

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΕΠΙΣΤΗΜΗ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΟΥ
ΑΝΘΡΩΠΟΥ»
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΑΣ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

“Εμπλουτισμός μικρογαλακτωμάτων με αιθέρια έλαια και νισίνη.
Έλεγχος της αντιμικροβιακής δράσης των μικρογαλακτωμάτων.”



ΟΝ/ΜΟ ΦΟΙΤΗΤΡΙΑΣ : Ελπίδα Ν.Γαδ
ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: Τσακαλίδου Έφη

ΑΘΗΝΑ 2015

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

“Εμπλουτισμός μικρογαλακτωμάτων με αιθέρια έλαια και νισίνη.
Έλεγχος της αντιμικροβιακής δράσης των μικρογαλακτωμάτων.”



ΟΝ/ΜΟ ΦΟΙΤΗΤΡΙΑΣ : Ελπίδα Ν.Γαδ
ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: Τσακαλίδου Έφη

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Όνομα επιβλέποντος: Καθ. Τσακαλίδου Έφη, ΓΠΑ
Όνομα Β' μέλους Τριμελούς: Δρ. Α.Ξενάκης, Ερευνητής Α', Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών
Όνομα Α' μέλους Τριμελούς: Επικ. Καθ. Π.Σκανδάμης, ΓΠΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τελευταία χρόνια έχει αρχίσει να προβάλλεται ως αίτημα των καιρών η επιστροφή στην φύση. Η τάση αυτή έχει οδηγήσει την Ελλάδα αλλά και την παγκόσμια κοινότητα, σε μια αύξηση στη ζήτηση για φυσικά προϊόντα και ιδιαίτερα αυτά που βασίζονται σε αρωματικά-φαρμακευτικά φυτά. Τα αιθέρια έλαια, πτητικά προϊόντα με έντονη οσμή και δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών, έχουν ευρεία εφαρμογή στην λαϊκή ιατρική, στην συντήρηση και τον αρωματισμών τροφίμων, καθώς και σε βιομηχανίες αρωμάτων. Τα αιθέρια έλαια θεωρούνται «φυσικές» εναλλακτικές των χημικών συντηρητικών και η χρήση τους στα τρόφιμα πληροί τις απαιτήσεις των καταναλωτών για ήπια επεξεργασία ή φυσικά προϊόντα [1], [2]. Οι αντιμικροβιακές τους ιδιότητες είναι γνωστές εδώ και αρκετούς αιώνες, ενώ τα τελευταία χρόνια ένας μεγάλος αριθμός αιθέριων ελαίων και των συστατικών τους έχουν ερευνηθεί για τις αντιμικροβιακές τους ιδιότητες έναντι ορισμένων βακτηρίων και μυκήτων. Ακόμα ένα φυσικό συντηρητικό που χρησιμοποιείται κατά κόρον τα τελευταία χρόνια είναι η βακτηριοσίνη **νισίνη**, η οποία παράγεται από το είδος *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, και παρουσιάζει ένα ευρύ αντιμικροβιακό φάσμα, καθώς είναι δραστική έναντι αρκετών αλλοιώσεων των τροφίμων και των τροφογενών παθογόνων βακτηρίων. Αντικείμενο μελέτης, έχει αποτελέσει επί σειρά ετών ο τρόπος που θα επέτρεπε στις παραπάνω ουσίες να μεταφερθούν στον οργανισμό-στόχο και να δράσουν αντιμικροβιακά σε συνδυασμό (συνεργιστική δράση).

Στόχος της παρούσας διπλωματικής μελέτης ήταν η παρασκευή νέων βιοσυμβατών μικρογαλακτωμάτων με την ενσωμάτωση αιθερίων ελαίων και ενεργής βακτηριοσίνης. Τα αιθέρια έλαια που ενσωματώθηκαν στα συστήματα των μικρογαλακτωμάτων ήταν της ρίγανης, του θυμαριού και του δενδρολίβανου, ενώ η βακτηριοσίνη που έγινε προσπάθεια για τον εγκλωβισμό της στα μικρογαλακτώματα αυτά, ήταν η νισίνη. Τα βιοσυμβατά μικρογαλακτώματα που παρασκευάστηκαν στην συνέχεια εξετάστηκαν ως προς την προς την αντιμικροβιακή τους ενεργότητα, ενώ πραγματοποιήθηκε επίσης η δομική μελέτη τους με την τεχνική του DLS (Δυναμικής Σκέδασης Φωτός) και του EPR (Ηλεκτρονικού Παραμαγνητικού Συντονισμού).

Λέξεις Κλειδιά: Αιθέρια Έλαια, *Origanum heraclioticum*, *Thymus saturoides*, *Rosmainus officinalis*, μικρογαλακτώματα, νισίνη, ψευδοτριγωνικό διάγραμμα φάσης, τεχνική DLS, φασματοσκοπία EPR, συνεργιστική αντιμικροβιακή δράση

THESIS: ‘Encapsulation of nisin in microemulsions with essential oils.**Testing of the antimicrobial action of the microemulsions.****ABSTRACT**

In recent years, the return to nature, has begun to appear as a demand of the times. This trend has led Greece and the global community in an increase of demand for natural products and especially, those based on aromatic-medicinal plants. Essential oils, as volatile products with a strong odor and secondary metabolites of plants, have wide application in folk medicine, maintenance and food flavoring and in perfume industries. Essential oils are considered "natural" alternatives to chemical preservatives and their use in food meets consumer demands for gentle treatment or natural products [1], [2]. The antimicrobial properties have been known for several centuries, and in recent years a large number of essential oils and their components have been investigated for their antimicrobial properties against certain bacteria and fungi. One more natural preservative that is widely used in recent years is the bacteriocin nisin produced by the species *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, and presents a broad antimicrobial spectrum, as it is effective against several food spoilage and foodborne pathogenic bacteria. Object of study, has been for years the way that would allow these substances to be transported in the target organism and act antimicrobials combined (synergistic effect).

The aim of this thesis was the preparation of new biocompatible microemulsions and then incorporating essential oils and active bacteriocin. Essential oils that were incorporated in the microemulsion systems were of oregano, thyme and rosemary, while simultaneously, the bacteriocin nisin was attempted to be wedged in these microemulsions. The biocompatible microemulsions that were prepared, were then examined for their antimicrobial activity and for their structural design, by using techniques such as DLS (Dynamic Light Scattering) and EPR (Electron Paramagnetic Resonance).

Keywords: Essential oils, *Origanum heraclioticum*, *Thymus saturoides*, *Rosmarinus officinalis*, microemulsions, nisine, pseudoternary phase diagram, DLS, EPR, synergistic antimicrobial activity

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Έφη Τσακαλίδου, για την δυνατότητα να εργαστώ στο Εργαστήριο Γαλακτοκομίας σε ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα, αλλά και την ευκαιρία να συνεργαστώ με αξιόλογους ανθρώπους και να αποκτήσω πολύτιμες εμπειρίες. Την ευχαριστώ ιδιαίτερα για την καθοδήγησή και τις συμβουλές της, τόσο στο πειραματικό όσο και στο συγγραφικό μέρος αυτής της εργασίας.

Μέρος της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε στην Ομάδα Βιομηχανικής και Νανοβιοτεχνολογίας του Ινστιτούτου Βιολογικών Ερευνών και Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών (ΕΙΕ-ΙΒΕΒ) και ως εκ τούτου, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Ερευνητή Α' Δρ. Ξενάκη Άρη, ο οποίος με εμπιστεύτηκε και μου επέτρεψε την εκπόνηση της συγκεκριμένης εργασίας στο εργαστήριο του. Τον ευχαριστώ για τις γνώσεις που μου προσέφερε, για τις πολύτιμες συμβουλές, καθώς και για την βοήθεια του, που όποτε και να χρειάστηκε, η πόρτα του γραφείου του ήταν πάντα ανοικτή.

Ευχαριστώ θερμά την Ερευνήτρια Γ' του Ινστιτούτου Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών, Δρ. Βασιλική Παπαδημητρίου η οποία με τις γνώσεις της, το ενδιαφέρον της και τον χαρακτήρα της με βοήθησαν στην εκπόνηση της παρούσας εργασίας. Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλο το προσωπικό του Εργαστηρίου Γαλακτοκομίας και ιδιαίτερα, τον Δρ. Κώστα Παπαδημητρίου για τις πολύτιμες συμβουλές που μου έδωσε κατά την εκπόνηση της παρούσας εργασίας και τον σωστό σχεδιασμό του πειράματος.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στις Υποψήφιες Διδάκτορες Χατζηδάκη Μαρία και Αλεξανδράκη Βούλα, οι οποίες μου προσέφεραν γνώσεις, βοήθεια, αλλά και μεγάλο μέρος του καθημερινού τους χρόνου, από τον σχεδιασμό του πειράματος, μέχρι και την ολοκλήρωσή και συγγραφή της μελέτης μου. Τις ευχαριστώ θερμά για την συνεχή παρακολούθηση της εργασίας μου, τις προτάσεις, τις πολύτιμες συμβουλές, αλλά και την υπομονή τους.

Θερμές ευχαριστίες σε όλο το προσωπικό του Ινστιτούτου Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών για τις πολύτιμες συμβουλές τους, ιδιαιτέρως όμως, στην βιολόγο Μήτσου Ευγενία και την χημικό Θεοχάρη Ιωάννα, για την άψογη συνεργασία μαζί τους, την βοήθεια και την στήριξη τους σε καθημερινή βάση.

Τέλος, ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια μου, ιδιαίτερα στους γονείς μου τόσο για την ηθική, όσο και για την οικονομική συμπαράσταση τους. Τους ευχαριστώ που ήταν εκεί και στήριζαν σιωπηλά κάθε μου επιλογ.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	3
ABSTRACT.....	4
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	5
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.1 ΑΡΩΜΑΤΙΚΑ ΦΥΤΑ	31
1.2 ΑΙΘΕΡΙΑ ΕΛΑΙΑ	11
1.2.1 Αιθέριο έλαιο Δενδρολίβανου (<i>Rosmarinus officinalis cineoliferum</i>).....	13
1.2.2 Αιθέριο έλαιο Θυμαριού (<i>Thymus Satureioides</i>)	14
1.2.3 Αιθέριο έλαιο Ρίγανης (<i>Origanum heracleoticum</i>).....	15
1.3 ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΒΑΚΤΗΡΙΟΣΙΝΕΣ.....	16
1.4 ΝΙΣΙΝΗ.....	17
1.5 ΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΑ	41
1.6 ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΦΑΣΗΣ	28
1.7 ΔΟΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΜΙΚΡΟΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΩΝ	30
1.8 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΙΚΡΟΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΩΝ.....	31
1.8.1 Μικρογαλακτώματα και βιοδιαθεσιμότητα	31
1.8.2 Εγκλωβισμός βιοδραστικών ουσιών.....	32
1.8.3 Μικρογαλακτώματα και τρόφιμα	33
2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	34
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	35
3.1 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	35
3.1.1. Αντιδραστήρια για την παρασκευή μικρογαλακτωμάτων	35
3.1.2. Αντιδραστήρια για την μελέτη της μεσεπιφάνειας του μικρογαλακτώματος.....	37
3.1.3. Αντιδραστήρια για την παρασκευή θρεπτικών υλικών για τρυβλία.....	38
3.2. ΟΡΓΑΝΑ	38
3.2.1. Δυναμική Σκέδασης Φωτός –DLS (Dynamic Light Sattering)	38
3.2.2 Ηλεκτρονικός Παραμαγνητικός Συντονισμός -EPR (Electron Paramagnetic Resonance).....	39
3.2.3 Ιξωδόμετρο	40
3.3. ΜΕΘΟΔΟΙ	41
3.3.1 Πρωτόκολλο Διαλυτοποίησης Νισίνης.....	41
3.3.2 Ανίχνευση αντιμικροβιακής δράσης.....	42
3.3.3 Διάγραμμα Φάσεων	42
3.3.4 Παρασκευή Μικρογαλακτωμάτων	43

3.3.5 Δυναμική Σκέδασης Φωτός (DLS)	44
3.3.6 Ηλεκτρονικός Παραμαγνητικός Συντονισμός	46
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	50
4.1 ΔΟΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΜΙΚΡΟΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΩΝ	51
4.1.1 Ψευδοτριγωνικά Διαγράμματα Φάσης	71
4.1.2 Ανάλυση αποτελεσμάτων τεχνικής Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (DLS)	71
4.1.2.1 Δείκτης διάθλασης (Refractive Index, RI)	56
4.1.2.2 Μέτρηση ιξώδους (viscosity)	56
4.1.2.3 Ανάλυση Φασμάτων Τεχνικής Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (DLS)	58
4.1.3. Ανάλυση Αποτελεσμάτων Φασματοσκοπίας Ηλεκτρονικού Παραμαγνητικού Συντονισμού (EPR)	61
4.1.3.1 Δομική μελέτη της μεσεπιφάνειας των μικρογαλακτωμάτων με την χρήση 5-DSA	61
4.1.3.2. Ανάλυση φασμάτων φασματοσκοπίας EPR	61
4.2. ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ	63
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	67
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	69
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	77

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1ΑΡΩΜΑΤΙΚΑ ΦΥΤΑ

Οι εδαφοκλιματικές συνθήκες της Ελλάδας ευνοούν ιδιαίτερα την ανάπτυξη των αρωματικών φυτών και μάλιστα εξαιρετικής ποιότητας. Η ελληνική χλωρίδα είναι πλουσιότατη σε είδη, περιλαμβάνοντας ένα πολύ σημαντικό αριθμό σπάνιων ειδών, που απαντώνται αποκλειστικά μόνο στον ελλαδικό χώρο. Έτσι, εμφανίζονται στην Ελλάδα ως αυτοφυή είδη, ορισμένα από τα πλέον εξαιρετικά μπαχαρικά, βότανα και αρωματικά φυτά στον κόσμο, όπως η ρίγανη, το θυμάρι, το τσάι του βουνού και άλλα.

Δόκιμος ορισμός για το τι ακριβώς σημαίνει αρωματικά-φαρμακευτικά φυτά δεν υπάρχει, γι' αυτό τα διάφορα φυτά, χαρακτηρίζονται ως αρωματικά ή ως φαρμακευτικά ή ως αρωματικά-φαρμακευτικά βάσει του σκοπού για τον οποίο χρησιμοποιούνται. Τα **αρωματικά φυτά**, είναι γενικά τα φυτά από τα οποία με διάφορες μεθόδους λαμβάνονται οι αρωματικές τους ουσίες, τα αιθέρια έλαια. Πιο συγκεκριμένα, περιέχουν στα φύλλα τους είτε στα άνθη τους αιθέρια έλαια, δηλαδή πτητικές χημικές ουσίες, που όταν ελευθερωθούν αναδύεται χαρακτηριστικό άρωμα, ξεχωριστό για κάθε είδος ή κάθε ποικιλία φυτού. **Φαρμακευτικά** θεωρούνται τα **φυτά** που περιέχουν ένα ή περισσότερα δραστικά συστατικά, τα οποία έχουν την ικανότητα να προλαμβάνουν, να ανακουφίζουν ή να θεραπεύουν ασθένειες.

Πολλά από τα αρωματικά φυτά χαρακτηρίζονται και ως φαρμακευτικά διότι περιέχουν ουσίες με αποδεδειγμένες θεραπευτικές ιδιότητες. Κοινό γνώρισμα των αρωματικών και των φαρμακευτικών φυτών είναι η ύπαρξη αρωματικών αιθέρων ελαίων στα διάφορα φυτικά μέρη τους (φύλλα, άνθη, κλπ.), τα οποία τους προσδίδουν χαρακτηριστική οσμή. Τα αιθέρια έλαια μπορεί να εμφανίζονται σε όλα τα όργανα των φυτών (βλαστό, ρίζα, φύλλα, άνθη, καρπούς).

Δεδομένου επίσης ότι πολλά από τα αρωματικά φυτά χρησιμοποιούνται είτε για την παραλαβή φαρμακευτικών ουσιών από τα αιθέρια έλαιά τους, είτε σαν δρόγες που τους προσδίδονται φαρμακευτικές ιδιότητες, πολύ συχνά υιοθετείται ο όρος **αρωματικά- φαρμακευτικά φυτά**.

Η Ελλάδα σήμερα απαριθμεί 500-600 είδη φυτών τα οποία διαθέτουν και τις δύο ιδιότητες που αναφέρθηκαν παραπάνω, γεγονός που δείχνει την υπεροχή της σε σχέση με άλλες χώρες [3]. Τα πιο σημαντικά από αυτά είναι ο βασιλικός, το γιασεμί, ο γλυκάνισος, η δάφνη, το δεντρολίβανο, ο δίκταμος, τα εσπεριδοειδή, ο ευκάλυπτος, το θυμάρι, η κάππαρη, ο κορίανδρος, ο κρίνος, ο κρόκος, το κύμινο, η λεβάντα, οι λειχήνες, ο μάραθος, η μαντζουράνα, το μελισσόχορτο, η μέντα, η ρίγανη, η σάλβια σκλάρεα, το σπάρτο, η τριανταφυλλιά, το τσάι του βουνού, ο ύσσωπος, το φασκόμηλο, η φλαμουριά και το χαμομήλι. Η πλειονότητα των ελληνικών αρωματικών φυτών ανήκει στις οικογένειες Apiaceae, Asteraceae, Lauraceae, Myrtaceae, Pinaceae, από τις οποίες πιο ενδιαφέρουσα μπορεί να θεωρηθεί αυτή των Lamiaceae (χειλανθή). Η οικογένεια των χειλανθών περιλαμβάνει 200 γένη με 3.200 περίπου είδη που εξαπλώνονται παγκοσμίως (Αυστραλία, ΝΔ. Ασία, Αφρική, Ευρώπη και Ν.Αμερική) με επίκεντρο την περιοχή της Μεσογείου. Στην Ελλάδα ταξινομούνται 320 είδη της οικογένειας, τα περισσότερα από τα οποία παράγουν αιθέρια έλαια. Αντιπροσωπευτικά είδη για την Ελλάδα είναι τα γένη *Teucrium*, *Mentha*, *Rosmarinus*, *Salvia*, *Sideritis*, *Satureja*, *Thymus*, *Origanum* κ.ά. [4].

Τα είδη που επιλέξαμε να ασχοληθούμε στην συγκεκριμένη μελέτη λόγω των ιδιοτήτων τους και θα αναλυθούν παρακάτω είναι τα *Rosmarinus officinalis cineoliferum*, *Thymus satureioides* και *Origanum heracleoticum*.

Τα αιθέρια έλαια των αρωματικών φυτών, εκτός από τη συνεισφορά τους στο άρωμα των τροφίμων, μπορούν να χρησιμοποιηθούν και σε μικρές ποσότητες για την πρόληψη ή καθυστέρηση αντιδράσεων αποικοδόμησης των λιπαρών υλών. Η χρήση των αιθέριων ως φυσικά αντιοξειδωτικά έχει προταθεί από πολλούς ερευνητές κυρίως στις περιπτώσεις τροφίμων όπου το άρωμα τους συνδέεται με τη χρήση συγκεκριμένων αιθέριων αρωματικών φυτών [5], και πιο συγκεκριμένα της ρίγανης [6]. Η αντιοξειδωτική δράση των αιθέριων ελαίων αρωματικών φυτών μπορεί να οφείλεται είτε στα κύρια συστατικά των αιθέριου ελαίου, είτε σε συστατικά που περιέχονται σε μικρές αναλογίες όπως ακόμη και στη συνδυαστική δράση των δύο – προηγούμενων [7]. Μέχρι σήμερα, έχει μελετηθεί εκτενώς και αποδειχθεί η υψηλή αντιοξειδωτική δράση πολλών μπαχαρικών και βοτάνων και των συστατικών τους, με πρώτο στην αγορά φυσικό αντιοξειδωτικό το δενδρολίβανο [8], αλλά και της θυμόλης και της καρβακρόλης, δύο υδροξυλιωμένων φαινολικών ενώσεων, που αποτελούν τις δραστικές ουσίες των αιθέριων ελαίων ρίγανης και θυμαριού [9], [10].

1.2 ΑΙΘΕΡΙΑ ΕΛΑΙΑ

Μελέτες έχουν δείξει ότι η χρήση των αιθέριων ελαίων των φαρμακευτικών και αρωματικών φυτών μπορεί να βοηθήσει όχι μόνο στην επιμήκυνση της ζωής των ζώων, αλλά και στην αποφυγή χρόνιων παθήσεων. Όσον αφορά τον τρόπο σχηματισμού αυτών των ελαίων επικρατούν διάφορες θεωρίες. Είναι όμως κοινά αποδεκτή η άποψη ότι τα αιθέρια έλαια σχηματίζονται από άλλες απλούστερες ενώσεις κατά την διάρκεια μιας διαδικασίας γνωστής ως *βιοσύνθεση*.

Τα αιθέρια έλαια όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, είναι ευώδεις, πτητικές ουσίες που εξάγονται από το εκάστοτε φυτό, με την μέθοδο της απόσταξης (υδρασπόσταξη-HD, απόσταξη με νερό και ατμό, απόσταξη με υδρατμό-SD), της εκχύλισης ή της μηχανικής έκθλιψης [11]. Στις πτητικές αυτές ενώσεις οφείλεται η χαρακτηριστική οσμή των φυτών. Τα αιθέρια έλαια βρίσκονται σε ειδικούς αδένες εκκρίσεως, που είναι είτε εσωτερικοί είτε εξωτερικοί, αλλά η κατανομή τους στα φυσικά όργανα είναι ακανόνιστη.

Απαντώνται στα διάφορα μέρη των φυτών (άνθη, φύλλα, καρπό, βλαστούς, αδένες, αδενώδεις τρίχες, κορμό, ρίζες, κ.ά.). Υπάρχουν περιπτώσεις φυτών στα οποία βρίσκονται αιθέρια έλαια διαφορετικής σύστασης στο ίδιο ή σε διαφορετικά μέρη τους. Σε κάθε ένα από τα αιθέρια έλαια μπορεί να εντοπιστούν μέχρι και διακόσιες διαφορετικές χημικές ενώσεις. Αυτό εξηγεί και την ποικιλία των ιδιοτήτων τους, δεδομένου ότι χρησιμοποιούνται σαν καλλυντικά, αντισηπτικά, αντιμικροβιακά, τονωτικά κ.λ.π. [12]. Επιστημονικές μελέτες, απέδειξαν ότι πολλά βότανα (και τα αιθέρια έλαιά τους) έχουν αντιβακτηριδιακές, αντιμυκητιακές, αντικαταθλιπτικές και άλλες ιατρικές ιδιότητες και ότι βοηθούν στη μείωση της αρτηριακής πίεσης ή επιδρούν θετικά στο ορμονικό σύστημα του σώματος [13]. Πολλά φαρμακευτικά φυτά, χρησιμοποιούνται και για την παρασκευή φαρμάκων που καταπολεμούν σύγχρονες αρρώστιες, όπως είναι ο καρκίνος και το AIDS [14]. Άλλωστε, οι πολλές τους ιδιότητες είναι αυτές που επιτρέπουν και την ευρεία χρήση τους από πολλές βιομηχανίες (τροφίμων, καλλυντικών κ.λ.π). Παρόλα τα οφέλη τους, μπορεί να αποβούν τοξικά με υπερβολική χρήση τους, ιδιαίτερα στην μορφή αιθέριων ελαίων.

Από χημικής πλευράς, δεν πρόκειται για έλαια (δηλαδή μίγματα γλυκεριδίων) αλλά για τερπενικές ουσίες μικρού μοριακού βάρους, κυρίως μονο- και σεσκιτερπένια και σε μικρότερο βαθμό διτερπένια αλλά και φαινυλοπροπανοειδή λιπαρά οξέα και

εστέρες τους ή ακόμα και προϊόντα αποικοδόμησης αυτών. Τα αιθέρια έλαια είναι υγρά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και δεν έχουν καμία σχέση με τα “λίπη και έλαια”, καθώς διαφέρουν τόσο στις φυσικές όσο και στις χημικές τους ιδιότητες.

Οι ουσίες που παραλαμβάνονται με απόσταξη του φυτού, είναι πάντοτε μίγματα διαφόρων οργανο-χημικών συνδυασμών, αλκοολών, αιθέρων, εστέρων, κετονών, αλδευδών κλπ. Υπάρχουν στη φύση περίπου 600 αιθέρια έλαια. Ως κύρια συστατικά τους έχουν μονοτερπένια και σεσκιτερπένια, ενώ μπορεί να περιέχουν και άλλες ουσίες όπως θειούχες ή αζωτούχες ενώσεις κ.ά.

Στο σύνολο των ενώσεων ενός αιθερίου ελαίου οφείλεται η τελική του οσμή. Ακόμα και ενώσεις που συμμετέχουν σε πολύ μικρό ποσοστό στο αιθέριο έλαιο συμβάλλουν στην διαμόρφωση της οσμής του, τα κύρια συστατικά του όμως είναι αυτά που ευθύνονται για την χαρακτηριστική του οσμή. Έτσι, η παρουσία ενός συστατικού στα αιθέρια έλαια σε αναλογία 1% ή μικρότερη προσδίδει σε αυτό το χαρακτηριστικό άρωμα [15].

Από πολλές βιβλιογραφικές αναφορές, επιβεβαιώνεται ότι συχνά τόσο η απόδοση όσο και η σύσταση του αιθερίου ελαίου για το ίδιο είδος φυτού εξαρτάται από τη γεωγραφική θέση της καλλιέργειας. Καθοριστικό επίσης, για τη σύσταση του αιθερίου ελαίου του φυτού, είναι το στάδιο ανάπτυξης των οργάνων του φυτού (φύλλα, άνθη, καρποί). Στις περισσότερες περιπτώσεις, η απόδοση σε αιθέριο έλαιο είναι αυξημένη την περίοδο της ανθοφορίας. Ταυτόχρονα, η αναλογία κάποιων συστατικών αυξάνεται από 10%, που μπορεί να βρισκόταν στα αρχικά στάδια, σε 50-70% στο στάδιο της πλήρους άνθησης. Οι αλλαγές που παρατηρούνται στη σύσταση των πτητικών συστατικών κατά την ωρίμανση των οργάνων, οφείλονται σε αντιδράσεις κυκλοποίησης και αφυδάτωσης συστατικών.

Ωστόσο, ο πραγματικός ρόλος των αιθέριων ελαίων για τα φυτά, δεν είναι γνωστός μέχρι και σήμερα. Είναι γνωστό ότι είναι πρόδρομες ουσίες δραστικών μεταβολιτών και επίσης μειώνουν την απώλεια του νερού με την διαπνοή (αντιδιαπνευστική δράση). Επιπρόσθετα, προσελκύουν τα έντομα που μαζεύουν γύρη και βοηθούν έτσι στην αναπαραγωγή με επικονίαση, ενώ ταυτόχρονα τα διάφορα συστατικά που διαθέτουν τους προσδίδουν αντιοξειδωτικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες ([16], [17], [18]).

Η πιθανή χρήση των αιθέριων ελαίων, ως φυσικοί αντιμικροβιακοί παράγοντες δεν έχει μελετηθεί εκτενώς σε σχέση με τις κοινές τους χρήσεις ως αρωματικές και αντιοξειδωτικές ενώσεις (π.χ. το ριγανέλαιο χρησιμοποιείται κυρίως ως άρτυμα, αλλά

και ως συντηρητικό). Τα αιθέρια έλαια από μπαχαρικά και βότανα (θυμάρι, ρίγανη, μέντα, κανέλα, φασκόμηλο και γαρίφαλο) βρέθηκαν να κατέχουν τις ισχυρότερες αντιμικροβιακές ιδιότητες μεταξύ πολλών που έχουν ερευνηθεί [12]. Εστιάζοντας στα τελευταία χρόνια, πολυάριθμες *in vitro* μελέτες, σε συστήματα με μοντελοποιημένα τρόφιμα, καθώς και σε πραγματικά τρόφιμα ή συσκευασίες τροφίμων [19], [20], έχουν αποκαλύψει την βακτηριοστατική ή βακτηριοκτόνο δράση αρκετών αιθέριων ελαίων έναντι σε παθογόνα όπως η *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* O157:H7, *Bacillus cereus* και *Staphylococcus aureus*, γεγονός που οφείλεται σε έναν αριθμό συστατικών που έχουν ανιχνευθεί στα αιθέρια έλαια (καρβακρόλη, θυμόλη, ευγενόλη, κινναμαλδεΐδη κ.ά) [13]. Έχει παρατηρηθεί συγκεκριμένα, ότι η ανάμιξη καρβακρόλης και θυμόλης από αιθέριο έλαιο ρίγανης σε συγκεκριμένη ποσότητα, μπορεί να ασκήσει ολική αναστολή των μικροβιακών πληθυσμών *Pseudomonas aeruginosa* και *Staphylococcus aureus* [21].

Η ανάπτυξη των μικροβίων μπορεί να παρεμποδιστεί, καθώς κάποια από τα συστατικά των αιθέριων ελαίων καθιστούν τις βακτηριακές μεμβράνες κυρίως των Gram θετικών βακτηρίων, πιο διαπερατές. Τα Gram αρνητικά βακτήρια είναι λιγότερο δεκτικά στη δράση των αιθέριων ελαίων, διότι διαθέτουν μια εξωτερική μεμβράνη που περιβάλλει το κυτταρικό τοίχωμα, το οποίο περιορίζει από το να διαχέονται τα υδροφοβικά συστατικά μέσω των λιποπολυσακχαριτών [16].

Ωστόσο, ο προσδιορισμός των πιθανών συνδυασμών των πλέον δραστικών ενώσεων των αιθέριων ελαίων μπορεί να είναι μεγάλης σημασίας, λαμβάνοντας υπόψη την αύξηση στη χρήση τους τα τελευταία χρόνια. Αυτή η γνώση θα μπορούσε επίσης να βοηθήσει να κατανοήσουμε το εύρος της αποτελεσματικότητας αυτών των ελαίων σε σχέση με την ποικιλομορφία στην σύνθεση τους, που επηρεάζεται από παράγοντες όπως ο τύπος του φυτού, η γεωγραφική θέση, καθώς και η εποχή του έτους [22].

Τα αιθέρια έλαια που χρησιμοποιήθηκαν για την σύνθεση των μικρογαλακτωμάτων επιλέχθηκαν με βάση τις δραστικές ουσίες που έχει το κάθε έλαιο, τις ιδιότητες που αποδίδουν αυτές, καθώς και τις πιθανές εφαρμογές τους στα τρόφιμα.



1.2.1 Αιθέριο έλαιο (*Rosmarinus officinalis cineoliferum*): το φυτό είναι γηγενές στην περιοχή της Μεσογείου και οι χώρες προέλευσής του είναι

Μαρόκο, Τυνησία, Τουρκία, Ελλάδα, Ιταλία, Γαλλία.

Η απόδοση του φυτού *Rosmarinus* (φύλλα και άνθη) σε αιθέριο έλαιο κυμαίνεται μεταξύ 1,3-3,1% ([23]) τα κύρια συστατικά του οποίου είναι το λιμονένιο και η 1,8 κινεόλη.

Το αιθέριο έλαιο του δεντρολίβανου χαρακτηρίζεται γενικά από ουσίες που ανήκουν στις ομάδες των αιθέρων και αλκοολών. Περιέχει περισσότερο από 40% της 1,8 κινεόλης (εστέρες, οξείδια), από αρωματικές ενώσεις περιέχει τερπένια, σεσκιτερπένια, τερπενικές αλκοόλες και τερπενικούς, ενώ από κετόνες περιέχει κάμφορα (βορνεόνη).

Αξίζει να αναφερθούμε στην αντιμυκητιακή ιδιότητα του αιθέριου ελαίου δενδρολίβανου, καθώς συμμετείχε σε μελέτη για τον έλεγχο της παραγωγής αφλατοξίνης με πολύ θετικά αποτελέσματα, αποδεικνύοντας ότι το αιθέριο έλαιο του μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως συντηρητικό σε κάποια τρόφιμα, προστατεύοντας από λοιμώξεις τοξιγενούς μυκητιακού χαρακτήρα [24].



1.2.2 Αιθέριο έλαιο Θυμαριού

(*Thymus Satureioides*): το φυτό συναντάται στην Ευρώπη, την Βόρεια Αφρική και την Ασία (350 είδη του γένους *Thymus*). Στον Ελλαδικό χώρο υπάρχουν περίπου 31 αυτοφυή είδη του γένους

Thymus, 5 από τα οποία ενδημικά.

Το θυμάρι περιέχει πάνω από 1% πτητικό έλαιο (περιέχει θυμόλη (63,3%), καρβακρόλη (2,2%), κυμόλη, λιναλοόλη, βορνεόλη), πικρά στοιχεία, τανίνη, φλαβονοειδή και τερπενοειδή και μάλιστα σύμφωνα με μελέτες των τελευταίων ετών [25] το συγκεκριμένο θυμάρι, παρουσιάζει ποσότητες αιθέριου ελαίου παραπάνω από αυτές που έχουν καταγραφεί στην βιβλιογραφία προηγούμενων ετών (4-6,5%). Παρατηρείται ωστόσο, μια αξιοσημείωτη ποικιλότητα στην εκατοστιαία περιεκτικότητα των παραπάνω συστατικών, που υποδηλώνει την ύπαρξη διαφορετικών χημειότυπων θυμαριού.

Το αιθέριο έλαιό του θυμαριού έχει μεγάλη περιεκτικότητα σε φαινόλες κυρίως θυμόλη και καρβακρόλη, που είναι κυρίως υπεύθυνες για την αντισηπτική του δράση. Επίσης, στην θυμόλη οφείλεται σε μεγάλο ποσοστό η αντιοξειδωτική του ιδιότητα, με αποτέλεσμα ο θυμέλαιο και τα συστατικά του να γίνονται όλο και περισσότερο

δημοφιλή ως πηγή φυσικών αντιμικροβιακών και αντιοξειδωτικών παραγόντων τα τελευταία χρόνια.



1.2.3 Αιθέριο έλαιο Ρίγανης (Origanum heracleoticum):

Το είδος *Origanum heracleoticum* είναι το κυρίως καλλιεργούμενο φυτό για την παραγωγή ρίγανης στον Ελλαδικό χώρο, και αποτελεί ανομοιόμορφο είδος, καθώς υποδιαιρείται σε τρεις ποικιλίες, οι οποίες μοιάζουν οπτικά αλλά

διαφέρουν λίγο στην οσμή (ματζουράνα, θυμάρι, τύπου-ρίγανης). Η τελευταία ποικιλία, που περιέχει την περισσότερη ποσότητα καρβακρόλης, έχει επικρατήσει να αποκαλείται μόνο ρίγανη [26], παρόλα αυτά, και κάποια από τα άλλα είδη διακινούνται ως “ρίγανη” αφού έχουν παρόμοια χαρακτηριστική οσμή, που οφείλεται στην παρουσία της καρβακρόλης στα αιθέρια έλαιά τους.

Η ποσότητα και η χημική σύσταση του ριγανελαίου ποικίλει μεταξύ των διαφόρων ειδών ή παραλλαγών της ρίγανης. Οι εδαφοκλιματικές συνθήκες της περιοχής όπου καλλιεργείται επηρεάζει επίσης την ποσότητα και την ποιότητά του.

Τα κυριότερα συστατικά του αιθέριου ελαίου του είναι η καρβακρόλη (65,25%) και η θυμόλη (14,84%) ([27]), ενώ περιέχει επίσης π-κυμένιο, γ-τερπένιο και α-θουγένιο. Η περιεκτικότητα σε καρβακρόλη και θυμόλη ευθύνονται για την μεγάλη αντιβακτηριακή δράση του αιθερίου ελαίου ρίγανης [18],[21], ενώ και τα άλλα συστατικά παρουσιάζουν μικρή αντιμικροβιακή δράση, καθώς και συνεργιστική δράση μεταξύ τους. Όσον αφορά το π-κυμένιο, δεν παρουσίασε κάποια δράση από μόνο του, μόνο σε συνέργεια με την καρβακρόλη.

Εργαστηριακές δοκιμές έχουν δείξει ότι πρόκειται για ένα πολύ ισχυρό φυσικό αντιβιοτικό (σε πολλές περιπτώσεις καλύτερο από τα χημικά αντιβιοτικά) ενώ δεν έχει καμία από τις παρενέργειες αυτών. Εξοντώνει άμεσα τα μικρόβια χωρίς αυτά να γίνονται ανθεκτικά στην χρήση του ριγανέλαιου κάτι που συμβαίνει σχεδόν πάντα με τα χημικά αντιβιοτικά. Ταυτόχρονα, αποτελεί το έλαιο με την καλύτερη απόδοση περιεκτικότητας αιθέριου ελαίου (περίπου 5% όγκος/ξηρό βάρος) και ένα από τα καλύτερα φυσικά αντισηπτικά, λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς του σε θυμόλη.

Παρατηρήθηκε η μυκητοκτόνος δράση του ελαίου, ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις του, ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις υπήρξε υψηλή παρεμπόδιση Συνοψίζοντας, αν και η αντιμικροβιακή δράση των αιθέριων ελαίων είναι

πειραματικά αποδεδειγμένη [1], ο μηχανισμός δράσης αυτών των ενώσεων δεν έχει μελετηθεί με μεγάλη λεπτομέρεια και έτσι, είναι ελάχιστα κατανοητός. Επιπλέον, σε αντίθεση με την εκτεταμένη έρευνα σχετικά με τον τρόπο δράσης των βακτηριοσινών (*Παράγραφος 1.3*) και των οξυγαλακτικών βακτηρίων, υπάρχουν πολύ λίγες αντίστοιχες μελέτες για τα αιθέρια έλαια. Για παράδειγμα, λίγα είναι γνωστά σχετικά με το μηχανισμό δράσης του αιθέριου ελαίου της ρίγανης σε διαφορετικά βακτήρια και για τις συγκεκριμένες επιδράσεις των συστατικών του, π.χ. καρβακρόλη και θυμόλη [28], [29], [30].

1.3 ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΒΑΚΤΗΡΙΟΣΙΝΕΣ

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια περιλαμβάνουν μια πληθώρα μικροβιακών γενών και ειδών και παίζουν σημαντικό οικονομικό ρόλο στην βιομηχανία τροφίμων [31]. Αποτελούν αναπόσπαστο μέρος πολλών διαδικασιών ζύμωσης που συμβάλλουν στην συντήρηση αλλά και ενίοτε στην αλλοίωση των τροφίμων. Πρόκειται για αυστηρώς ζυμωτικά βακτήρια με κύριο τελικό προϊόν της ζύμωσης το γαλακτικό οξύ.

Με την εντατική έρευνα των τελευταίων ετών έχουν αναπτυχθεί νέες εφαρμογές των οξυγαλακτικών βακτηρίων, όπως προϊόντα με φαρμακευτικές ιδιότητες ακόμα και εμβολίων [32]. Επίσης μια από τις γνωστότερες εφαρμογές των οξυγαλακτικών βακτηρίων είναι η χρήση τους στην παρασκευή προβιοτικών προϊόντων [33]. Τα τελευταία χρόνια υπάρχει η τάση τα γαλακτοκομικά προϊόντα να εμπλουτίζονται και με προβιοτικές καλλιέργειες, οι οποίες μπορούν είτε να περιληφθούν άμεσα στη διαδικασία ζύμωσης, είτε να προστεθούν στο τελικό προϊόν ως πρόσθετα.

Προκαλούν ταχεία οξίνυση του πρώτων υλών, μέσω της παραγωγής γαλακτικού και ενίοτε και οξικού οξέος. Αξίζει να σημειωθεί ότι με την παραγωγή του γαλακτικού οξέος και του οξικού οξέος, της αιθανόλης, του CO₂, του H₂O₂, και των βακτηριοσινών συμβάλλουν στη συντήρηση και στην αύξηση του χρόνου ζωής των τροφίμων αυτών. Επιπλέον, διαμορφώνουν και κατά κανόνα βελτιώνουν την ποιότητα των τροφίμων, μέσω της συμβολής τους στο άρωμα, στη γεύση και στην υφή [34]. Αξιόλογες μελέτες, (35), [36]) επισημαίνουν πως τα οξυγαλακτικά βακτήρια αποτελούν κατά κύριο λόγο στην πλειοψηφία τους, τις εναρκτήριες καλλιέργειες πολλών προϊόντων ζύμωσης και κυρίως των γαλακτοκομικών προϊόντων, μιας και τα φυσιολογικά και μεταβολικά τους χαρακτηριστικά τα

καθιστούν ιδανικά σε τέτοιες εφαρμογές. Επίσης ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η ικανότητά τους να παράγουν πλήθος διαφορετικών ενώσεων με αντιμικροβιακές ιδιότητες, μια ομάδα από τις οποίες είναι οι βακτηριοσίνες [37].



Οι **βακτηριοσίνες** είναι ενώσεις πρωτεϊνικής φύσεως, οι οποίες προέρχονται από βακτηριακά κύτταρα και έχουν ισχυρή βακτηριοκτόνο δράση. Συντίθενται ριβοσωμικά, κωδικοποιούνται δηλαδή από δομικά γονίδια [38], ενώ εντοπίστηκαν και μελετήθηκαν για πρώτη φορά σε μικροοργανισμούς της εντερικής χλωρίδας, κυρίως στα **οξυγαλακτικά βακτήρια**. Είναι ωστόσο δυνατόν να παραχθούν από διάφορα άλλα μη παθογόνα βακτήρια, είτε θετικά είτε αρνητικά κατά Gram.

Οι βακτηριοσίνες ταξινομούνται σε διάφορες κατηγορίες, ανάλογα με τις τροποποιήσεις που υφίσταται το πρωτεϊνικό μόριο μετά τη σύνθεσή του. Δρουν με δυο διαφορετικούς τρόπους. Ορισμένες συνδέονται με συστατικά του τοιχώματος του κυττάρου-στόχου διακόπτοντας τη σύνθεσή του, ενώ άλλες προσδένονται στη μεμβράνη των βακτηρίων επηρεάζοντας ποικίλες φυσιολογικές λειτουργίες, όπως η διαπερατότητα των μεμβρανών.

Οι βακτηριοσίνες των οξυγαλακτικών βακτηρίων είναι μικρού μοριακού βάρους πεπτίδια ή πρωτεΐνες που έχουν αντιμικροβιακή δράση απέναντι σε συγγενή Gram θετικά βακτήρια. Έρευνες έχουν δείξει ότι τα οξυγαλακτικά βακτήρια μπορούν να παράγουν βακτηριοσίνες εντός του τροφίμου και συνεπώς να έχουν ανασταλτική δράση απέναντι στα αλλοιωγόνα και παθογόνα βακτήρια [39]. Αρκετές μελέτες αναφέρουν πως πολλές από τις βακτηριοσίνες είναι δραστικές έναντι αλλοιωγόνων και παθογόνων βακτηρίων όπως είναι το *Clostridium* spp., ο *Staphylococcus aureus* και η *Listeria monocytogenes* [40], [41].

14 ΝΙΣΙΝΗ

Η πιο διαδεδομένη βακτηριοσίνη ως φυσικό συντηρητικό είναι η **νισίνη**, η οποία παράγεται από το είδος *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, και παρουσιάζει ένα ευρύ αντιμικροβιακό φάσμα, είναι δραστική έναντι αρκετών αλλοιώσεων των τροφίμων και των τροφογενών παθογόνων βακτηρίων. Η νισίνη είναι η πιο μελετημένη από όλες τις βακτηριοσίνες και χρησιμοποιείται ως συντηρητικό (E234) στα τρόφιμα

πάνω από 50 χρόνια και σε περισσότερες από 50 χώρες συμπεριλαμβανομένων των ΗΠΑ και της Ευρωπαϊκής Ένωσης με την εμπορική ονομασία “nisaplin”. Χρησιμοποιείται σε μια γκάμα προϊόντων όπως ανακατεργασμένα τυριά, ωριμασμένα τυριά και πηχτή κρέμα.

Η νισίνη είναι δραστική κυρίως κατά των Gram θετικών βακτηρίων (*Staphylococcus* spp., *Listeria* spp., *Clostridium* spp., κλπ.), προσβάλλοντας την κυτταροπλασματική τους μεμβράνη, ενώ δρα επίσης και κατά των σπορίων τους. Ταυτόχρονα, δεν είναι καθόλου δραστική ενάντια σε ζύμες και μύκητες, ενώ και τα Gram αρνητικά βακτήρια δεν προσβάλλονται εύκολα από υδρόφιλα μόρια, όπως η νισίνη, επειδή προστατεύονται από το εξωτερικό τους κυτταρικό τοίχωμα.

Αρκετές ερευνητικές προσπάθειες έχουν γίνει με χρήση της νισίνης σε διάφορα τρόφιμα για την αναστολή παθογόνων μικροοργανισμών των τροφίμων, όπως *Listeria* spp., *Bacillus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* κ.α., με ενθαρρυντικά αποτελέσματα.

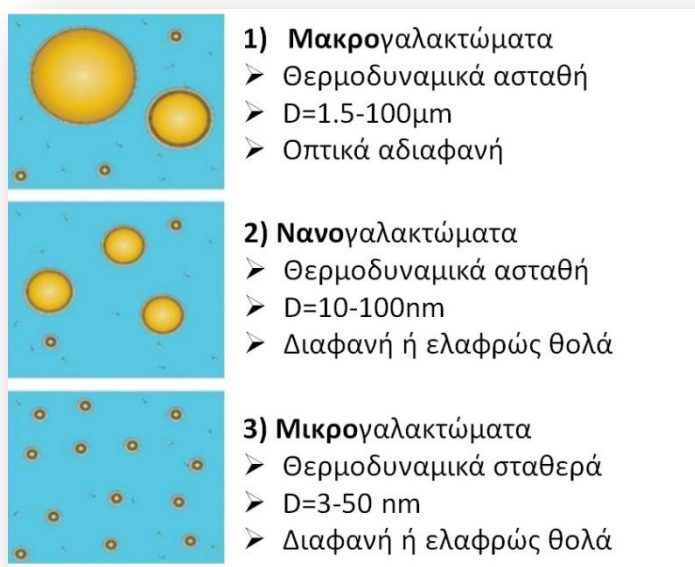
Οι ερευνητικές προσπάθειες στρέφονται σε εφαρμογές της στα συσκευασμένα τρόφιμα, με την ενσωμάτωση στο τρόφιμο ή την επιφανειακή απορρόφησή της στο υλικό της συσκευασίας. Οι τρόποι ενσωμάτωσης των βακτηριοσινών στα τρόφιμα είναι δύο. Στον ένα τρόπο πραγματοποιείται η παραγωγή και στη συνέχεια η προσθήκη της βακτηριοσίνης στο τρόφιμο (*ex situ*). Δηλαδή η βακτηριοσίνη παράγεται έξω από το τρόφιμο και προστίθεται σε αυτό σαν συστατικό. Στο δεύτερο τρόπο πραγματοποιείται απευθείας η παραγωγή της βακτηριοσίνης στο τρόφιμο (*in situ*). Ουσιαστικά στον δεύτερο τρόπο προστίθεται η καλλιέργεια του παραγωγού στελέχους, το οποίο παράγει την βακτηριοσίνη μέσα στο σύστημα του τροφίμου.

Η χρήση των βακτηριοσινών μπορεί να συμβάλει στην μείωση της χρήσης συντηρητικών στα τρόφιμα. Μέχρι τώρα για τη συντήρηση των τροφίμων χρησιμοποιούνταν σε μεγάλη κλίμακα συνθετικά πρόσθετα, όπως νιτρώδη, νιτρικά και θειώδη άλατα, προπιονικό, σορβικό και βενζοϊκό οξύ [39].

1.5 ΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΑ

Γαλακτώματα ονομάζονται τα κολλοειδή συστήματα διασποράς, τα οποία προκύπτουν από την διασπορά ενός υγρού (διεσπαρμένη ή εσωτερική φάση) σε ένα άλλο υγρό (συνεχής ή εξωτερική φάση), μη αναμίξιμα μεταξύ τους. Έτσι εάν έλαιο και νερό αναμιχθούν και αναταραχθούν ισχυρά, τα δύο υγρά διασπείρονται το ένα στη μάζα του άλλου, με αποτέλεσμα τη δημιουργία γαλακτώματος. Ένα τέτοιο γαλάκτωμα δεν είναι σταθερό, γιατί τα σταγονίδια της ασυνεχούς φάσης τείνουν να συσσωματωθούν, με αποτέλεσμα την καταστροφή του γαλακτώματος και το διαχωρισμό των δύο φάσεων [42], [43], [44].

Τα γαλακτώματα χωρίζονται σε τρεις μεγάλες κατηγορίες : α) τα **μακρογαλακτώματα**, β) τα **μικρογαλακτώματα** και γ) τα **νανογαλακτώματα**. Στην παρακάτω εικόνα αναφέρονται συνοπτικά τα χαρακτηριστικά τους.



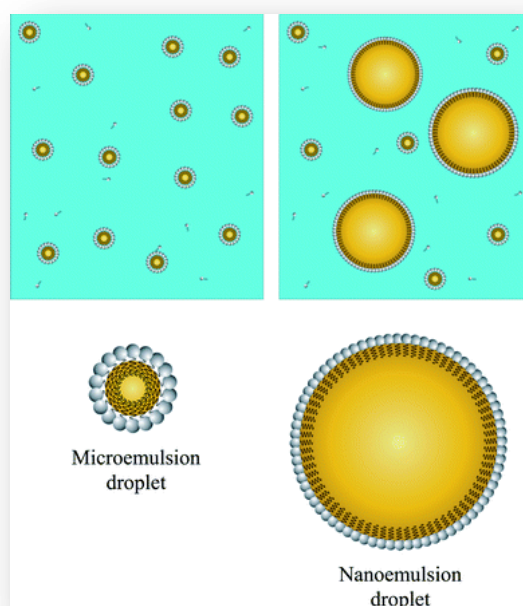
Εικόνα 1.2: Βασικές χαρακτηριστικά- διαφορές μακρο-, νανο- και μικρογαλακτωμάτων.

Τα γαλακτώματα μπορούν να ταξινομηθούν επίσης, ανάλογα με την αναλογία του νερού και του ελαίου. Έτσι, ένα σύστημα που αποτελείται από σταγονίδια ελαίου διεσπαρμένα σε υδατική φάση ονομάζεται γαλάκτωμα ελαίου σε νερό **O/W (oil-in-water)**, ενώ ένα σύστημα που αποτελείται από διεσπαρμένα σταγονίδια νερού σε συνεχή φάση ελαίου ονομάζεται γαλάκτωμα νερού σε έλαιο **W/O (water-in-oil)**,

όπου η πρώτη αναφερόμενη φάση είναι η φάση διασποράς και η δεύτερη η συνεχής φάση.

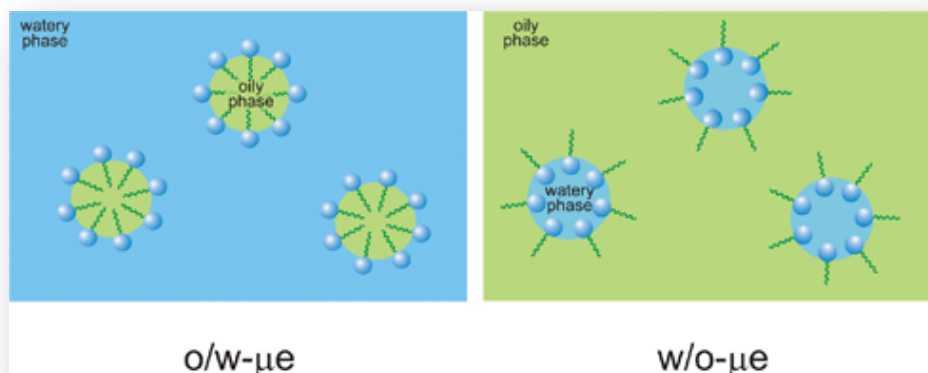
Στην παρούσα μελέτη, θα ασχοληθούμε εκτενέστερα με τα **μικρογαλακτώματα**, τα οποία αναγράφονται στην βιβλιογραφία ως συστήματα νερού, ελαίου και επιφανειοενεργών ουσιών (αμφίφιλων), που σχηματίζουν υγρά διαλύματα, οπτικά ισότροπα και θερμοδυναμικά σταθερά [45].

Το πρώτο άρθρο για τέτοιες κolloειδείς διασπορές δημοσιεύτηκε το 1943 από τον Hoar και τους συνεργάτες του [46], αλλά ήταν το 1960 που χρησιμοποιήθηκε ο όρος μικρογαλακτώματα από τους Schulman και συνεργάτες [47], ωστόσο αργότερα ανακαλύφθηκε ότι πρόκειται για νανοδομές. Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι τα μικρογαλακτώματα εμφανίζουν μικρότερη διάμετρο της διεσπαρμένης φάσης τους από τα νανογαλακτώματα (**Εικόνα 1.3**). Οι όροι νανο- και μικρο- παρ' όλο που είναι παραπλανητικοί όροι για το μέγεθος των συγκεκριμένων δομών παραμένουν ως και σήμερα στην βιβλιογραφία με αυτόν τον τρόπο για ιστορικούς λόγους.



Εικόνα 1.3. Σχηματική απεικόνιση μικρογαλακτώματος και νανογαλακτώματος O/W και στις δυο περιπτώσεις. Η δομή των σωματιδίων και στους δύο τύπους γαλακτωμάτων είναι αντίστοιχη-ένας υδρόφοβος πυρήνας από έλαιο προς τον οποίο έχουν προσανατολιστεί οι υδρόφοβες ουρές του επιφανειοενεργού, ενώ οι υδρόφιλες κεφαλές έχουν προσανατολιστεί προς την εξωτερική φάση (υδατική φάση).

Τα **μικρο-γαλακτώματα** είναι μακροσκοπικά ισότροπα μείγματα τουλάχιστον ενός υδρόφοβου, ενός υδρόφιλου και ενός αμφίφιλου συστατικού (επιφανειοενεργό). Μείγματα των παραπάνω συστατικών μπορεί να δημιουργήσουν πληθώρα συστημάτων ανάλογα με τη σύσταση αλλά και την θερμοκρασία στην οποία αυτά θα παρασκευαστούν. Η δομή της διεσπαρμένης φάσης μπορεί να είναι σφαιρική, κυλινδρική, να παρουσιάζει μορφή στοιβάδας κ.α. Τα επιφανειοενεργά που χρησιμοποιούνται είναι αμφίφιλα μόρια και η μη πολική τους ουρά προσανατολίζεται στην υδρόφοβη περιοχή, ενώ η υδρόφιλη κεφαλή τους εισχωρεί στην υδατική φάση (**Εικόνα 1.3**).



Εικόνα 1.4: Σχηματική αναπαράσταση του προσανατολισμού των επιφανειοενεργών ουσιών σε μικρογαλάκτωμα μορφής O/W (δομή μικκυλίου) και αντίστοιχα σε μικρογαλάκτωμα μορφής W/O (δομή αντίστροφου μικκυλίου). Και στις δύο περιπτώσεις, οι υδρόφιλες κεφαλές είναι στραμμένες προς την φάση του νερού, ενώ οι υδρόφοβες ουρές προς την φάση του ελαίου.

Σημαντικό χαρακτηριστικό, που τα διαφοροποιεί από τα **μακρο-γαλακτώματα** είναι ότι εμφανίζουν θερμοδυναμική σταθερότητα, καθώς σχηματίζονται αυθόρμητα και είναι ιδιαίτερος σταθερά για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Το γεγονός αυτό μπορεί αρχικά να εντυπωσιάζει, αλλά οφείλεται στις χαμηλές διεπιφανειακές τάσεις που δημιουργούνται μεταξύ των μικροδομών ελαίου και νερού [48].

Τα **νανο-γαλακτώματα** χωρίζονται και αυτά σε W/O ή O/W. Είναι θερμοδυναμικά ασταθή αλλά είναι κινητικά σταθερά. Τα νανογαλακτώματα, όπως και τα μικρογαλακτώματα, μπορούν να παρασκευαστούν χωρίς την χρήση συν-επιφανειοενεργών, δηλαδή ενώσεων μικρής πολικότητας που βοηθούν τα

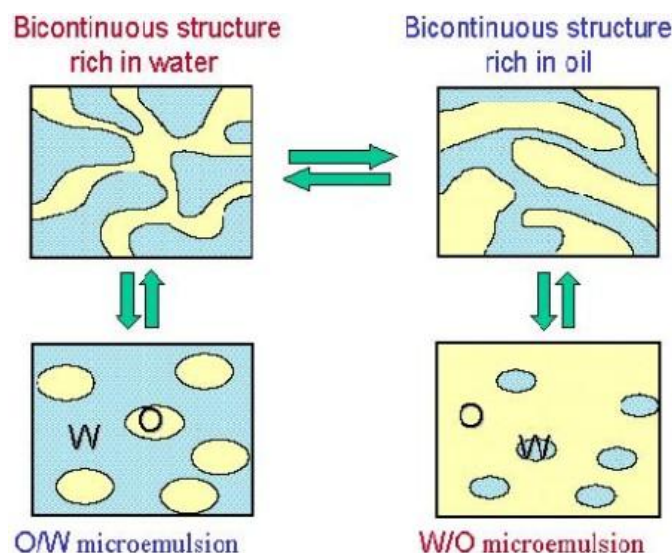
επιφανειοενεργά όταν είναι απαραίτητο στην μείωση της διεπιφανειακής τάσης, όπως θα αναλυθεί και παρακάτω. Επίσης, η παρασκευή τους απαιτεί την παροχή ενέργειας, γεγονός το οποίο δεν εμφανίζεται σαν προϋπόθεση στα μικρογαλακτώματα, τα οποία και δημιουργούνται αυθόρμητα [49].

Τα μικρογαλακτώματα διακρίνονται, όπως και τα γαλακτώματα, σε τρεις κατηγορίες βάσει της αναλογίας των επιμέρους συστατικών τους:

- **Μικρογαλακτώματα ελαίου σε νερό O/W (oil-in-water):** πρόκειται για μικροσταγονίδια ελαίου που περιβάλλονται από μια μονοστιβάδα επιφανειοενεργών μορίων, ενώ το νερό αποτελεί τη συνεχή φάση. Τα μικροσταγονίδια ελαίου στις περισσότερες των περιπτώσεων εμφανίζονται να έχουν σφαιρικό σχήμα, το σχήμα όμως αυτό εξαρτάται από το είδος του επιφανειοενεργού. Είναι ένας τύπος μικρογαλακτώματος πλούσιου σε νερό αλλά φτωχό σε έλαιο (μικκύλια).

Μικρογαλακτώματα νερού σε έλαιο W/O (water-in-oil): πρόκειται για μικροσταγονίδια νερού που περιβάλλονται από στρώμα αμφίφιλων μορίων προσανατολισμένων αντίθετα, δηλαδή οι πολικές κεφαλές προσανατολίζονται προς το εσωτερικό και οι υδρόφοβες αλυσίδες προς τη συνεχή φάση του ελαίου (αντίστροφα μικκύλια). Είναι ένας τύπος μικρογαλακτώματος πλούσιου σε έλαιο και φτωχό σε νερό.

- **Δισυνεχή μικρογαλακτώματα (bicontinuous):** πρόκειται για μικρογαλακτώματα με συγκρίσιμες ποσότητες νερού και ελαίου, η δομή των οποίων δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως. Υποστηρίζεται επίσης, ότι στη φάση αυτή υπάρχει συνύπαρξη των δύο παραπάνω ειδών μικρογαλακτωμάτων.



Εικόνα 1.5: Κατηγορίες μικρογαλακτωμάτων. Από αριστερά και δεξιόστροφα, μικρογαλάκτωμα ελαίου σε νερό (O/W), μικρογαλάκτωμα νερού σε έλαιο (W/O) και διασυνεχές μικρογαλάκτωμα (bicontinuous structure).

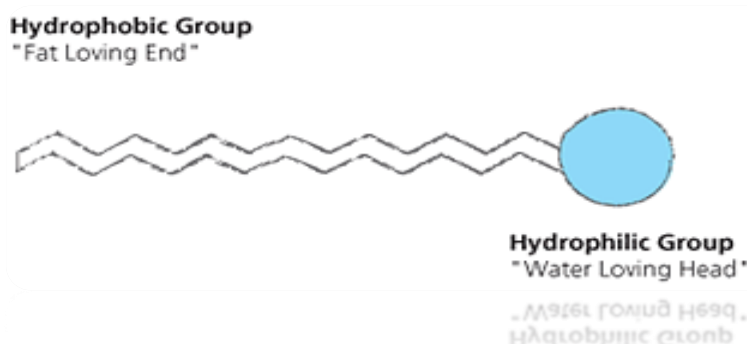
Η διαδικασία μείωσης του μεγέθους των σταγονιδίων σε ένα γαλακτώμα είναι γνωστή ως **ομογενοποίηση**. Στη βιομηχανία τροφίμων η μέθοδος αυτή συνήθως εφαρμόζεται σε διατάξεις που ονομάζονται **ομογενοποιητές**, όπου τα γαλακτώματα υποβάλλονται σε έντονη μηχανική ανάδευση με εφαρμογή πίεσης.

Επιφανειοενεργές ουσίες

Νερό και έλαιο (οργανικός μη πολικός διαλύτης) είναι δύο υγρά μη αναμίξιμα γεγονός που οφείλεται στην υψηλή επιφανειακή τάση μεταξύ τους, η οποία οδηγεί στην μείωση της διαχωριστικής επιφάνειας, με αποτέλεσμα τα δύο υγρά να διαχωρίζονται σε δύο φάσεις. Αν τα παραπάνω συστατικά υποστούν ανάδευση, έχουμε την δημιουργία ενός γαλακτώματος, το οποίο όμως όταν έρθει σε ηρεμία διαχωρίζεται και πάλι σε δύο διακριτές φάσεις [50].

Ο σχηματισμός μικρογαλακτωμάτων θεωρείται στιγμιαίος και ερμηνεύεται ως εξής: κάτω από ορισμένες συνθήκες η επιφανειακή τάση γίνεται αρνητική οδηγώντας σε ασταθή μεσεπιφάνεια. Αποτέλεσμα της αστάθειας αυτής είναι να αυξηθεί η μεσεπιφάνεια μέχρις ότου η επιφανειακή τάση να πάρει μια μικρή αλλά θετική τιμή όποτε και σχηματίζεται το μικρογαλάκτωμα [51]. Για να δημιουργήσουμε ένα γαλάκτωμα το οποίο θα σταθεροποιηθεί χρησιμοποιούμε **επιφανειοενεργές ουσίες**.

Οι επιφανειοενεργές ενώσεις, είναι μόρια με αμφίφιλο χαρακτήρα, καθώς αποτελούνται από δύο περιοχές διαφορετικής πολικότητας [52] (Εικόνα 1.6). Η μια περιοχή ονομάζεται πολική κεφαλή, έχει υδρόφιλο χαρακτήρα και προσανατολίζεται στην υδατική φάση του γαλακτώματος (συνήθως μια ομάδα $-COOH$, $-SO_3Na$ κ.λ.π.) και η άλλη ονομάζεται μη πολική ουρά, έχει υδρόφοβο χαρακτήρα (λιπόφιλη) και προσανατολίζεται προς την ελαιώδη φάση του γαλακτώματος (συνήθως μια μεγάλη υδρογονοανθρακική αλυσίδα).



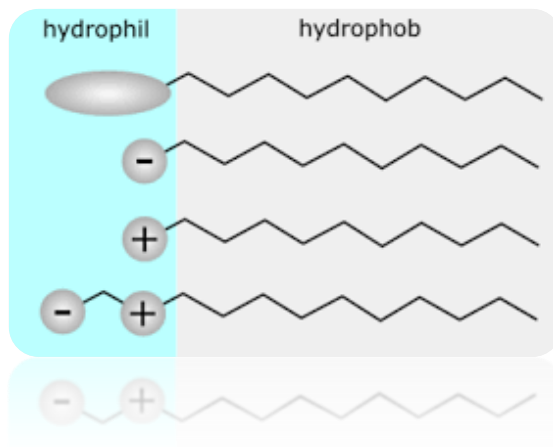
Εικόνα 1.6 : Διαγραμματική απεικόνιση της δομής μιας επιφανειοενεργής ουσίας.

Συνεπώς, τα επιφανειοενεργά μόρια λόγω του αμφίφιλου χαρακτήρα τους εντοπίζονται μεταξύ των μορίων του νερού και των μορίων του ελαίου έχοντας στραμμένες τις πολικές κεφαλές προς την υδατική φάση και τις μη πολικές κεφαλές προς την λιπαρή φάση.

Όπως και για απλά υδατικά συστήματα, ο σχηματισμός μικρογαλακτώματος εξαρτάται από τον τύπο και τη δομή του επιφανειοενεργού (Εικόνα 1.7). Ο κύριος ρόλος των επιφανειοενεργών είναι να μειώσουν τη διεπιφανειακή τάση των σταγονιδίων επαρκώς, έτσι ώστε να λαμβάνει χώρα αυθόρμητη διασπορά σταγονιδίων νερού ή ελαίου και το σύστημα να είναι θερμοδυναμικά σταθερό. Εξαιρετικά χαμηλές τιμές επιφανειακής τάσης είναι κρίσιμης σημασίας για το σχηματισμό των μικρο-γαλακτωμάτων.

Τον παραπάνω σκοπό, τον επιτυγχάνουν τα επιφανειοενεργά μόρια δημιουργώντας ηλεκτρικά, μηχανικά και στερεοχημικά «φράγματα» (ανθεκτικά φράγματα μεγάλου ιξώδους) και εμποδίζοντας έτσι την συνένωση ομοειδών σταγονιδίων.

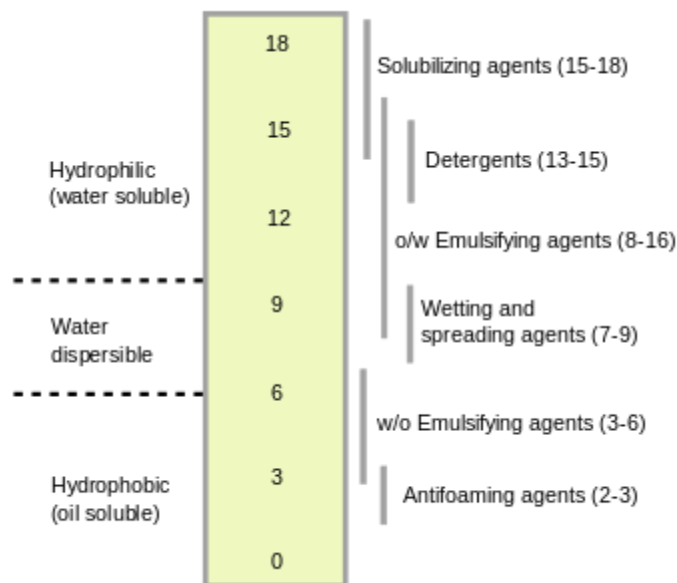
Τα ιονικά επιφανειοενεργά μόρια προσδίδουν ένα φορτίο στη διεπιφάνεια οπότε τα σταγονίδια, ως ομώνυμα φορτισμένα απωθούνται ενισχύοντας έτσι τη σταθερότητά τους.



Εικόνα 1.7: Κατηγορίες επιφανειοενεργών ανάλογα με το φορτίο της πολικής κεφαλής τους. Από πάνω προς τα κάτω: Μη ιοντικό, Ανιοντικό, Κατιοντικό και Αμφοτεριοντικό επιφανειοενεργό.

Προκειμένου να επιλεγεί το κατάλληλο επιφανειοενεργό για την παρασκευή των μικρογαλακτωμάτων, χρησιμοποιείται συχνά η εμπειρική παράμετρος **HLB** (Hydrophilic-Lipophilic Balance), η οποία εκφράζει τον λόγο υδροφιλικών-λιποφιλικών ομάδων και χαρακτηρίζει τα επιφανειοενεργά, ενώ χρησιμοποιείται ως κριτήριο καταλληλότητας του επιφανειοενεργού με τα συστατικά του μικρογαλακτώματος και τον τύπο του μικρογαλακτώματος.

Η τιμή HLB, λαμβάνει υπόψη την αναλογία της υδρόφιλης προς τη λιπόφιλη περιοχή ενός επιφανειοενεργού, όπως αυτή υπολογίζεται από τα μοριακά βάρη της κάθε περιοχής [53]. Όταν οι τιμές HLB του επιφανειοενεργού και του ελαίου είναι ίδιες ή τείνουν να συμπίπτουν τότε αυξάνεται η επιτυχία της παρασκευής του μικρογαλακτώματος (**Εικόνα 1.8**).

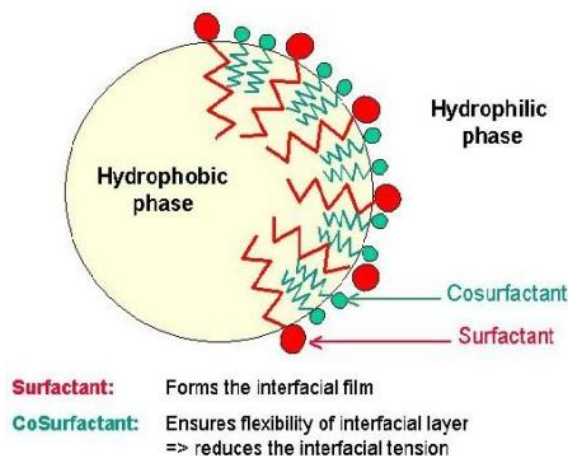


Εικόνα 1.8: Τιμές HLB και τύποι γαλακτωμάτων στους οποίους αντιστοιχούν.

Συν-επιφανειοενεργά

Ο κυριότερος ρόλος λοιπόν των επιφανειοενεργών ουσιών είναι να αυξάνουν την μεσεπιφάνεια μεταξύ των δύο υγρών, με αποτέλεσμα η υδατική και η ελαιώδης φάση να βρίσκονται σε λεπτότατη διασπορά ή μία μέσα στην άλλη λόγω της μείωσης της επιφανειακής τάσης. Βέβαια, η ύπαρξη επιφανειοενεργών ουσιών δεν είναι πάντα ικανή για την μείωση της επιφανειακής τάσης στα αναγκαία επίπεδα για την δημιουργία μικρογαλακτωμάτων. Έτσι, σε αρκετές περιπτώσεις χρησιμοποιούνται και ενώσεις μικρής πολικότητας που ονομάζονται **συν-επιφανειοενεργά** [8].

Πρόκειται για αλειφατικές αλκοόλες ή αμίνες με 4 έως 6 άτομα άνθρακα και σπανιότερα με 7 έως 8. Ο Moulík [54], θεωρεί ότι η παρουσία τους στην διεπιφάνεια μεταξύ της υδατικής και της λιπαρής φάσης προσφέρει ελαστικότητα με αποτέλεσμα να πραγματοποιείται πιο εύκολη κάμψη της διεπιφάνειας με ευνοϊκότερη ενεργειακή διασπορά (**Εικόνα 1.9**).

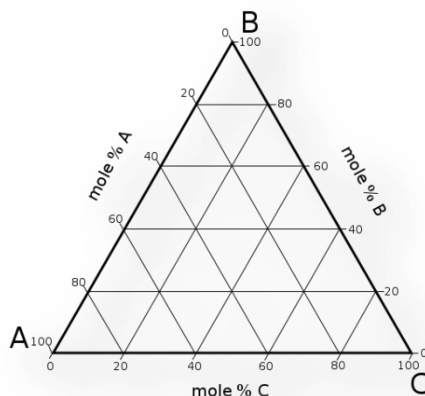


Εικόνα 1.9: Δομή και διάταξη επιφανειοενεργών και συν-επιφανειοενεργών μορίων για τον σχηματισμό της διεπιφανειακής μεμβράνης.

Η ύπαρξη συν-επιφανειοενεργού μπορεί συχνά να εμποδίζει την εφαρμογή κάποιων μικρογαλακτωμάτων σε τρόφιμα. Εάν ένα μικρογαλάκτωμα προορίζεται για από του στόματος χρήση, το σύστημα θα διαλυθεί στην στοματική κοιλότητα και στο στομάχι. Όμως, η ύπαρξη του συν-επιφανειοενεργού παράγοντα μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την αποσταθεροποίηση της μεσεπιφάνειας, και κατά συνέπεια την καταστροφή του μικρογαλακτώματος. Γι' αυτό τον λόγο, κατά την παρασκευή μικρογαλακτωμάτων που προορίζονται για χρήση τους σε τρόφιμα απαιτούνται συν-επιφανειοενεργά τα οποία θα παραμένουν στην μεσεπιφάνεια και θα μειώνουν την επιφανειακή τάση όπως ακριβώς γίνεται και με τα επιφανειοενεργά. Η αιθανόλη είναι η μόνη που επιτρέπεται σε περιορισμένη ποσότητα για την συγκεκριμένη χρήση. Σε σχετικά υψηλότερες συγκεντρώσεις (περίπου 20%) η αιθανόλη θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί και σε μικρογαλακτώματα που προορίζονται για αλκοολούχα ποτά.

1.6 ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΦΑΣΗΣ

Στην μελέτη των μικρογαλακτωμάτων, χρησιμοποιούνται τα *τριγωνικά διαγράμματα φάσης*, σταθερής θερμοκρασίας και πίεσης. Το *τριγωνικό διάγραμμα φάσης*, αναπαριστά σχηματικά την κατά βάρους σύσταση ενός συστήματος που αποτελείται από τρία συστατικά, καθένα από τα οποία αντιστοιχεί σε μία από τις κορυφές ενός ισόπλευρου τριγώνου (**Εικόνα 1.10**). Το τρίγωνο διαιρείται σε μικρότερα ισόπλευρα τρίγωνα με ευθύγραμμα τμήματα παράλληλα προς τις πλευρές του. Στο εσωτερικό του τριγώνου, υπάρχουν και οι γραμμές τιλοδότησης οι οποίες εκφράζουν την μεταβολή που προκαλείται όταν τα δύο εκ των τριών συστατικών παραμένουν σταθερά ενώ το τρίτο αλλάζει.

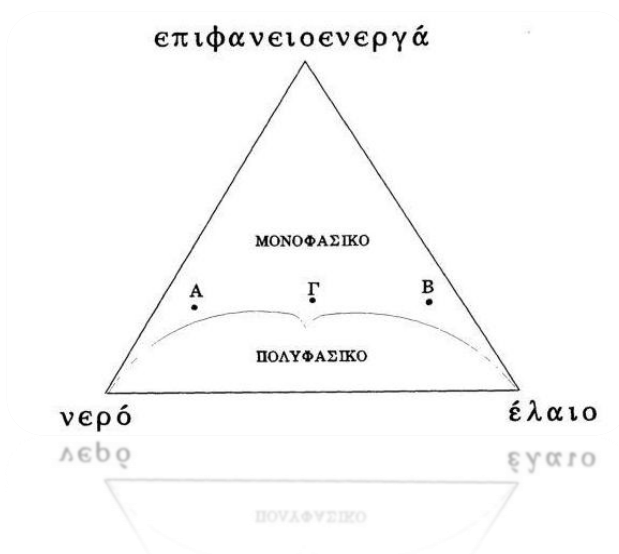


Εικόνα 1.10: Διαγραμματική απεικόνιση τριγωνικού διαγράμματος φάσης.

Το κάθε σημείο που βρίσκεται σε κάθε πλευρά του τριγώνου αντιστοιχεί σε μίγμα δύο εκ των τριών συστατικών ορισμένης αναλογίας, ενώ τα σημεία που βρίσκονται εντός του τριγώνου αντιστοιχούν σε μίγμα και των τριών συστατικών ορισμένης αναλογίας επίσης. Όταν όμως, το σύστημα του μικρογαλακτώματος αποτελείται από περισσότερα των τριών συστατικών το διάγραμμα φάσεων καλείται πλέον *ψευδοτριγωνικό διάγραμμα*. Στην περίπτωση αυτή η κάθε κορυφή του τριγώνου παριστάνει μίγμα δύο ή περισσότερων συστατικών η αναλογία των οποίων είναι σταθερή.

Το διάγραμμα φάσης αποτελεί σημαντικό στοιχείο για την μελέτη της δομής του συστήματος καθώς μέσω αυτού είμαστε σε θέση να επιλέξουμε το σύστημα με την επιθυμητή για εμάς αναλογία συστατικών. Στην παρακάτω εικόνα (**Εικόνα 1.11**),

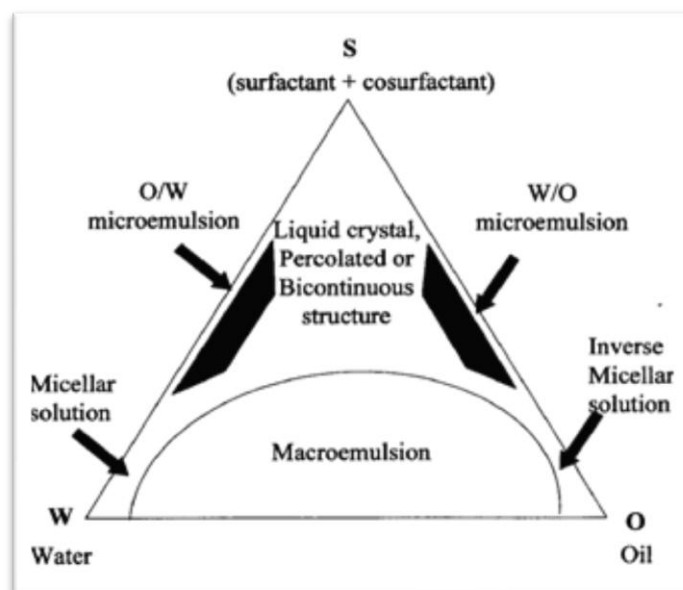
παρουσιάζεται το τριγωνικό διάγραμμα ιδανικού συστήματος νερού, ελαίου και επιφανειοενεργού. Επιλέγοντας τα σημεία για τα οποία το σύστημα είναι μονοφασικό δημιουργούνται δυο διακριτές περιοχές στο διάγραμμα. Η μια είναι η περιοχή που το σύστημα είναι μονοφασικό και δεύτερη είναι η περιοχή που το σύστημα είναι πολυφασικό. Τα μικρογαλακτώματα εντοπίζονται στην μονοφασική περιοχή. Επίσης στην μονοφασική περιοχή του τριγωνικού διαγράμματος διακρίνονται μικρογαλακτώματα τύπου ελαίου σε νερό (O/W) σημείο (Α), μικρογαλακτώματα τύπου νερού σε έλαιο (W/O) σημείο (Β), και τέλος τα δυσανεχτά μικρογαλακτώματα σημείο (Γ).



Εικόνα 1.11: Τριγωνικό διάγραμμα ιδανικού συστήματος νερού-ελαίου-επιφανειοενεργών.

Φτιάχνοντας το τριγωνικό διάγραμμα παρατηρούμε την εμφάνιση περιοχής όπου το σύστημά μας είναι μονοφασικό (μικρογαλάκτωμα) αλλά και την διαφασική περιοχή. Επίσης, είναι πιθανόν να εμφανιστούν περιοχές όπου οι αναλογίες των συστατικών προσδίδουν διαφορετική δομή από αυτή του μικρογαλακτώματος (κρυστάλλους κ.α), όπως περιγράφεται στην **Εικόνα 1.12**.

Επομένως, μικρογαλακτώματα θεωρούμε τα συστήματα τα οποία είναι διαυγή και ομοιογενή χωρίς παρατήρηση αναταράξεων στο εσωτερικό (κύματα). Οποιαδήποτε άλλη παρατήρηση, όπως: θολερότητα, κύματα (έντονα), διαχωρισμός φάσεων, δημιουργία γέλης (gel), παραπέμπει σε δείγματα που δεν αποτελούν μικρογαλακτώματα.



Εικόνα 1.12: Διαγραμματική απεικόνιση θεωρητικού τριγωνικού διαγράμματος φάσης με όλες τις πιθανές δομές ενός συστήματος που περιέχει έλαιο, νερό και επιφανειοενεργές ουσίες. Σημειώνεται, ότι δεν ακολουθούν αυστηρά όλα τα συστήματα τον παραπάνω τύπο διαγράμματος φάσης αλλά κάθε σύστημα εμφανίζει την δική του συμπεριφορά

1.7 ΔΟΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΜΙΚΡΟΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΩΝ

Το βασικότερο χαρακτηριστικό των μικρογαλακτωμάτων που μας δίνει την δυνατότητα να μελετήσουμε περαιτέρω την σύσταση τους, είναι η διαύγεια τους, καθώς είναι ομοιογενή μακροσκοπικά, αλλά αν εξετασθούν μικροσκοπικά διακρίνονται καλά καθορισμένες περιοχές ελαίου και νερού.

Η δομική μελέτη των μικρογαλακτωμάτων πραγματοποιείται από έναν αριθμό τεχνικών, οι οποίες όμως δρουν συμπληρωματικά καθώς δίνουν διαφορετικές πληροφορίες η καθεμία για το υπό μελέτη σύστημα. Κάποιες από τις τεχνικές αυτές βασίζονται στην σκέδαση φωτός, όπως η Δυναμική Σκέδαση Φωτός (DLS, Dynamic Light Scattering) καθώς επίσης και η σκέδαση ακτινών-X σε μικρές γωνίες (SAXS, Small Angle X-ray Scattering). Άλλες μέθοδοι βασίζονται σε φασματοσκοπικές τεχνικές, όπως ο Ηλεκτρονικός Παραμαγνητικός Συντονισμός (EPR, Electron Paramagnetic Resonance), αλλά και ο Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός (NMR, Nuclear Magnetic Resonance). Τέλος, υπάρχουν και οι τεχνικές που βασίζονται στην

μέτρηση ιδιοτήτων μεταφοράς όπως η αγωγιμότητα και το ιξώδες [55]. Υπάρχουν και απεικονιστικές τεχνικές όπως το CRYO-TEM (Cryogenic– Temperature Transmission Electron Microscopy) [75].

Παρακάτω, θα αναλύσουμε τις τεχνικές τις οποίες χρησιμοποιήσαμε για την δομική μελέτη και τον χαρακτηρισμό των μικρογαλακτωμάτων στην παρούσα εργασία και αυτές είναι η τεχνική DLS και η φασματοσκοπία EPR.

Η τεχνική του DLS χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της κατανομής και του μεγέθους σωματιδίων σε εναιώρημα ή σε διάλυμα πολυμερών, μετρώντας την ένταση του φωτός που σκεδάζεται μέσα στο διάλυμα αυτό, καθώς και την εξάρτησή της από τον χρόνο [56], [57], [58]. Το μέγεθος που προκύπτει μετά την μέτρηση, είναι η υδροδυναμική ακτίνα ή διάμετρος και η πολυδιασπορά των σχηματιζόμενων μικκυλίων. Το DLS μπορεί επίσης να εφαρμοστεί ώστε να αποσπάσουμε πληροφορίες σε σχέση με την τοπική ρεολογική συμπεριφορά πολύπλοκων ρευστών. Με την τεχνική του EPR παρέχονται πληροφορίες για την δυναμική και την ρευστότητα της μονοστιβάδας των επιφανειοενεργών στα μικρογαλακτώματα που αναπτύχθηκαν.

1.8 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΙΚΡΟΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΩΝ

1.8.1 Μικρογαλακτώματα και βιοδιαθεσιμότητα

Θεωρείται, ότι τα συστατικά που παρουσιάζουν μειωμένη δυνατότητα απορρόφησης από το σώμα, όπως βιοδραστικά πεπτίδια, βιταμίνες, φάρμακα και αντιοξειδωτικά, μπορούν να απορροφηθούν πιο αποτελεσματικά με την χρήση μικρογαλακτωμάτων. Πράγματι, τα μικρογαλακτώματα έχουν πολύ μικρό μέγεθος σταγονιδίων, κατά συνέπεια, μπορούν να απελευθερώσουν τις ουσίες που έχουν εγκλωβιστεί στο εσωτερικό τους και αυτές με την σειρά τους να απορροφηθούν γρηγορότερα από το έντερο.

Έχει παρατηρηθεί επίσης, ότι η απορρόφηση από του στόματος υδρόφοβων φαρμάκων, συμπεριλαμβανομένων και των πεπτιδίων, μπορεί να βελτιωθεί σημαντικά με τη χρήση συστημάτων παροχής φαρμάκου βασισμένα σε λιπίδια, τα οποία αποφεύγουν το στάδιο της διαλυτοποίησης. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιούνται συστήματα μικκυλίων και μικρογαλακτωμάτων, που είναι τα πιο διεσπαρμένα απ' όλα και φαίνονται να είναι και τα πιο ελπιδοφόρα. Ενώ τα

συστήματα αυτά παρουσιάζουν υψηλή παγίδευση του φαρμάκου και την απελευθέρωση υπό συνθήκες βύθισης, η βελτίωση στην από του στόματος βιοδιαθεσιμότητα του φαρμάκου είναι συχνά απρόβλεπτη [59].

Μια πολύ βολική και ανερχόμενη μέθοδος για την παρασκευή νανοκαψουλών κατάλληλων για την παγίδευση βιοδραστικών πεπτιδίων είναι ο διεπιφανειακός πολυμερισμός αυθορμητώς σχηματιζόμενων μικρογαλακτωμάτων νερού-σε-έλαιο [60].

Γενικά, μιλώντας για αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας αναφερόμαστε σε συγκεκριμένου τύπου μικρογαλακτώματα τα οποία έχουν συγκεκριμένα επιφανειοενεργά, μέγεθος διασποράς, pH και συγκεκριμένη ελαιώδη φάση. Θεωρείται λοιπόν, ότι η παρουσία μέσου μήκους ανθρακικής αλυσίδας τριγλυκεριδίων είναι ο βασικότερος λόγος αύξησης της βιοδιαθεσιμότητας.

1.8.2 Εγκλωβισμός βιοδραστικών ουσιών

Χαρακτηριστική ιδιότητα των μικρογαλακτωμάτων αποτελεί η διαλυτοποίηση σε αυτά ουσιών οι οποίες ανάλογα με τον εάν είναι υδρόφοβες ή υδρόφιλες μπορούν να εγκλωβιστούν στο εσωτερικό (διασπαρμένη φάση) ενός μικρογαλακτώματος o/w ή w/o αντίστοιχα. Συγκεκριμένα, υδρόφιλες βακτηριοσίνες, όπως η νισίνη, μπορούν να διαλυτοποιηθούν στην υδατική φάση μικρογαλακτώματος τύπου w/o και να εγκλωβιστούν σε αυτό. Από την άλλη πλευρά, λιποδιαλυτές ουσίες μπορούν να διαλυτοποιηθούν στην ελαιώδη φάση.

Το ενδιαφέρον της βιομηχανίας για την ανάπτυξη κολλοειδών διασπορών με σκοπό τον εγκλωβισμό βιοδραστικών ουσιών έχει πάρει μεγάλες διαστάσεις στις μέρες μας βρίσκοντας εφαρμογή στην βιομηχανία τροφίμων, αγροχημικών, φαρμάκων, καλλυντικών κ.α. Ο εγκλωβισμός βιοδραστικών ουσιών όπως φάρμακα, βιταμίνες, ουσίες με αντιμικροβιακή δράση και αντιοξειδωτικά σε διάφορα συστήματα έχει ως σκοπό την επιτυχή μεταφορά, αλλά και την απελευθέρωσή τους στον οργανισμό-στόχο [61].

1.8.3 Μικρογαλακτώματα και τρόφιμα

Η δυνατότητα παρασκευής μικρογαλακτωμάτων με σκοπό την χρήση τους ως φορείς ουσιών στην βιομηχανία τροφίμων είναι ένα σημαντικό πεδίο έρευνας. Βέβαια,

εμφανίζονται πολλοί περιορισμοί για το ποια μικρογαλακτώματα είναι ασφαλή ώστε να μπορούν να χρησιμοποιηθούν στα τρόφιμα, λόγω των συστατικών τους. Η πλειονότητα των ερευνών χρησιμοποιεί μικρογαλακτώματα τα οποία περιέχουν αλκοόλες μικρού μήκους ανθρακικής αλυσίδας ως συν-επιφανειοενεργούς παράγοντες, βιοσυμβατά ασφαλή επιφανειοενεργά και βρώσιμα έλαια. Τα παραδείγματα στην βιβλιογραφία για μικρογαλακτώματα που εφαρμόζονται σε τρόφιμα είναι λίγα, ενώ αναφορές που χρησιμοποιούν τριγλυκερίδια ως ελαιώδη φάση είναι σπάνιες. Παρακάτω θα γίνει εκτενέστερη αναφορά στα συστατικά των βιοσυμβατών μικρογαλακτωμάτων που πληρούν τις προϋποθέσεις για εφαρμογή σε τρόφιμα ευρείας κατανάλωσης.

Είναι γεγονός, ότι υπάρχει πληθώρα περιορισμών όσον αφορά την εφαρμογή των μικρογαλακτωμάτων στην τεχνολογία των τροφίμων. Οι δύο κύριοι περιορισμοί αφορούν α) στην επιλογή των επιφανειοενεργών και β) στην χαμηλή ικανότητα διαλυτοποίησης των τριγλυκεριδίων υψηλού μοριακού βάρους. Ελάχιστα από τα διαθέσιμα επιφανειοενεργά επιτρέπονται και αυτά πρέπει να βρίσκονται σε ιδιαίτερα χαμηλά επίπεδα. Γι αυτό, λοιπόν, οι έρευνες έχουν στραφεί σε επιφανειοενεργά τα οποία έχουν χαρακτηριστεί ως ασφαλή (**GRAS- Generally Recognized As Safe**) [62], [63], [64], [65]. Τα τελευταία χρόνια λοιπόν, οι αντιμικροβιακές ενώσεις από βότανα και μπαχαρικά επανεξετάζονται και οι φραγμοί για την υιοθέτηση αυτών των ουσιών ως συντηρητικά τροφίμων είναι υπό συζήτηση. Καθώς η προσοχή στρέφεται λοιπόν, κυρίως σε βακτήρια και μύκητες σε έτοιμα φαγητά, επανεξετάζεται ο τρόπος δράσης των αιθέριων ελαίων και η πιθανότητα ανάπτυξης μηχανισμών ανθεκτικότητας από τους μικροοργανισμούς [2].

Στην συγκεκριμένη εργασία τα μικρογαλακτώματα που μελετήθηκαν αποτέλεσαν συστήματα που εγκλώβισαν μια αντιμικροβιακή πρωτεΐνη στο εσωτερικό τους, ώστε να χρησιμοποιηθούν ως φορείς βιοδραστικών ουσιών, που θα αυξήσουν την ασφάλεια των τροφίμων στα οποία εφαρμόζονται. Για αυτό, λοιπόν θα δοθεί ιδιαίτερη σημασία σε αυτό το κομμάτι εφαρμογής των μικρογαλακτωμάτων.

2.ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Στην παρούσα μελέτη, σκοπό είχαμε την παρασκευή βιοσυμβατών μικρογαλακτωμάτων εμπλουτισμένων με νισίνη, προκειμένου να μελετηθούν ως το μέσο παράδοσης της βακτηριοσίνης στα τρόφιμα. Για το σκοπό αυτό, αιθέρια έλαια όπως το ριγανέλαιο, το αιθέριο έλαιο δενδρολίβανου κ.ά. χρησιμοποιήθηκαν σαν συνεχή φάση των μικρογαλακτωμάτων.

Ιδιαίτερα σημαντικό, είναι το γεγονός ότι διασπορές όπως τα μικρογαλακτώματα, μπορούν να προσφέρουν στην εγκλωβισμένη ουσία ένα περιβάλλον το οποίο μπορεί να αυξήσει την βιοδιαθεσιμότητά της. Η συμπεριφορά των συστημάτων περιγράφηκε από τα ψευδοτριγωνικά διαγράμματα στους 25°C. Ακολούθησε δομική μελέτη των συστημάτων που παρασκευάστηκαν με την χρήση της τεχνικής Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (DLS) και της φασματοσκοπίας Ηλεκτρονικού Παραμαγνητικού Συντονισμού (EPR). Τέλος, η αποτελεσματικότητα των βιοσυμβατών μικρογαλακτωμάτων εξετάστηκε ως προς αντιμικροβιακή δραστηριότητα τους με την μέθοδο Well Diffusion Assay.

3.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

3.1.1 Αντιδραστήρια για την παρασκευή μικρογαλακτωμάτων

Στο πλαίσιο της έρευνας για το μικρογαλάκτωμα με την επιθυμητή βιοδραστικότητα, έγινε εκτεταμένη έρευνα και χρησιμοποιήθηκαν πολλοί διαφορετικοί συνδυασμοί αντιδραστηρίων κάθε φορά. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν καθ' όλη την διάρκεια, αναφέρονται συγκεντρωτικά παρακάτω:

A) Αιθέρια Έλαια:

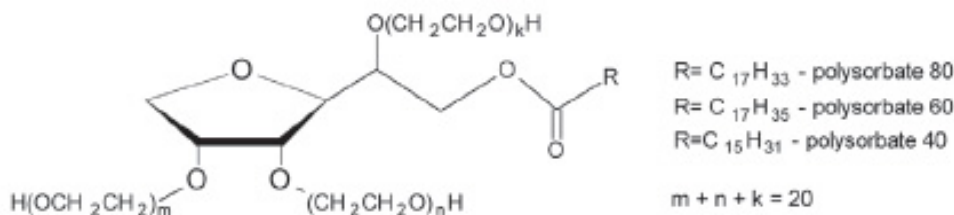
- **Ρίγανη: Greek Origan** (*Origanum heracleoticum*, carvacrol, γ - terpinene) της εταιρείας PRANAROM INTERNATIONAL, Avenue des Artisans, 37-B-7822 Ghislenghien.
- **Θυμάρι: Thymus satureioides** (*Thymus satureioides*, Borneol, carvacrol) της εταιρείας PRANAROM INTERNATIONAL, Avenue des Artisans, 37-B-7822 Ghislenghien.
- **Δεντρολίβανο: Rosmarinus officinalis CT cineole** (*Rosmarinus officinalis* 1,8 cineol) της εταιρείας PRANAROM INTERNATIONAL, Avenue des Artisans, 37-B-7822 Ghislenghien.
- **Λιμονένιο: (R)-(+)- Limonene, 97%** της εταιρείας Alfa Aesar GmbH & Co KG, Zeppelinstrasse 7b, 76185 Karlsruhe, Germany. Χρησιμοποιήθηκε επίσης συγκριτικά και λιμονένιο της εταιρείας Vioryl.

Σημειώνεται ότι όλα τα έλαια είναι βιοχημικά πιστοποιημένα, CT. Ιατρικής κατηγορίας – **medical grade**.

B) Επιφανειοενεργές ουσίες:

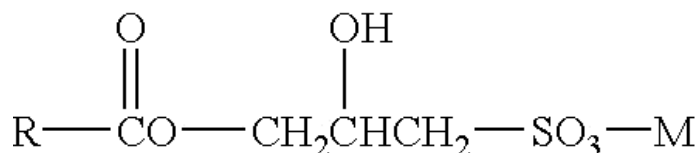
Στην συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν ως επιφανειοενεργές ουσίες οι παρακάτω (με χρήση του εμπειρικού κανόνα HLB):

- **Γαλακτωματοποιητής Tween 80** (Emulsifier T80, Polysorbitan 80) της εταιρείας Vioryl. Ανήκει στην κατηγορία των μη-ιοντικών γαλακτωματοποιητών και έχει τιμή HLB=15.0. Ο χημικός του τύπος περιγράφεται στην παρακάτω **Εικόνα 3.1**:

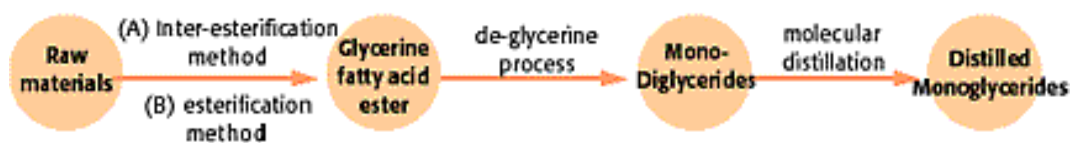


Εικόνα 3.1: Χημική δομή των πολυσορβικών 80, 60 και 40 (*polyethoxylated monoester of sorbitan and fatty acids*).

- **Γαλακτοματοποιητής μονογλυκερίδια (DMG 0295, Distilled Monoglycerides)** της εταιρείας Palsgaard, DK-7130 Juelsminde, Denmark. Το DMG προκύπτει από μοριακή απόσταξη των μονογλυκεριδίων, με σκοπό να ενισχυθεί η λειτουργικότητα του μορίου και μέσω της διεργασίας που περιγράφεται στο **Εικόνα 3.3**. Ο χημικός του τύπος απεικονίζεται παρακάτω στην **Εικόνα 3.2**:



Εικόνα 3.2: Γενική φόρμουλα απεσταγμένων Μονογλυκεριδίων.



Εικόνα 3.3: Διεργασία παρασκευής DMG (Distilled Monoglycerides) από πρώτη ύλη.

αστική ουσία: Νισίνη

Η νισίνη, γνωστή στο χώρο των τροφίμων σαν E234 και γνωστή για την αντιμικροβιακή της δράση, χρησιμοποιήθηκε ως βιοδραστική ουσία, έγινε προσπάθεια για τον εγκλωβισμό της σε μικρογαλακτώματα και την απελευθέρωση της υπό συγκεκριμένες συνθήκες. Η νισίνη που χρησιμοποιήθηκε στην συγκεκριμένη

μελέτη ήταν της εταιρείας Sigma-Aldrich και χρειάστηκε πρώτα η διαλυτοποίηση της σε υπερκάθαρο νερό, πριν εισαχθεί στο εκάστοτε μικρογαλάκτωμα.

Δ) Άλλα υλικά και αντιδραστήρια:

α) Αιθανόλη (>98%) (Ethanol absolute, denaturated with 1% MEK and 0.001% Bitrex GR dor analysis) της εταιρείας Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany.

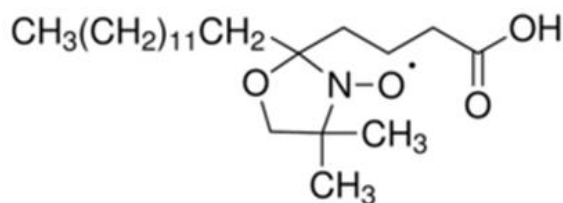
β) Προπυλενογλυκόλη PG (1,2-propanediol, Propylene Glycol) της εταιρείας Sigma Aldrich Chemie GmbH, Riedstr.2, D-89555 Steinheim).

γ) Ισοπροπανόλη (2-propanol ,analytical reagent grade) της εταιρείας Sigma Aldrich Chemie GmbH, Riedstr.2, D-89555 Steinheim).

Όλα τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας. Το νερό που χρησιμοποιήθηκε ήταν υπερκάθαρο από την συσκευή Milli Q Plus της Millipore.

3.1.2 Αντιδραστήρια για την μελέτη της μεσεπιφάνειας του μικρογαλακτώματος

Το αντιδραστήριο που χρησιμοποιήθηκε για την περαιτέρω δομική μελέτη του μικρογαλακτώματος με φασματοσκοπία EPR ήταν το 5-doxyl stearic acid (5-(1-οξυλ-2,2-διμεθυλο-οξαζολιδινο)-στεατικό οξύ) (**5-DSA**), προϊόν της εταιρείας Sigma – Aldrich του οποίου ο συντακτικός τύπος εμφανίζεται στην **Εικόνα 3.3**.



Εικόνα 3.3: Συντακτικός τύπος 5-doxyl stearic acid.

3.1.3 Αντιδραστήρια για την παρασκευή θρεπτικών υλικών για τρυβλία

Άγαρ: Agar Bacteriologique TYPE E της εταιρείας Biokar Diagnostics-Zac De Ther-Allone-F60000 Beauvais.

Μέσο ανάπτυξης: M17 BROTH της εταιρείας Oxoid, Basignstoke, Hampshire, England.

Γλυκόζη: D (+)- Glucose monohydrate Molecular biology grade της εταιρείας AppliChem GmbH, Ottoweg 4, D-64291 Darmstadt, Germany.

Θρεπτικό υλικό GM17: M17 BROTH και γλυκόζη

Το ευαίσθητο στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* MG1363, αναπτύχθηκε σε θρεπτικό υπόστρωμα M17, εμπλουτισμένο με 0.5% (w/v) γλυκόζη (Appllichem, Darmstadt, Germany) (GM17) στους 30 °C για 24 h.

Θρεπτικό υλικό BHI (Brain Heart Infusion Broth): Brain Heart Broth της εταιρείας Biokar Diagnostics-Zac De Ther-Allone-F60000 Beauvais.

Το στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο *Staphylococcus aureus* FMCC B-95 που μας παραχώρησαν από το εργαστήριο του Καθ. κ. Νυχά και αναπτύχθηκε σε θρεπτικό υπόστρωμα BHI στους 37 °C για 24 h.

3.2. ΌΡΓΑΝΑ

3.2.1 Δυναμική Σκέδαση Φωτός-DLS (Dynamic light scattering)

Η τεχνική DLS χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό μεγέθους διασπορών σε διαλύματα και περίπλοκα ρευστά, όπως τα μικρογαλακτώματα. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με το μηχάνημα Zetasizer Nano ZS (ZEN3600) από την Malvern Instruments (UK) το οποίο διαθέτει λέιζερ He-Ne (632,8 nm) (Εικόνα 3.4). Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε γωνία σκέδασης 173°.



Εικόνα 3.4: Συσκευή Zetasizer Nano ZS (ZEN3600) από την Malvern Instruments (UK)

3.2.2 Ηλεκτρονικός Παραμαγνητικός Συντονισμός – EPR (Electron paramagnetic resonance)

Τα φάσματα και οι μετρήσεις ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού ελήφθησαν με φασματοφωτόμετρο Bruker EMXmicro (**Εικόνα 3.5**), με λειτουργία σε συχνότητα 9,5 GHz (X-band). Τα φάσματα επεξεργάστηκαν με το πρόγραμμα Win-EPR Processing. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με την χρήση κυψελίδας WG-813-Q (Wilmand Glass Company, INC ,Buena, NJ), αλλά και με την χρήση κυψελίδων EPR SAMPLE TUBES, της ίδιας εταιρείας. Το όργανο εκπέμπει μονοχρωματικά μικροκύματα.



Εικόνα 3.5: Φασματοφωτόμετρο ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού (EPR). Φαίνεται η κονσόλα ελέγχου των ηλεκτρονικών και επεξεργασίας του σήματος, η πηγή των μικροκυμάτων και ο

μαγνήτης. Το δείγμα τοποθετείται σε κατάλληλη κυψελίδα στο κέντρο ειδικής κοιλότητας (sample cavity) στην περιοχή του μέγιστου μικροκυματικού μαγνητικού πεδίου.



Εικόνα 3.6: Από αριστερά προς τα δεξιά, απεικονίζονται οι κυψελίδες της Wildmand για EPR και η πεπλατυσμένη κυψελίδα WG-813-Q για υδατικά διαλύματα, της ίδιας εταιρίας.

3.2.3 Ιξωδόμετρο

Οι μετρήσεις ιξώδους πραγματοποιήθηκαν με περιστροφικό ιξωδόμετρο DV-I Prime της Brookfield (**Εικόνα 3.7**). Οι μετρήσεις για το ιξώδες πραγματοποιήθηκαν στους 25 °C και σε διαφορετικές ταχύτητες (4 ,6 ,10, 20, 30 και 50 RPM).



Εικόνα 3.7: Περιστροφικό Ιξωδόμετρο DV-I Prime της Brookfield

3.3 ΜΕΘΟΔΟΙ

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε μελέτη συγκεκριμένων μικρογαλακτωμάτων, συμπεριλαμβανομένων των δομικών τους χαρακτηριστικών και τον εγκλωβισμό ουσιών στο εσωτερικό τους. Παρακάτω, ακολουθούν οι μέθοδοι οι οποίες εφαρμόστηκαν κατά την διάρκεια της μελέτης των μικρογαλακτωμάτων.

3.3.1 Πρωτόκολλο Διαλυτοποίησης Νισίνης

Στο παρόν σύστημα χρησιμοποιήθηκε νισίνη σε σκόνη της Sigma-Aldrich (N5764) άγνωστης καθαρότητας.

- 1) Διαλύουμε 40 mg νισίνη/ml σε απιονισμένο H₂O που οξυνίζεται πρώτα με 0,05% v/v οξικό οξύ
- 2) Σταθεροποιούμε το pH στο 5,5 χρησιμοποιώντας διάλυμα NaOH 10N
- 3) Φυγοκεντρούμε το διάλυμα για 10 min στις 13.000 rpm σε θερμοκρασία 25 °C
- 4) Παίρνουμε προσεκτικά το υπερκείμενο. Θεωρούμε ότι στο διάλυμα αυτό, έχουμε τελική συγκέντρωση 1 mg νισίνης/ml βάσει των οδηγιών του κατασκευαστή.

3.3.2 Ανίχνευση αντιμικροβιακής δράσης

Η μέθοδος διάχυσης σε άγαρ (**WDA, Well Diffusion Assay**) στηρίζεται στην διαύγαση του θρεπτικού υποστρώματος γύρω από τα σημεία που έχει τοποθετηθεί η βακτηριοσίνη λόγω της διάχυσης της ουσίας στο στερεοποιημένο υπόστρωμα.

Σε θρεπτικό υπόστρωμα GM17 (1,3 % w/v άγαρ) (παράγραφος **3.1.3**) εμβολιάστηκε το στέλεχος *L. lactis* MG1363 (εμβόλιο 1 ‰ v/v) και στρώθηκαν τρυβλία. Στο στερεοποιημένο υπόστρωμα ανοίχτηκαν οπές με ανεστραμμένες πιπέτες Pasteur. Από κάθε δείγμα μικρογαλακτώματος 50 μl τοποθετήθηκαν στις οπές του τρυβλίου και ακολούθησε επώαση στους 30 °C για 24 h.

Η ίδια ακριβώς διαδικασία ακολουθήθηκε και για το στέλεχος *S.aureus* FMCC B-95 σε θρεπτικό υπόστρωμα BHI (1,3 % w/v άγαρ), με εμβόλιο 1 ‰ v/v. Τα 50 μl από

κάθε δείγμα μικρογαλακτώματος τοποθετήθηκαν στις οπές του τρυβλίου και ακολούθησε επώαση στους 37 °C για 24 h .

Μετά την επώαση, έγινε οπτική παρατήρηση των τρυβλίων για την ύπαρξη ή την απουσία διαυγούς ζώνης γύρω από τις οπές. Διαυγής ζώνη υποδηλώνει την ύπαρξη αντιμικροβιακής δράσης.

3.3.3 Διάγραμμα Φάσεων

Βασικό εργαλείο για την μελέτη ενός συστήματος εγκλωβισμού και μεταφοράς δραστικών ουσιών αποτελεί ο προσδιορισμός των δομικών του χαρακτηριστικών τα οποία και θα αποτελέσουν την βάση για την μελέτη των δυνατοτήτων του συστήματος και την ανάπτυξη νέων εφαρμογών.

Στην παρούσα εργασία, κατά την δημιουργία διαγραμμάτων φάσης για το μικρογαλάκτωμα, η επί τοις εκατό αναλογία των επιφανειοενεργών και των ελαίων μεταβάλλεται. Αρχικά παρασκευάζονται διαλύματα της λιπαρής φάσης με τα επιφανειοενεργά σε συγκεκριμένες εκατοστιαίες αναλογίες. Στη συνέχεια, σε κάθε δείγμα προστίθεται συγκεκριμένη ποσότητα υδατικής φάσης (περίπου 5 μl ανά μέρα) και καταγράφεται το ακριβές της βάρος. Μετά την προσθήκη της ποσότητας νερού το δείγμα αναδεύεται ήπια με σκοπό το νερό να μπορέσει να διασπαρεί, και αφήνεται σε υδατόλουτρο σε σταθερή θερμοκρασία (στην συγκεκριμένη περίπτωση στους 25 °C) για 24 h. Την επόμενη μέρα και πριν προστεθεί η καινούργια ποσότητα νερού εξετάζεται προσεκτικά η διαύγεια των δειγμάτων με οπτική παρατήρηση. Εάν τα δείγματα παραμένουν διαυγή σημαίνει ότι το συγκεκριμένο σύστημα αποτελεί μικρογαλάκτωμα, δέχεται αυτή την ποσότητα νερού και γίνεται περαιτέρω σταδιακή προσθήκη νερού. Στην περίπτωση που παρατηρείται θολερότητα, παρουσία έντονων αναταράξεων ή διαχωρισμός συστατικών, τα δείγματα αποτελούν διφασικά συστήματα.

Αφού εφαρμοστεί η παραπάνω διαδικασία για κάθε διαφορετική αναλογία και κάθε διαφορετικό μικρογαλάκτωμα, τα αποτελέσματα συγκεντρώνονται και κατασκευάζεται τριγωνικό διάγραμμα, σύμφωνα με το θεωρητικό τριγωνικό διάγραμμα (**Εικόνα 1.10**).

Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης εργασίας για τα τριγωνικά διαγράμματα φάσης αναλύθηκαν με την βοήθεια του προγράμματος ProSim Ternary Diagramme.

3.3.4 Παρασκευή Μικρογαλακτώματων

α) Παρασκευή μικρογαλακτώματος νερού σε έλαιο

Πραγματοποιήθηκε εκτενής έρευνα σε μικρογαλακτώματα που είχαν ως συνεχή φάση μόνο αιθέρια έλαια. Παρασκευάστηκαν πολλά διαφορετικά συστήματα (**Πίνακας 4.1, 4.2**), με ποικιλομορφία στην σύσταση, αλλά με την ίδια μέθοδο κάθε φορά. Τα μικρογαλακτώματα που παρασκευάστηκαν για την συγκεκριμένη μελέτη αποτελούνταν από το εκάστοτε αιθέριο έλαιο (ρίγανη, θυμάρι, δεντρολίβανο), σε αναλογία με αιθανόλη για ορισμένα μικρογαλακτώματα (αναλογία 1:1).

Ως επιφανειοενεργά χρησιμοποιήθηκαν το πολυσορβικό 80 (polyoxyethylene sorbitan monolaurate, Tween 80) και μόνο- και διγλυκερίδια (DMG).

Η αιθανόλη όπως και η προπυλενογλυκόλη (PG), χρησιμοποιήθηκαν ως συν-επιφανειοενεργά σε κάποια από τα συστήματα.

Τέλος, το μικρογαλάκτωμα σχηματιζόταν με την προσθήκη κατάλληλης ποσότητας υπερκάθαρου νερού. Η ποσότητα του νερού που προστέθηκε στο κάθε σύστημα, προήλθε από την μελέτη του εκάστοτε συστήματος με την χρήση ψευδοτριγωνικού διαγράμματος και την βοήθεια του προγράμματος ProSim Ternary Diagramme.

Η παρασκευή των μικρογαλακτώματων έγινε σε σταθερές συνθήκες πίεσης και θερμοκρασίας (25°C).

β) Παρασκευή μικρογαλακτώματος νερού σε έλαιο με εγκλωβισμένη δραστική ουσία (νισίνη)

Το μικρογαλάκτωμα παρασκευάστηκε όπως ακριβώς και στην παραπάνω ενότητα. Η διαδικασία διαφοροποιήθηκε μόνο στο στάδιο της προσθήκης νερού, όπου στο νερό είχε διαλυθεί πρώτα η δραστική ουσία νισίνη, ακολουθώντας το πρωτόκολλο που περιγράφεται στην **παράγραφο 3.3.1**. Εφόσον το μικρογαλάκτωμα σχηματιστεί και δεν θολώσει το διάλυμα, θεωρείται ότι ο εγκλωβισμός της δραστικής ουσίας στην υδατική φάση (διεσπαρμένη φάση) ήταν επιτυχής.

Η επιβεβαίωση του εγκλωβισμού, αλλά και της απελευθέρωσης της δραστικής ουσίας, γίνεται κατά την μελέτη των μικρογαλακτώματων με τη μέθοδο διάχυσης σε τρυβλίο (**παράγραφο 3.3.2**), όπου η διαυγής ζώνη περιμετρικά των οπών αποδεικνύει την ύπαρξη βακτηριοσίνης στο μικρογαλάκτωμα.

3.3.5 Δυναμική σκέδαση φωτός (DLS)

Αρχή μεθόδου δυναμικής σκέδασης φωτός

Η δυναμική σκέδαση φωτός (**D**ynamic **L**ight **S**cattering) είναι μια φασματοσκοπική μέθοδος η οποία βοηθά στον προσδιορισμό του μεγέθους των σωματιδίων μέσω της μέτρησης των αλλαγών της έντασης του φωτός που σκεδάζεται μέσα σε ένα διάλυμα ή εναιώρημα. Η τεχνική αυτή είναι γνωστή με τον όρο Dynamic Light Scattering (DLS) αλλά χρησιμοποιείται επίσης και ως Photon Correlation Spectroscopy (PCS) και Quasi-Elastic Light Scattering (QELS). Ο τελευταίος όρος συναντάται κατά κύριο λόγο στην παλαιότερη βιβλιογραφία. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται συνήθως στην ανάλυση νανοσωματιδίων και στη μέτρηση μεγέθους διασπορών σε διαλύματα, όπως πρωτεϊνών, πολυμερών και μικκυλίων. Το μέγεθος που προκύπτει από τις μετρήσεις είναι η **υδροδυναμική ακτίνα** των σωματιδίων.

Μικρά αιωρούμενα σωματίδια υφίστανται τυχαία θερμική κίνηση, γνωστή και ως κίνηση Brown. Αυτή η τυχαία θερμική κίνηση μοντελοποιήθηκε μέσω της εξίσωσης Stokes-Einstein. Παρακάτω δίνεται η εξίσωση η οποία χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του μεγέθους των σωματιδίων: η μέση διάμετρος των διεσπαρμένων νανοσταγονιδίων υπολογίστηκε από το νόμο Stokes-Einstein:

$$D_h = K_b T / 3\pi\eta D_t$$

όπου

D_h : υδροδυναμική διάμετρος (που είναι και το ζητούμενο για το μέγεθος της διασποράς)

D_t : συντελεστής διάχυσης

K_b : συντελεστής Boltzmann

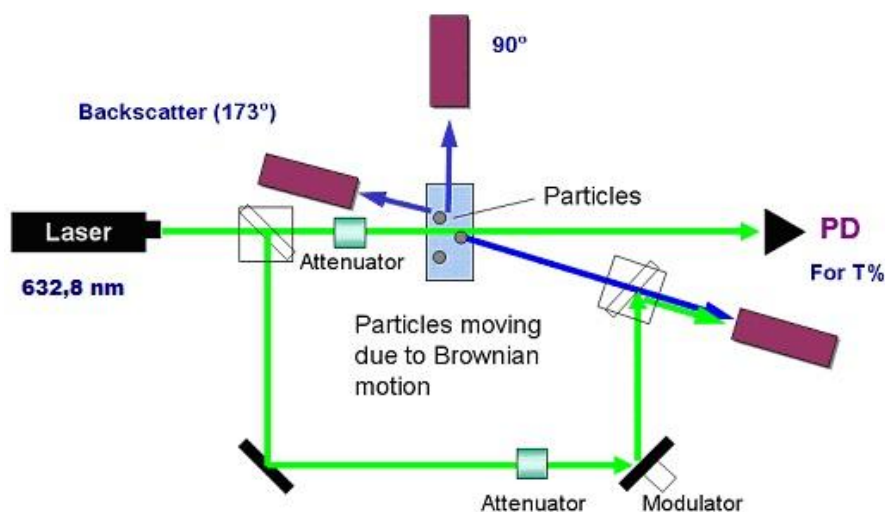
T : θερμοκρασία

η : ιξώδες

Οι απαιτούμενοι υπολογισμοί για την εξαγωγή αποτελέσματος πραγματοποιούνται αυτόματα από το ειδικό λειτουργικό πρόγραμμα.

Φως από την πηγή laser ακτινοβολεί το δείγμα το οποίο τοποθετείται σε ειδική κυψελίδα. Το διαχεόμενο φως συλλέγεται από τον έναν από τους δύο ανιχνευτές, είτε

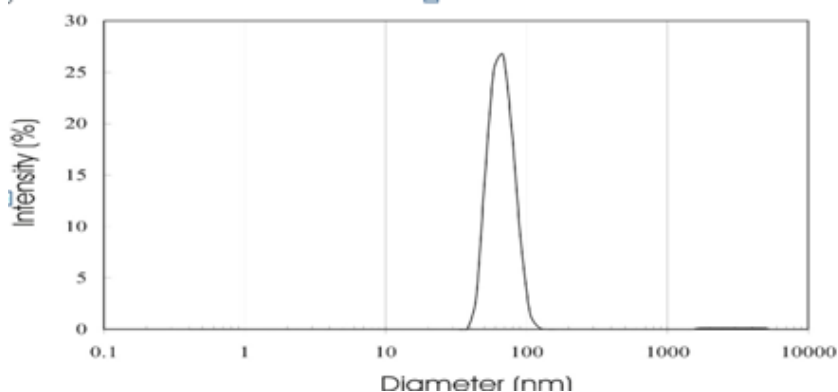
στις 90° είτε στις 173° . Η διάταξη (**Εικόνα 3.9**) των δύο ανιχνευτών είναι τέτοια ώστε να επιτρέπει τη μεγαλύτερη δυνατή ευελιξία στην επιλογή των συνθηκών μέτρησης. Απαραίτητες παράμετροι οι οποίες πρέπει να είναι γνωστές για την μέτρηση ενός δείγματος είναι το ιξώδες αυτού και ο δείκτης διάθλασης.



Εικόνα 3.9: Απεικόνιση διάταξης DLS.

Ο θόρυβος ο οποίος εμφανίζεται είναι κυρίως λόγω της κίνησης των σωματιδίων και χρησιμοποιείται για την εξαγωγή του μεγέθους των σωματιδίων. Κατά την μέτρηση χρησιμοποιείται κατά κύριο λόγο μόνο η μία γωνία σκέδασης.

Τέλος, τα δείγματα τα οποία μετρούνται με DLS επεξεργάζονται με ειδικά φίλτρα καθώς η τεχνική είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη και απαιτούνται δείγματα απαλλαγμένα από σκόνη. Οι απαλλαγμένες από σκόνη συνθήκες είναι απαραίτητες για την διεξαγωγή πειραμάτων καθώς το μηχάνημα είναι σε θέση να εντοπίσει τα σωματίδια σκόνης και να τα εμφανίσει ως έναν ξεχωριστό πληθυσμό (με διαφορετικό μέγεθος αλλά και ποσότητα) στο δείγμα. Χαρακτηριστικό διάγραμμα της μέτρησης με την χρήση DLS αποτελεί το **Εικόνα 3.10** το οποίο εμφανίζει την κατανομή του πληθυσμού των διασπορών σε συνάρτηση με την διάμετρό τους.



Εικόνα 3.10: Χαρακτηριστικό διάγραμμα που απεικονίζει το μέγεθος του πληθυσμού των σωματιδίων σε νανόμετρα.

3.3.6 Ηλεκτρονικός παραμαγνητικός συντονισμός (EPR)

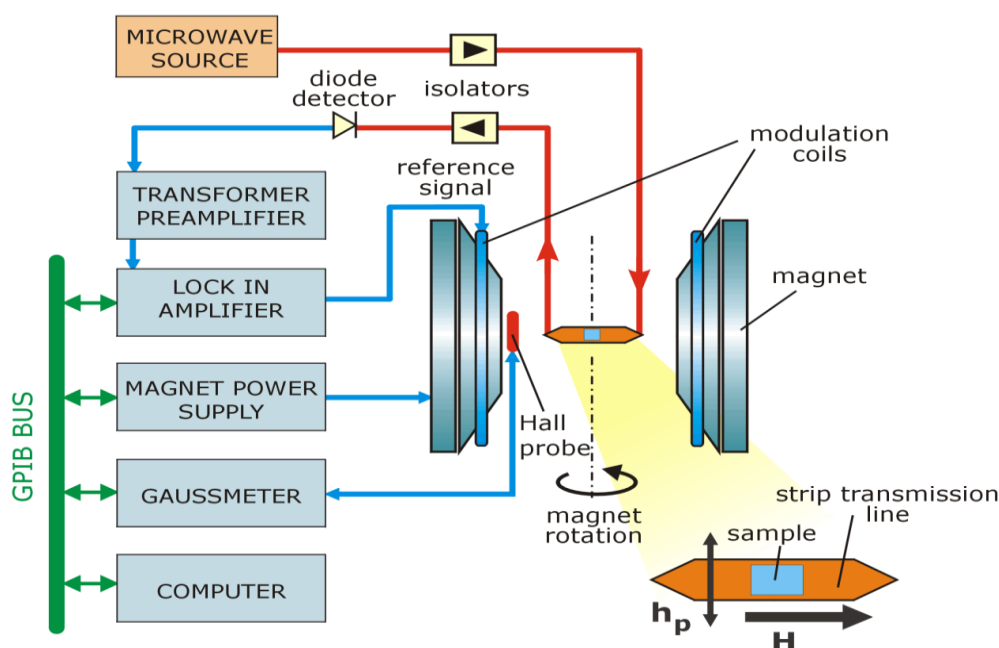
α) Αρχή μεθόδου ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού(EPR)

Ο ηλεκτρονικός παραμαγνητικός συντονισμός είναι η μέθοδος φασματοσκοπίας απορρόφησης κατά την οποία η ακτινοβολία μικροκυματικής συχνότητας απορροφάται από μόρια τα οποία περιέχουν ασύζευκτα ηλεκτρόνια (**Εικόνα 3.11**). Το φαινόμενο οφείλεται σε συντονισμό spin ασύζευκτου ηλεκτρονίου. Κάθε φορτισμένο σωματίδιο που περιστρέφεται γύρω από τον εαυτό του συμπεριφέρεται ως ένας μικροσκοπικός μαγνήτης με τους πόλους του κατά μήκος του άξονα περιστροφής του. Γενικά, τα άτομα ή τα μόρια δεν είναι παραμαγνητικά γιατί τα ηλεκτρόνιά τους συνδυάζονται σε ζεύγη με αντίθετο spin ($\uparrow\downarrow$) και τα μαγνητικά τους δίπολα αλληλοαναιρούνται. Όταν όμως το μόριο περιέχει περιττό αριθμό ηλεκτρονίων ή όταν στη θεμελιώδη κατάσταση το μόριο περιλαμβάνει δύο ηλεκτρόνια με παράλληλη κατεύθυνση spin ($\uparrow\uparrow$), τότε εμφανίζεται μαγνητική ροπή και το μόριο καλείται **παραμαγνητικό**.

Όλες οι ενώσεις οι οποίες εμφανίζουν παραμαγνητικό χαρακτήρα μπορούν να εντοπισθούν και να μελετηθούν με τη χρήση φασματοσκοπίας EPR, επομένως είναι κατάλληλη φασματοσκοπική τεχνική για την μελέτη ελεύθερων ριζών, οι οποίες παρουσιάζουν παραμαγνητικές ιδιότητες.

Η ελεύθερη ρίζα τοποθετημένη μέσα σε ένα μαγνητικό πεδίο και υποβαλλόμενη σε ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία μικροκυμάτων, συμπεριφέρεται παραμαγνητικά, λόγω της συνεχούς περιστροφής του ασύζευκτου ηλεκτρονίου που δημιουργεί μαγνητική ροπή και προσανατολίζεται κατά δύο κατευθύνσεις, μία προς την

κατεύθυνση του εξωτερικού πεδίου και μία σε αντίθετη κατεύθυνση. Η ακτινοβολία συντονισμού είναι της περιοχής των μικροκυμάτων.



Εικόνα 3.11: Σχηματικό διάγραμμα φασματοφωτόμετρου EPR. Το δείγμα τοποθετείται στο κέντρο της κυψελίδας στην περιοχή του μέγιστου μικροκυματικού πεδίου. Η βάση του οργάνου είναι το Klystron το οποίο εκπέμπει μικροκύματα.

Η πηγή ακτινοβολίας της περιοχής των μικροκυμάτων, παράγεται μέσω της βαλβίδας Klystron. Το φάσμα EPR λαμβάνεται με την καταγραφή της απορρόφησης της ακτινοβολίας από το δείγμα, που είναι μέσα σε σωληνίσκο ή πεπλατυσμένη κυψελίδα από quartz (**Εικόνα 3.6**), καθώς σαρώνεται το μαγνητικό πεδίο.

Προκειμένου να ληφθούν οι μετρήσεις κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, το μηχάνημα ρυθμίστηκε με τις παραμέτρους του **Πίνακα 3.1**:

Πίνακας 3.1: Παράμετροι EPR.

Center field	3480G
Sweep Width (Scan range)	100 G
Receiver Gain	$5.64 \cdot 10^3$
Time constant	164ms
Conversion time	5ms
Modulation amplitude	4G
Frequency	9.78 GHz

β) Χρήση του μεμβρανικού ιχνηθέτη 5-DSA, για την μελέτη της μεσεπιφάνειας των μικρογαλακτωμάτων

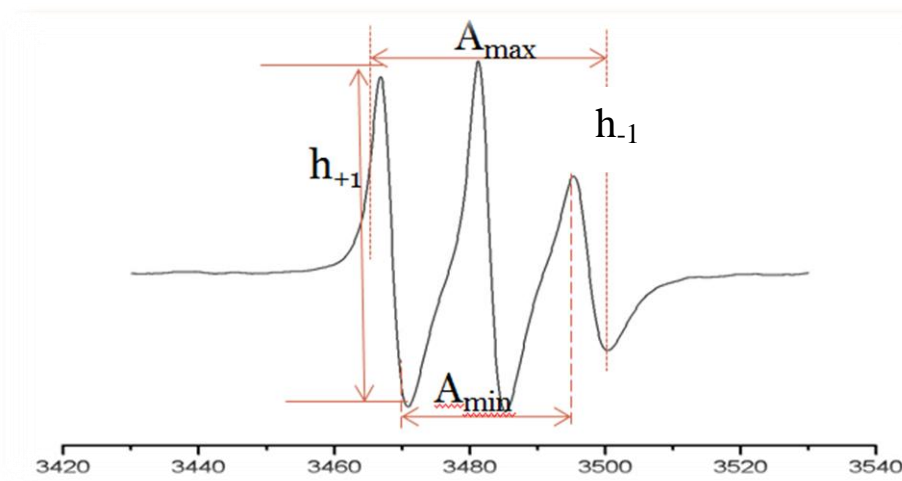
Το ιχνηθετημένο λιπαρό οξύ 5-doxyyl stearic acid είναι ένα μακρύ αμφίφιλο μόριο το οποίο έχει την δυνατότητα να αλληλεπιδρά με τα μόρια των επιφανειοενεργών ουσιών. Μέσω των μετρήσεων με την τεχνική του EPR είναι δυνατόν να εξαχθούν συμπεράσματα για την κινητικότητα του ιχνηθέτη και κατά συνέπεια για την ελαστικότητα της μεμβράνης. Η ελαστικότητα της μεμβράνης εκφράζεται με την παράμετρο S , ενώ συμπεράσματα για την κινητικότητα του μορίου εξάγονται από τον αριθμό τ_R (rotational correlation time).

Συγκεκριμένα η παράμετρος τ_R είναι ο χρόνος ο οποίος απαιτείται για ένα μόριο (του ιχνηθέτη στην συγκεκριμένη περίπτωση) για να πραγματοποιήσει μια περιστροφή. Η μονάδα μέτρησής του είναι τα **picoseconds**. Ο παράγοντας S αποτελεί ένα μέτρο για την διεύθετηση του ιχνηθέτη και κυμαίνεται σε τιμές μεταξύ 0 και 1 , με το 0 να εκφράζει την τυχαία κατάσταση ενώ το 1 την απόλυτα διευθετημένη κατάσταση.

Το τ_R υπολογίζεται από την παρακάτω εξίσωση:

$$\tau_R = 6 \times 10^{-10} [(h_0/h_{-1})^{1/2} + (h_0/h_{+1})^{1/2} - 2] A_0$$

όπου A_0 είναι το πλάτος (σε Gauss) της κεντρικής κορυφής του φάσματος και h_{-1} , h_0 και h_{+1} είναι οι εντάσεις των χαμηλών, κεντρικών και υψηλών κορυφών αντίστοιχα (Εικόνα 3.12).



Εικόνα 3.12: Φάσμα του ιχνηθέτη 5-DSA. Ο οριζόντιος άξονας εμφανίζει τις τιμές του μαγνητικού πεδίου σε Gauss(G).

Η παράμετρος S υπολογίζεται από την εξίσωση:

$$S = (A_{II} - A_I) / [A_{ZZ} - 1/2(A_{XX} + A_{YY})] (\alpha_{No} / \alpha_N)$$

όπου

$$A_{II} = A_{\max} / 2$$

$$A_I = A_{\min} / 2 + 1.4(1 - S^{\text{app}})$$

$$S^{\text{app}} = (A_{\max} / 2 - A_{\min} / 2) / [A_{ZZ} - 1/2(A_{XX} + A_{YY})]$$

$$[A_{ZZ} - 1/2(A_{XX} + A_{YY})] = 27.55$$

$$\alpha_{No} = 1/3(A_{II} + 2 A_I) \quad \text{και} \quad \alpha_N = 15,23$$

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1. ΔΟΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΜΙΚΡΟΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΩΝ

Παρακάτω, ακολουθεί συγκεντρωτικός πίνακας με τα συστήματα που παράχθηκαν και μελετήθηκαν καθ' όλη την διάρκεια της μελέτης (**Πίνακας 4.1**) και ένας δεύτερος πίνακας (**Πίνακας 4.2**) που περιέχει όλα τα συστήματα που παράχθηκαν αλλά δεν μελετήθηκαν περαιτέρω είτε γιατί δεν μπορούσαν να πάρουν αρκετή ποσότητα νερού, είτε γιατί η αντιμικροβιακή τους δράση ελέγχθηκε και δεν έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα

Πίνακας 4.1: Συγκεντρωτικός πίνακας μικρογαλακτωμάτων που παράχθηκαν καθ' όλη την διάρκεια της μελέτης και εγκλώβισαν αρκετή ποσότητα νερού ώστε να μελετηθούν περαιτέρω.

ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΜΙΚΡΟΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΩΝ	ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ
11% λιμονένιο+11% EtOH + 50% Tween+ 28% H ₂ O	Για όλα τα συστήματα ακολούθησε πρώτα μελέτη αντιμικροβιακής δράσης, και για όσα έδωσαν θετικά αποτελέσματα, ακολούθησε μελέτη με τις τεχνικές DLS και EPR, καθώς και κατασκευή τριγωνικού διαγράμματος φάσης.
11% ρίγανη+ 11% EtOH+ 50% Tween+28% H ₂ O	
11% δεντρολίβανο +11% EtOH +50% Tween +28% H ₂ O	
33.9% δεντρολίβανο + 50.9% Tween:PG (1:1) + 15.3% H ₂ O	
47.2% ρίγανη +47.2% Tween +5.7% H ₂ O:PG (1:1)	
46.7% ρίγανη +46.7% DMG +6.5 H ₂ O:PG (1:1)	
27.8% ελαιόλαδο +27.8% EtOH +37% DMG +7.4% H ₂ O	
2.3% δεντρολίβανο+ 25.5% ελαιόλαδο +27.8% EtOH +37% DMG +7.4% H ₂ O	
4.6% δεντρολίβανο+ 23.2% ελαιόλαδο +27.8% EtOH +37% DMG +7.4% H ₂ O	
9.3% δεντρολίβανο+ 18.5% ελαιόλαδο +27.8% EtOH +37% DMG +7.4% H ₂ O	
18.5% δεντρολίβανο+ 9.3% ελαιόλαδο +27.8% EtOH +37% DMG +7.4% H ₂ O	
9.3% θυμάρι +18.5% ελαιόλαδο+27.8% EtOH +37% DMG +7.4% H ₂ O	
9.3% ρίγανη +18.5% ελαιόλαδο+27.8% EtOH +37% DMG +7.4% H ₂ O	

Πίνακας 4.2: Συγκενρωτικός πίνακας με συστήματα που παράχθηκαν αλλά δεν μελετήθηκαν περαιτέρω για ποικίλους λόγους.

ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΜΙΚΡΟΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΩΝ	ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ
NEtOH: Ρίγανη(80%,70%,60%)+T80(20%,30%,40%)	Συστήματα χωρίς καθόλου αιθανόλη (NEtOH). Εγκλώβισαν πολύ μικρή ποσότητα νερού ($\approx 20\mu\text{l}$) γι' αυτό και δεν προχώρησε η μελέτη των δομικών τους χαρακτηριστικών.
NEtOH: Θυμάρι(80%,70%,60%)+T80(20%,30%,40%)	
NEtOH: Δενδρολίβανο(80%,70%,60%)+T80(20%,30%,40%)	
Ρίγανη (90%,80%,70%,60%,50%,40%)+T80:PG(1:1) (10%,20%,30%,40%,50%,60%)	Η μελέτη τους δεν προχώρησε γιατί τα μικρογαλακτώματα εγκλώβισαν πολύ μικρή ποσότητα νερού ($\approx 10\text{-}30\ \mu\text{l}$)
Θυμάρι (90,80,70,60%,50%,40%)+T80:PG(1:1) (10,20,30,40%,50%,60%)	
Δενδρολίβανο (90%,80%,70%,60%,50%,40%)+T80:PG(1:1) (10%,20%,30%,40%,50%,60%)	
Ρίγανη (90%,80%,70%,60%,50%,40%)+ DMG:PG(1:1) (10%,20%,30%,40%,50%,60%)	Η μελέτη τους δεν προχώρησε γιατί τα μικρογαλακτώματα εγκλώβισαν πολύ μικρή ποσότητα νερού ($\approx 60\ \mu\text{l}$)
Θυμάρι (90%,80%,70%,60%,50%,40%)+ DMG:PG(1:1) (10%20%,30%,40%)	
Δενδρολίβανο (90%,80%,70%,60%)+ DMG:PG(1:1) (10%,20%,30%,40%)	

4.1.1. Ψευδοτριγωνικά Διαγράμματα Φάσης

Όπως προαναφέρθηκε και στην παράγραφο 3.1.3, για την μελέτη των μικρογαλακτωμάτων είναι απαραίτητη η κατασκευή τριγωνικού διαγράμματος.

Ψευδοτριγωνικό διάγραμμα κατασκευάστηκε μόνο για τα συστήματα που έδειξαν κάποια αντιμικροβιακή δράση. Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 4.3), αναφέρονται τα μικρογαλακτώματα που παράχθηκαν και η μελέτη που έχει ακολουθήσει για το καθένα ξεχωριστά.

Πίνακας 4.3: Συγκεντρωτικός πίνακας μικρογαλακτωμάτων που παράχθηκαν καθ'όλη την διάρκεια της μελέτης και η δομική ή αντιμικροβιακή μελέτη που ακολουθήθηκε.

ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΜΙΚΡΟΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΩΝ	Τ.Δ.Φ	(DLS)	(EPR)	A .Δ
11% λιμονένιο+11% EtOH + 50% Tween+ 28% H ₂ O	-	-	-	✓
11% ρίγανη+ 11%EtOH+ 50%Tween+28%H ₂ O	✓	✓	-	✓
11% δενδρολίβανο +11% EtOH +50% Tween +28% H ₂ O	✓	✓	✓	✓
33.9% δενδρολίβανο + 50.9% Tween:PG (1:1) + 15.3% H ₂ O	✓	✓	✓	✓
47.2% ρίγανη +47.2% Tween +5.7% H ₂ O:PG (1:1)	✓	✓	-	✓
46.7% ρίγανη +46.7% DMG +6.5 H ₂ O:PG (1:1)	✓	✓	-	✓
27.8% ελαιόλαδο +27.8% EtOH +37% DMG +7.4% H ₂ O	-	-	-	✓
2.3% δενδρολίβανο+ 25.5% ελαιόλαδο +27.8% EtOH +37% DMG +7.4% H ₂ O	-	-	-	✓
4.6% δενδρολίβανο+ 23.2% ελαιόλαδο +27.8% EtOH +37% DMG +7.4% H ₂ O	-	-	-	✓
9.3% δενδρολίβανο+ 18.5% ελαιόλαδο +27.8% EtOH +37% DMG +7.4% H ₂ O	-	-	-	✓
18.5% δενδρολίβανο+ 9.3% ελαιόλαδο +27.8% EtOH +37% DMG +7.4% H ₂ O	-	-	-	✓
9.3% θυμάρι +18.5% ελαιόλαδο+27.8% EtOH +37% DMG +7.4% H ₂ O	-	-	-	✓
9.3% ρίγανη +18.5% ελαιόλαδο+27.8% EtOH +37% DMG +7.4% H ₂ O	-	-	-	✓

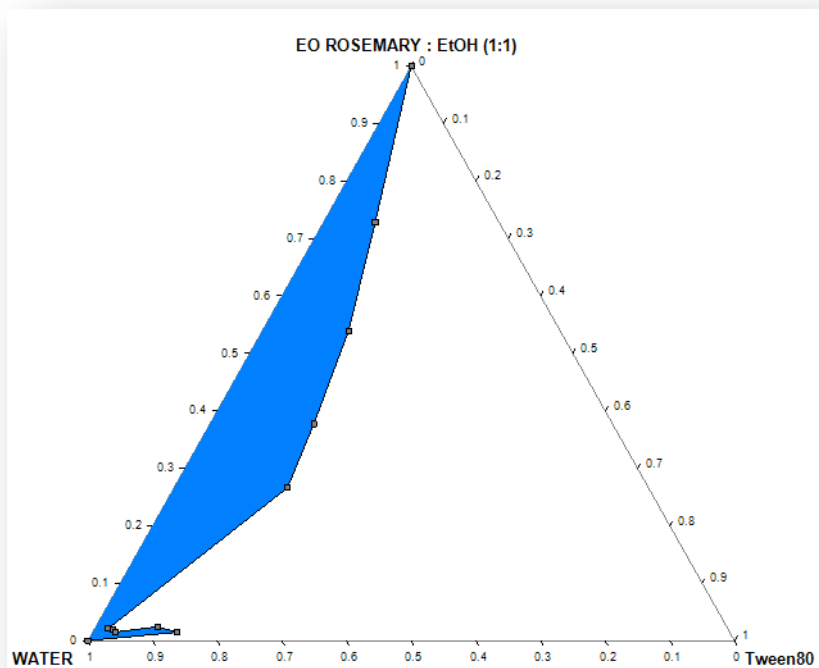
*Τ.Δ.Φ: Τριγωνικό Διάγραμμα Φάσης

DLS: Τεχνική Δυναμικής Σκέδασης Φωτός

EPR: Ηλεκτρονικός Παραμαγνητικός Συντονισμός

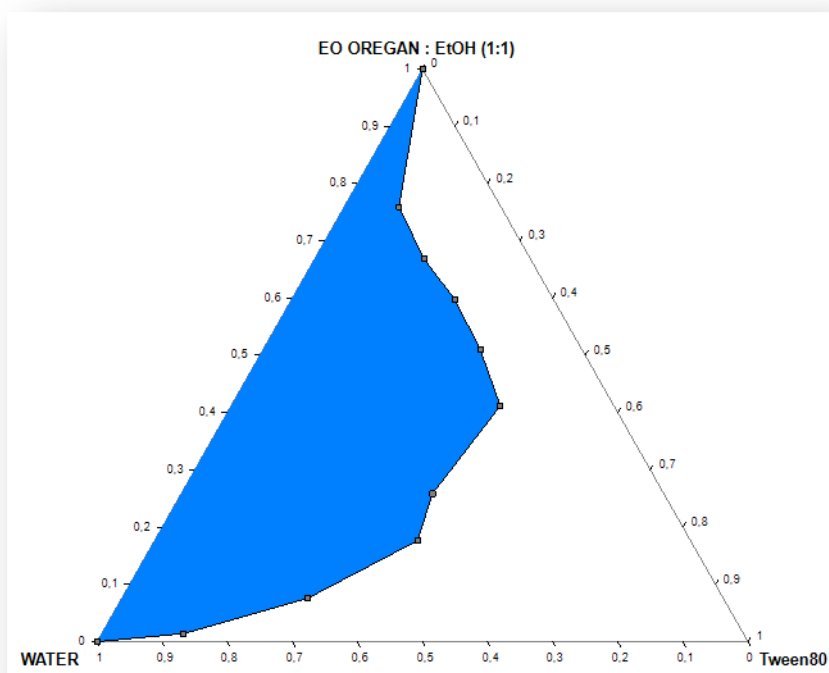
A .Δ: Αντιμικροβιακή δράση

Στην **Εικόνα 4.1**, απεικονίζεται το ψευδοτριγωνικό διάγραμμα για το σύστημα με Δενδρολίβανο και αιθανόλη (1:1), Tween 80 και νερό (με επιλεγμένο σημείο μελέτης το 11% δενδρολίβανο+ 11% EtOH+ 50% Tween 80 +28% H₂O), το οποίο μας έδωσε την μεγαλύτερη μονοφασική περιοχή από όλα τα συστήματα που δοκιμάστηκαν και ταυτόχρονα σημαντική αντιμικροβιακή δράση.

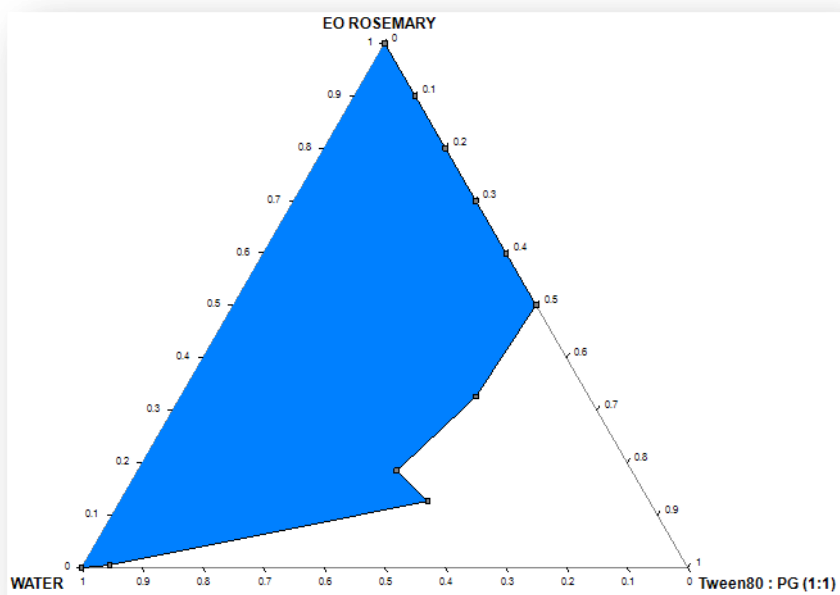


Εικόνα 4.1: Ψευδοτριγωνικό διάγραμμα του συστήματος δενδρολίβανο/ αιθανόλη (1:1), Tween 80, H₂O.

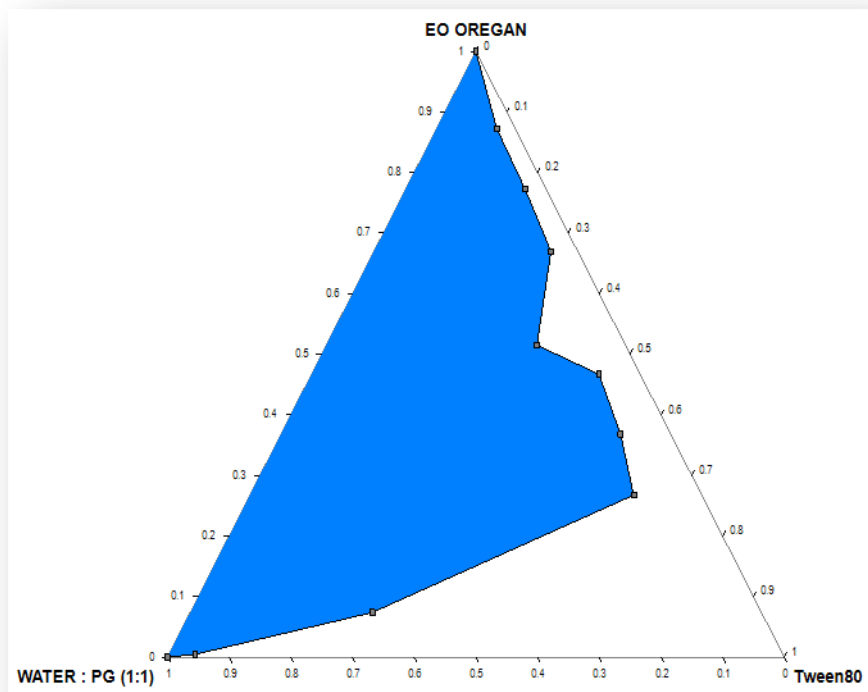
Η περιοχή με το λευκό χρώμα αντιστοιχεί στην μονοφασική περιοχή, όπου η ανάμειξη των συστατικών που χρησιμοποιήσαμε και της αντίστοιχης υδατικής φάσης έχει οδηγήσει στη επίτευξη μικρογαλακτώματος, ενώ η περιοχή που είναι χρωματισμένη γαλάζια αντιστοιχεί σε πολυφασική περιοχή (**Εικόνα 4.1**). Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε σταθερή θερμοκρασία (στους 25° C). Ακολουθούν τα υπόλοιπα ψευδοτριγωνικά διαγράμματα που κατασκευάστηκαν (**Εικόνα 4.2, 4.3, 4.4, 4.5**). Οι γαλάζιες περιοχές αντιστοιχούν στην πολυφασική περιοχή για όλα τα τριγωνικά που ακολουθούν.



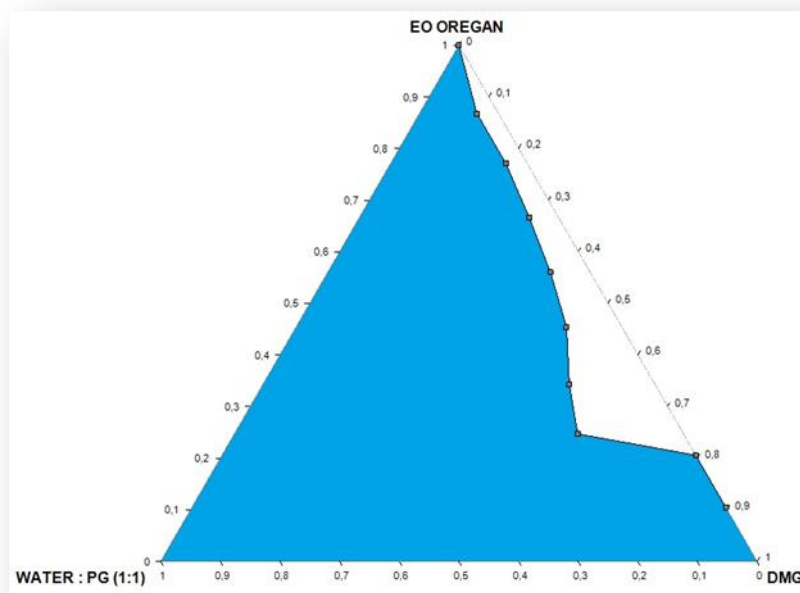
Εικόνα 4.2: Ψευδοτριγωνικό διάγραμμα του συστήματος ρίγανη/ αιθανόλη (1:1), Tween 80, H₂O.



Εικόνα 4.3: Ψευδοτριγωνικό διάγραμμα του συστήματος δεντρολίβανο, Tween 80/ PG (1:1), H₂O.



Εικόνα 4.4: Ψευδοτριγωνικό διάγραμμα του συστήματος ρίγανη, Tween 80, H₂O:PG (1:1).



Εικόνα 4.5: Ψευδοτριγωνικό διάγραμμα του συστήματος ρίγανη , DMG, H₂O:PG (1:1).

Αρχική παρατήρηση αποτελεί το γεγονός ότι καθώς αυξάνουμε την ποσότητα του επιφανειοενεργού - και μειώνεται η αντίστοιχη των ελαίων - το σύστημα είναι σε

θέση να ενσωματώσει περισσότερο νερό από ότι όταν αυτό περιείχε μεγαλύτερη ποσότητα ελαίων. Η συγκεκριμένη παρατήρηση είναι συνήθης, καθώς οι επιφανειοενεργές ουσίες ελαττώνουν την μεσεπιφανειακή τάση μεταξύ των δύο υγρών και έτσι σχηματίζονται περισσότερα μικκύλια παρέχοντας την δυνατότητα ενσωμάτωσης περισσότερου νερού. Στον αντίποδα όμως, σκοπός των μελετών κατά κύριο λόγο είναι η δημιουργία μικρογαλακτωμάτων τα οποία θα περιέχουν το μικρότερο δυνατό ποσοστό επιφανειοενεργών, καθώς αποτελούν ακριβά συστατικά για τις βιομηχανίες. Επιπρόσθετα, ουσίες όπως η αιθανόλη αποτελούν συστατικά τα οποία δεν επιθυμούνται σε ιδιαίτερα μεγάλο ποσοστό σε μικρογαλακτώματα τροφίμων και γενικά σε σκευάσματα σχετικά με τρόφιμα παρ' όλο που έχουν χαρακτηριστεί ως «Γενικά αναγνωρισμένα ως ασφαλή» (Generally Recognized as Safe –GRAS).

4.1.2 Ανάλυση Αποτελεσμάτων Τεχνικής Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (DLS)

4.1.2.1 Δείκτης Διάθλασης (Refractive Index, RI)

Για την δομική μελέτη ενός δείγματος με την τεχνική DLS είναι απαραίτητο να γνωρίζουμε τον δείκτη διάθλασης της μετρούμενης ουσίας (συνεχούς φάσης), καθώς και το ιξώδες της.

Στην συγκεκριμένη μελέτη, τα μικρογαλακτώματα που μετρήθηκαν περιείχαν αιθέριο έλαιο ρίγανης και δεντρολίβανου. Από βιβλιογραφική έρευνα, διαπιστώνουμε ότι το αιθέριο έλαιο ρίγανης έχει δείκτη διάθλασης **RI= 1.5091** στους 20 °C, ενώ το αιθέριο έλαιο δεντρολίβανου έχει **RI= 1.4689** στους 20 °C.

4.1.2.2 Μέτρηση Ιξώδους (Viscosity)

Η μέτρηση του ιξώδους του αιθέριου ελαίου ρίγανης και του δεντρολίβανου έγινε με περιστροφικό ιξωδόμετρο DV-I Prime της Brookfield (**Εικόνα 2.7**) (παράγραφος 2.2.3). Για να πάρουμε μέτρηση, τοποθετούμε 500 μl από το έλαιο στην κεφαλή και την “ξαναβιδώνουμε” στο κύριο σώμα του οργάνου. Στον παρακάτω **Πίνακα 4.4 και 4.5**, ακολουθούν αναλυτικά οι μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν:

Πίνακας 4.4: Μέτρηση ιξώδους αιθέριου ελαίου Ρίγανης.**ΑΙΘΕΡΙΟ ΕΛΑΙΟ ΡΙΓΑΝΗΣ**

ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ (°C)		ΤΑΧΥΤΗΤΑ (RPM)		VISCOSITY (cP)	
ΜΕΤΡΗΣΗ 1 ^H	ΜΕΤΡΗΣΗ 2 ^H	ΜΕΤΡΗΣΗ 1 ^H	ΜΕΤΡΗΣΗ 2 ^H	ΜΕΤΡΗΣΗ 1 ^H	ΜΕΤΡΗΣΗ 2 ^H
24.9	25	4	4	8.51	8.51
24.9	25.1	30	10	8.59	8.43
25.1	25	20	20	8.64	8.51
24.9	25	50	30	Error	8.71

Πίνακας 4.5: Μέτρηση ιξώδους αιθέριου ελαίου Δενδρολίβανου.**ΑΙΘΕΡΙΟ ΕΛΑΙΟ ΔΕΝΔΡΟΛΙΒΑΝΟΥ**

ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ (°C)		ΤΑΧΥΤΗΤΑ (RPM)		VISCOSITY (cP)	
ΜΕΤΡΗΣΗ 1 ^H	ΜΕΤΡΗΣΗ 2 ^H	ΜΕΤΡΗΣΗ 1 ^H	ΜΕΤΡΗΣΗ 2 ^H	ΜΕΤΡΗΣΗ 1 ^H	ΜΕΤΡΗΣΗ 2 ^H
24.9	25	4	6	2.91	2.96
24.9	25	20	30	2.96	2.96
24.9	25	50	50	2.94	2.97
24.9	-	100	-	2.93	-

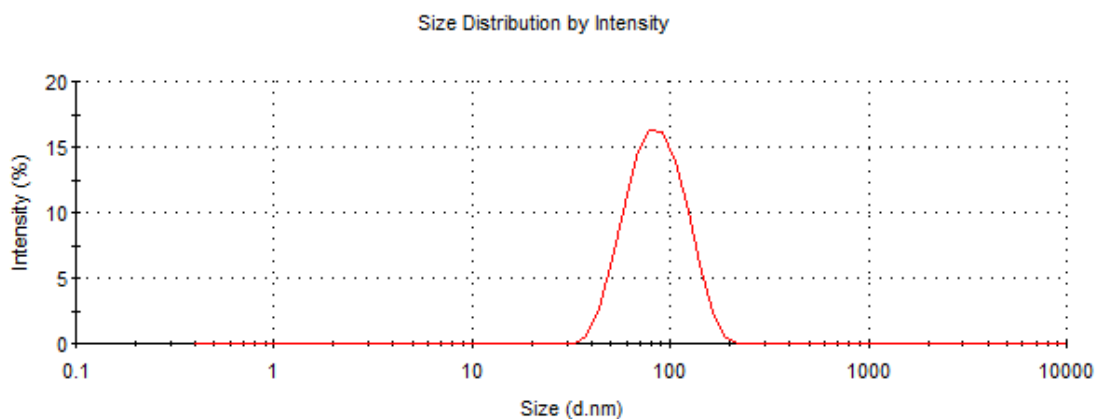
Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε πολλές διαφορετικές ταχύτητες, προκειμένου να επιβεβαιωθεί η σταθερότητα της τιμής του ιξώδους ανεξαρτήτου ταχύτητας. Στην 2^η μέτρηση για το ιξώδες του δενδρολίβανου παρατηρήσαμε ότι η τιμή 2.96 επαναλαμβανόταν σε διαφορετικές ταχύτητες, επομένως δεν χρειάστηκε παραπάνω μέτρηση.

4.1.2.3 Ανάλυση Φασμάτων Τεχνικής Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (DLS)

Με την τεχνική DLS επιλέχθηκαν και μελετήθηκαν μικρογαλακτώματα “άδεια” ως προς την δραστική ουσία (empty, απουσία νισίνης) αλλά και τα αντίστοιχα μικρογαλακτώματα ίδιας σύστασης, τα οποία είχαν εγκλωβισμένη την δραστική ουσία (full, παρουσία νισίνης). Η ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε τρία ανεξάρτητα πειράματα, με πλαστικές κυψελίδες (Polystyrene 10 x 10 x 45 mm) και στην συνέχεια, με κυψελίδα από Quartz.

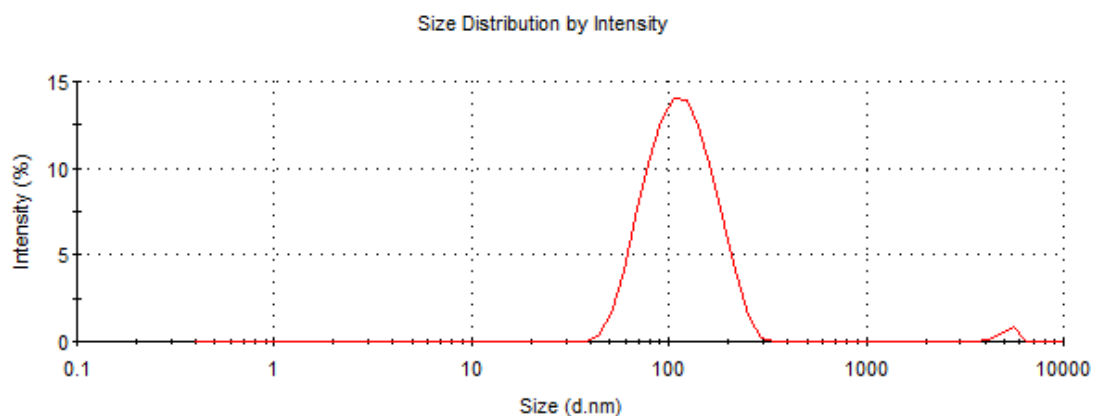
Η διαδικασία ετοιμασίας των δειγμάτων ήταν η ίδια και στις δύο περιπτώσεις. Όλα τα συστατικά των μικρογαλακτωμάτων φιλτραρίστηκαν ξεχωριστά, με την χρήση υδρόφιλων ή λιπόφιλων φίλτρων διαμέτρου πόρων 0,45 μm, ανάλογα με την σύστασή τους, για την απομάκρυνση πιθανής σκόνης.

Από την μελέτη των δομικών χαρακτηριστικών με την τεχνική DLS προσδιορίστηκε το μέγεθος (διάμετρος, d) των μικκυλίων, αλλά και η ομοιογένεια (Δείκτης πολυδιασποράς, PdI). Παρακάτω, ακολουθούν ενδεικτικά δύο διαγράμματα από τις ουσίες που μας έδωσαν φάσμα με την τεχνική DLS:



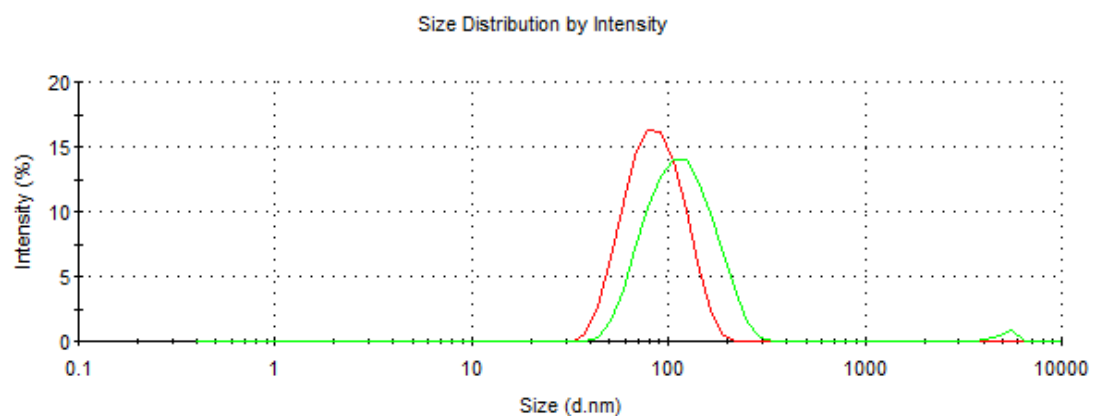
Εικόνα 4.6: Διάγραμμα DLS του μικρογαλακτώματος δενδρολίβανο 33,9% + T80: PG (1:1) 50,9% + 15,3% H₂O (Empty).

Στην **Εικόνα 4.6** απεικονίζεται το φάσμα του μικρογαλακτώματος του οποίου η διεσπαρμένη φάση είναι μόνο νερό. Στο συγκεκριμένο διάγραμμα εμφανίζεται ένας πληθυσμός (μία καμπύλη) και μας δίνει την πληροφορία ότι η διάμετρος των διασπορών κυμαίνεται στα 89 nm με PdI (polydispersity index- δείκτης διασποράς) 0.2.



Εικόνα 4.7: Διάγραμμα DLS του μικρογαλακτώματος δενδρολίβανο 33.9%+ T80: PG (1:1) 50.9% + 15.3% H₂O (Full).

Στην **Εικόνα 4.7** απεικονίζεται το φάσμα του μικρογαλακτώματος του οποίου η διεσπαρμένη φάση αποτελείται από νερό και νισίνη (180 μl υδατικού διαλύματος νισίνης). Στο συγκεκριμένο διάγραμμα εμφανίζεται ένας πληθυσμός (μία καμπύλη) και μας δίνει την πληροφορία ότι η ακτίνα των διασπορών κυμαίνεται στα 121 nm με PdI (polydispersity index- δείκτης διασποράς) 0..



Εικόνα 4.8: Συγκριτικό διάγραμμα DLS του μικρογαλακτώματος δενδρολίβανο 33.9% + T80: PG (1:1) 50.9% + 15.3% H₂O Full και Empty (με πράσινο χρώμα το Full και με κόκκινο το Empty).

Συγκρίνοντας τα δύο φάσματα (Empty και Full) στην **Εικόνα 4.8**, παρατηρούμε ότι η καμπύλη που αφορά στο δείγμα Full (πράσινο χρώμα), εμφανίζεται με πιο μεγάλο άνοιγμα καμπάνας και μικρότερο ύψος από την καμπύλη που αφορά στο δείγμα Empty (κόκκινο χρώμα). Επίσης, από τα δεδομένα του διαγράμματος βλέπουμε ότι η διάμετρος του μικκυλίου για το δείγμα Full είναι μεγαλύτερη (121 nm) από εκείνη του δείγματος Empty (89 nm). Όσον αφορά τον δείκτη διασποράς, το δείγμα Full

εμφανίζεται λίγο μεγαλύτερος ($PdI = 0.24 \approx 0.2$) από αυτόν του δείγματος Empty ($PdI = 0.199 \approx 0.2$), γεγονός που σημαίνει ότι το δείγμα Empty, ο πληθυσμός που εμφανίζεται έχει μεγαλύτερη ομοιογένεια, από τον πληθυσμό που εμφανίζεται στο δείγμα Full.

Ακολουθεί συγκεντρωτικός πίνακας (**Πίνακας 4.6**) με τον μέσο όρο της διαμέτρου σταγονιδίων για τα διάφορα μικρογαλακτώματα που μελετήθηκαν, καθώς και ο μέσος όρος του δείκτη διασποράς.

Πίνακας 4.6: Συγκεντρωτικός πίνακας με τον μέσο όρο των μετρήσεων DLS που πραγματοποιήθηκαν για τα μικρογαλακτώματα που μελετήθηκαν.

ΤΥΠΟΙ ΜΙΚΡΟΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΩΝ	AVERAGE	AVERAGE
	r_h (nm)	PdI
11% ρίγανη+ 11%EtOH+ 50%Tween+28%H ₂ O (Empty)	5	0.4
11% ρίγανη+ 11%EtOH+ 50%Tween+28%H ₂ O (Full)	9	0.5
11% δεντρολίβανο +11% EtOH +50% Tween +28% H ₂ O (Empty)	2	1
11% δεντρολίβανο +11% EtOH +50% Tween +28% H ₂ O (Full)	2	1
33.90% δεντρολίβανο + 50.85% Tween:PG (1:1) + 15.25% H ₂ O (Empty)	76	0.6
33.90% δεντρολίβανο + 50.85% Tween:PG (1:1) + 15.25% H ₂ O (Full)	104	0.3
47.2% ρίγανη +47.2% Tween +5.7% H ₂ O:PG (1:1) (Empty)	3	0.6
47.2% ρίγανη +47.2% Tween +5.7% H ₂ O:PG (1:1) (Full)	2	0.8
46.7% ρίγανη +46.7% DMG +6.5 H ₂ O:PG (1:1) (Empty)	2	0.6
	2	0.6

4.1.3 Ανάλυση Αποτελεσμάτων Φασματοσκοπίας Ηλεκτρονικού Παραμαγνητικού Συντονισμού (EPR)

4.1.3.1 Δομική μελέτη της μεσεπιφάνειας των μικρογαλακτωμάτων με την χρήση 5-DSA

Τα μικρογαλακτώματα προς μελέτη, παρασκευάστηκαν σύμφωνα με την διαδικασία που περιγράφεται στην *παράγραφο 2.3.4*.

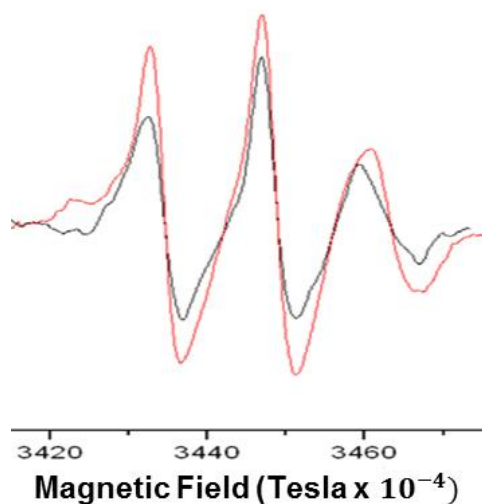
Για να προκύψουν οι επιθυμητές συγκεντρώσεις του ιχνηθέτη 5-DSA, στα μικρογαλακτώματα, 1 g από το προς μελέτη μικρογαλάκτωμα τοποθετήθηκε σε erppendorf στο οποίο ήταν τοποθετημένη η κατάλληλη ποσότητα 5-DSA, η οποία και πρόεκυψε με την μέθοδο της εξατμισμένης αιθανόλης. Πιο συγκεκριμένα, 10 μl από stock διάλυμα 5-DSA σε αιθανόλη ($7.8 \cdot 10^{-3}$ M) τοποθετήθηκε σε erppendorf και αμέσως ακολουθούσε εξάτμιση.

Ακολούθησε ανάδευση του μίγματος και κατόπιν το δείγμα μεταφέρθηκε στην κυψελίδα WG, η οποία τοποθετήθηκε στο κέντρο του οργάνου (sample cavity) και εφόσον έχουν ορισθεί οι παράμετροι (**Πίνακας 2.1**), το δείγμα μετρήθηκε. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με τον συντονισμό του φασματόμετρου EPR και με την βοήθεια του προγράμματος WinEPR Acquisition.

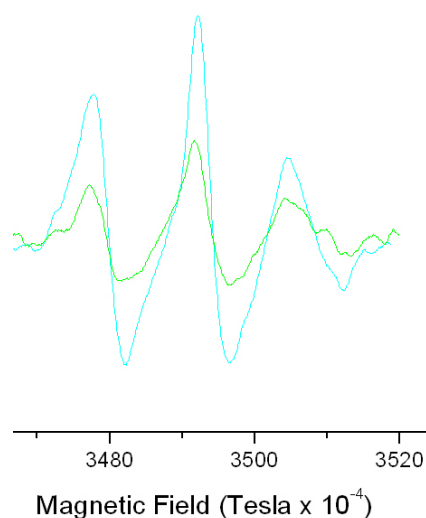
4.1.3.2 Ανάλυση Φασμάτων Φασματοσκοπίας EPR

Στη συγκεκριμένη ενότητα, δίνονται τα αποτελέσματα της μελέτης του μικρογαλακτώματος με την βοήθεια του ιχνηθέτη 5-DSA με σκοπό την εξαγωγή συμπερασμάτων για την μελέτη της μεσεπιφάνειας μεταξύ της διεσπαρμένης υδατικής φάσης και του εξωτερικού οργανικού διαλύτη. Το μόριο αυτό έχει χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα για την μελέτη των μικκυλιακών μεσεπιφανειών και των βιολογικών μεμβρανών ([45], [66], [67]). Από το φάσμα του EPR, μπορούν να εξαχθούν συμπεράσματα για την κινητικότητα και την πολικότητα του περιβάλλοντος του ιχνηθέτη.

Παρακάτω, ακολουθούν ενδεικτικά φάσματα (**Εικόνα 4.9, 4.10**) από τις ουσίες που μας έδωσαν φάσμα με την φασματοσκοπία EPR.



Εικόνα 4.9: Φάσματα EPR των empty μικρογαλακτωμάτων δύο διαφορετικών συστημάτων (καμπύλη με μαύρο χρώμα 22% Δενδρολίβανο: EtOH (1:1) + 50% T80 + 28% H₂O (Empty) και καμπύλη με κόκκινο χρώμα 33,9% Δενδρολίβανο + 50,85% T80:PG(1:1) + 15,25% H₂O (Empty)). Και οι δύο κορυφές είναι κεντραρισμένες στο ίδιο μαγνητικό πεδίο $3442 \cdot 10^{-4}$ Tesla (ή 3442 Gauss).



Εικόνα 4.10: Φάσματα EPR του empty και full μικρογαλακτώματος του ίδιου συστήματος (καμπύλη με γαλάζιο χρώμα 22% Δενδρολίβανο: EtOH (1:1) + 50% T80 + 28% H₂O (Empty) και καμπύλη με πράσινο χρώμα 22% Δενδρολίβανο: EtOH(1:1) + 50% T80 + 28% H₂O (full)). Και οι δύο κορυφές είναι κεντραρισμένες στο ίδιο μαγνητικό πεδίο $3442 \cdot 10^{-4}$ Tesla (ή 3485 Gauss).

Στον παρακάτω πίνακα (**Πίνακας 4.8**) καταγράφηκαν οι παράμετροι τ_R και **S** όπως αυτές μετρήθηκαν για το κάθε μικρογαλάκτωμα που μας έδωσε φάσμα EPR.

Πίνακας 4.8: Μέσος όρος των τιμών S και τ_R για όλα τα μικρογαλακτώματα που πήραμε φάσμα EPR.

Σύστημα	S	τ_R (ns)
33.9% Δενδρολίβανο + 50.85% T80:PG(1:1) + 15.25% H ₂ O (Empty)	0.15 ± 0	1.64 ± 0
22% Δενδρολίβανο: EtOH(1:1) + 50% T80 + 28% H ₂ O (Empty)	0.25 ± 0.11	2.95 ± 1.28
22% Δενδρολίβανο: EtOH(1:1) + 50% T80 + 28% H ₂ O (full)	0.17 ± 0.05	1.65 ± 0.70

Από τον **Πίνακα 4.8**, φαίνεται ότι οι παράμετροι εμφανίζονται μειωμένες παρουσία νισίνης. Επομένως η νισίνη μειώνει τον χρόνο που χρειάζεται ο ιχνηθέτης για να κάνει μια ολόκληρη περιστροφή (τ_R) και την αυξάνει την ελαστικότητα της μεμβράνης (S).

Αναλυτικότερα, η παράμετρος τ_R όπως έχει προαναφερθεί υποδηλώνει τον χρόνο που χρειάζεται το μόριο του ιχνηθέτη ώστε να πραγματοποιήσει μια περιστροφή. Συνεπώς, παρατηρείται σημαντική αλλαγή στην συγκεκριμένη τιμή παρουσία νισίνης, εκτιμάται ότι ο ιχνηθέτης, ο οποίος είναι αμφίφιλος και εδράζεται στην επιφάνεια μεταξύ συνεχούς και διεσπαρμένης φάσης, χρειάζεται λιγότερο χρόνο για να πραγματοποιήσει μια περιστροφή. Επομένως, η νισίνη αλληλεπιδρά με το στρώμα των επιφανειοενεργών.

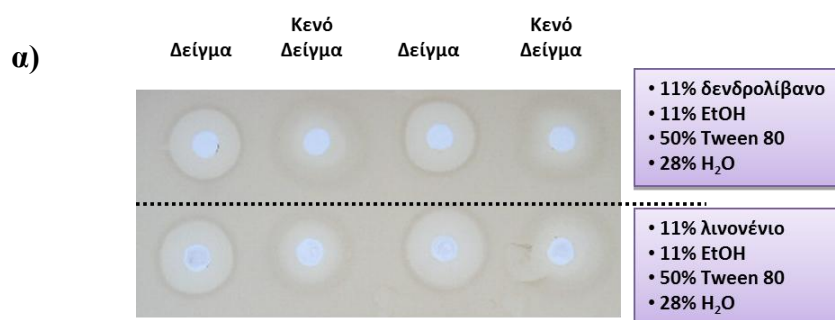
Στο ίδιο συμπέρασμα οδηγούμαστε και με την παρατήρηση της ελαστικότητας της μεμβράνης, όπου εφόσον η τιμή της παραμέτρου S μειώνεται αισθητά παρουσία νισίνης, οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι η νισίνη έρχεται σε επαφή με την μεσεπιφάνεια, άρα και με τον ιχνηθέτη, και κατά συνέπεια η μεμβράνη των επιφανειοενεργών εμφανίζεται πιο ελαστική.

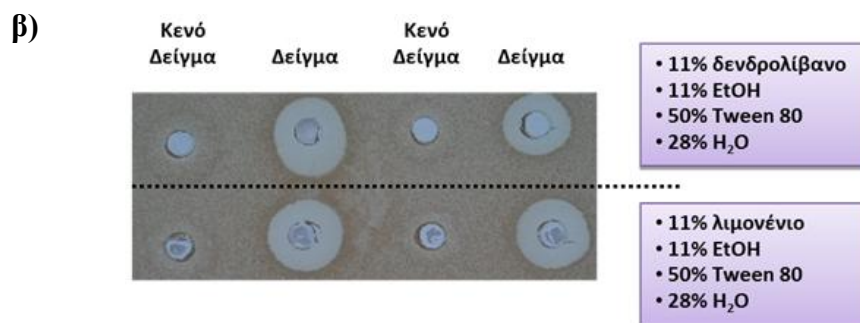
4.2 ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ

Για την ανίχνευση της αντιμικροβιακής δράσης των μικρογαλακτωμάτων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος WDA (παράγραφος 2.3.2). Τα τρυβλία επωάστηκαν σε συγκεκριμένες συνθήκες ανάλογα με τον μικροοργανισμό με τον οποίο εμβολιάστηκαν (στους 30 °C / 24 h για τον *Lactococcus lactis* και 37 °C / 24 h για τον *Staphylococcus aureus*), και στην συνέχεια παρατηρήθηκαν οπτικά για την ύπαρξη ή την απουσία ζωνών παρεμπόδισης.

Αρχικά επιλέχθηκαν προς μελέτη συστήματα που έδειξαν ότι δέχονται μεγάλη ποσότητα νερού, γεγονός καθοριστικό για την πιθανότητα εγκλωβισμού της υδατοδιαλυτής βιοδραστικής ουσίας (νισίνη). Ταυτόχρονα, προσπαθήσαμε να επιλέξουμε συστήματα με μειωμένη ποσότητα αιθανόλης και επιφανειοδραστικού. Τα συστήματα που μας έδωσαν ενθαρρυντικά αποτελέσματα μελετήθηκαν έναντι και του *S. aureus*, εκτός από τον *L. lactis*.

Ένα σύστημα που η μελέτη του έδωσε πολύ θετικά αποτελέσματα ήταν αυτό του δενδρολίβανου (11% δενδρολίβανο +11% EtOH +50% T80 + 28% H₂O). Το δείγμα με την νισίνη, έδωσε διαυγείς ζώνες παρεμπόδισης και μεγαλύτερου μεγέθους από το κενό δείγμα (χωρίς νισίνη), γεγονός που αποδεικνύει την συνεργιστική δράση της βακτηριοσίνης και του αιθέριου ελαίου. Το συγκεκριμένο μικρογαλάκτωμα, συγκρίθηκε με το αντίστοιχο του που περιείχε λιμονένιο στη συνεχή φάση (11% λιμονένιο +11% EtOH +50% T80 + 28% H₂O), καθώς έχει εμφανίσει συνεργιστική αντιμικροβιακή δράση με την νισίνη σε προηγούμενες μελέτες. Λόγω των θετικών αποτελεσμάτων έναντι του *L. lactis* τα μικρογαλακτώματα αυτά μελετήθηκαν και έναντι του *S. aureus* (Εικόνα 4.11).





Εικόνα 4.11: α) Ζώνες παρεμπόδισης των συστημάτων 11% δενδρολίβανο +11% EtOH +50% T80 + 28%H₂O (πάνω) και 11% λιμονένιο +11% EtOH +50% T80 + 28%H₂O (κάτω) σε τρυβλίο εμβολιασμένο με *Lactococcus lactis* και β) Ζώνες παρεμπόδισης των συστημάτων 11% δενδρολίβανο +11% EtOH +50% T80 + 28%H₂O (πάνω) και 11% λιμονένιο +11% EtOH +50% T80 + 28%H₂O(κάτω) σε τρυβλίο εμβολιασμένο με *Staphylococcus aureus*.

Επίσης μελετήθηκε το αντίστοιχο μικρογαλάκτωμα με αιθέριο έλαιο ρίγανης (11% ρίγανη +11% EtOH +50% T80 + 28% H₂O). Το δείγμα που περιείχε νισίνη εμφάνισε διαυγείς ζώνες παρεμπόδισης, λίγο μεγαλύτερες από τις αντίστοιχες ζώνες του κενού δείγματος, γεγονός που ενισχύει την υπόθεση της συνεργιστικής δράσης μεταξύ της νισίνης και του αιθέριου ελαίου ρίγανης.

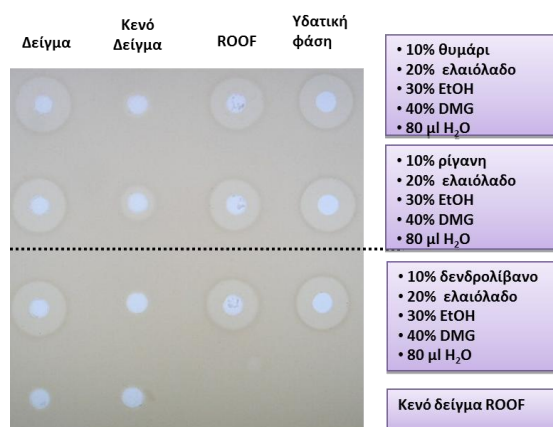
Τα μικρογαλακτώματα με υψηλό ποσοστό αιθέριου ελαίου ρίγανης (>45%) και διαφορετική επιφανειοδραστική ουσία (47.2% ρίγανη + 47.2% T80 + 5.7% H₂O:PG και 46.7% ρίγανη + 46.7% DMG + 6.5% H₂O:PG), δεν εμφάνισαν συνεργιστική αντιμικροβιακή δράση με τη νισίνη έναντι του *L. lactis*. Οι ζώνες παρεμπόδισης τόσο των δειγμάτων με νισίνη όσο και αυτών χωρίς την βακτηριοσίνη ήταν όμοιες σε μέγεθος διαμέτρου και σε διαύγηση. Όσον αφορά στο μικρογαλάκτωμα με μεγάλο ποσοστό αιθέριου ελαίου δενδρολίβανου (33.9% δεντρολίβανο + 50.9% Tween80:PG (1:1) +15.3% H₂O), παρατηρήθηκαν μεσαίου μεγέθους ζώνες παρεμπόδισης και όχι τόσο διαυγείς. Το μέγεθος των ζωνών του δείγματος με νισίνη και του κενού δείγματος ήταν το ίδιο, γεγονός που υποδηλώνει την απουσία συνεργιστικής δράσης μεταξύ του αιθέριου ελαίου δενδρολίβανου και της νισίνης σε αυτό το σύστημα.

Επιπρόσθετα, μελετήθηκαν κάποια μικρογαλακτώματα που περιείχαν στη συνεχή τους φάση αιθέριο έλαιο δενδρολίβανου και ελαιόλαδο, σε διαφορετικές αναλογίες. Από τους συνδυασμούς που εξετάστηκαν αρχικά, επιλέχθηκε και μελετήθηκε περαιτέρω το μικρογαλάκτωμα με αναλογία αιθέριου ελαίου:ελαιόλαδου που έδωσε

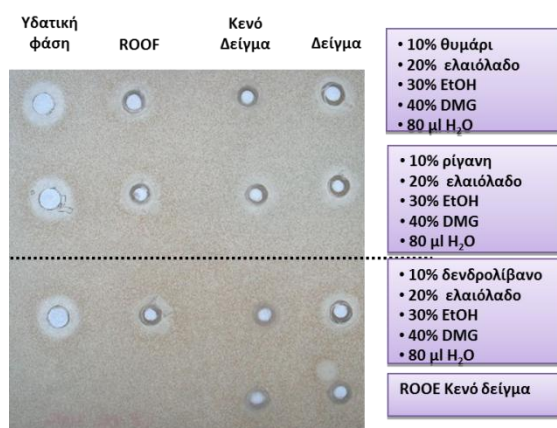
τις μεγαλύτερες και πιο διαυγείς ζώνες παρεμπόδισης (9.3% δεντρολίβανο+ 18.5% ελαιόλαδο +27.8% EtOH +37.04% DMG +7.41% H₂O). Οι αναλογίες αυτές εφαρμόστηκαν και για την μελέτη συστημάτων με αιθέριο έλαιο ρίγανης και θυμαριού. Τα μικρογαλακτώματα αυτά μελετήθηκαν αρχικά έναντι του *L. lactis* (Εικόνα 4.12 α), δίνοντας ενθαρρυντικά αποτελέσματα, καθώς τα δείγματα με νισίνη και για τα τρία αιθέρια έλαια, έδωσαν μεγάλες ζώνες παρεμπόδισης σε αντίθεση με τα κενά δείγματα (χωρίς νισίνη) και το δείγμα ROOF (χωρίς αιθέριο έλαιο), για τα οποία παρατηρήθηκε είτε μικρότερη είτε καθόλου ζώνη.

Τα ίδια μικρογαλακτώματα μελετήθηκαν επίσης και με μικροοργανισμό στόχο τον *S. aureus* (Εικόνα 4.12 β). Ωστόσο τα αποτελέσματα διαφέρουν σε σχέση με αυτά που αναφέρθηκαν παραπάνω για τον *L. lactis*, καθώς δεν παρουσιάστηκε συνεργιστική αντιμικροβιακή δράση μεταξύ των αιθέρων ελαίων και της νισίνης. Πιο αναλυτικά, ενώ οι ζώνες παρεμπόδισης των κενών δειγμάτων (μόνο αιθέριο έλαιο) ήταν αισθητά μικρότερες, οι αντίστοιχες των δειγμάτων (αιθέριο έλαιο και νισίνη) και του ROOF (μόνο νισίνη) είχαν ίδιο μέγεθος και διαύγηση. Το γεγονός αυτό, υποδεικνύει την απουσία συνεργιστικής δράσης νισίνης και αιθερίων ελαίων στα συστήματα αυτά και ταυτόχρονα, θέτει βάσεις για περαιτέρω μελέτη και βελτιώσεις.

α)



β)



Εικόνα 4.12: α) Ζώνες παρεμπόδισης των συστημάτων 10% θυμάρι + 20% ελαιόλαδο +30% EtOH +40% DMG +80μl H₂O, 10% ρίγανη + 20% ελαιόλαδο +30% EtOH +40% DMG +80μl H₂O και 10% δενδρολίβανο + 20% ελαιόλαδο +30% EtOH +40% DMG +80μl H₂O σε τρυβλίο εμβολιασμένο με *Lactococcus lactis* και **β)** ζώνες παρεμπόδισης των ίδιων συστημάτων σε τρυβλίο εμβολιασμένο με *Staphylococcus aureus*. Ως ROOF έχει συμβολιστεί το σύστημα 30% ελαιόλαδο +30% EtOH +40% DMG +80μl H₂O (με νισίνη), ενώ ως κενό δείγμα ROOE, το σύστημα 30% ελαιόλαδο +30% EtOH +40% DMG +80μl H₂O (χωρίς νισίνη)

Στο παράρτημα υπάρχουν αναλυτικοί πίνακες (**Πίνακες Π1, Π2, Π3, Π4**) με τις διαμέτρους των ζωνών διαύγασης για κάθε τρυβλίο και κάθε σύστημα.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σήμερα, οι καταναλωτές έχουν επίγνωση των κινδύνων για την υγεία που μπορεί να προέρχονται από τη χρήση πρόσθετων στα τρόφιμα. Η ιδέα του «φυσικού» και του «παραδοσιακού» τροφίμου, επεξεργασμένου αλλά χωρίς καμία προσθήκη συνθετικών συντηρητικών, γίνεται όλο και πιο ελκυστική. Μία από τις εναλλακτικές λύσεις για να ικανοποιηθεί το αίτημα αυτό είναι οι βακτηριοσίνες, οι οποίες είναι αντιμικροβιακά πεπτίδια που έχουν μελετηθεί συστηματικά τα τελευταία χρόνια ως προς τη δυνατότητα χρήσης τους ως βιοσυντηρητικά τροφίμων [68],[69]. Οι βακτηριοσίνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παράταση της διάρκειας ζωής του τροφίμου, αλλά και για τον έλεγχο της μικροχλωρίδας της ζύμωσης. Τοξικολογικές μελέτες έδειξαν ότι η πρόσληψη νισίνης δεν προκαλεί καμία τοξική επίδραση σε ανθρώπους, παρά μόνο σε πολύ υψηλά επίπεδα (εκτιμώμενη θανατηφόρα δόση 6.950 mg/kg) [69], ενώ παρουσιάζει ένα ευρύ φάσμα

αντιμικροβιακής δράσης κατά των μικροοργανισμών *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* και άλλων παθογόνων.

Πολύ πρόσφατα λοιπόν, οι βακτηριοσίνες εφαρμόζονται στην τεχνολογία των εμποδίων, η οποία αξιοποιεί τη συνεργιστική δράση πολλών παραγόντων ώστε να επιτευχθεί η αποτελεσματικότερη συντήρηση των τροφίμων μέσω του ελέγχου της μικροβιακής ανάπτυξης, όπως η χρήση αιθέριων ελαίων. Η αντιμικροβιακή δράση των αιθέριων ελαίων στα μοντελοποιημένα συστήματα τροφίμων ή σε πραγματικά τρόφιμα ([19],[70]) έχει μελετηθεί τα τελευταία χρόνια αρκετά ([19],[71]) και παρά το γεγονός ότι η πλειοψηφία των αιθέριων ελαίων έχει ταξινομηθεί και είναι γενικά αναγνωρισμένα ως ασφαλή (GRAS) [72], η χρήση τους στα τρόφιμα ως συντηρητικά, είναι συχνά περιορισμένη. Καθοριστικό για τον περιορισμό της χρήσης τους, είναι το γεγονός ότι μεγάλη δόση αιθέριου ελαίου μπορεί να αποβεί τοξική για τον ανθρώπινο οργανισμό, αλλά περιοριστικός εμφανίζεται και ο παράγοντας της γεύσης, καθώς η αποτελεσματική αντιμικροβιακή δόση μπορεί να υπερβεί τα επιθυμητά οργανοληπτικά αποδεκτά επίπεδα. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι η αποτελεσματικότητά τους μετριάζεται συχνά από την αλληλεπίδραση με τα συστατικά τροφίμων και τη δομή [73], [74].

Ο εγκλωβισμός βιοδραστικών ουσιών με αντιμικροβιακή δράση, όπως η νισίνη, σε μικρογαλακτώματα, έχει ως σκοπό την προστασία των ουσιών από την οξείδωση, αλλά και την εύκολη μεταφορά τους στον οργανισμό-στόχο [61]. Έτσι, το ενδιαφέρον της βιομηχανίας για την ανάπτυξη κολλοειδών διασπορών με σκοπό τον εγκλωβισμό βιοδραστικών ουσιών έχει πάρει μεγάλες διαστάσεις στις μέρες μας βρίσκοντας εφαρμογή στην βιομηχανία τροφίμων, αγροχημικών, φαρμάκων κ.α.

Κύριος στόχος τις δικής μας μελέτης ήταν η εύρεση ενός βιοσυμβατού μικρογαλακτώματος, που θα γίνει ο φορέας της βιοδραστικής ουσίας στον οργανισμό-στόχο και θα αναδείκνυε ταυτόχρονα την συνεργιστική δράση δύο μεμονωμένων αντιμικροβιακών ουσιών (αιθέρια έλαια και νισίνη).

Καταφέραμε να παρασκευάσουμε και να χαρακτηρίσουμε δομικά με φασματοσκοπικές τεχνικές (DLS, EPR) μια ποικιλία μικρογαλακτωμάτων, στην συνέχεια εγκλωβίσαμε την δραστική μας ουσία και ελέγξαμε την αντιμικροβιακή της δράση.

Τα αποτελέσματα της μελέτης ήταν ενθαρρυντικά και ελπίζουμε στην περαιτέρω εξέλιξη της, καθώς η χρήση της νισίνης μέσω μικρογαλακτωμάτων μπορεί να αποτελέσει σημαντική εφαρμογή στην τεχνολογία τροφίμων.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1]. Nychas, G.J.E. (1995), Natural antimicrobials from plants. In *New Methods of Food Preservation*, ed. Gould, G.W. pp. 58–89. London: Blackie Academic Professional
- [2]. GJE Nychas, PN Skandamis, CC Tassou, S Roller (2003), Antimicrobials from herbs and spices, *Natural antimicrobials for the minimal processing of foods*, Woodhead Publishing Ltd, pp. 176-200.
- [3]. Παπαναγιώτου Ε., Παπανικολάου Κ., Ζαμανίδης Σ. (2001), Καλλιέργεια των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών στην Ελλάδα, *Γεωργία-Κτηνοτροφία*, 1, σσ. 36-42
- [4]. Στεφανάκη-Νικηφοράκη Μαρία (1999), *Συστηματική Βοτανική*, Εκδ. Σταμούλης, Αθήνα
- [5]. G Ruberto, MT Baratta (2000), Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems, *Food chemistry*, Volume 69, Issue 2, Pages 167–174
- [6]. T. Kulisic, A. Radonic, V. Katalinic, M. Milos (2004), Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil, *Food Chemistry*, Volume 85, Issue 4, Pages 633–640
- [7]. O. Politeo, M. Jukic, M. Milos (2007), Chemical composition and antioxidant capacity of free volatile aglycones from basil (*Ocimum basilicum* L.) compared with its essential oil, *Food Chemistry*, Volume 101, Issue 1, Pages 379–385
- [8]. Nedyalka V. Yanishlieva, Emma Marinova, Jan Pokorný (2006), Natural antioxidants from herbs and spices, *European Journal of Lipid Science and Technology*, Volume 108, Issue 9, pages 776–793, No. 9
- [9]. Nedyalka V Yanishlieva, Emma M Marinova, Michael H Gordon, Violeta G Raneva (1999), Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems, *Food Chemistry*, Volume 64, Issue 1, Pages 59–66
- [10]. V. Exarchou, N. Nenadis, M. Tsimidou, I. P. Gerothanassis, A. Troganis, D. Boskou (2002), Antioxidant Activities and Phenolic Composition of Extracts from Greek Oregano, Greek Sage, and Summer Savory, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (19), pp 5294–5299
- [11]. P. Rubiolo, B. Sgorbini, E. Liberto, C. Cordero, C. Bicchi (2010), Essential oils and volatiles: sample preparation and analysis. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, Volume 25, Issue 5, pages 282–290.
- [12]. Kalembe, D.; Kunicka, A., (2003) Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils, *Current Medicinal Chemistry*, Volume 10, Number 10, pp. 813-829 (17)
- [13]. Sara Burt (2004), Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review *International Journal of Food Microbiology*, Volume 94, Issue 3, Pages 223–253

- [14]. Singh N., Shaik S., Dewir Y., Khamyile Z., Smith M., Shode F., Mngomezulu S., Nicholas A. (2009), Detection of L-canavanine in the Cancer bush (*Lessertia frutescens* L.), a reputed anti-HIV/AIDS medicinal plant. *South African Journal of Botany*, Volume 75, Issue 2, Pages 440
- [15]. Simon, J.E. (1990), *Essential oils and culinary herbs*. In: J. Janick and J.E. Simon (eds.), *Advances in new crops*, Timber Press, Portland, OR, p. 472-483.
- [16]. Sari, M., Biondi, D., M., Kaabeche, M., Mandalari, G., D'Arrigo, M., Bisignano, G., Saija, C., and Ruberto, G. (2006), Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of several populations of Algerian *Origanum glandulosum* Desf., *Flavour and Fragrance Journal*, 21; 890-898
- [17]. Nikos Chorianopoulos, Epameinontas Evergetis, Athanasios Mallouchos, Eleftherios Kalpoutzakis, George-John Nychas, and Serkos A. Haroutounian (2006), Characterization of the Essential Oil Volatiles of *Satureja thymbra* and *Satureja parnassica*: Influence of Harvesting Time and Antimicrobial Activity, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (8), pp 3139–3145
- [18]. Esen, G., Azaz, A., D., Kurkcuoglu, M., Husnu Can Baser, K, and Tinmaz, a. (2007), Essential oil and antimicrobial activity of wild and cultivated *Origanum vulgare* L. subsp. *hirtum* (Link) Letswaart from Marmara region, Turkey, *Flavour and Fragrance Journal*. 22:371-376
- [19]. P. Skandamis, E. Tsigarida G.-J.E. Nychas (2000) Ecophysiological attributes of *Salmonella typhimurium* in liquid culture and within a gelatin gel with or without the addition of oregano essential oil, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Volume 16, Issue 1, pp 31-35
- [20]. P Skandamis, E Tsigarida, G-J.E Nychas (2002), The effect of oregano essential oil on survival/death of *Salmonella typhimurium* in meat stored at 5°C under aerobic, VP/MAP conditions, *Food Microbiology*, Volume 19, Issue 1, Pages (97–103)
- [21]. R.J.W. Lamber¹, P.N. Skandamis, P.J. Coote and G.-J.E. Nychas, (2001), A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol, *Journal of Applied Microbiology*, Volume 91, Issue 3, pages 453–462
- [22]. Kokkini, S., Karousou, R., Dardioti, A., Krigas, N., Lanaras, T. (1997), Autumn essential oils of Greek oregano. *Phytochemistry* 44, 883–886.
- [23]. V. Papageorgiou, C. Gardeli, A. Mallouchos, M. Papaioannou and M. Komaitis (2008), Variation of the Chemical Profile and Antioxidant Behavior of *Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia fruticosa* Miller Grown in Greece, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (16), pp 7254–7264
- [24]. Iraj Rasooli, Mohammad Hadi Fakoor, Davod Yadegarinia, Latif Gachkar, Abdolamir Allameh, Mohammad Bagher Rezaei (2008), Antimycotoxigenic characteristics of *Rosmarinus officinalis* and *Trachyspermum copticum* L. essential oils, *International Journal of Food Microbiology*, Volume 122, Issues 1–2, Pages 135–139
- [25]. G. Economou, G. Panagopoulos, P. Tarantilis, D. Kalivas, V. Kotoulas, I.S. Travlos, M. Polysiou, A. Karamanos (2011), Variability in essential oil content and composition

of *Origanum hirtum* L., *Origanum onites* L., *Coridothymus capitatus* (L.) and *Satureja thymbra* L. populations from the Greek island *Ikaria*, *Industrial Crops and Products* 33, pp.236-241

- [26]. A. Fleisher and N. Sneer (1982), Oregano spices and *Origanum* chemotypes, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Volume 33, Issue 5, pages 441-446
- [27]. A. Dzamic, M. Sokovic, M. S. Ristic, S. Grujic-Jovanovic, J. Vukojevic, P. D. Marin (2008), Chemical composition and antifungal activity of *Origanum heracleoticum* essential oil, *Chemistry of Natural Compounds*, Volume 44, Issue ,pp 659-660
- [28]. Ultee, A., Kets, E.P.W., Smid, E.J. (1999), Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology* 65 , 4606–4610.
- [29]. Tassou, C.C., Koutsoumanis, K., Nychas, G.-J.E. (2000), Inhibition of *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus* in nutrient broth by mint essential oil. *Food Research International* 33, 273–280.
- [30]. R.J.W. Lambert, P.N. Skandamis, P.J. Coote and G.-J.E. Nychas (2001) ,A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol, *Journal of Applied Microbiology*, Volume 91, Issue 3, pages 453–462.
- [31]. Michael E. Stiles, Wilhelm H. Holzapfel (1997), Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy (Review article), *International Journal of Food Microbiology*, Volume 36, Issue 1, Pages 1–29
- [32]. Mercenier A, H. Müller-Alouf , Grangette C (2000), Lactic acid bacteria as live vaccines. (Review Article), *Current Issues in Molecular Biology*, 2(1):17-25
- [33]. Wilhelm H. Holzapfel, Ulrich Schillinger (2002), Introduction to pre- and probiotics, *Food Research International*, Volume 35, Issues 2–3, Pages 109–116
- [34]. Elizabeth Caplice, Gerald F Fitzgerald (1999), Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation, *International Journal of Food Microbiology* ,Volume 50, Issues 1-2,Pages 131-149
- [35]. E. Skyttä, T. Mattila-Sandholm (1991), A quantitative method for assessing bacteriocins and other food antimicrobials by automated turbidometry, *Journal of Microbiological Methods*, Volume 14, Pages 77-88
- [36]. Egon Bech Hansen (2002), Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future, *International Journal of Food Microbiology* ,Volume 78, Issues 1-2,Pages 119-131
- [37]. Roos, R. P., Morgan, S., and Hill, C. (2002), Preservation and fermentation: past, present and future, *International Journal of Food Microbiology* 79:3-16
- [38]. Nicholas C.K. Heng, Pearl M. Swe, Yi-Tian Ting, Muriel Dufour, Hayley J. Baird, Nancy L. Ragland, Grace A. Burtenshaw, Ralph W. Jack, John R. Tagg (2006), The large antimicrobial proteins (bacteriocins) of streptococci, *International Congress Series*, Volume 1289, Pages 351-354
- [39]. Frédéric Leroy, Luc De Vuyst (2004), Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry, *Trends in Food Science & Technology*, Volume 15, Issue 2, Page 67-78

- [40]. Nettles, C. G. and Barefoot, S. F. (1993), Biochemical and genetic characteristics of bacteriocins of food-associated lactic acid bacteria, *Journal of food Protection*, 56:338-356
- [41]. Ennahar, S., Sashihara T., Sonomoto, K., and Ishizaki A. (2000), Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity, *FEMS Microbiology Reviews*, 24:85-106
- [42]. Garti N. (1997), Double emulsions- scope, limitations and new achievements. *Colloids and surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 123-124, 233-246.
- [43]. Garti N. and Bisperink C. (1998), Double emulsions: progress and applications. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 3, 657-667
- [44]. Benichou A., Aserin A. and Garti N. (2004), Double emulsions stabilized with hybrids of natural polymers for entrapment and slow release of active matters. *Advances in Colloid and Interface Science*, 108-109, 29-41.
- [45]. P Guering, B Lindman (1985), *Droplet and bicontinuous structures in microemulsions from multicomponent self-diffusion measurements*. *Langmuir*, 1(4), pp.464-468
- [46]. T.P. Hoar and J.H. Schulman (1943), Transparent water in oil dispersions: the oleo-pathic hydro-micelle. *Nature*, 152, pp.102-103
- [47]. W Stoeckenius, J.H. Schulman and L M. Prince (1960), The structure of Myelin Figures and Microemulsions as Observed with the Electron microscope. *Colloid and Polymer Science*, Volume 169, Issue 1-2, pp 170-180
- [48]. D. Langevin (1988), Microemulsions (Research Article), *Accounts of Chemical Research*, 21 (7), pp 255–260
- [49]. D J McClements (2012), Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences and similarities. *Soft Matter*, 2012 8, pp.1719-1729
- [50]. I.D. Robb (1982), *Microemulsions*, Plenum Press, New York
- [51]. E. Rucknstein and R.Krishnan (1980), Effect of electrolytes and mixtures of surfactants on the oil-water interfacial tension and their role in formation of microemulsions, *Journal of Colloid and Interface Science*, Volume 76, Issue 1, Pages 201-211
- [52]. Kotlarchyk, M., Huang, J. S. And Chen, S.H. (1985), Structure of AOT determined by small angle neutron scattering, *Journal of Physical Chemistry* 89:4382-4386
- [53]. Lawrence, M.J., and Rees, G.D. (2000), Microemulsions -based media as novel drug delivery systems, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 45:89–121
- [54]. Satyaranjan. Bisal, Pranab Kumar. Bhattacharya , Satya Priya. Moulik, (1990), Conductivity study of microemulsions: dependence of structural behavior of water/oil systems on surfactant, cosurfactant, oil, and temperature, *Journal of Physical Chemistry*, 94 (1), pp 350–355
- [55]. Pramanik, R., Sarkar, S., Ghatak, C., Rao, V.G. and Sarkar, N. (2011), Ionic liquid containing microemulsions: Probe by conductance, dynamic light scattering, diffusion-ordered spectroscopy NMR measurements, and study of solvent relaxation dynamics, *Journal of Physical Chemistry B*. Volume 115:10 2322-2330

- [56]. Puthusserickal A. Hassan^{*}, Suman Rana, and Gunjan Verma (2014), Making Sense of Brownian Motion: Colloid Characterization by Dynamic Light Scattering, *Langmuir*, 31 (1), pp 3–12
- [57]. Bruce J. Berne, Robert Pecora (2000), *Dynamic Light Scattering: With Applications to Chemistry, Biology, and Physics*
- [58]. R. Pecora (2000), Dynamic light scattering measurement of nanometer particles in liquids, *Journal of Nanoparticle Research* 2: 123-131
- [59]. Ajit S. Narang, David Delmarre, Danchen Gao. (2007), Stable drug encapsulation in micelles and microemulsion. *International Journal of Pharmaceutics*, Volume 345, Issues 1–2, Pages 9–25
- [60]. Suchat Watnasirichaikul, Nigel M. Davies, Thomas Rades, Ian G. Tucker (2000), Preparation of Biodegradable Insulin Nanocapsules from Biocompatible Microemulsions, *Pharmaceutical Research*, Volume 17, Issue 6, pp 684-689
- [61]. J Flanagan and H Singh (2006), Microemulsions: A potential delivery system for bioactive compounds. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Volume 46, Issue 3, pp. 221–237
- [62]. N Garti, A Yaghmur, M E. Leser, V Clement and H J. Watzke (2001), Improved Oil Solubilization in Oil/Water Food Grade Microemulsions in the Presence of Polyols and Ethanol, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49(5), pp. 2552-2562.
- [63]. W.A Ritschel,. (1993), Microemulsions for improved peptide absorption from the gastrointestinal tract, *Methods Finds Exp. Clin. Pharmacol.*, Volume 13: pp.205–220.
- [64]. H Chiou, HK Chan, R K. Prud'homme and J A. Raper (2008), Evaluation on the Use of Confined Liquid Impinging Jets for the Synthesis of Nanodrug Particle, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, Vol. 34, No 1. Pp 59-64
- [65]. J Flanagan & H Singh (2007) *Microemulsions: A potential Delivery System for Bioactives in Food*, Volume 46, Issue 3, pp. 221-237.
- [66]. V Papadimitriou, S. Pispas, S. Syriou, A. Pournara, M. Zoumpanioti, T.G. Sotiroudis, A. Xenakis (2008), Biocompatible Microemulsions Based on Limonene: Formulation Structure, and Applications, *Langmuir*, 24(7), pp 3380-3386
- [67]. M Zoumpanioti, H Stamatis, V Papadimitriou, A Xenakis (2006), Spectroscopic and catalytic studies of lipases in ternary hexane-1-propanol water surfactantless microemulsion systems, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. Volume 47, Issue 1, Page 1-9.
- [68]. Denis Twomey, R. P. Ross, Maire Ryan, Billy Meaney, C. Hill (2002), Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications, Antonie van Leeuwenhoek, *Journal of Microbiology*, Volume 82, Issue 1-4, pp 165-185
- [69]. Eduardo Marcos Balciunas, Fabio Andres Castillo Martinez, Svetoslav Dimitrov Todorov, Bernadette Dora Gombossy de Melo Franco, Attilio Converti, Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira, (2013), Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review, *Food Control*, Volume 32, Issue 1, Pages 134–142

- [70]. Tassou, C.C., Drosinos, E.H., Nychas, G.J.E. (1996), Inhibition of resident microbial flora and pathogen inocula on cold fresh fillets in olive oil, oregano, and lemon juice under modified atmosphere or air. *Journal of Food Protection* 58, 31–34
- [71]. Koutsoumanis, K., Tassou, C.C., Taoukis, P.S., Nychas, G.-J.E. (1998), Modelling the effectiveness of a natural antimicrobial on *Salmonella enteritidis* as a function of concentration, temperature and pH, using conductance measurements. *Journal of Applied Microbiology* 84, 981–987.
- [72]. Kabara, J.J. (1991), Phenols and chelators. In *Food Preservatives*, Eds Russell, N.J. and Gould, G.W. pp. 200–214. London: Blackie
- [73]. Vincenzi G-Testoni I. (1994), Τα φαρμακευτικά βότανα της Ελλάδος, Αθήνα: Παπαδόπουλος
- [74]. P.N. Skandamis and G.-J.E. Nychas (2001), Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres, *Journal of Applied Microbiology*, Volume 91, Issue 6, pages 1011–1022
- [75]. You-Yeon Won , Aaron K. Brannan , H. Ted Davis , and Frank S. Bates, (2002), Cryogenic Transmission Electron Microscopy (Cryo-TEM) of Micelles and Vesicles Formed in Water by Poly(ethylene oxide)-Based Block Copolymers, *The Journal of Physical Chemistry B*, 106 (13), pp 3354–3364

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας Π1: Μέσοι όροι ζωνών παρεμπόδισης για όλα τα δείγματα που μελετήθηκαν την 1^η εργαστηριακή μέρα.

ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ 1^{HC} ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗΣ ΜΕΡΑΣ	Διάμετρος ζώνης παρεμπόδισης (cm)
1) 11% lim+11% EtOH + 50% Tween+ 28% H₂O	
Full	1.35
Empty	1.10
Blank	1.43
Υδατικό διάλυμα νισίνης	1.43
2) 11% ρίγανη+ 11%EtOH+ 50%Tween+28%H₂O	
Full	1.48
Empty	1.45
Blank	1.40
Υδατικό διάλυμα νισίνης	1.43
3) 11% δεντρολίβανο +11% EtOH +50% Tween +28% H₂O	
Full	1.55
Empty	1.48
Blank	1.45
Υδατικό διάλυμα νισίνης	1.43
4) 40% δεντρολίβανο + 30% Tween +30% PG +180 μl H₂O	
Full	1.95
Empty	2.05
Blank	1.80
Υδατικό διάλυμα νισίνης	1.40
5) 50% ρίγανη +50% Tween +60 μl H₂O:PG (1:1)	
Full	1.65
Empty	1.63
Blank	1.65
Υδατικό διάλυμα νισίνης	1
6) 50% ρίγανη +50% DMG +70 μl H₂O:PG (1:1)	
Full	2.23
Empty	2.23
Blank	2.45
Υδατικό διάλυμα νισίνης	1
7) essential oils	
λιμονένιο	0.90
ριγανέλαιο	3.65
δεντρολίβανο	1.55

Πίνακας Π2: Μέσοι όροι ζωνών παρεμπόδισης για όλα τα δείγματα που μελετήθηκαν την 2^η εργαστηριακή μέρα.

ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ 2^{ης} ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗΣ ΜΕΡΑΣ	Διάμετρος ζώνης παρεμπόδισης (cm)
1) 11% lim+11% EtOH + 50% Tween+ 28% H₂O	
Full	1.55
Empty	1.40
Blank	1.38
Υδατικό διάλυμα νισίνης	1.50
2) 11% ρίγανη + 11%EtOH+ 50%Tween + 28% H₂O	
Full	1.50
Empty	1.43
Blank	1.35
Υδατικό διάλυμα νισίνης	1.50
3) 11% δεντρολίβανο +11% EtOH +50% Tween +28% H₂O	
Full	1.63
Empty	1.53
Blank	1.48
Υδατικό διάλυμα νισίνης	1.50
4) 40% δεντρολίβανο + 30% Tween +30% PG +175 μl H₂O	
Full	1.75
Empty	1.78
Blank	1.65
Υδατικό διάλυμα νισίνης	1.38
5) 50% ρίγανη +50% Tween +60 μl H₂O:PG (1:1)	
Full	1.80
Empty	1.80
Blank	1.60
Υδατικό διάλυμα νισίνης	1.05
6) 50% ρίγανη +50% DMG +70 μl H₂O:PG (1:1)	
Full	2.18
Empty	2.15
Blank	2.25
Υδατικό διάλυμα νισίνης	0.95
7) essential oils + DMG	
λιμονένιο + DMG	0.70
ριγανέλαιο + DMG	2.60
δεντρολίβανο +DMG	0.93
8) essential oils + T80	
λιμονένιο + T80	1.45
ριγανέλαιο + T80	1.95
δεντρολίβανο +T80	1.65
9) essential oils	
λιμονένιο	0.85
ριγανέλαιο	3.25
δεντρολίβανο	1.45

10) surfactants	
T80	1.2
DMG	-

Πίνακας Π3: Μέσοι όροι ζωνών παρεμπόδισης για όλα τα δείγματα που μελετήθηκαν την 3^η εργαστηριακή μέρα.

ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ 3^{ης} ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗΣ ΜΕΡΑΣ	Διάμετρος ζώνης παρεμπόδισης (cm) (<i>Lactococcus lactis</i>)	Διάμετρος ζώνης παρεμπόδισης (cm) (<i>Staphylococcus aureus</i>)
1) 2,5% δεντρολίβανο+ 27,5% ελαιόλαδο +30% EtOH +40% DMG +80μl H₂O		
Full	1.45	1.05
Empty	0.00	0.00
Blank	0.00	0.00
Υδατικό διάλυμα νισίνης	1.40	1.10
2) 5% δεντρολίβανο+ 25% ελαιόλαδο +30% EtOH +40% DMG +80μl H₂O		
Full	1.50	1.15
Empty	0.00	0.00
Blank	0.00	0.00
Υδατικό διάλυμα νισίνης	1.35	1.10
3) 10% δεντρολίβανο+ 20% ελαιόλαδο +30% EtOH +40% DMG +80μl H₂O		
Full	1.60	1.05
Empty	0.00	0.00
Blank	0.00	0.00
Υδατικό διάλυμα νισίνης	1.35	1.15
4) 20% δεντρολίβανο+ 10% ελαιόλαδο +30% EtOH +40% DMG +80μl H₂O		
Full	1.50	1.05
Empty	0.00	0.00
Blank	0.00	0.00
Υδατικό διάλυμα νισίνης	1.33	1.15
5) 11% δεντρολίβανο+ 11% EtOH +50% T80+28% H₂O		
Full	1.45	1.45
Empty	1.30	0.00
6) 11% λιμονένιο+ 11% EtOH +50% T80+28% H₂O		
Full	1.55	1.53
Empty	1.20	0.00

Πίνακας Π4: Μέσοι όροι ζωνών παρεμπόδισης για όλα τα δείγματα που μελετήθηκαν την 4^η εργαστηριακή μέρα.

ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ 4 ^{ης} ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗΣ ΜΕΡΑΣ	Διάμετρος ζώνης παρεμπόδισης (cm) (<i>Lactococcus lactis</i>)	Διάμετρος ζώνης παρεμπόδισης (cm) (<i>Staphylococcus aureus</i>)
1) 10% θυμάρι +20% ελαιόλαδο+30% EtOH +40% DMG +80μl H2O		
Full	1.55	0.88
Empty	0.7	0.00
ROOF	1.4	0.90
Υδατικό διάλυμα νισίνης	1.45	1.12
2) 10% ρίγανη +20% ελαιόλαδο+30% EtOH +40% DMG +80μl H2O		
Full	1.45	0.97
Empty	0.9	0.57
ROOF	1.4	0.93
Υδατικό διάλυμα νισίνης	1.45	1.08
3) 10% δεντρολίβανο +20% ελαιόλαδο+30% EtOH +40% DMG +80μl H2O		
Full	1.45	1.00
Empty	0	0.00
ROOF	1.35	0.90
Υδατικό διάλυμα νισίνης	1.45	1.08