



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ**

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

### **Πτυχιακή Εργασία**

**«Μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης των συστατικών  
χαρουπιού»**



**ΑΠΟΣΤΟΛΟΥ ΧΡΙΣΤΙΝΑ**

**ΑΜ: 19684118**

**Επιβλέπουσα καθηγήτρια:**

**ΑΝΘΙΜΙΑ ΜΠΑΤΡΙΝΟΥ**

**Αθήνα, Σεπτέμβριος 2023**



**UNIVERSITY OF WEST ATTICA**

**SCHOOL OF FOOD SCIENCES**

**DEPARTMENT OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY**

**Diploma Thesis**

**«Study of the antimicrobial activity of carob components»**

**APOSTOULOU CHRISTINA**

**RN: 19684118**

**Supervisor:**

**ANTHIMIA BATRINOU**

**Athens, September 2023**



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ**

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

**Εγκρίθηκε από τριμελή εξεταστική επιτροπή**

Αθήνα, Σεπτέμβριος 2023

### **ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ**

1. Επιβλέπουσα Καθηγήτρια

#### **Ανθμία Μπατρίνου**

Βιολόγος MSc, PhD, Επίκουρη Καθηγήτρια Τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων, Σχολή  
Επιστημών Τροφίμων, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

2. Μέλος επιτροπής

#### **Ειρήνη Στρατή**

Χημικός MSc, PhD, Επίκουρη Καθηγήτρια Τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων, Σχολή  
Επιστημών Τροφίμων, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

3. Μέλος επιτροπής

#### **Σπυρίδων Κοντελής**

Γεωπόνος, PhD, Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων, Σχολή  
Επιστημών Τροφίμων, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

## ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΔΗΛΩΣΗ ΜΗ ΛΟΓΟΚΛΟΠΗΣ

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Χριστίνα Αποστόλου του Γεώργιου, με αριθμό μητρώου 19684118, φοιτήτρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, δηλώνω υπεύθυνα και γνωρίζοντας τις κυρώσεις του νόμου περί Πνευματικής Ιδιοκτησίας, ότι η παρούσα πτυχιακή εργασία έχει συγγραφεί από εμένα αποκλειστικά και δεν αποτελεί προϊόν αντιγραφής ούτε προέρχεται από ανάθεση σε τρίτους.

Στην βιβλιογραφία περιλαμβάνονται όλες οι πηγές από τις οποίες έγινε χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο.

Δηλώνω, επίσης, ότι αναλαμβάνω τις συνέπειες, όπως αυτές νομίμως ορίζονται, σε περίπτωση που αποδειχθεί διαχρονικά ότι η εργασία αυτή αποτελεί προϊόν λογοκλοπής.

Η Δηλούσα

ΑΠΟΣΤΟΛΟΥ ΧΡΙΣΤΙΝΑ





## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

*Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες, στην επιβλέπουσα καθηγήτρια μου, κ. Ανθιμία Μπατρίνου, για την υποστήριξη και την καθοδήγηση της κατά την διάρκεια της εκπόνησης αυτής της εργασίας.*

*Επίσης, ευχαριστώ ιδιαίτερα την εξαιρετική υποψήφια διδάκτορα, Κατερίνα Πυροβόλου, για την πολύτιμη βοήθειά της καθ' όλη τη διάρκεια των μικροβιολογικών πειραμάτων. Η έρευνα αυτή διεξήχθη σε στενή συνεργασία με την Κατερίνα Πυροβόλου ως μέρος της διδακτορικής της διατριβής με τίτλο: "Αξιοποίηση συστατικών χαρουπιού (*Ceratonia siliqua*) μέσω μικροβιακών ζυμώσεων. Επιπλέον, οφείλω να ευχαριστήσω τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής μου, για τον χρόνο που αφιέρωσαν.*

*Επιπρόσθετα, δεν θα μπορούσα να παραλείψω να εκφράσω τις ευχαριστίες και την ευγνωμοσύνη μου στην οικογένεια και τους φίλους μου, για την αγάπη και τη στήριξη, τους καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.*

Αποστόλου Χριστίνα

Σεπτέμβριος 2023

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας είναι η διερεύνηση της αντιμικροβιακής δράσης που παρουσιάζουν τα συστατικά του ελληνικού χαρουπιού έναντι τεσσάρων παθογόνων βακτηριακών στελεχών, της *Escherichia coli*, του *Staphylococcus aureus*, της *Salmonella Typhimurium* και *Listeria monocytogenes*. Αρχικά έγινε αναφορά στην ιστορική αναδρομή της χαρουπιάς και στα βοτανικά χαρακτηριστικά της. Στην συνέχεια έγινε εκτενέστερη περιγραφή της χημικής σύστασης των διάφορων τμημάτων της χαρουπιάς, με ιδιαίτερη έμφαση στις πολυφαινολικές ενώσεις οι οποίες χαρακτηρίζονται για το ισχυρό αντιμικροβιακό δυναμικό τους. Ακολούθως έγινε μια σύντομη ανάλυση των διάφορων μεθόδων εκχύλισης και τεχνικών προσδιορισμού φαινολικών ενώσεων. Επιπλέον, έγινε βιβλιογραφική ανασκόπηση της αντιμικροβιακής δράσης που παρουσιάζει η χαρουπιά, με τις πλείστες έρευνες να εστιάζουν στις πολυφαινολικές τους ενώσεις. Ακόμη, αναλύθηκαν δύο ευρέως γνωστές μέθοδοι αξιολόγηση και ελέγχου αντιμικροβιακής ικανότητας, με ιδιαίτερη έμφαση στο αυτοματοποιημένο και ταχύ σύστημα θολομέτρησης, *Bioscreen C* το οποίο χρησιμοποιήθηκε στο πειραματικό πλαίσιο. Τέλος, παρουσιάστηκαν οι σημαντικότερες κατηγορίες τροφιμογενών, παθογόνων μικροοργανισμών. Όσον αφορά το πειραματικό μέρος, παρασκευάστηκαν εκχυλίσματα χαρουπιάς με την μέθοδο διαβροχής και με την χρήση μη τοξικών διαλυτών. Συγκεκριμένα οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το νερό και το μίγμα νερού:αιθανόλης 90:10. Για τους σκοπούς της έρευνας, πραγματοποιήθηκαν δύο πειραματικές διαδικασίες. Στην πρώτη μελετήθηκε η αντιμικροβιακή ικανότητα όλων των τμημάτων της χαρουπιάς έναντι στους μικροοργανισμούς *Escherichia coli* και *Staphylococcus aureus*, ενώ στην δεύτερη μελετήθηκε η αντιμικροβιακή ικανότητα εκχυλισμάτων άγουρων (πράσινων) λοβών διαφορετικών σταδίων ωρίμανσης έναντι και των τεσσάρων μικροοργανισμών. Τα αποτελέσματα οπτικής πυκνότητας που ελήφθησαν από το *Bioscreen C*, επεξεργάστηκαν με την βοήθεια του προγράμματος ComBase – DMFit 3\_5 στην Microsoft Excel. Η αξιολόγηση της αντιμικροβιακής ικανότητας των εκχυλισμάτων, έναντι των διαφόρων προς μελέτη μικροοργανισμών, στηρίχθηκε στην ανάλυση των καμπυλών ανάπτυξης, στην στατιστική ανάλυση των ειδικών ρυθμών ανάπτυξης των μικροοργανισμών και στον παράγοντα αναστολής (% inhibition). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι για κάθε μικροοργανισμό, τουλάχιστον ένα εκχύλισμα παρουσίασε μια ικανοποιητική αντιμικροβιακή ικανότητα. Αξιοσημείωτη είναι η αντιμικροβιακή ικανότητα που παρουσίασε το εκχύλισμα άγουρου (πράσινου) λοβού με μήνα ωρίμανσης τον Μάιο του 2022 και με διαλύτη το μίγμα νερού:αιθανόλης 90:10 ενάντια στην *Salmonella Typhimurium*.

**Λέξεις κλειδιά:** εκχυλίσματα χαρουπιού, αντιμικροβιακή δράση, πολυφαινόλες, εκχύλιση με διαβροχή, παθογόνοι μικροοργανισμοί, Bioscreen C.

## ABSTRACT

The primary objective of this study is to explore the antimicrobial properties of Greek carob components against four pathogenic bacterial strains: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Typhimurium, and *Listeria monocytogenes*. The research journey begins with an introduction to the historical and botanical aspects of carob, followed by an in-depth examination of the chemical composition of various carob parts. Special emphasis is placed on polyphenolic compounds, renowned for their robust antimicrobial potential. Additionally, the study provides a concise overview of diverse extraction methods and techniques employed for quantifying phenolic compounds. To substantiate these findings, a comprehensive literature review is conducted, focusing predominantly on the antimicrobial attributes of carob, particularly its polyphenolic compounds. Furthermore, the study assesses two widely recognized methods for antimicrobial evaluation and testing, with a particular spotlight on the automated and rapid photometric system known as Bioscreen C, which is the linchpin of our experimental framework. In order to contextualize the study, an introduction to the most pertinent classes of foodborne, pathogenic microorganisms is presented. The experimental section details the preparation of carob extracts through the maceration method employing non-toxic solvents, specifically, water and a 90:10 water-ethanol mixture. Our research design encompasses two distinct experimental procedures. The first evaluates the antimicrobial potential of all carob parts against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, while the second investigates the antimicrobial efficacy of extracts from unripe (green) carob pods at various stages of ripening against all four target microorganisms. For data analysis, optical density results obtained from Bioscreen C are processed using the ComBase - DMFit 3\_5 program within Microsoft Excel. The assessment of extract antimicrobial capacity against the various studied microorganisms relies on the analysis of growth curves, statistical scrutiny of the specific growth rates of these microorganisms, and the computation of inhibition factors (% inhibition). The results yield promising findings, with at least one extract demonstrating satisfactory antimicrobial capabilities against each microorganism. Notably, the extract from unripe (green) pods maturing in May 2022, prepared with a solvent mixture of water and ethanol (90:10), stands out for its noteworthy antimicrobial activity against *Salmonella* Typhimurium.

**Keywords:** carob extracts, antimicrobial activity, polyphenols, Maceration extraction, pathogenic microorganisms, Bioscreen C.

# Περιεχόμενα

<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι – ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b> .....	8
<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	9
<b>1.1 Η χαρουπιά</b> .....	9
1.1.1 Ιστορική Αναδρομή.....	9
1.1.2 Υφιστάμενη κατάσταση στην Κύπρο.....	10
1.1.3 Βοτανική περιγραφή.....	11
1.1.4 Κλιματικές και εδαφικές απαιτήσεις της χαρουπιάς .....	14
1.1.5 Λειτουργικά χημικά συστατικά των καρπών και φύλλων χαρουπιάς .....	15
1.1.6 Οφέλη του χαρουπιού στην υγεία του ανθρώπου .....	25
<b>1.2 Μέθοδοι εκχύλισης και τεχνικές προσδιορισμού φαινολικών ενώσεων</b> .....	28
<b>1.3 Αντιμικροβιακή δράση</b> .....	29
1.3.1 Αντιμικροβιακή δράση των φυτικών εκχυλισμάτων.....	30
1.3.2 Αντιμικροβιακή δράση της χαρουπιάς .....	30
1.3.3 Μέθοδοι αντιμικροβιακής δράσης.....	32
<b>1.4 Τροφιμογενείς παθογόνοι μικροοργανισμοί</b> .....	36
1.4.1 <i>Escherichia coli</i> .....	36
1.4.2 <i>Salmonella species (spp.)</i> .....	39
1.4.3 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	41
1.4.4 <i>Listeria monocytogenes</i> .....	44
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙ – ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b> .....	48
<b>2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b> .....	49
<b>2.1 Σκοπός της εργασίας</b> .....	49
<b>2.2 Υλικά και Μεθοδολογία</b> .....	49
2.2.1 Υλικά και εξοπλισμός .....	49
2.2.2 Μέθοδος εκχύλισης χαρουπιού.....	50
2.2.3 Προετοιμασία πρώτης ύλης.....	50
2.2.4 Πορεία εκχύλισης.....	51
2.2.5 Παστερίωση .....	54
2.2.6 Παρασκευή θρεπτικού υποστρώματος - <i>Brain Heart Infusion Broth</i> .....	55
2.2.7 Ανακαλλιέργεια και δεκαδική αραίωση των μικροοργανισμών .....	55
2.2.8 Προετοιμασία δειγμάτων.....	56
2.2.9 Μέθοδος ανίχνευσης αντιμικροβιακής ικανότητας – Μέτρηση με <i>Bioscreen</i> .....	56
<b>2.3 Αποτελέσματα και συζήτηση</b> .....	60
<b>3. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b> .....	115
<b>4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	119

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι – ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 Η χαρουπιά

### 1.1.1 Ιστορική Αναδρομή

Η χαρουπιά (*Ceratonia siliqua* L.), γνωστή με διάφορες ονομασίες όπως ξυλοκερατιά ή τερατσιά είναι ένα αειθαλές δέντρο που ανήκει στην οικογένεια “*Leguminosae*” (ή *Fabaceae*) η οποία συνήθως αναφέρεται ως οικογένεια των ψυχανθών ή του μπιζελιού. Πιο συγκεκριμένα, ανήκει στην υποοικογένεια “*Caesalpinioideae*”. Το χαρουπόδεντρο κατατάσσεται επιστημονικά στο γένος *Ceratonia* και στο είδος *Ceratonia siliqua* L., υποδηλώνοντας τη μοναδική βοτανική του ταυτότητα. Η λατινική ονομασία του χαρουπιού είναι “*Ceratonia silique*” και προέρχεται από την ελληνική λέξη «κέρας» (*Ceratonia*), δηλαδή το κέρατο ενός ζώου, και τη λατινική λέξη “*silique*”, που αναφέρεται στη σκληρότητα και το σχήμα του λοβού της. Η κοινή ονομασία της προέρχεται από την εβραϊκή λέξη «*kharuv*» (Syed M. Nasar-Abbas, 2015) , (Κώστα, 2016), (Giochari, et al., 2022).

Ο Θεόφραστος κατά τη διάρκεια των βοτανικών σπουδών του στη Βαβυλώνα περί το 310 π.Χ., αναφέρει ένα δέντρο που ονομάζεται από τους Έλληνες ως «Κερωνία», ενώ από κάποιους ονομαζόταν «Αιγυπτιακό σύκο». Ο Θεόφραστος διαφωνούσε με τη χρήση του όρου “αιγυπτιακή συκιά”, καθώς πίστευε ότι ήταν ανακριβής. Υποστήριζε ότι η προέλευση του χαρουπιού δεν εντοπίζεται στην Αίγυπτο αλλά σε περιοχές όπως η Συρία, η Ιωνία, η Κνίδος και η Ρόδος. Σε κάποιες περιοχές της Ιταλίας, το χαρούπι ονομαζόταν “*pselocherato*” και “*pselocherea*”, λέξεις οι οποίες πιθανότατα προέρχονταν από την ελληνική λέξη «ξύλο». Επιπλέον, στο Μαρόκο οι γνωστές ονομασίες του χαρουπιού είναι “*slighwa*” και “*tikida*”. Οι παραπάνω ονομασίες αναφέρθηκαν από τον Ab l-Khayr, ο οποίος απέδωσε το θρυλικό όνομα του δέντρου στον βασιλιά Σολομώντα. Εξήγησε ότι το δέντρο κέρδισε το όνομα “*kharrub*” επειδή φέρεται να προειδοποίησε τον βασιλιά Σολομώντα για την επικείμενη καταστροφή της μοναρχίας του. (RAMÓN-LACA & MABBERLEY, 2003).

Η χαρουπιά καλλιεργείται ευρέως σε χώρες της Μεσογείου, όπως η Ελλάδα, η Κύπρος, η Ιταλία, η Ισπανία, η Πορτογαλία, η Μάλτα, το Μαρόκο, η Τουρκία και η Συρία και αποτελεί σημαντικό στοιχείο της μεσογειακής χλωρίδας για οικονομικούς και περιβαλλοντικούς λόγους (Durazzo, et al., 2014). Οι αρχαίοι Έλληνες το έφεραν από την Μέση Ανατολή στην Ελλάδα και την Ιταλία, ενώ οι Άραβες το διέδωσαν κατά μήκος των ακτών της Βόρειας Αφρικής και βόρεια στην Ισπανία και την Πορτογαλία. Επίσης, το χαρούπι έχει εξαπλωθεί και σε άλλες χώρες όπως η Καλιφόρνια, η Αριζόνα, το Μεξικό, η Χιλή, η Αργεντινή, τμήματα της Αυστραλίας, της Νότιας Αφρικής και της Ινδίας (I. Batlle & J. Tous, 1997), (Ioannis J. Stavrou, Atalanti Christou, & Constantina P. Kapnissi-Christodoulou, 2018).

Σύμφωνα με τον Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας των Ηνωμένων Εθνών (Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO) το 2012 η συνολική παγκόσμια παραγωγή χαρουπιού ήταν 163.000 τόνοι με 81.832 εκταρίων καλλιέργειας (Syed M. Nasar-Abbas, 2015). Οι χώρες με την μεγαλύτερη παραγωγή χαρουπιού παγκοσμίως, σε τόνους, για το έτος 2016, ήταν η Πορτογαλία με 40.385, η Ιταλία με 28.925, η Ισπανία με 26.185, το Μαρόκο με 22.032, η Τουρκία με 13.405, η Ελλάδα με

12.150, η Κύπρος με 8.280 και η Αλγερία με 3.257 (Krokou, Stylianos, & Agariou, 2019).

Το γένος *Ceratonia* είναι από τα αρχαιότερα γένη χαρουπιού και από τα πιο απομονωμένα από τα υπόλοιπα γένη της οικογένειας (I. Batlle & J. Tous, 1997). Τα πρώτα αναγνωρισμένα ευρήματα, τα οποία τεκμηριώθηκαν από τις αρχαιολογικές ανασκαφές, είναι ο άνθρακας από ξύλο χαρουπιού, ο οποίος ανακαλύφθηκε στο *Jericho* του Ισραήλ και χρονολογείται περί το 8000-6000 π.Χ. Επιπλέον, σπόροι χαρουπιού βρέθηκαν στο όρος Κάρμελ του Ισραήλ και χρονολογούνται περί το 6000-4000 π.Χ., κατά την πρώιμη εποχή του Χαλκού. Ακόμα δυο αποξηραμένα θραύσματα λοβών βρέθηκαν σε μια σπηλιά στη βόρεια έρημο της Ιουδαίας με ημερομηνία 4000 π.Χ από την αποικιακή περίοδο του Χαλ (RAMÓN-LACA & MABBERLEY, 2003). Σύμφωνα με τις αρχαιολογικές αναφορές, το δέντρο της χαρουπιιάς καλλιεργήθηκε από τους ρωμαϊκούς χρόνους στην Καμπανία της Ιταλίας, επειδή περίπου 50 σπασμένα κομμάτια καλά διατηρημένων λοβών χαρουπιού βρέθηκαν στο *Herculaneum*, κοντά στο Βεζούβιο, το οποίο εξερράγη το 79 μ.Χ.. Ίχνη χαρουπιού έχουν βρεθεί επίσης και σε σπήλαιο σε λίμνη στην έρημο *Judaeana*, στο Ισραήλ, σε ευρήματα της ρωμαϊκής περιόδου, όπως και στην Αντονα σε ευρήματα της πρώιμης αραβικής περιόδου (RAMÓN-LACA & MABBERLEY, 2003). Υπάρχουν αναφορές πως τα παλαιότερα χρόνια, και συγκεκριμένα στις δύσκολες εποχές του πρώτου παγκοσμίου πολέμου, τα ιπικά των Βρετανών στρατηγών Ουέλλινγκτον στην Ισπανία και του Άλενμπι στην Παλαιστίνη κατανάλωναν βρώσιμους λοβούς χαρουπιού. Από τότε χρησιμοποιούσαν το χαρούπι ως καραμέλα λόγω της γλυκιάς του γεύσης για τα παιδιά (Calixto & Cañellas, 1982), (Haber, 2002).

Ένα δεύτερο είδος του γένους *Ceratonia* είναι το “*oreothauma*”. Αυτό το είδος ταξινομείται περαιτέρω σε δύο υποείδη: α) το εγχώριο της Αραβίας και β) το “*somalensis*”, που εντοπίζεται στα βόρεια της Σομαλίας. Ειδικότερα, η *Ceratonia oreothauma* μπορεί να διακριθεί από την *Ceratonia siliqua* βάσει των μορφολογικών χαρακτηριστικών της. Συγκεκριμένα, διαθέτει ελαφρώς μικρότερους και τρίχρωμους κόκκους γύρης, σε αντίθεση με τους πιο συνηθισμένους τετράχρωμους κόκκους γύρης που απαντώνται στην *Ceratonia siliqua*. Το *Ceratonia oreothauma* χαρακτηρίζεται ως πρόγονος του είδους *Ceratonia siliqua*, γεγονός που υποδηλώνει μια κοινή εξελικτική ιστορία μεταξύ των δύο ειδών (I. Batlle & J. Tous, 1997).

### 1.1.2 Υφιστάμενη κατάσταση στην Κύπρο

Στην Κύπρο η χαρουπιιά καλλιεργείται από πολύ παλιά και αποτελούσε μία από τις κύριες πηγές εισοδήματος των κατοίκων καθώς κατατασσόταν ως ένα από τα πιο σημαντικά εξαγωγικά προϊόντα, το οποίο, λόγω της συμβολής του στην εισαγωγή συναλλάγματος, ονομαζόταν «μαύρος χρυσός» της Κύπρου. Ωστόσο, λόγω των χαμηλών διεθνών τιμών των χαρουπιών που επικράτησαν κατά τη δεκαετία του 1960 και αργότερα, της ραγδαίας οικιστικής ανάπτυξης στις παράλιες περιοχές, της σταθερής αύξησης του κόστους των εργατικών, της υψηλής ζήτησης και κατά συνέπεια χρήσης τους ως ξυλοκάρβουνων και καυσόξυλων καθώς και άλλων παραγόντων, η χαρουπιιά παραμελήθηκε και συρρικνώθηκε σε έκταση (Κώστα, 2016).



### 1.1.3 Βοτανική περιγραφή

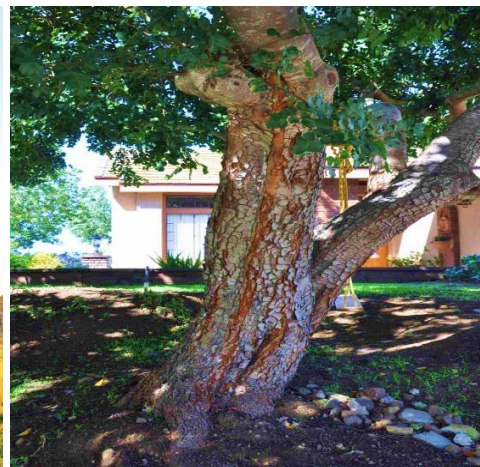
Η χαρουπιά αποτελεί αιθαλές δέντρο, που διατηρεί τα πράσινα φύλλα του καθ' όλη τη διάρκεια του έτους. Αυτό το χαρακτηριστικό επιτρέπει στα αιθαλή δέντρα να διατηρούν τη φωτοσυνθετική τους δραστηριότητα και να συνεχίζουν να παράγουν τροφή (σάκχαρα) ακόμη και σε περιόδους που άλλα δέντρα χάνουν τα φύλλα τους (I. Batlle & J. Tous, 1997). Σε αντίθεση με τη συνηθισμένη φθινοπωρινή πτώση των φύλλων, η χαρουπιά ρίχνει τα φύλλα της αποκλειστικά κατά τη διάρκεια του Ιουλίου αλλά σε διετή βάση και ανανεώνει μερικώς μόνο το φύλλωμά της την άνοιξη (Απρίλιο και Μάιο) (Kaïs Rtibi, και συν., 2017).

Η χαρουπιά είναι δίοικο φυτό, δηλαδή άλλα δέντρα είναι αρσενικά και άλλα θηλυκά. Για να επιτευχθεί ικανοποιητική επικονίαση και γονιμοποίηση, είναι απαραίτητο να επιδεικνύεται προσοχή κατά την εγκατάσταση μιας φυτείας και να εξασφαλίζεται η παρουσία αρσενικών ή ερμαφρόδιτων δέντρων (επικονιαστές). Η αναλογία αρσενικών ή ερμαφρόδιτων δέντρων σε σχέση με τα θηλυκά συστήνεται να είναι ένα αρσενικό για κάθε 8 - 10 θηλυκά δέντρα. Επίσης, τα θηλυκά δέντρα είναι γνωστό ότι περιέχουν μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ζάχαρη σε σύγκριση με τα αρσενικά, ενώ τα αρσενικά δέντρα δεν αποδίδουν καθόλου καρπούς (ubaid, Hussein, & Hameed, 2016), (Κώστα, 2016).

Το ύψος της χαρουπιάς ανέρχεται μεταξύ 8-17 μέτρων και μερικές φορές τα ώριμα δέντρα μπορούν να ξεπεράσουν τα 20 μέτρα (Giochari, et al., 2022). Ο κορμός του είναι παχύς με τραχύ καφέ φλοιό και έχει ανθεκτικά κλαδιά. Το ξύλο του αποτελεί πολύ καλό καύσιμο, διότι κατά την καύση καίγεται αργά και παράγει πολύ καλό κάρβουνο (GÜBBÜK, GÜNEŞ, & R., 2013).



Εικόνα 1. Η χαρουπιά σε ένα νησί της Μαγιόρκα



Εικόνα 2. Κορμός χαρουπιάς

Τα φύλλα είναι σύνθετα, κατ' εναλλαγή, μήκους 3 -10 εκατοστών. Έχουν χρώμα χαλκοκόκκινο στη νεαρή ηλικία και βαθυπράσινο όταν ωριμάσουν. Είναι λεία και δερματώδη και καλύπτονται από μία παχιά κηρώδη επίστρωση πλούσια σε φαινολικές ενώσεις και η οποία αποτρέπει την υπερβολική απώλεια υγρασίας σε ημίξηρα κλίματα (Κώστα, 2016), (I. Batlle & J. Tous, 1997).

Τα άνθη είναι μικρά (μήκους 6-12 χιλιοστών), πολυάριθμα και τοποθετημένα σπειροειδώς σε βοτρυοειδείς ταξιανθίες, σε ξύλο ηλικίας 2-15 ετών. Έχουν χρώμα



πρασινοκόκκινο και δυσάρεστη οσμή (κυρίως τα αρσενικά). Φέρουν μόνο χνουδωτά σέπαλα και διακρίνονται σε αρσενικά, θηλυκά και ερμαφρόδιτα. Τα θηλυκά φέρουν ένα βραχύστυλο ύπερο και τα αρσενικά πέντε στήμονες. Τα ερμαφρόδιτα άνθη (τα οποία σπανίζουν), περιέχουν τόσο βραχύστυλο ύπερο όσο και στήμονες, δηλαδή έχουν τα θηλυκά και τα αρσενικά όργανα στο ίδιο λουλούδι (Sanchez). Μόνο ένα μικρό ποσοστό από τα άνθη αποδίδει καρπούς και σπάνια δημιουργούνται δύο καρποί ανά άνθος (Κώστα, 2016). Η άνθιση αρχίζει από τα τέλη Αυγούστου και τελειώνει τον Νοέμβριο. Η επικονίαση επιτυγχάνεται με τις μέλισσες και τον άνεμο. Ανεπαρκείς συνθήκες επικονίασης οδηγούν σε σημαντική μείωση της ανθοφορίας και μειωμένη καρπόδεση. Επιπλέον, ο βαθμός της επικονίασης μπορεί επίσης να επηρεάσει το μέγεθος των καρπών. Όσο πιο αποτελεσματική είναι η επικονίαση τόσο μεγαλύτερο είναι το μέγεθος του καρπού, σε σχέση πάντοτε με τα χαρακτηριστικά της ποικιλίας.



Εικόνα 3. Χαρουπιά με αρσενικά άνθη



Εικόνα 4 Φύλλα από χαρουπόδεντρο

Ο καρπός του χαρουπιού (*Ceratonia siliqua*) είναι ένας λοβός ο οποίος όταν είναι άγουρος παραμένει πράσινος, δίνοντας την εντύπωση πράσινου φασολιού μέχρι να ωριμάσει πλήρως. Κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου, καθώς προχωρούν προς την πλήρη ωρίμανση, υφίσταται διάφορες αλλαγές για την προετοιμασία της συγκομιδής. Συγκεκριμένα, αποκτά σκούρο καφέ χρώμα, το οποίο αποτελεί σημαντικό οπτικό δείκτη της ετοιμότητας του για συγκομιδή και η εξωτερική υφή του γίνεται ξυλώδης, συρρικνωμένη και δερματώδη λόγω της χαμηλής περιεκτικότητας του σε υγρασία (Syed M. Nasar-Abbas, 2015). Η μείωση της περιεκτικότητας σε υγρασία κατά τη διαδικασία ωρίμανσης του καρπού χαρουπιού εξυπηρετεί πολλαπλούς κρίσιμους σκοπούς. Πρώτα απ' όλα, διευκολύνει την ωρίμανση των σπόρων μέσα στο λοβό του χαρουπιού, εξασφαλίζοντας ότι θα φτάσουν στο πλήρες μέγεθός τους, και τη βιωσιμότητά τους. Δεύτερον, με τη μείωση της υγρασίας, ο καρπός προστατεύει τους σπόρους από πιθανές επιβλαβείς επιπτώσεις που προκαλούνται από την ανάπτυξη μικροοργανισμών και μυκήτων. Τρίτον, η διαδικασία επιτρέπει την αποτελεσματική διασπορά των σπόρων, καθώς η ξήρανση και η συρρίκνωση του λοβού οδηγούν στην ενδεχόμενη διάσπαση του, απελευθερώνοντας ώριμους σπόρους έτοιμους να διασκορπιστούν με διάφορα μέσα, όπως ο άνεμος ή τα ζώα. Τέλος, η διαδικασία αυτή ενισχύει σημαντικά τη συνολική ελκυστικότητα, τη γεύση και τη γλυκύτητα του ώριμου καρπού, καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση σακχάρων και άλλων αρωματικών ενώσεων, καθιστώντας τον καρπό του χαρουπιού μια απόλαυση για κατανάλωση. Μετά τη συγκομιδή τα χαρούπια έχουν περιεκτικότητα σε υγρασία από 10-20% και θα

πρέπει να αποξηραθούν μέχρι η περιεκτικότητα σε υγρασία να κατέβει στο 8%, ώστε οι λοβοί να μην σαπίσουν και στην συνέχεια κτυπιούνται για να διαχωριστούν οι σπόροι από το τμήμα του πολτού (Agramanitaria, 2019; Giohari, et al., 2022).

Οι ώριμοι λοβοί χαρουπιού παρουσιάζουν σημαντικές διαφοροποιήσεις στα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους, όπως το σχήμα, το μέγεθος, οι διαστάσεις, το βάρος, η πυκνότητα και το χρώμα. Το σχήμα των λοβών μπορεί να είναι είτε ευθύγραμμο είτε καμπυλωτό (κυρτό), με τα ευθύγραμμα να θεωρούνται περισσότερο επιθυμητά λόγω της ευκολίας στη συγκομιδή. Τυπικά, οι ώριμοι λοβοί κυμαίνονται από 10 έως 30 cm σε μήκος, 1,5 έως 3,5 cm σε πλάτος και έχουν πάχος περίπου 1 cm , (Goulas, Stylos, Chatziathanasiadou, Mavromoustakos, & Tzakos, 2016), (Syed M. Nasar-Abbas, 2015), ενώ το βάρος του κυμαίνεται μεταξύ 5-30 γραμμαρίων με συνηθέστερο βάρος τα 12-15 γραμμάρια (Haber, 2002).

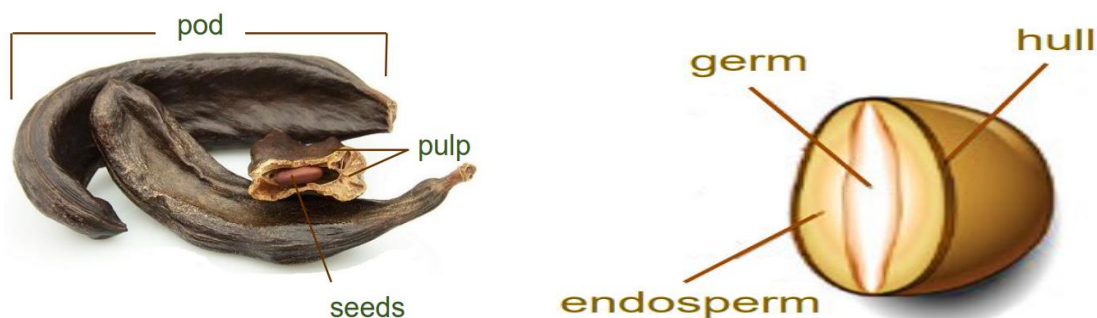


Εικόνα 6. Λοβοί πριν την ωρίμανση



Εικόνα 5. Ωριμοι λοβοί

Ο καρπός του χαρουπιού χωρίζεται σε δύο κύρια μέρη, τον πολτό, ο οποίος αποτελεί περίπου το 90% του καρπού και είναι πλούσιος σε σακχαρόζη, γλυκόζη, κυτταρίνη και τανίνες και τους σπόρους, οι οποίοι αποτελούν το υπόλοιπο 10%. Ο πολτός αποτελείται από ένα σκληρό εξωτερικό περίβλημα, το περικάρπιο και ένα μαλακό εσωτερικό περίβλημα, το μεσοκάρπιο το οποίο είναι σαρκώδες και πλούσιο σε σάκχαρα. Εντός του λοβού και σε εγκάρσια τοποθέτηση υπάρχουν 10-16 σπόρια τα οποία διαχωρίζονται από το μεσοκάρπιο. Έχουν καφέ χρώμα, με σκληρή υφή και ωοειδές σχήμα, με μήκος περίπου 10 mm και βάρος 0,2 g ανά σπόρο. Οι σπόροι αυτοί έχουν το χαρακτηριστικό ότι όλοι έχουν το ίδιο βάρος. (Giohari, et al., 2022). Επίσης, οι σπόροι αποτελούνται από τρία μέρη, τον εξωτερικό φλοιό (hull) με ποσοστό 30-35%, το ενδοσπέρμιο (endosperm) με 40-50% και το φυτό (germ) με 20-25% (Fidan, Stankov, & Petkova, 2020).



Εικόνα 5. Τα κύρια μέρη του λοβού και του σπόρου χαρουπιού

Η δημιουργία, η ανάπτυξη και η ωρίμανση του καρπού καλύπτουν σχεδόν ένα ολόκληρο έτος, από το φθινόπωρο όπου γίνεται η ανθοφορία μέχρι τα τέλη του καλοκαιριού της επόμενης χρονιάς που ωριμάζουν οι πρώτοι καρποί. Τα χαρούπια ωριμάζουν και είναι έτοιμα για συγκομιδή όταν ο φλοιός αποκτά το καστανό χαρακτηριστικό χρώμα. Ανάλογα την ποικιλία της χαρουπιάς, οι καρποί ωριμάζουν την περίοδο του φθινοπώρου από τα τέλη Αυγούστου μέχρι τα τέλη Οκτωβρίου. Η συγκομιδή των χαρουπιών γίνεται με το χέρι ή μηχανικά με ράβδισμα.

Η διαδικασία αυτή μπορεί να χωριστεί σε τρία διακριτά στάδια (Κώστα, 2016):

- Το αρχικό στάδιο αρχίζει στα τέλη του φθινοπώρου και ολοκληρώνεται μέχρι τον χειμώνα. Κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου, παρατηρείται πολύ αργή ανάπτυξη του καρπού.
- Το δεύτερο στάδιο εκτείνεται από την άνοιξη έως τις αρχές του καλοκαιριού και χαρακτηρίζεται από ταχεία ανάπτυξη των καρπών.
- Το τελικό στάδιο, που λαμβάνει χώρα τον Ιούλιο-Αύγουστο, είναι η φάση της ωρίμανσης που συνοδεύεται από πολύ αργή ανάπτυξη των καρπών.

Η περίοδος σύνθεσης των σακχάρων στον καρπό παρατηρείται από τα μέσα Ιουνίου μέχρι τα μέσα Ιουλίου. Επιπλέον τα χαρουπόδεντρα μπορούν να αρχίσουν να παράγουν λοβούς ήδη από την ηλικία των 6-7 ετών, η μέγιστη παραγωγή επιτυγχάνεται και σταθεροποιείται γύρω στα 20-25 έτη (Κώστα, 2016). Αυτό το χρονικό διάστημα επιτρέπει στο δέντρο να δημιουργήσει ένα ισχυρό ριζικό σύστημα και να αναπτύξει την απαραίτητη δομή για συνεπή και αποτελεσματική παραγωγή λοβών. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι ο συγκεκριμένος χρόνος για τη μέγιστη παραγωγή μπορεί να επηρεαστεί από διάφορους παράγοντες, όπως οι συνθήκες καλλιέργειας, το κλίμα, η ποιότητα του εδάφους και οι πρακτικές διαχείρισης του δέντρου. Ενώ τα 20-25 χρόνια είναι ένας γενικός οδηγός, ορισμένα χαρουπόδεντρα μπορεί να φτάσουν στο μέγιστο της παραγωγής λίγο νωρίτερα ή αργότερα, ανάλογα με τις τοπικές συνθήκες.

#### 1.1.4 Κλιματικές και εδαφικές απαιτήσεις της χαρουπιάς

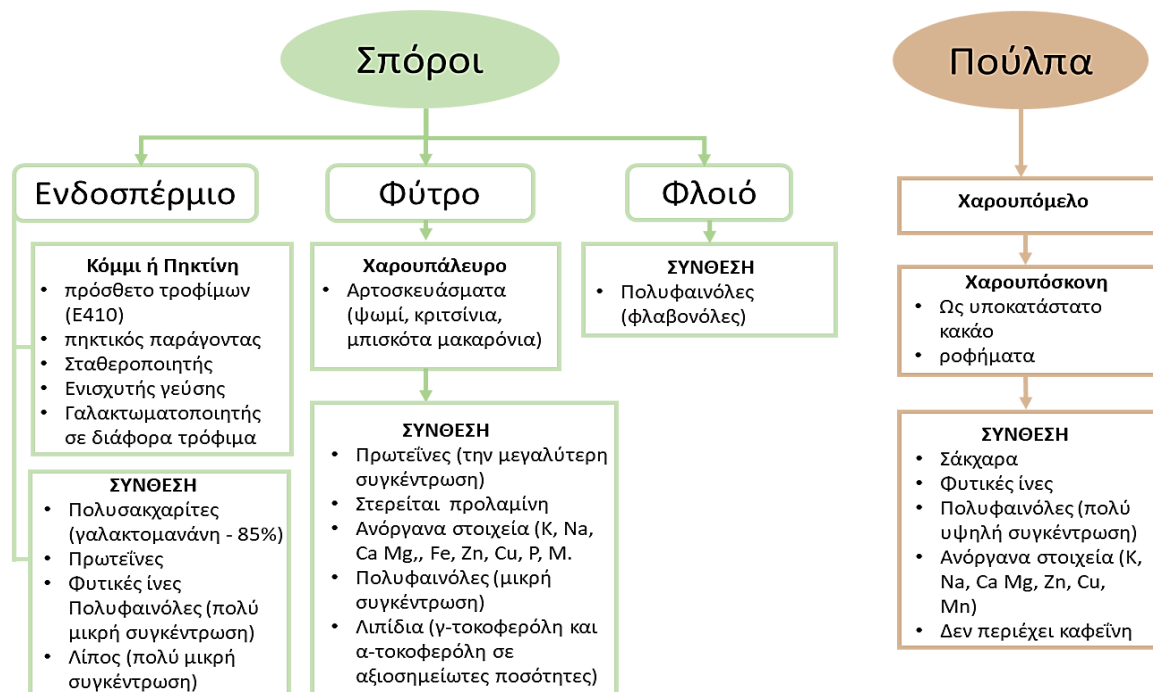
Η χαρουπιά είναι δέντρο θερμών και ξηρών περιοχών και μπορεί να ευδοκιμήσει και να αποδώσει ικανοποιητικά σε θερμές, υποτροπικές περιοχές. Η βλαστική ανάπτυξη της χαρουπιάς μειώνεται αισθητά όταν οι θερμοκρασίες είναι κάτω των 10°C ενώ, ως είδος, παρουσιάζει κάποια ευαισθησία στον παγετό, είναι ωστόσο λιγότερο ευαίσθητη από την ελιά. 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. Ωστόσο, λόγω της ιδιότητας της χαρουπιάς να παράγει πολλές παραφυάδες είναι δυνατό να γίνει αντικατάσταση των κατεστραμμένων βλαστών από αυτές. Αντίθετα, το φυτό είναι εξαιρετικά ανθεκτικό σε υψηλές θερμοκρασίες που ξεπερνούν τους 40°C χωρίς να υπόκειται οποιαδήποτε ζημιά. Γι' αυτό, κατάλληλες περιοχές για φύτευση με χαρουπιά θεωρούνται οι περιοχές με ήπιους χειμώνες, ήπια/ζεστή άνοιξη και θερμά/ξηρά καλοκαίρια, αποφεύγοντας κατά το δυνατό, περιοχές που πλήττονται από παγετούς ή περιοχές με υψόμετρο μεγαλύτερο των 600 μέτρων. Επίσης, θα πρέπει να αποφεύγονται περιοχές που πλήττονται από ανέμους καθώς τα νεαρά δέντρα είναι επιρρεπή στους ισχυρούς

ανέμους. 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 καρπώδεση καθώς η βροχή παρεμποδίζει τη μεταφορά γύρης και, κατ' επέκταση, τη μη ικανοποιητική επικονίαση. Επιπρόσθετα, υψηλά ποσοστά υγρασίας κατά την περίοδο της άνοιξης δυνατό να αυξήσουν την πιθανότητα προσβολής από ωίδιο (μύκητας γένους *Oidium*) τόσο στα φύλλα όσο και στους καρπούς (Κώστα, 2016).

Η χαρουπιά είναι δέντρο με περιορισμένες εδαφικές απαιτήσεις. Ευδοκίμει σε διάφορα είδη εδαφών, εκτός από πολύ αργιλώδη και υγρά εδάφη, ευδοκίμει ακόμα και σε βραχώδη, ξηρά και επικλινή εδάφη με την προϋπόθεση ότι είναι βαθιά και ελαφριά ούτως ώστε να διαπερνώνται από το ριζικό σύστημα της χαρουπιάς. Ως καταλληλότερα εδάφη θεωρούνται τα αμμοπηλώδη εδάφη με καλή αποστράγγιση (Κώστα, 2016). Επίσης, είναι ανθεκτική στα άλατα έως 3% NaCl στο έδαφος, αλλά είναι ευαίσθητη στα βαριά εδάφη τα οποία δεν έχουν καλό αερισμό (Agriamanitaria, 2019).

### 1.1.5 Λειτουργικά χημικά συστατικά των καρπών χαρουπιού

Το χαρούπι συνιστά ένα περίπλοκο μείγμα πρωτογενών και δευτερογενών μεταβολιτών, με την παρουσία των σακχάρων, των διαιτητικών ινών και των πολυφαινόλων να καθορίζουν σε μεγάλο βαθμό τη σύσταση του. Αποτελεί μια σημαντική πρωτεϊνική πηγή και δεν περιέχει σχεδόν καθόλου λίπος. Περιέχει μια σειρά βιταμινών και ιχνοστοιχείων, όπως είναι η βιταμίνη Α, οι βιταμίνες του συμπλέγματος Β, το κάλιο, ο φώσφορος, το ασβέστιο, το μαγνήσιο, ο σίδηρος, ο ψευδάργυρος, το μαγγάνιο καθώς και ο χαλκός (Goulas, Stylos, Chatziathanasiadou, Mavromoustakos, & Tzakos, 2016). Ειδικότερα, όπως προαναφέρθηκε, ο καρπός του χαρουπιού αποτελείται από περίπου 90% πούλπα του λοβού, πλούσια σε σακχαρόζη, γλυκόζη, κυτταρίνη, και τανίνες, και 10% από σπόρους (Rizzo, Tomaselli, Gentile, Malfa, & Maccarone, 2004).





## Χημική σύσταση της πούλπας λοβού χαρουπιάς

Οι λοβοί χαρουπιού έχουν πολύπλοκη χημική σύνθεση και το θρεπτικό τους περιεχόμενο μπορεί να διαφέρει ανάλογα με παράγοντες όπως η ποικιλία, η ωριμότητα, οι συνθήκες καλλιέργειας και οι μέθοδοι επεξεργασίας. Συγκεκριμένα, η πούλπα λοβού, περιέχει υψηλές συγκεντρώσεις υδατανθράκων 90-91%, με κύριους αντιπροσώπους τη σακχαρόζη 34-46%, τη γλυκόζη 2-5% και τη φρουκτόζη 2-5%, αλλά χαμηλές συγκεντρώσεις πρωτεϊνών 3-4% και λιπιδίων 0,5-0,9 % (Petkova, Ivanov, Petrova, & Mihov, 2017). Περιέχει επίσης διαιτητικές ίνες 30-36%, πολυφαινολικές ενώσεις και κυρίως τανίνες (16- 20%), οι οποίες συμβάλλουν στις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες, τέφρα 2-3% και σημαντικές ποσότητες ανόργανων συστατικών, όπως κάλιο, ασβέστιο, φώσφορο, μαγνήσιο, και σίδηρο (Kais Rtibi, Slimen Selmi, Dhekra Grami, & Amri Mohamed, 2017). Οι πρωτεΐνες έχουν χαμηλή πεπτικότητα επειδή δεσμεύονται από τις τανίνες και τις φυτικές ίνες (I. Batlle & J. Tous, 1997). Οι λοβοί χαρουπιού περιέχουν αμινοξέα, τα οποία είναι τα δομικά στοιχεία των πρωτεϊνών. Αν και η περιεκτικότητα σε αμινοξέα στους λοβούς χαρουπιού δεν είναι τόσο σημαντική, συμβάλλουν στο συνολικό διατροφικό προφίλ των λοβών χαρουπιού. Το ασπαρτικό οξύ, η ασπαραγίνη, η αλανίνη, το γλουταμικό οξύ, η λευκίνη και η βαλίνη αποτελούν το 57% της συνολικής περιεκτικότητας των λοβών σε αμινοξέα (Ayaz, et al., 2009).

## Χημική σύσταση των φύλλων της χαρουπιάς

Τα φύλλα χαρουπιάς, κατέχουν μια πιο πλούσια δεξαμενή πολυφαινολικών ενώσεων, σε σύγκριση με τον πολτό. Συγκεκριμένα περιλαμβάνει ολικές φαινόλες, συμπυκνωμένες τανίνες και φλαβονοειδή. Αυτό υποδηλώνει ότι τα φύλλα θα μπορούσαν να θεωρηθούν ως πιο δυναμική πηγή φαινολικών ενώσεων σε σχέση με τον πολτό (Ioannis J. Stavrou, Atalanti Christou, & Constantina P. Kapnissi-Christodoulou, 2018). Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης, γνωστή ως ανάλυση HPLC, βρίσκει συχνή εφαρμογή στη διαλεύκανση της σύνθεσης των φύλλων. Μέσω της χρήσης αυτής της μεθόδου, έχει διαπιστωθεί ότι οι κύριες φαινολικές ενώσεις που υπάρχουν στα φύλλα είναι, η καμπφερόλη (77 %), το ταννικό οξύ (13 %), η ένυδρη κατεχίνη (4,3%) και η πολυδατίνη (0,85%) (Rtibi, et al., 2017). Ονομαστικά αξίζει να αναφερθούν μερικές ακόμη φαινολικές ενώσεις που έχουν, μέχρι στιγμής, ανιχνευθεί στα φύλλα χαρουπιού και οι οποίες είναι, το γαλλικό οξύ, το π-υδροξυβενζοϊκό οξύ, το χλωρογενικό οξύ, το κουμαρικό οξύ, το φερουλικό οξύ, το συριγγικό οξύ, το γεντισικό οξύ, η (+)-κατεχίνη, η (-)-επικατεχίνη, η (-)-επιγαλλοκατεχινολικό, η μυρικετίνη, η ρουτίνη, η κερκετίνη, η καεμφερόλη, η απιγενίνη, η ισοκερσετίνη, η γλυκοσίδη μυρικετίνης, η ραμνοσίδη μυρικετίνης. Πρόσθετες έρευνες αποκαλύπτουν ότι τα αρσενικά και ερμαφρόδιτα φύλλα δέντρων παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα φλαβονοειδών σε σύγκριση με τα θηλυκά φύλλα δέντρων. (Ioannis J. Stavrou, Atalanti Christou, & Constantina P. Kapnissi-Christodoulou, 2018). Τέλος, μια άλλη αξιοσημείωτη διάκριση μεταξύ των φύλλων χαρουπιού και των λοβών έγκειται στο γεγονός ότι τα πρώτα διακρίνονται από την υψηλότερη περιεκτικότητά τους σε ίνες. (Rtibi, Sebai, Selmi, & Mohamed, 2016).

## Χημική σύσταση των σπόρων της χαρουπιάς

Οι σπόροι χαρουπιού αντιπροσωπεύουν το 10% των καρπών χαρουπιού. Λόγω της ιδιαίτερα διαφορετικής σύνθεσης σακχάρων σε σύγκριση με τον πολτό χαρουπιού, οι σπόροι βρίσκουν περιορισμένη χρήση στη βιομηχανία τροφίμων. Συγκεκριμένα μελέτες φανερώνουν χαμηλότερη περιεκτικότητα σε σάκχαρα και περισσότερο λίπος στους σπόρους σε σύγκριση με τον πολτό. Το κυρίαρχο μακροθρεπτικό συστατικό που υπάρχει στους σπόρους είναι η πρωτεΐνη, η οποία ανέρχεται σε 18,6%, ενώ τα σάκχαρα και το λίπος απαντώνται σε συγκεντρώσεις 5,2% και 2% αντίστοιχα. Το μεγαλύτερο ποσοστό της πρωτεΐνης βρίσκεται στο φύτρο, ενώ το ενδοσπέρμιο είναι πλούσιο σε γαλακτομαννάνη. Όσον αφορά την σύνθεση των πρωτεϊνών, στους σπόρους χαρουπιού έχουν κλασματοποιηθεί η αλβουμίνη, η σφαιρίνη, η γλιαδίνη, και η διαλυτή και αδιάλυτη γλουτενίνη. Έχουν επίσης εντοπιστεί διάφορα αμινοξέα, όπως η αργινίνη (27,8 g / 100g), η αλανίνη (17 g / 100g) και τα απαραίτητα αμινοξέα λυσίνη (15,0 g / 100g), ισολευκίνη (8,6 g / 100g) και η βαλίνη (7,3 g / 100g). Επιπλέον, διάφορα λιπαρά οξέα έχουν ανιχνευτεί στο λιπιδικό κλάσμα των σπόρων χαρουπιού, συμπεριλαμβανομένου του ελαϊκού (45%), του λινελαϊκού (32,4%), του παλμιτικού (16,6%) και του στεατικού (4,7%) οξέος, ενώ η αναλογία κορεσμένων προς ακόρεστα λιπαρά οξέα είναι περίπου 22:78. Στο λιπιδικό κλάσμα, η γ-τοκοφερόλη και η α-τοκοφερόλη βρίσκονται σε αξιοσημείωτες ποσότητες με ποσοστά 53,1% και 43,1%, αντίστοιχα. (Giochari, και συν., 2022). Έτσι θα μπορούσαμε να πούμε ανεπιφύλακτα ότι οι σπόροι χαρουπιού αποτελούν πηγή βιταμινών E (Ayache, et al., 2021). Σχετικά με τις φαινολικές ενώσεις, η πιο δημοφιλής άποψη, κατατάσσει τους σπόρους φτωχότερους σε σύγκριση με το πολτό και τα φύλλα (Ioannis J. Stavrou, Atalanti Christou, & Constantina P. Kapnissi-Christodoulou, 2018).

## Ενδοσπέρμιο

Το ενδοσπέρμιο των σπόρων χαρουπιού λαμβάνεται μέσω μιας διαδικασίας που περιλαμβάνει την αποφλοιώση του εξωτερικού περιβλήματος του σπόρου για να αποκαλυφθεί το ενδοσπέρμιο. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με αραιό θειικό οξύ ή με θερμική μηχανική επεξεργασία. Αφού αποφλοιωθούν οι σπόροι, υποβάλλονται σε μηχανική άλεση ώστε να διασπαστεί η δομή των σπόρων και να προετοιμαστούν για περαιτέρω διαχωρισμό. Μετά την άλεση, το φύτρο (έμβρυο) του σπόρου μπορεί να διαχωριστεί από το αλεσμένο υλικό. Με το διαχωρισμό του φύτρου, το υπόλοιπο υλικό, περιλαμβάνει το ενδοσπέρμιο (Kawamura, 2008).

Οι πολυσακχαρίτες συγκεντρώνονται στο ενδοσπέρμιο, λειτουργώντας ως ζωτικής σημασίας θρεπτική πηγή για τη βλάστηση των σπόρων. Αυτοί οι πολυσακχαρίτες υφίστανται υδρόλυση μέσω του ενζύμου α-D-γαλακτοσιδάση, δίνοντας προϊόντα D-γαλακτόζης και ένα μίγμα ποικίλου μοριακού μεγέθους ολιγοσακχαριτών (Smith, 1948). Το ενδοσπέρμιο περιέχει κατά κύριο λόγο γαλακτομαννάνη, σε συγκέντρωση που μπορεί να φτάσει έως το 85% του σπόρου του χαρουπιού. Αποτελούνται από μια γραμμική αλυσίδα συνδεδεμένων, με 1→4 δεσμούς, β-D-μαννοπυρανοζυλικών μονάδων, με α-D-γαλακτοπυρανοζυλικά μόρια, συνδεδεμένων με 1→6 δεσμούς ως πλευρικές αλυσίδες (Rizzo, Tomaselli, Gentile, Malfa, & Maccarone, 2004). Η αναλογία των σακχάρων γαλακτόζης προς μαννόζης υπολογίζεται μεταξύ 1:3.1 – 1:3,9, με την γαλακτόζη να εμφανίζεται σε κάθε τέταρτο περίπου μόριο της μαννόζης στην

αλυσίδα (Karababa & Coşkuner, 2013). Επιπλέον, η περιεκτικότητα της μαννόζης κυμαίνεται από 77% έως 78%, ενώ η γαλακτόζη περιλαμβάνει περίπου 21% έως 23% (Goulas, Stylos, Chatziathanasiadou, Mavromoustakos, & Tzakos, 2016). Ο πολυσακχαρίτης αυτός του κόμμος χαρουπιού, είναι γνωστός για τις πηκτικές του ικανότητες και τις συνεργιστικές του δυνατότητες όταν συνδυάζεται με άλλους φορτισμένους πολυσακχαρίτες. Αυτή η συνεργιστική αλληλεπίδραση συμβάλλει στην ευελιξία και τη χρησιμότητα της γαλακτομαννάνης σε διάφορες εφαρμογές.

Πίνακας 1. Λειτουργικές ιδιότητες της γαλακτομαννάνης και οι εφαρμογές της (I. Batlle & J. Tous, 1997)

Λειτουργικές ιδιότητες	Εφαρμογές
Πρόσφυση	Χυμοί
Αναστολέας κρυστάλλωσης	Παγωτό, κατεψυγμένα τρόφιμα, ψωμί
Παράγοντας θόλωσης	Δημητριακά, ψωμί
Σταθεροποιητής αφρού	Παγωτό
Πηκτωματοποιητής	Πουτίγκα, γλυκά, είδη ζαχαροπλαστικής
Παράγοντας αποστείρωσης	Σάλτσες για σαλάτες, παγωτά
Διογκωτικός παράγοντας	Μεταποιημένα προϊόντα κρέατος
Συνεργιστική δράση	Μαλακά τυριά, κατεψυγμένα τρόφιμα
Πυκνωτικό μέσο	Μαρμελάδες, σάλτσες, παιδικές τροφές

Ο όρος "κόμμι χαρουπιού" ή πηκτίνη, που προέρχεται από το ενδοσπέρμιο του σπόρου, είναι ένα διαδεδομένο πρόσθετο τροφίμων (με την ένδειξη E410). Η ουσία αυτή εξυπηρετεί έναν πολύπλευρο ρόλο, λειτουργώντας ως πηκτικός παράγοντας, σταθεροποιητής, ενισχυτής γεύσης και γαλακτωματοποιητής σε διάφορα τρόφιμα. Εκτός από τις γαλακτομαννάνες, η εμπορικά διαθέσιμη σκόνη κόμμος χαρουπιού περιέχει 5% πρωτεΐνη, 0,5% λίπος, 1,0% ακατέργαστες φυτικές ίνες και ίχνη γλυκόζης, ραμνόζης, αραβινόζης και ξυλόζης (Giochari, και συν., 2022). Οι (Paragiannopoulos, Wollseifen, Mellenthin, Haber, & Galensa, 2004) στην μελέτη τους, εντόπισαν και ποσοτικοποίησαν τις φαινολικές ενώσεις που εμπεριέχονται στο κόμμι χαρουπιού. Σε αυτή την μελέτη, η κερκετίνη-δεσοξυεξοζίδιο (44,7 mg/kg), η (+)-κατεχίνη (23,8 mg/kg), η καμφερόλη-δεσοξυεξοζίδιο (1,2 mg/kg) ήταν οι μόνες φαινολικές ενώσεις που ανιχνεύθηκαν. Επίσης παρουσιάζει ενδιαφέρον το γεγονός ότι δεν ανιχνεύθηκε γαλλικό οξύ στο κόμμι χαρουπιού (Ioannis J. Stavrou, Atalanti Christou, & Constantina P. Kapnissi-Christodoulou, 2018).

## Φύτρο

Το φύτρο αντιπροσωπεύει περίπου το 20 έως 25% του συνολικού βάρους του σπόρου. Περιλαμβάνει κυρίως πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, λιπίδια, υγρασία, τέφρα και πολυφαινόλες, η περιεκτικότητα των οποίων εξαρτάτε από την προέλευση τους. Η μέση σύνθεση των φύτρων της χαρουπιάς με προέλευση το Μαρόκκο περιγράφεται αναλυτικά στον πίνακα 1 (Re-Jiménez & Amadó, 1989) . Το φύτρο ξεχωρίζει ως μια σημαντική δεξαμενή πρωτεϊνών με δυνατότητα αξιοποίησης ως λειτουργική πηγή πρωτεϊνών. Μέσα στο φύτρο, οι πρωτεΐνες σχηματίζουν συσσωματώματα με μοριακό βάρος που κυμαίνεται από 13 kDa έως 95 kDa. Αυτές οι πρωτεΐνες διαθέτουν μια καλά ολοκληρωμένη σύνθεση αμινοξέων, λόγω της συμπερίληψης και των εννέα

απαραίτητων αμινοξέων ( βαλίνη, ισολευκίνη, λευκίνη, ιστιδίνη, λυσίνη, μεθειονίνη, φαινυλαλανίνη, θρεονίνη και τρυπτοφάνη) (Bengoechea, et al., 2008).

Πίνακας 2. Μέση σύνθεση των φύτρων της χαρουπιάς με προέλευση το Μαρόκκο (Re-Jiménez & Amadó, 1989)

Σύνθεση	% περιεκτικότητα
Υγρασία	6,83
Λιπίδια	7,98
Τέφρα	5,78
Ακατέργαστη πρωτεΐνη	52,49
Υδατάνθρακες	26,42
Πολυφαινόλες	0,5

Η διατροφική αξία του φύτρου χαρουπιού είναι ιδιαίτερα αυξημένη λόγω της περιεκτικότητάς του σε πρωτεΐνες, που ξεπερνούν το 50%. Το αλεύρι των φύτρων λαμβάνεται ως υποπροϊόν της επεξεργασίας των σπόρων και στο οποίο διακρίνονται σημαντικά πρωτεϊνικά κλάσματα όπως η αλβουμίνη, οι σφαιρίνες και οι γλουτελίνες. Είναι αξιοσημείωτο να τονιστεί ότι το χαρουπάλευρο στερείται πρωτεϊνών προλαμίνης, που συνήθως υπάρχουν σε δημητριακά όπως το σιτάρι, το κριθάρι και η σίκαλη, γνωστές για τη συμβολή τους στο σχηματισμό γλουτένης. Η απουσία αυτή καθιστά το αλεύρι φύτρου κατάλληλο για την παραγωγή προϊόντων χωρίς γλουτένη (Giochari, et al., 2022). Ακόμη, περιέχει μία πρωτεΐνη την καρουβίνη, η οποία είναι ένα μίγμα πολλών πρωτεϊνών που έχουν διαφορετικό μέγεθος και βαθμό πολυμερισμού. Αυτό το μίγμα πρωτεΐνης έχει αναφερθεί ότι κατέχει παρόμοιες ρεολογικές ιδιότητες ανάλογες της γλουτένης (Bengoechea, et al., 2008). Έτσι, μπορεί να χρησιμοποιηθεί αντί αυτής σε τρόφιμα που προορίζονται για ανθρώπους με δυσανεξία στη γλουτένη (Ioannis J. Stavrou, Atalanti Christou, & Constantina P. Karpnissi-Christodoulou, 2018). Η καρουβίνη, επίσης μπορεί να αντικαταστήσει τις πρωτεΐνες γάλακτος και σόγιας και είναι μια ουσία ιδανική για άτομα που αθλούνται, έχουν αυξημένη σωματική δραστηριότητα ή κόπωση ή αυξημένες διατροφικές ανάγκες.

Το έλαιο του φύτρου (περίπου 5- 8%) περιέχει ακόρεστα λιπαρά οξέα, οπότε δεν γίνεται εύκολα η τάγγιση του, λόγω της παρουσίας φυσικών αντιοξειδωτικών (Maza, Zamora, Alaiz, Hidalgo, & Millán, 1989). Το περισσότερο από το 78% του συνόλου των λιπαρών οξέων αποτελείται από το ελαϊκό, και λινελαϊκό οξύ. Η μελέτη των (Maza, Zamora, Alaiz, Hidalgo, & Millán, 1989) έδειξε ότι το 38,5% αποτελούνταν από το ελαϊκό οξύ ενώ το 43,6% από το λινελαϊκό οξύ. Επιπλέον, η υψηλή συγκέντρωση του αλεύρου από φύτρα σπόρων σε φωσφολιπίδια (11,8% v/v) θα μπορούσε να αυξήσει το αντιοξειδωτικό δυναμικό και κατά συνέπεια τη σταθερότητα και τη διάρκεια ζωής των προϊόντων αρτοποιίας με βάση το χαρούπι (Giochari, και συν., 2022).



Η χημική σύνθεση σε ανόργανα στοιχεία του φύτρου της χαρουπιάς περιέχει μαγνήσιο, κάλιο, νάτριο, ασβέστιο, σίδηρο, ψευδάργυρο, χαλκό, φώσφορο και μαγγάνιο (Petit & Pinilla, 1995)

Οι (Custódio L. , et al., 2011), ανέλυσαν εκχυλίσματα αλεύρου φύτρου χαρουπιού διαφορετικής προέλευσης και εντόπισαν έναν αριθμό πολυφαινολικών ενώσεων μέσω της χρήσης υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC). Παρατηρήθηκε ότι, όπως και στον πολτό χαρουπιού, η περιοχή, η ποικιλία και οι ειδικές γονοτυπικές παραλλαγές εντός ενός συγκεκριμένου φυτικού είδους άσκησαν σημαντική επίδραση στη διακριτή φαινολική σύνθεση. Τα δείγματα της ποικιλίας Galhosa παρουσίασαν την υψηλότερη συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων (ολική περιεκτικότητα σε φαινολικά, ολική περιεκτικότητα σε φλαβονοειδή και ολική περιεκτικότητα σε ταννίνες) σε σύγκριση με τις υπόλοιπες ποικιλίες. Ωστόσο, το πιο εντυπωσιακό αποτέλεσμα που προέκυψε από αυτή την έρευνα ήταν η διάχυτη παρουσία του γαλλικού οξέος σε όλα τα δείγματα, ενώ άλλες ενώσεις ανιχνεύθηκαν μόνο σε ορισμένες ποικιλίες. Ιδιαίτερα αξιοσημείωτη ήταν η ταυτοποίηση της (+)-κατεχίνης και του γεντισικού οξέος αποκλειστικά στην ποικιλία Galhosa, ενώ το χλωρογενικό οξύ, το φερουλικό οξύ και η βανιλίνη εντοπίστηκαν αποκλειστικά στην ποικιλία Mulata. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε ένα υποσύνολο δειγμάτων ανιχνεύθηκε ένα φάσμα πρόσθετων πολυφαινολών, το οποίο περιλάμβανε μυρικετίνη, γαλλικό μεθύλιο, κερκετίνη και συριγγικό οξύ (Ioannis J. Stavrou, Atalanti Christou, & Constantina P. Kapnissi-Christodoulou, 2018).

## Φλοιός

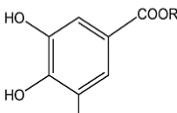
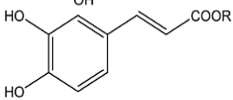
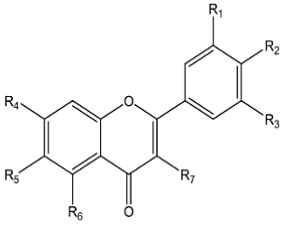
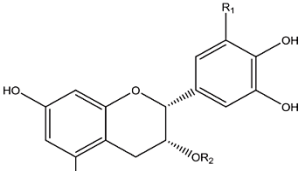
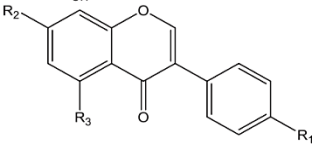
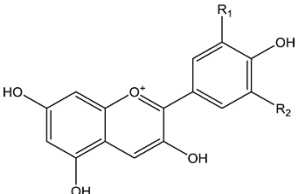
Οι πληροφορίες σχετικά με τη σύνθεση του περιβλήματος των σπόρων είναι προς το παρόν αρκετά περιορισμένες. Ωστόσο, μια πρόσφατη μελέτη που διεξήχθη από τον Lakka και τους συνεργάτες του έριξε φως σε αυτό το θέμα, αποκαλύπτοντας ότι το περίβλημα των σπόρων είναι άφθονο σε φαινολικές ενώσεις γνωστές για την ισχυρή αντιοξειδωτική τους δράση (Giohari, και συν., 2022). Επιπλέον, όπως επισημάνθηκε στην έρευνα που διεξήγαγαν ο D. Rico και η ομάδα του, τα ευρήματά τους έδειξαν ότι η κυρίαρχη φαινολική ομάδα που εντοπίστηκε εντός του περιβλήματος των σπόρων αποτελείται από φλαβονόλες, που αποτελούν περίπου το 77%, με την κερκετίνη να αποτελεί ένα αξιοσημείωτο παράδειγμα (Ayache, και συν., 2021).

## Φαινολικές ενώσεις

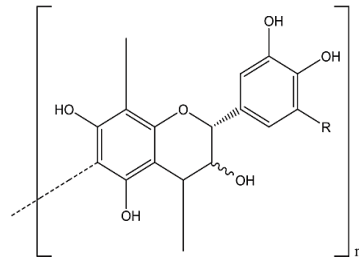
Οι φαινολικές ενώσεις είναι δευτερογενείς μεταβολίτες φυτών που εμπλέκονται στην άμυνα έναντι της υπερϊώδους ακτινοβολίας ή τη μόλυνση από παθογόνους μικροοργανισμούς και κατά συνέπεια καθορίζουν την ποιότητα των φρούτων, των λαχανικών και άλλων φυτών (Ignat, Volf, & Popa, 2011), (Ioannis J. Stavrou, Atalanti Christou, & Constantina P. Kapnissi-Christodoulou, 2018). Αποτελούνται από ένα αρωματικό δακτύλιο με μία ή περισσότερες ομάδες υδροξυλίου και δρουν ως δότες υδρογόνου απενεργοποιώντας τις ελεύθερες λιπιδικές ρίζες, με συνέπεια να δεσμεύουν το μοριακό οξυγόνο, τα μέταλλα, καθώς και τις πολύ επικίνδυνες ελεύθερες ρίζες. Ορισμένες φαινολικές ενώσεις είναι απλά μόρια με χαμηλό μοριακό βάρος, ενώ κάποιες άλλες είναι πολυμερή (Kim, Quon, & Kim, 2014), (Ioannis J. Stavrou, Atalanti Christou, & Constantina P. Kapnissi-Christodoulou, 2018). Αυτές οι ενώσεις μπορούν να ταξινομηθούν σε διαφορετικές ομάδες ανάλογα με τον αριθμό των φαινολικών δακτυλίων που περιέχουν και τα δομικά στοιχεία που συνδέουν τους δακτυλίους. Έτσι

ταξινομούνται κυρίως σε φλαβονοειδή, φαινολικά οξέα, τανίνες, στυλβένια και λιγνάνες. Οι τανίνες είναι σύνθετες πολυφαινολικές ενώσεις και μπορούν να ταξινομηθούν σε 2 ομάδες, τις υδρόλυσιμες και τις συμπυκνωμένες τανίνες (Syed M. Nasar-Abbas, 2015). Οι φαινολικές ενώσεις εκχυλίζονται από φρέσκα, κατεψυγμένα ή αποξηραμένα δείγματα φυτών εφαρμόζοντας πρώτα μια προεπεξεργασία η οποία περιλαμβάνει την ξήρανση των δειγμάτων χαρουπιού, την αφαίρεση των σπόρων, την άλεση σε μύλο και την αποθήκευση σε δροσερό μέρος μέχρι την εκχύλιση. Η ξήρανση μπορεί να πραγματοποιηθεί με τη χρήση αέρα ή λυοφιλοποιητή. Η δεύτερη τεχνική φαίνεται να προτιμάται, καθώς διατηρεί υψηλότερη περιεκτικότητα σε φαινόλες στα δείγματα από την ξήρανση με αέρα (Ioannis J. Stavrou, Atalanti Christou, & Constantina P. Kapnissi-Christodoulou, 2018).

Πίνακας 3. Δομές των κύριων κατηγοριών πολυφαινολών (Ioannis J. Stavrou, Atalanti Christou, & Constantina P. Kapnissi-Christodoulou, 2018)

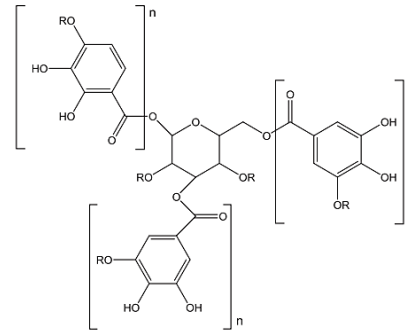
Class	Structure	Representatives
Phenolic acids: Hydroxybenzoic acids and derivatives		Galic acid Gentisic acid Ellagic acid Protocatechuic acid Syringic acid
Hydroxycinnamic acids and derivatives		Caffeic acid Chlorogenic acid Ferulic acid Sinapic acid
Flavonoids: Flavonols Flavones Flavanones		Quercetin Apigenin Naringenin Kaempferol Myricetin Luteolin Chrysoeriol
Catechins		(+)-Catechin (-)-Epicatechin (-)-Epigallocatechin (-)-Epigallocatechin gallate (-)-Epicatechin gallate
Isoflavones		Genistein Daidzein
Anthocyanidins		Delphinidin Pelargonidin

Tannins:  
Condensed tannins- procyanidins



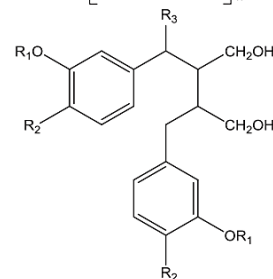
Procyanidin B1  
Procyanidin B4

Hydrolyzable tannins:  
Gallotannins  
Ellagitannins



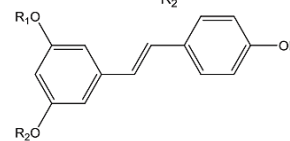
Theogallin  
Punicalagin

Lignans



Pinoresinol  
Isolaricresinol  
Laricresinol  
Secoisolaricresinol

Stilbenes



Piceatannol  
Pterostilbene  
Resveratrol

Οι πολυφαινόλες του χαρουπιού εντοπίζονται κυρίως στην πούλπα, καθώς αυτήν αντιπροσωπεύει το 90% του καρπού του χαρουπιού. Οι πολυφαινόλες μπορούν να εντοπιστούν σε ελεύθερη αλλά και συνδεδεμένη μορφή. Με την πάροδο των ετών, έχουν ανιχνευτεί σημαντικές πολυφαινόλες στον πολτό χαρουπιού, με το γαλλικό οξύ να βρίσκεται στην υψηλότερη συγκέντρωση, υποδεικνύοντας ότι είναι η πιο άφθονη φαινολική ένωση στους λοβούς χαρουπιού. Πέρα του γαλλικού οξέος, αρκετές πειραματικές μελέτες από τους (Corsi, et al., 2002), (Sakakibara, Honda, Nakagawa, Ashida, & Kanazawa, 2003) κατέδειξαν την παρουσία (+)-κατεχίνης, (-)-επιγαλλοκατεχίνης, (-)-επικατεχίνης να είναι οι κυριάρχες και οι πιο άφθονες πολυφαινόλες στο εκχύλισμα. Ο λόγος για τον οποίο το γαλλικό οξύ, η (+)-κατεχίνη, η (-)-επικατεχίνη και η (-)-επιγαλλοκατεχίνη ξεχωρίζουν ως οι πιο άφθονες ενώσεις είναι επειδή αποτελούν τις απλούστερες μορφές φαινολικών ενώσεων και επίσης χρησιμεύουν ως θεμελιώδεις δομικές μονάδες για πιο σύνθετες ενώσεις όπως οι φλαβονόλες και οι τανίνες. Η αποικοδόμηση αυτών των πιο σύνθετων ενώσεων κατά την διάρκεια της διαδικασίας εκχύλισης οδηγεί στην εμφάνιση των αναφερόμενων ελεύθερων φαινολικών μονομερών, συμβάλλοντας στην επικράτηση αυτών των συγκεκριμένων ενώσεων στο τελικό εκχυλισμένο μείγμα (Ioannis J. Stavrou, Atalanti Christou, & Constantina P. Kapnissi-Christodoulou, 2018). Μια άλλη έρευνα που

διεξήχθη από τους (Sakakibara, Honda, Nakagawa, Ashida, & Kanazawa, 2003) εμβάθυνε στο περίπλοκο πεδίο των διαλυτών εκχύλισης. Τα ευρήματά τους τόνισαν συγκεκριμένα ότι η χρήση νερού ως διαλύτη απέδωσε τη βέλτιστη εκχύλιση του γαλλικού οξέος, της (-)-επιγαλλοκατεχίνης, της (+)-κατεχίνης, της γαλλικής επικατεχίνης (ECG) και της γαλλικής επιγαλλοκατεχίνης (EGCG). Από την άλλη πλευρά, η χρήση οργανικών διαλυτών, όπως 90% μεθανόλη ή 70% ακετόνη, διευκόλυνε την πρόσθετη εκχύλιση ορισμένων φλαβονοειδών, συμπεριλαμβανομένων των γλυκοζιτών κερκετίνης, καθώς και των ταννινών. Επιπλέον, όπως περιγράφεται από τους (Avallone, Plessi, Baraldi, & Monzani) στη μελέτη τους σχετικά με τις ταννίνες στον πολτό χαρουπιού, παρατηρήθηκε ότι τα επίπεδα των συμπυκνωμένων ταννινών (προανθοκυανιδίνες) υπερέβαιναν εκείνα των υδρολύσιμων ταννινών, όπως οι ελλαγιταννίνες και οι γαλλοταννίνες.

Οι ποσότητες των φαινολικών ενώσεων που εκχυλίστηκαν από λοβούς χαρουπιού που αντιπροσωπεύουν τρία διαφορετικά στάδια ωρίμανσης προσδιορίστηκαν με τη χρήση χρωματομετρικών μεθόδων από τους (Othmen, Garcia-Beltrán, Elfalleh, Haddad, & Esteban, 2021). Τα συμπεράσματα που ελήφθησαν είναι τα εξής: Το ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο (TPC) των χαρουπιών επηρεάστηκε από τη διαδικασία ωρίμανσης. Τα στατιστικά δεδομένα έδειξαν ότι η TPC είχε ένα όμοιο πρότυπο στα εκχυλίσματα νερού και στα εκχυλίσματα αιθανόλης ως προς το στάδιο ωρίμανσης. Πιο συγκεκριμένα τα επίπεδα TPC έτειναν να μειώνονται σταδιακά με την αύξηση του σταδίου ωρίμανσης, με την χαμηλότερη ποσότητα να παρουσιάζεται στο τέλος της ωρίμανσης τους. Η ποσότητα των ολικών φαινολικών ενώσεων (TPC) φαίνεται να επηρεάζεται από την πολικότητα του διαλύτη που χρησιμοποιείται. Συγκεκριμένα, κατά τα αρχικά στάδια της ωρίμανσης, η ικανότητα του διαλύτη να εκχυλίζει TPC ήταν σχετικά ομοιόμορφη σε όλους τους διαλύτες. Ωστόσο, καθώς οι λοβοί έφτασαν στο στάδιο της μέσης ωρίμανσης, οι εκχυλίσεις με χρήση νερού ως διαλύτη επέδειξαν σημαντικά πιο αποτελεσματική εκχύλιση της TPC σε σύγκριση με τις εκχυλίσεις με χρήση αιθανόλης (Othmen, Garcia-Beltrán, Elfalleh, Haddad, & Esteban, 2021).

Επιπλέον, τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η συνολική περιεκτικότητα σε φλαβονοειδή επηρεάστηκε σημαντικά από τις ημερομηνίες συγκομιδής. Η υψηλότερη περιεκτικότητα επιτεύχθηκε στο άγουρο στάδιο και η χαμηλότερη ήταν στο στάδιο της ωρίμανσης. Η επιλογή του διαλύτη δεν επηρεάζει την ποσότητα των φλαβονοειδών σε ένα δεδομένο στάδιο ωρίμανσης, αλλά επηρεάζει το πρότυπο ανάπτυξής τους κατά τη διάρκεια της διαδικασίας ωρίμανσης. Με άλλα λόγια, ενώ η συνολική περιεκτικότητα σε ολικά φλαβονοειδή παραμένει σταθερή, η ικανότητα κάθε μεμονωμένης πολυφαινόλης εντός της κατηγορίας των φλαβονοειδών να διαπερνά το εκχύλισμα διαφέρει ανάλογα με τον χρησιμοποιούμενο διαλύτη (Othmen, Garcia-Beltrán, Elfalleh, Haddad, & Esteban, 2021).

Τόσο τα στάδια ωρίμανσης του φυτού όσο και η επιλογή του διαλύτη επηρεάζουν σημαντικά τη συγκέντρωση των συμπυκνωμένων ταννινών στα εκχυλίσματα. Είναι ενδιαφέρον ότι η εξέλιξη της εκχύλισης συμπυκνωμένων ταννινών παρουσίασε ομοιόμορφη συμπεριφορά και για τους δύο διαλύτες, ανεξάρτητα από το στάδιο ωρίμανσης. Η συγκέντρωση των συμπυκνωμένων ταννινών παρουσίασε μια τάση μείωσης μεταξύ του άγουρου και του σταδίου μέσης ωρίμανσης και στη συνέχεια παρέμεινε σταθερή μέχρι την πλήρη ωρίμανση. Ωστόσο, προέκυψαν αξιοσημείωτες

διαφορές μεταξύ των διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν. Συγκεκριμένα, η αιθανόλη επέδειξε ανώτερη αποτελεσματικότητα στην εκχύλιση συμπυκνωμένων τανινών κατά το στάδιο της ωρίμανσης. Αντίθετα, κατά το στάδιο της μέσης ωρίμανσης, το υδατικό εκχύλισμα παρουσίασε την υψηλότερη συγκέντρωση συμπυκνωμένων τανινών (Othmen, Garcia-Beltrán, Elfalleh, Haddad, & Esteban, 2021).

## Σάκχαρα

Μια αξιολογημένη μελέτη που διεξήχθη από τους (Othmen, Garcia-Beltrán, Elfalleh, Haddad, & Esteban, 2021) έχει σημασία για την παρούσα έρευνα, καθώς εξέτασε τις αλλαγές στο προφίλ σακχάρων των υδατικών και αιθανολικών εκχυλισμάτων λοβού κατά τη διάρκεια της διαδικασίας ωρίμανσης. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι οι κύριοι μονοσακχαρίτες και δισακχαρίτες που εντοπίστηκαν στους λοβούς χαρουπιού κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης περιλάμβαναν φρουκτόζη, γλυκόζη και σακχαρόζη. Οι ποσότητές τους παρουσίασαν εξάρτηση τόσο από το στάδιο της ωρίμανσης όσο και από τον χρησιμοποιούμενο διαλύτη εκχύλισης. Ειδικότερα, η περιεκτικότητα σε σακχαρόζη παρουσίασε έντονη απόκλιση μεταξύ των εκχυλισμάτων νερού και αιθανόλης, με τάση να αυξάνεται σταδιακά με την αύξηση των επιπέδων ωρίμανσης. Ομοίως, η ποσότητα φρουκτόζης παρουσίασε διαφορετικές τάσεις ανάλογα με τον χρησιμοποιούμενο διαλύτη. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα φρουκτόζης που εκχυλίστηκαν με νερό παρουσίασαν σημαντική μείωση κατά το στάδιο της άγουρης και της μέσης ωρίμανσης ενώ στη συνέχεια σταθεροποιήθηκαν μέχρι το τέλος της ωρίμανσης. Αντίθετα, τα εκχυλίσματα αιθανόλης δεν παρουσίασαν ουσιαστικές διαφορές στην περιεκτικότητα φρουκτόζης στα τρία στάδια ωρίμανσης. Η περιεκτικότητα σε γλυκόζη στα υδατικά εκχυλίσματα παρουσίασε μέτρια μείωση καθ' όλη τη διάρκεια της ωρίμανσης, ενώ τα εκχυλίσματα αιθανόλης εμφάνισαν οριακή μεταβολή στα επίπεδα γλυκόζης.

## Διαιτητικές ίνες

Οι διαιτητικές ίνες αποτελούν μια ετερογενή ομάδα ουσιών οι οποίες διαχωρίζονται σε υδατοδιαλυτές και μη υδατοδιαλυτές. Οι ίνες χαρουπιού προέρχονται από την εκχύλιση του πολτού χαρουπιού με τη χρήση νερού, εξαλείφοντας αποτελεσματικά την πλειονότητα των υδατοδιαλυτών υδατανθράκων. Το συνολικό περιεχόμενο των διαιτητικών ινών στον πολτό του χαρουπιού κυμαίνεται από 30% έως 40%. Το μη υδατοδιαλυτό κλάσμα αποτελείται από κυτταρίνη, ημικυτταρίνες, λιγνίνη και αδιάλυτες πολυφαινόλες. Οι ίνες χαρουπιού ξεχωρίζουν από τις υπόλοιπες πηγές διαιτητικών ινών λόγω της αξιοσημείωτης αφθονίας πολυφαινόλων και κυρίως τανινών. Αυτές οι πολυφαινόλες εκδηλώνονται κυρίως ως συμπυκνωμένες ταννίνες, συγκεκριμένα προανθοκυανιδίνες, που αντιπροσωπεύουν μια ομάδα συμπυκνωμένων φλαβαν-3-ολών, που βρίσκονται σε διάφορα φυτά. Επίσης οι φαινολικές ενώσεις που είναι παρούσες στις ίνες χαρουπιού είναι το γαλλικό οξύ, οι κατεχίνες, η γαλλική επικατεχίνη, η γαλλική επιγαλλοκατεχίνη και οι γλυκοζίτες κερκετίνης (Syed M. Nasar-Abbas, 2015). Επίσης, οι διαιτητικές ίνες του χαρουπιού έχουν μεγάλη επίδραση στη ρεολογία της ζύμης, όταν αυτό χρησιμοποιείται ως συστατικό σε προϊόντα αρτοποιίας (Goulas, Stylos, Chatziathanasiadou, Mavromoustakos, & Tzakos, 2016).

### 1.1.6 Οφέλη του χαρουπιού στην υγεία του ανθρώπου

Ένα πλήθος ερευνητικών μελετών έχουν αποκαλύψει μια ποικιλία φυσιολογικών αντιδράσεων που προκαλούνται από τους καρπούς χαρουπιού και τα προϊόντα του, που ενδεχομένως έχουν σημασία για την ενίσχυση της ανθρώπινης ευεξίας και την πρόληψη ή θεραπεία ορισμένων χρόνιων παθήσεων.

#### Αντιοξειδωτικές ιδιότητες

Τα τελευταία χρόνια το χαρούπι και τα προϊόντα του έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον των ερευνητών και των βιομηχανιών λόγω της πολυφαινολικής τους σύνθεσης. Ο ανθρώπινος οργανισμός δεν μπορεί να παράξει μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά από μόνος του και γι' αυτόν τον λόγο θεωρείται αναγκαίο να λαμβάνονται μέσω της τροφής (Benchikh et al., 2014). Το σημαντικό αντιοξειδωτικό δυναμικό που παρουσιάζουν οι καρποί χαρουπιού (τόσο ο πολτός όσο και οι σπόροι), καθώς και τα φύλλα χαρουπιού σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές, καθιστά τα προϊόντα αυτά ιδανικά για την ενσωμάτωση τους σε τρόφιμα που ενισχύουν την υγεία (Giochari, και συν., 2022).

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 ασκούν προστατευτικό ρόλο εξουδετερώνοντας τις ελεύθερες ρίζες μέσω της δωρεάς ηλεκτρονίων. Οι αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες των φαινολικών ενώσεων έχουν αναγνωριστεί ευρέως μέσω εκτεταμένων ερευνών κατά τη διάρκεια των ετών (Syed M. Nasar-Abbas, 2015).

Τον τελευταίο καιρό, ένας σημαντικός όγκος ερευνών έχει στρέψει την προσοχή του στα φυτά και τα παράγωγά τους, με στόχο την αξιοποίηση φυσικών και οικονομικά αποδοτικών αντιοξειδωτικών που μπορούν να αντικαταστήσουν τα συνθετικά πρόσθετα όπως η βουτυλιωμένη υδροξυανισόλη (BHA) και το βουτυλιωμένο υδροξυτολουόλιο (BHT). Αυτά τα συνθετικά πρόσθετα, γνωστά για την πιθανή καρκινογένεση, τις βλάβες που σχετίζονται με το στομάχι και την ευρύτερη τοξικότητά τους, ώθησαν στην αναζήτηση ασφαλέστερων εναλλακτικών λύσεων (Syed M. Nasar-Abbas, 2015).

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε μελέτη για την αξιολόγηση της επίδρασης δύο εκχυλισμάτων χαρουπιού, το ένα με περιεκτικότητα σε ταννίνη 35% και το άλλο με 85%. Αυτά τα εκχυλίσματα χαρουπιού χρησιμοποιήθηκαν σε μαγειρεμένο χοιρινό κρέας και συγκρίθηκαν με την α-τοκοφερόλη, ένα αναγνωρισμένο αντιοξειδωτικό τροφίμων. Τα ευρήματα αποκάλυψαν ότι και τα δύο εκχυλίσματα παρουσίασαν ανώτερη αντιοξειδωτική αποτελεσματικότητα σε σύγκριση με την α-τοκοφερόλη (Syed M. Nasar-Abbas, 2015). Επιπρόσθετα, οι αντιοξειδωτικές ικανότητες των εκχυλισμάτων χαρουπιού αξιολογήθηκαν χρησιμοποιώντας δύο μοντέλα *in vitro*, αποκαλύπτοντας ότι οι πολυφαινόλες που περιείχαν παρουσίασαν σχεδόν ισοδύναμες αντιοξειδωτικές και αναγωγικές ιδιότητες με εκείνες που βρέθηκαν στο κόκκινο κρασί (Syed M. Nasar-Abbas, 2015).



## Αντικαρκινογόνες ιδιότητες

Την τελευταία δεκαετία έχουν γίνει μεγάλα επιτεύγματα στην έρευνα για τον καρκίνο. Παρ' όλα αυτά, η αύξηση της συχνότητας εμφάνισης του καρκίνου εξακολουθεί να προκαλεί ανησυχία. Πολυάριθμες μελέτες έχουν υποδείξει μια πιθανή προστατευτική επίδραση των ταννινών και άλλων πολυφαινόλων έναντι διαφόρων μορφών καρκίνου. Για παράδειγμα, η κερκετίνη, μια πολυφαινόλη που έχει ερευνηθεί εκτενώς, προάγει την απόπτωση στα T-λευχαιμικά κύτταρα στοχεύοντας άμεσα την αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-xL. Επιπλέον, η κερκετίνη εμφάνισε την ικανότητα να μειώνει το μέγεθος του όγκου και να παρεμποδίζει την καρκινική αγγειογένεση σε μοντέλα ξενομοσχεύματος καρκίνου του παγκρέατος και του μαστού (Goulas, Stylos, Chatziathanasiadou, Mavromoustakos, & Tzakos, 2016).

Το γαλλικό οξύ, ένα φαινολικό οξύ που υπάρχει στους καρπούς χαρουπιού, μείωσε την ανάπτυξη των όγκων ξενομοσχεύματος οστεοσαρκώματος MNNG/HOS σε ποντίκια. Όταν εφαρμόστηκε στις κυτταρικές σειρές οστεοσαρκώματος MNNG/HOS, προκάλεσε απόπτωση και αναστολή του πολλαπλασιασμού, ενώ διαπιστώθηκε ότι η πρωτεΐνη p-38 ρυθμίστηκε προς τα πάνω, η JNK ρυθμίστηκε προς τα κάτω και η ERK1/2 ενεργοποιήθηκε (Goulas, Stylos, Chatziathanasiadou, Mavromoustakos, & Tzakos, 2016).

Οι συγγραφείς (Klenow, Gleib, Haber, Owen, & Pool-Zobel, 2008), υπέθεσαν ότι η παρατηρούμενη αντιπολλαπλασιαστική επίδραση στις ανθρώπινες κυτταρικές σειρές καρκίνου του παχέος εντέρου HT29 και LT97 μπορεί να αποδοθεί στην αυξημένη εμφάνιση του γαλλικού οξέος στη μη συζευγμένη του κατάσταση. Ενώ το εκχύλισμα ινών χαρουπιού εμπόδισε αποτελεσματικά τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HT29 και LT97 παρεμποδίζοντας τη σύνθεση του DNA, η απομονωμένη εφαρμογή γαλλικού οξέος στις κυτταρικές σειρές δεν απέδωσε το ίδιο αποτέλεσμα. Αυτό υποδηλώνει ότι η αντιπολλαπλασιαστική αποτελεσματικότητα του εκχυλίσματος χαρουπιού θα μπορούσε να αποδοθεί σε ένα διαφορετικό συστατικό ή να είναι το αποτέλεσμα μιας συνεργιστικής αλληλεπίδρασης μεταξύ διαφόρων συστατικών.

Το εκχύλισμα ινών χαρουπιού έχει επιδείξει προστατευτικές ιδιότητες έναντι του οξειδωτικού στρες σε κύτταρα αδενώματος, γεγονός που υποδηλώνει τη δυνατότητά του να εξουδετερώνει ή να επιβραδύνει την καρκινογενετική εξέλιξη στον καρκίνο του παχέος εντέρου. Επιπρόσθετα, οι ίνες χαρουπιού, εμπλουτισμένες με πολυφαινόλες, ασκούν ισχυρή αναστολή του πολλαπλασιασμού (που αποδίδεται στην αναστολή της σύνθεσης του DNA) τόσο σε κύτταρα αδενώματος όσο και σε κύτταρα αδενοκαρκινώματος εντός του ανθρώπινου παχέος εντέρου (Syed M. Nasar-Abbas, 2015).

Τα υδατικά εκχυλίσματα που προέρχονται από λοβούς χαρουπιού αποκάλυψαν σημαντικές τροποποιήσεις στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε μια κυτταρική σειρά ηπατοκυτταρικού καρκινώματος ποντικού, προκαλώντας ταυτόχρονα απόπτωση σε αυτά τα κύτταρα. Η παρατήρηση αυτή αναδεικνύει την παρουσία αντιπολλαπλασιαστικών παραγόντων στους λοβούς χαρουπιού, που ενδεχομένως έχουν πρακτική σημασία στη δημιουργία λειτουργικών τροφίμων ή/και χημειοπροληπτικών φαρμάκων (Syed M. Nasar-Abbas, 2015).

Μελέτες αποκάλυψαν ότι ένα εκχύλισμα από φύτρο χαρουπιού έχει σημαντική αντιοξειδωτική δράση και μείωσε τη βιωσιμότητα των κυττάρων του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας (HeLa) (Custódio L. , et al., 2011).

### Αντιδιαβητικές ιδιότητες

Ο διαβήτης τύπου 2 είναι ιδιαίτερα διαδεδομένος στις περισσότερες ανεπτυγμένες χώρες του κόσμου, με τη διατροφή να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αιτιολογία της πάθησης. Η αντιδιαβητική δράση του χαρουπιού έχει αξιολογηθεί με θετικά αποτελέσματα σε αρκετές μελέτες. Οι άφθονες φυτικές ίνες που περιέχονται στο χαρούπι έχουν τη δυνατότητα να βοηθήσουν στη διαχείριση της απόκρισης της γλυκόζης σε άτομα με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2. Το 1989, ο Forestieri και οι συνεργάτες του ήταν πρωτοπόροι στην παρατήρηση της επίδρασης του χαρουπιού στη ρύθμιση της γλυκόζης και της ινσουλίνης, συνοδευόμενη από μείωση του σωματικού βάρους (BW) και της ολικής χοληστερόλης (T-CHOL).

Η πιθανή αντιδιαβητική δράση των προϊόντων χαρουπιού αποδίδεται πιθανότατα στην παρουσία D-πινιτόλης, η οποία πιστεύεται ότι ρυθμίζει τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα σε άτομα με σακχαρώδη διαβήτη τύπου II ενισχύοντας την ευαισθησία στην ινσουλίνη. Το χαρουπόμελο αναγνωρίζεται ως σημαντική δεξαμενή D-πινιτόλης, με μόλις 10 γραμμάρια σιροπιού ή 10 mg D-πινιτόλης ανά κιλό σωματικού βάρους να αρκούν για τη μείωση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα σε άτομα που έχουν διαγνωστεί με διαβήτη τύπου II. Οι Bates et al. υποστηρίζουν ότι η D-πινιτόλη μπορεί να έχει ανάλογες επιδράσεις με την ινσουλίνη, οδηγώντας ενδεχομένως σε ενισχυμένο γλυκαιμικό έλεγχο (βελτιωμένα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα). Για να το διερευνήσουν αυτό, αξιολόγησαν την αποτελεσματικότητά της σε ζωικά μοντέλα με διαβήτη (πειραματόζωα) (Goulas, Stylos, Chatziathanasiadou, Mavromoustakos, & Tzakos, 2016). Μια ομάδα ερευνητών διεξήγαγε μια μελέτη στην οποία συμμετείχαν 15 άτομα που είχαν διαγνωστεί με διαβήτη τύπου 2. Στους εν λόγω συμμετέχοντες δόθηκε 50 γραμμάρια μαγειρεμένο λευκό ρύζι και ορισμένοι από αυτούς έλαβαν επίσης 1,2 γραμμάρια d-πινιτόλης σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα πριν από το γεύμα (0, 60, 120 ή 180 λεπτά πριν από το γεύμα). Η μελέτη κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η λήψη d-πινιτόλης 60 λεπτά πριν από την κατανάλωση ρυζιού ήταν ο πιο αποτελεσματικός τρόπος για τον έλεγχο των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα. Επιπλέον, η προσέγγιση αυτή μείωσε σημαντικά την αύξηση της γλυκόζης στο αίμα μετά το γεύμα, ιδιαίτερα στα 90 και 120 λεπτά μετά την κατανάλωση ρυζιού. Η συνολική αύξηση του σακχάρου στο αίμα ήταν επίσης χαμηλότερη σε όσους έλαβαν d-πινιτόλη σε σύγκριση με όσους κατανάλωσαν μόνο ρύζι. Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι η d-πινιτόλη θα μπορούσε να αποδειχθεί ευεργετική στη διαχείριση των μεταγευματικών αιχμών του σακχάρου στο αίμα σε άτομα με διαβήτη τύπου 2 (Syed M. Nasar-Abbas, 2015).

### Επίδραση στη μείωση της χοληστερόλης

Τα καρδιαγγειακά νοσήματα και η υπερχοστερολαιμία σε συνδυασμό με διάφορους παράγοντες κινδύνου, όπως η παχυσαρκία, το κάπνισμα, η σωματική αδράνεια και η υπέρταση συμβάλλουν συλλογικά στις κύριες αιτίες θνησιμότητας στις δυτικές κοινωνίες. Η διατήρηση ενός πιο υγιεινού τρόπου ζωής μέσω πρακτικών που περιλαμβάνουν τη μείωση της κατανάλωσης ζωικών λιπών και την αύξηση της πρόσληψης τροφίμων που είναι αποτελεσματικά στη διαχείριση της



υπερχοληστερολαιμίας, όπως οι φυτικές ίνες, μπορεί να μετριάσει σημαντικά τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου.

Μια μελέτη διάρκειας 8 εβδομάδων με 47 συμμετέχοντες, αποτελούμενη από 31 γυναίκες και 16 άνδρες με μέτρια υπερχοληστερολαιμία, είχε ως στόχο να διερευνήσει την επίδραση του χαρουπιού στη μείωση των λιπιδίων. Στόχος της μελέτης ήταν να αποδειχθεί κατά πόσον η κατανάλωση 15 γραμμαρίων χαρουπιού ως συμπλήρωμα της κανονικής τους διατροφής θα μπορούσε να επηρεάσει τα επίπεδα ολικής και LDL χοληστερόλης στο αίμα. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν αξιοσημείωτη μείωση της ολικής χοληστερόλης κατά 7,1% καθώς και της LDL χοληστερόλης κατά 10,6% χοληστερόλης μετά από 4 εβδομάδες. Ωστόσο, τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων παρέμειναν αμετάβλητα καθ' όλη τη διάρκεια της περιόδου μελέτης.

Όταν το χαρουπάλευρο χορηγήθηκε σε ποντίκια Sprague-Dawley παράλληλα με μια υπερλιπιδαιμική διαίτα, οδήγησε σε δόσοεξαρτώμενη μείωση των επιπέδων χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων. Ειδικότερα, οι ερευνητές υπογράμμισαν ότι το ιστοπαθολογικό προφίλ της καρδιάς και των νεφρών στα πειραματόζωα που καταναλώναν χαρουπάλευρο ήταν φυσιολογικό, ενώ εκείνα που ακολουθούσαν αποκλειστικά την υπερλιπιδαιμική διαίτα παρουσίαζαν σημαντικές ιστοπαθολογικές ανωμαλίες. Αυτό υποδηλώνει ότι το χαρουπάλευρο θα μπορούσε να αποτελέσει ευεργετική προσθήκη στη διατροφή υπέρβαρων ή παχύσαρκων ατόμων (Goulas, Stylos, Chatziathanasiadou, Mavromoustakos, & Tzakos, 2016). Επιπλέον οι (Valero-Muñoz, Martín-Fernández, Ballesteros, Lahera, & Heras, 2014), παρατήρησαν ότι οι διαιτητικές ίνες του λοβού χαρουπιού ανέστειλαν τους μηχανισμούς που οδηγούν στην αθηροσκλήρυνση σε κουνέλια με δυσλιπιδαιμία.

## 1.2 Μέθοδοι εκχύλισης και τεχνικές προσδιορισμού φαινολικών ενώσεων

Ορισμένες από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες συμβατικές μεθόδους εκχύλισης είναι η μέθοδος της διαβροχής (Maceration extraction method), του βρασμού (Decoction extraction method) και η μέθοδος Soxhlet. Ωστόσο, οι μέθοδοι αυτές απαιτούν συνήθως τη χρήση οργανικών διαλυτών, όπως η αιθανόλη, η μεθανόλη, η ακετόνη, ο διαιθυλαιθέρας και ο οξικός αιθυλεστέρας. Δυστυχώς, αυτοί οι διαλύτες δεν είναι μόνο επικίνδυνοι, αλλά μπορεί επίσης να οδηγήσουν σε υπολειμματικά ίχνη στα τελικά εκχυλίσματα. Προκειμένου να απομακρυνθούν οι εναπομείναντες διαλύτες, απαιτούνται χρονοβόρα στάδια καθαρισμού. Επιπλέον, μερικές φορές με την χρήση συμβατικών μεθόδων εκχύλισης χρησιμοποιούνται υψηλές θερμοκρασίες με αποτέλεσμα την απώλεια πολυφαινόλων. Κατά συνέπεια, με την πάροδο των ετών έχουν αναπτυχθεί εναλλακτικές και πιο προηγμένες μέθοδοι εκχύλισης για τον μετριασμό αυτών των μειονεκτημάτων. (Ioannis J. Stavrou, Atalanti Christou, & Constantina P. Kapnissi-Christodoulou, 2018).

Ορισμένες από τις σύγχρονες τεχνικές εκχύλισης είναι η εκχύλιση με υπερήχους (Ultrasound assisted method-USE), η εκχύλιση με μικροκύματα (Microwave assisted extraction- MAE), η εκχύλιση με τη βοήθεια υπερήχων-μικροκυμάτων (UME) και η εκχύλιση με υπερκρίσιμα υγρά (Supercritical fluid extraction-SFE). Οι μέθοδοι αυτές

είναι απλές, με σχετικούς σύντομους χρόνους εκχύλισης και χαμηλή κατανάλωση διαλυτών. Επιπλέον, η MAE παρέχει ένα ήπιο περιβάλλον εκχύλισης, εξασφαλίζοντας ανώτερα αποτελέσματα εκχύλισης, διατηρώντας παράλληλα την ακεραιότητα των εκχυλισμένων ενώσεων, ενώ η υποβοηθούμενη με υπερήχους εκχύλιση αποτελεί μια φθηνή, απλή και αποτελεσματική εναλλακτική λύση στις συμβατικές τεχνικές εκχύλισης. (Garcia-Castello et al., 2015). Η εκχύλιση με υπερήχους εξασφαλίζει άφθονη αλληλεπίδραση μεταξύ της μήτρας του δείγματος και του διαλύτη εκχύλισης, με τελικό αποτέλεσμα μια πιο αποτελεσματική διαδικασία εκχύλισης σε σύγκριση με την τεχνική μικροκυμάτων (Ioannis J. Stavrou, Atalanti Christou, & Constantina P. Kapnissi-Christodoulou, 2018).

Η εκχύλιση με υπερκρίσιμα ρευστά (SFE) είναι μια φιλική προς το περιβάλλον εναλλακτική λύση σε σχέση με τις συμβατικές μεθόδους εκχύλισης οι οποίες βασίζονται σε οργανικούς διαλύτες. (Ioannis J. Stavrou, Atalanti Christou, & Constantina P. Kapnissi-Christodoulou, 2018). Στην SFE, το CO<sub>2</sub> χρησιμοποιείται ως διαλύτης στην υπερκρίσιμη κατάστασή του, η οποία επιτυγχάνεται με την υποβολή του σε συγκεκριμένες συνθήκες θερμοκρασίας και πίεσης. Τα πλεονεκτήματα της SFE είναι ότι σε αντίθεση με τους οργανικούς διαλύτες, το CO<sub>2</sub> είναι μη τοξικό και μη εύφλεκτο και έτσι δεν αφήνει πίσω του επιβλαβή κατάλοιπα στις εξαγόμενες ενώσεις. Επιπλέον, διεξάγεται υπό σχετικά ήπιες συνθήκες, οι οποίες μπορούν να βοηθήσουν στην προστασία ευαίσθητων ενώσεων όπως οι πολυφαινόλες από το να υποστούν αποδόμηση ή αποσύνθεση. Έτσι η εκχύλιση με υπερήχους (USE) και η εκχύλιση με υπερκρίσιμα ρευστά (SFE) αποδείχθηκαν οι καταλληλότερες τεχνικές λόγω της εκλεκτικότητας και της αποτελεσματικότητάς τους στην εκχύλιση πολυφαινολών, η οποία, με τη σειρά της, μπορεί να οδηγήσει σε μεγαλύτερες αντιοξειδωτικές δραστηριότητες (Bernardo-Gil, et al., 2011), (Roseiro, et al., 2013), (Ioannis J. Stavrou, Atalanti Christou, & Constantina P. Kapnissi-Christodoulou, 2018).

Όσον αφορά τον προσδιορισμό των πολυφαινολικών ενώσεων, η HPLC (υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης) χρησιμοποιείται συχνά, ενώ για το δύσκολο έργο του ποσοτικού προσδιορισμού, η υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με συζευγμένη φασματομετρία μαζών (Liquid Chromatography coupled with Tandem Mass Spectrometry- LC-MS/MS) αποτελεί την καταλληλότερη τεχνική. Η LC-MS/MS είναι η καταλληλότερη τεχνική διότι παρέχει χαμηλά όρια ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού, ενώ ταυτόχρονα μπορούν να ληφθούν ακριβέστερες πληροφορίες σχετικά με τα δομικά χαρακτηριστικά των ενώσεων (Ioannis J. Stavrou, Atalanti Christou, & Constantina P. Kapnissi-Christodoulou, 2018).

### 1.3 Αντιμικροβιακή δράση

Η κλιμακούμενη απειλή για την ανθρώπινη υγεία που προκαλείται από την αυξανόμενη ανθεκτικότητα των παθογόνων μικροοργανισμών έναντι των αντιβιοτικών, παράλληλα με την ενισχυμένη οικονομική επιβάρυνση που απορρέει από το αυξημένο κόστος νοσηλείας που αποδίδεται στις λοιμώξεις που προκαλούνται από αυτά τα ανθεκτικά παθογόνα, μαζί με την ταυτόχρονη αύξηση των ποσοστών θνησιμότητας, έχει αυξήσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας για νέους αντιμικροβιακούς παράγοντες.

Πέρα όμως από τα ανθεκτικά παθογόνα που κατά κύριο λόγο ευδοκιμούν σε περιβάλλοντα νοσηλείας, υψίστης σημασίας για τη δημόσια υγεία είναι και η μικροβιολογική ασφάλεια των τροφίμων με την ελαχιστοποίηση των τροφογενών παθογόνων (Almajano et al., 2008). Η ύπαρξη και ο πολλαπλασιασμός των μικροοργανισμών στα τρόφιμα, σε συνδυασμό με ακατάλληλα πρωτόκολλα αποθήκευσης και κατανάλωσης, μπορεί να προκαλέσει επιβλαβείς επιπτώσεις όχι μόνο στη δημόσια υγεία αλλά και σε οικονομικές διαστάσεις.

### 1.3.1 Αντιμικροβιακή δράση των φυτικών εκχυλισμάτων

Όσον αφορά τη διατήρηση της μικροβιακής σταθερότητας των τροφίμων, τα τελευταία χρόνια εφαρμόζεται η «τεχνολογία εμποδίων», σύμφωνα με την οποία εφαρμόζονται διάφορες διεργασίες και συστατικά συνδυαστικά με σκοπό τη διατήρηση των προϊόντων. Ως αποτέλεσμα αυτής της εφαρμογής, οι μικροοργανισμοί δεν εμφανίζουν, πλέον, τόση ανθεκτικότητα, ενώ παράλληλα μειώνονται στο ελάχιστο οι αλλαγές στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των τροφίμων.

Ως αντιμικροβιακή ένωση μπορεί να οριστεί οποιαδήποτε χημική ή φυσική ένωση που είναι ικανή να αναστέλλει, να επιβραδύνει ή να εμποδίζει την ανάπτυξη μικροοργανισμών ή οποιαδήποτε αλλοίωση των τροφίμων λόγω μικροοργανισμών ή να αποκρύπτει την απόδειξη οποιασδήποτε τέτοιας φθοράς. Τα πιο κοινώς χρησιμοποιούμενα συντηρητικά που χρησιμοποιούνται ως μικροβιακές ενώσεις στα αναψυκτικά είναι τα σορβικά όξια (E 200-203) και τα βενζοϊκά οξέα (E 210-213) καθώς και τα άλατά τους.

Με την πάροδο του χρόνου, η χρήση αντιμικροβιακών ενώσεων στα τρόφιμα έχει αποτελέσει αντικείμενο ανησυχίας τόσο για τους καταναλωτές όσο και για τη βιομηχανία. Αυτό οφείλεται σε δύο βασικούς παράγοντες. Πρώτον, η λάθος χρήση διάφορων συντηρητικών έχουν οδηγήσει σε αξιοσημείωτη αύξηση του αριθμού των μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένων ορισμένων τροφιμογενών παθογόνων, οι οποίοι είναι περισσότερο ανθεκτικοί στις μεθόδους επεξεργασίας και συντήρησης τροφίμων και δεύτερον, η αύξηση της ευαισθητοποίησης των καταναλωτών σχετικά με τις πιθανές αρνητικές επιπτώσεις των συνθετικών συντηρητικών στην υγεία, σε αντίθεση με τα οφέλη των φυσικών προσθέτων, τα λεγόμενα ως «πράσινα πρόσθετα», έχει προκαλέσει ενδιαφέρον για την ανάπτυξη και τη χρήση φυσικών προϊόντων.

Τα βιοενεργά συστατικά των φυτών αναγνωρίζονται πλέον τόσο για τις αντιμικροβιακές όσο και για τις ευεργετικές τους ιδιότητες. Όπως προαναφέρθηκε, τα νέα «πράσινα πρόσθετα» γίνονται αποδεκτά από τους ανήσυχους καταναλωτές που απορρίπτουν την προσθήκη χημικών ουσιών στα προϊόντα διατροφής. Οι ενώσεις που προέρχονται από φυσικές πηγές έχουν αντιμικροβιακές ιδιότητες έναντι ευρέος φάσματος παθογόνων τροφίμων και θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως εναλλακτικά συντηρητικά, με τη δυνατότητα βελτίωσης της ασφάλειας και της ποιότητας των τροφίμων.

### 1.3.2 Αντιμικροβιακή δράση της χαρουπιιάς

Το χαρούπι όπως περιεγράφηκε παραπάνω παρουσιάζει ένα ευρύ φάσμα ευεργετικών χαρακτηριστικών, μεταξύ των οποίων ξεχωρίζει το αντιμικροβιακό

δυναμικό του το οποίο αποτελεί το κεντρικό θέμα της παρούσας εργασίας. Πολυάριθμες μελέτες έχουν διερευνήσει το αντιμικροβιακό δυναμικό του χαρουπιού έναντι ποικίλων μικροοργανισμών. Παρ' όλα αυτά, παραμένουν πολλές ευκαιρίες για πρόσθετη έρευνα ώστε να κατανοηθούν πλήρως οι διάφορες πτυχές της αντιμικροβιακής δράσης του χαρουπιού. Αυτό το συνεχές ενδιαφέρον έχει προσελκύσει την προσοχή και τον ενθουσιασμό των ερευνητών στον τομέα αυτό.

Η διερεύνηση της αντιμικροβιακής αποτελεσματικότητας των πολυφαινολικών ενώσεων που περιέχονται στα βοτανικά τρόφιμα και στα θεραπευτικά βοτανικά προϊόντα έχει αποτελέσει αντικείμενο εκτενούς επιστημονικού ελέγχου, ο οποίος περιλαμβάνει ένα ευρύ φάσμα μικροοργανισμών. Ειδικότερα, μεταξύ των πολυφαινολικών συστατικών, ιδιαίτερη έμφαση έχει δοθεί στις φλαβονόλες και τις τανίνες, λόγω των έντονων αντιμικροβιακών ιδιοτήτων τους, οι οποίες υπερβαίνουν εκείνες των εναλλακτικών πολυφαινολών. Οι ενώσεις αυτές έχουν επιδείξει μια τάση για συνεργιστικές αλληλεπιδράσεις με τα συμβατικά αντιβιοτικά, αυξάνοντας περαιτέρω το αντιμικροβιακό δυναμικό τους. Επιπλέον, συγκεκριμένες υποκατηγορίες φαινολικών ενώσεων έχουν θεωρηθεί ως υποψήφιοι για τη διαμόρφωση νέων συντηρητικών τροφίμων, συμβάλλοντας έτσι στον ευρύτερο τομέα της διασφάλισης της διατροφής (Vaquero, Nadra, Serravalle, & Saad, 2010). Επιπλέον, η ενσωμάτωση των πολυφαινολών στη σφαίρα των πρωτοποριακών θεραπευτικών ουσιών έχει συγκεντρώσει την προσοχή ως στρατηγική οδός για την αντιμετώπιση διαφόρων μικροβιακών λοιμώξεων. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό δεδομένης της αυξανόμενης επικράτησης της μικροβιακής αντοχής στα συμβατικά αντιβιοτικά.

Πλήθος μελετών έχουν αναδείξει την αντιβακτηριακή δράση διαφόρων πολυφαινολών και εκχυλισμάτων πλούσιων σε αυτές τις ενώσεις έναντι παθογόνων στελεχών του *Staphylococcus aureus*. Ορισμένες από αυτές τις επιμέρους πολυφαινόλες, όπως η μορίνη, η κερκετίνη, η καμφερόλη, η (-)-επιγαλλοκατεχίνη γαλλική (EGCG), η γαλλική επικατεχίνη (ECG), η (+)-κατεχίνη, ο αιθυλεστερας πρωτοκατεχουϊκού οξέος, το καφεϊκό οξύ και το γαλλικό οξύ, έχουν εντοπιστεί να παρουσιάζουν δράση έναντι κλινικών απομονωμένων στελεχών του *Staphylococcus aureus* (Manso, Lores, & Miguel, 2021).

Οι (Fidan, et al., 2018) στην μελέτη τους αξιολόγησαν την αντιμικροβιακή δράση των εκχυλισμάτων χαρουπιού ενάντια τεσσάρων παθογόνων βακτηρίων όπως η *Listeria monocytogenes*, η *Escherichia coli*, η *Salmonella enterica* και ο *Staphylococcus aureus*. Διαπίστωσαν ότι το εκχύλισμα χαρουπιού, όταν χρησιμοποιήθηκε σε ποσότητα 0,15 ml, έδειξε ισχυρή αντιβακτηριακή δράση, δημιουργώντας ζώνες αναστολής: 22 mm κατά της *Listeria monocytogenes*, 12 mm κατά της *Escherichia coli*, 10 mm κατά της *Salmonella enterica* και 13 mm κατά του *Staphylococcus aureus*.

Μια άλλη έρευνα που διερεύνησε τα αντιμικροβιακά χαρακτηριστικά των αιθέριων ελαίων που προέρχονται από τον πολτό και τους σπόρους χαρουπιού διαπίστωσε ότι τα έλαια αυτά παρουσιάζουν ισχυρή αντιμικροβιακή δράση έναντι αρνητικών κατά Gram παθογόνων βακτηρίων όπως η *Pseudomonas aeruginosa* και η *Escherichia coli*, καθώς και έναντι του θετικού κατά Gram παθογόνου *Staphylococcus aureus* (Nawel & Ahmed, 2018).

### 1.3.3 Μέθοδοι αντιμικροβιακής δράσης

Για την αξιολόγηση και τον έλεγχο της αντιμικροβιακής αποτελεσματικότητας που χαρακτηρίζει τα φυτικά εκχυλίσματα μπορεί να χρησιμοποιηθεί ένα ευρύ φάσμα εργαστηριακών τεχνικών *in vitro*. Ένα σημαντικό μέρος αυτών των τεχνικών βοηθά επιπλέον στον προσδιορισμό της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) έναντι των μικροοργανισμών. Στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης, η προσοχή στρέφεται σε δύο συγκεκριμένες μεθοδολογίες. Ωστόσο, είναι αξιοσημείωτο ότι μόνο μία από αυτές τις μεθοδολογίες έχει εκτελεστεί στο πειραματικό πλαίσιο:

- **Μέθοδος διάχυσης δίσκου σε άγαρ (Kirby-Bauer)**

Η μέθοδος διάχυσης δίσκων άγαρ, γνωστή και ως μέθοδος Kirby-Bauer, είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη και τυποποιημένη τεχνική για την αξιολόγηση της αντιμικροβιακής ευαισθησίας των μικροοργανισμών σε διάφορους αντιμικροβιακούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων αντιβιοτικών, φυτικών εκχυλισμάτων και άλλων ενώσεων. Η μέθοδος αυτή παρέχει ένα ποιοτικό μέτρο της αποτελεσματικότητας των παραγόντων δοκιμής έναντι συγκεκριμένων βακτηρίων ή μυκήτων.

Η μέθοδος βασίζεται στον εμβολιασμό εναιωρήματος του υπό μελέτη παθογόνου μικροοργανισμού σε πλάκα με άγαρ Mueller-Hinton και ακολούθως τοποθέτηση δίσκων φίλτρου, εμποτισμένων με έναν αντιμικροβιακό παράγοντα, δηλαδή το εξεταζόμενο εκχύλισμα μας. Στην ουσία, η διαδικασία αυτή επιτρέπει την εξέταση τόσο της ανάπτυξης των μικροοργανισμών όσο και της ταυτόχρονης διάχυσης των αντιμικροβιακών ουσιών στην επιφάνεια του άγαρ. Η διαδικασία προσομοιώνει τον τρόπο με τον οποίο οι μικροοργανισμοί επεκτείνονται και αλληλεπιδρούν με τις αντιμικροβιακές ενώσεις καθώς διαχέονται προς τα έξω από τους δίσκους φίλτρου, με τελικό αποτέλεσμα τον σχηματισμό ζωνών αναστολής όπου η μικροβιακή ανάπτυξη παρεμποδίζεται λόγω της παρουσίας της αντιμικροβιακής ουσίας. Εάν το εκχύλισμα αυτό έχει αντιμικροβιακή δράση, θα αναστείλει ή θα επιβραδύνει την ανάπτυξη του μικροοργανισμού, δημιουργώντας μια σαφή ζώνη αναστολής γύρω από το δίσκο. Η διάμετρος των ζωνών αναστολής μετριέται με ένα παχύμετρο ή ένα χάρακα και συγκρίνεται με τυποποιημένους πίνακες ή κατευθυντήριες γραμμές που παρέχονται από οργανισμούς όπως το Ινστιτούτο Κλινικών και Εργαστηριακών Προτύπων (CLSI) ή η Ευρωπαϊκή Επιτροπή για τη δοκιμή αντιμικροβιακής ευαισθησίας (EUCAST). Αυτές οι κατευθυντήριες γραμμές κατηγοριοποιούν την ευαισθησία των μικροοργανισμών ως ευαίσθητη, ενδιάμεση ή ανθεκτική.

Η μέθοδος διάχυσης με δίσκους άγαρ παρέχει ποιοτικά δεδομένα, υποδεικνύοντας εάν ο μικροοργανισμός είναι ευαίσθητος στον παράγοντα δοκιμής. Δεν παρέχει πληροφορίες σχετικά με την ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) ή τον ειδικό τρόπο δράσης. Παράλληλα η μέθοδος αυτή μπορεί να ανιχνεύσει την αναστολή της ανάπτυξης των βακτηρίων (βακτηριοστατική δράση), αλλά δεν μπορεί να προσδιορίσει αν η παρατηρούμενη αναστολή οφείλεται στο ότι τα βακτήρια θανατώνονται (βακτηριοκτόνο δράση) ή απλώς εμποδίζονται να αναπτυχθούν περαιτέρω. Είναι επίσης σημαντικό να σημειωθεί ότι διαφορετικοί μικροοργανισμοί έχουν διαφορετική ευαισθησία σε διαφορετικούς αντιμικροβιακούς παράγοντες και η μέθοδος ενδέχεται να μην είναι κατάλληλη για όλους τους τύπους μικροοργανισμών.

Ωστόσο, η δοκιμασία διάχυσης δίσκου προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα έναντι άλλων μεθόδων: απλότητα, χαμηλό κόστος, δυνατότητα εξέτασης τεράστιου αριθμού μικροοργανισμών και αντιμικροβιακών παραγόντων και ευκολία στην ερμηνεία των παρεχόμενων αποτελεσμάτων.

- **Μέτρηση οπτικής πυκνότητας με το όργανο *Bioscreen C***

Η αναγκαιότητα ελέγχου και εξασφάλιση μικροβιακής ποιότητας, με ταυτόχρονη μείωση του κόστους ελέγχου, αύξηση της ταχύτητας λήψης των αποτελεσμάτων και δυνατότητα ελέγχου μεγάλου αριθμού δειγμάτων ταυτόχρονα, οδήγησε τους μικροβιολόγους στον περιορισμό της χρήσης των κλασσικών μεθόδων και στην ολοένα εκτενέστερη χρησιμοποίηση των νέων ταχέων μεθόδων. Σε αντίθεση με τις κλασσικές μεθόδους, οι ταχείες δεν μετράνε κύτταρα, δίνοντας απλούς αριθμούς, αλλά καταγράφουν τον μεταβολισμό ή άλλα χαρακτηριστικά των μικροβίων (Τυμπής, Πετράκης, & Κοντελής, 2016).

Η αυτοματοποίηση, λοιπόν, η απλούστευση και κυρίως η συντόμευση του μικροβιακού ελέγχου, που επιτυγχάνεται με τις ταχείες μεθόδους, οδηγούν σε:

1. Γρήγορο έλεγχο πρώτων υλών, άρα μικρότερες ανάγκες αποθήκευσης.
2. Έλεγχο μεγαλύτερου αριθμού δειγμάτων.
3. Γρηγορότερη, όσο είναι δυνατόν, ανίχνευση επιμόλυνση σε κάποιο στάδιο της παραγωγής, που σημαίνει λιγότερο χαμένο προϊόν και ταχύτερη επαναφορά της λειτουργίας.
4. Αυτοματοποίηση, που σημαίνει εξοικονόμηση χρόνου, προσωπικού και χώρου.

Το αυτοματοποιημένο σύστημα ανάλυσης μικροβιολογικών καμπυλών ανάπτυξης *Bioscreen C* είναι μια λύση αιχμής προσαρμοσμένη για τον εκσυγχρονισμό των εργασιών της μικροβιολογικής έρευνας. Αυτό το εξαιρετικά προηγμένο σύστημα προσφέρει μια σειρά χαρακτηριστικών που διευκολύνουν την ακριβή και αποτελεσματική ανάλυση της μικροβιακής ανάπτυξης. Το σύστημα αποτελείται από έναν αναγνώστη (ο οποίος ενσωματώνει επωαστήρα και μονάδα μέτρησης), πλάκες δειγμάτων και λογισμικό. Στο σύστημα περιλαμβάνεται το λογισμικό EZExperiment, το οποίο καταγράφει τις μετρήσεις της οπτικής πυκνότητας (OD) με την πάροδο του χρόνου. Οι χρήστες έχουν τη δυνατότητα να λαμβάνουν δεδομένα από το σύστημα και να τα εξάγουν σε άλλα προγράμματα λογισμικού όπως το Microsoft Excel, για πρόσθετο χειρισμό δεδομένων, εάν απαιτείται (Oy Growth Curves Ab Ltd).

Στον πυρήνα του, διαθέτει έναν μοναδικό επωαστήρα που ενσωματώνει έναν εναλλάκτη θερμότητας υγρής κυκλοφορίας. Η επιλογή της θερμοκρασίας επώασης κυμαίνεται από 1 έως 60 °C, εξασφαλίζοντας παράλληλα ακλόνητη σταθερότητα θερμοκρασίας σε όλα τα φρεάτια με εντυπωσιακή ακρίβεια 0,1 °C. Αυτός ο έλεγχος της θερμοκρασίας είναι ζωτικής σημασίας για τη διατήρηση των βέλτιστων συνθηκών ανάπτυξης των υπό μελέτη μικροοργανισμών. Συμπληρωματικά, το σύστημα διαθέτει ένα γραμμικό αναδευτήρα, που εγγυάται τη διεξοδική ανάμιξη σε κάθε φρεάτιο, μια κρίσιμη πτυχή για την ομοιόμορφη κατανομή των θρεπτικών συστατικών και τα συνεπή αποτελέσματα (Oy Growth Curves Ab Ltd).

Το *Bioscreen C* είναι ένα σύστημα που μπορεί να μετρήσει τις αλλαγές στη θολερότητα ενός δείγματος με την πάροδο του χρόνου. Αυτή η μέτρηση της θολότητας



χρησιμοποιείται για την παρακολούθηση της ανάπτυξης ή του πολλαπλασιασμού μικροοργανισμών, όταν καλλιεργούνται σε ένα υγρό μέσο που ονομάζεται ζωμός. Όταν οι μικροοργανισμοί πολλαπλασιάζονται ή αναπτύσσονται στον ζωμό, αυξάνεται ο αριθμός τους και αυτή η αύξηση της κυτταρικής πυκνότητας κάνει το υγρό να εμφανίζεται πιο θολό. Το Bioscreen C μπορεί να παρακολουθεί αυτές τις αλλαγές στη θολρότητα και, κατ' επέκταση, την κινητική ανάπτυξης των μικροοργανισμών. Μπορεί επίσης να παρακολουθείται η ανάπτυξη αναερόβιων βακτηρίων, δημιουργία ενός περιβάλλοντος χωρίς οξυγόνο. Αυτό επιτυγχάνεται με ερμητικό σφράγισμα του καλύμματος της πλάκας ώστε να αποτραπεί η είσοδος οξυγόνου. Εναλλακτικά, μπορεί να χρησιμοποιηθεί η "τεχνική στρώματος ελαίου", η οποία είναι μια άλλη μέθοδος για τη δημιουργία αναερόβιου περιβάλλοντος, που συνήθως περιλαμβάνει την προσθήκη ενός στρώματος ελαίου στην κορυφή του μέσου καλλιέργειας (Oy Growth Curves Ab Ltd).

Ένα από τα πλεονεκτήματα που επισημαίνονται είναι η αποτελεσματικότητα ως προς το κόστος. Η χρήση του Bioscreen C μπορεί να οδηγήσει σε σημαντική εξοικονόμηση κόστους, επειδή μειώνει την κατανάλωση μέσων και εργαστηριακών προμηθειών, όπως τα τρυβλία Petri και οι δοκιμαστικοί σωλήνες. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό για τα εργαστήρια που επιθυμούν να βελτιστοποιήσουν τον προϋπολογισμό τους. Λειτουργεί αυτόματα, πράγμα που σημαίνει ότι μπορεί να εκτελεί πειράματα χωρίς συνεχή ανθρώπινη επίβλεψη. Αυτή η υψηλή απόδοση και ο αυτοματισμός μπορούν να επιταχύνουν σημαντικά την πειραματική διαδικασία, καθώς μπορεί να λειτουργεί συνεχώς, 24 ώρες την ημέρα, επτά ημέρες την εβδομάδα. Επιπλέον, αναφέρεται ότι μπορούν να ολοκληρωθούν τόσες δοκιμές σε λίγες εβδομάδες όσες θα χρειάζονταν συνήθως ένα χρόνο με τη χρήση παραδοσιακών χειροκίνητων τεχνικών. Αυτό υποδηλώνει ότι το Bioscreen C μπορεί να εξοικονομήσει στους ερευνητές σημαντικό χρόνο (Oy Growth Curves Ab Ltd).

Επιπλέον, η ενσωμάτωση 8 φίλτρων που καλύπτουν συγκεκριμένα μήκη κύματος από 405nm έως 600nm, συμπεριλαμβανομένου ενός φίλτρου ευρείας ζώνης, με ευρύ φάσμα μηκών κύματος ορατού φωτός (420-580 nm) ενισχύει την ευελιξία για εξειδικευμένες αναλύσεις και πειράματα. Αυτό το φίλτρο ευρείας ζώνης, γνωστό και ως "λευκό" φίλτρο προτιμάται όταν δεν χρειάζεται να ληφθεί υπόψη το χρώμα του μέσου ανάπτυξης και μετράει κυρίως την ανάπτυξη της θολότητας. Ωστόσο, για εξειδικευμένες εργασίες όπου οι χρωματικές αλλαγές είναι σημαντικές, μπορούν να χρησιμοποιηθούν άλλα φίλτρα για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό αυτών των αλλαγών με μεγαλύτερη ακρίβεια. Επιπλέον, η ικανότητα του συστήματος να εκτελεί ταυτόχρονα μετρήσεις σε δύο κυψελωτές πλάκες επιτρέπει την ταυτόχρονη ανάλυση έως και 200 δειγμάτων, αυξάνοντας σημαντικά την απόδοση και την παραγωγικότητα. Η μέγιστη χωρητικότητα των κυψελίδων του Bioscreen ανέρχεται στα 400  $\mu$ L (Oy Growth Curves Ab Ltd).

Επισημαίνεται ότι το Bioscreen C είναι εξοπλισμένο με ειδικό λογισμικό BioScreener. Αυτό το φιλικό προς τον χρήστη λογισμικό όχι μόνο απλοποιεί την απόκτηση και την ανάλυση δεδομένων, αλλά επιτρέπει επίσης την εύκολη προσαρμογή των τιμών οπτικής πυκνότητας (OD) σε ένα ευρύ φάσμα μορφών δεδομένων και γραφικών αναπαραστάσεων, εξαλείφοντας την ανάγκη για χρήση άλλων λογισμικών για την επεξεργασία των δεδομένων. Το όργανο αυτό μπορεί να ανιχνεύσει αύξηση της

οπτικής πυκνότητας, όταν ο ολικός αριθμός των μικροβίων ανέλθει σε  $10^6 - 10^7$  CFU/mL. Επισημαίνεται ότι κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων η οπτική πυκνότητα, θεωρείται ανάλογη της ποσότητας των μικροοργανισμών και συνολικά τα διαγράμματα που προκύπτουν, απεικονίζουν καμπύλες ανάπτυξης. Λαμβάνεται βέβαια υπόψιν ότι, αυτό ενδέχεται να επιφέρει κάποιο σφάλμα κατά την διεξαγωγή συμπερασμάτων, κυρίως λόγω της συνυπολόγισης των νεκρών μικροοργανισμών στην τιμή της μετρούμενης οπτικής πυκνότητας (Oy Growth Curves Ab Ltd).

Η μέθοδος αυτή, επιτρέπει στους ερευνητές να εξερευνήσουν και να τεκμηριώσουν πολυάριθμες πτυχές της μικροβιολογίας, της βιοχημείας και της βιοτεχνολογίας

- Μέτρηση του συνολικού αριθμού μικροοργανισμών σε δείγματα τροφίμων.
- Διεξαγωγή μικροβιολογικών δοκιμών για τη μέτρηση των ποσοτήτων διαφόρων ουσιών, όπως βιταμίνες, αμινοξέα, αντιβιοτικά ή άλλες χημικές ουσίες.
- Ανάπτυξη μικροβιολογικών πρωτεϊνών από οργανικά απόβλητα.
- Δημιουργία νέων αντιμικροβιακών ή αντιμυκητιασικών παραγόντων.
- Ανάπτυξη μικροβιολογικών συντηρητικών.
- Διερεύνηση μικροβιολογικών διεργασιών σε διαφορετικές θερμοκρασίες.
- Προσδιορισμός παραμέτρων όπως η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) αντιμικροβιακών ουσιών που απαιτείται για την παρεμπόδιση της ανάπτυξης ή της αναπαραγωγής του μικροοργανισμού και η θανατηφόρος δόση (LD) αντιβιοτικών ή άλλων ενώσεων που απαιτείται για τη θανάτωση ενός συγκεκριμένου οργανισμού.
- Ανάπτυξη μικροοργανισμών με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά
- Ανίχνευση της παρουσίας και του επιπέδου βακτηριουρίας (βακτήρια στα ούρα)
- Μέτρηση της τοξικότητας και της δυνητικής μεταλλαξιγένεσης διαφόρων ενώσεων
- Ανάλυση των συνδυασμένων επιδράσεων διαφόρων παραμέτρων (π.χ. pH, θερμοκρασία, χημικές ουσίες) στις καλλιέργειες
- Μελέτη της κινητικής ανάπτυξης βακτηριοφάγων
- Χρήση μαθηματικής μοντελοποίησης της ανάπτυξης μικροοργανισμών, φάγων ή κυττάρων με χρήση λογισμικού όπως το MS Excel.

Συμπερασματικά, το αυτοματοποιημένο αυτό σύστημα ανάλυσης μικροβιολογικών καμπυλών ανάπτυξης Bioscreen C είναι μια δύναμη στην έρευνα μικροβιολογίας, προσφέροντας ακριβή έλεγχο θερμοκρασίας, άψογη ανάμιξη, εξαιρετικά ευαίσθητη μέτρηση θολότητας, ευελιξία μήκους κύματος, εντυπωσιακή απόδοση και απρόσκοπτη διαχείριση δεδομένων μέσω του καινοτόμου λογισμικού του, καθιστώντας το ανεκτίμητο εργαλείο για τους επιστήμονες στο πεδίο.



## 1.4 Τροφιμογενείς παθογόνοι μικροοργανισμοί

Τα παθογόνα βακτήρια που μελετήθηκαν στην παρούσα διατριβή είναι η *E. coli*, ο *Staphylococcus aureus*, η *Salmonella Typhimurium* και η *Listeria monocytogenes*.

### 1.4.1 *Escherichia coli*

Το 1884, ο Γερμανός μικροβιολόγος και παιδίατρος *Theodor Escherich* ξεκίνησε μια έρευνα σχετικά με τους μικροοργανισμούς που κατοικούν στο έντερο και τις λειτουργίες τους στην πέψη και τις ασθένειες. Μέσω αυτής της έρευνας, εντόπισε ένα βακτήριο ταχείας ανάπτυξης που αρχικά ονομάστηκε "*Bacterium coli commune*". Ωστόσο, σήμερα αναγνωρίζεται ως *Escherichia coli*, που συνήθως αναφέρεται ως *E. coli*. Η αναγνωρισιμότητα του *E. coli* στη βιολογία οφείλεται στο πόσο εύκολο είναι να βρεθεί αλλά και να εργαστεί κάποιος με αυτό. Ανθεκτικά, μη παθογόνα και ευπροσάρμοστα στελέχη *E. coli* που αναπτύσσονται γρήγορα σε πολλά διαφορετικά θρεπτικά συστατικά μπορούν να απομονωθούν από σχεδόν οποιονδήποτε άνθρωπο. Κατά συνέπεια, όταν οι μικροβιολόγοι στις αρχές του 20ου αιώνα έψαχναν ένα πρότυπο οργανισμό, το *E. coli* ήταν μια από τις πιο ευρέως διαθέσιμες επιλογές (Blount, 2015).

Τα εντεροβακτηρίδια περιλαμβάνουν μια ομάδα βακτηρίων της οικογένειας *Enterobacteriaceae*, η οποία περιλαμβάνει σημαντικά αλλοιογόνα και παθογόνα βακτήρια των τροφίμων (*Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Proteus*, *Enterobacter*, *Citobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Escherichia coli*). Πρόκειται για αερόβια και προαιρετικά αναερόβια, Gram-, μη σπορογόνα βακτήρια. Τα εντεροβακτηρίδια διακρίνονται σε κολοβακτηριοειδή (*coliforms*) και μη-κολοβακτηριοειδή (*non-coliforms*) εντεροβακτήρια. Η διαφορά μεταξύ των δύο παραπάνω ομάδων είναι ότι τα κολοβακτηριοειδή ζυμώνουν τη λακτόζη και παράγουν οξύ και αέριο, ενώ τα μη-κολοβακτηριοειδή δεν έχουν την ικανότητα αυτή. Αυτή η ιδιότητα των κολοβακτηριδίων, δημιουργεί αλλοιώσεις σε πολλά τρόφιμα (π.χ. όξυνση λαχανικών, διόγκωση συσκευασμένων τροφίμων, σκάσιμο τυριών κλπ.). Τα κολοβακτηριοειδή διακρίνονται περαιτέρω σε δύο υποομάδες : τα εντερικής προέλευσης κολοβακτηριοειδή (*fecal coliforms*) και τα μη-εντερικής προέλευσης κολοβακτηριοειδή ή όπως συνήθως ονομάζονται ολικά κολοβακτηριοειδή (*total coliforms*). Τα ολικά κολοβακτηριοειδή ενδημούν στον εντερικό σωλήνα διαφόρων ειδών ζώων, αλλά απομονώνονται και από το περιβάλλον. Αντίθετα τα εντερικής προέλευσης κολοβακτηριοειδή ενδημούν αποκλειστικά στον εντερικό σωλήνα του ανθρώπου και των θερμόαιμων ζώων, γι' αυτό θεωρούνται και ως «δείκτης κοπρομόλυνσης». Ο χαρακτηριστικότερος αντιπρόσωπος της ομάδας των εντερικής προέλευσης κολοβακτηριοειδή είναι το βακτήριο *Escherichia coli*. Επειδή καταστρέφονται με ήπια θερμική επεξεργασία, αφυδάτωση και κατάψυξη, η παρουσία τους στα επεξεργασμένα τρόφιμα οφείλεται σε επιμόλυνση. Ελέγχοντας ένα δείγμα τροφίμου ή νερού για κολοβακτηριοειδή και ιδιαίτερα για *Escherichia coli*, που είναι ένα θερμοανθεκτικό κολοβακτηριοειδές, μπορεί να διαπιστωθεί εάν το δείγμα έχει εκτεθεί σε μόλυνση εντερικής προέλευσης. Η λογική πίσω από αυτό έγκειται στο γεγονός ότι τα θερμοανθεκτικά κολοβακτηριοειδή συναντώνται σε υψηλότερες

συγκεντρώσεις από ότι τα περισσότερα παθογόνα και έτσι μπορούν να ανιχνευτούν σχετικά πιο εύκολα (Τυμπής, Πετράκης, & Κοντελής, 2016).

### Ταξινόμηση του *Escherichia coli*

Βασίλειο	Bacteria
Φύλο	Proteobacteria
Ομοταξία	Gammaproteobacteria
Τάξη	Enterobacteriales
Οικογένεια	Enterobacteriaceae
Γένος	Escherichia
Είδος	Escherichia coli

### Γενικά χαρακτηριστικά

Η *Escherichia coli*, μέλος της οικογένειας *Enterobacteriaceae*, είναι ένα ραβδόμορφο βακτήριο που χαρακτηρίζεται από τον αρνητικό κατά Gram χαρακτήρα του. Έχει διαστάσεις περίπου 1-3 μm σε μήκος και 0,4-0,7 μm σε πλάτος. Αυτό το μη σπορογόνο βακτήριο είναι γνωστό για τη δυνατότητά του να ευδοκιμεί σε δυνητικά αναερόβιες συνθήκες. Η *E. coli* εμφανίζει κινητικότητα μέσω της παρουσίας περιφερικών μαστίγιων, αν και ορισμένα στελέχη μπορεί να στερούνται αυτού του χαρακτηριστικού κινητικότητας. Γενικά αναπτύσσεται σε μεγάλο εύρος θερμοκρασιών, από 7 έως 46°C με την κύρια ανάπτυξή της να λαμβάνει χώρα στους 37°C και σε ενεργότητα νερού άνω του 0,95. Δρα άριστα σε pH= 7-7,2, ενώ, έχει και μερικά οξυάντοχα στελέχη που επιβιώνουν σε pH=4,2 (Σπηλιώτης & Μπατρίνου, 2014). Αυτή η ασυνήθιστη ανθεκτικότητα σε όξινες συνθήκες συμβάλλει στη συσχέτισή του με ξεσπάσματα τροφικών δηλητηριάσεων σε όξινα τρόφιμα. Επιπλέον, η *Escherichia coli*, παρουσιάζει ανθεκτικότητα στις υψηλές συγκεντρώσεις άλατος, έχοντας την δυνατότητα να επιβιώσει ακόμη και σε συγκέντρωση 7-10%, αλλά παρουσιάζει μεγάλη ευαισθησία στην ακτινοβολία.

### Κατηγορίες της *Escherichia coli*

Η διαρροϊκή *Escherichia coli* κατηγοριοποιείται σε συγκεκριμένες ομάδες με βάση τις μολυσματικές ιδιότητες, τους μηχανισμούς παθογένειας, τα κλινικά σύνδρομα και τους διαφορετικούς οροτύπους O:H. Τα στελέχη της *E. coli* είναι ορολογικά διαφοροποιημένα σύμφωνα με τρία βασικά αντιγόνα επιφάνειας (Montville & Matthews, 2010), (Pan, 2023):

- Σωματικά αντιγόνα, επίσης γνωστά ως **αντιγόνα O**

Η *E. coli* κατηγοριοποιείται σε 173 διαφορετικούς ορότυπους O, καθένας από τους οποίους ορίζεται από το ειδικό σωματικό αντιγόνο O. Το βασικό αυτό αντιγόνο της

εξωτερικής επιφανείας των βακτηριακών κυττάρων, γνωστό ως Ο-ειδικό πολυσακχαρίτη του τριμερούς λιποπολυσακχαρίτη (LPS), παρουσιάζει ποικίλες μορφές που διακρίνουν τους διάφορους ορότυπους του *E. coli*.

- Μαστιγιακά αντιγόνα ή **αντιγόνα Η**

Η *E. coli* διαθέτει 75 διαφορετικά Η-αντιγόνα. Τα βακτηριακά μαστίγια αποτελούνται από την πρωτεΐνη μαστίγινη που αναφέρεται επίσης ως φλαγγελίνη η οποία παρουσιάζει αντιγονικές ιδιότητες. Η πρωτοταγής δομή της διαφέρει σε κάθε είδος ή στέλεχος.

- Καψιδιακά αντιγόνα ή **αντιγόνα Κ**

Έχουν αναγνωριστεί 103 «Κ» αντιγόνα. Τα καψιδιακά αντιγόνα, γνωστά ως αντιγόνα Κ, αντιπροσωπεύουν όξινα, θερμοευαίσθητα πολυσακχαριδικά αντιγόνα με ποικίλες δομές που υπάρχουν στην κάψουλα του βακτηριακού κυττάρου.

### **Παθογόνα είδη της *Escherichia coli***

Τα περισσότερα στελέχη *E. coli* αποικίζουν αβλαβώς τη γαστρεντερική οδό ανθρώπων και ζώων ως φυσιολογική χλωρίδα. Ωστόσο, υπάρχουν μερικά στελέχη *E. coli* που έχουν εξελιχθεί σε παθογόνα αποκτώντας παράγοντες μολυσματικότητας.

Έχουν αναγνωριστεί μέχρι στιγμής οι εξής μορφές που προκαλούν τροφολοιμώξεις :

- A. Η εντεροπαθογόνος (*Enteropathogenic E. coli* - EPEC)
- B. Η εντεροτοξινογόνος (*Enterotoxigenic E. coli* - ETEC)
- C. Η εντεροαιμορραγική (*Enterohaemorrhagic E. coli* - EHEC)
- D. Η εντεροδιεισδυτική (*Enteroinvasive E. coli* - EIEC)
- E. Η εντεροσυσσωρευτική (*Enterocoagulative E. coli* - EAEC)
- F. Η εντεροδιαχέομενη (*Diffusely adherent E. coli* - DAEC)

Μεταξύ αυτών, η εντεροαιμορραγική ομάδα *E. coli* (EHEC) περιλαμβάνει παθογόνα στελέχη *E. coli* που παράγουν τοξίνες οι οποίες καλούνται “βεροτοξίνες” (verotoxin-VTI) ή τοξίνες τύπου “Shiga” (Stxs), διότι μοιάζουν με τις τοξίνες που παράγει το βακτήριο *Shigella dysenteriae*. Τα κολοβακτηρίδια που παράγουν Shiga-τοξίνες χαρακτηρίζονται ως STEC. Ενώ έχουν απομονωθεί πάνω από 200 ορότυποι EHEC σε ανθρώπους, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι μόνο τα στελέχη που έχουν την ικανότητα να προκαλούν αιματηρή διάρροια κατηγοριοποιούνται ως πραγματικά παθογόνα EHEC. Οι μολύνσεις από *E. coli* που παράγουν Stxs συνδέονται με μία σοβαρή και, μερικές φορές, θανατηφόρα κατάσταση, το αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο (HUS). Ο ορότυπος O157:H7 είναι το βασικό αίτιο για ασθένειες που συνδέονται με την EHEC και γι’ αυτό θεωρείται ο κλινικά σημαντικότερος ορότυπος (Montville & Matthews, 2010).

Τα τέσσερα χαρακτηριστικά της *Escherichia coli* O157:H7 που την διαχωρίζουν και την κάνουν πολύ επικίνδυνη από τα υπόλοιπα στελέχη και γενικά των κολοβακτηριδίων που παράγουν Shiga τοξίνη (STEC) :

1. Η μικρή μολυσματική δόση που απαιτείται για την πρόκληση ασθένειας (10-100 κύτταρα)
2. Η ασυνήθιστα υψηλή ανθεκτικότητα τους σε αντίξοες συνθήκες όπως χαμηλές θερμοκρασίες και όξινο pH.
3. Οι επικίνδυνες επιπτώσεις στην υγεία, δεδομένου ότι η μόλυνση μπορεί να οδηγήσει σε καταστροφή του ήπατος και θάνατο
4. Δεν μεταβολίζουν την σορβιτόλη, γεγονός που αποτελεί ένα γρήγορο τρόπο εύρεσης του συγκεκριμένου παθογόνου στο εργαστήριο
5. Διαθέτουν συγκεκριμένα γονίδια (stx1, stx2, stx2c, stx2d) τα οποία είναι υπεύθυνα για την παραγωγή των Shiga τοξινών.

#### 1.4.2 *Salmonella* species (spp.)

##### **Γενικά χαρακτηριστικά**

Το γένος *Salmonella* είναι προαιρετικά αναερόβιο, gram αρνητικό, ραβδόμορφο βακτήριο, που ανήκει στην οικογένεια Enterobacteriaceae. Αποτελεί όπως όλα τα gram αρνητικά βακτήρια, ένα μη σπορογόνο βακτήριο που απαντάται μόνο στις βλαστικές του μορφές. Ειδικότερα, η *Salmonella* spp. ανήκει στα μη-κολοβακτηριοειδή (non-coliforms) εντεροβακτήρια τα οποία δεν έχουν την ικανότητα να ζυμώνουν τη λακτόζη και παράγουν οξύ και αέριο. Παρόλο που τα μέλη του γένους μπορούν να κινούνται με την βοήθεια περίτριχων μαστιγίων, υπάρχουν ορισμένες παραλλαγές χωρίς μαστίγια. Παραδείγματα αποτελούν το *S. Pullorum* και *S. Gallinarum*, μαζί με το *S. Typhi*, το *S. Paratyphi* και το *S. Dublin*, τα οποία παράγουν ένα ειδικό περίβλημα σαν έλυτρο. Αναπτύσσεται σε ένα μεγάλο εύρος θερμοκρασιών από 5 ° C έως 45 ° C με την ευνοϊκότερη ανάπτυξη να λαμβάνει χώρα στους 37°C. Σε γενικές γραμμές, η *Salmonella* είναι ευαίσθητη στη θερμότητα και καταστρέφεται σε θερμοκρασίες παστερίωσης με εξαίρεση την *Salmonella* Senftenberg η οποία είναι η πιο ανθεκτική στη θερμότητα μεταξύ όλων των οροτύπων. Επίσης ένα σημαντικό χαρακτηριστικό της είναι ότι μπορεί να επιβιώσει για παρατεταμένες περιόδους σε τρόφιμα που βρίσκονται αποθηκευμένα σε θερμοκρασίες ψύξης, κατάψυξης ή δωματίου. Η φυσιολογική προσαρμοστικότητα των ειδών *Salmonella* φαίνεται ακόμη περισσότερο από την ικανότητα τους να αναπτύσσονται σε τιμές pH που κυμαίνονται από 4,5 έως 9,5, με ένα βέλτιστο pH ανάπτυξης από 6,5 έως 7,5. Από τα διάφορα οργανικά και ανόργανα οξέα που χρησιμοποιούνται κατά την οξίνιση των τροφίμων, το προπιονικό και το οξικό είναι πιο βακτηριοκτόνα απ' ό,τι το κοινό γαλλικό και κιτρικό οξύ. Είναι ενδιαφέρον ότι η αντιμικροβιακή δράση των οργανικών οξέων μειώνεται καθώς αυξάνεται το μήκος της αλυσίδας των λιπαρών οξέων. Η ελάχιστη τιμή ενεργότητας ύδατος ( $a_w$ ) για την ανάπτυξη τους κυμαίνεται μεταξύ 0,94 και 0,95. Σε αντίθεση με την *Escherichia coli*, η *Salmonella* δεν επιβιώνει σε υψηλές συγκεντρώσεις άλατος και ειδικότερα μία συγκέντρωση πάνω από 9% θεωρείται βακτηριοκτόνος. Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η *Salmonella* παρουσιάζει πολύ χαμηλή μολυσματική δόση, μόλις 15-20 κύτταρα είναι ικανά να προκαλέσουν τροφική δηλητηρίαση (Montville & Matthews, 2010).

Το γένος *Salmonella* περιλαμβάνει δύο είδη, το *S. enterica*, το οποίο είναι και το χαρακτηριστικότερο είδος και το είδος *S. bongori*. Η *Salmonella enterica*, το κυριότερο παθογόνο είδος που απασχολεί τις αρχές ασφάλειας τροφίμων και τη βιομηχανία τροφίμων διαιρείται σε έξι υποείδη, τα οποία αναφέρονται με ένα λατινικό νούμερο και ένα όνομα:

- *S. enterica* subsp. *enterica* (I)
- *S. enterica* subsp. *salamae* (II)
- *S. enterica* subsp. *arizonae* (IIIa)
- *S. enterica* subsp. *diarizonae* (IIIb)
- *S. enterica* subsp. *houtenae* (IV)
- *S. enterica* subsp. *indica* (VI)

Η *Salmonella enterica* διαιρείται περαιτέρω σε πολυάριθμους ορότυπους, συμπεριλαμβανομένων των *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Newport* και *S. Stanley* οι οποίοι έχουν συνδεθεί με πρόσφατα περιστατικά τροφιμογενών ασθενειών (Montville & Matthews, 2010).

## Ορολογική ταυτοποίηση

Ο σκοπός των διαδικασιών ορολογικού ελέγχου είναι ο προσδιορισμός των πλήρων αντιγονικών τύπων των μεμονωμένων στελεχών *Salmonella*. Στα αντιγονικά χαρακτηριστικά περιλαμβάνονται:

- Σωματικά αντιγόνα O, επίσης γνωστά ως **αντιγόνα O**

Αυτό το βασικό αντιγόνο βρίσκεται στην εξωτερική επιφάνεια της εξωτερικής μεμβράνης των βακτηριακών κυττάρων και αποτελεί τον O-ειδικό πολυσακχαρίτη του λιποπολυσακχαρίτη (LPS).

- Μαστιγιακά αντιγόνα, επίσης γνωστά ως **αντιγόνα H**

Τα αντιγόνα του μαστιγίου (H) είναι πρωτεΐνες που παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στη θερμότητα. Τα μεμονωμένα στελέχη της *Salmonella* μπορούν να παράγουν ένα (μονοφασικό) ή δύο (διφασικό) σετ αντιγόνων μαστιγίου. Αν και ορότυποι όπως το Dublin παράγουν ένα μόνο σετ αντιγόνων μαστιγίου, η πλειονότητα των ορότυπων έχει την ικανότητα να αναπτύσσει οποιοδήποτε από τα δύο σύνολα αντιγόνων.

- Αντιγόνα κάψουλας (έλυτρου), επίσης γνωστά ως **αντιγόνα Vi**

Τα αντιγόνα κάψουλας (K), που παρατηρούνται συχνά σε μέλη της οικογένειας *Enterobacteriaceae* όπως η *Escherichia coli*, εμφανίζονται αποκλειστικά ως αντιγόνο Vi στο γένος *Salmonella*. Το αντιγόνο αυτό συναντάται μόνο στους ορότυπους Typhi, Paratyphi C και Dublin.

## Ασθένειες και συμπτώματα *Salmonella*

Τα τρέχοντα εθνικά επιδημιολογικά δεδομένα υπογραμμίζουν σταθερά τη σημασία της *Salmonella* spp. ως την δεύτερη πιο συχνά αναφερόμενη αιτία τροφιμογενών λοιμώξεων. Οι λοιμώξεις από *Salmonella* στον άνθρωπο μπορεί να οδηγήσουν σε διάφορες κλινικές καταστάσεις, όπως, 1) εντερικό (τυφοειδή) πυρετό, 2) μη τυφοειδής σαλμονέλωση και 3) απλή εντεροκολίτιδα

### 1. Εντερικός (τυφοειδής) πυρετός

Ο τυφοειδής πυρετός είναι μια απειλητική για τη ζωή και μεταδοτική βακτηριακή λοίμωξη που προκαλείται από τα στελέχη *Salmonella* Typhi και *Salmonella* Paratyphi A. Τα βακτήρια αυτά ζουν αποκλειστικά σε ανθρώπινους ξενιστές και συνήθως μεταδίδονται μέσω μολυσμένων τροφίμων ή νερού. Ιστορικά, κατατάσσεται μεταξύ των πιο διαδεδομένων λοιμώξεων, με σημαντικά ποσοστά θνησιμότητας (20%), ιδίως σε μέρη που επικρατούσαν. Τα συμπτώματα περιλαμβάνουν παρατεταμένο υψηλό πυρετό, κόπωση, πονοκέφαλο, ναυτία, κοιλιακό άλγος και διάρροια ή δυσκοιλιότητα. Οι σοβαρές περιπτώσεις μπορεί να οδηγήσουν σε σοβαρές επιπλοκές ή ακόμη και θάνατο. Ο τυφοειδής πυρετός μπορεί να επιβεβαιωθεί με εξέταση αίματος και μπορεί να αντιμετωπιστεί με αντιβιοτικά.

### 2. Μη τυφοειδής σαλμονέλωση

Η μη τυφοειδής σαλμονέλωση αντιπροσωπεύει την πιο ήπια μορφή παθογένειας. Είναι συνήθως αυτοπεριοριζόμενη με συμπτώματα παρόμοια με εκείνα της γαστρεντερίτιδας (ναυτία, στομαχόπνος, εμετός, διάρροια) που υποχωρούν μέσα σε 5 ημέρες από την αρχική εκδήλωση τους.

#### 1.4.3 *Staphylococcus aureus*

Ο όρος “σταφυλόκοκκος” προέρχεται από την ελληνικές λέξεις σταφύλι και κόκκος. Ο *Staphylococcus* στο μικροσκόπιο εμφανίζονται σε ζεύγη ή συσσωματώματα, με μορφή τσαμπιών σταφυλιού και γ' αυτό πήρε το όνομα «σταφυλόκοκκος». Ο σταφυλόκοκκος (*Staphylococcus*) είναι ένα γένος θετικών κατά Gram (+), σφαιρικών βακτηρίων (σε σχήμα κόκκου) που προκαλούν συνήθως χειρουργικές και δερματικές λοιμώξεις, αναπνευστικές ασθένειες και τροφική δηλητηρίαση. Το 1880, ο σκωτσέζος χειρουργός Sir Alexander Ogston περιέγραψε για πρώτη φορά σταφυλόκοκκους στο πύον από χειρουργικό απόστημα σε γόνατο: «οι μάζες έμοιαζαν με τσαμπιά σταφυλιών». Το 1884, ο Γερμανός γιατρός Friedrich Julius Rosenbach διαφοροποίησε τα βακτήρια με το χρώμα των αποικιών τους: *Staphylococcus aureus* (από το λατινικό aurum, χρυσό) και *Staphylococcus albus* (από την λατινική λέξη λευκό). Το *S. albus* μετονομάστηκε αργότερα *S. epidermidis* λόγω της σχεδόν πανταχού παρουσίας του στο ανθρώπινο δέρμα (Licitra, 2013).

Οι σταφυλόκοκκοι είναι συνηθισμένοι αποικιστές του δέρματος και των βλεννογόνων ανθρώπων και άλλων θηλαστικών. Ως φορείς, οι άνθρωποι διαιωνίζουν τη μετάδοσή τους από άτομο σε άτομο, επεκτείνοντας τελικά την εμβέλειά τους στα

τρόφιμα που καταναλώνονται. Κατά συνέπεια, οι χειριστές τροφίμων αναδεικνύονται ως οι πρωταρχικοί παράγοντες μόλυνσης των τροφίμων σε αυτό το πλαίσιο.

Το Εγχειρίδιο Προσδιοριστικής Βακτηριολογίας του Bergey, κατατάσσει τους σταφυλόκοκκους στην οικογένεια Micrococcaceae. Αυτή η οικογένεια περιλαμβάνει τα γένη *Micrococcus*, *Staphylococcus* και *Planococcus*. Το γένος *Staphylococcus* διαιρείται περαιτέρω σε περισσότερα από 23 είδη και υποείδη. Δύο μεγάλες κατηγορίες στις οποίες μπορούν να ταξινομηθούν τα διάφορα είδη του *Staphylococcus* είναι:

A. Οι κοαγκουλάση-θετικοί σταφυλόκοκκοι - Coagulase-positive staphylococci (CoPS)

Τα είδη αυτά διακρίνονται από την ικανότητά τους να ζυμώνουν τα σάκχαρα και να παράγουν το ένζυμο κοαγκουλάση. Έχουν αναγνωρισθεί επτά είδη σταφυλόκοκκων θετικών στην κοαγκουλάση (CoPS): *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus lutrae*, *Staphylococcus delphini* και *Staphylococcus pseudintermedius*. Το σημαντικότερο και το πιο παθογόνο είδος από αυτά είναι ο *Staphylococcus aureus*. Γενικά, τα CoPS είναι ευκαιριακά παθογόνα. Έχουν μεγάλο αριθμό παραγόντων λοιμογόνου δράσης και η ικανότητά τους να προκαλούν ασθένεια συνήθως συνδέεται με τον ξενιστή. Τα CoPS φέρουν διάφορους μηχανισμούς αντίστασης. Ειδικότερα, ο *S. aureus* έγινε ανθεκτικός στη μεθικιλίνη αποκτώντας μια γονιδιωματική νησίδα αντοχής γνωστή ως σταφυλοκοκκική χρωμοσωμική κασέτα mec (SCCmec)

B. Οι κοαγκουλάση-αρνητικοί σταφυλόκοκκοι - Coagulase-negative staphylococci (CoNS)

Αυτή η κατηγορία περιλαμβάνει τα σταφυλοκοκκικά είδη που δεν έχουν την ικανότητα να παράγουν το ένζυμο κοαγκουλάση. Αποτελούν μια ομάδα με πάνω από 40 είδη, κύριο ενδιαφέρον να παρουσιάζουν ο *Staphylococcus epidermidis*, ο *Staphylococcus haemolyticus* και ο *Staphylococcus saprophyticus*. Αν και ιστορικά θεωρούνταν ως αβλαβείς κοινόχρηστοι οργανισμοί, πρόσφατες έρευνες έχουν φωτίσει τη δυνατότητά τους να προκαλούν λοιμώξεις ιδίως σε άτομα με εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα.

### Γενικά χαρακτηριστικά του *Staphylococcus aureus*

Το *S. aureus* είναι ένα θετικό κατά Gram (+) βακτήριο σε σχήμα κόκκου (με διάμετρο 0,5–1,5 μm), μη σπορογόνο, προαιρετικά αναερόβιο. Δεν έχει δυνατότητα κίνησης και διατάσσεται σε σταφυλοειδείς σχηματισμούς ή άτακτα. Παράγει το ένζυμο καταλάση, όπως και οι άλλοι σταφυλόκοκκοι και τα περισσότερα υποχρεωτικά και προαιρετικά αερόβια βακτήρια. Ο *Staphylococcus aureus* αναπτύσσεται στο εξειδικευμένο θρεπτικό μέσο που είναι γνωστό ως Mannitol Salt Agar (Chapman) Bioprepate. Σε αυτό το μέσο, αναπτύσσει αποικίες που παρουσιάζουν μια χαρακτηριστική κίτρινη απόχρωση. Αυτή η χρωματική μετατροπή προέρχεται από την αερόβια ζύμωση της μαννιτόλης, η οποία οδηγεί σε μείωση του pH. Καθώς το pH μετατοπίζεται, το άλλοτε κόκκινο υπόστρωμα αλλάζει σε μια ζωρή κίτρινη απόχρωση. Αναπτύσσεται σε ένα μεγάλο εύρος θερμοκρασιών από 7 °C έως 48 °C με την ευνοϊκότερη ανάπτυξη να λαμβάνει χώρα στους 37-40 °C. Σε γενικές γραμμές ο *S. aureus* καταστρέφεται εύκολα με την θερμική

επεξεργασία και με την εφαρμογή απολυμαντικών. Κατά συνέπεια, η παρουσία είτε του ίδιου του βακτηρίου είτε των εντεροτοξινών του σε επεξεργασμένα τρόφιμα και εξοπλισμό αποτελεί ένδειξη ελλιπούς υγιεινής από τους χειριστές. Χαρακτηρίζεται επίσης από την ικανότητα του να αναπτύσσονται σε τιμές pH που κυμαίνονται από 4,0 έως 10,0 με ένα βέλτιστο pH ανάπτυξης από 6,0 έως 7,0. Ο *Staphylococcus aureus* αποτελεί τον υψηλότερο κίνδυνο για τις βιομηχανίες που ασχολούνται με την παραγωγή τροφίμων λόγω της αξιοσημείωτης ικανότητάς του να ευδοκιμεί σε περιβάλλοντα με επίπεδα ενεργότητας νερού έως και 0,83, σε συνδυασμό με την ανοχή του σε χαμηλές τιμές pH. Επιπλέον, μπορεί να αναπτύσσεται σε υψηλές συγκεντρώσεις άλατος (έως 20%) και παρουσιάζει καλή ανάπτυξη σε θρεπτικά υποστρώματα που περιέχουν 10% χλωριούχο νάτριο. Η παραγωγή εντεροτοξίνης λαμβάνει χώρα σε συγκεντρώσεις άλατος έως και 10%, ενώ αναστέλλεται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις. Οι σταφυλόκοκκοι δεν αποτελούν καλούς ανταγωνιστές και πολλά βακτήρια των τροφίμων, εμποδίζουν την ανάπτυξη του και μετριάζουν την πιθανότητα παραγωγής εντεροτοξινών. Ωστόσο, μια εξαίρεση προκύπτει στην περίπτωση του ακατέργαστου, μη παστεριωμένου γάλακτος που προέρχεται από αγελάδα που πάσχει από μαστίτιδα που προκαλείται από μόλυνση από σταφυλόκοκκο (Montville & Matthews, 2010).

### **Επικίνδυνο στέλεχος του *Staphylococcus aureus* (MRSA)**

Ένας λόγος για τον οποίο παρατηρήθηκε μεγάλο ενδιαφέρον στο πεδίο των σταφυλόκοκκων αποτέλεσε η εμφάνιση και η αυξανόμενη εξάπλωση του ανθεκτικού στη μεθικιλίνη *S. aureus* (MRSA) ως τρομερού νοσοκομειακού παθογόνου. Τα MRSA στελέχη που εγκαταστάθηκαν στα νοσοκομεία και σε χώρους παροχής υπηρεσιών υγείας ονομάστηκαν νοσοκομειακά MRSA στελέχη (Hospital-Associated MRSA, HA-MRSA). Μέσα σε μικρό χρονικό διάστημα τα στελέχη αυτά απέκτησαν αντοχή στα περισσότερα συνήθη αντιμικροβιακά, με αποτέλεσμα την εμφάνιση των πρώτων πολυανθεκτικών HA-MRSA στελεχών. Έκτοτε οι λοιμώξεις από MRSA, που παρουσιάζουν συνεχώς αυξανόμενη επίπτωση, έχουν εξελιχθεί σε ένα παγκόσμιο πρόβλημα υγείας. Εκτός όμως από την παρουσία των στελεχών MRSA στο περιβάλλον του νοσοκομείου και της κοινότητας, τα τελευταία χρόνια ανάδυση αυτών έχει γίνει και στον χώρο της κτηνοτροφίας (Livestock Associated MRSA, LA-MRSA), υποδηλώνοντας την ικανότητα του *S. aureus* να αποικίζει σε διάφορους ξενιστές. Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι ορισμένα στελέχη LA-MRSA έχουν την ικανότητα να αποικίζουν στους ανθρώπους και ότι από την πλευρά τους οι άνθρωποι αποτελούν μια σημαντική πηγή νέων παθογόνων στελεχών που επηρεάζουν τα ζώα (Murra, Mortensen, & Wang, 2019).

### **Τοξίνες του *Staphylococcus aureus***

Η τροφική δηλητηρίαση από σταφυλόκοκκο αποτελεί μια συνήθη αιτία γαστρεντερίτιδας. Ο *S. aureus* είναι ο κύριος παράγοντας τροφικής δηλητηρίασης από σταφυλόκοκκο. Οι τροφικές δηλητηριάσεις προκαλούνται από την κατανάλωση σταφυλοκοκκικών τοξινών που έχουν ήδη παραχθεί μέσα στο μολυσμένο τρόφιμο και όχι από την κατανάλωση ζωντανών βακτηρίων. Αυτός ο τρόπος τροφικής δηλητηρίασης λέγεται τροφοτοξίνωση.

Ορισμένες από τις βασικές τοξίνες που παράγει ο *S. aureus* περιλαμβάνουν:



1. Σταφυλοκοκκικές εντεροτοξίνες, A, B, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, D, E, G, H, I, J, K και L (superantigens, SAGs)
2. Τοξίνες που δημιουργούν πρωτεϊνικούς πόρους (Pore-forming toxins (PFTs))
3. Επιδερμολυτικές τοξίνες (exfoliative toxins, ETs)

#### 1.4.4 *Listeria monocytogenes*

### Ταξινόμηση

Πριν από τη δεκαετία του 1970, η επιστημονική κοινότητα δεν διέθετε μια οριστική ταξινόμηση της *Listeria* στο ευρύτερο φάσμα των ζωντανών οργανισμών. Η επικρατούσα αντίληψη ήταν ότι το γένος *Listeria* ανήκε στην οικογένεια *Corynebacteriaceae*. Ωστόσο, καθώς ο χρόνος προχωρούσε, οι ερευνητές αποκάλυψαν ότι η *Listeria* παρουσίαζε κοινά χαρακτηριστικά με βακτηριακά είδη όπως τα *Lactobacillus*, *Erysipelothrix*, *Brochothrix*, *Renibacterium*, *Kurthia* και *Caryophanon*. Αυτά τα κοινά γνωρίσματα περιλαμβάνουν το ότι είναι μη σπορογόνα, θετικά κατά Gram ραβδόμορφα βακτήρια.

Η σημερινή ταξινόμια του είδους περιγράφεται ως εξής:

- Βασίλειο: Bacteria
- Φύλο: Firmicutes
- Κλάση: Bacilli
- Τάξη: Bacillales
- Οικογένεια: *Listeriaceae*
- Γένος: *Listeria*

Το βακτήριο *Listeria monocytogenes* αποτελεί ένα εκ των δέκα αναγνωρισμένων ειδών του γένους *Listeria* που περιγράφηκε πρώτο, με τα υπόλοιπα είδη να ακολουθούν με χρονολογική σειρά αναφοράς: *Listeria grayi*, *Listeria innocua*, *Listeria welshimeri*, *Listeria seeligeri*, *Listeria ivanovii*, *Listeria marthii*, *Listeria rocouriae*, *Listeria fleischmannii* και *Listeria weihenstephanensis*. Από αυτά τα δέκα μόνο η *Listeria monocytogenes* και *Listeria ivanovii* είναι παθογόνα. Συγκεκριμένα η *Listeria monocytogenes* παθογόνο για τους ανθρώπους ενώ *Listeria ivanovii* είναι κυρίως παθογόνο των ζώων.

Δεκατρείς ορότυποι έχουν ταυτοποιηθούν για το παθογόνο *L. monocytogenes*, βάση το σωματικό αντιγόνο O και το μαστιγιακό αντιγόνο H, οι οποίοι περιλαμβάνουν τους 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e και 7 αλλά μόνο τρία από αυτά (1/2a, 1/2b, και 4b) είναι υπεύθυνα για την πλειονότητα (περίπου 95%) των κρουσμάτων ανθρώπινων ασθενειών παγκοσμίως. Είναι ενδιαφέρον ότι, αν και ο ορότυπος 1/2a είναι ο πιο συχνά απομονωμένος από τρόφιμα, ο ορότυπος 4b προκαλεί την πλειονότητα των επιδημιών στον άνθρωπο (Capita, Felices-Mercado, García-Fernández, & Alonso-Calleja, 2019).

## Γενικά χαρακτηριστικά *Listeria monocytogenes*

Η *Listeria monocytogenes* είναι μη σπορογόνο, κατά Gram θετικό βακτήριο σε σχήμα ράβδου (βάκιλος). Είναι επίσης κινητό σε θερμοκρασίες μικρότερες των 30 °C και ακίνητο στους 37°C και έχει διάμετρο 0,5μm και μήκος 1-2μm. Είναι ένας μικροαερόβιος μικροοργανισμός όπου απαιτεί χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου της τάξης του 5% και 10% CO<sub>2</sub>. Η *Listeria monocytogenes* είναι μεταξύ των κυριότερων αιτιών θανάτου από τροφιμογενείς ασθένειες.

## Ανάπτυξη και επιβίωση της *Listeria monocytogenes* σε φυσικούς και χημικούς παράγοντες

Η ανάπτυξη και επιβίωση της *L. monocytogenes* εξαρτάται από ένα εύρος παραγόντων όπως είναι η θερμοκρασία, η ενεργός οξύτητα (pH), ο συντελεστής ενεργού ύδατος (aw), η αλατότητα και η παρουσία συντηρητικών.

Η *Listeria monocytogenes*, ως ψυχρότροφο βακτήριο, αναπτύσσεται αρκετά καλά σε θερμοκρασίες 0-45°C, ενώ το βέλτιστο εύρος θερμοκρασίας είναι 30-37 °C. Ωστόσο, σε θερμοκρασίες παστερίωσης, δηλαδή μεγαλύτερες των 50°C, θανατώνεται, ενώ σε χαμηλές θερμοκρασίες αναπτύσσεται με αργό ρυθμό. Η ψύξη δεν μειώνει σημαντικά τον βακτηριακό πληθυσμό, ενώ η επιβίωση και η πρόκληση βλαβών κατά την διάρκεια αποθήκευσης στην κατάψυξη εξαρτάται πάντοτε από το τρόφιμο και το ρυθμό κατάψυξης (Montville & Matthews, 2010).

Η *Listeria monocytogenes* εμφανίζει καλή ανάπτυξη ακόμα και σε όξινα pH, σε τιμές μέχρι και 4,4, ενώ σε τιμές pH μικρότερες του 4,3, τα κύτταρα δεν αναπτύσσονται, αλλά επιβιώνουν. Τα οργανικά οξέα, όπως το οξικό, το κιτρικό και το γαλακτικό, μπορούν να αναστείλουν την ανάπτυξη της, ακόμη και σε ποσοστό 0,1%, εξαρτωμένου βέβαια και του βαθμού διάσπασής τους. Το βακτήριο έχει μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στο κιτρικό και το γαλακτικό, σε ένα συγκεκριμένο pH σε αντίθεση με το οξικό, στο οποίο εμφανίζει μεγαλύτερη ευαισθησία. Το πιο αβλαβές οξύ για το βακτήριο είναι το υδροχλωρικό (HCl) (Montville & Matthews, 2010). Επομένως, η ικανότητα του βακτηρίου να αναπτύσσεται σε τιμές χαμηλού pH επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από τη φύση του οξινιστικού σε συνδιασμό με την θερμοκρασία συντήρησης. Αυτή η ικανότητα χάνεται σε υψηλές θερμοκρασίες συντήρησης (Montville & Matthews, 2010).

Αναφορικά για την ενεργότητα νερού ( $a_w$ ), η *Listeria monocytogenes* αναπτύσσεται καλύτερα σε  $a_w \geq 0,97$ . Για τα περισσότερα στελέχη η ελάχιστη  $a_w$  για την ανάπτυξη είναι 0,93, αλλά ορισμένα στελέχη μπορούν να αναπτύσσονται σε τιμές  $a_w$  μέχρι και 0,90. Ωστόσο, σε χαμηλότερες τιμές ενεργότητας νερού μέχρι και 0,83, το βακτήριο δεν αναπτύσσεται, αλλά μπορεί και επιβιώνει για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Έχει παρατηρηθεί επίσης, πως η θερμοανθεκτικότητα του βακτηρίου αυξάνεται με την μείωση της  $a_w$  του τροφίμου στο οποίο βρίσκεται. Αυτό δημιουργεί προβλήματα για τους παραγωγούς τροφίμων, οι οποίοι συνδυάζουν χαμηλή  $a_w$  και θερμικούς χειρισμούς για να διατηρήσουν την ασφάλεια (Montville & Matthews, 2010).

Η *Listeria monocytogenes* αναπτύσσεται σε υψηλά επίπεδα όταν βρίσκεται σε μέτριες συγκεντρώσεις αλάτων, μέχρι και 6,5%, ενώ αναπτύσσεται ακόμα και υπό την

παρουσία 10-12% χλωριούχου νατρίου. Σημαντικό είναι και το γεγονός ότι μπορεί να επιβιώνει για μεγάλα χρονικά διαστήματα σε υψηλότερες συγκεντρώσεις αλάτων, χωρίς όμως να αναπτύσσεται. Η μείωση της θερμοκρασίας ενισχύει τη βιωσιμότητα της *Listeria monocytogenes* σε περιβάλλοντα με υψηλή αλατότητα. Έτσι, τα αλλαντικά, όπως για παράδειγμα τα χοιρινό, τα λουκάνικα και το ζαμπόν, αποτελούν πολύ φιλόξενα περιβάλλοντα για την ανάπτυξη της *Listeria monocytogenes*.

## **Παθογένεια της *Listeria monocytogenes***

Η μολυσματική διαδικασία του μικροοργανισμού αρχίζει με τη μετάδοσή του στον άνθρωπο μέσω της στοματικής οδού, ακολουθούμενη από την διείσδυσή του στο έντερο. Τα βακτήρια στην συνέχεια εισάγονται στους μακροφάγους όπου και διπλασιάζονται. Στην συνέχεια μέσω της κυκλοφορίας του αίματος μεταφέρονται στους λεμφικούς αδένες και με το που φτάσουν στο σπ्लीν και τον σπλήνα, οι περισσότερες λιστέριες πεθαίνουν γρήγορα. Αυτές που θα επιβιώσουν ταξιδεύουν μέσω του αίματος προς τον εγκέφαλο προκαλώντας μηνιγγίτιδα ή τον πλακούντα προκαλώντας αποβολή (Montville & Matthews, 2010).

## **Μικροβιολογικά κριτήρια**

Τα μικροβιολογικά κριτήρια που έχουν θεσπιστεί για τη *Listeria monocytogenes*, όπως περιγράφονται στον κανονισμό αριθ. 2073/2005, επιβάλλουν πολιτική μηδενικής ανοχής για την παρουσία αυτού του βακτηρίου σε 25 γραμμάρια τροφίμου. Ωστόσο, υπάρχει μια εξαίρεση σε αυτόν τον αυστηρό κανόνα όταν πρόκειται για μη ωριμασμένα (μαλακά) τυριά που παράγονται από παστεριωμένο γάλα. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, το επιτρεπτό όριο για τη μόλυνση από *Listeria monocytogenes* ορίζεται σε  $10^2$  cfu/g

## **Ανθρώπινη λιστερίωση – Χαρακτηριστικά της ασθένειας**

Η ανθρώπινη λιστερίωση είναι μια σοβαρή μολυσματική ασθένεια που προκαλείται από το βακτήριο *Listeria monocytogenes*. Το βακτήριο αυτό βρίσκεται σε διάφορα περιβάλλοντα, όπως το έδαφος, το νερό, το περιβάλλον επεξεργασίας τροφίμων και έτσι δύναται να μολύνει εύκολα τα τρόφιμα. Επιπλέον, μπορεί να εισέλθει στα εργοστάσια επεξεργασίας τροφίμων και μέσω ανθρώπινων φορέων. Συγκεκριμένα, έχει δυνατότητα να προσκολληθεί στην ενδυμασία, τα παπούτσια και τα χέρια των εργατών που χειρίζονται τον εξοπλισμό, αλλά και μέσω των οχημάτων που μεταφέρουν προϊόντα εντός του εργοστασίου. Προσκολλάται σε επιφάνειες όπως το λάστιχο, το γυαλί και το ανοξείδωτο ατσάλι, παραμένοντας εκεί για μεγάλο χρονικό διάστημα σχηματίζοντας ανθεκτικά βιοφίλμ. Η λιστερίωση προσβάλλει κυρίως άτομα με εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα, όπως οι ηλικιωμένοι, οι εγκυμονούσες γυναίκες, τα νεογέννητα και τα άτομα σε ανασοκαταστολή ή ιδιαίτερα ευαίσθητα (Westrell, et al., 2009).

Η παρουσία του μικροβίου στα τρόφιμα αποτελεί σημαντικό πρόβλημα στην περίπτωση που η σύσταση τους μπορεί να υποστηρίξει την ανάπτυξη του. Τα έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα όπως τα μαλακά τυριά, τα λουκάνικα Φρανκφούρτης, αλλαντικά «delicatessen» και προϊόντα πουλερικών είναι η πιο σημαντική πηγή σποραδικών περιστατικών λιστερίωσης σε ανθρώπους, λόγω της ικανότητά της

*Listeria monocytogenes* να ευδοκιμεί και να πολλαπλασιάζεται ακόμη και σε χαμηλές θερμοκρασίες ψυγείου. Εκτός από τα έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα, τα γαλακτοκομικά προϊόντα, θεωρούνται επίσης επικίνδυνα στην μετάδοση του παθογόνου (Montville & Matthews, 2010).

Η πλειονότητα των ανθρώπινων κρουσμάτων λιστερίωσης φαίνεται να εμφανίζεται τυχαία και μεμονωμένα. Ωστόσο, αναγνωρίζεται ότι ορισμένο ποσοστό των κρουσμάτων θα μπορούσε να αποδοθεί σε μια κοινή προέλευση όπως για παράδειγμα, μολυσμένα τρόφιμα. Αν και τα τρόφιμα είναι αυτά που ενοχοποιούνται σε μερικά περιστατικά, ο τρόπος που γίνεται η μόλυνση στις περισσότερες περιπτώσεις παραμένει άγνωστος. Πολλά περιστατικά δεν συνδέονται με τρόφιμα διότι είναι πολύ δύσκολο να μελετηθούν. Πολυάριθμα κρούσματα δεν συνδέονται με πηγές τροφίμων λόγω της πολυπλοκότητας της μελέτης τους. Συχνά, ο ακριβής προσδιορισμός του διατροφικού ιστορικού των προσβεβλημένων ατόμων και ο έλεγχος των ύποπτων τροφίμων καθίσταται ιδιαίτερα δύσκολος, επειδή η *Listeria monocytogenes* έχει σχετικά μεγάλη περίοδο επώασης εντός του οργανισμού, η οποία διαρκεί έως και 5 εβδομάδες (Montville & Matthews, 2010).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙ – ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## 2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 2.1 Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας είναι η διερεύνηση της αντιμικροβιακής δράσης που παρουσιάζουν τα συστατικά του ελληνικού χαρουπιού έναντι ορισμένων παθογόνων μικροοργανισμών. Για να επιτευχθεί αυτό διεξήχθησαν δύο διαδικασίες εκχύλισης με διαβροχή, οι οποίες απέδωσαν εκχυλίσματα από τέσσερα διαφορετικά τμήματα χαρουπιού και από πράσινους λοβούς, οι οποίοι συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια τριών διαφορετικών περιόδων ωρίμανσης (Μάιος 2022, Ιούνιος 2022, Μάρτιος 2023). Για τη διερεύνηση της αντιμικροβιακής τους δράσης έναντι ευρέως απαντώμενων τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών, ιδίως στελεχών *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Typhimurium* και *Listeria monocytogenes*, χρησιμοποιείται η αυτοματοποιημένη θολομετρική μέθοδος Bioscreen.

### 2.2 Υλικά και Μεθοδολογία

#### 2.2.1 Υλικά και εξοπλισμός

Τα μηχανήματα και ο εργαστηριακός εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή της παρούσας εργασίας περιλαμβάνουν:

ΜΗΧΑΝΗΜΑΤΑ & ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ	
Δοκιμαστικοί σωλήνες καλλιέργειας	Λύχνος Bunsen
Ηλεκτρόδιο pH (pH-Meter GLP 21)	Αναλυτικός Ζυγός (KERN-EW)
Εργαστηριακό γυάλινο θερμόμετρο	Περιστροφικός Μύλος (BRABENDER)
Vortex (Scientific Industries)	Εμπορικό μπλέντερ (WARING)
Μαγνητικός θερμαντήρας ανάδευσης	Γυάλινη ράβδος ανάδευσης
Πιπέτα (Accumax PRO)	Εργαστηριακό διηθητικό χαρτί
Ρύγχη Πιπέτας (Tips)	Χωνί
Σωλήνας φυγοκέντρισης erpendorf	Bioscreen C
Μπουκάλια με φαρδύ λαιμό και βιδωτό καπάκι, 250ml	Κλίβανός (memmert)
Ποτήρια ζέσεως, 100 ml	Υδατόλουτρο (memmert)
Ποτήρια ζέσεως, 250 ml	Συσκευή φυγοκέντρισης Heraeus Biofuge Pico
Μπουκάλια αποστειρώσιμα με βιδωτό πώμα	

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα υλικά:

1. Στελέχη μικροοργανισμών
  - a) *Escherichia coli*
  - b) *Staphylococcus aureus*
  - c) *Salmonella Typhimurium*
  - d) *Listeria monocytogenes*
2. Αιθανόλη
3. Απιονισμένο νερό

4. Διάλυμα καυστικού νατρίου, 1N
5. Τμήματα χαρούπιας
  - a) Ωριμοί λοβοί (Pods)
  - b) Άγουροι (πράσινοι) λοβοί (Green pods)
  - c) Σπόροι από ώριμους λοβούς (Seeds)
  - d) Φύλλα χαρουπιάς (Leaves)
6. Brain Heart Infusion Agar (pronadisa, CONDA)

### 2.2.2 Μέθοδος εκχύλισης χαρουπιού

Η παρούσα έρευνα επιλέγει να επικεντρωθεί κυρίως στην εκχύλιση με διαβροχή ως ενδεικτικό πρωτότυπο των συμβατικών μεθοδολογιών. Ειδικότερα, παρακάμπτεται η χρήση επικίνδυνων οργανικών διαλυτών, προτιμώντας το νερό και την αιθανόλη. Η επιλογή του νερού απορρέει από την εγγενή πολικότητά του, η οποία αυξάνει την εκχύλιση των πολυφαινολικών ενώσεων, σε συνδυασμό με την οικονομική και οικολογικά ευνοϊκή φύση του ως μέσο διαλύτη. Η αιθανόλη, η οποία διακρίνεται από την αβλαβή φύση της ως βιοδιαλύτης, ενσωματώνεται σταθερά σε υδατικά διαλύματα και μάλιστα σε μέτριες συγκεντρώσεις 10%. Αυτή η σκόπιμη προσέγγιση αξιοποιεί συνεργιστικά τις εγγενείς ιδιότητες διαλύτη του νερού.

### 2.2.3 Προετοιμασία πρώτης ύλης

Το αρχικό πείραμα (Εκχύλιση Α) περιελάμβανε την εξέταση τεσσάρων διαφορετικών τμημάτων χαρουπιού τα οποία συλλεχτήκαν από το Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής :

#### Ωριμοί λοβοί (Pods)

Τον Σεπτέμβριο του 2022, συλλέχθηκαν οι πλήρεις ώριμοι λοβοί και, στη συνέχεια, τα δείγματα πλύθηκαν σχολαστικά για να εξαλειφθούν τυχόν προσμίξεις. Στη συνέχεια, οι σπόροι διαχωρίστηκαν και τα υπόλοιπα κομμάτια ώριμων λοβών χωρίς σπόρους αλέστηκαν με τη χρήση εμπορικού μπλέντερ. Το προκύπτον αλεσμένο υλικό αποθηκεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου (25°C) σε σκιερό μέρος.

#### Σπόροι από ώριμους λοβούς (Seeds)

Οι απομονωμένοι σπόροι από τους ώριμους λοβούς επωάζονται στους 40°C για 24 ώρες σε επωαστήρα. Στη συνέχεια, υποβάλλονται σε πρόσθετη ξήρανση σε ξηραντήριο στην ίδια θερμοκρασία για 1 ώρα. Στη συνέχεια, οι σπόροι αλέθονται αρχικά με τη χρήση εμπορικού μπλέντερ και, στη συνέχεια, υποβάλλονται σε περαιτέρω άλεση σε περιστροφικό μύλο για να αποκτήσουν την τελική μορφή αλεύρου. Τέλος, οι επεξεργασμένοι σπόροι αποθηκεύονται σε σκιερό χώρο σε θερμοκρασία δωματίου (25°C).

#### Ανώριμοι λοβοί (Green Pods)

Μετά τη συγκομιδή τους τον Μάιο του 2022, οι ανώριμοι λοβοί καταψύχθηκαν για συντήρηση μέχρι να είναι έτοιμα για χρήση. Κατά την διεκπεραίωση του πειράματος, αφού αποψυχθούν τεμαχίζονται σε λεπτά κομμάτια, με τα μικρότερα κομμάτια να αποδίδουν μεγαλύτερη ποσότητα εκχυλισμένου υλικού. Η αυξημένη επιφάνεια στα μικρότερα κομμάτια επέτρεψε καλύτερη επαφή μεταξύ του διαλύτη και των δραστικών συστατικών που υπάρχουν στους λοβούς.

### Φύλλα χαρουπιάς (Leaves)

Μετά τη συγκομιδή τους τον Δεκέμβριο του 2022, τα φύλλα χαρουπιού υποβάλλονται σε σχολαστικό πλύσιμο για την απομάκρυνση τυχόν ακαθαρσιών. Στη συνέχεια, τα φύλλα κόβονται σε λεπτά κομμάτια, με τα μικρότερα κομμάτια να αποδίδουν μεγαλύτερη ποσότητα εκχυλισμένου υλικού. Το αποτέλεσμα αυτό μπορεί να αποδοθεί στην αυξημένη επιφάνεια των μικρότερων κομματιών, η οποία διευκολύνει τη επαφή μεταξύ του διαλύτη και των ενεργών συστατικών μέσα στα φύλλα. Η πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει την άμεση χρήση αυτών των τεμαχισμένων τμημάτων.

Το δεύτερο πείραμα (Εκχύλιση Β) επικεντρώθηκε αποκλειστικά στους πράσινους λοβούς, οι οποίοι συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια τριών διαφορετικών σταδίων ωρίμανσης (Μάιος 2022, Ιούνιος 2022, Μάρτιος 2023) από το Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής. Μετά τη συγκομιδή, οι ανώριμοι λοβοί καταψύχθηκαν για συντήρηση μέχρι να χρειαστούν για το πείραμα. Κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, αυτοί οι ανώριμοι λοβοί τεμαχίστηκαν σε λεπτά κομμάτια και χρησιμοποιήθηκαν άμεσα, με τα μικρότερα κομμάτια να οδηγούν σε μεγαλύτερη ποσότητα εξαγόμενου υλικού.

#### 2.2.4 Πορεία εκχύλισης

**Τον Δεκέμβριο του 2022, η διαδικασία εκχύλισης (Εκχύλιση Α) πραγματοποιήθηκε με διαβροχή, χρησιμοποιώντας νερό ως διαλύτη και διατηρώντας την αναλογία υγρού προς στερεό 10:1**

Η μελέτη περιλαμβάνει την εκχύλιση και των τεσσάρων μερών του χαρουπιού, δηλαδή των ώριμων λοβών χωρίς σπόρους, των σπόρων ώριμων λοβών, ολόκληρων ανώριμων λοβών και των φύλλων χαρουπιού, αφού ακολουθηθούν τα προαναφερθέντα στάδια επεξεργασίας της υποενότητας 2.2.3. Λαμβάνονται 20g από κάθε δείγμα και ακολούθως προστίθενται 200ml απιονισμένου νερού στο κάθε ένα. Στην συνέχεια τα διαλύματα αυτά παραμένουν σε ηρεμία, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (25 °C) και σε σκιερό μέρος για 7 ημέρες ώστε να επιτευχθεί η διεξαγωγή εκχύλισης. Με το πέρας αυτής της περιόδου, τα δείγματα υποβάλλονται σε διήθηση, όπου συγκρατείται το υπερκείμενο ως το εκχύλισμα που θα μελετηθεί, ενώ το υπόλειμμα στο αντίστοιχο διηθητικό χαρτί απορρίπτεται ως απόβλητο. Ακολουθεί μέτρηση του βάρους των εκχυλισμάτων με ακρίβεια και εν συνεχεία γίνεται μέτρηση και καταγραφή του pH τους με χρήση κατάλληλου ηλεκτροδίου. Επιπλέον, εφαρμόζεται ένα στάδιο ήπιας παστερίωσης για να εξασφαλιστεί η αδρανοποίηση όλων των παθογόνων και των περισσότερων μη παθογόνων μικροοργανισμών που ενδέχεται να υπάρχουν στα εκχυλίσματα. Εν τέλει, η αποθήκευση των εκχυλισμάτων πραγματοποιείται σε θερμοκρασία ψύξης, 4 °C μέχρις ότου χρησιμοποιηθούν για μελέτη.

**Τον Δεκέμβριο του 2022, η διαδικασία εκχύλισης (Εκχύλιση Α) πραγματοποιήθηκε με διαβροχή, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη μίγμα αιθανόλης : νερού σε αναλογία 10:90 και διατηρώντας την αναλογία υγρού προς στερεό 10:1**

Η μελέτη περιλαμβάνει την εκχύλιση και των τεσσάρων μερών του χαρουπιού, δηλαδή των ώριμων λοβών χωρίς σπόρους, των σπόρων ώριμων λοβών, ολόκληρων ανώριμων λοβών και των φύλλων χαρουπιού, αφού ακολουθηθούν τα προαναφερθέντα στάδια επεξεργασίας της υποενότητας 2.2.3. Λαμβάνονται 20g από κάθε δείγμα και



ακολουθώς προστίθενται 200ml διαλύματος αλκοόλης : απιονισμένου νερού σε αναλογία 10:90 σε κάθε ένα από τα δείγματα. Στην συνέχεια τα διαλύματα αυτά παραμένουν σε ηρεμία, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (25 °C) και σε σκιερό μέρος για 7 ημέρες ώστε να επιτευχθεί η διεξαγωγή εκχύλισης. Με το πέρας αυτής της περιόδου, τα δείγματα υποβάλλονται σε διήθηση, όπου συγκρατείται το υπερκείμενο ως το εκχύλισμα που θα μελετηθεί, ενώ το υπόλειμμα στο αντίστοιχο διηθητικό χαρτί απορρίπτεται ως απόβλητο. Ακολουθεί μέτρηση του βάρους των εκχυλισμάτων με ακρίβεια και εν συνεχεία γίνεται μέτρηση και καταγραφή του pH τους με χρήση κατάλληλου ηλεκτρόδιου. Επιπλέον, εφαρμόζεται ένα στάδιο ήπιας παστερίωσης για να εξασφαλιστεί η αδρανοποίηση όλων των παθογόνων και των περισσότερων μη παθογόνων μικροοργανισμών που ενδέχεται να υπάρχουν στα εκχυλίσματα. Εν τέλει, η αποθήκευση των εκχυλισμάτων πραγματοποιείται σε θερμοκρασία ψύξης, 4 °C μέχρις ότου χρησιμοποιηθούν για μελέτη.



Εικόνα 1: Εκχυλίσματα από σπόρους ώριμων λοβών , ώριμους λοβούς χωρίς σπόρια, ολόκληρους ανώριμους λοβούς και φύλλα χαρουπιάς που λαμβάνονται κατά την εκχύλιση A, η οποία πραγματοποιήθηκε τον Δεκέμβριο του 2022



Εικόνα 2: Υπερκείμενα που λαμβάνονται μετά τη διήθηση εκχυλισμάτων από σπόρους ώριμων λοβών, ώριμους λοβούς χωρίς σπόρια, ολόκληρους ανώριμους λοβούς και φύλλα χαρουπιάς.

**Τον Μάρτιο του 2023, η διαδικασία εκχύλισης (Εκχύλιση Β) πραγματοποιήθηκε με διαβροχή, χρησιμοποιώντας νερό ως διαλύτη και διατηρώντας την αναλογία υγρού προς στερεό 10:1**

Η μελέτη περιλαμβάνει την εξέταση της εκχύλισης των ανώριμων λοβών, για τρεις διαφορετικές περιόδους ωρίμανσης (Μάιο 2022, Ιούνιο 2022, Μάρτιο 2023), αφού ακολουθηθούν τα προαναφερθέντα στάδια επεξεργασίας της ενότητας 4.2.3. Λαμβάνονται 20g από κάθε δείγμα και προστίθενται 200ml απιονισμένου νερού στο

κάθε ένα. Στην συνέχεια τα διαλύματα αυτά παραμένουν σε ηρεμία, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (25 °C) και σε σκιερό μέρος για 7 ημέρες ώστε να επιτευχθεί η διεξαγωγή εκχύλισης. Με το πέρας αυτής της περιόδου, τα δείγματα υποβάλλονται σε διήθηση, όπου συγκρατείται το υπερκείμενο ως το εκχύλισμα που θα μελετηθεί, ενώ το υπόλειμμα στο αντίστοιχο διηθητικό χαρτί απορρίπτεται ως απόβλητο. Ακολουθεί μέτρηση του βάρους των εκχυλισμάτων με ακρίβεια και εν συνεχεία γίνεται μέτρηση και καταγραφή του pH τους με χρήση κατάλληλου ηλεκτρόδιου. Επιπλέον, εφαρμόζεται ένα στάδιο ήπιας παστερίωσης για να εξασφαλιστεί η αδρανοποίηση όλων των παθογόνων και των περισσότερων μη παθογόνων μικροοργανισμών που ενδέχεται να υπάρχουν στα εκχυλίσματα. Εν τέλει, η αποθήκευση των εκχυλισμάτων πραγματοποιείται σε θερμοκρασία ψύξης, 4 °C μέχρις ότου χρησιμοποιηθούν για μελέτη.

**Τον Μάρτιο του 2023, η διαδικασία εκχύλισης (Εκχύλιση Β) πραγματοποιήθηκε με διαβροχή, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη μίγμα αιθανόλης : νερού σε αναλογία 10:90 και διατηρώντας την αναλογία υγρού προς στερεό 10:1**

Η μελέτη περιλαμβάνει την εξέταση της εκχύλισης των ανώριμων λοβών, για τρεις διαφορετικές περιόδους ωρίμανσης (Μάιο 2022, Ιούνιο 2022, Μάρτιο 2023), αφού ακολουθηθούν τα προαναφερθέντα στάδια επεξεργασίας της ενότητας 4.2.3. Λαμβάνονται 20g από κάθε δείγμα και προστίθενται 200ml διαλύματος αλκοόλης : απιονισμένου νερού σε αναλογία 10:90 στο κάθε ένα. Στην συνέχεια τα διαλύματα αυτά παραμένουν σε ηρεμία, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (25 °C) και σε σκιερό μέρος για 7 ημέρες ώστε να επιτευχθεί η διεξαγωγή εκχύλισης. Με το πέρας αυτής της περιόδου, τα δείγματα υποβάλλονται σε διήθηση, όπου συγκρατείται το υπερκείμενο ως το εκχύλισμα που θα μελετηθεί, ενώ το υπόλειμμα στο αντίστοιχο διηθητικό χαρτί απορρίπτεται ως απόβλητο. Ακολουθεί μέτρηση του βάρους των εκχυλισμάτων με ακρίβεια και εν συνεχεία γίνεται μέτρηση και καταγραφή του pH τους με χρήση κατάλληλου ηλεκτρόδιου. Επιπλέον, εφαρμόζεται ένα στάδιο ήπιας παστερίωσης για να εξασφαλιστεί η αδρανοποίηση όλων των παθογόνων και των περισσότερων μη παθογόνων μικροοργανισμών που ενδέχεται να υπάρχουν στα εκχυλίσματα. Εν τέλει, η αποθήκευση των εκχυλισμάτων πραγματοποιείται σε θερμοκρασία ψύξης, 4 °C μέχρις ότου χρησιμοποιηθούν για μελέτη.



Εικόνα 3: Εκχυλίσματα από ολόκληρους ανώριμους λοβούς οι οποίοι συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια τριών διαφορετικών περιόδων ωρίμανσης (Μάιος 2022, Ιούνιος 2022, Μάρτιος 2023). Τα εκχυλίσματα λαμβάνονται κατά την εκχύλιση Β, η οποία πραγματοποιήθηκε τον Μάρτιο του 2023



Εικόνα 4: Υπερκείμενα που λαμβάνονται μετά τη διήθηση εκχυλισμάτων από ολόκληρους ανώριμους λοβούς οι οποίοι συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια τριών διαφορετικών περιόδων ωρίμανσης (Μάιος 2022, Ιούνιος 2022, Μάρτιος 2023).

### 2.2.5 Παστερίωση

Για να εξασφαλιστεί η αδρανοποίηση όλων των παθογόνων και των περισσότερων μη παθογόνων μικροοργανισμών που ενδεχόμενος περιέχονται μέσα στα εκχυλίσματα που λαμβάνονται από την εκχύλιση Α και Β, διεξάχθηκε ήπια παστερίωση στους 65 °C για 5 λεπτά. Επιπλέον αυτό το προληπτικό βήμα έγινε ώστε να αποφευχθεί η οποιαδήποτε αλλαγή στα αποτελέσματα των αντιμικροβιακών δοκιμών. Κατά τη διαδικασία παστερίωσης χρησιμοποιήθηκε χειροποίητο υδατόλουτρο εξοπλισμένο με θερμαντικό μανδύα. Επιπλέον, η θερμοκρασία των εκχυλισμάτων παρακολουθούνταν με τη χρήση ηλεκτροδίου θερμοκρασίας καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας. Πιο αναλυτικά, τα εκχυλίσματα από τις εκχυλίσεις Α και Β συγκεντρώθηκαν σε δοχείο γεμάτο με απιονισμένο νερό και τοποθετήθηκαν σε θερμαντικό μανδύα. Επιπλέον, στο κέντρο των εκχυλισμάτων τοποθετήθηκε μια φιάλη με φαρδύ λαιμό και ανοιχτό καπάκι, η οποία περιείχε ίση ποσότητα απιονισμένου νερού με αυτή που υπήρχε στις άλλες φιάλες που περιείχαν τα εκχυλίσματα. Ταυτόχρονα, η θερμοκρασία του νερού παρακολουθείται σταθερά με τη χρήση ενός ηλεκτροδίου μέχρι να φτάσει τους 65°C. Μόλις η θερμοκρασία του νερού φθάσει στο στόχο των 65°C, ξεκινά μια αντίστροφη μέτρηση 5 λεπτών για να πραγματοποιηθεί η παστερίωση των εκχυλισμάτων.



Εικόνα 5: Βυθισμένα μέσα σε απιονισμένο νερό, τα εκχυλίσματα και η κεντρική φιάλη παρακολούθησης της θερμοκρασίας για την πραγματοποίηση της διαδικασίας παστερίωσης.





Εικόνα 6: Υπερκείμενα σπόρων ώριμων λοβών, ώριμων λοβών χωρίς σπόρους, ολόκληρων ανώριμων λοβών και φύλλων χαρουπιού μετά τη διαδικασία παστερίωσης.



Εικόνα 7: Υπερκείμενα ολόκληρους ανώριμους λοβούς οι οποίοι συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια τριών διαφορετικών περιόδων ωρίμανσης (Μάιος 2022, Ιούνιος 2022, Μάρτιος 2023), μετά τη διαδικασία παστερίωσης.

## 2.2.6 Παρασκευή θρεπτικού υποστρώματος- Brain Heart Infusion Broth

Συγκεντρώνονται όλα τα υλικά όπως ένας ογκομετρικός σωλήνας 500mL, ένα δοχείο (κατσαρολάκι), υπόστρωμα BHI broth, αλουμινόχαρτο, ύαλο, αποστειρωτική ταινία και φιάλες με βιδωτό καπάκι. Ζυγίζεται προσεκτικά η απαιτούμενη ποσότητα ζωμού BHI, με βάση τις προδιαγραφές που αναγράφονται στην συσκευασία. Συγκεκριμένα αναγράφεται 37g/L. Στην συνέχεια ο ζωμός BHI διαλύεται σε 500mL απιονισμένου νερού μέσω μιας διαδικασίας θέρμανσης και συνεχούς ανάδευσης έως ότου το διάλυμα αποκτήσει διαυγές χρώμα. Η συνεχής ανάδευση διεξάγεται ώστε να αποφευχθεί η τυχόν συσσωμάτωση των υλικών στον πυθμένα και να μην καούν τα θρεπτικά συστατικά. Μετέπειτα γίνεται έλεγχος της τιμής του pH με στόχο ένα εύρος μεταξύ 6,8 και 7. Ακολούθως το διαλυμένο μείγμα διανέμεται σε φιάλες αποστείρωσης των 250 ml ή δοκιμαστικούς σωλήνες και το θρεπτικό υπόστρωμα αποστειρώνεται σε φούρνο ατμού στους 121 °C σε 1,2 atm για 15 λεπτά. Λόγω του κινδύνου αφυδάτωσης, τα θρεπτικά υποστρώματα πρέπει να αποθηκεύονται σε κατάλληλους ψυχόμενους χώρους για τον ελάχιστο απαραίτητο χρόνο.

## 2.2.7 Ανακαλλιέργεια και δεκαδική αραιώση των μικροοργανισμών

Πριν από την εκτέλεση οποιασδήποτε δοκιμής, οι μικροοργανισμοί υποβάλλονται σε ανακαλλιέργεια μία ημέρα πριν από την πραγματοποίηση των πειραμάτων. Πρόκειται για το στάδιο εκείνο το οποίο μεσολαβεί πριν από τον ενοφθαλμισμό των μικροοργανισμών σε θρεπτικό υπόστρωμα, επιτρέποντάς τους να ανακτήσουν τη ζωτικότητα τους και να καταστούν άμεσα έτοιμοι για ανάπτυξη. Ταυτόχρονα, η κρίσιμη

αυτή διαδικασία διασφαλίζει ότι οι μικροοργανισμοί βρίσκονται στη λογαριθμική τους φάση, εξασφαλίζοντας ότι τα αποτελέσματα που λαμβάνονται από τις μεθόδους αντικατοπτρίζουν με ακρίβεια τη δραστικότητα των εκχυλισμάτων. Για να πραγματοποιηθεί αυτή η διαδικασία, η αρχική καλλιέργεια του μικροοργανισμού πρέπει να ανακινηθεί σε vortex. Στην συνέχεια με χρήση πιπέτας, μεταφέρονται 0,1ml από την καλλιέργεια του εκάστοτε μικροοργανισμού σε δοκιμαστικούς σωλήνες καλλιέργειας με πώμα, οι οποίοι περιέχουν Brain Heart Infusion Broth. Το επόμενο βήμα περιλαμβάνει την επώαση των σωληναρίων στους 37°C για 24 ώρες σε επωαστήρα. Πριν από τον εμβολιασμό των μικροοργανισμών σε μια πλάκα Bioscreen, οι μικροοργανισμοί υποβάλλονται σε αραιώση για να επιτευχθεί μια ελαφρώς χαμηλότερη αρχική συγκέντρωση καλλιέργειας. Αυτό περιλαμβάνει την διοχέτευση με σιφόνιο 0,1 mL από την ανακαλλιέργεια κάθε μικροοργανισμού, η οποία είχε παρασκευαστεί την προηγούμενη ημέρα, σε 9 mL αραιωτικού Brain Heart Infusion Broth.

### 2.2.8 Προετοιμασία δειγμάτων

Προτού υποβληθούν τα εκχυλίσματα των τμημάτων χαρουπιού σε αντιμικροβιακές δοκιμές, ένα κρίσιμο βήμα περιλαμβάνει τη φυγοκέντρωση για τον διαχωρισμό των στερεών σωματιδίων ή υπολειμμάτων από το υγρό υπερκείμενο. Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει την ταχεία περιστροφή των δειγμάτων, με αποτέλεσμα τα πυκνότερα σωματίδια να καθιζάνουν στον πυθμένα και να σχηματίζουν ένα σφαιρίδιο, ενώ το υγρό τμήμα (υπερκείμενο) παραμένει στην κορυφή. Το στάδιο της φυγοκέντρωσης διασφαλίζει ότι η αξιολόγηση της αντιμικροβιακής δράσης επικεντρώνεται αποκλειστικά στο υγρό συστατικό, όπου υπάρχουν οι διαλυτές βιοδραστικές ενώσεις και είναι σημαντικές για την ανάλυση. Με την εξάλειψη των στερεών σωματιδίων, η διαδικασία αυτή ενισχύει τη σαφήνεια και την αξιοπιστία της αξιολόγησης του αντιμικροβιακού δυναμικού των εκχυλισμάτων χαρουπιού. Για τη διαδικασία φυγοκέντρωσης, 2 mL των εκχυλισμάτων μεταφέρονται προσεκτικά σε σωληνάρια φυγοκέντρου erpendorf και τοποθετούνται στη φυγόκεντρο Heraeus Biofuge Pico. Στη συνέχεια, η συσκευή ρυθμίζεται στη μέγιστη ταχύτητα των 6.000 στροφών ανά λεπτό (rpm) και η φυγοκέντρωση πραγματοποιείται για διάρκεια 7 λεπτών. Μετά τη φυγοκέντρωση, το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέα σωληνάρια φυγοκέντρου erpendorf.

### 2.2.9 Μέθοδος ανίχνευσης αντιμικροβιακής ικανότητας – Μέτρηση με Bioscreen

Για την μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης εκχυλισμάτων χαρουπιού χρησιμοποιήθηκε η τεχνική *Bioscreen C*. Η τεχνική του *Bioscreen*, επιλέχθηκε ως ένα αυτοματοποιημένο και ταχύ σύστημα θολομέτρησης, το οποίο επιτρέπει συνεχή παρακολούθηση της βακτηριακής ανάπτυξης παρουσία αντιμικροβιακών παραγόντων. Η πορεία που ακολουθείται για την ετοιμασία της πλακέτας μικροαραιώσης του *Bioscreen C* περιγράφεται ακολούθως.

Η τεχνική αυτή εφαρμόστηκε και για τις δύο εκχύλισης (A και B) που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Στην περίπτωση της εκχύλισης A, τα 100 φρεάτια του micro-plate, αξιοποιήθηκαν για την μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης των εκχυλισμάτων τεσσάρων τμημάτων χαρουπιού ( σπόροι, ώριμοι λοβοί, άγουροι-

πράσινοι λοβοί, φύλλα) ενάντια στους μικροοργανισμούς *Escherichia coli* και *Staphylococcus aureus* ενώ στην εκχύλιση Β αξιοποιήθηκαν για την μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης των εκχυλισμάτων άγουρων-πράσινων λοβών για διάφορα στάδια ωρίμανσης (Μάιο 2022, Ιούνιο 2022, Μάρτιο 2023) ενάντια στους μικροοργανισμούς *Escherichia coli* και *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Typhimurium* και *Listeria monocytogenes*. Δεδομένου ότι το ανώτατο όριο για τη διανομή όγκου υγρού ανά φρεάτιο στη διαμόρφωση της πλάκας είναι 400  $\mu\text{L}$ , λήφθηκε ένα προληπτικό μέτρο κατά το οποίο κάθε φρεάτιο γέμισε με μειωμένη ποσότητα 350  $\mu\text{L}$  για να μετριαστεί η πιθανότητα υπερχειλίσης του υγρού. Επισημαίνεται ότι στην εκχύλιση Α, για κάθε συνδυασμό: α) εκχυλίσματος – Broth – μικροοργανισμού, χρησιμοποιήθηκαν 3 φρεάτια, β) διαλύτη  $\text{H}_2\text{O}/\text{Ethanol}$  90:10 – Broth – μικροοργανισμού (Control 2), χρησιμοποιήθηκαν 5 φρεάτια και γ) Broth – μικροοργανισμού (Control 1), χρησιμοποιήθηκαν 5 φρεάτια επίσης. Στην εκχύλιση Β, για κάθε συνδυασμό: α) εκχυλίσματος – Broth – μικροοργανισμού, χρησιμοποιήθηκαν 3 φρεάτια, β) διαλύτη  $\text{H}_2\text{O}/\text{Ethanol}$  90:10 – Broth – μικροοργανισμού (Control 2), χρησιμοποιήθηκαν 3 φρεάτια και γ) Broth – μικροοργανισμού (Control 1), χρησιμοποιήθηκαν 3 φρεάτια επίσης. Πιο αναλυτικά οι περιεχόμενες ποσότητες οι οποίες εμβολιάστηκαν στα φρεάτια των δύο μεθόδων εκχύλισης φαίνονται αναλυτικά στους πιο κάτω πίνακες.

Πίνακας 4 Τα τέσσερα τμήματα χαρουπιάς που εκχυλίστηκαν με νερό και μίγμα νερού:αιθανόλης 90:10 κατά την εκχύλιση Α, συνοδευόμενα από το αντίστοιχο δείγμα ελέγχου ή "μάρτυρα". Επιπλέον, παρέχεται μια εκτενέστερη περιγραφή σχετικά με τις ακριβείς ποσότητες των δειγμάτων που εμβολιάστηκαν στις κυψελίδες του Bioscreen

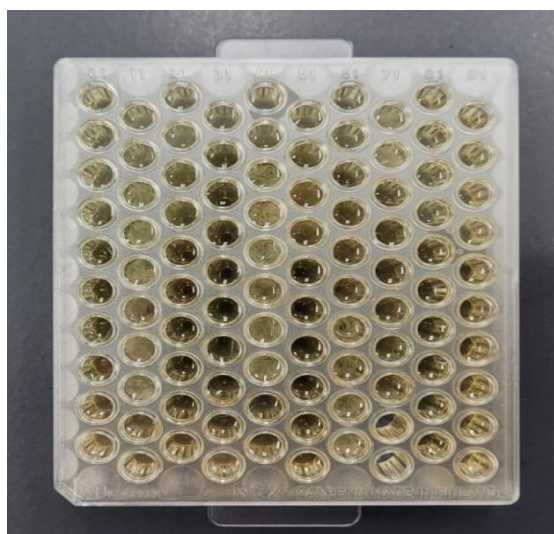
<b>ΕΚΧΥΛΙΣΗ Α</b>		
<b>ΕΚΧΥΛΙΣΗ</b>	<b>ΤΜΗΜΑ ΧΑΡΟΥΠΙΟΥ</b>	<b>ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ</b>
Water extraction	Seeds September 2022 (114a)	Seeds (a) 50 $\mu\text{L}$ + Bacterium 50 $\mu\text{L}$ + BHI Broth 250 $\mu\text{L}$
	Pods September 2022 (116a)	Pods (a) 50 $\mu\text{L}$ + Bacterium 50 $\mu\text{L}$ + BHI Broth 250 $\mu\text{L}$
	Green pods May 2022 (118a)	Green Pods (a) 50 $\mu\text{L}$ + Bacterium 50 $\mu\text{L}$ + BHI Broth 250 $\mu\text{L}$
	Leaves December 2022 (119a)	Leaves (a) 50 $\mu\text{L}$ + Bacterium 50 $\mu\text{L}$ + BHI Broth 250 $\mu\text{L}$
	Bacterium Control 1 (Broth)	Bacterium 50 $\mu\text{L}$ + BHI Broth 300 $\mu\text{L}$
Water/Ethanol 90:10 extraction	Seeds September 2022 (114b)	Seeds (b) 50 $\mu\text{L}$ + Bacterium 50 $\mu\text{L}$ + BHI Broth 250 $\mu\text{L}$
	Pods September 2022 (116b)	Pods (b) 50 $\mu\text{L}$ + Bacterium 50 $\mu\text{L}$ + BHI Broth 250 $\mu\text{L}$
	Green pods May 2022 (118b)	Green Pods (b) 50 $\mu\text{L}$ + Bacterium 50 $\mu\text{L}$ + BHI Broth 250 $\mu\text{L}$
	Leaves December 2022 (119b)	Leaves (b) 50 $\mu\text{L}$ + Bacterium 50 $\mu\text{L}$ + BHI Broth 250 $\mu\text{L}$
	Bacterium Control 2 (Water/Ethanol - 90:10)	Bacterium 50 $\mu\text{L}$ + BHI Broth 250 $\mu\text{L}$ + 50 $\mu\text{L}$ $\text{H}_2\text{O}/\text{ethanol}$ (90:10)



Πίνακας 5 Τα τέσσερα τμήματα χαρουπιάς που εκχυλίστηκαν με νερό και μίγμα νερού:αιθανόλης 90:10 κατά την εκχύλιση B, συνοδευόμενα από το αντίστοιχο δείγμα ελέγχου ή "μάρτυρα". Επιπλέον, παρέχεται μια εκτενέστερη περιγραφή σχετικά με τις ακριβείς ποσότητες των δειγμάτων που εμβολιάστηκαν στις κυψελίδες του Bioscreen

ΕΚΧΥΛΙΣΗ Β		
ΕΚΧΥΛΙΣΗ	ΤΜΗΜΑ ΧΑΡΟΥΠΙΟΥ	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ
Water extraction	Green pods May 2022 (118a)	Green pods (a) 50 μL + Bacterium 50 μL + BHI Broth 250 μL
	Green pods June 2022 (120a)	Green pods (a) 50 μL + Bacterium 50 μL + BHI Broth 250 μL
	Green pods March 2023 (121a)	Green pods (a) 50 μL + Bacterium 50 μL + BHI Broth 250 μL
	Bacterium Control 1 (Broth)	Bacterium 50 μL + BHI Broth 300 μL
Water/Ethanol 90:10 extraction	Green pods May 2022 (118b)	Green pods (b) 50 μL + Bacterium 50 μL + BHI Broth 250 μL
	Green pods June 2022 (120b)	Green pods (b) 50 μL + Bacterium 50 μL + BHI Broth 250 μL
	Green pods March 2023 (121b)	Green pods (b) 50 μL + Bacterium 50 μL + BHI Broth 250 μL
	Bacterium Control 2 (Water/Ethanol - 90:10)	Bacterium 50 μL + BHI Broth 250 μL + 50 μL H <sub>2</sub> O/ethanol (90:10)

Μετά την ολοκλήρωση της επεξεργασίας της πλάκας, αυτή ενσωματώθηκε στη συσκευή Bioscreen, όπου ρυθμίστηκαν συγκεκριμένες παράμετροι. Συγκεκριμένα, καθιερώθηκε ένα καθεστώς θερμοκρασίας 37°C, ταυτόχρονα με μια χρονική έκταση που καλύπτει 48 ώρες, κατά τη διάρκεια των οποίων πραγματοποιήθηκε η μεθοδολογία. Αυτή η χρονική διάρκεια περιλάμβανε τη λήψη μετρήσεων οπτικής πυκνότητας ανά διαστήματα των 30 λεπτών. Ειδικότερα, η απόκτηση δεδομένων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση φίλτρου σε μήκος κύματος 600nm.



Εικόνα 8 Πλακέτα μικροαρέωσης Bioscreen κατά την εκχύλιση A



Εικόνα 9 Πλακέτα μικροαρέωσης Bioscreen κατά την εκχύλιση B



Η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας ( $OD_{600}$ ) στα 600 nm, είναι ο ευκολότερος τρόπος για τη μέτρηση του σταδίου ανάπτυξης της βακτηριακής καλλιέργειας. Η οπτική πυκνότητα μετρά τον βαθμό σκέδασης του φωτός που προκαλούν τα βακτήρια σε μια καλλιέργεια. Συγκεκριμένα, όσο περισσότερα βακτήρια υπάρχουν, τόσο περισσότερο σκεδάζεται το φως. Το μήκος κύματος των 600 nm επιλέγεται ειδικά για μετρήσεις OD βακτηρίων, επειδή σε αντίθεση με τα μήκη κύματος UV, τα 600 nm δεν είναι επιβλαβή για την καλλιέργεια. Επίσης, αυτό το μήκος κύματος δεν απορροφάτε από το θρεπτικό υπόστρωμα της καλλιέργειας κάτι που αυξάνει την αξιοπιστία της οπτικής πυκνότητας. Επισημαίνεται ότι κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων η οπτική πυκνότητα, θεωρείται ανάλογη της ποσότητας των μικροοργανισμών και συνολικά τα διαγράμματα απεικονίζουν καμπύλες ανάπτυξης. Λαμβάνεται βέβαια υπόψιν ότι, αυτό ενδέχεται να επιφέρει κάποιο σφάλμα κατά την διεξαγωγή συμπερασμάτων, κυρίως λόγω του συνυπολογισμού των νεκρών μικροοργανισμών στην τιμή της μετρούμενης οπτικής πυκνότητας.

## 2.3 Αποτελέσματα και συζήτηση

Σε μελέτες αντιμικροβιακής ικανότητας, η εξέταση του pH των υπό μελέτη εκχυλισμάτων καθίσταται αναγκαία ώστε να ελεγχθεί η τυχόν ανασταλτική δράση τους έναντι των υπό μελέτη μικροοργανισμών. Σε γενικές γραμμές, η προσαρμοστικότητα και η ικανότητα ανάπτυξης των εξεταζόμενων παθογόνων βακτηρίων εκδηλώνεται μέσω της ικανότητάς τους να ευδοκιμούν και να αντέχουν σε ένα ευρύ φάσμα τιμών pH, που συνήθως κυμαίνεται από 4,5 έως 9,5. Κατά συνέπεια, καθίσταται προφανές ότι τα εν λόγω εκχυλίσματα, με βάση τις τιμές pH του πίνακα 6 και 7 σε καμία περίπτωση δεν μπορούν να θεωρηθούν ως αναστολείς. Αξίζει να αναφερθεί ότι το βέλτιστο pH ανάπτυξης των βακτηρίων αυτών κυμαίνεται σε ένα ουδέτερο εύρος τιμών, από 6,5 έως 7,5. Σε προηγούμενες μελέτες μια συνηθισμένη διαδικασία ήταν η ρύθμιση του pH των εκχυλισμάτων σε μια ουδέτερη περιοχή, που αυτό όμως αποκαλύφθηκε στην πορεία ότι δεν επηρεάζει τα αποτελέσματα των δοκίμων αντιμικροβιακής δράσης.

Επιπλέον, μια άλλη βασική μέτρηση που πραγματοποιήθηκε στα προς μελέτη εκχυλίσματα αφορούσε την μέτρηση του βάρους τους. Η μέτρηση αυτή απορρέει από το γεγονός ότι, μετά τη διαδικασία διήθησης, το υπερκείμενο που απομένει παρουσιάζει αισθητά μειωμένο βάρος.

Πίνακας 6. Τιμές βάρους και pH που λήφθηκαν με ηλεκτρόδιο pH (pH-Meter GLP 21) για τα εκχυλίσματα της εκχύλισης Α μετά από διήθηση.

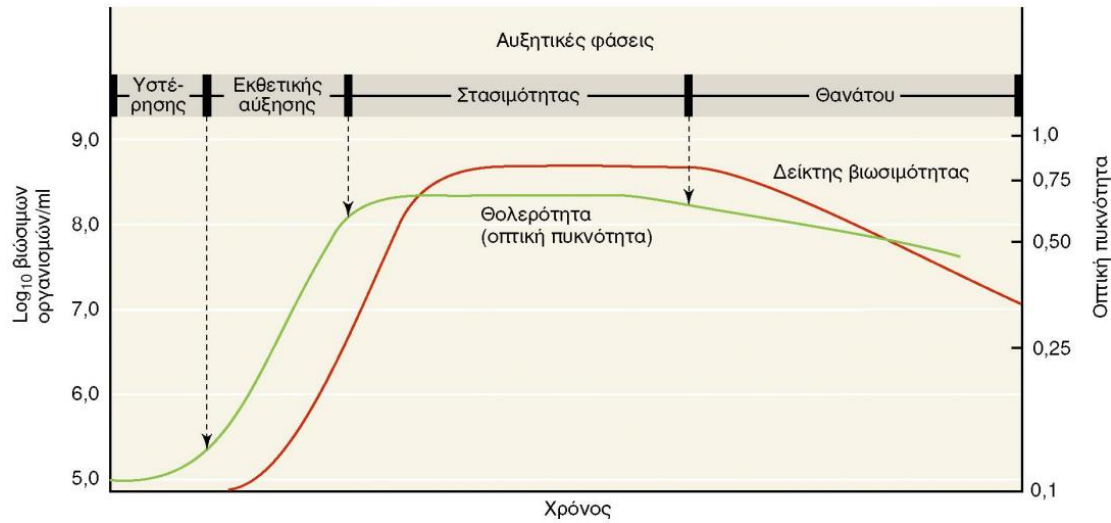
ΕΚΧΥΛΙΣΗ	ΤΜΗΜΑ ΧΑΡΟΥΠΙΟΥ	ΒΑΡΟΣ	pH
Water extraction	Seeds September 2022 (114a)	138,62 g	5,50
	Pods September 2022 (116a)	167,72 g	4,82
	Green pods May 2022(118a)	165,90 g	4,70
	Leaves December 2022 (119a)	184,83 g	5,35
Water/Ethanol 90:10 extraction	Seeds September 2022 (114b)	155,48 g	5,54
	Pods September 2022 (116b)	160,66 g	5,05
	Green pods May 2022 (118b)	177,14 g	5,04
	Leaves December 2022 (119b)	174,80 g	5,28

Πίνακας 7. Τιμές βάρους και pH που λήφθηκαν με ηλεκτρόδιο pH (pH-Meter GLP 21) για τα εκχυλίσματα της εκχύλισης B μετά από διήθηση.

ΕΚΧΥΛΙΣΗ	ΤΜΗΜΑ ΧΑΡΟΥΠΙΟΥ	ΒΑΡΟΣ	pH
Water extraction	Green pods May 2022 (118a)	160,41 g	4,77
	Green pods June 2022 (120a)	177,07 g	4,73
	Green pods March 2023 (121a)	185,55 g	4,91
Water/Ethanol 90:10 extraction	Green pods May 2022 (118b)	175,77 g	4,93
	Green pods June 2022 (120a)	177,28 g	4,93
	Green pods March 2023 (121a)	185,71 g	5,02

Για να μπορέσει να μελετηθεί η αντιμικροβιακή δράση των διάφορων εκχυλισμάτων που προέκυψαν από τμήματα χαρουπιάς, τα αποτελέσματα που λαμβάνονται από την τεχνική Bioscreen C, τίθενται σε επεξεργασία μέσω της εφαρμογής ComBase – DMFit 3\_5 στην Microsoft Excel. Ένα από τα πιο σημαντικά δεδομένα που εξάγονται από την πιο πάνω εφαρμογή είναι οι χρονοσειρές οπτικής πυκνότητας. Αξίζει να αναφερθεί ότι, για την αύξηση της αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων και την εξαγωγή ασφαλέστερων συμπερασμάτων, λήφθηκε ο μέσο όρος της οπτικής πυκνότητας των δοκιμών που πραγματοποιήθηκαν για κάθε συνδυασμό: α) εκχυλίσματος – Broth – μικροοργανισμού, β) διαλύτη H<sub>2</sub>O/Ethanol 90:10 – Broth – μικροοργανισμού (Control 2) και γ) Broth – μικροοργανισμού (Control 1). Μέσω της γραφικής αναπαράστασης των χρονοσειρών μέσου όρου οπτικής πυκνότητας προκύπτουν οι καμπύλες ανάπτυξης του εκάστοτε μικροοργανισμού στο προς μελέτη εκχύλισμα. Προτού παρουσιαστούν τα αποτελέσματα των πειραμάτων γίνεται μία σύντομη αναφορά στις καμπύλες ανάπτυξης, οι οποίες θα απασχολήσουν στη συνέχεια καθώς μέσω αυτών μπορούν να εξαχθούν χρήσιμα συμπεράσματα για την αντιμικροβιακή ικανότητα των εκχυλισμάτων.

## Μικροβιακή καμπύλη ανάπτυξης



Εικόνα 10. Τυπική καμπύλη αύξησης ενός βακτηριακού πληθυσμού

Γενικά, μπορούν να διακριθούν τέσσερις φάσεις στην καμπύλη ανάπτυξης οι οποίες είναι οι εξής:

### 1. Φάση προσαρμογής ή υστέρησης

Κατά τη διάρκεια της φάσης αυτής οι μικροοργανισμοί προσαρμόζονται στο νέο μέσο καλλιέργειας. Η διάρκεια της φάσης αυτής ποικίλλει ανάλογα με τις συνθήκες του θρεπτικού μέσου στο οποίο αφήνεται να αναπτυχθεί καθώς και από τον όγκο του εμβολιάσματος. Όσο μεγαλύτερος είναι ο όγκος αυτός, τόσο πιο σύντομη είναι η φάση αυτή. Αντιστοιχεί στη σύνθεση των απαραίτητων ενζύμων, ώστε να γίνει δυνατή η αποικοδόμηση του νέου υποστρώματος. Επίσης κατά τη διάρκεια αυτής της φάσης, δεν γίνονται κυτταρικοί διπλασιασμοί και άρα δεν υπάρχει αύξηση της κυτταρικής μάζας.

### 2. Λογαριθμική φάση ή εκθετική φάση

Κατά την διάρκεια της φάσης αυτής η μικροβιακή καλλιέργεια αναπτύσσεται και πολλαπλασιάζεται με ένα μέγιστο σταθερό ρυθμό ανάπτυξης, την λεγόμενη ειδική ταχύτητα πολλαπλασιασμού η οποία συμβολίζεται με “ $\mu$ ”. Επίσης, κατά τη διάρκεια αυτής της αυξητικής φάσης των μικροοργανισμών συντίθενται πρωτογενείς μεταβολίτες καθώς και δευτερογενείς μεταβολίτες οι οποίοι όμως συντίθενται μεταξύ του τέλους της αυξητικής φάσης και της αρχής της στάσιμης φάσης

### 3. Φάση στασιμότητας

Στην φάση αυτή ο πληθυσμός των ζωντανών κυττάρων παραμένει σταθερός. Ωστόσο, ο μεταβολισμός των κυττάρων και ιδιαίτερα οι βιοσυνθέσεις μπορούν ακόμα να διατηρούνται σε υψηλά επίπεδα. Ο μικροβιακός πληθυσμός εισέρχεται στην φάση αυτή για διάφορους λόγους όπως για παράδειγμα, η εξάντληση του θρεπτικού υποστρώματος και η μείωση κάποιου θρεπτικού παράγοντα ανάπτυξης.

#### 4. Φάση θανάτου

Το περιβάλλον που κάποτε ήταν ιδανικό έχει μεταβληθεί από τους μικροοργανισμούς, λόγω της κατανάλωσης των θρεπτικών ουσιών και την συγκέντρωση τοξικών προϊόντων του μεταβολισμού τους, σε τέτοιο βαθμό ώστε να μη είναι δυνατή η επιβίωση τους. Η φάση αυτή προσδιορίζεται μόνο με μέτρηση των ζωντανών κυττάρων αφού ο θάνατος και η λύση επηρεάζουν την οπτική πυκνότητα ελάχιστα ή καθόλου.

Ο κυριότερος παράγοντας που χαρακτηρίζει την αντιμικροβιακή δράση ενός εκχυλίσματος έναντι ενός μικροοργανισμού, είναι η ειδική ταχύτητα πολλαπλασιασμού. Πιο συγκεκριμένα, όταν υπάρχει στατιστικά σημαντική μείωση της ειδικής ταχύτητας πολλαπλασιασμού στο εκχύλισμα σε σχέση με την αντίστοιχη τιμή στο Control, τότε υπάρχει αντιμικροβιακή δράση. Όσο πιο μεγάλη είναι η μείωση τόσο πιο έντονη είναι η αντιμικροβιακή δράση. Ακόμα ένας παράγοντας που πρέπει να λαμβάνεται υπόψη χωρίς όμως να έχει τόσο καθοριστικό ρόλο, είναι ο χρόνος προσαρμογής του μικροοργανισμού στο εκχύλισμα που εξετάζεται.

Για την ενίσχυση των παρατηρήσεων που εν συνεχεία θα προκύψουν μέσω γραφικών παραστάσεων για την αντιμικροβιακή ικανότητα των διαφόρων τμημάτων του χαρουπιού που μελετήθηκαν, υπολογίστηκε ακόμη μια παράμετρος η οποία εκφράζει την ποσοστιαία αναστολή ενός μικροοργανισμού στο περιβάλλον στο οποίο αφήνεται να αναπτυχθεί σε σχέση με την αντίστοιχη αναστολή σε κάποιο δείγμα ελέγχου/μάρτυρα. Αυτή η παράμετρος χαρακτηρίζεται ως % **inhibition** και υπολογίζεται ως εξής :

$$\frac{\mu_{\text{μάρτυρα}} - \mu_{\text{εκχυλίσματος}}}{\mu_{\text{μάρτυρα}}} \times 100$$

Με  $\mu_{\text{μάρτυρα}}$  συμβολίζεται ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης του μικροοργανισμού στο δείγμα ελέγχου (Control 1 ή 2).

Με  $\mu_{\text{εκχυλίσματος}}$  συμβολίζεται ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης του μικροοργανισμού στο υπό εξέταση εκχύλισμα του.

Ουσιαστικά αυτή η παράμετρο εκφράζει την ποσοστιαία αύξηση, στην περίπτωση που λαμβάνει αρνητική τιμή ή μείωση, στην περίπτωση που λαμβάνει θετική τιμή του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης του μικροοργανισμού στο υπό εξέταση εκχύλισμα σε σχέση με τον αντίστοιχο στο δείγμα ελέγχου. Στην περίπτωση που λαμβάνεται αρνητική τιμή του παράγοντα % **inhibition**, ορίζεται ως 0% εκφράζοντας την μηδενική αντιμικροβιακή ικανότητα του υπό εξέταση δείγματος. Όσο μεγαλύτερο είναι το ποσοστό αυτό, τόσο ισχυρότερη είναι και η αντιμικροβιακή ικανότητα του εκχυλίσματος σε σχέση με τα αντίστοιχα των δειγμάτων ελέγχου.

Η παράμετρος % **inhibition** μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την σύγκριση της αντιμικροβιακής δράσης εκχυλισμάτων που εξάγονται με τον ίδιο διαλύτη. Για την σύγκριση της αντιμικροβιακής ικανότητας εκχυλισμάτων με διαφορετικό διαλύτη, πρέπει να συγκριθούν οι ειδικοί ρυθμοί ανάπτυξης των εκχυλισμάτων αυτών. Το εκχύλισμα με τον μικρότερο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης είναι και αυτό που παρουσιάζει την ισχυρότερη αντιμικροβιακή δράση.

Ακόμη μια σημαντική παρατήρηση είναι ότι η τιμή που λαμβάνει ο ποσοστιαίος συντελεστής αναστολής για την αντιμικροβιακή ικανότητα ενός εκχυλίσματος, είναι άμεσα συνδεδεμένη με την τιμή του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης στο δείγμα ελέγχου. Επομένως ο χαρακτηρισμός της αντιμικροβιακής ικανότητας ενός εκχυλίσματος με βάση τον παράγοντα % *inhibition* μπορεί να διαφέρει ανάμεσα σε δύο πειράματα όπου ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης στα δείγματα ελέγχου λαμβάνει διαφορετικές τιμές.

### Πείραμα πρώτο (Εκχύλιση Α)

Στην συνέχεια παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του αρχικού πειράματος (Εκχύλιση Α), το οποίο περιελάμβανε την εξέταση της αντιμικροβιακής δράσης τεσσάρων διαφορετικών τμημάτων χαρουπιού τα οποία συλλεχτήκαν από το Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής. Στόχος αυτού του πειράματος είναι να γίνει όσο το δυνατόν αντιληπτό ποια από αυτά τα τμήματα θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν ως αντιμικροβιακοί παράγοντες ενάντια της *Escherichia coli* και του *Staphylococcus aureus*.

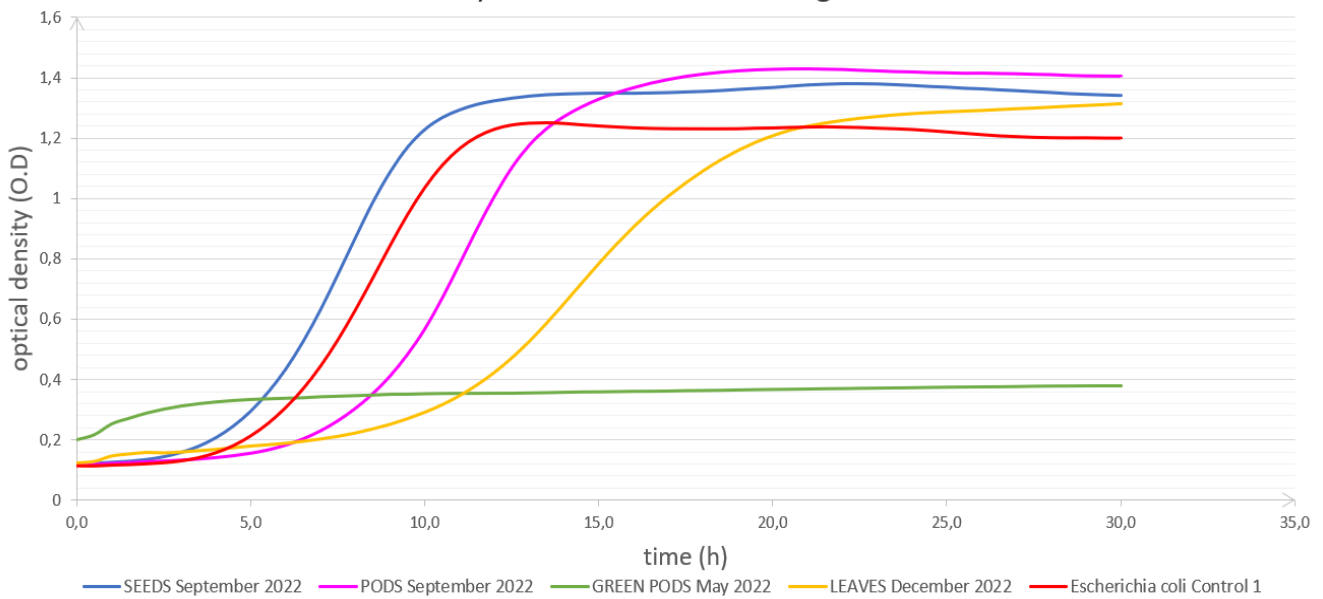
Αρχικά παρουσιάζονται οι καμπύλες ανάπτυξης της *Escherichia coli* στα εκχυλίσματα με διαλύτη το νερό:

Πίνακας 8. Τα τέσσερα τμήματα χαρουπιάς που εκχυλίστηκαν με νερό συνοδευόμενα από το αντίστοιχο δείγμα ελέγχου ή "μάρτυρα". Παρέχονται Επιπλέον λεπτομερείς ποσότητες εμβολιασμού των δειγμάτων

<i>Escherichia coli</i>		
ΕΚΧΥΛΙΣΗ	ΤΜΗΜΑ ΧΑΡΟΥΠΙΟΥ	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ
Water extraction	Seeds September 2022 (114a)	Seeds (a) 50 μL + EC 50 μL + BHI Broth 250 μL
	Pods September 2022 (116a)	Pods (a) 50 μL + EC 50 μL + BHI Broth 250 μL
	Green pods May 2022 (118a)	Green Pods (a) 50 μL + EC 50 μL + BHI Broth 250 μL
	Leaves December 2022 (119a)	Leaves (a) 50 μL + EC 50 μL + BHI Broth 250 μL
	EC Control 1 (Broth)	EC 50 μL + BHI Broth 300 μL



## Antimicrobial activity with water extraction against *Escherichia coli*



Γράφημα 1 Καμπύλες ανάπτυξης της *Escherichia coli* σε εκχυλίσματα νερού από διάφορα τμήματα χαρουπιού σε συνδυασμό με την αντίστοιχη καμπύλη ανάπτυξης στο δείγμα ελέγχου/μάρτυρα (Control 1)

Από τις καμπύλες ανάπτυξης που παρουσιάζονται παραπάνω προκύπτουν οι ακόλουθες σημαντικές παρατηρήσεις, οι οποίες αποδεικνύονται πολύτιμες για τον χαρακτηρισμό της αντιμικροβιακής ικανότητας κάθε εκχυλίσματος, με νερό ως διαλύτη, έναντι της *Escherichia coli*. Πιο συγκεκριμένα, συγκρίνεται η συμπεριφορά και η ανάπτυξη της *Escherichia coli* όταν υποβάλλεται σε εκχυλίσματα χαρουπιού σε σχέση με την συμπεριφορά και την ανάπτυξη της απουσίας αυτών (Control 1).

- Στο εκχύλισμα σπόρων οι συνθήκες ανάπτυξης του προς μελέτη μικροοργανισμού (*Escherichia coli*), είναι ευνοϊκότερες σε σχέση με το Control 1. Αυτό αποδεικνύεται από το γεγονός ότι ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης της *Escherichia coli* στο εκχύλισμα σπόρων είναι μεγαλύτερος σε σχέση με τον αντίστοιχο στο Control 1 καθώς επίσης η διάρκεια της φάσης προσαρμογής είναι συντομότερη. Επομένως δεν φαίνεται να παρουσιάζεται αντιμικροβιακή δράση στο εκχύλισμα σπόρων με διαλύτη το νερό.
- Στο εκχύλισμα λοβών φαίνεται να υπάρχει ελάχιστη αντιμικροβιακή δράση ενάντια της *Escherichia coli* καθώς ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης φαίνεται να είναι ελαφρά μικρότερος σε σχέση με το Control 1. Παράλληλα αυτό προκύπτει και από το γεγονός ότι ο μικροοργανισμό αυτός χρειάστηκε περισσότερο χρόνο να προσαρμοστεί στο περιβάλλον αυτό.
- Στο εκχύλισμα πράσινων λοβών, παρατηρείται από το γράφημα πολύ μικρός ειδικός ρυθμός ανάπτυξης. Παράλληλα, φαίνεται ότι η *Escherichia coli* παρουσιάζει μια λογαριθμική φάση πολύ σύντομη με αποτέλεσμα να περνάει στην στασιμότητα πολύ σύντομα. Αυτά συνηγορούν μια ισχυρή αντιμικροβιακή δράση του εκχυλίσματος αυτού. Αξίζει να αναφερθεί ότι στο

εκχύλισμα αυτό ο μικροοργανισμός δεν παρουσιάζει φάση προσαρμογής. Το γεγονός αυτό δεν αναιρεί την ισχυρή αντιμικροβιακή δράση του εκχυλίσματος αυτού καθώς παρόλο που ο μικροοργανισμός δεν χρειάστηκε χρόνο να προσαρμοστεί, δεν μπόρεσε στην συνέχεια να αναπτυχθεί και παρέμεινε σε πολύ χαμηλά επίπεδα.

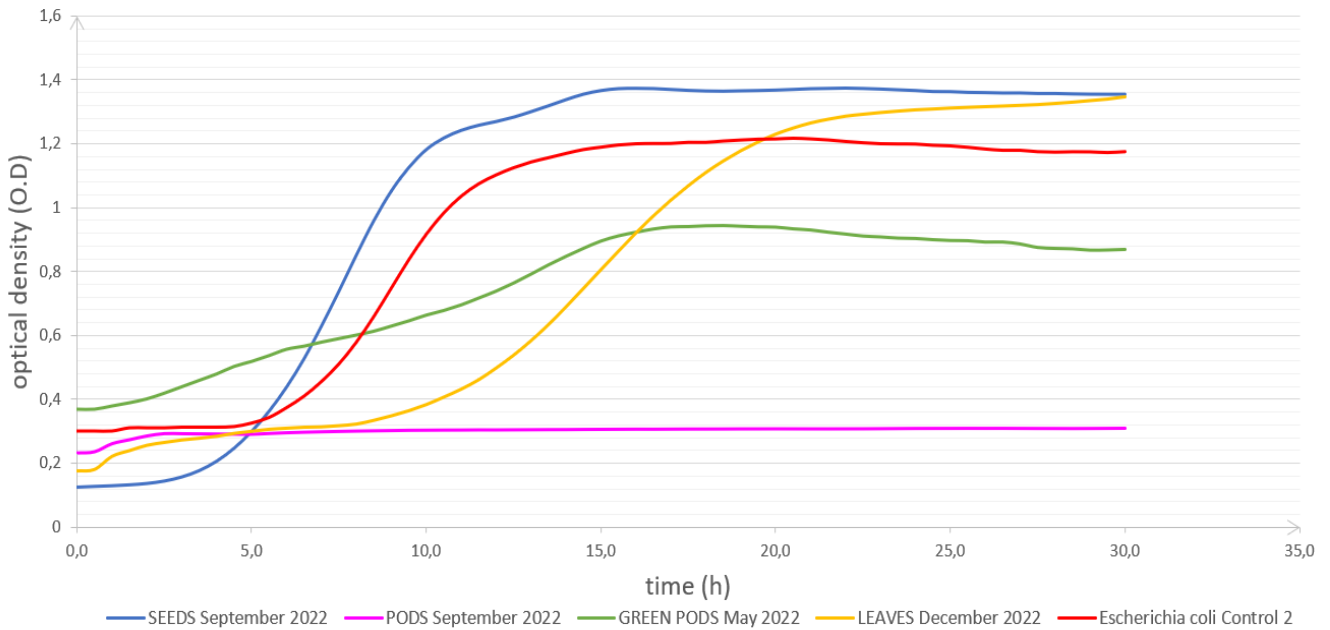
- Στο εκχύλισμα φύλλων φαίνεται να υπάρχει αντιμικροβιακή δράση ενάντια της *Escherichia coli* καθώς ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης φαίνεται να είναι αισθητά μικρότερος σε σχέση με το Control 1. Παράλληλα, ο μικροοργανισμός αυτός χρειάστηκε αρκετά περισσότερο χρόνο να προσαρμοστεί στο περιβάλλον αυτό. Επίσης σημαντικό είναι και το γεγονός ότι η *Escherichia coli* στο εκχύλισμα των φύλλων φαίνεται να χρειάστηκε τον περισσότερο χρόνο ώστε να φτάσει στο μέγιστο πληθυσμό της σε σχέση με τα υπόλοιπα εκχυλίσματα.
- Το εκχύλισμα στα οποίο φαίνεται η *Escherichia coli* να παρουσιάζει την μικρότερη ειδική ταχύτητα πολλαπλασιασμού είναι αυτό των πράσινων λοβών με διαλύτη το νερό. Αυτό μας υποδεικνύει ισχυρότερη αντιμικροβιακή δράση στο εκχύλισμα από αυτό το τμήματα χαρουπιάς σε σχέση με τα υπόλοιπα που εξετάστηκαν.

Στη συνέχεια, παρουσιάζονται οι καμπύλες ανάπτυξης της *Escherichia coli* στα εκχυλίσματα με διαλύτη το μίγμα νερού:αιθανόλης 90:10.

Πίνακας 9. Τα τέσσερα τμήματα χαρουπιάς που εκχυλίστηκαν με μίγμα νερού:αιθανόλης (90:10) συνοδευόμενα από το αντίστοιχο δείγμα ελέγχου ή "μάρτυρα Παρέχονται Επιπλέον λεπτομερείς ποσότητες εμβολιασμού των δειγμάτων.

<i>Escherichia coli</i>		
ΕΚΧΥΛΙΣΗ	ΤΜΗΜΑ ΧΑΡΟΥΠΙΟΥ	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ
Water/Ethanol 90:10 extraction	Seeds September 2022 (114b)	Seeds (b) 50 μL + EC 50 μL + BHI Broth 250 μL
	Pods September 2022 (116b)	Pods (b) 50 μL + EC 50 μL + BHI Broth 250 μL
	Green pods May 2022 (118b)	Green Pods (b) 50 μL + EC 50 μL + BHI Broth 250 μL
	Leaves December 2022 (119b)	Leaves (b) 50 μL + EC 50 μL + BHI Broth 250 μL
	EC Control 2 (Water/Ethanol - 90:10)	EC 50 μL + BHI Broth 250 μL + 50 μL H <sub>2</sub> O/ethanol (90:10)

## Antimicrobial activity with water/ethanol extraction against *Escherichia coli*



Γράφημα 2 Καμπύλες ανάπτυξης της *Escherichia coli* σε εκχυλίσματα με μίγμα νερού:αιθανόλης 90:10 από διάφορα τμήματα χαρουπιού σε συνδιασμό με την αντίστοιχη καμπύλη ανάπτυξης στο δείγμα ελέγχου/μάρτυρα (Control 2)

- Στο εκχύλισμα σπόρων δεν φαίνεται να υπάρχει αντιμικροβιακή δράση καθώς η ειδική ταχύτητα πολλαπλασιασμού της *Escherichia coli* φαίνεται να είναι μεγαλύτερη σε σχέση με το Control 2. Επίσης ο μικροοργανισμός χρειάστηκε λιγότερο χρόνο να προσαρμοστεί στο περιβάλλον αυτό.
- Στο εκχύλισμα λοβών, παρατηρείται από το γράφημα πολύ μικρότερος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης σε σχέση με το Control 2. Ταυτόχρονα, η *Escherichia coli* επιδεικνύει μια εξαιρετικά σύντομη λογαριθμική φάση ανάπτυξης, μεταβαίνοντας γρήγορα στη στασιμότητα. Αυτές οι παρατηρήσεις υποδηλώνουν έντονα μια ισχυρή αντιμικροβιακή δράση σε αυτό το εκχύλισμα. Η γενική συμπεριφορά της *Escherichia coli* είναι πανομοιότυπη με την αντίστοιχη του εκχυλίσματος πράσινων λοβών με διαλύτη το νερό.
- Στο εκχύλισμα πράσινων λοβών, φαίνεται να υπάρχει ισχυρή αντιμικροβιακή δράση ενάντια της *Escherichia coli* καθώς ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης της φαίνεται να είναι αισθητά μικρότερος σε σχέση με το Control 2. Όπως και στο εκχύλισμα πράσινων λοβών με διαλύτη το νερό, δεν παρουσιάζεται φάση προσαρμογής. Ούτε σε αυτή την περίπτωση δεν επηρεάζεται η αντιμικροβιακή δράση του εκχυλίσματος καθώς η πολύ μικρή ειδική ταχύτητα πολλαπλασιασμού δεν επιτρέπει στην *Escherichia coli* να αναπτυχθεί ιδιαίτερα παραμένοντας σε χαμηλά επίπεδα.
- Στο εκχύλισμα φύλλων φαίνεται να υπάρχει αντιμικροβιακή δράση ενάντια της *Escherichia coli* καθώς ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης φαίνεται να είναι αισθητά μικρότερος. Επίσης σημαντικό είναι και το γεγονός ότι όπως και στο εκχύλισμα φύλλων με διαλύτη το νερό, έτσι και σε αυτό το δείγμα, η *Escherichia coli* χρειάστηκε τον περισσότερο χρόνο ώστε να φτάσει στο μέγιστο πληθυσμό της σε σχέση με τα υπόλοιπα εκχυλίσματα.

- Το εκχύλισμα στο οποίο φαίνεται η *Escherichia coli* να παρουσιάζει την μικρότερη ειδική ταχύτητα πολλαπλασιασμού και κατά συνέπεια την ισχυρότερη αντιμικροβιακή δράση είναι αυτό των λοβών με διαλύτη το μίγμα νερού:αιθανόλης 90:10.

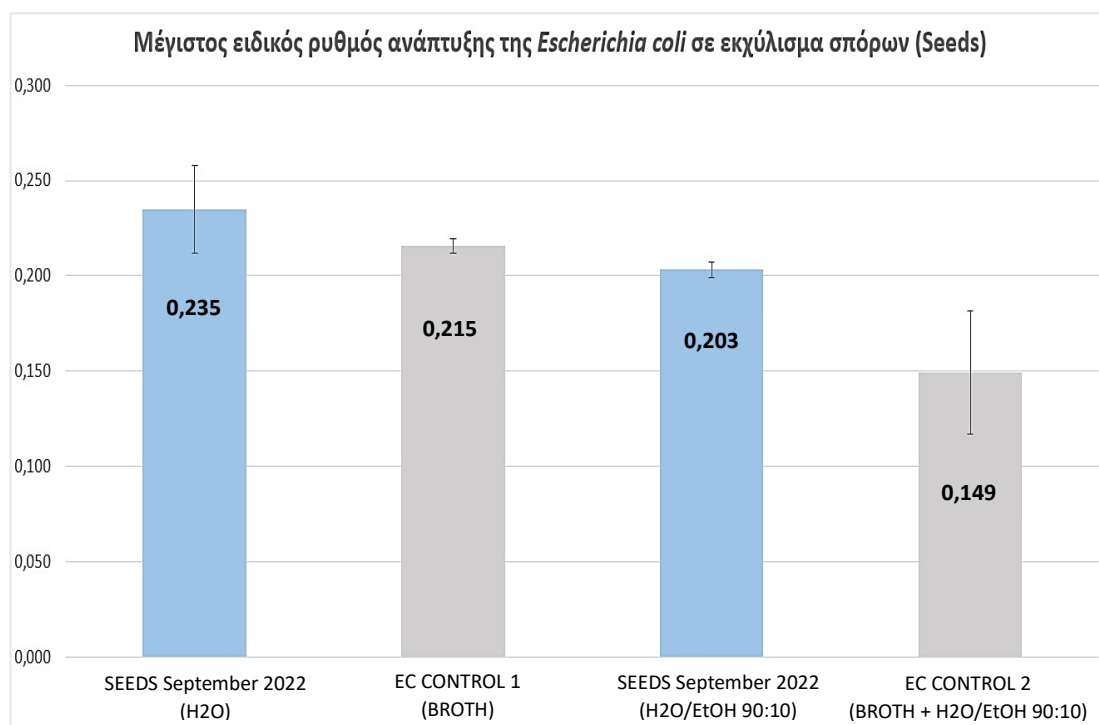
Τα αποτελέσματα ενός πειράματος συνοδεύονται πάντα από σφάλματα (τυχαία ή συστηματικά) και ως εκ τούτου οι υπολογισμένες ειδικές ταχύτητες πολλαπλασιασμού ( $\mu$ ) που παρουσιάζονται στον πιο πάνω πίνακα αποτελούν εκτιμήσεις των πραγματικών άγνωστων τιμών. Για τον μετριάσμο της επιρροής των σφαλμάτων στα πειράματα μας, πραγματοποιήθηκαν, τρεις δοκιμές για κάθε συνδυασμό εκχυλίσματος – μικροοργανισμού και πέντε δοκιμές διαλύτη – μικροοργανισμού (Control), κατά την διεξαγωγή του πρώτου πειράματος και υπολογίστηκε ο μέσος όρος της οπτικής πυκνότητας. Ο υπολογισμός της ειδικής ταχύτητας πολλαπλασιασμού έγινε αξιοποιώντας τον μέσο όρο. Επιπλέον, αξιοποιώντας τις ειδικές ταχύτητες πολλαπλασιασμού που προέκυψαν από τις τιμές των τριών δοκιμών της οπτικής πυκνότητας, υπολογίστηκε η τυπική απόκλιση.

Η κάθετη, μαύρη γραμμή που απεικονίζεται σε κάθε στήλη των ραβδογραμμάτων, συμβολίζει το διάστημα εμπιστοσύνης  $\mu \pm \sigma$ , στο οποίο με μεγάλη πιθανότητα η πραγματική τιμή της ειδικής ταχύτητας πολλαπλασιασμού ( $\mu$ ) ανήκει σε αυτό.

Όταν η ειδική ταχύτητα πολλαπλασιασμού του μικροοργανισμού στο εκχύλισμα είναι μικρότερη από την ειδική ταχύτητα πολλαπλασιασμού στο Control και ταυτόχρονα το διάστημα εμπιστοσύνης του πρώτου δεν επικαλύπτεται από αυτό του Control, τότε υπάρχει στατιστικά σημαντική μείωση της ειδικής ταχύτητας πολλαπλασιασμού στο εκχύλισμα, με επακόλουθο την ύπαρξη αντιμικροβιακής δράσης.

Πίνακας 10 Ειδικοί ρυθμοί ανάπτυξης ( $\mu$ ) συνοδευόμενοι από την τυπική τους απόκλιση και χρόνος προσαρμογής (lag phase) της *Escherichia coli* στα εξεταζόμενα εκχυλίσματα.

<i>Escherichia coli</i>				
Aqueous extracts	Περιγραφή δειγμάτων	Rate, $\mu$ (1/h)	Standard deviation (SD)	lag phase (h)
Seeds September 2022 (114a)	Seeds (a) 50 $\mu$ L + EC 50 $\mu$ L + BHI Broth 250 $\mu$ L	0,235	0,023	4,874
Pods September 2022 (116a)	Pods (a) 50 $\mu$ L + EC 50 $\mu$ L + BHI Broth 250 $\mu$ L	0,193	0,014	7,658
Green pods May 2022 (118a)	Green Pods (a) 50 $\mu$ L + EC 50 $\mu$ L + BHI Broth 250 $\mu$ L	0,036	0,028	-
Leaves December 2022 (119a)	Leaves (a) 50 $\mu$ L + EC 50 $\mu$ L + BHI Broth 250 $\mu$ L	0,111	0,011	9,595
EC Control 1 (Broth)	EC 50 $\mu$ L + BHI Broth 300 $\mu$ L	0,215	0,004	5,629
Water/Ethanolic (90:10) extracts	Περιγραφή δειγμάτων	Rate, $\mu$ (1/h)	Standard deviation (SD)	lag phase (h)
Seeds September 2022 (114b)	Seeds (b) 50 $\mu$ L + EC 50 $\mu$ L + BHI Broth 250 $\mu$ L	0,203	0,004	4,515
Pods September 2022 (116b)	Pods (b) 50 $\mu$ L + EC 50 $\mu$ L + BHI Broth 250 $\mu$ L	0,031	0,004	-
Green pods May 2022 (118b)	Green Pods (b) 50 $\mu$ L + EC 50 $\mu$ L + BHI Broth 250 $\mu$ L	0,051	0,041	-
Leaves December 2022 (119b)	Leaves (b) 50 $\mu$ L + EC 50 $\mu$ L + BHI Broth 250 $\mu$ L	0,094	0,013	9,347
EC Control 2 (Water/Ethanol - 90:10)	EC 50 $\mu$ L + BHI Broth 250 $\mu$ L + 50 $\mu$ L H <sub>2</sub> O/ethanol (90:10)	0,149	0,032	5,509



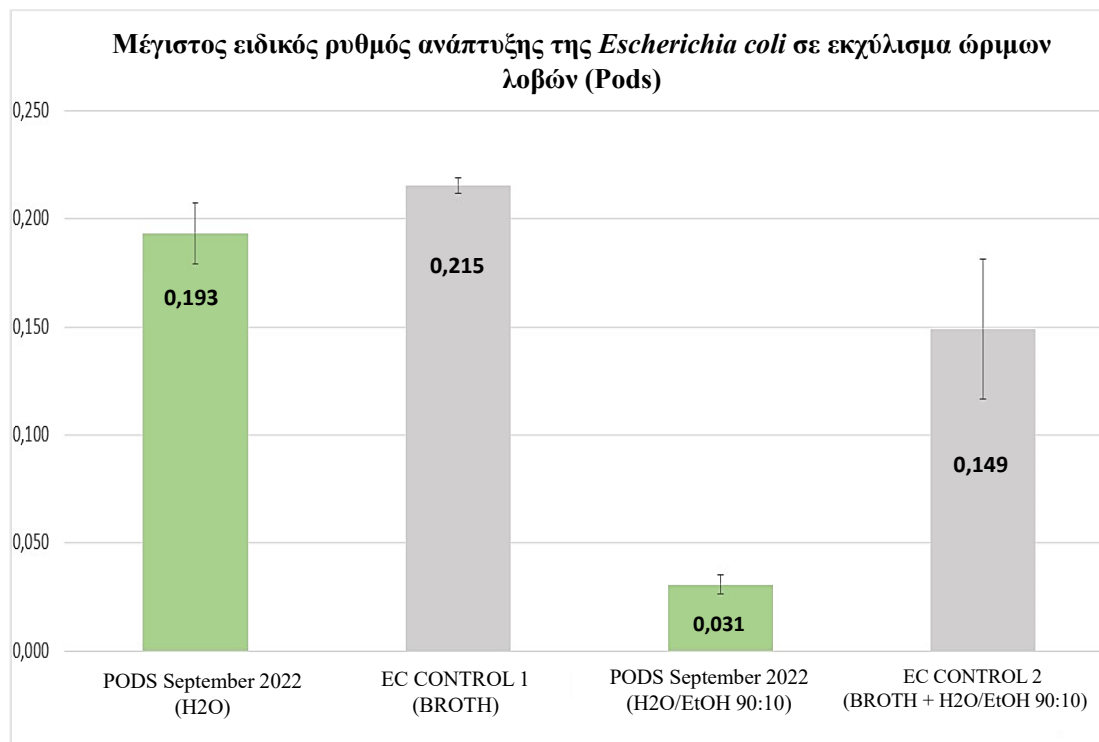
Γράφημα 3. Ραβδόγραμμα των ειδικών ρυθμών ανάπτυξης σε συνδυασμό με τα διαστήματα εμπιστοσύνης τους (μαύρη κάθετη γραμμή), της *Escherichia coli* σε εκχυλίσματα σπόρων, μαζί με τα αντίστοιχα δείγματα ελέγχου (Control 1 και 2)

Λαμβάνοντας υπόψη την ειδική ταχύτητα πολλαπλασιασμού ( $\mu$ ) και την αντίστοιχη τυπική απόκλιση των δειγμάτων που παρουσιάζονται στο πιο πάνω ραβδόγραμμα προκύπτουν οι ακόλουθες σημαντικές παρατηρήσεις:

- Στο εκχύλισμα σπόρων με διαλύτη το νερό παρατηρείται αύξηση του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης της *Escherichia coli* σε σχέση με τον αντίστοιχο στο δείγμα ελέγχου (Control 1), χωρίς όμως να είναι στατιστικά σημαντική. Επιπλέον με βάση τα διαστήματα εμπιστοσύνης, όσες φορές και αν επαναληφθεί η πειραματική διαδικασία, με μεγάλη πιθανότητα ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης της *Escherichia coli* στο εκχύλισμα σπόρων με διαλύτη το νερό, θα είναι μεγαλύτερος σε σχέση με το Control 1. Έτσι με βάση αυτές τις παρατηρήσεις το εκχύλισμα αυτό φαίνεται να παρουσιάζει μηδενική αντιμικροβιακή δράση.
- Στο εκχύλισμα σπόρων με διαλύτη το μίγμα νερού:αιθανόλης 90:10 παρατηρείται στατιστικά σημαντική αύξηση του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης της *Escherichia coli* σε σχέση με τον αντίστοιχο στο δείγμα ελέγχου (Control 2). Αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι τόσο ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης της *Escherichia coli* έχει αυξηθεί, όσο και από την μη επικάλυψη των διαστημάτων εμπιστοσύνης τους. Επομένως το εκχύλισμα αυτό φαίνεται να παρουσιάζει μηδενική αντιμικροβιακή δράση.
- Με βάση τις στήλες που αφορούν τα εκχυλίσματα σπόρων παρατηρείται ότι η χρήση του μίγματος νερού:αιθανόλης 90:10 ως διαλύτη ενίσχυσε την αντιμικροβιακή ικανότητα των σπόρων. Αυτό προκύπτει από την μείωση του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης στο εκχύλισμα σπόρων με διαλύτη το μίγμα νερού:αιθανόλης 90:10 σε σχέση με το αντίστοιχο εκχύλισμα με διαλύτη το νερό. Βέβαια με βάση τις πιο πάνω παρατηρήσεις αυτή η μείωση δεν μπορεί να χαρακτηριστεί ως στατιστικά σημαντική.

Με βάση τις πιο πάνω παρατηρήσεις μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι οι σπόροι χαρουπιού δεν μπορούν να χαρακτηριστούν ως αντιμικροβιακοί παράγοντες ενάντια στην *Escherichia coli*.

Στην συνέχεια παρουσιάζονται, μέσω ραβδογράμματος, οι ειδικοί ρυθμοί ανάπτυξης των εκχυλίσμάτων λοβού και των αντίστοιχων δειγμάτων ελέγχου τους μαζί με τα διαστήματα εμπιστοσύνης τους.



Γράφημα 4. Ραβδόγραμμα των ειδικών ρυθμών ανάπτυξης σε συνδυασμό με τα διαστήματα εμπιστοσύνης τους (μαύρη κάθετη γραμμή), της *Escherichia coli* σε εκχυλίσματα λοβών, μαζί με τα αντίστοιχα δείγματα ελέγχου (Control 1 και 2)

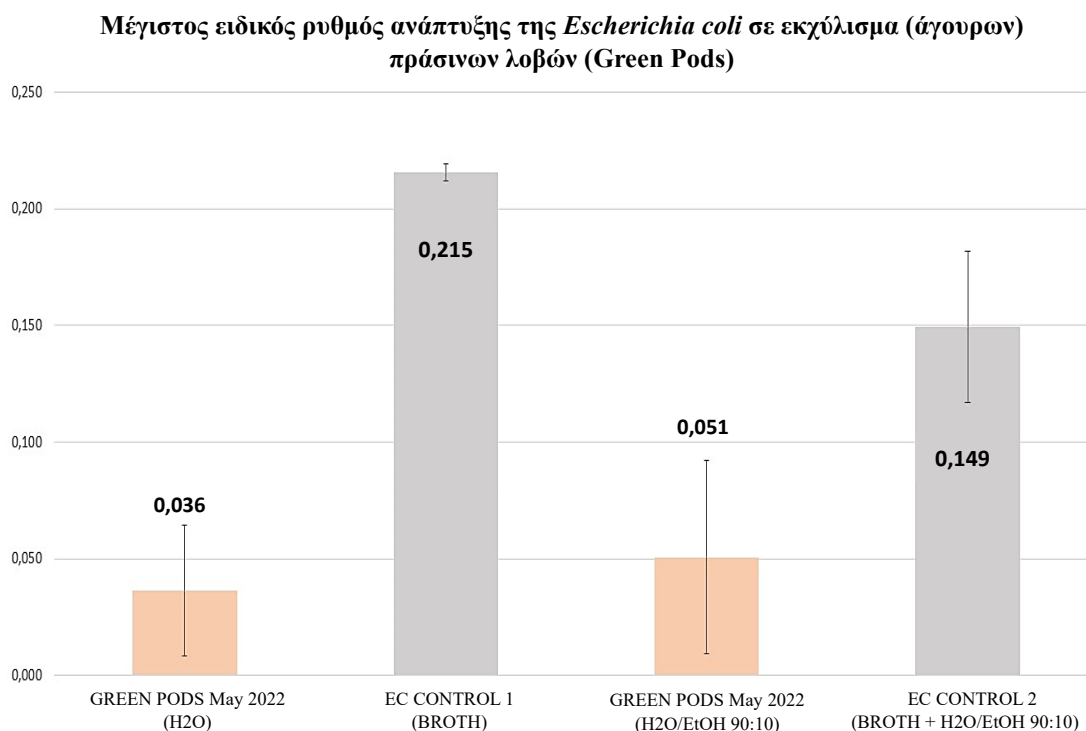
- Στο εκχύλισμα ώριμων λοβών με διαλύτη το νερό παρατηρείται στατιστικά σημαντική μείωση του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης της *Escherichia coli* σε σχέση με τον αντίστοιχο στο δείγμα ελέγχου (Control 1). Αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι τόσο ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης της *Escherichia coli* έχει μειωθεί κατά 10%, όσο και από την μη επικάλυψη των διαστημάτων εμπιστοσύνης τους. Βέβαια, τα διαστήματα εμπιστοσύνης απέχουν ελάχιστα γεγονός που υποδεικνύει ότι η ένταση της αντιμικροβιακής δράσης είναι ήπια προς ελάχιστη.
- Στο εκχύλισμα ώριμων λοβών με διαλύτη το μίγμα νερού:αιθανόλης 90:10 παρατηρείται στατιστικά σημαντική μείωση του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης της *Escherichia coli* σε σχέση με τον αντίστοιχο στο δείγμα ελέγχου (Control 2). Αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι τόσο ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης της *Escherichia coli* έχει μειωθεί κατά 79% , όσο και από την μη επικάλυψη των διαστημάτων εμπιστοσύνης τους. Τόσο η τάξη της μείωσης του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης όσο και η απόσταση των διαστημάτων εμπιστοσύνης είναι αρκετά μεγάλη γεγονός που υποδεικνύει ισχυρή αντιμικροβιακή δράση των εκχυλίσμάτων λοβού με διαλύτη το μίγμα νερού:αιθανόλης 90:10 ενάντια της *Escherichia coli*.
- Με βάση τις στήλες που αφορούν τα εκχυλίσματα λοβών παρατηρείται ότι η χρήση του μίγματος νερού:αιθανόλης 90:10 ως διαλύτη ενίσχυσε σε πολύ μεγάλο βαθμό την αντιμικροβιακή ικανότητα των λοβών. Αυτή η ενίσχυση



αποδεικνύεται σαφώς από την αξιοσημείωτη μείωση του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης κατά 84% που παρατηρήθηκε στο εκχύλισμα ώριμων λοβών που εκχυλίστηκε με τη χρήση νερού:αιθανόλης 90:10 και από την πολύ μεγάλη απόσταση των διαστημάτων εμπιστοσύνης των δύο εκχυλισμάτων.

Με βάση τις πιο πάνω παρατηρήσεις μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι οι λοβοί όταν εκχυλιστούν με διαλύτη το μίγμα νερού:αιθανόλης 90:10 παρουσιάζουν μία πολύ ισχυρή αντιμικροβιακή ικανότητα ενάντια στην *Escherichia coli*. Όταν εκχυλιστούν με νερό εξακολουθούν να έχουν αντιμικροβιακή ικανότητα αλλά η ένταση της είναι πολύ ασθενέστερη.

Με το ακόλουθο ραβδόγραμμα γίνεται εκτενέστερη μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης που παρουσιάζουν τα εκχυλίσματα πράσινων λοβών ενάντια στην *Escherichia coli*.



Γράφημα 5. Ραβδόγραμμα των ειδικών ρυθμών ανάπτυξης σε συνδυασμό με τα διαστήματα εμπιστοσύνης τους (μαύρη κάθετη γραμμή), της *Escherichia coli* σε εκχυλίσματα πράσινων λοβών, μαζί με τα αντίστοιχα δείγματα ελέγχου (Control 1 και 2)

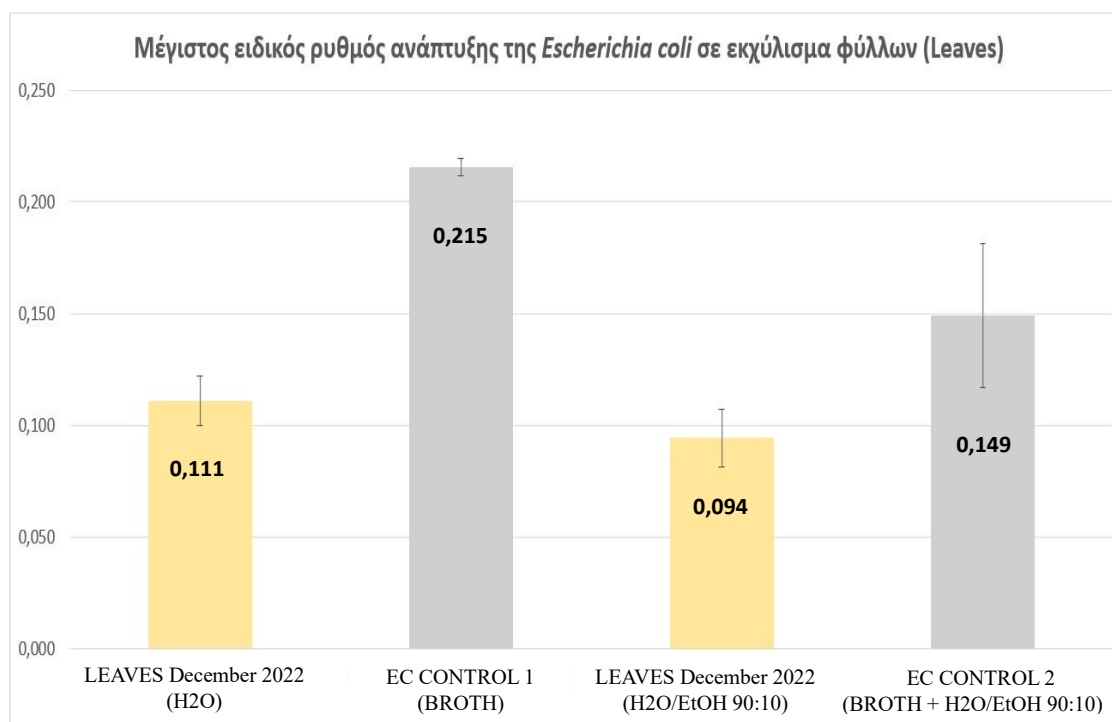
- Στο εκχύλισμα (άγουρων) πράσινων λοβών που έχει εκχυλιστεί με νερό, παρατηρείται στατιστικά σημαντική μείωση του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης της *Escherichia coli* σε σχέση με τον αντίστοιχο στο δείγμα ελέγχου (Control 1). Αυτό απορρέει από το γεγονός ότι τόσο ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης της *Escherichia coli* έχει μειωθεί σε μεγάλο βαθμό της τάξης του 83%, όσο και από την μη επικάλυψη των διαστημάτων εμπιστοσύνης τους. Τόσο η τάξη της μείωσης του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης όσο και η απόσταση των διαστημάτων εμπιστοσύνης είναι αρκετά μεγάλη γεγονός που υποδεικνύει ισχυρή

αντιμικροβιακή δράση των εκχυλισμάτων πράσινου λοβού με διαλύτη το μίγμα νερό ενάντια της *Escherichia coli*.

- Στο εκχύλισμα (άγουρων) πράσινων λοβών με διαλύτη το μίγμα νερού:αιθανόλης 90:10 παρατηρείται στατιστικά σημαντική μείωση του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης της *Escherichia coli* σε σχέση με τον αντίστοιχο στο δείγμα ελέγχου (Control 2). Η παρατήρηση αυτή απορρέει από διπλή αιτιότητα: από την μείωση του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης της *Escherichia coli* κατά 66%, σε συνδυασμό με την απουσία επικάλυψης των διαστημάτων εμπιστοσύνης τους. Τόσο η τάξη της μείωσης του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης όσο και η απόσταση των διαστημάτων εμπιστοσύνης είναι αρκετά μεγάλη γεγονός που υποδεικνύει ισχυρή αντιμικροβιακή δράση των εκχυλισμάτων πράσινου λοβού με διαλύτη το μίγμα νερού:αιθανόλης 90:10 ενάντια της *Escherichia coli*.
- Το εκχύλισμα πράσινων λοβών με διαλύτη το νερό φαίνεται να παρουσιάζει ελαφρά ισχυρότερη αντιμικροβιακή ικανότητα σε σχέση με το αντίστοιχο εκχύλισμα με διαλύτη το μίγμα νερού:αιθανόλης 90:10. Αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης της *Escherichia coli* στο εκχύλισμα με διαλύτη το νερό είναι κατά 29% μικρότερος σε σχέση με τον αντίστοιχόν στο εκχύλισμα με διαλύτη το μίγμα νερού:αιθανόλης 90:10

Με βάση τις πιο πάνω παρατηρήσεις μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι οι (άγουροι) πράσινοι λοβοί είτε εκχυλιστούν με νερό είτε με μίγμα νερού:αιθανόλης 90:10 παρουσιάζουν ισχυρή αντιμικροβιακή ικανότητα ενάντια στην *Escherichia coli*, με ελαφρά υπεροχή στο εκχύλισμα με διαλύτη το νερό.

Στο παρακάτω ραβδόγραμμα παρουσιάζονται οι ειδικοί ρυθμοί ανάπτυξης των εκχυλισμάτων φύλλων και των αντίστοιχων δειγμάτων ελέγχου, συνοδευόμενοι από τα αντίστοιχα διαστήματα εμπιστοσύνης.



Γράφημα 6. Ραβδόγραμμα των ειδικών ρυθμών ανάπτυξης σε συνδυασμό με τα διαστήματα εμπιστοσύνης τους (μαύρη κάθετη γραμμή), της *Escherichia coli* σε εκχυλίσματα φύλλων, μαζί με τα αντίστοιχα δείγματα ελέγχου (Control 1 και 2).

- Το εκχύλισμα φύλλων με διαλύτη το νερό φαίνεται να παρουσιάζει ήπια αντιμικροβιακή δράση καθώς προκάλεσε στατιστικά σημαντική μείωση του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης της *Escherichia coli* σε σχέση με το δείγμα ελέγχου (Control 1). Αυτή η παρατήρηση πηγάζει από την μείωση του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης κατά 49 % και την μη επικάλυψη των διαστημάτων εμπιστοσύνης τους.
- Στο εκχύλισμα φύλλων με διαλύτη το μίγμα νερού:αιθανόλης 90:10, η μείωση του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης της *Escherichia coli* σε σχέση με το δείγμα ελέγχου (Control 2) και παράλληλα η μη επικάλυψη των διαστημάτων εμπιστοσύνης τους φανερώνει την ύπαρξη αντιμικροβιακής δράσης. Η ένταση της αντιμικροβιακής δράσης του εκχυλίσματος αυτού χαρακτηρίζεται ως ήπια λόγω του ότι η τάξη της μείωσης του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης ανέρχεται στο 37%
- Η ένταση της αντιμικροβιακής ικανότητας των εκχυλισμάτων φύλλων δεν παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάλογα με τον χρησιμοποιούμενο διαλύτη. Παρόλα αυτά υπάρχει μία ελαφρά υπεροχή στο εκχύλισμα με διαλύτη το μίγμα νερού:αιθανόλης 90:10.

Με βάση τις παραπάνω παρατηρήσεις, η αντιμικροβιακή ικανότητα των φύλλων μπορεί να χαρακτηριστεί ως ικανοποιητική και στα δύο εκχυλίσματα της χωρίς να παρουσιάζει ιδιαίτερη διαφοροποίηση αναλόγως του χρησιμοποιούμενου διαλύτη.

Συγκρίνοντας τις στήλες που αφορούν τα δείγματα ελέγχου (Control 1, Control 2) που παρουσιάστηκαν σε όλα τα παραπάνω ραβδογράμματα προκύπτει μία σημαντική παρατήρηση. Στο δείγμα ελέγχου 2 στο οποίο περιείχε μίγμα νερού:αιθανόλης σε συγκεντρώσεις 90:10 προέκυψε στατιστικά σημαντική μείωση του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης της *Escherichia coli* κατά 31% σε σχέση με το δείγμα ελέγχου 1 στο οποίο απουσίαζε το μίγμα νερού:αιθανόλης 90:10. Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η αιθανόλη παρουσιάζει αντιμικροβιακή ικανότητα ενάντια στην *Escherichia coli*. Αξίζει να σημειωθεί ότι προτιμήθηκε μία χαμηλή συγκέντρωση αιθανόλης της τάξης του 10% καθώς σε μεγάλες συγκεντρώσεις θα μπορούσε να επηρεάσει αρνητικά τα προς εκχύλιση συστατικά των δειγμάτων μας.

Στον πιο κάτω πίνακα παρουσιάζονται οι τιμές του παράγοντα % *inhibition* και ο χαρακτηρισμός της αντιμικροβιακής δράσης του κάθε εκχυλίσματος ενάντια στην *Escherichia coli* με βάση αυτές. Ο χαρακτηρισμός της ισχύος της αντιμικροβιακής δράσης γίνεται με βάση κάποια κατάλληλα εύρη τιμών τα οποία παρουσιάζονται και αυτά στον πίνακα.

Πίνακας 11 Χαρακτηρισμός της αντιμικροβιακής δράσης των εκχυλισμάτων που μελετήθηκαν ενάντια στην *Escherichia coli* με βάση τις τιμές του παράγοντα % *inhibition*.

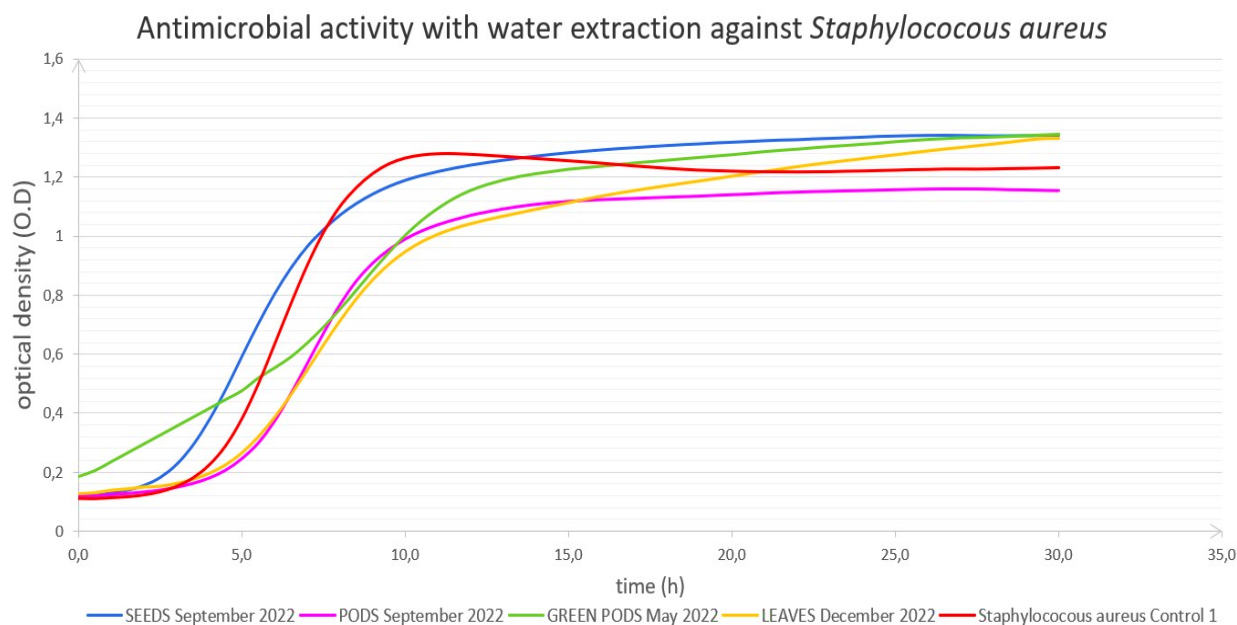
<i>Escherichia coli</i>						
Aqueous extracts	% inhibition	ΜΗΔΕΝΙΚΗ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ (% inhibition= 0%)	ΕΛΑΧΙΣΤΗ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ (% inhibition <35%)	ΗΠΙΑ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ (% inhibition < 60%)	ΙΣΧΥΡΗ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ (% inhibition 60-85%)	ΠΟΛΥ ΙΣΧΥΡΗ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ (% inhibition > 85%)
PODS (H <sub>2</sub> O)	10		√			
SEEDS (H <sub>2</sub> O)	0	√				
LEAVES (H <sub>2</sub> O)	49			√		
GREEN PODS (H <sub>2</sub> O)	83				√	
<b>Ethanolic extracts</b>						
PODS (H <sub>2</sub> O/EtOH)	79				√	
SEEDS (H <sub>2</sub> O/EtOH)	0	√				
LEAVES (H <sub>2</sub> O/EtOH)	37			√		
GREEN PODS (H <sub>2</sub> O/EtOH)	66				√	

Με βάση τον πιο πάνω πίνακα τα εκχυλίσματα με την ισχυρότερη αντιμικροβιακή δράση ενάντια στην *Escherichia coli* είναι αυτά των πράσινων λοβών τόσο με διαλύτη το νερό, όσο και με το μίγμα νερού:αιθανόλης 90:10 και το εκχύλισμα λοβών με διαλύτη το μίγμα νερού:αιθανόλης 90:10. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι σπόροι είτε εκχυλιστούν με νερό είτε με μίγμα νερού:αιθανόλης 90:10, δεν παρουσιάζουν αντιμικροβιακή ικανότητα ενάντια στην *Escherichia coli*. Επομένως, οποιαδήποτε περεταίρω μελέτη για την αντιμικροβιακή ικανότητα των εκχυλισμάτων σπόρων ενάντια στον μικροοργανισμό αυτό, θα άξιζε εφόσον επιλεγθεί μία εναλλακτική επιλογή μεθόδου εκχύλισης καθώς και διαφορετικό μέσω εκχύλισης.

Ακολούθως, παρουσιάζονται οι καμπύλες ανάπτυξης του *Staphylococcus aureus* στα εκχυλίσματα με διαλύτη το νερό.

Πίνακας 12. Τα τέσσερα τμήματα χαρουπιάς που εκχυλίστηκαν με νερό συνοδευόμενα από το αντίστοιχο δείγμα ελέγχου ή "μάρτυρα". Παρέχονται Επιπλέον λεπτομερείς ποσότητες εμβολιασμού των δειγμάτων

<i>Staphylococcus aureus</i>		
ΕΚΧΥΛΙΣΗ	ΤΜΗΜΑ ΧΑΡΟΥΠΙΟΥ	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ
Water extraction	Seeds September 2022 (114a)	Seeds (a) 50 $\mu$ L + SA 50 $\mu$ L + BHI Broth 250 $\mu$ L
	Pods September 2022 (116a)	Pods (a) 50 $\mu$ L + SA 50 $\mu$ L + BHI Broth 250 $\mu$ L
	Green pods May 2022 (118a)	Green Pods (a) 50 $\mu$ L + SA 50 $\mu$ L + BHI Broth 250 $\mu$ L
	Leaves December 2022 (119a)	Leaves (a) 50 $\mu$ L + SA 50 $\mu$ L + BHI Broth 250 $\mu$ L
	SA Control 1 (Broth)	SA 50 $\mu$ L + BHI Broth 300 $\mu$ L



Γράφημα 7. Καμπύλες ανάπτυξης του *Staphylococcus aureus* σε εκχυλίσματα νερού από διάφορα τμήματα χαρουπιού σε συνδυασμό με την αντίστοιχη καμπύλη ανάπτυξης στο δείγμα ελέγχου/μάρτυρα (Control 1)

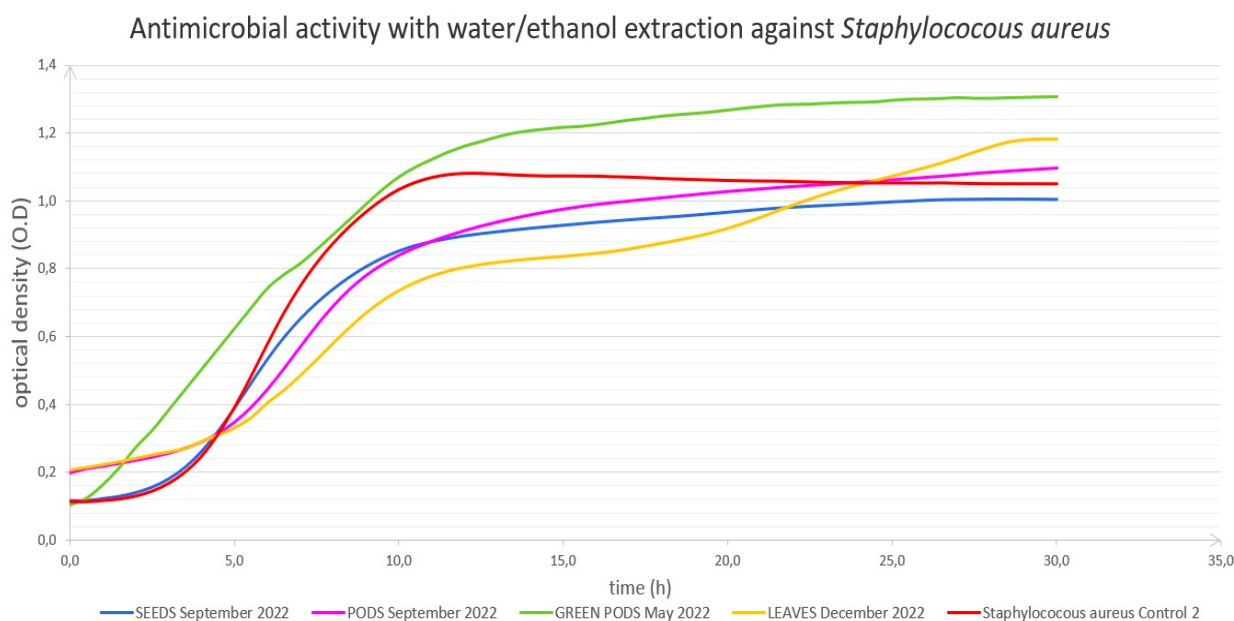
Από τις καμπύλες ανάπτυξης που παρουσιάζονται παραπάνω προκύπτουν οι ακόλουθες σημαντικές παρατηρήσεις, οι οποίες αποδεικνύονται πολύτιμες για τον χαρακτηρισμό της αντιμικροβιακής ικανότητας κάθε εκχυλίσματος, με νερό ως διαλύτη, έναντι του *Staphylococcus aureus*. Πιο συγκεκριμένα, συγκρίνεται η συμπεριφορά και η ανάπτυξη του *Staphylococcus aureus* όταν υποβάλλεται σε εκχυλίσματα χαρουπιού σε σχέση με την συμπεριφορά και την ανάπτυξη της απουσίας αυτών (Control 1).

- Στο εκχύλισμα σπόρων φαίνεται να υπάρχει ήπια αντιμικροβιακή δράση ενάντια του *Staphylococcus aureus* καθώς η ειδική ταχύτητα πολλαπλασιασμού του φαίνεται να είναι ελαφρά μικρότερη σε σχέση με το Control 1. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο χρόνος προσαρμογής του *Staphylococcus aureus* στο εκχύλισμα αυτό ήταν ελαφρά μικρότερος σε σχέση με το δείγμα ελέγχου χωρίς όμως αυτή η μικρή μείωση να είναι ικανή να αναίρεση την αντιμικροβιακή ικανότητα του εκχυλίσματος.
- Στο εκχύλισμα λοβών φαίνεται να υπάρχει ελάχιστη αντιμικροβιακή δράση ενάντια του *Staphylococcus aureus* καθώς η ειδική ταχύτητα πολλαπλασιασμού φαίνεται να είναι ελαφρά μικρότερη σε σχέση με το Control 1. Παράλληλα αυτό προκύπτει και από το γεγονός ότι ο μικροοργανισμό αυτός φαίνεται να χρειάστηκε λίγο περισσότερο χρόνο να προσαρμοστεί στο περιβάλλον αυτό.
- Στο εκχύλισμα πράσινων λοβών, παρατηρείται από το γράφημα πολύ μικρή ειδική ταχύτητα πολλαπλασιασμού. Επιπλέον ο χρόνος προσαρμογής του *Staphylococcus aureus* παρέμεινε στα ίδια επίπεδα με τον αντίστοιχο στο δείγμα ελέγχου.
- Στο εκχύλισμα φύλλων φαίνεται να υπάρχει ισχυρή αντιμικροβιακή δράση ενάντια του *S.aureus* καθώς η ειδική ταχύτητα πολλαπλασιασμού φαίνεται να είναι αρκετά μικρότερη σε σχέση με το Control 1. Παράλληλα, φαίνεται ότι ο *S.aureus* στο εκχύλισμα αυτό δεν παρουσιάζει φάση προσαρμογής, όμως αυτό το γεγονός δεν επηρεάζει την ισχυρή αντιμικροβιακή ικανότητα που φαίνεται να παρουσιάζει καθώς ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης είναι τόσο μικρός που αναγκάζει τον *S.aureus* να παραμείνει για μεγάλο χρονικό διάστημα σε χαμηλότερα επίπεδα σε σχέση τόσο με το δείγμα ελέγχου όσο και με όλα τα υπόλοιπα εκχυλίσματα που μελετήθηκαν. Επίσης σημαντικό είναι και το γεγονός ότι ο *S.aureus* στο εκχύλισμα των φύλλων φαίνεται να χρειάστηκε τον περισσότερο χρόνο ώστε να φτάσει στο μέγιστο πληθυσμό της σε σχέση με τα υπόλοιπα εκχυλίσματα.
- Το εκχύλισμα στα οποίο φαίνεται ο *S.aureus* να παρουσιάζει την μικρότερη ειδική ταχύτητα πολλαπλασιασμού είναι αυτό των φύλλων με διαλύτη το νερό. Αυτό μας υποδεικνύει ισχυρότερη αντιμικροβιακή δράση στο εκχύλισμα από αυτό το τμήματα χαρουπιάς σε σχέση με τα υπόλοιπα που εξετάστηκαν.

Στη συνέχεια, φαίνονται οι καμπύλες ανάπτυξης του *Staphylococcus aureus* στα εκχυλίσματα με διαλύτη το μίγμα νερού:αιθανόλης 90:10.

Πίνακας 13. Τα τέσσερα τμήματα χαρουπιάς που εκχυλίστηκαν με μίγμα νερού:αιθανόλης (90:10) συνοδευόμενα από το αντίστοιχο δείγμα ελέγχου ή "μάρτυρα". Παρέχονται Επιπλέον λεπτομερείς ποσότητες εμβολιασμού των δειγμάτων.

<i>Staphylococcus aureus</i>		
ΕΚΧΥΛΙΣΗ	ΤΜΗΜΑ ΧΑΡΟΥΠΙΟΥ	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ
Water/Ethanol 90:10 extraction	Seeds September 2022 (114b)	Seeds (b) 50 $\mu$ L + SA 50 $\mu$ L + BHI Broth 250 $\mu$ L
	Pods September 2022 (116b)	Pods (b) 50 $\mu$ L + SA 50 $\mu$ L + BHI Broth 250 $\mu$ L
	Green pods May 2022 (118b)	Green Pods (b) 50 $\mu$ L + SA 50 $\mu$ L + BHI Broth 250 $\mu$ L
	Leaves December 2022 (119b)	Leaves (b) 50 $\mu$ L + SA 50 $\mu$ L + BHI Broth 250 $\mu$ L
	SA Control 2 (Water/Ethanol - 90:10)	SA 50 $\mu$ L + BHI Broth 250 $\mu$ L + 50 $\mu$ L H <sub>2</sub> O/ethanol (90:10)



Γράφημα 8. Καμπύλες ανάπτυξης του *Staphylococcus aureus* σε εκχυλίσματα με μίγμα νερού:αιθανόλης 90:10 από διάφορα τμήματα χαρουπιού σε συνδυασμό με την αντίστοιχη καμπύλη ανάπτυξης στο δείγμα ελέγχου/μάρτυρα (Control 2)

- Στο εκχύλισμα σπόρων φαίνεται να υπάρχει αντιμικροβιακή δράση καθώς η ειδική ταχύτητα πολλαπλασιασμού του *S.aureus* φαίνεται να είναι μικρότερη σε σχέση με το Control 2. Επίσης παρατηρείται ότι ο μικροοργανισμός



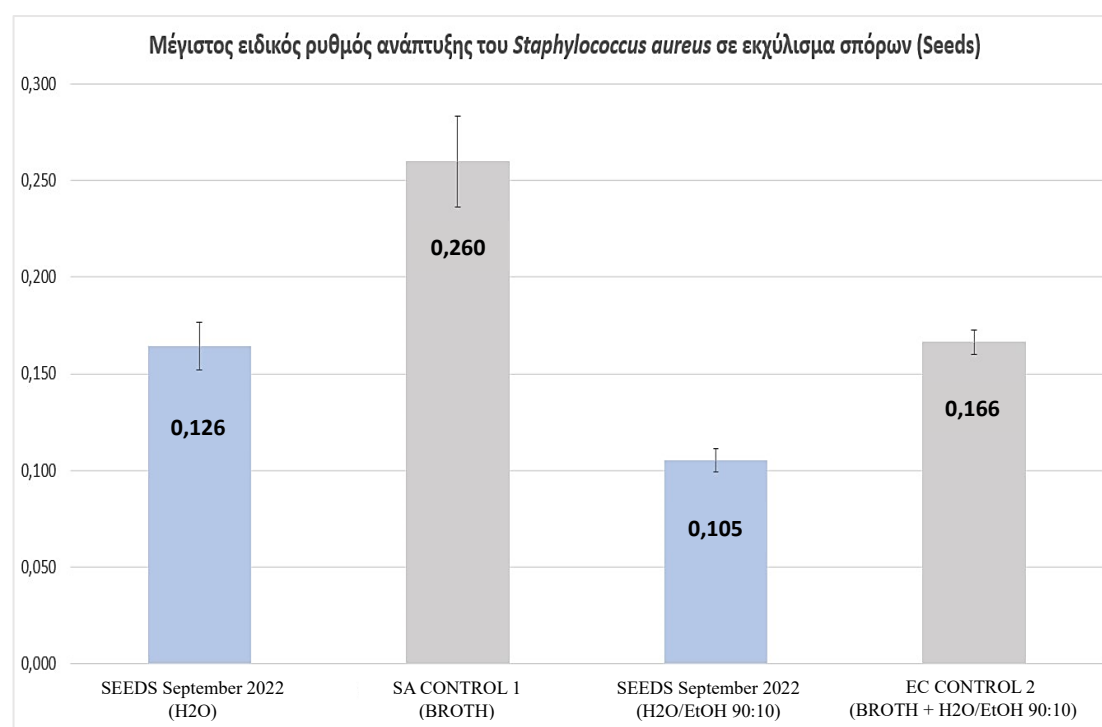
χρειάστηκε λιγότερο χρόνο να προσαρμοστεί στο περιβάλλον του εκχυλίσματος, όμως αυτό δεν αναιρεί την αντιμικροβιακή δράση του καθώς ο *S.aureus* παρέμεινε καθ' όλη τη διάρκεια σε χαμηλότερα επίπεδα σε σχέση με το δείγμα ελέγχου Control 2.

- Στο εκχύλισμα λοβών, παρατηρείται από το γράφημα πολύ μικρότερη ειδική ταχύτητα πολλαπλασιασμού σε σχέση με το Control 2, γεγονός που υποδεικνύει ισχυρή αντιμικροβιακή ικανότητα του εκχυλίσματος ενάντια στον *S.aureus*. Αξίζει να σημειωθεί ότι και σε αυτό το εκχύλισμα δεν παρουσιάζεται φάση προσαρμογής. Ούτε σε αυτή την περίπτωση δεν επηρεάζεται η αντιμικροβιακή δράση του εκχυλίσματος καθώς η πολύ μικρή ειδική ταχύτητα πολλαπλασιασμού δεν επιτρέπει στον *Staphylococcus aureus* να αναπτυχθεί ιδιαίτερα παραμένοντας σε χαμηλότερα επίπεδα σε σχέση με το Control 2, σχεδόν σε όλη την χρονική περίοδο πριν την φάση σταθεροποίησης.
- Στο εκχύλισμα πράσινων λοβών, φαίνεται να υπάρχει ισχυρή αντιμικροβιακή δράση ενάντια του *Staphylococcus aureus* καθώς η ειδική ταχύτητα πολλαπλασιασμού φαίνεται να είναι αισθητά μικρότερη σε σχέση με το Control 2. Παράλληλα, φαίνεται ότι ο *S.aureus* στο εκχύλισμα αυτό δεν παρουσιάζει φάση προσαρμογής. Το γεγονός αυτό δεν αναιρεί την ισχυρή αντιμικροβιακή δράση του εκχυλίσματος αυτού καθώς παρόλο που ο μικροοργανισμός δεν χρειάστηκε χρόνο να προσαρμοστεί, αναπτύχθηκε με πολύ μικρό ρυθμό σε σχέση με το Control 2. Επιπλέον παρατηρείται μέσα από την καμπύλη ανάπτυξης ένα μεγάλο χρονικό διάστημα όπου η οπτική πυκνότητα αυξάνεται και παραμένει σε υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με το Control 2. Υπενθυμίζεται ότι κατά τον υπολογισμό της οπτικής πυκνότητας, συνυπολογίζονται ταυτόχρονα και νεκρά κύτταρα του μικροοργανισμού που προφανώς υπάρχουν σε αυτό το εκχύλισμα και για αυτό ο μικροοργανισμός καθυστερεί να εισέλθει στη στασιμότητα.
- Στο εκχύλισμα φύλλων φαίνεται να υπάρχει ισχυρή αντιμικροβιακή δράση ενάντια του *S.aureus* καθώς η ειδική ταχύτητα πολλαπλασιασμού φαίνεται να είναι σε πολύ μεγάλο βαθμό μικρότερη σε σχέση με το Control 2. Όπως και στα εκχυλίσματα λοβών και πράσινων λοβών, έτσι και σε αυτό το εκχύλισμα ο *S.aureus* δεν χρειάστηκε χρόνο να προσαρμοστεί, χωρίς όμως να αναιρείτε η ισχυρή αντιμικροβιακή δράση του εκχυλίσματος καθώς σε αυτό το εκχύλισμα ο *Staphylococcus aureus* χρειάστηκε πολύ περισσότερο χρόνο ώστε να φτάσει στο μέγιστο πληθυσμό της σε σχέση τόσο με το Control 2 όσο και με τα υπόλοιπα εκχυλίσματα.
- Το εκχύλισμα στο οποίο φαίνεται ο *Staphylococcus aureus* να παρουσιάζει την μικρότερη ειδική ταχύτητα πολλαπλασιασμού και κατά συνέπεια την ισχυρότερη αντιμικροβιακή δράση είναι αυτό των φύλλων με διαλύτη το μίγμα νερού:αιθανόλης 90:10.

Στον πιο κάτω πίνακα παρουσιάζονται οι τιμές των ειδικών ρυθμών ανάπτυξης και των αντίστοιχων τυπικών αποκλίσεων του *Staphylococcus aureus* σε κάθε εκχύλισμα και δείγμα ελέγχου που μελετήθηκε. Επιπλέον παρουσιάζεται ο χρόνος προσαρμογής του μικροοργανισμού στο εκάστοτε εκχύλισμα και δείγμα ελέγχου.

Πίνακας 14 Ειδικοί ρυθμοί ανάπτυξης ( $\mu$ ) συνοδευόμενοι από την τυπική τους απόκλιση και χρόνος προσαρμογής (lag phase) του *Staphylococcus aureus* στα εξεταζόμενα εκχυλίσματα.

<i>Staphylococcus aureus</i>				
Aqueous extracts	Περιγραφή δειγμάτων	Rate, $\mu$ (1/h)	Standard deviation (SD)	lag phase (h)
Seeds September 2022 (114a)	Seeds (a) 50 $\mu$ L + SA 50 $\mu$ L + BHI Broth 250 $\mu$ L	0,126	0,012	1,333
Pods September 2022 (116a)	Pods (a) 50 $\mu$ L + SA 50 $\mu$ L + BHI Broth 250 $\mu$ L	0,171	0,056	4,46
Green pods May 2022 (118a)	Green Pods (a) 50 $\mu$ L + SA 50 $\mu$ L + BHI Broth 250 $\mu$ L	0,09	0,019	3,475
Leaves December 2022 (119a)	Leaves (a) 50 $\mu$ L + SA 50 $\mu$ L + BHI Broth 250 $\mu$ L	0,079	0,017	-
SA Control 1 (Broth)	SA 50 $\mu$ L + BHI Broth 300 $\mu$ L	0,26	0,023	3,397
Water/Ethanolc (90:10) extracts	Περιγραφή δειγμάτων	Rate, $\mu$ (1/h)	Standard deviation (SD)	lag phase (h)
Seeds September 2022 (114b)	Seeds (b) 50 $\mu$ L + SA 50 $\mu$ L + BHI Broth 250 $\mu$ L	0,105	0,006	1,339
Pods September 2022 (116b)	Pods (b) 50 $\mu$ L + SA 50 $\mu$ L + BHI Broth 250 $\mu$ L	0,065	0,006	-
Green pods May 2022 (118b)	Green Pods (b) 50 $\mu$ L + SA 50 $\mu$ L + BHI Broth 250 $\mu$ L	0,058	0,01	-
Leaves December 2022 (119b)	Leaves (b) 50 $\mu$ L + SA 50 $\mu$ L + BHI Broth 250 $\mu$ L	0,033	0,002	-
SA Control 2 (Water/Ethanol - 90:10)	SA 50 $\mu$ L + BHI Broth 250 $\mu$ L + 50 $\mu$ L H <sub>2</sub> O/ethanol (90:10)	0,166	0,006	2,565



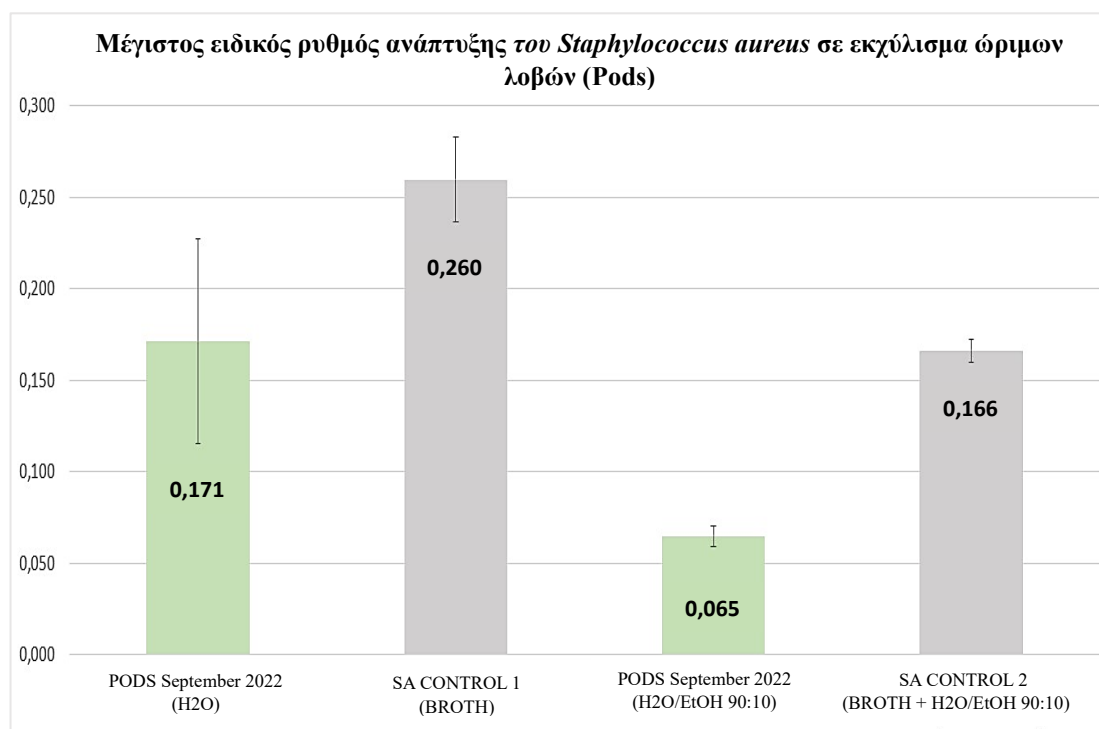
Γράφημα 9 Ραβδόγραμμα των ειδικών ρυθμών ανάπτυξης σε συνδυασμό με τα διαστήματα εμπιστοσύνης τους (μαύρη κάθετη γραμμή), του *Staphylococcus aureus* σε εκχυλίσματα σπόρων, μαζί με τα αντίστοιχα δείγματα ελέγχου (Control 1 και 2)

Λαμβάνοντας υπόψη την ειδική ταχύτητα πολλαπλασιασμού ( $\mu$ ) και την αντίστοιχη τυπική απόκλιση των δειγμάτων που παρουσιάζονται στο πιο πάνω ραβδόγραμμα προκύπτουν οι ακόλουθες σημαντικές παρατηρήσεις:

- Το εκχύλισμα σπόρων με διαλύτη το νερό φαίνεται να παρουσιάζει ήπια αντιμικροβιακή δράση καθώς προκάλεσε στατιστικά σημαντική μείωση του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης του *Staphylococcus aureus* σε σχέση με το δείγμα ελέγχου (Control 1). Αυτή η παρατήρηση πηγάζει από την μείωση του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης κατά 37% και την μη επικάλυψη των διαστημάτων εμπιστοσύνης τους.
- Στο εκχύλισμα σπόρων με διαλύτη το μίγμα νερού:αιθανόλης 90:10, η μείωση του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης του *Staphylococcus aureus* σε σχέση με το δείγμα ελέγχου (Control 2) και παράλληλα η μη επικάλυψη των διαστημάτων εμπιστοσύνης τους φανερώνει την ύπαρξη αντιμικροβιακής δράσης. Η ένταση της αντιμικροβιακής δράσης του εκχυλίσματος αυτού χαρακτηρίζεται ως ήπια λόγω του ότι η τάξη της μείωση του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης ανέρχεται στο 37%
- Η ένταση της αντιμικροβιακής ικανότητα των εκχυλισμάτων σπόρων παρουσιάζει ελάχιστη στατιστικά σημαντική διαφορά ανάλογα με τον χρησιμοποιούμενο διαλύτη. Πιο συγκεκριμένα, υπάρχει μία ελαφρά υπεροχή της αντιμικροβιακής ικανότητας του εκχυλίσματος με διαλύτη το μίγμα νερού:αιθανόλης 90:10.

Με βάση τις παραπάνω παρατηρήσεις, η αντιμικροβιακή ικανότητα των σπόρων ενάντια στον *Staphylococcus aureus* μπορεί να χαρακτηριστεί ως ικανοποιητική και στα δύο εκχυλίσματα της χωρίς να παρουσιάζει ιδιαίτερη διαφοροποίηση αναλόγως του χρησιμοποιούμενου διαλύτη.

Στην συνέχεια παρουσιάζονται, μέσω ραβδογράμματος, οι ειδικοί ρυθμοί ανάπτυξης των εκχυλισμάτων λοβού και των αντιστοιχών δειγμάτων ελέγχου τους μαζί με τα διαστήματα εμπιστοσύνης τους



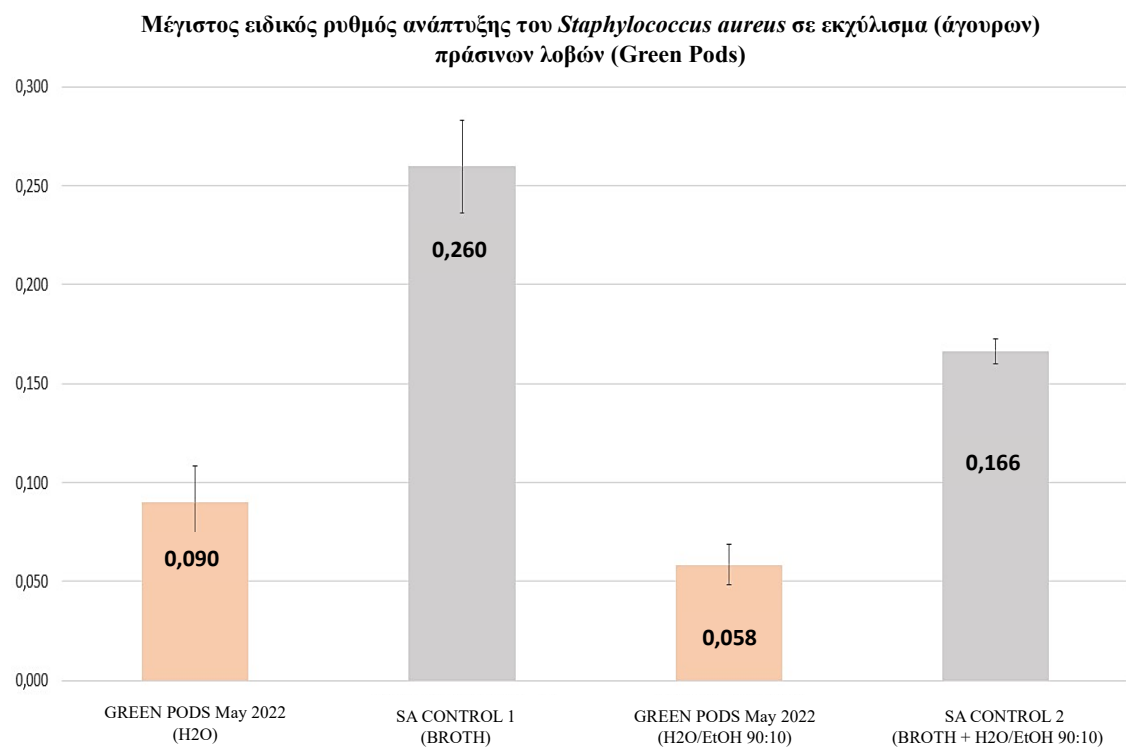
Γράφημα 10 Ραβδόγραμμα των ειδικών ρυθμών ανάπτυξης σε συνδυασμό με τα διαστήματα εμπιστοσύνης τους (μαύρη κάθετη γραμμή), του *Staphylococcus aureus* σε εκχυλίσματα λοβών, μαζί με τα αντίστοιχα δείγματα ελέγχου (Control 1 και 2)

- Στο εκχύλισμα ώριμων λοβών με διαλύτη το νερό παρατηρείται στατιστικά σημαντική μείωση του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης του *Staphylococcus aureus* σε σχέση με τον αντίστοιχο στο δείγμα ελέγχου (Control 1). Αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι τόσο ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης του *Staphylococcus aureus* έχει μειωθεί κατά 34%, όσο και από την μη επικάλυψη των διαστημάτων εμπιστοσύνης τους. Βέβαια, τα διαστήματα εμπιστοσύνης απέχουν ελάχιστα γεγονός που υποδεικνύει ότι η ένταση της αντιμικροβιακής δράσης είναι ήπια προς ελάχιστη.
- Στο εκχύλισμα ώριμων λοβών με διαλύτη το μίγμα νερού:αιθανόλης 90:10 παρατηρείται στατιστικά σημαντική μείωση του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης του *Staphylococcus aureus* σε σχέση με τον αντίστοιχο στο δείγμα ελέγχου (Control 2). Αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι τόσο ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης του *Staphylococcus aureus* έχει μειωθεί κατά 61% , όσο και από την μη επικάλυψη των διαστημάτων εμπιστοσύνης τους. Τόσο η τάξη της μείωσης του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης όσο και η απόσταση των διαστημάτων εμπιστοσύνης είναι αρκετά μεγάλη γεγονός που υποδεικνύει ισχυρή αντιμικροβιακή δράση των εκχυλισμάτων λοβού με διαλύτη το μίγμα νερού:αιθανόλης 90:10 ενάντια του *Staphylococcus aureus*.

- Με βάση τις στήλες που αφορούν τα εκχυλίσματα ώριμων λοβών παρατηρείται ότι η χρήση του μίγματος νερού:αιθανόλης 90:10 ως διαλύτη ενίσχυσε σε πολύ μεγάλο βαθμό την αντιμικροβιακή ικανότητα των σπόρων. Αυτή η ενίσχυση αποδεικνύεται σαφώς από την αξιοσημείωτη μείωση του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης κατά 62% που παρατηρήθηκε στο εκχύλισμα λοβών που εξήχθησαν με τη χρήση νερού:αιθανόλης 90:10 και από την απόσταση των διαστημάτων εμπιστοσύνης των δύο εκχυλισμάτων.

Με βάση τις πιο πάνω παρατηρήσεις μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι οι λοβοί όταν εκχυλιστούν με διαλύτη το μίγμα νερού:αιθανόλης 90:10 παρουσιάζουν μία πολύ ισχυρή αντιμικροβιακή ικανότητα ενάντια του *Staphylococcus aureus*. Όταν εκχυλιστούν με νερό εξακολουθούν να έχουν αντιμικροβιακή ικανότητα αλλά η ένταση της είναι αρκετά ασθενέστερη.

Με το ακόλουθο ραβδόγραμμα γίνεται εκτενέστερη μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης που παρουσιάζουν τα εκχυλίσματα άγουρων (πράσινων) λοβών ενάντια στον *Staphylococcus aureus*.



Γράφημα 11 Ραβδόγραμμα των ειδικών ρυθμών ανάπτυξης σε συνδυασμό με τα διαστήματα εμπιστοσύνης τους (μαύρη κάθετη γραμμή), του *Staphylococcus aureus* σε εκχυλίσματα πράσινων λοβών, μαζί με τα αντίστοιχα δείγματα ελέγχου (Control 1 και 2)

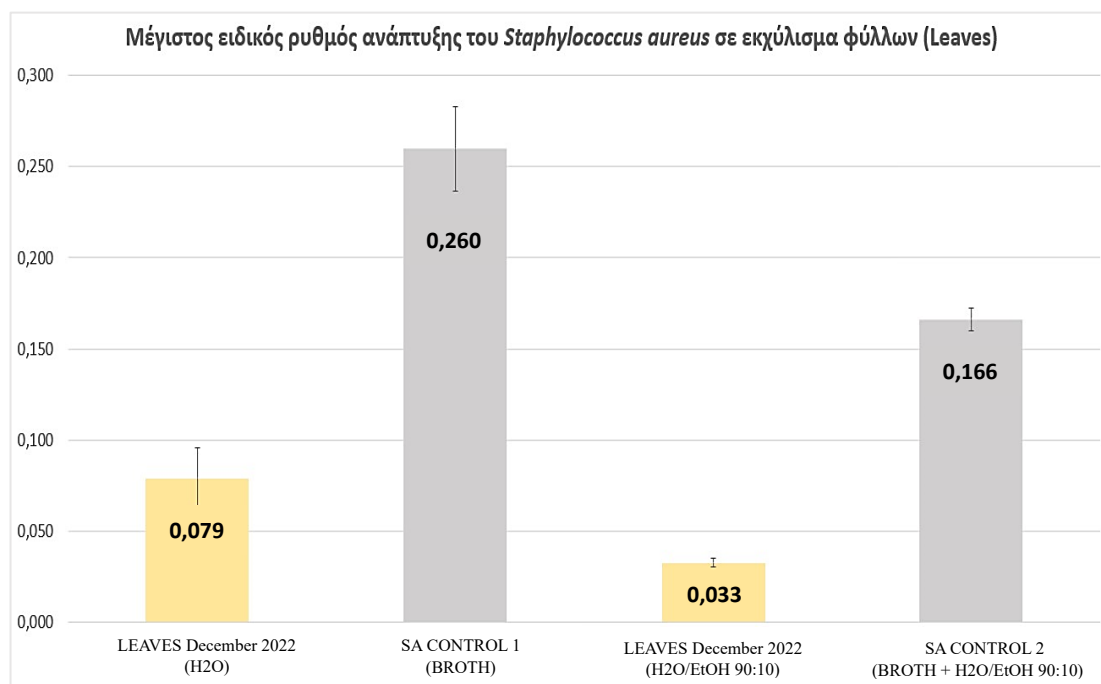
- Στο εκχύλισμα άγουρων (πράσινων) λοβών που έχει εκχυλιστεί με νερό, παρατηρείται στατιστικά σημαντική μείωση του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης του *Staphylococcus aureus* σε σχέση με τον αντίστοιχο στο δείγμα ελέγχου (Control 1). Αυτό απορρέει από το γεγονός ότι τόσο ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης του *Staphylococcus aureus* έχει μειωθεί σε μεγάλο βαθμό της τάξης του 65%, όσο

και από την μη επικάλυψη των διαστημάτων εμπιστοσύνης τους. Τόσο η τάξη της μείωσης του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης όσο και η απόσταση των διαστημάτων εμπιστοσύνης είναι αρκετά μεγάλη γεγονός που υποδεικνύει ισχυρή αντιμικροβιακή δράση των εκχυλισμάτων πράσινου λοβού με διαλύτη το μίγμα νερό ενάντια του *Staphylococcus aureus*.

- Στο εκχύλισμα άγουρων (πράσινων) λοβών με διαλύτη το μίγμα νερού:αιθανόλης 90:10 παρατηρείται στατιστικά σημαντική μείωση του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης του *Staphylococcus aureus* σε σχέση με τον αντίστοιχο στο δείγμα ελέγχου (Control 2). Η παρατήρηση αυτή απορρέει από διπλή αιτιότητα: από την μείωση του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης του *Staphylococcus aureus* κατά 65%, σε συνδυασμό με την απουσία επικάλυψης των διαστημάτων εμπιστοσύνης τους. Τόσο η τάξη της μείωσης του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης όσο και η απόσταση των διαστημάτων εμπιστοσύνης είναι αρκετά μεγάλη γεγονός που υποδεικνύει ισχυρή αντιμικροβιακή δράση των εκχυλισμάτων πράσινου λοβού με διαλύτη το μίγμα νερού:αιθανόλης 90:10 ενάντια του *Staphylococcus aureus*.
- Το εκχύλισμα άγουρων (πράσινων) λοβών με διαλύτη το μίγμα νερού:αιθανόλης 90:10 φαίνεται να παρουσιάζει ελαφρά ισχυρότερη αντιμικροβιακή ικανότητα σε σχέση με το αντίστοιχο εκχύλισμά με διαλύτη το νερό . Αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης του *Staphylococcus aureus* στο εκχύλισμα με διαλύτη το μίγμα νερού:αιθανόλης 90:10 είναι κατά 35,6% μικρότερος σε σχέση με τον αντίστοιχόν στο εκχύλισμα με διαλύτη το νερό.

Με βάση τις πιο πάνω παρατηρήσεις μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι οι άγουροι (πράσινοι) λοβοί είτε εκχυλιστούν με νερό είτε με μίγμα νερού:αιθανόλης 90:10 παρουσιάζουν ισχυρή αντιμικροβιακή ικανότητα, με ελαφρά υπεροχή στο εκχύλισμα με διαλύτη το μίγμα νερού:αιθανόλης 90:10.

Στο παρακάτω ραβδόγραμμα παρουσιάζονται οι ειδικοί ρυθμοί ανάπτυξης των εκχυλισμάτων φύλλων και των αντίστοιχων δειγμάτων ελέγχου, συνοδευόμενοι από τα αντίστοιχα διαστήματα εμπιστοσύνης.



Γράφημα 12 Ραβδόγραμμα των ειδικών ρυθμών ανάπτυξης σε συνδυασμό με τα διαστήματα εμπιστοσύνης τους (μαύρη κάθετη γραμμή), του *Staphylococcus aureus* σε εκχυλίσματα φύλλων, μαζί με τα αντίστοιχα δείγματα ελέγχου (Control 1 και 2)

- Στο εκχύλισμα φύλλων που έχει εκχυλιστεί με νερό, παρατηρείται στατιστικά σημαντική μείωση του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης του *Staphylococcus aureus* σε σχέση με τον αντίστοιχο στο δείγμα ελέγχου (Control 1). Αυτό απορρέει από το γεγονός ότι τόσο ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης του *Staphylococcus aureus* έχει μειωθεί σε μεγάλο βαθμό της τάξης του 70%, όσο και από την μη επικάλυψη των διαστημάτων εμπιστοσύνης τους. Τόσο η τάξη της μείωσης του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης όσο και η απόσταση των διαστημάτων εμπιστοσύνης είναι αρκετά μεγάλη γεγονός που υποδεικνύει ισχυρή αντιμικροβιακή δράση των εκχυλισμάτων φύλλων με διαλύτη νερό ενάντια του *Staphylococcus aureus*.
- Στο εκχύλισμα φύλλων με διαλύτη το μίγμα νερού:αιθανόλης 90:10 παρατηρείται στατιστικά σημαντική μείωση του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης του *Staphylococcus aureus* σε σχέση με τον αντίστοιχο στο δείγμα ελέγχου (Control 2). Η παρατήρηση αυτή απορρέει από διπλή αιτιότητα: από την μείωση του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης του *Staphylococcus aureus* κατά 80%, σε συνδυασμό με την απουσία επικάλυψης των διαστημάτων εμπιστοσύνης τους. Τόσο η τάξη της μείωσης του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης όσο και η απόσταση των διαστημάτων εμπιστοσύνης είναι αρκετά μεγάλη γεγονός που υποδεικνύει ισχυρή αντιμικροβιακή δράση των εκχυλισμάτων φύλλων με διαλύτη το μίγμα νερού:αιθανόλης 90:10 ενάντια του *Staphylococcus aureus*.
- Το εκχύλισμα φύλλων με διαλύτη το μίγμα νερού:αιθανόλης 90:10 φαίνεται να παρουσιάζει ελαφρά ισχυρότερη αντιμικροβιακή ικανότητα σε σχέση με το



αντίστοιχο εκχύλισμα με διαλύτη το νερό . Αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης του *Staphylococcus aureus* στο εκχύλισμα με διαλύτη το μίγμα νερού:αιθανόλης 90:10 είναι κατά 58,2% μικρότερος σε σχέση με τον αντίστοιχόν στο εκχύλισμα με διαλύτη το νερό.

Με βάση τις πιο πάνω παρατηρήσεις μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι τα φύλλα είτε εκχυλιστούν με νερό είτε με μίγμα νερού:αιθανόλης 90:10 παρουσιάζουν ισχυρή αντιμικροβιακή ικανότητα, με ελαφρά υπεροχή στο εκχύλισμα με διαλύτη το μίγμα νερού:αιθανόλης 90:10

Κατά τη σύγκριση των στηλών που αντιστοιχούν στα δείγματα ελέγχου (Control 1 και Control 2) στα παρουσιαζόμενα ραβδογράμματα, προκύπτει μια αξιοσημείωτη παρατήρηση. Η συμπερίληψη μίγματος νερού:αιθανόλης 90:10 στο δείγμα ελέγχου 2 είχε ως αποτέλεσμα στατιστικά σημαντική μείωση κατά 36% του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης του *Staphylococcus aureus* σε σύγκριση με δείγμα ελέγχου 1, όπου απουσίαζε το μίγμα αυτό. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει έντονα ότι η αιθανόλη επιδεικνύει αντιμικροβιακή δράση έναντι του *Staphylococcus aureus*.

Στον πιο κάτω πίνακα παρουσιάζονται οι τιμές του παράγοντα **% inhibition** και ο χαρακτηρισμός της αντιμικροβιακής δράσης του κάθε εκχυλίσματος ενάντια στον *Staphylococcus aureus* με βάση αυτές. Ο χαρακτηρισμός της ισχύος της αντιμικροβιακής δράσης γίνεται με βάση κάποια κατάλληλα εύρη τιμών τα οποία παρουσιάζονται και αυτά στον πίνακα

Πίνακας 15 Χαρακτηρισμός της αντιμικροβιακής δράσης των εκχυλισμάτων που μελετήθηκαν ενάντια στον *Staphylococcus aureus* με βάση τις τιμές του παράγοντα % inhibition.

<b>Staphylococcus aureus</b>						
Aqueous extracts	% inhibition	ΜΗΔΕΝΙΚΗ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ (% inhibition= 0%)	ΕΛΑΧΙΣΤΗ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ (% inhibition <35%)	ΗΠΙΑ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ (% inhibition < 60%)	ΙΣΧΥΡΗ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ (% inhibition 60-85%)	ΠΟΛΥ ΙΣΧΥΡΗ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ (% inhibition > 85%)
PODS (H2O)	34		√			
SEEDS (H2O)	37			√		
LEAVES (H2O)	70				√	
GREEN PODS (H2O)	65				√	
<b>Ethanollic extracts</b>						
PODS (H2O/EtOH)	61				√	
SEEDS (H2O/EtOH)	37			√		
LEAVES (H2O/EtOH)	80				√	
GREEN PODS (H2O/EtOH)	65				√	

Με βάση τον πιο πάνω πίνακα, πέρα από τα εκχυλίσματα σπόρων και το εκχύλισμα λοβών με διαλύτη το νερό, όλα τα υπόλοιπα εκχυλίσματα παρουσιάζουν ισχυρή αντιμικροβιακή δράση ενάντια στον *Staphylococcus aureus*. Αξίζει να σημειωθεί ότι

οι σπόροι είτε εκχυλιστούν με νερό είτε με μίγμα νερού:αιθανόλης 90:10, παρουσιάζουν την ίδια αντιμικροβιακή ικανότητα η οποία χαρακτηρίζεται με βάση τον παράγοντα % *inhibition* ως ήπια. Αξιοσημείωτη είναι η μεγάλη αύξηση της αντιμικροβιακής ικανότητας των λοβών (από ελάχιστη σε ισχυρή), όταν χρησιμοποιηθεί το μίγμα νερού:αιθανόλης 90:10 ως διαλύτης έναντι του νερού.

## Πείραμα δεύτερο (Εκχύλιση Β)

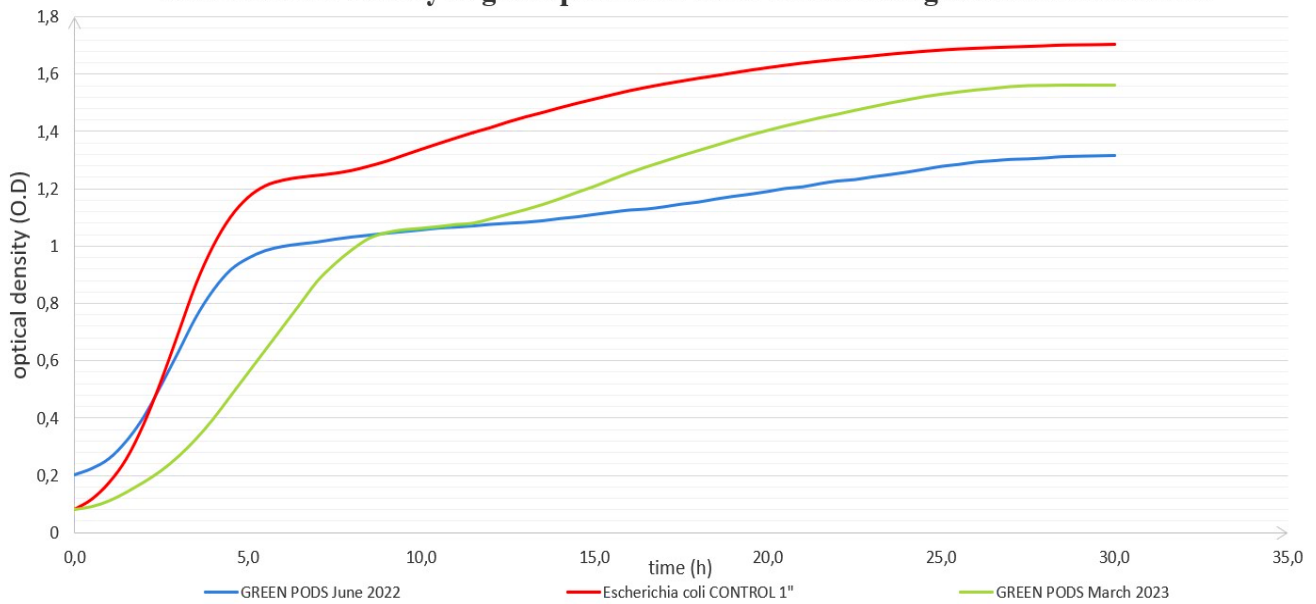
Στην συνέχεια παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του δεύτερου πειράματος (Εκχύλιση Β). Με βάση τα αποτελέσματα του πρώτου πειράματος παρατηρήθηκε ότι οι άγουροι (πράσινοι) λοβοί (Green pods), έχουν ισχυρή αντιμικροβιακή ικανότητα ενάντια στους μικροοργανισμούς *Escherichia coli* και *Staphylococcus aureus*. Γ' αυτό τον λόγο επιλέχθηκε ως το τμήμα χαρουπιού για το οποίο εξετάστηκε η αντιμικροβιακή του ικανότητα για τρία στάδια ωρίμανσης (Μάιος 2022, Ιούνιος 2022, Μάρτιος 2023) ενάντια στους μικροοργανισμούς *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Typhimurium* και *Listeria monocytogenes*. Αξίζει να σημειωθεί ότι η αντιμικροβιακή ικανότητα των άγουρων (πράσινων) λοβών με μήνα συγκομιδής τον Μάιο του 2022 ενάντια στην *Escherichia coli* και στον *Staphylococcus aureus*, μελετήθηκε ήδη στο πρώτο πείραμα και γι' αυτό τον λόγο δεν μελετήθηκε ξανά. Το πείραμα αυτό διεξάχθηκε με σκοπό να διερευνήσει ποιο από τα τρία προαναφερθέν στάδια ωρίμανσης μεγιστοποιεί την αντιμικροβιακή ικανότητα των πράσινων λοβών ενάντια στον εκάστοτε προς μελέτη μικροοργανισμό.

Αρχικά παρουσιάζονται οι καμπύλες ανάπτυξης της *Escherichia coli* σε εκχυλίσματα πράσινων λοβών με περιόδους συγκομιδής τον Ιούνιο του 2022 και το Μάρτιο του 2023 και με διαλύτη το νερό:

Πίνακας 16 Πράσινοι λοβοί που συγκομίστηκαν τον Ιούνιο του 2022 και τον Μάρτιο του 2023 και εκχυλίστηκαν με νερό, συνοδευόμενα από το αντίστοιχο δείγμα ελέγχου. Παρέχονται λεπτομερείς ποσότητες εμβολιασμού των δειγμάτων.

<i>Escherichia coli</i>		
ΕΚΧΥΛΙΣΗ	ΤΜΗΜΑ ΧΑΡΟΥΠΙΟΥ	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ
Water extraction	Green pods June 2022 (120a)	Green pods June 2022 (a) 50 µL + EC 50 µL + BHI Broth 250 µL
	Green pods March 2023 (121a)	Green pods March 2023 (a) 50 µL + EC 50 µL + BHI Broth 250 µL
	EC Control 1 (Broth)	EC 50 µL + BHI Broth 300 µL

### Antimicrobial activity of green pods with water extraction against *Escherichia coli*



Γράφημα 13 Καμπύλες ανάπτυξης της *Escherichia coli* σε εκχυλίσματα πράσινων λοβών με διαφορετικούς μήνες ωρίμανσης και με νερό ως διαλύτης, σε συνδυασμό με την αντίστοιχη καμπύλη ανάπτυξης στο δείγμα ελέγχου/μάρτυρα (Control 1)

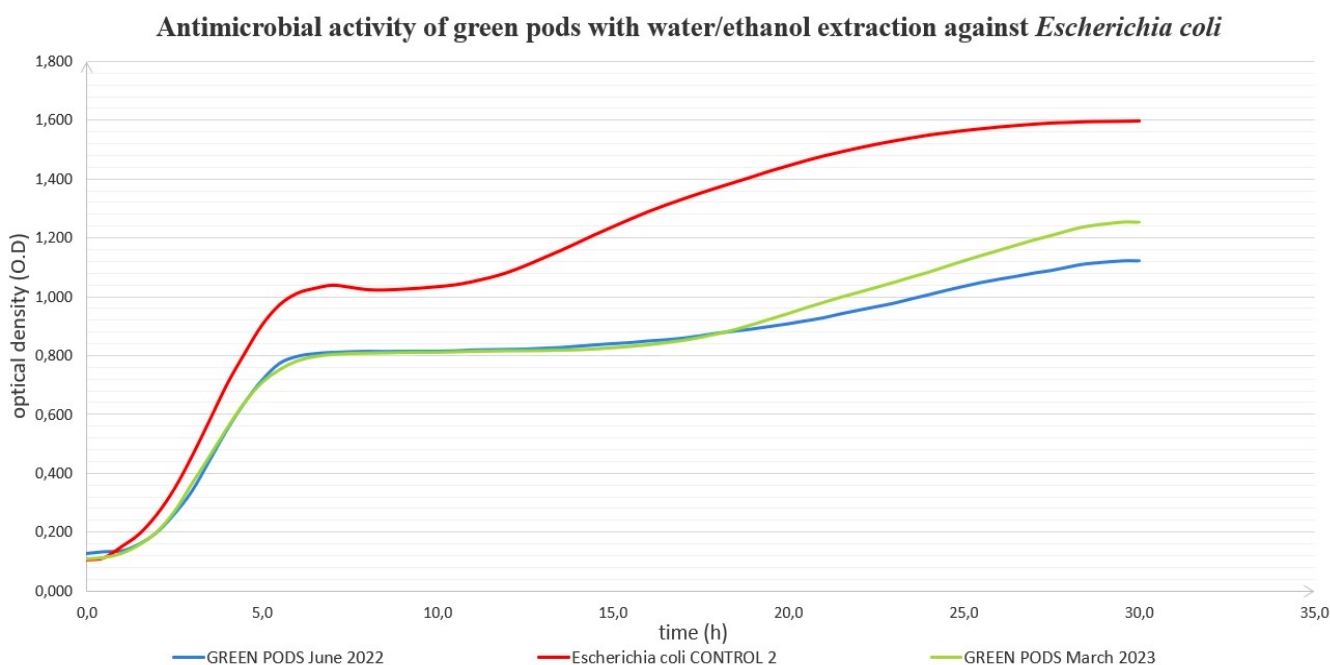
Από τις καμπύλες ανάπτυξης που παρουσιάζονται παραπάνω προκύπτουν οι ακόλουθες σημαντικές παρατηρήσεις, οι οποίες αποδεικνύονται πολύτιμες για τον χαρακτηρισμό της αντιμικροβιακής ικανότητας κάθε εκχυλίσματος, με νερό ως διαλύτη, έναντι της *Escherichia coli*. Πιο συγκεκριμένα, συγκρίνεται η συμπεριφορά και η ανάπτυξη της *Escherichia coli* όταν υποβάλλεται σε εκχυλίσματα πράσινων λοβών διαφορετικών σταδίων ωρίμανσης σε σχέση με την συμπεριφορά και την ανάπτυξη της απουσίας αυτών (Control 1).

- Το εκχύλισμα πράσινων λοβών, ωρίμανσης Ιουνίου 2022, φαίνεται να παρουσιάζει ελάχιστη αντιμικροβιακή δράση έναντι της *Escherichia coli*. Αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης της *Escherichia coli* στο εκχύλισμα αυτό φαίνεται να είναι ελαφρά μικρότερος σε σχέση με τον αντίστοιχο στο δείγμα ελέγχου 1 (Control 1).
- Ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης *Escherichia coli* στο εκχύλισμα πράσινων λοβών, ωρίμανσης Μαρτίου 2023, φαίνεται να είναι αισθητά μικρότερος σε σχέση με τον αντίστοιχο στο δείγμα ελέγχου. Αυτό υποδεικνύει μία ήπια προς ισχυρή αντιμικροβιακή ικανότητα του εκχυλίσματος αυτού ενάντια στην *Escherichia coli*.
- Αξίζει να σημειωθεί ότι σε κανένα από τα πιο πάνω εκχυλίσματα, η *Escherichia coli* δεν χρειάστηκε χρόνο να προσαρμοστεί. Επιπλέον η *Escherichia coli* σε όλα τα εκχυλίσματα χρειάστηκε αρκετό χρόνο για να φτάσει στη φάση στασιμότητας. Υπενθυμίζεται ότι κατά τον υπολογισμό της οπτικής πυκνότητας, συνυπολογίζονται ταυτόχρονα και νεκρά κύτταρα του μικροοργανισμού που προφανώς υπάρχουν σε αυτά το εκχύλισμα και για αυτό φαίνεται ο μικροοργανισμός να καθυστερεί να εισέλθει στη στασιμότητα.

Ακολουθως παρουσιάζονται οι καμπύλες ανάπτυξης της *Escherichia coli* σε εκχυλίσματα πράσινων λοβών με περιόδους συγκομιδής τον Ιούνιο του 2022 και το Μάρτιο του 2023 και με διαλύτη το μίγμα νερού:αιθανόλης 90:10.

Πίνακας 17 Πράσινοι λοβοί που συγκομίστηκαν τον Ιούνιο του 2022 και τον Μάρτιο του 2023 και εκχυλίστηκαν με μίγμα νερού:αιθανόλης 90:10, συνοδευόμενα από το αντίστοιχο δείγμα ελέγχου. Παρέχονται λεπτομερείς ποσότητες εμβολιασμού των δειγμάτων

<i>Escherichia coli</i>		
ΕΚΧΥΛΙΣΗ	ΤΜΗΜΑ ΧΑΡΟΥΠΙΟΥ	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ
Water/Ethanol 90:10 extraction	Green pods June 2022 (120b)	Green pods June 2022 (b) 50 $\mu$ L + EC 50 $\mu$ L + BHI Broth 250 $\mu$ L
	Green pods March 2023 (121b)	Green pods March 2023 (b) 50 $\mu$ L + EC 50 $\mu$ L + BHI Broth 250 $\mu$ L
	EC Control 2 (Water/Ethanol - 90:10)	EC 50 $\mu$ L + BHI Broth 250 $\mu$ L + 50 $\mu$ L H <sub>2</sub> O/ethanol (90:10)



Γράφημα 14 Καμπύλες ανάπτυξης της *Escherichia coli* σε εκχυλίσματα πράσινων λοβών με διαφορετικούς μήνες ωρίμανσης και με μίγμα νερού:αιθανόλης 90:10 ως διαλύτης, σε συνδυασμό με την αντίστοιχη καμπύλη ανάπτυξης στο δείγμα ελέγχου/μάρτυρα (Control 2)

- Ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης *Escherichia coli* στο εκχύλισμα πράσινων λοβών, ωρίμανσης Ιουνίου 2022, φαίνεται να είναι ελάχιστα μικρότερος σε σχέση με τον αντίστοιχο στο δείγμα ελέγχου. Αυτό υποδεικνύει μία ήπια αντιμικροβιακή ικανότητα του εκχυλίσματος αυτού ενάντια στην *Escherichia coli*.
- Το εκχύλισμα πράσινων λοβών, ωρίμανσης Μαρτίου 2023, φαίνεται να παρουσιάζει ελάχιστη αντιμικροβιακή δράση έναντι της *Escherichia coli*. Αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης της *Escherichia coli* στο εκχύλισμα αυτό φαίνεται να είναι ελαφρά μικρότερος σε σχέση με τον αντίστοιχο στο δείγμα ελέγχου 2 (Control 2).
- Ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης των δύο εκχυλισμάτων φαίνεται να είναι σχεδόν όμοιος. Αυτό μαρτυρά ότι όταν οι πράσινοι λοβοί εκχυλιστούν με αιθανόλη, η ημερομηνία συγκομιδής τους, δεν επηρεάζει την αντιμικροβιακή ικανότητα του εκχυλίσματος ενάντια στην *Escherichia coli*.
- Όπως και στα εκχυλίσματα με διαλύτη το νερό που παρουσιάστηκαν παραπάνω, έτσι και σε αυτά με διαλύτη το μίγμα νερού:αιθανόλης 90:10, η *Escherichia coli* δεν χρειάστηκε χρόνο να προσαρμοστεί. Ακόμη, φαίνεται ότι ο πληθυσμός της στα δύο εκχυλίσματα παρέμεινε σε αρκετά χαμηλότερα επίπεδα σε σχέση με το δείγμα ελέγχου.

Για την εκτενέστερη μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης των εκχυλισμάτων πράσινου λοβού ενάντια στην *Escherichia coli*, παρουσιάζονται στο πιο κάτω πίνακα οι τιμές του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης της συνοδευόμενες από τις τυπικές τους αποκλίσεις. Επίσης αναγράφονται και οι χρόνοι προσαρμογής του μικροοργανισμού στο κάθε εκχύλισμα.

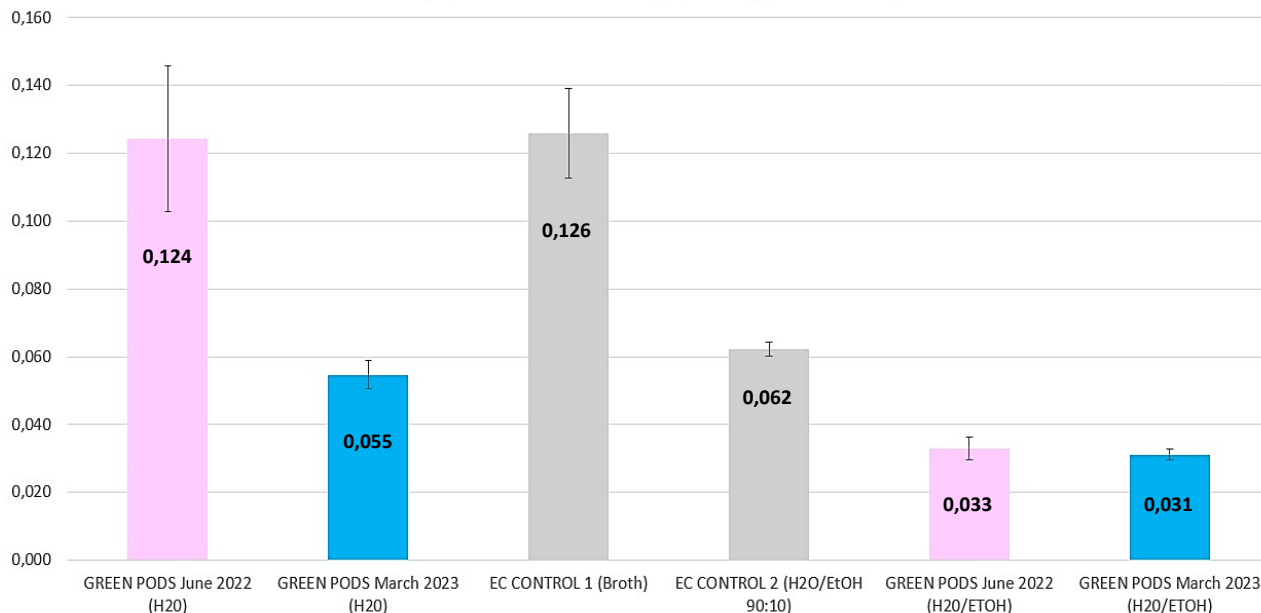
Πίνακας 18 Ειδικοί ρυθμοί ανάπτυξης ( $\mu$ ) συνοδευόμενοι από την τυπική τους απόκλιση και χρόνος προσαρμογής (lag phase) της *Escherichia coli* στα εξεταζόμενα εκχυλίσματα.

<b><i>Escherichia coli</i></b>				
<b>Aqueous extracts</b>	<b>Περιγραφή δειγμάτων</b>	<b>Rate, <math>\mu</math> (1/h)</b>	<b>Standard deviation (SD)</b>	<b>lag phase (h)</b>
Green pods June 2022 (120a)	Green pods June 2022 (a) 50 $\mu$ L + EC 50 $\mu$ L + BHI Broth 250 $\mu$ L	0,124	0,022	-
Green pods March 2023 (121a)	Green pods March 2023 (a) 50 $\mu$ L + EC 50 $\mu$ L + BHI Broth 250 $\mu$ L	0,055	0,004	-
EC Control 1 (Broth)	EC 50 $\mu$ L + BHI Broth 300 $\mu$ L	0,126	0,013	-
<b>Water/Ethanol (90:10) extracts</b>	<b>Περιγραφή δειγμάτων</b>	<b>Rate, <math>\mu</math> (1/h)</b>	<b>Standard deviation (SD)</b>	<b>lag phase (h)</b>
Green pods June 2022 (120b)	Green pods June 2022 (b) 50 $\mu$ L + EC 50 $\mu$ L + BHI Broth 250 $\mu$ L	0,033	0,003	-
Green pods March 2023 (121b)	Green pods March 2023 (b) 50 $\mu$ L + EC 50 $\mu$ L + BHI Broth 250 $\mu$ L	0,031	0,002	-
EC Control 2 (Broth + Water/Ethanol - 90:10)	EC 50 $\mu$ L + BHI Broth 250 $\mu$ L + 50 $\mu$ L H <sub>2</sub> O/ethanol (90:10)	0,062	0,002	-



Με βάση τις παραπάνω τιμές και τα ραβδογράμματα που ακολουθούν, προκύπτουν περεταίρω παρατηρήσεις και συμπεράσματα για την αντιμικροβιακή ικανότητα των εκχυλισμάτων πράσινου λοβού ενάντια στην *Escherichia coli*.

Μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης της *Escherichia coli* σε εκχυλίσματα πράσινων λοβών διαφορετικού σταδίου ωρίμανσης και διαλύτη



Γράφημα 15 Ραβδόγραμμα των ειδικών ρυθμών ανάπτυξης σε συνδυασμό με τα διαστήματα εμπιστοσύνης τους (μαύρη κάθετη γραμμή), της *Escherichia coli* σε εκχυλίσματα πράσινων λοβών, διαφορετικού σταδίου ωρίμανσης, μαζί με τα αντίστοιχα δείγματα ελέγχου (Control 1 και 2).

- Στο εκχύλισμα πράσινων λοβών με μήνα συγκομιδής τον Ιούνιο 2022 και με διαλύτη το νερό παρατηρείται ελάχιστη μείωση του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης της *Escherichia coli* σε σχέση με τον αντίστοιχο στο δείγμα ελέγχου (Control 1). Η μείωση αυτή δεν μπορεί να χαρακτηριστεί ως στατιστικά σημαντική καθώς είναι μόνο της τάξης του 1% και τα διαστήματα εμπιστοσύνης τους επικάλυπτονται. Η ελάχιστη αυτή μείωση του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης, δεν είναι ικανή να αποδώσει αντιμικροβιακή ικανότητα ενάντια στην *Escherichia coli*.
- Στο εκχύλισμα πράσινων λοβών με μήνα συγκομιδής τον Μάρτιο 2023 και με διαλύτη το νερό παρατηρείται στατιστικά σημαντική μείωση του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης της *Escherichia coli* σε σχέση με τον αντίστοιχο στο δείγμα ελέγχου (Control 1). Αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι τόσο ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης της *Escherichia coli* έχει μειωθεί κατά 57% , όσο και από την μη επικάλυψη των διαστημάτων εμπιστοσύνης τους. Τόσο η τάξη της μείωσης του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης όσο και η απόσταση των διαστημάτων εμπιστοσύνης είναι αρκετά μεγάλη γεγονός που υποδεικνύει μια πολύ ικανοποιητική αντιμικροβιακή δράση του εκχυλίσματος αυτού ενάντια της *Escherichia coli*.

- Το εκχύλισμα πράσινων λοβών με μήνα συγκομιδής τον Ιούνιο 2022 και με διαλύτη το μίγμα νερού:αιθανόλης 90:10, φαίνεται να παρουσιάζει ήπια αντιμικροβιακή δράση. Αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης μειώθηκε κατά 47% και τα διαστήματα εμπιστοσύνης δεν επικαλύπτονται.
- Ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης της *Escherichia coli* στο εκχύλισμα πράσινων λοβών με μήνα συγκομιδής τον Μάρτιο 2023 και με διαλύτη το μίγμα νερού:αιθανόλης 90:10, παρουσιάζει στατιστικά σημαντική μείωση κατά 50% σε σχέση με τον αντίστοιχο στο δείγμα ελέγχου. Επιπλέον τα διαστήματα εμπιστοσύνης των ειδικών ρυθμών ανάπτυξης των δειγμάτων αυτών δεν επικαλύπτονται. Με βάση αυτές τις παρατηρήσεις η αντιμικροβιακή ικανότητα του εκχυλίσματος αυτού ενάντια στην *Escherichia coli* μπορεί να χαρακτηριστεί ως ήπια.
- Συγκρίνοντας τις στήλες που αφορούν τα δείγματα ελέγχου (Control 1, Control 2), προκύπτει όπως και στο πρώτο πείραμα (Εκχύλιση Α), ότι η αιθανόλη ακόμη και σε μικρές συγκεντρώσεις τις τάξης του 10%, παρουσιάζει μία αξιοσημείωτη αντιμικροβιακή ικανότητα ενάντια στην *Escherichia coli*. Αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι στο δείγμα ελέγχου 2 στο οποίο περιείχε μίγμα νερού:αιθανόλης σε συγκεντρώσεις 90:10 προέκυψε στατιστικά σημαντική μείωση του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης της *Escherichia coli* κατά 51% σε σχέση με το δείγμα ελέγχου 1 στο οποίο απουσίαζε το μίγμα νερού:αιθανόλης 90:10.
- Με βάση τις στήλες που αφορούν τα εκχυλίσματα πράσινων λοβών ωρίμανσης Ιουνίου 2022 παρατηρείται ότι η χρήση του μίγματος νερού:αιθανόλης 90:10 ως διαλύτη ενίσχυσε σε πολύ μεγάλο βαθμό την αντιμικροβιακή τους ικανότητα. Αυτή η ενίσχυση αποδεικνύεται σαφώς από την στατιστικά σημαντική μείωση του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης κατά 72% που παρατηρήθηκε στο εκχύλισμα πράσινων λοβών ωρίμανσης Ιουνίου 2022 που εξήχθησαν με τη χρήση νερού:αιθανόλης 90:10.
- Με βάση τις στήλες που αφορούν τα εκχυλίσματα πράσινων λοβών ωρίμανσης Μαρτίου 2023 παρατηρείται στατιστικά σημαντική μείωση κατά 44% του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης στο εκχύλισμα που περιέχει αιθανόλη. Αυτό υποδεικνύει μια ελαφρά ισχυρότερη αντιμικροβιακή ικανότητα στο εκχύλισμα αυτό. Βέβαια αυτή η μείωση, είναι πολύ μικρότερου βαθμού σε σχέση με τα εκχυλίσματα πράσινων λοβών ωρίμανσης Ιουνίου 2022.

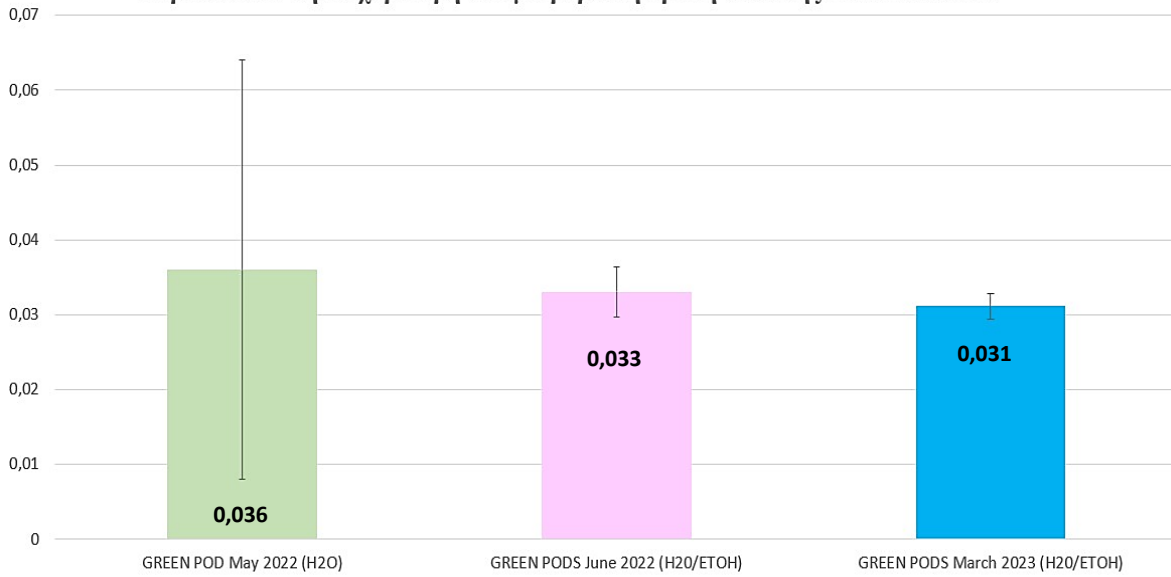
Στον πιο κάτω πίνακα παρουσιάζονται οι τιμές του παράγοντα **% inhibition** και ο χαρακτηρισμός της αντιμικροβιακής δράσης του κάθε εκχυλίσματος ενάντια στην *Escherichia coli* με βάση αυτές. Ο χαρακτηρισμός της ισχύος της αντιμικροβιακής δράσης γίνεται με βάση κάποια κατάλληλα εύρη τιμών τα οποία παρουσιάζονται και αυτά στον πίνακα.

Πίνακας 19 Χαρακτηρισμός της αντιμικροβιακής δράσης των εκχυλισμάτων που μελετήθηκαν ενάντια στην *Escherichia coli* με βάση τις τιμές του παράγοντα **% inhibition**.

<i>Escherichia coli</i>						
Aqueous extracts	% inhibition	ΜΗΔΕΝΙΚΗ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ (% inhibition= 0%)	ΕΛΑΧΙΣΤΗ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ (% inhibition <35%)	ΗΠΙΑ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ (% inhibition < 60%)	ΙΣΧΥΡΗ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ (% inhibition 60-85%)	ΠΟΛΥ ΙΣΧΥΡΗ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ (% inhibition > 85%)
GREEN PODS June 2022 (H2O)	1	√				
GREEN PODS March 2023 (H2O)	57			√		
<b>Ethanollic extracts</b>						
GREEN PODS June 2022 (H2O/EtOH)	47			√		
GREEN PODS March 2023 (H2O/EtOH)	50			√		

Με βάση τις τιμές του πιο πάνω πίνακα και τις προηγούμενες παρατηρήσεις μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι όλα τα εκχυλίσματα πράσινων λοβών παρουσιάζουν αντιμικροβιακή ικανότητα, ήπιας εντάσεως εκτός από το εκχύλισμα πράσινων λοβών ωρίμανσης Ιουνίου 2022 με νερό ως διαλύτη. Αξίζει να σημειωθεί ότι το εκχύλισμα αυτό παρόλο που με βάση την τιμή του **% inhibition** θα έπρεπε η αντιμικροβιακή του ικανότητα να χαρακτηριστεί ως ελάχιστη, αποφασίστηκε να χαρακτηριστεί ως μηδενικής ισχύος καθώς η τιμή του **% inhibition** είναι πάρα πολύ μικρή (1%). Υπενθυμίζεται ότι η αντιμικροβιακή ικανότητα των εκχυλισμάτων πράσινων λοβών ωρίμανσης Μαΐου που μελετήθηκε στο πρώτο πείραμα χαρακτηρίστηκε ως ισχυρή. Βέβαια στο πείραμα αυτό, οι τιμές του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης στα δείγματα ελέγχου προέκυψαν μεγαλύτερες σε σχέση με τις αντίστοιχες στο δεύτερο πείραμα. Έτσι, προκειμένου να προσδιορίσουμε τη βέλτιστη φάση ωρίμανσης για την ενίσχυση του αντιμικροβιακού δυναμικού των πράσινων λοβών έναντι της *Escherichia coli*, συγκρίνουμε τους ειδικούς ρυθμούς ανάπτυξης των τριών εκχυλισμάτων που παρουσίασαν την πιο ισχυρή αντιμικροβιακή δράση και στα δύο πειράματα.

Τα τρία εκχυλίσματα πράσινων λοβών με διαφορετική περίοδο ωρίμανσης που παρουσίασαν την ισχυρότερη αντιμικροβιακή δράση κατά της *Escherichia coli*



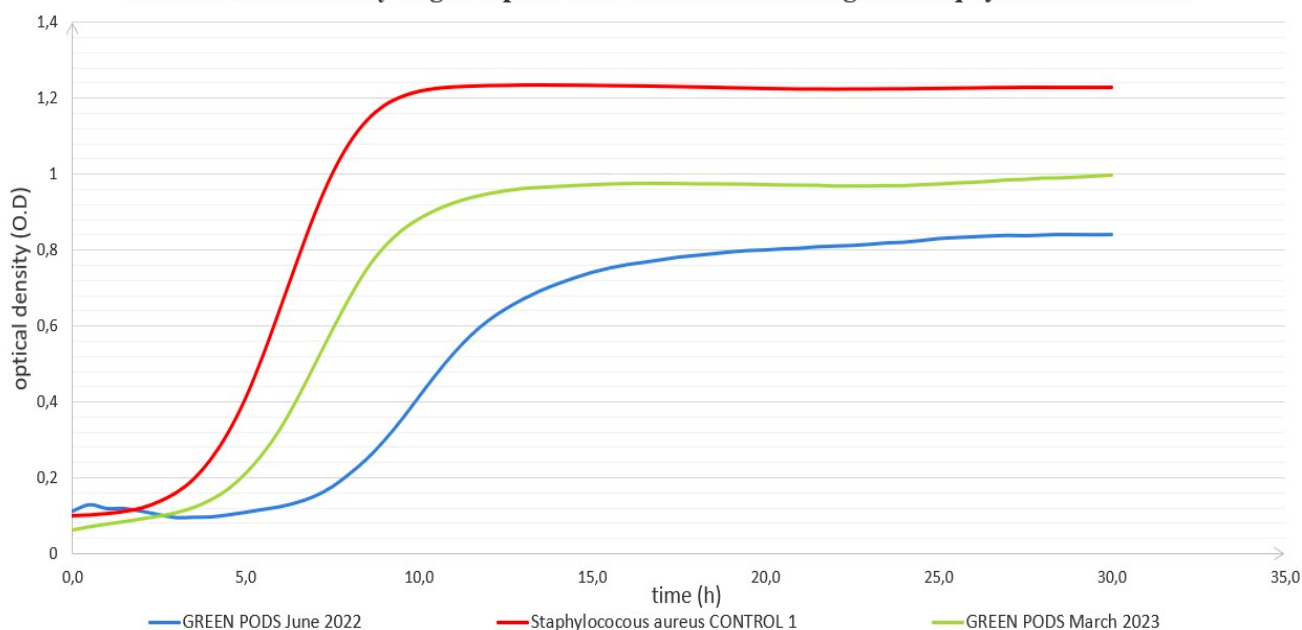
Παρατηρείται ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφοροποιήσεις στους ειδικούς ρυθμούς ανάπτυξης των τριών πιο πάνω εκχυλισμάτων. Η αντιμικροβιακή τους ικανότητα ενάντια στην *Escherichia coli* μπορεί να χαρακτηριστεί ως αρκετά ικανοποιητική καθώς ο ρυθμός ανάπτυξης της σε αυτά είναι πολύ μικρός. Με βάση λοιπόν την μελέτη που έγινε φαίνεται ότι οι πράσινοι λοβοί διατηρούν όμοια αντιμικροβιακή ικανότητα (με κατάλληλο διαλύτη κάθε φορά) και στα τα τρία στάδια ωρίμανσης. Το εκχύλισμα του οποίου η αντιμικροβιακή ικανότητα φαίνεται να υπερτερεί ελάχιστα, είναι αυτό με μήνα ωρίμανσης τον Μάρτιο του 2023 και με διαλύτη το μίγμα νερού:αιθανόλης 90:10.

Ακολουθώς παρουσιάζονται οι καμπύλες ανάπτυξης του *Staphylococcus aureus* σε εκχυλίσματα πράσινων λοβών με περιόδους συγκομιδής τον Ιούνιο του 2022 και το Μάρτιο του 2023 και με διαλύτη το νερό.

Πίνακας 20 Πράσινοι λοβοί που συγκομίστηκαν τον Ιούνιο του 2022 και τον Μάρτιο του 2023 και εκχυλίστηκαν με νερό, συνοδευόμενα από το αντίστοιχο δείγμα ελέγχου. Παρέχονται επιπλέον λεπτομερείς ποσότητες εμβολιασμού των δειγμάτων.

<i>Staphylococcus aureus</i>		
ΕΚΧΥΛΙΣΗ	ΤΜΗΜΑ ΧΑΡΟΥΠΙΟΥ	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ
Water extraction	Green pods June 2022 (120a)	Green pods June 2022 (a) 50 µL + SA 50 µL + BHI Broth 250 µL
	Green pods March 2023 (121a)	Green pods March 2023 (a) 50 µL + SA 50 µL + BHI Broth 250 µL
	SA Control 1 (Broth)	SA 50 µL + BHI Broth 300 µL

### Antimicrobial activity of green pods with water extraction against *Staphylococcus aureus*



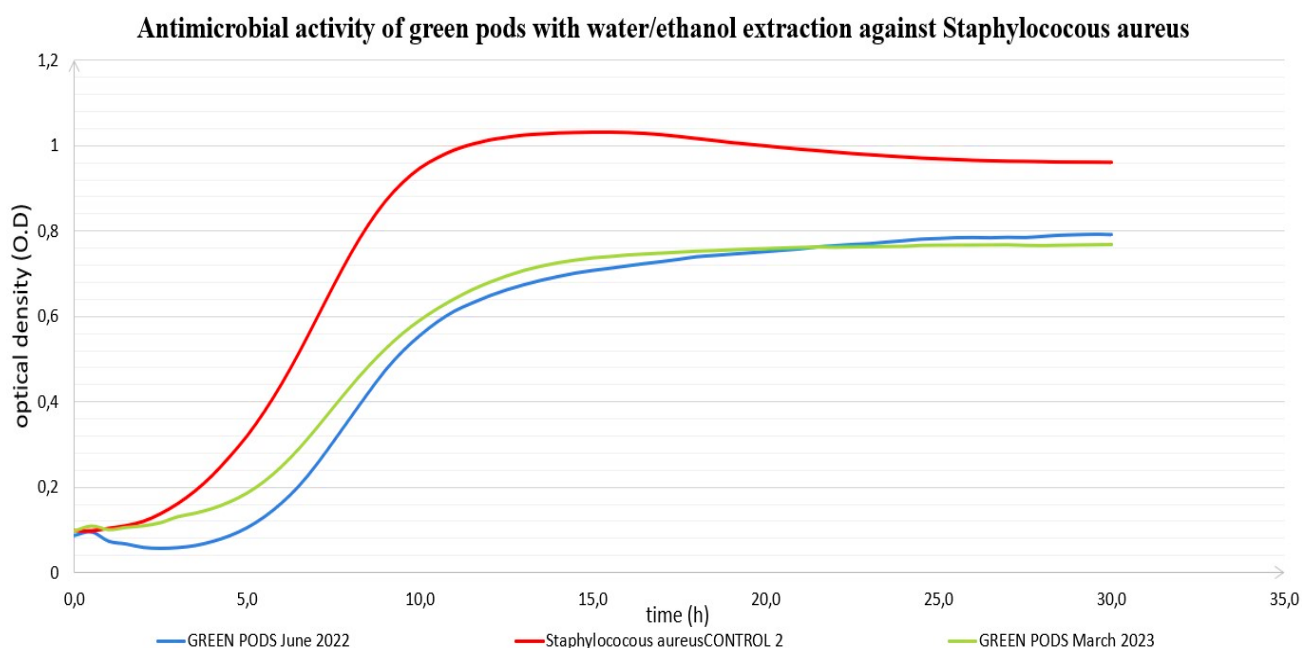
Γράφημα 16 Καμπύλες ανάπτυξης του *Staphylococcus aureus* σε εκχυλίσματα πράσινων λοβών με διαφορετικούς μήνες ωρίμανσης και με νερό ως διαλύτης, σε συνδυασμό με την αντίστοιχη καμπύλη ανάπτυξης στο δείγμα ελέγχου/μάρτυρα (Control 1)

- Στο εκχύλισμα πράσινων λοβών, ωρίμανσης Ιουνίου 2022, φαίνεται να υπάρχει ισχυρή αντιμικροβιακή δράση καθώς η ειδική ταχύτητα πολλαπλασιασμού του *S.aureus* φαίνεται να είναι αισθητά μικρότερη σε σχέση με το Control 1. Επίσης παρατηρείται ότι ο μικροοργανισμός χρειάστηκε περισσότερο χρόνο να προσαρμοστεί στο περιβάλλον του εκχυλίσματος, γεγονός που ενισχύει την αντιμικροβιακή ικανότητα του εκχυλίσματος. Επιπλέον ο πληθυσμός *S.aureus* φαίνεται να παρέμεινε καθ' όλη την διάρκεια σε πολύ χαμηλότερα επίπεδα τόσο σχέση με το δείγμα ελέγχου όσο και με το εκχύλισμα πράσινων λοβών, ωρίμανσης Μαρτίου 2023.
- Στο εκχύλισμα πράσινων λοβών, ωρίμανσης Μαρτίου 2023, παρατηρείται από το γράφημα μικρότερη ειδική ταχύτητα πολλαπλασιασμού σε σχέση με το Control 1, γεγονός που υποδεικνύει την ύπαρξη αντιμικροβιακής ικανότητας του εκχυλίσματος ενάντια στον *S.aureus*. Επιπλέον, όπως και στο εκχύλισμα πράσινων λοβών, ωρίμανσης Ιουνίου 2022, έτσι και σε αυτό το εκχύλισμα ο μικροοργανισμός χρειάστηκε περισσότερο χρόνο να προσαρμοστεί στο περιβάλλον του εκχυλίσματος.
- Ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης του *S.aureus* στο εκχύλισμα πράσινων λοβών, ωρίμανσης Ιουνίου 2022, φαίνεται να είναι αισθητά μικρότερος σε σχέση με τον αντίστοιχο στο εκχύλισμα πράσινων λοβών, ωρίμανσης Μαρτίου 2023. Με βάση αυτή την παρατήρηση φαίνεται ότι οι πράσινοι λοβοί με ωρίμανση τον Ιούνιο του 2022, όταν εκχυλιστούν με νερό, έχουν ισχυρότερη αντιμικροβιακή δράση.

Οι καμπύλες ανάπτυξης που απεικονίζουν την ανάπτυξη του *Staphylococcus aureus* σε εκχυλίσματα πράσινων λοβών με χρήση μίγματος νερού:αιθανόλης 90:10 ως διαλύτη, τα οποία συλλέχθηκαν τον Ιούνιο του 2022 και τον Μάρτιο του 2023, παρουσιάζονται παρακάτω.

Πίνακας 21 Πράσινοι λοβοί που συγκομίστηκαν τον Ιούνιο του 2022 και τον Μάρτιο του 2023 και εκχυλίστηκαν με μίγμα νερού:αιθανόλης 90:10, συνοδευόμενα από το αντίστοιχο δείγμα ελέγχου. Παρέχονται επιπλέον λεπτομερείς ποσότητες εμβολιασμού των δειγμάτων

<i>Staphylococcus aureus</i>		
ΕΚΧΥΛΙΣΗ	ΤΜΗΜΑ ΧΑΡΟΥΠΙΟΥ	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ
Water/Ethanol 90:10 extraction	Green pods June 2022 (120b)	Green pods June 2022 (b) 50 $\mu$ L + SA 50 $\mu$ L + BHI Broth 250 $\mu$ L
	Green pods March 2023 (121b)	Green pods March 2023 (b) 50 $\mu$ L + SA 50 $\mu$ L + BHI Broth 250 $\mu$ L
	SA Control 2 (Water/Ethanol - 90:10)	SA 50 $\mu$ L + BHI Broth 250 $\mu$ L + 50 $\mu$ L H <sub>2</sub> O/ethanol (90:10)



Γράφημα 17 Καμπύλες ανάπτυξης του *Staphylococcus aureus* σε εκχυλίσματα πράσινων λοβών με διαφορετικούς μήνες ωρίμανσης και με μίγμα νερού:αιθανόλης 90:10 ως διαλύτη, σε συνδυασμό με την αντίστοιχη καμπύλη ανάπτυξης στο δείγμα ελέγχου/μάρτυρα (Control 2)



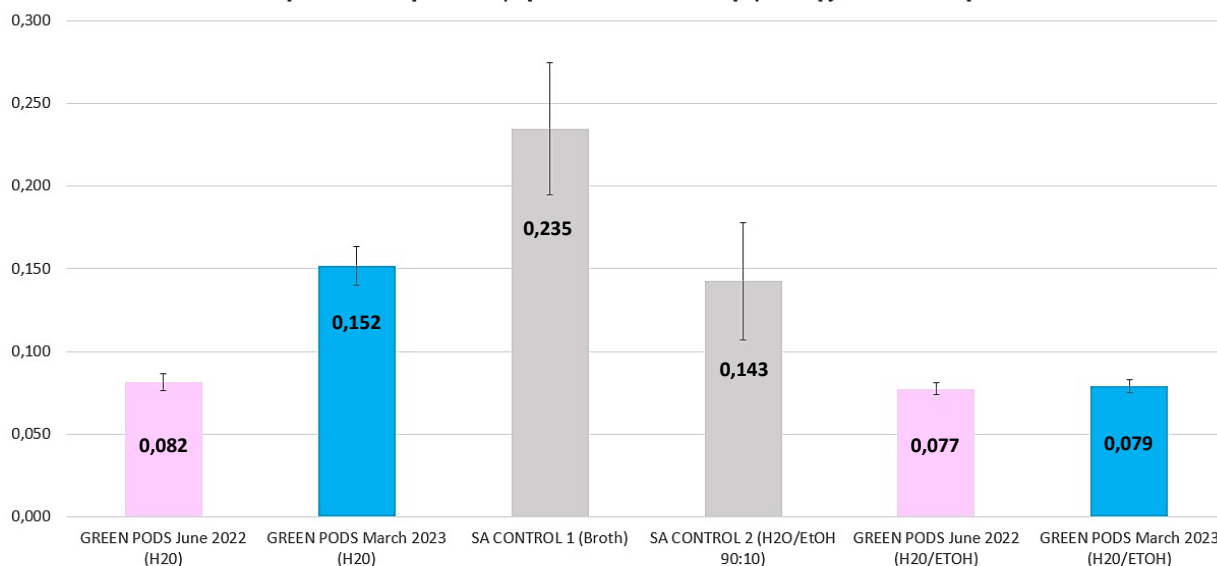
- Ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης του *S.aureus* στο εκχύλισμα πράσινων λοβών, ωρίμανσης Ιουνίου 2022, φαίνεται να είναι μικρότερος σε σχέση με τον αντίστοιχο στο δείγμα ελέγχου. Αυτό υποδεικνύει μία ήπια αντιμικροβιακή ικανότητα του εκχυλίσματος αυτού ενάντια στον *S.aureus*.
- Το εκχύλισμα πράσινων λοβών, ωρίμανσης Μαρτίου 2023, φαίνεται να παρουσιάζει ήπια αντιμικροβιακή δράση έναντι του *S.aureus*. Αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης του *S.aureus* στο εκχύλισμα αυτό φαίνεται να είναι μικρότερος σε σχέση με τον αντίστοιχο στο δείγμα ελέγχου 2 (Control 2).
- Ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης των δύο εκχυλισμάτων φαίνεται να είναι σχεδόν όμοιος. Αυτό μαρτυρά ότι όταν οι πράσινοι λοβοί εκχυλιστούν με αιθανόλη, η ημερομηνία συγκομιδής τους, δεν επηρεάζει την αντιμικροβιακή ικανότητα του εκχυλίσματος ενάντια στον *Staphylococcus aureus*. Η μόνη διαφοροποίηση μεταξύ των δύο αυτών εκχυλισμάτων είναι ως προς το χρόνο προσαρμογής του *S.aureus* σε αυτά. Πιο συγκεκριμένα στο εκχύλισμα με περίοδο ωρίμανσης τον Μάρτιο του 2023 φαίνεται να χρειάστηκε περισσότερο χρόνο να προσαρμοστεί.
- Ακόμη, φαίνεται ότι ο πληθυσμός του *S.aureus* στα δύο εκχυλίσματα παρέμεινε σε αρκετά χαμηλότερα επίπεδα σε σχέση με το δείγμα ελέγχου.

Για τη διεξαγωγή μιας ολοκληρωμένης έρευνας σχετικά με τις αντιμικροβιακές ιδιότητες των εκχυλισμάτων πράσινου λοβού έναντι του *Staphylococcus aureus*, παρέχονται οι τιμές του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης μαζί με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις τους στον παρακάτω πίνακα. Επιπλέον, προσδιορίζονται οι περίοδοι που απαιτούνται για την προσαρμογή του μικροοργανισμού σε κάθε εκχύλισμα.

*Πίνακας 22 Ειδικοί ρυθμοί ανάπτυξης (μ) συνοδευόμενοι από την τυπική τους απόκλιση και χρόνος προσαρμογής (lag phase) του Staphylococcus aureus στα εξεταζόμενα εκχυλίσματα.*

<b>Staphylococcus aureus</b>				
<b>Aqueous extracts</b>	<b>Περιγραφή δειγμάτων</b>	<b>Rate, μ (1/h)</b>	<b>Standard deviation (SD)</b>	<b>lag phase (h)</b>
Green pods June 2022 (120a)	Green pods June 2022 (a) 50 μL + SA 50 μL + BHI Broth 250 μL	0,082	0,005	5,713
Green pods March 2023 (121a)	Green pods March 2023 (a) 50 μL + SA 50 μL + BHI Broth 250 μL	0,152	0,138	4,209
SA Control 1 (Broth)	SA 50 μL + BHI Broth 300 μL	0,235	0,040	3,037
<b>Water/Ethanolic (90:10) extracts</b>	<b>Περιγραφή δειγμάτων</b>	<b>Rate, μ (1/h)</b>	<b>Standard deviation (SD)</b>	<b>lag phase (h)</b>
Green pods June 2022 (120b)	Green pods June 2022 (b) 50 μL + SA 50 μL + BHI Broth 250 μL	0,077	0,004	2,578
Green pods March 2023 (121b)	Green pods March 2023 (b) 50 μL + SA 50 μL + BHI Broth 250 μL	0,079	0,004	3,719
SA Control 2 (Broth + Water/Ethanol - 90:10)	SA 50 μL + BHI Broth 250 μL + 50 μL H2O/ethanol (90:10)	0,143	0,035	2,627

Μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης του *Staphylococcus aureus* σε εκχυλίσματα πράσινων λοβών διαφορετικού σταδίου ωρίμανσης και διαλύτη



Γράφημα 18 Ραβδόγραμμα των ειδικών ρυθμών ανάπτυξης σε συνδυασμό με τα διαστήματα εμπιστοσύνης τους (μαύρη κάθετη γραμμή), του *Staphylococcus aureus* σε εκχυλίσματα πράσινων λοβών, διαφορετικού σταδίου ωρίμανσης, μαζί με τα αντίστοιχα δείγματα ελέγχου (Control 1 και 2).

- Στο εκχύλισμα πράσινων λοβών με μήνα συγκομιδής τον Ιούνιο 2022 και με διαλύτη το νερό παρατηρείται στατιστικά σημαντική μείωση του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης του *S.aureus* σε σχέση με τον αντίστοιχο στο δείγμα ελέγχου (Control 1). Αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι τόσο ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης του *S.aureus* έχει μειωθεί κατά 65% , όσο και από την μη επικάλυψη των διαστημάτων εμπιστοσύνης τους. Τόσο η τάξη της μείωσης του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης όσο και η απόσταση των διαστημάτων εμπιστοσύνης είναι αρκετά μεγάλη γεγονός που υποδεικνύει ισχυρή αντιμικροβιακή δράση του εκχυλίσματος αυτού ενάντια στον *S.aureus*.
- Στο εκχύλισμα πράσινων λοβών με μήνα συγκομιδής τον Μάρτιο 2023 και με διαλύτη το νερό παρατηρείται μείωση του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης του *S.aureus* σε σχέση με τον αντίστοιχο στο δείγμα ελέγχου (Control 1). Η αντιμικροβιακή ικανότητα μπορεί να χαρακτηριστεί ως ήπια καθώς η μείωση του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης είναι της τάξης του 35%.
- Το εκχύλισμα πράσινων λοβών με μήνα συγκομιδής τον Ιούνιο 2022 και με διαλύτη το μίγμα νερού:αιθανόλης 90:10, φαίνεται να παρουσιάζει ήπια αντιμικροβιακή δράση. Αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης μειώθηκε κατά 46% και τα διαστήματα εμπιστοσύνης δεν επικαλύπτονται.
- Ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης του *S.aureus* στο εκχύλισμα πράσινων λοβών με μήνα συγκομιδής τον Μάρτιο 2023 και με διαλύτη το μίγμα νερού:αιθανόλης 90:10, παρουσιάζει στατιστικά σημαντική μείωση κατά 45% σε σχέση με τον αντίστοιχο στο δείγμα ελέγχου. Με βάση αυτή την παρατήρηση, η αντιμικροβιακή ικανότητα του εκχυλίσματος αυτού ενάντια στον *S.aureus* μπορεί να χαρακτηριστεί ως ήπια.

- Με βάση τις στήλες που αφορούν τα εκχυλίσματα πράσινων λοβών ωρίμανσης Μαρτίου 2023 παρατηρείται ότι ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης, στο εκχύλισμα που περιείχε αιθανόλη, παρουσιάζει στατιστικά σημαντική μείωση κατά 48% σε σχέση με το εκχύλισμα που περιείχε ως διαλύτη το νερό. Επομένως η χρήση του μίγματος νερού:αιθανόλης 90:10 ως διαλύτη ενίσχυσε σε πολύ μεγάλο βαθμό την αντιμικροβιακή τους ικανότητα.
- Με βάση τις στήλες που αφορούν τα εκχυλίσματα πράσινων λοβών ωρίμανσης Ιουνίου 2022 παρατηρείται όμοια συμπεριφορά και ισοδύναμη αντιμικροβιακή ικανότητα και για τους δύο χρησιμοποιούμενους διαλύτες.
- Κατά τη σύγκριση των στηλών που αντιστοιχούν στα δείγματα ελέγχου (Control 1 και Control 2) στα παρουσιαζόμενα ραβδογράμματα, προκύπτει μια αξιοσημείωτη παρατήρηση. Η συμπερίληψη μίγματος νερού:αιθανόλης 90:10 στο δείγμα ελέγχου 2 είχε ως αποτέλεσμα στατιστικά σημαντική μείωση κατά 39% του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης του *Staphylococcus aureus* σε σύγκριση με δείγμα ελέγχου 1, όπου απουσίαζε το μίγμα αυτό. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει έντονα ότι η αιθανόλη επιδεικνύει αντιμικροβιακή δράση έναντι του *Staphylococcus aureus*.

Ο πίνακας που παρουσιάζεται παρακάτω παρέχει τόσο τις τιμές του ποσοστιαίου συντελεστή αναστολής όσο και την αξιολόγηση της αντιμικροβιακής δράσης για κάθε εκχύλισμα έναντι του *Staphylococcus aureus*. Ο προσδιορισμός της έντασης της αντιμικροβιακής δράσης βασίζεται σε συγκεκριμένα προκαθορισμένα εύρη τιμών, τα οποία περιγράφονται επίσης εντός του πίνακα.

Πίνακας 23 Χαρακτηρισμός της αντιμικροβιακής δράσης των εκχυλισμάτων που μελετήθηκαν ενάντια στον *Staphylococcus aureus* με βάση τις τιμές του παράγοντα % inhibition.

<i>Staphylococcus aureus</i>						
Aqueous extracts	% inhibition	ΜΗΔΕΝΙΚΗ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ (% inhibition= 0%)	ΕΛΑΧΙΣΤΗ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ (% inhibition <35%)	ΗΠΙΑ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ (% inhibition < 60%)	ΙΣΧΥΡΗ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ (% inhibition 60-85%)	ΠΟΛΥ ΙΣΧΥΡΗ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ (% inhibition > 85%)
GREEN PODS June 2022 (H2O)	65				✓	
GREEN PODS March 2023 (H2O)	35			✓		
Ethanollic extracts						
GREEN PODS June 2022 (H2O/EtOH)	46			✓		
GREEN PODS March 2023 (H2O/EtOH)	45			✓		

Με βάση τον πιο πάνω πίνακα, την ισχυρότερη αντιμικροβιακή δράση ενάντια στον *Staphylococcus aureus*, παρουσιάζει το εκχύλισμα πράσινων λοβών με μήνα ωρίμανσης τον Ιούνιο του 2022 και διαλύτη το νερό. Όλα τα υπόλοιπα εκχυλίσματα παρουσιάζουν ήπια αντιμικροβιακή δράση. Βέβαια, παρόλο που η τιμή του παράγοντα % inhibition στο εκχύλισμα πράσινων λοβών ωρίμανσης Ιουνίου 2022 και με διαλύτη το νερό, είναι μεγαλύτερη σε σχέση με τα δύο εκχυλίσματα που περιείχαν αιθανόλη, η αντιμικροβιακή ικανότητα και των τριών εκχυλισμάτων είναι σε πολύ κοντινά επίπεδα. Αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι οι ειδικοί ρυθμοί ανάπτυξης του *S. aureus* στα εκχυλίσματα αυτά λαμβάνουν πολύ κοντινές τιμές. Επισημαίνεται ξανά ότι ο χαρακτηρισμός της αντιμικροβιακής ικανότητας ενός εκχυλίσματος με βάση τον παράγοντα % inhibition είναι πάντοτε συγκριτικός με την αντιμικροβιακή ικανότητα των αντίστοιχων δειγμάτων ελέγχου. Αυτός είναι και ο λόγος που τα εκχυλίσματα που

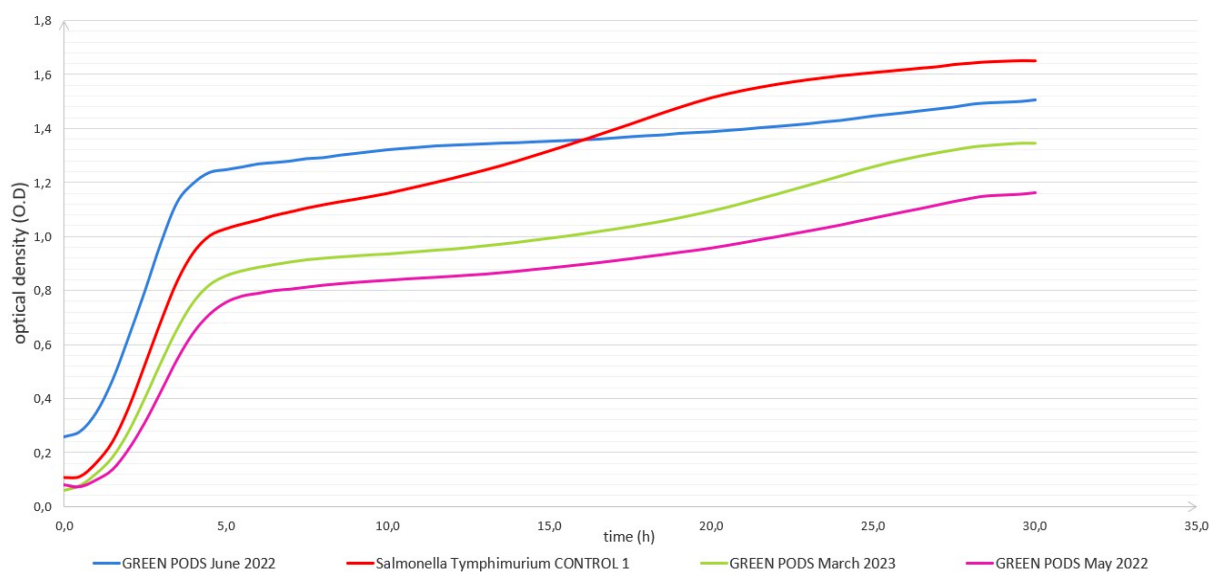
περιείχαν αιθανόλη, χαρακτηρίστηκαν με βάση την τιμή inhibition ως ήπιας αντιμικροβιακής ικανότητας. Λαμβάνοντας υπόψη και το πρώτο πείραμα στο οποίο μελετήθηκε η αντιμικροβιακή ικανότητα εκχυλίσματος πράσινων λοβών ωρίμανση Μαΐου 2022, προκύπτει ότι το εκχύλισμα πράσινων λοβών με την ισχυρότερη αντιμικροβιακή ικανότητα είναι αυτό με ωρίμανση τον Μάιο 2022 και με διαλύτη το μίγμα νερού:αιθανόλης 90:10.

Παρακάτω, παρουσιάζονται οι καμπύλες ανάπτυξης της *Salmonella* Typhimurium σε εκχυλίσματα πράσινων λοβών που χρησιμοποιούν νερό ως διαλύτη, με δεδομένα που συλλέχθηκαν από τρεις περιόδους συγκομιδής, δηλαδή Μάιο του 2022, Ιούνιο του 2022 και Μάρτιο του 2023.

Πίνακας 24 Πράσινοι λοβοί που συγκομίστηκαν τον Μάιο του 2022, τον Ιούνιο του 2022 και τον Μάρτιο του 2023 και εκχυλίστηκαν με νερό, συνοδευόμενα από το αντίστοιχο δείγμα ελέγχου. Παρέχονται επιπλέον λεπτομερείς ποσότητες εμβολιασμού των δειγμάτων.

<b>Salmonella Typhimurium</b>		
<b>ΕΚΧΥΛΙΣΗ</b>	<b>ΤΜΗΜΑ ΧΑΡΟΥΠΙΟΥ</b>	<b>ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ</b>
Water extraction	Green pods May 2022 (118a)	Green pods May 2022 (a) 50 μL + ST 50 μL + BHI Broth 250 μL
	Green pods June 2022 (120a)	Green pods June 2022 (a) 50 μL + ST 50 μL + BHI Broth 250 μL
	Green pods March 2023 (121a)	Green pods March 2023 (a) 50 μL + ST 50 μL + BHI Broth 250 μL
	ST Control 1 (Broth)	ST 50 μL + BHI Broth 300 μL

**Antimicrobial activity of green pods with water extraction against *Salmonella* Typhimurium**



Γράφημα 19 Καμπύλες ανάπτυξης της *Salmonella* Typhimurium σε εκχυλίσματα πράσινων λοβών με διαφορετικούς μήνες ωρίμανσης και με νερό ως διαλύτη, σε συνδυασμό με την αντίστοιχη καμπύλη ανάπτυξης στο δείγμα ελέγχου/μάρτυρα (Control 1)

- Το εκχύλισμα πράσινων λοβών, ωρίμανσης Ιουνίου 2022, δεν φαίνεται να παρουσιάζει αντιμικροβιακή δράση έναντι της *Salmonella* Typhimurium. Αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης της *S. Typhimurium* στο εκχύλισμα αυτό φαίνεται να είναι ελαφρά μεγαλύτερος σε σχέση με τον αντίστοιχο στο δείγμα ελέγχου 1 (Control 1).
- Ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης της *Salmonella* Typhimurium στο εκχύλισμα πράσινων λοβών, ωρίμανσης Μαρτίου 2023, φαίνεται να είναι ελάχιστα μικρότερος σε σχέση με τον αντίστοιχο στο δείγμα ελέγχου. Αυτό υποδεικνύει μία ελάχιστη προς ήπια αντιμικροβιακή ικανότητα του εκχυλίσματος αυτού ενάντια στην *Salmonella* Typhimurium.
- Το εκχύλισμα πράσινων λοβών, ωρίμανσης Μαΐου 2022, φαίνεται να παρουσιάζει ήπια αντιμικροβιακή δράση έναντι της *Salmonella* Typhimurium. Αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης της *S. Typhimurium* στο εκχύλισμα αυτό φαίνεται να είναι ελαφρά μικρότερος σε σχέση με τον αντίστοιχο στο δείγμα ελέγχου 1 (Control 1).
- Αξίζει να σημειωθεί ότι σε κανένα από τα πιο πάνω εκχυλίσματα, η *Salmonella* Typhimurium δεν χρειάστηκε χρόνο να προσαρμοστεί.

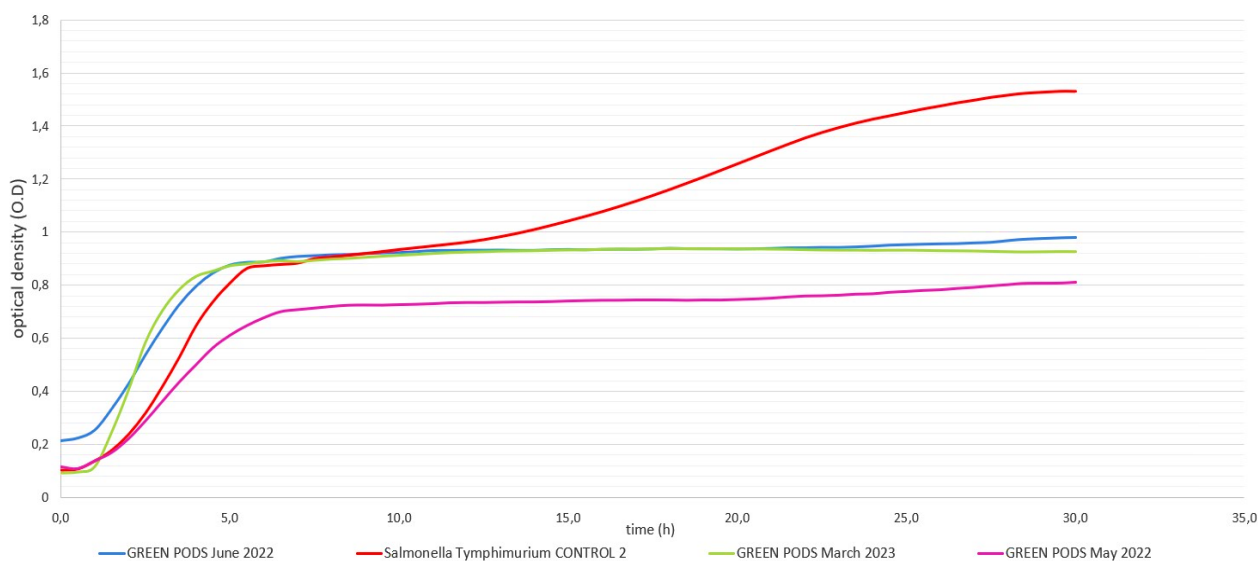
Οι καμπύλες ανάπτυξης που απεικονίζουν την ανάπτυξη της *Salmonella* Typhimurium σε εκχυλίσματα πράσινων λοβών με χρήση μίγματος νερού:αιθανόλης 90:10 ως διαλύτη, τα οποία συλλέχθηκαν τον Ιούνιο του 2022 και τον Μάρτιο του 2023, παρουσιάζονται παρακάτω.

Πίνακας 25 Πράσινοι λοβοί που συγκομίστηκαν τον Ιούνιο του 2022 και τον Μάρτιο του 2023 και εκχυλίστηκαν με μίγμα νερού:αιθανόλης 90:10, συνοδευόμενα από το αντίστοιχο δείγμα ελέγχου. Παρέχονται επιπλέον λεπτομερείς ποσότητες εμβολιασμού των δειγμάτων.

<b><i>Salmonella</i> Typhimurium</b>		
<b>ΕΚΧΥΛΙΣΗ</b>	<b>ΤΜΗΜΑ ΧΑΡΟΥΠΙΟΥ</b>	<b>ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ</b>
Water/Ethanol 90:10 extraction	Green pods May 2022 (118b)	Green pods May 2022 (b) 50 μL + ST 50 μL + BHI Broth 250 μL
	Green pods June 2022 (120b)	Green pods June 2022 (b) 50 μL + ST 50 μL + BHI Broth 250 μL
	Green pods March 2023 (121b)	Green pods March 2023 (b) 50 μL + ST 50 μL + BHI Broth 250 μL
	ST Control 2 (Water/Ethanol - 90:10)	ST 50 μL + BHI Broth 250 μL + 50 μL H <sub>2</sub> O/ethanol (90:10)



### Antimicrobial activity of green pods with water/ethanol extraction against *Salmonella* Typhimurium



Γράφημα 20 Καμπύλες ανάπτυξης της *Salmonella* Typhimurium σε εκχυλίσματα πράσινων λοβών με διαφορετικούς μήνες ωρίμανσης και με μίγμα νερού:αιθανόλης 90:10 ως διαλύτης, σε συνδυασμό με την αντίστοιχη καμπύλη ανάπτυξης στο δείγμα ελέγχου/μάρτυρα (Control 2)

- Το εκχύλισμα του πράσινου λοβού, το οποίο συγκομίστηκε τον Ιούνιο του 2022, δεν παρουσιάζει αντιμικροβιακή δράση έναντι της *Salmonella* Typhimurium. Αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης της *S.* Typhimurium σε αυτό εκχύλισμα φαίνεται να είναι μεγαλύτερος από ό,τι στο δείγμα ελέγχου 2 (Control 2).
- Στο εκχύλισμα πράσινων λοβών, ωρίμανσης Μαρτίου 2023, οι συνθήκες ανάπτυξης της *Salmonella* Typhimurium, φαίνεται να είναι ευνοϊκότερες σε σχέση με το Control 2. Αυτό αποδεικνύεται από το γεγονός ότι ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης της *S.* Typhimurium στο εκχύλισμα αυτό είναι μεγαλύτερος σε σχέση με τον αντίστοιχο στο Control 2. Κατά συνέπεια, δεν φαίνεται να παρουσιάζει αντιμικροβιακή δράση το εκχύλισμα πράσινων λοβών, ωρίμανσης Μαρτίου 2023 με διαλύτη το μίγμα νερού:αιθανόλης 90:10.
- Στο εκχύλισμα πράσινων λοβών, ωρίμανσης Μαΐου 2022, φαίνεται να υπάρχει ισχυρή αντιμικροβιακή δράση καθώς η ειδική ταχύτητα πολλαπλασιασμού της *S.* Typhimurium φαίνεται να είναι αισθητά μικρότερη σε σχέση με το δείγμα ελέγχου.
- Όπως και στα εκχυλίσματα με διαλύτη το νερό που παρουσιάστηκαν παραπάνω, έτσι και στα περισσότερα εκχυλίσματα με διαλύτη το μίγμα νερού:αιθανόλης 90:10, η *S.* Typhimurium δεν χρειάστηκε χρόνο να προσαρμοστεί. Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί ότι στην περίπτωση του εκχυλίσματος πράσινου λοβού, ωρίμανσης Μαρτίου του 2023, η *S.* Typhimurium φαίνεται να χρειάστηκε μια πολύ σύντομη περίοδο προσαρμογής.

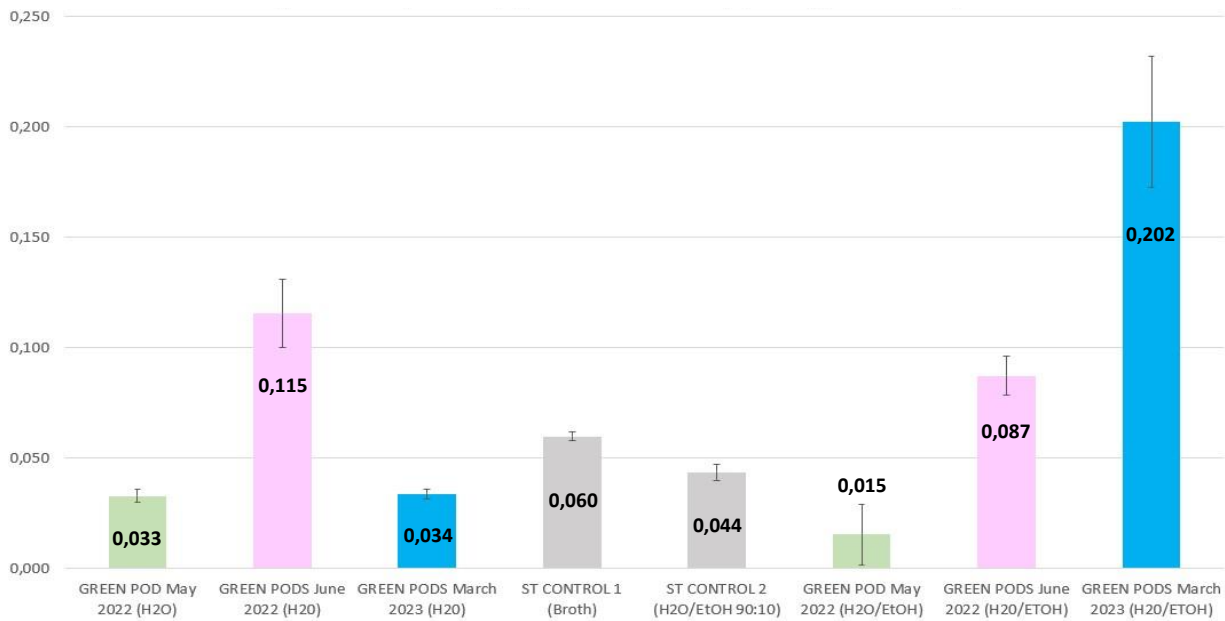


Προκειμένου να διερευνηθούν διεξοδικά τα αντιμικροβιακά χαρακτηριστικά των εκχυλισμάτων πράσινων λοβών έναντι της *Salmonella* Typhimurium, ο παρακάτω πίνακας παρουσιάζει τις τιμές του ρυθμού ανάπτυξης μαζί με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις τους. Επιπλέον, ο πίνακας περιλαμβάνει πληροφορίες σχετικά με τις χρονικές περιόδους που απαιτούνται για την προσαρμογή του μικροοργανισμού σε κάθε εκχύλισμα.

Πίνακας 26 Ειδικοί ρυθμοί ανάπτυξης ( $\mu$ ) συνοδευόμενοι από την τυπική τους απόκλιση και χρόνος προσαρμογής (lag phase) της *Salmonella* Typhimurium στα εξεταζόμενα εκχυλίσματα.

<b><i>Salmonella</i> Typhimurium</b>				
<b>Aqueous extracts</b>	<b>Περιγραφή δειγμάτων</b>	<b>Rate, <math>\mu</math> (1/h)</b>	<b>Standard deviation (SD)</b>	<b>lag phase (h)</b>
Green pods May 2022 (118a)	Green pods May 2022 (a) 50 $\mu$ L + ST 50 $\mu$ L + BHI Broth 250 $\mu$ L	0,033	0,003	-
Green pods June 2022 (120a)	Green pods June 2022 (a) 50 $\mu$ L + ST 50 $\mu$ L + BHI Broth 250 $\mu$ L	0,115	0,058	-
Green pods March 2023 (121a)	Green pods March 2023 (a) 50 $\mu$ L + ST 50 $\mu$ L + BHI Broth 250 $\mu$ L	0,034	0,002	-
ST Control 1 (Broth)	ST 50 $\mu$ L + BHI Broth 300 $\mu$ L	0,060	0,002	-
<b>Water/Ethanol (90:10) extracts</b>	<b>Περιγραφή δειγμάτων</b>	<b>Rate, <math>\mu</math> (1/h)</b>	<b>Standard deviation (SD)</b>	<b>lag phase (h)</b>
Green pods May 2022 (118b)	Green pods May 2022 (b) 50 $\mu$ L + ST 50 $\mu$ L + BHI Broth 250 $\mu$ L	0,015	0,014	-
Green pods June 2022 (120b)	Green pods June 2022 (b) 50 $\mu$ L + ST 50 $\mu$ L + BHI Broth 250 $\mu$ L	0,087	0,046	-
Green pods March 2023 (121b)	Green pods March 2023 (b) 50 $\mu$ L + ST 50 $\mu$ L + BHI Broth 250 $\mu$ L	0,202	0,030	1,509
ST Control 2 (Broth + Water/Ethanol - 90:10)	ST 50 $\mu$ L + BHI Broth 250 $\mu$ L + 50 $\mu$ L H <sub>2</sub> O/ethanol (90:10)	0,044	0,004	-

**Μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης της *Salmonella* Typhimurium σε εκχύλισμα πράσινων λοβών διαφορετικού σταδίου ωρίμανσης και διαλύτη**



Γράφημα 21 Ραβδόγραμμα των ειδικών ρυθμών ανάπτυξης σε συνδυασμό με τα διαστήματα εμπιστοσύνης τους (μαύρη κάθετη γραμμή), της *Salmonella* Typhimurium σε εκχύλισμα πράσινων λοβών, διαφορετικού σταδίου ωρίμανσης, μαζί με τα αντίστοιχα δείγματα ελέγχου (Control 1 και Control 2)

- Ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης στο εκχύλιμα πράσινων λοβών ωρίμανσης Μαΐου 2022 και νερό ως διαλύτη, παρουσιάζει στατιστικά σημαντική μείωση σε σχέση με τον αντίστοιχο στο δείγμα ελέγχου (Control 1). Αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι τόσο ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης της *Salmonella* Typhimurium έχει μειωθεί κατά 45%, όσο και από την μη επικάλυψη των διαστημάτων εμπιστοσύνης τους. Συνεπώς, το εκχύλιμα αυτό παρουσιάζει ήπια αντιμικροβιακή ικανότητα.
- Στο εκχύλιμα πράσινων λοβών, ωρίμανσης Ιουνίου 2022 και διαλύτη το νερό, ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης της *Salmonella* Typhimurium παρουσιάζει στατιστικά σημαντική αύξηση. Το γεγονός αυτό προκύπτει από την μεγάλη αύξηση του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης στο εκχύλιμα αυτό σε σχέση με τον Control 1 καθώς επίσης από την μη επικάλυψη των διαστημάτων εμπιστοσύνης τους. Συνεπώς, το εκχύλιμα αυτό δεν παρουσιάζει αντιμικροβιακή ικανότητα κατά του βακτηρίου αυτού.
- Το εκχύλιμα πράσινων λοβών με μήνα συγκομιδής τον Μάρτιο του 2023 και με διαλύτη το νερό, φαίνεται να παρουσιάζει ήπια αντιμικροβιακή δράση. Αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης του βακτηρίου αυτού μειώθηκε κατά 43% και τα διαστήματα εμπιστοσύνης δεν επικαλύπτονται.
- Ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης του *S. Typhimurium* στο εκχύλιμα πράσινων λοβών με μήνα συγκομιδής τον Μάιο του 2022 και με διαλύτη το μίγμα νερού:αιθανόλης 90:10, παρουσιάζει στατιστικά σημαντική μείωση κατά 65% σε σχέση με τον αντίστοιχο στο δείγμα ελέγχου (Control 2). Με βάση αυτή την παρατήρηση, η αντιμικροβιακή ικανότητα του εκχυλίσματος αυτού ενάντια στον *S. Typhimurium* μπορεί να χαρακτηριστεί ως ισχυρή.

- Στο εκχύλισμα πράσινων λοβών, ωρίμανσης Ιουνίου 2022 και διαλύτη το μίγμα νερού:αιθανόλης 90:10, ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης της *Salmonella Typhimurium* παρουσιάζει στατιστικά σημαντική αύξηση. Το γεγονός αυτό προκύπτει από την μεγάλη αύξηση του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης στο εκχύλισμα αυτό σε σχέση με τον Control 2 καθώς επίσης από την μη επικάλυψη των διαστημάτων εμπιστοσύνης τους. Συνεπώς, το εκχύλισμα αυτό δεν παρουσιάζει αντιμικροβιακή ικανότητα κατά του βακτηρίου αυτού.
- Το εκχύλισμα πράσινων λοβών ωρίμανσης Μαρτίου 2023 και διαλύτη το μίγμα νερού:αιθανόλης 90:10 δεν παρουσιάζει αντιμικροβιακή ικανότητα κατά της *Salmonella Typhimurium*. Η παρατήρηση αυτή απορρέει από διπλή αιτιότητα: από την πολύ μεγάλη αύξηση του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης της *S. Typhimurium*, σε συνδυασμό με την απουσία επικάλυψης των διαστημάτων εμπιστοσύνης τους.
- Κατά τη σύγκριση των στηλών που αντιστοιχούν στα δείγματα ελέγχου (Control 1 και Control 2) στα παρουσιαζόμενα ραβδογράμματα, προκύπτει μια αξιοσημείωτη παρατήρηση. Η συμπερίληψη μίγματος νερού:αιθανόλης 90:10 στο δείγμα ελέγχου 2 είχε ως αποτέλεσμα στατιστικά σημαντική μείωση κατά 27% του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης της *S. Typhimurium* σε σύγκριση με δείγμα ελέγχου 1, όπου απουσίαζε το μίγμα αυτό. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η αιθανόλη επιδεικνύει μια καλή αντιμικροβιακή δράση έναντι της *S. Typhimurium*.
- Συγκρίνοντας τους ειδικούς ρυθμούς ανάπτυξης στα εκχυλίσματα πράσινων λοβών ωρίμανσης Μαΐου 2022, προκύπτει ότι στο εκχύλισμα που περιείχε αιθανόλη, ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης της *S. Typhimurium* μειώθηκε κατά 55% συγκριτικά με αυτό που περιείχε νερό ως διαλύτη. Παρόλα αυτά η μείωση αυτή δεν μπορεί να χαρακτηριστεί ως στατιστικά σημαντική καθώς τα διαστήματα εμπιστοσύνης τους επικαλύπτονται. Επομένως, δεν μπορεί να εξαχθεί με βεβαιότητα κατά πόσο η προσθήκη αιθανόλης στο εκχύλισμα αυξάνει την αντιμικροβιακή ικανότητα.
- Όπως προαναφέρθηκε, τα εκχυλίσματα πράσινων λοβών ωρίμανσης Ιουνίου 2022, δεν παρουσιάζουν αντιμικροβιακή ικανότητα. Η προσθήκη αιθανόλης στο εκχύλισμα συνέλαβε στην στατιστικά σημαντική μείωση του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης της *S. Typhimurium* χωρίς όμως να μπορεί να χαρακτηριστεί ως αξιοσημείωτη.
- Συγκρίνοντας τα εκχυλίσματα πράσινων λοβών Μαρτίου 2023 φαίνεται ξεκάθαρα ότι η χρήση του νερού ως διαλύτη συνέβαλε αποτελεσματικά στην αξιοσημείωτη ενίσχυση της αντιμικροβιακής ικανότητας του εκχυλίσματος αυτού. Αντίθετα η χρήση του μίγματος νερού:αιθανόλης 90:10 ως διαλύτη φαίνεται να αναιρεί την αντιμικροβιακή ικανότητα του εκχυλίσματος αυτού.

Ο πίνακας που παρουσιάζεται παρακάτω παρέχει τόσο τις τιμές του ποσοστιαίου συντελεστή αναστολής όσο και την αξιολόγηση της αντιμικροβιακής δράσης για κάθε εκχύλισμα έναντι της. Ο προσδιορισμός της έντασης της αντιμικροβιακής δράσης βασίζεται σε συγκεκριμένα προκαθορισμένα εύρη τιμών, τα οποία περιγράφονται επίσης εντός του πίνακα

Πίνακας 27 Χαρακτηρισμός της αντιμικροβιακής δράσης των εκχυλισμάτων που μελετήθηκαν ενάντια στην *Salmonella Typhimurium* με βάση τις τιμές του παράγοντα % inhibition

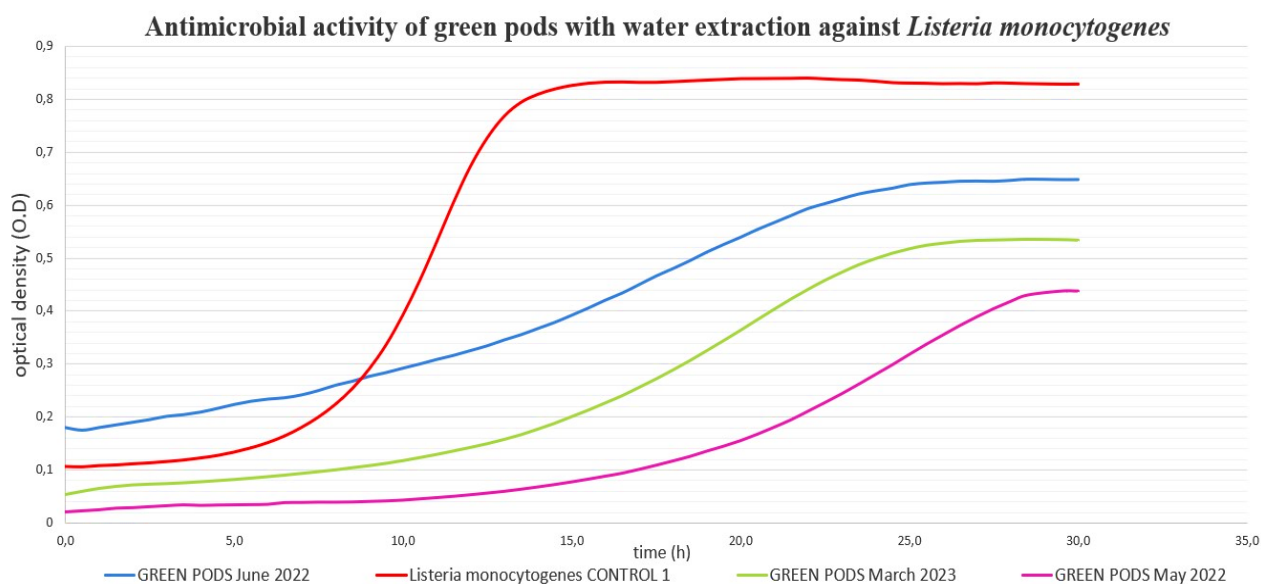
<b>Salmonella Typhimurium</b>						
<b>Aqueous extracts</b>	<b>% inhibition</b>	<b>ΜΗΔΕΝΙΚΗ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ (% inhibition= 0%)</b>	<b>ΕΛΑΧΙΣΤΗ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ (% inhibition &lt;35%)</b>	<b>ΗΠΙΑ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ (% inhibition &lt; 60%)</b>	<b>ΙΣΧΥΡΗ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ (% inhibition 60-85%)</b>	<b>ΠΟΛΥ ΙΣΧΥΡΗ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ (% inhibition &gt; 85%)</b>
GREEN PODS May 2022 (H2O)	45			√		
GREEN PODS June 2022 (H2O)	0	√				
GREEN PODS March 2023 (H2O)	43			√		
<b>Ethanolic extracts</b>						
GREEN PODS May 2022 (H2O/EtOH)	65				√	
GREEN PODS June 2022 (H2O/EtOH)	0	√				
GREEN PODS March 2023 (H2O/EtOH)	0	√				

Με βάση τον πιο πάνω πίνακα, την ισχυρότερη αντιμικροβιακή δράση ενάντια στην *S. Typhimurium*, παρουσιάζει το εκχύλισμα πράσινων λοβών με μήνα ωρίμανσης τον Μάιο του 2022 και διαλύτη το μίγμα νερό:αιθανόλη 90:10. Ήπια αντιμικροβιακή ικανότητα παρουσιάζουν τα εκχυλίσματα πράσινου λοβού ωρίμανσης Μαΐου και Μαρτίου και διαλύτη το νερό. Όλα τα υπόλοιπα εκχυλίσματα δεν παρουσιάζουν αντιμικροβιακή ικανότητα ενάντια στο βακτήριο αυτό. Με βάση αυτές τις παρατηρήσεις προκύπτει το συμπέρασμα ότι οι ημερομηνίες συγκομιδής των πράσινων λοβών που εύνουν, όταν επιλεγθεί ο κατάλληλος διαλύτης, την αντιμικροβιακή τους ικανότητα ενάντια στην *S. Typhimurium* είναι αυτές του Μάιου και Μαρτίου.

Παρακάτω, παρατηρούνται οι καμπύλες ανάπτυξης της *Listeria monocytogenes* μέσα σε εκχυλίσματα πράσινων λοβών που συλλέχθηκαν τον Μάιο του 2022, τον Ιούνιο του 2022 και τον Μάρτιο του 2023, και τα οποία παρασκευάστηκαν χρησιμοποιώντας νερό ως διαλύτη.

Πίνακας 28 Πράσινοι λοβοί που συγκομίστηκαν τον Μάιο του 2022, τον Ιούνιο του 2022 και τον Μάρτιο του 2023 και εκχυλίστηκαν με νερό, συνοδευόμενα από το αντίστοιχο δείγμα ελέγχου. Παρέχονται επιπλέον λεπτομερείς ποσότητες εμβολιασμού των δειγμάτων

<i>Listeria monocytogenes</i>		
ΕΚΧΥΛΙΣΗ	ΤΜΗΜΑ ΧΑΡΟΥΠΙΟΥ	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ
Water extraction	Green pods May 2022 (118a)	Green pods May 2022 (a) 50 μL + LM 50 μL + BHI Broth 250 μL
	Green pods June 2022 (120a)	Green pods June 2022 (a) 50 μL + LM 50 μL + BHI Broth 250 μL
	Green pods March 2023 (121a)	Green pods March 2023 (a) 50 μL + LM 50 μL + BHI Broth 250 μL
	LM Control 1 (Broth)	LM 50 μL + BHI Broth 300 μL



Γράφημα 22 Καμπύλες ανάπτυξης της *Listeria monocytogenes* σε εκχυλίσματα πράσινων λοβών με διαφορετικούς μήνες ωρίμανσης και με νερό ως διαλύτη, σε συνδυασμό με την αντίστοιχη καμπύλη ανάπτυξης στο δείγμα ελέγχου/μάρτυρα (Control 1)

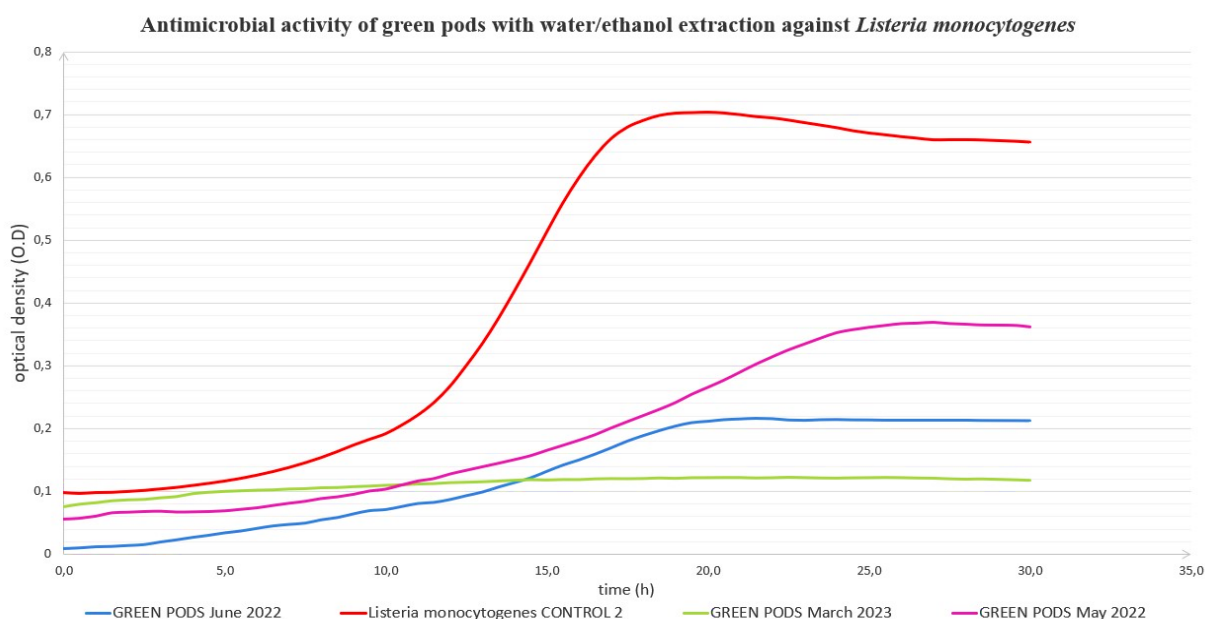
- Στο εκχύλισμα πράσινων λοβών, ωρίμανσης Ιουνίου 2022, φαίνεται να υπάρχει πολύ ισχυρή αντιμικροβιακή δράση καθώς η ειδική ταχύτητα πολλαπλασιασμού της *Listeria monocytogenes* φαίνεται να είναι σε πολύ μεγάλο βαθμό μικρότερη σε σχέση με το Control 1. Επίσης παρατηρείται ότι ο μικροοργανισμός χρειάστηκε λιγότερο χρόνο να προσαρμοστεί στο περιβάλλον του εκχυλίσματος, όμως αυτό δεν αναιρεί την αντιμικροβιακή δράση του καθώς η *L.monocytogenes* παρέμεινε καθ' όλη τη διάρκεια σε χαμηλότερα επίπεδα σε σχέση με το δείγμα ελέγχου Control 1. Αξίζει να σημειωθεί ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης του μικροοργανισμού αυτού φαίνεται να είναι μικρότερος σε σχέση και με τα άλλα δύο εκχυλίσματα.
- Στο εκχύλισμα πράσινων λοβών, ωρίμανσης Μαρτίου 2023, παρατηρείται από το γράφημα αρκετά μικρότερη ειδική ταχύτητα πολλαπλασιασμού σε σχέση με το Control 1, γεγονός που υποδεικνύει και σε αυτή την περίπτωση, την ύπαρξη ισχυρής αντιμικροβιακής ικανότητας του εκχυλίσματος ενάντια στην *Listeria monocytogenes*. Επίσης παρατηρείται ότι ο μικροοργανισμός χρειάστηκε περισσότερο χρόνο να προσαρμοστεί στο περιβάλλον του εκχυλίσματος, γεγονός που ενισχύει την αντιμικροβιακή ικανότητα του εκχυλίσματος.
- Ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης της *Listeria monocytogenes* στο εκχύλισμα πράσινων λοβών, ωρίμανσης Μαΐου 2022, φαίνεται να είναι αρκετά μικρότερος σε σχέση με το δείγμα ελέγχου. Επιπλέον στο εκχύλισμα αυτό η *Listeria monocytogenes* φαίνεται να χρειάστηκε πολύ περισσότερο χρόνο προσαρμογής σε σχέση τόσο με το δείγμα ελέγχου όσο και με τα άλλα δύο εκχυλίσματα. Συνεπώς, το εκχύλισμα αυτό φαίνεται να παρουσιάζει ισχυρή αντιμικροβιακή δράση.
- Αξιοσημείωτη παρατήρηση είναι ότι η *Listeria monocytogenes* παρέμεινε σε αρκετά πιο χαμηλά επίπεδα σε όλα τα εκχυλίσματα που μελετήθηκαν σε σχέση με το δείγμα ελέγχου. Αυτός είναι ένας ακόμη παράγοντας που φανερώνει την ισχυρή αντιμικροβιακή δράση των τριών πιο πάνω εκχυλισμάτων κατά της *Listeria monocytogenes*.



Οι καμπύλες ανάπτυξης που απεικονίζουν την ανάπτυξη της *Listeria monocytogenes* σε εκχυλίσματα πράσινων λοβών με χρήση μίγματος νερού:αιθανόλης 90:10 ως διαλύτη, τα οποία συλλέχθηκαν τον Ιούνιο του 2022 και τον Μάρτιο του 2023, παρουσιάζονται παρακάτω.

Πίνακας 29 Πράσινοι λοβοί που συγκομίστηκαν τον Μάιο του 2022, τον Ιούνιο του 2022 και τον Μάρτιο του 2023 και εκχυλίστηκαν με μίγμα νερού:αιθανόλης 90:10, συνοδευόμενα από το αντίστοιχο δείγμα ελέγχου. Παρέχονται επιπλέον λεπτομερείς ποσότητες εμβολιασμού των δειγμάτων.

<i>Listeria monocytogenes</i>		
ΕΚΧΥΛΙΣΗ	ΤΜΗΜΑ ΧΑΡΟΥΠΙΟΥ	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ
Water/Ethanol 90:10 extraction	Green pods May 2022 (118b)	Green pods May 2022 (b) 50 μL + LM 50 μL + BHI Broth 250 μL
	Green pods June 2022 (120b)	Green pods June 2022 (b) 50 μL + LM 50 μL + BHI Broth 250 μL
	Green pods March 2023 (121b)	Green pods March 2023 (b) 50 μL + LM 50 μL + BHI Broth 250 μL
	LM Control 2 (Water/Ethanol - 90:10)	LM 50 μL + BHI Broth 250 μL + 50 μL H <sub>2</sub> O/ethanol (90:10)



Γράφημα 23 Καμπύλες ανάπτυξης της *Listeria monocytogenes* σε εκχυλίσματα πράσινων λοβών με διαφορετικούς μήνες ωρίμανσης και με μίγμα νερού:αιθανόλης 90:10 ως διαλύτη, σε συνδυασμό με την αντίστοιχη καμπύλη ανάπτυξης στο δείγμα ελέγχου/μάρτυρα (Control 2)

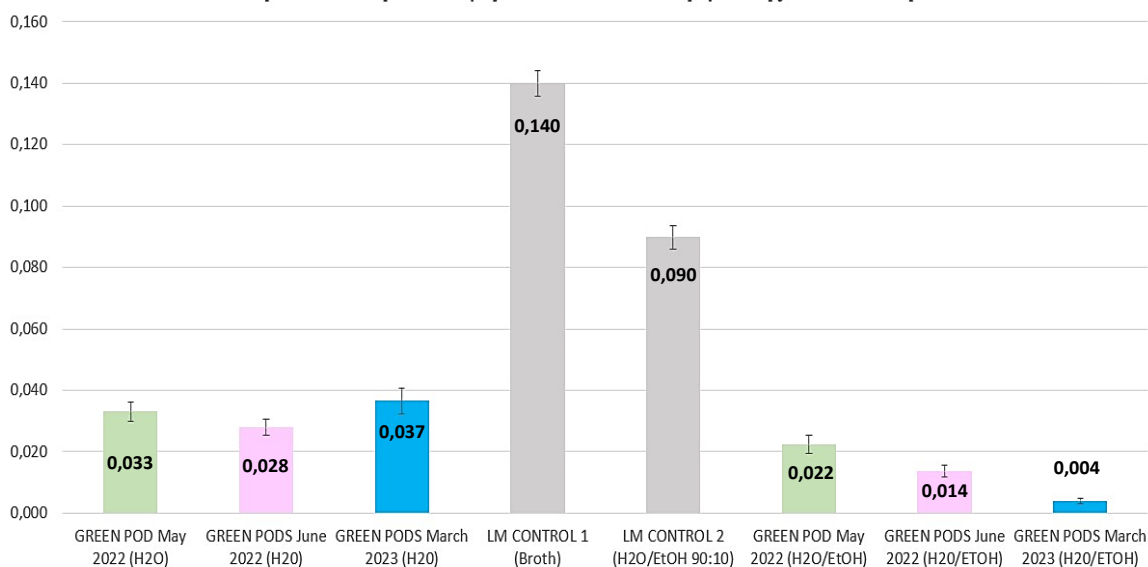
- Στο εκχύλισμα πράσινων λοβών, ωρίμανσης Ιουνίου 2022, φαίνεται να υπάρχει πολύ ισχυρή αντιμικροβιακή δράση καθώς η ειδική ταχύτητα πολλαπλασιασμού της *Listeria monocytogenes* φαίνεται να είναι σε πολύ μεγάλο βαθμό μικρότερη σε σχέση με το Control 2. Επίσης παρατηρείται ότι ο μικροοργανισμός δεν χρειάστηκε χρόνο να προσαρμοστεί στο περιβάλλον του εκχυλίσματος, όμως αυτό δεν αναιρεί την αντιμικροβιακή δράση του καθώς η *L.monocytogenes* παρέμεινε καθ' όλη τη διάρκεια σε χαμηλότερα επίπεδα σε σχέση με το δείγμα ελέγχου Control 2.
- Στο εκχύλισμα πράσινων λοβών, ωρίμανσης Μαρτίου 2023, παρατηρείται από το γράφημα εξαιρετικά μεγάλη μείωση της ειδικής ταχύτητας πολλαπλασιασμού σε σχέση με το Control 2, γεγονός που υποδεικνύει την ύπαρξη πολύ ισχυρής αντιμικροβιακής ικανότητας του εκχυλίσματος ενάντια στην *Listeria monocytogenes*. Αξίζει να αναφερθεί ότι στο εκχύλισμα αυτό ο μικροοργανισμός δεν παρουσιάζει φάση προσαρμογής. Το γεγονός αυτό δεν αναιρεί την πολύ ισχυρή αντιμικροβιακή δράση του εκχυλίσματος αυτού καθώς παρόλο που ο μικροοργανισμός δεν χρειάστηκε χρόνο να προσαρμοστεί, δεν μπόρεσε στην συνέχεια να αναπτυχθεί και σταθεροποιήθηκε σχεδόν αμέσως σε πολύ χαμηλά επίπεδα.
- Ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης της *Listeria monocytogenes* στο εκχύλισμα πράσινων λοβών, ωρίμανσης Μαΐου 2022, φαίνεται να είναι αρκετά μικρότερος σε σχέση με το δείγμα ελέγχου. Στο εκχύλισμα αυτό φαίνεται η *L. monocytogenes* να παρουσίασε φάση προσαρμογής κάτι που δεν συνέβη στα άλλα δύο εκχυλίσματα.
- Όπως και στα εκχυλίσματα πράσινων λοβών με διαλύτη το νερό έτσι και σε αυτά, η *Listeria monocytogenes* παρέμεινε σε αρκετά πιο χαμηλά επίπεδα σε σχέση με το δείγμα ελέγχου (Control 2). Αυτός είναι ένας ακόμη παράγοντας που φανερώνει την πολύ ισχυρή αντιμικροβιακή δράση των τριών πιο πάνω εκχυλισμάτων κατά της *Listeria monocytogenes*.

Προκειμένου να διερευνηθούν διεξοδικά τα αντιμικροβιακά χαρακτηριστικά των εκχυλισμάτων πράσινων λοβών έναντι της *Listeria monocytogenes*, ο παρακάτω πίνακας παρουσιάζει τις τιμές του ρυθμού ανάπτυξης μαζί με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις τους. Επιπλέον, ο πίνακας περιλαμβάνει πληροφορίες σχετικά με τις χρονικές περιόδους που απαιτούνται για την προσαρμογή του μικροοργανισμού σε κάθε εκχύλισμα.

Πίνακας 30 Ειδικό ρυθμό ανάπτυξης ( $\mu$ ) συνοδευόμενοι από την τυπική τους απόκλιση και χρόνο προσαρμογής (lag phase) της *Listeria monocytogenes* στα εξεταζόμενα εκχυλίσματα.

<i>Listeria monocytogenes</i>				
Aqueous extracts	Περιγραφή δειγμάτων	Rate, $\mu$ (1/h)	Standard deviation (SD)	lag phase (h)
Green pods May 2022 (118a)	Green pods May 2022 (a) 50 $\mu$ L + LM 50 $\mu$ L + BHI Broth 250 $\mu$ L	0,033	0,003	15,156
Green pods June 2022 (120a)	Green pods June 2022 (a) 50 $\mu$ L + LM 50 $\mu$ L + BHI Broth 250 $\mu$ L	0,028	0,003	5,663
Green pods March 2023 (121a)	Green pods March 2023 (a) 50 $\mu$ L + LM 50 $\mu$ L + BHI Broth 250 $\mu$ L	0,037	0,004	11,882
LM Control 1 (Broth)	LM 50 $\mu$ L + BHI Broth 300 $\mu$ L	0,140	0,004	8,030
Water/Ethanolic (90:10) extracts	Περιγραφή δειγμάτων	Rate, $\mu$ (1/h)	Standard deviation (SD)	lag phase (h)
Green pods May 2022 (118b)	Green pods May 2022 (b) 50 $\mu$ L + LM 50 $\mu$ L + BHI Broth 250 $\mu$ L	0,022	0,003	6,943
Green pods June 2022 (120b)	Green pods June 2022 (b) 50 $\mu$ L + LM 50 $\mu$ L + BHI Broth 250 $\mu$ L	0,014	0,002	-
Green pods March 2023 (121b)	Green pods March 2023 (b) 50 $\mu$ L + LM 50 $\mu$ L + BHI Broth 250 $\mu$ L	0,004	0,001	-
LM Control 2 (Broth + Water/Ethanol - 90:10)	LM 50 $\mu$ L + BHI Broth 250 $\mu$ L + 50 $\mu$ L H <sub>2</sub> O/ethanol (90:10)	0,090	0,004	10,528

Μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης της *Listeria monocytogenes* σε εκχυλίσματα πράσινων λοβών διαφορετικού σταδίου ωρίμανσης και διαλύτη



Γράφημα 24 Ραβδόγραμμα των ειδικών ρυθμών ανάπτυξης σε συνδυασμό με τα διαστήματα εμπιστοσύνης τους (μαύρη κάθετη γραμμή), της *Listeria monocytogenes* σε εκχυλίσματα πράσινων λοβών, διαφορετικού σταδίου ωρίμανσης, μαζί με τα αντίστοιχα δείγματα ελέγχου (Control 1 και Control 2)

- Σε όλα τα εκχυλίσματα πράσινων λοβών με διαλύτη το νερό, ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης της *Listeria monocytogenes* παρουσίασε στατιστικά σημαντική μείωση συγκριτικά με το δείγμα ελέγχου 1. Η τάξη της μείωσης αυτής στα εκχυλίσματα πράσινων λοβών ωρίμανσης Μαΐου 2022, Ιουνίου 2022 και Μαρτίου 2023 είναι 76%, 80% και 74% αντίστοιχα. Επιπλέον, τα διαστήματα εμπιστοσύνης των ρυθμών ανάπτυξης και στα τρία εκχυλίσματα δεν επικαλύπτονται με το αντίστοιχο στο δείγμα ελέγχου και παράλληλα η απόσταση μεταξύ τους είναι πάρα πολύ μεγάλη. Με βάση αυτές τις παρατηρήσεις και τα τρία αυτά εκχυλίσματα παρουσιάζουν ισχυρή αντιμικροβιακή ικανότητα.
- Ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης της *Listeria monocytogenes* σε όλα τα εκχυλίσματα πράσινων λοβών με διαλύτη το μίγμα νερού:αιθανόλης 90:10 παρουσίασε στατιστικά σημαντική μείωση σε σχέση με το δείγμα ελέγχου 2. Αυτό προκύπτει από την μείωση του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης σε συνδυασμό με τη μη επικάλυψη των διαστημάτων εμπιστοσύνης τους. Η τάξη της μείωσης αυτής στα εκχυλίσματα πράσινων λοβών ωρίμανσης Μαΐου 2022, Ιουνίου 2022 και Μαρτίου 2023 είναι 75%, 85% και 96% αντίστοιχα. Με βάση λοιπόν αυτές τις παρατηρήσεις μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι το εκχύλισμα πράσινων λοβών ωρίμανσης Μαΐου 2022 παρουσιάζουν ισχυρή αντιμικροβιακή δράση, ενώ τα εκχυλίσματα πράσινων λοβών ωρίμανσης Ιουνίου 2022 και Μαρτίου 2023 παρουσιάζουν πολύ ισχυρή αντιμικροβιακή ικανότητα έναντι στην *Listeria monocytogenes*.
- Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης της *Listeria monocytogenes* στο εκχύλισμα πράσινων λοβών ωρίμανσης Μαρτίου 2023 και με διαλύτη το μίγμα νερού:αιθανόλης 90:10 είναι εξαιρετικά μικρός και γι' αυτό τον λόγο το εκχύλισμα αυτό παρουσιάζει την ισχυρότερη αντιμικροβιακή ικανότητα ενάντια στην *Listeria monocytogenes* σε σχέση με όλα τα άλλα εκχυλίσματα που μελετήθηκαν.
- Ακόμη μια σημαντική παρατήρηση είναι ότι σε όλα τα εκχυλίσματα που περιείχαν αιθανόλη, ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης ήταν μικρότερος σε σχέση με τα αντίστοιχα εκχυλίσματα που δεν περιείχαν αιθανόλη.

Ο πίνακας που παρουσιάζεται παρακάτω παρέχει τόσο τις τιμές του ποσοστιαίου συντελεστή αναστολής όσο και την αξιολόγηση της αντιμικροβιακής δράσης για κάθε εκχύλισμα έναντι της *Listeria monocytogenes*. Ο προσδιορισμός της έντασης της αντιμικροβιακής δράσης βασίζεται σε συγκεκριμένα προκαθορισμένα εύρη τιμών, τα οποία περιγράφονται επίσης εντός του πίνακα

Πίνακας 31 Χαρακτηρισμός της αντιμικροβιακής δράσης των εκχυλισμάτων που μελετήθηκαν ενάντια στην *Listeria monocytogenes* με βάση τις τιμές του παράγοντα % inhibition

<i>Listeria monocytogenes</i>						
Aqueous extracts	% inhibition	ΜΗΔΕΝΙΚΗ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ (% inhibition= 0%)	ΕΛΑΧΙΣΤΗ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ (% inhibition <35%)	ΗΠΙΑ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ (% inhibition < 60%)	ΙΣΧΥΡΗ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ (% inhibition 60-85%)	ΠΟΛΥ ΙΣΧΥΡΗ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ (% inhibition > 85%)
GREEN PODS May 2022 (H2O)	76				✓	
GREEN PODS June 2022 (H2O)	80				✓	
GREEN PODS March 2023 (H2O)	74				✓	
Ethanollic extracts						
GREEN PODS May 2022 (H2O/EtOH)	75				✓	
GREEN PODS June 2022 (H2O/EtOH)	85				✓	
GREEN PODS March 2023 (H2O/EtOH)	96					✓

Με βάση τις τιμές του πιο πάνω πίνακα γίνεται εμφανές για ακόμη μια φορά, ότι το εκχύλισμα που παρουσιάζει την ισχυρότερη αντιμικροβιακή ικανότητα εναντία στην *Listeria monocytogenes* είναι αυτό με ωρίμανση Μαρτίου 2023 και με διαλύτη το μίγμα νερού:αιθανόλης 90:10. Βέβαια όλα τα εκχυλίσματα παρουσιάζουν ισχυρή αντιμικροβιακή δράση ενάντια στην *Listeria monocytogenes*.

### 3. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η αναμενόμενη αντιμικροβιακή αποτελεσματικότητα των διαφόρων τμημάτων του χαρουπιού, όπως προκύπτει από τα ευρήματα που περιγράφονται στο υποκεφάλαιο 2.3 επιβεβαιώθηκε σε μεγάλο βαθμό. Έγινε προφανές ότι διάφορα μέρη χαρουπιού παρουσίασαν την ικανότητα να παρεμποδίζουν αποτελεσματικά τον πολλαπλασιασμό ενός ευρέος φάσματος παθογόνων μικροοργανισμών.

Στο πλαίσιο του πρώτου πειράματος, το οποίο αποσκοπούσε στον εντοπισμό των τμημάτων του χαρουπιού με την πιο ισχυρή αντιμικροβιακή ικανότητα, προέκυψαν διάφορα βασικά συμπεράσματα.

Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης δείχνουν ότι οι σπόροι Σεπτεμβρίου 2022 χαρουπιού δεν επιδεικνύουν αντιμικροβιακή δράση έναντι της *Escherichia coli*, είτε υποβάλλονται σε εκχύλιση με νερό είτε σε μίγμα νερού:αιθανόλης 90:10. Αντίθετα οι σπόροι αυτοί επιδεικνύουν μια ικανοποιητική αντιμικροβιακή δράση έναντι του *Staphylococcus aureus* και κυρίως η ισχύς αυτή παραμένει σταθερή ανεξάρτητα από τον διαλύτη που χρησιμοποιείται για την εκχύλιση. Διάφοροι παράγοντες θα μπορούσαν να εξηγήσουν την απουσία αντιμικροβιακής δράσης στα εκχυλίσματα των σπόρων έναντι της *Escherichia coli*. Πρώτον, η αξιοσημείωτα χαμηλή περιεκτικότητά τους σε φαινολικές ενώσεις, γνωστές για τις αντιβακτηριακές ιδιότητες, θα μπορούσε να αποτελέσει την κυριότερη αιτία αυτής της συμπεριφοράς. Επιπλέον, η κυρίαρχη παρουσία μακροθρεπτικών συστατικών στους σπόρους, ιδίως πρωτεϊνών (σε ποσοστό 18,6%), οι οποίες συνήθως δεν συνδέονται με αντιβακτηριακές επιδράσεις, μπορεί επίσης να διαδραματίσει κάποιο ρόλο. Τέλος, θα πρέπει να ληφθούν υπόψη οι διαφοροποιήσεις στην ευαισθησία των βακτηρίων σε αντιμικροβιακούς παράγοντες. Η *Escherichia coli* και ο *Staphylococcus aureus* διαθέτουν διαφορετικές δομές κυτταρικών τοιχωμάτων και συνθέσεις μεμβρανών, οι οποίες μπορούν να οδηγήσουν σε διαφορετικές αντιδράσεις όταν εκτίθενται στις ίδιες αντιμικροβιακές ενώσεις. Περαιτέρω έρευνα σχετικά με την χημική σύσταση των σπόρων χαρουπιού και των αλληλεπιδράσεών τους με διάφορους μικροοργανισμούς θα μπορούσε να προσφέρει βαθύτερη κατανόηση αυτού του φαινομένου.

Μετατοπίζοντας την προσοχή μας στους λοβούς χαρουπιού με περίοδο συγκομιδής τον Σεπτέμβριο 2022, γίνεται φανερό ότι οι λοβοί αυτοί παρουσιάζουν σημαντικά ισχυρότερη αντιμικροβιακή δράση τόσο έναντι της *Escherichia coli* όσο και έναντι του *Staphylococcus aureus* όταν εκχυλίζονται με μείγμα νερού:αιθανόλης 90:10 σε σύγκριση με την εκχύλιση με νερό. Τα αποτελέσματα αυτά αναδεικνύουν τη σημασία της επιλογής του διαλύτη στη μεγιστοποίηση του αντιμικροβιακού δυναμικού των λοβών χαρουπιού, τονίζοντας την αποτελεσματικότητα του μείγματος νερού:αιθανόλης 90:10 στην αξιοποίηση των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων τους έναντι και των δύο βακτηριακών στελεχών.

Μία ακόμη αποκάλυψη της παρούσας μελέτης είναι ότι οι πράσινοι λοβοί χαρουπιού ωρίμανσης Μαΐου 2022 παρουσιάζουν ισχυρή αντιμικροβιακή δράση τόσο έναντι της *Escherichia coli* όσο και έναντι του *Staphylococcus aureus*, ανεξάρτητα από τον χρησιμοποιούμενο διαλύτη εκχύλισης. Στην περίπτωση της *Escherichia coli*, τόσο το



νερό όσο και το εκχύλισμα από το μείγμα νερού:αιθανόλης 90:10 εμφανίζουν ισχυρή αντιμικροβιακή δράση, με ένα μικρό πλεονέκτημα που παρατηρείται στο εκχύλισμα με διαλύτη νερό. Ομοίως, για τον *Staphylococcus aureus*, και οι δύο μέθοδοι εκχύλισης αποδίδουν ισχυρή αντιμικροβιακή δράση, με οριακή προτίμηση στο μείγμα νερού:αιθανόλης 90:10 ως διαλύτη. Τα ευρήματα αυτά υπογραμμίζουν το συνολικό ισχυρό αντιμικροβιακό δυναμικό των πράσινων λοβών χαρουπιού, καθιστώντας τους έναν πολλά υποσχόμενο υποψήφιο για περαιτέρω διερεύνηση και δυναμική αξιοποίηση ως φυσικό αντιμικροβιακό παράγοντα έναντι μιας σειράς βακτηριακών στελεχών.

Τέλος η εξέταση των φύλλων χαρουπιάς με περίοδο συγκομιδής τον Δεκέμβριο του 2022, απέδειξε μια ήπια αντιμικροβιακή ικανότητα έναντι της *Escherichia coli* τόσο στο εκχύλισμα νερού όσο και στο εκχύλισμα νερού:αιθανόλης 90:10. Αντίθετα, όταν εξετάστηκαν κατά του *Staphylococcus aureus*, τα φύλλα αυτά αποκάλυψαν ισχυρή αντιμικροβιακή δράση και στους δύο τύπους εκχυλισμάτων, με ελαφρά προτίμηση στο μείγμα νερού:αιθανόλης 90:10 ως διαλύτη επιλογής.

Εν όψει του δεύτερου πειράματός, το οποίο αποσκοπούσε στον εντοπισμό του βέλτιστου σταδίου ωρίμανσης των πράσινων λοβών για τη μεγιστοποίηση της αντιμικροβιακής τους ικανότητας, προέκυψαν διάφορα καίρια συμπεράσματα.

Αρχικά, τα εκχυλίσματα των πράσινων λοβών που συγκομίστηκαν τον Ιούνιο του 2022 παρουσίασαν διαφορετικά αντιμικροβιακά χαρακτηριστικά ανάλογα με τον διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε. Όταν το νερό χρησίμευε ως διαλύτης, δεν υπήρχε διακριτή αντιμικροβιακή δράση έναντι της *Escherichia coli*. Ωστόσο, η χρήση μίγματος νερού:αιθανόλης 90:10 αύξησε σημαντικά την αντιμικροβιακή τους αποτελεσματικότητα έναντι αυτού του βακτηρίου. Στην περίπτωση του *Staphylococcus aureus*, τα εκχυλίσματα εμφάνισαν ισχυρή αντιμικροβιακή δράση όταν διαλύτης ήταν το νερό, ενώ η χρήση μίγματος νερού:αιθανόλης 90:10 απέδωσε ηπιότερη αντιμικροβιακή δράση. Αξίζει να σημειωθεί ότι, ανεξάρτητα από τον διαλύτη, τα εκχυλίσματα πράσινων λοβών Ιουνίου 2022 δεν παρουσίασαν αντιμικροβιακή δράση έναντι της *Salmonella Typhimurium*. Είναι αξιοσημείωτο ότι τα εκχυλίσματα πράσινου λοβού Ιουνίου 2022 επέδειξαν την πιο ισχυρή αντιμικροβιακή τους απόδοση έναντι της *Listeria monocytogenes*, τόσο με το νερό όσο και με το μείγμα νερού:αιθανόλης 90:10 ως διαλύτες. Ειδικότερα, το εκχύλισμα που περιείχε το μείγμα νερού:αιθανόλης 90:10 παρουσίασε μια υπεροχή όσο αφορά την αντιμικροβιακή του ικανότητα.

Το εκχύλισμα που προέρχεται από τους πράσινους λοβούς ωρίμανσης Μαρτίου 2023, χρησιμοποιώντας νερό ως διαλύτη, επέδειξε ιδιαίτερα ικανοποιητική αντιμικροβιακή δράση έναντι της *Escherichia coli*. Ομοίως, το εκχύλισμα που περιείχε αιθανόλη παρουσίασε ικανοποιητική αντιμικροβιακή δράση, αν και με ελαφρώς υψηλότερο βαθμό αποτελεσματικότητας σε σύγκριση με το εκχύλισμα με βάση το νερό. Κατά την αξιολόγηση της αντιμικροβιακής δράσης έναντι του *Staphylococcus aureus*, παρατηρήθηκε ότι το εκχύλισμα πράσινων λοβών Μαρτίου 2023 με νερό ως διαλύτη, παρουσίασε ήπια δράση. Ωστόσο, η αξιοσημείωτη ενίσχυση της αντιμικροβιακής ικανότητας ήταν εμφανής όταν στο συγκεκριμένο εκχύλισμα χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης το μείγμα νερού:αιθανόλης 90:10. Επιπλέον αξιολόγο είναι το γεγονός ότι τα εκχυλίσματα πράσινου λοβού του Μαρτίου 2023 εμφάνισαν εξαιρετικό αντιμικροβιακό δυναμικό στην καταπολέμηση της *Salmonella*

*Typhimurium*, όταν το νερό χρησίμευε ως διαλύτης. Αντίθετα, η χρήση μίγματος νερού:αιθανόλης 90:10 ως διαλύτη φαίνεται να αναιρεί την αντιμικροβιακή ικανότητα του εκχυλίσματος αυτού. Αξιόλογο είναι το γεγονός επίσης ότι ανεξάρτητα από τον διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε, το εκχύλισμα πράσινων λοβών ωρίμανσης Μαρτίου 2023 επέδειξαν ισχυρή αντιμικροβιακή δράση έναντι στην *Listeria monocytogenes*. Είναι σημαντικό όμως ότι η χρήση μίγματος νερού:αιθανόλης 90:10 ενίσχυσε ακόμη περισσότερο την αντιμικροβιακή ικανότητα των εκχυλισμάτων, καθιστώντας τα, τα πιο ισχυρά έναντι της *Listeria monocytogenes* σε σύγκριση με όλα τα άλλα εκχυλίσματα που μελετήθηκαν.

Το εκχύλισμα από πράσινους λοβούς ωρίμανσης Μαΐου 2022, όταν χρησιμοποιήθηκε νερό ως διαλύτης, παρουσίασε ήπια αντιμικροβιακή δράση έναντι της *Salmonella Typhimurium*. Αντίθετα, όταν χρησιμοποιήθηκε μείγμα νερού:αιθανόλης 90:10, εμφάνισε ισχυρή αντιμικροβιακή δράση έναντι της *Salmonella Typhimurium*. Επιπλέον, η αντιμικροβιακή δράση των εκχυλισμάτων των πράσινων λοβών ωρίμανσης Μαΐου 2022 ενάντια στην *Listeria monocytogenes* εμφανίζεται να είναι ισχυρή, ανεξάρτητα από την επιλογή του χρησιμοποιούμενου διαλύτη.

Συνοπτικά, την πιο ισχυρή αντιμικροβιακή δράση έναντι της *Escherichia coli* παρουσιάζουν τα ακόλουθα εκχυλίσματα: Πράσινων λοβών ωρίμανσης Μαΐου 2022 με διαλύτη το νερό, ωρίμανσης Ιουνίου 2022 με διαλύτη το μίγμα νερού:αιθανόλης 90:10 και ωρίμανσης Μαρτίου 2023 με διαλύτη το μίγμα νερού:αιθανόλης 90:10. Ακόμη ένα εκχύλισμα που παρουσίασε εξίσου ισχυρή αντιμικροβιακή δράση είναι αυτό των λοβών με περίοδο συγκομιδής τον Σεπτέμβριο 2022. Ακόμη ένα σημαντικό συμπέρασμα που προκύπτει είναι ότι οι πράσινοι λοβοί διατηρούν όμοια αντιμικροβιακή ικανότητα (με κατάλληλο διαλύτη κάθε φορά) και στα τα τρία στάδια ωρίμανσης.

Το υψηλότερο επίπεδο αντιμικροβιακής αποτελεσματικότητας έναντι του *Staphylococcus aureus* παρουσιάζει το εκχύλισμα φύλλων με μήνα συγκομιδής τον Σεπτέμβριο 2022 και διαλύτη το μίγμα νερού:αιθανόλης 90:10. Ακολουθούν τα εκχυλίσματα πράσινων λοβών ωρίμανσης Μαΐου 2022 με διαλύτη το μίγμα νερού:αιθανόλης 90:10, φύλλων με μήνα συγκομιδής τον Σεπτέμβριο 2022 με διαλύτη το νερό και πράσινων λοβών ωρίμανσης Ιουνίου 2022 με διαλύτη το νερό.

Την ισχυρότερη αντιμικροβιακή δράση ενάντια στην *Salmonella Typhimurium*, παρουσιάζει το εκχύλισμα πράσινων λοβών με μήνα ωρίμανσης τον Μάιο του 2022 και διαλύτη το μίγμα νερό νερό:αιθανόλη 90:10. Ακολουθούν τα εκχυλίσματα πράσινων λοβών ωρίμανσης Μαΐου 2022 και Μαρτίου 2023 με διαλύτη το νερό. Συνεπώς, προκύπτει το συμπέρασμα ότι οι ημερομηνίες συγκομιδής των πράσινων λοβών που εύνουν, όταν επιλεγθεί ο κατάλληλος διαλύτης, την αντιμικροβιακή τους ικανότητα ενάντια στην *S. Typhimurium* είναι αυτές του Μάιου και Μάρτιου.

Με βάση τις τιμές του πιο πάνω πίνακα γίνεται εμφανές για ακόμη μια φορά, ότι το εκχύλισμα που παρουσιάζει την ισχυρότερη αντιμικροβιακή ικανότητα εναντίον στην *Listeria monocytogenes* είναι αυτό με ωρίμανση Μαρτίου 2023 και με διαλύτη το μίγμα νερού:αιθανόλης 90:10. Βέβαια όλα τα εκχυλίσματα που μελετήθηκαν τόσο με νερό όσο και με μίγμα νερού:αιθανόλης 90:10 παρουσίασαν ισχυρή αντιμικροβιακή δράση ενάντια στην *Listeria monocytogenes*.

Μέσω μιας συνολικής αξιολόγησης της αντιμικροβιακής απόδοσης των δειγμάτων ελέγχου, μπορεί να εξαχθεί συμπέρασμα κατά πόσο η αιθανόλη (απουσία εκχυλίσματος), ακόμη και σε χαμηλή συγκέντρωση (10%), ασκεί ανασταλτική επίδραση στους υπό εξέταση στοχευόμενους μικροοργανισμούς. Συνοψίζοντας, τα ευρήματά μας καταδεικνύουν απερίφραστα ότι η αιθανόλη αναστέλλει αποτελεσματικά όλους τους στοχευόμενους μικροοργανισμούς που εξετάστηκαν.

## 4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Agriamanitaria. (2019, January). Ceratonia siliqua Χαρουπιά Ξυλοκερατιά. *Άγρια Μανιτάρια, Βότανα Θεραπείες μανιτάρια*. Ανάκτηση από <https://www.agriamanitaria.gr/ceratonia-siliqua-%CF%87%CE%B1%CF%81%CE%BF%CF%85%CF%80%CE%B9%CE%AC-%CE%BE%CF%85%CE%BB%CE%BF%CE%BA%CE%B5%CF%81%CE%B1%CF%84%CE%B9%CE%AC/>
- Avallone, R., Plessi, M., Baraldi, M., & Monzani, A. (1997). Determination of Chemical Composition of Carob (Ceratonia siliqua): Protein, Fat, Carbohydrates, and Tannins. *Journal of Food Composition and Analysis*, σσ. 166-172. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1006/jfca.1997.0528>
- Ayache, S. B., Reis, F. S., Dias, M. I., Pereira, C., Glamoclija, J., Sokovic, M., . . . Achour, L. (2021). Chemical characterization of carob seeds (Ceratonia siliqua L.) and use of different extraction techniques to promote its bioactivity. *Food Chemistry*. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129263>
- Ayaz, F. A., Torun, H., Glew, R. H., Bak, Z. D., Chuang, L. T., Presley, J. M., & Andrews, R. (2009). Nutrient Content of Carob Pod (Ceratonia siliqua L.) Flour Prepared Commercially and Domestically. *Plant Foods for Human Nutrition*. Ανάκτηση από [10.1007/s11130-009-0130-3](https://doi.org/10.1007/s11130-009-0130-3)
- Bengochea, C., Romero, A., Villanueva, A., Moreno, G., Alaiz, M., Millán, F., . . . Puppo, M. (2008, March). Composition and structure of carob (Ceratonia siliqua L.) germ proteins. *Food Chemistry*, σσ. 675-683. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.069>
- Bernardo-Gil, M. G., Roque, R., Roseiro, L. B., Duarte, L. C., Gírio, F., & Esteves, P. (2011, November). Supercritical extraction of carob kibbles (Ceratonia siliqua L.). *The Journal of Supercritical Fluids*, σσ. 36-42. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2011.08.007>
- Blount, Z. D. (2015). The Natural History of Model Organisms: The unexhausted potential of E. coli. *eLife*. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.7554/eLife.05826>
- Calixto, F. S., & Cañellas, J. (1982, December). Components of nutritional interest in carob pods (Ceratonia siliqua). *Journal of the Science of Food and Agriculture* .
- Capita, R., Felices-Mercado, A., García-Fernández, C., & Alonso-Calleja, C. (2019). Characterization of Listeria monocytogenes Originating from the Spanish Meat-Processing Chain. *MDPI*. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.3390/foods8110542>
- Corsi, L., Avallone, R., Cosenza, F., Farina, F., Baraldi, C., & Baraldi, M. (2002). Antiproliferative effects of Ceratonia siliqua L. on mouse hepatocellular carcinoma cell line. *Fitoterapia*, σσ. 674-684. Ανάκτηση από [https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(02\)00227-7](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(02)00227-7)

- Custódio, L., Fernandes, E., & Fernandes, E. (2009). Quantification of Polyphenols in Carob Tree (*Ceratonia siliqua* L.) Fruits and Leaves in Portuguese Cultivars. *Acta Horticulturae*. doi:10.17660/ActaHortic.2009.841.69
- Custódio, L., Fernandes, E., Escapa, A. L., A. Fajardo, R. A., Alberício, F., Neng, N. R., . . . Romano, A. (2011). Antioxidant and Cytotoxic Activities of Carob Tree Fruit Pulps Are Strongly Influenced by Gender and Cultivar. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, σσ. 7005-7012. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1021/jf200838f>
- Durazzo, A., Turfani, V., Narducci, V., Azzini, E., Maiani, G., & Carcea, M. (2014, June). Nutritional characterisation and bioactive components of commercial carobs flours. *Food Chemistry*.
- Fidan, H., Mihaylova, D., Petkova, N., Sapoundzhieva, T., Slavov, A., & Krastev, L. (2018, October). Determination of chemical composition, antibacterial and antioxidant properties of products obtained from carob and honey locust. *Turkish Journal of Biochemistry*. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1515/tjb-2018-0113>
- Fidan, H., Stankov, S., & Petkova, N. (2020, January). Evaluation of chemical composition, antioxidant potential and functional properties of carob (*Ceratonia siliqua* L.) seeds. *Journal of Food Science and Technology*.
- Gioxari, A., Amerikanou, C., Nestoridi, I., Gourgari, E., Pratsinis, H., Kalogeropoulos, N., . . . Kaliora, A. C. (2022, July). Carob: A Sustainable Opportunity for Metabolic Health. *MDPI*.
- Goulas, V., Stylos, E., Chatziathanasiadou, M. V., Mavromoustakos, T., & Tzakos, A. G. (2016, November). Functional Components of Carob Fruit: Linking the. *International Journal of Molecular Sciences*.
- GÜBBÜK, H., GÜNEŞ, E., & R., B. (2013, October). Carob Production Potential in Turkey and Uses of Carob. *International Caucasia Forestry Symposium*.
- Haber, B. (2002, September). Carob fiber benefits and applications. *Cereal Foods World*.
- I. Batlle, & J. Tous. (1997). *Carob tree. Ceratonia siliqua* L. Rome, Italy: IPK and IPGRI.
- Ignat, I., Volf, I., & Popa, V. I. (2011, June). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.026>
- Ioannis J. Stavrou, Atalanti Christou, & Constantina P. Kapnissi-Christodoulou. (2018). Polyphenols in carobs: A review on their composition, antioxidant capacity. *Food Chemistry*.
- Kais Rtibi, Slimen Selmi, Dhekra Grami, & Amri Mohamed. (2017, September). Chemical constituents and pharmacological actions of carob pods and leaves ( *Ceratonia siliqua* L.) on the gastrointestinal tract: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. Ανάκτηση από [10.1016/j.biopha.2017.06.088](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.06.088)
- Karababa, E., & Coşkuner, Y. (2013). Physical properties of carob bean (*Ceratonia siliqua* L.): An industrial gum yielding crop. *Industrial Crops and Products*, σσ. 440-446. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.05.006>

- Kawamura, Y. (2008). CAROB BEAN GUM. *Chemical and Technical Assessment (CTA)*.  
Ανάκτηση από <https://www.fao.org/3/at960e/at960e.pdf>
- Kim, H.-S., Quon, M. J., & Kim, J.-a. (2014). New insights into the mechanisms of polyphenols beyond antioxidant properties; lessons from the green tea polyphenol, epigallocatechin 3-gallate. *Redox Biology*, σσ. 187-195. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.12.022>
- Klenow, S., Gleib, M., Haber, B., Owen, R., & Pool-Zobel, B. (2008, April). Carob fibre compounds modulate parameters of cell growth differently in human HT29 colon adenocarcinoma cells than in LT97 colon adenoma cells. *Food and Chemical Toxicology*, σσ. 1389-1397. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.003>
- Krokou, A., Stylianou, M., & Agapiou, A. (2019, February ). Assessing the volatile profile of carob tree (*Ceratonia siliqua* L.). *Environmental Science and Pollution Research*.
- Lakkab, I., Hajaji, H. E., Lachkar, N., Lefter, R., Ciobica, A., Bali, B. E., & Lachkar, M. (2019). *Ceratonia siliqua* L. seed peels: Phytochemical profile, antioxidant activity, and effect on mood disorders. *Journal of Functional Foods*, σσ. 457-465. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.01.041>
- Licitra, G. (2013). Etymologia: Staphylococcus. *Emerging Infectious Diseases*. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.3201/eid1909.et1909>
- Manso, T., Lores, M., & Miguel, T. d. (2021, December). Antimicrobial Activity of Polyphenols and Natural Polyphenolic Extracts on Clinical Isolates. *MDPI*. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.3390/antibiotics11010046>
- Maza, M. P., Zamora, R., Alaiz, M., Hidalgo, F., & Millán, F. (1989). Carob bean germ seed (*Ceratonia siliqua*): Study of the oil and proteins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, σσ. 495-502. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740460411>
- Montville, T. J., & Matthews, K. R. (2010). *Μικροβιολογία τροφίμων*. Εκδοτικός Όμιλος Ίων.
- Murra, M., Mortensen, K., & Wang, M. (2019). Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (clonal complex 398) causing bacteremia and epidural abscess. *International Journal of Infectious Diseases*, σσ. 107-109. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2019.01.012>
- Nawel, O., & Ahmed, H. (2018). Antioxidant and antibacterial activities of the essential oils of *Ceratonia*. *Banat's Journal of Biotechnology*. doi:10.7904/2068-4738-IX(17)-13
- Othmen, K. B., Garcia-Beltrán, J. M., Elfalleh, W., Haddad, ., & Esteban, M. Á. (2021, February). Phytochemical Compounds and Biological Properties of Carob Pods (*Ceratonia siliqua* L.) Extracts at Different Ripening Stages. *Waste and Biomass Valorization*, σσ. 4975–4990. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1007/s12649-021-01352-x>
- Othmen, K. B., Garcia-Beltrán, J. M., Elfalleh, W., Haddad, M., & Esteban, M. Á. (2021). Phytochemical Compounds and Biological Properties of Carob Pods (*Ceratonia siliqua* L.) Extracts at Different Ripening Stages. *Waste and Biomass Valorization*, σσ. 4975–4990. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1007/s12649-021-01352-x>
- Oy Growth Curves Ab Ltd. (χ.χ.). BIOSCREEN C. Ανάκτηση από [www.bioscreen.fi](http://www.bioscreen.fi)



- Oy Growth Curves Ab Ltd., (χ.χ.). BIOSCREEN C. Ανάκτηση από <http://www.interlabsystems.hu/catalog/Labsystems/Bioscreen%20User%20Manual%202011.pdf>
- Pan, S. (2023). *Escherichia coli*(E. coli) morphology, arrangement, Cultural Characteristics, Diagnosis. Ανάκτηση από <https://microbiologynote.com/el/escherichia-colie-coli-morphology-arrangement-cultural-characteristics-diagnosis/>
- Papagiannopoulos, M., Wollseifen, H. R., Mellenthin, A., Haber, B., & Galensa, R. (2004, June). Identification and quantification of polyphenols in carob fruits (*Ceratonía siliqua* L.) and derived products by HPLC-UV-ESI/MSn. *Journal of agricultural and food chemistry*, σσ. 3784-3791. doi:10.1021/jf030660y.
- Petit, M., & Pinilla, J. (1995). Production and purification of a sugar syrup from carob pods. *LWT - Food Science and Technology*, σσ. 145-152. Ανάκτηση από [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80027-1](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80027-1)
- Petkova, N. T., Ivanov, I., Petrova, I., & Mihov, R. (2017, November). Nutritional and antioxidant potential of carob (*Ceratonía siliqua*) flour and evaluation of functional properties of its polysaccharide fraction. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*.
- RAMÓN-LACA, L., & MABBERLEY, D. J. (2003, September). The ecological status of the carob-tree (*Ceratonía siliqua*, Leguminosae) in the Mediterranean. *Botanical Journal of the Linnean Society*.
- Re-Jiménez, B. L., & Amadó, R. (1989, April). Comparative study of the chemical composition of germ meals from carob, guar and tara seeds. *Food Hydrocolloids*, σσ. 149-156. Ανάκτηση από [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(89\)80024-4](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(89)80024-4)
- Rizzo, V., Tomaselli, F., Gentile, A., Malfa, S. L., & Maccarone, E. (2004, November). Rheological Properties and Sugar Composition of Locust Bean Gum from Different Carob Varieties (*Ceratonía siliqua* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1021/jf0494332>
- Roseiro, L. B., Duarte, L. C., Oliveira, D. L., Roque, R., Bernardo-Gil, M. G., & Martins, A. I. (2013, May). Supercritical, ultrasound and conventional extracts from carob (*Ceratonía siliqua* L.) biomass: Effect on the phenolic profile and antiproliferative activity. *Industrial Crops and Products*, σσ. 132-138. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.02.026>
- Rtibi, K., Sebai, H., Selmi, S., & Mohamed, A. (2016, January). *Ceratonía siliqua* leaves exert a strong ROS-scavenging effect in human neutrophils, inhibit myeloperoxidase in vitro and protect against intestinal fluid and electrolytes secretion in rat. *RSC Advances*. Ανάκτηση από [10.1039/C6RA11297H](https://doi.org/10.1039/C6RA11297H)
- Rtibi, K., Selmi, S., Grami, D., Amri, M., Eto, B., El-benna, J., . . . Marzouki, L. (2017). Chemical constituents and pharmacological actions of carob pods and leaves (*Ceratonía siliqua* L.) on the gastrointestinal tract: A review. *Biomedicine and Pharmacotherapy*.
- Sakakibara, H., Honda, Y., Nakagawa, S., Ashida, H., & Kanazawa, K. (2003). Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1021/jf020926l>

- Sanchez, M. (χ.χ.). What are hermaphroditic plants? *JardineriaOn*. Ανάκτηση από [https://www.jardineriaon.com/en/plantas-hermafroditas.html#google\\_vignette](https://www.jardineriaon.com/en/plantas-hermafroditas.html#google_vignette)
- Smith, F. (1948). The Constitution of Carob Gum. *Jacs journal of the american chemical society*, σσ. 3249–3253. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1021/ja01190a013>
- Syed M. Nasar-Abbas, Z.-e.-H. T.-H. (2015, November). Carob Kibble: A Bioactive-Rich Food Ingredient. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*.
- ubaid, J. m., Hussein, H. M., & Hameed, I. H. (2016). Analysis of Bioactive Compounds of *Tribolium Castaneum* and Evaluation of Anti-Bacterial Activity . *International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* .
- Valero-Muñoz, M., Martín-Fernández, B., Ballesteros, S., Lahera, V., & Heras, N. d. (2014, September). Carob pod insoluble fiber exerts anti-atherosclerotic effects in rabbits through sirtuin-1 and peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$ . *The Journal of Nutrition*, σσ. 1378-1384. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.3945/jn.114.196113>
- Vaquero, M. R., Nadra, M. M., Serravalle, L. T., & Saad, A. S. (2010). Antioxidant capacity and antibacterial activity of phenolic compounds from argentinean herbs infusions. *Food Control*, σσ. 779-785. doi:10.1016/j.foodcont.2009.10.017
- Westrell, T., Ciampa, N., Boelaert, F., Helwigh, B., Korsgaard, H., Chríel, M., . . . Mäkelä, P. (2009). Zoonotic infections in Europe in 2007: a summary of the EFSA-ECDC annual report. *Eurosurveillance*. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.2807/ese.14.03.19100-en>
- Κώστα, Χ. (2016, August). Η καλλιέργεια της χαρουπιάς. *Υπουργείο Γεωργίας, Αγροτικής Ανάπτυξης και Περιβάλλοντος, Τμήμα Γεωργίας*. Ανάκτηση από [http://www.moa.gov.cy/moa/da/da.nsf/All/8EB4B75FFA28F366C22587AE0040569E/\\$file/%CE%97%20%CE%BA%CE%B1%CE%BB%CE%BB%CE%B9%CE%AD%CF%81%CE%B3%CE%B5%CE%B9%CE%B1%20%CF%84%CE%B7%CF%82%20%CF%87%CE%B1%CF%81%CE%BF%CF%85%CF%80%CE%B9%CE%AC%CF%82.pdf?OpenElement](http://www.moa.gov.cy/moa/da/da.nsf/All/8EB4B75FFA28F366C22587AE0040569E/$file/%CE%97%20%CE%BA%CE%B1%CE%BB%CE%BB%CE%B9%CE%AD%CF%81%CE%B3%CE%B5%CE%B9%CE%B1%20%CF%84%CE%B7%CF%82%20%CF%87%CE%B1%CF%81%CE%BF%CF%85%CF%80%CE%B9%CE%AC%CF%82.pdf?OpenElement)
- Σπηλιώτης, Β., & Μπατρίνου, Α. (2014). *Βιομηχανικη Μικροβιολογία*. Δίσιγμα.
- Τυμπής, Δ., Πετράκης, Ε., & Κοντελής, Σ. (2016). *Μικροβιολογία Τροφίμων, Μεθοδολογία και τεχνικές αναλύσεων*. Δίσιγμα.