



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΙΓΑΙΟΥ

ΣΧΟΛΗ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ
ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Προσδιορισμός βιοδραστικού προφίλ και βιοδιαθεσιμότητας μέσω in vitro πέψης καινοτόμου λειτουργικού τυριού τύπου spread, ενισχυμένου με εκχυλίσματα βοτάνων και άγριων χόρτων του Βορείου Αιγαίου.





ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΙΓΑΙΟΥ

ΦΟΙΤΗΤΡΙΑ: ΑΛΜΠΟΥΝΙΩΤΗ ΚΑΛΛΙΟΠΗ
ΑΜ: 17005

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ :
ΚΟΥΤΕΛΙΔΑΚΗΣ ΑΝΤΩΝΙΟΣ

Μέλη Τριμελούς Επιτροπής:

ΚΟΥΤΕΛΙΔΑΚΗΣ ΑΝΤΩΝΙΟΣ, Επίκουρος Καθηγητής (Επιβλέπων)

ΓΚΙΑΟΥΡΗΣ ΕΥΣΤΑΘΙΟΣ, Αναπληρωτής Καθηγητής

ΑΡΓΥΡΙΟΥ ΑΝΑΓΝΩΣΤΗΣ, Καθηγητής Α' βαθμίδας

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΜΥΡΙΝΑΛΗΜΝΟΥ, 2022

Ευχαριστίες

Με την ολοκλήρωση της πτυχιακής μου εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Κουτελιδάκη Αντώνιο, Επίκουρο καθηγητή του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Πανεπιστημίου Αιγαίου , καθώς και την Πανεπιστημιακή υπότροφο κ. Αικατερίνη Κανδυλιάρη, για όλη τη στήριξη και τη βοήθειά τους σε όλα τα στάδια της πτυχιακής μου . Ευχαριστώ πολύ επίσης τη κ.Χρύσα Καλοτεράκη, και την κ.Παναγιώτα Ποτσάκη, για τη πολύτιμη βοήθεια και συνεχή υποστήριξη τους στις εργαστηριακές και πειραματικές διαδικασίες όλους αυτούς τους μήνες. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής για τον χρόνο που αφιέρωσαν για την αξιολόγηση της πτυχιακής μου εργασίας.



ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

A. Θεωρητικό Μέρος

Κεφάλαιο 1 : Βιοδραστικά Συστατικά	8
1.1 Αντιοξειδωτικές Ενώσεις.....	8
1.2 Φαινολικές Ενώσεις	10
1.3 Επιλεγμένα Βότανα Β. Αιγαίου	12
1.3.1 Κρίταμος	12
1.3.2 Σαλικόρνια.....	13
1.3.3 Τσάι του Βουνού	14
1.3.4 Φασκόμηλο	15
1.3.5 Σπαθόχορτο	15
Κεφάλαιο 2 : Ενισχυμένα Λειτουργικά Τρόφιμα	17
2.1 Γενικά Στοιχεία	17
2.2 Τάσεις και ανάλυση αγοράς	17
2.3 Εφαρμογή στη βιομηχανία	18
Κεφάλαιο 3 : Βιοδιαθεσιμότητα και πέψη	19
3.1 Επίδραση διατροφής στο εντερικό μικροβίωμα	19
3.2 In Vitro πέψη ως μέθοδος εκτίμησης βιοδιαθεσιμότητας	20
3.3 In-Vitro Πέψη και Προβιοτικά.....	22

B. Πειραματικό Μέρος

Κεφάλαιο 4: Στόχος Μελέτης Και Πειραματική Διαδικασία.....	23
4.1 Σκοπός Έρευνας.....	23
4.2 Δημιουργία εκχυλισμάτων.....	23
4.2.1 Επιλογή βοτάνων και χόρτων.....	23
4.2.2 Υλικά και Συσκευές.....	24
4.2.3 Βήματα Διαδικασίας	24
4.3 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο Frap (Ferric Reducing Antioxidant Power).....	26
4.3.1 Αρχή Μεθόδου	26
4.3.2 Πρότυπη καμπύλη.....	26
4.3.3 Προσδιορισμός Αντιοξειδωτικών – Βήματα Διαδικασίας	27
4.4 Προσδιορισμός ολικών φαινολικών των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο Folin-Clocalteu	28
4.4.1 Αρχή Μεθόδου	28
4.4.2 Υλικά και Συσκευές.....	29
4.4.3 Κατασκευή Πρότυπης Καμπύλης	29

4.4.4 Μέτρηση ολικών φαινολικών δειγμάτων – Βήματα Διαδικασίας.....	30
4.4.5 Έκφραση Αποτελεσμάτων.....	31
4.5 Ενσωμάτωση εκχυλισμάτων σε καινοτόμο λειτουργικό τρόφιμο.....	31
4.5.1 Επιλογή Εκχυλισμάτων.....	31
4.5.2 Υλικά και Συσκευές.....	32
4.5.3 Τελική Συνταγή - Βήματα Διαδικασίας	32
4.6 Οργανοληπτική Αξιολόγηση λειτουργικού τροφίμου	34
4.7 In-Vitro Πέψη ενισχυμένου λειτουργικού τροφίμου.....	35
4.7.1 Υλικά και Συσκευές.....	35
4.7.2 Βήματα Διαδικασίας	35
Κεφάλαιο 5 : Αποτελέσματα Πειραμάτων	39
5.1 In-Vitro Αξιολόγηση εκχυλισμάτων δειγμάτων	39
5.1.1 Σύγκριση Ολικών Αντιοξειδωτικών Εκχυλισμάτων (FRAP)	39
5.1.2 Σύγκριση Ολικών Φαινολικών Εκχυλισμάτων (Folin)	40
5.2 Αξιολόγηση In – Vitro Πέψης Λειτουργικού Τροφίμου	41
5.2.1 Σύγκριση Ολικών Αντιοξειδωτικών Δειγμάτων Τροφίμων - In-Vitro Πέψη (FRAP)	41
5.2.2 Σύγκριση Ολικών Φαινολικών Δειγμάτων Τροφίμων - In-Vitro Πέψη (Folin)	43
5.3 Αποτελέσματα Εντυπώσεων Οργανοληπτικής Δοκιμής.....	44
5.3.1 Δημογραφικά Αποτελέσματα Οργανοληπτικού	44
5.3.2 Σύγκριση Εντύπωσης Χρώματος Δειγμάτων.....	45
5.3.3 Σύγκριση Εντύπωσης Αρώματος Δειγμάτων.....	45
5.3.4 Σύγκριση Εντύπωσης Υφής Δειγμάτων	46
5.3.5 Σύγκριση Εντύπωσης Γεύσης Δειγμάτων.....	46
5.3.6 Σύγκριση Ολικής Εντύπωσης Δειγμάτων	47
Κεφάλαιο 6 : Συμπεράσματα και Συζήτηση	48
6.1 Σύγκριση Αποτελεσμάτων Εκχυλισμάτων και Τροφίμων	48
6.1.1 Σύγκριση Αντιοξειδωτικών εκχυλισμάτων και Τροφίμων (Frap).....	48
6.1.2 Σύγκριση Φαινολικών Εκχυλισμάτων και Τροφίμων (Folin).....	49
Βιβλιογραφία	51

Περίληψη

Τα τελευταία χρόνια, όλο και αυξανόμενο είναι το ενδιαφέρον για νέα, λειτουργικά τρόφιμα, τα οποία οι καταναλωτές θα προτιμούν τόσο για τις οργανοληπτικές τους ιδιότητες όσο και για τα οφέλη που η συχνή κατανάλωσή τους θα επιφέρει στην υγεία τους. Λόγω αυτού, το ερευνητικό πεδίο γύρω από τα ενισχυμένα τρόφιμα, τα βιοδραστικά συστατικά και την επίδραση της διατροφής στην υγεία, όλο και επεκτείνεται. Στη παρούσα μελέτη, στόχος μας ήταν να δημιουργήσουμε ένα καινοτόμο λειτουργικό τρόφιμο το οποίο οι καταναλωτές θα βρίσκουν ευχάριστο, και θα συμβάλει επίσης στην επίτευξη της καθημερινής συνιστάμενης πρόσληψης σε αντιοξειδωτικά και φαινολικές ενώσεις.

Για να το πετύχουμε αυτό, και έχοντας ως γνώμονα την τοπικότητα των προϊόντων του Β.Αιγαίου, επιλέξαμε 5 βότανα (τσάι του βουνού, φασκόμηλο, σπαθόχορτο) και άγρια χόρτα (κρίταμος, σαλικόρνια) από την περιοχή της Λήμνου, με τα οποία δημιουργήσαμε υδατικά εκχυλίσματα. Τα εκχυλίσματα αυτά αξιολογήθηκαν *in-vitro*, ως προς τη συνολική τους περιεκτικότητα σε αντιοξειδωτικά και φαινολικές ενώσεις, χρησιμοποιώντας τις μεθόδους F.R.A.P και Folin αντίστοιχα. Έπειτα τα εκχυλίσματα με τα βέλτιστα αποτελέσματα τόσο στην *in-vitro* δοκιμή όσο και οργανοληπτικά, ενσωματώθηκαν σε επιλεγμένο αλειφωτό τυρί τύπου spread, κάνοντας χρήση τριών διαφορετικών αναλογιών και συνδυασμών εκχυλισμάτων. Τα τρόφιμα αυτά αξιολογήθηκαν από δείγμα καταναλωτών μέσω διοργάνωσης οργανοληπτικής δοκιμής ως προς τη γεύση, το άρωμα, την υφή, το χρώμα και τη γενική εντύπωση. Ως τελικό στάδιο, πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της βιοδιαθεσιμότητας των βιοδραστικών συστατικών (αντιοξειδωτικά και φαινολικά) διεξάγοντας διαδικασία *in-vitro* πέψης στα τρόφιμα που είχαμε κατασκευάσει. Η δοκιμή αυτή πραγματοποιήθηκε για να λάβουμε μια εκτίμηση της ποσότητας των βιοενεργών συστατικών που εν τέλη θα επιζήσουν της πέψης έπειτα της κατανάλωσης, και θα απορροφηθούν από τον οργανισμό, με μελλοντική πρόθεση να προχωρήσουμε σε κλινικές μελέτες κατανάλωσης των τροφίμων, οι οποίες θα μας δώσουν μια πιο πλήρη εικόνα για την επίδραση του λειτουργικού τροφίμου στον ανθρώπινο οργανισμό.

Abstract

In recent years, there has been a growing interest in new, functional foods, which consumers will prefer both for their sensory properties as well as for the benefits that their frequent consumption will bring to their health. Because of this, the field of research on fortified foods, bioactive ingredients and the effect of diet on health is expanding. In the present study, our goal was to create an innovative functional food that consumers will find enjoyable and will also aim to achieve the recommended daily intake for antioxidants and phenolic compounds.

For this purpose, and with the locality of the North Aegean's products in mind, we chose 5 different herbs (mountain tea, sage, st'john's wort) and wild grasses (kritamos, salicornia) from the island of Lemnos, and we created aquatic extracts. These extracts were evaluated in-vitro for their total antioxidant and phenolic content, using the F.R.A.P and Folin methods, respectively. The extracts with the best results in the in-vitro test, were then incorporated into a carefully selected spread cheese, using three different proportions and combinations of extracts. These spreads were evaluated by a sample of consumers through a sensory evaluation in terms of taste, aroma, texture, color and general impression. As a final step, the bioavailability of the bioactive ingredients (antioxidants and phenolics) was determined by performing an in-vitro digestion process on the food we had manufactured. This test was performed to obtain an estimate of the amount of bioactive ingredients that will eventually survive digestion after consumption, and eventually be absorbed by the body, with the intention of proceeding with clinical studies of food consumption, which will give us a more complete picture of the effect of our new, functional food on the human body.

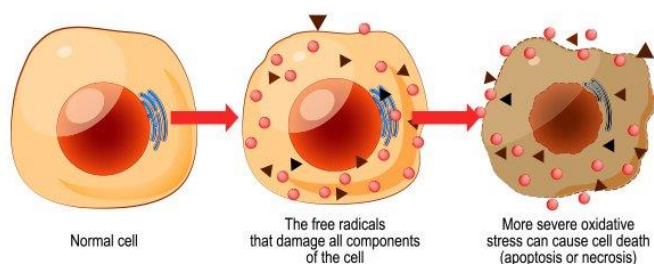
Α. Θεωρητικό Μέρος

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 : ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ

1.1 ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ

Ο σύγχρονος τρόπος ζωής, με τους γρήγορους ρυθμούς του, το άγχος και τις επιβλαβείς καθημερινές συνήθειες, έχει επιβαρύνει τον οργανισμό των ατόμων και κατ' επέκταση και την υγεία τους. Κύρια αιτία για αυτή την συστηματική καταπόνηση φαίνεται να είναι το **οξειδωτικό στρες**, δηλαδή η εξασθένηση των κυττάρων του οργανισμού μέσω οξείδωσης από ορισμένα φορτισμένα μόρια, τις **ελεύθερες ρίζες**. Αυτές οι ελεύθερες ρίζες, παράγονται καθημερινά στον οργανισμό τόσο λόγω εξωγενών παραγόντων (κάπνισμα, ατμοσφαιρική ρύπανση, στρες) όσο και λόγω ενδογενών παραγόντων ως φυσιολογική λειτουργία του μεταβολισμού. (Kaloteraki et al., 2021)

Oxidative stress

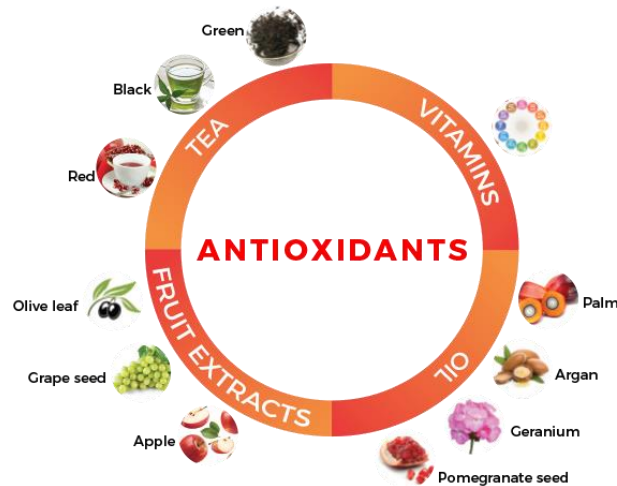


Εικόνα 1: Δράση Οξειδωτικού Στρες Στα Κύτταρα

Τα αντιοξειδωτικά, θεωρούνται οι φυσικές εκείνες ουσίες που περιέχονται σε διάφορα τρόφιμα και ροφήματα, και παρουσιάζουν την ικανότητα να προστατεύουν τα κύτταρα, εξουδετερώνοντας τις ελεύθερες ρίζες, προλαμβάνοντας δηλαδή το οξειδωτικό στρες και προστατεύοντας κατ' επέκταση τον ανθρώπινο οργανισμό από διάφορες πιθανές ασθένειες. (Sultana, Anwar, & Ashraf, 2009)

Ως ενώσεις, παράγονται φυσικά από τον ίδιο τον οργανισμό, με σκοπό να δράσουν ως ανασταλτικοί παράγοντες του εκφυλισμού των κυττάρων, και ως άμυνα **έναντι της γήρανσης**. Ωστόσο οι ποσότητες αντιοξειδωτικών που παράγονται από τον οργανισμό δεν επαρκούν για να καλύψουν και να αντισταθμίσουν τις βλάβες που δημιουργεί η καθημερινότητα. Για αυτό και είναι απαραίτητο να προσλαμβάνουμε επαρκείς συγκεντρώσεις αντιοξειδωτικών ενώσεων **μέσω τις διατροφής**. Δηλαδή μπορούμε είτε να τα εντάξουμε στο καθημερινό μας διαιτολόγιο μέσω κατάλληλων τροφίμων και ροφημάτων, είτε να προνοήσουμε για τη λήψη ορισμένων **συμπληρωμάτων διατροφής**.

Στις αντιοξειδωτικές ενώσεις, ανήκουν συστατικά πολύ γνωστά στον απλό καταναλωτή που όμως μπορεί να μην έχει συνειδητοποιήσει τη σημασία της ένταξής τους στο καθημερινό του διαιτολόγιο. Χαρακτηριστικά να αναφέρουμε ορισμένες βιταμίνες όπως οι βιταμίνες A, C, E, η προβιταμίνη A, το σελήνιο, τα καροτενοειδή, το β-καροτένιο, το λυκοπένιο, τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα ω-3, το συνένζυμο Q10, οι πολυφαινόλες (τα φλαβονοειδή), οι τανίνες, οι κατεχίνες και το φυλλικό οξύ. (Sotiropoulou, Megremi, & Tarantilis, 2020) Χαρακτηριστικά παραδείγματα τροφίμων πλούσια στις προαναφερθείσες ενώσεις είναι τα εξής:



Εικόνα 2: Πηγές Αντιοξειδωτικών

- **Πηγές βιταμίνης A:** Αποτελούν τα λαχανικά και τα φρούτα με σκούρο πράσινο ή/και με έντονο κίτρινο-πορτοκαλί χρώμα που περιέχουν την β-καροτίνη. Επίσης τα γαλακτοκομικά πλήρων λιπαρών, ο κρόκος του αυγού, το συκώτι καθώς και η πλειοψηφία των τροφίμων ζωικής προέλευσης. Η πρόσληψη της συμβάλλει στην καλή λειτουργία του ανοσοποιητικού, ενισχύει την δημιουργία νέων κυττάρων, αναζωογονεί το δέρμα, ενισχύει την όραση και προστατεύει από την εκδήλωση κάποιων μορφών καρκίνου.
- **Πηγές βιταμίνης C:** Αποτελούν τα φρούτα και κυρίως τα εσπεριδοειδή, το πεπόνι, το μάνγκο, το ακτινίδιο, οι φράουλες κλπ. Από τα λαχανικά ξεχωρίζουν η ντομάτα, το λάχανο, ο μαϊντανός, οι πιπεριές, το μπρόκολο και το κουνουπίδι. Η βιταμίνη C, ενισχύει το ανοσοποιητικό, βοηθά στην απορρόφηση του σιδήρου και επίσης ενισχύει την σύνθεση κολλαγόνου.
- **Πηγές βιταμίνης E:** Αποτελούν οι ξηροί καρποί, άλλοι διάφοροι σπόροι (ηλιόσπορος, λιναρόσπορος), τα όσπρια, το αυγό, τα φυτικά έλαια, οι ελιές και το ελαιόλαδο. Η επαρκής πρόσληψή της έχει έμμεση αντιοξειδωτική δράση αφού προστατεύει τις βιταμίνες A και C από το να οξειδωθούν και να μην μπορούν να δράσουν αποτελεσματικά. Η καθημερινή πρόσληψη της μειώνει επίσης τις καρδιαγγειακές παθήσεις και παράλληλα ελαχιστοποιεί τον κίνδυνο θρομβώσεων.
- **Πηγές των πολυφαινολών (φλαβονοειδών):** Αποτελούν τα εσπεριδοειδή, τα σταφύλια, τα μήλα, τα κεράσια, το πράσινο και μαύρο τσάι, ο καφές, το κόκκινο κρασί, η μαύρη σοκολάτα, το ρόδι, τα καρύδια, το κόκκινο λάχανο και η σόγια. Μεγαλύτερη συγκέντρωση εντοπίζεται κυρίως στις φλούδες των φρούτων και λαχανικών. Η συμβολή τους στον οργανισμό είναι

σημαντική καθώς δρουν ως φυσικό αντιπηκτικό μειώνοντας τον κίνδυνο θρομβώσεων, ενώ έχουν και αγγειοδιασταλτικές ιδιότητες.

- Λιπαρά ω-3 οξέα και Συνένζυμο Q10: Λαμβάνονται επαρκώς από την κατανάλωση της σαρδέλας, του σκουμπριού και της σόγιας.
- Λυκοπένιο: Λαμβάνεται κυρίως από τις ντομάτες (ωμή ή λιαστή, καθώς και επεξεργασμένη), το καρπούζι και τα γκρέιπ φρουτ.
- Σελήνιο: Εμπεριέχεται σε όλα τα θαλασσινά, στην μαγιά της μπύρας, στο κοτόπουλο, στο αυγό, στα καρύδια, στο μαύρο ρύζι, τα δημητριακά ολικής άλεσης, τα γαλακτοκομικά και το σκόρδο.
- Φυλλικό οξύ: Εντοπίζεται στα όσπρια, στο αβοκάντο, στα σπαράγγια, τα αυγά, τα φιστίκια, το μπρόκολο και συνήθως σε λαχανικά με σκούρα πράσινα φύλλα. Είναι απαραίτητο για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, αφού συμβάλλει στη σύνθεση των νουκλεϊκών οξέων του DNA. Επίσης βοηθά στην ανάπλαση και καλή υγεία του δέρματος και των μαλλιών. (Carlsen et al., 2010)

Τα αντιοξειδωτικά ως πρόσθετα τροφίμων, αρχικά χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία κυρίως για να μειώνουν της πιθανότητες οξείδωσης των προϊόντων στα οποία προστίθενται και να επεκτείνουν τη διάρκεια ζωής τους. Ωστόσο στις μέρες μας, κύριος σκοπός ενσωμάτωσής τους στα τρόφιμα είναι η εκμετάλλευση των ευεργετικών τους ιδιοτήτων οι οποίες γίνονται όλο και ευρύτερα γνωστές, χάρη στην συνεχή αύξηση της ενημέρωσης του καταναλωτικού κοινού σχετικά με την υγεία και την διατροφή (Finley et al., 2011). Η τάση αυτή ωστόσο να ενισχύονται τρόφιμα με βιοενεργά συστατικά, μπορεί να επιφέρει και ορισμένα ζητήματα. (Prior, Wu, & Schaich, 2005)

Συγκεκριμένα, επι πολλές δεκαετίες, πολλές χρόνιες ασθένειες όπως ο καρκίνος και τα καρδιαγγειακά νοσήματα, είχαν αποδοθεί αποκλειστικά στην ύπαρξη και τη δράση του οξειδωτικού στρες. Ωστόσο όπως φαίνεται, η ύπαρξη των ελεύθερων ριζών σε ορισμένες (μικρές) ποσότητες, συμβάλλει σε αναγκαίες λειτουργίες του οργανισμού, κυρίως μεταβολικού χαρακτήρα. Επομένως, είναι σημαντικό να υπάρχει σωστή χρήση και έρευνα όσον αφορά τα ενισχυμένα με αντιοξειδωτικά τρόφιμα προκειμένου να αποφευχθεί η υπερβολική δράση των συγκεκριμένων βιοενεργών συστατικών, και η παραπάνω από το επιθυμητό δέσμευση ελεύθερων ριζών, που θα μπορούσε να οδηγήσει σε κάποια διαταραχή μεταβολικών διεργασιών. (Finley et al., 2011)

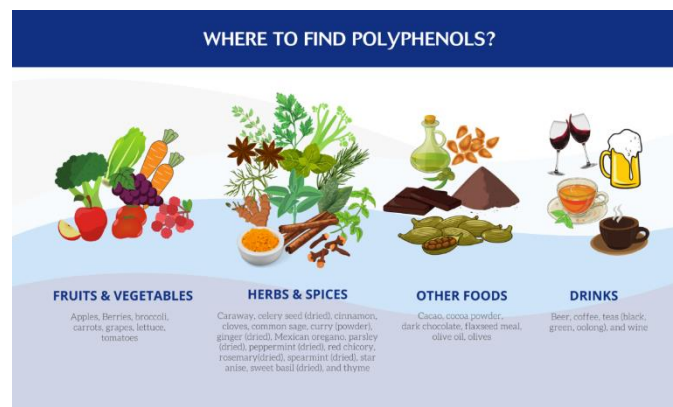
1.2 ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ

Οι φαινολικές ενώσεις έχουν αντιοξειδωτική δράση και αποτελούν μια ομάδα από περίπου 10.000 ενώσεις οι οποίες έχουν ομαδοποιηθεί σε κατηγορίες σύμφωνα με βασική τους χημική δομή και δρουν ως μέρος του δευτερογενούς μεταβολισμού (δευτερογενείς μεταβολίτες). Ο κύριος διαχωρισμός τους είναι μεταξύ φλαβονοειδών και μη φλαβονοειδών. (Gonçalves et al., 2017)

Οι φαινολικές ενώσεις οι οποίες εμπεριέχονται στα τρόφιμα, χρήζουν μεγάλου ερευνητικού ενδιαφέροντος τα τελευταία χρόνια, καθώς έρευνες έχουν δείξει ότι επηρεάζουν ευεργετικά την υγεία του ανθρώπου και μάλιστα σε σημαντικό βαθμό. Συγκεκριμένα, φαίνεται ότι η αντιοξειδωτική δράση των φαινολικών ενώσεων, παρέχει στον οργανισμό προστασία από καρδιαγγειακές παθήσεις και ανάπτυξη καρκίνου έχοντας παράλληλα αντιφλεγμονώδη και θρομβολυτική δράση. Αυτό γιατί, καθώς αποτελούν κατηγορία των αντιοξειδωτικών δρουν με παρόμοιο μηχανισμό. Εξαλείφουν δηλαδή τις ελεύθερες ρίζες και μειώνουν την οξειδωση των κυττάρων, ενώ απορροφώνται με ευκολία από τον οργανισμό μέσω των τοιχωμάτων των εντερικού συστήματος. Με συχνή χρήση δρουν και ως φυσικά αντιφλεγμονώδη για άτομα που έχουν ανάγκη μακροχρόνιας χρήσης τέτοιων φαρμάκων (Ulewicz-Magulska & Wesolowski, 2019).

Τροφές πλούσιες σε φαινολικές ενώσεις είναι οι εξής : Το μπρόκολο, οι ντομάτες, το τσάι, ο καφές, το κόκκινο κρασί, το ελαιόλαδο, η σόγια, η πατάτα, καθώς και διάφορα φρούτα όπως σταφύλια, μήλα, δαμάσκηνα κ.α

Μια από τις κυριότερες κατηγορίες των φαινολικών ενώσεων που πιο συχνά εντοπίζονται σε τρόφιμα και προϊόντα φυτικής προέλευσης, είναι τα φαινολικά οξέα ή όπως συχνά αναφέρονται, οι **πολυφαινόλες**.(Shori, 2020) Χωρίζονται και αυτές σε δυο υποκατηγορίες, σύμφωνα πάντα με την δομή τους, οι οποίες είναι: Υδροξυβενζοϊκά Οξέα (π.χ γαλλικό οξύ) και Υδροξυκιναμικά Οξέα (π.χ καφεϊκό, φερουλικό οξύ), με τα υδροξυκιναμικά να απαντώνται συχνότερα στα τρόφιμα. (Bruni & Sacchetti, 2009)



Εικόνα 3: Πηγές Πολυφαινολών Στα Τρόφιμα

Κάποιες χαρακτηριστικές πηγές των πολυφαινολών στα τρόφιμα είναι οι εξής:

- Το γαλλικό οξύ εντοπίζεται στους σπόρους των σταφυλιών και του τσαγιού.
- Το καφεϊκό οξύ εντοπίζεται στον καφέ, τα δαμάσκηνα, τα κεράσια και τα μήλα.
- Το φερουλικό οξύ περιέχεται στα εξωτερικά περιβλήματα των κόκκων των δημητριακών (κόκκοι σταριού, καλαμποκιού, ρυζιού, βρώμης)
- Το κινναμωμικό οξύ περιέχεται στα εσπεριδοειδή και το κόκκινο κρασί. Το κόκκινο κρασί περιέχει επίσης και μια άλλη μορφή πολυφαινόλης, την ρεσβερατρόλη, με αντίστοιχα οφέλη στην υγεία.(Yesil-Celiktas, Nartop, Gurel, Bedir, & Vardar-Sukan, 2007)

Πέρα όλων των πάρα πάνω τροφών, σε περίπτωση δυσκολίας πρόσληψης της προτεινόμενης ημερήσιας κατανάλωσης, τα φαινολικά οξέα και άλλα είδη αντιοξειδωτικών, διατίθενται και με την μορφή συμπληρωμάτων διατροφής. Ωστόσο έρευνες δείχνουν ότι η βιοδιαθεσιμότητα των βιοενεργών συστατικών που προσλαμβάνονται από μια ισορροπημένη διατροφή είναι μεγαλύτερη και υψηλότερης αξίας συγκριτικά με οποιονδήποτε αντίστοιχο συμπλήρωμα.(Drakou et al., 2015)

1.3 ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΑ ΒΟΤΑΝΑ Β. ΑΙΓΑΙΟΥ

1.3.1 Κρίταμος

Ο κρίταμος ή η αλμύρα όπως είναι διαφορετικά γνωστό, είναι ένα μικρό φυτό με σαρκώδη φύλλα πράσινου χρώματος με ανθοφορία από τον Ιούλιο έως τον Οκτώβριο και συγκομιδή δύο με τρεις φορές τον χρόνο, από τον Μάιο έως τον Νοέμβριο. Ως χόρτο συγκαταλέγεται στην οικογένεια των σεληνοειδών, και φέρει τη λατινική ονομασία *Crithmum maritimum* (κριθμον το παράλιο).



Εικόνα 4: Φυτό Κρίταμου σε Βράχο

Συναντάται κυρίως στις παράκτιες περιοχές της Μεσογείου, αλλά έχει εντοπιστεί και σε αντίστοιχες περιοχές της Μαύρης Θάλασσας και του Ατλαντικού, πάντοτε βέβαια σε σημεία όπως βραχώδεις ακτές, αμμώδεις παραλίες και σχισμές βράχων. Αναφορές για τον κρίταμο και τις διάφορες χρήσεις του, γίνονται από την αρχαιότητα, με ιδιαίτερη έμφαση στις θεραπευτικές του ιδιότητες. Μάλιστα αναφέρεται ότι χρησιμοποιείται παραδοσιακά ως φυσικό ιατρικό από την εποχή του Ιπποκράτη. Πλέον γνωρίζουμε, ότι ο κρίταμος εμπεριέχει μεγάλες συγκεντρώσεις βιταμινών -όπως η βιταμίνη E και C-, ιχνοστοιχείων και μεταλλικών αλάτων όπως το ιώδιο. Τα φύλλα του, που είναι και το πλέον εκμεταλλεύσιμο μέρος του, είναι επίσης πλούσια σε ω3 και ω6 λιπαρά οξέα. Γενικότερα δηλαδή, ο κρίταμος παρουσιάζει υψηλή αντιοξειδωτική, αντιμικροβιακή, και αντιδιουρητική δράση που συμβάλει στην φυσική αποτοξίνωση και μπορεί να καλύψει τις ανάγκες ημερήσιας πρόσληψης αρκετών βιταμινών (με καθημερινή κατανάλωση 100 γρ.). Σήμερα, πέραν της βιομηχανίας των τροφίμων, και ακριβώς λόγω των θεραπευτικών ιδιοτήτων του, υπάρχει όλο και μεγαλύτερη ζήτηση και χρήση του κρίταμου στη βιομηχανία των φαρμάκων και των καλλυντικών.

1.3.2 Σαλικόρνια

Η σαλικόρνια ή Αλμυρίχα ή αλλιώς σπαράγγι της θάλασσας είναι ένα θαμνώδες φυτό ύψους περίπου 20 έως 70 εκατοστών, που ανήκει στη κατηγορία των γνησίων αλόφυτων. Είναι δικοτυλήδοιο και συγκαταλέγεται στην οικογένεια των chenopodiaceae. Επιστημονικά ονομάζεται *Salicornia* *egyptiaca*, με την ονομασία της να διαφοροποιείται ανάλογα με τη περιοχή στην οποία εντοπίζεται και το είδος της. Συχνά ανάλογα τη τοποθεσία, τη συναντούμε και ως: *Samphire greens* (Βρετανία), *Sea Beans* ή *Salicornia* ή *Sea Asparagus* (Αμερική).



Εικόνα 5: Σαλικόρνια σε αλυκή λίμνη

Η σαλικόρνια εντοπίζεται παραδοσιακά σε αλατούχα-αμμώδη εδάφη, όπως αλυκές λίμνες ή αλμυρόβαλτοι), δίπλα στη θάλασσα και ανάλογα με την εποχή παρουσιάζει και διαφορετικό χρώμα. Το χρώμα της συνήθως είναι πράσινο ενώ το φθινόπωρο έχει κόκκινο πορτοκάλι ή κίτρινο χρώμα. Είναι γνωστή από την αρχαιότητα, αναφερόμενη αρχικά από τον Κλαύδιο Γαληνό, έγινε όμως περισσότερο γνωστή τους νεότερους χρόνους για τις θεραπευτικές της ιδιότητες και την υψηλή περιεκτικότητά της σε βιταμίνες και μέταλλα. Πλέον γνωρίζουμε ότι η σαλικόρνια, εμπεριέχει μεγάλες συγκεντρώσεις ασβεστίου, νατρίου, μαγνησίου, σιδήρου και βιταμινών Α, Β και C, γεγονός που της προσδίδει ισχυρές αντιοξειδωτικές, αντιβακτηριακές και αντιθρομβωτικές ιδιότητες.



Εικόνα 6: Σαλικόρνια

1.3.3 Τσάι του Βουνού

Το τσάι του βουνού ή αλλιώς σιδερίτης είναι ένα ποώδες φυτό που ανήκει στην οικογένεια των Χειλανθών. Επιστημονικά ονομάζεται *Sideritis* και ανήκει στο ομώνυμο γένος. Ως φυτό φτάνει περίπου τα 30cm και αποτελείται από λεπτά και στρογγυλά κλαδιά με χνουδωτά υποπράσινα φύλλα. Από την αρχαιότητα κιόλας, όλες οι ποικιλίες εντοπιζόνταν στην λεκάνη της Μεσογείου και φύονται ανάμεσα σε βράχια. Λόγω του κλίματος στο οποίο εντοπίζεται, είναι ιδιαίτερα ανθεκτικές στην ξηρασία και στις υψηλές θερμοκρασίες.



Εικόνα 7: Ρόφημα Από Τσάι του Βουνού

Τα τελευταία χρόνια, λόγω της μεγάλης ζήτησης και της μακροχρόνιας χρήσης του, δημιουργήθηκε ανησυχία για την εξαφάνιση του είδους. Έτσι σήμερα καλλιεργείται σε διάφορες περιοχές, κυρίως τις περιόδους Οκτώβριο - Νοέμβριο και Φεβρουάριο - Μάρτιο, συλλέγεται τον Ιούλιο και ακολουθεί αποξήρανση πριν την διάθεση του στην αγορά.

Οι θεραπευτικές δράσεις και οι ευεργετικές ιδιότητες του Σιδερίτη, είναι γνωστές από την αρχαιότητα, με τις χρήσεις του να αναφέρονται από τους Διοσκουρίδη και Ιπποκράτη. Όπως δείχνουν οι μελέτες σχετικά με αυτό, το τσάι του βουνού διαθέτει ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες αλλά και αντιφλεγμονώδεις, αναλγητικές, αντιμικροβιακές και αγχολυτικές δράσεις. Επίσης εμπεριέχει υψηλές συγκεντρώσεις σιδήρου, φλαβονοειδών και τερπενίων. Οι ευεργετικές αυτές ιδιότητες, σε συνδυασμό με την πλήρη απουσία καφεΐνης από τη σύνθεσή του, εξηγεί τη ευρέως διαδεδομένη χρήση του και την δυνατότητα του να καταναλώνεται ως ρόφημα από όλες τις ηλικίες άφοβα χωρίς περιορισμό στην δοσολογία και δίχως κίνδυνο παρενεργειών.

1.3.4 Φασκόμηλο

Το φασκόμηλο ή αλιφασκιά είναι ένα θαμνοειδές φυτό με ύψος από 20 έως 60 cm. Η επίσημη ονομασία του, είναι Ελελίφασκος ο φαρμακευτικός με την λατινική ονομασία *Salvia officinalis*, που προέρχεται από το λατινικό *salvare* -σημαίνει θεραπεύω-. Ανήκει στην οικογένειά Χειλανθή όπως και το τσάι του βουνού. Το συναντάμε κυρίως στην Νότια Ελλάδα και φύτεται σε πετρώδη, ξερά και άγονα εδάφη με μεγάλη ηλιοφάνεια. Είναι ιδιαίτερα ανθεκτικό φυτό με λευκό- πράσινα, παχιά και μεγάλα φύλλα, ενώ κατά την ανθοφορία του έχει έντονο μωβ χρώμα. Η συγκομιδή του φασκόμηλου πραγματοποιείται συλλέγοντας τα φύλλα του φυτού λίγο πριν την ανθοφορία ή ακόμα και στην αρχή της, κυρίως τους μήνες Μάιο και Ιούνιο. Στη συνέχεια ακολουθεί αποξήρανση και διάθεση στην αγορά. Σήμερα, λόγω τεράστιας ζήτησης του συγκεκριμένου βοτάνου, η καλλιέργειά του είναι συστηματική και οργανωμένη.



Εικόνα 8: Αποξηραμένο Φασκόμηλο

Όπως και τα προαναφερθέντα βότανα, οι ιδιότητες του φασκόμηλου είναι γνωστές από την αρχαιότητα αφού αναφέρεται συχνά από τους Διοσκουρίδη, Ιπποκράτη και Γαληνό για τις θεραπευτικές του χρήσεις. Συγκεκριμένα διαθέτει αντιβιοτική, αντισπασμωδική και υπογλυκαιμική δράση ενώ αποτελεί και ισχυρό αντιοξειδωτικό που ενισχύει τη λειτουργία του ανοσοποιητικού. Οι ιδιότητες αυτές οφείλονται στις περισσότερες από 160 πολυφαινόλες που περιέχει, συμπεριλαμβανομένου των ταννινών, των τερπενίων, των ρητινών, των διτερπενίων, των τριτερπενίων και των φλαβονοειδών. Πέρα από αυτό, περιέχει μεγάλες ποσότητες σιδήρου, βιταμίνης Β6, ασβεστίου, μαγγανίου, και μικρότερες ποσότητες μαγνησίου, χαλκού και βιταμινών Α, C, E.

1.3.5 Σπαθόχορτο

Το σπαθόχορτο ή βάλσαμο ή βαλσαμοχόρτο είναι ένα ποώδες ανθοφόρο φυτό. Η επίσημη ονομασία του είναι Υπερικό το Διάτρητο και η λατινική του είναι *Hypericum Perforatum* L. Το σπαθόχορτο ανήκει στη οικογένεια των Υπερικών, και μπορούμε να το βρούμε σε ξηρές περιοχές της Ευρώπης, της Ασίας καθώς και της Βόρειας Αφρικής. Η ανθοφορία του γίνεται από τον Ιούνιο έως τον Σεπτέμβριο και η συγκομιδή του πραγματοποιείται από τον Ιούλιο έως τον Αύγουστο. Σαν φυτό,

μπορεί να φτάσει έως το ένα μέτρο, ενώ έχει στενόμακρα φύλλα πράσινο - κίτρινου χρώματος, και έντονα κίτρινα άνθη .



Εικόνα 9: Σπαθόχορτο σε ανθοφορία

Η εξωτερική του χρήση πραγματοποιείται με εφαρμογή επάνω στο δέρμα ως έλαιο, είτε ως έχει είτε ως συστατικό σε άλλα προϊόντα με στόχο την επούλωση πληγών ,φλεγμονών και εγκαυμάτων. Επίσης η κατανάλωσή του μπορεί να γίνει με τη μορφή αφεψήματος, ελαίου ή βάμματος.

Ιστορικά, το σπαθόχορτο εμφανίζεται από την εποχή των Δρυιδών, ενώ στον Μεσαίωνα ήταν ευρέως γνωστό ως επουλωτικό και καρδιοτονωτικό βότανο. Πράγματι, αποδεδειγμένα παρουσιάζει αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες και αποτελεσματική αντικαταθλιπτική δράση, αφού είναι ιδιαίτερα πλούσιο σε βιταμίνες A, B1, B2, B6, D, πρωτεΐνες και ιχνοστοιχεία. Ένα πραγματικά ενδιαφέρον εύρημα είναι ότι η υπερικίνη που εμπεριέχεται στη σύνθεση του βαλσαμόχορτου, μπορεί να επιφέρει οφέλη σε ασθενείς που πάσχουν από AIDS. Ωστόσο η χρήση και η κατανάλωσή του, απαγορεύεται και θα πρέπει να αποφεύγεται κατά την διάρκεια της κύησης και του θηλασμού αλλά και για παιδιά κάτω των δυο ετών. Γενικότερα όμως, δεν υπάρχουν παρενέργειες εάν η χρήση του γίνεται σύμφωνα με τις προτεινόμενες δοσολογίες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 : ΕΝΙΣΧΥΜΕΝΑ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΑ ΤΡΟΦΙΜΑ

2.1 ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Ο όρος Λειτουργικά Τρόφιμα, εμφανίστηκε για πρώτη φορά στην Ιαπωνία, στα τέλη της δεκαετίας του 80'. Από τότε πολλοί οργανισμοί και επιστήμονες του χώρου έχουν προσπαθήσει να ορίσουν όσο το δυνατόν καλύτερα την έννοια, με όχι και τόσο μεγάλη επιτυχία. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να υπάρχουν πολλοί αρκετά διαφορετικοί ορισμοί για τα Λειτουργικά Τρόφιμα, ανάλογα την οπτική με την οποία προσεγγίζουμε το θέμα. (Kaloteraki et al., 2021) Γενικότερα ωστόσο θα μπορούσαμε να πούμε ότι, λειτουργικά θεωρούνται τα τρόφιμα τα οποία έχουν ως στόχο η κατανάλωσή τους να επιφέρει ορισμένα οφέλη στην υγεία του καταναλωτή, και αποσκοπεί στη πρόληψη ή ακόμη και τη θεραπεία χρόνιων ασθενειών. (Konstantinidi & Koutelidakis, 2019)

Τα τελευταία χρόνια, εξαιτίας της αύξησης της ενημέρωσης γενικότερα αλλά και ειδικά γύρω από τα θέματα υγείας, οι καταναλωτές τείνουν να επιλέγουν όλο και περισσότερο τρόφιμα και προϊόντα που όχι μόνο τους ευχαριστούν αλλά και τους προσφέρουν επιπλέον οφέλη. Αυτός είναι και ο λόγος που η ζήτηση για οργανοληπτικά ευχάριστα, λειτουργικά και ενισχυμένα τρόφιμα έχει αυξηθεί σε μεγάλο βαθμό.

2.2 ΤΑΣΕΙΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΓΟΡΑΣ

Όπως προαναφέρθηκε, η ζήτηση και άρα η αγορά των λειτουργικών τροφίμων, επεκτείνεται όλο και περισσότερο τα τελευταία χρόνια. Η ανοδική αυτή αύξηση ενδιαφέροντος φαίνεται ότι θα συνεχιστεί αφού ο γρήγορος ρυθμός ζωής και οι συνθήκες τις καθημερινότητας, ωθούν τους καταναλωτές να κάνουν πιο συνειδητές επιλογές σχετικά με τα προϊόντα που επιλέγουν, αναλογιζόμενοι πλέον πώς αυτά επηρεάζουν και την υγεία τους μακροπρόθεσμα. Έτσι η συζήτηση, και η επιστημονική έρευνα γύρω από το πεδίο των λειτουργικών (π.χ ζυμωμένων, ενισχυμένων, εμπλουτισμένων) τροφίμων παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον.

Όσον αφορά συγκεκριμένα τα αλειφόμενα τυριά τα οποία και επιλέχθηκαν ως υλικό για τη μελέτη μας, γνωρίζουμε ότι αποτελούν βάση για πολλά γρήγορα σνακ τα οποία και προτιμούν οι καταναλωτές, με αποτέλεσμα να υπάρχει μεγάλη ζήτηση στην αγορά για τέτοιου είδους προϊόντα. Ωστόσο η γκάμα των αλειφωτών τυριών στην αγορά, είναι αρκετά περιορισμένη, με την πλειοψηφία τους να μοιάζουν πολύ μεταξύ τους και να περιορίζονται σε λίγες εταιρίες.

Αρκετά στην αγορά είναι τα αλειφόμενα τυριά που εμπεριέχουν βότανα και μπαχαρικά που ως σκοπό όμως έχουν να ενισχύσουν και να βελτιώσουν το άρωμα και τη γεύση των προϊόντων και όχι να τους προσθέσουν κάποια διατροφική αξία. Τα βότανα αυτά προστίθενται σε μικρή ποσότητα και στην παραδοσιακή αποξηραμένη τους μορφή γεγονός που δεν ευνοεί ιδιαίτερα την επίδραση των βιοδραστικών τους συστατικών. Γενικότερα, όσον αφορά τα εμπλουτισμένα τυριά, αυτο που βλέπουμε συνήθως στην αγορά είναι προϊόντας με προσθήκη ασβεστίου ή / και βιταμινών όπως η βιταμίνη B12 και όχι άλλες βιοενεργές ενώσεις.

2.3 ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΣΤΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ

Η ενίσχυση και ο εμπλουτισμός τροφίμων όπως τα αλειφωτά τυριά δεν αντιτίθεται απαραίτητα στη νομοθεσία. Τα εκχυλίσματα των βοτάνων και των χόρτων θεωρούνται ασφαλή προς κατανάλωση και έχουν εγκριθεί από όλες τις αρμόδιες αρχές στις Η.Π.Α έχοντας αποκτήσει και την ιδιότητα των πρόσθετων τροφίμων. Ωστόσο στην Ευρώπη η νομοθεσία είναι φυσικά αυστηρότερη όπως και στα περισσότερα ζητήματα σχετικά με τη βιομηχανία των τροφίμων και των φαρμάκων. Συγκεκριμένα, ελάχιστα εκχυλίσματα βοτάνων έχουν ήδη εγκριθεί για χρήση στα τρόφιμα και ακόμα και αυτά υπόκεινται σε αυστηρές οδηγίες παρασκευής . Έτσι μπορεί να εξηγηθεί και το γεγονός ότι δεν υπάρχουν ήδη στην αγορά λειτουργικά spread τυριών που έχουν ενισχυθεί με βότανα, ή εκχυλίσματα αυτών. Ωστόσο λόγω πρόσφατων μελετών και ερευνών, το πλαίσιο γύρω από τη νομοθεσία φαίνεται να γίνεται πιο ευνοϊκό, με την βιομηχανία να αναμένει έγκριση ή τροποποίηση νομοθετικού πλαισίου γύρω από αυτά τα συστατικά.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 : ΒΙΟΔΙΑΘΕΣΙΜΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΠΕΨΗ

3.1 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΣΤΟ ΕΝΤΕΡΙΚΟ ΜΙΚΡΟΒΙΩΜΑ

Το εντερικό μας μικροβίωμα αποτελείται από το σύνολο των μικροοργανισμών οι οποίοι ζουν και εγκαθιδρύονται στο εντερικό μας σύστημα (Salazar, Valdés-Varela, González, Gueimonde, & de los Reyes-Gavilán, 2017). Το εντερικό μικροβίωμα όπως και οι περισσότεροι πληθυσμοί μικροοργανισμών που υπάρχουν στο σώμα μας εντοπίστηκε και μετρήθηκε αποτελεσματικότερα από τους επιστήμονες όταν ανακαλύφθηκε η τεχνολογία NGS (next generation sequencing) η οποία και μας επέτρεψε να κατανοήσουμε περισσότερο τη σημασία του για τον οργανισμό μας. (Frame, Costa, & Jackson, 2020)

Λόγω του σύγχρονου τρόπου ζωής, η μέση δυτική διαίτα αποτελείται πλέον κατά κύριο λόγο από επεξεργασμένα τρόφιμα με υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα και νάτριο αλλά χαμηλή περιεκτικότητα σε φυτικές ίνες, φρούτα και λαχανικά. Η νέα αυτή τάση έχει κατά πολλούς συνδεθεί με την διατάραξη του εντερικού μικροβιώματος προκαλώντας χρόνιες καταστάσεις φλεγμονής, και μεταβολικές ή νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Martínez Leo & Segura Campos, 2020). Αυτό συμβαίνει γιατί μια πιθανή διατάραξη στην ομοιοστάση του μικροβιώματος επηρεάζει πολλές μεταβολικές οδούς, επίπεδα ορμονών και νευρολογικές διαδικασίες. (Frame et al., 2020). Συσχέτιση έχει επίσης εμφανιστεί μεταξύ αυτής της διαταραχής και των αυξημένων κρουσμάτων άσθματος και αλλεργιών στις δυτικές χώρες. (McKenzie, Tan, Macia, & Mackay, 2017)

Γενικότερα, δεν υπάρχει μία καθολική σύσταση εντερικού μικροβιώματος η οποία θεωρείται υγιής (Flint, Duncan, Scott, & Louis, 2014). Αντιθέτως οι πληθυσμοί αυτών των μικροοργανισμών διαφέρουν σε μεγάλο βαθμό από άτομο σε άτομο. Ιδιαίτερα όταν μιλάμε για υγιή ή μη άτομα, έρευνες που συνέκριναν υγιείς ενήλικες με νοσούντες ασθενείς έδειξαν μεγάλες διαφορές στη σύσταση του εντερικού τους μικροβιώματος (Frame et al., 2020). Αυτή η συγκεκριμένη περίπτωση κατά την οποία το μη ισορροπημένο εντερικό μικροβίωμα ενός ατόμου έχει προκαλέσει ή έχει προκληθεί από μια ασθένεια ονομάζεται δυσβίωση. Πολύ γενικευμένα μπορούμε να πούμε ότι τα μικροβιώματα ατόμων τα οποία παρουσιάζουν μεγαλύτερη ποικιλομορφία περιέχουν δηλαδή τα περισσότερα είδη μικροοργανισμών, είναι και τα πιο υγιή. (Frame et al., 2020)

Η διατροφή αποτελεί τον μεγαλύτερο παράγοντα επιρροής και τροφοδοσίας του εντερικού μικροβιώματος, με τη σχέση αυτή να ξεκινά ακόμα και πριν από τη γέννηση, αφού όπως φαίνεται, η διατροφή της μητέρας κατά τη διάρκεια της κύησης μπορεί να συσχετιστεί με σχετικές ασθένειες στη μετέπειτα ζωή (McKenzie et al., 2017). Το μητρικό γάλα στη συνέχεια περιέχει ολιγοσακχαρίτες που σκοπός τους πέρα από την ανάπτυξη του εμβρύου είναι και η δημιουργία του εντερικού μικροβιώματος του. Η γρήγορη και σωστή ανάπτυξη του μικροβιώματος από τη βρεφική ηλικία έχει συνδεθεί μάλιστα με τη σωστή λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος αφού η πλειοψηφία των ανοσοκυττάρων βρίσκεται στο έντερο (Frame et al., 2020). Αργότερα στην τρίτη ηλικία, παρατηρείται μια ανισορροπία στο εντερικό μικροβίωμα η οποία συσχετίζεται έντονα με την γήρανση κυρίως λόγω αλλαγής των καθημερινών συνηθειών και των διατροφικών συμπεριφορών (Salazar et al., 2017).

Οι παροδικές αλλαγές στη διατροφή και συγκεκριμένα στη ποσότητα προσλαμβανόμενων θερμίδων δεν φαίνονται να μπορούν να επηρεάσουν σε μεγάλο βαθμό το μικροβίωμα, όμως μια συνειδητή μακροχρόνια αλλαγή σε διατροφικές συνήθειες μπορεί να φέρει σημαντικά αποτελέσματα. Συγκεκριμένα για την πρόσληψη θερμίδων, αν και η σχέση με το μικροβίωμα δεν είναι γραμμική, έχει παρατηρηθεί μια γενικότερη σχέση κατά την οποία αν αυξήσουμε ή μειώσουμε τις προσλαμβανόμενες

θερμίδες έχουμε μείωση ή αύξηση της ποικιλομορφίας του μικροβιώματος αντίστοιχα. Η σχέση αυτή έχει όμως ανώτατα και κατώτατα όρια αφού σε περιπτώσεις υποσιτισμού ή υπερβολικής πρόσληψης τροφής, προκαλείται δυσβίωση. (Frame et al., 2020)

Από το σύνολο των συστατικών που προσλαμβάνουμε από τη διατροφή, οι φυτικές ίνες αποτελούν τη κύρια τροφοδοσία του εντερικού μικροβιώματος γιατί μεταβολίζονται σε λιπαρά οξέα μικρής αλυσίδας (SCFAs) τα οποία μεταξύ άλλων επιτρέπουν στα κύτταρα του εντέρου να απορροφούν αποτελεσματικότερα και γρηγορότερα τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά των τροφίμων (Frame et al., 2020). Αυτά τα λιπαρά οξέα (SCFAs) συσχετίζονται και με τη μεταγραφή γονιδίων σε πολλά κύτταρα ή ιστούς (McKenzie et al., 2017), με τη ανταπόκριση στην ινσουλίνη και τη ρύθμιση της όρεξης (Frame et al., 2020) οπότε η επαρκής παραγωγή τους από τα ένζυμα του εντέρου είναι κρίσιμης σημασίας. Για αυτόν ακριβώς το λόγο, η πλειοψηφία των ερευνών επικεντρώνεται γύρω από την επιρροή των υδατανθράκων -μεγάλος μέρος των οποίων είναι φυτικές ίνες- στο μικρόβιομα, καθώς έχει αποδειχθεί ότι η πρόσληψη φυτικών ινών (π.χ πολυσακχαριτών) ιδιαίτερα από τα φρούτα και τα λαχανικά μπορεί να προκαλέσει τις μεγαλύτερες αλλαγές στη μορφολογία του μικροβιώματος σε σχέση με άλλες διατροφικές ομάδες. Κατανοούμε λοιπόν ότι η επαρκής πρόσληψη φυτικών ινών από πηγές όπως φρούτα, λαχανικά, ακατέργαστους καρπούς και προϊόντα ολικής άλεσης είναι ιδιαίτερα ευνοϊκή για το μικρόβιομα μας. Ωστόσο η υπερβολική κατανάλωση μπορεί να επιφέρει τα αντίθετα αποτελέσματα δημιουργώντας δυσκολίες στην πέψη των τροφών.

Πέρα από τις φυτικές ίνες, άλλα μικροθρεπτικά συστατικά όπως οι πολυφαινόλες έχουν δείξει αυξημένη αλληλεπίδραση με το μικρόβιομα. Οι πολυφαινόλες βρίσκονται σε τρόφιμα όπως το κρασί, το τσάι, το κακάο και διάφορα μούρα. Τα οφέλη των πολυφαινόλων για τη σωστή λειτουργία όλου του οργανισμού είναι γνωστά όμως όπως φαίνεται όταν έρχονται σε επαφή με το μικρόβιομα η δράση τους εντείνεται και μετατρέπονται σε ιδιαίτερα βιοδιαθέσιμους ισχυρούς αντιμικροβιακούς παράγοντες που μπορούν να προλάβουν διάφορες φλεγμονές και ασθένειες.

Στα πλαίσια της διατροφής, αρκετά συνήθη είναι και τα συμπληρώματα πρεβιοτικών και προβιοτικών ως μέσο ενίσχυσης του μικροβιακού πληθυσμού του εντέρου. Τα πρεβιοτικά είναι τύπος φυτικών ινών που ως σκοπό έχουν να τροφοδοτήσουν όπως προαναφέραμε τους ήδη υπάρχοντες μικροοργανισμούς του εντέρου ενώ τα προβιοτικά είναι ζωντανές καλλιέργειες μικροοργανισμών που θεωρητικά θα φτάσουν αυτούσιοι στο εντερικό μας σύστημα. Οι έρευνες βέβαια για την αποτελεσματικότητα αυτών των συμπληρωμάτων δεν είναι απόλυτες καθώς υπάρχουν μεγάλες ανακρίβειες για τον τρόπο παραγωγής τους στη βιομηχανία, τη νομοθεσία γύρω από αυτά κλπ. Τα προβιοτικά βρίσκονται επίσης φυσικά στα ζυμώμενα τρόφιμα όπως το γιαούρτι οπότε η πρόσληψή τους από τέτοιου είδους πηγές θεωρείται απαραίτητη. (Quigley, 2019)

3.2 IN VITRO ΠΕΨΗ ΩΣ ΜΕΘΟΔΟΣ ΕΚΤΙΜΗΣΗΣ ΒΙΟΔΙΑΘΕΣΙΜΟΤΗΤΑΣ

Η in vitro πέψη αποτελεί μια διαδικασία που ως σκοπό έχει να μιμηθεί τις φυσιολογικές διαδικασίες πέψης του οργανισμού σε συνθήκες εργαστηρίου. Μέσω της αναπαράστασης της πέψης εργαστηριακά, μεταξύ άλλων μπορούμε και να εκτιμήσουμε με σχετική ακρίβεια την βιοδιαθεσιμότητα των συστατικών που προσλαμβάνονται από την τροφή ή που προκύπτουν από την διάσπαση των μακρομορίων (Minekus et al., 2014). Σαν τεχνική προτιμάται και εφαρμόζεται στη πλειοψηφία των περιπτώσεων για τέτοιου είδους μελέτες, καθώς οι in-vitro έρευνες έχουν πολύ μεγαλύτερο κόστος από τις προσομοιώσεις στο εργαστήριο και εξαρτώνται κατά μεγάλο βαθμό από τον ανθρώπινο παράγοντα γεγονός που μειώνει την αξιοπιστία τους (Minekus et al., 2014). Πέρα από

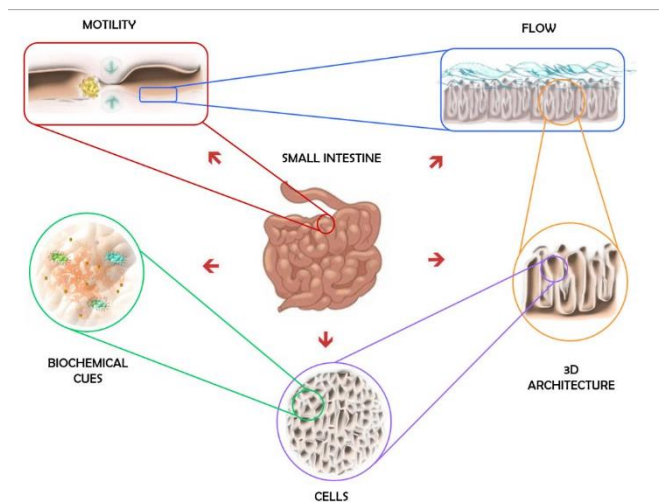
αυτό, οι in-vitro διαδικασίες μπορούν ευκολότερα να στανταροποιηθούν και να είναι επαναλήψιμες (Costa & Ahluwalia, 2019) γεγονός πολύ κρίσιμο για την βιομηχανία. Η στανταροποίηση αυτή επιτυγχάνεται μέσω μοντέλων που αναπτύσσονται και επιλέγονται ανάλογα τον σκοπό του εκάστοτε πειράματος.

Ορισμένοι από τους παράγοντες που μπορούν να διαφέρουν σε κάθε μοντέλο είναι η ποσότητα και η προέλευση των ενζύμων που χρησιμοποιούμε, τα επίπεδα pH, ο χρόνος πέψης κλπ. (Minekus et al., 2014). Μια από τις σημαντικότερες επιτεύξεις στανταροποίησης και δημιουργίας ενός καθολικού μοντέλου για την in-vitro πέψη, έκανε η εταιρεία COST Infogest προτείνοντας ένα μοντέλο σταθερών παραγόντων, υλικών και συνθηκών το οποίο έλαβε μεγάλη αναγνώριση από την επιστημονική κοινότητα και έχει αρχίσει να ακολουθείται όλο και περισσότερο. (Minekus et al., 2014) (Lucas-González, Viuda-Martos, Pérez-Alvarez, & Fernández-López, 2018). Το πρωτόκολλο αυτό ανανεώθηκε το 2019 με σκοπό να επιλύσει ορισμένους περιορισμούς που υπήρχαν στην αρχική εκδοχή (Brodkorb et al., 2019). Μάλιστα ανέπτυξαν και ένα online εργαλείο [Infogest harmonized IVD \(proteomics.ch\)](https://infogest.harmonized.IVD.proteomics.ch) που μπορεί να δώσει αναλυτικά τις ποσότητες των ενζύμων, διαλυμάτων κλπ που χρειάζονται για ένα τέτοιο πείραμα ανάλογα το τρόφιμο και τα συστατικά που θέλουμε να αναλύσουμε. .

Στην πλειοψηφία των πειραμάτων, μπορούμε να διακρίνουμε τα στάδια της μάσησης, της γαστρικής πέψης, και το εντερικό στάδιο (Lucas-González et al., 2018). Όπως προαναφέραμε τα ακριβή υλικά και οι δοσολογίες διαφέρουν αλλά συνήθως ακολουθούν αυτή τη γραμμή:

- Στάδιο μάσησης της τροφής με διάλυση του δείγματος τροφίμου και προσθήκη ενζύμου αμυλάσης το οποίο φυσιολογικά εντοπίζεται στο σάλιο.
- Στάδιο γαστρικής πέψης με προσθήκη πεπτικών ενζύμων, ανάδευση σε κατάλληλη θερμοκρασία και συνεχή ρύθμιση του pH. Η ρύθμιση της οξύτητας γίνεται με προσθήκη οξέων όπως υδροχλωρικό οξύ ή υδροξείδιο του νατρίου.
- Εντερικό στάδιο με προσθήκη κατάλληλων πεπτικών ενζύμων.
- Διαχωρισμός προϊόντων πέψης από τα υπόλοιπα προϊόντα και ανάλυση τους.

Παρά την ραγδαία εξέλιξη αυτών των στατικών μοντέλων τα τελευταία χρόνια, είναι σημαντικό να κατανοήσουμε ότι τα ανθρώπινα όργανα και ιδιαίτερα το εντερικό σύστημα αποτελούν ιδιαίτερα σύνθετους μηχανισμούς με τις διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα εκεί να είναι εξαιρετικά περίπλοκες. Γι' αυτόν ακριβώς τον λόγο η αντιγραφή της σύνθεσης και της λειτουργίας ενός οργάνου in vitro είναι σχεδόν αδύνατη. (Costa & Ahluwalia, 2019). Στο σχεδιασμό ενός τέτοιου βιομημητικού μοντέλου, φαίνεται ότι δεν αρκεί η πιστή " αντιγραφή " των βιοχημικών συνθηκών (pH, ένζυμα κλπ). Καθώς οι μηχανικές διαδικασίες και η γεωμετρία των οργάνων φαίνεται να επηρεάζουν κατά πολύ τις διεργασίες που εκτελούνται σε αυτά, οι επιστήμονες θα πρέπει να στοχεύουν και στην όσο γίνεται πιο ακριβή μίμηση της τρισδιάστατης δομής του εκάστοτε οργάνου. (Kasendra et al., 2018) Ειδικά στη περίπτωση του εντερικού συστήματος πολλές από τις διεργασίες για τις οποίες είναι υπεύθυνο, παρακινούνται από την κίνηση των διάφορων δομών που το αποτελούν. Θεωρητικά λοιπόν στη περίπτωσή μας καθώς το μεγαλύτερο ποσοστό των θρεπτικών ουσιών πέπτονται και απορροφώνται στο λεπτό έντερο, η μίμηση της τρισδιάστατης δομής του ιστού αυτού εργαστηριακά θα επέφερε την πιο ακριβή απεικόνιση της πραγματικότητας. (Kim, Huh, Hamilton, & Ingber, 2012) (Kasendra et al., 2018)



Εικόνα 10 Παράγοντες που επηρεάζουν την ακρίβεια ενός μοντέλου *in-vitro* πέψης (Costa & Ahluwalia, 2019)

3.3 IN-VITRO ΠΕΨΗ ΚΑΙ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΑ

Συχνά η *in-vitro* πέψη χρησιμοποιείται για να μελετηθεί η αντοχή ευαίσθητων κυττάρων όπως τα προβιοτικά κύτταρα στις όξινες συνθήκες του στομάχου. Έτσι μπορούμε να εκτιμήσουμε πόση απορρόφηση αυτού του συστατικού μπορούμε να αναμένουμε στο έντερο. Για το σκοπό αυτό έχουν αναπτυχθεί ειδικές τεχνικές και τεχνολογίες που στόχος τους είναι να προστατέψουν τα συστατικά που μας ενδιαφέρουν από αυτές τις συνθήκες επιτυγχάνοντας έτσι μεγαλύτερη τελική απορρόφηση. (Melchior, Marino, Innocente, Calligaris, & Nicoli, 2020)

Η μικροενθυλάκωση είναι μία από αυτές τις τεχνικές που συχνά χρησιμοποιείται για την ενσωμάτωση βιοδραστικών συστατικών σε τρόφιμα, βοηθώντας τα να παραμείνουν βιώσιμα από την στιγμή παραγωγής του τροφίμου έως και μετά την κατανάλωση και τη διαδικασία της πέψης. Μια σύγχρονη εκδοχή της μικροενθυλάκωσης είναι η *electro spraying* ενθυλάκωση, η οποία σε αντίθεση με την κλασική μέθοδο δεν κάνει χρήση υψηλής θερμοκρασίας αλλά χρησιμοποιεί σχετικά ήπιες συνθήκες (Gomez-Mascaraque, Morfin, Pérez-Masiá, Sanchez, & Lopez-Rubio, 2016).

Καθώς τα μεγαλύτερα ποσοστά κυτταρικού θανάτου παρατηρούνται κατά την γαστρική πέψη εξαιτίας του πολύ χαμηλού pH, η έξτρα δομή γύρω από τα βακτηριακά κύτταρα λόγω της μικροενθυλάκωσης προστατεύει κατά ένα βαθμό τα κύτταρα επιφέροντας μικρότερα ποσοστά θανάτου σε αυτό το στάδιο αλλά δεν έχει παρατηρηθεί ακόμα κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά στα άλλα στάδια. (Gomez-Mascaraque et al., 2016)

Όσον αφορά την επιλογή των κυττάρων για μια τέτοια μελέτη, η χρήση ζωντανών καλλιιεργειών φαίνεται να προτιμάται και να είναι πιο αποτελεσματική από τη χρήση άλλων μορφών κυττάρων όπως π.χ λυοφιλιωμένα κύτταρα. Επιπλέον η προσθήκη πρεβιοτικών ή κάποιων επιφανειοδραστικών ουσιών ευνοεί σε συγκεκριμένες περιπτώσεις τη διαδικασία. (Zhang et al., 2020) Γενικότερα μπορούμε να πούμε ότι είναι μια μέθοδος που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στη παραγωγή λειτουργικών τροφίμων για προστασία βιοδραστικών συστατικών. (Gomez-Mascaraque et al., 2016)(Succi et al., 2017)

β. Πειραματικό Μέρος

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΤΟΧΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΚΑΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

4.1 ΣΚΟΠΟΣ ΈΡΕΥΝΑΣ

Στόχος της μελέτης ήταν αρχικά να συγκρίνουμε τα ολικά φαινολικά και την ολική αντιοξειδωτική δράση ορισμένων εκχυλισμάτων βοτάνων και άγριων χόρτων του Β.Αιγαίου, για τα οποία εντοπίσαμε μέσω ανασκόπησης βιβλιογραφίας ότι υπήρχε ερευνητικό ενδιαφέρον και προοπτικές όσον αφορά τα συγκεκριμένα βιοδραστικά συστατικά. Στη συνέχεια θελήσαμε να ερευνήσουμε το κατά πόσο είναι εφικτό, τα εκχυλίσματα με την υψηλότερη απόδοση στις βιοχημικές δοκιμές, να ενσωματωθούν σε ένα καινοτόμο, λειτουργικό τρόφιμο (αλειφόμενο τυρί) το οποίο θα γινόταν αποδεκτό από τους καταναλωτές και θα αποτελούσε καθημερινή πηγή αυτών των βιοενεργών συστατικών. Τελικώς θέλαμε να αξιολογήσουμε, μέσω μίμησης της διαδικασίας της πέψης, τη βιοδιαθεσιμότητα των φαινολικών και των αντιοξειδωτικών του τελικού τροφίμου, δηλαδή την ποσότητα των συστατικών που επιζεί της πέψης και μπορεί να απορροφηθεί από τον οργανισμό επωφελώντας τον με τις ανάλογες ευεργετικές ιδιότητες.

4.2 ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ

4.2.1 Επιλογή βοτάνων και χόρτων

Για την *in vitro* ανάλυση και καταμέτρηση των αντιοξειδωτικών και των φαινολικών ενώσεων, δημιουργήθηκαν υδατικά εκχυλίσματα από 3 βότανα (τσάι του βουνού, φασκόμηλο, σπαθόχορτο) και 2 άγρια χόρτα (κρίταμος, σαλικόρνια) αποκλειστικά προέλευσης Λήμνου.

Συγκεκριμένα :

Πίνακας 1: Προέλευση Επιλεγμένων Βοτάνων

Δείγμα	Προέλευση	Τοποθεσία
Κρίταμος	*Συλλέχθηκε	Μούδρος, Λήμνος
Σαλικόρνια	*Συλλέχθηκε	Χορταρόλιμνη, Λήμνος
Σπαθόχορτο	*Εμπορίου	Aegean Organics, Λήμνος
Τσάι του Βουνού	*Εμπορίου	Aegean Organics, Λήμνος
Φασκόμηλο	*Εμπορίου	Aegean Organics, Λήμνος

Τα τρία βότανα βρισκόντουσαν ήδη σε αποξηραμένη μορφή, το οποίο ήταν και το επιθυμητό για τη δημιουργία των εκχυλισμάτων μας. Τα άγρια χόρτα ωστόσο ήταν σε χλωρή μορφή γι 'αυτό και ακολουθήθηκε διαδικασία ξήρανσης, πριν την χρήση τους στα εκχυλίσματα.

Συγκεκριμένα, ο κρίταμος και η σαλικόρνια αποξηράθηκαν σε εργαστηριακό φούρνο για 5 ημέρες στους 60 βαθμούς έως ότου να απομακρυνθεί το μεγαλύτερο μέρος της υγρασίας τους και να μπορούν έτσι να είναι συγκρίσιμα με τα αποξηραμένα βότανα. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η σαλικόρνια παρουσιάζει περίπου 82% υγρασίας ενώ ο κρίταμος εμπεριέχει 86% υγρασία, γεγονός που επιβεβαιώθηκε από την ζύγιση του χλωρού και του ξηρού δείγματος.



Εικόνα 11: Αποξηραμένα Δείγματα Για Δημιουργία Εκχυλισμάτων

Κατά τη διαδικασία της εκχύλισης χρειάστηκαν τα ακόλουθα υλικά και ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα:

4.2.2 Υλικά και Συσκευές

- 2 g αποξηραμένα βότανα και άγρια χόρτα (Κρίταμος, Σαλικόρνια, Τσάι του Βουνού, Σπαθόχορτο, Φασκόμηλο)
- Απεσταγμένο νερό
- Ζυγός (μη ακριβείας)
- Μεγάλες φιάλες Duran
- Ποτήρια ζέσεως
- Διηθητικό χαρτί
- Χωνί γυάλινο
- Ογκομετρικός κύλινδρος
- Υδατόλουτρο Υπερήχων

4.2.3 Βήματα Διαδικασίας

1. Σε ζυγό μη ακριβείας ζυγίστηκαν 2g από το κάθε αποξηραμένο βότανο / άγριο χόρτο.
2. Το κάθε δείγμα τοποθετήθηκε σε φιάλη Durham μαζί με 100ml dH₂O (μετρήθηκαν με ογκομετρικό κύλινδρο).
3. Όλες οι φιάλες τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο υπερήχων για 1h στους 70oC, σε ρύθμιση pulse 80/40 Hz.
4. Πραγματοποιήθηκε διήθηση των δειγμάτων με χρήση διηθητικού χαρτιού.

5. Τα υδατικά διαλύματα αποθηκεύτηκαν υπο ψύξη σε φιάλες Durham μέχρι το επόμενο στάδιο.



Εικόνα 12: Φιάλες Durham Με Υδατικά Εκχυλίσματα

Στο πρώτο στάδιο της μελέτης και μετά τη δημιουργία των εκχυλισμάτων, πραγματοποιήθηκε ενδεικτική μέτρηση με διάφορες αραιώσεις όλων των δειγμάτων ώστε να εντοπιστεί η κατάλληλη προς χρήση συγκέντρωση των διαλυμάτων για κάθε δείγμα και για κάθε μέθοδο.

Συγκεκριμένα παρασκευάστηκαν αραιώσεις (με προσθήκη H₂O) 1/2, 1/5, 1/10, 1/20, 1/50 για κάθε ένα από τα 5 δείγματα με συνολικό όγκο της κάθε αραιώσης να είναι 5 ml σε δοκιμαστικό σωλήνα. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε Vortex σε όλους τους σωλήνες και εκτελέστηκαν μετρήσεις για τις μεθόδους FRAP και FOLIN σύμφωνα με τα πρωτόκολλα που αναλύονται στις ενότητες 5.2 και 5.3.

Στόχος ήταν να καταλήξουμε στις αραιώσεις οι οποίες στο φασματοφωτόμετρο έδειχναν σταθερά τιμές <1. Αυτό γιατί σε τιμές απορρόφησης σε φασματοφωτόμετρο >1, δεν έχουμε τόσο ακριβείς μετρήσεις λόγω της φύσης της μεθόδου. Σε περίπτωση που πολλαπλές αραιώσεις ενός δείγματος έδιναν αυτές τις τιμές, κρατήθηκε η μικρότερη αραιώση.

Εν τέλη καταλήξαμε στις εξής αραιώσεις τις οποίες εφαρμόσαμε σε όλες τις πειραματικές επαναλήψεις :

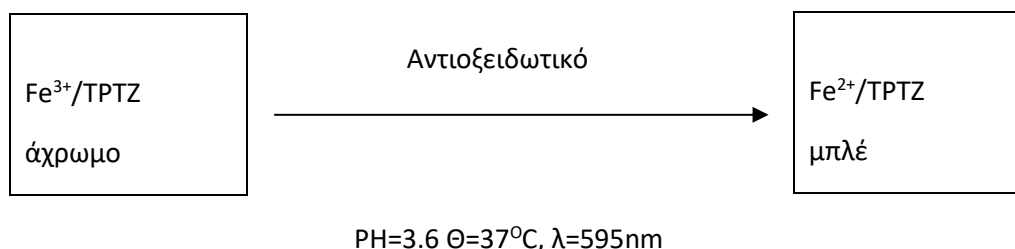
Πίνακας 2: Τελικές Αραιώσεις Εκχυλισμάτων

Δείγμα	Αποδεκτές αραιώσεις FRAP	Αποδεκτές αραιώσεις FOLIN
Κρίταμος	Χωρίς Αραίωση	Χωρίς Αραίωση
Σαλικόρνια	Χωρίς Αραίωση	Χωρίς Αραίωση
Τσάι του Βουνού	1/10	1/5
Σπαθόχορτο	1/10	1/5
Φασκόμηλο	1/10	1/5

4.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ FRAP (FERRIC REDUCING ANTIOXIDANT POWER)

4.3.1 Αρχή Μεθόδου

Η αντιοξειδωτική ικανότητα των δειγμάτων καθορίζεται από την ικανότητα αναγωγής του συμπλόκου σιδήρου (Fe^{3+})-τριπυριδυλτριαζίνης (TPTZ 2,4,6-Trif2-pirydil)-s-triazine, Fluka, Buchs, Switzerland). Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην μετατροπή του άχρωμου συμπλόκου στην χρωματισμένη μορφή ενώσεως δισθενούς σιδήρου παρουσία αντιοξειδωτικών ουσιών. Σε σχηματική παρουσία η αρχή της μεθόδου έχει ως εξής:



4.3.2 Πρότυπη καμπύλη

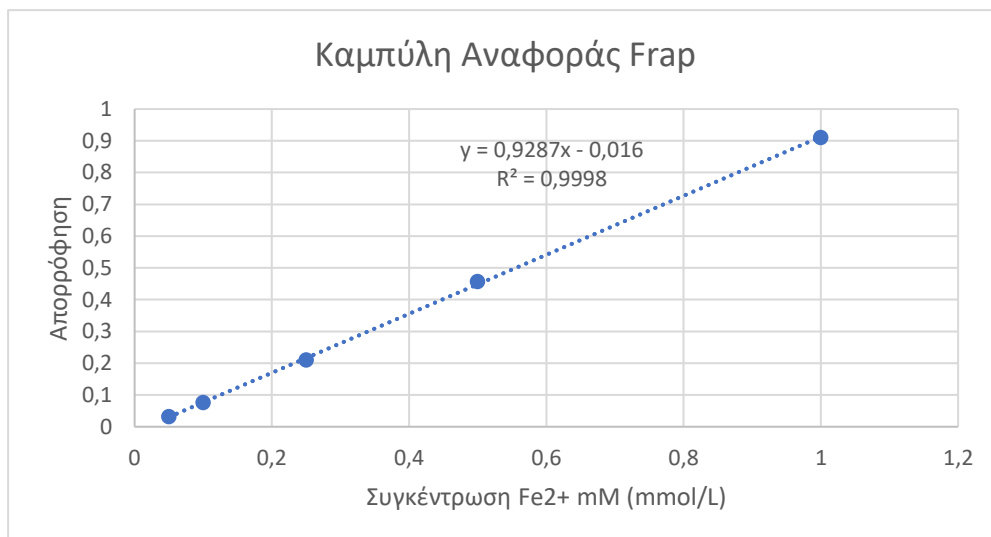
Για την ποσοτικοποίηση των απορροφήσεων των δειγμάτων που μετριοούνται με το φασματοφωτόμετρο, κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Για αυτό μετρήθηκαν οι απορρόφησης διαλυμάτων FeSO_4 διαφόρων συγκεντρώσεων (από 100 έως 1000 μM) 30 λεπτά μετά την προσθήκη αντιδραστήριου FRAP (400 μl από το κάθε διάλυμα συν 1600 μl FRAP). Από την καμπύλη αυτή, μέσω αντικατάστασης όπου Y το ΔA και επίλυσης ως προς X και έπειτα από τις κατάλληλες αναγωγές, εκφράζεται ποσοτικά η αντιοξειδωτική ικανότητα ως $\mu\text{mol FeSO}_4/\text{ml}$ ή $\mu\text{mol Fe}^{+2}$.

- Πρότυπο: Προετοιμάστηκε πρότυπο διάλυμα $\text{FeSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 10 mM διαλύοντας 0.278 g FeSO_4 σε 100mL H_2O

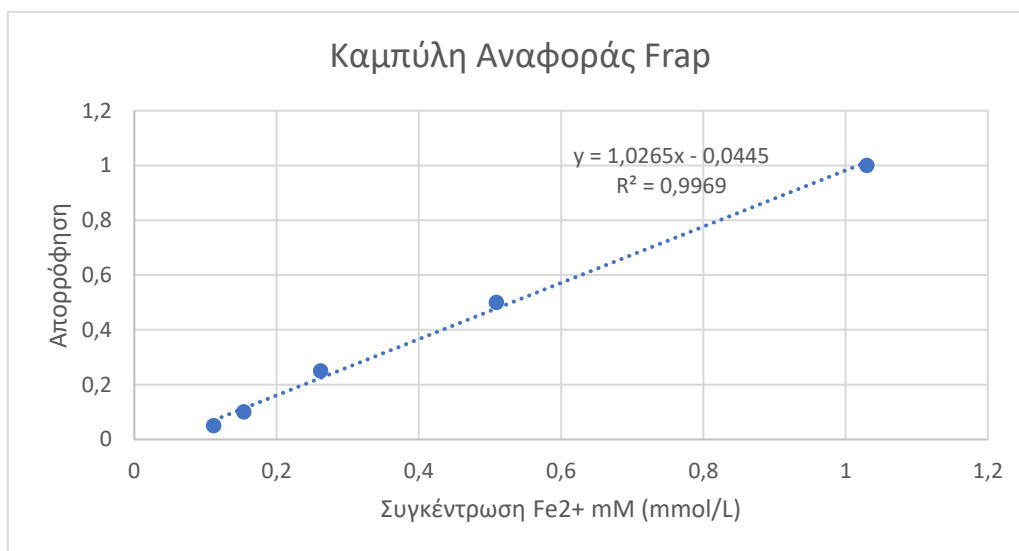
Έγιναν αραιώσεις και παρασκευάστηκαν τα εξής διαλύματα: 0,05, 0.1, 0.25, 0.5, 1 mM

	0,05 mM Fe^{+2}	0,1 mM Fe^{+2}	0,25 mM Fe^{+2}	0,5 mM Fe^{+2}	1 mM Fe^{+2}
H ₂ O	1990 μL	1980 μL	1850 μL	1900 μL	1800 μL
Stock 10mM	10 μL	20 μL	50 μL	100 μL	200 μL
Συνολικό	2000 μL	2000 μL	2000 μL	2000 μL	2000 μL

Η διαδικασία δημιουργίας πρότυπης καμπύλης πραγματοποιήθηκε δύο φορές καθώς οι πειραματικές διαδικασίες για τα εκχυλίσματα και για το τρόφιμο πραγματοποιήθηκαν με διαφορά μηνών. Οι πρότυπες καμπύλες και κατ' επέκταση οι εξισώσεις υπολογισμού για τον πρώτο και τον δεύτερο κύκλο πειραμάτων διαμορφώθηκαν ως εξής :



Fe ²⁺ mM	A
0,05	0,031564
0,1	0,075773
0,25	0,210427
0,5	0,456627
1	0,909973

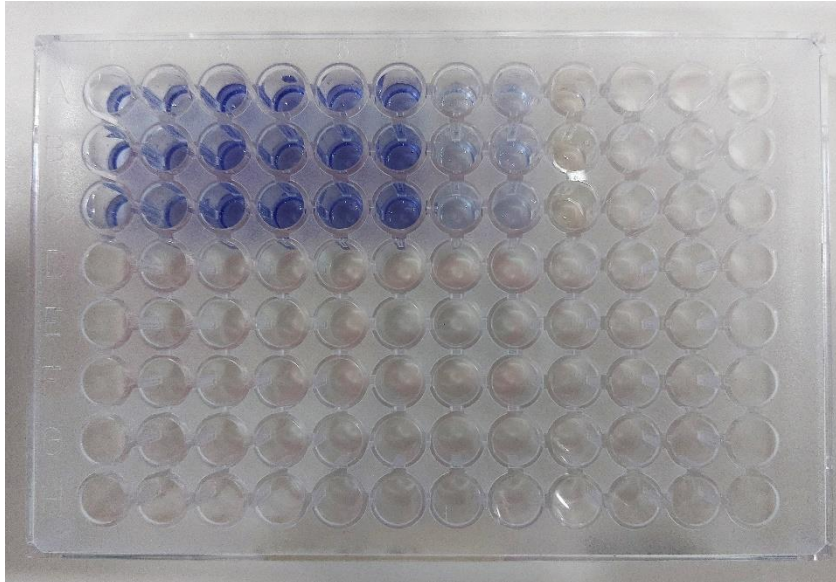


Fe ²⁺ mM	A
0,111657	0,05
0,154227	0,1
0,26223	0,25
0,50938	0,5
1,03	1

4.3.3 Προσδιορισμός Αντιοξειδωτικών – Βήματα Διαδικασίας

1. Παρασκευάστηκε διάλυμα 10mM TPTZ: Διαλύθηκαν 0.0234g TPTZ σε 7,5 ml διαλύματος 40 mM HCL. Αυτό το διάλυμα πρέπει να φυλάσσεται στο ψυγείο και σε σκοτεινό μέρος.
2. Παρασκευάστηκε διάλυμα FeCl₃ 20mM: Διαλύθηκαν 1.3525 gr σε απεσταγμένο νερό ώστε ο τελικός όγκος να είναι 250ml. Εναλλακτικά διαλύθηκαν 0,2705 g FeCl₃ σε απεσταγμένο νερό ώστε ο τελικός όγκος να είναι 50 ml.
3. Παρασκευάστηκε stock Ρυθμιστικό διάλυμα 0.3 M με pH=3,6: Αναμείχθηκαν 0,775 g οξικού νατρίου, 4ml οξικού οξέος και έγινε συμπλήρωση με νερό, ώστε να παραχθούν 350ml ρυθμιστικού διαλύματος. Ο έλεγχος του pH έγινε με πεχάμετρο. Το διάλυμα μπορεί να διατηρηθεί για αρκετές ημέρες εκτός ψυγείου.
4. Παρασκευάστηκε αντιδραστήριο FRAP: Αναμείχθηκαν 25ml του ρυθμιστικού διαλύματος, 2.5ml του διαλύματος TPTZ και 2.5ml του διαλύματος FeCl₃. Διατηρείται μόνο για 1 ημέρα σε 37°C.

5. Για τη μέτρηση προστέθηκαν σε κάθε πηγαδάκι του 96-well, 20μL του εκάστοτε δείγματος και 80 μL του αντιδραστηρίου FRAP.
6. Το 96-well αφέθηκε σκεπασμένο στο σκοτάδι για 30min προκειμένου να δράσει το αντιδραστήριο.
7. Πραγματοποιήθηκε μέτρηση στο φασματοφωτόμετρο σε Absorbance 595nm.



Εικόνα 13: Διεξαγωγή Δοκιμής FRAP Σε 96-Well

4.4

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ FOLIN-CLOCALTEU

4.4.1 Αρχή Μεθόδου

Τα ολικά φαινολικά συστατικά που περιέχονται στα εκχυλίσματα προσδιορίζονται με τη βοήθεια φασματοφωτόμετρου υπεριώδους-ορατού (UV-vis) διπλής δέσμης, με τη μέθοδο Folin-Cicalteau και μέτρηση απορρόφησης στα 765nm. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην αναγωγή (οξείδωση φαινολικών συστατικών δείγματος) διαλύματος φωσφορομολυβδενικού και φωσφοροβολφραμικού οξέος (Folin-Cicalteau reagent) με τις ακόλουθες δομές:

$3H_2O, P_2O_5, 13WO_3, 5MoO_3, 10 H_2O$ και $3H_2O, P_2O_5, 14WO_3, 4MoO_3, 10 H_2O$ σε φωσφορομολυβδενικό/ φωσφοροβολφραμικό-φαινολικό σύμπλοκο, μπλε χρώματος και σε αλκαλικό περιβάλλον.

Phenolics + alkaline + FC reagent → blue colored product, Abs 765 nm

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των ολικών φαινολών γίνεται με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης γαλλικού οξέος, ενώ η ταυτοποίηση της κάθε φαινόλης χωριστά δεν είναι δυνατή. Οι συγκεντρώσεις των ολικών φαινολικών στα εκχυλίσματα οι οποίες έχουν προσδιοριστεί βάση της Folin-Cicalteau δεν αποτελούν απόλυτες τιμές των ποσοτήτων των φαινολών στο εκχύλισμα αλλά στα πραγματικότητα βασίζονται στην αναγωγική τους ικανότητα αναφορικά ισοδύναμη με την αναγωγική τους ικανότητα του γαλλικού οξέος.

4.4.2 Υλικά και Συσκευές

- Φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμευσης ορατού/ υπεριώδους φωτός (Jasco V. 530)
- Κυψελίδες χαλαζία
- Αναλυτικός ζυγός
- Vortex
- Χαρτιά ζυγίσματος και σπάτουλα
- 5 ογκομετρικές φιάλες των 10mL (για παρασκευή πρότυπου διαλύματος γαλλικού οξέος σε διαφορετικές συγκεντρώσεις)
- 1 ογκομετρική φιάλη των 25mL (για παρασκευή πρότυπου μητρικού διαλύματος γαλλικού οξέος)
- 6 δοκιμαστικούς σωλήνες με στατό
- Μηχανική πιπέττα μεταβλητού όγκου 100-1000μL με μπλε ρύγχος
- 2 σιφώνια του 1mL και 2 σιφώνια των 10mL
- Πιπέτες μιας χρήσεως

4.4.3 Κατασκευή Πρότυπης Καμπύλης

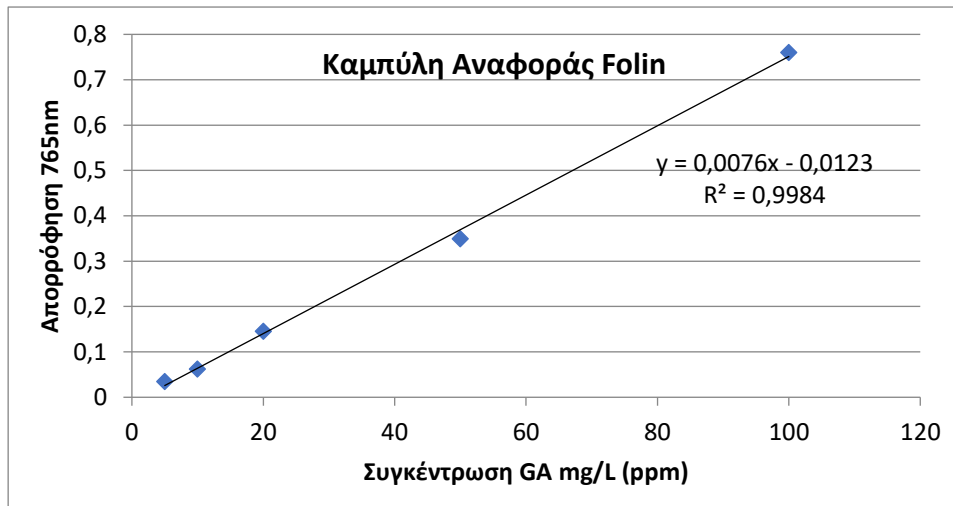
Παρασκευάστηκαν διαλύματα γαλλικού οξέος συγκεντρώσεων από 5ppm έως 100ppm (συνηθισμένες συγκεντρώσεις φαινολικών συστατικών στα φυτά) ως εξής:

1. Παρασκευάστηκε πρότυπο μητρικό διάλυμα γαλλικού οξέος 500ppm: Πραγματοποιήθηκε με διάλυση 50mg (0.05g) γαλλικού οξέος σε ογκομετρική φιάλη των 100mL και συμπλήρωση με απιονισμένο νερό. Το συγκεκριμένο διάλυμα παραμένει σταθερό για λίγες μέρες στους 4° C.
2. Σε υάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες μεταφέρθηκαν με χρήση μηχανικής πιπέττας:

	5 ppm GA	10 ppm GA	20 ppm GA	50 ppm GA	100ppm GA
H2O	1980 μL	1960 μL	1920 μL	1800 μL	1600 μL
Stock 5000ppm	20 μL	40 μL	60 μL	200 μL	400 μL
Συνολικό	2000 μL	2000 μL	2000 μL	2000 μL	2000 μL

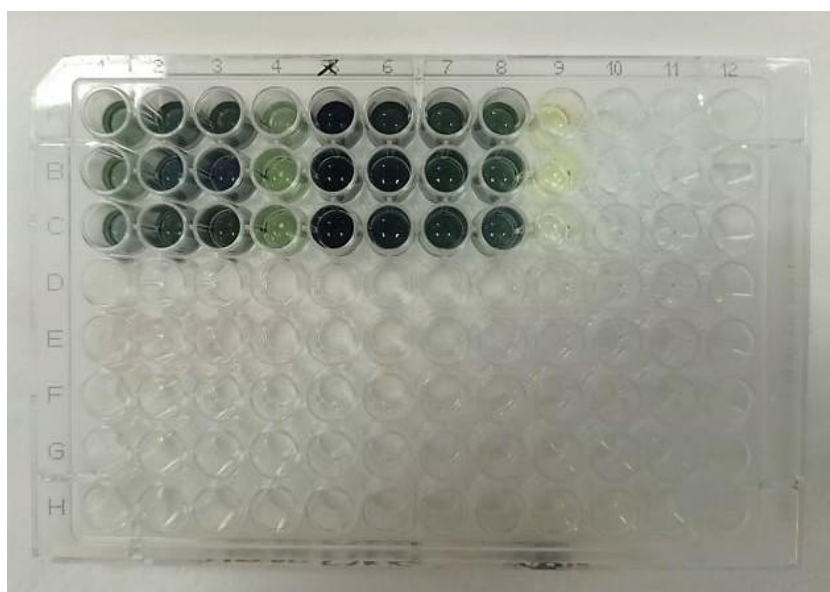
Με βάση τις παραπάνω συγκεντρώσεις και τις απορροφήσεις τους κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη του Γαλλικού οξέος ($A=f(C)$).

ppm GA	A
5	0,034366
10	0,062044
20	0,145174
50	0,349448
100	0,760108



4.4.4 Μέτρηση ολικών φαινολικών δειγμάτων – Βήματα Διαδικασίας

1. Παρασκευάστηκαν 7,5% υδατικού διαλύματος ανθρακικού νατρίου Na_2CO_3 (σταθερό για αρκετές ημέρες): $7,5\text{g Na}_2\text{CO}_3 + 100\text{ml H}_2\text{O}$
2. Το αντιδραστήριο **Folin-Ciocalteu** διατηρείται υπο ψύξη
3. Για τη μέτρηση των φαινολικών των δειγμάτων προστέθηκαν σε κάθε πηγαδάκι του 96-well : 20μL διαλύματος Na_2CO_3 , 20μL αντιδραστηρίου Folin και 50μL από το εκάστοτε δείγμα.
4. Το 96-well παρέμεινε σκεπασμένο στο σκοτάδι για 30min ώστε να δράσουν τα αντιδραστήρια.
5. Πραγματοποιήθηκε μέτρηση στο φασματοφωτόμετρο σε Absorbance 765 nm
6. Ως δείγμα αναφοράς για το μηδενισμό του φασματοφωτόμετρου χρησιμοποιήθηκε απιονισμένο νερό.



Εικόνα 14: Διεξαγωγή Δοκιμής Folin σε 96-Well

4.4.5 Έκφραση Αποτελεσμάτων

Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε **mg γαλλικού οξέος ανά g ξηρού δείγματος**. Η σχέση που χρησιμοποιείται για την έκφραση των εξής:

$$C = c * V / m$$

Όπου: C= η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών σε mg γαλλικού οξέος /g ξηρού δείγματος

c= συγκέντρωση των ολικών φαινολικών του δείγματος σε mg γαλλικού οξέος ανά L (ppm), βάση πρότυπης καμπύλης

V= ο όγκος του εκχυλίσματος σε L (0.1L στη συγκεκριμένη περίπτωση)

M= το βάρος του δείγματος σε g (2g στη συγκεκριμένη περίπτωση)

4.5 ΕΝΣΩΜΑΤΩΣΗ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΣΕ ΚΑΙΝΟΤΟΜΟ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟ ΤΡΟΦΙΜΟ

4.5.1 Επιλογή Εκχυλισμάτων

Κατά τη διάρκεια των δοκιμών για να καταλήξουμε στην τελική συνταγή του τροφίμου για την οργανοληπτική δοκιμή δοκιμάστηκαν διαφορετικοί συνδυασμοί και αναλογίες των εκχυλισμάτων των άγριων χόρτων και των βοτάνων. Βασιζόμενοι στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των εκχυλισμάτων όπως το άρωμα και η γεύση αλλά και στα αποτελέσματα των αναλύσεων in vitro καταλήξαμε στο σπαθόχορτο, το τσάι του βουνού και τον κρίταμο. Ωστόσο ο κρίταμος απορρίφθηκε κατά την πορεία των δοκιμών καθώς δεν είχε τα αναμενόμενα αποτελέσματα. Συγκεκριμένα, ο κρίταμος σε περιεκτικότητα 20% v/w παρουσίαζε ελάχιστο άρωμα και ελαφριά γεύση χορταρικών που δεν ήταν επιθυμητή.

Αρχικός μας στόχος ήταν να συμπεριληφθούν στο τρόφιμο τουλάχιστον ένα εκχύλισμα βοτάνου και ένα εκχύλισμα άγριου χόρτου. Ωστόσο, τα άγρια χόρτα δεν είχαν τα επιθυμητά αποτελέσματα ούτε στις δοκιμές in vitro ούτε οργανοληπτικά και έτσι απορρίφθηκαν.

Καταλήξαμε λοιπόν στην επιλογή εκχυλισμάτων από σπαθόχορτο και τσάι του βουνού. Όπως αναφέρεται και αναλυτικά στην ενότητα των αποτελεσμάτων, το σπαθόχορτο είχε την καλύτερη απόδοση στις δοκιμές in vitro, καθώς εμφάνισε τη μεγαλύτερη συγκέντρωση ολικών φαινολικών και αντιοξειδωτικών ακολουθούμενο από το τσάι του βουνού. Το σπαθόχορτο είχε επίσης έντονο άρωμα που θεωρήσαμε ότι θα αναδείκνυε ευχάριστα τη γεύση της κρέμας τυριού. Επίσης το τσάι του βουνού είχε το εντονότερο άρωμα και γεύση που μάλιστα είναι και ιδιαίτερα οικείο στους καταναλωτές. Επομένως καταλήξαμε στην εξής συνταγή :

4.5.2 Υλικά και Συσκευές

- Αποξηραμένα βότανα (σπαθόχορτο, τσάι του βουνού)
- Κρέμα τυρί Philadelphia (πλήρη λιπαρά)
- Γυάλινα βάζα τροφίμων
- Χάρτινα φίλτρα διήθησης
- Σκευή αποθήκευσης μίας χρήσης
- Εμφιαλωμένο νερό
- Βραστήρας
- Αναδευτήρας γυάλινος
- Σύριγγες των 5 ml



4.5.3 Τελική Συνταγή - Βήματα Διαδικασίας

1. Πραγματοποιήθηκε εκχύλιση των βοτάνων και προετοιμασία των εκχυλισμάτων σύμφωνα με τη μέθοδο που αναλύθηκε στην ενότητα 5.1, χρησιμοποιώντας ωστόσο εμφιαλωμένο νερό αφού το δείγμα προοριζόταν για χρήση σε τρόφιμο.
2. 20 gr πλήρες κρέμα τυρί Philadelphia ζυγίστηκαν σε ζυγό μη ακριβείας (x 4 δείγματα)
3. Ανάλογη ποσότητα του κάθε εκχυλίσματος προστέθηκε σε κάθε δείγμα σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 3: Στάδια Και Παρατηρήσεις Για Τελική Συνταγή Λειτουργικού Τροφίμου

Δείγματα οργανοληπτικής δοκιμής	% Περιεκτικότητα Εκχυλίσματος	Τύπος Εκχυλίσματος	Σχόλια
<u>Κρέμα τυρί - Control</u>	-	-	Ως control χρησιμοποιήθηκε κρέμα τυρί Philadelphia χωρίς καμία προσθήκη ή επέμβαση.
<u>Κρέμα τυρί - Σπαθόχορτο</u>	35% v/w εκχύλισμα σπαθόχορτου	Υδατικό εκχύλισμα αποξηραμένου σπαθόχορτου με χρήση εμφιαλωμένου νερού.	Σε συγκεντρώσεις έως 30% v/w το άρωμα και η γεύση του σπαθόχορτου δεν ήταν αρκετά διακριτή, αλλά η υφή του τυριού ήταν πυκνότερη. Στη συγκέντρωση που επιλέχθηκε είχαμε έντονη γεύση σπαθόχορτου, υφή αντίστοιχη γιαουρτιού και ανοιχτό καφέ/κρεμ χρώμα.
<u>Κρέμα τυρί - Τσάι του Βουνού</u>	35% v/w εκχύλισμα από τσάι βουνού	Υδατικό εκχύλισμα από αποξηραμένο τσάι του βουνού με χρήση εμφιαλωμένου νερού.	Ακόμα και στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις 25-30% v/w η γεύση από το τσάι ήταν διακριτή εξαιτίας της έντασής της. Προκειμένου όμως να επιτευχθεί η υψηλότερη δυνατή περιεκτικότητα σε αντιοξειδωτικά και φαινολικά, επιλέχθηκε η συγκέντρωση 35% v/w στην οποία είχαμε μια πιο

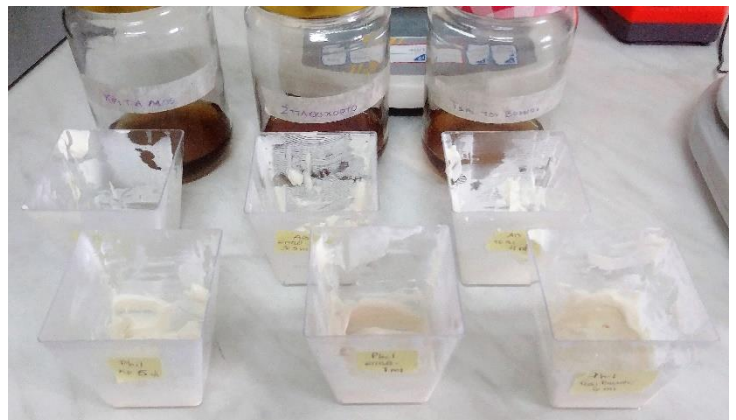
			υδαρή υφή (γιαουρτιού), έντονη γεύση του τσαγιού και ελαφρύ κρεμ χρώμα.
<u>Κρέμα τυρί - Mix</u>	25% v/w εκχύλισμα σπαθόχορτου 10% v/w εκχύλισμα από τσάι βουνού	Συνδυασμός των υδατικών εκχυλισμάτων από σπαθόχορτο και τσάι του βουνού.	Το άρωμα και η γεύση από το τσάι του βουνού ήταν πυκνότερο απ' όλα τα εκχυλίσματα. Έτσι προκειμένου να εξισορροπηθεί με το σπαθόχορτο χρησιμοποιήθηκε μικρότερη συγκέντρωση τσαγιού και μεγαλύτερη συγκέντρωση σπαθόχορτου. Σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις τσαγιού που δοκιμάστηκαν, το σπαθόχορτο έπαβε να είναι διακριτό. Στην επιλαχούσα συγκέντρωση είχαμε πλήρη εξισορρόπηση των δύο γεύσεων, υφή γιαουρτιού και ανοιχτό ροζ/μπεζ χρώμα.

* Οι ποσότητες στο συγκεκριμένο πρωτόκολλο αφορούν τα δείγματα που παρασκευάστηκαν κατά τις δοκιμές συνταγής. Πριν από την τελική οργανοληπτική δοκιμή τα δείγματα παρασκευάστηκαν σε μεγαλύτερες παρτίδες ακολουθώντας τις περιεκτικότητες εκχυλισμάτων του παραπάνω πίνακα και έπειτα χωρίστηκαν σε δείγματα για τους δοκιμαστές.

* Τα σχόλια του ανωτέρω πίνακα, αφορούν τις παρατηρήσεις που έγιναν κατά τη διάρκεια των δοκιμών, οι οποίες μας βοήθησαν να καταλήξουμε στην κατάλληλη συνταγή για το λειτουργικό αλειφόμενο τυρί. Στόχος μας ήταν να επιτύχουμε μια ευχάριστη εμπειρία για τον καταναλωτή, δίνοντας έμφαση στο να αναδείξουμε τη γεύση και τα αρώματα του τυριού διατηρώντας παράλληλα όσο το δυνατόν περισσότερο τη πρωτότυπη υφή του.



Εικόνα 15: Δοκιμές Συνταγής Λειτουργικού Τροφίμου



Εικόνα 16: Δοκιμές Συνταγής Λειτουργικού Τροφίμου

4.6 ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΥ ΤΡΟΦΙΜΟΥ

Για την οργανοληπτική αξιολόγηση των δειγμάτων του ενισχυμένου με υδατικά εκχυλίσματα spread που κατασκευάσαμε, διοργανώθηκε οργανοληπτική δοκιμή. Αυτή έλαβε χώρα στη Μονάδα Διατροφής του τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Πανεπιστημίου Αιγαίου στη Λήμνο και συμμετείχαν 25 άτομα, εκ των οποίων οι περισσότεροι ήταν φοιτητές του τμήματος. Για την πραγματοποίησή της, λήφθηκε έγκριση από την επιτροπή Βιοηθικής του Πανεπιστημίου. Καθώς η δοκιμή διοργανώθηκε και εκτελέστηκε εν μέσω πανδημίας, οι δυνατότητες για μεγάλο αριθμό δοκιμαστών ποικίλων δημογραφικών υπόβαθρων, ήταν περιορισμένες. Γι' αυτό ακριβώς τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης δοκιμής μας δίνουν μια ενδεικτική εικόνα για τις προτιμήσεις των καταναλωτών αλλά όχι καθοριστικά αποτελέσματα.

Οι συμμετέχοντες πραγματοποίησαν την έρευνα σε ομάδες των 3 ατόμων, χωρίς οπτική επαφή ή επικοινωνία μεταξύ τους, δοκιμάζοντας τα δείγματα σε τυχαία σειρά και χωρίς διακριτικό ονομασίας. Αυτό ήταν σημαντικό ώστε να διασφαλιστεί η αμερόληπτη βαθμολόγησή τους. Κατά τη διάρκεια της δοκιμής, οι συμμετέχοντες τέθηκαν να αξιολογήσουν τη γεύση, την υφή, το άρωμα, το χρώμα, και την συνολική εντύπωση 4 δειγμάτων λειτουργικών αλειφόμενων τυριών που είχαμε παρασκευάσει. Η κλίμακα με βάση την οποία βαθμολόγησαν οι δοκιμαστές ήταν από το 1-5 με την εξής σήμανση:

- 1 = Δε μου άρεσε καθόλου
- 2 = Δε μου άρεσε αρκετά
- 3 = Ούτε μου άρεσε ούτε δε μου άρεσε
- 4 = Μου άρεσε λίγο
- 5 = Μου άρεσε πολύ



Εικόνα 17: Διάταξη Δοκιμασίας Στην Οργανοληπτική Δοκιμή

4.7 IN-VITRO ΠΕΨΗ ΕΝΙΣΧΥΜΕΝΟΥ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΥ ΤΡΟΦΙΜΟΥ

4.7.1 Υλικά και Συσκευές

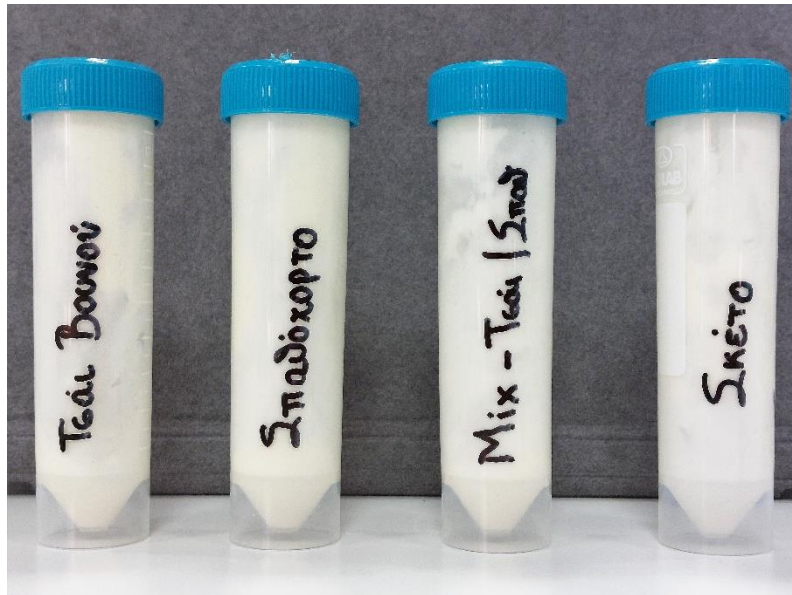
- Εκχυλίσματα βοτάνων (τσάι του βουνού, σπαθόχορτο)
- Τυρί κρέμα Philadelphia
- Πεχάμετρο
- 4 Μεγάλα Eppendorf
- Ζυγός ακριβείας
- Πιπέτες 200, 1000 μL
- Πουάρ
- Ποτήρια Ζέσεως
- Συσκευή Vortex
- Επωαστήρας
- 6-well plates
- Μεμβράνες πέψης
- Κυλινδρικά Ένθετα (ring)
- Λαστιχάκια
- Απιονισμένο νερό



Εικόνα 18: Φιάλες Durhan με εκχυλίσματα σπαθόχορτου και τσάι του βουνού

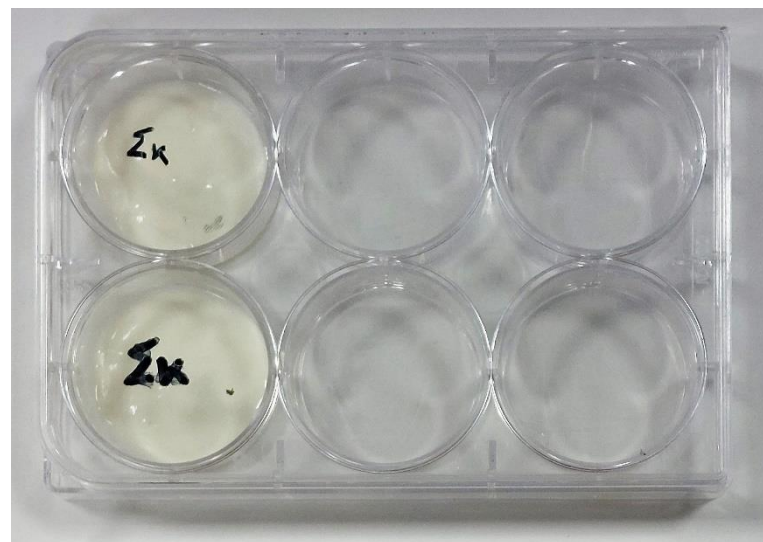
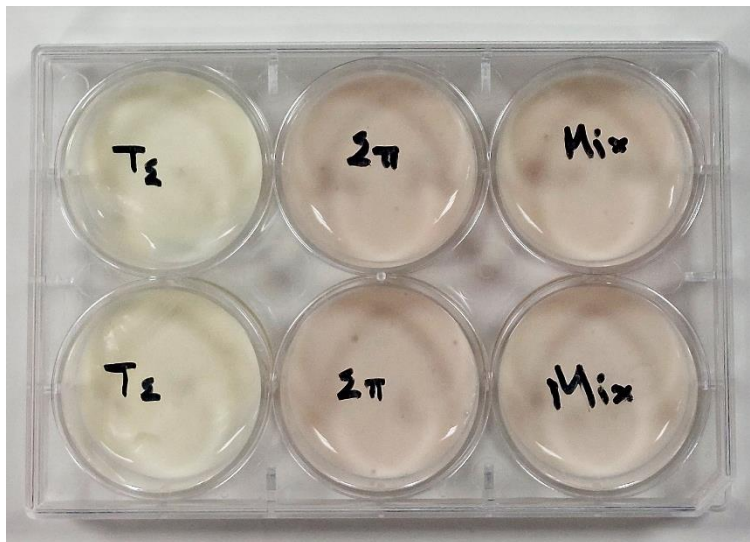
4.7.2 Βήματα Διαδικασίας

1. Παρασκευάστηκαν τα εκχυλίσματα των βοτάνων με τη μέθοδο που αναλύθηκε στην ενότητα 5.1. Τα εκχυλίσματα δεν αραιώθηκαν.
2. Παρασκευάστηκαν τα δείγματα του αλειφόμενου τυριού σύμφωνα με τις ποσοστιαίες περιεκτικότητες που ορίστηκαν στη συνταγή : Ζυγίστηκαν 7,41 gr τυρί κρέμα σε καθένα από 4 μεγάλα Eppendorf στο ζυγό ακριβείας. Εκεί προστέθηκαν 2,953ml νερό εμφιαλωμένο (με χρήση πιπέτας) και 3,5ml εκχύλισμα (χρήση πουάρ). Έγινε ανάδευση στο vortex.
3. Πραγματοποιήθηκε ρύθμιση pH των δειγμάτων: Μικρή ποσότητα **πυκνού** υδροχλωρίου HCl μεταφέρθηκε σε ποτήρι ζέσεως και προστέθηκαν σταγόνες αυτού σε κάθε δείγμα, με παράλληλη μέτρηση με το πεχάμετρο έως ότου η τιμή pH όλων των δειγμάτων να είναι όσο το δυνατό πιο κοντά στο 2.6.



Εικόνα 19: Προετοιμασία Δειγμάτων Λειτουργικού Τροφίμου για In-Vitro Πέψη

4. Παρασκευάστηκε η πεψίνη ως εξής : 0.2 gr πεψίνης σε 5ml δ/τος HCL 0.1M. Στη συνέχεια τοποθετήθηκε στον επωαστήρα για 20min μέσα σε μικρή κωνική φιάλη.
5. Σε κάθε πηγαδάκι ενός 6-well plate τοποθετήθηκαν 2ml δ/τος δείγματος και 100 μL πεψίνης με χρονική διαφορά 15sec μεταξύ του κάθε well. Χρησιμοποιήθηκαν 2 well για κάθε δείγμα σε κάθε επανάληψη της διαδικασίας.
6. Έγινε χειροκίνητη ανάδευση για την αποφυγή συσσωμάτων και το 6-well παρέμεινε σκεπασμένο στον επωαστήρα για 2h στους 37οC με σκοπό την προσομοίωση της γαστρικής φάσης.

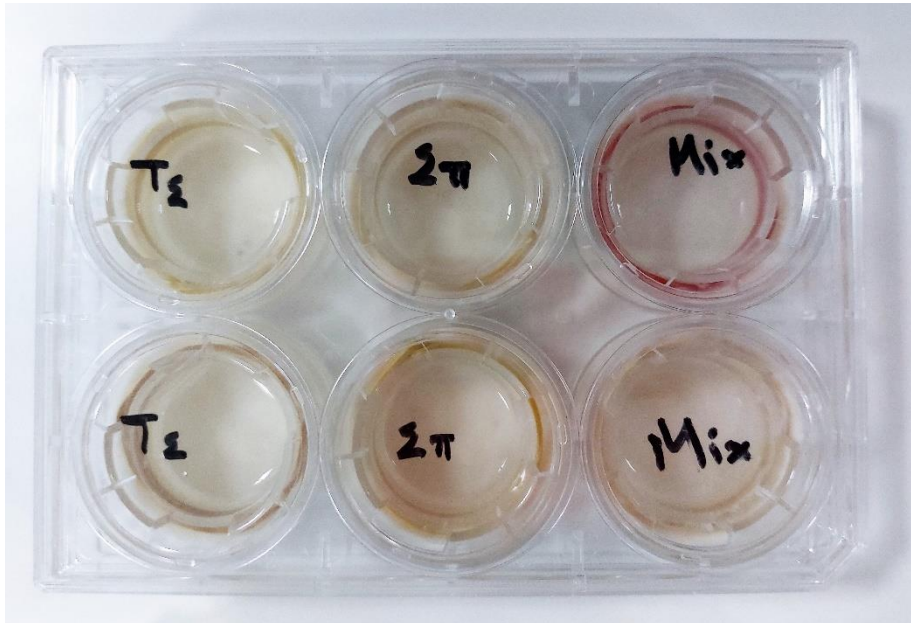


Εικόνα 20: Δείγματα Τροφίμου σε 6-Well για In-Vitro Πέψη

7. Κατά τη διάρκεια παραμονής των δειγμάτων στον επωαστήρα κόπηκαν οι μεμβράνες (ανά 3-4 cm) και τοποθετήθηκαν σε ποτήρι ζέσεως με απιονισμένο νερό στον επωαστήρα για 20 – 30 λεπτά μέχρι να μαλακώσουν. Έπειτα τοποθετήθηκαν σε κυλινδρικό ένθετο (ring), το οποίο δέθηκε με ελαστική λωρίδα (λαστιχάκι) στο μέσο περίπου του ring. Αφαιρέθηκε το τμήμα της μεμβράνης που περίσσευε, τα ένθετα ζεπλύθηκαν με απιονισμένο νερό και αποθηκεύτηκαν

σε ποτήρι ζέσεως με απιονισμένο νερό στον επωαστήρα μέχρι να ετοιμαστεί το διάλυμα PIPES.

8. Παρασκευάστηκε ρυθμιστικό διάλυμα PIPES 0.15M ως εξής: 2.5975 gr PIPES μεταφέρθηκαν σε ποτήρι ζέσεως και προστέθηκαν 50ml dH₂O. Έγινε ρύθμιση του pH του ΡΔ PIPES σε 6.3 με προσθήκη HCl 37% w/w (12M) και μέτρηση στο πεχάμετρο.
9. Τα ring και τα well βγήκαν από τον επωαστήρα, τινάχθηκαν για αφαίρεση του νερού και και τοποθετήθηκαν σε κάθε πηγαδάκι. Κάθε ring γεμίσθηκε με 2ml ρυθμιστικού δ/τος PIPES με χρονική διαφορά 15sec. Κατά τον τρόπο αυτό το ΡΔ διαχύθηκε διαμέσου της μεμβράνης ρυθμίζοντας το pH των διαλυμάτων από 2.8 σε 6.3, προσομοιάζοντας τη μεταφορά του

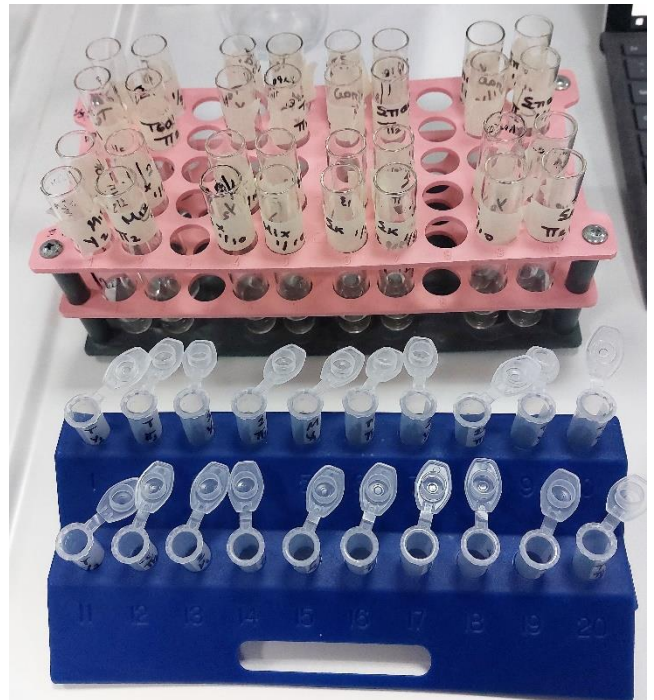


Εικόνα 21: Δείγματα Τροφίμου σε 6-Well για In-Vitro Πέψη

φαγητού από το στομάχι στο έντερο.

10. Το 6-well plate κλείστηκε και τοποθετήθηκε στον επωαστήρα για 30min.
11. Παρασκευάστηκε η παγκρεατίνη και τα χολικά άλατα, προσθέτοντας 0.02 gr παγκρεατίνης και 0.12 gr χολικών αλάτων σε 10 ml διαλύματος 0.1M NaHCO₃.
12. Μετά το πέρας των 30min επώασης κάθε ring ανασηκώθηκε ελαφρώς και έγινε προσθήκη 0.5 ml διαλύματος παγκρεατίνης-χολικών, με χρονική διαφορά 15".
13. Το ring τοποθετήθηκε στη θέση του, κλείστηκε το plate, και μετά από ελαφριά ανάδευση έγινε επώαση για 2 h στον επωαστήρα.
14. Σε αυτό το διάστημα προετοιμάστηκαν, 32 δοκιμαστικοί σωλήνες χωρισμένοι ανα τετράδες για να γίνουν στη συνέχεια οι αραιώσεις 1/5 και 1/10. Στην αραιώση 1/5 προσθέσαμε 0.4 ml του αντίστοιχου δείγματος και 1.6 ml νερό, ενώ στην αραιώση 1/10 προσθέσαμε 0.2ml αντίστοιχου δείγματος και 1.8ml νερό.

15. Προετοιμάστηκαν επίσης 20 μικρά Eppendorf τα οποία και ονομάστηκαν κατάλληλα για κάθε δείγμα, και για υποκείμενο / υπερκείμενο υγρό.
16. Μετά το πέρας της επώασης αφαιρέθηκαν όλα τα ένθετα μεμβράνης και ίση ποσότητα υπερκείμενου και υποκείμενου διαλύματος μεταφέρθηκε στα μικρά Eppendorf που προετοιμάστηκαν νωρίτερα.
17. Έγινε φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 5000 στροφές και στους 4 ο C για 15'.
18. Έπειτα παραλήφθηκε το υπερκείμενο διάλυμα από κάθε Eppendorf και έγινε ο προσδιορισμός των αντιοξειδωτικών και φαινολικών του με τις μεθόδους Frap και Folin όπως αυτές περιεγράφηκαν στις ενότητες 5.2 και 5.3.
19. Για τις δοκιμές Frap και Folin έγινε αραιώση του κάθε δείγματος που παραλήφθηκε από τα Eppendorf σε αναλογίες 1/5 και 1/10.



Εικόνα 22: Προετοιμασία Αραιώσεων Για Τελικό Στάδιο Δοκιμής

Παράρτημα

Παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος PIPES 0.15M. Συγκεκριμένα, για την παρασκευή 50ml διαλύματος ισχύει:

$$c=n/V \Rightarrow n= c*V= 0.15M * 0.05L = 0.0075 \text{ mol}$$

$$n= m/Mr \Rightarrow m= 0.0075 \text{ mol} * 346.33 = 2.5975 \text{ gr}$$

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 : ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ

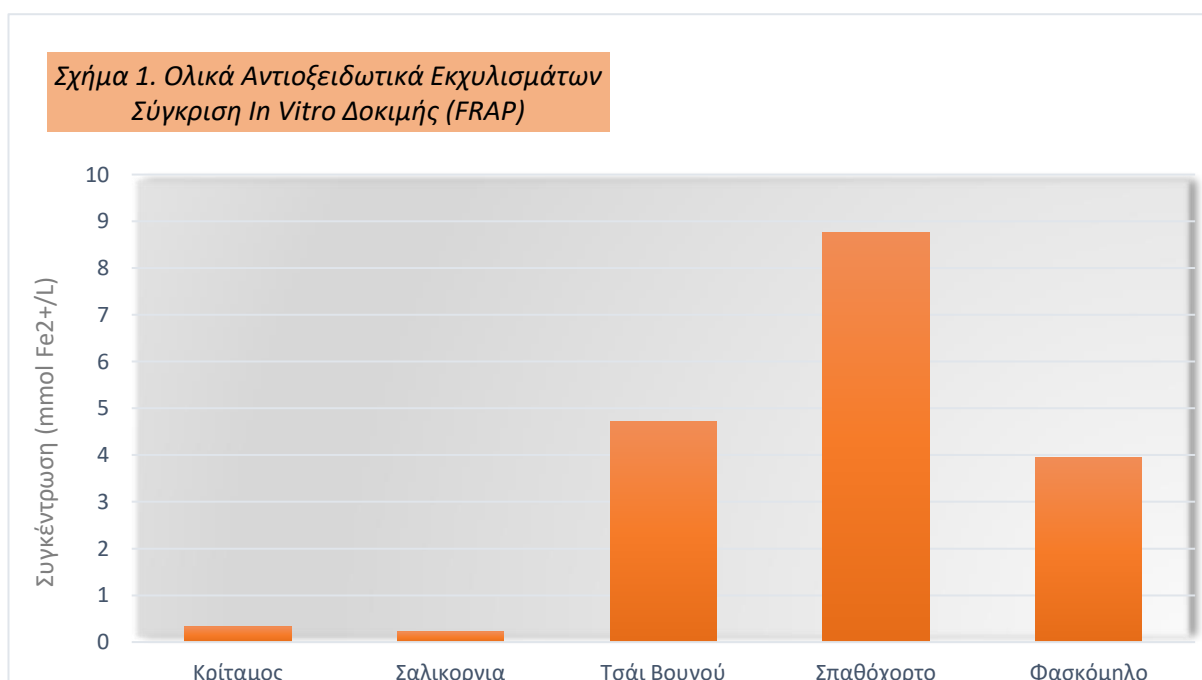
5.1 IN-VITRO ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

5.1.1 Σύγκριση Ολικών Αντιοξειδωτικών Εκχυλισμάτων (FRAP)

Ύστερα από την εκτέλεση της βιοχημικής δοκιμής FRAP με σκοπό τον προσδιορισμό των ολικών αντιοξειδωτικών σύμφωνα με τη μέθοδο που αναλύθηκε στην ενότητα 5.2, αλλά και στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων, καταλήξαμε στα παρακάτω :

Πίνακας 4: Σύγκριση Ολικών Αντιοξειδωτικών Εκχυλισμάτων (FRAP)

Δείγμα	Ολικά Αντιοξειδωτικά (mmol Fe ²⁺ /L) (Μέση τιμή ± Τυπική Απόκλιση)
Κρίταμος	0,33 ± 0,14
Σαλικόρνια	0,23 ± 0,14
Τσάι Βουνού	4,72 ± 0,61
Σπαθόχορτο	8,76 ± 1,88
Φασκόμηλο	3,96 ± 0,91



Όπως παρατηρούμε και από τον παραπάνω πίνακα, τα δύο άγρια χόρτα (κρίταμος και σαλικόρνια), παρουσιάζουν πολύ μικρότερες τιμές αντιοξειδωτικών, συγκριτικά με τα δείγματα των βοτάνων. Συνολικά, μεγαλύτερη συγκέντρωση αντιοξειδωτικών εμφανίζεται στο εκχύλισμα του σπαθόχορτου, το οποίο ακολουθείται από το τσάι του βουνού, το φασκόμηλο, τον κρίταμο και τέλος τη σαλικόρνια.

Τα συγκεκριμένα αποτελέσματα φαίνεται να έχουν στατιστική σημαντικότητα, αφού μετά από εκτέλεση Kruskal-Wallis Test στο πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης IBM SPSS, λάβαμε τιμή p – value = 0.000 (αν $p < 0.005$ έχουμε αποτέλεσμα στατιστικής σημαντικότητας).

Πίνακας 5: Αποτελέσματα Kruskal-Wallis Test Για Ολικά Αντιοξειδωτικά Εκχυλίσμάτων (SPSS Statistics)

	Total_Antioxidants
Chi-Square	45.524
df	3
Asymp. Sig.	.000

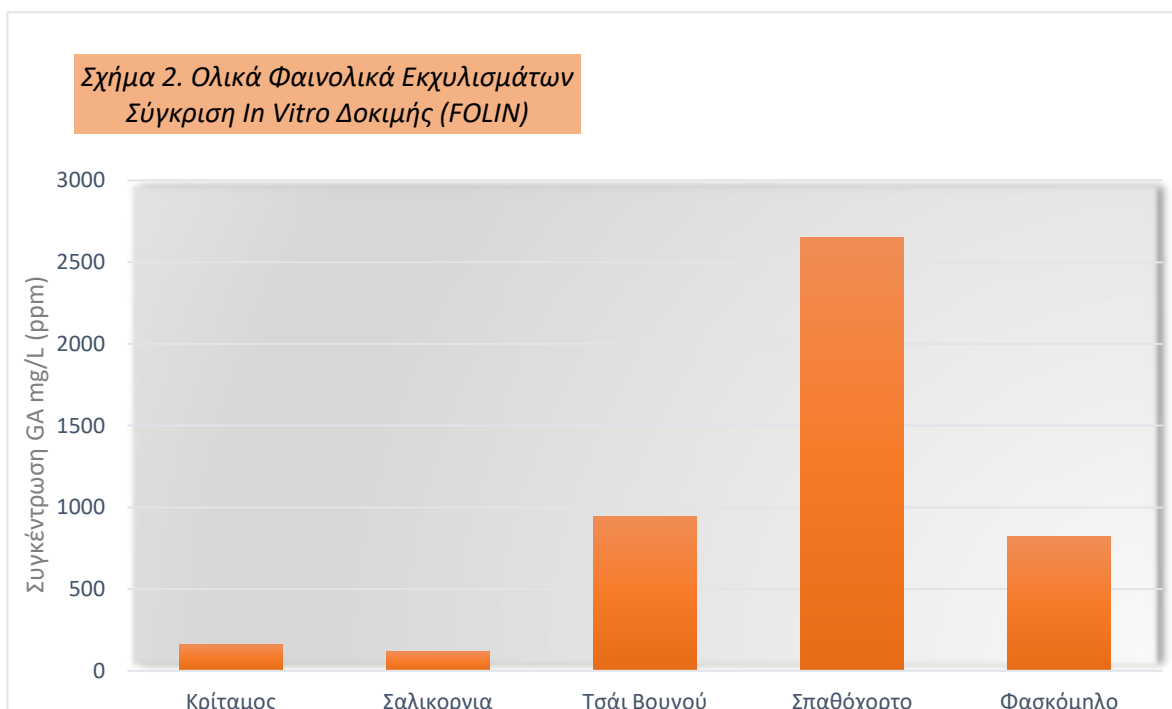
→ **p-value**

5.1.2 Σύγκριση Ολικών Φαινολικών Εκχυλίσμάτων (Folin)

Μετά από την πραγματοποίηση της βιοχημικής δοκιμής Folin στα σκέτα εκχυλίσματα των δειγμάτων, με σκοπό τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών σύμφωνα με τη μέθοδο που αναλύθηκε στην ενότητα 5.3, αλλά και στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων, καταλήξαμε στα παρακάτω :

Πίνακας 6: Σύγκριση Ολικών Φαινολικών Εκχυλίσμάτων (Folin)

Δείγμα	Ολικά Φαινολικά (GA mg/L (ppm)) (Μέση τιμή ± Τυπική Απόκλιση)
Κρίταμος	160,83 ± 88,14
Σαλικόρνια	116,49 ± 25,37
Τσάι Βουνού	946,90 ± 126,21
Σπαθόχορτο	2648,84 ± 720,01
Φασκόμηλο	819,03 ± 247,64



Όπως παρατηρούμε, η κατάταξη των δειγμάτων με βάση τις μετρήσεις για τα ολικά φαινολικά των εκχυλισμάτων, συμβαδίζουν με εκείνα των ολικών αντιοξειδωτικών. Βλέπουμε λοιπόν ότι και πάλι τα δύο άγρια χόρτα, δηλαδή ο κρίταμος και η σαλικόρνια, έχουν πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις βιοδραστικού συστατικού συγκριτικά με τα βότανα. Και πάλι το εκχύλισμα σπαθόχορτου δίνει τις υψηλότερες τιμές, ακολουθούμενο από το τσάι του βουνού, το φασκόμηλο, τον κρίταμο, και την σαλικόρνια. Όπως ίσχυε και στην προηγούμενη περίπτωση της FRAP, τα αποτελέσματα είναι στατιστικώς σημαντικά, αφού μετά από εκτέλεση Kruskal-Wallis Test στο πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης IBM SPSS, λάβαμε και πάλι τιμή $p - value = 0.000$ (αν $p < 0.005$ έχουμε αποτέλεσμα στατιστικής σημαντικότητας).

Πίνακας 7: Αποτελέσματα Kruskal-Wallis Test Για Ολικά Φαινολικά Εκχυλισμάτων (SPSS Statistics)

	Total_Phenolics
Chi-Square	55.817
df	3
Asymp. Sig.	.000

→ **p-value**

5.2 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ IN – VITRO ΠΕΨΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΥ ΤΡΟΦΙΜΟΥ

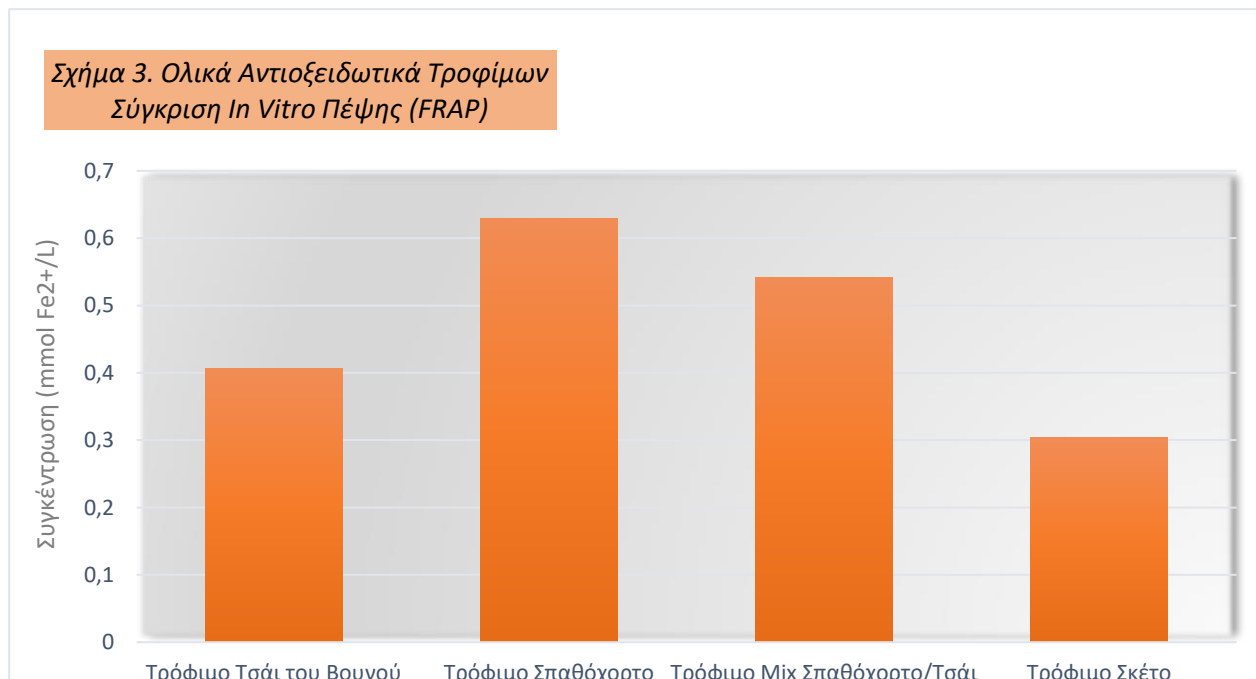
5.2.1 Σύγκριση Ολικών Αντιοξειδωτικών Δειγμάτων Τροφίμων - In-Vitro Πέψη (FRAP)

Ύστερα από την εκτέλεση in-vitro πέψης στα 4 διαφορετικά δείγματα λειτουργικού τροφίμου που δόθηκαν στους δοκιμαστές κατά την οργανοληπτική δοκιμή και πραγματοποίηση βιοχημικής δοκιμής

FRAP με σκοπό τον προσδιορισμό των ολικών αντιοξειδωτικών σύμφωνα με τη μέθοδο που αναλύθηκε στην ενότητα 5.2, καταλήξαμε στα παρακάτω :

Πίνακας 8: Σύγκριση Αντιοξειδωτικών In Vitro Πέψης Τροφίμων (FRAP)

Δείγμα	Ολικά Αντιοξειδωτικά (mmol Fe ²⁺ /L) (Μέση Τιμή ± Τυπική Απόκλιση)
Τρόφιμο Τσάι του Βουνού	0,41 ± 0,17
Τρόφιμο Σπαθόχορτο	0,63 ± 0,18
Τρόφιμο Mix Σπαθόχορτο/Τσάι	0,54 ± 0,18
Τρόφιμο Σκέτο	0,30 ± 0,15



Παρατηρούμε ότι το τρόφιμο που εμπειρεύει μόνο εκχύλισμα σπαθόχορτου, έδωσε τις υψηλότερες τιμές ολικών αντιοξειδωτικών, ακολουθούμενο από το τρόφιμο Mix (εκχύλισμα σπαθόχορτου και τσάι του βουνού), το τρόφιμο με εκχύλισμα από τσάι του βουνού και τέλος το τυφλό δείγμα που δεν περιείχε κανένα εκχύλισμα. '

Στα συγκεκριμένα αποτελέσματα πραγματοποιήθηκε και στατιστική ανάλυση κάνοντας χρήση του προγράμματος IBM SPSS και του τεστ Kruskal-Wallis. Η συγκεκριμένη ανάλυση επιβεβαίωσε τη στατιστική σημαντικότητα των αποτελεσμάτων μας, δίνοντας τιμή $p - value = 0.000$ (αν $p < 0.05$ έχουμε αποτέλεσμα στατιστικής σημαντικότητας).

Πίνακας 9: Αποτελέσματα Kruskal-Wallis Test Για Ολικά Αντιοξειδωτικά In Vitro Πέψης Τροφίμων (SPSS Statistics)

	Digest_Antioxidants
Chi-Square	32.954
df	3
Asymp. Sig.	.000

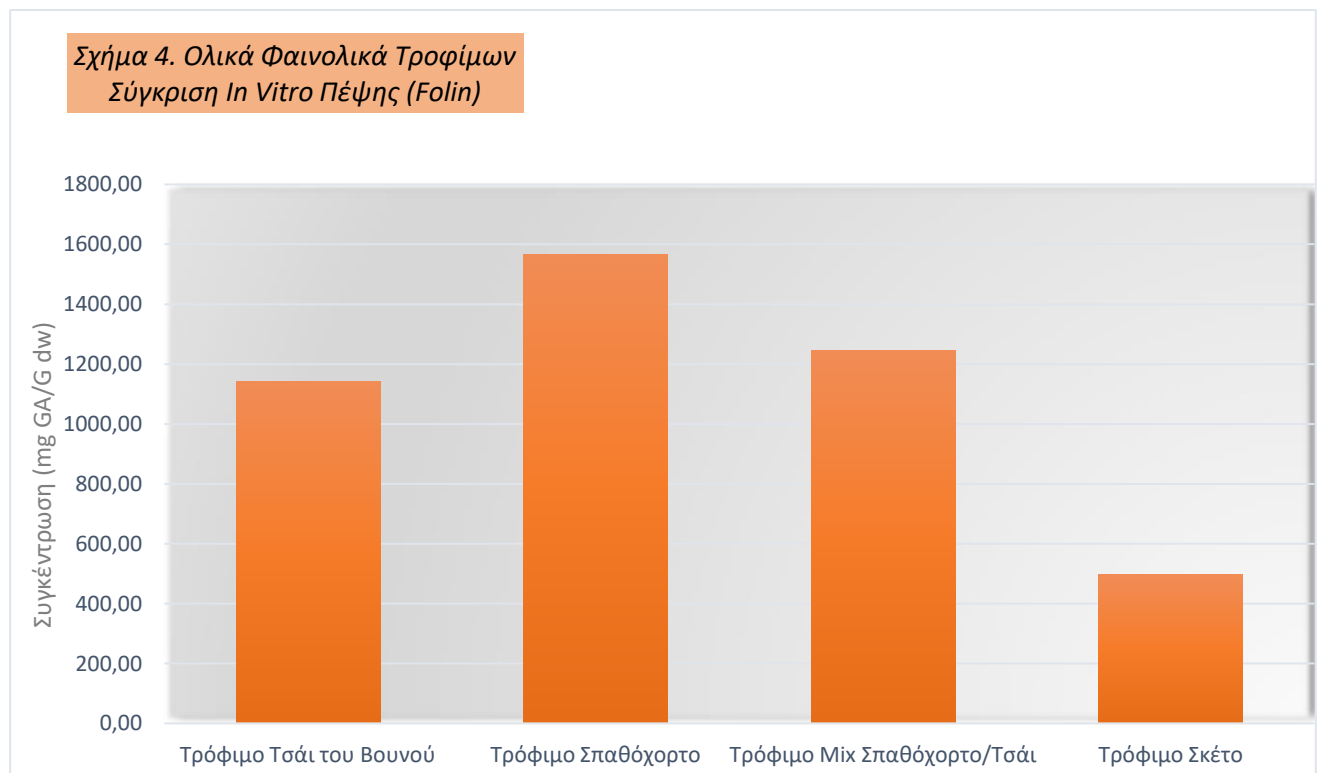
→ **p-value**

5.2.2 Σύγκριση Ολικών Φαινολικών Δειγμάτων Τροφίμων - In-Vitro Πέψη (Folin)

Ύστερα από την εκτέλεση in-vitro πέψης στα 4 διαφορετικά δείγματα λειτουργικού τροφίμου που δόθηκαν στους δοκιμαστές κατα την οργανοληπτική δοκιμή και πραγματοποίηση βιοχημικής δοκιμής Folin με σκοπό τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών σύμφωνα με τη μέθοδο που αναλύθηκε στην ενότητα 5.3, καταλήξαμε στα παρακάτω:

Πίνακας 10: Σύγκριση Ολικών Φαινολικών In Vitro Πέψης Τροφίμων

Δείγμα	Ολικά Φαινολικά (mg GA/G dw)
	(Μέση Τιμή ± Τυπική Απόκλιση)
Τρόφιμο Τσάι του Βουνού	1143,24 ± 319,01
Τρόφιμο Σπαθόχορτο	1565,47 ± 227,57
Τρόφιμο Mix Σπαθόχορτο/Τσάι	1244,68 ± 382,04
Τρόφιμο Σκέτο	497,98 ± 56,62



Σε αυτή τη δοκιμή, υψηλότερες τιμές ολικών φαινολικών εντοπίστηκαν στο τρόφιμο που περιείχε μόνο εκχύλισμα σπαθόχορτου ακολουθούμενο από το τρόφιμο mix, το τρόφιμο με το εκχύλισμα από το τσάι του βουνού και τέλος το δείγμα control.

Πίνακας 11: Αποτελέσματα Kruskal-Wallis Test Για Ολικά Φαινολικά In Vitro Πέψης Τροφίμων (SPSS Statistics)

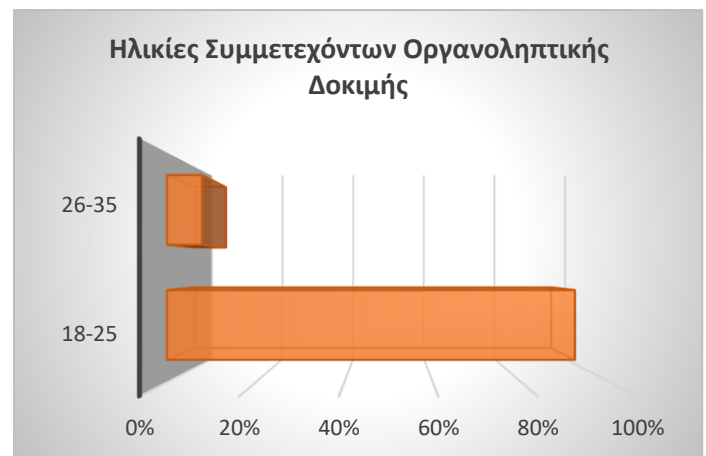
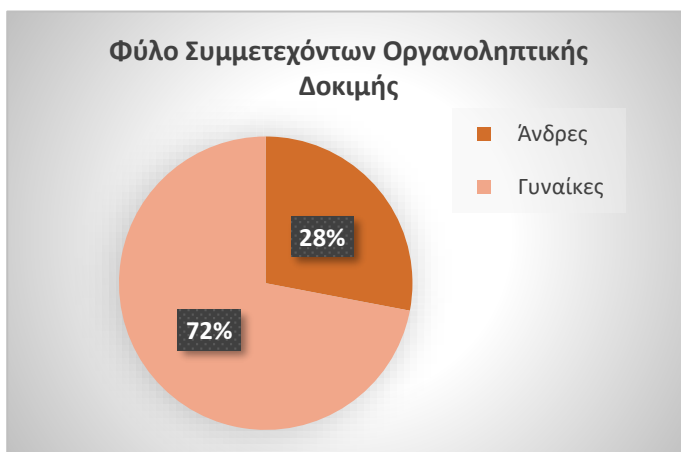
	Digest_Phenolics
Chi-Square	14.478
df	3
Asymp. Sig.	.002

→ p-value

Στα συγκεκριμένα αποτελέσματα πραγματοποιήθηκε και στατιστική ανάλυση κάνοντας χρήση του προγράμματος IBM SPSS και του τεστ Kruskal-Wallis. Η συγκεκριμένη ανάλυση επιβεβαίωσε τη στατιστική σημαντικότητα των αποτελεσμάτων μας, δίνοντας τιμή $p - value = 0.002$ (αν $p < 0.05$ έχουμε αποτέλεσμα στατιστικής σημαντικότητας).

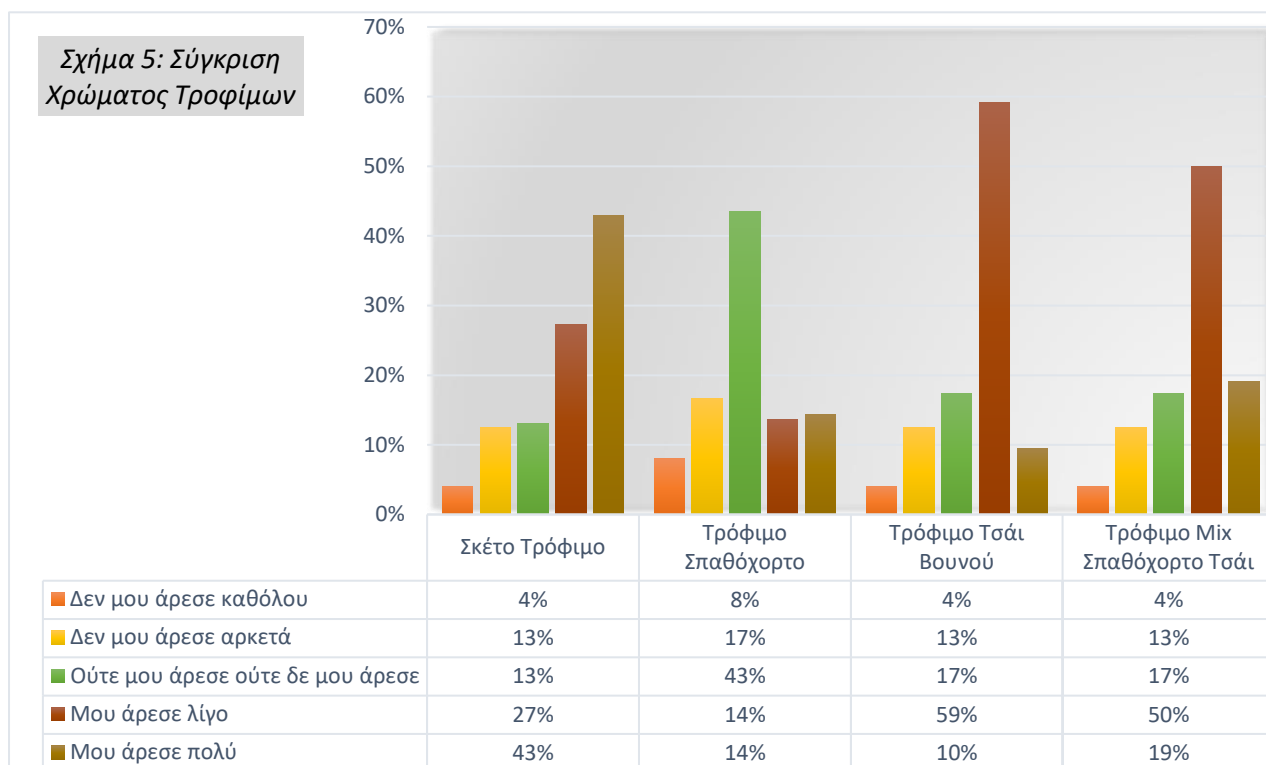
5.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΝΤΥΠΩΣΕΩΝ ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

5.3.1 Δημογραφικά Αποτελέσματα Οργανοληπτικού

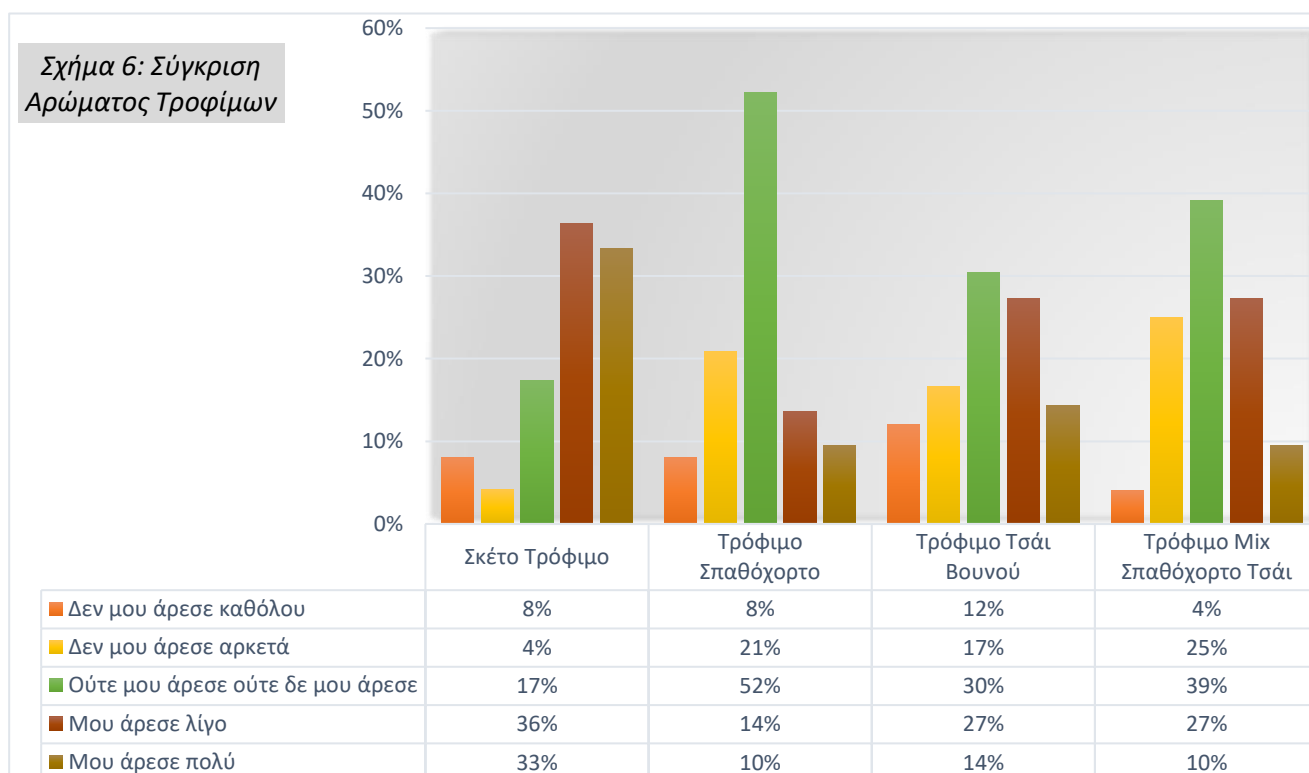


Όπως προαναφέρθηκε και στην μεθοδολογία της Οργανοληπτικής Μελέτης, το δείγμα μας ήταν ιδιαίτερα περιορισμένο, με την πλειοψηφία των δοκιμαστών να είναι φοιτητές του τμήματος γεγονός που δικαιολογεί και τις ηλικίες των συμμετεχόντων.

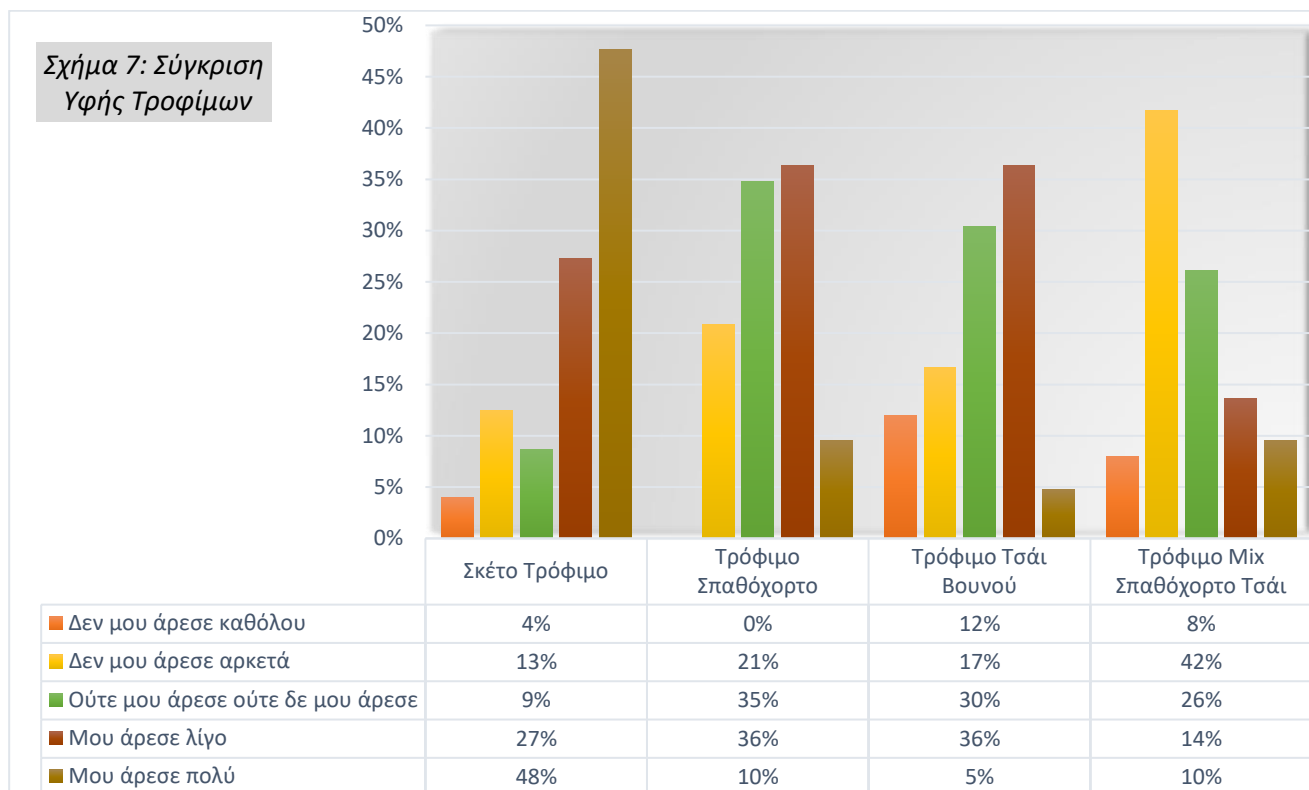
5.3.2 Σύγκριση Εντύπωσης Χρώματος Δειγμάτων



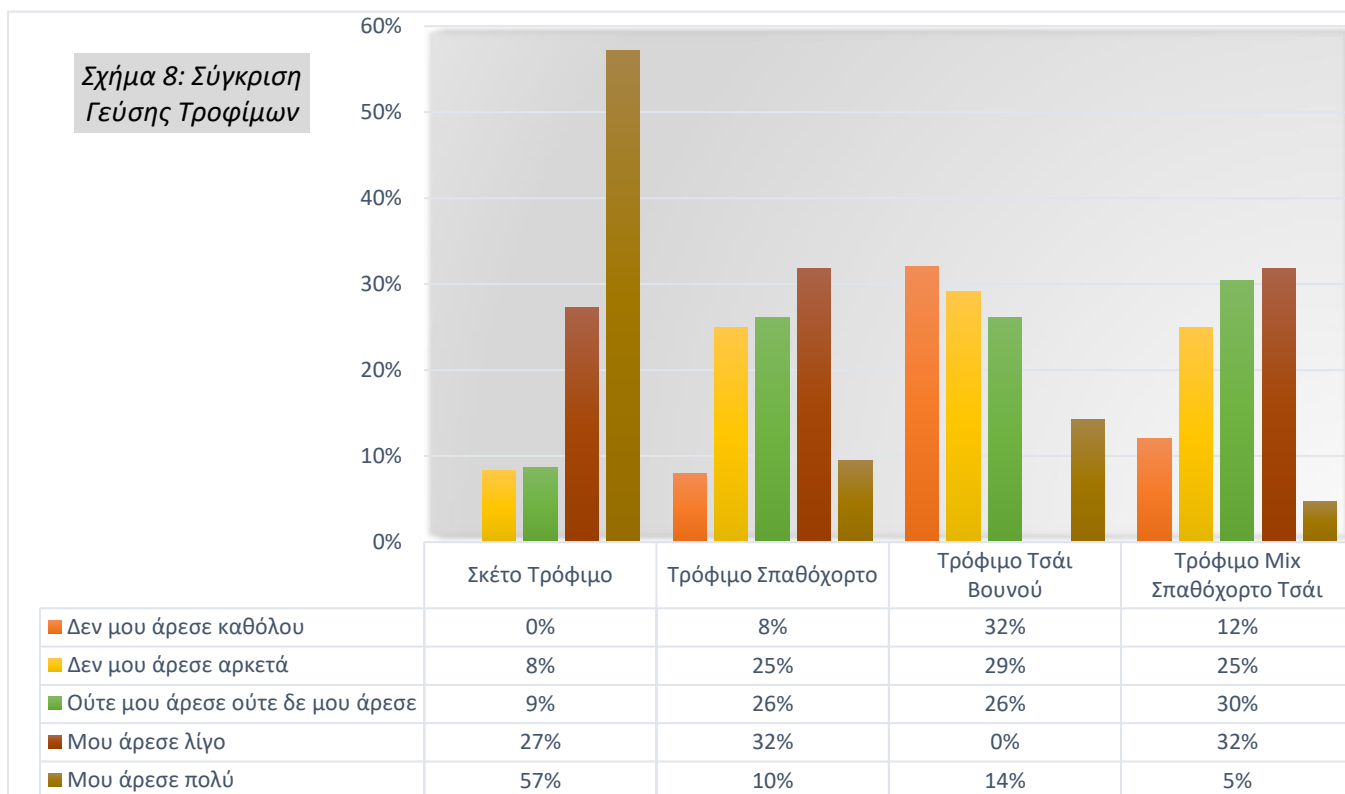
5.3.3 Σύγκριση Εντύπωσης Αρώματος Δειγμάτων



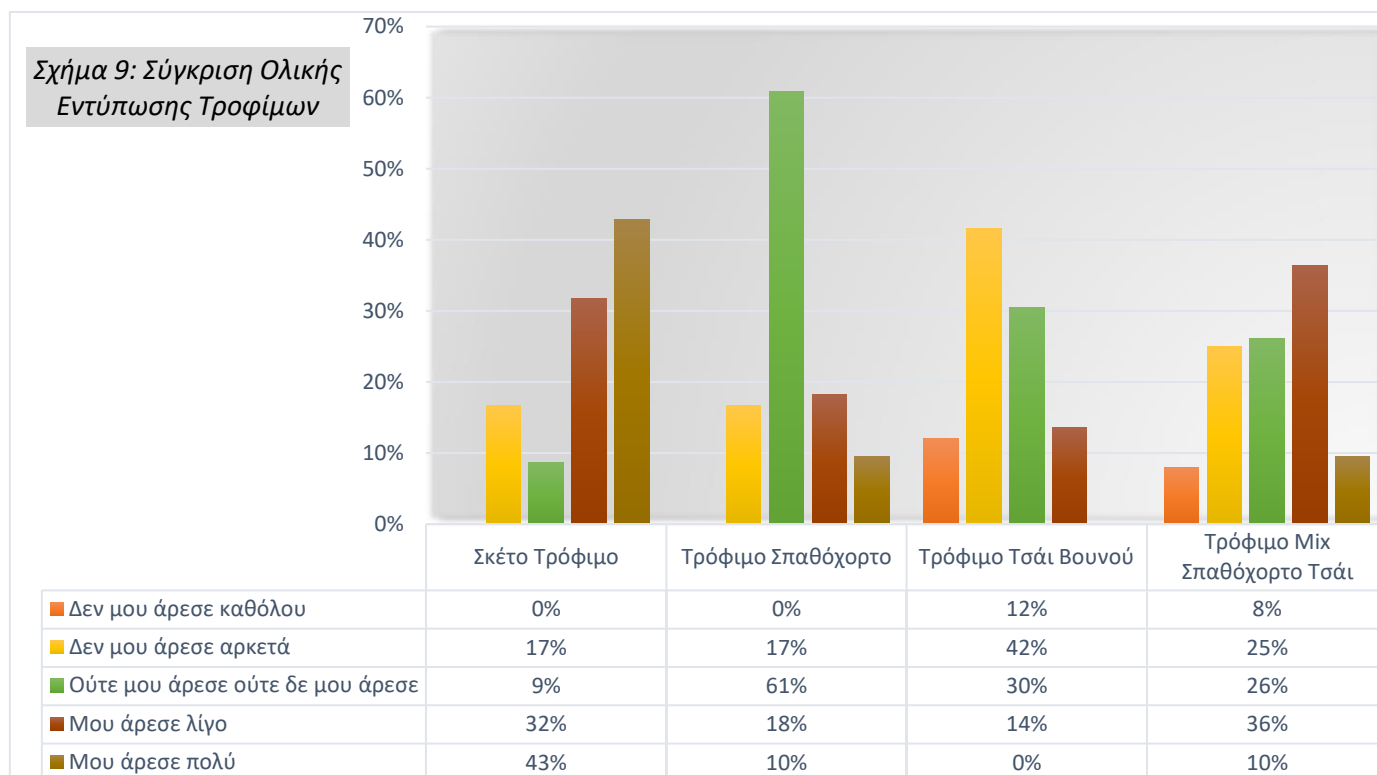
5.3.4 Σύγκριση Εντύπωσης Υφής Δειγμάτων



5.3.5 Σύγκριση Εντύπωσης Γεύσης Δειγμάτων



5.3.6 Σύγκριση Ολικής Εντύπωσης Δειγμάτων



5.3.6 Στατιστικές διαφορές αποτελεσμάτων δειγμάτων οργανοληπτικού

Για τα αποτελέσματα του οργανοληπτικού ελέγχου πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση και τεστ Kruskal-Wallis ώστε να δούμε αν τα δεδομένα που λάβαμε για τους διάφορους παράγοντες εντύπωσης των τροφίμων, είχαν κάποια στατιστική σημαντικότητα.

Πίνακας 12: Αποτελέσματα Kruskal-Wallis Test Για Σύγκριση Παραγόντων Εντύπωσης Της Οργανοληπτικής Δοκιμής (SPSS Statistics)

Kruskal-Wallis Test

Test Statistics^{a,b}

	Cheese_Color	Cheese_Aroma	Cheese_Texture	Cheese_Flavor	Cheese_Total
Chi-Square	7.862	9.944	13.706	29.240	20.699
df	3	3	3	3	3
Asymp. Sig.	.049	.019	.003	.000	.000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Sample

Βλέπουμε ότι σε όλους τους παράγοντες αξιολόγησης, τα αποτελέσματα ήταν στατιστικώς σημαντικά (ίσως όχι και τόσο στο χρώμα), αφού όλες οι τιμές p-value < 0.05.

p-value

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 : ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

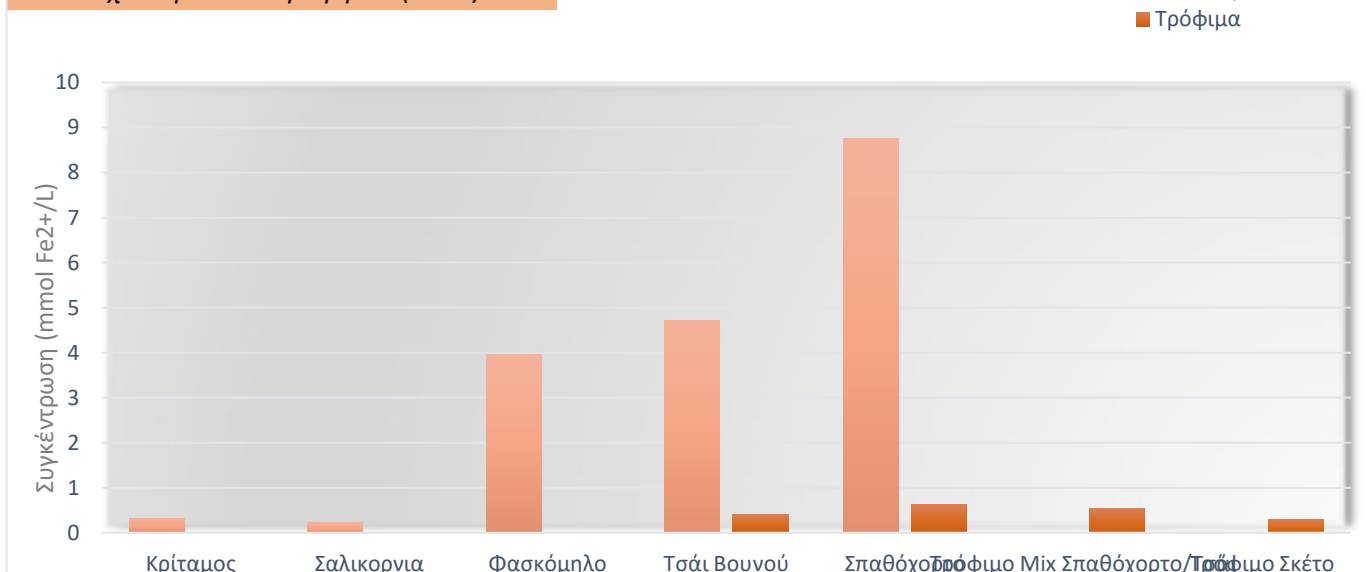
6.1 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

6.1.1 Σύγκριση Αντιοξειδωτικών εκχυλισμάτων και Τροφίμων (Frap)

Πίνακας 13: Σύγκριση Αποτελεσμάτων FRAP Τροφίμων Και Εκχυλισμάτων

FRAP (mmol Fe ²⁺ /L)		Μέση Τιμή	Τυπική Απόκλιση	Τρόφιμο	Μέση Τιμή	Τυπική Απόκλιση
Εκχύλισμα						
Κρίταμος	0,33	0,14				
Σαλικόρνια	0,23	0,14				
Φασκόμηλο	3,96	0,91				
Τσάι Βουνού	4,72	0,61	Τρόφιμο Τσάι του Βουνού	0,41	0,17	
Σπαθόχορτο	8,76	1,88	Τρόφιμο Σπαθόχορτο	0,63	0,18	
			Τρόφιμο Σπαθόχορτο/Τσάι	0,54	0,18	
			Τρόφιμο Σκέτο	0,30	0,15	

Σχήμα 10. Σύγκριση Ολικών Αντιοξειδωτικών Εκχυλισμάτων - Τροφίμων (FRAP)



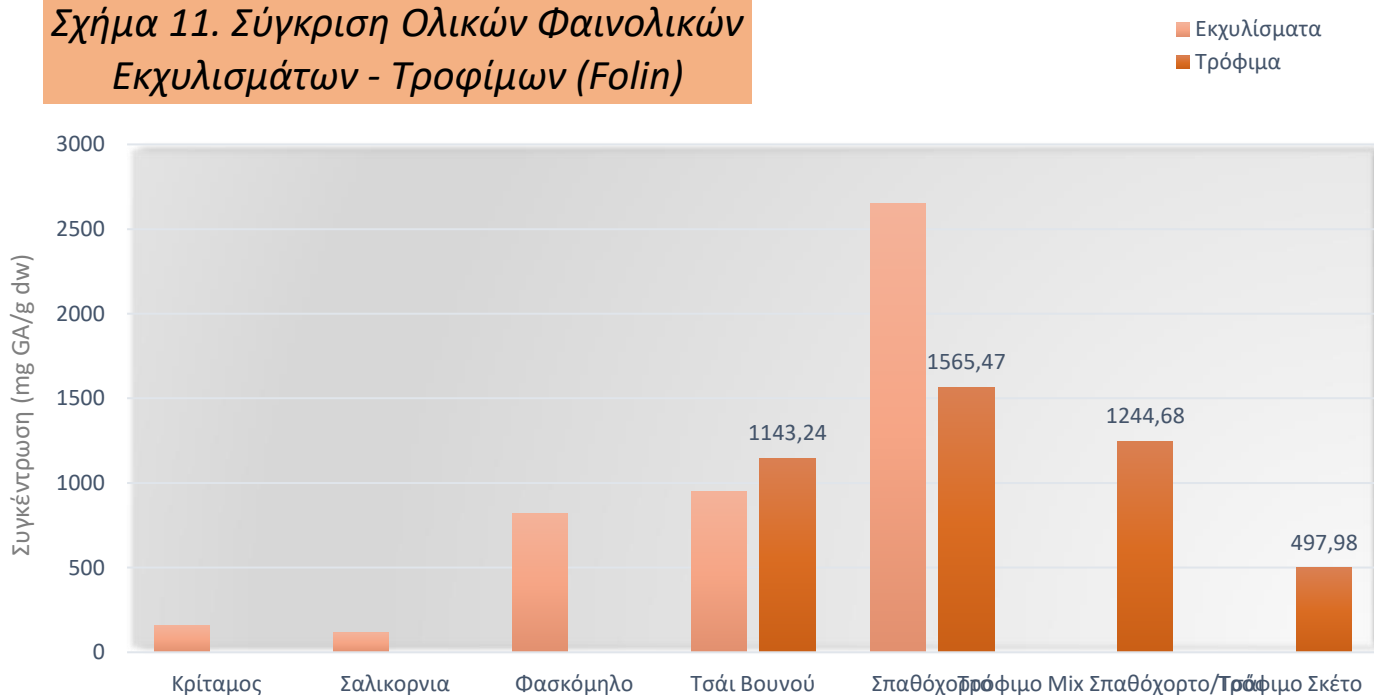
Όπως ήταν λογικό, τα αποτελέσματα της Frap για τα σκέτα εκχυλίσματα έδωσαν πολύ υψηλότερες τιμές ολικών αντιοξειδωτικών από τις αντίστοιχες τιμές των τροφίμων που εμπεριείχαν εκείνα τα εκχυλίσματα. Αυτό εξηγείται λόγω της διαδικασίας της πέψης που έχει προηγηθεί και προφανώς και καταστρέφει κάποιο ποσοστό των βιοδραστικών συστατικών (π.χ αντιοξειδωτικά) . Επίσης η διαφορά αυτή μπορεί να οφείλεται και στην επίδραση κάποιων συστατικών της πρώτης μας ύλης δηλαδή του τυριού Philadelphia, στα αντιοξειδωτικά του προστιθέμενου εκχυλίσματος γεγονός που δεν μπορούμε να το εντοπίσαμε με τις μετρήσεις μας. Όπως φαίνεται το τρόφιμο με το Σπαθόχορτο, αλλά και το σκέτο εκχύλισμα σπαθόχορτου είναι αυτό που δίνει τα καλύτερα αποτελέσματα σε όλες τις δοκιμές.

6.1.2 Σύγκριση Φαινολικών Εκχυλισμάτων και Τροφίμων (Folin)

Πίνακας 14: Σύγκριση Αποτελεσμάτων Folin Τροφίμων Και Εκχυλισμάτων

FOLIN (mg GA/g dw)					
Εκχύλισμα	Μέση Τιμή	Τυπική Απόκλιση	Τρόφιμο	Μέση Τιμή	Τυπική Απόκλιση ²
Κρίταμος	160,83	88,14			
Σαλικόρνια	116,46	25,37			
Φασκόμηλο	819,03	247,64			
Τσάι Βουνού	946,90	126,21	Τρόφιμο Τσάι του Βουνού	1143,24	319,01
Σπαθόχορτο	2648,84	720,01	Τρόφιμο Σπαθόχορτο	1565,47	227,57
-			Τρόφιμο Mix Σπαθόχορτο/Τσάι	1244,68	382,04
-			Τρόφιμο Σκέτο	497,98	56,62

Σχήμα 11. Σύγκριση Ολικών Φαινολικών Εκχυλισμάτων - Τροφίμων (Folin)



Στη βιοχημική δοκιμή της Folin για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών παρατηρούμε διαφορετική συμπεριφορά όσον αφορά τα αποτελέσματα των σκέτων εκχυλισμάτων συγκριτικά με αυτά των ενισχυμένων τροφίμων. Συγκεκριμένα, τα φαινολικά δεν φαίνεται να παρουσιάζουν κάποια μεγάλη μείωση μετά την ενσωμάτωσή τους στο λειτουργικό τρόφιμο και την εκτέλεση της in-vitro πέψης. Τα αποτελέσματα των σκέτων εκχυλισμάτων είναι σχετικά κοντά σε αυτά του ενισχυμένου τροφίμου. Αυτό μπορεί να σημαίνει είτε ότι τα φαινολικά είναι πιο ανθεκτικά ως ενώσεις, και άρα επιβιώνουν κατα μεγαλύτερο ποσοστό μετά την πέψη, είτε ότι η επιβίωσή τους δεν παρεμποδίζεται

από την σύνθεση ή/και τα συστατικά της πρώτης ύλης του τροφίμου μας δηλαδή του τυριού Philadelphia. Και πάλι όπως βλέπουμε, το εκχύλισμα του σπαθόχορτου και το τρόφιμο που ενισχύθηκε με το εκχύλισμά του, δίνουν τους υψηλότερους δείκτες ολικών φαινολικών.

Τα αποτελέσματα της in-vitro πέψης, ως μέθοδος μίμησης της γαστρεντερικής πέψης και εκτίμησης της βιοδιαθεσιμότητας των βιοενεργών ενώσεων, μπορούν να μας δώσουν μια εικόνα για την ποσότητα των αντιοξειδωτικών και των φαινολικών που θα επιβιώσουν και εν τέλη θα απορροφηθούν από τον οργανισμό, αλλά δεν μπορούν να αποτελέσουν πλήρη μίμηση της διαδικασίας του οργανισμού. Γι' αυτό ακριβώς και είναι απαραίτητο με γνώμονα τα αποτελέσματα που έχουμε λάβει από τις μετρήσεις μας, να προχωρήσουμε σε κλινικές μελέτες, που ως στόχο θα έχουν την μέτρηση των βιοδεικτών ενδιαφέροντος σε καταναλωτές που υπο συγκεκριμένες συνθήκες και πρωτόκολλα καταναλώνουν το λειτουργικό μας τρόφιμο.

Γενικότερα οι τιμές που προέκυψαν τόσο από την in-vitro πέψη όσο και από την in-vitro αξιολόγηση των απλών εκχυλισμάτων, συνάδουν αρκετά με τα βιβλιογραφικά δεδομένα τα οποία υπάρχουν αναφορικά με τα δείγματά μας (Kaloteraki et al., 2021)(Paragianni et al., 2020). Το γεγονός αυτό μας επιβεβαιώνει ότι τα συγκεκριμένα πρωτόκολλα και μέθοδοι είναι κατάλληλα για το σκοπό και τις πρώτες ύλες της μελέτης και ότι μπορούμε να βασιστούμε στις μετρήσεις μας για περαιτέρω αναλύσεις ή/και κλινικές μελέτες.

Τέλος όσον αφορά την αποδεκτικότητα των καταναλωτών, μπορούμε να πούμε ότι από την ανασκόπηση της αγοράς των αλειφόμενων τυριών αλλά και από τα αποτελέσματα της οργανοληπτικής μας δοκιμής αναφορικά με τη συχνότητα κατανάλωσης τέτοιων προϊόντων, οι καταναλωτές είναι πολύ πιθανό να αποδεχθούν ένα spread τυριού ενισχυμένο με εκχυλίσματα βοτάνων, αφού είναι ήδη εξοικειωμένοι με τέτοιου είδους γεύσεις. Ωστόσο, η Ευρωπαϊκή Νομοθεσία που δεν έχει οριστεί ακόμα αναφορικά με τα εκχυλίσματα βοτάνων ως πρόσθετα τροφίμων, θα μπορούσαν να αποτελέσουν τροχοπέδη σε αυτή τη διαδικασία, που όμως εξαιτίας του όλο και αυξανόμενου ενδιαφέροντος γύρω από αυτόν τον τομέα, είναι πολύ πιθανό να υπάρξουν σημαντικές εξελίξεις και αλλαγές.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Brodkorb, A., Egger, L., Alminger, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., ... Recio, I. (2019). INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols*, *14*(4), 991–1014. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1>
- Bruni, R., & Sacchetti, G. (2009). Factors Affecting Polyphenol Biosynthesis in Wild and Field Grown St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L. Hypericaceae/Guttiferae). *Molecules* *2009*, Vol. *14*, Pages 682-725, *14*(2), 682–725. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES14020682>
- Carlsen, M. H., Halvorsen, B. L., Holte, K., Bøhn, S. K., Dragland, S., Sampson, L., ... Blomhoff, R. (2010). The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide. *Nutrition Journal*, *9*(1). <https://doi.org/10.1186/1475-2891-9-3>
- Costa, J., & Ahluwalia, A. (2019, June 18). Advances and Current Challenges in Intestinal in vitro Model Engineering: A Digest. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, Vol. *7*, p. 144. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00144>
- Drakou, M., Birmpa, A., Koutelidakis, A. E., Komaitis, M., Panagou, E. Z., & Kapsokefalou, M. (2015). Total antioxidant capacity, total phenolic content and iron and zinc dialyzability in selected Greek varieties of table olives, tomatoes and legumes from conventional and organic farming. <Http://Dx.DoI.Org/10.3109/09637486.2014.979320>, *66*(2), 197–202. <https://doi.org/10.3109/09637486.2014.979320>
- Finley, J. W., Kong, A. N., Hintze, K. J., Jeffery, E. H., Ji, L. L., & Lei, X. G. (2011). Antioxidants in foods: State of the science important to the food industry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*(13), 6837–6846. <https://doi.org/10.1021/JF2013875>
- Flint, H. J., Duncan, S. H., Scott, K. P., & Louis, P. (2014). Links between diet, gut microbiota composition and gut metabolism. *Proceedings of the Nutrition Society*, *760*(1), 13–22. <https://doi.org/10.1017/S0029665114001463>
- Frame, L. A., Costa, E., & Jackson, S. A. (2020). Current explorations of nutrition and the gut microbiome: A comprehensive evaluation of the review literature. *Nutrition Reviews*, *78*(10), 798–812. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuz106>
- Gomez-Mascaraque, L. G., Morfin, R. C., Pérez-Masiá, R., Sanchez, G., & Lopez-Rubio, A. (2016). Optimization of electrospraying conditions for the microencapsulation of probiotics and evaluation of their resistance during storage and in-vitro digestion. *LWT - Food Science and Technology*, *69*, 438–446. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.01.071>
- Gonçalves, S., Moreira, E., Grosso, C., Andrade, P. B., Valentão, P., & Romano, A. (2017). Phenolic profile, antioxidant activity and enzyme inhibitory activities of extracts from aromatic plants used in Mediterranean diet. *Journal of Food Science and Technology*, *54*(1), 219–227. <https://doi.org/10.1007/S13197-016-2453-Z/TABLES/4>
- Kaloteraki, C., Almpounioti, K., Potsaki, P., Bousdouni, P., Kandyliari, A., & Koutelidakis, A. E. (2021). Total Antioxidant Capacity and Phenolic Content of 17 Mediterranean Functional Herbs and Wild Green Extracts from North Aegean, Greece. *Biol. Life Sci. Forum*, *2021*. <https://doi.org/10.3390/xxxxx>
- Kasendra, M., Tovaglieri, A., Sontheimer-Phelps, A., Jalili-Firoozinezhad, S., Bein, A., Chalkiadaki, A., ... Ingber, D. E. (2018). Development of a primary human Small Intestine-on-a-Chip using biopsy-derived organoids. *Scientific Reports*, *8*(1), 2871. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21201-7>
- Kim, H. J., Huh, D., Hamilton, G., & Ingber, D. E. (2012). Human gut-on-a-chip inhabited by microbial

- flora that experiences intestinal peristalsis-like motions and flow. *Lab on a Chip*, 12(12), 2165–2174. <https://doi.org/10.1039/c2lc40074j>
- Konstantinidi, M., & Koutelidakis, A. E. (2019). Functional Foods and Bioactive Compounds: A Review of Its Possible Role on Weight Management and Obesity's Metabolic Consequences. *Medicines* 2019, Vol. 6, Page 94, 6(3), 94. <https://doi.org/10.3390/MEDICINES6030094>
- Lucas-González, R., Viuda-Martos, M., Pérez-Alvarez, J. A., & Fernández-López, J. (2018, May 1). In vitro digestion models suitable for foods: Opportunities for new fields of application and challenges. *Food Research International*, Vol. 107, pp. 423–436. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.02.055>
- Martínez Leo, E. E., & Segura Campos, M. R. (2020, March 1). Effect of ultra-processed diet on gut microbiota and thus its role in neurodegenerative diseases. *Nutrition*, Vol. 71, p. 110609. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2019.110609>
- McKenzie, C., Tan, J., Macia, L., & Mackay, C. R. (2017). The nutrition-gut microbiome-physiology axis and allergic diseases. *Immunological Reviews*, 278(1), 277–295. <https://doi.org/10.1111/imr.12556>
- Melchior, S., Marino, M., Innocente, N., Calligaris, S., & Nicoli, M. C. (2020). Effect of different biopolymer-based structured systems on the survival of probiotic strains during storage and *in vitro* digestion. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(10), 3902–3909. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10432>
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., ... Brodkorb, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food—an international consensus. *Food and Function*, 5(6), 1113–1124. <https://doi.org/10.1039/c3fo60702j>
- Papagianni, O., Loukas, T., Magkoutis, A., Biagki, T., Dimou, C., Karantonis, C., & Koutelidakis, A. (2020). Postprandial Bioactivity of Spread Cheese, Enhanced with Mountain Tea and Orange Peel Extract, in Healthy Volunteers. A Pilot Study. *Proceedings 2021*, Vol. 70, Page 19, 70(1), 19. https://doi.org/10.3390/FOODS_2020-07671
- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290–4302. <https://doi.org/10.1021/JF0502698>
- Quigley, E. M. M. (2019, January 1). Prebiotics and Probiotics in Digestive Health. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, Vol. 17, pp. 333–344. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2018.09.028>
- Salazar, N., Valdés-Varela, L., González, S., Gueimonde, M., & de los Reyes-Gavilán, C. G. (2017, March 4). Nutrition and the gut microbiome in the elderly. *Gut Microbes*, Vol. 8, pp. 82–97. <https://doi.org/10.1080/19490976.2016.1256525>
- Shori, A. B. (2020). Inclusion of phenolic compounds from different medicinal plants to increase α -amylase inhibition activity and antioxidants in yogurt. <https://doi.org/10.1080/16583655.2020.1798072>, 14(1), 1000–1008. <https://doi.org/10.1080/16583655.2020.1798072>
- Sotiropoulou, N. S., Megremi, S. F., & Tarantilis, P. (2020). Evaluation of Antioxidant Activity, Toxicity, and Phenolic Profile of Aqueous Extracts of Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) and Sage (*Salvia officinalis* L.) Prepared at Different Temperatures. *Applied Sciences* 2020, Vol. 10, Page 2270, 10(7), 2270. <https://doi.org/10.3390/APP10072270>
- Succi, M., Tremonte, P., Pannella, G., Tipaldi, L., Cozzolino, A., Coppola, R., & Sorrentino, E. (2017).

- Survival of commercial probiotic strains in dark chocolate with high cocoa and phenols content during the storage and in a static in vitro digestion model. *Journal of Functional Foods*, 35, 60–67. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.05.019>
- Sultana, B., Anwar, F., & Ashraf, M. (2009). Effect of Extraction Solvent/Technique on the Antioxidant Activity of Selected Medicinal Plant Extracts. *Molecules* 2009, Vol. 14, Pages 2167-2180, 14(6), 2167–2180. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES14062167>
- Ulewicz-Magulska, B., & Wesolowski, M. (2019). Total Phenolic Contents and Antioxidant Potential of Herbs Used for Medical and Culinary Purposes. *Plant Foods for Human Nutrition*, 74(1), 61–67. <https://doi.org/10.1007/S11130-018-0699-5/FIGURES/1>
- Yesil-Celiktas, O., Nartop, P., Gurel, A., Bedir, E., & Vardar-Sukan, F. (2007). Determination of phenolic content and antioxidant activity of extracts obtained from *Rosmarinus officinalis*’ calli. *Journal of Plant Physiology*, 164(11), 1536–1542. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2007.05.013>
- Zhang, C., Quek, S. Y., Fu, N., Su, Y., Kilmartin, P. A., & Chen, X. D. (2020). Storage stability and in vitro digestion of microencapsulated powder containing fermented noni juice and probiotics. *Food Bioscience*, 37, 100740. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100740>