



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Αλληλεπίδραση ανθρώπινου
μικροβιώματος με τρόφιμα**

DIPLOMA THESIS

**Interactions of human microbiome with
foods**

Χριστίνα Αβράμη

A.M.: 17218

Επιβλέπουσα καθηγήτρια:

Ανθιμία Μπατρίνου

ΑΘΗΝΑ, 2024



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Μέλη Εξεταστικής Επιτροπής

**Η πτυχιακή εργασία εξετάστηκε επιτυχώς από την κάτωθι Εξεταστική
Επιτροπή:**

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Μπατρίνου Ανθιμία, Επίκουρη Καθηγήτρια	
Μέλος Επιτροπής: Ειρήνη Στρατή, Επίκουρη Καθηγήτρια	
Μέλος Επιτροπής: Σπύρος Κοντελής, Επίκουρος Καθηγητής	

Ευχαριστίες

Με την περάτωση της παρούσας πτυχιακής εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλους όσους με την πολύτιμη βοήθειά τους συνέλαβαν στην εκπόνηση της. Αρχικά, θα ήθελα να εκφράσω εκ βάθους καρδιάς τις ευχαριστίες μου στην επιβλέπουσα καθηγήτρια κυρία Μπατρίνου Ανθιμία για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, τον πολύτιμο χρόνο που μου αφιέρωσε σε όλη τη διάρκεια της ερευνητικής μου εργασίας και για τις ανεκτίμητες γνώσεις που μου προσέφερε απλόχερα επί του θέματος.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα το οικογενειακό μου περιβάλλον και τους φίλους που ήταν δίπλα μου, πίστεψαν σε μένα και τι δυνατότητές μου και για την κατανόηση και τη στήριξη που μου προσέφεραν όλο αυτό το χρονικό διάστημα με σκοπό να έλθει εις πέρας η εκπόνηση της πτυχιακής μου εργασίας.

Αφιερώσεις

*Η εργασία μου είναι αφιερωμένη στην οικογένεια μου
(στους γονείς μου Δημήτρη και Σοφία, στις αδερφές
μου Άννα και Μαριαλένα και στην γιαγιά μου Ελένη)
για την αδιάκοπη στήριξή τους σε όλα τα χρόνια των
σπουδών μου.*

Δήλωση συγγραφέα πτυχιακής εργασίας

Η κάτωθι υπογεγραμμένη **Αβράμη Χριστίνα** του **Δημητρίου**, με αριθμό μητρώου **17218**, φοιτήτρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της **Σχολής Επιστημών Τροφίμων** του Τμήματος **Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων**, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα 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. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος.

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Η Δηλούσα

Χριστίνα Αβράμη



Περίληψη

Θέμα της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η αλληλεπίδραση του ανθρώπινου μικροβιώματος με τα τρόφιμα. Το ανθρώπινο μικροβίωμα και, κυρίως, ο γαστρεντερικός σωλήνας του ανθρώπου, φιλοξενεί ένα σύνολο μικροοργανισμών, ποικίλης σύνθεσης και ποσότητας. Οι μικροοργανισμοί αυτοί επιδρούν στην ανθρώπινη υγεία, άλλοτε θετικά και άλλοτε αρνητικά. Σκοπός, λοιπόν αυτής της μελέτης, είναι να εξετάσει πως η κατανάλωση ορισμένων τροφίμων μπορεί να αλληλεπιδράσει με τη μικροχλωρίδα του εντέρου. Ως αντικείμενο μελέτης επιλέχθηκε ένα φυτικό εκχύλισμα (ιβίσκος, γαρίφαλο και τσάι του βουνού), το οποίο είναι πλούσιο σε βιοδραστικές ενώσεις και το οποίο ήταν εμπλουτισμένο με προβιοτικά. Δημιουργήθηκε συνθετικό γαστρικό και εντερικό υγρό στο οποίο προστέθηκε το εμπλουτισμένο με προβιοτικά φυτικό εκχύλισμα και το οποίο επέτρεψε την προσομοίωση της διαδικασίας πέψης σε περιβάλλον εργαστηρίου. Η διαδικασία προσομοίωσης αποτελούνταν από 5 φάσεις (αρχική, γαστρική, εντερική, πρώιμη εντερική ζύμωση και όψιμη εντερική ζύμωση), όπου στην τέταρτη φάση προστέθηκαν ανθρώπινα κόπρανα υγιούς ατόμου και ατόμου που έπασχε από νόσο Crown. Εξετάστηκε το φαινολικό περιεχόμενο δειγμάτων των 5 φάσεων με τη βοήθεια του αντιδραστήριου Folin-Ciocalteu, καθώς και το μικροβίωμα του υγιούς και πάσχοντος ατόμου στο συνθετικό υπόστρωμα στις διάφορες φάσεις πέψης.

Λέξεις κλειδιά: ανθρώπινο μικροβίωμα, φυτικό εκχύλισμα, προβιοτικά, Folin-Ciocalteu, καλλιέργεια μικροοργανισμών

Abstract

The subject of this thesis is the interaction of the human microbiome with food. The human microbiome and, above all, the human gastrointestinal tract, hosts a set of microorganisms of varying composition and quantity. These microorganisms affect human health, sometimes positively and sometimes negatively. Therefore, the purpose of this study is to examine how the consumption of certain foods can interact with the intestinal microflora. A plant extract (hibiscus, clove and mountain tea), which is rich in bioactive compounds and which was enriched with probiotics, was chosen as the object of study. Synthetic gastric and intestinal fluid was created to which the probiotic-enriched plant extract was added and which allowed the digestion process to be simulated in a laboratory environment. The simulation process consisted of 5 phases (initial, gastric, enteric, early enteric fermentation and late enteric fermentation), where in the fourth phase, human feces of a healthy individual and an individual suffering from Crohn disease were added. The phenolic content of samples of the 5 phases was examined using the Folin-Ciocalteu reagent, as well as the microbiome of the healthy and diseased individual in the synthetic substrate at the different digestion phases.

Keywords: human microbiome, plant extract, probiotics, Folin-Ciocalteu, culture of microorganisms

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες	5
Αφιερώσεις	6
Δήλωση συγγραφέα πτυχιακής εργασίας	7
Περίληψη	8
Abstract	9
Περιεχόμενα	10
Κατάλογος πινάκων	13
Κατάλογος διαγραμμάτων	13
Κατάλογος εικόνων	15
Σκοπός	16
Δομή	16
Κεφάλαιο 1: Ανθρώπινο μικροβίωμα	17
1.1 Εισαγωγικά στοιχεία για το ανθρώπινο μικροβίωμα	17
1.2 Μικροχλωρίδα γαστρεντερικού σωλήνα	17
1.3 Προσδιορισμός μικροχλωρίδας γαστρεντερικού σωλήνα	19
1.3 Επίδραση διατροφής στο μικροβίωμα του εντέρου	21
1.4 Επίδραση μικροβιώματος στην ανθρώπινη υγεία	21
Κεφάλαιο 2 – Βιοδραστικές ενώσεις	25
2.1 Τι σημαίνει βιοδραστικές ενώσεις	25
2.2 Παραγωγή βιοδραστικών ενώσεων στα φυτά	25
2.3 Βασικές κατηγορίες βιοδραστικών ενώσεων συνοπτικά	26
2.3.1 Γλυκοσίδες	26
2.3.2 Πολυφαινόλες	30
2.3.3 Τερπενοειδή	32
2.3.4 Αλκαλοειδή	33

Κεφάλαιο 3: Ιβίσκος – Γαρύφαλλο – Τσάι βουνού- Προβιοτικά	35
3.1 Ιβίσκος (Hibiscus)	35
3.1.1 Προέλευση και καλλιέργεια ιβίσκου	35
3.1.2 Χημική σύσταση και βιοδραστικές ενώσεις ιβίσκου	36
3.1.3 Παραδοσιακή χρήση ιβίσκου	40
3.2 Γαρίφαλο ή γαρύφαλλο(Syzygium aromaticum)	41
3.2.1 Προέλευση και καλλιέργεια γαρύφαλλου	41
3.2.2 Βιοδραστικές ενώσεις γαρύφαλλου	43
3.2.3 Παραδοσιακή χρήση γαρύφαλλου	44
3.3 Τσάι βουνού (Sideritis)	45
3.3.1 Προέλευση και καλλιέργεια τσαγιού βουνού	45
3.3.2 Βιοδραστικές ενώσεις τσαγιού βουνού	45
3.3.3 Παραδοσιακή χρήση τσαγιού βουνού	48
3.4 Επίδραση ιβίσκου, γαρύφαλλου και τσαγιού βουνού στο μικροβίωμα του εντέρου	48
3.5 Τι καλούνται προβιοτικά	49
3.6 Επίδραση προβιοτικών στη μικροχλωρίδα του εντέρου	50
4. ΣΚΟΠΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	51
5. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	51
5.1 Υλικά και παρασκευή διαλυμάτων	51
5.1.1 Αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu	51
5.1.2 Κορεσμένο διάλυμα ανθρακικού νατρίου Na ₂ CO ₃ .	52
5.1.2 Διάλυμα γαλλικού οξέος	52
5.2 Χημικές αναλύσεις	52
5.2.1 Προσδιορισμός του ολικού φαινολικού περιεχομένου με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu	52
5.3 Μικροβιολογικοί έλεγχοι	54
5.3.1 Μέθοδος διαδοχικών αραιώσεων	54
5.3.2 Ανίχνευση Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (ΟΜΧ)	54
5.3.3 Ανίχνευση οξυγαλακτικών βακτηρίων	54

5.3.4 Ανίχνευση Μπιφιδοβακτηρίων _____	54
5.3.5 Τεχνική Ενσωμάτωσης _____	55
5.3.6 Έλεγχος ζυμών/μυκήτων σε Petrifilm _____	55
5.4 Εκχύλισμα φυτικής προέλευσης _____	56
5.4.1 Υλικά _____	56
5.5 Πειραματική διαδικασία προσομοίωσης γαστρεντερικού συστήματος	57
5.5.1 Παρασκευή συνθετικού γαστρικού και εντερικού υγρού _____	57
5.5.2 Δοκιμή με εκχύλισμα και ανθρώπινο μικροβίωμα _____	58
6.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ _____	62
6.1 Ολικό φαινολικό περιεχόμενο _____	62
6.3 Μετρήσεις ολικού φαινολικού περιεχομένου _____	63
6.4 Μετρήσεις μικροοργανισμών _____	64
7.ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ _____	71
Βιβλιογραφία _____	73
Ιστοσελίδες _____	81

Κατάλογος πινάκων

Πίνακας 1: Μέθοδοι ανάλυσης μικροβιώματος εντέρου – πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα που παρουσιάζουν	19
Πίνακας 2: Μελέτες που αφορούν την επίδραση της μικροχλωρίδας του εντέρου στην ανθρώπινη υγεία	22
Πίνακας 3: Ταξινόμηση γλυκοσιδών με τη βοήθεια διαφορετικών παραμέτρων (αριθμός σακχάρων, τύπος γλυκοζιτικού δεσμού, χημική ομάδα αγλυκόνης)	27
Πίνακας 4: Θρεπτική σύσταση διαφόρων μερών του ιβίσκου της ποικιλίας H. Sabdariffa.....	36
Πίνακας 5: Παραδείγματα ερευνών που δείχνουν τη συσχέτιση του ιβίσκου του γαρύφαλλου και του τσαγιού με τη μικροχλωρίδα του εντέρου	48
Πίνακας 6: Προετοιμασία δειγμάτων προς επώαση (Στάδιο Γ)	60
Πίνακας 7: Για το δείγμα M ₂ και αραίωση 10 ⁻³ (Στάδιο Δ).....	61
Πίνακας 8: Αποτελέσματα μικροβιακών αναλύσεων για τα δείγματα κοπράνων (cfu/g)	65

Κατάλογος διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1: Απεικόνιση μεγαλύτερων παραγωγών χωρών γαρύφαλλου κατά το έτος 2022	42
Διάγραμμα 2: Πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος.....	62
Διάγραμμα 3: Ολικό φαινολικών περιεχόμενο δειγμάτων εκφρασμένο σε mg GA/L (α΄δοκιμή: 19/5/2022) κατά τη χρονική διάρκεια 5 φάσεων: αρχική φάση (t=0), γαστρική φάση (GF=1,5h), εντερική φάση (EF=2h), πρώιμη εντερική ζύμωση (early fermentation=4h) και όψιμης εντερικής ζύμωσης (late fermentation=18h).	63
Διάγραμμα 4: Ολικό φαινολικών περιεχόμενο δειγμάτων εκφρασμένο σε mg GA/L (β΄δοκιμή:19/5/2022) κατά τη χρονική διάρκεια 5 φάσεων: αρχική φάση (t=0), γαστρική φάση (GF=1,5h), εντερική φάση (EF=2h), πρώιμη εντερική ζύμωση (early fermentation=4h) και όψιμης εντερικής ζύμωσης (late fermentation=18h).	64
Διάγραμμα 5: Αποτελέσματα OMX σε αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες, βακτηρίων γαλακτικού οξέως, bifidobacteria και ζυμών/μυκήτων του δείγματος M2 (γαστρικό υγρό και φυτικό εκχύλισμα με προβιοτικού μικροοργανισμούς) στο τέλος της εντερικής	

φάσης (4,5h) στο τέλος της πρώιμης εντερικής ζύμωσης (9h) και στο τέλος της όψιμης εντερικής ζύμωσης (24h). Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε LogCFU/mL 66

Διάγραμμα 6: Αποτελέσματα ανάπτυξης οξυγαλακτικών βακτηρίων σε υπόστρωμα MRS σε αναερόβιες συνθήκες των δειγμάτων M3 (με κόπρανα από άτομο με νόσο Crohn) και M4 (με κόπρανα από υγιή δότη), στο τέλος της πρώιμης εντερικής ζύμωσης (9h) και στο τέλος της όψιμης εντερικής ζύμωσης (24h). Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε LogCFU/mL 67

Διάγραμμα 7: Αποτελέσματα ανάπτυξης O.M.X. σε BHI agar σε αερόβιες συνθήκες των δειγμάτων M3 (με κόπρανα από άτομο με νόσο Crohn) και M4 (με κόπρανα από υγιή δότη), στο τέλος της πρώιμης εντερικής ζύμωσης (9h) και στο τέλος της όψιμης εντερικής ζύμωσης (24h). Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε LogCFU/ml..... 68

Διάγραμμα 8: Αποτελέσματα ανάπτυξης O.M.X. σε BHI agar σε αναερόβιες συνθήκες των δειγμάτων M3 (με κόπρανα από άτομο με νόσο Crohn) και M4 (με κόπρανα από υγιή δότη), στο τέλος της πρώιμης εντερικής ζύμωσης (9h) και στο τέλος της όψιμης εντερικής ζύμωσης (24h). Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε LogCFU/mL. 68

Διάγραμμα 9: Αποτελέσματα ανάπτυξης Bifidobacterium σε υπόστρωμα TOS σε αναερόβιες συνθήκες των δειγμάτων M3 (με κόπρανα από άτομο με νόσο Crohn) και M4 (με κόπρανα από υγιή δότη), στο τέλος της πρώιμης εντερικής ζύμωσης (9h) και στο τέλος της όψιμης εντερικής ζύμωσης (24h). Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε LogCFU/mL..... 69

Διάγραμμα 10: Αποτελέσματα ανάπτυξης μυκήτων και ζυμών σε petrifilm σε αερόβιες συνθήκες των δειγμάτων M3 (με κόπρανα από άτομο με νόσο Crohn) και M4 (με κόπρανα από υγιή δότη), στο τέλος της πρώιμης εντερικής ζύμωσης (9h) και στο τέλος της όψιμης εντερικής ζύμωσης (24h). Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε LogCFU/ml. 70

Κατάλογος εικόνων

Εικόνα 1: Δομή γλυκοσίδων	27
Εικόνα 2: Κατηγορίες πολυφαινολών. Φλαβονοειδών και μη φλαβονοειδών ενώσεων	31
Εικόνα 3: Ταξινόμηση τερπενοειδών και παραδείγματα ανά κατηγορία	33
Εικόνα 4: Παραδείγματα ομάδων αλκαλοειδών Α) Αλκαλοειδή βενζυλισοκινολίνης στον ιερό λωτό. (Β) στεροειδή αλκαλοειδή και γλυκοσίδες τους σε ντομάτα, πατάτα και μελιτζάνα. (C) Αλκαλοειδή τερπενικής ινδόλης στο <i>C. roseus</i>	34
Εικόνα 5: Άνθος του <i>H. Syriacus</i>	35
Εικόνα 6: <i>Syzygium aromaticum</i> κατά την περίοδο άνθησης (πάνω) και αποξηραμένα μπουμπούκια (κάτω)	43
Εικόνα 7: Βασικά συστατικά του ελαίου του γαρύφαλλου. (Α) κύρια συστατικά αιθέριου ελαίου μπουμπουκιών (Β) λιπαρά οξέα αιθέριου ελαίου	44
Εικόνα 8: Ενώσεις εκχυλισμάτων <i>S. scardica</i>	46
Εικόνα 9: Πολυφαινολικές ενώσεις του <i>S. scardica</i> και του παραγόμενου αιθέριου ελαίου	47
Εικόνα 10: Δείγματα κατά τον προσδιορισμό Folin-Ciocalteu	53
Εικόνα 11: Ανάπτυξη <i>Bifidobacterium</i> σε υπόστρωμα TOS δείγματος M3 (με κόπρανα από άτομο με νόσο Crohn)	55
Εικόνα 12: Ανάπτυξη ζυμών και μυκήτων του δείγματος M2E (μόνο γαστρικό υγρό και pink powder) στο τέλος της όψιμης εντερικής ζύμωσης (24h) σε petrifilm	56
Εικόνα 13: Εκχύλισμα “pink powder” ενισχυμένο με προβιοτικές καλλιέργειες	56
Εικόνα 14: Κωνικές φιάλες που περιέχουν τα δείγματα M1, M2, M3 και M4	58
Εικόνα 15: Σχηματική αναπαράσταση διαδοχικών αραιώσεων ως 10^{-6} αραιώση ...	60

Σκοπός

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να αξιολογήσει την αλληλεπίδραση φυτικού εκχυλίσματος τριών αρωματικών βοτάνων (ιβίσκος, γαρίφαλο, τσάι του βουνού) εμπλουτισμένο με προβιοτικές καλλιέργειες με το ανθρώπινο μικροβίωμα της γαστρεντερικής οδού. Πρόκειται για ένα θέμα, που ιδιαίτερα τις τελευταίες δεκαετίες απασχολεί την επιστημονική κοινότητα, καθώς διάφορες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί με σκοπό να προσδιορισθεί η επίδραση που το εντερικό μικροβίωμα ασκεί στην ανθρώπινη υγεία, όπως στη σοβαρότητα και την εξέλιξη της νόσου COVID-19 (Yeoh et al., 2021), αλλά και η επίδραση που η διατροφή έχει στη σύνθεση της εντερικής μικροχλωρίδας, όπως η κατανάλωση προβιοτικών (Wieers et al., 2020).

Δομή

Η παρούσα εργασία χωρίζεται σε 7 κεφάλαια. Τα πρώτα τρία κεφάλαια ασχολούνται με το θεωρητικό υπόβαθρο της παρούσας μελέτης και στα επόμενα τέσσερα κεφάλαια παρουσιάζεται η πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε, καθώς και τα αποτελέσματα των αναλύσεων που πραγματοποιήθηκαν.

Στο πρώτο κεφάλαιο, γίνεται μία αναφορά στο ανθρώπινο μικροβίωμα και την επίδραση που αυτό μπορεί να ασκήσει στην υγεία του ανθρώπου.

Στο δεύτερο κεφάλαιο γίνεται μία προσπάθεια να προσδιορισθεί ο όρος βιοδραστικές ενώσεις, καθώς και η χρησιμότητά τους για τα φυτά. Αναφέρονται συνοπτικά ορισμένες από τις κυριότερες κατηγορίες βιοδραστικών ενώσεων.

Στο τρίτο κεφάλαιο, δίνονται ορισμένες πληροφορίες για τον ιβίσκο, το γαρίφαλο και το τσάι του βουνού. Αναφέρονται ορισμένα στοιχεία που αφορούν την προέλευση και την καλλιέργεια τους. Επίσης, δίνονται ορισμένα στοιχεία για τη χημική σύστασή τους και τα βιοδραστικά συστατικά που περιέχουν, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία. Τέλος, ορίζονται τα προβιοτικά και τονίζεται ο ρόλος τους στην ανθρώπινη υγεία.

Στο τέταρτο κεφάλαιο, γίνεται μία αναφορά στον σκοπό της παρούσας πειραματικής μελέτης.

Στο πέμπτο κεφάλαιο, αναφέρονται οι χημικές και μικροβιολογικές μέθοδοι ανάλυσης που χρησιμοποιήθηκαν.

Στο έκτο κεφάλαιο, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της έρευνας.

Στο έβδομο κεφάλαιο παρουσιάζονται τα συμπεράσματα.

Κεφάλαιο 1: Ανθρώπινο μικροβίωμα

1.1 Εισαγωγικά στοιχεία για το ανθρώπινο μικροβίωμα

Το ανθρώπινο μικροβίωμα αποτελείται από το σύνολο των οργανισμών, οι οποίοι εντοπίζονται εσωτερικά και εξωτερικά του ανθρώπινου σώματος, κυρίως βακτήρια, αρχαία, ιούς, πρωτόζωα και μύκητες. Οι μικροοργανισμοί αυτοί κατοικούν και αλληλεπιδρούν με τον ανθρώπινο οργανισμό. Μπορούν να ενισχύσουν ή να εξασθενήσουν τις μεταβολικές και ανοσοποιητικές λειτουργίες, άρα και να συμβάλουν στη διαμόρφωση της υγείας του ατόμου ή στην εξέλιξη μίας ασθένειας. Εντοπίζονται στο δέρμα, τη βλεννογόνο, τη γαστρεντερική οδό, την αναπνευστική οδό, την ουρογεννητική οδό και τον μαστικό αδένα. Συνήθως, οι περισσότεροι αυστηρά αερόβιοι μικροοργανισμοί εντοπίζονται στο δέρμα, στη ρινική κοιλότητα και, γενικότερα, στην αναπνευστική οδό, ενώ οι προαιρετικά αναερόβιοι μικροοργανισμοί κυριαρχούν στην γαστρεντερική οδό (Ogunrinola et al., 2020).

Αποτελούν ένα οικοσύστημα το οποίο ξεκινά να διαμορφώνεται από τη στιγμή που το άτομο θα γεννηθεί. Το μικροβίωμα εξαρτάται από παράγοντες όπως:

- Η ηλικία
- Η διατροφή
- Ο τρόπος ζωής
- Πιθανές ορμονικές μεταβολές
- Κληρονομικότητα
- Υποκείμενα νοσήματα

Ο μεγαλύτερος πληθυσμός των μικροοργανισμών εντοπίζεται στην εντερική οδό. Θεωρείται ότι συνδέονται άμεσα με την ανθρώπινη υγεία. Μία πιθανή δυσμενή αλλαγή στη σύνθεση της μικροχλωρίδας, η οποία είναι γνωστή με τον όρο δυσβίωση, μπορεί να επηρεάσει το ανοσοποιητικό περιβάλλον του εντέρου, αυξάνοντας τον κίνδυνο για την εμφάνιση προβλημάτων υγείας (Ogunrinola et al., 2020).

1.2 Μικροχλωρίδα γαστρεντερικού σωλήνα

Η επιφάνεια του ανθρώπινου γαστρεντερικού σωλήνα έχει υπολογιστεί ότι κυμαίνεται από 250 έως 400 m². Η τροφή διέρχεται μέσα από τον σωλήνα αυτό και μαζί της, ένα τεράστιος αριθμός μικροοργανισμών, βλαβερών ή/και ωφέλιμων, εισέρχονται από το εξωτερικό περιβάλλον στον ανθρώπινο οργανισμό. Λαμβάνοντας υπόψη ότι κατά μέσο όρο ένας άνθρωπος καταναλώνει περίπου 60 τόνους τροφής κατά τη διάρκεια της ζωής του, γίνεται αντιληπτό ότι οι μικροοργανισμοί αυτοί μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά τον ανθρώπινο οργανισμό και την κατάσταση της υγείας του ατόμου. Το σύνολο των μικροοργανισμών που αποικίζουν τον γαστρεντερικό σωλήνα ονομάζονται μικροβίωμα ή μικροχλωρίδα του εντέρου. Πρόκειται για ένα πολύπλοκο πληθυσμό μικροοργανισμών, ο οποίος δεν διατηρείται σταθερός στο χρόνο, ούτε από άποψη σύνθεσης ούτε από άποψη αριθμού. Ασκεί σημαντική επίδραση στον ξενιστή κατά τη διάρκεια της ομοιόστασης και της νόσησης (Thursby & Juge, 2017).

Ο πληθυσμός των μικροοργανισμών που κατοικούν στη γαστρεντερική οδό θεωρείται ότι ξεπερνά τα 10¹⁴. Θεωρείται ότι ο αριθμός των βακτηριακών κυττάρων είναι σχεδόν 10 φορές μεγαλύτερος από τον αριθμό των ανθρώπινων κυττάρων. Ο ξενιστής- άνθρωπος μαζί με τους μικροοργανισμούς που φέρει καλούνται συχνά με τον όρο «υπεροργανισμός» (Thursby & Juge, 2017).

Οι Hugon et al. (2015) συγκέντρωσαν τα αποτελέσματα μελετών και εντόπισαν 2172 είδη προκαρυωτικών οργανισμών που απομονώθηκαν από τον άνθρωπο, τα οποία ταξινομήθηκαν σε 12 διαφορετικά γένη βακτηρίων και ένα γένος αρχαίων, τα *Euryarchaeota*. Τέσσερα είναι τα κυρίαρχα γένη, όπου αποτελούν το 93,5% των βακτηρίων που έχουν ανιχνευθεί στον ανθρώπινο οργανισμό: πρωτεοβακτήρια (*Proteobacteria*), *Firmicutes*, ακτινοβακτήρια (*Actinobacteria*) και βακτηριοειδή (*Bacteroidetes*). Μπορούν, επίσης να εντοπιστούν πιο σπάνια (5,9% του συνόλου των βακτηρίων) *Spirochaetes*, *Tenericutes*, *Fusobacteria*, *Chlamydiae* και *Synergistetes*. Τρία από τα 12 ταυτοποιημένα γένη περιείχαν μόνο ένα είδος που απομονώθηκε από τον άνθρωπο: *Akkermansia muciniphila* του *Verrucomicrobia*, *Victivallis vadensis* του *Lentisphaerae* και το *Deinococcus aquaticus* του γένους *Deinococcus-Thermus*. Στον άνθρωπο, 386 από τα αναγνωρισμένα είδη είναι αυστηρά αναερόβια και ως εκ τούτου γενικά θα βρεθούν σε περιοχές του βλεννογόνου όπως η στοματική κοιλότητα και η γαστρεντερική οδός (Hugon et al., 2015).

1.3 Προσδιορισμός μικροχλωρίδας γαστρεντερικού σωλήνα

Μέχρι πριν μερικά χρόνια, οι περισσότερες γνώσεις σχετικά με την εντερική μικροχλωρίδα του ενήλικου ανθρώπου προήλθαν από μεθόδους που βασίζονται σε καλλιέργειες, οι οποίες όμως ενώ δίνουν μία εικόνα για την πολυπλοκότητα του εντερικού μικροβιώματος δεν επαρκούν. Πρόσφατα, ωστόσο, η έρευνα του εύρους του εντερικού μικροβιώματος έχει ενισχυθεί με την εμφάνιση προσεγγίσεων, ανεξάρτητων από την καλλιέργεια, όπως οι μέθοδοι προσδιορισμού αλληλουχίας υψηλής απόδοσης και χαμηλού κόστους. Για παράδειγμα, σε ορισμένες από μεθόδους αυτές, ο στόχος δεν είναι η ανίχνευση και ταυτοποίηση του βακτηριακού κυττάρου αλλά ο εντοπισμός του βακτηριακού γονιδίου ριβοσωμικού RNA (rRNA) 16S, καθώς αυτό το γονίδιο υπάρχει σε όλα τα βακτήρια και τα αρχαία (προκαρυωτικοί μικροοργανισμοί, οι οποίοι παλαιότερα είχαν καταταχθεί στην κατηγορία των βακτηρίων) και περιέχει εννέα εξαιρετικά μεταβλητές περιοχές (V1–V9), που επιτρέπει στα είδη να διακρίνονται εύκολα. (Thursby & Juge, 2017). Παραδείγματα αυτών των μεθόδων είναι η ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (quantitative real-time polymerase chain reaction - q PCR), η ηλεκτροφόρηση μετουσιωτικής βαθμίδωσης γέλης (denaturing gradient gel electrophoresis - DGGE), ο πολυμορφισμός μήκους τελικού περιοριστικού θραύσματος (terminal restriction fragment length polymorphism- T-RFLP), φθορίζων in situ υβριδισμός (fluorescence in situ hybridization - FISH), η αλληλουχία γονιδίου 16S rRNA -με βάση την κλωνοποίηση, απευθείας προσδιορισμό αλληλουχίας αμπλικονίων 16S rRNA (Rezasoltani et al., 2020).

Στον πίνακα, παρουσιάζονται ορισμένες τεχνικές ανάλυσης της μικροχλωρίδας του ανθρώπινου σωλήνα, καθώς και ορισμένα από τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα τους.

Πίνακας 1: Μέθοδοι ανάλυσης μικροβιώματος εντέρου – πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα που παρουσιάζουν

Μέθοδος ανάλυσης	Αρχή μεθόδου	Πλεονέκτημα	Μειονέκτημα
Καλλιέργεια	Επιλεκτικό υπόστρωμα καλλιέργειας ώστε να αναπτυχθούν επιλεγμένα είδη βακτηρίων	Χαμηλό κόστος Ημι-ποσοτική μέθοδος	Δεν μπορεί να καλλιεργηθεί το σύνολο του μικροβιώματος.

			Χρονοβόρα και κουραστική εργασία.
q-PCR	Ποσοτικοποίηση του 16 rRNA. Στο μείγμα αντίδρασης περιέχεται μία ουσία που όταν συνδεθεί με δίκλωνο μόριο DNA, φθορίζει.	Ταχεία διαδικασία Φυλογενετική αναγνώριση Ποσοτικοποίηση	Μεροληψία PCR Η μέθοδος PCR δεν μπορεί να αναγνωρίσει άγνωστα είδη
DGGE	Διαχωρισμός με τη βοήθεια γέλης των αμπλικονίων 16 rRNA	Δημιουργία ημι-ποσοτικών ζωνών που θα μπορούσαν να αναλυθούν περαιτέρω	Μεροληψία PCR Δεν πραγματοποιείται φυλογενετικός χαρακτηρισμός
T-RFLP	Ποσοτικοποίηση των επισημασμένων με φθορισμό εκκινητών. Ακολουθεί εφαρμογή περιοριστικών ενζύμων για την πέψη του αμπλικόνιου 16S rRNA. Τα χωνευμένα θραύσματα διαχωρίζονται περαιτέρω με ηλεκτροφόρηση γέλης	Χαμηλό κόστος Ταχεία διαδικασία Ημι-ποσοτική μέθοδος	Μεροληψία PCR Δεν πραγματοποιείται φυλογενετικός χαρακτηρισμός. Παρουσιάζει χαμηλή ανάλυση.
FISH	Υβριδισμός συμπληρωματικών αλληλουχιών 16S rRNA με τη βοήθεια επισημασμένων με φθορισμό ανιχνευτών ολιγονουκλεοτιδίων. Μέτρηση του φθορισμού χρησιμοποιώντας κυτταρομετρία ροής	Φυλογενετικός χαρακτηρισμός Ημιποσοτική μέθοδος	Δεν μπορούν να χαρακτηριστούν άγνωστα είδη
Αλληλουχία γονιδίου 16S rRNA με βάση την κλωνοποίηση	Αλληλούχιση κατά Sanger, που επιτρέπει να ανιχνεύονται αλλαγές στην αλληλουχία του DNA, τριχοειδής ηλεκτροφόρηση, κλωνοποίηση πλήρους μήκους θραύματος 16S rRNA.	Φυλογενετικός χαρακτηρισμός. Ποσοτική μέθοδος. Ακριβής	Μεροληψία PCR Απαιτητική διαδικασία. Μεροληψία κλωνοποίησης
Απευθείας προσδιορισμός αλληλουχίας αμπλικονίων 16S rRNA	Μεγάλη παράλληλη αλληλουχία μερικών αμπλικονίων 16S rRNA	Ταχεία μέθοδος. Φυλογενετικός χαρακτηρισμός. Ποσοτική μέθοδος. Ικανότητα εντοπισμού	Μεροληψία PCR. Υψηλό κόστος. Απαιτητική διαδικασία.

		άγνωστων βακτηρίων	
--	--	-----------------------	--

Πηγή: Rezasoltani et al., 2020

Πρόσφατα, η εστίαση της αλληλουχίας του 16S rRNA έχει μετατοπιστεί στην ανάλυση μικρότερων υποπεριοχών του γονιδίου σε μεγαλύτερο βάθος. Ωστόσο, η χρήση μικρότερων μηκών ανάγνωσης μπορεί να προκαλέσει σφάλματα. Πιο αξιόπιστες εκτιμήσεις της σύνθεσης και της ποικιλομορφίας των μικροβίων μπορούν να παρέχονται από τη μεταγονιδιωματική ολόκληρου του γονιδιώματος λόγω της υψηλότερης ανάλυσης και ευαισθησίας αυτών των τεχνικών (Poretsky et al., 2014).

1.3 Επίδραση διατροφής στο μικροβίωμα του εντέρου

Η διατροφή θεωρείται ως ένας από τους κύριους παράγοντες διαμόρφωσης της μικροχλωρίδας του εντέρου. Μετά τον τοκετό, το μικροβίωμα του εντέρου του βρέφους επηρεάζεται από την ποσότητα και το είδος των διαθέσιμων θρεπτικών συστατικών που λαμβάνονται μέσω της διατροφής. Το μητρικό γάλα είναι πλούσιο σε ολιγοσακχαρίτες, οι οποίοι απαιτούν για την πέψη τους την παρουσία των κατάλληλων γονιδίων, ενώ όταν το βρέφος ξεκινήσει την κατανάλωση στερεής τροφής απαιτούνται γονίδια που επιτρέπουν στον οργανισμό να μεταβολίσει πολυσακχαρίτες και βιταμίνες. Ο θηλασμός ευνοεί την ανάπτυξη των *Actinobacteria*, ενώ η διατροφή του γλεύκους με παρασκευάσματα φαίνεται ότι ευνοεί την αύξηση των *Clostridia*, *Streptococci*, *Bacteroides* και *Enterbacteria*. Επίσης, έχει παρατηρηθεί ότι τα άτομα που ακολουθούν χορτοφαγική διατροφή σχετίζεται με την ανάπτυξη των *Firmicutes* και *Bacteroidetes*, ενώ μία διατροφή πλούσια σε πρωτεΐνες ευνοεί την αύξηση των *Bacteroides*, *Bilophila* και *Alistipes* (Gomaa, 2020).

Η μικροχλωρίδα του εντέρου που μπορεί να επηρεαστεί από την κατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων, φυκιών, ρυζιού, δημητριακών, σακχαρόζης, φυτικών ινών, αλλά και από την περιεκτικότητα ενός γέυματος σε πρωτεΐνες και λίπος, καθώς και τη συνολική ποσότητα τροφής που προσλαμβάνεται (Hughes, 2020).

1.4 Επίδραση μικροβιώματος στην ανθρώπινη υγεία

Οι μικροοργανισμοί που έχουν εξελιχθεί παράλληλα με τον άνθρωπο και συμμετέχουν στη ρύθμιση των καθημερινών λειτουργιών του σώματος. Επιστημονικές μελέτες έχουν “ενοχοποιήσει” τους μικροοργανισμούς αυτούς για διάφορες ασθένειες όπως:

- το άσθμα
- τον αυτισμό
- τον καρκίνο
- το διαβήτη
- τις καρδιοπάθειες
- την παχυσαρκία
- τη σκλήρυνση κατά πλάκας
- την κοιλιοκάκη
- τα εκζέματα
- τις κολίτιδες
- τις φλεγμονώδεις νόσους του εντέρου (τη νόσο του Crohn και την ελκώδη κολίτιδα)
- την υποθρεψία

Στον πίνακα 1, παρουσιάζονται ορισμένες από τις μελέτες αυτές, καθώς και τα συμπεράσματα στα οποία έχουν καταλήξει.

Πίνακας 2: Μελέτες που αφορούν την επίδραση της μικροχλωρίδας του εντέρου στην ανθρώπινη υγεία

Ασθένεια	Σχολιασμός- συμπεράσματα	Αναφορά
Σακχαρώδης διαβήτης τύπου II	Δείγμα Β. Κίνα υγιών και διαβητικών ατόμων. Μείωση ποικιλότητας μικροχλωρίδας εντέρου, των διαβητικών ατόμων. Αλλαγή σύνθεσης μικροχλωρίδας, όπως μείωση <i>Bifidobacterium</i> και αύξηση βακτηρίων που παράγουν βουτυρικό.	Li et al., 2020
Ασθένεια Crohn	Δείγμα 19 ασθενών (φλεγμονώδη βλεννογόνο) και 7 υγιών ατόμων. Ανάλυση μυκητιακής μικροχλωρίδας. Διαφορετική σύνθεση μεταξύ ασθενών και υγιών. Αυξημένη συγκέντρωση <i>Candida albicans</i> , <i>Aspergillus clavatus</i> και <i>C. neoformans</i> .	Li et al., 2014

Νόσος Parkinson και διαταραχές ύπνου	Σύγκριση μικροχλωρίδας εντέρου ασθενών με νόσο Parkinson (76), διαταραχών ύπνου (21) και υγιών ατόμων (78). Διαφορά στη σύνθεση και την ποσότητα ορισμένων κατηγοριών μικροοργανισμών του εντέρου (ασθενείς: άφθονα <i>Akkermansia</i> , <i>Anaerotruncus</i> και <i>Bacteroides spp</i>)	Heintz-Buschart et al., 2017
Covid-19	Διερεύνηση αλλαγών στη μικροχλωρίδα ασθενών νοσηλευομένων (15) στο Χονγκ Κόνγκ συγκριτικά με υγιή άτομα. Ταξινόμηση των συμπτωμάτων της αναπνευστικής λοίμωξης σε ήπια, μέτρια, σοβαρή και κρίσιμη. Παρατηρήθηκε δυσβίωση εντέρου ακόμη και μετά την υποχώρηση της ασθένειας. Η αυξημένη συγκέντρωση ορισμένων βακτηρίων (π.χ. <i>Coprobacillus</i> , <i>Clostridium ramosum</i> και <i>Clostridium hathewayi</i>) συσχετίστηκε θετικά με τη σοβαρότητα του COVID-19, ενώ η αφθονία ορισμένων άλλων (<i>Faecalibacterium prausnitzii</i> - αντιφλεγμονώδες βακτήριο) είχε αρνητική συσχέτιση.	Zuo et al., 2020
Καρκίνος παχέος εντέρου	Συστηματική ανασκόπηση και μετανάλυση. Σε 19 μελέτες παρατηρήθηκε ότι η μικροχλωρίδα των ασθενών παρουσίαζε διαφορά στην ποσότητα των βακτηρίων συγκριτικά με υγιή άτομα. Πιο κοινό βακτήριο : <i>Fusobacterium</i>	Amitay et al., 2018

Το γαστρεντερικό είναι το μεγαλύτερο ανοσολογικό όργανο στο σώμα. Η μικροβιακή χλωρίδα ρυθμίζει τη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος και τις ανοσολογικές αποκρίσεις έναντι παθογόνων μικροοργανισμών που μπορούν να προκαλέσουν λοίμωξη (Yeoh et al., 2021).

Αλλοιώσεις στη σύσταση της μικροβιακής χλωρίδας, γνωστές με το όρο δυσβίωση (dysbiosis) συνδέονται με δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού και αυξημένη προδιάθεση για την εμφάνιση φλεγμονωδών ασθενειών και λοιμώξεων (Yeoh et al., 2021).

Ορισμένα από τα βακτήρια που βρίσκονται σε ένα υγιές γαστρεντερικό σωλήνα προάγουν την δράση των T-λεμφοκυττάρων, τα οποία εκκρίνουν αντιφλεγμονώδεις παράγοντες και καταστέλλουν την έκκριση προ-φλεγμονωδών ουσιών. Οι προ-φλεγμονώδεις ουσίες μπορούν να οδηγήσουν σε φλεγμονές σε νοσήματα όπως η νόσος του Alzheimer, του Crohn, η ελκώδης κολίτιδα και το ευερέθιστο έντερο.

Χωρίς την επαφή με τους μικροοργανισμούς που αποικίζουν το ανθρώπινο σώμα από τη γέννησή, η προσαρμοστική ανοσία δεν θα υπήρχε. Προσαρμοστική ανοσία είναι το μέρος του ανοσοποιητικού μας συστήματος, που μαθαίνει πώς να ανταποκριθεί σε μικρόβια, επιτρέποντας μια πιο γρήγορη άμυνα έναντι των παθογόνων οργανισμών (De Rosa et al., 2017).

Μελέτες έχουν δείξει αυξημένη νοσηρότητα σε πειραματόζωα που ήταν στείρα μικροοργανισμών. Η μικροχλωρίδα παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στα αυτοάνοσα νοσήματα και τις αλλεργίες, που είναι πιο πιθανόν να αναπτυχθούν όταν διαταράσσεται η έκθεση σε μικροοργανισμούς σε νεαρή ηλικία (Hills et al., 2019).

Επίσης, σύμφωνα με τα υπάρχοντα δεδομένα, η αλλοίωση της σύστασης του μικροβιώματος, είναι σημαντικός παράγοντας στην ανάπτυξη αυτοάνοσων ασθενειών όπως ο συστηματικός ερυθρεμάτης, ο λύκος, η σκλήρυνση κατά πλάκας, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η ψωρίαση και τα φλεγμονώδη νοσήματα του εντέρου (Li et al., 2018; Chu et al., 2021).

Επίσης, λόγω της συμμετοχής της στην πέψη, η εντερική μικροχλωρίδα μπορεί επίσης να επηρεάσει και τον εγκέφαλο, για αυτό και έχει χαρακτηριστεί ως ο “δεύτερος εγκέφαλος”. Μικρά μόρια που απελευθερώνονται από τη δραστηριότητα των βακτηρίων του εντέρου, ενεργοποιούν την απόκριση των νεύρων στο γαστρεντερικό σωλήνα.

Επίσης έχει παρατηρηθεί συσχέτιση μεταξύ της εντερικής μικροχλωρίδας και των εγκεφαλικών διαταραχών, όπως η νόσος του Alzheimer, η νόσος του Parkinson και διαταραχές του φάσματος του αυτισμού.

Κεφάλαιο 2 – Βιοδραστικές ενώσεις

2.1 Τι σημαίνει βιοδραστικές ενώσεις

Οι βιοδραστικές ενώσεις μπορούν να οριστούν ως θρεπτικά και μη θρεπτικά συστατικά που υπάρχουν στα τρόφιμα είτε φυτικά είτε ζωικά που μπορούν να παράγουν φυσιολογικές επιδράσεις πέρα από τις κλασικές διατροφικές τους ιδιότητες (Cazarin et al., 2022). Οι βιοδραστικές ενώσεις μπορούν να βρεθούν σε μικρές ποσότητες σε διάφορα είδη τροφίμων και φυτών, φρούτα, λαχανικά, ξηρούς καρπούς και έλαια. Ορισμένες από αυτές τις ενώσεις έχουν αποτελέσει αντικείμενο έρευνας και έχουν αξιολογηθεί ως προς την ευεργετική επίδραση που ασκούν στην υγεία του ατόμου (Jaiswal & Prakash, 2023).

Μπορούν να ενισχύσουν το ανοσοποιητικό σύστημα του οργανισμού, να ελαχιστοποιήσουν την προφλεγμονώδη κατάσταση, να μετριάσουν το οξειδωτικό στρες και να βοηθήσουν στην αντιμετώπιση ή την αποφυγή των μεταβολικών διαταραχών. Έχει πραγματοποιηθεί ένας σημαντικός αριθμός επιδημιολογικών μελετών που δείχνουν ότι η κατανάλωση τροφίμων που περιέχουν βιοδραστικές ενώσεις όπως βιταμίνες και φαινολικές ενώσεις, επιδρά θετικά στην υγεία του ατόμου (Santos et al., 2019). Οι ενώσεις αυτές μειώνουν τον κίνδυνο εμφάνισης χρόνιων νοσημάτων ή/και στην αντιμετώπισή τους, όπως είναι ορισμένες μορφές καρκίνου (Malaiyandi et al., 2020; Alobaedi et al., 2017), καρδιαγγειακές παθήσεις (Liu et al., 2018; Rangel-Huerta et al., 2015), Αλτσχάιμερ (Taslimi et al., 2020; Godos et al., 2023), σακχαρώδης διαβήτης (Taslimi et al., 2020; Delpino & Figueiredo, 2021).

Η βιοδιαθεσιμότητα των φυτοδραστικών ενώσεων εξαρτάται από τη χημική δομή τους αλλά και από ορισμένες βιολογικούς παράγοντες, όπως είναι για παράδειγμα η παρουσία αντιθρεπτικών παραγόντων. Οι αντιθρεπτικοί παράγοντες μπορούν να προκαλέσουν αναστολή στα ένζυμα της πέψης ή να μειώσουν τη βιοδραστικότητα ή τη σταθερότητα των συγκεκριμένων ενώσεων (Santos et al., 2019).

2.2 Παραγωγή βιοδραστικών ενώσεων στα φυτά

Οι βιοδραστικές ενώσεις παράγονται κυρίως ως δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών. Κατά την διάρκεια των βιοσυνθετικών και μεταβολικών οδών που πραγματοποιούνται στα φυτά, παράγονται ενώσεις, όπως υδατάνθρακες, αμινοξέα,

πρωτεΐνες και λιπίδια, που ως στόχο έχουν να βοηθήσουν στην ανάπτυξη και την ευρωστία του φυτού. Παράλληλα, όμως, παράγονται και ορισμένες άλλες ενώσεις, σε μικρές συνήθως ποσότητες, οι οποίες αν και δεν είναι απόλυτα απαραίτητες για τη καθημερινή λειτουργία του φυτού, έχουν ρόλο προστατευτικό. Οι ουσίες αυτές λέγονται δευτερογενείς μεταβολίτες (Bernhofs et al., 2010).

Είναι απαραίτητο να γίνει αντιληπτό ότι οι ουσίες αυτές είναι ιδιαίτερα χρήσιμες. Για παράδειγμα (Bernhofs et al., 2010):

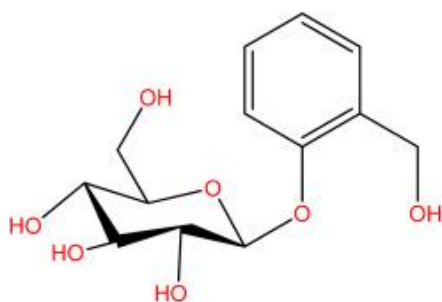
- τα φλαβονοειδή ασκούν αντιοξειδωτική δράση και προστατεύουν τα φυτά από τις ελεύθερες ρίζες που δημιουργούνται κατά τη φωτοσύνθεση.
- Μία άλλη κατηγορία ενώσεων, τα τερπενοειδή μπορούν και ελκύουν επικονιαστές ή διασκορπιστές σπόρων ή αναστέλλουν την ανάπτυξη ανταγωνιστικών φυτών.
- Τα αλκαλοειδή, τα οποία είναι ανήκουν στις φυτοαλεξίνες, έχουν αναλάβει να απομακρύνουν φυτοφάγα ζώα ή επιθέσεις εντόμων.
- Ορισμένοι άλλοι δευτερογενείς μεταβολίτες λειτουργούν ως κυτταρικά μόρια σηματοδότησης.

2.3 Βασικές κατηγορίες βιοδραστικών ενώσεων συνοπτικά

2.3.1 Γλυκοσίδες

Οι γλυκοσίδες είναι δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγονται από τα φυτά και ο ρόλος τους είναι πολλαπλός. Είναι ένας από τους παράγοντες που ρυθμίζουν την ανάπτυξη των φυτών, εμποδίζουν την ανάπτυξη άλλων φυτών (αλλεοπάθεια), συμμετέχουν στην άμυνα του φυτού έναντι φυτοφάγων ζώων και παθογόνων (Soto-Blanco, 2022).

Το μόριο των γλυκοσιδών αποτελείται από δύο τμήματα. Το ένα τμήμα λέγεται γλυκόνη και περιέχει σάκχαρο και το δεύτερο τμήμα λέγεται αγλυκόνη και συνδέεται με τον άνθρακα 1 της γλυκόνης. Το πιο κοινό σάκχαρο που αποτελεί τη γλυκόνη είναι η γλυκόζη, η οποία είναι μονοσακχαρίτης.



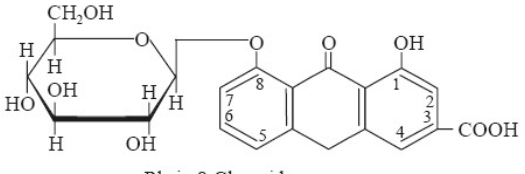
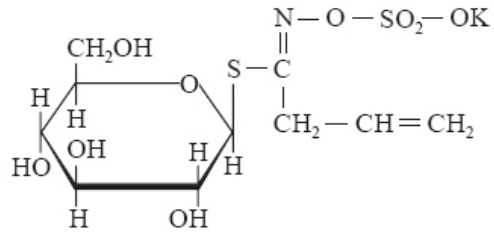
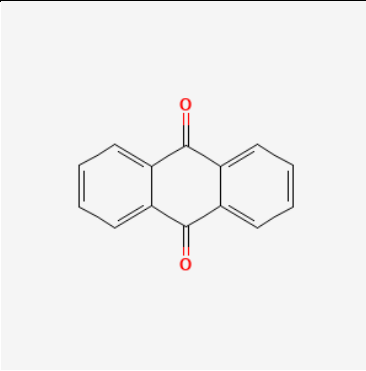
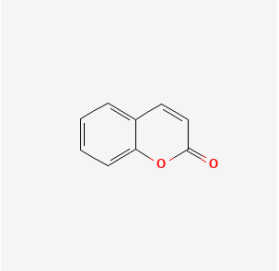
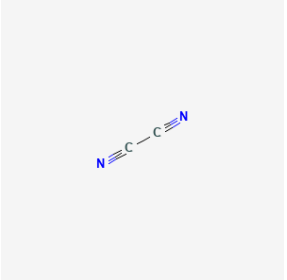
Εικόνα 1: Δομή γλυκοσίδων

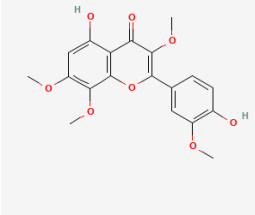
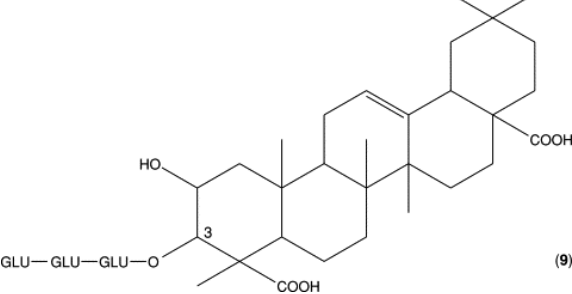
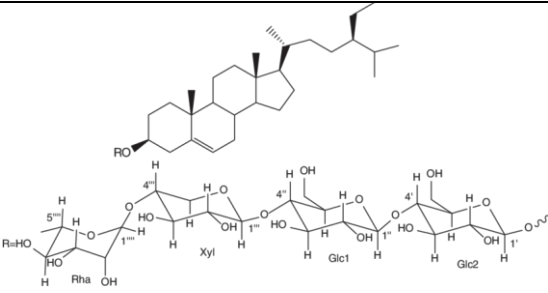
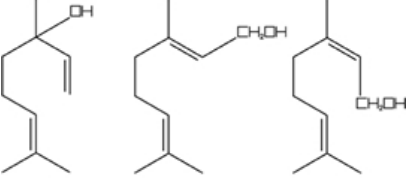
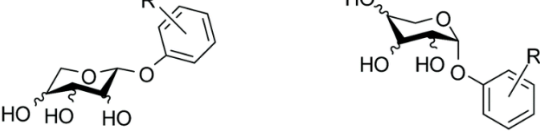
Πηγή: Nsairat et al., 2023

Οι γλυκοσίδες ταξινομούνται σε κατηγορίες με διάφορα κριτήρια, όπως είναι ο τύπος του γλυκοζιτικού δεσμού και η χημική ομάδα που αποτελεί την αγλυκόνη (πίνακας 3).

Πίνακας 3: Ταξινόμηση γλυκοσίδων με τη βοήθεια διαφορετικών παραμέτρων (αριθμός σακχάρων, τύπος γλυκοζιτικού δεσμού, χημική ομάδα αγλυκόνης)

Παράμετροι ταξινόμησης	Κατηγορίες	Παραδείγματα
Τύπος γλυκοζιτικού δεσμού (σύνδεση γλυκόνης και αγλυκόνης μέσω διαφορετικών στοιχείων)	C-γλυκοσίδες (σύνδεση μέσω άνθρακα C)	<p>Aloin (or Barbaloin)</p> <p>http://www.epharmacognosy.com/2012/03/c-glycosides.html</p>
	N-γλυκοσίδες (σύνδεση μέσω αζώτου από NH)	<p>Adenosine</p> <p>http://www.epharmacognosy.com/2012/03/1_30.html</p>

	<p>O-γλυκοσίδες (σύνδεση μέσω οξυγόνου, O)</p>	 <p>Rhein-8-Glycoside</p> <p>http://www.epharmacognosy.com/2012/03/o-glycosides.html</p>
	<p>S-γλυκοσίδες (σύνδεση μέσω θείου, S)</p>	 <p>Sinigrin</p> <p>http://www.epharmacognosy.com/2012/03/1.html</p>
<p>Αγλυκόνη (ενώνονται με σάκχαρο και δημιουργούν γλυκοσίδες)</p>	<p>Ανθρακινόνη</p>	 <p>https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Anthraquinone#section=2D-Structure</p>
	<p>Κουμαρίνη</p>	 <p>https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/323#section=2D-Structure</p>
	<p>Κυανογόνα (κυανυδρίνη)</p>	 <p>https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cyanogen#section=2D-Structure</p>

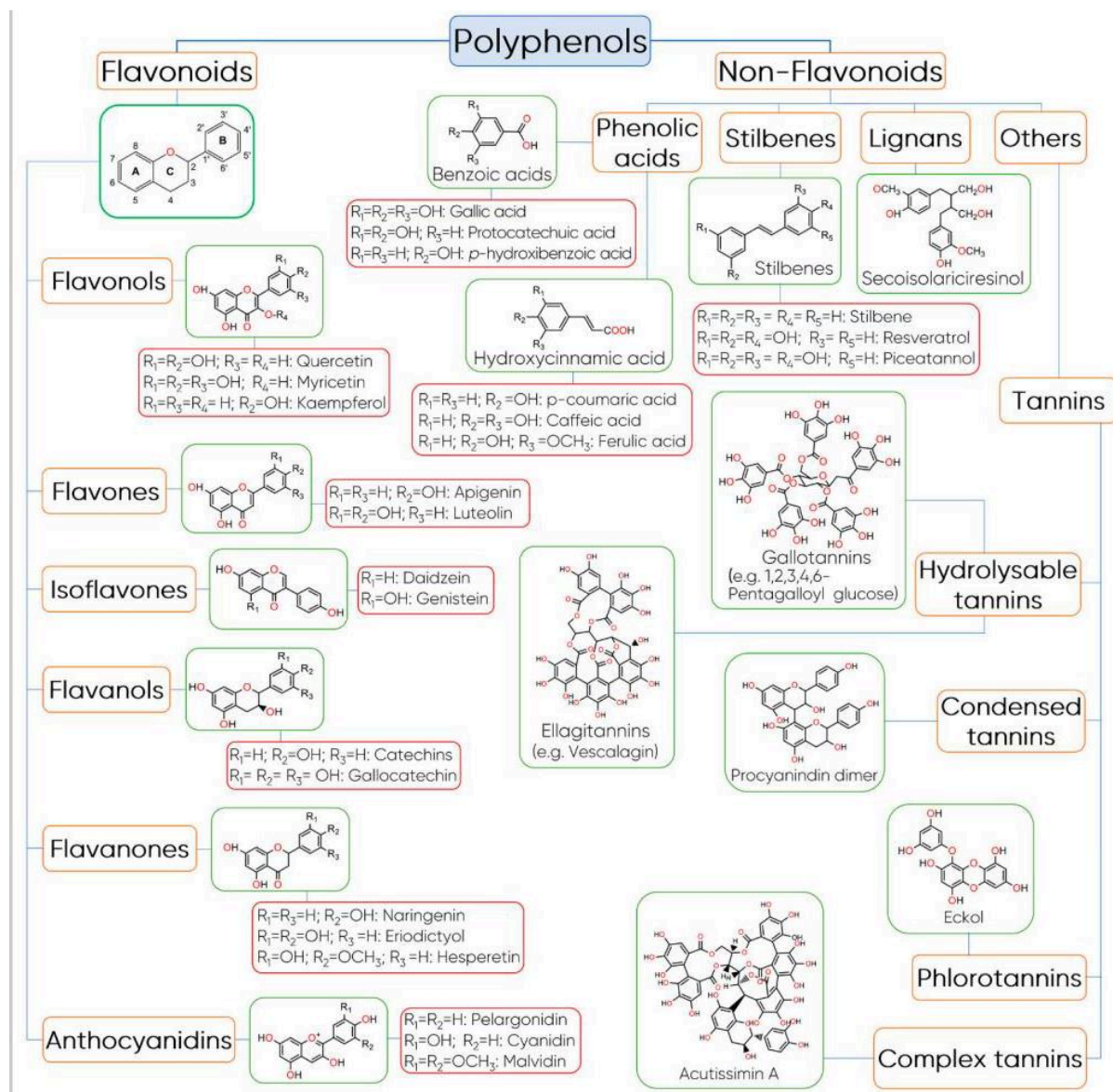
	<p>Φλαβονοειδή</p>	 <p>https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5459184#section=2D-Structure (τερνατίνη)</p>
	<p>Θειογλυκοσίδε ς</p>	<p>-SR</p>
	<p>Σαπωνίνες</p>	 <p>https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B012227055X013183</p>
	<p>Στεροειδή</p>	 <p>https://www.researchgate.net/figure/Structure-of-steroidal-glycoside-1_fig1_280240932</p>
	<p>Τερπενοειδή</p>	 <p>https://waterhouse.ucdavis.edu/whats-in-wine/terpenes</p>
	<p>Φαινόλες</p>	 <p>β-phenolic glycosides α-phenolic glycosides</p> <p>https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2022/ma/d1ma00907a</p>

Τα μόρια των γλυκοσιδασών μπορούν να διασπαστούν με τη βοήθεια ορισμένων ενζύμων, όπως οι β-γλυκοσιδάσες, που διασπούν τον γλυκοζιτικό δεσμό μεταξύ της γλυκόνης και της αγλυκόνης (Soto-Blanco, 2022).

2.3.2 Πολυφαινόλες

Οι πολυφαινόλες είναι ιδιαίτερα διαδεδομένες ομάδες βιοδραστικών ενώσεων του φυτικού βασιλείου. Έχουν αναγνωριστεί περισσότερες από 8000 φαινολικές δομές και παρουσιάζουν μεγάλη ετερογένεια. Χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη ενός αρωματικού δακτυλίου, ο οποίος φέρει τουλάχιστον ένα υδροξύλιο (-OH). Η δομή των πολυφαινολικών ενώσεων μπορεί να είναι απλή, όπως ισχύει για την ομάδα των φαινολικών οξέων ή πολύπλοκη, όπως ισχύει για τις ταννίνες, οι οποίες είναι μόρια που προκύπτουν από πολυμερισμό (Camara et al., 2021).

Η ταξινόμησή τους μπορεί να πραγματοποιηθεί με διάφορους τρόπους όπως για παράδειγμα, ανάλογα την προέλευση, τη βιολογική λειτουργία και τη δομή. Ένας συχνός και γενικά αποδεκτός διαχωρισμός είναι σε δύο κύριες ομάδες: την ομάδα των φλαβονοειδών και την ομάδα των μη φλαβονοειδών. Όπως φαίνεται, στο διάγραμμα, κάθε ομάδα διακρίνεται σε υποομάδες.



Εικόνα 2: Κατηγορίες πολυφαινολών. Φλαβονοειδών και μη φλαβονοειδών ενώσεων

Πηγή: Camara et al., 2021

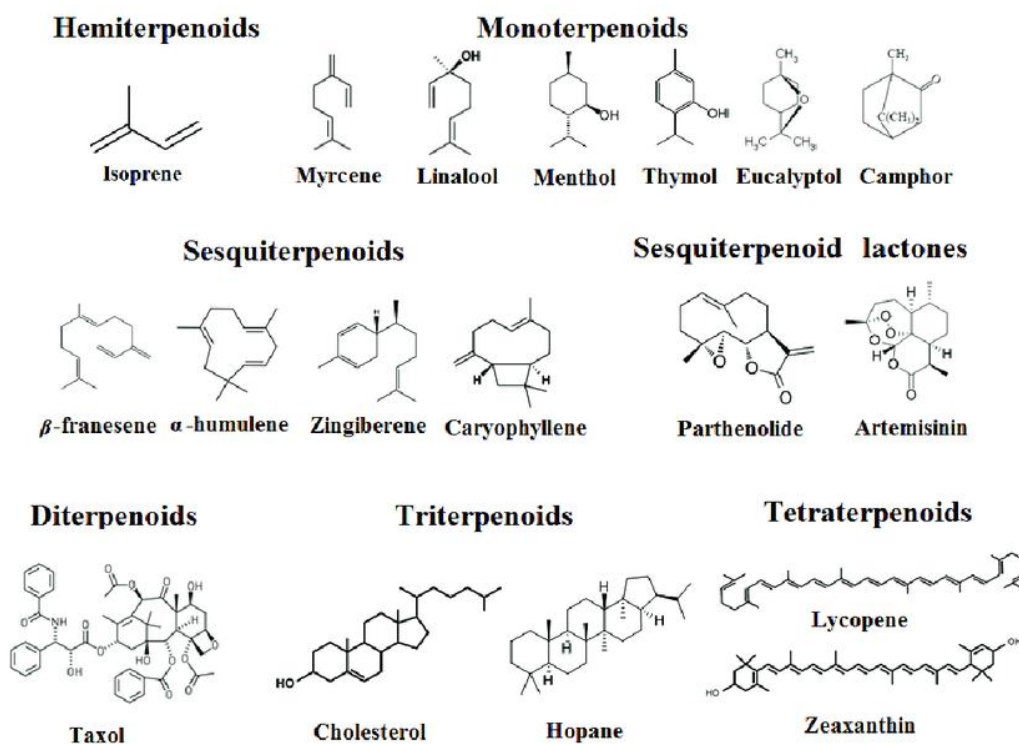
Τα φλαβονοειδή είναι ενώσεις άφθονες σε φυτά, όπως φρούτα, λαχανικά, τσάι, σοκολάτα, κρασί. Χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη του διφαινυλοπροπανίου (C₆-C₃-C₆). Το διφαινυλοπροπάνιο αποτελείται από δύο βενζολικούς δακτύλιους, οι οποίοι συνήθως καλούνται Α και Β και οι οποίοι συνδέονται μεταξύ τους με μία ομάδα 3 ατόμων άνθρακα. Τα τρία αυτά άτομα άνθρακα συνήθως σχηματίζουν ένα ετεροκυκλικό δακτύλιο με οξυγόνο, ο οποίος καλείται δακτύλιος C (Camara et al., 2021).

Ο δακτύλιος C παρουσιάζει διάφορες παραλλαγές, οι οποίες παράλληλα με τους υποκαταστάτες σχηματίζουν έξι κύριες υποομάδες: φλαβονόλες, φλαβόνες, ισοφλαβόνες, φλαβανόλες, ανθοκυανιδίνες και φλαβανόνες (Camara et al., 2021).

2.3.3 Τερπενοειδή

Τα τερπενοειδή ή ισοπρενοειδή είναι μία από τις μεγαλύτερες και πιο ποικιλόμορφες κατηγορίες δευτερογενών μεταβολιτών. Έχουν ταυτοποιηθεί περισσότερες από 64.000 ενώσεις (Abdallah & Quax, 2017). Είναι ενώσεις ευρέως διαδεδομένες, οι οποίες έχουν ταυτοποιηθεί σε όλα τα έμβια όντα, όπως φυτά, βακτήρια, ζυμομύκητες, αλλά και ζώα. Βοηθούν στη διαμόρφωση της γεύσης, του αρώματος (κανέλα, γαρύφαλου, ευκάλυπτου) και του χρώματος φύλλων, άνθων και καρπών (κίτρινο χρώμα του ηλιάνθου ή το κόκκινο της ντομάτας). Συμβάλλουν στην ανάπτυξη του φυτού και προστατεύουν το φυτό από έντομα, φυτοφάγα ζώα και μυκητισιακές προσβολές. Στους ζωικούς οργανισμούς λειτουργούν ως πρόδρομες ενώσεις για την παραγωγή στεροειδών και στερολών (Reyes et al., 2018).

Σχηματίζονται από μονάδες ισοπρενίου ($\text{H}_2\text{C}=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}_2$). Πρόκειται συνήθως για γραμμικούς υδρογονάνθρακες ή πολυκυκλικές δομές που διακρίνονται μεταξύ τους ανάλογα τη βασική σκελετική δομή που παρουσιάζουν, αλλά και τις λειτουργικές ομάδες που φέρουν, όπως υδροξύλιο, κετόνη, αλδεΐδη (Reyes et al., 2018). Ταξινομούνται ανάλογα με τον αριθμό των μονάδων ισοπρενίου και τη δομική οργάνωση των μονάδων αυτών σε κατηγορίες: ημιτερπενοειδή C₅, μονοτερπενοειδή C₁₀, σεσκιτερπενοειδή C₁₅, διτερπενοειδή C₂₀, σεστερτερπενοειδή C₂₅, πολυτερπενοειδή C₃₀, πολυτερπενοειδή C₄₀, C₄₀ και τετερπενοειδή (εικόνα 1) (Abdallah & Quax, 2017).



Εικόνα 3: Ταξινόμηση τερπενοειδών και παραδείγματα ανά κατηγορία

Πηγή: Abdallah & Quax, 2017

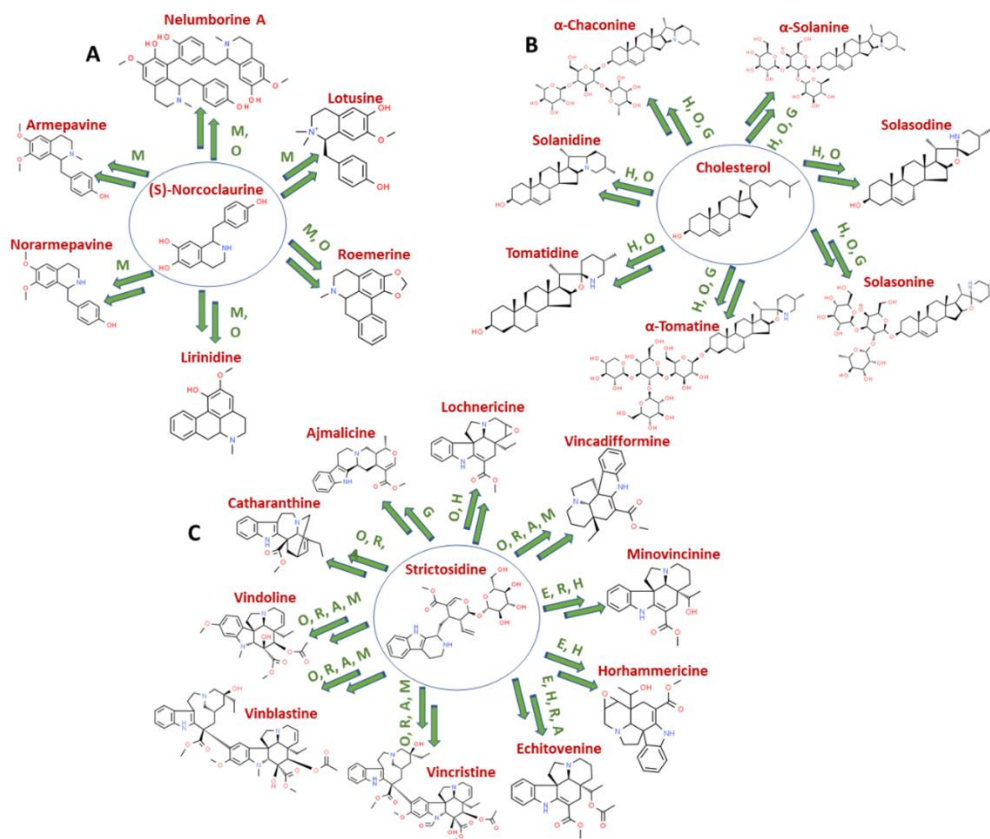
2.3.4 Αλκαλοειδή

Τα αλκαλοειδή είναι ευρέως διαδεδομένες ενώσεις που περιέχουν άζωτο και η παρουσία τους έχει ταυτοποιηθεί περίπου στο 15% των έμβιων οργανισμών, όπως φυτά, βακτήρια, μύκητες, ακόμη και ζώα. Σύμφωνα με τους Ravipati et al. (2014) . Οικογένειες φυτών πλούσιες σε αλκαλοειδή είναι οι *Papaveraceae* (π.χ. παπαρούνα), *Berberidaceae* (π.χ. Βερβερίς η κρητική ή οξαγκαθιά), *Fabaceae* (π.χ. ψυχανθή, κυαμοειδή), *Boraginaceae* , *Aprocynaceae* (π.χ. πικροδάφνη), *Asteraceae* (π.χ ηλίανθος), *Liliaceae* (π.χ. λινάρι – λινάρόσπορος), *Gnetaceae* (κωνοφόρα δέντρα), *Rubiaceae* (π.χ. γαρδένια, καφές), *Solanaceae* (π.χ. κοκκινοπίπερο, μπελαντόνα) και *Rutaceae* (εσπεριδοειδή) (Wink et al., 2016).

Τα αλκαλοειδή μπορούν να ταξινομηθούν σε κατηγορίες ανάλογα με την βιοσυνθετική οδό που οδήγησε στην παραγωγή τους, τη χημική δομή και τους υποκαταστάτες που περιέχουν. Έτσι, για παράδειγμα ένας τρόπος ταξινόμησης είναι ανάλογα με τη θέση του ατόμου αζώτου. Διακρίνονται, δηλαδή, σε δύο κατηγορίες (Bhambhani et al., 2021):

- ετεροκυκλικές ενώσεις όταν το άτομο αζώτου περιέχεται εντός κυκλικού δακτυλίου, όπως στην περίπτωση που προέρχονται με αποκαρβοξυλίωση από αμινοξέα όπως από L-τυροσίνη, L-φαιτυλαλανίνη ή L-λυσίνη
- μη ετεροκυκλικές ενώσεις, αν το άτομο του αζώτου εντοπίζεται σε αλειφατική αλυσίδα, όπως η καψαϊκίνη ή η κολχικίνη.

Επίσης, αν και αρκετά αλκαλοειδή, παρουσιάζουν κοινό σκελετό διαφέρουν ως προς τους υποκατάστατες και παρουσιάζουν σημαντική διαφορές στο χημικό και βιολογικό τους ρόλος. Στην εικόνα 4, παρουσιάζονται ορισμένες από τις σημαντικότερες ομάδες αλκαλοειδών.



Εικόνα 4: Παραδείγματα ομάδων αλκαλοειδών A) Αλκαλοειδή βενζυλισκοκινολίνης στον ιερό λωτό. (B) στεροειδή αλκαλοειδή και γλυκοσίδες τους σε ντομάτα, πατάτα και μελιτζάνα. (C) Αλκαλοειδή τερπενικής ινδόλης στο *C. roseus*

Πηγή: Bhambhani et al., 2021

Κεφάλαιο 3: Ιβίσκος – Γαρύφαλλο – Τσάι βουνού- Προβιοτικά

3.1 Ιβίσκος (Hibiscus)

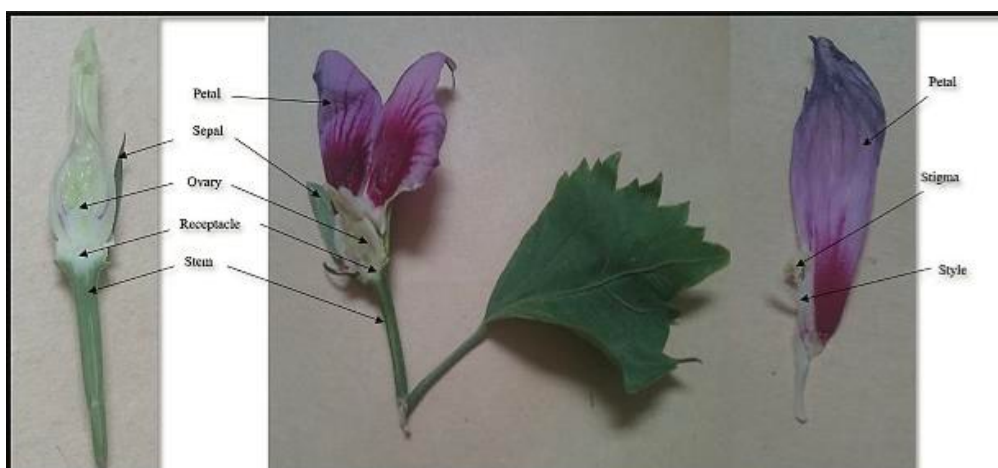
3.1.1 Προέλευση και καλλιέργεια ιβίσκου

Το γένος *Hibiscus* (Malvaceae) ανήκει στην τάξη *Malvales*. Περιλαμβάνει περίπου 244 γένη και περίπου 4.225 είδη. Τα φυτά του ιβίσκου είναι ποώδη, μονοετή ή πολυετή (Shazly et al., 2018).

Η αρχική προέλευση του δεν είναι πλήρως γνωστή. Ορισμένοι υποστηρίζουν ότι μπορεί να προέρχεται από την περιοχή της Ινδίας ή της Σαουδικής Αραβίας, ενώ άλλοι ότι καλλιεργήθηκε για πρώτη φορά στο δυτικό Σουδάν, το 4000 π.Χ. Η καλλιέργεια του σήμερα έχει επεκταθεί σε πολλές τροπικές και υποτροπικές περιοχές, όπως Ινδία, Σαουδική Αραβία, Κίνα, Μαλαισία, Ινδονησία, Φιλιππίνες, Βιετνάμ, Φιλιππίνες, Αίγυπτο, Νιγηρία, Μεξικό (Da-Costa-Rocha et al., 2014).

Ορισμένες από τις διαδεδομένες ποικιλίες ιβίσκου είναι:

- *Hibiscus var. altissima* Western.
- *Hibiscus var. sabdariffa*.
- *Hibiscus Syriacus* L. Φυλλοβόλος ανθοφόρος θάμνος. Σε φυσικό περιβάλλον συναντάται στις πλαγιές των βουνών, αλλά σε κήπους ή φράχτες. Στην εικόνα 5, διακρίνονται τα μέρη ενός άνθους της ποικιλίας *H. syriacus* (Shazly et al., 2018).



Εικόνα 5: Άνθος του *H. Syriacus*

Πηγή: Shazly et al., 2018

3.1.2 Χημική σύσταση και βιοδραστικές ενώσεις ιβίσκου

Η σύσταση του ιβίσκου δεν είναι σταθερή, αλλά εξαρτάται από την ποικιλία, τη γενετική έκφραση, τις περιβαλλοντικές συνθήκες, τον χρόνο και τον τρόπο συγκομιδής, τις συνθήκες αποθήκευσης (Da-Costa-Rocha et al., 2014). Σε έρευνα των Ismail et al., (2008), υπολογίστηκε η σύσταση στα κύρια θρεπτικά συστατικά του κάλυκα, των φύλλων, ενώ οι Nzikou et al (2011) αξιολόγησαν τη θρεπτική σύσταση των σπόρων της ποικιλίας *H. Sabdariffa*. Τα αποτελέσματα διακρίνονται στον πίνακα 4.

Πίνακας 4: Θρεπτική σύσταση διαφόρων μερών του ιβίσκου της ποικιλίας *H. Sabdariffa*

Συστατικά	Κάλυκες	Φύλλα	Σπόροι
Πρωτεΐνες (g/100g)	1,9	3,3	27,78
Υδατάνθρακες (g/100g)	12,3	9,2	21,25
Λίπος (g/100g)	0,1	0,3	21,85
Ακατέργαστες ίνες (g/100g)			16,44
Τέφρα (g/100g)			6,2
Βιταμίνη C (mg/100g)	14	54	
β-καροτίνη (μg/100g)	300	4135	
Ασβέστιο (mg/100g)	1,72		647
Κάλιο (mg/100g)			659
Σίδηρος (mg/ 100g)	57	4,8	
Φώσφορο (mg/100g)		214	510
Μαγνήσιο (mg/100g)			448,12

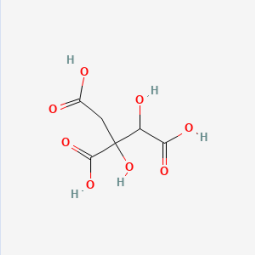
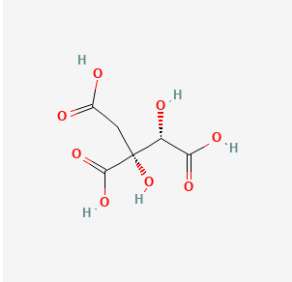
Πηγή: Ismail et al., 2008; Nzikou et al., 2011

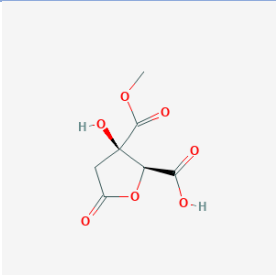
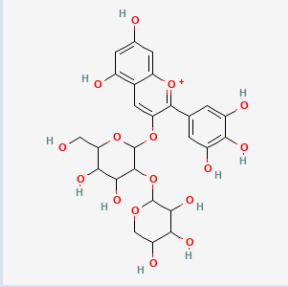
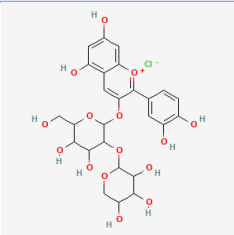
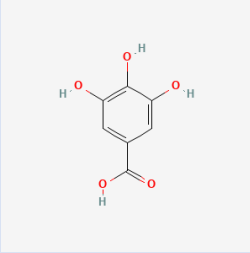
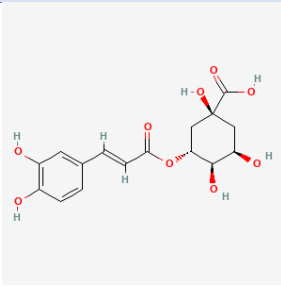
Όσο αφορά την ποικιλία *H.syriacus L.*, η σύσταση διαφοροποιείται. Το μεγαλύτερο ποσοστό τέφρας βρίσκεται στα άνθη και ανέρχεται στο 17,40% , ενώ το στέλεχος ήταν πλούσιο σε ίνες, οι οποίες ανέρχονταν σε ποσοστό 36,98% και ακολουθούσαν τα άνθη και τα φύλλα (Shazly et al., 2018).

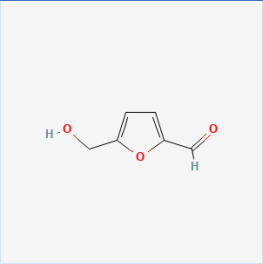
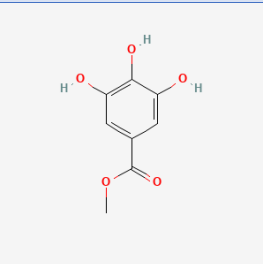
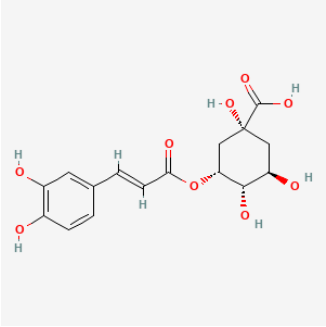
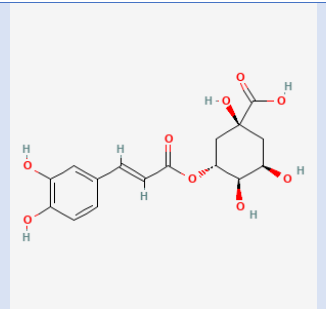
Οι κυριότερες βιοδραστικές ενώσεις που έχουν βρεθεί στον ιβίσκο ανήκουν στα οργανικά οξέα, τις ανθοκυανίνες, τους πολυσακχαρίτες και τα φλαβονοειδή ((Da-Costa-Rocha et al., 2014).

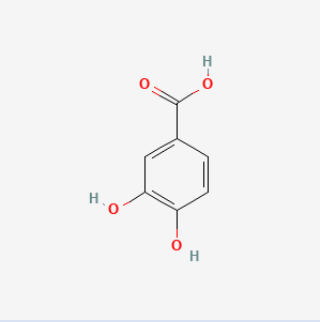
- Οργανικά οξέα.
- Ανθοκυανίνες.
- Πολυσακχαρίτες.
- Φλαβονοειδή.

Στον πίνακα, παρουσιάζονται ορισμένα από τα βιοδραστικά συστατικά που ανιχνεύτηκαν στον ιβίσκο, σύμφωνα με διάφορες μελέτες.

Ένωση	Χημικός τύπος	Κατηγορία ενώσεων	Αναφορά
Υδροξυκιτρικό οξύ	 <p>https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/123908#section=2D-Structure</p>	Οργανικό οξύ	Beltran-Debon et al., 2010
Οξύ ιβίσκου	 <p>https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/9856782#section=2D-Structure</p>		Beltran-Debon et al., 2010; Peng et al., 2011; Ramirez-Rodrigues et al., 2011
Γλυκοζίτης οξέος ιβίσκου			Ramirez-Rodrigues et al., 2011

<p>6- μεθυλεστέρας οξέος ιβίσκου</p>	 <p>https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/273019043#section=2D-Structure</p>		<p>Peng et al., 2011; Ramirez- Rodrigues et al., 2011</p>
<p>Δελφινιδίνη-3- σαμπουβιοσίδη</p>	 <p>https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Delphinidin-3-O-sambucoside#section=2D-Structure</p>	<p>Ανθοκυανίνες</p>	<p>Peng et al., 2011; Ramirez- Rodrigues et al., 2011</p>
<p>Κυανιδίνη-3- σαμπουβιοσίδη</p>	 <p>https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cyanidin-3-sambucoside#section=Structures</p>		
<p>Γαλλικό οξύ</p>	 <p>https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/370#section=2D-Structure</p>	<p>Φλαβανοειδή και οργανικά οξέα</p>	<p>Peng et al., 2011; Ramirez- Rodrigues et al., 2011</p>
<p>Χλωρογενικό οξύ</p>	 <p>https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1794427#section=2D-Structure</p>		<p>Beltran-Debon et al., 2010; Peng et al., 2011</p>

<p>5-υδροξυ- μεθυλο- φουρφουράλη</p>	 <p>https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/237332#section=2D-Structure</p>		<p>Peng et al., 2011</p>
<p>Γαλλικός μεθυλεστέρας</p>	 <p>https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/7428#section=2D-Structure</p>		<p>Ramirez- Rodrigues et al., 2011</p>
<p>2-O-trans- καφεούλο- υδροξυκιτρικό οξύ</p>			<p>Ramirez- Rodrigues et al., 2011</p>
<p>5- Καφεούλκινικό οξύ</p>	 <p>https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5280633#section=2D-Structure</p>		<p>Peng et al., 2011; Ramirez- Rodrigues et al., 2011</p>
<p>3- Καφεούλκινικό οξύ</p>	 <p>https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1794427</p>		<p>Ramirez- Rodrigues et al., 2011</p>

Μυρικετίνη-3- αραβινογαλακτ οσίδη			Beltran-Debon et al., 2010
Πρωτοκατεχου ϊκό οξύ			Peng et al., 2011
	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/72#section=2D-Structure		

3.1.3 Παραδοσιακή χρήση ιβίσκου

Η ποικιλία *H. Sabdariffa* είναι εδώδιμη. Οι κάλυκες είτε φρέσκοι είτε αποξηραμένοι είναι εδώδιμοι και παραδοσιακά έχουν χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή αφεψημάτων, στη ζύμωση οίνου, στην παρασκευή μαρμελάδας, στη ζαχαροπλαστική (ζελέ, παγωτό, σοκολάτα, πουτίγκα ή κέικ). Έτσι, στην Αίγυπτο χρησιμοποιείται στο τσάι cacody, ενώ προστίθεται σε ποτά που ζυμώνονται, στο Σουδάν, στη Νιγηρία και το νερό βράζονται με ζάχαρη για να παράγουν ένα ποτό (karkade ή zoborodo ή agua de Jamaica) (Da-Costa-Rocha et al., 2014). Επίσης, τα άνθη του *H. Syriacus* που έχουν αποξηρανθεί στον ευρωπαϊκό χώρο έχουν χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή αφεψήματος (Shazly et al., 2018)..

Οι σπόροι της ποικιλίας *H. Sabdariffa* μπορούν να φαγωθούν ψημένοι ή μετά από άλεση να χρησιμοποιηθούν για την προετοιμασία γευμάτων, τα φύλλα και οι βλαστοί καταναλώνονται ωμοί ή αφού μαγειρευτού ή ως λαχανικό ή ως καρύκευμα που προσδίδει όξινη γεύση (Da-Costa-Rocha et al., 2014).

Ο ιβίσκος έχει χρησιμοποιηθεί παραδοσιακά και για την παραγωγή φαρμάκων σε διάφορες περιοχές. Στην Ινδία, την Αφρική και το Μεξικό, θεωρούν ότι το έγχυμα από τα φύλλα και τους κάλυκες έχει διουρητικές, αντιπυρετικές και υποτασικές δράσεις, ενώ διεγείρει το έντερο (Da-Costa-Rocha et al., 2014). Στην Αίγυπτο, οι κάλυκες του ιβίσκου έχουν χρησιμοποιηθεί ως διουρητικά, ενώ ο *Hibiscus Syriacus L.*

έχει χρησιμοποιηθεί ως αντιπυρετικό και για την παραγωγή ανθελμινθικών (αντιπαρασιτικών) σκευασμάτων (Shazly et al., 2018). Στη Γουατεμάλα, θεωρούνται ότι μπορούν να βοηθήσουν στα συμπτώματα της μέθης, ενώ στη Β. Αφρική, χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση του βήχα, του πονόλαιμου και τη θεραπεία προβλημάτων που σχετίζονται με τα γεννητικά όργανα. Στην Ινδία και τη Βραζιλία, θεωρείται ότι ο ιβίσκος βοηθάει στην αντιμετώπιση στομαχικών διαταραχών και πεπτικών προβλημάτων (Da-Costa-Rocha et al., 2014).

Το υδατικό εκχύλισμα των φύλλων έχει θεωρηθεί ότι παρουσιάζει αντιμυκητοβακτηριακές δράσεις, ενώ ο φλοιός από τη ρίζα του ιβίσκου ότι έχει αντιοξειδωτικές και κυτταροτοξικές ικανότητες (Shazly et al, 2018).

3.2 Γαρίφαλο ή γαρύφαλλο(*Syzygium aromaticum*)

3.2.1 Προέλευση και καλλιέργεια γαρύφαλλου

Το γαρύφαλλο (επιστ. ονομ.: *Syzygium aromaticum* ή *Eugenia caryophyllata*) αποτελεί ιθαγενές φυτό της Ινδονησίας, και συγκεκριμένα των νησιών Maluku, αλλά η καλλιέργεια του σήμερα έχει επεκταθεί σε πολλά μέρη του κόσμου. Πρόκειται για ένα από τα πρώτα μπαχαρικά που εμπορεύθηκε ο άνθρωπος. Μέχρι περίπου τον 17^ο αιώνα, οι Ισπανοί είχαν το μονοπώλιο του εμπορίου του γαρύφαλλου, το οποίο όμως έχασαν όταν Ολλανδοί αποικιστές κατοίκησαν στα νησιά Maluku. Στα τέλη του 18^{ου} αιώνα, η καλλιέργεια του γαρύφαλλου εξαπλώθηκε και σε άλλες περιοχές με τη βοήθεια Γάλλων αποίκων. Αυτοί κατάφεραν να μεταφέρουν λαθραία και να καλλιεργήσουν το γαρύφαλλο σε άλλες περιοχές, όπως για παράδειγμα στο Μαυρίκιο (χώρα της Ανατολικής Αφρικής, ανατολικά της Μαδαγασκάρης) το 1770. Η παραγωγή του αιθερίου ελαίου ξεκίνησε σχεδόν ένα αιώνα αργότερα (Habtemariam, 2019).

Σύμφωνα με τα στοιχεία του FAO (Διεθνής Οργάνωση Τροφίμων και Γεωργίας – Food and Agriculture Organization of the United Nations), οι χώρες που παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη παραγωγή στο γαρύφαλλο είναι η Ινδονησία, η Μαδαγασκάρη, η Τανζανία, η Κομόρες και η Σρι Λάνκα (διάγραμμα 1).



Διάγραμμα 1: Απεικόνιση μεγαλύτερων παραγωγών χωρών γαρυφαλλού κατά το έτος 2022

Πηγή: Στοιχεία FAOSTAT

Ανήκει στην τάξη Magnoliopsida (δικοτυλήδονα), στην οικογένεια *Myrtaceae* και στο γένος *Syzygium* (Habtemariam, 2019). Πρόκειται για ένα δέντρο με ύψος που μπορεί να φθάσει τα 8-12 μέτρα. Συνήθως, η καλλιέργεια του πραγματοποιείται σε παράκτιες περιοχές με μέγιστο ύψος από τη στάθμη της θάλασσας ίση με 200 m. (Cortes-Rojas et al., 2014).

Το νεαρό φυτό ξεκινάει να παράγει καρπό κατάλληλο για να διατεθεί στην αγορά, από τα 4 χρόνια και μετά. Πραγματοποιείται συλλογή των ανθοφόρων βλαστών (νεαρά άνθη- μπουμπούκια), πριν ξεκινήσει η ανθοφορία. Η συλλογή του καρπού γίνεται με το χέρι, ενώ μπορεί να χρησιμοποιηθούν φυτικές ορμόνες, για να επιταχύνουν την ωρίμανση του καρπού. Αποξηραίνονται και αποκτούν το χαρακτηριστικό καφέ-κοκκινωπό χρώμα τους (Cortes-Rojas et al., 2014).



Εικόνα 6: *Syzygium aromaticum* κατά την περίοδο άνθησης (πάνω) και αποξηραμένα μπουμπούκια (κάτω)

Πηγή: Habtemarian, 2019

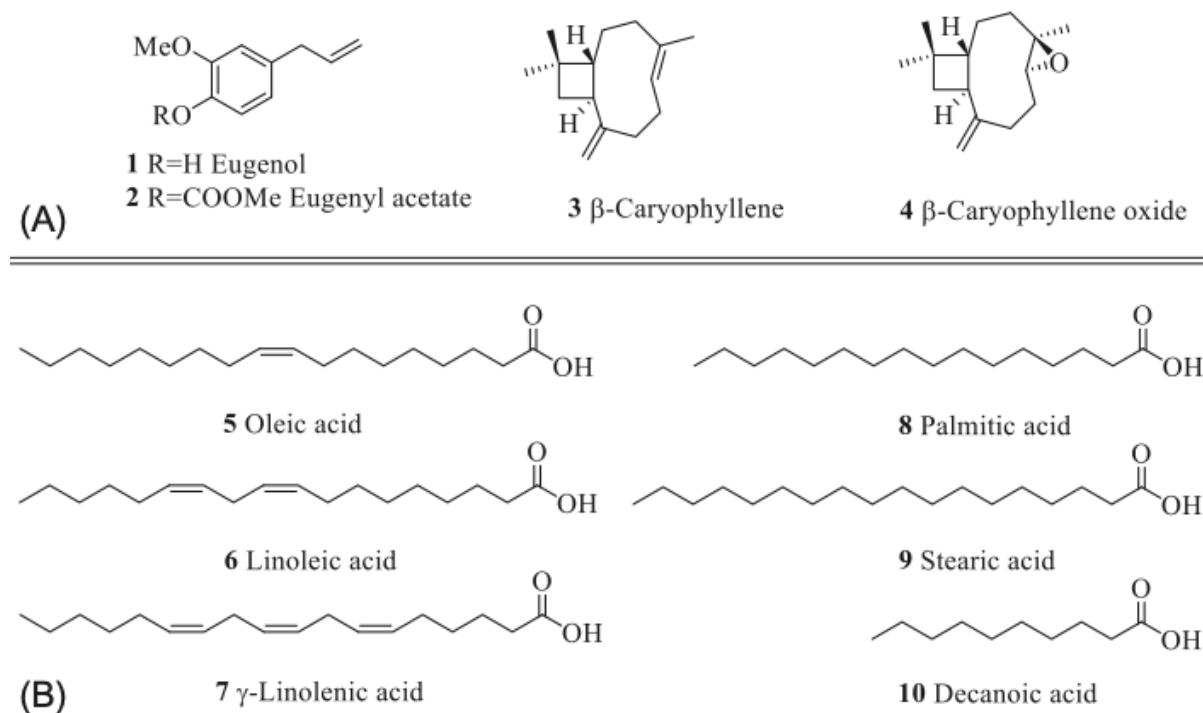
3.2.2 Βιοδραστικές ενώσεις γαρύφαλλου

Το γαρύφαλλο έχει πλούσιο φαινολικό περιεχόμενο, όπως φλαβονοειδή, υδροξυβενζοϊκά οξέα, υδροκυκινικά οξέα και υδροξυφαινοπροπένη. Παρουσιάζει υψηλή συγκέντρωση σε ευγενόλη (9381,70 έως 14 650,00 mg ανά 100 g φρέσκου φυτικού υλικού), οξική ευγενόλη και γαλλικό οξύ (783,50 mg ανά 100g φρέσκου φυτικού υλικού). Σε υψηλή περιεκτικότητα ανευρίσκεται επίσης τα φαινολικά οξέα: καφεϊκό οξύ, φερουλικό οξύ, σαλικυλικό οξύ, καθώς και τα φλαβονοειδή καμπφερόλη, κερσεκίνη και τα γλυκοζυλιωμένα παράγωγά τους. (Cortes-Rojas et al., 2014).

Το γαρυφαλέλαιο είναι ένα αιθέριο έλαιο που προκύπτει από μπουμπούκια ανθέων. Η περιεκτικότητα του γαρύφαλλου σε αιθέριο έλαιο ανέρχεται σε 18% και οι κυριότερες ενώσεις που συναντά κανείς είναι η ευγενόλη (5-15% του αιθέριου ελαίου), η οξική ευγενόλη και το β-καρβοφυλλένιο (δικυκλικό σεσκιτερπένιο). Σε μικρότερη

συγκέντρωση μπορεί να ανιχνεύσει κανεί β-πινένιο, λιμονένιο, βενζαλδεΐδη, 2 επτανόνη και εξανοϊκό αιθυλεστέρα (Jironetz et al., 2006).

Στην εικόνα 7, παρουσιάζονται ορισμένες από τις κυριότερες ενώσεις το αιθέριου ελαίου του γαρύφαλλου.



Εικόνα 7:Βασικά συστατικά του ελαίου του γαρύφαλλου. (Α) κύρια συστατικά αιθέριου ελαίου μπουμπουκιών (Β) λιπαρά οξέα αιθέριου ελαίου

Πηγή: Habtemariam, 2019

3.2.3 Παραδοσιακή χρήση γαρύφαλλου

Το γαρύφαλλο είναι ένα μπαχαρικό γνωστό εδώ και αιώνες για το χαρακτηριστικό άρωμά του. Χρησιμοποιείται ως συντηρητικό τροφίμων, αλλά και στην παραδοσιακή φαρμακευτική και ιατρική (Cortes-Rojas et al., 2014).

Θεωρείται ότι παρουσιάζει υψηλότερες αντιοξειδωτικές και αντιμικροβιακές ικανότητες από πολλά φρούτα και λαχανικά. Σε αρκετές τροπικές χώρες, έχει χρησιμοποιηθεί για την αντιμετώπιση του δάγκειου πυρετού (ιός που μεταφέρεται μέσω κουνουπιών *Aedes aegypti*), καθώς θεωρείται ότι έχει προνυμφοκτόνο δράση (σκοτώνει τις νύμφες των κουνουπιών) (Cortes-Rojas et al., 2014).

3.3 Τσάι βουνού (*Sideritis*)

3.3.1 Προέλευση και καλλιέργεια τσαγιού βουνού

Το τσάι του βουνού (*Sideritis*) ανήκει στην οικογένεια *Lamiaceae*. Περιλαμβάνει περισσότερα από 160 είδη και συναντάται από την Μακαρονησία, η οποία βρίσκεται στο βόρειο Ατλαντικό Ωκεανό, μέχρι και την Κίνα. Πολλά από τα είδη του *Sideritis* είναι ενδημικά των μεσογειακών χωρών. Ένας σημαντικός αριθμός, περίπου 17 από αυτά φυτρώνουν αποκλειστικά στην Ελλάδα, όπως στο Άγιο Όρος (*Sideritis perfoliata*), στον Ταΰγετο (*Sideritis clandestina* subsp. *peloponnesiaca*), στην Κρήτη (*Sideritis syriaca*, γνωστό ως μαλοτήρας), στον Όλυμπο (*Sideritis scardica*), στην Εύβοια (*Sideritis euboica*) (Stefanaki & Van Andel, 2021).

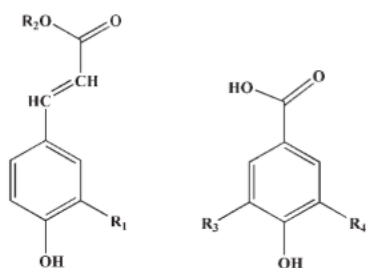
Στο γένος *Sideritis* ανήκουν φυτά που είναι ετήσια ή πολυετή, είναι μικροί θάμνοι και αναπτύσσονται συνήθως σε περιοχές με έντονη ηλιοφάνεια, βραχώδεις πλαγιές ή βοσκοτόπια, ακόμη και αν βρίσκονται ως 3000m πάνω από το επίπεδο της θάλασσας ((Dinic et al., 2020). Το διάφορα είδη τσαγιού του βουνού φέρουν περισσότερο ή λιγότερο χνούδι, λευκό ως ανοικτό πράσινο χρώμα. Οι ταξιανθίες τους φέρουν συστάδες από μικρά κίτρινα άνθη, τα οποία μπορεί να είναι συμπαγή ή απομακρυσμένα. Ορισμένα είδη, όπως ο *Sideritis scardica*, φέρουν βράκτια (Stefanaki & Van Andel, 2021).

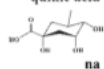
3.3.2 Βιοδραστικές ενώσεις τσαγιού βουνού

Το τσάι του βουνού είναι πλούσιο σε флаβονοειδή, τερπένια και αιθέρια έλαια (Dinic et al., 2020).

Οι Tadic et al. (2012) μελέτησαν το ολικό φαινολικό περιεχόμενο εκχυλισμάτων *S. scardica*. Χρησιμοποίησαν ως διαλύτες είτε διαιθυλαιθέρα είτε οξικό αιθυλεστέρα είτε n- βουτανόλη. Ταυτοποιήθηκαν παράγωγα του υδροξυκινναμικού οξέος, του 4-υδροξυ-βενζοϊκού οξέος και флаβονοειδή (εικόνα 8).

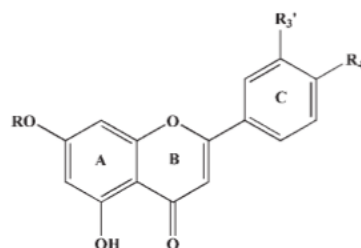
A





N°	Trivial name	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
1.	Protocatechuic acid	na*	na	H	OH
2.	Chlorogenic acid (3- <i>O</i> -caffeoylquinic acid)	OH	quinic acid 	na	na
3.	Vanillic acid	na	na	H	OCH ₃
4.	Caffeic acid	OH	H	na	na
5.	Syringic acid	na	na	OCH ₃	OCH ₃
6.	<i>p</i> -Coumaric acid	H	H	na	na
7.	Ferulic acid	OCH ₃	H	na	na

* not applicable

B



N°	Trivial name	R _{3'}	R _{4'}	R
8.	Luteolin-7- <i>O</i> - β -glucoside	OH	OH	β -glucosyl 
9.	Apigenin-7- <i>O</i> - β -glucoside	H	OH	β -glucosyl 
10.	Luteolin	OH	OH	H
11.	Chrysoeriol	OCH ₃	OH	H
12.	Apigenin	H	OH	H

Εικόνα 8: Ενώσεις εκχυλισμάτων *S. scardica*

Πηγή: Tadic et al., 2012

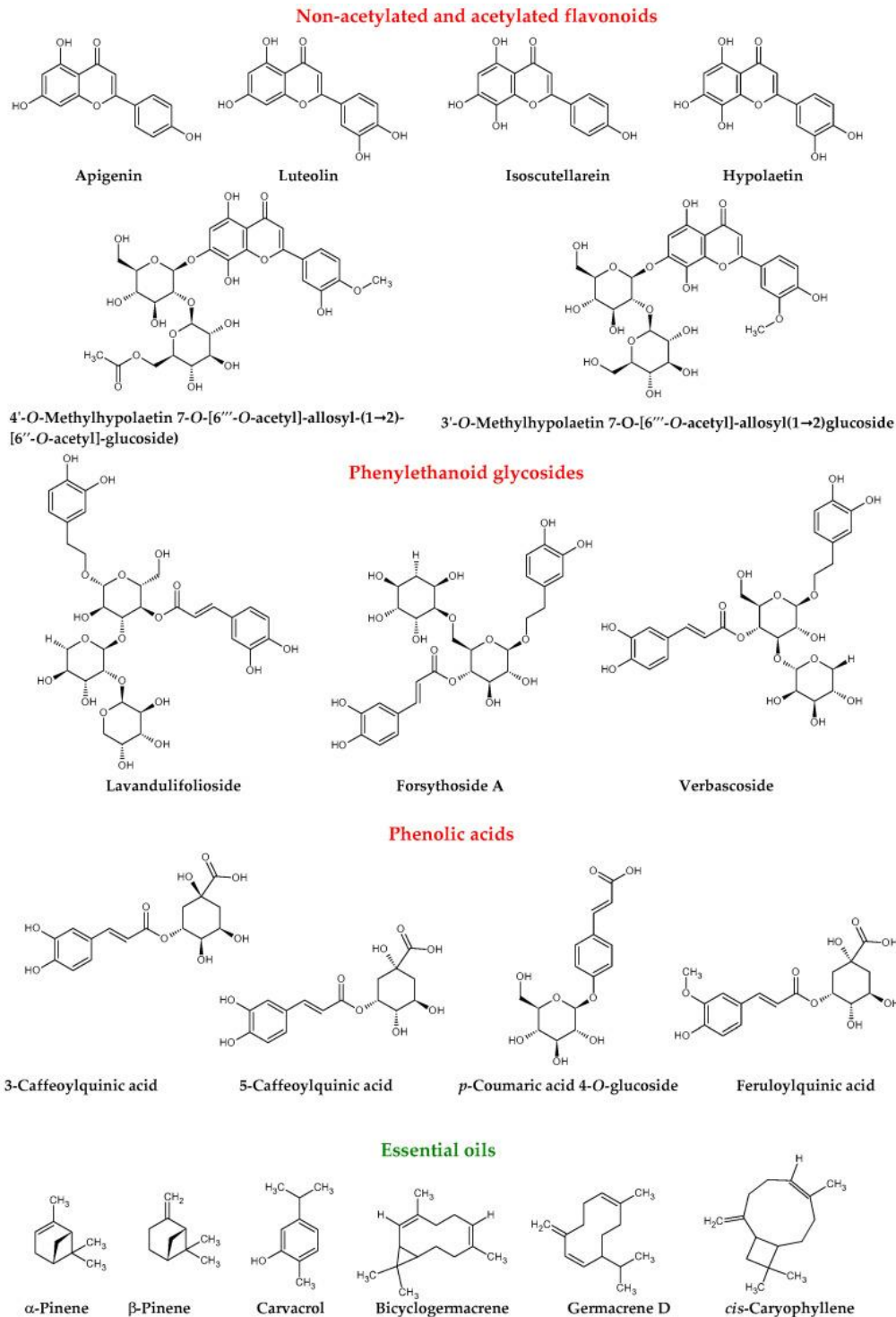
Τα αιθέρια έλαια του τσαγιού του βουνού αποτελούνται από ένα μεγάλο αριθμό ενώσεων, οι κυριότερες από τις οποίες είναι μονοτερπένια και σесκιτερπένια (Stefanaki & Van Andel, 2021).

Οι Kararakou et al., (2023) μελέτησαν τη χημική σύσταση των αιθέριων ελαίων που απομονώθηκαν από τρεις διαφορετικές ελληνικές ποικιλίες (*S. raeseri*, *S. scardica*, *S. syriaca*). Η απομόνωση του αιθέριου ελαίου πραγματοποιήθηκε με υδρο-απόσταξη και η ανάλυση της χημική σύστασής του πραγματοποιήθηκε με Αέρια Χρωματογραφία-Φασματοσκοπία μάζας (GC-MS). Ταυτοποιήθηκαν συνολικά περίπου 165 χημικές ενώσεις και από τις τρεις ποικιλίες *Sideritis*. Τα κοινά συστατικά, αν και σε διαφορετική περιεκτικότητα για κάθε ποικιλία ήταν: 1-οκτεν-3-όλη, λιναλοόλη, trans-πινोκαρβεόλη, *p*-μεθα-1,5-διεν-8-όλη, α-τερπινεόλη, μυρτενόλη και βερβενόνη (Kararakou et al., 2023).

Τα κυριότερα συστατικά του αιθέριου ελαίου από δείγματα τσαγιού των ποικιλιών *S. raeseri* (Μεταμόρφωση και Πολύρραχο Κοζάνης), *S. scardica* (Μεταμόρφωση και Χρώμιο Κοζάνης) είναι: α-πινένιο (8,2–17,8%), β-πινένιο (12,8–13,1%), cis-καρφοφυλλένιο (6,6–7,6%), δικυκλογερμακρένιο (6,6–7,1%) και γερμακρένιο D (2,2–6,6%). Η σύνθεση και η συγκέντρωση κάθε συστατικού στα συγκεκριμένα αιθέρια

έλαια θεωρήθηκε ότι εξαρτώνται από διάφορους παράγοντες που σχετίζονται με το υψόμετρο και τις μεθόδους καλλιέργειας. Στην εικόνα , διακρίνονται οι χημικοί τύποι των κυριότερων συστατικών που ταυτοποιήθηκαν (Κλουκίνα et al., 2019).

Στην εικόνα 8, παρουσιάζονται ορισμένες από τις κυριότερες πολυφαινολικές ενώσεις του *S.scardica* και του αιθέριου ελαίου.



Εικόνα 9: Πολυφαινολικές ενώσεις του *S.scardica* και του παραγόμενου αιθέριου ελαίου

Πηγή: Zyzelewicz et al., 2020

3.3.3 Παραδοσιακή χρήση τσαγιού βουνού

Παραδοσιακά το τσάι του βουνού στην Ελλάδα, τα Βαλκάνια και την Τουρκία καταναλώνεται ως αφέψημα, το οποίο έχει ευχάριστο και χαρακτηριστικό άρωμα και γεύση. Στον ελληνικό χώρο, συνήθως μπορεί κανείς να το συλλέξει από τη φύση ή να το αγοράσει σε αγορά με τοπικά προϊόντα. Πιο σπάνια, χρησιμοποιείται στη μαγειρική ή τη ζαχαροπλαστική για να αρωματίσει ένα τρόφιμο (Stefanaki & Van Andel, 2021).

Έχει χρησιμοποιηθεί από την αρχαιότητα στη μεσογειακή παραδοσιακή ιατρική, καθώς θεωρήθηκε ότι έχει αντιφλεγμονώδη, αντιρευματική και αντιμικροβιακή δράση. Μία από τις πρώτες γραπτές αναφορές για το τσάι του βουνού συναντάται στο έργο του Διοσκουρίδη, «De Materia Medica» (Karakarou et al., 2023).

Τα αιθέρια έλαια του τσαγιού του βουνού βρίσκουν εφαρμογή στη βιομηχανία τροφίμων, όπου θεωρούνται φυσικές αρωματικές ουσίες, ενώ, ταυτόχρονα, λειτουργούν ως συντηρητικά, καθώς έχουν αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή ικανότητα (Karakarou et al., 2023).

3.4 Επίδραση ιβίσκου, γαρύφαλλου και τσαγιού βουνού στο μικροβίωμα του εντέρου

Στον πίνακα, παρουσιάζονται ορισμένες έρευνες σχετικές με την επίδραση του ιβίσκου, του γαρύφαλλου και του τσαγιού του βουνού στον γαστρεντερικό σωλήνα και, ιδιαίτερα στην μικροχλωρίδα του εντέρου.

Πίνακας 5: Παραδείγματα ερευνών που δείχνουν τη συσχέτιση του ιβίσκου του γαρύφαλλου και του τσαγιού με τη μικροχλωρίδα του εντέρου

Φυτό	Δείγμα/ Νόσημα	Δείγμα ελέγχου	Συμπεράσματα	Αναφο ρά
Πέταλα άνθεων <i>H.sabdariffa</i> .	Ποντίκια με ελκώδη κολίτιδα	Θεραπεία με μεσαλαζίνη (φάρμακο αγωγής για ελκώδης κολίτιδα)	Μετρίαση φλεγμονής – αντιφλεγμονώδη δράση	Lubis et al., 2019

Κόκκινος και λευκός ιβίσκος (υδατικό εκχύλισμα)	Αρουραίοι με φλεγμονή δωδεκαδακτύλου και παχέος εντέρου	1.Υγιείς αρουραίοι 2.Θεραπεία με πρεβιοτικά	Βελτίωση ιστοαρχιτεκτονικής δωδεκαδακτύλου και παχέος εντέρου. Αντιφλεγμονώδης δράση	Ahmed & Sheir, 2021
Υδροαλκοολικό εκχύλισμα <i>Hibiscus rosa sinensis</i>	Αρουραίοι με κολίτιδα που προκλήθηκε από οξικό οξύ	1. Θεραπεία με πρεδνιζολόνη 2. Υγιείς αρουραίοι	Ισχυρή θεραπευτική δράση. Βελτίωση συμπτωμάτων	Kandhare et al., 2012
β-καρυοφυλλένιο από γαρύφαλλο	Ποντίκια με ελκώδη κολίτιδα	Υγιή ποντίκια	Βελτίωση κινητικότητας εντέρου, αύξηση μήκους παχέος εντέρου και μικροχλωρίδας εντέρου	Yeom et al., 2022
Σκόνη γαρύφαλλου και εκχύλισμα <i>tulsi</i>	Νεαρά κοτόπουλα λαμβάνουν συμπλήρωμα γαρύφαλλου και <i>tulsi</i>	Κοτόπουλα που τρέφονται μόνο με εμπορικό σκεύασμα για κοτόπουλα κρεατοπαραγωγής	Αύξηση επιφάνειας λαχνών λεπτού εντέρου και βελτίωση μικροχλωρίδας εντέρου (αύξηση βακτηρίων <i>Lactobacillus</i> και μείωση <i>E. coli</i>)	Islam et al., 2023
Εκχύλισμα <i>Sideritis Scardica</i>	Μέτρηση ολικού φαινολικού περιεχομένου		Αντιφλεγμονώδης και γαστροπροστατευτική δράση.	Tadic et al., 2012

3.5 Τι καλούνται προβιοτικά

Τα προβιοτικά ορίστηκαν για πρώτη φορά το 1965 από τους Lilly & Stillwell και αναφερόταν σε ουσίες που παράγονται από βακτήρια και προάγουν την ανάπτυξη άλλων βακτηριακών πληθυσμών. Δύο δεκαετίες αργότερα, εισήχθη η έννοια του ζωντανού μικροβιακού συμπληρώματος, από τον Fuller (1989). Ωστόσο, τα

προβιοτικά παρέμειναν μία έννοια που συνδέονταν με την διατροφική υγεία. Ο πιο πρόσφατος ορισμός, εμφανίστηκε στα τέλη του 20^{ου} αιώνα και αναφέρει ότι τα προβιοτικά είναι ζωντανοί μικροοργανισμοί που έχουν θετική επίδραση στην υγεία αν ληφθούν σε επαρκή ποσότητα (Wieers et al., 2020).

3.6 Επίδραση προβιοτικών στη μικροχλωρίδα του εντέρου

Τα προβιοτικά χρησιμοποιούνται για θεραπευτικούς σκοπούς εδώ και δεκαετία. Στις αρχές του 19^{ου} αιώνα, για πρώτη φορά έγινε πρόταση να χρησιμοποιηθούν bifidobacterial για την θεραπεία διάρροιας σε παιδιά. Θεωρήθηκε ότι θα μπορούσαν να ενισχύσουν τη μικροχλωρίδα του εντέρου και να βελτιώσουν τα συμπτώματα. Από τότε μέχρι σήμερα έχουν πραγματοποιηθεί πολλές έρευνες και μελέτες που εξετάζουν την επίδραση των προβιοτικών στην εξέλιξη μίας ασθένειας (Wieers et al., 2020).

4. ΣΚΟΠΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός της παρούσας πειραματικής διαδικασίας είναι να μελετηθεί η αλληλεπίδραση ενός φυτικού εκχυλίσματος (που περιέχει ιβίσκο, γαρύφαλλο και τσάι του βουνού) εμπλουτισμένο με προβιοτικές καλλιέργειες, με τους μικροοργανισμούς ανθρώπινου μικροβιώματος. Χρησιμοποιήθηκε ένα σύστημα προσομοίωσης γαστρεντερικής πέψης με 5 φάσεις (αρχική, γαστρική, εντερική, πρώιμη εντερική ζύμωση και όψιμη εντερική ζύμωση), όπου στην πρώιμη εντερική ζύμωση προστέθηκαν ανθρώπινα κόπρανα. Μελετήθηκε κατά πόσο επηρεάζεται η μέτρηση του ολικού φαιολικού περιεχομένου από την παρουσία των μικροοργανισμών κατά τη διάρκεια των διαφορετικών φάσεων της εντερικής ζύμωσης. Για τις ανάγκες της μελέτης, χρησιμοποιήθηκαν κόπρανα ενός υγιούς ατόμου και ενός ατόμου που πάσχει από νόσο του Crohn. Επίσης, πραγματοποιήθηκε μικροβιολογική ανάλυση με καλλιέργεια μικροοργανισμών σε διαφορετικά υποστρώματα και καταμέτρηση των αποικιών που προέκυψαν.

5. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

5.1 Υλικά και παρασκευή διαλυμάτων

- Αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu
- Κορεσμένο διάλυμα ανθρακικού νατρίου (Na_2CO_3)
- Διάλυμα γαλλικού οξέος
- Μεθανόλη αναλυτικής καθαρότητας
- Απεσταγμένο ύδωρ

5.1.1 Αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu

Χρησιμοποιήθηκε εμπορικά διαθέσιμο αντιδραστήριο (Folin-Ciocalteu's phenol reagent, της εταιρείας Merck KGaA, Germany). Σύμφωνα με την εταιρεία, πρόκειται για κίτρινο, υγρό διάλυμα, πυκνότητας $1,24 \text{ g/cm}^3$ στους $20 \text{ }^\circ\text{C}$ και με τιμή pH μικρότερη

του 0,5 (H₂O, 20°C). Προτείνεται να φυλάσσεται στους 15 °C έως 25 °C (MERCCK, 2024).

5.1.2 Κορεσμένο διάλυμα ανθρακικού νατρίου Na₂CO₃.

Για την παρασκευή κορεσμένου διαλύματος ανθρακικού νατρίου (Na₂CO₃), ζυγίζονται και διαλύονται 200,00 g άνυδρου ανθρακικού νατρίου (Na₂CO₃) σε 800,00 mL απεσταγμένου H₂O εν βρασμό και αφήνεται να επανέλθει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Στη συνέχεια, γίνεται προσθήκη περίπου 80 g κρυστάλλων Na₂CO₃. Το διάλυμα παραμένει σε ηρεμία για 24 h. Τέλος, ακολουθεί διήθηση και αραιώση σε ογκομετρική φιάλη 1L μέχρι τον τελικό όγκο (1,00 L) με απεσταγμένο H₂O. Το κορεσμένο διάλυμα ανθρακικού νατρίου μπορεί να παραμείνει σταθερό και κατάλληλο για χρήση για μεγάλο χρονικό διάστημα.

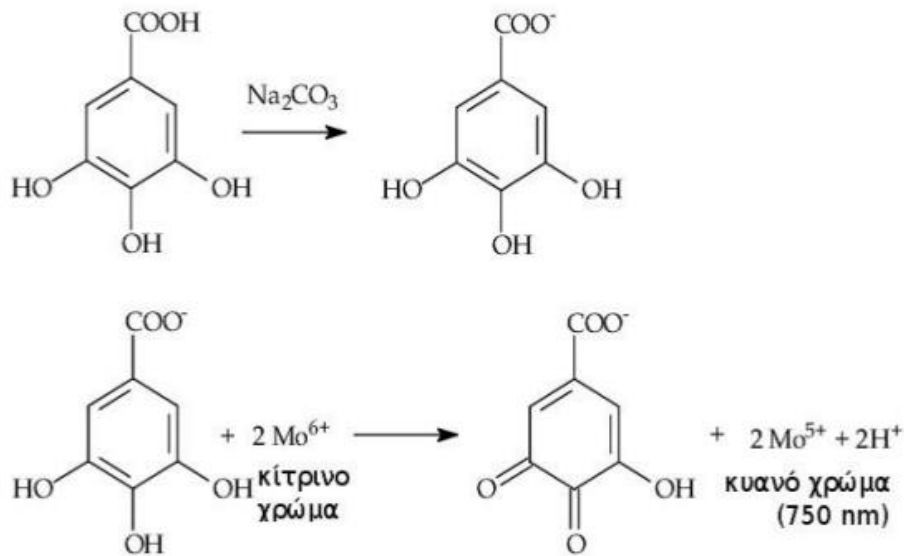
5.1.2 Διάλυμα γαλλικού οξέος

Παρασκευάζεται διάλυμα γαλλικού οξέος (Gallic Acid, GA), συγκέντρωσης 5 g GA/L ως εξής: 0,500 g GA διαλυθήκαν πλήρως σε 10,00 mL αιθανόλης και αραιώθηκαν με απιονισμένο μέχρι τα 100,00 mL. Το διάλυμα διατηρείται στο ψυγείο για 2 εβδομάδες. Από το διάλυμα αυτό παρασκευάζονται υδατικά διαλύματα συγκεντρώσεων 25-2600 mg GA/L προκειμένου να κατασκευασθεί η πρότυπη καμπύλη αναφοράς.

5.2 Χημικές αναλύσεις

5.2.1 Προσδιορισμός του ολικού φαινολικού περιεχομένου με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu

Το αντιδραστήριο αποτελείται από άλατα του μολυβδαινίου (Mo) και του βολφραμίου (W). Σε αλκαλικό περιβάλλον, η φαινολική ένωση οξειδώνεται και το αντιδραστήριο ανάγεται προς οξειδία που έχουν το χαρακτηριστικό κυανό χρώμα του πεντασθενούς μολυβδαινίου. Η ένταση του χρώματος είναι ανάλογη του φαινολικού περιεχομένου, η συγκέντρωση του οποίου εκφράζεται σε ισοδύναμα ενός επιλεγμένου πρότυπου.



Για τον υπολογισμό του ολικού φαινολικού περιεχομένου, ακολουθούμε την εξής διαδικασία :

20 μL δείγματος αναμιγνύονται με 200 μL Folin-Ciocalteu. Προστίθενται 2500 μL (2,5 ml) απιονισμένο νερό. Το δείγμα τοποθετείται στο σκοτάδι για 8 min. Προστίθενται 500 μL ανθρακικού ασβεστίου (CaCO_3) και ακολουθεί ανάδευση και τοποθέτηση σε υδατόλουτρο (40°C για 90 min). Ακολουθεί μέτρηση της απορρόφησης στα 750 nm. Χρησιμοποιείται, επίσης, τυφλό δείγμα, για τον υπολογισμό του θετικού σφάλματος που προκαλείται στην τιμή της απορρόφησης των δειγμάτων λόγω του διαλύτη και των πρότυπων διαλυμάτων, οπότε η ένδειξη απορρόφησης του τυφλού αφαιρείται από το δείγμα.



Εικόνα 10: Δείγματα κατά τον προσδιορισμό Folin-Ciocalteu
 Πηγή: Προσωπικό αρχείο

5.3 Μικροβιολογικοί έλεγχοι

5.3.1 Μέθοδος διαδοχικών αραιώσεων

Χρησιμοποιήθηκε ισότονο αραιωτικό υγρό για την αραιώση των δειγμάτων κοπράνων. Αρχικά 0,1 g δείγμα κοπράνων, σε ασηπτικό περιβάλλον τοποθετήθηκαν σε σωληνάριο μαζί με 10 mL ισότονο αραιωτικό υγρό, έτσι έχουμε την πρώτη αραιώση 10^{-1} . Στη συνέχεια, αφού έγινε ανακίνηση στο Vortex, από την αραιώση αυτή λήφθηκε 1 mL και τοποθετήθηκε σε σωληνάριο με 9 mL αραιωτικού μέσου, έτσι έχουμε την δεύτερη αραιώση 10^{-2} . Η διαδικασία αυτή συνεχίστηκε ως και την 10^{-5} αραιώση.

5.3.2 Ανίχνευση Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (OMX)

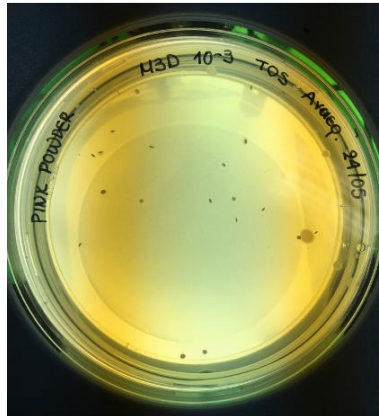
Για την ανίχνευση της αερόβιας και αναερόβιας Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (OMX) δειγμάτων κοπράνων χρησιμοποιήθηκε ως επιλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα BHI Agar (στερεό υποστρώμα, κατάλληλο για την ανάπτυξη πολλών διαφορετικών τύπων μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένων βακτηρίων, ζυμομυκήτων και νηματοειδών μυκήτων και πολλών τύπων παθογόνων).

5.3.3 Ανίχνευση οξυγαλακτικών βακτηρίων

Η ανίχνευση οξυγαλακτικών βακτηρίων στα δείγματα κοπράνων πραγματοποιήθηκε σε αναερόβιες συνθήκες. Χρησιμοποιήθηκε υπόστρωμα MRS.

5.3.4 Ανίχνευση Μπιφιδοβακτηρίων

Η ανίχνευση των μπιφιδοβακτηρίων (*Bifidobacterium* spp.) πραγματοποιήθηκε με εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα TOS.



Εικόνα 11: Ανάπτυξη Bifidobacterium σε υπόστρωμα TOS δείγματος M3 (με κόπρανα από άτομο με νόσο Crohn)
Πηγή: Προσωπικό αρχείο

5.3.5 Τεχνική Ενσωμάτωσης

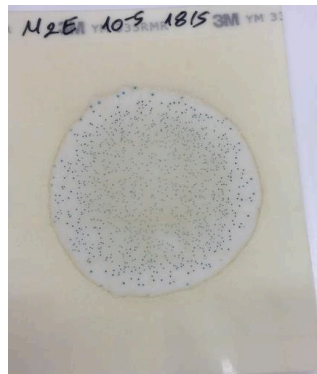
Και στις 3 περιπτώσεις ανίχνευσης των παραπάνω μικροοργανισμών χρησιμοποιήθηκε ως μέθοδος εμβολιασμού η τεχνική της ενσωμάτωσης. 1ml αραιωμένου δείγματος τοποθετήθηκε σε άδειο τρυβλίο και στη συνέχεια προστέθηκε τηγμένο το επιλεγμένο υπόστρωμα. Στη συνέχεια έγινε ομογενοποίηση του υποστρώματος με το δείγμα και ακολούθησε επώαση. Συγκεκριμένα οι συνθήκες επώασης ήταν:

- Για την ανάπτυξη της OMX ήταν 37°C σε αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες για 24 ώρες
- Για την ανάπτυξη των οξυγαλακτικών ήταν 37°C σε αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες για 48 ώρες.
- Για την ανάπτυξη των μπιφιδοβακτηρίων ήταν 37°C σε αναερόβιες συνθήκες για 48 ώρες.

5.3.6 Έλεγχος ζυμών/μυκήτων σε Petrifilm

Σε μια επίπεδη επιφάνεια τοποθετούμε το Petrifilm και ανασηκώνεται η ημιδιαφανής ταινία ώστε να τοποθετηθεί με μια πιπέτα 1 mL δείγματος στο κυκλικό κέντρο της κάτω ταινίας. Στη συνέχεια η ανασηκωμένη ταινία αφήνεται για να ακουμπήσει την επιφάνεια της κάτω ταινίας και να απλωθεί το δείγμα. Με την βοήθεια διαστολέα ασκήθηκε πίεση στο κέντρο του Petrifilm, ώστε το δείγμα να απλωθεί

ομοιόμορφα στην κυκλική επιφάνεια. Τέλος τα δείγματα επωάστηκαν για 2-4 ημέρες στους 25°C.



Εικόνα 12: Ανάπτυξη ζυμών και μυκήτων του δείγματος M2E (μόνο γαστρικό υγρό και pink powder) στο τέλος της όψιμης εντερικής ζύμωσης (24h) σε petrifilm
Πηγή: Προσωπικό αρχείο

5.4 Εκχύλισμα φυτικής προέλευσης

Πρόκειται για ένα στιγμιαίο ρόφημα από εκχυλίσματα βοτάνων και τσάι του βουνού εμπλουτισμένου με προβιοτικές καλλιέργειες. Το εκχύλισμα ονομάστηκε «pink powder» λόγω του χρώματος του (εικόνα).



Εικόνα 13: Εκχύλισμα “pink powder” ενισχυμένο με προβιοτικές καλλιέργειες
Πηγή: Προσωπικό αρχείο

5.4.1 Υλικά

1. Τσάι του βουνού (*Sideritis scardica*) (αποξηραμένο)

2. Γαρύφαλλο (*Syzygium aromaticum*) (αποξηραμένο)
3. Ιβίσκος (*Hibiscus sabdariffa*) (αποξηραμένο)
4. Προβιοτικές καλλιέργειες

Λαμβάνεται έτοιμο εκχύλισμα τριών βοτάνων (τσάι του βουνού, γαρύφαλλο και ιβίσκος), εμπλουτισμένο με προβιοτικές καλλιέργειες.

Το εκχύλισμα δημιουργήθηκε με ψυχρή εκχύλιση. Τα βότανα αναμίχθηκαν με κατάλληλη και συγκεκριμένη αναλογία. Οι προβιοτικές καλλιέργειες προετοιμάστηκαν στο εργαστήριο Μικροβιολογίας με ανακαλλιέργεια λυοφιλιωμένης σκόνης βακτηρίων γαλακτικού οξέως που χρησιμοποιείται σαν εμπορικό μείγμα για την παρασκευή γιαούρτης. Η ενσωμάτωση των προβιοτικών στο εκχύλισμα των βοτάνων έγινε με μικροενθυλάκωση χρησιμοποιώντας την τεχνική της ξήρανσης με ψεκασμό. Ο παράγοντας εγκλεισμού που χρησιμοποιήθηκε ήταν η μαλτοδεξτρίνη και συγκεκριμένα έγινε χρήση μαλτοδεξτρίνης 12 και 21 DE (ισοδύναμα δεξτρόζης) (Πολυβακίδη, 2022).

5.5 Πειραματική διαδικασία προσομοίωσης γαστρεντερικού συστήματος

5.5.1 Παρασκευή συνθετικού γαστρικού και εντερικού υγρού

Υλικά

- Γλυκόζη: 0,4 g
- Εκχύλισμα Μαγιάς: 3,0 g
- Πεπτόνη από κρέας: 1,0g
- Βλεννίνη από στομάχι χοίρων: 4,0g
- NaCl: 0,08 g
- NaHCO₃: 0,4g
- K₂HPO₄ : 0,04 g
- KH₂PO₄: 0,04 g
- CaCl₂ 2H₂O ?
- MgSO₄ 7H₂O: 0,008 g
- Xylan: 1,0 g
- Διαλυτό άμυλο: 3,0g
- Πηκτίνη: 2,0g

- Tween 80: 1,0 ml

Τα παραπάνω υλικά χρησιμοποιούνται για την παρασκευή 1L συνθετικού γαστρικού υγρού. Αφού πραγματοποιηθεί αρχικά η ανάμειξη και η ομογενοποίηση του μίγματος στη συνέχεια ρυθμίζεται το pH σε τιμή ίση με 2,00 με τη βοήθεια πυκνού διαλύματος HCl (12 N). Ακολουθεί διαδικασία αποστείρωσης για 15 min στους 121°C και στη συνέχεια προστίθενται δύο θερμοευαίσθητα συστατικά:

- Κυστεΐνη :0,5g
- Πεψίνη :3,0 g

Και το διάλυμα αφήνεται για επώαση στους 37°C.

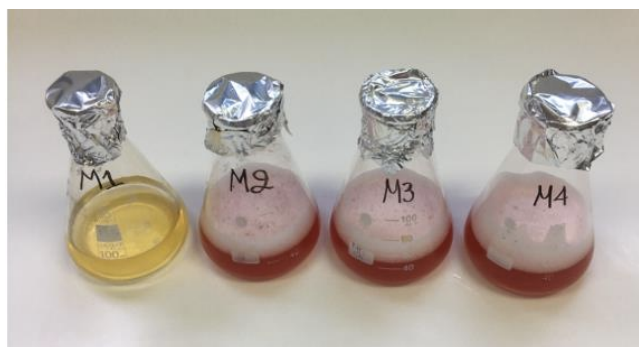
Ακολουθεί η παρασκευή συνθετικού εντερικού υγρού από το γαστρικό υγρό.

Πραγματοποιείται αύξηση του pH στο 8 με τη βοήθεια διαλύματος NaOH (5N) και προσθήκη παγκρεατίνης σε αναλογία 0,1% w/w και εκχύλισμα χολής χοίρων σε αναλογία 0,3% w/w.

5.5.2 Δοκιμή με εκχύλισμα και ανθρώπινο μικροβίωμα

Τα δείγματα που μελετήθηκαν, είναι:

- M₁: 50,03 ml γαστρικού υγρού (GF)
- M₂: 0,50 g pink power + 10 ml H₂O + 40,09 ml γαστρικού υγρού (GF)
- M₃: 0,51 g pink power + 10 ml H₂O + 40,01 ml γαστρικού υγρού (GF) + κόπρανα 1
- M₄: 0,51 g pink power + 10 ml H₂O + 40,03 ml γαστρικού υγρού (GF) + κόπρανα 2



Εικόνα 14: Κωνικές φιάλες που περιέχουν τα δείγματα M₁, M₂, M₃ και M₄

Πηγή: Προσωπικό αρχείο

Το δείγμα κοπράνων 1, ανήκει σε άτομο που πάσχει από νόσο του Crohn, ενώ το δείγμα κοπράνων 2 ανήκει σε άτομο υγιές. Τα δείγματα τοποθετούνται σε σακούλες stomacher και μεταφέρονται σε BagMixer για 120 s.

Η πειραματική διαδικασία διακρίνεται σε 5 στάδια:

Στάδιο A: Αρχικό στάδιο (t=0h)

Παρασκευή διαλυμάτων $M_{1(A)}$, $M_{2(A)}$, $M_{3(A)}$, $M_{4(A)}$

$M_{1(A)}$: 50,03 ml γαστρικού υγρού (GF)

$M_{2(A)}$: 0,50 g pink power + 10 ml H_2O + 40,09 ml γαστρικού υγρού (GF)

$M_{3(A)}$: 0,51 g pink power + 10 ml H_2O + 40,01 ml γαστρικού υγρού (GF)

$M_{4(A)}$: 0,51 g pink power + 10 ml H_2O + 40,03 ml γαστρικού υγρού (GF)

Αρχικά, 1,5 ml από κάθε δείγμα μεταφέρεται σε σωλήνες φυγοκέντρησης erpendorf (3 σωλήνες erpendorf για κάθε δείγμα). Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 3.000 rpm για 1 min. Συλλέγεται το υπερκείμενο υγρό σε άδειους σωλήνες erpendorf, οι οποίοι οδηγούνται στο ψυγείο για αποθήκευση.

Τα δείγματα $M_{1(A)}$, $M_{2(A)}$, $M_{3(A)}$, $M_{4(A)}$ οδηγούνται για επώαση στους 37°C για 1,5 h υπό ανάδευση (200 speed)

Στάδιο B: Γαστρική φάση (GF) (t=1,5h)

Στο τέλος του χρόνου επώασης, 1,5 ml από κάθε δείγμα μεταφέρεται σε σωλήνες φυγοκέντρησης erpendorf (3 σωλήνες erpendorf για κάθε δείγμα). Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 3.000 rpm για 1 min. Συλλέγεται το υπερκείμενο υγρό σε άδειους σωλήνες erpendorf.

Το pH των δειγμάτων $M_{1(A)}$, $M_{2(A)}$, $M_{3(A)}$, $M_{4(A)}$ ρυθμίζεται σε τιμή ίση με 8,00, με τη βοήθεια διαλύματος NaOH 1N και προστίθενται χολικά άλατα σε περιεκτικότητα 0,3% w/w (περίπου 0,12 g σε κάθε δείγμα). Επίσης, προστίθεται παγκρεατίνη περίπου 0,2g στα 50 ml δείγμα (εντερικό υγρό). Για την ακρίβεια, η τιμή του pH διαμορφώθηκε ως εξής:

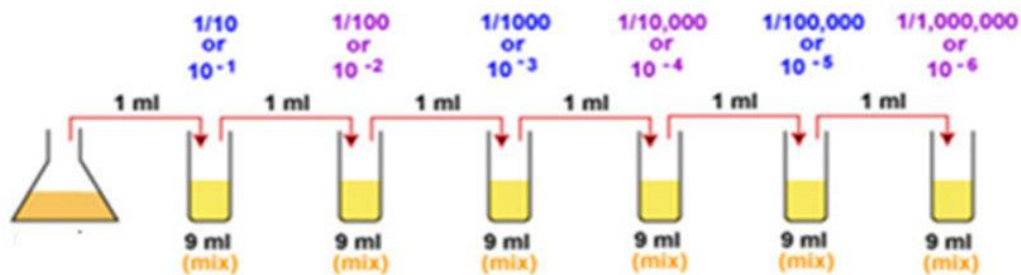
- $M_{1(B)}$: pH= 8,06
- $M_{2(B)}$: pH= 7,98
- $M_{3(B)}$: pH= 8,00
- $M_{4(B)}$: pH= 8,05

Ακολουθεί επώαση στους 37°C για 2 h υπό ανάδευση.

Στάδιο Γ: Εντερική φάση (EF) (t=2h)

Στο τέλος του χρόνου επώασης, 1,5 ml από καθένα από τα M_{1 (B)}, M_{2 (B)}, M_{3 (B)}, M_{4 (B)}, μεταφέρεται σε σωλήνες φυγοκέντρησης errendorf (3 σωλήνες errendorf για κάθε δείγμα). Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 3.000 rpm για 1 min. Συλλέγεται το υπερκείμενο υγρό σε άδειους σωλήνες errendorf

Συλλέγεται 1 ml από τα M_{2 (B)}, M_{3 (B)}, M_{4 (B)}, και πραγματοποιούνται για καθένα διαδοχικές αραιώσεις της τάξης 10⁻¹ έως 10⁻⁶, όπως φαίνεται στην εικόνα.



Εικόνα 15: Σχηματική αναπαράσταση διαδοχικών αραιώσεων ως 10⁻⁶ αραιώση

Πηγή: Aladlogo, 2023

Στο σημείο αυτό, προστίθενται τα δείγματα κοπράνων, (στο M_{3 (B)} το δείγμα κοπράνων 1 και στο M_{4 (B)} το δείγμα κοπράνων 2) σε ποσοστό 1% (δηλαδή περίπου 0,2 gr κόπρανα ανά 20 ml) κάτω από ασηπτικές συνθήκες.

Πραγματοποιούνται εμβολιασμός σε κατάλληλα υποστρώματα, σύμφωνα με τον πίνακα.

Πίνακας 6: Προετοιμασία δειγμάτων προς επώαση (Στάδιο Γ)

Ποσότητα δείγματος	Υπόστρωμα	Συνθήκες
1 ml	BHI άγαρ	Αναερόβιες
1 ml	BHI άγαρ	Αερόβιες
1 ml	Petrifilm (2/M)	
1 ml	MRS	Αναερόβιες
1 ml	TOS	Αναερόβιες

Τα δείγματα αφήνονται για επώαση στους 37°C για 4 h υπό ανάδευση.

Στάδιο Δ: Στάδιο πρώιμης εντερικής ζύμωσης (Early fermentation) (t=4h)

Στο τέλος του χρόνου επώασης, δείγμα μεταφέρεται για αποθήκευση. Δηλαδή, 1,5 ml από καθένα από τα M₁, M₂, M₃, M₄, μεταφέρεται σε σωλήνες φυγοκέντρησης errendorf (3 σωλήνες errendorf για κάθε δείγμα). Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 3.000 rpm για 1 min. Συλλέγεται το υπερκείμενο υγρό σε άδειους σωλήνες errendorf.

Υπό ασηπτικές συνθήκες, λαμβάνονται 1 ml από τα M₂, M₃, M₄, τα οποία αραιώνονται ως τελικές αραιώσεις τάξης 10⁻⁵. Οι αραιώσεις 10⁻³, 10⁻⁴ και 10⁻⁵ του κάθε δείγματος χρησιμοποιούνται για εμβολιασμό σε διάφορα υποστρώματα. Για παράδειγμα στον πίνακα διακρίνεται η διαδικασία που ακολουθήθηκε για το M₂ δείγμα για την αραιώση 10⁻³.

Πίνακας 7: Για το δείγμα M₂ και αραιώση 10⁻³ (Στάδιο Δ)

Ποσότητα δείγματος	Υπόστρωμα	Συνθήκες
1 ml	BHI άγαρ	Αναερόβιες
1 ml	BHI άγαρ	Αερόβιες
1 ml	Petrifilm (Z/M)	
1 ml	MRS	Αναερόβιες
1 ml	TOS	Αναερόβιες

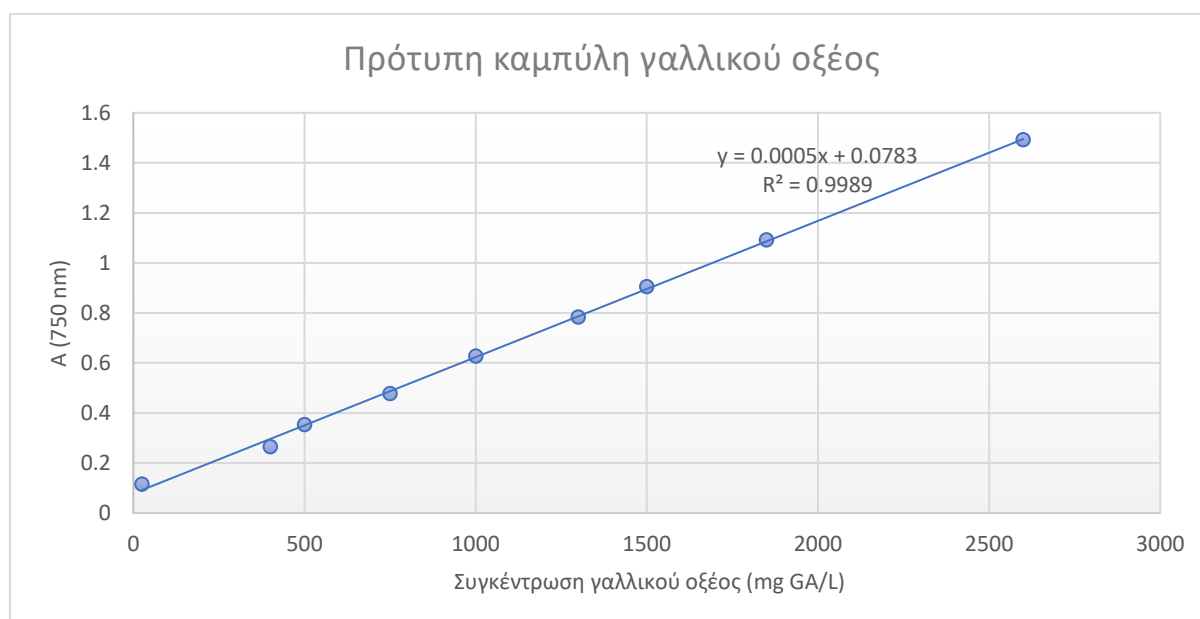
Στάδιο Ε: Στάδιο όψιμης εντερικής ζύμωσης (t=18h)

Πραγματοποιείται μετά την επώαση φυγοκέντρηση για τα δείγματα M₂, M₃, M₄, σε σωλήνες φυγοκέντρησης errendorf (3 σωλήνες errendorf για κάθε δείγμα).

6.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

6.1 Ολικό φαινολικό περιεχόμενο

Στο διάγραμμα απεικονίζεται η πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος, η οποία θα χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό του ολικού φαινολικού περιεχομένου των δειγμάτων με τη βοήθεια της δοκιμής Folin-Ciocalteu.



Διάγραμμα 2: Πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος

Η εξίσωση της καμπύλης είναι $y=0,0005x + 0,0783$, όπου:

y = απορρόφηση (A) στα 750 nm και x = συγκέντρωση γαλλικού οξέος σε mg GA/L

Η πρότυπη καμπύλη παρουσιάζει συντελεστή προσδιορισμού $R^2=0,9989$, τιμή η οποία προσεγγίζει την τιμή 1, γεγονός που δείχνει ότι η απορρόφηση και η συγκέντρωση του γαλλικού οξέος παρουσιάζουν μία πολύ καλή γραμμική σχέση εξάρτησης.

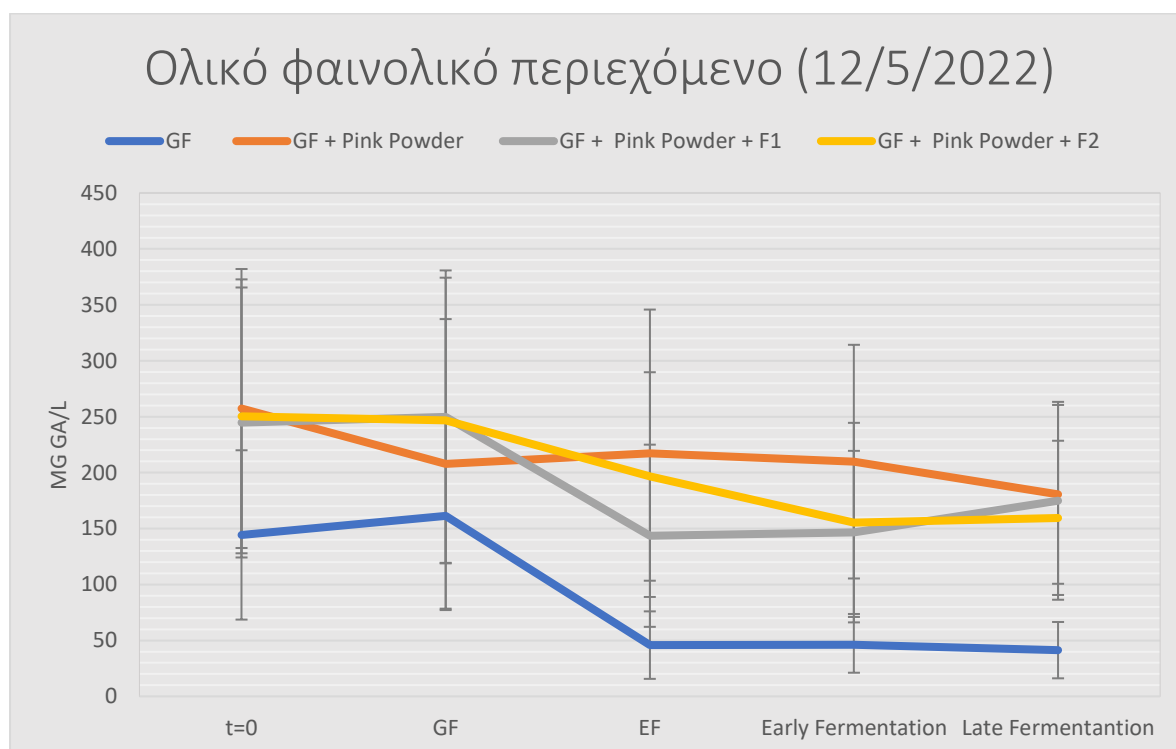
Για τους υπολογισμούς των συγκεντρώσεων του ολικού φαινολικού περιεχομένου των δειγμάτων η εξίσωση της πρότυπης καμπύλης του γαλλικού οξέος επιλύεται ως προς x , δηλαδή:

$$x = \frac{y - 0,0783}{0,0005}$$

6.3 Μετρήσεις ολικού φαινολικού περιεχομένου

Για τον προσδιορισμό του ολικού φαινολικού περιεχομένου πραγματοποιήθηκαν δύο αναλύσεις, μία στις 12/5/2022 και μία στις 19/5/2022.

Στο διάγραμμα 3, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της δοκιμής Folin-Ciocalteu για τα δείγματα M₁ (GF), M₂ (GF+ Pink Powder), M₃ (GF+Pink Powder+F₁) και M₄ (GF+Pink Powder+ F₂) για τις 12/5/2022.

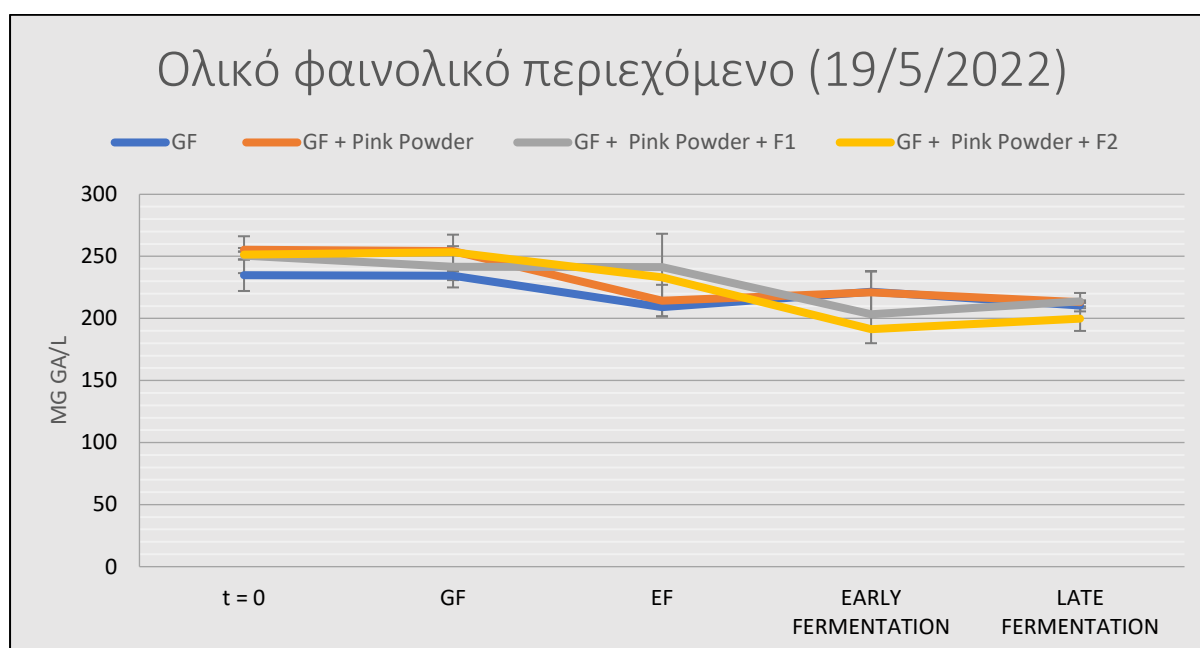


Διάγραμμα 3: Ολικό φαινολικών περιεχόμενο δειγμάτων εκφρασμένο σε mg GA/L (α'δοκιμή: 19/5/2022) κατά τη χρονική διάρκεια 5 φάσεων: αρχική φάση (t=0), γαστρική φάση (GF=1,5h), εντερική φάση (EF=2h), πρώιμη εντερική ζύμωση (early fermentation=4h) και όψιμης εντερικής ζύμωσης (late fermentation=18h).

Από το διάγραμμα της πρώτης ανάλυσης των δειγμάτων, παρατηρείται ότι το γαστρικό υγρό παρουσιάζει χαμηλότερη συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων συγκριτικά με τα υπόλοιπα δείγματα σε όλα τα στάδια της πειραματικής διαδικασίας. Η προσθήκη της pink powder (δείγμα M₂) οδηγεί σε αύξηση του φαινολικού περιεχομένου αρχικά, το οποίο όμως στα υπόλοιπα στάδια μειώνεται και σχεδόν σταθεροποιείται. Η αρχική αύξηση των φαινολικών συστατικών αποτελεί σαφή ένδειξη της περιεκτικότητας των φαινολών στο pink powder, γεγονός που ίσως να δείχνει

υψηλή αντιοξειδωτική δράση. Τα M₃ (GF+Pink Powder+F₁) και M₄ (GF+Pink Powder+F₂) παρουσιάζουν μείωση των φαινολικών ενώσεων σε όλα τα επόμενα στάδια με εξαίρεση το 5^ο στάδιο. Στην τελική φάση δεν παρατηρείται σημαντική διαφορά μεταξύ των δειγμάτων M₃ και M₄.

Στο διάγραμμα 4, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της δοκιμής Folin-Ciocalteu για τα δείγματα M₁ (GF), M₂ (GF+ Pink Powder), M₃ (GF+Pink Powder+F₁) και M₄ (GF+Pink Powder+ F₂) για τις 19/5/2022.



Διάγραμμα 4: Ολικό φαινολικών περιεχόμενο δειγμάτων εκφρασμένο σε mg GA/L (β'δοκιμή:19/5/2022) κατά τη χρονική διάρκεια 5 φάσεων: αρχική φάση (t=0), γαστρική φάση (GF=1,5h), εντερική φάση (EF=2h), πρώιμη εντερική ζύμωση (early fermentation=4h) και όψιμη εντερικής ζύμωσης (late fermentation=18h).

Παρατηρείται ότι όλα τα δείγματα παρουσιάζουν παρόμοια συγκέντρωση φαινολικών συστατικών, η οποία εξελίσσεται με παρόμοιο τρόπο από το ένα στάδιο στο άλλο. Δεν υπάρχει σαφή διαφοροποίηση κάποιου δείγματος.

6.4 Μετρήσεις μικροοργανισμών

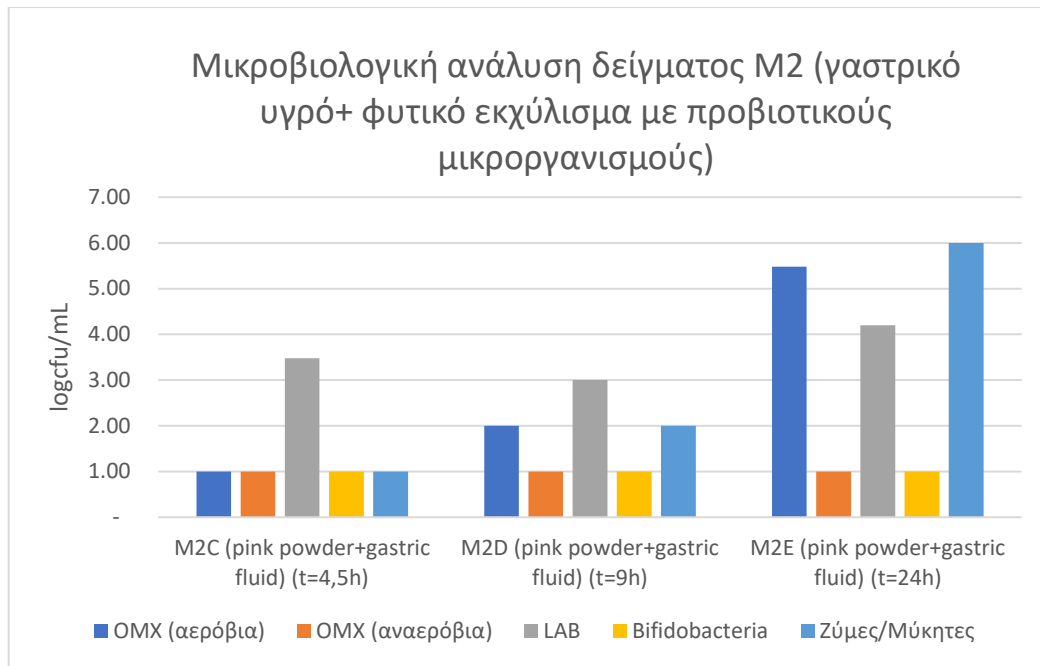
Στον πίνακα 8, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μικροβιακών αναλύσεων, των αρχικών δειγμάτων κοπράνων, όπως παρατηρήθηκαν και μετρήθηκαν στα διάφορα υποστρώματα.

Πίνακας 8: Αποτελέσματα μικροβιακών αναλύσεων για τα δείγματα κοπράνων (cfu/g)

ΔΕΙΓΜΑΤΑ	Μεσόφιλα βακτήρια (σε BHI AGAR)		Βακτήρια Γαλακτικού οξέος (σε MRS άγαρ)	Bifidobacteria (σε TOS άγαρ)	Petrifilms Z/M
	ΑΕΡΟΒΙΕΣ	ΑΝΑΕΡΟΒΙΕΣ	ΑΝΑΕΡΟΒΙΕΣ	ΑΝΑΕΡΟΒΙΕΣ	ΑΕΡΟΒΙΕΣ
F1 (Feces Crohn's Disease) - Στάδιο C	$9,5 \cdot 10^4$	10^6	$5 \cdot 10^4$	10^3	10^3
F2 (Feces Healthy) - Στάδιο C	$6,8 \cdot 10^5$	$1,7 \cdot 10^4$	$8,5 \cdot 10^4$	10^3	10^5

Στις καλλιέργειες κοπράνων, παρατηρείται παρουσία μεσόφιλων μικροοργανισμών είτε σε αερόβιες είτε σε αναερόβιες συνθήκες και για το δείγμα του υγιούς (F2) και για το δείγμα του ασθενούς (F1). Ομοίως παρατηρείται ανάπτυξη οξυγαλακτικών βακτηρίων και Bifidobacterium, σε αναερόβιες συνθήκες, καθώς και ανάπτυξη ζυμών και μυκήτων σε αερόβιο περιβάλλον.

Μετρήθηκε και το μικροβιακό φορτίο του δείγματος M2 που περιείχε μόνο το γαστρικό υγρό και το φυτικό εκχύλισμα με τους προβιοτικούς μικροοργανισμούς χωρίς την προσθήκη κοπράνων και αποτελούσε ένα δείγμα ελέγχου (control). Στο διάγραμμα 5, φαίνονται οι πληθυσμοί διαφόρων κατηγοριών μικροοργανισμών του δείγματος M2.

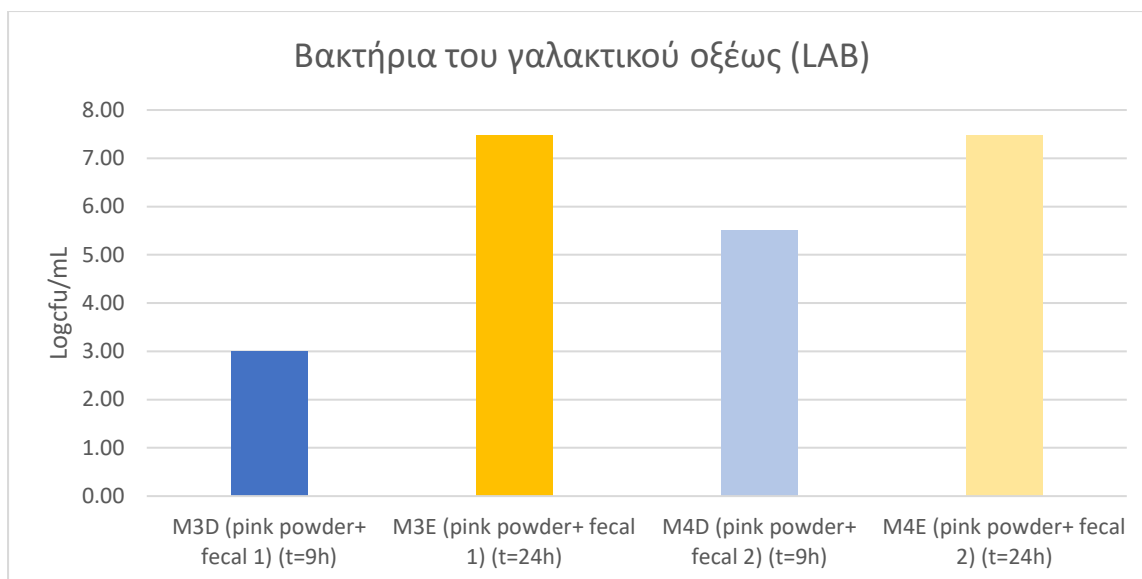


Διάγραμμα 5: Αποτελέσματα OMX σε αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες, βακτηρίων γαλακτικού οξέως, *bifidobacteria* και ζυμών/μυκήτων του δείγματος M2 (γαστρικό υγρό και φυτικό εκχύλισμα με προβιοτικού μικροοργανισμούς) στο τέλος της εντερικής φάσης (4,5h) στο τέλος της πρώιμης εντερικής ζύμωσης (9h) και στο τέλος της όψιμης εντερικής ζύμωσης (24h). Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε LogCFU/mL

Στα διαγράμματα που ακολουθούν, αναφέρονται οι μικροβιολογικές μετρήσεις στο δείγμα M3 που περιείχε το γαστρικό υγρό, το φυτικό εκχύλισμα σε μορφή σκόνης (pink powder) και ποσότητα από ανθρώπινα κόπρανα ασθενούς με νόσο του Crohn (F1) και στο δείγμα M4 που περιείχε το γαστρικό υγρό, το φυτικό εκχύλισμα σε μορφή σκόνης (pink powder) και ποσότητα από ανθρώπινα κόπρανα υγιούς δότη (F2) σε δύο από τις φάσεις του συστήματος γαστρεντερικής προσομοίωσης, στο τέλος της πρώιμης εντερικής ζύμωσης (9h) και στο τέλος της όψιμης εντερικής ζύμωσης (24h).

Οξυγαλακτικά βακτήρια.

Στον διάγραμμα 6, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για την ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε υπόστρωμα MRS σε αναερόβιες συνθήκες

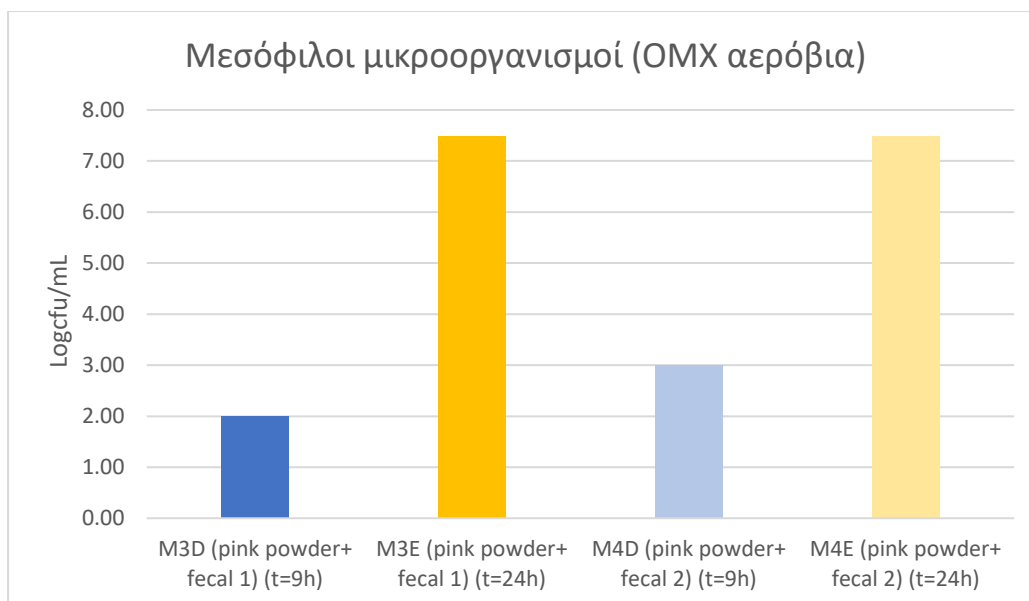


Διάγραμμα 6: Αποτελέσματα ανάπτυξης οξυγαλακτικών βακτηρίων σε υπόστρωμα MRS σε αναερόβιες συνθήκες των δειγμάτων M3 (με κόπρανα από άτομο με νόσο Crohn) και M4 (με κόπρανα από υγιή δότη), στο τέλος της πρώιμης εντερικής ζύμωσης (9h) και στο τέλος της όψιμης εντερικής ζύμωσης (24h). Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε LogCFU/mL

Παρατηρείται αρχικά μεγαλύτερος πληθυσμός οξυγαλακτικών βακτηρίων στο δείγμα κοπράνων του υγιούς από ότι στο δείγμα του ασθενούς. Ωστόσο, αναπτύσσονται οξυγαλακτικά βακτήρια σε όμοιους πληθυσμούς και στα δύο δείγματα κοπράνων στις καλλιέργειες του τελευταίου σταδίου.

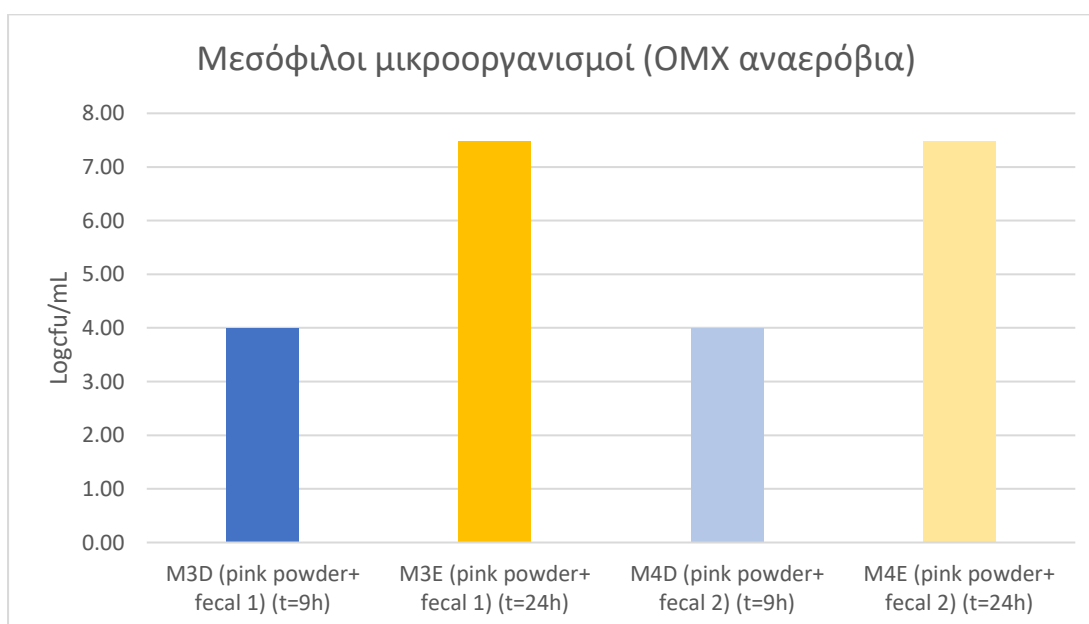
O.M.X.

Στον διάγραμμα 7, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ανάπτυξης μεσόφιλων μικροοργανισμών (O.M.X.) σε υπόστρωμα BHI agar σε αερόβιες συνθήκες. Παρατηρείται ελαφρά μεγαλύτερο πληθυσμός O.M.X. στο δείγμα του υγιούς στο τέλος της πρώιμης εντερικής ζύμωσης από ότι στο δείγμα κοπράνων του ασθενούς ατόμου, αλλά ο πληθυσμός εξισορροπείται στο τέλος της όψιμης εντερικής ζύμωσης.



Διάγραμμα 7: Αποτελέσματα ανάπτυξης Ο.Μ.Χ. σε BHI agar σε αερόβιες συνθήκες των δειγμάτων M3 (με κόπρανα από άτομο με νόσο Crohn) και M4 (με κόπρανα από υγιή δότη), στο τέλος της πρώιμης εντερικής ζύμωσης (9h) και στο τέλος της όψιμης εντερικής ζύμωσης (24h). Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε LogCFU/ml.

Στο διάγραμμα 8, είναι τα αποτελέσματα της μικροβιακής ανάπτυξης των Ο.Μ.Χ. σε υπόστρωμα BHI agar σε αναερόβιες συνθήκες. Αναπτύσσονται μικροοργανισμοί Ο.Μ.Χ. τόσο στο δείγμα με τα κόπρανα του υγιούς όσο και στο δείγμα με τα κόπρανα του ασθενούς ατόμου.

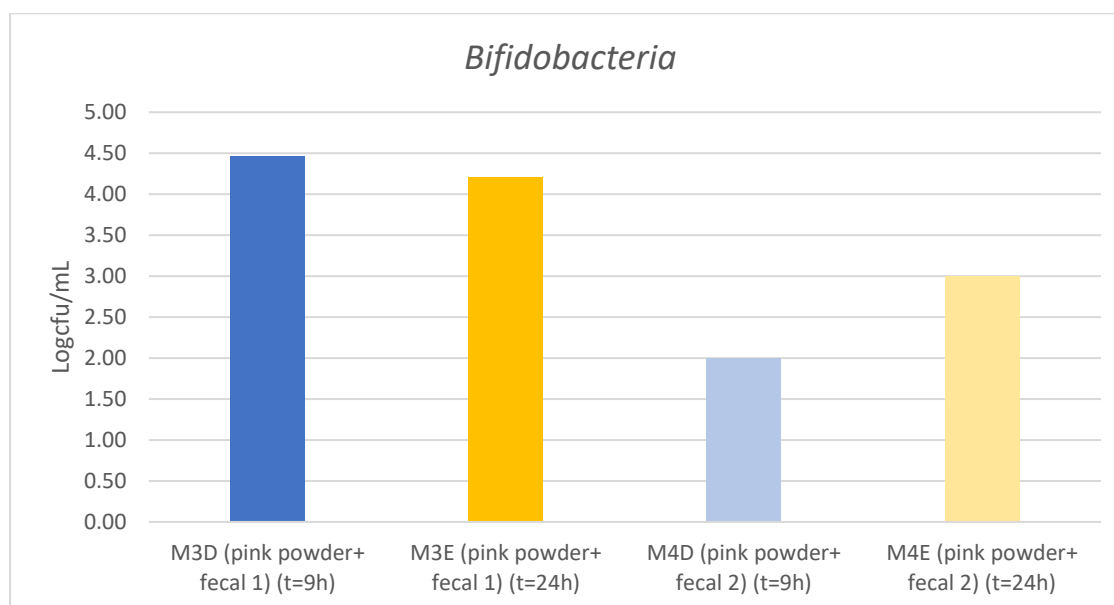


Διάγραμμα 8: Αποτελέσματα ανάπτυξης Ο.Μ.Χ. σε BHI agar σε αναερόβιες συνθήκες των δειγμάτων M3 (με κόπρανα από άτομο με νόσο Crohn) και M4 (με κόπρανα από υγιή δότη), στο τέλος της πρώιμης

εντερικής ζύμωσης (9h) και στο τέλος της όψιμης εντερικής ζύμωσης (24h). Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε LogCFU/mL.

Bifidobacterium

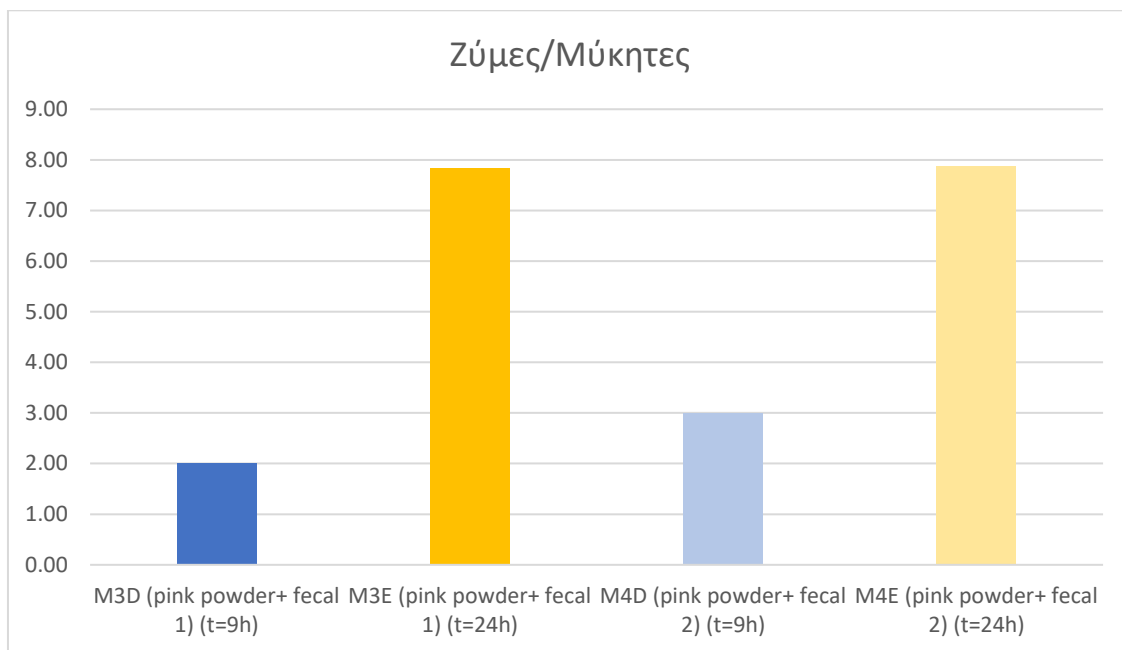
Στο διάγραμμα 9, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ανάπτυξης των *Bifidobacterium*. Η καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε σε υπόστρωμα TOS και σε αναερόβιες συνθήκες. Το δείγμα με τα κόπρανα του υγιούς ατόμου παρουσιάζει ανάπτυξη με μικρότερο πληθυσμό κατά 0,5 λογαριθμικούς κύκλους σε σχέση με το δείγμα του ασθενούς, όμως ο πληθυσμός στο δείγμα του ασθενούς μειώνεται αισθητά κατά 2,5 λογαριθμικούς κύκλους.



Διάγραμμα 9: Αποτελέσματα ανάπτυξης *Bifidobacterium* σε υπόστρωμα TOS σε αναερόβιες συνθήκες των δειγμάτων M3 (με κόπρανα από άτομο με νόσο Crohn) και M4 (με κόπρανα από υγιή δότη), στο τέλος της πρώιμης εντερικής ζύμωσης (9h) και στο τέλος της όψιμης εντερικής ζύμωσης (24h). Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε LogCFU/mL.

Ζύμες και μύκητες

Στο διάγραμμα 10, φαίνονται τα αποτελέσματα ανάπτυξης μυκήτων και ζυμών σε petrifilm σε αερόβιες συνθήκες. Το δείγμα του υγιούς και του ασθενούς ατόμου δεν διαφέρουν σημαντικά ως προς το φορτίο των συγκεκριμένων μικροοργανισμών και επίσης και στα δύο δείγματα παρατηρείται μεγάλη αύξηση του πληθυσμού στο τέλος της όψιμης εντερικής ζύμωσης.



Διάγραμμα 10: Αποτελέσματα ανάπτυξης μυκήτων και ζυμών σε petrifilm σε αερόβιες συνθήκες των δειγμάτων M3 (με κόπρανα από άτομο με νόσο Crohn) και M4 (με κόπρανα από υγιή δότη), στο τέλος της πρώιμης εντερικής ζύμωσης (9h) και στο τέλος της όψιμης εντερικής ζύμωσης (24h). Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε LogCFU/ml.

7.ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα πειραματική διαδικασία, για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης του ανθρώπινου μικροβιώματος με τα τρόφιμα, χρησιμοποιήθηκε ένα εκχύλισμα ιβίσκου, γαρύφαλλου και τσαγιού του βουνού στο οποίο είχε γίνει προσθήκη προβιοτικών. Επιλέχθηκαν αυτά τα τρία αρωματικά βότανα, καθώς σύμφωνα με την βιβλιογραφία, είναι φυτά πλούσια σε βιοδραστικές ενώσεις, όπως πολυφαινόλες, φλαβονοειδή, ανθοκυάνες, τερπένια, γλυκοσίδες (Da-Costa-Rocha et al., 2014; Cortes-Rojas et al., 2014; Jirovetz et al., 2006; Stefanaki & Van Andel, 2021). Επίσης, πρόκειται για τρία φυτά που παραδοσιακά θεωρείται ότι έχουν θεραπευτική δράση και έχουν χρησιμοποιηθεί λόγω:

- Της αντιμικροβιακής τους δράσης: ιβίσκος (Shazly et al., 2018), γαρύφαλλο (Cortes-Rojas et al., 2014)
- Της κυτταροτοξικής τους δράσης: ιβίσκος (Shazly et al., 2018)
- Της αντιφλεγμονώδους ικανότητας : τσάι βουνού (Ahmed & Sheir, 2021)
- Για την αντιμετώπιση ασθενειών εντέρου : τσάι βουνού (Yeom et al., 2022; Islam et al., 2023; Tadir et al., 2012)

Οπότε, η αξιολόγηση της επίδρασης του στη χλωρίδα του εντέρου παρουσιάζει ενδιαφέρον, καθώς εμπειρικά έχουν συσχετίσει με την εύρυθμη λειτουργία του εντέρου.

Η επιλογή των προβιοτικών καλλιεργειών ενισχύει θεωρητικά τον βιοέλεγχο που το φυτικό εκχύλισμα μπορεί να ασκήσει στο έντερο. Οι προβιοτικοί οργανισμοί μπορούν να δράσουν προς όφελος της ωφέλιμης μικροχλωρίδας του οργανισμού (Wieers et al., 2020).

Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης πειραματικής διαδικασίας δείχνουν ότι αν και το εκχύλισμα του ιβίσκου, του γαρύφαλλου και του τσαγιού ενισχυμένο με τα προβιοτικά, παρουσιάζουν σημαντικό πολυφαινολικό περιεχόμενο, η αντιοξειδωτική δράση τους είναι περιορισμένη.

Το μικροβίωμα του ασθενούς με νόσο Crohn's και του υγιούς ατόμου δεν παρουσιάζει σημαντικές διαφορές κατά τον έλεγχο της ανάπτυξης των μικροοργανισμών. Αναπτύχθηκαν ιδιαίτερα κατά το τέλος της όψιμης εντερικής ζύμωσης μεσόφιλοι μικροοργανισμοί τόσο σε αερόβιο όσο και σε αναερόβιο

περιβάλλον σε όμοιους πληθυσμούς, όπως και ζύμες και μύκητες σε αερόβιες συνθήκες. Η ανάπτυξη των *Bifidobacterium* παρουσίασε διαφορά μεταξύ του δείγματος με τα κόπρανα του υγιούς ατόμου και του δείγματος με τα κόπρανα του ασθενούς. Το πρώτο δείγμα παρουσίασε αισθητά μεγαλύτερη ανάπτυξη *Bifidobacterium*.

Θα ήταν χρήσιμο να επαναληφθεί η διαδικασία και να διερευνηθούν τα αποτελέσματα περαιτέρω. Τα προβιοτικά σε συνδυασμό με φυτικά εκχυλίσματα μπορεί να αποτελέσουν ένα αποτελεσματικό παράγοντα ενίσχυσης της ωφέλιμης μικροχλωρίδας του γαστρεντερικού σωλήνα, άρα να δράσουν ευεργετικά στον ανθρώπινο οργανισμό. Το είδος των προβιοτικών μικροοργανισμών και τα φυτικά εκχυλίσματα που θα χρησιμοποιηθούν, όπως και η αναλογία τους αποτελεί πιθανό αντικείμενο έρευνας. Τέλος, θα ήταν χρήσιμο να πραγματοποιηθεί κλινική έρευνα, ώστε να ελεγχθούν με μεγαλύτερη ακρίβεια οι αλληλεπιδράσεις ανθρώπινου μικροβιώματος και διατροφής.

Βιβλιογραφία

1. **Abdallah, I.I. & Quax, W.J.** (2017). A Glimpse into the Biosynthesis of Terpenoids. *KnE Life Sciences*, 2017 (5): 81-98: https://www.researchgate.net/publication/319645034_A_Glimpse_into_the_Biosynthesis_of_Terpenoids
2. **Ahmed, R.A. & Sheir, M.A.** (2021). A Comparative Study on the Ameliorative Effects of Aqueous Extract of Two Varieties of Hibiscus on the Intestinal Epithelial Barrier in Bowel Inflammation. *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences*, 13 (1): 183-216: https://eajbsz.journals.ekb.eg/article_173200_39f4d606a771af20c2026dc8da01ffc2.pdf
3. **Aladlogo, M.B.M.** (2023). Evaluation of the Total Aflatoxin Level in Certain Cereals and Legumes Highly Consumed in Mali. *European Modern Studies Journal*, 7 (3): 357-367: https://www.researchgate.net/publication/372948245_Evaluation_of_the_Total_Aflatoxin_Level_in_Certain_Cereals_and_Legumes_Highly_Consumed_in_Mali
4. **Alobaedi, O.H., Talib, W.H., Basheti, I.A.** (2017). Antitumor effect of thymoquinone combined with resveratrol on mice transplanted with breast cancer. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 10 (4): 400-408: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1995764517305813>
5. **Amitay, E.L., Krilaviciute, A., Brenner, H.** (2018). Systematic review: Gut microbiota in fecal samples and detection of colorectal neoplasms. *Gut microbes*, 9 (4): 293-307: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/19490976.2018.1445957>
6. **Beltran-Debon, R., Alonso-Villaverde, C., Aragones, G., Rodriguez-Medina, I., Rull, A., Micol, V., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A., Camps, J., Joven, J.** (2010). The aqueous extract of Hibiscus sabdariffa calices modulates the production of monocyte chemoattractant protein-1 in humans. *Phytomedicine*, 17 (3-4): 186-191: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0944711309002037>
7. **Bernhoff, A.** (2010). A brief review on bioactive compounds in plants. In: *Bioactive compounds in plants – benefits and risks for man and animals*. Oslo. The Norwegian Academy of Science and Letters: 11-17:

<https://www.researchgate.net/publication/284482613> A brief review on bioactive compounds in plants

8. **Bhambhani, S., Kondhare, K.R., Giri, A.P.** (2021). Diversity in Chemical Structures and Biological Properties of Plant Alkaloids. *Molecules*, 26 (11): 3374: <https://www.mdpi.com/1420-3049/26/11/3374>
9. **Camara, J.S., Albuquerque, B.R., Aguiar, J., Correa, R.C.G., Goncalves, J.L., Granato, D., Pereira, J.A.M., Barros, L., Ferreira, I.C.F.R.** (2021). Food Bioactive Compounds and Emerging Techniques for Their Extraction: Polyphenols as a Case Study. *Foods*, 10 (1): 37: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7823739/>
10. **Cazarin, C.B.B., Bicas, J.L., Pastore, G.M., Junior, M.R.M.** (2022). Chapter 1- Introduction. In: *Bioactive Food Components Activity in Mechanistic Approach*: 1-3: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780128235690000047>
11. **Chu, X.-J., Cao, N.-W., Zhou, H.-Y., Meng, x., Guo, B., Zhang, H.-Y., Li, B.-Z.** (2021). The oral and gut microbiome in rheumatoid arthritis patients: a systematic review. *Rheumatology (Oxford)*, 60 (3): 1054-1066: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33450018/>
12. **Cortes-Rojas, D.F., De Souza, C.R.F., Oliveira, W.P.** (2014). Clove (*Syzygium aromaticum*): a precious spice. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine.*, 4 (2): 90-96: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3819475/#b6>
13. **Da-Costa-Rocha, I., Bonnlaender, B., Sievers, H., Pischel, I., Heinrich, M.** (2014). Hibiscus sabdariffa L. – A phytochemical and pharmacological review. *Food chemistry*, 165: 424-443: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030881461400692X>
14. **Delpino, F.M. & Figueiredo, L.M.** (2021). Resveratrol supplementation and type 2-diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62 (16): 4465-4480: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408398.2021.1875980>
15. **De Rosa, V., La Cava, A., Matarase, G.** (2017). Metabolic pressure and the breach of immunological self-tolerance. *Nature Immunology*, 18 (11):1190-1196: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29044230/>

16. **Dinic, J., Novakovic, M., Pesic, M.** (2020). Chapter 9 – Potential for cancer treatment: natural products from the Balkans. In: Ozturk, M., Egamberdieva, D., Pesic, M. (eds). *Biodiversity and Biomedicine*: 137 -159: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780128195413000098>
17. **El Shazly, J.M.N., El Gayed, S.H., Kandil, Z.A., Yassin, N.A., Tawab, S.A., ElAlfy, T.S.M.** (2018). Botanical and genetic characterization of *Hibiscus syriacus* L. cultivated in Egypt. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 8 (12): 092-103: https://japsonline.com/abstract.php?article_id=2788&sts=2
18. **FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations).** (2023). Cloves (whole stems) raw by country. Crops and Livestock products. FAOSTAT. Available online [28/12/2023]: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>
19. **Godos, J., Micek, A., Mena, P., Del Rio, D., Galvano, F., Castellano, S., Grosso, G.** (2023). Dietary (Poly)phenols and Cognitive Decline: A Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies. *Molecular Nutrition Food Research*, 2023: 2308472: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/mnfr.202300472>
20. **Gomaa, E.Z.** (2020). Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review. *Antonie van Leeuwenhoek*, 113: 2019-2040: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10482-020-01474-7>
21. **Habtemariam, S.** (2019). Chapter 16- The chemical and pharmacological basis of cloves (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M.Perry) as potential therapy for 2 diabetes and associated diseases. In: *Medicinal Foods as Potential Therapies for Type-3 Diabetes and Associated Diseases*: 551-578: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B978008102922000016X>
22. **Heintz-Buschart, A., Pandey, U., Wicke, T., Sixel-Doring, F., Janzen, A., Sittig-Wiegand, E., Trenkwalder, C., Oertel, W.H., Mollenhauer, B., Wilmes, P.** (2017). The nasal and gut microbiome in Parkinson's disease and idiopathic rapid eye movement sleep behavior disorder. *Movement Disorders*, 33 (1): 88-98: <https://movementdisorders.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/mds.27105>
23. **Hills, R.D., Pontefract, B.A., Mishcon, H.R., Black, C.A., Sutton, S.C., Theberge, C.R.** (2019). Gut microbiome: Profound Implications for Diet and Disease. *Nutrients*, 11(7): 1613: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6682904/>

24. **Hughes, R.L.** (2020). A Review of the Role of the Gut Microbiome in Personalized Sports Nutrition. *Frontiers in Nutrition*, 6: 191: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnut.2019.00191/full>
25. **Hugon, P., Dufour, J.-C., Colson, P., Fournier, E., Sallah, K., Raoult, D.** (2015). A comprehensive repertoire of prokaryotic species identified in human beings. *The Lancet Infectious Diseases*, 15 (10): 1211-1219: [https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099\(15\)00293-5/fulltext#seccestitle130](https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099(15)00293-5/fulltext#seccestitle130)
26. **Jaiswal, A.K. & Prakash, B.** (2023). Chapter 11- Bioinformatics approaches: elucidation of novel sites of action, toxicity prediction tool, and perception of bioactive compounds. In: Prakash, B. & De Sao Jose, J.F.B. (eds). *Green Products in Food Safety*: 309-327: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780323955904000102>
27. **Jirovetz, L., Buchbauer, G., Stoilova, I., Stoyanova, A., Krastanov, A., Schmidt, E.** (2006). Chemical Composition and Antioxidant Properties of Clove Leaf Essential Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(17): 6303-6307: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf060608c>
28. **Islam, R., Sultana, N., Bhakta, S., Haque, Z., Hasan, A., Siddique, M.P., Islam, M.R.** (2023). Modulation of growth performance, gut morphometry and cecal microbiota in broilers by clove (*Syzygium aromaticum*) and tulsi (*Ocimum sanctum*) supplementation. *Poultry Science*, 102 (1): 102266: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032579122005582>
29. **Ismail, A., Ikram, E.H.K., Nazri, H.S.M.** (2008). Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) Seeds – Nutritional Composition, Protein Quality and Health Benefits, *Food*, 2 (1): 1-16: https://www.doc-developpement-durable.org/file/Culture/Arbres-Fruitiers/FICHES_ARBRES/bissap-hibiscus%20sabdarriffa&cannabinus/roselle%20seeds.pdf
30. **Kandhare, A.D., Raygude, K.S., Ghosh, P., Ghule, A.E., Gosavi, T.P., Badole, S.L., Bodhankar, S.L.** (2012). Effect of hydroalcoholic extract of *Hibiscus rosa sinensi* Linn. Leaves in experimental colitis in rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2 (5): 337-344: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2221169112600537>
31. **Kaparakou, E.H., Daferera, D., Kanakis, C.D., Skotti, E., Kokotou, M.G., Tarantlis, P.A.** (2023). Chemical Composition of the Essential Oils of Three

Popular Sideritis Species Cultivated in Greece Using GC-MS Analysis. *Biomolecules*, 13 (7): 1157: <https://www.mdpi.com/2218-273X/13/7/1157>

32. Kloukina, C., Tomou, E.-M., Skaltsa, H. (2019). Essential oil composition of the two Greek cultivated *Sideritis* spp. *Natural Volatiles & Essential Oils*, 6 (3): 16-23: <https://dergipark.org.tr/en/download/article-file/878333>

33. Li, B., Selmi, C., Tang, R., Gershwin, M.E., Ma, X. (2018). The microbiome and autoimmunity: a paradigm from the gut-liver axis. *Cellular & Molecular Immunology*, 15: 595-609: <https://www.nature.com/articles/cmi20187>

34. Li, Q., Chang, Y., Zhang, K., Chen, H., Tao, S., Zhang, Z. (2020). Implication of the gut microbiome composition of type 2 diabetic patients from northern China. *Scientific Reports*, 10: 5450: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-62224-3>

35. Li, Q., Wang, C., Tang, C., He, Q., Li, N., Li, J. (2014). Dysbiosis of Gut Fungal Microbiota is Associated with Mucosal Inflammation in Crohn's Disease. *Journal of clinical gastroenterology*, 48 (6): 513-523: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC405>

36. Liu, A.H., Bondonno, C.P., Russell, J., Flood, V.M., Lewis, J.R., Croft, K.D., Woodman, R.J., Lim, W.H., Kifley, A., Wong, G., Mitchell, P., Hodgson, J.M., Blekkenhorst, L. (2018). Relationship of dietary nitrate intake from vegetables with cardiovascular disease mortality: a prospective study in a cohort of older Australians. *European Journal of Nutrition*, 58: 2741-2753: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00394-018-1823-x>

37. Lubis, M., Siregar, G.A., Bangun, H., Ilas, S. (2020). The effect of roselle flower petals extract (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) on reducing inflammation in dextran sodium sulfate-induced colitis. *Med Glas (Zenica)*: 17(2): 395-401: https://ljkzedo.ba/mgpdf/mg33/13_Lubis_1095_A.pdf

38. Malaiyandi, J., Anandapadmanaban, G., Perumalsamy, H., Kilankajae, A., Chellappan, D.K., Dua, K., Shammugam, G., Balusamy, S.R. (2020). Plumbagin from *Plumbago* species inhibits the growth of stomach and breast cancer cell lines. *Industrial Crops and Products*, 146: 112147: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0926669020300637>

39. Nsairat, H., Khater, D., Odeh, F., Jaber, A.M., Al Sulaibi, M.A., Alsaer, W., Al Bawab, A., Mubarak, M.S. (2023). Chapter 12 - Phytosomes: a modernistic approach to the delivery of herbal drugs. In: Nayak, A.K., Hasnain, S., Laha, B., Maiti,

S. (eds). *Advanced and Modern Approaches for Drug Delivery*: 301-355: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780323916684000290>

40. **Nzikou, J.M., Bouanga-Kalou, G., Matos, L., Ganongo-Po, F.B., Mboungou-Mboussi, P.S., Moutoula, F.E., Panyoo-Akdowa, E., Silou, T.H., Desobry, S.** (2011). Characteristics and Nutritional Evaluation of seed oil from Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) in Congo-Brazzaville. *Current Research Journal of Biological Sciences*, 3 (2): 141-146: <https://www.airitilibrary.com/Article/Detail/20410778-201103-201512240016-201512240016-141-146>

41. **Ogunrinola, G.A., Oyewale, J.O., Oshamika, O.O., Olasehinde, G.I.** (2020). The Human Microbiome and Its Impacts on Health. *International Journal of Microbiology*, 2020: 8045646: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7306068/>

42. **Peng, C.-H., Chyau, C.-C., Chan, K.-C., Chan, T.-H., Wang, C.-J., Huang, C.-N.** (2011). Hibiscus sabdariffa Polyphenolic Extract Inhibits Hyperglycemia, Hyperlipidemia, and Glycation-Oxidative Stress while Improving Insulin Resistance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59 (18): 9901-9909: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf2022379>

43. **Πολυβακίδη Μ.-Ε.** (2022). Παραγωγή στιγμιαίου ροφήματος από εκχυλίσματα βοτάνων εμπλουτισμένου με προβιοτικές καλλιέργειες. (Πτυχιακή Εργασία). Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής. Αθήνα: https://polynoe.lib.uniwa.gr/xmlui/bitstream/handle/11400/2905/Polyvakidi_18684081.pdf?sequence=1&isAllowed=y

44. **Poretsky, R., Rodriguez, L.M., Luo, C., Tsementzi, D., Konstantinidis, K.T.** (2014). Strengths and limitations of 16S rRNA gene amplicon sequencing in revealing temporal Microbiat Community Dynamics. *PLOS ONE*, 9(4): e93827: <https://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0093827&type=printable>

45. **Ramirez-Rodrigues, M.M., Balaban, M.O., Marshall, M.R., Rouseff, R.L.** (2011). Hot and Cold Water Infusion Aroma Profiles of Hibiscus sabdariffa: Fresh Compared with Dried. *Journal of Food Science*, 76 (2): C212-C217: <https://ift.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1750-3841.2010.01989.x>

46. **Rangel-Huerta, O.D., Pastor-Villaescusa, B., Aguilera, C.M., Gil, A.** (2015). A Systematic Review of the Efficacy of Bioactive Compounds in

Cardiovascular Disease: Phenolic Compounds. *Nutrients*, 7 (7): 5177-5216:
<https://www.mdpi.com/2072-6643/7/7/5177>

47. **Reyes, B.A.S., Dufourt, E.C., Ross, J., Warner, M.J., Tanquilut, N.C., Leung, A.B.** (2018). Chapter 4- Selected Phyto and Marine Bioactive Compounds: Alternatives for the Treatment of Type 2 Diabetes. *Studies in Natural Products Chemistry*, 55: 111-143:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780444640680000048>

48. **Rezasoltani, s., Bashirzadeh, D.A., Mojarad, E.N., Aghdaei, H.A., Norouzinia, M., Shahrokh, S.** (2020). Signature of Gut Microbiome by Conventional and Advanced Analysis Techniques: Advantages and Disadvantages. *Middle East Journal of Digestive Diseases*, 12 (1): 5-11:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7023644/>

49. **Rosselli, R., Romoli, O., Vitulo, N., Vezzi, A., Campanaro, S, De Pascale, F., Schiavon, R., Tiarca, M., Poletto, F., Concheri, G., Valle, G., Squartini, A.** (2016). Direct 16 rRNA-seq from bacterial communities: a PCR-independent approach to simultaneously assess microbial diversity and functional activity potential of each taxon. *Scientific Reports*, 6: 32165:
<https://www.nature.com/articles/srep32165>

50. **Santos, D.I., Saraiva, J.M.A., Vicente, A.A., Moldao-Martins, M.** (2019). 2-Methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds and nutrients. *Innovative Thermal and Non-Thermal Processing, Biaccessibility and Bioavailability of Nutrients and Bioactive Compounds*: 23-54:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780128141748000020>

51. **Soto-Bianco, B.** (2022). Chapter 12-Herbal glycosides in healthcare. In” Mandal., S.C., Nayak, A.K., Dhara, A.K. (eds). *Herbal Biomolecules in Healthcare Applications*: 239 – 282:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780323858526000214>

52. **Stefanaki, A. & Van Andel, T.** (2021). Chapter 3 – Mediterranean aromatic herbs and their culinary use. In: Galanakis, C. *Aromatic Herbs in Food*: 93-121: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780128227169000032>

53. **Tadic, V.M., Jeremic, I., Dobric, S., Isakovic, A., Markovic, I., Trajkovic, V., Bojovic, D., Arsic, I.** (2012). Anti-inflammatory, Gastroprotective, and Cytotoxic Effects of *Sideritis scardica* Extracts. *Planta Medica*, 78 (5): 415-427:

<https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/abstract/10.1055/s-0031-1298172>

54. **Taslimi, P., Koksai, E., Goren, A.C., Bursal, E., Aras, A., Kilic, O., Alwaseel, S., Gulcin, I.** (2020). Anti-Alzheimer, antidiabetic and antioxidant potential of *Satureja cuneifolia* and analysis of its phenolic contents by LC-MS/MS. *Arabian Journal of Chemistry*, 13 (3): 4528-4537:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878535219301133>

55. **Thursby, E. & Juge, N.**, (2017). Introduction to the human gut microbiota. *Biochemical Journal*, 474 (11): 1823-1836:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5433529/>

56. **Wieers, G., Belkhir, L., Enaud, R., Leclercq, S. De Foy, J-M. P., Dequenue, I., De Timary, P., Cani, P.D.** (2020). How Probiotics Affect the Microbiota. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9:

https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2019.00454/full?utm_source=dlvr.it&utm_medium=twitter

57. **Wink, M.** (2016). Alkaloids: Properties and Determination. *Encyclopedia of Food and Health*: 97-105:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780123849472000192>

58. **Yeoh, Y.K., Zuo, T., Lui, G.C.-Y., Zhang, F., Liu, Q., Li, A.Y., Chung, A.C. et al.** (2021). Gut microbiota composition reflects disease severity and dysfunctional immune responses in patients with COVID-19. *Gut*, 70(4): 698-706:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33431578/>

59. **Yeom, J.E., Kim, S.-K., Park, S.-Y.** (2022). Regulation of the Gut Microbiota and Inflammation by β -Caryophyllene Extracted from Cloves in a Dextran Sulfate Sodium,- Induced Colitis Mouse Model. *Molecules*, 27 (22): 7782:

<https://www.mdpi.com/1420-3049/27/22/7782>

60. **Zuo, T., Zhang, F., Lui, G.C.Y., Yeoh, Y.K., Li, A.Y.L. Zhan, H., Wan, Y., Chung, A.C.K., Cheung, C.P., Chen, N., Lai, C.K.C., Chen, Z., Tso, E.Y.K., Fung, K.S.C., Chan, V., Ling, L., Joynt, G., Hui, D.C., Chan, F.K.L., Chan, P.K.S., Ng, S.C.** (2020). Alterations in Gut Microbiota of Patients With Covid-19 During Time of Hospitalization. *Gastroenterology*, 159 (3): 944-955:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016508520347016>

61. **Zyzelewicz, D., Kullbat-Warycha, K., Oracz, J., Zyzelewicz, K.** (2020). Polyphenols and Other Bioactive Compounds of Sideritis Plants and Their

Potential Biological Activity. *Molecules*, 25 (12): 3763:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7464829/#B17-molecules-25-03763>
62.

Ιστοσελίδες

- **MERCK.** (2024). Folin-Ciocalteu's phenol reagent. Ανακτήθηκε από (20/01/2024): https://www.lib.auth.gr/sites/default/files/docs_files/APA-examples-gre.pdf