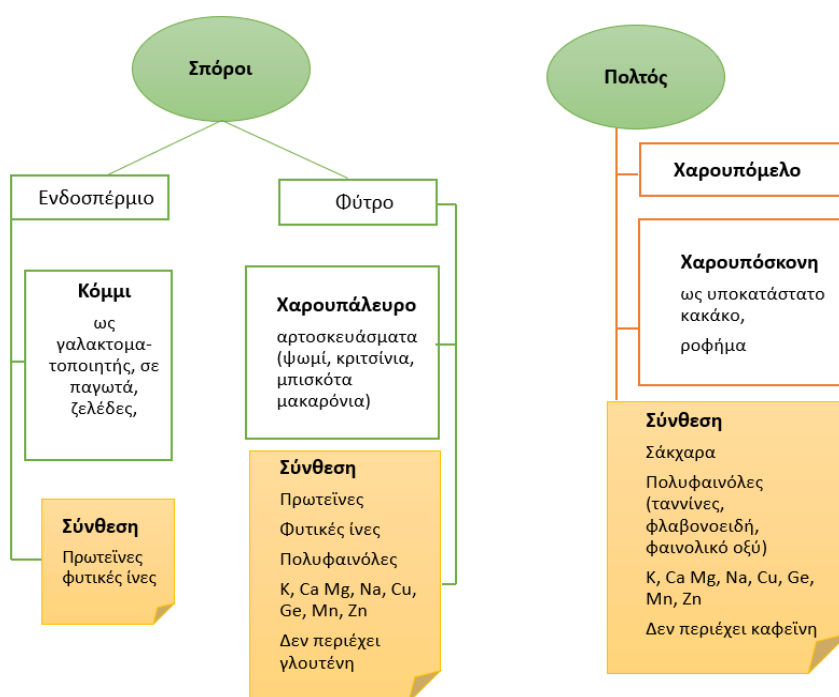


Εικόνα 4: Τα προϊόντα που παράγονται από τη βιομηχανία τροφίμων από τον καρπό της χαρουπιάς.

Από όλο τον καρπό του χαρουπιού το μεγαλύτερο βιομηχανικό ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι σπόροι. Συγκεκριμένα από το φύτρο του σπόρου παράγεται το χαρουπάλευρο. Χρησιμοποιείται για τη χρήση αρτοπαρασκευασμάτων, ζυμαρικών και μπισκότων. Το χαρουπάλευρο που παράγεται από το φύτρο είναι πλούσιο σε πρωτεΐνη. Ακόμη, περιέχει μια πρωτεΐνη, την καρουμπίνη, η οποία παρουσιάζει παρόμοιες ιδιότητες με τη γλουτένη. Έτσι, μπορεί να χρησιμοποιηθεί αντί αυτής σε τρόφιμα που προορίζονται για ανθρώπους με δυσανεξία στη γλουτένη (Stavrou *et al.*,

2018). Από τον σπόρο του χαρουπιού παράγεται, επίσης το κόμμα. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, το κόμμα του χαρουπιού είναι μια λευκή σκόνη, η οποία προέρχεται από το ενδοσπέρμιο. Χρησιμοποιείται ως φυσικό πρόσθετο τροφίμων (E410), καθώς παρουσιάζει πηκτική, σταθεροποιητική και γαλακτωματοποιητική δράση. Συνήθως χρησιμοποιείται σε προϊόντα τροφίμων, όπως το παγωτό, το ζελέ και το ντρέσινγκ για σαλάτες (Barak & Mudgil, 2014; Battle & Tous, 1997; Calixto & Cañellas, 1982). Επίσης, λόγω της δράσης του, το κόμμα του χαρουπιού έχει χρησιμοποιηθεί και από βιομηχανίες φαρμάκων και καλλυντικών, για την δημιουργία προϊόντων, όπως γαλακτώματα κρέμες και οδοντόκρεμες (Battle & Tous, 1997).

Όσον αφορά τον πολτό αξιοποιείται και αυτός από τη βιομηχανία τροφίμων. Λόγω της υψηλής του περιεκτικότητας σε σάκχαρα χρησιμοποιείται για την παραγωγή σιροπιών, τα οποία γίνονται χωρίς προσθήκη ζάχαρης και θεωρούνται φυσικά γλυκαντικά, ενώ μπορούν να χρησιμοποιηθεί και ως υποκατάστατο της ζάχαρης. Επίσης, από τον πολτό, μπορεί να προκύψει και η χαρουπόσκονη. Η χαρουπόσκονη χρησιμοποιείται ως υποκατάστατο του κακάο, αλλά και ως ρόφημα. Αξίζει να σημειωθεί, πως η χαρουπόσκονη είναι πλούσια σε πολυφαινόλες, ενώ δεν περιέχει καφεΐνη, θειοβρωμίνη ή οξαλικό οξύ και έχει χαμηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά.



Εικόνα 5: Τα προϊόντα που παράγονται από τον καρπό της χαρουπιάς και η σύστασή τους.

### 2.1.5 Ευεργετικές ιδιότητες χαρουπιού

Το χαρούπι όπως αναφέρθηκε κρίνεται πλούσιο τόσο σε ποσότητα όσο και σε ποικιλία βιοδραστικών ουσιών καθώς συν άλλων περιέχει βιταμίνες, μέταλλα, διαιτητικές ίνες, πολυφαινόλες, φλαβονοειδή και πρωτεΐνες. Για το λόγο αυτό οι χρήσεις του έχουν επεκταθεί και στη βιοτεχνολογία. Συγκεκριμένα μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί αποδίδουν στο χαρούπι αντιοξειδωτική, αντικαρκινική, αντιδιαβητική, αντιμικροβιακή και αντιφλεγμονώδη δράση.

Ιδιαίτερη προσοχή έχει λάβει το χαρούπι λόγω της αντιοξειδωτικής δράσης που του προσφέρουν κυρίως οι περιεχόμενες πολυφαινόλες. Μία χαρακτηριστική λειτουργία που έχουν οι πολυφαινόλες στην υγεία του ανθρώπου είναι η αναστολή της οξείδωσης των λιπιδίων και του DNA και η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης (Nasar-abbas *et al.*, 2016). Η διατάραξη της ισορροπίας των αντιοξειδωτικών και των οξειδωτικών ουσιών, με τις οξειδωτικές ουσίες να υπερτερούν στον οργανισμό έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας παθολογικής κατάστασης που ονομάζεται οξειδωτικού στρες (López-Sánchez *et al.*, 2018). Η χρόνια έκθεση σε οξειδωτικού στρες ευθύνεται σε μεγάλο βαθμό για την ανάπτυξη ασθενειών (Nasar-abbas *et al.*, 2016). Κάποιες ασθένειες και προβλήματα υγείας, τα οποία μπορεί να προκληθούν από το οξειδωτικό στρες είναι οι νεφρικές παθήσεις, οι καρδιαγγειακές παθήσεις και οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες με υποκείμενους μηχανισμούς επαγωγής οξείδωσης και αντίδρασης λιπιδίων, πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων (Benchikh *et al.*, 2014). Η βιοδραστική ικανότητα των φαινολικών ενώσεων, οι οποίες περιέχονται το χαρούπι, είναι σημαντική καθώς δρουν ως χημικά αντιοξειδωτικά που διαθέτουν την ικανότητα να μειώνουν την οξειδωτική βλάβη (Benchikh *et al.*, 2014). Οι πολυφαινόλες δρουν προστατευτικά μειώνοντας τις ελεύθερες ρίζες. Είναι γνωστό από πολλές μελέτες εδώ και χρόνια πως οι φαινολικές ενώσεις έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Nasar-abbas *et al.*, 2016; Benchikh & Louail`eche, 2014; Goulas & Georgiou, 2020). Επίσης, πρόσφατη μελέτη έδειξε πως η D-πινιτόλη, που περιέχεται στον πολτό του χαρουπιού έχει ευεργετικές ιδιότητες στο οξειδωτικό στρες λόγω των ελευθέρων ριζών (López-Sánchez *et al.*, 2018). Επίσης, πολύ καλή αντιοξειδωτική ικανότητα κατά των ελευθέρων ριζών βρέθηκε ότι έχει το έλαιο του χαρουπιού σε σχέση με τους σπόρους του (Ouis & Hariri, 2018).

Γενικά οι λοβοί και τα φύλλα του χαρουπιού κρίνονται ως ισχυρά

αντιοξειδωτικά, καθώς είναι πλούσια σε πολυφαινόλες και μπορούν να αποτρέψουν την οξειδωτική βλάβη ορισμένων βιομορίων (Paragiannopoulos *et al.* 2004). Συνεπώς το χαρούπι μπορεί να χαρακτηριστεί ως διαιτητικό φυσικό αντιοξειδωτικό συμπλήρωμα συμβάλλοντας στη πρόληψη ασθενειών που σχετίζονται με ελεύθερες ρίζες (Stavrou *et al.*, 2018). Συγκεκριμένα οι ίνες χαρουπιού (σκόνη πολτού χαρουπιού χωρίς ζάχαρη) φαίνεται να εμφανίζουν υψηλότερο αντιοξειδωτικό δυναμικό από πολλές άλλες τροφές πλούσιες σε πολυφαινόλες, όπως τα βατόμουρα ή το κόκκινο κρασί (Owen *et al.*, 2003).

Θεωρείται ακόμη ότι το χαρούπι παρουσιάζει αντικαρκινική δράση. Αυτή αποδίδεται κυρίως στην υψηλή περιεκτικότητά του σε διαιτητικές ίνες, πολυφαινόλες και φλαβονοειδή. Γενικά στις διαιτητικές ίνες αποδίδεται πιθανό χημειοπροληπτικό δυναμικό έναντι ορισμένων καρκίνων και ιδιαίτερα αυτών της γαστρεντερικής οδού. Μια μελέτη έδειξε ισχυρή γραμμική αντίστροφη σχέση μεταξύ των φλαβονοειδών και του κινδύνου για καρκίνο του παχέος εντέρου (Klenow *et al.*, 2009).

Επιπλέον, το εκχύλισμα των λοβών του χαρουπιού έδειξε σημαντική μεταβολή στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων σε ήπαρ ποντικού. Λόγω της αντιοξειδωτικής δράσης την οποία διαθέτει το φύτρο του χαρουπιού, μελέτες έχουν δείξει πως μειώθηκε η βιωσιμότητα του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας (Nasar-abbas *et al.*, 2016). Μία πολυφαινόλη, η οποία ονομάζεται κουερσετίνη, προάγει την απόπτωση των T-λεμφοκυττάρων στοχεύοντας σε μια πρωτεΐνη, η οποία δρα κατά της απόπτωσης παράγοντας θετικές επιδράσεις. Επιπλέον, η κουερσετίνη μείωσε το μέγεθος του όγκου σε καρκίνου του παγκρέατος και του μαστού και ανέστειλε την αγγειογένεση σε μοντέλα ξένου μοσχεύματος (Goulas *et al.*, 2016).

Επιπρόσθετα, έρευνα έχει δείξει την σημαντικότητα των αντιοξειδωτικών, και κυρίως των πολυφαινόλων, για την παρασκευή αντικαρκινικών φαρμάκων (Gurel *et al.*, 2021). Μελετήθηκαν τρεις διαφορετικές φαρμακευτικές φόρμουλες από χαρούπι και διερευνήθηκε η αντικαρκινική τους δράση. Το χαρούπι μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε προκαθορισμένες δόσεις, για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα κατά του καρκίνου και σε ορισμένες χρονικές περιόδους της νόσου (Gurel *et al.*, 2021). Αξίζει ακόμα να αναφερθεί ότι εκτός από το χημειοπροληπτικό δυναμικό του καρκίνου, που παρουσιάζουν οι πολυφαινόλες, μειώνουν επίσης τη συχνότητα

εμφάνισης στεφανιαίας νόσου καταστέλλοντας την οξείδωση λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας και προάγοντας την διαδικασία της αγγειοδιαστολής (Owen *et al.*, 2003).

Επιπλέον φαίνεται πως το ανώριμο χαρούπι εμποδίζει την εντερική απορρόφηση της γλυκόζης, χαρακτηρίζοντας το ως αντιδιαβητικό. Στη μελέτη των Rtibi και των συνεργατών του, εξετάστηκαν οι επιδράσεις υδατικών εκχυλισμάτων ανώριμων χαρουπιών στην εντερική απορρόφηση γλυκόζης διαβητικών ποντικών στα οποία είχε χορηγηθεί αλλοξάνη. Η αλλοξάνη όταν χορηγείται σε ένα ζώο, νεκρώνει επιλεκτικά τα παγκρεατικά κύτταρα που παράγουν ινσουλίνη, μετατρέποντας ένα πειραματόζωο σε διαβητικό. Ειδικότερα, εφαρμόστηκε δοκιμασία ανοχής στη γλυκόζη κατά την οποία χορηγήθηκε γλυκόζη και στη συνέχεια εκχύλισμα χαρουπιού. Το χαρούπι βελτίωσε την ανοχή στη γλυκόζη και σε διαφορετικές δόσεις είχε σαν αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση της γλυκόζης στο αίμα σε διαβητικά ποντίκια. Συνεπώς φαίνεται πως το χαρούπι μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο της πάθησης του σακχαρώδη διαβήτη. Γι' αυτή την ευεργετική ιδιότητα του χαρουπιού πιθανόν να είναι υπεύθυνη η παρουσία της D-πινιτόλης στον πολτό, καθώς αυτή ρυθμίζει τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα ασθενών με σακχαρώδη διαβήτη τύπου II, αυξάνοντας την ευαισθησία στην ινσουλίνη. Σύμφωνα με τον Bates και τους συνεργάτες τους, η D-πινιτόλη παρουσιάζει όμοια δράση με την ινσουλίνη και βελτιώνει τον γλυκαιμικό έλεγχο, σε μοντέλα ζώων με διαβήτη. Αξίζει να σημειωθεί πως το χαρουπόμελο θεωρείται πλούσια πηγή της D-πινιτόλης, καθώς 10 g σιροπιού ή αλλιώς 10 mg D-πινιτόλης/kg βάρος σώματος, είναι αρκετά για να μειωθούν τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα ασθενών με σακχαρώδη διαβήτη τύπου II (López-Sánchez *et al.*, 2018).

Επίσης, θεωρείται ότι η κατανάλωση χαρουπιού μπορεί να συμβάλει στην καταπολέμηση της παχυσαρκίας. Έχουν γίνει αναφορές σχετικά με την ικανότητα του χαρουπιού να μειώνει τα επίπεδα της ολικής και της LDL χοληστερόλης στο αίμα υπερχοληστερολαιμικών (Stavrou *et al.*, 2018 ; Paragiannopoulos *et al.*, 2004). Το χαρούπι βελτιώνει επίσης την διαδικασία της πέψης. Έχουν γίνει μελέτες σχετικά με την κατανάλωση ινών χαρουπιού, πλούσιες σε συμπυκνωμένες ταννίνες, οι οποίες φανερώνουν ευεργετική επίδραση στο σωματικό βάρος. Οι φυτικές ίνες στα τρόφιμα έχουν το πλεονέκτημα ότι μειώνουν την θερμιδική τους αξία, με αποτέλεσμα την

πιθανή απώλεια βάρους (Nasar-abbas *et al.*, 2016).

Επίσης λόγω των πολυφαινολών στα χαρούπια, φαίνεται ότι αυτά αποτρέπουν ή/και προστατεύουν το γαστρικό βλεννογόνο από οξεία βλάβη και ευνοούν την επούλωση των χρόνιων γαστρικών ελκών (Stavrou *et al.*, 2018). Εκτός αυτού η χρήση αλεύρου χαρουπιού έχει σημαντική αξία ως διαιτητική θεραπεία για την βρεφική διάρροια και τη βακτηριακή δυσεντερία, όσον αφορά τη μείωση της διάρκειας της νόσου (Nasar-abbas *et al.*, 2016).

Στο ευρύ φάσμα βιολογικών ιδιοτήτων που παρουσιάζει το χαρούπι, συγκαταλέγεται και η αντιμικροβιακή του ικανότητα. Αρκετές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί σχετικά με την αντιμικροβιακή ιδιότητα του χαρουπιού σε μεγάλο φάσμα μικροοργανισμών (Nasar-abbas *et al.*, 2016). Μελέτη ανακάλυψε ότι το μεθανολικό εκχύλισμα φύλλων χαρουπιού ανέστειλε την ανάπτυξη του βακτηρίου *Listeria monocytogenes* (Krokou *et al.*, 2019), ενώ οι Aissani και οι συνεργάτες απέδωσαν αντιλιστερική δράση στα φύλλα της χαρουπιιάς που περιέχουν υψηλά επίπεδα πολυφαινολικών ενώσεων. Σε άλλη μελέτη έγινε δοκιμή μεθανολικού εκχυλίσματος χαρουπιού για την αντιβακτηριακή του δραστηριότητα. Επίσης οι Ayache και οι συνεργάτες του απέδωσαν σε εκχυλίσματα σπόρων χαρουπιιάς ισχυρή ανασταλτική δράση στην ανάπτυξη της *E. coli* και του *B. cereus*.

Συμπερασματικά το χαρούπι έχει πολλές ευεργετικές ιδιότητες και οφέλη για τον ανθρώπινο οργανισμό. Ωστόσο, δεν είναι σίγουρο αν όλες αυτές οι ευεργετικές δράσεις μπορούν να αποδοθούν εμπειριστατωμένα στο χαρούπι. Αυτό οφείλεται κυρίως στο πολύ μεγάλο πλήθος παραγόντων από το οποίο μπορεί να επηρεαστεί η σύνθεση των χαρουπιών. Το γεγονός αυτό καθιστά τα αποτελέσματα των ερευνών μη συγκρίσιμα. Επιπλέον πολλές από τις βιοδραστικές ουσίες που περιέχονται στο χαρούπι δρουν είτε μόνα τους είτε συνεργατικά, δυσκολεύοντας έτσι την εξαγωγή σίγουρων συμπερασμάτων. Τα οφέλη όμως που φαίνεται να έχει το χαρούπι, το καθιστούν άξιο περαιτέρω μελέτης και έρευνας.

#### **2.1.6 Οι πολυφαινόλες στο χαρούπι και στα προϊόντα του**

Όπως προαναφέρθηκε ο καρπός της χαρουπιιάς (πολτός, σπόρος, φύτρο) είναι πλούσιος σε πολυφαινόλες. Οι κύριες κατηγορίες φαινολικών ενώσεων που βρίσκονται στον καρπό της χαρουπιιάς είναι φαινολικά οξέα, γαλλοταννίνες και



φλαβονοειδή (Stavrou *et al.*,2018). Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται αναλυτικά οι πολυφαινόλες που βρίσκονται στη χαρουπιά και στα προϊόντα της (Stavrou *et al.*,2018).

Plant parts	Polyphenol class	Polyphenol
Carob Pulp	Benzaldehydes	<i>p</i> -Hydroxybenzaldehyde Dimethoxybenzaldehyde Dimethoxy- <i>p</i> -hydroxy-benzaldehyde Methoxybenzaldehyde Methoxy- <i>p</i> -hydroxy-benzaldehyde
		(-)-Epicatechin gallate
	Flavanol galloyl esters	(-)-Epigallocatechin gallate
		(-)-Galocatechin gallate
		(-)-Epicatechin
	Flavanols	(-)-Epigallocatechin
		(-)-Epigallocatechin
		(+)-Catechin
	Flavanone glycosides	Eriodictyol glucoside Naringenin glucoside Naringeninhexoside
		Flavanones
Flavone glycosides Flavones	Methoxy Genkwanin glucoside	
	Flavonol glycosides	3,4,7-Trihydroxyflavone 7,4'-dihydroxyflavone Apigenin Chrysoeriol Dihydroxyflavone Methoxy Genkwanin Tricetin Tricetin-3',5'-dimethyl ether Trihydroxy trimethoxy flavone Kaempferol desoxyhexoside Kaempferol rhamnoside Kampferide hexoside Myricetin desoxyhexoside Myricetin glucoside Myricetin hexoside Myricetin rhamnoside Myricetin pentoside

Plant parts	Polyphenol class	Polyphenol
		Quercetin arabinoside
		Quercetin glucoside
		Quercetin hexoside
		Quercetin rhamnoside
		Quercetin glucoside
	Flavonols	Isorhamnetin
		Myricetin
		Quercetin
	Gallate deivatives	Digallate Ethylgallate Methylgallate Tetragallate Trigallate Gallate glucoside Genistein glucoside
	Isoflavone glycosides Isoflavones	Genistein Genistein dimethylether Genistein-4,7-dimethyl ether
	Phenolic acids	3,4-Dihydroxybenzoic acid 4-Hydroxybenzoic acid Caffeic acid
		Cinnamic acid
		Coumaric acid
		Ellagic acid
		Ferulic acid
		Gallic acid
		Gallic acid diglucoside Gallic acid glucoside Gentisic acid
		Sinapic Acid

Plant parts	Polyphenol class	Polyphenol
		Syringic acid
		Vanillic acid
	Tannins	Digalloyl-glucose Digalloyl-glucose derivative Galloyl-glucose derivative Pentagalloyl-glucose Prodelphinidin trimer
		Tannic acid
Carob fiber	Flavanones	Tetragalloyl-glucose Trigalloyl-glucose Eriodictyol
		Naringenin
	Flavanol galloyl esters	Epigallocatechin gallate
	Flavanols	Epigallocatechin
	Flavones	Apigenin
		Chrysoeriol
		Luteolin
		Tricetin 3',5' dimethyl ether
	Flavonol glycosides	Kaempferol desoxyhexoside Kaempferol rhamnoside
		Myricetin desoxyhexoside
		Myricetin glucoside

Plant parts	Polyphenol class	Polyphenol
		Myricetin hexoside Myricetin pentoside Myricetin rhamnoside Quercetin arabinoside
		Quercetin desoxyhexoside Quercetin hexoside Quercetin pentoside Quercetin rhamnoside
		Quercetin rhamnoside
	Flavonols	Isorhamnetin
		Kaempferol
		Kaempferol derivative
		Methoxykaempferol derivative
		Myricetin Quercetin
		Quercetin derivative
	Gallate derivatives	Methyl gallate
	Isoflavones	Genistein
	Phenolic acids	Caffeic acid
		Cinnamic acid
		Coumaric acid
		Ferulic acid

Plant parts	Polyphenol class	Polyphenol
Carob flour		Gallic acid
		Syringic acid
		4-hydroxybenzoic acid
	Tannins	1,2,3,6-Tetra- <i>O</i> -galloyl- $\beta$ - <i>D</i> -glucose 1,2,6-Tri- <i>O</i> -galloyl- $\beta$ - <i>D</i> -glucose 1,6-Di- <i>O</i> -galloyl- $\beta$ - <i>D</i> -glucose
	Flavanols	Procyanidin dimer Procyanidin trimer Prodelphinidin dimer Prodelphinidin trimer (+)-Catechin Epigallocatechin
	Flavanones	Naringenin
	Flavone glycosides	Apigenin glucose
	Flavones	Apigenin Luteolin
	Flavonol glycosides	Kaempferol desoxyhexoside Kampferol rhamnoside Myricetin glucose Myricetin rhamnoside Myricetin desoxyhexoside Myricetin hexoside Quercetin arabinoside Quercetin glucose Quercetin rhamnoside Quercetin desoxyhexoside Quercetin hexoside
	Flavonols	Kampferol Myricetin Quercetin
	Gallate derivatives	Methyl gallate
	Isoflavones	Genistein
	Phenolic acids	Cinamic acid Ferulic acid Gallic acid
		Gentisic acid

Plant parts	Polyphenol class	Polyphenol
		Coumaric acid
		Protocatechuic acid Sinapic acid Syringic acid
	Tannins	Procyanidin dimer
<b>Carob syrup</b>	Flavanol galloyl esters Flavanols Flavonol glycosides	Catechin gallate Epigallocatechin gallate (+)-Catechin Epigallocatechin Myricetin 3-glycoside Myricetin desoxyhexoside Quercetin desoxyhexoside Quercetin glucoside
	Flavonols	Kaempferol
	Phenolic acids	Caffeic acid
		Cinnamic acid
		Coumaric acid
		Ferulic acid
		Gallic acid
		Syringic acid
<b>Germ flour</b>	Benzaldehydes	Vanillin
	Flavanols	(+)-Catechin
	Flavonols	Myricetin Quercetin
	Gallate derivatives	Methyl gallate
	Phenolic acids	Chlorogenic acid Ferulic acid Gallic acid Gentisic acid Syringic acid
<b>LBG</b>	Flavanols	(+)-Catechin
	Flavonol glycosides	Kaempferol desoxyhexoside Kaempferol dihexoside Myricetin hexoside Myricetin pentoside Quercetin desoxyhexoside Quercetin hexoside
<b>Leaves</b>	Benzaldehydes	Vanillin
	Flavanol galloyl esters	(-)-Epicatechingallate (-)-Epigallocatechingallate (-)-Epigallocatechingallate
	Flavanols	(-)-Epicatechin (+)-Catechin (+)-Catechin

Plant parts	Polyphenol class	Polyphenol
	Flavanones	Naringenin
	Flavanonols	Taxifolin
	Flavones	7,3',4' trihydroxy Flavone Apigenin
	Flavonol glycosides	Luteolin Isoquercetin Myricetin glucoside Myricetin rhamnoside Myricitrin Rutin
	Flavonols	Kaempferol
		Myricetin Quercetin
	Isoflavones	Biochanina Genistein
	Phenolic acids	Chlorogenic acid  Coumaric acid Ferulic acid  Gallic acid  Gentisic acid <i>p</i> -Hydroxybenzoic acid Syringic acid
	Tannins	1,2,3,6-Tetra-O-galloyl-glucose 1,2,6-Tri-O-galloyl-glucose 1,6-Di-O-galloyl-glucose (+)-Catechin
Seeds	Flavanols	(+)-Catechin
	Phenolic acids	Gallic acid Vanillic acid

Plant parts	Polyphenol class	Polyphenol
Sapwood	Tannins	Tannic acid
	Trihydroxybenzene	Pyrogallol
	Benzaldehydes	Vanillin
	Flavanols	(+)-Catechin
	Flavanone glycosides	Rutin
	Flavanones	(-)-Epicatechin
	Flavones	Trihydroxyflavone Dihydroxyflavone
	Flavonols	Kaempferol
	Gallate derivatives	Methylgallate
	Phenolic acids	Ellagic acid Vanillic acid Gallic acid Gallic acid Chlorogenic acid Gentisic acid Syringic acid

Πίνακας 1: Οι πολυφαινόλες στα διάφορα τμήματα του φυτού της χαρουπιάς αλλά και στα προϊόντα από χαρούπι (Stavrou *et al.*, 2018).

## 2.2 Μικροβίωμα

Για την εξέταση του όρου του μικροβιώματος του ατόμου απαραίτητη προϋπόθεση είναι η αποσαφήνιση συγκεκριμένων ορισμών. Αρχικά σύμφωνα με τους Lederberg και McCray η μικροβιοκοινότητα (microbiota) ορίζεται ως το σύνολο ή η συγκέντρωση των μικροοργανισμών που διαβιούν σε ένα συγκεκριμένο περιβάλλον, όπως στο ανθρώπινο σώμα (Marchesi *et al.*, 2015; Lederberg & McCray A. T., 2001). Οι οργανισμοί που ζουν στους ανθρώπους καλούνταν παλαιότερα ως μικροχλωρίδα (microflora), ένας όρος ο οποίος πλέον θεωρείται ξεπερασμένος καθώς υποδηλώνει πως οι άνθρωποι έχουν αποικιστεί από μικροσκοπικά φυτά. Οι οργανισμοί οι οποίοι απαρτίζουν τη μικροβιοκοινότητα του ατόμου δεν είναι φυτά, αλλά μικροοργανισμοί διαφόρων ειδών. Όσον αφορά την έννοια του μικροβιώματος (microbiome),



υπάρχουν σύμφωνα με τη βιβλιογραφία δύο ορισμοί ο γονιδιακός και ο οικολογικός. Σύμφωνα με το γονιδιακό ορισμό, όπως ακριβώς το σύνολο των ανθρώπινων γονιδίων ορίζεται ως ανθρώπινο γονιδίωμα, με τον ίδιο τρόπο ο όρος μικροβίωμα υποδηλώνει το σύνολο των γονιδίων που υπάρχουν σε όλα τα μικρόβια τα οποία συνδέονται με ένα συγκεκριμένο ξενιστή. Ωστόσο με βάση τον οικολογικό ορισμό, ως μικροβίωμα ορίζεται ένα πολύπλοκο οικοσύστημα αποτελούμενο από τα μικρόβια μέσα και πάνω στο ανθρώπινο σώμα – δηλαδή το σύνολο ή η συγκέντρωση των μικροβίων οι οποίοι ζουν στο ανθρώπινο φυσικό περιβάλλον (ενδιαίτημα).

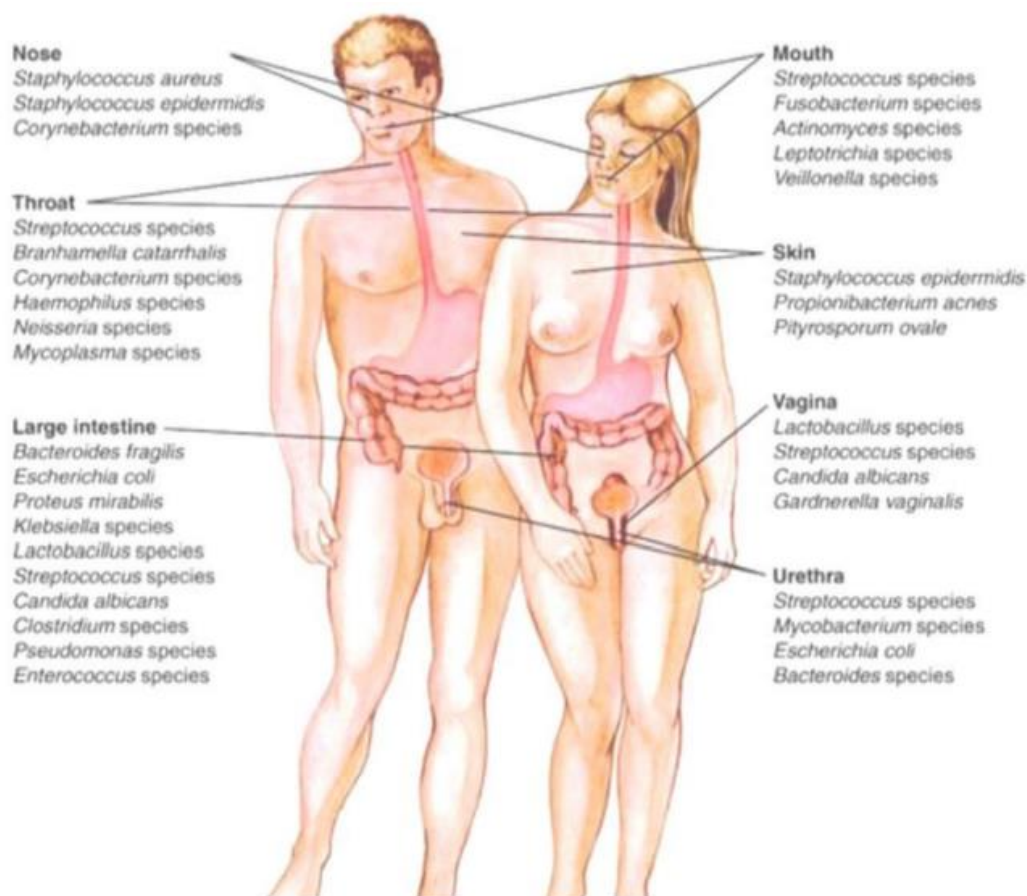
Επίσης, όσον αφορά την διεθνή βιβλιογραφία σχετικά με το εντερικό μικροβίωμα οι όροι gut microbiota και gut microbiome εναλλάσσονται, αλλά υφίσταται μια σημαντική διαφορά μεταξύ τους. Αναλυτικότερα, ο όρος gut microbiota αναφέρεται στην κοινότητα των μικροοργανισμών που διαβιούν στη γαστρεντερική περιοχή ενός ατόμου και αποτελείται από μέλη των βακτηρίων, των ιών τους των αρχαίων, των μυκήτων, καθώς και των ευκαρυωτικών μικροοργανισμών και επομένως μπορεί να χαρακτηριστεί ως μικροχλωρίδα του εντέρου. Ο όρος gut microbiome αφορά στο σύνολο των γονιδίων των μικροβίων της εντερικής μικροχλωρίδας ενός ατόμου (Gordon J., 2012).

### **2.2.1 Ανθρώπινο μικροβίωμα**

Το ανθρώπινο μικροβίωμα αναφέρεται σε ένα σύνολο μικροβιακών πληθυσμών που αποικίζουν το ανθρώπινο σώμα. Κάθε όργανο έχει το δικό του μικροβίωμα (π.χ. μικροβίωμα του δέρματος, του εντέρου, του στόματος, του κόλπου και των αεραγωγών) με σύνθεση όμως που διαφέρει κατά τόπους (Εικ. 6). Οι περισσότεροι μικροοργανισμοί περιέχονται στο γαστρεντερικό σωλήνα. Το ανθρώπινο μικροβίωμα είναι ένα πολύπλοκο οικοσύστημα, το οποίο εκτιμάται ότι αποτελείται από περίπου  $10^{14}$  βακτηριακά κύτταρα, που είναι 10 φορές περισσότερα από το συνολικό αριθμό των κυττάρων στο ανθρώπινο σώμα. Αξίζει να σημειωθεί ότι το 90% αυτών των μικροοργανισμών βρίσκονται στο έντερο.

Η μικροχλωρίδα κάθε ατόμου είναι μοναδική και μπορεί να θεωρηθεί ως μικροβιακό αποτύπωμα. Οι μικροοργανισμοί του απαρτίζουν το ανθρώπινο μικροβίωμα συνυπάρχουν, δημιουργώντας σχέση συμβίωσης ή δυσβίωσης με τον ξενιστή. Στους μικροοργανισμούς αυτούς έχουν αποδοθεί λειτουργίες οι οποίες

συμβάλλουν στις λειτουργίες του οργανισμού με κυριότερη αυτή του ανοσοποιητικού συστήματος. Επίσης κάποιες ακόμα από αυτές τις λειτουργίες είναι η σύνθεση βιταμινών (βιταμίνη Κ, βιταμίνες συμπλέγματος Β και συγκεκριμένα βιταμίνη Β12 και Β9), ο μεταβολισμός χολικών αλάτων, ο καταβολισμός φυτικών ινών, βλέννης και λιπαρών οξέων, η καταπολέμηση επιθέσεων από άλλους επιβλαβείς μικροοργανισμούς (διατηρώντας την ακεραιότητα του βλεννογόνου του εντέρου), η ρύθμιση φλεγμονωδών αντιδράσεων και η ομοιοστάση του ανοσοποιητικού συστήματος (Μέντης κ.α., 2013). Για το λόγο αυτό το ανθρώπινο μικροβίωμα είναι γνωστό και ως «εκτεταμένο γονιδίωμα» ή «νέο όργανο».



Εικόνα 6: Η σύνθεση του ανθρώπινου μικροβιώματος.

Παλαιότερα υπήρχε η αντίληψη ότι το μικροβίωμα άρχιζε να διαμορφώνεται μετά τη γέννηση του εμβρύου. Πλέον, υπάρχει η άποψη ότι η μικροχλωρίδα αρχίζει να σχηματίζεται στον ανθρώπινο οργανισμό ακόμα και πριν από τη γέννησή του, μέσω του πλακούντα. Ο πλακούντας αποτελείται από κάποια βακτήρια, κυρίως *Enterobaccaeae* και *Propionibacterium*, τα οποία βρίσκονται και στο έντερο του νεογέννητου. Ωστόσο οι περισσότεροι μικροοργανισμοί εισάγονται στο σώμα του

νεογέννητου κατά την γέννηση. Από την πρώτη στιγμή που το έμβρυο εξέρχεται από το προστατευμένο περιβάλλον της μήτρας οι μικροοργανισμοί αποικίζουν σταδιακά το δέρμα, τη στοματική κοιλότητα και τις επιφάνειες της ρινικής, των γεννητικών οργάνων, της αναπνευστικής και της πεπτικής οδού, οι οποίες καλύπτονται από επιθήλια. Επίσης, φαίνεται ότι διάφοροι παράγοντες επηρεάζουν το μικροβίωμα ενός ανθρώπου κατά τη διάρκεια των πρώτων τριών ετών της ζωής του.

Αρχικά η διαμόρφωσή της μικροχλωρίδας του ανθρώπου επηρεάζεται από τον τρόπο της γέννησης του (φυσιολογικός τοκετός ή καισαρική). Λίγο καιρό πριν την ολοκλήρωση της κύησης πολλαπλασιάζονται στον κόλπο της γυναίκας βακτήρια του γένους *Lactobacillus* και *Bacteroides*, τα οποία επικρατούν στη μικροχλωρίδα των βρεφών που γεννιούνται φυσιολογικά. Αντίθετα το μικροβίωμα των βρεφών που γεννιούνται με καισαρική τομή μοιάζει περισσότερο με αυτό του ανθρώπινου δέρματος, με άφθονο το βακτήριο *Staphylococcus aureus*. Τέλος, η διαμόρφωση του ανθρώπινου μικροβιώματος φαίνεται να εξαρτάται από τη διατροφή (μητρικό γάλα ή γάλα εμπορίου), από τη λήψη αντιβιοτικών αλλά και από το περιβάλλον διαβίωσης.

Η μελέτη του μικροβιώματος αποτελεί δύσκολο εγχείρημα καθώς πολλά είδη δεν μπορούν να απομονωθούν και να καλλιεργηθούν στο εργαστήριο εξαιτίας του μικροπεριβάλλοντος στο οποίο αναπτύσσονται. Στο παρελθόν είχαν γίνει σημαντικές προσπάθειες για την καταγραφή των πληθυσμών των μικροβίων που υπάρχουν σε κάθε ανατομική περιοχή και ιδιαίτερα στο έντερο, με καλλιέργεια των βακτηρίων σε θρεπτικά υποστρώματα και την ακόλουθη απομόνωσή τους. Σήμερα, είναι πλέον γνωστό ότι μόνο το 20–40% των μικροβίων του ανθρώπινου σώματος μπορούν να καλλιεργηθούν. Το ενδιαφέρον για τις μικροχλωρίδες αναζωπυρώθηκε στη δεκαετία του 1990 λόγω της προόδου της βιοτεχνολογίας, που παρείχε τη δυνατότητα να μελετηθούν και μικροοργανισμοί που δεν ήταν δυνατόν να καλλιεργηθούν (Μέντης, κ.α, 2013). Οι τεχνολογίες αυτές αρχικά βασίζονταν σε μεθόδους DNA υβριδισμού ή PCR. Ιδιαίτερα σημαντική ήταν η χρησιμοποίηση της μεθόδου ταξινόμησης των μικροβίων βάσει της αλληλουχίας του 16S rRNA γονιδίου, η οποία επέτρεψε λεπτομερή περιγραφή της σύνθεσης των μικροχλωρίδων και ιδιαίτερα εκείνης του εντέρου. Οι νέες τεχνολογίες επέτρεψαν όχι μόνο τη μελέτη της σύνθεσης των μικροχλωρίδων, δηλαδή ποια είδη μικροβίων, σε ποια ποσότητα και πού βρίσκεται, αλλά και τη μελέτη μεταβολικών και άλλων λειτουργιών, την

αλληλεπίδραση μικροβίων μεταξύ τους, την αλληλεπίδραση μικροβίων και ξενιστή, καθώς και των παραγόντων που επιδρούν στη διατήρηση των μικροχλωρίδων (Μέντης κ.α, 2013).

Από τα αποτελέσματα πρόσφατων ερευνών προκύπτει ότι η βακτηριακή ποικιλότητα είναι εντυπωσιακή ως προς την παρουσία μεγάλου αριθμού μικροβίων, η οποία, όμως, αποτελείται από έναν περιορισμένο αριθμό φύλων. Μόνο 4 από τα 50 γνωστά φύλα βακτηρίων που έχουν περιγραφεί μέχρι σήμερα και συγκεκριμένα βακτήρια των φύλων Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria και Proteobacteria επικρατούν στους βλεννογόνους και στο δέρμα των ανθρώπων.

Τέλος, το μεγαλύτερο ενδιαφέρον του ανθρώπινου μικροβιώματος αποτελεί η εντερική μικροχλωρίδα, καθώς συνίσταται από περίπου 400- 500 διαφορετικά γένη βακτηρίων.

### 2.2.2 Μικροβίωμα εντέρου

Το ανθρώπινο εντερικό μικροβίωμα περιλαμβάνει δεκάδες τρισεκατομμύρια μικροοργανισμών, μέσα στους οποίους συμπεριλαμβάνονται τουλάχιστον χίλια διαφορετικά είδη από γνωστά βακτήρια. Το ένα τρίτο του εντερικού μικροβιώματος είναι όμοιο στους περισσότερους ανθρώπους και τα δύο τρίτα είναι ειδικά για κάθε άτομο (Gut Microbiome Health, 2019).

Η στοματική κοιλότητα περιέχει υψηλό αριθμό βακτηρίων. Ο στόμαχος φέρει περίπου  $10^3$ – $10^4$  βακτήρια, το δωδεκαδάκτυλο  $10^5$ – $10^6$  και ο τελικός ειλεός  $10^8$ – $10^9$  βακτήρια (ανά γραμμάριο ιστού ή κοπράνων). Ωστόσο, ο μεγαλύτερος αριθμός των βακτηριακών κυττάρων έχει βρεθεί στο παχύ έντερο ( $10^{12}$  βακτήρια ανά γραμμάριο εντερικού ιστού) (Εικ. 7). Το AM του παχέος εντέρου είναι πυκνότερο και περισσότερο πολυποίκιλο σε σχέση με το AM του λεπτού εντέρου (Μέντης κ.α, 2013).



Εικόνα 7: Η σύνθεση του εντερικού μικροβιώματος.

Το μικροβίωμα του ανθρώπινου εντέρου περιλαμβάνει  $10^{13}$  μόνιμους μικροοργανισμούς, συμπεριλαμβανομένων των βακτηρίων, των αρχαίων (αρχαιοβακτηρίων), των ιών, των μυκήτων και των πρωτόζωων, τα οποία είναι συναφή με την ανθρώπινη εντερική οδό. Μεταξύ αυτών, τα βακτήρια αντιπροσωπεύουν την καλύτερα μελετημένη ομάδα. Αν και υπάρχει μεγάλη ποικιλία στα μικρόβια που αποικίζουν το έντερο, έχει βρεθεί ότι η εντερική μικροχλωρίδα των περισσότερων ατόμων μπορεί να κατηγοριοποιηθεί σε μία από τις τρεις ομάδες ή «εντερότυπους» ανάλογα με την επικράτηση των γενών: Bacteriodes (εντερότυπος 1), Prevotella (εντερότυπος 2) ή Ruminococcus (εντερότυπος 3) (Μέντης κ.α, 2013). Όμως η ανωτέρω κατηγοριοποίηση δεν καλύπτει επαρκώς τα σύγχρονα δεδομένα διότι στο έντερο παρατηρείται η ύπαρξη πολλών ενδιάμεσων καταστάσεων. Η επικράτηση του κάθε εντερότυπου καθορίζεται κυρίως από διαιτητικούς παράγοντες. Φαίνεται όμως ότι το κάθε άτομο διαθέτει σταθερά στελέχη βακτηρίων, αν και η σύνθεση μπορεί να μεταβάλλεται. Η πλειοψηφία των μικροβίων του εντέρου είναι αυστηρά αναερόβια (97%) και ανήκει στα φύλα Firmicutes (65%), Bacteroidetes (30%), Proteobacteria και Actinobacteria (4%), ενώ όλα τα υπόλοιπα φύλα βακτηρίων, οι ιοί, οι μύκητες και τα αρχαία περιλαμβάνονται στο (1%) του συνόλου των μικροβίων του εντερικού μικροβιώματος.

### **2.2.3 Οφέλη του εντερικού μικροβιώματος στον οργανισμό**

Οι μικροοργανισμοί που ζουν στο έντερο αποκομίζουν τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά για την ανάπτυξή τους από τους υδατάνθρακες της διατροφής. Η ζύμωση των υδατανθράκων και ολιγοσακχαριτών από τους μικροοργανισμούς όπως τα *Bacteroides*, *Roseburia*, *Bifidobacterium*, *Fecalibacterium* και *Enterobacteria* οδηγούν στη σύνθεση λιπαρών οξέων βραχείας αλυσίδας (short chain fatty acids, SCFA) όπως βουτυρικό, προπιονικό και οξικό, που αποτελούν πλούσιες πηγές ενέργειας για τον ξενιστή.

Το μικροβίωμα του εντέρου έχει, ακόμη, θετική επίδραση στον μεταβολισμό των λιπιδίων, καταστέλλοντας την αναστολή της δραστηριότητας της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης στα λιποκύτταρα.

Η σύνθεση της βιταμίνης K και διαφόρων συστατικών της βιταμίνης B αποτελεί μια ακόμη σημαντική μεταβολική λειτουργία της μικροχλωρίδας του

εντέρου. Τα μέλη του γένους *Bacteroides* συνθέτουν συζευγμένο λινολεϊκό οξύ που είναι γνωστό για μια σειρά ευεργετικές για τον οργανισμό ιδιότητες.

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι τα μεταβολικά στοιχεία της εντερικής μικροχλωρίδας εμπλέκονται στη διάσπαση φαινολικών ενώσεων που καταναλώνονται στη διατροφή. Οι πολυφαινόλες, οι οποίες συνήθως παραμένουν ανενεργές στη διατροφή, μετατρέπονται σε δραστικές ενώσεις μετά την αφαίρεση του τμήματος σακχάρου εξαιτίας της δράσης της εντερικής μικροχλωρίδας. Η δομική εξειδίκευση της πολυφαινόλης και η σύνθεση της μικροχλωρίδας καθορίζουν το επίπεδο μετασχηματισμού των φαινολών που παρατηρείται στο έντερο. Τα τελικά δραστικά προϊόντα απορροφώνται από την πυλαία φλέβα και μεταναστεύουν σε άλλους ιστούς και όργανα, παρέχοντας έτσι αντιμικροβιακή προστασία και άλλα μεταβολικά οφέλη (SM Jandhyala *et al.*, 2015).

Το εντερικό μικροβίωμα προσφέρει επίσης αντιμικροβιακή προστασία στον οργανισμό. Προκειμένου να συντηρηθεί η επιθυμητή εντερική ομοιόσταση, πρέπει να επάγεται και να διατηρείται ανοσολογική ανοχή στη φυσιολογική μικροχλωρίδα που έχει οφέλη για τον οργανισμό, ενώ ταυτόχρονα να ενεργοποιείται η άμυνα απέναντι στους παθογόνους μικροοργανισμούς. Κύριος μηχανισμός αντιμικροβιακής προστασίας είναι η παρουσία της βλέννας, η οποία διατηρεί τους μικροοργανισμούς μακριά από την επιθηλιακή επαφή, κυρίως στο παχύ έντερο.

#### **2.2.4 Διαμόρφωση και ρυθμιστικοί παράγοντες του εντερικού μικροβιώματος**

Η ανάπτυξη του εντερικού μικροβιώματος πιστεύεται ότι ξεκινά από τη γέννηση, παρόλο που αυτό το δόγμα αμφισβητείται από ορισμένες μελέτες στις οποίες το μικροβίωμα ανιχνεύεται ακόμα και στον πλακούντα της κυοφορούσας. Μετά τη γέννηση ο γαστρεντερικός σωλήνας αποικίζεται από το εντερικό μικροβίωμα.

Η εντερική μικροχλωρίδα μεταβάλλεται κατά τα διάφορα στάδια της ζωής ενός ανθρώπου. Η περίοδος κατά την οποία ο ανθρώπινος οργανισμός επηρεάζεται περισσότερο είναι η μεταγεννητική περίοδος. Τα 2-3 πρώτα έτη της ζωής το εντερικό μικροβίωμα έχει διαμορφωθεί και μοιάζει στη σύσταση με το μικροβίωμα ενός ενήλικα. Η σύνθεση της εντερικής μικροχλωρίδας στους ανθρώπους ηλικίας άνω των 65 ετών διαφέρει από αυτή των νεότερων.

Έχουν αναφερθεί διάφοροι παράγοντες που επηρεάζουν το εντερικό

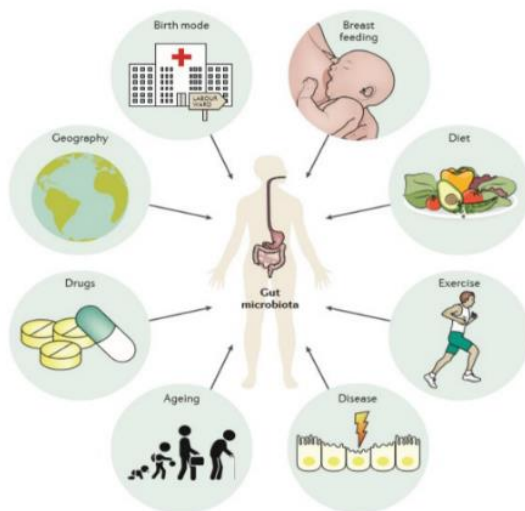
μικροβίωμα κατά τη διάρκεια της ζωής ενός ανθρώπου. Βασικός παράγοντας είναι ο τρόπος της γέννησης. Έχει παρατηρηθεί διαφορά στη σύσταση του μικροβιώματος σε νεογνά που γεννήθηκαν με φυσιολογικό τοκετό και σε αυτά που γεννήθηκαν με καισαρική τομή. Φαίνεται πως η άμεση επαφή των νεογέννητων με μικρόβια του γεννητικού σωλήνα κατά το φυσιολογικό τοκετό επηρεάζει την ανάπτυξη του εντερικού μικροβιώματος, καθώς γίνεται μεταφορά μικροβιώματος από τον τράχηλο της μητέρας, με μεγαλύτερη σύσταση αυτή του *Lactobacillus*, το οποίο αφθονεί στην τραχιλική χλωρίδα. Αντιθέτως, στα νεογνά που γεννιούνται με καισαρική τομή, το μικροβίωμα είναι εξασθενημένο και καθυστερεί να αποικιστεί από το γένος *Bacteroides*, ενώ ανευρίσκονται κυρίως ευκαιριακά παθογόνα, όπως τα είδη του *Clostridium*. Τα νεογνά που γεννιούνται με φυσιολογικό τοκετό φέρουν το 72% του μικροβιώματος της μητέρας τους σε σχέση με αυτά που γεννιούνται με καισαρική τομή, τα οποία φέρουν το 41%. Στα αρχικά στάδια το μικροβίωμα υπολείπεται σε ποικιλομορφία και αποτελείται κυρίως από *Acinetobacteria* και *Proteobacteria* (Eckburg *et al.*, 2005).

Μετά τη γέννηση, μια σημαντική πηγή εμπλουτισμού του μικροβιώματος αποτελεί η θρέψη του νεογνού (μητρικό ή εμπορίου γάλα). Το μητρικό γάλα φαίνεται να περιέχει περισσότερα από 700 διαφορετικά είδη βακτηρίων, ενώ οι εκκρίσεις από το μαστό περιέχουν IgA αντισώματα. Τα μικρόβια του γάλακτος είναι από τα πρώτα που εισέρχονται στον οργανισμό και μπορεί να επηρεάζουν τη σύσταση της εντερικής μικροχλωρίδας του βρέφους, να έχουν μεταβολικό ρόλο ή και να επιδρούν στην ωρίμανση του ανοσοποιητικού συστήματος (Μέντης, κ.α, 2013). Επίσης, ο θηλασμός, σε αντίθεση με τη διατροφική φόρμουλα στα εμπορικά διαθέσιμα γάλατα των νεογνών, έχει συνδεθεί με μια σειρά ευεργετικά αποτελέσματα για το παιδί στα πρώτα στάδια της ανάπτυξής του αλλά και στη συνέχεια της ζωής του, όπως η λειτουργία του εγκεφάλου, οι μαθησιακές ικανότητες. Στα βρέφη που τρέφονται με γάλα του εμπορίου, τα γένη που κυριαρχούν στο έντερό τους είναι τα *Enterococcus*, *Enterobacteria*, *Bacteroides*, *Clostridia*, και *Streptococcus*, ενώ στα βρέφη που θηλάζουν κυριαρχούν μικροοργανισμοί των γενών *Bifidobacterium* και *Lactobacillus*.

Η σύνθεση του εντερικού μικροβιώματος διαφέρει επίσης μεταξύ υγιών ατόμων που κατοικούν σε αναπτυσσόμενες ή αναπτυγμένες χώρες. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στις διαφορετικές συνήθειες διατροφής, καθώς οι υδατάνθρακες, οι

πρωτεΐνες, το λίπος, οι φυτικές ίνες, και οι βιταμίνες φαίνεται πως επηρεάζουν τη σύσταση του εντερικού μικροβιώματος (Dore J. & Blottiere H., 2015). Οι δραστικές αλλαγές στις διατροφικές συνήθειες οδηγούν σε αλλαγές στους μικροβιακούς πληθυσμούς του εντέρου. Η διατροφή αποτελεί τον πλέον καθοριστικό παράγοντα στη διαμόρφωση της σύνθεσης, της ποικιλομορφίας και της αφθονίας του μικροβιώματος σε όλη την ενηλικίωση. Ένα διαιτολόγιο πλούσιο σε φρούτα, λαχανικά και φυτικές ίνες σχετίζεται με υψηλότερη αφθονία και ποικιλομορφία της εντερικής μικροχωρίδας.

Τέλος, άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν το εντερικό μικροβίωμα είναι η λήψη αντιβιοτικών φαρμάκων (Robinson CJ. & Young VB., 2010; Modi SR., *et al.*, 2014; Blaser MJ., 2016). Έχει παρατηρηθεί ότι η λήψη αντιβιοτικών, κυρίως κατά τα πρώτα έτη ζωής, μπορεί να οδηγήσει σε μεταβολικές και φλεγμονώδεις διεργασίες στη μετέπειτα ζωή (Εικ. 8).



Εικόνα 8: Βασικοί παράγοντες που επηρεάζουν τη σύνθεση του εντερικού μικροβιώματος.

Κατά την ενήλικη ζωή παρατηρείται μία σχετική σταθερότητα στο μικροβίωμα του εντέρου. Η σύγκριση του μικροβιώματος του εντέρου νεαρών ατόμων, με ηλικιωμένα άτομα και με άτομα που φθάνουν τα 100 έτη ζωής, έδειξε ότι οι αλλαγές της μικροβιακής ποικιλότητας και της εντερικής μικροχλωρίδας δεν ακολουθεί μία γραμμική συσχέτιση με την ηλικία. Παρά τις διαφορές που υπάρχουν στην αναλογία της σύνθεσης της εντερικής μικροχλωρίδας σε επίπεδο βακτηριακών ειδών και στελεχών, η λειτουργική ικανότητα αυτής παραμένει σχετικά σταθερή μεταξύ των υγιών ενηλίκων.

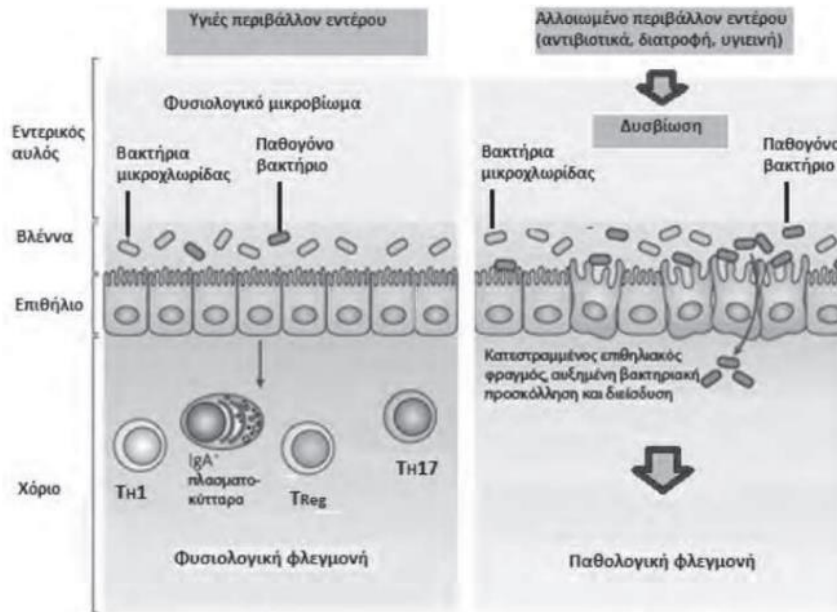


Παρατηρείται, λοιπόν, ότι το μικροβίωμα δε μεταβάλλεται έντονα για περισσότερες από τέσσερις δεκαετίες στη ζωή του ατόμου, εκτός κι αν επιδράσουν ισχυροί παράγοντες (Biagi E. *et al.*, 2010).

### **2.2.5 Εντερικό μικροβίωμα και ο ρόλος του στην ανθρώπινη υγεία και στις ασθένειες**

Η σχέση μεταξύ του μικροβιώματος του εντέρου και του ξενιστή (ανθρώπινος οργανισμός) είναι συμβιωτική, κατά την οποία τόσο ο ξενιστής όσο και οι μικροοργανισμοί έχουν κοινή ωφέλεια. Ο ξενιστής προσφέρει τόπο ανάπτυξης και διατροφής στα συμβιωτικά εντερικά βακτήρια, τα οποία με τη σειρά τους ευνοούν τη λειτουργία του ξενιστή, ενεργοποιώντας την αντίσταση στις μολύνσεις και διευκολύνοντας την απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών από τις τροφές. Σε περίπτωση που αυτή η σχέση για διάφορους διαταραχθεί, τότε δημιουργείται δυσβίωση.

Ως δυσβίωση ορίζεται η ποιοτική και ποσοτική αλλαγή στο εντερικό μικροβίωμα, στις μεταβολικές του δραστηριότητες και στην τοπική του κατανομή. Σε αυτή την περίπτωση ο ξενιστής μπορεί να παρουσιάσει παθολογικές καταστάσεις, όπως φλεγμονή στο έντερο ή διαταραχές στο μεταβολισμό. Σε υγιείς ξενιστές, η ακεραιότητα του εντερικού βλεννογόνου και ο ανοσολογικός φραγμός διατηρεί την εντερική χλωρίδα στον εντερικό αυλό, ενώ μηχανισμοί ανάδρασης οδηγούν στην αποφυγή εκτεταμένης ενεργοποίησης των ανοσιακών απαντήσεων του ξενιστή. Τα μικρόβια της φυσιολογικής μικροχλωρίδας απελευθερώνουν αντιφλεγμονώδη προϊόντα που ρυθμίζουν την ανοχή της απάντησης του ξενιστή προς τα μικρόβια της χλωρίδας και βοηθούν στην άμβλυση των φλεγμονωδών επιδράσεων παθογόνων μικροβίων που ενδεχομένως είναι παρόντα στο εντερικό μικροβίωμα, διατηρώντας έτσι την εντερική ομοιοστασία. Σε ανοσοανεπαρκείς ασθενείς, στους οποίους υπάρχει έλλειψη ενός σημαντικού παράγοντα του εντερικού φραγμού, όπως για παράδειγμα των εκκριτικών ανοσοσφαιρινών, αναπτύσσεται εντερική φλεγμονή όταν εκτίθενται στην εντερική μικροχλωρίδα και σε παθογόνους μικροοργανισμούς (Εικ. 9).



Εικόνα 9: Απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων ξενιστή-μικροβιώματος σε υγιές και σε έντερο με φλεγμονή.

Το εντερικό μικροβίωμα του ανθρώπου έχει επίσης σημαντική επίδραση πάνω στην ανάπτυξη τόσο της έμφυτης όσο και της επίκτητης ανοσίας. Τα περισσότερα σχετικά δεδομένα προέρχονται από πειραματικές μελέτες που συνέκριναν μύες με φυσιολογική χλωρίδα στο έντερό τους σε σχέση με μύες που είχαν στείρο μικροβίων εντερικό περιεχόμενο. Έχει βρεθεί ότι οι σπλήνες των μυών με στείρο εντερικό μικροβίωμα περιέχουν λιγότερα και μικρότερα βλαστικά κέντρα στους λεμφαδένες και μειωμένο αριθμό CD4 + T κυττάρων μνήμης στο εντερικό επιθήλιο. Παρόμοιες μελέτες υπογραμμίζουν τη σημασία του εντερικού μικροβιώματος για τη φυσιολογική ανάπτυξη του περιφερικού ανοσοποιητικού συστήματος σε ανοσο-επαρκείς ξενιστές. Οι μηχανισμοί πάντως μέσω των οποίων το εντερικό μικροβίωμα επιδρά στο περιφερικό ανοσοποιητικό σύστημα δεν είναι πλήρως κατανοητοί και αποτελούν αντικείμενο μεγαλύτερης έρευνας.

Επίσης, η μικροχλωρίδα του εντέρου μπορεί να επιδρά στην ανθρώπινη υγεία και σε διάφορες ασθένειες. Μελέτες έχουν δείξει ότι η σύνθεση του εντερικού μικροβιώματος σχετίζεται με την εμφάνιση καρκίνου στην γαστρεντερική οδό (Moore *et al.*, 1995). Σύμφωνα με την ίδια μελέτη, η εντερική χλωρίδα σε ασθενείς με ορθοκολικό καρκίνο χαρακτηρίζεται από αύξηση της ποικιλίας των *Clostridium spp*, καθώς και από εμπλουτισμό του εντέρου με *Bacteroides* και *Bifidobacterium spp*. Από την άλλη πλευρά άνθρωποι με χαμηλό κίνδυνο για ανάπτυξη καρκινώματος

παρουσιάζουν εντερική μικροχλωρίδα πλούσια σε βακτήρια που παράγουν γαλακτικό οξύ όπως *Lactobacillus spp* και *Eubacterium aerofaciens*. Άλλη μελέτη υποστηρίζει πως τυχόν ύπαρξη εντερικής φλεγμονής δημιουργεί κατάλληλο περιβάλλον για την ανάπτυξη βακτηρίων που υποστηρίζουν τη καρκινογένεση (Arthur *et al.*, 2012 ). Επίσης, σε μια πιο πρόσφατη μελέτη (Grivennikov *et al.*, 2012) υποστηρίζεται ότι καρκινογένεση στο έντερο είναι αποτέλεσμα μεταλλάξεων των επιθηλιακών κυττάρων. Στη μελέτη τους σε πειραματόζωα διαπίστωσαν ότι μεταλλάξεις στα επιθηλιακά κύτταρα οδηγούν σε χαλάρωση των ενδοκυτταρικών συνδέσμων και μείωση στην παραγωγή βλέννης με συνέπεια μειωμένη ακεραιότητα του βλεννογόνου. Το επιθήλιο τελικά εμφανίζει δυσπλασία και πιθανόν καρκίνωμα. Εκτός από τον καρκίνο της γαστρεντερικής οδού, με τη σύσταση του μικροβιώματος σχετίζονται και οι ηπατοχολικές παθήσεις. Όσον αφορά στις ηπατικές παθήσεις, η ανάλυση της χλωρίδας των κοπράνων από κίρρωτικούς ασθενείς αποκάλυψε ελαττωμένα επίπεδα του *Bifidobacteria*.

Η παχυσαρκία είναι επίσης μια νόσος που έχει συσχετιστεί με το εντερικό μικροβίωμα. Σε μελέτη που έγινε σε ποντίκια τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η πλειονότητα του εντερικού μικροβιώματος περιλαμβάνει δύο φύλα, τα *Bacteroidetes* και τα *Firmicutes*. Η αναλογία των μικροβιακών φύλων διαφέρει μεταξύ παχύσαρκων και αδύνατων ποντικών. Τα παχύσαρκα είχαν >50% υψηλότερη αναλογία *Firmicutes/Bacteroidetes* σε σχέση με τα αδύνατα. Πιθανή εξήγηση είναι ότι τα βακτήρια του φύλου *Firmicutes* μεταβολίζουν πιο αποτελεσματικά τις ενεργειακές πηγές από τα βακτήρια του φύλου *Bacteroidetes* και έτσι προάγουν την αποτελεσματική απορρόφηση θερμίδων, με συνέπεια αύξηση του βάρους. Επί πλέον, φαίνεται ότι η χλωρίδα επενεργεί και στα επιθηλιακά κύτταρα έμμεσα ελέγχοντας την κατανάλωση ενέργειας και την αποθήκευσή της. Έχουν προταθεί, όμως, και άλλοι πιθανοί μηχανισμοί μέσω των οποίων το μικροβίωμα οδηγεί σε παχυσαρκία, στους οποίους περιλαμβάνονται η επαγωγή χαμηλού βαθμού φλεγμονής λόγω των λιποπολυσακχαριτών, η ρύθμιση των γονιδίων του ξενιστή που είναι υπεύθυνα για την κατανάλωση και την αποθήκευση ενέργειας, καθώς και η επικοινωνία του εντερικού μικροβιώματος και του ξενιστή μέσω ενδοκρινικών κυττάρων (Μέντης κ.α, 2013).

Το εντερικό μικροβίωμα φαίνεται να σχετίζεται επίσης και με αυτοάνοσα

νοσήματα, καθώς η απώλεια ανοσίας μπορεί να προκληθεί από αλλαγές στη μικροβιακή σύσταση. Η μεταβολή του εντερικού μικροβιώματος θα μπορούσε να προκαλέσει ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις νόσους. Πολυάριθμες μελέτες έχουν αποδείξει ότι τόσο στη νόσο του Crohn, όσο και στην ελκώδη κολίτιδα παρατηρήθηκε αύξηση των φύλων Proteobacteria, κυρίως των οικογενειών Enterobacteriaceae και Fusobacteriaceae. Επιπλέον οι μικροοργανισμοί *E. coli*, *Yersinia* and *Clostridium difficile*, είναι συνηθισμένο να ανευρίσκονται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε ασθενείς που έχουν διαγνωστεί με νόσο του Crohn από ότι σε υγιή πληθυσμό.

### **2.2.6 Εντερικό μικροβίωμα και Ιδιοπαθείς Φλεγμονώδεις Νόσοι του Εντέρου (ΙΦΝΕ)**

Οι Ιδιοπαθείς Φλεγμονώδεις Νόσοι του Εντέρου (ΙΦΝΕ) είναι χρόνιες ασθένειες που χαρακτηρίζονται από έντονη φλεγμονή του γαστρεντερικού συστήματος και ακολουθούν μια παρατεταμένη πορεία με εξάρσεις και υφέσεις. Η ακριβής αιτιολογία αυτών των νοσημάτων δεν είναι γνωστή, υπάρχουν όμως, διάφοροι παράγοντες που έχουν θεωρηθεί ότι έχουν επίδραση στην ανάπτυξη αυτής της ομάδας ασθενειών, με κύριους τους γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες.

Οι ΙΦΝΕ περιλαμβάνουν τη νόσο του Crohn και την ελκώδη κολίτιδα, οι οποίες χαρακτηρίζονται από φλεγμονή στο γαστρεντερικό σύστημα.

Συγκεκριμένα σε ασθενείς με ΙΦΝΕ δεν ανιχνεύθηκαν τα είδη *Eubacterium*, *Lactobacillus*, ενώ η συγκέντρωση των βακτηρίων *E. coli* και *Clostridium* ήταν αυξημένη (Ott *et al.*, 2004). Αυτό ενισχύει την υπόθεση της δυσβίωσης ανάμεσα στα προστατευτικά και τα τοξικά βακτήρια στον εντερικό βλεννογόνο των ασθενών με ΙΦΝΕ, η οποία συμβάλλει στην εμφάνιση της νόσου.

Επίσης οι Frank και οι συνεργάτες βρήκαν στους ιστούς των ασθενών με ΙΦΝΕ μειωμένες συγκεντρώσεις των στελεχών *Firmicutes* και *Bacteroidetes* και αυξημένες συγκεντρώσεις των στελεχών *Proteobacteria* και *Actinobacteria*.

Γενικά, φαίνεται ότι οι ασθενείς με ΙΦΝΕ παρουσιάζουν μικρότερη ποικιλία και πλούτο στη μικροχλωρίδα του εντέρου. Τέλος, πρέπει να τονιστεί ότι μέχρι σήμερα δεν έχει αποσαφηνιστεί αν οι σχετιζόμενες με των ΙΦΝΕ αλλαγές στην εντερική μικροχλωρίδα αποτελούν την αιτία ή τη συνέπεια των ΙΦΝΕ.

### 2.2.7 Νόσος του Crohn

Η νόσος του Crohn είναι ιδιοπαθής φλεγμονώδης νόσος του εντέρου (ΙΦΝΕ). Μπορεί να προσβάλλει οποιοδήποτε σημείο του γαστρεντερικού συστήματος, από το στόμα έως και των πρωκτό. Χαρακτηριστικό αυτής της νόσου είναι η τμηματική προσβολή του γαστρεντερικού σωλήνα, δηλαδή η παρεμβολή φυσιολογικών τμημάτων μεταξύ των φλεγμαινόντων. Επιπλέον, χαρακτηριστικό της είναι και η διατοιχωματική φλεγμονή, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε επιπλοκές, όπως η ινώδης στένωση και τα συρίγγια.

Η ακριβής αιτία της νόσου του Crohn δεν είναι γνωστή, αλλά φαίνεται πως παράγοντες όπως η διατροφή, το άγχος, η κληρονομικότητα και το περιβάλλον διαβίωσης του ασθενή την επηρεάζουν σημαντικά. Στο 30% των ασθενών η νόσος περιορίζεται αποκλειστικά στο λεπτό έντερο, ενώ στο 20% υπάρχει μεμονωμένη προσβολή του παχέος εντέρου. Τα συχνότερα συμπτώματα της νόσου είναι το χρόνια διαρροϊκό σύνδρομο και το κοιλιακό άλγος. Το σύμπτωμα της διάρροιας σχετίζεται με την υπερέκκριση υγρών από το έντερο, ενώ το κοιλιακό άλγος ενδέχεται να είναι αποτέλεσμα των στενώσεων που προκαλεί η νόσος. Γενικά η κλινική διαδρομή της συγκεκριμένης νόσου χαρακτηρίζεται από εξάρσεις και υφέσεις.

Παρόλο που η νόσος του Crohn είναι μη ιάσιμη, σημαντική πρόοδος έχει γίνει όσον αφορά την αντιμετώπισή της. Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί αποτελεσματικότερα φάρμακα κατά της νόσου και σύγχρονες ενδοσκοπήσεις για την παρακολούθησή αυτής. Σε περιπτώσεις όπου τα συμπτώματα δεν βελτιώνονται με χρήση φαρμακευτικής αγωγής, είναι πιθανόν να χρειαστεί χειρουργική επέμβαση κατά την οποία ανοίγεται ή αφαιρείται το τμήμα του εντέρου που έχει προσβληθεί από τη νόσο.

### 2.2.8 Προβιοτικά και νόσος του Crohn

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας και Γεωργίας των Ηνωμένων Πολιτειών «Τα προβιοτικά είναι μία ετερογενής κατηγορία «ζωντανών» μη παθογόνων μικροοργανισμών, οι οποίοι όταν χορηγηθούν σε επαρκείς ποσότητες επιφέρουν ευεργετικά αποτελέσματα στην υγεία του ξενιστή». Συγκεκριμένα είναι θετικά κατά Gram βακτήρια με κυριότερους εκπροσώπους τους τα γένη *Lactobacillus* και *Bifidobacterium*. Οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί έχουν ευεργετικές δράσεις σε

ασθένειες του γαστρεντερικού συστήματος.

Όσον αφορά τα αίτια της εκδήλωσης της νόσου του Crohn δεν είναι πλήρως γνωστά. Όμως η μεταβολή της εντερικής μικροχλωρίδας φαίνεται ότι παίζει σημαντικό ρόλο. Σε ασθενείς με νόσο του Crohn, η μείωση της συγκέντρωσης των *Bifidobacteria* στα κόπρανα και η χορήγηση από το στόμα του *Lactobacillus rhamnosus*, οδήγησε σε αύξηση της ανοσολογικής απόκρισης της ανοσοσφαιρίνης Α του εντέρου. Η πιθανότητα των προβιοτικών να ρυθμίζουν το μικροβίωμα, να παρέχουν ευεργετικά ανοσορρυθμιστικά αποτελέσματα και να αποκαθιστούν ελαττώματα του επιθηλιακού φραγμού υποδηλώνει ότι μια προβιοτική στρατηγική μπορεί να αποτελέσει μια ελπιδοφόρο μελλοντική θεραπευτική επιλογή για ασθενείς του εντέρου.

### **2.2.9 Πολυφαινόλες και εντερικό μικροβίωμα**

Οι φαινολικές ενώσεις περιλαμβάνουν μια ποικιλία μορίων τα οποία έχουν πολυφαινολική δομή. Οι ενώσεις αυτές φέρουν μία ομάδα ( ή περισσότερες ομάδες) υδροξυλίου απευθείας συνδεδεμένη με έναν αρωματικό δακτύλιο. Οι ενώσεις αυτές είναι ευρέως διαδεδομένες στα φυτικά προϊόντα και προκύπτουν ως δευτερογενείς μεταβολίτες.

Οι πολυφαινόλες χωρίζονται σε διάφορες κατηγορίες ανάλογα με τον αριθμό των φαινολικών δακτυλίων που περιέχουν και ανάλογα με τα δομικά στοιχεία που συνδέουν αυτούς τους δακτυλίους μεταξύ τους. Οι κυριότερες ομάδες πολυφαινολών είναι: τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή, οι ταννίνες, τα στυλβένια και οι λιγνάνες.

Οι φαινολικές ενώσεις έχουν πολλές ευεργετικές ιδιότητες, με σημαντικότερη την αντιοξειδωτική τους δράση. Η αντιοξειδωτική τους συμπεριφορά οφείλεται, κατά κύριο λόγο, στην ικανότητα τους να δρουν ως ομάδες δότες ηλεκτρονίου ή/ και υδρογόνου, συμβάλλοντας, έτσι, στην εξουδετέρωση των ελεύθερων ριζών. Δεδομένης της μεγάλης δραστηριότητας και της επιβλαβούς φύσης των ελεύθερων ριζών, ο τερματισμός των αλυσιδωτών τους αντιδράσεων αποτρέπει την οξείδωση σημαντικών βιομορίων, όπως για παράδειγμα των λιπιδίων, των πρωτεϊνών και του DNA, συμβάλλοντας, έτσι, στην προστασία του οργανισμού από το οξειδωτικό στρες και τις επακόλουθες ασθένειές του (Ningappa *et al.*, 2008).

Εκτός από την ισχυρή αντιοξειδωτική τους δράση οι πολυφαινόλες φαίνεται να έχουν και άλλο ρόλο στον ανθρώπινο οργανισμό, καθώς αλληλοεπιδρούν με τους μικροοργανισμούς του εντέρου αλλάζοντας την μικροχλωρίδα του (Tomás-Barberán *et al.*, 2016), και ως εκ τούτου επηρεάζοντας και την υγεία του ανθρώπινου οργανισμού.

Σύμφωνα με έρευνες οι πολυφαινόλες μπορούν να θεωρηθούν πρεβιοτικά καθώς έχουν την ικανότητα να ρυθμίζουν τη μικροχλωρίδα του εντέρου και να προσφέρουν οφέλη στον ξενιστή (Marchesi *et al.*, 2016). Ως πρεβιοτικό ορίζεται μια μη αφομοιώσιμη ένωση που, μέσω του μεταβολισμού της από μικροοργανισμούς στο έντερο, ρυθμίζει τη σύνθεση ή / και τη δραστηριότητα του μικροβίου του εντέρου παρέχοντας έτσι ένα ωφέλιμο φυσιολογικό αποτέλεσμα στον ξενιστή.

Οι πολυφαινόλες παρουσιάζουν μικρή βιοδιαθεσιμότητα. Μόνο ένα μικρό ποσοστό από τις συνολικές πολυφαινόλες που προσλαμβάνονται από τον οργανισμό απορροφώνται από το λεπτό έντερο. Στη συνέχεια οι μη απορροφηθήσες πολυφαινόλες φτάνουν το παχύ έντερο (κόλον), όπου καταβολίζονται από τους μικροοργανισμούς του εντέρου, και είναι πλέον διαθέσιμες για απορρόφηση από τον εντερικό βλεννογόνο. Οι φαινολικές ενώσεις που δεν απορροφώνται από το εντερικό επιθήλιο αποβάλλονται μέσω των ούρων και των κοπράνων. Με αυτόν τον τρόπο οι πολυφαινόλες αλληλοεπιδρούν με το εντερικό μικροβίωμα, ρυθμίζοντας τη σύσταση της εντερικής μικροχλωρίδας και ως εκ τούτου επηρεάζοντας την ανθρώπινη υγεία (Gowd *et al.*, 2019).

Κατανάλωση τροφών που είναι πλούσιες σε πολυφαινόλες, όπως το ρόδι, το σταφύλι και το κακάο φαίνεται να ενισχύουν την ανάπτυξη των προβιοτικών βακτηρίων της οικογένειας *Bifidobacteriaceae* και *Lactobacillaceae* και να αναστέλλουν τη δράση των παθογόνων βακτηρίων *E.coli* και *Clostridium perfringens* (Dueñas *et al.*, 2015). Επίσης, σύμφωνα με άλλες μελέτες που έχουν διεξαχθεί σε ποντίκια, τα εκχυλίσματα από σταφύλι, ρόδι και κακάο, τα οποία είναι πηγές πολυφαινολών, ευνοούν την ανάπτυξη των βακτηρίων *Akkermansia muciniphila* και *Faecalibacterium prausnitzii*, τα οποία προάγουν τη μεταβολική κατάσταση του ξενιστή (Anhê *et al.*, 2015; Neyrinck *et al.*, 2017; Roopchand *et al.*, 2015). Ακόμα η κατανάλωση αυτών των εκχυλισμάτων μείωσε την αναλογία βακτηρίων *Firmicutes* προς *Bacteroidetes*. Σε άλλη μελέτη που διεξήχθη σε αρουραίους, διαπιστώθηκε ότι

η κατανάλωση τανινών αύξησε των πληθυσμό των *Bacteroides*, ενώ μείωσε τη συγκέντρωση των βακτηρίων *Clostridium spp* (Smith et al., 2004).

Όπως φαίνεται οι πολυφαινόλες αλληλοεπιδρούν με το μικροβίωμα του εντέρου, καθώς φαίνεται να παρουσιάζουν πρεβιοτική δράση, συμβάλλοντας έτσι στη διατήρηση της υγείας του οργανισμού. Ωστόσο, οι αποδείξεις σχετικά με αυτή τη σχέση και δράση βασίζονται κυρίως σε μελέτες σε ζώα, ενώ τα αποτελέσματα που υποστηρίζονται από ανθρώπινες διατροφικές παρεμβάσεις είναι περιορισμένα.



### **3. Υλικά & Μέθοδοι**

#### **3.1 Σχεδιασμός πειράματος**

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε στις εγκαταστάσεις του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας, της σχολής Επιστήμης Τροφίμων, του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής.

Για τις ανάγκες του πειράματος συλλέχθηκαν χαρούπια από τις χαρουπιές στο χώρο του πανεπιστημίου (Αγ. Σπυρίδωνος, Αιγάλεω), τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του χαρουπόμελου, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για το συγκεκριμένο πείραμα. Στη συνέχεια ακολούθησε η πειραματική πορεία της προσομοίωσης του γαστρεντερικού συστήματος και αφού συλλέχθηκαν τα δείγματα από όλες τις φάσεις έγινε ο προσδιορισμός των ολικών φαινολικών συστατικών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu. Παράλληλα έγιναν και μικροβιολογικές αναλύσεις για να βρεθεί το ολικό μικροβιακό φορτίο των δειγμάτων των κοπράνων.

#### **3.2 Παρασκευή Χαρουπόμελου**

##### **3.2.1 Υλικά & εξοπλισμός**

Για την παρασκευή του χαρουπόμελου χρησιμοποιήθηκαν

- Αναλυτικός ζυγός ( Kern EW)
- Ποτήρια ζέσεως
- Μεταλλικό σκεύος (κατσαρόλα)
- Θερμαντική πλάκα
- Μπουκάλια με φαρδύ λαιμό και βιδωτό καπάκι
- pHμετρο (HANNA HI 8010)
- Αναλογικό διαθλασίμετρο ( Kern optics, ORA 80BB)

##### **3.2.2 Διαδικασία παρασκευής χαρουπόμελου**

- Συλλέξαμε τα χαρούπι
- Πλύναμε τα χαρούπια και τα σπάσαμε σε μικρά κομμάτια
- Ύστερα τα βράσαμε σε νερό για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 100° C. Η αναλογία νερού και χαρουπιών ήταν 3:1
- Μετά από το 10λεπτο βράσιμο αποσύραμε από τη φωτιά και αφήσαμε τα

χαρούπια μέσα στο νερό για 3 ημέρες

- Έπειτα από 3 ημέρες σουρώσαμε τα χαρούπια και βράσαμε το ζουμί τους σε χαμηλή θερμοκρασία έως ότου πήρε τη μορφή σιροπιού
- Αποθηκεύτηκε στο ψυγείο



Εικόνα 10: Διαδικασία παρασκευής χαρουπόμελου.

Το χαρουπόμελο που χρησιμοποιήσαμε στην πορεία του πειράματος μας είχε τα παρακάτω χαρακτηριστικά.

ρΗ	4,90
Ολικά σάκχαρα / Brix	64,5 %

### 3.3 Μικροβιολογικές αναλύσεις

Πραγματοποιήθηκαν μικροβιολογικές αναλύσεις στα δείγματα κοπράνων (με κωδικούς F1 και F2) για ανίχνευση της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας σε αερόβιες και

αναερόβιες συνθήκες, για ανίχνευση οξυγαλακτικών βακτηρίων σε αναερόβιες συνθήκες, καθώς και ανίχνευση ζυμών και μυκήτων. Τα δείγματα κοπράνων ήταν από εθελοντές και μας παραχωρήθηκαν από το τμήμα Διατροφής και Διαιτολογίας του Χαροκόπειου Πανεπιστημίου.

### 3.3.1 Υλικά και εξοπλισμός

Για την πραγματοποίηση των μικροβιολογικών αναλύσεων χρησιμοποιήθηκαν

- Σωληνάκια αραίωσης
- Αραιωτικό υγρό APHA

Για τη παρασκευή του αραιωτικού υγρού χρησιμοποιήθηκε μητρικό διάλυμα που παρασκευάστηκε με προσθήκη 34,0 g δισόξινου φωσφορικού καλίου ( $KH_2PO_4$ ) σε 500,0 ml D.W. Έπειτα διορθώθηκε το pH στο 7,2. Έγινε συμπλήρωση με D.W μέχρι 1000,0 ml. Έπειτα έγινε διήθηση και το διάλυμα αποστειρώθηκε στους 121.1° C για 15 min.

- Κωνική φιάλη
- Γυάλινο δοχείο
- Dispenser (fortuna, polyfix 10)
- Στατώ
- Κλίβανος υγρής αποστείρωσης
- Αναλυτικός ζυγός
- Απιονισμένο νερό
- Λύχνος Bunsen
- Τρίποδο
- Ογκομετρικός κύλινδρος
- Μπουκάλια με φαρδύ λαιμό και βιδωτό καπάκι
- Τρυβλία
- Θρεπτικό υπόστρωμα BHI
- Θρεπτικό υπόστρωμα MRS
- Άγαρ
- Petrifilm
- Κλίβανος επώασης

- Anaerobic jar
- Πιπέττα μεταβλητού όγκου 100- 1000  $\mu\text{L}$  (ratiopetta)
- Colony Counter

### 3.3.2 Προετοιμασία μικροβιολογικών αναλύσεων

#### 3.3.2.1 Παρασκευή θρεπτικού υποστρώματος

##### ➤ *Για την ανίχνευση της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας*

Για την ανίχνευση της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας σε αερόβιο και αναερόβιο περιβάλλον στα δείγματα κοπράνων F1 και F2 χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό εκλεκτικό υπόστρωμα BHI Agar.

Εργαστηριακά χρησιμοποιήθηκε έτοιμο BHI Agar σε μορφή σκόνης, όπου για την παρασκευή του απαιτούνται 37 gr αυτού για 1000 ml νερό και το οποίο έχει pH 6,0-6,4 στους 25°C. Το υλικό ζυγίστηκε σε αναλυτικό ζυγό και προστέθηκε μαζί με 1000ml απιονισμένο νερό σε ποτήρι ζέσεως. Αναδεύτηκαν με θέρμανση μέχρι διαλύσεως όλων των συστατικών και έως ότου το διάλυμα έγινε απόλυτα διαυγές. Το θρεπτικό υπόστρωμα τοποθετήθηκε σε φιαλίδια και αποστειρώθηκε σε υγρό κλίβανο αποστείρωσης στους 121°C, για 15 min.

##### ➤ *Για την ανίχνευση οξυγαλακτικών βακτηρίων*

Για την ανίχνευση των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε αναερόβιο περιβάλλον στα δείγματα F1 και F2 χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό εκλεκτικό υπόστρωμα MRS.

Εργαστηριακά χρησιμοποιήθηκε έτοιμο MRS σε μορφή σκόνης, όπου για την παρασκευή του απαιτούνται 62 gr αυτού για 1000 ml νερό. Το υλικό ζυγίστηκε σε αναλυτικό ζυγό και προστέθηκε μαζί με 1000ml απιονισμένο νερό σε ποτήρι ζέσεως. Αναδεύτηκαν με θέρμανση μέχρι διαλύσεως όλων των συστατικών και έως ότου το διάλυμα καταστάθηκε απόλυτα διαυγές. Το θρεπτικό υπόστρωμα τοποθετήθηκε σε φιαλίδια και αποστειρώθηκε σε υγρό κλίβανο αποστείρωσης στους 121°C, για 15 min.

#### 3.3.2.2 Παρασκευή δεκαδικών αραιώσεων

Για τις δεκαδικές αραιώσεις των δειγμάτων κοπράνων χρησιμοποιήθηκε ισότονο αραιωτικό υγρό. Για το κυρίως αραιωτικό διάλυμα παρελήφθησαν 1,25 ml μητρικού υγρού APHA διαλύματος και τοποθετήθηκαν σε ογκομετρική φιάλη 1000,0 ml.

Συμπληρώθηκαν με απιονισμένο νερό μέχρι τα 1000,0 ml. Έπειτα σε σωληνάκια τοποθετήθηκαν 9 ml από το παρασκεύασμα αυτό και στη συνέχεια έγινε αποστείρωση στους 121,1°C, για 15 min. Οι αραιώσεις έγιναν σε ασηπτικό περιβάλλον με το εξής τρόπο.

Αρχικά σε falcon τοποθετήθηκε 0,1 gr κοπράνων και 10 ml ισότονου αραιωτικού διαλύματος. Αυτή θεωρείται η πρώτη αραιώση δείγματος ( $10^{-1}$ ). Έπειτα από την αραιώση αυτή λήφθηκε δείγμα 1ml, το οποίο τοποθετήθηκε σε σωληνάκι που περιείχε 9 ml ισότονου αραιωτικού υγρού, και έτσι δημιουργήθηκε η δεύτερη αραιώση του δείγματος ( $10^{-2}$ ). Από την αραιώση αυτή παρασκευάστηκε η επόμενη δεκαδική αραιώση ( $10^{-3}$ ) και η διαδικασία επαναλήφθηκε διαδοχικά μέχρι την τελική τέταρτη αραιώση ( $10^{-5}$ ).

Πριν από την κάθε λήψη δείγματος από τα σωληνάκια πραγματοποιήθηκε ανακίνηση της κάθε αραιώσης σε συσκευή ανακίνησης Vortex. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε καινούργιο τιπ πιπέτας για κάθε παραλαβή δείγματος και γενικά τηρήθηκαν όλα όσα προβλέπονται για την ορθή παρασκευή δεκαδικών αραιώσεων μέσα στα πλαίσια των σωστών χειρισμών της διαδικασίας

### 3.3.3 Μέθοδος εμβολιασμού

#### *Τεχνική της ενσωμάτωσης για την ανίχνευση της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας και των οξυγαλακτικών βακτηρίων*

Σε άδεια τρυβλία τοποθετήθηκε 1ml αραιωμένου δείγματος και στη συνέχεια προστέθηκε το ανάλογο υπόστρωμα σε υγρή μορφή ( $T= 42-45^{\circ} C$ ). Ακολούθησε ομογενοποίηση δείγματος – υποστρώματος (Εικ. 11) και επώαση των τρυβλίων σε κατάλληλες συνθήκες. Για την ανάπτυξη της μεσόφιλης χλωρίδας η επώαση έγινε για 24 ώρες στους  $37^{\circ} C$  σε αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες. Ενώ για την ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων τα δείγματα επώαστηκαν για δύο ημέρες στους  $37^{\circ} C$  σε αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες.



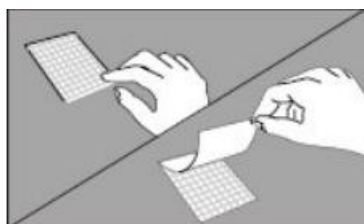
Εικόνα 11: Εμβολιασμός με ενσωμάτωση για την ανίχνευση βακτηρίων.

## **Petrifilm για την ανίχνευση ζυμών- μυκήτων**

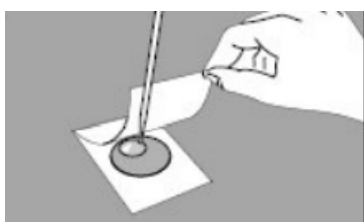
Για την ανίχνευση ζυμών και μυκήτων χρησιμοποιήθηκαν petrifilm (Εικ. 12)



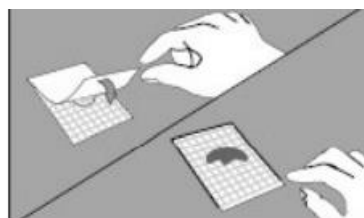
Εικόνα 12: Petrifilm



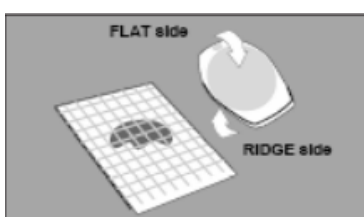
Το petrifilm τοποθετήθηκε σε μια επίπεδη επιφάνεια.



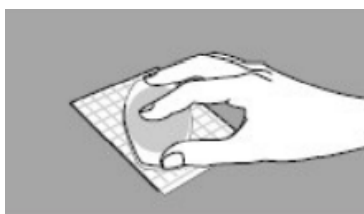
Στη συνέχεια ανασηκώθηκε η εξωτερική ταινία και με το σιφώνιο τοποθετήθηκε το δείγμα ( V= 1ml), στο κέντρο της κυκλικής επιφάνειας της κάτω ταινίας.



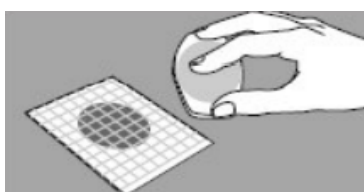
Έπειτα η ανασηκωμένη ταινία απελευθερώθηκε με τέτοιο τρόπο ώστε να κυλήσει στην επιφάνεια της κάτω ταινίας.

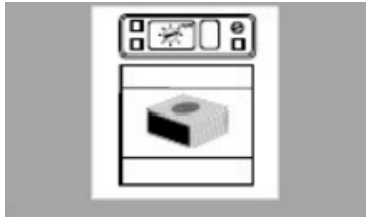


Μετά χρησιμοποιήθηκε διαστολέας.



Ασκήθηκε ήπια πίεση ακριβώς στην κυκλική επιφάνεια με σκοπό να κυλήσει το δείγμα σε όλη την επιφάνεια.

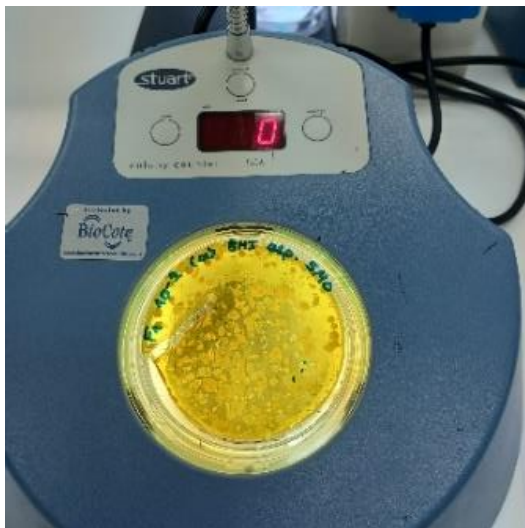




Τέλος τα δείγματα επώαστηκαν με τη διάφανη πλευρά προς τα πάνω για 2-4 ημέρες στους 25° C.

### 3.3.4 Καταμέτρηση αποικιών

Μετά το πέρας της επώασης των δειγμάτων, η αρίθμηση των αποικιών έγινε με ειδικό μηχάνημα για την καταμέτρηση αποικιών (Εικ. 13), το οποίο φέρει μεγεθυντικό φακό και ειδικό φωτισμό. Αριθμήθηκαν όλες οι ορατές αποικίες, ακόμη και οι πιο μικρές και για τις δύο σειρές των αραιώσεων των δειγμάτων.



Εικόνα 13: Μηχάνημα καταμέτρησης αποικιών (Colony Counter).

## 3.4 Προσομοίωση in vitro γαστρεντερικού συστήματος

### 3.4.1 Υλικά και εξοπλισμός

Για την προσομοίωση του γαστρεντερικού συστήματος in vitro χρησιμοποιήθηκαν

- Λύχνος Bunsen
- Κωνικές φυάλες
- Σιφώνια πλήρωσης
- Γαστρικό υγρό

Για την παρασκευή 1L γαστρικού υγρού (Paramera *et al.*, 2010).

Αναμείχθηκαν 0,4 g γλυκόζης & 3,0 g εκχυλίσματος μαγιάς & 1,0 g πεπτόνης κρέατος & 4 g βλεννίνης από στόμαχο χοίρων & 0,08 g NaCl & 0,4 g NaHCO<sub>3</sub> &

0,04 g  $K_2HPO_4$  & 0,04 g  $KH_2PO_4$  & 0,008 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  & 1g Xylan & 3,0 g διαλυτό άμυλο & 2,0 g πηκτίνη & 1,0 ml Tween.

Στη συνέχεια ρυθμίστηκε το pH στο 2,00 με πυκνό HCl & το παρασκεύασμα αποστειρώθηκε στους 121° C για 15 min. Τέλος, προστίθενται τα θερμοευαίσθητα υλικά 0,5 g κυστεΐνη & 3,0 g πεψίνη.

- Κλίβανος επώασης (memmert)
- Multi Vortex Genie digital (Scientific Industries)
- pHμετρο (HANNA HI 8010)
- NaOH 1N
- Αναλυτικό ζυγό ( Kern EW)
- Χολικά άλατα (bile extract porcine)
- Παγκρεατίνη (Pancreatin)
- Πλαστικοί σωλήνες φυγοκέντρησης, 50ml (BD Falcon)

#### **3.4.2 Πειραματική πορεία in vitro γαστρεντερικού συστήματος**

Η in vitro γαστρεντερική πέψη είναι μια ανάλυση που χρησιμοποιείται για την προσομοίωση της ανθρώπινης πέψης.

Στο συγκεκριμένο μοντέλο προσομοίωσης του γαστρεντερικού συστήματος η πειραματική πορεία χωρίστηκε σε πέντε φάσεις.

- Αρχική (φάση Α) t=0 h
- Γαστρική (φάση Β) t=1.5 h
- Εντερική (φάση Γ) t=2 h
- Πρώιμη εντερική ζύμωση (φάση Δ) t=4 h
- Όψιμη εντερική ζύμωση (φάση Ε) t=18 h

##### ***Κατά την αρχική φάση (Α)***

Αρχικά παρασκευάστηκαν τα δείγματα σε αποστειρωμένο περιβάλλον (Εικ. 14).

- C1: 40 ml γαστρικό υγρό (gastric fluid GF)
- C2: 40 ml γαστρικό υγρό (GF) + 5 ml χαρουπόμελο (carob syrup CB)
- C3: 40ml γαστρικό υγρό (GF) + 5 ml χαρουπόμελο (CB)
- C4: 40 ml γαστρικό υγρό (GF) +5 ml χαρουπόμελο (CB)





Εικόνα 14: Τα δείγματα στην αρχική φάση ( $t=0$ ).

Έπειτα από κάθε κωνική φιάλη συλλέξαμε δύο δείγματα ( $V_{\text{δείγματος}}=2\text{ml}$ ) και τα τοποθετήσαμε σε σωληνάκια Eppendorf.

Μετά τη λήψη των δειγμάτων τοποθετήσαμε τις κωνικές φιάλες για επώαση σε θερμοκρασία  $37^{\circ}\text{C}$  για 1,5 ώρα υπό συνθήκες ανάδευσης.

#### **Κατά την γαστρική φάση (B)**

Μετά την επώαση συλλέξαμε δύο δείγματα ( $V_{\text{δείγματος}}=2\text{ml}$ ) από κάθε κωνική φιάλη σε σωληνάκια Eppendorf.

Στη συνέχεια σε κάθε κωνική φιάλη:

- Ρυθμίσαμε το pH σε 8,0 με προσθήκη NaOH (1N)
- Προσθέσαμε 0,12 g χολικά άλατα (0,3% bile)
- Προσθέσαμε 0,2 g παγκρεατίνη ( περιείχε αμυλάση, λιπάση, προτεάση).

Έπειτα τοποθετήσαμε τις κωνικές φιάλες για επώαση σε θερμοκρασία  $37^{\circ}\text{C}$  για 2 ώρες υπό συνθήκες ανάδευσης.

#### **Κατά την εντερική φάση (Γ)**

Μετά την επώαση συλλέξαμε δύο δείγματα ( $V_{\text{δείγματος}}=2\text{ml}$ ) από κάθε κωνική φιάλη σε σωληνάκια Eppendorf.

Στη συνέχεια προσθέσαμε τα δείγματα κοπράνων στις κωνικές φιάλες με τα δείγματα C3 & C4.

Δείγματα κοπράνων: αραιώση 1% δηλαδή 0,1 g κοπράνων σε 10 ml αραιωτικό υγρό (απιονισμένο νερό και μητρικό διάλυμα APHA).

Fecal 1: δείγμα από εθελοντή με νόσο του Crohn → τα 10 ml του αραιωμένου

δείγματος F1 προστίθενται στην κωνική φιάλη C3.

Fecal 2: δείγμα από υγιή εθελοντή → τα 10 ml του αραιωμένου δείγματος F2 προστίθενται στην κωνική φιάλη C4.

Έπειτα τοποθετήσαμε όλες τις κωνικές για επώαση στους 37° C για 4 ώρες υπό συνθήκες ανάδευσης.

#### **Κατά την πρώιμη ζύμωση (Δ)**

Μετά την επώαση συλλέξαμε δύο δείγματα ( $V_{\text{δείγματος}} = 2\text{ml}$ ) από κάθε κωνική φιάλη σε σωληνάκια Eppendorf.

Έπειτα ακολούθησε ξανά επώαση στους 37° C για όλο το βράδυ υπό συνθήκες ανάδευσης .

#### **Κατά την όψιμη ζύμωση (Ε)**

Μετά την επώαση συλλέξαμε δύο δείγματα ( $V_{\text{δείγματος}} = 2\text{ml}$ ) από κάθε κωνική φιάλη σε σωληνάκια Eppendorf.

Τα δείγματα που συλλέξαμε από κάθε φάση είναι τα εξής:

ΦΑΣΕΙΣ	ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΣΤΑ ERPENDORFS			
A. Αρχική (t=0h)	C1A1	C2A1	C3A1	C4A1
B. Γαστρική (t=1.5h)	C1B1	C2B1	C3B1	C4B1
Γ. Εντερική (t=2h)	C1Γ1	C2Γ1	C3Γ1	C4Γ1
Δ. Πρώιμη εντερική ζύμωση (t=4h)	C1Δ1	C2Δ1	C3Δ1	C4Δ1
Ε. Όψιμη εντερική ζύμωση (t=18h)	C1Ε1	C2Ε1	C3Ε1	C4Ε1

*Πίνακας 2: Τα δείγματα που συλλέχθηκαν από κάθε φάση. Σε αυτά έγινε ο προσδιορισμός των ολικών φαινολικών ουσιών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu.*

Στη συνέχεια ακολούθησε ο προσδιορισμός των ολικών φαινολικών συστατικών με τη μέθοδο Folin- Ciocalteu σε κάθε δείγμα από τα παραπάνω

### **3.5 Προσδιορισμός των ολικών φαινολικών συστατικών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu**

#### **3.5.1 Υλικά και εξοπλισμός**

Για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών συστατικών με τη μέθοδο Follin-Ciocalteu

- Σωληνάκια Eppendorf
- Φυγόκεντρος ( Biofuge pico, Heraeus)
- Στατώ
- Κυψελίδες
- Πιπέττα μεταβλητού όγκου 100- 1000  $\mu\text{L}$  (ratiopetta)
- Πιπέττα μεταβλητού όγκου 20- 200  $\mu\text{L}$  (Transferpette S)
- Πιπέττα Gilson
- Ρύγχη
- Υδατόλουτρο
- Φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού (UV-Vis)
- Αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu
- Κορεσμένο διάλυμα ανθρακικού νατρίου ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ).
- Για την παρασκευή του ανθρακικού νατρίου:
- Σε 800,0 mL απεσταγμένου νερού διαλύονται 200,0 g άνυδρου ανθρακικού νατρίου με τη βοήθεια βρασμού. Αφού επανέλθει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, προστίθενται περίπου 80 g κρυστάλλων ανθρακικού νατρίου και το διάλυμα αφήνεται για 24 ώρες. Τέλος, διηθείται και αραιώνεται μέχρι το 1,00 L με απεσταγμένο νερό. Το διάλυμα παραμένει σταθερό και κατάλληλο για χρήση για μεγάλο χρονικό διάστημα.
- Γαλλικό οξύ ( Gallic Acid, GA)
- Απεσταγμένο νερό
- Μεθανόλη αναλυτικής καθαρότητας

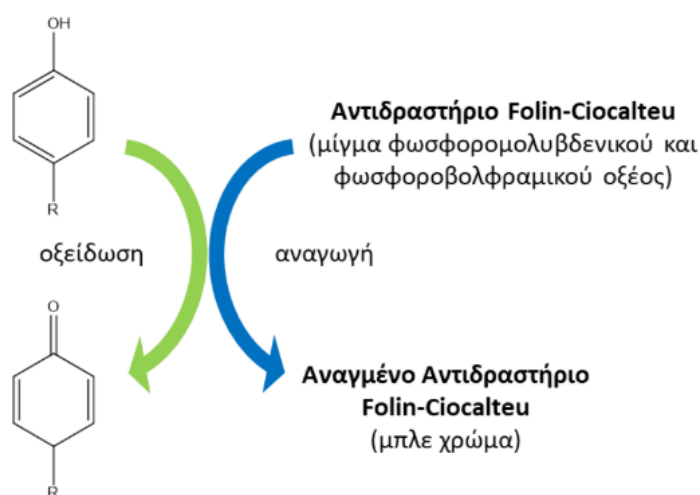
### 3.5.2 Μέθοδος Folin-Ciocalteu

Σκοπός της μεθόδου αυτής είναι η ποσοτική εκτίμηση των ολικών φαινολικών συστατικών των υπό μελέτη δειγμάτων. Με τη μέθοδο αυτή προσδιορίζεται το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο του δείγματος, χωρίς διαχωρισμό μεταξύ μονομερών, διμερών και μεγαλύτερων φαινολικών συστατικών.

#### 3.5.2.1 Αρχή της μεθόδου

Είναι μία χρωματομετρική μέθοδος που βασίζεται σε μία οξειδοαναγωγική

αντίδραση των φαινολικών συστατικών του δείγματος με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu. Αυτή η αντίδραση έχει ως συνέπεια την οξείδωση των φαινολικών συστατικών και την αναγωγή του αντιδραστήριου. Το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu είναι διάλυμα σύνθετων πολυμερών ιόντων που σχηματίζονται από φωσφομολυβδενικά και φωσφοβολφραμικά ετεροπολυμερή οξέα, τα οποία αντιδρούν με ενεργοποιημένους αρωματικούς πυρήνες υπό αλκαλικές συνθήκες. Κατά την οξείδωση των φαινολικών ενώσεων, το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu ανάγεται προς μείγμα κυανών οξειδίων του βολφραμίου και του μολυβδαινίου (Εικ. 15). Το σχηματιζόμενο κυανό χρώμα παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση στα 750 nm περίπου και είναι ανάλογο με τη συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων. Η αλκαλικότητα ρυθμίζεται με κορεσμένο διάλυμα  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  που δεν διαταράσσει τη σταθερότητα του αντιδραστήριου ούτε και του προϊόντος της αντίδρασης.



Εικόνα 15: Σχηματική απεικόνιση της αντίδρασης Folin-Ciocalteu.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των ολικών φαινολών γίνεται με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης γαλλικού οξέος, ενώ η ταυτοποίηση της κάθε φαινόλης ξεχωριστά δεν είναι δυνατή.

Οι συγκεντρώσεις των ολικών φαινολικών στα δείγματα οι οποίες έχουν προσδιοριστεί βάση της μεθόδου Folin-Ciocalteu δεν αποτελούν απόλυτες τιμές των ποσοτήτων των φαινολών στο δείγμα αλλά στη πραγματικότητα βασίζονται στην αναγωγική τους ικανότητα αναφορικά ισοδύναμη με την αναγωγική ικανότητα του γαλλικού οξέος. Δηλαδή μετράμε την αναγωγική ικανότητα πρότυπου διαλύματος γαλλικού οξέος και εκφράζουμε τη συγκέντρωση των ολικών φαινολικών του

άγνωστου δείγματος ως ισοδύναμα γαλλικού οξέος (Gallic acid equivalents – GAE).

### 3.5.2.2 Προετοιμασία της μεθόδου Folin-Ciocalteu

- Έγινε φυγοκέντρηση των δειγμάτων που συλλέξαμε από κάθε φάση στα 6000 rpm για 1 λεπτό
- Παραλήφθηκε το υπερκείμενο και μεταφέρθηκε σε νέα σωληνάκια Eppendorf, ώστε να χρησιμοποιηθεί για την πειραματική πορεία

### 3.5.2.3 Πρωτόκολλο της μεθόδου Folin-Ciocalteu

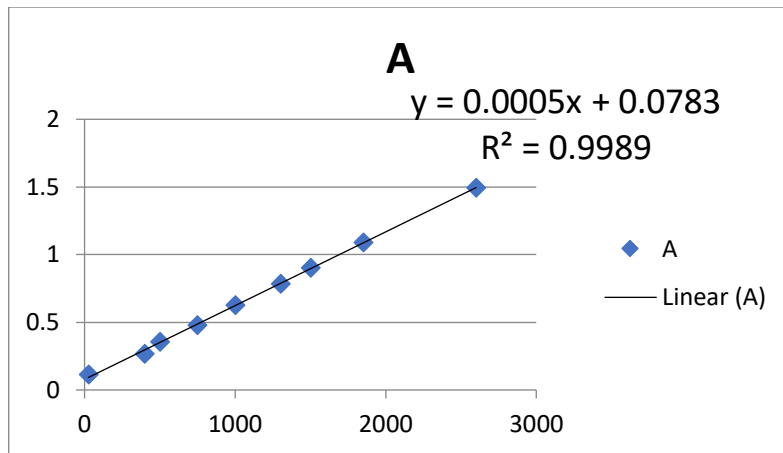
- Σε κυψελίδες των 4,0 mL, τοποθετήθηκε δείγμα ( $V_{\text{δείγματος}} = 20 \mu\text{L} = 0,2 \text{ mL}$ ), που είχε παραληφθεί όπως περιγράφεται προηγουμένως.
- Προστέθηκε 2500,0  $\mu\text{L}$  απεσταγμένο νερό και 200  $\mu\text{L}$  αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu
- Ακολούθησε ανάδευση και οι κυψελίδες τοποθετήθηκαν σε σκοτεινό μέρος για 8 λεπτά
- Έπειτα προστέθηκαν στις κυψελίδες 500 $\mu\text{L}$   $\text{Na}_2\text{CO}_3$  και αναδεύτηκαν ξανά
- Στη συνέχεια οι κυψελίδες τοποθετήθηκαν για 30 λεπτά σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 40° C, σε συνθήκες σκότους
- Ακολούθησε φασματοφωτομέτρηση στα 750 nm και καταγραφή των τιμών απορρόφησης, αφού πρώτα το μηχάνημα μηδενίστηκε με απιονισμένο νερό

Η διόρθωση στο σφάλμα της τιμής της απορρόφησης εξαιτίας του διαλύτη των δειγμάτων γίνεται με το «τυφλό» δείγμα. Η πειραματική διαδικασία και οι προσδιορισμοί έγιναν εις τριπλούν για κάθε δείγμα.

### 3.5.4.4 Πρότυπη καμπύλη

Παρατίθεται (Πιν. 3) η πρότυπη καμπύλη που χρησιμοποιήθηκε για τη ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων των ολικών φαινολών.

ΕΞΙΣΩΣΗ ΚΑΜΠΥΛΗΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ:						$y = 0,0005x + 0,0783$		
						Y=ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ στα 750nm		
						X=mg/L GA		
						A = f c		
Καμπύλη Αναφοράς Γαλλικού Οξέος (GA)								
C (mg / L)	A 750 nm	A 750 nm – Blank				Average	C (mg / L)	A
25	0,183	0,182	0,1165	0,1155	0,116	25	0,116	
400	0,332	0,322	0,2655		0,2655	400	0,2655	
500	0,374	0,42		0,3535	0,3535	500	0,3535	
750	0,532	0,557	0,4655	0,4905	0,478	750	0,478	
1000	0,691	0,697	0,6245	0,6305	0,6275	1000	0,6275	
1300	0,863	0,837	0,7965	0,7705	0,7835	1300	0,7835	
1500	0,987	0,955	0,9205	0,8885	0,9045	1500	0,9045	
1850	1,196	1,158		1,0915	1,0915	1850	1,0915	
2600	1,559		1,4925		1,4925	2600	1,4925	
Blank	0,053	0,08						



Πίνακας 3: Πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος (mg/L).

#### 4. Αποτελέσματα & Συζήτηση

##### 4.1 Μικροβιολογικές αναλύσεις

Από τις μικροβιολογικές αναλύσεις που έγιναν στα δείγματα κοπράνων του ασθενούς (F1) και του υγιούς (F2) προέκυψαν τα παρακάτω αποτελέσματα.

ΔΕΙΓΜΑ	ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ	N (cfu/ml)
F1(νόσος Crohn)	BHI (αερόβιο)	$9,5 \cdot 10^4$
	BHI (αναερόβιο)	$>10^6$
	MRS (αναερόβιο)	$5 \cdot 10^2$
	PETRIFILM- Ζύμες/ Μύκητες	0
F2(υγιής)	BHI (αερόβιο)	$6,8 \cdot 10^5$
	BHI (αναερόβιο)	$1,7 \cdot 10^6$
	MRS (αναερόβιο)	$8,5 \cdot 10^5$
	PETRIFILM- Ζύμες/ Μύκητες	$10^4$

Πίνακας 4: Αποτελέσματα μικροβιολογικών αναλύσεων.

Όσον αφορά την ολική μεσόφιλη χλωρίδα σε αερόβιο περιβάλλον παρουσιάζεται μεγαλύτερος αριθμός βακτηρίων στο δείγμα του υγιούς, με αριθμό  $6,8 \cdot 10^5$  cfu/ml κοπράνων, σε αντίθεση με το δείγμα κοπράνων του ασθενούς, όπου η ΟΜΧ σε αερόβιες συνθήκες είναι  $9,5 \cdot 10^4$  cfu/ml κοπράνων. Ωστόσο η ΟΜΧ σε αναερόβιο περιβάλλον είναι υψηλότερη στο δείγμα του ασθενούς σε σχέση με το δείγμα κοπράνων του υγιούς.

Όσον αφορά τα οξυγαλακτικά βακτήρια δεν ανιχνεύθηκε σημαντικός αριθμός στο δείγμα κοπράνων του ασθενούς, ενώ στο δείγμα κοπράνων του υγιούς ανιχνεύθηκαν  $8,8 \cdot 10^5$  cfu/ ml κοπράνων.

Τέλος, τα δείγματα κοπράνων φαίνεται να ήταν απαλλαγμένα από ζύμες και μύκητες.

Γενικά οι ασθενείς με νόσο του Crohn παρουσιάζουν το φαινόμενο της δυσβίωσης στο εντερικό τους μικροβίωμα. Σύμφωνα με μελέτες, οι ασθενείς που παρουσιάζουν αυτή τη νόσο έχουν αυξημένες συγκεντρώσεις αναερόβιων βακτηρίων (*E. Coli*, *Clostridium*) στο βλενογόνο του εντέρου (Darfeuille-Michaud *et al.*, 1998; Barnich and Darfeuille-Michaud 2007).

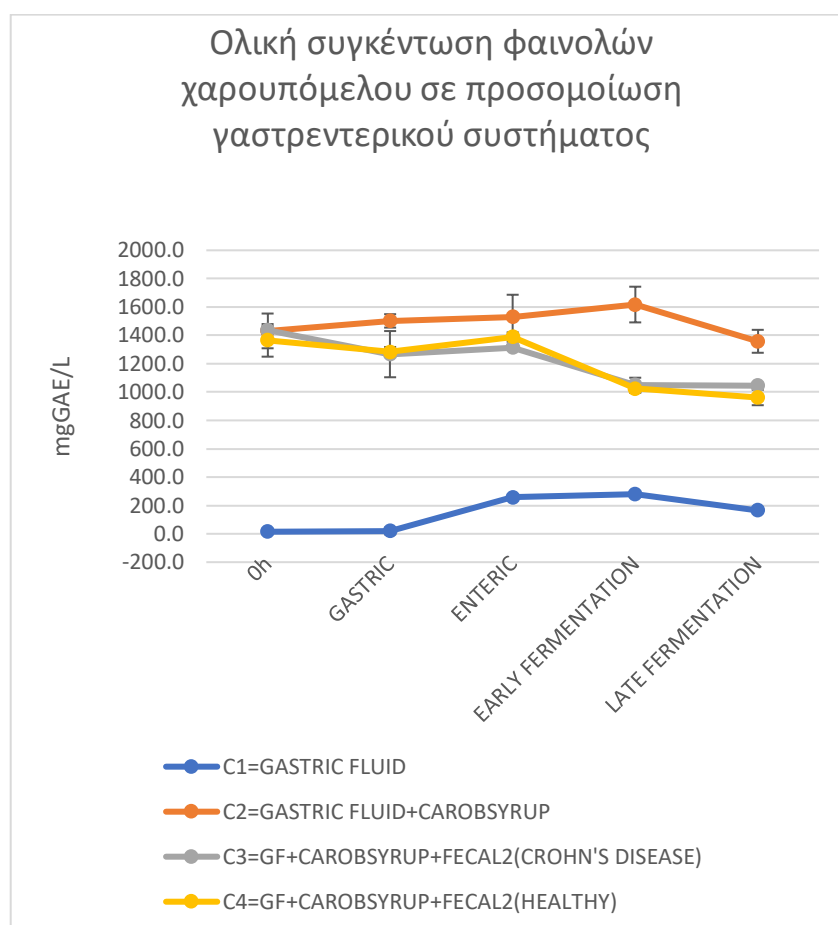
Παρά τις διαφορές στον συνολικό αριθμό των βακτηρίων που υπάρχουν στα δείγματα κοπράνων του υγιούς και του ασθενούς, υπάρχουν ενεργοί μικροοργανισμοί και στις δύο περιπτώσεις.

#### 4.2 Αποτελέσματα ολικών φαινολικών ουσιών

Παρατίθενται τα αποτελέσματα των ολικών φαινολικών ουσιών των δειγμάτων στις πέντε φάσεις της in vitro πέψης που μας έδωσε η μέθοδος Folin-Ciocalteu. Τα αποτελέσματα υπολογίστηκαν σύμφωνα με την καμπύλη αναφοράς με πρότυπη ουσία το γαλλικό οξύ. Τα αποτελέσματα έχουν εκφραστεί σε mg γαλλικού οξέος ανά L πεπτικού υγρού.

Επίσης, υπολογίστηκε η τυπική απόκλιση (standard deviation) για κάθε τριπλέτα δείγματος σε κάθε φάση της in-vitro πέψης, μέσω του excel.

Πραγματοποιήθηκαν δύο επαναληπτικές δοκιμές in-vitro προσομοίωσης γαστρεντερικού υγρού (διάγραμμα 1 και 2).



Διάγραμμα 1: Συνολική συγκέντρωση πολυφαινολών χαρουπόμελου σε προσομοίωση γαστρεντερικού συστήματος (δοκιμή 1<sup>η</sup>)



Από το διάγραμμα 1 φαίνεται ότι το γαστρικό υγρό (δείγμα C1), σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα παρουσίασε πολύ χαμηλή συγκέντρωση φαινολικών ουσιών και στις πέντε φάσεις του πειράματος, με στατιστικώς σημαντική διαφορά. Αυτό είναι φυσιολογικό, καθώς αυτό το δείγμα περιείχε μόνο το γαστρικό υγρό, χωρίς κάποια άλλη ουσία, που θα μπορούσε να αυξήσει τη συγκέντρωση των φαινολών.

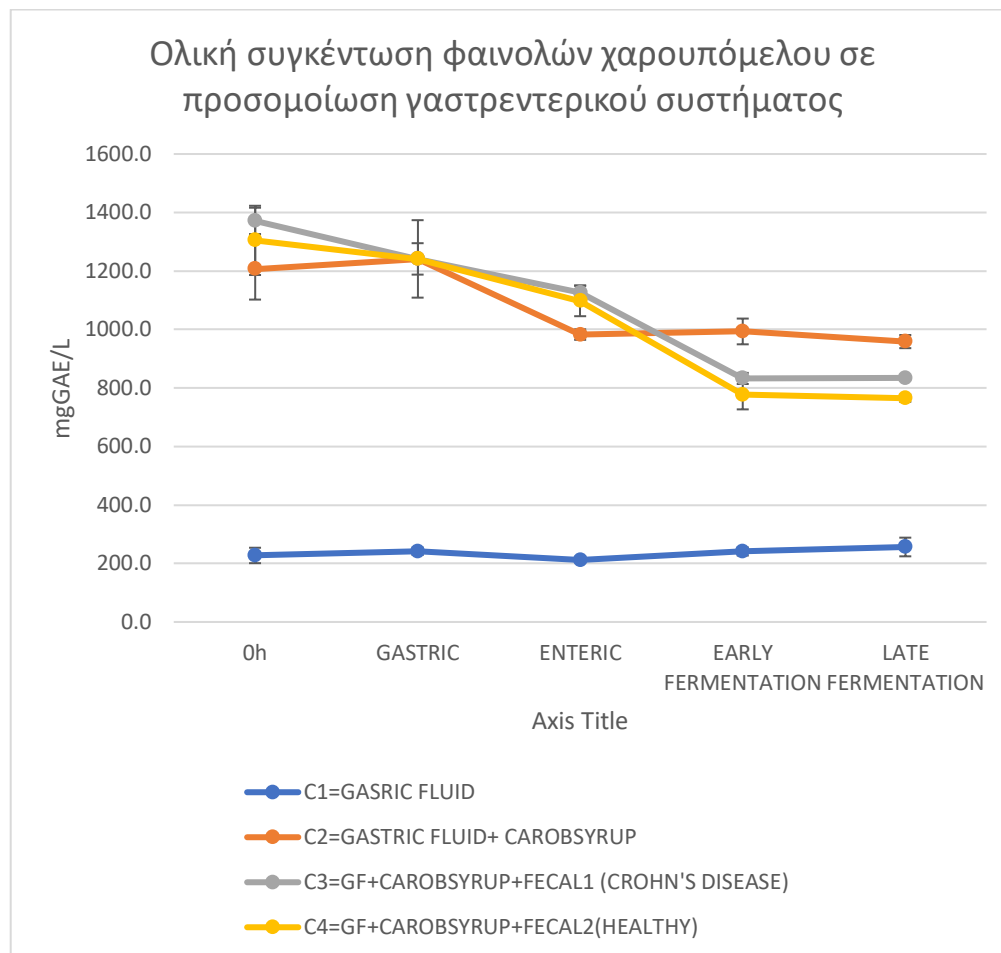
Την υψηλότερη συγκέντρωση συνολικών φαινολικών ουσιών σε όλες τις φάσεις της *in vitro* πέψης παρουσίασε το δείγμα C2, το οποίο περιείχε γαστρικό υγρό και χαρουπόμελο. Αυτή η αύξηση επιβεβαιώνει την υψηλή συγκέντρωση φαινολών στο χαρούπι, καθώς και την αντιοξειδωτική του δράση. Στο στάδιο της όψιμης εντερικής ζύμωσης το δείγμα αυτό παρουσίασε μικρή πτώση στη συγκέντρωση των φαινολών σε σχέση με την αρχική συγκέντρωση στην αρχική φάση, με ποσοστό μείωσης 5,1%.

Όσον αφορά το δείγμα C3 και C4, από το διάγραμμα φαίνεται πως και τα δύο παρουσίασαν μια μικρή μείωση στη συγκέντρωση των φαινολών κατά την γαστρική φάση και έπειτα μικρή αύξηση κατά την εντερική φάση. Μετά την εντερική φάση, προστέθηκαν στα δείγματα C3 και C4 κόπρανα ασθενούς με νόσο του Crohn και υγιούς, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι πριν την έναρξη της πρώιμης εντερικής ζύμωσης (δεν έχουν προστεθεί τα κόπρανα) οι συγκεντρώσεις των φαινολικών ουσιών για τα δείγματα του ασθενούς με νόσο του Crohn και του υγιούς ήταν 131,5 mg γαλλικού οξέος / 100 mL εντερικού υγρού και 138,8 mg γαλλικού οξέος/ 100mL εντερικού υγρού, αντίστοιχα. Σε αυτή τη φάση τα δείγματα C3 και C4 παρουσίασαν στατιστικώς σημαντική διαφορά. Στη συνέχεια όπως φαίνεται από το διάγραμμα, κατά την φάση της πρώιμης εντερικής ζύμωσης υπάρχει μείωση της συγκέντρωσης των φαινολικών ουσιών και στα δύο δείγματα. Κατά τη διάρκεια αυτής της φάσης η συγκέντρωση των φαινολικών ουσιών μειώθηκε κατά 20,1% στο δείγμα του ασθενούς με νόσο του Crohn και κατά 26,1% στο δείγμα του υγιούς, συγκριτικά με το στάδιο πριν την έναρξη της πρώιμης εντερικής ζύμωσης.

Όμως μελετώντας συνολικά όλη τη φάση της εντερικής ζύμωσης (πριν την έναρξη της πρώιμης φάσης έως το τέλος της όψιμης φάσης) η συγκέντρωση των φαινολών μειώθηκε κατά 20,5% για το δείγμα του ασθενούς με νόσο του Crohn και κατά 30,7% για το δείγμα του υγιούς.

Επίσης, συγκρίνοντας τα αποτελέσματα των δειγμάτων C3 και C4 στην

τελευταία φάση της in-vitro πέψης (όψιμη εντερική ζύμωση) με τα αντίστοιχα αρχικά στην αρχική φάση (t=0) παρατηρούμε στατιστικώς σημαντική διαφορά. Τελικά, η συγκέντρωση μειώθηκε συνολικά κατά 27,3% για τον ασθενή με νόσο του Crohn και κατά 29,6% για τον υγιή (Πιν. 5).



Διάγραμμα 2: Συνολική συγκέντρωση πολυφαινολών χαρουπόμελου σε προσομοίωση γαστρεντερικού συστήματος (δοκιμή 2<sup>η</sup>).

Και σε αυτή τη δοκιμή (διάγραμμα 2) το γαστρικό υγρό (δείγμα C1) είχε τη χαμηλότερη συγκέντρωση ολικών φαινολικών ουσιών και στις πέντε φάσεις της in vitro πέψης.

Συγκριτικά με το δείγμα C1, το δείγμα C2, το οποίο περιείχε γαστρικό υγρό και χαρουπόμελο εμφάνισε σημαντική αύξηση φαινολών, σε όλα τα στάδια. Το δείγμα C2 στο τέλος της όψιμης εντερικής ζύμωσης μειώθηκε σε σχέση με τη συγκέντρωση των φαινολών στην αρχική φάση κατά 20,5%. Η διαφοροποίηση αυτή ήταν στατιστικώς σημαντική.

Όσον αφορά τα δείγματα C3 και C4 η αρχική συγκέντρωση το φαινολικών

ουσιών ήταν 1371,4 mg γαλλικού οξέος / L και 1304,7 mg γαλλικού οξέος / L αντίστοιχα. Κατά την εντερική φάση οι συγκεντρώσεις και των δύο δειγμάτων μειώθηκαν. Πριν την έναρξη των εντερικών ζυμώσεων η συγκέντρωση των φαινολών για το δείγμα C3 ήταν 112,5 mg γαλλικού οξέος / 100 mL εντερικού υγρού, ενώ για το δείγμα C4 ήταν 109,7 mg γαλλικού οξέος / 100 mL εντερικού υγρού. Μετά την προσθήκη των κοπράνων και την έναρξη της εντερικής ζύμωσης η συγκέντρωση των φαινολικών ουσιών μειώθηκε και στα δύο δείγματα. Συγκεκριμένα, συγκρίνοντας τη φάση πριν την έναρξη της πρώιμης εντερικής ζύμωσης έως τη λήξη της όψιμης εντερικής ζύμωσης, η συγκέντρωση των φαινολών μειώθηκε στο δείγμα C3 του ασθενούς με νόσο του Crohn κατά 25,9%, ενώ στο δείγμα C4 του υγιούς κατά 30,3%.

Συγκρίνοντας τις συγκεντρώσεις των φαινολικών ουσιών κατά την αρχική φάση (t=0) με τις συγκεντρώσεις των φαινολικών ουσιών κατά την τελική φάση (όψιμη εντερική ζύμωση), τελικά υπήρξε στατιστικώς σημαντική διαφορά και για τα δύο δείγματα. Η περιεκτικότητα των φαινολών μειώθηκε τελικά κατά 39,1% για το δείγμα του ασθενούς με νόσο του Crohn και κατά 41,4% για το δείγμα του υγιούς. Επίσης το δείγμα του ασθενούς με νόσο του Crohn διαφέρει στατιστικώς σημαντικά με το δείγμα του υγιούς στην φάση της όψιμης εντερικής ζύμωσης (Πιν.5).

<b>Δοκιμή 1</b>			
	<b>C2</b>	<b>C3</b>	<b>C4</b>
Αρχική φάση (t=0)	1431,4	1436,4	1364,7
Όψιμη εντερική φάση	1358,1	1044,7	961,4
Τελική μείωση (%)	5,1	27,3	29,6

<b>Δοκιμή 2</b>			
	<b>C2</b>	<b>C3</b>	<b>C4</b>
Αρχική φάση (t=0)	1206,7	1371,4	1304,7
Όψιμη εντερική φάση	958,7	834,1	765
Τελική μείωση (%)	20,5	39,2	41,4

Πίνακας 5: Οι συγκεντρώσεις των ολικών φαινολών των δειγμάτων στην αρχική φάση και στην τελική φάση (όψιμη εντερική ζύμωση) και το τελικό ποσοστό μείωσής τους.

C2: γαστρικό υγρό+ χαρουπόμελο, C3: γαστρικό υγρό + χαρουπόμελο + κόπρανα ασθενούς με νόσο του Crohn, C4: γαστρικό υγρό + χαρουπόμελο + κόπρανα υγιούς (στην αρχική φάση δεν υπήρχαν κόπρανα στα δείγματα. Στα δείγματα C3 και C4 προστέθηκαν στην εντερική φάση).

Εξάγοντας συμπεράσματα και από τις δύο δοκιμές αξίζει να αναφερθεί, πως και στις δύο δοκιμές η μεγαλύτερη μείωση στη συγκέντρωση των ολικών φαινολικών ουσιών στα δείγματα του υγειούς αλλά και του ασθενούς παρατηρήθηκε πριν την έναρξη της πρώιμης εντερικής ζύμωσης έως και την ολοκλήρωσή της, ενώ δεν υπήρξε σημαντική μεταβολή μέχρι το τέλος της όψιμης εντερικής ζύμωσης. Επίσης, συγκρίνοντας τα τελικά αποτελέσματα (από την αρχική φάση έως το τέλος της όψιμης ζύμωσης), του ασθενούς με νόσο του Crohn και του υγειούς, η υψηλότερη απορρόφηση φαινολικών ενώσεων συνολικά παρατηρήθηκε στα δείγματα του υγειούς (Πιν 5). Αυτό οφείλεται στο σύνολο των μικροοργανισμών που υπήρχαν αρχικά στα κόπρανα και επίδρασαν με τις πολυφαινόλες του χαρουπόμελου. Στο δείγμα κοπράνων του υγειούς τα κύτταρα αυτά ήταν περισσότερα και συνεπώς κατανάλωσαν μεγαλύτερη ποσότητα πολυφαινολών.

Γενικά οι πολυφαινόλες έχουν μικρή βιοδιαθεσιμότητα. Η χαμηλή απορρόφησή τους από τον οργανισμό οφείλεται κυρίως στη χημική τους δομή. Σύμφωνα με έρευνες η απορρόφηση των πολυφαινολών λαμβάνει χώρα μέσω παθητικής διάχυσης των επιθηλιακών κυττάρων του εντέρου (Manach *et al.*, 2005). Μόνο ένα μικρό ποσοστό από τις προσλαμβανόμενες πολυφαινόλες απορροφώνται από το λεπτό έντερο. Έπειτα οι πολυφαινόλες που δεν έχουν απορροφηθεί από το λεπτό έντερο φτάνουν στο παχύ έντερο (κόλον) και μεταβολίζονται από τη μικροχλωρίδα του εντέρου (González-Sarrías & Barberán, 2017). Οι μη απορροφημένες φαινολικές ουσίες και τα παράγωγά τους στο κόλον έχει βρεθεί ότι έχουν «πρεβιοτικά» αποτελέσματα (Gonzalez-Sarrías & Barberan, 2017).

Όσον αφορά τη δική μας μελέτη, το δείγμα C2, στο οποίο υπάρχει μόνο γαστρικό υγρό με χαρουπόμελο σε όλες τις φάσεις της *in vitro* πέψης, και το οποίο έχει υψηλή συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων, στο τέλος της όψιμης ζύμωσης η περιεκτικότητα των πολυφαινολών μειώθηκε αλλά με μικρό ποσοστό, γεγονός που επιβεβαιώνει την χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολών.

Ωστόσο, στα δείγματα C3 του ασθενούς με νόσο του Crohn και C4 του υγειούς, οι πολυφαινόλες μειώνονται συνολικά με μεγαλύτερο ποσοστό. Έτσι συμπεραίνουμε ότι οι μικροοργανισμοί οι οποίοι προϋπήρχαν στα κόπρανα αλληλοεπίδρασαν θετικά με τις πολυφαινόλες του χαρουπόμελου, μεταβολίζοντας τις μη απορροφημένες φαινόλες που δεν απορροφήθηκαν στο λεπτό έντερο.

Συμπερασματικά, στο στάδιο της εντερικής ζύμωσης οι πολυφαινόλες είτε μεταβολίζονται και διασπώνται από τους μικροοργανισμούς, είτε δεσμεύονται από τις κυτταρικές μεμβράνες των μικροοργανισμών του μικροβιώματος και γι' αυτό το λόγο μειώνεται η ανισχεύσιμη συγκέντρωσή τους.

Το παραπάνω συμπέρασμα επιβεβαιώνεται και από άλλες έρευνες που έχουν διεξαχθεί με σκοπό τη μελέτη της μεταβολής των φαινολικών ουσιών σε *in vitro* πέψη σε φυτικά προϊόντα πλούσια σε πολυφαινόλες.

Οι Ordonez-Diaz και οι συνεργάτες μελέτησαν την *in vitro* εντερική ζύμωση της πούλπας του φρούτου μάνγκο (*Mangifera indica L.*) για 48 ώρες. Η αρχική συγκέντρωση των φαινολών του μάνγκο σε αυτή την μελέτη υπολογίστηκε σε 3469 μmol/ ξηρή ουσία. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης έδειξαν ότι κατά τη διάρκεια της εντερικής ζύμωσης η συγκέντρωση των πολυφαινολών μειώθηκε και ότι η μικροχλωρίδα που υπήρχε στα κόπρανα μεταβόλισε σταδιακά τις πολυφαινόλες που υπήρχαν πριν την έναρξη της ζύμωσης. Μετά από 24 ώρες ζύμωσης απορροφήθηκε το 34,1% των πολυφαινολών της πούλπας του μάνγκο (Ordonez-Diaz L.J *et al.*, 2020). Ακόμα μια μελέτη, με σκοπό τη διερεύνηση της βιοδιαθεσιμότητας των φαινολικών ενώσεων σε *in vitro* πέψη διεξήχθη σε σπόρους και σε φλούδα βραζιλιάνικου σταφυλιού (*Plinia jaborcaba*). Σε αυτή τη μελέτη, μετά την γαστρική πέψη, η βιοδιαθεσιμότητα των φαινολικών ενώσεων ήταν 47%, ενώ μετά από 48 ώρες ζύμωσης η βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολών του βραζιλιάνικου σταφυλιού ήταν 16%, υποδηλώνοντας και σε αυτή την περίπτωση τον μεταβολισμό των πολυφαινολών από το εντερικό μικροβίωμα (Inada P.O.K, *et al.*, 2020).

Η μικροχλωρίδα του παχέος εντέρου είναι υπεύθυνη για την εκτεταμένη διάσπαση των αρχικών πολυφαινολικών δομών σε μια σειρά φαινολικών μεταβολιτών χαμηλότερου μοριακού βάρους, με αποτέλεσμα την απορρόφηση τους από τον οργανισμό. Η αλληλεπίδραση αυτή μεταξύ των φαινολικών ενώσεων και της μικροχλωρίδας του εντέρου έχει επίδραση στην υγεία του ανθρώπου. Γενικά, μόλις τα μη απορροφημένα φαινολικά φτάσουν στο κόλον μπορούν να ωφελήσουν τον ξενιστή αυξάνοντας τα ευεργετικά μικρόβια. Οι πολυφαινόλες υποστηρίζουν τον μεταβολισμό του ξενιστή στο έντερο απορροφώντας τα νιτρώδη και ορισμένα δευτερογενή χολικά άλατα που δρουν ως υποστρώματα για διάφορες πολύπλοκες ενζυμικές αντιδράσεις. Η πρεβιοτική δράση των πολυφαινολών ενισχύει την

ανάπτυξη των ευεργετικών βακτηρίων, με αποτέλεσμα τη μειωμένη διαθεσιμότητα θρεπτικών ουσιών στα παθογόνα βακτήρια, δρώντας έτσι αντιμικροβιακά εναντίον τους. Η αυξημένη κατανάλωση τροφίμων πλούσιων σε πολυφαινόλες, όπως το χαρούπι και η βιοδιαθεσιμότητά τους μειώνει τον κίνδυνο διαφόρων χρόνιων ασθενειών (Gonzalez-Sarrías & Barberan, 2017).

Τέλος, από όλα τα παραπάνω εξάγεται το συμπέρασμα ότι το μικροβίωμα του εντέρου αλληλοεπιδρά με τις φαινολικές ενώσεις του χαρουπόμελου, μειώνοντας την αρχική συγκέντρωση των ολικών πολυφαινολών.

## 5. Συμπεράσματα

Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης υποδεικνύουν ότι η βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινόλων μιας τροφής με υψηλή περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες όπως το χαρουπόμελο στο έντερο μπορεί τελικά να μειωθεί, λόγω της βιομετατροπής που λαμβάνει χώρα στο κόλον.

Επιπλέον, παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ των μικροβιωμάτων του εντέρου που μελετήθηκαν (ασθενής με νόσο του Crohn και υγιής), με τον δεύτερο να παρουσιάζει πιο «ενεργό» μεταβολισμό, καθώς υπήρξε μεγαλύτερη μείωση στο συνολικό περιεχόμενο των φαινολικών ουσιών.

Ωστόσο, απαιτείται περαιτέρω έρευνα, ώστε να διαλευκανθούν οι πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις των συστατικών των τροφίμων και των μικροοργανισμών του εντέρου που μπορεί να επηρεάσουν τη βιοδιαθεσιμότητα των βιοδραστικών ουσιών στα τρόφιμα.

## Βιβλιογραφία

- Ajila C. M., Brar S. K., Verma M., Tyagi R. D., Godbout S., Valero L. R. (2011). Crit. Rev Biotechnol.
- Aissani N., Coroneo V., Fattouch S., & Caboni P. (2012). Inhibitory effect of Carob (*Ceratonia siliqua*) leaves methanolic extract on *listeria monocytogenes*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60(40), 9954–9958.
- Anhê F., Roy D., Pilon G., Dudonné S., Matamoros S., Varin T.V., et al. (2015). A polyphenol-rich cranberry extract protects from diet-induced obesity, insulin resistance and intestinal inflammation in association with increased *Akkermansia* spp. population in the gut microbiota of mice. Gut 64:872–83.
- Arnous A., Makris D. P., & Kefalas P. (2002). Correlation of Pigment and Flavanol Content with Antioxidant Properties in Selected Aged Regional Wines from Greece. Journal of Food composition and Analysis, Volume 15, pp. 655 – 665.
- Arthur J.C., Perez- Chanona E., Muhlbauer M., Tomkovich S., Uronis J.M, Fan T.J. (2012). Intestinal inflammation targets cancerinducing activity of the microbiota. Science, 338:120–123.
- Ayache S. B., Reis F. S., Dias M., Pereira C., Glamoclija J., Sokovic M., Saafi E. B., Ferreira I. C F R, Barros L., Achour L. (2021). Chemical characterization of carob seeds (*Ceratonia siliqua* L.) and use of different extraction techniques to promote its bioactivity.
- Barak S., & Mudgil D. (2014). Locust bean gum: Processing, properties and food applications—A review. International Journal of Biological Macromolecules, 66, 74–80.
- Barnich N., Darfeuille-Michaud A. (2007). Adherent-invasive *Escherichia coli* and Crohn's disease. *Curr Opin Gastroenterol* 23: 16–20.
- Battle I., & Tous J. (1997). Carob tree: *Ceratonia siliqua* L. – Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 17: Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research. Rome: Gatersleben/International Plant Genetic Resources Institute.
- Benchikh Y., Louaileche H., George B., Merlin A. (2014). Changes in bioactive



phytochemical content and in vitro antioxidant activity of carob (*Ceratonia siliqua* L.) as influenced by fruit ripening, *Industrial Crops and Products*, 60, pp. 298–303.

- Biagi E, Nylund L, Candela M. (2010). Through ageing, and beyond: gut microbiota and inflammatory status in seniors and centenarians [published correction appears in PLoS One.
- Blaser J. Martin & Dominguez-Bello G. Maria (2016). The Human Microbiome before Birth. *Cell Host & Microbe* Volume 20, Issue 5, pp. 558-560
- Blaser J. Martin (2016). Antibiotics and its consequences for the normal microbiome. *Science*.
- Brassesco M. E., Brandao T. R.S, Silvar C. L.M, Pitando M. (2021). Carob bean (*Ceratonia siliqua* L.): A new perspective for functional food.
- Calixto F. S., & Cañellas J. (1982). Components of nutritional interest in carob pods (*Ceratonia siliqua*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 33(12), 1319–1323.
- Cardona F., Andrés-Lacuevac C., Tulipania S., Francisco J., Tinahonesb F., Queipo-Ortuño M. (2013). Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *Journal of Nutritional Biochemistry*.
- Christou A, Stavrou I. J., and Kapnissi-Christodoulou C. P (2021). Continuous and Pulsed Ultrasound-Assisted Extraction of Carob's Antioxidants: Processing Parameters Optimization and Identification of Polyphenolic Composition. *Ultrasonics Sonochemistry* 76.
- Darfeuille-Michaud A., Neut C., Barnich N., Lederman E., Di Martino P., Desreumaux P. *et al.* (1998). Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* **115**: 1405–1413.
- Dore J. & Blottiere H. (2015). The influence of diet on the gut microbiota and its consequences for health. *Curr Opin Biotechnol*.
- Dueñas M., Muñoz-González I., Cueva C., Jiménez-Girón A., Sánchez-Patán F., et al. (2015). A survey of modulation of gut microbiota by dietary polyphenols. *Biomed. Res. Int.* 850.

- FAOSTAT. (2020). FAOSTAT <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>.
- Frank D.N., St Amand A.L., Feldman R.A. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. (2007). Proc Natl Acad Sci USA.
- Francisco A. Tomás-Barberán and Juan C. Espín. (2018). Effect of Food Structure and Processing on (Poly)phenol– Gut Microbiota Interactions and the Effects on Human Health. Annual Review of Food Science and Technology.
- González-Sarrías A., & Barberán Tomas F. A. (2017). The gut microbiota: A key factor in the therapeutic effects of (poly)phenols. Biochemical Pharmacology.
- Gordon JI. (2012). Honor thy gut symbionts redux. Science, 336:1251–1253.
- Goulas V., and Georgiou E. (2020). Utilization of Carob Fruit as Sources of Phenolic Compounds with Antioxidant Potential: Extraction Optimization and Application in Food Models. Foods 9(1).
- Goulas V., & Hadjisolomou A. (2019). Dynamic changes in targeted phenolic compounds and antioxidant potency of carob fruit (*Ceratonia siliqua* L.) products during in vitro digestion. Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie- Food Science and Technology, 101, 269–275.
- Goulas V., Stylos E., Chatziathanasiadou M. V., Mavromoustakos, T., & Tzakos A. G. (2016). Functional Components of Carob Fruit: Linking the Chemical and Biological Space. International journal of molecular sciences, 17(11), 1875.
- Gowd, V., Karim, N., Shishir, M. R. I., Xie, L., & Chen, W. (2019). Dietary polyphenols to combat the metabolic diseases via altering gut microbiota. Trends in Food Science & Technology, 93, 81–93.
- Grivennikov S., Wang K., Mucida D., Stewart C., Schnabl B., Jauch D. (2012). Adenoma-linked barrier defects and microbial products drive IL-23/IL-17-mediated tumour growth. Nature.
- Gübbük H., Güneş E. and Balkiç R. (2013). Carob Production Potential in Turkey and Uses of Carob Abstract: Introduction: Carob, an important component of the Mediterranean flora, is cultivated in marginal and prevailing calcareous soils of the Mediterranean region giving it an environmental a', pp. 71–74.
- Gurel F., Ekici H., & Yurdakok Dikmen, B. (2021). Cytotoxic and antitumoral effect

of *Ceratonia siliquaracta* L. (Carob) extrsct. *Journal of Applied Biological Sciences*, 15(2), 225–234.

- Inada P.O.K., Silva R.B.T., Lobo A.L., Dominigues R.M., Perrone D.m Monteiro M. (2020). Bioaccessibility of phenolic compounds of jaboticaba (*Plinia jaboticaba*) peel and seed after simulated gastrointestinal digestion and gut microbiota fermentation. *Journal of Functional Foods* 67.
- Klenow S., Glei M., Haber B., Owen R., Pool-Zobel B.L. (2008). Carob fibre compounds modulate parameters of cell growth differently in human ht29 colon adenocarcinoma cells than in LT97 colon adenoma cells. *Food Chemistry Toxicology*, 46, 1389–1397.
- Krokou A., Stylianou M., Agapiou A. (2019). Assessing the volatile profile of carob tree (*Ceratonia siliqua* L.), *Environmental Science and Pollution Research*.
- López-Sánchez J.I, Moreno D.A, García-Viguera C. (2018). D-pinitol, a highly valuable product from carob pods: Health-promoting effects and metabolic pathways of this natural super-food ingredient and its derivatives. *AIMS Agriculture and Food*, 3(1): 41–63.
- Lederberg J., & McCray A. T. (2001). 'Ome sweet 'omics – a genealogical treasury of words. *Scientist*, 15(7), pp. 8.
- Manach C., Williamson G., Morand C., Scalbert A., & Rémésy C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *American Journal of Clinical Nutrition*, 81, 230S–242S.
- Marchesi JR., Adams D.H., Fava F., Hermes G.D., Hirschfield G.H., et al. (2016). The gut microbiota and host health: a new clinical frontier. *Gut* 65:330–39
- Marchesi J. R. & Ravel J. (2015). The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome*.
- Mithul Aravind S., Santad Wichienchot, Rong Tsao, Ramakrishnan S., Chakkaravarthi S. (2021). Role of dietary polyphenols on gut microbiota, their metabolites and health benefits. *Food Research International*.
- Modi SR, Collins LL, Relman DA. (2014). Antibiotics and the gut microbiota. *J. Clin invest*.

- Moore W., Moore LH. (1995). Intestinal floras of populations that have a high risk of colon cancer. *Appl Environ Microbiol*.
- Naghmouchi S., Khouja M. L., Romero A., Tous J., & Boussaid M. (2009). Tunisian carob (*Ceratonia siliqua* L.) populations: Morphological variability of pods and kernel. *Scientia Horticulturae*, 121(2), 125–130.
- Nasar-Abbas S. M., e-Huma Z., Vu, T.-H., Khan, M. K., Esbenshade, H., & Jayasena, V. (2016). Carob Kibble: A Bioactive-Rich Food Ingredient. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(1), 63–72.
- Neyrinck A.M., Etxeberria U., Taminiau B., Daube G., Van Hul M., et al. (2017). Rhubarb extract prevents hepatic inflammation induced by acute alcohol intake, an effect related to the modulation of the gut microbiota. *Mol. Nutr. Food Res*.
- Ningpapa M. B., Aktumsek A., Karatas S. L. (2016). *Funct. Foods*.
- Ordonez-Diaz L.J., Moreno-Ortega A., Roldan-Guerra J.F., Ortiz-Somovilla V., Moreno-Rojas M.J, Pereira-Caro G. (2020). Article: In Vitro Gastrointestinal Digestion and Colonic Catabolism of Mango (*Mangifera indica* L.) Pulp Polyphenols. MDPI.
- Ott S.J., Musfeldt M., Wenderoth D.F. (2004) Reduction in diversity of the colonic mucosa associates bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease.
- Ouis N. and Hariri A. (2018) 'Antioxidant and antibacterial activities of the essential oils of *Ceratonia*' *Banat's Journal of Biotechnology*.
- Owen R. W., Haubner R, Hull W.E., Erben G., Spiegelhalder B., Bartsch H., and Haber B. (2003). Isolation and Structure Elucidation of the Major Individual Polyphenols in Carob Fibre. *Food and Chemical Toxicology* 41(12):1727–38
- Papaefstathiou, E., Agapiou, A., Giannopoulos, S., & Kokkinofta, R. (2018). Nutritional characterization of carobs and traditional carob products. *Food Science & Nutrition*.
- Papagiannopoulos M., Hans Rainer W., Annett M., Bernd H. and Rudolf G/ (2004). Identification and Quantification of Polyphenols in Carob Fruits

- (*Ceratonia Siliqua* L.) and Derived Products by HPLC-UV-ESI/MSn., *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(12):3784–91.
- Paramera, E. I., Konteles, S. J., & Karathanos, V. T. (2011). Stability and release properties of curcumin encapsulated in *Saccharomyces cerevisiae*,  $\beta$ -cyclodextrin and modified starch. *Food chemistry*, 125(3), 913-922.
  - Pyrovolou K., Konteles S., Kosta C., Kaliora, A.C., Amerikanou C., Strati E., Batrinou A. (2022). Bioavailability of carob syrup polyphenols in a simulated gastrointestinal and colonic fermentation system. 1st International Congress on Food, Nutrition & Public Health - Towards a sustainable future, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, I.P., Lisbon, Portugal.
  - Robinson CJ., Youn VB. (2010). Antibiotic administration alters the community structure of the gastrointestinal microbiota. *Gut Microbes*
  - Roopchand D.E., Carmody R.N., Kuhn P., Moskal K., Rojas-Silva P., Turnbaugh PJ, et al. (2015). Dietary polyphenols promote growth of the gut bacterium *Akkermansia muciniphila* and attenuate high-fat diet-induced metabolic syndrome. *Diabetes* 64:2847–58.
  - Rtibi K., Selmi S., Grami D., Saidani K., Sebai H., Amri M., Marzouki L. (2016). *Ceratonia siliqua* L. (immature carob bean) inhibits intestinal glucose absorption, improves glucose tolerance and protects against alloxan-induced diabetes in rat. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(8), 2664–2670.
  - Sigge G. O., lipumbu, L. & Britz T. J. (2011). Proximate composition of carob cultivars growing in South Africa. *South African Journal of Plant and Soil*, 28(1), 17–22.
  - Smith, A. H., & Mackie, R. I. (2004). Effect of condensed tannins on bacterial diversity and metabolic activity in the rat gastrointestinal tract. *Applied and Environment Microbiology*, 1104–1115.
  - Stavrou I. J., Christou A., Kapnissi-Christodoulou C. P. (2018). Polyphenols in carobs: A review on their composition, antioxidant capacity and cytotoxic effects, and health impact, *Food Chemistry*, 269, pp. 355–374.
  - Tomas-Barberan A.F., Espin Juan C. (2018). Effect of Food Structure and

Processing on (Poly)phenol– Gut Microbiota Interactions and the Effects on Human Health. Annual Reviews of Food Science and Technology.

- Tortora J. G., Funke R. B., Case L. C., (2019). Microbiology: An Introduction, Pearson.
- HUMAN MICROBIOME PROJECT CONSORTIUM. Structure, functions and diversity of the healthy human microbiome. Nature 2012, 486:207.
- Μεντής Φ. Α. & Γύπας, Φ.(2013). Ανθρώπινο μικροβίωμα του εντέρου: Ο ρόλος του στην υγεία και στη νόσο. Αρχεία Ελληνικής Ιατρικής, Τόμος 30, σελ. 272-288.
- Τζάθας Κωνσταντίνος, Σημειώσεις από μάθημα με θέμα: Βιολογικές πρώτες ύλες οργανικών βιομηχανιών, Εργαστηριακή άσκηση: Μέτρηση ολικού φαινολικού περιεχομένου με τη μέθοδο folin-ciocalteu, Εργαστήριο Οργανικής Χημικής Τεχνολογίας.
- Υπουργείο Γεωργίας, Αγροτικής Ανάπτυξης και Περιβάλλοντος, Τμήμα Γεωργίας. (2016). Η καλλιέργεια της χαρουπιάς Έκδοση 8/2016 Λευκωσία-ΚΥΠΡΟΣ.

#### Πηγές εικόνων

- Εικόνα 1: Προσωπικό αρχείο.
- Εικόνα 2: Σημειώσεις eclass του μαθήματος τεχνολογίας τροφίμων, της σχολής τεχνολογίας τροφίμων και διατροφής του τεχνολογικού εκπαιδευτικού ιδρύματος Θεσσαλονίκης.
- Εικόνα 3: Goulas V., Stylos E., Chatziathanasiadou M. V., Mavromoustakos T., & Tzakos, A. G. (2016). Functional Components of Carob Fruit: Linking the Chemical and Biological Space. International journal of molecular sciences, 17(11), 1875.
- Εικόνα 4: Προσωπική εργασία.
- Εικόνα 5: Προσωπική εργασία.
- Εικόνα 6: [enteriko\\_mikrobiwma\\_kai\\_EnteroScan.pdf \(athenslab.gr\)](#)
- Εικόνα 7: [Ο ρόλος του μικροβιώματος - Υγεία του εντέρου \(ygeiakaifrontidagiatoentero.gr\)](#)
- Εικόνα 8: [enteriko\\_mikrobiwma\\_kai\\_EnteroScan.pdf \(athenslab.gr\)](#)

- Εικόνα 9: Μεντής Φ. Α. & Γύπας, Φ.(2013). Ανθρώπινο μικροβίωμα του εντέρου: Ο ρόλος του στην υγεία και στη νόσο. Αρχεία Ελληνικής Ιατρικής, Τόμος 30, σελ. 272-288.
- Εικόνα 10: Προσωπικό αρχείο
- Εικόνα 11: Προσωπικό αρχείο
- Εικόνα 12: Σημειώσεις e-class του μαθήματος μικροβιολογίας, του ΓΠΑ
- Εικόνα 13: Προσωπικό αρχείο
- Εικόνα 14: Προσωπικό αρχείο
- Εικόνα 15: Τζάθας Κωνσταντίνος, Σημειώσεις από μάθημα με θέμα: Βιολογικές πρώτες ύλες οργανικών βιομηχανιών, Εργαστηριακή άσκηση: Μέτρηση ολικού φαινολικού περιεχομένου με τη μέθοδο folin-ciocalteu, Εργαστήριο Οργανικής Χημικής Τεχνολογίας.
- Εικόνα εξωφύλλου: Barros C.G.R, Pereira C.U, Andrade S.K.J, Vasconcelos V.S, Narain N. (2020). In vitro gastrointestinal digestion and probiotics fermentation impact on bioaccessibility of phenolics compounds and antioxidant capacity of some native and exotic fruit residues with potential antidiabetic effects. Food Research International.

## Παράρτημα Α

Παρακάτω παρουσιάζονται όλες οι μετρήσεις των απορροφήσεων που πήραμε και τα τελικά αποτελέσματα για τον ολικό προσδιορισμό των φαινολικών ουσιών των δειγμάτων με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu για τη δοκιμή 1 και 2. Τα τελικά αποτελέσματα υπολογίστηκαν σε mg γαλλικού οξέος/ L.

### 1) Δοκιμή 1

Samples	A (750 nm)			αφαιρούμε το blank			Υπολογισμός του C με την εξίσωση $Y = (Y-0,0783)/0,0005$			διόρθωση τιμών για τον όγκο V=20μL (C*10)/20				αραίωση 1:2 σε όσα έγινε αραίωση									
	V=20 μL			average A	A(750nm-blank)		AVA-blank	C (mg/L)			Coverage	Ccorr(mg/L)		Ccorr average (mg/L)	SD	Ccorr*2 (mg/L)		Ccorr av*2 SD					
	0,094	0,105	0,101	0,100	0,087	0,098	0,094	0,093	17,400	39,400	31,400	29,400	8,700	19,700	15,700	14,700	5,568	8,700	19,700	15,700	14,7	5,6	
1 C1A	0,094	0,105	0,101	0,100	0,087	0,098	0,094	0,093	17,400	39,400	31,400	29,400	8,700	19,700	15,700	14,700	5,568	8,700	19,700	15,700	14,7	5,6	
2 C2A	0,827	0,845	0,731	0,801	0,820	0,838	0,724	0,794	1483,400	1519,400	1291,400	1431,400	741,700	759,700	645,700	715,700	61,286	1483,400	1519,400	1291,400	1431,4	122,6	
3 C3A	0,793	0,814	?	0,547	0,804	0,786	0,807	?	0,797	1415,400	1457,400	?	1436,400	707,700	728,700	?	718,200	14,849	1415,400	1457,400	?	1436,4	29,7
4 C4A	0,818	0,705	0,780	0,768	0,811	0,698	0,773	0,761	1465,400	1239,400	1389,400	1364,733	732,700	619,700	694,700	682,367	57,501	1465,400	1239,400	1389,400	1364,7	115,0	
5 C1B	0,099	0,085	0,131	0,105	0,092	0,078	0,124	0,098	27,400	-0,600	91,400	39,400	13,700	-0,300	45,700	19,700	23,580	13,700	-0,300	45,700	19,7	23,6	
6 C2B	0,818	0,863	0,828	0,836	0,811	0,856	0,821	0,829	1465,400	1555,400	1485,400	1502,067	732,700	777,700	742,700	751,033	23,629	1465,4	1555,4	1485,4	1502,1	47,3	
7 C3B	0,763	0,769	0,625	0,719	0,756	0,762	0,618	0,712	1355,400	1367,400	1079,400	1267,400	677,700	683,700	539,700	633,700	81,462	1355,4	1367,4	1079,4	1267,4	162,9	
8 C4B	0,731	0,742	0,708	0,727	0,724	0,735	0,701	0,720	1291,400	1313,400	1245,400	1283,400	645,700	656,700	622,700	641,700	17,349	1291,4	1313,4	1245,4	1283,4	34,7	
9 C1C	0,350	0,353	0,326	0,343	0,343	0,346	0,319	0,336	529,400	535,400	481,400	515,400	264,700	267,700	240,700	257,700	14,799	264,700	267,700	240,700	257,7	14,8	
10 C2C	0,815	0,94	0,797	0,851	0,808	0,933	0,790	0,844	1459,400	1709,400	1423,400	1530,733	729,700	854,700	711,700	765,367	77,887	1459,4	1709,4	1423,4	1530,7	155,8	
11 C3C	0,742	0,734	0,752	0,743	0,735	0,727	0,745	0,736	1313,400	1297,400	1333,400	1314,733	656,700	648,700	666,700	657,367	9,018	1313,4	1297,4	1333,4	1314,7	18,0	
12 C4C	0,793	0,761	0,784	0,779	0,786	0,754	0,777	0,772	1415,400	1351,400	1397,400	1388,067	707,700	675,700	698,700	694,033	16,503	1415,4	1351,4	1397,4	1388,1	33,0	
13 C1D	0,354	0,357	0,384	0,365	0,347	0,350	0,377	0,358	537,400	543,400	597,400	559,400	268,700	271,700	298,700	279,700	16,523	268,700	271,700	298,700	279,7	16,5	
14 C2D	0,885	0,836	0,961	0,894	0,878	0,829	0,954	0,887	1599,400	1501,400	1751,400	1617,400	799,700	750,700	875,700	808,700	62,984	1599,4	1501,4	1751,4	1617,4	126,0	
15 C3D	0,635	0,584	0,612	0,610	0,628	0,577	0,605	0,603	1099,400	997,400	1053,400	1050,067	549,700	498,700	526,700	525,033	25,541	1099,4	997,4	1053,4	1050,1	51,1	
16 C4D	0,603	0,61	0,581	0,598	0,596	0,603	0,574	0,591	1035,400	1049,400	991,400	1025,400	517,700	524,700	495,700	512,700	15,133	1035,4	1049,4	991,4	1025,4	30,3	
17 C1E	0,242	0,246	0,267	0,252	0,235	0,239	0,260	0,245	313,400	321,400	363,400	332,733	156,700	160,700	181,700	166,367	13,429	156,700	160,700	181,700	166,4	13,4	
18 C2E	0,733	0,81	0,750	0,764	0,726	0,803	0,743	0,757	1295,400	1449,400	1329,400	1358,067	647,700	724,700	664,700	679,033	40,452	1295,4	1449,4	1329,4	1358,1	80,9	
19 C3E	0,610	0,606	0,607	0,608	0,603	0,599	0,600	0,601	1049,400	1041,400	1043,400	1044,733	524,700	520,700	521,700	522,367	2,082	1049,4	1041,4	1043,4	1044,7	4,2	
20 C4E	0,540	0,564	0,594	0,566	0,533	0,557	0,587	0,559	909,400	957,400	1017,400	961,400	454,700	478,700	508,700	480,700	27,055	909,4	957,4	1017,4	961,4	54,1	
Blank	0,007																						
A	0 hours	initial																					
B	1,5 hours GF	gastric phase																					
C	1,5 h GF+2h EF	enteric phase		C1	GF				14,7	5,6	19,7	23,6	257,7	14,8	279,7	16,5	166,4						
D	1,5h GF + 4h EF	early fermentation		C2	GF+ CB				1431,4	122,6	1502,1	47,3	1530,7	155,8	1617,4	126,0	1358,1						
E	1,5h GF + 18h EF	late fermentation		C3	GF+ CB +F1				1436,4	29,7	1267,4	162,9	1314,7	18,0	1050,1	51,1	1044,7						
				C4	GF+ CB +F2				1364,7	115,0	1283,4	34,7	1388,1	33,0	1025,4	30,3	961,4						
C1	gastric fluid (GF)																						
C2	GF + carob syrup (CB)																						
C3	GF + carob syrup +feces 1 (code F1, crohns disease)																						
C4	GF + carob syrup+ feces 2 (code F2, healthy)																						



## II) Δοκιμή 2

Samples	A (750 nm)			αφαιρούμε το blank			Υπολογισμός του C με την εξίσωση X= (Y-0,0783)/0,0005			διόρθωση τιμών για τον όγκο V=20μL			αραίωση 1:2									
	V=20 μL			average A	A(750nm-blank)		AVA-blank	C (mg/L)		C coverage	Ccorr(mg/L)		Ccorr average (mg/L)	SD	Ccorr*2 (mg/L)		Ccorr av*2	SD				
1 C1A	0,331	0,279	0,313	0,308	0,329	0,277	0,311	0,306	501,400	397,400	465,400	454,733	250,700	198,700	232,700	227,367	26,407	250,700	198,700	232,700	227,4	26,4
2 C2A	0,701	0,725	0,625	0,684	0,699	0,723	0,623	0,682	1241,400	1289,400	1089,400	1206,733	620,700	644,700	544,700	603,367	52,205	1241,4	1289,4	1089,4	1206,7	104,4
3 C3A	0,767	0,788	0,743	0,766	0,765	0,786	0,741	0,764	1373,400	1415,400	1325,400	1371,400	686,700	707,700	662,700	685,700	22,517	1373,4	1415,4	1325,4	1371,4	45,0
4 C4A	0,786	0,743	0,669	0,733	0,784	0,741	0,667	0,731	1411,400	1325,400	1177,400	1304,733	705,700	662,700	588,700	652,367	59,181	1411,4	1325,4	1177,4	1304,7	118,4
5 C1B	0,325	0,308	0,333	0,322	0,323	0,306	0,331	0,32	489,400	455,400	505,400	483,400	244,700	227,700	252,700	241,700	12,767	244,700	227,700	252,700	241,7	12,8
6 C2B	0,7	0,702	0,700	0,701	0,698	0,700	0,698	0,699	1239,400	1243,400	1239,400	1240,733	619,700	621,700	619,700	620,367	1,155	1239,4	1243,4	1239,4	1240,7	2,3
7 C3B	0,677	?	0,715	0,696	0,675	?	0,713	0,694	1193,400	?	1269,400	1231,400	596,700	?	634,700	615,700	26,870	1193,4	?	1269,4	1231,4	53,7
8 C4B	0,777	0,67	0,656	0,701	0,775	0,668	0,654	0,699	1393,400	1179,400	1151,400	1241,400	696,700	589,700	575,700	620,700	66,189	1393,4	1179,4	1151,4	1241,4	132,4
9 C1C	0,292	0,297	0,288	0,292	0,290	0,295	0,286	0,290	423,400	433,400	415,400	424,067	211,700	216,700	207,700	212,033	4,509	211,700	216,700	207,700	212,0	4,5
10 C2C	0,582	0,566	0,567	0,572	0,580	0,564	0,565	0,570	1003,400	971,400	973,400	982,733	501,700	485,700	486,700	491,367	8,963	1003,4	971,4	973,4	982,7	17,9
11 C3C	0,64	0,632	0,657	0,643	0,638	0,630	0,655	0,641	1119,400	1103,400	1153,400	1125,400	559,700	551,700	576,700	562,700	12,767	1119,4	1103,4	1153,4	1125,4	25,5
12 C4C	0,608	0,621	0,658	0,629	0,606	0,619	0,656	0,627	1055,400	1081,400	1155,400	1097,400	527,700	540,700	577,700	548,700	25,942	1055,4	1081,4	1155,4	1097,4	51,9
13 C1D	0,311	0,316	0,337	0,321	0,309	0,314	0,335	0,319	461,400	471,400	513,400	482,067	230,700	235,700	256,700	241,033	13,796	230,700	235,700	256,700	241,0	13,8
14 C2D	0,577	0,599	0,555	0,577	0,575	0,597	0,553	0,575	993,400	1037,400	949,400	993,400	496,700	518,700	474,700	496,700	22,000	993,4	1037,4	949,4	993,4	44,0
15 C3D	0,487	0,506	0,497	0,497	0,485	0,504	0,495	0,495	813,400	851,400	833,400	832,733	406,700	425,700	416,700	416,367	9,504	813,4	851,4	833,4	832,7	19,0
16 C4D	0,498	0,457	0,452	0,469	0,496	0,455	0,450	0,467	835,400	753,400	743,400	777,400	417,700	376,700	371,700	388,700	25,239	835,4	753,4	743,4	777,4	50,5
17 C1E	0,322	0,333	0,382	0,346	0,320	0,331	0,380	0,344	483,400	505,400	603,400	530,733	241,700	252,700	301,700	265,367	31,943	241,700	252,700	301,700	265,4	31,9
18 C2E	0,55	0,557	0,572	0,560	0,548	0,555	0,570	0,558	939,400	953,400	983,400	958,733	469,700	476,700	491,700	479,367	11,240	939,4	953,4	983,4	958,7	22,5
19 C3E	0,491	0,49	0,496	0,492	0,489	0,488	0,494	0,490	821,400	819,400	831,400	824,067	410,700	409,700	415,700	412,033	3,215	821,4	819,4	831,4	824,1	6,4
20 C4E	0,452	0,464	0,459	0,4583	0,450	0,462	0,457	0,456	743,400	767,400	757,400	756,067	371,700	383,700	378,700	378,033	6,028	743,4	767,4	757,4	756,1	12,1
Blank	0,002																					
A	0 hours	initial																				
B	1,5 hours GF	gastric phase						0h	SD		SD		SD		SD							
C	1,5 h GF+2h EF	enteric phase			C1	GF			227,4	26,4			GASTRIC phase		SD							
D	1,5h GF + 4h EF	early fermentation			C2	GF+ syrup			1206,7	104,4				ENTERIC phase		SD						
E	1,5h GF + 18h EF	late fermentation			C3	GF+syrup +F1			1371,4	45,0					SD							
					C4	GF+ syrup +F2			1304,7	118,4						SD						
C1	gastric fluid (GF)																					
C2	GF + carob syrup (CB)																					
C3	GF + carob syrup +feces 1 (code F1, crohns disease)																					
C4	GF + carob syrup+ feces 2 (code F2, healthy)																					