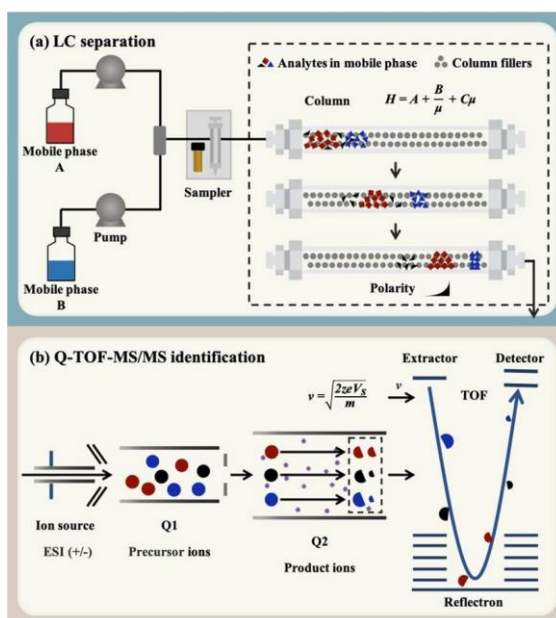




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ:

«ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ –
ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ ΜΕ ΑΝΑΛΥΤΗ ΧΡΟΝΟΥ ΠΤΗΣΗΣ (LC-QTOF MS) ΓΙΑ ΤΟΝ
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΜΕΤΑΒΙΟΤΙΚΩΝ»



ΑΛΥΣΣΑΝΔΡΑΚΗΣ ΑΓΓΕΛΟΣ

ΑΜ:684/19684166

ΜΑΥΡΗ ΜΑΡΘΑ

ΑΜ:684/19684057

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΖΟΥΜΠΟΥΛΑΚΗΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ

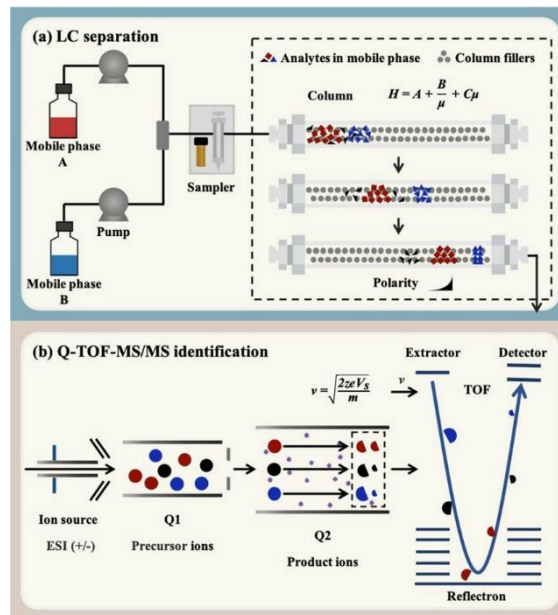
ΑΘΗΝΑ, 09/2024



UNIVERSITY OF WEST ATTICA
SCHOOL OF FOOD SCIENCES
DEPARTMENT OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY

THESIS:

«Development and validation of a liquid chromatography- time of flight spectrometry (LC-QTOF MS) method for the determination of metabiotics»



ALYSSANDRAKIS ANGELOS

RN:19684166

MARTHA MAVRI

RN:19684057

SUPERVISOR:

ZOUMPOULAKIS PANAGIOTIS

ATHENS, 09/2024



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

«Ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδου υγρής χρωματογραφίας – φασματομετρία μάζας με αναλυτή χρόνου πτήσης (LC-QTOF MS) για τον προσδιορισμό μεταβιοτικών»

Μέλη Εξεταστικής Επιτροπής συμπεριλαμβανομένου και του Εισηγητή

Η πτυχιακή εργασία εξετάστηκε επιτυχώς από την κάτωθι εξεταστική Επιτροπή:

A/A	ΟΝΟΜΑ-ΕΠΩΝΥΜΟ	ΒΑΘΜΙΔΑ/ΙΔΙΟΤΗΤΑ	ΨΗΦΙΑΚΗ ΥΠΟΓΡΑΦΗ
1	ΖΟΥΜΠΟΥΛΑΚΗΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ	ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ	
2	ΣΙΝΑΝΟΓΛΟΥ ΒΑΣΙΛΕΙΑ	ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ	
3	ΤΣΙΑΚΑ ΘΑΛΕΙΑ	ΕΠΙΚΟΥΡΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ	

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ

Οι κάτωθι υπογεγραμμένοι Αλυσσανδράκης Άγγελος του Ιωάννη με αριθμό μητρώου 684/19684166 και Μαύρη Μάρθα του Δημητρίου, με αριθμό μητρώου 684/19684057, φοιτητές του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, δηλώνουμε υπεύθυνα ότι:

«Είναι συγγραφείς της παρούσας πτυχιακής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια που είχαν για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επιπλέον, οι όποιες πηγές από τις οποίες έγινε χρήση δεδομένων, ιδεών και λέξεων, είτε επακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνουν ότι η εργασία αυτή έχει συγγραφεί από αυτές αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας, τόσο δικής τους, όσο και του Ιδρύματος.

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μας ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση των πτυχίων μας.»

Οι Δηλούντες
Αλυσσανδράκης Άγγελος Μαύρη Μάρθα



ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε τον επιβλέποντα καθηγητή μας και πρόεδρο του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, κύριο Ζουμπουλάκη Παναγιώτη, για την πολύτιμη καθοδήγηση, την εμπιστοσύνη καθώς και την εκτίμηση που μας έδειξε καθ' όλη τη διάρκεια της συγγραφής της παρούσας πτυχιακής.

Στη συνέχεια, ευχαριστούμε όλους τους καθηγητές οι οποίοι έχουν συνδράμει στην ακαδημαϊκή μας πορεία, μεταδίδοντας μας τις γνώσεις τους απλόχερα, διαμορφώνοντάς μας στους ανθρώπους που είμαστε σήμερα.

Τέλος, ευχαριστούμε θερμά όλους τους ανθρώπους, οικογένεια και φίλους, για τη συνεχή συμπαράσταση, βοήθεια και κατανόηση που έδειξαν σε όλη τη διάρκεια των προπτυχιακών μας σπουδών.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σήμερα, μία νέα κατηγορία ενώσεων, που ονομάζονται μεταβιοτικά (metabiotics), έχει κερδίσει το ενδιαφέρον της βιομηχανίας τροφίμων και συμπληρωμάτων διατροφής. Τα μεταβιοτικά αποτελούν βακτηριακούς μεταβολίτες που έχουν προέλθει μέσω ζύμωσης από ζωντανούς μικροοργανισμούς του εντερικού μικροβιώματος, που χαρακτηρίζονται για τις προβιοτικές τους ιδιότητες. Οι μεταβολίτες αυτοί έχουν αξιοσημείωτες λειτουργίες (πχ. αντιμικροβιακή, αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση), καθώς μπορούν να συνδράμουν στη βελτιστοποίηση της υγείας του ξενιστή. Υπάρχουν πολλές ενώσεις που υπάγονται στα μεταβιοτικά ωστόσο, η παρούσα πτυχιακή εστιάζει σε μεταβιοτικά που αποτελούν μεταβολίτες (πολυ)φαινολικών διατροφικών συστατικών ή ανήκουν σε συμπλέγματα βιταμινών (πχ. βιταμίνες του συμπλέγματος Β). Το έντονο ενδιαφέρον γύρω από τα μεταβιοτικά υπάρχει κυρίως λόγω της συμβολής τους στην αντιμετώπιση κάποιων γνωστών ασθενειών, όπως ο καρκίνος, τα μεταβολικά σύνδρομα, οι παθήσεις του γαστρεντερικού συστήματος, οι καρδιαγγειακές και οι μυϊκές παθήσεις κ.ά. Αξιοσημείωτο είναι ότι έχει ήδη ξεκινήσει η παραγωγή συμπληρωμάτων και σκευασμάτων που περιέχουν τις προαναφερθείσες ενώσεις. Ωστόσο, η διαδικασία αυτή βρίσκεται ακόμα σε αρχικό στάδιο, και απαιτείται η διεξαγωγή επιπλέον μελετών για να διασφαλιστεί η ποιότητα και η ασφάλεια των τελικών προϊόντων. Για αυτό το λόγο, στα πλαίσια της παρούσας πτυχιακής εργασίας, πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη μίας μεθόδου υγρής χρωματογραφίας- φασματομετρίας μάζας με τετραπολικό αναλυτή χρόνου πτήσης (liquid chromatography-triple time-of-flight mass spectrometry, LC-TTOF MS) για τη ταυτοποίηση 15 μεταβιοτικών, με κατάλληλη ρύθμιση των συνθηκών χρωματογραφίας και φασματομετρίας μάζας. Αναλυτικότερα, έγινε βαθμιδωτή έκλυση, η οποία συνίσταται από τους διαλύτες Α [νερό – και 0,1% (v/v) μηρυγκικό οξύ] και Β [ακετονιτρίλιο – 0,1% (v/v) μυρμηγκικό οξύ], με διάρκεια ανάλυσης 10min σε θετικό και αρνητικό ιοντισμό. Πιο συγκεκριμένα μελετήθηκαν οι ενώσεις ουρολιθίνη Α, ουρολιθίνη Β, εντερολακτόνη, εντεροδιόλη, διϋδρορεσβερατρόλη, πολυδατίνη (riceid), κατεχόλη, πυρογαλλόλη, s- εκουόλη, γ- βαλερολακτόνη, πρωτοκατεχικό οξύ, μενακινόνη (βιταμίνη Κ2), θειαμίνη (βιταμίνη Β1), ριβοφλαβίνη(βιταμίνη Β2) και πυριδοξίνη (βιταμίνη Β6). Από το σύνολο των μελετούμενων ενώσεων, τελικά προσδιορίστηκαν 13 (δεν προσδιορίστηκαν η μενακινόνη και η θειαμίνη) με τη μέθοδο που αναπτύχθηκε. Έπειτα, ακολούθησε η επικύρωση της μεθόδου με τον προσδιορισμό της γραμμικότητας, της πιστότητας, της ακρίβειας και των ορίων ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ). Από τα αποτελέσματα διεξάγεται το συμπέρασμα ότι η μέθοδος εμφανίζει γραμμικότητα, ικανοποιητική επαναληψιμότητα στο μεσαίο και υψηλό επίπεδο συγκέντρωσης των πρότυπων διαλυμάτων. Ωστόσο, δεν εμφανίζει ιδιαίτερα ικανοποιητική αναπαραγωγιμότητα, η οποία όμως προβλέπεται να βελτιωθεί με αύξηση των επαναλήψεων των μετρήσεων και την ημερών που πραγματοποιείται η μελέτη αναπαραγωγιμότητας. Η μέθοδος παρουσιάζει ικανοποιητική ακρίβεια. Επιπλέον η πλειοψηφία των μεταβιοτικών μπορούν να ανιχνευτούν και να ποσοτικοποιηθούν σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Η ανάπτυξη και επικύρωση μιας ή και παραπάνω μεθόδων που θα προσδιορίζουν τους παραγόμενους βακτηριακούς μεταβολίτες διατροφικών συστατικών είναι εξαιρετικής σημασίας για τους τομείς των τροφίμων και της υγείας, καθώς το τωρινό ερευνητικό ενδιαφέρον έχει επικεντρωθεί στις προσπάθειες ενσωμάτωσης των μεταβιοτικών όσο και του συνόλου αδρανοποιημένων βακτηρίων, συστατικών κυτταρικών τοιχωμάτων και μεταβολιτών τους, που είναι γνωστά ως postbiotics, απευθείας μέσα σε προϊόντα τροφίμων, με τη χρήση κάποιων τεχνολογιών όπως η ξήρανση με ψεκασμό, η λυοφιλίωση και η μικροενθυλάκωση.

Λέξεις κλειδιά : Μεταβιοτικά, Υγρή Χρωματογραφία- Φασματομετρία Μάζας με Αναλυτή Χρόνου Πτήσης, Ανάπτυξη μεθόδου, Επικύρωση μεθόδου

ABSTRACT

Nowadays, a new class of compounds called metabiotics has gained the interest of the food and supplement industry. Metabiotics are bacterial metabolites derived through fermentation from living microorganisms of the intestinal microbiome, characterized by their probiotic properties. These metabolites have remarkable functions (antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory activity), as they can help optimize host health. There are many compounds that belong to the metabiotic group, however, this thesis focuses on metabiotics that are metabolites of (poly)phenolic nutrients or belong to vitamin complexes (e.g. B vitamins). The intense interest in metabiotics is mainly due to their contribution to the treatment of some well-known diseases such as cancer, metabolic syndromes, gastrointestinal diseases, cardiovascular and muscular diseases, etc. It is noteworthy that the production of supplements and preparations containing the aforementioned compounds has already started. However, this process is still at an early stage, and further studies are needed to ensure the quality and safety of the final products. For this reason, in the context of this thesis, a liquid chromatography-triple time-of-flight mass spectrometry (LC-TTOF MS) method was developed for the identification of 15 metabiotics, with appropriate adjustment of the chromatography conditions. More specifically, a gradient elution was performed, consisting of solvents A [water - 0.1% (v/v) formic acid] and B [acetonitrile - 0.1% (v/v) formic acid], with an analysis time of 10 min in positive and negative ionization. More specifically, the compounds urolithin A, urolithin B, enterolactone, enterodiol, dihydroresveratrol, polydatin (piceid), catechol, pyrogallol, s-equal, γ -valerolactone, protocatechuic acid, menaquinone (vitamin K₂), thiamine (vitamin B₁), riboflavin (vitamin B₂) and pyridoxine (vitamin B₆) were studied. Of the total number of compounds studied, 13 compounds were finally identified (menaquinone and thiamine were not identified) by the method developed. The method was then validated by determining the linearity, precision, accuracy, and limits of detection (LOD) and quantification (LOQ). From the results it is concluded that the method shows linearity, good repeatability at medium and high concentration level of the standard solutions. However, it does not demonstrate particularly satisfactory reproducibility, but this is expected to improve with an increase in the number of measurement replicates and the number of days the reproducibility study is carried out. The method shows satisfactory accuracy. In addition, the majority of metabiotics can be detected and quantified at low concentrations. The development and validation of one or more methods to identify the produced bacterial metabolites of dietary ingredients is of great importance for the food and health sectors, as current research interest has focused on efforts to introduce both metabiotic and inactivated bacteria, cell wall components and their metabolites, known as postbiotics, directly into food products, using some technologies such as spray drying, lyophilisation and microencapsulation.

Keywords: Metabiotics, Liquid Chromatography-Time-Of-Flight Mass Spectrometry, Method Development, Method Validation

Περιεχόμενα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	13
1.1.	ΟΡΙΣΜΟΣ	13
1.2.	ΓΕΝΙΚΑ	14
1.3.	ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ	15
1.4.	ΚΑΤΗΓΟΡΙΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΤΑΒΙΟΤΙΚΩΝ	16
1.5.	ΒΙΤΑΜΙΝΕΣ ΩΣ ΜΕΤΑΒΙΟΤΙΚΑ	20
1.5.1.	ΟΡΙΣΜΟΣ	21
1.5.2.	ΘΕΙΑΜΙΝΗ (THIAMINE/ VITAMIN B1)	21
1.5.3.	ΡΙΒΟΦΛΑΒΙΝΗ (RIBOFLAVIN/ VITAMIN B2)	22
1.5.4.	ΠΥΡΙΔΟΞΙΝΗ (PYRIDOXINE/ VITAMIN B6)	22
1.5.5.	ΜΕΝΑΚΙΝΟΝΗ (MENAQUINONE/ VITAMIN K2)	22
1.5.6.	ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΠΟΥ ΠΑΡΑΓΟΥΝ ΒΙΤΑΜΙΝΕΣ ΣΤΟ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΜΙΚΡΟΒΙΩΜΑ	23
1.6.	ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ-ΦΑΙΝΟΛΕΣ	23
1.6.1.	ΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ	23
1.6.2.	ΟΥΡΟΛΙΘΙΝΕΣ	24
1.6.3.	ΕΝΤΕΡΟΛΑΚΤΟΝΗ (ENTEROLACTONE) & ΕΝΤΕΡΟΔΙΟΛΗ (ENTERODIOL)	25
1.6.4.	ΔΙΥΔΡΟΡΕΣΒΕΡΑΤΡΟΛΗ (DIHYDRORESVERATROL)	25
1.6.5.	ΚΑΤΕΧΟΛΗ (CATECHOL)	26
1.6.6.	S- ΕΚΟΥΟΛΗ (S- EQUOL)	26
1.6.7.	γ- ΒΑΛΕΡΟΛΑΚΤΟΝΗ (γ- VALEROLACTONE)	26
1.6.8.	ΠΡΩΤΟΚΑΤΕΧΙΚΟ ΟΞΥ (PROTOCATEHUIC ACID)	27
1.6.9.	ΠΥΡΟΓΑΛΛΟΛΗ (PYROGALLOL)	27
1.6.10.	ΠΟΛΥΔΑΤΙΝΗ (POLYDATIN/ PICEID)	28
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΙΟΤΙΚΑ	30
2.1.	Γενικά	30
2.2.	Καταστολή του καρκίνου, των όγκων και της απόπτωσης	30
2.3.	Νευροτροποποίηση	31
2.4.	Διαβήτης, παχυσαρκία και φλεγμονή	31
2.5.	Διατήρηση γαστρεντερικής ακεραιότητας	32
2.6.	Ρόλος στις καρδιαγγειακές παθήσεις	32

2.7. Ρόλος στην ανοσοδιαρρύθμιση.....	33
2.8. Ρόλος στον αποκλεισμό παθογόνων παραγόντων	33
2.9. Ρόλος στη στοματική υγεία.....	34
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΑΓΟΡΑ ΜΕΤΑΒΙΟΤΙΚΩΝ	35
3.1. ΓΕΝΙΚΑ.....	35
3.2. Εφαρμογή μεταβιοτικών σε τρόφιμα φυτικής προέλευσης μέσω ζύμωσης	35
3.3. ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ ΑΓΟΡΑΣ POSTBIOΤIC ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΩΝ	38
3.4. ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ (REGULATION).....	39
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ΜΕΤΑΒΙΟΤΙΚΑ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ.....	42
4.1. ΖΥΜΩΣΗ	42
4.2. ΜΕΤΑΒΙΟΤΙΚΑ/POSTBIOΤICS ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ	42
4.3. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗΣ POSTBIOΤICS	48
4.3.1. Ξήρανση με ψεκασμό (spray drying).....	48
4.3.2. Λυοφιλίωση-Ξήρανση με κατάψυξη (Lyophilization, Freeze drying)	49
4.3.3. Μικροενθυλάκωση postbiotics	49
4.4. Παράγοντες που επηρεάζουν τα postbiotics κατά την παραγωγή τους.....	50
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ΣΚΟΠΟΣ.....	51
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	52
6.1. ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΡΟΗΣ.....	52
6.2. ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ	53
6.2.1. Αντιδραστήρια, διαλύτες και πρότυπες ουσίες	53
6.2.2. Συσκευές και επιστημονικά όργανα	53
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ – ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΑΣ ΜΕ ΑΝΑΛΥΤΗ ΧΡΟΝΟΥ ΠΤΩΣΗΣ (LC-QTOF MS) 54	54
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	55
8.1. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΜΕΤΑΒΙΟΤΙΚΩΝ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ – ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΑΣ ΜΕ ΑΝΑΛΥΤΗ ΧΡΟΝΟΥ ΠΤΩΣΗΣ (LC-QTOF MS)	55
8.1.1. Συνθήκες υγρής χρωματογραφίας μικρορροών (microLC).....	55
8.1.2. Συνθήκες τετραπολικού φασματογράφου μαζών με αναλυτή χρόνου πτήσης.....	56
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9 ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ	59
9.1. Γραμμικότητα μεθόδου (Linearity)	59

9.2. Πιστότητα (Precision).....	66
9.2.1. Επαναληψιμότητα (Repeatability).....	66
9.2.2. Αναπαραγωγιμότητα (Reproducibility/Intraday precision)	69
9.3. Ακρίβεια (Accuracy).....	72
9.4. Όριο ανίχνευσης (LOD) και όριο ποσοτικοποίησης (LOQ).....	75
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΕΞΕΛΙΞΕΙΣ.....	78
10.1. Μελλοντικές εξελίξεις	79
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	81

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1 Postbiotics.....	14
Εικόνα 2 Τύποι μεταβιοτικών	20
Εικόνα 3 Χημική δομή θειαμίνης	21
Εικόνα 4 Χημική δομή ριβοφλαβίνης.....	22
Εικόνα 5 Χημική δομή πυριδοξίνης	22
Εικόνα 6 Χημική δομή μενακινόνης.....	22
Εικόνα 7 Φαινολικές ενώσεις	23
Εικόνα 8 Χημική δομή ουρολιθίνης Α.....	24
Εικόνα 9 Χημική δομή ουρολιθίνης Β.....	24
Εικόνα 10 Χημική δομή εντερολακτόνης.....	25
Εικόνα 11 Χημική δομή εντεροδιόλης.....	25
Εικόνα 12 Χημική δομή διϋδρορεσβερατρόλης.....	25
Εικόνα 13 Χημική δομή κατεχόλης	26
Εικόνα 14 Χημική δομή s- εκουόλης.....	26
Εικόνα 15 Χημική δομή γ- βαλερολακτόνης.....	26
Εικόνα 16 Χημική δομή πρωτοκατεχικού οξέος	27
Εικόνα 17 Χημική δομή πυρογαλλόλης	27
Εικόνα 18 Χημική δομή πολυδατίνης.....	28
Εικόνα 19 Ευρείες εφαρμογές των postbiotics	44
Εικόνα 20 Διάγραμμα βαθμιδωτής έκλυσης της υπό ανάπτυξη μεθόδου micro LC. (η μαύρη γραμμή απεικονίζει το διάλυμα νερού, ενώ η μπλε το διάλυμα ακετονιτριλίου).....	55
Εικόνα 21 Φάσμα μάζας MS κατεχόλης στους 300°C και 350°C στον αρνητικό ιοντισμό.....	56
Εικόνα 22 Φάσμα μάζας MS ουρολιθίνης Α στους 300°C και 350°C στον θετικό ιοντισμό.....	57
Εικόνα 23 Καμπύλη αναφοράς ουρολιθίνης Β	60
Εικόνα 24 Καμπύλη αναφοράς πυριδοξίνης.....	60
Εικόνα 25 Καμπύλη αναφοράς s-equiol	61
Εικόνα 26 Καμπύλη αναφοράς κατεχόλης.....	61
Εικόνα 27 Καμπύλη αναφοράς εντερολακτόνης	62
Εικόνα 28 Καμπύλη αναφοράς διϋδρορεσβερατρόλης.....	62
Εικόνα 29 Καμπύλη αναφοράς πυριδοξίνης.....	63

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1 Μελετούμενα μεταβιοτικά, χαρακτηριστικοί μικροοργανισμοί που τα παράγουν και η συγκέντρωσή τους σε βιολογικά υγρά εθελοντών.....	17
Πίνακας 2 Τα εξεταζόμενα μεταβιοτικά, οι ενώσεις από τις οποίες προέρχονται και τα τρόφιμα στα οποία μπορεί να βρίσκονται.....	28
Πίνακας 3 Ζυμωμένα φυτικά τρόφιμα που περιέχουν προβιοτικά στελέχη, οι βιοδραστικοί μεταβολίτες (μεταβιοτικά) που τα παράγουν και οι πιθανοί ρόλοι τους στα τρόφιμα αυτά (Biswas & Das Mohapatra, 2023).....	36
Πίνακας 4 Προοπτικές αγοράς postbiotics (συμπληρώματα) (2024-2034).....	38
Πίνακας 5 Εφαρμογή και οφέλη των postbiotics σε συμπληρώματα διατροφής (Liang & Xing, 2023).....	44
Πίνακας 6 Τα μεταβιοτικά και η εταιρεία παραγωγής τους.....	53
Πίνακας 7 Τα μεταβιοτικά και οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για τη παρασκευή stock προτύπων διαλυμάτων.....	54
Πίνακας 8 Διάγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης.....	56
Πίνακας 9 Συνθήκες QTOF - MS.....	57
Πίνακας 10 Χρόνος έκλουσης των μεταβιοτικών και τα MS μητρικά ιόντα τους στο θετικό και αρνητικό ιοντισμό.....	58
Πίνακας 11 Αποτελέσματα γραμμικότητας της μεθόδου.....	64
Πίνακας 12 Αποτελέσματα επαναληψιμότητας μεθόδου σε θετικό και αρνητικό ιοντισμό.....	67
Πίνακας 13 Αποτελέσματα αναπαραγωγιμότητας μεθόδου σε θετικό και αρνητικό ιοντισμό.....	70
Πίνακας 14 προσδιοριζόμενα μεταβιοτικά και σχετική ακρίβεια μεθόδου σε θετικό και αρνητικό ιοντισμό.....	73
Πίνακας 14 προσδιοριζόμενα μεταβιοτικά και σχετική ακρίβεια μεθόδου σε θετικό και αρνητικό ιοντισμό.....	Error! Bookmark not defined.
Πίνακας 15 Αποτελέσματα ορίου ποσοτικοποίησης (LOQ) και ανίχνευσης (LOD) στον αρνητικό ιοντισμό.....	76
Πίνακας 16 Αποτελέσματα ορίου ποσοτικοποίησης (LOQ) και ανίχνευσης (LOD) στον θετικό ιοντισμό.....	77

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1 Διάγραμμα ροής πειραματικής διαδικασίας.....	52
--	----

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΞΙΣΩΣΕΩΝ

Εξίσωση 1 Εξίσωση υπολογισμού % σχετικής τυπικής απόκλισης (RSD%)	66
Εξίσωση 2 Εξίσωση υπολογισμού της ακρίβειας.....	72
Εξίσωση 3 Εξίσωση υπολογισμού του σχετικού σφάλματος (RE%).....	72
Εξίσωση 4 Εξίσωση υπολογισμού της σχετικής ακρίβειας.....	72
Εξίσωση 5 Εξίσωση για τον υπολογισμό του ορίου ανίχνευσης.....	75
Εξίσωση 6 Εξίσωση για τον υπολογισμό του ορίου ποσοτικοποίησης.....	75

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1. ΟΡΙΣΜΟΣ

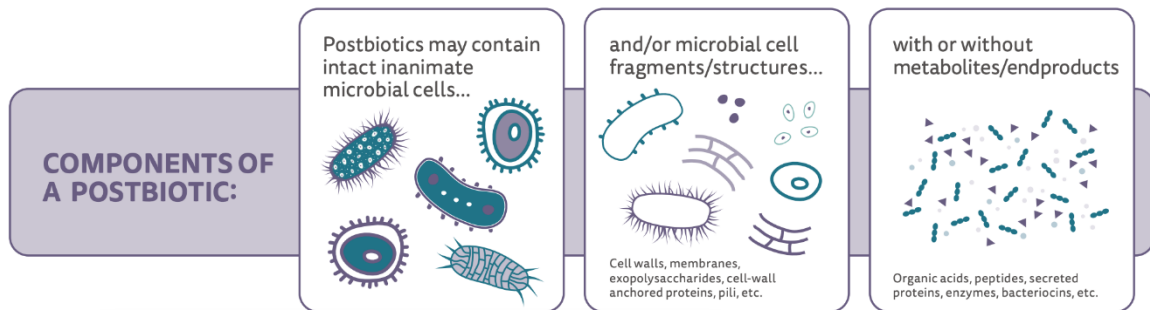
Ο όρος “μεταβιοτικό” στην ελληνική γλώσσα, δεν έχει μοναδική σημασία καθώς, χρησιμοποιείται για να περιγράψει 2 κατηγορίες ενώσεων. Αυτές είναι τα “metabiotics” και τα “postbiotics”.

Τα **μεταβιοτικά(metabiotics)** ορίζονται ως βιοδραστικές ενώσεις/μεταβολίτες που παράγονται μέσω της μεταβολικής διαδικασίας των προβιοτικών μικροοργανισμών. Στα μεταβιοτικά ανήκουν μόνο οι βακτηριακοί μεταβολίτες, δηλαδή δεν περιέχουν τους ίδιους τους μικροοργανισμούς καθώς είναι μοναδικές ενώσεις. Αυτοί οι μεταβολίτες, έχουν καθορισμένη χημική δομή και συγκεκριμένους μηχανισμούς δράσης που μπορούν να συμβάλουν στην υγεία του ξενιστή. (αντιοξειδωτική, αντιμικροβιακή δράση, κ.α.). (Jang et al., 2024)

Αντιθέτως τα **postbiotics** με βάση τη Διεθνή Επιστημονική Ένωση για τα Προβιοτικά και τα Προβιοτικά (ISAPP-International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics) είναι ένα παρασκεύασμα νεκρών μικροοργανισμών ή/και συστατικών τους που παρέχει όφελος για την υγεία του ξενιστή. Συγκεκριμένα τα συστατικά των postbiotic μπορεί να περιέχουν νεκρά μικροβιακά κύτταρα και/ή μικροβιακά κυτταρικά θραύσματα/δομές με η χωρίς τους μεταβολίτες τους όπως φαίνεται και στην εικόνα (Εικόνα 1). Ένα postbiotic πρέπει να προέρχεται από έναν ζωντανό μικροοργανισμό στον οποίο εφαρμόζεται μια τεχνολογική διαδικασία για τον τερματισμό της ζωής του (θερμότητα, υψηλή πίεση, έκθεση σε οξυγόνο για αυστηρά αναερόβια, κ.λπ.). Οι ιοί, συμπεριλαμβανομένων των βακτηριοφάγων, δεν θεωρούνται ζωντανοί μικροοργανισμοί, επομένως τα postbiotic δεν μπορούν να προέρχονται από αυτούς. Η ασφάλεια και τα οφέλη πρέπει να αποδεικνύονται για τη μη βιώσιμη μορφή του. Ένα postbiotic δεν χρειάζεται να προέρχεται από ένα προβιοτικό. Έτσι, ο μικροοργανισμός που χρησιμοποιείται για την παραγωγή ενός postbiotic δεν χρειάζεται να επιδεικνύει όφελος για την υγεία ενώ είναι ζωντανός. Επιπλέον, ένα προβιοτικό προϊόν που χάνει τη βιωσιμότητα των κυττάρων του κατά την αποθήκευση δεν πληροί αυτόματα τα κριτήρια για postbiotic· απαιτούνται μελέτες σχετικά με το όφελος για την υγεία του απενεργοποιημένου προβιοτικού.(ISAPP - International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics, 2018)

Postbiotics

A postbiotic is a preparation of inanimate microorganisms and/or their components that confers a health benefit on the host.



Εικόνα 1 Postbiotics

Πηγή: <https://isappscience.org/behind-the-publication-understanding-isapps-new-scientific-consensus-definition-of-postbiotics/>

1.2. ΓΕΝΙΚΑ

Αυτοί οι πολυλειτουργικοί μεταβολίτες, που είναι γνωστοί ως μεταβιοτικά είναι δυνητικά αντιφλεγμονώδεις, ανοσοτροποποιητικοί, αντιμεταστατικοί και αντιμεταλλαξιογόνοι παράγοντες, καθώς βελτιστοποιούν πολλές φυσιολογικές, μεταβολικές και ρυθμιστικές δραστηριότητες του ξενιστή. Τα μόρια αυτά έχουν υψηλή διαλυτότητα, ποικίλη χημική σύνθεση και χαμηλό μοριακό βάρος (Low Molecular Weight-LMW). Τα μεταβιοτικά έχουν ισχυρότερη ικανότητα απορρόφησης, κατανομής, μεταβολισμού και απέκκρισης (ADME-Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion) σε σύγκριση με τα παραδοσιακά προβιοτικά. Επομένως, μπορεί να συναχθεί το συμπέρασμα ότι η χορήγηση μεταβιοτικών είναι πλεονεκτικότερη έναντι των προβιοτικών. Τα συμπληρώματα μεταβιοτικών μπορούν να χρησιμοποιηθούν αποτελεσματικά για την μείωση του άγχους των ασθενών, καθώς και για την πρόληψη ή θεραπεία ποικίλων ασθενειών (διαβήτης, παχυσαρκία, καταστολή καρκίνου και όγκων). (Biswas & Das Mohapatra, 2023)

Τα συστατικά των τροφίμων, στη διατροφή μας δεν παρέχουν μόνο τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά στο σώμα μας, αλλά και υποστρώματα για τη συμβιωτική μικροβιακή χλωρίδα στο γαστρεντερικό μας σύστημα, γνωστή ως μικροβίωμα του εντέρου. Το ανθρώπινο γαστρεντερικό σύστημα (Gastrointestinal GI Tract) λειτουργεί για την πέψη των τροφών και την απορρόφηση θρεπτικών συστατικών. Επίσης, προστατεύει από μολύνσεις παθογόνων και διατηρεί την ανοσολογική ανοχή (immune tolerance). Τα μη αφομοιωμένα τρόφιμα φτάνουν στο παχύ έντερο και χρησιμεύουν ως υποστρώματα για το βακτηριακό μεταβολισμό(π.χ φαινόλες). (P. Zhang, 2022)

Οι φαινολικές ενώσεις, είναι ουσίες φυτικής προέλευσης, οι οποίες δεν απορροφούνται εύκολα από τον ανθρώπινο οργανισμό, αλλά αποικοδομούνται από τα βακτήρια του εντέρου, επομένως έχουν πρεβιοτική δράση, παράγοντας βιοδραστικές ενώσεις (μεταβιοτικά), προσδίδοντας, έτσι, θετικές επιδράσεις στην υγεία του ανθρώπου. (Mithul Aravind et al., 2021)

1.3. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ

Δράσεις μεταβιοτικών στον ανθρώπινο οργανισμό:

Οι κοινοί και συμβιωτικοί(*Bacteroides fragilis*, *Clostridium*, *Bifidobacterium infantis*) οργανισμοί της μικροχλωρίδας του εντέρου παράγουν τα μεταβιοτικά, ως βακτηριακούς μεταβολίτες ύστερα από τη βιομετατροπή φυτοχημικών διατροφικών συστατικών. Οι ενώσεις αυτές μπορούν να διεισδύσουν εύκολα στις μεμβράνες και στα τοιχώματα των ευκαρυωτικών και προκαρυωτικών κυττάρων στον ανθρώπινο οργανισμό. Εναλλακτικά, μπορεί να χρειαστεί να αλληλεπιδράσουν προκαρτακτικά με συγκεκριμένους υποδοχείς που βρίσκονται στην επιφάνεια του κυττάρου. (Shenderov et al., 2020)

Τα μεταβιοτικά μπορούν να επιδράσουν σε διαφορετικά επίπεδα και σημεία στον ανθρώπινο οργανισμό:

- i. Μοριακό επίπεδο (αντιγραφή και έκφραση γονιδίων, μεταγραφή, μετάφραση της γενετικής πληροφορίας και η επιγονιδιωματική τροποποίησή της)
 - ii. Κυτταρικό επίπεδο (κυτταρικές επιφάνειες και μεμβράνες, μετα-μεταφραστικά αποτελέσματα, βιοσύνθεση ενέργειας και πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια, ριβοσώματα, εξωσώματα)
 - iii. Ενδοκυττάρια διαμερίσματα-υαλόπλασμα (περιέχει τον πυρήνα, οργανίδια, εξωσώματα, διάφορα εγκλείσματα, κανάλια ιόντων)
 - iv. Διακυτταρική μήτρα (θέση των τριχοειδών και νευρικών συνάψεων, μεταβολικές αντιδράσεις, σύνθεση και συσσώρευση ορμονικά ενεργών κυτταρικών πεπτιδίων, διακυτταρική ανταλλαγή πληροφοριών κλπ)
 - v. Ιστοί, όργανα, φυσιολογικά και μεταβολικά συστήματα.
 - vi. Οργανισμός ξενιστή στο σύνολό του.
- (Shenderov et al., 2020)

1.4. ΚΑΤΗΓΟΡΙΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΤΑΒΙΟΤΙΚΩΝ

Κάτω από την ομπρέλα των μεταβιοτικών εντάσσονται τόσο τα μεταβιοτικά που περιέχουν κυτταρικά συστατικά και αδρανοποιημένα βακτήρια (postbiotics) όσο και τα μεταβιοτικά που περιλαμβάνουν βακτηριακούς μεταβολίτες (metabiotics). Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως στην ελληνική γλώσσα δεν υπάρχει διαφορετικός όρος για την διάκριση των δύο κατηγοριών, οπότε στην παρούσα εργασία ο όρος μεταβιοτικά θα αναφέρεται μόνο στα metabiotics και τα postbiotics θα περιγράφονται με τον αγγλικό όρο τους.

Τα postbiotics έχουν ως κύριο συστατικό τους τους μη-ζωντανούς μικροοργανισμούς και τα κυτταρικά συστατικά τους, ενώ τα μεταβιοτικά περιέχουν στη σύνθεσή τους μεταβολίτες, που παράγονται από προβιοτικά στελέχη. (Biswas & Das Mohapatra, 2023; Shenderov et al., 2020) Οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί μπορούν να παράξουν πολυάριθμες βιοδραστικές ουσίες χαμηλού και μεγαλύτερου μοριακού βάρους όπως βακτηριοσίνες, αντιμικροβιακά μόρια, βραχείας αλυσίδας λιπαρά οξέα (Short Chain Fatty Acids-SCFA), βιοεπιφανειοδραστικά, πεπτιδογλυκάνες, πολυσακχαρίτες, τείχοϊκά οξέα, λιποπρωτεΐνες, γλυκοπρωτεΐνες, βιταμίνες, νουκλεϊκά οξέα, αντιοξειδωτικά, πρωτεΐνες που περιλαμβάνουν ένζυμα, λεκτίνες, αμινοξέα, πεπτίδια, αυξητικοί παράγοντες, μόρια σηματοδότησης και μεταφοράς, φαινολικές ενώσεις, συμπαράγοντες κ.λπ. Κατά συνέπεια οι μικροοργανισμοί αυτοί, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή μεταβιοτικών και χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία και τη πρόληψη χρόνιων ασθενειών στον άνθρωπο. (Biswas & Das Mohapatra, 2023)

Στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται τα μελετούμενα σε αυτή την πτυχιακή εργασία μεταβιοτικά, τα βακτήρια από τα οποία παράγονται, η παρουσία τους σε διάφορα βιολογικά υγρά και οι προσδιοριζόμενες συγκεντρώσεις σε αυτά, σύμφωνα με την διαδικτυακή πλατφόρμα Human Metabolome Database (HMDB) (*Human Metabolome Database*, n.d.)

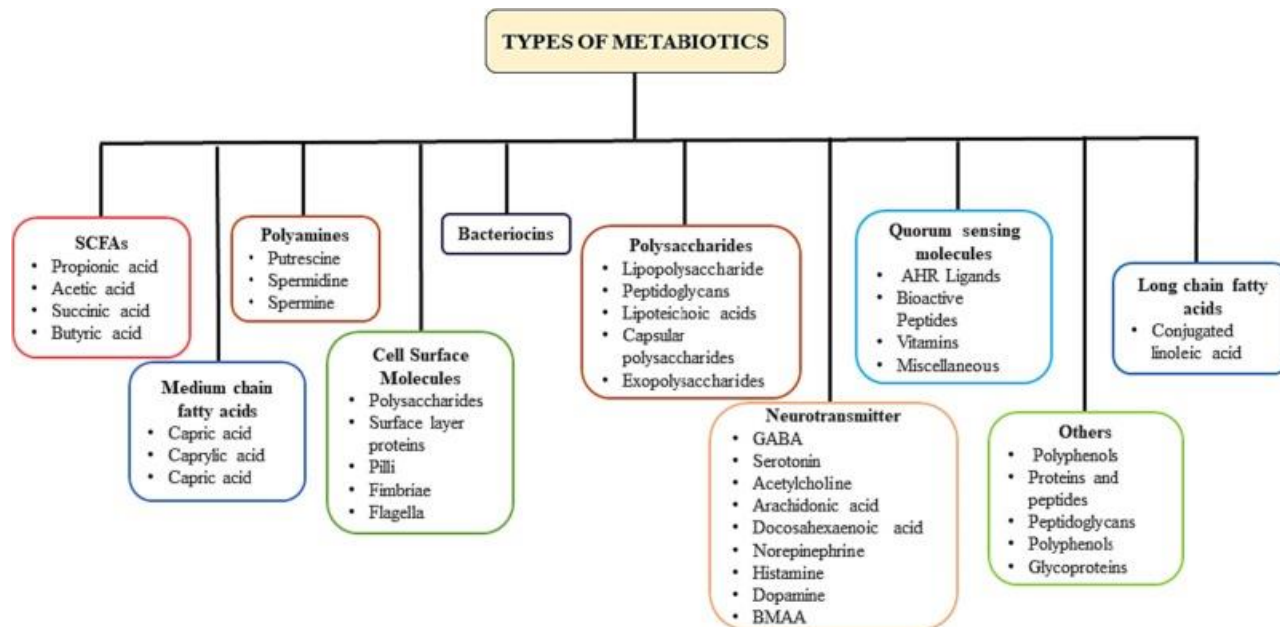
Πίνακας 1 Μελετούμενα μεταβιοτικά, χαρακτηριστικοί μικροοργανισμοί που τα παράγουν και η συγκέντρωσή τους σε βιολογικά υγρά εθελοντών

ΜΕΤΑΒΙΟΤΙΚΑ	ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΑΠΟ ΤΟΥΣ ΟΠΟΙΟΥΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΙ	ΑΝΑΦΟΡΕΣ	ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΥΓΡΑ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΝΤΑΙ (https://hmdb.ca/)	ΕΝΔΕΙΚΤΙΚΕ Σ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΣΤΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΥΓΡΑ (https://hmdb.ca/)
Urolithin B	1) Bifidobacterium pseudocatenulatum INIA P815	(Gaya et al., 2018)	Ούρα, αίμα	Not quantified
	2) Gordonibacter urolithinfaciens και Ellagibacter isourolithinifaciens	(García-Villalba et al., 2020)		
Urolithin A	1) Bifidobacterium pseudocatenulatum INIA P815	(Gaya et al., 2018)	Αίμα, κόπρανα, ούρα	Not quantified
	2) Gordonibacter (G. pamelaee και G. urolithinfaciens), Ellagibacter isourolithinifaciens	(Kujawska & Jodynis-Liebert, 2020)		
Enterodiol	Απομεθυλίωση μέσω Butyribacterium methylotrophicum, Eubacterium callanderi, Eubacterium limosum και Peptostreptococcus productus και διυδροξυλίωση Clostridium scindens και Eggerthella lenta	(Speckmann et al., 2024)	Αίμα, κόπρανα ούρα	Αίμα: 0,0014 uM Ούρα: 0.0247 umol/mmol creatinine
Enterolactone	Ruminococcus sp.	(Jin et al., 2007)	Αίμα, κόπρανα ούρα	Αίμα: 0.0041 uM Ούρα: 0.208 umol/mmol creatinine
	Coriobacteriaceae (Slackia equolifaciens και	(M. Li et al., 2022)	Αίμα, ούρα	Not quantified

Dihydroresveratro 1	Adlercreutzia equolifaciens, Eggerthella lenta ATCC 43055)			
Piceid	Bacillus cereus NCTR-466	(M. Li et al., 2022)	Αίμα, ούρα	Not quantified
Catechol	P. solanacearum και Rhizobium sp.	(Knezevic et al., 2021)	Αίμα, κόπρανα, σάλιο, ούρα	Αίμα: 0.714 +/- 0.201 uM Κόπρανα: 10.353 +/- 4.995 nmol/g wet feces Ούρα: 4.7 (2.0- 8.5) umol/mmol creatinine
Pyrogallol	Adlercreutzia, Eggerthella και Lactiplantibacillus plantarum KACC11451, L. plantarum	(Choi et al., 2023)	Αίμα, κόπρανα, ούρα	Ούρα: 0.07 umol/mmol creatinine
S-equol	1) Coriobacteriaceae	(Gong et al., 2023)	Αίμα, ούρα	Αίμα: 0.0006 uM Ούρα: 0.00590 +/- 0.0120 umol/mmol creatinine
	2) Στελέχη Bacteroides ovatus spp., Streptococcus intermedius spp. και Ruminococcus productus SNU-Julong 732 ,Enterococcus faecium EPI1, Lactobacillus mucosae EPI2, Finegoldia magna EPI3 και Veillonella sp.	(Selma et al., 2009)		
γ-Valerolactone	Eggerthella lenta και Flavonifractor plautii	(Santangelo et al., 2019)	Αίμα	Not quantified
Protocatehuic acid	P. solanacearum και Rhizobium sp.	(Knezevic et al., 2021)	Αίμα, κόπρανα ούρα	Αίμα: 0.224 +/- 0.036 uM Κόπρανα: 0.973 (0.0130-6.0148) nmol/g wet feces Ούρα: 0.229 umol/mmol

				creatinine
Menaquinone (K2)	B. subtilis, Flavobacterium, βακτήρια γαλακτικού οξέος (Lactococcus, Lactobacillus, Enterococcus, Leuconostoc και Streptococcus)	(Ren et al., 2020)	Αίμα, ούρα	Not Quantified
Vitamin B1 (Thiamine)	Bacteroides fragilis, Prevotella, Fusobacterium varium, Actinobacteria, και Clostridium	(Wan et al., 2022)	Not Quantified	Not Quantified
Riboflavin (B2)	Bacteroidetes, Fusobacteria, και Proteobacteria, Clostridium acetobutylicum, Eremothecium ashbyii, Ashbya gossypii, Bacillus subtilis	(Wan et al., 2022)	Αίμα, Κόπρανα, Σάλιο, Ούρα	Αίμα: 0.00797-0.0399 uM Κόπρανα: Not Quantified Σάλιο: 0.058 +/- 0.048 uM Ούρα: 0.0255 +/- 0.0208 umol/mmol creatinine
Pyridoxine (B6)	B. fragilis και P. copri (Bacteroidetes), Bifidobacterium longum και Collinsella aerofaciens (Actinobacteria) και H. pylori (Proteobacteria)	(Wan et al., 2022)	Αίμα, Κόπρανα, Ούρα	Αίμα: 0.025 (0.007-0.060) uM Κόπρανα: Not Quantified Ούρα: <1 nmol/mmol creatinine
	Escherichia coli	(Fitzpatrick et al., 2007)		

Στην Εικόνα 2 παρουσιάζονται όλες οι κατηγορίες μεταβιοτικών ουσιών και παραδείγματα αυτών.



Εικόνα 2 Τύποι μεταβιοτικών

Πηγή: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2589014X23002542>

Τα μεταβιοτικά μικροβιακής προέλευσης ταξινομούνται σε πολυάριθμες κατηγορίες, ωστόσο στην εν λόγω πτυχιακή εργασία παρουσιάζονται και αναλύονται εκτενέστερα οι βιταμίνες και οι φαινόλες.

1.5. ΒΙΤΑΜΙΝΕΣ ΩΣ ΜΕΤΑΒΙΟΤΙΚΑ

Κριτήρια για να ονομαστεί μια ένωση βιταμίνη

Οι βιταμίνες είναι οργανικές ενώσεις που ταξινομούνται ως βασικά θρεπτικά συστατικά και πρέπει να προσλαμβάνονται σε περιορισμένες ποσότητες. Εξ ορισμού, οι βιταμίνες έχουν τα ακόλουθα δύο χαρακτηριστικά:

(α) Είναι οργανικές ενώσεις, που δεν κατατάσσονται στη κατηγορία των υδατανθράκων, λιπιδίων ή πρωτεϊνών και είναι απαραίτητες για την εκτέλεση μιας συγκεκριμένης μεταβολικής λειτουργίας ή για την πρόληψη μιας συγκεκριμένης ανεπάρκειας.

(β) Το σώμα δεν μπορεί να συνθέσει επαρκείς ποσότητες για τη διατήρηση της υγείας, επομένως πρέπει να λαμβάνεται μέσω της διατροφής. (Anastassakis, 2022)

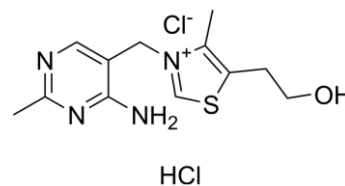
1.5.1. ΟΡΙΣΜΟΣ

Στο σώμα, υπάρχουν κάποιες ενώσεις, οι οποίες μπορούν να επηρεάσουν μια ποικιλία χημικών αντιδράσεων στα ζωντανά κύτταρα, οι οποίες ονομάζονται καταλύτες (catalysts). Οι περισσότεροι από αυτούς είναι πρωτεΐνες που λειτουργούν ως ένζυμα, μερικά από τα οποία απαιτούν επιπλέον «συμπαράγοντες» για να ολοκληρώσουν τις λειτουργίες τους. Οι συμπαράγοντες αυτοί, μπορεί να είναι είτε μέταλλα, όπως μαγνήσιο, ασβέστιο και χαλκός ή οργανικές ενώσεις, όπως οι βιταμίνες, οι οποίες πρέπει να καταναλώνονται μέσω της διατροφής καθώς ο οργανισμός, συνήθως, δεν μπορεί να τις συνθέσει μόνος του. Οι βιταμίνες σε αντίθεση με τα ανόργανα άλατα, καταστρέφονται ευκολότερα έχοντας ως αποτέλεσμα η έλλειψη αυτών να μπορεί να βλάψει και να σταματήσει ορισμένες λειτουργίες του σώματος, ενώ η ανεπάρκεια τους μπορεί να είναι θανατηφόρος. Το σώμα απαιτεί μικρές ποσότητες βιταμινών, μετρούμενες σε χιλιοστόγραμμα ή μικρογραμμάρια, και σε ορισμένες περιπτώσεις, οι υπερβολικές ποσότητες μπορεί να είναι επιβλαβείς. Ορισμένες βιταμίνες (βιταμίνη D και βιταμίνη K, βιταμίνες του συμπλέγματος B, κλπ) εμφανίζουν συνεργιστικές δράσεις. Ειδικότερα μπορεί να εμπλέκονται σε διαφορετικά στάδια της ίδιας βιολογικής διεργασίας και έλλειψη της μίας να εμποδίζει τη λειτουργία της άλλης. Βρίσκονται σε μικρές ποσότητες τόσο σε φυτικές όσο και σε ζωικές τροφές. Διαφέρουν ως προς τη χημική τους δομή, αλλά πλέον συντίθενται και μπορούν να χορηγηθούν ως ή σε διατροφικά συμπληρώματα. (Riccioni et al., 2003)

Παρακάτω παρουσιάζονται οι βιταμίνες που εξετάστηκαν στην παρούσα πτυχιακή εργασία και ο ρόλος τους ως μεταβιοτικά :

1.5.2. ΘΕΙΑΜΙΝΗ (THIAMINE/ VITAMIN B1)

Η θειαμίνη (Εικόνα 3), είναι γνωστή για τη σημασία της στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (Central Nervous System-CNS), καθώς ρυθμίζει τον μεταβολισμό της γλυκόζης, που αποτελεί την κύρια πηγή ενέργειας για τον εγκέφαλο. Αυτή η βιταμίνη υπάρχει τόσο σε μη φωσφορυλιωμένες όσο και σε φωσφορυλιωμένες μορφές, όπως μονοφωσφορική θειαμίνη (TMP-Thiamine Monophosphate), διφωσφορική θειαμίνη (TDP-Thiamine Diphosphate) και τριφωσφορική θειαμίνη (TTP-Thiamine Triphosphate). Επίσης η



Εικόνα 3 Χημική δομή θειαμίνης

Πηγή:https://www.medchemexpress.com/Thiamine_hydrochloride.html

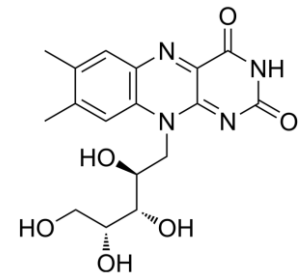
θειαμίνη στα μιτοχόνδρια αποτελεί ζωτικής σημασίας συμπράγοντα για τη σύνθεση τριφωσφορικής Αδενοσίνης (ATP-Adenosine Triphosphate). Ακόμη η βιταμίνη αυτή συμμετέχει στο μεταβολισμό του γλουταμινικού (glutamate), γάμμα αμινοβουτυρικού οξέος (GABA-Gamma Amino Butyric Acid) και της ακετυλοχολίνης (acetylcholine). Σύμφωνα με μελέτες έχει εκτιμηθεί ότι τα βακτήρια

του ανθρώπινου εντέρου θα μπορούσαν να παρέχουν το 2,3% της ημερήσιας πρόσληψης αναφοράς θειαμίνης. Συντίθεται κυρίως από τα είδη *Fusobacteria* και *Bacteroidetes*. Σοβαρή έλλειψη της θειαμίνης οδηγεί στη νόσο μπέρι-μπέρι(beriberi) η οποία επηρεάζει το νευρικό, γαστρεντερικό, καρδιαγγειακό και μυϊκό σύστημα. Τέλος σοβαρή ανεπάρκεια της θειαμίνης οδηγεί στην εκδήλωση του συνδρόμου Wernicke-Korsakoff (WCF) (συνδυάζει τα συμπτώματα

της εγκεφαλοπάθειας Wernicke και του συνδρόμου Korsakoff) προκαλώντας συμπτώματα όπως σύγχυση, ψύχωση, παραλήρημα και απώλεια μνήμης. (Rudzki et al., 2021)

1.5.3. ΡΙΒΟΦΛΑΒΙΝΗ (RIBOFLAVIN/ VITAMIN B2)

Η ριβοφλαβίνη (Εικόνα 4), παράγεται από τη μικροχλωρίδα του εντέρου και είναι διαθέσιμη στα ζυμωμένα τρόφιμα. Η βιταμίνη αυτή έχει νευροπροστατευτικές ιδιότητες. Ερευνητικές μελέτες σε ζώα έδειξαν ότι η έλλειψη ριβοφλαβίνης μπορεί να οδηγήσει σε νευροπάθεια και μειωμένο σχηματισμό μυελίνης. Ο βασικός ρόλος αυτής της βιταμίνης είναι η αντιμετώπιση της ημικρανίας, της νόσου του Πάρκινσον, και της κατάθλιψης. Τα βακτήρια του ανθρώπινου εντέρου μπορούν να παρέχουν το 2,8% της ημερήσιας πρόσληψης αναφοράς της ριβοφλαβίνης. Η ριβοφλαβίνη έχει διάφορους αντιφλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς δράσης. (Rudzki et al., 2021)

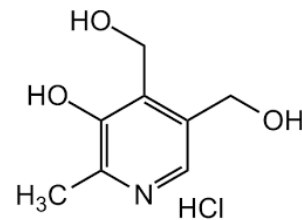


Εικόνα 4 Χημική δομή ριβοφλαβίνης

Πηγή: <https://www.medchemexpress.com/riboflavin.html>

1.5.4. ΠΥΡΙΔΟΞΙΝΗ (PYRIDOXINE/ VITAMIN B6)

Η πυριδοξίνη (Εικόνα 5), βρίσκεται στο ανθρώπινο σώμα σε 6 διαφορετικά παράγωγά της και λειτουργεί ως συμπράγοντας για περισσότερες από 100 ενζυμικές αντιδράσεις. Αυτές οι αντιδράσεις περιλαμβάνουν αμινοξέα, αιμογλοβίνη, βιοσύνθεση νευροδιαβιβαστών μεταβολισμό λιπαρών οξέων και γλυκονογένεση. Στο κεντρικό νευρικό σύστημα το αρωματικό ένζυμο L-amino decarboxylase που εξαρτάται από την πυριδοξάλη-5 φωσφορική (PLP-pyridoxal 5-phosphate) καταλύει την σύνθεση δύο σημαντικών νευροδιαβιβαστών, της σεροτονίνης και της ντοπαμίνης. Η δεύτερη αποτελεί πρόδρομη ένωση της ανδρεναλίνης. Η βιταμίνη αυτή έχει αντιφλεγμονώδη δράση και προσφέρει νευροπροστασία σε διάφορες ψυχιατρικές διαταραχές όπως κατάθλιψη, σχιζοφρένεια και αγχώδη διαταραχή.



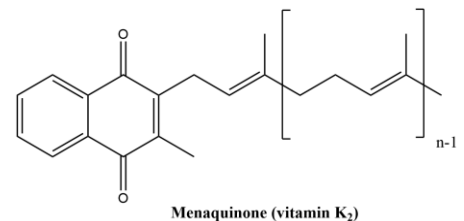
Εικόνα 5 Χημική δομή πυριδοξίνης

Πηγή: <https://www.chemodex.com/de/products/pyridoxine-hydrochloride/>

Ανεπάρκεια της πυριδοξίνης αυξάνει το ρίσκο φλεγμονοδών διαταραχών όπως ρευματοειδής αρθρίτιδα και καρδιαγγειακά νοσήματα. (Rudzki et al., 2021)

1.5.5. ΜΕΝΑΚΙΝΟΝΗ (MENAQUINONE/ VITAMIN K2)

Η βιταμίνη K (Εικόνα 6), είναι λιποδιαλυτή βιταμίνη, η οποία σε συνεργασία με τη βιταμίνη D διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό του ασβεστίου και στην υγεία των οστών. Η βιταμίνη D προάγει τη παραγωγή πρωτεϊνών που εξαρτώνται από την βιταμίνη K για την απορρόφηση του ασβεστίου, ενώ η ίδια βιταμίνη K ενεργοποιεί αυτές τις πρωτεΐνες. Μελέτες υποστηρίζουν ότι αυτές οι βιταμίνες δρουν συνεργιστικά όχι μόνο για την υγεία των οστών αλλά



Εικόνα 6 Χημική δομή μενακινόνης

Πηγή: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Menaquinone_%28vitamin_K2%29.png

και για την υγεία του ανοσοποιητικού συστήματος. Επίσης αυτές οι δύο βιταμίνες έχουν αντιφλεγμονώδη δράση. (Gholami et al., 2023) Οι μενακινόνες είναι βακτηριακά παραγόμενες μορφές της βιταμίνης K που παράγονται από μικροοργανισμούς του εντέρου και καταναλώνονται με τη διατροφή. (Ellis et al., 2021) Ανεπάρκεια μενακινόνης (K2) οδηγεί σε αυξημένο κίνδυνο καταγμάτων και άλλων οστικών προβλημάτων. (Gholami et al., 2023)

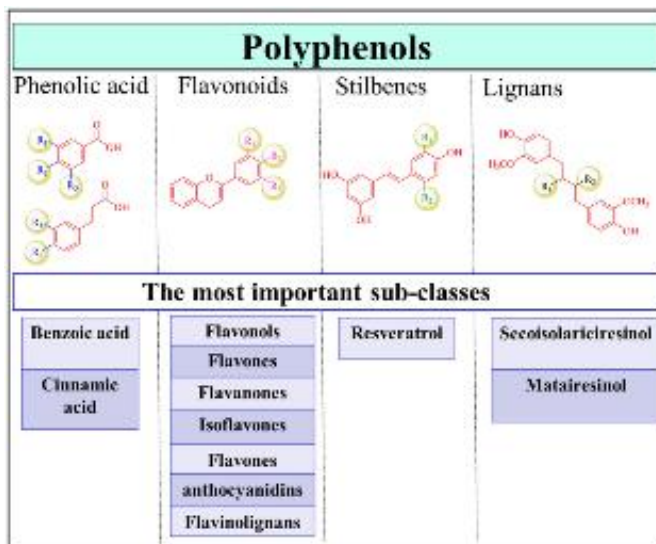
1.5.6. ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΠΟΥ ΠΑΡΑΓΟΥΝ ΒΙΤΑΜΙΝΕΣ ΣΤΟ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΜΙΚΡΟΒΙΩΜΑ

Οι παραγωγοί των βιταμινών στο ανθρώπινο σώμα είναι κάποια προβιοτικά βακτήρια (π.χ. *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus gasseri* και *Lactobacillus reuteri*), βακτήρια του γένους *Bifidobacterium* όπως το *B. Adolescentis*, τα *Propionibacteria freudenreichii* και άλλα μέλη της μικροχλωρίδας του εντέρου. Συγκεκριμένα, μπορούν να συνθέτουν βιταμίνη K και βιταμίνες του συμπλέγματος B, όπως φολικό οξύ, βιοτίνη, νιασίνη, κοβαλαμίνη, ριβοφλαβίνη, θειαμίνη, πυριδοξίνη και παντοθενικό οξύ. (Singh et al., 2018)

1.6. ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ-ΦΑΙΝΟΛΕΣ

1.6.1. ΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Οι φαινολικές ενώσεις, είναι μια ομάδα βιολογικά ενεργών ενώσεων που αποτελούνται από ένα ευρύ φάσμα σύνθετων δομών. Συνήθως, οι ενώσεις αυτές είναι μέρος της ανθρώπινης διατροφής και απαντώνται στα τρόφιμα κυρίως φυτικής προέλευσης, όπως τα φρούτα, τα λαχανικά, τα δημητριακά, ο καφές, κ.ά. Ταξινομούνται σε φαινολικά οξέα και φαινολικές αλκοόλες με βασικό μονομερές τους, τον φαινολικό δακτύλιο. Οι φαινολικές ενώσεις μπορούν να διακριθούν σε πολλές κατηγορίες, αλλά οι κύριες ομάδες τους είναι τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή, τα στυλβένια, οι φαινολικές αλκοόλες και οι λυγνάνες όπως παρουσιάζεται στην εικόνα



(Εικόνα 7) (Abbas et al., 2017). Συγκεκριμένα τα φλαβονοειδή ταξινομούνται ως φλαβόνες, φλαβανόνες, φλαβονόλες, φλαβανόλες και ισοφλαβόνες, ενώ τα φαινολικά οξέα ταξινομούνται σε υδροξυβενζοϊκά οξέα και υδροξυκινικά οξέα. (Abbas et al., 2017)

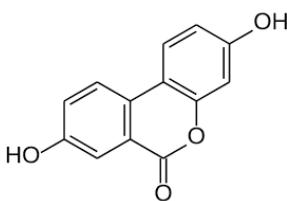
Εικόνα 7 Φαινολικές ενώσεις

Πηγή: https://www.researchgate.net/figure/Polyphenol-classification-The-classes-of-polyphenols-include-phenolic-acids-flavonoids_fig1_319219463

Οι φαινόλες, είναι πιθανώς οι σημαντικότεροι δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγονται από τα φυτά, και έχουν προσελκύσει τεράστιο ενδιαφέρον λόγω των ευεργετικών επιδράσεων στην υγεία, όπως είναι οι αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιβακτηριακές, αντιλιπογενετικές και νευροπροστατευτικές δράσεις. Τα εντερικά μικρόβια(πχ *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, κ.α) καταβολίζουν τα φαινολικά συστατικά για να απελευθερώσουν βιοδραστικούς μεταβολίτες(βραχείας αλύσου λιπαρά οξέα , φαινολικές ενώσεις κλπ). Έχει αναφερθεί ότι το μεγαλύτερο μέρος της πρόσληψης φαινολών από τη διατροφή παραμένει μη απορροφήσιμο στο λεπτό έντερο και μπορεί να συσσωρεύεται στο παχύ έντερο και να μεταβολίζεται εκτενώς από την εντερική μικροχλωρίδα. Συνεπώς, η εντερική μικροχλωρίδα παίζει σημαντικό ρόλο στη βιομετατροπή και τον μεταβολισμό των αρχικών φαινολικών δομών σε μεταβολίτες χαμηλού μοριακού βάρους, οι οποίοι μπορούν να απορροφηθούν εύκολα στο λεπτό έντερο και να συμβάλουν στα οφέλη για την υγεία του ξενιστή. (Wang et al., 2022)

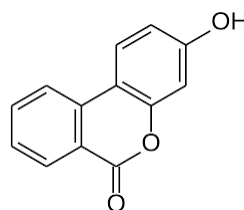
Παρακάτω, αναφέρονται κάποιες γενικές πληροφορίες για τα εξεταζόμενα μεταβιοτικά φαινολικής προέλευσης.

1.6.2. ΟΥΡΟΛΙΘΙΝΕΣ



Εικόνα 8 Χημική δομή ουρολιθίνης Α

Πηγή:https://en.wikipedia.org/wiki/Urolithin_A



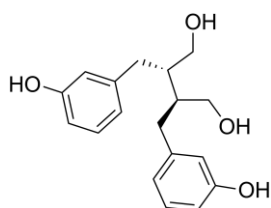
Εικόνα 9 Χημική δομή ουρολιθίνης Β

Πηγή:
https://en.wikipedia.org/wiki/Urolithin_B

Οι ελλαγιτανίνες υδρολύονται στο λεπτό έντερο και μετατρέπονται σε ελλαγικό οξύ . Οι ελλαγιτανίνες και το ελλαγικό οξύ δεν απορροφώνται ικανοποιητικά από το λεπτό έντερο, οπότε το ελλαγικό οξύ μεταβολίζεται με τη σειρά του από μικροοργανισμούς του εντέρου σε άλλες ενώσεις, μέσω αντιδράσεων διάσπασης του δακτυλίου της λακτόνης (lactone-ring cleavage), αποκαρβοξυλίωσης (decarboxylation) και αφυδροξυλίωσης (dehydroxylation). Αυτές οι ενώσεις είναι οι ουρολιθίνες , εκ των οποίων οι ουρολιθίνες Β (Εικόνα 8) και Α (Εικόνα 9) βρίσκονται κυρίως στο πλάσμα και στα ούρα. (Gaya et al., 2018), (Hasheminezhad et al., 2022). Οι ουρολιθίνες παρουσιάζουν αυξανόμενο ενδιαφέρον λόγω των ποικίλων δράσεών τους στην υγεία του ανθρώπου όπως προστασία του καρδιαγγειακού συστήματος, αντιφλεγμονώδη και αντιδιαβητική δράση, και αντικαρκινικές και αντιγηρατικές ιδιότητες. (Hasheminezhad et al., 2022)

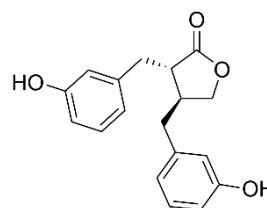
1.6.3. ΕΝΤΕΡΟΛΑΚΤΟΝΗ (ENTEROLACTONE) & ΕΝΤΕΡΟΔΙΟΛΗ (ENTERODIOL)

Οι εντερολιγνάνες (enterolignans), δηλαδή η εντερολακτόνη (Εικόνα 11) και η εντεροδιόλη (Εικόνα 10), είναι οι βασικοί μεταβολίτες των φυτικών λιγνάνων που παράγονται από τη μικροβιακή χλωρίδα του εντέρου. Αυτοί οι μεταβολίτες διαθέτουν αυξημένη δραστηριότητα και επιδρούν θετικά στην μεταβολική και καρδιαγγειακή υγεία. Γενικά οι λιγνάνες μπορεί να βοηθήσουν στη μείωση του καρδιαγγειακού κινδύνου προάγοντας τη λειτουργία του ενδοθηλίου, βελτιώνοντας το λιπιδαιμικό προφίλ και μειώνοντας τη φλεγμονή. (Laveriano-Santos et al., 2024)



Εικόνα 11 Χημική δομή εντεροδιόλης

Πηγή:<https://en.wikipedia.org/wiki/Enterodiol>

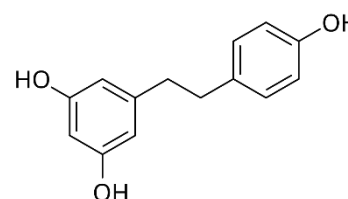


Εικόνα 10 Χημική δομή εντερολακτόνης

Πηγή:<https://en.wikipedia.org/wiki/Enterolactone>

1.6.4. ΔΙΥΔΡΟΡΕΣΒΕΡΑΤΡΟΛΗ (DIHYDRORESVERATROL)

Η ρεσβερατρόλη (Εικόνα 12), μπορεί να μεταβολιστεί από εντερικά βακτήρια και να παραχθούν οι μεταβολίτες διυδρορεσβερατρόλη (dihydroresveratrol/ DHR) και lunularin. Αυτοί οι μικροβιακοί μεταβολίτες είναι οι κύριες ουσίες που απορροφώνται από το εντερικό επιθήλιο και έχει αποδειχθεί ότι διαφέρουν σημαντικά μεταξύ των ατόμων. Έχει βρεθεί ότι οι ενώσεις DHR και lunularin παρουσίασαν ισχυρότερες αντιφλεγμονώδεις και αντικαρκινικές δράσεις από τη ρεσβερατρόλη σε ιστούς ποντικών. (F. Li et al., 2022; B. Zhang et al., 2022)

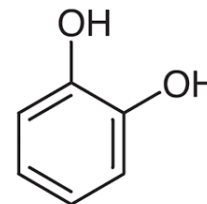


Εικόνα 12 Χημική δομή διυδρορεσβερατρόλης

Πηγή:<https://chemfaces.com/natural/Dihydroresveratrol-CFN98987.html>

1.6.5. ΚΑΤΕΧΟΛΗ (CATECHOL)

Οι κατεχίνες είναι φλαβαν-3-ολες (flavan-3-ols), δηλαδή μια υποκατηγορία των φλαβονοειδών (flavonoids). Οι κατεχίνες έχουν αποδεδειγμένες αντιοξειδωτικές ικανότητες και θετική δράση στη καρδιαγγειακή υγεία. Ο μεταβολισμός των κατεχινών μπορεί να λάβει χώρα μέσω πολλών διαφορετικών βιοχημικών οδών, όπου μόνο μερικές από αυτές παράγουν κατεχόλη (Εικόνα 13). Συγκεκριμένα το *P. solanacearum* και το *Rhizobium sp.*, διασπούν οξειδωτικά την κατεχίνη σε πρωτοκατεχικό οξύ, το οποίο στη συνέχεια αποκαρβοξυλιώνεται σε κατεχόλη. (Knezevic et al., 2021)



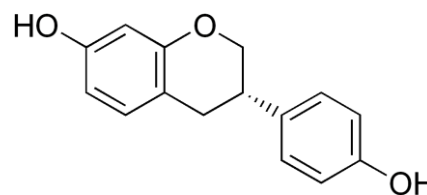
Εικόνα 13 Χημική δομή κατεχόλης

Πηγή: <https://www.tcichemicals.com/IN/en/p/P0567>

Η κατεχόλη χρησιμοποιείται επίσης ευρέως στην ιατρική ως πρόδρομη ουσία φαρμάκων για τη αντιμετώπιση της νόσου του Πάρκινσον, και τη μείωση της αρτηριακής πίεσης. (Bukowska et al., 2015)

1.6.6. S- ΕΚΟΥΟΛΗ (S- EQUOL)

Η S-Εκουόλη (Εικόνα 14), ένας μεταβολίτης της δαϊδεΐνης (daidzein), που ανήκει στην ομάδα των ισοφλαβόνων βρίσκεται κυρίως στη σόγια, και έχει ισχυρές αντιοξειδωτικές δράσεις. Η αντιοξειδωτική δραστηριότητα της μπορεί να είναι αποτελεσματική στην πρόληψη της άνοιας, αναστέλλοντας την φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών TAU (tubulin associated unit) που σχετίζονται με τη νόσο του Αλτσχάιμερ. Επιπλέον, οι ισοφλαβόνες είναι γνωστό ότι προλαμβάνουν και θεραπεύουν διάφορες ασθένειες, συμπεριλαμβανομένων των καρδιαγγειακών παθήσεων, της οστεοπόρωσης, του διαβήτη, των εγκεφαλικών παθήσεων, της υπέρτασης, της παχυσαρκίας και της φλεγμονής. Επίσης, έχουν θετικές επιδράσεις στην ανωμαλία της εμμήνου ρύσεως σε γυναίκες που δεν έχουν φτάσει στην εμμηνόπαυση και στην ανακούφιση των συμπτωμάτων της εμμηνόπαυσης σε γυναίκες μέσης ηλικίας. (Kim, 2021)

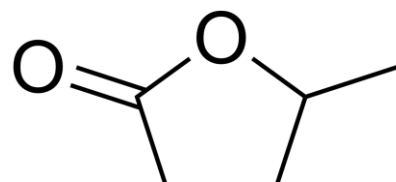


Εικόνα 14 Χημική δομή s- εκουόλης

Πηγή: <https://en.wikipedia.org/wiki/Equol>

1.6.7. γ- ΒΑΛΕΡΟΛΑΚΤΟΝΗ (γ- VALEROLACTONE)

Η 5-(3',4'-Διυδροξυφαινυλ)-γ-βαλερολακτόνη (5-(3',4'-dihydroxyphenyl)-γ-valerolactone ή DHPV) (Εικόνα 15), έχει αναγνωριστεί ως ο σημαντικότερος μικροβιακός μεταβολίτης των προκυανιδινών (procyanidins) και των (επι)κατεχινών (epicatechins). Μελέτες έχουν δείξει ότι η DHPV και οι συζευγμένες μορφές της έχουν ανιχνευτεί, σε χαμηλές συγκεντρώσεις μΜ στο πλάσμα και στα ούρα μετά την πρόσληψη διαφόρων τροφίμων πλούσιων σε προανθοκυανιδίνες όπως

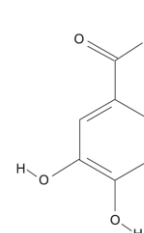


Εικόνα 15 Χημική δομή γ-βαλερολακτόνης

Πηγή: <https://www.caymanchem.com/product/28240>

σταφύλι και κρασί, ξηροί καρποί, κακάο και μαύρη σοκολάτα (proanthocyanidins) (Lee et al., 2017). Μέχρι στιγμής, έχει βρεθεί ότι η DHPV παρουσιάζει αντιφλεγμονώδεις και αντιπολλαπλασιαστικές δράσεις. (Sánchez-Patán et al., 2011)

1.6.8. ΠΡΩΤΟΚΑΤΕΧΙΚΟ ΟΞΥ (PROTOCATECHUIC ACID)



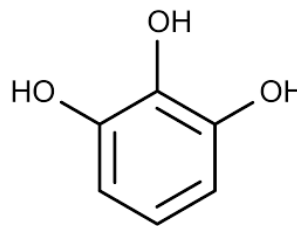
Εικόνα 16 Χημική δομή πρωτοκατεχικού οξέος

Το πρωτοκατεχικό οξύ (Protocatechuic acid-PCA) (Εικόνα 16) είναι ένας τύπος ευρέως διαδεδομένου φαινολικού οξέος. Τα φαινολικά συστατικά, όπως οι κατεχίνες και τα φλαβονοειδή, αποτελούν πρόδρομες ενώσεις στην μικροβιακή παραγωγή του PCA. Μέσω διαφόρων ενζυματικών αντιδράσεων που περιλαμβάνουν υδροξυλίωση, οξείδωση και διάσπαση του δακτυλίου, οι μικροοργανισμοί μπορούν να μετατρέψουν αυτά τα φαινολικά συστατικά σε PCA. Το πρώτοκατεχικό οξύ, αποτελεί πολύ κοινό συστατικό στη διατροφή του ανθρώπου, διότι είναι παρόν σε πίτυρα και καστανό ρύζι καθώς και σε μεγάλη ποικιλία φρούτων όπως τα δαμάσκηνα. Επίσης είναι γνωστό για τις θετικές του δράσεις, όπως αντιοξειδωτική δραστηριότητα, αντιβακτηριακή δραστηριότητα, αντικαρκινική δραστηριότητα, αντιγηραντική δραστηριότητα, αντιφλεγμονώδη δραστηριότητα, κ.α. (Kakkar & Bais, 2014)

Πηγή: https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structure-of-protocatechuic-acid_fig1_282743699

1.6.9. ΠΥΡΟΓΑΛΛΟΛΗ (PYROGALLOL)

Η πυρογαλλόλη (Εικόνα 17), επίσης γνωστή ως πυρογαλλικό οξύ (1,2,3-τριυδροξυβενζόλιο), χρησιμοποιείται ευρέως στις βιομηχανίες τροφίμων και φαρμάκων. Η εν λόγω ένωση μπορεί να παραχθεί μέσω υδροξυλίωσης της κατεχόλης, από μικροοργανισμούς. Εντοπίζεται σε διάφορα φρούτα, όπως μάνγκο, και εσπεριδοειδή, όπως λεμόνι, λάιμ και μανταρίνι. Η πυρογαλλόλη έχει ισχυρή αντιμικροβιακή δράση εναντίον του *S. aureus* μέσω της αναστολής ενζύμων που συμμετέχουν στη διαδικασία οξείδωσης. (Padilha Da Silva et al., 2024)



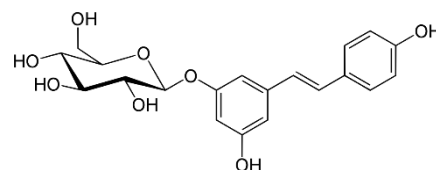
Εικόνα 17 Χημική δομή πυρογαλλόλης

Πηγή: <https://en.wikipedia.org/wiki/Pyrogallol>

1.6.10. ΠΟΛΥΔΑΤΙΝΗ (POLYDATIN/ PICEID)

Η πολυδατίνη (PD, επίσης γνωστή ως piceid) (Εικόνα 18), μπορεί να ανιχνευθεί σε σταφύλια, φυστίκια, κόκκινα κρασιά, κ.α. Η εν λόγω ένωση, είναι η πιο άφθονη μορφή της ρεσβερατρόλης στη φύση. Προηγούμενες μελέτες έχουν

δείξει ότι η PD διαθέτει πολλές βιοϊατρικές ιδιότητες όπως αντιοξειδωτική δράση, καρδιοπροστατευτική δραστηριότητα, αντιφλεγμονώδεις και ανοσορρυθμιστικές λειτουργίες. (Du et al., 2013)



Εικόνα 18 Χημική δομή πολυδατίνης

Πηγή: <https://en.wikipedia.org/wiki/Piceid>

Στον Πίνακα 2 παρουσιάζονται τα εξεταζόμενα μεταβιοτικά, από που προέρχονται καθώς και τα είδη τροφίμων στα οποία περιλαμβάνονται.

Πίνακας 2 Τα εξεταζόμενα μεταβιοτικά, οι ενώσεις από τις οποίες προέρχονται και τα τρόφιμα στα οποία μπορεί να βρίσκονται

ΜΕΤΑΒΙΟΤΙΚΑ	ΑΠΟ ΠΟΥ ΠΡΟΕΡΧΟΝΤΑΙ	ΤΡΟΦΙΜΑ ΠΟΥ ΤΑ ΠΕΡΙΛΑΜΒΑΝΟΥΝ	ΑΝΑΦΟΡΕΣ
Urolithin B	Ελλαγιταννίνες / Ελλαγικά οξέα	Μούρα, φράουλες, σμέουρα, βατόμουρα, ρόδι, τροπικά φρούτα (camu-camu), ξηροί καρποί (καρύδια, κάστανα, αμύγδαλα, βελανίδια δρυός, φιστίκια, πεκάν), κρασιά και αποστάγματα παλαιωμένα σε δρύινα βαρέλια και τσάι	(García-Villalba et al., 2016)
Urolithin A	Ελλαγιταννίνες / Ελλαγικά οξέα	Μούρα, φράουλες, σμέουρα, βατόμουρα, ρόδι, τροπικά φρούτα (camu-camu), ξηροί καρποί (καρύδια, κάστανα, αμύγδαλα, βελανίδια δρυός, φιστίκια, πεκάν), κρασιά και αποστάγματα παλαιωμένα σε δρύινα βαρέλια και τσάι	(García-Villalba et al., 2016)
Enterodiol	Λιγνάνες	Λιναρόσπορος, σουσάμι, δημητριακά ολικής άλεσης, φασόλια, μούρα, ξηροί καρποί, διάφοροι σπόροι, λαχανικά, φρούτα και ποτά.	(Bartkiene et al., 2011)
Enterolactone	Λιγνάνες	Λιναρόσπορος, σουσάμι, δημητριακά ολικής άλεσης, φασόλια, μούρα, ξηροί καρποί, διάφοροι σπόροι, λαχανικά, φρούτα και ποτά.	(Bartkiene et al., 2011)
Dihydroresveratrol	Ρεσβερατρόλη (στιλβένιο)	1) Σταφύλια (προϊόντα όπως μαρμελάδες, πουρέδες, χυμοί και κρασί) και φυστίκια (και προϊόντα τους).	(Cassidy et al., 2000)
		2) Μαύρη σοκολάτα και εκχυλίσματα λικέρ κακάο	(Counet et al., 2006)
Piceid	Ρεσβερατρόλη (στιλβένιο)	1) Σταφύλια (προϊόντα όπως μαρμελάδες, πουρέδες, χυμοί και κρασί) και φυστίκια (και προϊόντα τους).	(Cassidy et al., 2000)

		2) Μαύρη σοκολάτα και εκχυλίσματα λικέρ κακάο	(Counet et al., 2006)
Catechol	Ομάδα κατεχινών	Κρεμμύδια, ραδίκια, γκρέιπφρουτ, φράουλες, ελιές, ρίγανη, αβοκάντο, κακάο, βανίλια, ίχνη σε άλλα φρούτα και λαχανικά και σε πολλούς ζυμωμένους χυμούς μούρων και κρασιά	(Knezevic et al., 2021)
Pyrogallol	Catechins group Epigallocatechin gallate	Φυτικά τρόφιμα και ποτά, φρούτα, σοκολάτα, κρασί και τσάι	(Oliveira et al., 2016)
S-equol	Ισοφλαβόνες (ισοφλαβόνες δαιδζεΐνης)	Σόγια και προϊόντα σόγιας, κρόκος αυγού, λάχανο, μαρούλι	(Gong et al., 2023)
γ-Valerolactone	Φλαβον-3-όλες	Φρούτα, λαχανικά, όσπρια, ποτά, σοκολάτες, σάλτσες, χυμούς, δημητριακά, κρασί, μπίρα, ξηρούς καρπούς και παιδικές τροφές	(Aron & Kennedy, 2008)
Protocatehuic acid	Ανθοκυανίνες, φλαβονόλες (κερκετίνη), προκυανιδίνες και κατεχίνες	Λαχανικά, φρούτα, δημητριακά, τσάι και ορισμένα φυτικά ποτά, βότανα και κινέζικα φάρμακα	(Song et al., 2020)
Menaquinone (K2)	Βακτηριακά παραγόμενες μορφές βιταμίνης K	Τυρί, τυρόπηγμα και natto (παραδοσιακό ιαπωνικό φαγητό που αποτελείται από ζυμωμένα φασόλια σόγιας)	(Beulens et al., 2013)
Vitamin B1 (Thiamine)	Βακτηριακά παραγόμενη μορφή της ομάδας βιταμινών B	Δημητριακά ολικής αλέσεως, ψωμί, κρέας (ιδίως χοιρινό) και όσπρια, ξηροί καρποί	(Hrubša et al., 2022)
Riboflavin (B2)	Βακτηριακά παραγόμενη μορφή της ομάδας βιταμινών B	Γαλακτοκομικά προϊόντα, κρέας, δημητριακά, λαχανικά, αυγά, όσπρια, ξηροί καρποί, μανιτάρια και συκώτι	(Hrubša et al., 2022)
Pyroxidine (B6)	Βακτηριακά παραγόμενη μορφή της ομάδας βιταμινών B	Μοσχάρι, χοιρινό, κοτόπουλο, ψάρι, κρέατα οργάνων ,δημητριακά ολικής αλέσεως, μπανάνες ,πατάτες, αλεύρι ολικής αλέσεως	(Da Silva & Gregory, 2020)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΙΟΤΙΚΑ

2.1. Γενικά

Τα μεταβιοτικά έχουν πολλές επιδράσεις στην υγεία, όπως ανοσοτροποποιητικές, αντιμεταλλαξιγόνες, αντιπολλαπλασιαστικές, αντιφλεγμονώδεις, αντι-αποπτωτικές και αντιυπερτασικές. Έχει επίσης διαπιστωθεί ότι συμβάλλουν στη μείωση οξειδωτικού στρες, ρυθμίζουν την αρτηριακή πίεση και διατηρούν την ομοιόσταση του εντέρου. Επίσης συμμετέχουν στη μεθυλίωση DNA (Deoxyribonucleic Acid), τη φωσφορυλίωση, την ακετυλίωση ιστονών, την βιοτινυλίωση, την παρεμβολή RNA (Ribonucleic Acid) και επιγενετικές τροποποιήσεις μέσω ακετυλοτρανσφερασών, αποακετυλασών, μεθυλοτρανσφερασών και φωσφοτρανσφερασών. (Biswas & Das Mohapatra, 2023).

Αξίζει να σημειωθεί ότι, μεταβιοτικά όπως οι διαιτητικές φαινόλες και οι βιταμίνες μπορούν να τροποποιούν άμεσα το εντερικό μικροβίωμα, λόγω χάριν αυξάνοντας τους ευεργετικούς μικροοργανισμούς (*Lactobacillus spp*, *Bifidobacterium spp*. κ.α) ή μειώνοντας τους επιβλαβείς (*Escherichia coli* O157:H7 κ.α.). Έτσι η τροποποιημένη μικροβιακή κοινότητα του εντέρου συμβάλει στη διατήρηση της φυσιολογικής λειτουργίας της υγείας του ξενιστή και στην θεραπεία διαφόρων ασθενειών, όπως η παχυσαρκία, ο διαβήτης, η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου και ακόμη και οι νευροεκφυλιστικές διαταραχές. (Wang et al., 2022)

Κάποιες από τις ασθένειες και νόσους στις οποίες συμβάλλουν τα μεταβιοτικά είναι :

2.2. Καταστολή του καρκίνου, των όγκων και της απόπτωσης

Μεταξύ των μεταβολιτών που παράγονται από τους προβιοτικούς μικροοργανισμούς του εντέρου, τα λιπαρά οξέα βραχείας αλυσίδας (Short Chain Fatty Acid -SCFA) είναι τα πιο αναγνωρισμένα αντικαρκινικά συστατικά, καθώς παρέχουν προστασία σε ένα ευρύ φάσμα καρκίνων, όπως του παχέος εντέρου, του στομάχου, του πνεύμονα, του προστάτη, των ωθηκών κλπ. Ο κύριος στόχος των SCFA είναι η αναστολή της δράσης των αποακετυλασών ιστόνης, μεταβάλλοντας τη δομή των χρωμοσωμάτων καθώς οι αποακετυλάσες αυτές προκαλούν επιγενετικές αλλαγές μέσω της μεταφραστικής τροποποίησης των πρωτεϊνών ιστόνης. Ως εκ τούτου, τα SCFA προωθούν τη μεταγραφή διαφόρων ογκοκατασταλτικών γονιδίων και παρέχουν ανοσοτροποποιητική δραστηριότητα μέσω παραγωγής ρυθμιστικών T κυττάρων. Η μείωση της συγκέντρωσης των SCFA και η αύξηση του pH στο δείγμα κοπράνων αποτελούν ένδειξη καρκίνου του παχέος εντέρου. Είναι προφανές ότι τα SCFA από το προβιοτικό στέλεχος *Propionibacteria freudenreichii* δημιουργούν ένα όξινο περιβάλλον που προάγει τη μετάβαση από την απόπτωση στη νέκρωση μέσα σε ένα καρκινικό κύτταρο. Τα SCFAs που παράγει το *P. freudenreichii* έχουν επίσης παρουσιάσει την αντικαρκινική τους δράση στις ανθρώπινες κυτταρικές σειρές καρκίνου του παχέος εντέρου και του στομάχου. Επιπλέον, οι βακτηριοσίνες που παράγονται από τους μικροοργανισμούς *Enterococcus faecium*, *B. subtilis* και *Bifidobacterium* έχουν αποδειχθεί ότι μειώνουν τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του στομάχου καθώς εμποδίζουν την ανάπτυξη του *H. pylori*. Επομένως, τα μεταβιοτικά μπορούν να

χρησιμοποιηθούν ως βιώσιμη στρατηγική για τη θεραπεία ποικίλων κακοηθειών, λόγω της εξαιρετικής ικανότητάς τους να εκτελούν κρίσιμες εργασίες όπως ο έλεγχος της κυτταρικής διαφοροποίησης, η πρόκληση απόπτωσης, η διακοπή του κυτταρικού κύκλου και ο έλεγχος της επιγενετικής δραστηριότητας (Biswas & Das Mohapatra, 2023).

2.3. Νευροτροποποίηση

Η εκπληκτική αλληλεπίδραση του εγκεφάλου, του στομάχου, του ανοσοποιητικού και του ενδοκρινικού συστήματος ενός ατόμου έχει ως αποτέλεσμα την πλήρη νευροομοιοστάση και υπάρχει μια περίπλοκη αλληλεπίδραση μεταξύ των πληθυσμών του εντερικού μικροβιώματος και του άξονα εντέρου-εγκεφάλου. Οι διαταραχές στον άξονα αυτό μπορούν να οδηγήσουν στην ανάπτυξη νευρολογικών διαταραχών όπως η κατάθλιψη, ο αυτισμός, η νόσος του Πάρκινσον, οι διαταραχές Αλτσχάιμερ και το άγχος. Διάφορα μεταβιοτικά προερχόμενα από προβιοτικά στελέχη έχουν βρεθεί ότι έχουν νευροτροποποιητικές δράσεις και είναι σίγουρα γνωστά ως «ψυχοβιοτικά» (psychobiotics). Αρκετά νευροτροποποιητικά συστατικά όπως η σεροτονίνη, η αδρεναλίνη, το GABA (gamma amino butyric acid), η ισταμίνη και η νοραδρεναλίνη προβιοτικής προέλευσης έχουν βρεθεί ότι έχουν πιθανή εφαρμογή στη μείωση της εμφάνισης επίμονων ασθενειών όπως αυτές που περιγράφηκαν παραπάνω. Τα είδη *Streptococcus*, *Escherichia*, *Enterococcus*, *Lactococcus* και *Lactobacillus* παράγουν τις ουσίες σεροτονίνη και ισταμίνη οι οποίες δρουν ως νευροδιαβιβαστές. Συγκεκριμένα, η σεροτονίνη ρυθμίζει το συναίσθημα, ενώ η ισταμίνη σχετίζεται με τον ύπνο και τις γνωστικές λειτουργίες. Επίσης, ο νευροδιαβιβαστής ακετυλοχολίνη ρυθμίζει την μνήμη και την μάθηση και παράγεται από το στέλεχος *L. Plantarum*. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι η χρήση του *Bacteroides fragilis* NTCC 9343 συμβάλλει στην μείωση του άγχους και του αυτισμού ελαττώνοντας τα επίπεδα της νευροτοξίνης 4-αιθυλο φαινυλο θειικό (4-Ethyl Phenyl Sulfate-4-EPS) στον ορό. Ο νευροδιαβιβαστής GABA που παράγεται από *Lactobacillus sp.* και *Bifidobacterium sp.* μειώνει τη δυσφορία και παρέχει άμυνα ενάντια στο όξινο περιβάλλον του εντέρου μειώνοντας έτσι το άγχος και το αίσθημα αγωνίας και απόγνωσης. Συνολικά, τα αποτελέσματα αυτά φαίνεται να υποδεικνύουν μια ουσιαστική σχέση μεταξύ της επιτυχούς νευρο-ομοιοστάσης και των μεταβιοτικών συστατικών. Ακόμη, έχει διαπιστωθεί ότι οι φαινόλες και τα παράγωγά τους αναστέλλουν τον μετασχηματισμό της ντοπαμίνης σε νοραδρεναλίνη. (Biswas & Das Mohapatra, 2023)

2.4. Διαβήτης, παχυσαρκία και φλεγμονή

Εκτός από τους γενετικούς παράγοντες και τις επιγενετικές τροποποιήσεις, οι ανισορροπίες στον εντερικό μικροβίοκοσμο επηρεάζουν σημαντικά τη συχνότητα εμφάνισης παχυσαρκίας και διαβήτη και των σχετικών επιπλοκών, όπως η υπεργλυκαιμία, η υπερχοληστερολαιμία, η δυσλειτουργία β-κυττάρων, η λιπαρότητα, η δυσλιπιδαιμία, η συστηματική φλεγμονή κ.λπ. Αναφέρεται ότι τα προβιοτικά έχουν σημαντικές αντιδιαβητικές και κατά της παχυσαρκίας ιδιότητες και συμβάλλουν στη μείωση του οξειδωτικού στρες, της φλεγμονής και των

συγκεντρώσεων λιπιδίων μετά το φαγητό. Μεταξύ των μεταβιοτικών που έχουν μελετηθεί, τα μικρές αλυσίδας λιπαρά οξέα (SCFA) ασκούν τη μεγαλύτερη επιρροή όσον αφορά για την ανακούφιση συνεπειών της παχυσαρκίας και του διαβήτη. Τα SCFA βοηθούν στη μείωση της έκφρασης του τύπου αγγειοποιητίνης 4 (Angiopoietin-like 4-ANGPTL4), που είναι ένα γονίδιο-στόχος των υποδοχέων που ενεργοποιούνται από τον πολλαπλασιαστική υπεροξυσώματος (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors-PPARs) και επίσης δρα ως κύριος ρυθμιστής της λιπογένεσης. Επιπλέον, τα SCFA ρυθμίζουν το ενδοκανναβινοειδές σύστημα (endocannabinoid system) και τη πρωτεΐνη σφιχτής σύνδεσης (tight junction protein), δηλαδή τη zona occludin-1, οι οποίες είναι υπεύθυνες για τη ρύθμιση των βλαβών που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες (Biswas & Das Mohapatra, 2023).

2.5. Διατήρηση γαστρεντερικής ακεραιότητας

Η διατήρηση της γαστρεντερικής ακεραιότητας αποτελεί έναν απίστευτά κρίσιμο μηχανισμό για την εντερική ομοιόσταση. Οποιοσδήποτε διαταραχές θα μπορούσαν να προκαλέσουν δυσβίωση, δηλαδή ανισορροπία μεταξύ των παθογόνων και των ωφέλιμων βακτηριακών πληθυσμών του εντερικού μικροβιώματος υπέρ των παθογόνων, μεταβολικά προβλήματα και χρόνια φλεγμονή. Τα επιθηλιακά κύτταρα είναι κυρίως υπεύθυνα για τη διατήρηση της ακεραιότητας του γαστρεντερικού σωλήνα, καθώς δημιουργούν ένα φράγμα μέσω των αλληλεπιδράσεων με τις πρωτεΐνες σφιχτής σύνδεσης (tight junction proteins) και το στρώμα βλέννας. Η φλεγμονή, ο τραυματισμός και η βακτηριακή μετανάστευση επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών κυττάρων και ως εκ τούτου, διακυβεύεται η ακεραιότητα του επιθηλίου. Πρόσφατες μελέτες προέβλεψαν ότι ο προστατευτικός ρόλος ορισμένων επιφανειακών μορίων, συμπεριλαμβανομένων των λιποτεϊχοϊκών οξέων, των τειχοϊκών οξέων του κυτταρικού τοιχώματος, των πύλων (pilus) και των πρωτεϊνών που δεσμεύουν τη βλέννα των προβιοτικών βακτηρίων, σχετίζεται με τη διατήρηση της γαστρεντερικής ακεραιότητας. Επιπλέον, το βακτήριο *L. plantarum* έχει την ικανότητα να αναστέλλει την ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών απελευθερώνοντας βακτηριοσίνες ή λαντιβιοτικά (πολυκυκλικά πεπτίδια που δρουν ως αντιβιοτικά), καθώς και έναν αριθμό οξέων συμπεριλαμβανομένων του γαλακτικού, του οξικού και του προπιονικού οξέος για τη διατήρηση της ακεραιότητας του εντέρου. Με λίγα λόγια, οι προβιοτικοί μεταβολίτες είναι χρήσιμα εργαλεία για τη διατήρηση του γαστρεντερικού συστήματος και συμβάλλουν στη πρόληψη μιας σειράς μεταβολικών παθήσεων (Biswas & Das Mohapatra, 2023).

2.6. Ρόλος στις καρδιαγγειακές παθήσεις

Οι κύριες αιτίες πολλών καρδιαγγειακών νοσημάτων είναι η υπέρταση, η δυσλιπιδαιμία και η εναπόθεση υψηλών συγκεντρώσεων LDL-χοληστερόλης (Low Density Lipoproteins-LDL). Έχει υποστηριχθεί, ότι η υδρολάση των χολικών αλάτων (Bile Salt Hydrolase-BSH) αποτελεί σημαντικό βιοχημικό μηχανισμό για τη μείωση της χοληστερόλης. Ορισμένα προβιοτικά βακτήρια, όπως τα *L. plantarum*, *B. longum*, *L. acidophilus* και *L. reuteri*, εμφανίζουν

υψηλήδραστικότητα BSH που συμβάλλει στη μείωση των συγκεντρώσεων χοληστερόλης, είτε αυξάνοντας την ανάγκη για χοληστερόλη ώστε να παραχθούν χολικά οξέα για να αντικαταστήσουν αυτά που χάνονται από τα κόπρανα, είτε αυξάνοντας την ποσότητα χοληστερόλης που απορροφάται από τον εντερικό αυλό μειώνοντας τη διαλυτότητα της χοληστερόλης. Επιπλέον, οι εξωπολυσακχαρίτες που απελευθερώνονται από ορισμένα είδη *Lactobacillus* έχουν την ικανότητα να απομακρύνουν τη χοληστερόλη. Επιπροσθέτως, πειράματα έχουν διαπιστώσει ότι βιοενεργά πεπτίδια από τον εντερικό μικροβίοκοσμο μπορούν να μειώσουν την αρτηριακή πίεση. Μελέτες έχουν δείξει ότι ορισμένα στελέχη *Lactobacillus* και *Bifidobacterium* παράγουν βιοενεργά πεπτίδια που έχουν ως αποτέλεσμα την αναστολή του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης ACE (Angiotensin Converting Enzyme-ACE), μειώνοντας τα συμπτώματα της υπέρτασης. Οι παρατηρήσεις αυτές ρίχνουν φως στις βελτιωτικές δυνατότητες των βακτηριακών μεταβολιτών στη θεραπεία και την πρόληψη των καρδιαγγειακών επιπλοκών (Biswas & Das Mohapatra, 2023).

2.7. Ρόλος στην ανοσοδιαρρύθμιση

Η ανοσοτροποποιητική δράση είναι απαραίτητη όχι μόνο για τη θεραπεία των αυτοάνοσων νοσημάτων, αλλά και για την πρόληψη και τη θεραπεία της παθογένεσης, την ανακούφιση της σοβαρής φλεγμονής και την εξάλειψη των κακοήθων κυττάρων του ξενιστή. Τα μεταβιοτικά παρατηρείται ότι έχουν κάποια ανοσοτροποποιητική δράση. Η πλειονότητα των ανοσοτροποποιητών παράγεται αποκλειστικά από είδη τα *Lactobacillus*. Τα βραχείας αλυσίδας λιπαρά οξέα (SCFA) παρέχουν σημαντικές ανοσοτροποποιητικές επιδράσεις μέσω της αντιφλεγμονώδους δράσης τους, παρέχουν ομοίωση του εντέρου μέσω της παραγωγής Treg κυττάρων (Regulatory T cells), μειώνουν την έκφραση FoxP3+ (Forkhead Box P3 του παχέος εντέρου και με τη σειρά τους μειώνουν την κολίτιδα. Επιπλέον, οι αντιφλεγμονώδεις επιδράσεις του βουτυρικού οξέος έχουν αποδειχθεί μέσω της αλληλεπίδρασής του με έναν άλλο υποδοχέα, τον GPR109A (G-Protein Coupled Receptor 109A), ο οποίος αυξάνει τα Treg κύτταρα και την IL-10 (Interleukin-10) και μειώνει τις προφλεγμονώδεις δραστηριότητες στα κύτταρα του παχέος εντέρου, ιδίως στα μονοκύτταρα φαγοκύτταρα (Biswas & Das Mohapatra, 2023).

2.8. Ρόλος στον αποκλεισμό παθογόνων παραγόντων

Τα προβιοτικά αναγνωρίζονται ευρέως ως αποτελεσματική θεραπεία για τις γαστρεντερικές διαταραχές που προκαλούνται από τροφιμογενή παθογόνα βακτήρια. Πολλά τροφιμογενή παθογόνα, όπως το *E. coli*, το *Helicobacter pylori*, το *Campylobacter jejuni*, η *Salmonella* και η *Listeria monocytogenes*, έχουν κατασταλεί με τη χρήση βακτηρίων *Lactobacilli* και *Bifidobacteria*. Τα μεταβιοτικά εμπλέκονται στον ανταγωνιστικό αποκλεισμό των παθογόνων μέσω των μηχανισμών προσκόλλησής τους. Οι βακτηριακές πρωτεΐνες που δρουν ως μόρια προσκόλλησης περιλαμβάνουν πρωτεΐνες επιφανειακού στρώματος, πρωτεΐνες με μοτίβο LPXTG, πρωτεΐνες μεταφορείς και βασικές μη δεσμευμένες πρωτεΐνες. Άλλα επιφανειακά μόρια όπως οι εξωτερικοί πολυσακχαρίτες, (λιποτεϊχικά οξέα) (LTA- Lipoteichoic Acid) και τα οργανικά οξέα όπως το οξικό, το γαλακτικό και το προπιονικό οξύ έχουν επίσης ιδιότητες προσκόλλησης. Επιπλέον έχει παρατηρηθεί ότι η επιδερμίνη, ένας τύπος βακτηριοσίνης, που

παράγεται από τον *Staphylococcus epidermidis*, είναι χρήσιμη στη θεραπεία δερματικών λοιμώξεων. Σύμφωνα με την παραπάνω περιγραφή, τα μεταβιοτικά παρουσιάζουν σημαντικές ιδιότητες, όπως ο ανταγωνιστικός αποκλεισμός των επιβλαβών μικροβίων και η προφύλαξη της υγείας του ξενιστή (Biswas & Das Mohapatra, 2023).

2.9. Ρόλος στη στοματική υγεία

Στην οδοντιατρική έχουν σχεδιαστεί εφαρμογές για την υποκατάσταση της στοματικής κοιλότητας, αξιοποιώντας την ικανότητα των προβιοτικών να σχηματίζουν βιοϋμένια (biofilm). Σκοπός είναι ο ανταγωνιστικός αποκλεισμός των καρυογόνων και περιοδοντικών παθογόνων μικροοργανισμών, συμβάλλοντας στην πρόληψη της τερηδόνας και των προβλημάτων των ούλων. Σύμφωνα με τα αξιοσημείωτα αποτελέσματα ορισμένων μελετών, τα αναερόβια βακτήρια *Porphyromonas gingivitis*, *Treponema denticola* και *Treponema forsythia* που συνδέονται με την κακοσμία του στόματος (malodor) έχουν μειωθεί από τις βακτηριοσίνες που παράγονται από το *Streptococcus salivarius*. Επιπλέον, επιπολασμός της στοματικής καντιντίασης έχει παρατηρηθεί ότι μειώνεται μέσω των SCFA που παράγονται από το *L. rhamnosus GG*. Τέλος, η χρόνια περιοδοντίτιδα έχει αναφερθεί ότι αναστέλλεται από αντιβακτηριακές ενώσεις που παράγονται από το *L. gasseri* και το *L. fermentum* στη στοματική κοιλότητα (Biswas & Das Mohapatra, 2023).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΑΓΟΡΑ ΜΕΤΑΒΙΟΤΙΚΩΝ

3.1. ΓΕΝΙΚΑ

Την τελευταία δεκαετία σημειώθηκε τεράστια προόδος στην κατανόηση του ρόλου των μικροβιακών κοινοτήτων και των αλληλεπιδράσεων τους με τον ξενιστή σε σχέση με τη διατροφή και τις αλλαγές στον τρόπο ζωής τόσο σε υγιείς όσο και σε ασθενείς ανθρώπους. Οι περιορισμοί των προβιοτικών που ξεπεράστηκαν με την ανάπτυξη των μεταβιοτικών, βοήθησαν στην παραγωγή νέων προϊόντων. Αρχικά, υπήρξε σημαντική εξέλιξη στην εμπορική παραγωγή και αγορά στη Ρωσία, την Ιαπωνία και τις Ηνωμένες Πολιτείες. Έπειτα ολόένα και περισσότερες βιομηχανίες παγκοσμίως συμμετείχαν στην έρευνα των μεταβιοτικών με αποτέλεσμα την ανάπτυξη μιας σειράς εμπορικών προϊόντων μεταβιοτικών. (Singh et al., 2018)

Αξίζει να σημειωθεί ότι η τεχνολογική πρόοδος που καθοδηγείται από «ωμικές» τεχνολογίες όπως η μεταγραφωμική (transcriptomics), η μεταβολομική (metabolomics) και η πρωτεομική (proteomics), καθώς και τεχνικές που αφορούν την παραγωγή μεταβιοτικών σε μεγάλη κλίμακα μέσω βιοαντιδραστήρων, έχουν προσφέρει σημαντικές πληροφορίες για την ταυτοποίηση των ιδανικών βακτηριακών στελεχών που παράγουν συγκεκριμένα μεταβιοτικά.. Η ανάλυση του γονιδιώματος των προβιοτικών, έχει προσφέρει νέες συναρπαστικές ευκαιρίες για τον εντοπισμό μεταβιοτικών συστατικών που επηρεάζουν τη φυσιολογία και την ανοσολογική λειτουργία των ξενιστών τους. Η εισαγωγή εργαλείων βιοπληροφορικής (τεχνητή νοημοσύνη, αλγόριθμοι μηχανικής εκμάθησης, κ.ά.) και ανάλυση και κατανόηση των μηχανισμών που εμπλέκονται σε βιολογικές οδούς χρησιμοποιούνται συνεχώς για την κατανόηση των λεπτομερών μηχανισμών των βιοδραστικών ενώσεων και τη σχέση τους με τη μικροχλωρίδα του εντέρου (Singh et al., 2018). Γι' αυτόν τον λόγο, ένα σημερινό μέλημα της βιοτεχνολογίας τροφίμων είναι να μπορέσουν οι επιστήμονες να παράγουν καινοτόμα και υγιεινά τρόφιμα από ομάδες συμβιωτικών (σύνολο προβιοτικών και πρεβιοτικών), με κύριο επίκεντρο τα τελευταία χρόνια τα μεταβιοτικά. Τα μεταβιοτικά, θα μπορούν να προστεθούν σε προϊόντα τροφίμων, φαρμάκων καθώς και ζωοτροφών. Συγκεκριμένα έχει ήδη ξεκινήσει η εισαγωγή τους σε φαρμακευτικά σκευάσματα, χρειάζονται όμως περισσότερες μελέτες και έρευνες για να γίνει προσθήκη σε τρόφιμα. Αυτό συμβαίνει καθώς θα πρέπει να εξετασθεί αν διασφαλίζεται η ποιότητα και η ασφάλεια τους. (Pihurov et al., 2021)

3.2. Εφαρμογή μεταβιοτικών σε τρόφιμα φυτικής προέλευσης μέσω ζύμωσης

Δίνοντας προσοχή στη βιομηχανία και τα προϊόντα τροφίμων, πρέπει να τονιστεί πως τα μεταβιοτικά εντοπίζονται στα ζυμώμενα τρόφιμα, καθώς παράγονται από διάφορους μικροοργανισμούς κατά τη ζύμωση. Τα τρόφιμα που έχουν υποστεί ζύμωση συχνά παρουσιάζουν μια σειρά από διακριτές φυσικοχημικές και βιολογικές αλλαγές, συμπεριλαμβανομένης της παρατεταμένης διάρκειας ζωής, βελτιωμένες οργανοληπτικές ιδιότητες και υψηλότερης βιοδιαθεσιμότητας βιταμίνες και μέταλλα. Επιπλέον, τόσο προκλινικές όσο και κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι τα τρόφιμα που έχουν υποστεί ζύμωση είναι αποτελεσματικά έναντι χρόνιων ανθρώπινων ασθενειών, όπως ο καρκίνος, οι καρδιαγγειακές παθήσεις, η μικροβιακή δυσβίωση του εντέρου, η παχυσαρκία, ο διαβήτης, η

φλεγμονή και η ανοσολογία. Μελέτες έχουν δείξει ότι η προβιοτική ζύμωση τσαγιού, μήλου, μούρων, καλλιεργειών και άλλων φρούτων με τη χορήγηση προβιοτικών καλλιεργειών ενίσχυσε το φαινολικό δυναμικό και τα βιοενεργά στοιχεία και έχει αποτελέσματα που προάγουν την υγεία. . Παρακάτω (Πίνακας 3), παρουσιάζονται μερικά φυτικά τρόφιμα, τα βακτήρια που συμμετέχουν στη ζύμωσή τους, καθώς και οι παραγόμενες βιοδραστικές ενώσεις (κυρίως φαινολικές ουσίες) και ο πιθανός τους ρόλος στην υγεία του ανθρώπου. (Biswas & Das Mohapatra, 2023). Τέλος είναι σημαντικό να ειπωθεί ότι, η εφαρμογή των μεταβιοτικών σε φυτικά τρόφιμα βρίσκεται ακόμα σε εξέλιξη.

Πίνακας 3 Ζυμωμένα φυτικά τρόφιμα που περιέχουν προβιοτικά στελέχη, οι βιοδραστικοί μεταβολίτες (μεταβιοτικά) που τ α παράγουν και οι πιθανοί ρόλοι τους στα τρόφιμα αυτά (Biswas & Das Mohapatra, 2023)

ΦΥΤΙΚΗ ΠΗΓΗ	ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ (ΜΕΤΑΒΙΟΤΙΚΑ) ΚΑΙ ΠΙΘΑΝΟΙ ΡΟΛΟΙ
Τσαϊ	Saccharomyces boulardii CNCM I-745 και Lactiplantibacillus plantarum	Σαλικυλικό μεθύλιο, γερανιόλη και 2-φαινυλαιθυλική αλκοόλη που βελτίωσαν επίσης το άρωμα τσαγιού
Πράσινο Τσαϊ	Levilactobacillus brevis	γ-αμινοβουτυρικό οξύ
Μαύρο Τσαϊ	Lactobacillus acidophilus	Κατεχίνες που βελτιώνουν την κυτταροτοξικότητα έναντι του παθογόνου E. coli
Χυμός μήλου	Lactobacillus acidophilus, L. casei και L. plantarum	Φαινολικά και οργανικά οξέα που αυξάνουν την αντιοξειδωτική και αντιβακτηριδιακή δράση και έναντι του Escherichia coli και του Staphylococcus aureus
	Lactobacillus plantarum	Προπανόλη, κιτρονελλόλη, γαλακτικό αιθυλεστέρα και βουτυρικό εξύλιο(hexyl butyrate) με πιθανή αντιοξειδωτική ικανότητα
Χυμός βατόμουρου	Lactobacillus plantarum	Κυανιδίνη, γλωριούχος πετουνιδίνη, πελαργκοριδίνη

		<p>και πεονιδίνη που έχουν εξέχουσες κυτταροπροστατευτικές επιδράσεις</p> <p>Malvidin 3-O-glucopyranoside, γαλλικό οξύ, πρωτοκατεχικό οξύ, κατεχόλη, χλωρογενικό οξύ, συριγγικό οξύ και επιγαλλοκατεχίνη με αντιοξειδωτικό δυναμικό και αντικαρκινική δράση κατά του ανθρώπινου καρκίνου του τραχήλου της μήτρας</p>
Capsicum annuum (Πιπεριά)	Lactobacillus plantarum, L. acidophilus και Bacillus subtilis	Νορδιδροκαψαϊκίνη, διδροκαψαϊκίνη, ομοκαψαϊκίνη και ομοδιδροκαψαϊκίνη με ιδιότητες κατά της παχυσαρκίας
Γάλα σόγιας	Lactobacillus fermentum	Μειώνει την οξειδωτική βλάβη
Φύλλα Houttuynia cordata με πράσινο τσάι	Lactobacillus paracasei subsp. paracasei	Υψηλότερο EGCG(epigallocatechin gallate), EGC (epigallocatechin) και χλωρογενικό οξύ με κυτταροπροστατευτικές επιδράσεις
Φύλλο Cudrania tricuspidata με γάλα	Lactobacillus gasseri	3,4-διυδροξυ-υδροκινναμικό οξύ με βελτιωμένη αντιοξειδωτική δράση
Χυμός κερασιού Cornelian	Lactobacillus plantarum ATCC	Υψηλό επίπεδο φαινολικού περιεχομένου με ανοσοτροποποιητικές δράσεις
Φυτό Zanthoxylum schinifolium	Lactobacillus rhamnosus	Βενζαμίδια, ginsenoside, tricosanamide, gynuramide που έχουν αντιβακτηριακή δράση, αντικαρκινικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες
Φρούτο Phyllanthus emblica	Lactobacillus paracaseiHII01	Υψηλό επίπεδο φαινολών με αντιοξειδωτικές ιδιότητες

3.3. ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ ΑΓΟΡΑΣ POSTBIOTIC ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΩΝ

Τα postbiotics χρησιμοποιούνται σε διάφορα διατροφικά προϊόντα, συμπεριλαμβανομένων των συμπληρωμάτων. Η κατανόηση των δυνατικών ωφελειών αυτών των ενώσεων για την υγεία έχει αυξήσει τη ζήτηση για συμπληρώματα. Τα συμπληρώματα postbiotics ενισχύουν το ανοσοποιητικό σύστημα και μειώνουν τα συμπτώματα του συνδρόμου του ευερέθιστου εντέρου (Irritable Bowel Syndrome-IBS). Επίσης ελαττώνουν τις πιθανότητες για εμφάνιση αλλεργιών καθώς ενεργοποιούν το ανοσοποιητικό σύστημα και καταπολεμούν τους παθογόνους μικροοργανισμούς. Έτσι, η ανάγκη για τα συμπληρώματα αυτά αναμένεται να αυξηθεί κατά τη διάρκεια της επόμενης δεκαετίας λόγω της αυξανόμενης συχνότητας ορισμένων πεπτικών διαταραχών, όπως η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου (Inflammatory Bowel Disease-IBD). Στους τομείς των λειτουργικών τροφίμων και της φαρμακευτικής, τα συμπληρώματα postbiotic προσφέρουν διατροφικά οφέλη, προλαμβάνουν και θεραπεύουν ασθένειες. Πιο συγκεκριμένα η αγορά των postbiotic συμπληρωμάτων εκτιμάται ότι θα αποτιμηθεί στα 10,8 εκατομμύρια δολάρια USD το 2024. Με την αυξανόμενη ευαισθητοποίηση σχετικά με τα οφέλη των προϊόντων για την υγεία, τα συμπληρώματα αυτά αναμένεται να καταγράψουν Σύνθετο Ετήσιο Ποσοστό Ανάπτυξης (Compound Annual Growth Rate) CAGR 10,9% από το 2024 έως το 2034, φθάνοντας σε αποτίμηση 30,5 εκατ. δολάρια ΗΠΑ έως το 2034 όπως φαίνεται και στον πίνακα (Πίνακας 4) (*Postbiotic Supplements Market Outlook, Size & Share to 2034, n.d.*)

Πίνακας 4 Προοπτικές αγοράς postbiotics (συμπληρώματα) (2024-2034)

Χαρακτηριστικά	Λεπτομέρειες
Αξία αγοράς postbiotic συμπληρωμάτων (2024)	10.8 million USD
Αξία αγοράς postbiotic συμπληρωμάτων (2034)	30.5 million USD
Πρόβλεψη CAGR (2024-2034)	10,90%

Υπάρχουν πολλές προκλήσεις όσον αφορά την ανάπτυξη ενός αποτελεσματικού postbiotic σκευάσματος, όπως το υψηλό κόστος παραγωγής, οι πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις των postbiotic μεταβολιτών με τη μικροχλωρίδα του εντέρου και ο ανταγωνισμός με τα προβιοτικά και πρεβιοτικά. Ως αποτέλεσμα, οι εταιρείες πρέπει να επινοήσουν δημιουργικές στρατηγικές για να προκαλέσουν την ανάπτυξη της αγοράς (market-growth). Οι πιο σημαντικές χώρες παραγωγής postbiotics είναι η οι Ηνωμένες Πολιτείες, η Γερμανία, η Κίνα, η Ιαπωνία και η Ινδία.

Ενδεικτικά αναφέρονται κάποια στοιχεία για την κάθε μία:

- Ο αυξανόμενος πληθυσμός των Ηνωμένων Πολιτειών προτιμά να καταναλώνει υγιεινά διατροφικά συμπληρώματα που συμβάλλουν στην υγεία του πεπτικού συστήματος.
- Η αγορά των συμπληρωμάτων postbiotic στη Γερμανία αναμένεται να αναπτυχθεί με ρυθμό ανάπτυξης 9,6% CAGR καθώς υπάρχει μεγάλη ζήτηση για vegan-friendly συμπληρώματα.

- Η ζήτηση για συμπληρώματα postbiotic στην Κίνα προβλέπεται να επεκταθεί με ρυθμό ανάπτυξης 7,8% CAGR από το 2024 έως το 2034. Ορισμένες χρόνιες παθήσεις όπως η μείωση της αρτηριακής πίεσης, τα επίπεδα χοληστερόλης, η φλεγμονή, το οξειδωτικό στρες και το βάρος του σώματος, είναι πιο διαδεδομένες στην Κίνα, δημιουργώντας μια ευρύτερη βάση καταναλωτών για παραγωγή διατροφικών συμπληρωμάτων.
- Η Ιαπωνία αναμένεται να έχει αύξηση της ζήτησης για postbiotics με ρυθμό ανάπτυξης 11,4% CAGR από το 2024 έως το 2034. Συγκεκριμένα, αυξάνεται η ζήτηση για αθλητικά συμπληρώματα καθώς ολοένα και περισσότεροι αθλητές επικεντρώνονται στο body building και άλλα αθλήματα.
- Η βιομηχανία συμπληρωμάτων postbiotic στην Ινδία αναμένεται να καταγράψει ρυθμό ανάπτυξης 14,8% CAGR έως το 2034. Μεταξύ των κύριων παραγόντων που οδηγούν την αγορά στη παρασκευή postbiotic συμπληρωμάτων είναι η βελτίωση της υγείας του δέρματος και του εντέρου.
(Postbiotic Supplements Market Outlook, Size & Share to 2034, n.d.)

3.4. ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ (REGULATION)

Στη βιβλιογραφία έχουν χρησιμοποιηθεί διάφοροι όροι για να περιγράψουν τα οφέλη για την υγεία, που απορρέουν από τη χρήση μη ζωντανών μικροοργανισμών ή των θραυσμάτων και μεταβολιτών τους. Για να διατηρηθεί η συνέπεια σε αυτόν τον αναδυόμενο τομέα, η Διεθνής Επιστημονική Ένωση Προβιοτικών και Πρεβιοτικών (International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics-ISAPP) συγκάλυψε μια ομάδα ειδικών για να εξετάσει αυτή την κατηγορία ουσιών και πρότεινε τον όρο "μεταβιοτικό" (postbiotic), που ορίζεται ως «παρασκευή ανενεργών μικροοργανισμών και/ή των συστατικών τους, η οποία προσφέρει όφελος για την υγεία στον ξενιστή». Αυτός ο ορισμός δεν καθορίζει συγκεκριμένα οφέλη για την υγεία, συγκεκριμένο τελικό προϊόν, πληθυσμό-στόχο. Επιπλέον, είναι σημαντικό να τονισθεί ότι η ISAPP δεν απαιτεί το αρχικό στέλεχος ενός μεταβιοτικού να είναι προβιοτικό. Ένας μικροοργανισμός που παρουσιάζει ενδιαφέρον μπορεί να αναπτυχθεί και να κυκλοφορήσει στην αγορά ως ανενεργός μικροοργανισμός, ανεξαρτήτως εάν η ζωντανή μορφή του έχει εγκριθεί για ανθρώπινη κατανάλωση. Αυτό συμβαίνει με την παστεριωμένη *Akkermansia muciniphila* καθώς και με το *Faecalibacterium prausnitzii*. (Vinderola et al., 2023)

Με βάση την οδηγία 2004/27/EK, η οποία τροποποιεί την οδηγία 2001/83/EK, «φαρμακευτικά προϊόντα (medicinal products) είναι: α) κάθε ουσία ή συνδυασμός ουσιών που έχουν ιδιότητες για τη θεραπεία ή την πρόληψη ασθενειών στον άνθρωπο, ή β) κάθε ουσία ή συνδυασμός ουσιών που μπορεί να χρησιμοποιηθεί ή να χορηγηθεί στον άνθρωπο με σκοπό είτε την αποκατάσταση, διόρθωση ή τροποποίηση φυσιολογικών λειτουργιών με την άσκηση φαρμακολογικής, ανοσολογικής ή μεταβολικής δράσης, είτε τη διενέργεια ιατρικής διάγνωσης». Σε αυτό το ευρωπαϊκό κανονιστικό πλαίσιο δίνεται επίσης ορισμός για την υποκατηγορία βιολογικά φαρμακευτικά προϊόντα (biological medicinal products). Το παράρτημα 1, μέρος 1 της οδηγίας 2001/83/EK αναφέρει ότι «βιολογικό φάρμακο προϊόν είναι ένα προϊόν, του οποίου η δραστική ουσία είναι βιολογική. Μια βιολογική ουσία είναι μια ουσία που παράγεται από

βιολογική πηγή ή εκχυλίζεται από αυτήν και η οποία χρειάζεται για τον χαρακτηρισμό και τον προσδιορισμό της ποιότητάς της ένα συνδυασμό φυσικοχημικών-βιολογικών δοκιμών, μαζί με τη διαδικασία παραγωγής και τον έλεγχο της». Τα postbiotics, που προέρχονται από ζωντανούς οργανισμούς, μπορούν επομένως να θεωρηθούν ως δραστικές ουσίες που χρησιμοποιούνται σε βιολογικά φαρμακευτικά προϊόντα. Έτσι, οι εταιρείες φαρμακευτικών προϊόντων μπορούν να βασίζονται σε όλες τις οδηγίες που προορίζονται για τα βιολογικά φαρμακευτικά προϊόντα, ακόμη και αν τα μεταβιοτικά δεν έχουν επί του παρόντος ειδικές οδηγίες. Τα νομοθετικά πλαίσια και οι οδηγίες βασίζονται σε προϊόντα που βρίσκονται υπό αξιολόγηση/έχουν ήδη αξιολογηθεί από τις αρμόδιες αρχές. Ωστόσο, οι εν λόγω αρχές δεν είναι σε θέση να προβλέψουν όλες τις καινοτομίες που προέρχονται από έναν ταχέως εξελισσόμενο τομέα, όπως ο τομέας του μικροβιώματος. Πιθανώς, τα νομοθετικά πλαίσια θα εξελίσσονται καθώς αναπτύσσονται καινοτόμα προϊόντα, με υψηλή προτεραιότητα στην ασφάλεια των καταναλωτών. (Vinderola et al., 2023)

Για δύο από τις εξεταζόμενες ενώσεις (μεταβιοτικά της εν λόγω πτυχιακής έχουν γίνει προσπάθειες εισαγωγής τους σε τρόφιμα. Πιο συγκεκριμένα η Ουρολιθίνη Α και η Μενακινόνη (βιταμίνη K2), πρόκειται να εγκριθούν από την Ευρωπαϊκή Αρχή Ασφάλειας Τροφίμων (European Food Safety Authority – EFSA)

Ειδικότερα όσον αφορά την ουρολιθίνη Α, η εταιρεία Amazentis SA διαθέτει μια συνθετική εκδοχή της ουρολιθίνης Α, πανομοιότυπη ως προς τη δομή με την ένωση που σχηματίζεται ενδογενώς μετά την κατανάλωση του ελλαγιικού οξέος και των ελλαγιτανινών. (https://Food.Ec.Europa.Eu/Document/Download/8f10d273-65cb-4450-85cb-4bf389d8670c_en?Filename=novel-Food_sum_ongoing-App_2018-0538.Pdf, n.d.)

Η ουρολιθίνη Α θα χρησιμοποιείται ως συστατικό σε στιγμιαία ζεστά δημητριακά πρωινού (instant hot breakfast cereals) [εξαιρουμένων των επεξεργασμένων τροφίμων με βάση τα δημητριακά, όπως ορίζονται στον κανονισμό (ΕΕ) αριθ. 609/2013], σε μπάρες δημητριακών και σε μπάρες πρωτεΐνης, γιαούρτια με γεύσεις (flavored yogurts) και ροφήματα γιαουρτιού (yogurt drinks) [εξαιρουμένων των παιδικών τροφών όπως ορίζονται στο πλαίσιο του κανονισμού (ΕΕ) αριθ. 609/2013], πουτίγκες με μειωμένες θερμίδες για ενήλικες, βιταμινούχο νερό, υποκατάστατα γεύματος (meal replacements) για αθλητές και για απώλεια βάρους θρεπτικά ροφήματα (nutrition drinks) και σκόνες, συμπληρώματα διατροφής και τρόφιμα για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς, εξαιρουμένων των προϊόντων για βρέφη και μικρά παιδιά. (https://Food.Ec.Europa.Eu/Document/Download/8f10d273-65cb-4450-85cb-4bf389d8670c_en?Filename=novel-Food_sum_ongoing-App_2018-0538.Pdf, n.d.)

Επίσης, αναφορικά με την μενακινόνη έχει προταθεί από φορείς να διατίθεται στην αγορά με τη μορφή ελαίου που περιέχει βιταμίνη K2, το οποίο παράγεται από τη ζύμωση απομονωμένης πρωτεΐνης σόγιας και αμύλου καλαμποκιού παρουσία του θετικού κατά Gram βακτηρίου *Bacillus subtilis natto*. Το εν λόγω έλαιο, περιέχει βιταμίνη K2 που εμφανίζεται κυρίως ως μενακινόνη-7 (MK-7) και σε μικρότερο βαθμό ως μενακινόνη-6 (MK-6). Η χρήση βρώσιμου ελαίου πλούσιου σε μενακινόνη, που πληροί τις προβλεπόμενες προδιαγραφές, σε τρόφιμα για τον γενικό πληθυσμό (συμπεριλαμβανομένων των συμπληρωμάτων διατροφής) και σε τρόφιμα για ειδικές διατροφικές χρήσεις, εκτός από τις παιδικές τροφές και τα παρασκευάσματα για

βρέφη, στα προτεινόμενα επίπεδα χρήσης δεν προκαλεί ανησυχία για την ασφάλεια. Επιπλέον, στην παραγωγική διαδικασία του εν λόγω ελαίου, η οποία περιλαμβάνει 30λεπτη αποστείρωση του ζυμωμένου ζωμού στους 120°C και απόσμηξη με απόσταξη με ατμό (deodorization by steam distillation) στους 170°C, δεν αναμένεται να υπάρχουν βιώσιμοι μικροοργανισμοί στο τελικό προϊόν . (Authority (EFSA), 2008)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ΜΕΤΑΒΙΟΤΙΚΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ

4.1. ΖΥΜΩΣΗ

Τα postbiotics μπορεί να αποτελούνται από αδρανοποιημένα βακτήρια και προϊόντα κυτταρικής λύσης (lysates), όπως πρωτεΐνες της κυτταρικής επιφάνειας, βακτηριακά ένζυμα, πεπτίδια, μεταβολίτες (που παράγονται από τα βακτήρια όπως τα τειχοϊκά οξέα και τα μεταβιοτικά), κατώτερα οργανικά οξέα, όπως το γαλακτικό οξύ και νευροπεπτίδια (που προέρχονται από πεπτιδογλυκάνες, πολυσακχαρίτες). Η ζύμωση είναι η πιο διαδεδομένη διαδικασία παραγωγής μεταβιοτικών και postbiotics στη βιομηχανία τροφίμων. Ειδικότερα, τα postbiotics είναι φυσικά παρόντα σε διάφορα τρόφιμα που έχουν υποστεί ζύμωση, όπως το γιαούρτι, το ξινολάχανο, τα λαχανικά τουρσί και το kombucha, και παράγονται από διάφορα είδη βακτηρίων και μυκήτων, τα στελέχη των οποίων περιλαμβάνουν κυρίως αυτά των *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Eubacterium*, *Faecalibacterium* και *Saccharomyces*. Η ποσότητα των postbiotics που παράγονται κατά τη διάρκεια της φυσικής ζύμωσης δεν είναι πλήρως ελεγχόμενη και μπορεί να είναι ελάχιστη ή ανεπαρκής για τη παραγωγή ποσοτήτων αυτών μεταβιοτικών/postbiotics σε ποσότητες που εμφανίζουν μία φυσιολογική απόκριση in vivo. Ως εκ τούτου οι ερευνητές αναζητούν μεθοδολογίες για την ελεγχόμενη και αποτελεσματική παραγωγή μεταβιοτικών ενώσεων, επιτρέποντας τη διερεύνηση και την εφαρμογή τους σε τρόφιμα, φάρμακα και θεραπευτικά συστατικά (nutraceuticals). (Thorakkattu et al., 2022)

Ένα παράδειγμα παραγωγής postbiotics σε τρόφιμα είναι η παραγωγή τους από το γάλα είναι η ζύμωση με πρωτεολυτικές καλλιέργειες εκκίνησης (*Lactobacillus helveticus*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus* κ.α.), όπου το pH διατηρείται κοντά στο ουδέτερο ενισχύοντας την απελευθέρωση πεπτιδίων από τις πρωτεΐνες του γάλακτος. (Dunand et al., 2019)

4.2. ΜΕΤΑΒΙΟΤΙΚΑ/POSTBIOTICS ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Τα μεταβιοτικά/postbiotics είναι ένα παρασκεύασμα νεκρών μικροοργανισμών ή/και συστατικών τους που παρέχει όφελος για την υγεία του ξενιστή. Οι τεχνολογίες παραγωγής postbiotics, περιλαμβάνουν γενικά τεχνικές διάσπασης των κυττάρων, όπως θερμότητα, υψηλή πίεση, ενζυμική επεξεργασία, συγκαλλιέργεια (co-culturing), εκχύλιση με διαλύτες, χημική επεξεργασία (π.χ. φορμόλη) και υπερήχους (sonication). Για τα ενδοκυτταρικά μεταβιοτικά, η βακτηριακή μεμβράνη διασπάται με την εφαρμογή ενός συνδυασμού των προαναφερθέντων επεξεργασιών για τη λήψη ενδοκυτταρικών μεταβολιτών ή/και συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος με τη μορφή θραυσμάτων. Πρόσθετα στάδια εκχύλισης και καθαρισμού, όπως φυγοκέντρηση, λυοφιλίωση/ξήρανση με κατάψυξη, ξήρανση με ψεκασμό και καθαρισμός με στήλη, χρησιμοποιούνται επίσης για να βοηθούν στις διαδικασίες απόκτησης. (Thorakkattu et al., 2022)

Επί του παρόντος, ένας σημαντικός αριθμός ερευνών σχετικά με τα μεταβιοτικά/postbiotics, επικεντρώνεται όχι μόνο στους ακριβείς μηχανισμούς δράσης τους, αλλά και στη δημιουργία

νέων λειτουργικών τροφίμων και φαρμακευτικών σκευασμάτων για τη βελτίωση της υγείας του ξενιστή. Συγκεκριμένα τα postbiotics είναι σταθερά σε ένα ευρύ φάσμα θερμοκρασιών και pH και επομένως μπορούν να προστεθούν σε τρόφιμα και συστατικά τροφίμων πριν από τη θερμική επεξεργασία χωρίς να διακυβεύεται η λειτουργικότητά τους, προσφέροντας στις εταιρείες ορισμένα τεχνικά και οικονομικά πλεονεκτήματα. Επίσης, τα postbiotics μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε άλλα προϊόντα, όπως τα λειτουργικά τρόφιμα ή/και τα φαρμακευτικά προϊόντα καθώς η ποσότητα τους μπορεί να ελεγχθεί κατά τη διάρκεια της παραγωγής και των συνθηκών αποθήκευσης, διότι δεν αποτελούνται από ζωντανούς μικροοργανισμούς, οι οποίοι μπορεί να πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα μέσα στο προϊόν. Ειδικότερα για τις εφαρμογές αυτές, η επεξεργασία των postbiotics με λυοφιλίωση και ξήρανση με ψεκασμό είναι πλεονεκτική, καθώς είναι ευκολότερη η διαχείριση και η αποθήκευσή τους. (Thorakkattu et al., 2022)

Ακόμη, τα postbiotics αποτελούν μια εξαιρετική εναλλακτική λύση, καθώς είναι πιο σταθερά και δεν απαιτούν τις αυστηρές συνθήκες αποθήκευσης, χειρισμού και μεταφοράς κατά την ψυκτική αλυσίδα. Δυστυχώς, λίγες μελέτες έχουν ενσωματώσει postbiotics σε τρόφιμα, αλλά τρόφιμα, όπως το γιαούρτι και τα ροφήματα με βάση τον ορό γάλακτος, που περιέχουν αδρανοποιημένα οξυγαλακτικά (LAB) βακτήρια. Τα *L. bulgaricus*, *St. thermophilus*, *L. acidophilus*, *L. gasseri* CP2305 και *L. casei* 01, είναι παραδείγματα που έχουν ήδη πραγματοποιηθεί. (Vera-Santander et al., 2023)

Η εφαρμογή των postbiotics επεκτείνεται σταδιακά από τα γλυκά, τους χυμούς, τα ροφήματα, τις σκόνες αντικατάστασης γευμάτων και σε άλλα τρόφιμα, όπως ψωμί, σνακ και άλλα τρόφιμα όπως φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 19). (Liang & Xing, 2023)

Postbiotic Market Applications

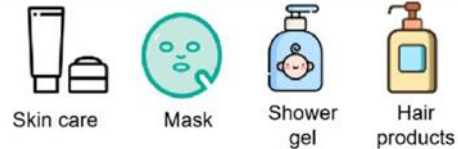
Food & Beverage



Nutraceuticals



Personal care




Pharmaceuticals


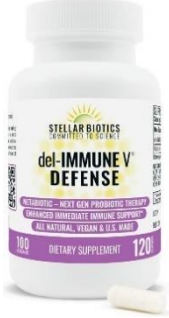


Εικόνα 19 Ευρείες εφαρμογές των postbiotics




Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως η εφαρμογή μεταβιοτικών σε τρόφιμα είναι ακόμα σε πρώιμο στάδιο, καθώς χρειάζονται περαιτέρω μελέτες για να ενταχθούν σε αυτά. Ωστόσο, στην αγορά υπάρχουν ήδη, προϊόντα postbiotics (συμπληρώματα διατροφής και τρόφιμα), τα οποία περιέχουν αδρανοποιημένους μικροοργανισμούς και μεταβολίτες τους. Τα προϊόντα αυτά, η σύστασή τους καθώς και η επίδρασή τους στην ανθρώπινη υγεία φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 5)

Πίνακας 5 Εφαρμογή και οφέλη των postbiotics σε συμπληρώματα διατροφής (Liang & Xing, 2023)

ΟΝΟΜΑΣΙΑ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ	ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΟΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ	ΟΦΕΛΟΣ	ΚΑΤΑΣΚΕΥΑΣΤΗΣ	ΕΙΚΟΝΑ
HT-BPL1 (Συμπλήρωμα διατροφής)	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> CECT8145	Μείωση του σπλαχνικού λίπους και της κοιλιακής περιμέτρου	ADM (USA)	
Epicor (Συμπλήρωμα διατροφής)	<i>Sac. cerevisiae</i>	Υποστήριξη του ανοσοποιητικού συστήματος και της υγείας του εντέρου	Cargill (USA)	

				<p>Πηγή: https://www.enutrient.gr/product/doctors-best-epicor-500mg-60-vcaps/?utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=max-v1&gad_source=1&gclid=CjwKCAjwodC2BhAHEiwAE67hJKynLRDt_AaWV6T_SsXTmQuof5g9FMRMufqLDDXC0yHSuChdGpgQjRoC2LYQAvD_BwE</p>
<p>ImmunoSpore (Συμπλήρωμα διατροφής)</p>	<p>Bac. coagulans MTCC 5856</p>	<p>Υποστήριξη του ανοσοποιητικού σύστηματος</p>	<p>Sabinsa (USA)</p>	 <p>Πηγή: https://nzsi.co.nz/products/immunospore%E2%84%A2-designs-for-health-dfh</p>
<p>Del-Immune V® (Συμπλήρωμα διατροφής)</p>	<p>L. rhamnosus V</p>	<p>Ανοσορυθμιστής</p>	<p>Pure Research Products LLC (USA)</p>	 <p>Πηγή: https://www.amazon.com/Stellar-Biotics-del-Immune-Immediate-Broad-Spectrum/dp/B09DTMZRNV</p>

LAC-Shield (Συμπλήρωμα διατροφής)	<i>L. paracasei</i> MCC 1849	Υποστήριξη της υγείας του ανοσοποιητικού συστήματος	Morinaga (Japan)	 <p>Πηγή: https://www.morinaga.co.jp/taberu-shield/en/</p>
Immuse (Τρόφιμο-ροφήματα με γεύση)	<i>Lac. lactis</i> subsp. JCM5805	Υποστήριξη της υγείας του ανοσοποιητικού συστήματος	Kyowa Hakko (Japan)	 <p>Πηγή: https://immusehealth.com/where-to-find-immuse-postbiotic</p>
Pylopass (Συμπλήρωμα διατροφής)	<i>L. reuteri</i> DSM 17648	Δρα έναντι του <i>Helicobacter pylori</i>	Nouveau Healthcare (UK)	 <p>Πηγή: https://nouveauhealthcare.com/products/pylopass-l-reuteri-dsm-17648?srsltid=AfmBOorsPU2FsSalLsKVT7oi-FMbdNILQg_gLhGQIVBX5PdZKhh2l0Ob</p>
LBiome (Συμπλήρωμα διατροφής)	<i>L. fermentum</i> και <i>L. delbrueckii</i>	Υποστήριξη της υγείας του εντέρου	Adare Biome (France)	

<p>Hylak® forte (Φάρμακευτικό προϊόν)</p>	<p>Ent. faecalis, L. acidophilus, L. helveticus, και E. coli</p>	<p>Αντιμικροβιακή δράση σε παθογόνα βακτήρια στο έντερο</p>	<p>Ratiopharm/ Merckle GmbH (Germany)</p>	 <p>Πηγή: https://www.valsona.at/hylak-forte-tropfen</p>
<p>Lacteol fort (φαρμακευτικό προϊόν)</p>	<p>L. fermentum και L. delbrueckii</p>	<p>Ανακούφιση από διάρροια και δυσφορία του εντέρου</p>	<p>Amsco Healthcare (Singapore)</p>	 <p>Πηγή:https://www.truemedical.sg/digital-pharmacy/p/lacteol-fort-sachet</p>
<p>Totipro (συμπλήρωμα διατροφής)</p>	<p>LAB (οξυγαλακτικά βακτήρια)</p>	<p>Υγεία του εντέρου</p>	<p>Bioflag (China)</p>	 <p>Πηγή: https://www.linkedin.com/pulse/pre-intestinal-care-totipropostbiotic-pe0301-glac-biotech-1tu2c</p>

Συντομογραφίες : LAB lactic acid bacteria, L Lactobacillus, B Bifidobacterium, Lac Lactococcus, Leuc, Leuconostoc, Bac Bacillus, Sac Saccharomyces, SCFAs short-chain fatty acids, Ent Enterococcus.

4.3. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗΣ POSTBIOTICS

Τα postbiotics που παρασκευάζονται από οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB) περιλαμβάνουν εκατοντάδες μεμονωμένους μεταβολίτες που χρησιμοποιούνται είτε ως ακατέργαστο συμπύκνωμα (εκχύλισμα) είτε ως ημι-καθαρισμένη μορφή (Moradi et al., 2021).

Τα postbiotics μπορούν να παρασκευαστούν τόσο σε υγρή όσο και σε ξηρή μορφή (ξήρανση με ψεκασμό και λυοφιλίωση). Και οι δύο μέθοδοι χρησιμοποιούνται, αλλά η λυοφιλίωση αποτελεί τη κυρίαρχη μέθοδο καθώς αυξάνει το χρόνο συντήρησης του αυτού του βιοενεργού παρασκευάσματος. Ωστόσο, η μέθοδος παρασκευής και ενσωμάτωσης των postbiotics βασίζεται στον τύπο του τροφίμου. Γενικά, τα παχύρρευστα λυοφιλοποιημένα postbiotics παρουσιάζουν αυξημένη αντιμικροβιακή δράση και ελαχιστοποιούν την αύξηση της υγρασίας στα τρόφιμα σε σύγκριση με τα postbiotics σε υγρή μορφή. Ακόμη, ο ψεκασμός τους στην επιφάνεια των τροφίμων μπορεί να λειτουργήσει ως μια αποτελεσματική εναλλακτική λύση προκειμένου να ανασταλεί η ανάπτυξη των αλλοιογόνων και των παθογόνων μικροοργανισμών. (Moradi et al., 2021)

4.3.1. Ξήρανση με ψεκασμό (spray drying)

Η ξήρανση με ψεκασμό (spray drying), είναι μια από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων για παραγωγή μικροσωματιδίων με ομοιόμορφη κατανομή μεγέθους, καθώς και ως μέθοδος εγκλεισμού ενεργών συστατικών, όπως προβιοτικά. Αποτελεί μια ευέλικτη, οικονομική και συνεχής διαδικασία που στις μέρες μας αξιοποιείται στη παραγωγή μικρόβιολογικά σταθερών προϊόντων. Πιο συγκεκριμένα, περιλαμβάνει τον ψεκασμό (εκνέφωση) μιας Υγρής τροφοδοσίας (υδατικό, οργανικό διάλυμα κ.α.) σε ένα θερμό μέσο ξήρανσης με αποτέλεσμα τη μετατροπή της σε ξηρή μορφή (σκόνη, κόκκοι ή συσσωματώματα). Τα στάδια που περιλαμβάνει αναφορικά είναι 1) σύνθεση διαλύματος τροφοδοσίας, 2) διαμερισμός του υγρού δείγματος σε σταγονίδια, 3) επαφή σταγονιδίων με θερμό αέρα, ξήρανση και αφυδάτωση των σταγονιδίων και 5) διαχωρισμό αφυδατωμένου προϊόντος και αέρα. (Δρόσου Χριστίνα (2021 Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο (ΕΜΠ)) *Ενθυλάκωση Βιοδραστικών Ενώσεων Σε Φυσικά Πολυμερή Με Εφαρμογή Καινοτόμων Μεθόδων Νανοεγκλεισμού Με Σκοπό Την Ενσωμάτωσή Τους Σε Συστήματα Τροφίμων*, n.d.)

Η ξήρανση με ψεκασμό έχει προταθεί ως, εναλλακτική λύση χαμηλού κόστους έναντι της ξήρανσης με κατάψυξη για την ανάπτυξη αφυδατωμένων αλλά βιώσιμων μικροβιακών καλλιεργειών και θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί με υψηλότερες θερμοκρασίες εισόδου ή/και εξόδου για την επίτευξη μικροβιακής αδρανοποίησης. Για παράδειγμα, το βρεφικό γάλα που έχει υποστεί ζύμωση με γαλακτικά βακτήρια και bifidobacteria είναι ευρέως διαθέσιμο σε πολλές χώρες, αλλά δεν περιέχει σημαντικές ποσότητες βιώσιμων βακτηρίων στο τελικό προϊόν, συνεπώς δεν μπορεί να χαρακτηριστεί ως μεταβιοτικό/postbiotic σκεύασμα. Η εφαρμογή ξήρανσης με ψεκασμό θα μπορούσε να βελτιώσει τις ιδιότητες τους βρεφικής φόρμουλας με την ενσωμάτωση σε αυτής postbiotics παρασκευασμάτων. (Salminen et al., 2021)

4.3.2. Λυοφιλίωση-Ξήρανση με κατάψυξη (Lyophilization, Freeze drying)

Η ξήρανση με κατάψυξη ή λυοφιλίωση (freeze drying), αποτελεί εξίσου μια δημοφιλή εφαρμογή για την παραγωγή αφυδατωμένων προϊόντων. Η διαδικασία αυτή, παράγει το επιθυμητό αποτέλεσμα μέσω απομόνωσης του νερού από το σύστημα χρησιμοποιώντας τη διαδικασία της εξάχνωσης(στερεή μορφή μετατρέπεται απευθείας σε αέρια κατάσταση - υδρατμοί - χωρίς τη μεσολάβηση υγρής φάσης - νερό) υπό την επίδραση υψηλού κενού. Η εν λόγω διαδικασία πλεονεκτεί έναντι της ξήρανσης με ψεκασμό στις θερμοευαίσθητες ουσίες. Επίσης, σπανιότερα χρησιμοποιείται στη βιομηχανία τροφίμων και ως μέθοδος μικροενθυλάκωσης. Ειδικότερα, κατά τη λυοφιλίωση, το νερό, μετατρέπεται σε πάγο και έπειτα υφίσταται εξάχνωση. Τα στάδια, της εν λόγω διαδικασίας είναι τα έξης : 1)κατάψυξη ,2) ξήρανση, 2α) πρωτογενής ξήρανση (εξάχνωση πάγου), 2β)δευτερογενής ξήρανση (εκρόφιση εναπομείναντος νερού). (Δρόσου Χριστίνα (2021 Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο (ΕΜΠ)) *Ενθυλάκωση Βιοδραστικών Ενώσεων Σε Φυσικά Πολυμερή Με Εφαρμογή Καινοτόμων Μεθόδων Νανοεγκλεισμού Με Σκοπό Την Ενσωμάτωσή Τους Σε Συστήματα Τροφίμων*, n.d.). Είναι σημαντικό να σημειωθεί, ωστόσο, ότι η ξήρανση με κατάψυξη είναι κοπιαστική και δαπανηρή, αλλά φαίνεται να βελτιώνει το χρόνο ζωής και τη σταθερότητα του τελικού προϊόντος ς.(Sharif, n.d.)

Άλλες τεχνικές ξήρανσης, όπως η ξήρανση υπό κενό και η ξήρανση σε ρευστοποιημένη κλίση, έχει αποδειχθεί ότι καταπονούν τους μικροοργανισμούς και μειώνουν τη βιωσιμότητά τους και θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε πιο αυστηρές συνθήκες λειτουργίας για την πλήρη αδρανοποίηση των καλλιεργειών(Salminen et al., 2021). Για παράδειγμα, έχει αποδειχθεί ότι οι διάφορες θερμικές επεξεργασίες που εφαρμόζονται για την ανάπτυξη αφυδατωμένων προβιοτικών (ξήρανση στον αέρα, ξήρανση κατάψυξης και ξήρανση με ψεκασμό) μπορούν να επηρεάσουν έντονα τόσο τη βιωσιμότητα όσο και τις ανοσοτροποποιητικές ιδιότητες των προβιοτικών στελεχών, και έτσι μπορούμε να υποθέσουμε ότι οι επεξεργασίες αυτές θα μπορούσαν επίσης να επηρεάσουν τις μεταβιοτικές ιδιότητες. (Salminen et al., 2021)

4.3.3. Μικροενθυλάκωση postbiotics

Η προστασία των postbiotics έναντι δυσμενών περιβαλλόντων, συμπεριλαμβανομένων αντιμικροβιακών παραγόντων, χημικών ουσιών, ενεργού οξυγόνου σε περίπτωση αποκλειστικά αναερόβιων μικροβίων, χολικών αλάτων και υψηλής οξύτητας, θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί με τη χρήση μεθόδων μικροενθυλάκωσης των βιοενεργών συστατικών. Ενώσεις όπως υδατάνθρακες, πρωτεΐνες και λιπίδια μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μικροενθυλάκωση postbiotics. Τα υλικά που χρησιμοποιούνται για τη διαδικασία αυτή πρέπει να είναι μη τοξικά, ιδιαίτερα διαλυτά, ανθεκτικά στη θερμότητα, διαπερατά από το οξυγόνο μέσω της μήτρας του τροφίμου, ανθεκτικά στα οξέα και ασταθή σε pH άνω του 6. Η διαδικασία ενθυλάκωσης των postbiotics απαιτεί τη χρήση ενός βιοσυμβατού φορέα για την ενθυλάκωση τους έναντι παραγόντων όπως το pH και η υψηλή θερμοκρασία. Ο φορέας εγκλεισμού ή ενθυλάκωσης λειτουργεί ως ημιπερατή μεμβράνη και επιτρέπει τη μεταφορά των postbiotics σε δύο κατευθύνσεις, εντός του σχηματιζόμενου γαλακτώματος ή σωματιδίου και εντός του οργανισμού. Πρόσφατες μελέτες σχετικά με την ενθυλάκωση των εν λόγω ουσιών έχουν δείξει ότι η ενθυλάκωση και συγκεκριμένα η μικροενθυλάκωση είναι μια κατάλληλη μέθοδος για την

προστασία αυτών των ενώσεων από ανεπιθύμητους παράγοντες. Η τεχνολογία μικροενθυλάκωσης μπορεί να επιτρέψει τη χρήση postbiotics σε τρόφιμα (π.χ. λαχανικά) που εκτίθενται σε υψηλές θερμοκρασίες και χαμηλό pH. (“Postbiotics, as Dynamic Biomolecules, and Their Promising Role in Promoting Food Safety,” 2021)

4.4. Παράγοντες που επηρεάζουν τα postbiotics κατά την παραγωγή τους

Η παρασκευή τροφίμων που περιέχουν μεταβιοτικά/postbiotics απαιτεί την εξέταση παραγόντων όπως, το βακτηριακό προβιοτικό, το μέσο ανάπτυξης, είτε στη τροφή είτε σε ένα επιλεκτικό μέσο καλλιέργειας (όπως ο ζυμός MRS), και τις συνθήκες ανάπτυξης, όπως το pH, η θερμοκρασία, η ενεργότητα νερού (water activity) και τα υποστρώματα. Επιπλέον, θα πρέπει να επιλεγεί η τεχνική αδρανισμού, είτε μέσω συμβατικών (παστερίωση ή αποστείρωση) είτε μέσω αναδυόμενων τεχνολογιών (υπέρηχοι, υπεριώδης ακτινοβολία, υψηλές πιέσεις ή ακτινοβολία). Ο διαχωρισμός με διήθηση ή φυγοκέντρηση είναι προαιρετικός. Επιπλέον, υπάρχουν μέθοδοι συμπίκνωσης όπως η ξήρανση με ψεκασμό και η λυοφιλίωση (ξήρανση με κατάψυξη) καθώς και μέθοδοι ενσωμάτωσης των μεταβιοτικών στη μήτρα του τροφίμου ως υγρά ή στερεά. (Vera-Santander et al., 2023)

Η χρήση προβιοτικών μικροοργανισμών, που αποτελούν βασικό συστατικό των postbiotics, στα τρόφιμα θέτει σημαντικές προκλήσεις σε σχέση με τις τεχνολογικές και θεραπευτικές πτυχές τους. Για να ασκήσουν τις βιολογικές επιδράσεις τους στους καταναλωτές, απαραίτητη προϋπόθεση είναι να παραμένουν οι μικροοργανισμοί βιώσιμοι κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας, της αποθήκευσης και ακόμη και της πέψης από τον καταναλωτή σε συγκεντρώσεις περίπου 10^6 έως 10^9 UFC/g ή mL. Ωστόσο, κατά την βιομηχανική επεξεργασία, πολλοί παράγοντες που σχετίζονται με τη σύνθεση της μήτρας του τροφίμου (pH, συγκέντρωση υδατανθράκων, λιπών και πρωτεϊνών, ενεργότητα νερού, παρουσία φυσικών αντιβιοτικών), τις συνθήκες επεξεργασίας και αποθήκευσης (χρόνος, θερμοκρασία, περιεκτικότητα σε οξυγόνο, ρυθμός εμβολιασμού, pH, υλικά συσκευασίας) μπορεί να συμβάλουν στη μείωση της βιωσιμότητας των προβιοτικών κυττάρων. Ειδικότερα, ορισμένα προβιοτικά βακτήρια χάνουν τη βιωσιμότητά τους κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας και η απώλεια αυτή αυξάνεται σταδιακά κατά την μακροχρόνια αποθήκευση (Barros et al., 2020)

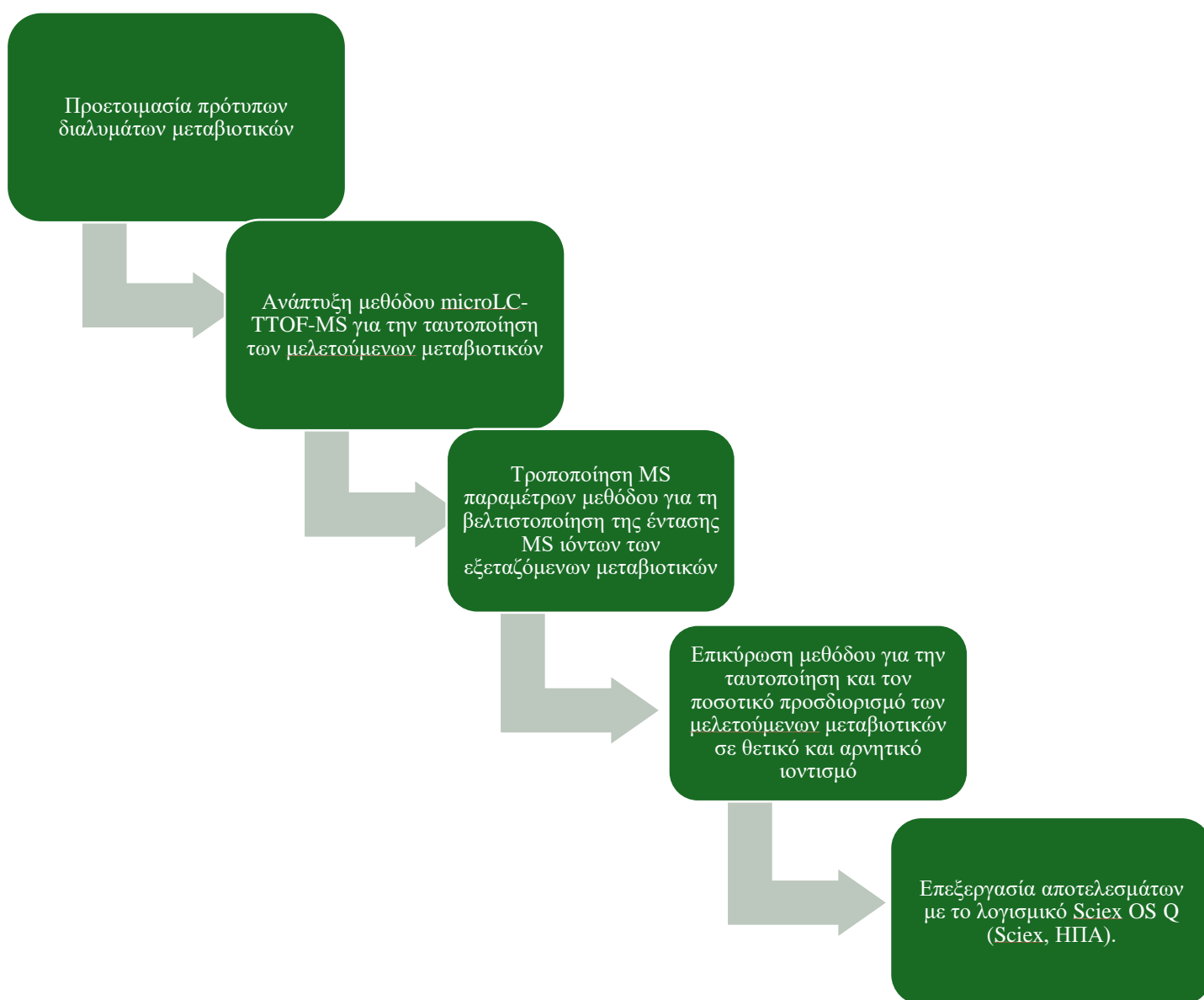
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ΣΚΟΠΟΣ

Τα μεταβιοτικά αποτελούν βακτηριακούς μεταβολίτες προερχόμενους από τη ζύμωση διατροφικών συστατικών από τους πληθυσμούς της εντερικής μικροχλωρίδας. Οι μεταβολίτες αυτοί, καθώς και το σύνολο των αδρανοποιημένων βακτηρίων και των κυτταρικών συστατικών τους, που χαρακτηρίζονται ως postbiotics, συγκεντρώνουν, τα τελευταία χρόνια, όλο και μεγαλύτερο ερευνητικό, αλλά και εμπορικό ενδιαφέρον, λόγω των ευεργετικών βιολογικών τους δράσεων (αντιγηραντική, αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδης, ανοσοτροποποιητική, κ.ά.) και των πλεονεκτημάτων τους έναντι των προβιοτικών (ασφάλεια και μειωμένη τοξικότητα, μεγαλύτερη βιοδιαθεσιμότητα και βιοαπορρόφηση, κ.ά.). Παρόλα αυτά, στη έως τώρα βιβλιογραφία, δεν εντοπίζεται μεγάλος αριθμός ερευνών που επικεντρώνονται στην ταυτόχρονη ταυτοποίηση και ιδιαίτερα στον ποσοτικό προσδιορισμό των μεταβιοτικών, που προέρχονται από διαφορετικά φυτοχημικά συστατικά, με τη χρήση σύγχρονων αναλυτικών τεχνικών. Για τους παραπάνω λόγους, ο πρωταρχικός στόχος της παρούσας μελέτης είναι η ανάπτυξη και η επικύρωση μιας μεθόδου υγρής Χρωματογραφίας μικροροών- φασματομετρίας μάζας με χρήση τετραπολικό αναλυτή χρόνου πτήσης (microLC-TTOF MS)) για την ταυτοποίηση και το ποσοτικό προσδιορισμό 15 πρότυπων μεταβιοτικών ουσιών, που ανήκουν στις κατηγορίες των βιταμινών και των μεταβιοτικών προερχόμενων από φαινολικές ενώσεις. Η μέθοδος που θα αναπτυχθεί θα εστιάσει στον ικανοποιητικό διαχωρισμό των μεταβιοτικών ακολουθούμενο από την ποσοτικοποίηση τους με τη κατασκευή καμπυλών αναφοράς με χρήση πρότυπων ενώσεων. Αρχικά θα πραγματοποιηθεί ανάπτυξη της μεθόδου με την κατάλληλη ρύθμιση των χρωματογραφικών συνθηκών (κινητές φάσεις και σύστασή τους, ροή διαλύτη, πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης, κατάλληλη χρωματογραφική στήλη) και των συνθηκών της φασματομετρίας μάζας (θερμοκρασία πηγή ιοντισμού, ροές φέροντων αερίων, κ.ά.). Έπειτα θα ακολουθήσει η επικύρωση της μεθόδου που αναπτύχθηκε και θα προσδιοριστεί η γραμμικότητα, η πιστότητα και η ακρίβεια της μεθόδου, καθώς και το όριο ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της μεθόδου, με στόχο την εφαρμογή της συγκεκριμένης μεθόδου για τον προσδιορισμό μεταβιοτικών σε βιολογικά υγρά (αίμα, κόπρανα, κ.ά) και νέα καινοτόμα προϊόντα τροφίμων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

6.1. ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΡΟΗΣ

Στο διάγραμμα ροής που ακολουθεί (Διάγραμμα 1) παρουσιάζεται η πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε. Η προετοιμασία των προτύπων διαλυμάτων μεταβιοτικών, καθώς και οι αναλύσεις υγρής χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας με αναλυτή χρόνου πτήσης (LC-TTOF MS) εκπονήθηκαν στο Εργαστήριο Ενόργανης Ανάλυσης του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων.



Διάγραμμα 1 Διάγραμμα ροής πειραματικής διαδικασίας

6.2. ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

6.2.1. Αντιδραστήρια, διαλύτες και πρότυπες ουσίες

Για τις αναλύσεις LC-TTOF MS χρησιμοποιήθηκε μεθανόλη 99,9% (LC-MS grade), η οποία αγοράστηκε από την εταιρεία Fisher Scientific (Loughborough, UK), ισοπροπανόλη (2-propanol), η οποία αγοράστηκε από την εταιρεία Panreac Química SLU (Barcelona, Spain) και τέλος ακετονιτρίλιο, νερό και μυρμηγκικό οξύ 99,9%, όλα βαθμού καθαρότητας LC-MS που αγοράστηκαν από την εταιρεία CARLO ERBA REAGENTS GmbH (Emmendingen, Germany). Οι πρότυπες ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 6).

Πίνακας 6 Τα μεταβιοτικά και η εταιρεία παραγωγής τους

ΜΕΤΑΒΙΟΤΙΚΑ	ΕΤΑΙΡΕΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
Ουρολιθίνη Α (Urolithin A)	Sigma – Aldrich®
Ουρολιθίνη Β (Urolithin B)	Sigma – Aldrich®
Εντεροδιόλη(Enterodiol)	Sigma – Aldrich®
Εντερολακτόνη (Enterolactone)	Sigma Life Science
Διϋδρορεσβερατρόλη (Dihydroresveratrol)	Sigma – Aldrich®
Piceid / Polydatin	Sigma – Aldrich®
Κατεχόλη/Πυροκατεχόλη (Catechol/ Pyrocatechol)	Sigma – Aldrich®
Πυρογαλλόλη (Pyrogallol)	Sigma – Aldrich®
S- εκουόλη (S- equol)	Sigma – Aldrich®
Πρωτοκατεχικό οξύ (Protocatechuic acid)	PhytoLab
γ- Βαλερολακτόνη (γ – Valerolactone)	Sigma – Aldrich®
Μενακινόνη/ Βιταμίνη K2 (Menaquinone)	Sigma – Aldrich®
Θιαμίνη / Βιταμίνη B1 (Thiamine)	Sigma – Aldrich®
Ριβοφλαβίνη / Βιταμίνη B2 (Riboflavin)	Sigma – Aldrich®
Πυριδοξίνη / Βιταμίνη B6 (Pyroxidine)	Sigma – Aldrich®

6.2.2. Συσκευές και επιστημονικά όργανα

Για την ζύγιση των πρότυπων ουσιών χρησιμοποιήθηκε αναλυτικός ζυγός με ακρίβεια στο πέμπτο δεκαδικό ψηφίο του γραμμαρίου της εταιρίας KERN (Germany).

Το σύστημα υγρής χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας με τετραπολικό αναλυτή χρόνου πτήσης (LC-TTOF MS) αποτελείται από τον χρωματογράφο ekspert™ nanoLC 425 της εταιρείας eksigent® (California,USA) το σύστημα φασματομετρίας μάζας TripleTOF® 6600+ της εταιρείας Sciex (Toronto, Canada) και από μια στήλη διαχωρισμού Luna® C-18(2) 100 A (Phenomenex California, USA) με εσωτερική διάμετρο 150 mm x 0,3 mm και μέγεθος σωματιδίων 3 μm. Η δειγματοληψία έγινε με τη χρήση μικρο – σύριγγας ekspert 400 Autosampler (50 μL).

Για την λειτουργία του οργάνου χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Analyst® TF Software 1.8 (Sciex, USA), ενώ για την επεξεργασία των φασμάτων μάζας και των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Sciex OS Q (Sciex, USA) και το πρόγραμμα Microsoft Excel

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ – ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΑΣ ΜΕ ΑΝΑΛΥΤΗ ΧΡΟΝΟΥ ΠΤΩΣΗΣ (LC-QTOF MS)

Για την παρασκευή προτύπων διαλυμάτων μεταβιοτικών συγκεκριμένη ποσότητα στερεάς ουσίας διαλύθηκε σε ανάλογα mL κατάλληλου διαλύτη (νερό, μεθανόλη, ισοπροπανόλη, ακετονιτρίλιο) ώστε να παραληφθούν διαλύματα με συγκέντρωση 1000 µg/ml. Τα πρότυπα αυτά διαλύματα θεωρήθηκαν ως διαλύματα παρακαταθήκης (stock 1). Ειδικότερα, όλες οι πρότυπες ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα πτυχιακή εργασία ήταν σε μορφή σκόνης εκτός από την γ- Valerolactone, η οποία ήταν σε υγρή μορφή.

Για τις ανάγκες του πειράματος παρασκευάστηκαν επιπλέον διαλύματα παρακαταθήκης των εξεταζόμενων μεταβιοτικών με συγκεντρώσεις 100 µg/ml, 10 µg/ml και 1µg/ml (stock 2, stock 3 και stock 4 αντίστοιχα), με μόνη εξαίρεση τη ριβοφλαβίνη (βιταμίνη Β2) που λόγω μικρής διαλυτότητας στους χρησιμοποιούμενους διαλύτες, παρασκευάστηκε ως πιο πυκνό stock (stock 1) διάλυμα συγκέντρωσης 125 µg/ml Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 7) φαίνονται αναλυτικά τα μεταβιοτικά και οι χρησιμοποιούμενοι διαλύτες για το καθένα ξεχωριστά.

Πίνακας 7 Τα μεταβιοτικά και οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για τη παρασκευή stock προτύπων διαλυμάτων

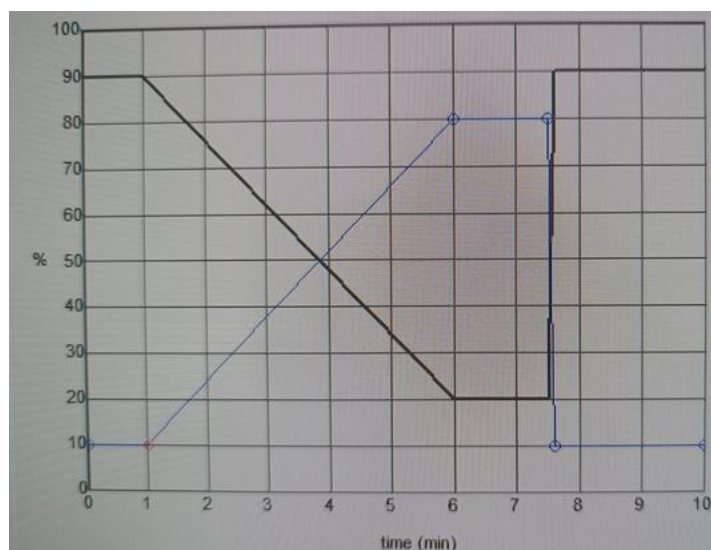
ΜΕΤΑΒΙΟΤΙΚΑ	ΔΙΑΛΥΤΗΣ
Ουρολιθίνη Α (Urolithin Α)	Μεθανόλη (MeOH)
Ουρολιθίνη Β (Urolithin Β)	Μεθανόλη (MeOH)
Εντεροδιόλη(Enterodiol)	Ακετονιτρίλιο (ACN)
Εντερολακτόνη (Enterolactone)	Ακετονιτρίλιο (ACN)
Διϋδρορεσβερατρόλη (Dihydroresveratrol)	Μεθανόλη (MeOH)
Piceid / Polydatin	Μεθανόλη (MeOH)
Κατεχόλη/Πυροκατεχόλη (Catechol/ Pyrocatechol)	Νερό (H ₂ O)
Πυρογαλλόλη (Pyrogallol)	Μεθανόλη (MeOH)
S- εκουόλη (S-equol)	Μεθανόλη (MeOH)
Πρωτοκατεχικό οξύ (Protocatechuic acid)	Ακετονιτρίλιο (ACN)
γ- Βαλερολακτόνη (γ – Valerolactone)	Ακετονιτρίλιο (ACN)
Μενακινόνη/ Βιταμίνη Κ2 (Menaquinone)	Ισοπροπανόλη (2-propanol)
Θιαμίνη / Βιταμίνη Β1 (Thiamine hydrochloride)	Μεθανόλη (MeOH)
Ριβοφλαβίνη / Βιταμίνη Β2 (Riboflavin)	Μεθανόλη/ Νερό (MeOH/ H ₂ O) 70:30 v/v
Πυριδοξίνη / Βιταμίνη Β6 (Pyridoxine hydrochloride)	Μεθανόλη (MeOH)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

8.1. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΜΕΤΑΒΙΟΤΙΚΩΝ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ – ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΑΣ ΜΕ ΑΝΑΛΥΤΗ ΧΡΟΝΟΥ ΠΤΩΣΗΣ (LC-QTOF MS)

8.1.1. Συνθήκες υγρής χρωματογραφίας μικροροών (microLC)

Η ανάπτυξη της μεθόδου πραγματοποιήθηκε με τον χρωματογράφο ekspert™ nanoLC 425 της εταιρείας eksigent® (California, USA). Αναλυτικότερα, ο διαχωρισμός των μεταβιοτικών ουσιών διεξήχθη με στήλη αντίστροφης φάσης (Reversed phase, RP). Το πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης συνίσταται από διαλύτη Α [νερό – και 0,1% (v/v) μηρυγκικό οξύ] και διαλύτη Β [ακετονιτρίλιο – 0,1% (v/v) μυρμηγκικό οξύ]. Η ροή της κινητής φάσης ήταν 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ και το πρόγραμμα για τη βαθμιδωτή έκλουση ήταν αρχικά 10% Β στο χρονικό διάστημα 0-1 min, γραμμική βαθμίδωση 10-80% Β στο χρόνο 1-6 min. Διατηρήθηκε σταθερό στο 80% στο χρόνο 6-7,5 min και 80-10% Β στο χρονικό διάστημα 7,5-7,6 min. Τέλος η σύσταση της κινητής φάσης επανήλθε στις αρχικές συνθήκες (10% Β) και παρέμεινε από το 7,6 έως το 10 min για εξισορρόπηση της στήλης, όπως φαίνεται αναλυτικά στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 20) και πίνακα (Πίνακας 8). Ο όγκος έγχυσης των δειγμάτων, αλλά και του «τυφλού» (blank) ήταν 1 μL , ενώ η θερμοκρασία της στήλης παρέμεινε στους 30 °C.



Εικόνα 20 Διάγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης της υπό ανάπτυξη μεθόδου micro LC. (η μαύρη γραμμή απεικονίζει το διάλυμα νερού, ενώ η μπλε το διάλυμα ακετονιτρίλιου)

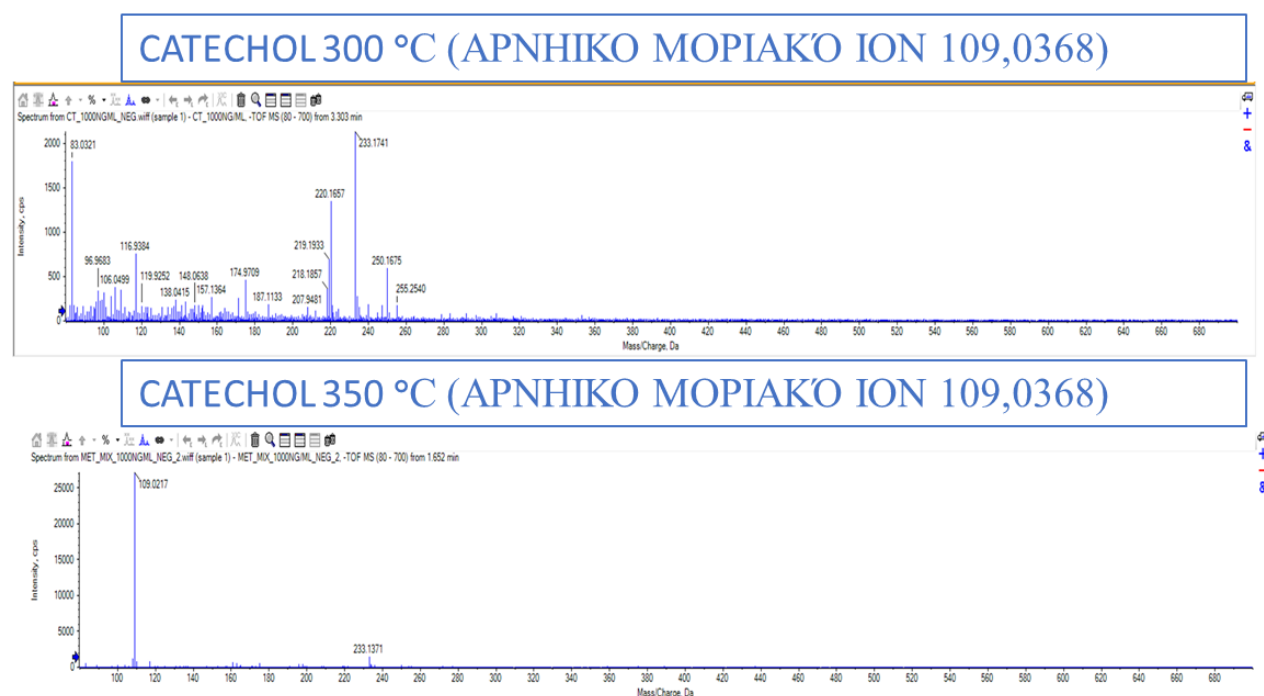
Πίνακας 8 Διάγραμμα βαθμιδωτής έκλυσης

ΧΡΟΝΟΣ (min)	A%	B%
0	90	10
1	90	10
6	20	80
7,5	20	80
7,6	90	10
10	90	10

8.1.2. Συνθήκες τετραπολικού φασματογράφου μαζών με αναλυτή χρόνου πτήσης

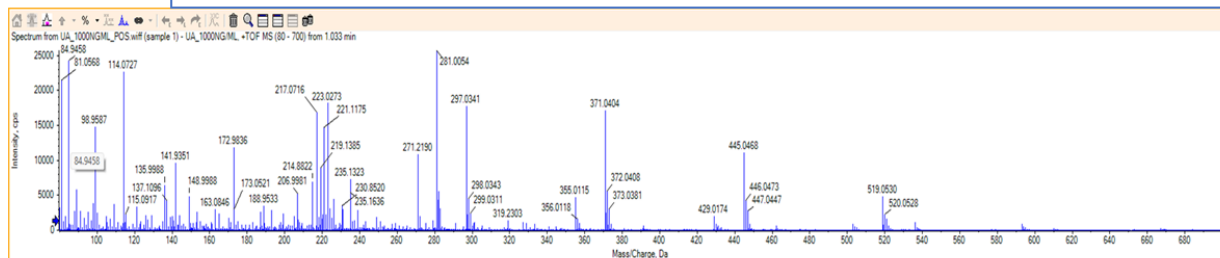
Η ανίχνευση έγινε σε τετραπολικό φασματογράφο μαζών με αναλυτή χρόνου πτήσης (TripleTOF® 6600+, Sciex). Το σύστημα ελεγχόταν από ηλεκτρονικό υπολογιστή μέσω του λογισμικού προγράμματος Analyst® TF Software 1.8. (Sciex). Για την ανίχνευση των μεταβιοτικών ουσιών επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί ο ιονισμός με θετικό και αρνητικό ηλεκτροψεκασμό (Electrospray Ionization-ESI).

Όσον αφορά την θερμοκρασία πηγής ιονισμού αρχικά, ρυθμίστηκε στους 300 °C, ωστόσο αποφασίστηκε τελικά κατά την ανάπτυξη της μεθόδου ότι ιδανικότερη θερμοκρασία για τη δημιουργία MS ιόντων των μελετούμενων ενώσεων, για τη πλειοψηφία των ενώσεων, ήταν οι 350 °C, όπως φαίνεται στην Εικόνα 21 &22

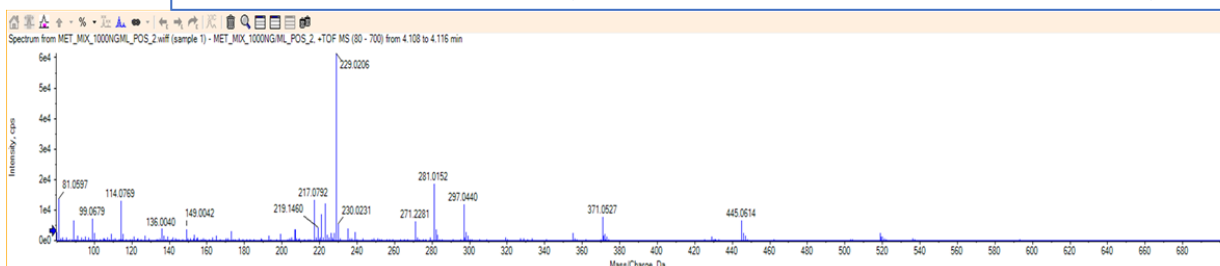


Εικόνα 21 Φάσμα μάζας MS κατεχόλης στους 300°C και 350°C στον αρνητικό ιοντισμό

UROLITHIN A 300 °C (ΘΕΤΙΚΟ ΜΟΡΙΑΚΟ ΙΟΝ 229,0423)



UROLITHIN A 350 °C (ΘΕΤΙΚΟ ΜΟΡΙΑΚΟ ΙΟΝ 229,0423)



Εικόνα 22 Φάσμα μάζας MS ουρολιθίνης Α στους 300°C και 350°C στον θετικό ιοντισμό

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 9) φαίνονται οι συνθήκες του QTOF- MS

Πίνακας 9 Συνθήκες QTOF - MS

ΣΥΝΘΗΚΕΣ QTOF-MS	
Ion source gas 1	40
Ion source gas 2	40
curtain gas	30 (au)
ionspray voltage floating	4500
Temperature	300°C→350°C
declustering potential	80 eV
collision energy	10 eV
Cycles	1200
Cycle time	0,5000 sec
Duration	10,000 min
TOF Mass Range	80-700 Da

Στον Πίνακα 10 παρουσιάζονται οι χρόνοι έκλουσης των μεταβιοτικών και τα MS μητρικά ιόντα τους στο θετικό και αρνητικό ιοντισμό.

Πίνακας 10 Χρόνος έκλουσης των μεταβιοτικών και τα MS μητρικά ιόντα τους στο θετικό και αρνητικό ιοντισμό

ΜΕΤΑΒΙΟΤΙΚΑ	ΧΡΟΝΟΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (min)	ΘΕΤΙΚΟ ΜΟΡΙΑΚΟ ΙΟΝ [M+H]⁺	ΑΡΝΗΤΙΚΟ ΜΟΡΙΑΚΟ ΙΟΝ [M-H]⁻
Urolithin A	4,137	229,0423	227,0423
Urolithin B	4,914	213,0473	211,0473
Enterodiol	4,012	ND	301,1518
Enterolactone	4,729	299,1205	297,1205
Dihydroresveratrol	3,975	231,0943	ND
Piceid / Polydatin	1,431	ND	389,1315
Catechol/ Pyrocatechol	1,622	ND	109,0368
Pyrogallol	1,382	ND	125,0317
S-equol	4,671	243,0943	241,0943
Protocatechuic acid	1,404	ND	153,0266
γ – Valerolactone	1,576	101,0524	ND
Menaquinone	ND	ND	ND
Thiamine hydrochloride	ND	ND	ND
Riboflavin	1,395	377,1383	375,1383
Pyridoxine hydrochloride	1,097	170,0739	168,0739

*ND: not detected

Από τις 15 ενώσεις που μελετήθηκαν στην παρούσα πτυχιακή εργασία, δύο από αυτές δεν μπόρεσαν να προσδιοριστούν με την μέθοδο που αναπτύχθηκε. Οι ενώσεις αυτές είναι η θειαμίνη (Βιταμίνη Β1) και η μενακινόνη (Βιταμίνη Κ2). Για την πρώτη ενδεχομένως να χρειαζόταν διαφορετικές συνθήκες μάζας, όπως για παράδειγμα μείωση θερμοκρασίας στην πηγή ιοντισμού ESI (~150 °C), ενώ για τη δεύτερη διαφορετικές συνθήκες στο σύστημα της υγρής χρωματογραφίας, λόγω χάριν διαφορετικό πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης, καθώς η βιταμίνη Κ2 είναι η μοναδική λιποδιαλυτή ένωση μεταξύ των εξεταζόμενων και ίσως χρειάζεται μεγαλύτερη ποσότητα οργανικού διαλύτη στο σύστημα βαθμιδωτής έκλουσης.

Επιπλέον, από τον Πίνακα 9 είναι προφανές πως 6 από τις 13 προσδιοριζόμενες ενώσεις δίνουν ιόντα τόσο στο θετικό όσο και στον αρνητικό ιοντισμό, ενώ οι περισσότερες ενώσεις εντοπίζονται στον αρνητικό παρά στο θετικό ιοντισμό. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι στην πλειοψηφία τους, τα εξεταζόμενα μεταβιοτικά ανήκουν σε μεταβολίτες φαινολικών ενώσεων και είναι και τα ίδια ενώσεις με φαινολικό δακτύλιο, που συνήθως ο ιοντισμός τους είναι πιο σταθερός όταν σχηματίζονται αρνητικώς φορτισμένα ιόντα. (López-Fernández et al., 2020)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9 ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η αναλυτική μέθοδος, που αναπτύχθηκε στην παρούσα εργασία, επικυρώθηκε με τον προσδιορισμό των εξής παραμέτρων: γραμμικότητα, πιστότητα και ακρίβεια μεθόδου. Αξίζει να αναφερθεί πως η πιστότητα διαθέτει δύο υποκατηγορίες, την επαναληψιμότητα και την αναπαραγωγιμότητα. Επίσης, προσδιορίστηκαν τόσο τα όρια ανίχνευσης (LOD), όσο και τα όρια ποσοτικοποίησης (LOQ), για κάθε μεταβιοτικό που μελετήθηκε. Για την επικύρωση της μεθόδου ακολουθήθηκαν οι κατευθυντήριες οδηγίες επίσημων φορέων όπως το International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH). (<https://www.ich.org/>) (ICH Official Web Site : ICH, n.d.)

9.1. Γραμμικότητα μεθόδου (Linearity)

Η γραμμικότητα μιας αναλυτικής διαδικασίας είναι η ικανότητά της (εντός ενός συγκεκριμένου εύρους συγκεντρώσεων) να λαμβάνει αποτελέσματα τα οποία είναι ευθέως ανάλογα με τη συγκέντρωση (ποσότητα) του αναλύτη στο δείγμα. (Chandran & Singh, 2007).

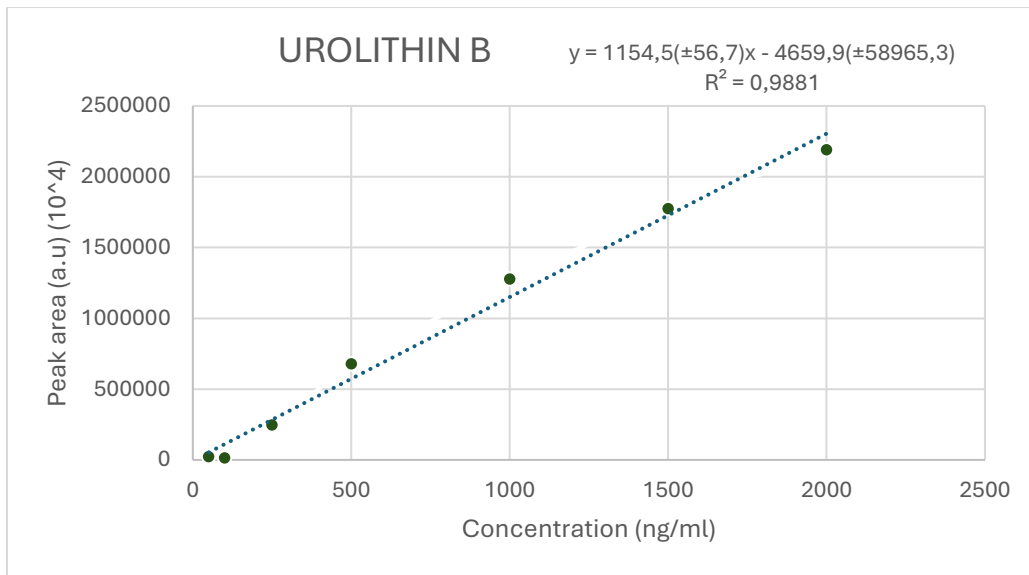
Προκειμένου να κατασκευαστούν οι καμπύλες αναφοράς, υπολογίστηκαν οι κατάλληλες ποσότητες των αρχικών διαλυμάτων stock και παρασκευάστηκαν επτά (7) διαφορετικά διαλύματα με συγκεντρώσεις 0,05 µg/ml, 0,1 µg/ml, 0,25 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 1,5 µg/ml και 2 µg/ml. Τα διαλύματα αυτά περιείχαν όλες τις μεταβιοτικές ουσίες (συνολικά 13) που προσδιορίστηκαν κατά την ανάπτυξη της μεθόδου στην παρούσα πτυχιακή. Τα εν λόγω διαλύματα αραιώθηκαν σε διαλύτη νερού-ακετονιτριλίου σε αναλογία 90:10 v/v, που αποτελεί και την αρχική σύσταση της κινητής φάσης στο πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης.

Τέλος για τον πιο αποτελεσματικό καθαρισμό της στήλης μεταξύ των δειγμάτων (carry-over), καθώς και για την σταθερότητα και ορθή λειτουργία του χρωματογραφικού συστήματος έγινε προετοιμασία τυφλών δειγμάτων τα οποία περιείχαν νερό-ακετονιτρίλιο σε αναλογία 90:10 v/v.

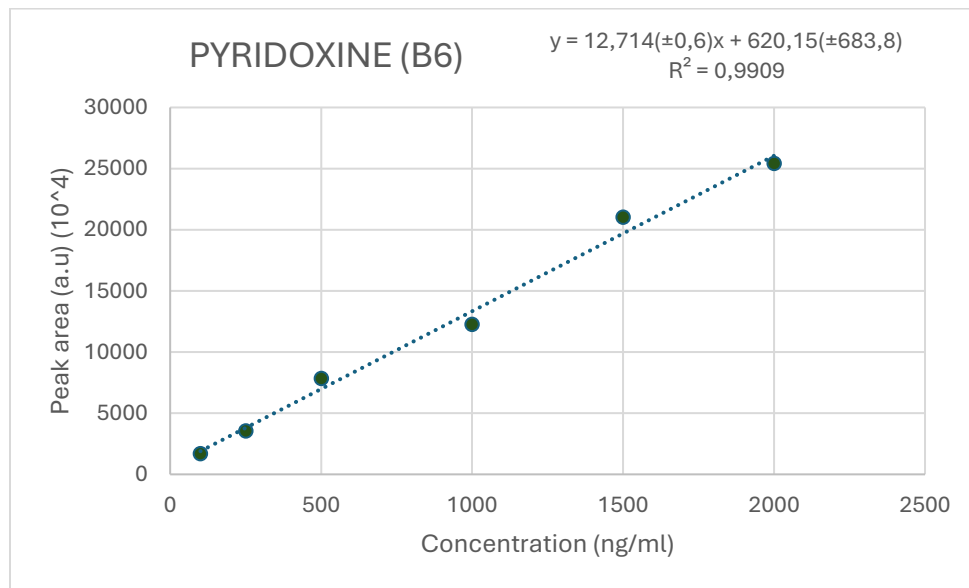
Οι καμπύλες βαθμονόμησης των προτύπων ουσιών, που κατασκευάστηκαν, αποτελούν διαγράμματα της συγκέντρωσης των προτύπων μεταβιοτικών ουσιών συναρτήσεως του εμβαδού των κορυφών της χρωματογραφικής τους κορυφής. Η εξίσωση παλινδρόμησης και ο συντελεστής προσδιορισμού (R^2) υπολογίστηκαν για κάθε καμπύλη μεταβιοτικού ξεχωριστά.

Ενδεικτικά παρακάτω (Εικόνες 23-29) παρουσιάζονται οι καμπύλες αναφοράς, δηλαδή τα διαγράμματα συγκέντρωσης [Concentration (µg/mL)] συναρτήσεως του εμβαδού [Peak area (au x 10^4)], για ορισμένα από τα μεταβιοτικά (και σε θετικό και σε αρνητικό ιοντισμό) που ταυτοποιήθηκαν με την μέθοδο που αναπτύχθηκε.

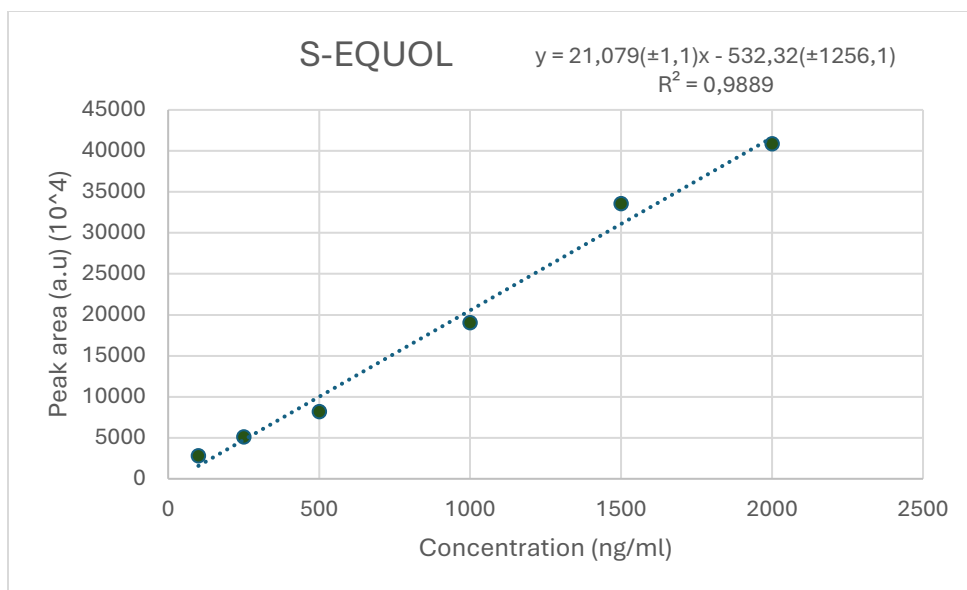
ΓΙΑ ΤΟΝ ΑΡΝΗΤΙΚΟ ΙΟΝΤΙΣΜΟ



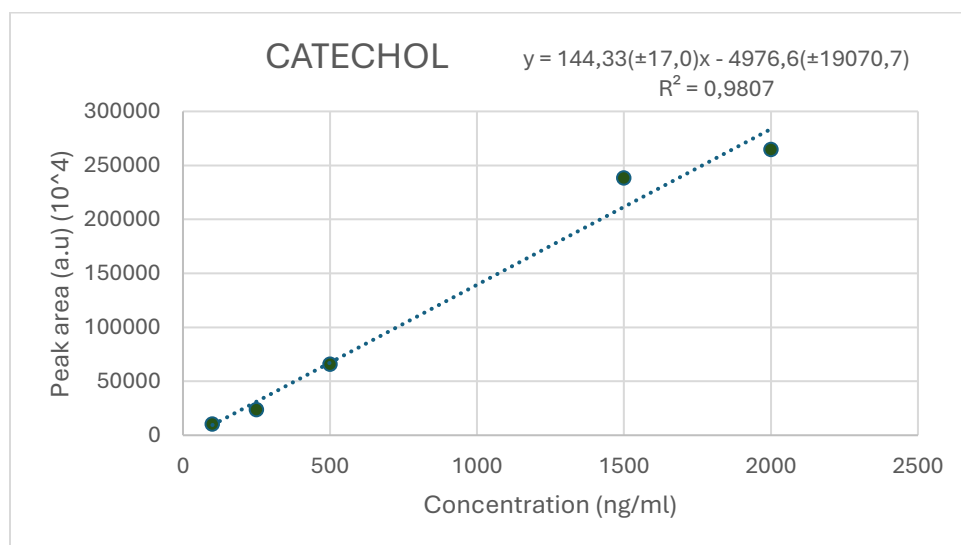
Εικόνα 23 Καμπύλη αναφοράς ουρολιθίνης B



Εικόνα 24 Καμπύλη αναφοράς πυριδοξίνης

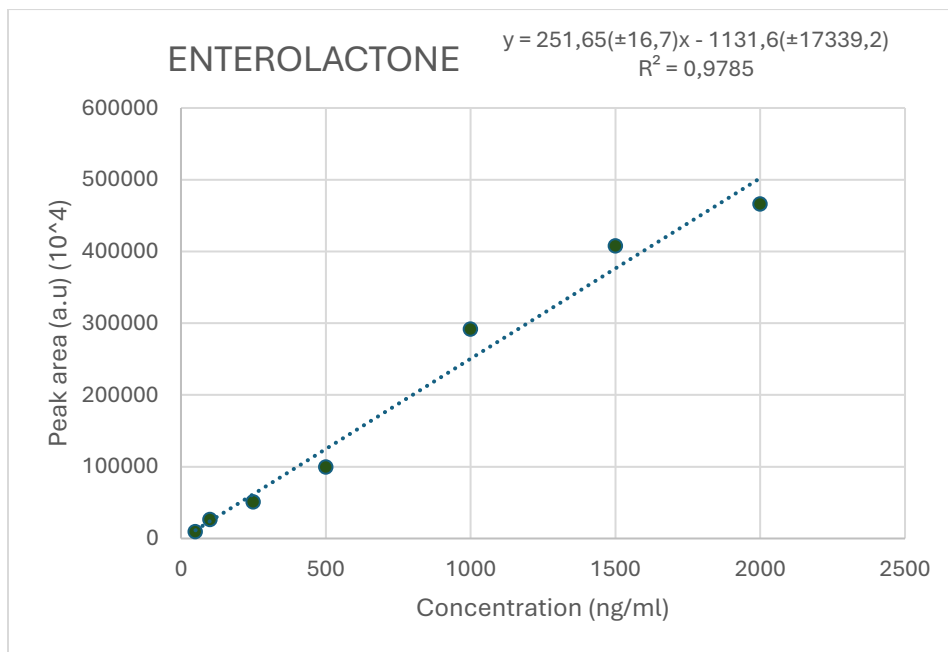


Εικόνα 25 Καμπύλη αναφοράς s-equol

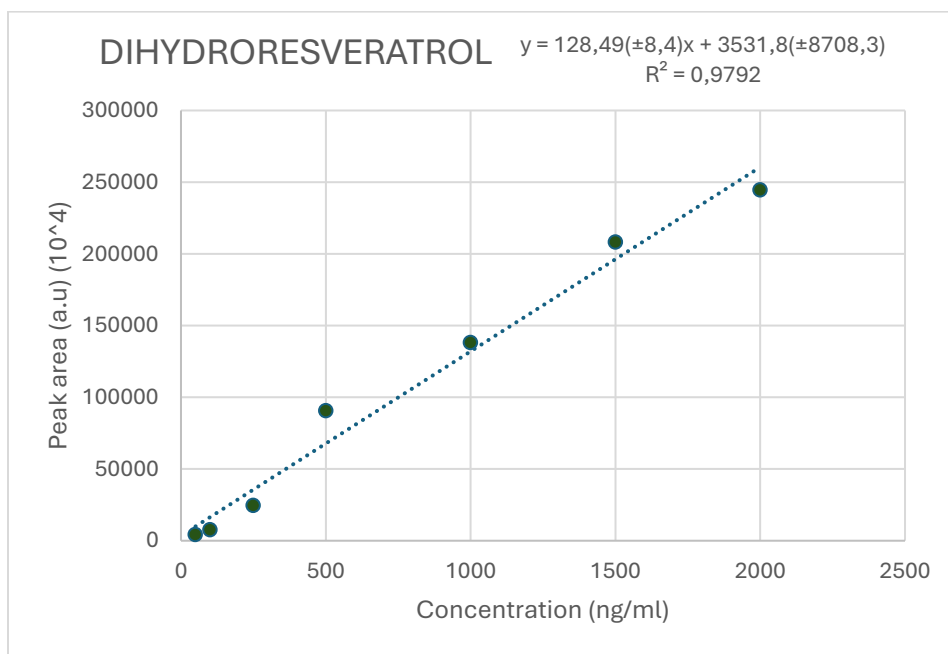


Εικόνα 26 Καμπύλη αναφοράς κατεχόλης

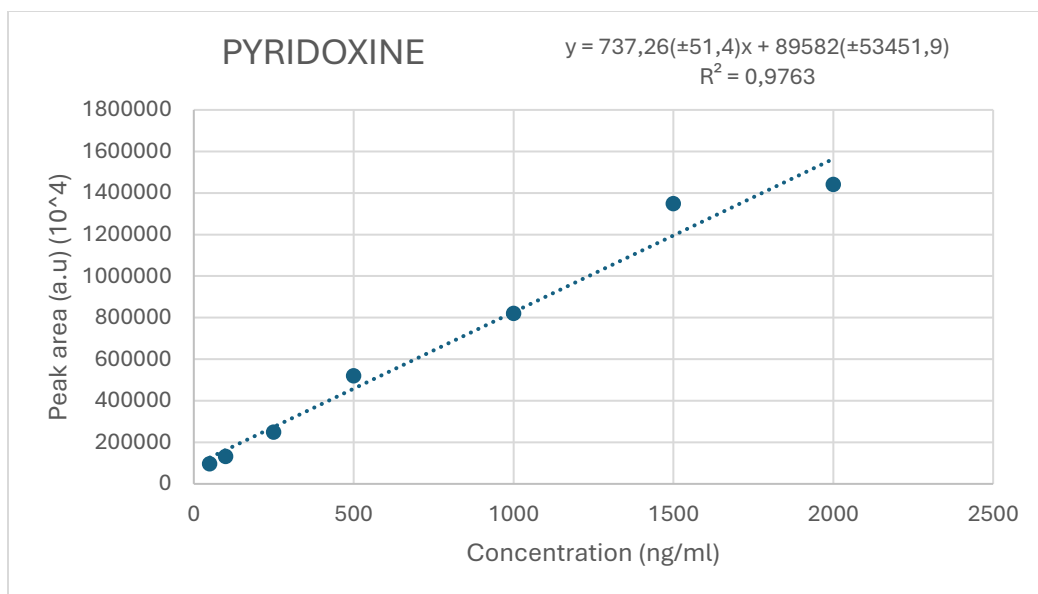
ΓΙΑ ΤΟΝ ΘΕΤΙΚΟ ΙΟΝΤΙΣΜΟ



Εικόνα 27 Καμπύλη αναφοράς εντερολακτόνης



Εικόνα 28 Καμπύλη αναφοράς διϋδρορεσβερατρόλης



Εικόνα 29 Καμπύλη αναφοράς πυριδοξίνης

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 11) συνοψίζονται τα μεταβιοτικά που μελετήθηκαν, οι εξισώσεις των καμπυλών αναφοράς του κάθε μεταβιοτικού καθώς και ο συντελεστής προσδιορισμού R^2 .

Πίνακας 11 Αποτελέσματα γραμμικότητας της μεθόδου

ΜΕΤΑΒΙΟΤΙΚΑ	ΑΡΝΗΤΙΚΟΣ ΙΟΝΤΙΣΜΟΣ		ΘΕΤΙΚΟΣ ΙΟΝΤΙΣΜΟΣ	
	ΕΞΙΣΩΣΗ ΚΑΜΠΥΛΗΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ	R ²	ΕΞΙΣΩΣΗ ΚΑΜΠΥΛΗΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ	R ²
Urolithin A	y=874,7x- 66309 (Εύρος C; 0,05μg/mL - 2,0 μg/mL)	0,9791	y=478,46x- 29827 (Εύρος C: 0,05μg/mL - 2,0 μg/mL)	0,9695
Urolithin B	y=1154,5x-4659,9 (Εύρος C: 0,05μg/mL - 2,0 μg/mL)	0,9881	y=1072,3x- 30978 (Εύρος C: 0,05μg/mL - 2,0 μg/mL)	0,9722
Enterodiol	y=370,89x- 39395 (Εύρος C: 0,05μg/mL - 2,0 μg/mL)	0,9777		
Enterolactone	y=833,98x- 8410,7 (Εύρος C: 0,05μg/mL - 2,0 μg/mL)	0,9607	y=251,65x- 1131,6 (Εύρος C: 0,05μg/mL - 2,0 μg/mL)	0,9785
Dihydroresveratrol			y=128,49x+ 3531,8 (Εύρος C: 0,05μg/mL - 2,0 μg/mL)	0,9792
Piceid / Polydatin	y=31,977x- 110,6 (Εύρος C: 0,05μg/mL - 2,0 μg/mL)	0,9702		
Catechol/ Pyrocatechol	y=144,33x- 4976,6 (Εύρος C: 0,1μg/mL - 2,0 μg/mL)	0,9807		
Pyrogallol	y=115,43x- 5105,5 (Εύρος C: 0,1μg/mL - 2,0 μg/mL)	0,9752		
S- equol	y=21,079x- 532,32 (Εύρος C: 0,1μg/mL - 2,0 μg/mL)	0,9889	y=113,77x+9358,7 (Εύρος C: 0,1μg/mL - 2,0 μg/mL)	0,9761
Protocatechuic acid	y=105,12x- 4841,3 (Εύρος C: 0,05μg/mL - 2,0	0,9534		

	μg/mL)			
γ – Valerolactone			y=74,06x+ 32761 (Εύρος C: 0,25μg/mL - 2,0 μg/mL)	0,9593
Riboflavin	y=44,493x- 4038,8 (Εύρος C: 0,05μg/mL - 2,0 μg/mL)	0,9563	y=65,95x+ 2344 (Εύρος C: 0,05μg/mL - 2,0 μg/mL)	0,9606
Pyridoxine hydrochloride	y=12,714x+ 620,15 (Εύρος C: 0,1μg/mL - 2,0 μg/mL)	0,9909	y=737,26x+ 89582 (Εύρος C: 0,05μg/mL - 2,0 μg/mL)	0,9763

Προκειμένου να γίνει αποδεκτή μία καμπύλη αναφοράς, δηλαδή να παρουσιάζει γραμμικότητα, που σημαίνει πως απαιτείται συντελεστής προσδιορισμού με $R^2 \geq 0,98$. Όπως προκύπτει από τον παραπάνω πίνακα (Πίνακας 10) ο συντελεστής προσδιορισμού R^2 ήταν μεγαλύτερος από 0,9 για όλα τα μεταβιοτικά στο υπό μελέτη εύρος συγκεντρώσεων (γραμμικό εύρος συγκεντρώσεων 0,05μg/mL - 2μg/mL), εκτός από τις ενώσεις κατεχόλη, πυρογαλλόλη, s- εκουόλη και πυριδοξίνη (εύρος 0,1μg/mL - 2μg/mL) στον αρνητικό ιοντισμό και τις ενώσεις s- εκουόλη (εύρος 0,1μg/mL - 2μg/mL), γ- βαλερολακτόνη (εύρος 0,25μg/mL - 2μg/mL) στον θετικό ιοντισμό. Επί πλέον, οι ενώσεις που παρουσιάζουν τις υψηλότερες τιμές συντελεστή προσδιορισμού (R^2 είναι οι πυριδοξίνη, s- εκουόλη και ουρολιθίνη Α με τιμές 0,9909, 0,9889 και 0,9881 αντίστοιχα).

9.2. Πιστότητα (Precision)

Η πιστότητα μιας αναλυτικής διαδικασίας εκφράζει τον βαθμό διασποράς μεταξύ μιας σειράς μετρήσεων που λαμβάνονται από πολλαπλές επαναλήψεις ή δειγματοληψίες του ίδιου ομοιογενούς δείγματος υπό καθορισμένες συνθήκες. Η πιστότητα, όπως ήδη αναφέρθηκε, χωρίζεται σε δύο υποκατηγορίες, την επαναληψιμότητα (repeatability/intraday precision) και την αναπαραγωγιμότητα (reproducibility/interday precision). (Chandran & Singh, 2007)

9.2.1. Επαναληψιμότητα (Repeatability)

Ως επαναληψιμότητα ορίζεται ο βαθμός διασποράς των αποτελεσμάτων που προέκυψαν με την ίδια μέθοδο, το ίδιο δείγμα και τις ίδιες συνθήκες (χειριστής, χρονική περίοδος, εξοπλισμός). (Chandran & Singh, 2007)

Τα πειράματα που αφορούν την επαναληψιμότητα περιλάμβαναν μετρήσεις του ίδιου δείγματος (μείγμα μεταβιοτικών ουσιών), με τη χρήση της ίδιας μεθόδου και των ίδιων εξωτερικών πειραματικών συνθηκών (χειριστής, εξοπλισμός). Για τον προσδιορισμό της επαναληψιμότητας παρασκευάστηκαν διαλύματα ελέγχου ποιότητας (quality control standards, QC) σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις, μία χαμηλή, μία μεσαία και μία υψηλή (0,1 µg/mL, 0,5 µg/mL και 2 µg/mL). Για κάθε συγκέντρωση πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις (n=3).

Έπειτα, καταγράφηκε το εμβαδόν κάθε κορυφής του χρωματογραφήματος, υπολογίστηκαν οι συγκεντρώσεις των μεταβιοτικών του κάθε δείγματος από τις αντίστοιχες καμπύλες αναφοράς, καθώς και ο μέσος όρος αυτών. Στη συνέχεια, υπολογίστηκε η τυπική απόκλιση των μετρήσεων (stdev), καθώς και η σχετική τυπική απόκλιση (RSD%) μέσω της παρακάτω εξίσωσης (Εξίσωση 1), η οποία αποτελεί το κριτήριο για την επαναληψιμότητα. Προκειμένου να κριθεί μία μέθοδος επαναλήψιμη, η τιμή της σχετικής τυπικής απόκλισης (RSD%) πρέπει να είναι μικρότερη ή ίση με 15% (RSD% ≤15%).

$$RSD\% = \frac{stdev}{\bar{x}} \times 100$$

Εξίσωση 1 Εξίσωση υπολογισμού % σχετικής τυπικής απόκλισης (RSD%)

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 11) συνοψίζονται τα μεταβιοτικά που μελετήθηκαν, στις 3 συγκεντρώσεις που εξετάστηκαν (χαμηλή, μεσαία, υψηλή) καθώς και η σχετική τυπική τους απόκλιση.

Πίνακας 12 Αποτελέσματα επαναληψιμότητας μεθόδου σε θετικό και αρνητικό ιοντισμό.

ΜΕΤΑΒΙΟΤΙΚΑ	ΑΡΝΗΤΙΚΟΣ ΙΟΝΤΙΣΜΟΣ		ΘΕΤΙΚΟΣ ΙΟΝΤΙΣΜΟΣ	
	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ	RSD%	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ	RSD%
Urolithin A	0,1 µg/ml	56,66	0,1 µg/ml	11,50
	0,5 µg/ml	14,33	0,5 µg/ml	0,95
	2,0 µg/ml	40,81	2,0 µg/ml	9,60
Urolithin B	0,1 µg/ml	48,19	0,1 µg/ml	16,97
	0,5 µg/ml	19,11	0,5 µg/ml	10,59
	2,0 µg/ml	7,84	2,0 µg/ml	9,49
Enterodiol	0,1 µg/ml	52,81	0,1 µg/ml	-
	0,5 µg/ml	8,43	0,5 µg/ml	-
	2,0 µg/ml	12,84	2,0 µg/ml	-
Enterolactone	0,1 µg/ml	49,25	0,1 µg/ml	14,41
	0,5 µg/ml	4,04	0,5 µg/ml	13,70
	2,0 µg/ml	10,94	2,0 µg/ml	6,96
Dihydroresveratrol	0,1 µg/ml	-	0,1 µg/ml	31,52
	0,5 µg/ml	-	0,5 µg/ml	109,35
	2,0 µg/ml	-	2,0 µg/ml	3,69
Piceid / Polydatin	0,1 µg/ml	53,98	0,1 µg/ml	-
	0,5 µg/ml	13,30	0,5 µg/ml	-
	2,0 µg/ml	1,17	2,0 µg/ml	-
Catechol/ Pyroatechol	0,1 µg/ml	12,72	0,1 µg/ml	-
	0,5 µg/ml	3,50	0,5 µg/ml	-
	2,0 µg/ml	10,54	2,0 µg/ml	-
Pyrogallol	0,1 µg/ml	37,72	0,1 µg/ml	-
	0,5 µg/ml	7,92	0,5 µg/ml	-
	2,0 µg/ml	12,64	2,0 µg/ml	-
S- equol	0,1 µg/ml	54,34	0,1 µg/ml	10,53
	0,5 µg/ml	2,56	0,5 µg/ml	8,18
	2,0 µg/ml	16,08	2,0 µg/ml	11,26
Protocatechuic acid	0,1 µg/ml	56,38	0,1 µg/ml	-
	0,5 µg/ml	16,43	0,5 µg/ml	-
	2,0 µg/ml	9,33	2,0 µg/ml	-
γ – Valerolactone	0,1 µg/ml	-	0,1 µg/ml	-
	0,5 µg/ml	-	0,5 µg/ml	2,82
	2,0 µg/ml	-	2,0 µg/ml	5,08
Riboflavin	0,1 µg/ml	3,61	0,1 µg/ml	10,26
	0,5 µg/ml	14,71	0,5 µg/ml	8,06
	2,0 µg/ml	9,05	2,0 µg/ml	7,80
Pyridoxine	0,1 µg/ml	15,70	0,1 µg/ml	10,81
	0,5 µg/ml	18,40	0,5 µg/ml	43,00

hydrochloride	2,0 µg/ml	1,51	2,0 µg/ml	32,16
---------------	-----------	------	-----------	-------

Όπως προκύπτει από τον παραπάνω πίνακα (Πίνακας 11) η μέθοδος εμφανίζει επαναληψιμότητα στο μεσαίο και υψηλό επίπεδο συγκέντρωσης στον αρνητικό ιοντισμό. Συγκεκριμένα, στη χαμηλή συγκέντρωση (0,05 µg/ml) παρατηρείται ότι καμία ένωση δεν παρουσιάζει επαναληψιμότητα καθώς οι σχετικές τους αποκλίσεις είναι πάνω από 15%. Εξάιρεση αποτελούν για τη συγκέντρωση αυτή η κατεχόλη και ριβοφλαβίνη με RSD% ίσο με 12,72 και 3,61 αντίστοιχα. Το γεγονός των υψηλότερων %RSD στο χαμηλό επίπεδο συγκέντρωσης μπορεί να οφείλεται στο ότι η μελετούμενη συγκέντρωση είναι αρκετά χαμηλή και κοντά στα όρια θορύβου του οργάνου και της μεθόδου, γεγονός που μπορεί να δυσχεραίνει την ακριβή ποσοτικοποίηση της χρωματογραφικής κορυφής. Στη μεσαία συγκέντρωση (0,5 µg/ml) εμφανίζεται επαναληψιμότητα στα περισσότερα μεταβιοτικά εκτός από ουρολιθίνη Β, πρωτοκατεχικό οξύ και πυριδοξίνη με σχετικές όμως αποκλίσεις πολύ κοντά στο 15% (19,11, 16,43 και 18,40 αντίστοιχα). Τέλος στην υψηλή συγκέντρωση (2,0 µg/ml) μόνο τα μεταβιοτικά ουρολιθίνη Α και S- εκουόλη με RSD% 40,81 και 16,08 αντίστοιχα δεν παρουσιάζουν επαναληψιμότητα.

Αντίστοιχα στον θετικό ιοντισμό παρατηρείται επαναληψιμότητα σε όλες τις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν. Ειδικότερα στη χαμηλή συγκέντρωση δεν παρουσιάζουν επαναληψιμότητα οι ενώσεις ουρολιθίνη Β και διυδρορεσβερατρόλη με σχετικές τυπικές αποκλίσεις 16,97 και 31,52 αντίστοιχα. Στη μεσαία συγκέντρωση εμφανίζεται επαναληψιμότητα στα περισσότερα μεταβιοτικά εκτός από διυδρορεσβερατρόλη και πυριδοξίνη με RSD% 109,35 και 43,00 αντίστοιχα. Τέλος, όσον αφορά την υψηλή συγκέντρωση μόνο η πυριδοξίνη δεν είναι επαναλήψιμη με RSD% 32,16.

Σε αυτό το σημείο αξίζει να σημειωθεί πως (α) ο θετικός ιοντισμός παρουσιάζει υψηλότερη επαναληψιμότητα από τον αρνητικό και πως (β) η αύξηση του αριθμού επαναλήψεων θα βελτιώνει την επαναληψιμότητα της μεθόδου σε όλες τις συγκεντρώσεις για όλες τις μελετούμενες ενώσεις.

9.2.2. Αναπαραγωγιμότητα (Reproducibility/Intraday precision)

Ως αναπαραγωγιμότητα ορίζεται ο βαθμός διασποράς των αποτελεσμάτων που προέκυψαν με την ίδια μέθοδο, το ίδιο δείγμα, αλλά κάτω από διαφορετικές εξωτερικές πειραματικές συνθήκες (π.χ. διαφορετικός χειριστής, διαφορετική μέρα ανάλυσης). (Chandran & Singh, 2007)

Όσον αφορά τα πειράματα για την αναπαραγωγιμότητα, περιλάμβαναν μετρήσεις του ίδιου δείγματος (μείγμα μεταβιοτικών), με την χρήση της ίδιας μεθόδου, αλλά σε διαφορετικές ημέρες. Για τον προσδιορισμό της αναπαραγωγιμότητας παρασκευάστηκαν διαλύματα ελέγχου ποιότητας (quality control standards, QC) σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις, μία χαμηλή, μία μεσαία και μία υψηλή (0,1 μg/mL, 0,5 μg/mL και 2 μg/mL), και εκτελέστηκαν αναλύσεις σε δύο διαφορετικές μέρες, τρεις επαναλήψεις εντός ημέρας για κάθε διάλυμα ελέγχου ποιότητας.

Έπειτα, καταγράφηκε το εμβαδόν κάθε κορυφής του χρωματογραφήματος, υπολογίσθηκαν οι συγκεντρώσεις των μεταβιοτικών του κάθε δείγματος από τις αντίστοιχες καμπύλες αναφοράς, καθώς και ο μέσος όρος αυτών. Στη συνέχεια, υπολογίσθηκε η τυπική απόκλιση των μετρήσεων (stdev), καθώς και η σχετική τυπική απόκλιση (RSD%), η οποία αποτελεί και κριτήριο για την αναπαραγωγιμότητα. Προκειμένου να κριθεί μία μέθοδος αναπαραγωγίμη, η τιμή της σχετικής τυπικής απόκλισης (RSD%) πρέπει να είναι μικρότερη ή ίση με 15% ($RSD\% \leq 15\%$) (Εξίσωση 1)

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 13) συνοψίζονται τα μεταβιοτικά που μελετήθηκαν, στις 3 συγκεντρώσεις που εξετάστηκαν (χαμηλή, μεσαία, υψηλή) καθώς και η σχετική τυπική τους απόκλιση.

Πίνακας 13 Αποτελέσματα αναπαραγωγιμότητας μεθόδου σε θετικό και αρνητικό ιοντισμό

METABIOTIKA	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ	RSD%
Urolithin A	0,1 µg/ml	18,70
	0,5 µg/ml	12,78
	2,0 µg/ml	20,18
Urolithin B	0,1 µg/ml	19,97
	0,5 µg/ml	13,71
	2,0 µg/ml	20,80
Enterodiol	0,1 µg/ml	-
	0,5 µg/ml	-
	2,0 µg/ml	-
Enterolactone	0,1 µg/ml	34,21
	0,5 µg/ml	11,35
	2,0 µg/ml	51,17
Dihydroresveratrol	0,1 µg/ml	45,44
	0,5 µg/ml	15,59
	2,0 µg/ml	19,18
Piceid / Polydatin	0,1 µg/ml	-
	0,5 µg/ml	-
	2,0 µg/ml	-
Catechol/ Pyroatechol	0,1 µg/ml	-
	0,5 µg/ml	-
	2,0 µg/ml	-
Pyrogallol	0,1 µg/ml	-
	0,5 µg/ml	-
	2,0 µg/ml	-
S- equol	0,1 µg/ml	19,14
	0,5 µg/ml	9,30
	2,0 µg/ml	48,65
Protocatechuic acid	0,1 µg/ml	-
	0,5 µg/ml	-
	2,0 µg/ml	-
γ – Valerolactone	0,1 µg/ml	-
	0,5 µg/ml	11,54
	2,0 µg/ml	14,71
Riboflavin	0,1 µg/ml	15,87
	0,5 µg/ml	15,11
	2,0 µg/ml	51,37
Pyridoxine hydrochloride	0,1 µg/ml	9,83
	0,5 µg/ml	17,43
	2,0 µg/ml	15,59

Αρχικά από τα αποτελέσματα του παραπάνω πίνακα (Πίνακας 13), παρατηρείται ότι στην εν λόγω μέθοδο, στο θετικό ιοντισμό εμφανίζει ικανοποιητικές (<20%), αλλά όχι σε όλες τις περιπτώσεις εντός αποδεκτών ορίων, τιμές αναπαραγωγιμότητας. Σε αυτό το σημείο πρέπει να αναφερθεί πως στην παρούσα πτυχιακή δεν παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για τη μελέτη αναπαραγωγιμότητας στον αρνητικό ιοντισμό, καθώς αυτά τα πειράματα δεν ολοκληρώθηκαν ποτέ λόγω βλάβης του οργάνου.

Από τον παραπάνω πίνακα (Πίνακα 13) εξάγεται το συμπέρασμα πως η μέθοδος, στο θετικό ιοντισμό, εμφανίζει όχι ιδιαίτερα υψηλή αναπαραγωγιμότητα στην πλειοψηφία των ενώσεων, γεγονός που μπορεί να οφείλεται στις μικρές διακυμάνσεις στην ροή της κινητής φάσης από μέρα σε μέρα, που έχουν όμως σημαντική επίδραση σε ένα σύστημα υγρής χρωματογραφίας μικρορών σε σχέση με ένα σύστημα συμβατικής χρωματογραφίας. Για την βελτίωση της αναπαραγωγιμότητας της μεθόδου απαιτείται μεγαλύτερος αριθμός επαναλήψεων σε περισσότερες διαφορετικές μέρες.

9.3. Ακρίβεια (Accuracy)

Ως ακρίβεια ορίζεται η συμφωνία μεταξύ της μετρούμενης συγκέντρωσης και της «αληθούς τιμής» ή ονομαστικής τιμής της (true value). Υπολογίζεται ως η διαφορά μεταξύ της μετρούμενης τιμής (x_i) και της «αληθούς τιμής» (μ) (Εξίσωση 2, Εξίσωση 3). Το σχετικό σφάλμα αποτελεί κριτήριο με βάση το οποίο αξιολογείται η ακρίβεια. Γενικά, όσο πιο κοντά είναι η μετρούμενη τιμή στην «αληθή τιμή», δηλαδή όσο πιο μικρό είναι το σχετικό σφάλμα της μέτρησης, τόσο μεγαλύτερη ακρίβεια παρουσιάζει μία μέθοδος. (Chandran & Singh, 2007)

$$\text{Ακρίβεια} = x_i - \mu$$

Εξίσωση 2 Εξίσωση υπολογισμού της ακρίβειας

$$\text{Σχετικό σφάλμα (RE\%)} = \left[\frac{x_i - \mu}{\mu} \right] * 100$$

Εξίσωση 3 Εξίσωση υπολογισμού του σχετικού σφάλματος (RE%)

Για τον προσδιορισμό της ακρίβειας της μεθόδου παρασκευάστηκαν διαλύματα ελέγχου ποιότητας (quality control, QC) σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις, μία χαμηλή (0,1 μg/mL), μία μεσαία (0,5 μg/mL) και μία υψηλή (2,0 μg/mL). Προκειμένου να αξιολογηθεί η ακρίβεια της προς επικύρωση μεθόδου υπολογίστηκε η σχετική ακρίβεια της μεθόδου (Εξίσωση 4). Για να εμφανίζει μία μέθοδος ακρίβεια οι τιμές της σχετικής ακρίβειας πρέπει να κυμαίνονται από 85% έως 115% ($\pm 15\%$), με τη δυνατότητα και ανάλογα με την εφαρμογή της μεθόδου και το μελετούμενο υπόστρωμα, οι τιμές αυτού του κριτηρίου επικύρωσης να μπορούν να κυμανθούν έως $\pm 20\%$.

$$\text{Σχετική ακρίβεια} = \left[\frac{C'}{C} \right] * 100$$

Εξίσωση 4 Εξίσωση υπολογισμού της σχετικής ακρίβειας

όπου C' η πρότυπη συγκέντρωση που υπολογίζεται από την καμπύλη βαθμονόμησης και C η «ονομαστική» πρότυπη συγκέντρωση που προστέθηκε.

Πίνακας 14 προσδιοριζόμενα μεταβιοτικά και σχετική ακρίβεια μεθόδου σε θετικό και αρνητικό ιοντισμό

METABΙΟΤΙΚΑ	συγκεντρώσεις (neg)	ΣΧΕΤΙΚΗ ΑΚΡΙΒΕΙΑ (NEG)	συγκεντρώσεις (pos)	ΣΧΕΤΙΚΗ ΑΚΡΙΒΕΙΑ (POS)
Urolithin A	0,1 µg/ml	142,74	0,1 µg/ml	183,70
	0,5 µg/ml	63,22	0,5 µg/ml	78,12
	2,0 µg/ml	81,48	2,0 µg/ml	113,98
Urolithin B	0,1 µg/ml	15,88	0,1 µg/ml	42,12
	0,5 µg/ml	118,36	0,5 µg/ml	92,14
	2,0 µg/ml	104,53	2,0 µg/ml	106,49
Enterodiol	0,1 µg/ml	165,45	0,1 µg/ml	-
	0,5 µg/ml	63,80	0,5 µg/ml	-
	2,0 µg/ml	113,88	2,0 µg/ml	-
Enterolactone	0,1 µg/ml	92,54	0,1 µg/ml	121,15
	0,5 µg/ml	62,94	0,5 µg/ml	87,62
	2,0 µg/ml	99,80	2,0 µg/ml	92,80
Dihydroresveratrol	0,1 µg/ml	-	0,1 µg/ml	32,84
	0,5 µg/ml	-	0,5 µg/ml	135,78
	2,0 µg/ml	-	2,0 µg/ml	93,80
Piceid / Polydatin	0,1 µg/ml	126,63	0,1 µg/ml	-
	0,5 µg/ml	59,23	0,5 µg/ml	-
	2,0 µg/ml	105,78	2,0 µg/ml	-
Catechol/ Pyroatechol	0,1 µg/ml	98,86	0,1 µg/ml	-
	0,5 µg/ml	79,49	0,5 µg/ml	-
	2,0 µg/ml	80,97	2,0 µg/ml	-
Pyrogallol	0,1 µg/ml	148,08	0,1 µg/ml	-
	0,5 µg/ml	120,83	0,5 µg/ml	-
	2,0 µg/ml	111,23	2,0 µg/ml	-
S- equol)	0,1 µg/ml	158,68	0,1 µg/ml	118,12
	0,5 µg/ml	90,42	0,5 µg/ml	79,38
	2,0 µg/ml	112,41	2,0 µg/ml	107,94
Protocatechuic acid	0,1 µg/ml	137,50	0,1 µg/ml	-
	0,5 µg/ml	56,14	0,5 µg/ml	-
	2,0 µg/ml	99,13	2,0 µg/ml	-
γ – Valerolactone	0,1 µg/ml	-	0,1 µg/ml	-
	0,5 µg/ml	-	0,5 µg/ml	147,42
	2,0 µg/ml	-	2,0 µg/ml	111,03
Riboflavin	0,1 µg/ml	141,74	0,1 µg/ml	148,98
	0,5 µg/ml	48,21	0,5 µg/ml	65,53
	2,0 µg/ml	102,92	2,0 µg/ml	110,66

Pyridoxine hydrochloride	0,1 μg/ml	58,65	0,1 μg/ml	72,00
	0,5 μg/ml	113,57	0,5 μg/ml	116,64
	2,0 μg/ml	79,71	2,0 μg/ml	91,71

Στο παραπάνω πίνακα (Πίνακας 14) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που αφορούν τη σχετική ακρίβεια της μεθόδου που αναπτύχθηκε. Παρατηρείται ότι η πλειοψηφία των μεταβιοτικών παρουσιάζουν ικανοποιητική ακρίβεια και στους δύο ιοντισμούς και στα τρία επίπεδα συγκεντρώσεων. Σε αυτό το σημείο αξίζει να σημειωθεί, πως η αύξηση των επαναλήψεων μπορεί να βελτιώσει πέρα από την πιστότητα, και την ακρίβεια της μεθόδου που αναπτύχθηκε.

9.4. Όριο ανίχνευσης (LOD) και όριο ποσοτικοποίησης (LOQ)

Το όριο ανίχνευσης (LOD) και το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ) αποτελούν ενδείξεις για την ευαισθησία της αναλυτικής μεθόδου. Το όριο ποσοτικοποίησης, είναι μικρότερη ποσότητα αναλύτη σε ένα δείγμα η οποία μπορεί να προσδιοριστεί ποσοτικά με κατάλληλη ακρίβεια και πιστότητα. Το όριο ανίχνευσης, ορίζεται ως η χαμηλότερη ποσότητα αναλύτη στο δείγμα, η οποία μπορεί να ανιχνευτεί χωρίς απαραίτητα να μπορεί να ποσοτικοποιηθεί υπό καθορισμένες συνθήκες. (Chandran & Singh, 2007) Τόσο το όριο ποσοτικοποίησης, όσο και το όριο ανίχνευσης, για κάθε μεταβιοτικό, υπολογίστηκαν με βάση την τυπική απόκλιση της πιο χαμηλής συγκέντρωσης η οποία διαιρέθηκε με την κλίση της καμπύλης αναφοράς του κάθε μεταβιοτικού. Τέλος, το αποτέλεσμα που προέκυψε πολλαπλασιάστηκε με 3,3 για το όριο ανίχνευσης και με 10 για το όριο ποσοτικοποίησης. Τα όρια ποσοτικοποίησης και ανίχνευσης προσδιορίστηκαν σε μονάδες mg/mL.

Προκειμένου να προσδιορισθεί τόσο το όριο ανίχνευσης όσο και το όριο ποσοτικοποίησης χρησιμοποιήθηκαν οι ήδη υπάρχουσες καμπύλες αναφοράς, για τις οποίες ο τρόπος παρασκευής τους αναφέρεται αναλυτικά στο κομμάτι της γραμμικότητας (Κεφάλαιο 9.1.) . Παρακάτω φαίνονται οι εξισώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την εύρεση των προαναφερθέντων ορίων (Εξίσωση 5 και Εξίσωση 6).

$$LOD = 3,3 * \frac{S_{lowconc}(stdev)}{a}$$

Εξίσωση 5 Εξίσωση για τον υπολογισμό του ορίου ανίχνευσης

$$LOQ = 10 * \frac{S_{lowconc}(stdev)}{a}$$

Εξίσωση 6 Εξίσωση για τον υπολογισμό του ορίου ποσοτικοποίησης

όπου a η κλίση της ευθείας της καμπύλης βαθμονόμησης, για κάθε μεταβιοτικό και $S_{lowconc}(stdev)$ η τυπική απόκλιση της χαμηλότερης συγκέντρωσης της καμπύλης.

Πίνακας 15 Αποτελέσματα ορίου ποσοτικοποίησης (LOQ) και ανίχνευσης (LOD) στον αρνητικό ιοντισμό

METABIOTIKA	Εξίσωση καμπύλη αναφοράς αρνητικού ιοντισμού	R2	LOQ (µg/ml)	LOD (µg/ml)
Urolithin A	$y=874,7x- 66309$	0,9791	0,03466	0,01144
Urolithin B	$y=1154,5x-4659,9$	0,9881	0,04276	0,01411
Enterodiol	$y=370,89x- 39395$	0,9777	0,02446	0,00807
Enterolactone	$y=833,98x- 8410,7$	0,9607	0,28553	0,09423
Piceid / Polydatin	$y=31,977x- 110,6$	0,9702	0,03117	0,01028
Catechol/ Pyrocatechol	$y=144,33x- 4976,6$	0,9807	0,14414	0,04756
Pyrogallol	$y=115,43x- 5105,5$	0,9752	0,39176	0,12928
S- equol	$y=21,079x- 532,32$	0,9889	0,72502	0,23926
Protocatechuic acid	$y=105,12x- 4841,3$	0,9534	0,04636	0,01530
Riboflavin	$y=44,493x- 4038,8$	0,9563	0,05329	0,01758
Pyridoxine hydrochloride	$y=12,714x+ 620,15$	0,9909	0,44215	0,14591

Πίνακας 16 Αποτελέσματα ορίου ποσοτικοποίησης (LOQ) και ανίχνευσης (LOD) στον θετικό ιοντισμό

ΜΕΤΑΒΙΟΤΙΚΑ	ΕΞΙΣΩΣΗ ΚΑΜΠΥΛΗΣ ΑΜΑΦΟΡΑΣ ΘΕΤΙΚΟΥ ΙΟΝΤΙΣΜΟΥ	R ²	LOQ (μg/ml)	LOD (μg/ml)
Urolithin A	y=478,46x- 29827	0,9695	0,09017	0,02976
Urolithin B	y=1072,3x- 30978	0,9722	0,07779	0,02567
Enterolactone	y=251,65x- 1131,6	0,9785	0,17194	0,05674
Dihydroresveratrol	y=128,49x+ 3531,8	0,9792	0,00367	0,00121
S- equol	y=113,77x+9358,7	0,9761	0,42208	0,13929
γ – Valerolactone	y=74,06x+ 32761	0,9593	1,4487	0,47808
Riboflavin	y=65,95x+ 2344	0,9606	0,06522	0,02152
Pyridoxine hydrochloride	y=737,26x+ 89582	0,9763	0,54987	0,1815

Όπως φαίνεται στον παραπάνω πίνακα (Πίνακας 15) στον αρνητικό ιοντισμό, όσον αφορά το όριο ανίχνευσης, παρατηρείται ότι όλα τα μεταβιοτικά μπορούν να ανιχνευτούν σε μικρές συγκεντρώσεις, ειδικότερα η εντεροδιόλη εμφανίζει το χαμηλότερο όριο ανίχνευσης (0,00807 μg/mL, ενώ η s- εκουόλη, η πυριδοξίνη και η πυρογαλλόλη εμφανίζουν το μεγαλύτερο, με τιμές LOD 0,23926μg/mL, 014591μg/mL και 0,12928μg/mL αντίστοιχα. Ομοίως, στον θετικό ιοντισμό (Πίνακας 16), παρατηρείται εξίσου ότι όλα τα μεταβιοτικά μπορούν να ανιχνευτούν σε μικρές συγκεντρώσεις, συγκεκριμένα η διϋδρορεσβερατρόλη εμφανίζει το χαμηλότερο όριο ανίχνευσης (0,00121 μg/MI), ενώ η γ- βαλερολακτόνη εμφανίζει το μεγαλύτερο, με τιμή LOD 0,47808 μg/mL.

Τα εξεταζόμενα μεταβιοτικά στον αρνητικό ιοντισμό, έχουν χαμηλό όριο ποσοτικοποίησης. Συγκεκριμένα, η εντεροδιόλη εμφανίζει το χαμηλότερο LOQ με τιμή 0,02446μg/mL, ενώ η s- εκουόλη το μεγαλύτερο με τιμή 0,72502μg/mL. Αντίστοιχα τα μεταβιοτικά, στον θετικό ιοντισμό έχουν εξίσου χαμηλό όριο ποσοτικοποίησης. Αναλυτικότερα, η διϋδρορεσβερατρόλη εμφανίζει το χαμηλότερο όριο ανίχνευσης με τιμή 0,00367 μg/mL, ενώ η γ- βαλερολακτόνη εμφανίζει το μεγαλύτερο, με τιμή LOD 1,4487 μg/mL.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΕΞΕΛΙΞΕΙΣ

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία αναπτύχθηκαν κατάλληλες μέθοδοι για την ανάλυση και επικύρωση 15 μεταβιοτικών ενώσεων (φαινόλες ενώσεις και βιταμίνες) με την τεχνική της υγρής χρωματογραφίας μικροροών- φασματομετρίας μάζας με τη χρήση τετραπολικού αναλυτή χρόνου πτήσης (microLC-TTOF MS). Η μέθοδος που αναπτύχθηκε επικυρώθηκε σύμφωνα με τα κριτήρια του επίσημου φορέα ICH. Το κομμάτι της επικύρωσης περιλαμβάνει τη γραμμικότητα, την πιστότητα (επαναληψιμότητα, αναπαραγωγιμότητα), την ακρίβεια, τα όρια ανίχνευσης (LOD) και το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ).

Βάσει των αποτελεσμάτων της εν λόγω μελέτης προκύπτουν τα εξής:

- Η θερμοκρασία πηγής ιονισμού αρχικά, ρυθμίστηκε στους 300 °C, ωστόσο κατά την ανάπτυξη της μεθόδου ιδανικότερη θερμοκρασία ιονισμού για τη πλειοψηφία των ενώσεων διαπιστώθηκε ότι ήταν οι 350 °C.
- Από το σύνολο των μεταβιοτικών ουσιών που εξετάστηκαν (15), δεν προσδιορίστηκαν 2. Αυτές ήταν η θειαμίνη και η μενακινόνη (βιταμίνη K2). Πιθανόν, για την πρώτη να χρειάζονταν διαφορετικές συνθήκες μάζας (π.χ. μείωση θερμοκρασίας στην πηγή ESI), ενώ για τη δεύτερη διαφορετικές συνθήκες στο σύστημα της υγρής χρωματογραφίας (λόγου χάριν διαφορετικό πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης με αυξημένη αναλογία οργανικού διαλύτη, καθώς είναι η μόνη λιπόφιλη ένωση από τις εξεταζόμενες).
- Η πλειοψηφία των ενώσεων προσδιορίστηκε στον αρνητικό ιοντισμό καθώς, τα περισσότερα μελετούμενα μεταβιοτικά είναι φαινολικές ενώσεις και εμφανίζουν σταθερότερα μοριακά ιόντα στον ιοντισμό αυτό.
- Η μέθοδος εμφανίζει ικανοποιητική **γραμμικότητα** ($R^2 > 0,95$ για όλες τις ενώσεις).
- **Για την επαναληψιμότητα:**
 - Στον αρνητικό ιοντισμό εμφανίζεται ικανοποιητική επαναληψιμότητα στο μεσαίο (0,5 μg/mL) και υψηλό (2,0 μg/mL) επίπεδο συγκέντρωσης.
 - Στον θετικό ιοντισμό παρουσιάζεται επαναληψιμότητα σε όλες τις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν.
- **Για την αναπαραγωγιμότητα:**
 - Στον θετικό ιοντισμό, εμφανίζονται ικανοποιητικές (<20%), αλλά όχι σε όλες τις περιπτώσεις εντός αποδεκτών ορίων, τιμές αναπαραγωγιμότητας. Στην παρούσα πτυχιακή δεν παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για τη μελέτη αναπαραγωγιμότητας στον αρνητικό ιοντισμό, καθώς αυτά τα πειράματα δεν ολοκληρώθηκαν ποτέ λόγω βλάβης του οργάνου
- **Για την ακρίβεια:**
 - Εμφανίζεται ικανοποιητική ακρίβεια στο σύνολο των μεταβιοτικών και για τους δύο ιοντισμούς σε όλα τα επίπεδα συγκέντρωσης.
- **Για το όριο ανίχνευσης/ποσοτικοποίησης:**
 - Όλα τα μεταβιοτικά και στους δύο ιοντισμούς μπορούν να ανιχνευτούν σε χαμηλές συγκεντρώσεις (<50-100 ng/ml)

- Για το όριο ποσοτικοποίησης: τα μεταβιοτικά και στους δύο ιοντισμούς, έχουν χαμηλό όριο ποσοτικοποίησης
- Οι λόγοι για μη ικανοποιητική πιστότητα στο κομμάτι της αναπαραγωγιμότητας, ενδεχομένως να οφείλονται στις μικρές διακυμάνσεις στην ροή της κινητής φάσης από μέρα σε μέρα. Για την βελτίωση των αποτελεσμάτων στην πιστότητα θα μπορούσαν να γίνουν οι εξής διορθωτικές ενέργειες : για την επαναληψιμότητα αύξηση του αριθμού επαναλήψεων σε όλες τις συγκεντρώσεις για όλες τις μελετώμενες ενώσεις και για την αναπαραγωγιμότητα πιθανόν να απαιτείται μεγαλύτερος αριθμός επαναλήψεων σε περισσότερες διαφορετικές μέρες.
- Αντίστοιχα η αύξηση των επαναλήψεων θα βελτιώνει και την ακρίβεια της μεθόδου
- Από την ανάπτυξη της μεθόδου προκύπτει ότι καλύτερος ιοντισμός είναι ο αρνητικός λόγω του ότι ανιχνεύτηκαν περισσότερες ενώσεις και λήφθηκαν πιο σταθερά φάσματα μαζών. Αντιθέτως, όσον αφορά την επικύρωση προκύπτει ότι καλύτερος ιοντισμός είναι ο θετικός, ωστόσο με έναν ενδοιασμό σχετικά με τις τιμές της αναπαραγωγιμότητας για το λόγο που αναφέρθηκε παραπάνω.

10.1. Μελλοντικές εξελίξεις

Τα μεταβιοτικά δεν αποτελούν πλέον ένα μύθο, αλλά μια φυσική εξέλιξη της έννοιας των προβιοτικών. Στο εγγύς μέλλον, θα σχεδιαστούν ημι- ή/και πλήρως συνθετικές μεταβιοτικές ουσίες με βάση βακτηριακές βιοενεργές ενώσεις με αποδεδειγμένες ειδικές ευεργετικές επιδράσεις. Πρόκειται για μια παρόμοια πορεία ανάπτυξης με εκείνη των παραδοσιακών φαρμακευτικών ουσιών που παράγονται τα τελευταία 50 χρόνια. Τα μεταβιοτικά που είναι χημικά παρόμοια με μόρια άλλης προέλευσης (π.χ. από συστατικά τροφίμων ή πηγές τροφίμων) εμφανίζουν πλεονεκτήματα (σταθερότητα, αύξηση της διάρκειας ζωής του προϊόντος στο ράφι κ.α.) σε σχέση με αυτές. Επιπλέον, μεγάλο στοίχημα τόσο για την επιστήμη όσο και για τις βιομηχανία τροφίμων και συμπληρωμάτων διατροφής αποτελεί η μεγάλης κλίμακας παραγωγή μεταβιοτικών/postbiotics σε βιοαντιδραστήρες μεγάλης δυναμικής, η τυποποίηση της παραγωγής τους, καθώς και οι μελέτες τοξικότητας και ασφάλειας των νέων αυτών προϊόντων με σκοπό τη θέσπιση σαφώς καθορισμένου νομικού πλαισίου γύρω από τη χρήση των μεταβιοτικών/postbiotics.

Με βάση τα αποτελέσματα και συμπεράσματα της παρούσας πτυχιακής εργασίας, δύναται να ορισθούν μελλοντικοί στόχοι με σκοπό την ακριβέστερη προσέγγιση της εν λόγω μεθόδου ανάλυσης μεταβιοτικών ενώσεων, καθώς και στόχοι που αφορούν την αξιοποίηση της διαδικασίας βελτιστοποίησης στη βιομηχανία των τροφίμων. Πιο συγκεκριμένα:

- Ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδου για τον προσδιορισμό θειαμίνης και βιταμίνης K2.
- Εμπλουτισμός της μεθόδου με την προσθήκη επιπλέον μεταβιοτικών που προέρχονται από φυτοχημικά διατροφικά συστατικά (πχ φαινολικές ενώσεις, καροτενοειδή, κ.ά)
- Εφαρμογή της μεθόδου σε βιολογικά δείγματα (αίμα, κόπρανα) εθελοντών κλινικών παρεμβάσεων
- Μελέτες πιθανής τοξικότητας και εμπλουτισμός νομοθετικού πλαισίου

- Ενσωμάτωσή τους σε νέα καινοτόμα τρόφιμα, συμπληρώματα διατροφής και προϊόντα τροφίμων.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abbas, M., Saeed, F., Anjum, F. M., Afzaal, M., Tufail, T., Bashir, M. S., Ishtiaq, A., Hussain, S., & Suleria, H. A. R. (2017). Natural polyphenols: An overview. *International Journal of Food Properties*, 20(8), 1689–1699. <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1220393>

Anastassakis, K. (2022). *Androgenetic Alopecia From A to Z: Vol. 2 Drugs, Herbs, Nutrition and Supplements*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-031-08057-9>

Aron, P. M., & Kennedy, J. A. (2008). Flavan-3-ols: Nature, occurrence and biological activity. *Molecular Nutrition & Food Research*, 52(1), 79–104. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200700137>

Authority (EFSA), E. F. S. (2008). Vitamin K2 added for nutritional purposes in foods for particular nutritional uses, food supplements and foods intended for the general population and Vitamin K2 as a source of vitamin K added for nutritional purposes to foodstuffs, in the context of Regulation (EC) N° 258/97—Scientific Opinion of the Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies. *EFSA Journal*, 6(11), 822. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2008.822>

Barros, C. P., Guimarães, J. T., Esmerino, E. A., Duarte, M. C. K., Silva, M. C., Silva, R., Ferreira, B. M., Sant’Ana, A. S., Freitas, M. Q., & Cruz, A. G. (2020). Paraprobiotics and postbiotics: Concepts and potential applications in dairy products. *Current Opinion in Food Science*, 32, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.12.003>

Bartkiene, E., Juodeikiene, G., Basinskiene, L., Liukkonen, K.-H., Adlercreutz, H., & Kluge, H. (2011). Enterolignans enterolactone and enterodiol formation from their precursors by the action of intestinal microflora and their relationship with non-starch polysaccharides in various berries and vegetables. *LWT - Food Science and Technology*, 44(1), 48–53. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.06.018>

Beulens, J. W. J., Booth, S. L., Heuvel, E. G. H. M. van den, Stoecklin, E., Baka, A., & Vermeer, C. (2013). The role of menaquinones (vitamin K2) in human health. *British Journal of Nutrition*, 110(8), 1357–1368. <https://doi.org/10.1017/S0007114513001013>

Biswas, I., & Das Mohapatra, P. K. (2023). Recent advancement in metabiotics: A consortium with bioactive molecules after fermentation by probiotic bacteria with multidisciplinary application potential and future solution in health sector. *Bioresource Technology Reports*, 23, 101583. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2023.101583>

Bukowska, B., Michałowicz, J., & Marczak, A. (2015). The effect of catechol on human peripheral blood mononuclear cells (in vitro study). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 39(1), 187–193. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.11.017>

Cassidy, A., Hanley, B., & Lamuela-Raventos, R. M. (2000). Isoflavones, lignans and stilbenes – origins, metabolism and potential importance to human health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 1044–1062. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(20000515\)80:7<1044::AID-JSFA586>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<1044::AID-JSFA586>3.0.CO;2-N)

- Chandran, S., & Singh, R. S. P. (2007). *Comparison of various international guidelines for analytical method validation. 1*, 4–14. <https://doi.org/10.1691/ph.2007.1.5064>
- Choi, S. R., Lee, H., Singh, D., Cho, D., Chung, J.-O., Roh, J.-H., Kim, W.-G., & Lee, C. H. (2023). Bidirectional Interactions between Green Tea (GT) Polyphenols and Human Gut Bacteria. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(10), 1317–1328. <https://doi.org/10.4014/jmb.2306.06014>
- Counet, C., Callemien, D., & Collin, S. (2006). Chocolate and cocoa: New sources of trans-resveratrol and trans-piceid. *Food Chemistry*, 98(4), 649–657. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.06.030>
- Da Silva, V. R., & Gregory, J. F. (2020). Vitamin B6. In *Present Knowledge in Nutrition* (pp. 225–237). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-66162-1.00013-5>
- Du, Q.-H., Peng, C., & Zhang, H. (2013). Polydatin: A review of pharmacology and pharmacokinetics. *Pharmaceutical Biology*, 51(11), 1347–1354. <https://doi.org/10.3109/13880209.2013.792849>
- Dunand, E., Burns, P., Binetti, A., Bergamini, C., Peralta, G. H., Forzani, L., Reinheimer, J., & Vinderola, G. (2019). Postbiotics produced at laboratory and industrial level as potential functional food ingredients with the capacity to protect mice against Salmonella infection. *Journal of Applied Microbiology*, 127(1), 219–229. <https://doi.org/10.1111/jam.14276>
- Ellis, J. L., Karl, J. P., Oliverio, A. M., Fu, X., Soares, J. W., Wolfe, B. E., Hernandez, C. J., Mason, J. B., & Booth, S. L. (2021). Dietary vitamin K is remodeled by gut microbiota and influences community composition. *Gut Microbes*, 13(1), 1887721. <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1887721>
- Fitzpatrick, T. B., Amrhein, N., Kappes, B., Macheroux, P., Tews, I., & Raschle, T. (2007). Two independent routes of *de novo* vitamin B6 biosynthesis: Not that different after all. *Biochemical Journal*, 407(1), 1–13. <https://doi.org/10.1042/BJ20070765>
- García-Villalba, R., Beltrán, D., Frutos, M. D., Selma, M. V., Espín, J. C., & Tomás-Barberán, F. A. (2020). Metabolism of different dietary phenolic compounds by the urolithin-producing human-gut bacteria *Gordonibacter urolithinifaciens* and *Ellagibacter isourolithinifaciens*. *Food & Function*, 11(8), 7012–7022. <https://doi.org/10.1039/D0FO01649G>
- García-Villalba, R., Espín, J. C., & Tomás-Barberán, F. A. (2016). Chromatographic and spectroscopic characterization of urolithins for their determination in biological samples after the intake of foods containing ellagitannins and ellagic acid. *Journal of Chromatography A*, 1428, 162–175. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.08.044>
- Gaya, P., Peirotén, Á., Medina, M., Álvarez, I., & Landete, J. M. (2018). Bifidobacterium pseudocatenulatum INIA P815: The first bacterium able to produce urolithins A and B from ellagic acid. *Journal of Functional Foods*, 45, 95–99. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.03.040>

Gholami, H., Chmiel, J. A., Burton, J. P., & Maleki Vareki, S. (2023). The Role of Microbiota-Derived Vitamins in Immune Homeostasis and Enhancing Cancer Immunotherapy. *Cancers*, *15*(4), 1300. <https://doi.org/10.3390/cancers15041300>

Gong, Y., Lv, J., Pang, X., Zhang, S., Zhang, G., Liu, L., Wang, Y., & Li, C. (2023). Advances in the Metabolic Mechanism and Functional Characteristics of Equol. *Foods*, *12*(12), 2334. <https://doi.org/10.3390/foods12122334>

Hasheminezhad, S. H., Boozari, M., Iranshahi, M., Yazarlu, O., Sahebkar, A., Hasanpour, M., & Iranshahi, M. (2022). A mechanistic insight into the biological activities of urolithins as gut microbial metabolites of ellagitannins. *Phytotherapy Research*, *36*(1), 112–146. <https://doi.org/10.1002/ptr.7290>

Hrubša, M., Siatka, T., Nejmanová, I., Vopršalová, M., Kujovská Krčmová, L., Matoušová, K., Javorská, L., Macáková, K., Micolini, L., Remião, F., Mátuš, M., Mladěnka, P., & on behalf of the OEMONOM. (2022). Biological Properties of Vitamins of the B-Complex, Part 1: Vitamins B1, B2, B3, and B5. *Nutrients*, *14*(3), 484. <https://doi.org/10.3390/nu14030484>

https://food.ec.europa.eu/document/download/8f10d273-65cb-4450-85cb-4bf389d8670c_en?filename=novel-food_sum_ongoing-app_2018-0538.pdf. (n.d.). Retrieved September 3, 2024, from https://food.ec.europa.eu/document/download/8f10d273-65cb-4450-85cb-4bf389d8670c_en?filename=novel-food_sum_ongoing-app_2018-0538.pdf

Human Metabolome Database. (n.d.). Retrieved September 4, 2024, from <https://hmdb.ca/>

ICH Official web site: ICH. (n.d.). Retrieved September 4, 2024, from <https://www.ich.org/>

Jang, H. J., Lee, N.-K., & Paik, H.-D. (2024). A Narrative Review on the Advance of Probiotics to Metabiotics. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *34*(3), 487–494. <https://doi.org/10.4014/jmb.2311.11023>

Jin, J.-S., Kakiuchi, N., & Hattori, M. (2007). Enantioselective Oxidation of Enterodiol to Enterolactone by Human Intestinal Bacteria. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, *30*(11), 2204–2206. <https://doi.org/10.1248/bpb.30.2204>

Kakkar, S., & Bais, S. (2014). A Review on Protocatechuic Acid and Its Pharmacological Potential. *ISRN Pharmacology*, *2014*, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2014/952943>

Kim, I.-S. (2021). Current Perspectives on the Beneficial Effects of Soybean Isoflavones and Their Metabolites for Humans. *Antioxidants*, *10*(7), 1064. <https://doi.org/10.3390/antiox10071064>

Knezevic, S., Ghafoor, A., Mehri, S., Barazi, A., Dziura, M., Trant, J. F., & Dieni, C. A. (2021). Catechin and other catechol-containing secondary metabolites: Bacterial biotransformation and regulation of carbohydrate metabolism. *PharmaNutrition*, *17*, 100273. <https://doi.org/10.1016/j.phanu.2021.100273>

- Kujawska, M., & Jodynis-Liebert, J. (2020). Potential of the ellagic acid-derived gut microbiota metabolite—Urolithin A in gastrointestinal protection. *World Journal of Gastroenterology*, 26(23), 3170–3181. <https://doi.org/10.3748/wjg.v26.i23.3170>
- Laveriano-Santos, E. P., Luque-Corredera, C., Trius-Soler, M., Lozano-Castellón, J., Dominguez-López, I., Castro-Barquero, S., Vallverdú-Queralt, A., Lamuela-Raventós, R. M., & Pérez, M. (2024). Enterolignans: From natural origins to cardiometabolic significance, including chemistry, dietary sources, bioavailability, and activity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1–21. <https://doi.org/10.1080/10408398.2024.2371939>
- Lee, C. C., Kim, J. H., Kim, J. S., Oh, Y. S., Han, S. M., Park, J. H. Y., Lee, K. W., & Lee, C. Y. (2017). 5-(3',4'-Dihydroxyphenyl- γ -valerolactone), a Major Microbial Metabolite of Proanthocyanidin, Attenuates THP-1 Monocyte-Endothelial Adhesion. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(7), 1363. <https://doi.org/10.3390/ijms18071363>
- Li, F., Han, Y., Wu, X., Cao, X., Gao, Z., Sun, Y., Wang, M., & Xiao, H. (2022). Gut Microbiota-Derived Resveratrol Metabolites, Dihydroresveratrol and Lunularin, Significantly Contribute to the Biological Activities of Resveratrol. *Frontiers in Nutrition*, 9, 912591. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.912591>
- Li, M., Li, P., Tang, R., & Lu, H. (2022). Resveratrol and its derivatives improve inflammatory bowel disease by targeting gut microbiota and inflammatory signaling pathways. *Food Science and Human Wellness*, 11(1), 22–31. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2021.07.003>
- Liang, B., & Xing, D. (2023). The Current and Future Perspectives of Postbiotics. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 15(6), 1626–1643. <https://doi.org/10.1007/s12602-023-10045-x>
- López-Fernández, O., Domínguez, R., Pateiro, M., Munekata, P. E. S., Rocchetti, G., & Lorenzo, J. M. (2020). Determination of Polyphenols Using Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Technique (LC–MS/MS): A Review. *Antioxidants*, 9(6), 479. <https://doi.org/10.3390/antiox9060479>
- Mithul Aravind, S., Wichienchot, S., Tsao, R., Ramakrishnan, S., & Chakkaravarthi, S. (2021). Role of dietary polyphenols on gut microbiota, their metabolites and health benefits. *Food Research International*, 142, 110189. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110189>
- Moradi, M., Molaei, R., & Guimarães, J. T. (2021). A review on preparation and chemical analysis of postbiotics from lactic acid bacteria. *Enzyme and Microbial Technology*, 143, 109722. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2020.109722>
- Oliveira, M. R. D., Nabavi, S. F., Daglia, M., Rastrelli, L., & Nabavi, S. M. (2016). Epigallocatechin gallate and mitochondria—A story of life and death. *Pharmacological Research*, 104, 70–85. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.12.027>
- Padilha Da Silva, W., Lopes, G. V., Ramires, T., & Kleinubing, N. R. (2024). May phenolics mitigate the antimicrobial resistance in foodborne pathogens? *Current Opinion in Food Science*, 55, 101107. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2023.101107>

Pihurov, M., Păcularu-Burada, B., Cotârleț, M., Vasile, M. A., & Bahrim, G. E. (2021). Novel Insights for Metabiotics Production by Using Artisanal Probiotic Cultures. *Microorganisms*, 9(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9112184>

Postbiotic Supplements Market Outlook, Size & Share to 2034. (n.d.). Retrieved September 3, 2024, from <https://www.futuremarketinsights.com/reports/postbiotic-supplements-market>

Postbiotics, as Dynamic Biomolecules, and Their Promising Role in Promoting Food Safety. (2021). *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 11(6), 14529–14544. <https://doi.org/10.33263/BRIAC116.1452914544>

Ren, L., Peng, C., Hu, X., Han, Y., & Huang, H. (2020). Microbial production of vitamin K2: Current status and future prospects. *Biotechnology Advances*, 39, 107453. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107453>

Riccioni, G., D’Orazio, N., Menna, V., & De Lorenzo, A. (2003). Fat Soluble Vitamins and Immune System: An Overview. *European Journal of Inflammation*, 1(2), 59–64. <https://doi.org/10.1177/1721727X0300100202>

Rudzki, L., Stone, T. W., Maes, M., Misiak, B., Samochowicz, J., & Szulc, A. (2021). Gut microbiota-derived vitamins – underrated powers of a multipotent ally in psychiatric health and disease. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 107, 110240. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2020.110240>

Salminen, S., Collado, M. C., Endo, A., Hill, C., Lebeer, S., Quigley, E. M. M., Sanders, M. E., Shamir, R., Swann, J. R., Szajewska, H., & Vinderola, G. (2021). The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 18(9), 649–667. <https://doi.org/10.1038/s41575-021-00440-6>

Sánchez-Patán, F., Chioua, M., Garrido, I., Cueva, C., Samadi, A., Marco-Contelles, J., Moreno-Arribas, M. V., Bartolomé, B., & Monagas, M. (2011). Synthesis, Analytical Features, and Biological Relevance of 5-(3',4'-Dihydroxyphenyl)- γ -valerolactone, a Microbial Metabolite Derived from the Catabolism of Dietary Flavan-3-ols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(13), 7083–7091. <https://doi.org/10.1021/jf2020182>

Santangelo, R., Silvestrini, A., & Mancuso, C. (2019). Ginsenosides, catechins, quercetin and gut microbiota: Current evidence of challenging interactions. *Food and Chemical Toxicology*, 123, 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.10.042>

Selma, M. V., Espín, J. C., & Tomás-Barberán, F. A. (2009). Interaction between Phenolics and Gut Microbiota: Role in Human Health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(15), 6485–6501. <https://doi.org/10.1021/jf902107d>

Sharif, A. (n.d.). Evaluation of Encapsulation Efficiency of Spray Drying and Freeze Drying for Probiotic *Lb. Rhamnosus* & *Lb. Fermentum*.

Shenderov, B. A., Sinitsa, A. V., Zakharchenko, M. M., & Lang, C. (2020). *METABIOTICS: PRESENT STATE, CHALLENGES AND PERSPECTIVES*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-34167-1>

Singh, A., Vishwakarma, V., & Singhal, B. (2018). Metabiotics: The Functional Metabolic Signatures of Probiotics: Current State-of-Art and Future Research Priorities—Metabiotics: Probiotics Effector Molecules. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 9(4), Article 4. <https://doi.org/10.4236/abb.2018.94012>

Song, J., He, Y., Luo, C., Feng, B., Ran, F., Xu, H., Ci, Z., Xu, R., Han, L., & Zhang, D. (2020). New progress in the pharmacology of protocatechuic acid: A compound ingested in daily foods and herbs frequently and heavily. *Pharmacological Research*, 161, 105109. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105109>

Speckmann, B., Ehring, E., Hu, J., & Rodriguez Mateos, A. (2024). Exploring substrate–microbe interactions: A metabiotic approach toward developing targeted synbiotic compositions. *Gut Microbes*, 16(1), 2305716. <https://doi.org/10.1080/19490976.2024.2305716>

Thorakkattu, P., Khanashyam, A. C., Shah, K., Babu, K. S., Mundanat, A. S., Deliephan, A., Deokar, G. S., Santivarangkna, C., & Nirmal, N. P. (2022). Postbiotics: Current Trends in Food and Pharmaceutical Industry. *Foods*, 11(19), Article 19. <https://doi.org/10.3390/foods11193094>

Vera-Santander, V. E., Hernández-Figueroa, R. H., Jiménez-Munguía, M. T., Mani-López, E., & López-Malo, A. (2023). Health Benefits of Consuming Foods with Bacterial Probiotics, Postbiotics, and Their Metabolites: A Review. *Molecules*, 28(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/molecules28031230>

Vinderola, G., Druart, C., Gosálbez, L., Salminen, S., Vinot, N., & Lebeer, S. (2023). Postbiotics in the medical field under the perspective of the ISAPP definition: Scientific, regulatory, and marketing considerations. *Frontiers in Pharmacology*, 14, 1239745. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1239745>

Wan, Z., Zheng, J., Zhu, Z., Sang, L., Zhu, J., Luo, S., Zhao, Y., Wang, R., Zhang, Y., Hao, K., Chen, L., Du, J., Kan, J., & He, H. (2022). Intermediate role of gut microbiota in vitamin B nutrition and its influences on human health. *Frontiers in Nutrition*, 9, 1031502. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1031502>

Wang, X., Qi, Y., & Zheng, H. (2022). Dietary Polyphenol, Gut Microbiota, and Health Benefits. *Antioxidants*, 11(6), 1212. <https://doi.org/10.3390/antiox11061212>

Zhang, B., Zhang, Y., Liu, X., Yin, J., Li, X., Zhang, X., Xing, X., Wang, J., & Wang, S. (2022). Differential Protective Effect of Resveratrol and Its Microbial Metabolites on Intestinal Barrier Dysfunction is Mediated by the AMPK Pathway. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(36), 11301–11313. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c04101>

Zhang, P. (2022). Influence of Foods and Nutrition on the Gut Microbiome and Implications for Intestinal Health. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(17), 9588. <https://doi.org/10.3390/ijms23179588>

Δρόσου Χριστίνα (2021 Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο (ΕΜΠ)) Ενθυλάκωση βιοδραστικών ενώσεων σε φυσικά πολυμερή με εφαρμογή καινοτόμων μεθόδων νανοεγκλεισμού με σκοπό την ενσωμάτωσή τους σε συστήματα τροφίμων. (n.d.). Retrieved September 4, 2024, from <https://freader.ekt.gr/eadd/index.php?doc=50273&lang=el#p=71>